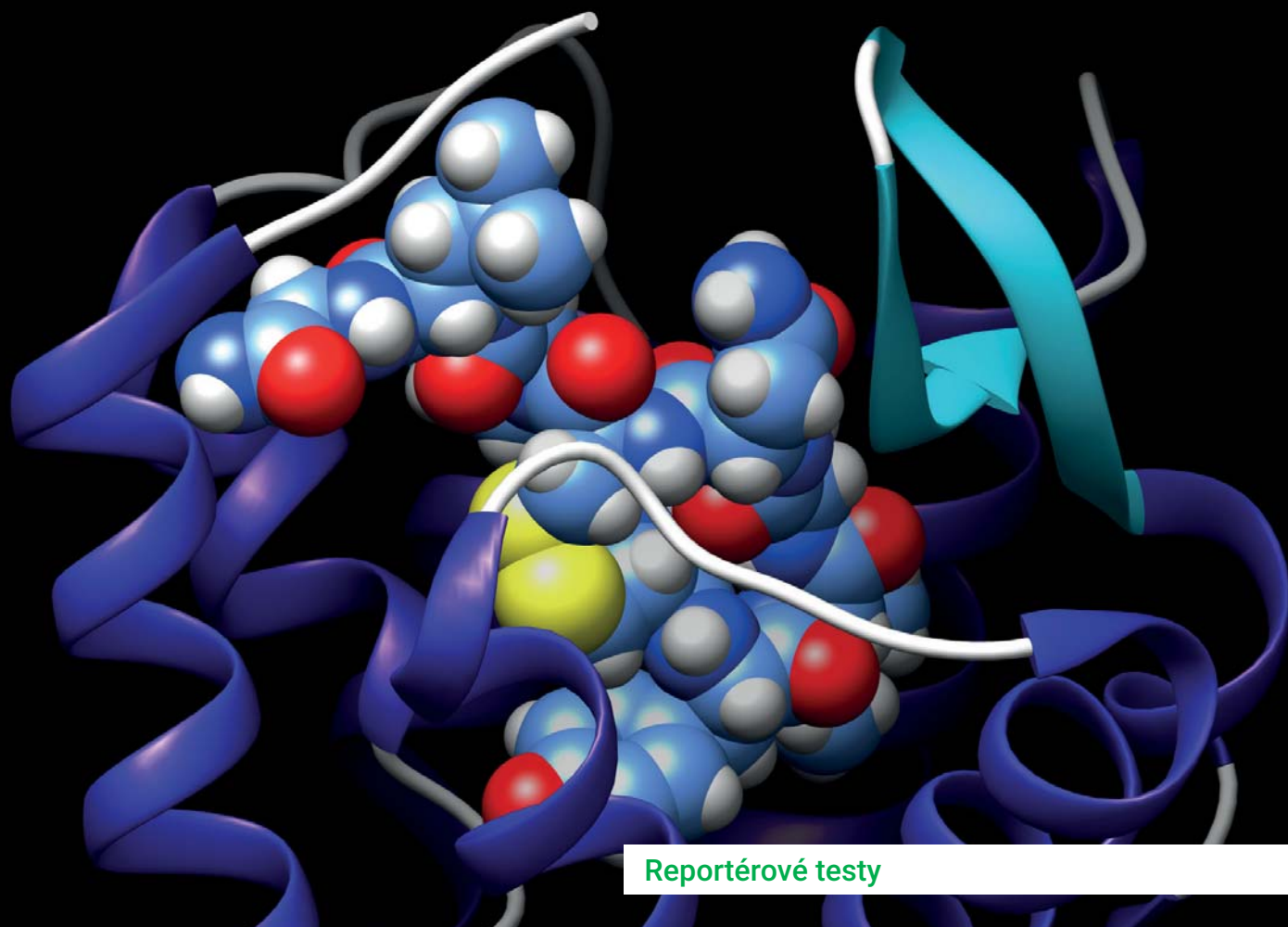


# Chemické Listy

# 8

ročník • 117



Reportérové testy

Lesní entheogen

Radioaktivní cesium v přírodě

Potenciál L-asparaginas



# Excellence in Chemistry Research



## Announcing our new flagship journal

- Gold Open Access
- Publishing charges waived
- Preprints welcome
- Edited by active scientists

## Meet the Editors of *ChemistryEurope*



**Luisa De Cola**

Università degli Studi  
di Milano Statale, Italy



**Ive Hermans**

University of  
Wisconsin-Madison, USA



**Ken Tanaka**

Tokyo Institute of  
Technology, Japan

### Jak se ujistit, že dostanete Nobelovu cenu

Tvrdě pracujete a možná ani nepřemýšlíte o tom, že byste jednou mohli dostat Nobelovu cenu za chemii (nebo za něco jiného, ale jste chemik, takže se soustředíte především na svůj obor). Nicméně existuje šance, že ji získáte. Kromě snahy o získání skvělého nápadu, který by vám nominaci zaručil, byste měli dodržet několik kroků, které vám mohou pomoci se tomuto cíli přiblížit. Všechny kroky, které zde popíšeme, se ukázaly jako velmi užitečné.

Nejprve napište něco, co může popsat koncept reakce, která by byla mimořádně specifická a použitelná pro mno-

ho situaci. Vymyslete pro tuto reakci název, například „click reakce“. Pak nechte své včelky dělnice (pomůžte vám, když už pro vás pracuje hodně lidí), aby se pokusily něco v tomto směru vyzkoumat. Pošlete své lidi na chemickou konferenci (velmi důležité). Zejména na tu, která se koná ve stejném městě, v němž sídlí vaše laboratoře. Ať pečlivě prostudují vše, co je tam prezentováno, přednášky, postery a vůbec. Můžete přijít i vy, jen si ověřit, jak pilně vaši lidé pracují. Pokud uvidí něco, co stojí za vyzkoušení i ve vaší laboratoři, ujistěte se, že to hned otestují

THE CHEMISTRY AND LAW SAN DIEGO SECTION  
OF  
THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY


## THE BACKSTORY OF THE CLICK CHEMISTRY PATENT

Don Lewis, JD, LL.M, PhD


THE TALK WILL BE ABOUT THE EVENTS  
LEADING TO CLICK CHEMISTRY, AS  
WITNESSED BY AN IN-HOUSE PATENT  
COUNSEL, COVERING THE TOPIC OF THE  
CLICK CHEMISTRY PATENT, THE PATENT  
COVERING PROF. BARRY SHARPLESS'  
SECOND NOBEL PRIZE.

WEDNESDAY, MARCH 29, 2023  
6 PM - 7:30 PM  
IN-PERSON EVENT  
ROTH AUDITORIUM, SANFORD CONSORTIUM

Register here!

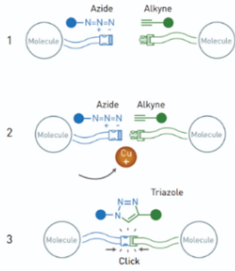
  


SHORTURL.AT/IPCVM





#### The click reaction that changed chemistry

Azides and alkynes react very efficiently when copper ions are added. This reaction is now used globally to link molecules together in a simple manner.



©Johan Jarnestad/The Royal Swedish Academy of Sciences





United States Patent  
Sharpless et al.

Patent No.: US 7,375,234 B2  
Date of Patent: May 20, 2008

COPIES AVAILABLE FOR SALE AT THE A.C.S. STORE  
© 2008 American Chemical Society, Washington, DC  
All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or by any information storage and retrieval system, without permission in writing from the American Chemical Society, 11 Dupont Circle, N.W., Washington, DC 20036

a zároveň úplně zapomenou na to, kde k nápadu přišli. Pokud reakce ve vaší laboratoři bude fungovat, požádejte o patent.

To je v podstatě příběh<sup>1</sup> Nobelovy ceny za chemii 2022. Laboratoř Barryho Sharplesse, nositele Nobelovy ceny z roku 2001, pracovala na konceptu „Click Chemistry“. Sharpless tuto koncepci nejprve představil na zasedání Americké chemické společnosti v roce 1999 a později ji publikoval v roce 2001 v časopise *Angewandte Chemie*<sup>2</sup>. Myšlenka amerického týmu vycházela z předpokladu, že namísto tvorby vazby uhlík-uhlík pro vytvoření nových potenciálně důležitých molekul by bylo rozumnější použít tvorbu vazby heteroatom-uhlík, která by přesně nenapodobovala biologicky aktivní molekulu, ale místo toho by vytvářela molekulu podobnou a jednodušeji vytvořitelnou. K tomuto způsobu uvažování vedl koncept kombinatoriální chemie, který na počátku 90. let 20. století průkopnický zavedlo několik laboratoří. Huisgenova reakce<sup>3</sup> vytvářející triazol z azidu a alkynu byla jedním z navrhovaných kandidátů tohoto chemického konceptu.

Na druhé straně Atlantiku, v laboratoři Mortena Meldala, byl jako vedlejší produkt jejich výzkumu učiněn zásadní objev. Použitelnost reakce katalyzované jednomocnou mědí Meldal okamžitě rozpoznal a její úspěšné využití pro syntézu modifikovaných peptidových knihoven na pevné fázi prezentoval na sympoziu<sup>4</sup> v San Diegu v létě 2001. Tehdy se autor tohoto článku poprvé zapojil do tohoto příběhu, neboť se stal spolueditorem sborníku z tohoto konkrétního sympozia. Sborník byl netypicky vydán ve stejném roce jako sympozium, a díky tomu byla tato reakce publikována již v roce 2001.

První dvě časopisecké publikace<sup>5,6</sup> o této prototypické „click reakci“ se objevily v roce 2002 (Meldalova a Sharplessova skupina) a Scrippsův institut si v roce 2002 také podal žádost o patentování reakce. Poté jsem se do toho opět zapojil, tentokrát jsem musel napsat čestné prohlášení pro patentový úřad, že chemie Cu<sup>I</sup> katalyzované azidové-alkynové reakce byla skutečně prezentována Meldalovou skupinou v létě 2001 a v téměř roce publikována ve sbor-

níku. To samozřejmě vytvořilo situaci „prior art“ a patent neměl být vydán. Nicméně po upuštění od původní přihlášky z roku 2002 a podání nové přihlášky v roce 2003 a mnoha tahanicích s patentovým úřadem byl patent v roce 2008 vydán<sup>7</sup>.

Je zajímavé, že publikace<sup>4</sup> z roku 2001 není uvedena v patentové přihlášce jako popis předchozího stavu techniky. Je uvedena pouze pozdější publikace Meldala z roku 2002 (cit.<sup>5</sup>, ve skutečnosti doplněná patentovým úřadem). Poslech prezentace právníka společnosti Scripps, která proběhla v březnu 2023, popisující příběh patentování byl docela objasňující, když připustil, že Meldalův poster mohl být inspirací k „objevu“ této klikací reakce.

Takže teď už víte, jak postupovat, abyste měli šanci na příští Nobelovu cenu za chemii. Možná je také dobré mít na své straně dobrého právníka.

Michal Lebl

#### LITERATURA

1. Sharpless B., Meldal M., Bertozzi C.: *Chem. Unserer Zeit* 56, 394 (2022).
2. Kolb H. C., Finn M. G., Sharpless K. B.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, 2004 (2001).
3. Huisgen R., Szeimies G., Möbius L.: *Chem. Ber.* 100, 2494 (1967).
4. Tornøe C. V., Meldal M.: *Peptidotriazoles: Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions on Solid-Phase*, ve sborníku *Peptides: The Wave of the Future* (Lebl M., Houghten R. A., ed.), str. 263. American Peptide Society, San Diego 2001.
5. Tornøe C. W., Christensen C., Meldal M.: *J. Org. Chem.* 67, 3057 (2002).
6. Rostovtsev V. V., Green L. G., Fokin V. V., Sharpless K. B.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 2596 (2002).
7. Sharpless K. B., Fokin V., Rostovtsev V. A., Green L., Himo F.: US 7,375,234 B2 (2008).

## VYUŽITÍ REPORTÉROVÝCH TESTŮ PŘI SLEDOVÁNÍ BUNĚČNÉHO STRESU A TOXICITY

DENISA ČÁKOVÁ, NIKOLA JELENOVÁ a JITKA VIKTOROVÁ

Ústav biochemie a mikrobiologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6, Česká republika  
prokesoj@vscht.cz

Došlo 27.9.22, přijato 11.5.23.

Sledovat ovlivnění či průběh genové exprese je v mnoha studiích velmi důležitou součástí výzkumu. V současné době dochází k rozvoji mnoha metod usnadňujících sledování regulace genové exprese, jedním z takových příkladů je využití tzv. genových reportérových testů (z angl. gene reporter assays). Tyto systémy představují rozsáhlý soubor nástrojů ke studiu regulačních sekvencí promotorů, zesilovačů a transkripčních faktorů. Existuje celá řada testů využívajících reportérové buňky pro stanovení biologické aktivity studovaných sloučenin. Cílem tohoto přehledového článku je představit přípravu reportérových plasmidů, což je vždy prvním krokem u testů využívajících reportérové geny. Následně budou popsány nejčastější druhy reportérových testů a představeny příklady jejich použití v testování *in vitro*.

Klíčová slova: plasmid, regulace genové exprese, transfekce, luciferasa, *in vitro* test, reportér, genotoxicita, poškození DNA

### Obsah

1. Úvod
2. Plasmid a jeho použití pro přenos genetické informace
3. Druhy reportérových testů
  - 3.1. Luciferasa (EC 1.13.12.7)
  - 3.2. Zelený fluorescenční protein
4. Příklady reportérových testů
  - 4.1. SOS chromotest/Umu test
  - 4.2. VITOTOX test
  - 4.3. Test ToxTracker
  - 4.4. Reportérové vektory pGL4
  - 4.5. Signal Finder Stress & Toxicity 10-pathway Reporter Array
5. Závěr

### 1. Úvod

Regulace genové exprese v eukaryotních buňkách je v rámci buněčné signalizace zajišťována prostřednictvím vazby transkripčních faktorů do tzv. promotorové oblasti genu, čímž dojde ke spuštění či potlačení exprese daného genu<sup>1</sup>. Sledovat ovlivnění či průběh genové exprese je v mnoha studiích velmi důležitou součástí výzkumu. Jako nejjednodušší přístup se často volí kvantifikace semi-/finálního produktu genu (mRNA či proteinu) příslušnými technikami molekulární biologie (např. kvantitativní polymerasová reakce po reverzní transkripci mRNA, RT-qPCR či Western blot). Tento přístup má ovšem řadu limitací,

kupříkladu neschopnost sledování molekulárních mechanismů zapojených do procesu regulace genové exprese.

V současné době dochází k rozvoji mnoha metod usnadňujících sledování regulace genové exprese. Jedním z takových příkladů je využití tzv. genových reportérových testů (z angl. gene reporter assays). Jak již název napovídá, jedná se o systém, který informuje (reportuje) o genové expresi. Tyto systémy představují rozsáhlý soubor nástrojů ke studiu regulačních sekvencí promotorů, zesilovačů a transkripčních faktorů. Při přípravě bakteriálních i eukaryotních buněčných linií pro vznik reportérových testovacích systémů genotoxicity využíváme známé biomarkery, které díky toxicitě vzorku produkují snadno kvantifikovatelný signál. Reportérový gen je umístěn pod kontrolou promotoru cílového genu. Vizualizace specifických drah, aktivovaných buněčnou stresovou odezvou po reakci na poškození, poskytuje pohled na typ a rozsah indukovaného poškození buněk, a tedy na biologickou aktivitu sloučenin<sup>2</sup>.

Bakterie jsou vhodnými akceptory reportérů díky svým rychlým reakcím, nízké ceně, jednoduchému uchování a snadné genetické manipulaci. K dispozici je však i spousta eukaryotních kmenů, příkladem může být rekombinantní kvasinkový kmen *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 s reportérovým plasmidem s genem pro zelený fluorescenční protein (GFP), řízeným promotorem ribonukleotid-difosfátoreduktasy (RNR3) reagujícím na poškození DNA (cit.<sup>3</sup>). V lidských buňkách hepatocelulárního karcinomu (linie HepG2) byly připraveny různé sublinie založené na vysoce výkonných luciferasových reportéro-

vých testech využívajících signální dráhy p53, Nrf2, RAD51C a cystatin A (cit.<sup>4</sup>).

Buněčné testy *in vitro* založené na reportérech získávají stále větší důležitost při hodnocení rizik chemických látek pro lidské zdraví. Jejich velkou výhodou je snadné využití při vysokokapacitním testování (HTS, z angl. high-throughput screening), kde poskytují rychlou a levnou primární informaci. V buněčných testovacích modelech *in vitro* je sledována specifická receptorová interakce mezi chemickou látkou a buněčným modelem nebo reakce buňky na stresový podnět (obr. 1). Po aktivaci příslušné signální dráhy či responsivního elementu dochází k odpovědi buňky expresí reportérového genu. Jedním z velmi univerzálních a často používaných responsivních elementů je ARE (z angl. antioxidant response element), který se přirozeně nachází v promotorové oblasti několika genů kódujících detoxikační enzymy a cytoprotektivní proteiny.

Mezi nejčastější reportérové geny patří geny kódující luciferasu, fluorescenční proteiny (např. GFP nebo RFP, z angl. green/red fluorescent protein),  $\beta$ -laktamasu ( $\beta$ -laktamhydrolasa, EC 3.5.2.6) (cit.<sup>5</sup>) nebo sekretovanou embryonální alkalickou fosfatasu (SEAP, z angl. secreted embryonic alkaline phosphatase, EC 3.1.3.1). Prvním krokem přípravy testů reportérového genu je konstrukce reportérového plasmidu a jeho následná, přechodná (transientní) nebo stabilní (trvalá) transfekce do hostitelské buňky. Tento přístup poskytuje hlubší a citlivější pohled na mechanismus toxického efektu chemické látky než standardní testy toxicity<sup>6</sup>.

## 2. Plasmid a jeho použití pro přenos genetické informace

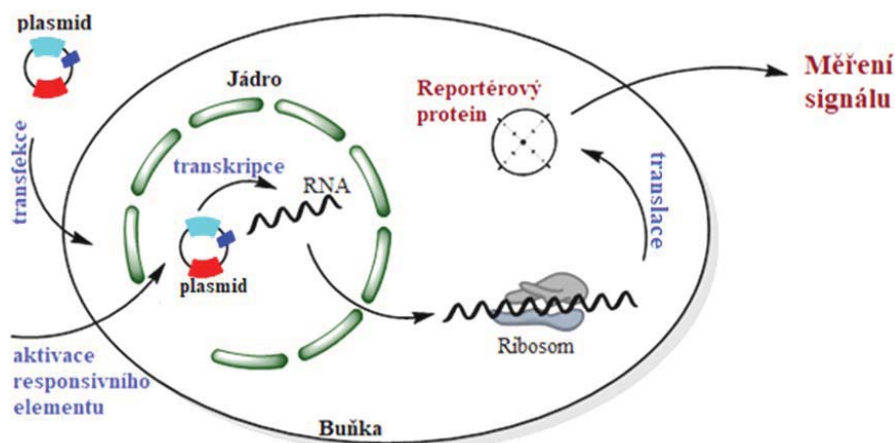
Plasmidy jsou doplňková genetická informace, která je tvořena dvouvláknovou molekulou DNA (dsDNA, z angl. double stranded) obsahující vlastní replikační počátek. Chovají se jako autonomní replikony nezávislé na chromosomu<sup>7</sup>. Přirozeně existují zejména v bakteriálních

buňkách a vyskytují se také v některých eukaryotech. V genomu inženýrství se plasmidy používají jako vektory pro přenos genetické informace<sup>8</sup> (obr. 2).

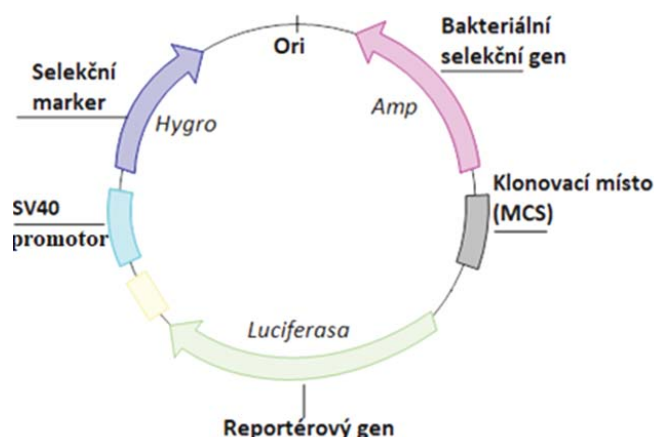
Obecně by tyto vektory měly být složeny z několika sekvencí, které je činí vhodnými pro transformaci/transfekci a selekci hostitelského organismu. První sekvencí je počátek replikace (*ori*), který je rozpoznán buněčným replikačním aparátem a také definuje počet kopií daného plasmidu v buňce<sup>9</sup>. Pro přípravu reportérového buněčného organismu se obvykle využívá plasmid se dvěma počátky replikace, první z nich umožní replikaci v bakteriální buňce (obvykle *oriC* z *Escherichia coli*), druhý z nich v eukaryotní buňce (obvykle *SV40* z angl. Simian virus 40). Další klíčovou složkou plasmidu je selekční marker, kterým může být jakýkoli gen poskytující selektivní výhodu pozitivním transformantům (nejčastěji rezistence k antibiotiku, např. gen pro hygromycinfosfotransferasu (ATP:hygromycin-B 4-*O*-fosfotransferasa, EC 2.7.1.163), neboli kinasa poskytující rezistenci k hygromycinu jeho inaktivací pomocí fosforylace)<sup>10</sup>.

Mezi další potřebné sekvence se řadí klonovací místo (MCS, z angl. multicloning site), usnadňující klonování požadované sekvence DNA a obsahující několik míst pro rozpoznání různými restrikčními enzymy<sup>11</sup>. V reportérových vektorech je promotor cílového genu následován sekvencí genu reportérového proteinu, který může být fluorescenční<sup>12</sup>, luminiscenční<sup>13</sup> nebo se může jednat o enzym (např.  $\beta$ -D-galaktosidasa<sup>14</sup>,  $\beta$ -D-galaktosidgalaktohydrolasa, EC 3.2.1.23).

Připravený reportérový plasmid je následně vložen do bakteriální buňky za účelem pomnožení. Plasmid se do bakteriální buňky vkládá různými technikami, např. teplotním šokem, elektroporací nebo pomocí lipofekčních činidel<sup>15</sup>. Následně musí dojít k přechodné (transientní) nebo stabilní transfekci vektoru do vhodné buněčné linie. Tyto reportérové vektory umožňují analýzu kinetiky genové exprese *in vivo* v průběhu růstu organismu, což umožňuje sofistikované studie i na úrovni jednotlivých buněk<sup>16</sup>.



Obr. 1. Schéma principu měření pomocí reportérového testu. Nakresleno v ChemDraw Professional 16.0.



Obr. 2. Základní sekvence reportérového plasmidu (vektoru pro přenos genetické informace). Plasmid obvykle obsahuje počátek replikace (ori) a počátek replikace pro savčí buňky (žlutá barva), gen pro selekci v bakteriích (růžová barva), klonovací místo (šedá barva), reportérový gen cílového proteinu např.: luciferasa (zelená barva), polyadenylační místo (žlutá barva), SV40 promotor (světle modrá) a selekční marker pro eukaryotní buňky (tmavě modrá). Hygro = hygromycinofototransferasa (EC 2.7.1.163), MCS = multiklonovací místo, Amp = rezistence k ampicilinu (gen kódující  $\beta$ -laktamasu, EC 3.5.2.6). Nakresleno v ChemDraw Professional 16.0.

### 3. Druhy reportérových testů

Existuje celá řada testů využívajících reportérové buňky pro stanovení biologické aktivity studovaných sloučenin. Tyto testy mohou stanovit schopnost sloučenin indukovat buněčnou proliferaci, apoptózu, expresi cytokinů nebo působit cytotoxicky<sup>17</sup>, a tím nahradit některé těžkopádné tradiční testy<sup>18</sup>.

Reportérové genové testy využívají aktivaci nebo inaktivaci signální dráhy, která ovlivňuje expresi stabilně transfekovaných reportérových genů pod kontrolou příslušných regulačních prvků<sup>19</sup>. Jeden z dosud nejlépe charakterizovaných bioluminiscenčních proteinů je luciferasa, která katalyzuje oxidaci substrátu, což vede k reakci produkující světlo<sup>18</sup>. Vazba ligandu na transmembránový receptor za normálních podmínek vede k aktivaci intracelulární signální dráhy, která zahrnuje modifikaci signálních molekul (např. fosforylaci), translokaci do jádra, expresi specifických proteinů (např. cytokinů) a výsledně fenotypové změny (např. proliferaci, apoptózu aj.). Když je však aktivována signální dráha u reportérové buňky, transkripční faktor se naváže na regulační oblasti ve stabilně transfekovaných buňkách a výsledkem je exprese reportéru, např. genu pro luciferasu. Míra signálu je pak přímo úměrná schopnosti testované sloučeniny ovlivňovat předmětnou signální dráhu nebo receptor<sup>20</sup>.

#### 3.1. Luciferasa (EC 1.13.12.7)

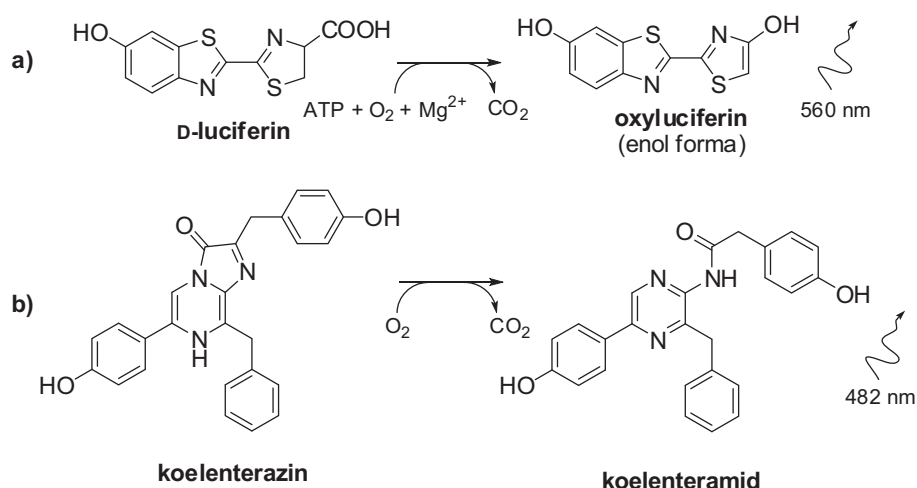
Reportérové testy využívající gen pro luciferasu jsou jedněmi z nejpoužívanějších kvůli své vysoké citlivosti a snadné manipulaci. Reportérový plasmid obsahuje promotorovou oblast požadovaného genu následovanou luciferasovým genem. Když je konstrukt transfekován do buňky,

luciferasa je produkována v množství, které je úměrné aktivitě promotoru. Luciferasu (a tedy promotorovou aktivitu) lze poté kvantifikovat měřením luminiscence produkované po přidání enzymového substrátu<sup>21</sup>. Luciferasa (D-firefly luciferin:kyslík-4-oxidoreduktasa (dekarboxylující, ATP-hydrolyzující), EC 1.13.12.7.) ze světlušky *Photinus pyralis* (FLuc) je nejrozšířenější luciferasa využívaná pro bioluminiscenční testy. FLuc vyžaduje přítomnost  $O_2$ ,  $Mg^{2+}$  a ATP, v jejichž přítomnosti katalyzuje oxidaci D-luciferinu na oxyluciferin se současnou emisí fotonu. Existují však možné inhibitory FLuc, obvykle se jedná o nízkomolekulární sloučeniny s planárními strukturami<sup>22,23</sup> soutěžící o vazebné místo se substrátem (D-luciferinem nebo ATP). Další nevýhodou je rychlost reakce a tím nutné vybavení detektoru injektorem. Zejména tyto důvody vedou k vývoji nových systémů s luciferasami z nových zdrojů.

Další používaná luciferasa (koelenterazin:kyslík-2-oxidoreduktasa (dekarboxylující), EC 1.13.12.5) je původem z mořské sasanky *Renilla reniformis* (RLuc) a často se kombinuje s FLuc např. při stanovení cytotoxicity<sup>5,24,25</sup>. RLuc katalyzuje podobnou reakci jako FLuc, dochází k oxidaci substrátu, a to koelenterazinu za vzniku světelné emise. Každá z těchto dvou zmíněných luciferas generuje světelnou emisi v různých vlnových délkách<sup>26</sup> (obr. 3).

#### 3.2. Zelený fluorescenční protein

Zelený fluorescenční protein (GFP) je další v biologických systémech velmi používaný reportérový gen. Původní sekvence genu GFP byla klonována z medúzy *Aequorea victoria*, produkt tohoto genu je nejvíce studovaným zeleně fluoreskujícím proteinem<sup>27</sup>. Je odolný vůči pH indukovaným konformačním změnám



Obr. 3. Biochemická reakce katalyzovaná luciferasou ze světlušky *Photinus pyralis* (FLuc) a mořské sasanky *Renilla reniformis* (RLuc). Nakresleno v ChemDraw Professional 16.0

a denuraci. Expresí genu pro GFP je druhově nezávislá a nevyžaduje žádné další kofaktory, substráty nebo jiné genové produkty z medúzy. Intenzita fluorescence GFP je přímým měřením transkripční aktivity promotoru, který řídí expresi genu a odpovídající produkci proteinu. Komerčně dostupné plasmidy obvykle umožňují klonování genu zájmu buď před a nebo za sekvenci fluorescenčního proteinu, čímž umožňují N- či C-terminální fúzi vznikajícího proteinu. Tyto plasmidy umožňují řízenou expresi v různých buňkách a organismech, včetně bakterií, kvasinek a savčích buněk. V současné době je snaha o zavedení vylepšených variant GFP, které by zlepšily fluorescenční vlastnosti a stabilizovaly expresi v savčích buňkách<sup>19</sup>. Dostupnost spektrálně odlišných fluorescenčních proteinů může také otevřít nové cesty pro zobrazování interakcí protein-protein *in vitro* a *in vivo* diagnostice.

#### 4. Příklady reportérových testů

Pokud si nechceme připravovat reportérový plasmid sami, je možné využít sbírku komerčních reportérových plasmidů, které jsou připraveny pro transfekci lidských buněk, či dokonce i připravené bakteriální nebo savčí buněčné reportérové linie. O nejčastěji používaných reportérových buňkách a plasmidech pojednávají následující kapitoly.

##### 4.1. SOS chromotest/Umu test

SOS chromotest a Umu test jsou dvě rychlé kolorimetrické mikrobiální metody založené na produkci  $\beta$ -galaktosidasy ( $\beta$ -gal) jako odpovědi na poškození DNA. Poškozením DNA se aktivují geny tzv. SOS opravné

dráhy (cit.<sup>28</sup>). Fúze genu *lacZ* s SOS opravným genem (*sfiA*) v genomu *E. coli* K12 je komerčně dostupná prostřednictvím bakteriálního kmene *E. coli* K12 PQ37. Po vystavení mutagení látky a poškození DNA je spuštěn opravný systém, který indukuje produkci enzymu  $\beta$ -gal. Zvýšená syntéza enzymu způsobí konverzi bezbarvého substrátu 5-brom-4-chlor-2-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosidu (X-gal) na modrý produkt, jehož intenzita je měřena spektrofotometricky. Test je možné provést jako zkumavkový nebo v modifikované verzi na mikrotitrační destičce<sup>28</sup>.

*Umu* operon je zodpovědný za ochranu před chemickou a radiační mutagenezí. Princip je založen na schopnosti látek poškozujících DNA, z nichž většina může být potenciálními karcinogeny, indukovat expresi *umu* operonu. Produkty genů indukovaných poškozením – *recA* a *lexA*, dále regulují expresi genů, jejichž produkty jsou zodpovědné za opravné mechanismy buňky indukci *umu* operonu. Látka poškozující DNA tedy indukuje dráhu produkující enzym  $\beta$ -gal, který štěpí substrát *o*-nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktosid (ONPG) na žlutý produkt *o*-nitrofenyl (ONP). Plasmid byl původně vyvinut pro použití v bakterií *Salmonella typhimurium* TA1535 a později modifikován pro *E. coli*<sup>28–30</sup>. Test je z 90 % srovnatelný s Amesovým testem, avšak má praktické výhody. Buněčná toxicita v této metodě není problém a buňky nemusí přežít, test je také časově méně náročný<sup>31</sup>. Nevýhodou je skutečnost, že některé látky nemusí vykazovat mutagení vlastnosti i přes jejich známou karcinogenitu, nebo je vykazují pouze u jednoho z testů. Ne všechny látky indukují poškození *Umu* operonu a také SOS odpověď nemusí být spuštěna pouze chemickými sloučeninami, ale vysokou teplotou nebo účinkem DMSO (cit.<sup>32</sup>).



#### 4.2. VITOTOX test

VITOTOX test (vyvinutý Vlámským institutem pro technologický výzkum, z angl. Flemish Institute for Technological Research, Mol, Belgie) je vysoce účinný bakteriální genotoxický test, který je založen na bioluminiscenci a umožňuje snadnou, velmi rychlou a levnou detekci genotoxických sloučenin. Je přinejmenším stejně citlivý jako Amesův test a SOS chromotest<sup>33</sup>. V tomto testu jsou použity dva geneticky upravené bakteriální kmeny, nejčastěji *Salmonella typhimurium*, někdy i *E. coli*, které obsahují luciferasový operon *lux* (*luxCDABE*) z *Vibrio fischeri* pod transkripční kontrolou *recN* promotoru, který je součástí SOS opravného systému DNA. Součástí testu je také kmen TA104 pr1, který konstitutivně exprimuje *lux* operon a slouží jako kontrola toxicity. Po inkubaci bakterií v přítomnosti genotoxické sloučeniny se *recN* promotor dereprimuje, což vede k indukci *lux* operonu. Expresse vede k produkci světla v závislosti na genotoxicitě.

Test je užitečný pro rychlé testování velkého počtu chemikálií s malým množstvím spotřebovaného materiálu, měření probíhá automaticky a sběr a zpracování dat může být také zcela automatizováno, což snižuje náklady na pracovní sílu<sup>34</sup>.

#### 4.3. Test ToxTracker

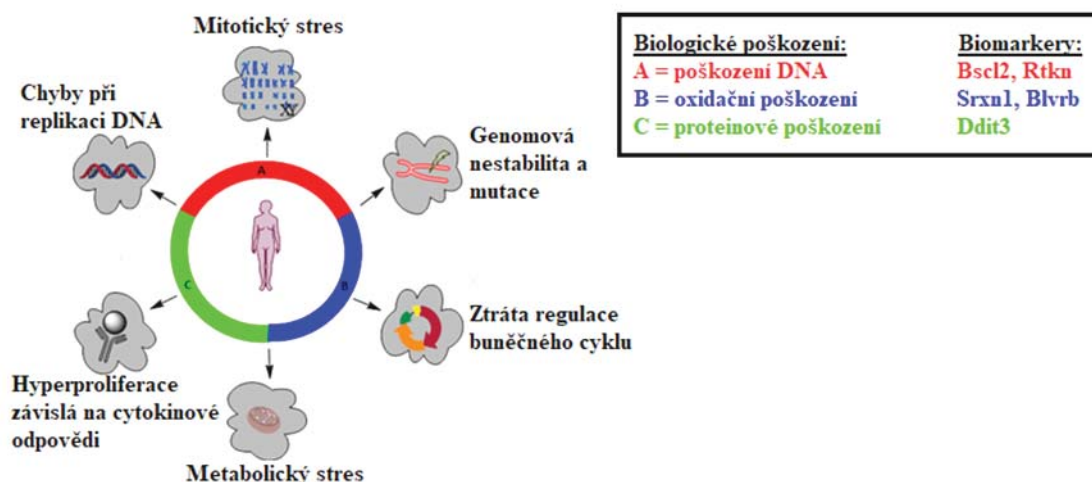
Reportérový systém ToxTracker (komerčně dostupný od firmy Toxys, spin-off založený roku 2014 Lékařským centrem Leidenské univerzity, Nizozemí) je založený na biomarkerech řízených s genem kódujícím GFP. Systém je založen na šesti různých biomarkerových genech, které byly zavedeny transfekcí do myších embryonálních kmenových linií (obr. 4).

Test využívá rozdílnou citlivost různých buněčných linií a umožňuje predikci primárních vlastností známých i neznámých chemikálií. Expresse vybraných genů specificky reflektuje poškození DNA, oxidativní stres či poškození proteinů. Expresse reportérů GFP je stanovena průtokovou cytometrií<sup>2</sup>.

Genotoxicita je detegovaná reportérem *Bscl2-GFP*, který je aktivován promutagenními lézemi DNA a replikačním stresem, a jeho indukce v reakci na poškození je spojena s aktivací ATR/CHK1 signální dráhy. ATR (ataxie teleangiektasie a Rad3 příbuzné proteiny) spolu s kinasou CHK1 aktivují mnoho mechanismů opravy DNA a slouží jako kontrolní bod replikace<sup>35</sup>. Reportér *Rtkn-GFP* je aktivován vznikem dvouvláknových zlomů DNA. Reportér *Srxn1-GFP* je aktivován při zvýšené úrovni oxidačního stresu a je součástí antioxidační dráhy s transkripčním faktorem Nrf2, obdobně jako reportér *Blvrb-GFP*. *Btg2-GFP* reportérový systém je založen na p53-responzivním elementu *Btg2* genu a je aktivován širokým spektrem toxických sloučenin. *Ddit3-GFP* je přímo spojen s buněčnou odpovědí na špatně sbalené proteiny<sup>2</sup>.

V porovnání s předchozími metodami vykazuje tento systém vysokou senzitivitu i specifitu a poskytuje výkonný nástroj pro hodnocení rizika nových chemikálií při současném zjištění genotoxických a/nebo oxidačních vlastností sloučeniny.

Po rané mezilaboratorní validační studii byla v roce 2017 zahájena oficiální validační studie OECD (Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj, z angl. Organisation for Economic Co-operation and Development). V této validační studii testuje 7 laboratoří z různých průmyslových odvětví (farmakochemie, chemie a CRO) výběr 64 genotoxických a negenotoxických sloučenin. Studie se provádí podle pokynů OECD, a pokud



Obr. 4. Přehled hlavních typů biologického poškození a příslušné spojení s biomarkery. Nakresleno v ChemDraw Professional

dobře dopadne, mohlo by se jednat o oficiálním přijetí a zařazení testu do standardní regulační strategie bezpečnostních testů.

#### 4.4. Reportérové vektory pGL4

Luciferasové reportérové vektory pGL4, komerčně dostupné od firmy Promega Corporation (Madison, Wisconsin, USA), jsou další generací reportérových genových vektorů určených pro expresi v savčích buňkách. K dispozici je řada konfigurací vektorů pGL4, včetně těch se syntetickými geny *luc2* (*Photinus pyralis*) a *hRluc* (*Renilla reniformis*), které byly kodonově uzpůsobeny pro účinnější expresi v savčích buňkách. Proteiny kódované těmito geny reagují rychleji a ve větší míře na změny v transkripční aktivitě než jejich předchůdci. Kromě toho byly reportérové geny i vektorová kostra, včetně genu bakteriální rezistence ( $\beta$ -laktamasa), a savčí selektovatelné geny (rezistence pro hygromycin, neomycin nebo puromycin), navrženy tak, aby se snížil počet vazebných míst pro transkripční faktory a riziko anomální transkripce.

Signální dráhy, jejichž aktivace je sledována pomocí pGL4 reportérových plasmidů, zahrnují signální dráhu MAPK/JNK, ve které je responsivní element pro aktivací protein 1 indukovatelný např. forbol-12-myristát-13-acetátem (PMA). PMA je známý jako aktivátor proteinových kinas. Další signální dráha souvisí se zánětem, responsivní element pro jaderný faktor NF- $\kappa$ B je zde aktivován např. tumor nekrotizujícím faktorem – TNF $\alpha$ . Signální dráha oxidativního stresu je reprezentována responsivním elementem pro faktor Nrf2 aktivovaný např. *tert*-butylhydrochinonem. Poškození DNA je sledováno aktivací responsivního elementu pro protein p53, např. doxorubicinem. Stres endoplasmatického retikula je stanoven pomocí responsivního elementu pro aktivací transkripční faktor 6, který je aktivován např. tunikamycinem, inhibitory syntézy glykoproteinů. Stres způsobený těžkými kovy je sledován aktivací responsivního elementu pro responsivní transkripční faktor 1 reagující na kovy (např. ZnSO<sub>4</sub>). Tepelný šok souvisí s aktivací responsivního elementu pro faktor 1 tepelného šoku pomocí např. 17-allylamino-17-demetyxgeldanamycinu, který je inhibitory proteinu p90 tepelného šoku. Hypoxie se stanovuje aktivací responsivního elementu pro faktor 1 $\alpha$  indukovaného hypoxií (aktivován např. fenantrolinem). Stres vyvolaný xenobiotiky je sledován aktivací responsivního elementu pro arylhydrokarbonový receptor, např. prostřednictvím 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxinu – persistentního organického polutantu.

#### 4.5. Signal Finder Stress & Toxicity 10-Pathway Reporter Array

Vektory pGL4 od firmy Promega jsou k dostání jako jednotlivé plasmidy, které si uživatel může cíleně vybrat a následně s nimi pracovat. O krok dál je řešení firmy Qiagen (Hilden, Německo), které nabízí set deseti vektorů pro sledování stresu a toxicity chemických sloučenin akti-

vací signálních drah. Sledované signální dráhy se neliší od řešení firmy Promega, pouze jsou doplněny o vektor s glukokortikoidním responsivním elementem. Gen pro glukokortikoidní receptor je exprimován téměř v každé buňce v těle a jeho signální dráha reguluje expresi genů řídících vývoj, metabolismus a imunitní odpověď. Některá xenobiotika, všudypřítomná v prostředí, se mohou vázat na glukokortikoidní receptor a jsou tak schopná modulovat následné účinky, které zahrnují reakce na zánětlivé, alergické, metabolické, neoplastické a autoimunitní procesy. Mnohá xenobiotika mohou mít prostřednictvím interakce s glukokortikoidním receptorem škodlivé toxické účinky s potenciálně smrtelnými následky<sup>36</sup>.

Pathway Reporter Array je připravena ve formátu 96-jamkové destičky, kdy každý sloupec obsahuje jeden reportérový vektor a poslední dva sloupce obsahují vektor pro pozitivní a negativní kontrolu. Pathway Reporter Array je navržen jako duální test obsahující vždy dva vektory – vektor s genem pro luciferasu ze světlušky pod kontrolou responsivního elementu a vektor s genem pro luciferasu ze sasanky pod kontrolou konstitutivního promotoru CMV (promotor lidského cytomegaloviru). Toto duální uspořádání umožňuje normalizaci detegovaného signálu na počet pozitivně transfekovaných buněk.

## 5. Závěry

Oblast toxikologie v současné době prochází posunem od tradičních studií expozice zvířat směrem k vysoce výkonným přístupům využívajícím výpočetní modely, alternativní zvířecí modely a *in vitro* modelové systémy založené na buňkách. Testy *in vitro* pro predikci toxických a genotoxických vlastností látek (Amesův test, *hprt* test, kometový test aj.) se primárně zaměřují na hodnocení genotoxického potenciálu a obecně neberou v úvahu alternativní typy biologického poškození a selhávají v integraci různých metabolických dějů, které mohou být důležité pro predikci nebezpečí<sup>37</sup>. Relativně vysoká specifita Amesova testu využívajícího bakteriální buňky a nízká specifita (časté falešně pozitivní výsledky) zavedených testů na savčích buňkách často vedou k mnoha potížím. Nejedná se tedy o žádoucí vlastnosti účinného přístupu v predikci toxicity a mutagenity, neboť včetně promarněného času dochází k finančním ztrátám, a pokud je vyžadováno i testování *in vivo*, k nadměrnému využití laboratorních zvířat.

Potenciální toxické vlastnosti chemikálií lze snadněji posoudit sledováním aktivace specifických buněčných signálních drah. K aktivaci těchto drah může dojít při nižších koncentracích a kratších expozičních časech než u jiných koncových bodů, jako je např. sledování buněčné smrti, což z nich dělá dobré nástroje pro predikci následné toxicity. Kromě toho může testování aktivace drah stresové reakce poskytnout informace o způsobu působení sloučeniny a tyto dráhy lze studovat v různých typech buněk, což umožní získání informací o tkáňově specifických reakcích na chemickou expozici. Reportérové testy nám nabízejí

široké detekční spektrum a vysokou citlivost. Ovšem vzhledem k tomu, že většina navrhovaných testů využívajících reportérové geny dosud nebyla validována ve velkých srovnávacích studiích se standardními metodami, ani nebyly provedeny mezilaboratorní testy a stanovena jejich reprodukovatelnost, měly by se využívat spolu s dosud zavedenými metodami k lepší interpretaci výsledků<sup>38</sup>.

*Autoři děkují Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy za poskytnutí finančních prostředků prostřednictvím projektu INTER-COST (LTC20015). Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu – projekt č. A2\_FPBT\_2022\_055.*

#### Seznam zkratk

Amp	ampicilin
ATB	antibiotika
β-gal	β-galaktosidasa
CMV	lidský cytomegalovirus
DMSO	dimethylsulfoxid
dsDNA	double stranded DNA, dvouvláknová DNA
FLuc	luciferasa ze světlušky <i>Photinus pyralis</i>
GFP	green fluorescent protein, zelený fluorescenční protein
HepG2	lidský hepatocelulární karcinom
HTS	high-throughput screening
<i>Hprt</i>	hypoxanthine phosphoribosyltransferase
Hygro	hygromycin
<i>lacZ</i>	gen kódující enzym β-galaktosidasu
MCS	multicloning site, multiklonovací místo
mRNA	messenger RNA,
NF-κβ	nukleární faktor kappa B
OECD	z angl. Organisation for Economic Co-operation and Development
ONPG	<i>o</i> -nitrofenyl-β-D-galaktosid
ONP	<i>o</i> -nitrofenyl
ori	počátek replikace
PMA	forbol-12-myristát-13-acetát
RFP	red fluorescent protein, červeně fluoreskující protein
RLuc	luciferasa z mořské sasanky <i>Renilla reniformis</i>
RT-qPCR	Real-time polymerase chain reaction
SEAP	secreted embryonic alkaline phosphatase
<i>sfiA</i>	SOS reparační gen
SV 40	Simian virus 40
TNFα	tumor nekrotizující faktor α
<i>Umu</i>	operon zodpovědný za ochranu před chemickou a radiační mutagenezí
X-gal	5-brom-4-chlor-2-indolyl-β-D-galaktopyranosid

#### LITERATURA

- van Gaal E. V. B., Hennink W. E., Crommelin D. J. A., Mastrobattista E.: *Pharm. Res.* 23, 1053 (2006).
- Hendriks G., Atallah M., Morolli B., Calléja F., Ras-Verloop N., Huijskens I., Raamsman M., van de Water B., Vrieling H.: *Toxicol. Sci.* 125, 285 (2012).
- Suzuki H., Sakabe T., Hirose Y., Eki T.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 659 (2017).
- Westerink W. M. A., Stevenson J. C. R., Horbach G. J., Schoonen W. G. E. J.: *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 696, 21 (2010).
- Miraglia L. J., King F. J., Damoiseaux R.: *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 14, 648 (2011).
- Fischer F. C., Abele C., Henneberger L., Kluven N., König M., Muhlenbrink M., Schlichting R., Escher B. I.: *Chem. Res. Toxicol.* 33, 1770 (2020).
- Frost L. S., Koraimann G.: *Future Microbiol.* 5, 1057 (2010).
- Komatsu Y., Tomonaga K.: *Curr. Opin. Virol.* 44, 42 (2020).
- Durland R. H., Toukdarian A., Fang F., Helinski D. R.: *J. Bacteriol.* 172, 3859 (1990).
- Gnügge R., Rudolf F.: *Yeast* 34, 205 (2017).
- Yue Y., Duan D.: *Biotechniques* 33, 672 (2002).
- Shaner N. C., Steinbach P. A., Tsien R. Y.: *Nat. Methods* 2, 905 (2005).
- Winson M. K., Swift S., Hill P. J., Sims C. M., Griesmayr G., Bycroft B. W., Williams P., Stewart G. S. A. B.: *FEMS Microbiol. Lett.* 163, 193 (1998).
- Juers D. H., Matthews B. W., Huber R. E.: *Protein Sci.* 21, 1792 (2012).
- Kim T. K., Eberwine J. H.: *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 3173 (2010).
- Nora L. C., Westmann C. A., Martins-Santana L., Alves L. D., Monteiro L. M. O., Guazzaroni M. E., Silva-Rocha R.: *Microb. Biotechnol.* 12, 125 (2019).
- Rieder N., Gazzano-Santoro H., Schenerman M., Strause R., Fuchs C., Mire-Sluis A., McLeod L.: *BioProcess Int.* 8, 33 (2010).
- Svobodová K., Cajthaml T.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88, 839 (2010).
- Jiang T., Xing B., Rao J.: *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 25, 41 (2008).
- de Wet J. R., Wood K. V., DeLuca M., Helinski D. R., Subramani S.: *Mol. Cell. Biol.* 7, 725 (1987).
- Wang L., Yu C., Wang J.: *Biotechnol. Adv.* 39, 107466 (2020).
- Thorne N., Shen M., Lea W. A., Simeonov A., Lovell S., Auld D. S., Inglese J.: *Chem. Biol.* 19, 1060 (2012).
- Auld D. S., Southall N. T., Jadhav A., Johnson R. L., Diller D. J., Simeonov A., Austin C. P., Inglese J.: *J. Med. Chem.* 51, 2372 (2008).
- Kenda M., Vegelj J., Herlah B., Perdih A., Mladěnka P., Sollner Dolenc M.: *Int. J. Mol. Sci.* 22, 6927 (2021).
- Barriscale K. A., O'Sullivan S. A., McCarthy T. V.: *Anal. Biochem.* 453, 44 (2014).
- Marcos-Vadillo E., García-Sánchez A.: *Methods Mol. Biol.* 1434, 199 (2016).
- Soboleski M. R., Oaks J., Halford W. P.: *FASEB J.* 19, 440 (2005).

28. McDaniels A. E., Reyes A. L., Wymer L. J., Rankin C. C., Stelma G. N. J.: *Environ. Mol. Mutagen.* 16, 204 (1990).
29. Whong W. Z., Wen Y. F., Stewart J., Ong T. M.: *Mutat. Res.* 175, 139 (1986).
30. Oda Y., Nakamura S., Oki I., Kato T., Shinagawa H.: *Mutat. Res.* 147, 219 (1985).
31. Reifferscheid G., Heil J.: *Mutat. Res.* 369, 129 (1996).
32. Yasunaga K., Kiyonari A., Oikawa T., Abe N., Yoshikawa K.: *Environ. Mol. Mutagen.* 44, 329 (2004).
33. van der Lelie D., Regniers L., Borremans B., Provoost A., Verschaeve L.: *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 389, 279 (1997).
34. Verschaeve L., Van Gompel J., Thilemans L., Regniers L., Vanparys P., van der Lelie D.: *Environ. Mol. Mutagen.* 33, 240 (1999).
35. Smith J., Mun Tho L., Xu N., Gillespie D. A.: *Adv. Cancer Res.* 108, 73 (2010).
36. Gulliver L. S. M.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 319, 69 (2017).
37. Hendriks G., Derr R. S., Misovic B., Morolli B., Calléja F. M. G. R., Vrieling H.: *Toxicol. Sci.* 150, 190 (2016).
38. Elad T., Belkin S.: *Adv. Biochem. Eng. / Biotechnol.* 157, 135 (2017).

**D. Čáková, N. Jelenová, and J. Viktorová**  
(*Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic*): **Use of Reporter Assays in Monitoring Cellular Stress and Toxicity**

Monitoring the influence or process of gene expression is a very important part of research in many studies. Currently, many methods are being developed to facilitate the monitoring of gene expression regulation, the use of gene reporter assays being one of the examples. These systems represent an extensive set of tools to study the regulatory sequences of promoters, enhancers, and transcription factors. There are several assays using reporter cells to determine the biological activity of the compounds studied. The aim of this review article is to present the preparation of reporter plasmids, which is always the first step in assays using reporter genes. Subsequently, the most common types of reporter test are described, and examples of their use in *in vitro* testing are presented.

**Keywords:** plasmid, regulation of gene expression, transfection, luciferase, *in vitro* assay, reporter, genotoxicity, DNA damage

## O LESNÍM ENTHEOGENU

MICHAL JURÁŠEK<sup>a</sup>, LUBOMÍR OPLETAL<sup>b</sup> a PAVEL DRAŠAR<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, <sup>b</sup> Katedra farmakologie a farmaceutické botaniky, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Česká republika  
jurasekm@vscht.cz, opletal@faf.cuni.cz, drasarp@vscht.cz

Došlo 26.4.23, přijato 9.5.23.

Článek popisuje muchomůrku červenou (*Amanita muscaria*) v zrcadle historie, přírodní medicíny, obsahových látek, toxicity a v souvislostech s šamanskými, rituálními a náboženskými praktikami s tím, že důrazně varuje před jakýmkoliv experimentováním s požíváním houby samotné, či přípravků z ní připravených, pro kteréžto varování uvádí vědecké důvody.

Klíčová slova: muchomůrka, *Amanita muscaria*, soma, toxicita, halucinogen, rozpustnost, logP

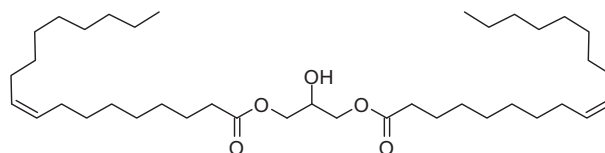
Vše začalo před dávnými a dávnými časy. Řada archeologických důkazů naznačuje, že lidé mají od prehistorických časů sklon používat psychedelické drogy v náboženském a/nebo uzdravovacím kontextu. Jako důkaz takového použití psychomimetických hub můžeme jmenovat obrazy a sochy zobrazující mj. stylizované humanoidy s houbovými rysy<sup>1</sup>. Nějakou dobu po poslední době ledové v severském lesním pásmu, mezi březovými stromy, našli naši předkové preferovaný mykorrhizní symbiont tohoto stromu – nádherné muchomůrky s červenobílými klobouky (muchomůrka červená, *Amanita muscaria* var. *muscaria* (L.) Lam. (Amanitaceae), obr. 1, cit.<sup>2</sup>). Poté, co pozorovali, že houba měla zajímavý účinek na soby, kteří, když ji pozřeli, upadli do jakéhosi transu, to zkusili také. Tak začalo náboženské, mystické a rekreační použití této psychedelické houby, která pokračuje do sou-



Obr. 1. Muchomůrka červená, *Amanita muscaria* var. *muscaria* (L.) Lam. (Amanitaceae)<sup>2</sup>

časnosti v několika regionech světa<sup>3,4</sup>. Z kruhů ugrofinských šamanů se znalost rozšířila mj. do védských, tibetských, budhistických a dalších obřadů, jako nápoj bohů, soma (ze sanskrtského mačkat, drtit).

V našich krajích však mnohem prozaičtější hospodynky braly klobouky houby, které pak máčely ve sladké vodě či mléce, a posypaly je cukrem. Sladká pochutina pak nalákala mouchy, které se jejím požitím otrávil; proto se česky houba jmenuje muchomůrka, neb umožní mouchy. Nutno poznamenati, že jakkoliv je lákavý tvar muchomůrka (podle vzoru Vochomůrka), správně je pouze muchomůrka<sup>5</sup>. Jiná teorie tvrdí, že hmyz láká v houbě obsažený 1,3-diolein (2-hydroxypropan-1,3-diyl-di(9Z)-oktadec-9-enoát)<sup>6</sup>.



1,3-diolein

Ale zpět do historie, staří Indoevropané nazývali muchomůrku, či její výluh „maga“ (velký dar, údajně se od tohoto slova odvozují výrazy jak magie a mág), Rgvéda nejstarší klasický text staroindického vědění, pocházející z doby před asi třemi a půl tisíci lety (Rg Veda 8.48.3) pak o ní říká<sup>7,8</sup>:

*Pili jsme somu a stali jsme se nesmrtelnými,  
světlo jsme dosáhli, bohy objevili.*

*Jakou škodu může zloba nepřítele způsobit, aby nám ublížila?*

dále pak (Rg Veda 8.68.1):

*Toto zde je soma, ničím omezená, aktivní, vše dobývající, rozvíjející vědění pro jasnovidce a mudrce. Všech-*

*no, co je holé pokrývá; všechny nemocné léčí: slepý muž vidí, zmrzačený chodí.*

Během obřadů a používání se experimentálně zjistilo, že je možno žádoucí intoxikace dosáhnout i požitím moči jedinců požívších muchomůrku, přičemž moč je možno takto recyklovat až pětkrát, kterážto „mystická“ moudrost byla známa jak uživatelům, najmě šamanům na Sibíři<sup>9</sup>, kterým ji původně sdělil mytický Velký krkavec (Quikinnáqu), tvůrce vesmíru<sup>10</sup>, Vikingům, tak také některým Indiánům Severní Ameriky a mnoha dalším kulturám, včetně čínské, japonské<sup>11</sup>, až do maloasijské<sup>12</sup>. Šamani a kněží též zjistili, že naopak jsou po průchodu organismem metabolizovány některé emetické složky obsažené v muchomůrkách a že tudíž recyklovaná moč je do jisté míry užitečnější, než samotná muchomůrka či její prvotní výluh. Darováním moči k sobě pak vázali nevědomé soukmenovce. Recentní zdroje uvádějí, že důvodem „kvality“ moči je metabolicky způsobená dekarboxylace ibotenové kyseliny<sup>13</sup>.

Účinnost extraktu z muchomůrek byla známa i védským kněžím, kde je taková intoxikace ve starobylé literatuře spojována s bájným nápojem „soma (též amrita, haoma)“, nektarem nesmrtelnosti, jemuž jsou připisovány magické vlastnosti alchymické medicíny. Nápojem, který vyvolává pocity božskosti (entheogen)<sup>14</sup>, který má silný psychotropní efekt s pocitem „nesmrtelnosti“, euforie a létání. Staré texty explicitně spojují požití muchomůrek s levitací. Muchomůrky údajně požívali před bitvou bojovníci evropského severu (Berserkové), kteří pak údajně necítili bolest a ve svém stavu nekontrolovatelné zběsilosti byli imunní vůči ohni i kovu<sup>15</sup>, neb, jak říká (o haomě) také staroperská Yasna<sup>16</sup>: ... *Haoma přináší sílu a rychlost válečnickům v sedle, ... poskytuje studujícím (jak mnoho jich!), více znalostí a více moudrosti ...*

Klasik definuje<sup>17</sup> psychedelickou drogu jako prostředek, který, aniž by způsobil fyzickou závislost či touhu, závažné fyziologické poruchy, delirium, dezorientaci nebo amnézii, více či méně spolehlivě tvoří myšlenky, nálady a změny percepce, jinak zřídka zažívané s výjimkou snů, kontemplativní a náboženské vytržení, záblesky živých nedobrovolných fragmentů paměti a akutní psychózu. Muchomůrka se podle mnohých tomuto ideálu blíží. Pověst praví, že zářijové muchomůrky jsou prý narkotické, srpnové vizionářsky psychedelické.

O (svých) zkušenostech s muchomůrkami zajímavě píše Mika Waltari<sup>18</sup>, případně Lewis Carrol (Charles Lutwidge Dodgson)<sup>19</sup>. Dlouze dokázal o psychoaktivitě muchomůrek vyprávět i známý drogový experimentátor Jiří Glos, alias Freud<sup>20,21</sup>, vulgo Obrázek. Snil o tom, že muchomůrka, „by mohla být takové české LSD“, jenom kdyby se podařilo nějak odstranit látky, které působí emeticky; nestačilo mu, že antiemeticky docela dobře působí kouření marihuany, on to chtěl mít čistě oučké, což by se mu asi nepovedlo, protože sám muscimol je v konečné fázi sedativní (ačkoliv je to velmi silný agonista GABA<sub>A</sub>), je opojný, halucinogenní, ale i vzbuzující somatickou reakci zahrnující nevolnost a zvracení<sup>22</sup>, a trik s močí neznal.

O Jiřím Glosovi (\*1947) pověst praví, že přivedl na

českou scénu v polovině minulého století pervitin, ač údajně nedostudovaný geolog, měl již v mládí takové znalosti z chemie, že by složil na vysoké škole zkoušku z pokročilé organické chemie i farmakologie. O jeho zápiscích, údajně, s povzdechem prohlásili lékaři, že byl ve výzkumu psychoaktivních látek dvacet let před nimi, protože zatímco on experimentoval na lidech, oni na králících.

Jako každá věc, má toto rub i líc. Požití muchomůrky či extraktů z ní však také vyvolává další příznaky, včetně pocení, nevolnosti, svalového škubání a sluchových nebo vizuálních halucinací, podstatně jsou i toxické a potenciálně fatální vlastnosti v houbě obsaženého muskarinu<sup>14</sup>. Další potíž je v tom, že požití halucinogenů může vést k čemusi, co se v angličtině označuje jako „bad trip“ (stav, kdy člověk po užití halucinogenu zažívá (velmi) nepříjemné vjemy), či k stavu deliria nebo k opakujícím se poruchám vnímání (tzv. flashback, tj. záblesk z minulosti, při kterém se člověk chová tak, jako by se v minulosti prožítá situace (intoxikace) nebo nepříjemná událost znova opakovala)<sup>23</sup>.

Nicméně, jak jsme psali v článku o muškátovém oříšku<sup>24</sup>, Andrew T. Weil<sup>25</sup> říkával: „*Osoby, které používají narkotika, jsou často ochotny trpět extrémním diskomfortem pro pár příjemných okamžiků, vyvolaných (omamnými) drogami*“.

K tomu je třeba dodat, že současného pohledu psychedelika nejsou narkotiky, mj. proto, že narkotika jsou většinou spouštěči závislosti, což psychedelika nejsou a extra významný diskomfort po jejich aplikaci zpravidla není. Negativní aspekty působení muchomůrek však lze do jisté míry eliminovat. Již jsme zmínili průchod organismem a marihuanu, podívejme se dále. Klasikové uvádějí, že je nutno macerovat houbu sušenou, potažmo její klobouk samotný, nejlépe s co nejvíce bílých zbytků pochvy (obalu). „S výhodou“ se sušený klobouk maceruje ve vodě, mléce, nebo ovocné šťávě. Sušení téhož se doporučuje<sup>12</sup> na mírném teple, 35–50 °C, dokud materiál není zcela suchý (snadno se láme a droří), což prý radikálně změní chemické složení houby, a výsledkem je pak aromatický produkt sladké příjemné chuti, který je plně použitelný a dobře skladovatelný. Poté se v dobrém obalu před použitím skladuje 2–3 měsíce. Samozřejmě, jedna větev úprav muchomůrky vede k „ideálně“ použitelné substanci k navození halucinogenního stavu, druhá k neškodné, voňavé potravíně.

Recept na přípravu „jedlé“ muchomůrky cituje Pearson<sup>26</sup>: Chcete-li připravit *Amanita muscaria* k bezpečnému jídlu (upraveno): (1) pečlivě oloupejte klobouk a odstraňte každý kousek korové vrstvy; (2) nakrájejte na malé kousky; (3) vložte kousky do vroucí vody a vařte přesně pět minut; (4) sceďte důkladně vodu a znovu vařte v čerstvé, vroucí vodě po dobu dalších pět minut; (5) odstraňte vodu a obvyklým způsobem připravte houbu. (Autor z bezpečnostních důvodů radí pečlivě likvidovat vodu, použitou k extrakci.) Chemika varuje, že neuvádí množství vody ani to, zda „předvařená“ muchomůrka měla ještě jakoukoliv biologickou aktivitu, kromě houbové vůně

a chuti. Asi nikoli, protože hledači snů si červené korové vrstvy (exokarpu) cení nejvíce. Připravit muchomůrku bez jejích hlavních alkaloidů se jeví zcela reálné, pokud přihlídneme k rozpustnosti podstatných složek. Rozpustnosti ve vodě jsme v literatuře nenašli, proto jsme je modelovali pomocí programu ADMET Profiler<sup>27</sup>: muskarin 129 mg ml<sup>-1</sup> (logP=2,93), ibotenová kyselina 467 mg ml<sup>-1</sup> (logP=0,85), muscimol 1000 mg ml<sup>-1</sup> (logP=0,92), muscazon 305 mg ml<sup>-1</sup> (logP=0,60).

Klasický postup přípravy somy zahrnoval tři stupně<sup>28</sup>: sušení na sluníčku, extrakci a filtraci přes organismus. Známý farmakoetnograf František Šita<sup>29</sup> ve svém pojednání o somě píše: *Postup přípravy (somy) začínal očištěním drogy (muchomůrek) vodou, jejím rozdrčením mezi kameny a zalitím drti vodou. Tento postup se několikrát opakoval. Potom byla kapalina odlita, zbytek vymačkáán, a tako získaná tekutina přidávána k dřívě získané. Nyní nastával vrcholný okamžik. Spojený surový macerát byl filtrován přes plátno. Jasně žlutý filtrát představoval při svém objevení zjevení samotného božstva. Získaná tekutina byla před požitím smíšena s mlékem, vodou nebo rozpuštěným máslem s medem, případně odvarem z vrbovky úzkolisté (*Epilobium angustifolium*, rostliny široce používané k přípravě povzbuzujícího nálevu na Rusi před příchodem čajové kultury) či šťávou z bažinné borůvky vlochyně bahenní (*Vaccinium uliginosum*, drogy známé pro navození psychomotorického neklidu a pocitů závratí či mírné halucinogenní účinnosti; má se nicméně za to, že zásadní podíl na účincích nemá rostlina samotná, ale metabolické produkty parazitické houby hlízky vlochyňové (*Sclerotinia megalospora*), která ji napadá<sup>30</sup>). Dodejme k tomu citát z práce Feeneyho<sup>31</sup>: Vzhledem k obtížnému rozpouštění kyseliny ibotenové ve studené vodě může mít extrakt ve studené vodě koncentrace této kyseliny nižší než extrakt ve vodě horké, a tudíž je sníženo riziko zvracení.*

Šita nám dále přibližuje chronologii účinku muchomůrek, je to natolik zajímavý text, že jej přinášíme beze změny, jakkoliv k němu lze mít připomínky: *Dávka muchomůrky červené, která působí otravu průměrného zdravého člověka, je asi 20–40 g. Na otravu umírají nejméně dva lidé ze sta. Obsahové látky se mění v závislosti na místě výskytu houby. Proto důrazně varujeme před neuváženými pokusy s houbou, které by velmi pravděpodobně měly ty nejtěžší následky. Popíšme si průběh otravy muchomůrkou u těch šťastných, kteří ji přežili. Hledejme motivy souhlasící, nebo odporující popisu otravy somou... První příznaky otravy se objevují v průměru za půl až dvě hodiny po požití houby. Postižený cítí vysychání v hrdle a v ústech, má ztížené polykání, přichází pocit „zatažení dechu“. Následuje nevolnost až tlak v žaludku, podobně jako při přejedení. Objeví se pocit tepla až nepříjemně intenzivní. Postižený touží po ochlazení. Srdce začíná silně bušit. Objeví se poruchy vnímání. Do dálky je vidět nezvykle ostře, jasně, a to i při slabém osvětlení. Obraz je zdánlivě plastický, černobílý. Může se však objevit i vidění žluté, modré nebo fialové. Zdá se, že se blízké předměty zvětšují. Na blízko je vidět stále nejasněji, postižený není schopen psát. Nastává hyperakusie: otrávený se například*

*domnívá, že slyší zvuk hodin z vedlejšího pokoje. Objeví se poruchy hmatu, brnění v končetinách, pak necitlivost. Pokrmy a nápoje se zdají bez chuti. Tento popis otravy odpovídá periferním účinkům obsahových látek muchomůrky. Vliv jedů na centrální nervový systém se rozvíjí dále. Počátkem je bolest hlavy, hučení v uších a pocit prázdnoty v hlavě, pak otáčivá závrať. Končetiny se zdají být „lehčí než papír“; někteří otrávení mají pocit, že jsou nadnášeni nebo hnáni vpřed neznámou silou, dostavuje se i pocit létání. Současně se objeví ztráta svalové síly. Postižený neudrží ani lehké předměty v ruce. Nastávají záškuby svalstva končetin a trupu. Otrávený je stále v kontaktu s okolím, uvědomuje si skutečnost svého stavu, má vzrušenou náladu, je mnohmluvný, častokrát opakuje slova nebo celé věty, které uslyšel v okolí. Vzrušení se stupňuje, postižený ztrácí vědomí a kontakt s okolím. Co prožívá od tohoto okamžiku ve formě snů, dovede obvykle popsat jen zčásti, nebo i vůbec ne. Jeden nemocný vyprávěl, že „existoval ve formě dvou osob, z nichž jedna pozorovala, co dělá druhá“ – toto stádium otravy končí někdy delirantním obrazem, ve kterém může i agresivně vystupovat vůči svému okolí. Po vybití sil nemocný zmalátní, a pak upadne spíš do bezvědomí než spánku. Klidně leží, tělesná teplota klesá, dýchání je rychlé a ztížené. Objevuje se modrátní. Zde je smrt nejbližší. Fantastičnost snů otrávených vystihují výroky jako „viš, vstal jsem z mrtvých, žiju“ nebo „tak já jsem se vrátil, byl jsem na onom světě“. Pomyslný návrat ze záhrobní je líčen často. Další postižený si připadal umístěn ve velké bílé kouli závratnou rychlostí se otáčející mezi rotujícími červenými koulemi. Otrava trvá asi 24 hodin. Období uzdravování začíná probuzením, nemocný se na nic nepamatuje, nebo si je vědom, že přestál těžký snový stav. Pociťuje bolesti hlavy, ochablost, má depresivní náladu. Poruchy vidění mohou trvat i několik dní. Nejčastější příčinou smrti při otravě muchomůrkou červenou je – vedle řady dalších komplikací – selhání srdce nebo bronchopneumonie.*

Výzkum obsahových látek muchomůrky červené zahájili už v roce 1869 Schmiedeberg a spol.<sup>32</sup> a v roce 1875 publikovali strukturu<sup>33</sup> a o rok později syntézu<sup>34</sup> prvé izolované látky; získali jedovatou látku, která dostala později jméno muskarin. Při podkožní injekci 1–3 mg působila slinění, pocit tlaku v hlavě, změny srdeční činnosti, nevolnost, červenání v tváři, závrať, úzkost, pocení a křeče. Halucinogenní efekt se neprojevil ani při zvýšení dávek na 100–200 mg, kdy vznikala už nebezpečná otrava. Smrtelná dávka je vyšší než 300 mg. Teprve o sto let později popsali Eugster a spol. ve Švýcarsku<sup>35</sup> a Takemoto a spol. v Japonsku<sup>36</sup> objev další účinné látky z muchomůrky červené. Byla to kyselina ibotenová a její rozkladný produkt muscimol. Farmakologický účinek obou látek je velmi blízký. Po dávce 10–15 mg popisovali dobrovolníci zmatenost, dezorientaci v prostoru i čase, zvětšené vidění předmětů, zrakové i sluchové halucinace, třes až svalové křeče. Nakonec usinali. Obraz otravy muchomůrkou je tak syntézou účinku muskarinu, kyseliny ibotenové s muscimolem i stavu organismu, na který houba působí. Proto nemůže být zcela přesně zpodobněn pokusným po-

dáním čistých izolovaných látek. V roce 1967 pak oba, Eugster a Takemoto, položili základ názvosloví obsahových látek muchomůrek<sup>37</sup>.

Zajímavý je popis intoxikace od Donalda E. Teetera<sup>12</sup>, podobně podrobný jako popisy Shulginovy<sup>38</sup>: *Koupil jsem několik sušených vzorků Amanita muscaria prostřednictvím poštovní objednávky. Při otevření sáčku mě zasáhla nejpříjemnější vůně. Někde v mém těle kliknul starý přepínač, jako by moje tělo mělo předchozí zkušenost s tím, co bylo v mých rukou. Zkouška potvrdila, že droga chutnala stejně, jako voněla. Nebylo to vůbec hořké nebo ošklivé, ale sladké, vlastně chutné.*

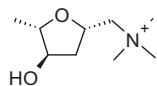
*Požil jsem asi 1,75 g. Účinky byly velmi mírné; Mírná euforie; Mírné zvýšení okolního světla, tyto příjemné účinky trvaly asi 3 hodiny. O týden později jsem požil 3,5 g. Výraznější účinky: obecný vnitřní klid, velmi uklidňující; vizuální iluze barvy, modrá je obzvláště brilantní; zvlněné zorné pole; mírné problémy s chůzí; měnící se barevné vzory se zavřenými očima. Asi po 2 hodinách: ospalost, musel jsem si lehnout se zavřenými očima, mimořádně vizuální iluze, vnitřní smysl pro mír, 4,5 hodiny po požití se cítím odpočínutý a zpět v normálu. O týden později, 7 g. Mnohem výraznější efekty s rychlejším nástupem: setmělá místnost je světelně brilantní, chodím jako opilý a musím si lehnout. Asi po 2 hodinách: vidím intenzivní vzory perského koberce za zavřenými očima, mám velký pocit vnitřního míru, pociťuji nějaké sluchové vjemy. Jeden týden poté jsem požil 14 g, velmi rychlý nástup, jen pár minut. Po asi 1 až 1,5 hodině jsem musel ulehnout: extrémní vnitřní klid; nepopsatelné osvětlené vize; extrémně složité sluchové účinky, od slyšeného vyprávění vizí po složité „výroky nebo učení“, lépe to vyjádřit neumím. Zkušenost nebyla úplně stejná jako při vnímání mluveného slova; k*

*otázkám jsem znal odpovědi; někdy pak vize ilustrovaly odpovědi! V určitém okamžiku jsem se duchovně vydal na místo, které mohu nazvat pouze jako království. Všechno viděné bylo osvětleno vnitřním světlem. Tato vize byla soudržný celek se začátkem, prostředkem a koncem. Vizuální a sluchové efekty ustoupily asi po 4,5 hodinách. Za 6 hodin po požití jsem se cítil odpočínutý a fyzicky omlazen. Tento pocit fyzické pohody trval asi 14 dní po aplikaci. Teeter dále popisuje, že se po aplikaci zbavil celé řady neduhů, včetně bolestí kloubů.*

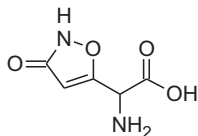
Podívejme se tedy na hlavní látky v houbě obsažené<sup>22,39–41</sup>. Mezi hlavní látky můžeme uvést silně toxický muskarin (LD<sub>50</sub> (myš) 0,23 mg kg<sup>-1</sup>)<sup>42</sup>, který je parasympatomimetikem, zjednodušeně řečeno ovlivňuje hladinu acetylcholinu, působí na muskarinové receptory a způsobuje křeče hladkého svalstva střev, dělohy, močového měchýře a bronchů, pocení, slinění, slzení, bolesti žaludku a nucení na zvracení; nicméně jeho obsah v muchomůrkách je nízký, kolem 0,002–0,02 % suché hmotnosti plodnic.

Dále pak kyselinu ibotenovou (LD<sub>50</sub> (krysa) až 129 mg kg<sup>-1</sup>, obsah v sušině klobouku kolem 1 %) <sup>43</sup>, která je rozpustná ve vodě a při sušení drogy dekarboxyluje<sup>44</sup> na muscimol v droze též obsažený. Je látkou, která přechází přes hematoencefalickou bariéru, pak je dekarboxylována. V mozku sama působí jako silný neurotoxin. Strukturně je příbuzná s glutamovou kyselinou a aktivuje receptory NMDA, nezdá se však, že by se jí daly připsat psychoaktivní vlastnosti muchomůrek.

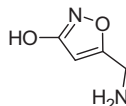
Muscimol (agarin, pantherin, obsah v sušině klobouku kolem 0,09 %) je agonistou GABA<sub>A</sub> receptorů (LD<sub>50</sub> (krysa, p.o.) 45 mg kg<sup>-1</sup>) zřejmě nejvíce spojovaný s psychoaktivními a psychedelickými účinky a funguje



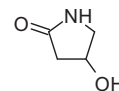
muskarin



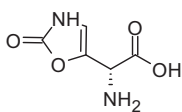
ibotenová kyselina



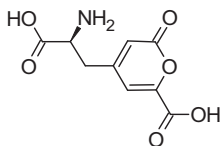
muscimol



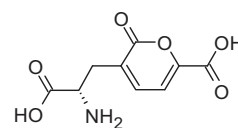
4-hydroxypyrrolidin-2-on



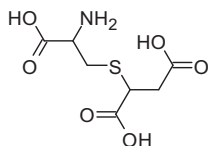
muskazon



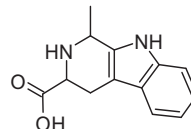
stizolobová kyselina



stizolobinová kyselina



2-amino-3-(1,2-dikarboxyethylthio)propanová kyselina



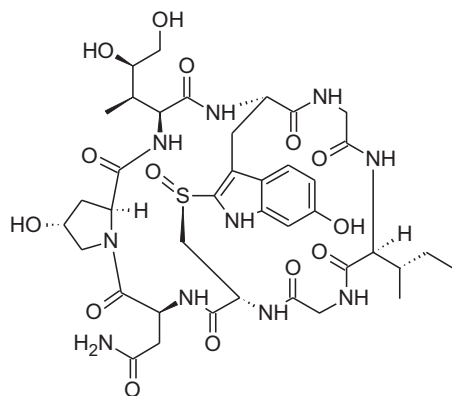
tetrahydroharman-3-karboxylová kyselina



jako primární inhibující neurotransmitter. Působení je podobné jako u alkoholu, navíc působí halucinogenně.

Další látkou je muskazon, je zřejmě tvořen fotochemickou reakcí z ibotenové kyseliny, někteří autoři soudí, že jde o izolační artefakt. Obáváme se však, že tomu tak nebude. Převést 1,3-oxazol-2-on-5-ylový derivát na 1,2-oxazol-3-on-5-ylový při pouhé extrakci vodou se nám zdá nanejvýš nepravděpodobné. Jeho toxicitu ACD/Percepta<sup>27</sup> odhaduje LD<sub>50</sub> na 180 mg kg<sup>-1</sup> (myš s.c.; nejnížší údaj); jeho psychoaktivita je nízká. Dále byly nalezeny kyseliny stizolobová a stizolobinová, tetrahydroharman-3-karboxylová kyselina a 2-amino-3-(1,2-dikarboxyethylthio)propanová kyselina. Další složky jsou antibakteriální a antimykotický 4-hydroxypyrolidin-2-on, řada beta-glukanů, najmě imunomodulační AM-ASN, antioxidační tokoferoly, stopy tropanových alkaloidů, stopy vysoce toxických amatoxinů a phalotoxinů (typické látky zejména pro *A. phalloides*), bufotenin (5-hydroxy-*N,N*-dimethyltryptamin), barviva, aminokyseliny atd. Hlavní součástí klobouku je přibližně 90 % vody. Muscimol je ve shodě s názvem kreslen jako oxazolový enol; stejně jako ostatní deriváty si jej, podle podmínek, umíme představit v obou formách, i existenci některých v zwitteriontové podobě. Přidržujeme se obvyklé literární podoby vzorců.

Několik autorů udává, že k toxicitě muchomůrek, a *A. muscaria* v to počítaje, přispívají mykotoxiny, jako např.  $\alpha$ -amanitin ( $\alpha$ -amatoxin), i když jejich obsah v (zřejmě čerstvé) houbě je nižší než 1 mg kg<sup>-1</sup>, což při střední letální dávce 0,5–1 mg kg<sup>-1</sup> (cit.<sup>45,46</sup>) znamená, že pokud by se chtěl člověk otrávit  $\alpha$ -amanitinem z *A. muscaria*, musel by spořádat pořádnou smaženici. V jiných muchomůrkách je obsah mykotoxinů mnohem vyšší, toxicita *A. muscaria* je z tohoto aspektu relativně nízká<sup>47</sup>.



$\alpha$ -amanitin

Zkušenosti uživatelé varují před současným požitím nápojů s oxidem uhličitým, neboť mají za to, že ibotenová kyselina, která je při sušení dekarboxylována na muscimol, který může být působením kyseliny uhličitě převeden z muscimolu zpět na kyselinu ibotenovou<sup>12</sup>, což je myšlenka svůdná, leč pro chemika přinejmenším podivná, ale příroda jest mocná čarodějka. Je třeba však před muchomůrkou znovu varovat, neb i když intoxikace odez-

ní bez větších zdravotních problémů, stále potom hrozí řada komplikací, které se mohou objevit později: respirační a kardiovaskulární problémy, selhávání ledvin, rhabdomyolýza nebo nádorová onemocnění<sup>48</sup>.

O muchomůrce *Amanita muscaria* uvádí Erowid 30 článků<sup>49</sup>. SciFinder na dotaz „amanita“ poskytuje 3494 článků, které se po zpřesnění dalším dotazem „muscaria“ ztenčí na 803 citací, přičemž jejich četnost začala narůstat v 50. letech minulého století. Existuje i celá řada zdrojů tzv. šedé literatury, jako např. materiály tzv. České psychedelické společnosti, která má podle obchodního rejstříku 4 funkcionáře a celkem 4 členy, a mnoha dalších skupin a spolků. Snažíme se tímto článkem přispět k poznání skutečnosti, čerpané především z odborné literatury. Přinášíme i tento příspěvek jako další článek do série učebních textů popisujících různé zajímavé aspekty chemie přírodních látek<sup>50–52</sup> i proto, že chceme takto reagovat na množství smyšlenek, polopравd a nesmyslů, které jsou kolem přírodních sloučenin dnes šířeny. Je nabíledni, že zkoumání přírodních látek, jakožto látek z obnovitelných zdrojů, je jednou z cest, jak laciným a efektivním způsobem přispět ku všeobecnému prospěchu<sup>53,54</sup>.

Závěrem lze poznamenat, že souhlasíme s výrokem ChatGPT<sup>55</sup>, kde jsme se zeptali na názor k výše popsané problematice: „Je důležité poznamenat, že konzumace muchomůrky může být nebezpečná a může vést k vážným zdravotním problémům. Mnoho jedinců po požití muchomůrky cítí nevolnost, zvracejí, trpí silnými bolestmi břicha a závratěmi. Dále může být nebezpečné podcenit účinky houby a podlehnout halucinacím, což může vést k rizikovému chování a úrazům. Z těchto důvodů se konzumace muchomůrky nedoporučuje a měla by být ponechána pouze pro výzkumné účely pod dozorem zkušených vědců a lékařů.“

## LITERATURA

1. Froese T., Guzmán G., Guzmán-Dvalos L.: *Econ. Bot.* 70, 103 (2016).
2. [https://www.freepik.com/free-photo/amanita-muscaria-illustration-from-medical-botany-1836\\_3533340.htm](https://www.freepik.com/free-photo/amanita-muscaria-illustration-from-medical-botany-1836_3533340.htm), staženo 8. 2. 2023.
3. Wasson R.G.: *Soma: Divine Mushroom of Immortality*. Harcourt, Brace, Jovanovich, New York 1968.
4. Hajicek-Dobberstein S.: *J. Ethnopharmacol.* 48, 99 (1995).
5. <https://www.pravopisne.cz/2019/12/muchomurka-x-mochomurka/>, staženo 12. 2. 2023.
6. Benjamin D. R.: *Mushrooms Poisons and Panaceas: A Handbook for Naturalists, Mycologists, and Physicians*. W. H. Freeman & Co., New York 1995.
7. Bhaktivedanta Vedabase: <https://vedabase.io/cs/library/sb/10/87/36/>, staženo 7. 2. 2023.
8. Complete Rig Veda in English (Sakala Shakra): <https://archive.org/details/rigvedacomplete/page/n839/mode/2up>, staženo 8. 2. 2023.
9. Нам Е. В.: *Вестник Томского государственного университета* 403, 87 (2016).

10. Jochelson W.: *Am. Anthropol. New Ser.* 6, 413 (1904).
11. Dannaway F.: *J. Psychoact. Drugs* 41, 67 (2009).
12. Teeter D. E.: *Amanita Muscaria; Herb of Immortality*. Ambrosia Society, Yager Lane Manor Texas 2005; [http://en.psilosophy.info/amanita\\_muscaria\\_herb\\_of\\_immortality.html](http://en.psilosophy.info/amanita_muscaria_herb_of_immortality.html), staženo 8. 2. 2023.
13. Lee M. R., Dukan E., Milne I.: *J. R. Coll. Physicians Edinb.* 48, 85 (2018).
14. Walker S., Brightmore G.: *Educ. Chem. (London, U. K.)* 47, 49 (2010).
15. Vlčková J.: *Encyklopedie mytologie germánských a severských národů*. Libri, Praha 2006.
16. Avesta Yasna: *Sacred Liturgy and Gathas/Hymns of Zarathushtra*. <http://www.avesta.org/yasna/#y9>, staženo 8. 2. 2023.
17. Grinspoon L., Bakalar J. B.: *Psychedelic drugs reconsidered*. Basic Books, New York 1979.
18. Waltari M.: *Čtyři západy slunce* (orig. *Neljä päivän-laskua*). Vyšehrad, Praha 1976.
19. Carrol L.: *Alenka v říši divů*. Grada, Praha 2010.
20. Šantúrová K., Singer F.: *Newsweek* 2015 (3), 30.
21. Kolář J.: *Drogy v socialistickém Československu. Disertační práce*. Filozofická fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Praha 2018.
22. Carboué Q., Lopez M.: *Encyclopedia* 1, 905 (2021).
23. Díaz J. L.: *Phenom. Cogn. Sci.* 9, 159 (2010).
24. Jurášek M., Drašar P.: *Chem. Listy* 117, 348 (2023).
25. Weil A. T.: *Econ. Bot.* 19, 194 (1965).
26. Pearson L. C.: *The Mushroom Manual*. Naturegraph Publishers. Happy Camp, California 1987.
27. ACD/Labs: *ACD/Percepta*, Release 2022.1.0 (Build 3577; 7. June 2022).
28. Feeney K. (ed.): *Soma's Third Filter: New Findings Supporting the Identification of Amanita muscaria as the Ancient Sacrament of the Vedas*, v knize: *Fly Agaric: A Compendium of History, Pharmacology, Mythology, and Exploration*, str. 51–62. Fly Agaric Press, Ellensburg, Washington 2020.
29. Šita F.: *Záhada božské sómy*. Kruh, Hradec Králové 1982.
30. Jacquemart A.-L.: *J. Ecol.* 84, 771 (1996).
31. Feeney K.: *J. Psychoact. Drugs* 42, 499 (2010).
32. Schmiedeberg O., Koppe R.: *Das Muscarin*. Vogel F. C. W., Leipzig 1969.
33. Schmiedeberg O., Harnack E.: *Chem. Zentralbl.* 1875, 629.
34. Schmiedeberg O., Harnack E.: *Chem. Zentralbl.* 1876, 554.
35. Eugster C. H.: *Naturwissenschaften* 55, 305 (1968).
36. Takemoto T., Nakajima T., Yokobe T.: *Yakugaku Zasshi* 84, 1232 (1964).
37. Eugster C. H., Takemoto T.: *Helv. Chim. Acta* 50, 126 (1967).
38. Shulgin A., Shulgin A.: *PiHKAL: A Chemical Love Story*. Transform Press, Berkeley 1991.
39. Rumack B. H., Spoerke D. G.: *Handbook of mushroom poisoning: diagnosis and treatment*. CRC Press, Boca Raton 1942.
40. Michelot D., Melendez-Howell L. M.: *Mycol. Res.* 107 (2), 131 (2003).
41. Chilton W. S., Ott J.: *Lloydia* 39, 150 (1976).
42. *The Merck Index*. Merck & Co. Whitehouse Station NJ 2001.
43. Theobald W., Büch O., Kunz H. A., Krupp P., Stenger E. G., Heimann H.: *Arzneimittelforschung* 18, 311 (1968).
44. Filer C. N., Lacy J. M., Peng C. T.: *Synth. Commun.* 35, 967 (2005).
45. Siegers C. P.: *Dtsch. Med. Wochenschr.* 98, 1779 (1973).
46. Zheleva A.: *Med. Hypotheses* 69, 361 (2007).
47. Saporová V.: *Průkaz a stanovení vybraných amatoxinů ve vzorcích s biologickou maticí. Diplomová práce*. Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Olomouc 2015 (a citace tam obsažené).
48. Lima A. D., Costa Fortes R., Carvalho Garbi Novaes M. R., Percário S.: *Nutr. Hosp.* 27, 402 (2012).
49. <https://erowid.org/search.php?exclude=&q=amanita+muscaria&x=0&y=0>, staženo 12. 2. 2023.
50. Jurášek M., Stárka L., Drašar P.: *Chem. Listy* 116, 115 (2022).
51. Bejček J., Spiwok W., Kmoníčková E., Ruml T., Rimpelová S.: *Chem. Listy* 115, 4 (2021).
52. Jurášek M., Opletal L., Kmoníčková E., Drašar P.: *Chem. Listy* 115, 363 (2021).
53. Jurášek M., Opletal L., Harmatha J., Sláma K., Drašar P.: *Chem. Listy* 115, 595 (2021).
54. Rádl S.: *Chem. Listy* 115, 246 (2021).
55. ChatGPT (ver. 4): <https://chat.openai.com/?model=gpt-4>, dotaz učiněn 14. 3. 2023.

**M. Jurášek<sup>a</sup>, L. Opletal<sup>b</sup>, and P. Drašar<sup>a</sup>** (<sup>a</sup> Department of Chemistry of Natural Substances, University of Chemistry and Technology, Prague, <sup>b</sup> Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic): **On Forest Entheogen**

The article describes the red toadstool, *Amanita muscaria*, in the mirror of history, natural medicine, content of substances, and toxicity, as well as within the context of shamanic, ritual, and religious practices. Based on scientific reasons, a strong warning against any experimentation with the consumption of the mushroom itself, or preparations prepared from it, is delivered.

Full text English translation is available in the on-line version.

Keywords: red-and-white toadstool, fly agaric, fly amanita, *Amanita muscaria*, soma, toxicity, hallucinogen, solubility, logP

## STABILNÍ A RADIOAKTIVNÍ CESIUM V PŘÍRODNÍM PROSTŘEDÍ

VÁCLAV PROCHÁZKA<sup>a</sup>, IVAN SUCHARA<sup>b</sup>, LENKA THINOVÁ<sup>a</sup>, JIŘÍ MIZERA<sup>c</sup>, JULIE SUCHAROVÁ<sup>b</sup>  
a JAKUB HRANÍČEK<sup>d</sup>

<sup>a</sup> České vysoké učení technické v Praze, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, Katedra dozimetrie a aplikace ionizujícího záření, Břehová 7, 115 19 Praha 1, <sup>b</sup> Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v. v. i., Květnové náměstí 391, 252 43 Průhonice, <sup>c</sup> Ústav jaderné fyziky AV ČR, v. v. i., Hlavní 130, 250 68 Husinec – Řež, <sup>d</sup> Katedra analytické chemie PŘF UK, Hlavova 2030/8, 128 00 Praha 2, Česká republika  
vaclav.prochazka@jfifi.cvut.cz

Došlo 24.4.23, přijato 6.6.23.

Cesium je důležitým stopovým prvkem v horninách typických pro zemskou kůru, a jeho obsah v biomase je také poměrně vysoký ve srovnání s některými málo rozpustnými nebiogenními prvky. Nenáročné analytické metody, jako je rentgenová fluorescence, jsou pro stanovení cesia v typických přírodních vzorcích nedostatečné, a proto se zpravidla používá ICP-MS (hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem) nebo INAA (instrumentální neutronová aktivizační analýza). K poznání biogeochemie cesia přispělo i zkoumání znečištění radioaktivním izotopem <sup>137</sup>Cs, který je důležitým štěpným produktem a lze jej měřit pomocí spektrometrie gama. Ukázalo se, že Cs je obvykle silně zadržováno v humusu (díky jílovým minerálům), nebo je intenzivně recyklováno v systému půda-biomasa a jen pomalu odstraňováno (to však nemusí platit globálně, neboť většina výzkumů byla prováděna v podmínkách severního mírného pásu). Podobně i výsledky rozsáhlého biomonitoringu (se stanovením desítek stopových prvků) v českých jehličnatých lesích (s převahou smrku) ukazují, že Cs je přirozenými procesy koncentrováno v humusu (relativně vůči všem ostatním alkalickým kovům).

Klíčová slova: cesium, rubidium, draslík, lesní ekosystém, radioizotopy cesia

### Obsah

1. Úvod
2. Cesium v zemské kůře
3. Cesium v ekosystémech a životním prostředí
  - 3.1. Cesium v půdách a jeho vstup do biomasy
  - 3.2. Cesium v lesních ekosystémech
  - 3.3. Cesium v palivech a popelu
4. Radioaktivní izotopy Cs
  - 4.1. Původ hlavních radioizotopů Cs a jejich měření
  - 4.2. Izotopy <sup>137</sup>Cs a <sup>134</sup>Cs v ekosystémech a potravinách

### 1. Úvod

Cesium je nejtěžším stabilním alkalickým kovem (s jediným stabilním izotopem <sup>133</sup>Cs) a v přírodě se vyskytuje především jako kationt substituující K<sup>+</sup>. Patří mezi významné stopové prvky v zemské kůře a nezanedbatelný může být i jeho obsah v biomase. S rozvojem neutronové aktivizační analýzy a zvláště po rozšíření dostupnějších analýz ICP-MS (hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem) výrazně přibýlo i dat o cesiu v geologických vzorcích, biomase i půdách. V tomto člán-

ku jsme se s ohledem na vlastní výzkumné aktivity do jisté míry zaměřili na biogeochemii cesia v lesních ekosystémech.

Radioaktivní izotop <sup>137</sup>Cs patří k nejvýznamnějším štěpným produktům uvolněným při jaderném výbuchu nebo havárii. Výzkum kontaminace radionuklidy v životním prostředí i potravinách pomohl objasnit i chování cesia jako takového, mj. poukázal na jeho poměrně silnou retenci v humusu, resp. v systému půda-biomasa, alespoň v podmínkách mírného klimatického pásu. To potvrzují také výsledky rozsáhlého mapování stopových prvků v českých jehličnatých lesích.

### 2. Cesium v zemské kůře

Z pohledu geochemie je Cs díky značně velkému iontovému poloměru typickým představitelem tzv. nekompatibilních prvků, tedy takových, které jsou magmatickými procesy silně extrahovány ze zemského pláště i ze spodní kůry, a při vývoji (diferenciaci) magmatu se hromadí ve zbytkové tavenině, případně i fluidech. V zemské kůře se odhaduje průměrný obsah Cs na jednotky mg kg<sup>-1</sup>, např. podle (cit.<sup>1</sup>) je obsah v kontinentální kůře 3,4 mg kg<sup>-1</sup> a poměry K/Cs a Rb/Cs přibližně 6300 a 23, zatímco běž-

né koncentrace Cs v plášti jsou nižší než 0,10 mg kg<sup>-1</sup> (cit.<sup>2</sup>). V kyselých žulách a jiných vyvřelinách bohatých na K je běžný obsah Cs od prvních desítek mg kg<sup>-1</sup> výše. Nejvýznamnější akumulace bývají na okrajích magmatických těles nebo v magmatických žilách, ovlivněných vysokoteplotními fluidy (gresienizované žuly, pegmatity).

Nerosty s vysokou koncentrací Cs jsou vzácné. Nejdůležitější je polucit se zjednodušeným vzorcem CsAlSi<sub>2</sub>O<sub>6</sub>·2H<sub>2</sub>O (Cs však může být do různé míry substituováno), který je v současnosti jediným ekonomicky využívaným<sup>3</sup>. Celkově mnohem větší množství Cs se vyskytuje (spolu s Rb a Tl) jako izomorfní příměs v minerálech draslíku, z nichž koncentrují Cs především slídy, a to hlavně slídy trioktaedrické („tmavé“). Ke slídám s významným obsahem Cs (např. na Cínovci zhruba 400–600 mg kg<sup>-1</sup>, cit.<sup>4</sup>) patří i zinnwaldit, který tvoří ekonomická ložiska mj. v Krušných horách především jako zdroj lithia. V souvislosti s využitím Li z Cínovce, případně i dalších ložisek, je zajímavá také otázka využití Rb a Cs z lithné slídy, neboť při neefektivnější známé technologii úpravy (s využitím chloridů, např. v chloridovém bypassu v cementárně) jsou všechny alkálie uvolněny ze slídy s podobnou výtěžností<sup>5</sup>.

Při zvětrávání hornin se Cs uvolňuje poměrně snadno, zároveň však vstupuje do nově vznikajících jílových minerálů bohatých K, především illitu, nebo je silně sorbováno i na některé jílové minerály bez K (montmorilonit, vermikulit)<sup>6</sup>, případně zůstává ve slídě částečně přeměněné na vermikulit (hydrobiotit). Tyto nerosty pak buď zůstávají v půdě, nebo jsou odneseny vodou, větrem aj. a stávají se součástí sedimentů. Při intenzivnějším chemickém zvětrávání, zejména ve vlhkých tropech, kdy se původní silikáty mění až na kaolinit nebo dokonce hydroxidy Al a Fe, již vstupuje do roztoku podstatně větší podíl Cs (cit.<sup>7</sup>). Nicméně ze všech alkálií je podíl Cs odneseného řekami v roztoku nebo koloidech nejmenší, a to nejen v mírném pásu, ale i v globálním měřítku; pouze suspendované částice jsou naopak poněkud obohaceny o Cs (viz též tab. I). Velmi nízká je i koncentrace Cs v mořské vodě (tab. I). Ekonomicky zajímavé však mohou být koncentrace v některých solankách a geotermálních vodách<sup>8</sup>.

Tabulka I

Příklady koncentrací Cs a poměrů K/Cs a Rb/Cs ve vodách

Materiál	Cs [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ]	K/Cs	Rb/Cs	Lit.
Srážky s prašným spadem, jižní Morava	0,08	n.a.	19,7	60
Srážky s prašným spadem, Francie (filtrované)	0,0055	28 000	n.a.	9
Podkorunové srážky, Francie (filtrované)	0,093	48 000	n.a.	10
Řeky v ČR: filtrovaná voda (0,4 $\mu\text{m}$ )	0,07	90 000	60	11
Řeky v ČR: částice v suspenzi	7,8 *	1 800	12,7	11
Řeky ve světě: filtrovaná voda	0,01	75 000	160	12
Řeky ve světě: částice v suspenzi	6,25 *	2 700	12,6	13
Oceán: filtrovaná voda	0,4	950 000	300	14

\* mg kg<sup>-1</sup>; n.a. – neanalyzováno

### 3. Cesium v ekosystémech a životním prostředí

#### 3.1. Cesium v půdách a jeho vstup do biomasy

Suchozemské rostliny přijímají Cs především z půdního roztoku, a to společně s K, který patří mezi základní živiny. Různé látky vylučované kořeny (nebo podhoubím) uvolňují alkalické kationty přímo z minerálů, a tak urychlují jejich přenos do kořenů. Podobně jako Rb (cit.<sup>15</sup>), také Cs je kořeny více přijímáno v kyselých půdách a při nedostatku K (cit.<sup>16</sup>). Toxické projevy stabilního Cs byly v přírodě zjištěny jen na půdě na horninovém podkladu mimořádně bohatém cesiem<sup>17</sup>.

V zemědělských půdách, případně i ve městech byly ve velké části Evropy provedeny výzkumy mapující stopové prvky v určitých malých hloubkách (obvykle 0–20 cm) bez genetického rozlišení půdních horizontů. Obsáhla je hlavně databáze GEMAS, porovnávající především koncentrace vyluhovatelné lučavkou královskou za teploty 90 °C (rovněž bylo stanoveno celkové Cs v půdě, ale jen rentgenfluorescenční analýzou, která není pro nízké koncentrace příliš vhodná; s tím může souviset problematický závěr o poměrně vysoké koncentraci Cs v půdách na vápencích)<sup>18</sup>. Množství vyluhovaného Cs horkou lučavkou v půdní jemnozemi (bez částic větších než 2 mm) bylo v průměru 1,1 mg kg<sup>-1</sup>, což odpovídá zhruba 20 % celkového obsahu Cs. Ve vyluzích získaných stejným způsobem byly mapovány desítky prvků včetně Cs v půdách v centru Prahy<sup>19</sup>. Výsledky, včetně poměrně nízkého poměru Rb/Cs reprezentujícího zřejmě jílové minerály (průměr vyluhovatelných Rb a Cs 14,8, resp. 1,3 mg kg<sup>-1</sup>), jsou srovnatelné se zemědělskými půdami<sup>18</sup>, což ukazuje na nepatrný význam typicky městských zdrojů znečištění pro oba prvky.

#### 3.2. Cesium v lesních ekosystémech

Lesní půdy, včetně hospodářských lesů, jsou podstatně méně ovlivněny přímými zásahy člověka než půdy zemědělské. Proto jsou cenným zdrojem informací o přirozených procesech, které řídí i chování stopových prvků.

Minerální živiny i jim příbuzné stopové prvky tvoří do jisté míry uzavřený cyklus, jehož důležitou součástí je opad listí (jehličí) a vyluhování nadzemní biomasy srážkami (z hlavních živin významné hlavně v případě draslíku, pro něž jsou typické vysoké koncentrace v podkorunových srážkách).

Především pro hodnocení atmosférické depozice se prováděl biochemický monitoring složek smrkových lesů v ČR, a to na více než 250 lokalitách rozmístěných poměrně rovnoměrně po celém území (nicméně ve srovnání s listnatými lesy nebo zemědělskými půdami jsou více zastoupeny kyselé, a naopak méně bazické nebo vápňité podklady). V roce 2010 byl stanoven obsah 39–41 prvků v lesní půdě: nadložní humus – horizont Oh (často byl odebrán i pod borovicemi nebo jinými stromy), horizonty minerální půdy (B1 a B2), a v biomase: mech – převážně travník Schreberův (*Pleurozium schreberi*), tráva – převážně metlička křivolaká (*Avenella flexuosa*), jednoleté a dvouleté jehličí smrku (mech, který je nejspolehlivější bioindikátor znečištění, byl sledován opakovaně v letech 1991–2022). Pro 80 ploch jsou k dispozici také analýzy vody lesních potoků, které je odvodňují (provedené již v roce 1995). Tato data tvoří unikátní podklad pro hodnocení chování mnoha stopových prvků, včetně Cs. Publikována byla dosud pouze část výsledků, včetně statistik obsahů prvků ve svrchním minerálním horizontu (B1) a v nadložním humusu<sup>20</sup>.

Obsah Cs i většiny ostatních prvků v půdním horizontu B závisí především na jejich obsahu v horninovém podloží. V nadzemní biomase je vztah koncentrací většiny prvků ke geologickému podkladu velmi slabý, avšak právě v případě Cs a několika dalších stopových prvků (včetně Rb a Sr) poměrně výrazný<sup>21</sup>. Naopak Cs (a z alkálií rovněž Li) se vyznačuje velmi slabou korelací mezi obsahem v minerální půdě a humusu. V minerální složce horizontu Oh (tvůřící asi pětinu až čtvrtinu jeho hmotnosti) je totiž významný jemný prach, který může být přinesen i ze širo-

kého okolí (viz též cit.<sup>22</sup>). V organickém podílu dominuje opad jehličí, přičemž koncentrace Cs v mladých jehlicích sice má vztah k horninovému podloží, ale ve starých tato korelace patrně již není zachována. Naproti tomu Li vůbec vstupuje do biomasy velmi málo (podobně jako Na, jehož retence v půdách je obvykle velmi slabá a je odplavován v roztoku), takže se z podloží do humusu dostává v podstatě jen procesy bioturbace.

V humusu je koncentrace Cs relativně nejvyšší ze všech alkálií (tab. II). To lze vysvětlit kombinací několika faktorů. Cesium je uvolňováno z podložních hornin a je s biogenními prvky aktivně přenašeni přijímáno přes kořenové bariéry, čímž se odlišuje od mnoha nebiogenních prvků, které jsou málo rozpustné a mohou se hromadit ve zvětralinách (zvláště Al, Ti, Zr, prvky vzácných zemin, Th). Zároveň je však Cs z rostlinné biomasy intenzivně vylučováno. Koncentrace Cs se v jednotlivých živých jehlicích časem snižují ještě rychleji než koncentrace K (viz též tab. II; ještě více klesá koncentrace Rb). Zčásti jsou K, Rb i Cs ukládány (resorbovány) do dřevní biomasy, odkud jsou pak retranslokovány do rostoucích nejmladších jehlic, zčásti jsou vymývány dešťovou vodou. Zatím není dostatek dat pro zhodnocení, nakolik se liší vzájemné poměry K, Rb a Cs v podkorunových srážkách od biomasy: podle výsledků z různých lesů ve Francii (viz též tab. I) jsou poměry K/Cs v podkorunových srážkách vysoké. Také vysoký poměr K/Rb v tekoucích vodách bývá vysvětlován dominantním vlivem vyluhované biomasy na odtok těchto prvků ze zalesněných oblastí<sup>23</sup>, přičemž se uplatňuje i přednostní vyluhování K (oproti Rb a zřejmě i Cs) z opadu listí/jehličí. Naproti tomu nové výsledky z Krkonoš ukazují poměrně nízký poměr K/Rb ve srážkách pod korunami smrků, a také poměry Rb/Cs podstatně nižší než v biomase<sup>58</sup>.

Pozoruhodné jsou celkově srovnatelné poměry Cs/Tl v minerální půdě, humusu i mechu (tab. II); tyto hodnoty jsou blízké i průměrnému složení kontinentální kůry<sup>1</sup>

Tabulka II

Koncentrace Cs ( $\text{mg kg}^{-1}$  sušiny; v potocích v  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) a poměry K/Cs a Rb/Cs v různých složkách ekosystému v jehličnatých lesích ČR (viz též<sup>20</sup> pro koncentrace jednotlivých prvků v půdních horizontech B1 a Oh)

Rezervoár	Počet lokalit	Cs	K/Cs	Rb/Cs	Cs/Tl
Minerální půda B2	258	4,4	3 800	21,3	7,6
Minerální půda B1	258	4,4	3 600	20,9	7,8
Humus (Oh)	259	2,17	1 470	8,2	7,0
Mech	273	0,26	22 800	72	7,0
Tráva – A.f.	227	0,14	146 000	355	30,9
Tráva – F.r.	33	0,02	1 089 000	599	4,4
Jehlice roční	254	0,12	69 000	177	11,6
Jehlice dvouleté	254	0,067	82 000	123	1,9
Potoky	80	0,032	54 000	78,6	3,9

Druhy trav: A.f. – metlička křivolaká (*Avenella flexuosa*), F.r. – kostřava červená (*Festuca rubra*). Jehličí bylo analyzováno pouze ze smrku ztepilého.

(z horninového podloží v ČR je údajů o thaliu velmi málo). V trávě i ve smrkovém jehličí se však oba prvky chovají velmi rozdílně – příkladem je výrazná akumulace Tl ve starších jehlicích oproti mladším. To může souviset jak s toxicitou thalia, tak i s jeho možnou oxidací na trojmocné.

Koncentrace Rb a Cs ve smrkových jehlicích starých až 5 let byly zkoumány také ve Švýcarsku a jižním Německu<sup>24</sup>. Po rychlém poklesu v prvním roce se kolem pátého roku pravděpodobně již stabilizovaly.

Z listnatých lesů lze uvést jako příklad výzkumy ve Švédsku. V opadaném bukovém listí klesal poměr K/Rb a ještě více poměr Rb/Cs (cit.<sup>25</sup>). V průběhu sezóny rovněž klesá (po maximu dosaženém již v květnu) zásoba K, Rb i Cs v listí; tento trend pokračoval i v odumřelých listech, které na stromech zůstaly přes zimu<sup>22</sup>.

Významnou roli v oběhu Cs mají houby. Většina hub tvořících makroskopické plodnice se vyznačuje vysokou koncentrací K, který zpravidla doprovází zvýšené Rb a často i Cs. Obecně nejvíce přijímají Cs houby ektomykorhizní<sup>25</sup>, jejichž přítomnost zároveň zpravidla snižuje obsah Cs v rostlině, jejíž kořeny jsou obaleny pláštěm hyf<sup>26</sup>. Méně přijímají Cs houby saprofytické a nejméně parazitické<sup>25,27</sup>. Rozklad a vyluhování nadzemní biomasy (rostlin i hub) i metabolismus živočichů, kteří ji konzumují, jsou faktory přispívající k poměrně vysoké koncentraci Cs ve svrchních půdních horizontech.

### 3.3. Cesium v palivech a popelu

Obecně je málo dat o Cs v dřevní biomase. Ve dřevě japonských cedrů byly zjištěny koncentrace Cs zhruba od 2 do 40  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (cit.<sup>28</sup>). Při takto nízkých koncentracích bývá technicky jednodušší analýza popela. Ve skle reprezentujícím v podstatě přetavený popel (bottom ash) z topeniště výtopny spalující biomasu (převážně slámu, ale i piliny a zbytky dřeva) ve Žluticích byly zjištěny koncentrace Cs jen v desetinách  $\text{mg kg}^{-1}$  (cit.<sup>29</sup>). Otázkou je těkavost reaktivních sloučenin Cs (podobně jako K), vznikajících při spalování, za vyšších teplot. I když jsou známé technické problémy s kondenzáty sloučenin draslíku<sup>30</sup>, při reálných teplotách se uvolňuje spíše jen malý zlomek jeho množství v palivu, což lze předpokládat i u Cs (viz též cit.<sup>31</sup>). Podobně nízký obsah Cs (0,2–0,9  $\text{mg kg}^{-1}$ ) byl zjištěn v popelu ze dřeva listnatých stromů (lípa, dub, habr)<sup>59</sup>.

V uhlí je obsah alkálií všeobecně nízký, i když podle některých kompilací mohou být pozoruhodně frakcionované jejich poměry (např. nízké Rb/Cs v českém černém uhlí<sup>32</sup>, nebo globálně naopak v hnědém<sup>33</sup>). Cesium je převážně v jílových minerálech, a to i tam, kde je jeho obsah v uhlí zvýšený<sup>34</sup>. Nepatří mezi prvky významné z hlediska znečištění ovzduší, bez ohledu na způsob spalování, a koncentrace Cs v popílku je srovnatelná s „přirozeným“ polétavým prachem, který je naprosto převažujícím zdrojem Cs v atmosféře (protože může být transportován na velké vzdálenosti, jeho složení do značné míry reprezentuje průměrnou kontinentální kůru).

Určitý problém však mohou představovat požáry

nebo nevhodné způsoby spalování biomasy, případně i rašeliny kontaminované radioaktivním spadem, kdy může určitý podíl radioizotopů Cs uniknout v jemném aerosolu<sup>31,35</sup>.

Také v ropě jsou koncentrace Cs nízké na to, aby měly ekonomický, technologický nebo ekologický význam<sup>36</sup>, a publikovaných dat je proto málo. Mravenčanec je však klíčovou složkou těžkých tekutin používaných v průzkumu i těžbě ropy; v současnosti má největší podíl na průmyslovém využití Cs (cit.<sup>3</sup>).

Jako geochemickou zajímavost lze uvést poměrně vysokou koncentraci Cs ve vltavínech (moldavitech), tedy jedné ze skupin tektitů, přírodních skel vzniklých ze sedimentů přetavených za extrémně vysokých teplot při dopadech kosmických těles. Některé jejich chemické charakteristiky jsou vysvětlovány vlivem biomasy<sup>29</sup>, přičemž právě obsah Cs je jednou z indicií pravděpodobně významného vlivu humusu a snad i sladkovodních organických sedimentů<sup>37</sup>. Cesium se tedy v tomto případě vůbec nechovalo jako těkavý prvek.

## 4. Radioaktivní izotopy Cs

### 4.1. Původ hlavních radioizotopů Cs a jejich měření

Izotop <sup>137</sup>Cs je jedním z nejvýznamnějších štěpných produktů, které vznikají v použitém jaderném palivu i při jaderném výbuchu. Jeho poločas přeměny (30,17 roku) je příliš krátký na to, aby se jeho radioaktivita dala zanedbat, a příliš dlouhý na to, aby intenzita záření rychle poklesla. Na rozdíl od dalšího nebezpečného štěpného produktu – stroncia <sup>90</sup>Sr se srovnatelným poločasem přeměny (28,8 roku), které je nutné pro analýzu separovat, lze aktivitu <sup>137</sup>Cs snadno měřit spektrometrií gama, přičemž plošná aktivita v půdě (bez rozlišení jednotlivých vrstev) je běžně měřena i v terénu spolu s přírodními radionuklidy. Díky tomu je <sup>137</sup>Cs zmapováno snad nejlépe ze všech umělých radionuklidů. Další rozdíl mezi <sup>137</sup>Cs a <sup>90</sup>Sr spočívá v mnohem větší těkavosti Cs za vysokých teplot, díky níž se aktivita <sup>90</sup>Sr uvolněného do ovzduší blíží aktivitě <sup>137</sup>Cs pouze při nadzemních jaderných výbuších, avšak i při největších haváriích jaderných elektráren zůstala aktivita uniklého <sup>90</sup>Sr mnohem nižší než <sup>137</sup>Cs.

Pouze kratší dobu po kontaminaci je významný také izotop <sup>134</sup>Cs s poločasem přeměny 2,1 roku, který vzniká aktivací stabilního <sup>133</sup>Cs (rovněž hojného mezi štěpnými produkty) zachytem neutronu (této jaderné reakce se využívá i při stanovení stopových koncentrací cesia neutronovou aktivací analýzou). Zpočátku je <sup>134</sup>Cs dobře měřitelné alespoň laboratorní spektrometrií gama. Oba zmíněné radioizotopy Cs se mění na stabilní izotopy barya <sup>137</sup>Ba, resp. <sup>134</sup>Ba (přeměnou  $\beta^-$ , významné je i záření  $\gamma$ ). Ve štěpných produktech není zanedbatelný ani izotop <sup>136</sup>Cs, který však má velmi krátký poločas přeměny (13 dnů). Naopak další radioizotop <sup>135</sup>Cs má dlouhý poločas přeměny (2,3 mil. let) a jde o čistý zářič  $\beta^-$  (vzniká stabilní <sup>135</sup>Ba). Z hlediska radiační ochrany tedy není relevantní

jako kontaminant, ale jeho význam spočívá v možnosti upřesnění zdroje radionuklidů<sup>38</sup>, a to i u starších kontaminací, kde je <sup>134</sup>Cs již neměřitelné.

Pouze menší podíl izotopu <sup>137</sup>Cs a zanedbatelný podíl <sup>135</sup>Cs vznikají přímo štěpením uranu nebo plutonia<sup>39</sup>. Podstatný je jejich druhotný vznik z izobarů, z nichž významné jsou příslušné izotopy xenonu, jodu a telluru. Zatímco přeměna izobarů těchto prvků na <sup>137</sup>Cs proběhne během nanejvýš několika minut (nejdelší poločas přeměny z nich má <sup>137</sup>I, a to jen 24,5 s), tvorbu <sup>135</sup>Cs komplikuje delší životnost <sup>135</sup>I a <sup>135</sup>Xe (s poločasy přeměny zhruba 6,5 a 9 hodin), neboť <sup>135</sup>Xe má velmi vysoký účinný průřez pro zachycení neutronu<sup>39,40</sup>, kdy se mění na <sup>136</sup>Xe (který lze v praxi považovat za stabilní, i když ve skutečnosti je radioaktivní s extrémně dlouhým poločasem přeměny<sup>39</sup>). Navíc se mohou xenon i jod uvolňovat např. z poškozených palivových tyčí<sup>41</sup>.

Odlišnosti v původu izotopů <sup>134</sup>Cs, <sup>135</sup>Cs a <sup>137</sup>Cs se zákonitě projevují variabilitou jejich poměrů už v době vzniku kontaminace. Vliv má druh jaderného paliva a stupeň jeho vyhoření, neutronový tok v reaktoru aj.<sup>41</sup>. Ve zplodinách jaderného výbuchu, kde jsou štěpné produkty vystaveny neutronovému toku jen velmi krátce, je poměr <sup>135</sup>Cs/<sup>137</sup>Cs vysoký<sup>42</sup>, avšak blízko místa výbuchu je vzhledem k úniku většiny <sup>135</sup>Xe v plynné podobě naopak nízký<sup>42</sup>. V okolí elektrárny Fukušima-Daiči kombinace stanovení izotopů <sup>134</sup>Cs, <sup>135</sup>Cs a <sup>137</sup>Cs umožnila dokonce jisté posouzení podílu jednotlivých reaktorů ze tří havarovaných na kontaminaci biomasy z různých lokalit<sup>43</sup>. Autoři (cit.<sup>43</sup>) uvádějí pro vzorky odebrané krátce po havárii elektrárny molární poměr izotopů <sup>135</sup>Cs/<sup>137</sup>Cs 0,3808–0,3896 a poměr aktivit <sup>134</sup>Cs/<sup>137</sup>Cs v rozmezí 0,999–1,054 (přepočteno na 11. 3. 2011).

Stanovení obsahu <sup>135</sup>Cs, resp. jeho poměru k lépe měřitelným izotopům je velmi náročné, neboť pro radiometrické metody jde o velmi slabý zářič, a pro běžnou hmotnostní spektrometrii je podíl radioaktivních izotopů Cs v přírodních vzorcích příliš nízký (viz též<sup>44</sup>). Nutná je vždy důkladná chemická separace, po níž zpravidla následují speciální metody hmotnostní spektrometrie, nejčastěji ICP-MS s trojitým kvadrupólem (ICP-QQQ-MS) (cit.<sup>42,44</sup>), lze použít i neutronovou aktivační analýzu<sup>40</sup>.

#### 4.2. Izotopy <sup>137</sup>Cs a <sup>134</sup>Cs v ekosystémech a potravinách

Ve většině světa pochází dosud převažující podíl kontaminace radioaktivním spadem z pokusných jaderných výbuchů s maximem v roce 1963. Východní, severní a střední Evropu navíc silně zasáhla havárie černobylské jaderné elektrárny v roce 1986. Proto se naprostá většina novějších výzkumů znečištění radiocesiumem odehrála právě v těchto oblastech; od roku 2011 je zkoumána nová kontaminace radionuklidů také v Japonsku<sup>43</sup>.

Díky tomu, že v roce 1986 již téměř nezbylo žádné <sup>134</sup>Cs z jaderných zkoušek, mohla být na základě poměrů <sup>134</sup>Cs/<sup>137</sup>Cs sledována rychlost pronikání radiocesia do půdy<sup>27</sup>, podobně jako později v Japonsku<sup>45</sup> (v Evropě je

dnes <sup>134</sup>Cs opět prakticky vymřelé).

Migrace <sup>137</sup>Cs byla zkoumána také v českých jehličnatých lesích (převážně na plochách používaných v biomonitoringu – viz kap. 3.2). I v tomto případě se potvrdil pozoruhodný fakt, že faktory zvyšující rozpustnost Cs (kyselost, vysoký obsah půdní organické hmoty, srážky) nesnižují, ale naopak zvyšují dobu jeho setrvání v ekosystému<sup>46</sup>. To lze vysvětlit intenzivnějším koloběhem Cs mezi složkami půdy a nadzemní i podzemní biomasou. Pravděpodobně nejpomaleji proniká Cs do hloubky humusovým horizontem, v němž byla na třech blíže zkoumaných lokalitách vertikální migrace vyčíslena na 0,4–0,6 mm/rok (cit.<sup>47</sup>). Rychlejší migrace Cs do hloubky je však běžná v rašelinných půdách a rašelinách<sup>48</sup>. Podle měření v běloruském borovém lese silně zasaženém černobylským spadem se v roce 1998 již chování radioaktivního a stabilního cesia v ekosystému nijak nelišilo, což svědčí o homogenizaci zásoby Cs za 12 let nebo méně<sup>49</sup>.

Velký význam pro šíření radiocesia potravním řetězcem mají houby. Podobně jako stabilní cesium, také radioaktivní přijímají nejvíce houby mykorrhizní<sup>27</sup>. Značné množství dat existuje hlavně pro hřib hnědý (*Xerocomus badius*), který se konzumuje téměř v celé Evropě, a zároveň jsou jeho koncentrace <sup>137</sup>Cs výrazně nadprůměrné. V prvních letech po černobylské havárii aktivita <sup>137</sup>Cs v sušině plodnic jedlých hub běžně dosahovala desítek kBq kg<sup>-1</sup> v celé střední Evropě (cit.<sup>50</sup> a odkazy tamtéž). Efektivní dávka jen ze <sup>137</sup>Cs tak často výrazně překonala efektivní dávku ze <sup>40</sup>K a zpravidla i ze všech ostatních radionuklidů v houbách dohromady. Při ingestci 1 kg sušených hub s koncentrací <sup>137</sup>Cs 1000 Bq kg<sup>-1</sup> obdrží jedinec velmi malý úvazek efektivní dávky (z cesia): 13 μSv. Ingestci Cs lze značně snížit pouhým uvařením nebo jen předvařením hub a odstraněním vývaru, přitom však může dojít i k ochuzení o žádoucí látku (cit.<sup>51</sup> a odkazy tamtéž).

V Polsku byla dlouhodobě zkoumána oblast se značně vysokým spadem <sup>137</sup>Cs v roce 1986 blízko Opole (cit.<sup>27</sup> a odkazy tamtéž). Aktivity <sup>137</sup>Cs v sušině hřibu hnědého v prvních letech běžně přesahovaly i 100 kBq kg<sup>-1</sup>. Ukázalo se, že některé druhy hub (včetně hřibu smrkového), jejichž podhoubí patrně zasahuje do větší hloubky než podhoubí hřibu hnědého, měly nejvyšší aktivitu <sup>137</sup>Cs mnohem později. Běžná konzumace hub i tak tvoří jen malý příspěvek k celkové efektivní dávce obyvatel (ze všech přírodních i umělých zdrojů ionizujícího záření), individuální hodnoty se však mohou od průměrných značně lišit.

V oblasti „horké skvrny“ u Opole byla též porovnána aktivita <sup>137</sup>Cs mnoha druhů hub, včetně nejedlých a jedovatých, ve stejném porostu (jen v roce 2007 bylo analyzováno 63 druhů). Vysokou aktivitou se vyznačovaly ryze vodomlččný, klouzek sličný, čechratka podvinutá, holubinka hořká, lakovka ametystová, hřib hnědý, ale srovnatelně i smrkový, ze saprotrofních druhů šafránka červenožlutá; nízkou aktivitou např. bedly, penízovky, pýchavky a houby vyrůstající ze dřeva<sup>27</sup>. Řada druhů s vysokou aktivitou <sup>137</sup>Cs má také obvykle zvýšený obsah stabilního cesia<sup>52</sup>, např. lišák zprohýbaný<sup>25,51</sup>, totéž platí i naopak.

Jsou však výjimky, jako lakovka ametystová<sup>50,53,54</sup>, která zřejmě silně přijímá (nebo v prvních letech po kontaminaci přijímala) <sup>137</sup>Cs spíše díky mělkému podhoubí.

V okolí JE Temelín probíhá dlouhodobé sledování <sup>137</sup>Cs v jedlých houbách a borůvkách. Navíc bylo jednorázově stanoveno na 29 plochách v širším okolí elektrárny <sup>137</sup>Cs v humusu, mechu a kůře borovic, a na 15 těchto plochách také v houbách<sup>55</sup>. Ze tří druhů biomasy pouze kůra vykazuje významnou korelaci aktivity <sup>137</sup>Cs s aktivitou v humusu, výrazná je však korelace mezi aktivitou v mechu a v houbách (slabší jsou korelace „kůra-houby“ a „kůra-mech“). Veškerý obsah <sup>137</sup>Cs lze vysvětlit černobylyským a starším spadem. Proto postupně klesá, a to s efektivním poločasem přeměny obvykle mezi 6 a 9 lety.

Obvykle méně významné je <sup>137</sup>Cs v rostlinné potravě, kromě období krátce po kontaminaci, kdy se značné množství radiocesia zachytilo přímo v nadzemních částech rostlin<sup>17,56</sup>. Díky konzumaci hub může být vysoká aktivita <sup>137</sup>Cs také ve zvěřině, především mase divokých prasat<sup>51</sup>. V severských zemích byl v prvních letech po černobylyské havárii často vysoký obsah <sup>137</sup>Cs také v mase sobů, pro něž jsou významným zdrojem potravy lišejníky<sup>56</sup> (které mají díky dlouhotrvajícímu příjmu látek z atmosférické depozice často zvýšené koncentrace mnoha stopových prvků i přírodních radionuklidů).

Pozornost byla věnována i <sup>137</sup>Cs v mléku. Po černobylyské havárii zpravidla klesly aktivity <sup>137</sup>Cs velmi rychle již v prvních letech. To souvisí patrně s rychlou imobilizací Cs v půdě jílovými minerály; tento efekt však byl podstatně slabší na kyselých písčitých půdách, jak vyplývá např. ze srovnání mléka z různých oblastí v Německu<sup>57</sup>.

V akvatických ekosystémech je <sup>137</sup>Cs významnější spíše ve sladkovodním prostředí; vysoké koncentrace byly doloženy ve vodních rostlinách (ale i v hydroponicky pěstovaných suchozemských), a Cs se může dále koncentrovat směrem k vyšším trofickým úrovním<sup>17,49</sup>, což má příčinu mj. v pomalém vylučování Cs z těl ryb<sup>56</sup>.

*Tato práce byla podpořena v rámci projektu CAAS (Centrum pokročilých aplikovaných přírodních věd) reg. č.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000778 Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR.*

## LITERATURA

- Wedepohl K. H.: *Geochim. Cosmochim. Acta* 59, 1217 (1995).
- McDonough W. F., Sun S.: *Chem. Geol.* 120, 223 (1995).
- Vidal R., Alberola-Borrás J.-A., Mora-Seró I.: *Resources Policy* 68, 101792 (2020).
- Breiter K., Hložková M., Korbelová Z., Vašinová Galiová M.: *Ore Geol. Rev.* 106, 12–27 (2019).
- Faltus M., Hong Vu N.: patent CZ 306932 (2017, B6).
- Sawhney B. L.: *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 30, 565 (1966).
- Middelburg J. J., van der Weijden C. H., Woittiez J. R. W.: *Chem. Geol.* 68, 253 (1988).
- Zhang J.F., Yang L.R., Dong T.T., Pan F., Xing H.F., Liu H.Z.: *Ind. Eng. Chem. Res.* 57, 4399 (2018).
- Roulier M., Bueno M., Coppin F., Nicolas M., Thiry Y., Rigal F., Le Hécho I., Pannier F.: *Chemosphere* 273, 128971 (2021).
- Roulier M., Bueno M., Coppin F., Nicolas M., Thiry Y., Rigal F., Pannier F., Le Hécho I.: *Chemosphere* 273, 128952 (2021).
- Veselý J., Majer V., Kučera J., Havránek V.: *Appl. Geochem.* 16, 437 (2001).
- Gaillardet J., Viers J., Dupré B.: *Treatise on Geochemistry* 5, 225 (2003).
- Viers J., Dupré B., Gaillardet J.: *Sci. Total Environ.* 407, 853 (2009).
- James R., Wright J. *Marine biogeochemical cycles*. Open University, Milton Keynes, Velká Británie (2005).
- Nyholm N. E. I., Tyler G.: *Forest Ecol. Mng.* 134, 89 (2000).
- Menzel R. G., Heald W. R.: *Soil Sci.* 80, 287 (1955).
- Burger A., Lichtscheidl I.: *Sci. Total Environ.* 618, 1459 (2018).
- Négre P., Ladenberger A., Reimann C., Birke M., Sadeghi M.: *Chem. Geol.* 479, 188 (2018).
- Poňavič M., Wittlingerová Z., Čoupek P., Buda J.: *J. Geochem. Explor.* 87, 118 (2018).
- Sucharová J., Suchara I., Holá M., Maříková Š., Reimann C., Boyd R., Filzmoser P., Englmaier P.: *Appl. Geochem.* 27, 138 (2012).
- Procházka V., Suchara I., Sucharová J., Holá M.: *Zpr. Geol. Výzk.* 52, 117 (2019).
- Tyler G., Olsson T.: *Chemosphere* 65, 250–260 (2006).
- Peltola P., Brun C., Åström M., Tomilina O.: *Chem. Geol.* 257, 92 (2008).
- Tobler L., Bucher J., Furrer V., Schlegli P., Wyttenbach A.: *Biol. Trace Elem. Res.* 43, 195 (1994).
- Tyler G.: *Forest Ecol. Mng.* 206, 167 (2005).
- Brunner I., Frey B., Riesen T.: *Tree Physiol.* 16, 705 (1996).
- Mietelski J. W., Dubchak S., Błażej S., Anielska T., Turnau K.: *J. Environ. Radioact.* 101, 706 (2010).
- Nagakura J., Abe H., Zhang Ch., Takano Ts., Takahashi M.: *Jpn. J. For. Environ.* 58, 51 (2016).
- Mizera J., Řanda Z.: *Geol. Soc. Am. Spec. Pap.* 553, 12 s. (2021).
- Voláková P.: *Problematika spalování biomasy – tvorba strusky a skelných nápeků z biomasového na alkálie bohatého popela. Disertační práce*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2008.
- Jantunen M. J., Reponen A., Mustonen R., Itkonen A., Kaurane P.: *Health Phys.* 62, 245 (1992).
- Pešek J., Sýkorová I., Jelínek E., Michna O., Forstová J., Martínek K., Vašíček M., Havelcová M.: *Práce Č. Geol. Služby* 20, 1 (2010).
- Ketris M. P., Yudovich Ya. E.: *Int. J. Coal Geol.* 78,



- 135 (2009).
34. Zhao C., Liu B., Ma J., Liu S., Blokhin M. G.: *Energy Explor. Exploit.* **35**, 376 (2017).
  35. Martinsson J., Pedehontaa-Hiaa G., Malmborg V., Madsen D., Raaf C.: *Sci. Total Environ.* **20**, 148310 (2021).
  36. Ivanov K. S., Erokhin Y. V., Kudryavtsev D. A.: *Energies* **15**, 48 (2021).
  37. Procházka V., Mizera J., Suchara I., Sucharová J., Hraníček J. (2023): *54<sup>th</sup> Lunar and Planetary Science Conference, Woodlands, USA* (Lunar and Planetary Institute), Abstract No. 1973.
  38. Taylor V. F., Evans R. D., Cornett R. J.: *J. Environ. Radioact.* **99**, 109 (2008).
  39. IAEA: <https://www-nds.iaea.org/relnsd/vcharthtml/VChartHTML.html>, staženo 29. 5. 2023.
  40. Chao J. H., Tseng C. L.: *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A* **372**, 275 (1996).
  41. Delmore J. E., Snyder D. C., Tranter T., Mann N. R.: *J. Environ. Radioact.* **102**, 1008 (2011).
  42. Zok D. et al. (15 spoluautorů): *Environ. Sci. Technol.* **55**, 4984 (2021).
  43. Shibahara Y., Kubota T., Fujii T., Fukutani S., Ohta T., Takamiya K., Okumura R., Mizuno S., Yamana H.: *J. Nucl. Sci. Technol.* **51**, 575 (2014).
  44. Matulová M., Bujdoš M.: *Chem. Listy* **114**, 753 (2020).
  45. Kato H., Onda Y., Teramage M.: *J. Environ. Radioact.* **111**, 59 (2012).
  46. Škrkal J., Pilátová H., Rulík P., Suchara I., Sucharová J., Holá M.: *Sci. Total Environ.* **593-594**, 155 (2017).
  47. Takahashi S., Suchara I., Okamoto K., Sucharová J., Umegaki K., Fujiyoshi R.: *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **311**, 929 (2017).
  48. Oldfield F., Appleby P. G., Cambray R. S., Eakins J. D., Barber V. E., Battarbee R. W., Pearson G. R., Williams J. M.: *Oikos* **33**, 40 (1979).
  49. Yoshida S., Muramatsu Y., Dvornik A. M., Zhuchenko T. A., Linkov I.: *J. Environ. Radioact.* **75**, 301 (2004).
  50. Kalač P.: *Food Chemistry* **75**, 29 (2001).
  51. Kalač P., v knize: *Mushrooms: types, properties and nutrition* (S. Andres, N. Baumann, ed.), str. 215. Nova Science Publishers, New York (2012).
  52. Karadeniz Ö., Yaprak G.: *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **285**, 611 (2010).
  53. Falandysz J., Szymczyk K., Ichihashi H., Bielawski L., Gucia M., Frankowska A., Yamasaki S. J.: *Food Addit. Contam.* **18**, 503 (2001).
  54. Horyna J., Řanda Z.: *Nucl. Chem. Lett.* **127**, 107 (1988).
  55. Thinová L., Frontasyeva M., Vergel K., Bayushkina E.: *Radiat. Phys. Chem.* **104**, 432 (2014).
  56. Avery S. V.: *J. Environ. Radioact.* **30**, 139 (1996).
  57. Wiechen A.: *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* **43**, 179 (1991).
  58. Procházka V. a spol.: Nепublikovaná data.
  59. Mizera J., Řanda Z.: Nепublikovaná data.
  60. Suchara I. a spol.: Nепublikovaná data.
- V. Procházka<sup>a</sup>, I. Suchara<sup>b</sup>, L. Thinová<sup>a</sup>, J. Mizera<sup>c</sup>, J. Sucharová<sup>b</sup>, and J. Hraníček<sup>d</sup>** (<sup>a</sup> *Czech Technical University in Prague*, <sup>b</sup> *Silva Tarouca Research Institute, Průhonice*, <sup>c</sup> *Czech Academy of Sciences, Nuclear Physics Institute, Řež*, <sup>d</sup> *Charles University, Prague, Czech Republic*): **Stable and Radioactive Cesium in Natural Environment**
- Cesium is the heaviest stable alkali metal (with only one stable isotope – <sup>133</sup>Cs) and it occurs mainly as a potassium-substituting cation. It is an important trace element in rocks typical for the Earth crust, and its content in biomass is also relatively high compared to those abiogenic elements which are little soluble. Low-cost analytical methods like X-Ray Fluorescence are inadequate to quantify cesium in typical natural samples, so that the usage of ICP-MS (Inductively-Coupled-Plasma Mass Spectrometry) or INAA (Instrumental Neutron Activation Analysis) is necessary. Nevertheless, investigation of the pollution with the radioactive isotope <sup>137</sup>Cs, which is an important fission product and can be measured with gamma-ray spectrometry, also contributed to the knowledge of biogeochemistry of cesium. It has been shown that Cs is usually strongly retained in humus (thank to clay minerals), or is cycling intensely within the soil-biomass system, being only slowly removed (at least, this is valid for ecosystems in temperate climate). The results of extensive biomonitoring in Czech coniferous forests (with prevailing spruce) also show that Cs is concentrated in humus (relatively to all other alkali elements) by natural processes.
- Keywords: cesium, rubidium, potassium, forest ecosystem, radiocesium
- Acknowledgments*  
The work was supported by the funding of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, namely the CAAS project CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000778.

## L-ASPARAGINASY A JEJICH POTENCIÁL V MEDICÍNĚ A POTRAVINÁŘSTVÍ

LUCIE PEJŠKOVÁ, KAROLÍNA LOUŽECKÁ, TOMÁŠ PODZIMEK a EVA BENEŠOVÁ

Ústav biochemie a mikrobiologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika  
eva.benesova@vscht.cz

Došlo 17.4.23, přijato 26.6.23.

L-Asparaginasa (EC 3.5.1.1) je klíčovým enzymem, který hydrolyzuje L-asparagin na L-asparagovou kyselinu a amoniak. Těto vlastnosti L-asparaginasy je využíváno v protinádorové terapii k inhibici syntézy proteinů v rakoviných buňkách. L-Asparaginasa je díky tomu základem pro chemoterapii využívanou k léčbě pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií v pediatrii. Komerční L-asparaginasy jsou pro aplikace ve zdravotnictví získávány především z *Escherichia coli* a *Erwinia chrysanthemi* (přejmenována na *Dickeya dadantii*). Nicméně, vysoká míra nežádoucích účinků komplikuje dlouhodobé klinické použití L-asparaginasy, a proto se současný výzkum zaměřuje na hledání enzymů nových či na modifikaci vlastností enzymů již známých. Zároveň se L-asparaginasa v posledních letech stala nepostradatelnou pro potravinářský průmysl, ve kterém je uznávána jako jeden z možných prostředků pro odstraňování L-asparaginu z potravin, u kterých hrozí vznik akrylamidu během tepelného zpracování. Tento článek poskytuje přehled informací o současném využití L-asparaginas a jejich úskalích.

Klíčová slova: L-asparaginasa, akutní lymfoblastická leukémie, akrylamid, biosenzor, biologická protinádorová léčba

### Obsah

1. Úvod
2. Využití L-asparaginas v medicíně
  - 2.1. Léčba onkologických onemocnění
  - 2.2. Vedlejší účinky
  - 2.3. Další aplikace v medicíně
3. Využití L-asparaginas v potravinářství
4. Metody stanovení aktivity L-asparaginas
5. Závěr

### 1. Úvod

L-Asparaginasy (EC 3.5.1.1) (L-ASNasy) jsou enzymy řadící se mezi amidohydrolasy. Jejich hlavní funkcí je hydrolyza L-asparaginu za vzniku L-asparagové kyseliny a amoniaku (schéma 1). Přítomnost L-ASNasy byla potvrzena u mnoha mikroorganismů, rostlin i živočichů. Na základě aminokyselinové sekvence, biochemických vlastností a struktury jsou L-ASNasy děleny do tří rodin: bakteriální (typ I a typ II), rostlinné (typ III) a rhizobiální<sup>1</sup>, nicméně toto dělení již neodpovídá všem současným poznatkům a lze předpokládat, že v budoucnu vznikne nomenklatura nová<sup>2</sup>.

Právě díky schopnosti štěpit L-asparagin nacházejí L-ASNasy široké uplatnění jak při léčbě onkologických onemocnění, tak i v potravinářském průmyslu jako čidlo zabráňující vzniku akrylamidu. V poslední době je stále

větší pozornost věnována i jejich využití v biosenzorech<sup>3</sup> a testována je i možnost jejich aplikace při léčbě infekčních onemocnění<sup>4</sup>.

### 2. Využití L-asparaginas v medicíně

Dosud největší uplatnění našla L-ASNasa v medicíně, a to při léčbě dětské akutní lymfoblastické leukémie (ALL) a dalších hematologických malignit<sup>5</sup>. V posledních letech se však objevují informace naznačující potenciál těchto enzymů i v dalších oblastech medicíny, a to konkrétně při léčbě některých autoimunitních<sup>6</sup> a infekčních onemocnění<sup>7,8</sup>.

#### 2.1. Léčba onkologických onemocnění

L-ASNasa se používá v kombinaci s jinými léky především k léčbě různých lymfoproliferativních poruch,

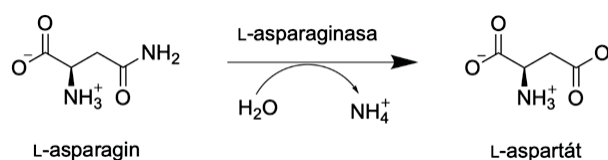


Schéma 1. L-Asparaginasa katalyzuje chemickou přeměnu L-asparaginu na L-asparagovou kyselinu a amoniak

především ALL. ALL je jednou z malignit, během kterých dochází k nadměrné produkci nezralých leukocytů, což má za následek potlačení vývoje ostatních krevních buněk a také šíření a ukládání těchto nádorových buněk do dalších orgánů, jako jsou játra, slezina a lymfatické uzliny<sup>5</sup>. Kromě terapie ALL je L-ASNasa využívána k léčbě Non-Hodgkinova lymfomu<sup>9</sup>, Hodgkinovy choroby<sup>10</sup>, chronické lymfocytární leukémie<sup>9</sup>, lymfosarkomu<sup>10</sup>, akutní myeloidní leukémie<sup>10</sup> a akutní myelomonocytické leukémie<sup>9</sup>. Její účinnost byla zaznamenána i při léčbě solidních tumorů, jako je karcinom pankreatu<sup>11</sup>, prostaty<sup>11</sup>, sarkom retikula<sup>10</sup>, plicní adenokarcinom<sup>9</sup>, melanosarkom<sup>9</sup>, rakovina vaječníků<sup>11</sup> a některých nádorů mozku<sup>9,11</sup>. Pro úplnost je možné doplnit, že tento enzym našel uplatnění i ve veterinární praxi, například při léčbě skotu s bovinní vřovou leukosou<sup>12</sup>. Během těchto terapií L-ASNasou je využito skutečnosti, že L-asparagin patří k proteinogenním aminokyselinám, nezbytným pro biosyntézu proteinů a další buněčné procesy. Přestože se jedná o neesenciální aminokyselinu a v lidském organismu je tato aminokyselina přímo syntetizována, mnoho typů leukemických nezralých buněk je citlivých na nízkou hladinu L-asparaginu ve vnějším prostředí<sup>13,14</sup>. Důvodem je skutečnost, že neoplastické buňky, na rozdíl od zdravých buněk, mají nízkou produkci enzymu L-asparaginsynthetasy a postrádají tak schopnost syntetizovat L-asparagin v dostatečném množství na pokrytí potřeb rychlého růstu a nekontrolované proliferace a nedokáží dostatečně rychle reagovat na L-asparaginovou deprivaci<sup>15,16</sup>. Je uváděno, že v krvi je nejběžněji udržována hladina L-asparaginu v rozmezí 40–80  $\mu\text{mol l}^{-1}$  (cit.<sup>17</sup>), může se však pohybovat od jednotek ke stovkám  $\mu\text{mol l}^{-1}$  u zdravých jedinců. U pacientů s ALL neléčených L-ASNasou naopak hladina L-asparaginu stoupá k jednotkám až stovkám  $\text{mmol l}^{-1}$  (cit.<sup>18,19</sup>). Účinkem vhodných L-ASNas může dojít ke snížení koncentrace L-asparaginu v krvi až na méně než 0,1–3  $\mu\text{mol l}^{-1}$  (cit.<sup>17,20</sup>), což vede k nutriční deprivaci, zastavení proteosyntézy a proliferace a následně k apoptóze leukemických buněk<sup>21</sup>.

Syntéza L-asparaginu *de novo* ve zdravých buňkách začíná pomocí enzymové transaminace (schéma 2). Prekurzorem biosyntézy L-asparaginu je oxalacetát, který v přítomnosti transaminasy reaguje s L-glutamátem za vzniku L-aspartátu a 2-oxoglutarátu. L-Aspartát poté reaguje s L-glutaminem za vzniku L-asparaginu v ATP-dependentní reakci, která je katalyzována L-asparaginsynthetasou<sup>22</sup>. Z výše uvedených informací vyplývá, že dostatečná aktivita L-asparaginsynthetasy také souvisí

s dostatečným zdrojem ATP (cit.<sup>14,23</sup>). V této souvislosti je nutné vyzdvihnout selektivní působení L-ASNasy na nádorové buňky oproti neselektivnímu působení jiných terapeutik<sup>20</sup>.

Z hlediska využití v lékařství jsou v současné době nejdůležitější bakteriální L-ASNasy typu II, které se typicky vyznačují vysokou afinitou k L-asparaginu a relativně nízkou afinitou k L-glutaminu<sup>2</sup>. Ačkoli jsou tyto enzymy v léčbě nádorových onemocnění využívány již přes 40 let, dostupné jsou na farmaceutickém trhu preparáty obsahující L-ASNasy pouze ze dvou bakteriálních zdrojů, konkrétně se jedná o preparáty obsahující nativní L-ASNasu z *Escherichia coli* (nativní a pegylovaná forma) a z *Erwinia chrysanthemi* (dále zmiňovaná v tomto článku jako *Dickeya dadantii*, přejmenována v roce 2005 laboratoří Laboratory of Genetic Evolution at the University of Wisconsin<sup>24</sup>). Vzhledem k bakteriálnímu původu těchto enzymů je jejich využití spojeno s řadou nežádoucích účinků, jak bude popsáno v následující kapitole.

Jednou z rozhodujících charakteristik pro možnost efektivního využití L-ASNas v léčbě ALL je afinita k substrátu. Zjednodušeně lze tedy říct, že je nutné, aby se hodnota jejich Michaelisovy konstanty ( $K_M$ ) reakce využívající L-asparagin jako substrát pohybovala v řádech  $\mu\text{mol l}^{-1}$  (viz koncentrace L-asparaginu v krvi). To splňují oba výše zmiňované enzymy, konkrétně byla hodnota  $K_M$  pro L-ASNasu z *E. coli* stanovena na 15  $\mu\text{mol l}^{-1}$  (cit.<sup>25</sup>), u enzymu z *D. dadantii* pak na 58  $\mu\text{mol l}^{-1}$  (cit.<sup>26</sup>).

Pro objev antineoplastických účinků L-ASNasy byl důležitý rok 1922 (cit.<sup>27</sup>), ve kterém byla zjištěna přítomnost L-ASNasy v morčecím séru. Tato L-ASNasa byla poprvé úspěšně testována v roce 1966 u dětí trpících ALL (cit.<sup>28</sup>). Prvním lékem na léčbu ALL schváleným americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) byl v roce 1978 Elspar<sup>®</sup>, který obsahoval nativní L-ASNasu, izolovanou z *E. coli*<sup>29,30</sup>. Dnes je však již nedostupný, neboť byl stažen z trhu v souvislosti s problémy s výrobou a novými přísnějšími podmínkami schvalování léčiv<sup>31</sup>. V roce 1985 bylo schváleno léčivo s nativní L-ASNasou z *D. dadantii* (Erwinase<sup>®</sup>)<sup>32</sup> a v roce 1994 bylo schváleno léčivo Oncaspar<sup>®</sup> obsahující L-ASNasu konjugovanou s polyethylenglykolem (PEG) (tzv. pegylovaná L-ASNasa). Tím bylo dosaženo nižší imunogenity tohoto enzymu a zároveň delšího biologického poločasu<sup>33–36</sup>. Přehled dalších preparátů, se kterými je dnes možné se setkat na světovém trhu, je uveden v tabulce I.

V současné době je léčba ALL velmi komplexním procesem, který zahrnuje, v rámci chemoterapie, 6 a více

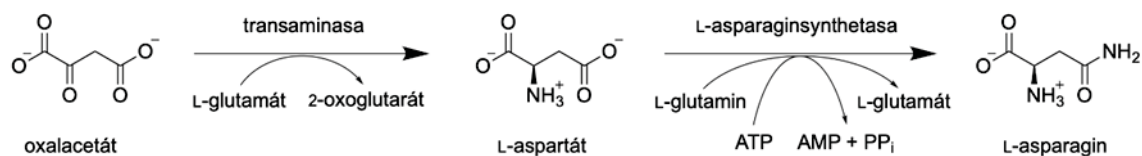


Schéma 2. Schéma mechanismu *de novo* syntézy L-asparaginu

Tabulka I  
Přehled komerčních léčiv obsahujících L-asparinasu

Původ enzymu	Obchodní název preparátu (forma)	Schválení rok, instituce, region	Poznámka
<i>Escherichia coli</i>	Elspar <sup>®</sup> (cit. <sup>30</sup> ) (nativní)	1978, FDA, USA	V roce 2012 ukončena výroba
	Kidrolase <sup>®</sup> (cit. <sup>77</sup> ) (nativní)	1974, Francie	Generická forma přípravku Elspar <sup>®</sup>
	Oncaspar <sup>®</sup> (cit. <sup>35</sup> ) (pegylovaná)	1994, FDA, USA 2016, EMA, Evropa <sup>a</sup>	Od 2006 doporučena FDA k užívání v první linii
	Leunase <sup>®</sup> (cit. <sup>78</sup> ) (nativní)	1971, PMDA (od roku 2004), Japonsko	Generická forma přípravku Elspar <sup>®</sup> , od roku 2013 produkovaná v upraveném kmeni <i>E. coli</i> <sup>79</sup>
	Spectrila <sup>®</sup> (cit. <sup>80</sup> ) (nativní, rekombinantní)	2015, EMA, Evropa <sup>a</sup>	
	Asparlas <sup>®</sup> (cit. <sup>81</sup> ) (pegylovaná)	2018, FDA, USA	
<i>Dickeya dadantii</i>	Erwinase <sup>®</sup> (cit. <sup>82,83</sup> ) (nativní)	1985, MHRA, UK 2011, FDA, USA	Pro pacienty vykazující hypersenzitivitu na L-ASNasu z <i>E. coli</i>
	Rylaze <sup>®</sup> (cit. <sup>84</sup> ) (nativní, rekombinantní)	2021, FDA, USA	Produkována v <i>Pseudomonas fluorescens</i>

<sup>a</sup> Pro zjednodušení je v tabulce použit jako region pro Evropskou agenturu pro léčivé přípravky (EMA) Evropa, ovšem EMA má ve skutečnosti platnost pro státy Evropské unie a jmenovitě Island, Lichtenštejnsko a Norsko

léčivých přípravků<sup>37</sup>. Terapie zahrnuje aplikaci L-ASNasy z *E. coli* či *D. dadantii*<sup>38</sup> v kombinaci s jinými léky, jako je vinkristin nebo dexamethason (v závislosti na fázi léčby)<sup>39</sup>, a v kombinaci s radioterapií<sup>40</sup>.

## 2.2. Vedlejší účinky

Léčba pomocí L-ASNasy může vést k mnoha závažným vedlejším účinkům. Závažnost vedlejších účinků se může u jednotlivých pacientů výrazně lišit a závisí mimo jiné i na tom, jestli je simultánně podstupována léčba i jinými léky či radioterapií. Mezi nejběžnější vedlejší účinky je zahrnována alergická reakce, nevolnost, horečka a toxicita pro centrální nervový systém<sup>38,41</sup>.

Řada těchto nežádoucích účinků je připisována skutečnosti, že jsou tyto enzymy schopné kromě L-asparaginu využívat jako substrát i L-glutamin<sup>1,42</sup>. L-Glutamin je majoritním transportním zdrojem amoniaku pro mnoho biosyntetických reakcí, a tak dlouhodobý pokles hladiny L-glutaminu v plasmě narušuje biochemické funkce, zejména jater<sup>25</sup>. Tyto vedlejší účinky často znemožňují dokončení celého léčebného procesu vedoucího k remisi<sup>43</sup>. Vystává však otázka, zda by terapeutický index (poměr dávky léčiva vyvolávající toxicitu ku dávce léčiva vyvolávající léčebný efekt) L-ASNasy mohl být zvýšen snížením či úplným odstraněním L-glutaminasové aktivity použitého enzymu, nebo zda by se tím úměrně také snížil protirako-

vinný účinek. V odborné literatuře je totiž možné vysledovat i teorie, které naopak hovoří o podporujícím terapeutickém účinku L-glutaminasové aktivity, neboť při působení L-asparaginsynthetasy je L-glutamin nezbytným donorem aminoskupiny pro syntézu L-asparaginu<sup>22</sup>. Chan W. K. a spol.<sup>43</sup> formulovali ve své publikaci teorii, podle které některé rakovinné buňky jsou citlivé na absenci L-asparaginu kvůli nepřítomnosti L-asparaginsynthetasy, tudíž L-glutaminasová aktivita nepodporuje antineoplastický účinek a je vhodné použít L-ASNasu s co nejnižší L-glutaminasovou aktivitou. Pokud se však jedná o typ nádoru, u kterého buňky aktivní L-asparaginsynthetasy mají, ale jsou citlivé na nepřítomnost L-asparaginu, L-glutaminasová aktivita antineoplastický účinek L-ASNasy podpoří<sup>43</sup>.

Pro úplnost je nutné dodat, že enzymy využívané v současné praxi vykazují kromě L-asparaginasové aktivity též aktivitu L-glutaminasovou (hodnota  $K_M$  L-ASNasy z *E. coli* pro reakci využívající L-glutamin jako substrát je  $3,7 \text{ mmol l}^{-1}$ , L-ASNasy z *D. dadantii*  $10,3 \text{ mmol l}^{-1}$  (cit.<sup>44</sup>)). Koncentrace L-glutaminu v krvi je přibližně  $0,5\text{--}0,8 \text{ mmol l}^{-1}$  (cit.<sup>45</sup>). Nicméně, pro jasný závěr o přítomnosti L-glutaminasové aktivity v léčivech je bezpochyby nezbytný další výzkum.

Dalším hojně diskutovaným problémem použití výše zmiňovaných L-ASNas v medicíně je jejich cizorodý původ. Všechna léčiva na trhu obsahují L-ASNasu pocházející z bakteriálních zdrojů, a proto mohou v lidském orga-

nismu vyvolat nežádoucí reakci imunitního systému, vedoucí k nemožnosti užívat L-ASNasu dlouhodobě či v některých případech dokonce dokončit zahájenou léčbu. Jednou z již dříve zmíněných možností snížení imunogenity nativní L-ASNasy je zastínění její struktury pro imunitní systém připojením molekul PEG, které snižují schopnost rozpoznání enzymu makrofágy a navíc vedou ke zpomalení degradace podaného enzymu<sup>44,46</sup>. Reakce protilátek s antigenními strukturami proteinu nemusí vyvolat jen přehnanou reakci imunitního systému, nýbrž pouze protein tiše deaktivovat, čímž se stává léčba pomocí L-ASNasy neúčinnou a vzniká tak rezistence vůči dané L-ASNase (cit.<sup>47</sup>). Navíc jsou komerčně schváleny pouze dva zdroje L-ASNas (viz výše), což představuje značně omezený výběr, který by měl být do budoucna rozšířen o nové L-ASNasy z jiných zdrojů, případně jejich řízeně mutované formy s vyhovujícími vlastnostmi.

### 2.3. Další aplikace v medicíně

Kromě dlouhodobě využívané protinádorové aktivity byly nedávno u L-ASNas popsány možnosti využití i v dalších medicínských aplikacích<sup>10</sup>. Publikovány byly například studie upozorňující na potenciál L-ASNasy v léčbě infekčních a autoimunitních onemocnění<sup>48</sup>.

V souvislosti s možným využitím při terapii infekčních onemocnění byla studována bakterie *Streptococcus pyogenes* patřící do skupiny označované jako „Group A *Streptococcus*“ (GAS). Tato bakterie způsobuje onemocnění s různě závažným průběhem<sup>7</sup>. GAS po přilnutí k hostitelské buňce produkuje toxiny (streptolysiny) způsobující stres endoplasmatického retikula, což se mimo jiné projevuje zvýšenou expresí genu pro L-asparagin-synthetasu, čímž dojde ke zvýšení produkce aminokyseliny L-asparaginu, která indukce proliferaci a růst GAS. Bez této aminokyseliny se neexprimuje zhruba 17 % genů GAS (cit.<sup>49</sup>). Zde se nabízí využití léčivého přípravku obsahujícího L-ASNasu, u které byla prokázána schopnost potlačit růst patogenu GAS v myším modelu lidské bakteriémie (bakterie přítomné v krevním řečišti) a také v lidské krvi<sup>49</sup>. I další patogenní bakterie, například *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* nebo *Staphylococcus aureus*, obsahují toxiny podobné streptolysinům. Není tedy vyloučeno, že by přípravky s L-ASNasou mohly být účinné i při terapii dalších infekčních onemocnění<sup>4</sup>.

Rada studií již potvrdila i schopnost bakteriálních L-ASNas ovlivňovat imunitní odpověď lidského organismu. Konkrétně se jedná o imunosupresivní a protizánětlivý účinek<sup>50</sup>. Proběhly již i první testy naznačující možnost využití pegylované L-ASNasy z *E. coli* při léčbě autoimunitních onemocnění. V tomto případě se jednalo o revmatoidní artritidu, jejíž léčba byla testována na myším modelu s artritidou indukovanou kolagenem<sup>6</sup>. Ukázalo se, že podání této L-ASNasy potlačilo buněčnou imunitní odpověď B-lymfocytů zprostředkovanou pomocnými T-lymfocyty. U humorální imunitní odpovědi bylo zaznamenáno nižší množství protilátek tvořených B-lymfocyty<sup>10</sup>. Toto je v souladu se zjištěním, že na virulenci bakte-

rie *Salmonella typhimurium* se podílí její L-ASNasa, jejíž mechanismus nebyl doposud zcela objasněn. Extracelulární doména receptoru T-lymfocytu obsahuje variabilní část odpovídající antigenní struktuře, která je nejčastěji složena z heterodimeru alfa a beta řetězce. Bylo zjištěno, že L-ASNasa ze *S. typhimurium* brání modulaci beta řetězce, čímž se snižuje odpověď T-lymfocytů<sup>51</sup>.

V jedné studii byly popsány dokonce i antivirové účinky L-ASNasy, konkrétně u viru Cocksackie B3, kde L-ASNasa izolovaná z řasy *Spirulina maxima* nevysvětleným mechanismem bránila adsorpci viru na povrch buňky a jeho penetraci dovnitř<sup>8</sup>.

### 3. Využití L-aspariginas v potravinářství

Své využití našly L-ASNasy i v potravinářském průmyslu, a to konkrétně při snižování množství akrylamidu v tepelně zpracovaných potravinách. Již více než půl století se ví o neurotoxických účincích akrylamidu<sup>52</sup> a desítky let je také označován jako potenciální karcinogen<sup>53,54</sup>. Avšak do havárie ve Švédsku (r. 1997), během níž bylo do životního prostředí během výstavby železničního tunelu nešťastně vypuštěno velké množství akrylamidu, nebyl akrylamid spojován s potravinami. Kontaminace vody, úhyn velkého množství zvířat, mediální zájem a panika mezi veřejností vedly nejprve ke stažení potravin z dané lokality a následně k vzbuzení zájmu o monitoring akrylamidu v potravinách. Tím však bylo zjištěno, že některé potraviny i mimo danou oblast obsahují vyšší hladiny akrylamidu. Postupně se díky vědeckému zkoumání objasnily mechanismy, kterým akrylamid v potravinách vzniká, a od roku 2002 je snaha ve spolupráci s organizacemi, jako je WHO (World Health Organization), EFSA (European Food Safety Authority) či FAO (Food and Agriculture Organization), omezit množství akrylamidu v potravinách pomocí legislativy, v níž se ke každé komoditě vztahují různá doporučení k postupu zpracování surovin a specifické limity k obsahu akrylamidu<sup>55</sup>.

Podstatou využití L-ASNasy v potravinářství je tedy snížení koncentrace L-asparaginu, který se v potravinách přirozeně vyskytuje a může (za určitých podmínek) sloužit jako prekurzor pro vznik akrylamidu – neurotoxinu a potenciálního karcinogenu<sup>21,56,57</sup>. Nebezpečí vzniku akrylamidu hrozí u potravin bohatých na sacharidy zpracovávaných při vysokých teplotách (obvykle se udává teplota vyšší než 120 °C) a nízké vlhkosti, jako jsou hranolky, bramborové lupínky, pečárské výrobky, snídanové cereálie či pražená káva<sup>5,58</sup>. V procesu nazývaném Maillardova reakce dochází k reakci L-asparaginu s redukcujícími sacharidy a výsledkem sledu několika reakcí je vznik akrylamidu. Zároveň však Maillardova reakce slouží ke vzniku řady dalších sloučenin, které jsou naopak žádáné vzhledem k jejich senzoryckým vlastnostem<sup>58</sup>.

V současné době jsou provozovateli potravinářských podniků v Evropě povinni se řídit nařízením Komise EU 2017/2158, které stanovuje opatření pro snížení přítomnosti akrylamidu v potravinách<sup>58</sup>. Existuje celá řada pří-

stupů, díky kterým je možné snižovat množství akrylamidu ve finálních výrobcích. Patří mezi ně výběr vhodných surovin, přidávání řady různých aditiv či změna výrobních podmínek, například teploty či pH. Nicméně použití těchto metod má často za následek změnu kvality konečného výrobku, která je patrná na jeho chuti či vzhledu. Výhodu využití L-ASNas vidí řada odborníků právě ve skutečnosti, že při využití této enzymové metody nedochází k negativnímu ovlivnění požadovaných vlastností výrobku. Zároveň byla prokázána možnost redukce množství akrylamidu pomocí L-ASNas v některých případech až o 90 % (cit.<sup>59</sup>).

Jako příklady praktického využití L-ASNas v potravinářství bychom rádi zmínili na trhu dostupné přípravky řady PreventAse<sup>®</sup> a Acrylaway<sup>®</sup>, které obsahují L-ASNasy původem z *Aspergillus niger* a *Aspergillus oryzae*<sup>21</sup>.

Produkty pod označením PreventAse<sup>®</sup> vyrábí firma DSM z Nizozemí. Optimální pH pro aktivitu těchto přípravků se pohybuje v kyselější oblasti (pH 4–5), teplotní optimum preparátu je přibližně 50 °C. Schopnost přípravku štěpit L-asparagin a tím snížit množství vzniklého akrylamidu byla popsána v několika studiích s různými potravinářskými výrobky<sup>60–62</sup>. Ošetření pšenično-ovesného bochníku chleba pomocí tohoto přípravku po dobu 15 min při 32 °C před pečením vedlo ke snížení vzniklého množství akrylamidu o 46 % (cit.<sup>60</sup>). Rotmann a spol.<sup>61</sup> se rozhodli studovat použití L-ASNasy pro snížení množství L-asparaginu při přípravě smažených hranolků podle průmyslových standardů. Nejlepší vlastnosti pro daný postup vykazoval přípravek PreventAse L<sup>®</sup>. Přípravek byl aplikován po blanširovacím kroku v různých koncentracích a ponechán působit po dobu 1 min při 60 °C. Ve výsledku došlo ke snížení akrylamidu až o 59 % (cit.<sup>61</sup>). Potenciál přípravku z Nizozemí byl nově studován také při přípravě těsta na pizzu<sup>62</sup>. V práci byly použity různé formulace přípravku PreventAse<sup>®</sup> pod označeními M, W a XR-BG, které byly přidány do těsta. V tomto případě L-ASNasa působila po celou dobu hnětení těsta (řádově v hodinách). Při aplikaci formulace XR-BG (vyvinuta pro použití v prostředí o vyšších hodnotách pH) došlo vlivem štěpení L-asparaginu ke snížení vzniku akrylamidu asi o 89 % a po přidání přípravků M a W byl snížen obsah akrylamidu dokonce pod detekovatelnou mez<sup>62</sup>.

Přípravky řady Acrylaway<sup>®</sup> vyrábí firma Novozymes A/S z Dánska. Enzymy obsažené v těchto přípravcích vykazují nejvyšší aktivitu při pH 6–7 a teplotě kolem 60 °C. Účinky těchto přípravků byly také popsány v několika studiích<sup>63–65</sup>. Podobně jako u produktu PreventAse<sup>®</sup>, i zde byl přípravek testován při přípravě smažených hranolků po blanširovacím kroku<sup>63</sup>. V této studii bylo dosaženo 60% snížení množství vznikajícího akrylamidu po působení enzymového přípravku při 40 °C po dobu 20 min. Jako příklad studie zabývající se účinkem přípravku Acrylaway<sup>®</sup> na množství L-asparaginu v kávových bobech může sloužit práce autorů Porto a spol. (cit.<sup>64</sup>). Ošetřením kávových bobů bylo dosaženo snížení obsahu L-asparaginu asi o 30 %. Díky experimentům v jiné studii zaměřené také na snížení obsahu L-asparaginu v kávových bobech bylo dosaženo poklesu obsahu akrylamidu po pražení kávy až

o 77 % (cit.<sup>65</sup>). Z obou těchto studií vyplývá, že je možné snížit obsah L-asparaginu i v takto pevných maticích, jako jsou kávové boby, ale je nutné předřadit krok, kterým se zvýší dostupnost L-asparaginu pro L-ASNasu (byla zvolena předúprava bobů horkou párou).

Kromě aplikace volného izolovaného enzymu byl navržen i přístup založený na použití celých buněk. Firma Kerry přišla ve spolupráci s Renaissance BioScience Corp. v roce 2019 na trh s výrobkem Acryleas<sup>®</sup>, který obsahuje pekařské kvasinky<sup>66</sup>. V roce 2022 firma uvedla na trh produkt pod názvem Acryleas Pro<sup>®</sup> vykazující více než dvojnásobnou L-asparaginasovou aktivitu oproti původnímu produktu<sup>67</sup>. Tyto kvasinky byly šlechtěny pomocí adaptivní evoluce za účelem získání varianty s L-ASNasou, která by fungovala i za podmínek přípravy potravin (např. kynutí těsta). Běžně totiž kvasinky L-asparagin přítomný v surovinách neštěpí, neboť využívají dostupnější zdroje dusíku<sup>68</sup>. Využití aktivity tohoto přípravku obsahujícího celé buňky je samozřejmě možné pouze pro přípravu potravinářských výrobků, u kterých se využívá činnosti pekařských kvasinek. Zároveň však jde o velmi elegantní způsob, který nevyžaduje změny ve výrobním procesu a zároveň neovlivňuje chuť ani další vlastnosti konečného výrobku.

Z výše zmíněných informací lze vyvodit, že kromě dříve vyjmenovaných faktorů (pH, teplota atd.), které ovlivňují výsledné snížení obsahu akrylamidu v konečném výrobku, je nutné přihlídnout i k technologickému postupu, který je pro přípravu konkrétního výrobku využíván.

#### 4. Metody stanovení aktivity L-asparaginas

Popsaná technologická využití L-ASNas se neobejdou bez stanovení aktivity enzymových preparátů a také koncentrace volného L-asparaginu. Pro měření aktivity L-ASNasy byly vyvinuty a popsány různé metody, přičemž tyto metody spočívají hlavně ve stanovení množství produktů reakce katalyzované těmito enzymy, tedy amoniaku nebo kyseliny L-asparagové<sup>1</sup>. Amoniak uvolněný během asparaginasové reakce lze stanovit Berthelotovou metodou, reakcí s Nesslerovým činidlem, s indofenolem<sup>69</sup> nebo je možné detekovat amoniak iontově selektivní elektrodou<sup>70</sup>. Vzniklou L-asparagovou kyselinu lze stanovit např. pomocí HPLC (cit.<sup>71</sup>), cirkulárního dichroismu<sup>72</sup> nebo reakcí s hydroxylaminem a chloridem železitým<sup>73</sup>. Jiné metody stanovení L-asparaginasové aktivity využívají alternativních substrátů: 5-diazo-4-oxo-L-norvalinu, L-asparagová kyselina-β-7-amido-4-methylkumarinu a β-hydroxamátu kyseliny L-asparagové<sup>74</sup>.

Při využití L-ASNas v medicíně i v potravinářství je hodnocena nejen aktivita enzymového preparátu, ale i množství nerozštěpeného L-asparaginu po aplikaci preparátu, což určuje jeho efektivitu a tedy použitelnost. K analýze množství přítomného L-asparaginu se v současné době využívá vysokotlaké chromatografie, což je ale přístrojově i časově náročná metoda<sup>75</sup>.

Nalezení jednoduché, rychlé, snadno kvantifikovatelné a dostatečně citlivé metody, nejlépe za použití netoxických sloučenin, by nepochybně vedlo k rozvoji další oblasti využití L-ASNas, a to konkrétně při konstrukci biosenzorů<sup>18,76</sup>. Řada vědeckých týmů se zabývá možnostmi vytvoření biosenzorů obsahujících L-ASNasu, pomocí kterých by bylo možné sledovat hladinu L-asparaginu v krvi v průběhu onkologické léčby<sup>3</sup>. Zároveň by obdobné využití mohly nalézt tyto biosenzory i v potravinářském průmyslu, kde by sloužily k rychlému ověření množství volného L-asparaginu ve vstupních surovinách, u nichž hrozí riziko vzniku akrylamidu během zpracování<sup>3</sup>.

## 5. Závěr

V tomto krátkém přehledovém článku jsme se snažili přiblížit a shrnout možnosti využití L-ASNasy ve zdravotnictví i potravinářském průmyslu. Jak je patrné, tyto enzymy mají velký potenciál pro různé obory, který se dosud nepodařilo plně využít. Současný výzkum se proto zaměřuje hlavně na optimalizaci parametrů rekombinantní produkce a purifikace těchto enzymů a zároveň na charakterizaci L-ASNas z nových zdrojů, které by mohly poskytnout enzymy s vlastnostmi výhodnějšími pro medicínskou či biotechnologickou aplikaci. Pozadu nezůstávají ani moderní techniky genového inženýrství, díky kterým je možné modifikovat vlastnosti již známých enzymů uměle, případně přiblížit jejich strukturu lidské L-ASNase a snížit tak nežádoucí vedlejší účinky vznikající v důsledku cizorodého původu enzymů využívaných v současné době.

### Zkratky

L-ASNasa	L-asparaginasa
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
GAS	„Group A Streptococcus“
EMA	Evropská agentura pro léčivé přípravky
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
$K_M$	Michaelisova konstanta
MHRA	Regulační úřad pro léky a zdravotnictví
PEG	polyethylenglykol
PMDA	Agentura pro léčiva a zdravotnické přípravky

### LITERATURA

- Batool T., Makky E. A., Jalal M., Yusoff M. M.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 178, 900 (2016).
- da Silva L. S., Doonan L. B., Pessoa A. Jr., de Oliveira M. A., Long P. F.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 69, 503 (2022).
- Nunes J. C., Cristóvão R. O., Santos-Ebinuma V. C., Faria J. L., Silva C. G., Neves M. C., Freire M. G., Tavares A. P.: *Encyclopedia* 1, 848 (2021).
- Vimal A., Kumar A.: *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 33, 40 (2017).
- Izadpanah Qeshmi F., Homaei A., Fernandes P., Javadpour S.: *Microbiol. Res.* 208, 99 (2018).
- Reiff A., Zastrow M., Sun B. C., Takei S., Mitsuahada H., Bernstein B., Durden D.: *Clin. Exp. Rheumatol.* 19, 639 (2001).
- Carapetis J. R., Steer A. C., Mulholland E. K., Weber M.: *Lancet Infect. Dis.* 5, 685 (2005).
- Abd El-Baky H. H., El-Baroty G. S.: *Recent Pat. Biotechnol.* 14, 154 (2020).
- Chen Q., Ye L., Fan J., Zhang X., Wang H., Liao S., Song P., Wang Z., Wang S., Li Y.: *Oncotarget* 8, 91052 (2017).
- Vimal A., Kumar A.: *3 Biotech* 8, 278 (2018).
- Panosyan E. H., Wang Y., Xia P., Lee W.-N. P., Pak Y., Laks D. R., Lin H. J., Moore T. B., Cloughesy T. F., Kornblum H. I.: *Mol. Cancer Res.* 12, 694 (2014).
- Masterson M., Hull B., Vollmer L.: *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192, 1301 (1988).
- Broome J.: *J. Exp. Med.* 127, 1055 (1968).
- Haskell C., Canellos G., Leventhal B., Carbone P., Block J., Serpick A., Selawry O.: *N. Engl. J. Med.* 281, 1028 (1969).
- Chiu M., Taurino G., Bianchi M. G., Kilberg M. S., Bussolati O.: *Front. Oncol.* 9, 1480 (2020).
- Seeman P.: *J. Med. Biogr.* 22, 90 (2014).
- Boos J., Werber G., Ahlke E., Schulze-Westhoff P., Nowak-Göttl U., Würthwein G., Verspohl E., Ritter J., Jürgens H.: *Eur. J. Cancer* 32, 1544 (1996).
- Verma N., Kumar K., Kaur G., Anand S.: *Artif. Cells, Blood Substitutes, Biotechnol.* 35, 449 (2007).
- Punia S., Kumar R., Kumar K.: *Int. J. Appl. Biol.* 6, 40 (2015).
- de Moraes S. B., de Souza T. D. A. C. B.: *Int. J. Clin. Oncol.* 58, 11 (2021).
- Nunes J. C., Cristóvão R. O., Freire M. G., Santos-Ebinuma V. C., Faria J. L., Silva C. G., Tavares A. P.: *Molecules* 25, 5827 (2020).
- Richards N. G., Kilberg M. S.: *Annu. Rev. Biochem.* 75, 629 (2006).
- Horowitz B., Madras B. K., Meister A., Old L. J., Boyse E. A., Stockert E.: *Science* 160, 533 (1968).
- Samson R., Legendre J. B., Christen R., Fischer-Le Saux M., Achouak W., Gardan L.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1415 (2005).
- Derst C., Henseling J., Röhm K. H.: *Protein Sci.* 9, 2009 (2000).
- Kotzia G. A., Labrou N. E.: *J. Biotechnol.* 127, 657 (2007).
- Clementi A.: *Arch. Int. Physiol.* 19, 369 (1922).
- Dolowy W. C., Henson D., Cornet J., Sellin H.: *Cancer* 19, 1813 (1966).
- Lew G.: *Clin. Cancer Res.* 26, 325 (2020).
- [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2013/101063s5169lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/101063s5169lbl.pdf), staženo 19. 10. 2022.
- <https://www.fiercepharma.com/m-a/lundbeck-to-stop-making-cancer-drug>, staženo 13. 10. 2022.
- <https://www.medicines.org.uk/emc/product/12340#gref>, staženo 12. 3. 2023.
- Ho D., Brown N., Yen A., Holmes R., Keating M., Abuchowski A., Newman R., Krakoff I.: *Drug Metab.*

- Dispos. 14, 349 (1986).
34. Kurtzberg J., Asselin B., Bernstein M., Buchanan G. R., Pollock B. H., Camitta B. M.: *J. Pediatr. Hematol./Oncol.* 33, 610 (2011).
  35. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2011/103411s5126lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/103411s5126lbl.pdf), staženo 19. 10. 2022.
  36. Jiang J., Batra S., Zhang J.: *Metabolites* 11, 402 (2021).
  37. Avramis V. I., Tiwari P. N.: *Int. J. Nanomed.* 1, 241 (2006).
  38. Shrivastava A., Khan A. A., Khurshid M., Kalam M. A., Jain S. K., Singhal P. K.: *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* 100, 1 (2016).
  39. Hunger S. P., Mullighan C. G.: *N. Engl. J. Med.* 373, 1541 (2015).
  40. Chaubard S. a 24 spoluautorů: *Br. J. Haematol.* 201, 673 (2023).
  41. Raetz E. A., Salzer W. L.: *J. Pediatr. Hematol./Oncol.* 32, 554 (2010).
  42. Ramya L. N., Doble M., Rekha V. P. B., Pulicherla K. K.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167, 2144 (2012).
  43. Chan W. K., Lorenzi P. L., Anishkin A., Purwaha P., Rogers D. M., Sukharev S., Rempe S. B., Weinstein J. N.: *Blood* 123, 3596 (2014).
  44. Lanvers-Kaminsky C.: *Cancer Chemother. Pharmacol.* 79, 439 (2017).
  45. Cruzat V., Macedo Rogero M., Noel Keane K., Curi R., Newsholme P.: *Nutrients* 10, 1564 (2018).
  46. Avramis V. I. a 12 spoluautorů: *Blood* 99, 1986 (2002).
  47. Strullu M., Corradini N., Audrain M., Orsonneau J. L., Bouige D., Thomare P., Vermot-Desroches C., Mansuy A., Legrand A., Rozé J. C.: *Leuk. Lymphoma* 51, 1464 (2010).
  48. Vimal A., Kumar A.: *Int. J. Pept. Res. Ther.* 28, 9 (2022).
  49. Baruch M., Belotserkovsky I., Hertzog B. B., Ravins M., Dov E., McIver K. S., Le Breton Y. S., Zhou Y., Cheng C. Y., Hanski E.: *Cell* 156, 97 (2014).
  50. Gieldanowski J.: *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 24, 243 (1976).
  51. Kullas A. L., McClelland M., Yang H. J., Tam J. W., Torres A., Porwollik S., Mena P., McPhee J. B., Bogomolnaya L., Andrews-Polymeris H.: *Cell Host Microbe* 12, 791 (2012).
  52. McCollister D., Oyen F., Rowe V.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 6, 172 (1964).
  53. Butterworth B. E., Eldridge S. R., Sprankle C. S., Working P. K., Bentley K. S., Hurtt M. E.: *Environ. Mol. Mutagen.* 20, 148 (1992).
  54. Bull R., Robinson M., Stober J.: *Cancer Lett.* 24, 209 (1984).
  55. Reynolds T.: *J. Natl. Cancer Inst.* 94, 876 (2002).
  56. Shakambari G., Ashokkumar B., Varalakshmi P.: *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 17, 213 (2019).
  57. Wang Y., Xu W., Wu H., Zhang W., Guang C., Mu W.: *Int. J. Biol. Macromol.* 186, 975 (2021).
  58. <https://www.szpi.gov.cz/clanek/informace-k-nove-povinnosti-provozovatelu-prijmout-opatreni-ke-snizeni-obsahu-akrylamidu-v-potravinach.aspx>, staženo 8. 3. 2023.
  59. Hendriksen H. V., Kornbrust B. A., Østergaard P. R., Stringer M. A.: *J. Agric. Food Chem.* 57, 4168 (2009).
  60. Ciesarová Z., Kukurová K., Mikušová L., Basil E., Polakovičová P., Duchoňová L., Vlček M., Šturdík E.: *Qual. Assur. Saf. Crops Foods* 6, 327 (2014).
  61. Rottmann E., Hauke K. F., Krings U., Berger R. G.: *Food Control* 123, 107739 (2021).
  62. Covino C., Sorrentino A., Di Piero P., Aiello A., Romano R., Masi P.: *Food Chem. Adv.* 2, 100206 (2023).
  63. Pedreschi F., Kaack K., Granby K.: *Food Chem.* 109, 386 (2008).
  64. Porto A. C. V., Freitas-Silva O., de Souza E. F., Gottschalk L. M. F.: *Beverages* 5, 32 (2019).
  65. Corrêa C. L. O., das Mercês Penha E., Dos Anjos M. R., Pacheco S., Freitas-Silva O., Luna A. S., Gottschalk L. M. F.: *Food Chem.* 338, 128045 (2021).
  66. <https://www.kerry.com/products/functional-ingredients/acrylamide-reduction/acryleast.html>, staženo 20. 6. 2023.
  67. <https://www.nutritionaloutlook.com/view/kerry-launches-next-generation-of-acrylamide-reducing-yeast-called-acryleast-pro>, staženo 20. 6. 2023.
  68. <https://www.renaissanceingredients.com/solution#evolution>, staženo 20. 6. 2023.
  69. Scheiner D.: *Water Res.* 10, 31 (1976).
  70. Zhou L., Boyd C. E.: *Aquaculture* 450, 187 (2016).
  71. Nath C. E., Dallapozza L., Eslick A. E., Misra A., Carr D., Earl J. W.: *Biomed. Chromatogr.* 23, 152 (2009).
  72. Kudryashova E. V., Sukhoverkov K. V.: *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 1183 (2016).
  73. Grossowicz N., Wainfan E., Borek E., Waelsch H.: *J. Biol. Chem.* 187, 111 (1950).
  74. Lanvers C., Pinheiro J. P. V., Hempel G., Wuerthwein G., Boos J.: *Anal. Biochem.* 309, 117 (2002).
  75. Rizzari, C. a 28 spoluautorů: *Haematologica* 104, 1812 (2019).
  76. Fraticelli Y., Meyerhoff M.: *Anal. Chem.* 55, 359 (1983).
  77. [https://pdf.hres.ca/dpd\\_pm/00053021.pdf](https://pdf.hres.ca/dpd_pm/00053021.pdf), staženo 27. 3. 2023.
  78. <https://www.kyowakirin.com/history/index.html>, staženo 25. 3. 2023.
  79. <https://www.pmda.go.jp/files/000232773.pdf>, staženo 25. 3. 2023.
  80. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/spectrila-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/spectrila-epar-public-assessment-report_en.pdf), staženo 18. 8. 2022.
  81. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2018/761102s0001bl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/761102s0001bl.pdf), staženo 27. 9. 2022.
  82. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2016/125359s0881bl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/125359s0881bl.pdf), staženo 19. 10. 2020.



83. <https://portonbiopharma.com/products/erwinase/>, staženo 26. 3. 2023.  
84. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2021/761179s000lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/761179s000lbl.pdf), staženo 18. 8. 2022.

**L. Pejšková, K. Loužecká, T. Podzimek, and E. Benešová** (*Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic*): **L-Asparaginases and Their Potential in Biotechnology and Medicine**

L-Asparaginase (EC 3.5.1.1) is a key enzyme that hydrolyzes L-asparagine to L-aspartic acid and ammonia. This feature of L-asparaginase is used in anti-cancer therapy to inhibit protein synthesis in cancer cells. Therefore, L-asparaginase is used as a basis for chemotherapy to treat patients with acute lymphoblastic leukemia in pediatrics.

Commercial L-asparaginases for healthcare applications are mainly obtained from *Escherichia coli* and *Erwinia chrysanthemi* (renamed to *Dickeya dadantii*). However, the high prevalence of adverse effects complicates the long-term clinical use of L-asparaginase, and therefore current research focuses on the search for new enzymes or on modifying the properties of enzymes already known. At the same time, L-asparaginase has become indispensable for the food industry in recent years, when it had been recognized as one of the possible tools for removing L-asparagine from foods that are at risk of acrylamide formation during thermal processing. This review provides an overview of the current use of L-asparaginase and its pitfalls.

Keywords: L-asparaginase, acute lymphoblastic leukemia, acrylamide, biosensor, biological anti-cancer treatment

## STANOVENÍ ORGANICKÝCH KYSELIN VE SPECIÁLNÍCH PIVECH A NÁPOJÍCH NA BÁZI PIVA POMOCÍ KAPILÁRNÍ IZOTACHOFORÉZY

SIMONA ČERNÁ<sup>a</sup>, KAROLÍNA BENEŠOVÁ<sup>a</sup> a JAN MARTINÍK<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Mostecká 7, 614 00 Brno, <sup>b</sup> Ústav biotechnologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika  
cerna@beerresearch.cz

Došlo 16.2.23, přijato 11.5.23.

Organické kyseliny v pivu mají vliv na kvalitu piva, včetně organoleptických vlastností a koloidní stability. Velká část celkových organických kyselin v pivu pochází z mladiny, zatímco zbytek vzniká nebo se přeměňuje v důsledku metabolismu kvasinek. Ve vybraných druzích piva byly stanoveny koncentrace pěti organických kyselin. Kvantifikována byla jablečná, jantarová, citronová, octová a mléčná kyselina. Koncentrace kyselin se liší vzhledem k druhu piva. Nejvyšší koncentrace mléčné kyseliny byla nalezena v kyselých a ovocných pivech. Nejvíce citronové kyseliny obsahovaly radlery a ovocná piva. Nejvyšší koncentrace octové kyseliny byla nalezena v ovocných pivech. Vyšší koncentraci jablečné kyseliny měla kyselá a ovocná piva. Nejvíce jantarové kyseliny obsahovala piva typu Ale a ovocná piva. Stanovení bylo provedeno metodou kapilární izotachoforézy. Bylo zjištěno, že stanovení koncentrace organických kyselin v souvislosti se statistickým vyhodnocením by mohlo být vhodnou metodou pro kontrolu technologie výroby piva, případně autenticity přídavku ovocného podílu do radlerů a ovocných piv.

Klíčová slova: organické kyseliny, pivo, kapilární izotachoforéza

### Úvod

Pivo by až na určité speciální typy (kyselá piva, ovocná piva a radlery) nemělo vykazovat výraznou kyselou chuť<sup>1</sup>. Kyselost je vnímána intenzivněji u méně plných piv a piv s vyšším stupněm prokvašení<sup>2</sup>. K výrobě kyselých piv se používají bakterie mléčného kvašení anebo octové bakterie spolu s kvasinkami. Jedná se o různé mikroorganismy, které se liší podle pivního stylu a použité technologie (spontánní nebo řízené kvašení). Kyselá piva lze vyrábět naočkováním kultur bakteriemi mléčného kvašení do rmutu nebo naočkováním do mladiny před nebo po varu. Za tuto kyselost jsou zodpovědné organické kyseliny a kyselina uhličitá<sup>3,4</sup>.

Základní složkou pro výrobu míchaných nápojů na bázi piva typu radler je vždy pivo s obsahem 50–70 obj.%. Pivo se po dokončení výrobního procesu míchá s limonádami s různými ovocnými nebo bylinnými příchutěmi. Tyto limonády žádné ovoce neobsahují, jedná se zpravidla o průmyslově vyrobené příchutě. Nápoje mohou být alkoholické nebo nealkoholické, s jednou nebo více přísadami, s jednou nebo více příchutěmi, slazené cukrem nebo umělým sladidlem. Přidávání ovocných kyselin je důležité pro vyvážený poměr sladké a kyselé chuti. Přídavek kyselin také snižuje hodnotu pH výsledného nápoje<sup>5,6</sup>.

Ovocná piva jsou většinou vyráběna řemeslnými pivovary. Do piva lze přidávat téměř všechny druhy ovoce, jako jsou peckovice, jádrové ovoce, tropické ovoce i bobule<sup>7</sup>. Ovocné pivo je pivo vařené s ovocným přídavkem nebo příchutí. O ovoce a ovocnou šťávu se jedná zejména v případě lambiců, které kvasí spontánně (kriek, framboise, peche a další). V případě ostatních ovocných piv jde zejména o ovocné extrakty, sirupy a příchutě, které jsou přidávány až do spodního nebo svrchního kvašení. Ovoce nejen že dodává nové příchutě, ale může také zvýšit koncentraci bioaktivních sloučenin. Chuť ovoce nesmí dominovat základnímu typu piva<sup>8–10</sup>.

Nealkoholická piva lze vyrábět šetrným odstraněním alkoholu z normálně kvašeného alkoholického piva tepelnými metodami (např. vakuová destilace) nebo použitím membránových separačních technik (např. reverzní osmóza, dialýza). Nejjednodušší postup však spočívá v omezené nebo přerušované fermentaci s potlačenou tvorbou alkoholu, které lze dosáhnout kombinací několika strategií<sup>11,12</sup>. Samotné kvašení lze zastavit při dosažení požadovaného obsahu alkoholu, a to buď odstraněním kvasinek (filtrace, odstředění) nebo jejich deaktivací (pasterizace). Další možností je vytvoření podmínek fermentace, které potlačují metabolismus kvasinek<sup>13</sup>. Na výrobu nealkoholických piv lze použít i mutantní kvasinky. Dochází

k snížené produkci alkoholu v důsledku poklesu pH média během fermentace spolu s rapidní produkcí organických kyselin<sup>14</sup>.

Organické kyseliny ovlivňují senzory kyselost piva a patří mezi důležité složky z hlediska vlivu na kvalitu piva. Kromě toho, že organické kyseliny jsou řazené do jedné z hlavních chuťových skupin (kyselé), mají samostatně charakteristické příchutě na základě jejich molekulární struktury. Citronová kyselina má svěží kyselou chuť, která je odlišná od jablečné kyseliny. Jantarová kyselina má kromě kyselosti nepřijemnou slanou a hořkou chuť. Octová kyselina má příchut' octa a chuť mléčné kyseliny se podobá kyselému mléku<sup>4,15</sup>.

Kyseliny přítomné ve finálním pivu jsou z velké části ty, které se nacházejí v surovinách pro výrobu piva, z nichž hlavní je slad<sup>15,16</sup>. Autoři<sup>15,17</sup> uvádějí, že složení organických kyselin ve sladu je ovlivněno několika parametry: odrůda ječmene, jeho chemické ošetření, ročník, oblast, stav zralosti, ale také sladovnické parametry. Citronová kyselina a jablečná kyselina jsou převážně produkty klíčení<sup>18</sup>. Velká část celkových organických kyselin (cca 50 %) v pivu pochází z mladiny, zatímco zbytek vzniká nebo se přeměňuje v důsledku metabolismu kvasinek<sup>15,16</sup>. V pivu jsou organické kyseliny s krátkým uhlíkovým skeletem odvozené jak z neúplného obratu citrátového cyklu, ke kterému dochází při anaerobním růstu kvasinek, tak z katabolismu aminokyselin<sup>16</sup>. Jednotlivé kmeny kvasinek se mohou lišit také ve schopnosti tvořit ethanol, oxid uhlíčitý a organické kyseliny. Čím intenzivnější je rozmnožovací a fermentační schopnost kvasnic, tím více se spotřebovávají ústrojné látky z mladiny, a tím více se vytvoří organických kyselin. Vzhledem k tomu, že organické kyseliny zvyšují koncentraci vodíkových iontů v prostředí, ovlivňují koagulaci bílkovin, vylučování hořkých látek z chmele a biologickou stabilitu piva<sup>19</sup>. Množství kyselin vnesených do produktu chmelem lze zanedbat<sup>20</sup>.

Pyrohroznová, octová, mléčná, citronová, jantarová a jablečná kyselina přispívají ke snížení pH během fermentace a chrání pivo před mikrobiologickým napadením. Přispívají k prodloužení skladovatelnosti, jelikož poskytují silnou pufrační schopnost, která koreluje se zákalem piva, stabilitou pěny a rychlostí zatuchnutí chuti<sup>21,22</sup>.

Cílem této práce bylo stanovit obsah organických kyselin ve speciálních pivech vyráběných různými technologiemi. Vzorky byly analyzovány metodou kapilární izotachografie. Tato metoda umožňuje separaci a stanovení širokého rozsahu analytů ve stopových koncentracích. K těmto analytům patří např. organické kyseliny a zásady, neorganické kationty a anionty, nukleotidy, aminokyseliny, peptidy, proteiny a syntetické ionogenní polymery. Systémem prochází elektrický proud, iontové chemické sloučeniny přítomné ve vzorku se oddělují v důsledku různé rychlosti migrace, což vede k vytvoření odlišných zón v rovnovážném stavu<sup>23–25</sup>.

## Experimentální část

### Výběr a příprava vzorků

K analýze bylo vybráno celkem 58 piv z následujících zemí: Německo, Belgie, USA, Rakousko, Česká republika, Velká Británie, Itálie, Švédsko, Estonsko, Irsko a Španělsko. Jednalo se o světlá piva, tmavá piva (portry a stouty), nealkoholická piva, míchané nápoje na bázi piva (radlery), ovocná piva, kyselá piva a piva typu Ale. 100 ml vzorku piva bylo odlito do kádinky a odpěněno v ultrazvukové lázni po dobu 5 minut. Následně bylo 5 ml vzorku přefiltrováno přes stříkačkový nylonový filtr (0,22  $\mu\text{m}$ ). Pivo se dále ředilo dle potřeby  $10\times - 100\times$ .

### Standardy, chemikálie a příprava roztoků

Ke stanovení byly použity standardy jablečné kyseliny čistoty  $\geq 95\%$ , jantarové kyseliny čistoty  $\geq 99\%$  (Sigma-Aldrich, Německo), octové kyseliny 100 % (Merck, Německo), mléčnanu lithného (čistota neuvvedena, Villa Labeco, Slovensko), citronanu lithného (čistota neuvvedena, Villa Labeco, Slovensko). Z připravených zásobních roztoků se připravily ředěním směsné standardy. Pětibodové kalibrační křivky byly změřeny v následujících intervalech koncentrací: jablečná 2,5–50  $\text{mg l}^{-1}$ , jantarová 1,25–25  $\text{mg l}^{-1}$ , citronová 2,5–50  $\text{mg l}^{-1}$ , octová 2,5–50  $\text{mg l}^{-1}$  a mléčná kyselina 5–100  $\text{mg l}^{-1}$ . Koncentrace jednotlivých kyselin byly voleny tak, aby odpovídaly předpokládaným koncentracím ve vzorcích. Chemikálie pro přípravu ukončovacího roztoku: kapronová kyselina čistoty  $\geq 99\%$ , histidin čistoty  $\geq 95\%$  (Sigma-Aldrich, Německo) a pro vodící roztok: kyselina chlorovodíková, bis-tris-propan, methylhydroxyethyl-celulosa (čistota neuvvedena, Villa Labeco, Slovensko). Složení vedoucího roztoku: 10 mM HCl + 5,6 mM bis-tris-propan + 0,1% methylhydroxyethyl-celulosa. Složení koncového roztoku: 5 mmol  $\text{l}^{-1}$  kyselina kapronová a 5 mmol  $\text{l}^{-1}$  histidin.

### Přístroj a metoda

Koncentrace vybraných organických kyselin v pivech byla stanovena pomocí izotachografického analyzátoru EA 101 (výrobce Villa Labeco, Slovensko) s vodivostní detekcí. Stanovovaly se jako anionty. Separační kolona rozdělí složky vzorku v krátkém čase a analytická kolona rozšiřuje detekční schopnost separovaných složek. Separační kolona je zhotovena z fluorovaného ethylenpropylenového kopolymeru (FEP), vybavena kapilárou o délce 90 mm a vnitřním průměru 0,8 mm. Analytická kolona je vyrobena z fluorovaného ethylenpropylenového kopolymeru (FEP), tvořena kapilárou o délce 160 mm a vnitřním průměru 0,3 mm. Podle výrobce je nastřikovane množství naředěného vzorku cca 1 ml injekční stříkačkou. Dávkovací kohout pojme 30  $\mu\text{l}$  vzorku, který je nastřikován mezi vedoucí a koncový elektrolyt. Maximální napětí bylo nastaveno na 8000 V, maximální hodnota proudu separační kolony 250  $\mu\text{A}$  a analytické kolony

50  $\mu\text{A}$ . Doba analýzy je cca 30 minut při laboratorní teplotě. Analyzátor pracuje s programovým vybavením ITPPro (Villa Labeco, Slovensko).

## Výsledky a diskuse

Metoda byla aplikována na vzorky piv vyrobených různou technologií vzhledem k druhu piva. Výsledky nalezených koncentrací organických kyselin jsou uvedeny v tabulce I.

V kyselých pivech byla nejvíce zastoupena mléčná kyselina v rozmezí hodnot 1776–9429  $\text{mg l}^{-1}$ . Vysoké množství zejména mléčné kyseliny a octové kyseliny má za následek nízké pH a vysokou intenzitu kyselosti ve srovnání s pivy a ležáky fermentovanými čistými kulturami<sup>26</sup>. Vyšší koncentrace mléčné kyseliny v zahraničních pivech lze vysvětlit vyšší mírou okyselování rmutu, ať už přidavkem průmyslově vyrobené mléčné kyseliny nebo biologickým okyselením přidavkem kyselého rmutu vyrobeného v pivovaru. Okyselování rmutů se používá pro zvýšení acidity, která podporuje enzymatické reakce probíhající při rmutování, pivo rychleji kvasí a zraje, zlepšuje pěnovost a trvanlivost piva<sup>27</sup>.

V nealkoholických pivech byla nejvíce zastoupena mléčná kyselina o koncentraci 58–1088  $\text{mg l}^{-1}$ . Ostatní kyseliny se vyskytovaly v nižších koncentracích. Tento typ piva je díky vyšší koncentraci cukrů a téměř žádnému alkoholu mnohem citlivější na mikrobiální kontaminaci než normální alkoholické pivo. Aby se tomuto riziku zabránilo, je třeba snížit hodnotu pH mladiny. Literatura uvádí způsob výroby nealkoholického piva zahrnující předúpravu mladiny fermentací pomocí bakterií mléčného kvašení. Dále uvádí koncentraci 1380  $\text{mg l}^{-1}$  kyseliny mléčné v nealkoholickém pivu<sup>28</sup>.

Ovocná piva obsahovala nejvyšší koncentraci mléčné kyseliny 323–7256  $\text{mg l}^{-1}$  a citronové kyseliny 348–2850  $\text{mg l}^{-1}$ . Přidání ovoce do piva má za následek vyšší kyselost a také neobvyklou barvu, ovocnou chuť a chuť v závislosti na přidaném množství a druhu ovoce<sup>9</sup>. Některá ovocná piva získávají část své kyselosti přidáním kyselého ovoce, které obsahuje organické kyseliny<sup>29</sup>. V pomerančích, citronech, jahodách a v angreštu převažuje citronová kyselina. V jablkách, hruškách a třešních je nejvíce obsažena jablečná kyselina<sup>18</sup>.

V radlrech převažovala citronová kyselina v rozsahu hodnot 808–2914  $\text{mg l}^{-1}$ . Podílí se na celkové kyselosti piva a má vliv na jeho chuť. Bývá přidávána ke zvýšení kyselosti jak u nízkoalkoholických, tak i nealkoholických nápojů<sup>29</sup>.

Ve světlých pivech se mléčná kyselina nacházela v rozmezí hodnot 115–666  $\text{mg l}^{-1}$  a dále citronová kyselina v rozmezí hodnot 225–360  $\text{mg l}^{-1}$ . Obsah mléčné kyseliny závisí na použitém kmeni pivovarských kvasinek a na složení mladiny<sup>30</sup>. Literatura uvádí nejvíce zastoupenou mléčnou kyselinu v pivech v rozmezí 48–233  $\text{mg l}^{-1}$  a citronovou kyselinu 56–158  $\text{mg l}^{-1}$  (cit.<sup>31</sup>).

Tmavá piva měla největší zastoupení citronové kyseliny v rozsahu hodnot 185–559  $\text{mg l}^{-1}$  a mléčné kyseliny 142–464  $\text{mg l}^{-1}$ . Literatura uvádí nejvyšší naměřené hodnoty mléčné kyseliny 292–275  $\text{mg l}^{-1}$  (cit.<sup>31</sup>).

Piva typu Ale se vyznačují nejvyšší koncentrací mléčné kyseliny v rozsahu hodnot 202–1678  $\text{mg l}^{-1}$  a citronové kyseliny 50–694  $\text{mg l}^{-1}$ . Literatura<sup>31</sup> uvádí podstatně nižší hodnoty mléčné kyseliny 61–278  $\text{mg l}^{-1}$  a citronové kyseliny 71–133  $\text{mg l}^{-1}$ .

Obsah jantarové kyseliny a jablečné kyseliny v analyzovaných vzorcích piva se pohyboval v nižších koncentracích. V pivech typu Ale se naměřená koncentrace jantarové kyseliny pohybovala v nejvyšší koncentraci v rozmezí

Tabulka I  
Naměřené hodnoty organických kyselin v různých druzích piv ( $\text{mg l}^{-1}$ )

Druhy piv	Jablečná kyselina	Jantarová kyselina	Citronová kyselina	Octová kyselina	Mléčná kyselina
Radler (R1-R11)	76–234	4–30	808–2914	110–271	79–571
Nealkoholická piva (N1-N7)	43–172	13–102	73–307	74–191	58–1088
Ovocná piva (O1-O5)	94–500	56–217	348–2850	107–600	323–7256
Kyselá piva (K1-K4)	60–790	115–158	81–261	89–502	1776–9429
Světlá piva (S1-S15)	32–173	26–114	225–360	99–275	115–666
Tmavá piva (T1-T7)	80–229	49–196	185–559	59–260	142–464
Ale (A1-A9)	46–420	15–279	50–694	104–375	202–1678

15–279 mg l<sup>-1</sup>. Jablečná kyselina byla nejvíce zastoupena v kyselých pivech v rozmezí hodnot 60–790 mg l<sup>-1</sup>. Literatura uvádí, že obsah jablečné kyseliny nezávisí na kmeni použitých kvasinek<sup>31</sup>.

Během celého procesu výroby piva může dojít k mikrobiologické kontaminaci, a tím se zvýší produkce octové kyseliny, která může být produkována nejen octovými bakteriemi, ale i divokými kvasinkami, které se dostávají do meziproduktů výroby piva<sup>32</sup>.

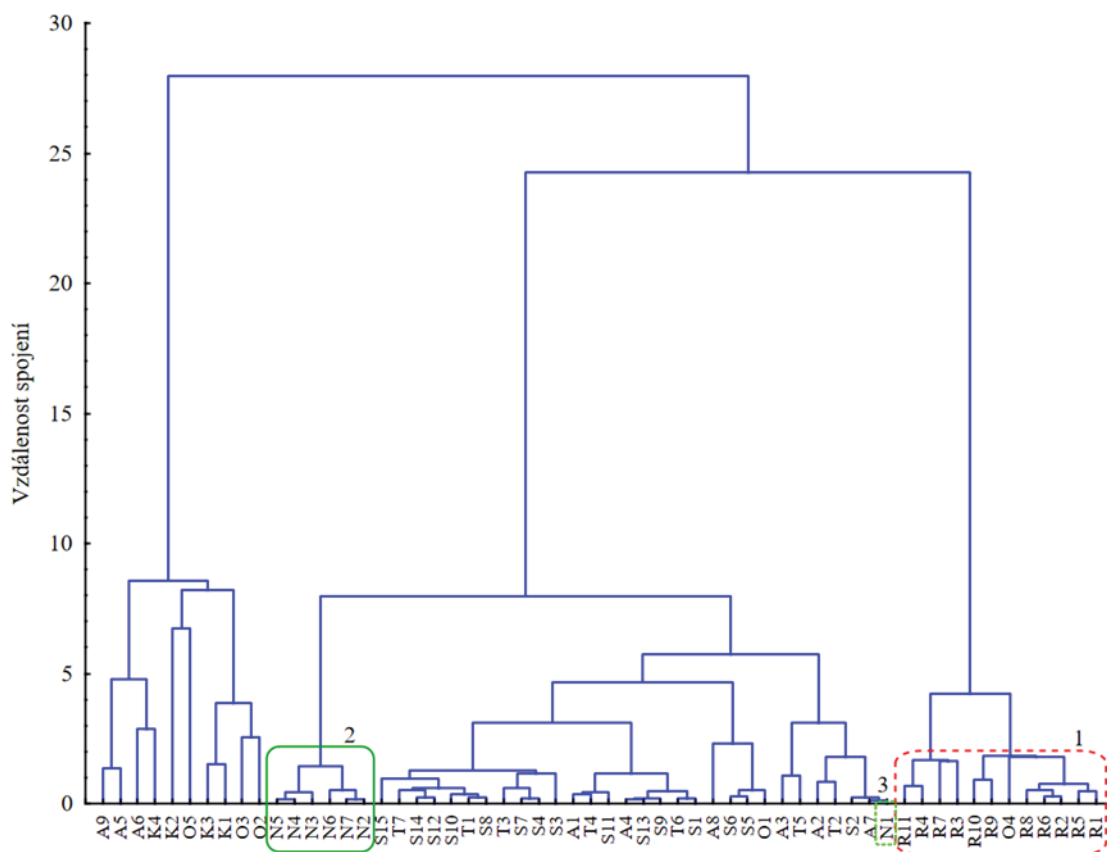
V programu Statistica 13.3. byla provedena shluková analýza pro různé druhy piv obsahující jablečnou, jantarovou, citronovou, octovou a mléčnou kyselinu. Úkolem této analýzy bylo zjistit, jestli při této analýze dojde k rozdělení druhů piv do klastrů podle obsahu organických kyselin.

Před samotnou analýzou byly hodnoty koncentrací organických kyselin standardizovány. Pro shlukovou analýzu byla využita Wardova metoda, kde pro měření vzdáleností byla použita euklidovská metrika.

Z obr. 1 lze vyčíst, že tato analýza rozdělila piva typu radler a typu nealko do jednotlivých klastrů zvýrazněných červeně a zeleně (čísla 1–3). Do klastru obsahující piva typu radler (číslo 1) bylo zařazeno i jedno ovocné pivo

s označením O4, které mělo podobný obsah organických kyselin jako piva typu radler. Naopak do klastru nealkoholických piv (číslo 2) nebylo zařazeno nealkoholické pivo s označením N1 (číslo 3), které mělo výrazně odlišný obsah organických kyselin než ostatní nealkoholická piva. Z klastrové analýzy je také patrné, že světlá, tmavá, ovocná piva, piva typu Ale a kyselá piva nebyla rozdělena do samostatných klastrů. V daném klastru se nacházelo vždy více různých druhů piv. Z toho lze usuzovat, že v obsahu organických kyselin v těchto druzích piva není dostatečně významná odlišnost (obr. 1).

Byla vypracována korelační analýza mezi jablečnou, jantarovou, citronovou, octovou, mléčnou kyselinou a obsahem alkoholu pro všechny druhy piv. V tabulce II jsou zaznamenány výsledné korelační koeficienty, kde tučně jsou zvýrazněny korelační koeficienty, pro které byla p-hodnota testu nižší než 0,05 a lze tak zamítnout nulovou hypotézu testu a to, že mezi jednotlivými obsahy analytů neexistuje lineární závislost. Z tabulky lze pozorovat, že mezi obsahem jablečné, jantarové a citronové kyseliny existuje středně silná pozitivní závislost. Slabá pozitivní korelace existuje i mezi kyselinou jantarovou a octovou a mléčnou kyselinou. Naopak mezi citronovou



Obr. 1. Klastrová analýza obsahu organických kyselin v různých druzích piv (barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chemické listy)

Tabulka II  
Korelační analýza mezi organickými kyselinami

	Jablečná kyselina	Jantarová kyselina	Citronová kyselina	Octová kyselina	Mléčná kyselina	Obsah alkoholu
Jablečná kyselina	1,0000	<b>0,4172</b>	<b>0,5427</b>	0,1606	–0,1534	<b>0,2770</b>
Jantarová kyselina	<b>0,4172</b>	1,0000	–0,1013	<b>0,2650</b>	<b>0,3395</b>	<b>0,5969</b>
Citronová kyselina	<b>0,5427</b>	–0,1013	1,0000	0,1457	<b>–0,2699</b>	–0,0609
Octová kyselina	0,1606	<b>0,2650</b>	0,1457	1,0000	0,1007	<b>0,3987</b>
Mléčná kyselina	–0,1534	<b>0,3395</b>	<b>–0,2699</b>	0,1007	1,0000	0,2097
Obsah alkoholu	<b>0,2770</b>	<b>0,5969</b>	–0,0609	<b>0,3987</b>	0,2097	1,0000

a mléčnou kyselinou existuje slabá negativní závislost. S obsahem alkoholu slabě až středně silně pozitivně koreluje obsah jablečné, jantarové a octové kyseliny. Korelační analýza by také mohla být použita na kontrolu správnosti technologie vaření piva, kdy by v případě nevyhovující technologie nebo chyby při výrobě piva došlo ke statisticky významným rozdílům v obsahu organických kyselin, které jsou na sobě závislé podle vypracované korelační analýzy.

## Závěr

Profil organických kyselin je velmi důležitým faktorem pro stanovení kvality piva. Z výsledků vyplývá, že nejvíce zastoupenou byla mléčná kyselina v kyselých a ovocných pivech a citronová kyselina v radlerch a ovocných pivech. Organické kyseliny jsou zásadní pro stabilitu pH a chuť piva a jsou v pivu přítomny v poměrně velkém množství. Stanovení profilu organických kyselin v souvislosti s korelační analýzou by proto mohlo být užitečným nástrojem pro kontrolu technologie výroby piva, případně autenticity přídatku ovocného podílu do radlerů a ovocných piv. Kapilární elektroforéza je užitečným nástrojem pro separaci a kvantifikaci organických kyselin v pivu.

*Autoři děkují Ministerstvu zemědělství ČR, MZE-RO1923 za finanční podporu.*

## LITERATURA

- Erny G. L., Rodrigues J. E. A., Gil M. A., Barros A. S., Esteve V. I.: *Chromatographia* 70, 1737 (2009).
- Olšovská J., Čejka P., Štěrbá K., Slabý M., Frantík F.: *Senzorická analýza piva*. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha 2017.
- Ciosek A., Rusiecka I., Poreda A.: *J. I. Brewing* 126, 53 (2020).
- Preedy V.: *Beer in Health and Disease Prevention*. Elsevier/Academic Press, Amsterdam 2009.
- Eßlinger M. H.: *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*. 1. vyd. Wiley-VCH, Weinheim 2009.
- Franz O., Gastl M., Back W.: *Handbook of Brewing* 44, 257 (2009). Wiley 2009.
- Zhao X., Yin Y., Fang W., Yang Z.: *Int. J. Gastron. Food Sci.* 32, 100716 (2023).
- Baigts-Allende D. K., Pérez-Alva A., Ramírez-Rodrigues M. A., Palacios A., Ramírez-Rodrigues M. M.: *J. Food Compos. Anal.* 100, 103921 (2021).
- Fanari M., Fortesch M., Sanna M., Piu P. P., Porcu C. M., D'hallewin G., Secchi N., Zinellu M., Pretti L.: *J. Food Process. Pres.* 44, 1737 (2019).
- Koren D., Hegyesné Vecseri B., Kun-Farkas G., Urbin A., Nyitrai A., Sipos, L.: *J. Food Sci. Technol.* 57, 1183 (2020).
- Brányik T., Silva D. P., Baszczynski M., Lehnert R., Almeida e Silva J. B.: *J. Food Eng.* 108, 493 (2012).
- Burberg F., Zarnkow M.: *Special Production Methods*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2009.
- Narziss L., Miedaner H., Kern E., Leibhard M.: *Brauwelt Int.* 4, 396 (1992).
- Selecký R., Šmogrovičová D., Šulák M.: *Kvasny Prum.* 51, 235 (2005).
- Yang X., Yin L., Qi L., Guoxian G.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 64, 222 (2018).
- Wales D. S., Cartledge T. G., Loyd D.: *J. Gen. Microbiol.* 116, 93 (1980).
- Püschner C., Zenz H., Schwarz H.: *Änderung des Carbonsäureprofils während des Brauprozesses*. Mit-

- teilungen Österreichisches Getränke Institut, Berlin 1995.
18. Gehlhoff R., Piendl A.: Proc. Annual Meeting-ASBC 33, 43 (2018).
  19. Bendová O., Pardonová B.: Kvasny Prum. 21, 75 (1975).
  20. Tyrell T., Reimann S., Folz R., Harms D., Hinrichs J., Offer G.: Brew. Sci. 66, 75 (2013).
  21. Montanari L., Perretti G., Natella F., Guidi A., Fantozzi P.: LWT Food Sci. Technol. 32, 535 (1999).
  22. Yoshida S., Yokoyama A.: J. Biosci. Bioeng. 113, 556 (2012).
  23. Buszewski B., Dziubakiewicz E., Szumski M.: *Electromigration Techniques*. Elsevier Science, Berlin 2013.
  24. Havlová P., Šusta J.: Kvasny Prum. 43, 37 (1997).
  25. Wilson I.: *Encyclopedia of Separation Science*. Volume 2. Academic Press, San Diego 2000.
  26. Dysvik A., La Rosa L. S., De Rouck G., Rukke O. E., Westereng B., Wicklund T., Ercolini D.: Appl. Environ. Microbiol. 86 (2020). doi:10.1128/AEM.00566-20.
  27. Basařová G.: *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Vydavatelství VŠCHT, Praha 2010.
  28. Navrátil M., Dömény Z., Šturdík E., Šmogrovičová D., Gemeiner P.: Biotechnol. Appl. Biochem. 35, 133 (2015).
  29. Garrett O.: *The Oxford Companion to Beer*. Oxford University Press, New York 2012.
  30. Whiting G. C.: J. Inst. Brew. 82, 84 (1976).
  31. Coote N., Kirsop H. B.: J. Inst. Brew. 80, 474 (1974).
  32. Hough J. S., Briggs E. D., Stevens R., Young W. T.: *Malting and Brewing Science*. Springer US, Boston 1982.

**S. Černá<sup>a</sup>, K. Benešová<sup>a</sup>, and J. Martiník<sup>a,b</sup>**  
(<sup>a</sup> *Research Institute of Brewing and Malting, Brno*,  
<sup>b</sup> *Institute of Biotechnology, University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic*): **Determination of Organic Acids in Special Beers and Beer-based Beverages Using Capillary Isotachophoresis**

Organic acids in beer affect beer quality, including organoleptic properties and colloidal stability. A large proportion of the total organic acids in beer comes from the wort, while the rest is produced or transformed by yeast metabolism. Concentrations of five organic acids were determined in selected types of beer. Malic, succinic, citric, acetic and lactic acids were quantified. The concentration of acids varies according to the type of beer. The determination was made by the capillary isotachophoresis.

Keywords: organic acids, beer, capillary isotachophoresis

#### Acknowledgements

The authors would like to thank the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, project MZE-RO1923, for financial support.

## SYSTÉMOVÉ ÚLOHY VO VÝUČBE ORGANICKEJ CHÉMIE

MÁRIA GANAJOVÁ<sup>a</sup>, IVANA SOTÁKOVÁ<sup>a</sup> a HANA ČTRNÁCTOVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Oddelenie didaktiky chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Moyzesova 11, 040 01 Košice, Slovensko, <sup>b</sup> Katedra učiteľstvá a didaktiky chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Karlova, Hlavova 8, 128 43 Praha, Česká republika  
maria.ganajova@upjs.sk

Došlo 7.11.22, prijaté 6.6.23.

Tento článok nadväzuje na predchádzajúci článok s názvom "Systémové úlohy vo vyučovaní anorganickej chémie" uverejnený v Chemických listoch 9/2022, v ktorom bola vysvetlená metóda SATL (Systemic Approach in Teaching and Learning), popísané jednotlivé typy systémových úloh v anorganickej chémii a uvedené príklady. Cieľom tohto príspevku je sprístupniť o príklady systémových úloh určených na vyučovanie organickej chémie, ktoré sú zamerané na rozvoj kognitívnych procesov vyššieho rádu. Tieto systémové úlohy aplikovalo 89 učiteľov vo vyučovaní na 2136 žiakoch 2. ročníka gymnázií v priebehu dvoch školských rokov (2019–2021). Po overení sa potvrdilo, že systémové úlohy zlepšili porozumenie žiakov organickej chémie a prispeli k rozvoju kognitívnych a vedeckých zručností, ako sú kritické myslenie, riešenie problémov, spolupráca, argumentácia a interpretácia výsledkov. Učítelia zapojení do tohto výskumu tiež poskytli svoje názory na kladné a problémové stránky tohto vyučovacieho nástroja z hľadiska motivácie, hlbšieho porozumenia, identifikácie miskoncepcií a časovej náročnosti.

Kľúčové slová: metóda SATL, systémové úlohy, kognitívne procesy, výučba organickej chémie

## Obsah

1. Úvod
2. Charakteristika pracovných listov so systémovými úlohami pre organickú chémiu
3. Ukážky vybraných systémových úloh z organickej chémie s priradením dimenzie vedomostí a kognitívneho procesu podľa revidovanej Bloomovej taxonómie
4. Názory učiteľov k implementácii systémových úloh do výučby organickej chémie
5. Záver

## 1. Úvod

Život v súčasnej spoločnosti vyžaduje stále viac schopnosť systémového myslenia, čo sa odráža aj v požiadavkách pre výučbu žiakov na stredných školách. Preto sme zamerali svoju pozornosť na osvojovanie chemických úloh, ktoré také myslenie rozvíjajú. V príspevku „Systémové úlohy vo výučbe anorganickej chémie“, publikovanom v Chemických listoch č. 9/2022, bola vysvetlená metóda SATL (z angl. Systemic Approach in Teaching and Learning) a opísané jednotlivé typy systémových úloh – spolu s ukázkami úloh k téme s-prvky a ich zlúčeniny na úrovni gymnázia<sup>1</sup>. Ako bolo v tomto príspevku uvedené,

systémový prístup k výučbe a učeniu sa, označovaný SATL, zaviedli Fahmy a Lagowski v roku 1997 na Texaskej univerzite v Austine<sup>2</sup>. Cieľom tohto prístupu je pretvárať mechanické učenie na hlboké učenie žiakov<sup>3</sup>. Tento cieľ je možné dosiahnuť rozvojom systémového myslenia v kontexte systémovo orientovaných učebných úloh<sup>4</sup>. Takéto úlohy využívajú uzavreté schémy tzv. systémové diagramy, v ktorých sú pojmy priamo alebo nepriamo prepojené a vytvárajú uzavretú pojmovú štruktúru. Od žiakov sa vyžaduje analýza, zostrojenie alebo doplnenie systémového diagramu, pričom na splnenie týchto úloh by žiaci mali používať systémové myslenie a rozvíjať dôležité zručnosti, ako sú schopnosť rozlišovať pojmy, vytvárať vzťahy, analyzovať systém na základné zložky (pojmy a prepojenia) a syntetizovať tieto zložky do vzájomne prepojených subsystémov tvoriacich celok<sup>5</sup>.

Žiaci sa neučia izolované fakty (naspamäť), ale spájajú pojmy a fakty v logickom kontexte<sup>6</sup>.

Úlohy využívajúce systémové diagramy môžu evokovať štruktúru podobnú pojmovým mapám. Rozdiel medzi pojmovými mapami a systémovými úlohami je v tom, že pojmové mapy sú náročné na objektívnu skórovateľnosť z hľadiska posúdenia jednoznačnosti a správnosti<sup>7</sup>. V uzavretom systémovom diagrame existujú aj implikácie viaccestných vzťahov, ktoré môžu byť „odhalené“ neskôr a v danom čase použité na účely posudzovania. V tomto zmysle uzavreté systémové diagramy sú úplné, čo je v kontraste so štandardnými pojmovými mapami<sup>2</sup>.



Systémové diagramy môžu obsahovať 3–6 zložiek (názvy prvkov či zlúčenín, chemické značky či chemické vzorce), pričom jednotlivé zložky diagramu musia navzájom súvisieť.

Cieľom tohto príspevku je sprístupniť ukážky vytvorených systémových úloh z organickej chémie zamerané na vyššie kognitívne procesy, ako aj názory učiteľov na ich implementáciu do výučby na gymnáziu. Vytvorené systémové úlohy majú pomôcť žiakom hlbšie porozumieť organickej chémii, ktorá je teoretickým základom mnohých špecializovaných chemických disciplín, ako sú chémia liečiv, farbív, makromolekulová chémia, kozmetická chémia apod.

## 2. Charakteristika pracovných listov so systémovými úlohami pre organickú chémiu

Učivo organickej chémie sa vyučuje prevažne v 2. ročníku 4-ročného gymnázia, resp. 6. ročníku gymnázia s osemročným štúdiom. Pre organickú chémiu bola vytvorená sada pracovných listov so systémovými úlohami na nasledovné témy: Úvod do organickej chémie, Uhl'ovodíky, Deriváty uhl'ovodíkov, Hydroxyderiváty a Karboxylové kyseliny a ich deriváty.

Pracovné listy so systémovými úlohami boli vytvorené v súlade s obsahovými a výkonovými štandardmi Štátneho vzdelávacieho programu (ŠVP) pre gymnáziá<sup>8</sup> (SR) a Rámcového vzdelávacieho programu (RVP) pre gymnázia<sup>9</sup> (ČR). V týchto štandardoch je zdôraznené, že v organickej chémii je potrebné klásť dôraz na súvislosti medzi štruktúrou a vlastnosťami organických látok, princípmi ich reaktivity a zamerať sa na ich najdôležitejšie reakcie. Práve reaktivita organických zlúčenín predstavuje pre žiakov jednu z najnáročnejších častí štúdia organickej chémie.

Cieľom vytvorených pracovných listov je preto prehĺbovanie a upevňovanie učiva organickej chémie prostredníctvom systémových úloh, ktoré sú koncipované tak, aby žiaci porozumeli širším súvislostiam a vzťahom, pravidlám a zákonitostiam zápisov reakčných schém reakcií organických zlúčenín<sup>10</sup>.

Vytvorené pracovné listy predstavujú súbory úloh obsahujúce systémové diagramy zamerané na posilnenie kognitívneho porozumenia základným pojmom organickej chémie, typom chemických reakcií organických zlúčenín, vzťahom medzi uhl'ovodíkmi a ich derivátmi, hydroxyderivátmi uhl'ovodíkov a ich reaktivitou, karboxylovými kyselinami a ich derivátmi s dôrazom na reakčné podmienky/reakčné činidlá.

Všetky pracovné listy boli vytvárané v spolupráci autorov článku s učiteľmi, pilotne overené a následne optimalizované.

## 3. Ukážky vybraných systémových úloh z organickej chémie s priradením dimenzie vedomostí a kognitívneho procesu podľa revidovanej Bloomovej taxonómie

V súvislosti s požiadavkou na zvyšovanie úrovne tvorivého a kritického myslenia žiakov vo vzdelávacom procese je dôležité zamerať sa najmä na rozvíjanie vyšších kognitívnych procesov a využívanie takých vzdelávacích aktivít, ktoré ich rozvíjajú<sup>11,12</sup>.

Ako uvádzajú Fahmy a Lagowski<sup>13</sup>, systémové úlohy a testy z nich vytvorené môžu rozvíjať a overovať vyššie kognitívne procesy, ako sú analýza, syntéza a hodnotenie v Bloomovej taxonómii<sup>14</sup>. Tradičné objektívne testy nedokážu posúdiť učenie nad rámec porozumenia.

Preto sme sa aj v našom príspevku zamerali na príklady systémových úloh z organickej chémie (tab. I) určených na rozvíjanie vyšších kognitívnych procesov, ktoré sú hierarchicky usporiadané v rámci revidovanej Bloomovej taxonómie (ďalej RBT)<sup>15</sup>.

Predpokladom rozvíjania kognitívnych procesov je poznanie príslušných aktívnych sloviess, ktoré vymedzujú jednotlivé kategórie. Na základe týchto aktívnych sloviess dokážeme identifikovať, ktoré kognitívne procesy by sa mali rozvíjať<sup>16,17</sup>.

Z hľadiska vedomostnej dimenzie podľa RBT možno rozvíjať faktické, konceptuálne, procedurálne a metakognitívne vedomosti. Navrhnuté systémové úlohy v pracovných listoch prehĺbujú a upevňujú predovšetkým vedomosti žiakov v kategórii konceptuálne vedomosti. V závere pracovných listov sa nachádzajú úlohy na rozvoj metakognitívnych vedomostí a zručností žiakov so zameraním na stratégiu sebahodnotenia.

Z hľadiska dimenzie kognitívnych procesov podľa RBT sú systémové úlohy v pracovných listoch zamerané nielen na zapamätanie a porozumenie, ale hlavne na:

- schopnosť uplatniť vedomosti v nových konkrétnych situáciách,
- schopnosť analyzovať alebo syntetizovať jednotlivé časti systémového diagramu,
- schopnosť porovnávať a vyhodnocovať správnosť prístupných systémových diagramov.

Vytvorené pracovné listy so systémovými úlohami prehĺbujú schopnosti žiakov pracovať s odborným textom, schémami, kriticky analyzovať informácie a syntetizovať ich. Ďalej rozvíjajú schopnosti žiakov pracovať vo dvojiciach alebo skupinách, diskutovať, komunikovať a argumentovať.

Je potrebné zdôrazniť, že diagramy v systémových úlohách obsahujú iba schematické zápisy (nie úplné), preto sa v niektorých reakciách vedľajší produkt nepíše.

V závere pracovných listov sa nachádzajú úlohy overujúce metakognitívne znalosti žiakov prostredníctvom sebahodnotenia. Zo skúseností vieme, že žiaci majú často problém slovne zhodnotiť úroveň svojich vedomostí a zručností. Práve sebahodnotiacia karta žiaka tomuto javu

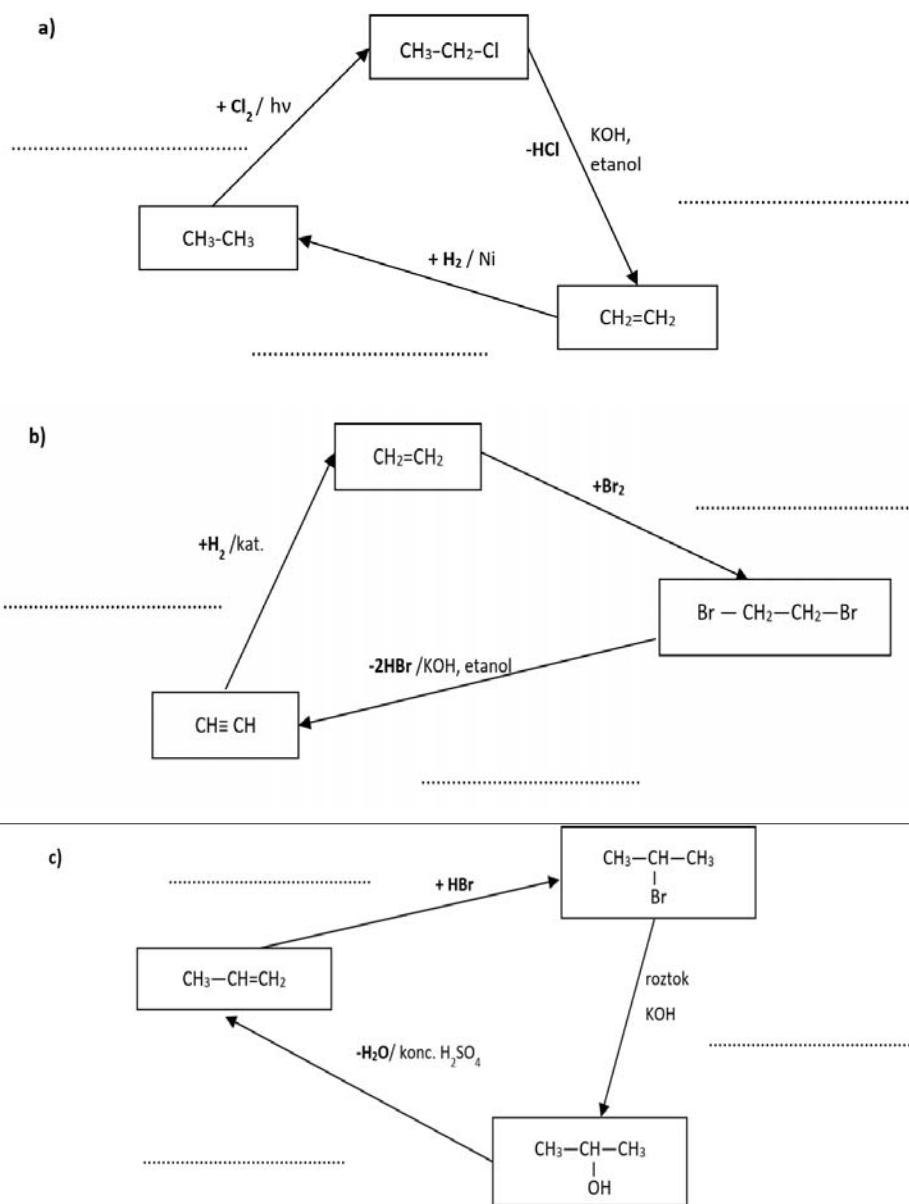
## Tabuľka I

Príklady systémových úloh z organickej chémie s priradením dimenzie vedomostí a dimenzie kognitívneho procesu podľa RBT

## Úloha č. 1 na systémovú analýzu

## Dimenzia vedomostí/kognitívneho procesu: konceptuálne vedomosti/aplikácia

Doplňte typy chemických reakcií v nasledujúcich systémových diagramoch.



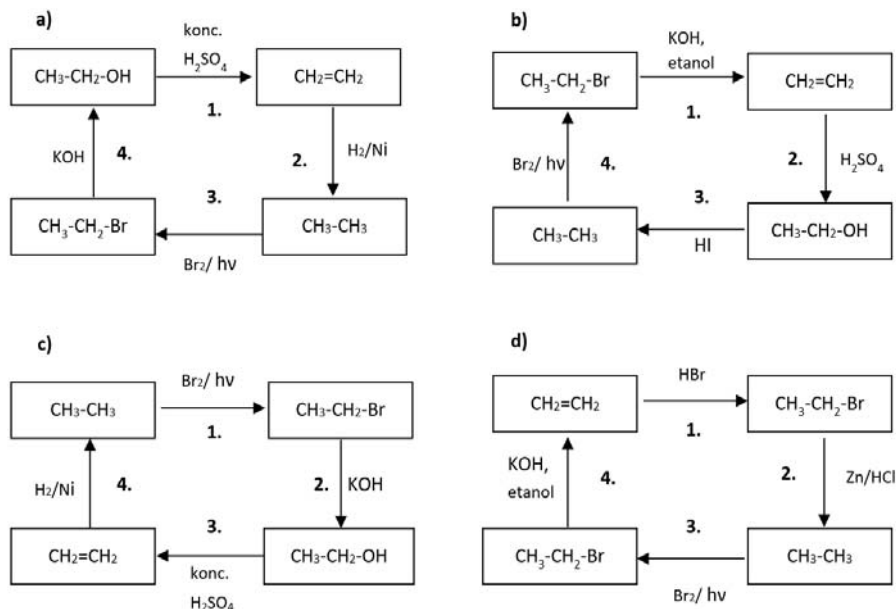
Žiaci analyzujú vzťahy medzi jednotlivými organickými zlúčeninami a reakčnými podmienkami/reakčnými činidlami.

**Riešenie** (zhora v smere hodinových ručičiek):

- a) eliminácia – adícia – substitúcia  
 b) adícia – eliminácia – adícia  
 c) substitúcia – eliminácia – adícia

**Úloha č. 2 s možnosťou výberu z viacerých odpovedí****Dimenzia vedomostí/kognitívneho procesu: konceptuálne vedomosti/analýza**

Určte, ktorý zo systémových diagramov vyjadruje priebeh chemických reakcií v poradí: substitúcia – substitúcia – eliminácia – adícia.



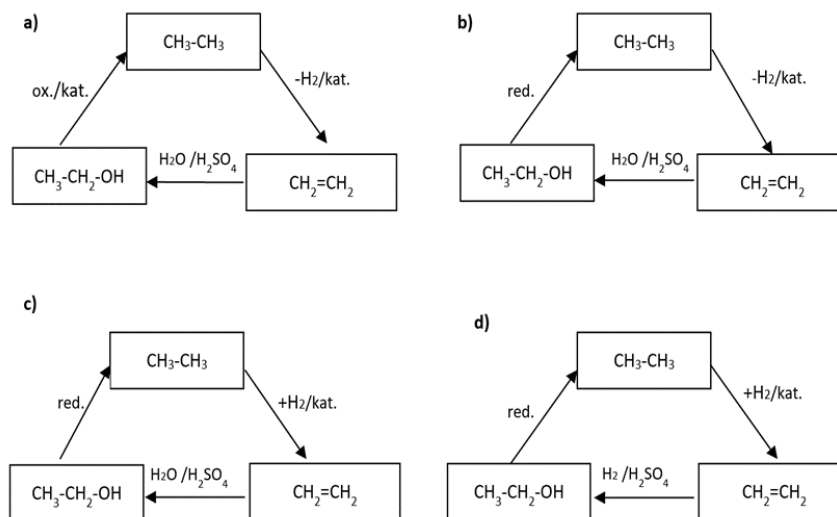
Žiaci vyberajú správnu odpoveď z viacerých odpovedí, pričom analyzujú každú možnosť. Úlohu môžeme rozšíriť zadáním, aby žiaci vysvetlili a zdôvodnili svoju odpoveď.

**Riešenie:**

Správny je systémový diagram c).

**Úloha č. 3 s možnosťou výberu z viacerých odpovedí****Dimenzia vedomostí/kognitívneho procesu: konceptuálne vedomosti/analýza**

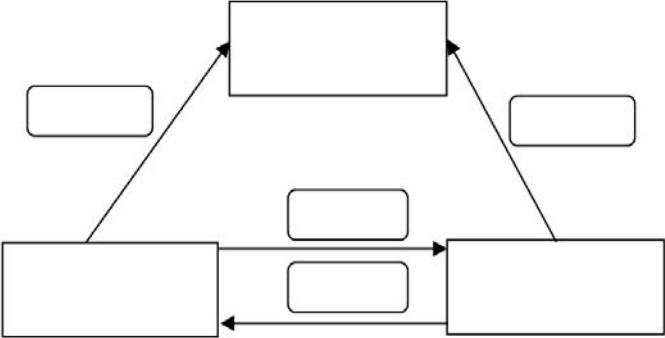
Určte, ktorý zo systémových diagramov správne vyjadruje priebeh chemických reakcií medzi etánom, eténom a etanolom.

**Riešenie:**

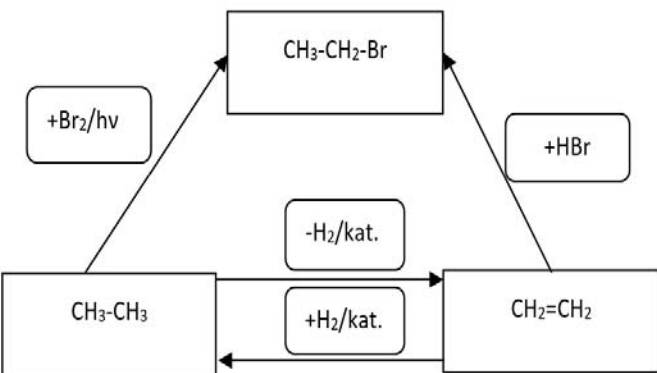
Správny je systémový diagram b).

**Úloha č. 4 na priradovanie****Dimenzia vedomostí/kognitívneho procesu: konceptuálne vedomosti/analýza**

Vyberte zlúčeniny zo stĺpca A a reakčné podmienky/reakčné činidlá zo stĺpca B a zostavte systémový diagram v stĺpci C.

A	C	B
$\text{CH}_2=\text{CH}_2$ $\text{CH}_3-\text{CH}_3$ $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{Br}$		$+\text{Br}_2/\text{h}\nu$ $+\text{HBr}$ $-\text{H}_2/\text{kat.}$ $+\text{H}_2/\text{kat.}$

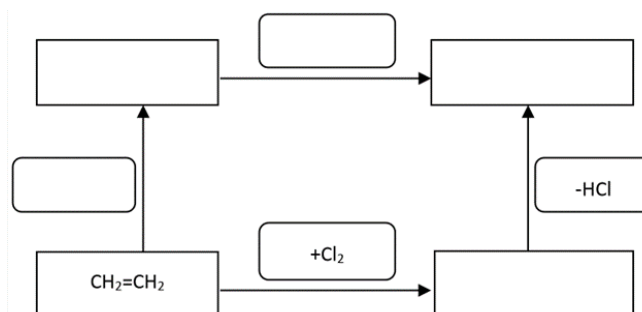
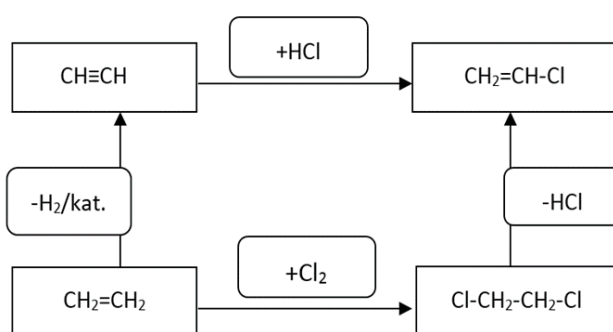
**Riešenie:**

A	C	B
$\text{CH}_2=\text{CH}_2$ $\text{CH}_3-\text{CH}_3$ $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{Br}$		$+\text{Br}_2/\text{h}\nu$ $+\text{HBr}$ $-\text{H}_2/\text{kat.}$ $+\text{H}_2/\text{kat.}$

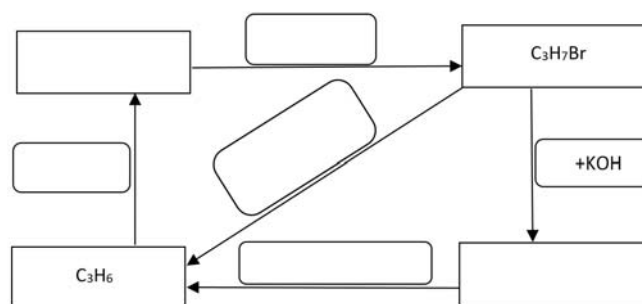
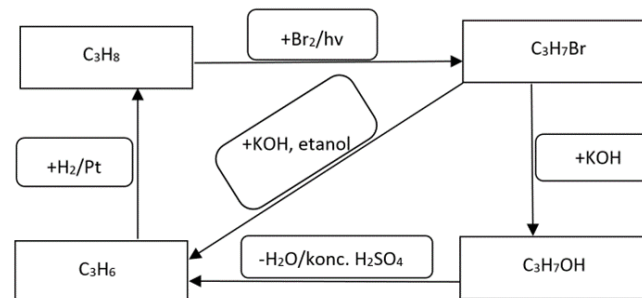
Uvedenú úlohu je vhodné využiť aj na hodnotenie, body môžeme pridelovať za správne zaradenie vybraných zlúčenín a reakčných podmienok/reakčných činidiel do diagramu.

**Úloha č. 5 na zorad'ovanie****Dimenzia vedomostí/kognitívneho procesu: konceptuálne vedomosti/analýza**

Zaraďte organické zlúčeniny  $\text{Cl-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Cl}$ ,  $\text{CH}\equiv\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2=\text{CH-Cl}$  a doplňte príslušné reakčné podmienky/reakčné činidlá do nasledovného systémového diagramu.

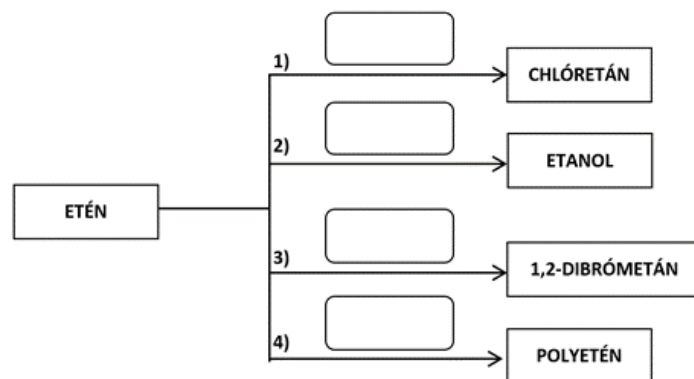
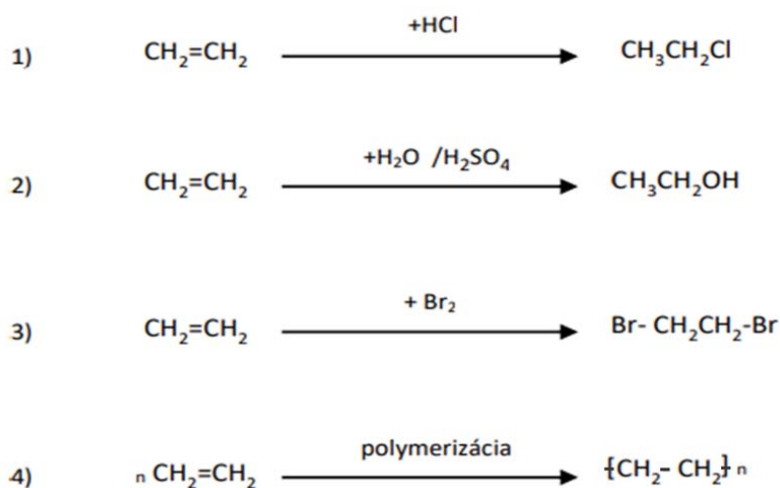
**Riešenie:****Úloha č. 6 na zorad'ovanie****Dimenzia vedomostí/kognitívneho procesu: konceptuálne vedomosti/analýza**

Zaraďte organické zlúčeniny  $\text{C}_3\text{H}_8$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$  a doplňte príslušné reakčné podmienky/reakčné činidlá do nasledovného systémového diagramu.

**Riešenie:**

**Úloha č. 7 na systémovú syntézu a analýzu****Dimenzia vedomostí/kognitívneho procesu: konceptuálne vedomosti/ analýza**

Doplňte správne reakčné podmienky/reakčné činidlá do diagramu a zapíšte príslušné reakcie chemickými rovnicami. Reakciu č. 4 pomenujte.

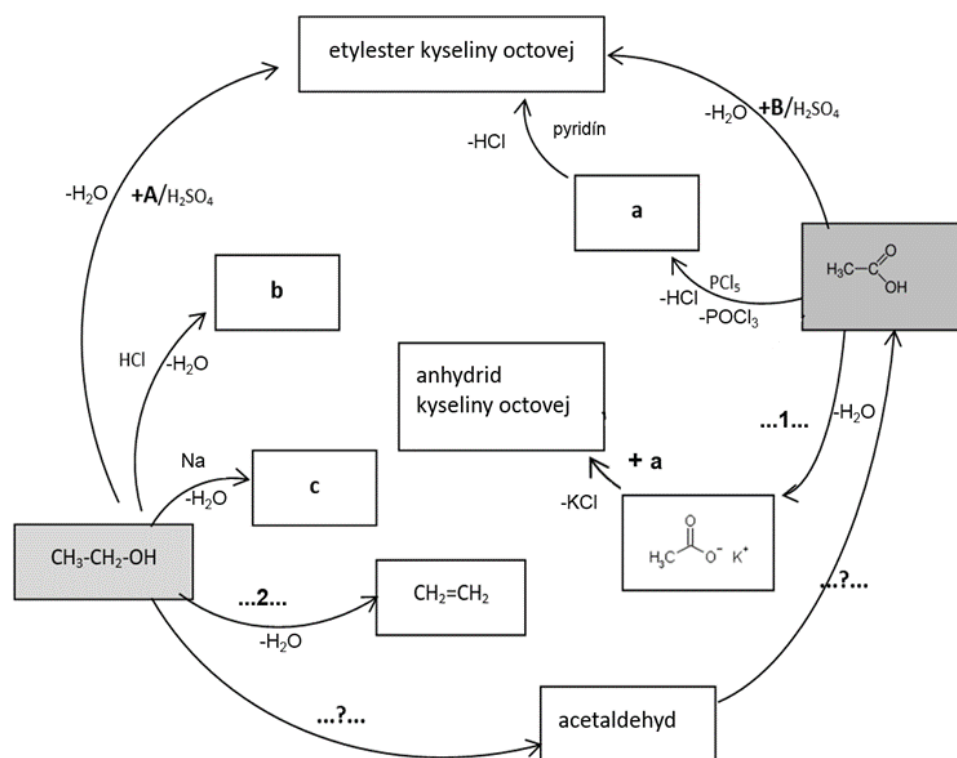
**Riešenie:**

Pracovné listy obsahovali i obťažnejšie úlohy zložené z viac typov systémových úloh. Ako príklad uvádzame systémovú úlohu k téme Karboxylové kyseliny a ich deriváty obsahujúcu čiastkové úlohy zamerané na doplňovanie, analýzu a syntézu. Úloha je vhodná na prácu žiakov v skupinách.

**Úloha č. 8 na systémovú syntézu a analýzu, dopĺňovanie**  
**Dimenzia vedomostí/kognitívneho procesu: konceptuálne vedomosti/ analýza**

V nasledujúcom diagrame, ktorý ukazuje na reakčné vzťahy medzi uhl'ovodíkmi, derivátmi uhl'ovodíkov, karboxylovými kyselinami a ich derivátmi, doplňte:

- názvy produktov (a – c)
- reakčné podmienky (1 – 2)
- názvy reaktantov (A – B)
- typ reakcie (?)



**Riešenie:**

- a – chlorid kyseliny octovej, b – etylchlorid/chlóretán, c – etoxid sodný (nátrium etanolát)
- 1 – KOH, 2 – konc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, t
- A – kyselina octová, B – etanol
- ? – oxidácia

predchádza tým, že umožňuje žiakom opísať stav porozumenia danej témy. Ponúka vopred naformulované kritériá, čím pomáha žiakom vyjadriť úroveň vlastných vedomostí a zručností, ktorú intuitívne pociťujú, len nevedia, ako by to mohli transformovať do viet<sup>18</sup>. Ako ukážky uvádzame sebahodnotiacu kartu k téme Uhl'ovodíky (tab. II) a sebahodnotiacu kartu k téme Karboxylové kyseliny (tab. III).

Využívanie kariet tohto typu umožňuje žiakovi sledovať vlastné procesy učenia sa, vyhodnotiť, nakoľko sú efektívne a zmeniť učebné stratégie, keď je to potrebné.

#### 4. Názory učiteľov k implementácii systémových úloh do výučby organickej chémie

Mnohé štúdie<sup>19–23</sup> v oblasti prírodovedného vzdelávania zdôrazňujú skutočnosť, že systémové myslenie je veľmi dôležitá schopnosť myslenia vyššieho rádu, ktorá by sa mala podporovať/rozvíjať počas vyučovania.

Existujú zahraničné štúdie<sup>5,23–25</sup>, ktoré sa zaoberali návrhmi systémových úloh pre organickú chémiu a následne ich implementáciou do výučby s cieľom rozví-

Tabuľka II

Ukážka sebahodnotiacej karty žiaka k téme Uhľovodíky

Vyznačte krížikom, do akej miery súhlasíte s uvedeným výrokom	Áno, bez pomoci	Čiastočne, s pomocou	Zatiaľ nie
<b>Viem doplniť</b> do systémových diagramov vzorce a reakčné podmienky/reakčné činidlá, ktoré správne vyjadrujú reakcie medzi alkánmi, alkénmi a alkínmi.			
<b>Viem pomocou</b> systémových diagramov <b>zapísať</b> chemickými rovnicami reakcie medzi alkánmi, alkénmi a alkínmi.			
<b>Viem zostaviť</b> systémový diagram na základe ponúknutých organických látok/zlúčenín a reakčných podmienok/reakčných činidiel.			

Tabuľka III

Ukážka sebahodnotiacej karty žiaka k téme Karboxylové kyseliny

Vyznačte krížikom, do akej miery súhlasíte s uvedeným výrokom	Samostatne	S malou pomocou	S výraznou pomocou
<b>Viem napísať</b> vzorcom dôležité karboxylové kyseliny.			
<b>Viem doplniť</b> činidlá a reakčné podmienky v reakciách prípravy karboxylových kyselín.			
<b>Viem napísať</b> produkty reakcií karboxylových kyselín a pomenovať ich.			
<b>Viem analyzovať systémový diagram</b> chemických reakcií alkoholov a karboxylových kyselín a doplniť v ňom reakčné podmienky, produkty a typ reakcie.			
<b>Viem argumentovať a zdôvodňovať</b> správnosť svojich tvrdení.			

jať zručnosti systémového myslenia u žiakov strednej školy. Výsledky štúdií potvrdzujú, že pre rozvoj systémového myslenia žiakov v oblasti organickej chémie je výučba s implementáciou systémových úloh efektívnejšia v porovnaní s tradičnými metódami výučby. Názory učiteľov na tento spôsob výučby však neboli zisťované.

Preto cieľom nášho výskumu bolo zistiť názory učiteľov k implementácii systémových úloh pri výučbe organickej chémie. Vytvorené pracovné listy (pozri kapitola 2) implementovalo do výučby 89 učiteľov počas dvoch školských rokov (2019–2021). Na tejto výučbe sa zúčastnilo spolu 2136 žiakov 2. ročníka gymnázií. Výber škôl bol uskutočnený náhodne tak, aby boli zastúpené školy z celého Slovenska. Všetci učitelia boli aktívne zapojení do národného projektu IT Akadémia – vzdelávanie pre 21. storočie (<https://itakademia.sk/>) a prejavili záujem implementovať vytvorené pracovné listy so systémovými úlohami do svojej výučby.

Názory učiteľov k pracovným listom so systémovými úlohami po ich implementácii vo výučbe boli zisťované prostredníctvom elektronického spätnoväzbového dotazníka. Učitelia vyjadrovali svoje názory k jednotlivým polož-

kám dotazníka na trojstupňovej škále „áno“, „neviem posúdiť“ a „nie“.

Dotazník obsahoval 12 položiek, ktoré boli rozdelené do štyroch oblastí:

1. Vhodnosť obsahovej stránky pracovných listov v súlade s obsahovými a výkonovými štandardami podľa ŠVP pre gymnáziá
  2. Význam systémových úloh pre rozvoj vybraných zručností žiakov
  3. Kladné stránky implementácie systémových úloh do výučby
  4. Problémové stránky implementácie systémových úloh do výučby
- V ďalšej časti uvádzame výsledky vyhodnotenia jednotlivých oblastí dotazníka.

- 4.1. Vhodnosť obsahovej stránky pracovných listov v súlade s obsahovými a výkonovými štandardami podľa ŠVP pre gymnáziá

Podľa 87,64 % učiteľov vytvorené pracovné listy prehlbujú a upevňujú vedomosti žiakov v súlade s cieľmi stanovenými príslušným ŠVP pre gymnáziá<sup>8</sup>.





Obr. 1. Názory učiteľov na systémové úlohy; Zdroj: vlastné spracovanie

Systémové úlohy v pracovných listoch učiteľia považovali za veľmi dobre spracované po odbornej stránke (84,27 %), jasne a zrozumiteľne formulované (89,89 %) a názorné vďaka systémovým diagramom (100 %) – pozri obr. 1. Učiteľia kladne hodnotili rôznorodosť úloh (88,76 %) ako aj rôznu obtiažnosť úloh (88,76 %). Rade nie úloh od jednoduchších k obťažnejším žiakov povzbudzovalo. Ak sa im podarilo správne odpovedať na niekoľko prvých úloh, boli viac motivovaní zamýšľať sa nad zložitejšími úlohami, čo je v súlade aj s cieľmi RBT.

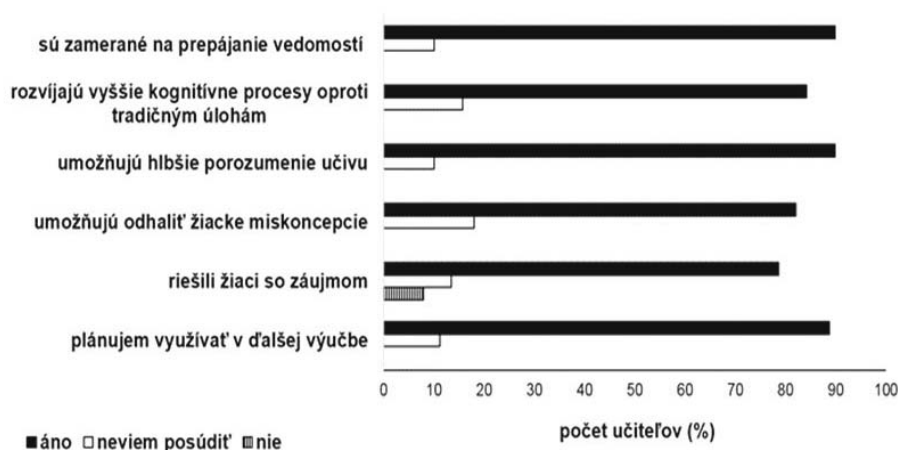
Poznámka: Vzhľadom k tomu, že v tejto oblasti na trojstupňovej škále „áno“, „neviem posúdiť“ a „nie“ u učiteľov nebola zaznamenaná žiadna negatívna odpoveď, obr. 1 predstavuje iba prvé dva stupne škály.

Asi 50 % učiteľov implementovalo tieto pracovné listy do výučby počas pandémie dištančnou formou, pričom znižovali počet úloh väčšinou o jednu úlohu.

#### 4.2. Význam systémových úloh pre rozvoj vybraných zručností žiakov

Pracovné listy so systémovými úlohami podľa učiteľov rozvíjajú nasledovné zručnosti:

- kritické myslenie (88,76 %),
- argumentácia (88,76 %),
- skupinová spolupráca (84,27 %),
- pracovať s diagramami – tvoriť, analyzovať a dopĺňať systémové diagramy (89,89 %),
- interpretovať výsledky (82,02 %),
- tvoriť závery a zovšeobecňovania (86,51 %).



Obr. 2. Názory učiteľov na kladné stránky implementácie systémových úloh do výučby; Zdroj: vlastné spracovanie

#### 4.3. Kladné stránky implementácie systémových úloh do výučby

Za kladné stránky implementácie systémových do výučby (pozri obr. 2) považovali učitelia predovšetkým prepájanie vedomostí (89,89 %), čo pomáha žiakom vnímať pojmy vo vzájomných súvislostiach, upevňovať ich a učiť sa myslieť hlbkovo<sup>26,27</sup>. Podľa 84,27 % učiteľov systémové úlohy oproti tradičným úlohám rozvíjajú vyššie kognitívne procesy, ako sú analýza či hodnotenie (podľa RBT). Systémové úlohy umožňujú odhaliť aj žiacke miskoncepce (82,02 %), čo súvisí so vstupnými vedomosťami žiakov pri riešení týchto úloh. 78,65 % učiteľov sa vyjadrilo, že žiaci majú záujem riešiť takéto typy úloh. 88,76 % učiteľov chce využívať takéto typy úloh vo výučbe aj naďalej.

#### 4.4. Problémové stránky implementácie systémových úloh do výučby

Na obr. 3 uvádzame problémy s implementáciou systémových úloh do výučby podľa učiteľov.

Ako hlavné problémy sa ukazujú chýbajúce metodické materiály (73,03 %), čím sa myslia pracovné listy, nedostatočné vstupné teoretické vedomosti žiakov (60,67 %) a obavy učiteľov z implementácie metódy SATL do výučby (41,57 %), čo si podľa nich vyžaduje školenie napríklad formou webinárov.

Niektorí žiaci nemajú dostatočné vedomosti napr. o názvosloví organických zlúčenín, určovaní typov chemických reakcií či príslušných reakčných podmienok/reakčných činidiel, čo má vplyv na úspešnosť riešenia týchto úloh. U slabších žiakov sa ukázali problémy s argumentáciou, čo súvisí so slovnou zásobou, porozumeli síce vysvetleniu, ale nevedeli ho zdôvodniť.

Ďalším problémom sa ukazuje časové hľadisko – niektorí učitelia sa sťažovali na nedostatok času na riešenie systémových úloh počas dištančnej formy vzdelávania (40,44 %).

## 5. Záver

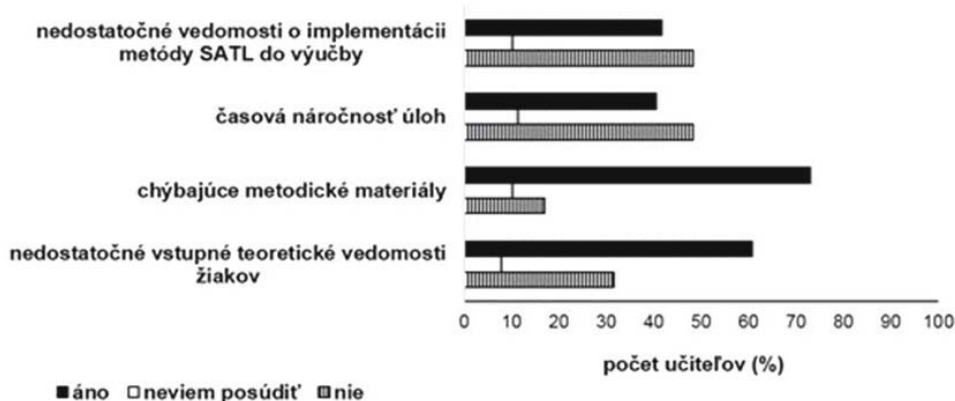
Z názorov učiteľov na kvalitu sady pracovných listov so systémovými úlohami vyplynulo, že je plne využiteľná vo výučbe organickej chémie v 2. ročníku 4-ročného gymnázia, resp. 6. ročníku gymnázia s osemročným štúdiom v rámci riadnych vyučovacích hodín ako aj v 4. ročníku pri opakovaní učiva na seminároch.

Učitelia plánujú využívať tieto pracovné listy aj v budúcnosti. Potenciál systémových úloh vidia v rozvoji hlbokého porozumenia a kritického a systémového myslenia žiakov, na rozdiel od učenia sa naspamäť. Rozvinutá schopnosť žiakov systémovo myslieť sa môže odraziť aj pri výučbe ďalších tém v chémii (napr. biochémie) i v rámci ďalších predmetov ako aj pri riešení problémov bežného života.

Učitelia na základe vlastného uváženia môžu systémové úlohy implementovať do výučby buď s cieľom poskytnúť žiakom spätnú väzbu slúžiacu na zlepšenie procesu učenia sa alebo za účelom sumatívneho hodnotenia (známkovania), kedy napr. môžu prideliť body za správne zaradenie vybraných organických zlúčenín a reakčných podmienok/reakčných činidiel do systémového diagramu.

Prezentované pracovné listy boli zaradené do *Zbierky inovatívnych metodík z chémie pre stredné školy*<sup>28</sup>, ktorú vydalo Centrum vedecko-technických informácií SR v Bratislave a využíva ju vo výučbe väčšina slovenských učiteľov pôsobiach na gymnáziách.

*Táto práca bola podporená národným projektom IT Akadémia – vzdelávanie pre 21. storočie s ITMS kódom 312011F057 a grantom KEGA č. 001UPJŠ-4/2023 „Implementácia formatívneho hodnotenia do výučby na základnej škole so zameraním na digitálnu formu“.*



Obr. 3. Názory učiteľov na problémové stránky implementácie systémových úloh do výučby; Zdroj: vlastné spracovanie

## LITERATÚRA

- Ganajová M., Sotáková I., Dzurišinová Z., Čtrnáctová H.: *Chem. Listy* 116, 552 (2022).
- Fahmy A. F. M., Lagowski J. J.: *Afr. J. Chem. Educ.* 1, 29 (2011).
- Hrin T., Milenković D., Kekez Babić S., Segedinac M.: *Croat. J. Educ.* 16, 175 (2014).
- Fahmy A. F. M., Lagowski J. J.: *Afr. J. Chem. Educ.* 2, 66 (2012).
- Vachliotis T., Salta K., Tzougraki C.: *Res. Sci. Educ.* 44, 239 (2014).
- Fahmy A. F. M.: *Afr. J. Chem. Educ.* 2, 92 (2012).
- Schubertová R., Bednárová M.: *Sci. Educ.* 9, 104 (2018).
- Inovovaný ŠVP pre gymnázia so štvorročným a päťročným vzdelávacím programom. Vzdelávacia oblasť: Človek a príroda – Chémia.* [https://www.statpedu.sk/files/articles/dokumenty/inovovany-statny-vzdelavaci-program/chemia\\_g\\_4\\_5\\_r.pdf](https://www.statpedu.sk/files/articles/dokumenty/inovovany-statny-vzdelavaci-program/chemia_g_4_5_r.pdf), stiahnuté 19. 9. 2022.
- Rámcový vzdelávací program pro gymnázia. MŠMT, Praha 2007.
- Fahmy A. F. M., Lagowski J. J.: *Afr. J. Chem. Educ.* 1, 62 (2011).
- Gillies R. M., Nichols K., Burgh G., Haynes M.: *Int. J. Educ. Res.* 53, 93 (2012).
- Mohammed Saido G., Siraj S., Bakar Bin Nordin A., Saadallah Al Amedy O.: *Malays. Online J. Educ. Sci.* 3, 13 (2015).
- Fahmy A. F. M., Lagowski J. J.: *19th International Conference on Chemical Education, 12–17 August 2006, Seoul, Korea*, Proceedings (Korean Chemical Society, ed.), str. 13, Korea 2006.
- Bloom B., Englehart M., Furst E., Hill W., Krathwohl D.: *Taxonomy of Educational Objectives: The Classification of Educational Goals. Handbook I: Cognitive Domain*. Longmans, Green, New York 1956.
- Anderson L. W., Krathwohl D. R., Airasian P. W., Cruikshank K. A., Mayer R. E., Pintrich P. R., Raths J., Wittrock M. C.: *A Taxonomy for Learning, Teaching and Assessing: A Revision of Bloom's Taxonomy of Educational Objectives* (Complete Edition). Longman, New York 2001.
- Vávra J.: *Geografická revue* 9, 154 (2013).
- Hudecová D.: *Pedagogika* 54, 274 (2004).
- Ganajová M. a 10 spoluautorov: *Formatívne hodnotenie vo výučbe prírodných vied, matematiky a informatiky* (1. vyd.). Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Košice 2021.
- Dori Y. J., Tal R. T., Tsaushu M.: *Sci. Educ.* 87, 767 (2003).
- Evagorou M., Korfiatis K., Nicolaou C., Constantinou C.: *Int. J. Sci. Educ.* 31, 655 (2009).
- Hung W.: *Brit. J. Educ. Technol.* 39, 1099 (2008).
- Zoller U.: *J. Chem. Educ.* 70, 195 (1993).
- Hrin T. N., Milenković D. D., Segedinac M. D., Horvat S.: *J. Serb. Chem. Soc.* 81, 1455 (2016).
- Hrin T. N., Fahmy A. F. M., Segedinac M. D., Milenković D. D.: *Res. Sci. Educ.* 46, 525 (2016).
- Vachliotis T., Salta K., Vasiliou P., Tzougraki C.: *J. Chem. Educ.* 88, 337 (2011).
- Petlák E.: *Studia Scientifica Facultatis Paedagogicae Universitas Catholica Ružomberok* 21, 148 (2022).
- Fahmy A. F. M.: *Afr. J. Chem. Educ.* 7, 2 (2017).
- Ganajová a 17 spoluautorov: *Zbierka inovatívnych metodík z chémie pre stredné školy*. Centrum vedecko-technických informácií SR, Bratislava 2021. <https://vzdelavanie.itakademia.sk/vystupy/zim-che-ss.pdf>

**M. Ganajová<sup>a</sup>, I. Sotáková<sup>a</sup>, and H. Čtrnáctová<sup>b</sup>**  
<sup>a</sup>Department of Didactics of Chemistry, Faculty of Science, Pavol Jozef Šafárik University in Košice, Slovakia,  
<sup>b</sup>Department of Teaching and Didactics of Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic): **Systemic Tasks in the Teaching of Organic Chemistry**

This paper builds on a previous one entitled “Systemic Tasks in the Teaching of Inorganic Chemistry” published in *Chemické listy* 9/2022, which explained the SATL method (Systemic Approach in Teaching and Learning), described the individual types of systemic tasks in inorganic chemistry, and provided examples. This paper aims to share examples of systemic tasks designed for teaching organic chemistry, which focus on developing higher-order cognitive processes. 89 teachers applied these systemic tasks in teaching 2136 second year grammar school students in the course of two school years (2019–2021). Upon verification, it was confirmed that systemic tasks enhanced students’ understanding of organic chemistry and contributed to the development of cognitive and scientific skills such as critical thinking, problem-solving, cooperation, argumentation, and result interpretation. The teachers involved in this research also provided their opinions on the pros and cons of this teaching tool in terms of motivation, deeper understanding, identifying misconceptions, and time requirements.

Keywords: SATL method, systemic tasks, cognitive processes, chemistry teaching

*Acknowledgements*

*This work was supported by the National project “IT Academy – Education for the 21st Century”, ITMS code of the project: 312011F057 and by the grant KEGA No. 001UPJŠ-4/2023 “Implementation of Formative Assessment in Primary School Teaching with the Focus on the Digital Form”.*



**Nabízíme uplatnění  
ve farmaceutické  
a v chemické výrobě,  
v R&D, laboratořích,  
kvalitě a dalších oborech**

**Jsme Teva, Vaše jistota,  
Vaše místo k růstu.**

- Část školení probíhá ve virtuální realitě
- Roční bonus a každoroční navýšení mzdy
- Šance rychlého růstu - kariérní postup s jasně danými pravidly
- Moderní technologie
- Spousta benefitů + cafeterie 17 000 Kč ročně
- Zdarma i psychologická, právní, sociální a finanční asistence
- Skvělá dostupnost - vlak, autobus

**T: 553 642 424**

**[www.teva.jobs.cz](http://www.teva.jobs.cz)**

---

**OBSAH****ÚVODNÍK**

- Jak se ujistit, že dostanete Nobelovu cenu** 485  
Michal Lebl

**REFERÁTY**

- Využití reportérových testů při sledování buněčného stresu a toxicity** 487  
D. Čáková, N. Jelenová a J. Viktorová
- O lesním entheogenu** 495  
M. Jurášek, L. Opletal a P. Drašar
- Stabilní a radioaktivní cesium v přírodním prostředí** 501  
V. Procházka, I. Suchara, L. Thinová, J. Mizera, J. Sucharová a J. Hraníček
- L-Asparaginasy a jejich potenciál v medicíně a potravinářství** 508  
L. Pejšková, K. Loužecká, T. Podzimek a E. Benešová

**PŮVODNÍ A METODICKÉ PRÁCE**

- Stanovení organických kyselin ve speciálních pivech a nápojích na bázi piva pomocí kapilární izotachofóry** 516  
S. Černá, K. Benešová a J. Martiník

**VÝUKA CHEMIE**

- Systémové úlohy ve výuce organické chemie** 522  
M. Ganajová, I. Sotáková a H. Čtrnáctová

---

**CONTENTS****EDITORIAL**

- How to Make Sure That You Will Get The Nobel Prize** 485  
Michal Lebl

**REVIEW ARTICLES**

- Use of Reporter Assays in Monitoring Cellular Stress and Toxicity** 487  
D. Čáková, N. Jelenová, and J. Viktorová
- On Forest Entheogen** 495  
M. Jurášek, L. Opletal, and P. Drašar
- Stable and Radioactive Cesium in Natural Environment** 501  
V. Procházka, I. Suchara, L. Thinová, J. Mizera, J. Sucharová, and J. Hraníček
- L-Asparaginases and Their Potential in Biotechnology and Medicine** 508  
L. Pejšková, K. Loužecká, T. Podzimek, and E. Benešová

**ORIGINAL AND METHODOLOGICAL PAPERS**

- Determination of Organic Acids in Special Beers and Beer-based Beverages Using Capillary Isotachopheresis** 516  
S. Černá, K. Benešová, and J. Martiník

**EDUCATION IN CHEMISTRY**

- Systemic Tasks in the Teaching of Organic Chemistry** 522  
M. Ganajová, I. Sotáková, and H. Čtrnáctová

# Odborná skupina termické analýzy České společnosti chemické



pořádá

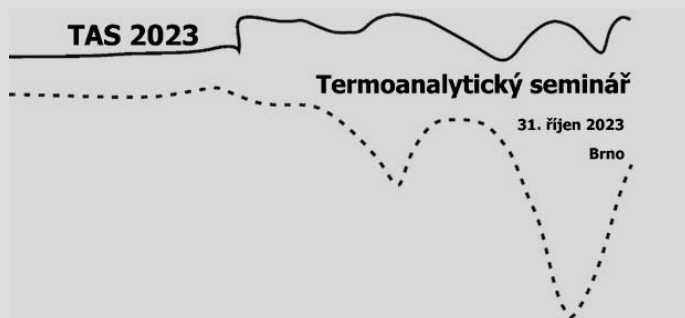
## TERMOANALYTICKÝ SEMINÁŘ

31. říjen 2023

Ústav fyziky materiálů AVČR, v.v.i,  
Brno

Další informace: <http://www.thermal-analysis.cz>

Kontakt na organizátory: [petra.sulcova@upce.cz](mailto:petra.sulcova@upce.cz)



**CHEMICKÉ LISTY** • ročník/volume 117 (2023), čís./no. 8 • **LISTY CHEMICKÉ**, roč./vol. 147, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 133 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT Praha, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Rady vědeckých společností ČR, Akademie věd ČR, Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCh • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUCÍ REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: V. Vyskočil • REDAKTORI/EDITORS: J. Barek, E. Benešová, P. Drašar, P. Holý, P. Chuchvalec, M. Jurášek, Z. Kolská, B. Kratochvíl, J. Masák, J. Podešva, P. Šmejkal; Bulletin: P. Drašar; Webové stránky: R. Liboska, V. Vyskočil • ZAHRAŇIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTORI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA, ČR) • TECHNICKÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: K. Bláha, L. Červený, E. Dibuszová, L. Grubhoffer, J. Hanika, Z. Havlas, M. Hof, Z. Hostomský, J. Káš, M. Koman, P. Konvalinka, J. Kotek, J. Koubek, J. Málek, P. Matějka, K. Melzoch, V. Pačes, M. Pospíšil, V. Růžička, P. Slaviček, I. Stibor, J. Zima, T. Zima • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného Lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, e-mail: [chem.listy@csvts.cz](mailto:chem.listy@csvts.cz) • INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCh, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel. +420 221 082 383, e-mail: [chem.spol@csvts.cz](mailto:chem.spol@csvts.cz), [chem.ekonom@csvts.cz](mailto:chem.ekonom@csvts.cz) • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://www.chemicke-listy.cz> • TISK: TG TISK s.r.o., 5. května 1010, 563 01 Lanškroun • SAZBA, ZLOM: ČSCh, Chemické listy • Copyright © 2023 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 180 Kč, roční plné předplatné 2023 (12 čísel) 1810 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCh 900 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 96 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCh 73 EUR (doručování via SCHS), 96 EUR + poštovné (individuální doručování), ceny jsou uvedeny včetně DPH • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • Pokyny pro autory najdete na <http://www.chemicke-listy.cz>, zkratky časopisů podle Chemical Abstract Service Source Index (viz <http://casi.cas.org/search.jsp>) • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zaslány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCh a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností • Molekulární námět na obálce: V. Spiwok • Dáno do tisku 26.7.2023.

# SU X ESS

## Přepisuje nejlepší výsledky ve své třídě

Nový IRXross je FTIR střední třídy, který dosahuje výsledků o třídy lepších přístrojů. Napříč širokému spektru vzorků dosahuje vysoké rychlosti a rozlišení měření, což zajišťuje vysokou kvalitu při udržení nízké ceny analýz. Integrovaný operační systém zajišťuje jednoduché ovládání přístroje. Užitím příslušenství je možné ušetřit až 90% energie v pohotovostním režimu.

**Špičková citlivost ve své třídě s poměrem S/N 55 000:1.**

**Vysokorychlostní měření 20krát za sekundu s volitelným softwarem pro rychlé skenování.**

**Rychlé spuštění a snadná navigace pomocí softwaru IRPilot™.**



**ANALYTICAL  
INTELLIGENCE**



# LC-MS Grade Solvents and Reagents

MERCK

Superior resolution and sensitivity for accurate, brilliant results

## LC-MS Grade Solvents

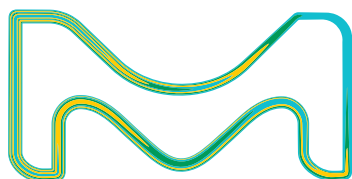
- No ghost peaks
- Full reproducibility
- Extends the lifetime of your columns
- Optimized and tested for LC-MS applications
- Minimal background ion suppression

## Why Pre-Blended?

- Reduces the risk of contamination
- Saves time
- No cleaning of glassware or filtration
- Less exposure to hazardous chemicals

## LC-MS Reagents and Additives

- Tested for consistent quality according to the reserpine test
- Optimized to improve ionization and resolution
- Extremely low levels of inorganic and organic impurities

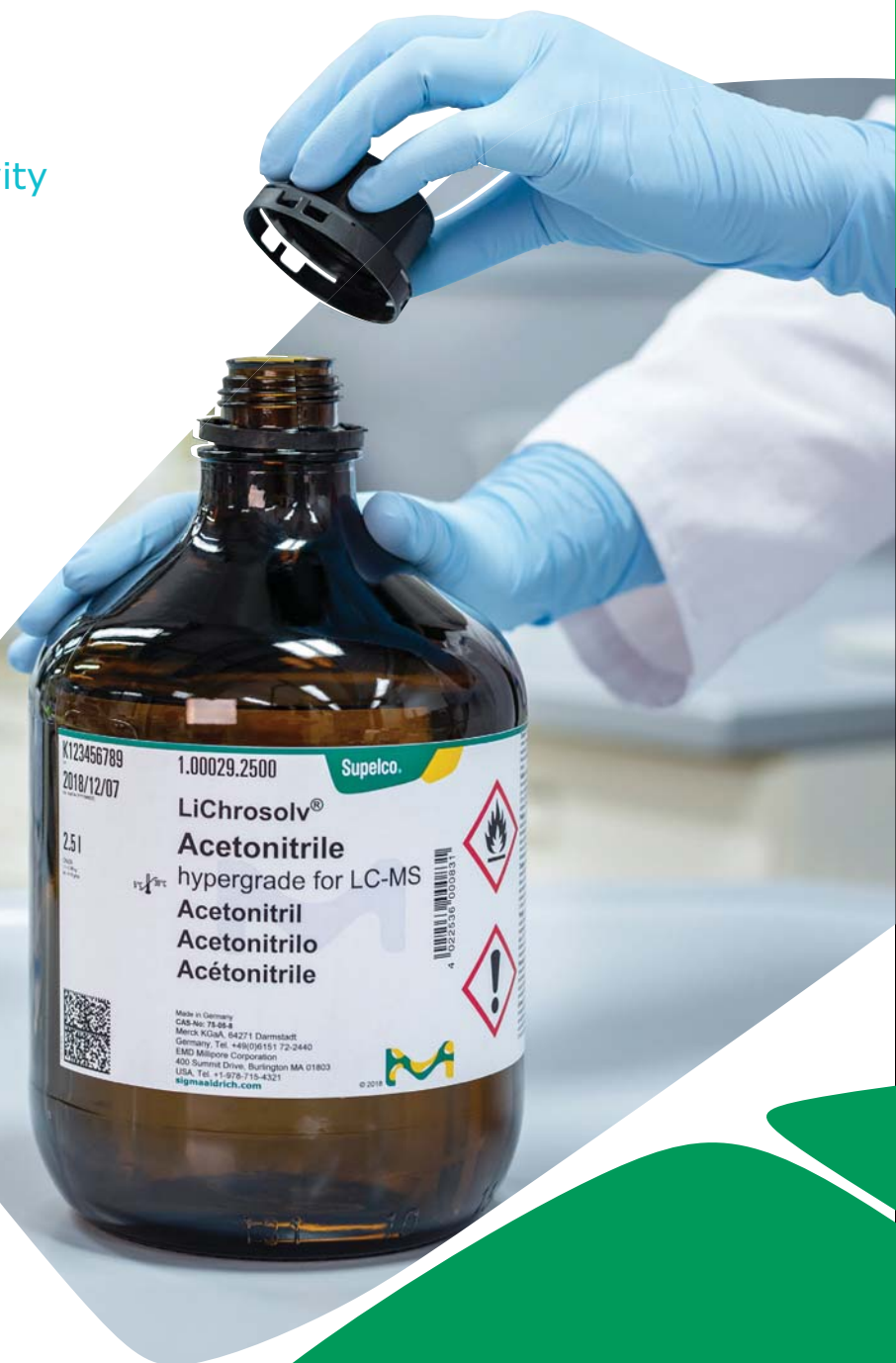


For more information on solvents, visit [SigmaAldrich.com/lcms-solvents](https://www.sigmaaldrich.com/lcms-solvents)

For more information on reagents, visit [SigmaAldrich.com/lcms-reagents](https://www.sigmaaldrich.com/lcms-reagents)



The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.



**Supelco®**  
Analytical Products