

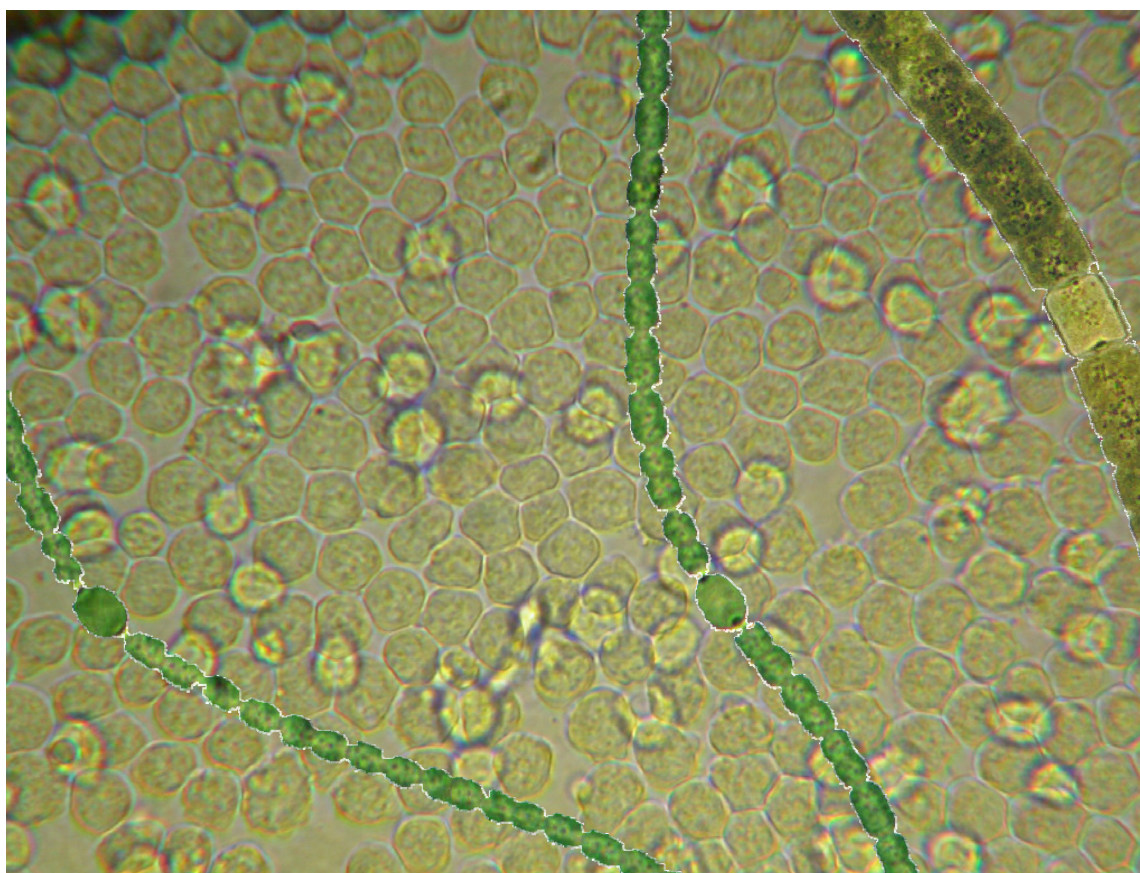
JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
BIOLOGICKÁ FAKULTA



Bakalářská diplomová práce

P E T R T O M E K

CYTOTOXICITA VLÁKNITÝCH SINIC V NÁVAZNOSTI NA JEJICH EKOLOGII



školitel: Mgr. Pavel Hrouzek
školitel – specialista: Ing. Jiří Kopecký, CSc.

České Budějovice

2007

TOMEK, P. Cytotoxicita vláknitých sinic v návaznosti na jejich ekologii. [**Cytotoxicity of the filamentous cyanobacteria in relation to its ecology. Bc. Thesis, in Czech, 2007**] - 49 p., Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The aims of this study was to screen a cytotoxic activity in 53 strains of the genera *Nostoc* and *Anabaena* and to compare occurrence of active isolates within different ecological groups. Selected cytotoxic strains were subjected to HPLC/MS analysis to identify their extracts composition. Isolates with strong cytotoxic effect containing unknown substances were fractionated to obtain pure fraction of this compound. Finally, the selected strains toxicity dependence on time and concentration was evaluated.

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a referencí uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, dne 14.5.2007

.....
Petr Tomek

Poděkování:

...Ze všeho nejdříve a nejvíce bych chtěl poděkovat paní Evě Řezníčkové z Parazitologického ústavu AVČR za cenné rady ohledně kultivace a manipulace s buněčnými kulturami a zejména za její neustávající ochotu a laskavost oživovat nové buněčné linie vždy, když bylo zapotřebí, zejména během rekonstrukce pracoviště v Třeboni. Svému školiteli, Pavlu Hrouzkovi, musím poděkovat za skvělý tým, který jsme vytvořili, nejen co se týče transferu do Třeboně, na obědy ..., ale v neposlední řadě také experimentální práce, realizace skvělých nápadů, podporu a finalizace této práce, a těším se, že tato spolupráce bude pokračovat i nadále. Za skvělé odborné rady týkající se hmotnostní spektrometrie, chromatografie a nejen jich, tony humoru a celkově skvělou atmosféru v laboratoři děkuji Jirkovi Kopeckému. Vše by bylo mnohem strastiplnější nebýt krásných žen - Lady Samcové, které mimo jiné vděčím za udržování buněčných kultur v mé nepřítomnosti a všemožnou pomoc, a Jany Tomšíčkové a Lenky Čížkové, které také zajišťovaly pohodlný transfer na pracoviště. Nesmím zapomenout ani na pomoc svého kolegy Dana Hisema. Dík směřuje i všem z „Opaťáku“, kamarádům, které jsem během práce zanedbával a mým skvělým rodičům. Zejména v posledních týdnech práce vděčím za lásku a pochopení mojí drahé polovičky Ájince.

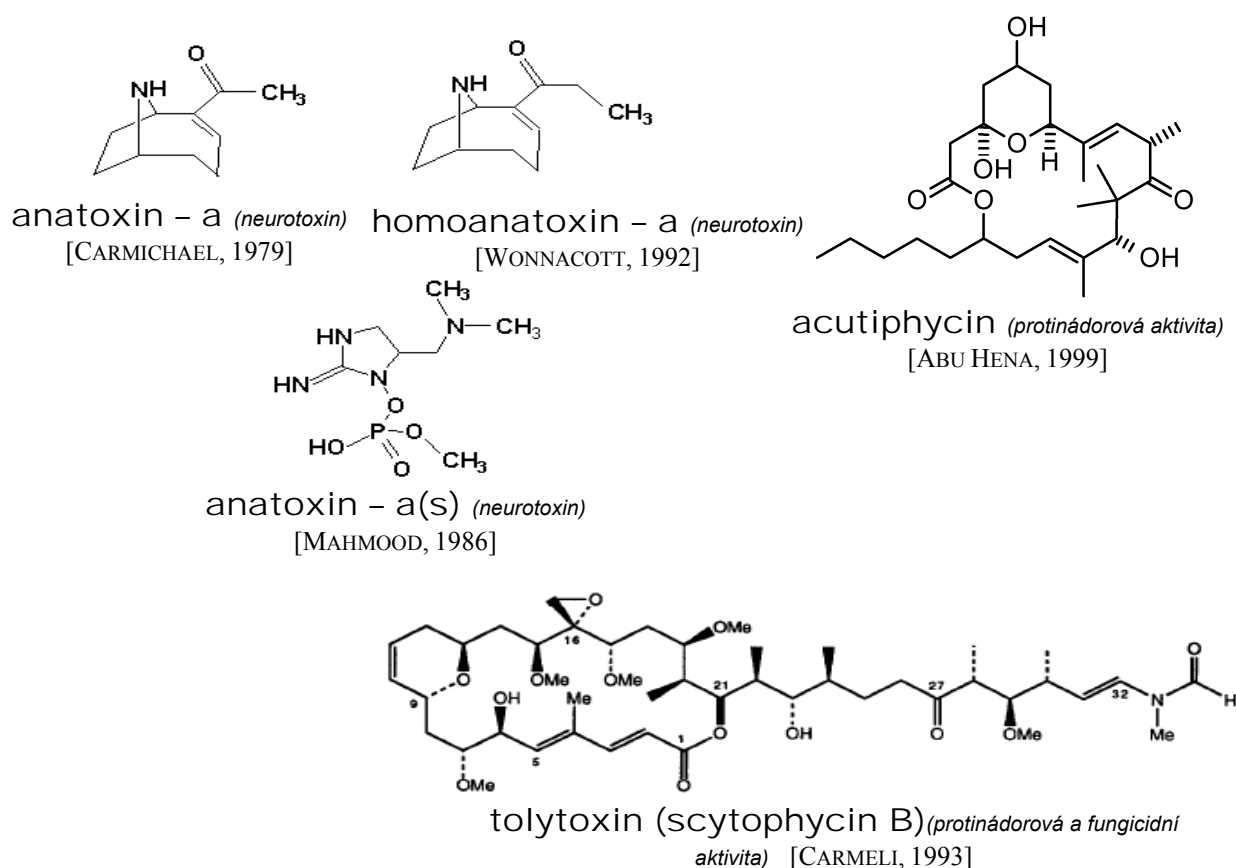
OBSAH:

1	Literární rešerše	1
1.A	SEKUNDÁRNÍ METABOLITY SINIC	1
1.B	STUDIUM CYTOTOXICITY	5
1.C	CYTOTOXICITA HEPATOTOXINŮ SINIC	5
1.D	OSTATNÍ SINICOVÉ CYTOTOXINY.....	7
1.E	ROZŠÍŘENÍ BIOSYNTÉZY SINICOVÝCH TOXINŮ	10
1.F	CÍLE PRÁCE	11
2	Materiály a metodika	12
2.A	SINICOVÉ KMENY A EXTRAKCE	12
2.B	BUNĚČNÉ LINIE	14
2.C	TEST CYTOTOXICITY (MTT TEST)	14
2.D	SEPARAČNÍ METODY:	15
2.D.I	HPLC/ESI/MS/MS (analytická), frakcionace.....	15
2.D.II	HPLC (preparativní), frakcionace	15
2.D.III	TLC, frakcionace	16
2.E	STANOVENÍ „IC ₅₀ “ A ZÁVISLOST TOXICKÉHO EFEKTU NA DOBĚ EXPOZICE.....	17
3	Výsledky.....	18
3.A	SCREENING CYTOTOXICITY SINICOVÝCH KMENŮ	18
3.B	HPLC/ESI/MS ANALÝZY CYTOTOXICKÝCH EXTRAKTŮ.....	20
3.B.I	Extrakt <i>Anabaena affinis</i> 04-44 a <i>Anabaena eucompacta x reniformis</i> Pěšák 2.....	20
3.B.II	Extrakt <i>Nostoc</i> sp. OBU36S07	21
3.B.III	Extrakt <i>Nostoc</i> sp. Cam2S01.....	23
3.B.IV	Extrakt <i>Nostoc</i> sp. NMB25 a NMB26.....	24
3.B.V	Extrakt <i>Nostoc muscorum</i> I.....	26
3.B.VI	Extrakt <i>Nostoc</i> sp. De.....	27
3.C	CYTOTOXIN KMENE <i>NOSTOC MUSCORUM</i> I	31
3.D	CYTOTOXINY KMENE <i>NOSTOC</i> SP. DE	33
3.D.I	Separace látky kmene <i>Nostoc</i> sp. De: frakce 31'	34
3.D.II	Separace látky kmene <i>Nostoc</i> sp. De: frakce 37'	37
3.E	„IC ₅₀ “ A ČASOVÝ EXPERIMENT	39
4	Diskuse.....	41
5	Literatura	43

1 LITERÁRNÍ REŠERŠE

1.A SEKUNDÁRNÍ METABOLITY SINIC

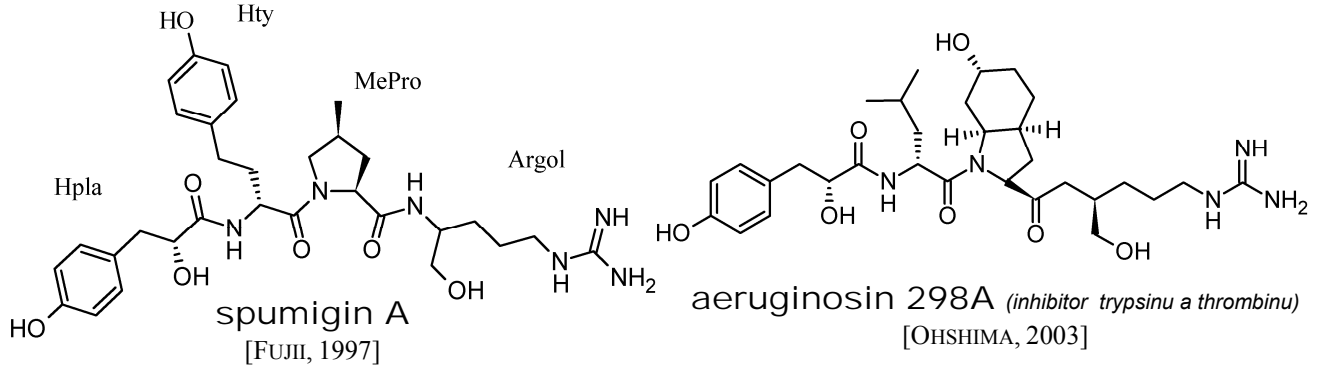
Sinice (cyanobakterie) mají schopnost produkovat široké spektrum chemických látek, jejichž syntéza není pro primární metabolismus nezbytná, avšak jejich geny přetrvávají v genomu miliony let [RANTALA, 2004]. Zatím se můžeme pouze domnívat, jaký je jejich původní význam a úloha v životě těchto "bakterií". Sekundární metabolity sinic jsou z hlediska chemické struktury a biologické aktivity různorodou skupinou [CARMICHAEL 1992, CODD 1995, SIVONEN 1996, HERFINDAL 2005, NAMIKOSHI 1996]. Na základě jejich působení můžeme rozlišit biotoxiny a cytotoxiny. Zatímco biotoxiny jsou schopny usmrtit vícebuněčné organismy, cytotoxiny indukují smrt jednotlivých buněk či jednobuněčných organismů. Z vlastní definice je však patrné, že je toto rozdělení umělé a obě kategorie se mohou překrývat. Cytotoxiny mohou být kategorizovány jako neurotoxiny, hepatotoxiny, genotoxiny, imunotoxiny a embryotoxiny [MARŠÁLEK, 1996] dle afinity k buňkám specifické tkáně, např. hepatotoxickou látku můžeme považovat za cytotoxickou či ve výsledku biotoxickou. Nicméně většina toxinů sinic vykazuje biologickou aktivitu smíšenou (zejména hepatotoxicita a nefrotoxicita aj.) a je možné, že specifická populace bude syntetizovat více druhů těchto toxinů.



Obr. 1. Příklady struktur sekundárních metabolitů nepeptidické povahy.

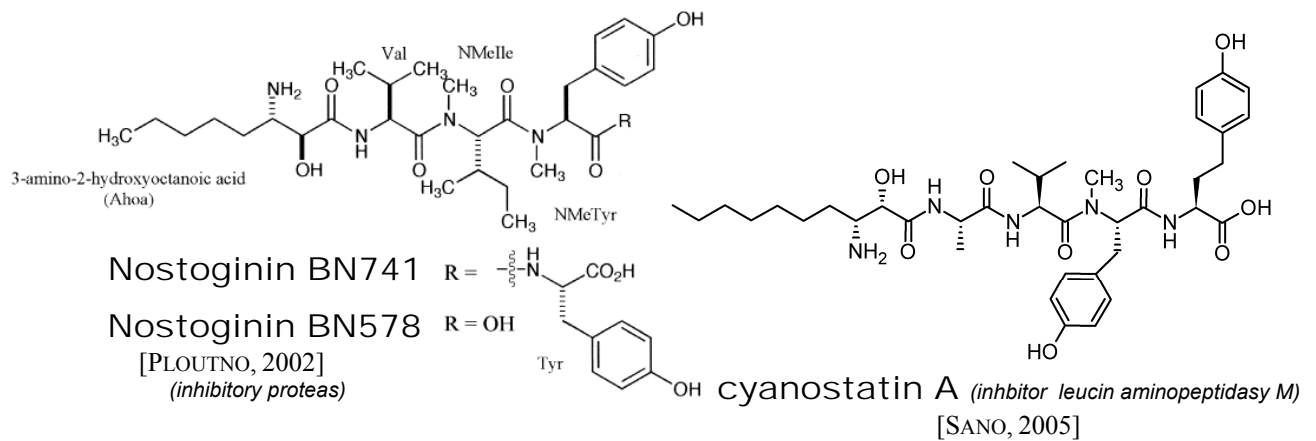
Sinice jsou schopny syntetizovat nesčetné množství těchto metabolitů. Co se týče chemických struktur jedná se především o cyklické a lineární peptidy, alkaloidy, makrolaktony, deriváty nukleosidů a heterocyklické sloučeniny (viz obr. 1.). Z výše uvedených se u sinic nejběžněji vyskytují peptidy. Dodnes je jich známo několik stovek a jsou klasifikovány do osmi tříd [WELKER, 2006] (viz obr. 2.-8.):

1. **aeruginosiny** (lineární, 4 aminokyseliny (dále AMK), **obecná struktura:** Choi = 2-karboxy-6-hydroxyoktahydroindol, C-koncový derivát Arg)



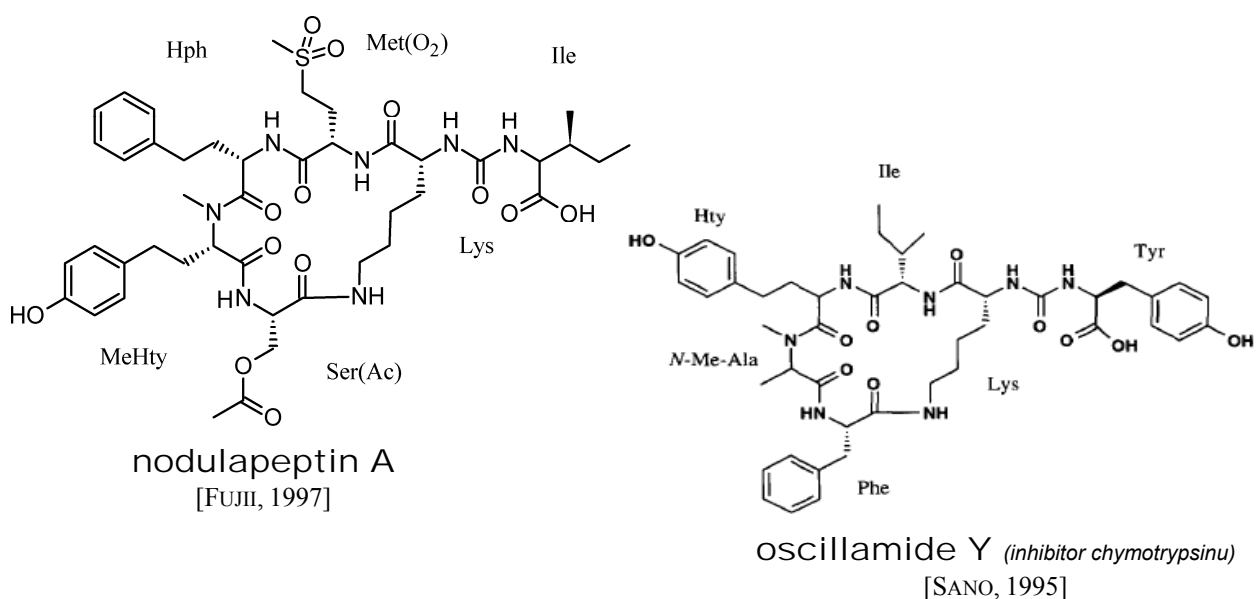
Obr. 2. Příklady obecných struktur lineárních peptidů **aeruginosinů**.

2. **microgininy** (lineární, 4-6 AMK, **obecná struktura:** Ahda = 3-amino-2-hydroxydekanová kyselina + 2x C-koncové Tyr)



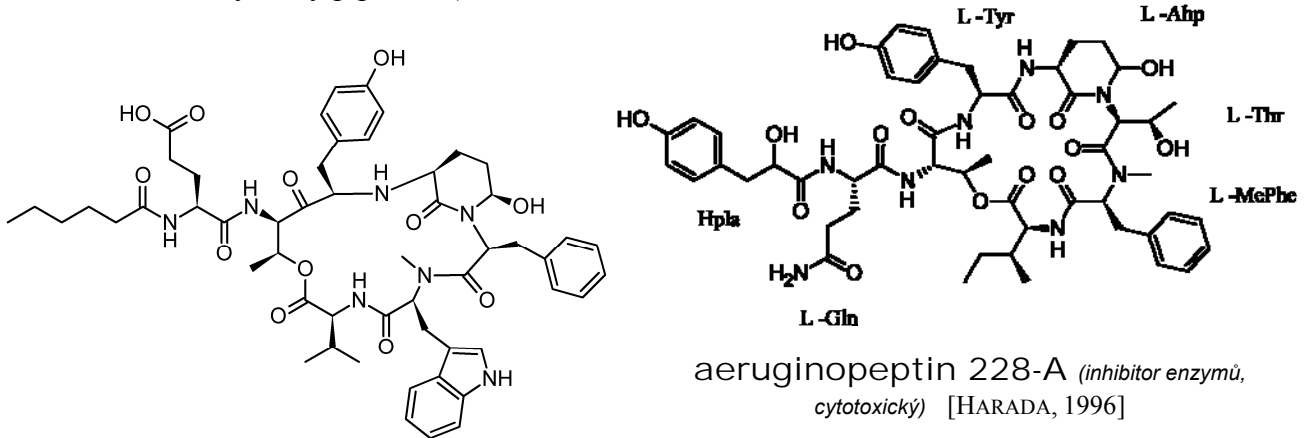
Obr. 3. Příklady obecných struktur lineárních peptidů **microgininů**.

3. **anabaenopeptiny** (cyklické, 6 AMK, **obecná struktura:** Lys + 4 AMK cyklus, 1 AMK postranní řetězec)



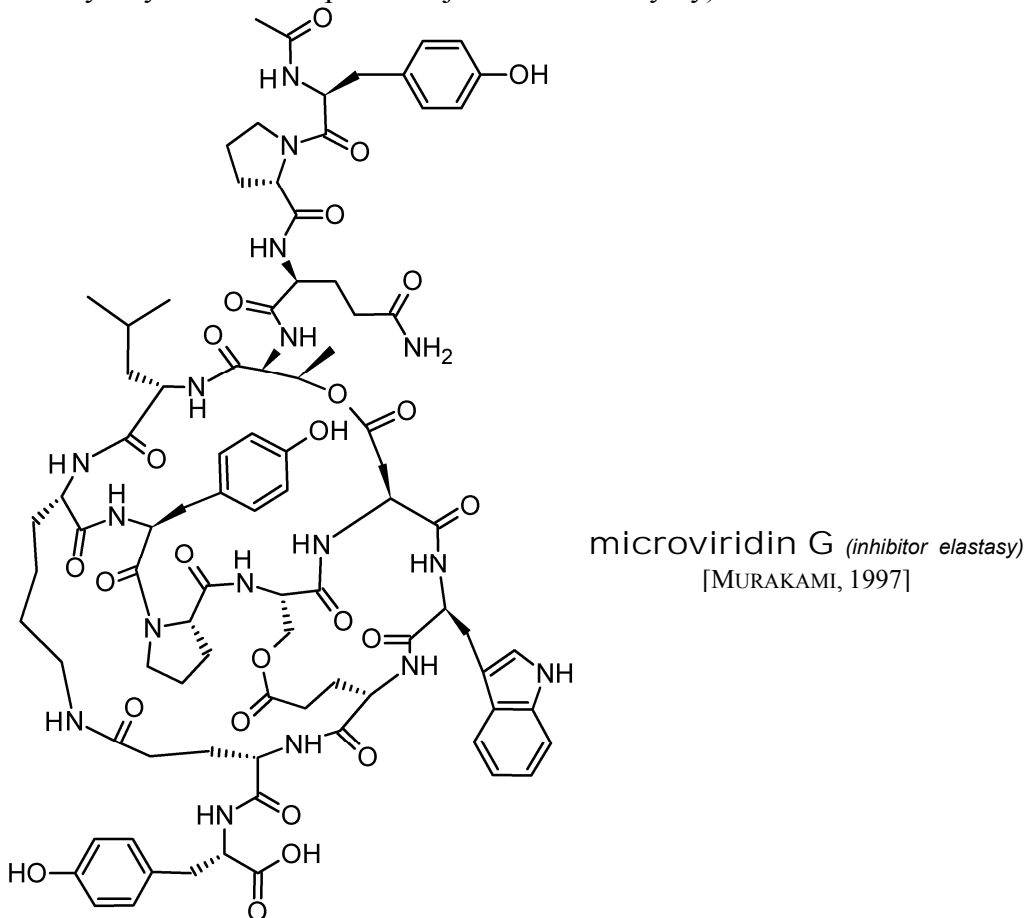
Obr. 4. Příklady obecných struktur cyklických hexapeptidů **anabaenopeptinů**.

4. **cyanopeptoliny** (smíšené – cyklické a lineární, různý počet AMK, **obecná struktura:** Ahp = amino-hydroxy piperidon)

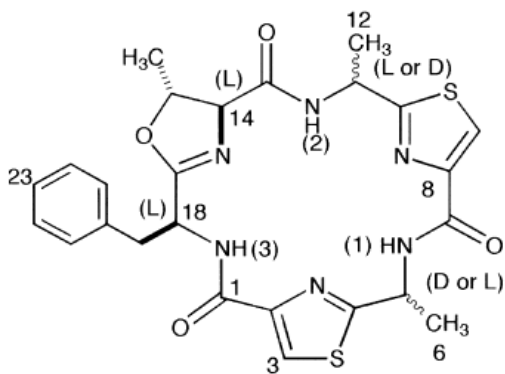


Obr. 5. Příklady obecných struktur cyanopeptolínů.

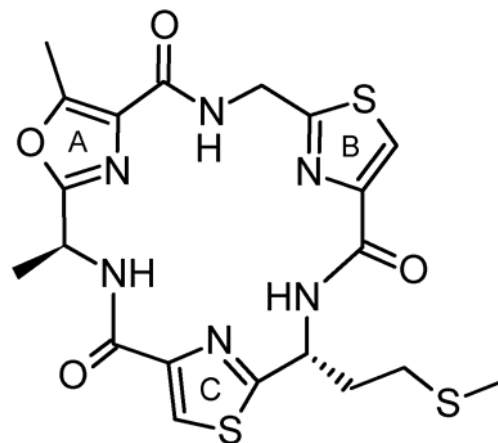
5. **microcystiny a nodulariny** (cyklické, 7 a 5 AMK respektive, **obecná struktura:** viz 1.3)
6. **microviridiny** (tricyklické, 14 AMK, **obecná struktura:** hlavní kruh 7 AMK, sekvence Lys-Tyr-Pro-Ser-Asp rozděluje kruh na tři cykly)



Obr. 6. Příklad obecné struktury cyklických depsipeptidů microviridinů.

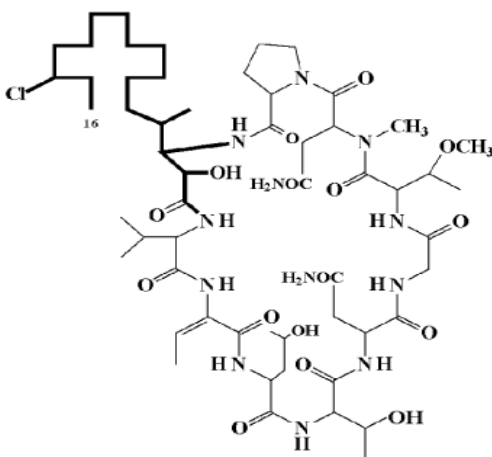
7. **cyclamidy** (cyklické, 3 AMK, **obecná struktura:** thiazolová a oxazolová skupina)

banyascyclamid A (*inhibitor proteas*)
[PLOUTNO, 2002]

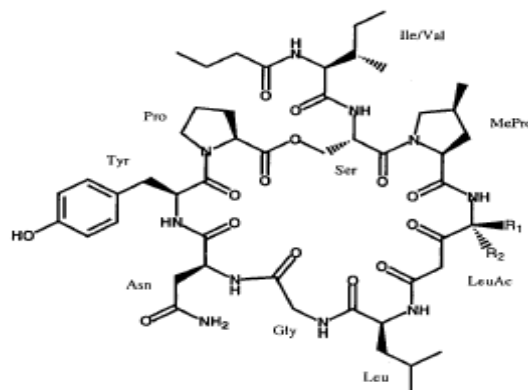


nostocyclamid M (*alelopatická aktivita – řasy, sinice*)
[JÜTTNER, 2001]

Obr. 7. Příklady obecných struktur cyklických peptidů **cyclamidů**.

8. **ostatní peptidy...** (50% známých peptidů)

puwainaphycin C (*kardioaktivní agens*) [MOORE, 1989]



A1 R = CH₃ R₁ = CH₂CH(CH₃)₂; R₂ = H
A2 R = H R₁ = CH₂CH(CH₃)₂; R₂ = H
A3 R = CH₃ R₁ = H; R₂ = CH₂CH(CH₃)₂

nostopeptolid A1, A2, A3 (*cytotoxický, fungicidní, inhibitor proteas*) [TRIMURTULU, 2000]

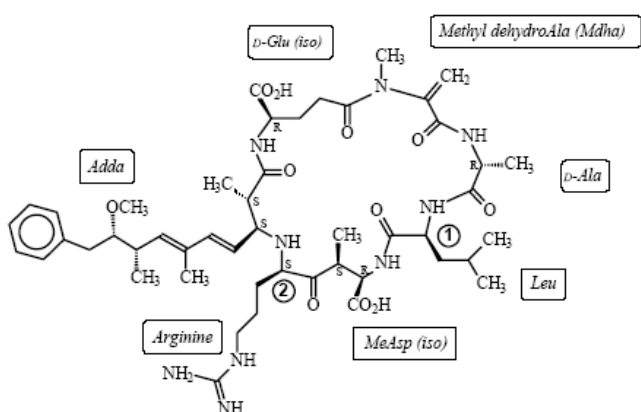
Obr. 8. Příklady obecných struktur **ostatních** metabolitů.

1. B STUDIUM CYTOTOXICITY

V závislosti na požadavcích našeho studia můžeme ke stanovení cytotoxicity sekundárních metabolitů využít široké spektrum *in vitro* experimentů s imortalizovanými či nediferenciovanými buněčnými liniemi, primokulturami buněk, tkáňovými řezy či izolovanými orgány. Přičemž dva poslední testovací systémy poskytují zajímavé výsledky nejen exaktní, ale hlavně umožňují sledovat histopatologické změny na kompletně či částečně zachované 3D struktuře studovaného orgánu.

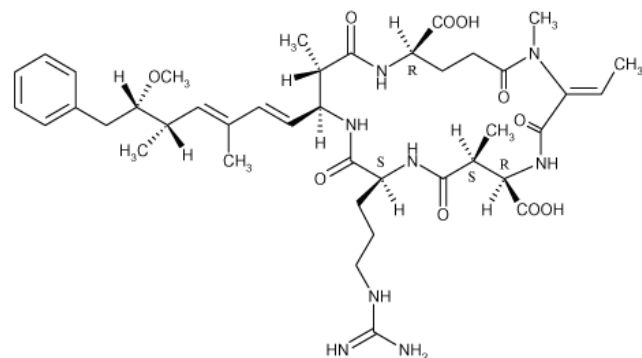
Co se týče toxicity k celému organismu, potažmo toxicity pro člověka, nejsou tyto testy schopné nahradit *in vivo* experimenty např. s menšími obratlovci, bezobratlými (zejména *Artemia salina* cytotoxicity assay [LINCOLN, 1996], *Daphnia* test [PERSOONE, 1994]) a hlavně s vyššími živočichy. Avšak rychlost a relativně snadná interpretace výsledků z nich činí ideální experimentální metody. Přestože *in vitro* systémy nejsou schopny plně reprodukovat vysoce integrované funkce živočichů a mechanismy toxického efektu mohou být diametrálně odlišné [CHONG, 2002], IC₅₀ stanovené testem na buněčných liniích většinou korelují se studii toxicity na myších či letálními dávkami pro člověka, [EVANS, 2001]. Zejména v posledních letech jsou buněčné linie využívány jako levné testovací objekty pro vyhledávání protirakovinných látek. Z výše uvedených důvodů je patrné, že práce se savčími buňkami *in vitro* je nejlepším startem pro studium toxicity sekundárních metabolitů, avšak úspěšné biotechnologické využití se bez *in vivo* metodiky neobejde.

1. C CYTOTOXICITA HEPATOTOXINŮ SINIC



Obr. 9. Microcystin-LR [HARADA, 1996]

tyrosinem za X a alaninem, argininem, tyrosinem a methioninem na místo Y. Z mnoha možných strukturních variant microcystinu je dnes popsáno cca 70 o různé toxicitě [CHORUS, 2004].



Obr. 10. Nodularin [RINEHART, 1988]

Jednou z nejvíce probádaných sinicových látek je hepatotoxický peptid microcystin. Produkce této sloučeniny byla poprvé prokázána u planktonní sinice *Microcystis aeruginosa*, avšak dnes je již jasné, že tuto látku mohou syntetizovat i sinice jiných rodů, např. *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix*, *Nostoc* [CARMICHAEL 1992, SIVONEN 1996]. Jedná se o cyklický heptapeptid o sekvenci cyclo-D-Ala-L-X-erythro-bmethyl-D-isoaspartová kyselina-L-Y-ADDA-D-isoglutamalová kyselina-N-methyl-dehydroalanin s variabilními aminokyselinami argininem, leucinem a

Molekulární váha těchto peptidů se pohybuje v rozmezí 900-1100Da [SIVONEN, 1996] a vzhledem k tomu, že jsou složeny z netypických D a L aminokyselin se jedná o sloučeniny termostabilní.

Podobnou strukturu můžeme nalézt u nodularinu syntetizovaného výhradně planktonní sinicí rodu *Nodularia* [NAMIKOSHI 1996, RINEHART 1988]. Jedná se též o cyklický peptid s Adda v bočním řetězci, ale na rozdíl od microcystinu je cyklus tvořen 5

aminokyselinami.

Je patrné, že molekula velikosti microcystinu nebude do hepatocytu transportována pasivní difuzí [ERIKSSON, 1990]. Její přenos probíhá za spotřeby ATP pomocí žlučového transportního systému, což potvrzuje nulová toxicita microcystinu-LR proti buněčným liniím tohoto systému zbavených [CHONG, 2002].

Cílovou organelou microcystinu je mitochondrie, jeden z nejnáchylnějších článků subbuněčné organizace. Jedny z prvotních procesů toxického efektu vedoucí k aktivaci apoptózy jsou depolarizace a alterace funkcí mitochondriální membrány a zejména jejího potenciálu [DING, 2003]. Následkem toho, zatím neobjasněným způsobem, dojde k tvorbě megakanálu umožňujícího nekontrolovaný průnik molekul.

Je zřejmé, že změnami membránového potenciálu je ovlivněno buněčné dýchání a s ním spřažená oxidativní fosforylace. PACE A KOL. (1991) dokázali, že inhibice v důsledku působení toxinu činí v průměru až 50%. Vlastní toxický efekt je způsoben nadprodukcí ROS (reactive oxygen species -OH radikály, peroxidy vodíku a další oxidační činidla), které vznikají pravděpodobně v některém z Fe^{3+} redukčních cyklů, jelikož je jejich produkce při aplikaci desferrioxaminu (membránového antioxidantu) inhibována [DING, 1998A].

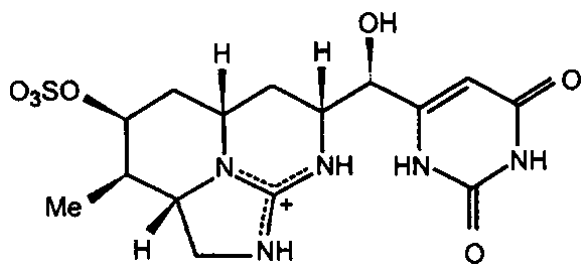
Při vysoké koncentraci ROS zřejmě dochází k peroxidaci lipidů a hromadění koncového produktu tohoto děje malondialdehydu v cytosolu buňky. Po 24 hodinách dochází k poškození buněčné membrány a úniku cytosolické laktátdehydrogenasy (LDH) mimo buňku. Dodnes není jasný přesný mechanismus těchto dějů, avšak byla prokázána přímá závislost koncentrace uvolněné MDA a LDH na použité koncentraci microcystinu [DING, 1998A]. Vyjma použití mechanismů redukcí ROS je buňka schopna bránit se toxickému působení microcystinu jeho detoxikací a vyloučením pomocí glutathiontransferasy. Tento detoxifikační enzym je schopen pomocí -SH domény hepatotoxin vázat a vyloučit ho. Již při podprahové koncentraci toxinu dochází v buňce k rapidnímu navýšení koncentrace této látky [BOUAICHA, 2004], které se dá stejně jako LDH s úspěchem využít při stanovování cytotoxicity [BHATTACHARYA, 1996].

Tyto obranné mechanismy jsou teoreticky schopny potlačit apoptózu, nicméně při vysoké expoziční koncentraci k její aktivaci dojde většinou již při depolarizaci membrány mitochondrie [DING, 2003]. V apoptotické buňce dochází k puchýřkatění a externalizaci plasmatické membrány a tudíž i fosfatidylserinu na ní vázaném. Fosfatidylserin můžeme použít k detekci apoptotických buněk, a to pomocí fluorescenční proby Anexinu V-Flos. Apoptické buňky pak můžeme úspěšně kvantifikovat pomocí průtokové cytometrie [FADOK, 1992].

Při apoptóze buňky jsou uplatňovány stejné mechanismy jako při přirozené smrti buňky (uvolněním cytochromu c a aktivací calpain Ca^{2+} dependentních proteas a kaspas), avšak šestkrát rychleji [DING, 2003]. Při vysokých koncentracích toxinu je tento čas zkrácen až na 2 minuty [FLADMARK, 1999].

Microcystiny a nodularin jsou na molekulární úrovni mimo jiné silnými inhibitory proteinfosfatas PP1, PP2A a PP3 typu, což vede k hyperfosforylaci proteinů a nekontrolované aktivitě proteinkinás. Tyto enzymy se podílejí na omezení fluidity intermediárních filament a mikrofilament zodpovědných za morfologickou strukturu hepatocytu. Jejich nekontrolovanou fosforylací dochází ke zhroucení cytoskeletu [MATSUHIMA 1990, CARMICHAEL 1992] a následně ztrátě schopnosti regulace homeostase buněčného prostředí [DING, 1998B]. Z klinického hlediska je tento stav charakterizován jako jaterní insuficience a může končit smrtí. Vzhledem k tomu, že jsou tyto děje mnohdy spjaty s proliferací buněčného cyklu jsou microcystiny velmi silnými TPF (tumour promoting factors) [MARŠÁLEK, 2005]. V této funkci se výrazně liší microcystiny a nodularin. Microcystin-LR, ovlivňuje buněčný cyklus kaskádou biochemických dějů, zatímco nodularin je přímo iniciátorem deregulace buněčného cyklu [BOUAICHA, 2004].

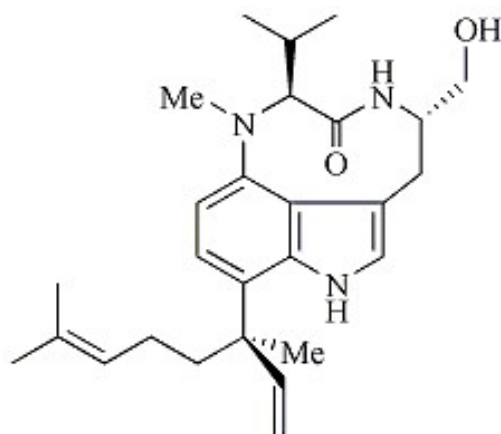
Třetím typem sinicových hepatotoxinů je cylindrospermopsin. Jedná se o sloučeninu alkaloidní povahy skládající se z tricyklické guanidinové kostry se substituovaným hydroxymethyluracilem [OHTANI, 1992]. Vzhledem k jeho nízké molekulární váze (415Da) je do buňky transportován aktivně, což bylo potvrzeno aplikací žlučových kyselin cholové a taurocholové



Obr. 11. Cylindrospermopsin [HARADA, 1994]

na buňky vystavené cylindrospermopsinu a microcystinu. Zatímco u microcystinu byla vzhledem k typu jeho transportu zaznamenáno výrazné snížení toxického efektu, u cylindrospermopsinu nebyla toxicita pozměněna [CHONG, 2002]. Toxicita cylindrospermopsinu a jeho derivátů vyplývá právě z uracilového zbytku, který *in vitro* v myších hepatocytech nekompetitivně inhibuje aktivitu UMP (uridin monofosfátsyntetasy, $K_i = 10 \mu\text{M}$) a následně syntézu pyrimidinových nukleotidů [REISNER, 2004]. Dochází k proliferaci buněčné membrány, akumulaci tukových kapének a smrti buňky [RUNNEGAR, 2002]. Co se týče přímého buněčného poškození a následné toxicity k teplokrevným obratlovcům je MCLR nejtoxickéjší z výše uvedených látek, následován nodularinem, cylindrospermopsinem a MCRR (viz tab.1). Rozdílné efektivní koncentrace MCLR a MCRR naznačují dle experimentů i odlišný mechanismus působení relativně podobných hepatotoxinů. Zatímco toxicita MCRR se vyznačuje především celkovou změnou obsahu proteinů, MCLR změnou lysosomálních funkcí a aktivitou sukcinátdehydrogenasy [PICHARDO, 2005].

1.D OSTATNÍ SINICOVÉ CYTOTOXINY



Obr. 12. Lyngbyatoxin A [MURATAKE, 1987]

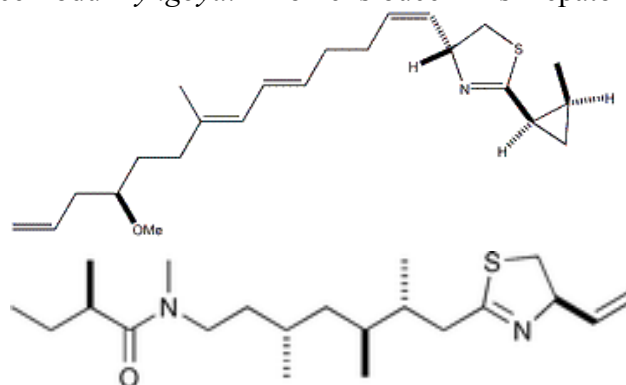
neurotoxickými účinky jakou jsou např. lyngbyatoxin A či antillatoxin, byla z této sinice izolována celá řada cytotoxických látek. Toxicita lyngbyatoxinu A, poprvé izolovaného z kmene *Lyngbya aerugino-coerulea*, je způsobena zablokováním syntézy DNA a stimulací mitózy. Tyto naprosto antagonistické procesy ve svém důsledku ústí buď v proliferaci buňky či její smrt [TENEVA, 2003].

Mezi významné potenciální protirakovinné látky patří curacin A [HOEMANN, 1997], inhibitor mikrotubulů, inhibující nádorové buňky prsu již v nanomolárních koncentracích. Dále byl z Floridských isolátů tohoto rodu identifikován pahayokolide A, pravděpodobně složený z peptidové a nepeptidové části [BERRY, 2004]. Přestože pahayokolide A není tak účinným cytotoxinem jako curacin A, vykazuje značnou cytotoxicitu proti velkému počtu lidských nádorových linií. Nejefektivněji inhibuje buněčné linie

Zejména v posledních letech byla provedena řada studií zaměřených na vyhledávání látek zajímavých z biotechnologického a farmaceutického hlediska [NAMIKOSHI 1996, MOORE 1988, SIVONEN 1990, BERRY 2004, CHEN 2003, BARCHI 1983, PATTERSON 1992, JUNG 1991]. Tyto studie potvrdily v sinicích přítomnost látek s antimikrobiálními, fungicidními, protirakovinnými, anti-HIV [ESSER, 1999] aj. aktivitami. Díky těmto screeningovým pracem dnes známe několik desítek látek s cytotoxickým účinkem.

Značná diverzita bioaktivních látek byla nalezena u sinice rodu *Lyngbya*. Kromě sloučenin s hepato-

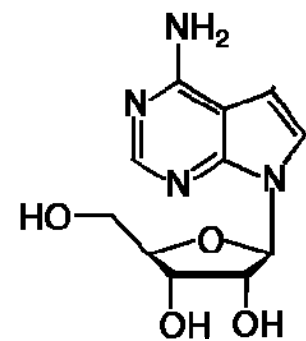
cytotoxicitou, byly izolovány i látky s protirakovinnými účinky.

Obr. 13. nahoře: curacin A [HOEMANN, 1997]
dole: kalkitoxin [WHITE, 2004]

H460 (plicní adenokarcinom), A498 (ledvinný adenokarcinom), SK-OV-3 (adenokarcinom vaječníků) a CEM (lymfocytická leukémie); zatímco buněčná linie HT29 (tračnickový adenokarcinom, GRIII) je ovlivněna v porovnání s ostatními relativně vysokou koncentrací [BERRY, 2004] (viz tab.1). Proč se působení proti jednotlivým nádorovým buněčným liniím tak markantně odlišuje zbývá objasnit.

Stejně vlastnosti byly prokázány u tolytoxinu (6-hydroxy-7-O-methyl-scytophycinu B, viz obr. 1.) syntetizovaného zejména rodu *Scytonema* a *Tolypothrix* [JUNG, 1991]. Tolytoxin působí cytotoxicky na široké spektrum eukaryotních organismů, zatímco inhibice prolaryot aplikací stejných koncentrací nebyla prokázána [PATTERSON, 1992].

Stejně jako pahayokolid A působí specificky na určité linie, avšak jeho toxicita je výrazně vyšší. Hodnoty IC_{50} se při 72h inkubaci pohybují v řádech desetin až desítek nM. Zatímco lidské nádorové buněčné linie COLO-201 (tračnickový adenokarcinom) a KATO-III (žaludeční adenokarcinom) jsou k působení tohoto toxinu citlivější, LoVo (adenokarcinom) a KB (epidermoidní karcinom) a HL-60 (promyelocytická leukémie) jsou méně citlivé (viz tab. 1.) [PATTERSON, 1992].



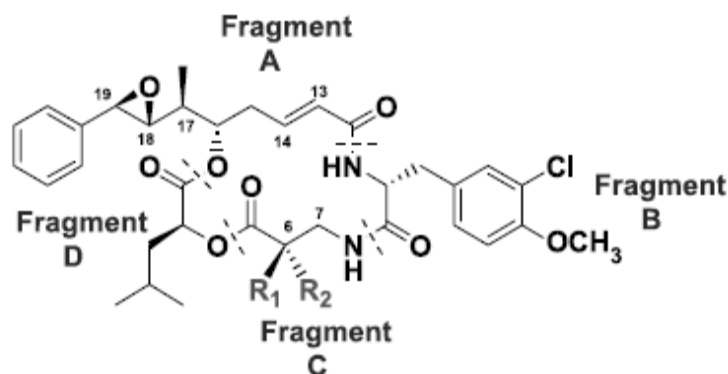
Obr. 14. Tubercidin [BARCHI, 1983]

Ze sinice rodu *Tolypothrix byssoidea* byl izolován další bioaktivní cytotoxin tubercidin (pyrrollo[2,3-d]pyrimidin nukleosid). Prostřednictvím interakcí s m-RNA se stává silným inhibitorem syntézy RNA a DNA [BARCHI, 1983]. Takovýto mechanismus působení je logický u většiny derivátů purinových a pyrimidinových bází jakou je i tubercidin. Podobně se chovají i 9-deazaadenosin a jeho 5'-glucopyranosid izolované z *Anabaena affinis* VS-1 [NAMIKOSHI, 1996] a deriváty dolastatinu 13.

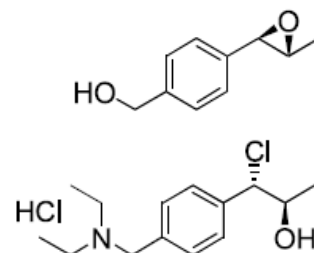
Velikým problémem úspěšné farmaceutické aplikace těchto produktů se stává rezistence (multidrug resistance - MDR) nádorových buněk způsobená P-glykoproteiny (P-gp, MDR-1) a MDR-vázanými proteiny MRP-1. Jedná se o transportéry integrované v buněčné membráně. Pokud má substrát (léčivo, toxin) afinitu k tomuto P-gp ATP-dependentnímu „efflux pump“ kanálu, je jeho absorpce inhibována [ENDICOTT 1989, SMITH 1994].

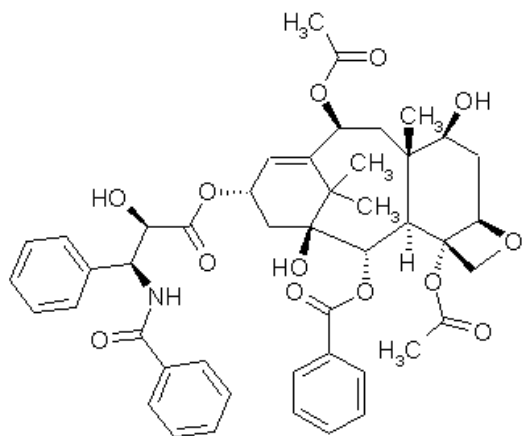
Nejperspektivnější látka z hlediska farmaceutické využitelnosti [MOORE, 1995] byla izolována z terestrické sinice kmene *Nostoc sp.* GSV224 [TRIMURTULU, 1994]. Jedná se o depsipeptid cryptophycin A o neobvyklé struktuře obsahující epoxidovou funkční skupinu. V dnešní době známe 18 derivátů této látky [TRIMURTULU 1995, PANDA 1997] a obdobně jako u jiných velmi účinných cytotoxinů spočívá mechanismus v destrukci cytoskeletu [SMITH, 1994].

Cryptophyciny neprojevují takovou citlivost vůči rezistenčním mechanismům nádorových linií jako doposud užívaná cytostatika Taxol či Adriamycin. Jedním z nejúčinnějších cytostatik ze sinic izolovaných je cryptophycin 52 (LY355703) – synteticky vytvořený derivát lišící se adicí $-CH_3$ skupiny k fragmentu C původní molekuly. Naopak nízké hodnoty inhibice byly zjištěny u cryptophycinu C (viz tab. 1.) [Trimurtulu 1994, Trimurtulu 1995] postrádajícího epoxidovou funkční skupinu.

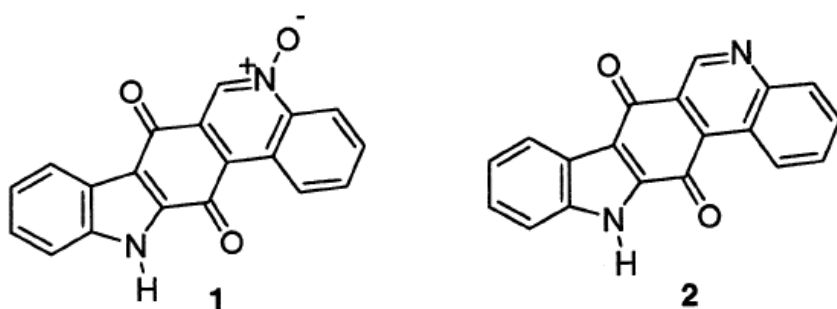


Obr. 15. Cryptophycin 1 ($R_1 = CH_3$, $R_2 = H$). Cryptophycin 52 (LY355703, $R_1 = R_2 = CH_3$) [AL-AWAR, 2004]
dole: syntetické deriváty cryptophycinu fragmentu A





Obr. 16. Paclitaxel (Taxol) [HARBORNE, 1993]

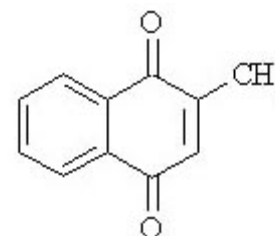


Obr. 17. Calothrixin A (1). Calothrixin B (2) [BERNARDO, 2002]

nepostradatelná pro život buňky. Tímto se v G₂-M fázi přerušuje buněčný cyklus a následuje apoptóza buňky [SMITH, 1994], avšak tento proces je na rozdíl od působení hepatotoxinů značně zpomalen. Aplikace cryptophycinu52 o koncentraci rovné LD₉₀ po dobu 18h vedla u myších linií k nárůstu buněk v časně metafázi. Znaky apoptického jádra byly pozorovány za dalších 36h, což může vysvětlit graduální aktivace kaspasy-3 či neschopnost enzymů navázat se na pozměněnou strukturu DNA [KESSEL, 2000]. Cryptophycin52 je považován za dosud nejúčinnější supresor mikrotubulové dynamiky (k přerušení buněčného cyklu nádorových buněk dostačuje řádově pikomolární množství) [DE MUYS, 1996].

Přerušení buněčného cyklu v G₂-M fázi se také stává cílem pentacyklických indolofenantridinů calothrixinu A a calothrixinu B, ovšem narušuje od cryptophycinu tyto látky neblokují buněčná mikrofilamenta. Obecný mechanismus toxicity chinonových molekul, mezi které mimo jiné patří i menadion (vitamin K3), spočívá v přímé arylaci glutathionu, inhibici sulf-hydryl dependentních proteinů [GANT, 1988] či tvorbě ROS [BOLTON, 2000]. Vzhledem k trojnásobné toxicitě calothrixinu A oproti menadionu (vitaminu K3) a neschopnosti přímé arylace, spočívá toxicita calothrixinu zřejmě v interakci chinonové části molekuly s DNA dosud neznámým způsobem [CHEN, 2003].

K vytvoření představy o tom, jak různorodé cytotoxiny mohou sinice produkovat, zbývá doplnit schopnost syntézy indolokarbazolových makrocyclů. Tato látka byla nalezena u sinice *Nostoc sphaericum* (EX-5-1), vykazuje antivirální aktivitu proti *Herpes simplex* viru typu 2 a neselektivní cytotoxicitu vůči několika lidským nádorovým liniím [KNÜBEL, 1990].



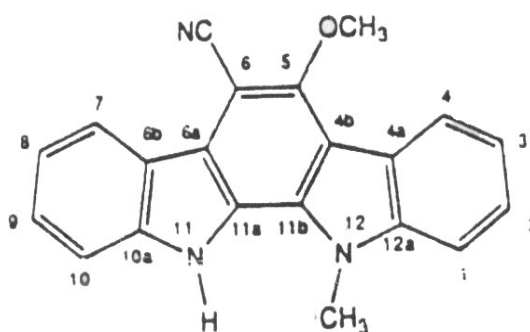
Obr. 18. Menadion, vitamin K3

Snaha získat rozpustnější a účinnější látku vedla k syntéze řady derivátů cryptophycinu52, zejména adicemi na fenylovém jádru fragmentu A - zodpovědného za toxický účinek (viz obr. 16.). Prolomení jistých rezistenčních mechanismů bylo prokázáno na HL-60 buněčné linii s nadměrně exprimovanými MRP-1 a P-gp. Dobré výsledky byly získány adicemi polárních amino či hydroxy skupin na (ne)hydrochlorované molekule, a naopak nejnižší toxický efekt vykazovaly deriváty adované nepolárními funkčními skupinami jako je např. methyl. Ve výsledku je patrné, že těmito změnami nebyly MDR bariéry překonány, jelikož aminoderiváty a hydroxyderiváty sice úspěšně inhibovaly MRP-1 buněčné linie, ale zároveň se

stávaly lepším substrátem pro transportní systém P-gp, což je nepříjemné pro farmaceutické využití jako protirakovinové agens (viz tab.1) [AL-AWAR, 2004].

Stejně jako cryptophyciny se také cryptophycin52 selektivně váže na konce mikrotubulů a potlačuje tím jejich dynamiku, která je

Nutno dodat, že výčet cytotoxických látek v této kapitole není úplný, neboť řada sinicových peptidů vykazuje cytotoxické účinky. Inhibice buněčných linií byla prokázána u lineárních aeruginoguanidinů, cyklických aeruginopeptinů a nostopeptolidu A [ISHIDA 2002, SIVONEN 1996, TRIMURTULU 2000]. Ovšem toxicita těchto látek byla vždy výrazně nižší než u výše uvedených látek a mechanismy jejich působení nejsou plně objasněny.



Obr. 19. 6-cyano-5-methoxy-12-methylindolo[2.3-a]karybazol [KNÜBEL, 1990]

1.E ROZŠÍŘENÍ BIOSYNTÉZY SINICOVÝCH TOXINŮ

Dodnes je předmětem zkoumání to, jaký vliv mají na syntézu sinicových metabolitů podmínky prostředí a k čemu vlastně takové množství energeticky náročných látek sinicím slouží. Bylo prokázáno, že např. microcystiny syntetizují i velmi nepříbuzné sinice z různých geografických oblastí a pravděpodobně tomu tak bude také i u řady jiných látek [RANTALA ET AL., 2004]. A naopak není pravidlem, že sinice určitého rodu nebo druhu syntetizovala pouze daný typ toxinu. Zpravidla určitý organismus syntetizuje peptidy několika tříd společně s jinými látkami. Příkladem, tohoto na první pohled nahodilého uspořádání, je rozšíření *Cylindrospermopsin*. I přesto, že byl poprvé izolován ze sinice *Cylindrospermopsis raciborskii* [OHTANI, 1992], neplatí, že je tento toxin produkovaný tímto druhem kosmopolitně. Dle HPLC-MS analýz kmeny izolované z Německa neobsahují *cylindrospermopsin* ani *microcystin* a jsou toxické vůči HEP-G2 (lidský hepatocelulární karcinom) a CACO-2 (lidský střevní adenokarcinom) buněčným liniím [FASTNER, 2003]. Naproti tomu kmen AWT 205, izolovaný z Austrálie, *cylindrospermopsin* obsahuje a vykazuje silný toxický efekt vůči HEP-G2 i myším hepatocytům, které německým kmenem nebyly inhibovány. Je tedy zřejmé, že určité kmeny sinic syntetizují své metabolity v závislosti na ekologických podmínkách. Dalším příkladem produkce různých toxinů v rámci jednoho taxonu může být situace u planktonních a bentických kmenů rodů *Anabaena* a *Nodularia*. U planktonních izolátů z Baltického moře, byla prokázána hepatotoxicita způsobená *microcystinem* a *nodularinem* [SIVONEN & JONES 1999, LAAMANEN 2001], zatímco bentické izoláty nejsou syntézy *microcystinu* ani *nodularinu* schopny. U této skupiny byl naopak prokázán častý výskyt cytotoxických látek [SURAKKA, 2005].

cyanotoxin	testovací objekt	toxický efekt / koncentrace	doba expozice	autor
hepatotoxiny				
<i>microcystin LR</i>	myší hepatocyty	LC ₅₀ - 8 ng/ml	72h	CHONG, 2002
	myší hepatocyty	LC ₅₀ - 48 ng/ml		BOUAICHA, 2004
	PLHC-1 (rybí hepatokarcinom)	EC ₅₀ - 12 μM		PICHARDO, 2005
	myší hepatocyty	EC ₅₀ - 0,5 μM	24h	FASTNER, 1995
<i>microcystin RR</i>	RTG-2 (rybí gonády)	EC ₅₀ - 80 μM		PICHARDO, 2005
	myší hepatocyty	EC ₅₀ - 4,5 μM		FASTNER, 1995
	PLHC-1 (rybí hepatokarcinom)	EC ₅₀ - >100 μM	24h	PICHARDO, 2005
	RTG-2 (rybí gonády)	EC ₅₀ - >150 μM		PICHARDO, 2005

<i>nodularin</i>	myší hepatocyty	LC ₅₀ - 62 ng/ml	24h	BOUAICHA, 2004
<i>cylindrospermopsin</i>	myší hepatocyty	LC ₅₀ - 40 ng/ml	72h	CHONG, 2002
cytotoxiny				
<i>pahayokolide A</i>	H460	IC ₅₀ - 2,13 μM	48h	BERRY, 2004
	A498	IC ₅₀ - 2,61 μM		
	SK-OV-3	IC ₅₀ - 2,76 μM		
	CEM	IC ₅₀ - 3,27 μM		
	HT29	IC ₅₀ - 44,57 μM		
<i>tolytoxin</i>	LoVo	IC ₅₀ - 8,4 nM	72h	PATTERSON, 1992
	KB	IC ₅₀ - 5,3 nM		
	HL-60	IC ₅₀ - 4,8 nM		
	COLO-201	IC ₅₀ - 520 pM		
	KATO-III	IC ₅₀ - 780 pM		
<i>cryptophycin 52</i>		IC ₅₀ - 24,8 pM	24h	
<i>cryptophycin-OH</i>	HL-60/S	IC ₅₀ - 7,9 pM		
<i>cryptophycin-HCl-pyrrol</i>		IC ₅₀ - 6,4 pM		
<i>cryptophycin 52</i>		IC ₅₀ - 19,5 pM	24h	AL-AWAR, 2004
<i>cryptophycin-OH</i>	HL-60/MRP-1	IC ₅₀ - 9,6 pM		
<i>cryptophycin-HCl-pyrrol</i>		IC ₅₀ - 7,6 pM		
<i>cryptophycin 52</i>		IC ₅₀ - 138 pM	24h	
<i>cryptophycin-OH</i>	HL-60/P-gp	IC ₅₀ - 214 pM		
<i>cryptophycin-HCl-pyrrol</i>		IC ₅₀ - 90 pM		
<i>cryptophycin A</i>	KB	IC ₅₀ - 5 pM	24h	TRIMURTULU, 1994
<i>cryptophycin C (deoxy)</i>	KB	IC ₅₀ - 3 nM	24h	TRIMURTULU, 1994
<i>calothrixin A</i>	HeLa	IC ₅₀ - 1,6 μM	24h	RICKARDS, 1999

Tab. 1. Toxické hodnoty uvedených cyanotoxinů

1.F CÍLE PRÁCE

Screeningová část

- otestovat cytotoxicitu sinicových kmenů vůči savčím buněčným liniím
- porovnat cytotoxickou aktivitu sinic z různých biotopů
- porovnat účinek vybraných cytotoxických kmenů v závislosti na dávce a době expozice

Analytická část

- pomocí HPLC-MS určit obsahové látky cytotoxických extraktů
- u vybraných kmenů, obsahujících neznámý cytotoxin, získat aktivní frakci a pokusit se látku charakterizovat

2 MATERIÁLY A METODIKA

2.A SINICOVÉ KMENY A EXTRAKCE

V předkládané práci byla studována cytotoxicita a obsahové látky u 25 izolátů rodu *Nostoc*, 7 přírodních sběrů sinice *Nostoc commune* a 21 izolátů planktonního rodu *Anabaena* pocházejících z různých lokalit a biotopů (viz tab. 2.). Pro studium byly záměrně vybrány organismy půdní, symbiotické, planktonní, epifytické a subaerofytické. Sinicové kmeny byly poskytnuty ze sbírek Ing. Aleny Lukešové (ÚPB AVČR), Dr. Stefana Ventury (Consiglio Nazionale Ricerche, Institute for Ecosystem studies, Florencie), neoficiální sbírky na Opatovickém Mlýně (MBÚ AVČR) a sbírky Elišky Zapomělové (BF JČU). V případě, že nebyla k dispozici lyofilizovaná biomasa, probíhala kultivace ve 300ml sterilních kultivačních válcích na médiu A-D *Anabaena* [ARNON, 1974], v prostředí obohaceném 2% CO₂ při kontinuální fotoperiodě (70W/m², OSRAM DULUX Philips L) a teplotě 28°C. Kultury byly sklizeny po dosažení konce exponenciální fáze růstu centrifugací (Hettich Universal 320 – 4500 rpm, 15 min), přeneseny na Petriho misku a uloženy po 1 hodinu v hlubokomrazícím boxu při -80°C.

Následně byla biomasa lyofilizací zbavena vody a extrahována disintegrací v hmoždíři za pomoci přečištěných písečných zrn 70% methanolem. Pro porovnatelnost výsledků bylo u každého kmene 200 mg biomasy převedeno do 10 ml extrakčního rozpouštědla. Extrakce probíhala po 1hod bez přístupu světla. Vzniklá směs byla centrifugována (4500 rpm, 15 min) a supernatant převeden do srdcové baňky a odpařen na vakuové odparce (Büchi Rotavapor). Následně byl supernatant zakoncentrován (pokud není uvedeno jinak) na finální surový extrakt o koncentraci 200mg suché biomasy/ml a zbaven případných precipitátů ultrazvukovou sonifikací (Bandolin Sonorex, Bandolin GmbH).

kmen	vědecké jméno	rok izolace	lokality/stát	biotop
De1	<i>Nostoc sp.</i>	1992	skleník, Řím / Itálie	<i>Dioon edule</i> symbiont
OGU36S01	<i>Nostoc sp.</i>	2000	Achill Island / Irsko	<i>Gunnera</i> symbiont
OGU36S02	<i>Nostoc sp.</i>	2000	Achill Island / Irsko	<i>Gunnera</i> symbiont
4AL2	<i>Nostoc sp.</i>	nezn.	botanická zahrada Siena / Itálie	<i>Anthoceros laevis</i> symbiont
Cr4	<i>Nostoc sp.</i>	1992	skleník, Florencie / Itálie	<i>Cycas revoluta</i> symbiont
Gm1	<i>Nostoc sp.</i>	1992	skleník, Siena / Itálie	<i>Gunnera manicata</i> symbiont
Mm1	<i>Nostoc sp.</i>	1992	skleník, Řím / Itálie	<i>Macrozamia moorei</i> symbiont
ATCC53789	<i>Nostoc sp.</i>	nezn.	Skotsko	symbiont lišejníku
3SD05S05	<i>Nostoc sp.</i>	2005	Sassendalen / Svalbard Island	černý povlak
SAG3491	<i>Nostoc coeruleum</i>	nezn.	Wilhelmshaven / Německo	jezíčko
TH1S01	<i>Nostoc sp.</i>	nezn.	Thajsko	nezatopené rýžové pole
TH2S22	<i>Nostoc sp.</i>	nezn.	Thajsko	nezatopené rýžové pole
NMB-21(poušť)	<i>Nostoc sp.</i>	2003	Minia / Egypt	písečná poušť
NMB-25	<i>Nostoc sp.</i>	1999	Německo	výsypka po těžbě uranu
NMB-26	<i>Nostoc sp.</i>	1999	Německo	výsypka po těžbě uranu
Cam2S01	<i>Nostoc sp.</i>	1996	Kambodža	rýžoviště
N. Muscorum I	<i>Nostoc muscorum</i>	1991	Nezamyslice / Česká Republika	orné pole
RQH	<i>Nostoc sp.</i>	2004	Paranapiacaba / Brazílie	smáčená kůra stromů
Nostoc IIB	<i>Nostoc sp.</i>	2004	Paranapiacaba / Brazílie	smáčená kůra stromů
Nostoc III	<i>Nostoc sp.</i>	2004	Paranapiacaba / Brazílie	smáčená kůra stromů

Nostoc V	<i>Nostoc sp.</i>	2004	Paranapiacaba / Brazílie	smáčená kůra stromů
NostocVI	<i>Nostoc sp.</i>	2004	Paranapiacaba / Brazílie	smáčená kůra stromů
SAG6179	<i>Nostoc pruniforme</i>	1964	Plön, Německo	bentos
SAG5979	<i>Nostoc muscorum</i>	1952	Francie	bentos
NC1	<i>Nostoc commune</i>	2006	Třeboň / Česká Republika	silážní jáma
NC2	<i>Nostoc commune</i>	2006	Třeboň / Česká Republika	silážní jáma
NC3	<i>Nostoc commune</i>	2006	Nové Hradky / Česká Republika	hráz rybníka u železničního přejezdu
NC4	<i>Nostoc commune</i>	2006	Nové Hradky / Česká Republika	hráz rybníka
NC5	<i>Nostoc commune</i>	2006	tankodrom, České Budějovice / Česká Republika	panelová cesta
NC6	<i>Nostoc commune</i>	2006	České Budějovice / Česká Republika	betonový nájezd
NC7	<i>Nostoc commune</i>	2006	České Budějovice / Česká Republika	betonové parkoviště ENTU AV
OBU36S07	<i>Nostoc sp.</i>	2000	The Burren, Clare / Irsko	periphyton
Anarenif Pěšák 2	<i>A. eucompacta x reniformis</i>	2006	Pěšák / Česká Republika	
Litv II 06	čeleď <i>Rivulariaceae</i>	2006	Litvínovice / Česká Republika	
Acom Svět	<i>A. compacta</i>	2006	Svět / Česká Republika	
04-26	<i>A. circinalis x crassa</i>	2004	Jesenice / Česká Republika	
04-17	<i>A. compacta</i>	2004	Dubenský / Česká Republika	
04-57	<i>A. flos-aquae</i>	2004	Vajgar / Česká Republika	
04-06	<i>A. mendotae x sigmoidea</i>	2004	Březová / Česká Republika	
04-24	<i>A. lemmermannii</i>	2004	Husinec / Česká Republika	
04-28	<i>A. circinalis x crassa</i>	2004	Hodějovický / Česká Republika	
04-45	<i>A. mendotae x sigmoidea</i>	2004	Svět / Česká Republika	
04-59	<i>A. circinalis x crassa</i>	2004	Valcha / Česká Republika	
04-51	<i>A. cf. spiroides</i>	2004	Svět / Česká Republika	rybník
04-43	<i>Aphanizomenon aphanizomenoides</i>	2004	Svět / Česká Republika	
04-33	<i>A. lemmermannii</i>	2004	Orlík / Česká Republika	
Anaps-Ole 03	<i>Anabaenopsis cf. elenkini</i>	2003	Oleksovice / Česká Republika	
04-22	<i>A. circinalis x crassa</i>	2004	Husinec / Česká Republika	
AlemLipno05-silná	<i>A. lemmermannii - silná vlákna</i>	2005	Lipno / Česká Republika	
04-44	<i>A. affinis</i>	2004	Svět / Česká Republika	
04-40a	<i>A. cf. flos-aquae</i>	2004	Skalka / Česká Republika	
04-12	<i>A. mendotae x sigmoidea</i>	2004	Černiš / Česká Republika	
Anarenif Pěšák 4	<i>A. eucompacta x reniformis</i>	2006	Pěšák / Česká Republika	

pozn.: kmeny NC1-NC7 nebyly čistými izoláty

Tab. 2. Testované kmeny sinic

2. B BUNĚČNÉ LINIE

Myši immortalizované buněčné linie (lymfoblastomy) YAC-1 (neadherentní) a Sp/2 (semiadherentní) byly ochotně poskytnuty paní Evou Řezníčkovou a Doc. Janem Kopeckým (Parazitologický ústav Akademie věd v Českých Budějovicích). Kultivace probíhala ve sterilních kultivačních lahvích 25 cm² (50ml, Cellstar, Greiner Bio-One) v mediu RPMI-1640 [MARTIN, 1994] (SIGMA) s přidávkou 5% (v/v) kravského fetálního séra (PAA), 1% (2mM) L-glutaminu (SIGMA), 1% směsi antibiotika/antimykotika (PAA), 0,1% 50 mM merkaptoethanolu v inkubátoru (SANYO MCO-15AC, Schoeller) za stálé teploty 37°C a vysoké relativní vlhkosti. Buněčné linie byly sledovány inverzním mikroskopem (IM-2, MERCI) a pasáže u obou typů kultur probíhaly každé 1-2 dny. Semiadherentní buněčné linie Sp/2 musely být před pasáží uvolněny ze dna kultivační lahve rozfoukáním. Viabilita a koncentrace buněčných linií byla před vlastním testem cytotoxicity měřena exkluzivním barvením trypanovou modří [BERG, 1972] a koncentrace buněk počítána v Bürkerově komůrce (Cyrus MEOPTA), přičemž pro experiment byly použity pouze kultury s viabilitou větší než 95%.

2. C TEST CYTOTOXICITY (MTT TEST)

Do sterilní 96-jamkové mikrotitrační destičky (Nunclon delta Surface, NUNC) byly nanášeny testované surové extrakty (frakce) a to v triplicátech po 10μl tak, aby krajní jamky zůstaly prázdné. Z důvodu odpaření rozpouštědla byly destičky vloženy cca na 30 min do inkubátoru o nastavené teplotě 37°C. Buněčná suspenze byla centrifugována (Sorvall Evolution RC, Kendro Lab Systems – 1000 rpm, 14 min, 4°C) a rozředěna v mediu RPMI-1640 na požadovanou koncentraci - 7,5x10⁵ buněk/1ml. Do každé pokusné jamky bylo mikropipetou nanášeno 200μl buněčné suspenze tak, aby první tři jamky ve sloupci obsahovaly testovaný extrakt a zbývající pouze kontrolní suspenzi. Krajní jamky byly naplněny 200μl destilované vody, aby se omezilo vypařování testovacích jamek.

Buněčné linie byly inkubovány s extraktem (frakcí) za teploty 37°C a 4,25 ± 0,75% podílu CO₂ ve vzduchu po dobu 12hod. Poté bylo do jamek přidáno 10μl MTT [3-(4',5' dimethylthiazol-2'-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid; SIGMA] o koncentraci 4mg/ml (přefiltrované přes filtr Millipore express PES Membrane 0,22μm, Millex GP) a destičky vloženy zpět do inkubátoru na 3-4hod. Použitá metoda je založena na schopnosti mitochondriální succinyldehydrogenasy redukovat rozpustnou kvartérní sůl MTT na nerozpustné fialovo-modré formazanové krystalky. Koncentrace vzniklého formazanu je přímo úměrná počtu živých metabolizujících buněk a porovnáním kontrolních a testovacích jamek lze zjistit výslednou viabilitu [MOSMANN, 1983]. Po stočení mikrotitračních destiček (Hettich Universal 320 – 3000 rpm, 13 min) byl supernatant odstraněn a k rozpuštění formazanu použit dimethylsulfoxid (CHROMSERVIS). Za použití spektrofotometru (Tecan SUNRISE Elisa reader) byly při měření (λ=590nm) a referenční vlnové délce (λ=640nm) odečteny hodnoty kontrolních a testovacích jamek a zjištěna výsledná cytotoxicita jednotlivých extraktů podle vzorce uvedeného níže. Míra toxicity studovaných kmenů byla rozdělena do tří kategorií dle tab. 3.

$$Viabilita\ buněk\ [\%] = \frac{\text{průměr } (A_{590} - A_{640}) \text{ testovacích jamek}}{\text{průměr } (A_{590} - A_{640}) \text{ kontrolních jamek}}$$

efekt	inhibice [%]
vysoce cytotoxický	50-100
cytotoxický	25-49
necytotoxický (mírně cytotoxický)	0-24

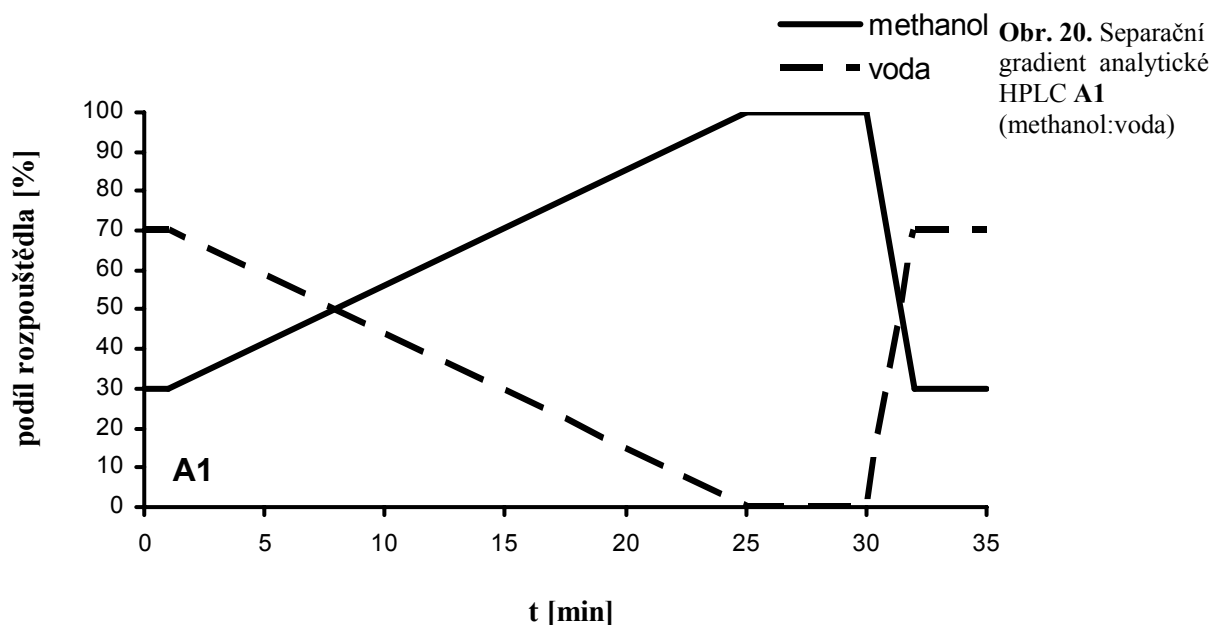
Tab. 3. Rozřazovací kritéria cytotoxicity sinicových kmenů

2.D SEPARAČNÍ METODY:

2.D.I HPLC/ESI/MS/MS (analytická), frakcionace

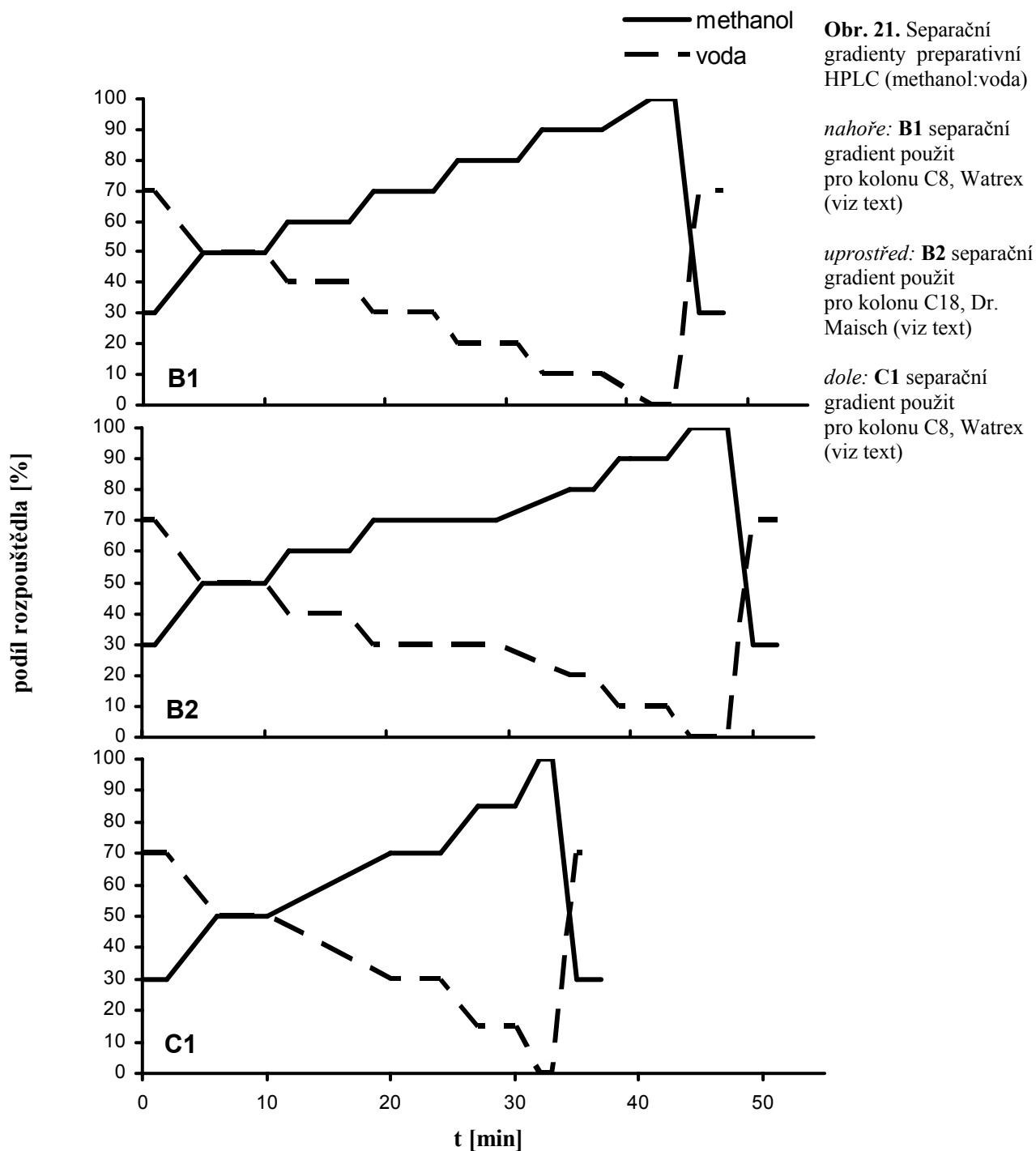
Složení sinicových extraktů bylo stanoveno za užití vysokoúčinné kapalinové chromatografie s propojením na hmotnostní spektrometr (dále HPLC-MS) na přístroji Agilent 1100 series, MSD100 Ion Trap. Dle potřeby byla analýza prováděna s alternujícími polaritami MS a se zaměřením iontové pasti na ionty o velikosti m/z 900 a m/z 1800 na analytické koloně (Zorbax Eclipse XDB-C8; 4,6x150mm, 5 μ m; průtok 0,6ml/min; nástřik 20 μ l, teplota 30°C). Analýza probíhala po dobu 35 min. za použití gradientu methanol a voda (viz obr. 20) s přidávkou 0,1% HCOOH pro zajištění lepší ionizace látek v ESI/MS. Za účelem zjištění aktivní složky extraktu byla provedena frakcionace s následným testem cytotoxicity (viz odstavec 2.C).

Frakcionace probíhala jímáním eluentu během standardní analýzy do baněk dle UV a MS záznamu, přičemž pro dobrou separaci látek byl použit online UV záznam a retenční čas. Frakce byly odpařeny a zakoncentrovány ve výchozím množství nástřiku v 70% methanolu z důvodu zajištění stejného efektu jako při aplikaci surového extraktu.



2.D.II HPLC (preparativní), frakcionace

Preparativní HPLC byla použita za účelem získání většího objemu extraktů. Práce byla provedena na přístroji LabAlliance (Watrex Praha) při průtoku 3,8ml/min; nástřiku 0,5ml a teplotě 30°C. UV detektor (KNAUER variable wavelength monitor, $\lambda=220$ nm) byl použit pro přesné odchytení frakcí obsahujících jednu látku. Za účelem lepší separace a možnosti nástřiku většího objemu byly použity kolony: C8 Reprosil100, 250x10mm, 5 μ m, Watrex a C18 Reprosil100, 250x8mm, 5 μ m, Dr. Maisch GmbH) a tudíž musely být optimalizovány také separační gradienty. Standardní analytický gradient použitý v analytické HPLC-MS byl vzhledem k nedostatečné separaci nahrazen vhodnějšími (viz obr. 21).



2.D.III TLC, frakcionace

U vybraných frakcí byla ze separačních a analytických důvodů použita tenkovrstevná chromatografie (dále jen TLC). Eluční směs a podmínky byly s drobnými úpravami převzaty z práce EL-THAHER, 1994. Jako mobilní fáze byla použita směs *n*-butanol - kyselina octová - voda (v poměru 4:1:1). Na TLC desku s fluorescenční značkou (průměrná velikost silikagelových částic 2-25 μ m, výška 20cm, SIGMA) byly cca 0,5 cm pod okraj koncentrační zóny mikropipetovou špičkou naneseny vzorky v podobě bodů či pásků. Vzorky byly dokonale vysušeny fénem a deska vložena na 3 hodiny do dobře nasycené TLC komory naplněné mobilní fází. Po vytažení byla vysušena fénem, a díky fluorescenční značce byly separované látky patrné pod UV zářivkou ($\lambda=254$ nm) jako tmavé body. K permanentnímu záznamu a ověření, zda-li frakce obsahuje cyklický

peptid, bylo třeba desku obarvit, a to vložení do 20% (w/v) roztoku kyseliny trichloroctové (TCA) na 10 min, a následně na 5 min do 0,3% (w/v) barviva Serva Blue W. Za pomoci tohoto barviva by se cyklické peptidy měly jevit jako tmavomodré skvrny či pruhy na světlemodrém pozadí desky.

TLC frakcionace probíhala ještě před obarvením pomocí Serva Blue W. Po prohlédnutí desky pod UV zářivkou byly skvrny či pruhy opatrně označeny ostrým předmětem. Tyto „frakce“ byly i s vrstvou silikagelu seškrabány do zkumavek, extrahovány do 2ml 70% methanolu a zcentrifugovány (Hettich Universal 320, 4500 rpm, 10 min). Extrakce byla opakována dvakrát. Supernatant byl odpařen a zakonzentrován do původního objemu extraktu (0,5ml). Takto vzniklá frakce byla podrobena testu cytotoxicity a analýze HPLC-MS.

2.E STANOVENÍ „IC₅₀“ A ZÁVISLOST TOXICKÉHO EFEKTU NA DOBĚ EXPOZICE.

Jelikož nebyla k dispozici navážka čisté izolované látky, byla hodnota „IC₅₀“ i ostatní koncentrace v tomto experimentu vyjadřovány jako koncentrace lyofilizované biomasy/ml (dále jen LB/ml). K oběma experimentům byly použity extrakty kmenů *Nostoc muscorum I* a *Nostoc sp. De* (viz tab. 2.) o koncentracích 80mg/ml pro *N. muscorum I* a 125mg/ml pro *De*.

Ke stanovení hodnoty „IC₅₀“ pro buněčné linie YAC-1 a Sp/2 bylo použito koncentrační rozpětí 62 µg LB/ml až 10 mg LB/ml připravované ředící řadou v 70% methanolu. Experiment byl následně proveden a vyhodnocen MTT testem. Koncentrační závislost byla konstruována na základě proložení získaných dat sigmoidální křivkou pomocí metody nejmenších čtverců. Hodnota „IC₅₀“ byla vypočtena podle níže uvedeného vzorce,

$$y = \frac{a - c}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}}\right)^b} + d$$

kde **a**=horní limita, **b**=sklon funkce, **c**=spodní limita, **d**=posun po ose y, **x**=proměnná.

Pro časový experiment byla použita, díky lepším „fotogenickým vlastnostem“ způsobeným adhesí, linie Sp/2. Buňky byly exponovány koncentrací shodné s „IC₅₀“. Extrakty byly naneseny v šesti opakováních a ponechány odpařit v inkubátoru při 37°C a následně byla přidána buněčná suspenze. Jednotlivé jamky byly prohlédnuty a fotodokumentovány v intervalech 0h, 2h, 4h, 8h, 12h, 24h Paralelně k tomu byla viabilita pro jednotlivé expoziční časy hodnocena pomocí trypanové modři.

Fotodokumentace byla provedena za použití inverzního mikroskopu IM-2 s modrou clonou a digitálního fotoaparátu NIKON CoolPix 4500.

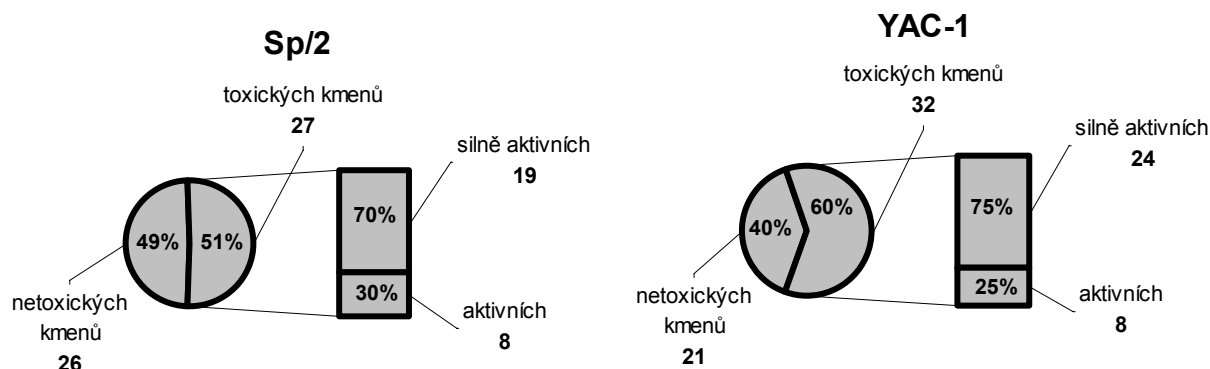
3 VÝSLEDKY

3.A SCREENING CYTOTOXICITY SINICOVÝCH KMENŮ

V screeningové části předkládané práce byla testována cytotoxicita celkem **53 kmenů** sinic ze **6 různých biotopů** (viz graf 2.) Celkem **62%** testovaných kmenů vykazovalo jistou míru cytotoxicity alespoň proti jedné buněčné linii a více než třetina z nich vyvolávala silný toxický efekt. Z grafu 1. je také patrné, že větší procento extraktů způsobovalo poškození buňkám linie YAC-1, kde byla inhibice zaznamenána u 32 kmenů a až na výjimky bylo poškození vždy vyšší než u linie YAC-1. Naproti tomu linii Sp/2 inhibovalo celkem 27 extraktů. Pro detailní porovnání viz grafy 1. a 2.

Přesto se nedá říci, že by se ve většině případů jednalo o specifický efekt vůči jedné linii. Pouze u kmene *Nostoc* sp. TH1SO1 byla nalezena specifická aktivita proti buňkám YAC-1 (inhibice 59%).

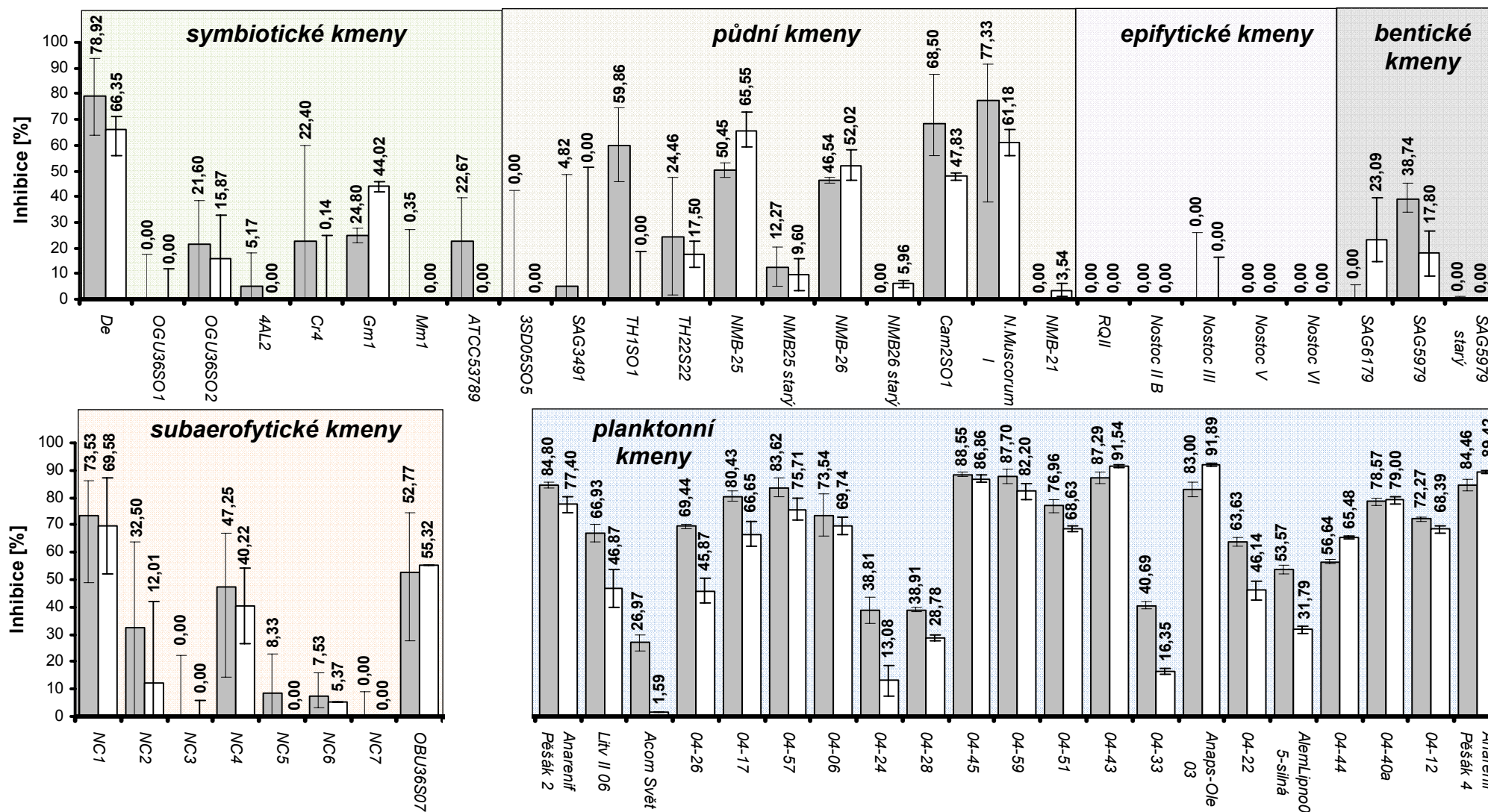
Co se týče porovnání izolátů různých ekologických skupin, byly nalezeny pozoruhodné rozdíly ve výskytu cytotoxických kmenů. Zatímco mezi bentickými a epifytickými organismy nebyly nalezeny výrazně pozitivní izoláty, vysoká frekvence výskytu cytotoxických kmenů byla pozorována u planktonních a půdních kmenů. Vysoké hodnoty inhibice byly zaznamenány u 5 z 9 studovaných půdních sinic, přičemž izoláty *N. muscorum* I, Cam2SO1, NMB-26, NMB-25 a TH1SO1 způsobovaly silný toxický efekt alespoň proti jedné linii. Vyjma sinice *Anabaena compacta* Svět byla nalezena výrazná cytotoxicita u všech planktonních izolátů. Méně častý výskyt byl nalezen mezi symbiotickými a subaerofytickými kmeny. Nutno dodat, že v obou skupinách byly také zpozorovány velmi aktivní kmeny, avšak zřídka. Většina nezpůsobovala buňkám žádná poškození, anebo jejich aktivita byla podprahová. Silný toxický efekt vyvolával u obou linií extrakt symbiotického kmene *Nostoc* sp. De (78% vůči YAC-1 a 66% vůči linii Sp/2), dva sběry subaerofytické sinice *Nostoc commune* NC-1 a NC-4, a perifytonní kmen *Nostoc* sp. OBU36SO7.



Graf 1. Srovnání cytotoxicit studovaných extraktů proti buněčným liniím YAC-1 a Sp/2.

Toxicita kmenů sinic proti buněčným liniím YAC-1 a Sp/2

□ YAC-1 □ Sp/2

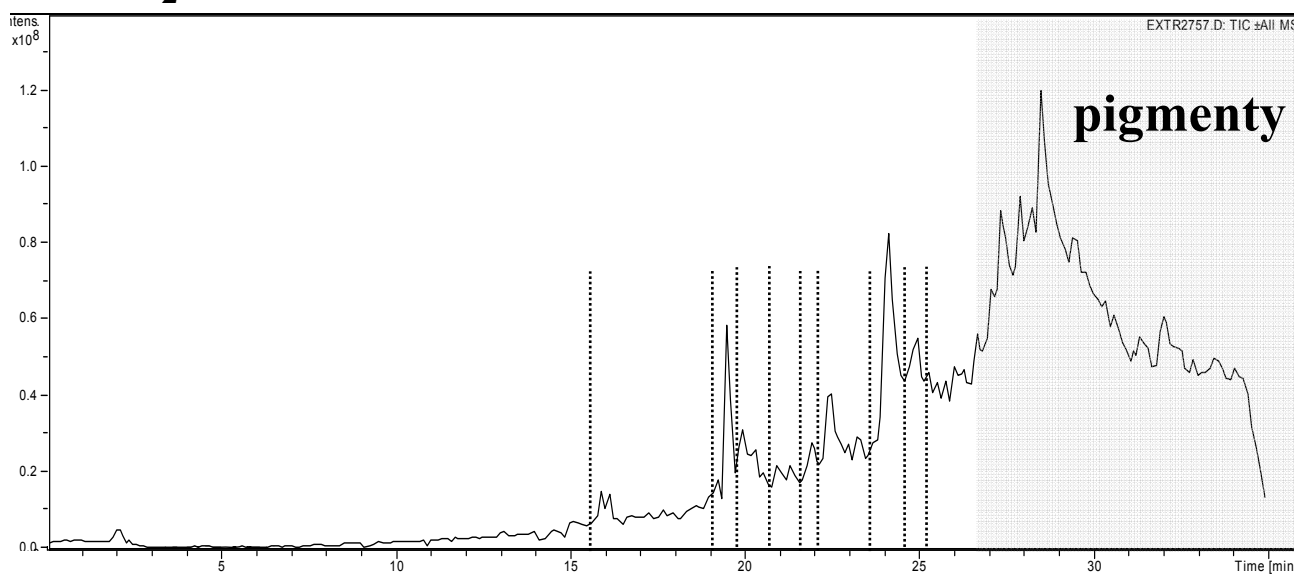


Graf 2. Výsledky celkového screeningu 53 kmenů sinic. Všechny experimenty byly provedeny pro každý kmen minimálně ve dvou opakováních. Hodnoty značí průměrnou inhibici kmene a chybové úsečky znázorňují minimální a maximální hodnotu z celkového souboru hodnot. Záporné hodnoty inhibice byly převedeny na nulové. Rámované oblasti označují kmeny z jednotlivých biotopů.

3.B HPLC/ESI/MS ANALÝZY CYTOTOXICKÝCH EXTRAKTŮ

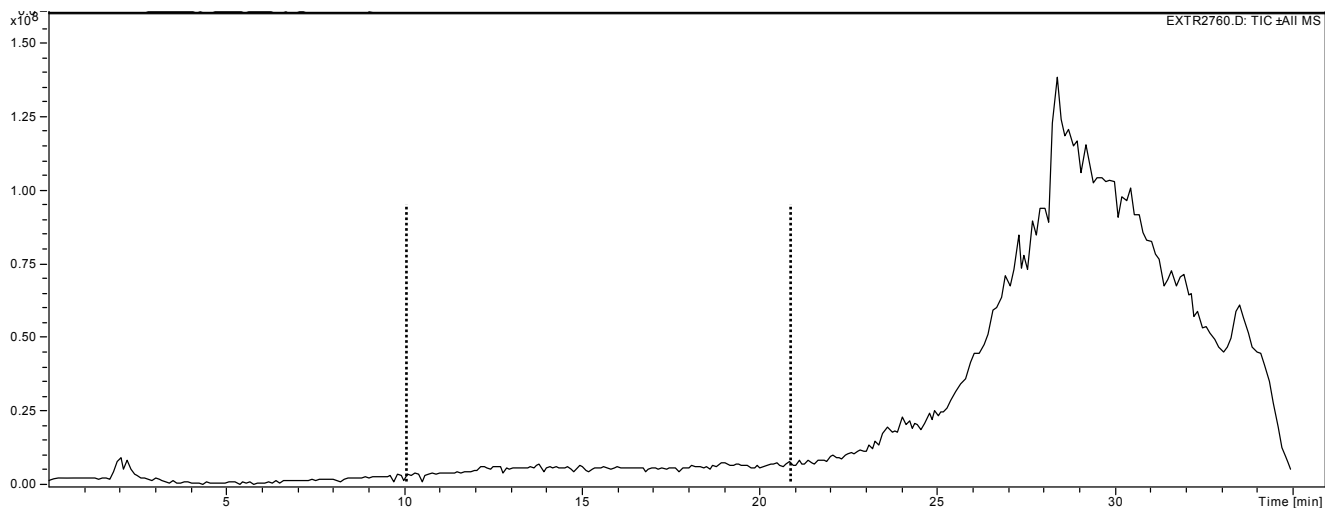
Na základě výše uvedené screeningové části práce bylo pro podrobnou HPLC-MS analýzu vybráno 6 silně cytotoxických extraktů. U nejzajímavějších kmenů byla provedena frakcionace a charakterizace aktivní látky. Měření probíhala za použití gradientu **A1a** byly analyzovány extrakty následujících kmenů: Symbiotický kmen *Nostoc* sp. De, půdní izoláty *Nostoc* sp. NMB25, NMB26, Cam2SO1, *Nostoc Muscorum I*, *Nostoc* sp. OBU36SO7 a planktonní sinice druhu *Anabaena affinis* 04-44 a *Anabaena eucompacta x reniformis* Pěšák 2. U všech extraktů byly v retenčním čase (dále jen RT) 25 min. zaznamenány molekulární ionty 301/579 odpovídající kontaminaci ftalátů z plastových laboratorních pomůcek. V následující části analýzy pak bylo možno nalézt na základě absorpce ve vlnových délkách 440 a 660 nm především pigmenty a jejich degradační produkty [KOPECKÝ, ÚSTNÍ SDĚLENÍ], a proto nebyla tato část chromatogramu podrobněji analyzována. Zvolenou analytickou metodou bylo dosaženo ve většině extraktů dobré ionizace a dostatečné separace pro účely určení molekulárních iontů. Pouze extrakty kmenů NMB-25, 04-44 a Cam2SO1 vykazovaly nedostatečnou ionizaci a intenzita molekulárních iontů se pohybovala na hranici šumu. Vlivem nedostatečné separace mohl být v +MS spektrech některých kmenů pozorován více než jeden molekulární iont.

3.B.I Extrakty *Anabaena affinis* 04-44 a *Anabaena eucompacta x reniformis* Pěšák 2

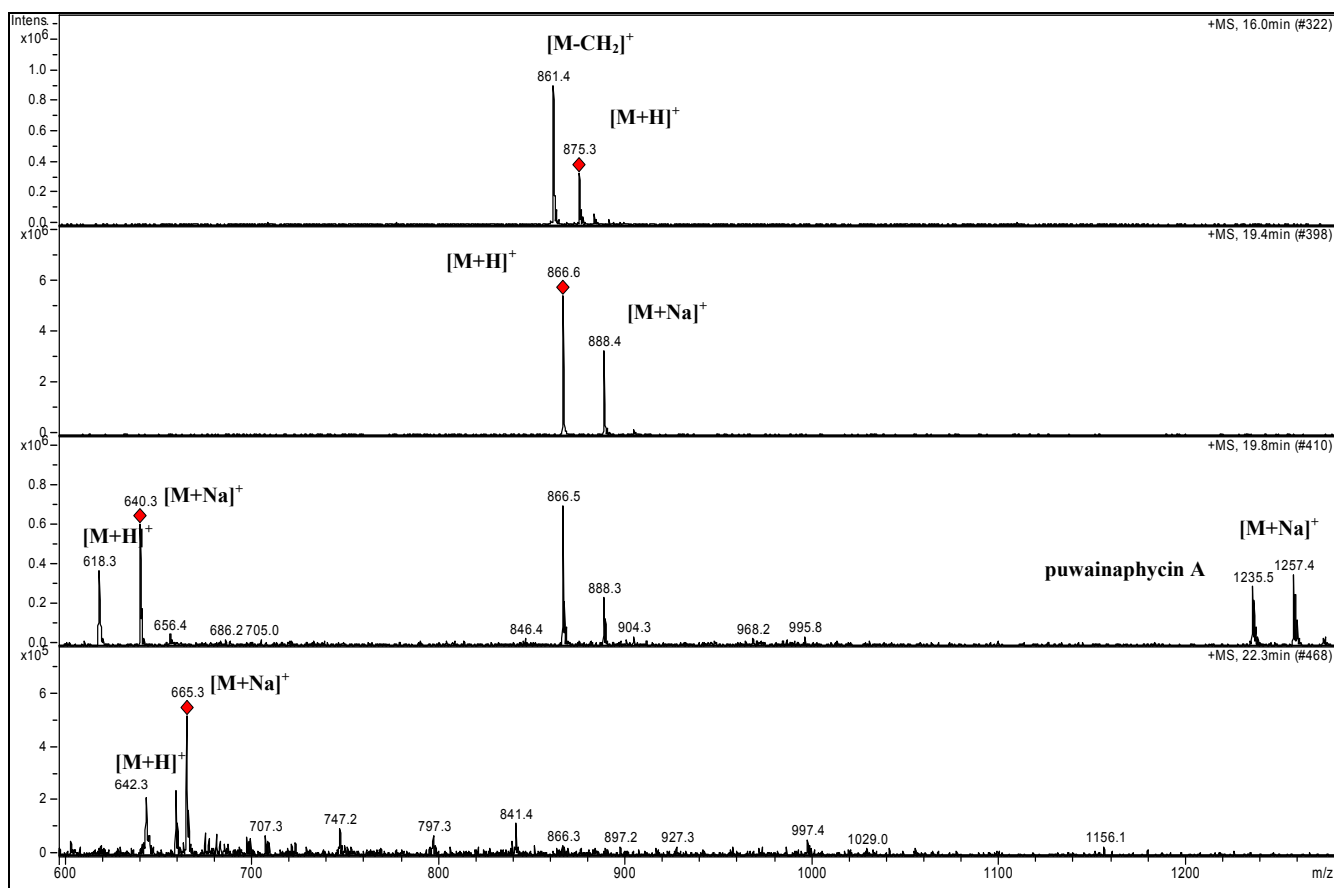


Graf 3. HPLC-MS chromatogram (Total Ion Current) kmene *Anabaena eucompacta x reniformis* Pěšák 2. Na ose X je znázorněn retenční čas a na ose Y celková intenzita iontů. Svislé čáry znázorňují jednotlivé frakce.

Zatímco u kmene *Anabaena affinis* 04-44 (viz graf 4.) nebyly v extraktu nalezeny prakticky žádné sloučeniny, chromatogram *Anabaena eucompacta x reniformis* Pěšák 2 (graf 3.) vykazoval relativně dobře separované píky pro hmoty $[M+H]^+$ **875, 866, 618, 1235,5 a 642**. Molekulární iont 1235,5 vypovídá na základě molekulární váhy o přítomnosti **puwainaphycinu A**, $[M+H]^+$ **1236** [GREGSON, 1992]. Ostatní ionty nemohly být dle dostupných materiálů identifikovány. Vzhledem k silnému cytotoxickému efektu obou kmenů byly jejich extrakty frakcionovány. Extrakt kmene 04-44 byl rozdělen na tři frakce pouze na základě RT. Tento postup byl zvolen pro případ, že by extrakt obsahoval špatně ionizovatelné látky, které by v MS záznamu nebyly patrné. Překvapivě u žádné ze získaných frakcí nebyla cytotoxicita pomocí MTT testu prokázána.



Graf 4. HPLC-MS chromatogram (Total Ion Current) kmene *Anabaena affinis* 04-44. Na ose X je znázorněn retenční čas a na ose Y celková intenzita iontů. Svislé čáry znázorňují jednotlivé frakce.

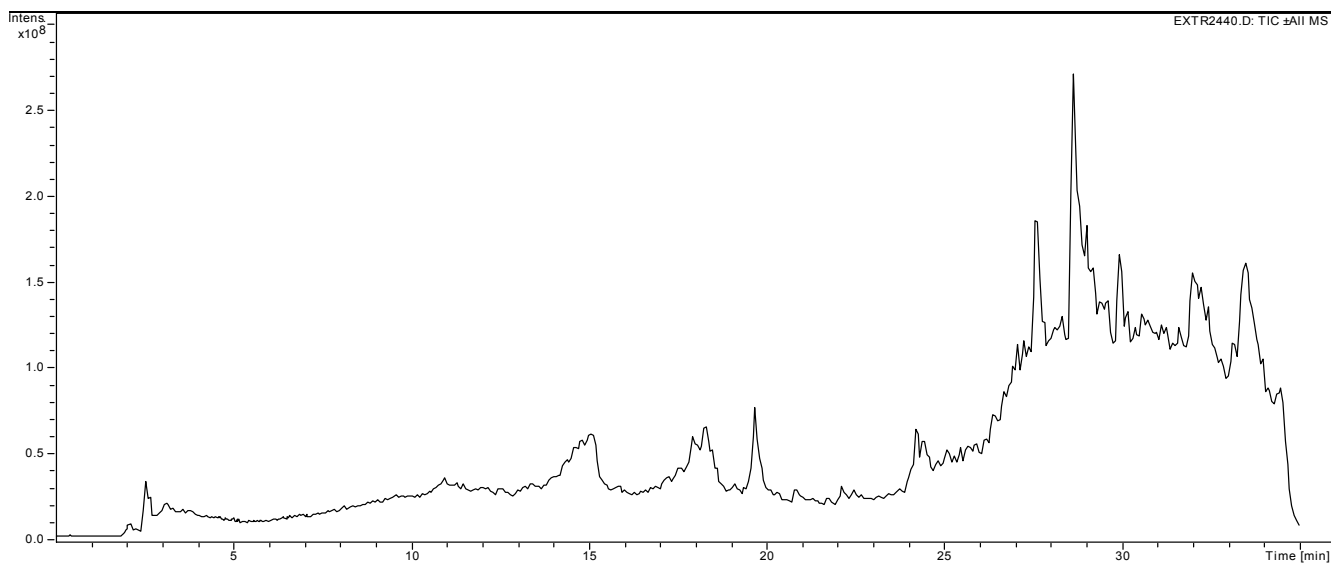


Graf 5. +MS spektra kmene *Anabaena eucompacta x reniformis* Pěšák 2. Na ose X je znázorněn poměr m/z a na ose Y celková intenzita iontů. +MS spektra s intenzitami nižšími než hodnoty šumu nebyly zahrnuty.

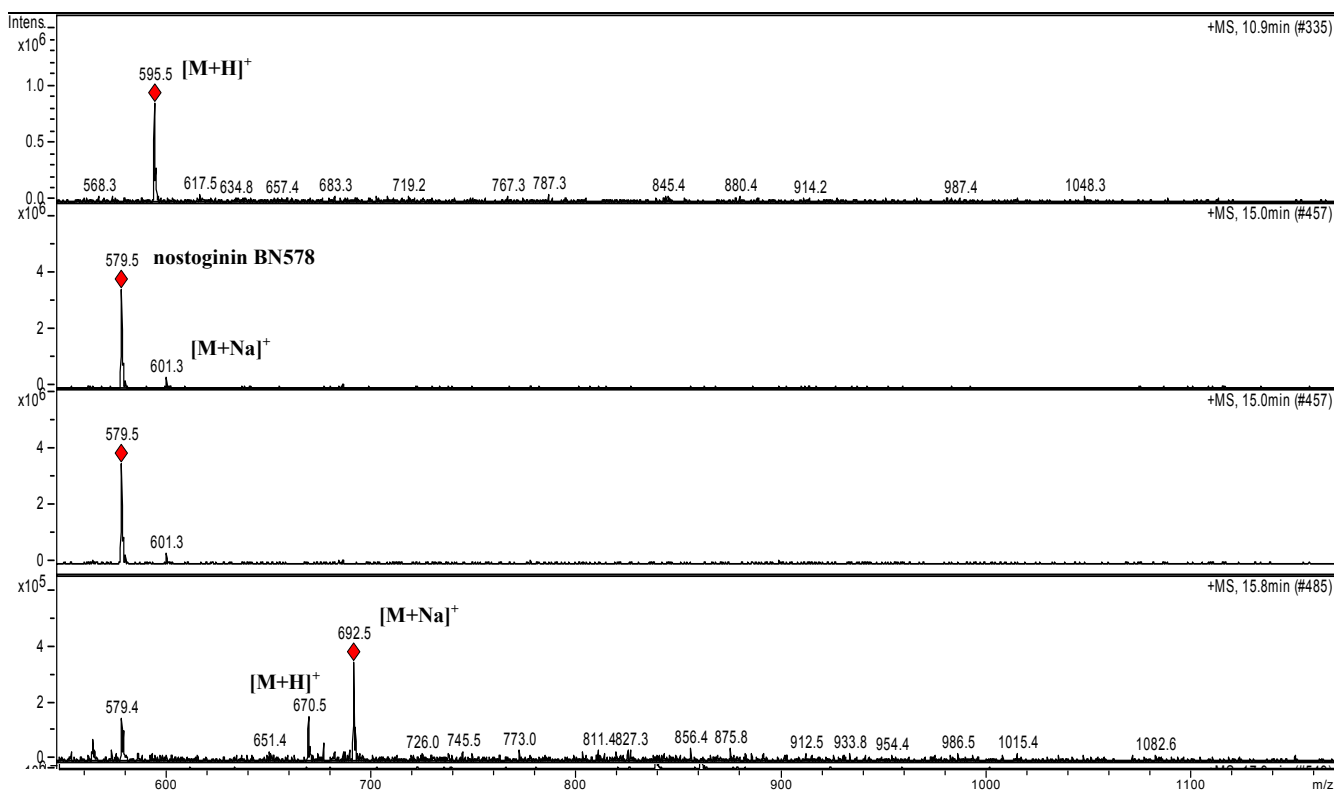
3.B.II Extrakt *Nostoc* sp. OBU36SO7

Analýza kmene OBU36SO7 dokázala přítomnost několika látek s velmi podobnou retencí, proto můžeme na chromatogramu nalézt překrývající se píky. Na základě přítomnosti sodných aduktů $[M+Na]^+$ byly identifikovány molekulární ionty pro hmoty $[M+H]^+$ 595, 579, 670, 965, 987,

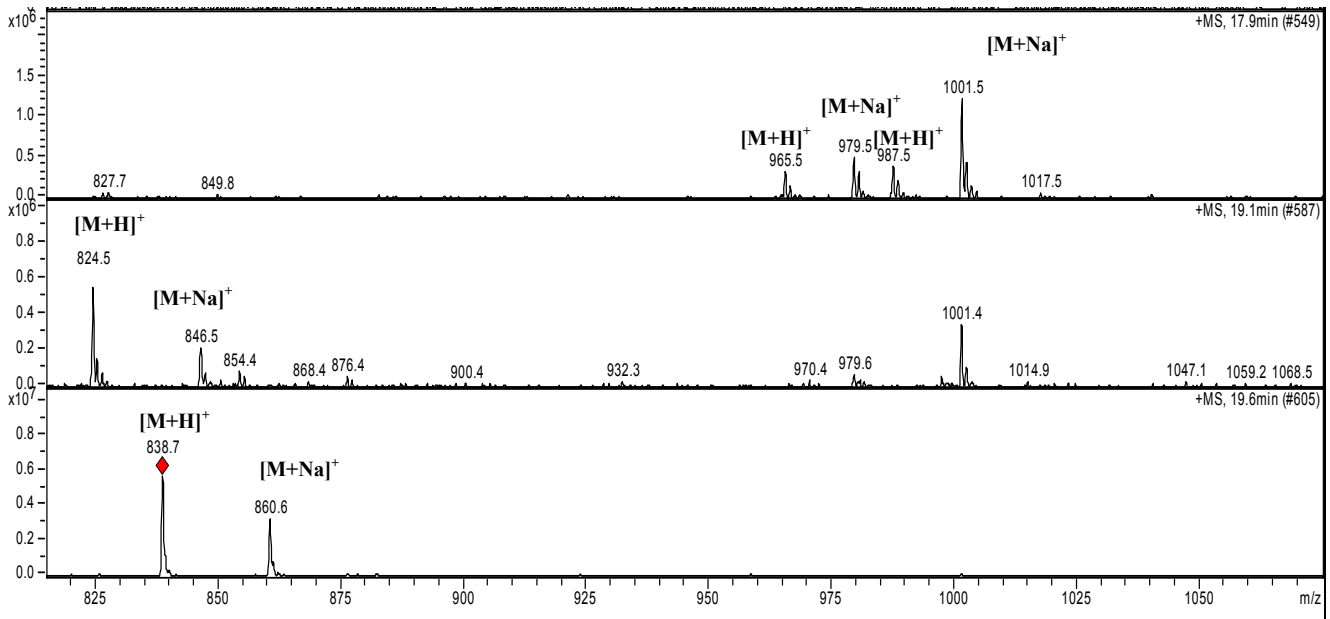
824 a 838. Téměř ve všech případech se bude jednat o neznámé struktury. V retenčním čase 15.0 min byla identifikována molekula $[M+H]^+$ 579,5 odpovídající **Nostogininu BN578**, HRFABMS $[M+H]^+ = 579.3758$ [PLOUTNO, 2002].



Graf 6. HPLC-MS chromatogram (Total Ion Current) kmene *Nostoc* sp. OBU36SO7. Na ose X je znázorněn retenční čas a na ose Y celková intenzita iontů.



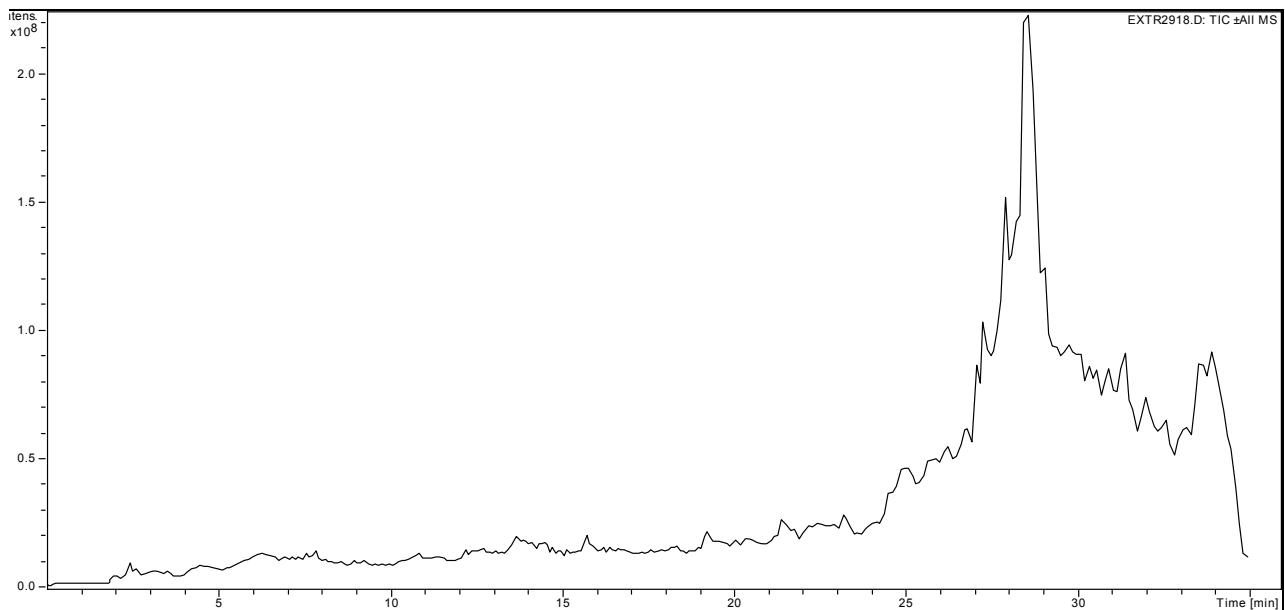
Graf 7a. +MS spektra kmene *Nostoc* sp. OBU36SO7. Na ose X je znázorněn poměr m/z a na ose Y celková intenzita iontů.



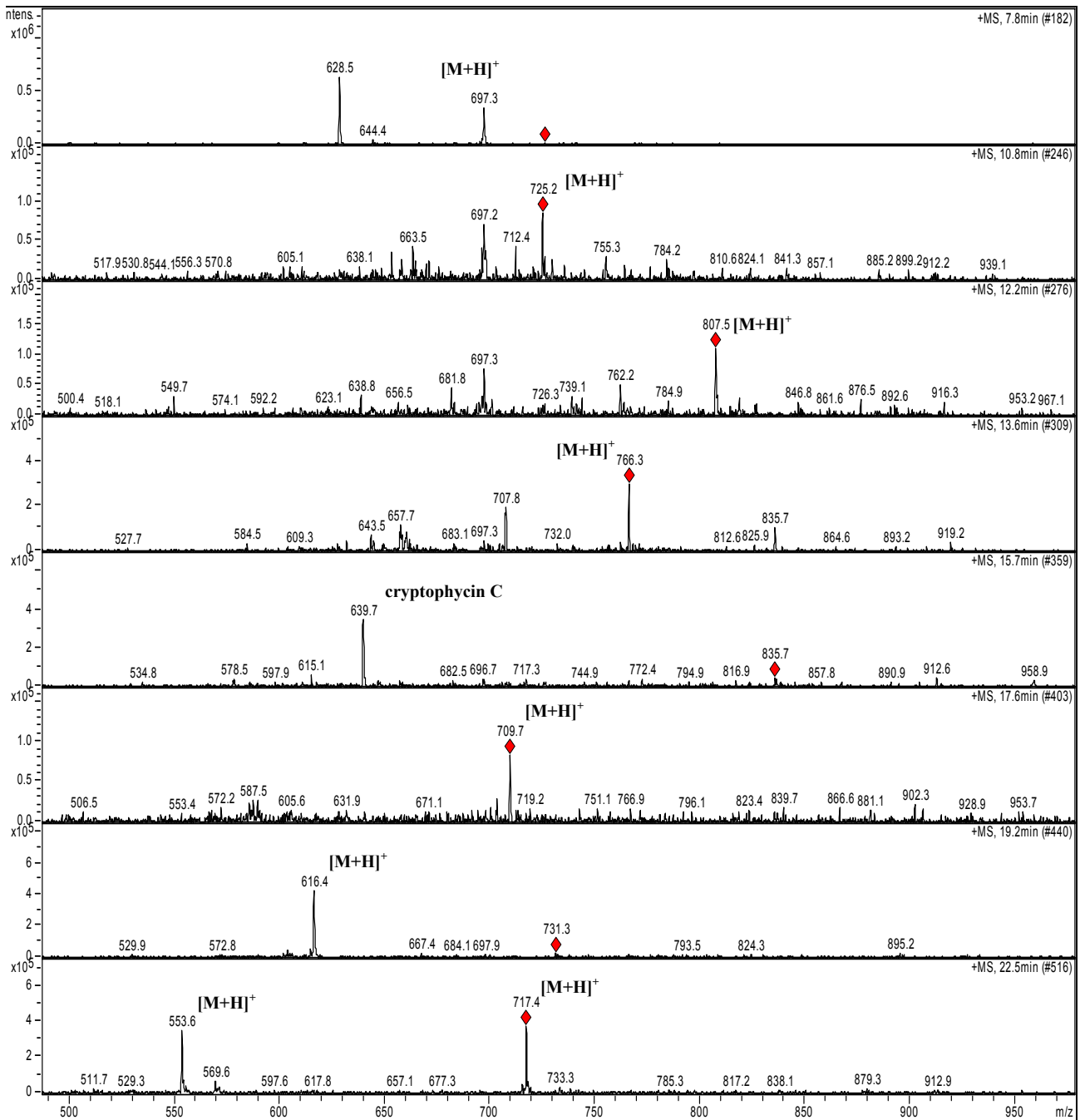
Graf 7b. +MS spektra kmene *Nostoc* sp. OBU36SO7. Na ose X je znázorněn poměr m/z a na ose Y celková intenzita iontů.

3.B.III Extrakt *Nostoc* sp. Cam2SO1

Přestože tento kmen vykazoval značnou cytotoxicitu, v HPLC-MS analýze byly nalezeny pouze nepříliš intenzivní chromatografické píky a v jejich +MS spektrech slabé molekulární ionty. Vzhledem k této nízké intenzitě nebylo možné s jistotou určit molekulární iont na základě přítomnosti sodíkových aduktů, a tak byl iont o největší hodnotě m/z a relevantní intenzitě považován za molekulární. Tímto způsobem byly určeny látky o hmotách $[M+H]^+$ 697, 725, 807, 766, 639, 709, 616, 717. Žádná z těchto hmot nebyla identifikována jako známá struktura. Pouze v RT 15.7 min byl nalezen iont $[M+H]^+$ 639, který se shoduje s molekulární vahou **cryptophycin C**. Vzhledem k tomuto výsledku a faktu, že velikost cryptophycinů se pohybuje právě v rozmezí 600-700, je pravděpodobné, že by za toxický efekt mohly být zodpovědné právě tyto molekuly s cytotoxickým efektem [DE MUYS, 1996].



Graf 8. HPLC-MS chromatogram (Total Ion Current) kmene *Nostoc* sp. Cam2SO1. Na ose X je znázorněn retenční čas a na ose Y celková intenzita iontů.

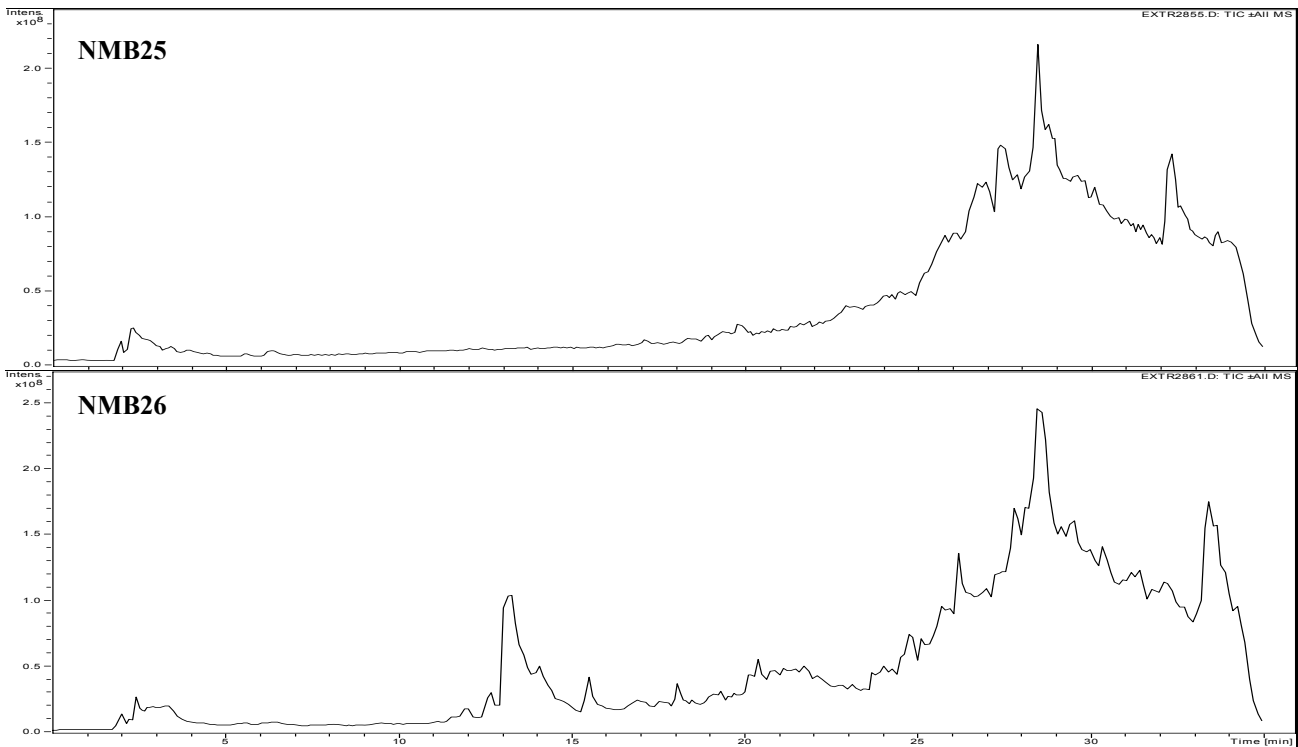


Graf 9. +MS spektra kmene *Nostoc* sp. Cam2S01. Na ose X je znázorněn poměr m/z a na ose Y celková intenzita iontů.

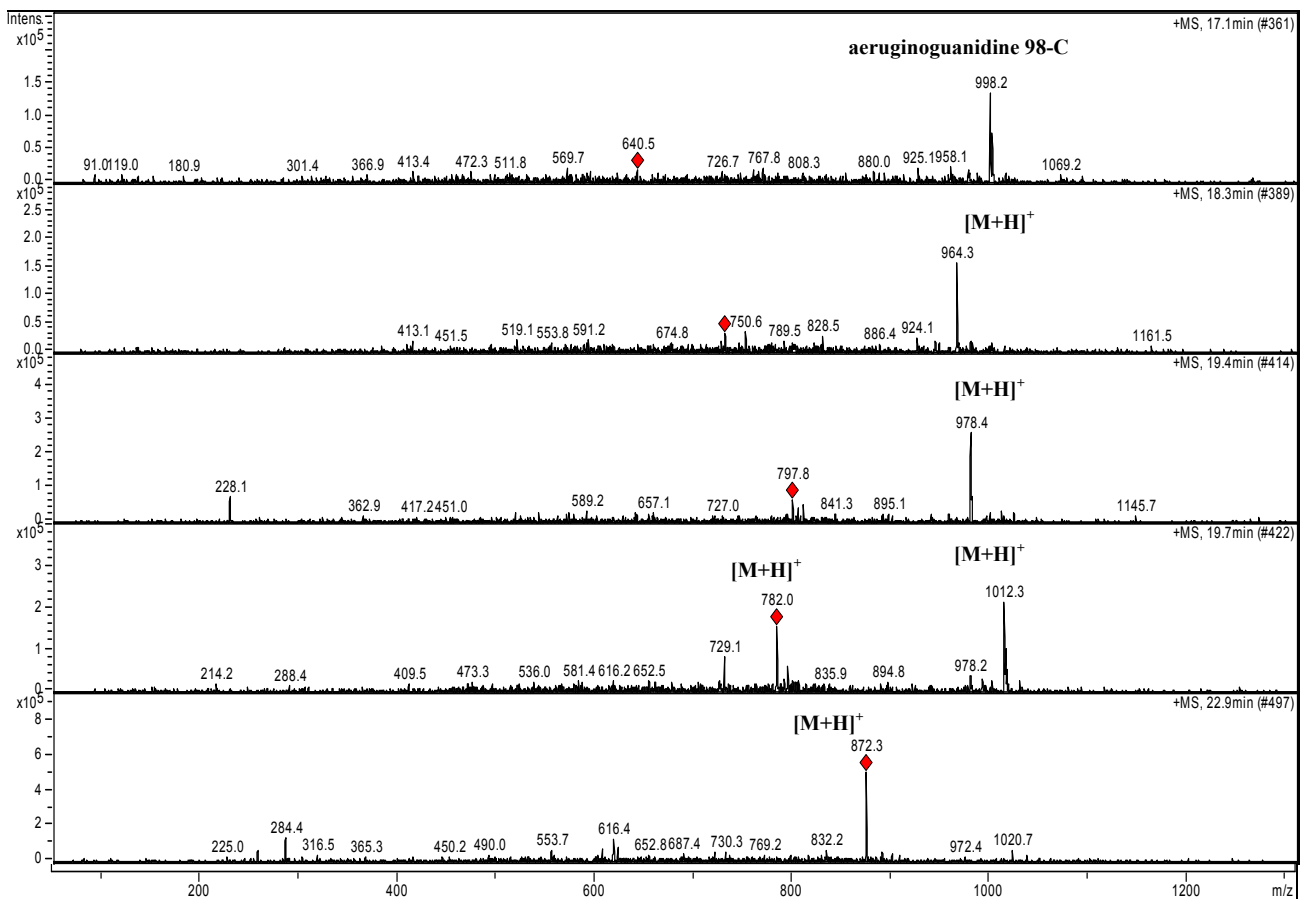
3.B.IV Extrakty *Nostoc* sp. NMB25 a NMB26

Tyto kmeny vykazovaly rozdílnou aktivitu extraktů různého stáří biomasy použité na extrakci, a proto byly analyzovány pouze extrakty aktivní. Je však pravděpodobné, že aktivní látka podléhá degradaci i v lyofilizované biomase. V extraktu kmene NMB-25 se podařilo identifikovat na základě nejvyšších intenzit $[M+H]^+$ ionty **998**, **964**, **978**, **782**, **1012**, **872** (viz graf 11.). Pík v 17.1 min o $[M+H]^+ = 998$ byl identifikován jako známý cytotoxin **aeruginoguanidine 98-C** (HRFABMS $[M-H]^- = 996.3851$, [ISHIDA, 2002]), avšak vzhledem k nízkým intenzitám a nízkému rozlišení přístroje není výsledek zcela zaručený.

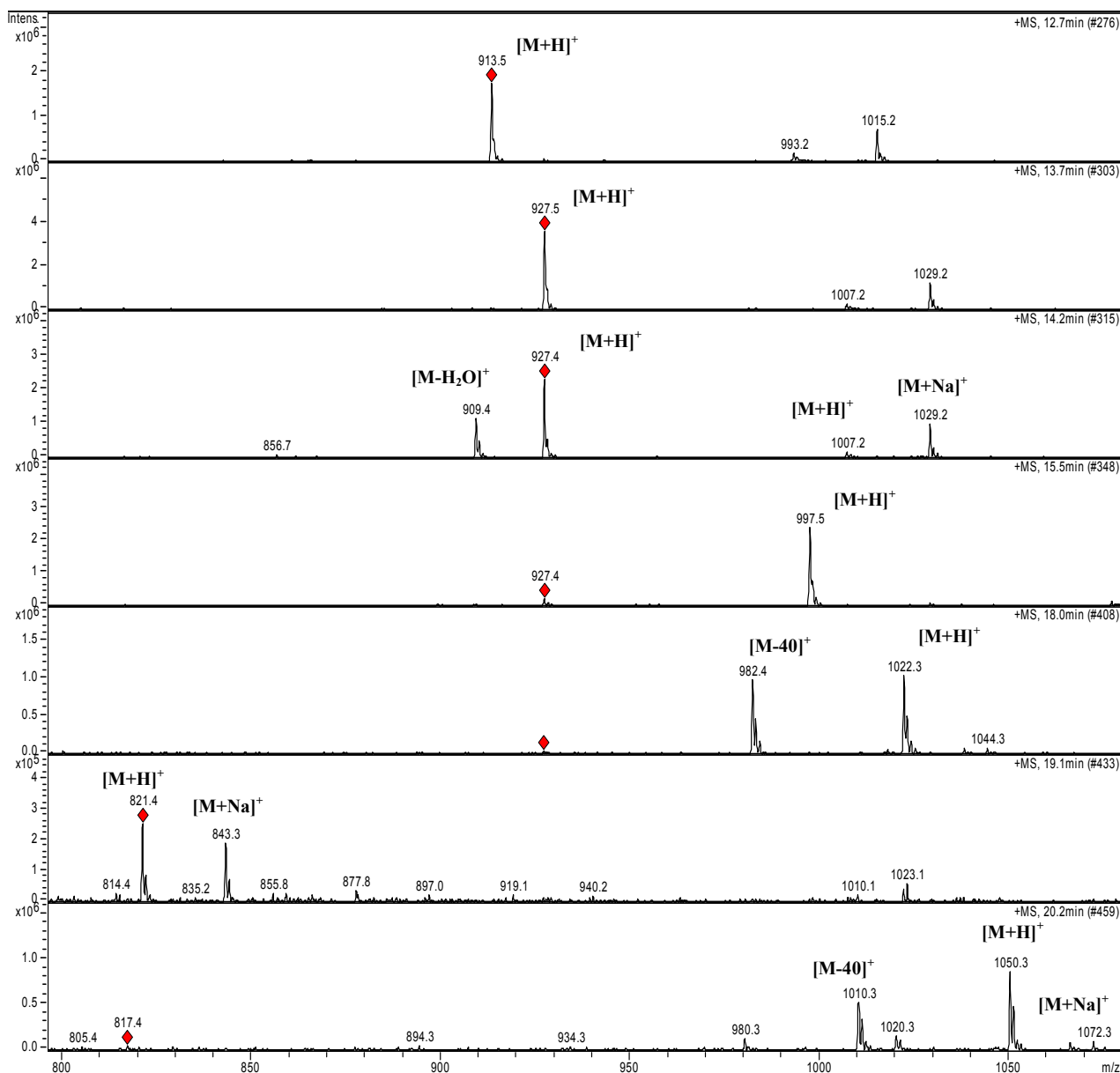
Analýza extraktu NMB-26 poskytla chromatogram s vyššími píky a lepšími MS spektry, a proto byly molekulární ionty určeny většinou pomocí sodíkových aduktů. Byly nalezeny ionty spíše polárního charakteru $[M+H]^+$ 913, 927, 1007, 997, 1022, 821, 1050. (viz graf 12.).



Graf 10. HPLC-MS chromatogramy (Total Ion Currents) kmenů *Nostoc* sp. NMB25 a NMB26. Na ose X je znázorněn retenční čas a na ose Y celková intenzita iontů.



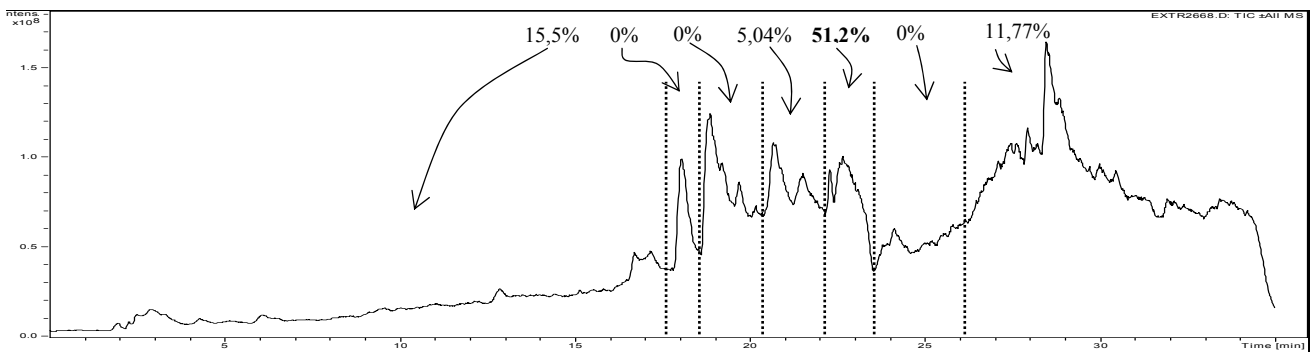
Graf 11. +MS spektra kmene *Nostoc* sp. NMB25 s retenčními časy. Na ose X je znázorněn poměr m/z a na ose Y celková intenzita iontů.



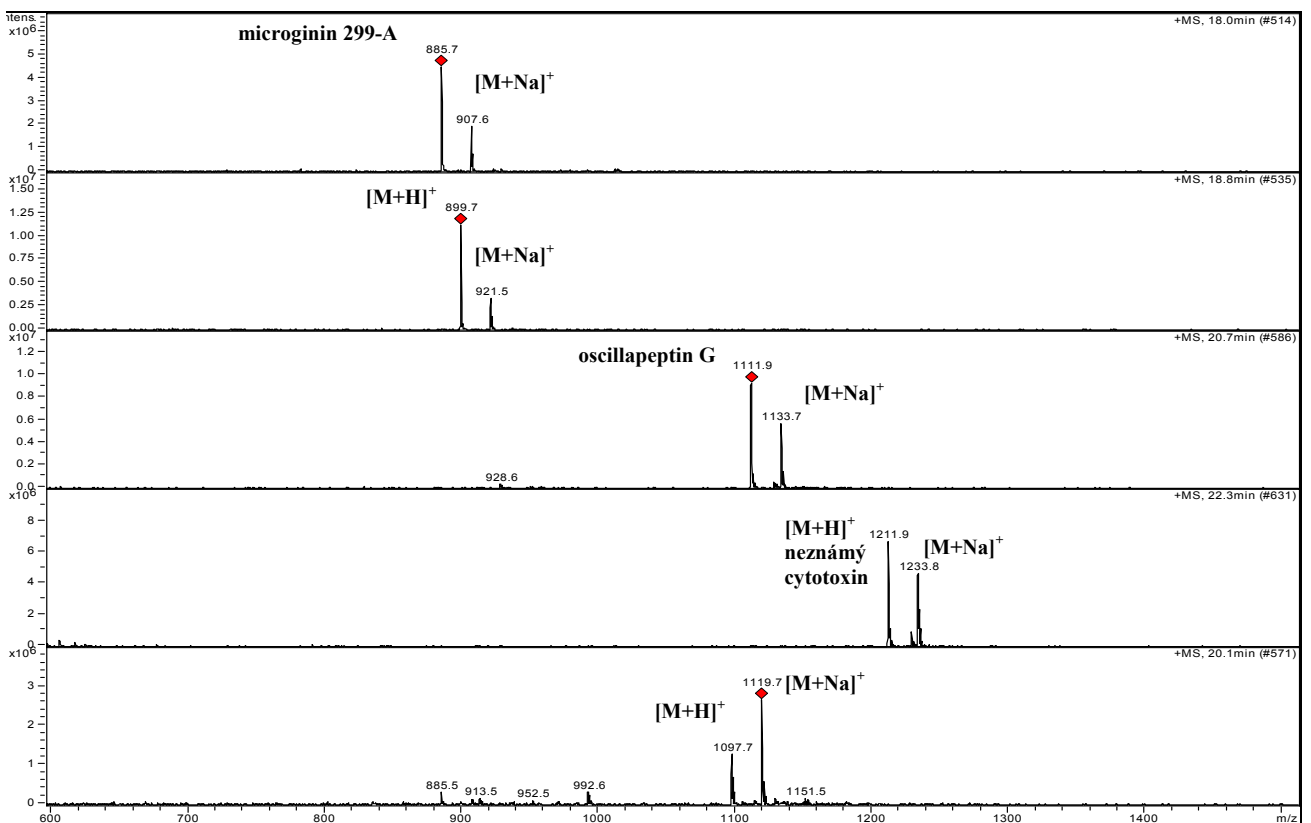
Graf 12. +MS spektra kmene *Nostoc* sp. NMB26 s retenčními časy. Na ose X je znázorněn poměr m/z a na ose Y celková intenzita iontů. Odštěpení fragmentu m/z 40 v RT 20.2min a 18.0min bývá v naší laboratoři často pozorováno, ačkoli identifikovat se ho zatím nepodařilo.

3.B.V Extrakt *Nostoc muscorum* I

I přesto, že chromatografický záznam (viz graf 13.) naznačuje přítomnost látek s velmi podobnou retencí, MS spektra v maximech píků byla dostatečně čistá a obsahovala vždy jednu hlavní sloučeninu. Dle sodíkových aduktů byly s vysokou spolehlivostí stanoveny molekulární ionty **885**, **899**, **1097**, **1111**, **1211**. V extraktu byly identifikovány pravděpodobně dvě známé necytotoxické látky - v RT 18.0 min iont [M+H]⁺ **885,7** odpovídající **microgininu 299-A** (HRFABMS [M-H]⁻ **885.4512** [ISHIDA, 1997]), a v 20.7 min iont [M+H]⁺ **1111,9** odpovídající **oscillapeptinu G** (pozitivní FABMS (glycerol) [M+H]⁺ **1112**, [FUJII, 2000]). Po frakcionaci byla objevena aktivní látka v RT 22.3 min pro hmotu [M+H]⁺ **1211,9** - [M+Na]⁺ **1233,8** odpovídající dosud neznámé chemické struktúře (viz graf 12.). Na základě této skutečnosti a silného cytotoxického efektu byla tato látka vybrána pro podrobnější identifikaci (kapitola 3.C).



Graf 13. HPLC-MS chromatogram (Total Ion Current) kmene *Nostoc muscorum I* s retenčními časy. Svislé čáry představují jednotlivé frakce a hodnoty v procentech inhibice jednotlivých frakcí proti buněčným liniím Sp/2. Na ose X je znázorněn retenční čas a na ose Y celková intenzita iontů.



Graf 14. +MS spektra kmene *Nostoc muscorum I* s retenčními časy. Na ose X je znázorněn poměr m/z a na ose Y celková intenzita iontů.

3.B.VI Extrakt *Nostoc sp. De*

U tohoto kmene nebylo použitou separační metodou dosaženo optimální rozdělení obsahových látek. Chromatogram nasvědčuje přítomnosti velkého množství metabolitů a z důvodu existence série $[M+Na]^+$ aduktů a časté ztráty molekuly vody $[M-H_2O]^+$ (viz graf 17.) lze stanovit molekulární ionty těchto látek. Podle rozdílných retenčních časů stejných iontů a podobných fragmentačních spekter v $+MS^2$ se pravděpodobně jedná o látky chemicky velice příbuzné, pravděpodobně obsahující stejný molekulární základ.

Podobnost těchto chemických struktur dokazuje přítomnost iontů m/z 740 a m/z 692,2 obsažených v korelujících $+MS^2$ spektrech studovaných chromatografických píků. (viz graf 16.) Ionty $[M+H]^+$ 885,5 (RT 21,5min) a $[M+Na]^+$ 871,5 (RT 20,8min) se liší fragmentem $-CH_2$ (m/z 14), a pokud tento štěp odečteme od $+MS^2$ fragmentů iontu 885,5 získáme $+MS^2$ ionty 740 (754-14) a 723 (737-14) shodné s $+MS^2$ štěpy iontu 871,5. Iont $[M+H]^+$ 938,5 (RT 19,4min) štěpí taktéž

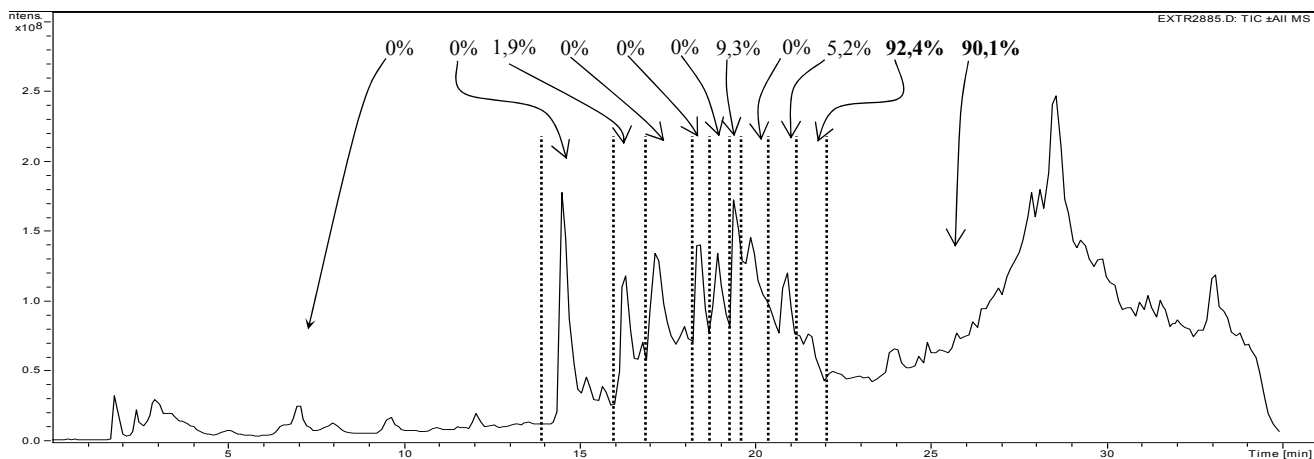
fragment m/z 740, čili iont 885,5 štěpí fragmenty s teoretickou $-CH_2$ skupinou a ionty 871,5 a 938,5 bez ní, z čehož vyplývá hypotetická podobnost v základní struktuře molekuly.

Ve svých $+MS^2$ spektrech mají stejný fragment 692,2 m/z i ionty $[M+H]^+$ 892,7 (RT 14,5min) a $[M+H]^+$ 849,6 (RT 20,9min).

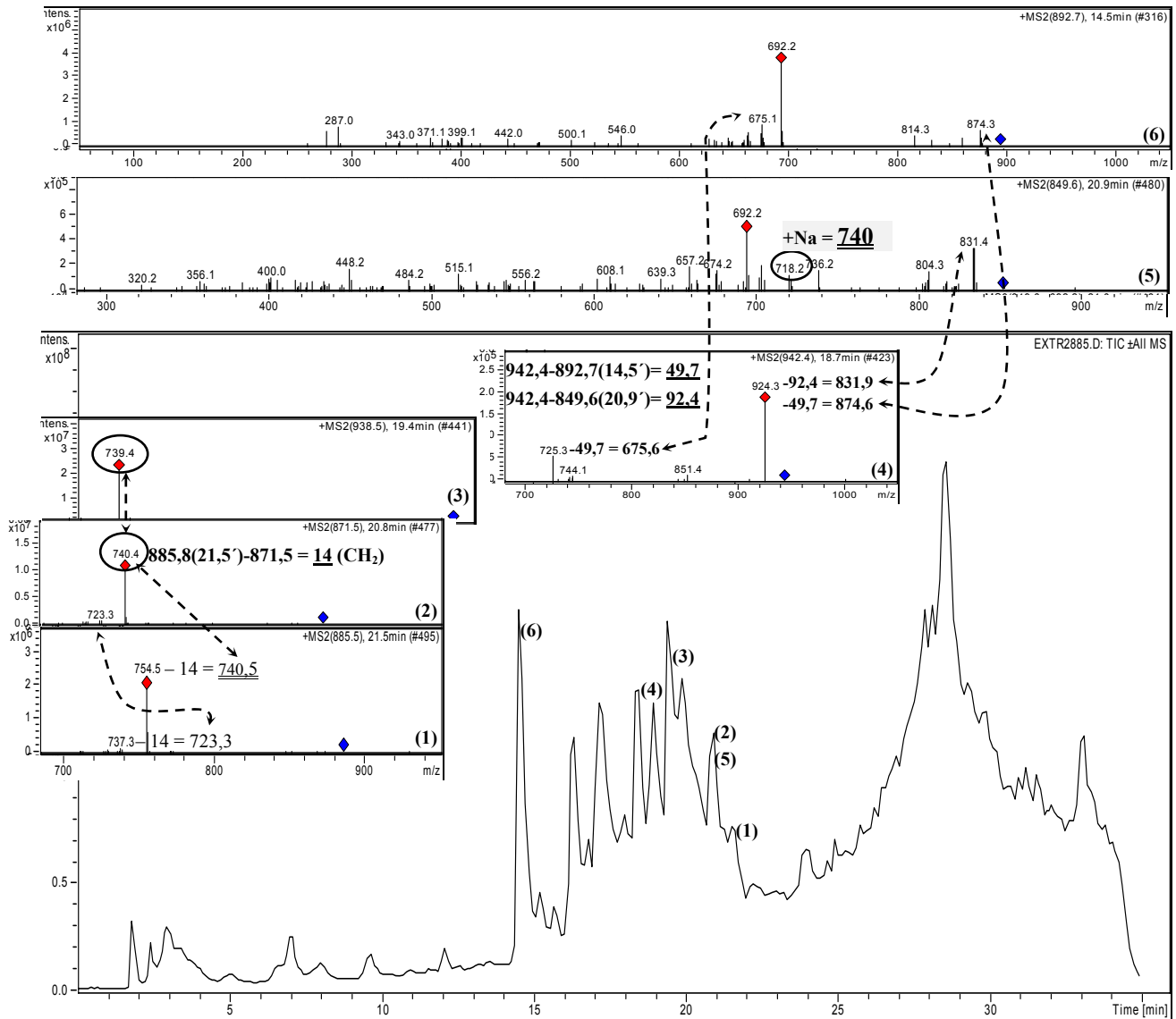
Ionty $[M+H]^+$ 892,7 (RT 14,5min) a $[M+H]^+$ 942,4 (RT 18,7min) se liší fragmentem 49,7 a ionty $[M+H]^+$ 849,6 (RT 20,9min) a $[M+H]^+$ 942,4 (RT 18,7min) se liší fragmentem 92,4, a pokud tento štěp odečteme od $+MS^2$ fragmentů iontu 942,4 získáme $+MS^2$ iont 831,9 (924,3-92,4) shodný s $+MS^2$ fragmentem iontu 849,6 a 874,6 (924,3-40,7) shodný s $+MS^2$ fragmentem iontu 892,7.

Jelikož zmíněné výpočty dávají ucelený výsledek, menší odchylky v hodnotách m/z byly v rámci nepřesnosti přístroje akceptovány. Ačkoli nebyla nalezena korelace mezi hypotetickými základními fragmenty molekul 740 a 692, je možné, že i když se liší zbytkem m/z 48 budou pravděpodobně velice podobné.

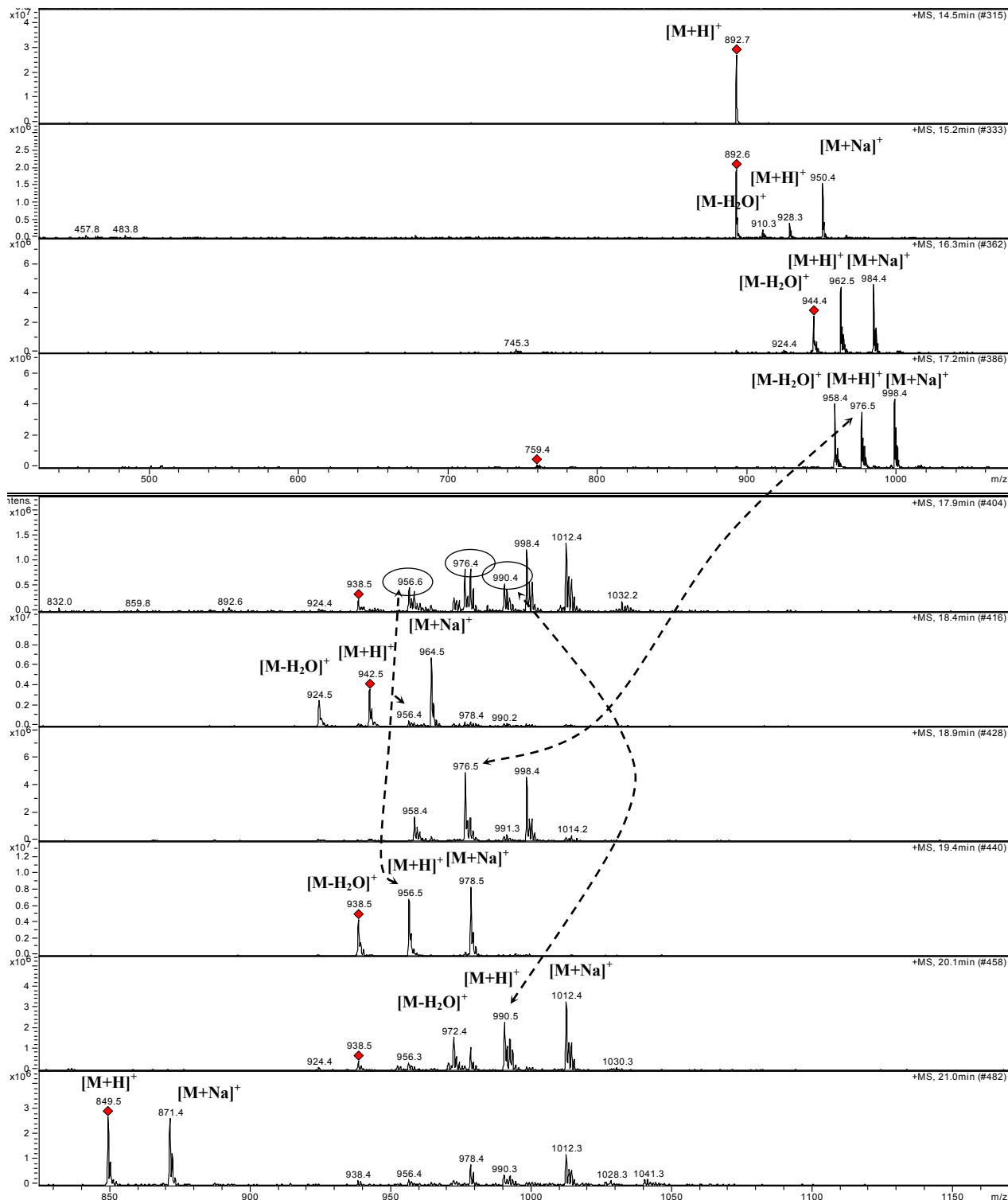
V $+MS$ spektrech tohoto kmene byly tudíž nalezeny intenzivní ionty o $[M+H]^+$ 849, 892, 928, 942, 962, 956, 976, 990, z nichž žádný nebyl ve shodě s literaturou. Studovaný extrakt byl frakcionován na 11 dílčích frakcích, z nichž dvě vykazovaly silný cytotoxický účinek. Frakce jímáná v RT mezi 21'-22' vykazovala 92% inhibici a frakce 22'-35' 90% (viz graf 15.). I přesto, že nebylo dosaženo dobré separace, byl tento kmen, vzhledem k jeho silné aktivitě vybrán pro izolaci a separaci aktivní látky (kapitola 3.D).



Graf 15. HPLC-MS chromatogram (Total Ion Current) kmene *Nostoc* sp. De. Na ose X je znázorněn retenční čas a na ose Y celková intenzita iontů. Svislé čáry představují jednotlivé frakce a hodnoty v procentech inhibice jednotlivých frakcí proti buněčné linii Sp/2. Na ose X je znázorněn retenční čas a na ose Y celková intenzita iontů.



Graf 16. Důkaz strukturně podobných látek kmene *Nostoc* sp. De. HPLC-MS (Total Ion Current) chromatogram a odpovídající +MS spektra a +MS² fragmentační spektra příslušných piků s retenčními časy a hmotami fragmentovaných +MS iontů v pravém horním rohu každého pole. Čárkované šipky znázorňují korelace mezi fragmenty odpovídající podtrženým hodnotám rozdílů na základě hmot +MS spekter. Na osách X je znázorněn poměr m/z a na osách Y celková intenzita iontů. Pro snažší orientaci korelují čísla jednotlivých piků v závorkách v HPLC-MS (Total Ion Current) chromatogramu se svými +MS² spektry.

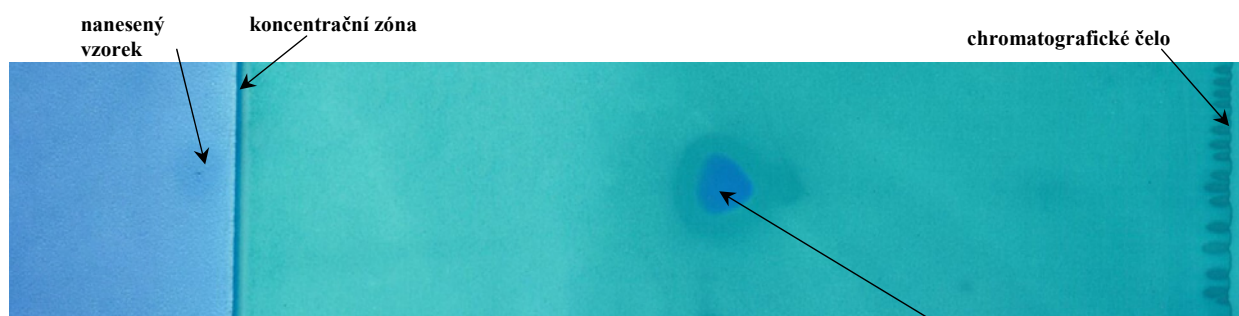


Graf 17. +MS spektra kmene *Nostoc* sp. De s retenčními časy. Šipky znázorňují retence stejných iontů v různých časech. Na ose X je znázorněn poměr m/z a na ose Y celková intenzita iontů.

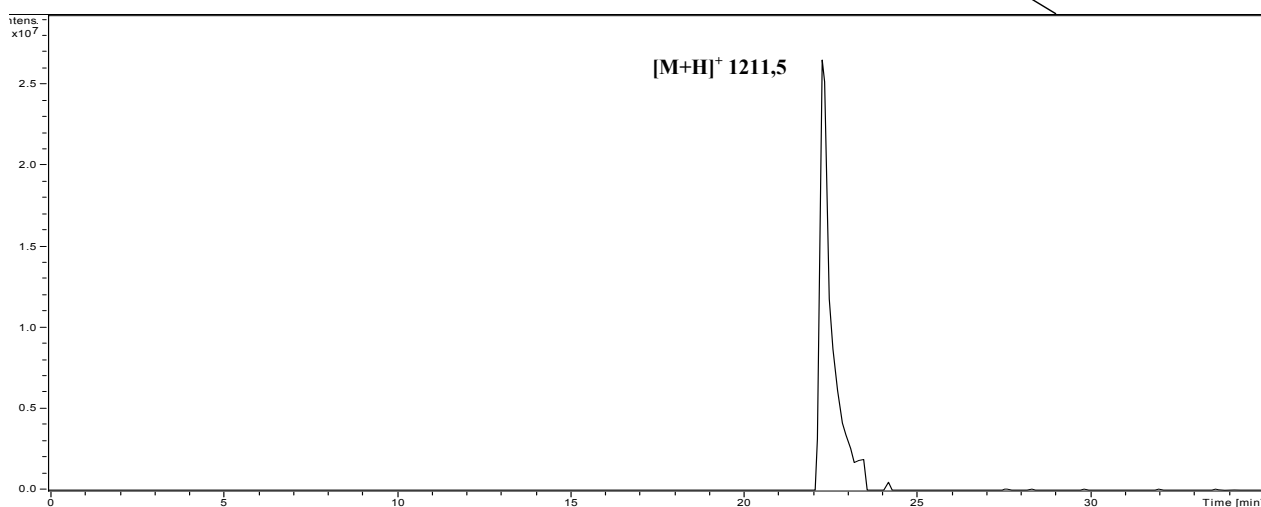
3.C CYTOTOXIN KMENE *NOSTOC MUSCORUM I*

Extrakt tohoto kmene způsoboval silnou inhibici oběma liniím, proto byl tento organismus vybrán pro další charakterizaci. Oproti ostatním testovaným kmenům byla zjištěna jediná aktivní frakce s velmi čistým +MS spektrem. Pro další purifikaci a identifikaci této látky byly zvoleny alternativní separační metody – TLC spojené se specifickým značením Serva Blue W a pro získání dostatečného množství čisté frakce preparativní systém HPLC. Namísto lineárního gradientu z 0 na 100% MeOH byly do metody zavedeny dva krátké časové úseky, kdy byla kolona eluována 70%, a následně z 85% MeOH právě v části analýzy, kde ležel retenční čas studované látky za použití analytické kolony gradientem A1. Nakonec se nejvíce osvědčil gradient C1 (viz graf 19.). Touto metodou byly odstraněny kontaminace ostatními látkami, především druhým peptidem s podobným RT o MW 1110 a byl získán velice dobře separovaný cytotoxický pík (viz graf.19). Analýza získané frakce vykazuje za použití alternujícího režimu MS dostatečnou čistotu pro další použití. Z pozitivního MS záznamu (viz graf 19.) je také patrná existence molekulárního iontu $[M+H]^+$ 1211,5 a jeho sodného aduktu $[M+Na]^+$ 1233,6 a v negativním MS molekulárního iontu $[M-H]^-$ 1209,6 a jeho aduktu $[M+Na]^-$ 1231,6. Tudiž můžeme s naprostou jistotou usuzovat na neznámou látku o MW 1210,5. V chromatogramu je patrná přítomnost běžné kontaminace v podobě iontu 256,2 eluovaného z kolony.

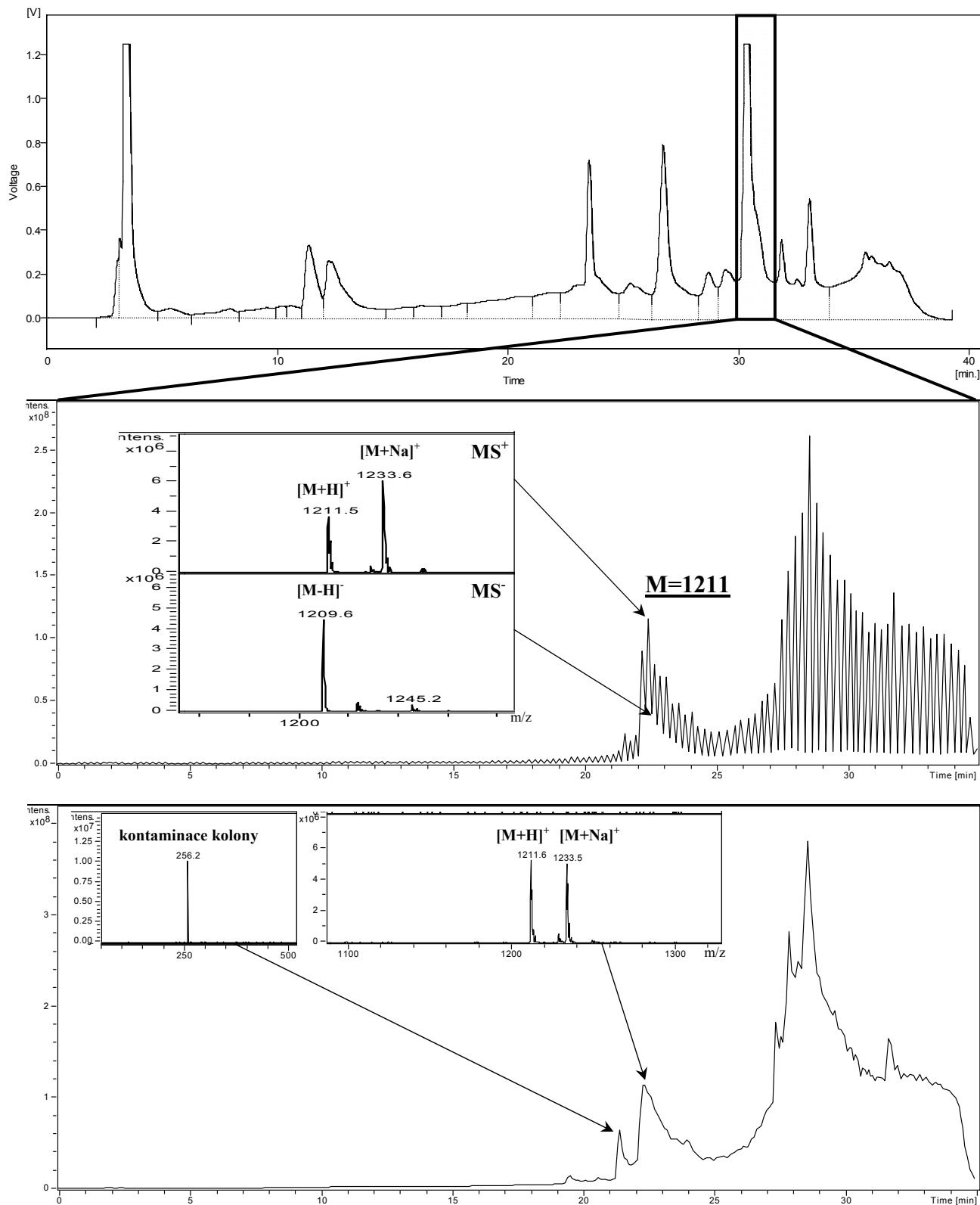
Na TLC desce byla po eluci v UV patrná matná skvrna jenž se po použití Serva Blue W obarvila v tmavě modrou (viz obr. 22.). Extrakce neobarvené skvrny do 100% MeOH a její následná analýza dokazuje, že se jedná opravdu o studovanou látku. Tyto výsledky nasvědčují, že aktivním cytotoxinem ve kmeni *Nostoc muscorum I* je neznámý cyklický peptid, tento výsledek navíc podporuje absorpce látky při vlnové délce 220 nm.



Obr. 22. TLC kmene *Nostoc Muscorum I*. Modrá skvrna znázorňuje cyklický peptid.



Graf 18. HPLC-MS chromatogram extrahovaného iontu 1211,5 aktivní TLC frakce kmene *Nostoc muscorum I*. Na ose X je znázorněn retenční čas a na ose Y celková intenzita iontů.



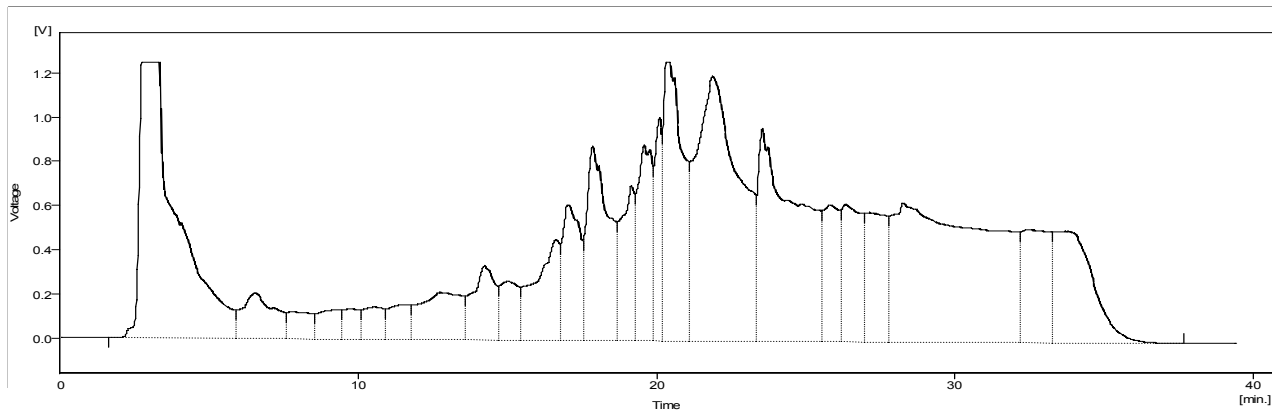
Graf 19. nahoře: HPLC (preparativní) chromatogram kmene *Nostoc muscorum I* s vyznačenou jímanou frakcí odpovídající cytotoxické látce. Chromatogram vyjadřuje závislost UV absorbce (220nm) na retenčním čase.

uprostřed: HPLC±MS chromatogram (Total Ion Current) a příslušná +MS spektra frakce.

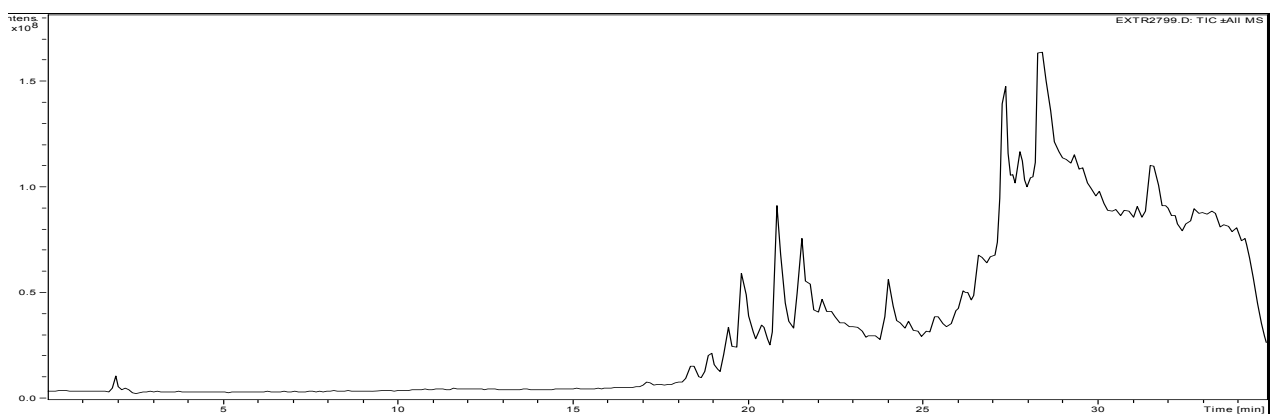
dole: HPLC-MS chromatogram (Total Ion Current) a +MS spektra příslušných piků frakce. Na ose Y je znázorněna celková intenzita iontů a na ose X poměr m/z či v případě Total ion chromatogramů retenční čas.

3.D CYTOTOXINY KMENE *NOSTOC* SP. DE

Frakcionací tohoto kmene byly získány dva vysoce aktivní separáty zjevně obsahující pigmenty, jež ve vysokých koncentracích způsobují mírný toxický efekt proti studovaným liniím [HROUZEK, ÚSTNÍ SDĚLENÍ]. Avšak 90% hodnota inhibice mnohonásobně převyšuje toxicitu pigmentové frakce, jež se pohybuje u extraktu v 70% MeOH mezi 10-30%.

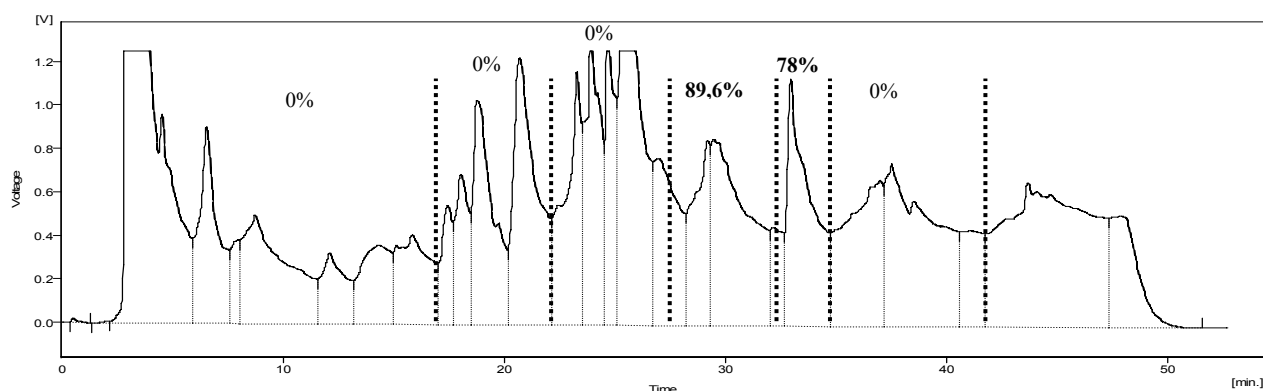


Graf 20. HPLC chromatogram (preparativní) kmene *Nostoc* sp. De získaný použitím gradientu **A1**. Na ose X je znázorněn retenční čas a na ose Y UV absorpce při 220 nm.

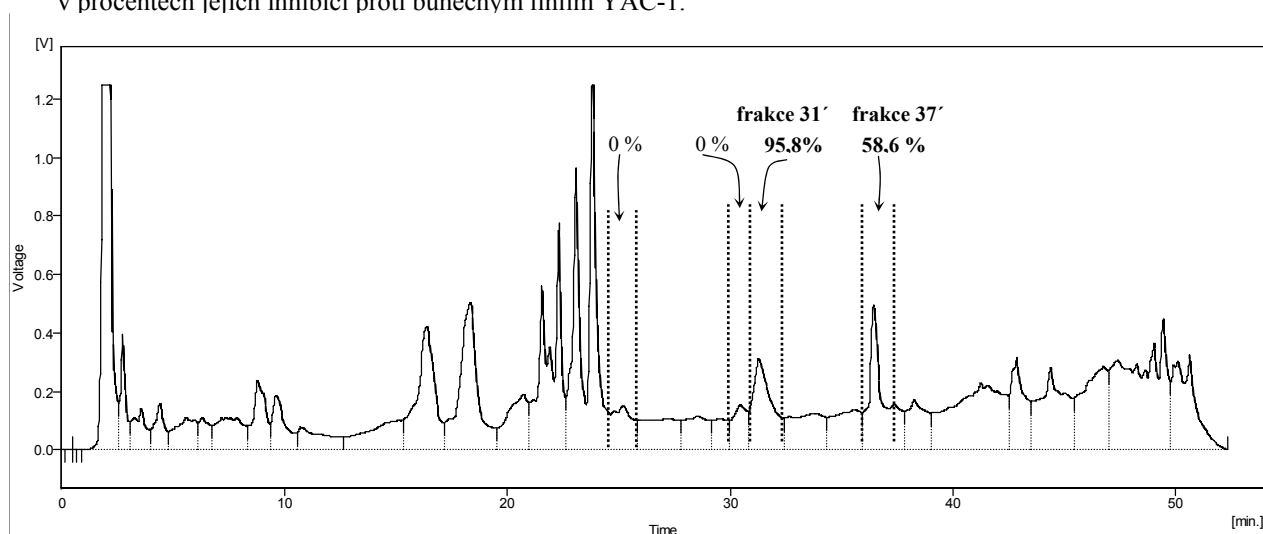


Graf 21. HPLC-MS (Total Ion Current) chromatogram frakce 21' -22' kmene *Nostoc* sp. De. získané použitím gradientu **A1**. Na ose X je znázorněn retenční čas a na ose Y celková intenzita iontů.

Jelikož aktivní frakce analytické HPLC-MS (21'-22') nevykazovala dostatečnou čistotu (viz graf 21.), nebylo možné stanovit molekulární iont odpovídající cytotoxické látce. Gradienty **A1** ani **B1** (kolona C8) neposkytovaly dobré výsledky, co se týče dostatečného rozdělení oblasti, ve které se aktivní látka nachází. Za použití gradientu **B1** byly v extraktu charakterizovány dvě aktivní frakce ve shodě s frakcionací na analytické koloně (viz graf 22.). Frakce mezi 28' - 32' vykazovala 89.6% inhibici a frakce 32' -35' 78% inhibici. Z důvodu silného šumu a nedostatečné separace byla použita pro další frakcionaci kolona C18 a gradient **B2**. Stejně jako v předešlých dvou metodách byly frakcionací a následným testem cytotoxicity získány dvě frakce. Frakce jímáná mezi 31' - 32' byla letální téměř pro všechny pokusné buňky (inhibice 96%), zatímco frakce mezi 37' - 38' způsobovala mírnější tox. efekt (inhibice 58%). Získané frakce vykazovaly lepší vlastnosti než předešlé, a proto byly použity jako výchozí pro další analýzy (viz graf 23.). Dalším dělením získané frakce 31' pomocí TLC byly obdrženy tři jasně definované pruhy nasvědčující přítomnosti tří látek (viz obr. 23.), přičemž pouze jedna z těchto látek byla zodpovědná za inhibici. Po vymytí prostředního pruhu 100% MeOH byla pomocí MTT testu prokázána inhibice YAC-1 buněk ve výši 45%. Snížená toxicita této frakce vůči původní, obdržené z preparativní HPLC, může být vysvětlena rozmytím a ztrátami látky v proceduře TLC, což bylo v naší laboratoři prokázáno u jiných látek [HROUZEK, ÚSTNÍ SDĚLENÍ].



Graf 22. HPLC chromatogram (preparativní) kmene *Nostoc* sp. De za použití gradientu **B1**. Na ose X je znázorněn retenční čas a na ose Y UV absorpce při 220 nm. Svislé čáry představují jednotlivé frakce a hodnoty v procentech jejich inhibici proti buněčným liniím YAC-1.



Graf 23. HPLC chromatogram (preparativní) kmene *Nostoc* sp. De za použití gradientu **B2**. Na ose X je znázorněn retenční čas a na ose Y UV absorpce při 220 nm. Svislé čáry oddělují 4 separované frakce a hodnoty v procentech udávají jejich inhibici proti buněčným liniím YAC-1.

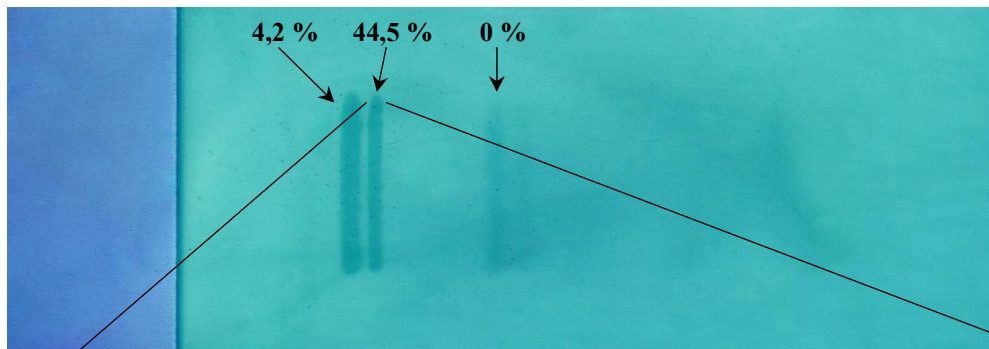
3.D.1 Separace látky kmene *Nostoc* sp. De: frakce 31'

Po podrobení **frakce 31'** detailní HPLC-MS analýze nebyly v chromatogramu nalezeny téměř žádné intenzivní píky, avšak +MS spektra vykazovala přítomnost málo intenzivních (řádově 10^3) iontů >1500 . Jelikož chromatogram obsahoval rovněž ionty o přibližně polovičních m/z , u kterých byla prokázána distribuce izotopomerů o rozdílu 0.5 Da, jenž by mohli hypoteticky odpovídat dvakrát nabitým iontům, byla na základě tohoto výsledku provedena analýza se zaměřením iontové pasti na ionty o velikosti $m/z = 1800$. Toto nastavení poskytlo „vizuálně“ zcela odlišný chromatogram a umožnilo naprosto odlišnou interpretaci látek obsažených v této frakci. Byl nalezen intenzivní pík a iont o $m/z = 1850$ (viz graf 24.), ovšem žádná hmota v tomto +MS spektru neodpovídala $[M+H]^{2+}$ či $[M+Na]^{2+}$ ani dimerní struktuře $[2M+2H]^+$ či $[2M+H]^+$.

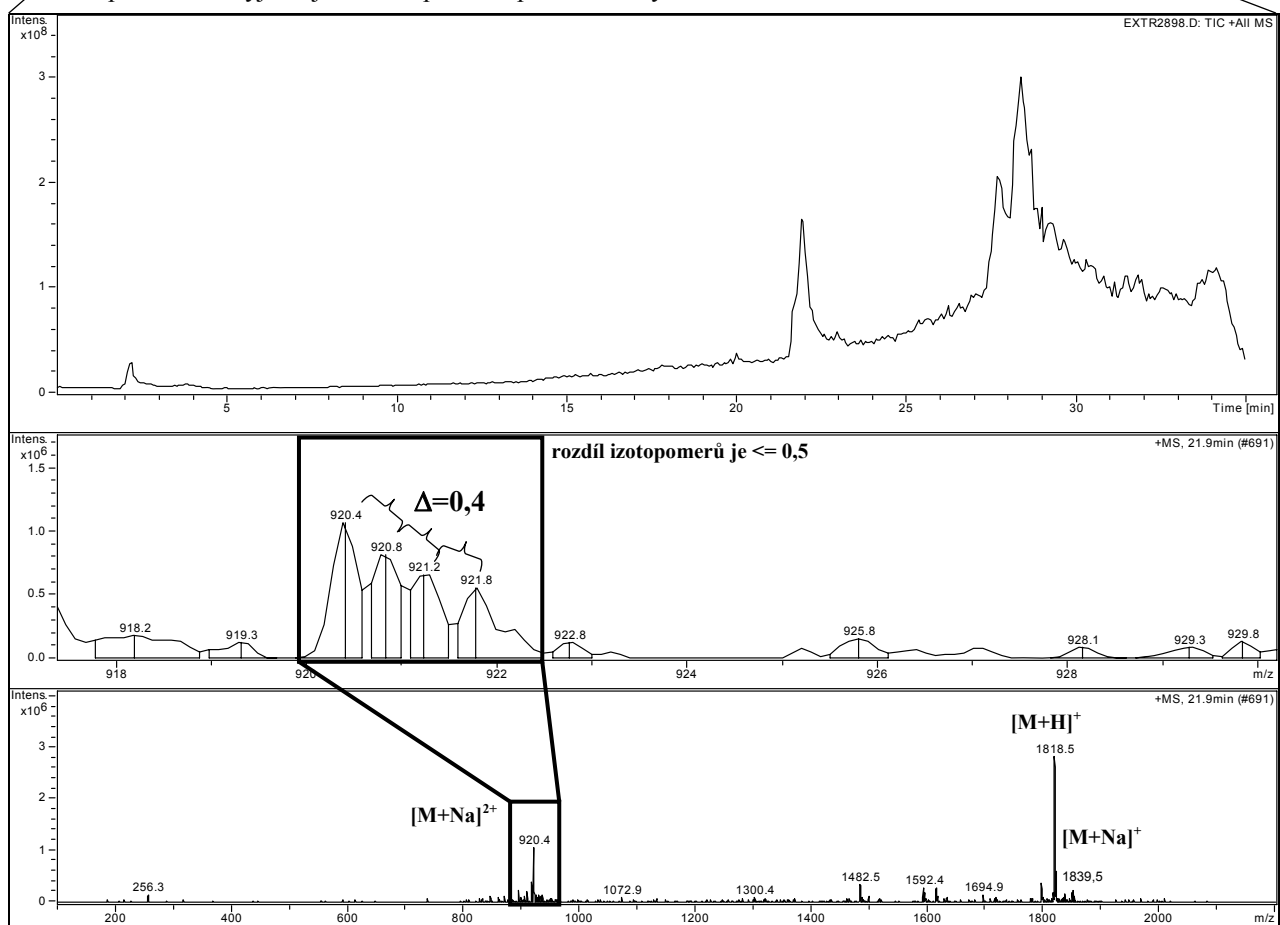
Jasnější výsledky poskytla analýza frakce získané z TLC. V HPLC-MS byl identifikován iont $[M+Na]^{2+} = 920,4$ (viz graf 25.) o rozdílu izotopomerů 0.5, který by mohl odpovídat dvakrát nabitému sodnému aduktu $[M+Na]^+ 1840$, čili molekulárnímu iontu $[M+H]^+ 1818,5$. Vzhledem k přítomnosti málo intenzivního iontu pro hmotu $m/z 1850$, však iont **1818.5** mohl být fragmentem 1850 po odštěpení methoxyskupiny $-OCH_3$. Pro definitivní odhalení molekulové hmotnosti této látky bude nutné dalších postupů.

Také barvení pomocí Serva Blue W neposkytuje jednoznačné výsledky, po srovnání s aktivní látkou kmene *N. muscorum* I je odstín modré méně výrazný, a proto není jednoznačné, zda se jedná

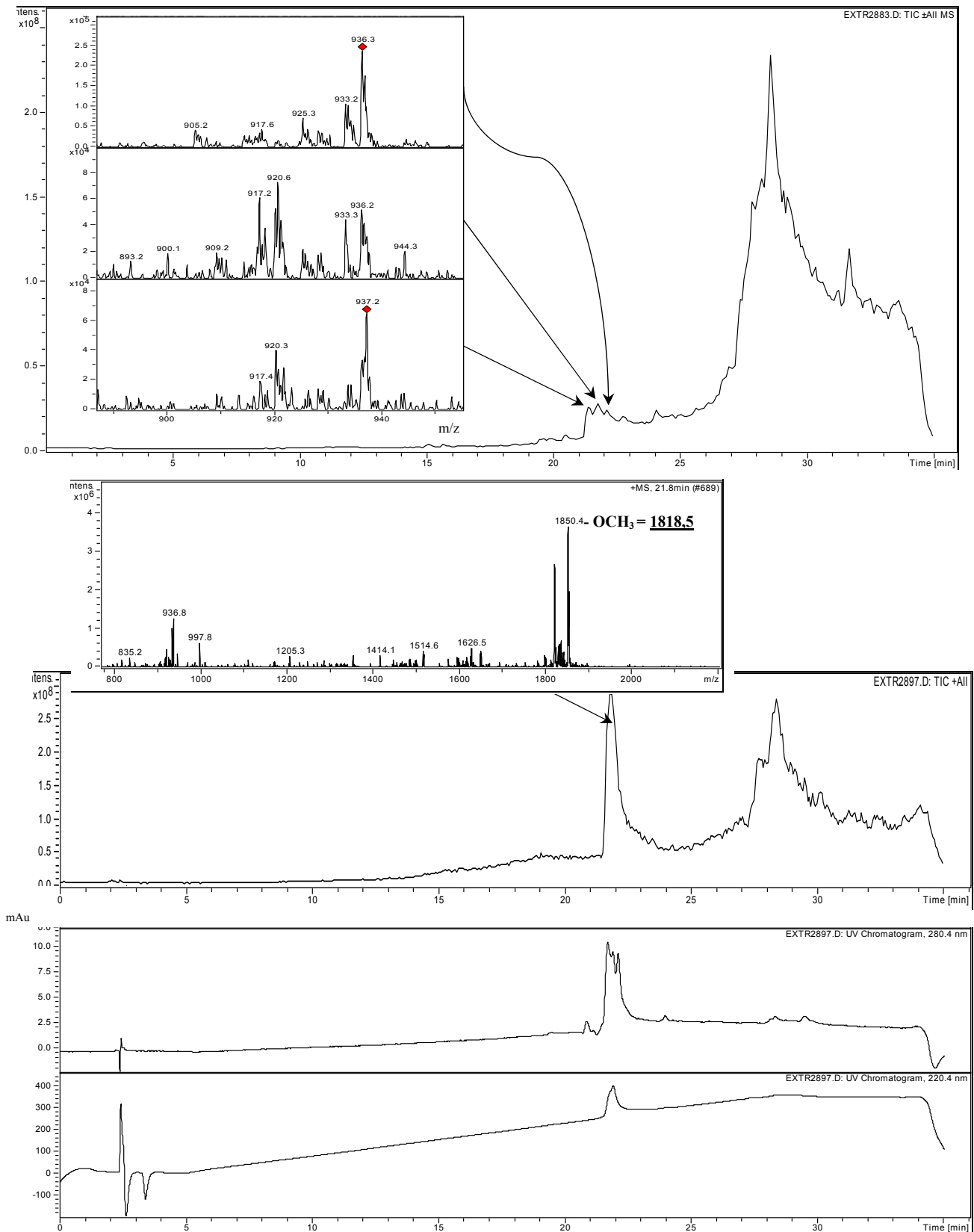
o cyklický peptid. V absorpčních spektrech této látky mohou být nalezeny dvě maxima při $\lambda = 220\text{nm}$ a 280nm , které naznačují, že se v molekule vyskytují aromatické funkční skupiny.



Obr. 23. TLC výřez frakce 31'. Tmavé skvrny odpovídají separovaným látkám a hodnoty v procentech vyjadřují inhibici proužku proti buněčným liniím YAC-1



Graf 25. HPLC-MS chromatogram (Total Ion Current) TLC 2. pruhu frakce 31' kmene *Nostoc* sp. De při zaměření iontové pasti na $m/z = 1800$ a +MS spektra RT 21,9 min. Na ose Y je znázorněna celková intenzita iontů a na ose X poměr m/z , či v případě Total Ion Current chromatogramu nejvýše retenční čas.

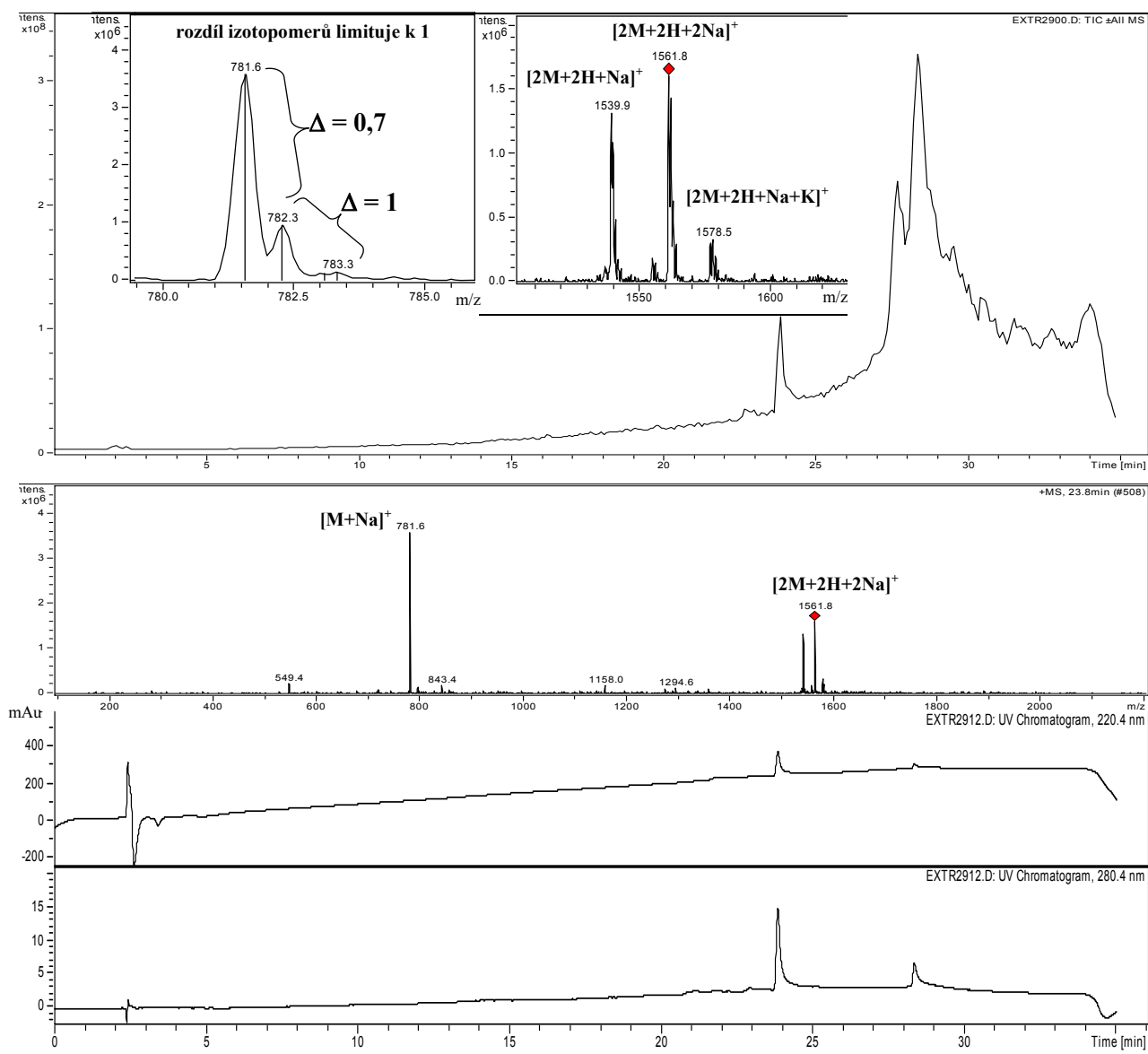


Graf 24. HPLC-MS chromatogram (Total Ion Current) frakce 31' kmene *Nostoc* sp. De při zaměření iontové pasti na $m/z = 900$ (nahore), $m/z = 1800$ s UV chromatogramy (dole). Vlnové délky UV chromatogramů v pravém horním rohu příslušných polí. Na ose Y je znázorněna celková intenzita iontů a na ose X poměr m/z , či v případě Total Ion Current chromatogramů retenční čas. UV chromatogramy vyjadřují závislost absorpce při 220 a 280 nm na retenčním čase.

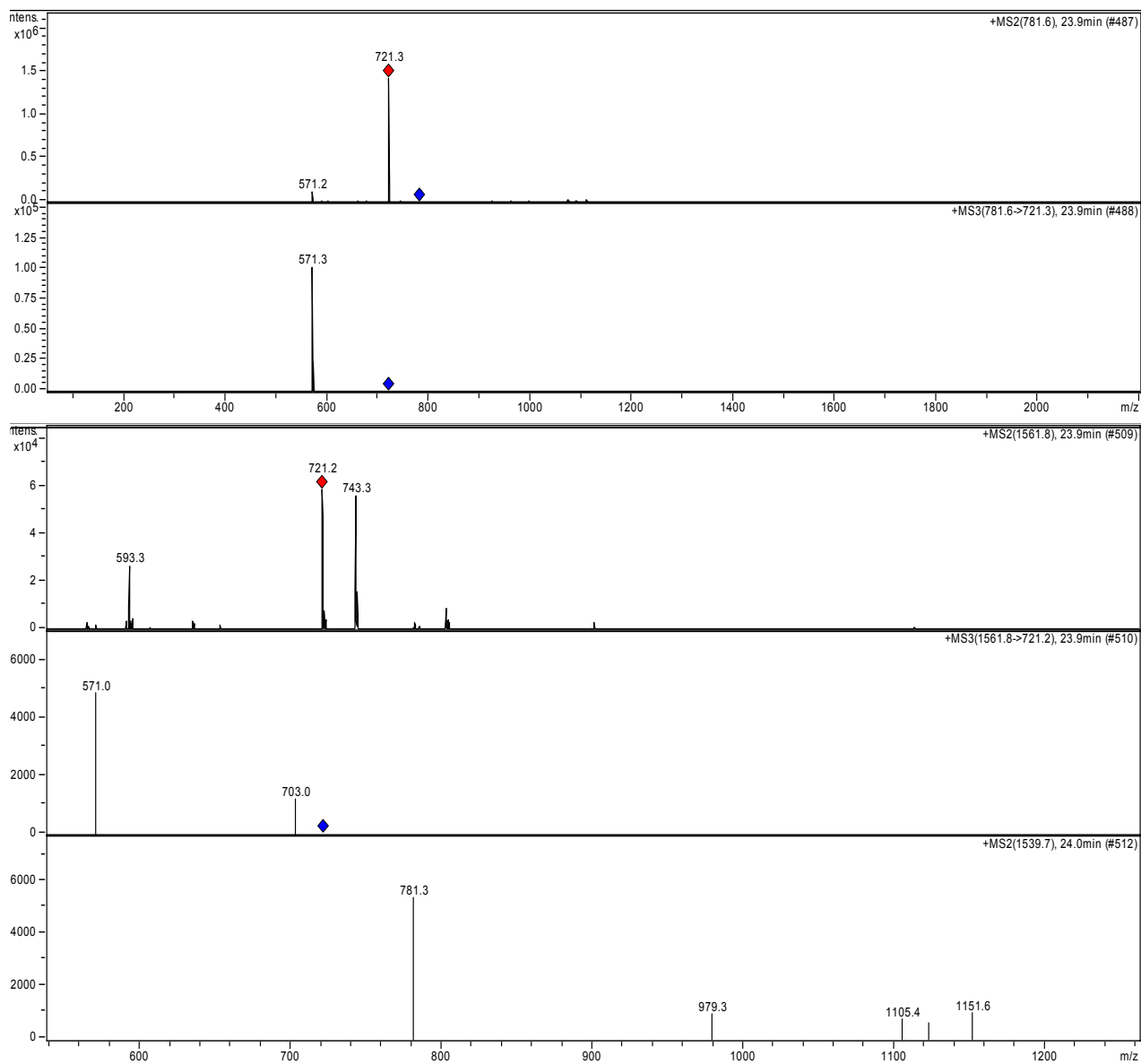
3.D.II Separace látky kmene *Nostoc* sp. De: frakce 37'

Analýzou HPLC-MS se zaměřením na ionty m/z 1800 byla určena trojice iontů s největší intenzitou: $m/z = 781$, 1540 , 1562 a iont s menší intenzitou 1578 . Dle izotopomerové distribuce iontu 781 , která je téměř rovna 1 Da, půjde o jednu nabitý sodný adukt $[M+Na]^+$ molekulárního iontu $[M+H]^+ = 759$ (viz graf 26.). V případě iontů 1540 , 1562 a 1578 půjde o dvakrát protonované dimerní struktury. U iontu 1540 jde o dimer se sodíkovým aduktem na jednom monomeru $[2M+2H+Na]^+ = 1540$. Dále se pak ve spektru vyskytují dimer se sodíkovým aduktem na obou monomerech $[2M+2H+2Na]^+ = 1562$ a dimer s draselným a sodným aduktem $[2M+2H+Na+K]^+ = 1578$.

Toto tvrzení potvrzuje i štěpení molekulárního iontu m/z 781 v $+MS^2$ na 721 a v $+MS^3$ na 571 , které je shodné v $+MS^2$ se spektry dimerních struktur. V těchto spektrech je navíc patrný fragment monomeru se sodíkovým aduktem 743 . Štěpením dimerního iontu 1540 na iont $[M+Na]^+$ 781 se toto tvrzení upřesňuje (viz graf 27.).



Graf 26. HPLC-MS chromatogram (Total Ion Current) frakce 37' kmene *Nostoc* sp. De při zaměření iontové pasti na $m/z = 1800$ a příslušná $+MS$ spektra. Na ose Y je znázorněna celková intenzita iontů a na ose X poměr m/z , či v případě Total Ion Current chromatogramu retenční čas. UV chromatogramy vyjadřují závislost absorpce při 220 a 280 nm na retenčním čase.

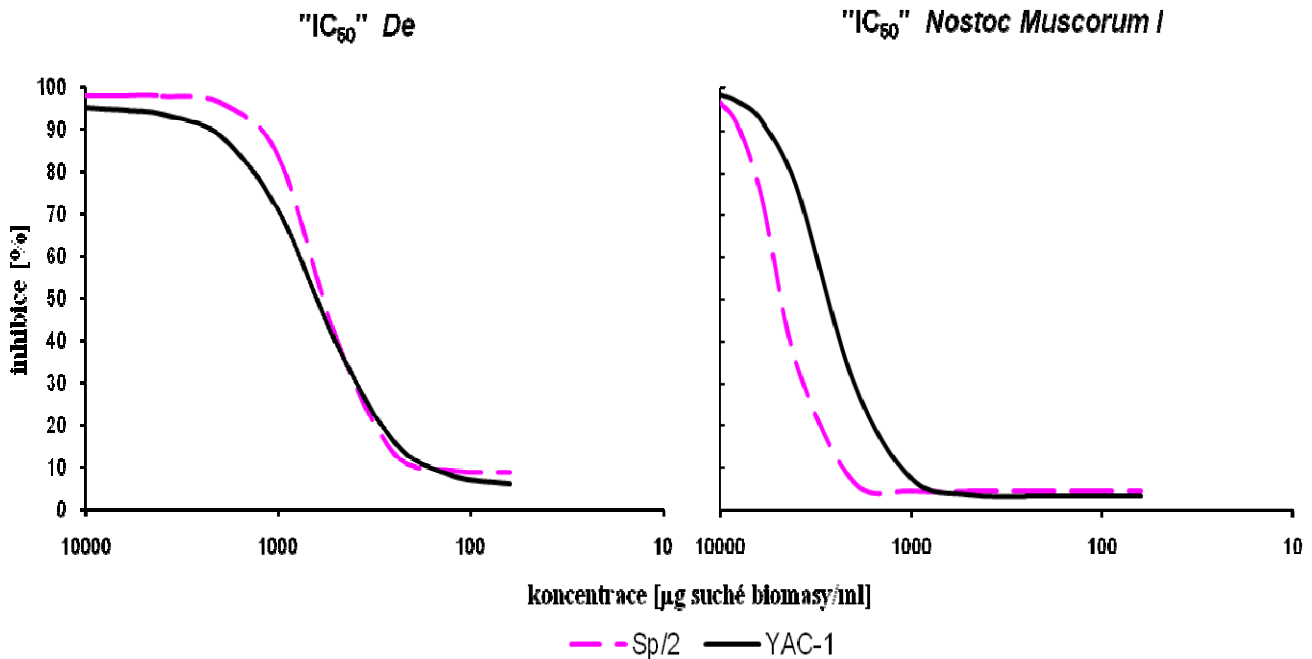


Graf 27. Fragmentační spektra +MS² a +MS³ frakce 37' kmene *Nostoc* sp. De pro vybrané ionty 781, 1562 a 1540. Ion vybraný pro fragmentaci je vyznačen v pravém horním rohu příslušných polí. Na ose X je znázorněn poměr m/z a na ose Y celková intenzita iontů.

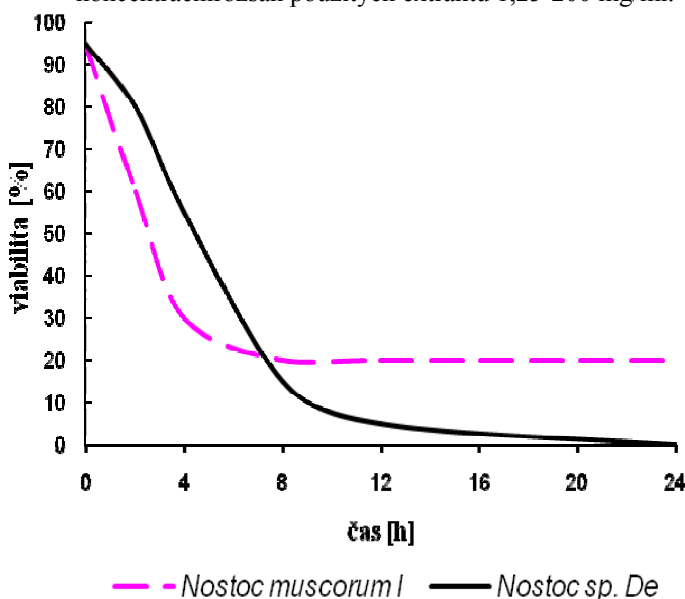
3.E „IC₅₀“ A ČASOVÝ EXPERIMENT

Aby mohla být porovnána toxicita kmenů *De* a *Nostoc muscorum I* a vyjádřena jejich účinnost, byly provedeny měření závislosti toxického efektu na koncentraci látky s následným stanovením „IC₅₀“ a závislosti toxického efektu na expozičním čase.

Testovaný koncentrační rozsah se pohyboval mezi 1,25 – 200 mg LB/ml. Koncentrační závislost je patrná z grafu 28. „IC₅₀“ kmene *Nostoc muscorum I* byla regresní metodou stanovena na **4.8mg LB/ml** (SS = 46,356) pro buňky YAC-1 a **2.8 mg LB/ml** (SS = 95,375) pro buňky Sp/2. V porovnání s tímto výsledkem byla toxicita kmene *De* o řád větší, kde hodnoty „IC₅₀“ byly shodné pro YAC-1 (SS = 65,8) i Sp/2 (SS = 65,8), a to **0.6mg LB/ml**.



Graf 28. Stanovení „IC₅₀“ pro extrakty kmene *Nostoc sp. De* a *Nostoc muscorum I*. Na ose Y je vynesena procentuální inhibice buněčných linií YAC-1 a Sp/2 vůči kontrolním buňkám při 12h expozici a na ose X koncentrační rozsah použitých extraktů 1,25-200 mg/ml.



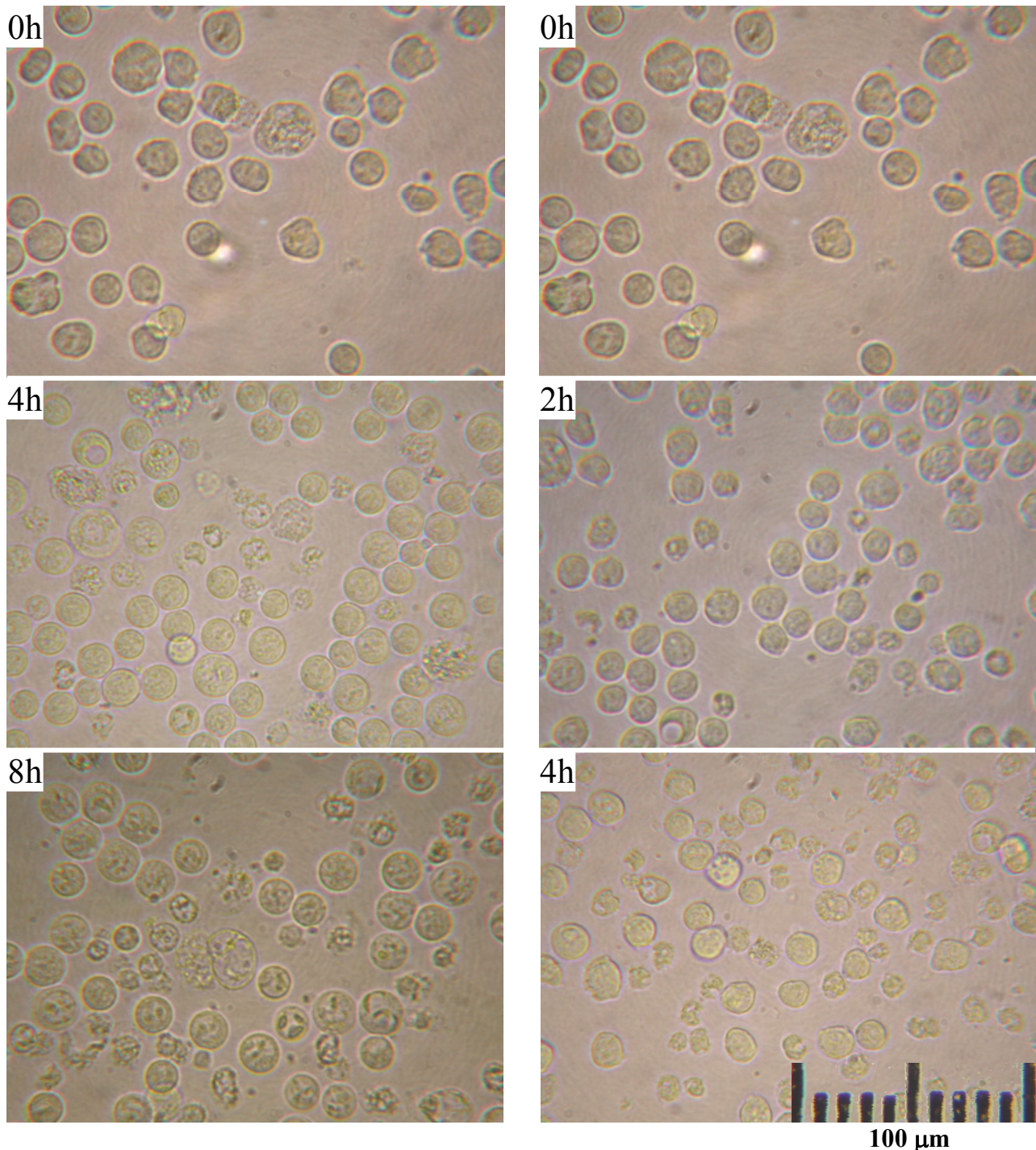
Graf 29. Časová závislost viability buněčné linie Sp/2 exponované „IC₅₀“ koncentraci extraktů kmenů *Nostoc sp. De* a *Nostoc muscorum I*.

Z hodnot „IC₅₀“ a grafu 28 je patrná více než 6-ti násobná toxicita kmene *De* oproti *Nostoc muscorum I*, což může být ovšem způsobeno přítomností dvou cytotoxicky aktivních látek v extraktu *De*. Ačkoliv je zřejmé, že tímto způsobem nelze hodnotit aktivitu zkoumaných látek, je patrné, že symbiont *Nostoc sp. De* je ve srovnání s kmenem *Nostoc muscorum I* cytotoxičtější.

Rozdílné působení obou extraktů je též patrné ze závislosti toxicity na době expozice. Extrakt sinice *Nostoc muscorum I* způsoboval toxický efekt v kratším expozičním čase. Již mezi 2-4 hodinami klesla viabilita buněk z 60 na 30 % a dále se již výrazně neměnila (mezi 8-24 hodinou již zůstávala stabilně na 20%).

Zatímco aplikace extraktu kmene *Nostoc sp.* De vedla po 2 hodinách k poklesu o pouhých 15% a hlavní toxický efekt se dostavil mezi 4-8 hodinami, kdy viabilita klesla na 15%. Následujících 24 hodin vedlo ke smrti všech buněk.

Také morfologie buněk vystavených působení obou extraktů se výrazně liší. Celkové zmenšení objemu a perforace membrány bylo zaznamenáno u buněk vystavených extraktu *Nostoc muscorum I.* Morfologie linie Sp/2 postižené extraktem De vykazovala odlišné změny. Bylo pozorované časté zvětšování a zakulacování buněk a kondenzace granulí uvnitř až po destrukci organel. Z výše uvedeného se lze domnívat, že zatímco *Nostoc muscorum I* způsobuje nekrotickou smrt buněk, extrakt De vyvolává uvnitř buňky změny podobné apoptóze [DING 2003, DING 1998A]



Obř. 24. Fotodokumentace stavu Sp/2 buněk po expozici sinicových extraktů *Nostoc sp.* De a *Nostoc muscorum I.* Pravý sloupec odpovídá extraktu *Nostoc Muscorum I*, levý extraktu *Nostoc sp.* De. Časy odpovídající snímkům jsou vyznačeny v levém horním rohu, expoziční koncentrace byla rovna „IC₅₀“ studovaných extraktů.

4 DISKUSE

Ačkoli byla cytotoxicita zaznamenána u 62% testovaných kmenů, není možné tvrdit, že každý z těchto kmenů syntetizuje sloučeniny se specifickým cytotoxickým účinkem. Jak potvrzuje frakcionace extraktů planktonních kmenů *Anabaena affinis* 04-44 a *Anabaena eucompacta x reniformis* Pěšák 2, toxický efekt může být způsoben přítomností produktů degradace chlorofylu, lipopolysacharidů, či jiných obsahových látek. Tyto látky mohou působit synergicky, anebo jejich koncentrace může být v extraktu natolik vysoká, že změnami v kultivačním médiu zapříčiní mortalitu buněk. Právě planktonní sinice rodu *Anabaena* vykazovaly téměř bez výjimky cytotoxický účinek zprvu přisuzovaný microcystinu-LR, jenž je často u těchto sinic hlavním toxinem [SIVONEN & JONES, 1999]. Ovšem analýzy HPLC-MS přítomnost MC-LR neprokázaly. Naopak byly v extraktech nalezeny zpravidla látky o neznámých molekulárních hmotnostech a pouze u kmene *Anabaena affinis* 04-44 se dá usuzovat na přítomnost puwainaphycinu A. Také u ostatních ekologických skupin je zastoupení neznámých látek zarážející. U čtyř studovaných půdních kmenů bylo pouze pět látek z 24 určeno jako známé struktury. Ačkoli se patrně ve většině případů jedná o varianty známých skupin peptidů, je patrné, že sinice jsou stále dobrým zdrojem nových struktur.

Významným výsledkem je časté zastoupení cytotoxických kmenů mezi půdními izoláty. Navíc dva ze čtyř cytotoxických půdních izolátů obsahovali neznámý cytotoxin. Ze známých látek byl u půdního kmene Cam2SO1 s vysokou pravděpodobností identifikován cryptophycin C. Tato strukturální varianta cryptophycinu bez funkční deoxy skupiny je charakteristická nižším inhibičním efektem vůči buněčným liniím, a 53% inhibiční efekt vůči buněčným liniím YAC-1 by tomuto předpokladu odpovídal. Známý cytotoxin byl identifikován též u sinice *Nostoc* sp. NMB25 z oblastí uranových výsypek, jedná se o aeruginoguanidine 98-C poprvé izolovaný z planktonní sinice *Microcystis aeruginosa* [ISHIDA, 2002]. U neaktivnějšího půdního kmene v této práci, *Nostoc muscorum* I, byly nalezeny hned dvě známé necytotoxické struktury a jeden neznámý cytotoxin způsobující velmi rychlé, pravděpodobně nekrotické poškození. Na základě výše uvedených výsledků se domnívám, že půdní izoláty jsou nejvýhodnější skupinou pro vyhledávání cytotoxických látek, což potvrzuje i fakt, že nejsilnější sinicová cytostatika cryptophyciny byly izolovány z půdních sinic.

Některé ze subaerofytických sběrů sinice *Nostoc commune* vykazovaly výraznou cytotoxicitu, ovšem v tomto případě si nemůžeme být jisti, jestli se jedná o toxicitu způsobenou samotnými sinicemi, jelikož jde o přírodní materiál obsahující bakterie a jiné kontaminace. Kmen *Nostoc* sp. OBU36SO7 je výjimkou v této skupině a je jediným čistým izolátem s cytotoxickým účinkem. Vzhledem k silné toxicitě nalezené u subaerofytických sinic, bude izolace čistých kultur a jejich testování objektem dalšího studia.

Kmeny symbiotické by teoreticky neměly vykazovat vysoké toxické účinky, jelikož symbióza je výhodná pro oba partnery. Tomuto předpokladu však odporuje svou vysokou (v některých měřeních téměř 100%) cytotoxicitou cykasový symbiont *Nostoc* sp. De, jenž indukuje u savčích buněk apoptózu. Vyšší rostliny ovšem disponují mnohými biochemickými drahami rozkladu škodlivin a je možné, že tento toxin specificky odbourávají. Navíc je zřejmé, že rostlinné buňky jsou morfologicky i strukturálně natolik odlišné od testovaných buněčných linií, a tak je možné, že jim toxické látky nebudou působit žádná poškození.

Ačkoli je vyhledávání a studium sekundárních metabolitů významné především jako možnost izolace potenciálně biotechnologicky využitelných látek, poskytuje také zajímavé výsledky ekologického charakteru. Pokud přijmeme hypotézu, že sinice produkují cytotoxiny jako obranu proti herbivornímu či konkurenčnímu tlaku ze strany hub, roztočů a jiných mikroorganismů, pak by naše výsledky nasvědčovaly, že sinice jsou jednoznačně pod nejvyšším konkurenčním tlakem v půdním prostředí. Dalším zajímavým faktem je, že kmeny NMB25 a NMB26 izolované ze stejné lokality, vykazovaly vysokou míru cytotoxicity, avšak jejich extrakty nesdílely jedinou shodnou látku. Zatímco u kmene NMB25 byla nalezena přítomnost cytotoxického aeruginoguanidinu 98-C,

tato látka nebyla u NMB26 přítomna, a tudíž je u obou kmenů zodpovědná za toxicitu struktura jiná.

Podobné výsledky byly získány v naší laboratoři u jiných kmenů izolovaných ze stejných lokalit. U kmene *Nostoc muscorum I* byla v této práci nalezena produkce neznámého cytotoxického peptidu o hmotě 1211 Da. Tento kmen byl izolován společně s organismem *Nostoc ellipsosporum* z obhospodařovaných polí u Nezamyslic (Česká Republika). Také v tomto případě se u obou kmenů výsledky analýzy naprosto liší a kmen *Nostoc ellipsosporum* výše zmíněnou látku neobsahuje [HROUZEK, ÚSTNÍ SDĚLENÍ]. Tento výsledek by mohl nasvědčovat tomu, že produkce cytotoxických látek je skutečně ekologicky podmíněna. Proto dva rozdílné organismy pocházející ze stejného prostředí syntetizují funkčně podobné látky, ale jejich struktury se liší z důvodu přítomnosti jiných syntetáz. Jsme si však vědomi, že na potvrzení této hypotézy bude potřeba ucelenější studie.

5 LITERATURA

ABU HENA MOSTAFA, KIM CHUL-SA, HORIIKE MICHIO, KIYOOKA SYUN-ICHI. **Toward a practical synthesis of acutiphycin. Highly stereoselective synthesis of C10-epi seco acid derivative via reaction paths shortened by using a series of chiral oxazaborolidinone-promoted aldol reactions.** *Tetrahedron Letters* 40 (1999): 1161-1164

AL-AWAR RIMA S., CORBETT THOMAS H., RAY JAMES E., POLIN LISA, KENNEDY JOSEPH H., WAGNER MARGARET M., WILLIAMS DANIEL C. **Biological evaluation of cryptophycin 52 fragment A analogues: Effect of the multidrug resistance ATP binding cassette transporters on antitumor activity.** *Molecular Cancer Therapeutics* 3 (2004): 1061-1067

ARNON DANIEL I., MCSWAIN BERAH D., TSUJIMOTO HARRY Y., WADA KEISHIRO. **Photochemical activity and components of membrane preparations from blue-green algae. I. Coexistence of two photosystems in relation to chlorophyll a and removal of phycocyanin.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics* 357 (1974): 231-245

BARCHI JOSEPH J., NORTON TED R., FURUSAWA EIICHI, PATTERSON GREGORY M. L., MOORE RICHARD E. **Identification of a cytotoxin from *Tolypothrix byssoidea* as tubercidin.** *Phytochemistry* 22 (1983): 2851-2852

BERG T., BOMAN D., SEGLEN P.O. **Induction of tryptophan oxygenase in primary rat liver cell suspensions by glucocorticoid hormone.** *Experimental Cell Research* 72 (1972): 571-574

CHEN XINXIN, SMITH GEOFFREY D., WARING PAUL. **Human cancer cells (Jurkat) killing by the cyanobacterial metabolite calothrixin A.** *Journal of Applied Phycology* 15 (2003): 269-277

BERNARDO PAUL H., CHAI CHRISTINA L. L., ELIX JOHN A. **A simple and concise route to calothrixin B (short communication).** *Tetrahedron Letters* 43 (2002): 2939-2940

BERRY JOHN P., GANTAR MIROSLAV, GAWLEY ROBERT E., WANG MINGLEI, REIN KATHLEEN S. **Pharmacology and toxicology of pahayokolide A, a bioactive metabolite from a freshwater species of *Lyngbya* isolated from the Florida Everglades.** *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 139 (2004): 231-238

BHATTACHARYA R., RAO P.V. LAKSHMANA, BHASKAR A.S.B., PANT S.C., DUBE S.N. **Liver slice culture for assessing hepatotoxicity of freshwater cyanobacteria.** *Human & Experimental Toxicology* 15 (1996): 105-110

BOLTON J.L., TRUSH M.A., PENNING T.M., DRYHURST G., MONKS T.J. **Role of quinones in toxicology.** *Chemical Research in Toxicology* 13 (2000): 135-160

BOUAICHA NOUREDDINE, MAATOUK IMED. **Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes.** *Toxicology Letters* 148 (2004): 53-63

CARMELI SHMUEL, MOORE RICHARD E., PATTERSON GREGORY M.L., YOSHIDA WESLEY Y. **Biosynthesis of tolytoxin (scytophycin B). Origin of the carbons and heteroatoms.** *Tetrahedron Letters* 34 (1993): 5571-5574

- CARMICHAEL W.W. **Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins.** *Journal of Applied Bacteriology* 72 (1992): 445-459
- CARMICHAEL W.W., BIGGS DAVID F., PETERSON MARGE A. **Pharmacology of Anatoxin-a, produced by the freshwater cyanophyte *Anabaena flos-aquae* NRC-44-1.** *Toxicon* 17 (1979): 229-236
- CODD G.A. **Cyanobacterial toxins: Occurrence, properties and biological significance.** *Water Science and Technology* 32 (1995): 149-156
- DE MUYS JEAN-MARC, REJ RABINDRA, NGUYEN DIEU, GO BRIAN, FORTIN SAMUEL, LAVALLÉE JEAN-FRANCOIS. **Synthesis and *in vitro* cytotoxicity of cryptophycins and related analogs.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 6 (1996): 1111-1116
- DING WEN-XING, ONG CHOON NAM. **Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity.** *FEMS Microbiology Letters* 220 (2003): 1-7
- DING WEN-XING, SHEN HAN-MING, SHEN YI, ZHU HUI-GANG, ONG CHOON-NAM. **Microcystic cyanobacteria causes mitochondrial membrane potential alteration and reactive oxygen species formation in primary rat hepatocytes.** *Environmental Health Perspectives* 106 (1998B): 409-413
- DING WEN-XING, SHEN HAN-MING, ZHU HUI-GANG, ONG CHOON-NAM. **Studies on oxidative damage induced by cyanobacteria extract in primary cultured rat hepatocytes.** *Environmental research, section A* 78 (1998A): 12-18
- EL-THAHER TALEL S., BAILEY GRAHAM S. **A new staining method for cyclic peptides after Thin-layer chromatography.** *Analytical biochemistry* 217 (1994): 335-337
- ENDICOTT J.A., LING V. **The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance.** *Annual Review of Biochemistry* 58 (1989): 137-171
- ERIKSSON J.E., GRONBERG L., NYGARD S., SLOTTE J.P., MERILUOTO J.A.O. **Hepatocellular uptake of ³H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1025 (1990): 60-66
- ESSER M.T., MORI T., MONDOR I, SATTENTAU Q.J., DEY B., BERGER E.A., BOYD M.R., LIFSON J.D. **Cyanovirin-N binds to gp120 to interfere with CD4-dependent human immunodeficiency virus type 1 virion binding, fusion, and infectivity but does not affect the CD4 binding site on gp120 or soluble CD4-induced conformational changes in gp120.** *Journal of Virology* 73 (1999): 4360-4371
- EVANS S. M., CASARTELLI A., HERREROS E., MINNICK D. T., DAY C., GEORGE E., WESTMORELAND C. **Development of a high throughput *in vitro* toxicity screen predictive of high acute *in vivo* toxic potential.** *Toxicology in Vitro* 15 (2001): 579-584
- FADOK V.A., VOELKER D.R., CAMPBELL P.A., COHEN J.J., BRATTON D.L., HENSON P.M. **Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages.** *The Journal of Immunology* 148 (1992): 2207-2216

FASTNER JUTTA, HEINZE RITA, CHORUS INGRID. **Microcystin-content, hepatotoxicity and cytotoxicity of cyanobacteria in some German water bodies.** *Water Science and Technology* 32(1995): 165-170

FASTNER J., HEINZE R., HUMPAGE A. R., MISCHKE U., EAGLESHAM G. K., CHORUS I. **Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates.** *Toxicon* 42 (2003): 313-321

FLADMARK K.E., BRUSTUGUN O.T., HOVLAND R., BOE R., GJERTSEN B.T., ZHIVOTOVSKY B., DØSKELAND S.O. **Ultrarapid caspase-3 dependent apoptosis induction by serine/threonine phosphatase inhibitors.** *Cell Death & Differentiation* 6 (1999): 1099-1108

FUJII KIYONAGA, SIVONEN KAARINA, ADACHI KYOKO, KAZUYOSHI NOGUCHI, SANO HIROSHI, HIRAYAMA KAZUO, SUZUKI MAKOTO, HARADA KEN-ICHI. **Comparative study of toxic and non-toxic cyanobacterial products: Novel peptides from toxic *Nodularia spumigena* AV1.** *Tetrahedron Letters* 38 (1997): 5525-5528

FUJII KIYONAGA, SIVONEN KAARINA, NAGANAWA EMIKO, HARADA KEN-ICHI. **Non-toxic peptides from toxic cyanobacteria, *Oscillatoria agardhii*.** *Tetrahedron* 56 (2000): 725-733

GANT T.W., RAO D.N., MASON R.P., COHEN G.M. **Redox cycling and sulphhydryl arylation; their relative importance in the mechanism of quinone cytotoxicity to isolated hepatocytes.** *Chemico-Biological Interactions* 65 (1988): 157-173

GREGSON JOHN M., CHEN JIAN-LU, PATTERSON GREGORY M.L., MOORE RICHARD E. **Structures of puwainaphycins A-E.** *Tetrahedron* 48 (1992): 3727-3734

HARADA KEN-ICHI, FUJII KIYONAGA, HAYASHI KAYO, SUZUKI MAKOTO, IKAI YOSHITOMO, OKA HISAO. **Application of D,L-FDLA derivatization to determination of absolute configuration of constituent amino acids in peptide by advanced Marfey's method.** *Tetrahedron Letters* 37 (1996): 3001-3004

HARADA KEN-ICHI, MURATA HIDEAKI, QIANG ZHANG, SUZUKI MAKOTO, KONDO FUMIO. **Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteria.** *Toxicon* 34 (1996): 701-710

CHORUS I. **A new WHO approach called „Water Safety Plans“: how does it work for cyanotoxins? In 6th Conference On Toxic Cyanobacteria (2004), p.30, Bergen, Norway**

HARADA KEN-ICHI, OHTANI IKUKO, IWAMOTO KAYOKO, SUZUKI MAKOTO, WATANABE MARIYO F., WATANABE MASAYUKI, TERAOKI KIYOSHI. **Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method.** *Toxicon* 32 (1994): 73-84

HARBORNE J.B. & BAXTER H. **Phytochemical dictionary - a handbook of bioactive compounds from plants.** *Taylor And Francis Limited, London* (1993).

HERFINDAL LARS, OFTEDAL LINN, SELHEIM FRODE, WAHLSTEN MATTI, SIVONEN KAARINA, DØSKELAND STEIN OVE. **A high proportion of Baltic Sea benthic cyanobacterial isolates contain apoptogens able to induce rapid death of isolated rat hepatocytes.** *Toxicon* 46 (2005): 252-260

HOEMANN M.Z., AGRIOS K.A., AUBÉ J. **Total synthesis of (+)-curacin A, a marine cytotoxic agent.** *Tetrahedron* 53 (1997): 11087-11098

CHONG M.W.K., WONG B.S.F., LAM P.K.S., SHAW G.R., SEAWRIGHT A.A. **Toxicity and uptake mechanism of cylindrospermopsin and lophyrotomin in primary rat hepatocytes.** *Toxicon* 40 (2002): 205-211

ISHIDA KEISHI, MATSUDA HISASHI, MURAKAMI MASAHIRO, YAMAGUCHI KATSUMI. **Microginins 299-A and -B, leucine aminopeptidase inhibitors from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (NIES-299).** *Tetrahedron* 53 (1997): 10281-10288

ISHIDA KEISHI, MATSUDA HISASHI, OKITA YUJI, MURAKAMI MASAHIRO. **Aeruginoguanidines 98-A–98-C: cytotoxic unusual peptides from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*.** *Tetrahedron* 58 (2002): 7645-7652

JUNG JEE H., MOORE RICHARD E., PATTERSON GREGORY M.L. **Scytophycins from a blue-green alga belonging to the Nostocaceae.** *Phytochemistry* 30 (1991): 3615-3616

JÜTTNER FRIEDRICH, TODOROVA ALBENA K., WALCH NADJA, VON PHILIPSBORN WOLFGANG. **Nostocyclamide M: a cyanobacterial cyclic peptide with allelopathic activity from *Nostoc* 31.** *Phytochemistry* 57 (2001): 613-619

KESSEL DAVID, LUO YU. **Cells in cryptophycin-induced cell-cycle arrest are susceptible to apoptosis.** *Cancer Letters* 151 (2000): 25-29

KNÜBEL GEORG, LARSEN LINDA K., MOORE RICHARD E., LEVINE IRA A., PATTERSON GREGORY M.L. **Cytotoxic, antiviral indolocarbazoles from a blue-green alga belonging to the Nostocaceae.** *The Journal of Antibiotics* (1990): 1236-1239

KODANI SHINYA, SUZUKI SHINGO, ISHIDA KEISHI, MURAKAMI MASAHIRO. **Five new cyanobacterial peptides from water bloom materials of lake Teganuma (Japan).** *FEMS Microbiology Letters* 178 (1999): 343-348

LAAMANEN M.J., GUGGER M.F., LEHTIMÄKI J.M., HAUKKA K., SIVONEN K. **Diversity of toxic and nontoxic *Nodularia* isolates (cyanobacteria) and filaments from the Baltic sea.** *Applied and Environmental Microbiology* 67 (2001): 4638-4647

LINCOLN R.A., STRUPINSKY K., WALKER J.M. **The use of *Artemia nauplii* (Brine shrimp larvae) to detect toxic compounds from microalgal cultures.** *Pharmaceutical Biology* 34 (1996): 384-389

MAHMOOD N.A., CARMICHAEL W.W. **The pharmacology of anatoxin-a(s), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17.** *Toxicon* 24 (1986): 425-434

MARŠÁLEK BLAHOŠLAV, BLÁHA LUDĚK, KRMEŇČÍK PAVEL, OSTRÝ VLADIMÍR. **Biotoxiny – učební texty pro přednášku „Ekotoxikologické aspekty biotoxinů“.** (2005) *Duben, Brno*

MARŠÁLEK BLAHOŠLAV, KERŠNER VLADIMÍR, MARVAN PETR. **Vodní květy sinic. *Nadatio flos-aquae* (1996)**

MARTIN B.R. **Tissue culture techniques – an introduction.** *Boston. USA: 1-243*

MATSUHIMA R., YOSHIZAWA S., WATANABE F.M., HARADA F.M., FURUSAWA M., CARMICHAEL W.W. **In vitro and in vivo effects of protein phosphatase inhibitors, microcystins and nodularin on mouse skin and fibroblasts.** *Biochemical and Biophysical Research Communications 171 (1990): 867-874*

MOORE RICHARD E., BORNEMANN V., NIEMCZURA W.P., GREGSON J.M., CHEN J.L., NORTON T.R., PATTERSON G.M.L., HELMS G.L. **Puwainaphycin-C, a cardioactive cyclic peptide from the blue-green alga *Anabaena* BQ-16-1 – Use of two-dimensional C-13-C-13 and C-13-N-15 correlation spectroscopy in sequencing the amino-acid units.** *Journal of the American Chemical Society 111 (1989): 6128-6132*

MOORE RICHARD E., PATTERSON G.M.L., CARMICHAEL W.W. **New pharmaceuticals from cultured blue-green algae.** In *Fautin DG (ed.), Biomedical Importance of Marine Organisms 13 (1988): 143-150*

MOORE RICHARD E., SMITH CHARLES D., PATTERSON GREGORY M.L., MOOBERRY SUSAN L., CORBETT THOMAS H., VALERIOTE FREDERICK A., TRIMURTULU GOLAKOTI. **Cryptophycins - U.S.Patent 5952298 (1995)**

MOSMANN T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival – application to proliferation and cytotoxicity assays.** *Journal of Immunological Methods 65 (1983): 55-63*

MURAKAMI MASAHIRO, SUN QI, ISHIDA KEISHI, MATSUDA HISAHI, OKINO TATSUFUMI, YAMAGUCHI KATSUMI. **Microviridins, elastase inhibitors from the cyanobacterium *Nostoc minutum* (NIES-26).** *Phytochemistry 45 (1997): 1197-1202*

MURATAKE HIDEAKI, NATSUME MITSUTAKA. **Total synthesis of lynngbyatoxin A (teleocidin A-1) and teleocidin A-2.** *Tetrahedron Letters 28 (1987): 2265-2268*

NAMIKOSHI M., RINEHART K.L. **Bioactive compounds produced by cyanobacteria.** *Journal of Industrial Microbiology 17 (1996): 373-384*

OHSHIMA T., GNANADESKIAN V., SHIBUGUCHI T., FUKUTA Y., NEMOTO T., SHIBASAKI M. **Enantioselective syntheses of aeruginosin 298-A and its analogues using a catalytic asymmetric phase-transfer reaction and epoxidation.** *Journal of the American Chemical Society 125 (2003): 11206-11207*

OHTANI I., MOORE RICHARD E., RUNNEGAR M.T.C. **Cylindrospermopsin, a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*.** *Journal of the American Chemical Society 114 (1992): 7941-7942*

PACE J.G., ROBINSON N.A., MIURA G.A., MATSON C.F., GEISBERT T.W., WHITE J.D. **Toxicity and kinetics of [3H] microcystin-LR in isolated perfused rat livers.** *Toxicology and Applied Pharmacology 107 (1991): 391-401*

PANDA D., HIMES R.H., MOORE RICHARD E., WILSON L., JORDAN M.A. **Mechanism of action of the unusually potent microtubule inhibitor cryptophycin 1.** *Biochemistry 36 (1997): 12948-12953*

PATTERSON GREGORY M.L., CARMELI SHMUEL. **Biological effects of tolytoxin (6-hydroxy-7-O-methyl-scytopycin b), a potent bioactive metabolite from cyanobacteria.** *Archives of Microbiology* 157 (1992): 406-410

PERSOONE GUIDO, JANSSEN COLIN, DE COEN WIM. **Cyst-based toxicity tests X: comparison of the sensitivity of the acute *Daphnia magna* test and two crustacean microbiotests for chemicals and wastes.** *Chemosphere* 29 (1994): 2701-2710

PICHARDO S., JOS A., ZURITA J.L., SALGUERO M., CAMEAN A.M., REPETTO G. **The use of the fish cell lines RTG-2 and PLHC-1 to compare the toxic effects produced by microcystins LR and RR.** *Toxicology in Vitro* 19 (2005): 865-873

PLOUTNO ALEXEI, CARMELI SHMUEL. **Modified peptides from a water bloom of the cyanobacterium *Nostoc sp.*** *Tetrahedron* 58 (2002): 9949-9957

RANTALA ANNE, FEWER DAVID P., HISBERGUES MICHAEL, ROUHIAINEN LEO, VAITOMAA JAANA, BÖRNER THOMAS, SIVONEN KAARINA. **Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (2004): 568-573

REISNER M., CARMELI S., WERMAN M., SUKENIK A. **The cyanobacterial toxin cylindrospermopsin inhibits pyrimidine nucleotide synthesis and alters cholesterol distribution in mice.** *Toxicological Sciences* 82 (2004): 620-627

RICKARDS R.W., ROTHSCHILD J.M., WILLIS A.C., DE CHAZAL N.M., KIRK J., KIRK K., SALIBA K.J., SMITH G.D. **Calothrixins A and B, novel pentacyclic metabolites from *Calothrix* cyanobacteria with potent activity against malaria parasites and human cancer cells.** *Tetrahedron* 55 (1999): 13513-13520

RINEHART K.L., HARADA K.I., NAMIKOSHI M., CHEN C., HARVIS C.A., MUNRO M.H.O., BLUNT J.W., MULLIGAN P.E., BEASLEY V.R., DAHLEM A.M., CARMICHAEL W.W. **Nodularin, microcystin, and the configuration of *Adda*.** *Journal of the American Chemical Society* 110 (1988): 8557-8558

RUNNEGAR M.T., XIE C., SNIDER B.B., WALLACE G.A., WEINREB S.M., KUHNENKAMP J. **In vitro hepatotoxicity of the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and related synthetic analogues.** *Toxicological Sciences* 67 (2002), 81 – 87.

SANO TOMOHARU, KAYA KUNIMITSU. **Oscillamide Y, a chymotrypsin inhibitor from toxic *Oscillatoria agardhii*.** *Tetrahedron Letters* 36 (1995): 5933-5936

SANO TOMOHARU, TAKAGI HIROO, MORRISON LOUISE F., METCALF JAMES S., CODD GEOFFREY A., KAYA KUNIMITSU. **Leucine aminopeptidase M inhibitors, cyanostatin A and B, isolated from cyanobacterial water blooms in Scotland.** *Phytochemistry* 66 (2005): 543-548

SIVONEN K., CARMICHAEL W.W., NAMIKOSHI M., RINEHART K.L., DAHLEM A.M., NIEMELA S.I. **Isolation and characterization of hepatotoxic microcystin homologs from the filamentous freshwater cyanobacterium *Nostoc sp.* strain 152.** *Applied Environmental Microbiology* 56 (1990): 2650-2657

SIVONEN KAARINA, JONES G. Cyanobacterial toxins. In Chorus I., Bartram J., editors. **Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring, and management.** London: E & FN Spoon. p 41-111

SIVONEN KAARINA. **Cyanobacteria toxins and toxin production.** *Phycologia* 35 (1996): 12-24

SMITH CHARLES D., ZHANG XINQUN, MOOBERRY SUSAN L., PATTERSON GREGORY M.L., MOORE RICHARD E. **Cryptophycin: A new antimicrotubule agent active against arug-resistant cells.** *Cancer Research* 54 (1994): 3779-3784

SURAKKA ANU, SIHVONEN LEILA M., LEHTIMÄKI JAANA M., WAHLSTEN MATI, VUORELA PIA, SIVONEN KAARINA. **Benthic cyanobacteria from the Baltic sea contain cytotoxic *Anabaena*, *Nodularia*, and *Nostoc* strains and an apoptosis-inducing *Phormidium* strain.** *Environmental Toxicology* 20 (2005): 285-292

TENEVA IVANKA, ASPARUHOVA DAFINKA, DZHAMBAZOV BALIK, MLADENOV RUMEN, SCHIRMER KRISTIN. **The freshwater cyanobacterium *Lyngbya aerugino-corulea* produces compounds toxic to mice and to mammalian and fish cells.** *Environmental Toxicology* 18 (2003): 9-20

TRIMURTULU G., OGINO J., HELTZEL C.E., LE HUSEBO TRANG, JENSEN CRAIG M., LARSEN LINDA K., PATTERSON GREGORY M. L., MOORE RICHARD E., MOOBERRY SUSAN L., AND ET AL. **Structure determination, conformational analysis, chemical stability studies, and antitumor evaluation of the cryptophycins. Isolation of 18 new analogs from *Nostoc* sp. strain GSV 224.** *Journal of the American Chemical Society* 117 (1995): 12030-12049

TRIMURTULU GOLAKOTI, OHTANI IKUKO, PATTERSON GREGORY M. L., MOORE RICHARD E., CORBETT THOMAS H., VALERIOTE FREDERICK A., DEMCHIK LISA. **Total Structures of Cryptophycins, Potent Antitumor Depsipeptides from the Blue-Green Alga *Nostoc* sp. Strain GSV 224.** *Journal of the American Chemical Society* 116 (1994): 4729-4737

TRIMURTULU GOLAKOTI, YOSHIDA WESLEY Y., CHAGANTY SREEDHARA, MOORE RICHARD E. **Isolation and Structures of Nostopeptolides A1, A2 and A3 from the Cyanobacterium *Nostoc* sp. GSV224.** *Tetrahedron* 56 (2000): 9093-9102

WELKER MARTIN, VON DÖHREN HANS. **Cyanobacterial peptides – Nature's own combinatorial biosynthesis.** *FEMS Microbiology Reviews* 30 (2006): 530-563

WHITE JAMES D., XU QING, LEE CHANG-SUN, VALERIOTE FREDERICK A. **Total synthesis and biological evaluation of (+)-kalkitoxin, a cytotoxic metabolite of the cyanobacterium *Lyngbya majuscula*.** *Organic and Biomolecular Chemistry* 2 (2004): 2092

WONACOTT S., SWANSON K.L., ALBUQUERQUE E.X., HUBY N.J., THOMPSON P., GALLAGHER T. **Homoanatoxin: a potent analogue of anatoxin-A.** *Biochemical Pharmacology* 43 (1992): 419-423