

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Cytotoxické působení sinicových metabolitů na
vybrané lidské rakovinné linie se zaměřením na
pankreatickou linii PaTu**

Bakalářská práce

Kateřina Vicková

Školitelka: Mgr. Kateřina Voráčová, Centrum Algatech, Mikrobiologický ústav AV ČR-
vědecké pracoviště Třeboň

Školitel specialista: RNDr. Pavel Hrouzek, Ph.D

České Budějovice 2015

Vicková, K., 2015: Cytotoxické působení sinicových metabolitů na vybrané lidské rakovinné linie se zaměřením na pankreatickou linii PaTu. [Cytotoxic effect of some cyanobacterial crude extracts and metabolites against selected human cancer cell lines, especially focusing on pancreatic cancer cell line PaTu. Bc. Thesis, in Czech.] – 55 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

Cancer is disease that affects human population for many thousands of years. Fortunately fighting cancer is more and more effective. This is mainly thanks to combining different strategies of therapy and progress in novel drug development and research. Cyanobacteria are emerging as an important source of novel bioactive secondary metabolites which provides an opportunity for new drug discovery. The aim of this study was evaluation of three cyanobacterial strains for in vitro cytotoxicity against human cancer cell lines, with special focus on pancreatic cancer cells. Crude extracts and chromatographic fractions were tested for their possible use (effectiveness) as selective cytotoxic and/or pro-apoptotic agents. Probably novel compound with anti-proliferative activity was found and isolated by HPLC-MS techniques.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury 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 elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, dne 24. 4. 2015

.....

Kateřina Vicková

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat lidem, bez kterých by tato práce nevznikla. Díky patří všem z laboratoře řasových biotechnologií na Opatovickém mlýně za to, že jsem se mohla stát součástí tak skvělého týmu. Jmenovitě pak v první řadě mé školitelce Kátě Voráčové a konzultantu Pavlovi Hrouzkovi za jejich skvělý přístup, čas, který mi věnovali a ochotu pomoci pokaždé, když bylo potřeba. Dále Petě Urajové a Honzíku Hájkovi za pomoc s LC-MS částí mé práce. V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu nejen při psaní této práce.

Obsah:

1. Úvod	1
1.1 Rakovina	1
1.2 Cílená protinádorová léčba	2
1.2.1 Vývoj léčby nádorových onemocnění.....	2
1.2.2 Dělení cílené protinádorové léčby podle mechanismu účinku.....	2
1.2.2.1 Inhibitory enzymů	3
1.2.2.2 Látky indukující apoptózu	5
1.2.2.3 Inhibitory angiogeneze	5
1.2.3. Hlavní typy látek používaných v cílené protinádorové léčbě	6
1.2.3.1 Terapeutické monoklonální protilátky	6
1.2.3.2 Malé molekuly.....	6
1.3 Sinice a jejich farmaceutický potenciál	8
1.3.1 Sekundární sinicové metabolity s protirakovinnými účinky.....	8
1.3.1.1 Cryptophycin	9
1.3.1.2 Dolastatin.....	10
1.4 Apoptóza.....	12
1.4.1. Buněčná smrt.....	12
1.4.2. Klasifikace základních typů řízené buněčné smrti.....	13
1.4.4 Morfologie a molekulární mechanismy apoptózy.....	15
1.4.4.1 Na kaspázách závislá vnitřní dráha apoptózy.....	16
1.4.4.2 Na kaspázách nezávislá vnitřní dráha apoptózy.....	16
1.4.4.3 Vnější dráha aktivace apoptózy přes „death receptors“	17
1.4.4.4 Vnější dráha aktivace apoptózy přes „dependence receptors“	17
1.4.4.5 Exekutivní fáze apoptózy	18
2. Cíle práce	19
3. Materiály a metody	20
3.1 Chemikálie	20
3.2 Metody	21
3.2.1 Extrakce sinicové biomasy- příprava surového extraktu	21
3.2.2 HPLC-MS analýza surových extraktů.....	21
3.2.3 Frakcionace surového extraktu.....	22

3.2.4 HPLC-HRMS analýza surových extraktů, refrakcionace aktivních frakcí, ověření čistoty frakcí.....	22
3.2.5 Buněčné linie.....	23
3.2.5.1 Kultivace buněčných linií.....	23
3.2.5.2 Práce s buněčnými liniemi.....	23
3.2.6 MTT test a hodnocení cytotoxicity	24
3.2.7 Hodnocení aktivity efektorových kaspáz 3/7	25
3.2.8 Fluorescenční barvení	25
3.2.8.1 Barvení jádra.....	25
3.2.8.2 Barvení mitochondrií	26
3.2.9 Časoběrná mikroskopie	26
4. Výsledky	27
4.1 Kmen 113.....	27
4.1.1 Kmen 113 – stará biomasa	27
4.1.2 Kmen 113 – nová biomasa	32
4.2 Kmen 91.....	36
4.3 Kmen 33.....	39
4.3.1 Surový extrakt	39
4.3.2 Chromatografické frakce.....	41
5. Diskuze.....	46
5.1 Kmen 113.....	46
5.2 Kmen 91.....	49
5.3 Kmen 33.....	49
6. Závěr	51
7. Seznam použité literatury	52

1. Úvod

1.1 Rakovina

Rakovina je všeobecný pojem používaný pro skupinu onemocnění způsobených nekontrolovatelným dělením nádorových buněk v nejrůznějších tělních orgánech a tkáních. Podstatou nádorových onemocnění je změna genetické informace a regulačních mechanismů v buňce, které ji osvobodí od obvyklé regulace buněčného cyklu. Takto pozměněná buňka se dělí bez zábran. Klony této buňky mutace zdědí a vzniká nádor, který může neomezeně růst (Alberts et al., 1998).

Nádor může být buď nezhoubný – benigní nebo zhoubný – maligní. Maligní nádor má schopnost pronikat do okolních tkání (má invazní charakter), kde tvoří druhotná ložiska nádoru tzv. metastáze a ohrožuje na životě (Altaner, 2008). Samotný vznik a rozvoj nádorů je složitý proces. U některých typů nádorů hrají roli dědičné mutace specifických genů, ale rozvoj většiny nejčastěji se vyskytujících nádorů je ve velké míře ovlivněn životním stylem a faktory vnějšího prostředí (Hofmanová, 2013).

V roce 2012 na nádorové onemocnění zemřelo 8,2 milionu lidí a bylo diagnostikováno přibližně 14,1 milionu nových případů výskytu rakoviny (Cancer Research UK, 2015). Společně s kardiovaskulárními onemocněními patří nádorové onemocnění celosvětově k nejčastějším příčinám úmrtí. I proto se výzkumu rakoviny, strategii její léčby a vývoji nových léčiv věnuje enormní zájem.

1.2 Cílená protinádorová léčba

1.2.1 Vývoj léčby nádorových onemocnění

Až do dvacátých let 20. století byla jedinou protinádorovou léčebnou metodou léčba chirurgická. S objevem a využitím rentgenových paprsků v léčbě rakoviny se terapie stala o něco účinnější. Chirurgická léčba i radioterapie se postupem času zdokonalovaly a umožňovaly stále odvážnější a radikálnější zákroky. Ve čtyřicátých letech minulého století již lze pozorovat nespěšné začátky nového léčebného přístupu – chemoterapie. Ta byla původně určená jako podpůrná léčebná metoda. V průběhu let se však stala jednou z metod hlavních, a to především díky jejímu systémovému léčebnému účinku. Obecně se největší efektivity léčby rakoviny dosahuje tzv. multimodální léčbou. Jedná se o kombinaci více způsobů dostupné terapie s ohledem na konkrétní diagnózu. Mimořádným přínosem pro léčbu onkologických onemocnění je také zdokonalení podpůrné a doplňkové léčby. Ta významně omezuje nebo i zcela eliminuje vedlejší účinky protinádorové léčby, což vede ke snížení mortality pacientů (Klener, 2013).

Rozluštění lidského genomu a zdokonalování technologických postupů v oblasti genetiky a molekulární biologie vedlo k hlubšímu poznání mechanismů kancerogeneze a patofyziologie nádorových onemocnění. Díky těmto poznatkům byly izolovány či syntetizovány chemické látky, které cíleně blokují nitrobuněčné pochody specifické pro nádorové buňky (Huang et al., 2014). Aplikace těchto znalostí do praxe vedla ke vzniku nového přístupu k léčbě a to k tzv. cílené terapii. Cílená protinádorová terapie se v posledních letech stále více rozvíjí a stala se součástí komplexní protinádorové léčby (Klener, 2013).

1.2.2 Dělení cílené protinádorové léčby podle mechanismu účinku

Cílená protinádorová léčba je využívána k zamezení růstu nádoru a jeho metastazování. Poté, co buňka projde procesem karcinogeneze, může neomezeně růst a tvořit nádor nebo se šířit tělními systémy. Dnes již víme více o molekulách a signálech, které jsou součástí tohoto procesu. Látky, používané při cílené terapii mají schopnost interagovat s určitou buněčnou strukturou či enzymem nebo signální molekulou potřebnou pro růst a rozvoj nádoru a tento proces narušit, a současně jsou specifické nebo částečně specifické pro nádorové buňky. Tyto látky jsou nejčastěji rozdělovány podle mechanismu působení nebo podle svých buněčných cílů do následujících kategorií (American Cancer Society, 2013).

1.2.2.1 Inhibitory enzymů

- Inhibitory tyrosinkinázy

Tyrosinkináza je enzym, který katalyzuje přenos fosfátové skupiny převážně z adenosintrifosfátu na cílový protein (fosforylace). Účastní se běžných buněčných regulačních procesů, jakými jsou buněčný růst, dělení a diferenciací. Zvýšená úroveň exprese genů kódujících tyto enzymy, která může být způsobena mutací genů či chromozomovou translokací, a tedy vyšší aktivita enzymu může vést až k maligní transformaci poškozené buňky.

Tyrosinkinázy mohou být klasifikovány jako receptorové, které hrají klíčovou roli v přenosu extracelulárních signálů do cytoplasmy, nebo nereceptorové, jejichž úkolem je přenos intracelulárních signálů. Některé se nacházejí také v jádře buňky, kde se podílejí na regulaci buněčného cyklu. Tyrosinkinázy jsou tedy velmi významným terčem pro cílenou protinádorovou léčbu (Gunby et al., 2007).

- mTOR inhibitory

mTOR (mammalian target of rapamycin) je serin / threonin proteinová kináza, která má významnou regulační roli během buněčného růstu, dělení, přežívání buňky a angiogeneze. Reaguje na aktuální podmínky prostředí, jako jsou signály z růstových faktorů, změna hladiny inzulínu či živin v okolí buňky. Podílí se přímo i nepřímo na regulaci řady molekul prostřednictvím regulace proteosyntézy.

Hyperstimulace mTOR kaskády iniciuje nádorovou přeměnu díky zvýšené translaci mRNA kódující růstové faktory, regulátory buněčného cyklu, proteiny důležité pro přežití buňky a angiogenní faktory. Signální dráha PI3K/Akt/mTOR je jednou z hlavních drah podílejících se na procesu kancerogeneze. Její inhibice se stala důležitým cílem onkologické terapie, zvláště u nádorů s odchylkou v dráze mTOR způsobující její nadměrnou aktivaci. Nadměrná aktivace mTOR může být způsobena mutací, amplifikací nebo ztrátou klíčových regulátorů dráhy PI3K/Akt/mTOR (Melichar & Študentová, 2010).

- Inhibitory proteazomu

Ubikvitin-proteazomová dráha se podílí na intracelulární regulaci proteinů. Její funkce je rozhodující pro udržení buněčné homeostáze. Inhibitory této dráhy se staly kandidátními látkami pro léčbu nádorových onemocnění, když bylo zjištěno, že indukují programovanou buněčnou smrt přednostně v maligně transformovaných buňkách (Orlowski & Kuhn, 2008).

- Inhibitory růstových faktorů/receptorů

Do této skupiny řadíme látky, které interagují s ligandy (faktory) nebo receptory a brání tak navázání ligandů. Z této kategorie patří mezi nejefektivnější ty, které jsou namířené proti extracelulární doméně receptorů pro epidermální růstové faktory (epidermal growth factor receptor, EGFR), který je stimulován regulačními peptidy označovanými jako růstové faktory. V patogenezi nádorového bujení dochází ke zvýšené tvorbě a vylučování těchto peptidů, které po vazbě na příslušný receptor zvyšují schopnosti dělení nádorové buňky (Harari, 2004). Konkrétním příkladem jsou látky interagující s receptorem 2 pro lidský epidermální růstový faktor (human epidermal growth factor receptor 2, HER-2): trastuzumab a pertuzumab (Staal et al., 2009).

- Multikinázové inhibitory

Jedná se o přípravky, které blokují signální dráhy několika různých kináz. Díky tomu tlumí buněčné dělení a stimulují apoptózu. Následně zpomalují růst tumoru, angiogenezi a další procesy charakteristické pro maligní bujení (Wilhelm et al., 2006).

1.2.2.2 Látky indukující apoptózu

Apoptóza je složitý proces, do kterého je zapojeno mnoho signálních drah (blíže o apoptóze pojednává kapitola 1.4 této práce). Defekty v regulaci apoptózy mohou vést k maligní transformaci dané buňky, metastazování a k rezistenci vůči protinádorové léčbě.

Změny v regulaci apoptózy tedy zpravidla vedou k nežádoucím jevům v organismu. Apoptóza hraje důležitou roli v léčbě nádorových onemocnění a je vhodným cílem mnoha léčebných strategií, jenž mají za úkol cíleně navodit apoptózu v rakovinných buňkách. V současné době se nachází v různých fázích klinických studií mnoho nových molekul cílených na proteiny účastnící se apoptózy. Řada z nich patří mezi antagonisty inhibitorů apoptózy a Bcl2- proteinové rodiny (Wong et al., 2011).

1.2.2.3 Inhibitory angiogeneze

Angiogeneze je proces tvorby nových krevních kapilár. U dospělého jedince je za normálních okolností proliferace endoteliálních buněk velmi nízká. Výjimkou je ženský reprodukční systém a proces hojení ran, kde však angiogeneze podléhá přísné regulaci. Neregulovaná angiogeneze má za následek řadu patologických stavů jako je revmatická artritida, psoriasis (lupénka), diabetická retinopatie a nádorová onemocnění (Hofmanová, 2013).

Nádor nebo metastáza potřebují ke svému růstu přívod živin a kyslíku. Po dosažení kritické velikosti nádoru dojde k hypoxii nádorových buněk, které začnou produkovat angiogenní faktory, především VEGF (vascular endothelial growth factor) a proteolytické enzymy zvané matrixmetaloproteázy (MMP). Také růstové faktory, cytokiny a produkty onkogenů se podílejí na produkci angiogenních faktorů. Tím dojde k deregulaci angiogenního procesu a začnou se vytvářet nové cévy vyživující nádor (Klener, 2013).

Inhibitory angiogeneze brání růstu nových kapilár. Tím dochází k zamezení přívodu krve do nádoru. Nádorové buňky jsou tak zbaveny příjmu živin, což je neslučitelné s jejich další existencí. Léky blokující angiogenezi se staly důležitou součástí léčby mnoha typů rakoviny.

1.2.3. Hlavní typy látek používaných v cílené protinádorové léčbě

Existuje celá řada organických molekul používaných v cílené protinádorové léčbě. Pro zjednodušení je můžeme rozdělit do následujících dvou skupin.

1.2.3.1 *Terapeutické monoklonální protilátky*

Terapeuticky využívané monoklonální protilátky jsou namířené proti specifickým antigenům prezentujícím se na povrchu nádorových buněk. Protilátky mohou účinkovat přímo, tím že zprostředkují zablokování receptoru a svojí agonistickou aktivitou indukují apoptózu, nebo mohou nasměrovat léčivo či cytotoxickou látku do místa působení. Déle pak mohou monoklonální protilátky vyvolat buněčnou cytotoxicitu závislou na protilátkách a regulovat funkci T-lymfocytů. Mají také specifické účinky na cévy nádoru a stroma. Konjugáty tvořené léčivem navázaným na protilátku a imunomodulační protilátky představují nové možnosti léčby lymfomů a solidních nádorů, které dosahují pozoruhodného klinického úspěchu (Scott et al., 2012)

1.2.3.2 *Malé molekuly*

Malé molekuly využívané v cílené protinádorové léčbě jsou látky schopné penetrovat buněčnou membránou a narušit funkci cílové molekuly. Objev a rozvoj přípravků používaných k cílené léčbě rakoviny založených na tomto principu se stal v posledním desetiletí převratem v léčbě nádorových onemocnění. Existuje řada studií popisujících důležitost přírodních zdrojů při získávání těchto látek.

Obrovská strukturní rozmanitost přírodních sloučenin izolovaných z rostlin, mořské flóry a mikroorganismů společně s jejich zajímavou biologickou aktivitou je předurčila k tomu, stát se jedním z největších zdrojů pro objevování a získávání látek s protinádorovými účinky. Až 60% protinádorových léčiv obsahuje přírodní nebo od nich odvozené sloučeniny (Newman & Cragg, 2007). Následující tabulka je přehledem několika významných látek přírodního původu používaných k léčbě nádorových onemocnění.

Tab. I: Přehled významných látek přírodního původu využívaných k léčbě nádorových onemocnění (Gordaliza, 2007).

Název	Mechanismus účinku	Indikace	Izolováno z
Paclitaxel (Taxol®)	Inhibice mitózy díky zamezení depolymerace mikrotubulů	Karcinom ovaria a prsu, pokročilý nemalobuněčný karcinom plic, Kaposiho sarkom související s AIDS	<i>Taxus brevifolia</i>
Docetaxel (Taxotere®)	Inhibice mitózy díky zamezení depolymerace mikrotubulů	Pokročilý karcinom prsu, časný karcinom prsu s postižením nebo bez postižení lymfatických uzlin, karcinom prostaty, metastatický karcinom žaludku, karcinomu hlavy a krku	<i>Taxus baccata</i>
Vinblastine	Inhibice mitózy díky zamezení polymerace mikrotubulů	Hodgkinova choroba, non - Hodgkinův lymfom, karcinom varlat	<i>Vinca rosea</i>
Vincristine	Inhibice mitózy díky zamezení polymerace mikrotubulů	Akutní lymfatická leukémie, zhoubné lymfomy včetně Hodgkinovy choroby a non-Hodgkinova lymfomu, vícečetný myelom, karcinom prsu, malobuněčný karcinom plic, Ewingův sarkom a další	<i>Vinca rosea</i>
Camptothecin (a jeho deriváty topotecan a irinotecan)	Inhibice topoizomerázy I	Karcinom ovaria, konečníku, malobuněčný karcinom plic	<i>Camptotheca acuminata</i>
Podophyllotoxin (a jeho deriváty etoposid, teniposide a etopophos)	Inhibice topoisomerázy II	Wilmsův tumor, non-Hodgkinův lymfom a jiné lymfomy, karcinom plic	<i>Podophyllum</i>

1.3 Sinice a jejich farmaceutický potenciál

Sinice jsou jednoduché autotrofní prokaryotické organismy. Tvoří geneticky a morfologicky velmi rozmanitou skupinu. Je možné je nalézt prakticky všude na naší planetě (Kulasooriya, 2011). Patří mezi nejstarší organismy na Zemi. Jejich stáří je odhadováno na 3,5 miliardy let (Schopf, 1992).

Sinice jsou zodpovědné za dvě klíčové události, které formovaly životní prostředí do podoby, jak ho známe dnes. Díky produkci kyslíku postupně přeměnily původní atmosféru Země na atmosféru vhodnou pro život a tím odstartovali evoluci biodiverzity (Olson, 2006). Za druhé, díky endosymbióze daly řasám a vyšším rostlinám schopnost fotosyntézy (Martin & Müller, 1998).

Mimo to, jsou sinice schopné syntetizovat nepřeberné množství sekundárních metabolitů, jejichž primární význam nebyl doposud uspokojivě objasněn. Staly se však zajímavým zdrojem nových látek s farmakologickým a biotechnologickým potenciálem (Tan 2007, Rastogi & Sinha 2009, Yadav et al., 2011).

1.3.1 Sekundární sinicové metabolity s protirakovinnými účinky

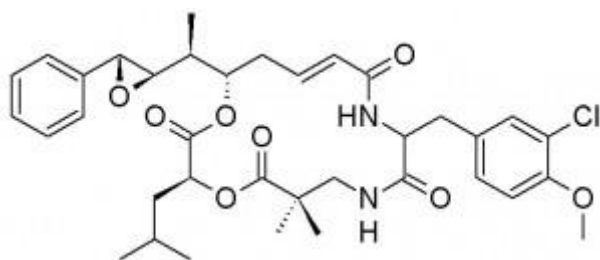
Přivést na trh nové léčivo je dlouhý a nákladný proces, který může trvat 15 až 20 let a stát miliardy dolarů. Důležité je, aby účinné látky bylo možné získávat co možná nejlevnější cestou a zároveň, aby je bylo možné modifikovat pro zvýšení jejich účinnosti a snížení vedlejších účinků léčby, které mohou mít významný vliv na kvalitu života pacientů (Vijayakumar & Menakha, 2015).

Na tradiční mikrobiální producenty léčiv, jako jsou aktinomycety a hyfomycety, byl farmaceutický výzkum zaměřen po celá desetiletí (Omura, 1992). Vzhledem ke snížení rychlosti objevování zajímavých látek v těchto klasických organismech se výzkum zaměřil i na další organismy, např. na sinice, jejichž sekundární metabolity představují zdroj nových látek, mimo jiné i s protinádorovými účinky. Některé z nich jsou již testovány v preklinických a klinických studiích.

1.3.1.1 Cryptophycin

• *Cryptophycin– 1*

Cryptophycin-1 byl izolován ze sinice rodu *Nostoc* počátkem devadesátých let minulého století (Schwartz et al., 1990). Vykazoval vysokou cytotoxicitu vůči rakovinným buněčným liniím. Následně bylo zjištěno, že se váže na mikrofilamenta tubulinu a tím brání buněčnému dělení (Smith et al., 1994). Dokáže rozpoznat rakovinné buňky nádoru včetně solidních tumorů, jako jsou nádory mozku, tlustého střeva, prostaty, slinivky břišní, plic a prsu. Navíc má schopnost ničit i rezistentní nádorové buňky (Rohr, 2006). Cryptophycin je nyní ve fázi I klinických studií. Vzhledem k ne příliš optimálním fyzikálně-chemickým vlastnostem byly vytvořeny jeho analogy pro další klinické studie (Shih & Teicher 2001).



Obr. 1: Struktura cryptophycinu-1.

• *Cryptophycin– 5*

Je to chemický analog cryptophycinu-1, který také vstoupil do klinických studií. Vykazuje však pouze minimální aktivitu (Liang et al, 2005). Ovšem jeho další dva analogy cryptophycin 249 a 309, které mají vyšší stabilitu a rozpustnost ve vodě, jsou považovány za kandidáty pro následující klinické studie.

• *Cryptophycin– 8*

Cryptophycin-8 byl připraven konverzí epoxidové skupiny na cryptophycinu-1 a chlorhydrinu. Je méně účinný než cryptophycin–1, a to přibližně čtyřikrát. Jeho výhodou oproti cryptophycin–1 je však lepší rozpustnost ve vodě, díky které má i větší terapeutickou účinnost (Corbett et al., 1996).

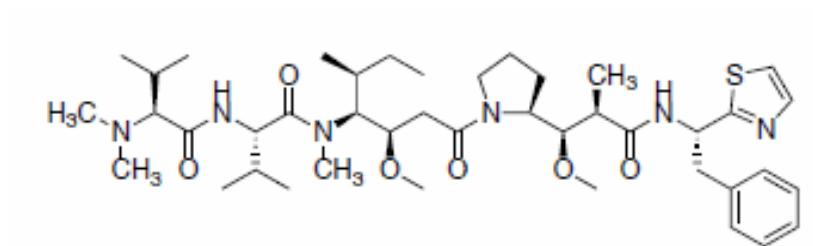
1.3.1.2 Dolastatin

•Dolastatin 10

Dolastatin 10 byl poprvé v malém množství izolován z mořského měkkýše zeje ušatého *Dolabella auricularia* (Pettit et al., 1987). Objasnění jeho chemické struktury trvalo téměř patnáct let, jelikož ze sta kilogramů tohoto mořského živočicha bylo možné izolovat přibližně 1 miligram dolastatinu. Později se však ukázalo, že jeho pravým producentem je sinice *Symploca* sp. sloužící jako potrava tohoto měkkýše.

Tento pentapeptid zamezuje dělení nádorových buněk. Váže se na tubulin a tím zabraňuje buňce přijít z G2 do M fáze buněčného cyklu. Také indukuje apoptózu prostřednictvím mechanismu zahrnujícího antiapoptické bcl-2 proteiny, jejichž nadměrná exprese je běžná u mnoha typů rakoviny.

V devadesátých letech minulého století vstoupil Dolastatin 10 do klinických studií a dostal se až do fáze II klinického hodnocení, kde však došlo k přerušení testů z důvodu periferní neuropatie u 40% pacientů (Pitot et al., 1999) a nedostatečného efektu u lidí s adenokarcinomem (Vaishampayan et al., 2000).



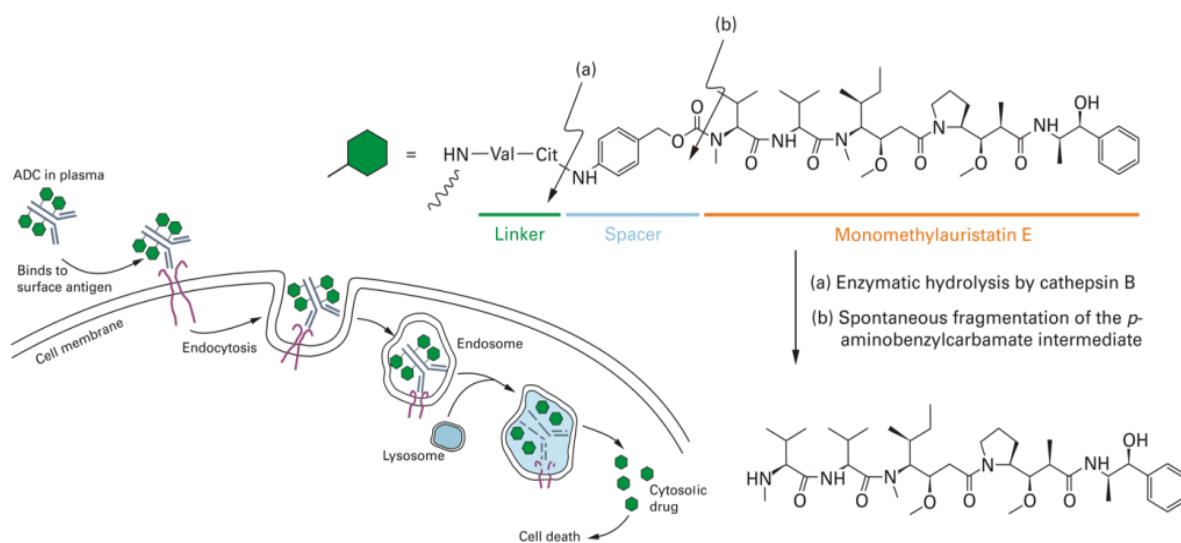
Obr. 2: Struktura Dolastatinu 10.

•*Monomethyl auristatin E*

Monomethyl auristatin E je prozatím nejvýznamnější látka odvozená od dolastatinu 10. Je součástí konjugátu protilátky a léku – brentuximab vedotin (Adcetris®). Adcetris® byl v roce 2011 v USA, koncem roku 2012 v Evropské unii a na počátku roku 2013 ve Velké Británii, schválen pro léčbu CD30 pozitivních lymfoproliferačních poruch, jako je Hodgkinův lymfom.

Brentuximab vedotin se skládá ze tří částí a to: monoklonální protilátky anti-CD30, cytostatika monomethylu auristatinu E a spojovací části. Konjugát se váže na antigen CD30 a cytostatikum proniká do buňky. V lysozomu dochází k odštěpení monomethylu auristatinu E, který se pak váže na tubulin. Tím narušuje mikrotubulární buněčnou síť, iniciuje zástavu buněčného cyklu a vede ke smrti nádorové buňky (Younes et al., 2012).

V současné době je tato látka předmětem 37 klinických studií ve fázi 0 až IV zejména v USA a dalších šesti studiích nacházejících se ve fázi II až IV ve státech Evropské unie (Newman & Gragg, 2014).



Obr. 3: Struktura a mechanismus účinku brentuximab vedotinu (Niedermeyer, 2012).

1.4 Apoptóza

Apoptóza je významný biologický děj. Fyziologická apoptóza je nezbytná pro řádný vývoj mnohobuněčného organismu v prenatální i postnatální fázi. Zodpovídá například za odstranění tkáně mezi prsty v embryogenezi, odstranění nadbytečných neuronů při vytváření synapsí v mozku, uvolňování endometria na počátku menstruace a mnohé další.

Deregulace apoptózy může v lidském organismu vést k celé řadě nemocí. Ty mohou souviset jak s nadměrnou apoptózou (neurodegenerativní nemoci, kardiovaskulární choroby apod.) nebo naopak s necitlivostí na signály k apoptóze, příkladem jsou nádorová onemocnění.

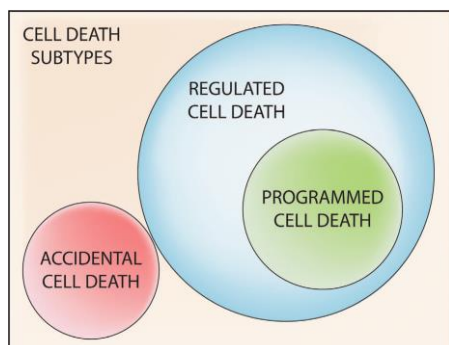
Apoptóza může být také indukována patologickým podnětem. Toho se využívá při chemoterapii nádorů. Jako chemoterapeutika se používají látky, které mají cytotoxický efekt na nádorové buňky a jsou schopné vyvolat apoptózu, a tím zamezit růstu a šíření nádoru (Wong, 2011).

1.4.1. Buněčná smrt

Lidské tělo je tvořeno obrovským množstvím buněk, které se během života přirozeně dělí, ale i umírají. Pokud jsou buňky vystaveny extrémním fyzikálním, chemickým či mechanickým podnětům, umírají bez jakékoliv regulace v důsledku bezprostředního strukturního poškození. Poté hovoříme o náhodné buněčné smrti „*accidental cell death*“. Do této kategorie spadá nekróza. Při tomto typu smrti se buňky nekontrolovaně rozpadnou, prasknou a vylijí svůj obsah do okolí. Nekróza způsobuje potenciálně nebezpečnou zánětlivou reakci (Berghe, 2013).

Oproti klasické nekróze buňky v lidském těle umírají také takzvanou regulovanou smrtí. Regulovaná buněčná smrt se může vyskytovat jako součást fyziologických dějů a vývoje mnohobuněčného organismu nebo jako reakce na změny extracelulárního nebo intracelulárního mikroprostředí. Na základě biochemických kritérií, která ji definují, rozeznáváme jednotlivé typy (viz tabulka č. II níže). Apoptóza je typ regulované potažmo programované buněčné smrti (Galluzzi et al., 2015).

Nejnovější pohled na dělení typů buněčné smrti představuje schéma na následujícím obrázku.



Obr. 4: Typy buněčné smrti (Galluzzi et al., 2015).

1.4.2. Klasifikace základních typů řízené buněčné smrti

V posledních letech nomenklatura jednotlivých typů buněčných smrtí dostala výrazných změn. Ukázalo se, že klasifikace na základě morfologických změn buňky je značně nepřesná. Zejména pak rozvoj na poli biochemie a molekulární biologie umožnil klasifikovat buněčnou smrt mnohem přesněji.

Morfologické znaky mohou být značně uniformní pro různé typy letálních kaskád, a tedy zavádějící. Biochemické metody nám v takovém případě dají přesnější informace o probíhajícímu typu buněčné smrti. Oproti klasickému mikroskopu však vyžadují sofistikované vybavení laboratoře. Musíme být také opatrní při interpretaci výsledků. Je důležité si uvědomit, že jeden samostatný biochemický ukazatel není jednoznačným výstupem, podle kterého by šlo klasifikovat buněčnou smrt. Na tento problém je třeba nahlížet komplexně a použít co možná nejširší škálu dostupných metod k určení a popsání typu buněčné smrti.

Nomenclature cell death committee (NCCD) pravidelně shrnuje a reviduje dostupné poznatky o buněčné smrti a vytváří doporučení pro užívání pojmů. Přehled klasifikace způsobů řízené buněčné smrti můžete vidět v tabulce níže (Galluzzi et al., 2012).

Tab. II: Funkční klasifikace způsobů řízené buněčné smrti (převzato z: Galluzzi et al, Molecular definitions of Cell death subroutines, 2012, přeloženo, upraveno)

Typ buněčné smrti	Hlavní biochemické znaky	Závislost na kaspázách
Anoikis	Omezení funkce EGFR Inhibice ERK1 Nadměrná exprese BIM Aktivace kaspázy-3 (-6,-7)	ano
Autofagická buněčná smrt	Lipidace MAP1LC3 Degradace SQSTM1	ne
Na kaspázách závislá vnitřní dráha apoptózy	MOMP Nevratná ztráta Dcm	ano
Na kaspázách nezávislá vnitřní dráha apoptózy	Uvolnění IMS proteinů Inhibice dýchacího řetězce	ne
Kornifikace	Aktivace transglutaminázy Aktivace kaspázy-14	ano
Entóza	Aktivace RHO Aktivace ROCK1	ne
Apoptóza indukovaná přes „death receptors“	Signalizovaná přes „death receptor“ Aktivace kaspázy-8 (-10) Štěpení BID a MOMP Aktivace kaspázy-3 (-6,-7)	ano
Apoptóza indukovaná přes „dependence receptors“	Signalizovaná přes „dependence receptor“ Aktivace PP2A Aktivace DAPK1 Aktivace kaspázy-9 Aktivace kaspázy-3 (-6,-7)	ano
Mitotická katastrofa	Aktivace kaspázy-2 (pouze v některých případech) Aktivace TP53 nebo TP73 (pouze v některých případech) Zastavení mitózy	ne
Nekroptóza	Inhibice kaspáz Aktivace NADH oxidázy Aktivace RIP1 a/nebo RIP3	ne
Netóza	Inhibice kaspáz Aktivace NADH oxidázy Uvolnění NET (v některých případech)	ne
Parthanatóza	Zprostředkovaná PARP1 Akumulace PAR Nevratná ztráta Dcm Vyčerpání ATP a NADH Navázání PAR na AIF a AIF	ne
Pyroptóza	Aktivace kaspázy-1 Aktivace kaspázy-7 Sekrece IL-1b a IL-18	ano

1.4.4 Morfologie a molekulární mechanismy apoptózy

Buňka, která prochází apoptózou, se zmenšuje a kondenzuje. Cytoskelet je odbourán, jaderný obal se rozkládá a jaderná DNA je fragmentována na malé úseky. Ke změnám dochází i na povrchu apoptické buňky, ve struktuře buněčné membrány. Buněčný povrch je změněn tak, že svým složením dává signál pro fagocytózu dané apoptické buňky (sousedními buňkami nebo makrofágy), a to ještě dříve, než dojde k vylití jejího obsahu (Alberts et al., 1998). Nedochozí k poškození sousedních buněk a zánětlivé reakci, což je výhodné například v cílené protinádorové léčbě.

Tab. III: Základní porovnání nekrózy a apoptózy (Berghe, 2013).

Nekróza	Apoptóza
Způsobuje zánětlivou reakci	Nezpůsobuje zánět
Netvoří vezikuly	„Blebbing“ membrány, rozpad na apoptická tělíska
Není potřeba energie	Je potřeba energie ve formě ATP
DNA není kondenzovaná	Kondenzace chromozomální DNA

Apoptózy se mimo jiné účastní dvě hlavní proteinové rodiny, a to Bcl-2 (B-cell lymfoma 2) a kaspázy (*CASPASEs Cystein-dependent ASP-artate-specific proteASEs*), které zprostředkovávají realizaci apoptózy. Apoptické kaspázy mohou být dále rozděleny na iniciační (kaspáza-2,-8,-9,-10) a efektorové (kaspáza-3,-6,-7).

Kaspázy jsou exprimovány v neaktivní formě jako tzv. prokaspázy. Funkční kaspázy jsou tetrametry složené ze dvou malých a dvou velkých podjednotek. Iniciační kaspázy jsou aktivovány většinou v multiproteinových komplexech jako je např. DISC, a následně funkční iniciační kaspázy aktivují efektorové, případně další proteiny. Kromě apoptózy hrají některé kaspázy roli například v zánětlivé reakci (Duprez, 2009).

Cesta aktivace apoptózy můžeme být vnitřní (intrinsic pathway) nebo vnější (extrinsic pathway).

1.4.4.1 Na kaspázách závislá vnitřní dráha apoptózy

Vnitřní dráha je aktivována různými stresovými stimuly. Patří sem poškození DNA, vznik reaktivních forem kyslíku, stres endoplasmatického retikula či další cytotoxické poškození. Pokud v buňce vlivem stresu převáží signály pro sebedestrukci, aktivuje se vnitřní dráha apoptózy, která zahrnuje funkční změny mitochondrie.

Strukturní změny mitochondrie jsou řízeny Bcl-2 genovou rodinou. Za normálních podmínek antiapoptické proteiny rodiny Bcl-2 udržují mitochondriální integritu tím, že interagují s proapoptickými členy rodiny Bcl-2 (Bax a Bak), které se nacházejí v mitochondriální membráně.

Během buněčného stresu jsou však aktivovány Bcl-2-homology 3 (BH3) a působí proti antiapoptickým Bcl-2 proteinům. V důsledku toho dochází k zamezení inhibice Bax a / nebo Bak proteinů, což vede k jejich oligomeraci a vytvoření kanálu, jehož prostřednictvím cytochrom c (cyt c) proniká do cytosolu. Poté cyt c společně s Apaf-1 a dATP vytváří superkomplex, tzv. apoptosom. Ten je schopný navázat prokaspázu-9, která se po navázání aktivuje. Aktivní kaspázy-9 štěpí a aktivují efektorové kaspázy-3, -6 a -7, které mají zásadní význam pro průběh exekutivní fáze apoptické smrti. Mimo to, další proapoptické proteiny uvolněné z mitochondrie přispívají k sebevražednému mechanismu buňky (Duprez, 2009).

1.4.4.2 Na kaspázách nezávislá vnitřní dráha apoptózy

Je známo, že vnitřně indukovaná apoptóza může probíhat i bez kaspázové aktivity. Hlavní funkci v tomto typu aktivace apoptózy mají apoptózu indukující faktor (AIF) a endonukleáza G (ENDOG), kteří zprostředkovávají fragmentaci jaderné DNA. Za zmínku ještě stojí serinová proteáza HTRA2, která také přispívá k na kaspázách nezávislé apoptóze štěpením široké škály buněčných substrátů, včetně cytoskeletárních proteinů (Galluzzi et al., 2012). Vedle kaspáz jsou i další proteázy, které se mohou účastnit apoptózy, zejména pak katepsiny a kalpainy (Smith & Schnellmann, 2012).

1.4.4.3 Vnější dráha aktivace apoptózy přes „death receptors“

Vnější cesta aktivace apoptózy přes receptory smrti (angl. „death receptors“) začíná tehdy, když se k membránovému receptoru smrti naváže signální molekula – anglicky „death ligand“. Rozeznáváme několik receptorů stimulující buněčnou smrt, nejznámější je rodina TNF (tumor necrosis faktor), kam patří TNF receptor 1 (TNFR1) a Fas receptor. Jejich ligandy se pak nazývají TNF a Fas ligand. (Hengartner, 2000).

Tyto receptory smrti mají intracelulární doménu, která se nachází v cytoplasmě a váže další proteiny jako TNF receptor-associated death domain (TRADD) a Fas-associated death domain (FADD), stejně tak jako prokaspázu-8 (nebo -10) (Schneider & Tschopp, 2000). Celý tento komplex je nazýván death-inducing signalling complex (DISC) (O'Brien & Kirby, 2008). DISC poté zahájí aktivaci prokaspázy-8 a přemění ji na iniciační kaspázu-8, která buď rovnou aktivuje exekutivní kaspázu-3 (Wong, 2011) nebo zprostředkuje štěpení Bid, který putuje do mitochondrie a indukuje permeabilizaci vnější mitochondriální membrány. (Billen et al., 2008).

1.4.4.4 Vnější dráha aktivace apoptózy přes „dependence receptors“

Molekulární cesta přes „dependence receptors“ byla popsána poměrně nedávno. Je spojena s rychlou aktivací exekutivních kaspáz, zejména kaspázou 3. Na rozdíl od „death receptors“ se signál pro apoptózu nepřenáší, pokud je ligand navázaný, ale naopak pokud není přítomen. Některé „dependence receptors“, jako Patched nebo DCC při absenci svých ligandů interagují s cytoplasmatickým proteinem DRAL za účelem aktivace kaspázy 9 (Mille et al., 2009).

Další „dependence receptor“, UNC5B, zodpovídá za odstranění netrinu -1 pomocí sestavení signálního komplexu který zahrnuje proteinfosfatázu 2A (PP2A) a kinázu 1 (DAPK1) (Guenebeaud et al., 2010). Tato multiproteinová interakce může vést k defosforylaci DAPK zprostředkované pomocí PP2A, která má proapoptický potenciál (Bialik & Kimchi, 2006).

1.4.4.5 Exekutivní fáze apoptózy

Vnější a vnitřní cesta apoptózy vede nejčastěji k aktivaci exekutivní kaspázy 3. Kaspáza 3 štěpí inhibitor kaspázově aktivované deoxyribonukleázy, která je zodpovědná za apoptické změny jádra (kondenzace chromatinu a rozpad jaderné DNA). Kaspázy navíc indukují také štěpení proteinkináz, cytoskeletárních proteinů a opravných proteinů DNA. Mají vliv na cytoskelet, buněčný cyklus a signální kaskády. To vše přispívá k morfologickým změnám typickým pro apoptickou buňku a k finálnímu rozpadu na apoptická tělíčka (Ghobrial et al., 2005).

2. Cíle práce

- 1) Stanovit cytotoxicitu surových extraktů a chromatografických frakcí získaných ze tří kmenů *Nostoc sp.* vůči lidským rakovinným buněčným liniím (HeLa, PaTu).
- 2) Na vybraných frakcích stanovit biochemické znaky buněčného poškození typické pro programovanou buněčnou smrt (indukce efektorových kaspáz 3/7, stav jádra, stav mitochondrie).
- 3) Pokusit se detekovat aktivní frakci pomocí HPLC-MS technik a izolovat látku zodpovědnou za efekt.

3. Materiály a metody

3.1 Chemikálie

- **DMEM** (Gibco® média, Life Technologies)
- **RPMI** (Gibco® média, Life Technologies)
- **FBS** – fetální bovinní sérum (Gibco®, Life Technologies)
- **Antibiotika – antimykotika** (Gibco®, Life Technologies)
- **L-glutamin** (Gibco®, Life Technologies)
- **PBS** - fosfátový pufr (Sigma- Aldrich)
- **Trypsin-EDTA bez fenolové červeně** (Gibco®, Life Technologies)
- **MTT** - 3-[4,5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid (Invitrogen Molecular Probes®, Life Technologies)
- **DMSO** - dimethylsulfoxid (Scharlau)
- **Caspase-Glo® 3/7 Assay kit** (Promega)
- **MitoTracker® Green FM** (Invitrogen – Molecular Probes®, Life Technologies)
- **Hoechst 33342** (Invitrogen – Molecular Probes®, Life Technologies)
- **Methanol LC-MS** (Scharlau)

3.2 Metody

3.2.1 Extrakce sinicové biomasy- příprava surového extraktu

Ke 200 mg lyofilizované sinicové biomasy jsem přidala mořský písek a 3 ml 70% methanolu. Směs byla řádně zhomogenizována a pomocí dalších 7 ml 70% methanolu převedena do zkumavky, kde byla ponechána nejméně jednu hodinu. Poté byla směs zcentrifugována (10min, 4500 RPM), získaný supernatant jsem převedla do nové zkumavky a následně odpařila na odstředivé odparce. Sušinu jsem rozpustila v 1 ml 100% methanolu a pomocí mikropipety převedla do vialky o objemu 2 ml, ve které byl extrakt uchovávan v mrazicím boxu (-80 °C).

Pro extrakci sinicové biomasy standardně používáme 70% methanol, jelikož je to typ universálního rozpouštědla, který je pro naše účely nejvýhodnější. Díky němu má surový extrakt relativně nízký obsah pigmentů, a současně vysoký obsah sekundárních metabolitů - zejména peptidů.

3.2.2 HPLC-MS analýza surových extraktů

Surový extrakt byl analyzován pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (Agilent 1100) s DAD (diode array detector) a hmotností detekcí (Agilent 1100 MDS- Trap). Separace látek probíhala na koloně Agilent Zorbax XDB-C8 (150 × 4,6 mm; 5 μm) za užití systému voda (A)/methanol (B) (oboje obsahující 0,1 % HCOOH) jako mobilní fáze.

Tab. IV: Gradient pro HPLC-MS analýzu surových extraktů.

Čas [min]	% A	% B	Průtok [ml.min ⁻¹]
0	70	30	0,6
1	70	30	0,6
25	0	100	0,6
35	0	100	0,6
40	70	30	0,6

3.2.3 Frakcionace surového extraktu

U surových sinicových extraktů jsem dle předchozí HPLC-MS analýzy navrhla frakcionaci. Frakcionace probíhala dle retenčních časů a UV záznamu. Jednotlivé frakce jsem jímala do zkumavek, odpařila a zakoncentrovala do objemu rozpouštědla odpovídajícímu frakcionovanému extraktu.

Frakce byly testovány na buněčných liniích za účelem určení jejich cytotoxicity. Ty frakce, které měly zajímavý cytotoxický efekt (předvybrány na základě MTT testu, zvýšené kaspázové aktivity nebo morfologie buněk připomínající apoptózu), byly znovu refrakcionovány pomocí HPLC-HRMS. Tímto postupem byly získány čisté biologicky aktivní sloučeniny (kmen 33, látka „2504“ (m/z)).

Izolace látky „2504“ (m/z) ve větším množství pak proběhla pomocí preparativní chromatografie. Tuto izolaci provedl Jan Hájek z laboratoře řasové biotechnologie, Centra Algotech, Mikrobiologického ústavu AV ČR- vědecké pracoviště Třeboň.

3.2.4 HPLC-HRMS analýza surových extraktů, refrakcionace aktivních frakcí, ověření čistoty frakcí

Pro analýzy byl použit kapalinový chromatograf Thermo Dionex Ultime 3000 (DAD detekce) spojený s hmotnostním spektrometrem Bruker Impact HD. Separace látek probíhala na koloně Phenomenex Kinetex ($150 \times 4,6$ mm; $2,6 \mu\text{m}$) za použití systému voda (A)/acetonitril (B) (obojí obsahující 0,1 % HCOOH) jako mobilní fáze.

Tab. V: Gradient pro HPLC-HRMS analýzu.

Čas [min]	% A	% B	Průtok [$\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$]
0	85	15	0,6
1	85	15	0,6
20	0	100	0,6
25	0	100	0,6
30	85	15	0,6

3.2.5 Buněčné linie

Testy cytotoxicity jsem prováděla na dvou typech lidských rakovinných buněčných linií, PaTu a HeLa. PaTu buněčná linie, odvozená od adenokarcinomu slinivky břišní, byla získána darem od MUDr. Matěje Kočíka z pražské Kliniky transplantační chirurgie IKEM. HeLa buňky byly poskytnuty s laskavým svolením pana profesora Jana Kopeckého z Parazitologického ústavu Akademie věd České republiky.

3.2.5.1 Kultivace buněčných linií

Buňky byly kultivovány v inkubátoru za konstantní teploty 37 °C v atmosféře s obsahem 5% CO₂. Ke kultivaci byla použita média DMEM (PaTu) a RPMI (HeLa) v obou případech s přídatkem 5% FBS, 1% L-glutaminu, 1% směsi antibiotik a antitykotik.

Pasáž buněk byla prováděna přibližně každé 3 dny. Vzhledem k tomu, že se jedná o adherentní buněčné linie (HeLa i PaTu), jsem kulturu po slití starého média opláchla PBS pufrem a následně přidala trypsin, díky němuž došlo k uvolnění buněk od povrchu i od sebe navzájem. Poté jsem část buněk přenesla do nové kultivační nádoby, kterou jsem doplnila novým médiem na požadovaný objem. Veškerou manipulaci s buněčnými kulturami jsem prováděla sterilně.

3.2.5.2 Práce s buněčnými liniemi

Všechny experimenty s buněčnými kulturami jsem prováděla v 96-ti jamkových kultivačních destičkách. Pro měření aktivity kaspáz jsem použila bílé destičky, pro MTT test a časosběrnou mikroskopii byly použity transparentní mikrodestičky. Pro účely fluorescenční mikroskopie (zvětšení 100x) jsem buňky sadila na mikrodestičku se skleněným dnem.

Různé typy experimentů často vyžadovaly různý počet buněk na jamku. Požadovanou koncentraci buněk jsem stanovila počítáním v Bürkerově komůrce. Buňky jsem sadila vždy den před samotným experimentem, standardně 2×10^4 buněk na jamku (200 μ l).

3.2.6 MTT test a hodnocení cytotoxicity

Cytotoxicitu surových sinicových extaktů ke studovaným buněčným liniím jsem stanovila pomocí MTT testu. Princip metody spočívá v redukci žlutého rozpustného 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný fialový formazan. Množství vzniklého formazanu pak odpovídá množství metabolicky aktivních buněk. Krystalky formazanu jsou rozpustné v DMSO a výsledné zbarvení je možné měřit spektrofotometricky, hodnota absorpance pak odpovídá množství živých buněk. (Mosmann, 1983).

Na předem připravenou mikrotitrační destičku s buňkami jsem do testovacích jamek přidala vždy v triplikátech 10 μ l expozičního roztoku. Ten se skládal z testovaného surového extraktu (případně frakce), který byl odpařen pod dusíkem do sucha a následně rozpuštěn v methanolu a kultivačním médiu tak, aby výsledná koncentrace methanolu v jamce nepřesáhla 1%. Ke kontrolním jamkám jsem také přidala 10 μ l expozičního roztoku (bez obsahu extraktu). Panel byl umístěn do inkubačního boxu na požadovanou dobu (24, 48, 72 či 96 hodin). Po uplynutí této doby jsem do jamek s buňkami přidala 10 μ l MTT (o koncentraci 4 mg MTT na 1 ml PBS). Destička byla další 4 hodiny inkubována a následně stočena (2000 rpm, 10 minut).

Médium z destičky jsem poté vyklepla a vzniklé formazanové krystalky rozpustila v 200 μ l DMSO na jamku. Absorbance byla naměřena na spektrofotometru Tecan SUNRISE při dvou vlnových délkách, 590 nm (hlavní) a 640 nm (referenční).

Z naměřených hodnot jsem zprůměrovala vždy triplikáty pokusných jamek a triplikáty kontrol. Poměr testovacích jamek ke kontrolám představuje míru viability (či inhibice), kterou jsem vyjádřila v procentech. U experimentů, kde je víc jak jedno opakování také udávám směrodatnou odchylku.

3.2.7 Hodnocení aktivity efektorových kaspáz 3/7

K hodnocení aktivity efektorových kaspáz 3 a 7 byl použit kit Caspase-Glo® 3/7 Assay. Jedná se o citlivou luminiscenční metodu. Kit obsahuje termostabilní luciferázu v pufru a proluminiscenční substrát, který je specificky štěpen (DEVD sekvence) kaspázami 3/7 pokud jsou přítomny v aktivní formě. Tímto štěpením je uvolněn substrát pro luciferasu (aminoluciferin), která reaguje a vzniká měřitelný luminiscenční signál úměrný aktivitě kaspáz.

Postup nasazování buněk na destičku, jejich inkubace a přidání expozičního roztoku byl obdobný jako u MTT testu. Panel byl umístěn do inkubačního boxu na požadovanou dobu (24, 48, či 72 hodin). Po uplynutí této doby byl do jamek s buňkami přidán kit Caspase-Glo® 3/7 Assay dle pokynů výrobce a byla změřena luminiscence pomocí spektrofotometru (Tecan Infinite 200).

Paralelně s destičkami pro měření kaspáz, jsem připravila i transparentní destičku (totožný pokus) na časoběrný mikroskop. Díky tomu bylo možné zjistit rychlost dělení pro kontrolní a testovací jamky a tedy kolik buněk se v jamce nacházelo v době měření luminiscence. Naměřené hodnoty aktivity kaspáz (RLU, relativní luminiscenční jednotky) v daném čase jsem přepočítala na jednu buňku. Opět jsem měla pokusné a kontrolní jamky v triplikátech.

3.2.8 Fluorescenční barvení

Fluorescenční mikroskopie využívá vlastnosti některých látek (fluoroforů) vyzařovat (emitovat) světlo pozměněné vlnové délky po ozáření (excitaci) světlem určité vlnové délky. Excitační a emisní maxima použitých fluorescenčních sond byly následující: Hoechst 33342 (350/461) nm, Mitotracker Green (490/516) nm.

3.2.8.1 Barvení jádra

K obarvení jaderné DNA byl použit Hoechst 33342 (3 μ l na jamku, inkubace 45 minut) Výhodou tohoto barvení je, že se buňky nemusí fixovat, ale lze použít na živé buňky. To je dáno jeho vyšší lipofilitou, díky čemuž prochází i neporušenými biomembránami. Hoechst 33342 může být použit k zobrazení jádra v apoptických buňkách či při studiu buněčného cyklu. U apoptických buněk má jádro typickou morfologii – dochází ke kondenzaci chromatinu a fragmentaci jádra.

3.2.8.2 Barvení mitochondrií

K barvení mitochondrií byl použit MitoTracker® Green FM. Barva se stává fluorescenční, když se akumuluje v lipidovém prostředí mitochondrie bez ohledu na její membránový potenciál a je poměrně fotostabilní.

Buňkám určeným k experimentu bylo odebráno médium a nahrazeno 100 µl média s MitoTrackerem® Green FM (100 nM). Toto médium bylo bez přidaného FBS, antibiotik, antimykotik a L-glutaminu. Po hodinové inkubaci ve tmě bylo médium opět nahrazeno standardním médiem bez MitoTracker® Green FM. Mitochondrie byly pozorovány na mikroskopu imerzním objektivem (zvětšení 100×).

3.2.9 Časoběrná mikroskopie

Surové extrakty, frakce a izolovaná látka byly testovány pro inhibici buněčné proliferace a cytotoxické účinky na buňkách také za použití časoběrné mikroskopie.

Pro veškerou mikroskopii jsem používala invertovaný mikroskop ZEISS Axio Observer Z.1, který je vybaven komorou pro udržení stálé teploty (37 °C) a přívodem CO₂. Mikroskop má motorizovaný (automatizovaný) stolek a jednotku (modul) pro kontrolu teploty. V každé jamce je možné nastavit jedno i více mikroskopických polí, které se bude po určitou dobu (24, 48, 72 či 96 hodin) a ve zvoleném časovém intervalu sledovat. Výsledkem je video, na kterém můžeme pozorovat změny v morfologii buněk, jejich dělení či smrt a zároveň mít informace o délce trvání těchto dějů.

4. Výsledky

Sinicové kmeny, se kterými jsem pracovala, byly vybrány na základě předchozího testování, které proběhlo v laboratoři řasové biotechnologie Centra Algatech, Mikrobiologického ústavu AV ČR- vědecké pracoviště Třeboň. Jednalo se o tři kmeny půdních sinic rodu *Nostoc*, v této práci označované číslem ve sbírce: kmen 33 (*Nostoc muscorum* CALU 456), 91 (*Nostoc* sp. NMB-21), 113 (*Nostoc* sp. Mm). Byla posuzována cytotoxicita surového sinicového extraktu a frakcí vůči lidským rakovinným buněčným liniím HeLa a PaTu, se zaměřením na pankreatickou linii PaTu.

Kmen 113 byl vybrán pro další studie, protože jeho surový extrakt vykazoval v porovnání s HeLa selektivní toxicitu vůči PaTu buňkám. Důvodem výběru kmenů 33 a 91 byl fakt, že jejich surový extrakt způsoboval výrazné zvýšení hladiny kaspáz 3/7 u HeLa buněk.

Výsledky, které nejsou uvedené se směrodatnou odchylkou, byly získány během jednoho experimentu na základě zprůměrování tří hodnot naměřených u testovacích jamek. Výsledky se směrodatnou odchylkou vznikly jako průměr takovýchto tří nezávislých pokusů. Uvedená viabilita je poměr viability testovaných buněk vůči kontrolám vyjádřený v procentech.

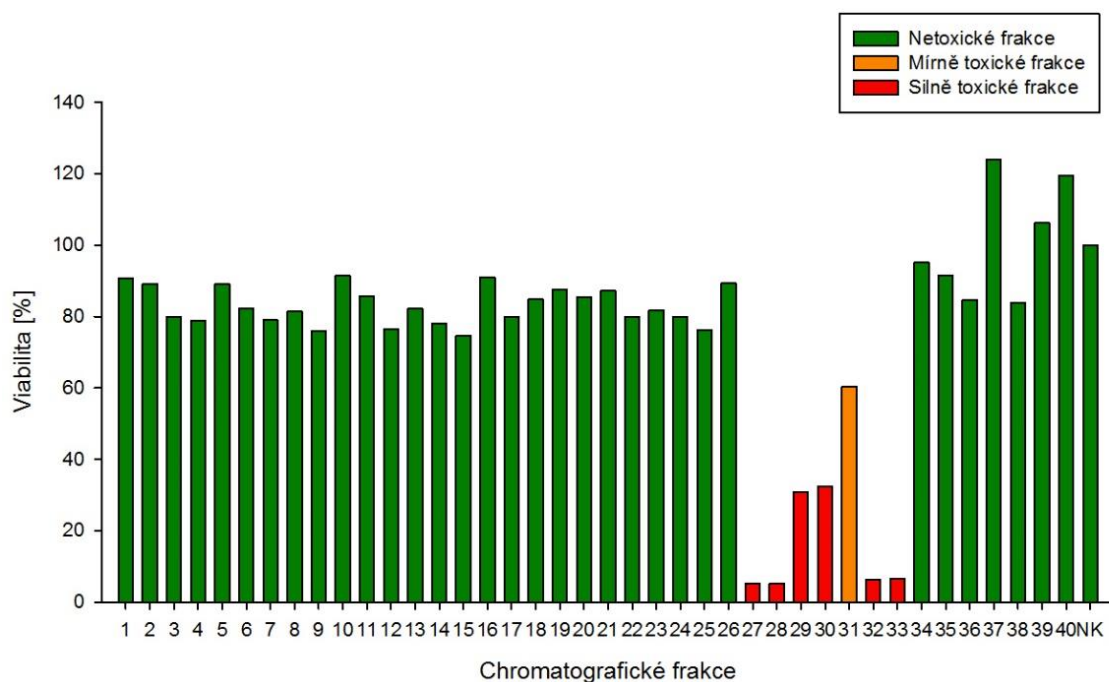
4.1 Kmen 113

Celkový extrakt a jednotlivé frakce pro stanovení cytotoxicity tohoto kmene byly připraveny z lyofilizované biomasy (skladované v temnu a suchu) staré více jak sedm let. Protože výsledky testů viability, které jsem provedla, neodpovídaly předchozím datům, pro které byl kmen předvybrán, tj. že surový extrakt vykazoval specificitu vůči PaTu buněčné linii, rozhodli jsme se napěstovat novou biomasu a tu znovu testovat.

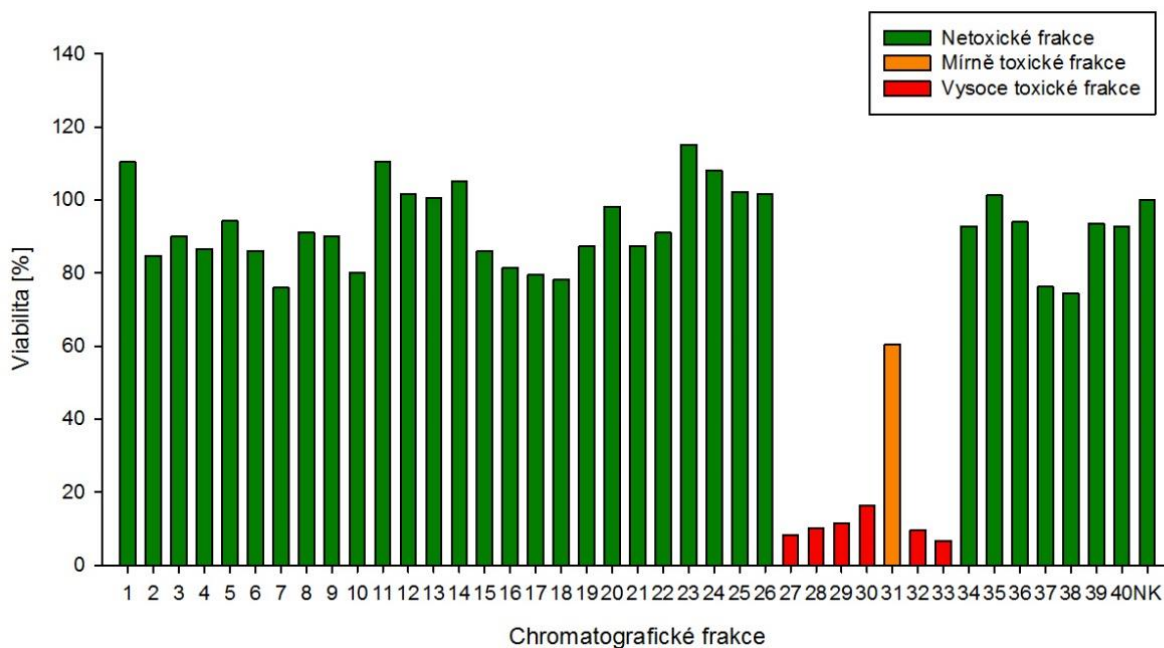
4.1.1 Kmen 113 – stará biomasa

Pro testy na buněčných liniích bylo připraveno 40 minutových chromatografických frakcí ze surového extraktu tohoto kmene. Stanovila jsem jejich cytotoxicitu k liniím HeLa a PaTu po 72 hodinové expozici pomocí MTT testu a současně jsem provedla i ohodnocení morfologie buněk podle snímků získaných pomocí časosběrného mikroskopu.

Výsledky MTT testu pro frakce 1-40 z extraktu staré biomasy kmene 113 jsou zobrazeny na obrázcích 5 a 6. Na ose X jsou jednotlivé frakce, označené čísly 1 až 40. Toto označení odpovídá retenčnímu času frakce v minutách. Změnu morfologie buněk jsem rozdělila do tří kategorií, čemuž odpovídají tři barvy v legendě grafu. Buňky inkubované v netoxických frakcích byly morfologií i rychlostí dělení srovnatelné s kontrolními buňkami, u mírně toxických frakcí bylo zpomaleno dělení. Silně toxické frakce způsobovaly buněčnou smrt. Výsledky cytotoxicity jednotlivých frakcí vůči HeLa i PaTu buněčné linii jsou obdobné. Frakce 1-26 a 34-40 nejsou cytotoxické (viabilita buněk $\pm 80\%$ a vyšší), frakce 27, 28, 32, 33 mají toxický nebo mírně toxický efekt na obě rakovinné linie. Jediný rozdíl je možné pozorovat u frakcí 29 (viabilita PaTu 36%, HeLa 18%) a 30 (viabilita PaTu 38%, HeLa 16%), kdy citlivější je HeLa linie oproti PaTu.

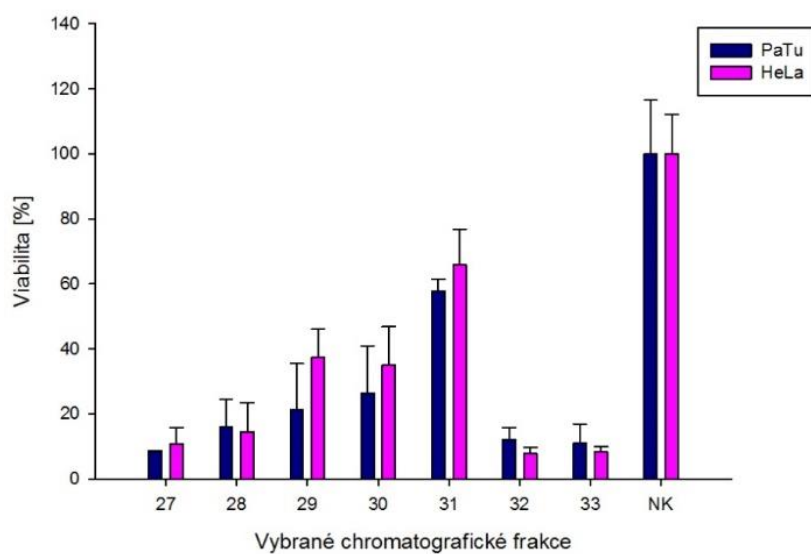


Obr. 5: Viabilita PaTu buněk po 72 hodinové inkubaci s chromatografickými frakcemi surového extraktu kmene 113 – stará biomasa. (NK- negativní kontrola)

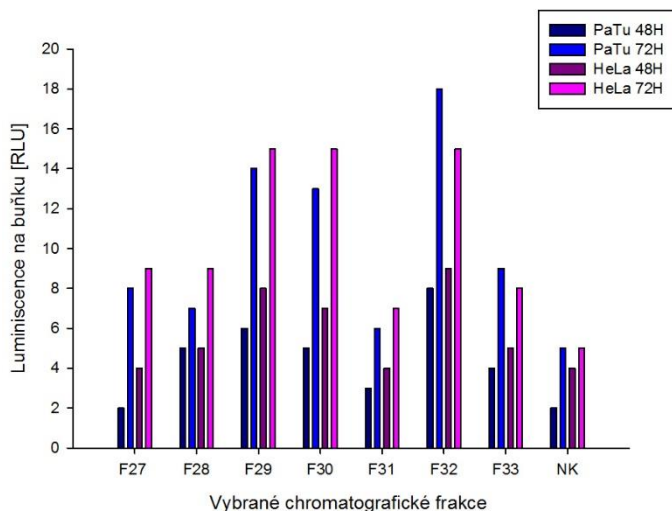


Obr. 6: Viabilita HeLa buněk po 72 hodinové inkubaci s chromatografickými frakcemi surového extraktu kmene 113 – stará biomasa.

Na základě výsledků z MTT testu a podle morfologie buněk byly k dalším experimentům vybrány chromatografické frakce 27, 28, 29, 30, 31, 32 a 33. S těmito frakcemi jsem mimo MTT testu provedla ještě měření aktivity efektorových kaspáz 3/7.

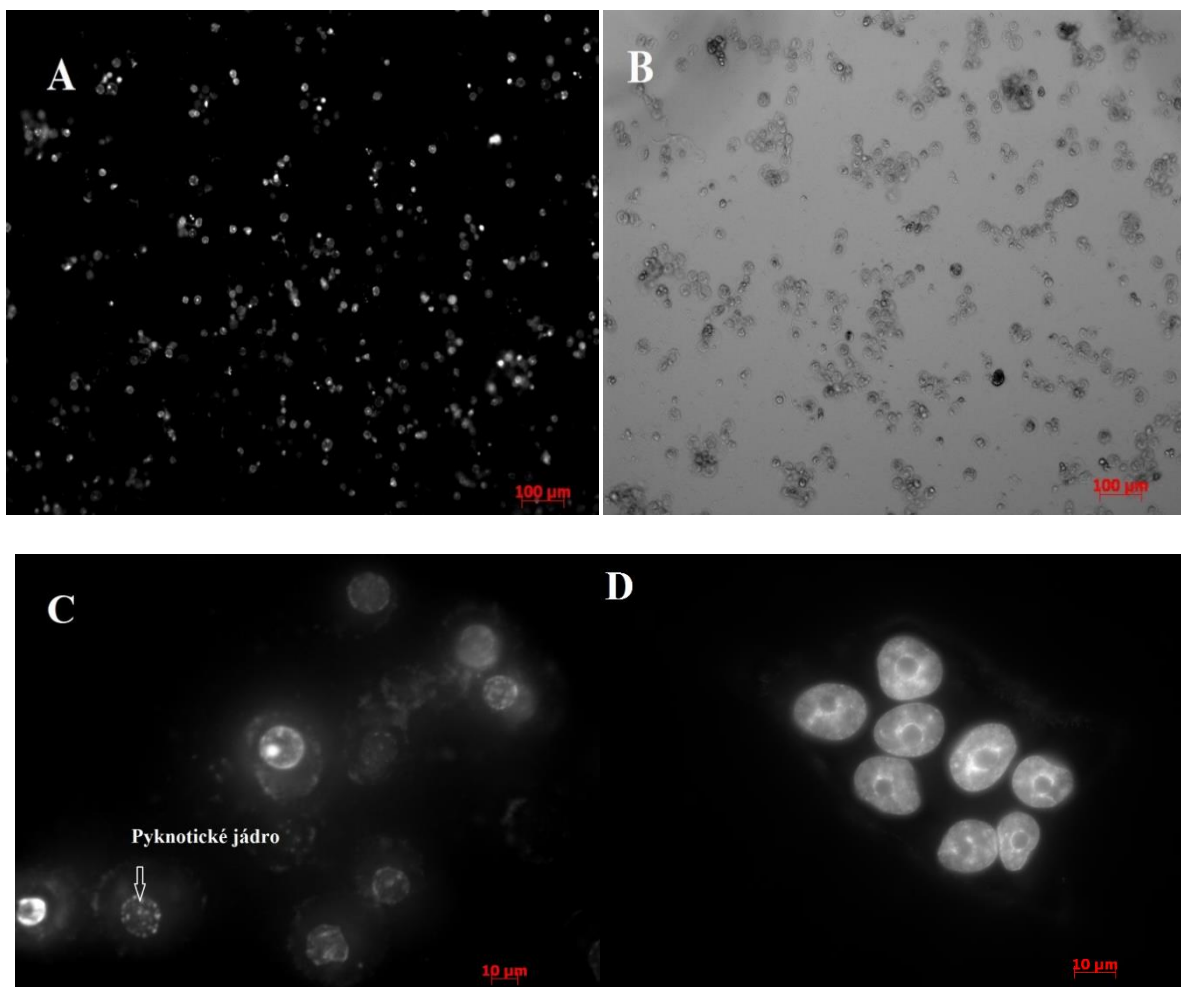


Obr. 7: Viabilita buněk (osa Y) PaTu a HeLa po 48 hodinové inkubaci s vybranými chromatografickými frakcemi ze surového extraktu kmene 113 – stará biomasa.



Obr. 8: Aktivita efektorových kaspáz 3/7 po 48 a 72 hodinové inkubaci PaTu a HeLa buněk s vybranými frakcemi surového extraktu kmene 113 - stará biomasa. Naměřené relativní luminiscenční jednotky jsou přepočteny na buňku (osa Y).

Aktivita kaspáz u testovaných buněk je obecně vyšší v čase 72 hodin oproti 48 hodinám. Nejvyšší hladina efektorových kaspáz byla naměřena u frakce 32 (v 72 hodinách 18 RLU u PaTu a 15 RLU pro HeLa). Rozdíly mezi HeLa a PaTu pro jednotlivé frakce jsou však zanedbatelné. Následující obrázek znázorňuje morfologii PaTu buněk a jejich jader po 48 hodinách od přidání frakce 32.

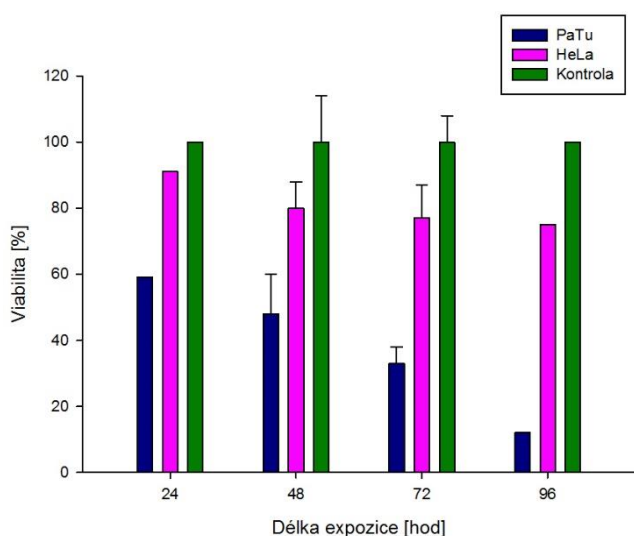


Obr. 9: PaTu buňky po 48 hodinách inkubace s frakcí 32 z kmene 113 – stará biomasa (zvětšení je uvedeno v závorce). A- obarvená jádra, Hoechst (10x), B- světelný mikroskop (10x), C- obarvená jádra, Hoechst (63x) D- kontrola, Hoechst (100x)

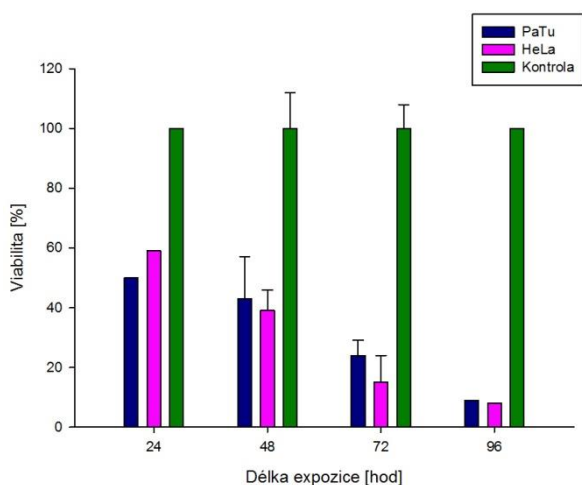
Na obrázku 9 je patrná změna jaderné morfologie. Při zvětšení 63x můžeme pozorovat pyknotické jádro typické mimo jiné i pro programovanou buněčnou smrt.

4.1.2 Kmen 113 – nová biomasa

Testy, které jsem provedla, nepřinesly důkaz o tom, že by některá ze získaných chromatografických frakcí starého extraktu kmene 113 vykazovala silnější působení na PaTu linii oproti HeLa buňkám. Zkusila jsem tedy specificitu surového extraktu tohoto kmene k vybrané buněčné linii znovu prověřit. K testům jsem použila nově napěstovanou biomasu a provedla jsem MTT test (obr. 10) a morfologické zhodnocení buněk.

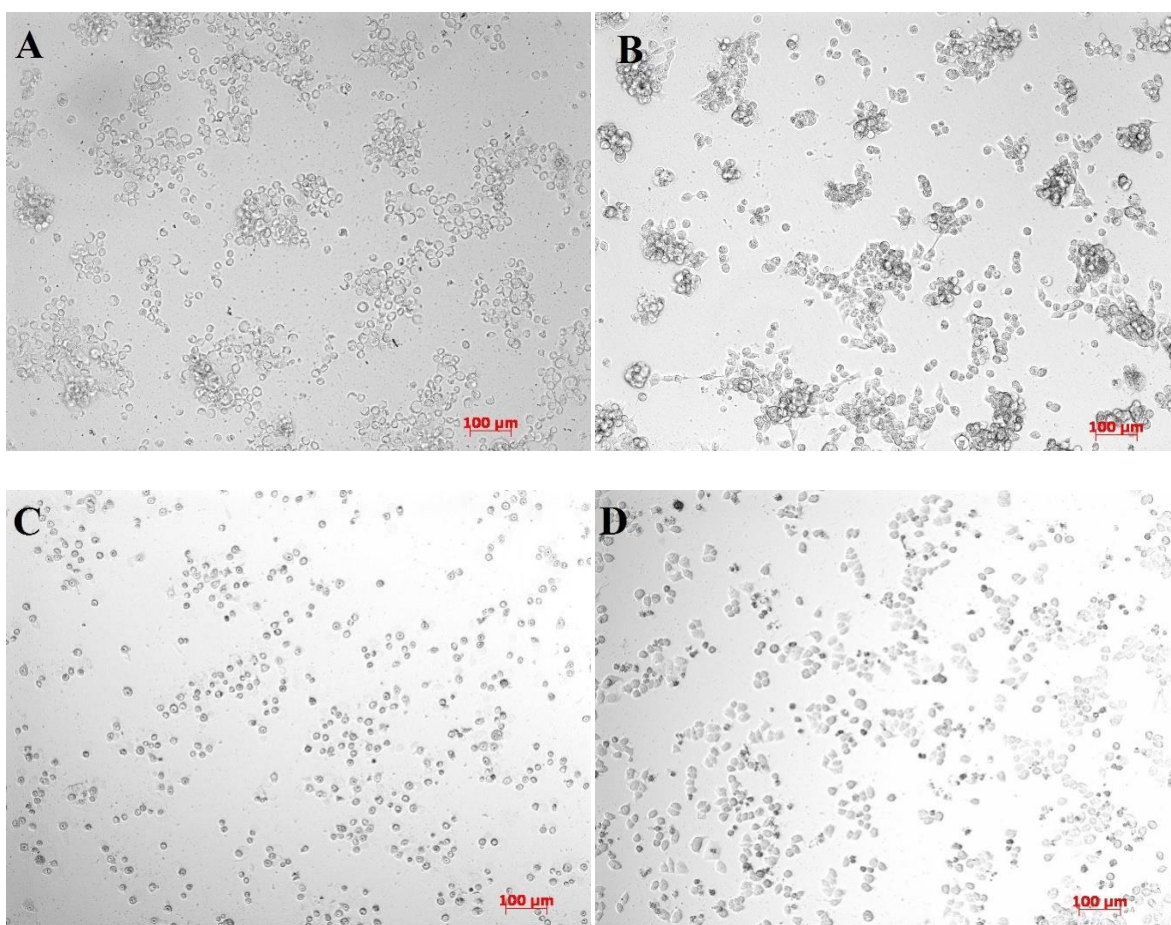


Obr. 10: Viabilita buněk PaTu a HeLa po inkubaci se surovým extraktem kmene 113 – nová biomasa.



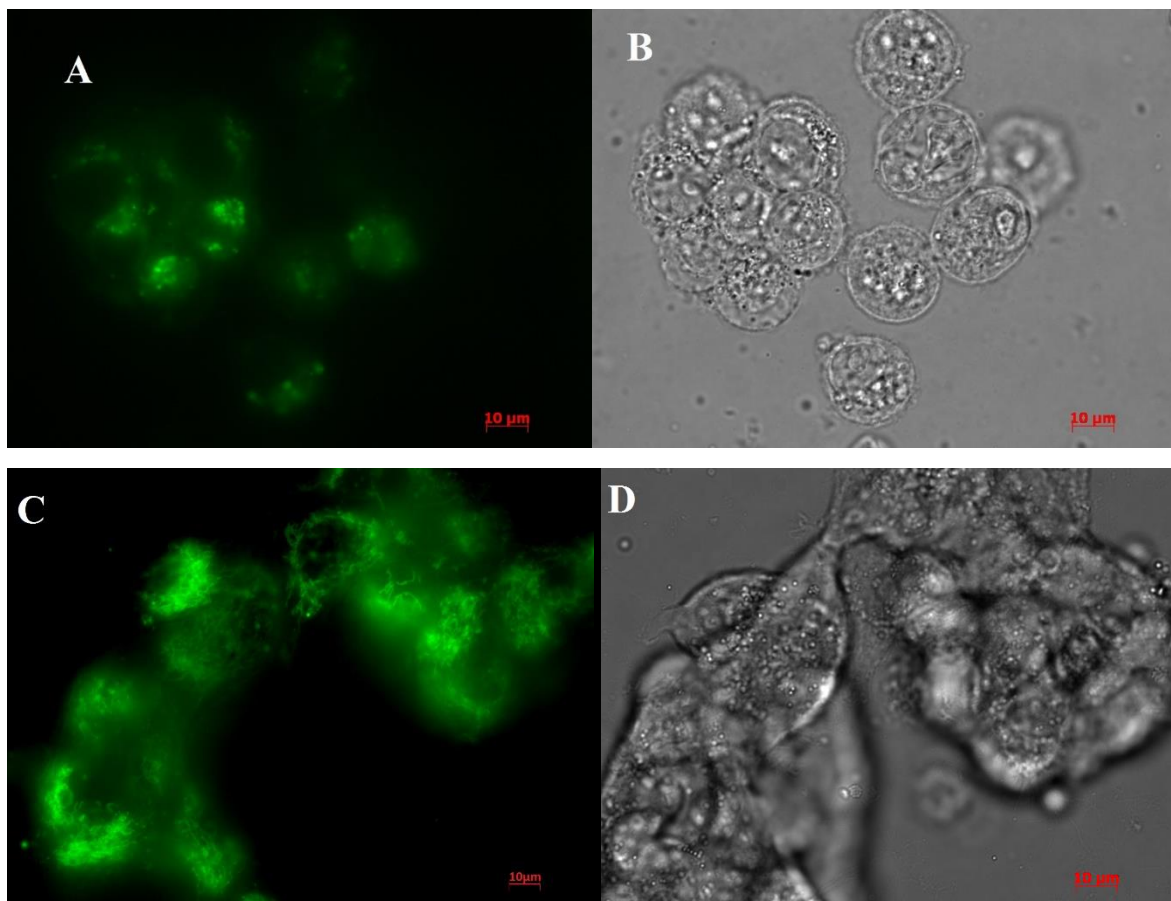
Obr. 11: Viabilita buněk PaTu a HeLa po inkubaci se surovým extraktem kmene 113 – stará biomasa.

Z výsledků MTT testu (obr. 10 a 11) je vidět, že toxicita starého extraktu kmene 113 vůči PaTu a HeLa je stejná. Oproti tomu při testování nové biomasy je patrná selektivní toxicita vůči linii PaTu. Rozdíly ve viabilitě HeLa a PaTu po působení extraktu 113- nová biomasa rostou v čase. Největší rozdíl je v 96 hodině: viabilita 80% (HeLa) a 16% (PaTu). Viabilita PaTu buněk po působení extraktu staré biomasy je obecně o něco nižší v porovnání s extraktem z nové biomasy, ale v obou případech má klesající tendenci v čase (obr. 10 a 11). Tentýž trend je patrný pro HeLa buňky a působení extraktu 113- stará biomasa (obr. 11). Naopak HeLa buňky po působení extraktu 113- nová biomasa mají viabilitu $\pm 80\%$ ve všech testovaných časech. To potvrzuje i morfologie buněk na následujícím obrázku (obr. 12).



Obr. 12: Morfologie PaTu a HeLa buněk po 48 hodinách inkubace se surovým extraktem kmene 113- nová a stará biomasa (10x). PaTu (A), HeLa (C) po 48 hodinách inkubace se surovým extraktem kmene 113- stará biomasa. PaTu (B), HeLa (D) po 48 hodinách inkubace se surovým extraktem kmene 113- nová biomasa

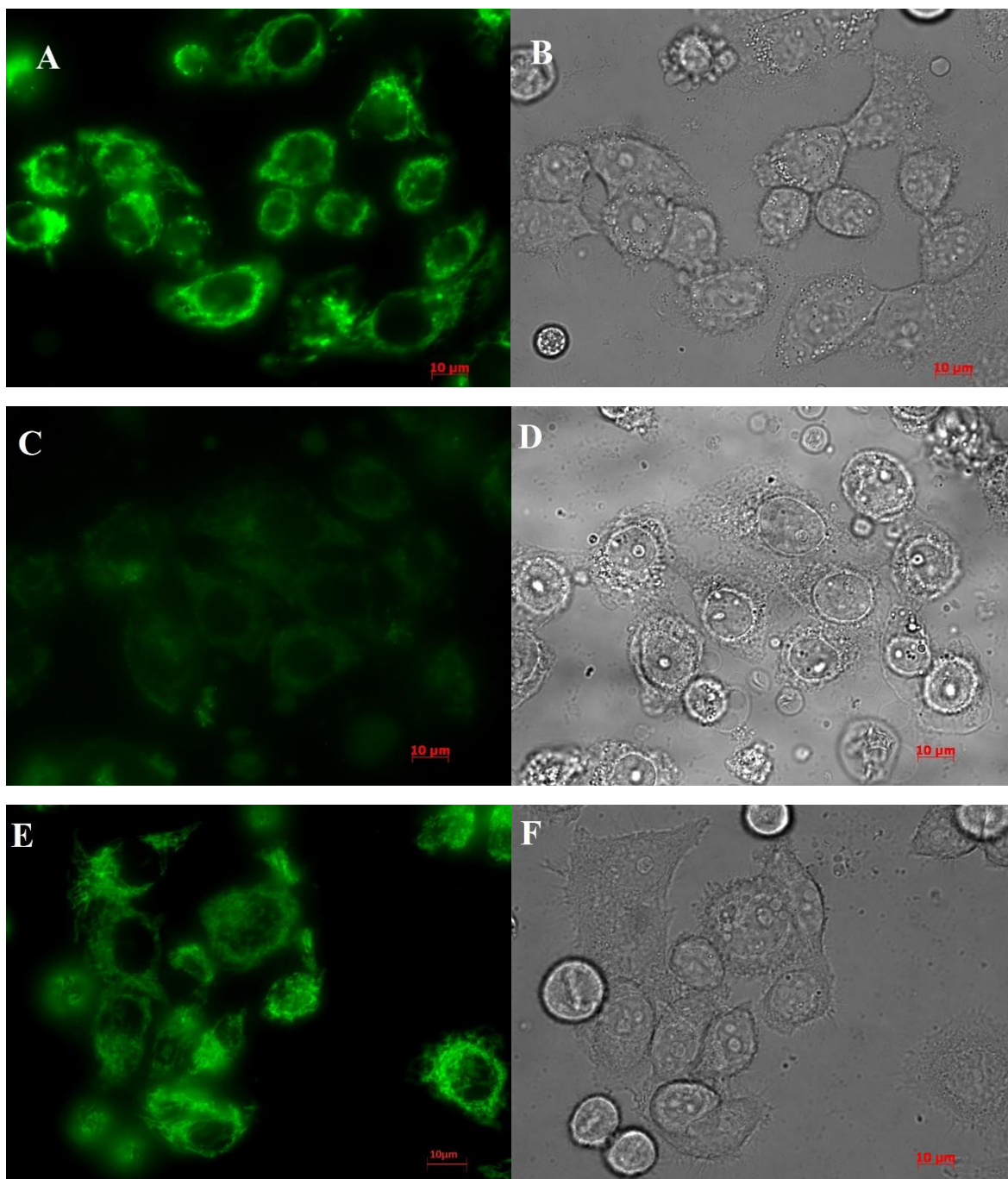
U PaTu buněčné linie jsem obarvila mitochondrie buněk inkubovaných se surovým extraktem kmene 113- nová biomasa a pozorovala jejich změny (obr. 13).



Obr. 13: PaTu buňky po 2 hodinách inkubace se surovým extraktem kmene 113- nová biomasa (100x) (A,B) a kontrolní buňky (C, D). A, C- obarvené mitochondrie, B,D- světelný mikroskop

Z obrázku je patrné, že již po 2 hodinách lze na buňkách pozorovat efekt. Mitochondriální síť u buněk s přidáním extraktem kmene 113 je fragmentovaná.

U HeLa buněk jsem obarvila mitochondrie buněk inkubovaných se surovým extraktem kmene 113- stará i nová biomasa a porovnávala je mezi sebou (obr. 14).

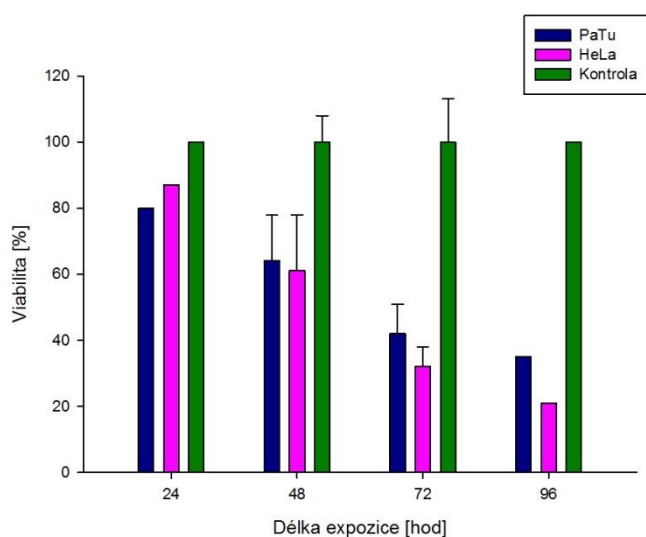


Obr. 14: HeLa buňky po 2 hodinách inkubace se surovým extraktem kmene 113 - nová a stará biomasa (100x). A- obarvené mitochondrie - nová biomasa, B-světelný mikroskop - nová biomasa, C - obarvené mitochondrie- stará biomasa, D - světelný mikroskop- stará biomasa, E- obarvené mitochondrie- kontrola, F- světelný mikroskop- kontrola

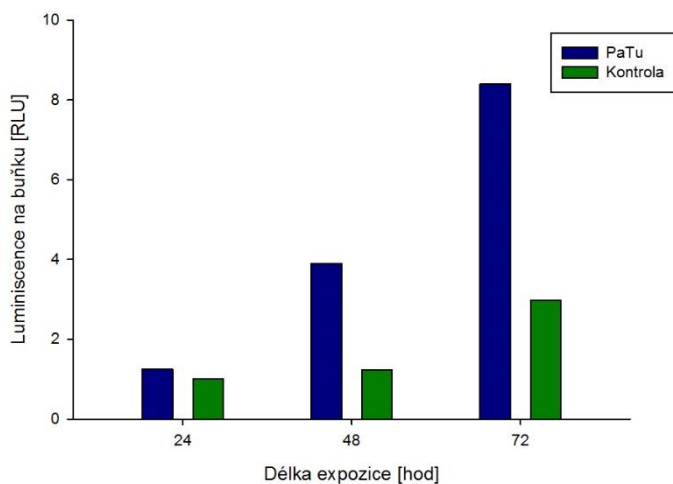
Mitochondriální síť se po 2 hodinách inkubace se surovým extraktem kmene 113 - nová biomasa jeví jako neporušená, i když buňky vypadají stresované (obr. 14 A, B). Oproti tomu u buněk inkubovaných se surovým extraktem kmene 113 - stará biomasa je patrná nižší fluorescence, změněná morfologie buňky i mitochondriální síť.

4.2 Kmen 91

Tento kmen byl vybrán pro další experimenty, jelikož jeho surový extrakt indukoval zvýšení hladiny efektorových kaspáz 3/7 u HeLa buněk. V rámci své práce jsem provedla stanovení viability pomocí MTT testu a měření kaspázové aktivity na PaTu buněčné linii ošetřené tímto extraktem.



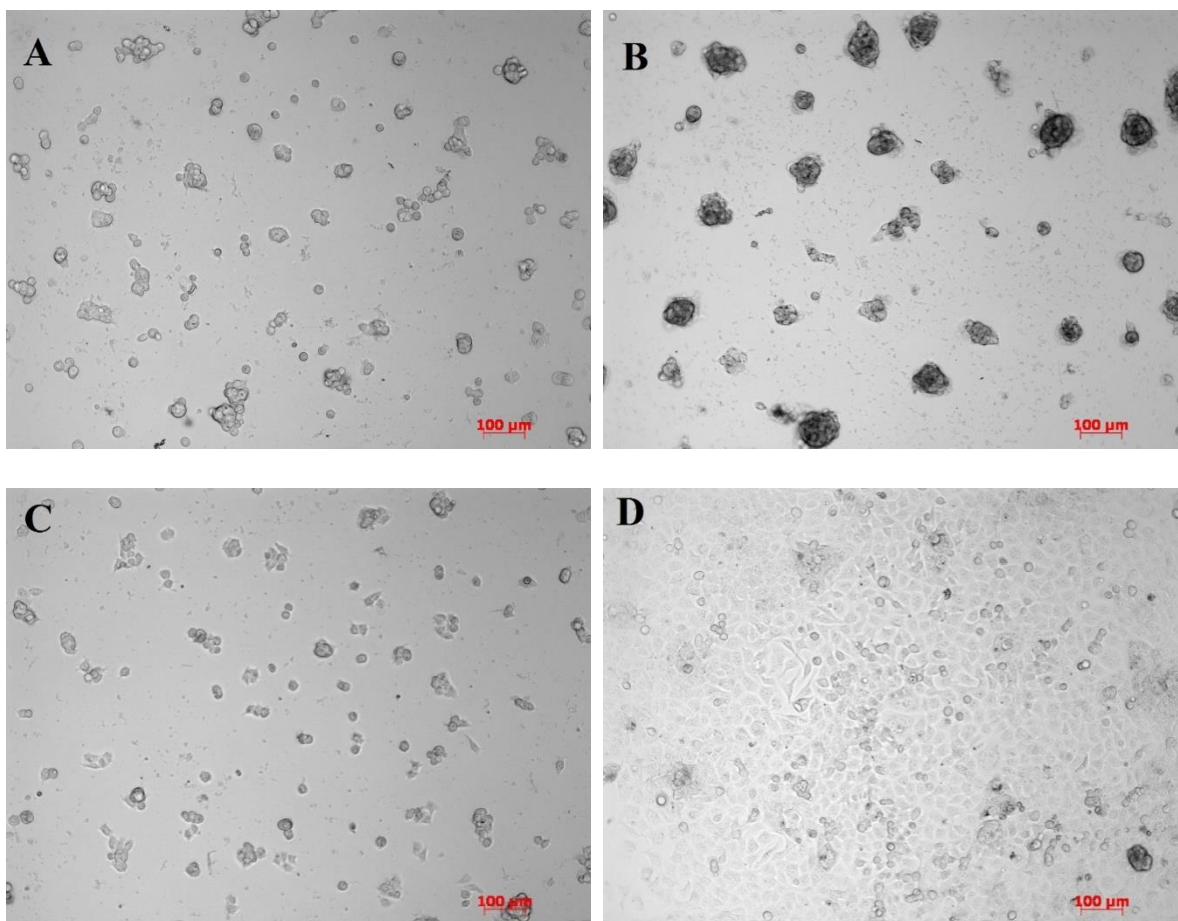
Obr. 15: Viabilita PaTu a HeLa buněk po expozici surovým extraktem kmenu 91.



Obr. 16: Kaspázová aktivita u PaTu po expozici surovým extraktem kmenu 91.

Z naměřených dat je patrné, že v průběhu času dochází ke snížení viability (obr. 15) a zároveň se zvyšuje hladina efektorových kaspáz na buňku (obr. 16). Tomu odpovídá i morfologie buněk (obr. 17). Viabilita HeLa a PaTu buněk se po působení extraktu 91 nijak zásadně neliší (obr. 15).

Hodnoty kaspáz-3/7 se pro kontrolní PaTu buňky pohybují v rozmezí 1-3, a pro testované buňky dosahují v čase 96 hodin více jak dvojnásobné hodnoty oproti kontrole (obr. 16).



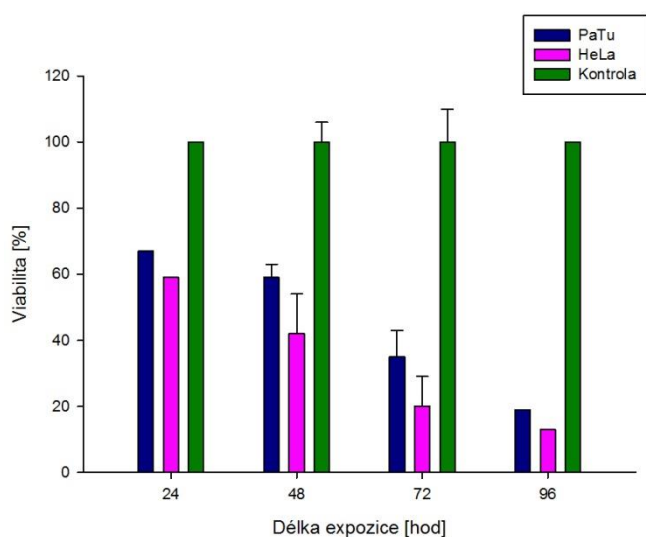
Obr. 17: PaTu buňky po expozici surovým extraktem kmene 91 (10x). A – 1 hodina inkubace s extraktem, B – 72 hodin inkubace s extraktem, C – kontrola po jedné hodině, D- kontrola po 72 hodinách

Na základě potvrzení cytotoxické aktivity surového extraktu jsem provedla frakcionaci extraktu standartním způsobem pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Výsledkem bylo dvanáct frakcí, jejichž efekty jsem testovala pomocí časosběrné mikroskopie na PaTu rakovinné buněčné linii. Bohužel, ani u jediné frakce nebyl patrný cytotoxický efekt, a to ani po navýšení její koncentrace v jamce na čtyřnásobek oproti koncentraci používané u surového extraktu a expozice po dobu 72 hodin. V dalších experimentech s tímto kmenem jsem proto nepokračovala.

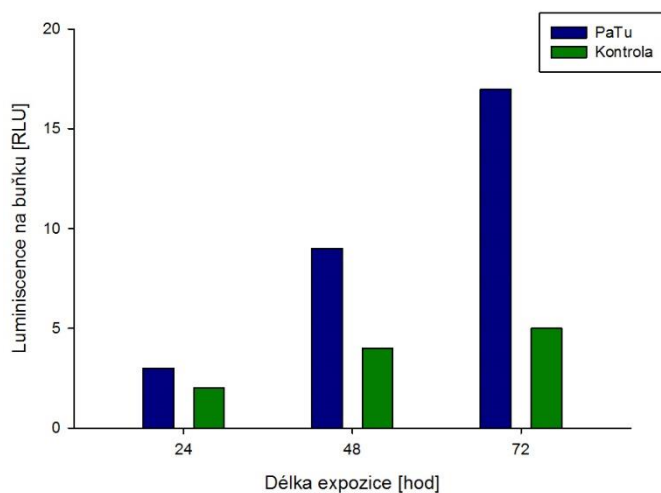
4.3 Kmen 33

4.3.1 Surový extrakt

Kmen 33 byl vybrán společně s kmenem 91 kvůli indukcí zvýšené aktivity efektorových kaspáz na PaTu buňkách. Testovala jsem cytotoxicitu surového extraktu pomocí MTT testu a provedla jsem sledování morfologie buněk pomocí časosběrné mikroskopie.

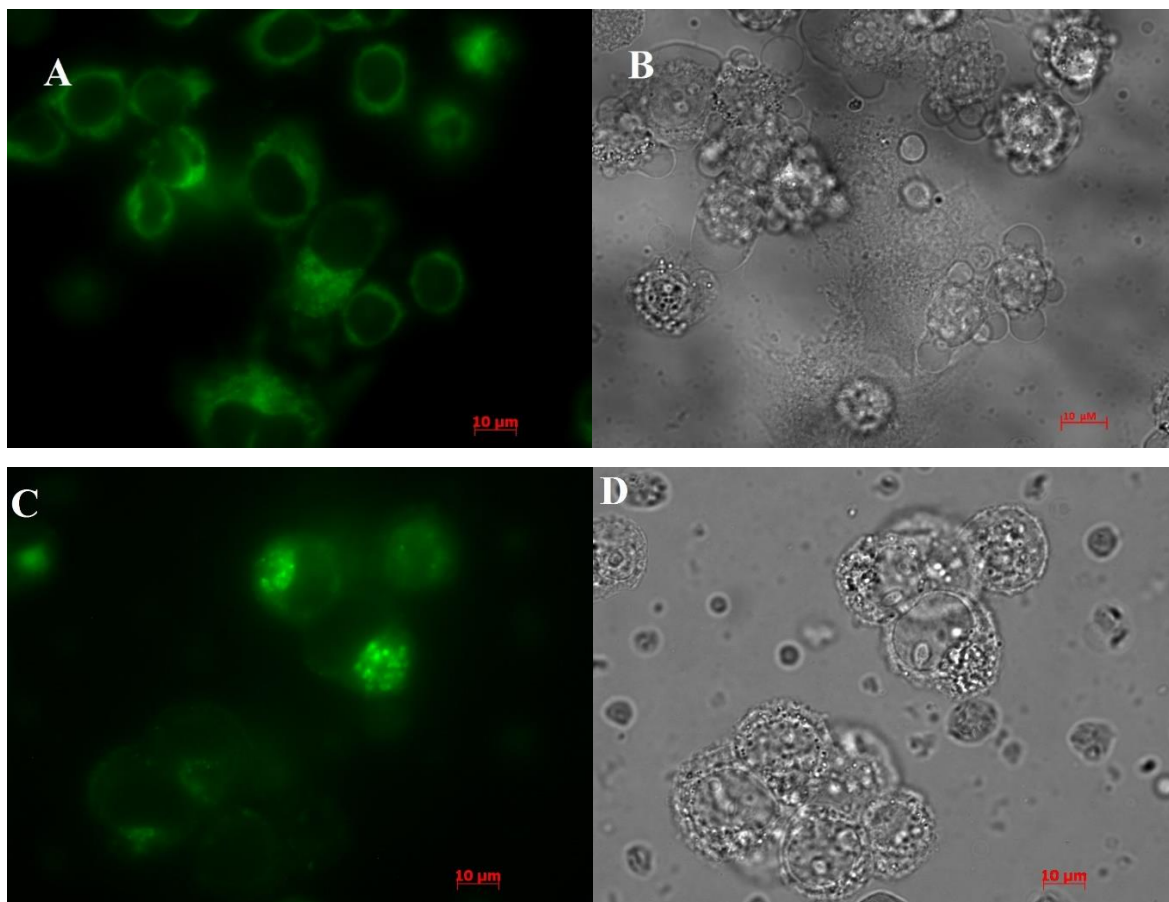


Obr. 18: Viabilita PaTu a HeLa po expozici surovým extraktem kmene 33.



Obr. 19: Kaspázová aktivita po expozici surovým extraktem kmene 33 na PaTu.

Na obou buněčných liniích jsem provedla také obarvení mitochondrie po 2 hodinách inkubace se surovým extraktem kmene 33.

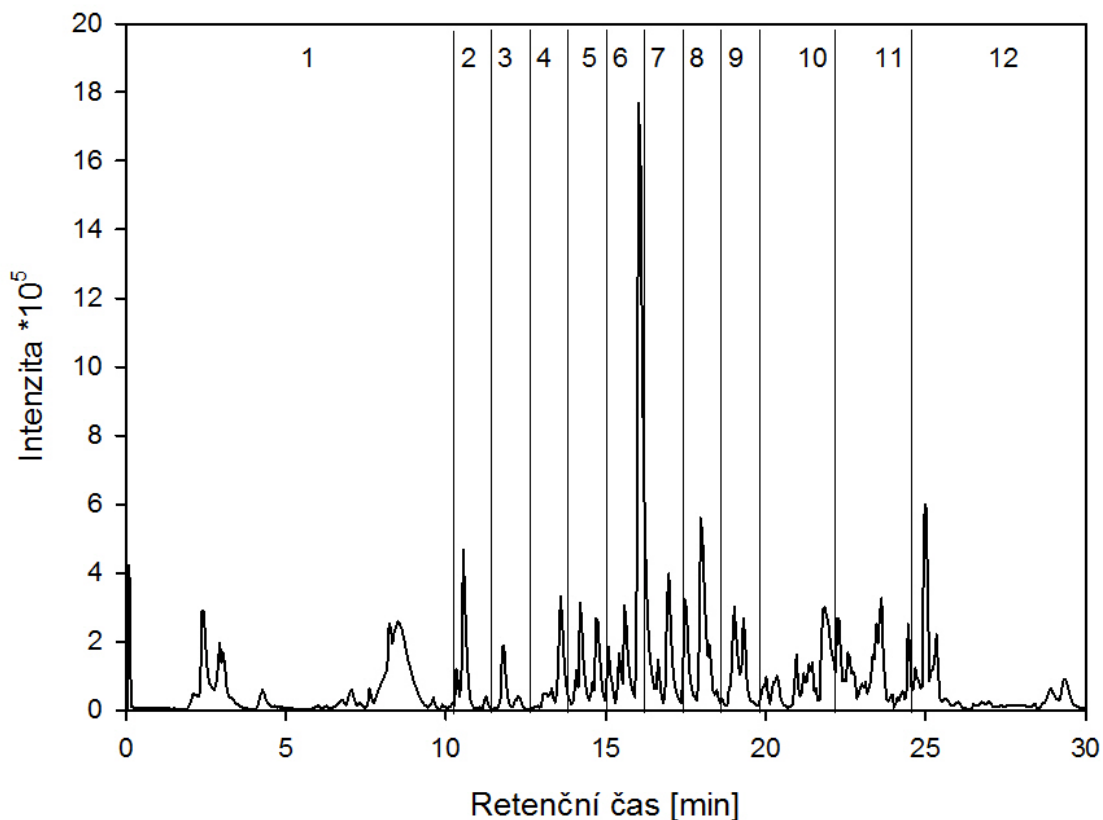


Obr. 20: HeLa a PaTu buňky po 2 hodinách inkubace se surovým extraktem kmene 33 (100x). A- HeLa - obarvené mitochondrie, B- HeLa- světelný mikroskop, C- PaTu- obarvené mitochondrie, D- PaTu- světelný mikroskop

Surový extrakt kmene byl vyhodnocen jako potencionálně zajímavý, a to zejména díky vysoké hladině kaspáz naměřené u PaTu buněk po inkubaci s ním. Proto byla provedena jeho frakcionace.

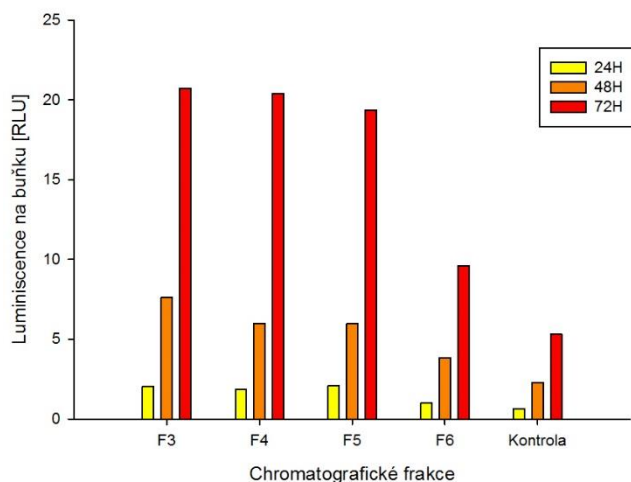
4.3.2 Chromatografické frakce

Na základě chromatografické analýzy surového extraktu (viz. base peak chromatogram na obr. 21) byla navržena jeho frakcionace na dvanáct chromatografických frakcí.



Obr. 21: Base Peak chromatogram surového extraktu kmene 33 s navrženou frakcionací.

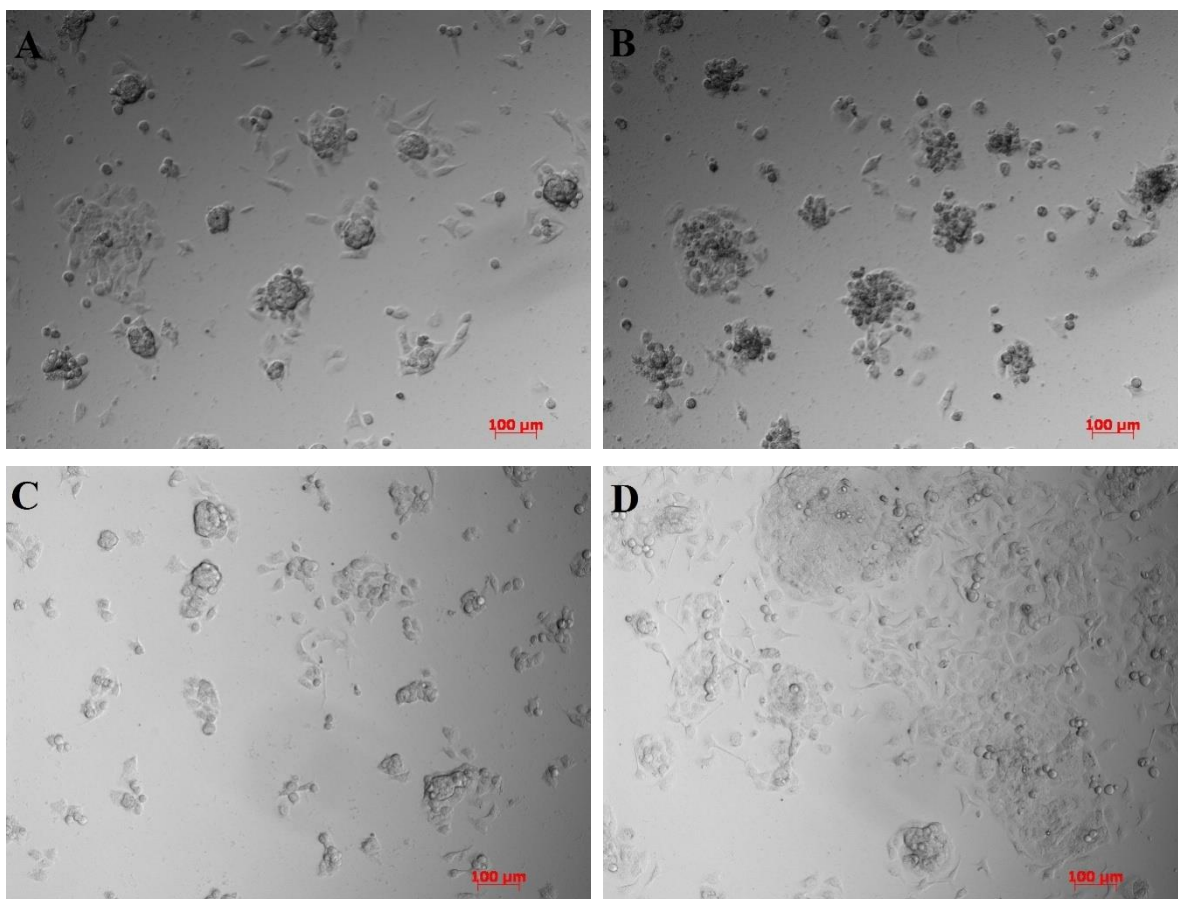
Cytotoxická aktivita frakcí byla testována na PaTu buněčné linii. Po 48 hodinách inkubace s frakcemi byla ohodnocena morfologie buněk. Efekt byl prokázán u čtyř frakcí (3, 4, 5, 6 na obrázku). U těchto frakcí byla změřena kaspázová aktivita.



Obr. 22 : Kaspázová aktivita po expozici aktivními frakcemi z kmene 33 na PaTu buňkách.

Vybrané frakce poté prošly další, tentokrát jemnější, frakcionací, aby bylo případně možné detekovat látku zodpovědnou za efekt.

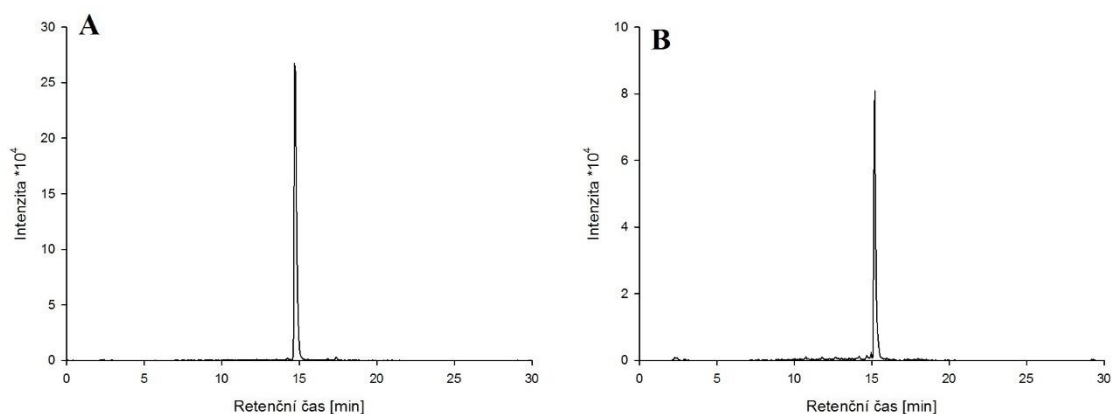
S refrakciovými chromatografickými frakcemi byly opět provedeny testy na PaTu buňkách. Z původních 27 vykazovaly efekt na buňkách pouze dvě frakce. Morfologii PaTu buněk po 48 hodinách inkubace s jednou z refrakciových frakcí lze vidět na obrázku 22.



Obr. 23: PaTu buňky po expozici jedné z aktivních frakcí kmene 33 (10x). A – 1 hodina inkubace s frakcí, B – 48 hodin inkubace s frakcí, C – kontrola po jedné hodině D- kontrola po 48 hodinách

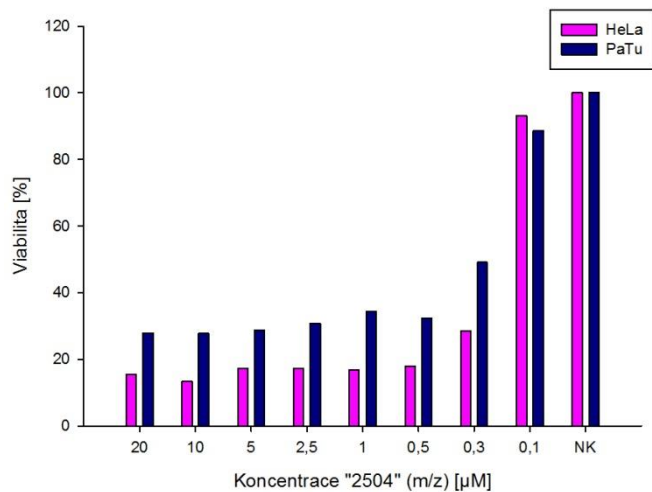
Buňky jsou po 48 hodinách inkubace s frakcí stále metabolicky aktivní (MTT test – data zde neuvádím). V porovnání s kontrolou je však patrné, že se nedělí. Navíc vytvářejí shluky a jejich morfologie je oproti kontrolním buňkám také pozměněna.

Pomocí HPLC-HRMS bylo zjištěno, že obě aktivní frakce obsahují stejnou látku o molekulární váze 2503- (m/z 2504) a v menší míře také látku o molekulární váze 2518- (m/z 2519), jejichž extracted ion chromatogramy (EIC) je možné vidět na následujícím obrázku.



Obr. 24: A- EIC látky „2504“ (m/z), B-EIC látky „2519“ (m/z).

Obě tyto látky byly pomocí preparativní chromatografie vyizolovány ve větším množství. Z 5g biomasy bylo získáno 1,68mg látky „2504“ (m/z) a 0,84mg látky „2519“ (m/z). Efekt obou látek na buňkách byl obdobný, u látky „2519“ (m/z) v nižších koncentracích už však pozorován nebyl, proto jsme se rozhodli dále pracovat jen s látkou „2504“ (m/z). Připravila jsem koncentrační řadu od 20 do 0,1 μ M a testovala efekt na PaTu a HeLa buňkách při 96 hodinovém experimentu pomocí MTT testu (obr. 25).



Obr. 25: Viabilita buněk po 96h inkubace s látkou „2504“ (m/z).

Z výsledků je patrné, že se viabilita buněk po 96 hodinové inkubaci s látkou v rozsahu koncentrací 20 - 0,5 μM výrazně nemění a je pod 35% u obou testovaných buněčných linií (obr. 25).

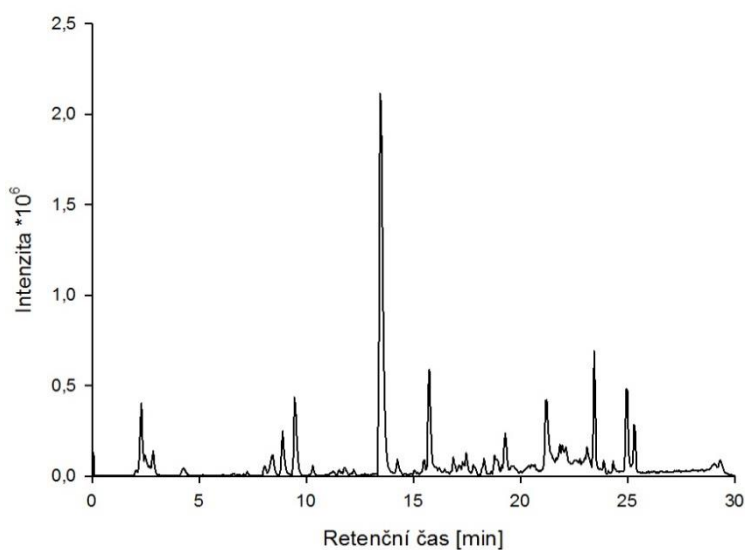
5. Diskuze

Hlavní náplní této práce bylo blíže otestovat tři sinicové extrakty, které se jevily jako zajímavé v souvislosti s jejich cytotoxicitou zejména vůči lidské rakovině linii PaTu, a případně identifikovat aktivní látku zodpovědnou za toxický efekt.

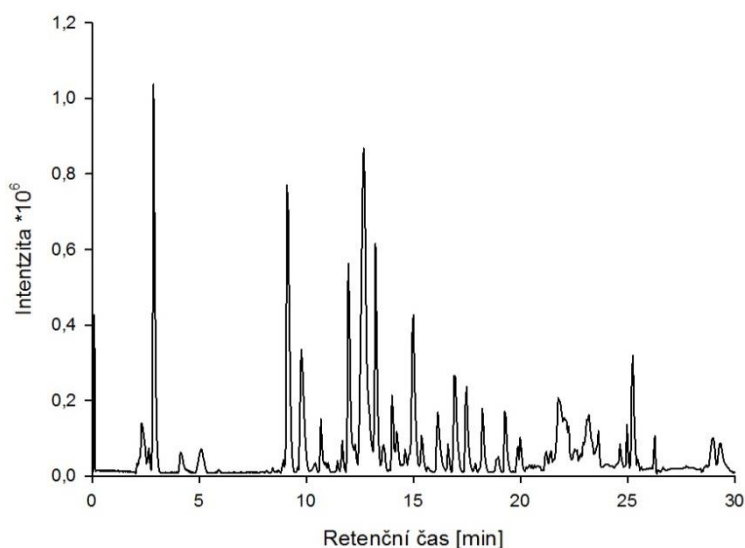
5.1 Kmen 113

Kmen 113 se dle prvotních studií jevil jako velmi zajímavý díky své selektivní toxicitě vůči rakovině buněčné linii PaTu v porovnání s HeLa buňkami. Byl proto frakcionován na 40 minutových chromatografických frakcí. Mým úkolem bylo zjistit jejich cytotoxicitu a případnou specifitu vůči této rakovině buněčné linii. K tomu jsem využila MTT test, měření hladiny efektorových kaspáz 3/7 a zhodnocení morfologie buněk.

Provedené experimenty však nepřinesly důkaz o tom, že by některá z chromatografických frakcí kmene 113 byla obecně cytotoxicky aktivnější k PaTu oproti HeLa buňkám nebo způsobovala apoptózu. Důvodem mohlo být staří biomasy, ze které byl surový extrakt připraven. Ta byla skladována od roku 2008 při pokojové teplotě na suchém místě bez přímého osvětlení. Změna ve složení biomasy je patná z HPLC chromatogramů vzorků obou biomas (obr. 26, 27).



Obr. 26: Base Peak chromatogram surového extraktu kmene 113- stará biomasa.



Obr 27: Base Peak chromatogram surového extraktu kmene 113- nová biomasa.

Ve staré biomase tedy pravděpodobně došlo k degradaci některých látek. Vzniklé produkty mohly působit toxicky vůči oběma rakovinným liniím a tím maskovat specifitu původního extraktu. V cytotoxických frakcích byly mimo jiné detekovány látky světle žluté barvy absorbující při 322nm. Mohlo by se jednat o látky vzniklé rozkladem chlorofylu. Cytotoxicita některých derivátů chlorofylu je známá (Lee et al., 1990).

Selektivní toxicitu surového extraktu vůči buněčné linii PaTu se nakonec podařilo znovu prokázat po použití nové biomasy k přípravě celkového extraktu (obr. 10, 11). První změny morfologie buněk a mitochondrií bylo možné pozorovat už po 2 hodinách inkubace se surovým extraktem kmene 113- stará i nová biomasa (obr. 13, 14).

Interpretace změn na mitochondriích pro PaTu buněčnou linii je obtížnější, jelikož jsou tyto buňky v porovnání s HeLa buňkami plastičtější a díky tomu se jejich mitochondriální síť obtížněji vizualizuje.

Dalším problémem vyskytujícím se u obou buněčných linií bylo snížení intenzity fluorescenčního signálu. Mitotracker® Green se váže na mitochondrii nezávisle na jejím membránovém potenciálu. Proto mohl být tento efekt zapříčiněn poškozením mitochondrie, rozpadem mitochondriální sítě a difuzí signálu.

Nicméně i na fotografiích buněk ve světlém poli při zvětšení 100x je zřejmá rozdílná morfologie HeLa buněk po inkubaci se surovým extraktem kmene 113- stará biomasa vůči biomase nové (obr. 14). Surový extrakt staré biomasy měl na HeLa buňky rychlejší účinek. Již po dvou hodinách jsou buňky viditelně poškozené a odlišné oproti kontrole, což ještě není patrné u buněk, kde byl přidán extrakt nové biomasy.

Navíc viabilita této buněčné linie HeLa ani po 96 hodinové inkubaci s novým surovým extraktem neklesla pod 70%. To je velmi zajímavé zjištění, na základě kterého bude tento kmen (extrakt) po napěstování potřebného množství biomasy podroben dalším experimentům.

5.2 Kmen 91

Pro frakcionaci surového extraktu tohoto kmene jsme se rozhodli z důvodu naměření zvýšené hladiny efektorových kaspáz u PaTu i HeLa buněk po inkubaci s tímto extraktem.

U získaných chromatografických frakcí však nebyl pozorován žádný efekt, který by způsoboval buněčnou smrt, ovlivňoval buněčné dělení nebo morfologii buňky, a to ani po navýšení koncentrace frakcí v testovací jamce. Můžeme tedy předpokládat, že efekt viditelný u surového extraktu byl podmíněn spolupůsobením (aditivním či multiplikativním efektem) několika látek, které se frakcionací oddělily a výsledné frakce tím cytotoxicitu ztratily. Proto jsme se rozhodli nepokračovat v práci s tímto kmenem, respektive jeho extraktem.

5.3 Kmen 33

Experimenty s extraktem kmene 33 přinesly asi nejzásadnější výsledek mé práce, a to vyizolování látky „2504“ (m/z).

Surový extrakt kmene vykazoval vysokou hladinu efektorových kaspáz. Po 72 hodinové inkubaci došlo u PaTu buněk k výraznému zvýšení této hladiny. Na obou buněčných liniích proběhlo také obarvení mitochondrie po 2 hodinách inkubace s extraktem. Změny morfologie buňky i mitochondriální sítě oproti kontrole můžeme pozorovat u obou buněčných linií (obr. 20). Na základě tohoto zjištění byl surový extrakt frakciován a aktivní frakce byly následně jemněji refrakciovány. Efekt na PaTu buňkách byl prokázán u dvou z nich.

Pomocí HPLC-HRMS analýzy těchto aktivních frakcí bylo zjištěno, že obě obsahují stejnou látku „2504“ (m/z) a v menší míře také látku „2519“ (m/z), která je pravděpodobně strukturálním analogem látky „2504“ (m/z). To může dokazovat i fakt, že efekt obou látek na buňkách je podobný. U látky „2519“ (m/z) už však nebyl v nižších koncentracích patrný, proto jsme dále pracovali pouze s látkou „2504“ (m/z).

Při 96 hodinovém experimentu na PaTu a HeLa buňkách se ukázalo, že vyizolovaná látka není toxicky specifická pro jednu z použitých buněčných kultur, viabilita buněk je obdobná (obr. 25). Zajímavý je ovšem fakt, že IC_{50} (tj. inhibiční koncentrace, která způsobí 50% snížení růstu nebo růstové rychlosti ve srovnání s kontrolním vzorkem) této látky je kolem 300nM.

Pro srovnání, dříve zmiňovaný brentuximab vedotin, který se používá k léčbě CD30 pozitivních lymfoproliferačních poruch má hodnoty IC_{50} proti CD30 pozitivním buněčným liniím v rozsahu 3,9 do 15,8 ng/mL (Seattle Genetics, Inc., 2011).

Tato hodnota je sice výrazně nižší než pro naši látku, ale zvážíme-li, že i cytotoxická látka obsažená v brentuximab vedotinu byla získána chemickou modifikací látky přírodní, můžeme konstatovat, že látka „2504“ má slibný potenciál pro další studie.

Látka „2504“ (*m/z*) pravděpodobně nezpůsobuje apoptózu, alespoň ne v časovém horizontu, ve kterém byly buňky sledovány (96 hodin), ale brání dělení buněk. Nástup efektu je poměrně pozdní, některé buňky se jednou rozdělí, ale k dalšímu dělení již nedojde.

Co se týče mechanismu účinku látky, žádné poznatky zatím nemáme. Podle její hmotnosti však můžeme usuzovat, že jde o látku velkou, jejíž průnik do buňky by byl velice obtížný, ne-li nemožný. V úvahu připadá průnik pouze určité části látky nebo interakce s receptory na povrchu buňky.

K tomu, aby se tento problém podařilo objasnit, bude potřeba znát složení a strukturu látky. Pro rozklíčování struktury bude použita NMR spektroskopie (spektroskopie nukleární magnetické resonance). Aby mohla být tato metoda provedena, je potřeba získat řádově miligramy čisté látky.

6. Závěr

Rakovina slinivky břišní je jedním z nejzákeřnějších typů nádorů. Je to velmi agresivní typ, který bohužel často bývá diagnostikován až ve velmi pokročilém stavu, což snižuje šance na úspěšnou léčbu. Nejúčinnější léčbou je odstranění nádoru chirurgicky s následnou chemoterapií, která zvyšuje šanci na úplné vyléčení.

Cílem mé práce bylo identifikovat frakci, případně látku sinicového původu, která by vykazovala potencionálně selektivní cytotoxicitu vůči rakovinné linii PaTu. Za tímto účelem byly provedeny experimenty s extrakty tří kmenů rodu *Nostoc*.

Kmen 91 byl vyloučen z dalších studií na základě ztráty cytotoxicity vůči PaTu buněčné linii po frakcionaci surového extraktu. U kmenu 113 byla po počátečních nezdarech specifita surového extraktu vůči PaTu buňkám v porovnání s HeLa buněčnou linií prokázána. V brzké době dojde k frakcionaci tohoto extraktu a bude dále posuzována aktivita jednotlivých frakcí vůči rakovinným buněčným liniím se zaměřením na pankreatickou linii PaTu.

Za největší úspěch této práce lze považovat izolaci látky „2504“ (m/z) z kmene 33, která vykazuje antiproliferační účinek vůči PaTu i HeLa buněčné linii v nízkých koncentracích.

7. Seznam použité literatury

ALBERTS, Bruce et al. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero, 2001. 630 s. ISBN 80-902906-0-4.

ALTANER, Čestmír. *Buněčná a molekulární biologie rakoviny*. Vyd. v českém jazyce 1. Praha: Liga proti rakovině, 2008. 127 s. ISBN 978-80-86031-85-9.

American cancer society. Targeted Therapy - American Cancer Society [online]. c2013, last revision 7/12/2013 [cit. 2015-03-25] Dostupný z: <<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003024-pdf.pdf>>

BERGHE, Tom Vanden, et al. Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. *Methods*, 2013, 61.2: 117-129.

BIALIK, Shani; KIMCHI, Adi. The death-associated protein kinases: structure, function, and beyond. *Annu. Rev. Biochem.*, 2006, 75: 189-210.

BILLEN, L. P.; SHAMAS-DIN, A.; ANDREWS, D. W. Bid: a Bax-like BH3 protein. *Oncogene*, 2008, 27: S93-S104.

Brentuximab Vedotin. (2011). *Drugs in R&D*, 11(1), 85–95. doi:10.2165/11591070-000000000-00000

Cancer Research UK [online]. Last revision: 4/2/2015 [cit. 2015-02-25]. Dostupné z: <http://publications.cancerresearchuk.org/downloads/product/CS_KF_ALLCANCERS.pdf>.

CORBETT, T. H., et al. Preclinical anticancer activity of cryptophycin-8. *Journal of experimental therapeutics & oncology*, 1996, 1.2: 95-108.

DUPREZ, Linde, et al. Major cell death pathways at a glance. *Microbes and Infection*, 2009, 11.13: 1050-1062.

GALLUZZI, Lorenzo, et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death & Differentiation*, 2015, 22.1: 58-73.

GALLUZZI, Lorenzo, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death & Differentiation*, 2012, 19.1: 107-120.

GHOBRAL, Irene M.; WITZIG, Thomas E.; ADJEI, Alex A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2005, 55.3: 178-194.

GORDALIZA, Marina. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clinical and Translational Oncology*, 2007, 9.12: 767-776.

GUENEBAUD, Céline, et al. The dependence receptor UNC5H2/B triggers apoptosis via PP2A-mediated dephosphorylation of DAP kinase. *Molecular cell*, 2010, 40.6: 863-876.

GUNBY, Rosalind H., et al. Oncogenic fusion tyrosine kinases as molecular targets for anti-cancer therapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 2007, 7.6: 594-611.

HARARI, P. M. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocrine-Related Cancer*, 2004, 11.4: 689-708.

HENGARTNER, Michael O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000, 407.6805: 770-776.

HOFMANOVÁ, Jiřina. Genotoxicita a karcinogeneze [online]. 1 vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2013 [cit. 2015-03-31]. El. portál. Dostupné z: <<http://is.muni.cz/elportal/?id=1126513>>. ISSN 1802-128X.

HUANG, Min, et al. Molecularly targeted cancer therapy: some lessons from the past decade. *Trends in pharmacological sciences*, 2014, 35.1: 41-50.

KLENER, Pavel a KLENER, Pavel. Principy systémové protinádorové léčby. 1. vyd. Praha: Grada, 2013. 198 s. ISBN 978-80-247-4171-0.

KULASOORIYA, S. A. Cyanobacteria: Pioneers of planet earth. *Ceylon Journal of Science (Biological Sciences)*, 2011, 40.2: 71-88.

LEE, Won Young, et al. Chlorophyll derivatives (CpD) extracted from silk worm excreta are specifically cytotoxic to tumor cells in vitro. *Yonsei Medical Journal*, 1990, 31.3: 225-233.

LIANG, Jian, et al. Cryptophycins-309, 249 and other cryptophycin analogs: preclinical efficacy studies with mouse and human tumors. *Investigational new drugs*, 2005, 23.3: 213-224.

MARTIN, William; MÜLLER, Miklós. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature*, 1998, 392.6671: 37-41.

MELICHAR, Bohuslav a Hana ŠTUDENTOVÁ. Nový mechanismus v léčbě karcinomu ledviny: m-TOR – nová cílová struktura. *Onkologgia*, 2010, roč. 5, č. 5, s. 270-274.

MILLE, Frédéric, et al. The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL-caspase-9 complex. *Nature Cell Biology*, 2009, 11.6: 739-746.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 1983, 65.1: 55-63.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Marine-sourced anti-cancer and cancer pain control agents in clinical and late preclinical development. *Marine drugs*, 2014, 12.1: 255-278.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of natural products*, 2007, 70.3: 461-477.

NIEDERMEYER, Timo. Natural Product Forum[online]. Last updated Nov 19, 2012 [cit. 17/3/2015]. Dostupné na World Wide Web: <<http://naturalproductforum.org/2012/11/the-story-of-the-dolastatins/>>

O'BRIEN, Mauria A.; KIRBY, Rebecca. Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 2008, 18.6: 572-585.

OLSON, John M. Photosynthesis in the Archean era. *Photosynthesis research*, 2006, 88.2: 109-117.

OMURA, Satoshi. Trends in the search for bioactive microbial metabolites. *Journal of industrial microbiology*, 1992, 10.3-4: 135-156.

ORLOWSKI, Robert Z.; KUHN, Deborah J. Proteasome inhibitors in cancer therapy: lessons from the first decade. *Clinical Cancer Research*, 2008, 14.6: 1649-1657.

PETTIT, George R., et al. The isolation and structure of a remarkable marine animal antineoplastic constituent: dolastatin 10. *Journal of the American Chemical Society*, 1987, 109.22: 6883-6885.

PITOT, Henry C., et al. Phase I trial of dolastatin-10 (NSC 376128) in patients with advanced solid tumors. *Clinical cancer research*, 1999, 5.3: 525-531.

RASTOGI, Rajesh P.; SINHA, Rajeshwar P. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 2009, 27.4: 521-539.

ROHR, Jürgen. Cryptophycin anticancer drugs revisited. *ACS chemical biology*, 2006, 1.12: 747-750.

SCOTT, Andrew M.; WOLCHOK, Jedd D.; OLD, Lloyd J. Antibody therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2012, 12.4: 278-287.

SHIH, Chuan; TEICHER, Beverly A. Cryptophycins: a novel class of potent antimitotic antitumor depsipeptides. *Current pharmaceutical design*, 2001, 7.13: 1259-1276.

SCHNEIDER, Pascal; TSCHOPP, Jürg. Apoptosis induced by death receptors. *Pharmaceutica acta Helvetiae*, 2000, 74.2: 281-286.

SCHOPF, J. William; KLEIN, Cornelis (ed.). *The Proterozoic biosphere: a multidisciplinary study*. Cambridge University Press, 1992.

SCHWARTZ, Robert E., et al. Pharmaceuticals from cultured algae. *Journal of industrial microbiology*, 1990, 5.2-3: 113-123.

SMITH, Charles D., et al. Cryptophycin: a new antimicrotubule agent active against drug-resistant cells. *Cancer Research*, 1994, 54.14: 3779-3784.

SMITH, Matthew A.; SCHNELLMANN, Rick G. Calpains, mitochondria, and apoptosis. *Cardiovascular research*, 2012, 96.1: 32-37.

STAAL, Stephen; O'CONNELL, Michael J.; ALLEGRA, Carmen J. The marriage of growth factor inhibitors and chemotherapy: bliss or bust?. *Journal of Clinical Oncology*, 2009, 27.10: 1545-1548.

TAN, Lik Tong. Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. *Phytochemistry*, 2007, 68.7: 954-979.

VAISHAMPAYAN, Uika, et al. Phase II study of dolastatin-10 in patients with hormone-refractory metastatic prostate adenocarcinoma. *Clinical cancer research*, 2000, 6.11: 4205-4208.

VIJAYAKUMAR, Subramaniyan; MENAKHA, Muniraj. Pharmaceutical applications of cyanobacteria—A review. *Journal of Acute Medicine*, 2015.

WILHELM, Scott, et al. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nature reviews Drug discovery*, 2006, 5.10: 835-844.

WONG, R. S., et al. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011, 30.1: 87.

YADAV, SHWETA, et al. Cyanobacterial secondary metabolites. *Int J Pharm Bio Sci*, 2011, 2.1: 144-167.

YOUNES, Anas; YASOTHAN, Uma; KIRKPATRICK, Peter. Brentuximab vedotin. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2012, 11.1: 19-20.