

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

Toxikologický potenciál bentických nostokálních sinic

Diplomová práce

Bc. Kateřina Delawská, DiS.

Školitel: RNDr. Pavel Hrouzek, Ph.D.
Konzultantka: Mgr. Kateřina Voráčová

České Budějovice 2016

Delawská, K. 2016. *Toxikologický potenciál bentických nostokálních sinic* [Toxicological potential in benthic cyanobacteria of order Nostocales. Mgr. Thesis, in Czech.] The University of South Bohemia, Faculty of Science, České Budějovice, 68 pp.

Annotation

A toxicological potential in benthic *Anabaena* strains was studied. Cytotoxicity of benthic *Anabaena* was tested on HeLa cells. Three different approaches were used for evaluation of cytotoxicological results: metabolic activity of cells (MTT assay), cell morphology and cell counting (time lapse microscopy). Cytotoxicity of benthic *Anabaena* strains were proven. On the other hand, occurrence of well known cyanotoxins, such as microcystins, anatoxin-a, cylindrospermopsin or nodularin, was not proven. This study is unique in terms of longer exposure time (72 h) compared to other studies (24 h). The exposure time was found to be significant for a correct evaluation of cytotoxicity.

Prohlašuji, že svoji diplomovou 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 diplomové 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, 21. 4. 2016.

.....
Bc. Kateřina Delawská, Dis.

Poděkování:

Moc ráda bych poděkovala svému školiteli Pavlovi Hrouzkovi, který mně vždy velmi ochotně pomohl a poradil. Dále bych ráda poděkovala Petře Urajové, Janu Hájkovi, Kateřině Voráčové a Jindřišce Paichlové, Pavlovi Šebkovi za cenné rady a pomoc. Také bych chtěla poděkovat svým rodičům za podporu a důvěru.

OBSAH

1. ÚVOD	3
1.1. Sekundární metabolity sinic	3
1.1.2. Cyanotoxiny	5
1.1.2.1. Hepatotoxiny	7
1.1.2.1.1. Microcystiny.....	7
1.1.2.1.2. Nodulariny.....	9
1.1.2.1.3. Cylindrospermopsiny	10
1.1.2.2. Neurotoxiny.....	11
1.1.2.2.1. Anatoxin-a, homoanatoxin-a, anatoxin-a(S)	11
1.1.2.3. Cytotoxiny	13
1.1.2.3.1. Nespecificky působící cytotoxické látky.....	14
1.1.2.3.2. Specifické cytotoxické protirakovinné látky	14
2. CÍLE PRÁCE	21
3. METODIKA	22
3.1. Chemikálie	22
3.2. Pěstování a sklizení sinicové biomasy a média	22
3.3. Výroba extraktů z média	22
3.4. Výroba extraktu z biomasy do metanolu.....	23
3.5. Výroba extraktů z biomasy do acetonitrilu	24
3.6. Kultivace buněk <i>in vitro</i> a nasazování buněk na experiment	24
3.7. Příprava expozičního roztoku.....	26
3.8. MTT test – princip	26
3.8.1. MTT test - provedení.....	27
3.9. Časoběrná mikroskopie	27
3.10. Hledání známých toxinů: Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (HRMS).....	28
3.11. Frakcionace: Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	28
4. VÝSLEDKY	30
4.1. Pěstování sinicové biomasy a výroba extraktů.....	30
4.2. Celkové hodnocení cytotoxicity.....	30
4.3. Uspořádání grafů.....	31
4.4. Silně cytotoxické kmeny	32
4.5. Mírně cytotoxické kmeny.....	35
4.5.1. Mírně cytotoxické – mírně cytostatické	36

4.5.2. Mírně cytotoxické – cytostatické	36
4.6. Kmeny bez cytotoxické aktivity.....	38
4.6.1. Kmeny bez cytotoxické aktivity - necytostatické.....	39
4.6.2. Kmeny bez cytotoxické aktivity – mírně cytostatické	40
4.6.3. Kmeny bez cytotoxické aktivity – cytostatické.....	41
4.7. Výsledky MTT testu u extraktů z médií studovaných kmenů.....	42
4.8. HPLC- frakcionace.....	43
4.9. HPLC-HRMS – hledání známých toxinů.....	43
5. DISKUZE.....	44
6. ZÁVĚR	51
7. LITERATURA.....	52
8. OBRAZOVÁ PŘÍLOHA	63

1. ÚVOD

Sinice jsou autotrofní prokaryotické organismy, které jsou pravděpodobně jedny z nejstarších fotosyntetizujících organismů na Zemi (jejich stáří se odhaduje na 3,5 miliardy let), a které sehrály velmi důležitou roli ve vzniku kyslíkové atmosféry. Jedná se o ubikvitní organismy schopné obývat téměř všechny biotopy na Zemi, včetně extrémních stanovišť (Pouličková, 2011). Přestože se jedná o prokaryotní organismy, dosáhly sinice pozoruhodné míry morfologické rozmanitosti, a tak v této skupině nalezneme zástupce jednobuněčné, koloniální, ale též vláknité se schopností diferenciacie specializovaných buněk. Tradičně jsou sinice řazeny do tří řádů, Chroococcales, Oscillatoriales a Nostocales, na základě morfologických, molekulárních a ultrastrukturálních znaků.

Jedním ze sinicových rodů řádu Nostocales je rod *Anabaena*. Rod *Anabaena* v tradičním pojetí Bornet a Flahault (1888) a Geitler (1932) je v dnešní době na základě fylogenetických studií rozdělen do několika rodů. Bentické a půdní druhy bez aerotopů jsou dle molekulárních analýz (16S rRNA genová sekvence) separované od planktonních druhů obsahujících aerotopy (Rajaniemi et al., 2005). Jedny z mnoha vzniklých rodů jsou *Dolichospermum* a *Anabaena*. *Dolichospermum* bylo navrženo pro skupinu planktonních sinic s typovým druhem *Anabaena flos-aque* a rod *Anabaena* pro skupinu bentických, půdních a perifytických druhů s typovým druhem *Anabaena oscillarioides* (Komárek a Zapomělová, 2007). Tyto rody byly uvedeny v roce 2009 v platnost (Wacklin et al., 2009). Rod *Anabaena* z řádu Nostocales zahrnuje vláknité, nevětvené heterocytózní druhy. Vlákna jsou obvykle formovaná do kolonií, které mohou být jak mikroskopické, tak i makroskopické. Isopolární (nezakončené heterocytem) vlákna jsou většinou stočená či zkroucená, vegetativní buňky jsou vždy bez aerotopů. Rozmnožují se fragmentací, hormogoniemi a akinetami (vznikají v blízkosti heterocytů). Tento nový rod obsahuje přibližně 60 druhů (Komárek, 2013). Druhy rodu *Anabaena* jsou bohatým zdrojem biologicky aktivních látek jako jsou např. látky proapoptické či cytotoxické (Ofstedal et al., 2012; Ofstedal et al., 2010a; Ofstedal et al., 2010b; Herfindal et al., 2005; Jokela et al., 2012; Surakka et al., 2005).

1.1. Sekundární metabolity sinic

Sekundární metabolity jsou organické látky, které nejsou zahrnuty do vývoje, růstu či rozmnožování organismu. Sinice produkují mnoho různých typů chemických látek a odhaduje se, že právě sekundární metabolity tvoří největší diverzitu struktur v sinicové

buňce. Jedná se většinou o látky s malou molekulovou hmotností (přibližně 150-2000 Da), které především díky svým netypickým strukturním motivům velmi často vykazují různorodé biologické aktivity. Sekundární metabolity sinic mohou být škodlivé pro zdraví člověka a ovlivňují i ostatní organismy v ekosystému. Zároveň jsou však bohatým zdrojem látek s antivirotickou, antimykotickou, antibakteriální, antiparazitickou, imunosupresivní či dokonce protirakovinnou aktivitou (Herrero a Flores, 2008). Jedná se i o látky alelopatické podílející se na mezidruhové kompetici - herbicidní, algicidní. Díky poměrně snadné přípravě vzorků i rozvoji citlivých analytických metod, které umožňují detekovat látky vyskytující se v biomase v minimálních koncentracích (např. vysokoúčinná kapalinová chromatografie s propojením na hmotnostní spektrometrii – HPLC-MS), dochází v poslední době k velkému nárůstu studií týkajících se sekundárních metabolitů. Nejvíce strukturních typů sekundárních metabolitů bylo izolováno z řádu Oscillatoriales (49 %), poté z Nostocales (26 %), Chroococcales (16 %), Pleurocapsales (6 %) a Stigonematales (4 %) (Jones, 2010). Tato distribuce je však do jisté míry zatížena počtem běžně studovaných taxonů a dostupných sbírkových kmenů.

V biosyntéze sekundárních metabolitů sinic hraje nejvýznamnější roli neribozomální peptidová syntetáza (NRPS). Jedná se o multidoménové enzymatické komplexy uložené v cytoplasmatické membráně, které jsou schopny aktivovat široké spektrum prekurzorů a spojovat je za tvorby peptidové vazby. Typ a pořadí jednotlivých enzymů v těchto megasyntetázách určuje výslednou strukturu sekundárního metabolitu. Za pomoci této mašinerie je možno syntetizovat nepřehledné množství látek peptidového charakteru. Navíc mohou být NRPS komplexy propojeny s dalšími biosyntetickými moduly: např. polyketid syntetázou (PKS), čímž vznikající strukturní diverzita ještě narůstá. Většina doposud známých sekundárních metabolitů sinic, jako např. microcystiny, nodulariny, anatoxin-a, homoanatoxin-a, cylindrospermopsiny, aeruginosiny, cryptophiciny a mnoho dalších, je syntetizována hybridní NRPS/PKS biosyntetickou dráhou (Méjean et al., 2013). První identifikovaná NRPS/PKS biosyntetická dráha byla objevena v roce 2000 u microcystinu produkovaného *Microcystis aeruginosa* (Tillett et al., 2000). Dalšími důležitými skupinami sekundárních metabolitů kromě polyketidů a neribozomálních peptidů jsou alkaloidy, terpenoidy, deriváty šikimátové kyseliny, glykosidy, ale i ribozomální peptidy (Méjean et al., 2013). Sekundární metabolity sinic jsou dle chemické struktury nejčastěji lineární a cyklické peptidy, kterých bylo již v roce 2006 popsáno přibližně 600, což se odhaduje jen jako zlomek reálné diverzity (Welker et al., 2006).

1.1.2. Cyanotoxiny

Sinice mohou produkovat velké množství toxických látek tzv. cyanotoxinů, které mohou negativně působit na poměrně širokou škálu organismů od bakterií přes řasy, rostliny, bezobratlé živočichy až po obratlovce. U bezobratlých živočichů mohou cyanotoxiny snižovat míru jejich přežití a plodnost. Přesto je jejich role stále neznámá, jelikož se v evoluci vyvinuly dávno před tím než jejich predátoři (Rantala et al., 2004). Sinice se mohou ve stojatých vodách za vhodných podmínek přemnožit a vytvořit tzv. vodní květ. Zásadními podmínkami pro tvorbu vodního květu je vysoká teplota, intenzita světla, pH a dostupnost živin, především fosforu a dusíku, který se do vody dostává hlavně eutrofizací spojenou s lidskou činností (např. vyplavování živin z polí, odpadní vody). Zvýšený výskyt vodních květů sinic je též přisuzován globálním změnám klimatu, jelikož zvýšení teploty vod sinice kompetičně zvýhodňuje (Merel et al., 2013). Právě vodní květ je často spojován s produkcí cyanotoxinů, které mohou ohrozit zdraví živočichů včetně člověka. Nejčastějšími příčinami intoxikace je koupání v kontaminované vodě či její požití. K otravě však může dojít i konzumací organismů (např. některých mlžů, krevet, ryb) akumulujících toxické látky ve svých tkáních. První záznam toxického vodního květu, který způsobil otravu hospodářských zvířat, je z roku 1878. Jako původce byla určena *Nodularia spumigera* (Francis, 1878). V závislosti na koncentraci a chemické struktuře mohou toxiny způsobovat různé zdravotní potíže, jak akutní tak chronické. Proto se cyanotoxiny nejčastěji dělí podle jejich hlavního zdravotního účinku na hepatotoxiny, neurotoxiny, cytotoxiny či dermatotoxiny. Přehled nejvýznamnějších toxinů je uveden v tabulce I.

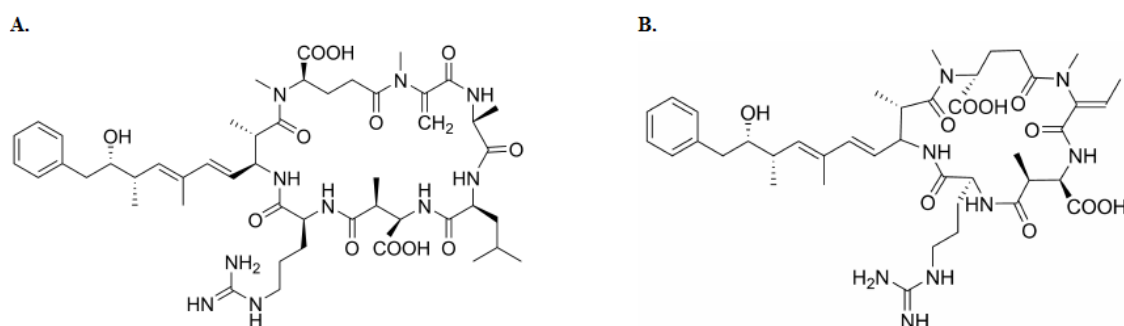
Tab. I: Přehled nejvýznamnějších cyanotoxinů. Převzato a upraveno (Zanchett, 2013; van Apeldoorn 2007)

Cyanotoxiny	sinicovní producenti	chemická klasifikace	mechanismus působení	primárně postižené orgány	LD50 (ug/kg)
Hepatotoxiny					
Microcystiny	<i>Dolichospermum, Microcystis, Planktothrix, Nostoc, Oscillatoria, Hapalosiphon</i>	cyklické heptapeptidy	inhibice protein fosfatázy 1 a 2A, potenciální rakovinový promoter?	játra - selhání, hemoragie	25-150
Nodulariny	<i>Nodularia, Nostoc</i>	cyklické pentapeptidy	inhibice protein fosfatázy 1 a 2A, potenciální rakovinový promoter a iniciátor	játra - selhání, hemoragie	30-70
Cylindrospermopsiny	<i>Cylindrospermopsis raciborskii, Umezakia natans, Aphanizomenon ovalisporum, A.bergi, Hormosquilla pringsheimi, Rhadiopsis curvata</i>	tricyklické guanidinové alkaloidy	inhibice syntézy proteinů - glutathionu, inhibice cytochromu P450	játra, ledviny - selhání	2100
Neurotoxiny					
Anatoxin-a	<i>Dolichospermum flos-aque, Aphanizomenon, Planktothrix, Microcystis, Oscillatoria, Cylindrospermum, Arthrospira, Raphidiopsis a druhem Phormidium favosum</i>	alkaloid	ireverzibilní vazba na nikotinový acetylcholinový receptor	nervové synapse - svalová paralýza	375
Anatoxin-a(s)	<i>Dolichospermum flos-aque, D. lemmermannii</i>	organofosfát	ireverzibilní inhibice acetylcholinesterázy	nervové synapse -svalová paralýza, křeče	31
Saxitoxiny	<i>Dolychospermum circinale, Aphanizomenon sp., Aphanizomenon, gracile, Cylindrospermopsis raciborskii, Lyngbya wollei</i>	karbamátové alkaloidy	blokáce sodných kanálů v nerových axonech	nervové axony- paralýza, ataxie, křeče	10
BMAA	mnoho	neproteinová aminokyselina	vazba na glutamátové receptory	neurodegenerativní syndrom	nespecifikováno
Dermatotoxiny					
Lyngbiatoxin-a	<i>Lyngbya</i>	alkaloid	silný rakovinový promotor, zesiluje účinek protein kinázy C	pokožka - podráždění, gastrointestinální trakt	250
Aplysiatoxin	<i>Lyngbya, Schizothrix, Planktothrix, (Oscillatoria)</i>	alkaloid	silný rakovinový promotor, zesiluje účinek protein kinázy C	pokožka podráždění	nespecifikováno

1.1.2.1. Hepatotoxiny

1.1.2.1.1. Microcystiny

Microcystiny patří mezi jedny z nejvíce studovaných hepatotoxinů. Jedná se o skupinu cyklických heptapeptidů, které jsou produkovány několika rody sinic jako jsou *Dolichospermum*, *Microcystis*, *Planktothrix*, *Oscillatoria*, *Nostoc* či *Hapalosiphon*. Microcystiny se mezi sebou liší zejména typem aminokyselin umístěných v pozici dvě a pozici čtyři. Jedním z nejběžnějších microcystinů je microcystin-LR o molekulové hmotnosti 995.17166 g/mol., který má v pozici dvě leucin (L) a v pozici čtyři arginin (R) (obr. 1). Díky různým kombinacím aminokyselin, které se mohou v těchto pozicích nacházet, existuje více než 90 variant tohoto toxinu (Dawson, 1998).



Obr. 1: Stukturní vzorce A. microcystin-LR, B. nodularin-R.

Mechanismem toxického účinku microcystinů je specifická inhibice protein fosfatáz 1 a 2A (enzymy zodpovědné za defosforylaci intracelulárních fosfoproteinů). Během působení microcystinu dochází ke kovalentní vazbě karbonylové skupiny N-methyldehydroalaninu microcystinu na cystein obsažený v protein fosfatáze. To však není hlavní příčinou inhibice. Hlavní příčinou je vazba netypické (neribozomální) aminokyseliny Adda v katalytickém místě protein fosfatáz, která jí touto vazbou inaktivuje (MacKintosh, et al., 1990). Kromě tohoto specifického efektu je microcystin zodpovědný za celou řadu cytotoxických a imunomodulačních efektů. Microcystin-LR může též zvyšovat oxidativní stres vedoucí k oxidační degradaci lipidů, při které volné radikály berou elektrony lipidům v buněčných membránách. Oxidativní stres vede ke ztrátě mitochondriálního membránového potenciálu a membránové permeability, což má za následek apoptózu či nekrózu (Ding et al., 2000; Wiegand a Pflugmacher, 2005). Struktury i mechanismy účinku microcystinů jsou tedy velmi dobře známy, avšak funkce těchto cytotoxinů v přírodních podmínkách a jejich

evoluční původ zůstává stále poměrně nejasný, a je tedy stále předmětem výzkumu (Wiegand a Pflugmacher, 2005).

U savců se akutní intoxikace microcystinem projevuje selháváním jater kvůli hemoragickému šoku a dále různým poškozením ledvin, plic či gastrointestinálního traktu (Wiegand a Pflugmacher, 2005). Microcystiny jsou toxické i při opakované dlouhodobé expozici a to v mnohem menších koncentracích. Dlouhodobá expozice může dokonce způsobit závažnější poškození zdraví než jednorázové vystavení daleko větší koncentraci. Microcystiny se označují jako potenciální promotory karcinogeneze, neboť existuje domněnka, že při chronických expozicích mohou podporovat rakovinné bujení (Babica et al., 2005).

Účinky microcystinů byly zkoumány v mnoha studiích na široké škále organismů. Byl zkoumán např. alelopatický efekt microcystinu na řasy či sinice, při kterém docházelo ke snížení růstu a fotosyntézy. Další řada studií byla prováděna na interakcích s vodními rostlinami, např. *Lemna minor*, *Ceratophyllum demersum* či *Spirodela oligorrhiza*, u kterých byla za přítomnosti microcystinu prokázána inhibice růstu (pokles chlorofylu a i b, karotenoidů) (Wiegand a Pflugmacher, 2005). Pozdější studie prokázala, že alelopatický efekt, který microcystin způsoboval *in vitro*, byl v koncentracích o mnohem vyšších, než je možné nalézt v přírodních vodách, a proto alelopatické efekty microcystinů pravděpodobně nejsou primární funkcí tohoto peptidu (Babica et al., 2006). Několik studií se zaměřilo na účinek microcystinu na terestrické hospodářsky pěstované rostliny, zavlažované vodou s obsahem microcystinu. Studie chtěly též upozornit na možné nebezpečí kontaminace závlahových vod microcystinem, jejich akumulaci v plodinách a následné konzumaci člověkem s negativním dopadem na jeho zdraví (McElhiney et al., 2001; Codd et al. 1999).

Vzrůst hustoty sinic produkujících microcystin má negativní ekologický dopad na zooplankton. Dochází k inhibici potravní aktivity zooplanktonu, snížení schopnosti filtrace, snížení populačního růstu, plodnosti i schopnosti přežívat (Chen a Xie, 2003). Pokles zooplanktonu má následně vliv na celou potravní síť v daném ekosystému, popř. akumulace microcystinu v zooplanktonu vede k přenosu toxinu do dalších potravních úrovní. Další skupiny organismů, ve kterých se toxin akumuluje jsou mlži, kraby, raci či krevety. Stejně jako u výše zmíněného zooplanktonu je zde riziko přenosu na konzumenta a tedy i člověka (Wiegand a Pflugmacher, 2005). Bylo prokázáno, že i velmi malé množství toxinu se hromadí v krevetách (hepatopankreas, srdce, mozek) bez zjevného projevu otravy, což je dalším důvodem k monitoringu hladiny microcystinu ve vodách (Kankaanp et al., 2004).

Z minulosti je známa i řada případů, kdy docházelo k hromadným úhynům jak hospodářských, tak divokých zvířat (krávy, ovce, ptáci) (Babica et al., 2005).

Nejzávažnější lidská intoxikace microcystinem, která byla doposud zaznamenána se odehrála v Caruaru v Brazílii v roce 1996, kdy 85% ze 130 hemodialyzovaných pacientů začalo trpět poruchami zraku, gastrointestinálními problémy, svalovou slabostí a bolestí jater. U sta z nich došlo k akutnímu selhání jater a 56 pacientů zemřelo. V krevním séru pacientů byly nalezeny microcystiny a v nádrži sloužící jako zásobní voda pro dialyzační centrum byly nalezeny sinice *Aphanizomenon*, *Oscillatoria* a *Spirulina* (Jochimsen et al., 1998).

1.1.2.1.2. Nodulariny

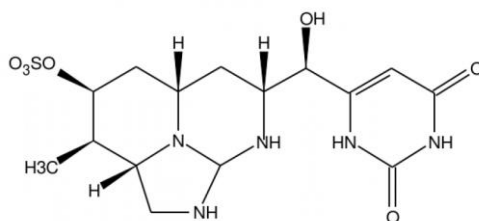
Nodulariny jsou neribozomální cyklické pentapeptidy, které mají velmi podobnou strukturu i biosyntetickou dráhu jako microcystiny a stejně jako microcystiny jsou inhibitory protein fosfatázy 1 a 2A (obr. 1). Nodularin o molekulární váze 824.9627 g/mol, který je produkovaný rody *Nodularia*, byl nalezen v brakických vodách Austrálie, Tasmánie, Nového Zélandu, Severní Evropy a v Baltském moři (Moffitt and Neilan 2004, van Apeldoorn et al., 2007). Kromě druhu *Nodularia spumigena*, která je hlavním producentem nodularinu, byly nalezeny i u druhu *N. harveyana* PCC7804, který produkoval izoformu nodularinu s hepatotoxickou aktivitou, a u symbiotických kmenů rodu *Nostoc* (Beattie et al., 2000; Gehringer et al., 2012). Jako producent analogu nodularinu byla označena i mořská houba *Theonella swinhoei*. Jelikož je houba schopna symbiózy s mnoha organismy, jednalo se pravděpodobně o nodularin sinicového původu (de Silva et al., 1992). Byly zaznamenány úhyny domácích i divokých zvířat po požití vody obsahující vodní květ *N. spumigena*; jako hlavní příčina smrti byla určena masivní hemoragie jater (Carmichael et al., 1988; Nehring et al., 1993). První záznam o výskytu toxického vodního květu *N. spumigena* je již z roku 1878 (Francis, 1878), avšak struktura nodularinu byla objevena až o sto let později (Carmichael et al., 1988).

V malých dávkách může být nodularin iniciátor i promotor rakoviny jater (Ohta et al., 1994). Hodnota LD₅₀ (koncentrace při níž uhyne 50% exponovaných organismů) u myší po i.p. injekci nodularinu byla stanovena na 30 až 70 µg/kg (van Apeldoorn et al., 2007). Úmrtí člověka následkem nodularinu nebylo zatím zaznamenáno (Merel et al., 2013). Byla též prokázána akumulace nodularinu v mlžích, krevetách a v některých rybách. Molekula nodularinu je značně termostabilní a nepodléhá degradaci ani během varu. Dokonce během kuchyňské úpravy intoxikovaných organismů může dojít k redistribuci jedu mezi

vnitřnostmi, masem a okolím. Toto zjištění vedlo k omezení činnosti některých pěstíren na mořské plody (Buyender et al., 2001).

1.1.2.1.3 *Cylindrospermopsiny*

Cylindrospermopsiny jsou hydrofilní tricyklické guanidinové alkaloidy (obr. 2). Jsou produkovány především sinicí *Cylindrospermopsis raciborskii*, ale i dalšími sinicemi jako je *Umezakia natans*, *Aphanizomenon ovalisporum*, *Rhadiopsis curvata*, *Aphanizomenon bergii* či *Hormoscilla pringsheimi* (Van Apeldoorn et al., 2007; Bohunická et al. 2015). Molekulární váha cylindrospermopsinu je 415,42154 g/mol.



Obr. 2: Strukurní vzorec cylindrospermopsinu.

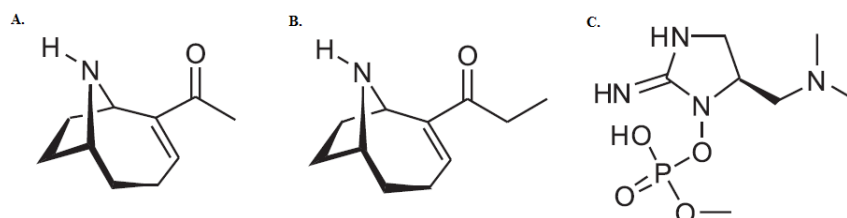
Vodní květy sinic produkující cylindrospermopsin jsou nejběžnější v subtropických, tropických a aridních oblastech. Jejich výskyt se díky invazivnosti zvyšuje i v Evropě. K invazivnosti přispívá schopnost *Cylindrospermopsis* spp. tolerovat nízkou hladinu osvětlení, což je poměrně velká kompetiční výhoda (Saker et al., 2001). První záznam toxicity cylindrospermopsinu je z roku 1979, kdy došlo k otravě přibližně 140 dětí po požití kontaminované pitné vody. Tato událost je známá jako *Palm Island mystery disease*. V roce 1992 byl cylindrospermopsin popsán jako silný hepatotoxin (Dilwyn et al., 2002). Je to však i silný cytotoxin (působí na tkáňové linie *in vitro*) a byla prokázána i jeho dermatotoxicita a genotoxicita (poškození DNA) (de la Cruz et al., 2013).

Mechanismus toxického účinku spočívá v ireverzibilní inhibici syntézy proteinů, hlavně glutathionu, který chrání organismus před oxidačním stresem (Runnegar et al., 1995). Dále je přisuzován inhibici cytochromu p-450, který hraje důležitou roli v metabolismu xenobiotik (Humpage et al., 2005). Po požití kontaminované vody dochází nejprve ke gastrointestinálním potížím. Následné poškození jaterních a ledvinových buněk vede ke vzniku hepatitidy a malfunkci ledvin. Poškozené buňky cév mají za následek hemoragii (Duy et al., 2000). Negativně působí nejen na obratlovce (otravy hospodářských zvířat), ale i na bakterie, protozoa, rostliny a bezobratlé (de la Cruz et al., 2013). Cylindrospermopsin je hojně vyplavován extracelulárně a je schopný se akumulovat v některých mlžích a rybách (Van Apeldoorn et al., 2007).

1.1.2.2. Neurotoxiny

1.1.2.2.1. Anatoxin-a, homoanatoxin-a, anatoxin-a(S)

Anatoxin-a je cyanotoxin produkovaný sinicemi rodu *Dolichospermum* (zejména *Dolichospermum flos-aquae*), ale i dalšími rody sinic jako jsou *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Planktothrix*, *Cylindrospermum*, *Oscillatoria*, *Arthrospira*, *Raphidiopsis* a druhem *Phormidium favosum* (Gugger et al., 2005; Aráoz et al., 2010). Anatoxin-a je bicycliklický sekundární aminový alkaloid s molekulárním vzorcem $C_{10}H_{15}NO$ s molekulární vahou 165.2322 g/mol (obr.3) (Devlin et al., 1977). Strukturní methylovaný analog homoanatoxin-a ($C_{11}H_{18}NO$) (obr. 3) byl poprvé izolován ze sinice *Oscillatoria formosa* (Skulberg et al., 1992) a dále byl nalezen u sinic rodu *Dolichospermum*, *Raphidiopsis* a *Phormidium*. Některé druhy sinic produkují dokonce oba typy (Aráoz et al., 2010).



Obr. 3: Strukturní vzorce A. anatoxin-a, B. homoanatoxin-a, C. anatoxin-a(S)

První studie poukazující na toxicitu anatoxinu byly provedeny v 60. letech 20. století kvůli nevysvětleným úhynům dobytka v Kanadě, který se napájel z jezera obsahujícího vodní květ. Toxin byl izolován a testován na myších a kvůli okamžité smrti, kterou způsoboval, byl nazván VFDF-*very fast death factor*. V roce 1977 byla popsána jeho chemická struktura a toxin byl pojmenován nynějším názvem anatoxin-a (Devlin et al., 1977). Biosyntetická dráha anatoxinu-a je složena z hybridních proteinů NRPS a PKS a domnívá se, že biosyntetázy anatoxinu-a a homoanatoxinu-a mají společný evoluční původ (Mejean et al., 2014). Mechanismus účinku anatoxinu-a spočívá v napodobování činnosti acetylcholinu při interakci s nikotinovými acetylcholinovými receptory (nAChR) nervových buněk ve vegetativním nervstvu a na nervosvalové ploténce. Za normálních podmínek dochází na nervosvalové ploténce k vazbě acetylcholinu na nAChR, což způsobí otevření iontových kanálků pro Na^+ a Ca^{2+} ionty a následnou depolarizaci membrány vedoucí ke svalové kontrakci. Anatoxin-a je mnohem účinnější než acetylcholin a je také mnohem účinnější než nikotin - exogenní agonista pro nAChR. Afinita anatoxinu-a k nikotinovému receptoru je přibližně 20-krát větší než acetylcholinu a může být 3 až 50-krát větší než afinita nikotinu (Thomas et al., 1993). Anatoxin-a se tedy naváže na nAChR místo

acetylcholinu. Na rozdíl od acetylcholinu je však anatoxin-a rezistentní k hydrolytické degradaci acetylcholinesterázou, která za normálních podmínek štěpí acetylcholin na cholin a acetát, čímž ukončuje synaptický přenos a cholin je recyklován pro přenos další. Jelikož není anatoxin-a acetylcholinesterázou degradován, dochází k nepřetržitému otevření iontových kanálků a ke kontinuální stimulaci svalových buněk, projevující se jako záškuby či křeče (Osswald et al., 2007). Po určité době dojde k desenzibilaci receptorů a zastavení průchodu iontů, což má za následek svalovou únavu až ochrnutí. Stejný mechanismus účinku vede k opakované stimulaci respiračních svalů a k jejich paralýze. Paralýza respiračních svalů je pravděpodobně jednou z nejčastějších příčin úmrtí zvířat pijících vodu kontaminovanou anatoxinem, který je navíc výborně absorbován gastrointestinálním traktem. Při laboratorních pokusech na potkanech bylo zjištěno, že se anatoxin-a chová jako agonista pro nAChR také v kardiovaskulárním systému, čímž zvyšuje krevní tlak a srdeční rytmus. Roli agonisty pro nAChR hraje i v mozkových neuronech potkanů i člověka a v boviních chromafinních buňkách dřeně nadledvin (NCEA, 2006).

Úhyny zvířat po požití vody kontaminované anatoxinem byly zaznamenány mnohokrát. Např. úhyny dobytka (Carmichael et al., 1975) či úmrtí psů po požití vody obsahující bentické sinice produkující anatoxin-a (Hamill et al., 2001; Edwards et al., 1992; Gugger et al., 2005; Wood et al., 2007). Přestože se doposud nevyskytl případ otravy člověka, toxikologické riziko anatoxinu pro člověka, je studováno zejména kvůli masivnímu výskytu otrav dobytka a dalších zvířat (Merel et al., 2013). V roce 2003 došlo k úmrtí jednoho člověka na zástavu srdce a u druhého k výskytu těžkých gastrointestinálních problémů. Tyto osoby byly v kontaktu s vodou s vodním květem *D. flos-aquae* a v krvi, sklivci a játrech zemřelého byl nalezen anatoxin-a. O rok později se ukázalo, že se nejednalo o anatoxin-a, ale o aromatickou aminokyselinu fenylalanin, jenž je i za pomoci některých moderních analytických technik snadno zaměnitelná s anatoxinem (NCEA, 2006). Záměna byla způsobená podobným chováním fenylalaninu během hmotnostně spektrometrické analýzy (shoda v hodnotě m/z molekulárního iontu anatoxinu-a a fenylalaninu o m/z 166), podobností v retenci a fragmentačním spektru ve většině analytických metod (Gugger et al., 2005). Za pomoci hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením jsou však molekuly velmi dobře rozlišitelné.

Poslední dobou dochází k velkému rozvoji doplňků stravy získávaných z řas i sinic (*Aphanizomenon*, *Spirulina*) pro jejich předpokládané prospěšné účinky na zdraví. Monitorovací studie však prokázala přítomnost anatoxinu-a v některých doplňcích stravy z rodu *Spirulina*. *Spirulina* doposud není známá produkcí anatoxinu-a, ale některé kmeny

rodu *Arthrospira*, která bývá někdy s rodem *Spirulina* zaměňována, ano. Dalším problémem je pěstování těchto sinic v otevřených systémech, kdy může dojít ke kontaminacím anatoxinovými producenty. Doplňky stravy by proto měly být testovány na přítomnost sinicových toxinů (Rellán et al., 2009).

Anatoxin-a(s) je guanidinium-metyl-fosfát-ester a je anatoxinu-a i homoanatoxinu-a chemicky nepříbuzný (obr. 3). Anatoxin-a(s) je inhibitor acetylcholinesterázy s mechanismem účinku podobný jako organofosfátové pesticidy a indukuje svalovou paralýzu. Je produkovaný *Dolichospermum flos-aquae* a *D. lemmermannii* a je zodpovědný za několik případů úmrtí zvířat (van Apeldoorn et al., 2007; Merel et al., 2013). Hodnota LD₅₀ po i.p. injekci a době expozice 24 h byla u myši stanovena na 375 µg/kg (van Apeldoorn et al., 2007).

Další známé neurotoxiny jsou saxitoxiny a β-N-methylamino-L-alanin (BMAA) a lipopeptidy antillatoxin, kalkitoxin a jamaicamid (Aráoz et al., 2010).

1.1.2.3. Cytotoxiny

Cytotoxické látky jsou všeobecně látky, které mohou působit v kterékoli fázi buněčného cyklu a inhibovat růst buněk *in vitro*. Cytotoxiny jsou velmi heterogenní skupina, jak podle chemické struktury tak podle jejich mechanismu působení. Může se jednat o polyketidy, peptidy či alkaloidy, přičemž nejčastější forma výskytu jsou lineární a cyklické peptidy (Welker et al., 2006).

Do roku 2010 bylo popsáno 82 základních typů cytotoxických látek u různých druhů vodních i terestrických sinic (Tomek, 2010). Mezi mořskými sinicemi bylo nejvíce cytotoxických látek izolováno z bentických kmenů rodů *Lyngbya* spp. a *Symploca* spp. (Oftedal et al., 2010). Častý výskyt látek z cytotoxickým účinkem v sinicových extraktech dokazují rozsáhlejší screeningové studie, v kterých cca 33 % extraktů z terestrických sinic, 40 % mořských sinic, 38 % brakických sinic a 30 % brakických bentických sinic vykazují tento účinek (Hrouzek et al., 2011; Hrouzek et al., 2015; Costa et al. 2014; Surakka et. al. 2005; Herfindal et. al. 2005). Vzhledem k tomuto častému výskytu je důležité zabývat se vlivem cytotoxinů na ostatní organismy včetně člověka a mechanismem jejich účinku.

Cytotoxické látky mohou být dvou typů. Ty, které působí *nepřímě* tzn. jak na rakovinné buňky, tak na normální buňky a mohou být potenciálně nebezpečné pro různé organismy včetně člověka. A potom *specifické*, které působí pouze proti rakovinným buňkám a ty mohou být potenciálními léky různých karcinomů.

1.1.2.3.1. Nеспецифicky působící cytotoxické látky

Mezi hlavní mechanismy účinku cytotoxických látek patří inhibice vodivých spojů (gap junction) mezi buňkami (Nováková et al.,2013), ovlivnění permeability buněčné membrány (Jokela et al.,2012; Hrouzek et al.,2012; Tomek et al.,2015) a tvorba reaktivních forem kyslíku (Poniedziaek et al.,2015). Jedním z nejčastěji se vyskytujících cytotoxinů je cylindrospermopsin, který je inhibítozem syntézy proteinů a induktorem ROS (Poniedziaek et al.,2015) (viz 1.1.2.1.3). Narušení permeability buněčné membrány je typické pro cyklické lipopeptidy. Následkem permeabilizace dochází k influxu vápenatých iontů a nekrotické smrti buňky. Tento mechanismus účinku byl zjištěn u několika cytotoxických látek jako jsou anabaenolysiny A a B (Oftendal et al., 2012; Jokela et al., 2012), puwainaphyciny F/G (Hrouzek et al., 2012), muscotoxin A/B (Tomek et al., 2015) či pseudodesmin A (De Vleeschouwer et al., 2014). Navíc aktivita anabaenolysinu A je vázána na přítomnost cholesterolu v membránách, což naznačuje preferenci pro eukaryotickou cytoplazmatickou membránu (Oftendal et al, 2012). Lipopeptidy doposud izolované ze sinic působí především na eukaryotické buňky, zatímco lipopeptidy izolované především z gram-positivních bakterií působí zejména na prokaryotické buňky. To je pravděpodobně způsobeno rozdílným aminokyselinovým složením v peptidovém cyklu. Lipopeptidy jiného původu než sinicového obsahují především kyselé či zásadité aminokyseliny, zatímco sinicové lipopeptidy jsou složeny převážně z neutrálních aminokyselin (Tomek et al., 2015). Permeabilizace eukaryotní buněčné membrány je tedy běžný mechanismus cytotoxicity sinicových lipopeptidů, což může mít potenciálně nebezpečné zdravotní následky na zdraví člověka.

1.1.2.3.2. Specifické cytotoxické protirakovinné látky

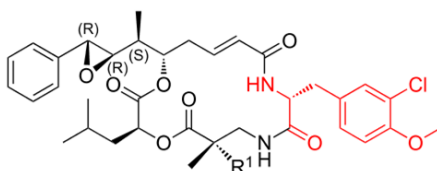
Některé sekundární metabolity působí selektivněji na určitý typ rakovinné linie, a pokud navíc indukují v buňkách programovanou smrt (apoptózu), jsou potenciálně zajímavé pro vývoj protirakovinných léků. Vzrůstající rezistence rakovinných buněk na dostupné léky a výskyt nových typů karcinomů jsou důvody hledání nových protirakovinných látek. Sinice jako bohatý zdroj sekundárních metabolitů jsou proto velmi vhodnými kandidáty. Když se podaří najít látku s protirakovinným účinkem, indukující apoptózu, musí před uvedením do oběhu projít řadou klinických testů. Tento proces zahrnuje preklinickou fázi a III klinické fáze. Každá fáze musí být schválena úřadem pro kontrolu léčiv, než může daná látka postoupit do další. Potenciální protirakovinný lék je nejprve testován na laboratorních zvířatech (preklinická fáze) a až po mnoha testech na zdravých lidech. III klinické fáze se liší

v počtu lidí, které podstupují experimentální podávání látky (I. 20-80, II. až 300, III. stovky až 3000). Nakonec musí být lék schválen národními kontrolními úřady než může být vpuštěn do oběhu (Dixit a Suseela, 2013). Doposud bylo identifikováno mnoho látek s protirakovinným a proapoptickým účinkem *in vitro*. Přesto do preklinické či klinické fáze testování se dostalo pouze pár z nich: dolastatin 10 a 15, curacin a, cryptophyciny a jejich analogy. Všechny tyto látky jsou inhibitory mikrotubulů a působí v nanomolárních koncentracích.

1.1.2.3.2.1. Cryptophyciny

Cryptophyciny jsou cyklické depsipeptidy, jenž z hlediska mechanismu účinku patří do skupiny tzv. Vinca-alkaloidů. Cryptophycin 1 byl izolovaný z terestrické sinice *Nostoc* sp. (ATCC 53789). Svůj název získal díky své antimykotické aktivitě proti *Cryptococcus* sp. a primárně byl také jako antimykotikum patentován (Schwartz et al., 1990). Až později byla objevena jeho cytotoxická aktivita. V přírodě se našlo více než 25 variant z čehož cytotoxicky nejúčinnější je stále cryptophycin 1 (Rohr et al., 2006).

Mechanismem účinku cryptophycinu je ireverzibilní vazba na mikrotubuliny, čímž se inhibuje buněčné dělení (Smith et al., 1994). Tento mitotický blok v G2/M fázi buněčného cyklu vede ke spuštění řízené smrti buňky skrze indukci proapoptotických proteinů bcl-2 rodiny (Bax/Bak), které vytvoří v mitochondriální membráně pór, čímž dojde k vyloučení cytochromu c a spuštění apoptózy.



R¹ = H: cryptophycin-1 (1)

R¹ = Me: cryptophycin-52 (2)

Obr. 4: Strukturální vzorec cryptophycinu 1 a cryptophycinu 52.

Je selektivně účinný proti buňkám kolorektálního, nosohltanového a prsního karcinomu, adenokarcinomu slinivky a nemalobuněčnému karcinomu plic (Shih a Teicher, 2001; Trimurtulu et al., 1994). Jelikož není negativně ovlivněn glykoproteinem-p, je účinný i u buněk rezistentních na cytostatika jako je taxol nebo vinblastin (Rohr et al., 2006). Přes všechny tyto žádané vlastnosti způsobuje cryptophycin při klinických testech vedlejší účinky (bolest svalů, neuropatie), které jsou dány hlavně jeho nepolární vlastností. Proto byl syntetizován analog **cryptophycin 52** (obr. 4), který sice dosáhl II. fáze klinických testů, ale

kvůli vedlejším účinkům muselo být jeho testování také zastaveno. Stále však dochází k pokusům o syntézu účinné varianty (Weiss et al., 2013).

1.1.2.3.2.2. Dolastatin 10 a 15

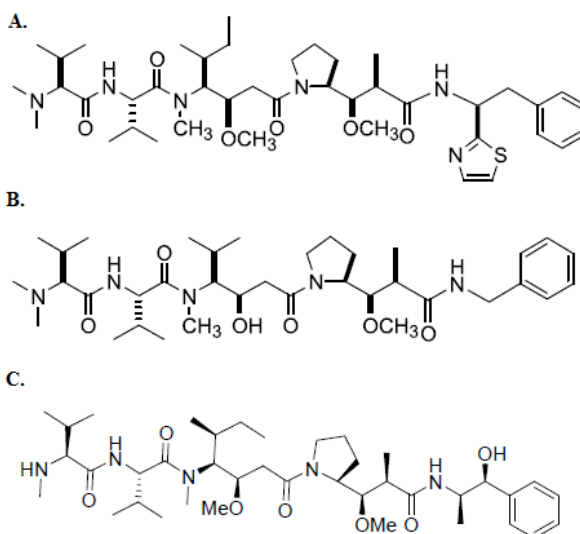
Dolastatin 10 byl poprvé izolován v 80. letech 20. století z mořského mlže *Dolabella auricularia*. Kvůli malé výtěžnosti (1 mg/100 kg mlže) byla jeho struktura odhalena až o 15 let později. Následně byl identifikován také jeho pravý původce a to sinice *Symploca* sp., čímž se vysvětlila malá výtěžnost z *D. auricularia*. Dolastatin 15 je lineární pentapeptid, působící velmi obdobným způsobem jako cryptophycin (Simmons et al., 2005). Mechanismus účinku je ireverzibilní vazba na mikrotubuliny, čímž se inhibuje buněčné dělení. Dále ovlivňuje hydrolýzu guanosin trifosfátu, který hraje důležitou roli v depolymerizaci mikrotubulů. Jelikož se mikrotubuly dělicího vřeténka nemohou depolymerizovat, dochází k zástavě buněčného dělení v metafázi (Bai et al., 1990). Dolastatin 10 se dostal do II. fáze klinického testování, ale musel být vyloučen kvůli vedlejším účinkům (neuropatie). Proto byl syntetizován jeho analog **soblidotin** s upravenou chemickou strukturou, který inhibuje dělení, indukuje kaspáza-3-dependentní apoptickou dráhu a je účinný i na multirezistentní rakovinné buňky. Nyní je soblidotin v II. fázi klinického testování (Fanale et al., 2015). Dalším analogem dolastatinu 10 je **monomethyl-auristatin E**. Nejúčinnější aplikací monomethyl-auristatinu E je jeho navázání na protilátku, která látku zacílí do rakovinných buněk a je poté oddělena katepsinem díky přítomnosti „cathepsin cleaveable linker“ domény v konstrukt. Tento konjugát auristatin-monoklonální protilátka je v současnosti již používán v medicíně (Francisco et al., 2003).

Obr. 5: Strukturní vzorce

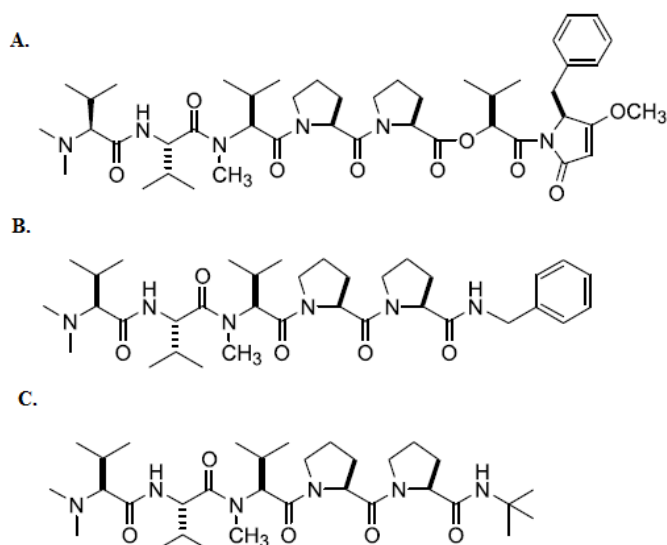
A. dolastatin 10,

B. soblidotin,

C. monomethyl-auristatin E.



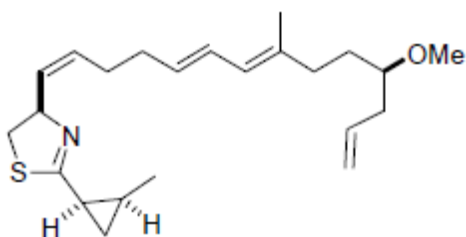
Dolastatin 15 je velmi podobný dolastatinu 10. Kvůli malé polaritě předešlých variant byly syntetizovány nové analogy: **cemadotin** a **synthadotin**. Oba tyto analogy postoupily až do II. fáze klinických studií. Cemadotin musel být vyloučen, kvůli vedlejším účinkům (neuropenie) a synthadotin (tasidotin) je nyní v II. fázi klinického testování (Simmons et al., 2005; Fanale et al., 2015). Dolastatin 10 i 15 selektivně působí na buňky kolorektálního, prsního a nemalobuněčného karcinomu plic a také na karcinom prostaty a melanom (Newmann a Cragg, 2004).



Obr. 6: Strukturální vzorce A. dolastatin 15, B. cemadotin, C. synthadotin.

1.1.2.3.2.3. Curacin A

Curacin A je heterocyklický alkaloid, který byl poprvé izolován ze sinice *Lyngbya majuscula* v Curaçau. Mechanismem účinku je též inhibice mikrotubulů, čímž zastavuje buněčné dělení. Kvůli malé rozpustnosti ve vodě bylo syntetizováno mnoho analogů, které jsou v preklinické fázi testování (Wipf et al., 2002).



Obr. 7: Strukturální vzorec curacinu A.

Dalším cytotoxinem ovlivňujícím složku cytoskeletu, konkrétně mikrofilament, je **tolytoxin**. Ten způsobuje narušení organizace mikrofilament tím, že inhibuje polymerizaci i depolymerizaci aktinu. U některých buněk inhibuje cytokinezi, ale karyokineze probíhá normálně, tudíž dochází ke vzniku mnohojadernosti. Jeho účinky však nebyly prokázány *in vivo* (Patterson et al., 1993).

Dalšími látkami vyizolovanými ze sinic jako potenciální protirakovinné léky jsou např.: **Apratoxin A**, **Bisebromoamid**, **Biselyngbyasid** **Coibamid A**, **Largazole** a **Somocystinamid A**.

1.1.2.3.2.4 Apoptóza

Apoptóza je jeden z hlavních typů programované buněčné smrti (PCD) a někdy je také s PCD synonymizována. Apoptóza je soubor procesů nezbytných k udržení homeostáze organismu, k fyziologickému vývoji tkání a k odstranění starých či poškozených buněk (Susan et al., 2007). Tyto biochemické procesy vedou k typickým morfologickým změnám buňky, které poprvé popsal Kerr (1972). Během apoptózy dochází ke zmenšení objemu buněk (smrštění), čímž dojde k zahuštění cytoplazmy a k „nahuštění“ organel k sobě. Objevuje se pyknóza, což je ireverzibilní kondenzace chromatinu v jádře a jeho následná fragmentace tzv. karyorhexe. Degradaci cytoskeletu se mění tvar cytoplazmatické membrány a vznikají nepravidelné záhyby membrány tzv. bleby. Z těchto výběžků se odpojují apoptická tělíska, které obsahují fragmeny organel a jaderného materiálu. Apoptická tělíska uzavírají organely v nepoškozené buněčné membráně a jsou *in vivo* rychle fagocytovány makrofágy či okolními buňkami a degradovány v jejich fagolysozómech. Nedochozí tedy k vylévání obsahu buňky do extracelulárního prostoru a tudíž, narozdíl od nekrózy, nevzniká zánětlivá reakce (Kerr, 1972). Jelikož nevzniká zánět, je vyvolání apoptózy v rakovinných buňkách výhodné z hlediska léčby nádorů. Mezi nekrozou a apoptózou však není ostrá hranice. Tyto typy buněčné smrti mohou probíhat buď nezávisle, následně po sobě nebo dokonce současně, čímž dochází k nejednoznačně pojmenovatelným typům buněčné smrti (Saikumar et al., 1999).

Existují dvě hlavní dráhy indukující apoptózu: vnější (receptorová) a vnitřní (mitochondriální). Spouštěcí mechanismy **vnější** apoptické dráhy mohou být cytokiny, toxiny, hormony, růstové faktory či oxid dusný. Vnější receptorová dráha je aktivována vazbou extracelulárních ligandů (Fas-L, TNF) na membránové „receptory smrti“ Fas či TNF-alfa (tumor nekrotizující faktor). Receptory smrti obsahují doménu DD (death domain),

na kterou se po aktivaci receptoru ligandem váže membránový protein. U Fas se jedná o membránový protein FADD a u TNF o membránový protein TRADD, oba z nich obsahují doménu DD. FADD obsahuje navíc ještě doménu DED (death effector domain), kterou se váže na DED pro-kaspázy 8. Tím vzniká komplex DISC (death-inducing signalling complex), který autokatalyticky aktivuje kaspázu 8. Aktivované kaspázy 8 aktivují pro-kaspázu 3, která je klíčová v apoptickém procesu a spouští kaspázovou kaskádu (Ouyang et al., 2012).

Spuštění **vnitřní** apoptické dráhy může být vyvoláno absencí růstových faktorů, cytokinů nebo hormonů či působením UV záření, toxinů, virové infekce, hypoxie či hypertermie (Susan et al., 2007). Všechny tyto spouštěče neaktivují membránové receptory a apoptické procesy jsou iniciovány v mitochondrii. Působením intracelulární signalizace dochází k vytvoření specifického kanálu vytvořeného proteiny Bax/Bak v mitochondriální membráně a následné ztrátě membránového potenciálu, čímž se do cytosolu vyplaví látky z mezimembránového prostoru mitochondrie. Jedná se v zásadě o dvě skupiny látek: první skupina zahrnuje cytochrom c, Smac/DIABLO a serin proteázu HtrA2/Omi. Cytochrom c se váže na Apaf-1 protein a pro-kaspázu 9, čímž vzniká komplex tzv. apoptozom, který je autokatalytický (aktivuje kaspázu 9) a je opět schopný aktivovat exekutivní kaspázu 3. Kaspáza 9 je hlavním představitelem vnitřní aktivace apoptózy přes mitochondrie. Smac/DIABLO a serin proteáza HtrA2/Omi inhibují inhibitory apoptózy. Druhá skupina látek zahrnuje endonukleázy, které způsobují fragmentaci DNA (Susan et al., 2007; Ouyang et al., 2012; Ghobrial et al., 2005).

Zásadní roli v apoptóze mají **kaspázy**. Kaspázy jsou proteázy exprimovány v neaktivní proenzymové formě ve většině buněk. Jsou schopny autokatalýzy a aktivace ostatních kaspáz, čímž umožňují iniciaci a existenci proteolytické kaskády. Proteolytická kaskáda, v které se kaspázy navzájem aktivují, vede k vzniku apoptických signálů a k následné smrti buňky. Celkem se apoptické kaskády zúčastňuje 7 kaspáz. Iniciační kaspázy 2, 8, 9 a 10 (8 a 10 mají DED, 2 a 9 mají CARD doménu) jsou na začátku apoptické kaskády a aktivují efektorové kaspázy 3, 6 a 7, které slouží k aktivaci apoptických procesů a štěpení celé řady intracelulárních proteinů. Efektorové kaspázy se účastní štěpení aktinu s následnou změnou v cytoskeletu, laminu v jaderné membráně, regulačních proteinů buněčného cyklu a dále štěpení proteinů replikace, transkripce a štěpení DNA aktivací endonukleázy. Následně dochází k morfologickým změnám (fragmentace jádra, „blebbing“) a ke vzniku apoptických těles. Prozánětlivé kaspázy 1, 4, 5 se vyskytují při nekróze (Rai et al., 2005).

Mnoho sekundárních metabolitů izolovaných ze sinic je schopno v různých typech živočišných buněk indukovat apoptózu. Při testování extraktů ze sinic z terestrických i vodních habitatů bylo objeveno mnoho kmenů způsobujících apoptózu u buněk akutní myeloidní leukémie (AML) (Liu et al., 2014). Sinice produkující látky způsobující apoptózu jsou rozšířenější v rodech *Microcystis* a *Anabaena* oproti např. rodu *Nostoc*, *Calothrix*, *Phormidium*, *Planktothrix* či *Pseudanabaena* (Herfindal, 2005; Oftedal et al., 2010a; Oftedal et al., 2010b). Další látky vyvolávající v některých rakovinných buňkách apoptické morfologické změny byly nalezeny v mořských sinicích rodu *Synechocystis* a *Synechococcus* (Martins et al., 2008).

Jedny z nejznámějších studovaných toxinů **microcystin** a **nodularin** jsou inhibitory protein fosfatázy 1 a 2A, které jsou nezbytné pro mnoho signálních drah jako je např. i kaspázová kaskáda. Po přidání microcystinu-LR a nodularinu byly v některých buněčných typech zaznamenány charakteristické apoptické morfologické změny jako je blebbing, zmenšení objemu a kondenzace chromatinu. Navíc byla apoptóza vyvolána během několika minut přes aktivaci kaspázy 3. Ve většině případů se apoptické změny projevují nejdříve po 30 minutách od expozice, ale spíše v rámci hodin. Diskutuje se tedy, zda tyto inhibitory protein fosfatázy způsobují nějakou jinou zkrácenou apoptickou dráhu (Fladmark et al., 1999). Myšlenka, že by se mohlo jednat o nekrózu, která většinou probíhá rychle, byla vyvrácena dalšími studiemi, v níž pomocí TUNEL analýzy bylo potvrzeno, že účinek microcystinu-LR opravdu způsobuje fragmentaci jaderné DNA a tedy apoptózu. Další mechanismus (kromě inhibice PP1 a PP2A) vysvětlující apoptické účinky microcystinu-LR je indukce oxidativního stresu s následným narušením mitochondriálního membránového potenciálu v hepatocytech. Díky zvýšené permeabilitě mitochondriální membrány je poté vyplavován cytochrom c, tím se aktivuje kaspáza-3 a následně celá kaskáda apoptózy (Ding et al., 2000). Kromě hepatocytů, které jsou schopny velmi efektivně přijímat microcystiny, byly pozorovány známky apoptózy po expozici microcystinem u lymfocytů, hepatocytů, neuronů a ledvinných epitelálních buněk (Huanga et al., 2015).

Dále by do této kapitoly patřily všechny látky z kapitoly 1.1.2.3.2. Specifické cytotoxické protirakovinné látky.

2. CÍLE PRÁCE

Cílem této práce bylo:

- zjistit cytotoxickou aktivitu vybraných bentických kmenů rodu *Anabaena*
- stanovit přítomnost známých toxinů (microcystin-LR, anatoxin-a, nodularin, cylindrospermopsin) v biomase těchto sinic
- u cytotoxických extraktů se pokusit určit látku zodpovědnou za biologický efekt
- identifikovat potenciální induktory apoptózy (potenciální protirakovinné látky) pomocí časoběrné mikroskopie pro budoucí testování
- zhodnotit stávající metodiku stanovení cytotoxicity pomocí MTT a to zejména porovnáním různých časů expozice a možné kombinace různých přístupů (MTT test, časoběrná mikroskopie, počítání buněk)

3. METODIKA

3.1. Chemikálie

- **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)
- **methanol** (Scharlau)
- **acetonitril** (Scharlau)
- **kyselina mravenčí** (Lachema, národní podnik Brno)
- **mořský písek** (VWR)

3.2. Pěstování a sklizení sinicové biomasy a média

Kmeny bentických sinic rodu *Anabaena* byly obdrženy ze sbírky RNDr. Elišky Kozlíkové, Ph.D, Hydrobiologický ústav, Biologické centrum AV ČR, v. v. i. (tab. II). Celkem bylo obdrženo 39 kmenů a po přijetí byly naočkovány do 350 ml kultivačních válců s BG-11 médiem (Stanier et al., 1971). Kmeny byly pěstovány při konstantní teplotě 28°C, ozáření 50 W/m² a probublávány vzduchem obohaceným o 2% CO₂. Biomasa byla opakovaně sklizena každých 7 až 10 dnů centrifugací (centrifuga Hettich Universal 320, 3175 g, 15 min), v závislosti na narostlém množství. Při prvním sklizení biomasy bylo zároveň sklizeno médium, v kterém byly sinice pěstovány. Před lyofilizací byla sinicová biomasa uložena do hlubokomrazicího boxu (-75°C).

3.3. Výroba extraktů z média

Supernatant byl přefiltrován přes GF/F filtr 47 mm za sníženého tlaku, aby došlo k odstranění zbytků biomasy z média. Následně byla provedena extrakce na pevné fázi za sníženého tlaku, při níž byl určitý objem média nanesen na C8 OASIS HLB Cartridge. Látky zachycené na sorbentu byly následně vymyty 100% metanolem tak, aby 100 ml

přefiltrovaného media odpovídalo 1 ml metanolu. Hotový extrakt byl ve skleněné vialce uložen do hlubokomrazícího boxu.

3.4. Výroba extraktu z biomasy do metanolu

Lyofilizovaná biomasa byla společně s mořským pískem a malým množstvím 70% metanolu homogenizována ve třecí misce, aby došlo k narušení buněčných stěn a získání intracelulárního obsahu. Po důkladném rozmělnění byla vzniklá směs převedena pomocí 15 ml 70 % metanolu do skleněných centrifugačních zkumavek a extrahována po dobu 1 h. Po centrifugaci (Hettich Universal 320, 3175 g, 10 min) byl vzniklý extrakt převeden do plastové zkumavky vhodné do vakuového koncentrátoru miVac QUATTRO. Ve vakuovém koncentrátoru byl vzorek odpařován za sníženého tlaku až do úplného vysušení. K dehydratovanému vzorku byl přidán 100% metanol, tak aby 1 ml metanolu odpovídal 200 mg navážené lyofilizované biomasy. Poté byla zkumavka vložena do ultrazvukové vany Kraintek K-6LM, kde došlo k rozpuštění dehydratovaného vzorku v přidaném metanolu a vzniku homogenní suspenze. Vzniklá suspenze byla převedena do mikrozkušavky a centrifugována v centrifuze Eppendorf MiniSpin 5 min při 12100 g, aby došlo k usazení nerozpustných zbytků. Vzniklý supernatant byl převeden do skleněné vialky a uložen do hlubokomrazícího boxu.

Tab.II: Seznam kmenů obdržných ze sbírky RNDr. Elišky Kozlíkové, Ph.D,
Hydrobiologický ústav, Biologické centrum AV ČR, v. v. i.

Kmen	Lokalita	Lokalizace	Rok	Izoloval	Sběr
Kut 7	Kutnar	Jižní Morava	2009	Kozlíková	Kozlíková, Lepšová, Řeháková
HL6	Horní Lesák	SZ od Jarošova n. Než.	2010	Kozlíková	Lepšová
PastA	Pastvsko - centrální mokřad	Jižní Morava	2011	Kozlíková	Kozlíková, Lepšová, Řeháková
SAG1	Sbírka Göttingen	?	?	?	?
Zad 21	Zadní rybník	Jižní Morava	2009	Kozlíková	Kozlíková, Lepšová, Řeháková
1403-1	Sbírka Göttingen	?	?	?	?
SAG8	Sbírka Göttingen	?	?	?	?
Vřes L1/4	Vřesová, louže 1	Sokolovsko	2010	Kozlíková	Kozlíková, Řeháková
Kut 5	Kutnar	Jižní Morava	2009	Kozlíková	Kozlíková, Lepšová, Řeháková
Treb K1/11	Třeboň, sbírka mokřadních rostlin BU AV ČR, kád'1	Třeboň	2010	Kozlíková	Hauer
Sorgen 7	Sorgen	Sokolovsko	?	Kozlíková	Kozlíková
Sorgen 5	Sorgen	Sokolovsko	?	Kozlíková	Kozlíková
Sorgen 3	Sorgen	Sokolovsko	?	Kozlíková	Kozlíková
Fin6B	Sbírka lab. prof. K. Sivonen, Finsko, Helsinky	?	?	?	?
VŘES JH 12	Vřesová, jezírko horní	Sokolovsko	2010	Kozlíková	Kozlíková, Řeháková
VSmol 13	Východní pata Smolnické výsypky	Sokolovsko	2010	Kozlíková	Kozlíková, Řeháková
Vřes JH 11	Vřesová, jezírko horní	Sokolovsko	2010	Kozlíková	Kozlíková, Řeháková
HL 5	Horní Lesák	SZ od Jarošova n. Než.	2010	Kozlíková	Lepšová
Kut 9	Kutnar	Jižní Morava	2009	Kozlíková	Kozlíková, Lepšová, Řeháková
Za Čírk 7	Malá tůň za Čirkovou tůňí	Jižní Morava	2011	Kozlíková	Kozlíková, Lepšová, Řeháková
Treb K2/7	Třeboň, sbírka mokřadních rostlin BU AV ČR, kád'2	Třeboň	2010	Kozlíková	Hauer
VŘES L2/3	Vřesová, louže 2	Sokolovsko	2010	Kozlíková	Kozlíková, Řeháková
Janice 1	GPS: 50°48.401, 14°2.699; 451, minerotrofi rašeliniště	Ostrov u Tisé, severní Čechy	2011	Kozlíková	Kulichová
Janice 2	GPS: 50°48.401, 14°2.699; 451, minerotrofi rašeliniště	Ostrov u Tisé, severní Čechy	2011	Kozlíková	Kulichová
Janice 11	GPS: 50°48.401, 14°2.699; 451, minerotrofi rašeliniště	Ostrov u Tisé, severní Čechy	2011	Kozlíková	Kulichová
Janice 13	GPS: 50°48.401, 14°2.699; 451, minerotrofi rašeliniště	Ostrov u Tisé, severní Čechy	2011	Kozlíková	Kulichová
Janice 15	GPS: 50°48.401, 14°2.699; 451, minerotrofi rašeliniště	Ostrov u Tisé, severní Čechy	2011	Kozlíková	Kulichová
Janice 16	GPS: 50°48.401, 14°2.699; 451, minerotrofi rašeliniště	Ostrov u Tisé, severní Čechy	2011	Kozlíková	Kulichová
Janice 18	GPS: 50°48.401, 14°2.699; 451, minerotrofi rašeliniště	Ostrov u Tisé, severní Čechy	2011	Kozlíková	Kulichová
SOOS Cis 12	Soos, Cisařský pramen	Františkovy Lázně	2010	Kozlíková	Kozlíková, Řeháková
Sokol 419/4	?	Sokolovsko	2012	Kozlíková	Kozlíková
D5	?	Droužkovice	???	???	???
Vřes L2/7	Vřesová, louže 2	Sokolovsko	2010	Kozlíková	Kozlíková, Řeháková

3.5. Výroba extraktů z biomasy do acetonitrilu

Extrakt byl zhotovován pro analýzu přítomnosti anatoxinu, a proto se při výrobě pracovalo pouze s malým množstvím biomasy. Biomasa byla lyofilizovaná v mikrozkuřavkách, do kterých se následně přidalo malé množství písku a okyseleného (0,1 % kys. mravenčí) 80 % acetonitrilu. S pomocí třecí tyčinky se směs v mikrozkuřavce homogenizovala a nechala 30 minut extrahovat. Následně byl vzorek centrifugován 5 min v centrifuze Eppendorf MiniSpin při 12100 g a vzniklý extrakt byl převeden do skleněného insertu a analyzován na HPLC-HMRS (viz níže).

3.6. Kultivace buněk *in vitro* a nasazování buněk na experiment

Test cytotoxicity byl prováděn na buněčné linii lidských rakovinných buněk děložního čípku HeLa. HeLa buňky byly pěstovány v inkubátoru Sanyo MCO-15AC při teplotě 37°C a atmosféře s 5 % CO₂, což přibližně odpovídá poměrům v extracelulární tekutině. Dále byla udržována relativní vlhkost vzduchu 90 %, aby se zamezilo odpařování vody z kultivačního média. Jelikož jsou HeLa buňky adherentní, byly pěstovány v kultivační lahvi s

polystyrenovým hydrofilním povrchem. HeLa buňky rostly v tekutém médiu RPMI 1640. RPMI médium obsahuje mnoho látek nezbytných pro růst buněk jako jsou anorganické soli, aminokyseliny a vitamíny a dále obsahuje acidobazický indikátor fenolovou červeň, který odráží změny pH kultivačního média. Pro přípravu média bylo nutné k základnímu RPMI roztoku (500 ml) přidat L-glutamin (5,7 ml), FBS (57 ml) a antibiotika (5,7 ml). L-glutamin se přidává jako aminokyselina nezbytná pro syntézu proteinů, FBS (fetální bovinní sérum) obsahuje růstové faktory nutné pro proliferaci buněk a antibiotika se předchází infekci.

Po určité době dochází v médiu k vyčerpání živin a k vzrůstu konfluency buněk do takové míry, že je nutné provést tzv. pasážování. Informaci o vhodné době pasážování nám poskytuje též acidobazický indikátor. Acidobazický indikátor (fenolová červeň) způsobuje červené zbarvení média v optimálním pH. Pokud pH v médiu jen nepatrně klesá, barví se médium do oranžova a tím signalizuje, že je nutné buňky zpasážovat. Pasážování bylo prováděno přibližně 2x týdně a pouze v případě, že buňky nebyly nasazovány na experiment. Před pasážováním bylo nutné všechny roztoky, které přišly do kontaktu s buňkami tzn. RPMI, PBS a trypsin vytemperovat na 37°C. Pasážování se provádělo sterilně v laminárním boxu a mezi jednotlivými kroky se veškeré otvírané nádoby a zkumavky opalovaly nad kahanem, aby se minimalizovalo riziko kontaminace. Z kultivační lahvičky bylo vylito staré médium s vyčerpanými živinami. HeLa buňky, které byly adherované na dně lahvičky, se několikrát opláchly PBS (pufrovaný fyziologický roztok). Poté bylo přidáno 400 µl trypsinu, který se nechal na buňky maximálně 10 minut působit v inkubátoru. Trypsin jakožto proteáza způsobil rozrušení mezibuněčných kontaktů a kontaktů buněk s povrchem kultivační lahve. Působení trypsinu bylo zastaveno přidáním RPMI media a suspenze buněk byla rozmíchána automatickou serologickou pipetou, aby se od sebe buňky oddělily. Poté nastaly dvě možnosti: *buňky nebyly nasazovány na experiment*, a tudíž se přibližně ¾ buněk vylily do odpadu, nebo *buňky byly nasazovány na experiment* a v tomto případě se ¾ buněk přelily do zkumavky. V obou případech se ke zbylému objemu buněk v kultivační lahvičce přililo RPMI medium a kultivační lahev se vrátila zpět do inkubátoru, kde buňky naadherovaly a pokračovaly v růstu.

Při přípravě na experiment bylo nutné buňky spočítat v Bürkerově komůrce, aby bylo možné připravovat na všechny experimenty standardní počet buněk. V případě mých experimentů byl roztok s buňkami ředěný na výslednou koncentraci $4 \cdot 10^4$ buněk/ 200 µl RPMI. Následně byla suspenze buněk přenesena pipetou do 96-jamkové transparentní kultivační destičky (200 µl na jamku) a ponechána adhezi do druhého dne. Do všech

okrajových jamek byla místo suspenze přenesena voda, aby nedošlo k vysychání. Druhý den byl k připraveným buňkám přidán expoziční roztok.

3.7. Příprava expozičního roztoku

Expoziční roztok byl připravován ze sinicového metanolového extraktu (či extraktu z média), který se odpařil buď pomocí vakuového koncentrátoru, nebo pod proudem dusíku. Odpařené množství extraktu bylo nahrazeno ekvivalentním množstvím roztoku RPMI média a 100 % metanolu v poměru 8:2 a promícháno na třepačce. K připraveným buňkám (200 μ l) bylo přidáno 10 μ l expozičního roztoku, tudíž koncentrace metanolu ve výsledném roztoku nepřekročila 1 %. Test byl prováděn v technickém triplicátu (3 jamky) a doba působení byla 24, 48 a 72 hodin. Celý proces byl opakován třikrát (3 biologické replikáty) – vždy s nově nasazenými buňkami a s nově odpařeným extraktem

3.8. MTT test – princip

Nejběžnější metodou vyhledávání protirakovinných a cytotoxických látek v přírodních produktech je testování na buňkách a následné vyhodnocení pomocí metod založených na redukci tetrazoliových solí (MTT, MTS, XTT or WST). Tyto metody jsou jednoduché, levné, rychlé a umožňují práci s velkým množstvím vzorků (Berridge et al., 2005). 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (dále MTT) test je celosvětově rozšířená metoda, používaná již od 80. let 20. století, kdy nahradila předtím používané radioaktivní metody (*thymidin incorporation assay*). MTT test je kolorimetrický test založený na redukci ve vodě rozpustného žlutého MTT metabolicky aktivní buňkou na ve vodě nerozpustný fialový formazan. K maximální redukci formazanu dochází 4 hodiny po inkubaci (Brown, 1999). Vzniklý formazan je rozpuštěný v dimethylsulfoxidu či isopropanolu a vyhodnocen spekrofotometricky. Absorbance barveného roztoku je obvykle měřena mezi 500 až 600 nm a je přímo úměrná metabolické aktivitě buněk (Wu, 2010). Počáteční domněnka, že redukci tetrazolia má na svědomí pouze mitochondrie byla vyvrácena a bylo potvrzeno, že v redukci MTT hrají roli i další buněčné části jako je cytoplazma, nemitochondriální membrány zahrnující endozómy, lysozomy a plazmatickou membránu za využití NADH/NADPH (Berridge, 2005). I když jsou často výsledky MTT prezentovány jako množství živých buněk (Mosmann et al., 1983), míra redukce MTT spíše odráží metabolickou aktivitu nebo míru NADH produkce, která je pravděpodobně zodpovědná za největší redukci tetrazolia (Berridge, 2005).

3.8.1. MTT test - provedení

MTT roztok byl vyroben rozpuštěním 4 mg MTT v 1 ml PBS. Kádinka s MTT roztokem byla vložena na několik vteřin do ultrazvukové vany a následně byl roztok přefiltrován přes bakteriologický filtr s velikostí pórů 0,2 μm . Tyto kroky byly provedeny pro zajištění řádného rozpuštění MTT krystalů a pro vznik homogenní směsi. Po určité době působení extraktu na buňky (tj. 24, 48 či 72 h) bylo do každé jamky přidáno 10 μl MTT na 200 μl RPMI. Destička byla umístěna na 4 hodiny do inkubačního boxu. Poté byla kultivační destička centrifugována 15 min při 556 g, čímž se buňky se vzniklým formazanem usadily na dno a zbylé RPMI medium mohlo být vylito. K buňkám bylo přidáno 200 μl DMSO a nechalo se 30 min působit. Následně byla destička vložena do spektrofotometru Tecan-Microplate reader – Sunrise a 3 minuty byla promíchávána. Měření absorbance probíhalo při měřící vlnové délce 590 n.m. a referenční vlnové délce 640 n.m. Průměr naměřených absorbancí triplikátu s přidaným extraktem byl vztahován k průměrné absorbanci kontrol (jamky bez přidaného extraktu, 100% viabilita), čímž bylo získáno procentuální zastoupení živých buněk v práci označované jako viabilita.

3.9. Časoběrná mikroskopie

Fyziologické i patologické děje, které probíhaly během působení extraktu na HeLa buňky byly zaznamenávány pomocí časoběrného inverzního mikroskopu Zeiss Axio Observer Z1. Mikroskop byl vybavený inkubátorem, který zajišťoval konstantní kultivační podmínky jako je teplota 37°C a atmosféra s 5% CO₂. Na experiment bylo použito objektivové zvětšení 10-krát a fotografický záznam byl automaticky zhotovován každých 45 min po dobu 72 h. Díky zaznamenanému videu bylo možné zjistit čas, ve kterém nastaly patologické změny, a odhadnout, o jaké patologické změny se jednalo - apoptóza či nekróza (tabule II). Další výhodou časoběrného záznamu byla možnost odhadnutí přírůstku buněk a to spočítáním jejich počtu v expozičních časech 0, 24, 48 a 72 hodin od přidání extraktu na výseku mikroskopického pole (tabule I). Procentuální přírůstek buněk byl vyjádřen mezi jednotlivými časy. Celkový cytostatický efekt byl hodnocen dle počtu dělení od času 0 (přidání extraktu) po konečný čas expozice, tedy 72 h.

3.10. Hledání známých toxinů: Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (HRMS)

Surové extrakty byly analyzovány na přítomnost známých toxinů jako je microcystin, anatoxin-a, nodularin a cylindrospermopsin. Přítomnost microcystinu v metanolovém extraktu byla analyzována na Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 UHPLC+ vybaveného detektorem s diodovým polem (DAD). K reverzní HPLC byla na separaci látek použita kolona Phenomenex Kinetex C18 (150 x 4,6 mm; 2,6 μm). Jako mobilní fáze byla použita voda (A) a acetonitril (B) oboje obsahující 0,1 % kys. mravenčí. Průtok byl nastaven na $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a gradient byl následující: A/B 85/15 (0 min), 85/15 (v 1 min), 0/100 (v 20 min), 0/100 (v 25 min) a 85/15 (v 30 min). Kapalinový chromatograf byl napojen na hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením Bruker Impact HD s ionizací elektrosprejem a byly nastaveny následující hodnoty: teplota sušícího plynu 200°C , průtok sušícího plynu 12 l/min, tlak nebulizačního plynu 3 bar a napětí na kapiláře 3800 V. Jednotlivá spektra byla zachycována v rozmezí 20-2600 m/z s frekvencí sběru dat 2 Hz. Nástřík surového extraktu byl obvykle 5 μl .

Při analýze acetonitrilových extraktů na zjištění přítomnosti anatoxinu byla použita kolona TSKgel 5 μm Amide-80 (250 x 4,6 mm; 5 μm) a nástřík byl obvykle 20 μl . Pro separaci látek byla použita izokratická eluce s mobilní fází 71 % vody a 29 % acetonitrilu okyselenou 0,1 % HCOOH. Ostatní parametry byly totožné jako u analýzy metanolových extraktů. Microcystiny a nodularin v surovém extraktu byly vyhledávány podle charakteristického fragmentu v MS2 spektru tzv. Adda fragmentu o m/z 135,08. Anatoxin byl vyhledáván podle hodnoty m/z 166,12 a cylindrospermopsin podle hodnoty m/z 416,12.

3.11. Frakcionace: Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Metoda HPLC-MS byla použita na vybrané extrakty, u nichž byla prokázána cytotoxická aktivita MTT testem. Na analýzu extraktu byl použit vysokoúčinný kapalinový chromatograf Agilent HP 1100 s DAD detektorem. K separaci látek byla použita kolona s reverzní fází C8 Agilent Zorbax Eclipse-XDB (150 x 4,6mm; 5 μm). Jako mobilní fáze byla použita voda (A) a metanol (B) oboje obsahující 0,1 % kys. mravenčí. Průtok byl nastaven na $0,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a gradient byl následující: A/B 70/30 (0 min), 70/30 (v 1 min), 0/100 (v25 min), 0/100 (v 35 min) a 70/30 (v 40 min).

Vybraný surový extrakt byl nejprve analyzován na chromatografu Agilent 1100 a dle UV chromatogramu (280 nm) byly vybrány oblasti (frakce), které byly separovaně chytány

do zkumavek. Frakce byly odpařeny a byl přidán 100 % metanol odpovídající celkovému objemu všech nástříků.

Frakce byly testovány na HeLa buňkách stejným způsobem jako je uvedeno výše. Pokud byla nalezena cytotoxicky aktivní oblast, byla provedena refrakcionace této frakce na HPLC-HMRS, aby bylo možné zjistit, která konkrétní látka způsobuje cytotoxický efekt. Produkty refrakcionace byly opět testovány na HeLa buňkách.

4. VÝSLEDKY

4.1. Pěstování sinicové biomasy a výroba extraktů

Celkem bylo kultivováno a opakovaně sklizeno 39 kmenů bentických sinic rodu *Anabaena* a ze získaných biomas byly vyrobeny extrakty do 70 % metanolu a okyseleného (0,1 % kys. mravenčí) 80 % acetonitrilu. Bohužel 11 extraktů muselo být kvůli opakovaným kontaminacím vyloučeno (tabule I). Jmenovitě se jednalo o kmeny **Janice 1, Janice 2, Janice 11, Janice 13, Janice 15, Janice 16, Janice 18, SOOS Cís 12, Sokol 419/4, D5, Vřes L2/7**. Před tím než byly kmeny vyloučeny, byl zopakován celý proces pěstování a výroby extraktu. Bohužel se i v nově vyrobených extraktech vyskytly kontaminace. K odstranění kontaminantů byly použity bakteriologické filtry o velikosti pórů 0,2 μm a UV záření, obojí bez výsledku. Relevantní data z testů cytotoxicity bylo nakonec možno získat u 28 kmenů. Z médií, v kterých byly sinice pěstované, bylo vyrobeno celkem 37 extraktů, z nichž bylo 26 testovaných na buňkách (odpovídající kmenům, u kterých byl testován extrakt z biomasy). Dva z nich nemohly být z důvodů ucpávání SPE kolonky zhotoveny.

4.2. Celkové hodnocení cytotoxicity

Cytotoxická aktivita testovaných kmenů proti buněčné linii HeLa byla hodnocena podle tří parametrů:

- metabolická aktivita určená pomocí MTT testu
- počtu dělení buněk získaných pomocí časoměrné mikroskopie
- morfologických změn buněk určených pomocí časoměrné mikroskopie

Testy cytotoxicity pomocí MTT testu byly opakovány minimálně 3-krát (3 biologické replikáty), vždy v technickém triplicátu (3 jamky) v časech 24, 48 a 72 h od přidání extraktu k HeLa buňkám. Kvůli nestabilitě některých extraktů a velké směrodatné odchylce byla však většina extraktů testována mnohokrát.

Následující kategorie byly použity při hodnocení testovaných kmenů ve 24, 48 a 72 h od přidání extraktu, přičemž celkové hodnocení působení extraktu bylo vždy podle nejvíce cytotoxické kategorie, do které alespoň v jednom čase testovaný kmen náležel.

Kategorie cytotoxicity:

silně cytotoxický kmen: 0 - 50 % viabilita HeLa buněk

mírně cytotoxický kmen: 50 - 75 % viabilita HeLa buněk

necytotoxický kmen: 75 - 100 % viabilita HeLa buněk

Kategorie cytostatického působení:

silně cytostatický kmen: počet dělení 0-1

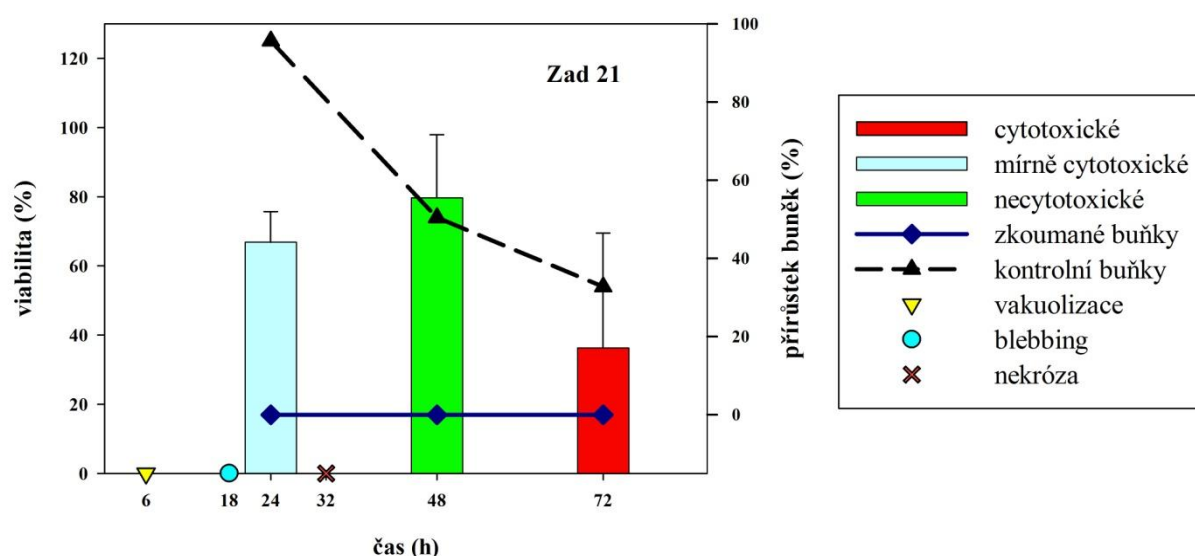
mírně cytostatický kmen: počet dělení 1-1,5

necytostatický kmen: počet dělení 1,5 – více

Na exponovaných buňkách byly pozorovány morfologické změny, které byly charakterizovány jako nekróza, apoptóza, vakuolizace či „blebbing“ (tabule II).

4.3. Uspořádání grafů

Data získaná všemi třemi metodami jsou sumarizována v následujících grafech. Na obr. 8 je znázorněn graf s legendou, vysvětlující uspořádání, které je u všech prezentovaných grafů totožné. Sloupcové grafy vyjadřují viabilitu buněk získanou pomocí MTT testu po přidání extraktu v časech 24, 48 a 72 h. Hodnotu viability je možné odečíst z osy y₁. Barevně jsou odlišené kategorie cytotoxicity (viz legenda). Spojnicové grafy vyjadřují změny v přírůstku buněk v procentech mezi jednotlivými časy tj. 0-24 h, 24-48 h a 48-72 h a jejich hodnoty náleží k ose y₂. Čárkovaný graf znázorňuje přírůstek kontrolních buněk a plná čára znázorňuje přírůstek buněk exponovaných extraktu. Morfologické změny byly do grafu zaneseny ve formě symbolů (viz legenda) a odpovídají časům, kdy bylo minimálně 80 % buněk postižených danou změnou. Tyto morfologické změny jsou vztaženy pouze k času, tudíž pouze k ose x.



Obr. 8: Ilustrační obrázek uspořádání grafu znázorňující výsledky testů cytotoxicity.

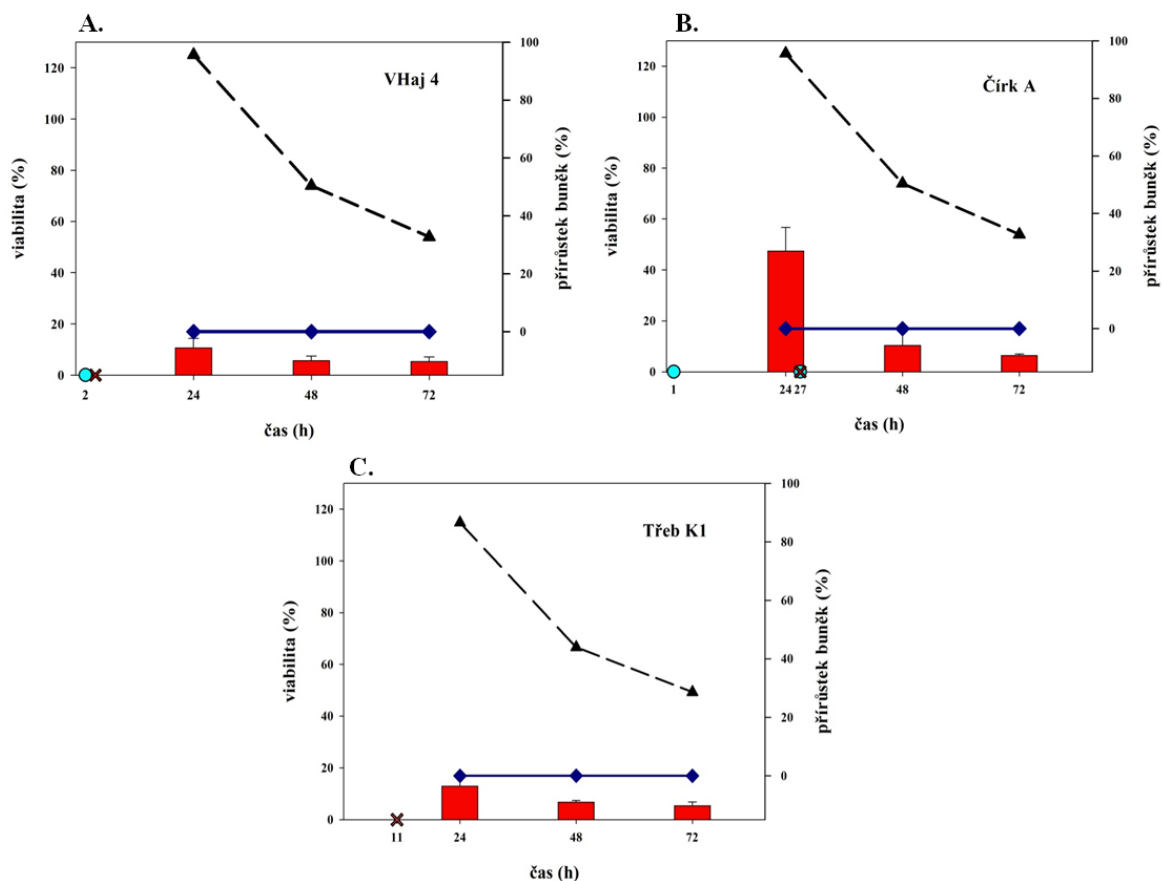
4.4. Silně cytotoxické kmeny

Do této kategorie náleží kmeny, které alespoň v jednom čase způsobily pokles viability pod 50 %, v porovnání s kontrolou (tab. III). Z 28 studovaných kmenů vykazovalo silnou cytotoxicitu 10 kmenů, tedy cca 30% zkoumaných sinic. U všech byl zaznamenán cytostatický účinek (stoprocentní inhibice buněčného dělení) a u všech byla zaznamenána nekrotická morfologie buněčné smrti, buď jako primární nekróza, nebo jako sekundární nekróza po některé z řízených forem buněčné smrti.

Tab.III: Přehled silně cytotoxických kmenů.

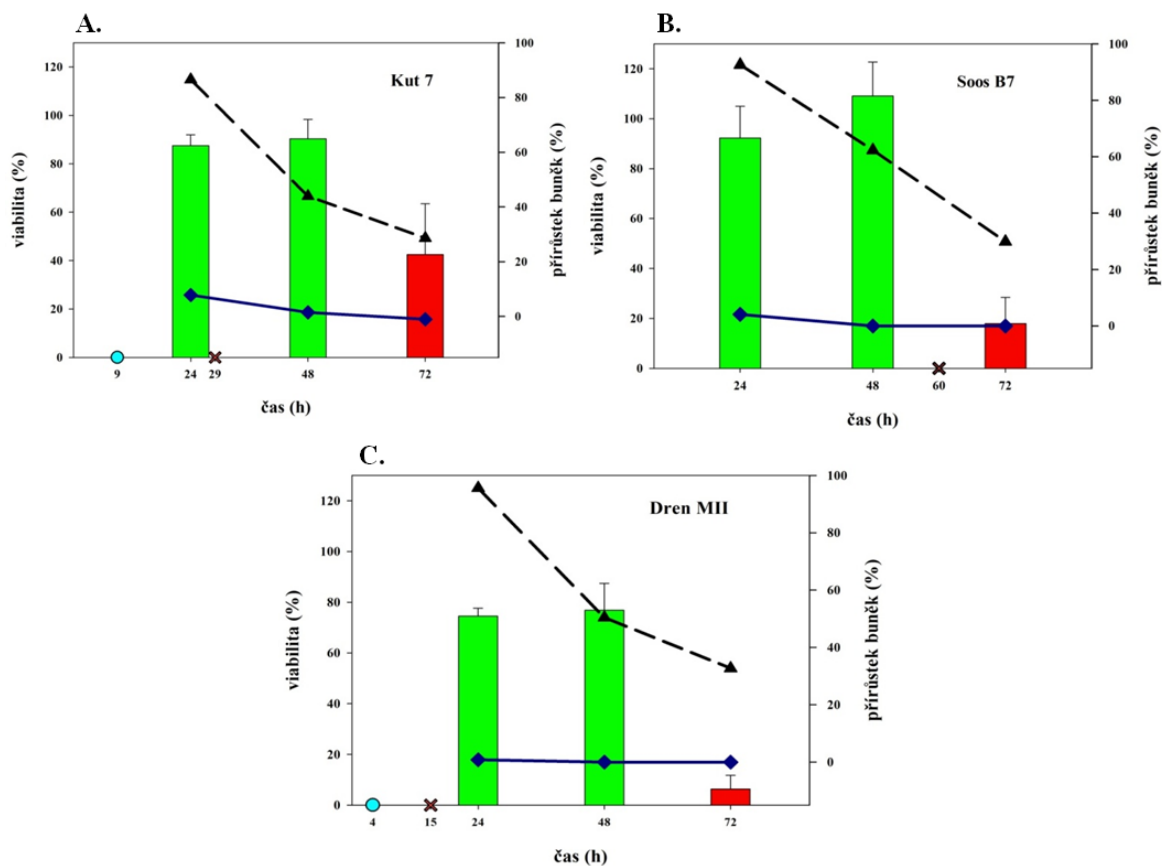
Kmen	Hodnocení dle MTT	Hodnocení dle dělení	Hodnocení dle morfologie
VHaj 4	silně cytotox.	cytostatické	nekróza
Třeb K1	silně cytotox.	cytostatické	nekróza
VŘES L2/3	silně cytotox.	cytostatické	nekróza
Třeb K1/11	silně cytotox.	cytostatické	nekróza
Soos B7	silně cytotox.	cytostatické	nekróza
Čírk A	silně cytotox.	cytostatické	apoptóza či nekróza?
Dren MII	silně cytotox.	cytostatické	blebbing/nekróza
Kut 7	silně cytotox.	cytostatické	blebbing/nekróza
Zad 21	silně cytotox.	cytostatické	vakuoliz./blebbing/nekróza
Kut 5	silně cytotox.	cytostatické	vakuoliz./blebbing/nekróza

Kmeny **VHaj 4**, **Čírk A**, **Třeb K1** byly hodnoceny jako silně cytotoxické ve všech zkoumaných časech. Po přidání extraktu došlo k zástavě buněčného dělení (obr. 9). Buňky po přidání extraktu Čírk A vykazovaly v čase 24 h ještě 50 % viabilitu (metabolickou aktivitu). Hodnota 50% v čase 24 h přesně odpovídá nulovému přírůstku buněk vůči kontrole. Velmi brzy po přidání extraktu došlo u buněk k „*blebbingu*“ a kolem 27 hodiny buňky podstoupily pravděpodobně sekundární nekrózu. Přidání extraktů VHaj 4 a Třeb K1 vyvolalo poměrně rychlou buněčnou smrt a následkem toho bylo nulové buněčné dělení i velmi nízká viabilita buněk.



Obr. 9: Vliv působení extraktů kmenů **A.** Vhaj 4, **B.** Čírk A, **C.** Třeb K1 na viabilitu stanovenou pomocí MTT, buněčného dělení a morfologii HeLa buněk.

Extrakt y kmenů **Kut 7**, **Soos B7** a **Dren MII** působily na HeLa buňky velmi podobně (obr. 10). Na základě výsledků MTT nedošlo v časech 24 a 48 h k ovlivnění viability buněk, zatímco v čase 72 h byla naměřena viabilita buněk nižší než 50 %. Buňky se po celou dobu expozice nerozdělily, či se rozdělily naprosto minimálně. Z toho vyplývá, že nedělicí se buňky exponované extraktem měly téměř stejné MTT hodnoty jako dělicí se buňky kontroly. To znamená, že zkoumané buňky musely mít několikanásobně větší metabolickou aktivitu než kontrolní buňky. Po přidání extraktu Kut 7 se nejprve objevila vakuolizace a kolem 29 h buňky jevíly známky nekrózy. Očekávaný pokles hodnoty viability se však projevil se zpožděním a to až po 72 h. Obdobný efekt byl zaznamenán u působení kmene Dren MII, kdy byla na základě morfologického pozorování v 15 h zaznamenána nekróza, ale k poklesu viability došlo až v 72 h. Po přidání extraktu kmene Soos B7 bylo pozorováno zastavení buněčného dělení, ale k smrti buněk dle mikroskopického pozorování došlo až v čase 60 h, což se projevilo jako pokles viability v měřeném čase 72 h.

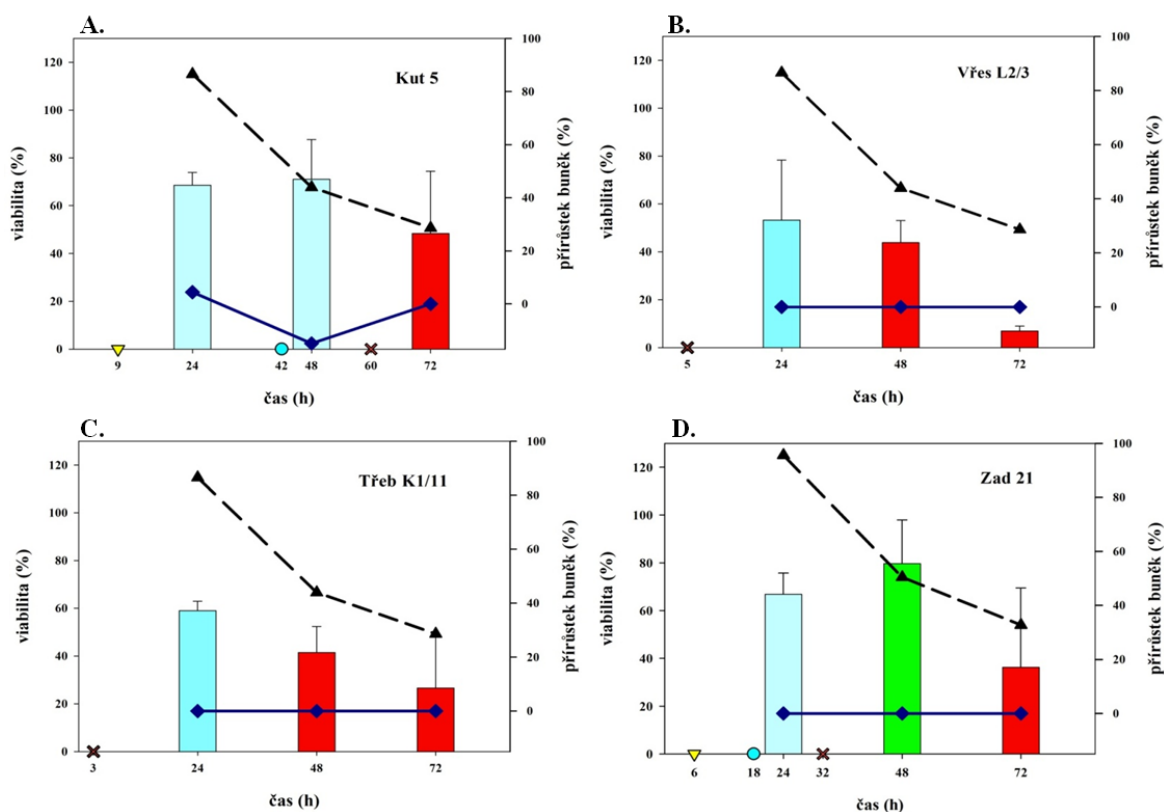


Obr. 10: Vliv působení extraktů kmenů **A. Kut 7**, **B. Soos B7**, **C. Dren MII** na viabilitu stanovenou pomocí MTT, buněčného dělení a morfologii HeLa buněk.

K velmi podobnému účinku jako u předchozích extraktů došlo též u extraktu **Kut 5**. Ale na rozdíl od předešlých extraktů byl u buněk v čase 24 a 48 h naměřen mírný pokles viability, který se dále prohloubil pod 50 % v čase 72 hod. Dělení bylo v časech 0-24 h a 48-72 h nulové a v čase 24-48 h dokonce záporné, což znamená, že muselo dojít k rozpadu některých buněk. Během působení extraktu se v cytoplazmě buněk objevila vakuolizace, poté se na buněčné membráně objevily „blebby“ a až v 60 h došlo ke smrti buněk, což se projevilo jako pokles viability v 72 h.

Kmeny **Vřes L2/3** a **Třeb K1/11** vykazovaly téměř totožný cytotoxický efekt. Oba kmeny byly ve 24 h mírně cytotoxické (i když oba na hraně se silnou cytotoxicitou) a oba kmeny vykazovali v 48 a 72 h silnou cytotoxicitu, přičemž se vzrůstajícím časem se cytotoxický efekt zvyšoval. Buňky se od přidání extraktu po celou dobu expozice nerozdělily a velmi krátce po přidání extraktu jeví známky nekrózy, která se však projevila poklesem viability až v 48 h.

U kmene **Zad 21** byla zaznamenána v expozičním čase 24 h mírná cytotoxicita. Mezi expozičními časy 24-48 h došlo k nepatrnému zvýšení viability až k hranici kategorie necytotoxických extraktů. V čase 72 h však došlo k výraznému poklesu viability. Buňky se po celou dobu působení extraktu nerozdělily. Po časné vakuolizaci a blebningu byla kolem 32 hod zaznamenána nekrotická morfologie. Přesto byly buňky v čase 48 h stále metabolicky aktivní a pokles viability jako následek nekrózy se projevil až v 72 h.



Obr.11: Vliv působení extraktů z kmenů **A.** Kut 5, **B.** Vřes L2/3, **C.** Třeb K1/11, **D.** Zad 21 na viabilitu stanovenou pomocí MTT, buněčného dělení a morfologii HeLa buněk.

4.5. Mírně cytotoxické kmeny

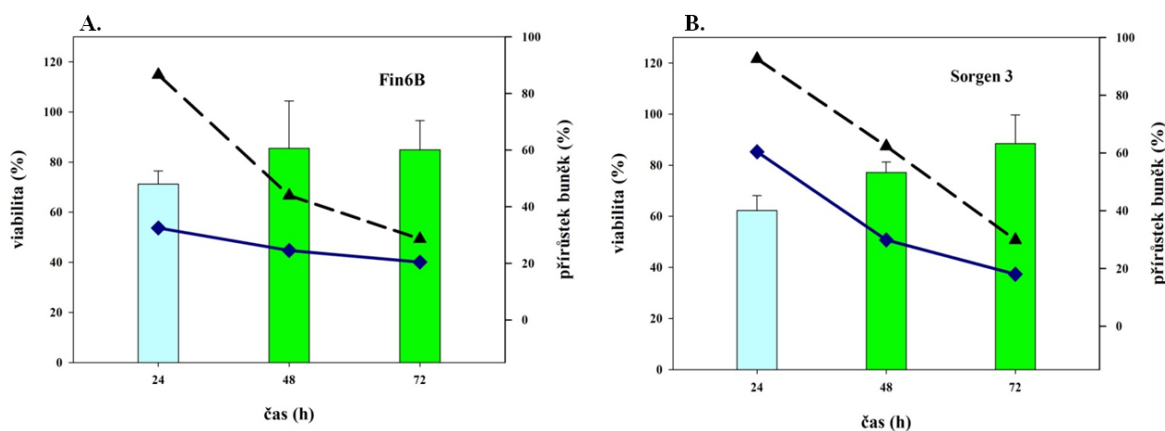
Kmeny, které alespoň v jednom expozičním čase způsobily pokles viability buněk v rozmezí 50 %-75 % jsou shrnuty v tabulce IV. Do kategorie mírně cytotoxické byly zařazeny extrakty sedmi kmenů, z čehož čtyři kmeny měly cytostatický účinek, dva kmeny měly mírně cytostatický účinek a u jednoho kmene nebyl časoběrný záznam zhotoven. Pouze u jednoho kmene byla zaznamenána nekrotická morfologie dle mikroskopického pozorování.

Tab. IV: Přehled mírně cytotoxických kmenů

Kmen	Hodnocení dle MTT	Hodnocení dle dělení	Hodnocení dle morfologie
VŘES JH 12	mírně cytotox.	cytostatické	vakuolizace
Vřes JH 11	mírně cytotox.	cytostatické	vakuolizace
HL6	mírně cytotox.	cytostatické	blebbing
Treb K2/7	mírně cytotox.	cytostatické	vakuolizace/nekróza
Fin6B	mírně cytotox.	mírně cytost.	bez morfologických změn
Sorgen 3	mírně cytotox.	mírně cytost.	bez morfologických změn
Kut 9	mírně cytotox.	není	není

4.5.1. Mírně cytotoxické – mírně cytostatické

Kmeny **Fin6B** a **Sorgen 3** vykazovaly velmi podobnou cytotoxickou aktivitu (obr.12). V čase 24 h působily na HeLa buňky mírně cytotoxicky, i když se hodnoty viability pohybovaly velmi blízko rozmezí s kategorií necytotoxické. Na dělení buněk působily extrakty Fin6B a Sorgen 3 pouze mírně cytostaticky. Oba extrakty pravděpodobně negativně ovlivnily metabolické procesy v exponovaných buňkách, jelikož byla viabilita ve 24 h. snížena. Buňky se však byly schopné s tímto působením vypořádat, a proto jejich viabilita v ostatních časech dosáhla normálních hodnot.

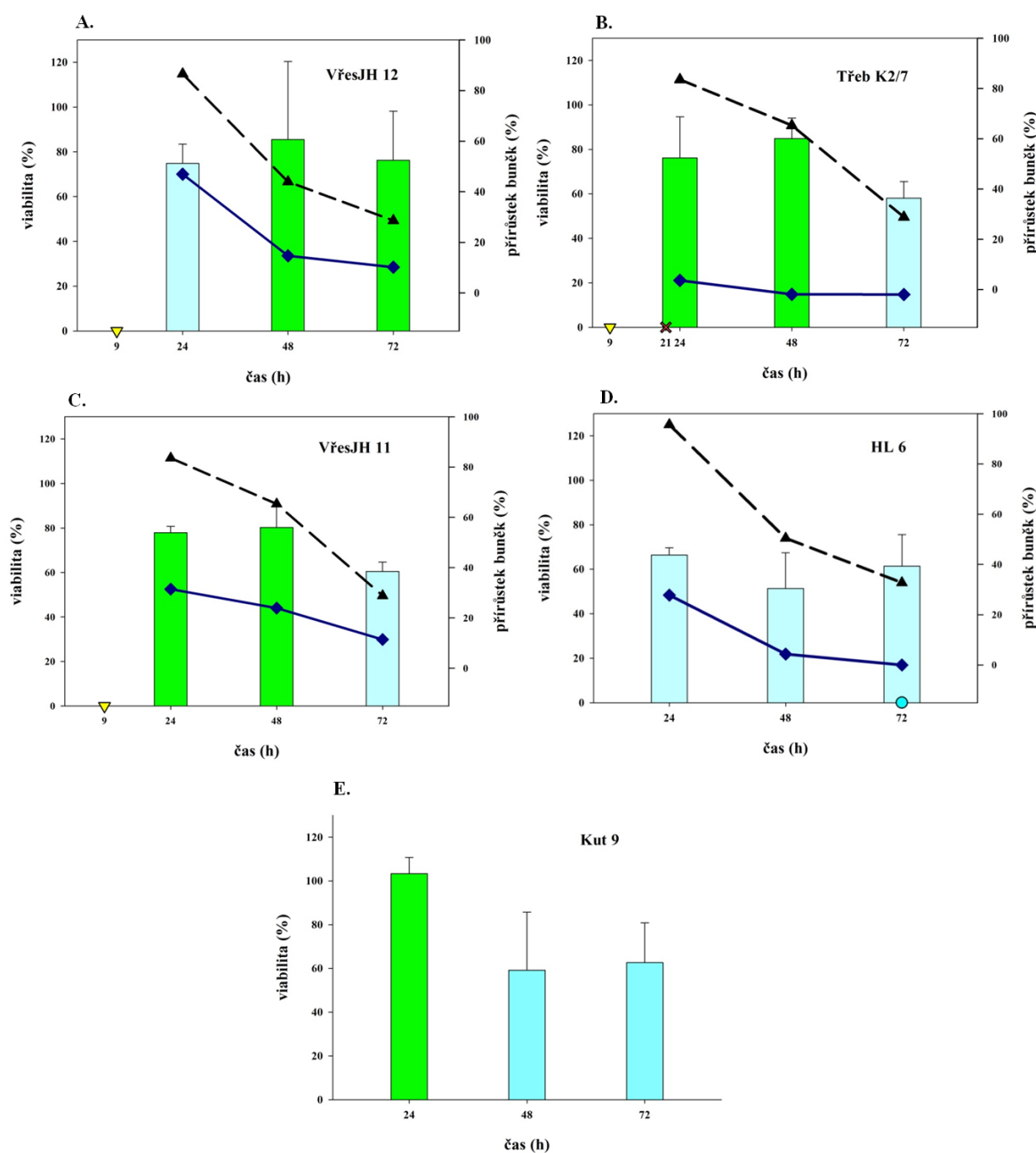


Obr. 12: Vliv působení extraktů z kmenů **A. Fin6B** a **B. Soren 3** na viabilitu stanovenou pomocí MTT, buněčného dělení a morfologii HeLa buněk.

4.5.2. Mírně cytotoxické – cytostatické

Extrakt kmene **VřesJH 12** působil na buňky obdobně jako předchozí kmeny Fin6B a Sorgen 3, ale na rozdíl od nich působil na buňky cytostaticky (obr. 13). Cytostatické působení kmene VřesJH 12 mohlo být způsobeno silnějším intracelulárním stresem, jenž byl

doprovázen značnou vakuolizací cytoplasmu, která se u buněk vyskytla. Delší expoziční čas by možná odhalil další morfologické změny. Jak je vidět na obr. 13, po přidání extraktů **Třeb K2/7** a **Vřes JH 11** byly naměřeny téměř shodné hodnoty viability a oba kmeny spadaly do kategorie cytostatické. V expozičních časech 24 a 48 h nebyla viabilita buněk dle naměřeného MTT nijak ovlivněna a až v čase 72 h byla nižší než 75 %. (Velmi podobné působení jako u výše popsanych kmenů Kut 7, Soos B7, Dren MII, Kut 5 atp.). U působení extraktu **Třeb K2/7** byla kolem 21 hodiny zaznamenána nekrotická morfologie, která se začala projevovat v poklesu viability až v 72 hod.



Obr. 13: Vliv působení extraktů kmenů A. VřesJH 12, B. Třeb K2/7, C. VřesJH 11, D. HL 6, E. Kut 9 na viabilitu stanovenou pomocí MTT, buněčného dělení a morfologii HeLa buněk.

Pokles viability v 72 h po přidání kmene VřesJH 11 by mohlo být způsobeno intracelulárním stresem doprovázeným vakuolizací (podobné působení VřesJH 12).

HL6 byl jediný kmen, jehož působení na buňky bylo hodnoceno jako mírně cytotoxické ve všech časech. K největšímu přírůstku buněk došlo mezi časy 0-24 h, poté se dělení v čase snižovalo a kmen byl celkově hodnocen jako cytostatický (obr. 13). K „*blebbing*“ došlo až na konci působení extraktu, tudíž by bylo zajímavé vyzkoušet delší expoziční čas. Po působení extraktu **Kut 9** na buňky, došlo ke snížení viability v pozdějších časech expozice (48 a 72 h). Nebylo zhotoveno video pomocí časosběrné mikroskopie, tudíž chybí záznam o přírůstku buněk i o morfologických změnách (obr. 13).

4.6. Kmeny bez cytotoxické aktivity

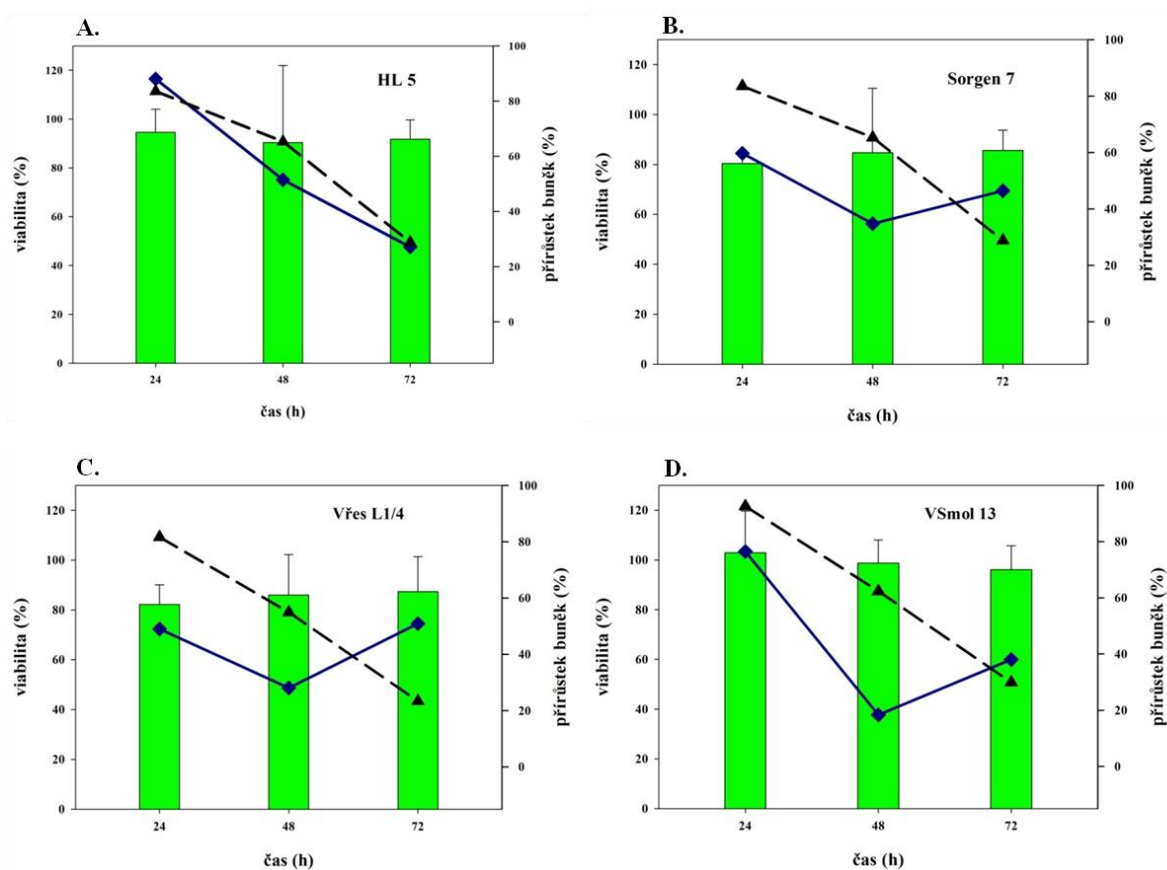
Kmeny, které nepůsobily cytotoxicky v žádném z expozičních časů jsou uvedeny v tabulce V. Celkem bylo zařazeno do této kategorie 11 kmenů, což je přibližně 30% ze všech zkoumaných. Naprostá většina nezpůsobovala žádné morfologické změny na testovaných buňkách.

Tab.V: Přehled necytotoxických kmenů.

Kmen	Hodnocení dle MTT	Hodnocení dle dělení	Hodnocení dle morfologie
HL 5	necytotoxické	necytostatické	bez morfologických změn
Sorgen 7	necytotoxické	necytostatické	bez morfologických změn
VSmol 13	necytotoxické	necytostatické	bez morfologických změn
Vřes L1/4	necytotoxické	necytostatické	bez morfologických změn
Sorgen 5	necytotoxické	mírně cytostatické	bez morfologických změn
SAG1	necytotoxické	mírně cytostatické	bez morfologických změn
VŘES L2/5	necytotoxické	mírně cytostatické	bez morfologických změn
Za Čírk 7	necytotoxické	mírně cytostatické	bez morfologických změn
SAG8	necytotoxické	cytostatické	bez morfologických změn
PastA	necytotoxické	cytostatické	bez morfologických změn
1403-1	necytotoxické	cytostatické	vakuoliz./blebbing/nekróza

4.6.1. Kmeny bez cytotoxické aktivity - necytostatické

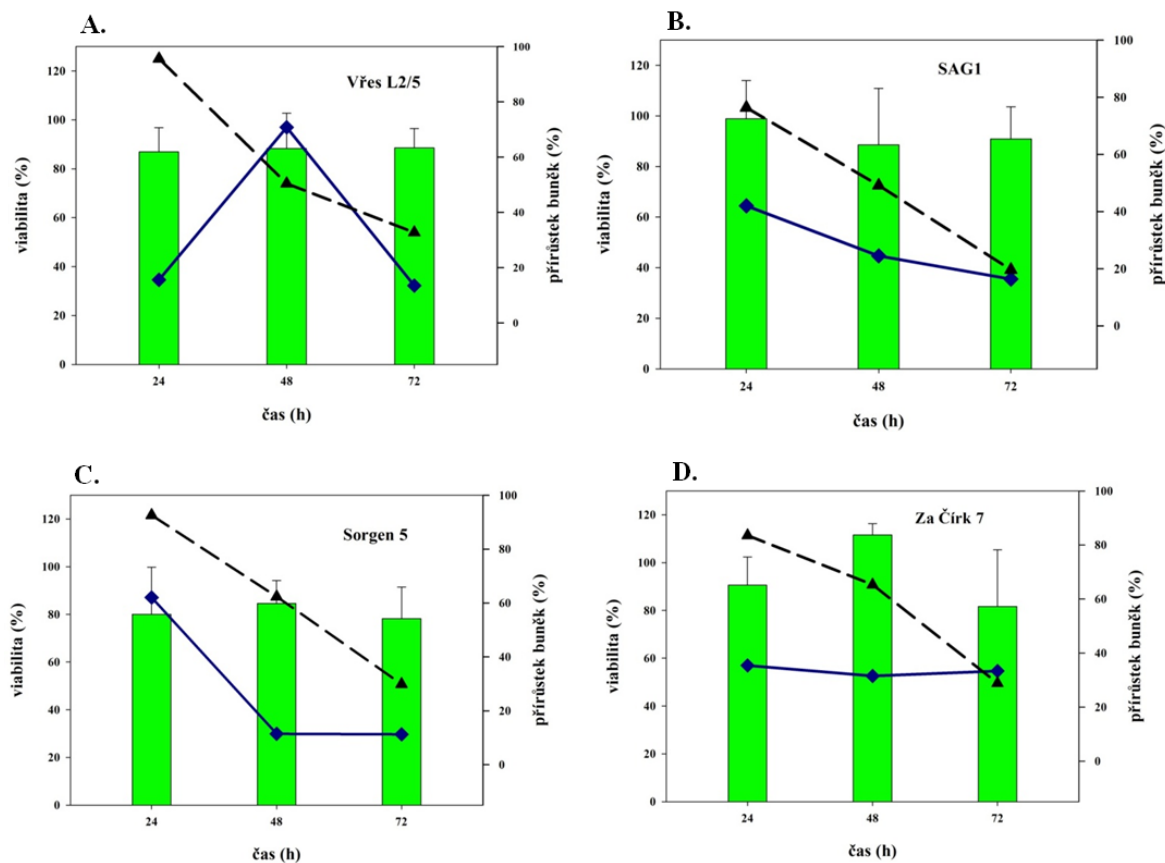
Po přidání extraktu kmene **HL 5** byla naměřena normální viabilita buněk ve všech časech. Zároveň byl pozorován přírůstek buněk, který byl téměř totožný s přírůstkem kontrolních buněk (obr. 14). Tento graf tedy ilustruje situaci, která by dle očekávání měla nastat u působení netoxického kmene. U kmenů **Sorgen 7**, **Vřes L1/4**, a **V Smol 13** bylo pozorováno podobné působení na HeLa buňky. Viabilita buněk nebyla snížena v žádném ze zkoumaných časů a kmeny byly hodnoceny jako necytostatické (obr. 14).



Obr. 14: Vliv působení extraktů kmenů **A. HL 5**, **B. Sorgen 7**, **C. Vřes L1/4**, **D. V Smol 13** na viabilitu stanovenou pomocí MTT, buněčného dělení a morfologii HeLa buněk.

4.6.2. Kmeny bez cytotoxické aktivity – mírně cytostatické

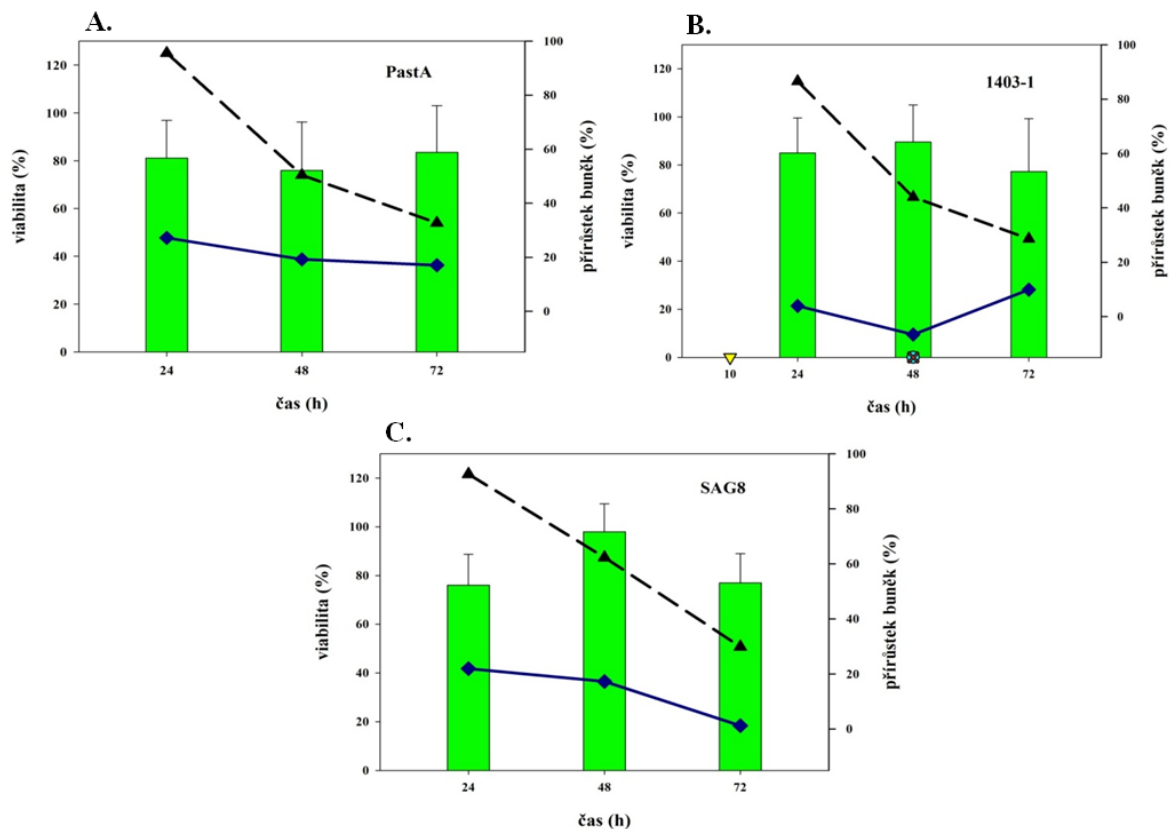
U kmenů **Vřes L2/5**, **SAG1**, **Sorgen 5** a **Za Čírk 7** byl pozorovaný mírně cytostatický efekt bez vlivu na viabilitu. Zároveň nebyly pozorovány morfologické změny (obr.15).



Obr.15: Vliv působení extraktu kmene **A.**Vřes L2/5, **B.** SAG1, **C.** Sorgen 5 a **D.** Za Čírk 7 na viabilitu stanovenou pomocí MTT, buněčného dělení a morfologii HeLa buněk.

4.6.3. Kmeny bez cytotoxické aktivity – cytostatické

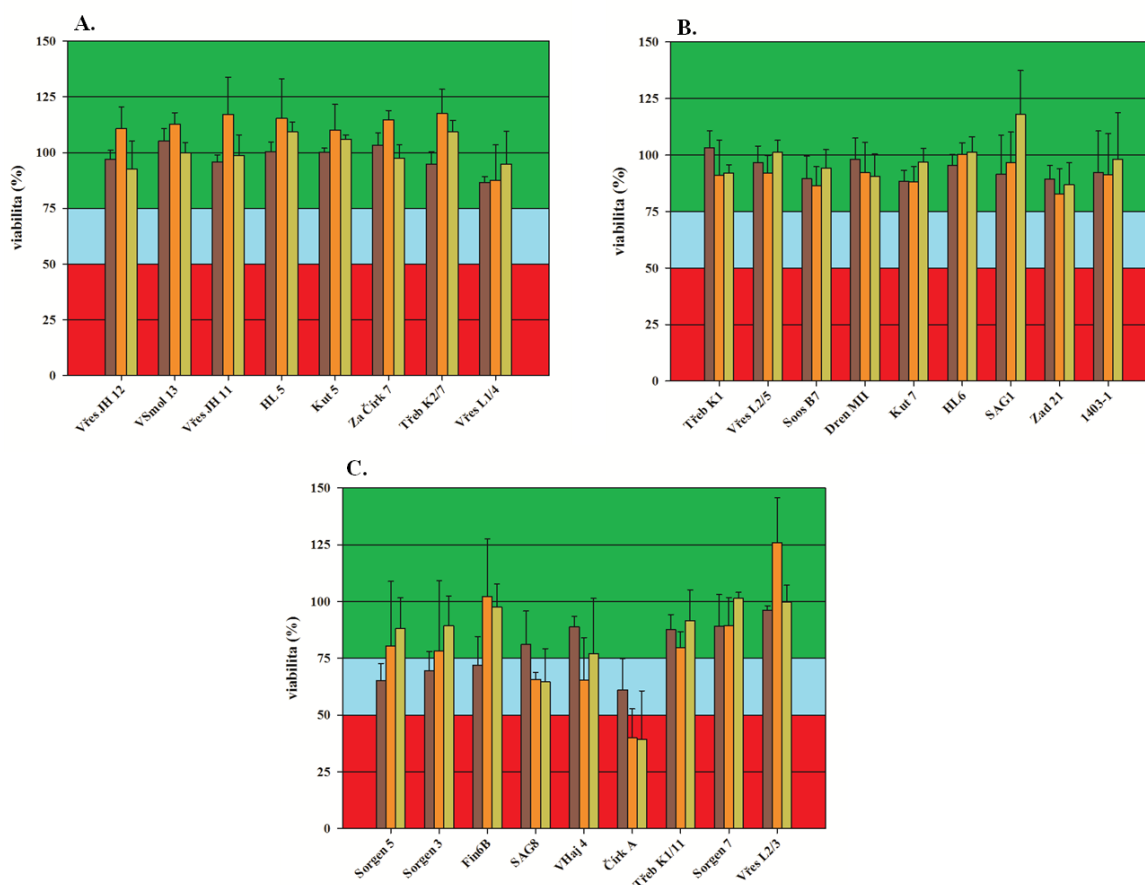
Celkem tři extrakty, **PastA**, **SAG8** a **1403-1**, byly dle celkového počtu dělení hodnoceny jako cytostatické (obr. 16). Buňky měly zpomalené dělení, ale po celou dobu expozice zůstaly živé. Pouze u kmene 1403-1 byly pozorovány morfologické změny jako je vakuolizace a kolem 48 h byla pozorována nekrotická morfologie. K poklesu viability však následkem těchto změn nedošlo, pravděpodobně by byly pozorovatelné v delším expozičním čase.



Obr.16: Vliv působení extraktů kmenů **A.** PastA, **B.** 1403-1 a **C.** SAG8 a na viabilitu stanovenou pomocí MTT, buněčného dělení a morfologii HeLa buněk.

4.7. Výsledky MTT testu u extraktů z médií studovaných kmenů

Sinicové kmeny byly pěstovány v BG 11 kultivačním médiu a z tohoto média byly připraveny extrakty (viz metodika). Extrakty z média byly stejně jako extrakty z biomasy testovány na HeLa buňkách v časech 24, 48 a 72 h a jejich působení bylo vyhodnoceno MTT testem (obr. 17). Oproti poměrně rozmanitému působení extraktů z biomasy, extrakty z média neměly na buňky většinou žádný cytotoxický účinek. Při výrobě extraktů z média u kmenů **PastA** a **Kut5** docházelo opakovaně k ucpávání kolonky. Nebylo tedy možné extrakty vyrobit, a proto nebyly zahrnuty do analýzy. Pouze 5 extraktů z celkového počtu 26 vykazovalo mírně cytotoxické působení na buňky: **Sorgen 5**, **Sorgen 3**, **Fin6B**, **VHaj 4** a **SAG8**. Jediný extrakt z média, který projevil i účinky silně cytotoxické byl u kmene **Čirk A**. Hodnocení cytotoxicity bylo obdobné jako u extraktů z biomasy (do 50 % viability: silně cytotoxické; 50-75 % viability: mírně cytotoxické; 75-více % viabilit: necytotoxické).



Obr. 17: Naměřená viabilita buněk v časech 24 h (hnědá), 48 h (oranžová) a 72 h (žlutá) od přidání extraktu z média.

4.8. HPLC- frakcionace

Na frakcionaci pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie byly vybrány vzorky vykazující silnou cytotoxickou aktivitu a přednostně ty, které vyvolávaly na HeLa buňkách silný cytotoxický účinek a nebo apoptóze podobný účinek. Frakcionace byla provedena u kmenů **Třeb K1/11**, **Čírk A**, **Dren MII**, **Vřes L2/3** a **Kut 5**. Dále byly frakcionovány kmeny **Janice 13** a **SOOS Cís 12**, které musely být později vyloučeny kvůli opakované kontaminaci. Frakce (a následné refrakce) byly testovány na buňkách a vyhodnoceny MTT testem v 72 h. U kmene SOOS Cís 12, Kut 5 byly nalezeny cytotoxicky aktivní frakce, ale refrakcionací tato aktivita vymizela. U kmene Janice 13 a Třeb K1/11 bylo nalezeno více aktivních frakcí, proto nebyla následná refrakcionace provedena. Naopak u kmene Dren MII nebyla žádná aktivní frakce nalezena. Dále byl frakcionován kmen Vřes L2/3, v kterém byla jedna aktivní frakce, která musí být v budoucnu refrakciována. U kmene Čírk A a Soos B7 byla úspěšně nalezena cytotoxicky aktivní látka s hodnotou *m/z* 834,53 a dominujícím sodným aduktem s hodnotou *m/z* 856,52.

4.9. HPLC-HRMS – hledání známých toxinů

Na zjištění přítomnosti známých toxinů jako jsou microcystiny, anatoxin-a, cylindrospermopsiny a nodulariny bylo analyzováno všech 39 extraktů (i ty, které byly později vyloučeny kvůli kontaminacím). V žádném z těchto extraktů nebyly tyto toxiny přítomny.

5. DISKUZE

Screeningová studie toxicity byla prováděna na nostokálních bentických sinicích z morfologického hlediska řazených do rodu *Anabaena*. Na molekulárních analýzách, které vyjasní fylogenetické zařazení těchto kmenů, se nyní pracuje na Hydrobiologickém ústavu, Biologického centra AV ČR. Z toho důvodu byl zvolen obecnější název studie: toxikologický potenciál bentických nostokálních sinic. Volba rodu *Anabaena*, jako vhodného kandidáta na průzkum toxikologického potenciálu, byla především díky dostupnosti rozsáhlé sbírky RNDr. Elišky Kozlíkové, Ph.D. Důkladnější zkoumání dostupných literárních pramenů zároveň odhalilo, že bentické sinice rodu *Anabaena* jsou bohatým zdrojem cytotoxických látek, a tudíž velmi vhodnými objekty zkoumání (Oftedal et al., 2010; Oftedal et al. 2011, Oftedal et al. 2012, Herfindal et al., 2005; Jokela et al., 2012; Surakka et. al., 2005). Zároveň je rod *Anabaena* v porovnání s ostatními sinicovými rody velmi dobrým zdrojem proapoptických látek, které jsou potenciálními kandidáty na protirakovinné léky (Oftedal et al., 2010, Oftedal et al., 2011; Herfindal et al., 2005).

Publikovaných studií o bentických sinicích obecně je přes jejich celosvětové rozšíření o poznání méně než studií o sinicích planktonních. Obdobně málo poznatků je i v oblasti výzkumu toxických látek produkovaných bentickými sinicemi (Gugger et al., 2005; Wood et al., 2007). V posledních desetiletích však zájem o bentické sinice stoupá a s ním i přímo úměrně počet publikovaných studií. Několik studií dokonce prokázalo spojení mezi toxicitou bentických sinic a úmrtím zvířat, čímž se důležitost výzkumu těchto organismů ještě zvýšila (Edwards et al., 1992; Mez et al., 1997; Hamill, 2001; Gugger et al., 2005; Wood et al., 2007, Wood et al., 2010a). Problém toxicity bentických sinic byl zaznamenán v oligotrofních vodách, kde může světlo pronikat až ke dnu vodního tělesa, což umožňuje velký rozvoj sinicových nárostů a uvolňování toxinů do vody (Mez et al., 1998, Wood et al., 2012). Otravy hospodářských zvířat či psů jsou spojovány především se sinicemi z čeledi *Oscillatoriales* (Quiblier et al., 2013). Abundance bentických sinic rodu *Anabaena* není v podstatě nikdy dominantní, tudíž by nemělo dojít k ohrožení zdraví zvířat ani člověka produkcí toxinů, avšak tuto eventualitu nelze zcela vyloučit. Díky globálnímu oteplování a jejich výhodě fixovat N_2 by mohlo časem dojít k rozšíření jejich abundance a zvýšení toxikologického rizika.

Z 39 kultivovaných kmenů byly vyrobeny extrakty, které byly v rámci této studie testovány pomocí HPLC-HRMS na přítomnost 4 známých toxinů: microcystiny, anatoxin-a, nodulariny a cylindrospermopsiny. Jelikož jsou tyto toxiny běžně produkovány hlavně

planktonními druhy sinic včetně sladkovodního rodu *Dolichospermum* (dříve *Anabaena*), bylo cílem zjistit, zda se vyskytují i v bentických sladkovodních zástupcích rodu *Anabaena* (Dawson, 1998; Gugger et al., 2005, Aráoz et al., 2010; van Apeldoorn et al., 2007; Merel et al., 2013). Podle výsledků HPLC-HRMS nebyl žádný z toxinů ve 39 zkoumaných kmenech nalezen. Screening byl proveden v rámci rozsáhlejší studie, v které bylo analyzováno přibližně 300 bentických sladkovodních kmenů rodu *Anabaena* a v žádném z nich nebyly hledané toxiny nalezeny (Kust, nepublikováno). Doposud bylo provedeno mnoho studií, které potvrzují produkci microcystinu (např. Mez et al., 1998; Mez et al., 1997; Hitzfeld et al., 2000; Wood et al., 2010a) a anatoxinu bentickými sinicemi (např. Edwards et al., 1992; Gugger et al., 2005; Wood et al., 2010b; Hamill, 2001). Tyto dva toxiny jsou detekovány v bentických sinicích nejčastěji (Quiblier et al., 2013). Záznamy o výskytu nodularinu (Wood et al., 2012; Hitzfeld et al., 2000) a cylindrospermopsinu (Seifert et al., 2007; Mazmouz et al., 2010) v bentických sinicích jsou méně časté, což však může být ovlivněno menším počtem studií zaměřených na výskyt těchto dvou toxinů. Z toho vyplývá, že přítomnost těchto toxinů mezi bentickými sinicemi je poměrně častá. Oproti tomu záznamů o přítomnosti toxinů u rodu *Anabaena* je velmi málo. Přítomnost microcystinu ani nodularinu nebyla mezi brakickými sinicemi rodu *Anabaena* prokázána, kromě jedné studie, která nepřímo odkazuje na rod *Anabaena* jako na producenta microcystinu (Herfindal et al., 2005; Surakka et al., 2005; Halinen et al., 2007). V další studii byly nalezeny v tekoucí vodě přímo druhy produkující mikrocytostiny *Anabaena subcylindrica* Borge 1921 a *A. variabilis* Kützing ex Bornet & Flahault 1886. I když tyto výsledky jsou poměrně nejednoznačné (Mohamed, 2006). Přítomnost cylindrospermopsinu, nodularinu ani anatoxinu-a nebyla doposud v bentických kmenech rodu *Anabaena* zaznamenána. V této diplomové práci je tedy poprvé demonstrován nízký výskyt známých cyanotoxinů a proto malý toxikologický potenciál sladkovodních zástupců rodu *Anabaena*. Z naměřených dat lze usoudit, že sladkovodní bentické sinice rodu *Anabaena* obecně neprodukují žádný ze 4 známých toxinů, a že jejich cytotoxická aktivita spočívá v přítomnosti jiných toxických látek.

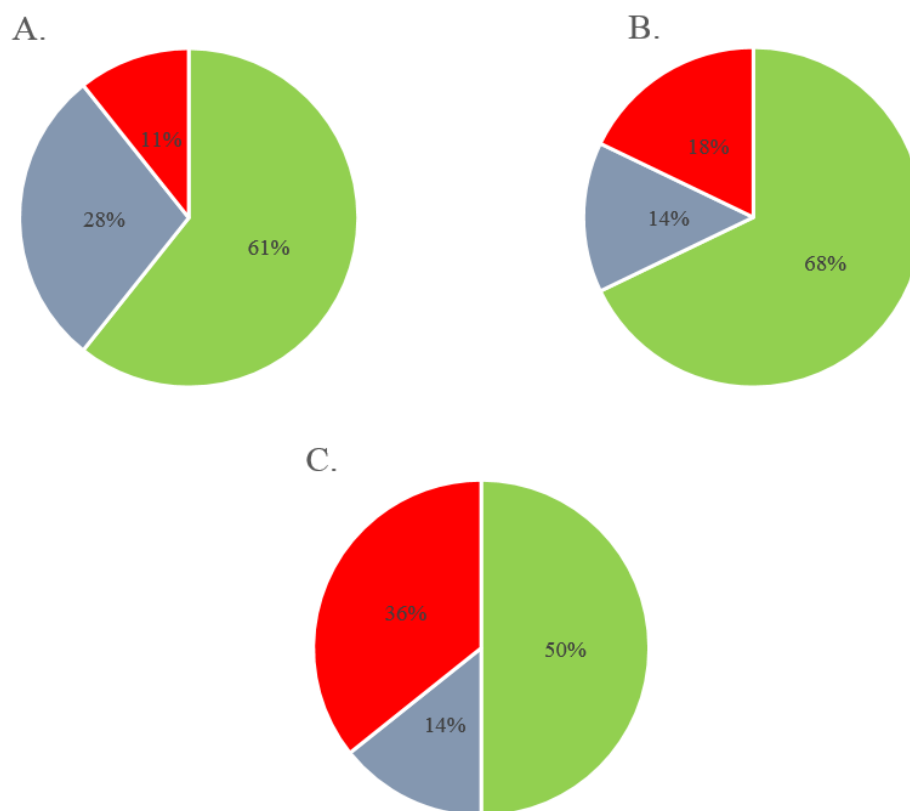
Cytotoxické účinky sinic, způsobené jinými látkami než doposud popsanými cyanotoxiny, dokazují rozsáhlejší screeningové studie, v kterých cca 33 % extraktů z terestrických sinic, 40 % mořských sinic, 38 % brakických sinic a 30 % brakických bentických sinic vykazují tento účinek (Hrouzek et al., 2011; Hrouzek et al., 2016; Costa et al. 2014, Surakka et al. 2005, Herfindal et al. 2005). Cytotoxicita rodu *Anabaena* v brakických vodách způsobená neznámými toxiny byla též pozorována (Herfindal et al., 2005; Surakka et al., 2005). Data získaná v rámci této práce proto v hrubém porovnání

naznačují porovnatelný výskyt cytotoxických látek ve sladkovodních zástupcích rodu *Anabena* (tj. 39% cytotoxických kmenů po 24 h expozici a 50% kmenů po 72 h expozici) jako byl publikován v předešlých studiích. Zde však nutno poukázat, že metodiky ve výše zmíněných pracích byly do jisté míry odlišné. Identickou metodou s expozičním časem 24 h byl vypracován screening 120 kmenů půdních sinic (především rodu *Nostoc*) s výsledkem 33% cytotoxických kmenů (Hrouzek et al., 2016).

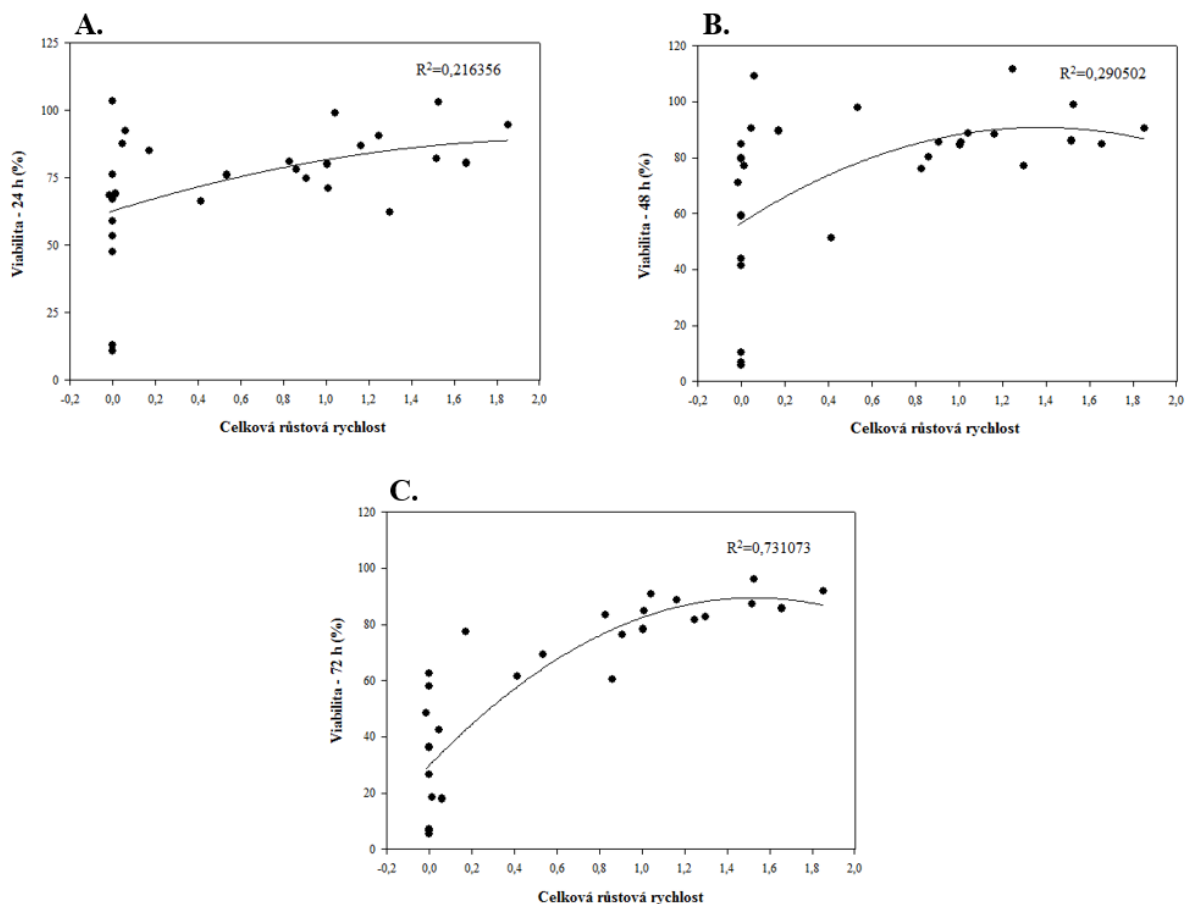
V této diplomové práci byly na zhodnocení cytotoxicity použity 3 různé přístupy: vyhodnocení viability buněk pomocí MTT, vyhodnocení cytostatického efektu extraktu a zhodnocení morfologických změn na buňkách HeLa. Kombinace těchto přístupů umožnila důkladnější vhled do metodologické problematiky.

Většina studií testujících cytotoxickou aktivitu pomocí MTT používá expoziční čas 24 h a méně. V této studii byla cytotoxicita hodnocena ve třech různých časech: 24, 48 a 72 h. Výsledky práce jasně dokazují, že pokud je hodnocení cytotoxicity prováděno pouze v čase 24 h, dochází k značnému podhodnocení výsledků (obr. 18.), jelikož některé extrakty vykazovaly opožděný nástup cytotoxického efektu, což se na poklesu viability buněk projevilo až v pozdějších časech expozice, nejčastěji v 72 h. Tyto výsledky naznačují nutnost provádět déle trvající experimenty (minimálně 72 h) pro správné stanovení cytotoxicity kmenů sinic.

Poměrně často docházelo u exponovaných buněk k zástavě buněčného dělení, přestože k poklesu hodnot MTT (vzhledem ke kontrole) došlo až s velkým zpožděním, nejčastěji v 72 h. To znamená, že za určitých podmínek, výsledky MTT testu neodráží počet buněk v testovaných jamkách, což má za následek v podstatě falešně negativní vyhodnocení testu. Paradoxně to v tomto případě znamená, že buňky zablokované v jisté fázi buněčného cyklu vykazují větší specifickou metabolickou aktivitu než buňky kontrolní. I když jsou často výsledky MTT prezentovány jako počet živých buněk, míra redukce MTT spíše odráží metabolickou aktivitu nebo míru NADH produkce, která je pravděpodobně zodpovědná za největší redukci tetrazolia (Berridge et al., 2005). Obdobný efekt byl pozorován ve studii, kdy při zástavě buněčného dělení v G2/M fázi za působení látky genistein, nedošlo k poklesu hodnot MTT ani v dlouhém expozičním čase, což bylo způsobeno namnožením mitochondrií a zvýšením jejich funkce (Pagliacci et al., 1994).



Obr.18: Hodnocení výsledků cytotoxicity dle MTT testu v různých expozičních časech **A.** expoziční čas 24 h, **B.** expoziční čas 48 h a **C.** expoziční čas 72 h. Zelená: necytotoxické extrakty, modrá: mírně cytotoxické extrakty a červená: silně cytotoxické extrakt.

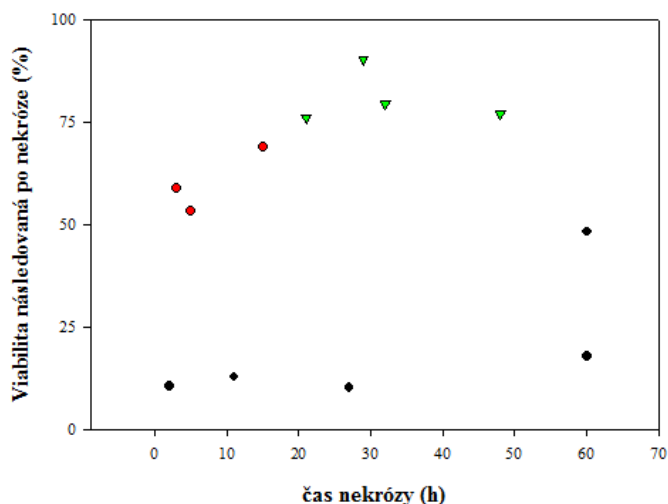


Obr. 19: Zhodnocení celkové růstové rychlosti v závislosti na hodnotě viability v různých expozičních časech **A.** expoziční čas 24 h, **B.** expoziční čas 48 h a **C.** expoziční čas 72 h.

Byly nalezeny i další látky, které zvyšují hodnoty MTT testu, přestože se buňky nedělí (Riss a Moravec, 2004). Dále existují látky, které přímo redukují tetrazolium (např. některé protirakovinné chemoterapeutické látky), čímž také zvyšují hodnoty MTT testu (Ulukaya et al., 2004). Mechanismy účinku a typy doposud známých látek interferujících s MTT (přímo i nepřímo) jsou shrnuty v review Stepanenko, 2015. MTT test je tedy velmi slabou metodou pro odlišení látek a extraktů s převládajícím cytostatickým účinkem a je nutné pro zhodnocení celkového toxikologického potenciálu použít i mikroskopické hodnocení či jinou metodu počítání buněk. Jelikož nejsou známy samozřejmě všechny látky interagující s MTT, zdá se, že MTT test není příliš vhodnou metodou na vyhledávání cytostatických ani protirakovinných látek. Cytostatický účinek nejlépe koreloval s poklesem MTT v 72 h, což opět podporuje významnost použití delších expozičních časů (obr. 19).

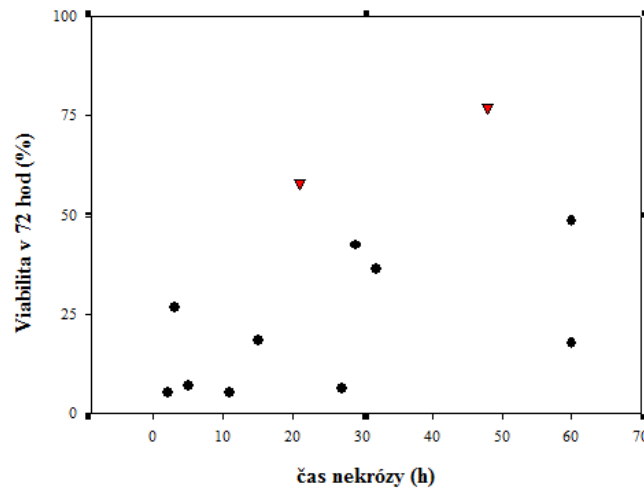
Poměrně často docházelo u exponovaných buněk k nekrotické smrti zaznamenané dle subjektivního vizuálního hodnocení. Samotné vizuální hodnocení buněčné smrti není

optimální metodou. Buňky podstupující nekrózu by následně neměli mít téměř žádné metabolické funkce. Jak je vidět na obr. 20, po stanovení nekrotické smrti byly u většiny buněk stále naměřeny vysoké hodnoty MTT, tudíž buňky pravděpodobně ještě metabolizovaly a mohlo se jednat o apoptózu, či jinou řízenou formu buněčné smrti.



Obr. 20: První naměřená viabilita po nekrotické buněčné smrti.

Na druhou stranu, pokud došlo v kterémkoliv expozičním čase k nekróze, byl pokles viability (pod 50%), detekovatelný pomocí MTT alespoň v 72 h (obr. 21.) Tento výsledek opět podporuje významnost provádění MTT testu v delších časech než je obvyklých 24 h. Pouze vizuální hodnocení nekrózy a apoptózy je tedy nedostačující a je ho potřeba vždy doplnit dalšími metodami jako jsou např. TUNEL, přítomnost kaspázy 3/7, vylučování laktát dehydrogenázy, barvení trypanovou modří či propidium jodidem, fluorescenční metody-Hoechst atp. (Renvoize et al, 1998). Čas použití testů na detekci apoptózy je zásadní pro rozlišení mezi apoptózou a nekrózou, jelikož apoptický proces je pomíjivý a vždy přejde *in vitro* experimentech do sekundární nekrózy (Riss a Moravec, 2004).



Obr. 21: Viabilita buněk v 72 hod po prodělání nekrozy v různých časech expozice.

Extraktů z média u kmenů VHaj 4 a Čírk A projeví silně cytotoxický účinek. Některé cytotoxicky aktivní látky se mohly uvolňovat ze sinic do média a způsobit tak sníženou viabilitu zkoumaných buněk. Obdobné vysvětlení je i pro kmeny Sorgen 3 a Fin6B, jejichž extraktů z biomasy měly mírně cytotoxické účinky a dokonce stejně jako extraktů z média působily cytotoxicky na buňky v čase 24 h. U extraktů z kmenů Sorgen 5 a SAG8, které nebyly cytotoxické, je vysvětlení komplikovanější. Většina toxinů jsou intracelulární látky a jejich produkce do okolí je většinou spojována se stářím kolonie a poškozením buněk. Různé sinicové toxiny byly detekovány ve zvýšeném množství v extracelulárním prostoru během pozdější fáze růstu. Jejich extracelulární výskyt je tedy obecně přisuzován lýze buněk u senescentních kolonií než aktivnímu vylučování (Volk et al., 2007; Dias et al., 2002; Sivonen et al. 1996; Rapala et al., 1997). To by mohlo být jedno z vysvětlení cytotoxicity extraktů z média u kmenů Sorgen 5 a SAG8. Tyto kmeny mohly být tedy sklizeny během pozdější růstové fáze, kdy byl obsah buněk vylit do média nebo k jeho vylití došlo během centrifugace.

Fracionace byla provedena u vybraných cytotoxických extraktů. Dle výsledků lze soudit, že u většiny extraktů docházelo k synergickému působení látek, a proto nebylo možné izolovat jednu cytotoxickou látku. Pouze u dvou extraktů z kmene Čírk A a Soos B7 se podařilo izolovat cytotoxicky aktivní látku s hodnotou *m/z* 834,53, která bude předmětem dalšího výzkumu.

6. ZÁVĚR

- Výskyt tradičně studovaných cyanotoxinů jako jsou microcystiny, anatoxin-a, nodulariny a cylindrospermopsin je v bentických sinicích rodu *Anabaena* poměrně nízký v porovnání s planktonními druhy rodu *Dolichospermum* a některými bentickými rody sinic.
- Bentické sinice rodu *Anabaena* jsou bohaté na cytotoxicky aktivní látky, avšak mnoho z těchto látek působí synergicky.
- Cytotoxicky aktivní látky u těchto kmenů většinou nejsou produkovány do extracelulárního prostoru.
- Výsledky MTT testu za určitých podmínek neodráží počet buněk v testovaných jamkách ani morfologické změny (falešně negativní vyhodnocení testu) a to zejména u extraktů působících cytostaticky.
- Mezi studovanými extrakty byl zaznamenán častý výskyt cytostatických efektů a efektů s pozdním nástupem, z čehož vyplývá nutnost provádět déle trvající experimenty (minimálně 72 h) pro správné stanovení cytotoxicity kmenů sinic.
- Vizualní hodnocení nekrózy a apoptózy je potřeba vždy doplnit dalšími metodami (např. TUNEL, přítomnost kaspázy 3/7, vylučování laktát dehydrogenázy, barvení trypanovou modří či propidium jodidem)
- Cytotoxická látka s hodnotou m/z 834,53 vyžaduje další studium (potenciální induktor apoptózy).

7. LITERATURA

- Araoz, R., Molgo, J. & de Marsac, N. T. 2010. Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicon* **56**:813-28.
- Babica, P., Blaha, L. & Marsalek, B. Microcystiny – cyklické heptapeptidy sinic. *Centrum pro cyanobakterie a jejich toxiny*.
- Babica, P., Blaha, L. & Marsalek, B. 2006. Exploring the natural role of microcystins - A review of effects on photoautotrophic organisms. *Journal of Phycology* **42**:9-20.
- Bai, R., Pettit, G. R. & Hamel, E. 1990. Binding of dolastatin-10 to tubulin at a distinct site for peptide antimetabolic agents near the exchangeable nucleotide and vinca alkaloid sites. *Journal of Biological Chemistry* **265**:17141-49.
- Beattie, K. A., Kaya, K. & Codd, G. A. 2000. The cyanobacterium *Nodularia* in PCC 7804, of freshwater origin, produces L-Har(2) nodularin. *Phytochemistry* **54**:57-61.
- Berridge M.V., Herst P.M., Tan A.S. (2005) Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.* **11**: 127–52
- Bohunicka, M., Mares, J., Hrouzek, P., Urajova, P., Lukes, M., Smarda, J., Komarek, J., Gaysina, L. A. & Strunecy, O. 2015. A combined morphological, ultrastructural, molecular and biochemical study of the peculiar family Gomontiellaceae (oscillatoriales) reveals a new cylindrospermopsin-producing clade of cyanobacteria. *Journal of Phycology* **51**:1040-54.
- Brown, R. 1999. Cytotoxic Drug Resistance Mechanisms. *Humana press* 238 p.
- Carmichael, W. W., Biggs, D. F. & Gorham, P. R. 1975. Toxicology and pharmacological action of *Anabaena flos-aquae* toxin. *Science* **187**:542-44.
- Carmichael, W. W., Eschedor, J. T., Patterson, G. M. L. & Moore, R. E. 1988. Toxicity and partial structure of a hepatotoxic peptide produced by the cyanobacterium *nodularia-spumigena mertens emend 1575* from New-Zealand. *Applied and Environmental Microbiology* **54**:2257-63.
- Chen, F. Z. & Xie, P. 2003. The effects of fresh and decomposed *Microcystis aeruginosa* on cladocerans from a subtropic Chinese Lake. *Journal of Freshwater Ecology* **18**:97-104.
- Codd, G. A., Metcalf, J. S. & Beattie, K. A. 1999. Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon* **37**:1181-85.
- Costa, M., Garcia, M., Costa-Rodrigues, J., Costa, M. S., Ribeiro, M. J., Fernandes, M. H.,

- Barros, P., Barreiro, A., Vasconcelos, V. & Martins, R. 2014. Exploring Bioactive Properties of Marine Cyanobacteria Isolated from the Portuguese Coast: High Potential as a Source of Anticancer Compounds. *Marine Drugs* **12**:98-114.
- Dawson, R. M. 1998. The toxicology of microcystins. *Toxicon* **36**:953-62.
- de la Cruz, A. A., Hiskia, A., Kaloudis, T., Chernoff, N., Hill, D., Antoniou, M. G., He, X., Loftin, K., O'Shea, K., Zhao, C., Pelaez, M., Han, C., Lynch, T. J. & Dionysiou, D. D. 2013. A review on cylindrospermopsin: the global occurrence, detection, toxicity and degradation of a potent cyanotoxin. *Environmental Science-Processes & Impacts* **15**:1979-2003.
- De Vleeschouwer, M., Sinnaeve, D., Van den Begin, J., Coenye, T., Martins, J. C. & Madder, A. 2014. Rapid Total Synthesis of Cyclic Lipodepsipeptides as a Premise to Investigate their Self-Assembly and Biological Activity. *Chemistry-a European Journal* **20**:7766-75.
- Desilva, E. D., Williams, D. E., Andersen, R. J., Klix, H., Holmes, C. F. B. & Allen, T. M. 1992. Motuporin, a potent protein phosphatase inhibitor isolated from the papua-new-guinea sponge theonella-swinhoei gray. *Tetrahedron Letters* **33**:1561-64.
- Devlin, J. P., Edwards, O. E., Gorham, P. R., Hunter, N. R., Pike, R. K. & Stavric, B. 1977. Anatoxin-a, a toxic alkaloid from anabaena-flos-aquae nrc-44h. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* **55**:1367-71.
- Dias, E., Pereira, P. & Franca, S. 2002. Production of paralytic shellfish toxins by *Aphanizomenon* sp LMECYA 31 (cyanobacteria). *Journal of Phycology* **38**:705-12.
- Ding, W. X., Shen, H. M. & Ong, C. N. 2000. Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition in microcystin-induced rapid apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology* **32**:547-55.
- Dixit, R. B. & Suseela, M. R. 2013. Cyanobacteria: potential candidates for drug discovery. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **103**:947-61.
- Duy, T. N., Lam, P. K. S., Shaw, G. R. & Connell, D. W. 2000. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Vol 163* **163**:113-85.
- Edwards, C., Beattie, K. A., Scrimgeour, C. M. & Codd, G. A. 1992. Identification of anatoxin-a in benthic cyanobacteria (blue-green-algae) and in associated dog poisonings at Loch Insh, Scotland. *Toxicon* **30**:1165-75.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*

35:495-516.

- Fanale, D., Bronte, G., Passiglia, F., Calo, V., Castiglia, M., Di Piazza, F., Barraco, N., Cangemi, A., Catarella, M. T., Insalaco, L., Listi, A., Maragliano, R., Massihnia, D., Perez, A., Toia, F., Cicero, G. & Bazan, V. 2015. Stabilizing versus Destabilizing the Microtubules: A Double-Edge Sword for an Effective Cancer Treatment Option? *Analytical Cellular Pathology*:1-19.
- Fladmark, K. E., Brustugun, O. T., Hovland, R., Boe, R., Gjertsen, B. T., Zhivotovsky, B. & Doskeland, S. O. 1999. Ultrarapid caspase-3 dependent apoptosis induction by serine/threonine phosphatase inhibitors. *Cell Death and Differentiation* **6**:1099-108.
- Francis, G. 1878. Poisonous Australian lake. *Nature* **18**, 11–12.
- Francisco, J. A., Cerveny, C. G., Meyer, D. L., Mixan, B. J., Klussman, K., Chace, D. F., Rejniak, S. X., Gordon, K. A., DeBlanc, R., Toki, B. E., Law, C. L., Doronina, S. O., Siegall, C. B., Senter, P. D. & Wahl, A. F. 2003. cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. *Blood* **102**:1458-65.
- Gehringer, M. M., Adler, L., Roberts, A. A., Moffitt, M. C., Mihali, T. K., Mills, T. J. T., Fieker, C. & Neilan, B. A. 2012. Nodularin, a cyanobacterial toxin, is synthesized in planta by symbiotic *Nostoc* sp. *Isme Journal* **6**:1834-47.
- Ghobrial, I. M., Witzig, T. E. & Adjei, A. A. 2005. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians* **55**:178-94.
- Griffiths, D. J. & Saker, M. L. 2003. The palm island mystery disease 20 years on: A review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. *Environmental Toxicology* **18**:78-93.
- Gugger, M., Lenoir, S., Berger, C., Ledreux, A., Druart, J. C., Humbert, J. F., Guette, C. & Bernard, C. 2005. First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicon* **45**:919-28.
- Halinen, K., Jokela, J., Fewer, D. P., Wahsten, M. & Sivonen, K. 2007. Direct evidence for production of microcystins by anabaena strains from the Baltic sea. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:6543-50.
- Hamill, K. D. 2001. Toxicity in benthic freshwater cyanobacteria (blue-green algae): first observations in New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **35**:1057-59.
- Herfindal, L., Oftedal, L., Selheim, F., Wahlsten, M., Sivonen, K. & Doskeland, S. O. 2005.

- A high proportion of Baltic Sea benthic cyanobacterial isolates contain apoptogens able to induce rapid death of isolated rat hepatocytes. *Toxicon* **46**:252-60.
- Herrero, A., Flores, E. 2008. The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution. *Norfolk, UK, Caister Academic Press* 484 p.
- Hitzfeld, B. C., Lampert, C. S., Spaeth, N., Mountfort, D., Kaspar, H. & Dietrich, D. R. 2000. Toxin production in cyanobacterial mats from ponds on the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Toxicon* **38**:1731-48.
- Hrouzek, P., Kapuscik, A., Vacek, J., Voracova, K., Paichlova, J., Kosina, P., Voloshko, L., Ventura, S. & Kopecky, J. 2016. Cytotoxicity evaluation of large cyanobacterial strain set using selected human and murine in vitro cell models. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **124**:177-85.
- Hrouzek, P., Kuzma, M., Cerny, J., Novak, P., Fiser, R., Simek, P., Lukesova, A. & Kopecky, J. 2012. The Cyanobacterial Cyclic Lipopeptides Puwainaphycins F/G Are Inducing Necrosis via Cell Membrane Permeabilization and Subsequent Unusual Actin Relocalization. *Chemical Research in Toxicology* **25**:1203-11.
- Hrouzek, P., Tomek, P., Lukesova, A., Urban, J., Voloshko, L., Pushparaj, B., Ventura, S., Lukavsky, J., Stys, D. & Kopecky, J. 2011. Cytotoxicity and Secondary Metabolites Production in Terrestrial Nostoc Strains, Originating From Different Climatic/Geographic Regions and Habitats: Is Their Cytotoxicity Environmentally Dependent? *Environmental Toxicology* **26**:345-58.
- Huang, X., Chen, L., Liu, W., Qiao, Q., Wu, K., Wen, J., Huang, C., Tang, R. & Zhang, X. 2015. Involvement of oxidative stress and cytoskeletal disruption in microcystin-induced apoptosis in CIK cells. *Aquatic Toxicology* **165**:41-50.
- Humpage, A. R., Fontaine, F., Froscio, S., Burcham, P. & Falconer, I. R. 2005. Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: Role of cytochrome P-450 and oxidative stress. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues* **68**:739-53.
- Jochimsen, E. M., Carmichael, W. W., An, J. S., Cardo, D. M., Cookson, S. T., Holmes, C. E. M., Antunes, M. B. D., de Melo, D. A., Lyra, T. M., Barreto, V. S. T., Azevedo, S. & Jarvis, W. R. 1998. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *New England Journal of Medicine* **338**:873-78.
- Jokela, J., Oftedal, L., Herfindal, L., Permi, P., Wahlsten, M., Doskeland, S. O. & Sivonen, K. 2012. Anabaenolysins, Novel Cytolytic Lipopeptides from Benthic Anabaena Cyanobacteria. *Plos One* **7**:9.

- Jones, A. C., Monroe, E. A., Eisman, E. B., Gerwick, L., Sherman, D. H. & Gerwick, W. H. 2010. The unique mechanistic transformations involved in the biosynthesis of modular natural products from marine cyanobacteria. *Natural Product Reports* **27**:1048-65.
- Kankaanpää, H.T.; Holliday, J.; Schröder, H.; Goddard, T.J.; von Fister, R.; Carmichael, W.W. 2005. Cyanobacteria and prawn farming in northern New South Wales, Australia—A case study on cyanobacteria diversity and hepatotoxin bioaccumulation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **203**: 243–256
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**: 239–57.
- Komárek, J., Zapomělová, E. 2007. Planktic morphospecies of the cyanobacterial genus *Anabaena* (= subg. *Dolichospermum*) – 1. part: coiled types. *Fottea Olomouc* **7** (1): 1-31.
- Komárek J. 2013. Cyanoprokaryota –3. Teil/ 3rd Part: Nostocales. – In Süßwasserflora von Mitteleuropa. *Elsevier/Spektrum, Heidelberg* 1130 p.
- Kust, A. Nепублиkováno. Occurrence of the most common toxins vs. Cytotoxicity in nongasvacuolate heterocytous cyanobacteria
- Liu, L., Herfindal, L., Jokela, J., Shishido, T. K., Wahlsten, M., Doskeland, S. O. & Sivonen, K. 2014. Cyanobacteria from Terrestrial and Marine Sources Contain Apoptogens Able to Overcome Chemoresistance in Acute Myeloid Leukemia Cells. *Marine Drugs* **12**:2036-53.
- Mackintosh, C., Beattie, K. A., Klumpp, S., Cohen, P. & Codd, G. A. 1990. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatase-1 and phosphatase-2a from both mammals and higher-plants. *Febs Letters* **264**:187-92.
- Martins, R. F., Ramos, M. F., Herfindal, L., Sousa, J. A., Skaerven, K. & Vasconcelos, V. M. 2008. Antimicrobial and cytotoxic assessment of marine cyanobacteria - *Synechocystis* and *synechococcus*. *Marine Drugs* **6**:1-11.
- Mazmouz, R., Chapuis-Hugon, F., Mann, S., Pichon, V., Mejean, A. & Ploux, O. 2010. Biosynthesis of Cyindrospermopsin and 7-Epicyindrospermopsin in *Oscillatoria* sp Strain PCC 6506: Identification of the *cyr* Gene Cluster and Toxin Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **76**:4943-49.
- McElhiney, J., Lawton, L. A. & Leifert, C. 2001. Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure. *Toxicon* **39**:1411-20.

- Mejean, A., Paci, G., Gautier, V. & Ploux, O. 2014. Biosynthesis of anatoxin-a and analogues (anatoxins) in cyanobacteria. *Toxicon* **91**:15-22.
- Mejean, A. & Ploux, O. 2013. A Genomic View of Secondary Metabolite Production in Cyanobacteria. *Genomics of Cyanobacteria* **65**:189-234.
- Merel, S., Walker, D., Chicana, R., Snyder, S., Baures, E. & Thomas, O. 2013. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment International* **59**:303-27.
- Mez, K., Beattie, K. A., Codd, G. A., Hanselmann, K., Hauser, B., Naegeli, H. & Preisig, H. R. 1997. Identification of a microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle deaths on alpine pastures in Switzerland. *European Journal of Phycology* **32**:111-17.
- Mez, K., Hanselmann, K. & Preisig, H. R. 1998. Environmental conditions in high mountain lakes containing toxic benthic cyanobacteria. *Hydrobiologia* **368**:1-15.
- Moffitt, M. C. & Neilan, B. A. 2004. Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:6353-62.
- Mohamed, Z. A., El-Sharouny, H. M. & Ali, W. S. M. 2006. Microcystin production in benthic mats of cyanobacteria in the Nile River and irrigation canals, Egypt. *Toxicon* **47**:584-90.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - application to proliferation and cyto-toxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**:55-63.
- NCEA. 2006. Toxicological Reviews of Cyanobacterial Toxins: Anatoxin-A. *National Center for Environmental Assessment*.
- Nehring, S. 1993. Mortality of dogs associated with a mass development of nodularia-spumigena (cyanophyceae) in a brackish lake at the German North-sea coast. *Journal of Plankton Research* **15**:867-72.
- Newman, D. J. & Cragg, G. M. 2004. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *Journal of Natural Products* **67**:1216-38.
- Novakova, K., Kohoutek, J., Adamovsky, O., Brack, W., Krauss, M. & Blaha, L. 2013. Novel metabolites in cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* with potencies to inhibit gap junctional intercellular communication. *Journal of Hazardous Materials* **262**:571-79.
- Oftedal, L., Myhren, L., Jokela, J., Gausdal, G., Sivonen, K., Doskeland, S. O. & Herfindal, L. 2012. The lipopeptide toxins anabaenolysin A and B target biological membranes in a cholesterol-dependent manner. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*

1818:3000-09.

- Oftedal, L., Selheim, F., Wahlsten, M., Sivonen, K., Doskeland, S. O. & Herfindal, L. 2010. Marine Benthic Cyanobacteria Contain Apoptosis-Inducing Activity Synergizing with Daunorubicin to Kill Leukemia Cells, but not Cardiomyocytes. *Marine Drugs* **8:2659-72.**
- Oftedal, L., Skjaerven, K. H., Coyne, R. T., Edvardsen, B., Rohrlack, T., Skulberg, O. M., Doskeland, S. O. & Herfindal, L. 2011. The apoptosis-inducing activity towards leukemia and lymphoma cells in a cyanobacterial culture collection is not associated with mouse bioassay toxicity. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **38:489-501.**
- Ohta, T., Sueoka, E., Iida, N., Komori, A., Suganuma, M., Nishiwaki, R., Tatematsu, M., Kim, S. J., Carmichael, W. W. & Fujiki, H. 1994. Nodularin, a potent inhibitor of protein phosphatase-1 and phosphatase-2a, is a new environmental carcinogen in male f344 rat-liver. *Cancer Research* **54:6402-06.**
- Osswald, J., Rellan, S., Gago, A. & Vasconcelos, V. 2007. Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a. *Environment International* **33:1070-89.**
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F. T., Zhou, T. T., Liu, B. & Bao, J. K. 2012. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation* **45:487-98.**
- Pagliacci, M. C., Spinozzi, F., Migliorati, G., Fumi, G., Smacchia, M., Grignani, F., Riccardi, C. & Nicoletti, I. 1993. Genistein inhibits tumor-cell growth in-vitro but enhances mitochondrial reduction of tetrazolium salts - a further pitfall in the use of the mtt assay for evaluating cell-growth and survival. *European Journal of Cancer* **29A:1573-77.**
- Patterson, G. M. L., Smith, C. D., Kimura, L. H., Britton, B. A. & Carmeli, S. 1993. Action of tolytoxin on cell morphology, cytoskeletal organization, and actin polymerization. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **24:39-48.**
- Poniedziałek, B., Rzymiski, P. & Karczewski, J. 2014. Cylindrospermopsin decreases the oxidative burst capacity of human neutrophils. *Toxicon* **87:113-19.**
- Pouličková, A. 2011. Základy ekologie sinic a řas. *Univerzita Palackého v Olomouci* 90 p.
- Quiblier, C., Wood, S., Echenique-Subiabre, I., Heath, M., Villeneuve, A. & Humbert, J. F. 2013. A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria - Ecology, toxin production and risk management. *Water Research* **47:5464-79.**

- Rai, N. K., Tripathi, K., Sharma, D., and Shukla, V. K. 2005. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds* **4**:138–44.
- Rajaniemi, P., Komarek, J., Willame, R., Hrouzek, P., Kastovska, K., Hoffmann, L. & Sivonen, K. 2005. Taxonomic consequences from the combined molecular and phenotype evaluation of selected *Anabaena* and *Aphanizomenon* strains. *Archiv fuer Hydrobiologie Supplement* **159**:371-91.
- Rantala, A., Fewer, D. P., Hisbergues, M., Rouhiainen, L., Vaitomaa, J., Borner, T. & Sivonen, K. 2004. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:568-73.
- Rapala, J., Sivonen, K., Lyra, C. & Niemela, S. I. 1997. Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *Applied and Environmental Microbiology* **63**:2206-12.
- Rellan, S., Osswald, J., Saker, M., Gago-Martinez, A. & Vasconcelos, V. 2009. First detection of anatoxin-a in human and animal dietary supplements containing cyanobacteria. *Food and Chemical Toxicology* **47**:2189-95.
- Renvoize, C., Biola, A., Pallardy, M. & Breard, J. 1998. Apoptosis: Identification of dying cells. *Cell Biology and Toxicology* **14**:111-20.
- Riss, T. L. & Moravec, R. A. 2004. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay and Drug Development Technologies* **2**:51-62.
- Rohr, J. 2006. Cryptophycin anticancer drugs revisited. *Acs Chemical Biology* **1**:747-50.
- Runnegar, M. T., Kong, S. M., Zhong, Y. Z. & Lu, S. C. 1995. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology* **49**:219-25.
- Saikumar, P., Dong, Z., Mikhailov, V., Denton, M., Weinberg, J. M. & Venkatachalam, M. A. 1999. Apoptosis: Definition, mechanisms, and relevance to disease. *American Journal of Medicine* **107**:489-506.
- Saker, M. L. & Griffiths, D. J. 2001. Occurrence of blooms of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya and Subba Raju in a north Queensland domestic water supply. *Marine and Freshwater Research* **52**:907-15.
- Schwartz, R. E., Hirsch, C. F., Sesin, D. F., Flor, J. E., Chartrain, M., Fromtling, R. E., Harris, G. H., Salvatore, M. J., Liesch, J. M. & Yudin, K. 1990. Pharmaceuticals from cultured algae. *Journal of Industrial Microbiology* **5**:113-23.

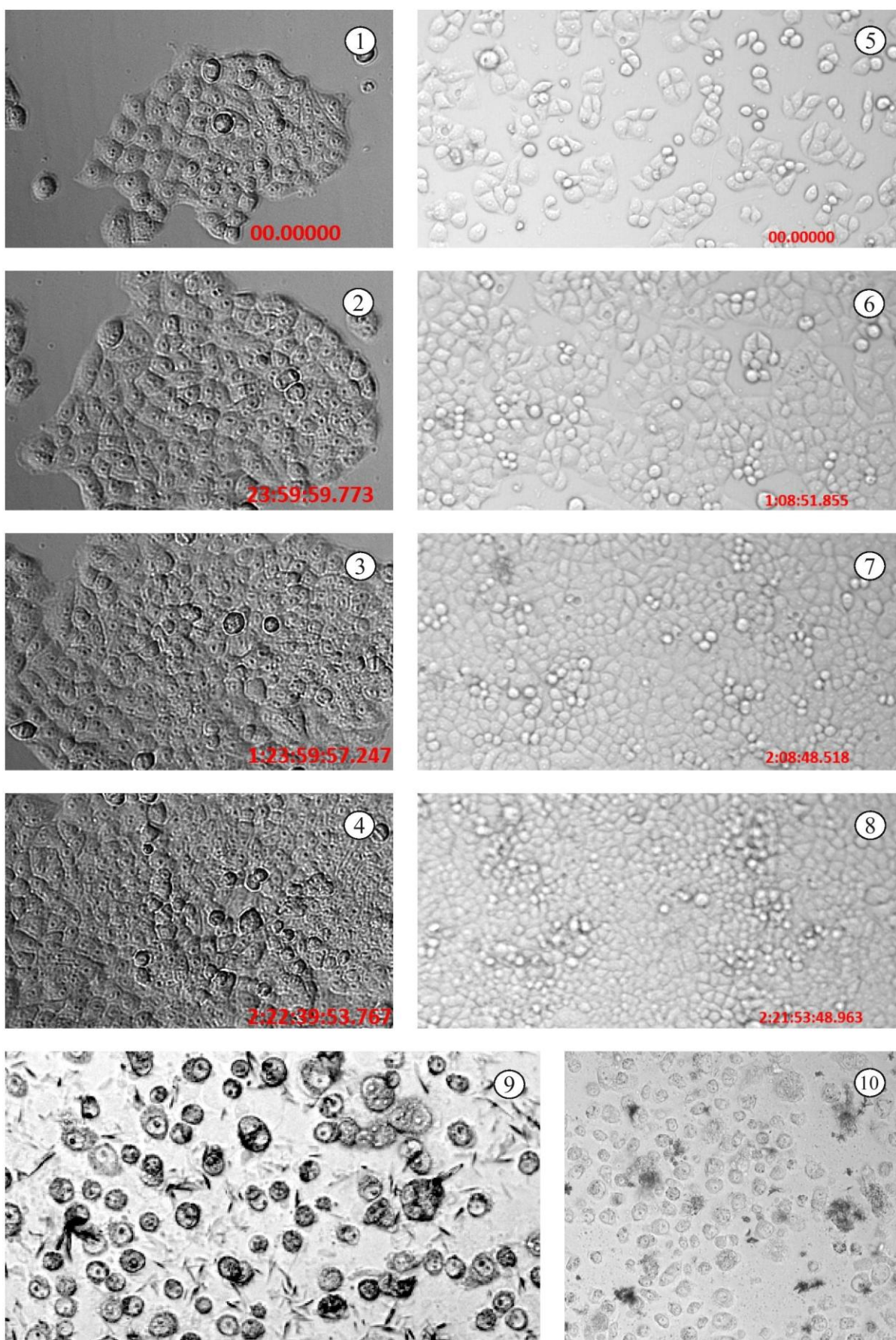
- Seifert, M., McGregor, G., Eaglesham, G., Wickramasinghe, W. & Shaw, G. 2007. First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gornont) Speziale and Dyck. *Harmful Algae* **6**:73-80.
- Shih, C. & Teicher, B. A. 2001. Cryptophycins: A novel class of potent antimitotic antitumor depsipeptides. *Current Pharmaceutical Design* **7**:1259-76.
- Simmons, T. L., Andrianasolo, E., McPhail, K., Flatt, P. & Gerwick, W. H. 2005. Marine natural products as anticancer drugs. *Molecular Cancer Therapeutics* **4**:333-42.
- Sivonen, K. 1996. Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycologia* **35**:12-24.
- Skulberg, O. M., Carmichael, W. W., Andersen, R. A., Matsunaga, S., Moore, R. E. & Skulberg, R. 1992. Investigations of a neurotoxic oscillatorian strain (cyanophyceae) and its toxin - isolation and characterization of homoanatoxin-a. *Environmental Toxicology and Chemistry* **11**:321-29.
- Smith, C. D., Zhang, X. Q., Mooberry, S. L., Patterson, G. M. L. & Moore, R. E. 1994. Cryptophycin - a new antimicrotubule agent active against drug-resistant cells. *Cancer Research* **54**:3779-84.
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. & Cohenbaz, G. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order chroococcales). *Bacteriological Reviews* **35**:171-&.
- Stepanenko, A. A. & Dmitrenko, V. V. 2015. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene* **574**:193-203.
- Surakka, A., Sihvonen, L. M., Lehtimäki, J. M., Wahlsten, M., Vuorela, P. & Sivonen, K. 2005. Benthic cyanobacteria from the Baltic Sea contain cytotoxic *Anabaena*, *Nodularia*, and *Nostoc* strains and an apoptosis-inducing *Phormidium* strain. *Environmental Toxicology* **20**:285-92.
- Thomas, P., Stephens, M., Wilkie, G., Amar, M., Lunt, G. G., Whiting, P., Gallagher, T., Pereira, E., Alkondon, M., Albuquerque, E. X. & Wonnacott, S. 1993. (+)-Anatoxin-a is a potent agonist at neuronal nicotinic acetylcholine-receptors. *Journal of Neurochemistry* **60**:2308-11.
- Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., von Dohren, H., Borner, T. & Neilan, B. A. 2000. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chemistry & Biology* **7**:753-64.

- Tomek, P. 2010. Muscotoxins: novel cytotoxic undecapeptides with unique structural elements and mechanism of action, isolated from soil cyanobacterium *Nostoc muscorum*. České Budějovice Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, 93 pp.
- Tomek, P., Hrouzek, P., Kuzma, M., Sykora, J., Fiser, R., Cerny, J., Novak, P., Bartova, S., Simek, P., Hof, M., Kavan, D. & Kopecky, J. 2015. Cytotoxic Lipopeptide Muscotoxin A, Isolated from Soil Cyanobacterium *Desmonostoc muscorum*, Permeabilizes Phospholipid Membranes by Reducing Their Fluidity. *Chemical Research in Toxicology* **28**:216-24.
- Trimurtulu, G., Ohtani, I., Patterson, G. M. L., Moore, R. E., Corbett, T. H., Valeriote, F. A. & Demchik, L. 1994. Total structures of cryptophycins, potent antitumor depsipeptides from the blue-green-alga *Nostoc* sp strain gsv-224. *Journal of the American Chemical Society* **116**:4729-37.
- Ulukaya, E., Colakogullari, M. & Wood, E. J. 2004. Interference by anti-cancer chemotherapeutic agents in the MTT-tumor chemosensitivity assay. *Chemotherapy* **50**:43-50.
- van Apeldoorn, M. E., van Egmond, H. P., Speijers, G. J. A. & Bakker, G. J. I. 2007. Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition & Food Research* **51**:7-60.
- Van Buynder, P. G., Oughtred, T., Kirkby, B., Phillips, S., Eaglesham, G., Thomas, K. & Burch, M. 2001. Nodularin uptake by seafood during a cyanobacterial bloom. *Environmental Toxicology* **16**:468-71.
- Volk, R. B. & Mundt, S. 2007. Cytotoxic and non-cytotoxic exometabolites of the cyanobacterium *Nostoc insulare*. *Journal of Applied Phycology* **19**:55-62.
- Wacklin, P., Hoffmann, L. & Komarek, J. 2009. Nomenclatural validation of the genetically revised cyanobacterial genus *Dolichospermum* (RALFS ex BORNET et FLAHAULT) comb. nova. *Fottea* **9**:59-64.
- Weiss, C., Sammet, B. & Sewald, N. 2013. Recent approaches for the synthesis of modified cryptophycins. *Natural Product Reports* **30**:924-40.
- Welker, M. & von Dohren, H. 2006. Cyanobacterial peptides - Nature's own combinatorial biosynthesis. *Fems Microbiology Reviews* **30**:530-63.
- Wiegand, C. & Pflugmacher, S. 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology* **203**:201-18.
- Wipf, P., Reeves, J. T., Balachandran, R. & Day, B. W. 2002. Synthesis and biological

- evaluation of structurally highly modified analogues of the antimitotic natural product curacin A. *Journal of Medicinal Chemistry* **45**:1901-17.
- Wood, S. A., Heath, M. W., Holland, P. T., Munday, R., McGregor, G. B. & Ryan, K. G. 2010a. Identification of a benthic microcystin-producing filamentous cyanobacterium (Oscillatoriales) associated with a dog poisoning in New Zealand. *Toxicon* **55**:897-903.
- Wood, S. A., Heath, M. W., Kuhajek, J. & Ryan, K. G. 2010b. Fine-scale spatial variability in anatoxin-a and homoanatoxin-a concentrations in benthic cyanobacterial mats: implication for monitoring and management. *Journal of Applied Microbiology* **109**:2011-18.
- Wood, S. A., Kuhajek, J. M., de Winton, M. & Phillips, N. R. 2012. Species composition and cyanotoxin production in periphyton mats from three lakes of varying trophic status. *Fems Microbiology Ecology* **79**:312-26.
- Wood, S. A., Selwood, A. I., Rueckert, A., Holland, P. T., Milne, J. R., Smith, K. F., Smits, B., Watts, L. F. & Cary, C. S. 2007. First report of homoanatoxin-a and associated dog neurotoxicosis in New Zealand. *Toxicon* **50**:292-301.
- Wu G. 2010. Assay development: fundamentals and practices. *United States: John Wiley & Sons* 46 pp.
- Zanchett, G. & Oliveira-Filho, E. C. 2013. Cyanobacteria and Cyanotoxins: From Impacts on Aquatic Ecosystems and Human Health to Anticarcinogenic Effects. *Toxins* **5**:1896-917.

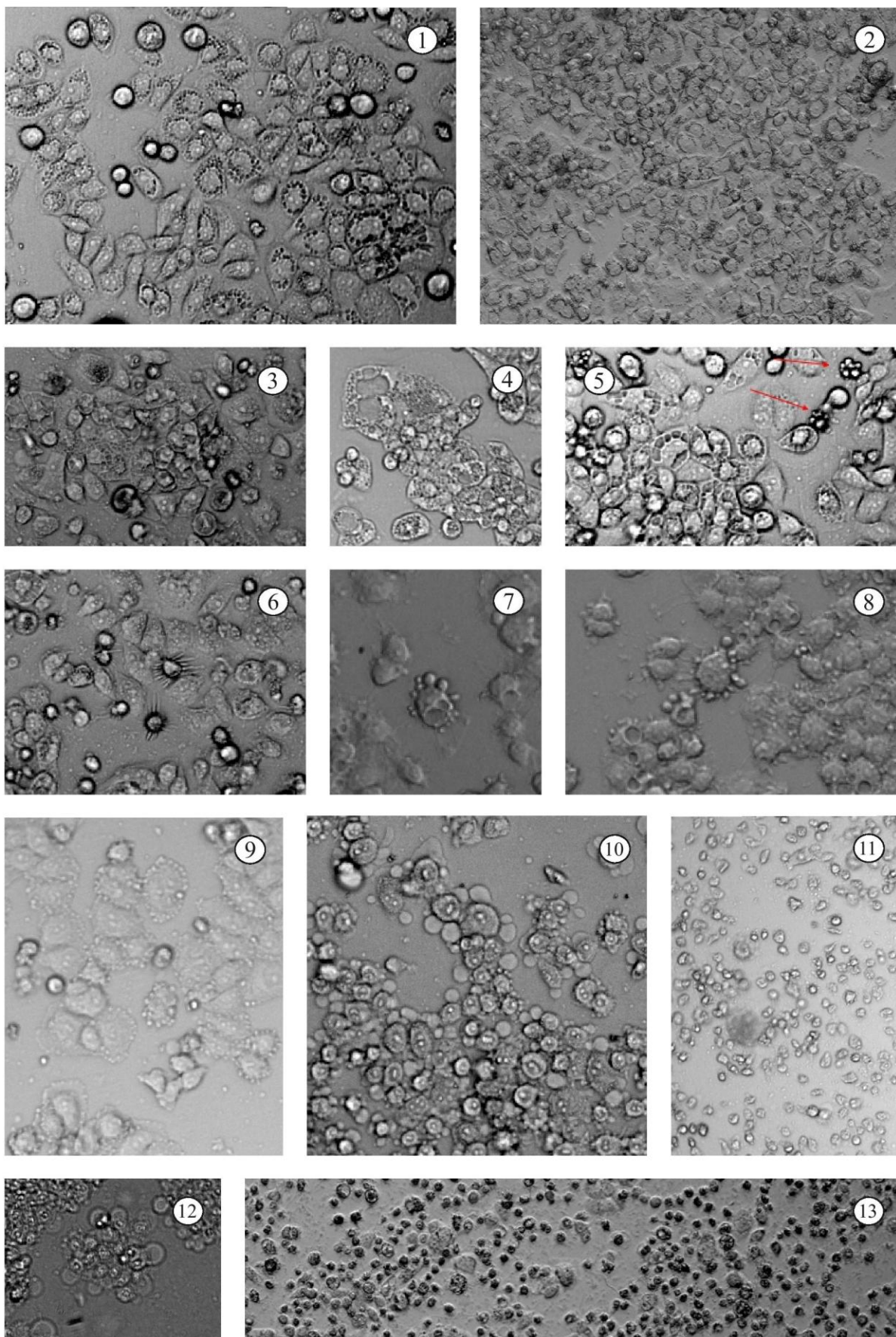
8. OBRAZOVÁ PŘÍLOHA

Tabule I.



1-4 kontrolní HeLa buňky v různých růstových časech (24, 48 a 72), 16.9.2014;
5-8 kontrolní HeLa buňky v různých růstových časech (24, 48 a 72), 28.8.2015;
9-10 příklady kontaminací u vyloučených vzorků

Tabule II.



1-4 typy morfolozických změn: klasifikované jako *vakuolizace*; 5 - vakuolizace a začínající blebbing (vyznačené šipkou); 6 - známka apoptózy?; 7-9 blebbing: klasifikované jako *apoptóza*; 10-13 scvrknutí buněk a vyhrěznutí cytoplazmatické membrány: klasifikované jako *nekróza*