

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biochemie a patobiochemie

Studijní obor: Biochemie a patobiochemie



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Mgr. Kateřina Vaňková

Biologické účinky jedlých řas

Biological effects of edible algae

Typ závěrečné práce

Disertační

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:

Prof. MUDr. Libor Vítek, PhD., MBA

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 30.5.2018

Kateřina Vaňková

Podpis

Identifikační záznam:

VAŇKOVÁ, Kateřina. *Biologické účinky jedlých řas. [Biological effects of edible algae]*. Praha, 2018. 111 s., 1 příl. Disertační práce (PhD.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky. Vedoucí práce Vítek, Libor.

Abstrakt:

Nutriční příjem látek s antioxidačními a dalšími bioaktivními vlastnostmi, jako těch, které jsou obsaženy v jedlých řasách nebo v zelených rostlinách, by mohl mít vliv na ochranu proti vzniku nádorových onemocnění. Chlorofyly a další tetrapyrolové sloučeniny, které jsou strukturně podobné hemu a antioxidačně působícímu žlučovému pigmentu bilirubinu, patří k důležitým kandidátním molekulám, které by mohly být zodpovědné za tyto účinky. Na základě našich studií prokazujících antiproliferační účinky extraktu jedlé sinice *S. platensis* na experimentálním modelu lidského adenokarcinomu pankreatu jsme detailně studovali účinky chlorofylu abundantně se vyskytujícího v této sinici. Vzhledem k tomu, že existují jen omezené údaje o antiproliferačních účincích chlorofylů, bylo cílem naší studie zhodnotit tyto účinky.

Studie byla provedena na experimentálních modelech lidského adenokarcinomu pankreatu a prostaty. V *in vitro* studiích byl prokázán inhibiční účinek chlorofylů (chlorofylu *a*, chlorofylu *b*, chlorofylinu a feofytinu *a*) na buněčnou proliferaci a viabilitu studovaných nádorových buněk. Chlorofyly snižovaly významně expresi mRNA i aktivitu hemoxygenázy. Chlorofyly významně ovlivňovaly redoxní prostředí nádorových buněk včetně vlivu na mitochondriální membránový potenciál, produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) v mitochondriích i v celých buňkách, stejně tak jako poměr redukovaného a oxidovaného glutathionu, který je významným buněčným antioxidantem. Protinádorové účinky chlorofylu byly potvrzeny v *in vivo* studii na athymických nu/nu myších xenotransplantovaných lidskými pankreatickými nádorovými buňkami, v které zvířata léčená chlorofylem vykazovala významně nižší růst a proliferaci nádorů v porovnání s kontrolní skupinou.

Závěrem lze říci, že mechanismus antiproliferačního působení chlorofylů probíhá na více úrovních mechanismů ovlivnění redoxního prostředí buněk. Tato data potvrzují ochranný vliv rostlinné stravy na vznik nádorových onemocnění pozorovaný v klinicko-epidemiologických studiích.

Klíčová slova:

Feofytin *a*, hemoxygenáza, chlorofyl *a*, chlorofyl *b*, chlorofylin, jedlé řasy, nádorová onemocnění, oxidační stres, buněčná proliferace, reaktivní formy kyslíku, *Spirulina platensis*, tetrapyrolové sloučeniny.

Abstract:

Nutritional factors with antioxidant properties, such as those contained in edible algae or green plants, might be implicated in protection against cancer development. Chlorophyll and other tetrapyrrolic compounds, structurally related to heme and antioxidant bile pigment bilirubin, belong to important candidate molecules, which might be responsible for these effects. Based on our studies demonstrating antiproliferative effects of *S. platensis* edible alga extract on experimental model of human pancreatic adenocarcinoma we investigated in detail the effect of chlorophyll occurring abundantly in this alga. Since only scarce data exist on the antiproliferative effects of chlorophylls, the aim of our study was to assess these effects.

The study was performed on experimental models of human pancreatic and prostate cancer. The inhibitory effects of chlorophylls (chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, chlorophyllin and pheophytin *a*) on cell proliferation and cell viability were investigated in *in vitro* studies. Chlorophylls reduced the mRNA expression as well as activity of hemeoxygenase in tested pancreatic cancer cells. Simultaneously, chlorophylls played an important role in redox environment of studied cancer cell lines including modulation of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species (ROS) production in mitochondria as well as in the whole cells, and change in proportion of reduced and oxidized glutathione. Anti-cancer effects of chlorophyll *a* were proved in *in vivo* experiments on pancreatic cancer cells xenotransplanted to nude mice.

In conclusion, the mechanisms of antiproliferative effects of chlorophyll are multiple, including the effects on the expression of key genes involved in antioxidant protection, as well as direct free radical scavenging affecting substantially the cell redox environment. This data confirm protective effect of plant food on incidence of cancer diseases observed in clinical and epidemiological studies.

Key words:

Cancer, chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, chlorophyllin, edible algae, heme oxygenase, oxidative stress, pheophytin *a*, cell proliferation, reactive oxygen species, *Spirulina platensis*, tetrapyrrolic molecules.

Poděkování:

V první řadě bych ráda poděkovala svému školiteli Prof. MUDr. Liborovi Vítkovi, PhD., MBA, který mi byl odborným vedením po celou dobu studia, byl mi oporou a skvělým školitelem. Víím, že to se mnou nebylo mnohdy lehké a jeho pomoci si velice vážím. Bez jeho trpělivosti, pomoci a odborných znalostí bych se zcela jistě neobešla.

Dále bych ráda poděkovala MUDr. Lucii Muchové, PhD. za pomoc při práci a konzultace, kterými mi pomohla zejména v začátcích studia. Veliké díky patří také Ing. Jaroslavovi Zelenkovi, PhD. a Alešovi Dvořákovi, PhD. za spolupráci na experimentech a jejich odbornou pomoc. Děkuji také ostatním spolupracovníkům a studentům, kteří se podíleli na měření dat či odbornou pomocí, a to především Renatě Koníčkové, PhD., která se nejen podílela na mnoha experimentech, ale také mi poskytla zaškolení do metod a různých technik v začátcích studia, které mi byly velice přínosné, dále děkuji Kateřině Váňové, PhD., Janě Vaníkové, PhD., Ivě Subhanové, PhD. a MUDr. Martinovi Leníčkoví, Ph.D. a v neposlední řadě také našim laborantkám a všem, co se spolupodíleli na této disertační práci.

Velké poděkování si zaslouží také moje rodina a přátelé, kteří mě podporovali a podrželi v těžkých chvílích během studia. Byli mi nejen psychickou oporou, ale také zázemím a vnesli mi do života spoustu lásky, síly a radosti. Děkuji vám všem.

Seznam zkratek:

HMOX1	hemoxygenáza
BLVRA	biliverdinreduktáza
MTT	thiazolyl blue tetrazolium bromid
CV	krystalová violet'
DMSO	dimetylsulfoxid
ATP	adenosintrifosfát
RNA	ribonukleová kyselina
CO	oxid uhelnatý
NADPH	β -nikotinamidadenindinukleotidfosfát
<i>S. platensis</i>	<i>Spirulina platensis</i>
ROS	reaktivní formy kyslíku
MMP	mitochondriální membránový potenciál
GSH	redukováný glutathion
GSSG	glutathion
Glu	γ -glutamyl
Cys	cysteinyl
Gly	glycin
VCD	spektroskopie vibračního cirkulárního dichroismu
ECD	spektroskopie elektronového cirkulárního dichroismu
IČ	infračervená spektroskopie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MS	hmotnostní spektra
RT-PCR	(Real Time) polymerázová řetězová reakce
MF	mobilní fáze
GC-RDG	plynový chromatograf s detektorem redukčního plynu
RES	retikuloendoteliální systém
PK, PKM2	pyruvátkináza, M2 forma pyruvátkinázy
PCB	fykokyanobilin

Obsah

1	Úvod.....	10
1.1	Anotace	10
1.2	Současný stav poznání	12
1.3	Tetrapyroly v přírodě i v organismu	14
1.4	Konjugovaný systém dvojných vazeb tetrapyrrolů.....	14
1.5	Studované chlorofyly	14
1.6	Chlorofyly jako biologicky aktivní sloučeniny	15
1.7	Syntéza porfyrinů	16
1.8	Degradace porfyrinů	18
1.9	Centrální atomy porfyrinů.....	20
1.10	Metabolické dráhy ovlivňované porfyriny.....	20
1.11	Oxidační stres a antioxidační ochrana buněk	22
1.12	Respirační řetězec a aerobní fosforylace	30
1.13	Role ROS u nádorových buněk	31
1.14	Buněčná smrt a mitochondriální membránový potenciál (MMP)	33
2	Cíle disertační práce.....	34
3	Význam a očekávané výsledky projektu.....	34
4	Materiál a metody	35
4.1	Chemikálie	35
4.2	Příprava experimentálních sloučenin	35
4.3	UV/VIS spektroskopie	36
4.4	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	37
4.5	Hmotnostní spektroskopie.....	37
4.6	Spektroskopie vibračního cirkulárního dichroismu (VCD), elektronového cirkulárního dichroismu (ECD), a infračervená spektroskopie (IČ)	37
4.7	Buněčné linie	38
4.8	Testy viability.....	38
4.9	Stanovení počtu buněk	39
4.10	Klonogenní analýza	39
4.11	Stanovení aktivity hemoxygenázy (HMOX).....	40
4.12	Izolace RNA a Real-time PCR	41
4.13	Stanovení MMP	42
4.14	Stanovení mitochondriální produkce superoxidu	42
4.15	Stanovení redoxního stavu glutathionu (GSH/GSSG).....	43
4.16	Stanovení produkce H ₂ O ₂	43
4.17	Stanovení antioxidační kapacity chlorofylů	44
4.18	Stanovení redukční karboxylace	44
4.19	Stanovení aktivace ERK a AKT	45
4.20	<i>In vivo</i> experimenty	45
4.21	Statistické analýzy	46
5	Výsledky	48
5.1	Izolace a charakterizace chlorofylu	48
5.1.1	Izolace chlorofylu <i>a</i> ze sinice <i>S. platensis</i>	48
5.1.2	Charakterizace chlorofylu <i>a</i>	50
5.1.3	Stanovení stability chlorofylu <i>a</i> a feofytinu <i>a</i>	64

5.2	<i>In vitro</i> experimenty.....	66
5.2.1	Vliv rostlinných tetrapyrólů na viabilitu, proliferaci a růst nádorových a endoteliálních buněk	66
5.2.2	Vliv rostlinných tetrapyrólů na expresi <i>HMOX1</i> a <i>BLVRA</i> mRNA buněk adenokarcinomu pankreatu	81
5.2.3	Vliv rostlinných tetrapyrólů na aktivitu HMOX buněk adenokarcinomu pankreatu	82
5.2.4	Vliv rostlinných tetrapyrólů na mitochondriální membránový potenciál (MMP) buněk lidského hepatoblastomu	84
5.2.5	Vliv rostlinných tetrapyrólů na mitochondriální produkci superoxidu buňkami adenokarcinomu pankreatu	84
5.2.6	Vliv rostlinných tetrapyrólů na redoxní stav glutathionu buněk adenokarcinomu pankreatu	85
5.2.7	Vliv tetrapyrólů na produkci H ₂ O ₂ buněk adenokarcinomu pankreatu	86
5.2.8	Vliv rostlinných tetrapyrólů na celkovou antioxidační kapacitu.....	87
5.3	Účinek rostlinných tetrapyrólů na redukční karboxylaci a glutaminolýzu buněk adenokarcinomu pankreatu	89
5.4	Účinek vlivu rostlinných tetrapyrólů na aktivaci ERK a AKT v buňkách adenokarcinomu pankreatu	89
5.5	Vliv perorální aplikace tetrapyrólů na velikost nádorů a antioxidační kapacitu krevních sér athymických nu/nu myší xenotransplantovaných buňkami lidského adenokarcinomu pankreatu	90
6	Diskuze a závěr.....	93
7	Literatura.....	102

1 ÚVOD

1.1 ANOTACE

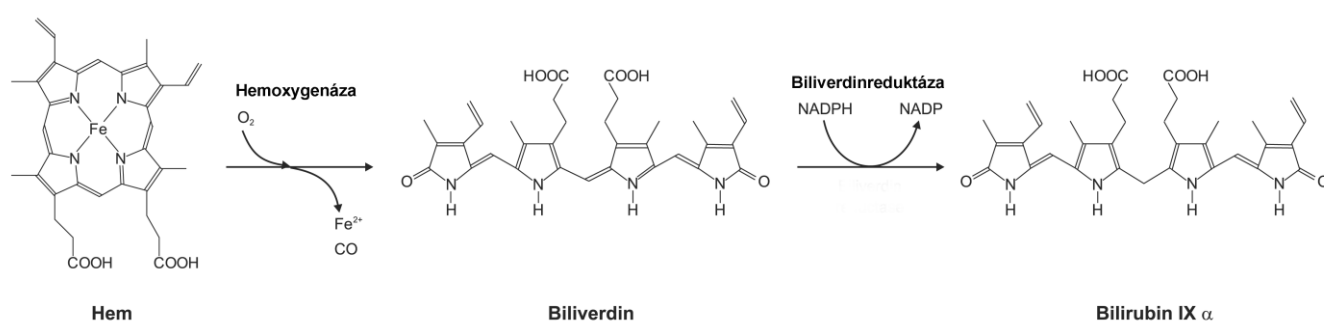
Nutriční faktory se významně podílejí na patogenezi nádorových onemocnění [1], obzvláště pak u západních typů diet bohatých na nasycené tuky a současně postrádajících ochranné látky. Mezi důležité nutrienty patří zejména látky schopné potlačovat oxidační stres. Takovými nutrienty mohou být látky obsažené v listové zelenině [2], zejména pak zelená barviva (chlorofyly). Zelená zelenina a současně také jedlé řady (*Spirulina platensis*, *Chlorella*) obsahují velké množství antioxidantů a zdraví prospěšných látek. Mezi tyto látky patří bílkoviny, esenciální aminokyseliny, vitamíny (vitamin A, C, E, K, vitamíny skupiny B), β -karoteny, lutein, celá řada mikronutrientů a minerálů (draslík, sodík, hořčík, železo a vápník) a v neposlední řadě také chlorofyly. [3] V současnosti se věnuje zvýšená pozornost možnému spojení peroxidace lipidů v živých organismech se širokým spektrem degenerativních onemocnění, jako jsou stárnutí, rakovina, cukrovka a kardiovaskulární onemocnění. Navíc je peroxidace lipidů jedním z hlavních důvodů zhoršení kvality potravinových složek během zpracování a skladování. Antioxidanty jsou důležitými inhibitory lipidové peroxidace nejen pro konzervaci potravin, ale také jako obranný mechanismus živých buněk proti oxidačnímu poškození. [4] Příjem potravin bohatých na antioxidanty, jako jsou např. jedlé řasy a zelená listová zelenina, působí příznivě na lidský organismus. V literatuře však chybí údaje o protinádorovém působení jednotlivých složek zelených rostlin. Na základě předchozího studia působení *S. platensis* na nádorové buňky jsme se zaměřily na chlorofyly, jako na potenciální látky s protinádorovými účinky. [5]

Chlorofyly (chlorofyl *a*, chlorofyl *b* aj.) se řadí mezi tetrapyrolová barviva, která jsou přítomna v zelených částech rostlin i mnohých jedlých řasách, která jsou nezbytná pro fotosyntézu. Během stárnutí pletiv, zrání plodů či při zpracování se přeměňují na olivově zelený feofytin [6], který se také řadí mezi chlorofyly. I když ztráta zelené barvy v zestárlých listech a zrání plodů je velice starý a dobře známý úkaz, biologické účinky chlorofylů a jejich metabolitů nejsou doposud příliš prozkoumané. Tetrapyrolová část již zmíněných chlorofylů má podobnou strukturu jako bilirubin a biliverdin, což jsou žlučové pigmenty s prokázanými velmi silnými antioxidačními [7] a dalšími biologickými vlastnostmi [8]. Oba tyto žlučové pigmenty vznikají v organismu degradací hemu (Obr. 1.) během rozpadu červených krvinek. Z hemu působením enzymu hemoxygenázy 1 (HMOX1) [9] vzniká biliverdin, který je redukován enzymem biliverdinreduktázou (BLVRA) na bilirubin. Bilirubin je obecně známý jako jeden z hlavních antioxidantů a jeho mírně zvýšená

koncentrace v krevním řečišti je spojována s nižším výskytem onemocnění podmíněných oxidačním stresem, včetně onemocnění kardiovaskulárních, autoimunitních i nádorových.

Na základě podobnosti struktur chlorofylů s hemem a žlučovými pigmenty se tedy lze domnívat, že i jejich biologické a antioxidační účinky budou podobné. Předpokládá se, že dietní příjem chlorofylu rostlinného původu by mohl být asociován s nižší prevalencí onemocnění podmíněných oxidačním stresem, ačkoli přesná data o možných protektivních účincích chlorofylů nejsou k dispozici.

Obr. 1. Katabolická dráha hemu



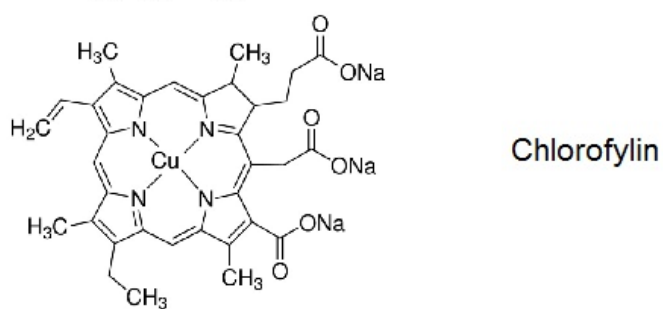
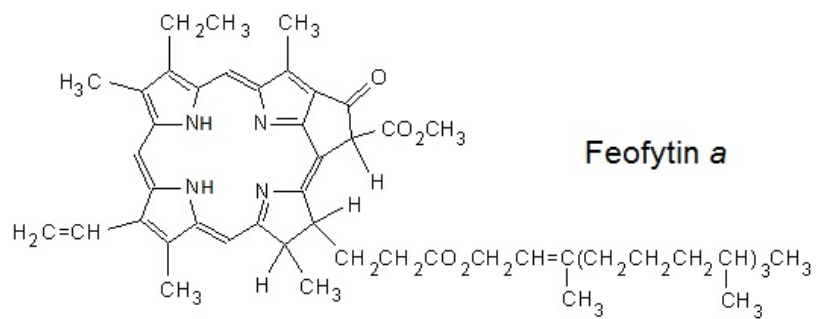
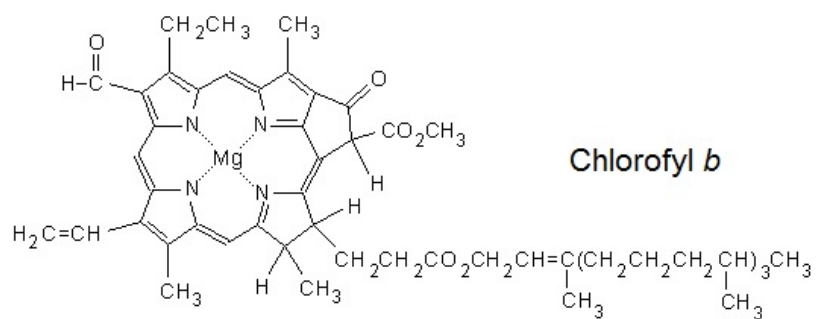
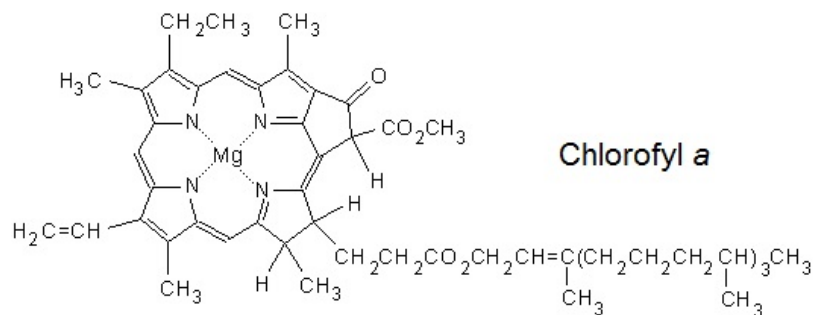
1.2 SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ

Nutriční faktory se významně podílejí na patogenezi civilizačních onemocnění, obzvláště pak u západních typů diet bohatých na nasycené tuky a současně postrádajících důležité ochranné látky. Odhaduje se, že životní styl a dietní faktory se podílejí z 30-70% na vzniku nádorových onemocnění [1]. Je prokázáno, že na čtyřech z 10 nejvýznamnějších příčin úmrtí ve Spojených státech zahrnujících nádorová onemocnění, kardio- a cerebrovaskulární nemoci a diabetes, se významně podílejí dietní faktory [10]. V patogenezi všech těchto chorob se značným způsobem uplatňuje zvýšená produkce volných kyslíkových radikálů [11]. Přitom dieta v zemích západní Evropy a ve Spojených státech (v angličtině označovaná jako Western diet) umožňuje tvorbu volných kyslíkových radikálů v těle zejména nadměrným přísunem kalorií, jednoduchých sacharidů, nasycených tuků a cholesterolu, nízkým příjmem vlákniny, ovoce a zeleniny a polynenasycených mastných kyselin [12].

Na druhou stranu konzumace antioxidantů v dietě, mezi které patří například tokoferoly, askorbát, karotenoidy, thioly, polyfenoly či další mikronutrienty je spojována s nižší prevalencí nemocí podmíněných oxidačním stresem [13].

Mezi důležité látky s potenciálně ochrannými účinky patří i zelené pigmenty chlorofyly *a* a *b* (Obr. 2.), které jsou obsaženy především v zelené listové zelenině a jedlých řasách. Dalšími takovými látkami jsou deriváty chlorofylu – ve vodě rozpustný chlorofylin (Obr. 2.), který se běžně používá v potravinářství jako zelené barvivo a feofytin *a* (Obr. 2.), což je chlorofyl *a* bez centrálního atomu hořčíku. Několik experimentálních studií prokázalo antioxidační účinky [14] a protektivní účinky chlorofylů na progresi nádorů [15, 16]. Tato data jsou pak podpořena epidemiologickými studii naznačujícími, že konzumace zelených rostlin obsahujících chlorofyly by mohla mít vliv na prevenci nádorových onemocnění [17], avšak existuje jen málo studií o působení těchto molekul a jejich vliv na redoxní prostředí buněk či ovlivnění různých biologických drah není známý.

Obr. 2. Struktura chlorofylů



1.3 TETRAPYROLY V PŘÍRODĚ I V ORGANISMU

Tetrapyrolové molekuly patří mezi klíčové biologické molekuly. Kromě molekul proteinů, lipidů a nukleových kyselin měly tetrapyroly největší vliv na vývoj života za poslední 4 miliardy let [18]. V přírodě je nalezneme prakticky všude. Dávají našemu světu barvy, účastní se tvorby kyslíku a život na Zemi by bez nich nebyl možný. Jednou z jejich hlavních funkcí u rostlin je produkce energie pomocí fotosyntézy; v organismu jsou pak součástí červených krvinek (hem), účastní se přenosu kyslíku a oxidační fosforylace (cytochromy), působí jako antioxidanty chránící proti reaktivním formám kyslíku (ROS) (bilirubin) a v neposlední řadě se účastní buněčné signalizace.

Chlorofyly, zelené rostlinné tetrapyroly, patří do velké rodiny od hemu odvozených molekul. V ekosystému hrají velmi důležitou roli zejména kvůli své přítomnosti ve fotosyntetizujících rostlinách a řasách a svým potenciálním biologickým účinkům. V přírodě existuje mnoho druhů chlorofylů (chlorofyl *a*, *b*, *c*₁, *c*₂, *d*) lišících se svou strukturou a výskytem [19]. Jednotlivé chlorofyly mají na tetrapyrolovém jádře zavěšeny různé substituenty.

1.4 KONJUGOVANÝ SYSTÉM DVOJNÝCH VAZEB TETRAPYROLŮ

Všechny tetrapyrolové sloučeniny, včetně chlorofylů, mají střídavý systém konjugovaných dvojných vazeb svých pyrolových kruhů. Při interakci volného radikálu s takovou molekulou dochází k přeuspořádání vazeb a k pohlcení volného radikálu. [20, 21] Chlorofyly jsou tedy přímými antioxidanty a mohou přispívat ke snížení oxidační zátěže organismu. Systém konjugovaných vazeb je mimo jiné také zodpovědný za barevnost těchto molekul. Chlorofyl *a* má sytě zelenou barvu, chlorofyl *b* je zelené barvy spíše tmavšího odstínu, feofytin *a* má tmavě zelenou olivovou barvu až do hněda a chlorofylin je barvy světle zelené.

1.5 STUDOVANÉ CHLOROFYLY

a) Hydrofobní chlorofyly

Nejčastěji se vyskytujícím chlorofylem je chlorofyl *a*, který najdeme prakticky ve všech rostlinách, včetně mechů, řas a sinic a stává se tak jednou z nejhojněji se vyskytujících molekul na Zemi. Chlorofyl *a* je tetrapyrolová sloučenina obsahující hořčnatý iont a dlouhý postranní řetězec fytyl. Je snadno degradovatelný a může být přeměněn na celou řadu produktů [22, 23]. V roztoku slabých hydroxidů alkalických kovů se odštěpuje fytyl (dlouhý nepolární postranní řetězec) za vzniku chlorofylidu *a*. V roztoku slabých kyselin je z chlorofylu uvolňován centrální atom hořčíku za vzniku feofytinu *a*. Při uvolnění jak fytylu tak hořčnatého iontu vzniká feoforbid *a*. Pokud chlorofyl vystavíme působení silných kyselin nebo je dlouhodobě vystaven světelnému záření,

dochází k rozštěpení porfyrinového kruhu. V žijících rostlinách nebo během extrakce chlorofylů může vzniknout také feofytin *a'*, chlorofylid *a'* či feoforbid *a'*, což jsou chlorofyly, u kterých došlo k epimeraci na 13. uhlíkovém atomu [24]. K malým změnám struktury chlorofylů dochází i při slabém světle fotooxidací vzdušným kyslíkem rozpuštěným v roztoku [25]. Je tedy nutné s těmito látkami pracovat, pokud možno, za úplné tmy a vyhnout se tak degradaci těchto molekul. Zda-li je v roztoku přítomno větší množství degradačních produktů chlorofylu, lze jednoduše poznat změnou barvy roztoku z intenzivně zelené na barvu olivovou až hnědou. Další hojně se vyskytující molekulou je chlorofyl *b*, který je obsažen ve vyšších rostlinách, zelených řasách a sinicích [26]. Další, méně časté, jsou chlorofyly *c*₁, *c*₂ a *d*, které se nacházejí v sinicích a hnědých řasách jako podpůrné lapače světla pro nezbytnou fotosyntézu.

Tyto přírodní chlorofyly mají lipofilní povahu díky svým dlouhým nepolárním postranním řetězcům, jejich tetrapyrrolová část molekuly má však hydrofilní povahu. Tyto molekuly se tedy dobře rozpouštějí v organických rozpouštědlech jako je dimetylsulfoxid (DMSO), hexan, heptan, chloroform a metanol.

b) Hydrofilní chlorofyly

Jediným chlorofylem, který je rozpustný ve vodě, je chlorofylin. Díky menší složitosti molekuly oproti chlorofylu *a* nebo *b* je možná jeho semisyntetická výroba, která je jednodušší a cenově méně náročná než jeho izolace. Chlorofylin je běžně používán v potravinářském průmyslu jako zelené barvivo potravin [27]. Tato molekula má oproti chlorofylu *a* a *b* ve svém centru navázaný atom mědi na místo atomu hořčíku.

1.6 CHLOROFYLY JAKO BIOLOGICKY AKTIVNÍ SLOUČENINY

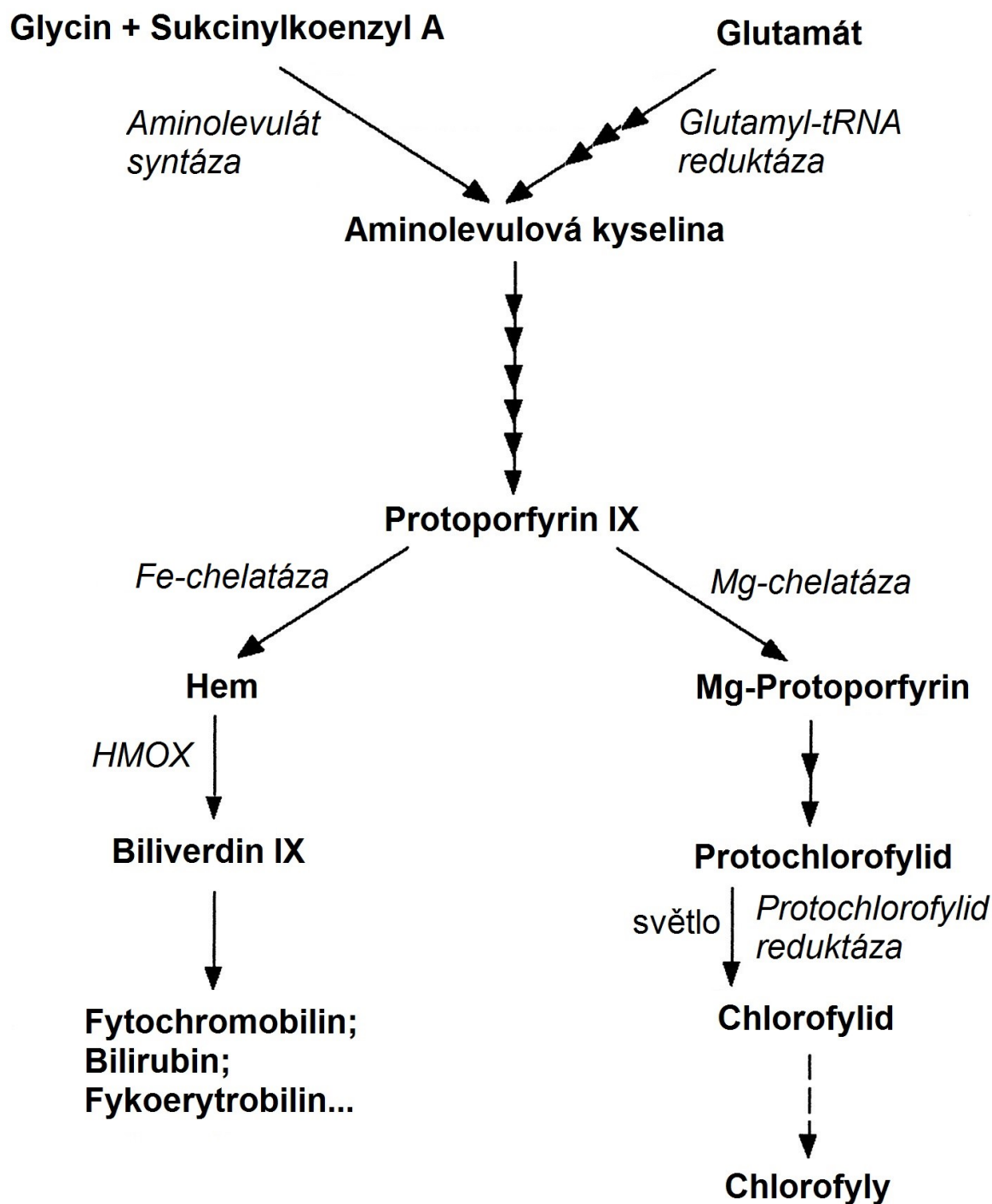
Bylo zjištěno, že chlorofyly se v organismu uplatňují jako velice účinné biologicky aktivní sloučeniny, které jsou schopny změnit aktivní formu mutagenů a karcinogenů biologickou transformací na neaktivní látky. Jedním z hlavních mechanismů působení chlorofylů je změna koncentrace volného karcinogenu vytvořením kovalentní vazby za vzniku komplexu karcinogen-chlorofyl, který ztrácí své biologické vlastnosti; dále je to inhibice metabolické aktivace mutagenu a v neposlední řadě degradace konečné aktivní formy mutagenu [28]. V již zmíněné dietě v zemích západní Evropy a ve Spojených státech (Western diet) vznikají v organismu z potravy heterocyklické aromatické aminy (především při tepelném zpracování potravy; kouřením tabáku), které jsou známými mutageny a karcinogeny. Jsou schopny přímé interakce s DNA prostřednictvím tvorby kovalentních aduktů skrze aktivaci enzymů cytochromu P450 v játrech.

Tento proces může působit v organismu různé mutace a přispívat k rozvoji nádorových onemocnění. Dalšími mutagenními látkami jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, ethyidium bromid, aflatoxiny, akridinová barviva a některé léky, které jsou součástí chemoterapie (daunomycin, doxorubicin, mitoxantron). Bylo zjištěno, že některé přírodní biologicky aktivní aromatické sloučeniny (jako např. chlorofyly) mohou chránit před genotoxickými účinky těchto, pro organismus, nebezpečných látek [29-31]. Chlorofyly *a*, *b* či feofytiny nejsou rozpustné ve vodě, a proto chlorofyly jako zdroj z potravy mají menší šanci se vstřebat do organismu, pokud nejsou přijímány zároveň s tuky. Na druhé straně chlorofylin, který je zcela rozpustný ve vodě, je pro organismus lépe dostupný [32].

1.7 SYNTÉZA PORFYRINŮ

Chlorofyly i hem vznikají z protoporfyrinu IX (Obr. 3.). Protoporfyrin IX je velice důležitým prekurzorem základních biologických molekul jako je například hem, cytochromy či chlorofyly v rostlinné říši. Celá řada organismů od bakterií až po savce je schopna syntézy této molekuly ze základních prekurzorů jako je glycin, sukcinyl-koenzymA či glutamát [33]. To poukazuje na důležitost a rozšířenost této molekuly. Chlorofyly vznikají chelatací protoporfyrinu IX hořčíkem působením enzymu Mg-chelátázy a hem vzniká chelatací protoporfyrinu IX železem působením enzymu ferochelátázy.

Obr. 3. Syntéza bilirubinu a chlorofylů



Převzato a upraveno z Tery M.J., Kendrick R. E., Plant Physiology , 1999, Vol. 119, pp. 143–152

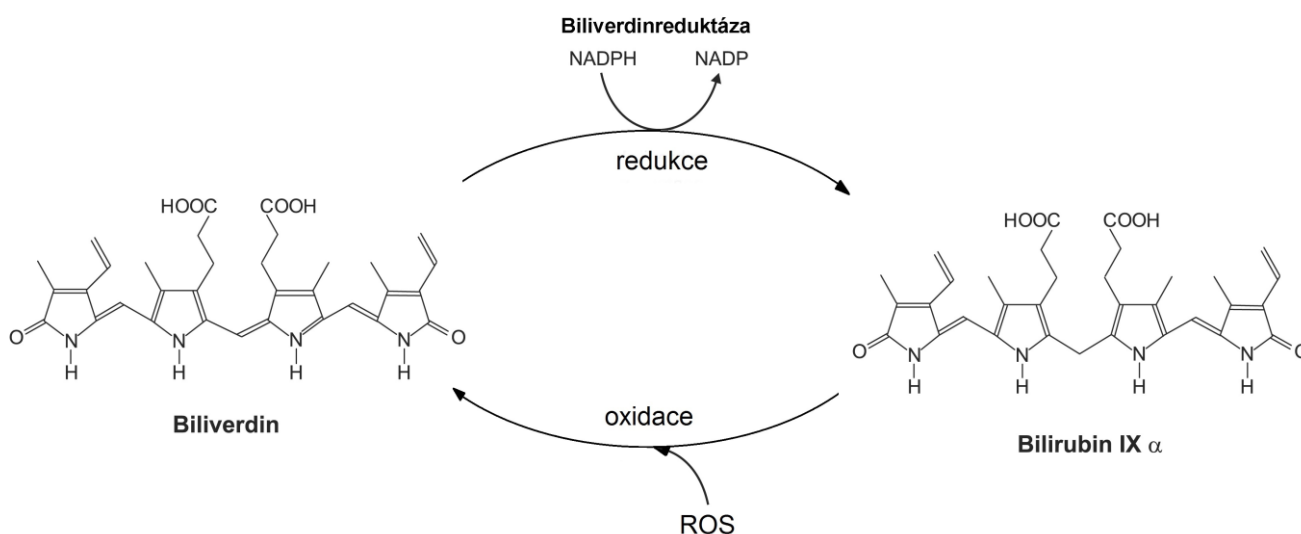
Enzymy psány kurzívou

1.8 DEGRADACE PORFYRINŮ

Během rozpadu červených krvinek se uvolňuje v lidském organismu zhruba 300 mg hemu, ze kterého následně vzniká až 300 mg bilirubinu [34]. Tetrapyrolový hem v buňkách retikuloendotelového systému (RES) indukuje enzym HMOX1 a za uvolnění železnatých iontů a oxidu uhelnatého vzniká lineární tetrapyrrol biliverdin. Působením enzymu BLVRA následně dochází k redukci centrálního methinového můstku a biliverdin je přeměněn na nekonjugovaný bilirubin

Obr. 1.), který je velice špatně rozpustný. Z RES buněk je bilirubin transportován do hepatocytů nespecificky navázaný na proteiny, především na albumin či apolipoprotein D v molekule HDL-lipoproteinu [35, 36]. Ve velmi nízké koncentraci (cca do 70 nM) je bilirubin v krevním řečišti ve volné formě, tedy nenavázaný na vazebnou bílkovinu (označován jako Bf, bilirubin free). Tato velice nízká koncentrace je však velice důležitá. Bilirubin se díky svému redoxnímu cyklu (Obr. 4.) stává v organismu velice důležitým antioxidantem. Antioxidační účinky jsou vysvětlovány zejména přítomností C10 methylenové skupiny, která slouží jako ochotný donor elektronu reaktivním formám kyslíku v krevní plazmě a tkáních [9]. Působením ROS z bilirubinu vzniká biliverdin a ten je opět zpětně přeměňován na bilirubin [37].

Obr. 4. Redoxní cyklus bilirubinu



V jaterních sinusoidech dochází k transportu bilirubinu z albuminu do jaterní buňky pomocí aktivního transportéru převážně z rodiny OATP transportérů [38]. V jaterní buňce je nekonjugovaný bilirubin vázán na specifické intracelulární proteiny. Bilirubin se nekovalentně váže na enzym glutathion-S-transferázu B [39] a nízkomolekulární protein FABP1 a je dopraven k hladkému endoplasmatickému retikulu, kde se konjuguje s kyselinou glukuronovou (tím se zvýší jeho polarita). Konjugovaný bilirubin je dále vylučován do žlučovodů aktivním transportním systémem pomocí transportéru organických iontů MRP2. V koncové části tenkého a v tlustém střevě je konjugovaný bilirubin hydrolyzován β -glukuronidázou střevních bakterií zpět na nekonjugovaný bilirubin, který je přeměňován bakteriálními enzymy přes mezobilirubin na bezbarvý urobilinogen a sterkobilinogen. Část těchto produktů je následně oxidována na žlutooranžový urobilin a tmavě červenohnědý sterkobilin, které jsou vylučovány stolicí a způsobují její barvu [34, 40, 41].

Distribuce sloučenin chlorofylu na druhou stranu není příliš známá. V rostlinách byl objeven Mg-ATP závislý transportér AtMRP2, který přepravuje velké molekuly jako konjugovaný glutathion a katabolity chlorofylu do vakuol [42]. Distribuce v lidském organismu není příliš známá. Chlorofyly přijaté z potravy jsou přeměněny na micely a jejich metabolity se v krevním řečišti z velké části vážou na plasmatické proteiny. Při konzumaci lipofilních chlorofylů je velice důležitý současný příjem tuků pro lepší vstřebatelnost a tvorbu micel. Na druhé straně, hydrofilní chlorofyl (chlorofylin) nepotřebuje pro svou micelarizaci příjem tuků v potravě. Byly zjištěny velké rozdíly v resorbovatelnosti derivátů chlorofylu. Deriváty chlorofylu obsahující fytyl podstupovaly pasivní absorpci jednoduchou difúzí, kdežto deriváty bez fytylu využívaly pasivní absorpci usnadněnou difúzí. Strukturální modifikace chlorofylových pigmentů, zejména těch, kde došlo k deesterifikaci fytolu, významně zvyšuje (cca 65x) prostupnost těchto látek z potravinové matrice do buněk střevního epitelu v průběhu trávení a stávají se tak biologicky dostupnější [43].

Byla provedena modelová studie na psech, která se snažila objasnit vstřebání chlorofylu do organismu ze špenátu obsaženého v potravě. Byla odhadnuta zdánlivá absorpce v závislosti na obsahu chlorofylu v potravě, přičemž byl odečten chlorofyl a jeho metabolity vyloučené stolicí. K absorpci chlorofylu z potravy docházelo ze cca 2 – 4 %. [44] Předpokládá se, že i takto malé procento absorbovaného chlorofylu postačuje k zajištění protektivních biologických účinků (antioxidační ochrana, protinádorové působení atd.). Zbytek chlorofylu se vylučuje stolicí, což může být výhodou, protože některé studie dokazují, že chlorofyly mají vliv na snížení rizika vzniku kolorektálního karcinomu [45, 46].

Při zkoumání distribuce chlorofylu a jeho metabolitů u králíků krmených špenátem bylo zjištěno, že v játrech se nalézají chlorofyl *a* a *b*, chlorofylid *a* a *b*, feofytin *a* a *b* a feoforbid *a* a *b*, přičemž nejvyšší koncentrace látek byly 8 hodin po krmení. Ve žlučníku se vyskytoval převážně chlorofylid *a* a *a'*, feoforbid *a* a *a'*, feoforbid *b* a *b'* s nejvyššími hodnotami 2 hodiny po krmení. Feoforbid *a* a *b* byl detekován také v krvi a v ledvinách s nejvyšší koncentrací 12 hodin po krmení. Dřívější výskyt chlorofylidu *a'*, feoforbidu *a* a *b* ve žlučníku v porovnání s hladinami v játrech (2. hodina vs. 8. hodina po krmení) poukazuje na to, že tyto metabolity chlorofylu byly kompartmentovány odlišně a mohou podstupovat stejný transport, jaký je charakteristický pro žlučové kyseliny. Koncentrace feoforbidu v krvi byly na vrcholu později v porovnání s játry. Zdá se, že chování chlorofylů v enterohepatálním oběhu je podobné, jako u žlučových kyselin, které mají velmi nízké plazmatické koncentrace, ale jejich hodnoty prudce stoupají v portálním řečišti jater. Z literatury také vyplývá, že chlorofyly *a* a *b* mohou být přeměňovány střevními bakteriemi na chlorofylid *a* a feoforbid *a* a *b*. [47]

1.9 CENTRÁLNÍ ATOMY PORFYRINŮ

V centru porfyrinů bývá vázán iont kovu. Takovým porfyrinům říkáme metaloporfyriny. Jak struktura porfyrinu tak i přítomnost centrálně vázaného iontu může ovlivňovat antioxidační aktivitu těchto látek díky různé síle vazby takového iontu a změnou konformace molekuly. Např. Ni, Cu a Mg deriváty potlačují oxidaci kyseliny linolové superoxidovým aniontem, zatímco Fe deriváty oxidaci podporují [48]. Ionty vyskytující se v porfyrinech mohou být např. ionty Fe, Cr, Mg, Co, Ni, Mg, Mn a Zn. V centru chlorofylu *a* a *b* je vázáný hořečnatý iont, v centru chlorofylinu je měďnatý iont a hem obsahuje iont železnatý. [49, 50]

1.10 METABOLICKÉ DRÁHY OVLIVŇOVANÉ PORFYRINY

Jak již bylo zmíněno, tetrapyrolová část chlorofylů má velmi podobnou strukturu jako bilirubin a biliverdin (Obr. 1. a 2.), což jsou žlučové pigmenty známé svými silnými antioxidačními [7] a dalšími biologickými vlastnostmi [8]. Antioxidační a antiproliferační účinky bilirubinu a biliverdinu byly popsány nejen v experimentálních studiích, ale také v celé řadě klinických pozorování [51, 52].

Protože data týkající se molekulární podstaty možných protektivních účinků chlorofylů nejsou příliš známá, předpokládali jsme, že budou ovlivňovat metabolické dráhy shodné s těmi, které ovlivňuje bilirubin. Tyto specifické dráhy se uplatňují v buněčné signalizaci, imunitní odpovědi,

regulaci produkce volných kyslíkových radikálů i buněčné proliferaci. Zaměřili jsme se proto na studium následujících drah:

a) Hemoxygenázová dráha

HMOX je hlavním enzymem v katabolismu hemu a je jedním z klíčových enzymů obrany před oxidačním stresem. Studie z posledních let poukazují na významnou úlohu HMOX v cytoprotekci. Indukce HMOX různými chemickými induktory poskytuje ochranu kultivovaným buňkám *in vitro* a *in vivo*. [53] Cytoprotektivní účinky tohoto enzymu jsou při jeho overexpresi zprostředkovány především zvýšenou odolností buněk vůči apoptóze a zvýšením buněčného růstu. Předpokládá se, že HMOX vytváří tento antiapoptotický účinek několika mechanismy, a to snížením hladin intracelulárních prooxidantů, zvýšením hladin bilirubinu a zvýšením produkce oxidu uhelnatého. Oxid uhelnatý může vyvolat antiapoptotický účinek inhibicí exprese p53 a inhibicí uvolňování mitochondriálního cytochromu c. [53] Avšak cytoprotekce u nádorových buněk není žádoucí a indukce HMOX v některých nádorových tkáních a buněčných liniích je spojována s podporou růstu a progresí nádorů [8]. HMOX hraje tedy důležitou roli v kancerogenezi; její overexpresi za určitých podmínek podporuje také syntézu vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) [54], avšak může mít i antiangiogenní účinky [55]. Snížená HMOX aktivita v nádorových tkáních je spojována s aktivací nádorové apoptózy a je spojována s nižším buněčným růstem. Patří mezi tzv. heat-shock proteiny rodiny HSP32 a k její aktivaci dochází mimo jiné také stimulací oxidačním stresem, či zvýšeným množstvím tetrapyrolového hemu. Indukce HMOX bývá tedy spojována se zvýšeným oxidačním stresem, avšak vliv tohoto enzymu na kancerogenezi je značně kontroverzní a jeho role zatím není zcela objasněna.

HMOX se vyskytuje v organismu ve dvou izoformách; první je indukibilní forma HMOX1, která je indukovatelná řadou faktorů zvyšujících oxidační stres; druhou formou je konstitutivní izoenzym HMOX2. V naší práci jsme se zabývali studiem vlivu tetrapyrolových sloučenin na tuto dráhu, konkrétně jsme zkoumali aktivitu HMOX1 a expresi *HMOX* mRNA. Součástí této dráhy je i enzym BLVRA, který se vyskytuje zejména v tkáních s vysokou aktivitou HMOX, kde redukuje biliverdin za vzniku bilirubinu. Uplatňuje se v protekci před řadou patologických stavů zahrnujících onemocnění gastrointestinálního traktu, ledvin a centrálního i periferního nervového systému.

b) Redoxní signalizační dráha

Protože redoxní signalizační dráha ovlivňuje proliferaci jak normálních, tak i nádorových buněk, zaměřili jsme se také na mitochondriální redoxní systém a produkci volných radikálů. Hlavním

zdrojem intracelulárních volných kyslíkových radikálů v rámci bazálních podmínek je superoxid vznikající v dýchacím řetězci mitochondrií. Mitochondriální superoxid přitom aktivuje řadu intracelulárních cílů, včetně NF-κB (p50, p65 podjednotky nukleárního faktoru kappa B) [56], mTOR (mammalian target of rapamycin) [57], inflammasomu, které představují významné patogenní faktory v kancerogenezi.

1.11 OXIDAČNÍ STRES A ANTIOXIDAČNÍ OCHRANA BUNĚK

ROS jsou meziprodukty redukce kyslíku na vodu. Jsou to silně oxidativní látky nebo extrémně reaktivní volné radikály poškozující buňky i funkční molekuly, avšak jsou nedílnou součástí žijícího aerobního organismu. ROS mohou být prospěšné, protože se podílejí na tvorbě energie [58], účastní se biotransformace xenobiotik (hydroxylace, zvýšení rozpustnosti a detoxikace látek) [59], jsou součástí obranyschopnosti organismu [60] a jsou také signalizačními molekulami [61]. Cílem signalizace jsou transkripční faktory, proteinkinázy a fosfatázy, které jsou aktivovány oxidačním stresem a výsledkem může být stimulace buněčné proliferace (Akt, ERK), indukce apoptózy (p53), produkce protilátek (NF-κB) či stárnutí buněk [62]. ROS jsou nedílnou součástí respiračního řetězce, který se stává největším producentem kyslíkových radikálů v organismu [63, 64]. Přenosem jednoho elektronu na molekulu kyslíku vzniká extrémně reaktivní superoxidový radikál [65]. Významným producentem ROS jsou aktivované fagocyty. V případě zánětu nebo napadení mikroorganismy je skrze NADPH oxidázu spuštěna tvorba superoxidu, dále peroxidu vodíku a dalších ROS k likvidaci patogenních látek [66].

K oxidačnímu stresu v organismu dochází v situaci, kdy je tvorba ROS převážena nad antioxidační schopností buněk. Tato velice důležitá rovnováha je udržována systémem antioxidační obrany organismu. [67]

ROS v organismu

V organismu vzniká velké množství reaktivních forem kyslíku. Vztah nejdůležitějších z nich je uveden na Obr. 5.

Superoxidový radikál $O_2^{\cdot-}$

Molekula kyslíku obsahuje dva nepárové elektrony, avšak díky svému uspořádání elektronů je velice stabilní. Pokud dojde k přijetí jednoho elektronu, vznikne reaktivní superoxidový radikál. Radikálové poškození má charakter řetězové reakce a stabilizuje se pouze vytržením elektronu

z jiné struktury, čímž vzniká další radikál. Jeho největším producentem je únik elektronů na kyslík buď v respiračním řetězci z komplexů I a III v mitochondriích [68, 69], nebo z jiných redoxních systémů (například působením cytochrom P450 monooxygenázy) [70]. Superoxid může dále vznikat působením NAD(P)H oxidázy ve fagocytech [71] i v nefagocytujících buňkách [72-74], dále působením některých enzymů (xanthinooxidáza [75], cyklooxygenáza, lipooxygenáza), reakcí hemoglobinu s kyslíkem nebo autooxidací různých látek (askorbát, glutathion, thioly atd.) [76]. Superoxidový radikál má omezený průchod membránami [77].

Peroxid vodíku H₂O₂

Pokud superoxid přijme jeden elektron, vzniká nestabilní peroxidový aniont O₂²⁻, jehož hydrogenací (enzym: superoxidodismutáza) vzniká peroxid vodíku, který je za normálních podmínek stabilní. V endotelu vzniká především ze čtyř enzymatických systémů, které obsahují různé formy NADPH oxidázy, xanthinooxidoreduktázy, syntázy oxidu dusnatého (eNOS) nebo pochází z mitochondriální aerobní fosforylace. Jsou popsány i další zdroje vzniku jako např. působením monoaminoxidázy, lipoxigenázy, cyklooxygenázy atd. [78] Odstraňován je glutathionperoxidázou nebo katalázou [79]. Peroxid vodíku má zajištěn volný průchod skrz buněčné membrány pomocí aquaporinových kanálů a tak je jeho intracelulární koncentrace v rovnováze s koncentrací vně buňky. [80]

Hydroxylový radikál OH[•]

Přijme-li peroxidový aniont další elektron, dojde k rozpadu molekuly na O²⁻ a O⁻. Po přijetí dvou protonů se O²⁻ přemění na vodu, avšak protonací O⁻ vzniká OH[•].

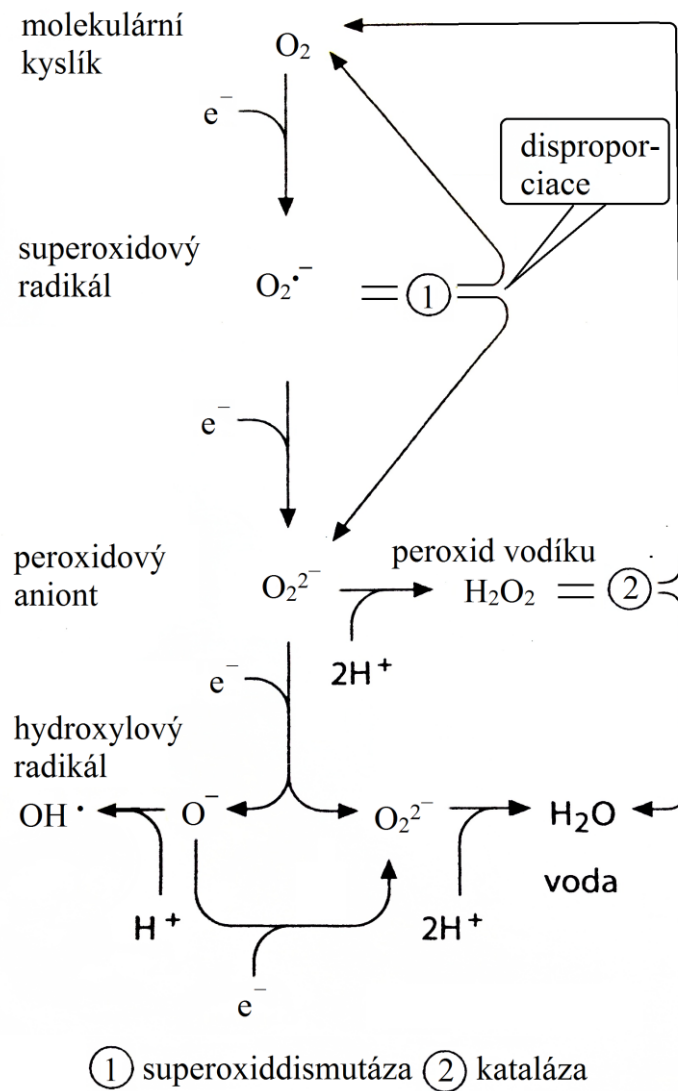
Při přetížení organismu železem může docházet k uvolňování železa z feritinu. Hydroxylový radikál může vzniknout reakcí peroxidu vodíku s redukovanými kovy (Fe²⁺, Cu²⁺) Fentonovou reakcí (H₂O₂ + Fe²⁺ → HO[•] + OH⁻ + Fe³⁺). [81]

Lipoperoxidové radikály LOO[•]

V membráně erytrocytů se z acylových zbytků mohou působením ROS tvořit acylové radikály, které se po reakci s kyslíkem mění na lipoperoxidové radikály. Tato lipidová peroxidace může mít za následek nevratné poškození membrán i hemoglobinu.

Další ROS vyskytující se v organismu jsou **hydroxyperoxyl HO_2^\bullet** , **kyselina chlorná HClO** , **ozón O_3** , **singletový kyslík $^1\text{O}_2$** , atd.

Obr. 5. Reaktivní formy kyslíku



Inspirováno a upraveno z Krumova, K., & Cosa, G. (n.d.). Chapter 1. Overview of Reactive Oxygen Species. Comprehensive Series in Photochemical & Photobiological Sciences. Royal Society of Chemistry.

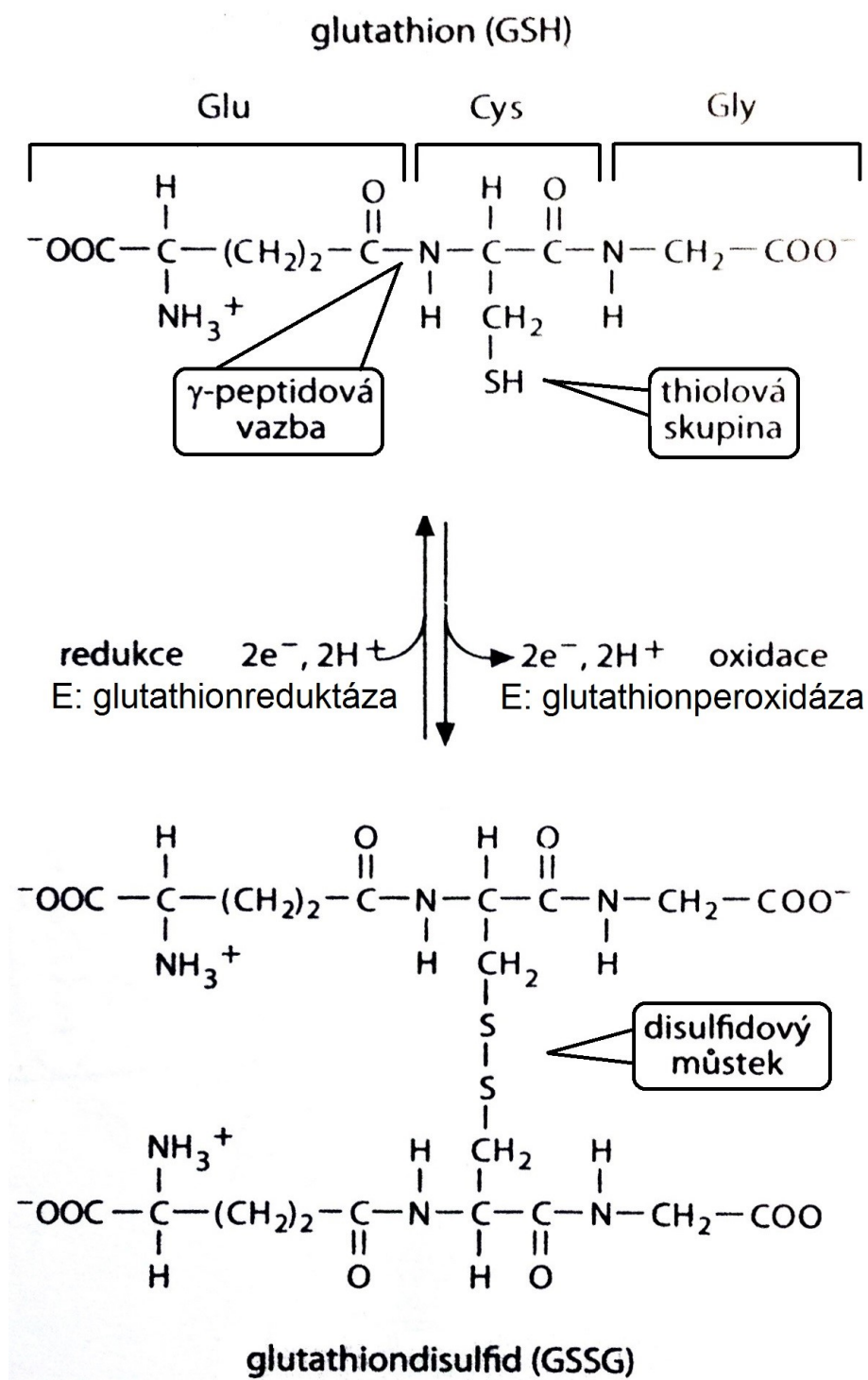
Antioxidační ochrana organismu

a) Biologické antioxidanty

Jedním ze systému ochrany každé buňky před ROS je přítomnost antioxidantů. Jsou to látky, které reagují s oxidačními činidly a redukuje je na méně škodlivé molekuly a tím chrání buňku před oxidačním poškozením. Mezi takové látky patří **vitamíny E, C a A, ubichinol, nebo-li koenzym Q, karotenoidy, flavonoidy, kyselina močová, kyselina lipoová, glutathion, albumin a bilirubin.** [8, 82-85]

Zvláště důležitým antioxidantem je **glutathion** (GSH), který se vyskytuje v každé buňce a udržuje redukční prostředí. Glutathion je tripeptid skládající se z γ -glutamylového (Glu) a cysteinylového (Cys) zbytku a glycinu (Gly). Obsahuje γ -peptidovou vazbu a thiolovou skupinu. Glutathion je snáze oxidovatelný než thiolové skupiny proteinů, a proto je oxidován přednostně a důležité proteiny či enzymy jsou tak chráněny [86]. Dvě molekuly redukované formy glutathionu (GSH) se při oxidaci spojí na disulfid (GSSG, enzym: glutathionperoxidáza) a odevzdají dva elektrony pro redukci ROS. GSSG se může opět rozložit (enzym: glutathionreduktáza + NADPH) na GSH a cyklus se opakuje (Obr. 6.).

Obr. 6. Oxidace glutathionu a vznik glutathiondisulfidu



Působení **bilirubinu** jako antioxidantu je vysvětleno výše v kapitole *1.8 Degradace porfyrinů* a antioxidačně působí především díky svému redoxnímu cyklu (Obr. 4. Redoxní cyklus bilirubinu). Ačkoliv vysoké koncentrace bilirubinu vedou k jeho akumulaci v mozku a hrozí neurotoxický efekt [87], mírně zvýšené hladiny bilirubinu oproti fyziologické koncentraci (např. u jedinců s Gilbertovým syndromem) jsou spojovány s nižším rizikem vzniku aterosklerózy, některých nádorových a kardiovaskulárních onemocnění a onemocnění podmíněných oxidačním stresem [51, 88]. Protizánětlivé a antioxidační účinky bilirubinu jsou prokázány v několika studiích, přičemž bilirubin působí různými mechanismy, např. je silným inhibítozem NADPH oxidázy [89], jednoho z nejvýznamnějších enzymů produkujících ROS. Bilirubin také přímo likviduje ROS za současné přeměny na biliverdin.

Velice důležitým antioxidantem je **vitamin E** (tokoferol), který přerušuje radikálové řetězové reakce autooxidací (zejména při peroxidaci mastných kyselin). Sbíráním peroxidových radikálů chrání především nenasycené lipidy v buňkách a v krevní plazmě [90]. Radikálová forma vitamínu E je zpětně redukována **vitaminem C** (kyselinou askorbovou), takže se jedná o znovu obnovitelný antioxidant. [91, 92] Vitamin E má prokázané protizánětlivé a antiaterogenní účinky. Má také antiokoagulační aktivitu, přičemž brání agregaci krevních destiček a může předcházet vzniku trombózy. [93] **Vitamin A** (retinol, 3-dehydroretinol) je důležitým prekurzorem zrakového pigmentu rhodopsinu, je nezbytný pro buněčný růst a diferenciaci a to především buněk epitelálních a kostních. Je nezbytný pro vývoj orgánů v embryonálním vývoji, je také nezbytný pro správnou funkci krevních buněk, pro fungování imunitního systému a v neposlední řadě působí jako antioxidant (zabraňuje především lipidové peroxidaci). [94]

β-karoten (provitamin A) je inhibítozem peroxidace a jeho antioxidační působení v těle je nejpravděpodobnější v kůži, kde zhasí singletový kyslík po UV ozáření pokožky. [95]

Albumin je sérový protein, jehož funkcí je transport velkého množství různých substrátů, včetně mastných kyselin, žlučových pigmentů a některých léčiv a bezpečně transportuje látky na místo určení. Albumin je schopný inhibovat peroxidaci a hemolýzu erytrocytů. Dále inhibuje produkci volných hydroxylových radikálů, např. ze systémů obsahujících dvojmocné ionty kovů a H₂O₂. [96] Některé z takto vázaných iontů kovů na albumin jsou však stále dostupné pro H₂O₂ a superoxid a mohou tvořit hydroxylové radikály. Nicméně tyto vzniklé radikály okamžitě atakují molekulu albuminu, která se degraduje a je snadno biologicky nahrazena. [97]

Koenzym Q (ubichinol) je pro lidský organismus velice důležitým antioxidantem, který je rozpustný v lipidech. Je přítomný ve všech buněčných membránách a tak se svým množstvím a

možností se znovu regenerovat stává důležitou antioxidační složkou v organismu. Koenzym Q je schopný bránit lipidové peroxidaci přímo přerušením řetězové reakce, přičemž se sám oxiduje, nebo antioxidačně působí nepřímo regenerací vitamínu E. Díky své lokalizaci v místě s největší produkcí kyslíkových radikálů, jako součást mitochondriálního respiračního řetězce, před oxidací ochraňuje lipidy, proteiny i DNA. [98-100]

Flavonoidy jsou přirozeně se vyskytující polyfenolové sloučeniny s širokým spektrem biologických účinků. Jejich antioxidační aktivita spočívá v aktivním vychytávání volných radikálů, zhášení singletového kyslíku, chelatují kovy a jsou schopny inhibovat různé prooxidační enzymy. Některé flavonoidy mohou vykazovat také prooxidační efekt. [101, 102]

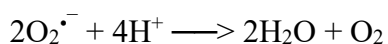
Kyselina močová je jedním z hlavních antioxidantů krevní plazmy, avšak její zvýšené hodnoty jsou asociovány s rozvojem obezity, hypertenze a kardiovaskulárních onemocnění. V aterosklerotickém prostředí se z původního antioxidantu kyseliny močové stává prooxidant [103]. Vysvětlením tohoto paradoxu může být pokus o ochrannou odpověď organismu, kdy se koncentrace kyseliny močové zvyšuje. [104]

Kyselina lipoová je prostetickou skupinou enzymů a účastní se především oxidační dekarboxylace oxokyselin. Je velice významným antioxidantem a napomáhá udržování stálé hladiny cukru v krvi. Kyselina lipoová reguluje recyklaci ostatních oxidovaných antioxidantů. [105, 106]

b) Antioxidační enzymy

Superoxiddismutáza

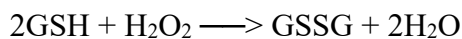
Tento enzym katalyzuje rozklad dvou superoxidových radikálů na kyslík a méně škodlivý peroxid vodíku (Obr. 5.).



U savců existují 3 druhy tohoto enzymu. Superoxiddismutáza 1 se nachází v cytoplasmě a jejími kofaktory je měď a zinek. Superoxiddismutáza 2 je součástí mitochondriální matrix a jejím kofaktorem je mangan. Superoxiddismutáza 3 je v extracelulárním prostoru a kofaktory jsou opět ionty mědi a zinku. [107, 108]

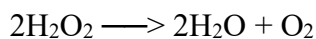
Glutathionperoxidáza

Glutathionperoxidáza, enzym obsahující selen, katalyzuje oxidaci glutathionu peroxidem za vzniku disulfidu (Obr. 6.). [109, 110]



Kataláza

Kataláza se vyskytuje v peroxizomech a mitochondriích a katalyzuje reakci vzniku kyslíku a vody z peroxidu vodíku (Obr. 5.). Jedná se o tetramer a každá z jejích podjednotek obsahuje hem s železem. Exprese a lokalizace katalázy je výrazně změněna v nádorech. [79] Molekulární mechanismy regulující expresi katalázy zatím nejsou zcela objasněny. Nádorové buňky jsou charakteristické zvýšenou produkcí ROS a pozměněnou expresí antioxidantních enzymů, což poskytuje výhodu pro proliferaci. [111]



HMOX a BLVRA

Tyto dva enzymy katalyzují rozpad hemu a jejich hlavní antioxidantní působení spočívá v produkci biliverdinu a bilirubinu. Inducibilní forma HMOX1 je indukovatelná řadou faktorů, např. tepelným šokem, vzplanutím fagocytů, prozánětlivými cytokiny, ROS, hemem atd. Působením HMOX z hemu vzniká biliverdin, který je následně BLVRA přeměňován na bilirubin a bilirubinový cyklus je schopný opakované likvidace ROS (Obr. 4.). BLVRA regeneruje bilirubin v redoxním cyklu a bylo zjištěno, že snížené hladiny BLVRA vedou k několikanásobnému nárůstu ROS v buňkách [9] a stejně tak tomu je i při deficienci HMOX [112].

c) Sekvestrace železa a mědi

Fe nebo Cu ionty jsou v aktivních centrech všech proteinů pracujících s kyslíkem, protože ochotně přijímají i poskytují elektron, avšak jako volné ionty jsou velice nebezpečné, protože mohou samovolně podléhat Fentonově reakci za vzniku ROS. Uvnitř a vně buňky proto funguje odlišný systém ochrany. Tyto kovy se váží na specializované proteiny, díky kterým mohou být bezpečně transportovány v extracelulárním prostoru. Takovými proteiny jsou například transferin, feritin, ceruloplazmin, albumin, haptoglobin a další. [85, 113, 114] Vazba kovů na proteiny je jedním z nejdůležitějších způsobů ochrany před oxidačním stresem. Po vstupu iontů do buňky jsou v intracelulárním prostoru volně. Intracelulární prostor je vybaven antioxidantními enzymy a

redukovanými thioley, takže ROS nemohou oxidovat volné ionty kovů. Odstraňování ROS však není vždy žádoucí, zejména pro signální funkce těchto molekul. [115, 116].

1.12 RESPIRAČNÍ ŘETĚZEC A AEROBNÍ FOSFORYLACE

Buněčná respirace a tvorba energie probíhá na vnitřní straně mitochondriální membrány, z níž lze izolovat pět multienzymových lipoproteinových komplexů, jejichž substráty jsou mobilními složkami dýchacího řetězce a aerobní fosforylace a jsou označovány čísly I až V. Z komplexu I a II jsou elektrony přenášeny koenzymem Q ke komplexu III a z něj jsou pak elektrony přeneseny membránovým cytochromem c na komplex IV. Přenosem elektronů přes komplexy I, II, III a IV dochází k přenosu protonů do cytosolového prostoru mitochondrie. [117-119] Buněčná respirace tak vede k rozdílu v koncentraci protonů uvnitř a vně membrány, tvoří se membránový potenciál, a tok protonů způsobený rozdílnými koncentracemi způsobuje vznik protonového gradientu. [120] Komplex V, ATP-syntáza, využívá tohoto gradientu pro tvorbu energie. [121] Membránový potenciál hraje důležitou roli pro normální funkci buňky, např. pro přenos nervového vzruchu, účasti na aktivním transportu látek v mitochondriích nebo pro tvorbu energie v procesu aerobní fosforylace. [122] Proces přenosu elektronů v dýchacím řetězci může být inhibován různými látkami, které specificky působí na určitém místě dýchacího řetězce. Rotenon [123] a piericidin [124] jsou inhibitory komplexu I. Antimycin [125], myxothiazol [126], stigmatelin [127] inhibují komplex III; CN, N₃⁻, CO a NO inhibují přenos elektronů přes komplex IV. [128] ATP-syntáza je inhibovatelná oligomycinem. [129] Některé látky, např. lipofilní slabé kyseliny, jsou schopny přenášet proton přes vnitřní membránu mitochondrie z mezimembránového prostoru do matrix a tím způsobují pokles protonového gradientu bez vzniku ATP. Takovými látkami jsou například dinitrofenol, karbonylkyanid m-chlorofenylhydrazon (CCCP) a karbonylkyanid p-trifluoromethoxy-fenylhydrazon (FCCP). [130] Tyto látky označujeme jako rozpráhovače. Použitím substrátů dýchacího řetězce, specifických inhibitorů, rozpráhovačů a ionoforů je možné testovat a hodnotit funkci dýchacího řetězce jako celku nebo také jednotlivých enzymů dýchacího řetězce.

Přenos elektronů v respiračním řetězci produkuje velké množství ROS a mitochondrie jsou jejich největším producentem v organismu [63, 64]. Jak již bylo zmíněno, kyslíkové radikály mají nejen nesmírně důležitou úlohu při tvorbě buněčné energie, ale jsou také významnými signálními molekulami a účastní se obranyschopné reakce organismu před patogeny.

1.13 ROLE ROS U NÁDOROVÝCH BUNĚK

Bez tvorby ROS v mitochondriích by nebyla možná tvorba buněčné energie. Ačkoli je hladina ROS v mitochondriích přísně regulována, stává se tato organela majoritním zdrojem ROS v buňce. ROS mají v intracelulárním prostoru nesmírně důležitou funkci signálních molekul, přičemž přispívají k řadě buněčných procesů, jako je například proliferace zdravých buněk, účastní se regulace hypoxií indukovaných faktorů (HIFs) a jsou důležitými mediátory signalizačních kaskád růstových faktorů. Nádorové buňky využívají mitochondriální ROS ku svému prospěchu, zejména pro nadměrnou aktivaci růstových faktorů a udržování angiogeneze v hypoxických podmínkách. [131] Jednou ze základních charakteristik nádorové buňky je schopnost podporovat proliferaci. Abnormální buněčný růst nádorových buněk je možný zejména díky aktivaci onkogenů a ztrátě tumor supresorů, které by proliferaci utlumily. [132] Je známo, že samy nádorové buňky produkují ROS ve zvýšené míře, a to především ve formě peroxidu vodíku [133]. Zvýšený oxidační stres u nádorových buněk je částečně způsoben onkogenní stimulací, zvýšenou metabolickou aktivitou a mitochondriálními poruchami. [134] Takto produkované ROS podporují tumorigenezi oxidačním poškozením DNA, které podporuje genetickou nestabilitu, a biochemickými a molekulárními změnami, které jsou nezbytné k progresi nádorů [135]. Na druhé straně příliš vysoké až toxické hladiny ROS by mohly vést k poškození mitochondriálních membrán, zprostředkovaného volnými radikály, následně by docházelo k uvolňování cytochromu c z mitochondrie a ke spuštění apoptózy nádorových buněk. [136] To vede k otázce, zda by se produkce ROS v nádorových buňkách měla potlačovat, nebo naopak vyvolat až toxické hladiny ROS a dovést tak buňku k apoptóze [137, 138]. Pokud však řízeně nedochází k potlačení přirozené aktivity superoxidodismutázy, produkce superoxidu není natolik velká, aby spustila buněčnou apoptózu a superoxid může působit pozitivně na progresi nádorů. [139] Většina nádorových buněk se vyznačuje přítomností mutace v mitochondriálním genomu a/nebo změnou obsahu mitochondriální DNA, což vede k poruchám mitochondriálních funkcí [140, 141].

Na rozdíl od zdravých diferenciovanych buněk, které získávají energii především z aerobní fosforylace v mitochondriích, většina nádorových buněk využívá pro získání energie aerobní glykolýzu. [142] Nádorové buňky mění svůj metabolismus s cílem podpořit růst, přežívání a proliferaci. Spotřebovávají zvýšené množství glukózy, kterou přeměňují na laktát, přičemž je glykolýza téměř úplně odpojena od respiračního řetězce. Tento jev je pozorován i u nádorových buněk se zcela funkčními mitochondriemi a nazývá se Warburgův efekt. [143-145] Aerobní glykolýza je velice neefektivní způsob výroby ATP oproti klasické aerobní fosforylaci, avšak umožňuje nádorovým buňkám snadnější zavádění a zabudovávání živin (například nukleotidů,

aminokyselin a lipidů) do biomasy potřebné pro stavbu nové buňky. Tento způsob metabolismu živin vede spíše k proliferaci než k efektivnímu získávání ATP. [146] Vzhledem k tomu, že generace ATP prostřednictvím glykolýzy je méně účinná, než prostřednictvím mitochondriální respirace je paradoxem, jak nádorové buňky s touto metabolickou nevýhodou mohou přežít konkurenci zdravých buněk. Odpovědí může být, že buňky s defektem mitochondriální respirace aktivují Akt dráhu pro přežití prostřednictvím nového mechanismu skrze NADH. Respiračně deficientní buňky tak vykazují závislost na glykolýze, zvýšeném NADH a aktivaci Akt, což vede k rezistenci vůči lékům a výhodám pro přežití buněk v hypoxických podmínkách. Tato zjištění poskytují nový mechanistický pohled na Warburgův efekt a vysvětlují, jak může metabolická změna v nádorových buňkách získat výhodu přežití a odolat terapeutickým činidlům. [147, 148] Bylo zjištěno, že Warburgův efekt poskytuje také výhodu nádorovým buňkám posílením antioxidačního systému k neutralizaci akumulace ROS. Pyruvátkináza (PK), jeden z hlavních glykolytických enzymů, hraje v tomto procesu důležitou roli. Nádorové buňky exprimují přednostně formu M2 tohoto enzymu (PKM2) [149], který na zvýšené hladiny ROS reaguje oxidací svých cysteinových zbytků. [150] Inhibice PKM2 pak vede k produkci dostatečného redukčního potenciálu, který způsobuje redukci ROS odklonem glukózového metabolismu do pentózového cyklu. Tím, že nádorová buňka reguluje vlastnosti PKM2, poskytuje ochranu proti nadměrné produkci ROS běžně pozorované v nádorech. [151]

V normálně fungujících mitochondriích nádorových buněk oxidační metabolismus glukózy a glutaminu dodává citrát a acetyl-koenzym A do lipidové syntézy, která je potřebná k tumorigenzi. Buňky některých nádorů však obsahují mutace v citrátovém cyklu nebo elektronovém transportním řetězci, které blokují normální oxidační mitochondriální funkci. Nádorové buňky s defektními mitochondriemi používají spíše na glutaminu závislou reduktivní karboxylaci než oxidační metabolismus jako hlavní cestu tvorby citrátu. Tato cesta využívá mitochondriální a cytosolové izoformy NADP(+)/NADPH závislé isocitrát dehydrogenázy a následný metabolismus citrátu pocházejícího z glutaminu poskytuje jak acetyl-koenzym A pro syntézu lipidů, tak čtyřuhlíkaté meziproducty potřebné k produkci zbývajících metabolitů citrátového cyklu a prekurzorů. [152]

1.14 BUNĚČNÁ SMRT A MITOCHONDRIÁLNÍ MEMBRÁNOVÝ POTENCIÁL (MMP)

Buněčná smrt je velice důležitým procesem, který pomáhá udržení tkáňové homeostázy především odstraněním infikovaných, mutovaných nebo poškozených buněk. [153] Deregulace apoptózy vede k imunodeficienci, nádorovým a autoimunitním onemocněním. [154] Mitochondrie jsou charakteristické membránovým potenciálem okolo 150 mV a mitochondriálním gradientem pH, který umožňuje vznik ATP. Mitochondriální buněčná smrt je charakteristická změnou transmembránového potenciálu a jeho narušení vede k permeabilizaci mitochondriální membrány s následným uvolněním proapoptotických faktorů z intermembránového mitochondriálního prostoru do cytosolu. [155] Depolarizace mitochondriální membrány vede k inhibici respirace a ztrátě produkce ATP. [156] Monitorování apoptotických markerů, jako je stav MMP a určení hladiny reaktivních kyslíkových radikálů, může přispět k prohloubení vědomostí o mechanismech mitochondriální buněčné smrti.

2 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Hlavním cílem disertační práce bylo posoudit potenciální chemopreventivní a antiproliferační účinky tetrapyrolů jedlých řas/sinic na experimentálních *in vitro* a *in vivo* modelech nádorových onemocnění. Studován byl vliv extraktu sinice řasy *S. platensis*, v dalších studiích pak detailně biologický potenciál chlorofylů, tetrapyrolů přítomných v sinicích i zelených rostlinách.

3 VÝZNAM A OČEKÁVANÉ VÝSLEDKY PROJEKTU

Přínosem výsledků mělo být bližší porozumění či objasnění mechanismů předpokládaného protektivního působení rostlinných tetrapyrolů, jejich role při ochraně proti zvýšení oxidačního stresu a kancerogenezi. Získané poznatky by měly v klinické praxi velký význam zejména pro chemoprevenci či adjuvantní léčbu nádorových onemocnění.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 CHEMIKÁLIE

Sinice *S. platensis* byla zakoupena od firmy Martin Bauer GmbH (Vestenbergsgreuth, Německo). Chlorofylin, komerční chlorofyl *a*, chlorofyl *b*, krystalová violet, thyazolyl blue tetrazolium bromid (MTT), dimetylsulfoxid (DMSO) a média pro práci s buněčnými kulturami (Minimum Essential Medium Eagle – MEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium - DMEM, Nutrient Mixture F12-Ham, RPMI-1640 Hank's solution) a přísady médií (neesenciální aminokyseliny, L-glutamin, směs antibiotik), včetně fetálního hovězího séra (FBS) byly od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Feofytin *a* byl získán od firmy OC Sciences (Shirley, New York, USA). Aceton, dioxan a glutaraldehyd (25 % roztok) byly od firmy Penta (Praha, ČR). Metanol a acetonitril byly od firmy Merck (Darmstadt, Německo).

4.2 PŘÍPRAVA EXPERIMENTÁLNÍCH SLOUČENIN

Pro vybrané experimenty bylo nutné některé látky nejprve připravit. Základem všech procesů přípravy byla lyofilizovaná sinice *S. platensis*.

Příprava vodného extraktu S. platensis

Vodný extrakt byl připravován v koncentraci 1 g *S. platensis* na 30 ml vody. Tento roztok byl sonifikován po dobu 15 minut, inkubován 10 minut při pokojové teplotě, centrifugován (8000 g, 30 min, 10 °C) a následně lyofilizován přes noc.

Příprava chlorofylu a

Ze sinice *S. platensis* byl izolován také chlorofyl *a*. Izolace chlorofylu *a* byla nezbytná pro provedení *in vivo* studií a bude podrobněji popsána ve výsledkové části. Výsledný postup izolace chlorofylu *a* byl modifikací metody dle Iriyama et al. [157].

Získaný preparát byl charakterizován a byla ověřena čistota získaného chlorofylu *a* pomocí následujících metod (detaily viz dále): UV/VIS spektroskopie, HPLC, hmotnostní spektroskopie a za použití metod cirkulárního dichroismu.

4.3 UV/VIS SPEKTROSKOPIE

UV/VIS spektroskopie byla použita pro charakterizaci chlorofylu porovnáním spekter komerčního a vyizolovaného chlorofylu *a* a také pro ověření správné koncentrace obtížně rozpustných látek. Množství feofytinu dostupného pro experimenty bylo velice omezené. Bylo nutné vytvořit zásobní roztok z malé navážky, který byl skladován při -20°C . Protože zde byla obava, zda se feofytin v roztoku DMSO nesráží a zdali jsou buňky exponovány správné koncentraci této látky, byla měřena koncentrace feofytinu spektrofotometricky [158] (UV/VIS Spectrophotometer Lambda 20, Perkin-Elmer, USA). Pro výpočet koncentrace byly použity známé hodnoty [158, 159] molárních extinkčních koeficientů (Tab. 1.) a Lambert-Beerův zákon ($A = c\epsilon l$).

Tab. 1. Hodnoty molárních extinkčních koeficientů jednotlivých chlorofylů

Tetrapyrol	Rozpouštědlo	Vlnová délka λ [nm]	Molární extinkční koeficient ϵ_{λ} [L/mol/cm]
Chlorofyl <i>a</i>	80% aceton	430	81 110 [159]
Chlorofyl <i>a</i>	80% aceton	663	73 300 [159]
Chlorofyl <i>b</i>	80% aceton	460	118 210 [159]
Chlorofyl <i>b</i>	80% aceton	645	41 370 [159]
Feofytin <i>a</i>	80% aceton	412	112 570 [158]
Feofytin <i>a</i>	80% aceton	665	50 160 [158]

4.4 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (HPLC)

Abychom mohli posoudit čistotu jednotlivých izolátů, bylo nutné zavést HPLC metodu pro stanovení chlorofylu *a* a *b*. Byla proto zoptimalizována metoda [160], kdy jsme jako stacionární fázi použili kolonu Nucleosil C18 (125 x 4 mm, 5 μ m, Macherey Nagel, Německo). Složení mobilní fáze a její gradient jsou blíže popsány ve výsledkové části.

Analýzy byly prováděny na přístroji Agilent 1200 HPLC s detektorem diodového pole (Agilent, Santa Clara, CA, USA) při vlnové délce 650 nm. Pro zavedení metody byly použity komerční chlorofyly – *a* a *b* ve směsi (Sigma-Aldrich). Retenční časy získané z těchto analýz byly potom dále použity k charakterizaci izolovaných chlorofylů.

4.5 HMOTNOSTNÍ SPEKTROSKOPIE

Pro bližší určení nečistot obsažených v připravených izolátech a přesnému určení chlorofylu *a* v izolovaných vzorcích bylo použito metody hmotnostní spektrometrie ve spojení s HPLC (sestava Agilent 1100, CA, USA). K identifikaci látek byl použit hmotnostní spektrometr TSQ 7000 s trojitým kvadrupólem (Thermo Scientific, Německo) a elektrosprejovou ionizací. Hmotnostní spektra (MS) izolovaných chlorofylů byla měřena v metanolovém rozpouštědle a porovnána s literaturou [161].

4.6 SPEKTROSKOPIE VIBRAČNÍHO CIRKULÁRNÍHO DICHROISMU (VCD), ELEKTRONOVÉHO CIRKULÁRNÍHO DICHROISMU (ECD), A INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE (IČ)

Pro další charakterizaci izolátu chlorofylu *a* byly použity metody cirkulárního dichroismu (CD), konkrétně vibračního CD (VCD) a elektronového CD (ECD), a také metoda infračervené spektroskopie (IČ).

VCD a IČ absorpční spektra byla měřena za použití spektrometru ISF66 / S FTIR ve spojení s modulem PMA 37 VCD (Bruker, Ettlingen, Německo) ve spektrální oblasti od 1800 do 1300 cm^{-1} , signál byl sbírán po dobu 20 minut.

ECD spektra byla měřena pomocí ECD spektrometru J-810 (Jasco, Tokio, Japonsko) ve spektrální oblasti 300-750 nm. V UV oblasti byly použity křemenné kyvety (Starna, Pfungstadt, Německo) a ve VIS oblasti byly použity 1 cm kyvety (Hellma, Müllheim, Německo).

VCD a ECD spektra vyizolovaného chlorofylu *a* byla měřena v benzenu, pro IČ spektra byl použit deuterovaný benzen-d6.

4.7 BUNĚČNÉ LINIE

Pro *in vitro* studie byly použity následující buněčné linie: buňky lidského adenokarcinomu pankreatu: PaTu-8902 (DSMZ, Braunschweig, Německo), MiaPaCa-2 a BxPC-3 (ATCC, Manassas, VA, USA), buňky lidského hepatoblastomu HepG2 (ATCC, Manassas, VA, USA), karcinomu prostaty PC3 (DSMZ, Braunschweig, Německo) a imortalizované endoteliální buňky EA.hy926 poskytnuté Dr. Jiřím Neužillem z Griffith University v Austrálii (získané fúzí lidských primárních buněk z umbilikální žíly s thioguanin rezistentním klonem A549 a následnou selekcí v HAT médiu).

Všechny buněčné linie byly udržovány ve zvlhčené atmosféře (obsahující 5% CO₂ při 37°C) v médiu obsahujícím 10% fetálního bovinního séra: PaTu-8902, MiaPaCa-2 a EA.hy926 v DMEM, HepG2 v MEM a BxPC-3 v RPMI ve směsi médií EMEM/F12 (1:1).

4.8 TESTY VIABILITY

Viabilita nádorových buněčných linií byla posuzována několika testy.

a) MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromid) test

Pro měření MTT testem byly buňky kultivovány v 96-jamkové destičce s testovanými látkami po dobu 24 hodin. Poté byly inkubovány po dobu 2 hodin s novým médiem obsahujícím MTT (v koncentraci 1 mg/ml) a obarvené buňky byly rozpuštěny v dimetylsulfoxidu (DMSO). Tímto testem je měřena intenzita fialového formazanu, na který je přeměněno žluté MTT barvivo v mitochondriích živých buněk [162, 163]. Změna barvy odpovídá aktivitě mitochondriálních oxidoreduktáz a tedy i buněčné viabilitě. Absorbance byla měřena při vlnové délce 540 nm ELISA readerem Sunrise (Tecan, Rakousko), vyhodnocená data byla sbírána programem Magelan-6 (Tecan, Rakousko).

b) Luminiscenční test viability

Jako alternativní test bylo použito vysoce citlivé luminiscenční stanovení (CellTiter Glo, Promega) na přístroji Synergy^{TM2} (2010, BioTek Instrument Inc.; Winooski, Vermont, USA; software Gen5TM). Je založeno na stanovení počtu živých buněk na základě jimi uvolněného ATP. Nejprve byly inhibovány všechny endogenní enzymy uvolňující se v průběhu buněčného rozkladu, které by mohly ATP degradovat. Buňky byly lyzovány a ATP z nich uvolněné

přeměnilo luciferin, který byl součástí reakční směsi, na oxyluciferin, jehož luminiscence byla měřena.

Buňky byly pipetovány do bílých kultivačních desek v malém množství, aby v době experimentu měly konfluenci cca 30 % (mez detekce stanovení je 50 buněk/jamku). Ovlivnění působky probíhalo po dobu 24 hodin. Před samotným měřením byla deska 30 minut temperována při pokojové teplotě, následně byl přidán pracovní roztok a po 20 minutách byla odečtena luminiscence.

4.9 STANOVENÍ POČTU BUNĚK

Krystalovou violetí (CV)

Touto metodou je možné stanovit počet živých buněk zafixovaných na dně jamek, přesněji tedy poměr množství buněk ovlivněných působky oproti množství kontrolních buněk. Příprava buněk probíhala obdobně jako u MTT testu; buňky byly vysety na 96-jamkovou destičku, po přisednutí bylo přidáno médium obsahující testované látky, s kterými byly inkubovány 24 hodin. Poté byl buňkám do média přidán glutaraldehyd k jejich zafixování na dno jamek. Buněčná jádra byla obarvena CV a buňky byly rozpuštěny v 10 % kyselině octové. Intenzita absorbance měřená při vlnové délce 590 nm (ELISA reader Sunrise s vyhodnocovacím programem Magelan-6, Tecan, Rakousko) odpovídala počtu všech živých buněk v jamce [164, 165].

Automatickým počítacem buněk

Buňky byly počítány na automatickém počítací buněk CountessTM Cell Counter (Thermo Fisher Scientific Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA). Buněčná suspenze byla vždy zředěna 1:1 s trypanovou modří, díky které bylo možné odlišit živé buňky, přes jejichž membrány barvivo neproniklo, na rozdíl od mrtvých buněk, které byly obarveny. Dále bylo používáno počítadlo Cellometer Auto T4 Cell Viability Counter (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA, USA), kde nebylo třeba používat barvivo pro odlišení živých a mrtvých buněk.

Bürkerovou počítací komůrkou

Poslední metodou počítání buněk bylo ruční počítání pomocí Bürkerovy počítací komůrky. Na důležitá měření byly využívány všechny tři metody a výsledky z nich byly porovnávány.

4.10 KLONOGENNÍ ANALÝZA

Klonogenní analýza je biologická metoda pro studium účinnosti specifického činidla na schopnost přežití a proliferaci buněk. Buňky byly na kultivační misky vysety ve velice řídké koncentraci a na

konci experimentu bylo sledováno procento buněk, které přežily. V našich experimentech byly buňky vysety v počtu 6000 buněk/10 cm² kultivační misku. Po přisednutí buněk k povrchu (cca po 2 hodinách) byla miska ovlivněna chlorofylem *a* v koncentraci 125 μmol/L. Buňky byly ponechány 7 dní v inkubátoru (36°C, 5% CO₂).

Na konci experimentu bylo odstraněno médium, buňky 2x promyty PBS pufrem a 30 minut barveny roztokem 0,5% krystalové violeti s 6% glutaraldehydem [166]. Obarvené buňky byly promyty vodou a jednotlivé kolonie spočítány a vyfotografovány.

4.11 STANOVENÍ AKTIVITY HEMOXYGENÁZY (HMOX)

Buňky lidského adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902, MiaPaCa-2 a prostaty PC3 byly inkubovány po dobu 24 hodin s testovanými terapeutiky. Po inkubaci byly buňky 3x promyty roztokem PBS (fosfátový pufr 0,1 M, pH 7,4), sklizeny (seškrábány z povrchu misek), odstředěny (1800 RPM, 10 min, 4°C) a každá peleta byla resuspendována v 200 μL PBS. Takto připravené buněčné suspenze uchovávané na ledu byly homogenizovány pomocí sonikátoru s ultrazvukovou jehlou při stupni 12 několika krátkými impulzy. Ve vzorku byla měřena koncentrace bílkovin.

Zásobní roztok heminu 1,5 mM (10x koncentrovaný) byl připraven rozpuštěním 9,9 mg heminu v 2,5 ml 0,4 M Na₃PO₄ a do rozpuštěného roztoku bylo přidáno 100 mg BSA. Roztok byl doplněn destilovanou vodou do 8 ml a jeho pH upraveno na 7,4 pomocí HCl a doplněn destilovanou vodou do celkového objemu 10 ml.

Zásobní roztok β-nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH) 7,6 mM byl připraven rozpuštěním 6,4 mg NADPH v 1 ml reakčního (fosfátového) pufru. Roztok byl připravován vždy čerstvý a v průběhu analýzy byl uchováván na ledu.

Aktivita HMOX byla stanovena měřením produkce oxidu uhelnatého (CO), vznikajícího v reakci katalyzované HMOX1 při rozkladu hemu, pomocí modifikované metody plynové chromatografie [167]. Přístrojem pro měření byl plynový chromatograf s detektorem redukčního plynu = GC-RGD (Trace Analytical, CA, USA).

Vialky byly po uzavření silikonovými septy pročištěny vzduchem bez CO, čímž se odstranil veškerý exogenní CO a ve vialce se při průběhu reakce hromadil pouze CO z hemoxygenázové reakce. Tím se stává tato metoda vysoce specifická pro měření aktivity HMOX1. CO, nasátý z vialky, přecházel do vyhrátého prostoru s oxidem rtuťnatým a rtuťnaté páry byly detekovány

pomocí UV spektrofotometru umístěnému za reakčním prostorem. Množství rtuťnatých par produkované v této reakci bylo přímo úměrné vstupující koncentraci CO.

Pro každý vzorek bylo měření prováděno v 5 vialkách (3 vialky pro reakci a 2 vialky jako blank) uchovávaných na ledu po celou dobu analýzy. Do každé vialky bylo pomocí Hamiltonovy pipety napipetováno 20 μ l roztoku hemu a 20 μ l vzorku. Do blanku bylo připipetováno 20 μ l reakčního pufru a do reakční vialky bylo přidáno 20 μ l NADPH. Vialky byly uzavřeny septem a reakční směs promíchána. Vialky s reakční směsí byly inkubovány po dobu 5 minut při teplotě 37 °C ve vodní lázni a poté byly promývány po dobu 10 s vzduchem bez CO. Reakce probíhala 15 minut při 37 °C a následně byly vialky vloženy do ledové lázně. Do každé vialky bylo přidáno 5 μ l 30% sulfosalicylové kyseliny pro zastavení reakce. Vzorek byl nasáván nástřikovou jehlou umístěnou ve vialce a obsah CO byl měřen pomocí GC-RGD.

Před měřením vzorků byla měřena kalibrační řada nástřikem standardního CO plynu od 50 μ l do 500 μ l reprezentující 24 až 240 pmol CO. Kalibrační přímka byla sestrojena jako závislost odezvy detektoru (plocha píku, mV/s) na množství CO. Aktivita byla vyjádřena v pmol CO/h/mg proteinu.

4.12 IZOLACE RNA A REAL-TIME PCR

Buňky PaTu-8902 byly nejdříve inkubovány 24 hodin a pak ovlivněny různými působky po dobu 4 hodin. RNA byla z buněk izolována pomocí PerfectPure RNA Cultured Cell Kit (5Prime, Hamburg, Germany). Kvalita a koncentrace RNA byla měřena na spektrofotometru Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Franklin, MA, USA).

Pomocí soupravy High Capacity cDNA (5Prime, Hamburg, Německo) byla provedena reverzní transkripce, kterou byla RNA přepsána na cDNA. Primery pro stanovení exprese genu pro *HMOX1* a *BLVRA* pomocí metody Real time-PCR (RT-PCR) byly navrženy za použití softwaru Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) a syntetizovány společností Generi Biotech (Hradec Králové, ČR). RT-PCR byla provedena ve směsi obsahující SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), specifické primery (Tab. 2.) a cDNA. Všechny RT-PCR byly prováděny v tetrapletech na zařízení ViiATM7 (Applied Biosystems).

Tab. 2. Sekvence primerů pro cílové geny

Cílové geny	Forward primer	Reverse primer
<i>HMOX1</i>	GGGTGATAGAAGAGGGCCAAGA	AGCTCCTGCAACTCCTCAAA
<i>BLVRA</i>	TCCCTCTTTGGGGAGCTTTC	GGACCCAGACTTGAAATGGAAG
<i>HPRT</i>	CACTGGCAAAAACAATGCAGAC	GGGTCCTTTTCACCAGCAAG

HMOX1, hemoxygenáza 1; *BLVRA*, biliverdinreduktáza; *HPRT*, hypoxanthin fosforibosyltransferáza 1 [168]

4.13 STANOVENÍ MMP

MMP slouží jako důležitý indikátor při ověřování správné funkce mitochondrií. K měření byla použita fluorescenční lipofilní kladně nabitá barvička JC-1 (Invitrogen, CA, USA), která může vstoupit do mitochondrií živých buněk, kde dojde k reversibilní změně její barvy ze zelené na červenou, přičemž intenzita červeného zbarvení je přímo úměrná nárůstu MMP. Ovlivněné buňky byly inkubovány s barvičkou JC-1 po dobu 30 minut. MMP byl poté stanoven za použití metody průtokové cytometrie (BD LSR II, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) a vypočten jako pokles intenzity hodnoty podílu fluorescence červené barvy (při emisní vlnové délce 590 nm) ku zelené (emisní vlnová délka 525 nm). Pro tento experiment byly zvoleny buňky lidského hepatoblastomu HepG2 jako vhodný buněčný model pro tento typ analýz. [169, 170] Použitými působky byl chlorofylin a extrakt ze sinice *S. platensis*, ze které jsme izolovali chlorofyl *a*.

4.14 STANOVENÍ MITOCHONDRIÁLNÍ PRODUKCE SUPEROXIDU

Mitochondriální superoxid se vytváří jako vedlejší produkt při oxidativní fosforylaci v respiračním řetězci. Produkce superoxidového aniontu v mitochondriální matrix byla stanovována jako časově závislé zvýšení intenzity fluorescence selektivního barviva MitoSOX (Life Technologies, Pleasanton, CA, USA) v buňkách inkubovaných s potenciálními terapeutiky. Stanovení probíhalo pomocí průtokové cytometrie (průtokový cytometr BD LSR II, BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Po 24 hodinové inkubaci s terapeutiky bylo odebráno médium, buňky byly promyty PBS, trypsinizovány a opětovně resuspendovány v malém množství (200 μ L) původně odebraného média, abychom minimalizovali buněčný stres, a následně bylo k buňkám přidáno na 15 minut

barvivo MitoSOX. Každý vzorek byl měřen bez i s přidavkem rotenonu, který se k buňkám přidává bezprostředně před každým měřením v koncentraci 10 $\mu\text{mol/L}$ pro zvýšení produkce mitochondriálního superoxidu. Rotenon je flavonoid, který zasahuje řetězce transportu elektronů v mitochondriích, konkrétně inhibuje přenos elektronů v komplexu I na ubichinon. Zabraňuje tvorbě buněčné energie ATP a zvyšuje produkci superoxidu [171].

Změna fluorescence byla měřena v minutových intervalech po dobu 16 min a byla odrazem produkce superoxidu. Z nárůstu přímek byly spočítány jejich směrnice a při závěrečném vyhodnocení byly vyneseny do poměru směrnice přímky s rotenonem ku směrnici bez rotenonu.

4.15 STANOVENÍ REDOXNÍHO STAVU GLUTATHIONU (GSH/GSSG)

Reaktivní formy kyslíku oxidují GSH na GSSG, proto byl sledován také poměr redukováného a oxidovaného glutathionu (GSH/GSSG) v buňkách. Testovanými terapeutiky byl chlorofyl *a*, chlorofyl *b* a feofytin *a* v koncentracích 10 $\mu\text{mol/L}$ a chlorofylin v koncentraci 30 $\mu\text{mol/L}$. Buňky byly pěstovány na 10 cm^2 miskách tak, aby výsledná konfluence nepřesáhla 60 %. Po 24 hodinové inkubaci s terapeutiky byly buňky seškrábány, 3x promyty PBS, centrifugovány (5000 g, 10 min, 4 °C) a buněčná peleta byla až do doby analýzy skladována v tekutém dusíku pro minimalizaci oxidace GSH. Maximální doba skladování vzorků nepřesáhla 4 týdny. V den měření byly pelety resuspendovány ve směsi aceton:voda (70:30), homogenizovány ultrazvukem, stočeny (15000 g, 20 min, 4 °C) a supernatanty byly analyzovány kapilární zónovou elektroforézou (napětí = 30 kV, detekce 195 nm, Agilent 7100). Jako separační pufr byl použit fosforečnanový pufr o pH 7 a koncentraci 40 mM.

4.16 STANOVENÍ PRODUKCE H_2O_2

Produkce peroxidu vodíku PaTu-8902 buněk byla měřena jako rychlost oxidace fluorogenního indikátoru Amplex Red (Life Technologies) v přítomnosti křenové peroxidázy (HRP, type VI-A, Sigma) [172]. Peroxidáza po dodání zdroje peroxidu a vhodného substrátu, který oxiduje a mění jeho barvu, vizualizuje reakci.

Buňky byly předem inkubovány po dobu 24 hodin s pigmenty, byly promyty PBS a resuspendovány v křemenných kyvetách. Následně byl přidán Amplex Red (5 $\mu\text{mol/L}$) a křenová peroxidáza (10 U/ml). Nárůst fluorescence 565/585 byl měřen po dobu 10 minut spektrofluorometricky (spektrofluorometr RF-5301-PC, Shimadzu). Působky byly chlorofyly (chlorofyl *a*, chlorofyl *b*, feofytin *a* a chlorofylin) v koncentracích 10 a 50 $\mu\text{mol/L}$.

4.17 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITY CHLOROFYLŮ

Byla měřena antioxidační kapacita různých koncentrací chlorofylů v závislosti na spotřebě antioxidantu Trolox [173]. Trolox je ve vodě rozpustný analog vitamínu E. Radikály byly v reakci generovány peroxidázou a byly detekovány fluorometricky (spektrofluorometr Lambda 20, Perkin Elmer Instruments). Výsledky jsou vyjádřeny jako index antioxidační kapacity, který je počítán jako poměr času potřebného k vychytání volných radikálů tetrapyrolu ku času Troloxu, potřebného na totéž. Čím větší index je, tím lepším antioxidantem daná látka je. Testovanými roztoky byl chlorofyl *a*, chlorofyl *b* a chlorofylin v koncentračním rozmezí 10 až 300 $\mu\text{mol/L}$.

Stejnou metodou byla měřena také antioxidační schopnost krevního séra athymických nu/nu myši xenotransplantovaných buňkami lidského adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902 (viz dále). Myši byly krmeny chlorofylem *a* po dobu 21 dní. Na konci experimentu byly myši usmrceny a byla stanovena antioxidační kapacita odebraného séra. Výsledné hodnoty byly porovnány s kontrolní skupinou krmenou placebem.

4.18 STANOVENÍ REDUKTIVNÍ KARBOXYLACE

Stupeň reduktivní karboxylace a glutaminolýzy byl vyhodnocen dle popsané metodiky [174]. Buňky byly inkubovány až do dosažení 80% konfluency, poté bylo médium nahrazeno čerstvým médiem obsahujícím ^{13}C -L-glutamin (Cambridge Isotope Laboratories Inc., Cambridge, MA, USA) a inkubováno při 37°C po dobu dalších šesti hodin. Nakonec byly buňky sklizeny, pelety byly extrahovány vodou/metanolem/chloroformem (v poměru 1:1:2, Penta, Česká republika) a centrifugovány při $1000 \times g$ po dobu 10 minut. Horní polární fáze byla přenesena do skleněné lahvičky a lyofilizována přes noc. Analyty byly derivatizovány pyridinem/N-(trimetylsilyl)acetamid / chlortrimetylsilanem (v poměru 9:3:1, Sigma-Aldrich) při 65°C po dobu jedné hodiny. Derivatizované vzorky se vstříkovaly přímo do přístroje pro plynovou chromatografii / hmotnostní spektrometrii (GC-MS, GC 6890N, MD 5973, Agilent) vybaveného difenyl-dimethylpolysiloxanovou kolonou (RESTEK). Při GC analýze byl použit teplotní gradient (10°C za minutu) a vybrané ionty byly monitorovány na hmotnostním detektoru. Aktivita reduktivní karboxylace byla stanovena mírou inkorporace ^{13}C z glutaminu do citrátu (m/z 273 a 274) a malátu (m/z 335 a 336). Kromě toho byla také pozorována syntéza 2-hydroxyglutarátu (m/z 349 a 350). Míra reduktivní karboxylace byla vypočítána jako procentuální podíl ^{13}C -metabolitu (citrát, malát) spolu s mírou syntézy 2-hydroxyglutarátu. Koncentrace laktátu (pmol laktátu na

milion buněk) byla měřena podle podobného protokolu se dvěma výjimkami: (1) buňky byly ovlivněny po dobu 12 hodin před sklizní a kultura byla doplněna čerstvým neznačeným médiem (bez ^{13}C -značeného glutaminu), (2) před analytickou přípravou pelet byl přidán vnitřní standard (oxalát, m/z 190, Sigma Aldrich).

4.19 STANOVENÍ AKTIVACE ERK A AKT

Buňky adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902 byly pěstovány v duplikátech v nepřítomnosti (kontrola) nebo v přítomnosti působku (chlorofylu *a* nebo chlorofylinu) po dobu 1 hodiny. Buňky narostlé do 50% konfluence byly lyzovány RIPA puforem, který byl doplněn inhibitory fosfatázy a proteázy (Protease-Inhibitor Mix G a Phosphatase-Inhibitor-Mix I, Serva, Heidelberg, Německo). Buněčné lyzáty byly pročištěny centrifugací, odděleny SDS-PAGE, blotovány na 0,45 μm nitrocelulózových membránách, blokovány v 5% netučném mléce v PBS a sondovány s primárními protilátkami. Pro vizualizaci pomocí infračerveného zobrazovacího systému Odyssey (LI-COR Biosciences) byly použity fluorescenčně značené anti-rabbit IRDye 700 a anti-mouse IRDye 800 sekundární protilátky (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). Rabbit fosfo-p44/42 MAPK (Erk1/2), rabbit fosfo-Akt (Ser473), mouse p44/42 MAPK (Erk1/2) a primární protilátky rabbit AKT byly získány z Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Myší p120RasGAP protilátka byla získána od firmy ECM Biosciences LLC (Versailles, KY, USA). Imunobloting s protilátkami ERK1/2 a p120RasGAP byl použit k potvrzení loadingu stejného množství proteinů.

4.20 *IN VIVO* EXPERIMENTY

In vivo studie byly provedeny na athymických nu/nu myších (Charles River Wiga, Sulzfeld, Německo) xenotransplantovaných subkutánně buněčnou linií lidského adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902 (10^7 buněk/myš, kontrolní skupina $n = 7$, léčebná skupina $n = 6$). Po dosažení bazální velikosti nádoru (0,15-0,2 cm^3 , 7 dní po xenotransplantaci) byla zahájena léčba chlorofylem *a* (perorální intubací žaludku, dávka 1,5 mg/kg váhy/den) čistým vehikulem a byl pozorován vliv této léčby na růst nádorů.

Skupina 1 byla léčena chlorofylem *a*, který byl rozpuštěný v malém množství čistého ethanolu a naředěn na patričný objem čistým rostlinným olejem (výsledná koncentrace ethanolu $< 1\%$), kontrolní skupině byl podáván čistý rostlinný olej. Léčba byla podávána prostřednictvím intragastrické sondy každý den (dávkování 1,5 mg/kg váhy). K posouzení velikosti nádoru byly nádory měřeny ve dvou místech s největším průměrem každé tři dny pomocí posuvného měřítka a objem nádorů vypočítán podle tabulek velikostí nádorů [175]. Po 29 dnech byl experiment

ukončen a zvířata byla usmrcena. Krev a vzorky nádorových tkání byly odebrány a uchovávány při -80°C .

Všechny aspekty zvířecích studií a všechny protokoly splňovaly kritéria pro péči a experimentální používání laboratorních zvířat a byly schváleny Etickou komisí pro práci se zvířaty 1. LF UK.

4.21 STATISTICKÉ ANALÝZY

Data jsou prezentována jako průměr \pm SD nebo medián s IQ rozpětím v závislosti na normalitě dat. Výsledky byly hodnoceny Studentovým t-testem nebo neparametrickým Mann-Whitney Rank Sum testem. Rozdíly ve velikostech nádorů zvířat léčených chlorofylem byly analyzovány testem RM ANOVA s Holm-Šidák posthoc testováním. Pro porovnání účinků léčby tetrapyroly na celkovou antioxidační kapacitu *in vitro* byla použita analýza lineární regrese. V závislosti na normalitě jsou data prezentována jako průměr \pm SD nebo medián v rozmezí 25 - 75%. Rozdíly byly považovány za statisticky významné při $p < 0,05$.

Podíl doktoranda na jednotlivých metodách a experimentech

Vzhledem k velkému rozsahu metodiky a náročnosti práce byly některé metody prováděny ve spolupráci s jinými pracovišti. Sama jsem zavedla metodu izolace hlavní experimentální sloučeniny, chlorofylu *a*, a zavedla jsem také metody pro bližší charakterizaci této sloučeniny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a UV/VIS spektroskopie. Měření hmotnostních spekter jsem prováděla na Přírodovědecké fakultě UK v Praze ve spolupráci s RNDr. Martinem Štíchou, Ph.D. Charakterizace chlorofylu *a* pomocí spektroskopie vibračního cirkulárního dichroismu (VCD), elektronového cirkulárního dichroismu (ECD) a infračervené spektroskopie (IČ) proběhla ve spolupráci s prof. Marií Urbanovou na VŠCHT v Praze.

Dále jsem zajišťovala veškeré práce s buněčnými kulturami, včetně měření buněčné viability, klonogenních měření, stanovení aktivity hemoxygenázy, izolace RNA a provádění Real-time PCR analýz. Měřila jsem také antioxidační kapacity roztoků a krevních sér a dále mitochondriální produkci superoxidu na průtokovém cytometru. Ve spolupráci s Ing. Jaroslavem Zelenkou, Ph.D. a Mgr. Alešem Dvořákem z Fyziologického ústavu Akademie věd probíhalo stanovení mitochondriálního membránového potenciálu (MMP), poměr oxidovaného a redukovaného glutathionu, produkce H₂O₂ a stanovení reduktivní karboxylace.

5 VÝSLEDKY

V iniciálních studiích z roku 2014 jsme se zabývali studiem protinádorových účinků *S. platensis* na experimentálním modelu karcinomu pankreatu. Antiproliferační účinky *S. platensis* a jejích tetrapyrolových složek (fykokyanobilinu (PCB) a chlorofylinu) byly testovány na několika lidských buněčných liniích karcinomu pankreatu a na xenotransplantovaných nu/nu myších. Hodnoceny byly také účinky experimentálních terapeutik na produkci mitochondriálních ROS a na redoxní stav glutathionu. Ve srovnání s neléčenými buňkami, experimentální terapeutika významně snižovala proliferaci buněk lidského karcinomu pankreatu *in vitro*, v závislosti na dávce (od 0,16 g/L *S. platensis*, 60 μmol/L PCB a 125 μmol/L chlorofylin, $p < 0,05$). Antiproliferační účinky *S. platensis* byly také prokázány *in vivo*, kde byla prokázána inhibice růstu karcinomu pankreatu od třetího dne léčby ($p < 0,05$). Všechny testované sloučeniny snižovaly produkci mitochondriálních ROS a redoxní stav glutathionu ($p = 0,0006$, 0,016 a 0,006 pro *S. platensis*, PCB a chlorofylin). *S. platensis* i PCB významně snižovaly proliferaci testovaného karcinomu pankreatu. Podobné výsledky byly dosaženy i pro chlorofylin, syntetický chlorofyl, což nás vedlo k hlubšímu studiu potenciálních protinádorových účinků těchto pigmentů.

5.1 IZOLACE A CHARAKTERIZACE CHLOROFYLU

5.1.1 Izolace chlorofylu *a* ze sinice *S. platensis*

Vzhledem k vysoké pořizovací ceně komerčního chlorofylu *a*, který byl potřeba pro plánované biologické experimenty, bylo nutné zavést metodu pro jeho izolaci.

Bylo zavedeno několik metod izolace chlorofylu *a* ze zelené sinice *S. platensis* s výtěžnostmi od 0,1 % do 5 %. Na základě charakterizace jednotlivých izolátů několika analytickými metodami (UV/VIS spektrometrie, HPLC, hmotnostní spektrometrie, metody cirkulární dichroismu a infračervené spektroskopie) byl následně vybrán postup, z něhož jsme získávali produkt s nejvyšší čistotou.

Metoda I

Na základě popsaných metod [19, 176] pro izolaci chlorofylu *a* byl zaveden následující postup. Chlorofyl *a* byl izolován za tmy z lyofilizované sinice *S. platensis*. Šest gramů *S. platensis* bylo smícháno se 150 ml 80% acetonu a ponecháno v sonifikátoru po dobu 15 minut. Roztok byl poté centrifugován (8000 g, 10 min). K supernatantu bylo přidáno 25 ml dioxanu a za intenzivního míchání bylo přidáno cca 100 ml vody k vysrážení chlorofylu. Vzorek byl opět centrifugován (8000 g, 10 min). Získaná peleta byla rozpuštěna v 75 ml hexanu, poté bylo do roztoku přidáno 10 ml vody a 10 ml acetonu. Roztok byl znovu centrifugován, byla odstraněna vodná fáze, a roztok byl znovu promyt cca 50 ml vody a opakovaně promýván směsí acetonu a vody. Organická fáze byla poté odpařena na vakuové odparce při 70°C. Odparek byl rozpuštěn v hexanu a odpařen ve vyhřívaném bločku pod dusíkem. Výtěžek získaného chlorofylu *a* byl cca 1 %.

Pro porovnání výtěžnosti metody a čistoty vyizolovaného chlorofylu *a* byly zavedeny další dvě metody a všechny způsoby izolace byly vzájemně porovnány (viz kapitola 5.1.2 Charakterizace chlorofylu *a*).

Metoda II

Jako druhou metodu jsme použili modifikaci metody dle Iriyama et al. [157]. Deset gramů sinice *S. platensis* bylo smícháno s 50 ml metanolu, ponecháno 15 minut v sonifikátoru a roztok byl centrifugován (500 g, 5 min). K supernatantu bylo přidáno 7 ml dioxanu a 10 ml vody. Roztok byl promíchán a ponechán v lednici po dobu 60 minut, aby došlo k sedimentaci. Poté byl roztok opět centrifugován (10000 g, 5 min) a získaná peleta byla rozpuštěna v 15 ml směsi metanol:dioxan (7:1, v/v). K roztoku bylo přidáno 25 ml vody. Celý postup byl poté znovu opakován. Získané pelety byly rozpuštěny v metanolu, přeneseny do zvážené vialky a odpařeny ve vyhřívaném bločku proudem dusíku. Výtěžek chlorofylu *a* touto metodou byl cca 0,2 %.

Metoda III

Poslední metodou vyzkoušenou pro izolaci chlorofylu *a* byla metoda podle autorů Tong et al. [177]. Pět gramů sinice *S. platensis* bylo smícháno s 10 ml 50% acetonu, který sloužil jako činidlo pro rozrušení buněčných stěn. Směs byla ponechána 60 sekund v mikrovlnné troubě (při cca 560 W), poté byl ke směsi přidán čistý etanol (koncentrace etanolu byla 10 ml/g *S. platensis*) a směs byla ponechána ve vodní lázni vyhřáté na teplotu 55°C po dobu 45 minut. Získaný extrakt byl přefiltrován a větší část etanolu byla odpařena ve vyhřívaném bločku pod dusíkem, pro úplné dosušení byl prášek lyofilizován. Výtěžek této metody byl 4,5 %.

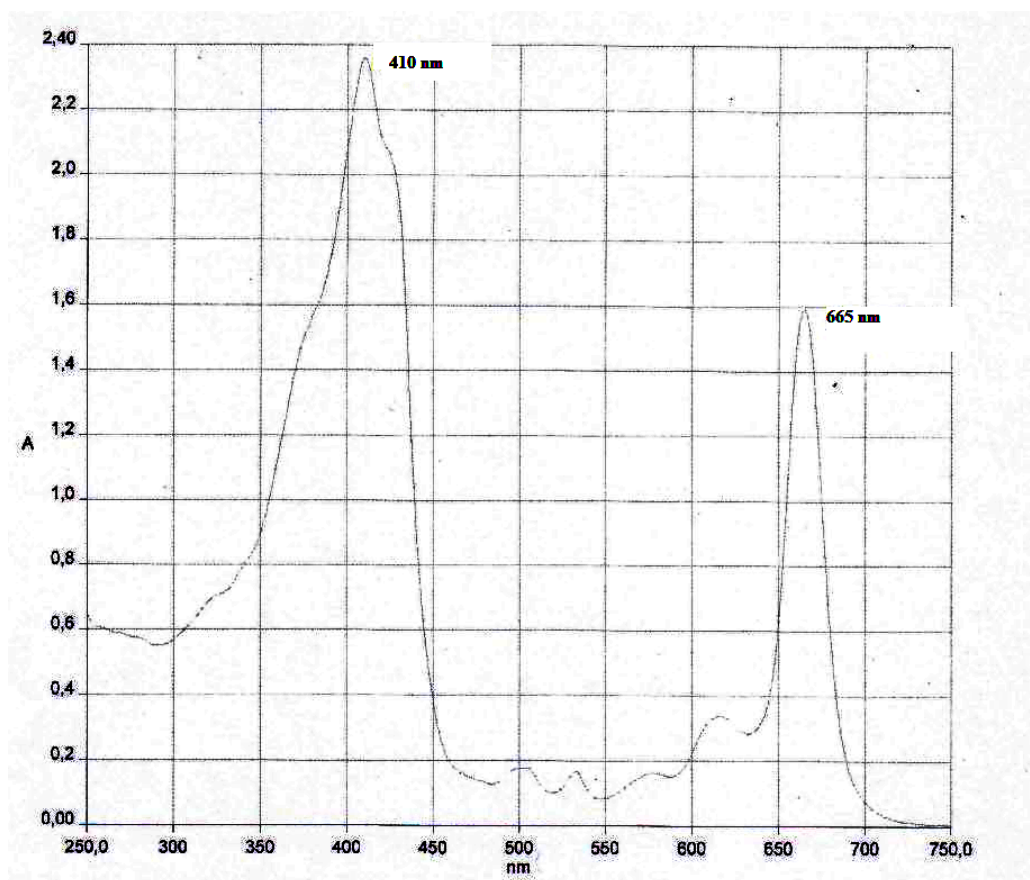
5.1.2 Charakterizace chlorofylu *a*

Abychom identifikovali nejvhodnější postup přípravy chlorofylu *a*, bylo nutné identifikovat izolovaný pigment. Za tímto účelem bylo provedeno měření absorpčních spekter všech izolovaných chlorofylů (provádělo se v rozsahu vlnových délek 200-900 nm). Bylo nutné také zavést metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) pro stanovení čistoty získaných preparátů a následně bylo potřeba metodu HPLC optimalizovat pro možnost stanovení hmotnostních spekter (MS) izolovaných analytů. Nejčistší izolovaný chlorofyl *a* byl poté charakterizován pomocí infračervené spektroskopie (IČ), metod vibračního cirkulárního dichroismu (VCD) a elektronového CD (ECD).

5.1.2.1 UV/VIS spektroskopie chlorofylu *a*

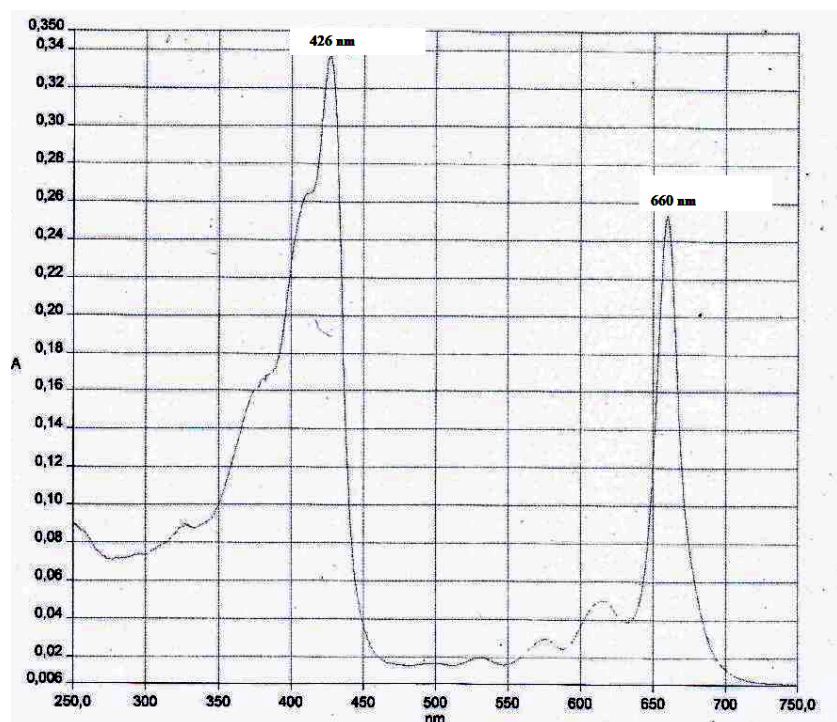
Vyizolovaný chlorofyl *a* připravený metodou I byl rozpuštěn v hexanu a bylo změřeno jeho absorpční spektrum (Obr. 7.). Absorpční maxima píků odpovídala 410 a 665 nm, což jsou maxima uváděná v literatuře [19].

Obr. 7. Absorpční spektrum chlorofylu *a* vyizolovaného metodou I

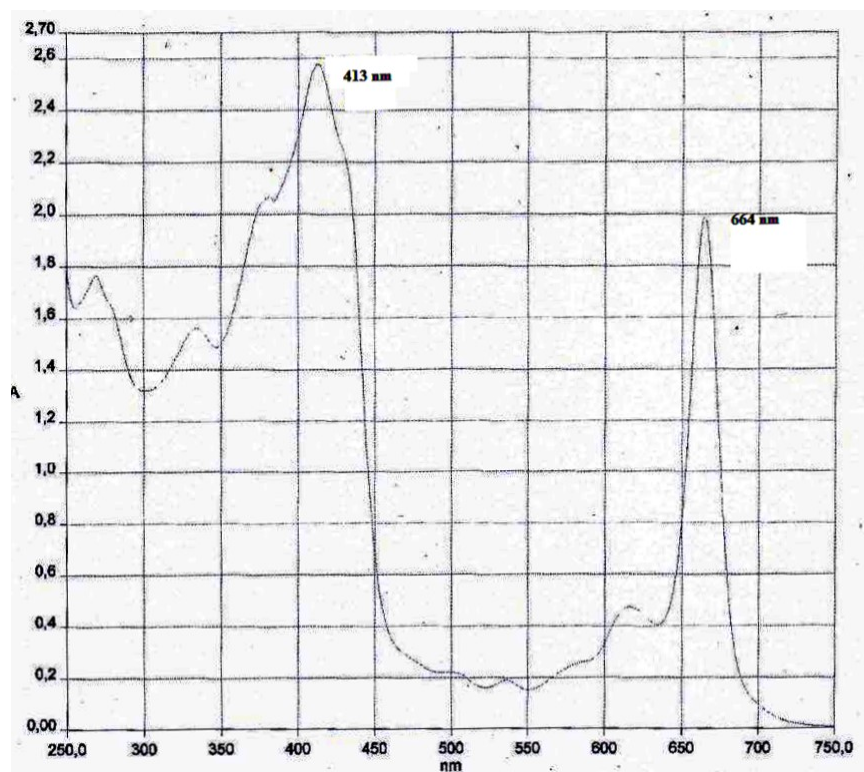


Postup byl zopakován s chlorofylem *a* vyizolovaným metodami II. a III. Absorpční spektra opět odhalila dvě maxima a to při vlnové délce 426 a 660 nm pro chlorofyl *a* izolovaný metodou II (Obr. 8.) a maxima při vlnové délce 413 a 664 nm pro chlorofyl *a* izolovaný metodou III (Obr. 9.).

Obr. 8. Absorpční spektrum chlorofylu *a* vyzolovaného metodou II.



Obr. 9. Absorpční spektrum chlorofylu *a* vyzolovaného metodou III.



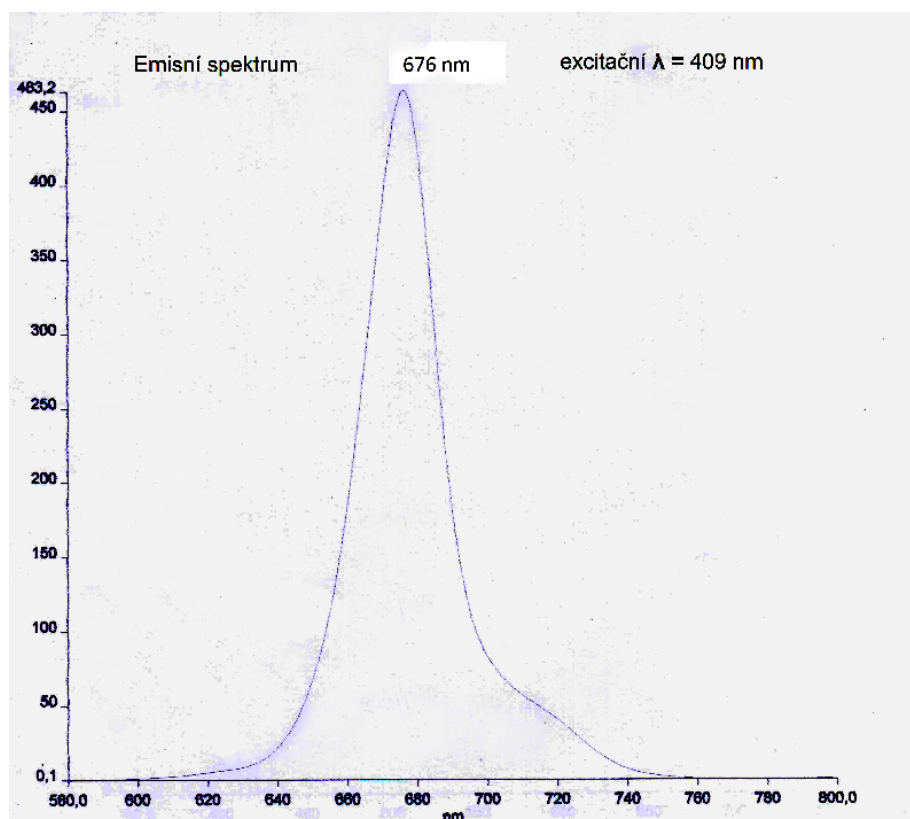
Závěr

Absorpční spektra naměřená ze třech různých izolovaných chlorofylů dle námi zavedených metodik vykazují vždy dvě vlnová absorpční maxima blízka vlnovým délkám 431 a 665 nm, což jsou vlnová maxima pro chlorofyl *a* uváděná v literatuře [19]. Z UV/VIS analýz je patrné, že některá spektra nemají zcela hladký průběh a absorpční maxima jsou lehce posunutá oproti hodnotám uváděných v literatuře, což naznačuje na přítomnost příměsí.

5.1.2.2 Fluorescenční spektroskopie chlorofylu *a*

Dalším krokem k charakterizaci izolovaného chlorofylu *a* bylo zjištění jeho emisního spektra. K měření byly použity parametry excitačních hodnot uvedených v literatuře [159]. Vlnová excitační délka byla nastavena na hodnotu $\lambda = 409$ nm. Získali jsme emisní spektrum charakteristické pro chlorofyl *a*, jež mělo maximum při vlnové délce 676 nm pro chlorofyl *a* vyizolovaný metodou I (Obr. 10.), 665 nm pro chlorofyl *a* vyizolovaný metodou II a 669 nm pro chlorofyl *a* vyizolovaný metodou III; literatura udává jako emisní vlnové délky chlorofylu *a* hodnoty v rozmezí 660 až 680 nm [159].

Obr. 10. Charakteristické emisní spektrum chlorofylu *a* vyizolovaného metodou I



5.1.2.3 HPLC analýza chlorofylu *a*

Abychom mohli posoudit čistotu jednotlivých izolátů, bylo nutné provést HPLC analýzu pro stanovení chlorofylu *a*. Byla proto optimalizována metoda dle Wong a Wong (dle článku byly mobilní fáze (MF) A: metanol:amonium acetát = 80:20, MF B: acetonitril:mili Q voda = 90:10 a MF C: ethylacetát) [160]. Jako stacionární fázi byla použita kolona Nucleosil C18 (125 x 4 mm, 5 um, firma Macherey Nagel, Německo). K provedení HPLC analýz byl pozměněn gradient i složení mobilní fáze (Tab. 3.). Důvodem ke změně složení MF bylo lepší rozdělení píku pro chlorofyl *a* a *b*. V původním složení MF se nám jednotlivé analyty nepodařilo rozdělit.

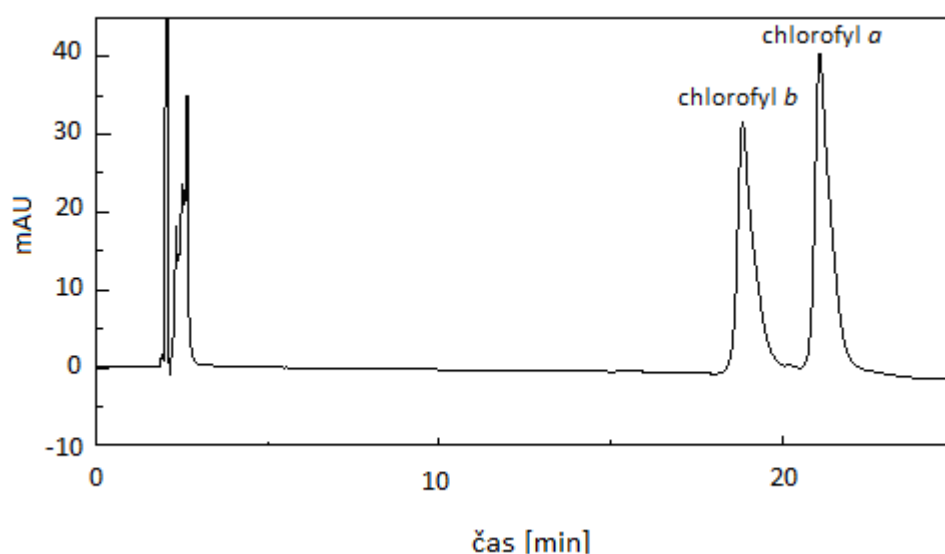
Tab. 3. Schéma gradientového programu pro HPLC analýzu chlorofylů.

Čas	MF A (%)	MF B (%)
0 min	80	20
20 min	100	0
30 min	80	20

MF A = Metanol, MF B = 1 M octan amonný, pH 7

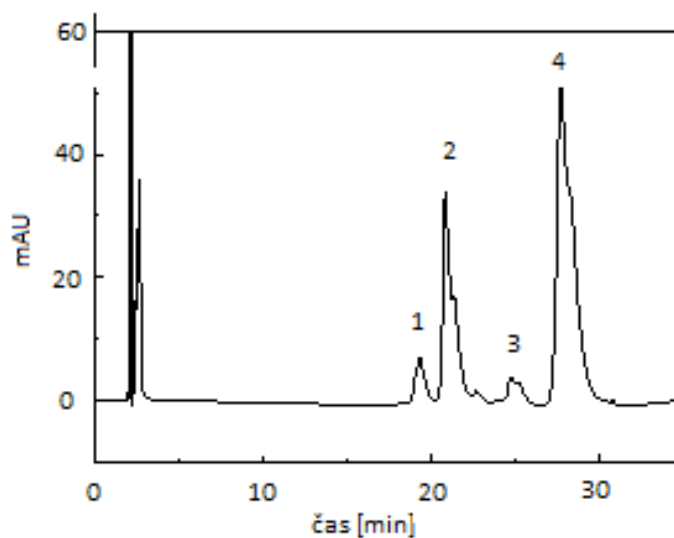
Sběr dat byl prováděn při vlnové délce 650 nm. Pro zavedení metody byly použity komerční chlorofyly *a* a *b* (Obr. 11.) ve směsi. Retenční časy získané z této analýzy byly dále použity jako referenční hodnoty k charakterizaci izolovaných chlorofylů.

Obr. 11. HPLC chromatogram směsi komerčních chlorofylů *a* a *b*



Zavedená HPLC metoda byla použita ke stanovení čistoty izolovaných chlorofylů dle výše popsaných metod. Na Obr. 12. je uveden chromatogram izolátu připraveného dle metody I. Podle uvedeného chromatogramu je zřejmé, že přípravou chlorofylu dle postupu I jsme získali ne zcela čistý izolát, který kromě chlorofylu *a* (pík 2) obsahuje také další analyty, které retencí neodpovídají čistému chlorofylu *a*. Pík 2 byl určen jako chlorofyl *a* na základě porovnání retenčního času s retenčním časem komerčního chlorofylu *a*.

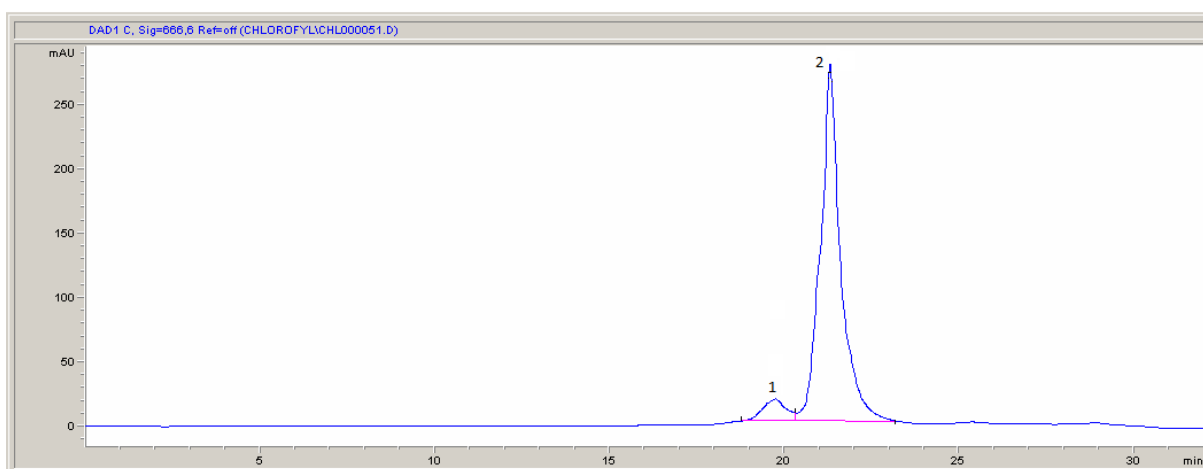
Obr. 12. HPLC chromatogram vyizolovaného chlorofylu *a* metodou I



2 – chlorofyl *a*

K další HPLC analýze byl použit chlorofyl izolovaný pomocí metody II. Na obrázku můžeme vidět, že takto připravený chlorofyl má vysokou čistotu, v chromatogramu vidíme pouze dva významné píky, z nichž pík 2 svojí retencí odpovídá chlorofylu *a* (Obr. 13.). Vzhledem k faktu, že pík 1 mohl být derivátem chlorofylu [178], bylo nutné pro přesnější charakterizaci použít další analytické metody (viz dále).

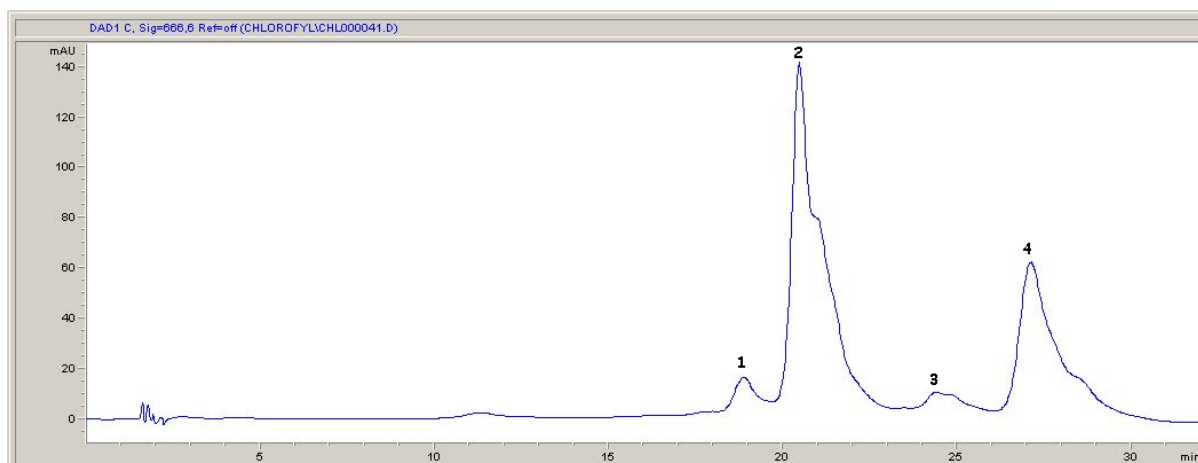
Obr. 13. HPLC chromatogram vyizolovaného chlorofylu *a* metodou II



2 – chlorofyl *a*

Na závěr byla stanovena čistota chlorofylu izolovaného dle postupu III. Izolace chlorofylu *a* touto metodou rovněž poukazuje na přítomnost nečistot v izolátu (Obr. 14.), jako tomu bylo v případě izolace postupem I. Ačkoliv jsme díky této přípravě získávali nejvyšší výtěžky chlorofylu *a*, chlorofyl získaný tímto postupem nebyl shledán vhodným pro použití na tkáňových kulturách kvůli kontaminujícím příměsím. Pík 2 odpovídá chlorofylu *a*.

Obr. 14. HPLC chromatogram vyizolovaného chlorofylu *a* metodou III



2 – chlorofyl *a*

Závěr:

Na základě provedených HPLC analýz byl chlorofyl *a* vyizolovaný metodou II. shledán jako nejčistší (Tab. 4.), a proto byl vybrán pro přesnější charakterizaci dalšími analytickými metodami.

Tab. 4. Přehled metod izolace chlorofylu *a*

	Výtěžnost metody	Čistota chlorofylu <i>a</i> dle HPLC
Metoda I	cca 1,0%	cca 50%
Metoda II	cca 0,2%	cca 95%
Metoda III	cca 4,5%	cca 40-50%

5.1.2.4 Charakterizace chlorofylu *a* hmotnostní spektrometrií

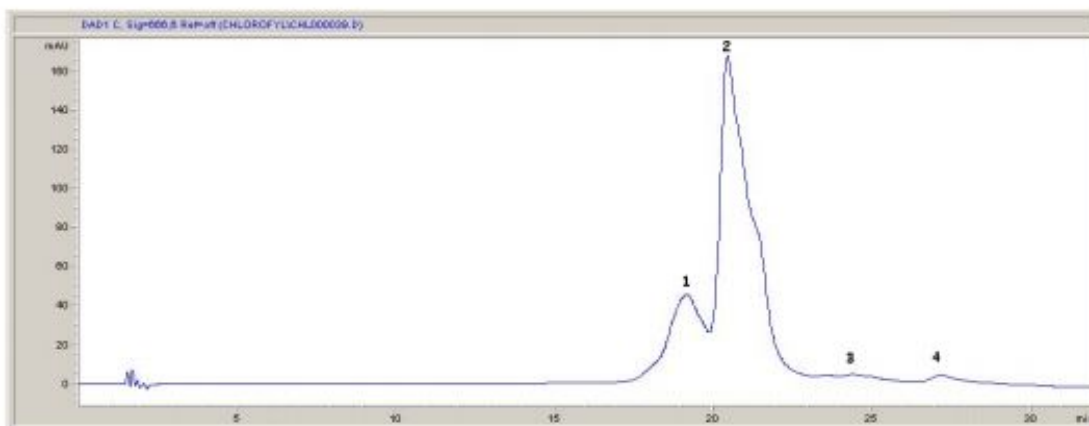
Pro bližší určení nečistot obsažených v připraveném izolátu a přesnému určení chlorofylu *a* byla použita metoda hmotnostní spektrometrie ve spojení s HPLC.

Pro hmotnostní analýzu bylo nutné upravit molaritu pufru obsaženého v mobilní fázi tak, aby nedocházelo k jeho srážení v přístroji v průběhu ionizace vzorků. Byly proto vyzkoušeny octanové pufrы o molaritách 1 mol/L, 0,5 mol/L, 0,2 mol/L a 0,1 mol/L. Ze získaných chromatogramů (data neuvedena) jsme prokázali, že k dostatečnému rozlišení bude stačit použít pufr o nejnižší molaritě, čili 0,1 M octan amonný.

HPLC-MS analýzy byly měřeny s chlorofylem *a* připraveného metodou II, tzn. námi připraveného chlorofylu *a* nejvyšší čistoty.

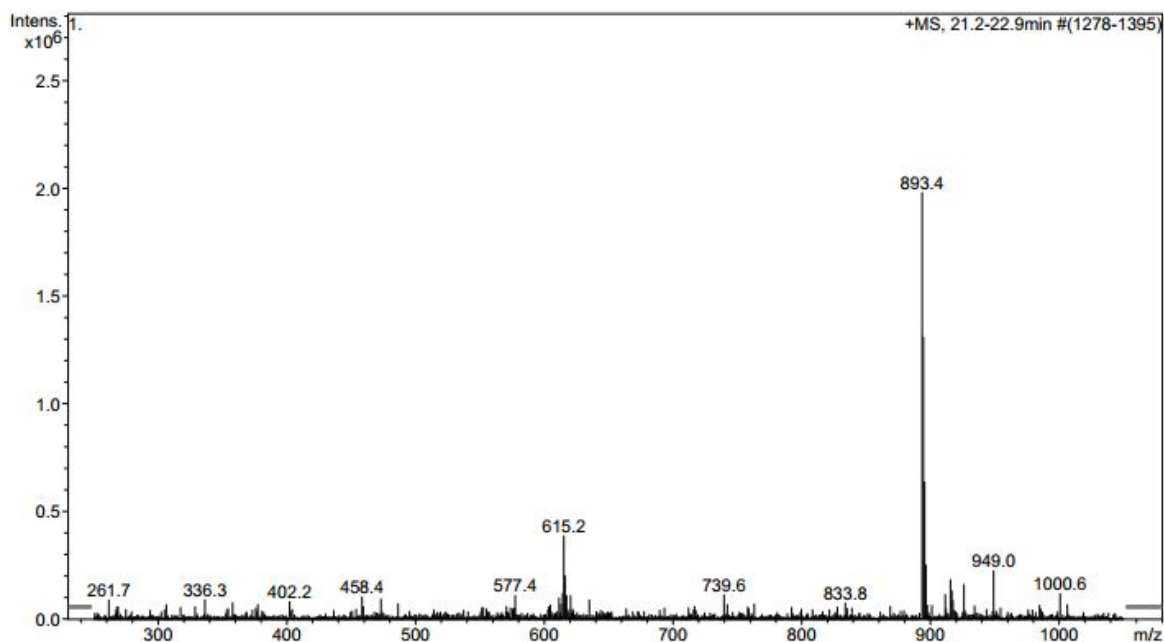
Na Obr. 15. je uveden chromatogram izolátu připraveného podle metody II, na kterém můžeme pozorovat celkem 4 různé píky. HPLC/MS analýzou jsme zjistili, že pík č. 1 se zřejmě neionizuje, protože detektor nezaznamenal žádné hmotnostní spektrum. Pík č. 2 obsahoval majoritní zastoupení hmoty m/z 893 (Obr. 16.), což je hmotnost odpovídající chlorofylu *a*. Pík č. 3 obsahoval převážně sloučeniny o m/z 579 a 619, jejichž identita nebyla prokázána (data neukázána). Pík č. 4 měl molekulovou hmotnost m/z 871 (Obr. 17.). Tento pík jsme identifikovali jako feofytin *a*, což je molekula identická s chlorofylem *a*, avšak má vytržený centrálně vázaný atom hořčíku [161]. Potvrzením tohoto faktu byl rozdíl molekulových hmotností mezi chlorofylem (893) a feofytinem (871), odpovídající molekulové hmotnosti atomu hořčíku.

Obr. 15. HPLC chromatogram izolovaného chlorofylu podle metody II



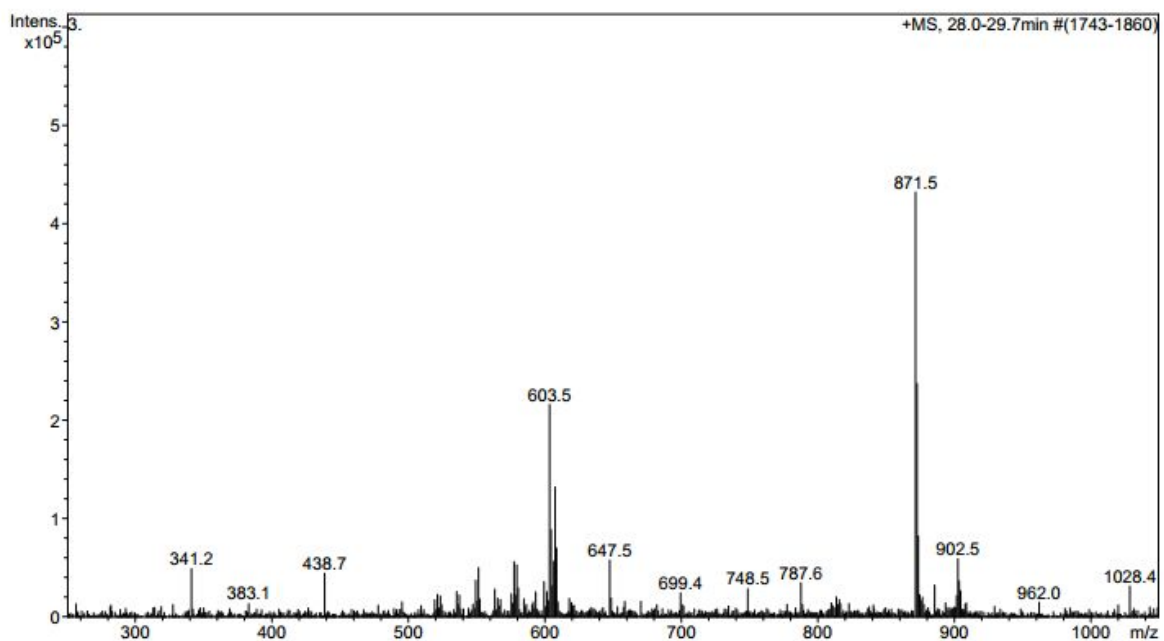
1 – neionizovaný vzorek, 2 – chlorofyl *a*, 3 – neidentifikováno, 4 – feofytin *a*

Obr. 16. MS chlorofylu *a* izolovaného metodou II



HPLC chromatografií byl vyizolován pík 2 (viz Obr. 15.) odpovídající chlorofylu *a* a bylo změřeno jeho hmotnostní spektrum. Majoritní hmota m/z 893 je charakteristická pro chlorofyl *a*.

Obr. 17. MS feofytinu *a* izolovaného metodou II



HPLC chromatografií byl vyizolován pík 4 (viz Obr. 15.) a bylo změřeno jeho hmotnostní spektrum. Majoritní hmota m/z 871 byla identifikována jako feofytin *a*.

5.1.2.5 Charakterizace chlorofylu *a* pomocí ECD, VCD a IČ spekter

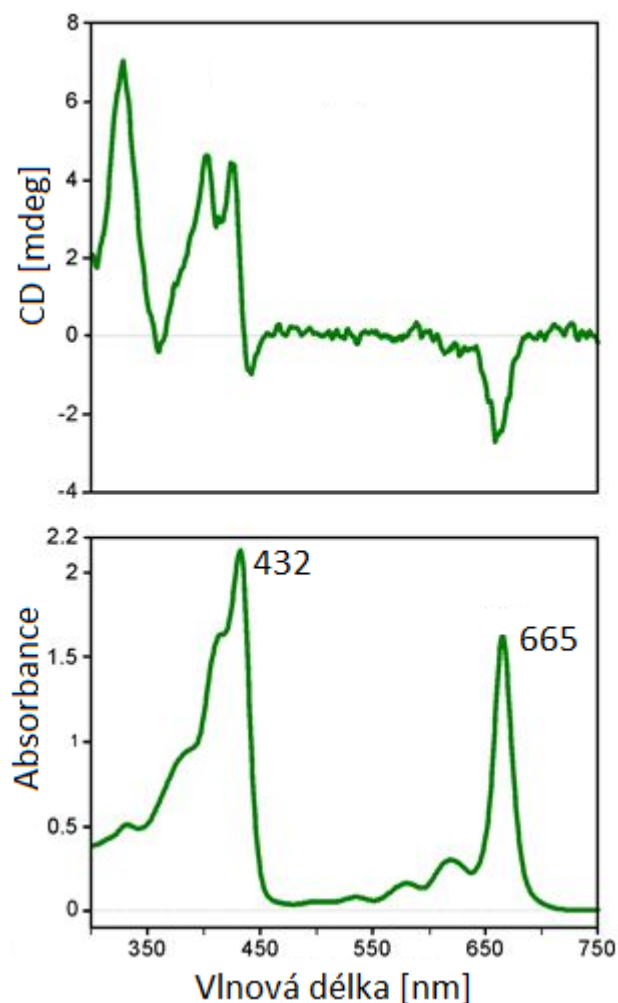
K další charakterizaci vyizolovaného chlorofylu byly použity metody cirkulárního dichroismu sloužící ke zjištění konformací chirálních molekul, tedy molekul obsahujících alespoň jedno chirální centrum.

Principem metody elektronového cirkulárního dichroismu je odlišná schopnost enantiomerů jedné látky pohlcovat cirkulárně polarizované záření. Oproti tomu vibrační cirkulární dichroismus používá ke zjištění struktury molekul světlo z infračervené oblasti záření, díky čemuž dochází k přechodům mezi vibračními hladinami studované molekuly.

Jako vhodné rozpouštědlo byl na základě dat z literatury [179] použit pro CD spektra benzen a pro IČ spektra denaturovaný benzen- d_6 . Pro analýzu za pomoci metod CD a IČ byl použit pouze vzorek získaný za použití metody II, tedy chlorofyl *a* s nejvyšší čistotou. Koncentrace chlorofylu *a* použitá pro stanovení ECD a UV-VIS spekter byla $6 \cdot 10^{-5}$ mol/L a koncentrace pro IČ a VCD spektra byla 0,056 mol/L.

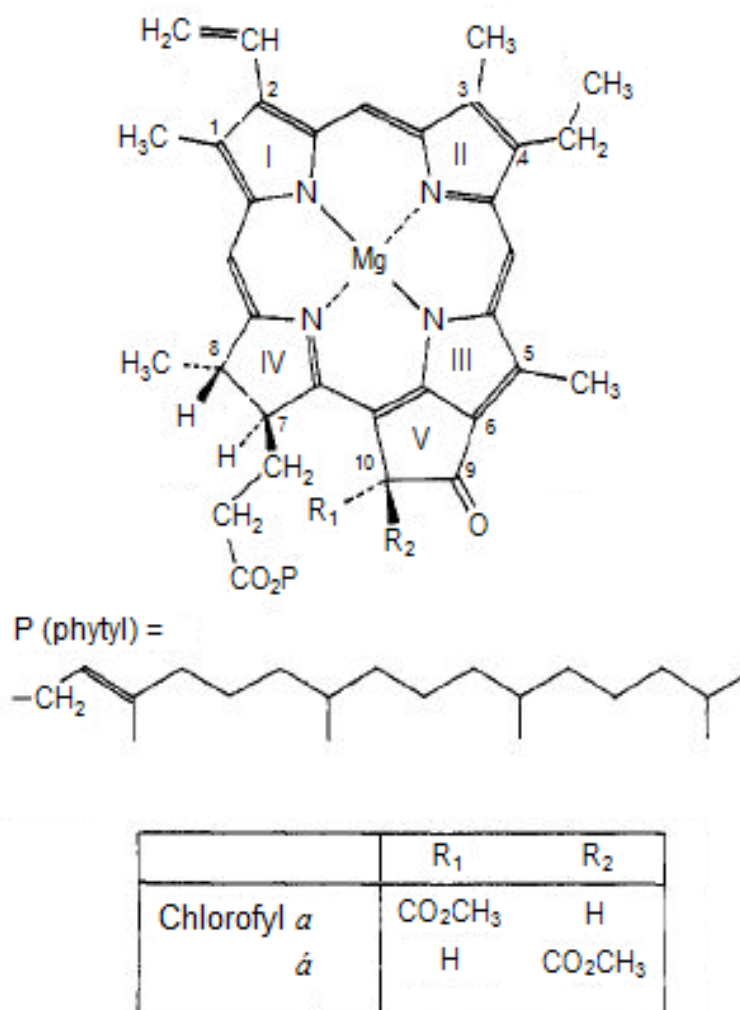
ECD a UV/VIS spektrum vyizolovaného chlorofylu *a* bylo proměřováno v oblasti vlnových délek 300-750 nm (Obr. 18.). Porovnáním získaných dat s literaturou [179] lze říci, že naměřený průběh odpovídá chlorofylu *a* nebo jeho epimeru chlorofylu *a'*. Epimery jsou látky shodné struktury lišící se konfigurací v jednom chirálním centru, v tomto případě se jedná o konfiguraci substituentů R_1 a R_2 navázaných na uhlíku C_{10} (Obr. 19.)

Obr. 18. ECD a UV-VIS absorpční spektra chlorofylu *a* v benzenu



Naměřené hodnoty a relativní intenzity absorpčních maxim odpovídají datům uváděným v literatuře pro chlorofyl *a* a jeho epimer chlorofyl *a'*. Na základě absorpčních spekter nelze tyto dva epimery od sebe rozlišit, avšak jejich ECD spektra se významně liší. Výrazný záporný signál ECD u vlnového maxima 665 nm by mohl svědčit ve prospěch přítomnosti chlorofylu *a'*. Spektrální průběh v oblasti Soretova pásu však tuto hypotézu jednoznačně nepotvrzuje. Podle naměřených výsledků však můžeme říci, že ve vzorcích nejsou významně zastoupeny jiné deriváty chlorofylu.

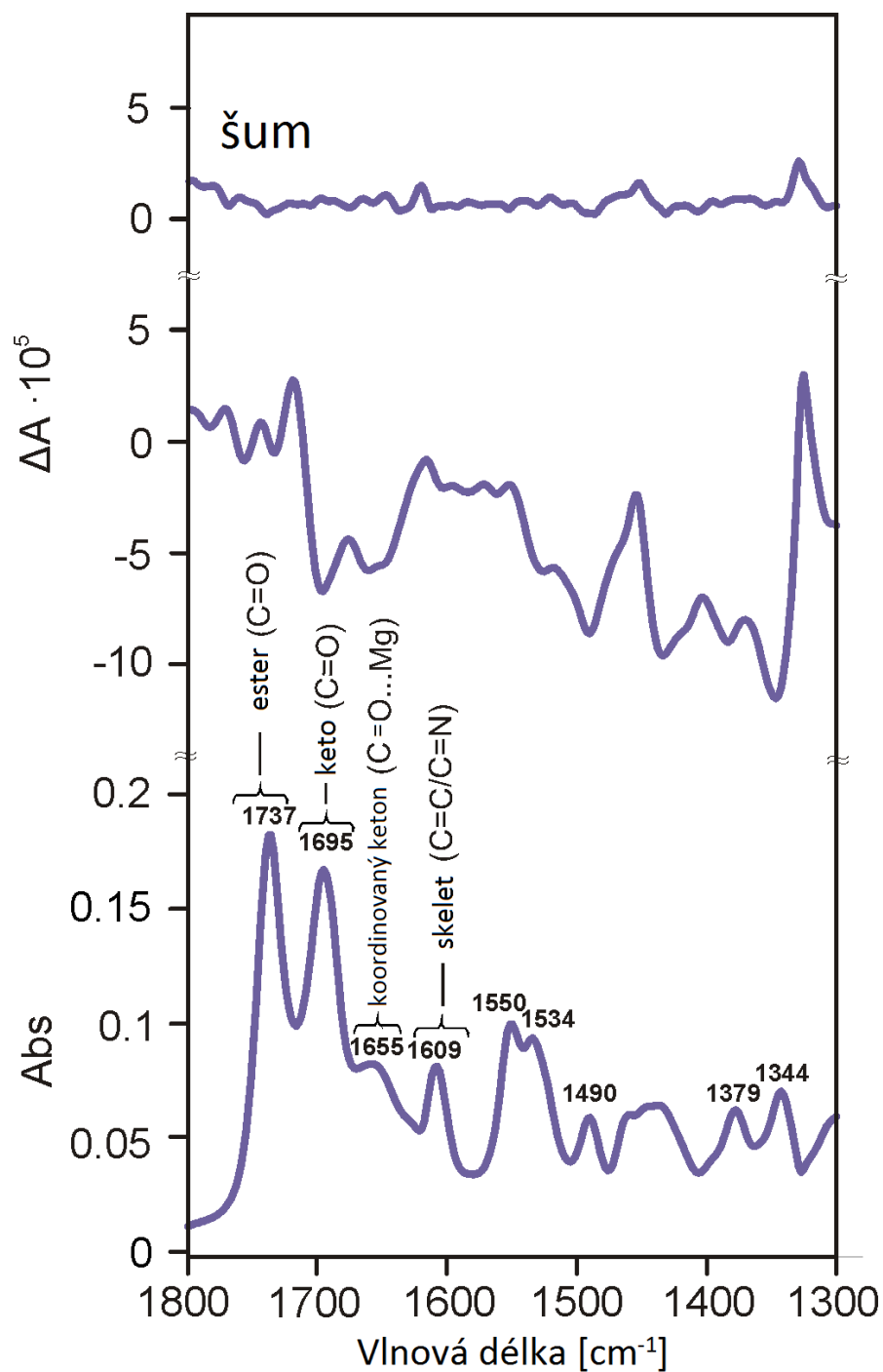
Obr. 19. Struktura chlorofylu *a* a jeho epimeru



převzato z Watanabe et al. [179]

VCD a IČ spektra byla proměřována v oblasti spektra 1800-1300 cm⁻¹. Výsledky těchto pozorování jsou shrnuty na Obr. 20. Byly nalezeny polohy charakteristických absorpčních pásů esterového karbonylu a keto karbonylu, které odpovídaly publikovaným datům [180]. Pás typický pro keto karbonyl, který byl pozorován u 1655 cm⁻¹ se obecně přiřazuje karbonylu, který je koordinačně vázán k centrálnímu atomu hořčíku jiné molekuly chlorofylu *a*. Díky naměřeným datům lze tedy předpokládat, že v našem vzorku vznikly dimery nebo větší agregáty mezi sousedními molekulami chlorofylu *a*.

Obr. 20. IČ a VCD spektra vyizolovaného chlorofylu *a* v benzenu



5.1.3 Stanovení stability chlorofylu *a* a feofytinu *a*

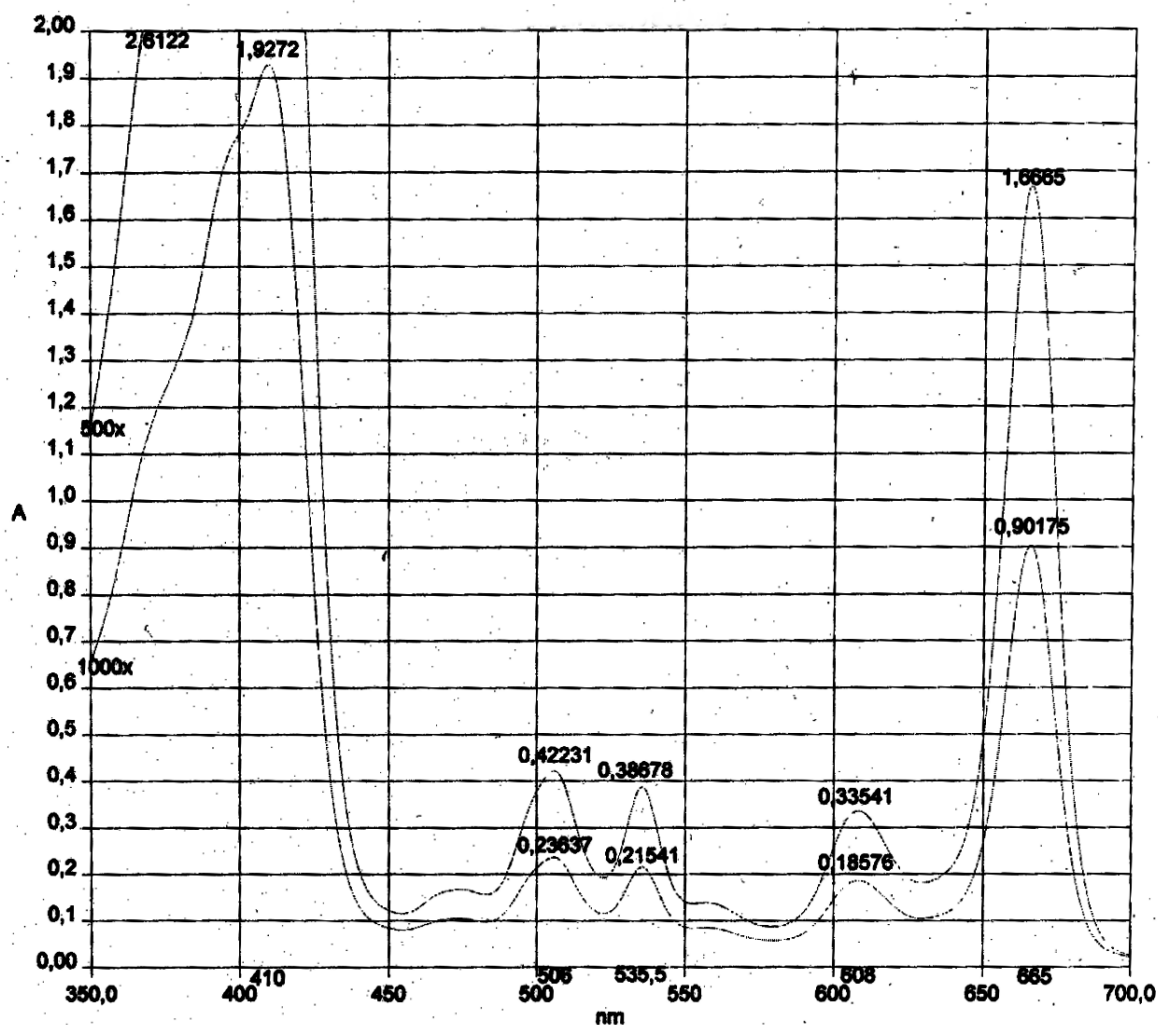
Zásobní roztoky chlorofylu *a* a feofytinu *a* byly připravovány z množství cca 2-3 mg a nespotřebovaný zásobní roztok byl skladován při -20°C.

Spektrofotometricky [158] bylo proměřeno celé spektrum zásobního roztoku feofytinu, které bylo měřeno bezprostředně po přípravě roztoku a po skladování při -20°C po dobu šesti měsíců (Obr. 21.).

V 1000x zředěném zásobním roztoku jsme naměřili při 665 nm hodnotu absorbance $A = 0,90175$. Hodnota skutečné koncentrace vypočítaná z Lambert-Beerova zákona odpovídala teoretické koncentraci vypočítané z navážky a molární hmotnosti, tedy 18 mM. Takto naměřená hodnota koncentrace se časem neměnila. Stejným způsobem byla ověřena i koncentrace zásobního roztoku chlorofylu *a*.

Závěrem můžeme říci, že zásobní roztoky chlorofylu *a* a feofytinu *a* v DMSO při -20°C byly stabilní po dobu nejméně šesti měsíců. Chlorofyl *b*, chlorofylin a ostatní sloučeniny byly vždy připravované čerstvé v den experimentu.

Obr. 21. Absorpční spektrum feofytinu *a*



Zásobní roztok feofytinu *a* ($c=18,3$ mM) byl zředěn 80% acetonem (500x a 1000x)

Závěr

Zavedením metody izolace chlorofylu *a* se nám podařilo výrazně snížit náklady na daný projekt. Pořizovací cena komerčního chlorofylu *a* v čistotě 90 % byla cca 20.000 Kč/5 mg. Na *in vitro* a *in vivo* experimenty jsme potřebovali dohromady chlorofyl v množství cca 100 mg. Cena izolovaného chlorofylu *a* ze sinice *S. platensis* optimalizovanou metodou byla v řádech stovek korun. Bez zavedení této metody by z finančních důvodů nebylo možné studii provést.

Uvedenými analytickými metodami se nám podařilo charakterizovat izoláty chlorofylu *a* připravené dle uvedených postupů. Jak naznačují data z UV/VIS spektroskopie a HPLC analýz, nejčistší chlorofyl *a* byl získán metodou II (přehled viz Tab. 4.), která nám poskytla sice nejnižší výtěžnost (0,2%), avšak získaný chlorofyl *a* měl nejvyšší čistotu (cca 95 % - čistota srovnatelná s komerčním chlorofylem *a* dodávaným firmou Sigma-Aldrich s.r.o.). HPLC metodou jsme

porovnali retenční časy izolovaného a komerčního chlorofylu, které byly ve shodě. Tento izolát byl posléze charakterizován pomocí hmotnostní spektroskopie a za použití metod cirkulárního dichroismu. IČ a VCD spektra potvrdila přítomnost skupin charakteristických pro chlorofyl *a* a poukázala na agregaci sousedních molekul chlorofylů. Na základě výsledků získaných z ECD spekter můžeme říci, že jsme vyizolovali buď chlorofyl *a*, nebo jeho epimer chlorofyl *a'* vysoké čistoty.

5.2 IN VITRO EXPERIMENTS

5.2.1 Vliv rostlinných tetrapyrólů na viabilitu, proliferaci a růst nádorových a endoteliálních buněk

V těchto *in vitro* experimentech byl zkoumán účinek chlorofylů *a*, *b* a dalších strukturně podobných látek (chlorofylinu, feofytinu *a*) na růst a proliferaci buněk. Cílem experimentu bylo zjistit, jak tetrapyroly působí na různé typy nádorů a jak jsou jednotlivé linie k terapeutikům citlivé. Tyto experimenty byly provedeny na různých buněčných liniích, konkrétně na nádorových liniích lidského adenokarcinomu pankreatu (PaTu-8902, BxPC-3, MiaPaCa-2), karcinomu prostaty (PC3) a na endotelové buněčné linii (EA.hy926). Zjistili jsme, že počet buněk byl po inkubaci s experimentálními terapeutiky snižován oproti kontrolní skupině v závislosti na koncentraci působku pouze nevýznamně (měřeno CV testem, data neuvedená). Naproti tomu, v závislosti na typu buněčné linie zkoumané pigmenty chlorofyl *a*, chlorofyl *b*, chlorofylin a feofytin *a* významně snižovaly buněčnou viabilitu, po 24 hodinové inkubaci s nimi, v koncentračním rozsahu od 10 do 125 $\mu\text{mol/L}$ ($p < 0,05$). Byl tedy prokázán negativní vliv těchto látek na viabilitu nádorových buněk.

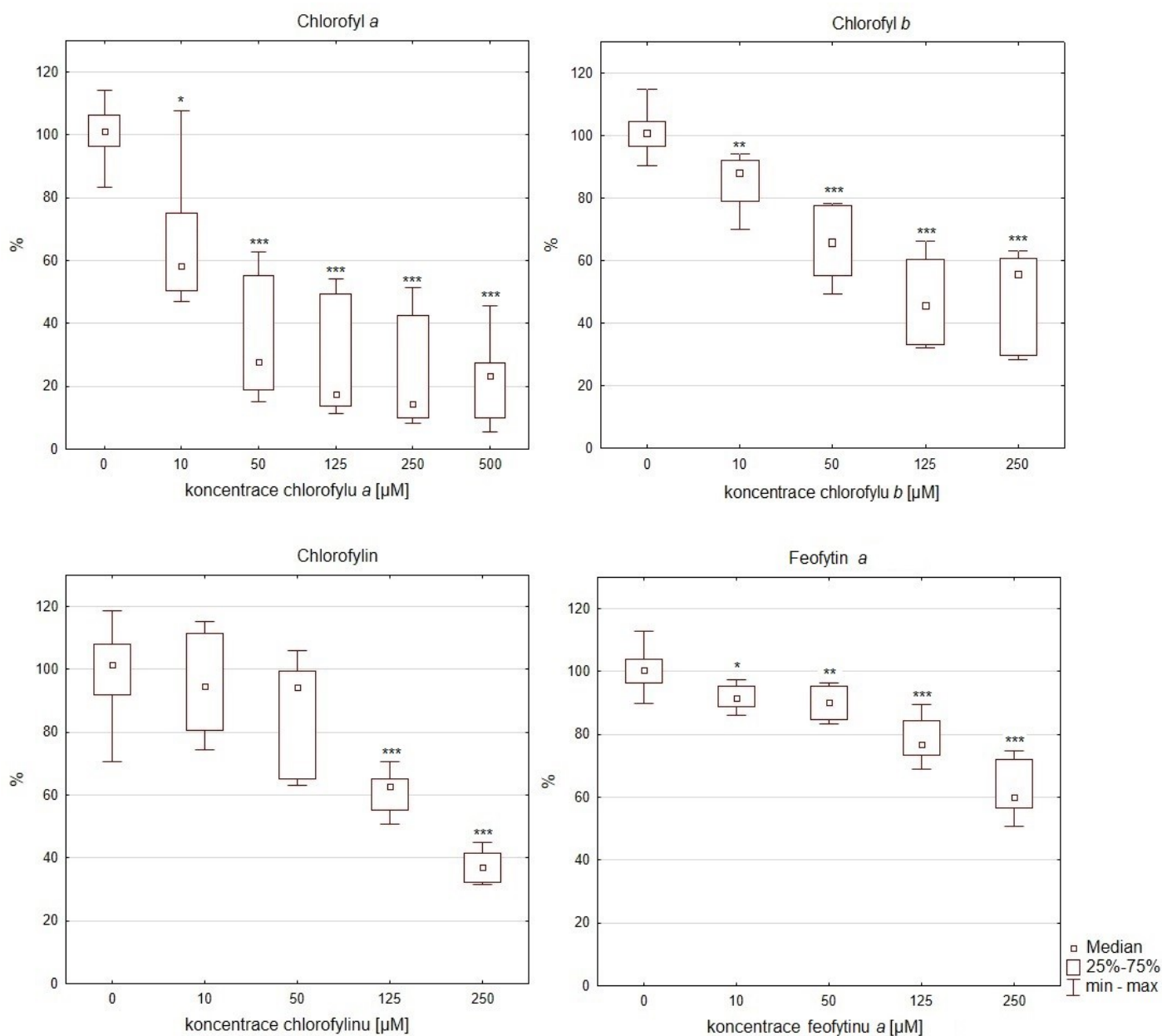
5.2.1.1 Vliv rostlinných tetrapyrolů na viabilitu buněk lidského adenokarcinomu pankreatu

a) Buněčná linie lidského adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902

Hlavní testovanou linií byla buněčná linie lidského adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902. Tyto buňky jsou vysoce diferenciované a nesou aktivační mutaci K-ras genu [181, 182], který je součástí několika biochemických drah, které zprostředkovávají buněčnou odpověď na růstové faktory. Bodové mutace K-ras jsou zodpovědné za setrvání proteinu v aktivní formě a dochází k trvalé signalizaci s nekontrolovatelnou buněčnou proliferací. [183]

Na Obr. 22. je ilustrován vliv chlorofylu *a*, chlorofylu *b*, chlorofylinu a feofytinu *a* na tuto nádorovou linii. Feofytin *a* v testech viability na dalších nádorových liniích již nebyl používán z důvodu velmi omezeného množství, které jsme měli k dispozici. Linie PaTu-8902 se ukázala jako velice citlivá a statisticky významný rozdíl viability oproti kontrole jsme pozorovali již při nejnižší koncentraci terapeutik, tedy 10 $\mu\text{mol/L}$.

Obr. 22. Vliv rostlinných tetrapyrólů na viabilitu buněk lidského adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902

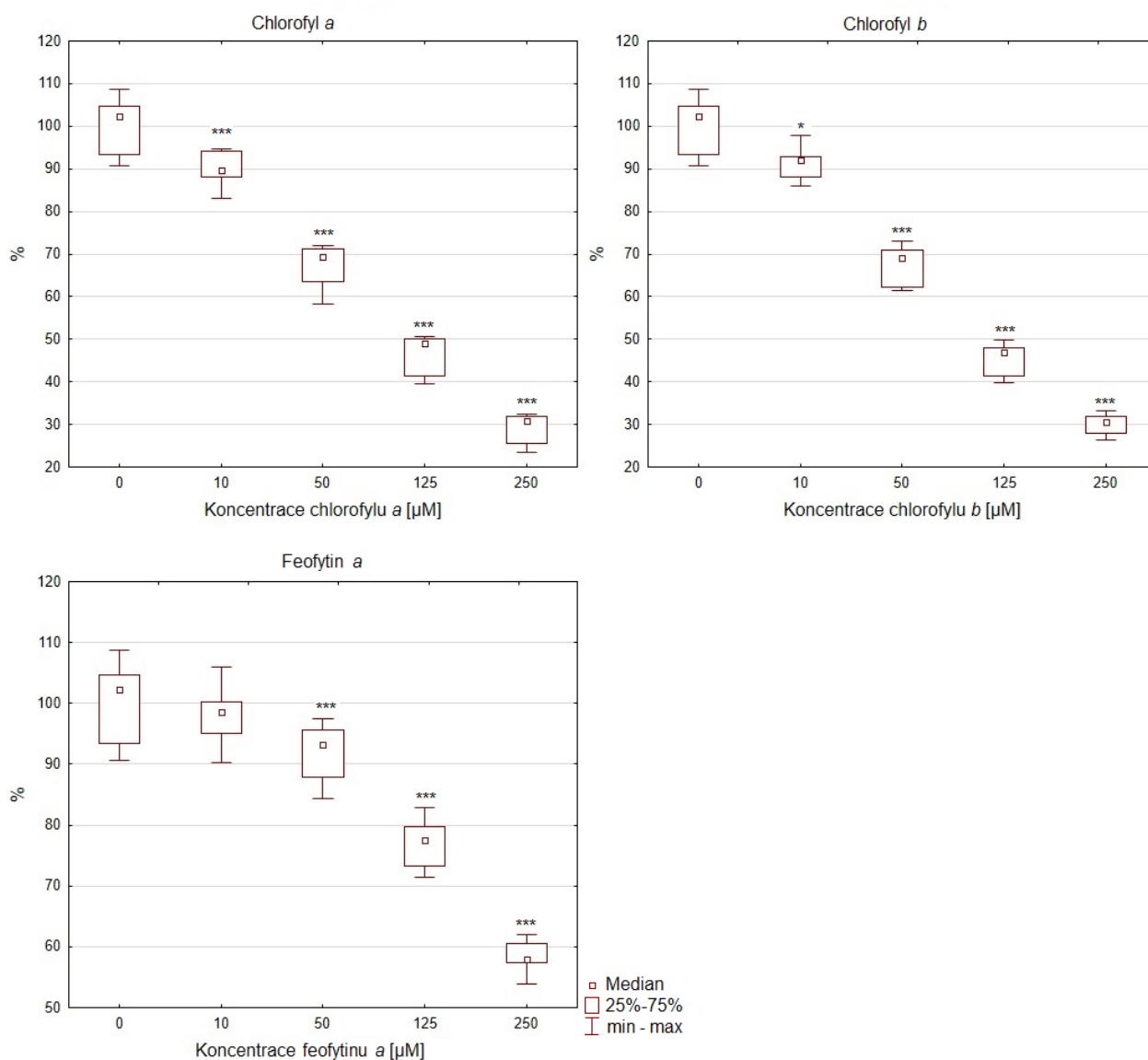


Chlorofyl a: n (kontrolní skupina) = 76, n (ovlivněné) = 23,
 Chlorofyl b: n (kontrolní skupina) = 40, n (ovlivněné) = 11,
 Chlorofylin: n (kontrolní skupina) = 16, n (ovlivněné) = 8,
 Feofytin a: n (kontrolní skupina) = 44, n (ovlivněné) = 12
 * p < 0,05, ** p < 0,005, *** p < 0,001

Testy viability luminiscenčně

Pro ověření výsledků viability buněk pomocí MTT testu bylo provedeno vysoce citlivé luminiscenční stanovení. Na Obr. 23. je výsledek luminiscenčního stanovení pro koncentrační řady chlorofylu *a*, chlorofylu *b* a feofytinu *a*.

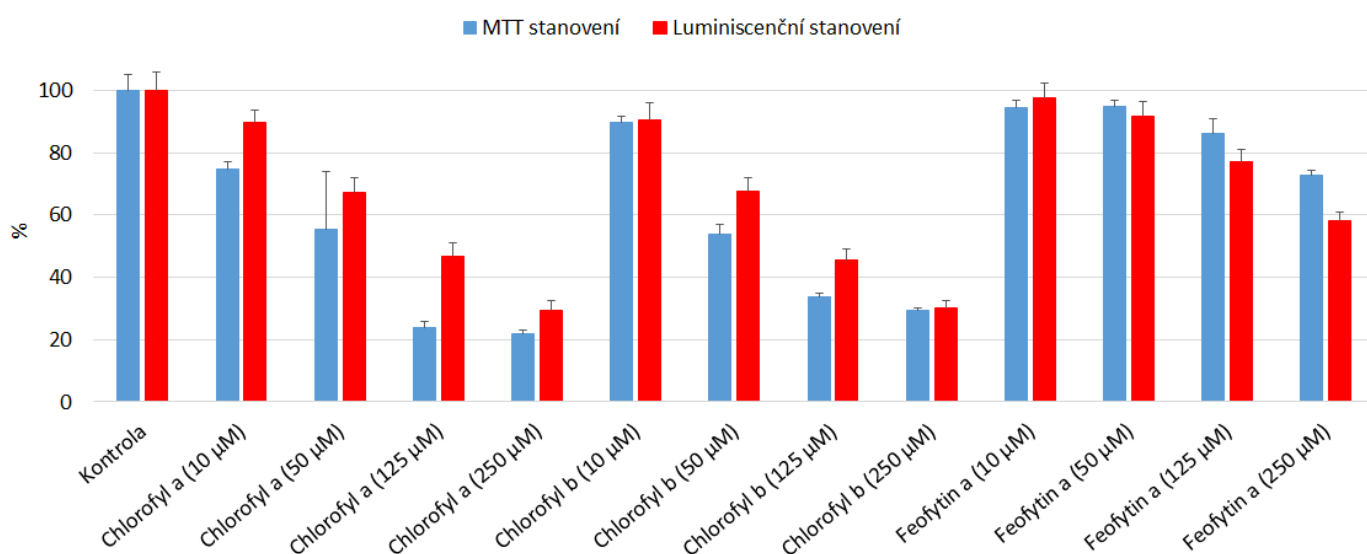
Obr. 23. Luminiscenční stanovení viability buněk adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902 ovlivněných tetrapyroly



Chlorofyl *a*, Chlorofyl *b*, Feofytin *a*, n = 9
* p < 0,05, ** p < 0,005, *** p < 0,001

Hodnoty naměřené luminiscenčně byly porovnány s viabilitou buněk měřenou paralelně pomocí MTT testu ze stejné buněčné pasáže (Obr. 24.).

Obr. 24. Porovnání buněčné viability buněk adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902 měřené luminiscenčně a pomocí MTT testu

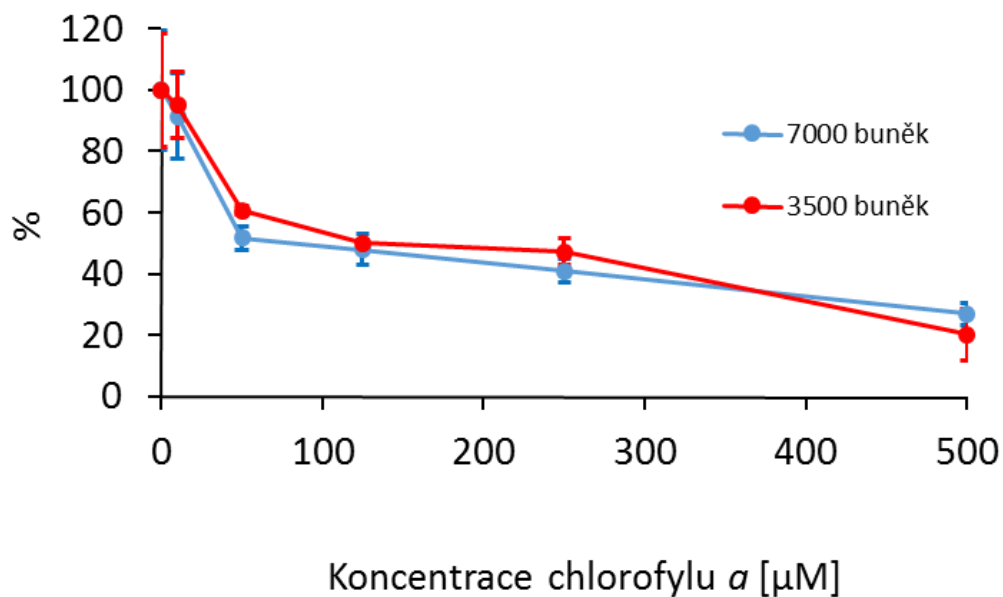


Na základě naměřených výsledků a porovnáním obou způsobů stanovení lze konstatovat, že výsledky z MTT testu odpovídají výsledkům z luminiscenčního stanovení variabilitou výsledků pohybující se v rozmezí 10 - 15 %.

Protinádorový účinek rostlinných tetrapyrrolů v závislosti na konfluenci buněk

Konfluencí buněk na destičce v čase experimentu se v rámci jednotlivých experimentů může v řádu desítek procent lišit. Abychom ověřili, jaký vliv má buněčná konfluencí na protinádorový účinek rostlinných tetrapyrrolů, byl proveden experiment, kdy jsme porovnávali vliv počtu vysazených buněk v kulturační destičce na viabilitu buněk. Buňky byly vysazeny ve dvou koncentracích; 7000 buněk odpovídá konfluenci cca 60% a 3500 buněk konfluenci cca 40%. Vybranou testovanou linií byl adenokarcinom pankreatu PaTu-8902 a působkem byl chlorofyl *a* (Obr. 25.).

Obr. 25. Protinádorový účinek rostlinných tetrapyrrolů v závislosti na konfluenci buněk



Zjistili jsme, že počet vysazených buněk nemá na viabilitu buněk vliv.

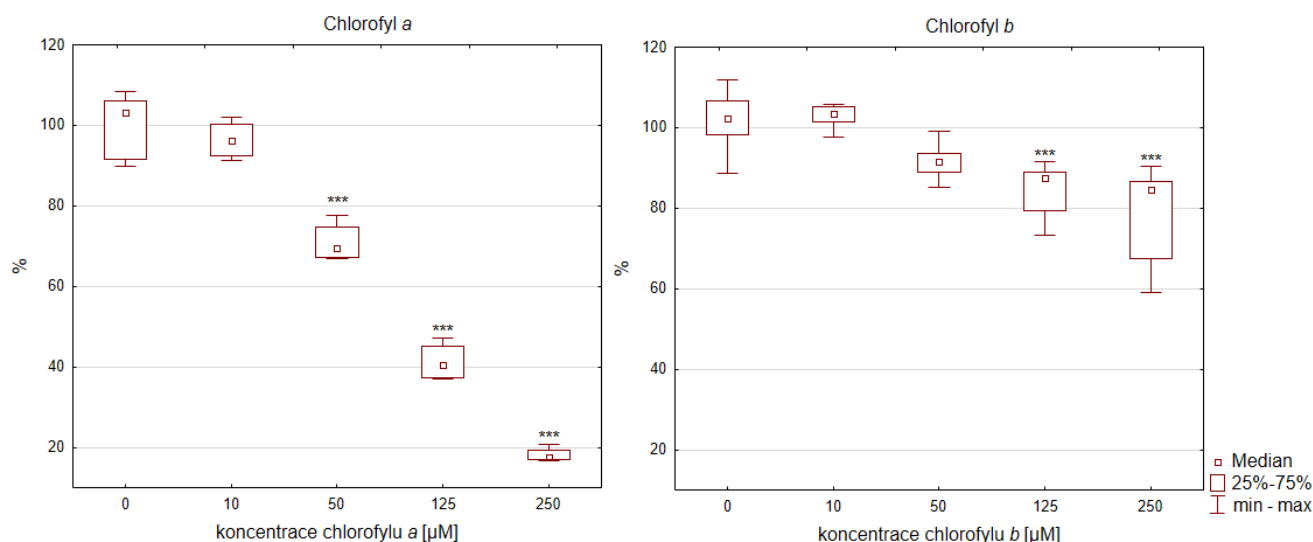
Porovnání protinádorového účinku komerčního a vyizolovaného chlorofylu a

Dále byly provedeny testy viability na buněčné linii lidského adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902 exponované komerčnímu a vyizolovanému chlorofylu *a* za účelem porovnání antiproliferačních účinků obou chlorofylů (data neuvedena). Srovnání bylo provedeno ve dvou různých koncentracích buněk; 7000 buněk/jamku a 3500 buněk/jamku. Doba ovlivnění byla 24 hodin. Při obou buněčných koncentracích nebyl pozorován významnější rozdíl v účinku vyizolovaného a komerčního chlorofylu *a*.

b) Buněčná linie lidského adenokarcinomu pankreatu MiaPaCa-2

Další testovanou linií byly buňky lidského adenokarcinomu pankreatu MiaPaCa-2. MiaPaCa-2 jsou málo diferenciované buňky nesoucí aktivační mutaci K-ras genu. [184] Testovali jsme opět vliv chlorofylu *a*, chlorofylu *b* (Obr. 26.) a chlorofylinu na tuto nádorovou linii. Statisticky významný rozdíl ve viabilitě buněk oproti kontrole jsme pozorovali u chlorofylu *a* při koncentraci od 50 $\mu\text{mol/L}$ ($p < 0,00001$), u chlorofylu *b* od 125 $\mu\text{mol/L}$ ($p < 0,00001$) a u chlorofylinu až při koncentraci 500 $\mu\text{mol/L}$ ($p = 0,002$, data neuvedena).

Obr. 26. Vliv rostlinných tetrapyrólů na viabilitu buněk lidského adenokarcinomu pankreatu MiaPaCa-2

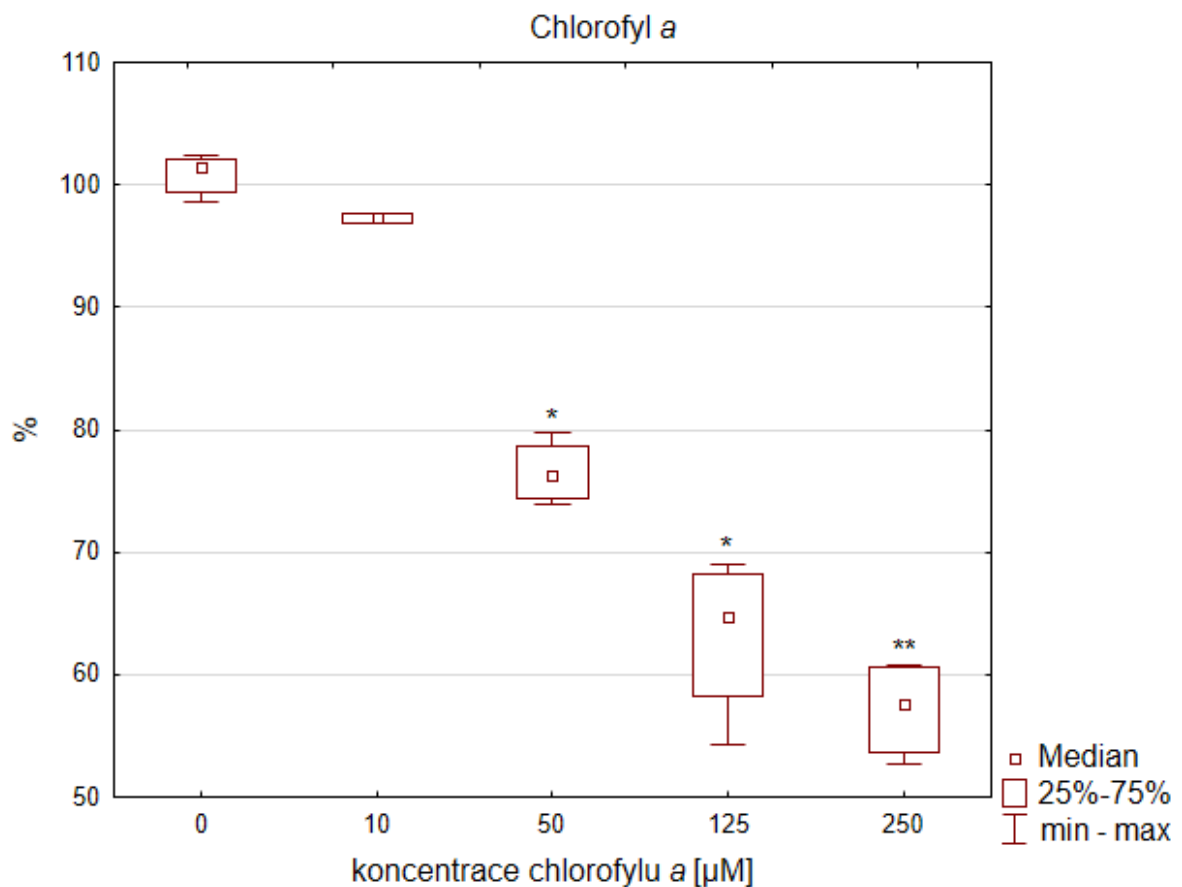


Chlorofyl *a*: n (kontrolní skupina) = 8, n (ovlivněné) = 4,
Chlorofyl *b*: n (kontrolní skupina) = 24, n (ovlivněné) = 12
* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$

c) Buněčná linie lidského adenokarcinomu pankreatu BxPC3

Poslední testovanou linií lidského adenokarcinomu pankreatu byly buňky BxPC3. BxPC3 jsou středně diferenciované nádorové buňky nesoucí bodovou mutaci genu K-ras [185] a mají zvýšenou expresi cyklooxygenázy-2, která je zodpovědná za inhibici apoptózy [186]. Chlorofyl *a* významně působil na buněčnou viabilitu v koncentracích od 50 $\mu\text{mol/L}$ (Obr. 27.), chlorofylin až při koncentraci 500 $\mu\text{mol/L}$ ($p < 0,05$) a u chlorofylu *b* jsme antiproliferační účinky nepozorovali vůbec (data neuvedena).

Obr. 27. Vliv chlorofylu *a* na viabilitu buněk lidského adenokarcinomu pankreatu BxPC3

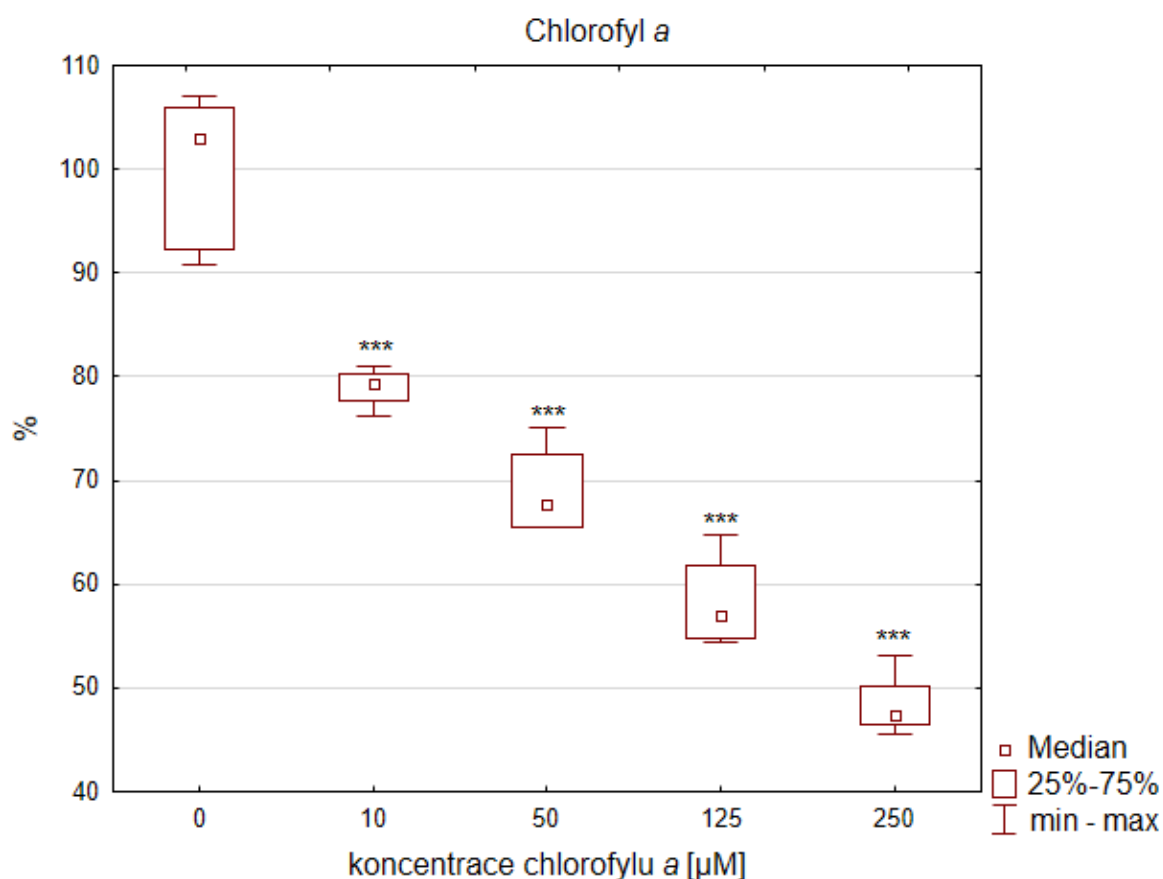


Chlorofyl *a*: n (kontrolní skupina) = 8, n (ovlivněné) = 4
* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$

5.2.1.2 Vliv rostlinných tetrapyrólů na viabilitu buněk lidského karcinomu prostaty

Další studovanou linií byly buňky karcinomu prostaty PC3, neboť nás zajímalo, zdali chlorofyly působí antiproliferačně i na jiné typy nádorů. PC3 buňky se vyznačují pozitivitou neuroendokrinních markerů, markeru pro nádorové kmenové buňky CD44 a jejich proliferace je závislá na androgenu. [187] Tato linie vykazovala velkou citlivost na chlorofyl *a*, kdy k významnému rozdílu viability buněk docházelo již od koncentrace 10 $\mu\text{mol/L}$ (Obr. 28.), zatímco u chlorofylu *b* změna viability buněk zaznamenána nebyla a u chlorofylinu až u koncentrace 125 $\mu\text{mol/L}$ ($p < 0,05$) a 250 $\mu\text{mol/L}$ ($p = 0,001$), (data neuvedena).

Obr. 28. Vliv chlorofylu *a* na viabilitu buněk lidského karcinomu prostaty PC3

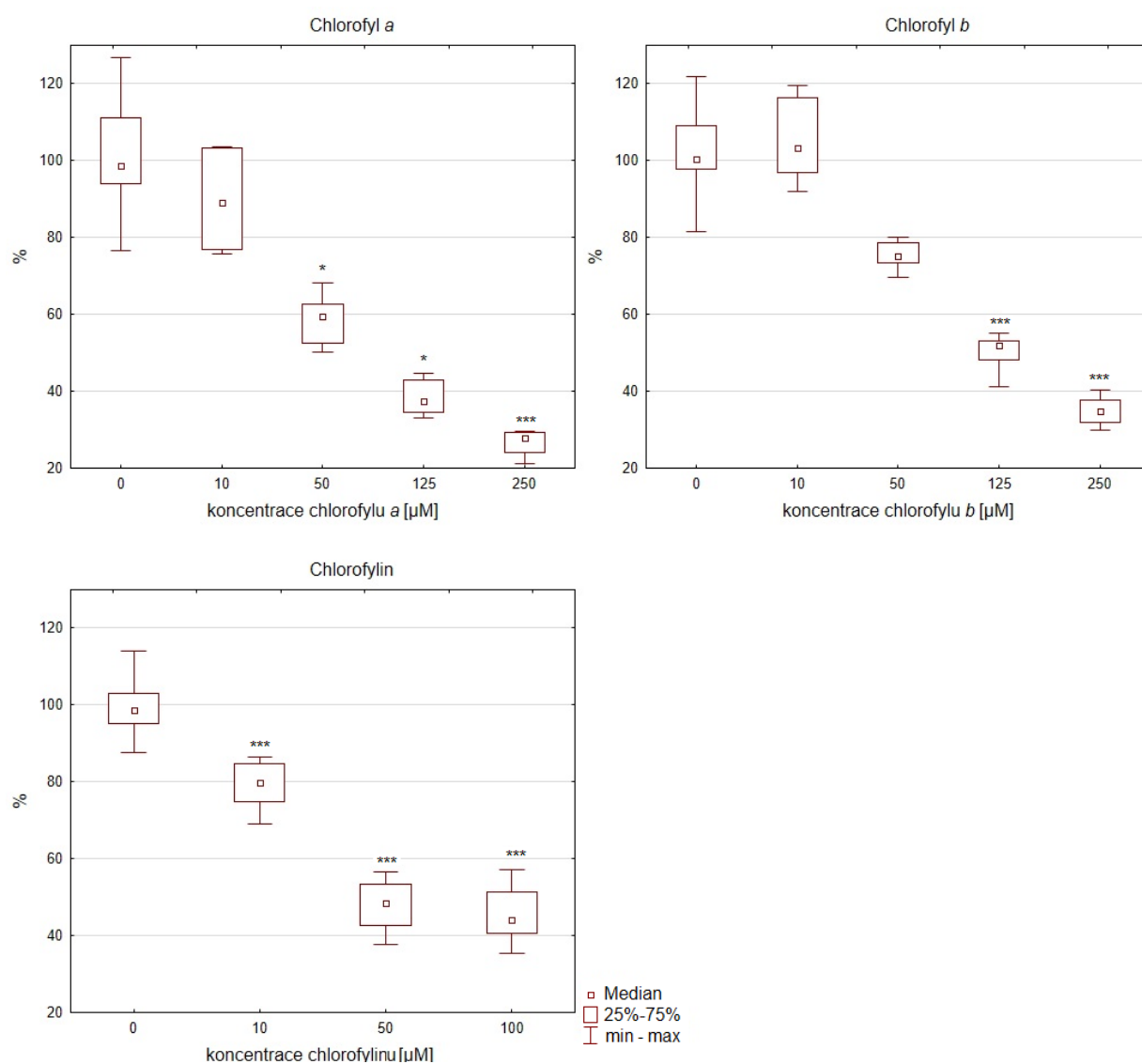


Chlorofyl *a*: n (kontrolní skupina) = 8, n (ovlivněné) = 4
* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$

5.2.1.3 Vliv rostlinných tetrapyrrolů na viabilitu endoteliálních buněk

Poslední testovanou linií byly immortalizované endoteliální buňky EA.hy926. Tato kontinuálně se replikující buněčná linie uchovává charakteristiky endoteliálních buněk z umbilikální žíly s aktivním endotelin-konvertujícím enzymem, který se podílí na proteolytickém štěpení endotelinu na biologicky aktivní peptidy. [188] U této buněčné linie jsme pozorovali největší snížení buněčné viability po ovlivnění buněk chlorofylinem (Obr. 29.).

Obr. 29. Vliv rostlinných tetrapyrrolů na viabilitu endoteliálních buněk EA.hy926



Chlorofyl a: n (kontrolní skupina) = 25, n (ovlivněné) = 8,
Chlorofyl b: n (kontrolní skupina) = 16, n (ovlivněné) = 8,
Chlorofylin: n (kontrolní skupina) = 56, n (ovlivněné) = 13
* p < 0,05, ** p < 0,005, *** p < 0,001

Nejcitlivější buněčnou linií ke zkoumaným rostlinným tetrapyrólům byly buňky adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902. Z tohoto důvodu jsme tuto buněčnou linii zvolili jako nejvhodnější pro další detailní analýzy biologických účinků zkoumaných pigmentů.

Závěr

Byl proveden screening účinku tetrapyrólů na viabilitu nádorových buněk lidského adenokarcinomu pankreatu, karcinomu prostaty a na endoteliálních buňkách. Cílem těchto experimentů bylo posouzení antiproliferačních účinků zkoumaných látek a také výběr nejvhodnější buněčné linie pro následující experimenty. Jako působek s největším účinkem na buněčnou viabilitu, při nejnižších koncentracích, se ukázal chlorofyl *a* a to i v případech, kdy ostatní tetrapyroly neměly na buněčnou viabilitu žádný vliv nebo byl patrný až při vyšších koncentracích. Buněčná linie PaTu-8902 byla nejcitlivější k tetrapyrolovým působkům a proto byla vybrána pro práci v dalších experimentech (viz Tab. 5.).

Tab. 5. Souhrn působení tetrapyrrolů na jednotlivé buněčné linie

Zhodnocení statisticky významného rozdílu buněčné viability v porovnání s kontrolní skupinou. Buněčná viabilita je vyjádřena v % oproti kontrolním buňkám. Zvýrazněné hodnoty představují signifikantní rozdíly oproti kontrolním buňkám; NT, netestováno.

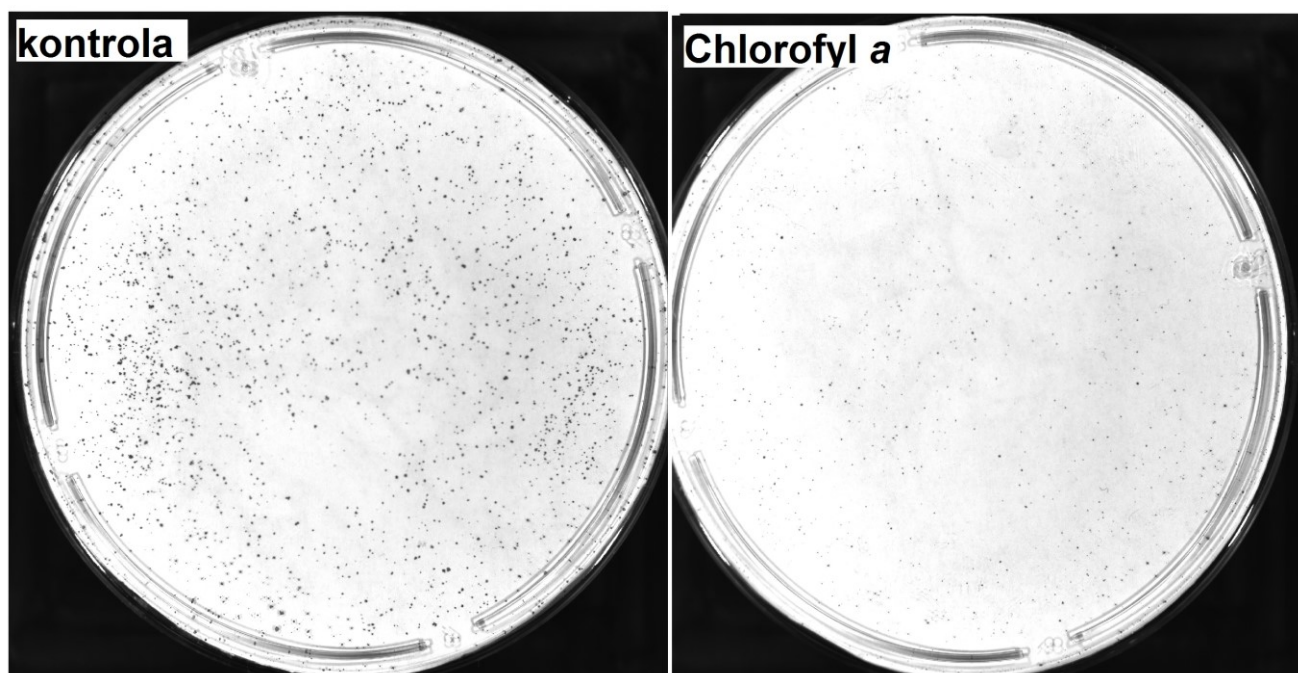
Buněčná linie	Koncentrace [μM]	Chlorofyl a	Chlorofyl b	Chlorofylin	Feofytin a
PaTu-8902	10	48,8	87,8	94,8	91,6
	50	18,6	65,6	94,2	90,2
	125	13,1	45,8	62,9	76,7
MiaPaCa-2	10	96,2	103,4	116,5	NT
	50	69,6	91,4	117,1	NT
	125	40,3	87,6	110,3	NT
BxPC-3	10	97,3	107,2	104,9	NT
	50	76,3	54,5	98,4	NT
	125	64,8	75,7	84,5	NT
PC3	10	79,0	115,2	89,3	NT
	50	69,0	59,3	95,6	NT
	125	58,3	69,5	81,3	NT
EA.hy926	10	89,8	105,7	75,0	NT
	50	58,4	75,6	48,4	NT
	125	38,4	50,3	NT	NT

5.2.1.4 Vliv chlorofylu *a* na tvorbu buněčných populací

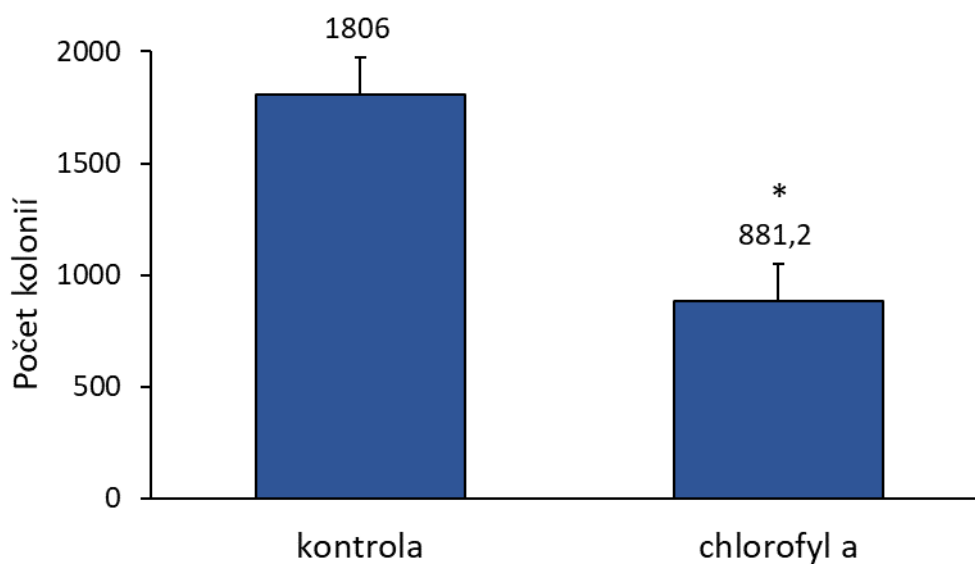
a) Klonogenní analýza

Klonogenní analýza byla použita pro studium účinku chlorofylu *a* na schopnost tvorby buněčných kolonií a proliferace buněk lidského adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902. Jedná se o jinou variantu testu proliferace buněk, při níž lze posuzovat potenciální účinky zkoumaných látek na iniciaci nádorového růstu. Klonogenní analýza je založena na posouzení působení experimentálních terapeutik na individuální vyšetě buňky, které jsou tak náchylnější k okolním vlivům. Pokud jednotlivé buňky vystavení působku přežijí, vyrostou z nich kolonie, které jsou na konci 7-denního experimentu obarveny, vyfotografovány a spočítány. Vliv chlorofylu *a* na počet vzrostlých kolonií je uveden na Obr. 30. a) a b).

Obr. 30. a) Vliv chlorofylu *a* na počet vzrostlých buněčných kolonií



b) Grafické vyjádření vlivu chlorofylu *a* na počet vzrostlých buněčných kolonií



c (chlorofyl *a*) = 125 $\mu\text{mol/L}$, čas ovlivnění t = 7 dní
n = 5, * p < 0,01

Byla vypočtena účinnost výsadby buněk (Planting efficiency factor P.E. = (počet kolonií/počet vyšetých buněk)*100), která říká, z kolika procent vyšetých buněk vyrostly kolonie. Dále byl vypočten faktor přežití (Surviving factor S.F. = (počet kolonií léčených/počet vyšetých buněk*P.E.)*100) který říká, z kolika procent léčené kolonie přežily oproti kontrolní skupině viz Tab. 6.

Tab. 6. Vliv chlorofylu *a* na počty kolonií buněk lidského adenokarcinomu PaTu-8902, účinnost výsadby buněk (P.E.) a faktor přežití (S.F.) po 7 denní inkubaci

	Průměrný počet kolonií	P.E.	S.F.
Kontrola	1806 ± 169	30,1 ± 2,8 %	100,0 ± 9,3 %
Chlorofyl <i>a</i>	881 ± 137*	14,7 ± 2,3%	48,8 ± 7,6 %

c (chlorofyl *a*) = 125 μmol/L, čas ovlivnění t = 7 dní, n = 5

* p < 0,01

Závěr

Chlorofyl výrazně omezuje schopnost zkoumaných buněk lidského adenokarcinomu pankreatu růst a proliferovat. Na miskách exponovaných chlorofylu *a* se uchytilo o polovinu méně kolonií oproti kontrolním buňkám; na místo účinnosti výsadby 30% byla účinnost jen 15%. Z již uchycených kolonií jich přežije o více než 50% méně, pokud jsou léčeny chlorofylem *a* oproti kontrolní skupině.

b) Vliv chlorofylu *a* na počet buněk lidského adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902 po 7-denní inkubaci

Vedle klonogenního stanovení, kde byly buňky vysety ve velice malé koncentraci (6000 buněk/10 cm misku), byl proveden další 7-denní test, kde byly buňky vysety ve větší koncentraci (180000 buněk/10 cm misku) a byl stanoven jejich počet. Koncentrace chlorofylu *a* byla stejná, jako u klonogenního stanovení, tedy 125 $\mu\text{mol/L}$. Počet buněk se snížil na cca 64 % oproti kontrolním buňkám (viz Tab. 7.). Výsledky korelují s klonogenním stanovením, kde byly léčené kolonie redukovány na 49% oproti kontrolní skupině. Dle předpokladu, pokud buňka není obklopena ostatními buňkami, je náchylnější na přidané působky a má sníženou šanci přežít.

Tab. 7. Vliv chlorofylu *a* na počet buněk po 7-denní inkubaci

	Počet buněk ($\cdot 10^5$)	%
Kontrola	$8,3 \pm 1,1$	$100,0 \pm 12,9 \%$
Chlorofyl <i>a</i>	$5,4 \pm 0,8^*$	$64,4 \pm 9,7 \%^*$

c (chlorofyl *a*) = 125 $\mu\text{mol/L}$, čas ovlivnění $t = 7$ dní, $n = 6$

* $p < 0,01$

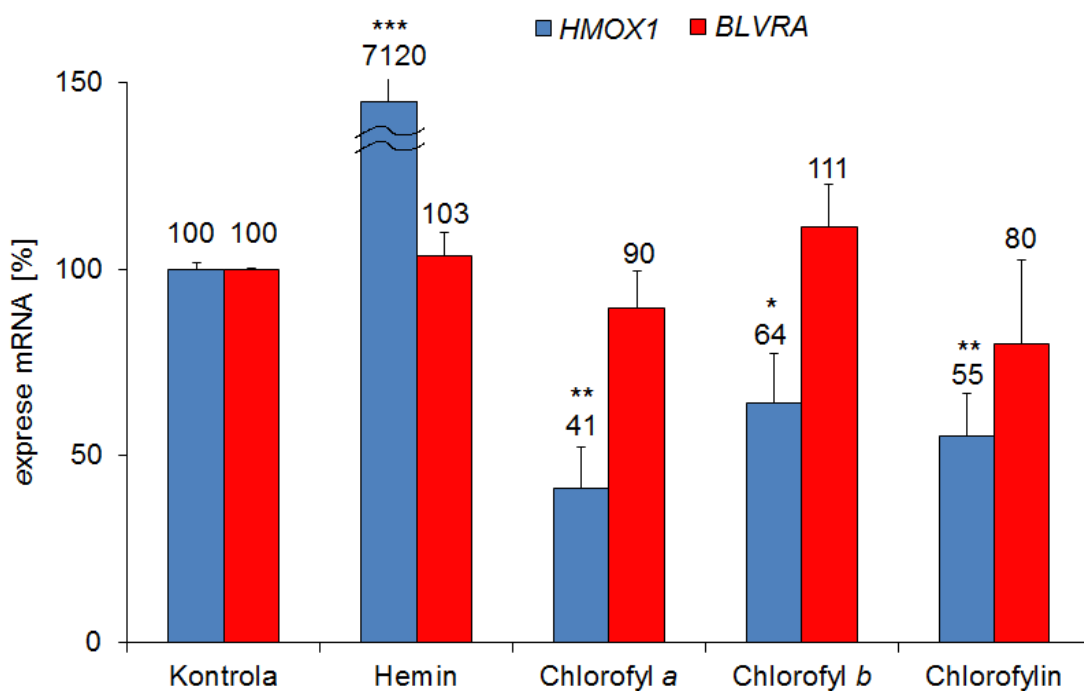
5.2.2 Vliv rostlinných tetrapyrólů na expresi *HMOX1* a *BLVRA* mRNA buněk adenokarcinomu pankreatu

Vzhledem ke strukturální podobnosti (detailně diskutované výše) chlorofylu, hemu a lineárních tetrapyrólů bilirubinu a biliverdinu nás zajímalo, zdali všechny studované tetrapyroly mohou ovlivnit expresi i aktivitu klíčových genů katabolismu hemu, obzvláště při vědomí kontroverzních dat týkajících se vlivu HMOX na kancerogenezi publikovaných v literatuře. [189] Jak již bylo zmíněno, HMOX1 je klíčovým enzymem v katabolismu hemu a hraje klíčovou roli v obraně před oxidačním stresem. Zvýšená aktivita HMOX1 zvyšuje odolnost zdravých buněk vůči apoptóze. K její aktivaci dochází vlivem faktorů vyvolávající oxidační stres, např. hemem, působením ROS atd. Její protektivní účinky jsou zprostředkovány skrze produkované žlučové pigmenty bilirubin a biliverdin, které mají velmi silné antioxidační [7] a další biologické vlastnosti [8].

Byl tedy posuzován vliv chlorofylů na expresi *HMOX1* a *BLVRA* mRNA. Mezi testované látky patřil chlorofyl *a*, *b*, chlorofylin a hemin, který sloužil jako pozitivní kontrola exprese *HMOX1* mRNA. Testovanou buněčnou linií byly opět buňky lidského adenokarcinomu pankreatu PaTu-

8902. U působků byly zvoleny nejnižší možné koncentrace tetrapyrólů, které signifikantně ovlivňovaly viabilitu PaTu-8902 buněk. Výsledky ukazují ve většině případů na pokles exprese *HMOX1* mRNA, avšak neměly vliv na expresi *BLVRA* mRNA (Obr. 31.).

Obr. 31. Vliv tetrapyrólů na expresi *HMOX1* a *BLVRA* mRNA PaTu-8902 buněk



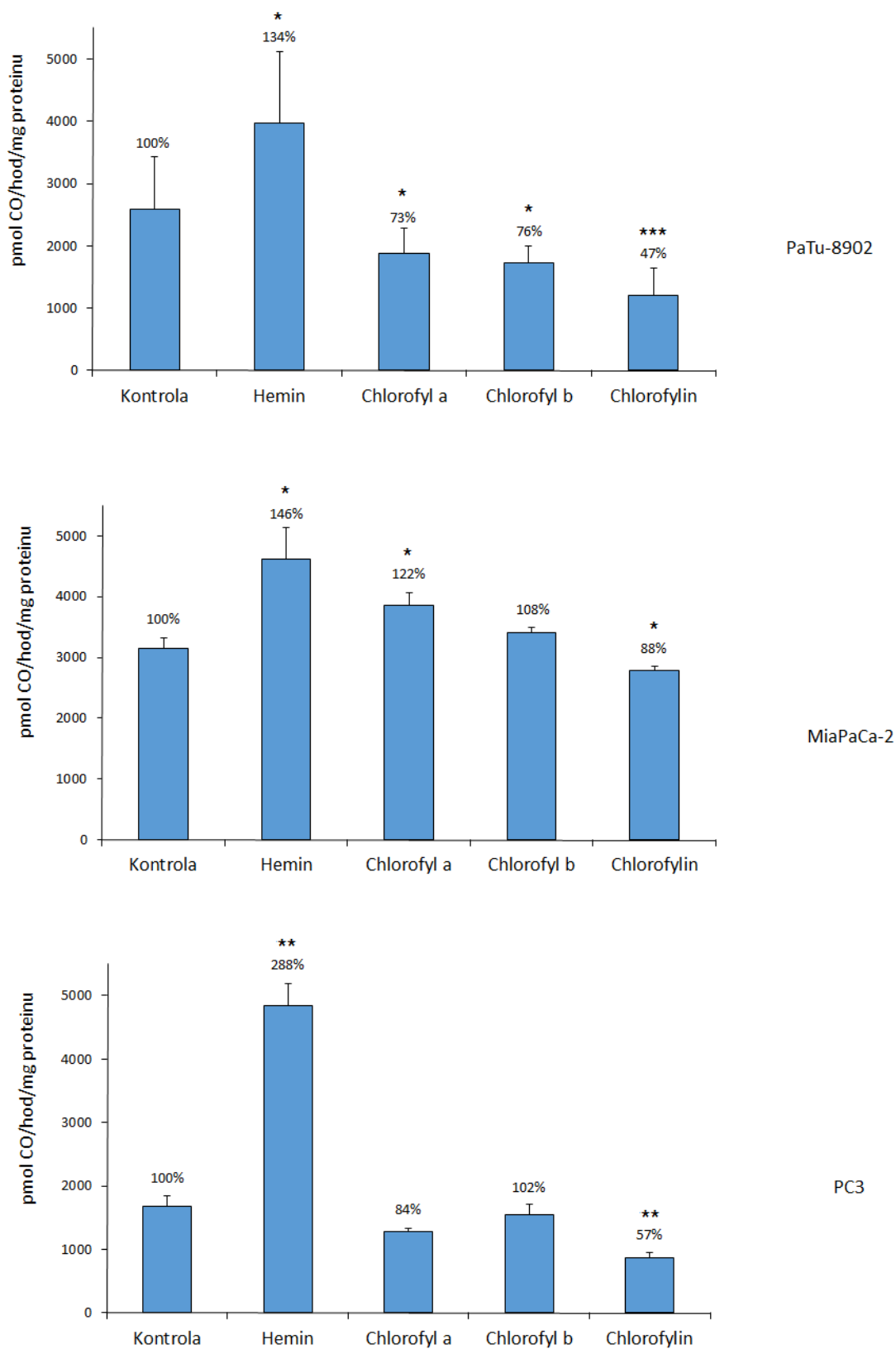
Hemin 30 $\mu\text{mol/L}$, chlorofyl *a* 10 $\mu\text{mol/L}$, chlorofyl *b* 10 $\mu\text{mol/L}$, chlorofylin 30 $\mu\text{mol/L}$, $n = 8$

* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$

5.2.3 Vliv rostlinných tetrapyrólů na aktivitu HMOX buněk adenokarcinomu pankreatu

Dalším bodem zájmu bylo zjistit, zdali studované rostlinné tetrapyroly ovlivňují aktivitu HMOX, popřípadě, zdali vykazují stejné protektivní účinky jako zmiňované žlučové pigmenty. Jako pozitivní kontrola byl opět použitý hemin, který indukuje aktivitu HMOX1. Testovanými působky byl chlorofyl *a*, chlorofyl *b* a chlorofylin, u nichž jsme opět volili nejnižší možnou koncentraci, při které jsme pozorovali signifikantní změnu viability nádorových buněk. Vliv chlorofylů na aktivitu HMOX1 buněk adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902, MiaPaCa-2 a adenokarcinomu prostaty PC3 je uveden na Obr. 32.

Obr. 32. Vliv tetrapyrrolů na aktivitu HMOX nádorových buněk



Hemin 30 $\mu\text{mol/L}$, chlorofyl *a* 10 $\mu\text{mol/L}$, chlorofyl *b* 10 $\mu\text{mol/L}$, chlorofylin 30 $\mu\text{mol/L}$
 * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$

Závěr

U buněk adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902 ovlivněných studovanými tetrapyroly, docházelo ke snížení exprese mRNA i aktivity HMOX. K tomuto snížení docházelo již při relativně malých koncentracích těchto tetrapyrólů. U nádorových linií MiaPaCa-2 a PC3 došlo k signifikantnímu snížení aktivity HMOX pouze při ovlivnění chlorofylinem. Snížení aktivity HMOX u nádorových buněk se může spolupodílet na zpomalení buněčného růstu a protinádorovém účinku. Vliv zkoumaných rostlinných tetrapyrólů na expresi *BLVRA* nebyl prokázán.

5.2.4 Vliv rostlinných tetrapyrólů na mitochondriální membránový potenciál (MMP) buněk lidského hepatoblastomu

Jedním z cílů této práce bylo prozkoumat vliv studovaných tetrapyrólů na redoxní prostředí buňky a zda chlorofyly zasahují i do metabolismu mitochondrií. Mitochondriální membránový potenciál (MMP) slouží jako důležitý indikátor při ověřování správné funkce mitochondrií. Pouze funkční mitochondrie vykazují membránový potenciál a pouze živé buňky mají funkční mitochondrie. Vliv rostlinných tetrapyrólů (konkrétně chlorofylinu a extraktu ze sinice *S. platensis*, obsahující značné množství chlorofylu *a* i chlorofylinu) na MMP byl zkoumán na buněčné linii lidského hepatoblastomu HepG2 (viz metodika) a u všech působků bylo pozorované významné snížení MMP těchto nádorových buněk (data neuvedena). Tento pilotní experiment prokázal, že tyto působky skutečně významně zasahují do funkce mitochondrií a v současné době je MMP předmětem bližšího zkoumání na našem pracovišti.

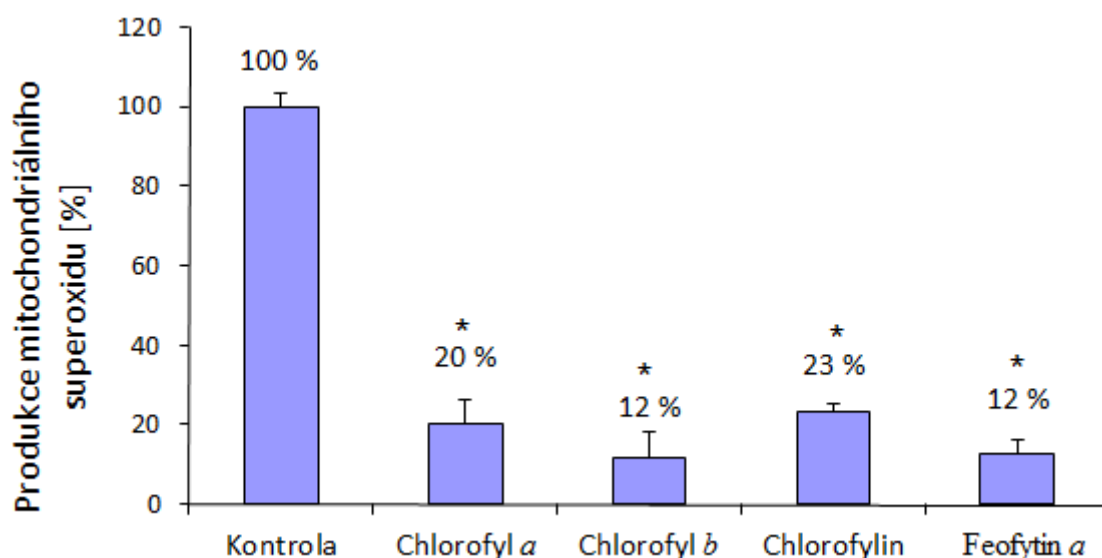
5.2.5 Vliv rostlinných tetrapyrólů na mitochondriální produkci superoxidu buňkami adenokarcinomu pankreatu

Na základě zjištění, že tetrapyroly snižují mitochondriální membránový potenciál a zasahují tak do metabolismu mitochondrií, zaměřili jsme se na procesy, které v těchto organelách probíhají. Mitochondrie jsou producenty mitochondriálního superoxidu, který se vytváří jako vedlejší produkt při oxidativní fosforylaci v respiračním řetězci. Pokud je převážena rovnováha mezi tvorbou a odklizením této molekuly směrem k větší produkci superoxidu, pak tento superoxid přispívá k oxidačnímu stresu buněk a může působit buněčné poškození, která vedou k buněčné proliferaci. Nádorové buňky jsou charakteristické zvýšenou generací ROS, které potřebují

zejména pro aktivaci růstových faktorů a udržování angiogeneze. [131] V pokročilých stádiích nádorů buňky často vykazují mnoho genetických změn a vysoký oxidační stres, což naznačuje, že by bylo možné tyto buňky eliminovat snížením superoxidové produkce. [190]

Všechny chlorofyly velice významně snižovaly produkci superoxidu mitochondriemi a to již při relativně malých koncentracích všech působků (10 $\mu\text{mol/L}$) viz Obr. 33.

Obr. 33. Vliv tetrapyrolů na mitochondriální produkci superoxidu buněk adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902



Procentuální vyjádření poměrů směrnice křivek nárůstu fluorescence měřených s přidavkem rotenonu a bez něj; vztaženo na kontrolní skupinu

Koncentrace chlorofylu *a*, chlorofylu *b*, chlorofylinu a feofytinu *a* = 10 $\mu\text{mol/L}$, $n = 4$, * $p < 0,001$

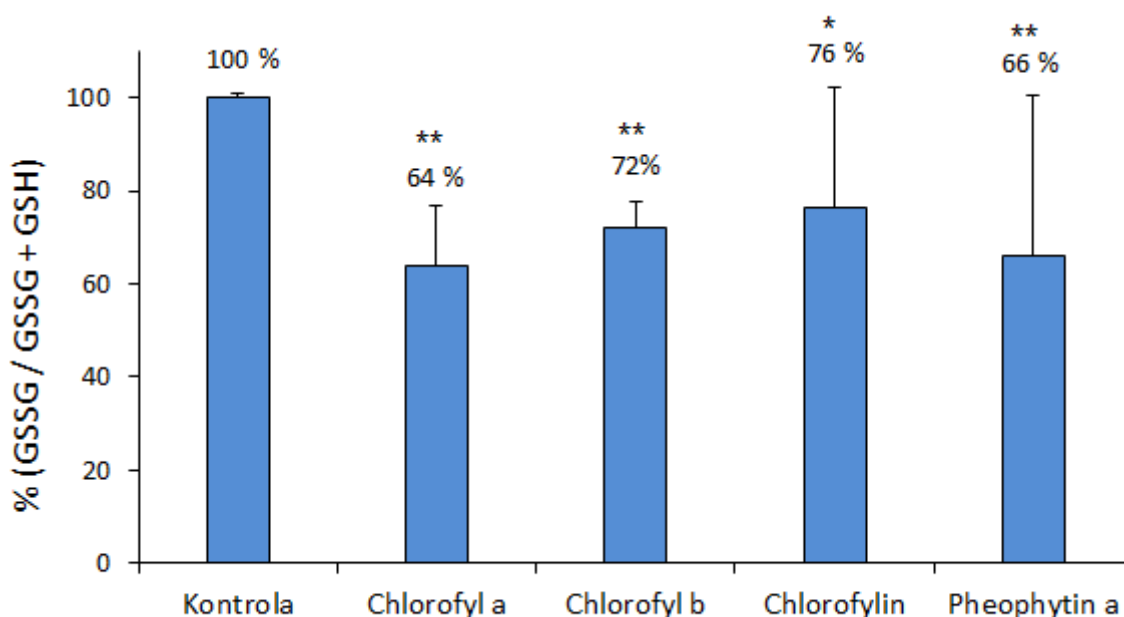
5.2.6 Vliv rostlinných tetrapyrolů na redoxní stav glutathionu buněk adenokarcinomu pankreatu

Buňka disponuje celou řadou ochranných systémů, kterými se brání před působením ROS a vznikem oxidačního stresu. Jedním z takových mechanismů je redukce ROS glutathionem (GSH), který se sám oxiduje. Proto byl sledován také poměr redukováného a oxidovaného glutathionu (GSH/GSSG) nádorových buněk léčených studovanými rostlinnými tetrapyrolly. Testovanými terapiemi byly chlorofyl *a*, chlorofyl *b*, feofytin *a* a chlorofylin v koncentracích 10 $\mu\text{mol/L}$. Pro ověření stálosti vzorků byl změřen poměr GSH/GSSG v čerstvě připravených vzorcích a ve vzorcích 4 týdny skladovaných v tekutém dusíku, přičemž byly použity všechny působky

(chlorofyl *a*, chlorofyl *b*, chlorofylin a feofytin *a*). Z výsledků vyplynulo, že 4-týdenní skladování vzorků nemělo na výsledné hodnoty vliv.

U buněk léčených chlorofyly jsme pozorovali zvýšené množství redukovaného glutathionu (GSH) (Obr. 34.).

Obr. 34. Vliv tetrapyrolů na redoxní stav glutathionu buněk adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902



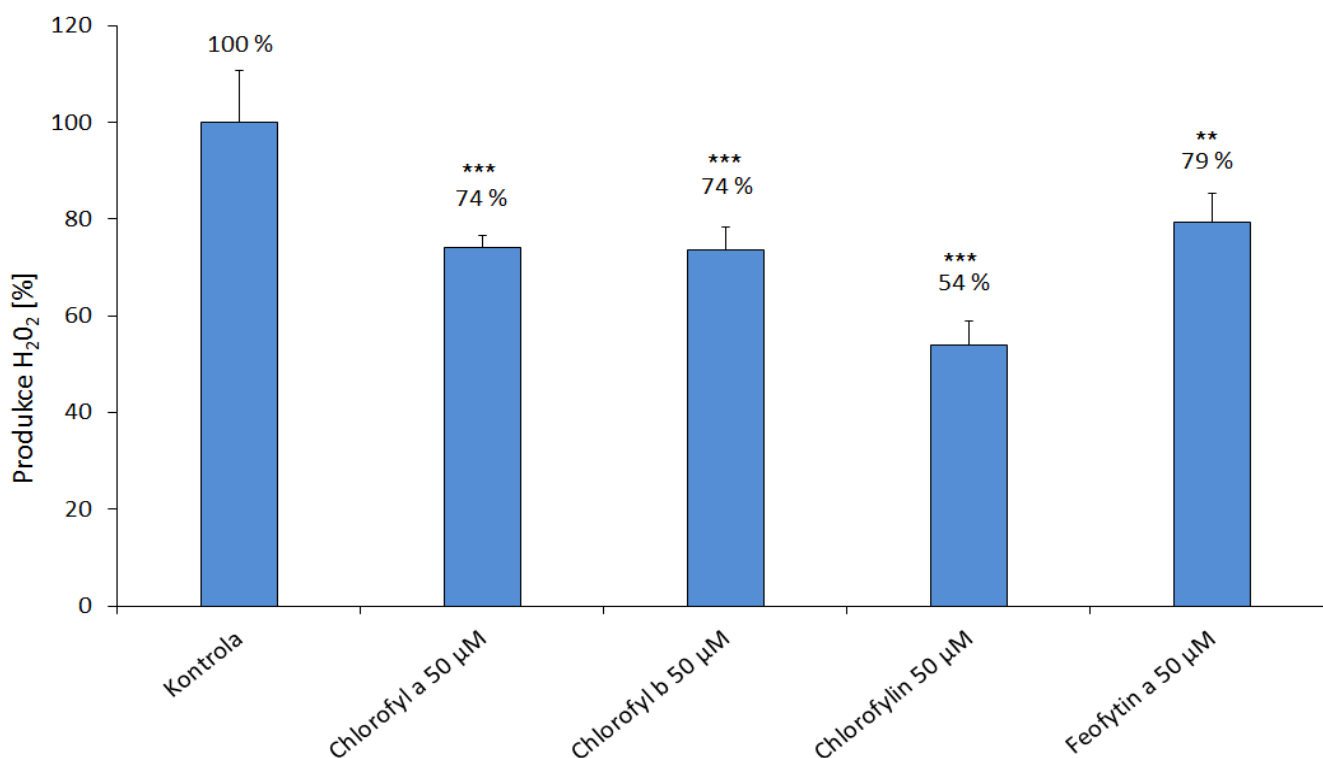
Chlorofyl *a* 10 $\mu\text{mol/L}$, chlorofyl *b* 10 $\mu\text{mol/L}$, chlorofylin 30 $\mu\text{mol/L}$, feofytin *a* 10 $\mu\text{mol/L}$, $n = 5$

* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$

5.2.7 Vliv tetrapyrolů na produkci H_2O_2 buněk adenokarcinomu pankreatu

Koncentrace peroxidu vodíku produkované do vnějšího prostředí buňky odpovídají i jejímu intracelulárnímu prostředí a ukazují míru zatížení buňky ROS. Zkoumali jsme, jak chlorofyly ovlivní produkci peroxidu vodíku PaTu-8902 buněk. Pro následující experimenty jsme zvolili dvě koncentrace působků 10 $\mu\text{mol/L}$ a 50 $\mu\text{mol/L}$. Zatímco u koncentrace 10 $\mu\text{mol/L}$ jsme nepozorovali významný rozdíl produkce peroxidu oproti kontrole (data neuvedena), při vyšší koncentraci 50 $\mu\text{mol/L}$ jsme pozorovali signifikantní pokles produkce u všech zkoumaných tetrapyrolů (Obr. 35.).

Obr. 35. Vliv tetrapyrolů na produkci H₂O₂ buněk adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902



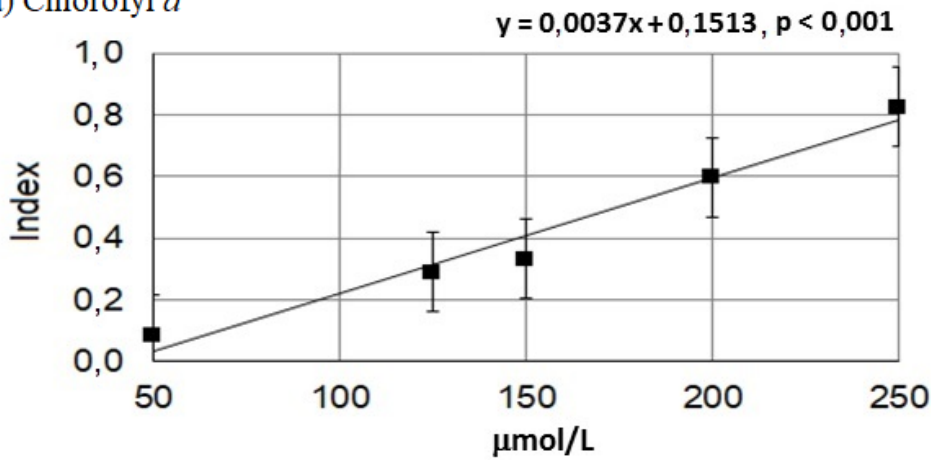
Koncentrace chlorofylu *a*, chlorofylu *b*, chlorofylinu a feofytinu *a* = 50 µmol/L, n = 3, ** p < 0,005, *** p < 0,001

5.2.8 Vliv rostlinných tetrapyrolů na celkovou antioxidační kapacitu

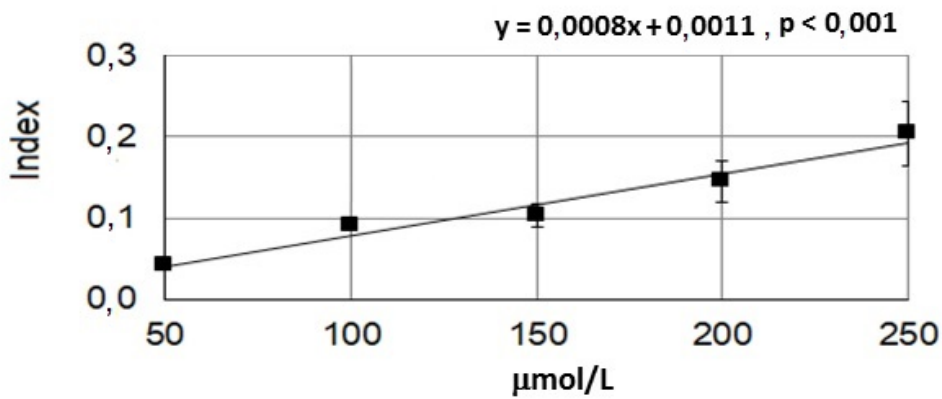
Předchozími experimenty jsme zjistili, že studované tetrapyroly významně zasahují do redoxního prostředí buněk adenokarcinomu pankreatu. Zajímalo nás dále, zdali rostlinné tetrapyroly ovlivňují celkovou antioxidační kapacitu jak v podmínkách *in vitro* tak *in vivo*. Testovanými roztoky byl chlorofyl *a*, chlorofyl *b* a chlorofylin v koncentračním rozmezí 10 až 300 µmol/L. U některých tetrapyrolů byly nižší koncentrace neměřitelné, resp. míra zhášení radikálů byla pod mezí detekce (data neuvedena). Se zvyšující se koncentrací tetrapyrolů rostla celková antioxidační kapacita roztoků, přičemž jako nejúčinnější antioxidant se ukázal chlorofylin, následně chlorofyl *a* a nejnižší antioxidační kapacitu měl roztok chlorofylu *b* (Obr. 36.), nicméně vliv na celkovou antioxidační kapacitu byl obecně pozorován až při relativně vysokých koncentracích.

Obr. 36. Vliv rostlinných tetrapyrrolů na celkovou antioxidační kapacitu

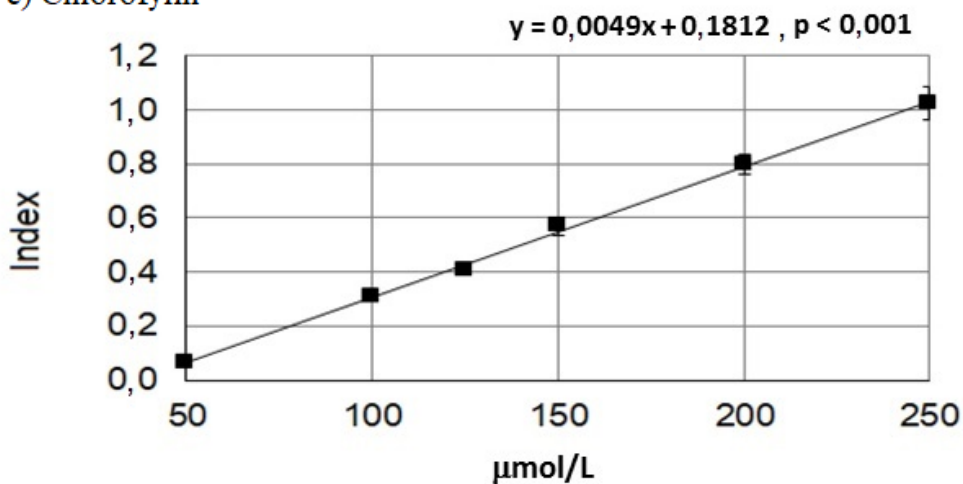
a) Chlorofyl *a*



b) Chlorofyl *b*



c) Chlorofylin



Chlorofyl *a*, chlorofyl *b*, chlorofylin ($c = 50 - 250 \mu\text{mol/L}$),

$n = 5$

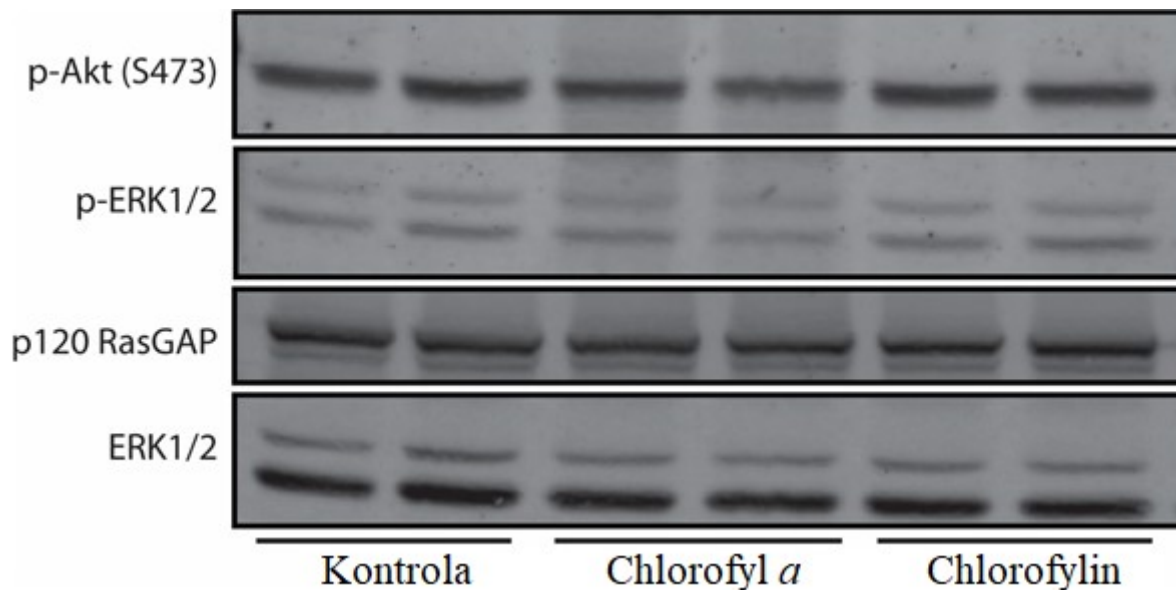
5.3 ÚČINEK ROSTLINNÝCH TETRAPHYROLŮ NA REDUKTIVNÍ KARBOXYLACI A GLUTAMINOLÝZU BUNĚK ADENOKARCINOMU PANKREATU

Kvůli inhibičním účinkům chlorofylů na produkci mitochondriálních ROS, jsme se zajímali o to, zda chlorofyly mohou modulovat mitochondriální glutaminolýzu a redukční karboxylaci, které přispívají k mitochondriální antioxidační ochraně [174, 191]. V této studii nevedla expozice buněk adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902 chlorofylem *a*, chlorofylem *b*, feofytinem *a* a ani chlorofylinem (50 $\mu\text{mol/L}$ u všech tetrapyrolů) k signifikantním změnám zabudování ^{13}C glutaminu do 2-hydroxyglutarátu a α -ketoglutarátu (oba jsou markery aktivní glutaminolýzy) ani do citrátu a malátu (oba jsou markery redukční karboxylace). Navíc nebyla pozorována žádná změna ve výrobě laktátu, což naznačuje nerušenou rovnováhu mezi mitochondriální respirací a glykolýzou (data nejsou uvedena).

5.4 ÚČINEK VLIVU ROSTLINNÝCH TETRAPHYROLŮ NA AKTIVACI ERK A AKT V BUŇKÁCH ADENOKARCINOMU PANKREATU

Vzhledem k tomu, že bylo prokázáno, že chlorofylin inhibuje proliferaci buněk karcinomu prsu MCF-7 deaktivací ERK [192] a také regulací signální dráhy PI3K/Akt [193], testovali jsme, zda se tento antiproliferační mechanismus může uplatnit i v buňkách adenokarcinomu pankreatu. Nicméně však expozice buněk adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902 chlorofylu *a* nebo chlorofylinu (50 $\mu\text{mol/L}$) po dobu 1 hodiny nevedla k žádným významným změnám ve fosforylaci, ani aktivaci AKT nebo ERK.

Obr. 37. Účinek vlivu tetrapyrolů na aktivaci AKT a ERK v nádorové linii PaTu-8902

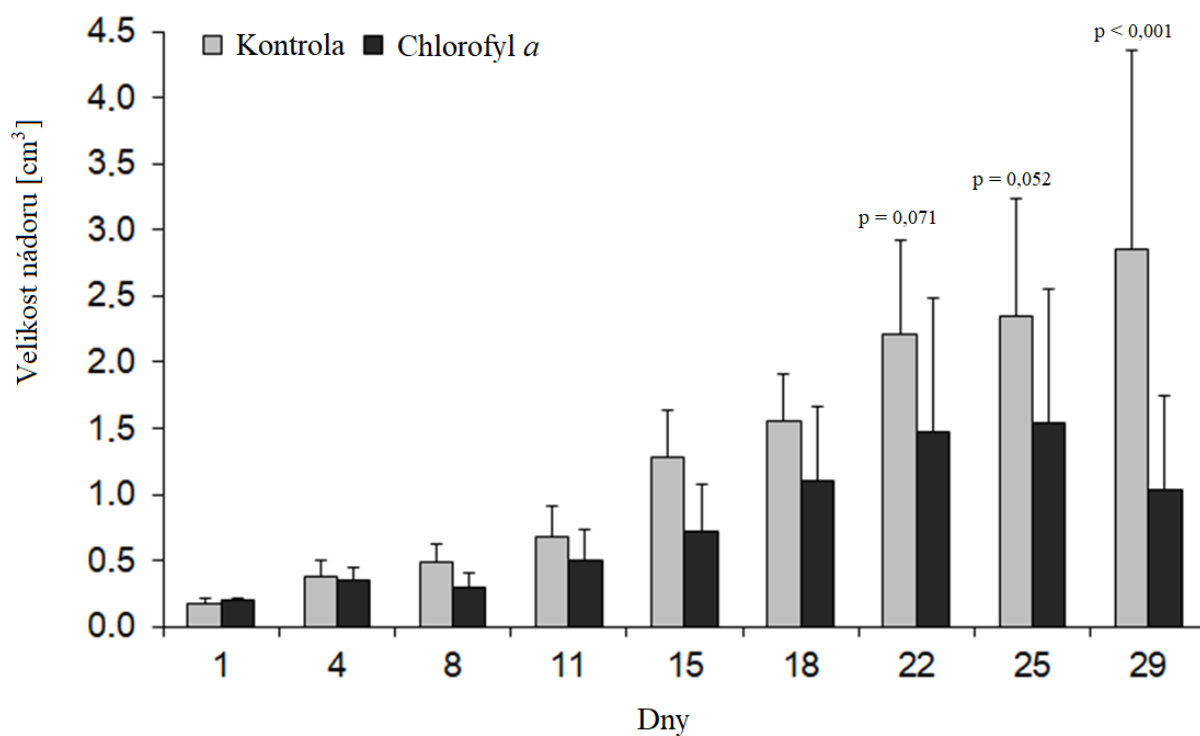


5.5 VLIV PERORÁLNÍ APLIKACE TETRAPYROLŮ NA VELIKOST NÁDORŮ A ANTIOXIDAČNÍ KAPACITU KREVNÍCH SÉR ATHYMICKÝCH NU/NU MYŠÍ XENOTRANSPLANTOVANÝCH BUŇKAMI LIDSKÉHO ADENOKARCINOMU PANKREATU

a) Vliv perorální aplikace chlorofylu *a* na velikost nádorů athymických nu/nu myší

V *in vivo* experimentech byl sledován účinek chlorofylu *a* na růst a proliferaci lidského adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902. V případě skupiny léčené chlorofylem *a* jsme pozorovali významně nižší růst a proliferaci nádorů v porovnání s kontrolní skupinou. K rozdílu ve velikostech došlo již od osmého dne experimentu a po měsíční terapii byl rozdíl ve velikosti nádoru více než trojnásobný ($1,04 \pm 0,8$ vs. $3,48 \pm 1,5$ cm³, $p = 0,012$, Obr. 38.).

Obr. 38. Vliv konzumace chlorofylu *a* na velikosti nádorů athymických nu/nu myši xenotransplantovaných adenokarcinomem pankreatu PaTu-8902



Perorální podání chlorofylu *a* v dávce 1,5 mg/kg váhy/den, n (kontrolní) = 7, n (chlorofyl *a*) = 6

Skupinové rozdíly ve velikosti nádorů byly měřeny metodou RM ANOVA s Holm-Šidák posthoc testováním.

Na zvířecím modelu byl prokázán jednoznačný antiproliferační vliv perorální aplikace chlorofylu *a* na růst lidského adenokarcinomu pankreatu.

b) Vliv perorální aplikace tetrapyrólů na celkovou antioxidační kapacitu krevních sér athymických nu/nu myši

Měřena byla také antioxidační schopnost krevního séra athymických nu/nu myši xenotransplantovaných adenokarcinomem pankreatu PaTu-8902 léčených chlorofylem *a* (dávka 1,5 mg/kg váhy/den). Antioxidační kapacita séra byla měřena stejnou metodou jako v kapitole 5.2.8 a výsledné hodnoty byly porovnány s kontrolní skupinou krmenou placebem.

Rozdíl mezi antioxidační kapacitou kontrolní skupiny a skupiny léčené chlorofylem *a* nebyl významný (kontrolní skupina: Index = $4,9 \pm 1,2$, $n = 7$, skupina léčená chlorofylem *a*: Index = $3,7 \pm 1,1$, $n = 6$, $p > 0,05$).

6 DISKUZE A ZÁVĚR

V našich iniciálních studiích byly na experimentálním modelu karcinomu pankreatu zkoumány potenciální antioxidantní a antiproliferační účinky sinice *S. platensis* a některých tetrapyrólů v ní obsažených [5] díky podobnosti tetrapyrólových struktur s podobně působící molekulou bilirubinu [7, 8]. Bylo zjištěno, že tyto látky zasahují do redoxního stavu nádorové buňky, a že mají velký potenciál jako chemoprotektivní látky, nicméně jejich účinek není v literatuře dostatečně popsán a *S. platensis* obsahuje mnoho látek, které mohou být zodpovědné za pozorované efekty. Pro naši další práci jsme zvolili studium chlorofylů, nejhojněji zastoupených pigmentů na Zemi. Chlorofyly jsou součástí potravinového řetězce a představují molekuly se silnými biologickými účinky. Jejich potenciální příznivé účinky na lidské zdraví byly zaznamenány již v první polovině 20. století [194], avšak přesvědčivá experimentální i klinická data o těchto molekulách nacházíme v odborné literatuře jen sporadicky.

Obecně se předpokládá, že chemoprotektivní účinky chlorofylů jsou zprostředkované jejich schopností vylučovat karcinogeny uvnitř střevního lumen, což bylo dokázáno v čínských a nizozemských klinických studiích [17, 45]. Několik experimentálních studií prokázalo antioxidantní [14] a protinádorové účinky chlorofylů [15, 16].

Chlorofylů se v rostlinné říši vyskytuje hned několik typů, které se snadno dostávají do lidského potravinového řetězce. V průběhu životního cyklu rostlin se navíc chlorofyly metabolizují a stárnutím listů či jiných zelených částí rostlin se např. chlorofyl *a* přeměňuje na feofytin *a* [24], což je molekula chlorofylu bez centrálního atomu hořčíku. Předpokládá se, že tyto metabolity by také mohly být zodpovědné za pozitivní účinky těchto molekul. Nicméně je třeba zdůraznit, že způsob, jakým jsou chlorofyly v lidském těle metabolizovány a jak tyto metabolity působí, je zatím ne zcela probádán.

Kvůli proveditelnosti experimentů, z finančních důvodů, byla zaváděna metoda izolace chlorofylu *a*, jeho následná charakterizace a zkoumání výsledné čistoty chlorofylu. Podařilo se zavést tři různé metody pro izolaci chlorofylu *a* z řasy *S. platensis* s různým výtěžky.

HPLC-MS analýza potvrdila, že majoritní pík patří chlorofylu *a* a minoritní pík odpovídal feofytinu *a* (chlorofyl *a* bez centrálního atomu hořčíku), přičemž ke ztrátě hořčíku mohlo dojít během ionizace. IČ a VCD spektra potvrdila přítomnost skupin charakteristických pro chlorofyl *a* a poukázala na agregaci sousedních molekul chlorofylů. Na základě výsledků získaných z ECD

spekter můžeme říci, že jsme vyizolovali buď chlorofyl *a* nebo jeho epimer chlorofyl *a'* vysoké čistoty (epimery jsou látky shodné struktury lišící se pouze konfigurací v jednom chirálním centru). Díky tomuto zavedenému postupu jsme nebyli limitováni množstvím chlorofylu *a* pro následné experimenty a získávali jsme chlorofyl *a* vysoké čistoty shodný s komerčně dostupnými preparáty.

Chlorofyl *a* a další přírodní tetrapyroly jako chlorofyl *b*, feofytin *a* a chlorofylin byly zkoumány zejména pro jejich potenciální protektivní účiny uplatňující se zejména v kancerogenezi. Díky strukturální podobnosti těchto látek s bilirubinem, který je znám pro své protektivní účinky, jsme se zaměřili zejména na biochemické dráhy jím ovlivňované.

V první fázi experimentů jsme se zaměřili na testy viability, buněčné proliferace a růst nádorových a endoteliálních buněk. V těchto *in vitro* experimentech byl zkoumán účinek tetrapyrolů na různých buněčných liniích, konkrétně na nádorových liniích lidského adenokarcinomu pankreatu (PaTu-8902, BxPC-3, MiaPaCa-2), karcinomu prostaty (PC3) a na endotelové buněčné linii (EA.hy926).

U testované buněčné linie PaTu-8902 byl zaznamenán největší pokles buněčné viability při inkubaci s chlorofylem *a* a to již při nejnižší zkoumané koncentraci 10 $\mu\text{mol/L}$. Významný pokles viability při stejné koncentraci byl pozorován také u působků chlorofylu *b* a feofytinu *a*. Chlorofylin působil signifikantní změny viability až při koncentraci 125 $\mu\text{mol/L}$. Výsledky testu viability na této buněčné linii byly ověřeny vysoce citlivým luminiscenčním stanovením, které je založeno na měření ATP uvolňovaným z buněk. Vyloučili jsme tedy možnost interference stanovení například barevnými tetrapyroly v buňkách. Bylo také ověřeno, že počet vyšetých buněk neovlivňuje měřené hodnoty buněčné viability a rozdíly buněčné konfluence v rámci různých experimentů neovlivňují naměřené výsledky.

Statisticky významný rozdíl ve viabilitě buněk MiaPaCa-2 oproti kontrole jsme pozorovali u expozice chlorofylu *a* při koncentraci od 50 $\mu\text{mol/L}$, u chlorofylu *b* od 125 $\mu\text{mol/L}$ a u chlorofylinu až při koncentraci 500 $\mu\text{mol/L}$. Na chlorofyl *a* a chlorofylin byla stejně citlivá i buněčná linie BxPC3, u které jsme však nepozorovali rozdíly v buněčné viabilitě v případě působku chlorofylu *b*.

Buňky lidského karcinomu prostaty PC3 byly velmi citlivé na chlorofyl *a* již od koncentrace 10 $\mu\text{mol/L}$, u chlorofylinu od 125 $\mu\text{mol/L}$ a efekt chlorofylu *b* nebyl pozorován. Důvod k rozdílné

reakci k jednotlivým tetrapyrólům napříč liniemi není zcela jasný. Každá ze zkoumaných nádorových linií má trochu odlišné vlastnosti, které mohou zapříčinit tyto rozdíly.

Je známý fakt, že rychle se dělicí endoteliální buňky reagují na cytostatika stejně citlivě, jako buňky nádorové. I u těchto buněk jsme zaznamenali rozdíly viability po inkubaci s terapeutiky. Endoteliální buňky EA.hy926 byly nejcitlivější k chlorofylinu (od 10 $\mu\text{mol/L}$), dále k chlorofylu *a* (od 50 $\mu\text{mol/L}$) a k chlorofylu *b* až při koncentraci 125 $\mu\text{mol/L}$.

Závěrem můžeme shrnout, že počet buněk (měřený CV testem) byl po inkubaci s experimentálními terapeutiky snižován oproti kontrolní skupině v závislosti na koncentraci působku pouze nevýznamně. Zatím co tedy vliv na počet přeživších buněk po 24 hodinovém kontaktu s terapeutiky nebyl prokázán, byla významně ovlivněna viabilita a životaschopnost těchto buněk. V závislosti na typu buněčné linie zkoumané pigmenty chlorofyl *a*, chlorofyl *b*, chlorofylin a feofytin *a* významně snižovaly buněčnou viabilitu, po 24 hodinové inkubaci s nimi, v koncentračním rozsahu od 10 do 125 $\mu\text{mol/L}$ ($p < 0,05$).

Díky screeningu různých nádorových linií jsme vybrali buněčnou linii PaTu-8902 jako nejvhodnější pro následující experimenty, protože byla ke zkoumaným terapeutikům nejcitlivější. Jako působek s největším účinkem na buněčnou viabilitu, při nejnižších koncentracích, se ukázal chlorofyl *a* a to i v případech, kdy ostatní tetrapyroly neměly na buněčnou viabilitu žádný vliv nebo byl patrný až při vyšších koncentracích.

Další variantou testu proliferace na PaTu-8902 buňkách byl klonogenní test, při němž se posuzoval vliv zkoumané látky na iniciaci nádorů. Pokud jednotlivé buňky přežijí, vyrostou z nich kolonie. Chlorofyl *a* v tomto testu působil na jednotlivě vyseté buňky a po sedmi dnech byl pozorován nárůst kolonií v porovnání s kontrolní skupinou. Byla vypočtena účinnost výsadby tzv. P.E. faktor, který říká, kolik buněk se uchytilo a vyrostly z nich kolonie a S.F. faktor který nám říká, z kolika procent léčené kolonie přežily oproti kontrolní skupině. Na miskách exponovaných chlorofylu *a* se uchytilo o polovinu méně kolonií oproti kontrole a z již uchycených buněk jich přežije méně jak 50%. Těmito testy bylo potvrzeno, že nejenom že chlorofyl *a* ovlivňuje viabilitu buněk (MTT test), ale také omezuje schopnost jednotlivých buněk přežít a o více než 50% snižuje schopnost nádorových buněk proliferovat.

Vedle klonogenního stanovení byl proveden další sedmidenní test, kde byly buňky vysety ve větší koncentraci a byl stanoven jejich počet. Počet buněk se snížil na cca 64 % oproti kontrolním buňkám. Výsledky korelují s klonogenním stanovením, kde byly léčené kolonie redukovány na

méně jak polovinu oproti kontrolní skupině. Dle předpokladu, pokud buňka není obklopena ostatními buňkami, je náchylnější na přidané působky a má sníženou šanci přežít. V delším časovém intervalu inkubace PaTu-8902 buněk s chlorofylem *a* tedy dochází i k redukci počtu buněk, které jsme při 24 hodinovém CV testu nepozorovali.

Jak bylo zmíněno výše, kvůli strukturální podobnosti zkoumaných tetrapyrolů a hemu nás zajímalo, zdali tyto látky ovlivní expresi klíčových genů katabolismu hemu. Na nádorové buněčné linii adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902 byl zkoumán vliv chlorofylu *a*, chlorofylu *b* a chlorofylinu na expresi *HMOX* a *BLVRA* mRNA. Již při velmi malé koncentraci zkoumaných tetrapyrolů (10 a 30 $\mu\text{mol/L}$) docházelo k výraznému a signifikantnímu poklesu exprese *HMOX* mRNA, zatímco vliv na expresi *BLVRA* mRNA pozorován nebyl. *BLVRA* je přitom enzymem katabolické dráhy hemu s potenciální proliferativní aktivitou [195]. Až několikanásobně zvýšené exprese *BLVRA* mRNA byly pozorovány u hepatocelulárního karcinomu, zatímco *BLVRA* a *HMOX1* hodnoty zůstaly nezměněné [196]. U všech tří tetrapyrolů jsme dále testovali vliv na *HMOX1* aktivitu u buněk adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902, MiaPaCa-2 a adenokarcinomu prostaty PC3. Ve většině případů, kdy byly buňky ovlivněny studovanými tetrapyroly, docházelo ke snížení aktivity *HMOX1* v nádorových buňkách, přičemž nejcitlivější byla opět linie PaTu-8902, která reagovala výrazným snížením *HMOX1* aktivity po inkubaci s chlorofylem *a*, chlorofylem *b* i chlorofylinem při relativně nízkých koncentracích (10 a 30 $\mu\text{mol/L}$). Zvýšená aktivita *HMOX* je považována za mechanismus obrany organismu před zvýšeným oxidačním stresem. Díky produktům katabolismu hemu tak dochází ke snižování oxidační zátěže buňky. Avšak úloha *HMOX* v procesu kancerogeneze není zcela objasněna a publikovaná data jsou značně kontroverzní [189, 197]. Je například známo, že overexprese *HMOX* podporuje buněčný růst a progresi nádorů. Za určitých podmínek zvýšené hladiny *HMOX* podporují i syntézu vaskulárního endoteliálního růstového faktoru VEGF. Data z našich studií ukazují, že chlorofyly měly významný inhibiční vliv na aktivitu *HMOX1* i expresi *HMOX* mRNA. Snížení aktivity *HMOX1* u nádorových buněk se může spolupodílet na zpomalení buněčného růstu a protinádorovém účinku.

Na buňkách lidského hepatoblastomu HepG2 byl studován vliv chlorofylinu a extraktu ze sinice *S. platensis* na redoxní prostředí buňky měřením MMP. Buněčná linie byla zvolena jako vhodný typ buněk pro tento druh analýzy na základě studované literatury [169, 170]. Mitochondriální membránový potenciál (MMP) slouží jako důležitý indikátor při ověřování správné funkce mitochondrií. Pouze funkční mitochondrie vykazují membránový potenciál, jsou schopny výroby

energie ve formě ATP a pouze živé buňky mají funkční mitochondrie. Nádorové buňky využívají ve zvýšené míře k získání energie aerobní glykolýzu (Warburgův efekt) a protonový gradient z aerobní fosforylace na mitochondriální membráně není tak výrazný jako u zdravých buněk. [198] Regulace buněčné apoptózy je nezbytná pro správný vývoj organismu a tkáňovou homeostázu. Její průběh může být určen dvěma signálními drahami a to vnější (receptorovou) dráhou řízenou receptory smrti a vnitřní (mitochondriální) apoptotickou dráhou, kde klíčovou roli plní mitochondrie. Mitochondriální buněčná smrt je charakteristická změnou transmembránového potenciálu a permeabilizací vnější mitochondriální membrány. Depolarizace mitochondriální membrány je důležitá pro uvolnění proapoptotických signálů. Sledování stavu mitochondriálního membránového potenciálu, jakožto apoptického markeru, a určení hladiny reaktivních kyslíkových radikálů poskytuje důležité informace a může mít prediktivní hodnotu pro výstup léčebných protokolů. [155] Pilotní experimenty ukazují, že chlorofylin i extrakt ze sinice *S. platensis* obsahující značné množství chlorofylu *a* i chlorofylinu významně snižují membránový potenciál mitochondrií nádorových buněk a ovlivňují tak funkci mitochondrií. Snížením MMP a depolarizací membrány tak může být nádorová buňka náchylnější k apoptóze. V současné době se na našem pracovišti dále pokračuje na zkoumání vlivu tetrapyrólů na MMP.

Po zjištění, že tetrapyroly ovlivňují MMP jsme zkoumali jejich vliv na redoxní prostředí buňky. ROS jsou důležitými signálními molekulami, jejichž cílem jsou transkripční faktory, které jsou aktivovány oxidačním stresem. Nádorové buňky jsou charakteristické zvýšenou tvorbou ROS, které potřebují zejména pro aktivaci růstových faktorů a udržováním angiogeneze. Výsledkem takové signalizace je stimulace buněčné proliferace, indukce apoptózy, poškození genetické informace a vznik mutací, které mohou vést k dalším nádorovým onemocněním. Prvním z cílů byl mitochondriální superoxid, který aktivuje řadu intracelulárních cílů, které představují významné patogenní faktory v kancerogenezi. U buněk léčených chlorofylem *a*, chlorofylem *b*, chlorofylinem a feofytinem *a* ve velmi malých koncentracích (10 $\mu\text{mol/L}$) docházelo k velice výraznému (na 12 – 23% v porovnání s kontrolní skupinou) a významnému poklesu superoxidu produkovaného mitochondriemi. Všechny studované tetrapyroly výrazně redukovaly oxidační zatížení buňky a takto významná redukce superoxidu může přispívat k protinádorovým účinkům těchto látek. Výsledky jsou v souladu s naměřenými hodnotami MMP, který po inkubaci buněk s tetrapyroly výrazně poklesl; klesl tedy protonový gradient na mitochondriální membráně a z toho lze usuzovat, že docházelo k aerobní fosforylaci ve snížené míře. Zdrojem mitochondriálního superoxidu je právě aerobní fosforylace a při snížené aktivitě tohoto procesu

dochází i ke snížené tvorbě superoxidu. Dalším vysvětlením tak výrazné redukce superoxidu může být přímá interakce konjugovaných tetrapyrólů s touto reaktivní molekulou.

Jedním z hlavních mechanismů antioxidační ochrany organismu je redukce ROS glutathionem. Byl sledován poměr redukované a oxidované formy glutathionu u buněk adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902 exponovaných chlorofylu *a*, chlorofylu *b*, chlorofylinu a feofytinu *a* v koncentraci 10 $\mu\text{mol/L}$. U všech studovaných tetrapyrólů jsme naměřili zvýšené množství redukovaného glutathionu. Jedním z vysvětlení zvýšených hodnot redukovaného glutathionu oproti kontrolní skupině může být, že chlorofyly mohou samy přímo zhaset ROS a dochází tak k menší spotřebě redukovaného glutathionu. K menší spotřebě tohoto antioxidantu může docházet také díky prokázané snížené produkci mitochondriálního superoxidu. Dalším možným vysvětlením je, že chlorofyly mohou také samy přispívat k regeneraci oxidovaného glutathionu na jeho redukovanou formu. Ať je mechanismus působení jakýkoliv, z naměřených dat je patrné, že chlorofyly přispívají ke zvyšování nitrobuněčného antioxidačního potenciálu.

U buněk adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902 byla také měřena produkce H_2O_2 do vnějšího prostředí buňky, která odpovídá koncentraci uvnitř buňky a ukazuje na míru zatížení buněk ROS. Všechny studované tetrapyroly (chlorofyl *a*, chlorofyl *b*, chlorofylin a feofytin *a*) významně snižovaly produkci peroxidu při koncentraci působků 50 $\mu\text{mol/L}$. U koncentrace působků 10 $\mu\text{mol/L}$ jsme nepozorovali statisticky významné změny v produkci peroxidu buňkami oproti kontrole.

Předchozími experimenty bylo zjištěno, že chlorofyly významně zasahují do redoxního prostředí nádorových buněk. Následně jsme měřili, jak rostlinné tetrapyroly ovlivňují celkovou antioxidační kapacitu roztoků *in vitro*. Nejúčinněji zhasel volné radikály ve vodě rozpustný chlorofylin, následně chlorofyl *a* a nejmenší antioxidační kapacitu měl chlorofyl *b*. Nicméně všechny tři tetrapyroly snižovaly koncentraci produkovaných radikálů. Všechny studované tetrapyroly tedy nejen že přispívaly ke snížení celkové koncentrace volných radikálů, ale také významně potlačovaly zatížení buněk ROS a snižovaly celkové buněčné hladiny peroxidu vodíku u nádorových buněk. Toto bylo podpořeno i výsledky vlivu chlorofylů na stav redukovaného glutathionu, a ovlivnění redoxního stavu nádorové buňky chlorofyly by tedy mohlo být jedním z mechanismů jejich protinádorového účinku.

Snížení hladiny ROS v nádorech a podpora antioxidantní schopnosti u nádorových buněk vede ke kontroverzním názorům. Na jedné straně, příliš vysoké až toxické hladiny ROS by mohly vést k poškození mitochondriálních membrán, následně by docházelo k uvolňování cytochromu c z mitochondrie a ke spuštění apoptózy nádorových buněk. [136] K tomuto však samovolně v nádorových tkáních nedochází a naopak zvýšená produkce ROS podporuje tumorigenezi oxidačním poškozením DNA a biochemickými a molekulárními změnami, které jsou nezbytné k progresi nádoru [135]. Důležité je, že mitochondriální ROS regulují buněčnou redoxní signalizaci a zvýšení jejich produkce se ukazuje jako rozhodující pro kancerogenezi [199, 200]. Nicméně i nádorové buňky se chrání před zvýšeným oxidačním stresem, a některé studie naznačují, že suplementace antioxidantů, včetně N-acetylcysteinu a tokoferolu, může ve skutečnosti dokonce podporovat progresi nádorů [201, 202]. V našich modelových studiích však chlorofyly skutečně potlačovaly progresi karcinomu pankreatu. Tento účinek byl doprovázen oslabenou expresí a aktivitou HMOX1, což je rozhodující složka vnitřního buněčného antioxidantního systému. Tato zjištění mohou mít skutečně význam pro jejich protinádorové účinky, neboť bylo uvedeno, že zvýšená exprese *HMOX1* brání buňky karcinomu pankreatu před cytostatickým působením protinádorových léků [203]. Je důležité poznamenat, že tento účinek může být nádorově specifický, jelikož byl pozorován opačný trend exprese *HMOX1* u endoteliálních buněk lidské umbilikální žíly léčených chlorofylinem [204].

Překvapivě jsme nepozorovali žádný účinek chlorofylů na glutaminolýzu nebo na reduktivní karboxylaci. Tato zjištění ukazují, že ani glykolýza, ani mitochondriální respirace nebyly ovlivněny léčbou chlorofyly [174]. Zdá se, že antiproliferační účinky chlorofylů ovlivňují redoxní stav nádorových buněk, stejně tak jako produkci ROS, ale do buněčné bioenergetiky nezasahují.

V předchozích studiích bylo uváděno, že chlorofylin down-reguluje signální dráhu PI3K/Akt [193], a že inhibuje proliferaci buněk karcinomu prsu MCF-7 deaktivací ERK [192]. Nicméně, ani chlorofyl *a* a ani chlorofylin neměly v našich studiích pankreatických nádorových buněk žádný inhibiční účinek na fosforylaci AKT nebo ERK.

Pro potvrzení protinádorového účinku chlorofylu *a*, který k nádorové linii adenokarcinomu pankreatu Patu-8902 reagoval nejcitlivěji a z *in vitro* studií byl patrný nejvýraznější pokles buněčné viability a efekt na snížení oxidačního zatížení buněk, byla provedena následná *in vivo* studie na nu/nu myších xenotransplantovaných adenokarcinomem pankreatu PaTu-8902. Při *in vivo* studii vlivu účinků chlorofylu *a* na proliferaci lidského adenokarcinomu pankreatu bylo

zjištěno, že myši perorálně léčené chlorofylem *a* měly významně menší nádory v porovnání s kontrolní skupinou, a to již od 8. dne léčby. Po 29 dnech byl experiment ukončen a nádory léčené skupiny byly v porovnání s kontrolní skupinou třikrát menší ($1,04 \pm 0,8$ vs. $3,48 \pm 1,5$ cm³, $p=0,012$). Byl tedy prokázán jednoznačný antiproliferační vliv chlorofylu *a* na růst lidského adenokarcinomu pankreatu.

Měřena byla také antioxidační schopnost krevního séra athymických nu/nu myši léčených chlorofylem *a* po dobu 29 dnů. Rozdíl mezi antioxidační kapacitou kontrolní skupiny a skupiny léčené chlorofylem *a* nebyl statisticky významný (kontrolní skupina: Index = $4,9 \pm 1,2$, $n = 7$, skupina léčená chlorofylem *a*: Index = $3,7 \pm 1,1$, $n = 6$, $p>0,05$). Vysvětlením, proč antioxidační kapacita séra po požití chlorofylu významně nevzrostla je, že chlorofyly mají velice špatnou vstřebatelnost a většina (až 95 %) požitého chlorofylu odchází stolicí. Byla provedena studie, kdy byli pacienti krmeni feofytinem a vařeným špenátem, kdy byla na fytol tetrapyrólů navázána radioaktivní molekula. Analyzované tetrapyroly byly z 90 – 95% nalezeny v nezměněné formě ve stolici. [205] Tetrapyroly se tedy nedostávají ve zvýšené míře do krevního řečiště, kde by působily přímo jako antioxidanty, avšak mají jiný mechanismus účinku, který redukuje nádory a snižuje antioxidační zatížení nádorových buněk.

Jak jsme demonstrovali v *in vitro* studiích, mechanismus působení chlorofylů zřejmě probíhá na více úrovních od působení na buněčnou viabilitu nádorových buněk, přes ovlivnění exprese klíčových genů antioxidační ochrany až po samotné vychytávání volných radikálů. Studované chlorofyly jsou schopny pohlcovat volné radikály díky konjugovanému systému dvojných vazeb a přímo tak v organismu působit jako antioxidanty. I když vstřebatelnost chlorofylů do krevního řečiště je relativně malá (cca 5 – 10%), pozorovali jsme výrazné protinádorové a antioxidační účinky těchto molekul *in vivo*. Chlorofyly velice významně zasahují do redoxního prostředí buněk a pomáhají jim ve snižování negativních dopadů volných radikálů.

Závěrem lze konstatovat, že potenciální protinádorové účinky chlorofylů jsou zprostředkovávány několika způsoby přes různé metabolické dráhy a souvisí s antioxidační aktivitou, snížením mitochondriální produkce superoxidu a účinky na expresi specifických genů. Fakt, že perorálně podávaný chlorofyl *a* na zvířecím modelu velice výrazně snižoval progresi karcinomu pankreatu a docházelo k velice výrazné redukci nádorů, potvrzuje antiproliferační působení tohoto tetrapyrólu. Na základě zjištěných dat se chlorofyl *a* a další tetrapyroly (chlorofyl *b*, chlorofylin a feofytin *a*) jeví jako slibné chemopreventivní látky, které by se mohly uplatňovat v chemoadjuvantní léčbě

nádorových onemocnění. Navíc zvýšený příjem těchto látek běžnou stravou by mohl pomáhat před zvýšeným oxidačním stresem a působit tak preventivně proti vzniku onemocnění podmíněných tímto mechanismem. K potvrzení těchto slibných předpokladů, vycházejících především z experimentálních dat jsou nezbytné a žádoucí klinicko-epidemiologické humánní studie.

7 LITERATURA

1. Glade, M.J., *Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective*. American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research, 1997. Nutrition, 1999. **15**(6): p. 523-6.
2. Huang, M.-T., T. Ferraro, and C.-T. Ho, *Cancer Chemoprevention by Phytochemicals in Fruits and Vegetables*, in *Food Phytochemicals for Cancer Prevention I*. 1993, Am. Chem. Soc. p. 2-16.
3. Rodriguez-Garcia, I. and J.L. Guil-Guerrero, *Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods*. Food Chem., 2008. **108**(3): p. 1023-1026.
4. Vimala, S., A.W. Norhanom, and M. Yadav, *Anti-tumour promoter activity in Malaysian ginger rhizobia used in traditional medicine*. Br. J. Cancer, 1999. **80**(1-2): p. 110-6.
5. Konickova, R., et al., *Anti-cancer effects of blue-green alga Spirulina platensis, a natural source of bilirubin-like tetrapyrrolic compounds*. Ann. Hepatol., 2014. **13**(2): p. 273-83.
6. Karel, K., *Zelenina ve výživě člověka*. 2010: Grada Publishing a.s.
7. Wu, T.W., K.P. Fung, and C.C. Yang, *Unconjugated bilirubin inhibits the oxidation of human low density lipoprotein better than Trolox*. Life Sci., 1994. **54**(25): p. P477-81.
8. Vitek, L. and H.A. Schwertner, *The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases*. Adv. Clin. Chem., 2007. **43**: p. 1-57.
9. Baranano, D.E., et al., *Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 2002. **99**(25): p. 16093-8.
10. Bendich, A. and R.J. Deckelbaum, *Preventive nutrition : the comprehensive guide for health professionals*. 3rd ed. Nutrition and health. 2005, Totowa, N.J.: Humana Press. xxv, 958 p.
11. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Int. J. Biochem. Cell Biol., 2007. **39**(1): p. 44-84.
12. Sies, H., W. Stahl, and A. Sevanian, *Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress*. J. Nutr., 2005. **135**(5): p. 969-72.
13. Ignarro, L.J., M.L. Balestrieri, and C. Napoli, *Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: an update*. Cardiovasc. Res., 2007. **73**(2): p. 326-40.
14. Kamat, J.P., K.K. Bloor, and T.P. Devasagayam, *Chlorophyllin as an effective antioxidant against membrane damage in vitro and ex vivo*. Biochim. Biophys. Acta, 2000. **1487**(2-3): p. 113-27.
15. Chernomorsky, S., A. Segelman, and R.D. Poretz, *Effect of dietary chlorophyll derivatives on mutagenesis and tumor cell growth*. Teratog. Carcinog. Mutagen., 1999. **19**(5): p. 313-22.
16. Castro, D.J., et al., *Identifying efficacious approaches to chemoprevention with chlorophyllin, purified chlorophylls and freeze-dried spinach in a mouse model of transplacental carcinogenesis*. Carcinogenesis, 2009. **30**(2): p. 315-20.
17. Egner, P.A., et al., *Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin-DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 2001. **98**(25): p. 14601-6.
18. Warren M., S.A., *Tetrapyrroles. Birth, Life and Death*. 2009, New York: Springer-Verlag XX, 406.
19. Smith, A.G. and M. Witty, *Heme, chlorophyll, and bilins : methods and protocols*. 2002, Totowa, N.J.: Humana Press. ix, 340 p.

20. BLANK, A., T. GALILI, and H. LEVANON, *Triplet porphyrins as donors in intramolecular electron transfer and their intermolecular interaction with free radicals*. J. Porphyrins Phthalocyanines, 2001. **05**(01): p. 58-66.
21. Fujisawa, J.-i., Y. Ohba, and S. Yamauchi, *Electron-Spin Polarizations Generated from Interactions between Excited Triplet Porphyrins and Stable Radicals Studied by Time-Resolved Electron Paramagnetic Resonance*. J. Phys. Chem. A, 1997. **101**(4): p. 434-439.
22. Eckardt, N.A., *A New Chlorophyll Degradation Pathway*. Plant Cell, 2009. **21**(3): p. 700-700.
23. Hortensteiner, S., *Chlorophyll degradation during senescence*. Annu. Rev. Plant Biol., 2006. **57**: p. 55-77.
24. Helfrich, M., et al., *Chlorophyll synthetase cannot synthesize chlorophyll a'*. Eur. J. Biochem., 1994. **219**(1-2): p. 267-75.
25. H.K., L., *Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes*. Methods in Enzymol., 1987. **148**: p. 350-382.
26. Procházka, S., et al., *Fyziologie rostlin*. 1. ed. 1998, Praha: Academia. 484.
27. de Vogel, J., et al., *Natural chlorophyll but not chlorophyllin prevents heme-induced cytotoxic and hyperproliferative effects in rat colon*. J. Nutr., 2005. **135**(8): p. 1995-2000.
28. Arimoto-Kobayashi, S., et al., *Iron-chlorophyllin-mediated conversion of 3-hydroxyamino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2(NHOH)) into its nitroso derivative*. Mutat. Res., 1998. **400**(1-2): p. 259-69.
29. Woziwodzka A., G.G., Piosik J., *Heterocyclic Aromatic Amines Heterocomplexation with Biologically Active Aromatic Compounds and Its Possible Role in Chemoprevention*. ISRN Biophysics, 2013. **2013**(Article ID 740821): p. 11 pages.
30. Waters, M.D., et al., *Activity profiles of antimutagens: in vitro and in vivo data*. Mutat. Res., 1996. **350**(1): p. 109-129.
31. Ferruzzi, M.G. and J. Blakeslee, *Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives*. Nutrition Research. **27**(1): p. 1-12.
32. Das, J., et al., *Nano-encapsulated chlorophyllin significantly delays progression of lung cancer both in in vitro and in vivo models through activation of mitochondrial signaling cascades and drug-DNA interaction*. Environ. Toxicol. Pharmac., 2016. **46**: p. 147-157.
33. Battersby, A.R., et al., *Biosynthesis of the pigments of life: formation of the macrocycle*. Nature, 1980. **285**(5759): p. 17-21.
34. Sofrová, D.a.k., *Biochemie - základní kurz*. 2009: Karolinum.
35. Sticova, E. and M. Jirsa, *New insights in bilirubin metabolism and their clinical implications*. World J. Gastroenterol., 2013. **19**(38): p. 6398-407.
36. Erlinger, S., I.M. Arias, and D. Dhumeaux, *Inherited disorders of bilirubin transport and conjugation: new insights into molecular mechanisms and consequences*. Gastroenterology, 2014. **146**(7): p. 1625-38.
37. Libor, V., *Bilirubin a interní choroby: Význam pro kliniku a praxi*. 2009.
38. Svoboda, M., et al., *Organic anion transporting polypeptides (OATPs): regulation of expression and function*. Curr. Drug Metab., 2011. **12**(2): p. 139-53.
39. Al-Abdi, S.Y., *Decreased Glutathione S-transferase Level and Neonatal Hyperbilirubinemia Associated with Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Deficiency: A Perspective Review*. Am. J. Perinatol., 2016.
40. Robert K. Murray, D.A.B., Kathleen M. Botham, Peter J. Kennelly, Victor W. Rodwell, P. Anthony Weil, *Harperova ilustrovaná biochemie*. 2012: Galén.
41. Vitek, L. and J.D. Ostrow, *Bilirubin chemistry and metabolism; harmful and protective aspects*. Curr. Pharm. Des., 2009. **15**(25): p. 2869-83.

42. Lu, Y.P., et al., *AtMRP2, an Arabidopsis ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with Atmrp1*. *Plant Cell*, 1998. **10**(2): p. 267-82.
43. Gandul-Rojas, B., L. Gallardo-Guerrero, and M.I. Mínguez-Mosquera, *Influence of the Chlorophyll Pigment Structure on Its Transfer from an Oily Food Matrix to Intestinal Epithelium Cells*. *J. Agric Food Chem.*, 2009. **57**(12): p. 5306-5314.
44. Fernandes, T.M., B.B. Gomes, and U.M. Lanfer-Marquez, *Apparent absorption of chlorophyll from spinach in an assay with dogs*. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 2007. **8**(3): p. 426-432.
45. Balder, H.F., et al., *Heme and Chlorophyll Intake and Risk of Colorectal Cancer in the Netherlands Cohort Study*. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2006. **15**(4): p. 717-725.
46. de Vogel, J., et al., *Green vegetables, red meat and colon cancer: chlorophyll prevents the cytotoxic and hyperproliferative effects of haem in rat colon*. *Carcinogenesis*, 2005. **26**(2): p. 387-393.
47. Hsu, C.Y., et al., *Organ-specific distribution of chlorophyll-related compounds from dietary spinach in rabbits*. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 2014. **51**(5): p. 388-95.
48. Kadish K. M., S.K.M., Guillard R., *The Porphyrin Handbook: Electron transfer*. 2000, San Diego, CA, USA: Academic Press. 205.
49. Hambright, P., *The coordination chemistry of metalloporphyrins*. *Coord. Chem. Rev.*, 1971. **6**(2): p. 247-268.
50. Fleischer, E.B., *Structure of porphyrins and metalloporphyrins*. *Acc. Chem. Res.*, 1970. **3**(3): p. 105-112.
51. Gazzin, S., et al., *A novel perspective on the biology of bilirubin in health and disease*. *Trends Mol. Med.*, 2016. **22**(9): p. 758-68.
52. Vitek, L., *The role of bilirubin in diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases*. *Front Pharmacol.*, 2012. **3**: p. 55.
53. Fang, J., T. Akaike, and H. Maeda, *Antiapoptotic role of heme oxygenase (HO) and the potential of HO as a target in anticancer treatment*. *Apoptosis*, 2004. **9**(1): p. 27-35.
54. Dulak, J., et al., *Heme oxygenase activity modulates vascular endothelial growth factor synthesis in vascular smooth muscle cells*. *Antioxid. Redox Signal.*, 2002. **4**(2): p. 229-40.
55. Ferrando, M., et al., *Heme oxygenase 1 (HO-1) challenges the angiogenic switch in prostate cancer*. *Angiogenesis*, 2011. **14**(4): p. 467-79.
56. Schmidt, K.N., et al., *The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF- κ B*. *Chem. Biol.*, 1995. **2**(1): p. 13-22.
57. Hay, N. and N. Sonenberg, *Upstream and downstream of mTOR*. *Genes Dev.*, 2004. **18**(16): p. 1926-45.
58. West, A.P., G.S. Shadel, and S. Ghosh, *Mitochondria in innate immune responses*. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011. **11**(6): p. 389-402.
59. Mulder, G.J., *Conjugation Reactions In Drug Metabolism*. 2005: Taylor & Francis e-Library.
60. Bylund, J., et al., *Measurement of Respiratory Burst Products, Released or Retained, During Activation of Professional Phagocytes, in Neutrophil Methods and Protocols*, M.T. Quinn and F.R. DeLeo, Editors. 2014, Humana Press: Totowa, NJ. p. 321-338.
61. Sazontova, T.G., et al., *[Reactive oxygen species and redox-signaling during adaptation to changes of oxygen level]*. *Fiziol. Zh. (Kiev, Ukraine : 1994)*, 2008. **54**(2): p. 18-32.
62. Jackson, M.J. and A. McArdle, *Age-related changes in skeletal muscle reactive oxygen species generation and adaptive responses to reactive oxygen species*. *J. Physiol.*, 2011. **589**(Pt 9): p. 2139-45.
63. Murphy, M.P., *How mitochondria produce reactive oxygen species*. *Biochem. J.*, 2009. **417**(1): p. 1-13.

64. Dröse, S., U. Brandt, and I. Wittig, *Mitochondrial respiratory chain complexes as sources and targets of thiol-based redox-regulation*. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2014. **1844**(8): p. 1344-1354.
65. Mohanty, J.G., E. Nagababu, and J.M. Rifkind, *Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging*. *Front. Physiol.*, 2014. **5**: p. 84.
66. Amanso, A., A.N. Lyle, and K.K. Griendling, *NADPH Oxidases and Measurement of Reactive Oxygen Species*, in *Hypertension: Methods and Protocols*, R.M. Touyz and E.L. Schiffrin, Editors. 2017, Springer New York: New York, NY. p. 219-232.
67. Pisoschi, A.M. and A. Pop, *The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review*. *Eur. J. Med. Chem.*, 2015. **97**: p. 55-74.
68. Muller, F.L., Y. Liu, and H. Van Remmen, *Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane*. *J. Biol. Chem.*, 2004. **279**(47): p. 49064-73.
69. Orr, A.L., et al., *Suppressors of superoxide production from mitochondrial complex III*. *Nat. Chem. Biol.*, 2015. **11**(11): p. 834-836.
70. Hrycay, E.G. and S.M. Bandiera, *Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer*. *Adv. Pharmacol.*, 2015. **74**: p. 35-84.
71. Vignais, P.V., *The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism*. *Cell Mol. Life Sci.*, 2002. **59**(9): p. 1428-59.
72. Li, J.M. and A.M. Shah, *ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: potential relevance in diabetic nephropathy*. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2003. **14**(8 Suppl 3): p. S221-6.
73. Suh, Y.A., et al., *Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1*. *Nature*, 1999. **401**(6748): p. 79-82.
74. Katsuyama, M., *NOX/NADPH oxidase, the superoxide-generating enzyme: its transcriptional regulation and physiological roles*. *J. Pharmacol. Sci.*, 2010. **114**(2): p. 134-46.
75. Galbusera, C., et al., *Superoxide radical production by allopurinol and xanthine oxidase*. *Biochem. Pharmacol.*, 2006. **71**(12): p. 1747-1752.
76. Foyer, C.H. and G. Noctor, *Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub*. *Plant Physiol.*, 2011. **155**(1): p. 2-18.
77. Fisher, A.B., *Redox Signaling Across Cell Membranes*. *Antiox. Redox Signal.*, 2009. **11**(6): p. 1349-1356.
78. Bretón-Romero, R. and S. Lamas, *Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells*. *Redox Biol.*, 2014. **2**: p. 529-534.
79. Rindler, P.M., et al., *Catalase-dependent H₂O₂ consumption by cardiac mitochondria and redox-mediated loss in insulin signaling*. *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol.*, 2016. **311**(5): p. H1091-h1096.
80. Bienert, G.P. and F. Chaumont, *Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide*. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - General Subjects*, 2014. **1840**(5): p. 1596-1604.
81. Toyokuni, S., *Iron and carcinogenesis: from Fenton reaction to target genes*. *Redox Rep.*, 2002. **7**(4): p. 189-197.
82. Rajendran, P., et al., *Antioxidants and human diseases*. *Clin. Chim. Acta*, 2014. **436**: p. 332-347.
83. Kattappagari, K., et al., *Role of antioxidants in facilitating the body functions: A review*. *J. Orofac. Sci.*, 2015. **7**(2): p. 71-75.
84. Niki, E., *Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: in vitro and in vivo evidence*. *Free Radical Bio. Med.*, 2014. **66**: p. 3-12.
85. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*. 2015: Oxford University Press, USA.

86. Quijano, C., et al., *Pathways of peroxyxynitrite oxidation of thiol groups*. *Biochem. J.*, 1997. **322 (Pt 1)**: p. 167-73.
87. Gazzin, S., et al., *Transport and metabolism at blood-brain interfaces and in neural cells: relevance to bilirubin-induced encephalopathy*. *Front Pharmacol.*, 2012. **3**: p. 89.
88. Vitek, L., [*Role of bilirubin in the prevention of cardiovascular diseases and cancer*]. *Cas. Lek. Cesk.*, 2016. **155(2)**: p. 10-4.
89. Datla, S.R., et al., *Induction of heme oxygenase-1 in vivo suppresses NADPH oxidase derived oxidative stress*. *Hypertension*, 2007. **50(4)**: p. 636-42.
90. Packer, L., *Protective role of vitamin E in biological systems*. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1991. **53(4 Suppl)**: p. 1050s-1055s.
91. Byers, T. and G. Perry, *Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers*. *Annu. Rev. Nutr.*, 1992. **12**: p. 139-59.
92. Wu, X., J. Cheng, and X. Wang, *Dietary Antioxidants: Potential Anticancer Agents*. *Nutr. Cancer*, 2017: p. 1-13.
93. O. Ibrahim, Z. and S. H. Ali, *Antiplatelts Activity of Vitamin E in Relation to Dose and Duration of Therapy*. *Iraqi J. Pharm. Sci.*, 2017. **17(1)**: p. 25-30.
94. Nagao, A., *Absorption and function of dietary carotenoids*, in *Food Factors for Health Promotion*. 2009, Karger Publishers. p. 55-63.
95. Godic, A., et al., *The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment*. *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2014. **2014**: p. 860479.
96. Gaetke, L.M. and C.K. Chow, *Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients*. *Toxicology*, 2003. **189(1-2)**: p. 147-163.
97. Halliwell, B., *Albumin—An important extracellular antioxidant?* *Biochem. Pharmacol.*, 1988. **37(4)**: p. 569-571.
98. Bentinger, M., K. Brismar, and G. Dallner, *The antioxidant role of coenzyme Q. Mitochondrion*, 2007. **7, Supplement**: p. S41-S50.
99. James, A.M., R.A.J. Smith, and M.P. Murphy, *Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial Coenzyme Q*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2004. **423(1)**: p. 47-56.
100. Genova, M.L., et al., *Mitochondrial Production of Oxygen Radical Species and the Role of Coenzyme Q as an Antioxidant*. *Exp. Biol. Med.*, 2003. **228(5)**: p. 506-513.
101. Cos, P., et al., *Structure-Activity Relationship of Flavonoids as Antioxidant and Pro-Oxidant Compounds*, in *Studies in Natural Products Chemistry*, R. Atta. ur., Editor. 2000, Elsevier. p. 307-341.
102. Burda, S. and W. Oleszek, *Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids*. *J. Agric. Food Chem.*, 2001. **49(6)**: p. 2774-2779.
103. Hayden, M.R. and S.C. Tyagi, *Uric acid: A new look at an old risk marker for cardiovascular disease, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus: The urate redox shuttle*. *Nutr. Metab.*, 2004. **1(1)**: p. 10.
104. Sautin, Y.Y. and R.J. Johnson, *Uric Acid: The Oxidant-Antioxidant Paradox*. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2008. **27(6-7)**: p. 608-619.
105. Fabbrini, E., et al., *Effect of Plasma Uric Acid on Antioxidant Capacity, Oxidative Stress, and Insulin Sensitivity in Obese Subjects*. *Diabetes*, 2014. **63(3)**: p. 976.
106. Moini, H., L. Packer, and N.-E.L. Saris, *Antioxidant and Prooxidant Activities of α -Lipoic Acid and Dihydrolipoic Acid*. *Toxicol. App. Pharmacol.*, 2002. **182(1)**: p. 84-90.
107. Birben, E., et al., *Oxidative Stress and Antioxidant Defense*. *World Allergy Organ. J.*, 2012. **5(1)**: p. 9-19.
108. Zelko, I.N., T.J. Mariani, and R.J. Folz, *Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression*. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002. **33(3)**: p. 337-349.

109. Mugesh, G. and H.B. Singh, *Synthetic organoselenium compounds as antioxidants: glutathione peroxidase activity*. Chem. Soc. Rev., 2000. **29**(5): p. 347-357.
110. Battin, E.E. and J.L. Brumaghim, *Antioxidant Activity of Sulfur and Selenium: A Review of Reactive Oxygen Species Scavenging, Glutathione Peroxidase, and Metal-Binding Antioxidant Mechanisms*. Cell Biochem. Biophys., 2009. **55**(1): p. 1-23.
111. Glorieux, C. and P.B. Calderon, *Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach*. Biol. Chem., 2017.
112. Matsumoto, H., et al., *Carbon monoxide and bilirubin from heme oxygenase-1 suppresses reactive oxygen species generation and plasminogen activator inhibitor-1 induction*. Mol. Cell Biochem., 2006. **291**(1-2): p. 21-8.
113. Bal, W., et al., *Binding of transition metal ions to albumin: Sites, affinities and rates*. Biochim. Biophys. Acta (BBA) - General Subjects, 2013. **1830**(12): p. 5444-5455.
114. Eid, C., et al., *Iron uptake and transfer from ceruloplasmin to transferrin*. Biochim. Biophys. Acta (BBA) - General Subjects, 2014. **1840**(6): p. 1771-1781.
115. Schieber, M. and Navdeep S. Chandel, *ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress*. Curr. Biol., 2014. **24**(10): p. R453-R462.
116. Reczek, C.R. and N.S. Chandel, *ROS-dependent signal transduction*. Curr. Opin. Cell Biol., 2015. **33**: p. 8-13.
117. H A Lardy, a. and S.M. Ferguson, *Oxidative Phosphorylation in Mitochondria*. Annu. Rev. Biochem., 1969. **38**(1): p. 991-1034.
118. Sazanov, L.A., *A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2015. **16**(6): p. 375-88.
119. Hatefi, Y., *The Mitochondrial Electron Transport and Oxidative Phosphorylation System*. Annu. Rev. Biochem., 1985. **54**(1): p. 1015-1069.
120. Schultz, B.E. and S.I. Chan, *Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 2001. **30**: p. 23-65.
121. Dimroth, P., G. Kaim, and U. Matthey, *Crucial role of the membrane potential for ATP synthesis by F(1)F(o) ATP synthases*. J. Exp. Biol., 2000. **203**(Pt 1): p. 51-9.
122. Chen, L.B., *Mitochondrial Membrane Potential in Living Cells*. Annu. Rev. Cell Biol., 1988. **4**(1): p. 155-181.
123. Heinz, S., et al., *Mechanistic Investigations of the Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone in the Context of Pharmacological and Safety Evaluation*. Scientific Reports, 2017. **7**: p. 45465.
124. El-Hawary, M., et al., *In Vitro Study of Impact of Piericidin on 3D Neurosphere Culture (P6.277)*. Neurology, 2015. **84**(14 Supplement).
125. Slater, E.C., *The mechanism of action of the respiratory inhibitor, antimycin*. Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics, 1973. **301**(2): p. 129-154.
126. Thierbach, G. and H. Reichenbach, *Myxothiazol, a new inhibitor of the cytochrome b-c1 segment of the respiratory chain*. Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Bioenergetics, 1981. **638**(2): p. 282-289.
127. Thierbach, G., et al., *The mode of action of stigmatellin, a new inhibitor of the cytochrome b-c1 segment of the respiratory chain*. Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Bioenergetics, 1984. **765**(2): p. 227-235.
128. Leavesley, H.B., et al., *Interaction of Cyanide and Nitric Oxide with Cytochrome c Oxidase: Implications for Acute Cyanide Toxicity*. Tox. Sci., 2008. **101**(1): p. 101-111.
129. Devenish, R.J., et al., *The Oligomycin Axis of Mitochondrial ATP Synthase: OSCP and the Proton Channel*. J. Bioenerg. Biomembr., 2000. **32**(5): p. 507-515.
130. Hanstein, W.G., *Uncoupling of oxidative phosphorylation*. Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics, 1976. **456**(2): p. 129-148.

131. Diebold, L. and N.S. Chandel, *Mitochondrial ROS regulation of proliferating cells*. Free Radic. Biol. Med., 2016. **100**: p. 86-93.
132. Hanahan, D. and Robert A. Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
133. Szatrowski, T.P. and C.F. Nathan, *Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells*. Cancer Res., 1991. **51**(3): p. 794-8.
134. Pelicano, H., D. Carney, and P. Huang, *ROS stress in cancer cells and therapeutic implications*. Drug Resist. Updat., 2004. **7**(2): p. 97-110.
135. Ames, B.N., M.K. Shigenaga, and T.M. Hagen, *Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging*. Proc. Nat. Acad. Sci. U S A, 1993. **90**(17): p. 7915-7922.
136. Galadari, S., et al., *Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress?* Free Radic. Biol. Med., 2017. **104**: p. 144-164.
137. Glasauer, A. and N.S. Chandel, *Targeting antioxidants for cancer therapy*. Biochem. Pharmacol., 2014. **92**(1): p. 90-101.
138. Fuchs-Tarlovsky, V., *Role of antioxidants in cancer therapy*. Nutrition, 2013. **29**(1): p. 15-21.
139. Huang, P., et al., *Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells*. Nature, 2000. **407**(6802): p. 390-395.
140. Srinivasan, S., et al., *Mitochondrial dysfunction and mitochondrial dynamics-The cancer connection*. Biochim. Biophys. Acta, 2017.
141. Guerra, F., A.A. Arbini, and L. Moro, *Mitochondria and cancer chemoresistance*. Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Bioenergetics.
142. Elstrom, R.L., et al., *Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells*. Cancer Res., 2004. **64**(11): p. 3892-9.
143. Liberti, M.V. and J.W. Locasale, *The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?* Trends Biochem. Sci., 2016. **41**(3): p. 211-8.
144. Baffy, G., *Mitochondrial uncoupling in cancer cells: Liabilities and opportunities*. Biochim. Biophys. Acta, 2017.
145. Gatenby, R.A. and R.J. Gillies, *Why do cancers have high aerobic glycolysis?* Nat. Rev. Cancer, 2004. **4**(11): p. 891-899.
146. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation*. Science (New York, N.Y.), 2009. **324**(5930): p. 1029-1033.
147. Pelicano, H., et al., *Mitochondrial respiration defects in cancer cells cause activation of Akt survival pathway through a redox-mediated mechanism*. J. Cell Biol., 2006. **175**(6): p. 913-923.
148. Gogvadze, V., S. Orrenius, and B. Zhivotovsky, *Mitochondria in cancer cells: what is so special about them?* Trends Cell Biol., 2008. **18**(4): p. 165-173.
149. Christofk, H.R., et al., *The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth*. Nature, 2008. **452**(7184): p. 230-233.
150. Anastasiou, D., et al., *Inhibition of Pyruvate Kinase M2 by Reactive Oxygen Species Contributes to Cellular Antioxidant Responses*. Science, 2011. **334**(6060): p. 1278-1283.
151. Hamanaka, R.B. and N.S. Chandel, *Warburg Effect and Redox Balance*. Science, 2011. **334**(6060): p. 1219-1220.
152. Mullen, A.R., et al., *Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria*. Nature, 2011. **481**(7381): p. 385-8.
153. Horvitz, H.R., *Genetic Control of Programmed Cell Death in the Nematode Caenorhabditis elegans*. Cancer Res., 1999. **59**(7 Supplement): p. 1701s-1706s.
154. Vaux, D.L. and S.J. Korsmeyer, *Cell Death in Development*. Cell, 1999. **96**(2): p. 245-254.

155. Pekarčíková, L., et al., *[The use of flow cytometry for analysis of the mitochondrial cell death]*. *Klin. onkol.*, 2014. **27 Suppl 1**: p. S15-21.
156. Crompton, M., *The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death*. *Biochem. J.*, 1999. **341**(2): p. 233-249.
157. Iriyama, K., N. Ogura, and A. Takamiya, *A simple method for extraction and partial purification of chlorophyll from plant material, using dioxane*. *J. Biochem.*, 1974. **76**(4): p. 901-4.
158. Eijckelhoff, C. and J.P. Dekker, *A routine method to determine the chlorophyll a, pheophytin a and β -carotene contents of isolated Photosystem II reaction center complexes*. *Photosynt. Res.*, 1997. **52**: p. 69–73.
159. Smith, A.G. and M. Witty, *Heme, chlorophyll, and bilins : methods and protocols*. 2002, Totowa, N.J.: Humana Press. ix.
160. Wong, C.K. and C.K. Wong, *HPLC pigment analysis of marine phytoplankton during a red tide occurrence in Tolo Harbour, Hong Kong*. *Chemosphere*, 2003. **52**(9): p. 1633-40.
161. Suzuki, T., H. Midonoya, and Y. Shioi, *Analysis of chlorophylls and their derivatives by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry*. *Anal. Biochem.*, 2009. **390**(1): p. 57-62.
162. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. *J. Immunol. Methods*, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
163. Ferrari, M., M.C. Fornasiero, and A.M. Isetta, *MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro*. *J. Immunol. Methods*, 1990. **131**(2): p. 165-72.
164. Kueng, W., E. Silber, and U. Eppenberger, *Quantification of cells cultured on 96-well plates*. *Anal. Biochem.*, 1989. **182**(1): p. 16-9.
165. Gillies, R.J., N. Didier, and M. Denton, *Determination of Cell Number in Monolayer-Cultures*. *Anal. Biochem.*, 1986. **159**(1): p. 109-113.
166. Franken, N.A., et al., *Clonogenic assay of cells in vitro*. *Nat Protoc*, 2006. **1**(5): p. 2315-9.
167. Vreman, H.J. and D.K. Stevenson, *Heme oxygenase activity as measured by carbon monoxide production*. *Anal. Biochem.*, 1988. **168**(1): p. 31-8.
168. Subhanova, I., et al., *Expression of Biliverdin Reductase A in Peripheral Blood Leukocytes Is Associated with Treatment Response in HCV-Infected Patients*. *PLOS ONE*, 2013. **8**(3): p. e57555.
169. Bova, M.P., et al., *Troglitazone induces a rapid drop of mitochondrial membrane potential in liver HepG2 cells*. *Toxicol. Lett.*, 2005. **155**(1): p. 41-50.
170. Wang, M., et al., *Curcumin induced HepG2 cell apoptosis-associated mitochondrial membrane potential and intracellular free Ca^{2+} concentration*. *Eur. J. Pharmacol.*, 2011. **650**(1): p. 41-47.
171. Drose, S. and U. Brandt, *The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc1 complex*. *J. Biol. Chem.*, 2008. **283**(31): p. 21649-54.
172. Votyakova, T.V. and I.J. Reynolds, *DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria*. *J. Neurochem.*, 2001. **79**(2): p. 266-77.
173. Iuliano, L., et al., *Fluorescence quenching of dipyrromethole associated to peroxy radical scavenging: a versatile probe to measure the chain breaking antioxidant activity of biomolecules*. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000. **1474**(2): p. 177-82.
174. Smolkova, K., et al., *Reductive carboxylation and 2-hydroxyglutarate formation by wild-type IDH2 in breast carcinoma cells*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2015. **65**: p. 125-33.
175. Tomayko, M.M. and C.P. Reynolds, *Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice*. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1989. **24**(3): p. 148-54.
176. Jubert, C. and G. Bailey, *Isolation of chlorophylls a and b from spinach by counter-current chromatography*. *J. Chromatogr. A*, 2007. **1140**(1-2): p. 95-100.

177. Tong, Y., et al., *Microwave Pretreatment-Assisted Ethanol Extraction of Chlorophylls from Spirulina Platensis*. J. Food Process Eng., 2012. **35**(5): p. 792-799.
178. Jackowski, G. and R. Przymusiński, *The Resolution Anti Biochemical-Characterization of Subcomplexes of the Main Light-Harvesting Chlorophyll-a/B Protein Complex of Photosystem-Ii (Lhc-Ii)*. Photosynth. Res., 1995. **43**(1): p. 41-48.
179. Watanabe, T., et al., *Preparation of Chlorophylls and Pheophytins by Isocratic Liquid-Chromatography*. Anal. Chem., 1984. **56**(2): p. 251-256.
180. Ballschm.K and J.J. Katz, *An Infrared Study of Chlorophyll-Chlorophyll and Chlorophyll-Water Interactions*. J. Am. Chem. Soc., 1969. **91**(10): p. 2661-&.
181. Moore, P.S., et al., *Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4*. Virchows Arch., 2001. **439**(6): p. 798-802.
182. Hamidi, H., et al., *KRAS mutational subtype and copy number predict in vitro response of human pancreatic cancer cell lines to MEK inhibition*. Br. J. Cancer, 2014. **111**(9): p. 1788-801.
183. Ellis, C.A. and G. Clark, *The importance of being K-Ras*. Cell. Signal., 2000. **12**(7): p. 425-434.
184. Sumi, S., et al., *Lovastatin inhibits pancreatic cancer growth regardless of RAS mutation*. Pancreas, 1994. **9**(5): p. 657-61.
185. Kita, K., et al., *Growth inhibition of human pancreatic cancer cell lines by anti-sense oligonucleotides specific to mutated K-ras genes*. Int. J. Cancer, 1999. **80**(4): p. 553-8.
186. El-Rayes, B.F., et al., *Cyclooxygenase-2-dependent and -independent effects of celecoxib in pancreatic cancer cell lines*. Mol. Cancer Ther., 2004. **3**(11): p. 1421-6.
187. Tai, S., et al., *PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma*. Prostate, 2011. **71**(15): p. 1668-1679.
188. Ahn, K., et al., *A permanent human cell line (EA.hy926) preserves the characteristics of endothelin converting enzyme from primary human umbilical vein endothelial cells*. Life Sci., 1995. **56**(26): p. 2331-2341.
189. Was, H., J. Dulak, and A. Jozkowicz, *Heme oxygenase-1 in tumor biology and therapy*. Curr. Drug Targets, 2010. **11**(12): p. 1551-70.
190. Trachootham, D., J. Alexandre, and P. Huang, *Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?* Nat. Rev. Drug Discov., 2009. **8**(7): p. 579-591.
191. Altman, B.J., Z.E. Stine, and C.V. Dang, *From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy*. Nat. Rev. Cancer, 2016. **16**(11): p. 749.
192. Chiu, L.C., C.K. Kong, and V.E. Ooi, *The chlorophyllin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells is associated with ERK deactivation and Cyclin D1 depletion*. Int. J. Mol. Med., 2005. **16**(4): p. 735-40.
193. Nagini, S., et al., *Chlorophyllin abrogates canonical Wnt/beta-catenin signaling and angiogenesis to inhibit the development of DMBA-induced hamster cheek pouch carcinomas*. Cell Oncol. (Dordr), 2012. **35**(5): p. 385-95.
194. Carpenter, E.B., *Clinical experiences with chlorophyll preparations with particular reference to chronic osteomyelitis and chronic ulcers*. Am. J. Surg., 1949. **77**(2): p. 167-71.
195. Gibbs, P.E., T. Miralem, and M.D. Maines, *Biliverdin reductase: a target for cancer therapy?* Front Pharmacol., 2015. **6**: p. 119.
196. Kubickova, K.N., et al., *Predictive role BLVRA mRNA expression in hepatocellular cancer*. Ann. Hepatol., 2016. **15**(6): p. 881-887.
197. Dulak, J., et al., *Heme Oxygenase-1 and Carbon Monoxide in Vascular Pathobiology: Focus on Angiogenesis*. Circulation, 2008. **117**(2): p. 231-241.

198. Johnson, L.V., et al., *Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy*. J. Cell Biol., 1981. **88**(3): p. 526-535.
199. Sabharwal, S.S. and P.T. Schumacker, *Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel?* Nat. Rev. Cancer, 2014. **14**(11): p. 709-21.
200. Weinberg, F., et al., *Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 2010. **107**(19): p. 8788-93.
201. Sayin, V.I., et al., *Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice*. Sci. Transl. Med., 2014. **6**(221): p. 221ra15.
202. Piskounova, E., et al., *Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells*. Nature, 2015. **527**(7577): p. 186-91.
203. Berberat, P.O., et al., *Inhibition of heme oxygenase-1 increases responsiveness of pancreatic cancer cells to anticancer treatment*. Clin. Cancer Res., 2005. **11**(10): p. 3790-8.
204. Zhang, Y., et al., *Protection of chlorophyllin against oxidative damage by inducing HO-1 and NQO1 expression mediated by PI3K/Akt and Nrf2*. Free Radic. Res., 2008. **42**(4): p. 362-71.
205. Baxter, J.H., *Absorption of chlorophyll phytol in normal man and in patients with Refsum's disease*. J. Lipid Res., 1968. **9**(5): p. 636-41.