

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognosie

Mgr. Michaela Nováková

**IZOLACE A BIOLOGICKÁ AKTIVITA PIGMENTU MYXOXANTHOPHYLLU
Z MIKROŘAS**

Rigorózní práce

Vedoucí rigorózní práce:

Doc. PharmDr. Lenka Tůmová, Ph.D.

Odborný konzultant:

Dr. José Carlos Cheel Horna, Ph.D.

CHARLES UNIVERSITY

Faculty Of Pharmacy In Hradec Králové

Department of Pharmacognosy

Mgr. Michaela Nováková

**ISOLATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE PIGMENT
MYXOXANTHOPHYLL FROM MICROALGAE**

PharmDr. Thesis

Supervisor:

Doc. PharmDr. Lenka Tůmová, Ph.D.

Co-supervisor:

Dr. José Carlos Cheel Horna, Ph.D.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Datum: 21.1.2022

Podpis:

Velmi ráda bych poděkovala za vedení mé rigorózní práce Dr. Josému Carlos Cheel Hornovi, Ph.D. a Doc.PharmDr. Lence Tůmové, Ph.D. Za vědecký dozor a cenné rady v průběhu celého výzkumného procesu Dr. Josému Carlos Cheel Hornovi, Ph.D. Děkuji také PharmDr. Doris Vokurkové, Ph.D.

Tato práce byla vytvořena jako výsledek spolupráce mezi Katedrou farmakognosie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Centrem Algatech, Mikrobiologický ústav AV ČR , Ústavem klinické imunologie a alergologie, Lékařská fakulta a Fakultní nemocnicí, Karlova Univerzita, Hradec Králové.

Obsah

1.	ÚVOD.....	10
2.	CÍL PRÁCE.....	11
3.	TEORETICKÁ ČÁST.....	12
3.1	Mikrořasy - Sinice (Cyanobakterie).....	12
3.1.1	Obecná charakteristika taxonomie.....	12
3.1.2	Morfologie, fyziologie, ekologie a kultivace sinic.....	13
3.1.3	Obsahové látky sinic (primární a sekundární metabolity).....	14
3.2	Karotenoidy.....	15
3.2.1	Chemická struktura.....	16
3.2.2	Vlastnosti karotenoidů a jejich potencionální využití ve farmacii.....	16
3.2.3	Biosyntéza karotenoidu myxoxanthophyll ze cyanobakterie <i>Synechocystis</i>	18
3.3	Chromatografie.....	19
3.3.1	Princip a rozdělení.....	19
3.3.2	Kapalinová chromatografie.....	20
3.3.3	Vysokoúčinná protiproudá chromatografie (HPCCC).....	21
3.3.4	HPCCC pro izolaci karotenoidů.....	24
3.4	Biologická aktivita karotenoidů sinic.....	25
3.4.1	Typy biologických aktivit.....	25
3.4.2	Imunitní systém a jeho funkce.....	31
3.4.3	Imunokompetentní buňky.....	31
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	32
4.1	Pomůcky a přístrojové vybavení.....	32
4.2	Chemikálie.....	33
4.3	Kultivace cyanobakterie <i>Synechocystis salina</i>	33
4.4	Extrakce biomasy.....	34
4.5	Izolace myxoxanthophyllu pomocí HPCCC.....	34
4.5.1	Zařízení použité pro izolaci.....	34
4.5.2	Vývoj a výběr vhodného dvoufázového systému solventů pro izolaci myxoxanthophyllu pomocí HPCCC.....	35
4.5.3	Vlastní proces separace pomocí HPCCC.....	35
4.6	Konečná purifikace myxoxanthophyllu pomocí semipreparativní HPLC.....	36
4.7	Analýza frakcí a extraktu pomocí HPLC.....	36

4.8	Potvrzení chemické identity výsledného purifikovaného myxoxanthophyllu	36
4.9	Testování biologické aktivity izolovaného myxoxanthophyllu	37
4.9.1	Antioxidační aktivita	37
4.9.2	Inhibice aktivity tyrosinázy	37
4.9.3	Aktivace imunitních buněk.....	38
4.9.4	Statistická analýza	39
5.	VÝSLEDKY.....	39
5.1	Kultivace cyanobakterie <i>Synechocystis salina</i> a extrakce biomasy	39
5.2	Separace myxoxanthophyllu pomocí HPCCC (vysokoúčinné protiproudé chromatografie)	40
5.2.1	Výzkum vhodného dvojfázového systému rozpouštědel pro separaci pomocí HPCCC40	
5.2.2	Vliv rychlosti toku mobilní fáze na retenci stacionární fáze uvnitř kolony HPCCC	43
5.2.3	Optimalizace metody HPCCC pro separaci myxoxanthophyllu	44
5.3	Konečná purifikace pomocí semipreparativní HPLC.....	54
5.4	Sumární přehled izolace myxoxanthophyllu	55
5.5	Potvrzení identity cílového vzorku.....	55
5.6	Vyhodnocení biologické aktivity.....	57
5.6.1	Antioxidační aktivita a inhibice tyrosinázy	57
5.6.2	Imunomodulační účinek	58
6.	DISKUZE	60
	Publications (Separations, Impact Faktor: 2.777)	63
	Conferences	63
7.	LITERATURA	64
8.	Seznam tabulek.....	70
9.	Seznam obrázků.....	70
10.	ABSTRAKT	73

Seznam zkratek a vysvětlivek

ACN acetonitril

ACT aceton

AGE reaktivní kyslíkové a dusíkové sloučeniny

AI aktivační index

BuOH n-butanol

(c_A)₁ koncentrace látky A v první fázi

(c_A)₂ koncentrace látky A v druhé fázi

CC kolonová chromatografie

CCALA autotrofní organismy z Botanického ústavu AV ČR

CCC protiproudá chromatografie

CD glykoprotein

CD69 povrchový glykoprotein shluk diferenciacce 69

CM režim souběžné eluce

DMSO dimethylsulfoxid

DNA deoxyribonukleová kyselina

2,2 DPPH 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

DW suchá hmotnost biomasy

ESI zdroj elektrosprejové ionizace

EtoAc ethyl-acetát

EtOH ethanol

F průtok mobilní fáze

FPP plocha fotobioreaktoru

FSC granulocyty s profily předního rozptylu

GC plynová chromatografie

GGPP geranylgeranylpyrofosfát

H₂O voda

HDL lipoprotein s vysokou hustotou
HPCCC vysokoúčinná protiproudá chromatografie
HPLC vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-DAD vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detekcí plochy piků diodovým polem
HRMS/MS tandemová hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
HSCCC vysokorychlostní protiproudá chromatografie
K rozdělovací koeficient
LC kapalinová chromatografie
LDL lipoprotein s nízkou hustotou
L-DOPA levodopa
LC spodní fáze
LLC kapalinová chromatografie systému kapalina-kapalina
LSC kapalinová chromatografie v systému kapalina-pevná látka
MAA mykosporin
MF mobilní fáze
MFI intenzita fluorescence
Myx myxoxanthophyll
NF-kB c-Rel jaderný faktor-kB
n-Hep n-heptan
NK cytotoxická buňka, součást imunitního systému, přirozený likvidátor
NO oxid dusnatý
O.D. optická hustota
ONOO peroxyinitrit
OO peroxylové radikály
PBS fosfátem pufovaný solný roztok
PC papírová chromatografie
PE fycoerythrin

PHA fytohemaglutinin
RF reverzní fáze
RNS reaktivní dusík
ROS reaktivní kyslík
SF stacionární fáze
SHR spontánně hypertenzní potkani
SSC granulocyty s profily bočního rozptylu
T2DM diabetes mellitus 2. typu
TAG triacylglycerol
TLC tenkovrstvá chromatografie
 T_R retenční čas
UCP1, UCP2 a UCP3 mitochondriální rozpojovací proteiny
UP horní fáze
 V_c objem kolony
 V_M objem mobilní fáze
 V_s objem stacionární fáze

1. ÚVOD

V současné době je globální trh přesycen produkty, které obsahují pigmenty získané organickou syntézou. S rostoucími důkazy o nebezpečí konzumace těchto chemických látek a se stále zvyšujícím se trendem používání přírodních surovin, roste zájem spotřebitelů o přírodní složky v nutraceutikách, potravinách, ale i v kosmetice. Nejdůležitějšími přírodními pigmenty jsou karotenoidy, jejich hlavními zdroji jsou mikrořasy, především sinice-fotosyntetické bakterie (cyanobakterie). Sinice *Synechocystis salina* je jedním z nejrozsáhleji studovaných druhů, obsahuje řadu pigmentů (chlorophyll, phycocyanin, fucoxanthin, β -caroten, astaxanthin, lutein, zeaxanthin, cantaxanthin), vitamíny (A, B1, B2, B3, B6, B12, C, E, H, kyselina listová, kyselina pantothenová), minerály a stopové prvky (K, Ca, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, P, Se, Na, Zn), nukleové kyseliny, antibakteriální, antivirové a fungicidní látky. Jejich významné biofunkční vlastnosti přilákaly pozornost řady průmyslových odvětví farmaceutických firem a výzkumných pracovníků. Jedním z méně známých karotenoidů je žlutý pigment myxoxanthophyll, glykosylovaný, monocyklický karotenoid, který nebyl dosud komerčně nabízen. Jeho vyjimečné účinky na lidský organismus budou dále zkoumány a myslím, že i potencionálně prospěšně využity v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Cyanobakterie *Synechocystis salina* je jedinečným zdrojem pigmentů, avšak pro získávání myxoxanthopyllu z této biomasy nebyl zatím vyvinut žádný účinný a nákladově efektivní izolační proces, který by bylo možné uvést do průmyslového měřítko.

2. CÍL PRÁCE

Cílem mé práce byla izolace vzácného pigmentu myxoxanthopyllu z mikrořas, konkrétně z cyanobacterie *Synechocystis salina* pomocí vysokoúčinné protiproudé chromatografie (HPCCC) a jeho následná purifikace pomocí HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie). Tento způsob separace s použitím dvou nemísitelných kapalin má řadu výhod, např. velká kapacita plnění vzorku, vysoká výtěžnost, nízká spotřeba rozpouštědel a velká provozní univerzálnost mobilní a stacionární fáze. Následným úkolem bylo testování antioxidačních, tyrosinázových a imunitních účinků myxoxanthophyllu na lidské zdraví.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Mikrořasy - Sinice (Cyanobakterie)

3.1.1 Obecná charakteristika taxonomie

Sinice (Cyanobacteria) jsou evolučně velmi staré organismy. Řadíme je mezi mikrořasy, díky jejich schopnosti fotosyntézy a reprodukčním vlastnostem. Jejich první paleontologické nálezy pocházejí z doby před 3,5 miliardami let. Jedná se o prokaryotní organismy s fotosyntézou rostlinného typu provázenou tvorbou kyslíku. Významně ovlivnily globální ekosystém, zejména vznikem kyslíkaté atmosféry. Tím poskytly podmínky pro vývoj dalších organismů. Jejich modrozelené stélky jsou jednobuněčné nebo vláknité v obou případech se vyskytují jednotlivě nebo tvoří kolonie. Jsou všeobecně rozšířené ve vodním prostředí, ve slané i sladké vodě, v půdě nebo na povrchu kamenů a skal. Jsou schopné žít i v extrémních podmínkách. Známe druhy, které vegetují v horkých pramenech (teplota 50-90 °C) nebo na sněhu a ledu. Některé sinice (rod *Nostoc*, *Gloeocapsa*, *Stigonema*) ochotně vstupují do symbiotických reakcí s jinými organismy, např. lišejníky, nahosemennými rostlinami či prvoky. [1,2,3]

V současnosti je známo asi 200 rodů a několik tisíc druhů sinic. Jelikož chybí detailnější prozkoumání některých oblastí, např. tropů, je skutečný počet mnohem vyšší. Díky značné proměnlivosti (fenoplasticitě) sinic se nepopisují druhy, ale jen rody. Detailněji bylo dosud popsáno jen velmi málo zástupců. Podle biochemických charakteristik se dá použít pro taxonomii dělení podle obsahu karotenoidů nebo mastných kyselin. S klasifikací sinic mají taxonomové mnoho problémů, jsou navrhovány různé systémy, např. podle molekulární analýzy. Základní rozdělení je do pěti řádů:

- *Chroococcales*
- *Chamaesiphonales*
- *Oscillatoriales*
- *Nostocales*
- *Stigonematales* [4]

3.1.2 Morfologie, fyziologie, ekologie a kultivace sinic

Sinice patří mezi gramnegativní bakterie. Mají pevnou, vícevrstvou buněčnou stěnu a na rozdíl od eukaryotních organismů nemají buněčné jádro ani buněčné organely (chloroplasty, mitochondrie, Golgiho tělíska apod.). Nemají mikrotubuly, cytoskelet ani žádný bičík.[1] Nejvíce nápadnými útvary v cytoplazmě jsou ploché váčky s fotosyntetickým aparátem, tzv. thylakoidy. Mají na svém povrchu drobné útvary fykobilizomy, které obsahují specifická barviva dva modré pigmenty (C-phycoerythrin a allophycoerythrin) a jeden červený (C-phycoerythrin). Tyto světločerné pigmenty umožňují mimo jiné i fotosyntézu sinic při velmi nízké hladině osvětlení hluboko pod hladinou vody, uvnitř půdy, v kamenech, v jeskyních atd. V thylakoidech jsou obsaženy pigmenty chlorophyll, hlavní (fotosyntetický) pigment β -caroten, zeaxanthin, echinenon a myxoxanthophyll (specifický xanthophyll sinic). [62]

Hlavní zásobní látkou u většiny sinic je sinicový škrob, který je svými vlastnostmi shodný s glykogenem některých bakterií, hub a živočichů. V buňkách se také nachází cyanofycinová zrnka a v nich uložené aminokyseliny, které představují dusíkatou zásobní látku. Polyfosfátové granule (volutin) jsou důležité v kritickém období nedostatku fosforečnanů z prostředí.[1]

Sinice, které tvoří vodní květ, tzv. aerotypy obsahují v cytoplazmě plynné měchýřky. Jejich stěna je poměrně pevná a propustná pro plyny. Tato plynem naplněná struktura je pouze u sinic a některých druhů bakterií. U sinic řádu *Nostocales* a *Stygonematales* jsou specializované buňky, tzv. heterocyty, které se vytvoří v buňce sinic asi v průběhu 24 hodin jako reakce na nízký obsah dusíkatých látek v prostředí. Heterocyty obsahují thylakoidy, které na světle neprodukují kyslík, protože vazba plynného dusíku pomocí mikrogenázy probíhá v přísně anaerobních podmínkách.[1]

Sinice jsou součástí sladkovodního i mořského planktonu, žijí téměř všude v nárostech půdy, na smáčených stěnách uvnitř kamenů. Mohou být součástí i extrémních biotopů. Při nadbytku živin tvoří tzv. vodní květ. Některé druhy jsou jedovaté, produkují toxiny, které nejsou jen odpadním produktem, ale mají přímo gen na jejich tvorbu. Sinice vstupují do symbiotických vztahů, např. s játrovkami (*Blasia*), hlavičky (*Anthoceros*), kapradinami (*Azolla*), makrosemennými rostlinami nebo tvoří fykobiont lišejníků. Sinice jsou výrazným geologickým činitelem. Mají velký význam při tvorbě nejstarších geologických útvarů v zemi, tzv. stromatolidů, které vznikají usazováním především uhličitanu vápenatého v pochvách sinic. [62]

Kultivací sinic získáme mnoho cenných látek potencionálně využitelných ve farmacii, potravinářství a v kosmetickém průmyslu. Optimální produkci těchto bioaktivních látek můžeme ovlivňovat shodnými kultivačními podmínkami. Je nezbytné nastavit nejlepší růstové podmínky pro produkci biomasy a pro syntézu důležitých metabolitů. Prvotní experimenty s kultivací se prováděly na Petriho miskách, v Erlenmayerových baňkách a v akváriích. Pokud byla aktivní látka nalezena, bylo nutné vyvinout zařízení na masovou kultivaci, např. dlouhé světelné trubice s probublávajícím vzduchem, ploché kultivační nádoby nebo bazénky. Unikátní je vynález kultivace na plošinách, který vyžaduje minimum externí energie a poskytuje vysoké výnosy.[4]

3.1.3 Obsahové látky sinic (primární a sekundární metabolity)

Primární metabolismus je soubor životně důležitých metabolických reakcí probíhajících ve všech rostlinných a živočišných organismech. Mezi produkty primárního metabolismu řadíme důležité funkční látky (např. enzymy, nukleové kyseliny), strukturální součásti protoplastů (proteiny, membránové lipidy), meziprodukty metabolismu a zásobní látky (sinicový škrob, glykogen). Naproti tomu sekundární metabolity nejsou zpravidla zdrojem energie, jejich rozklad nemá význam pro syntetizující buňku. Nepatří k základnímu biochemickému vybavení buňky.[5]

Sinice (Cyanobacteria) produkují nepřehledné množství sekundárních metabolitů, často v různých strukturních variantách a ve velkých koncentracích. Biologicky aktivní metabolity jsou cyanotoxiny, které snesou srovnání např. s hadími jedy. Bylo zjištěno, že metabolity izolované ze sinic vykazují široké spektrum aktivit proti bakteriím, houbám, prvokům, řasám i savčím tkáním. V dnešní době je preferován modernější systém dělení, a to podle působení toxinu, který rozděluje cyanotoxiny na neurotoxiny, hepatotoxiny, cytotoxiny, dermatotoxiny, embryotoxiny, genotoxiny a mutageny, imunotoxiny, imunomodulátory a promotory nádorového bujení (tumor promoting factors). Podle počtu publikací největší pozornost vědců zaujímají hepatotoxiny a neurotoxiny. Byl také zjištěn pozitivní vliv na lidský organismus v případě rodu *Nostoc* a to protinádorový účinek. Některé sinice mohou tvořit současně více cyanotoxinů, bylo popsáno mnoho případů úhynu krav, koz, ovcí a psů v důsledku otrav z vody zamořené sinicemi. [1,4]

Další velice důležité látky obsažené v buněčných membránách sinic jsou karotenoidy, nezbytné pro udržení integrity fotosyntetického aparátu. Různé druhy a změny cyanobakterií mají různé karotenoidní kompozice a růstové podmínky (intenzita světla, zdroj dusíku).

Sinice obsahují karotenoidy, které se dělí podle přítomnosti kyslíku v jejich řetězci na karoteny a xantofyly. Xantofyly obsahují kyslík a díky přítomnosti hydroxyly a keto skupiny jsou hydrofilní.

Hlavními karotenoidy jsou β -caroten a jeho hydroxylové deriváty, echinenon, conthaxanthin a karotenoidní glykosidy. Rod cyanobakterií zvaný *Synechocystis* obsahuje 26 % β -carotenu, 36 % myxoxanthophyllu, 14 % zeaxanthinu a 18 % echinenonu a 6 % ostatních zbytných karotenoidů. [6]

3.2 Karotenoidy

Téměř všechny živé organismy na Zemi (s výjimkou např. chemolithotrofních bakterií) využívají ve svých metabolických procesech chemickou energii, která je přeměněna z energie světelného záření pomocí fotoautotrofních organismů, např. sinice nebo řasy, v procesu fotosyntézy. Z hlediska života na Zemi jsou tedy fotosyntetické pigmenty hlavně chlorofyly jednou z klíčových molekul.

Fotosyntetické pigmenty se u řas a sinic vyskytují v thylakoidních membránách chloroplastů ve formě pigment-proteinových komplexů-fotosystémů. Rozlišují se dvě skupiny barviv: zelené chlorofyly a žluto-oranžovo-červené karotenoidy. Jejich obsah a složení je důležitým ukazatelem stavu fotosyntetického aparátu, závisí na druhu rostliny, stáří asimilačních orgánů, minerální výživě a také podmínkách růstu (slunná a stinná místa). [61]

Karotenoidy jsou lipofilní rostlinné pigmenty žlutě, oranžově nebo červeně zbarvené. Ve vyšších rostlinách jsou asociovány spolu s chlorofyly v chloroplastech, hlavně v listech, plodech a květech, což způsobuje jejich zbarvení. Karotenoidy jsou součástí buněčných membrán všech kyslíkatých fotoautotrofních organismů. Dále se vyskytují jako produkty sekundárního metabolismu, např. v cyanobakteriích, řasách, fototrofních bakteriích a v nefotosyntetizujících kvasinkách a plísních. Živočišné organismy nemají schopnost tyto pigmenty syntetizovat. Získávají je pouze z potravy a přetváří si je na látky jiné struktury nebo je ukládají do svých tukových tkání. [7,8]

3.2.1 Chemická struktura

Z chemického hlediska patří karotenoidy do skupiny tetraterpenů (C₄₀). Jejich základní uhlíkatý skelet je tvořen osmi jednotkami isoprenu (2-methyl-buta-1,3 dien).

Karotenoidy můžeme rozdělit na hlavní skupiny:

- podle obsahu kyslíku
 - karoteny – uhlovodíky, lišící se polohou dvojných vazeb (α -caroten, β -caroten, γ -caroten)
 - xantofyly – funkční kyslíkaté deriváty (alkoholy, ketony)
- podle struktury řetězce
 - acyklická struktura – lycopen, phytoen
 - monocyklická struktura – γ -caroten, torulen
 - bicyklická struktura – α -caroten, β -caroten. [9]

Známé karoteny jsou β -caroten a lycopen – oba jsou základní uhlovodíkové karotenoidy a neobsahují ve svých strukturách žádný substituent (dokonce ani kyslík). Xantofyly nebo oxykarotenoidy jsou molekuly obsahující kyslík. Lutein a zeaxanthin jsou dva xantofyly se skupinami –OH ve svých strukturách, zatímco canthaxanthin a echinenon obsahují =O skupiny. Astaxanthin má ve své struktuře jak –OH, tak =O skupiny. Dále některé karotenoidy jako je violaxanthin a diadinoxanthin obsahují epoxidové skupiny a další, jako je dinoxanthin a fucoxanthin má ve svých strukturách acetylové skupiny. [10]

Barevnost karotenoidů je způsobena přítomností konjugovaných dvojných vazeb nejčastěji v konfiguraci „all trans“, což znamená, že všechny dvojně vazby v řetězci zaujímají tuto konfiguraci. Avšak vlivem některých fyzikálních faktorů, zejména vlivem světla určitých vlnových délek a zvýšením teploty dochází k tvorbě cis izomerů. [9,11,12,13]

3.2.2 Vlastnosti karotenoidů a jejich potenciální využití ve farmacii

V čistém stavu tvoří karotenoidy hnědočervené až temně purpurové krystaly prakticky nerozpustné ve vodě, velmi málo rozpustné v nižších alkoholech a mastných olejích a velmi dobře rozpustné v uhlovodících. Jsou významně citlivé vůči působení vzdušného kyslíku, oxidačních činidel a světla. [9,14]

V důsledku obsahu konjugovaného systému dvojných vazeb jsou za přítomnosti kyslíku velmi snadno oxidovatelné. Pokud jsou dispergovány v kapalném prostředí za přítomnosti antioxidačních látek (tokoferoly) jsou znatelně stabilnějšími. [9,14]

Karotenoidy spolu s chlorofyly mají důležitou funkci při fotosyntéze, jsou považovány za nezbytné při syntéze, akumulaci a udržení integrity fotosyntetického aparátu. Díky svému odlišnému absorpčnímu spektru zachycují fotony jiných vlnových délek než chlorofyly. Mají také ochrannou funkci, chrání organismy před fotooxidací a fotoinhibicí. Při nadbytku zachycené světelné energie jsou schopné tuto energii přeměnit na teplo a tím ochránit ostatní součásti fotosystémů před destrukcí. [15]

Dále tyto molekuly pomáhají při různých chronických onemocnění, jako je *diabetes mellitus*, metabolický syndrom a v boji proti některým nemocem způsobených vlivem volných radikálů, např. nádorová onemocnění, degenerativní procesy stárnutí a kardiovaskulární onemocnění. [10,16,17] Karotenoidy jsou nejdůležitějším zdrojem provitaminu A pro lidskou populaci. Antixeroftalmickou aktivitu vitaminu A vykazuje asi 50 přirozeně se vyskytujících sloučenin. Nejvýznamnější je β -caroten. V potravinách je často obsažen α -caroten, γ -caroten a xantofyly. [17,18,19]

Další důležitou vlastností karotenoidů je jejich pozitivní vliv na imunitní systém člověka. Chrání lidskou kůži před vysokou intenzitou slunečního záření a UV záření, které může vést k poškození kůže, popř. může být příčinou rakoviny kůže. [19]

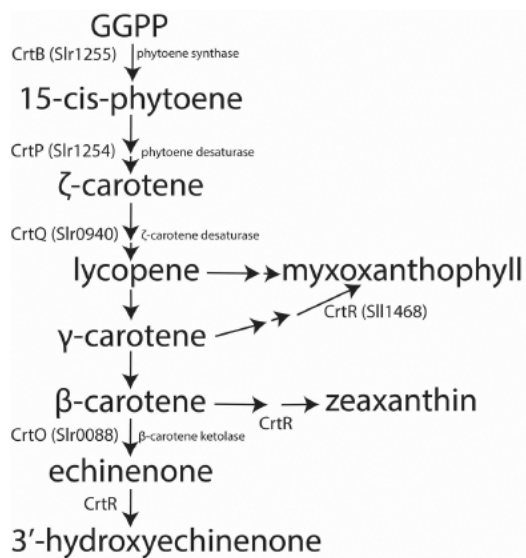
Hlavní biologický účinek karotenoidů spočívá v jejich antioxidační aktivitě, každý z nich, i když jsou si podobné, účinkuje na určitou tkáň. Vyšší denní dávky karotenoidů, než jsou doporučené, mohou zbarvit kůži na dlaních a chodidlech. Tento příznak je neškodný a vymizí, snížíme-li denní dávkování. [20]

Většina studií o karotenoidech byla zaměřena hlavně na preventivní a ochranné účinky. Nedávné studie však uvádějí, že karotenoidy mohou také hrát významnou roli v léčbě různých jiných nemocí. Ačkoli mechanismy některých karotenoidů byly dobře prostudovány, většina ostatních účinků karotenoidů, jako např. jejich pro-vitamin A aktivita, metabolická aktivita, účinky na imunitní a endokrinní systém, stejně jako jejich účinky na regulaci buněčného cyklu, apoptózu a buněčnou diferenciaci ještě nebyly detailně studovány. I když existuje řada probíhajících studií zkoumajících použití karotenoidů ke zvýšení zdravotní péče a krásy, většina z těchto studií byla prováděna jen na zvířecích modelech. [10]

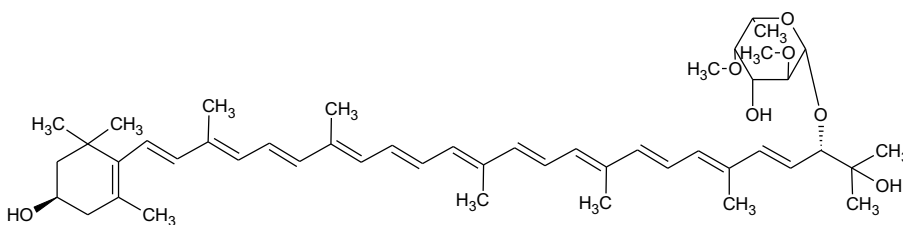
Budoucí oblasti výzkumu se budou muset zaměřit na klinické studie u lidí. Je zde velký potenciál využití karotenoidů při vývoji nových strategií pro prevenci, léčbu a zvládání nemocí. [10]

3.2.3 Biosyntéza karotenoidu myxoxanthophyll ze cyanobakterie *Synechocystis*

Hlavním karotenoidem v cyanobakteriích je β -caroten, jeho hydroxylové deriváty-zeaxanthin a nostoxanthin, jeho ketoderiváty-echinenon a canthaxanthin a karotenoidové glykosidy-myxol-2'-glykosidy a oscillol-2,2'-diglykosidy. V *Synechocystis* sp.PCC6803 jsou zastoupeny karotenoidní složky 26 %, β -caroten 36 %, myxoxanthophyll 18 %, echinenon 14 %, zeaxanthin a ostatní minoritní 6 %. Biosyntéza všech karotenoidů vychází ze všeobecné metabolické dráhy isoprenoidů objevené již v 60 letech. Prvním krokem je kondenzace dvou diterpenů GGPP (geranylgeranylpyrofosfát C₂₀) se vytvoří karotenoid phytoen. Proces je v *Synechocystis* sp.PCC6803 katalyzován fytoensyntázou. Postupným vytvářením konjugovaných dvojných vazeb vzniká C₄₀ bezbarvý karotenoid lycopene, z něhož se dále syntetizují ostatní acyklické či cyklické karotenoidy. Tato syntéza probíhá různými druhově specifickými reakcemi zahrnující např. hydrogenaci, dehydrogenaci, cyklizaci či oxidaci, příp. kombinaci těchto pochodů. Přestože většina genů, které se účastní biosyntézy myxoxanthophyllu byla identifikována v několika organismech, včetně *Synechocystis* sp. PCC 6803, detailní biosyntetická dráha není stále zcela objasněna. Předpokládá se, že tento pigment jakožto specifický karotenoid některých sinic, je syntetizován vedlejší dráhou z γ -carotenu, který vzniká z lycopenu za katalýzy lykopen cyklázou. [6] Souhrnný přehled biosyntézy karotenoidů počínaje GGPP je popsán na obrázku č.1. Chemická struktura myxoxanthophyllu je znázorněna na obrázku č.2.



Obrázek 1: Zjednodušená cesta pro biosyntézu karotenoidů v *Synechocystis*, zahrnutý pouze enzymy s ověřenou funkcí. [6]



Obrázek 2: Chemická struktura myxoxanthophyllu [40].

3.3 Chromatografie

3.3.1 Princip a rozdělení

Chromatografie patří mezi nejdůležitější metody, umožňující separaci složek směsi nebo kvalitativní i kvantitativní analýzu vzorků. Během separace se využívá různých fyzikálních, fyzikálně chemických a chemických vlastností vzorku. Dochází k postupnému a mnohonásobně opakovanému vytváření rovnovážného stavu dělené látky (A) mezi dvě různé nemísitelné fáze. Po dosažení rovnováhy může být distribuce složky A vyjádřena distribuční konstantou K , jedná se poměr koncentrací (c) této složky ve dvou daných fázích (1,2).

$$K = (c_A)_1 / (c_A)_2$$

Jedna fáze je stacionární, nepohyblivá. Může mít různé formy, např. částičky tuhé látky o velikosti jednotek až stovek mikrometrů, vrstvičku kapaliny nanesenou na tuhých částicích nebo kapalinou naplněná kolona. Druhá fáze je pohyblivá a unáší separované látky. Podle způsobu provedení dělíme chromatografie na CC-kolonovou chromatografii, PC-papírovou chromatografii (stacionární fáze je chromatografický papír) a TLC tenkovrstvou chromatografii, (stacionární fáze je na skleněné desce nebo na aluminiové fólii).

Další dělení je podle fyzikálně-chemického děje, tzn. podle separačního mechanismu na adsorpční, rozdělovací, iontově výměnnou a gelovou chromatografii.

Primární rozdělení chromatografie je na kapalinovou (LC) a plynovou (GC) podle skupenství mobilní fáze. [21,22,23,25]

3.3.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je v systému kapalina-pevná látka (LSC); jedná se o tzv. adsorpční chromatografii. Je založena na různé schopnosti látek v roztoku absorbovat se na povrch pevné fáze, nejprve dojde k absorpci podle afinity dělených složek a potom je třeba látky z vazby uvolnit desorbovat, to se provádí prostou elucí nebo vytěsněním roztokem látky, která má k absorbentu větší afinitu.

Druhý systém je kapalina-kapalina (LLC), tzv. rozdělovací chromatografie, probíhá v systému dvou navzájem nemísitelných kapalin a k separaci dochází na základě odlišnosti rozdělovacích koeficientů. Nedochozí k vazbě na některou z fází, a proto není nutná následná eluce. V původním provedení postupovaly obě kapaliny protiproudě, v současné době se však již toto uspořádání nepoužívá. Jedna z kapalných fází zakotví na inertní pevný nosič a stane se tak stacionární fází, zatímco druhá přes tuto fázi přetéká. Při normálním uspořádání je stacionární fází vodná fáze (nebo s vodou mísitelná), mobilní fází je fáze nepolární. Nosiči stacionární fáze mohou být látky, které absorbují značné procento vody, aniž by se změnilo jejich skupenství, např. silikagel nebo dextran. Toto uspořádání umožňuje separaci polárních ve vodě rozpustných látek. Látky nepolární je třeba separovat v tzv. chromatografii s převrácenou fází. [24]

Moderní separační technikou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography-HPLC). Má vysokou efektivitu a v krátkém čase dokáže rozdělit složité multikomponentní směsi. Výhodou HPLC je schopnost analyzovat termolabilní látky, které by

při použití plynové chromatografie degradovaly, a tím by nebyla možná analýza. Metoda HPLC existuje ve dvou modifikacích:

- normální HPLC – stacionární fáze je polárnější než fáze mobilní
- reverzní HPLC – mobilní fáze je polárnější než stacionární, která se používá častěji.

Mobilní fází může být například voda, methanol, acetonitril a jejich směsi v různých poměrech, pufrů a další. Mobilní fáze vstupuje do interakce se složkami analyzované směsi a konkrétní složení mobilní fáze může významným způsobem ovlivňovat celou analýzu.

Stacionární fáze je tvořena mikročásticemi silikagelu ($3\ \mu\text{m} - 10\ \mu\text{m}$), na kterých je navázána vlastní stacionární fáze. Vlastní stacionární fáze může být tvořena například nepolárními uhlovodíky (oktan, oktadekan) nebo polárnějšími uhlovodíky s funkční skupinou (-CN).

Kolonu obvykle tvoří nerezová trubice o vnitřním průměru okolo 4 mm a délce 5 cm – 25 cm, která je naplněna stacionární fází. O schopnosti kolony separovat určité směsi na jednotlivé složky opět rozhoduje zejména typ stacionární fáze zakotvené na silikagelovém nosiči.

Vysokotlaká pumpa je velmi důležitou součástí HPLC aparatury. Kolony pro HPLC jsou plněny mikročásticemi (stacionární fáze), které při průchodu mobilní fáze kladou značný odpor. Z toho důvodu musí být mobilní fáze pod vysokým tlakem (až 40 MPa), aby mohla projít přes kolonu.[25]

3.3.3 Vysokoučinná protiproudá chromatografie (HPCCC)

Protiproudá chromatografie je systém chromatografie kapalina-kapalina, kde je stacionární fáze udržována v koloně pomocí odstředivé síly. Zahrnuje soubor souvisejících technik, které používají dvě nemísitelné kapalně fáze bez pevného podkladu. Obě kapalně fáze přicházejí do vzájemného kontaktu, alespoň jedna fáze je čerpána přes kolonu, dutou trubku nebo řadu komor spojených s kanály, která obsahuje obě fáze. Nastříknutý vzorek prochází spolu s mobilní fází přes kolonu a podle svého distribučního koeficientu jsou jednotlivé komponenty drženy ve stacionární fázi a přechází dále přes detektor a do sběrače frakcí. K zajištění správné selektivity pro požadovanou separaci lze použít řadu systémů rozpouštědel a vybrat ten s nejvhodnějším distribučním koeficientem.

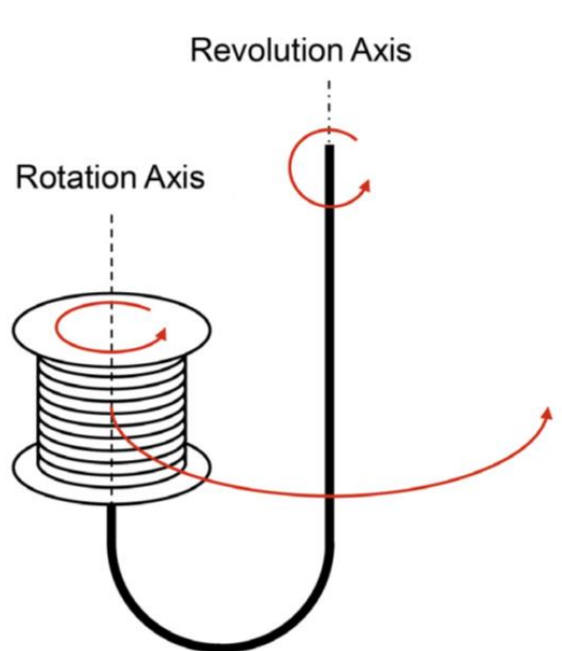
Moderní éra CCC začala vývojem planetární odstředivky od Dr. Yoichira Ita, která byla poprvé představena v roce 1966 jako uzavřená spirálová trubice, která se otáčí kolem „planetární“ osy. Dr.

Yoichira Ita, používal jedinou cívku a vyvažovačku plus sadu „volných vodičů“, které jsou trubkami spojující cívku. Dr. Walter Conway a další později vyvinuli design cívky tak, že na jednu cívku bylo možné umístit více cívek, dokonce i cívky různých velikostí hadiček. Edward Chou později vyvinul a design trojitě cívky jako Pharmatech CCC, který měl mechanismus de-twist pro vedení mezi třemi cívkami. Nyní jsou k dispozici CCC dispozici s až 4 cívkami, mohou být v trubkách z PTFE, PEEK, PVDF nebo z nerezové oceli. V roce 1982 byla funkce protiproudé chromatografie vylepšena a zefektivněna na vysokorychlostní protiproudou chromatografií - High speed countercurrent chromatography (HSCCC). Hydrodynamický princip CCC je často uváděn na trh jako vysokoúčinná protiproudá chromatografie (HPCCC) (obrázek č.3), která využívá Archimédovu šroubovou sílu ve spirálové cívce, aby udržely stacionární fázi v koloně. Složky systému CCC jsou podobné jako konfigurace vysoce účinné kapalinové chromatografie. Jedno nebo více čerpadel vstříkují fáze do kolony, která je samotným přístrojem CCC. Vzorky se aplikují do kolony vzorkovací smyčkou naplněnou automatizovanou nebo manuální stříkačkou a jsou monitorovány různými detektory, jako je ultrafialová viditelná spektroskopie nebo hmotnostní spektrometrie. Provoz čerpadel, přístroje CCC, vstříkování vzorku i detekce lze ovládat ručně nebo mikroprocesorem. [63]

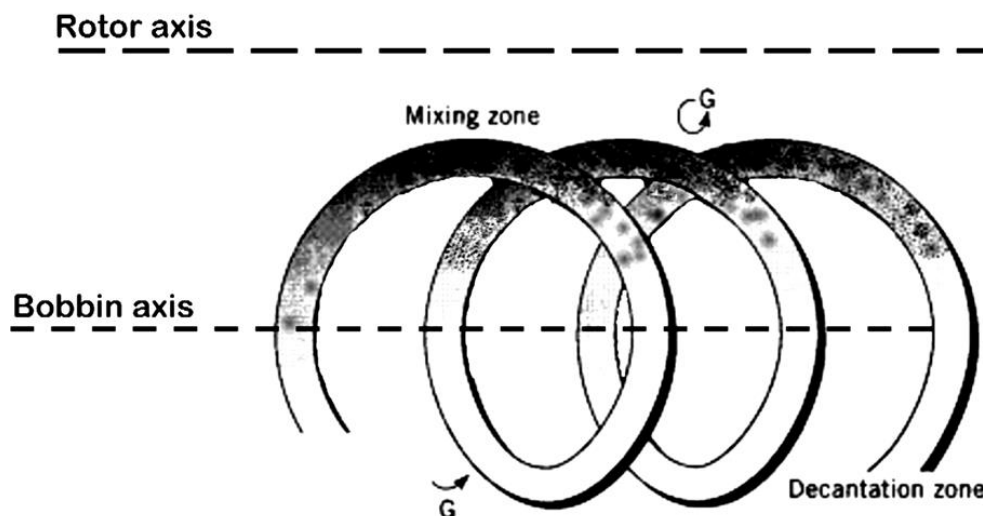
V CCC je kapalná stacionární fáze zadržována uvnitř kolony pomocí odstředivé síly, zatímco mobilní fáze protéká kolonou. Držák kolony se otáčí kolem své vlastní osy a zároveň se otáčí kolem osy odstředivky stejnou úhlovou rychlostí (ω) ve stejném směru (obrázek č.4). Tato rotace generuje proměnné odstředivé silové pole, které vytváří míchací a usazovací zóny po celé délce stočené kolony (obrázek č.5). Separace cílových látek poté probíhá na základě jejich hodnoty rozdělovacího koeficientu (K) pro dané nemísitelné kapalně fáze, tedy látky, které mají odlišné rozdělovací koeficienty. Mezi dvěma nemísitelnými kapalnými fázemi bude možné separovat pomocí CCC. Vzhledem k tomu, že tato nově vznikající technologie nepoužívá pevnou podporu jako stacionární fázi, nabízí oproti jiným typům chromatografie mnoho výhod. Má např. jedinečnou selektivitu, vysoký objem nástříku, dále poskytuje úplnou regeneraci nastříknutého vzorku, nízké riziko denaturace vzorku a nízkou spotřebu rozpouštědel. [27] Vzhledem ke kapalně povaze stacionární fáze v CCC je možné připravit a použít rozpouštědlové systémy s velkým rozsahem polarity, čímž se pokryje separace široké škály látek. Tato všestrannost by mohla usnadnit vývoj simultánních a sekvenčních izolačních platforem pro produkci většího množství různých mastných kyselin z řas.



Obrázek 3: Vysokoučinná protiproudá chromatografie (HPCCC) [fotografie pořízena přímo v laboratoři Algatech]



Obrázek 4: Princip tvorby planetárního pohybu separační kapilární cívky typu J v CC [59]



. Obrázek 5.: Schematický pohled na pohyb kapaliny v CCC kolonách [26]

3.3.4 HPCCC pro izolaci karotenoidů

Protiproudá separace karotenoidů začíná výběrem vhodného dvoufázového rozpouštědlového systému, je k dispozici široká škála dvoufázových směsí rozpouštědel, včetně kombinace *n*-hexanu (nebo heptanu), ethylacetátu, methanolu a vody v různých poměrech. Měřený rozdělovací koeficient z rozdělovacího experimentu bude indikovat eluční chování sloučeniny. Je žádoucí zvolit rozpouštědlový systém, který má rozdělovací koeficient mezi 0,25-4.

Vzorek je rozpustný v mobilní fázi, tato fáze nese vzorek přes stacionární fázi. Dochází k separaci jednotlivých složek vzorku podle rozdílné afinity k mobilní fázi a stacionární fázi. Stacionární fáze je pevně ukotvena v koloně, zůstává tam a přes ní je pumpována mobilní fáze. V tomto případě je stacionární fáze (lower phase) těžká, polárnější a mobilní fáze (upper phase) lehká, méně polární. Model reverzní fáze je opačný. V koloně je stacionární fáze (upper phase) méně polární a opačná fáze je mobilní, polárnější (lower phase). Tento model umožňuje separaci polárnějších složek vzorku, protože mají vyšší afinitu k mobilní fázi. Tento reverzní model byl použit v separaci myxoxanthophyllu v této práci. [61]

3.4 Biologická aktivita karotenoidů sinic

3.4.1 Typy biologických aktivit

Sinice pomocí chemické energie získané fotosyntézou vytváří různé biochemické sloučeniny, které mají velkou komerční hodnotu díky antioxidačním vlastnostem, zářivým barvám a pozitivnímu účinku na podporu zdraví. Tyto aktivity byly potvrzeny řadou studií a mají velký potenciál pro další výzkum. Mnoho rodů mikrořas, jako např. *Spirulina*, *Nostoc*, *Botryococcus* a *Porphyridium* jsou známé pro výrobu různých druhů bioaktivních sloučenin. Např. *Nostoc* sp. R76DM se používá v kosmetice k produkci aminokyselin podobných mykosporinu (MAA), které vykazují schopnost absorbovat UV záření. Extrakt z *Arthrospira* se používá jako prostředek proti stárnutí, eliminuje známky předčasného stárnutí a odstraňuje stří. [28] Sinicemi jsou produkovány různé druhy karotenoidů, mezi nejvíce zkoumané patří β -caroten, astaxanthin, lutein, zeaxanthin, lycopene, canthaxanthin a fucoxanthin. β -caroten je jedním z nejhojnějších zdrojů provitaminu A, lutein a zeaxanthin, jsou rozhodující pigmenty v oční makule a lutein byl také klinicky potvrzen inhibovat kataraktu. Canthaxanthin také pomáhá při prevenci onemocnění krevních poruch je však také prokázáno, že je nebezpečný, pokud je užíván ve velkém množství. Fucoxanthin je další karotenoid, který je produkován sinicemi a je oblíbený pro své protirakovinné, protizánětlivé účinky a proti obezitě. [28] V tabulce č.1 jsou uvedeny nejznámější karotenoidy, jejich molekulová hmotnost, absorpční spektrum a jejich prospěšné biologické účinky.

	Pigment	Absorpční spektrum	Molekulární hmotnost	Barva	Použití a aktivita	Reference
1	Chlorophyll	662,430 nm	892	zelená	Farmaceutický a kosmetický průmysl	da Silva Ferreira a San'tAnna 2017
Fykobiliproteiny						
2	Phycoerythrin	490-570 nm	240 000	červená	Immunofluorescenční techniky, protilátkové označení	Sonania a kol.,2018
3	Phycoerythrocyanin	560-600 nm	232000	oranžová		Chandra a kol.,2017
4	Phycocyanin	610-625 nm	232000	modrá	potravinářské barvivo, zmrzlina, sladkosti, kosmetika, imunofluorescenční techniky, značení protilátek	Tavanandi a kol.,2018
5	Allophycocyanin	650-660 nm	105000	zelenomodrá		Rastogi a kol.,2015
Karotenoidy						
6	β -caroten	425,450,480 nm	536,87	oranžová	antioxidant, používané jako provitamin A	Nagy a kol.2018
7	Astaxanthin	477 nm	105000	červená	antioxidant, protirakovinový účinek	Fonseca a kol.20156, Guerin a kol., 2003
8	Fucoxanthin	420,444,467 nm	658,91	olivově zelená	účinky proti obezitě, antiproliferativní aktivita	Menichini a kol.,2018

9	Lutein	425,448,476 nm	568,87	žlutavě červená		Zuluaga a kol.,2017
10	Zeaxanthin	428,454,481 nm	568,37	žlutá	používá se u očních chorob souvisejících s věkem, protirakovinová aktivita	Zuluaga kol., 2017
11	Scytonemin	384 nm	544,56	žlutohnědá	antiproliferativní, protizánětlivý účinek	Ratogi a kol.,2016, Soule a kol.,2007

Tabulka 1: Hlavní pigmenty sinic a jejich použití. str. 617 [28]

- **Antiangiogenní a antitumorová aktivita**

Angiogeneze je proces tvorby nových krevních kapilár. Jestliže se stane neregulovanou má za následek řadu patologických procesů a chronických onemocnění, např. revmatoidní artritidu, psoriasis (lupénka), diabetickou retinopatii a některá nádorová onemocnění. Karotenoidy (α -caroten, lutein, zeaxanthin, lycopene, β -cryptoxanthin, fucoxanthin, astaxanthin), stejně jako β -caroten, mohou být užitečné při prevenci rakoviny. Existují studie, zahrnující *in vitro* a *in vivo* experimenty na samčích myších C57BL / 6 a buňkách B16F-10, které byly použity k hodnocení antiangiogenních účinků β -carotenu. Kromě toho léčba β -carotenem také inhibovala aktivaci a jadernou translokaci podjednotek p65, p50 a c-Rel jaderného faktoru-kB (NF-kB), stejně jako další transkripční faktory, jako je c-fos, aktivovaný transkripční faktor-2, a cyklický adenosin.[29]

Jeden z druhů rakoviny trávicího traktu, který byl velmi zkoumán, je rakovina tlustého střeva. β -caroten byl jedním z prvních karotenoidů, jehož pozitivní účinek proti této rakovině byl prokázán. Byla objevena nepřímá závislost mezi příjmem β -carotenu a riziky kolorektálních adenomů. Podobně astaxanthin a canthaxanthin byly zkoumány jako preventivní a ochranné látky, protože řídí hyperproliferaci buněk indukovanou karcinogenem ve dvou orgánech. Fucoxanthin další významný karotenoid byl extrahován z *Phaeodactylum tricoratum* a studie potvrdila jeho vliv na buňky rakoviny tlustého střeva DLD-1 prostřednictvím své silné inhibiční aktivity na β -glukuronidázu. Dále byl studován účinek, indukující apoptózu na buňkách lidské leukémie HL-60. Inhiboval množení buněk HL-60 a indukoval fragmentaci DNA, charakteristický rys apoptotických buněk.

U fucoxanthinu byla prokázána *in vitro* inhibice proliferace nádorů buněk lidského hepatomu SK-Hep-1 a jaterní BNL CL2. Dále bylo uvedeno, že indukuje buňky adenokarcinomu zástavou cyklu ve fázi G0 / G1 v lidském tlustém střevě.[29]

- **Antioxidační aktivita**

Závažné chronické choroby jako je rakovina, cukrovka, neurodegenerativní a kardiovaskulární onemocnění mají oxidační stres jako hlavní příčinu zánětlivých příhod. Molekuly jako ROS (např. superoxidový anion O_2^- , singletový kyslík 1O_2 , hydroxyradikál OH^\cdot nebo peroxylové radikály OO^\cdot) a reaktivní dusík (RNS) (např. oxid dusnatý NO, peroxyinitrit ONOO) se produkují v těle během normálních metabolických reakcí a jsou dobře uznávány jako nezbytné pro udržení homeostázy a regulují několik metabolických procesů. Například tvorba ROS fagocytujícími buňkami představuje základní obranný mechanismus hostitele nezbytný k boji infekce. V určitých situacích ROS a RNS může být také potenciálně škodlivý při nerovnováze mezi oxidanty a antioxidanty ve prospěch oxidantů („Oxidační stres“). Fyziologický stres, znečištění ovzduší, tabákový kouř, vystavení chemikáliím nebo ultrafialovému světlu může zvýšit jejich produkci. Bez ohledu na to, jak a kde jsou generovány, vzestup hladin nitrobuněčných oxidantů má dva potenciálně důležité účinky: poškození různých komponent buněk (DNA, proteiny, lipidové membrány) a aktivace specifické signální dráhy. Oba tyto účinky mohou způsobit odchylku dělení buněk, které postupně přispívá ke stárnutí a k vývoji řady nemocí, jako je aterogeneze, ischemicko-reperfuční poškození, kojenecká retinopatie, makulární degenerace související s věkem a karcinogeneze. Epidemiologické studie odhalily pozitivní souvislost mezi vyšším dietním příjmem a koncentrací karotenoidů v tkáních a nižším rizikem několika degenerativních poruch, včetně různých typů rakoviny, kardiovaskulární nebo oftalmologická onemocnění. Preventivní účinky karotenoidů byly spojeny s jejich antioxidační aktivitou, ochranou buněk a tkání před oxidačním poškozením. Na *in vivo* pokusech pomocí zvířecích modelů byl prokázán příznivý antioxidační účinek β -carotenu, získaný z práškového extraktu z mikrořas *Dunaliella salina* ve srovnání se syntetickým karotenem. [30]

- **Kardioprotektivní aktivita**

Studie z roku 2005 od Husseina et al. [31] potvrdily antihypertenzní účinky astaxanthinu u spontánně hypertenzních potkanů (SHR). Ve své studii Hussein et al. shledali, že orální podávání astaxanthinu (v koncentraci 50 mg / kg) po dobu 14 dnů vedlo k významnému snížení krevního tlaku v SHR. Kromě toho dlouhodobé podávání astaxanthinu (po dobu 5 týdnů) také významně snížilo

krevní tlak a výskyt srdeční mrtvice. 4. den léčby vykazovalo 60 % potkanů ve skupině s placebem známky srdeční mrtvice, zatímco žádný ve skupině léčené. Autoři zjistili, že SHR léčené astaxanthinem vykazovali významně vyšší hodnoty úrovně vazorelaxace v reakci na oxid dusnatý (NO), které zvýšily kontrakce hrudní aorty, ve srovnání s potkany, kteří nebyli léčeni astaxanthinem. Tyto výsledky naznačují na antihypertenzní účinek astaxanthinu. Kromě toho byla provedena další studie k prozkoumání příznivých účinků astaxanthinu na reologii krve. Histopatologická nálezy, jako jsou hladiny vaskulárního elastinu v aortě a arteriální stěně byla také zlepšena u SHR léčených astaxanthinem.[10]

Karotenoidy mají několik hypolipidemických účinků. Například astaxanthin snížil triacylglycerol (TAG) stejně jako hladiny LDL-C způsobem závislým na dávce. U potkanůkrmených 1 % doplňkem astaxanthinu, hladina LDL-C poklesla, zatímco hladina HDL-C se zvýšila. Astaxanthin měl také potenciálně prospěšný účinek-v prevenci peroxidace lipidů u krmených králíků s aterogenní dietou. Navíc u lidských pacientů s mírnou hyperlipidemií tento karotenoid také snížil úroveň TAG a zvýšené hladiny HDL-C a adiponektinu. β -carotene může být také užitečný proti hyperlipidemii. Kromě snížení rizika oxidace LDL zlepšuje proliferaci lymfocytů, a tím i imunologické funkce. [30]

- **Účinky proti obezitě**

Obezita je způsobena nadměrným hromaděním lipidů v tukové tkáni a představuje zvýšené riziko mnoha závažných onemocnění, např jako diabetes typu II, hyperlipidemie, hypertenze a kardiovaskulární onemocnění. Astaxanthin je jedním z nejslibnějších přírodních látek proti obezitě a ukázal se i jako účinný a bezpečný pro řízení tělesné hmotnosti. Bylo zjištěno, že fucoxanthin potlačuje vývoj bílé tukové tkáně u obezích / diabetických myší. [30]

Zájem řady studií byl zaměřen na adaptivní termogenezi odpojovacích proteinů (UCP1, UCP2 a UCP3) jako fyziologickou obranu proti obezitě, hyperlipidemii a cukrovce. Mitochondriální rozpojovací protein 1 (UCP1) v hnědé tukové tkáni je klíčová molekula pro antiobezitu a jeho dysfunkce přispívá k rozvoji obezity. Jsou však zapotřebí další studie k objasnění různých molekulárních mechanismů, které se účastní protiobezitních aktivit fucoxanthinu. Tyto studie ukazují, že přírodní pigmenty mohou hrát zásadní roli v léčbě a prevenci obezity, protože mohou působit jako regulátory metabolismu lipidů v tukových tkáních. Získané přírodní pigmenty z mikrořas lze použít ve funkčních potravinách a doplňcích stravy, mohou být získané při relativně nízkých výrobních nákladech a vykazují nízkou cytotoxicitu. [10]

- **Anti-diabetická aktivita**

Nedávné práce na karotenoidech naznačují, že tyto molekuly mohou být účinnější při léčbě a kontrole cukrovky než antioxidanty. Studie prokázaly, že hladiny karotenoidů a koncentrace β -carotenu v krvi jsou nepřímo spojeny s hladinami glukózy v krvi nalačno a s inzulínovou rezistencí. Četné studie uvádějí, že karotenoidy snižují riziko rozvoje *diabetes mellitus* 2. typu (T2DM) u mužů a žen. Kromě toho nedávná zjištění potvrdila, že karotenoidy jako např. lycopene, lutein a zeaxanthin mohou chránit před diabetem rozvíjející se retinopatií. Astaxanthin, který je jedním z nejlépe studovaných karotenoidů, vykazuje velký potenciál v prevenci a léčbě cukrovky. Astaxanthin má vyšší antioxidační aktivitu než jiné karotenoidy, jako je lutein, β -caroten a zeaxanthin a může být bezpečně konzumován lidmi. U myši db/db (známý model obezity pro T2DM) léčba astaxanthinem snížila glukózovou toleranci a zvýšila hladinu inzulínu v séru a snížila hladinu glukózy v krvi. Tyto výsledky nasvědčují tomu, že astaxanthin má ochranné antioxidační účinky, které mohou pomoci správné funkci β -buněk pankreatu. Účinek astaxanthinu byl také zkoumán na metabolický syndrom. Na experimentálním modelu na krysách bylo zjištěno, že astaxanthin snižuje hladinu glukózy a triglyceridů v krvi a také zvyšuje sérové hladiny HDL-cholesterolu.[10]

Předpokládá se, že AGE sloučeniny působí jako hlavní riziko u diabetických komplikací jako je retinopatie, katarakta, neuropatie a nefropatie. Toxické účinky vyplývají z tvorby příčných vazeb mezi klíčovými molekulami, jako je DNA a proteiny a interakce AGE s nimi. Mnoho syntetických inhibitorů tvorby AGE bylo staženo z klinických studií kvůli jejich nízké účinnosti, špatné farmakokinetice a neuspokojivé bezpečnosti. Hledání inhibitorů AGE z přírodních zdrojů je tedy slibná strategie prevence nebo léčby cukrovky. Ukázalo se, že několik extraktů z mikrořas jsou potenciálními inhibitory AGE. Ethylacetátový extrakt ze zelené řasy *Chlorella zofingiensis* významně potlačil glykační kaskádu *in vitro*. Jako hlavní složka odpovědná za antiglykoxidační vlastnosti byl identifikován astaxanthin, zejména diesterová forma. Byly zkoumány i jiné kmeny řas, jako je zelená řasa *Chlorella protothecoides* a rozsívka *Nitzschia laevis* a vykazovaly podobné účinky s rychlostí inhibice vyšší než u aminoguanidinu, běžně používaného inhibitoru glykace. Několik studií silně naznačují, že zeaxanthin a astaxanthiny mají potenciál inhibovat vývoj diabetické retinopatie a nefropatie snížením oxidačního stresu, expresí růstového faktoru a zánětu. Navíc užíváním astaxanthinu bylo prokázáno, že působí na antitrombin-III na C protein a tím potenciálně snižuje aterosogenezi a trombózu, často spojené s cukrovkou.[30]

3.4.2 Imunitní systém a jeho funkce

Imunitní systém patří k základním homeostatickým mechanismům v těle. Udržuje integritu organismu tím, že rozpoznává škodliviny z vnějšího a vnitřního prostředí. Zvyšuje obranyschopnost vůči patogenním mikroorganismům, udržuje autotoleranci vůči vlastním tkáním a průběžně odstraňuje staré, poškozené a některé změněné (zmutované) buňky. Látky, na které imunitní systém reaguje se nazývají antigeny. Jedná se o exoantigeny-cizorodé látky z vnějšího prostředí nebo autoantigeny, ty pocházejí z organismu samotného. Jako antigeny mohou působit prakticky jakékoli chemické struktury, které imunitní systém rozezná ve formě makromolekul. Nejvýznamnější jsou proteiny, různé komplexní polysacharidy, lipidy nebo lipoproteiny.[32] Imunitní reakce lze rozdělit na nespecifické (neadaptivní) a antigenně specifické (adaptivní). Nespecifické, tzv. vrozené mechanismy jsou evolučně starší a jsou založeny na molekulách a buňkách, které jsou v organismu připraveny předem a jsou účinné proti různým patogenům. Reakce je rychlá, řádově v minutách a nezůstává tzv. imunologická paměť. Evolučně mladší adaptivní specifické mechanismy reagují na každou cizorodou strukturu pomocí vysoce specifických molekul, které se tímto aktivují. K úplnému rozvoji imunitní reakce je třeba několik dní až týdnů a zůstává imunologická paměť. [32,33]

3.4.3 Imunokompetentní buňky

Imunitní reakce jsou zajišťovány mnoha různými druhy buněk a molekul, spolu s dalšími pojivovými buňkami tvoří funkční, anatomické celky-lymfatickou tkáň a lymfatické orgány. Imunitní buňky vznikají v kostní dřeni a vyžívají v thymu. Mají rozmanitou strukturu a funkci, putují tělem a soustřeďují se v lymfatických orgánech. Hlavní složky buněčného nespecifického systému jsou fagocytující buňky a přirozeně cytotoxické buňky (tzv. NK buňky-natural killers). Humorální složky nespecifické imunity tvoří komplementový systém, interferony, lektiny a jiné sérové proteiny. U specifické imunitní odpovědi se molekuly aktivují až po reakci s antigenem. Mechanismus založený na protilátkách se nazývá humorální a je zajišťován B-lymfocyty. Druhý typ, zprostředkovaný T-lymfocyty je označován jako buněčný mechanismus. Z kmenových buněk vznikají dvě základní linie imunocytů. Z myeloidní linie vznikají monocyty-tzv. agranulocyty, ty cirkulují v krvi a ve tkáních se diferencují na makrofágy a tři druhy granulocytů-neutrofilů, eozinofilů a bazofilů. Tyto buňky mají schopnost fagocytózy a tvoří základ nespecifické imunity. Z lymfoidní linie se diferencují NK buňky,

B-lymfocyty a T-lymfocyty. Část těchto lymfocytů se po setkání s antigenem diferencuje v paměťové buňky a ty jsou zodpovědné za tzv. imunologickou paměť. [32,33]

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Pomůcky a přístrojové vybavení

Centrifuga - Sigma 8 KS (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Germany)

Cytometr Cytomics FC500 (Beckman Coulter, California, USA)

Čerpadlo Q-Grad (LabAlliance, Philadelphia, USA)

Čtečky desek Envision (PerkinElmer, Massachusetts, USA).

Detektor Sapphire UV-VIS (ECOM spol.s.r.o., Chrástky, Česká republika)

Detektor tandemové hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (HRMS/MS) se zdrojem elektrosprejové ionizace (ESI) source (Impact HD hmotnostní spektrometr Bruker, Massachusetts, USA) (HPLC-ESI-HRMS/MS)

Inteligentní chladič vody H50/H150(LabTechSri, Sorisole Bergamo, Itálie).

Lyofilizátor ScanVac CoolSafe freeze dryer (LaboGene ApS, Lyngby, Denmark)

Multimódové destičky Envision (PerkinElmer, Massachusetts, USA)

Plocha fotobioreaktoru (FPP) zkonstruováno v Algotech Mikrobiologický ústav AV ČR, vědecké pracoviště Třeboň

Sada zářivek Philips TLD 36W/84 Amsterdam, Nizozemsko

Software CXP (Coulter Electronic, Florida, USA)

Softwarová platforma EZChrom SI (Agilent Technologies, Kalifornie, USA).

Světelný metr LI-250 (LI-COR Biosciences, Nebraska, USA)

Systém Agilent HPLC (Agilent 1100 Series, California, USA) vybaveném DAD s kolonou s reverzní fází (Luna® C8 column, 100 × 4.6 mm, 3µm)

Systém Dionex UltiMate 3000 HPLC system (Thermo Scientific, California, USA)

Systém HPLC (Agilent 1100 Series, Německo) na semipreparativní koloně s reverzní fází (kolona Eclipse XDB-C8, 250 x 9,4 mm, 5 µm)

Vysokoúčinná protiproudá chromatografie (HPCCC) Model Spectrum (Dynamic Extractions Ltd., Slough, Velká Británie)

4.2 Chemikálie

(L-DOPA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

≥98.5% n-butanol (GPR Rectapur, VWR Inc., Fontenay-sous-Bois, France)

≥99% *n*-heptan (HiPerSolv Chromanorm, VWR Inc., Gliwice, Poland)

≥99.5% aceton (HiPerSolv Chromanorm, VWR Inc., Fontenay-sous-Bois, France)

≥99.8% ethylacetat (HiPerSolv Chromanorm, VWR Inc., Gliwice, Poland)

≥99.9% acetonitril (HiPerSolv Chromanorm, VWR Inc., Fontenay-sous-Bois, France)

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)

96% ethanol (AnalaR Normapur, VWR Inc., Fontenay-sous-Bois, France)

99.8% methanol (HiPerSolv Chromanorm, VWR Inc., Gliwice, Poland)

Fytohemaglutinin (PHA) (Sigma- Aldrich, Steinheim, Germany)

Koktejl fluorescenčně značených monoklonálních protilátek (CD3 PE-Cy5, CD16 PE, CD45 FITC, CD56 PE, a CD69 PE-Cy7) (Immunotech, Marseille France and Dako, Glostrup Denmark)

Kyselina kojová (TCI chemicals, Oxford, United Kingdom)

Médium (Bio-Wittaker, Maryland, USA)

Trolox a astaxanthin (oba Sigma-Aldrich)

Tyrosinázy (2138 U/mL, Sigma-Aldrich)

4.3 Kultivace cyanobakterie *Synechocystis salina*

S. salina PCC6906 byla kultivována ve 120 l plochem fotobioreaktoru (FPP) se světelnou dráhou 5 cm, délkou 200 cm a výškou 100 cm s celkovým pracovním objemem 100 L. K naočkování kultury *S. salina* byly použity autotrofní organismy (CCALA) z Botanického ústavu AV ČR. K udržování vysoké turbulence kulturou probublávala rychlostí 5 l/min směs vzduchu a CO₂ (98:2) a tím se zabránilo sedimentaci buněk sinic. Povrch FPP byl osvětlen sadou zářivek (Philips TLD 36 W/84 Amsterdam, Nizozemsko), které byly instalovány na vodorovné osvětlovací jednotce. Kontinuální intenzity dopadajícího světla na povrch fotobioreaktoru bylo dosaženo úpravou

vzdálenosti osvětlení na 80 W/m² a intenzita měřena světelným metrem LI-250 (LI-COR Biosciences, Nebraska, USA). Kultivační medium BG-11 se udržovalo při konstantní teplotě 25 °C ± 0,5 °C. Po vyčerpání dusičnanů z media byla biomasa ze čtyř pětín celkového objemu kultury sklizena centrifugací při rychlosti 4000 otáček a poté lyofilizována. Zbývající pětina suspenze byla znovu naplněna čerstvě připraveným mediem BG-11. Kultivace se opakovala třikrát, aby se získal dostatek lyofilizované biomasy *S. salina*.

4.4 Extrakce biomasy

Pro přípravu extraktu z mikrořas bylo použito 40 g usušené, lyofilizované biomasy (buňky mikrořasy dezintegrovány mořským pískem a ethanolem) a 1 L 96 % ethanolu (AnalaR Normapur, VWR Inc., Fontenay-sous-Bois, France). Byla provedena dvojitá extrakce v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut. Výsledné extrakty byly spojeny a dále centrifugovány (1350 otáček/ 10 min, 2000 otáček /5 min), aby se oddělily nerozpustné částice. Rozpouštědlo bylo odpařeno v rotační odparce při sníženém tlaku a teplotě 38 °C. UVdetekcí byla potvrzena přítomnost tohoto pigmentu ve vzorku. Dalším krokem byla izolace myxoxanthophyllu pomocí HPCCC.

4.5 Izolace myxoxanthophyllu pomocí HPCCC

4.5.1 Zařízení použité pro izolaci

Pro izolaci myxoxanthophyllu z extraktu *S. salina* bylo použito zařízení pro vysokoúčinnou protiproudou chromatografii (HPCCC) Model Spectrum (Dynamic Extractions Ltd., Slough, Velká Británie) vybavené separační kolonou o objemu 134 ml (PTFE díra=3,2mm). Rychlost otáčení kolony byla řízena regulátorem instalovaným do podvozku HPCCC a teplota kolony udržována na 28 °C pomocí inteligentního chladiče vody H50/H150 (LabTechSri, Sorisole Bergamo, Itálie). K čerpání mobilní fáze přes kolonu bylo použito čerpadlo Q-Grad (LabAlliance, Philadelphia, USA). Chromatografická separace byla monitorována detektorem Sapphire UV-VIS (ECOM spol.s.r.o., Chrást'any, Česká republika) při vlnové délce 478 nm. Na prohlížení záznamu chromatografie byla využita softwarová platforma EZChrom SI (AgilentTechnologies Kalifornie, USA).

4.5.2 Vývoj a výběr vhodného dvoufázového systému solventů pro izolaci myxoxanthophyllu pomocí HPCCC

Pro výběr vhodného dvoufázového systému bylo použito několik vzorků s různými objemovými poměry rozpouštědel *n-heptanu* (HiPerSolv Chromanorm, VWR Inc., Gliwice, Poland), *ethanolu* (AnalaR Normapur, VWR Inc., Fontenay-sous-Bois, France) a *vody*. Ideální systém pro HPCCC by měl mít hodnotu rozdělovacího koeficientu $K = (0.5 \leq K \leq 3)$, což je poměr plochy píku myxoxanthophyllu v horní fázi rozpouštědla k poměru plochy píku v dolní fázi [34,35]. Vzorky obsahovaly vždy 2 mg extraktu z mikrořas a 1 ml z horní fáze rozpouštědla a 1 ml z dolní fáze. Po důkladném protřepání vzorků byly po ustálení odděleny výsledné horní a dolní fáze a použity pro analýzu a výpočet několika hodnot. Jednalo se o výpočet poměru hmotnosti horní a dolní fáze, hodnoty času ustálení fází a rozdílu hustoty dolní fáze minus horní fáze. Ke stanovení rozdělovacího koeficientu K byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detekcí plochy píků myxoxanthofyllu diodovým polem (HPLC-DAD). [34,35].

4.5.3 Vlastní proces separace pomocí HPCCC

Příprava fází pro proces HPCCC byla provedena smícháním vybraných rozpouštědel *n-heptanu*, *ethanolu* a *vody* dle zvoleného vhodného objemového poměru. Směs byla energicky protřepána a důkladně odděleny dolní a horní fáze. Vlastní proces separace HPCCC začal naplněním kolony stacionární fází (horní fáze). Když byla kolona plná, byly nastaveny parametry měření-počet otáček 1400 za minutu a teplota 28 °C. Jakmile byly tyto parametry nastaveny, začalo čerpání mobilní fáze tak dlouho, než se dosáhlo hydrodynamické rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází v koloně. Mobilní fáze vytlačovala zakotvenou stacionární fází a rovnováha se ustálila až tehdy, jakmile kolonu opouštěla jen mobilní fáze a množství stacionární fáze bylo konstantní. V tomto okamžiku byl chromatografický systém připraven pro vstřikování vzorku, což byl extrakt *S. salina* rozpuštěný v daném objemu mobilní fáze. Frakce HPCCC byly ručně sebrány a analyzovány pomocí HPLC-DAD. Retence stacionární fáze (S_f) ve sloupci HPCCC byla vypočtena takto:

$$S_f(\%) = \frac{V_s}{V_c} \times 100 \quad (1)$$

kde V_c je objem kolony a V_s je objem stacionární fáze v koloně v okamžiku dosažení hydrodynamické rovnováhy. [36]

Retenční čas (t_R) cílové sloučeniny při separaci HPCCC byl vypočten takto:

$$t_R = \frac{V_M + (K \times V_S)}{F} \quad (2)$$

kde V_M je objem mobilní fáze, V_S objem stacionární při dosažení hydrodynamické rovnováhy, K je rozdělovací koeficient cílové sloučeniny a F je průtok mobilní fáze. [36]

4.6 Konečná purifikace myxoxanthophyllu pomocí semipreparativní HPLC

Výsledná myxoxanthophyllová frakce získaná z HPCCC byla nakonec purifikována za použití systému HPLC (Agilent 1100 Series, Německo) na semipreparativní koloně s reverzní fází (kolona Eclipse XDB-C8, 250 x 9,4 mm, 5 μ m při 30 °C. Jako mobilní fáze byla použita kombinace vody (A) a methanolu (B), která měla průtok 2,5 ml/min v režimu gradientové eluce, který byl naprogramován podle následujících podmínek : 0–10 min, 70%–30% A; 10–35 min, 30%–10% A; 35–37 min, 10%–0% A; 37–42 min, 0%–0% A; 42–45 min, 0%–70% A; 45–50 min, 70%–70%A. Cílové vzorky byly sledovány na chromatogramu pomocí detektoru diodového pole (DAD) při 478 nm.

4.7 Analýza frakcí a extraktu pomocí HPLC

Extrakt *S.salina* a frakce z HPCCC byly analyzovány na systému Agilent HPLC (Agilent 1100 Series, California, USA) vybaveném DAD. Byla použita kolona s reverzní fází (Luna® C8 column, 100 x 4.6 mm, 3 μ m) při teplotě 30 °C, mobilní fáze byla složena ze směsi vody (A) a methanolu (B) (HiPerSolv Chromanorm, VWR Inc., Gliwice, Poland) a byla neustále čerpána průtokovou rychlostí 0,8 ml/min. Pro separaci byla kolona eluována pomocí lineárního gradientu následujícím způsobem: 0–20 min, 20%–0% A; 20–25 min, 0% A; 25–27 min, 0%–20% A; 27–30 min, 20%–20% A. HPLC chromatogram byl získán při 478 nm, zatímco absorpční spektrum cílové sloučeniny bylo získáno od 200 do 700 nm. Čistota myxoxanthophyllu byla vypočtena na základě plochy píku HPLC.

4.8 Potvrzení chemické identity výsledného purifikovaného myxoxanthophyllu

Chemická identita izolovaného vzorku byla stanovena pomocí HPLC systému Dionex UltiMate 3000 HPLC system (Thermo Scientific, California, USA) připojenému k detektoru tandemové hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (HRMS/MS) se zdrojem elektrosprejové ionizace (ESI) source (Impact HD hmotnostní spektrometr Bruker, Massachusetts, USA) (HPLC-ESI-

HRMS/MS) za stejných podmínek jako byla analýza frakcí a extraktu. Dále byl do obou rozpouštědel A a B přidán roztok kyseliny mravenčí (0,1 %), aby se dosáhlo lepší ionizace cílové sloučeniny. Identifikace cílové sloučeniny byla potvrzena ve srovnáním s publikovanými údaji z literatury.

Provozní parametry hmotnostního spektrometru byly stanoveny následovně: 4,2 kV napětí stříkací jehly, 250 °C teplota sušení, dusík použitý k rozprašování (3 bar), sušící plyn (12 l/ min) současně. Rozsah skenování byl 50-2000 m/z v režimu kladných iontů s rychlostí skenování při 2 Hz. Pro fragmentaci myxoxanthophyllu byla srážková energie nastavena na 35 eV a srážkovým plynem byl dusík.

4.9 Testování biologické aktivity izolovaného myxoxanthophyllu

4.9.1 Antioxidační aktivita

Tato aktivita byla stanovena za použití 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) jako stabilního volného radikálu. Na analýzu bylo použito 100 µL 0,01 % DPPH zředěného v methanolu a bylo přidáno do 100 µL testované látky zředěné v methanolu s 0,5 % DMSO v 96 jamkové destičce. Absorbance byla měřena po 30 minutách při 515 nm za použití čtečky multimódových destiček Envision (PerkinElmer, Massachusetts, USA). Jako pozitivní kontroly byly použity Trolox a astaxanthin (oba Sigma-Aldrich). [37]

4.9.2 Inhibice aktivity tyrosinázy

Aktivita fungální tyrosinázy (2138 U/mL, Sigma-Aldrich) byla měřena spektrofotometricky s použitím levodopy (L-DOPA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) jako substrátu. Objem 50 µL cílové sloučeniny zředěný ve fosfátem pufovaném solném roztoku (PBS) s 8 % DMSO, byl smíchán se 100 µL L-DOPA (1 mg/ml), 50 µL fungální tyrosinázy (500 U/mL) zředěno v PBS a inkubováno při teplotě 37 °C po dobu 30 minut. Tvorba dopachromu byla měřena 475 nm za použití multimode čtečky desek Envision (PerkinElmer, Massachusetts, USA). Kyselina kojová (TCI chemicals, Oxford, United Kingdom) byla použita jako pozitivní kontrola).[38]

4.9.3 Aktivace imunitních buněk

Na stanovení imunitních účinků byla použita metoda exprese povrchového glykoproteinu CD69 (shluk diference 69) a byla měřena průtokovou cytometrií. [39] Periferní krev byla odebrána třem zdravým dobrovolníkům a dále antikoagulována heparinem sodným. Byly připraveny testované vzorky rozpuštěním myxoxanthophyllu o různých koncentracích v *ex-vivo* médiu (Bio-Wittaker, Maryland, USA), které bylo před použitím filtrováno přes 0.2- μm filtry. Objem 100 μm těchto testovaných vzorků byl inkubován s 100 μm krevní suspenze na sterilní 96 jamkové destičce s plochým dnem při 37 °C s 5 % CO₂ po dobu 24 h. Fytohemaglutinin (PHA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) byl použit jako pozitivní kontrola. PHA je látka rostlinného původu z fazole *Phaseolus vulgaris*, aglutinuje krevní buňky, je schopna stimulovat lymfocyty a byla použita jako pozitivní kontrola v koncentraci 10 $\mu\text{g/mL}$. Jako negativní kontrola fungoval roztok (0,5 %) dimethylsulfoxidu (DMSO). Konečné koncentrace myxoxanthophyllu v testování byly 20 a 60 μM . Po inkubaci bylo do testovacího média přidáno 10 μL koktejlu fluorescenčně značených monoklonálních protilátek (CD3 PE-Cy5, CD16 PE, CD45 FITC, CD56 PE, a CD69 PE-Cy7) (Immunotech, Marseille France and Dako, Glostrup Denmark). Fycoerythrinem (PE) značená protilátka specifická pro CD69, byla použita k detekci aktivovaných imunitních buněk. Protilátky, které se specificky vážou na CD56 a CD16, byly použity k detekci buněk zabijáků přirozeného původu (NK buňky). Na detekci všech typů lymfocytů byly použity protilátky, které specificky reagují s CD45. Protilátky, které jsou specifické pro CD3, byly použity k detekci T-lymfocytů. Granulocyty byly stanoveny na základě jejich charakteristických profilů předního rozptylu (FSC) a bočního rozptylu (SSC), které představují jejich velikost, respektive zrnitost.

Aktivace imunitních buněk v reakci na léčbu myxoxanthophyllem po 24 hodinách byla ukázána v histogramech jako posun doprava. Exprese CD69 na aktivovaných buňkách jsou zobrazeny jako hodnoty střední intenzity fluorescence (MFI). Aktivační index (AI), který představuje hodnoty aktivace, byl vypočítán vydělením procenta aktivovaných buněk v reakci na léčbu procentem kontroly. Hodnoty vyšší než $\text{AI} \geq 2$ byly definovány jako pozitivní odpověď imunitních buněk. Pro analýzu byl použit průtokový cytometr Cytomics FC500 Beckman Coulter, California, USA) a získaná data byla analyzována softwarem CXP (Coulter Electronic, Florida, USA). Jako logaritmicky zesílené signály byly prezentovány fluorescenční signály z 10000 událostí. Každá hodnota AI byla vypočtena jako průměr ze tří měření na třech různých vzorcích krve.

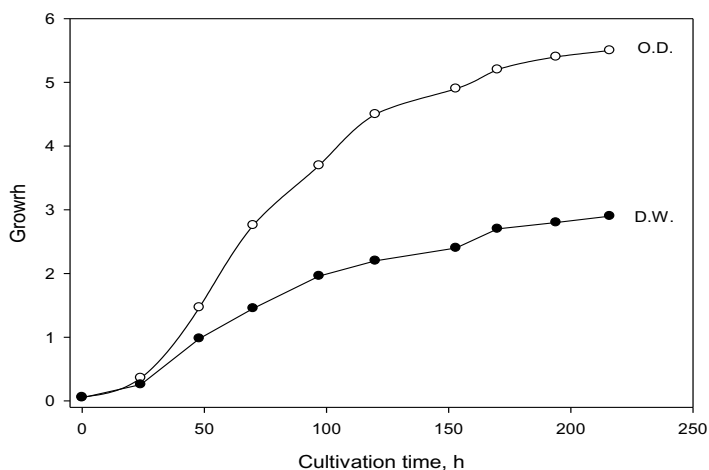
4.9.4 Statistická analýza

Jednosměrný Anova test ($p < 0,05$) byl zvolen jako prostředek k určení rozdílu mezi výsledky. Studentův t-test k porovnání kontrolního a testovaného vzorku při (** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$). Pro analýzu byl použit statistický balíček S-Plus 2000.

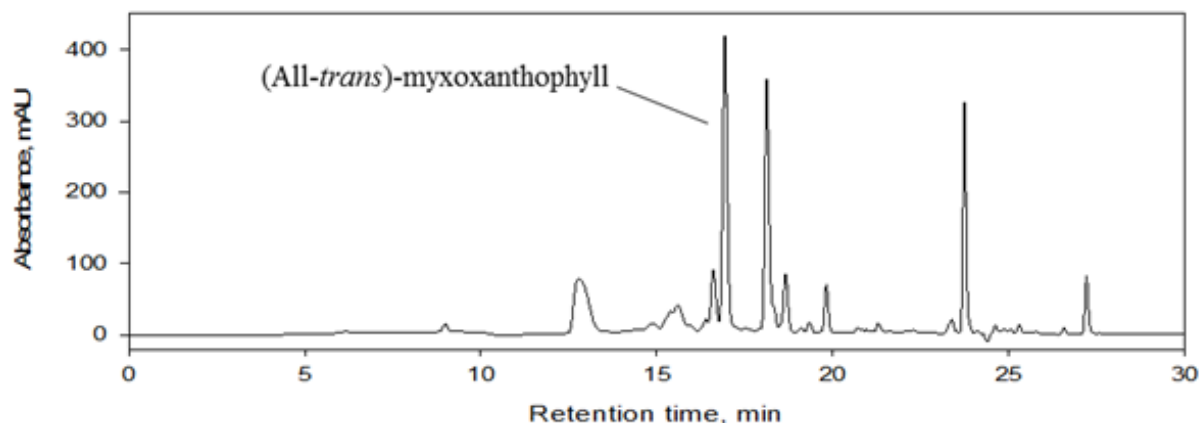
5. VÝSLEDKY

5.1 Kultivace cyanobakterie *Synechocystis salina* a extrakce biomasy

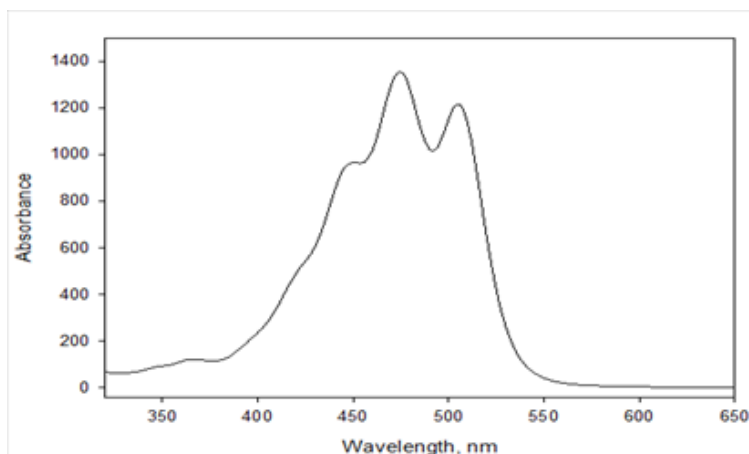
Růst mikrořas byl monitorován podle optické hustoty (O.D.) a suché hmotnosti biomasy (DW). Jak je znázorněno na obrázku č.6. Biomasa byla centrifugována 10 min za chladu v zařízení (Sigma 8KS) za $4000 \times g$. Výsledná biomasa byla zmrazená na $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ a poté lyofilizovaná za použití ScanVac CoolSafe freeze dryer (LaboGene ApS, Lyngø, Denmark) 72 hodin. 40 g usušené, lyofilizované biomasy bylo dezintegrováno pomocí mořského písku a extrahováno 96 % ethanolem (objem 1 L). Tímto procesem bylo získáno 4,736 g sušeného extraktu (11,84% výtěžek). Reprezentativní vzorek usušeného extraktu byl dále použit na HPLC analýzu, obrázek č.7. Myxoxanthophyll byl identifikován podle UV viditelného spektra 448, 474 a 504 nm, jak je znázorněno na obrázku č.8, ve srovnání s údaji Takaichi.[40] Po identifikaci byl extrakt použit na separaci myxoxanthophyllu pomocí HPCCC.



Obrázek 6: Růstová křivka *Synechocystis salina* PCC6906 v 120 L plochém panelovém fotobioreaktoru. Růst kultury byl monitorován spektrofotometrem V-1200 jako optická hustota (O.D.) při infračervené vlnové délce 750 nm s délkou optické dráhy 5 mm. Suchá hmotnost



Obrázek 7: Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s chromatografií extraktu *Synechocystis salina* s detekcí diodového pole (HPLC-DAD)



Obrázek 8: Ultrafialově viditelná spektra (UV-Vis) (all-trans)-myxoxanthophyllu

5.2 Separace myxoxanthophyllu pomocí HPCCC (vysokoúčinné protiproudé chromatografie)

5.2.1 Výzkum vhodného dvojfázového systému rozpouštědel pro separaci pomocí HPCCC

Na separaci byla použita rozpouštědla *n-heptan*, *ethanol* a *voda*, která byla smíchána v různých poměrech podle tabulky č.2. Dále pak testována, aby byla zaručena správná separace cílové sloučeniny. Nejvhodnější dvojfázový systém musel splňovat několik parametrů. Za prvé správnou

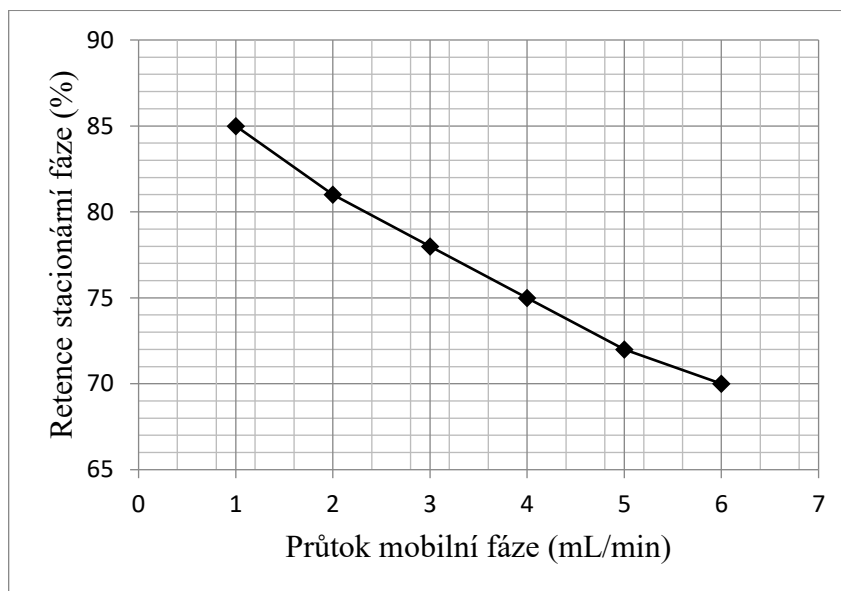
hodnotu rozdělovacího koeficientu $K = 0.5 \leq K \leq 3$ [35], za druhé dostatečnou stabilitu a udržení stacionární fáze uvnitř kolony. Tento požadavek je splněn, pokud byl čas ustálení fází $t < 30$ s [34] a rozdíl hustot mezi spodní a horní fází je > 0.08 g/mL. [35] Jak je uvedeno v tabulce 2, systém 7(*n-heptan, ethanol a destilovaná voda*) tyto požadavky splňoval, proto byl vybrán jako adekvátní na izolaci myxoxanthophyllu pomocí HPLC. Byla použita eluce v reverzní fázi, to znamená, že horní fáze (UP7) rozpouštědlového systému je stacionární fáze a dolní fáze (LP7) je fáze mobilní.

Systémy rozpuštědel	Složení	Relativní poměry rozpuštědel (v/v/v/v)	Objemový poměr fází (UP/LP *)	Čas ustálení (s)	Rozdíl hustoty (LP-UP, g/mL)	HPLC plocha		Rozdělovací koeficient Myx. ** (K)
						UP	LP	
1	n-Hep : EtOH : H ₂ O	5:4:0.5	0.9387	8	0.1147	10	523	0.019
2	n-Hep : EtOH : H ₂ O	5:4:1	1	9	0.1542	5	979	0.005
3	n-Hep : EtOH : H ₂ O	5:4:1.5	0.9444	8	0.1735	73	1607	0.045
4	n-Hep : EtOH : H ₂ O	5:4:2	0.9642	9	0.1916	100	1087	0.092
5	n-Hep : EtOH : H ₂ O	4:4:2	0.75	16	0.19	0	934.7	0
6	n-Hep : EtOH : H ₂ O	3:4:3	0.47	11	0.2016	288.7	392.3	0.736
7	n-Hep : EtOH : H₂O	2:4:4	0.2987	12	0.22	388.4	256	1.517
8	EtoAc : BuOH : H ₂ O	4:1:5	1	18	0.11944	591.3	0	591.3
9	EtoAc : BuOH : H ₂ O	3:2:5	1.0408	15	0.11602	1110	0	1110
10	EtoAc : BuOH : H ₂ O	2:3:5	1.2222	13	0.11848	1014	0	1014
11	EtoAc : BuOH : H ₂ O	1:4:5	1.222	18	0.1351	416.9	0	416.9
12	EtoAc : EtOH : H ₂ O	5:0.5:5	0.909	26	0.09497	352.2	68.5	5.142
13	EtoAc : EtOH : H ₂ O	5:1:5	0.9298	26	0.08	688.8	5	137.8
14	EtoAc : EtOH : H ₂ O	5:1.5:5	0.9166	18	0.07054	722	0	722
15	EtoAc : EtOH : H ₂ O	5:2:5	0.9672	35	0.05597	371.4	0	371.4
16	EtoAc : ACT : H ₂ O	5:0.5:5	0.9444	28	0.099	213.6	97.5	2.191
17	EtoAc : ACT : H ₂ O	5:0.5:5	0.909	13	0.1036	212.6	64.5	3.296
18	EtoAc : ACT : H ₂ O	5:1:5	1	35	0.0977	548.8	49.3	11.13
19	EtoAc : ACT : H ₂ O	5:1.5:5	0.9494	18	0.096	573	18.7	30.64
20	EtoAc : ACT : H ₂ O	5:2:5	1.0338	22	0.1028	479.3	132	3.631
21	EtoAc : ACT : H ₂ O	5:0.5:4	1.2093	14	0.097	599.2	101	5.933
22	EtoAc : ACT : H ₂ O	5:0.5:3	1.8333	10	0.113	216.3	79	2.738
23	EtoAc : ACT : H ₂ O	5:0.5:2	2.75	11	0.105	344.3	75	4.591
24	EtoAc : H ₂ O	5:4	1.142	19	0.102	731.3	168	4.353
25	EtoAc : H ₂ O	5:3	1.66	18	0.1	439.3	216.3	2.031
26	EtoAc : H ₂ O	5:2	2.5	16	0.08803	145.6	161.2	0.903
27	EtoAc : ACN : H ₂ O	5:1:5	1.037	10	0.104	426	39.3	10.84
28	EtoAc : ACN : H ₂ O	5:1.5:5	1.16	11	0.096	819.8	35.5	23.09
29	EtoAc : ACN : H ₂ O	5:2:5	1.18	12	0.098	1588	29.2	54.38
30	EtoAc : ACN : H ₂ O	5:2.5:5	1.27	14	0.097	775	10.2	75.98
31	EtoAc : ACN : H ₂ O	5:3:5	1.32	16	0.10884	486.7	24.3	20.03

Tabulka 2: Rozdělovací koeficient (K) myxoxanthophyllu v různých dvoufázových systémech rozpuštědel. Zdroj: vlastní zpracování.
*LP-spodní fáze. UP-horní fáze. **Myx- Myxoxanthophyll, n-Hep-n-heptan, EtOH-ethanol, H₂O-voda, EtoAc- ethyl-acetát, BuOH-n-butanol, ACT-acetoniril

5.2.2 Vliv rychlosti toku mobilní fáze na retenci stacionární fáze uvnitř kolony HPCCC

Rychlost otáčení kolony HPCCC byla stanovena jako optimální na 1400 otáček/min. U HPCCC platí, že čím vyšší je retence stacionární fáze uvnitř kolony, tím je lepší chromatografické rozlišení. [41] Nástřik vzorku a průtok jsou dva provozní parametry, které mohou pozitivně ovlivnit konečný výtěžek, je třeba dbát na to, aby nedošlo k přetížení vzorku ani k přílišnému zvýšení průtoku, což by mohlo vést ke ztrátě stacionární fáze a tím k poškození chromatografického rozlišení.[35] Pomocí rovnice (1) viz kapitola 4.3.3. byla vypočtena ideální hodnota retence stacionární fáze 75 %. [36] Dále byl zvolen dle (obrázku č.9) průtok mobilní fáze (6 mL/min), ten umožňoval maximální produktivitu při zachování 70% retence stacionární fáze. Tato podmínka generovala tlak pod maximální povolenou úrovní pro kolonu (<250 psi). Proto byla tato podmínka použita pro optimalizaci separace myxoxanthophyllu pomocí HPCCC. Experimenty byly prováděny v reverzní fázi, to znamená, že spodní fáze byla použita jako mobilní fáze a horní fáze byla stacionární fáze.

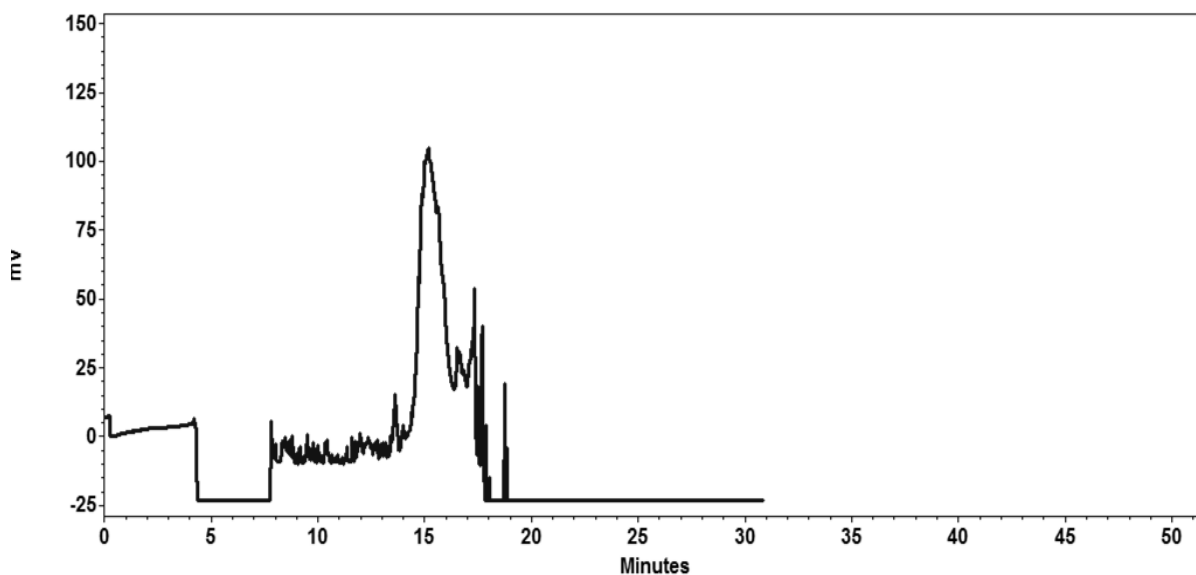


Obrázek 9: Vliv průtoku mobilní fáze na retenci stacionární fáze. Mobilní fáze: spodní fáze dvoufázového rozpuštědlového systému 7 (*n*-Hep :EtOH :H₂O) 2:4:4

5.2.3 Optimalizace metody HPCCC pro separaci myxoxanthophyllu

Pokus č.1

V prvním pokuse bylo použito 50 mg extraktu z mikrořas za podmínek uvedených v tabulce č.3. Jak je znázorněno na obrázku č.10 separace myxoxanthophyllu nebyla úspěšně dosažena. Pozorovali jsme tvorbu emulze v důsledku přítomnosti lipidu v extraktu. Tyto jevy způsobují ztrátu stacionární fáze a chromatografický proces byl narušen. Pro vyřešení tohoto problému jsme se rozhodli pro frakcionaci extraktu z mikrořas pomocí HPCCC, jak je naznačeno v dalším pokusu č.2.



Obrázek 10: HPCCC chromatogram extraktu z mikrořas

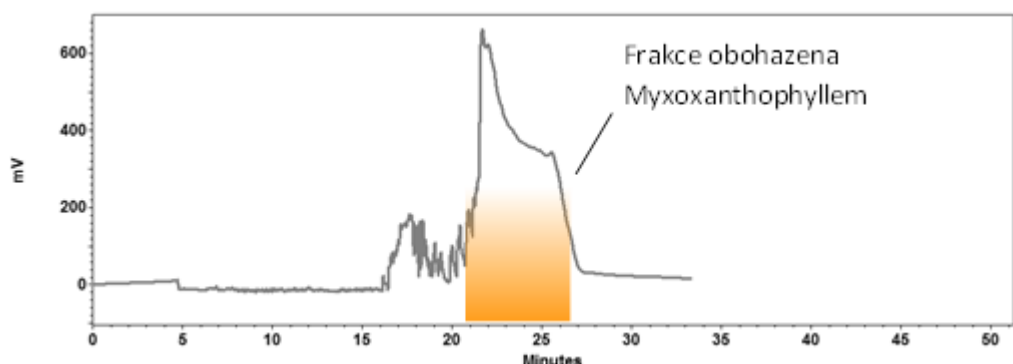
Kapacita kolony:	134 mL
Rozpouštědlový systém:	n-Hep–EtOH–H ₂ O, 2–4–4
Eluční mód:	Reverzní
Průtok:	6 mL/min
Kapacita dávkovací smyčky:	1 mL
Rotační rychlost:	1400 rpm
Nástřik:	50 mg

Teplota:	28 °C
Retence SP v hydrodynamické rovnováze:	70.14 %
Retence SP na konci experimentu:	29.85 %
Detekce:	478 nm

Tabulka 3: Operativní podmínky pokus č.1

Pokus č.2

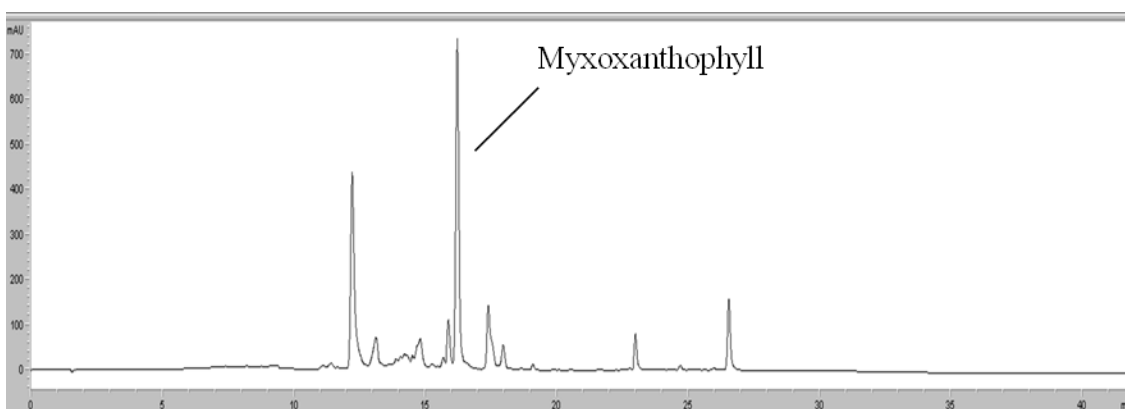
Tento pokus č.2 použil 500 mg extraktu z mikrořas a byl zaměřen na frakcionaci extraktu za podmínek uvedených v tabulce č.4. Vzhledem k tomu, že bylo vstříknuto velké množství extraktu, použili jsme kapacitu dávkovací myčky 6 ml. Proces separace byl opakován dvakrát, aby se získalo vyšší množství frakce. Jak je znázorněno na obrázku č.11, bylo dosaženo frakcionace extraktu. Frakce byla shromážděna a odpařena na rotační odparce při 38 °C. Získali jsme 280 mg frakce obsahující myxoxanthophyll. Reprezentativní vzorek této frakce byl analyzován pomocí HPLC. Jak je ukázáno na obrázku č.12, potvrzujícím přítomnost myxoxanthophyllu ve vyrobené frakci.



Obrázek 11: HPLC chromatogram frakce z extraktu z mikrořas

Kapacita kolony:	134 mL
Rozpouštědlový systém:	n-Hep–EtOH–H ₂ O, 2–4–4
Eluční mód:	Reverzní
Průtok:	6 mL/min
Kapacita dávkovací smyčky	6 mL
Rotační rychlost:	1400 rpm
Nástřik:	500 mg
Teplota:	28 °C
Retence SP v hydrodynamické rovnováze:	67.16 %
Retence SP na konci experimentu:	11.94 %
Detekce:	478 nm

Tabulka 4: Operativní podmínky pokus č.2

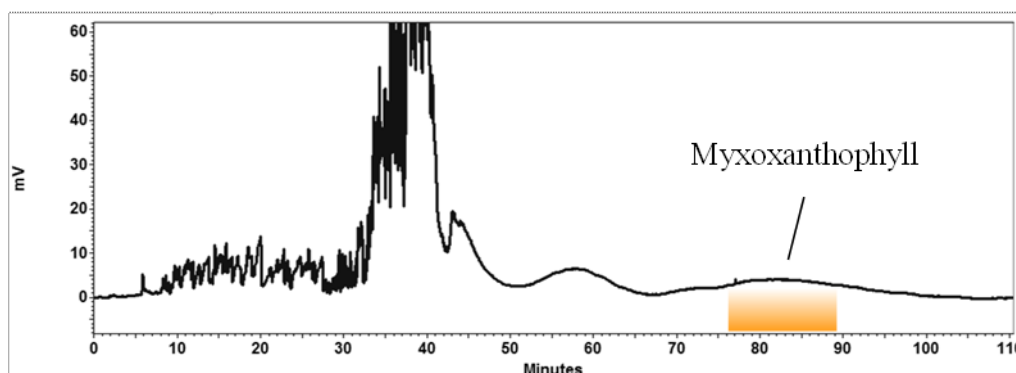


Obrázek 12: HPLC analýza frakce obohacená myxoxanthophyllem

Pokus č.3

Tento pokus č.3 použil 70 mg frakce obsahující myxoxanthophyll, která byla získána v pokuse č.2. Pokus č.3 jsme prováděli za podmínek uvedených v tabulce č.5. Je velmi dobře známo, že nízký průtok může být prospěšný pro chromatografické rozlišení v HPCCC, ale doba separace

může být delší. Proto jsme v tomto experimentu použili průtok 2 ml/min. Jak je znázorněno na obrázku č.13 myxoxanthophyll byl úspěšně izolován. Zjistili jsme, že 70 mg frakce obsahující myxoxanthophyll bylo maximální možné množství k rozpuštění ve 2 ml stacionární fáze (2 ml vzorkovací smyčka), je to tzv. bod nasycení. V souladu s tím bylo dále použito vždy 70 mg vzorku. Získaná sloučenina byla shromážděna a odpařena na rotační odparce při 38 °C. Úspěšně jsme získali 5 mg myxoxanthophyllu. Reprezentativní vzorek této sloučeniny byl analyzován pomocí HPLC. Jak je ukázáno na obrázku č.14, potvrzujícím přítomnost myxoxanthophyllu ve vyrobené frakci.

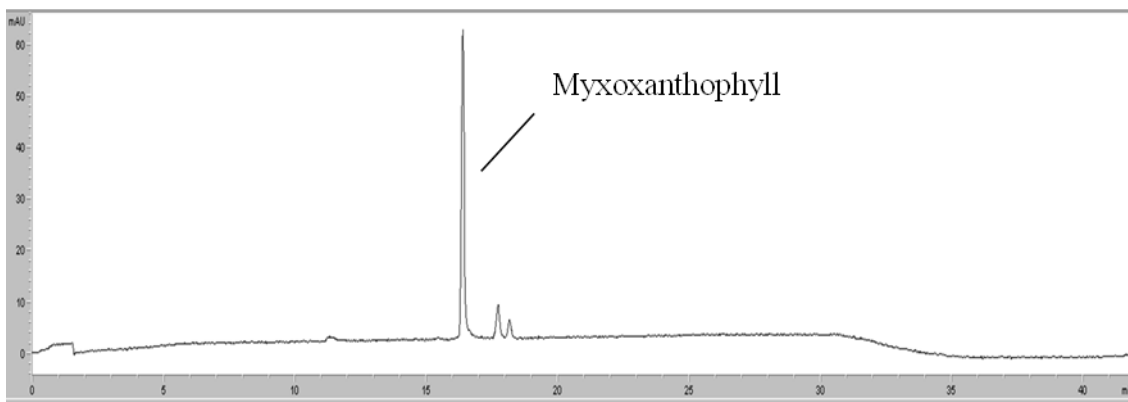


Obrázek 13: HPLC chromatogram separace myxoxanthophyllu z frakce

Kapacita kolony:	134 mL
Rozpouštědlový systém:	n-Hep–EtOH–H ₂ O, 2–4–4
Eluční mód:	Reverzní
Průtok:	2 mL/min
Kapacita dávkovací smyčky:	2 mL
Rotační rychlost:	1400 rpm
Nástřík:	70 mg
Teplota:	28 °C
Retence SP v hydrodynamické rovnováze:	80.59 %

Retence SP na konci experimentu:	49.25 %
Detekce:	478 nm

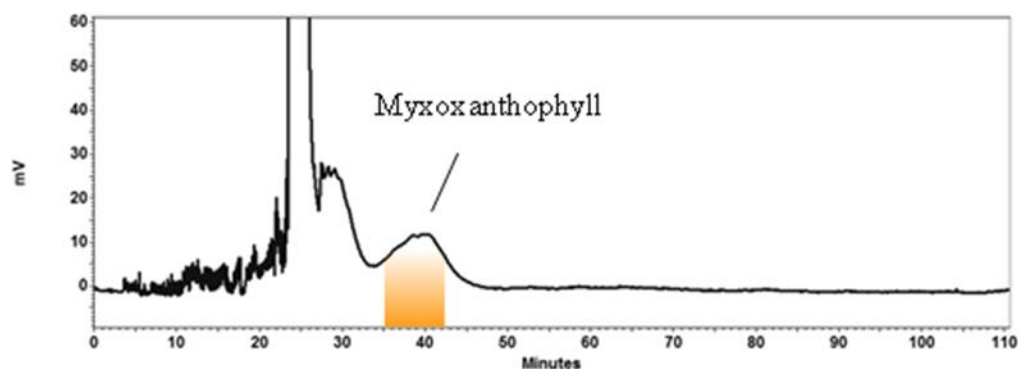
Tabulka 5: Operativní podmínky pokus č.3



Obrázek 14: HPLC analýza separovaného myxoxanthophyllu

Pokus č.4

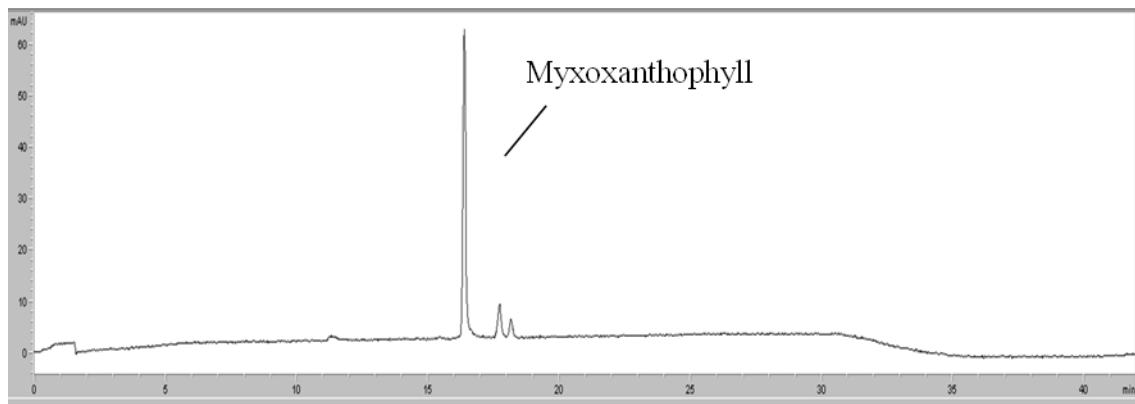
Tento pokus č.4 použil 70 mg frakce obsahující myxoxanthophyll, který byl získán v pokuse č.2. Pokus č.4 jsme prováděli za podmínek uvedených v tabulce č.6. V předchozím experimentu jsme pozorovali dobrou separaci myxoxanthophyllu při průtoku 2 ml/min. Abychom však získali cílovou sloučeninu ve zkráceném čase, testovali jsme účinek průtoku 4 ml/min na separaci myxoxanthophyllu. Jak je znázorněno na obrázku č.15, myxoxanthophyll byl úspěšně oddělen za kratší dobu. Získaná sloučenina byla shromážděna a odpařena na rotační odparce při 38 °C. Úspěšně jsme získali 5 mg myxoxanthophyllu. Reprezentativní vzorek této sloučeniny byl analyzován pomocí HPLC. Jak je ukázáno na obrázku č.16, potvrzujícím přítomnost myxoxanthophyllu ve vyrobené frakci.



Obrázek 16: HPLC chromatogram separace myxanthophyllu z frakce

Kapacita kolony:	134 mL
Rozpouštědlový systém:	n-Hep–EtOH–H ₂ O, 2–4–4
Eluční mód:	Reverzní
Průtok:	4 mL/min
Kapacita dávkovací smyčky:	2 mL
Rotační rychlost:	1400 rpm
Nástřik:	70 mg
Teplota:	28 °C
Retence SP v hydrodynamické rovnováze:	73.13 %
Retence SP na konci experimentu:	31.34 %
Kapacita kolony:	478 nm

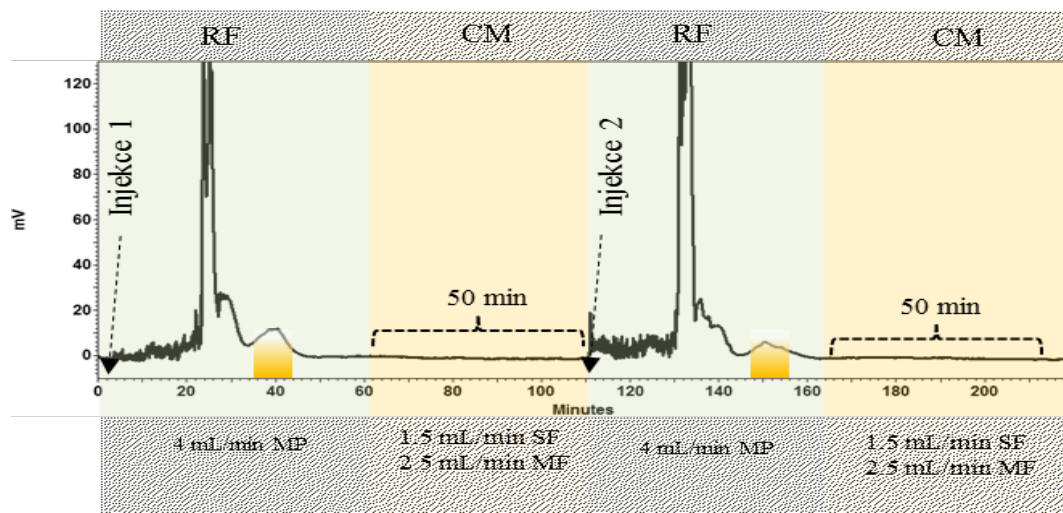
Tabulka 6: Operativní podmínky pokusu č.4



Obrázek 17: HPLC analýza separovaného myxoxanthophyllu

Pokus č.5

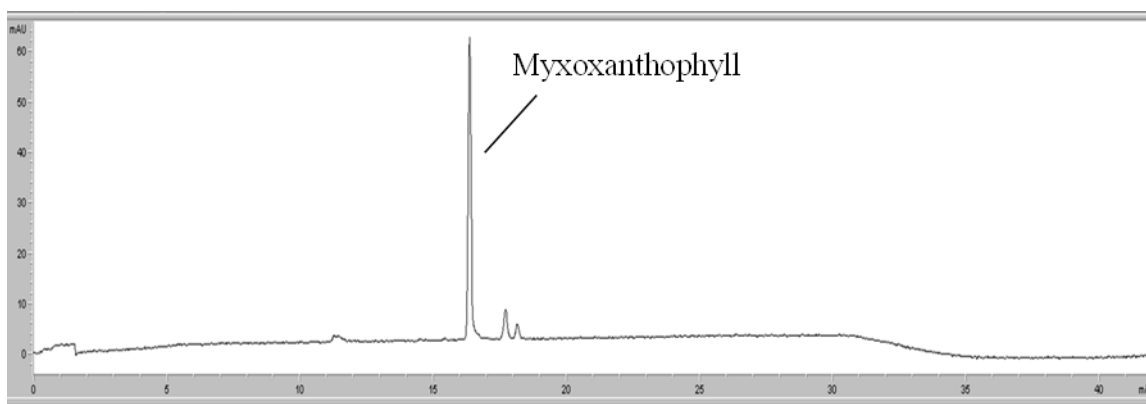
Předchozími pokusy byla úspěšně vyvinuta účinná metoda HPCCC k izolaci myxoxanthophyllu z frakce obsahující myxoxanthophyll, který využívá režim eluce s reverzní fází. To znamená, že jako mobilní fáze byla použita spodní fáze zvoleného dvoufázového systému rozpouštědel. Vyvinutá metoda však zahrnovala pouze injekci jediného vzorku (70 mg). V souladu s tím byl za účelem zvýšení produktivity implementován systém vícenásobného vstřikování, jak je znázorněno na obrázku č.17. V tomto přístupu byla znovu ustavena hydrodynamická rovnováha potřebná k získání cílové sloučeniny z prvního běhu, aniž by bylo nutné zastavit rotaci kolony. Toho je dosaženo pomocí režimu souběžné eluce, který se provádí současným čerpáním mobilní a stacionární fáze po eluci myxoxanthophyllu. Pokus byl realizován dle podmínek uvedených v tabulce č.7. Ztracený objem stacionární fáze během prvního běhu (75 ml) účinně doplněn při čerpání stacionární a mobilní fáze při průtoku 1,5 a 2,5 ml/min po dobu 50 minut, krátce po eluci myxoxanthophyllu. V důsledku toho bylo nově dosaženo hydrodynamické rovnováhy v koloně pro nový separační cyklus. Závěrem lze konstatovat, že na základě výše uvedených kritérií a podmínek byla prokázána proveditelnost aplikace vícenásobné injekční metody HPCCC k produkci myxoxanthophyllu ze *S. salina*. Reprezentativní vzorek této sloučeniny byl analyzován pomocí HPLC. Jak je ukázáno na obrázku č.18, potvrzujícím přítomnost myxoxanthophyllu ve vyrobené frakci.



Obrázek 18: HPLC chromatogram dvojinjekční separace myxoxanthophyllu z frakce. RF: reverzní fáze. CM: režim souběžné eluce. SF: stacionární fáze. MF: mobilní fáze

Kapacita kolony:	134 mL
Rozpouštědlový systém:	n-Hep–EtOH–H ₂ O, 2–4–4
Eluční mód:	Reverzní
Průtok:	4 mL/min
Kapacita dávkovací smyčky:	2 mL
Rotační rychlost:	1400 rpm
Nástřik:	70 mg (dvakrát)
Teplota:	28 °C
Retence SP v hydrodynamické rovnováze:	73.13 %
Retence SP na konci experimentu:	31.34 %
Kapacita kolony:	478 nm

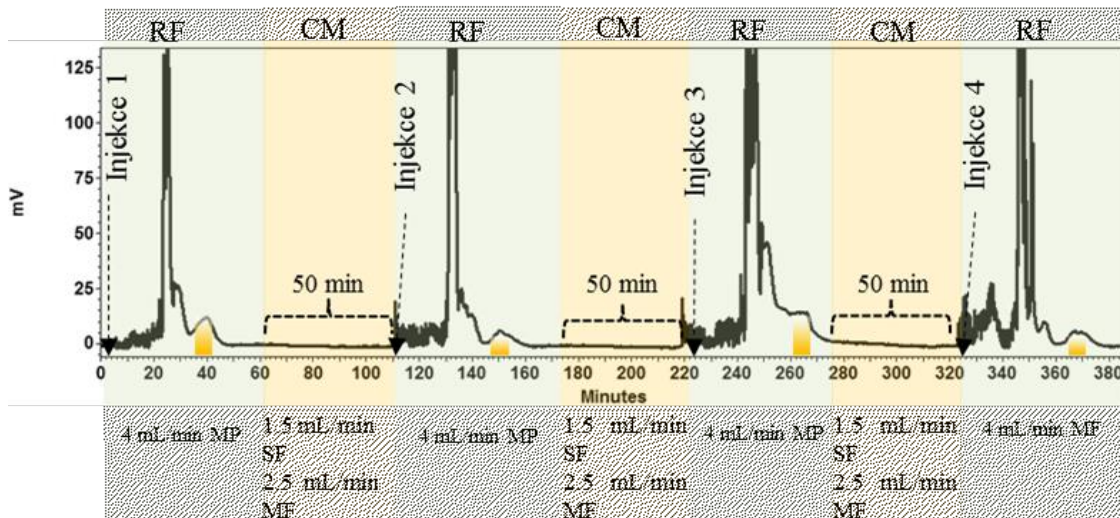
Tabulka 7: Operativní podmínky pokus č.5



Obrázek 19: HPLC analýza separovaného myxoxanthophyllu

Pokus č.6

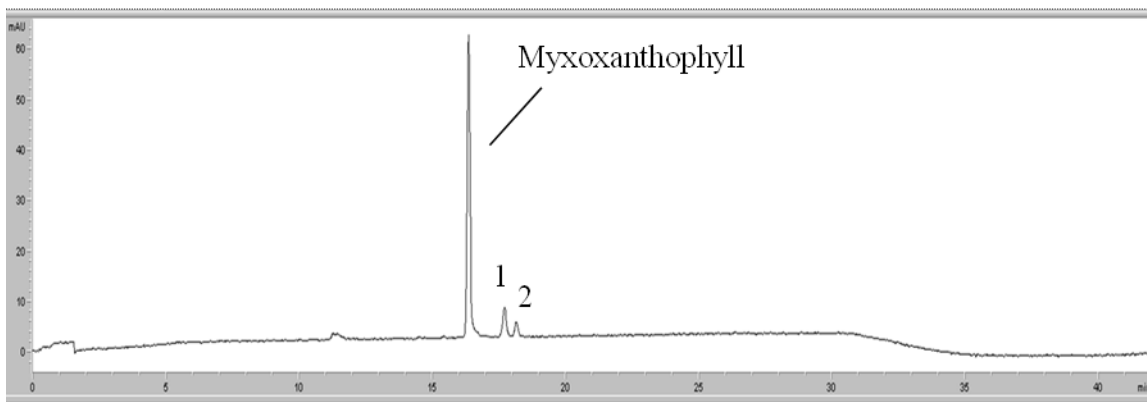
Na základě vyvinuté metody získávání myxoxanthophyllu ze *S. salina* byly aplikovány následné injekce extraktu z biomasy pro kontinuální výrobu tohoto pigmentu. Jak je vidět na čtyřech po sobě jdoucích injkcích (obrázek č.19), byly úspěšně provedeny při použití dříve optimalizovaných podmínek (tabulka č.8). Množství 70 mg frakce obsahující myxoxanthophyll bylo injikováno v každém běhu HPCCC, přičemž každý separační cyklus trval 110 minut. Celkem bylo zpracováno 280 mg extraktu *S. salina* a bylo získáno 20 mg myxoxanthophyllu s čistotou 95 %, jak bylo stanoveno pomocí HPLC. HPLC chromatogram izolované sloučeniny pomocí HPCCC (obrázek č.20) ukazuje přítomnost dvou menších píků (1 a 2) elujících krátce po cílové izolované sloučenině. V souladu s tím byl nutný konečný purifikační krok, který byl dělán pomocí semipreparativní HPLC.



Obrázek 20: HPCCC chromatogram čtyřinjekční separace myxoxanthophyllu z frakce. RF: reverzni fáze. CM: režim souběžné eluce. SF: stacionární fáze. MF: mobilní fáze.

Kapacita kolony:	134 mL
Rozpouštědlový systém:	n-Hep–EtOH–H ₂ O, 2–4–4
Eluční mód:	Reverzní
Průtok:	4 mL/min
Kapacita dávkovací smyčky:	2 mL
Rotační rychlost:	1400 rpm
Nástřík:	70 mg (čtyřikrát)
Teplota:	28 °C
Retence SP v hydrodynamické rovnováze:	73.13 %
Retence SP na konci experimentu:	31.34 %
Kapacita kolony:	478 nm

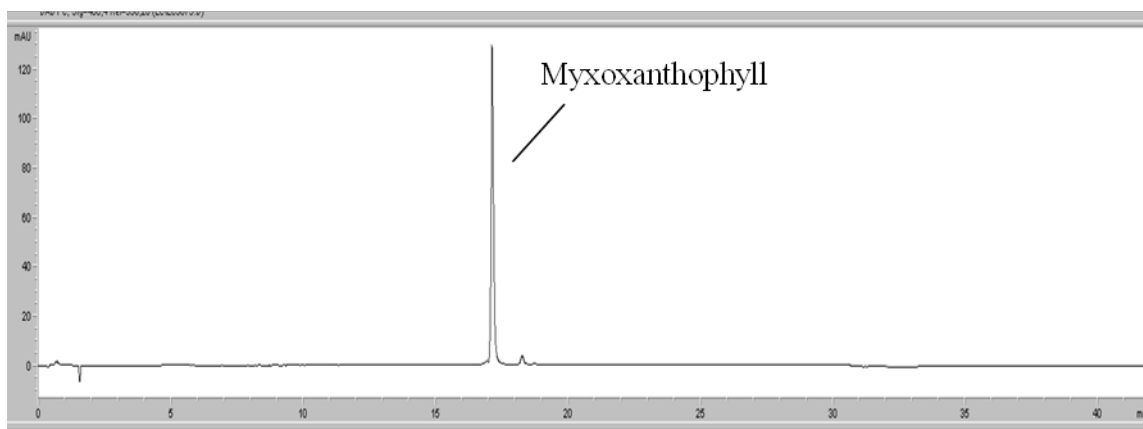
Tabulka 8: Operativní podmínky pokus č. 6



Obrázek 21: HPLC analýza separovaného myxoxanthophyllu

5.3 Konečná purifikace pomocí semipreparativní HPLC

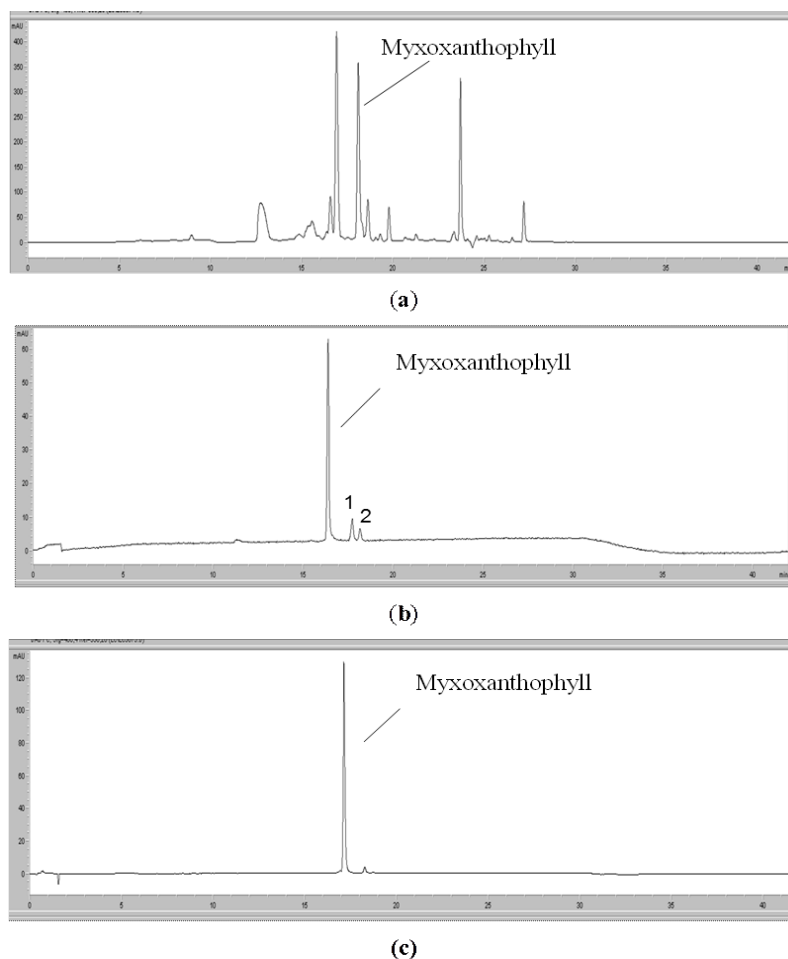
Konečná purifikace výsledného myxoxanthophyllu (20 mg), který byl separován pomocí HPCCC, bylo provedeno za použití semipreparativní HPLC. Výsledný vzorek se sušil na rotační odparce, čímž se získalo 15 mg purifikovaného myxoxanthophyllu, který se dále analyzoval pomocí HPLC a byla prokázána jeho čistota 98 %. (obrázek č.21)



Obrázek 22: HPLC analýza purifikovaného myxoxanthophyllu

5.4 Sumární přehled izolace myxoxanthophyllu

Na obrázku č.22 jsou zobrazeny chromatografy z HPLC analýzy extraktu myxoxanthophyllu (22a), myxoxanthophyllové frakce získané pomocí HPLC (22b) a purifikovaného myxoxanthophyllu získaného semipreparativní HPLC (22c).

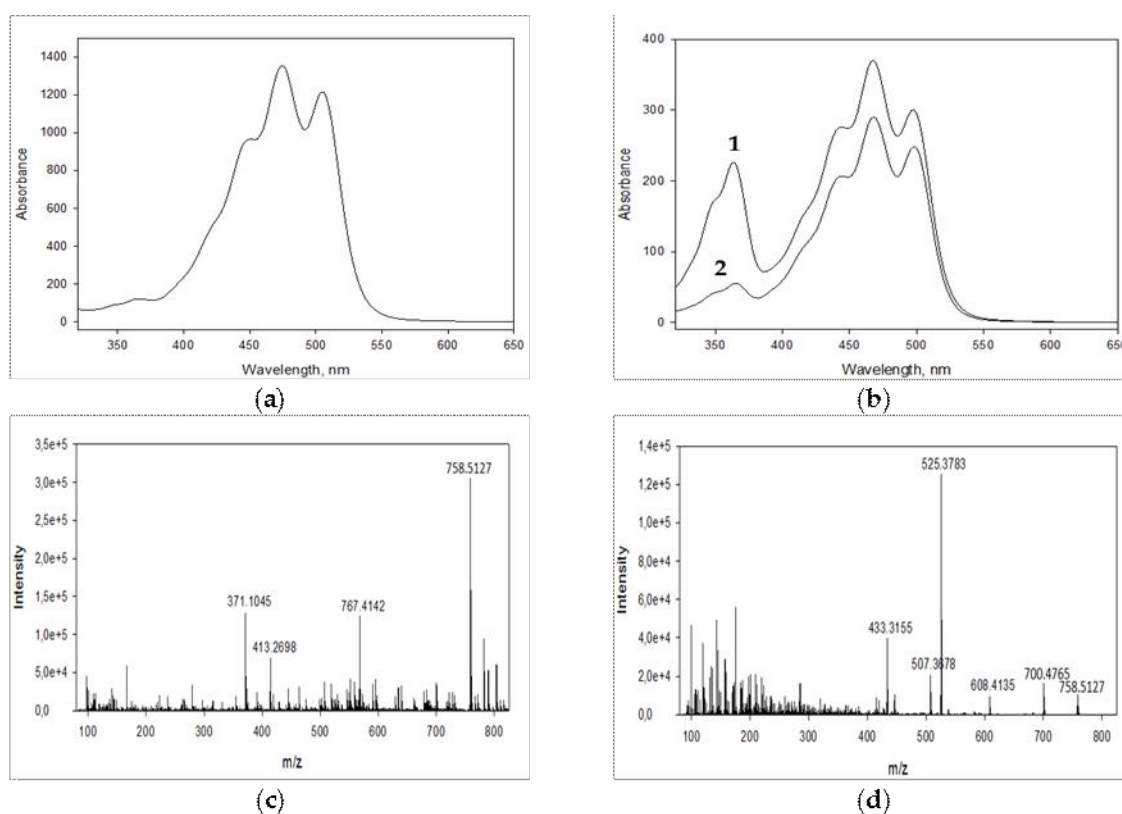


Obrázek 23: Vysoce účinná kapalinová chromatografie s detekcí diodovým polem (HPLC-DAD) chromatogramy extraktu ze *S. salina* (a), myxoxanthophyllové frakce získané pomocí HPLC (b) a myxoxanthophyllu dále purifikované pomocí HPLC (c). Chromatogramy byly monitorován při 478 nm. 1: (13 nebo 13'-cis) - myxoxanthophyll 2: (9 nebo 9'-cis) - myxoxanthophyll.

5.5 Potvrzení identity cílového vzorku

Potvrzení identity izolovaného vzorku bylo stanoveno na základě srovnání jeho UV-viditelných spektrch (obrázek č.23a) a ESI-HRMS spekter (obrázek č.23c, d) s údaji z literatury. [40] ESI-HRMS spektrum píku cílové látky (obrázek č.23c) indikovalo molekulární vzorec ($C_{48}H_{70}O_7$),

molekulární iont $[M+H]^+$ při m/z 758 (obrázek č.23d) a fragmentovaný iont při m/z 700 (obrázek č.23d), odpovídající štěpení acetonové jednotky v molekulárním iontu $[M+H-C_3H_6O]^+$. Toto je charakteristické pro (all-*trans*)- myxoxanthophyll jako (3R,2S)-myxol 2'-(2,4-di-O-methyl- α -L-fucoside).[40,42] Dva menší píky, kontaminanty přítomné ve frakci myxoxanthophyllu získané pomocí HPLC (obrázek č.22b) vykazovaly spektra ESI-HRMS/MS podobná spektrům (all-*trans*)-myxoxanthophyllu, ale s UV-viditelnými spektry, která byla kompatibilní se spektry z (13 nebo 13'-*cis*)- myxoxanthophyll (1) (obrázek č.23b) a (9 nebo 9'-*cis*)- myxoxanthophyll (2) (obrázek č.23b). Ukázalo se, že tyto dva druhy menších geometrických izomerů jsou běžně vytvářeny z (all-*trans*) karotenoidů působením světla a teploty. Nemusí představovat žádné nebezpečí pro člověka. [43,44]

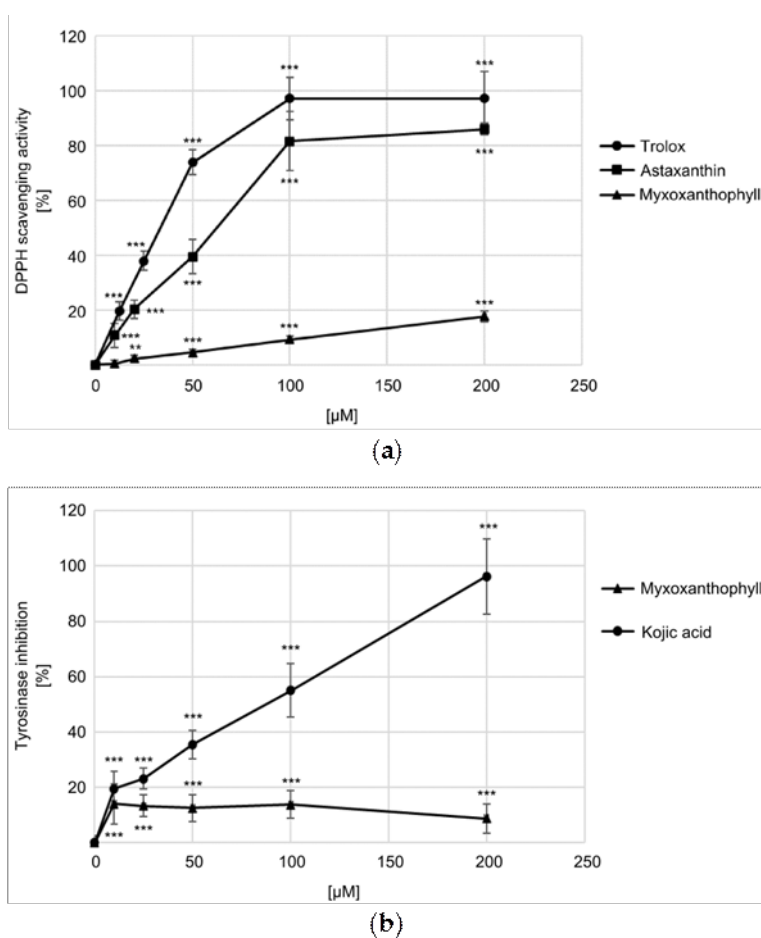


Obrázek 24: Spektra ultrafialového záření (UV-Vis) (all-*trans*)-myxoxanthophyllu získaného pomocí HPLC (a). Ultrafialově viditelná (UV-Vis) spektra 1 (13 nebo 13'-*cis*)-myxoxanthophyllu a 2 (9 nebo 9'-*cis*)-myxoxanthophyllu (b). Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením se zdrojem elektrosprejové ionizace (ESI) (ESI-HR / MS) spektra (all-*trans*)-myxoxanthophyllu (c). Tandemová hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením s elektrosprejovým ionizačním zdrojem (ESI-HRMS / MS) spektra molekulárního iontu (all-*trans*)-myxoxanthophyllu (d).

5.6 Vyhodnocení biologické aktivity

5.6.1 Antioxidační aktivita a inhibice tyrosinázy

V této studii byl prokázán mírný na dávce závislý pozitivní účinek myxoxanthophyllu na DPPH volných radikálů ve srovnání s pozitivními kontrolami Trolox a astaxanthin (obrázek č.24a). Pokud jde o inhibici tyrosinázy, vykazoval myxoxanthophyll mírný inhibiční účinek způsobem nezávislým na koncentraci v rozmezí od 10 do 200 μM (obrázek č. 24b).

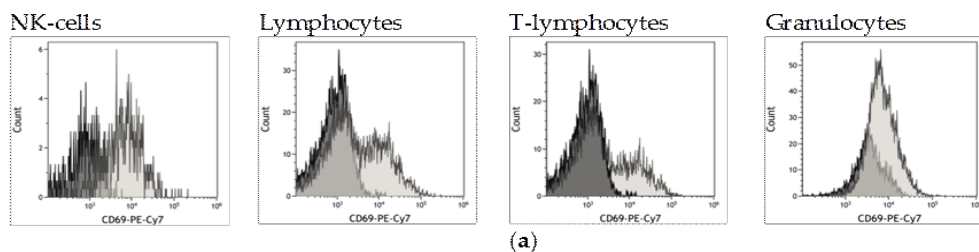


Obrázek 25: (a) Aktivita zachycování volných radikálů DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) zkoušené látky. Trolox a astaxanthin byly použity jako pozitivní kontroly. (b) Inhibice fungální tyrosinázy myxoxanthophylem za použití levodopy (L-DOPA) jako substrátu. Kyselina kojová byla použita jako pozitivní kontrola. Data představují průměr \pm SD. Pro statistickou analýzu byl použit Studentův T-test. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ související s kontrolou.

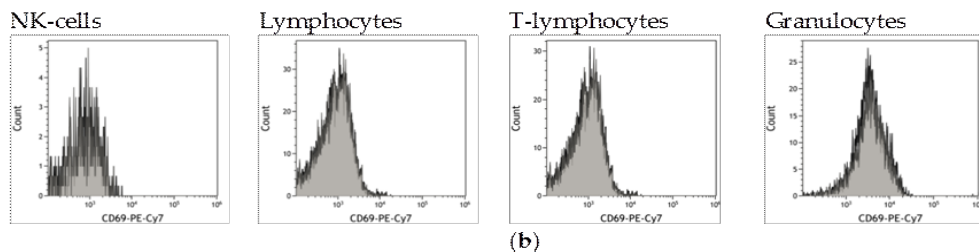
5.6.2 Imunomodulační účinek

Jak je vidět na obrázku č.25, kromě granulocytů nebyly aktivovány myxoxanthophyllem v koncentračním rozmezí od 20 do 60 μM žádné imunitní buňky testované v tomto výzkumu. Exprese CD69 na aktivovaných granulocytech v reakci na léčbu myxoxanthophyllem byla prokázána jako posun doprava v reprezentativních histogramech (obrázek č.25 c, d). Došlo ke zvýšení počtu granulocytů, což ukazuje stimulační index 2,37 a 2,77 při použití cílové sloučeniny o koncentraci 20 a 60 μM . Granulocyty (tj. neutrofily, eozinofily, bazofily a žírné buňky) jsou efektorové buňky vrozené imunitní odpovědi na bakteriální a houbové infekce.

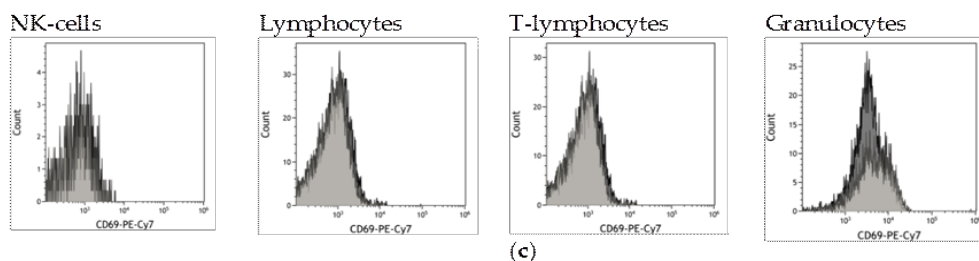
Positive control



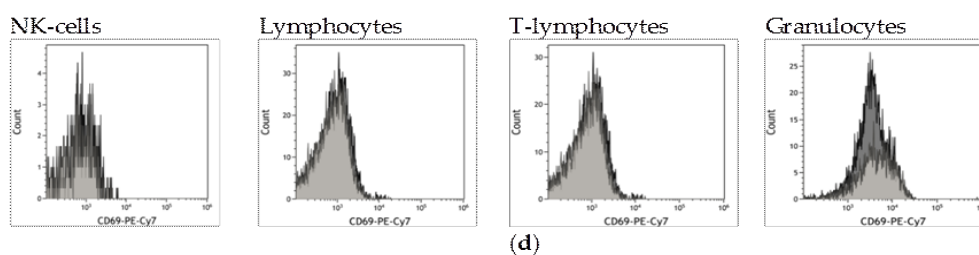
Negative control



Myxoxanthophyll (20 μ M)



Myxoxanthophyll (60 μ M)



MFI \dashrightarrow

Obrázek 26: Průměrná fluorescenční intenzita (MFI) exprese CD69 na aktivovaných imunitních buňkách z lidské periferní krve v reakci na léčbu myxoxanthophyllem po dobu 24 hodin je uvedena jako histogramy. Vyplněné histogramy (tmavě šedé) představují kontrolní skupinu (neošetřené) a ostatní histogramy (světle šedé) stimulovanou (předem ošetřenou) skupinu. Jako pozitivní kontrola byl použit mitogen, fytohemagglutinin (PHA). Histogramy jsou reprezentativní pro tři samostatné experimenty využívající buňky od tří různých dárců.

6. DISKUZE

Tato rigorózní práce představuje úspěšně vyvinutou vícenástřikovou izolační metodu, založenou na postupném separačním procesu pomocí HPCCC, integrovaném do autotrofní kultivace sinic *S. salina* pro získání myxoxanthophyllu. Ve srovnání s ostatními víceřadovými metodami má výhodu použitím pouze jednoho typu separační techniky. Bylo zjištěno, že 70 mg extraktu z biomasy bylo maximální možné množství, které se rozpustilo ve 2 ml stacionární fáze, tzv. bod nasycení. Retenční čas (t_R) cílové sloučeniny byl vypočten dle rovnice (2) viz kapitola 4.5.3. Jsou-li známé hodnoty VM objem mobilní fáze, VS objem stacionární fáze, K rozdělovací koeficient cílové sloučeniny a F průtok mobilní fáze. [36] Dle výpočtu by měl myxoxanthophyll retenční čas 46 minut. Tato informace je užitečná k předběžnému odhadu množství rozpouštědla potřebného ke chromatografickému procesu a také poskytuje informace k délce trvání HPCCC. Jak je vidět na (obrázku č.15) experimentálně stanovený retenční čas cílové sloučeniny je 40 minut, což zhruba odpovídá vypočtenému. Tato nepatrná nesrovnalost může být způsobena snížením retence stacionární fáze během separačního procesu v důsledku působení vzorku na hydrodynamickou rovnováhu.

Dosažené výsledky poukazují na efektivní metodu izolace myxoxanthophyllu z extraktu *S. salina* s využitím režimu eluce s reverzní fází. Kromě metody za použití jedné injekce vzorku (70 mg) byl také vyzkoušen efektivnější systém vícenásobného vstřikování za účelem kontinuální produkce tohoto pigmentu. V tomto případě byla hydrodynamická rovnováha opakovaně obnovena, aniž by bylo nutné zastavit otáčení kolony za účelem přípravy zařízení na nový separační proces. Toho je dosaženo použitím souproudového elučního režimu, který je prováděn současným čerpáním mobilní a stacionární fáze po myxoxanthophyllové eluci. Toto bylo potvrzeno i pro produkci luteinu [43] a astaxanthinu [45] z mikrořas s použitím HPCCC. V této studii byl ztracený objem stacionární fáze během prvního běhu (75 ml) účinně doplňován čerpáním stacionární a mobilní fáze rychlostí 1,5 a 2,5 ml /min po dobu 50 min krátce po eluci myxoxanthophyllu. Tím bylo dosaženo hydrodynamické rovnováhy uvnitř kolony pro další separační cyklus. Jak je vidět na (obrázku č.19) byly úspěšně provedeny čtyři po sobě jdoucí injekce za použití dříve optimalizovaných podmínek. V každém běhu bylo injikováno množství 70 mg extraktu ze *S. salina*, přičemž každý cyklus trval 110 minut. Celkově bylo zpracováno 280 mg extraktu *S. salina* a bylo získáno 20mg myxoxanthophyllu s čistotou 95 %, jak bylo stanoveno pomocí HPLC. Chromatogram HPLC izolované sloučeniny pomocí HPCCC (obrázek č.20) ukazoval přítomnost dvou menších vrcholů (1 a 2) eluovaných krátce po cílové látce.

Proto byl nezbytný krok konečné purifikace myxoxanthophyllová frakce pomocí semipreparativní HPLC. Výsledný vzorek se sušil na rotační odparce, čímž se získalo 15 mg myxoxanthophyllu, dále se analyzoval pomocí HPLC a byla prokázána čistota 98 %. (obrázek č.21). Na rozdíl od předchozích výzkumů uvádějících izolaci myxoxanthophyllu z přírodních zdrojů [40] je tato práce prvním důkazem izolace tohoto glykosylovaného karotenoidu ze *S. salina* pomocí HPLC. Vzájemná komplementarita HPLC a HPLC [35,45] umožnila úspěšné oddělení tohoto pigmentu od ostatních karotenoidů.

Potvrzení identity izolovaného vzorku bylo stanoveno na základě srovnání jeho UV-viditelných spektrch (obrázek č.23a) a ESI-HRMS spekter (obrázek č.23c, d) s údaji z literatury. [40] ESI-HRMS spektrum píku cílové látky (obrázek č.23c) indikovalo molekulární vzorec ($C_{48}H_{70}O_7$), molekulární iont $[M+H]^+$ při m/z 758 (obrázek č.23d) a fragmentovaný iont při m/z 700 (obrázek č.23d), odpovídající štěpení acetonové jednotky v molekulárním iontu $[M+H-C_3H_6O]^+$. Toto je charakteristické pro (all-*trans*)- myxoxanthophyll jako (3R,2S)-myxol 2'-(2,4-di-O-methyl- α -L-fucoside).[40,42] Dva menší píky, kontaminanty přítomné ve frakci myxoxanthophyllu získané pomocí HPLC (obrázek č.22b) vykazovaly spektra ESI-HRMS/MS podobná spektrům (all-*trans*)-myxoxanthophyllu, ale s UV-viditelnými spektry, která byla kompatibilní se spektry z (13 nebo 13'-*cis*)- myxoxanthophyll (1) (obrázek č.23b) a (9 nebo 9'-*cis*)- myxoxanthophyll (2) (obrázek č.23b). Ukázalo se, že tyto dva druhy menších geometrických izomerů jsou běžně vytvářeny z (all-*trans*) karotenoidů působením světla a teploty. Nemusí představovat žádné nebezpečí pro člověka. [43,44]

V poslední době stále roste zájem o zkoumání příznivých účinků karotenoidů ve zdravotnickém a kosmetickém průmyslu. [46] Přínosy karotenoidů pro lidské zdraví jsou především v jejich schopnosti zachytávat volné radikály, které způsobují předčasné stárnutí a některá chronická onemocnění. [47] Epidemiologické studie potvrzují, že adekvátní suplementace karotenoidů může významně snížit riziko některých poruch, zprostředkovaných právě volnými radikály. Byl prokázán mírný na dávce závislý pozitivní účinek myxoxanthophyllu na DPPH volných radikálů ve srovnání s pozitivními kontrolami Trolox a astaxanthin (obrázek č.24a).[48] Dalším významným využitím karotenoidů je kosmetický průmysl. Mají schopnost zasahovat do procesu melanogeneze inhibicí tyrosinázy, enzymu, který hraje významnou roli v syntéze melaninu. Tyto poznatky se využívají při vývoji anti-melanogenetických látek na bělení pokožky.[49] V tomto výzkumu myxoxanthophyll vykazoval pouze slabý antioxidační a tyrosinázový inhibiční účinek (obrázek č.24b). Jeho biologické účinky na jiné typy volných radikálů i na jiné druhy tyrosinázy by měly být dále zkoumány a

testovány, aby se stanovil komplexnější biologický profil tohoto vzácného karotenoidu. Imunomodulační aktivita karotenoidů (β -carotenu, canthaxanthinu a astaxanthinu) na proliferaci a funkci imunitních buněk, byla již dříve popsána. [50,51] Účinek myxoxanthophyllu na imunitní systém zatím není znám. V této práci byly provedeny zkoušky, které měly prověřit potenciální aktivační účinek na imunitní buňky v reakci na léčbu myxoxanthophyllem měřením exprese CD69 na povrchu buněk pomocí průtokové cytometrie. Glykoprotein CD69 je časný aktivační antigen, který je exprimován na aktivovaných imunitních buňkách. Jakmile je exprimován na T-lymfocytárních buňkách, stimuluje jejich aktivaci a proliferaci. CD69 je také indukovatelně exprimován buňkami B-lymfocytů, NK buňkami, monocyty, neutrofilů a eozinofily. [52] Tato schopnost byla využita ke zjištění imunitně stimulačních vlastností rostlin pomocí *in-vitro* [39,53-56] a *in-vivo* studií. [57] V prezentovaném výzkumu nebyly aktivovány myxoxanthophyllem kromě granulocytů žádné testované imunitní buňky (obrázek 25c,d). Granulocyty, tj. neutrofilů, eosinofily, bazofily a žírné buňky jsou efektorové buňky vrozené imunitní odpovědi na bakteriální a houbové infekce. Tyto buňky identifikují, pohlcují a ničí mikrobiální patogeny prostřednictvím receptorů, oxidačních mechanismů a enzymů, včetně lysozymu, kolagenázy a elastázy. [58] Data uvedená v této studii mohou podporovat potenciální využití myxoxanthophyllu pro posílení imunitního systému proti bakteriálním a plísňovým infekcím.

Jelikož cílová sloučenina získaná tímto procesem má potenciální využití v potravinářském nebo nutraceutickém sektoru, metoda odpaření a sušení finálního produktu zajišťuje nepřítomnost zbytkového rozpuštědla. Tento získaný pigment by mohl mít využití jako potencionální nespecifický imunitní stimulátor. Celkově představuje metoda HPCCC dobrou strategii pro účinnou izolaci myxoxanthophyllu ze sinic *S. salina* a může sloužit jako reference pro vývoj velkovýrobního modelu. V budoucnu se tato strategie může sblížit s biorafinérskými postupy a expandovat i do oblasti získávání dalších cenných produktů.

Publications (Separations, Impact Faktor: 2.777)

Nováková, M.; Fábryová, T.; Vokurková, D.; Dolečková, I.; Kopecký, J.; Hrouzek, P.; Tůmová, L.; Cheel, J. Separation of the glycosylated carotenoid myxoxanthophyll from *Synechocystis salina* by HPLC and evaluation of its antioxidant, tyrosinase inhibitory and immune-stimulating properties. *Separations* **2020**, 7, 73. <https://doi.org/10.3390/separations7040073>

Conferences

Nováková, M., Cheel, J., Fábryová, T., Hrouzek, P., Tůmová, L., Kopecký, J. Separation of myxoxanthophyll from cyanobacterium *Synechocystis* sp. by high performance countercurrent chromatography. The 10th International Conference on Countercurrent Chromatography. August 1–3, **2018**, Braunschweig, Germany.

Fábryová, T., **Nováková, M.**, Vokurková, D., Kopecký, J., Hrouzek, P., Cheel, J., Tůmová, L. Separation of the carotenoid myxoxanthophyll from *Synechocystis salina* by high performance countercurrent chromatography and evaluation of its immune-stimulating properties. 11 th Postgraduate and Postdoc Conference 27. - 28. January 2021, Faculty of Pharmacy, Charles University, Czech Republic

7. LITERATURA

- [1] Kalina T., Váňa J.: *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. Karolinum, Praha 2005, 57-60. ISBN 80-246-1036-1.
- [2] Zelík P.: Kinetické studium inhibitorů acetylcholinesterázy produkovaných autotrofními mikroorganismy. *Disertační práce*. Fakulta chemická, VUT Brno 2008.
- [3] Dvořák P., Hašler P., Pouličková A.: *Průvodce mikrosvětlem sinic a řas*. Univerzita Palackého v Olomouci, 1-46, 2015. ISBN 978-80-244-4408-6.
- [4] Tomšíčková J.: Fungicidní aktivita sinic rodu *Nostoc*. *Disertační práce*. Přírodovědná fakulta, JČU České Budějovice 2013.
- [5] Hubík J., Dušek J., Spilková J.: *Farmokognozie I. Obecná část a primární látky*. SPN. Univerzita Karlova. Praha 1989.
- [6] Zhang L., Selaot T., Selstam E., Norling B. et al.: Subcellular localization of carotenoid biosynthesis in *Synechocystis sp.* PCC 680. *Plos One Journal* 2015, 2-13.
- [7] Armstrong G. A.: Eubacteria show their true colors: Genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. *J. Bacteriol.* 1994, 176, (16), 4795-4802.
- [8] Velíšek J.: *Chemie potravin 2*. 1. Osis, Tábor, 2002. ISBN 80-86659-03-8.
- [9] Opletal L.: *Přírodní látky a jejich biologická aktivita: Nutraceutika*. Karolinum, Praha 2016. ISBN 978-246-2084-8.
- [10] Sathasivam R., Ki Jang-Seu : A Review of the Biological Activities of Microalgal Carotenoids and Their Potential Use in Healthcare and Cosmetic Industries. *Marine Drugs*. 2018, 16-26.
- [11] Rose A. H., Harrison J.S.: *The yeasts, Physiology and biochemistry of yeasts*. Volume 2, Academic Press London, 1971, 571. ISBN 12-596402-1.
- [12] Kouřilová X.: Srovnání růstu a produktivity autotrofních řas a karotenogenních kvasinek. *Bakalářská práce*. Fakulta chemická, VUT Brno, 2017.

- [13] Kubáčková M.: Produkce karotenoidů kvasinkami s využitím odpadních substrátů. *Bakalářská práce*. Fakulta chemická, VUT Brno, 2009.
- [14] Takáčsová M., Příbera A.: *Chémia potravín*, STU Bratislava, 1993.
- [15] Kindl H., Wober G.: *Biochemie rostlin 3*. Praha: Academia, 1981. ISBN 509-21-857.
- [16] Velíšek J.: *Chemie potravín 3*, OSSIS, Tábor 1999. ISBN 80-902391-5-3.
- [17] Velíšek J., Hajšlová J.: *Chemie potravín II*. OSSIS, Tábor 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [18] Velíšek J., Hajšlová J.: *Chemie potravín I*. OSSIS, Tábor 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [19] Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H.: *Carotenoids Volume 5: Nutrition and Health*. Birkhäuser Verlag, Basel 2009.
- [20] Jordan V., Hemzalová M.: *Antioxidanty zázračné zbraně*. JOTA, Brno 2001,15-17. ISBN 80-7217-156-9.
- [21] Nováková L., Douša M., et al.: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 4.vydání. Europrint a.s.Praha 5, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [22] Churáček J., Jandera P.: *Separace látek*. VŠCHT Pardubice, Praha 1986
- [23] Popl M., Kubát J.: *Základy chromatografie*, VŠCHT Praha 1981.
- [24] Králová B., Rauch P.: *Bioanalytické metody*. VŠCHT Praha 1993.
- [25] Kříženecká S., Synek V.: *Základy analytické chemie*, Universita Jana Evangelisty Purkyně, fakulta životního prostředí, Ústí nad Labem 2014, 101-120, ISBN 978-80-7414-804-0.
- [26] Berthod A., Maryutina T., Spivakov B., Shpigun O., Sutherland IA.: Countercurrent chromatography in analytical chemistry. *Pure Appl Chem*. 2009, 81, 355–387.
- [27] Michel T., Destandau E., Elfakir C.: New advances in countercurrent chromatography and centrifugal partition chromatography: focus on coupling strategy, *Anal. Bioanal. Chem*. 2014, 406, 957–969.

- [28] Dinesh K., Sainia S., Pabbib P.S.: Cyanobacterial pigments: Perspectives and biotechnological approaches, Enzyme Technology and Protein Bioinformatics Laboratory, Food and Chemical Toxicology, 2018, 617-621.
- [29] Jaswir I., Noviendri D., Hasrini R.F., Octavianti F.: Carotenoids: Sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. Journal of Medicinal Plants Research 2011, 5(33), 7125-7127.
- [30] Gateau H., Solymosi K., Marchand J., Schoefs B.: Carotenoids of Microalgae Used in Food Industry and Medicine. Mini Rev Med Chem. 2017, 1140–1172.
- [31] Hussein G., Nakamura M., Zhao Q., Iguchi T., Goto H. Sankawa U., Watanabe H.: Antihypertensive and neuroprotective effects of astaxanthin in experimental animals. Biol. Pharm. Bull. 2005, 28, 47–52.
- [32] Hořejší V., Bartůňková J.: *Základy Imunologie*. 6.vydání. Triton, Praha 2017. ISBN 978-80-7553-250-3.
- [33] Jílek P.: *Imunologie stručně, jasně, přehledně*. 4 vydání, Grada Publishing a.s.Praha 2014. 11-15, 65-68. ISBN 978-80-247-4822-1.
- [34] Ito Y.: Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. J. Chromatogr. A 2005, 1065, 145–168.
- [35] CheeL J., Urajová P., Hájek J., Hrouzek P., Kuzma M., Bouju E., Faure K., Kopecký J: Separation of cyclic lipopeptide puwainaphycins from cyanobacteria by countercurrent chromatography combined with polymeric resins and HPLC. Anal. Bioanal. Chem 2017, 409, 917–930.
- [36] Sutherland I.A.: Liquid stationary phase retention and resolution in hydrodynamic CCC. In Comprehensive Analytical Chemistry; Berthod, A., Ed.; Elsevier Science B.V.: Amsterdam, The Netherlands, 2002; 38, 159–176.
- [37] Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C.: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT 1995, 28, 25–30.

- [38] Jiménez M., Chazarra S., Escribano J., Cabanes J., García-Carmona F.: Competitive inhibition of mushroom tyrosinase by 4 -substituted benzaldehydes. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 4060–4063.
- [39] Tůmová, L., Dučaiová Z., Cheel J., Vokřál I., Sepúlveda B., Vokurková D.: *Azorella compacta* infusion activates human immune cells and scavenges free radicals in vitro. *Pharmacogn. Mag.* 2017, 13, 260–264.
- [40] Takaichi S., Maoka T., Masamoto K.: Myxoxanthophyll in *Synechocystis* sp. PCC 6803 is myxol 2'-dimethyl-fucoside, (3R,2'S)-myxol 2'-(2,4-di-O-methyl- α -L-fucoside), not rhamnoside. *Plant Cell Physiol.* 2001, 42, 756–762.
- [41] Berthod A., Faure K.: Separations with a liquid stationary phase: Countercurrent chromatography or centrifugal partition chromatography. In *Analytical Separation Science*, 1st ed.; Anderson J.L, Berthod A., Pino Estévez V., Stalcup A.M., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2015, 1177–1206,
- [42] Lagarde D., Vermaas W.: The zeaxanthin biosynthesis enzyme IS-carotene hydroxylase is involved in myxoxanthophyll synthesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett.* 1999, 454, 247–251.
- [43] Fábryová T., Cheel J., Kubáč D., Hrouzek P., Vu D.L., Tůmová L., Kopecký J.: Purification of lutein from the green microalgae *Chlorella vulgaris* by integrated use of a new extraction protocol and a multi-injection high performance counter-current chromatography (HPCCC). *Algal Res.* 2019, 41, 101574.
- [44] Aman R., Schieber A., Carle R.J.: Effects of heating and illumination on trans-cis isomerization and degradation of *beta*-carotene and lutein in isolated spinach chloroplasts. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 9512–9518.
- [45] Fábryová T., Tůmová L., da Silva D.C., Pereira D.M., Andrade P.B., Valentão P., Hrouzek P., Kopecký J., Cheel J.: Isolation of astaxanthin monoesters from the microalgae *Haematococcus pluvialis* by high performance countercurrent chromatography (HPCCC) combined with high performance liquid chromatography (HPLC). *Algal Res.* 2020, 49, 101947.

- [46] Sathasivam R., Ki J.S.: A Review of the biological activities of microalgal carotenoids and their potential use in healthcare and cosmetic industries. *Mar. Drugs* 2018, *16*, 26.
- [47] Halliwell B., Gutteridge J.M.: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 1984, *219*, 1–14.
- [48] Fiedor J., Burda K.: Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients* 2014, *6*, 466–488.
- [49] Pillaiyar T., Manickam M., Namasivayam V.: Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2017, *32*, 403–425.
- [50] Okai Y., Higashi-Okai K.: Possible immunomodulating activities of carotenoids in *in vitro* cell culture experiments. *Int. J. Immunopharmacol.* 1996, *18*, 753–758.
- [51] Hughes D.A.: Effects of carotenoids on human immune function. *Proc. Nutr. Soc.* 1999, *58*, 713–718.
- [52] Ziegler S.F., Ramsdell F., Alderson M.R.: The activation antigen CD69. *Stem Cells* 1994, *12*, 456–465.
- [53] Cheel J., Antwerpen P.V., Tůmová L., Onofre G., Vokurková D., Zouaoui-Boudjeltia K., Vanhaeverbeek M., Nève J.: Free radical-scavenging, antioxidant and immunostimulating effects of a licorice infusion (*Glycyrrhiza glabra* L.). *Food Chem.* 2010, *122*, 508–517.
- [54] Cheel J., Onofre G., Vokurková D., Tůmová L., Neugebauerová J.: Licorice infusion: Chemical profile and effects on the activation and the cell cycle progression of human lymphocytes. *Pharmacog. Mag.* 2010, *6*, 26–33.
- [55] Wagner H., Jurcic K.: Immunological studies of Revitonil®, a phytopharmaceutical containing *Echinacea purpurea* and *Glycyrrhiza glabra* root extract. *Phytomedicine* 2002, *9*, 390–397.
- [56] Zwickey H., Brush J., Iacullo C.M., Connelly E., Gregory W.L., Soumyanath A., Buresh R.: The effect of *Echinacea purpurea*, *Astragalus membranaceus* and *Glycyrrhiza glabra* on CD25 expression in humans: A pilot study. *Phytother. Res.* 2007, *21*, 1109–1112.

[57] Brush J., Mendenhall E., Guggenheim A., Chan T., Connelly E., Soumyanath A., Buresh R., Barrett R., Zwickey H.: The effect of *Echinacea purpurea*, *Astragalus membranaceus* and *Glycyrrhiza glabra* on CD69 expression and immune cell activation in humans. *Phytother Res.* 2006, 20, 687–695.

[58] Aristizábal B., González Á.: Innate immune system. In *Autoimmunity: From Bench to Bedside*; Anaya J.M., Shoenfeld Y., Rojas-Villarraga A., Levy R.A., Cervera R., Eds.; El Rosario University Press: Bogota, Colombia, 2013; 31–46.

[59] Shinomiya K., Tokura K., Kimura E., Takai M., Harikai N., Yoshida K., Yanagidaira K., Ito Y.: Design of a coil satellite centrifuge and its performance on counter-current chromatographic separation of 4-methylumbelliferyl sugar derivatives with polar organic–aqueous two-phase solvent systems, *J. Chromatogr. A*, 2015, 1392, 48–55,

Elektronické zdroje

[61] *Extrakce a spektrofotometrické stanovení fotosyntetických pigmentů* [online]. Muni.cz. Dostupné z: <https://www.sci.muni.cz/~fyzrost/chlorofyly.htm> (2019-01-07)

[62] *Oddělení Cyanobacteria* [online]. Sinice a řasy.cz. Dostupné z: <http://www.sinicearasy.cz/134/Cyanobacteria> (2021-23-11)

[63] *Protiproudová chromatografie* [online]. Dostupné z: https://cs.qaz.wiki/wiki/Countercurrent_chromatography (2019-23-10)

8. Seznam tabulek

Tabulka 1:Hlavní pigmenty sinic a jejich použití. str. 617 [28].....	27
Tabulka 2:Rozdělovací koeficient (K) myxoxanthophyllu v různých dvoufázových systémech rozpouštědel. Zdroj: vlastní zpracování. *LP-spodní fáze. UP-horní fáze.**Myx- Myxoxanthophyll, n-Hep-n-heptan, EtOH-ethanol, H ₂ O-voda, EtoAc- ethyl-acetát,BuOH-n-butanol, ACT-acetoniril	42
Tabulka 3: Operativní podmínky pokus č.1	45
Tabulka 4: Operativní podmínky pokus č.2	46
Tabulka 5: Operativní podmínky pokus č.3	48
Tabulka 6: Operativní podmínky pokusu č.4	49
Tabulka 7: Operativní podmínky pokus č.5	51
Tabulka 8: Operativní podmínky pokus č. 6	53

9. Seznam obrázků

Obrázek 1: Zjednodušená cesta pro biosyntézu karotenoidů v Synechocystis, zahrnutý pouze enzymy s ověřenou funkcí. [6].....	19
Obrázek 2: Chemická struktura myxoxanthophyllu [40].	19
Obrázek 3: Vysokoúčinná protiproudá chromatografie (HPCCC) [fotografie pořízena přímo v laboratoři Algatech].....	Chyba! Záložka není definována.
Obrázek 4: Princip tvorby planetárního pohybu separační kapilární cívky typu J v CC [59]...	Chyba! Záložka není definována.
Obrázek 5: Schematický pohled na pohyb kapaliny v CCC kolonách [26]	Chyba! Záložka není definována.
Obrázek 6: Růstová křivka Synechocystis salina PCC6906 v 120 L plochem panelovém fotobioreaktoru. Růst kultury byl monitorován spektrofotometrem V-1200 jako optická hustota (O.D.) při infračervené vlnové délce 750 nm s délkou optické dráhy 5 mm. Suchá hmotnost	39
Obrázek 7: Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s chromatografy extraktu Synechocystis salina s detekcí diodového pole (HPLC-DAD)	40
Obrázek 8: Ultrafialově viditelná spektra (UV-Vis) (all-trans) -myxoxanthophyllu.....	40
Obrázek 9: Vliv průtoku mobilní fáze na retenci stacionární fáze. Mobilní fáze: spodní fáze dvoufázového rozpouštědlového systému 7 (n-Hep :EtOH :H ₂ O) 2:4:4.....	43

Obrázek 10: HPCCC chromatogram extraktu z mikrořas	44
Obrázek 11: HPCCC chromatogram frakce z extraktu z mikrořas	45
Obrázek 12: HPLC analýza frakce obohacená myxoxanthophyllem.....	46
Obrázek 13: HPCCC chromatogram separace myxoxanthophyllu z frakce	47
Obrázek 14: HPLC analýza separovaného myxoxanthophyllu.....	48
Obrázek 15: HPCCC chromatogram separace myxoxanthophyllu z frakce	49
Obrázek 16: HPLC analýza separovaného myxoxanthophyllu.....	50
Obrázek 17: HPCCC chromatogram dvojinjekční separace myxoxanthophyllu z frakce. RF: reverzní fáze. CM: režim souběžné eluce. SF: stacionární fáze. MF: mobilní fáze	51
Obrázek 18: HPLC analýza separovaného myxoxanthophyllu.....	52
Obrázek 19: HPCCC chromatogram čtyřinjekční separace myxoxanthophyllu z frakce. RF: reverzní fáze. CM: režim souběžné eluce. SF: stacionární fáze. MF: mobilní fáze.....	53
Obrázek 20: HPLC analýza separovaného myxoxanthophyllu.....	53
Obrázek 21: HPLC analýza purifikovaného myxoxanthophyllu	54
Obrázek 22: Vysoce účinná kapalinová chromatografie s detekcí diodovým polem (HPLC-DAD) chromatogramy extraktu ze <i>S. salina</i> (a), myxoxanthophylové frakce získané pomocí HPCCC (b) a myxoxanthophyllu dále purifikované pomocí HPLC (c). Chromatogramy byly monitorovány při 478 nm. 1: (13 nebo 13'-cis) - myxoxanthophyll 2: (9 nebo 9'-cis) - myxoxanthophyll.....	Chyba!
Záložka není definována.	
Obrázek 23: Spektra ultrafialového záření (UV-Vis) (all-trans) -myxoxanthophyllu získaného pomocí HPCCC (a). Ultrafialově viditelná (UV-Vis) spektra 1 (13 nebo 13'-cis) -myxoxanthophyllu a 2 (9 nebo 9'-cis) -myxoxanthophyllu (b). Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením se zdrojem elektrosprejové ionizace (ESI) (ESI-HR / MS) spektra (all-trans) -myxoxanthophyllu (c). Tandemová hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením s elektrosprejovým ionizačním zdrojem (ESI-HRMS / MS) spektra molekulárního iontu (all-trans) -myxoxanthophyllu (d).....	56
Obrázek 24: (a) Aktivita zachycování volných radikálů DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) zkoušené látky. Trolox a astaxanthin byly použity jako pozitivní kontroly. (b) Inhibice fungální tyrosinázy myxoxanthophylem za použití levodopy (L-DOPA) jako substrátu. Kyselina kojová byla použita jako pozitivní kontrola. Data představují průměr ± SD. Pro statistickou analýzu byl použit Studentův T-test. ** p <0,01, *** p <0,001 související s kontrolou.....	57

Obrázek 25: Průměrná fluorescenční intenzita (MFI) exprese CD69 na aktivovaných imunitních buňkách z lidské periferní krve v reakci na léčbu myxoxanthophyllem po dobu 24 hodin je uvedena jako histogramy. Vyplněné histogramy (tmavě šedé) představují kontrolní skupinu (neošetřené) a ostatní histogramy (světle šedé) stimulovanou (předem ošetřenou) skupinu. Jako pozitivní kontrola byl použit mitogen, fytohemaglutinin (PHA). Histogramy jsou reprezentativní pro tři samostatné experimenty využívající buňky od tří různých zdravých dárců. 59

