

Microcystiny – cyklické heptapeptidy sinic

Pavel Babica, Blahoslav Maršálek, Luděk Bláha

1. Úvod

Sinice neboli **cyanobakterie** představují velmi starobylou skupinu prokaryotických organismů. Jedná se gramnegativní eubakterie schopné fotosyntézy za současné produkce kyslíku (tzv. oxygenní fotosyntéza) žijící buď ve formě jednotlivých buněk, kulovitých kolonií anebo vláken. Sinice osidlují po celém světě nejrozmanitější biotopy a jsou přirozenou součástí planktonních i bentických společenstev téměř všech vodních ekosystémů. V posledních desetiletích však dochází stále častěji k **masovým rozvojem sinic** prakticky po celém světě. Za hlavní příčinu zvýšené četnosti výskytu i doby trvání vodních květů sinic je považována **antropogenní (kulturní, indukovaná) eutrofizace vod**, tj. zvýšení přísunu živin do vodních ekosystému v důsledku činnosti člověka. Na vysoké koncentrace živin (zejména dusíku a fosforu) sinice reagují velmi intenzívním růstem a tvorbou nové biomasy. V současné době se tak stal masový rozvoj sinic jevem zcela běžným v mnoha vnitrozemských vodních nádržích, pomalu tekoucích řekách a mělkých příbřežních mořích.

Z hlediska vodárenského nebo rekreačního využívání nádrží lze považovat nadměrný rozvoj sinic za krajně nežádoucí jev s **negativními dopady na kvalitu vody**. Vedle procesů souvisejících s rozkladem ohromných množství biomasy sinic (pokles koncentrace kyslíku ve vodním sloupci a následný anaerobní rozklad organických látek doprovázený vznikem sloučenin ovlivňujících organoleptické vlastnosti vody nebo dokonce vznikem toxických látek) představují další závažný problém látky produkované samotnými sinicemi. Pravděpodobně nejproblematičtější skupinou sinicových metabolitů jsou toxiny sinic – **cyanotoxiny**.

2. Cyanotoxiny

Cyanotoxiny jsou do jisté míry uměle vytvořenou skupinou látek, která zahrnuje několik vzájemně nepříbuzných (strukturně a zřejmě také evolučně a funkčně) typů sloučenin s velmi rozdílnými toxikologickými vlastnostmi. Přirozená úloha těchto metabolitů a jejich přínos pro cyanobakterie jsou dosud ve většině případů nejasné.

Po chemické stránce jsou cyanotoxiny nejčastěji oligopeptidy (hepatotoxické **microcystiny** a **nodulariny**, dermatotoxický **lyngbyatoxin**) nebo heterocyklické látky (neurotoxické **anatoxiny** a **saxitoxiny**, hepatotoxický **cylindrospermopsin**). Mezi nejvýznamější producenty cyanotoxinů patří sinice rodů *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix*, *Cylindrospermopsis*, *Nodularia* aj. Některé druhy sinic mohou produkovat i několik různých toxinů současně, na druhou stranu některé jiné populace těchto druhů mohou být zcela netoxické. Spektrum produkováných toxinů i jejich obsah v biomase sinic se také může výrazně měnit i během jedné vegetační sezóny. (Sivonen and Jones 1999). Zhruba 75% vodních květů sinic obsahuje některý



z uvedených cyanotoxinů (Chorus *et al.* 2000; WHO 1998a). Toxicitu však vykazují také **lipopolysacharidy**, které jsou součástí buněčných stěn všech sinic.

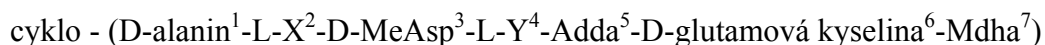
Je nutné si uvědomit, že ačkoli jsou výše zmíněné cyanotoxiny považovány za nejnebezpečnější z hlediska humánních rizik a je jim tedy oprávněně věnována značná pozornost, toxicita či jiná biologická aktivita byla zaznamenána u desítek dalších sloučenin produkovaných sinicemi a každoročně jsou podávány zprávy o nově identifikovaných toxických metabolitech sinic nebo o nově objevených toxických účincích již známých sloučenin.

3. Microcystiny

Nejrozšířenější, v sinicích sladkých vod nejčastěji nalézanou a také nejvíce studovanou skupinu cyanotoxinů představují hepatotoxické cyklické heptapeptidy – **microcystiny** (Sivonen and Jones 1999). Byly izolovány ze zástupců planktonních, bentických i půdních sinic rodů *Anabaena*, *Microcystis*, *Planktothrix*, *Nostoc*, *Anabaenopsis*, *Hapalosiphon* aj. a zcela běžně se vyskytují také ve vodních květech sinic v České republice (Maršálek and Bláha 2001; Maršálek *et al.* 2001).

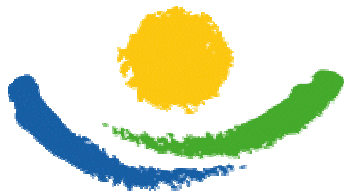
Struktura, fyzikálně chemické vlastnosti

Microcystiny jsou cyklické heptapeptidy (viz Obr.1), jejichž obecný vzorec je:



X a Y jsou různé L-aminokyseliny, MeAsp je D-erythro- β -methylasparagová kyselina, Adda je (2S,3S,8S,9S) - 3-amino- 9-methoxy- 2,6,8-trimethyl- 10-fenyldeka- 4,6-dienová kyselina a Mdha je N-methyldehydroalanin. Podle nejnovějších informací je známo přes 70 strukturálních variant microcystinů (Chorus 2004a; Meriluoto 2004). Nejčastěji se liší různými aminokyselinami X a Y v pozicích 2 a 4 a také demethylací aminokyselin v pozicích 3 a 7. Strukturální variace však byly popsány i u aminokyselin v ostatních polohách (Sivonen and Jones 1999). Dvoupísmenný kód v názvu microcystinu vyjadřuje, jaké aminokyseliny se v molekule nacházejí v polohách 2 a 4 (v případě microcystinu-LR jde tedy o leucin -L a arginin -R). Zřejmě nejběžnějšími microcystiny jsou microcystiny-LR, -YR a -RR. Naproti tomu některé jiné strukturální varianty microcystinů se vyskytují jen vzácně a téměř vždy v nízkých koncentracích a je tedy možné, že se jedná o spoluprodukty/vedlejší produkty při biosyntéze jiných microcystinů či snad artefakty vznikající při izolaci a purifikaci microcystinů (Lawton and Edwards 2001).

Většina microcystinů je poměrně hydrofilní, ve vodě dobře rozpustná a netěkavá. Kromě toxicity je další problematnou vlastností microcystinů jejich poměrně vysoká stabilita a odolnost vůči rozkladu (Harada 1996; Harada *et al.* 1996), která výrazně komplikuje jejich eliminaci v procesu výroby pitné vody (Hrudey *et al.* 1999). Microcystiny jsou ale odbourávány řadou bakterií vyskytujících se běžně ve vodách (Cousins *et al.* 1996; Hyenstrand *et al.* 2003; Christoffersen *et al.* 2002).



Toxikologie

Microcystiny jsou vysoce toxické pro nejrůznější organismy. Hlavní mechanismus účinku microcystinů spočívá v kovalentní vazbě na katalytickou podjednotku proteinfosfatáz 1 a 2A (MacKintosh *et al.* 1990) a v inhibici aktivity těchto enzymů, které uvnitř buněk všech organismů plní důležitou úlohu v regulačních procesech a při přenosu signálů. U obratlovců působí microcystiny toxicky především na játra (hepatotoxicita), neboť jaterní buňky aktivně přijímají microcystiny z krevního oběhu prostřednictvím transportního systému pro žlučové kyseliny (Eriksson *et al.* 1990). Závažné poškození jater v případě akutní intoxikace microcystiny se vyznačuje borcením cytoskeletu (v důsledku hyperfosforylace, která je způsobena inhibicí proteinfosfatáz; Falconer 1992), rozrušením sinusoidní struktury a lyzí jaterních buněk. Dochází k vnitřnímu krvácení do jater, hepatomegalii, poklesu krevního tlaku, hemodynamickému šoku, srdečnímu selhání a smrti. Vedle jater mohou microcystiny působit toxicky také na ledviny, plíce a střeva (Kuiper-Goodman *et al.* 1999) a diskutuje se také o možných neurotoxických efektech microcystinů. Hodnota akutní LD50 pro myš se u nejsledovanějšího microcystinu-LR pohybuje mezi 50-60 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ živé váhy při intraperitoneální aplikaci toxinu (i.p.) (Kuiper-Goodman *et al.* 1999), při perorální expozici (p.o.) dosahuje LD50 hodnot mezi 5 000 – 10 900 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ živé váhy (Fawell *et al.* 1994; Yoshida *et al.* 1997).

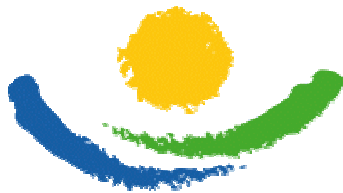
Microcystiny jsou toxické rovněž chronicky (tzn. při dlouhodobé opakované expozici) a to v mnohem menších dávkách (Falconer *et al.* 1994; Falconer *et al.* 1988; Fawell *et al.* 1994). Podle některých studií může opakovaný příjem nižších dávek microcystinů způsobovat závažnější poškození zdraví než jednorázová expozice daleko vyšší dávkou (Fitzgeorge *et al.* 1994).

Microcystiny jsou považovány za látky podporující nádorové bujení - tzv. promotory karcinogeneze (tumor promoting factors). Pro přehled experimentů *in vivo* na savcích, jejichž výsledky svědčí o karcinogenitě microcystinů, viz např. (Fitzgerald 2001). Účinky nádorových promotorů na stimulaci karcinogenních procesů se projevují nejvýrazněji především při chronických expozicích. Existují rovněž četné důkazy o genotoxicitě microcystinů, tzn. o jejich schopnosti indukovat poškození DNA (Zegura *et al.* 2004; Zegura *et al.* 2003; Zhan *et al.* 2004). Genotoxické procesy obecně se mohou významně podílet na iniciaci a také na další progresi nádorových onemocnění, podíl microcystinů na iniciaci karcinogeneze však nebyl dosud experimentálně prokázán.

Sinice produkující microcystiny byly příčinou řady hromadných úhynů hospodářských i divokých zvířat (krav, ovcí, psů, ryb, ptáků etc.; pro přehled viz např. Duy *et al.* 2000) a hrály hlavní roli také při mnoha humánních intoxikacích (viz Tab. 1). K nejtragičtější události došlo v polovině 90. let v brazilském Caruaru, kde v důsledku rozvoje hepatotoxických sinic v nádrži dodávající vodu pro hemodialyzi jednotku místní nemocnice došlo po rutinní renální dialýze k úmrtní zhruba 50 pacientů (Azevedo *et al.* 2002).

Limitní hodnoty, legislativa a regulace

Dokumentované případy otrav zvířat a lidí spolu s výsledky laboratorních experimentů se zvířaty ukazují, že microcystiny mohou být lidskému zdraví velmi nebezpečné. Skutečnost, že



frekvence výskytu vodních květů má vzestupnou tendenci a že microcystiny jsou v současnosti v prostředí běžně nalézány (např. v České republice v roce 1999 byly microcystiny detekovány ve více než 80% vzorků biomasy sinic; Maršálek 2001), zvyšuje zároveň pravděpodobnost expozice lidské populace microcystiny a tedy i pravděpodobnost reálného poškození zdraví (=nárůstající zdravotní rizika).

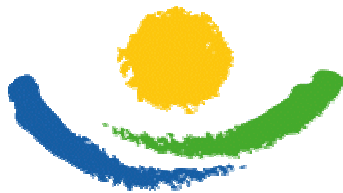
Na základě syntézy všech dostupných údajů o toxicitě microcystinů byla experty Světové zdravotnické organizace (WHO) odvozena pro účely charakterizace a minimalizace možných zdravotních rizik hodnota **tolerovaného denního příjmu (TDI)** pro microcystin-LR (zatím jako pro jediný z cyanotoxinů). TDI je dávka toxinu, která s nejvyšší pravděpodobností nezpůsobí poškození zdraví ani při opakované, dlouhodobé až celoživotní expozici, a to ani u zvláště citlivých skupin populace jako jsou např. děti. TDI pro microcystin-LR byl stanoven na $0,04 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti a tato hodnota byla dále použita ke kalkulaci **maximální přípustné koncentrace microcystinu-LR v pitné vodě**. Při výpočtu této limitní koncentrace byla uvažována průměrná hmotnost člověka (BW) 60 kg, průměrná denní spotřeba pitné vody (IR) 2 L a podíl microcystinů přijímaných z pitné vody (P) 0,8. Výsledná hodnota vypočtená podle rovnice $(\text{TDI} \times \text{BW} \times \text{P}) / \text{IR}$ činí po zaokrouhlení **$1,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$** (Kuiper-Goodman *et al.* 1999; WHO 1998a). Je součástí směrnice WHO pro pitné vody a byla implementována do legislativy a hygienických norem v mnoha zemích světa, včetně České republiky (vyhláška č. 252/2004).

Nejvýznamnějším nedostatkem uvedené limitní koncentrace je skutečnost, že se vztahuje pouze na jednu strukturní variantu microcystinu – microcystin-LR. Ačkoli je microcystin-LR s nejvyšší pravděpodobností nejčastěji se vyskytujícím microcystinem vůbec, podíl ostatních strukturních variant na celkovém obsahu microcystinů ve vzorku není možné v žádném případě zanedbat. Např. podle výsledků stanovení microcystinů v biomase sinic z různých nádrží České republiky v letech 1993-2003 byla strukturní varianta microcystin-LR detekována téměř v 98% vzorků, které obsahovaly microcystiny, nicméně její podíl na celkovém obsahu microcystinů ve vzorku se pohyboval v průměru okolo 48% (Maršálek, Bláha a kol., nepublikované výsledky).

Dle nejnovějších doporučení vyplývajících z diskuze odborníků v rámci 6. mezinárodní konference o toxických sinicích (Bergen, Norsko, 21-27/6/2004) **by měla být vytvořena jediná limitní hodnota pro sumu koncentrací všech strukturních variant microcystinů v pitné vodě** (Chorus 2004b). Jako nejjednodušší způsob se jeví adaptace dosavadního limitu odvozeného pro microcystin-LR, tzn. vztažení současné doporučované hodnoty $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ nikoli pouze na microcystin-LR, ale na všechny strukturní varianty microcystinů (tedy na celkovou koncentraci microcystinů ve vzorku).

Metody detekce microcystinů

Ke stanovení microcystinů může být použito několika principiálně odlišných metod. Vedle klasických instrumentálních technik mohou být microcystiny analyzovány také biochemicky (enzymatické stanovení) nebo imunochemicky.



Instrumentální techniky

Pravděpodobně nejrozšířenější metodou pro stanovení microcystinů je **vysoce účinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi** (reversed phase high performance/pressure liquid chromatography, RP – HPLC; Obr. 2). Princip metody spočívá v separaci microcystinů na analytické koloně (typicky se stacionární fází tvořenou chemicky modifikovaným silikagelem s navázanými oktadecylovými řetězci, tzv. C-18 kolony) a jejich následné detekci, nejčastěji buďto pomocí jednoduchého **UV detektoru** (ultra violet detector, UVD) anebo pomocí **detektoru s diodovým polem** (diode array detector, DAD). Za absorpci záření v UV oblasti vlnových délek je v molekule microcystinů odpovědná zejména aminokyselina Adda, která microcystinům uděluje charakteristická absorpční spektra s maximem při 238 nm (viz Obr. 3). Některé microcystiny obsahující v molekule aromatické aminokyseliny, především tyrosin (microcystiny-YR, -YM, -LY...) a tryptofan (microcystiny-WR, -LW) mohou mít absorpční maximum posunuté směrem ke kratším vlnovým délkám (230 nm resp. 222 nm, viz Obr. 4). Vzhledem k tomu, že analytické standardy jsou komerčně nabízeny jen pro některé strukturální varianty microcystinů, představuje nespornou výhodu detektoru s diodovým polem (oproti jednoduchému UVD) jeho schopnost odlišit microcystiny v chromatogramu od píků jiných sloučenin na základě jejich absorpčních spekter. Spolehlivá identifikace konkrétních strukturálních variant však také u DAD vyžaduje použití příslušných analytických standardů, podobně jako u jednoduchého UVD. Jednoznačnou výhodou stanovení microcystinů pomocí HPLC-UVD, resp. DAD je robustnost a spolehlivost metody, nevýhodami jsou vysoké náklady a nutnost kvalifikované obsluhy.

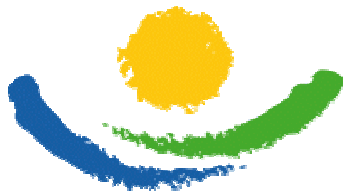
Kromě spektrofotometrické detekce bylo popsáno stanovení microcystinů použitím **HPLC v kombinaci s hmotnostně spektrometrickou detekcí** (Poon *et al.* 1993) nebo **elektrochemickým detektorem** (Meriluoto *et al.* 1998). Existují také techniky využívající derivatizačních reakcí microcystinů s fluorogenním (Shimizu *et al.* 1995) nebo chemiluminiscenčním substrátem (Murata *et al.* 1995) s následnou postkolonovou **luminiscenční detekcí** produktů.

Vedle chromatografických technik bylo popsáno i stanovení microcystinů **kapilární zónovou elektroforézou** (capillary zone electrophoresis, CZE) s detekcí laserem indukované fluorescence produktů derivatizačních reakcí (Wright 1989).

Zajímavá metoda vhodná pro stanovení microcystinů v komplikovaných maticích (sedimenty, tkáně) spočívá v oxidaci microcystinů, následné esterifikaci a analytickém stanovení produktu této oxidace pomocí **plynové chromatografie s plamenovým** (gas chromatography - flame ionization detector, GC-FID; Sano *et al.* 1992) nebo **hmotnostně spektrometrickým detektorem** (gas chromatography – mass spectrometric detector, GC-MSD; Kaya and Sano 1999) anebo pomocí kapalinové chromatografie s fluorescenčním detektorem (-fluorescence detector, HPLC-FLD; Sano *et al.* 1992).

Biochemické a imunochemické metody

Biochemické stanovení využívá **inhibičního působení microcystinů na proteinfosfatázy 1 a 2A**, jejichž aktivitu je možné určit měřením radiace [³²P]-fosfátu, který se činností těchto



CENTRUM PRO CYANOBAKTERIE A JEJICH TOXINY

Kamenice 126/3, 625 00 Brno, Česká Republika

Tel.: (+420) 549 495 967

E-mail: sinice@sinice.cz

Web: www.sinice.cz

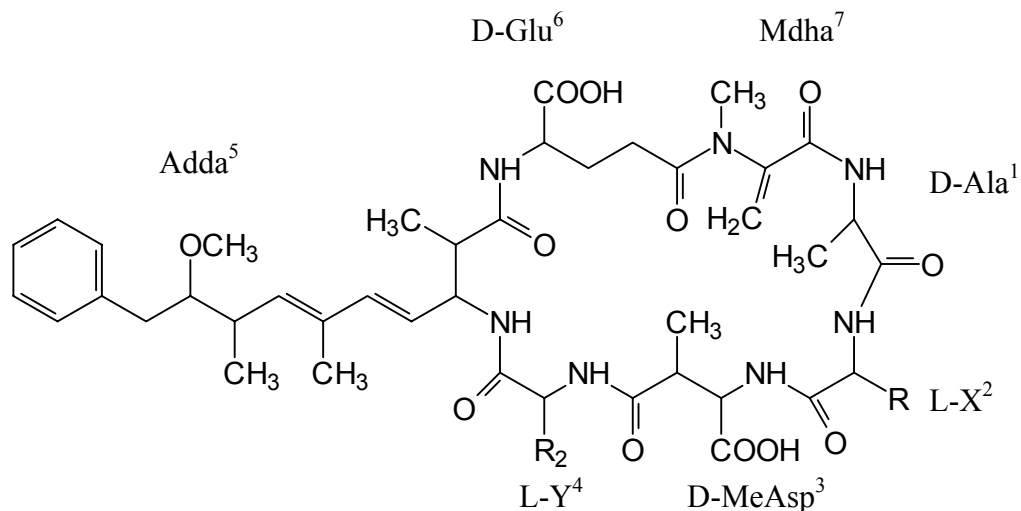
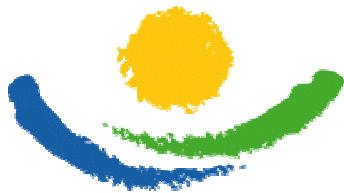


enzymů uvolňuje z radioaktivně značeného substrátu (Holmes 1991). Tato velmi citlivá metoda byla úspěšně aplikována a lze pomocí ní stanovit microcystin až v nanogramových množstvích (Andersen *et al.* 1993; Craig *et al.* 1993). Rutinní použití v praxi však znemožňuje práce s radioaktivními izotopy a s tím související potřeba speciálního laboratorního vybavení. Jiné modifikace této metody pracují s kolorimetrickými substráty (An and Carmichael 1994) nebo s luminiscenční koncovkou (Isobe *et al.* 1995) a zmíněné komplikace tak odpadají. Výhodou metody je její nízký detekční limit, nevýhodou nízká robustnost (možnost nespecifické inhibice enzymatické aktivity jinými komponentami vzorku než microcystiny) a neschopnost rozlišit jednotlivé strukturní varianty microcystinů.

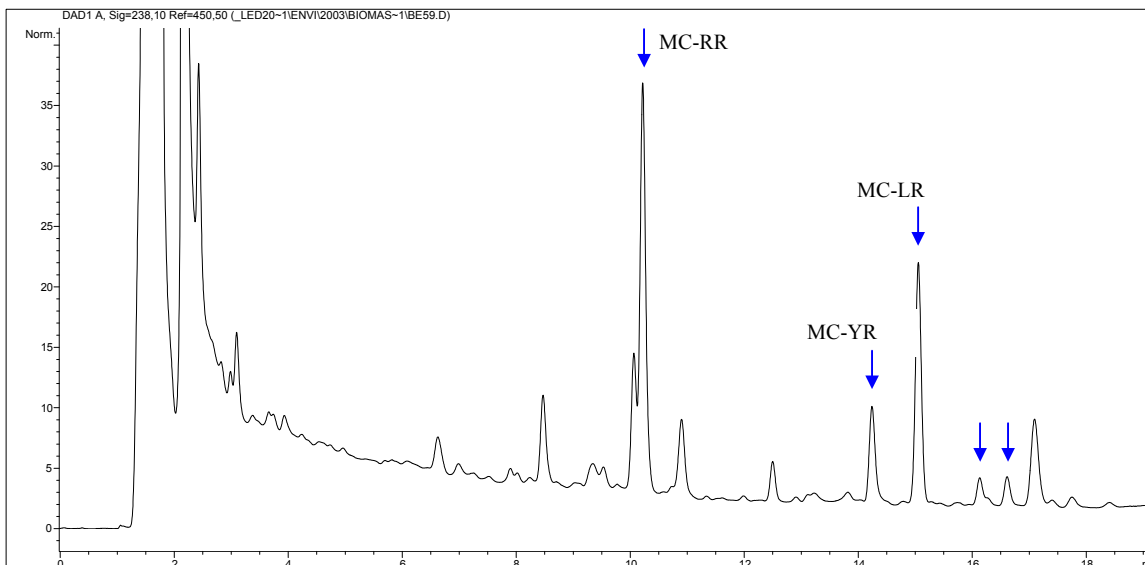
Velkého rozšíření se dočkalo **imunochemické stanovení microcystinů** (Harada *et al.* 1999). Princip metody je založen na detekci microcystinů pomocí specifických protilátek. Zatímco **radioimunoanalýza** (radioimmunoassay, RIA) se příliš neujala pro nutnost práce s radioaktivně značenými protilátkami, stanovení microcystinů pomocí **ELISA** (enzyme-linked immunosorbent assay) využívající enzymatického značení je dnes již dostupná ve formě komerčních kitů (Envirologix, Biosense). V typickém uspořádání jsou protilátky proti microcystinům navázány na stěny jamky v mikrotitrační destičce. Microcystiny ze vzorku obsadí určitý podíl vazebných míst na protilátkách na stěnách jamky, přičemž velikost tohoto podílu je úměrná koncentraci microcystinů. Zbývající vazebná místa jsou v dalším kroku obsazena microcystinem enzymaticky značeným (zpravidla křenovou peroxidázou), který je přidán do reakční směsi. Množství navázaných značených microcystinů je pak nepřímě úměrné koncentraci microcystinů ve vzorku a určí se (po odmytí nenavázaných značených microcystinů) změřením aktivity křenové peroxidázy, která štěpí externě dodaný kolorimetrický substrát (intenzita zbarvení odpovídá množství enzymu, tzn. současně také množství navázaných značených microcystinů). Vedle snadné dostupnosti je hlavní výhodou ELISA stanovení microcystinů velmi nízký detekční limit metody (kolem $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), který umožňuje stanovovat tyto cyanotoxiny v povrchových vodách přímo, bez nutnosti zakoncentrování vzorku, což výrazně zjednodušuje a urychluje celou proceduru. Nevýhodou je neschopnost metody rozlišit jednotlivé strukturní varianty microcystinů, potenciální detekce fragmentů microcystinů (možné nadhodnocení výsledků) a problémy s rozdílnou křížovou reaktivitou pro různé strukturní varianty microcystinů, které se však podařilo odstranit u některých nových typů monoklonálních protilátek (Zeck *et al.* 2001).

Nově vyvíjenou metodou připravovanou do podoby komerčního kitu je „**PP2A Competitive Binding Assay**“, která využívá kompetice microcystinů ze vzorku s fluorescenčně značeným microcystinem o vazbu na imobilizované molekuly proteinfosfatázy PP2A (Kleivdal *et al.* 2004).

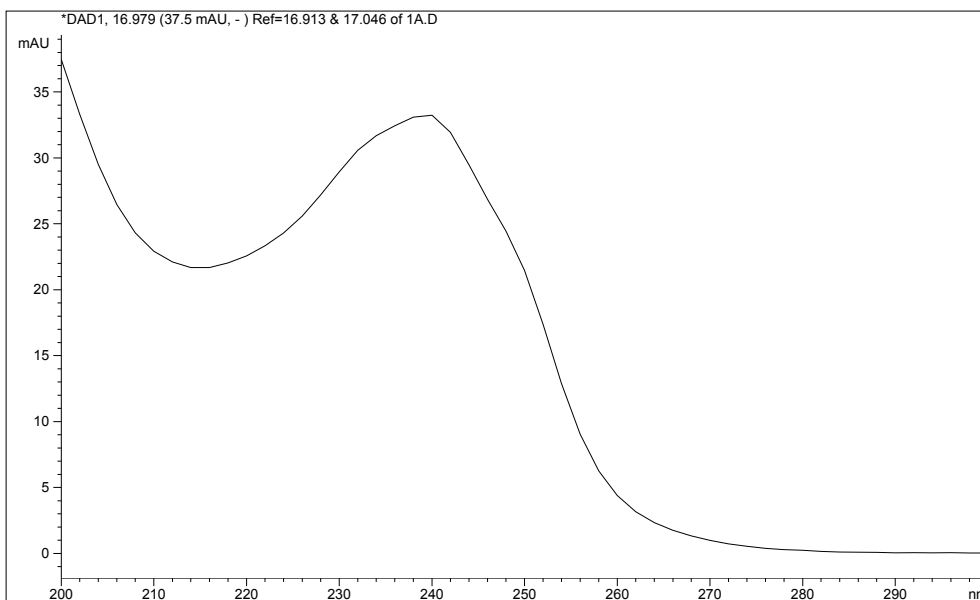
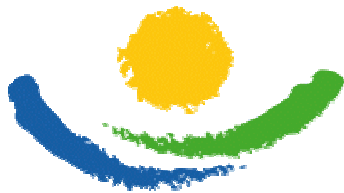
Biochemické a imunochemické metody jsou všeobecně považovány za ideální nástroj pro rutinní použití pro účely screeningu a monitoringu koncentrací microcystinů v pitných a rekreačních vodách (Rapala *et al.* 2002), kdežto instrumentální analytické metody pak mohou sloužit k verifikaci pozitivních nálezů.



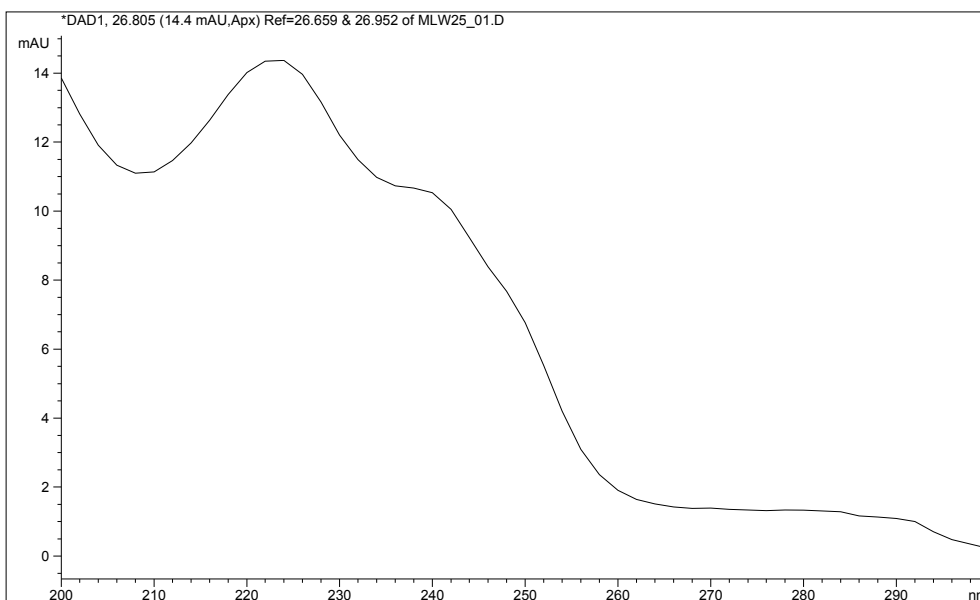
Obr. 1: Obecný vzorec microcystinů. V případě microcystinu-LR je X² L-leucin a Y⁴ L-arginin



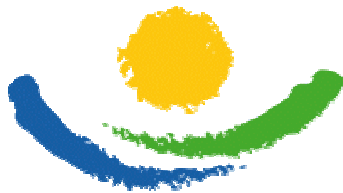
Obr. 2: Separace microcystinů na C-18 koloně (Supelcosil ABZ+Plus, 150x4,6mm, 5μm; detekce DAD, chromatografický záznam při 238 nm). Jde o chromatogram extraktu biomasy vodního květu sinic rodu *Microcystis* z Brněnské přehrady (Přístaviště, 30.09.2003). Šipky označují píky microcystinů (píky s popisem byly identifikovány na základě srovnání s retenčními časy standardů)



Obr. 3: Absorpční spektrum microcystinu-LR s typickým maximem při vlnové délce 238 nm



Obr. 4: Absorpční spektrum microcystinu-LW se maximem při vlnové délce 222 nm a sekundárním maximem při vlnové délce 238 nm



CENTRUM PRO CYANOBAKTERIE A JEJICH TOXINY

Kamenice 126/3, 625 00 Brno, Česká Republika

Tel.: (+420) 549 495 967

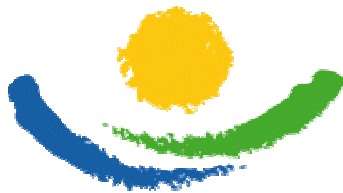
E-mail: sinice@sinice.cz

Web: www.sinice.cz



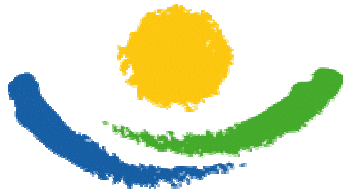
Případy otrav spojené s cyanotoxiny v pitné vodě	
1931	USA: masivní vodní květy <i>Microcystis</i> v řekách Ohio a Potomac způsobily onemocnění 5000 – 8000 lidí (převážně gastroenteritidami) v řadě měst zásobovaných vodou z těchto řek
1960-1965	Zimbabwe, Harare: v části města zásobované vodou z nádrže s vodním květem <i>Microcystis</i> každoročně v době kolapsu vodního květu docházelo k rozvoji gastroenteritid u dětí. Děti ze čtvrti s jiným zdrojem vody nebyly ovlivněny a nebyly identifikovány žádné infekční faktory.
1975	Pensylvánie, USA: akutní gastroenteritidy u 62% z 8000 lidí, konzumace vody z nádrže se sinicí <i>Schizotrix</i>
1975	USA: endotoxický šok 23 dialyzačních pacientů ve Washingtonu související s rozvojem sinic ve vodárenské nádrži
1979	Austrálie: po algicidním zásahu proti vodnímu květu <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> ve vodárenské nádrži na Palm Island onemocnělo přes 140 obyvatel (převážně děti) těžkými hepatoenteritidami, které si vyžádaly hospitalizaci. Symptomy byly malátnost, nechutenství, zvracení, bolesti hlavy, zvětšení jater, zácpy následované krvavými průjmy, dehydratace. Rozbory moče prokázaly poškození ledvin a rozbory krve zvýšené hladiny jaterních enzymů indikující poškození jater.
1981	Austrálie, Armidale: epidemiologická studie ukázala signifikantní změny aktivity některých jaterních enzymů (zejména gama glutamyltransferázy) v krevním séru lidí během rozvoje a následné likvidace vodního květu <i>Microcystis</i> ve vodárenské nádrži
1988	Brazílie: po napuštění přehrady Itaparica v roce 1988 bylo během 42 dnů zaznamenáno na 2000 případů gastroenteritid, z nichž 88 skončilo úmrtím. Následující výzkumy potenciálních příčin této epidemie vyloučily infekční patogeny, naopak zjistily vysoké koncentrace toxických cyanobakterií (<i>Anabaena</i> a <i>Microcystis</i>) v přítocích pitné vody v postižených oblastech.
1991-1992	jih Austrálie: 26 případů kožních a systémových onemocnění spojených s expozicí (v některých případech konzumace) říční a dešťové vody skladované v otevřených nádržích s vodními květy <i>Anabaena</i>
1992	střední Austrálie: onemocnění „horečkou Barcoo“, nevolností a zvracením v souvislosti s konzumací vody obsahující hepatotoxiny
1993	Čína: podle epidemiologické studie četnost výskytu rakoviny jater souvisí mj. se zdroji pitné vody a je významně vyšší u populací používajících povrchovou vodu zamořenou sinicemi než u populací s podzemními zdroji pitné vody. Předpokládá se, že příčinou byly microcystiny.
1994	Švédsko, 3 vesnice poblíž Malmö: po dobu několika hodin došlo k náhodnému míchání vodárensky neupravené říční vody s pitnou vodou. V řece v té době rostla hustě sinice <i>Planktothrix agardhii</i> produkující microcystiny. 121 obyvatel (z celkových 304) onemocnělo (nevolností, bolestí břicha, svalů, hlavy, zvracením, průjmy, horečky). Ovlivněna byla také domácí zvířata (psi a kočky).
Případy spojené s rekreační expozicí	
1959	Kanada, Saskatchewan: navzdory úhynům dobytka a varováním před rekreačním využitím plavali lidé v jezeře zamořeném sinicemi. 13 osob onemocnělo (bolesti hlavy, nevolnost, bolesti svalů, bolestivé průjmy). V exkrementech jednoho z pacientů, který náhodně požil asi 300 ml vody, byly identifikovány sinice <i>Microcystis</i> a <i>Anabaena circinalis</i> .
1980-1981	Pensylvánie a Nevada, USA: u více než 100 osob podráždění očí, kůže, bolest uší, symptomy „senné rýmy“, akutní gastroenteritidy aj. po plavání a vodním lyžování v jezeře s <i>Aphanizomenon</i> a <i>Anabaena</i>
1989	Anglie: po plavání a jízdě na kanoích ve vodě se silným vodním květem sinic rodu <i>Microcystis</i> trpělo 10 z 20 branců zvracením, průjmy, bolestmi břicha, otoky rtů, bolestmi v krku. U dvou z nich se rozvinul silný zápal plic (zřejmě způsobený aspirací cyanotoxinů), který si vyžádal hospitalizaci. Zdá se, že závažnost onemocnění souvisela s jejich schopnostmi plavat a s množstvím pohlčené vody.
1995	Austrálie: epidemiologické důkazy nepříznivých zdravotních efektů po kontaktu s cyanobaktériemi při rekreaci. Studie zahrnující 852 účastníků ukázala zvýšenou frekvenci kožních vyrážek, vředů v ústech, horeček, podráždění očí, uší a kůže, průjmů, zvracení, „syndromů chřipky“ během 2 – 7 dnů po expozici při koupání. Intenzita a četnost symptomů se významně zvyšovala v závislosti na době trvání koupání a na hustotě vodního květu.
Intoxikace jinými expozičními cestami	
1996	Brazílie, Caruaru: asi 85% z cca 130 pacientů místního hemodialyzačního centra po rutinní renální dialýze trpělo poruchami zraku, nevolností, zvracením, svalovou slabostí a bolestivou hepatomegalií. U 100 z nich následně dochází akutnímu selhání jater a 56 umírá. Nejméně 44 obětí vykazovalo podobné symptomy (včetně jaterní histopatologie) jako zvířata exponovaná microcystiny v laboratorních pokusech. V krevním séru exponovaných pacientů a jaterní tkáni mrtvých byly stanoveny microcystiny -LR, -YR a -AR. V nádrži sloužící také jako zdroj vody pro dialyzační centrum, byly poté identifikovány sinice rodů <i>Aphanizomenon</i> , <i>Oscillatoria</i> a <i>Spirulina</i> .

Tabulka 1: Přehled dokumentovaných humánních intoxikací toxickými cyanobaktériemi (Duy *et al.* 2000; Chorus *et al.* 2000; Kuiper-Goodman *et al.* 1999; WHO 1998a, b)



4. Literatura

- An, J., and Carmichael, W. W. (1994). Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. *Toxicon* **32**.
- Andersen, R. J., Luu, H. A., Chen, D. Z. X., Holmes, C. F. B., Kent, M. L., Leblanc, M., Taylor, F., and Williams, D. E. (1993). Chemical and Biological Evidence Links Microcystins to Salmon Netpen Liver-Disease. *Toxicon* **31**, 1315-1323.
- Azevedo, S. M. F. O., Carmichael, W. W., Jochimsen, E. M., Rinehart, K. L., Lau, S., Shaw, G. R., and Eaglesham, G. K. (2002). Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru--Brazil. *Toxicology* **181-182**, 441-446.
- Cousins, I. T., Bealing, D. J., James, H. A., and Sutton, A. (1996). Degradation of microcystins by indigenous mixed bacterial populations. *Water Res.* **30**, 481-485.
- Craig, M., McCready, T. L., Luu, H. A., Smillie, M. A., Dubord, P., and Holmes, C. F. B. (1993). Identification and characterisation of hydrophobic microcystins in Canadian freshwater cyanobacteria. *Toxicon* **31**, 1541-1549.
- Duy, T. N., Lam, P. K. S., Shaw, G. R., and Connell, D. W. (2000). Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. *Rev Environ Contam Toxicol* **163**, 113-186.
- Eriksson, J. E., Grönberg, L., Nygård, S., Slotte, J. P., and Meriluoto, J. A. O. (1990). Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR a cyclic peptide toxin. *Biochimica et Biophysica Acta* **1025**, 60-66.
- Falconer, I. R., Burch, M., Steffensen, D. A., Choice, M., and Coverdale, O. R. (1994). Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. *Environ Toxicol Wat Qual* **9**, 131-139.
- Falconer, I. R., Smith, J. V., Jackson, A. R. B., Jones, A., and Runnegar, M. T. C. (1988). Oral toxicity of a bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* administered to mice over periods up to 1 year. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **24**, 291-305.
- Falconer, I. R. e. Y., D. S. K. (1992). Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by *Microcystis* toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins. *Chem.-Biol. Interactions* **81**, 181-196.
- Fawell, J. K., James, C. P., and James, H. A. (1994). *Toxins from blue-green algae: toxicological assessment of microcystin-LR and a method for its determination in water*. Water Research Center.
- Fitzgeorge, R., Clark, S., and Keevil, C. (1994). Routes of intoxication. In *Detection methods for cyanobacterial toxins* (G. A. Codd, T. M. Jefferies, C. Keevil and E. Potter, eds.), pp. 69-74. The Royal Society of Chemistry.
- Fitzgerald, D. J. (2001). Cyanotoxins and human health - overview. In *Cyanotoxins - Occurrence, Causes, Consequences* (I. Chorus, ed., pp. 179-190. Springer-Verlag, Berlin.



CENTRUM PRO CYANOBAKTERIE A JEJICH TOXINY

Kamenice 126/3, 625 00 Brno, Česká Republika

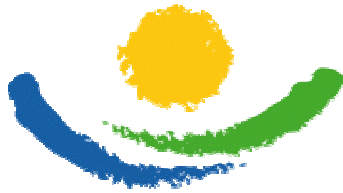
Tel.: (+420) 549 495 967

E-mail: sinice@sinice.cz

Web: www.sinice.cz



- Harada, K., Kondo, F., and Lawton, L. A. (1999). Laboratory analysis of cyanotoxins. In *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management* (I. Chorus and J. Bartram, eds.), pp. 369-399. E&FN Spon, London.
- Harada, K.-I. (1996). Chemistry and detection of microcystins. In *Toxic Microcystis* (M. F. Watanabe, K.-I. Harada, W. W. Carmichael and H. Fujiki, eds.), pp. 103-148. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Harada, K.-I., Tsuji, K., and Watanabe, M. F. (1996). Stability of microcystins from cyanobacteria - III. Effect of pH and temperature. *Phycologia* **35**, 83-88.
- Holmes, C. F. B. (1991). Liquid chromatography-linked protein phosphatase bioassay; a highly sensitive marine bioscreen for okadaic acid and related diarrhetic shellfish toxins. *Toxicon* **29**, 469-477.
- Hrudey, S., Burch, M., Drikas, M., and Gregory, R. (1999). Remedial measures. In *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management* (I. Chorus and J. Bartram, eds.). E&FN Spon, London.
- Hyenstrand, P., Rohrlack, T., Beattie, K. A., Metcalf, J. S., Codd, G. A., and Christoffersen, K. (2003). Laboratory studies of dissolved radiolabelled microcystin-LR in lake water. *Water Res.* **37**, 3299-3306.
- Chorus, I. (2004a). A new WHO approach called "Water Safety Plans": how does it work for cyanotoxins? In 6th International Conference On Toxic Cyanobacteria, p. 30, Bergen, Norway.
- Chorus, I. (2004b). Recommendations of the Special Session for discussion of regulatory approaches to cyanotoxin Risk Assessment and Risk Management. In 6th International Conference On Toxic Cyanobacteria, Bergen, Norway.
- Chorus, I., Falconer, I. R., Salas, H. J., and Bartram, J. (2000). Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* **3**, 323-347.
- Christoffersen, K., Lyck, S., and Winding, A. (2002). Microbial activity and bacterial community structure during degradation of microcystins. *Aquat. Microb. Ecol.* **27**, 125-136.
- Isobe, M., Sugiyama, Y., Ito, T., Ohtani, I. I., Toya, Y., Nishigohri, Y., and Takai, A. (1995). New analysis method for protein phosphatase type 2A inhibitors using the firefly bioluminescence system. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **59**, 2235-2238.
- Kaya, K., and Sano, T. (1999). Total microcystin determination using erythro-2-methyl-3-(methoxy-d(3))-4-phenylbutyric acid (MMPB-d(3)) as the internal standard. *Analytica Chimica Acta* **386**, 107-112.
- Kleivdal, H., Kristiansen, S. I., Doskeland, S. O., and Goksoyr, A. (2004). Development of a sensitive competitive PP2A binding assay for Microcystins and Nodularin. In 6th International Conference On Toxic Cyanobacteria, p. 18, Bergen, Norway.
- Kuiper-Goodman, T., Falconer, I. R., and Fitzgerald, D. J. (1999). Human health aspects. In *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management* (I. Chorus and J. Bartram, eds.), pp. 113-153. E&FN Spon, London.
- Lawton, L. A., and Edwards, C. (2001). Purification of microcystins - review. *Journal of chromatography A* **912**, 191-209.



CENTRUM PRO CYANOBAKTERIE A JEJICH TOXINY

Kamenice 126/3, 625 00 Brno, Česká Republika

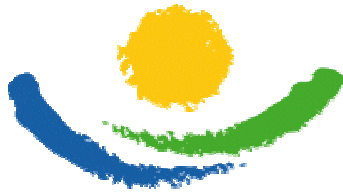
Tel.: (+420) 549 495 967

E-mail: sinice@sinice.cz

Web: www.sinice.cz



- MacKintosh, C., Beattie, K., Klumpp, S., Cohen, C., and Codd, G. A. (1990). Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Letters* **264**, 187-192.
- Maršálek, B. (2001). Toxiny sinic a současná realita v ČR. *SOVAK* **10**, 1-3.
- Maršálek, B., and Bláha, L. (2001). Dissolved microcystins in raw and treated drinking water in the Czech Republic. In *Cyanotoxins - Occurrence, Causes, Consequences* (I. Chorus, ed., pp. 212-217. Springer-Verlag, Berlin.
- Maršálek, B., Bláha, L., Turánek, J., and Neča, J. (2001). Microcystin-LR and total microcystins in cyanobacterial blooms in the Czech republic 1993-1998. In *Cyanotoxins - Occurrence, Causes, Consequences* (I. Chorus, ed., pp. 56-62. Springer-Verlag, Berlin.
- Meriluoto, J., Kincaid, B., Smyth, M. R., and Wasberg, M. (1998). Electrochemical detection of microcystins, cyanobacterial peptide hepatotoxins, following high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **810**, 226-230.
- Meriluoto, J. A. O. (2004). Detection methods for cyanobacterial toxins. In *6th International Conference On Toxic Cyanobacteria*, p. 39, Bergen, Norway.
- Murata, H., Shoji, H., Oshikata, M., Harada, K.-I., Suzuki, M., Kondo, F., and Goto, H. (1995). High performance liquid chromatography with chemiluminescence detection of derivatized microcystins. *Journal of Chromatography A* **693**, 263-270.
- Poon, G. K., Griggs, L. J., Edwards, C., Beattie, K. A., and Codd, G. A. (1993). Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry of cyanobacterial toxins. *Journal of Chromatography* **628**, 215-233.
- Rapala, J., Erkomaa, K., Kukkonen, J., Sivonen, K., and Lahti, K. (2002). Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay: Comparison of methods. *Analytica Chimica Acta* **466**, 213-231.
- Sano, T., Nohara, K., Shiraishi, F., and Kaya, K. (1992). A Method for Microdetermination of Total Microcystin Content in Waterblooms of Cyanobacteria (Blue-Green-Algae). *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **49**, 163-170.
- Shimizu, M., Iwasaki, Y., and Yamada, S. (1995). New fluorogenic dienophile: synthesis, reaction with vitamin D, vitamin A and microcystins, and application to fluorometric assays. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* **115**, 584-602.
- Sivonen, K., and Jones, G. (1999). Cyanobacterial toxins. In *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management* (I. Chorus and J. Bartram, eds.), pp. 41-111. E&FN Spon, London.
- WHO (1998a). *Guidelines for drinking water quality*. World Health Organisation, Geneva.
- WHO (1998b). Chapter 7: Freshwater algae and cyanobacteria. In *Guidelines for Safe Recreational-water Environments, Volume 1: Coastal and Freshwaters, Draft for Consultation*, pp. 125-209. World Health Organization.
- Wolf, H. U., and Frank, C. (2002). Toxicity Assessment of Cyanobacterial Toxin Mixtures. *Environ. Toxicol.* **17**, 395-399.



CENTRUM PRO CYANOBAKTERIE A JEJICH TOXINY

Kamenice 126/3, 625 00 Brno, Česká Republika

Tel.: (+420) 549 495 967

E-mail: sinice@sinice.cz

Web: www.sinice.cz



- Wright, B. W., Ross, G. A. et Smith, R. D. (1989). Capillary zone electrophoresis with laser fluorescence detection of marine toxins. *J. Microcolumn Separations* **1**, 85-89.
- Yoshida, T., Makita, Y., Nagata, S., Tsutsumi, T., Yoshida, F., Sekijima, M., Tamura, S. I., and Ueno, Y. (1997). Acute oral toxicity of microcystin-LR, a cyanobacterial hepatotoxin, in mice. *Natural Toxins* **5**, 91-95.
- Zeck, A., Weller, M. G., Bursill, D., and Niessner, R. (2001). Generic microcystin immunoassay based on monoclonal antibodies against Adda. *Analyst* **126**, 2000-2007.
- Zegura, B., Lah, T. T., and Filipic, M. (2004). The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. *Toxicology* **200**, 59-68.
- Zegura, B., Sedmak, B., and Filipic, M. (2003). Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicon* **41**, 41-48.
- Zhan, L., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Wu, D.-S., Zhang, L.-S., Suzuki, T., Hayashi, M., and Honma, M. (2004). Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **557**, 1-6.