

# MODULACE BIOMARKERŮ OXIDATIVNÍHO STRESU U TOLSTOLOBIKA BÍLÉHO (*HYPOPHTHALMICHTHYS MOLITRIX* VAL.) PO EXPOZICI VODNÍMU KVĚTU SINIC PRODUKUJÍCÍ MICROCYSTIN

*The modulation of the oxidative stress biomarkers in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) after the exposure of microcystin produced in the cyanobacterial water bloom*

KOPP, R., BLÁHA, L., ŠIMKOVÁ, K., MAREŠ, J.

## Abstract

The goal of the presented paper was to evaluate the influence of cyanobacterial water blooms common in eutrophic reservoirs on oxidative stress biomarkers of silver carp. The experimental fish were exposed to high concentration of natural population of cyanobacterial water bloom. In the population of colonial cyanobacteria *Microcystis ichthyoblabe* (60 %) with subdominant *Microcystis aeruginosa* (40 %) were detected three microcystins (the total concentration  $513 \mu\text{g g}^{-1}$  of dry mass).

The concentration of two oxidative stress markers - reduced glutathion (GSH) and malondialdehyde (MDA) was monitored. The concentration of reduced glutathion (GSH) showed statistically significant increase at fish exposed to the cyanobacterial population in comparison with control fish from the store-pond. The values of control fish from aquarium were significantly reduced in comparison with control fish from the store-pond.

The concentration of marker lipide peroxidase (MDA) did not show significant changes among individual fish orders. However, visible trend of value increase of fish exposed to the cyanobacterial population was observed.

## ÚVOD

Jedním z významných a obecných mechanismů toxického působení řady látek je tzv. oxidativní stres, tj. neschopnost organismu eliminovat škodlivé reaktivní formy kyslíku (ROS, reactive oxygen species). Oxidativní stres je považován za nejvýznamnější faktor procesu stárnutí, vede k genotoxickému poškození a je také příčinou řady onemocnění včetně nádorových (Toyokuni et al. 1995; Hofmanova et al. 2000).

Experimentálně i v přírodních podmínkách bylo dokázáno, že oxidativní stres je jak u člověka tak u volně žijících organismů (včetně např. ryb) indukován po expozici různými skupinami chemických látek. Oxidativní stres vyvolávají jak přímé produkty antropogenních činností (např. persistentní organické kontaminanty, těžké kovy), tak např. toxické metabolity sinic (cyanotoxiny) jako důsledek masových rozvoji sinic v důsledku eutrofizace vod (Ding et al. 1998; van der Oost et al. 2003).

Zda a do jaké míry vyvolává cizorodá látka oxidativní stres v živém organismu lze sledovat s využitím tzv. biomarkerů, tj. sledování změn specifických biochemických parametrů které jsou více či méně v příčinné souvislosti s nadprodukcí ROS. Mezi tyto biomarkery patří zejména (i) měření zvýšení produkce ROS po působení cizorodé látky (lze využít zpravidla jen v in vitro studiích), (ii) sledování oxidace přirozených biologických molekul (tj. oxy-DNA, oxidované proteiny/aminokyseliny, oxidace membránových fosfolipidů), (iii) sledování změn antioxidačních a detoxikačních parametrů, které jsou v přítomnosti ROS modulovány např. změny koncentrací glutathionu, GSH - peptidu významně se podílejícího se na antioxidační kapacitě buněk; koncentrací detoxikačních enzymů - glutathion-S-transferáza, glutathion peroxidáza, kataláza, superoxid dismutáza apod. (Boelsterli 2003). Sledování uvedených biomarkerů jako časných indikátorů poškození organismu v důsledku expozice chemickým látkám lze dobře využít také u ryb (van der Oost et al. 2003).

V předložené studii byly v hepatopankreatu tolstolobiků in vivo sledovány změny celkového glutathionu (GSH- marker antioxidačního potenciálu) a koncentrace malonyldialdehydu (MDA - konečný produkt lipidní peroxidace - marker poškození membránových fosfolipidů v důsledku oxidace ROS). Změny byly sledovány u ryb exponovaných 25 dní v rybářských sádkách - v sádce s masivně přirozeně vyvinutým vodním květem sinic vs. ryby v sádce bez sinic. Třetí skupina ryb byla exponována v akváriích v experimentálním recirkulačním zařízení s minimálním krměním.

## MATERIÁL A METODIKA

K experimentům byla použita násada tolstolobika bílého (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) z Rybníkářství Pohorčelice a.s. Průměrná kusová hmotnost ryb ze sádky se sinicemi byla  $55,8 \pm 18,0$  g, ze sádky kontrolní  $46,8 \pm 8,7$  g a z kontrolního akvária  $15,1 \pm 4,7$  g. K stanovení hladiny microcystinů a biomarkerů byly 6 rybám z každé skupiny odebrány vzorky hřbetní svaloviny, kůže a hepatopankreas.

Biomasa sinic v sádce s tolstolobiky byla tvořena dvěma kokálními druhy rodu *Microcystis* (*M. ichthyoblabe* 60% a *M. aeruginosa* 40%). Koncentrace buněk sinic se v průběhu pokusu pohybovala v řádu milionů buněk v mililitru vody. Množství ostatních řas bylo zanedbatelné.

První kontrolní skupina ryb byla chována v sádce bez přítomnosti planktonních sinic. Fytoplankton byl tvořen běžnými druhy chlorokokálních řas a rozsivek. Druhá kontrolní skupina byla chována v experimentálním recirkulačním zařízení bez přítomnosti sinic a řas.

V průběhu pokusu byly sledovány základní fyzikálně-chemické parametry vodního prostředí. Obsah rozpuštěného kyslíku byl u všech sledovaných skupin v rozsahu 95-159 % nasycení, hodnota pH se pohybovala v rozsahu 7,8-9,6 a teplota vody od 19,5 do 24,2 °C.

K stanovení koncentrací microcystinů v biomase sinic bylo využito HPLC s detekcí diodovým polem, C-18 kolona Supelcosil ABZ+Plus, gradientová eluce acetonitril/voda. Microcystiny byly detekovány pomocí retenčního času a spektra (200-300 nm) s charakteristickým maximem při 238 nm; HPLC systém Agilent (Bláha and Maršálek 2003).

Homogenáty pro stanovení microcystinů v extraktech z kůže a svaloviny byly připravené v PBS, pH 7.2 (5 g tkáň/ 20 mL PBS) a byly analyzovány na obsah microcystinů pomocí kompetitivní nepřímé ELISA (Enviroligix, USA) proti microcystinu-LR, která vykazuje křížové reakce i s dalšími variantami microcystinů. Detekční limit použité metody byl 0.6 ng.g<sup>-1</sup> f.w.

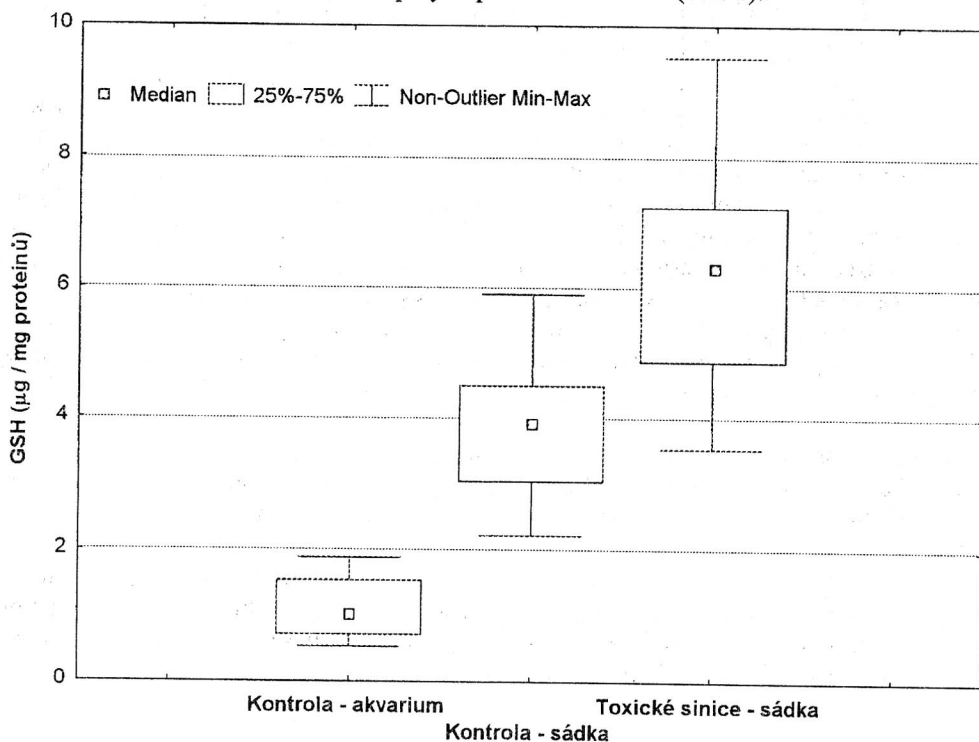
Stanovení redukovaného glutathionu (GSH) bylo provedeno dle Ellmanovy metody (Ellman 1959). Vzorky jater byly zhomogenizovány ve fosfátovém pufru, pH 7,2. Část homogenátu byla odebrána pro stanovení koncentrace proteinů metodou podle Lowryho (Lowry 1951). Pro stanovení GSH byl homogenát s 25% kyselinou trichloroctovou (w/v) zcentrifugován při 8900 rpm po dobu 10 minut. Supernatant byl použit pro samotné stanovení miniaturizované pro mikrodeskové provedení. Reakční směs obsahovala 50 µL vzorku, 230 µL pufru (0,8 M TRIS/HCl, 0,02 M EDTA, pH 8,9) a 20 µL 0,01 M DTNB (2,2'-dinitro-5,5'-dithiobenzoová kyselina). Reakční směs byla inkubována po dobu 5 min. při pokojové teplotě a absorbance vznikajícího konjugátu GSH-DNTN měřena při 412 nm. Koncentrace redukovaného GSH byla vyjádřena jako µg GSH/mg proteinů.

Tkáňová lipidní peroxidace byla stanovena na základě tvorby produktů reagujících s thiobarbiturovou kyselinou (TBARS, zejm. malonyldialdehyd - MDA) metodikou modifikovanou dle Livingstone et al. (1990). Homogenát vzorku jater, připravený ve fosfátovém pufru, pH 7,2, byl po přidání směsi 20% kyseliny trichloroctové, TCA (w/v) a 2% butylovaného hydroxytoluenu, BHT (w/v), v poměru 200:1 TCA:BHT, centrifugován po dobu 20 minut při 4000 rpm. Supernatant byl odebrán a v poměru 5:1:4 k němu byla přidána 0,6N HCl a roztok TRIS-TBA (25mM TRIS, 100mM kyselina thiobarbiturová, pH 7,4). Výsledná směs byla na vodní lázni vařena po dobu 45 minut při 95°C. Po ochlazení na pokojovou teplotu byla při 550 a 590 nm změřena absorbance. Výsledná koncentrace TBARS byla vyjádřena jako nmol MDA/mg proteinů.

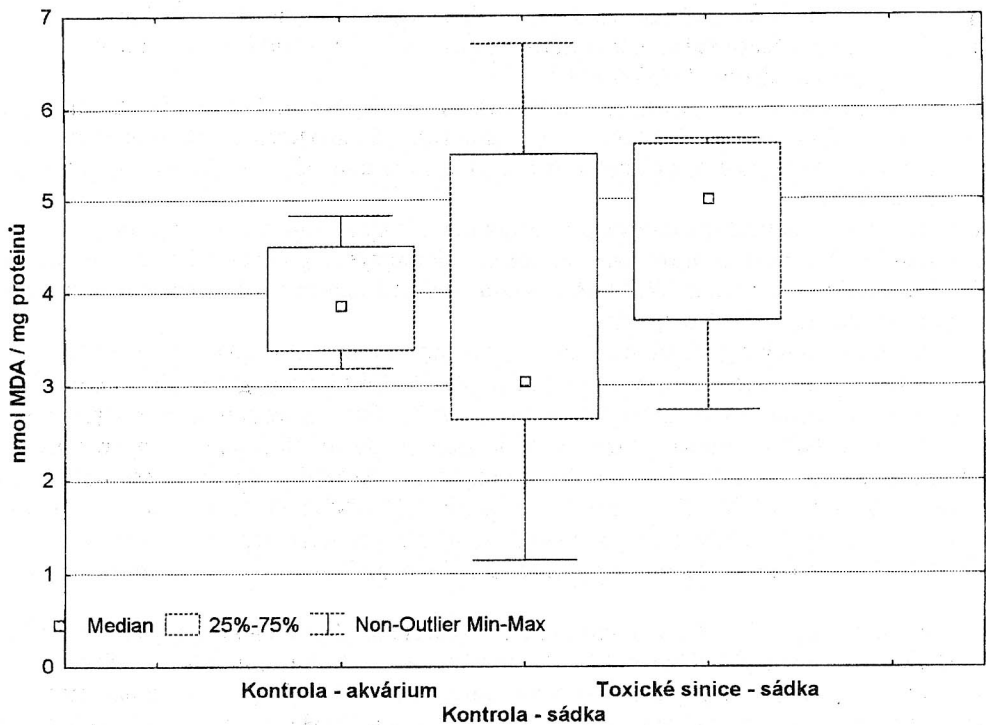
## VÝSLEDKY

Stanovení microcystinů v biomase sinic prokázalo 3 hlavní varianty microcystinů (-RR, -YR a -LR) v celkové koncentraci 513 µg.g<sup>-1</sup> d.w. (122, 185 a 206 µg.g<sup>-1</sup> jednotlivé varianty). Tyto koncentrace jsou dobře srovnatelné s hladinami nacházenými jinde v ČR (Maršálek et al. 2001) a patří spíše mezi mírně nadprůměrné. Stanovení koncentrací microcystinů v žádné z testovaných tkání (kůže, svalovina) technikou ELISA neprokázalo microcystiny v koncentracích vyšších než byl detekční limit metody (< 0.6 ng.g<sup>-1</sup> f.w.).

Hladiny GSH a MDA u exponovaných ryb jsou prezentovány v obr. 1 a obr.2. U ryb chovaných v přítomnosti toxického vodního květu sinic byly pozorovány statisticky významně zvýšené hladiny GSH (obr. 1). U skupiny chované v laboratorních prostředí byly zjištěny naopak snížené hladiny ve srovnání s rybami z chovné sádky bez sinic. Koncentrace markeru lipidní peroxidace - MDA - se mezi jednotlivými skupinami významně nelišily, ačkoliv byl zřejmý trend nárůstu u skupiny exponované sinicím (obr. 2).



Obr. 1: Hladiny glutathionu (GSH) u jednotlivých skupin tolstolobiků



Obr. 2: Hladiny lipidní peroxidace (malonyldialdehyd MDA) u jednotlivých skupin tolstolobiků

## DISKUZE

Ryby vystavené působení vodního květu sinic jsou vystaveny stresu, který může ovlivnit jak jejich fyziologický stav, tak kvalitu masa. Naše výsledky neprokázaly zvýšené koncentrace microcystinů v tkáních ryb vystavených toxickým sinicím. Možným vysvětlením může být relativně krátká doba vystavení ryb sinicím (25 dní) nebo existence eliminačních mechanismů u tolstolobiků (podle našich informací nebyla akumulace microcystinů ve svalovině tohoto druhu ryb doposud detailně studována). Možným problémem může případně být i metodický nedostatek techniky ELISA - tj. interference dalších látek v homogenátu s výslednou reakcí. Podle dostupné literatury však bohužel ve světě doposud nebyla dokonalejší technika pro stanovení microcystinů v komplikované matici živočišné tkáně vyvinuta (Freitas de Magalhaes et al. 2001).

Přestože nebyla prokázána kumulace microcystinů v tkáních ryb, byly v hepatopankreatu exponovaných ryb pozorovány změny některých biochemických parametrů, nejvýraznější změny byly zjištěny u hladin GSH, které reflektují toxické působení (Pflugmacher et al. 1998; Wiegand et al. 2002). Zvýšení hladin GSH reflektuje zvýšení intenzity metabolismu zapojeného do detoxikačních pochodů - např. aktivit glutathion-S-transferáz, glutathion reduktáz apod. (tj. zvýšená potřeba odstraňování toxických látek z těla) (Best et al. 2002). Zvýšené aktivity detoxikačních enzymů a související zvýšení hladin antioxidantů včetně GSH však mohou mít i významné negativní dopady - zvýšená citlivost k tvorbě reaktivních metabolitů, nefyziologická energetická náročnost na udržování detoxikačního aparátu, zvýšená proliferace a tvorba neoplazií (van der Oost et al. 2003).

Ačkoliv jsou sinice přirozenou součástí ekosystémů, současné vědecké práce prokazují, že jiné organismy (včetně ryb) jsou nuceny reagovat na jejich metabolity jako na xenobiotika. Dochází k modulaci detoxikačních pochodů a aktivaci potenciálně nebezpečných procesů. Kinetika detoxikace je silně časově závislá - při akutních fázích jsou patrné poklesy antioxidantů, po delších chronických expozicích dochází k stimulaci protektivních procesů. Podobné účinky jako v naší práci (tj. zvýšení hladin GSH) pozorovali *in vivo* po expozici microcystinům u myši (Gehringer et al. 2004) spolu s modulací detoxikačních enzymů (glutathion peroxidáza) a aktivací lipidní peroxidace (v naší práci nebyly zjištěny v tomto parametru (MDA) významné rozdíly). Bouaicha and Maatouk (2004) také pozorovali oxidativní stres a zvýšení hladin GSH v krysích hepatocytech exponovaných microcystinem-LR.

Při akutních expozicích hepatocytů kapra *in vitro* vysokým dávkám microcystinů byly pozorovány projevy oxidativního stresu jako zvýšená produkce ROS, stimulace enzymatických detoxikačních pochodů - GPx, SOD, CAT. Vzhledem k vysokým akutně toxickým dávkám však autoři v případě GSH pozorovali pokles jeho hladin. (Li et al. 2003)

Naše *in vivo* studie s tolstolobiky v přirozených podmínkách prokázala i po relativně krátké době expozice toxickým sinicím (25 dní ve vegetační sezoně) modulaci hladin glutathionu (GSH). Tento biomarker oxidativního stresu a detoxikační kapacity citlivě indikuje možné patologické efekty spojené s vystavením ryb působení toxických vodních květů produkujících microcystiny.

## Poděkování

Výzkum působení sinic vodního květu na tolstolobika bílého je podporováno grantem GAČR 206/02/D031. Studium efektů a ekologických důsledků toxických sinic je podporováno grantem GA AV KJB6005411.

## LITERATURA

- Ellman, G. L. (1959): Tissue sulfhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77.
- Lowry, O. H., Rosebrough, A. L., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951): Protein measurements with Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Livingstone, D.R., Garcia-Martinez, P., Michel, X., Narbonne, J.F., O'Hara, S., Ribera, D., Winston, G., (1990): Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel *Mytilus edulis* and other molluscs. *Functional Ecology* 4, 415-424.
- Best, J.H., Pflugmacher, S., Wiegand, C., Eddy, F.B., Metcalf, J.S., Codd, G.A. (2002): Effects of enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides, and of microcystin-LR, on glutathione S-transferase activities in zebra fish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 60: 223-231.
- Bláha, L., Maršálek, B. (2003): Contamination of drinking water in the Czech Republic by microcystins. *Arch. Hydrobiol* 158: 421-429.
- Boelsterli, U.A. (2003): *Mechanistic toxicology*. London, Taylor and Francis.
- Bouaicha, N., Maatouk, I. (2004): Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. *Toxicology Letters* 148: 53-63.
- Ding, W.X., Shen, H.M., Shen, Y., Zhu, H.G., Ong, C.N. (1998): Microcystic cyanobacteria causes mitochondrial membrane potential alteration and reactive oxygen species formation in primary cultured rat hepatocytes. *Environ Health Perspect* 106: 409-413.
- Freitas de Magalhaes, V., Moraes Soares, R., Azevedo, S.M.F.O. (2001): Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon* 39: 1077-1085.
- Gehring, M.M., Shephard, E.G., Downing, T.G., Wiegand, C., Neilan, B.A. (2004): An investigation into the detoxification of microcystin-LR by the glutathione pathway in Balb/c mice. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36: 931-941.
- Hofmanova, J., Machala, M., Kozubik, A. (2000): Epigenetic mechanisms of the carcinogenic effects of xenobiotics and in vitro methods of their detection. *Folia Biologica* 46: 165-173.
- Li, X., Liu, Y., Song, L., Liu, J.S.H. (2003): Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. *Toxicon* 42: 85-89.
- Maršálek, B., Bláha, L., Turánek, J., Neča, J. (2001): Microcystin-LR and total microcystins in cyanobacterial blooms in the Czech Republic 1993-2000. *Cyanotoxins - Occurrence, Causes, Consequences* (ISBN 3-540-64999-9). I. Chorus. Berlin, Germany, Springer-Verlag: 56-62.
- Pflugmacher, S., Wiegand, C., Oberemm, A., Beattie, K.A., Krause, E., Codd, G.A., Steinberg, C.E.W. (1998): Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Bba Gen Subjects* 1425: 527-533.
- Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J., Hiai, H. (1995): Persistent oxidative stress in cancer - hypothesis. *FEBS Letters* 358: 1-3.
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. (2003): Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13: 57-149.
- Wiegand, C., Peuthert, A., Pflugmacher, S., Carmeli, S. (2002): Effects of microcin SF608 and microcystin-LR, two cyanobacterial compounds produced by *Microcystis* sp., on aquatic organisms. *Environmental Toxicology* 17: 400-406.

Ing. **Radovan Kopp**, Ph.D.<sup>1</sup>, Mgr. **Luděk Bláha**, Ph.D.<sup>2,3</sup>, **Klára Šimková**<sup>2</sup>, Dr. Ing. **Jan Mareš**<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav rybářství a hydrobiologie, MZLU Brno, Zemědělská 1, CZ-613 00 Brno, [kopp@mendelu.cz](mailto:kopp@mendelu.cz)

<sup>2</sup>RECETOX (Research Center for Environmental Chemistry and Ecotoxicology), Masaryk Univerzity, Kamenice 3, CZ-625 00 Brno, CZ;

<sup>3</sup>Botanický Ústav AV ČR, Květná 8, Brno