

BIOAKUMULACE MICROCYSTINU LR V RYBÍ TKÁNI SPOJENÁ S ÚČINKY NA BIOCHEMICKÉ ÚROVNI

Ondřej Adamovský^{1,2}, Veronika Pašková¹, Luděk Bláha^{1,2}, Klára Hilscherová^{1,2}, Radovan Kopp³, Pavel Babica^{1,2}, Blahoslav Maršálek^{1,2}

¹⁾ RECETOX - Research centre for environmental chemistry and ecotoxicology, Masarykova Univerzita, Kamenice 3, Brno, Česká republika

²⁾ CCT-Centre for cyanobacteria and their toxins, Kamenice 3, Brno, Česká republika

³⁾ Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Česká republika

Úvod

Sinice a jejich toxiny budí zájem široké veřejnosti a vědců celého světa nejen kvůli jejich celosvětovému rozšíření ve vodním ekosystému, ale také kvůli stále čtenějším otravám divokých i domestikovaných zvířat. Četný výskyt úhynu zvířat v důsledku otrav lze nalézt i v Evropě [1]. Na úhynu se podílejí nejen neurotoxické, ale i hepatotoxické látky, mezi něž patří nejvíce studovaný cyanotoxin microcystin-LR (MC-LR).

Byly uveřejněny již mnohé studie o působení cyanotoxinů na ryby. V Anglii byly pozorovány masové úhyny pstruhů právě v období odumírání vodního květu. Při 85–90% nasycení vody kyslíkem a při pH 9, 35 nastal kolaps populace sinice *Anabaena flos-aquae*. Poškození žáber způsobilo pravděpodobně vysoké pH, vyvolané fotosyntetickou aktivitou sinic, spolu se zvýšenou hladinou amoniaku při jejich rozkladu. Lépe než poškození vysokým pH je prostudován vliv cyanotoxinů na histopatologii trávicího traktu, pokožky a svalstva. Změny, které jsou dávány do souvislosti s vodními květy sinic, byly nalezeny na játrech, srdci, ledvinách, žlázech, pokožce a slezině [3]. Rodger et al. pozoroval degenerativní změny v ledvinových tubulech a glomerulech u kaprů v souvislosti s výskytem sinic [2]. Bylo zjištěno, že mechanismus toxického účinku MC-LR je velmi podobný u savců i u ryb [4].

Současné výzkumy dokazují existenci konjugátu biomolekuly glutationu (GSH) s mikrocystinem-LR vznikajícího enzymatickou katalýzou pomocí rozpustné glutation-S-transferázy (GST) v různých vodních organismech zahrnujících rostliny (*Ceratophyllum demersum*), bezobratlé (*Dreissena polymorpha*, *Daphnia magna*), vajíčka ryb a ryby (*Danio rerio*, *Corydoras paleatus*). Vzniklý konjugát je zřejmě prvním krokem v detoxikaci microcystinu v organismu [5, 6]. Během biotransformačních procesů odstraňování toxinů dochází k formování reaktivních kyslíkových radikálů, které aktivují některé antioxidantní enzymy jako je superoxid-dismutáza, kataláza, askorbát-peroxidáza a enzymy glutation-askorbátového cyklu jako je glutation reduktáza a glutation peroxidáza [7].

Antioxidativní a detoxifikační systém organismu hraje velice důležitou roli v obraně vůči negativnímu působení volných kyslíkových radikálů (ROS) a s tím souvisejícím možným poškozením buněčných komponent. Volné radikály a další aktivní deriváty kyslíku jsou nevyhnutelnými vedlejšími produkty biologických redoxních reakcí; inaktivují enzymy a způsobují závažná poškození důležitých buněčných organel. Zvýšená produkce toxických kyslíkových radikálů je považována za univerzální důsledek působení stresových podmínek na organismus [8]. Za normálních homeostatických podmínek je udržována rovnováha mezi produkcí ROS a protektivní kapacitou antioxidantního systému. Termín ROS zahrnuje nejen kyslíkové radikály hydroxylový (OH^\bullet), superoxidový O_2^\bullet , ale i peroxidový ion O_2^{2-} , peroxid vodíku H_2O_2 , hydrogenový radikál (H^\bullet) a ozón (O_3). Superoxidový anion je endogenní produkt buněčné aktivity, který se může přeměňovat na peroxid vodíku a hydroxylový radikál [9]. ROS jsou schopné interagovat s množstvím buněčných komponent, včetně nukleových kyselin, lipidů, proteinů a aminokyselin. V případě vyčerpání obranného potenciálu antioxidantního systému, který zahrnuje zejména enzymy glutation peroxidázu (GPx), glutation reduktázu (GR), superoxid-dismutázu a katalázu, může dojít k poškození organismu a dalšímu negativnímu působení. Negativní účinky zahrnují lipidní peroxidaci, inaktivaci enzymů a modifikace nukleové kyseliny. Oxidativní poškození DNA může vyústit v narušení transkripce, translace a replikace a vést ke vzniku mutací až smrti buňky [10].

Toxické metabolity sinic vyvolávají oxidativní stres a sledování modulací hladin a aktivit vhodných biomarkerů, jako je aktivita detoxikačních enzymů glutation-S-transferázy (GST), glutation peroxidázy (GPx), glutation reduktázy (GR) nebo také hladina neenzymatické biomolekuly glutationu, lze dobře využít také u ryb i jiných organismů k časné indikaci poškození organismu v důsledku expozice toxickým sinicím [12–16]. Hyperoxigenace a indukce oxidativního stresu spojená se zvýšením hladiny lipidních peroxidů a aktivity GST byla pozorována po

expozici sinicím u mnohoštětinatce *Laonereis acuta* [17]. Hladiny a aktivity enzymů v hepatické mikrosomální frakci po expozici environmentálními kontaminantům byly měřeny například v experimentu s ploticí (*Rutilus rutilus*), pstruhem duhovým (*Oncorhynchus mykiss*), treskou (*Gadus morhua*) a platýzem (*Platichthys flesus*) [11, 18].

Testy na bioakumulaci cyanotoxinů v rybách byly zpravidla prováděny jako laboratorní experimenty s akutní expozicí. Jen málo z nich má charakter polních studií s důrazem na chronickou expozici. Tyto testy s akutní expozicí byly založeny na příjmu cyanotoxinů buď orální cestou, intraperitoneální injekcí, nebo přímým dávkováním do dorsální aorty. Toxin takto přijatý organismem však neodráží skutečný přirozený příjem v životním prostředí. Jedna z mála terénních studií prokázala významnou míru bioakumulace MC-LR v rybí tkáni a to i v období, kdy nebyl vodní květ vyvinut [19]. Jak bylo pozorováno na rybách při studiu akumulace cyanotoxinů na pobřeží Brazílie, ryby žijící ve vodě s rozvojem sinic nejsou schopny předejít konzumaci těchto sinic a jsou tak vystaveny expozici microcystiny. Proto i ryby neživící se fytoplanktonem mohou být kontaminovány MC-LR [20].

Formulace cílů

Prvním cílem této studie bylo na příkladu dvou ekologicky relevantních zástupců hospodářsky významných druhů ryb chovaných v České republice prokázat schopnost ryb akumulovat v sobě hepatotoxin microcystin-LR (MC-LR) a zhodnotit, jak byl tento cyanotoxin distribuován mezi svalovou a jaterní tkání. K tomuto účelu byli vybráni dva zástupci celosvětově nejběžněji chovaných ryb - fytoplanktovorní tolstolobik bílý (*Hypophthalmichthys molitrix*) a bentovorní kapr obecný (*Cyprinus carpio*). Tyto druhy byly vybrány také s ohledem na jejich rozdílný způsob života a příjmu potravy. S tím jsou i spojeny rozdílné expoziční cesty cizorodými látkami. Kapr obecný se živí hledáním potravy v bahně, zatímco tolstolobik bílý se živí i fytoplanktonem, který může obsahovat sinice, produkující cyklické heptapeptidy - microcystiny. Při kolapsu těchto sinic pak může dojít k zvýšení obsahu těchto toxinů ve vodě. Koncentrace microcystinu-LR byly analyzovány vysoce citlivou imunochemickou metodou ELISA nově připravenou v laboratořích RECETOX.

Druhým cílem bylo stanovení hladiny a aktivity komponent antioxidantního a detoxifikačního systému v průběhu a po ukončení expozice cyanobakteriemi. Ve tkáni hepatopankreatu byla měřena hladina biomolekuly glutationu, který se podílí na konjugaci toxinů v buňce. Dále byla sledována aktivita enzymů zapojených do askorbát-glutationového cyklu: enzymu glutation-*S*-transferázy (GST), který katalyzuje vznik konjugátu GSH s xenobiotikem vstupujícím do buňky; glutation reduktázy (GR), enzymu udržujícího stálý poměr oxidované a redukované formy GSH a glutation peroxidázy (GPx), enzymu odstraňujícího peroxidy a hraje tak důležitou roli v ochraně lipidů vůči peroxidaci.

Materiál a metody

Oba druhy ryb byly chovány v rybochovných sádkách v Pohořelicích po dobu deseti týdnů. Ryby byly chovány odděleně v klecích bez dokrmování. Klec byla umístěna asi 20 cm nad dno nádrže. Jak kapři, tak tolstolobici byli umístěni v nádržích bez výskytu sinic (kontrola) i s masivním rozvojem vodního květu sinic (expozice), který byl v době začátku chovu ryb nejvíce vyvinut. Na začátku experimentu, po měsíci (t28=28 dní) a po deseti týdnech (t72=72 dní) chovu byly všechny ryby usmrceny, a následně separována svalovina, hepatopankreas, mozek a další vybrané orgány. Všechny separované orgány a tkáně byly uchovány v mrazícím boxu na -80 °C. Před konečným testem ELISA bylo nutné tyto tkáně extrahovat a extrakty následně převést do vodné fáze. Poté mohly být takto připravené vzorky použity na detekci microcystinu-LR testem ELISA.

Biochemické metody: Hepatopankreas – orgán určený pro stanovení vybraných markerů oxidativního stresu a detoxifikace – byl homogenizován ve fosfátovém pufru PBS, pH 7, 2; pro účely stanovení lipidní peroxidace byl použit surový homogenát, pro zhodnocení hladin a aktivit antioxidantních látek byl surový homogenát zcentrifugován při 10000 ot./min, 4 °C, po dobu 15 min a supernatant zamražen na teplotu -80 °C. Podstatou kolorimetrického stanovení koncentrace **proteinů** ve vzorku bylo spektrofotometrické měření absorbance barevného komplexu vzniklého reakcí s komplexotvornou selektivní reagentií [21].

Stanovení **GSH** bylo provedeno pomocí principu tvorby barevného produktu thiol-selektivní reagentie s volnými -SH skupinami ve vzorku zbaveného proteinů [22]. Katalytická aktivita **GST** byla měřena spektrofotometricky na základě detekce tvorby konjugátu mezi redukovaným glutationem (GSH) a substrátem běžným pro všechny izoformy GST 1-chloro-2, 4-dinitrobenzenem [23]. Flavoprotein **GR**, který katalyzuje NADPH-závislou redukci oxidovaného glutationu na redukovaný glutation, byl stanoven metodou využívající míru oxidace NADPH [24].

Celková katalytická aktivita cytosolického enzymu GPx byla stanovena měřením míry úbytku NADPH v čase reakcí s redukováným GSH jako kosubstrátem. Současně probíhající oxidace NADPH spřažená s oxidací GSH katalyzovaná GPx byla sledována spektrofotometricky [25].

Výsledky a Diskuze

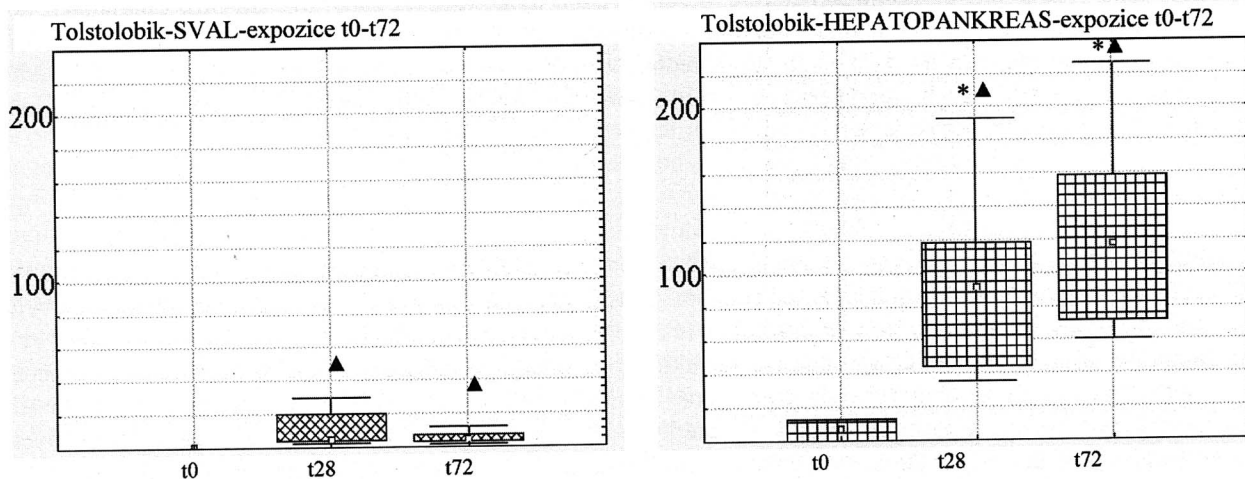
1) Bioakumulace microcystinu LR ve tkáních ryb

V rybích tkáních byl před začátkem experimentu nalezen velmi malý nebo žádný obsah MC-LR. V průběhu experimentu nebyl v kontrolní nádrži zaznamenán rozvoj vodního květu. Tomu odpovídaly i zanedbatelné hladiny MC-LR v tkáni obou druhů ryb chovaných v kontrolní nádrži. Oba druhy ryb byly umístěny do sádky s velkým rozvojem vodního květu a v této sádce chovány po dobu dvou měsíců. V exponované nádrži bylo pozorováno největší množství sinic na začátku experimentu (t 0), s časem (t 28, t 72) množství sinic klesalo. S klesajícím počtem sinic klesala i koncentrace MC-LR v biomase sinic až na 31 % v čase t 72 v porovnání se stavem v čase t 0. V čase t 0 bylo v exponované nádrži největší množství vodního květu. Biomasa obsahovala 2.600.000 buněk v mililitru vody. Tomu odpovídala naměřená koncentrace MC-LR v biomase sinic v čase t0 o hodnotě 451,9 µg/g DW (tab.1).

Čas	MC-LR (µg/g sušiny), procento	
t0	451,9	100%
t28	262,6	58,1%
t72	141,9	31,4%

Tabulka 1: Vývoj vodního květu v závislosti na čase (množství MC-LR v sušině)

Porovnáme-li tkáň ryb umístěných v kontrolních nádržích (t 0) a tkáň exponovaných ryb v čase t 28 a t 72, lze konstatovat, že tkáň ryb umístěné v nádržích s rozvinutým květem sinic obsahují prokazatelně větší množství microcystinu-LR (měřeno technikou ELISA). Výsledky byly statisticky srovnány (ANOVA a Dunnettův test). Analýzy ukázaly významný rozdíl hodnot koncentrací ve tkáních u kontrolních a exponovaných ryb (t 28, t 72).

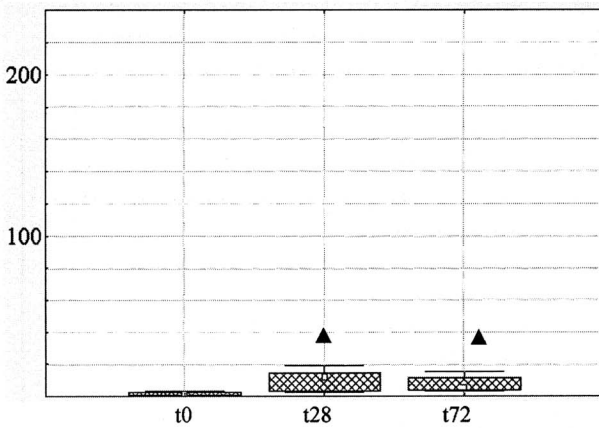


Obr.1: Porovnání hodnot (ng MC-LR/g tkáň) exponovaných tkání tolstolobika. Hvězdičky naznačují statisticky významný rozdíl hepatopankreatu oproti svalům, trojúhelníček udává statisticky významný rozdíl oproti kontrole.

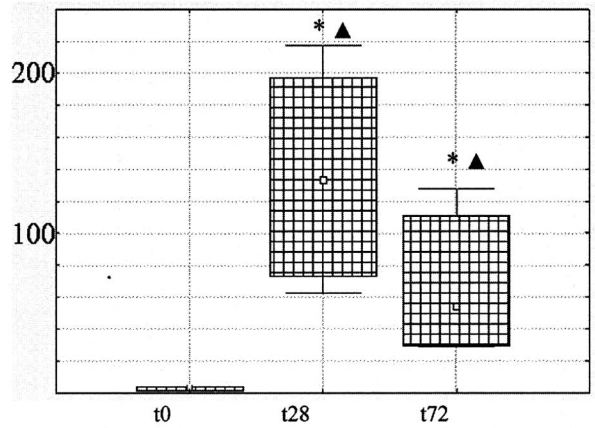
Lze se proto oprávněně domnívat, že ve tkáni ryb z nádrží, které obsahovaly vodní květ s nejhodnějšími rody *Microcystis*, docházelo k akumulaci MC-LR. Tento zjištěný fakt je v souladu s výsledky jiných studií, které byly prováděny na rybcích v souvislosti s akumulací cyanotoxinů. Magalhaes at al. pozoroval ve své studii nárůst koncentrace MC-LR ve tkáni ryb v závislosti na ročním období, kdy se ve vodách prokazatelně vyskytovaly sinice [19].

Podle porovnaných hodnot koncentrací MC-LR v exponovaných tkáních svalů a hepatopankreatu tolstolobika (obr.1) i kapra (obr.2) v čase t 28 a t 72 lze říci, že existují významné rozdíly mezi svaly a játry exponovaných tkání (analýza-Studentův t-test). V těchto grafech jsou znázorněny mediány s oblastí s 25-75 % výskytem hodnot. Znázorněny jsou též minimální i maximální hodnoty. Koncentrace MC-LR u svalů exponovaných tolstolobiků v čase t 28 a t 72 se pohybovala mezi 1,8–29 ng/g tkáň s průměrem 10 ng/g tkáň, respektive mezi 1,4–12 ng/g tkáň s průměrem 5, 2 ng/g tkáň. Koncentrace v játrech tolstolobika v čase t 28 a t 72 byla mezi 35–193 ng/g tkáň s průměrem 93 ng/g tkáň, respektive mezi 60–226 ng/g tkáň s průměrem 124 ng/g tkáň. Porovnáním koncentrací MC-LR v exponovaných svaích a játrech kapra docházíme k podobným závěrům jako v případě

Kapr-SVAL-expozice t0-t72



Kapr-HEPATOPANKREAS-expozice t0-t72



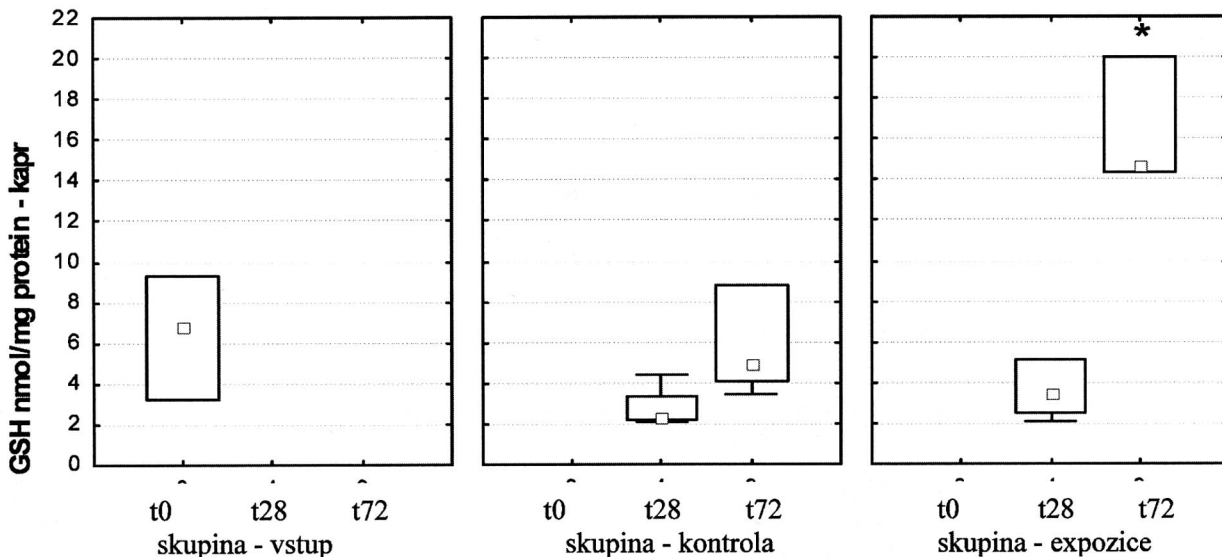
Obr.2: Porovnání hodnot (ng MC-LR/g tkáně) exponovaných tkání kapra. Hvězdičky naznačují statisticky významný rozdíl hepatopancreatu oproti svalům, trojúhelníček udává statisticky významný rozdíl oproti kontrole.

tkání tolstolobika. Koncentrace MC-LR v exponovaných svalectech kapra v čase t 28 a t 72 byly mezi 3,3–19 ng/g tkáně s průměrem 9, 8 ng/g tkáně, respektive mezi 3, 3–15, 6 ng/g tkáně s průměrem 7,3 ng/g tkáně. Koncentrace MC-LR v exponovaných játrech v čase t 28 a t 72 byly mezi 62–218 ng/g tkáně s průměrem 132 ng/g tkáně, respektive mezi 29–128 ng/g tkáně s průměrem 69 ng/g tkáně. Docházíme k závěru, že MC-LR v daleko větší míře se váže v hepatopancreatu. Tento fakt je dán tím, že MC-LR se dostává do buněk hepatopancreatu, popřípadě jater (u savců) přes selektivní přenašeče žlučových kyselin [26, 27]. Interpretace rozdílů mezi jednotlivými druhy ryb je velmi náročná s ohledem na ekologickou rozdílnost studovaných druhů. Nárůst koncentrace v játrech kapra je mnohem větší než u tolstolobika. Tento fakt je zřejmě dán tím, že tolstolobik má pomalejší metabolismus, a proto jsou v jeho játrech hodnoty koncentrace MC-LR menší. Tolstolobik se sinicemi živí, na rozdíl od kapra, a proto dochází v jeho játrech k akumulaci MC-LR i v době (mezi t 28–t 72), kdy klesal obsah microcystinu v prostředí. Kapr se sinicemi neživí a tudíž lze předpokládat, že koncentrace MC-LR v jeho tkáni bude postupně klesat s poklesem výskytu sinic v prostředí [19, 20]. Tento trend je vysvětlován jako biotransformace MC-LR vázaného v tkáni na konjugáty, které jsou odstraňovány z těla. Snižování koncentrace MC-LR v tkáni s úbytkem sinic v prostředí potvrzuje i náš experiment.

2) Modulace biomarkerů oxidativního stresu

Koncentrace neenzymatického antioxidantu GSH se statisticky významně zvýšila z 2–7 nmol/mg proteinu v kontrolách na 16 nmol/mg proteinu v čase t 28 v případě kapra (Obr.3), u tolstolobika došlo v čase t 28 ke statisticky významnému nárůstu z 15 na 23 nmol/mg proteinu oproti kontrole, v čase t 72 se koncentrace GSH snížila na hodnotu 18 nmol/mg proteinů, stále významně vyšší ve srovnání s kontrolou. Tyto výsledky korelují se studii expozice purifikovaným microcystinům u kaprů *in vivo* a krysích hepatocytů *in vitro*, kde byl pozorován nárůst hladiny GSH [12, 13]. Zvýšená koncentrace GSH v důsledku stimulace detoxifikačního systému byla zjištěna i u dalších akvatických organismů [14,15]. Nárůst hladiny GSH byl shodně pozorován v testu s křepelkou japonskou (RECETOX&VFU kontrolovaný experiment s koncentrační řadou sinicové biomasy), kde hladina GSH byla přímo úměrná zvyšující se koncentraci sinic. Aktivita GST v hepatopancreatu kapra významně vzrostla v čase t 28 ze 140 na 170 nmol/min/mg proteinu (Obr.4), v čase t 72 ze 160 na 200 nmol/min/mg proteinu, ve tkáni tolstolobika se oproti těmto nárůstům udržovala relativně stálá aktivita GST v rozmezí 130–160 nmol/min/mg proteinu. Citlivost rybích hepatocytů vůči sinicovým metabolitům provázená indukci oxidativního stresu byla ukázána ve studii Li et al. (2003). Akutní *in vitro* expozice rybích hepatocytů vysokým koncentracím microcystinů způsobovala akutní oxidativní stres a nadprodukcí ROS, která vedla ke stimulaci enzymatické detoxifikace [16], což koreluje s našimi výsledky. Indukce enzymů první a druhé fáze detoxikace byla zjištěna i v již zmiňované studii s modelovým ptákem – křepelkou. Enzymy GPx a GR měly při srovnání obou druhů různé trendy: v hepatopancreatu tolstolobika byl pozorován mírný pokles (statisticky nevýznamný) aktivit GR, GPx v čase t 72, zatímco u kapra nebyly pozorovány významné modulace aktivit těchto enzymů. Obdobné odpovědi detoxifikačního systému v játrech, jaké jsme pozorovali při experimentu se sinicemi [11, 18], byly pozorovány v expozičních studiích s různými druhy ryb vystavenými environmentálním toxikantům (PAHs, PCBs, HCB). V rámci těchto studií byla zjištěna hyperoxigenace v buňkách spojená se stimulací detoxifikačního systému, zejména nárůst hladin GSH a aktivit GST. V souladu se zmiňovanými studii vlivu sinicové expozice na vybrané druhy ryb i naše výsledky ukazují, že microcystin-LR indukuje nefyziologickou aktivaci detoxifikačních enzymů a stimuluje oxidativní stres, který může vyústit v poškození celého organismu [13–16].

Obr.3 Srovnání hladin GSH (nmol/mg proteinu) ve tkáni hepatopankreatu kapra a tolstolobika (statistická významnost zhodnocena testem LSD, * = $p < 0.05$ – významný efekt oproti vstupu; *t28 = $p < 0.05$ – významný efekt oproti kontrole v čase t28)



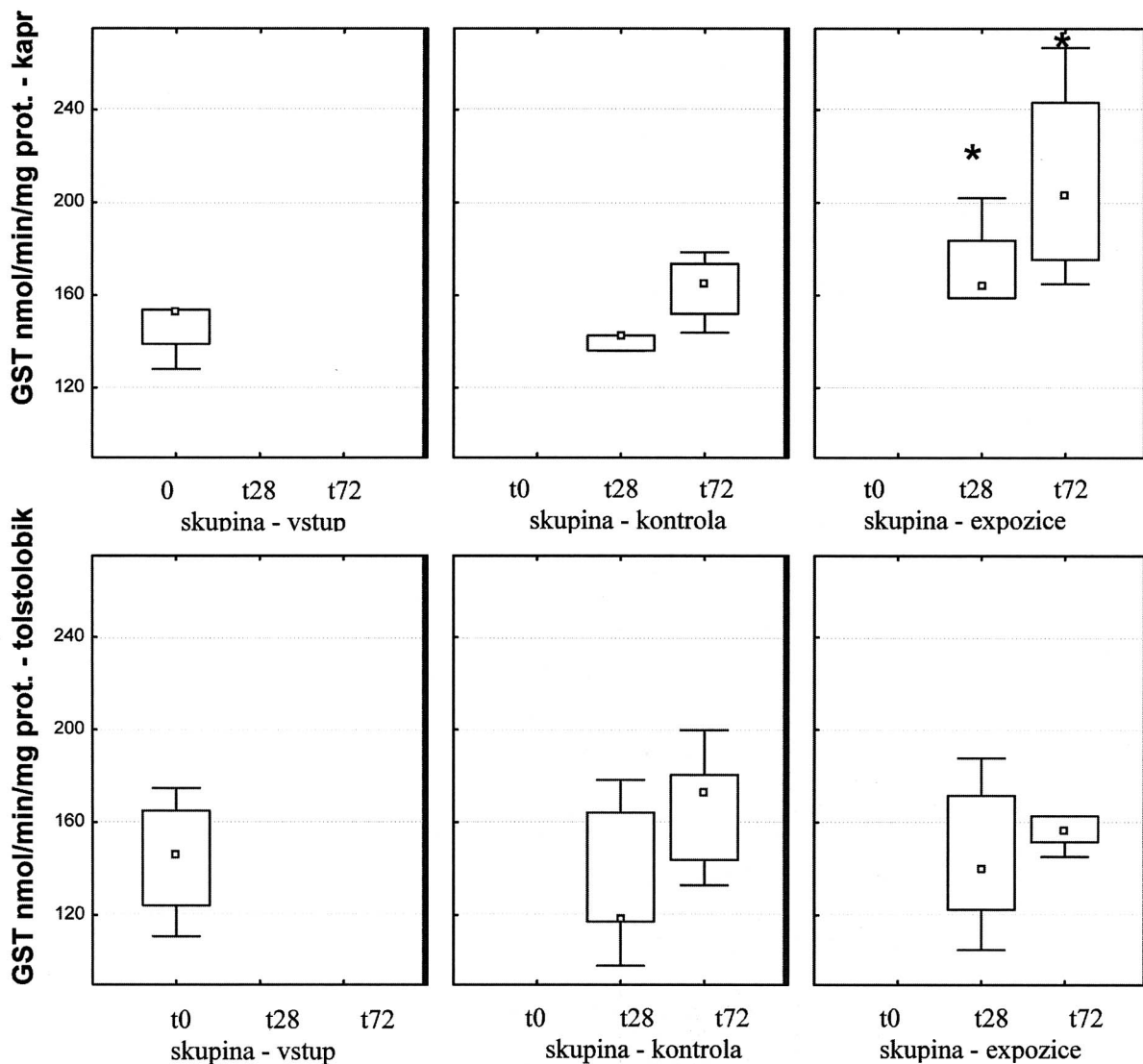
Výsledky rybního klecového experimentu s biomasou sinic ukazují významné modulační sledovaných parametrů po expozici sinicemi ve vodě a svědčí o indukci oxidativního stresu u ryb toxickými metabolity sinic. Byly zjištěny změny antioxidantních biomarkerů v porovnání expoziční sádky s kontrolou, a to zejména v případě kapra, který se ukázal být více citlivý vůči metabolitům sinic. Pozorovaná modulace aktivity GST je v souladu s výsledky zahraničních studií, které popisují ovlivnění aktivity tohoto detoxikačního enzymu u různých druhů organismů po expozici cyanotoxiny microcystiny [2, 16] a bylo prokázáno, že tento enzym se podílí na detoxikaci microcystinů. Ačkoli byly microcystiny v biomase sinic použité pro experimenty obsaženy, nelze vyloučit, že na pozorovaných efektech se mohly podílet rovněž jiné sloučeniny sinicového původu.

3) Zhodnocení bioakumulace microcystinu v hepatopankreatu v porovnání s biochemickými markery

Nalezené koncentrace MC-LR v hepatopankreatu obou druhů ryb korelují se změřenými hladinami biochemických markerů. Nárůst koncentrace GSH (obr.3) v čase t 28 u kapra i tolstolobika je 1,5 x oproti kontrole. Tento trend byl pozorovatelný i u koncentrace MC-LR v tkáni hepatopankreatu obou ryb. Zvýšená syntéza GSH je dána zvýšeným výskytem xenobiotika – cyanotoxinu – v buňkách, který je následně detoxikován konjugací s GSH za enzymatické katalýzy GST. Pokles GSH v čase t 72 u tolstolobika může být způsoben adaptací fytoplanktovorních druhů ryb na zvýšené koncentrace cyanotoxinů v prostředí, která vede k postupnému vyrovnání bazální hladiny GSH a zmenšení míry bioakumulace MC-LR v hepatopankreatu tolstolobika. Statisticky významné – trojnásobné - zvýšení hladiny GSH v čase t 72 oproti kontrole ve tkáni kapra je důsledkem jeho rychlejšího metabolismu [28] a se zřejmým účinkem na snížení koncentrace MC-LR ve sledované tkáni (obr.2). Provedená studie tedy potvrzuje, že množství GSH reaguje na hladinu MC-LR v tkáních ryb a tím pádem lze biochemický marker – koncentrace GSH - použít při hodnocení subletálních efektů expozice microcystinem-LR. Trendy shodné s GSH vykazuje i enzym GST, který se významnou měrou podílí na detoxikaci microcystinu ze tkání tím, že využívá GSH na vytvoření konjugátu v biotransformačních procesech (Obr.4).

Závěr

V rámci kontrolovaného experimentu byla provedena expozice surové biomase sinic z přírodního prostředí na dvou druzích ryb - fytoplanktovorní tolstolobik bílý (*Hypophthalmichthys molitrix*) a bentovorní kapr obecný (*Cyprinus carpio*). Z výsledků stanovení koncentrací microcystinu-LR vyplývá, že při rozvoji sinic a produkci jejich toxinů (microcystinu-LR) může docházet k akumulaci tohoto toxinu v tkáních ryb. Situace je o to závažnější, že podle výsledků našeho experimentu nedochází k bioakumulaci jen u vodních živočichů, kteří se sinicemi živí, ale i u organismů, které pouze žijí ve vodním prostředí s obsahem microcystinu. Získaná data nám mohou pomoci k nastínění osudu MC-LR ve vodním prostředí a nastínit rizika pro vodní organismy, zvláště ryby.



Obr.4 Srovnání aktivit GST (nmol/min/mg proteinu) ve tkáni hepatopankreatu kapra a tolstolobika (statistická významnost zhodnocena testem LSD, * = $p < 0.05$ – významný efekt oproti vstupu)

Dále byla ukázána výrazná modulace hladin a aktivit komponent detoxikačního systému. Byla zjištěna vyšší citlivost druhu *C. carpio* vůči cyanobakteriální expozici. Z výsledků vyplývá, že expozice sinicím u ryb vede ke zvýšení úrovně oxidativního stresu, na což reagují antioxidantní biomolekuly stimulací své aktivity. Námi získané výsledky potvrzují vhodnost použití biochemických markerů jako citlivých indikátorů subletálních účinků MC-LR na ryby.

Poděkování

V závěru tohoto příspěvku bychom chtěli poděkovat za trvalou podporu od Sdružení Flos-Aquae (Brno), Výzkumného centra RECETOX a Botanického ústavu AV ČR. Tato práce byla podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt č. IM6798593901) a grantovou agentou AV ČR (GA AV KJB6005411)

Použitá literatura

- [1] CODD, G.A. et al., Fatal Attraction to Cyanobacteria. *Nature*, 1992. 359(6391): p. 110-111.
- [2] RODGER, H.D. et al., Cyanobacterial (Blue-Green-Algal) Bloom Associated Pathology in Brown Trout, *Salmo-Trutta L*, in Loch Leven, Scotland. *Journal of Fish Diseases*, 1994. 17(2): p. 177-181.
- [3] RABERGH, C.M.I., BYLUND, G., ERIKSSON, J.E., Histopathological Effects of Microcystin-Lr, a Cyclic Peptide Toxin from the Cyanobacterium (Blue-Green-Alga) *Microcystis-Aeruginosa*, on Common Carp (*Cyprinus-Carpio L*). *Aquat. Toxicol.*, 1991. 20(3): p. 131-145.
- [4] CODD, G.A. AND CARMICHAEL, W.W., Toxicity of a clonal isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* from Great Britain. *FEMS Microbiology Letters*, 1982. 13(4): p. 409-411.

- [5] PFLUGMACHER, S., WIEGAND, C., OBEREMM, A., BEATTIE, K.A., KRAUSE, E., CODD, G.A., STEINBERG, C.E.W., Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxification. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*, 1998. 1425: p. 527-533.
- [6] CAZENAVE, J., de LOS ANGELES BISTONI, M., PESCE, S.F., WUNDERLIN, D.A., Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-LR. *Aquat. Toxicol.*, 2006. 76: p. 1-12.
- [7] PFLUGMACHER, S., Promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Aquat. Toxicol.*, 2004. 70: p. 169-178.
- [8] ARORA, A., SAIRAM, R.K. AND SRIVASTAVA, G.C., Oxidative stress and antioxidative system in plants, Indian Agricultural Research Institute, Current Science, 2002. p. 82-10.
- [9] WASHBURN, P.C. AND DI-GUILIO, R.T., Stimulation of superoxide production by nitrofurantoin, p-nitrobenzoic acid and m-dinitrobenzene in hepatic microsomes of three species of freshwater fish. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1989. 8: p. 171-180.
- [10] WINN, L. AND WELLS, P., Evidence for embryonic prostaglandin H synthase-catalyzed bioactivation and reactive oxygen species-mediated oxidation of cellular macromolecules in phenytoin and benzo[a]pyrene teratogenesis, *Free Radic. Biol. Med.*, 1997. 22: p. 607-621.
- [11] VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, V.P.E., Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 2003. 13: p. 57-149.
- [12] GEHRINGER, M.M., SHEPHARD, E.G., DOWNING, T.G., WIEGAND, C., NEILAN, B.A., An investigation into the detoxification of microcystin-LR by the glutathione pathway in Balb/c mice. *J Biochem. Cell Biol.*, 2004. 36: p. 931-941
- [13] BOUAICHA, N., MAATOUK, I., Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alternation, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. *Toxicol Lett*, 2004. 148: p. 53-63
- [14] PFLUGMACHER, S., WIEGAND, C., OBEREMM, A., BEATTIE, K.A., KRAUSE, E., CODD, G.A., STEINBERG, C.E.W., Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxification. *BBA Gen Subjects*, 1998. 1425: p. 527-533
- [15] WIEGAND, C., PEUTHERT, A., PFLUGMACHER, S., CARMELI, S., Effects of microcin SF608 and microcystin-LR, two cyanobacterial compounds produced by *Microcystis* sp., on aquatic organisms. *Environ. Toxicol.*, 2002. 17: P. 400-406
- [16] LI, X., LIU, Y., SONG, L., LIU, J.S.H., Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio*) to the toxicity of microcystin-LR. *Toxicol.*, 2003. 42: p. 85-89
- [17] DA-ROSA, C.E., DE-SOUZA, M.S., YUNES, J.S., PROENCA, L.A.O., NERY, L.E.M., MONSERRAT, J.M., Cyanobacterial blooms in estuarine ecosystems: Characteristics and effects on *Laonoreis acuta* (Polychaeta, Nereididae). *Marine Pollution Bulletin*, 2005. 50: p. 956-964.
- [18] ANDERSSON, T., PESONEN, M., JOHANNSSON, C., Differential induction of cytochrome-P-450-dependent monooxygenase, epoxide hydrolase, glutathione transferase and UDP glucuronosyl transferase activities in the liver of rainbow trout by β -naphthoflavone or Clophen A50. *Biochem. Pharmacol.*, 1985. 34: p. 3309-3314.
- [19] MAGALHAES, V.F. et al., Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicol.*, 2003. 42(3): p. 289-295.
- [20] MAGALHAES, V.F., SOARES, R.M., AZEVEDO, S.M.F.O., Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicol.*, 2001. 39(7): p. 1077-1085.
- [21] LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, A.L., FARR, A.R., RANDALL, R.J., Protein measurements with Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.*, 1951. 193: p. 256-275.
- [22] ELLMANN, G.L., Tissue sulfhydryl group. *Arch. Biochem. Biophysiol.*, 1959. 82: p. 70-77.
- [23] HABIG, W.M., PABST, M.J., JAKOBY, W.B., Glutathion-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 1974. 249: p. 7130-7139.
- [24] CARLBERG, I. AND MANNERVIK, B., Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, 1975. 250: p. 5475-5480.
- [25] FLOHÉ, L. AND GUNZLER, W.A., Assays of Glutathione peroxidase. *Meth. Enzymol.*, 1984. 105: p. 114-120.
- [26] ERIKSSON, J.E. et al., Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1990. 1025(1): p. 60-66.
- [27] WILLIAMS, D.E. ET AL., ¹⁴C-labelled microcystin-LR administered to Atlantic salmon via intraperitoneal injection provides in vivo evidence for covalent binding of microcystin-LR in salmon livers. *Toxicol.*, 1997. 35(6): p. 985-989.
- [28] SNYDER, G.S., A.E. GOODWIN, AND D.W. FREEMAN, Evidence that channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), mortality is not linked to ingestion of the hepatotoxin microcystin-LR. *Journal of Fish Diseases*, 2002. 25(5): p. 275-285.