

## **Bioakumulace cyanotoxinů v potravním řetězci**

Optimalizace a zavedení imunochemické metody stanovení toxinů sinic - microcystinů

### **Obsah :**

Úvod do problematiky.....	1
Co jsou sinice ? .....	2
Hlavní skupiny toxinů sinic.....	4
Microcystiny – toxické látky sinic .....	5
Metody detekce microcystinů a jejich srovnání .....	7
<i>HPLC</i> .....	8
<i>ELISA</i> .....	8
<i>Hodnocení metod</i> .....	10
Návaznost na projekt.....	11
Metodika.....	12
<i>Optimalizace nejvhodnějších koncentrací reagujících protilátek</i> .....	12
<i>Purifikace jednotlivých kongenerů microcystinů a jejich analýza</i> .....	12
<i>Validace metody měřením směsných vzorků s různým obsahem kongenerů</i> .....	12
<i>Extrakce a měření vzorků ryb</i> .....	13
<i>Extrakce a měření vzorků volných přírodních vod</i> .....	13
Standardní operační postup metody anti-Adda ELISY .....	13
<i>Chemikálie a spotřební materiál, pufry</i> .....	13
<i>Přístroje</i> .....	14
<i>Vlastní postup</i> .....	14
Výsledky.....	18
Diskuze.....	23
Literatura .....	26

### **Úvod do problematiky**

Sinice a jejich toxiny budí zájem vědců celého světa nejen kvůli jejich celosvětovému rozšíření ve vodním ekosystému, ale také kvůli stále čtenějšímu výskytu otrav divokých i domestikovaných zvířat (Carmichael 1992). Zájem o tyto organismy není jen z hlediska toxikologického, ale i ekotoxikologického. Masový rozvoj sinic může mít i značné ekonomické důsledky, jako v roce 1992 v případě hromadného úhynu skotu, čítajícího 10.000 kusů, který byl chován okolo řeky Darling v Austrálii. Smrt byla způsobena masovým rozvojem neurotoxické *Anabena circinalis* (Briand et al. 2003). Četné výskyty otrav zvířat, především ryb, lze nalézt i v Evropě (Codd et al. 1992). Na úhynu se podílí nejen neurotoxické ale i hepatotoxické látky, mezi než patří nejčastěji nalézáný microcystin.

K poškození organismu nedochází jen při akutních otravách cyanotoxiny, ale i během dlouhodobé opakované expozice a to v mnohem menších dávkách (Falconer et al. 1988; Falconer et al. 1994). Podle některých studií může opakovaný příjem nižších dávek microcystinů způsobovat závažnější poškození zdraví než jednorázová expozice daleko vyšší dávkou (Carmichael 1994). Tento případ expozice nastává například při dlouhodobém požívání vody z kontaminovaného zdroje. V civilizované části světa je voda upravována v úpravnách vod, ale v rozvojovém světě většinou tyto úpravy chybí. Obsah těchto látek ve vodách je nebezpečný nejen pro lidi, ale také pro živočichy žijící ve vodním prostředí. Sinicové toxiny jsou lidmi jen vzácně přijímány v takovém množství, které odpovídá letální dávce. V lidské populaci se však často lze setkat s účinky dlouho trvající expozice. Na ochranu zdraví a snížení zdravotního rizika doporučuje Světová zdravotnická organizace jako maximální bezpečnou koncentraci microcystinu -LR v pitné vodě  $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  (WHO 1998). Tento limit byl odvozen z experimentálně prokazaného maximálního tolerovatelného denního příjmu (TDI) produktů sinic a to  $0,04 \mu\text{g}$  MC-LR na kilogram tělesné hmotnosti a den (Chorus and Bartram 1999).

Bioakumulace microcystinů (MC) ve vodním prostředí a organismech byla popsána hned několika autory (Williams et al. 1997; Amorim and Vasconcelos 1999; Thostrup and Christoffersen 1999; Engstrom-Ost et al. 2002; Magalhaes et al. 2003). Existuje více laboratorních než terénních studií, umožňujících odhad reálného zdravotního rizika pro lidi, při konzumaci vodních živočichů, kteří přijímali a akumulovali microcystiny (Magalhaes et al. 2001). V této studii autoři poukazují na možnost expozice kontaminovanými potravinami, jako jsou především ryby, krevety, garnáty aj. Mezi další možné expoziční cesty patří pití vody z kontaminovaného zdroje.

Tyto studie potvrzují nutnost monitoringu obsah těchto látek nejen rybách ale i ve vodách, které mohou sloužit jako zdroj pitné vody. Tento monitoring je nejvíce aktuální právě v době rozvoje toxických druhů sinic. Toto tvrzení podporuje i silící trend masového rozvoje květu toxických sinic (Maršálek et al. 1996).

Program rektora pro podporu studentů byl realizován na společném pracovišti Centra pro sinice a jejich toxiny a Masarykovy univerzity, Centra pro chemii životního prostředí a ekotoxikologii (RECETOX) kde se o problematiku sinic a jejich toxinů intenzivně zajímáme. Významným přispěním k problematice je i zavedení nových metod pro stanovení těchto toxických látek. Jednou z nich je i nově zavedená, velice citlivá imunochemická metoda Anti-Adda ELISA.

## **Co jsou sinice ?**

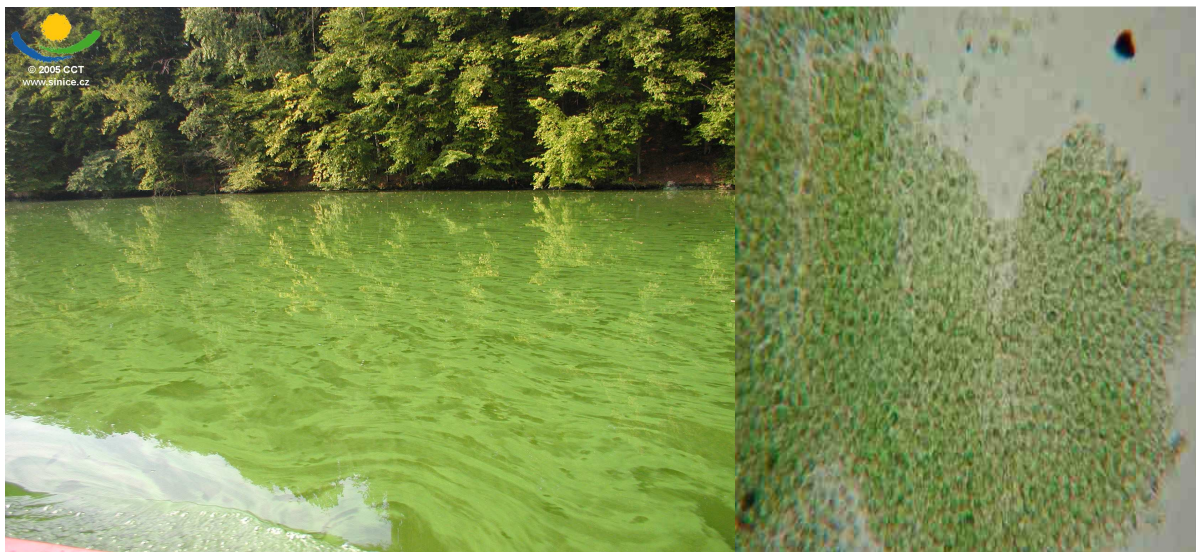
Sinice neboli cyanobaktérie (Cyanobacteria, Cyanophyta) představují starobylou skupinu prokaryotických organismů. Fosilní nálezy dokládají, že tyto organismy byly přítomny na naší planetě již před 3,5 miliardami let a měly podíl na vytváření tehdejší atmosféry (Briand et al. 2003). Se sinicemi se můžeme setkat v rozmanitých druzích biotopů - jak za polárním kruhem tak v rovníkovém pásu (Tang et al. 1997). V současné době je známo více než 150 rodů cyanobaktérií s přibližně 2000 druhy. Molekulární studie již dnes ukazují, že ve skutečnosti je mnohem více rodů i druhů a jejich systematika se zřejmě v budoucnu změní (Mur et al. 1999).

Cyanobaktérie obývají jak suchozemské, tak vodní ekosystémy. Je možno je nalézt jak v mořích, tak ve sladkých vodách (řeky, jezera a rybníky), stejně jako na povrchu vlhké půdy a skal. V mořích tvoří významnou složku planktonu v litorálu a sublitorálu (až do hloubky 200 m). Ve vodách s dostatkem živin tvoří řada zástupců v průběhu vegetační sezóny tzv. "vodní květ" (např. Rudé moře dostalo své jméno podle červeně zbarveného vodního květu) (Obr.1). Vodní květ má hned několik nepříznivých dopadů na vodní ekosystém – jednak

přímou kompeticí mohutné biomasy a na konci vegetační sezóny jejím hromadným odumíráním, kdy se do vody dostává velké množství cyanotoxinů.

Z pohledu člověka mají sinice vlastnosti jak prospěšné tak škodlivé. Jejich schopnost fixovat vzdušný dusík se využívá v Asii při zúrodnování rýžových polí. Preparáty ze sinic slouží jako složka potravy ve východní Asii. Velmi často se uplatňují v biotechnologiích, a to k produkci potravin s velkým obsahem proteinů a některých vitamínů. Potravinářský průmysl využívá i jejich fikobiliny jako barviva. Spekuluje se i o využití v medicíně při značkování díky fluorescenci - možná náhrada radionuklidů. Sinice jsou zdrojem farmaceuticky velmi zajímavých látek (např. s antivirovou, antibakteriální nebo protinádorovou aktivitou) (Kalina 1997; Mur et al. 1999). Na druhou stranu sinice svým intenzivním růstem s tvorbou rozmanitých, často toxických látek způsobují závažné problémy při využívání vodních nádrží a mohou za určitých okolností ohrožovat lidské zdraví.

Masový rozvoj sinic je globální problém. Nejvíce k tomuto masovému rozvoji přispívá proces eutrofizací jezer a nádrží.



**Obr.1:** Fotografie nádrže Brněnská přehrada s extrémně přemnoženou populací sinic (vlevo). Mikroskopický snímek v České Republice běžné sinice *Microcystis aerogenosa* (vpravo).

Jednu z hlavních příčin tohoto jevu je považována antropogenní (kulturní, indukovaná) eutrofizace těchto vodních ekosystémů, tzn. jejich obohacení o živiny (zejména dusík a fosfor) v důsledku lidské činnosti (např. z průmyslových a městských odpadních vod, zemědělství). Zvýšená nabídka živin v prostředí pak podporuje rozvoj primárních producentů, tedy i planktonních a bentických sinic, které jsou přirozenými obyvateli vodních ekosystémů. Situace nezřídka vede k jejich naprostému přemnožení, které se u planktonních druhů sinic označuje zpravidla termínem „vodní květ“.

S nadměrným rozvojem primárních producentů v eutrofizovaných vodních ekosystémech je spojena celá řada nepříznivých jevů. Při rozkladu velkých objemů biomasy vytvořených zvýšenou primární produkcí dochází ke spotřebě kyslíku a tedy ke snížení jeho koncentrace ve vodě, což může způsobit až úhyn ryb a dalších vodních živočichů. Následným rozkladem organických látek v anaerobních podmínkách (hnití) vznikají různé toxické produkty ( $H_2S$ ,  $NH_3$ ,  $CH_4$ ). Pokles redoxního potenciálu může vést k remobilizaci látek vázaných v sedimentech - kovů, toxických polutantů a mj. sloučenin fosforu, které mohou eutrofizaci ještě více akcelarovat. Dochází ke zhoršení kvality vody (estetické znehodnocení,

přítomnost látek ovlivňujících chuť a zápach vody), které znemožňuje využití nádrží pro hospodářské nebo rekreační účely a ztěžuje proces úpravy pitných vod.

V případě masového rozvoje sinic představuje velmi závažný problém jejich schopnost produkovat rozmanité sekundární metabolity. Jedná se o látky často velmi toxické (cyanotoxiny) nebo biologicky aktivní, které jsou nebezpečím pro ostatní živé organismy včetně člověka (Carmichael 2001). Některé ze sloučenin produkovaných sinicemi výrazně ovlivňují organoleptické vlastnosti vody (pachy a pachutě).

### Hlavní skupiny toxinů sinic

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 i chemickými vlastnostmi. Přirozená úloha těchto metabolitů a jejich přínos pro cyanobaktérie jsou dosud ve většině případů nejasné.

Po chemické stránce jsou cyanotoxiny nejčastěji oligopeptidy (hepatotoxické microcystiny a nodulariny, dermatotoxické aplysiatoxin a lyngbyatoxin) nebo heterocyklické látky (neurotoxické anatoxiny a saxitoxiny, hepatotoxický cilindropermopsin). Jednotlivé toxiny mají často smíšenou biologickou aktivitu (tabulka 1). Jiné dělení cyanotoxinů vychází z chemické struktury toxinů a někteří autoři dělí cyanotoxiny dle typů molekul – cyklické a lineární peptidy, alkaloidy a lipopolysacharidy (Sivonen and Jones 1999). Mezi nejstudovanější patří neurotoxiny a hepatotoxiny.

Některé druhy sinic mohou produkovat i několik druhů toxinů současně, na druhou stranu některé jiné populace těchto druhů mohou být zcela netoxické. Spektrum produkovaných 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 (WHO 1998; Chorus et al. 2000). Toxicitu vykazují též lipopolysacharidy, které jsou součástí všech buněčných stěn bakterií 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.

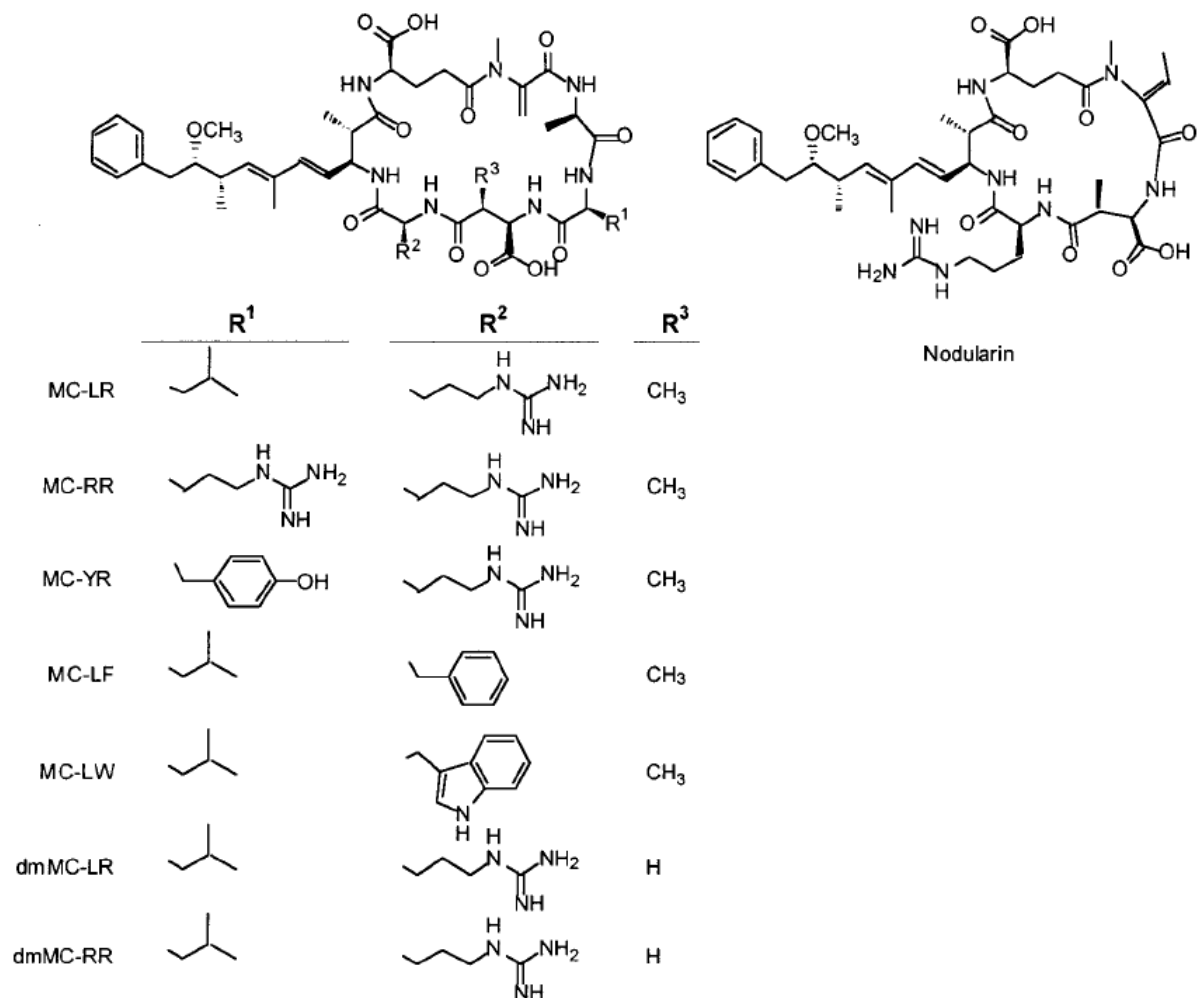
Skupina toxinů	Cílový orgán u savců	Rod sinic
<b>Cyklické peptidy</b>		
microcystin	Játra	<i>Microcystis, Anabaena Planktothrix (Oscillatoria), Nostoc, Hapalopsiphon, Anabaenopsis</i>
nodularin	Játra	<i>Nodularia</i>
<b>Alkaloidy</b>		
anatoxin-a	nervová zakončení	<i>Anabaena Planktothrix (Oscillatoria), Aphanizomenon</i>
anatoxin-a(S)	nervová zakončení	<i>Anabaena</i>
aplysiatoxin	Kůže	<i>Lyngbya, Achizothrix, Planktothrix (Oscillatoria),</i>
cylindropermopsin	Játra	<i>Aphanizomenon, Cyndropermopsis, Umezakia</i>
lyngbyatoxin-a	gastro-intestinální trakt, kůže	<i>Lyngbia</i>
saxitoxin	nervové axony	<i>Lyngbia, Aphanizomenon, Cyndropermopsis, Anabaena</i>
<b>Lipopolysacharidy (LPS)</b>	vliv na nespecifickou imunitní odezvu	Všechny G-bakterie včetně sinic

**Tabulka 1 :** Přehled nevýznamnějších cyanotoxinů, jejich působení a původ. Sestaveno podle (WHO 1999).

## Microcystiny – toxické látky sinic

Nejrozšířenější, nejčastěji nalézanou a také nejvíce studovanou skupinu cyanotoxinů představují hepatotoxické cyklické heptapeptidy – microcystiny. Geny kódující enzymy zodpovědné za syntézu microcystinů (neribozomální peptidsyntetázy a polyketidsyntetázy) jsou velmi starobylé a nacházejí se i u evolučně málo příbuzných druhů sinic (Rantala et al. 2004). Microcystiny byly dosud izolovány ze zástupců jak planktonních, tak bentických i půdních sinic rodů *Anabaena*, *Microcystis*, *Planktothrix*, *Nostoc*, *Anabaenopsis*, *Hapalosiphon* (Sivonen and Jones 1999).

Obecný vzorec microcystinů je: cyklo - (D-alanin1-L-X2-D-MeAsp3-L-Y4-Adda5-D-glutamová kyselina6-Mdha7), kde X a Y jsou různé L-aminokyseliny, MeAsp je D-erythro- $\beta$ -methylasparagová kyselina a Mdha je N-methyldehydroalanin. Neobvyklá aminokyselina Adda je hlavním charakteristickým rysem molekuly microcystinů. Jedná se o (2S,3S,8S,9S)- 3-amino- 9-methoxy- 2,6,8-trimethyl- 10-fenyldeka- 4,6-dienovou kyselinu. Podle nejnovějších informací je známo přes 90 strukturních variant microcystinů (Fischer et al. 2001; Zeck et al. 2001; Spooft et al. 2003). Nejčastěji se liší různými aminokyselinami X a Y v pozicích 2 a 4 a také demethylací aminokyselin v pozicích 3 a 7, strukturní 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). Nejběžnějšími microcystiny nalézány v biomase sinic ČR jsou microcystiny LR, YR a -RR (Bláhová et al. 2007).



**Obr.2 :** Chemická struktura microcystinu-LR, -RR, -YR, -LF, a -LW, 3-desmethylmicrocystinu-LR a -RR, a nodularinu.

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. V exponovaných buňkách microcystiny ovlivňují celou řadu procesů: fosforylaci cytoskeletu a jiných proteinů, oxidativní stres, mitochondriální procesy, apoptózu (Toivola and Eriksson 1999; Ding and Ong 2003; Gehringer 2004). Kompletní mechanismus účinku microcystinů na buněčné a molekulární úrovni však nebyl dosud zcela objasněn a není zřejmé, do jaké míry některé pozorované efekty souvisí s inhibicí proteinfosfatáz, anebo zda existují i jiné vnitrobuněčné cíle microcystinů (Mikhailov et al. 2003).

U savců 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). Vedle jater mohou microcystiny působit toxicky také na ledviny, plíce a střeva (Kuiper-Goodman et al. 1999) a nově se diskutuje také o neurotoxicitě microcystinů (Fischer et al. 2005). Hodnota akutní LD<sub>50</sub> pro myš se u nejsledovanějšího microcystinu-LR pohybuje mezi 50-60 μg.kg<sup>-1</sup> živé váhy při intraperitoneální aplikaci toxinu (i.p.) (Kuiper-Goodman et al. 1999), při perorální expozici

(p.o.) dosahuje LD<sup>50</sup> hodnot mezi 5 000 – 10 900 µg.kg<sup>-1</sup> 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. 1988; Falconer et al. 1994; 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; (Fitzgerald 2001)). Existují rovněž četné důkazy o schopnosti microcystinů indukovat poškození DNA (Zegura et al. 2003; Zhan et al. 2003; Zegura et al. 2004; 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 zatím experimentálně prokázán. Podle výsledků některých výzkumů by microcystiny mohly ovlivňovat také imunitní systém (Chen et al. 2004; Lankoff et al. 2004).

Vedle toxikologických studií existuje velké množství prací, které popisují negativní účinky microcystinů na nejrůznější druhy akvatických organismů (pro přehled např. (Wiegand and Pflugmacher 2005; Zurawell et al. 2005)) a dokumentují tak vysokou ekologickou nebezpečnost microcystinů a jejich ekotoxikologický význam.

Sinice produkující microcystiny byly příčinou řady hromadných úhynů hospodářských i divokých zvířat (krav, ovcí, psů, ryb, ptáků apod.; pro přehled viz např. (Duy et al. 2000)) a hrály hlavní roli také při mnoha humánních intoxikacích (Kuiper-Goodman et al. 1999; Duy et al. 2000; Chorus et al. 2000). 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 úmrtí zhruba 50 pacientů (Azevedo et al. 2002).

Dokumentované případy otrav zvířat a lidí spolu s výsledky laboratorních experimentů se zvířaty ukazují, že microcystiny mohou být lidskému zdraví velmi nebezpečné. Skutečnost, že se masové rozvoje sinic v posledních letech objevují se zvýšenou frekvencí, 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 proto 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), a dále byl doporučen limit pro jeho maximální koncentrace v pitné vodě - 1,0 µg.L<sup>-1</sup> (WHO 1998). Tato směrnice byla implementována do legislativy a hygienických norem v mnoha zemích světa, včetně České republiky (vyhláška č. 252/2004), což vypovídá o zvýšené pozornosti, která je problematice toxických sinic v současné době věnována.

### **Metody detekce microcystinů a jejich srovnání**

Ke stanovení microcystinů může být použito několika principiálně odlišných metod. Vedle klasických instrumentálních technik (HPLC, MS) mohou být microcystiny analyzovány také biochemicky (enzymatické stanovení) nebo imunochemicky (ELISA) (Harada et al. 1999).

## HPLC

Pravděpodobně nejrozšířenější metodou pro stanovení microcystinů je vysoko účinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (reversed phase high performance/pressure liquid chromatography, RP – HPLC). Princip metody spočívá v **separaci microcystinů na analytické koloně** (typicky se stacionární fázi 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. Vzhledem k tomu, že analytické standardy jsou komerčně nabízeny jen pro některé strukturní 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 strukturních variant však také u DAD vyžaduje použití příslušných analytických standardů, podobně jako u jednoduchého UVD.

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

## ELISA

ELISA je zkratka metody s názvem Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay. Naše uspořádání odpovídá přímé kompetitivní ELISE ve které se jedná o kompetici stanovované látky s látkou značenou enzymem o vazebná místa na protilátce (obr.3).

Pro takovéto stanovení je nebytné využití protilátek vázajících microcystin ze vzorku. Citlivost stanovení velmi závisí na použité protilátce, tak i na uspořádání jednotlivých kroků v ELISE. Vlastní postup je detailně popsán v sekci metod.

Protilátky proti microcystinům jsou 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). K měření intenzity barvy se používá fotospektrometr.

**Enzymy** používané pro tuto techniku by měli mít všeobecně malou relativní molekulovou hmotnost, **vysokou stabilitu a enzymovou aktivitu** (Rapala et al. 2002). Musí se dát kovalentně navázat na protilátky a na různé funkční skupiny antigenů. Produkt enzymové reakce musí být dostatečně barevný, nebo lehce detekovatelný. Enzym by měl také být lehce dostupný a i cena hraje určitou roli. Nejvíce se používá křenová peroxidáza (HRP), méně často pak alkalická fosfatáza, nebo  $\beta$ -D-galaktozidáza občas glukózooxidáza (Ferenčík 1989; Zeck et al. 2001; Zeck et al. 2001). V naší metodě jsme použili microcystin značený křenovou peroxidázou. Tento konjugát (MC+HRP) jsme nově připravili podle literatury



(Fischer et al. 2001; Zeck et al. 2001). Jeho účinnost a správnou reakční koncentraci jsme pak stanovili sérií měření.

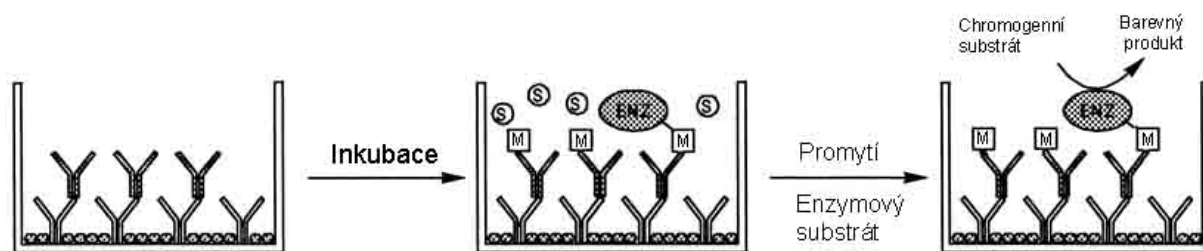
Pro stanovení microcystinu se běžně používá protilátka která byla vyvinuta proti microcystinu-LR (MC-LR). WHO doporučilo jako limit pro pitnou vodu 1 µg/L MC-LR. Tuto normu převzala i Česká republika. Do dnešního dne nebyl jiných analog microcystinu zaveden do legislativy ČR. Z toho důvodu se tato protilátka běžně používá ke stanovení microcystinů a to i v komerčních kitech (Alexis® Bichemicals s označením [anti-Microcystin-LR MAb (MC10E7)], produkt číslo 804-320-C200).

Tato protilátka byla vyrobena k účelu identifikace microcystinů, které mají v pozici 4 arginin (viz. obr.2). Sem spadá i běžně nalézáný a rutinně stanovovaný MC-LR. Detekční limit pro tento MC-LR je uveden 6 ng.l<sup>-1</sup>. Všechny microcystiny obsahující [4-arginin] mají teoreticky shodný detekční limit. V dnešní době je známo přes 90 strukturních variant (kongenerů) microcystinů a velká část z nich [4-arginin] neobsahuje (Fischer et al. 2001; Chorus 2004; Meriluoto 2004). Výrobce této protilátky (Alexis Bichemicals) uvádí míru křížové reaktivity a detekční limity pro jednotlivé varianty microcystinu u této protilátky. Detekční limit microcystinových variant, které obsahují jinou aminokyselinu, v pozici 4 peptidového kruhu, než arginin, je o šest řádů větší. U microcystinu-LR je tato hodnota 100% (Zeck et al. 2001).

Některé laboratoře vyvinuli hned několik imunoanalytických metod pro detekci microcystinů používající jak monoklonní tak polyklonní protilátky, nicméně většina z nich je vyvinuta proti úzké skupině microcystinových kongenerů (Saito et al. 1994; Nagata et al. 1995; Ueno et al. 1996; Tsutsumi et al. 1998). Takové metody jsou však pro použití monitoringu nevhodné protože umožňují **vznik falešně negativních výsledků ve vzorku, který obsahuje ty kongenery microcystinu pro které je tato protilátka necitlivá.** To výrazně ovlivňuje i odhady zdravotních rizik a ekotoxikologických dopadů na vodní ekosystém.

**Výrazný posun ve vývoji imunoanalytických metod přinesla monoklonní protilátka proti neobvyklé aminokyselině Adda která je obsažena ve všech strukturách známých microcystinů(90) a nodularinů(5)** (Fischer et al. 2001). Tato protilátka (AD4G2) je komerčně dostupná od firmy Alexis Biochemicalsa právě tuto protilátku využívá i naše metoda. Výrobce uvádí křížovou reaktivitu jednotlivých analogů microcystinu v rozmezí 27-129 %. Detekční limit se pohybuje v rozmezí 0,02-0,14 µg/L pro jednotlivé analogy, což je dostačující pro detekční limit z hlediska limitů navržených WHO (WHO 1998). Tato protilátka je vhodná především pro screeningové programy jako je například sledování obsahu toxických látek produkovaných sinicemi v nádržích ČR. Podle literárních zdrojů má tato protilátka dobrou stabilitu i proti interferencím v měření vlivem organických rozpouštědel, pH, nebo oxidačních činidel které se mohou ve stanovovaných vodách nalézat (Zeck et al. 2001). Některé studie toxických účinků a bioakumulace microcystinů používají pro detekci přítomnosti MC ve tkáních živočichů metod ELISA (Amorim and Vasconcelos 1999; Thostrup and Christoffersen 1999; Magalhaes et al. 2001; Sipia et al. 2001; Engstrom-Ost et al. 2002; Ferrao et al. 2002; Kankaanpaa et al. 2002; Magalhaes et al. 2003; Mohamed et al. 2003; Orr et al. 2003; Soares et al. 2004). Nicméně nové studie poukazují na možnost ovlivnění měření vlivem nespecifických vazeb jiných látek než microcystinů na vazebná místa protilátek právě v metodě ELISA (Sipia et al. 2001; Ernst et al. 2005). Ernst (2005) poukazuje na sporný vliv matrice na analýzu, nicméně měření výtěžnosti extrakce microcystinu z mas ryb ukazují dobrou shodu výsledků mezi HPLC i ELISA. Z toho autor vyvozuje závěr, že matrice nehraje v těchto analýzách podstatnější roli. Oproti tomu Kankaanpaa (2002) vysvětluje ve studii s nodularinem (NOD) (microcystinu podobném pentapeptidu) rozdílné koncentrace zjištěné metodou ELISA a HPLC u experimentu se pstruhem mořským (nodularin podávaný orálně). Ačkoli naměřené koncentrace metodou

ELISA dosáhly 1,2  $\mu\text{g}$  NOD /g tkáně, měření pomocí HPLC nodularin neprokázalo i když se koncentrace pohybovala nad limitem detekce pro HPLC (0,15  $\mu\text{g/g}$ ). Autor se domnívá, že nesrovnalost mezi HPLC a ELISA spočívá spíše v možnosti stanovení konjugátů nodularinu pomocí ELISA, zatímco metodou HPLC by to bylo velmi obtížné (Metcalf et al. 2000; Kankaanpaa et al. 2002). Matrice však hraje také významnou roli v detekci microcystinů. V případě biologických vzorků, jako jsou tkáně, je velká pravděpodobnost, že se některé peptidické látky ze vzorku budou vázat na protilátky a tak nadhodnocovat výsledek. Toto tvrzení podporuje i studie s nodularinem ve které se jako limit detekce metody ELISA bere hodnota nejméně 0,01 $\mu\text{g}$  NOD /g tkáně právě z důvodů nespecifického ovlivnění měření látkami z biologické matrice (Sipia et al. 2001). Podobný limit 0,02  $\mu\text{g}$  NOD /g tkáně doporučuje i studie zaměřená na měření NOD v játrech ryb pomocí ELISA (Kankaanpaa et al. 2002). **Přesto všechno, kolektiv autorů Ernst (2005) doporučuje k měření obsahu microcystinů v tkáních výhradně metodu anti-Adda ELISA** z důvodu velmi nízkého detekčního limitu, který je několika řádově menší oproti metodám HPLC, nebo metod spojených i inhibicí protein-fosfatáz. Z výsledku jejich studie se zdá být vliv pozadí/matrix-asociovaných efektů zanedbatelný a nemající velký vliv na nadhodnocení výsledků (Ernst et al. 2005). Obecně lze říci, že existuje jen velmi málo studií zabývajících se možnou interferencí látek, které negativně ovlivňují měření metodou ELISA.



**Obr. 3:** Princip metody imunoanalytické metody ELISA. Microcystin ve vzorku soupeří o vazebná místa s enzymově značeným microcystinem (konjugátem) o vazebná místa na protilátce. Poměr volného microcystin/konjugátu se určuje barevnou reakcí se substrátem.

### Hodnocení metod

Nejvíce používanou metodou stanovení microcystinů je metoda kapalinové chromatografie (HPLC). Velkou výhodou této metody je její spolehlivost, robustnost a použití při rutinních analýzách. Metoda je rovněž schopna rozlišit jednotlivé kongenery microcystinu, nicméně k jejich stoprocentní validitě je potřeba zakoupit standart dané látky. V případě velkého spektra microcystinů je to však velký problém, protože většina z nich se jako čistá látka koupit nedají. Velkou nevýhodou této metody je také její pořizovací cena, náročnost na kvalifikovanou obsluhu a poměrně vysoký detekční limit neumožňující měřit microcystiny přímo ve vodách, bez nutnosti jejich zkoncentrování (např. metodou SPE), což zase výrazně zvyšuje cenu přepočtenou na vzorek a čas potřebný k analýze.

Pro účely rutinního stanovení se jeví jako nejvíce vhodná metoda ELISA, která je oproti metodě HPLC nenáročná na laboratorní vybavení ani na kvalifikovanou obsluhu. Velkou výhodou je možnost stanovit sumu všech známých microcystinů a tím lépe postihnout toxický potenciál vzorku. Každým rokem je nově objeven další z řady microcystinů. Tato metoda je schopna zachytit i ty microcystiny a nodulariny, které nejsme zatím schopni stanovit jinou metodou. Kromě molekul microcystinu je tato metoda schopna změřit i microcystinové biokonjugáty, fragmenty a residua (Fischer et al. 2001). S porovnáním s metodou HPLC je ELISA levnější, ale jen v případě že využíváme vlastní metody, nikoli komerčního kitu. Během jednoho testu (v 96 jamkové mikrodessce) trvajících 3 hodiny jsme

schopni změřit až 28 vzorků, zatímco metoda HPLC měří v průměru jeden vzorek 30 minut. Metoda ELISA je v průměru o tři řády citlivější než metoda HPLC, ale zato v některých případech může být měření ovlivněno složením matrice. Detekční limit ELISY je na úrovni desítek ng MC/L, proto můžeme tuto metodu používat k měření MC přímo ve vzorcích vod bez nutnosti zakoncentrování.

### **Návaznost na projekt**

Cílem tohoto projektu byla optimalizace a zavedení nové velice citlivé imunoanalytické metody (ELISA) pro měření microcystinů - toxických látek sinic, která by na rozdíl od ostatních dostupných metod umožnila stanovit všechny analogy microcystinů ve vzorku. Po úspěšné optimalizaci se metoda stala součástí zavedených metod rozšiřující sadu stanovení microcystinu v našich laboratořích.

S nově vytvořenou metodou jsme se chtěli zapojit do projektu Mendlovy zemědělské a lesnické University v Brně, kde jsme chtěli tuto metodu použít na stanovení microcystinů v bioakumulačním experimentu s rybami. Získaná data měla sloužit jako podklad ke studiu toxokiniky těchto látek v rybách. Pro tuto studii jsme byli nuceni vybrat jinou metodu, protože se metoda ELISA ukázala jako nevhodná, právě z důvodů velkého vlivu pozadí při měření. Výsledky jsme získali použitím alternativní metody kapalinové chromatografie s hmotnostněspektrometrickou koncovkou (LC-MS).

Metoda ELISA je však velmi dobře použitelná při měření v jiných méně složitých a interferujících maticích, jako je například volná voda z nádrží a přehrad. Tuto metodu detekce jsme odzkoušeli na sérii vzorků z prostředí ze sezóny 2007. Jedná se o vybrané lokality v ČR, které mají jak rekreační tak vodohospodářský účel. Některé z nich jsou i zdrojem pitné vody. Vzorky vod z lokality jsme vybírali i s ohledem na rozdílné zastoupení různých kongenerů microcystinu v biomase sinic. S ohledem na použitou metodu mají tyto data ojedinělý charakter. Měřením celkové sumy microcystinů ve vodách se budeme i nadále zabývat a předpokládáme, že tyto data spolu s vyčíslením možných rizik a metodikou uveřejníme v recenzovaném časopise.

## Metodika

Prvořadým úkolem této práce byla samotné sestavení a optimalizace metody anti-Adda ELISA. Metodu jsme sestavili podle dostupné literatury (Fischer et al. 2001; Zeck et al. 2001; Zeck et al. 2001). Samotná optimalizace a validace metody proběhla v několika na sobě závislých krocích. Výslednou již optimalizovanou metodu jsme použili na stanovení MC ve vzorcích ryb a vzorcích přírodních vod. Jednotlivé kroky optimalizace a validace:

- 1) Optimalizace nejvhodnějších koncentrací reagujících protilátek.
- 2) Purifikace jednotlivých kongenerů microcystinů a jejich testování.
- 3) Validace metody měřením směsných vzorků s různým obsahem kongenerů.
- 4) Extrakce a měření vzorků ryb.
- 5) Extrakce a měření vzorků volných přírodních vod.

### Optimalizace nejvhodnějších koncentrací reagujících protilátek

První krok optimalizace spočíval v nalezení vhodných, sobě odpovídajících koncentrací obou protilátek používaných během metody. První protilátka slouží k vazbě na jamku v mikrotitrační destičce a k vazbě druhé protilátky, která váže stanovovanou látku a její enzymaticky značený analog. Pro nalezení vhodného poměru interagujících protilátek jsme proti sobě testovali různé ředění 1.protilátky (IgG, anti-myší anti-Fc IgG) v rozmezí 1000-3000x a druhé protilátky (AD4G2 - myší monoklonální protilátka proti Adda-microcystinu) v rozmezí 30.000-3.000x. Výsledky shrnují grafy 1-3.

### Purifikace jednotlivých kongenerů microcystinů a jejich analýza

K získání jednotlivých kongenerů microcystinu –LR, –RR, –YR byl použit extrakt z biomasy sinic z nádrže Nové Mlýny. Tyto tři kongenery –LR, –RR, –YR jsou nejčastěji nalézané kongenery v biomase sinic proto jejich výskyt očekáváme i ve vodě. Metoda stanovení pomocí HPLC: Chromatograf HPLC Agilent 1100 Series s PDA detektorem, kolona: Supelcosil ABZ+Plus 15 cm x 4.6 mm x 5 µm. Mobilní fáze: (A) H<sub>2</sub>O+ 0.1% TFA, (B) MeCN + 0.1% TFA, průtok 1 mL/min, gradientová eluce: lineární gradient 0-30 min 20-59% B, teplota 30°C, detektor PDA (200-350 nm), chromatogramy vyhodnocovány při 238 nm (SW HP Chemstation 1100). Kvantifikace podle externího standardu microcystinu-LR . Identifikace - retenční čas a knihovna spekter CTX.UVL. Chromatogramy čistých látek jsou v grafu 5.

Vyizolované kongenery microcystinů –LR, –RR, –YR byly měřeny spolu ve stejné ELISE a křížová reaktivita byla vyjádřena vůči microcystinu –LR, který je brán jako standart a jehož křížová reaktivita vůči protilátce je 100% (tabulka 2). Testované koncentrace se pohybovali v rozmezí 0,06 – 10 µg/l. Měření bylo vždy děláno minimálně 2x podle metodiky (Fischer et al. 2001). Výsledky shrnuje graf 4.

### Validace metody měřením směsných vzorků s různým obsahem kongenerů MC-LR,-RR,-YR

Pro validaci metody jsme sestavili sadu experimentálních vzorků s různými obsahy kongenerů microcystinu-LR, -RR, -YR. Jednotlivé koncentrace byly zvoleny v rozmezí 0-0,5 µg/l tak aby byly environmentálně relevantní. Měření bylo vždy prováděno v duplikátu a

naměřené koncentrace byly porovnány s očekávanými hodnotami, které byly vypočítány na základě stanovené křížové reaktivity. Výsledky uvádí graf 6 a tabulka 3.

#### Extrakce a měření vzorků ryb

- z mraženého vzorku (-80°C) hepatopankreatu ryb odebráno 0,5 g tkáně a s přídavkem 3 ml metanolu homogenizováno, 30 minut ultrazvukováno v ultrazvukové lázni, stočeno v rotační centrifuze (4000 RPM, 10 min). Odebrali jsme vrchní metanolový extrakt a přidali nových 3 ml metanolu. Celý cyklus se opakovali 3x do získání 9 ml etanolového extraktu.
- k metanolovému extraktu jsme přidali 1 ml destilované vody a 1 ml hexanu. Po důkladném protřepání a centrifugaci (4000 RPM, 10 min) jsme odebrali vrchní hexanovou vrstvu obsahující lipidickou složku. Celý proces opakovali 3x, případně i vícekrát do té doby než se neobjevil tuk v hexanové vrstvě.
- extrakt jsme vysušili při 50°C v sušárně a před analýzou rozpustili v 1ml destilované vody a nechali 30 min ultrazvukovat v ultrazvukové lázni.
- Tento proces extrakce byl převzat z (Magalhaes et al. 2001; Magalhaes et al. 2003) a modifikován. Výsledky měření shrnuje graf 7

#### Extrakce a měření vzorků volných přírodních vod.

- do 1.5 mL Eppendorfovy mikrozkušavky označené číslem vzorku jsme odebrali cca 1.5 ml reprezentativního vzorku volné vody (původní vzorek čerstvé nebo rozmražené vody homogenizovali vortexováním asi 30 s)
  - extrahovali jsme microcystiny pomocí ultrazvukového homogenizátoru (2 x 20 s, cycle 0.8 x 10%, power 90-95%).
  - před analýzou jsme vzorky rozmrazili a centrifugací oddělili případný buněčný debris nebo nečistoty (maximální možné otáčky cca 15 000 ot., 10 min).
- Výsledky měření přírodních vod shrnuje tabulka 4.

#### **Standardní operační postup metody anti-Adda ELISA**

Imunochemické stanovení sumy microcystinů ve vzorku pomocí protilátky AD4G2 (anti-adda)

#### **Chemikálie a spotřební materiál, pufr**

*Uhličitanový pufr, (40 mM, pH 9.6)*

Pufr používaný k ředění a krytí desky první protilátkou (IgG).

*PBS (80 mM koncentrovaný, pH 7.4, NaCl 8,76 g/l)*

Pufr používaný ke krytí desky druhou protilátkou - monoklonální anti-MC (MAb).

*PBS (7 mM standardní, pH 7.4, NaCl 150 mM)*

Pufr na promývání mezi IgG a MAb.

*PBS + Tween20 (7 mM standardní, pH 7.4, NaCl 150 mM, + 0,05% v/v Tween20)*

Pufr na promývání desky po navázání protilátek (po MAb).

*TRIS (0.1 M, pH 7.4, NaCl 8.76 g/l)*

Pufr na ředění konjugátu.

*H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% v/v.*

Kyselina - zastavení enzymatické reakce na konci.

*TRIS koncentrovaný (1M, pH 7.4, NaCl 87.6 g/l, 1% BSA, 1% EDTA)*

Blokovací pufr přidávaný těsně před vzorkem - blokování nespecifických vazeb.

*MAb*

(10x zředěná rozplněná v eppendorfci + neředěný zásobní roztok v originální lahvičce) - komerční protilátka (monoklonální - v myši vyrobená - protilátka AD4G2 proti aminokyselina Adda microcystinu, ALEXIS)

*Konjugát MC-HRP*

Stabilizovaný 1%BSA, rozdělený do několika šroubovacích plastických zkumavek a uchovaný při -18°C.

Příprava konjugátu (MC-HRP) - Chemická syntéza komerční peroxidázy (HRP = horse radish peroxidase) s čistým microcystinem-LR přes můstek vytvořený Traut's reagent a následné přečištění gelovou chromatografií. Postup (vyrobena v laboratořích RECETOX).

*TMB*

Chromogenní substrát pro peroxidázu (HRP) - „tetramethylbenzedine“ - komerční: TESTLINE (zásobní roztok je ve stříbrné 1,5L velké lahvi).

*IgG*

Komerční protilátka, v skleněné původní nádobce (*kozí polyklonální anti-myši anti-FcIgG protilátka třídy IgG, MP BIOMEDICALS*).

*Desky NUNC*

"high-binding" mikrotitrační 96-ti jamkové desky

Obyčejné desky - pomocné pro předpřípravu vzorku a standardu před analýzou

*Přístroje*

- třepačka LT-1
- vortex
- (*promývačka*)
- multikanálové pipety (8,12-kanálů) na objem 15ul-300ul, 10-200ul
- pipety do 1-10 µL, do 10-100 µL, do 100-1000 µL
- dávkovací pipeta (50-1000uL)
- mikrodestičkový spektrofotometr TECAN – Genios
- centrifuga

*Vlastní postup*

Den 1

Krytí desek IgG:

IgG ve skleněné původní lahvičce (+4°C) důkladně promíchat nejméně 30s (vortexovat). Dbát na to, aby se obsah skleničky nedostal do víčka odkud by se později špatně dostával. Potřebné množství IgG ředit 2000x v uhličitanovém pufru (tj. 1 díl rozmražen. IgG / 1999 dílům pufru). Důkladně promíchat – vortexovat.

Překrýt folií - parafilmem (případně i víčkem) a nechat přes noc inkubovat na třepačce při mírném míchání v teplotě laboratoře.

## Den 2

a) Vylít obsah jamek do odpadu, důkladně vše vyklepnout

b) Promývání PBS (zopakovat 5x)

- do každé jamky 250  $\mu$ L PBS (standardní)

- promíchat, vylít do odpadu, vyklepnout, (případně použít promývačku)

c) Krytí desek anti-Adda protilátkou (AD4G2)=MAb:

Zamraženou 10x zředěnou MAb (1dílní MAb:9dílní PBS:glycerol) v Eppendorfově zkumavce (-18°C) rozmrazit a důkladně promíchat (vortexovat).

Připravit potřebné množství MAb 2000x zředěné tzn. 10x zředěnou zásobní MAb zředíme ještě 200x v koncentrovaném 80 mM PBS (tj. 1dílní zamražená 10x ředěná MAb z eppendorfky / 299dílní pufru). Důkladně promíchat – vortexovat.

Dávkovat po 250  $\mu$ L/jamku.

Zbytky rozmražené MAb uložit do mrazáku a co nejdříve zpracovat!

d) Mikrodestičku překrýt folií - (případně víčkem a alobalem) a na třepačce nechat 60 minut mírně míchat. (pozn. délka inkubace je závislá na TMB, které bude použito ke vzniku barevné reakce – TMB od firmy TESTLINE – 60min), délku inkubace při použití TMB od jiného výrobce je lepší předem optimalizovat.

e) Vylít obsah jamek do odpadu, důkladně vše vyklepnout

f) Promývání PBS + TWEEN 0.05% (zopakovat 5x)

- do každé jamky 250  $\mu$ L PBS+TWEEN

- promíchat, vylít do odpadu, vyklepnout, případně použít promývačku

g) Dávkování blokačního roztoku

Do každé jamky dávkovat 20  $\mu$ L 1M TRIS+BSA/EDTA multikanálovou pipetou (koncentrovaný TRIS - blokační roztok, uložený v lednici, předem vytemperovat na laboratorní teplotu).

h) Dávkování vzorků

Dopředu mít připravené kalibrační roztoky a blank = destilovaná H<sub>2</sub>O (koncentrace microcystinu-LR 0.125, 0.5 a 2  $\mu$ g/L je vhodné připravit ředěním z koncentrovaného roztoku MC-LR 2 $\mu$ g/mL v den analýzy, je třeba dbát na dobré promíchání roztoků - vortexování, zásobní roztok MC-LR 2 $\mu$ g/mL uchovávat v mrazáku ve skleněné nádobce).

Dopředu mít připravené vzorky (SOP-CCT-CYANOTOX-MC-001-002- 008), před analýzou vzorků volné vody nutno zcentrifugovat 15000ot./min 10min., aby se odstranila případná biomasa a nečistoty, zlepšit se tím reprodukovatelnost výsledků.

*Ředění vzorku je nutné zejm. u vzorků, ve kterých lze očekávat koncentrace vyšší než maximální koncentrace v kalibraci (tj. > 2  $\mu$ g/L). Po ředění **5-10x** by se koncentrace vzorku měla dostat do kalibračního rozsahu metody.*

IHNED po dávkování blokačního roztoku přidávat vzorky přenesením 200  $\mu\text{L}$  z pomocné desky multikanálovou pipetou, do které byly vzorky a kalibrační roztoky (MC-LR 0.125 / 0.5 / 2  $\mu\text{g/L}$ ) a blank (destilovaná  $\text{H}_2\text{O}$ ) předem napipetovány v triplicátech a s rezervou 200+30  $\mu\text{L}$  v analyzovaném pořadí. Pozor na výměnu špiček při přenášení různých vzorků. Promíchat na desce stolu kruhovým pohybem a inkubovat 40 minut na kývačce s nejnižšími otáčkami, opět zakryté folií, víčkem a alobalem.

i) Dávkování konjugátu MC-HRP.

*Zásobní roztok MC-HRP je rozplněn a uložen při teplotě  $-18^\circ\text{C}$ . Před použitím rozmrazit a důkladně promíchat (vortexovat, min. 30s). Stále uchovávat ve tmě (zakryté alobalem).*

Připravit potřebné množství konjugátu MC-HRP 300x ředěného v 0.1M TRIS pufru (ředění 300x, tj. 1:299 v pufru 0.1 M TRIS).

Dávkovat multikanálovou pipetou do každé jamky po 50  $\mu\text{L}$  konjugátu.

Promíchat na desce stolu kruhovým pohybem a inkubovat 15 minut (maximálně 15 minut) na třepačce při nejnižší frekvenci třepání zakryté víčkem a alobalem před světlem.

j) Obsah jamek odsát multikanálovou pipetou, nevyklepávat, zmenší se riziko kontaminace sousedních jamek.

k) Promývání PBS + TWEEN (zopakovat 5x)

- do každé jamky 250  $\mu\text{L}$  PBS+TWEEN

- promíchat, vylít do odpadu, vyklepnout, eventuálně použít promývačku

-po posledním promytí důkladně vše vyklepnout - poklepáním na podložku/filtr. papír

l) Přidávání substrátu (tj. TMB) pro enzymatickou reakci HRP

Do každé jamky přidat 175  $\mu\text{L}$  substrátu (TMB) multikanálovou pipetou - je uchováván v lednici  $4^\circ\text{C}$ , předem třeba vytemperovat na teplotu laboratoře.

Inkubovat cca 5 až 15 minut - sledovat vývoj modré barvy (!!!)

*V případě rychlé reakce je lepší reakci zastavit dříve pro dobré odlišení negativní kontroly a MC:*

*NEGATIVNÍ KONTROLA (výrazná barva)*

*nejvyšší koncentrace MC 2.0  $\mu\text{g/L}$  (nejpomalejší reakce - málo barvy)*

m) Zastavit reakci přidávkem 75  $\mu\text{L}$  5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (v/v) multikanálovou pipetou ve stejném pořadí v jakém se dávkovala barva.

n) Promíchat a změřit Absorbanci na mikrodestičkovém spektrofotometru TECAN – Genios – v režimu dual 420 / 660 nm.

Výstup - protokol / výpočet

- spočítat průměrné hodnoty  $A_{420/660}$

NEG. KONTROLA / MC 0.125 / MC 0.5 / MC 2 / VZOREK

- spočítat %A (vůči negativní kontrole) pro jednotlivé vzorky/kalibrace:

$\%A = (A_{\text{vzorek}} / A_{\text{neg. kontrola}}) \times 100 [\%]$

- v Excelu vytvořit kalibrační křivku  $A_{420/660} = a \cdot \ln(\text{MC}) + b$



### Výpočet výsledku

1) Je-li  $A_{420/660\_VZOREK} \geq A_{420/660\_NEG. KONTROLA}$

=> koncentrace je  $< 0.125 \mu\text{g/L}$  (tj.  $< \text{LOD}$ )

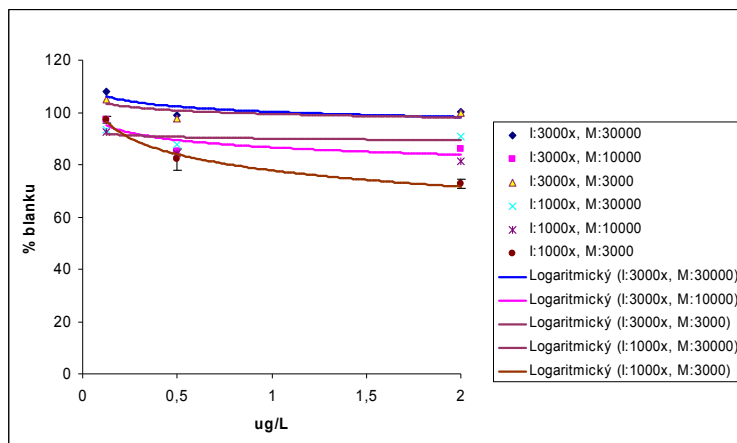
2) Je-li  $A_{420/660\_VZOREK}$  v rozmezí kalibrační křivky

=> dosadí se  $A_{\_vzorek}$  do rovnice kalibrační závislosti a odečte se koncentrace [ $\mu\text{g/L}$ ]

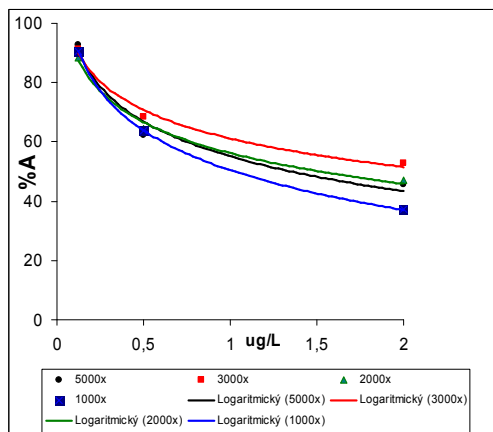
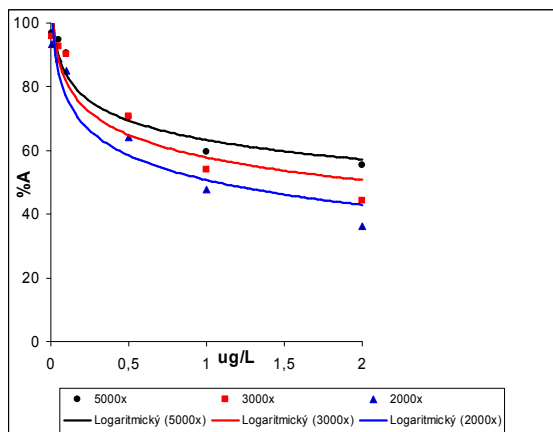
3) Je-li  $A_{420/660\_VZOREK} < A_{420/660\_MC2}$

=> koncentrace ve vzorku je  $> 2 \mu\text{g/L}$  a vzorek je třeba ředit, aby se koncentrace (a tím absorbance) dostala do rozmezí kalibrační křivky

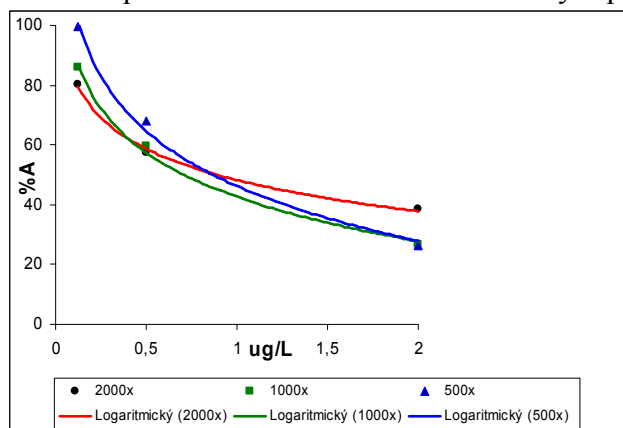
## Výsledky



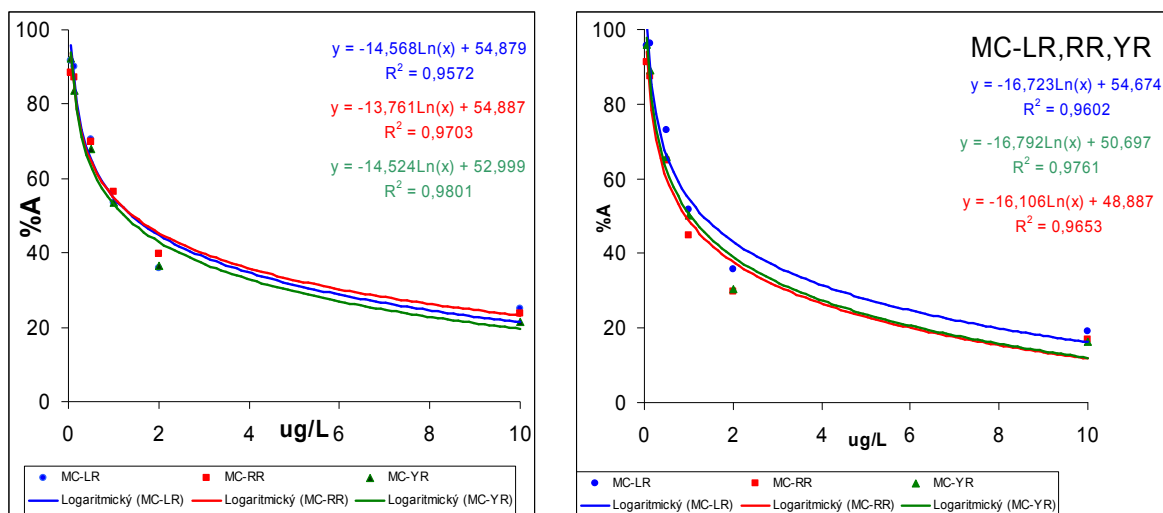
**Graf 1:** Výsledné kalibrační křivky pro koncentrace microcystinu 0,125-2 ug/L při ředění první protilátky IgG(I) v ředění 3.000x, 1.000x a druhé protilátky MAb(M) 30.000x, 10.000x a 3.000x.



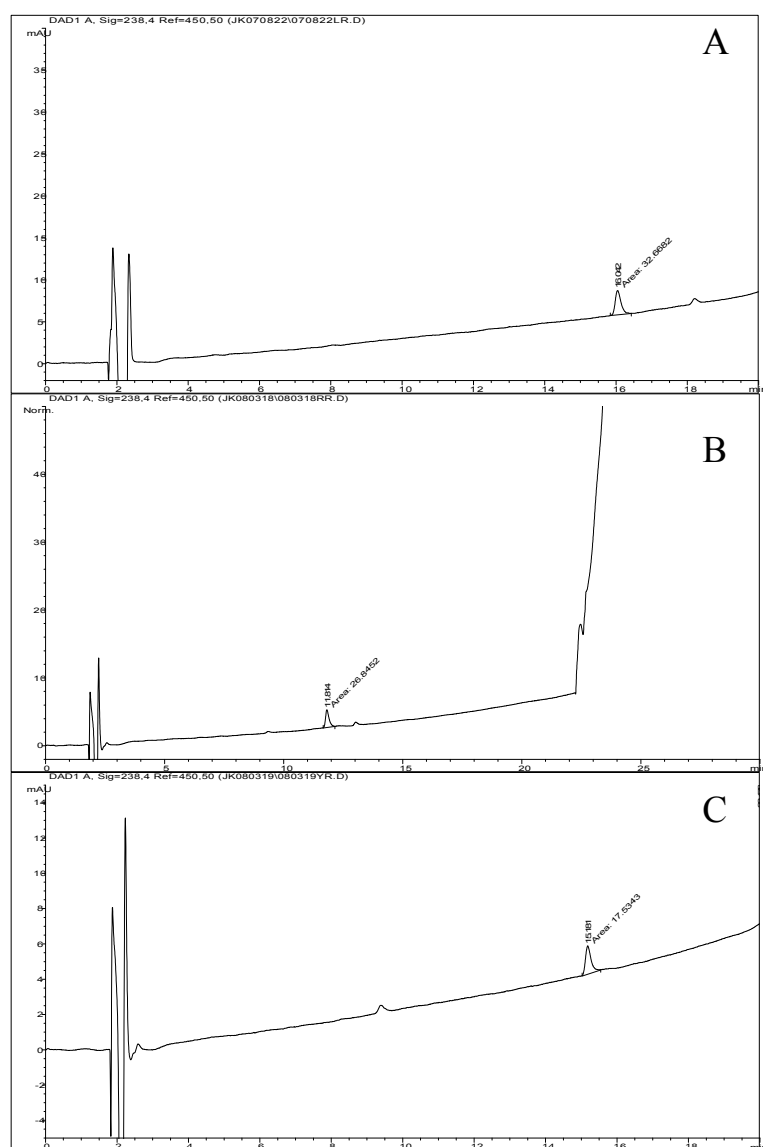
**Graf 2:** V grafu výsledné kalibrační křivky pro koncentrace microcystinu 0,125-2 ug/L při ředění druhé protilátky (MAb) 5.000x, 3.000x a 2.000x. První protilátka (IgG) použita v ředění 2.000x. Měření bylo provedeno v duplikátu.



**Graf 3 :** V grafu výsledné kalibrační křivky pro koncentrace microcystinu 0,125-2 ug/L při ředění druhé protilátky(MAb) 2. 000x, 1.000x a 500x. První protilátka (IgG) v ředění 2.000x.



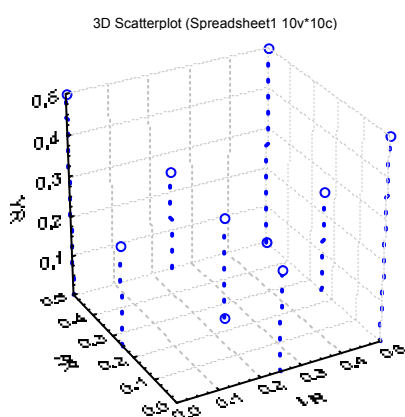
**Graf 4:** Kalibrační křivky tří různých kongenerů microcystinu (-LR,-RR,-YR) v kalibračním rozsahu 0,06-10 $\mu$ g/L.



**Graf 5 :** Chromatogramy kalibračních roztoků microcystinu –LR(A), -RR(B), -YR(C) použitých pro stanovení křížové reaktivity kongenerů microcystin.

Kongener	kalibrační rozmezí (ug/L)	IC50 (ug/L)	Křížová reaktivita relativně k MC-LR (%)	IC50 (ug/L)	Křížová reaktivita relativně k MC-LR (%)
		I. měření		II. měření	
<b>MC-LR</b>	0,06-10	1,320	<b>100</b>	1,398	<b>100</b>
<b>MC-RR</b>	0,06-10	0,933	<b>141</b>	1,426	<b>98</b>
<b>MC-YR</b>	0,06-10	1,042	<b>127</b>	1,229	<b>114</b>

**Tabulka 2 :** Testované kalibrační rozmezí, koncentrace odpovídající 50% blanku a vypočtená křížová reaktivita pro microcystiny-LR,-RR, -YR.

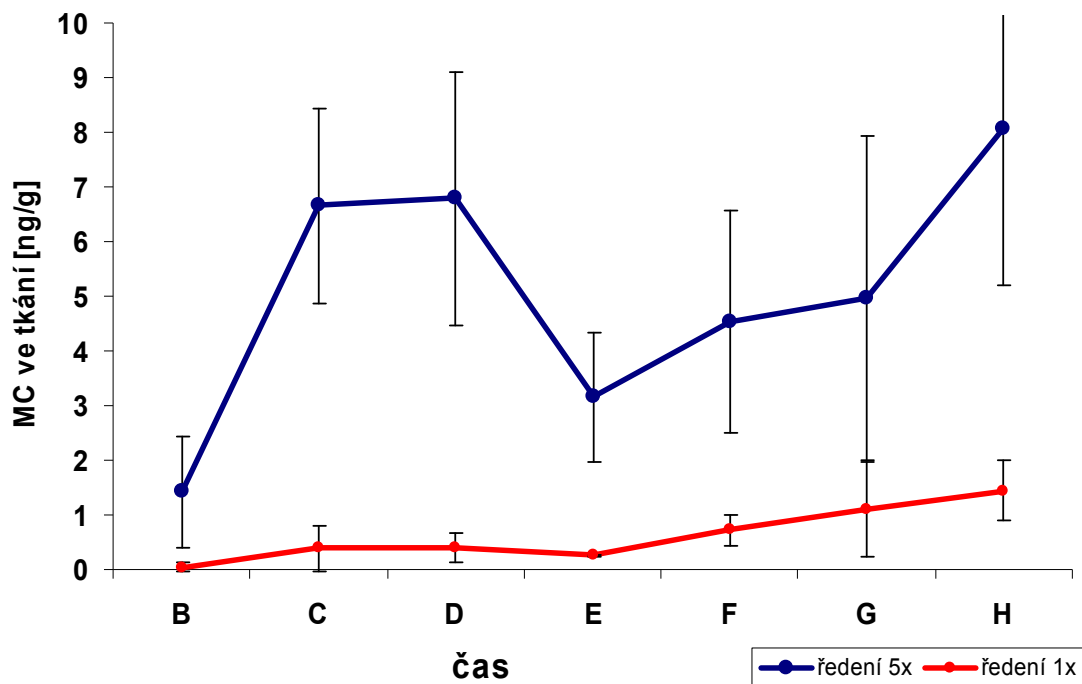


číslo vzorku	MC-LR (ug/L)	MC-RR (ug/L)	MC-YR (ug/L)
1	0,25	0,25	0
2	0	0,25	0,25
3	0,25	0	0,25
4	0,5	0,5	0
5	0	0,5	0,5
6	0,5	0	0,5
7	0,5	0,5	0,5
8	0,25	0,25	0,25
9	0,25	0,5	0,25
10	0,5	0,25	0,25

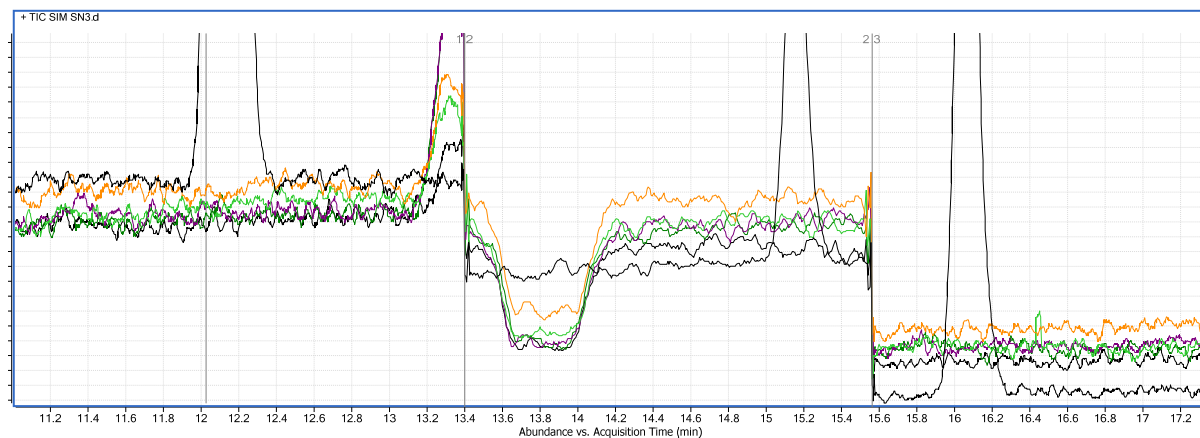
**Graf 6:** 3D grafická podoba zastoupení jednotlivých kongenerů microcystinu v experimentálně připravených vzorcích. Zastoupení jednotlivých kongenerů ve vzorcích ukazuje tabulka vpravo.

	I.mereni	II.mereni			
vzorek č.	Výsledná koncentrace I. [ug/L]	Výsledná koncentrace II. [ug/L]	Průměr měření [ug/L]	Teoretický výsledek se započtenou křížovou reaktivitou [ug/L]	rozdíl mezi naměřenou a teoretickou hodnotou [ug/L]
1	0,17	0,14	0,15	0,18	<b>-0,03</b>
2	0,12	0,15	0,13	0,20	<b>-0,07</b>
3	0,15	0,15	0,15	0,18	<b>-0,03</b>
4	0,51	0,19	0,35	0,37	<b>-0,02</b>
5	0,39	0,18	0,28	0,40	<b>-0,12</b>
6	0,31	0,17	0,24	0,37	<b>-0,12</b>
7	0,37	0,38	0,37	0,57	<b>-0,19</b>
8	0,16	0,24	0,20	0,28	<b>-0,08</b>
9	0,25	0,21	0,23	0,38	<b>-0,16</b>
10	0,25	0,25	0,25	0,37	<b>-0,11</b>
			<b>průměr</b>		<b>-0,09</b>

**Tabulka 3:** Tabulka ukazuje výsledky měření jednotlivých experimentálních vzorků, jejich průměr a odchylky od vypočtené teoretické koncentrace. Teoretická koncentrace byla vypočtena pro průměrnou křížovou reaktivitu MC-RR 119,5% a -YR 120,5%.



**Graf 7:** Výsledky dvou měření koncentrací microcystinů v hepatopancreatu ryb z Novoveského rybníka v čase při různých ředěních vzorku. Měření provedeno metodou anti-Adda Elisa. Naměřené koncentrace neodpovídají analyzovanému obsahu microcystinu v hepatopancreatu měřeného podle metody LC-MS, který MC v žádném ve vzorku nedetekoval.



**Graf 8 :** Chromatogram vzorků hepatopancreatu ryb z Novoveského rybníka a čistých standardů microcystinů –LR, -RR, -YR. Černá linka značí odezvu detektoru čistých standardů. Ostatní označují vzorky ryb. U žádného vzorku nebyl microcystin detekován.

Kód odběru	Suma ALL (biomasa, µg/g DW) <sup>a</sup>	MC-RR (biomasa, µg/g DW) <sup>a</sup>	MC-YR (biomasa, µg/g DW) <sup>a</sup>	MC-LR (biomasa, µg/g DW) <sup>a</sup>	Lokalita	Datum odběru	Část lokality	koncentrace měřena MC-LR ELISA [ug/L]	koncentrace měřena Anti-Adda ELISA [ug/L]
CCT-07-191					Ludkovice	2007-07-23		0,15	<b>5,86</b>
CCT-07-369					Máchovo	2007-07-02	Klůček	0,73	<b>1,32</b>
CCT-07-405	491,2	328,4	64,2	98,5	Máchovo jezero	2007-07-21	pláž Doksy	1,09	0,25
CCT-07-376	73,0	48,5	0	24,5	Máchovo jezero	2007-07-30	Klůček	1,22	1,13
CCT-07-383	9,0	9,0	0	0	Máchovo jezero	2007-08-27	Klůček	0,29	<b>0,41</b>
CCT-07-441	190,4	126,1	0	64,2	Nechranice	2007-07-26		29,75	2,48
CCT-07-432	168,9	58,6	0	110,3	Skalka	2007-06-16	Podhoří	1,70	<b>2,43</b>
CCT-07-416	1100,3	466,0	204,4	429,8	Skalka	2007-07-06	Hráz	7,74	<b>10,06</b>
CCT-07-415	1074,4	400,8	9,4	664,1	Skalka	2007-08-22	Hráz	19,86	10,90
CCT-07-101	315,7	0	191,0	124,7	Vír	2007-06-06		0,72	<b>1,35</b>
CCT-07-209	955,5	749,7	39,4	166,4	Vír	2007-08-16	Hráz	1,30	<b>1,65</b>
CCT-07-354	719,4	376,3	57,5	285,7	Želivka	2007-08-13	Zahrádka	1,15	0,81
CCT-07-353	887,6	466,1	102,1	319,4	Želivka	2007-08-13	Vojslavice	1,32	<b>3,66</b>

**Tabulka 4:** Seznam vybraných lokality k analýze a jejich suma kongenerů microcystinu –RR,-YR a –LR v biomase sinic i jejich vzájemný poměr. V každé lokalitě byla měřena také volná voda metodou MC-LR ELISA i Anti-adda ELISA (tučným písmem jsou zvýšené hodnoty naměřené oproti MC-LR ELISA).

<sup>a</sup> - hodnoty měřeny pomocí HPLC-DAD

## Diskuze

Primárním cílem projektu bylo sestavit, optimalizovat a zavést metodu anti-Adda ELISA. V navazujících krocích jsme tuto metodu testovali na schopnost analyzovat různé kongenery microcystinu, jejich směsi a schopnost jejich detekce v různých maticích (tkáň, přírodní voda). Záměrem tohoto projektu bylo popsat metodu jako celek, její využití a limitace a tím rozšířit možnosti stanovení cyanotoxinů pro účely kvantifikace, toxokinety, popisu osudu těchto látek a zpřesnění odhadu zdravotních rizik spojenými s microcystiny – toxickými metabolity sinic.

Prvním krokem bylo nalezení vhodných, sobě korelujících koncentrací dvou základních používaných protilátek mající zásadní vliv na úspěšnost měření. První polyklonní protilátka (IgG) sloužící k vazbě na jamku v mikrotitrační desce zatímco druhá monoklonní (MAb, označení AD4G2) váže analyt a jeho enzymově značný analog z roztoku. Podle literárních pramenů jsme odzkoušeli několik různých koncentrací obou protilátek proti sobě ve snaze nalezení nejvhodnějšího poměru. Vysoké ředění bylo odzkoušeno z důvodu lepší využitelnosti protilátek a případné finanční úspory. Odzkoušeno bylo ředění IgG v rozsahu 1000x-3000x zatímco druhá specifická protilátka (MAb) proti microcystinům v rozsahu 30.000-500x (grafy 1-3). Nejlepší kalibrační křivky s ohledem na ředění jsme dostali při ředění IgG 2000x a Mab 3000x-2000x. Kalibrační roztok MC-LR jsme použili v rozsahu 0,125-2 µg/L. Za validní jsme považovali ty kalibrace kde existuje významný rozdíl v hodnotách absorbance (A) negativní kontroly - vysoká A a kalibračního roztoku MC 2 µg/L. Další podmínkou byla hodnota absorbance kalibračního roztoku MC 0,125 nižší než absorbance negativní kontroly (cca 80-95% hodnoty negativní kontroly). Za limit detekce byl zvolen nejnižší kalibrační roztok 0,125 µg/L. Jednotlivé kroky metody byly převzaty z literatury a modifikovány (Zeck et al. 2001; Zeck et al. 2001). Námi navržené ředění protilátek je dostatečně citlivé pro analýzu a výrazně neprodražuje cenu stanovení vzorku.

Pro zjištění míry křížové reaktivity kongenerů microcystinu jsme použili nejčastěji nalézané microcystiny biomase ČR – microcystin –LR, -RR, -YR (Bláhová et al. 2007; Kohoutek et al. 2008). Microcystiny jsme purifikovali pomocí HPLC z biomasy sinic původem z nádrže Nové mlýny. Výsledné čisté látky byly na HPLC přeměřeny a kvantifikovány (graf 5) (Lawton et al. 1994; Lawton and Edwards 2001; Babica et al. 2006). Křížovou reaktivitu kongenerů microcystinu-RR, -YR oproti microcystinu-LR jsme stanovili dle metodiky (Fischer et al. 2001) v kalibračním rozsahu 0,06-10µg/L. Porovnány byly hodnoty koncentrací odpovídající 50% absorbance blanku. Výsledky prvního a druhého měření se výrazně liší u microcystinu-RR kde nabývá hodnot 141-98%, zatímco u microcystinu –YR jsou tyto hodnoty 127-114% (tabulka 2, graf 4). Hodnoty křížové reaktivity microcystinu-RR jsou v našem případě vyšší než udává literatura (50-70%), zatímco hodnoty MC-YR jsou srovnatelné s údaji v literatuře (129-167) (Fischer et al. 2001; Zeck et al. 2001). Problémem stanovení křížových reaktivit protilátky AD4G2 se zabývá jen velmi málo článků, proto nelze jednoznačně říci čím je tato variabilita způsobena.

Protilátka v naší metodě je schopna rozeznávat všech devadesát kongenerů microcystinu a všech pět kongenerů nodularinu (Zeck et al. 2001). Tím se tato metoda stává unikátním nástrojem pro studium toxicity microcystinů. I přes to, že některé vzácnější formy microcystinu mají podobný toxický účinek, norma pro pitnou vodu v ČR se zabývá pouze microcystinem-LR. Přitom v některých případech je toxicita těchto vzácnějších kongenerů vyšší než toxicita nejběžnějšího MC-LR. Obecně lze usuzovat na vztah mezi strukturou a

toxicitou microcystinů. Vliv má například přítomnost variabilní aminokyselina Leu2 ve struktuře microcystinů pro akutní toxicitu a inhibici protein-fosfatáz (PP2A) u myši, zatímco metylace Asp3 je důležitá pro inhibici PP1, nikoli PP2A (Chen et al. 2006). Za rozdíly v akutní toxicitě je také odpovědná rozdílná toxokinetika daných látek v jaterních buňkách. Bylo zjištěno, že toxicita konjugátu microcystinu s cysteinem a glutathionem je výrazně menší než u čistého MC-LR i MC-RR. Nicméně v in-vitro testech je toxicita těchto látek téměř stejná. Za rozdíly zřejmě může rozdílná rychlost příjmu a eliminace těchto látek jaterními buňkami (Ito et al. 2002). V některých případech se v přírodě vyskytuje kongener microcystinu, jehož toxicita je velká, nicméně není běžně stanovovaný. V nádrži s výskytem sinice *Planktothrix rubescens* v jezeře Zurich převládá [D-Asp(3), (E)-Dhb(7)]microcystin-RR. Tento microcystin je však velmi slabý inhibitor protein-fosfatáz, ale v testu s bezobratlým *Thamnocephalus platyurus* se ukázalo, že je mnohem toxicitější než MC-RR, MC-LR, MC-YR, jež byly navzájem porovnatelně toxické (Blom and Juttner 2005). V případě bezobratlých živočichů tedy zřejmě nekoreluje akutní toxicita a inhibice protein-fosfatáz. Jde tedy zřejmě o jiný druh účinku. Otázkou taktéž zůstává vliv hydrofobicity na toxicitu microcystinů. Pozitivní korelace mezi hydrofobicitou a toxicitou byla pozorována v testu s prvokem *Tetrahymena pyriformis*.  $LC_{50}$  se zvyšovala v řadě MC-LR > -LY > -LW, -LF odpovídající zvyšování log KOW (2.16, 2.92, 3.46, 3.56) zřejmě v důsledku lepšího biopříjmu hydrofobních microcystinů (Ward and Codd 1999). Negativní korelace byla popsána u rostlin kde docházelo k lepšímu příjmu MC-RR oproti MC-LR, MC-LY, MC-LW, MC-LF (McElhiney et al. 2001).

Microcystiny jsou velice variabilní molekuly u kterých můžeme předpokládat aditivní model toxického působení (Fischer et al. 2001). Při jejich stanovení proto nesmíme opomíjet i méně časté microcystiny, které se rutinně nestanovují, nebo stanovit nejdou kvůli metodám s vysokým detekčním limitem, nebo neexistujícím standardům (HPLC, LC-MC). Podle odzkoušených kongenerů se domníváme, že metoda Anti-Adda ELISA je dostatečně citlivá pro kongenery obsahující nemodifikovanou aminokyselinu 6E-Adda ve struktuře microcystinu, která je zodpovědná za toxický účinek. Není však jednoznačné jestli jsme schopni zachytit i méně časté varianty Adda, která má na C-9 hydroxylovou nebo aceto skupinu místo methoxy skupiny.

V rámci validace metody jsme připravili několik experimentálních vodných vzorků s různým obsahem MC-LR, MC-RR, MC-YR. Koncentrace byly navrženy tak, aby byly enviromentálně relevantní a byly v kalibračním rozsahu 0,125-2 ug/l (graf 6). Pro zpřesnění výsledku bylo toto měření provedeno v duplikátu. Pokud by jsme brali v úvahu námi stanovenou křížovou reaktivitu, pak se výsledky měření mohou jevit jako mírně podhodnocené (tabulka 3). Každý vzorek je vždy měřen v triplicátu mezi kterými existuje určitá variabilita stejně jako mezi jednotlivými měřeními, tím lze odchylky měření vysvětlit. Nedostatkem imunoanalytických metod je určitá mírná nespecifičnosti vazby látek ve vzorku na protilátky. Tím je v některých případech ovlivněn výsledek. Pro ověření možnosti použití této metody pro stanovení MC v tkáních byly využity tkáň hepatopancreatu ryb z Novoveského rybníka, kde se během loňského roku (07-10/2007) odebírali vzorky ryb (5ks v každé ze sedmi skupin). V Novoveském rybníce se během této sezóny vyskytovali microcystin produkující sinice, proto jsme očekávali, že tyto ryby budou mít v hepatopancreatu naakumulované microcystiny. Při analýze hepatopancreatu ryb metodou ELISA s různým ředěním vzorku se ukázalo, že výsledná koncentrace MC ve vzorcích roste v závislosti na ředění vzorku. Lze se tedy domnívat, že samotné měření je ovlivněno maticí vzorku, která je u obou měření stejná a výsledná koncentrace MC ve vzorku roste jen díky přepočtu na vyšší ředění (graf 7). Pro ověření správnosti domněnky jsme všechny vzorky



přeměřili s použitím kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem s dvojitým kvadrupólem (LC-MS). Koncentrace, měřené metodou ELISA ve vzorcích ryb, se teoreticky pohybovali v rozmezí 1,4-8,1 ng MC / g tkáně (průměr všech změřených koncentrací 5,1 ng/g). Tyto koncentrace by tedy byly nad detekčním limitem LC-MS, který jsme stanovili na 1,5 ng/g. Tento detekční limit je porovnatelný s metodou ELISA. Měřením metodou LC-MS jsme v žádném ze vzorků microcystin neprokázali (graf 8). Vzhledem k tomu, že ve vzorcích nebyl stanoven microcystin domníváme se, že výsledky měření metou ELISA ukazují na velký vliv matrice, která je sama o sobě velmi variabilní. Při takto nízkých koncentracích je naše metoda velmi málo použitelná. Možným řešením by bylo použití velkého ředění vzorku, při kterém by se mohl vliv matrice redukovat, nicméně by jsme ztratili výhodu nízkého detekčního limitu. Na možnost nespecifickou interakci protilátky s jinou molekulou než microcystinem, popřípadě nodularinem, upozorňují některé studie (Sipia et al. 2001; Kankaanpaa et al. 2002 ). Naproti tomu v jiné studie s microcystinem autor pozoruje dobrou shodu mezi ELISA a HPLC a daný efekt nepozorují (Ernst et al. 2005). Mírná nesrovnalost mezi HPLC a ELISA může spočívat spíše v možnosti stanovení konjugátů microcystinu a nodularinu pomocí ELISA, zatímco metodou HPLC by to bylo velmi obtížné (Metcalf et al. 2000; Kankaanpaa et al. 2002). Někteří autoři doporučují stanovit pomyslný limit detekce, který by byl nad úrovní falešně-positivních efektů matrice – 10-20 ng/g tkáně u nodularinu (Sipia et al. 2001; Kankaanpaa et al. 2002). V dostupné literatuře nenejdeme dostatek podrobných informací o matrix-asociovaných efektech při stanovení microcystinu metodou ELISA. Do této problematiky, stejně jako do problematiky limitace metody ELISA, přispívají i výsledky našich experimentů.

Pro ověření možnosti měřit celkovou sumu microcystinů jsme vybrali vzorky vod z nádrží v ČR u kterých známe poměr microcystinů –RR, -YR, -LR v biomase sinic stanovený pomocí HPLC. Přítomnost těchto kongenerů předpokládáme i ve stanovované volné vodě ze stejné lokality a data jako v případě biomasy. Z výsledků měření experimentálních vzorků je vidět zvýšení koncentrace sumy microcystinů měřené pomocí metody anti-Adda ELISA než pomocí metody MC-LR ELISA (8 z 13 vzorků, tabulka 4). Naměřené vyšší koncentrace MC jsou především u vzorků vod se zvýšeným obsahem kongenerů –RR a –YR v biomase. Průměrné zvýšení koncentrace je 1,7x což odpovídá našim předpokladům o schopnosti protilátky měřit spektrum kongenerů s vyšší účinností popřípadě o schopnosti měřit případně fragmenty, nebo biokonjugáty obsahující Adda (Fischer et al. 2001). V minulosti jsme se setkali s několika případy úmrtí lidí v důsledku otravy vod toxiny sinic. Při rozvoji sinic rodu *Anabaena* a *Microcystis* v jezeře Itaparica (Brazílie) došlo v důsledu kontaminace pitné vody k 2000 případů gastroenteritidy a 88 případům smrti, většinou dětí (Dietrich and Hoeger 2005; Apeldoorn et al. 2007) . Studií akutních otrav existuje celá řada, nicméně více nebezpečné jsou otravy chronické, trvající po delší časové období. Velký výskyt rakoviny jater v Číně je přisuzován právě dlouhodobému pití vody z kontaminovaného zdroje cyanobakteriálními hepatotoxiny (microcystiny), které způsobují promoci karcinogeneze v játrech (Ueno et al. 1996; Cummings 2002; Hoeger et al. 2002).

Naši metodou jsme schopni reálněji vystihnout skutečný obsah microcystinů ve vodě a tím zpřesnit odhad zdravotních rizik souvisejících s obsahem microcystinů. To je důležité v případě, že se jedná o zdroj pitné vody, nebo o pitnou vodu samotnou. Obsah microcystinů v přírodních vodách ČR se běžně stanovuje metodou MC-LR ELISA používající protilátky (MC10E7) tedy pouze proti kongenerům obsahující v pozici 4 peptidového kruhu arginin (Zeck et al. 2001). Tato metoda je běžně dostupná v komerčním kitu (Envirologix, Biosense). Nevýhodou těchto kitů je cena, nízká citlivost pro ostatní microcystiny a neschopnost detekovat nodulariny. Optimalizovaná metoda anti-Adda je schopna měřit všech 90

strukturních variant microcystinů a 5 variant nodularinů a její cena je výrazně nižší než běžně používané metody (Fischer et al. 2001; Zeck et al. 2001). Detekční limit 0,125 µg/L je dostačující pro měření těchto látek v přírodních vodách, z hlediska doporučení WHO. Velkou výhodou je možnost měření microcystinů bez nutnosti zkoncentrování vzorků. Přítomnost microcystinu ve vodách ČR ukazuje, že tato teoretická forma intoxikace člověka by měla být nadále monitorována a neměla být podceňena. K této problematice a řešení problémů spojenými s cyanotoxiny doufejme přispěje i tato metoda.

## **Literatura**

- Amorim, A. and V. Vasconcelos (1999). "Dynamics of microcystins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*." *Toxicon* 37(7): 1041-1052.
- Apeldoorn, M. E. v., H. P. v. Egmond, et al. (2007). "Toxins of cyanobacteria." *Mol.Nutr.Food Res.*: 7-60.
- Azevedo, S. M. F. O., W. W. Carmichael, et al. (2002). "Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru--Brazil." *Toxicology* 181-182: 441-446.
- Babica, P., J. Kohoutek, et al. (2006). "Evaluation of extraction approaches linked to ELISA and HPLC for analyses of microcystin-LR, -RR and -YR in freshwater sediments with different organic material contents." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385(8): 1545-1551.
- Bláhová, L., Babica P., et al. (2007). "Analyses of cyanobacterial toxins (microcystins, cylindrospermopsin) in the reservoirs of the Czech Republic and evaluation of health risks." *Environmental Chemistry Letters*.
- Blom, J. F. and F. Juttner (2005). "High crustacean toxicity of microcystin congeners does not correlate with high protein phosphatase inhibitory activity." *Toxicon* 46(4): 465-470.
- Briand, J. F., S. Jacquet, et al. (2003). "Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems." *Veterinary Research* 34(4): 361-377.
- Carmichael, W. W. (1992). "Cyanobacteria Secondary Metabolites - the Cyanotoxins." *Journal of Applied Bacteriology* 72(6): 445-459.
- Carmichael, W. W. (1994). "The toxins of cyanobacteria." *Scientific American* 270(1): 78-86.
- Carmichael, W. W. (2001). "Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria: "The CyanoHABs"." *Human and Ecological Risk Assessment* 7(5): 1393-1407.
- Codd, G. A., C. Edwards, et al. (1992). "Fatal Attraction to Cyanobacteria." *Nature* 359(6391): 110-111.
- Cummings, M. (2002). "EVALUATION OF MICROCYSTIN ENZYME-BASED ANALYTIC TECHNIQUES AND MICROCYSTIN OCCURRENCE IN THE METROPHOENIX, ARIZONA WATER SUPPLY SYSTEM." A Thesis Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Master of Science.
- Dietrich, D. and S. Hoeger (2005). "Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): a reasonable or misguided approach?" *Toxicology and Applied Pharmacology* 203(3): 273-289.
- Ding, W.-X. and C. N. Ong (2003). "Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity - MiniReview." *FEMS Microbiology Letters* 220(1): 1-7.

- Duy, T. N., P. K. S. Lam, et al. (2000). "Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water." *Rev Environ Contam Toxicol* 163: 113-186.
- Engstrom-Ost, J., M. Lehtiniemi, et al. (2002). "Does cyanobacterial toxin accumulate in mysid shrimps and fish via copepods?" *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 276(1-2): 95-107.
- Eriksson, J. E., L. Grönberg, et al. (1990). "Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR a cyclic peptide toxin." *Biochimica et Biophysica Acta* 1025: 60-66.
- Ernst, B., L. Dietz, et al. (2005). "Recovery of MC-LR in fish liver tissue." *Environmental Toxicology* 20(4): 449-458.
- Falconer, I. R., M. Burch, et al. (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., M. D. Burch, et al. (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." *Environmental Toxicology and Water Quality* 9(2): 131-139.
- Falconer, I. R., J. V. Smith, et al. (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., J. V. Smith, et al. (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(3): 291-305.
- Fawell, J. K., C. P. James, et al. (1994). *Toxins from blue-green algae: toxicological assessment of microcystin-LR and a method for its determination in water*, Water Research Center.
- Ferenčík, M. (1989). *Imunochémia*. Bratislava, Vydavateľstvo technickej a ekonomickej literatúry.
- Ferrao, A. D., B. Kozłowsky-Suzuki, et al. (2002). "Accumulation of microcystins by a tropical zooplankton community." *Aquatic Toxicology* 59(3-4): 201-208.
- Fischer, W. J., S. Altheimer, et al. (2005). "Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin." *Toxicology and Applied Pharmacology* 203(3): 257-263.
- Fischer, W. J., I. Garthwaite, et al. (2001). "Congener-independent immunoassay for microcystins and nodularins." *Environmental Science & Technology* 35(24): 4849-4856.
- Fitzgeorge, R., S. Clark, et al. (1994). *Routes of intoxication. Detection methods for cyanobacterial toxins*. G. A. Codd, T. M. Jefferies, C. Keevil and E. Potter, The Royal Society of Chemistry: 69-74.
- Fitzgerald, D. J. (2001). *Cyanotoxins and human health - overview*. Cyanotoxins - Occurrence, Causes, Consequences. I. Chorus. Berlin, Springer-Verlag: 179-190.
- Gehring, M. M. (2004). "Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response." *FEBS Letters* 557(1-3): 1-8.
- Harada, K., F. Kondo, et al. (1999). *Laboratory analysis of cyanotoxins. Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management*. I. Chorus and J. Bartram. London, E&FN Spon: 369-399.
- Hoeger, S. J., D. R. Dietrich, et al. (2002). "Effect of ozonation on the removal of cyanobacterial toxins during drinking water treatment." *Environmental Health Perspectives* 110(11): 1127-1132.

- Chen, T., X. Zhao, et al. (2004). "Analysis of immunomodulating nitric oxide, iNOS and cytokines mRNA in mouse macrophages induced by microcystin-LR." *Toxicology* 197(1): 67-77.
- Chen, Y. M., T. H. Lee, et al. (2006). "Comparison of protein phosphatase inhibition activities and mouse toxicities of microcystins." *Toxicon* 47(7): 742-746.
- Chorus, I. (2004). A new WHO approach called "Water Safety Plans": how does it work for cyanotoxins? 6th International Conference On Toxic Cyanobacteria, Bergen, Norway.
- Chorus, I. and J. Bartram (1999). *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. London, E&FN Spon.
- Chorus, I., I. R. Falconer, et al. (2000). "Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters." *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 3: 323-347.
- Ito, E., A. Takai, et al. (2002). "Comparison of protein phosphatase inhibitory activity and apparent toxicity of microcystins and related compounds." *Toxicon* 40(7): 1017-1025.
- Kalina, T. (1997). *Systém a vývoj sinic a řas*. Praha, Univerzita Karlova, Vydavatelství Karolinum.
- Kankaanpaa, H., P. J. Vuorinen, et al. (2002). "Acute effects and bioaccumulation of nodularin in sea trout (*Salmo trutta m. trutta* L.) exposed orally to *Nodularia spumigena* under laboratory conditions." *Aquatic Toxicology* 61(3-4): 155-168.
- Kohoutek, J., P. Babica, et al. (2008). "A novel approach for monitoring of cyanobacterial toxins: development and evaluation of the passive sampler for microcystins." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390(4): 1167-1172.
- Kuiper-Goodman, T., I. R. Falconer, et al. (1999). *Human health aspects. Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management*. I. Chorus and J. Bartram. London, E&FN Spon: 113-153.
- Lankoff, A., W. W. Carmichael, et al. (2004). "The uptake kinetics and immunotoxic effects of microcystin-LR in human and chicken peripheral blood lymphocytes in vitro." *Toxicology* 204(1): 23-40.
- Lawton, L. A. and C. Edwards (2001). "Purification of microcystins - review." *Journal of chromatography A* 912: 191-209.
- Lawton, L. A., C. Edwards, et al. (1994). "Extraction and high-performance liquid chromatographic method for determination of microcystins in raw and treated waters." *Analyst* 119: 1525-1530.
- MacKintosh, C., K. Beattie, et al. (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.
- Magalhaes, V. F., M. M. Marinho, et al. (2003). "Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ)." *Toxicon* 42(3): 289-295.
- Magalhaes, V. F., R. M. Soares, et al. (2001). "Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk." *Toxicon* 39(7): 1077-1085.
- Maršálek, B., V. Keršner, et al. (1996). *Vodní květy sinic*. Brno, Nadatio Flos-aque: 141.
- McElhiney, J., L. A. Lawton, et al. (2001). "Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure." *Toxicon* 39(9): 1411-1420.
- Meriluoto, J., B. Kincaid, et al. (1998). "Electrochemical detection of microcystins, cyanobacterial peptide hepatotoxins, following high-performance liquid chromatography." *Journal of Chromatography A* 810(1-2): 226-230.

- Meriluoto, J. A. O. (2004). Detection methods for cyanobacterial toxins. 6th International Conference On Toxic Cyanobacteria, Bergen, Norway.
- Metcalf, J. S., K. A. Beattie, et al. (2000). "Immuno-crossreactivity and toxicity assessment of conjugation products of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR." *FEMS Microbiology Letters* 189(2): 155-158.
- Mikhailov, A., A.-S. Harmala-Brasken, et al. (2003). "Identification of ATP-synthase as a novel intracellular target for microcystin-LR." *Chemico-Biological Interactions* 142(3): 223-237.
- Mohamed, Z. A., W. W. Carmichael, et al. (2003). "Estimation of microcystins in the freshwater fish *Oreochromis niloticus* in an Egyptian fish farm containing a *Microcystis* bloom." *Environmental Toxicology* 18(2): 137-141.
- Mur, L. R., O. M. Skulberg, et al. (1999). *Cyanobacteria in the environment. Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. I. Chorus and J. Bartram. London, WHO & E&FN Spon: 15-40.
- Nagata, S., T. Tsutsumi, et al. (1995). "Determination of Microcystin in Environmental Water by Highly Sensitive Immunoassay." *Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health* 41(1): P10-P10.
- Orr, P. T., G. J. Jones, et al. (2003). "Exposure of beef cattle to sub-clinical doses of *Microcystis aeruginosa*: toxin bioaccumulation, physiological effects and human health risk assessment." *Toxicol* 41: 613-620.
- Poon, G. K., L. J. Griggs, et al. (1993). "Liquid-Chromatography Electrospray Ionization Mass-Spectrometry of Cyanobacterial Toxins." *Journal of Chromatography* 628(2): 215-233.
- Rantala, A., D. P. Fewer, et al. (2004). "Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(2): 568-573.
- Rapala, J., K. Erkoma, et al. (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(2): 213-231.
- Saito, S., Y. Nakano, et al. (1994). "Cross-Reactivity and Neutralizing Ability of Monoclonal-Antibodies against Microcystins." *Microbiology and Immunology* 38(5): 389-392.
- Shimizu, M., Y. Iwasaki, et al. (1995). "New Fluorogenic Dienophile - Synthesis, Reaction with Vitamin-D, Vitamin-a and Microcystins, and Application to Fluorometric Assays." *Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 115(8): 584-602.
- Sipia, V., H. Kankaanpaa, et al. (2001). "Detection of Nodularin in flounders and cod from the Baltic Sea." *Environmental Toxicology* 16(2): 121-126.
- Sipia, V. O., H. T. Kankaanpaa, et al. (2001). "Time-dependent accumulation of cyanobacterial hepatotoxins in flounders (*Platichthys flesus*) and mussels (*Mytilus edulis*) from the northern Baltic Sea." *Environmental Toxicology* 16(4): 330-336.
- Sivonen, K. and G. Jones (1999). "Cyanobacterial toxins." *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management*: 41-111.
- Sivonen, K. and G. Jones (1999). *Cyanobacterial toxins. Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management*. I. Chorus and J. Bartram. London, E&FN Spon: 41-111.
- Soares, R. M., V. F. Magalhaes, et al. (2004). "Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions." *Aquatic Toxicology* 70(1): 1-10.

- Spoof, L., P. Vesterkvist, et al. (2003). "Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* 1020(1): 105-119.
- Tang, E. P. Y., R. Tremblay, et al. (1997). "Cyanobacterial dominance of polar freshwater ecosystems: Are high-latitude mat-formers adapted to low temperature?" *Journal of Phycology* 33(2): 171-181.
- Thostrup, L. and K. Christoffersen (1999). "Accumulation of microcystin in *Daphnia magna* feeding on toxic *Microcystis*." *Archiv Fur Hydrobiologie* 145(4): 447-467.
- Toivola, D. M. and J. E. Eriksson (1999). "Toxins affecting cell signalling and alteration of cytoskeletal structure." *Toxicology in Vitro* 13(4-5): 521-530.
- Tsutsumi, T., S. Nagata, et al. (1998). "Anti-idiotypic monoclonal antibodies against anti-microcystin antibody and their use in enzyme immunoassay." *Toxicon* 36(2): 235-245.
- Ueno, Y., S. Nagata, et al. (1996). "Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay." *Carcinogenesis* 17(6): 1317-1321.
- Ward, C. J. and G. A. Codd (1999). "Comparative toxicity of four microcystins of different hydrophobicities to the protozoan, *Tetrahymena pyriformis*." *Journal of Applied Microbiology* 86(5): 874-882.
- WHO (1998). Guidelines for drinking water quality. Geneva, World Health Organisation.
- WHO (1998). Guidelines for drinking water quality. Geneva, World Health Organisation.
- WHO (1999). "Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management."
- Wiegand, C. and S. Pflugmacher (2005). "Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review." *Toxicology and Applied Pharmacology* 203(3): 201-218.
- Williams, D. E., S. C. Dawe, et al. (1997). "Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, *Mytilus edulis*, and in vivo evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues." *Toxicon* 35(11): 1617-1625.
- Yoshida, T., Y. Makita, et al. (1997). "Acute oral toxicity of microcystin-LR, a cyanobacterial hepatotoxin, in mice." *Natural Toxins* 5: 91-95.
- Zeck, A., A. Eikenberg, et al. (2001). "Highly sensitive immunoassay based on a monoclonal antibody specific for [4-arginine]microcystins." *Analytica Chimica Acta* 441: 1-13.
- Zeck, A., M. G. Weller, et al. (2001). "Generic microcystin immunoassay based on monoclonal antibodies against Adda." *Analyst* 126: 2000-2007.
- Zegura, B., T. T. Lah, et al. (2004). "The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage." *Toxicology* 200(1): 59-68.
- Zegura, B., B. Sedmak, et al. (2003). "Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2." *Toxicon* 41(1): 41-48.
- Zhan, L., M. Honma, et al. (2003). "Genotoxicity induced by microcystin-LR in human TK6 lymphoblastoid cells." *Toxicology* 191(1): 37-37.
- Zhan, L., H. Sakamoto, et al. (2004). "Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 557(1): 1-6.
- Zurawell, R. W., H. R. Chen, et al. (2005). "Hepatotoxic cyanobacteria: A review of the biological importance of microcystins in freshwater environments." *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews* 8(1): 1-37.