

CYLINDROSPERMOPSIN

Nový alkaloidní toxin produkováný sinicemi: toxikologie a analýzy

Lucie Bláhová

M. Oravec, Z. Šimek, L. Šejnohová,
B. Maršálek, L. Bláha

Centrum pro Cyanobakterie a jejich Toxiny
Brno, Czech Republic

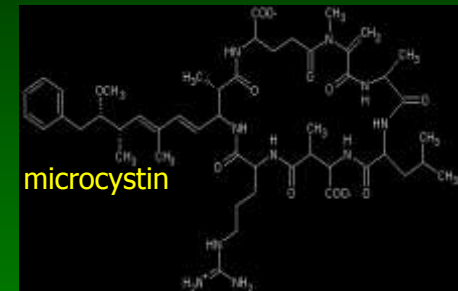


www.sinice.cz



Rozvoj VK → CYANOTOXINY

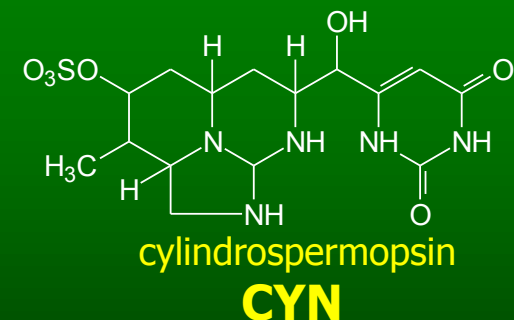
- nejstudovanější - peptidy microcystiny **MC**
(*hepatotoxicita*)



- vzácné v ČR - alkaloidy saxitoxiny, anatoxiny (*neurotoxicita*)
- ostatní - LPS (*imunotoxicita*)

v popředí zájmu – alkaloid **CYLINDROSPERMOPSIN**

- historie
- producenti
- výskyt a toxikologie



- experimentální výsledky → vývoj metod
→ první analýzy vzorků v ČR

CYLINDROSPERMOPSIN historie

- Palm Island (Austrálie, 1979): algicidní zásah
>100 lidí gastroenteritida
- Poprvé nalezen v tropických oblastech u druhu *Cylindrospermopsis raciborskii*
- Identifikace přesné struktury cylindrospermopsinu (2000)
- Syntéza CYN v cyanobakteriích podobným mechanismem jako u strukturně odlišného MC a ABT

Producenti CYN a jejich výskyt

Sinice	Země
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	Germany
<i>Aphanizomenon ovalisporum</i>	Izrael
	Australia
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Italy
	Thailand
	Australia
	Hungary
	USA
	Japan
<i>Anabaena bergii</i>	Australia
<i>Anabaena lapponica</i>	Finland
<i>Umezakia natans</i>	Japan
<i>Raphidiopsis curvata</i>	China
<i>Lyngbya wollei</i>	Australia

CYLINDROSPERMOPSIN toxicita

účinky CYN na organismy - detailně NEprostudovány x MC

- známé účinky
 - inhibice proteosyntézy (podoba s ABT)
 - indukce oxidativ. stresu
 - narušení detoxikačního aparátu



primární cíl játra → hepatotoxicita

- další možné účinky?
 - karcinogenita
 - genotoxicita
 - imunotoxicita
 - reprodukce



CYLINDROSPERMOPSIN toxicita

	CYN	MC
NOAEL	30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$	40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$
TDI (tolerovatelný denní příjem pro člověka)	0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$
Limit pro pitnou vodu	1 $\mu\text{g}/\text{L}$ **	1 $\mu\text{g}/\text{L}$ *
	15 $\mu\text{g}/\text{L}$ ***	

* WHO Guidelines for drinking-water quality. World Health Organisation, Geneva, (1998). **ČR**: Vyh. MZd. 252/2004

** **Nový Zéland**, *** **Brazílie**: BURCH, M.D. Proceedings of the Interagency, International Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms, Advances in Experimental Medicine & Biology (2007).



Zdravotní rizika srovnatelná

MC – regulován

CYN - výskyt a koncentrace v ČR neznámé



CYLINDROSPERMOPHSIN koncentrace

	CYN	MC
max. biomasa	5 mg/g d.w.	7 mg/g d.w. (ČR)
max. celkem ve vodě	0.8 mg/L	>10 mg/L v povrchové pění

extracelulární CYN 20%

exponenciální fáze



celkový CYN 100%

extracelulární CYN až 90%

stacionární fáze

Literární prameny: koncentrace srovnatelné

? CYN v nádržích v ČR ?

Možnosti stanovení CYLINDROSPERMOPSINU

Vyvinuto několik technik podobně jako u MC

instrumentální: **HPLC-DAD**

imunochemické: **ELISA**

HPLC-MS



ELISA - CYN



princip: komerční kit - kompetice CYN ve vzorku s enzymově značeným CYN s využitím polyklonálních protilátek

výhody: detekční limit **0.05**  /L - vhodný nástroj pro screening env. vzorků (doporučený limit 1  /L)

nevýhody: metoda není definitivní – pozitivní vzorky třeba ověřit jinou metodou (HPLC-MS)

HPLC - CYN

princip:

- rozdělení vzorku na (např. C18) koloně
- detekce jednotlivých látek: UV nebo MS detektor

HPLC/UV



výhody: běžný detektor, vhodný k vytipování biomas s CYN

nevýhody: mez detekce **400** $\mu\text{g/L}$, metoda není definitivní

HPLC/MS



výhody: mez detekce **< 1** $\mu\text{g/L}$, dostatečně citlivý pro vzorky (vody) bez zakoncentrování

nevýhody: vysoké náklady na instrumentaci

EXPERIMENTÁLNÍ DESIGN

Vytipování vzorků - vody a biomasy s vláknitými sinicemi
(*Cylindrospermopsis* spp. a *Aphanizomenon* spp.)



- analýza 96 vzorků (vody, biomasy)
odebraných 2004-2007

Úprava vzorků - extrakce okyselená voda



- zakoncentrování/přečištění SPE (C18 a grafitová kolona v tandemu)

Analýza vzorků - ELISA Abraxis – komerční kit

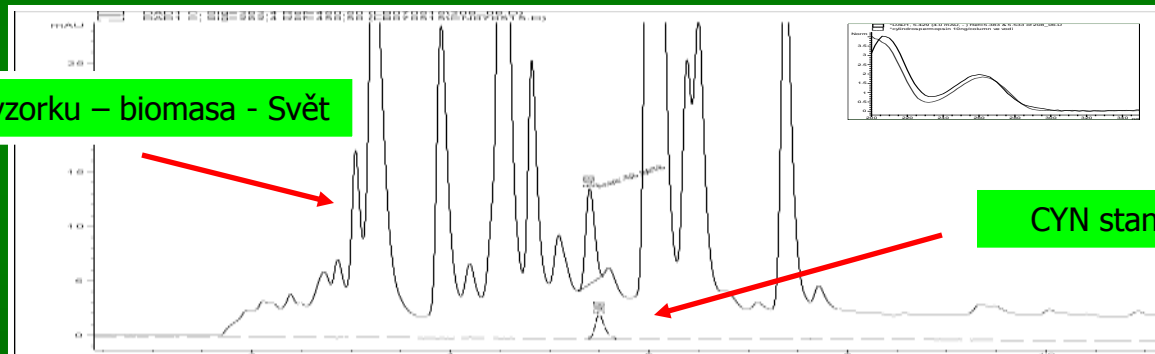
- HPLC/MS Agilent 1200 -Triple-Quad LC/MS, Supelcosil ABZ+Plus

- HPLC/UV-VIS Agilent 1100 -PDA, Supelcosil ABZ+Plus

VÝSLEDKY biomasa CYN v ČR

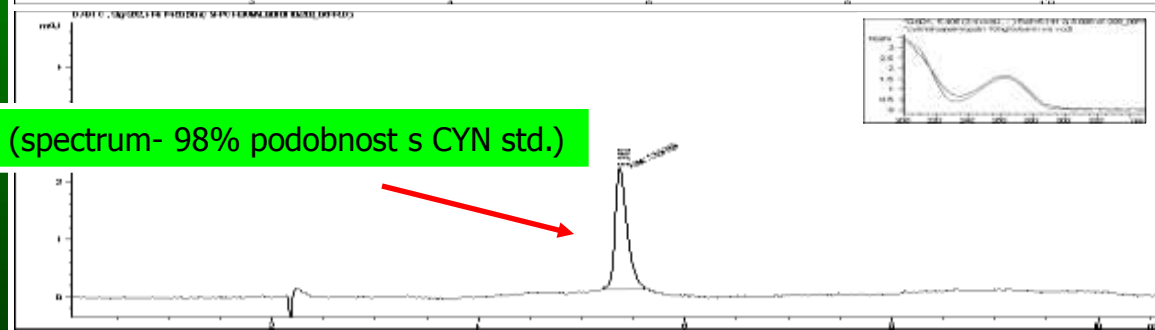
Ze 71 vzorků BIOMAS - 10 podezřelých na CYN
podle HPLC/UV

Chromatogram vzorku – biomasa - Svět



CYN standard

CYN-like (spectrum- 98% podobnost s CYN std.)



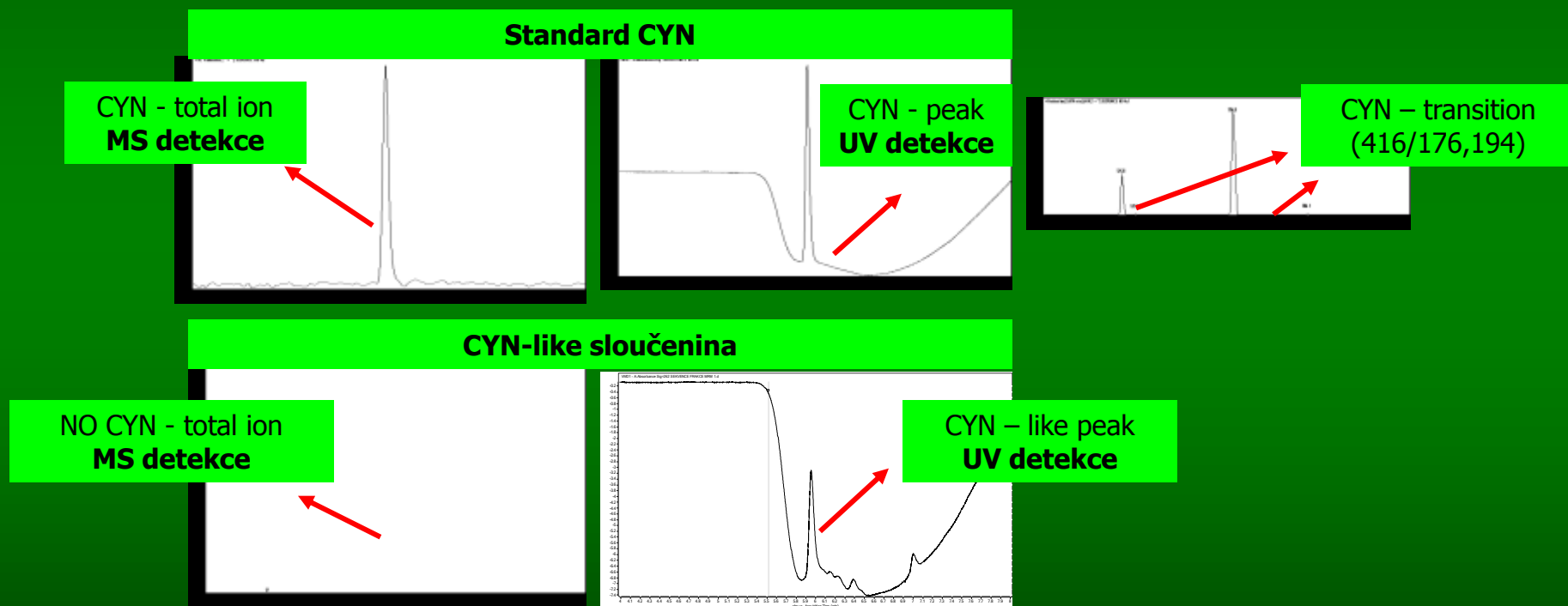
Lokality s „CYN-like“ sloučeninami

podezřelé lokality: mělké rybníky – bohatá společenstva
: koncentrace CYN-podobných látek 50-200 /g sušiny

Lokalita	Datum odběru	CYN-like (ug/g d.w.)	Dominantní sinice
Svět	28/8/2005	56	<u>Aphanizomenon klebahnii</u> 5%; <u>Woronichinia sp.</u> 10%; <u>Microcystis aeruginosa</u> 5%
Svět	19/9/2005	242	<u>Aphanizomenon klebahnii</u> 20%; <u>Planktothrix agardhii</u> 18%, <u>Woronichinia sp.</u> 12%; <u>M. ichtyoblabe</u> 10%
Svět	18/9/2006	188	<u>Aphanizomenon klebahnii</u> 5%; <u>Planktothrix isotrix</u> 30%, <u>Anabaena vigueri</u> 5%, <u>Limnothrix, M. sp.</u> 2%
Rožmberk	18/9/2006	59	<u>Aphanizomenon klebahnii</u> 10%, <u>Planktothrix isoethrix</u> 50%, <u>Anabaena f.-aquae</u> 10%, <u>Anabaena sp., M. sp.</u> %
Opatovický	22/7/2006	170	<u>Aphanizomenon klebahnii</u> 5%, <u>Planktothrix sp.</u> 40% , <u>M. aeruginosa</u> 30%, <u>Anabaena sp.</u> 25%

BIOMASA - CYN v ČR

Žádný z 10 podezřelých vzorků biomas **NEobsahoval** CYN
– ověření metodou HPLC/MS



Závěr : HPLC/UV - možné falešně pozitivní výsledky
? deriváty CYN - identifikace vyžaduje standardy

CYN v ČR: výsledky VODA

Vybráno 25 vzorků vod (2007) s obsahem *Cylindrospermopsis* a *Aphanizomenon* (celková voda vč. buněk sinic)
monitoring VKS 2007

Analýza pomocí ELISA (mez detekce 0.05 /L)

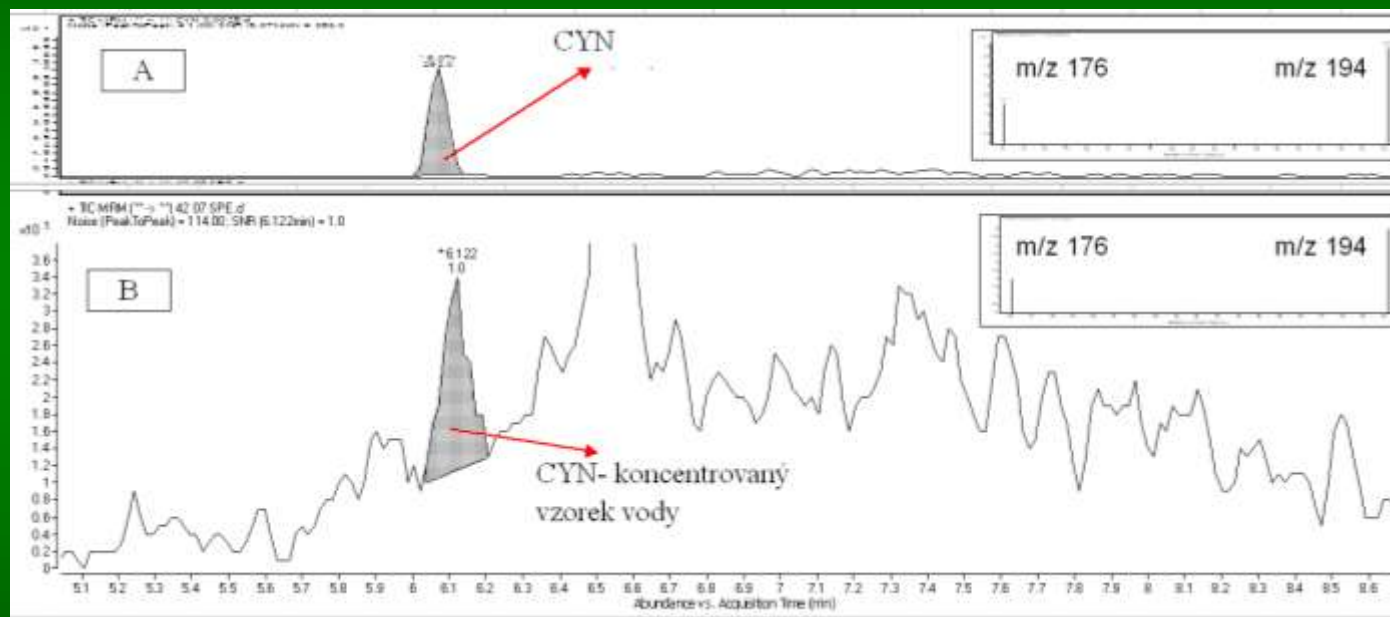
Výsledek: 1 pozitivní vzorek

Rybník Svět odběr 5.8.2007 koncentrace 0.06 /L



CYN v ČR: výsledky VODA

podezřelý vzorek (ELISA) **obsahoval** CYN v nízké koncentraci
– analýza HPLC/MS (100 x zakoncentrovaný vzorek)



Závěr : Prokázány píky odpovídající CYLINDROSPERMOPINU v environmentálním vzorku získaném díky **monitoringu VKS**

SHRNUTÍ

- CYN – vysoce toxická látka (srovnatelné s MC)
- Koncentrace **intracelulárního** a **celkového** CYN ve světě podobné jako u MC
- První studie v ČR (96 vzorků biomasy a vody):
 - 1) **HPLC/UV indikuje** přítomnost CYN
HPLC/MS jeho přítomnost **nepotvrzuje**
 - 2) **vysoká citlivost** metod **ELISA** a **HPLC/MS**
(shodný průkaz nízké koncentrace CYN)

ZÁVĚRY

- **CYN poprvé prokázán v ČR (nízká koncentrace)**
Nutný monitoring čerstvých vod: možná degradace CYN během skladování lyofilizovaných biomas (není prostudováno)
- **ELISA a HPLC/UV** – vhodné screeningové metody
– pozitivní vzorky by měly být **potvrzeny HPLC/MS**
- Nutno věnovat **pozornost CYN v pitné vodě**:
naše studie – pilotní data:
 - metodiky analýz nejsou validovány
 - extracelulární toxin
 - producenti CYN se mohou objevovat v ČR častěji

DĚKUJI VÁM ZA POZORNOST



www.sinice.cz