

Obsah

1. Literární rešerše.....	1
1.1 Úvod.....	1
1.2 Toxicita sinic	1
1.3 Farmaceutické využití cytotoxinů.....	7
1.4 Farmaceuticky perspektivní bentické sinice.....	7
1.5 Dopady sinicových toxinů na zdraví lidí a zvířat.....	10
1.6 Cíle práce.....	14
2. Metodika.....	15
3. Výsledky.....	20
3.1 Kultivace a testy toxicity.....	20
3.2 HPLC analýzy toxických extraktů, jejich frakcionace a testy toxicity jednotlivých frakcí.....	21
3.3 Testování biologické aktivity aktivních frakcí na buněčné linii HeLa	30
3. Diskuse.....	37
6. Literatura.....	39

1.Literární rešerše

1.1 Úvod

Sinice jsou fotosyntetizující gramnegativní bakterie (Codd & Poon 1988), produkující široké spektrum různých sekundárních metabolitů, z nichž mnohé mohou působit toxicky. Nezřídka jeden sinicový druh produkuje více různých toxinů, lišících se svou chemickou podstatou i biologickým účinkem. To vyvolává otázku, jaký je nebo v minulosti byl primární účel tvorby sinicových sekundárních metabolitů.

Existuje několik teorií, proč sinice tyto látky vytvářejí:

- Vzájemná kompetice, případně konkurence s makrofyty (Aboal 2005, Wright et al. 2005)
- Vzájemná komunikace (Hrouzek, ústní sdělení)
- Obrana proti herbivorii (Blom et al. 2001, Rohrlack et al. 2001, Rohrlack et al. 2004, Agrawal et al. 2005)
- Souvislost s příjmem železa (Sivonen, ústní sdělení)

Vzhledem k rozmanitosti těchto teorií je vcelku jasné, že žádná z vědeckých prací zatím nedospěla k uspokojivému vysvětlení primární funkce sinicových sekundárních metabolitů. Důležitým poznatkem však je, že biosyntetická dráha sinicových peptidů je evolučně výrazně starší než eukaryotní organismy (Rantala et al. 2004). Proto primární funkcí těchto látek určitě nebude obrana proti herbivorii. Je také třeba si uvědomit, že prapůvodní příčina jejich vzniku již dnes nemusí existovat.

1.2 Toxicita sinic

Na základě chemické struktury můžeme sekundární metabolity sinic rozdělit na alkaloidy, cyklické a lineární peptidy a depsipeptidy, makrolaktony a lipopolysacharidy (Namikoshi & Rinehart 1996, Chorus 2001, Harada 2004, Maršálek 2004). Nejpozoruhodnější a zároveň nejrozmanitější skupinou látek produkovaných sinicemi jsou různé formy cyklických i lineárních peptidů. Dnes je známo kolem 600 variant těchto sloučenin řazených do šesti tříd (Welker & van Döhren 2006).

Další možné dělení je na základě biologické aktivity na cytotoxiny a biotoxiny. Cytotoxiny se vyznačují inhibiční aktivitou k jednotlivým buňkám a cytotoxická aktivita je tedy zpravidla testována na buněčných liniích. Cytotoxické sloučeniny často mívají i antibakteriální či antimykotický účinek. Biotoxiny bývají testovány na zooplanktonu, rybách či myších a mohou být letální pro vícebuněčný organismus. Tato kategorie se dá dále rozdělit dle mechanismu a místa působení na neurotoxiny, hepatotoxiny, genotoxiny, imunotoxiny, embryotoxiny a dermatotoxiny (Maršálek 1996). Je však zřejmé, že rozdělení na biotoxiny a cytotoxiny je do jisté míry umělé – např. biotoxin microcystin-LR vykazuje jistou míru cytotoxicity skrze indukci apoptózy (Botha et al. 2004, Solstad 2006). Také účinky jednotlivých skupin biotoxinů se mohou prolínat.

Hepatotoxiny

Klinickými příznaky intoxikace hepatotoxiny jsou průjem, bledost sliznic, zvracení, slabost a nechutenství. Smrt nastává po 1 až 2 hodinách krvácením do jater. Dochází k nekróze jaterních buněk a desintegraci struktury (Cronberg & Annadotter 2006). Symptomy otravy se mohou objevit za 30 min. až 24 hod. a záleží přitom na velikosti savce a množství vodního květu, který byl zkonzumován (Dawson 1998). U microcystinu a nodularinu je akutní toxicita s LD₅₀ (koncentrace, která způsobí úhyn 50 % testovaných zvířat) pro myši 36 až 122 µg na kilogram váhy (Sivonen et al. 1989). Hepatotoxiny jsou nejčastější sinicové toxiny a řadíme mezi ně microcystin, nodularin a cylindrospermopsin. Cylindrospermopsin však často bývá kvůli mechanismu svého účinku řazen mezi cytotoxiny. Vzhledem k chemické struktuře microcystinů a nodularinů se jedná o látky velmi stabilní, které jsou schopné ve vodě přetrvávat týden i déle poté, co zmizí vodní květy.

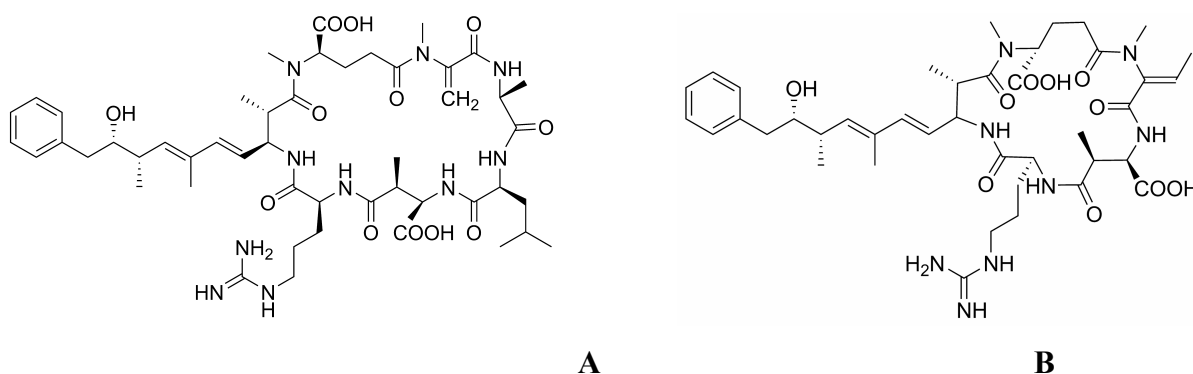
Microcystiny

Jedná se o skupinu cyklických heptapeptidů a v současnosti je známo více než 70 strukturních variant. Produkce těchto látek je známa u sinicových rodů: *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena*, *Nostoc* a *Phormidium* (Cronberg & Annadotter 2006, Pumann et al. 2008). Ačkoliv nemoci přičítané microcystinům zahrnují širokou škálu příznaků, jejich hlavním cílem působení jsou játra. V hepatocytech dochází k narušení cytoskeletu v důsledku inhibice proteinfosfatázy 1 a 2A, čímž dochází k masivní jaterní hemoragii. Příjem microcystinů do jaterních buněk probíhá prostřednictvím přenašečů žlučového transportního systému (Chong et al. 2002). Účinky microcystinů může antagonizovat několik inhibitorů příjmu. Nejúčinnější

z nich je ATB rifampin, který chrání myši a potkany proti letalitě vyvolané microcystinem, když je jim podáván profylakticky a v některých případech i terapeuticky. Novější experimenty ukázaly, že microcystiny mohou fungovat jako promotory jaterních nádorů v extrémně malých množstvích. Microcystin-LR byl v roce 2006 zařazen Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny do skupiny 2B (možný karcinogen pro člověka) (Pumann et al. 2008).

Nodularin

Tento cyklický pentapeptid poprvé izolovaný ze sinice *Nodularia spumigena* Mertens ex Bornet et Flahault má podobné složení i hepatotoxický efekt jako microcystin, ale je velmi pravděpodobné, že se na jeho toxicitě podílí také schopnost vytvářet póry v lipidické dvojvrstvě (Patočka 2001). Strukturu nodularinu je možné odvodit z obecného vzorce microcystinu vynecháním tří aminokyselin v pozicích 1, 2 a 7 (obr. 1). Aminokyseliny v pozici 6 a 3 jsou spojeny dehydrobutyrimem, který se v microcystinech nevyskytuje (Reinhart et. al. 1988). Podobný je také biologický účinek těchto hepatotoxinů, kterým je inhibice regulačních enzymů proteinfosfatáz.



Obr. 1: *Strukturní vzorec hepatotoxinů. A – microcystin-LR, B – nodularin-R.*

Neurotoxiny

Z chemického hlediska se jedná především o alkaloidy. Produkují je zejména planktonní rody *Anabaena*, *Aphanizomenon* a *Planktothrix* a dále také nárostové sinice rodů *Oscillatoria* a *Phormidium* (Pumann et al. 2008). Jsou zodpovědné za mnoho smrtelných otrav ptáků a savců (Stewart et al. 2008). Překvapující bylo zjištění, že sinice mohou produkovat aminokyselinu β -N-methylamino-L-alanin (BMAA). Existuje souvislost mezi touto

sloučeninou a výskytem neurodegenerativních onemocnění jako jsou Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba (Cox et al. 2005).

Anatoxiny

Do této skupiny alkaloidů řadíme tři sloučeniny – anatoxin-a, homoanatoxin-a, anatoxin-a(s). Homoanatoxin-a byl nejprve připraven synteticky (Yoshizawa et. al. 1990) a poté teprve nalezen v přírodě a vyizolován ze sinice *Phormidium formosum* (Bory ex Gomont) Anagnostidis et Komárek (dříve *Oscillatoria formosa*) (Skulberg et. al. 1992). Jeho intraperitoneální LD₅₀ pro myši je 250 µg na kilogram váhy. Letální dávka vede k rychlé paralýze těla, křečím a zástavě dechu. Anatoxin-a produkují sinicové rody *Cylindrospermum*, *Phormidium* a je strukturálním analogem kokainu a neurotransmiteru acetylcholinu (Cronberg et Annadotter 2006). Útočí na nervové synapse a není proti němu protilátka. Příznaky otravy jsou svalové spazmy, dýchavičnost a křeče. Smrt respiračním selháním nastává během několika minut až hodin, závisí na druhu sinice a dávce (Carmichael 1994). Intraperitoneální LD₅₀ pro myši je 50-250 µg na kilogram váhy a doba přežití je 4 až 7 minut (Carmichael et Gorham 1978).

Saxitoxiny

Skupina alkaloidů je známa také jako PSPs (Paralytic Shellfish Poisons), neboť se kumulují v mořských organismech a mohou způsobit otravu při jejich konzumaci (Daranas et al. 2000). Symptomy otravy zahrnují nepravidelné dýchání, ztrátu koordinace, nervové záškuby a smrt selháním dechu (Carmichael 1994). Intraperitoneální LD₅₀ pro myši je 10-30 µg na kilogram váhy (Codd et al. 2005).

Cytotoxiny

Tyto látky inhibují či působí letálně na živočišné buňky. Často vykazují také antibakteriální, fungicidní, algicidní či antimykotickou aktivitu (Kreitlow et al. 1999, Soltani et al. 2005, Aboal 2007). Jedná se o velmi různorodou skupinu látek co do chemické struktury i jejího působení na buňky.

Cylindrospermopsin

Jedná se o polycyklický derivát uracilu obsahující guanidinovou a sulfátovou skupinu. Je produkován hlavně planktonní invazivní sinicí *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju pocházející z teplých oblastí (Vigueredo et al. 2007,

Kaštovský in prep.). V její evropské populaci však toxicita dosud potvrzena nebyla. V Evropě je za produkci cylidrospermopsinu zodpovědný rod *Aphanizomenon* (hlavně *A. gracile*) (Pumann et al. 2008). Mechanismus jeho působení spočívá v inhibici proteosyntézy v hepatocytech, hromadění tukových kapének, proliferaci membrán a následné buněčné smrti. Při vystavení myši subakutní koncentraci (například z pitné vody) byl zjištěn vývoj abnormálních červených krvinek – tzv. akantocytů (Reisner et al. 2004). Působí jaterní a ledvinové poškození. LD₅₀ pro myši je 200 µg na kilogram váhy.

Cryptophyciny

Cryptophyciny jsou látky řadící se mezi depsipeptidy, tedy sloučeniny, kde jsou jednotlivé aminokyseliny vzájemně vázány jak peptidovou tak esterovou vazbou. Jedná se o velice aktivní cytotoxické sloučeniny, jejichž hodnoty IC₅₀ (koncentrace, která způsobí pokles viability o 50 %) se pohybují v nanomolárních koncentracích. Cryptophyciny jsou produkovány zejména sinicovým rodem *Nostoc* a dodnes bylo izolováno několik desítek analogů (Trimurtulu et al. 1994).

Nostopeptolidy

Ze stejného kmene jako cryptophyciny (*Nostoc* sp. GVS 224) byly také izolovány nostopeptolidy A1, A2 a A3, cyklické peptidy, vykazující též cytotoxickou aktivitu. Kromě cytotoxicity však vykazují také antifungální aktivitu a jsou inhibitory proteáz (Golakoti et al. 2000). O molekulárním mechanismu jejich účinků zatím není moc známo.

Tolytoxin

Poprvé byl tento silný fungicid a cytotoxin izolován roku 1977 ze sinice *Tolypothrix conglutinata* var. *colorata* Ghose. Později se ukázalo, že se po chemické stránce jedná o 6-hydroxy-7-0-methylscytophycin B a patří tedy do velké skupiny makrolaktonů nazvaných scytophyciny. Po cryptophycinu se jedná o druhý nejaktivnější cytotoxin s hodnotou IC₅₀ pohybující se mezi 0,52-8,4 nM pro různé typy buněčných linií (Patterson & Carmeli 1992). Jeho efekt spočívá v zablokování syntézy aktinových vláken a následné destrukci buňky (Patterson et al. 1993). Další zástupci skupiny scytophycinů, Scytophyciny A-E, byly postupně izolovány z kmenů BC-1-2 a ATCC53141 půdní sinice *Scytonema pseudohofmanni* Bharadwaja. Nejvíce toxické se ukázaly být scytophycin A a B, které vykazují velmi silný efekt proti lidským rakovinným buňkám nosohltanu (Carmeli et al. 1990).

Další cytotoxiny

Mezi další klinicky zajímavé cytotoxiny patří tubecidin izolovaný ze sinice *Tolypothrix brysoidea* (C. Agardh) Kirchner, který je inhibitorem syntézy DNA (Barchi et al. 1983), a také pahayokolid A izolovaný z *Lyngbya* sp., který je účinný proti širokému spektru nádorových linií a také má antibakteriální účinky (Berry et al. 2004).

Dermatotoxiny

Jedná se o skupinu toxinů produkovaných sinicovými rody *Lyngbya*, *Oscillatoria* a *Schizothrix*. Vyvolávají alergické reakce, kontaktní dermatitidy, podráždění sliznic a záněty spojivek. Při polknutí mohou vyvolat záněty trávicího traktu a průjemy. Fungují pravděpodobně také jako pre-karcinogeny (Maršálková & Maršálek 2006). Indolový alkaloid lyngbyatoxin a a polyacetáty aplysiatoxin a debromoaplysiatoxin (Fujiki et al. 1983) jsou metabolity brakické a mořské invazivní sinice *Lyngbya majuscula* Harvey ex Gomont, která je celosvětově rozšířená v tropickém a subtropickém pásu (Cardellina et al. 1979). Debromoaplysiatoxin byl také nalezen u *Schizothrix calcicola* (Agardh) Gomont a *Oscillatoria nigro-viridis* Thwaites (Cronberg & Annadotter 2006). Jedná se o nádorové promotory, vážící se na receptory forbolesteru, což vede k aktivaci proteinkinázy C. Mohou urychlovat transformaci buněk a stimulovat DNA syntézu in vitro (Patočka 2001). LD₅₀ pro lyngbyatoxin-a je 250 µg/kg (Cronberg & Annadotter 2006).

Endotoxiny – LPS (Lipopolysacharidy)

Poprvé byly popsány R. Pfeifferem v roce 1892 z *Vibrio cholerae*. Jsou to termostabilní sloučeniny obsažené v membránách všech gramnegativních bakterií, tedy i sinic (Cronberg & Annadotter 2006). Běžně bývají LPS udávány jako možná příčina řady zdravotních problémů (vyrážky, gastrointestinální problémy, dýchací obtíže, horečky, alergie), Stewart et al. se však domnívají, že LPS sinic jsou zodpovědné jen za respirační problémy při vdechování aerosolu obsahujícího sinice (Stewart et al. 2006). V toxicitě LPS z jednotlivých zkoumaných sinic byly zjištěny velké rozdíly. Největší toxicitu vykazovala přírodní populace *Aphanizomenon* sp. (Bernardová et al. 2008).

1.3 Farmaceutické využití cytotoxinů

Neurotoxické alkaloidy

Přes svoji toxickou podstatu jsou anatoxin-a a homoanatoxin-a velmi perspektivní ve farmacii. Výzkum je zaměřen zejména na vývoj nových léků, jejichž účinnou látkou by byly syntetické analogy anatoxinu-a. Ty by mohly fungovat jako náhrada acetylcholinu v léčbě Alzheimerovy choroby, neurodegenerativního onemocnění, při kterém nejsou neurony samy schopny acetylcholin produkovat (Patočka 2001). Saxitoxiny představují další skupinu látek potenciálně použitelných při léčbě neurologických onemocnění. Zejména pak skupina saxitoxinů nazývaná LWTX izolovaná z bentické sinice *Plectonema wollei* Forlow ex Gomont (dříve *Lyngbya wollei*) vykazuje slibné biologické aktivity. Saxitoxiny blokují přenos nervového vzruchu navázáním na Na⁺ kanál v axonech nervových buněk. Účinek je dobře prostudován na molekulární úrovni, ale pro praktické využití ve farmacii je třeba ještě mnohé objasnit (Patočka 2001, Cronberg et Annadotter 2006).

Cryptophycin

Jedním z nejslibnějších sinicových toxinů co se týče farmaceutické využitelnosti je depsipeptid cryptophycin a jeho strukturní varianty. Jedním z nadějných kandidátů pro klinické využití je cryptophycin A obsahující ve své struktuře epoxidovou funkční skupinu. Byl izolován z terestrické sinice *Nostoc* sp. GSV 224 (Trimurtulu et al. 1994). Dále je pro svůj silný efekt a lepší stabilitu díky gem-dimethyl substituentům na C6 klinicky testován syntetický analog cryptophycin-52. Podobně jako všechny varianty cryptophycinů se cryptophycin-52 selektivně váže na konce mikrotubulů. Tím se v G2-M fázi přerušuje buněčný cyklus a následuje apoptóza buňky (Smith 1994). Obrovskou výhodou této sloučeniny je protinádorová aktivita proti některým liniím vykazující rezistenci vůči komerčním cytostatikům (Al-awar et al. 2004).

1.4 Farmaceuticky perspektivní bentické sinice

Lyngbya

Rod *Lyngbya* je významným producentem řady sekundárních metabolitů zkoumaných pro farmaceutické účely. Vyjma kmenů izolovaných ze sinice druhu *Lyngbya wollei* byly nalezeny další kmeny s významnou bioaktivitou. Ze sinice *Lyngbya* sp. byly vyizolovány čtyři cyklické undekapeptidy – lyngbyazothrin A-D s antimikrobiálním účinkem. Směs lyngbyazothrinu A a B vykazala jen nízkou antimikrobiální aktivitu vůči *Micrococcus flavus*, zatímco směs lyngbyazothrinu C a D byla aktivní vůči *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Serratia marcescens* (Zainuddin et al. 2009). Z *Lyngbya majuscula* a *Lyngbya sordida* Gomont ex Gomont byl izolován apratoxin D vykazující in vitro toxicitu vůči buňkám lidské rakoviny plic (H-460) s IC_{50} 2,6 μ M. Apratoxin A indukuje zástavu buněčného cyklu v G_1 fázi, což vede k apoptóze. Jeho analogy byly uměle syntetizovány (Gutiérrez et al. 2008). Další bioaktivní látkou izolovanou ze sinice *Lyngbya* sp. z Everglades na Floridě je pahayokolid A. Byla u něj prokázána schopnost inhibovat buněčné linie několika typů adenokarcinomu: plic (H460), ledvin (A498), vaječníků (SK-OV-3) a také buňky lymfoidní leukémie (CEM) (Berry et al. 2004).

Phormidium

Dalším nadějným sinicovým rodem se zdá být rod *Phormidium*. Z in vitro testů bylo zjištěno, že dvě lidské nádorové buněčné linie (A2058 a RD buňky) reagovaly citlivě na médium, ve kterém rostlo *Phormidium molle* Gomont. To však pro normální lidské buňky (FL linie) toxické nebylo, což by ukazovalo na selektivní protinádorovou aktivitu některé z látek obsažené v tomto kmeni (Teneva et. al. 2005). Při hledání protinádorových promotorů bylo také studováno *Phormidium tenue* (Agardh ex Gomont) Anagnostidis et Komárek (dle současné taxonomie *Phormidium tergestinum* (Kützing) Anagnostidis et Komárek), které obsahovalo digalaktosyl diacylglycerol (DGDG). Byl zjištěn inhibiční efekt těchto látek na dvě stádia rakoviny kůže u myši, u kterých byly předem vyvolány papilomy (Tokuda et al. 1996).

Schizothrix

Výzkumný program v Panamě zabývající se hledáním nových léků na parazitární onemocnění provedl screening 60 kmenů mořských sinic, zda některý z jejich sekundárních metabolitů nebude mít antimalarické účinky. Ukázalo se, že druh *Schizothrix* vykazuje silný antimalarický účinek proti kmenu *Plasmodium falciparum* W2 rezistentnímu vůči komerčním antimalarikům s účinnou látkou chloroquinem. Aktivní látkou obsaženou v tomto kmeni je lineární peptid gallinamid A, vykazující aktivitu také proti *Leishmania donovani* (Linington et al. 2009).

Fischerella

Ze sinice *Fischerella ambigua* (Nägeli) Gomont byla mimo jiné izolována látka ambigol C (3,5-bis(2,4-dichlorofenoxy)-2,6-dichlorofenol), která vykazovala mírnou aktivitu proti *Trypanosoma rhodesiense* a stejně jako ambigol A byla aktivní vůči *Bacillus megaterium*. Ambigol A také vykazoval aktivitu proti *Trypanosoma cruzi*, *T. rhodesiense*, *Plasmodium falciparum* a *Mycobacterium tuberculosis*, pravděpodobně protože je celkově cytotoxický. Naproti tomu u ambigolu C, který není cytotoxický, byl zjištěn slabý účinek proti plasmodiím a trypanosomám, a tak může být vhodným kandidátem pro chemické modifikace a následné využití v medicíně. Antibakteriální působení ambigolu C bylo srovnatelné se streptomycinem (Wright et al. 2005). Se stejného druhu byly izolovány také indolové alkaloidy, isonitrily K a M, které vykazovaly silnou aktivitu proti *Mycobacterium tuberculosis* (MIC 6,6 a 7,5 μM). Isonitril ambiguinu A vykazoval nejsilnější aktivitu proti *Bacillus anthracis* (MIC 1,0 μM). Tyto slibné vlastnosti vedly ke snahám o jeho syntézu (Mo et al. 2009).

Nostoc

Rod *Nostoc* je známým producentem řady sekundárních metabolitů. Vyjma cytotoxické aktivity, která je nacházena zhruba u jedné třetiny kmenů (Piccardi et al 2000, Hrouzek et al. in press), je u extraktů těchto půdních sinic dokázána inhibice proteáz, antifungální aktivita a též virostatické účinky (Knübel et al. 1990, Kiyama et al. 1998, Golakoti 2000). Cyanovirin izolovaný ze sinice *Nostoc ellipsosporum* Gardner má anti-HIV účinky kvůli mnohočetné vazbě na manosové oligosacharidy virové kapsule, pročež je nadějným kandidátem na blokaci přenosu viru mezi buňkami (Zainuddin 2007). Cryptophyciny jsou skupinou 16 makrolidových antimitotických agens izolovaných z kmenů *Nostoc* sp. GSV 224 a *Nostoc* sp. ATCC53789 (Biondi et al. 2004).

Symploca

Dolastatin 10 byl původně izolován z mořského plže *Dolabella auricularia*, do kterého se zřejmě dostává s potravou. Pravým producentem této sloučeniny je sinice *Symploca sp.* Chemicky příbuzný analog symplostatin 1 byl izolován ze sinice *S. hypnoides* Kützing. Symplostatin 1 i dolastatin 10 jsou mikrotubulové inhibitory. Antitumorová aktivita symplostatinu 1 in vivo u myši byla prokázána proti rakovině prsu a tlustého střeva rezistentním k běžným lékům. Symplostatin 1 je však také velice toxický (Luesch et al. 2001).

1.5 Dopady sinicových toxinů na zdraví lidí a zvířat

Planktonní sinice

Z hlediska vlivu na člověka jsou bezesporu nejdůležitější planktonní sinice – tzv. vodní květ, který je velkým problémem vodárenských nádrží a může být viditelný i pouhým okem. Mezi nejběžnější zástupce patří zejména rody *Microcystis*, *Anabaena* a *Aphanizomenon*. Zprávy o sinicové toxicitě vodních květů se objevují hlavně během posledních několika dekád, ale první zdokumentovaný případ akutní sinicové otravy pochází již z roku 1878, kdy australský přírodovědec a chemik G. Francis popsal úhyn domácích zvířat (Cronberg et Annadotter 2006). Sinice způsobují akutní nebo chronické problémy u lidí a fatální otravy u živočichů (Skulberg et al. 1984, Carmichael 1992, 1994). V České republice je v upravené pitné vodě ze sinicových toxinů sledován pouze nejčastěji se vyskytující toxin - microcystin LR, který ale tvoří jen asi polovinu koncentrace všech přítomných microcystinů. Také je třeba si uvědomit, že nejvíce studované sinicové toxiny microcystiny jsou pouze jednou skupinou z několika stovek cyanotoxinů (Maršálková & Maršálek 2006). Velký problém ovšem nastává v suchých oblastech závislých na eutrofizovaných vodních zdrojích, které nemají moderní vodárenské technologie – např. Afrika (Cronberg & Annadotter 2006, Aboal 2007). Chronická expozice dlouhodobým pitím vody obsahující cyanotoxiny může vyvolat rakovinu tlustého střeva (Zhou et al. 2000). Jsou též známy případy otrav končící někdy až smrtí, kdy k přípravě roztoku pro hemodialýzu byla použita vodovodní voda obsahující cyanotoxiny.

V roce 1996 došlo v nemocnici v brazilském městě Caruaru k vypuknutí hepatitidy u 131 hemodialyzovaných pacientů. Dalšími symptomy byla malátnost, zvracení, závratě, horečka, bolest hlavy a hučení v uších. 100 pacientů mělo akutní jaterní selhání a 76 z nich mu podlehl. Laboratorní testy ukázaly zvýšený obsah sérových jaterních enzymů, alkalinefosfatáz, bilirubinu a trigliceridu. Pitva potvrdila akutní toxickou hepatitidu, zahrnující nekrózu, apoptózu a infiltraci neutrofilů. Ve vodě použité k hemodialýze byly zjištěny toxiny microcystiny a cylindrospermopsin, stejně jako v séru jaterní tkáně zemřelých pacientů (Carmichael et al. 2001). K podobnému případu došlo již roku 1975 ve Washingtonu, zde však nebyl přímo prokázán vliv sinic. U 23 ze 79 hemodialyzovaných pacientů se vyskytly horečnaté reakce. Ve vodovodní vodě použité na hemodialýzu byla zjištěna vysoká koncentrace endotoxinů (Hindman 1975).

Ohledně zdravotních rizik spojených s koupáním ve vodě obsahující vodní květy sinic je třeba v první řadě říci, že většina zdravotních obtíží má mírný průběh a proto není náležitě zdokumentována v odborné literatuře (Pumann et. al. 2008). Jediný známý případ úmrtí pravděpodobně spojený s koupáním ve vodě zamořené sinicemi se stal roku 2002 v USA, kdy chlapec zemřel na akutní selhání srdce 48 hodin po koupání v rybníčku na golfovém hřišti se silným sinicovým vodním květem. V jeho žaludku a krvi byl následně zjištěn anatoxin-a (Stewart et. al. 2006). Závažné zdravotní obtíže, zahrnující různé gastrointestinální potíže, puchýře na rtech a bolesti v krku, se vyskytly u 20 vojáků, kteří trénovali plavání a jízdu na kánoí ve vodě s vysokým obsahem sinic rodu *Microcystis*. Dva z nich byli hospitalizováni s pneumonií (Chorus & Bartram 1999).

Australská studie z roku 2004 prokázala celkové zhoršení zdravotního stavu jedinců, kteří se koupali ve vodě s vysokým výskytem sinicového vodního květu. Po dvou dnech od expozice nebyl rozdíl mezi pokusnou a kontrolní skupinou, po sedmi dnech však pokusná skupina vykazovala celkové zhoršení zdravotního stavu – průjem, zvracení, vyrážky, příznaky podobné chřipce, vředy na ústech, podráždění očí a uší. Účastníci byly po různou dobu vystaveny různým koncentracím sinic. Lidé vystaveni koncentraci vyšší než 5000 b/ml po dobu delší než jednu hodinu měli prokazatelně vyšší výskyt těchto symptomů než kontrolní skupina (Pilotto et. al. 1997).

Klinická studie na dobrovolnících pomocí tzv. náplast'ových testů zkoumala kožní citlivost jedinců vůči sinicím. Z testovaných vzorků *Microcystis aeruginosa* Kützing, *M. flos-aquae* (Wittrock) Kirchner a směsný vzorek *M. aeruginosa* a *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Bornet et Flahault vykazovaly všechny pozitivní reakci v jednotkách procent (Bílek

1976). V jiné studii však účastníci vykazovali kožní reakce i na zelené vláknité řasy rodu *Spirogyra* a *Mougeoutia* (Michl 1990), tudíž se spíše než o toxicitu jedná při kožním kontaktu o alergickou reakci.

Četné případy otrav zvířat po požití vody obsahující planktonní sinice, vedoucí nezřídka i k jejich smrti, shrnul ve své práci Stewartův výzkumný tým (Stewart et. al. 2008). Potvrzuje tak hepatotoxický účinek vodních květů prokázaný přítomností sinic a jejich toxinů v žaludcích uhynulých zvířat.

Bentické sinice

Sezónně se na hladině ve větší míře mohou objevit i od podkladu odtržené povlaky bentických sinic tzv. „mats“ (Pumann et. al. 2008), které tvoří zvláště v rybnících a menších vodních tělesech nezanedbatelnou biomasu. Tyto vodní plochy sice neplní v našich podmínkách primární funkci zdrojů pitné vody a toxiny v ní obsažené mají na člověka vliv spíše minimální (např. alergické reakce po koupání), mohou však být nebezpečné organismům, které v této vodě žijí, a zvířatům, která ji pijí (Krienitz et al. 2003, Wood et al. 2007, Stewart et al. 2008). Toxicita bentických sinic byla mnohokrát prokázána, ač je této problematice věnována daleko menší pozornost, než vodním květům. Toxiny prokázané u jednotlivých druhů bentických sinic shrnuje tab. 1.

Nejedna studie také dokládá souvislost mezi úhynem zvířat a přítomností bentických sinic.

Například microcystiny, jak ve volné vodě tak intracelulární, byly zjištěny v nádržích a řekách bez přítomnosti vodního květu, kde dominovaly bentické sinice řádů Oscillatoriales a Nostocales (Aboal 2007).

Je znám případ smrti 15 psů na Novém Zélandu, kteří přišli do kontaktu s vodou z Hutt River, která obsahovala tlusté povlaky bentických sinic. Vzorky ze žaludku jednoho z psů a sinicové „koláče“ byly podrobeny analýze na přítomnost toxinů. Pomocí LC-MS byla zjištěna přítomnost neurotoxinů anatoxin-a a homoanatoxin-a a jejich degradačních produktů dihydro-anatoxin-a a dihydro-homoanatoxin-a. Sinice byly na základě genetické analýzy nejpodobnější druhu *Phormidium autumnale* (Agardh) Trevisan ex Gomont (Wood et. al. 2007).

Studiu toxicity byly podrobeny i další druhy rodu *Phormidium* – *Ph. molle* Gomont, *Ph. papyraceum* Gomont ex Gomont, *Ph. uncinatum* Gomont ex Gomont, *Ph. autumnale* a také *Leptolyngbya bijugata* (Kongisser) Anagnostidis et Komárek (dříve *Ph. bijugatum*). U pokusných myší byl prokázán úbytek hmotnosti a také neuro- a hepatotoxický syndrom. *Leptolyngbya bijugata* vedla dokonce ke smrti pokusného zvířete. Velmi nízká koncentrace saxitoxinu a microcystinu potvrzená pomocí ELISA není dostatečným vysvětlením této toxicity (Teneva et. al. 2005).

Taktéž byla potvrzena toxicita sinicových *mats* tvořených *Phormidium* aff. *formosum* z Torrens Lake v australském městě Adelaide a *Phormidium* aff. *amoenum* Kützing ex Anagnostidis et Komárek z nádrže Myponga na jihu Austrálie (Baker et al. 2001).

Toxicitu bentických sinic podporují i nálezy z horkých pramenů v Keni, kde došlo k masovému úhynu plameňáků malých. Zde byla zjištěna přítomnost microcystinu a anatoxinu-a v sinicových *mats*, kde dominovaly sinice *Phormidium terebriforme* (Agardh ex Gomont) Anagnostidis & Komárek, *Phormidium willei* (Gardner) Anagnostidis et Komárek (dříve *Oscillatoria willei*), *Spirulina subsalsa* Oersted ex Gomont a *Synechococcus bigranulatus* Skuja. Tyto toxiny a také úlomky sinicových vláken byly nalezeny i v žaludcích mrtvých plameňáků a v trusu (Krienitz et al. 2003).

Přítomnost microcystinu-LR a nodularinu v bentických *mats* také potvrzuje studie provedená v mělkých antarktických sladkovodních tůních, kde byly nalezeny sinice řádů Oscillatoriales: *Geitlerinema deflexum* (West et West) Anagnostidis (dříve *Phormidium deflexum*), *Leptolyngbya frigida* (Fritsch) Anagnostidis et Komárek, *Pseudanabaena* sp., *Ph. pseudopriestleyi* (West et West) Anagnostidis et Komárek, *Ph. autumnale*, *Ph. murrayi* (West et West) Anagnostidis et Komárek, *Oscillatoria koettlitzii* Fritsch (dříve *Ph. koettlitzii*), *Oscillatoria subproboscidea* West & West (dříve *Ph. subproboscideum*) a Nostocales - *Nodularia* sp. a *Nostoc* sp. (Hitzfeld et al. 2000).

Další nález toxických sinicových *mats* obsahujících microcystin byl zaznamenán z ledovcových jezer ve Švýcarských Alpách, která mají nízký obsah živin a také vodivost (4 – 10 $\mu\text{S/cm}$). Nárosty na dně a ponořených kamenech byly tvořeny hlavně sinicemi *Oscillatoria limosa* Agardh ex Gomont, *Phormidium konstantinosum* (= *Oscillatoria tenuis* Agardh ex Gomont) a *Tychonema granulatum* (= *Oscillatoria granulata* Gardner) (Mez et al. 1998). Ve Švýcarsku byl také zaznamenán úhyn dobytka, který pil z horských jezer obsahujících *mats* tvořených *Oscillatoria limosa* (Mez et al. 1997).

Jsou známy i případy otrav lidí po konzumaci masa mořských želv obsahujícího lyngbyatoxin-a produkovaný sinicí *Lyngbya majuscula*. Příznaky zahrnovaly záněty jazyka a ústních sliznic, problémy při polykání, akutní gastritidu, tachykardii, bolesti hlavy, závratě, horečku, dechové obtíže. Tato sinice taktéž způsobuje dermatitidy zvané „seaweed itch“ (Cronberg & Annadotter 2006). Sinicovými toxiny mohou být taktéž kontaminovány mušle a ryby, což mívá za následek otravy jejich konzumentů (Patočka 2006).

Tab. 1: *Přehled bentických sinic a jejich toxinů.* (Upraveno z Cronberg & Annadotter 2006 a Funari & Testai 2008)

sinice	toxin
<i>Cylindrospermum</i> sp.	neurotoxiny, anatoxin-a
<i>Gloeotrichia echinulata</i>	neurotoxiny, hepatotoxiny
<i>Nostoc linckia</i>	microcystin
<i>Nostoc paludosum</i>	microcystiny
<i>Nostoc rivulare</i>	microcystiny
<i>Fisherella epiphytica</i>	neurotoxiny, hepatotoxiny
<i>Hapalosiphon hibernicus</i>	microcystiny
<i>Hapalosiphon fontinalis</i>	neurotoxiny, hepatotoxiny
<i>Scytonema mirabile</i>	dermatotoxiny
<i>Scytonema ocellatum</i>	scytophycin
<i>Scytonema pseudohofmannii</i>	scytophycin
<i>Lyngbya aerugineo-coerulea</i>	neurotoxiny, hepatotoxiny, saxitoxin a microcystin
<i>Lyngbya majuscula</i>	neurotoxiny, lyngbyatoxin-a, debromoaplysiatoxin, aplysiatoxin
<i>Lyngbya wollei</i> (nyní <i>Plectonema wollei</i>)	PSP-toxiny
<i>Phormidium formosum</i>	microcystiny, homoanatoxin-a
<i>Oscillatoria nigro-viridis</i>	debromoaplysiatoxin, oscillatoxin-a

V rešerši jsou použity současné názvy sinic podle klíče Komárek & Anagnostidis 2005. Pokud byl v použité literatuře uveden starý název, uvádím jej pro úplnost v závorce.

1.6 Cíle práce

Cílem této práce bylo ověřit cytotoxicitu vybraných kmenů bentických a nárostových sinic, přesněji specifikovat poškození buněk pomocí specifických cytologických testů a pokusit se určit aktivní látky.

2. Metodika

Izolace a kultivace sinic

Celkem bylo testováno 14 kmenů bentických sinic: 9 kmenů bylo získáno z oficiálních sbírek a 5 bylo vyzolováno pro účely této práce. Původy kmenů a informace o jejich izolaci jsou shrnuty v tab. 2.

Sinice byly izolovány na agarových plotnách za použití média BG 11. Kultivace dostatečné biomasy pro testy toxicity probíhaly na tekutém médiu BG 11 za stálé teploty (28°C) a permanentního osvětlení ve skleněných válcích probublávaných vzduchem obohaceným 1,7% CO₂ po dobu 15-20 dní.

Tab. 2: Přehled testovaných kmenů bentických sinic, informace o jejich původu a izolaci

kmen	odborný název, autor	biotop	lokality	vyzoloval	sbírka
JM 91/06	<i>Phormidium chalybeum</i> (Mertens ex Gomont) Anagnostidis et Komárek	bentos jezera	Květné jezero - Podivín (Česká republika)	K. Skácelová (2006)	Mastní izolát
R.Lom	<i>Phormidium formosum</i> (Bory ex Gomont) Anagnostidis et Komárek	bentos	Růženin lom - Brno (Česká republika)	K. Skácelová (2006)	Mastní izolát
Sloup	<i>Phormidium</i> sp.	bentos rybníka	Sloup (Česká republika)	K. Skácelová (2006)	Mastní izolát
FISH	<i>Fisherella</i> sp.	periphyton horkého pramene	teplý pramen u jezera Van (Turecko)	V. Kasalický	-
SAG34.91	<i>Nostoc caeruleum</i> Lyngbye	bentos rybníka	Groden at Voslapp - Wilhelmshaven (Německo)	D. Mollenhauer (1983)	SAG
SAG59.79	<i>Nostoc caeruleum</i> Lyngbye	bentos jezera	Rambouillet, Etang de la Tour (Francie)	M. Tassinigny (1965)	SAG
SAG61.79	<i>Nostoc pruniforme</i> (Linné) Agardh	bentos jezera	Schöhsee - Plön/Holstein (Německo)	D. Mollenhauer (1964)	SAG
167	<i>Leptolyngbya</i> sp.	bentos malé nádrže	(Rusko)	neuveveno	CALU
168	<i>Phormidium</i> sp.	bentos malé nádrže	(Rusko)	neuveveno	CALU
CY OM	<i>Cylindrospermum</i> sp.	nárost na submerzní vegetaci rybníka	Malý Knapr - Zliv (Česká republika)	P. Hrouzek (2004)	-
HINDAK 2000/17	<i>Nodularia moravica</i> Hindák, Smarda et Komárek	periphyton	Fraum ühl - Podivín (Česká republika)	F. Hindák (2000)	CCALA (797)
HINDAK 1984/43	<i>Anabaena cf. oscillarioides</i> Bory de Saint-Vincent ex Bomet et Flahault	periphyton	South Indian Lakes - Winnipeg (Kanada)	F. Hindák (1984)	CCALA (002)
LC27S01	<i>Nostoc</i> sp.	periphyton kamenitého břehu jezera	Alberta (Kanada)	(2001)	ISE CNR
101	<i>Nostoc calcicola</i> Brébisson ex Bomet et Flahault	periphyton řeky	vodopády Busra - Mondulkiiri (Kambodža)	P. Hrouzek (2005)	MBU AVČR

Lyofilizace a extrakce

Biomasa byla sklizena odstředěním (3500 rpm, 15 min.). Sklizená biomasa byla zmrazena v hlubokomrazícím boxu (-80°C) a lyofilizována.

200 µg lyofilizované sinicové biomasy bylo dezintegrováno v třecí misce za použití mořského písku a 3 ml 70% methanolu. Rozdrcená biomasa byla za pomoci dalších 7 ml methanolu kvantitativně převedena do zkumavky a extrahována po dobu jedné hodiny v temném prostředí. Poté byly zkumavky stočeny při 4500 RPM po dobu 15 minut.

Supernatant byl převeden mikropipetou do odparné baňky o objemu 50 ml a odpařen na vakuové odparce. Suchý extrakt byl rozpuštěn v 1 ml 70% methanolu, aby výsledná koncentrace získaného extraktu byla 200 µg lyofilizované sušiny na 1 ml methanolu. Vzniklé

precipitáty byly rozpuštěny za pomoci ultrazvuku. Extrakty byly uchovávány ve vialkách o objemu 2 ml v mrazicím boxu.

Kultivace buněčné linie HeLa a příprava experimentu

Testy toxicity byly prováděny na adherentní buněčné linii HeLa lidské rakoviny děložního čípku. Kultura byla získána z laboratoře imunologie Parazitologického ústavu AVČR. Buňky byly sterilně kultivovány v inkubátoru za stálé teploty 37°C a vysoké relativní vlhkosti. Ke kultivaci bylo používáno médium RPMI-1640 (Martin 1994) s přidavkem 5% kravského fetálního séra, 1% L-glutaminu, 1% směsi antibiotik a antimykotik (Sigma A-7292) a 0,1% 50nM merkaptoethanolu. Vzhledem k tomu, že se jedná o adhezivní buněčnou linii, pasáž byla prováděna oplachováním sterilním PBS a následnou trypsinizací každé 3 dny.

Test toxicity (MTT test)

Testování cytotoxicity extraktů bylo prováděno pomocí MTT testu (Mosmann 1983). Metoda spočívá v redukci žluté tetrazolinové soli [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid] na nerozpustné fialové krystalky formazanu, ke které dochází na mitochondriální membráně živých buněk. Množství formazanu tedy odpovídá množství živých metabolizujících buněk a po spektrofotometrickém odečtení hodnot je možné z poměru testovacích a kontrolních buněk vypočítat výslednou viabilitu (Mosmann 1983).

Cytotoxicita byla testována v sterilních 96-jamkové mikrotitračních destičkách. Do každé vnější jamky bylo napipetováno 250 µl deionizované vody, aby se omezilo vypařování z testovacích jamek a do všech zbývajících po 200 µl suspenze buněk o koncentraci přibližně 75 až 120 x 10⁶ buněk na 1 ml. Panel byl 24 hodin inkubován v inkubačním boxu (37°C, 4,5% CO₂), aby buňky mohly naadherovat a narůst do dostatečné koncentrace.

Mezitím byly z extraktů, média a methanolu připraveny testovací roztoky o takové koncentraci, aby bylo přeneseno 10 µl extraktu na jamku a zároveň koncentrace MeOH v jamce nepřesáhla 1%. Toho bylo docíleno odpařením extraktu pod dusíkem a rozpuštěním v metanolu a následně v médiu pro tkáňové kultury.

Do jamek obsahujících suspenzi buněk byly napipetovány připravené testovací roztoky vždy v triplicátech tak, že každý sloupec obsahoval tři testovací jamky a tři kontrolní. Panel byl umístěn do inkubátoru a buňky byly exponovány po dobu 24 hodin. Poté bylo do každé jamky napipetováno 10 µl roztoku MTT o koncentraci 4mg MTT na 1 ml Hank's solution, který byl předem přefiltrován přes bakteriální filtr. Panel byl inkubován 4 hodiny a následně stočen na centrifuze (3000 RPM, 15 min).

Z panelu byl odstraněn supernatant a formazanové krystalky byly následně rozpuštěny v 200 µl dimethylsulfoxidu na jamku.

Absorbance byla změřena na spektrofotometru Tecan SUNRISE Elisa reader po 180 sekundách třepání (pro dokonalé rozpuštění) ve vlnových délkách 590nm (hlavní) a 640nm (referenční).

Po odečtení hodnot byly zprůměrovány vždy triplicáty pokusných jamek a triplicáty kontrol. Výsledná hodnota cytotoxicity byla vypočtena jako poměr testovacích a kontrolních jamek a vyjádřena jako míra viability (případně inhibice) buněk v procentech.

Analýza extraktů pomocí HPLC-MS

Složení sinicových extraktů bylo analyzováno pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (dále HPLC-MS). Vzorek byl analyzován za užití reverzní fáze (kolona: Zorbax C8, 5 µm, 4,6 x 150 mm) za stabilní teploty 30°C a průtoku mobilní fáze 0,6 ml/min. Jako mobilní fáze byl použit gradient metanol/voda (30-100 % MeOH během 30 min., 5min 100% MeOH). Pro lepší ionizaci byla do rozpouštědel přidána kyselina mravenčí o koncentraci 0,1%. Chromatograf (Agilent 1100) byl propojen s hmotnostním spektrometrem (HP 1100 Agilent mass spectrometer s iontovou pastí HP 100 MSD).

Získané chromatogramy (UV-chromatogram a Total-ion chromatogram) byly analyzovány a získaná data (UV-absorpční spektra a molekulární hmotnosti) byly porovnány s údaji známými z literatury, zda se nejedná o některý ze známých toxinů. Výpočtem přítomnosti sodných a draselných aduktů bylo zjišťována přítomnost chemických látek v lokálních maximech chromatogramů – tzv. „*peak*“.

U vybraných látek byly analyzovány štěpy molekulárního iontu v MS2 a MS3 spektru za účelem zjištění jejich struktury.

Frakcionace za účelem zjištění aktivní látky

Na základě předešlé HPLC-MS analýzy byla navržena frakcionace kmenů vykazujících vysokou cytotoxicitu. Frakcionace probíhala podle retenčního času, MS a UV záznamu.

Frakce byly jímány do jednotlivých odparných baněk, odpařeny a zakoncentrovány na stejnou koncentraci, jakou měl původní extrakt.

Jednotlivé frakce byly opět otestovány pomocí MTT testu za účelem zjištění aktivní látky.

Imunofluorescenční mikroskopie (IFAT)

V Laboratoři buněčné imunologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy bylo provedeno imunofluorescenční značení jednotlivých buněčných struktur (f-aktin, časné a recyklující endozomy podílející se na příjmu transferinu, lysozomy a jádra) po vystavení aktivním frakcím vybraných extraktů. Následně byla pořízena fotodokumentace monitorující postupné změny buněčných kompartmentů v různých časových intervalech (mikroskop Cell-R, Olympus). Inkubace buněk s extraktem v časovém experimentu probíhala po dobu 1, 5, 12 a 24 hodin. Každému času odpovídala jedna jamka s jedním krycím sklíčkem.

HeLa buňky používané k experimentu byly kultivovány na sterilních podložních sklíčkích vložených do 24-jamkových kultivačních destiček (Nunc, objem DMEM média s 10 % FBS 2ml) .

Do každé testovací jamky byl přidán předem připravený expoziční roztok (aktivní frakce rozpuštěná v 40 μ l MeOH a 180 μ l kultivačního média) v koncentraci 50 μ l expozičního roztoku na 1 ml média s buňkami. Dvě jamky byly ponechány jako kontrolní.

Buňky s expozičním roztokem byly po požadovaný čas kultivovány v CO₂ inkubátoru za stálé teploty 37°C a vysoké relativní vlhkosti. Do každé jamky byly 15 min před ukončením inkubace s frakcemi přidány 2 μ l fluorescenčně značeného transferinu (FITC, EXBIO, výsledná koncentrace 5 mg/ml) pro testování klatrinem-zprostředkované endocytózy. Poté bylo médium slito a reakce fixována 3,7 % formaldehydem (3 ml na jamku) po dobu 20 minut. Po slítí formaldehydu byly jamky po dobu 5 minut třikrát promyty PBS. Do každé jamky bylo přidáno 1 ml 0,25 % tritonu v PBS pro permeabilizaci buněčné membrány. Po 5 minutách byl panel opět třikrát promyt PBS. Následně bylo do každé jamky na 10 minut

přidáno po 1 ml 2 % BSA (blokování). Poté byly v preparátech vizualizovány lysozomy pomocí primární protilátky proti molekule Lamp 1 (Santa Cruz, výsledná koncentrace 5 µg/ml) po dobu 40 minut.

Panel byl pětkrát promyt PBS po dobu 15 minut. Značení bylo dokončeno pomocí sekundární protilátky (Molecular Probes, GAM-647) a fluorescenčně značeného faloidinu (Phalloidin-Alexa 564). Následovalo intenzivní promytí PBS. Preparát pro fluorescenční detekci (obsahující 4 různé fluorescenční značky) byl dokončen uzavřením krycího sklíčka do zalévacího média Mowiol s rozpuštěným DAPI pro detekci jader.

Všechny inkubace během barvení probíhaly ve tmě.

Druhý den byla sklíčka prohlédnuta pod fluorescenčním mikroskopem a následně bylo vyhodnoceno poškození buněk.

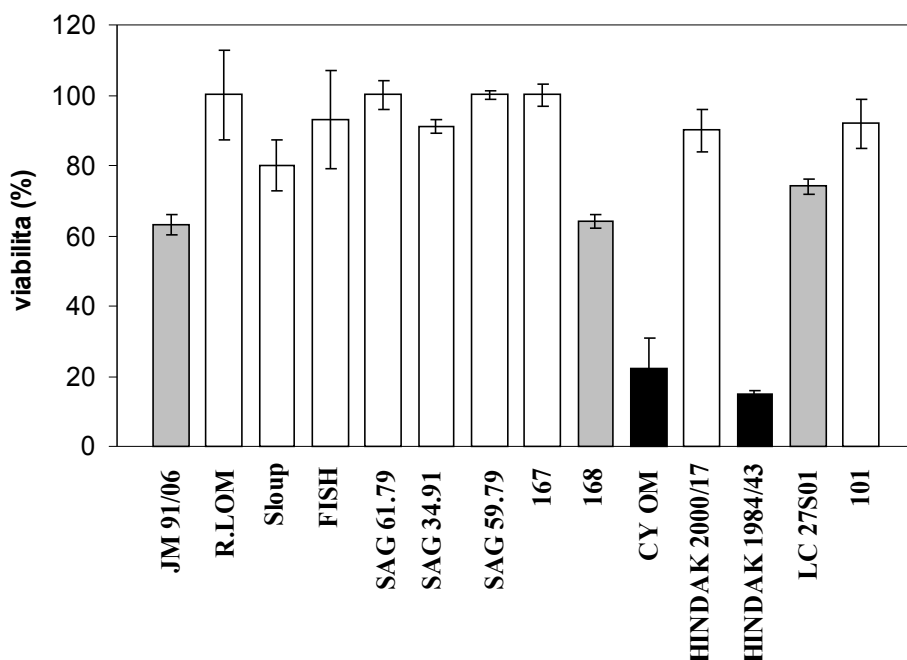
3. Výsledky

3.1 Kultivace a testy toxicity

Z bentických sinic nasbíraných v přírodě byly izolovány 3 čisté kmeny. Ve všech případech se jednalo o sinice rodu *Phormidium*.

Cytotoxická aktivita vůči buněčné linii HeLa byla testována u 14 kmenů bentických sinic. Z toho 3 kmeny vykazovaly mírné účinky projevující se snížením viability na 63-74 % (*Phormidium chalybeum* JM91/06, *Phormidium* sp. 168 a *Nostoc* sp. LC 27S01). Efekt dalších 2 kmenů byl silný, způsobující snížení viability na 15 % a 23 % (*Cylindrospermum*

sp. CY OM a *Anabaena oscillaroides* HINDAK 1984/43). Míra toxicity surových extraktů jednotlivých kmenů je patrná z obr. 2.



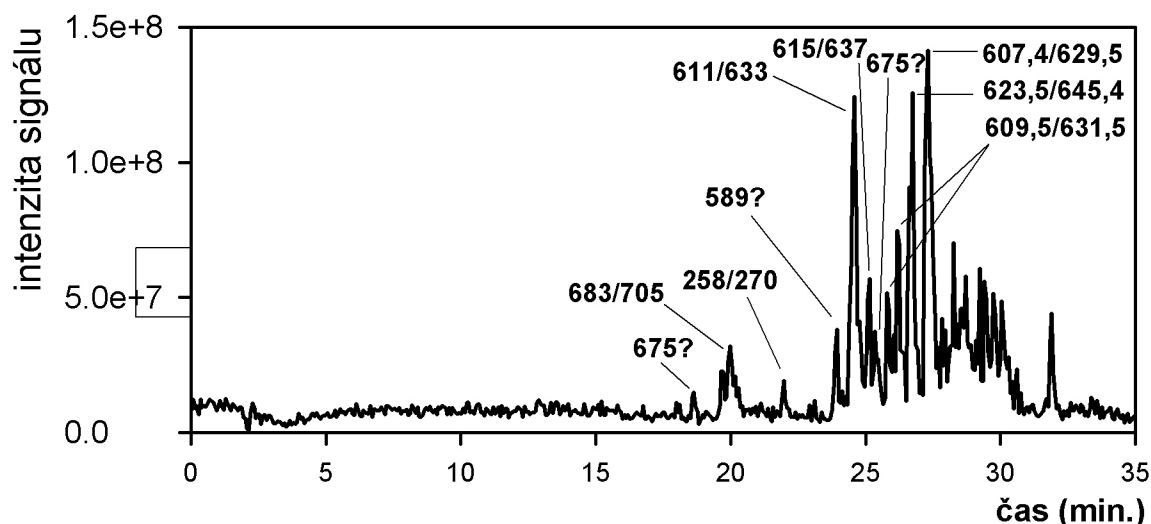
Obr. 2: Cytotoxicita surových extraktů testovaných bentických sinic vůči buněčné linii HeLa. Hodnoty vyjadřují viabilitu buněk po 24hodinové expozici extraktu. černé sloupce - silná toxicita, šedé sloupce - mírná toxicita, bílé sloupce – netoxické extrakty.

3.2 HPLC analýzy toxických extraktů, jejich frakcionace a testy toxicity jednotlivých frakcí

Pro další analýzy a podrobnější experimenty byly vybrány pouze kmeny vykazující silnou cytotoxicitu. Jejich extrakty byly nejprve analyzovány za pomoci HPLC-MS a následně frakcionovány za účelem zjištění aktivní frakce. Vzhledem k faktu, že při analýze a frakcionaci byl použit gradient ze vzrůstajícím podílem metanolu, byly méně polární látky vymývány v pozdějších retenčních časech. Na obou prezentovaných chromatogramech jsou tudíž v rozmezí 24-35 min patrné intenzivní *peaky* patřící pigmentům a jejich degradačním produktům, společně s kontaminanty (např. ftaláty). Proto v dalším textu nejsou interpretovány veškeré chromatografické *peaky* v tomto rozmezí.

3.2.1 Extrakt *Cylindrospermum* sp. CY OM

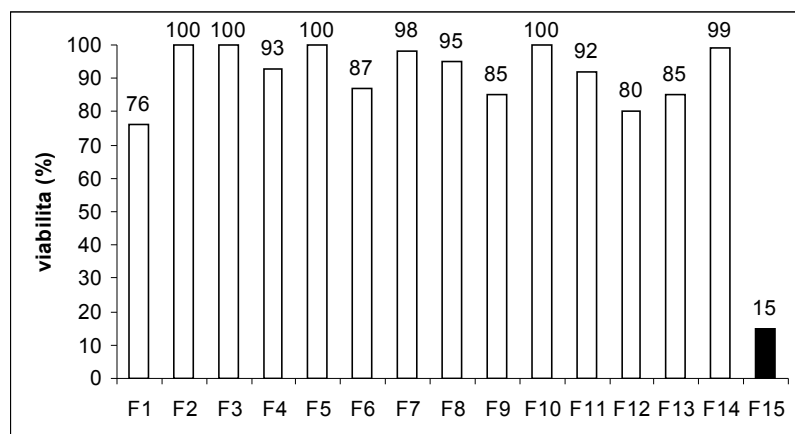
V extraktu sinice *Cylindrospermum* sp. CY OM byly identifikovány molekulární ionty na základě přítomnosti sodných aduktů u 10 látek (obr. 3). Pět z nich se nacházelo v retenčních časech do 25. minuty, ostatní byly vymývány v pozdějších retenčních časech, což napovídá o menší polaritě těchto látek. Překvapivě v rozmezí retenčních časů 0-18,6 min nebyly na výstupu z hmotnostního spektrometru patrné žádné chromatografické *peaky*, což může svědčit o slabé ionizaci polárnějších látek přítomných v tomto extraktu nebo jejich nepřítomnosti. Na základě přítomnosti *peaků* viditelných v UV (220,280 nm) (obr. 4/B,C) můžeme usuzovat, že jsou v tomto extraktu přítomny polární látky ze slabou ionizací.



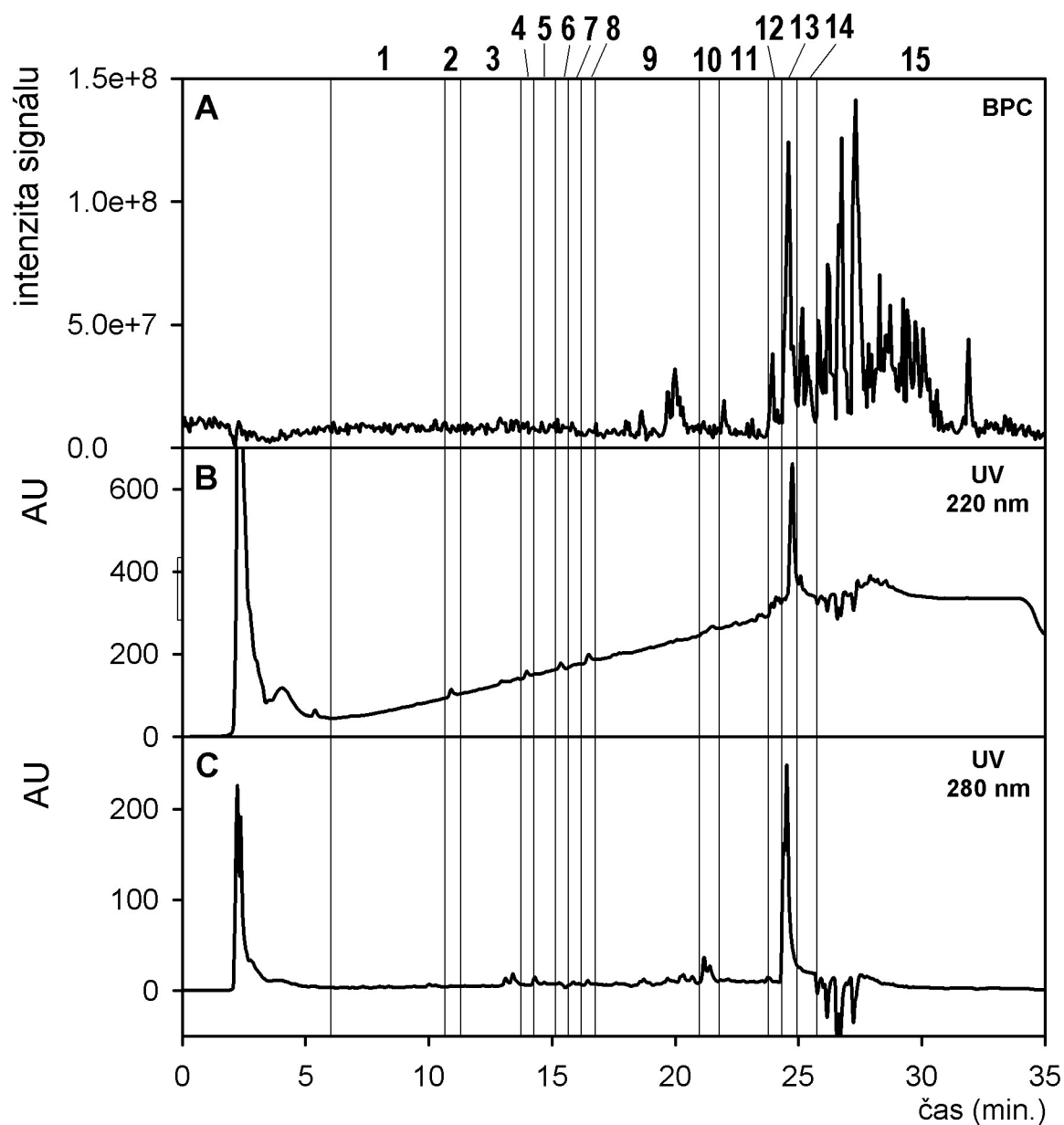
Obr. 3: Chromatogram surového extraktu sinice *Cylindrospermum* sp. CY OM (Base peak chromatogram). Chemické látky identifikované na základě přítomnosti sodných aduktů jsou vyznačeny u konkrétních *peaků*. Hodnoty v grafu udávají m/z molekulárního iontu $[M+H^+]$ a jejich sodného aduktu $[M+Na^+]$. U *peaků* označených hodnotou s ? byla intenzita sodného aduktu na hranici šumu.

Na základě předešlé analýzy byl extrakt tohoto kmene rozdělen do 15 frakcí (obr. 4). Frakcionace probíhala podle nejvýraznějších *peaků* v Total Ion Current chromatogramu a UV chromatogramu (220 a 280nm). Ve frakcích 2, 4, 6, 8 a 10 byly přítomny látky absorbující v UV spektru, které kvůli své špatné ionizaci nejsou patrné v BPC chromatogramu získaného hmotnostním spektrometrem.

Cytotoxické působení jednotlivých frakcí bylo otestováno pomocí MTT testu. Cytotoxická aktivita jednotlivých frakcí je viditelná v obr. 5.

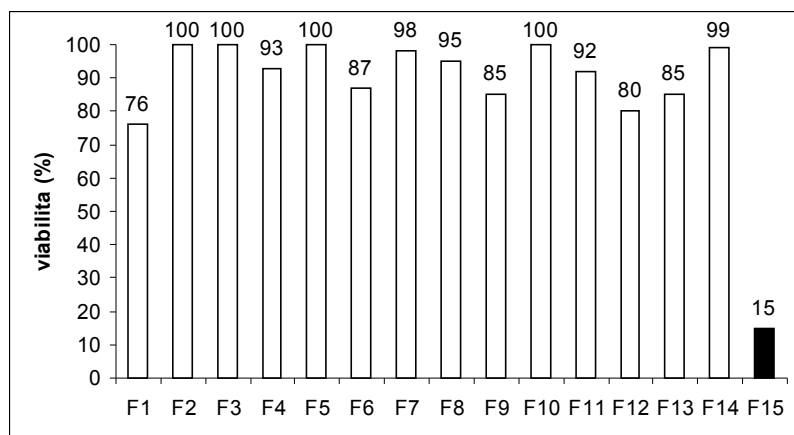


Obr. 5: Cytotoxicita jednotlivých frakcí kmene *Cylindrospermum sp. CY OM* vůči buněčné linii HeLa. Hodnoty vyjadřují viabilitu buněk po 24hodinové expozici. černý sloupec - silná toxicita, bílé sloupce – netoxické frakce.



Obr. 4: Frakcionace extraktu kmene *Cylindrospermum* sp. CY OM. **A** - Base Peak chromatogram, **B** – UV chromatogram (220nm), **C** – UV chromatogram (280nm). AU – absorbační jednotky (absorbant unit).

Cytotoxické působení jednotlivých frakcí bylo otestováno pomocí MTT testu. Cytotoxická aktivita jednotlivých frakcí je viditelná v obr. 5.



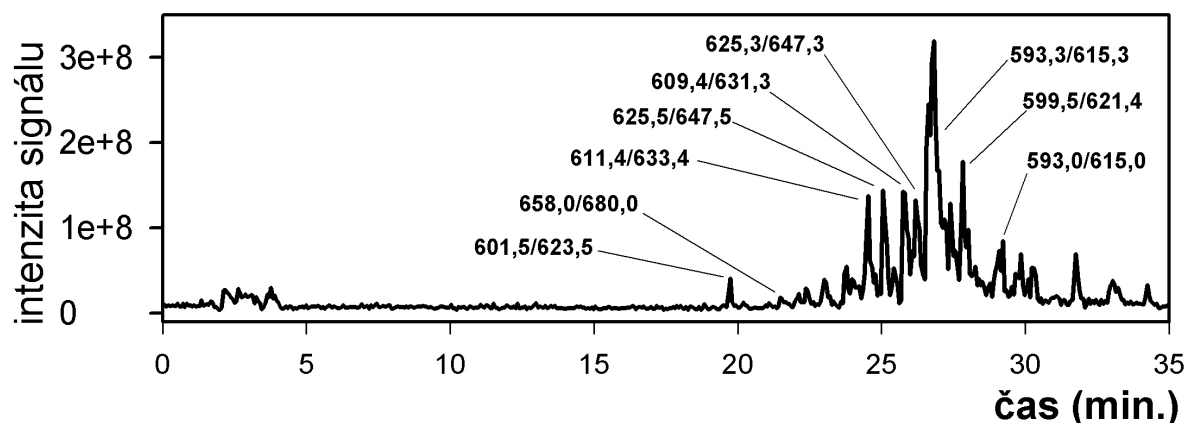
Obr. 5: Cytotoxicita jednotlivých frakcí kmene *Cylindrospermum sp. CY OM* vůči buněčné linii HeLa. Hodnoty vyjadřují viabilitu buněk po 24hodinové expozici. černý sloupec - silná toxicita, bílé sloupce – netoxické frakce.

Inhibici vyšší než 25 % vykazovala pouze frakce 15 (RT 25,8 až 35 min). Viabilita buněčné linie HeLa po 24hodinové expozici touto frakcí byla 15 %, což můžeme charakterizovat jako silný cytotoxický efekt. V hmotnostních spektrech příslušných retenčních časů byly nalezeny následující molekulární ionty: 607, 609, 623 $[M+H]^+$, což potvrzuje přítomnost jejich sodných aduktů 629, 631, 645 $[M+Na]^+$. Molekulární iont 609 $[M+H]^+$ odpovídá na základě molekulární váhy sinicovému peptidu toxinu microcinu SF608 (Banker & Carmeli 1999), který je inhibítoem proteázy.

Mírně snížená viabilita byla nalezena také u frakce 1, ale vzhledem k tomu, že se jednalo o hraniční hodnotu, nebyla frakce dále považována za cytotoxickou. U frakce 11 (RT 21,6 až 23,8 min) nebyl prokázán cytotoxický efekt (viabilita buněk byla 92%) avšak v optickém mikroskopu bylo patrné narušení schopnosti adheze – viz obr. 10.

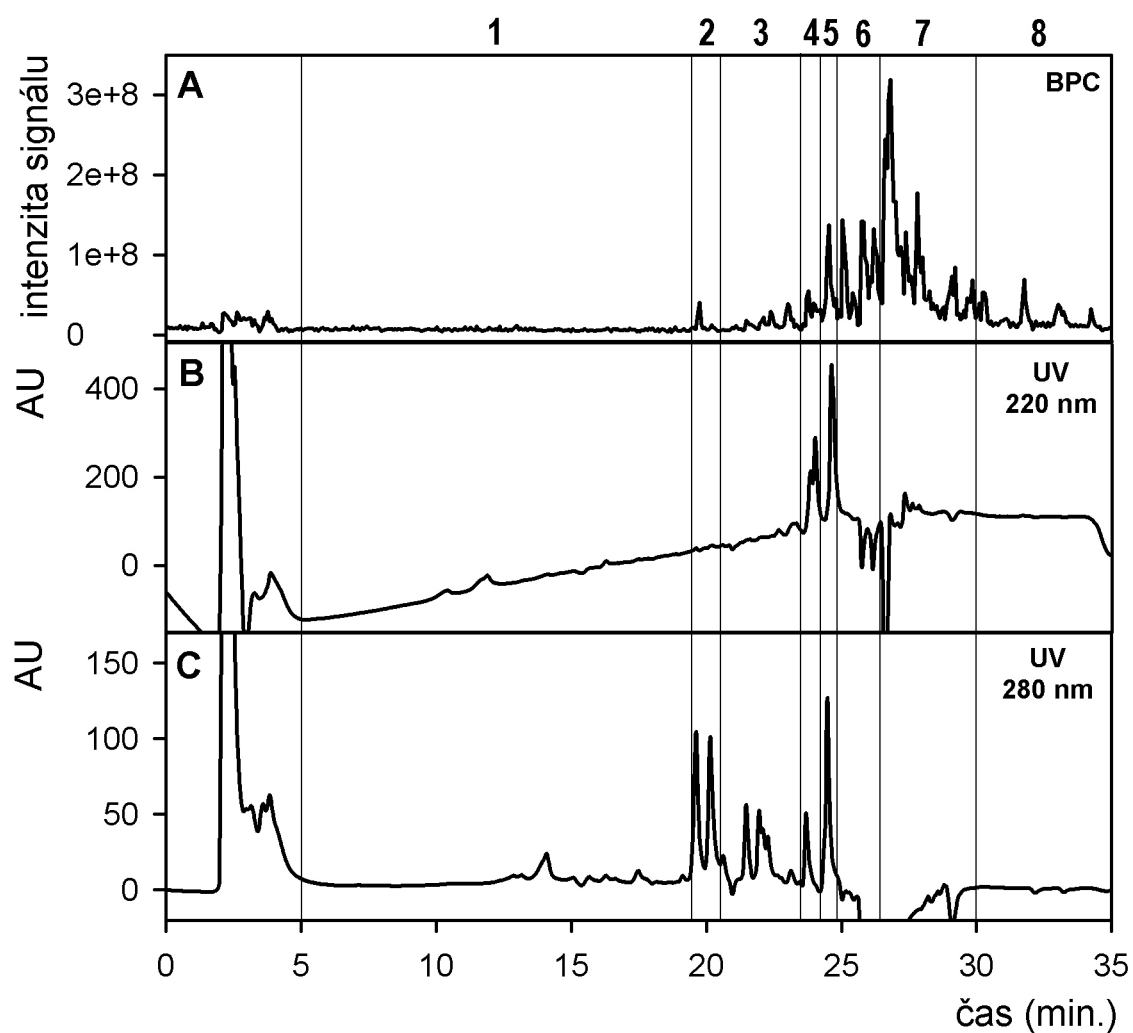
3.2.2 Extrakt *Anabaena oscillarioides* HINDAK 1984/43

V extraktu sinice *Anabaena oscillarioides* HINDAK 1984/43 bylo na základě přítomnosti sodných aduktů identifikováno 9 látek (obr. 6). Všechny tyto látky se nacházely v retenčním čase mezi 19. a 30. minutou, což svědčí o jejich nižší polaritě. V extraktu mohou být přítomny i polárnější látky, které se vymývají v dřívějších retenčních časech, avšak vlivem špatné ionizace nejsou patrné v Base Peak chromatogramu.



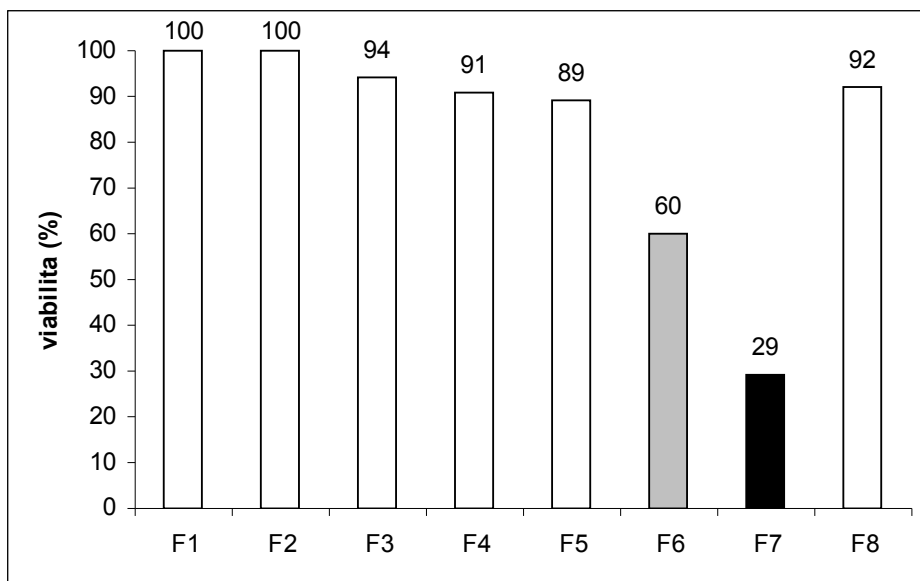
Obr. 6: Chromatogram surového extraktu sinice *Anabaena oscillarioides* HINDAK 1984/43 (Base peak chromatogram). Chemické látky identifikované na základě přítomnosti sodných aduktů jsou vyznačeny u konkrétních peaků. Hodnoty v grafu udávají m/z molekulárního iontu $[M+H^+]$ a jejich sodného aduktu $[M+Na^+]$.

Extrakt byl rozdělen na základě *peaků* v Total Ion Current chromatogramu a UV chromatogramu (220 a 280nm) na osm frakcí (obr. 7).



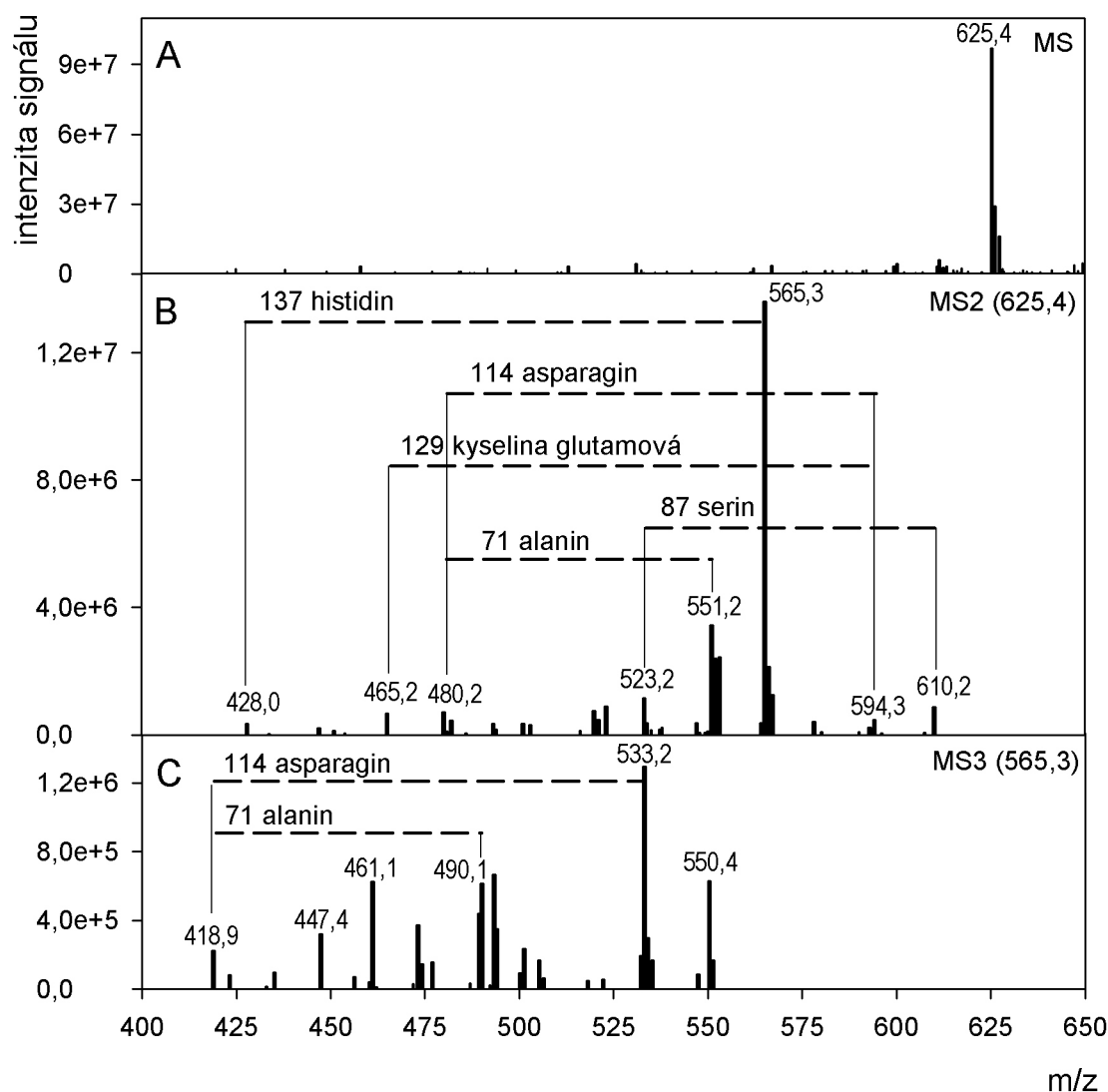
Obr. 7: Frakcionace extraktu kmene *Anabaena oscillarioides* HINDAK 1984/43. **A** - Base Peak chromatogram, **B** - UV chromatogram (220nm), **C** - UV chromatogram (280nm). AU – absorbační jednotky (absorbant unit).

Jak je patrné z obr. 8, pomocí MTT testu byly zjištěny dvě aktivní frakce (frakce 6 a frakce 7) ležící vedle sebe. Přesto však na základě distribuce látky, která pravděpodobně způsobuje toxicitu frakce 6, můžeme vyloučit, že by se jednalo o jednu látku zasahující do obou frakcí.



Obr. 8: Cytotoxicita jednotlivých frakcí kmene *Anabaena oscillarioides* HINDAK 1984/43 vůči buněčné linii HeLa. Hodnoty vyjadřují viabilitu buněk po 24hodinové expozici. černý sloupec - silná toxicita, šedý sloupec – mírná toxicita, bílé sloupce – netoxické frakce.

Inhibici vyšší než 25 % vykazovaly dvě frakce. Frakce 6 (RT 25,1 až 26,8 min) inhibovala buněčnou linii HeLa po 24hodinové expozici o 40 %. V této frakci byly na základě přítomnosti sodného aduktu zjištěny tři látky o molekulárních váhách 608,4 (RT=26,0 min), 624,3 (RT=25,2 min) 624,4 (RT=26,1 min) (obr. 6). Následnou automatickou fragmentací iontu 625 bylo získáno spektrum, v němž rozdíly mezi štěpy odpovídali 5 aminokyselinám (histidin, serin, asparagin, kys. glutamová, alanin) (obr. 9/B). Součet molekulárních vah těchto aminokyselin činil 538, rozdíl mezi touto hodnotou a vahou molekulárního iontu je 87, což odpovídá ztrátě serinu. Je tedy zřejmé, že látka obsahuje dvě molekuly serinu. V MS2 byl též nalezen rozdíl odpovídající ztrátě dvou serinů, z čehož je patrné, že obě molekuly se nacházejí vedle sebe. Další fragmentace (MS3) poskytla štěpy odpovídající ztrátám asparaginu a alaninu (obr. 9/C). Na základě ztrát odpovídajících párům aminokyselin byla navržena struktura lineárního peptidu o sekvenci: **Asn-Ala-His-Ser-Ser-Glu**.



Obr. 9: Hmotnostní spektra extraktu kmene *Anabaena oscillarioides* HINDAK 1984/43. A – hmotnostní spektrum ve 25,3 minutě. B – fragmentace molekulárního iontu 625,4. Čárkovaně jsou naznačeny aminokyselinové ztráty. C – fragmentace molekulárního iontu 565,3.

Ve frakci 7 (RT 26,8 až 30 min, 71% inhibice) byly zjištěny dvě látky o hmotách 352 a 592. Molekulární váha 352 odpovídá toxinu hapalindolin A (Klein et al. 1995), ale tento iont nebyl hmotnostním spektrometrem vybrán pro fragmentaci, tudíž nelze zjistit nic o struktuře této látky a ověřit, zda se skutečně jedná o daný toxin nebo pouze o shodu molekulární váhy. Molekulární váha druhé látky neodpovídá žádnému známému toxinu. Její

molekulární ion má sodný adukt a o její struktuře lze na základě fragmentace v MS2 spektru říci pouze to, že obsahuje aminokyselinu glycin.

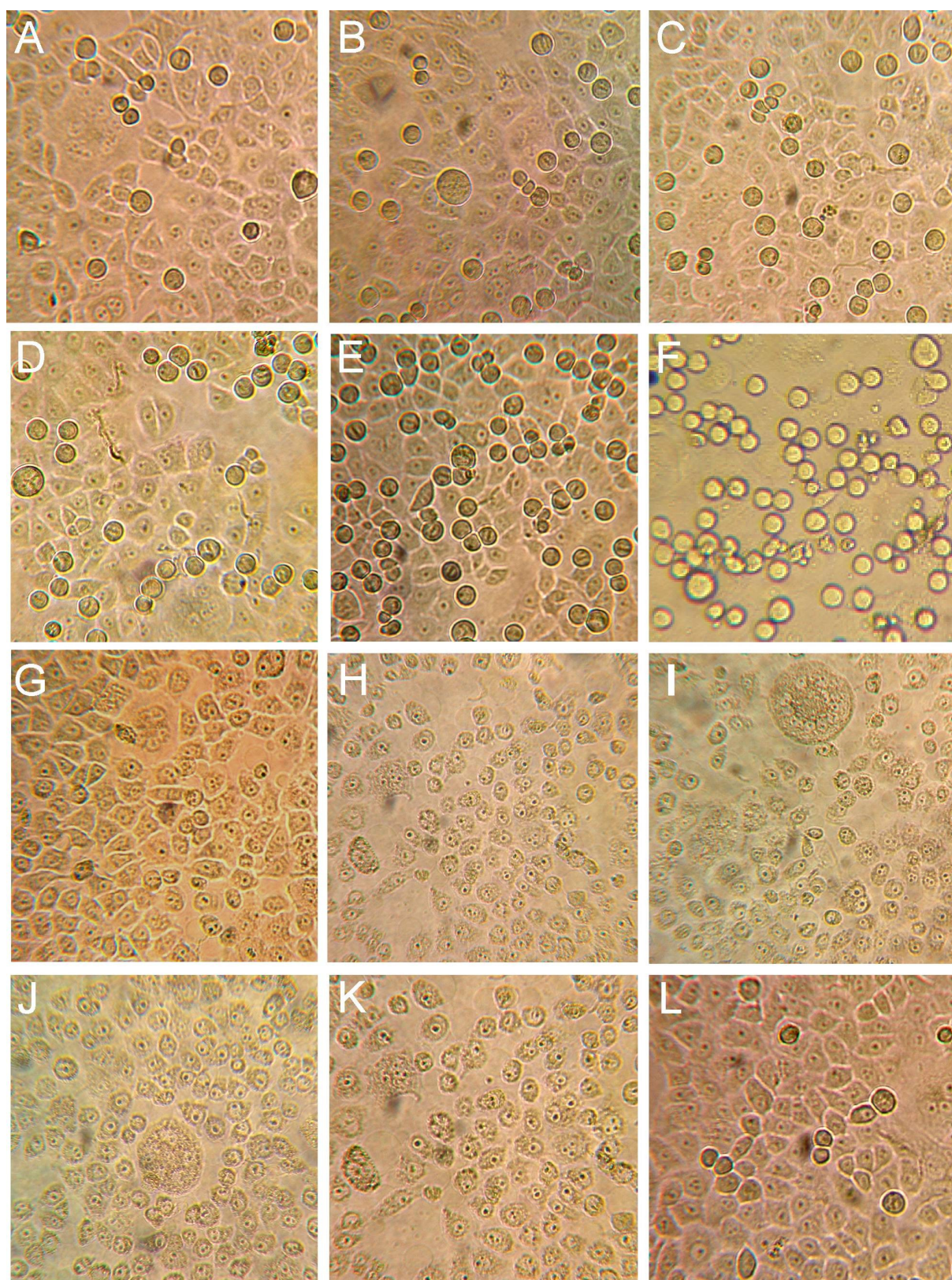
3.3 Testování biologické aktivity aktivních frakcí na buněčné linii HeLa

3.3.1 Extrakt *Cylindrospermum* sp. CY OM

Tento extrakt obsahoval dvě frakce působící poškození buněk.

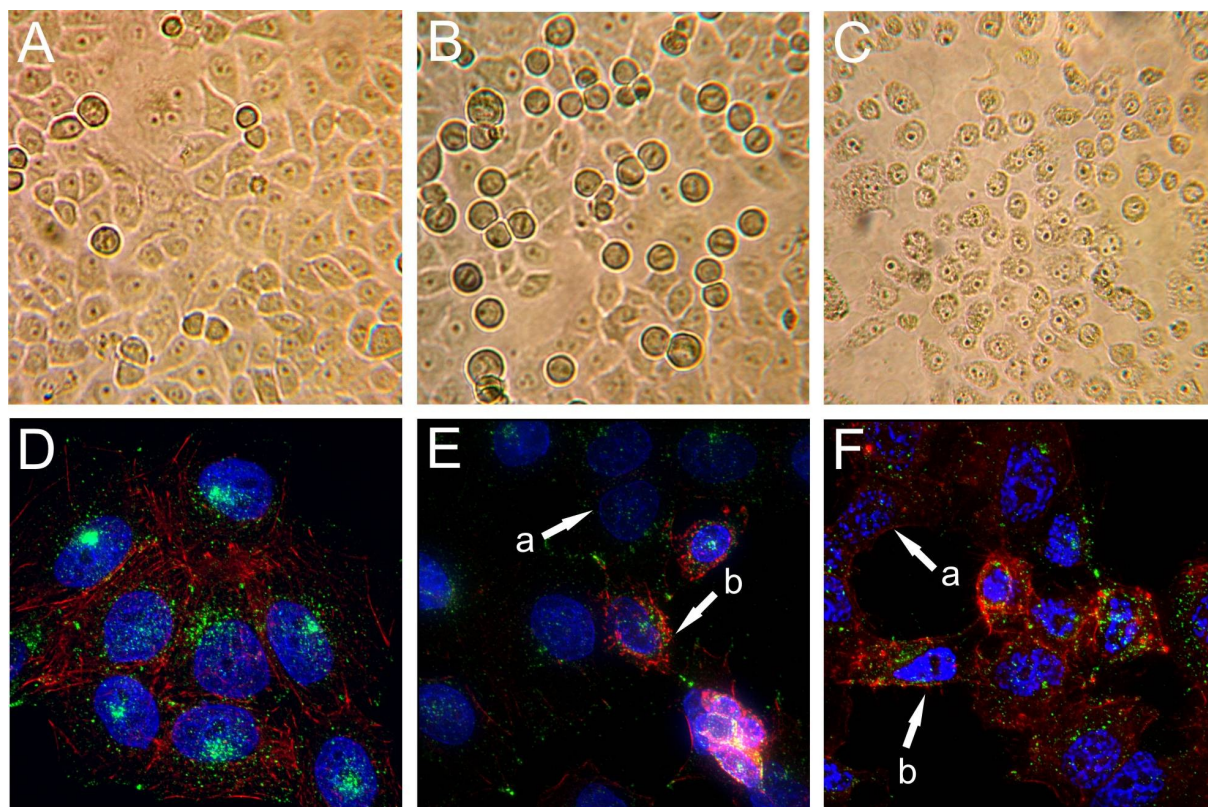
Frakce 11 působila v optickém mikroskopu viditelné narušení adheze buněk, aniž by zřetelně snížila jejich viabilitu. Tento efekt nastupoval pozvolna od páté hodiny a postupně se prohluboval (obr. 10/A-F). Při některých opakováních došlo k zakulacení a uvolnění do média 100 % buněk. Buňky se zabalovaly do kuliček a uvolňovaly do média, ale přesto i po 24hodinové inkubaci s frakcí zůstávaly živé (viabilita 92 %). Fluorescenčním barvením jader, aktinového cytoskeletu a transferinu se ukázalo, že po 12 hodinách dochází k dramatickému přeskupení kortikálního aktinu (12/B). Ten se začíná smršťovat a přesouvat se směrem k jádru (obr. 11/E, 12/C) a po 24 hodinách následně dochází k výraznému snížení aktinového signálu a v některých buňkách dokonce k jeho vymizení (obr. 11/E). V buňkách, kde je signál patrný, tvoří aktin jasně definované granule kolem jádra (obr. 11/E, 12/C). I přes tyto změny nejsou buněčná jádra poškozena a viabilitu buněk dokazuje též pozitivní signál transferinu, což dokazuje, že v buňkách stále probíhá klatrinem zprostředkovaná endocytóza (obr. 11/E).

Zcela jiné působení bylo pozorováno u frakce 15 izolované ze stejného kmene. Frakce působila výrazně cytotoxicky – 85 % inhibice. V procházejícím světle byla patrná změna morfologie buněk již po 5 hodinách expozice s touto frakcí, kdy se buňky začaly lehce deformovat a v cytosolu se začínají tvořit granule (obr. 10/G). Po 9 hodinách expozice již bylo zasaženo 100% buněk (obr. 10/H), na některých buňkách je též patrné „vyhřeznutí“ cytoplasmy a vytvoření vakovitých struktur (obr. 10). Granule byly přítomny u všech buněk po 24 hodinách. Zdá se, že tato frakce také u určitého procenta buněk blokuje cytokinezi a způsobuje vyšší výskyt mnohojaderných forem, než je obvyklé (obr. 10/I, J, K). Pomocí fluorescenčního mikroskopu byla zjištěna výrazná kondenzace a následná fragmentace jader po 12 hodinové expozici (obr. 11/F, 12/E, F). Dále pak byl výrazně zasažen aktinový cytoskelet (obr. 11/F, 12/B, C).

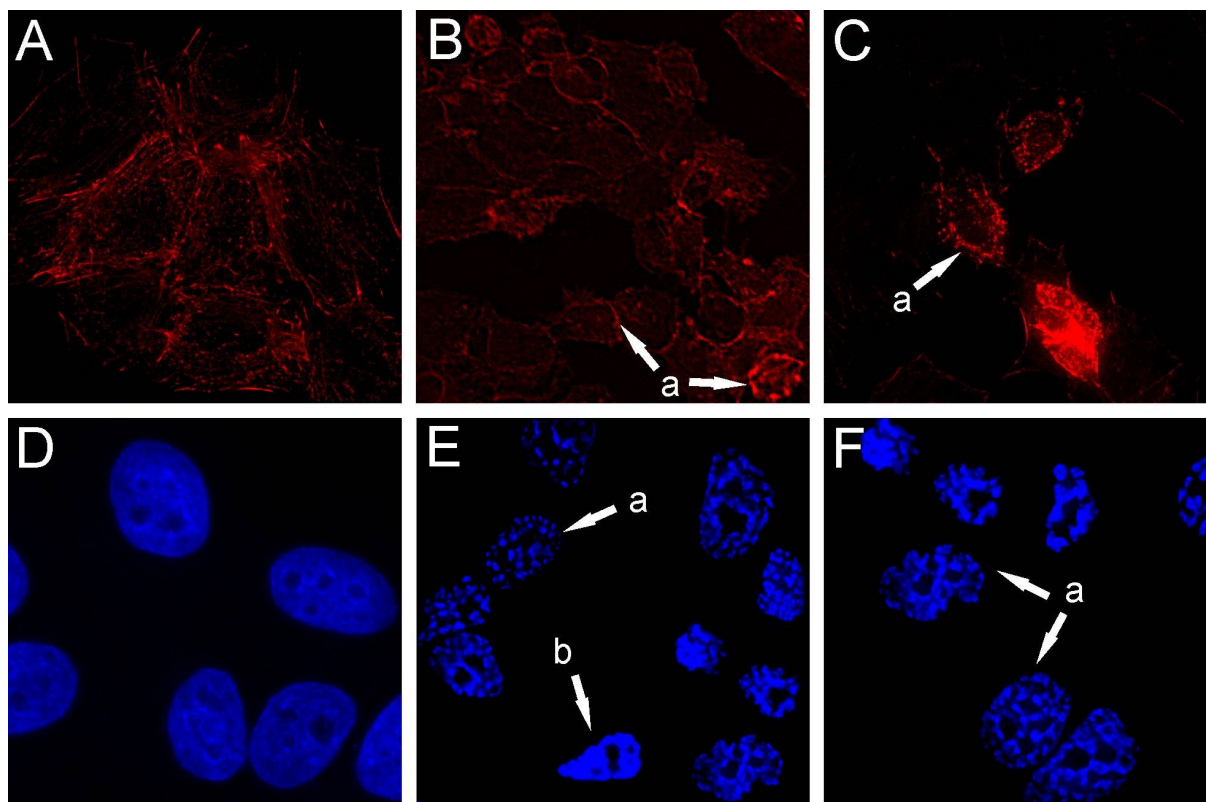


Obr. 10: Buněčná linie HeLa exponovaná frakcemi 11 (A až F) a 15 (G až K) extraktu *Cylindrospermum* sp. CY OM v různých časových intervalech. Frakce 11 - A – 5 hodin, B – 9

hodin, C - 12 hodin, D - 16 hodin, E - 24 hodin, F - 24 hodin (jiné opakování, při němž bylo zasaženo 100 % buněk). Frakce 15 - G - 5 hodin, H - 9 hodin, I - 12 hodin, J - 16 hodin, K - 24 hodin. L - kontrola.



Obr. 11: HeLa buňky po expozici aktivním frakcím extraktu *Cylindrospermum* sp. CY OM pod optickým mikroskopem (A, B, C) a pod fluorescenčním mikroskopem (D, E, F). U snímků z fluorescenční mikroskopie je červeně zobrazen aktin, zeleně fluorescenčně značený transferin a modře jádra. A - kontrola, B - 24hodinová inkubace s frakcí 11, C - 24hodinová inkubace s frakcí 15, D - kontrola, E - 24hodinová inkubace s frakcí 11 (a - buňka bez aktinu, b - buňka s granulovitým aktinem shluklým kolem jádra), F - 12hodinová inkubace s frakcí 15 (a - fragmentované jádro, b - kondenzované jádro).

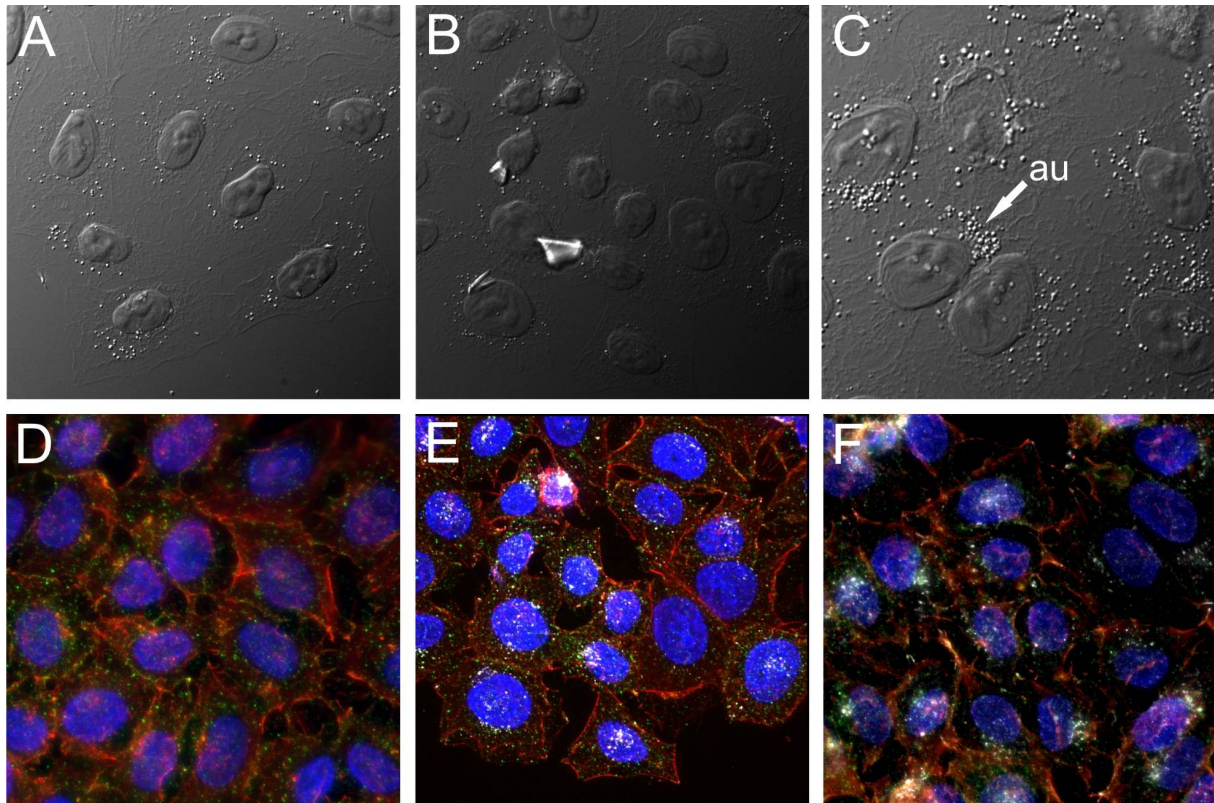


Obr. 12: Fluorescenčně obarvený aktinový cytoskelet (červeně) po expozici frakci 11 (A, B, C) a jádra (modře) po expozici frakci 15 (D, E, F). A – kontrola, B – výrazný kortikální aktin po 12 hodinové inkubaci s frakcí 11, C – zhroucený aktin po 24hodinové inkubaci s frakcí 11, D – kontrola, E, F – kondenzovaná (b) a fragmentovaná (a) jádra po 24hodinové inkubaci s frakcí 15.

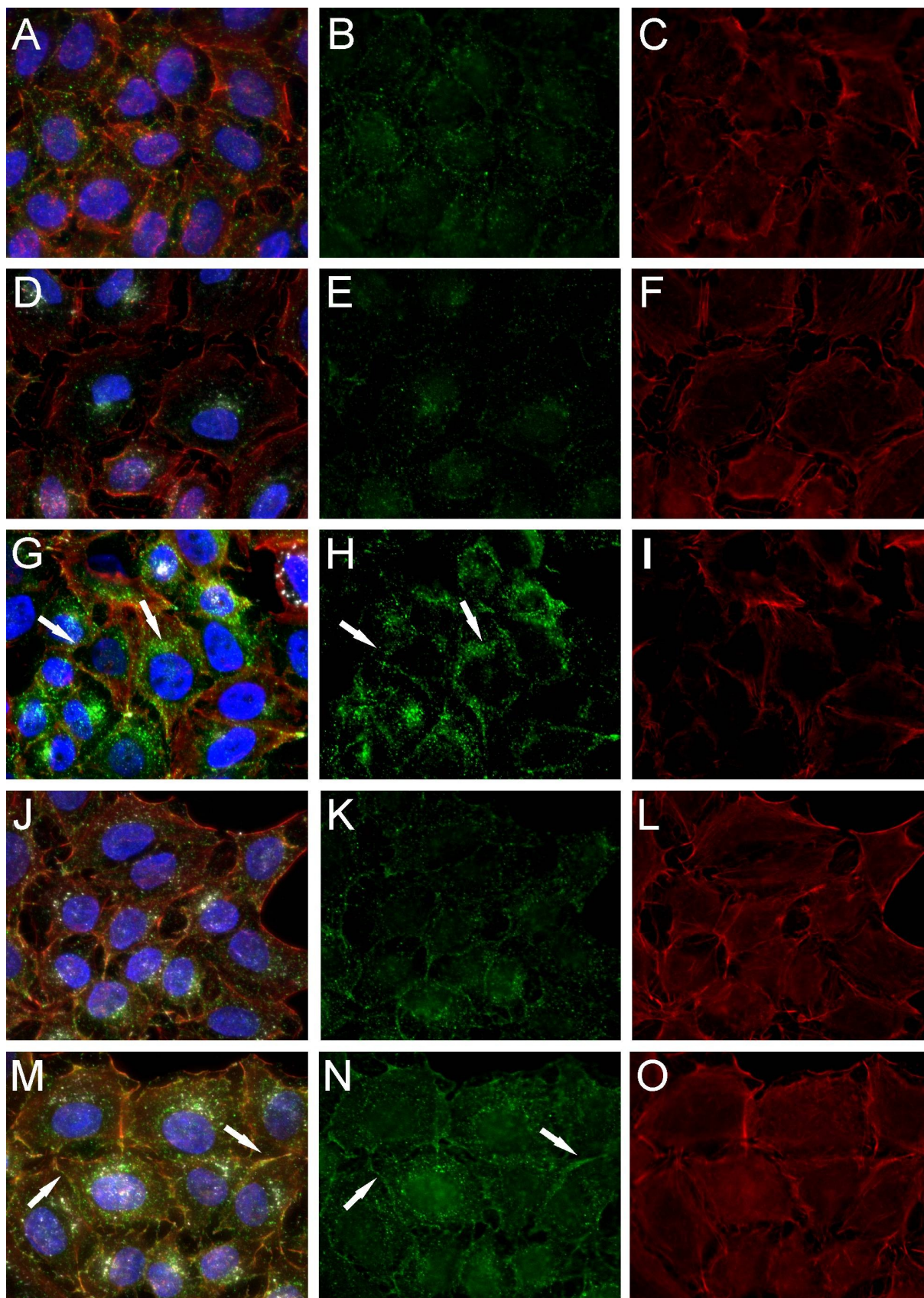
3.3.2 Extrakt *Anabaena oscillarioides* HINDAK 1984/43

Také u tohoto kmene byly podrobněji studovány dvě cytotoxické frakce (frakce 6 a 7). V porovnání s frakcemi z předešlého kmene *Cylindrospermum* sp. CY OM se jejich efekt nemanifestoval tak výrazně. U obou byl v optickém mikroskopu pozorován nárůst granulace v cytoplazmě testovaných buněk. Nejintenzivnější změny byly patrné na buňkách exponovaných frakcí 7 (obr. 13/C). Jednou z možných interpretací je indukce autofágie uvnitř buňky. Během 24hodinového experimentu nebyly pomocí fluorescenční mikroskopie zaznamenány žádné změny na aktinovém cytoskeletu ani jádrech. Jedinou výraznější změnou u buněk byla změna distribuce a intenzity signálu transferinu (obr. 14). Frakce 6, jež

inhibovala buněčnou linii HeLa o 40 %, způsobovala snížení signálu transferinu po pěti hodinách expozice (14 E) a výrazné přeskupení transferinu na membránu po 24 hodinách (14 H). Frakce 7, jejíž inhibice byla 71 %, snižovala signál transferinu již po jedné hodině (14 K). Blokování vstupu transferinu (viz membránová lokalizace) bylo patrné též po 1 hodině, v následujících časových intervalech nebyla zřejmá a znovu k ní došlo po 24hodinové expozici (obr. 14 N). Je tedy možné, že se jedná o reverzibilní proces, který je buňka schopna zvrátit.



Obr. 13: *HeLa* buňky po expozici aktivními frakcemi extraktu *Anabaena oscillarioides* HINDAK 1984/43 za použití Nomarského diferenciálního kontrastu (A, B, C) a pomocí fluorescenční mikroskopie (D, E, F). U snímků z fluorescenční mikroskopie je červeně zobrazen aktin, zeleně transferin a modře jádra. A – kontrola, B – 24hodinová inkubace s frakcí 6, C - 24hodinová inkubace s frakcí 7 (au – zmnožené autofagozomy), D – kontrola, E - 24hodinová inkubace s frakcí 6, F - 24hodinová inkubace s frakcí 7.



Obr. 14: Fluorescenční fotografie kontroly (A, B, C) a buněk exponovaných frakcemi 6 (D až I) a 7 (J až O) extraktu *Anabaena oscillarioides* HINDAK 1984/43. Červeně je zobrazen

aktin, zeleně transferin, modře jádra a bíle lysozomy. A až C – kontrola, D až F - 5hodinová expozice frakcí 6, G až I - 24hodinová expozice frakcí 6, J až L - hodinová expozice frakcí 7, M až O – 24hodinová expozice frakcí 7. Na snímku E je patrné snížení příjmu transferinu, na snímcích H a N vazba transferinu na buněčnou membránu.

3. Diskuse

Ze čtrnácti sledovaných kmenů bentických sinic byla průkazná cytotoxicita nalezena v pěti případech. Přibližná frekvence výskytu tedy je 36 %. Téměř identická četnost výskytu (38 %) cytotoxicity u bentických sinic byla prokázána u izolátů z Baltického moře (Surakka et al. 2005). Obecně se tato hodnota shoduje se sinicemi z jiných biotopů (Piccardi et al. 2000, Mian et al. 2003, Hrouzek et al. 2010). Takovýto výskyt též poukazuje na důležitost dalšího výzkumu v oblasti toxikologie bentických sinic. Zatímco hepatotoxicita a neurotoxicita této skupiny byla několikrát potvrzena a byly též potvrzeny přímé vlivy na zdraví člověka a zvířat (Hitzfeld et al. 2000, Aboal 2007, Stewart et al. 2008), jejich cytotoxicitou se zabývalo málo prací a standardní hodnocení cytotoxického potenciálu není zahrnuto v žádných normách, a to zejména kvůli komplikovanosti jejich stanovení a různorodosti chemických látek cytotoxicitu způsobujících. Dalším problémem zavedení rutinních analýz je složitost jejich odběru oproti odběru planktonních sinic.

Silně cytotoxický extrakt sinice kmene *Cylindrospermum* sp. CY OM obsahoval jednu toxickou frakci (frakce 15), což vypovídá o tom, že jeho toxicita není kumulativním efektem různých látek v extraktu obsažených, ale že se jedná o toxicitu specifickou, způsobenou konkrétní chemickou látkou. V buňkách po expozici s touto frakcí dochází k apoptóze, čemuž nasvědčuje pozvolný nástup účinku zahrnující tvorbu váčkovitých struktur na buněčné membráně, které se velmi podobají tvorbě apoptotických tělísek při klasickém průběhu apoptózy (Bursch et al. 2006). Další faktem nasvědčujícím iniciaci apoptózy je granulace buněčného obsahu a po 12 hodinách také fragmentace jader. Toto zjištění je zcela v souladu s tím, jak probíhají řízené změny v apoptické buňce. Apoptotické účinky této frakce by mohly být zajímavé z farmaceutického hlediska, neboť pro léčbu rakovinných onemocnění je nutné, aby příslušný lék vyvolal apoptózu a nikoliv nekrózu. Bohužel zatím nebylo možno stanovit mechanismus účinku aktivní látky, neboť všechny sledované změny jsou pravděpodobně následkem probíhající programované buněčné smrti. Je zřejmé, že použitými testy nebyly zaznamenány primární změny v buňce a že fragmentace jader a destrukce aktinu jsou následné projevy. Mechanismy spouštění apoptózy jsou doposud známy pouze u tří sinicových toxinů. V případě nejdůkladněji prostudovaného depsipeptidu cryptophycinu dochází k blokaci syntézy tubulinových vláken (Foster et al. 1998) což vede k mitotickému bloku a následné apoptóze. Na cytoskelet je též zaměřen i mechanismus účinku tolytoxinu, který však prvotně působí depolymeraci aktinových mikrofilament, na což buňka reaguje apoptózou. Podrobně je též popsána tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS) v mitochondriích buněk vystavených

vysokým koncentracím microcystinu-LR, čímž je opět spuštěna apoptóza (Botha et al. 2004). Působení frakce 15 je z výše jmenovaných mechanismů nejvíce podobné efektu cryptophycinu, neboť u části exponovaných buněk bylo patrné zablokování cytokineze, zatímco karyokineze proběhla. Je tedy možná interference aktivní látky s tubulinem. Postižení aktinového cytoskeletu v pozdějších časech je v souladu se standardním průběhem apoptózy (Bursch et al. 2006). Pro přesné objasnění mechanismů účinku bude nutné sledování stavu tubulinu v exponovaných buňkách společně s průtokově cytometrickou analýzou.

Druhá frakce z tohoto kmene nesnižovala viabilitu exponovaných buněk, avšak výrazně narušovala buněčnou adhezi. I taková bioaktivita by mohla být využitelná farmaceuticky. Je však vysoce pravděpodobné, že mechanismus tohoto jevu bude dosti obecný a aktivní látka bude toxická pro lidský organismus.

V druhém silně cytotoxickém extraktu *Anabaena oscillarioides* HINDAK 1984/43 byly přítomny dvě toxické frakce s viditelným účinkem v procházejícím světle. U obou frakcí byl efekt patrný již po hodinové inkubaci, přičemž efekt frakce 7 byl výraznější. Takto rychlý průběh naznačuje, že pravděpodobnou příčinou smrti buněk je nekróza. Také pomocí fluorescenční mikroskopie byl po hodinové expozici patrný pokles signálu endocytovaného transferinu. U obou frakcí docházelo ke granulaci cytoplazmy a u frakce 7 navíc po 24hodinové expozici k výraznému zmnožení pravděpodobně autofagozomů, což by poukazovalo problémy v energetickém metabolismu buňky. Fluorescenční mikroskopie však neposkytla odpověď na otázku, k jakým změnám buňce po expozici těmito frakcemi dochází. Během 24 hodin nedošlo k viditelným změnám na jádrech ani aktinovém cytoskeletu a jedinou prokazatelnou změnou byl úbytek transferinu v intracelulárních endozomech při krátké expozici a jeho lokalizace na plasmatické membráně při expozici dlouhodobější. Také tento fenotyp by spíše nasvědčoval nekrotickému působení. Je možné, že aktivní látky obou frakcí zastavují endocytózu, následuje vyhladovění buněk, spuštění autofágie a nakonec buněčná smrt. Vzhledem k našemu předpokladu, že aktivní látkou frakce 6 je navržený lineární peptid, je velmi pravděpodobné, že se jedná o molekulu termolabilní (Maršálek 1996) v porovnání se stabilními cyklickými peptidy. Tím by se dalo vysvětlit slabší působení aktivní frakce, jež jsme zaznamenali v později provedených experimentech, zejména pak rozdíl mezi výsledky získanými po extrakci z čerstvé lyofilizované biomasy (pozorování v procházejícím světle) a z extraktu získaného z biomasy starší (pozorování z fluorescenční mikroskopie).

6. Literatura

Aboal M., Puig M.A. & Asencio A.D. (2005): Production of microcystins in calcareous mediterranean streams: The Alharabe River, Segura River basin in south-east Spain. *Journal of Applied Phycology* 17: 231-243.

Agrawal M.K., Bagchi D. & Bagchi S.N. (2005): Cysteine and serine protease mediated proteolysis in body homogenate of a zooplankter, *Moina macrocopa*, is inhibited by the toxic cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B – Biochemistry and Molecular Biology* 141: 33-41.

Al-awar R.S., Corbett T.H., Ray J.E., Polin L., Kennedy J.H., Wagner M.M. & Williams D.C. (2004): Biological evaluation of cryptophycin 52 fragment A analogues: Effect of the multidrug resistance ATP binding cassette transporters on antitumor activity. *Molecular Cancer Therapeutics* 3: 1061-1067.

Baker P.D., Steffensen D.A., Humpage A.R., Nicholson B.C., Falconer I.R., Lanthois B., Fergusson K.M. & Saint C.P. (2001): Preliminary evidence of toxicity associated with the benthic cyanobacterium *Phormidium* in South Australia. *Environmental Toxicology* 16(6), Sp. Iss.: 506-511.

Banker R. & Carmeli S. (1999): Inhibitors of serine proteases from a waterbloom of the cyanobacterium *Microcystis* sp. *Tetrahedron* 55: 10835-10844

Barchi J.J., Norton T.R., Furusawa E., Patterson G.M.L. & Moore R.E. (1983): Identification of a cytotoxin from *Tolypothrix byssoidea* as tubercidin. *Phytochemistry* 22: 2851-2852.

Bernardová K., Babica P., Maršálek B. & Bláha L. (2008): Isolation and endotoxin activities of lipopolysaccharides from cyanobacterial cultures and complex water blooms and comparison with the effects of heterotrophic bacteria and green alga. *Journal of Applied Toxicology* 28: 72-77.

Berry J.P., Gantar M., Gawley R.E., Wang M.L. & Rein K.S. (2004): Pharmacology and toxicology of pahayokolide A, a bioactive metabolite from a freshwater species of *Lyngbya* isolated from the Florida Everglades. *Comparative Biochemistry and Physiology C-toxicology & Pharmacology* 139: 231-238.

Bílek J. (1976): Studie reaktivity kůže na vybrané sinice a řasy [kandidátská disertační práce]. Praha: Institut pro další vzdělávání lékařů a farmaceutů.

Biondi N., Piccardi R., Margheri M.C., Rodolfi L., Smith G.D. & Tredici M.R. (2004): Evaluation of *Nostoc* strain ATCC 53789 as a potential source of natural pesticides. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 3313-3320.

Blom J.F., Robinson J.A. & Juttner F. (2001): High grazer toxicity of [D-Asp(3) (E)-Dhb(7)] microcystin-RR of *Planktothrix rubescens* as compared to different microcystins. *Toxicon* 29: 1923-1932.

Botha N., Gehringer M.M., Downing T.G., van de Venter M. & Shephard E.G. (2004): The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCo2 cells. *Toxicon* 43: 85-92.

Bursch W., Ellinger A., Gerner Ch., Fröhwein U. & Schulte-Hermann R. (2006): Programmed cell death (PCD). Apoptosis, Autophagic PCD, or others? *Annals of the New York Academy of Science* 926: 1-12.

Cardellina J.H., Marner F.J. & Moore R.E. (1979): Seaweed dermatitis - structure of lyngbyatoxin-a. *Science* 204: 193-195.

Carmichael W.W. (1992): Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology* 72: 445-459.

Carmichael W.W. (1994): Toxins of cyanobacteria. *Scientific American* 270: 64-70.

Carmichael W.W. & Gorham P. (1978): Anatoxin from clones of *Anabaena flos-aquae* isolated from lakes of Western Canada. *Mitteilungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* 21: 285-295.

Carmichael W.W., Azevedo S.M.F.O., An J.S., Molica R.J.R., Jochimsen E.M., Lau S., Rinehart K.L., Shaw G.R. & Eaglesham G.K. (2001): Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives* 109: 663-668.

Chong M.W.K., Wong B.S.F., Lam P.K.S., Shaw G.R. & Seawright A.A. (2002): Toxicity and uptake mechanism of cylindrospermopsin and lophyrotomin in primary rat hepatocytes. *Toxicon* 40: 205-211.

Chorus, I. (2001): Cyanotoxins: occurrence, causes, consequences. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.

Chorus I. & Bartram J. (1999): Toxic cyanobacteria in water: a guide to public health significance, monitoring and management. E&FN Spon., London.

Codd G.A. & Poon G.K. (1988): Cyanobacterial toxins. In: Rogers L.J., Gallon J.R. [Eds.]: *Biochemistry of the algae and cyanobacteria*. Clarendon Press, Oxford, pp. 283-296.

Codd G.A., Azevedo S.M.F.O., Bagchi S.N., Burch M.D., Carmichael W.W., Harding W.R., Kaya K. & Utkilen H.C. (2005): Cyanonet – A global network for cyanobacterial bloom and toxin risk management. Initial situation assessment and recommendations. IHP-VI, *Technical Documents in Hydrobiology* 76, UNESCO, Paris.

Cox A.P., Banack S.A., Murch S.J., Rasmussen U., Tien G., Bidigare R.R., Metcalf J.S., Morrison L.F., Codd G.A. & Bergman B. (2005): Diverse taxa of cyanobacteria produce β -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 5074-5078.

Cronberg G. & Annadotter H. (2006): Manual on aquatic cyanobacteria. A photo guide and a synopsis of their toxicology. Copenhagen, Denmark. 106 pp.

Daranas A.H., Norte M. & Fernández J.J. (2000): Review. Toxic marine microalgae. *Toxicon* 39: 1101-1132.

Dawson R.M. (1998): The toxicology of microcystins. *Toxicon* 36: 953-962.

Eggen M.J. & Georg I.G. (2002): The cryptophycins: Their synthesis and anticancer activity. *Medicinal Research Reviews* 22: 85-101.

Foster B.J., Fortuna M., Media J., Wiegand R.A. & Valeriote F.A. (1998): Cryptophycin 1 cellular levels and effects in vitro using L 1210. *Investigational New Drugs* 16: 199-204.

Fujiki H., Sugimura T. & Moore R.E. (1983): New classes of environmental tumor promoters: indole alkaloids and polyacetates. *Environmental Health Perspectives* 50: 85-90.

Funari E. & Testai E. (2008): Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Critical Review in Toxicology* 38: 97-125.

Golakoti T., Yoshida W.Y., Chaganty S. & Moore R.E. (2000): Isolation and structures of nostopeptolides A1, A2 and A3 from the cyanobacterium *Nostoc* sp. GSV224. *Tetrahedron* 56: 9093-9102.

Gutiérrez M., Suyama T.L., Engene N., Wingerd J.S., Maitainaho T. & Gerwick W.H. (2008): Apratoxin D, a Potent Cytotoxic Cyclodepsipeptide from Papua New Guinea Collections of the Marine Cyanobacteria *Lyngbya majuscula* and *Lyngbya sordida*. *Journal of Natural Products* 71: 1099–1103.

Harada K. (2004): Production of secondary metabolites by freshwater cyanobacteria. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 52: 889-899.

Hindman S.H., Carson L.A., Favero M.S., Petersen N.J., Schonberger L.B. & Solano J.T. (1975): Pyrogenic reactions during haemodialysis caused by extramural endotoxin. *The Lancet* 2: 732-734.

Hitzfeld B.C., Lampert C.S., Spaeth N., Mountfort D., Kaspar H. & Dietrich D.R. (2000): Toxin production in cyanobacterial mats from ponds on the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Toxicon* 38: 1731-1748.

Hrouzek P., Tomek P., Lukešová A., Urban J., Voloshko L., Pushparaj B., Ventura S., Lukavský J., Štys D. & Kopecký J. (in press): Cytotoxicity and secondary metabolites production in terrestrial *Nostoc* strains, originating from different climatic/geographic regions and habitats: Is their cytotoxicity environmentally dependent? *Environmental Toxicology*.

Islam M.S., Miah M.A., Hasan M.K., Sack R.B. & Albert J.M. (1994): Detection of non-culturable *Vibrio cholerae* 01 in a blue-green alga from aquatic environment in Bangladesh. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88: 298-299.

Kajiyama S., Kanzaki H., Kawazu K. & Kobayashi A. (1998): Nostofungicidine, an antifungal lipopeptide from the field-grown terrestrial blue-green alga *Nostoc commune*. *Tetrahedron Letters* 39: 3737-3740.

Kaštovský J., Hauer T., Mareš J., Krautová M., Bešta T., Komárek J., Desortová B., Heteša J., Hindáková A., Houk V., Janeček E., Kopp R., Marvan P., Pumann P., Skácelová O. & Zapomělová E. (in prep): Biological Invasions: A review of the alien and expansive species of freshwater cyanobacteria and algae, a case study from the Czech Republic.

Klein D., Daloze D., Braekman J.C., Hoffmann L. & Demoulin V. (1995): New hapalindoles from the cyanophyte *Hapalosiphon langii*. *Journal of Natural Products* 58: 1781-1785

Knubel G., Larsen L.K., Moore R.E., Levine I.A. & Patterson G.M.L. (1990): Cytotoxic, antiviral indolocarbazoles from a blue-green alga belonging to the nostocaceae. *Journal of Antibiotics* 43: 1236-1239.

Krienitz L., Ballot A., Kotut K., Wiegand C., Putz S., Metcalf J.S., Codd G.A. & Pflugmacher S. (2003): Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of Lesser Flamingos at Lake Bogoria, Kenya. *FEMS Microbiology Ecology* 43: 141-148.

Kreitlow S., Mundt S. & Lindequist U. (1999): Cyanobacteria – a potential source of new biologically active substances. *Journal of Biotechnology* 70: 61-63.

Linington R.G., Clark B.R., Trimble E.E., Almanza A., Urena L.D., Kyle D.E. & Gerwick W.H. (2009): Antimalarial Peptides from Marine Cyanobacteria: Isolation and Structural Elucidation of Gallinamide A. *Journal of Natural Products* 72: 14-17.

Luesch H., Moore R.E., Paul W.J., Mooberry S.L. & Corbett T.H. (2001): Isolation of Dolastatin 10 from the Marine Cyanobacterium *Symploca* Species VP642 and Total

Stereochemistry and Biological Evaluation of Its Analogue Symplostatin 1. *J Journal of Natural Products* 64: 907-910.

Maršálek B. (2004): Rozdělení cyanotoxinů – legislativa. In: Maršálek, B., Maršálková E. & Halousková, O. [Eds.]: *Cyanobakterie*, Brno, Česká republika, Sborník konference 21. ledna 2004.

Maršálek B. & Turánek, J. (1996): Biologicky aktivní látky produkované sinicemi vodního květu. In: Maršálek, B., Maršálková E. [Eds.]: *Vodní květy sinic*. pp. 86-100.

Maršálková E. & Maršálek B. (2006): Technologie pro odstraňování cyanotoxinů ve vodárenských procesech. Maršálek Blahoslav, Feldmannová Marie, Maršálková Eliška, [Eds.], *Sborník Cyanobakterie 2006*, 24.-25. května 2006, Brno, Česká republika, Botanický ústav AV ČR Průhonice, 172 str.

Martin B.R. (1994): *Tissue culture techniques – an introduction*. Birkhauser, Boston. USA. 243 pp.

Mez K., Beattie K.A., Codd G.A., Hanselmann K., Hauser B., Naegeli H. & Preisig H.R. (1997): Identification of microcystins in benthic cyanobacteria linked to cattle deaths on alpine pastures in Switzerland. *European Journal of Phycology* 32: 111-117.

Mez K., Hanselmann K. & Preisig H.R. (1998): Environmental conditions in high mountain lakes containing toxic benthic cyanobacteria. *Hydrobiologia* 368: 1-15.

Michl I., Hochová B. & Lukavský J. (1990): Alergie na řasy a sinice. *Sborník Referátů Semináře VII. Sjezdu Československých Alergologů a Klinických Imunologů*. Praha: Ústav sér a očkovacích látek, 24-33.

Mo S., Krunic A., Chlipala G. & Orjala J. (2009): Antimicrobial Ambiguine Isonitriles from the Cyanobacterium *Fischerella ambigua*. *Journal of Natural Products* 72: 894–899.

Mosmann T. (1983): Rapid colometric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.

Namikoshi M. & Rinehart K.L. (1996): Bioactive compounds produced by cyanobacteria. *Journal of Industrial Microbiology* 17: 373-384.

Patterson G.M.L., Smith C.D., Kimura L.H., Britton B.A. & Carmeli S. (1993): Action of tolytoxin on cell morphology, cytoskeletal organization, and actin polymerization. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 24: 39-48.

Patočka J. (2001): The toxins of cyanobacteria. *Acta medica (Hradec Králové)*, 44 (2): 69-75.

Pilotto L.S., Douglas R.M., Burch M.D., Cameron S., Beers M., Rouch G.J., Robinson P., Kirk M., Cowie C.T., Hardiman S., Moore C. & Attewell R.G. (1997): Health effects of exposure to cyanobacteria (blue green algae) during recreational water-related activities. *Australian and New Zealand Journal of Public Health* 21: 562-6.

Pumann P., Chlupáčová M. & Kožíšek F. (2008): Zdravotní a hygienická rizika z přírodních koupacích vod, *Hygiena* 53(3).

Rantala A., Fewer D.P., Hisbergues M., Rouhiainen L., Vaitomaa J., Börner T. & Sivonen K. (2004): Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 568-573.

Reisner M., Carmeli S., Werman M. & Sukenik A. (2004): The cyanobacterial toxin cylindrospermopsin inhibits pyrimidine nucleotide synthesis and alters cholesterol distribution in mice. *Toxicological Sciences* 82: 620-627.

Rinehart K.L., Harada K., Namikoshi M., Chen C., Harvis C.A., Munro M.H.G., Blunt J.W., Mulligan P.E., Beasley V.R., Dahlem A.M. & Carmichael W.W. (1988): Nodularin, microcystin, and the configuration of ADDA. *Journal of the American Chemical Society* 110: 8557-8558.

Rohrlack T., Dittmann E., Henning M., Börner T. & Christoffersen K. (2001): Effects of cell-bound microcystins on survival and feeding of *Daphnia* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 3523–3529.

Rohrlack T., Christoffersen K., Kaebernick M. & Neilan B.A. (2004): Cyanobacterial protease inhibitor microviridin J causes a lethal molting disruption in *Daphnia pulex*. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5047–5050.

Sivonen K., Kononen K., Carmichael W.W., Dahlien A.M., Rinehart K.L., Kiviranta J. & Niemala S.I. (1989): Occurrence of the hepatotoxic cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic sea and structure of the toxin. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 1990-1995.

Skulberg O.M., Codd G.A. & Carmichael W.W. (1984): Toxic blue-green algal blooms in Europe: a growing problem. *Ambio* 13: 244-247.

Skulberg O.M., Carmichael W.W., Andersen R.A., Matsunaga S., Moore R.E. & Skulberg R. (1992): Investigations of a neurotoxic oscillatorian strain (*Cyanophyceae*) and its toxin. Isolation and characterization of homoanatoxin-a. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11: 321–329.

Smith C.D., Zhang X.Q., Mooberry S.L., Patterson G.M.L. & Moore R.E. (1994): Cryptophycin-a new antimicrotubule agent active against drug-resistant cells. *Cancer Research* 54: 3779-3784.

Solstad T. & Fladmark K.E. (2006): Algal Toxins as Guidance to Identify Phosphoproteins with Key Roles in Apoptotic Cell Death. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 7: 209-215.

Soltani N., Khavari-Nejad R.A., Yazdi M.T., Shokravi S. & Fernández-Valiente E. (2005): Screening of soil cyanobacteria for antifungal and antibacterial activity. *Pharmaceutical Biology* 43: 455-459.

Stewart I., Webb P.M., Schluter P.J. & Shaw G.R. (2006): Recreational and occupational field exposure to freshwater cyanobacteria – a review of anecdotal and case reports, epidemiological studies and the challenges for epidemiologic assessment. *Environmental Health* 5(6).

Stewart I., Seawright A.A. & Shaw G. (2008): Cyanobacterial poisoning in livestock, wild mammals and birds – an overview. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 619: 613-37.

Teneva I., Dzhambazov B., Koleva L., Mladenov R. & Schirmer K. (2005): Toxic potential of five freshwater *Phormidium* species (Cyanoprokaryota), *Toxicon* 45: 711-725.

Tokuda H., Nishino H., Shirahashi H., Murakami N., Nagatsubo A. & Sakakibara J. (1996): Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate promoted mouse skin papilloma by digalactosyl diacylglycerols from the fresh water cyanobacterium *Phormidium tenue*. *Cancer Letters* 104: 91-95.

Welker M. & van Döhren H. (2006): Cyanobacterial peptides – Nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews* 30: 530-563.

Wood S.A., Selwood A.I., Rueckert A., Holland P.T., Milne J.R., Smith K.F., Smits B., Watts L.F. & Cary C.S. (2007): First report of homoanatoxin-a and associated dog neurotoxicosis in New Zealand. *Toxicon* 50: 292-301.

Wright A.D., Papendorf O. & König G.M. (2005): Ambigol C and 2,4-dichlorobenzoic acid, natural products produced by the terrestrial cyanobacterium *Fischerella ambigua*. *Journal of Natural Products* 68: 459-461.

Yoshizawa S., Matsushima R., Watanabe M.F., Harada K., Ichihara A., Carmichael W.W. & Fujiki H. (1990): Inhibition of protein phosphatases by microcystis and nodularin associated with hepatotoxicity. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 116: 609-614.

Zainuddin E.N., Mentel R., Wray V., Jansen R., Nimtz M., Lalk M. & Mundt S. (2007): Cyclic Depsipeptides, Ichthyopeptins A and B, from *Microcystis ichthyoblabe*. *Journal of Natural Products* 70: 1084-1088.

Zainuddin E.N., Jansen R., Nimtz M., Wray V., Preisitsch M., Lalk M. & Mundt S. (2009): Lyngbyazothrins A-D, Antimicrobial Cyclic Undecapeptides from the Cultured Cyanobacterium *Lyngbya* sp. *Journal of Natural Products* 72:1373-1378.

Zhou L., Yu D. & Yu H. (2000): Drinking water types, microcystins and colorectal cancer. *Zhonghua Yufang Yixue Zazhi* 34: 224-226.