

**Radovan Kopp<sup>1,2</sup>, Andrea Ziková<sup>1</sup>, Jan Mareš<sup>1</sup>, Ondřej Adamovský<sup>3</sup>, Pavla Kratochvílová<sup>4</sup>,  
Anna Vašátková<sup>4</sup>, Stanislav Navrátil<sup>5</sup>, Miroslava Palíková<sup>5</sup>, Luděk Bláha<sup>2,3</sup>**

<sup>1)</sup> Oddělení rybářství a hydrobiologie, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

<sup>2)</sup> Centrum pro cyanobakterie a jejich toxiny, Botanický ústav AVČR, Lidická 25/27, 65220 Brno

<sup>3)</sup> Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí, RECETOX, PŘF MU, Kamenice 3, 62500 Brno

<sup>4)</sup> Ústav výživy zvířat a pícninářství, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

<sup>5)</sup> Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, Veterinární a farmaceutická univerzita,  
Palackého 1–3, 612 42 Brno

Sinice (cyanobakterie) produkují celou řadu biologicky aktivních látek, kterými mohou ovlivňovat ostatní organizmy. Jednou z nejsledovanějších skupin látek produkovaných sinicemi jsou toxiny. Cyanotoxiny představují rozmanitou skupinu látek jak z chemického tak z toxikologického hlediska. Nejrozšířenější a ve sladkých vodách nejčastěji nalézanou (a tudíž i nejvíce studovanou) skupinou cyanotoxinů představují microcystiny.

Microcystiny byly nalezeny u zástupců rodů planktonních, bentických i půdních sinic. V ČR produkují microcystiny běžně se vyskytující zástupci rodů *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix*, *Oscillatoria*, *Anabaenopsis* aj. Chemicky se jedná o cyklické heptapeptidy, lišící se mezi sebou nejčastěji různou skladbou navázaných aminokyselin. V současnosti je známo přes 75 strukturálních variant a kongenerů, mnohé cyanobakterie produkují souběžně i několik microcystinů [1].

Nejběžnějšími známými strukturálními variantami microcystinů jsou MC-LR, -RR, -YR. Většina microcystinů je poměrně hydrofilní, ve vodě dobře rozpustná a netěkavá. Microcystiny jsou velmi stabilní, odolné vůči chemické hydrolyze a působení peptidáz. Menší množství microcystinů je produkováno do okolního prostředí, většina však zůstává uvnitř sinicových buněk, odkud se ve vyšších koncentracích dostává do prostředí při kolapsu vodního květu sinic [2].

Microcystiny jsou vysoce toxické, mechanismus jejich účinku spočívá v kovalentní vazbě na katalytickou podjednotku proteinfosfatáz 1 a 2A [3]. Primárně jsou postiženy jaterní buňky, které aktivně přijímají microcystiny z krevního oběhu prostřednictvím transportního systému pro žlučové kyseliny [4]. Lze je však detekovat i v jiných orgánech – svaly, kůže, střevní epitel, krev. Sinicové toxiny se mohou projevit různými škodlivými vlivy nejen na vodní organizmy, ale i na teplokrevné obratlovce včetně člověka. Byly popsány i úmrtí lidí v závislosti na toxickém působení hepatotoxinů sinic [5].

Cílem naší studie bylo sledovat možnost přenosu negativního vlivu metabolitů sinic v rámci potravního řetězce (toxická sinice-ryba-potkan). Laboratorní potkan je vhodným modelovým zvířetem pro vyšší savce včetně člověka. Sledování celé řady parametrů včetně sinicových toxinů v tkáních laboratorních potkanů konzumujících ryby zasažené toxiny sinic nám mělo ukázat, zda dochází vlivem těchto metabolitů ke změnám charakteristik vnitřního prostředí těchto zvířat, a zda může dojít ke kumulaci těchto metabolitů nebo ke změnám ve složení jejich tkání.

V provedených experimentech jsme sledovali vliv krmné směsi s přidávkou rybního masa na laboratorního potkana. Mimo kontrolní variantu, které bylo předkládáno živinově optimální krmivo pro potkany bez rybního masa, bylo u všech experimentálních skupin do kompletní krmné směsi přidáno 20–25% rybního masa (mletý fileť z kapra obecného *Cyprinus carpio*). Vzhledem k tomu, že se nám nepodařilo získat rybní maso s akumulovanými toxiny sinic, byly u některých experimentálních skupin do krmných směsí přidány (naspajkovány) v různých koncentracích microcystiny získané extrakcí z přírodních populací sinic. Ke krmné směsi byla dále u dalších pokusných skupin přidána lyofilizovaná biomasa toxické sinice (*Microcystis*), nebo lyofilizovaná biomasa netoxické sinice (*Spirulina*) anebo lyofilizovaná biomasa zelené řasy (*Chlorella*), vše v množství 1% z hmotnosti krmné dávky.

Sledovány byly změny hmotnostních přírůstků jednotlivých skupin tak možné fyziologické změny především za využití biomarkerů krve, krevní plazmy a oxidativního stresu. Po ukončení pokusu byly odebrány tkáň (játra, svalovina) ke stanovení možného obsahu microcystinů. Bylo provedeno rovněž histologické vyšetření jater a ledvin. V jednom z experimentů jsme pokusným zvířatům aplikovali intraperitoneálně netoxický modelový antigen KLH (protein mořských plžů), k zjištění možného vlivu metabolitů sinic na imunitní reakci organismu a byl tedy u potkanů sledován i vývin protilátek proti tomuto proteinu.

## Koncentrace microcystinů v tkáních

Na základě analýz obsahu microcystinů v jednotlivých krmných směsích a množství spotřebovaného krmiva byly vypočteny průměrné dávky microcystinů, které byly jednotlivými pokusnými skupinami perorálně přijaty (Tab. č. 1). Většina publikovaných experimentů o vlivu sinic na potkany sleduje působení microcystinů po intraperitoneální aplikaci toxinu, kdy jsou negativní účinky na zvířecí organismus přibližně 10 krát výraznější oproti perorální aplikaci. V případě orálního podání microcystinu-LR potkanům v jedné dávce byla zjištěna  $LC_{50}$  5 mg/kg hm. [6] a letální koncentrace 10,9 mg/kg hm. [7]. Toxický efekt microcystinu-LR je obdobný jako u jiných zvířat, vyvolává prioritně poškození jaterního parenchymu, krevní výrony a jaterní tumory. Dále způsobuje poškození trávicího traktu, ledvin, varlat a nadvarlat, plic mění parametry krevní plazmy a má negativní dopad na potomstvo [8]. Koncentrace toxinů v tkáních potkanů nebyla v žádné z publikovaných prací při perorálním podání toxinu sledována, proto nelze naše výsledky porovnat. Na základě našich experimentů je zřejmé, že i při vysokých koncentracích toxinu v krmné dávce je akumulace toxinu v jednotlivých tkáních na velmi nízké úrovni a většina detekovaných koncentrací MCs se pohybovala těsně nad limitem detekce.

**Tab. 1:** Suma přijatých a v tkáních detekovaných MCs u jednotlivých experimentálních skupin potkanů.

Varianta	Typ experimentálního krmiva	Suma přijatých MCs	MCs ve svalovině	MCs v játrech
A	bez rybiho masa	0 µg MCs/kg hm./den	nedetekován	nedetekován
B	s 20% rybiho masa + 1% biomasy sinic rodu <i>Microcystis</i>	3000 µg MCs/kg hm./den	nedetekován	~ 5 ng/g (N=6/10)
C	s 20% rybiho masa z lokality bez microcystinů	0 µg MCs/kg hm./den	nedetekován	nedetekován
D	s 20% rybiho masa + 5ml MCs na 1 kg krmiva	136 µg MCs/kg hm./den	nedetekován	nedetekován
E	s 20% rybiho masa + 35ml MCs na 1 kg krmiva	928 µg MCs/kg hm./den	nedetekován	~ 3 ng/g (N=3/10)
F	s 20% rybiho masa z lokality s microcystiny	0 µg MCs/kg hm./den	nedetekován	nedetekován

Detekční limit < 3 ng/g hmotnosti, N= počet pozitivně detekovaných potkanů z celkově testovaných

## Hmotnost orgánů, somatické indexy

Po ukončení experimentů byli všichni potkani usmrceni a byla zjišťována hmotnost jednotlivých orgánů. Nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly mezi skupinami v hmotnosti ledvin, mozku a brzlíku. Játra všech skupin, které byly krmeny směsí s rybím masem měly nižší průměrnou hmotnost než kontrolní skupina, signifikantní rozdíly však byly pouze mezi skupinou A a F (Graf. č. 1). Rovněž hmotnost sleziny u skupiny F byla průkazně nižší než u skupiny kontrolní (A) a skupiny s rybím masem bez microcystinů (C). Signifikantní rozdíly byly zjištěny i u somatických indexů. Hepato-somatický index u kontrolní skupiny (A) a skupiny krmené krmivem s přidavkem toxické biomasy sinic (B) byl signifikantně vyšší ve srovnání se všemi ostatními skupinami potkanů (C, D, E, F). Obdobně i poměr hmotnosti sleziny k hmotnosti těla byl u skupin (A a B) vyšší než u všech ostatních skupin, průkazně ale pouze u skupiny (F).

## Biomarkery oxidativního stresu

Rozdíly mezi biomarkery oxidativního stresu byly pozorovány mezi skupinou (C) krmenou krmivem s 25% rybiho masa z lokality bez microcystinů a skupinou (E), která byla krmena stejnou směsí, akorát s přidavkem čistého microcystinu. Skupina E signifikantně zvyšovala aktivitu GST (glutathion-S-transferáza), enzymu zapojeného do detoxikace MCs skrze konjugaci s glutathionem a enzymu GR (glutathionreduktáza) zodpovědného za regeneraci oxidovaného glutathionu. Průkazné bylo i zvýšení lipidní peroxidace v játrech potkanů skupiny (E). Ostatní sledované parametry, hladina GSH (glutathion), rovněž jako aktivita enzymů GPx (glutathionperoxidáza), SOD (superoxid dismutáza) a CAT (kataláza) nevykazovaly průkazné rozdíly mezi jednotlivými skupinami potkanů. Naše experimenty prokazují, že v případě orálního příjmu vysoké koncentrace MCs je u potkanů indukována II fáze detoxikace skrze aktivaci enzymu GST. Obdobné zjištění popisuje u potkanů již [9].

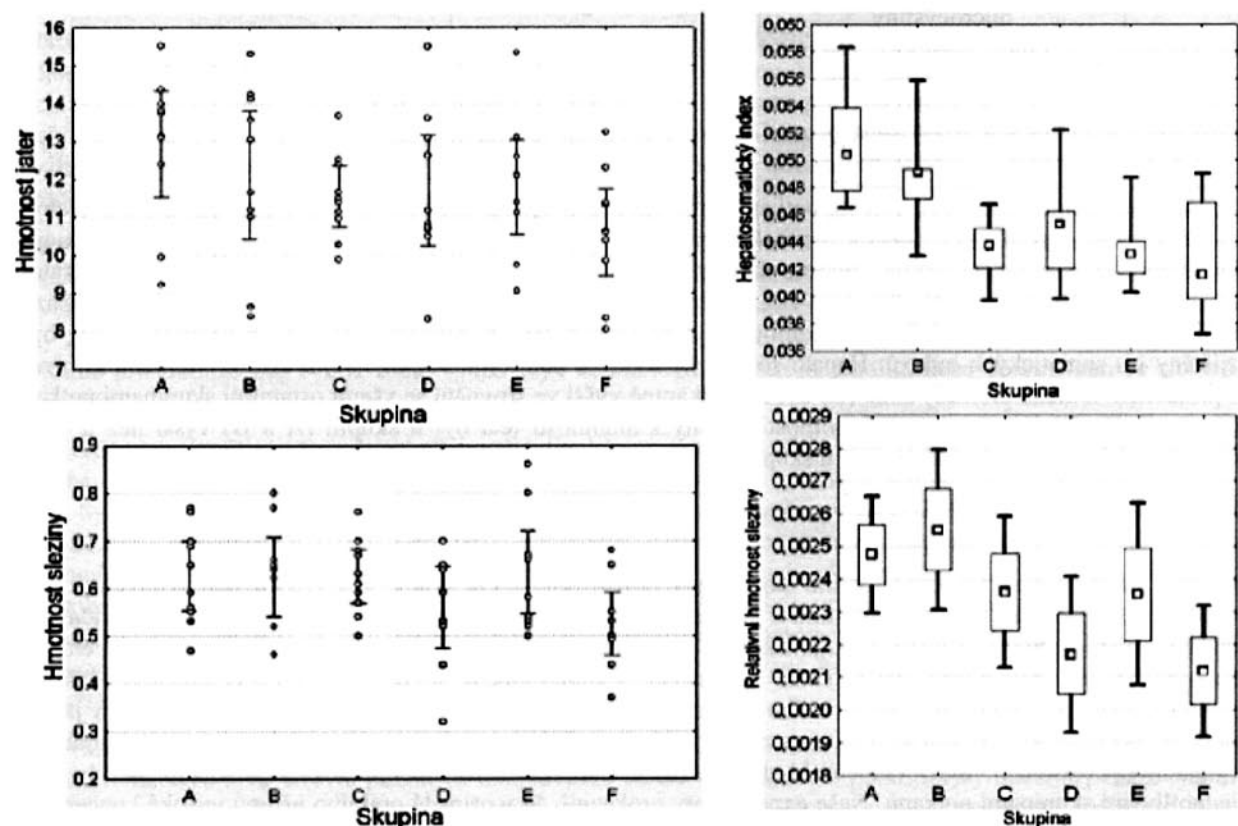
## Změny parametrů krve a krevní plazmy

Sledované parametry krve a krevní plazmy neprokázaly jednoznačné rozdíly mezi jednotlivými experimentálními skupinami. Z krevních parametrů byl u skupiny E (s vysokou koncentrací MCs) výrazně nižší počet bílých krvinek ve srovnání s ostatními variantami. Snížení počtu leukocytů pod vlivem microcystinů bylo popsáno i u ryb [10]. Hodnoty variant A, B, F hemoglobinu erytrocytu a střední barevné koncentrace byly signifikantně vyšší a u hematokritu signifikantně nižší než u variant C, D, E. Nebyly zjištěny průkazné rozdíly v hodnotách hemoglobinu, počtu červených krvinek a středním objemu erytrocytu.

Hodnoty alaninaminotransferázy u obou skupin s přidáním microcystinem (D, E) byly nejnižší, ale průkazně odlišné pouze od skupiny C. Obdobný trend, avšak zvýšení hodnot dosahovalo v plazmě potkanů železo. Hodnoty enzymu laktátdehydrogenázy byly vyšší u variant s přítomností MCs (B, D, E) oproti ostatním variantám, rozdíly ale nebyly průkazné. Zřetelně nižších hodnot v obsahu sodíku a chloridů dosahovaly všechny varianty potkanů krmené rybím masem ve srovnání s kontrolní skupinou. Obdobný trend měla i hodnota glukózy, naopak obsah močoviny byl nejnižší u kontrolní skupiny. U enzymu lipázy byly výrazně vyšší hodnoty u variant A a F oproti variantám B, C, a D. U většiny dalších sledovaných parametrů byly změny mezi jednotlivými variantami bez průkazného vlivu.

Naše studie nepotvrdila obecný trend zvyšování hodnot jaterních enzymů v krevní plazmě pod vlivem sinicových toxinů. Zvýšení hodnot transamináz a laktát dehydrogenázy po intraperitoneální aplikaci microcystinu-LR potkanům popisuje [11] a [12]. Zvýšení hodnoty těchto enzymů bylo pozorováno i po perorální aplikaci vysoké koncentrace microcystinů [13]. Naše výsledky potvrdily již známé údaje o snížení toxického účinku toxinů v případě perorálního podání, kdy enzymaticko-imunitní aparát zvířete účinně eliminuje negativní působení toxinů ve srovnání s intraperitoneálním podáním. Vzhledem k výraznému vlivu celé řady endogenních a exogenních faktorů, které mohou ovlivnit hodnoty sledovaných hematologických a biochemických ukazatelů, nelze v případě perorálního podání toxinu očekávat průkazné změny v jejich koncentracích.

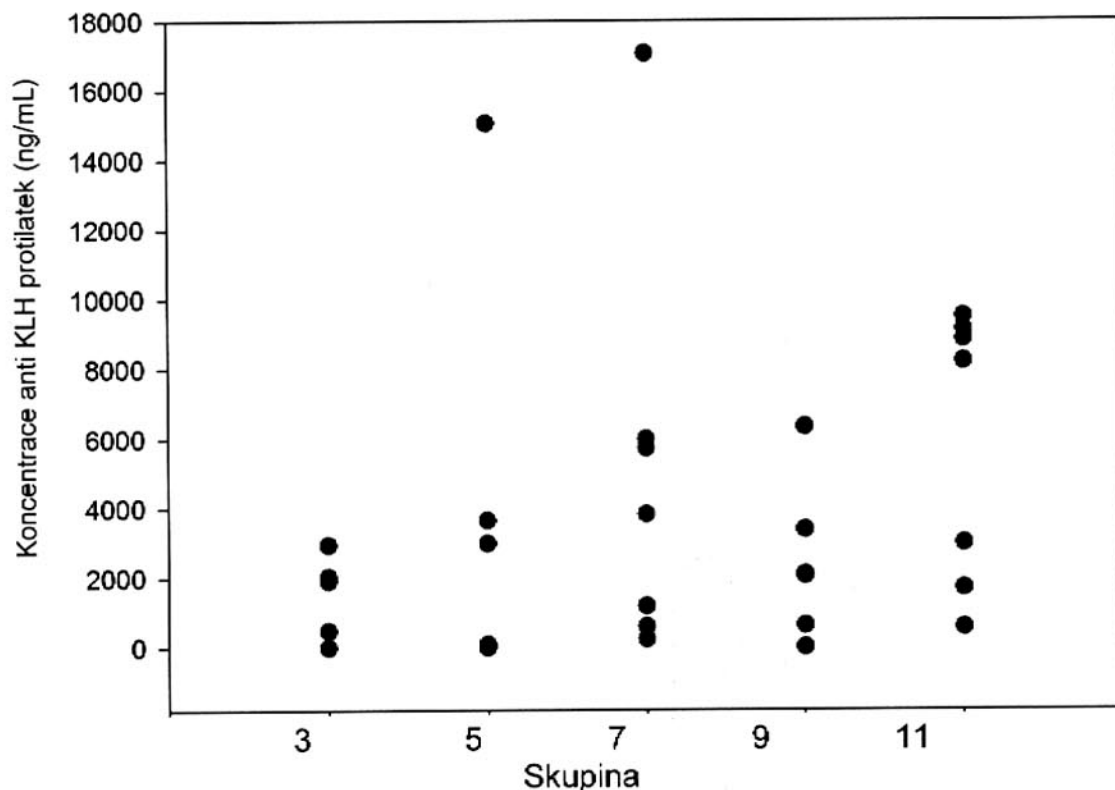
**Graf 1:** Rozdíly v hmotnosti jater a sleziny a poměr hmotnosti orgánu k hmotnosti těla u jednotlivých skupin potkanů. Pro vysvětlení jednotlivých pokusných variant viz Tab. č. 1.



## Imunitní systém

Poslední výzkumy z oblasti sledování vlivu metabolitů sinic na živé organizmy popisují ovlivnění imunitního systému zvířat toxiny sinic [14]. V experimentu jsme potkanům aplikovali intraperitoneálně netoxický modelový antigen KLH (protein mořských plžů), k zjištění možného vlivu metabolitů sinic na imunitní reakci organismu. Všechny skupiny byly krmeny krmivem pro potkany s přidavkem 25% rybího masa. Varianta 3 byla kontrolní, varianta 5 obsahovala 1% toxické biomasy sinic rodu *Microcystis*, varianta 7 obsahovala 1% netoxické biomasy sinic rodu *Spirulina*, varianta 9 obsahovala 1% biomasy zelené řasy rodu *Chlorella* a varianta 11 obsahovala čisté microcystiny v koncentraci shodné s variantou 5. Analýza prokázala statisticky významný rozdíl mezi skupinou 11 (expozice MCs), která měla vyšší titry protilátek proti KLH ve srovnání s kontrolní skupinou (č. 3) viz Graf č.2. Studie ukazuje, že potkani, kteří byli exponováni MCs měli stimulovaný imunitní systém, což se projevilo vyšší protilátkovou odpovědí na podaný antigen.

**Graf 2:** Koncentrace protilátek proti antigenu KLH u jednotlivých skupin potkanů. Vysvětlení jednotlivých variant viz text.



## Histologické vyšetření tkání

Zhodnocení získaných poznatků o histologickém vyšetření není jednoduché, neboť zjištěné strukturální parametry mají vesměs obecný charakter a mohou být zapříčiněny celou řadou etiologických faktorů. Navíc část popsanych změn může mít souvislost i s technologickými defekty při zpracování vzorků, zejména s opožděnou fixací. Nebyly zjištěny žádné průkazné rozdíly mezi jednotlivými experimentálními skupinami potkanů. V rámci skupiny posuzovaných a hodnocených orgánů dominovala především alterace jaterního parenchymu a poškození korového tubulárního systému ledviny. V případě jaterního parenchymu se prakticky ve všech případech jednalo o steatózní dystrofii buď ložiskovou nebo difúzní, vesměs malokapénkového či smíšeného typu, poměrně často doprovázenou ztrátou trámčitého uspořádání a setřením hranic jednotlivých lobulů. Navíc byla u některých jedinců pozorována i nekrotická ložiska (fokální nekrózy). Zjištěné nálezy evokují možnou souvislost se složením krmiva, individuální tolerancí krmné dávky, karencí některých složek (např. vitamínů) v potravě apod. Pochopitelně i experimentálně aplikovaná substance má zajisté podstatný vliv na finální podobu mikroskopické stavby.

Alterace mikroskopické struktury ledviny byla vesměs omezena pouze na korovou oblast, a to zejména na tubulární systém – tedy proximální a distální tubuly nefronů. Jednalo se především o poškození výstelky, mělo tedy charakter nefrózy, výjimečně byly přítomny i válce. U některých jedinců byl stupeň alterace výraznější, charakterizovaný destrukcí výstelky, případně celé stěny tubulů. Intersticiium se jevílo jako intaktní, tzn. bez zánětlivé celulizace, krvácenin apod., stejně tak dřev ledviny byla zcela intaktní ve všech případech. Struktura thymu byla prakticky ve všech případech intaktní.

Ve slezině dominovala siderinová depozita v červené dřev. Bílá pulpa byla ve většině případů bez strukturálních abnormalit. Pouze výjimečně jevíla znaky aktivizace. Přítomnost vysráženého železa jistě souvisí s defektní funkcí jater ve vztahu k metabolismu hemoglobinu. Orgány CNS (mozek, mozeček, případně další) nevykazovaly v rozsahu korové vrstvy žádné podstatné odchylky od normy. Oproti tomu bílá hmota (dřeňové lamely) mozečku obsahovala téměř pravidelně početné opticky prázdné sférické dutiny (označované pracovním jako „vakuolizace“). Tyto dutinky neměly výstelku, pouze výjimečně byly ohraničeny tenkou tmavší linií. Okolní tkáň byla bez reakce. Dle našeho názoru se jedná o rozpuštěná a vyplavená tuková depozita.

Výsledky našich experimentů s potkany ukazují nízký efekt metabolitů sinic na fyziologický stav potkaního organismu. Kumulace microcystinů v tkáních pokusných zvířat byla rovněž nízká, těsně nad hranicí detekce. Za nejvýznamnější změny lze při příjmu kompletní krmné směsi s microcystiny považovat snížení hmotnosti jater a sleziny, snížení počtu bílých krvinek, zvýšení aktivity glutathion-S-transferázy a stimulaci imunitního systému pokusných zvířat.

### Poděkování

Práce byla podporována projektem NAZV QH71015 Minimalizace rizik výskytu metabolitů sinic v technologických procesech rybářského sektoru a Výzkumným záměrem VFU MSM6215712402 – Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin. Infrastruktura je podporována projektem CETOCOEN v rámci OP VaVPI (CZ.1.05/2.1.00/01.0001).

### Použitá literatura:

- [1] LI, Y.H., WANG, Y., YIN, L.H., PU, Y.P., WANG, D.Y. (2009): Using the nematode *Caenorhabditis elegans* as a model animal for assessing the toxicity induced by microcystin-LR. *J. Environ. Sci.-China* 21: 395–401
- [2] SIVONEN, K., JONES, G. (1999): Cyanobacterial toxins. *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management.*: 41–111
- [3] MACKINTOSH, R.W., DALBY, K.N., CAMPBELL, D.G., COHEN, P.T.W., COHEN, P., MACKINTOSH, C. (1995): The Cyanobacterial Toxin Microcystin Binds Covalently to Cysteine-273 on Protein Phosphatase-1. *Febs. Letters* Vol. 371, Iss. 3: 236–240
- [4] ERIKSSON, J.E., GRÖNBERG, L., NYGLRD, S., SLOTTE, J.P., MERILUOTO, J. (1990): Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR a cyclic peptide toxin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1025:60–66
- [5] JOCHIMSEN, E. M., CARMICHAL, W. W., AN, J.S., CARDO, D.M., COOKSON, S.T., HOLMES, C.E., ANTUNES, M.B., DE MELO FILHO, D.A., LYRA, T. M., BARRETO, V. S., AZEVEDO, S. M., JARVIS, W. R. (1998): Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N. Engl. J. Med.* 338:1035–1040
- [6] FAWELL, J. K., MITCHELL, R. E., EVERETT, D. J., HILL, R. E. (1999): The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I Microcystin-LR. *Human and Experimental Toxicology* 18, 162–167
- [7] YOSHIDA, T., MAKITA, Y., NAGATA, S., TSUTSUMI, T., YOSHIDA, F., SEKIJIMA, M., TAMURA, S., UENO, Y. (1997): Acute oral toxicity of microcystin-LR a cyanobacterial hepatotoxin, in mice. *Natural Toxins* 5, 3:91–95
- [8] ZIKOVÁ, A., KOPP, R. (2008): Impacts of microcystin, a cyanobacterial toxin, on laboratory rodents in vivo. *Acta Universitatis agriculturae et silviculturae Mendelianae Brunensis*.5: 263–274
- [9] GEHRINGER, M. M., SHEPHARD, E. G., DOWNING, T. G., WIEGAND, C., NEILAN, B. A. (2004): An investigation into the detoxification of microcystin-LR by the glutathione pathway in Balb/c mice. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 36:931–941
- [10] PALÍKOVÁ, M., KOVÁŘŮ, F., NAVRÁTIL, S., KUBALA, L., PEŠÁK, S., VAJCOVÁ, V (1998): The Effects of Pure Microcystin LR and Biomass of Blue-green Algae on Selected Immunological Indices of Carp (*Cyprinus carpio* L.) and Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.). *Acta Vet. Brno* 67: 265–272

- [11] GUPTA, N., PANT, S. C., VIJAYARAGHAVAN, R., RAO, P. V. L. (2003): Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice. *Toxicology* 188: 285–296
- [12] HERMANSKÝ, S. J., STOHS, S. J., MARKIN, R. S., MURRAY, W. J. (1990): Hepatic lipid peroxidation, sulfhydryl status, and toxicity of the blue-green algal toxin microcystin-LR in mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 31:71–91
- [13] RAO, P. V. L., GUPTA, N., JAYRAJ, R., BHASKAR, A. S. B., JATAV, P. C. (2005): Age-dependent effects on biochemical variables and toxicity induced by cyclic peptide toxin microcystin-LR in mice. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part C, Toxicology and Pharmacology* 140, 1:11–19
- [14] SIEROSLAWSKA, A., RYMUSZKA, A. (2009): Cyanohepatotoxins influence on the neuroendocrine and immune systems in fish – a short review. *Neuroendocrinology Letters* 30, 1:13–16