

# Vliv toxinů sinic na teplokrevné obratlovce a člověka

**Blahoslav Maršálek**

*Autor věnuje honorář Nadaci Živa*

Sinice (cyanobakterie) jsou přirozenou součástí vodních ekosystémů. Dojde-li díky eutrofizaci a dalším podmínkám (pomalé proudění, teplota kolem 20 °C, atd.) k jejich přemnožení, projeví se to ve vodním ekosystému produkcí toxinů. Přítomnost toxinů sinic (cyanotoxinů) v rekreačních nádržích a pitných vodách se celosvětově stává nepřijemnou realitou. Publikovali jsme článek (2004), který prokazuje, že toxiny sinic v našich vodárenských systémech jsou vážný problém (podle analýz je microcystin od května 2004 součástí pitných vod). V r. 1999 dominovaly podle našich rozborů v letním období sinice, jejichž toxicita byla vysoká, v 83 % nádrží v ČR. Odhlédneme-li od možných fatálních následků, mohou cyanotoxiny přímo vyvolat tři hlavní skupiny onemocnění: poruchy zažívacího traktu, alergické reakce — respirační a kontaktní dermatitidy a onemocnění jater. Často jsou však jako primární funkce onemocnění uváděny jiné příčiny. Např. pacienti trpící poruchami jater často pozorují zhoršení zdravotního stavu po kontaktu s vodním květem a cyanotoxiny (i z pitné vody), obdobně jako zhoršení akutního stavu pozorují astmatiči a ekzematici. Proto jsou prováděny rozsáhlé modelové experimenty s teplokrevnými obratlovci ovlivněnými různými cyanotoxiny. Významným podnětem, který podpořil intenzivní výzkum v této oblasti, byly americké experimenty v Číně, kde bylo 50 000 obyvatel odkázáno na zdroj vody, ve kterém docházelo k masovému rozvoji sinice r. *Microcystis*. Teprve při tomto neobvyklém výzkumu bylo zjištěno, že řada typů onemocnění, která bývají připisována různým příčinám, mohou být důsledkem působení toxinů sinic.

Po zapojení epidemiologů do spolupráce s toxikology byl prokázán vliv cyanotoxinů na procesy kancerogeneze, oslabení imunitního systému, malátnost a celkovou slabost, zvracení a zažívací obtíže (křeče, průjmy apod.), respirační a alergická onemocnění (podráždění kůže, ekzémy, otoky, záchvaty kašle, dušení apod.), poruchy funkce jater a další zdravotní potíže. V této souvislosti se také často diskutuje výpovědní hodnota testů na myších, nejen pro určité velikostní a experimentální odlišnosti, ale hlavně pro rozdíly v délce působení toxinů v různých

experimentech. Zatímco při tradičních pokusech jde o jednorázové — akutní působení toxické látky na pokusný objekt, je expozice obyvatel konzumujících pitnou vodu z centrálních zdrojů chronická. Proto je zřejmé, že zdraví člověka mohou ohrozit daleko nižší koncentrace, než se uvádějí při použití akutních testů toxicity. Modelově jsou proto prováděny experimenty na ovčích (Carbis a kol. 1994), prasatech (Falconer a kol. 1994) atd. Klinická sledování lidské populace vystavené vlivu cyanotoxinů nejsou častá a nebývají zveřejňována. Novější práce týmu G. Codd (osobní sdělení) ukazují, že standardně používané biochemické markery poškození jater se liší v citlivosti u různých živočichů často až řádově. Např. u myši byla shledána jako „jediný užitečný indikátor“ poškození jater jedním z toxinů sinic — microcystinem — aktivita enzymu alaninaminotransferázy (ALT) v krevním séru, zatímco u člověka je (dle tohoto sdělení) pravděpodobně jediný enzym — gama-glutamyltransferáza, jehož aktivita je pod vlivem hepatotoxinů sinic průkazně zvýšena. U ovcí byla jako vhodný indikátor poškození jater po požití vody s obsahem cyanotoxinů shledán enzym glutamát dehydrogenáza (GLDH).

Microcystin LR prokazatelně působí toxicky na pohlavní žlázy a na vývoj plodu, jak vyplývá z pokusů na potkanech. Navíc bylo stejnými autory zjištěno, že nemá genotoxické účinky na bakterii *Salmonella typhimurium*, ale je aktivní v testu chromozomových zlomů při použití lidských lymfocytů. Autoři tento výzkum uzavírají tím, že pitná voda ze zdrojů s rozvojem vodních květů sinic může při chronické expozici vyvolat i Dawnuův syndrom (Crebelli 1986, Grabov a kol. 1992). Autoři většiny souhrnných studií uzavírají svá pojednání konstatováním, že vzhledem k nově zjištěným účinkům toxinů sinic a vzhledem ke stále ještě nedostatečné znalosti aktivit těchto látek představují cyanotoxiny pravděpodobně větší nebezpečí pro vodní ekosystémy a zdraví obyvatel, než je jim obecně přiznáváno (např. Carmichael 1992, Bell a Codd 1994, Falconer a kol. 1994).

Většina pozorovaných onemocnění zvěře a dobytka byla způsobena planktonními druhy sinic při jejich hromadném rozvoji.

Jsou však také známy případy otrav psů benctickými druhy sinic, jak bylo doloženo např. ve Skotsku. Porosty sinic uvolněné ze dna v kusech o průměru 10–30 cm působily na psy bez rozdílu ras jako atraktanty. Jedna z domněnek je, že je lákal rybí pach geosminu produkovaného sinicemi. Po konzumaci došlo během několika hodin k dušení, dávení a nakonec k smrti v křečích. Bylo dokonce popsáno hromadné přilákání psů k sinicím a poté jejich hromadný úhyn (Codd a kol. 1992).

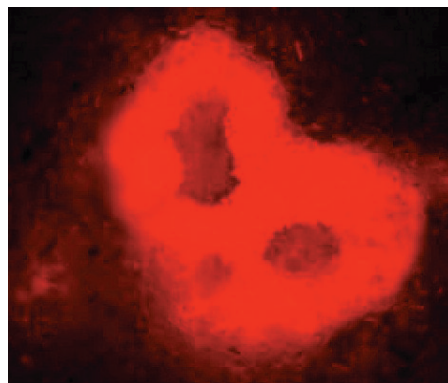
Vzhledem k tomu, že sinice jsou fotosyntetizující gram-negativní eubakterie, je jejich buněčná stěna složena také z lipopolysacharidů (LPS), které pravděpodobně přispívají k imunotoxicitě a imunomodulační reakci teplokrevných obratlovců (Bláha, Maršálek 1999). Tyto lipopolysacharidy mají molekulární strukturu podobnou endotoxinům izolovaným z jiných gram-negativních bakterií a přispívají k zánětu žaludku a střeva, závratím, nevolnosti, křečím a kožním vyrážkám (Martin a kol. 1989). Laboratorními pokusy autoři zjistili, že LPS sinic jsou srovnatelně toxické s endotoxiny jiných bakterií za předpokladu, že jde o čisté kultury sinic. V přírodě je však běžné, že v polysacharidových obalech kolonií sinic r. *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Anabaena* a jiných žije mnoho druhů bakterií. Odtud pramení, podle některých autorů, také rozdíl ve schopnosti sinic z přírody produkovat větší množství toxinů, než tvoří stejný taxon po měsíčních kultivace v laboratorních podmínkách. Podle J. Kiviranta (1992) platí, že je-li schopen taxon produkovat toxiny v přírodě, je to projev genotypu, který není ovlivnitelný fenotypickými projevy nebo vlivem ekologických faktorů. Produkce toxinů je složitý proces, který je spouštěn a modulován jak faktory fyzikálními (při dostatku světla a teploty), chemickými (při nedostatku železa a dostatku fosforu) nebo vlivem biologických interakcí (predace, bakterie na povrchu kolonií sinic atd.)

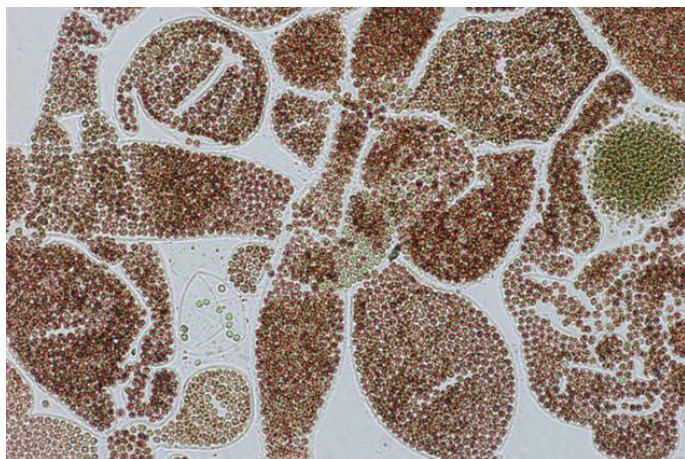
Obdobný případ lze uvést z léta 1994, kdy naše laboratoř Experimentální fykologie a ekotoxikologie BÚ AV ČR pracovala na projektu zaměřeném na Brněnskou přehradu. Většinu vegetačního období zde dominovala planktonní sinice *Microcystis wesenbergii* (viz obr.), která je považována na rozdíl od *M. aeruginosa* za netoxický druh. Provedené rozborů opravdu neprokázaly přítomnost jak hepatotoxinů, tak neurotoxinů. Přesto však při použití citlivých biotestů pro detekci tzv. celkové toxicity byla v biomase sinice *M. wesenbergii* přítomnost slabě toxických látek prokázána.

## Microcystin jako aktivátor rakovinných procesů

Hepatotoxické microcystiny jsou silnými inhibitory proteinfosfatáz (PP1 a 2A) — viz Živa 2004, 4: 150–152, což vede k nadměrné fosforylaci buněčných proteinů a ke změně cytoskeletu jaterních buněk, do kterých jsou hepatotoxiny transportovány přes přenašeč žlučových kyselin. Morfologické změny hepatocytů se *in vivo* projeví jaterní nedostatečností a následně smrtí. Podezření, že microcystin může být i silným nádoro-

*Vlevo srovnání kontrolního (dole) a sinicemi ovlivněného — malformovaného embrya drápatky vodní (*Xenopus laevis*). Foto L. Bláha ♦ Kolonie sinice *Microcystis aeruginosa* ve fluorescenčním mikroskopu, vpravo*





vým promotorem, bylo potvrzeno v pokusech *in vivo*. Ústní podávání hrubého extraktu microcystinu vyvolávalo u myši kožní nádory a podávání čistého preparátu microcystinu LR vedlo ke vzniku nádoru jater (Carmichael 1992). Pracovníci Národního centra pro výzkum rakoviny pod vedením prof. Fujiki (Tokyo), zkoumali vliv microcystinu LR (MIC-LR). Prokázali, že nejen tento typ microcystinu, ale i další známé deriváty působí na molekulární úrovni jako inhibitor proteinfosfatázy (PP) typu 1, 2A a 3 (Matsushima a kol. 1990). Výzkum fosforylace proteinů v souvislosti s inhibicí PP microcystinem umožnil objasnění již dříve pozorovaných změn v cytoskeletu jaterních buněk. Bylo prokázáno, že zvýšená aktivita fosforylace proteinů je způsobena inhibicí PP microcystinem, což vede k nekontrolované aktivitě proteinkináz, hyperfosforylaci a patologickým změnám v cytoskeletu jaterních buněk. Tyto změny jsou nejčastěji vyhodnocovány jako různé typy hepatitidy nebo vedou k rakovině jater (Matsushima a kol. 1990, Carmichael 1992). Výsledky podnítily výzkum cyklických hepatotoxinů sinic jako „tumor promoting factors“. Prozatím byl prokázán vliv cyanotoxinů na stimulaci procesů vedoucích k rakovině kůže a jater (Falconer a kol. 1991, 1994). Zejména posledně citovaná práce je příkladem detailního modelového experimentu ukazujícího riziko, které představují cyanotoxiny v pitných vodách. Při dlouhodobém působení (21 dnů) extraktu toxické *Microcystis aeruginosa* na myši s oholenou kůží byly prokázány biochemické procesy, které startují vznik rakoviny kůže. Další skupina myši byla krmena granulami ze sinice *M. aeruginosa* (hepatotoxická) a porovnávána se skupinou krmenou granulami obsahujícími r. *Anabaena* (neurotoxická, bez hepatotoxinů). Vysoce průkazné zvýšení případů rakoviny kůže a jater bylo sledováno u skupiny krmené *M. aeruginosa*, zatímco u skupiny krmené sinicí *Anabaena* nebyly nádory nalezeny vůbec (Falkoner 1991). Jiné práce ověřující aktivitu microcystinu v rakoviných procesech jater probíhaly v Japonsku na kozách a kryších. Z osmi zkoumaných látek byl microcystin LR nejsilnějším aktivátorem růstu rakovinných buněk, aktivnější než dietylnitrosamin (Nishivaki-Matsushima a kol. 1992). Také nodularin (cyklický peptid produkovaný r. *Nodularia*), mající hepatotoxickou aktivitu, byl sledován velmi aktivním inhibitorem PP 1 a 2A. Epidemiologické studie realizované v Číně americkými a australskými odborníky přinášejí stále nové důkazy o prokazatelném zvyšování výskytu rakoviny jater

*Sinice Microcystis wesenbergii ve světelném mikroskopu, vlevo. Snímky L. Šejnohové, není-li uvedeno jinak ♦ Brněnská přehrada, pohled na pláž (červenec 2002), vpravo. Foto B. Maršálek*

u lidí, kteří jsou odkázáni na zdroj pitné vody, kde dochází k silnému rozvoji vodních květů sinic.

### Řasy a sinice jako alergeny

Řasy a sinice jsou kosmopolitní organismy obývající vodní a půdní lokality, žijí na sněhu, skalách, kůře stromů, srsti zvířat, v jeskyních, šíří se větrem apod. Byly identifikovány také jako součást domácího prachu. Obsah proteinů tvoří v přírodních podmínkách 12–80 % jejich biomasy.

Z úvodního krátkého přehledu lze vyvodit, že tyto organismy si zaslouží pozornost jako možné potencionální alergeny pro své široké rozšíření a vysoký obsah proteinů. Tato problematika se dostává do popředí teprve v posledních letech, kdy se obecně hovoří o vysoké citlivosti obyvatel na alergenní podněty, a proto není doposud k dispozici dostatek ověřených údajů. Alergie citlivých skupin lidí na řasy a sinice jsou ovšem známy již z bývalého Československa, dobře protokolované údaje jsou z 60. let (Štěpánek, Červenka 1974). Obecně lze konstatovat, že se počet alergiků zvyšuje. Odborníci diskutují o tom, zda jde o obecný trend stoupající citlivosti lidské populace vlivem životního stylu a prostředí, nebo zda se opravdu mění struktura a aktivita alergenů. Bývalý Ústav sér a očkovacích látek (ÚSOL) vyráběl pouze omezený sortiment i množství diagnostických alergenů z řas a sinic (*Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Cladophora*, *Chlorella*, *Scenedesmus* a *Spirogyra*). Šlo sice v minulosti o nejčastější druhy, ale v současnosti neodrážejí posun od vláknitých sinic ke koloniálním a zdaleka nepostihují spektrum řas a sinic, které se často i masivně rozrůstají ve vodárenských a rekreačních nádržích ČR. Z monitoringu, který jsme provedli v létě 1999, vyplývá, že problematika cyanobakterií na nádržích je alarmující a že dominance sinic má stálou vzestupnou tendenci. Vzhledem k tomu, že byly v r. 1999 odebrány vzorky ze 112 nádrží, podrobeny botanické a zároveň toxikologické analýze, jde pravděpodobně o nejrozsáhlejší a nekomplexnější studii tohoto druhu zpracovanou na území ČR během jednoho roku. V r. 1960 a 1961 provedl kolektiv autorů (Štěpánek a kol. 1962) velmi hodnotnou studii, která byla zaměřena na hromadný rozvoj sinic v 44 přehradách a 23 rybnících na území tehdejší ČSSR. Z toho bylo na území ČR cel-

kově 57 nádrží. V r. 1960 a 1961 byl rozvoj sinic zaznamenán na 66 % nádrží na území současné ČR. V r. 1994 (Komárek, Komárková 1995) byly odběry provedeny na 78 nádržích a vodní květy sinic zaznamenány na 73 % z nich. V r. 1999 bylo provedeno 112 odběrů, z toho 41 z vodárenských nádrží. Sinice vodního květu byly silně rozvinuty na 78 % vodárenských nádrží (a celkově na 83 % nádrží v ČR). Toto číslo je výrazně vylepšeno tím, že do přehledu byla zahrnuta také data z takových oligotrofních nádrží, jako je Nýrsko, Fláje, Souš, Bedřichov apod. Z uvedeného je patrné, že hromadný rozvoj sinic není na území ČR problémem pouze posledních let, ale že má trvalou a vzestupnou tendenci. Zajímavá studie vyšla v minulosti ze spolupráce organizací OÚNZ, ÚSOL a Botanického ústavu AV ČR. J. Lukavský a kol. kultivovali 25 druhů kultur sinic a řas, z nichž pak ÚSOL připravil extrakty pro diagnostické testy. Pro testování bylo vybráno 32 pacientů z Jihočeského kraje, kteří udávali, že se u nich alergie dostaví po vykoupaní ve vodě s rozvojem řas a sinic. Udávané potíže jsou velmi pestré (vodnatá rýma s kýčáním 69 %, slzení očí 44 %, různé druhy kožních vyrážek 28 %, záchvaty spastické dušnosti 16 % atd.). Ve sledované skupině bylo 75 % mužů a 25 % žen ve věku 14–56 let (věkový průměr 38 roků), pouze u 7 z nich byla prokázána zvýšená hladina imunoglobulinu (IgE) signalizující onemocnění altopií (Michl a kol. 1991). U každého pacienta byly provedeny intradermální testy na 25 druhů sinic a řas, u většiny z nich byly sledovány časné reakce, pouze u 13 % pacientů byla sledována reakce pozdní (24 hod.). Ze sledovaných řas vyvolávaly nejsilnější alergické reakce rody *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Hydrodictyon*, *Nautococcus*, *Cladophora* a *Rhizoclonium*, ze sinic pak všechny studované rody (*Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Phormidium*, *Nostoc*). Zajímavá informace byla publikována z experimentů s čistými (bez bakterií a dalších organismů) kulturami (Torokne a kol. 2001). Zatímco přírodní populace vodních květů sinic vyvolala v testech na morčatech výrazně až prudké alergické reakce na kůži a v očích, čistá kultura měla alergizační potenciál minimální, na hranici detekce. Stejně výsledky vykazaly i pokusy s čistým microcystinem. Alergické reakce tedy způsobují pravděpodobně buď bakterie a další organismy žijící ve slizu (extracelulárních polysacharidech) sinic, nebo jde o obrannou reakci sinic při kontaktu s dalšími organismy, a pak by pocházely alergické látky ze sinic. Jde o nová zjištění, která zatím nebyla uspokojivě vysvětlena.