

Słowa kluczowe: cyjanotoksyny, anatoksyna-a, układ odpornościowy ryb

Adam BOWNIK*, Anna RYMUSZKA*, Anna SIEROSŁAWSKA*,
Tadeusz SKOWROŃSKI* **

ODDZIAŁYWANIE CYJANOTOKSYN NA UKŁAD ODPORNOSCIOWY RYB

Sinice (*Cyanobacteria*) są fototroficznymi mikroorganizmami produkującymi trujące wtórne metabolity – cyjanotoksyny. Intoksykacji tymi związkami ulegają zwierzęta wodne, w tym ryby oraz zwierzęta lądowe. Ryby są szczególnie narażoną grupą zwierząt na szkodliwe działanie cyjanotoksyn. Obserwowane częste zjawisko masowego śnięcia ryb podczas oraz po tzw. „zakwitach wód” może być wynikiem nie tylko obniżonej zawartości tlenu, zwiększonej zawartości siarkowodoru ale może być również skutkiem toksycznego oddziaływania cyjanotoksyn. Układ odpornościowy ryb jest wysoce wrażliwym systemem na ksenobiotyki odpowiedzialnym za utrzymanie homeostazy oraz chroniącym organizm przed chorobami bakteryjnymi, wirusowymi grzybiczymi oraz nowotworami. Obniżenie odporności u ryb może powodować wzrost zapadalności tych zwierząt na wymienione powyżej schorzenia. Wyniki badań podjętych przez autorów badania oraz dane z literatury wskazują iż, cyjanotoksyny, mikrocystyny oraz anatoksyna-a modulują funkcjonowanie układu odpornościowego ryb. Wykazano wrażliwość limfocytów T i B oraz komórek fagocytarnych na działanie tych dwóch często stwierdzanych w zbiornikach wodnych toksyn sinicowych.

Sinice (*Cyanobacteria*) są fototroficznymi organizmami prokariotycznymi zaliczanymi do Eubacteria, które masowo namnażając się w eutroficznym jeziorach, zbiornikach rekreacyjnych oraz stawach hodowlanych tworzą tzw. zakwity wód. Ponad 40 gatunków tych mikroorganizmów posiada zdolność do produkcji wtórnych metabolitów - cyjanotoksyn, stanowiących zagrożenie dla zdrowia zwierząt wodnych oraz człowieka i zwierząt lądowych. Zatruciom tymi związkami ulegają najczęściej zwierzęta wodne, w tym zooplankton oraz odżywiające się nimi ryby oraz zwierzęta hodowlane i domowe, ptaki dziko żyjące oraz ludzie mający kontakt ze skażoną wodą lub spożywający pokarm skażony cyjanotoksynami. Toksyny sinicowe, ze względu na sposób działania zostały podzielone na hepatotoksyny, neurotoksyny, dermatotoksyny, cytotoxyny oraz toksyny wywołujące inne efekty [14]. Ryby stanowią grupę zwierząt wodnych szczególnie narażonych na ksenobiotyki, w tym bardzo trujące cyjanotoksyny.

* Katedra Fizjologii i Ekotoksykologii, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II,
al. Raławickie 14, 20-950, adambownik@p.pl

** Stacja Badawcza Centrum Badań Ekologicznych PAN w Lublinie, ul. Niecała 18/3, 20-080 Lublin

Praca finansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego
(grant nr N308027 32/2393)

Powszechnie spotykane w wielu zbiornikach hodowlanych zjawisko śnięcia ryb podczas i po zakwitach sinicowych może być efektem nie tylko obniżonej zawartości tlenu w wodzie, wysokiego poziomu amoniaku, podwyższonego poziomu pH czy zwiększonej zawartości siarkowodoru, ale również może być skutkiem oddziaływania toksyn sinicowych. Układ odpornościowy ryb jest obok układu nerwowego jednym z najwrażliwszych systemów organizmu szybko reagujących na obecność substancji toksycznych w środowisku. Zaburzenie funkcjonowania tego układu prowadzi w konsekwencji do zwiększenia podatności ryb na choroby bakteryjne, wirusowe, grzybicze oraz nowotwory. Mimo powszechności występowania zjawiska zakwitów sinicowych, niewiele jest danych dotyczących wpływu cyjanotoksyn na układ odpornościowy ryb.

Spośród cyjanotoksyn występujących w zbiornikach wodnych na całym świecie najczęściej spotykane są hepatotoksyny oraz neurotoksyny. Mikrocystyny są bardzo powszechnie występującymi w zbiornikach wodnych hepatotoksynami produkowanymi przez sinice z rodzaju *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Nostoc* oraz *Haphalosiphon* [1]. Związki te występują w ponad 70 izoformach w postaci monocyklicznego heptapeptydu, który zawiera 2 zmienne oraz 5 stałych aminokwasów, w tym występujący we wszystkich wariantach aminokwas ADDA (kwas 3-amino, 9-metoksy, 2,6,8-trimetylo-10-fenylodeka-4,6-dienowy) odpowiadający za ich toksyczne działanie [3]. Mechanizm toksycznego działania mikrocystyn polega na blokowaniu aktywności białkowych fosfatyz PP1 i PP2A prowadzącym do deformacji cytoszkieletu hepatocytów oraz w konsekwencji śmierci komórki. Istnieją doniesienia o toksycznym oddziaływaniu mikrocystyn na ryby. Osobniki będące we wczesnych stadiach rozwojowych są szczególnie wrażliwe na działanie mikrocystyny-LR wykazując liczne nieprawidłowości rozwojowe [4]. U dorosłych ryb mikrocystyny wchłaniane są głównie drogą pokarmową i prawdopodobnie przez skrzela. Narządem docelowym dla tych cyjanotoksyn jest wątroba, lecz zmiany toksyczne wywoływane są także w nerce, sercu, skórze i śledzionie. Mikrocystyny wykazują również zdolność do kumulacji w różnych narządach również w mięśniach co jest szczególnie ważne dla zdrowia człowieka jako konsumenta.

Wykazano wpływ tych cyjanotoksyn na limfocyty – komórki będące elementem odporności nieswoistej pełniące istotną rolę w powstawaniu odpowiedzi immunologicznej. Teneva et al. [11] w badaniach *in vitro* stwierdzili obniżenie żywotności limfocytów T i B myszy po 4 i 24 godzinach inkubacji z mikrocystyną-LR. Ponadto, wykazano, iż mikrocystyna-LR wywołuje apoptozę limfocytów B. Zanotowano również, że oczyszczona mikrocystyna-LR wpływa na funkcjonowanie układu odpornościowego ryb. Palikova i wsp. [8] w badaniach *in vivo* stwierdzili obniżenie leukokrytu oraz liczby leukocytów u karpia po podaniu czystej mikrocystyny-LR. Zmniejszenie liczby leukocytów dotyczyło głównie limfocytów T cytotoksycznych oraz limfocytów B. W warunkach *in vitro*, mikrocystyny -LR oraz -RR posiadają zdolność do wywoływania apoptozy limfocytów izolowanych od karasia złocistego (*Carassius auratus*) objawiającej się kondensacją chromatyny w jądrze oraz tworzeniem ciał apoptotycznych [5]. Mikrocystyna-LR wywołuje również zmiany innych parametrów immunologicznych. Badania *in vitro* wykazały, że

hepatotoksyna ta powoduje obniżenie zdolności do proliferacji limfocytów T i B izolowanych z nerki główowej pstrąga [10].

W literaturze istnieją doniesienia o wpływie mikrocystyny-LR na komórki fagocytarne ryb. W badaniach *in vitro* stwierdzono obniżenie żywotności granulocytów oraz makrofagów izolowanych od pstrąga tęczowego po 24 godzinach inkubacji z cyjanotoksyną [11]. Ponadto nie stwierdzono zmiany w aktywności fagocytów w żadnym z zastosowanych stężeniach mikrocystyny-LR. Natomiast u karpia (*Cyprinus carpio* L.) stwierdzono obniżenie aktywności fagocytarnej po dootrzenowym podaniu czystej mikrocystyny-LR oraz doustnej aplikacji ekstraktów sinic zawierających tę cyjanotoksynę [8].

Obok mikrocystyny, równie powszechnie występującą cyjanotoksyną jest anatoksyna-a. Związek ten jest neurotoksyną, której obecność często stwierdza się w wielu zbiornikach słodkowodnych [9]. Anatoksyna-a należy do alkaloidów i produkowana jest przez sinice *Anabaena flos-aquae*, *Anabaena circinalis*, *Aphanizomenon* sp. *Cylindrospermum*, *Planktothrix* sp oraz *Microcystis aeruginosa* [2]. Mechanizm działania anatoksyny-a polega na nadmiernym pobudzeniu komórek nerwowych i mięśniowych spowodowanym stałym otwarciem kanałów sodowych oraz wapniowych prowadzącym do paraliżu układu nerwowego oraz mięśni oddechowych. Wyniki badań przeprowadzonych w ośrodkach naukowych na świecie sugerują, iż anatoksyna-a działa toksycznie na ryby. Podczas zakwitu sinic w jeziorze Richmond zaobserwowano masowe śnięcia wywołane tą cyjanotoksyną. Pomimo, iż nie wykazano przewlekłej toksyczności anatoksyny-a u ryb, gdyż w warunkach naturalnych w środowisku wodnym jest stosunkowo szybko neutralizowana stwierdzono, iż substancja ta ulega kumulacji w organizmie karpia [7]. Należy więc przypuszczać, iż zgromadzona w narządach układu odpornościowego ryb (nerka główowa, śledziona) cyjanotoksyna może chronicznie oddziaływać na komórki immunokompetentne. Opublikowano bardzo niewiele prac dotyczących wpływu anatoksyny-a na układ odpornościowy zwierząt stałocieplnych. W badaniach *in vitro* wykazano obniżenie żywotności limfocytów T i B izolowanych od myszy po inkubacji z anatoksyną-a [12] oraz obniżenie żywotności tymocytów u szczura [6]. Natomiast brak jest danych w literaturze o oddziaływaniu anatoksyny-a na układ odpornościowy ryb. Podjęte przez autorów badania miały więc na celu określenie wpływu anatoksyny-a na funkcjonowanie komórek układu odpornościowego karpia (*Cyprinus carpio* L.) w warunkach *in vitro*. Wykazano, że w stężeniach środowiskowych anatoksyna-a wywołuje apoptozę limfocytów. Po 24 h inkubacji limfocytów z tą cyjanotoksyną w stężeniach 0,1, 1, 5 µg/ml stwierdzono statystycznie istotny wzrost liczby komórek apoptotycznych. Natomiast w stężeniu 10 µg/ml anatoksyny-a zanotowano niewielkie lecz statystycznie istotne zwiększenie ilości komórek ulegających nekrozie. Ponadto wykazano, iż anatoksyna-a we wszystkich zastosowanych koncentracjach powoduje również zależne od koncentracji obniżenie stopnia proliferacji limfocytów T oraz B stymulowanych mitogenami. Zakwity sinicowe występujące w zbiornikach rekreacyjnych oraz stawach hodowlanych stanowią ważny problem ekotoksykologiczny, dlatego istnieje potrzeba prowadzenia dalszych badań nad oddziaływaniem cyjanotoksyn nie tylko na układ odpornościowy ryb ale również na inne systemy kręgowców niższych i wyższych.

LITERATURA

- [1] Carmichael W.W. 1992. *Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins*. J. Appl. Bacteriol., 72: 445-459.
- [2] Edwards C., Beattie K.A., Scrimgeour C.M., Codd G.A. 1992. *Identification of anatoxin-a in benthic cyanobacteria (blue-green algae) and in associated dog poisonings at Loch Insh, Scotland*. Toxicol., 30: 1165–1175.
- [3] Fastner J., Codd G.A., Metcalf J.S., Woitke P., Wiedner C., Utkilen H. 2002. *An international intercomparison exercise for the determination of purified microcystin-LR and microcystins in cyanobacterial field material*. Anal. Biochem. Chem., 374: 437–444.
- [4] Jacquet C., Thermes V., de Luze A., S. Puiseux-Dao, Bernard C., Joly J.S., Bourrat F., Edery M. 2004. *Effects of microcystin-LR on development of medaka fish embryos (Oryzias latipes)*. Toxicol., 43: 141-147.
- [5] Jianying Z., Hangjun Z., Yingxu Ch. 2006. *Sensitive apoptosis induced by microcystins in the crucian carp (Carassius auratus) lymphocytes in vitro*. Toxicol. in vitro, 20: 560-566.
- [6] Lakshmana Rao P.V., Bhattacharya R., Gupta N., Parida M. M., Bhaskar A.S.B., Dubey R. 2002. *Involvement of caspase and reactive oxygen species in cyanobacterial toxin anatoxin-a-induced cytotoxicity and apoptosis in rat thymocytes and Vero cells*. Arch. Toxicol., 76: 227-235.
- [7] Osswald J., Rellan S, Carvalho AP, Gago A, Vasconcelos V. 2007. *Accute effects of anatoxin-a producing cyanobacterium on juvenile fish-Cyprinus carpio L*. Toxicol., 49: 693-698.
- [8] Palikova M., Kovaru F., Navratil S., Kubala L., Vajcova V. 1998. *The effect of pure microcystin LR and biomass of blue-green algae on selected immunological inducers of carp (Cyprinus carpio L.) and silver carp (Hypophthalmichthys molitrix Val.)*. Acta Vet. Brno, 67: 265-272.
- [9] Pawlik - Skowrońska B., Skowroński T., Pirszel J., Adamczyk A. 2004. *Relationship between cyanobacterial bloom composition and anatoxin-a and microcystin occurrence in the eutrophic dam reservoir*. Pol. J. Ecol., 52: 479-490.
- [10] Rymuszka A., Sierosławska A., Bownik A., Skowroński T. 2007. *In vitro effects of pure microcystin-LR on the lymphocyte proliferation in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. Fish Shellfish Immunol., 22: 289-292.
- [11] Sierosławska A., Rymuszka A., Bownik A., Skowroński T., 2007. *The influence of microcystin-LR on fish phagocytic cells*. Hum. Exp. Toxicol., 26: 603-607.
- [12] Teneva I, Mladenov R, Popov N, Dzhambazov B. 2005. *Cytotoxicity and apoptotic effects of microcystin-LR and anatoxin-a in mouse lymphocytes*. Fol Biol (Praha), 51: 62-67.
- [13] Vajcova V., Navratil S., Palikova M. 1998. *The effect of intraperitoneally applied pure microcystin LR on hematological, biochemical and morphological indices of silver carp (Hypophthalmichthys molitrix Val.)*. Acta Vet. Brno, 67: 281-287.
- [14] Wiegand C. Pflugmacher S. 2005. *Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: a short review*. Toxicol. Appl. Pharmacol., 203: 201-218.

IMPACT OF CYANOTOXINS ON FISH IMMUNE SYSTEM

Cyanobacteria are phototrophic microorganisms producing toxic secondary metabolites – cyanotoxins. Higher and lower vertebrates are sensitive to these chemical compounds. Massive mortalities of fish during and after cyanobacterial blooms may be a result of not only oxygen depletion, high concentration of hydrogen sulfide but also presence of cyanotoxins. Fish immune system is a highly sensitive system protecting an organism against bacterial, viral and fungal diseases and neoplasms. Lowered responsiveness caused by can lead to diseases and consequently losses in fish aquaculture. The results of our studies and data from the literature indicate that cyanotoxins impair functioning of fish immune system T and B lymphocytes and phagocytic cells turned out to be sensitive to the toxic action of cyanotoxins – microcystins and anatoxin-a.