

Úvod

Povrchové vody jsou hlavním zdrojem vody pro zavlážování a zásobárnami pitné vody. Znečištěním těchto vod může docházet k nepříznivým vlivům na jednotlivé organismy vedoucí k modulaci ekosystému. I přes stále rostoucí rozvoj čistírenských technologií, se objevují látky, které procházejí čistírnami ve stopovém množství. Mezi tyto látky patří například hormony, léčiva a antibiotika, které působí již při nízkých koncentracích, a které mohou negativně ovlivňovat cílové orgány organismů, jako je imunitní systém.

Imunitní systém

Do imunitního systému (I.S.) řadíme molekuly, buňky, tkáně a orgány podílející se na imunitě organismu. Kromě imunity se tyto složky podílejí na procesu regenerace a hojení. Imunitu poté rozdělujeme na specifickou a nespecifickou.

Nespecifická imunita je jednodušší a nalezneme ji v různých formách u všech organismů vodního ekosystému. Řadíme zde anatomické bariéry (membrány), bariéry fyziologické (pH, teplota), bariéry mechanické (řasinky), ale také fagocytující buňky (makrofágy), vrozené zabijáče (NK) a všechny komponenty zánětu. Tato imunita je vrozená a imunitní odpověď probíhá v rozsahu hodin.

Specifická imunita, neboli adaptivní je získána na základě již proběhlých imunitních odpovědí, které jsou poté zafixovány imunitním systémem do imunitní paměti. Imunitní odpověď zde trvá až týdny a probíhá pomocí specifických antigenů, diverzity membránových receptorů, které pomáhají rozpoznat vlastní a cizí komponenta organismu. Hlavními buňkami podílejícími se na specifické imunitě jsou lymfocyty.

Molekulární regulace imunitní odpovědi

Látka vyvolávající imunitní odpověď se nazývá antigen. Antigen je označována látka se specifickou 3D strukturou, která je schopná interakce s protilátkou. Protilátkou je označována specifická molekula určitého tvaru obsahující jeden či více receptorů na svém konci.

Mezi další komponenty I.S. se dále řadí receptory, adhezivní molekuly, cytokiny, nebo glykoproteiny, které aktivují, modulují, nebo urychlují buněčnou odpověď na daný patogen.

Buněčná regulace imunitní odpovědi

Do buněčné imunitní reakce se zapojují jak buňky lymfatické řady, tak i řady myeloidní (obr. 2). Do lymfatické řady řadíme lymfocyty. Ty rozdělujeme na velké granulární lymfocyty (NK), B-buňky produkující protilátky a T-buňky, které dělíme na cytotoxické a pomocné podílející se na aktivaci tkánových makrofágu, tak i na podpoře B-buněk produkujících protilátky. Myeloidní řada je poté

zodpovědná za vývoj erytrocytů, destiček podílejících se na hojení a granulocytů (bazofylů, neutrofilů, eozinofilů), které jsou zodpovědné za destrukci různých forem antigenů. Do myeloidní řady patří také monocyty, které dávají vzniku tkánovým makrofágům a dendritickým buňkám, které jsou zodpovědné za přenos antigenního signálu a zpuštění tak příslušné kaskády.

Orgány imunitního systému

Lymfatické orgány rozdělujeme dle jejich funkce na primární, kde probíhá vývoj a zrání lymfocytů. V kostní dřeni se vyvíjí B-buňky a v brzlíku T-buňky. V sekundárních orgánech poté dochází k setkání s patogenem. Zde jsou zapojeny lymfatické uzliny, mukózní imunitní systém a slezina.

Imunitní systém vybraných vodních organismů

Imunitní systém bezobratlých

Vnější bariéry bezobratlých jako je exoskelet, ulita či sliz jsou základními bariérami vstupu patogenu do organismu. Buněčná imunita je po vniku patogenu zajišťována krevními buňkami nazývanými imunocyty a hemocyty. Hemocyty se podílejí na regulaci výdeje vody a podílejí se na obraně organismu před vstupem cizorodých látek. Hemocyty se také podílejí na hojení ran, enkapsulaci, nodulaci a hlavně fagocytoze. Na odstranění patogenů se také podílejí složky humorální, jako jsou enzymy lysiny uložené v lysozomech, či aglutiny zapojující se do koagulace hemocytů.

Imunitní systém ryb

Imunitní systém ryb se může zdát z pohledu adaptivní imunity teplokrevných živočichů méně pokročilý, je však dostatečně funkční a plastický, aby umožnil rybám adaptivní radiaci do všech vodních prostředí obsazených ohromným množstvím chemických látek a patogenů. Ryby nemají kostní dřeň a lymfatické uzliny. Hlavními lymfatickými orgány jsou u kostnatých ryb brzlík, ledviny a slezina. Velké množství lymfatických buněk se rovněž nachází ve sliznici střeva.

Imunitní systém obojživelníků

Primárními lymfatickými orgány obojživelníků jsou hlavně brzlík (vývoj T- lymfocytů) a slezina (vývoj B-lymfocytů, u některých bezocasých v dospělosti i kostní dřeň). Oba orgány jsou složením a funkcí velmi podobné orgánům ostatních obratlovců včetně savců. Sekundárními lymfatickými orgány pak jsou slezina, GALT a četné lymfopoeticky aktivní oblasti v ledvinách, játrech, mezenteriu, žábrech a kůži.

Imunotoxicita a její účinek na organismus

Imunotoxicitou se označuje narušení rovnováhy fungování IS pomocí imunotoxinů. Imunotoxinem může být syntetická, nebo přírodní látka, která je do vod bodově vyplavována nebo je vyloučená z živých organismů při metabolických pochodech. Příčinou imunotoxicity může být genetická fixace nebo vliv prostředí zahrnující i vlivy chemických látek, které vedou k imunomodulacím jako je porušení protiinfekční a protinádorové ochrany, neschopnost reagovat na vakcíny, či modulace imunopatologie (autoimunity, hypersensitivity). Imunomodulační faktory poté mohou působit přímo na buňky I.S., nebo na buňky spojené s neuroendokrinním řízením modulující imunitní systém.

Imunotoxicitu můžeme poté rozdělit na primární a sekundární. Primární imunotoxicita je způsobena genetickou fixací a mezi její projevy patří dědičné deficity B-buněk a produkce protilátek, či funkční poruchy T-buněk. Sekundární imunotoxicita je dána řadou faktorů během života. Řadíme zde metabolismus a výživu, záření (včetně slunečního), věk, ale také poranění a chronické infekce. Velkou část poté tvoří chemické látky a stres spojený s modulací hormonálního řízení.

V imunotoxikologii také platí základní princip toxikologie: „Každá látka je toxická - o toxicitě rozhoduje jen dávka“. Cizorodá látka vstupuje do těla, kde prodělává řadu dějů, které ovlivňují výslednou „dávku“. Toxikokinetikou se poté rozumí příjem, distribuce, metabolismus, vylučování látky v organismu a závisí na povaze látek. Toxikodynamika popisuje mechanismy interakce látek s cílovými místy. Takovým cílovým místem může být jakákoliv biologicky významná molekula, jako je receptor, protein, NK nebo fosfolipid v buněčných membránách.

V imunotoxikologii neexistuje jeden jednoduchý mechanismus ovlivnění I.S. a zpravidla se uplatňuje více různých procesů, kterými chemické látky působí na I.S. Po vystavení organismu účinnou chemickou látkou může dojít k:

- Prostorovým změnám molekul (proteinů), kdy může dojít ke změně povrchu s receptory a vystavenými antigeny → ovlivnění funkcí APC (antigen prezentujících buněk) a lymfocytů a vyvolání tak autoimunitních reakcí
- K modulacím na molekulární a enzymové úrovni jako je narušení výkonných funkcí enzymů či narušení syntézy DNA, nebo proteinů. Může také docházet k ovlivnění signálních drah a molekul (receptory, cAMP, Ca²⁺) a narušení membránové signalizace a celkové homeostázy organismu
- Nepřímé modulace systémů, které řídí a souvisí s neurohormonální regulací

Imunotoxické látky vodního prostředí

Zdroje:

Imunotoxiny se dají rozdělit podle povahy na přírodní, jako jsou některé složky buněčných těl sinic a syntetické, které jsou do povrchových vod vyplavovány jako sekundární produkty lidské spotřeby a průmyslu. Zejména se jedná o látky používané jako léčiva, či doplňky stravy modulující imunitní systém, mezi takové řadíme například kortizol, beta-glukany, retinoidy, antineoplastika a různá antibiotika (kyselina oxolinová), která jsou do vod transportována odpadními vodami. Často se jedná pseudoperzistentní látky, které jsou do vod přinášena v malých množstvích, ovlivňující hormonální a imunitní systém organismů chronicky.

Dalšími významnými imunotoxickými látkami jsou pesticidy a insekticidy, které jsou používány ve velkém množství na rozsáhlých plochách. Mezi nejnámější řadíme chlorované pesticidy, jako jsou pentachlorfenoly, antraziny, hexachlorbenzen a organofosfáty jako je malathion, glyfosfát, či jejich sloučeniny (trichlorfon).

Kromě splavení pesticidů prudkými dešti mohou být zdrojem znečištění také různé havárie a náhlý únik užívaných pesticidů. Mezi jejich hlavní negativní účinky patří narušení hormonální rovnováhy organismu, které je spojeno s odpovědí imunitního systému. Při nadměrném používání může také dojít ke vzniku rezistence cílových organismů a také k akumulaci metabolitů u necílových organismů. Ty mohou být přeměněny při metabolických pochodech na látky toxické a přímo působit na tkáň imunitního systému.

Průmyslové látky a těžké kovy působí bodově v místech úniku, či kontaminace, avšak jejich průnik do povrchových vod není tak častý. Zejména se jedná o některé persistentní organochlorové látky a polycyklické aromatické uhlovodíky vznikající při nedokonalém spalování a poté atmosférickou depozicí mohou pronikat do vodních systémů anebo polychlorované bifenoly, které se přidávaly do ochranných nátěrů a barev. Také některé těžké kovy jako je kadmium, rtuť, olovo negativně působí na imunitní systém. Možná kontaminace vod poté může probíhat korozí materiálů, ve kterých se dané kovy vyskytují, nebo bodovým únikem z průmyslových továren.

Osud:

Transformace jednotlivých látek závisí na složkách životního prostředí, kde dochází k degradaci látek působením fyzikálních, chemických i biologických vlivů a také na chemické povaze látek. Ve vodním prostředí dochází především k hydrolýze hydrofilních a polárních látek a dochází tak k jejich rozkladu a eliminaci. Další reakcí, které podléhají chemické látky ve vodě je fotolýza. Fotolýza probíhá za přítomnosti slunečního záření a je spojena s termickým rozkladem. Eliminace látek ve vodním prostředí také probíhá ukládáním některých lipofilních látek v biotě, či

v sedimentech. Organické pesticidy mohou také vstupovat do metabolických dějů mikrobiální buňky, kde podléhají degradaci a následně jsou využity jako zdroje organických látek.

Například některá farmaka mohou být vylučována v nepozměněných aktivních formách z hospodářských zvířat a z míst velké lidské spotřeby jako jsou nemocniční komplexy. Ty poté pronikají do povrchových vod dešťovým splavem, nebo prochází přes čističky odpadních vod. Problémem těchto látek je, že obsahují vysoce aktivní látky, které mohou vyvolat imunitní reakci již při nízké dávce i přes jejich poměrně dobrou vodní degradaci.

Působení vybraných chemických skupin látek:

POPs patří mezi nejvýznamnější organické kontaminanty ŽP. Jedná se o heterogenní skupinu látek odolávající degradaci, patří mezi látky persistentní v prostředí a jsou schopné bioakumulace. Mezi nejrozšířenější poté řadíme polychlorované dibenzo-p-dioxiny a polychlorované dibenzofurany (PCDD/Fs), které jsou vedlejší produkty spalování a polychlorované bifenyly (PCBs) používané jako průmyslové chemikálie.

Některé POPs jsou schopné vazby na AhR (Arylhydrokarbonový receptor), který je receptorem pro aromatické uhlovodíky, který je příbuzný ostatním „nukleárním“ receptorům sloužící jako transkripční faktory (receptory pro nízkomolekulární hormony jako jsou ER, AR, ThR, RAR/RXR). Jeho přirozenou funkci v organismu je reakce na toxické látky syntézou detoxikačních enzymů (CYP450).

Aktivací AhR přítomností některých PCDD/Fs, PCBs může dojít k různým vedlejším toxickým účinkům, jako je karcinogenita či imunotoxicita. AhR je také exprimován ve vysokých koncentracích v játrech, kde se podílí na detoxifikaci, ale také v brzlíku. Působením PCDD/Fs a PCBs v prenatálním období může docházet k prenatální atrofii thymu, kdy dochází k inhibici vývoje brzlíku a nemožnosti dozrání T-lymfocytů. Endokrinní systém je poté také ovlivněn Cross-talkem mezi receptory (AhR vs. ER).

Xenoestrogeny jsou látky schopné aktivace estrogenního receptoru (ER). Tyto syntetické látky jsou součástí antikoncepce, ale také látek syntetizovaných za jiným účelem jako jsou pesticidy, či detergenty.

Xenoestrogeny působí řadou mechanismů závislých na ER a může docházet k atrofii brzlíku a kostní dřeni. Kromě toho dochází k inhibici odštiňování autoreaktivních buněk ve slezině a játrech a dochází tak k autoimunitním reakcím vedoucím k zánětům.

PAHs vznikají při hoření a spalování. Jsou přítomné například v dehtu a jsou velmi heterogenní skupinou. Některé efekty PAHs mají podobnou planární strukturu s PCBs a PCDD/Fs avšak jsou méně persistentní a degradovatelné. I jejich toxicita je vázaná na AhR, ale také působí selektivní toxicitou pro makrofágy. Po fagocytóze dochází k řadě oxidačních reakcí a při vzplanutí dochází k aktivaci, oxidaci a následnému vytvoření jejich toxických derivátů. Známa je také jejich karcinogenita po metabolické aktivaci, kdy dochází ke vzniku reaktivních epoxidů.

Olovo je významné svoji toxicitou pro ledviny - nefrotoxicitou, CNS a negativním vlivem na hematopoézu. Po vystavení organismu dochází ke snížení celkových hladin protilátek, snížení aktivity komplementu a následnou neschopností lyzovat imunokomplexy, které vedou k poškození ledvin. Kromě nefrotoxicity olovo také narušuje degradaci starých MHCII receptorů na B-buňkách, což vede k silné imunitní odpovědi a následnému zánětu. Pb také negativně ovlivňuje signální transdukcí (Ca^{2+} / cAMP / proteinkináza C).

Arsen je častým kontaminantem ŽP (půda, voda, potrava). Jeho více sytné kationty (As^{3+} i As^{5+}) jsou schopné interkalace do DNA a vyvolávají tak genotoxicitu. Po expozici As dochází ke vzrůstu mortality u řady infekcí a vzrůstu incidence nádorů. Arsen je také spojován s přímou inhibicí NK a cytotoxických leukocytů. Po jeho expozici je také sledováno ovlivnění signálování kortikoidů a narušení hormonální rovnováhy organismu.

Rtuť působí na vodní organismy jak akutně, kdy dochází k poškození dýchacích cest, tak i chronicky poškozením CNS a poškozením ledvin ukládáním imunokomplexů vyvolávající autoimunitní reakce. Po jeho expozici dochází k silné indukci B-buněk a následné klonální proliferaci vedoucí k zvýšení hladiny Ig (IgE a IgG) a následnou autoimunitní reakci vedoucí k zánětu.

Pesticidy jsou velmi heterogenní skupina látek s různými chemickými vlastnostmi a toxicitou. Také se řadí mezi nejvýznamnější imunotoxické látky, a to převážně organochlorové pesticidy. Ty jsou velmi nebezpečné zejména svou persisterancí a bioakumulací. Jejich expozice je spojována se zvýšenou hepatotoxicitou a neurotoxicitou a také se vzrůstem dětských nádorů. Nejvýznamnější efekty na imunitní systém byly pozorovány u makrofágů, kdy docházelo k inhibici fagocytózy a produkci NO, nebo k endokrinním modulacím, které ovlivnily i I.S.

Retinoidy jsou přírodní i syntetické látky, jejichž biologická aktivita je esenciální pro embryonální vývoj a udržení homeostázy organismu. Jejich efekt na I.S. je stimulační, kdy dochází k stimulaci T-buněk a zvýšené humorální odpovědi.

Metody hodnocení imunotoxicity

Při měření imunotoxicity látek se využívá hojně zastoupení imunologických metod. Pro akutní a specifickou imunitu se používá aplikace imunotoxinu a následné sledování funkční odpovědi na specifické antigeny. Při testu chronické toxicity po aplikaci xenobiotika sledujeme vliv na obecné a základní vlastnosti I.S.

- Hematologie a buněčnost - celkové počty krevních buněk/ml, počty leukocytů, lymfocytů
- Množství a třídy protilátek - ELISA proti Fc fragmentům IgG, IgM, IgE
- Hodnocení histologie
 - 1) Stanovení produkce protilátek
 - 2) Stanovení proliferační odpovědi B-lymfocytů
 - 3) Hodnocení „oxidativního vzplanutí“ MF
 - 4) In vitro fagocytoza (a likvidace patogena)
 - 5) Sledování funkce NK buněk

Literatura:

Základy imunologie, Václav Hořejší, Jiřina Bartůňková, 4. Vydání, Praha

<http://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2007/06/04.pdf>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19699679>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18279846>

<http://www.ich.org/products/guidelines/safety/safety-single/article/immunotoxicity-studies-for-human-pharmaceuticals.html>