



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Akut mikrocystinförgiftning hos däggdjur

Josefine Löfgren

Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2013: 37

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2013



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Akut mikrocystinförgiftning hos däggdjur

Acute intoxication of mammals caused by microcystins

Josefine Löfgren

Handledare:

Jonas Tallkvist och Pia Larsson, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator:

Eva Tydén, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program: Veterinärprogrammet

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: SLU Uppsala

Utgivningsår: 2013

Omslagsbild: -

Serienamn, delnr: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2013: 37
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>

Nyckelord: Cyanotoxin, microcystin, absorption, distribution, metabolism, elimination, toxicitet, mekanismer, effekter

Key words: Cyanotoxin, microcystin, absorption, distribution, metabolism, elimination, toxicity, mechanisms, effects

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	1
SUMMARY	2
INLEDNING.....	3
MATERIAL OCH METODER	3
LITTERATURÖVERSIKT	4
Bakgrund.....	4
Exponering och absorption	4
Distribution	5
Metabolism.....	6
Elimination	7
Toxicitet	7
Toxiska mekanismer	7
Kliniska symtom.....	9
Patologiska fynd	9
DISKUSSION.....	10
LITTERATURFÖRTECKNING	13

SAMMANFATTNING

Förgiftningar hos däggdjur som druckit vatten kontaminerat med cyanotoxiner har observerats världen över, och riskerar att öka i takt med tilltagande övergödning och klimatförändringar. Denna litteraturstudie inriktar sig på mikrocystin (MC) som är det vanligaste och mest studerade cyanotoxinet. Studien avgränsar sig till akut intoxication hos däggdjur och fokuserar på grundläggande mekanismer hos toxinet, såsom absorption, distribution, metabolism och elimination. Vidare beskrivs de toxiska mekanismerna och de akuta toxiska effekterna.

MC orsakar utbredda nekroser och blödningar i levern. Den specifika distributionen till levern anses bero på det höga uttrycket av organiska anjontransportörer (OATP). Dessa transportörer har observerats ansvara för upptaget av MC till hepatocyterna. Vissa studier tyder på att OATPs även har en roll i absorptionen av MC från tarmen. Metabolisering av MC sker genom konjugering med glutation och cystein, och utsöndring sker via tarm och njurar. Ytterligare metaboliter har detekterats men inte kunnat identifieras. Den bakomliggande toxiska mekanismen hos MC har länge ansetts vara inhibering av protein fosfatas 1 och 2A. Denna inhibering orsakar hyperfosforylering i hepatocyterna, och vidare skador på cytoskelettet. Emellertid indikerar senare studier att reaktiva syreföreningar (ROS, reactive oxidative species) har en viktig roll i toxiciteten av MC.

Ytterligare forskning krävs gällande mikrocystiner, med fokus på absorption i tarmen och de toxiska mekanismerna. Det är viktigt att förstå de grundläggande mekanismerna hos toxinet för att i framtiden kunna förhindra och förhoppningsvis kunna behandla intoxicationer av MC hos djur.

SUMMARY

Intoxications by cyanobacterial toxins affecting mammals have been observed worldwide. Due to escalating eutrophication and climate changes, the incidence of cyanobacterial poisoning is proposed to increase. This literature study focuses on the most common and well-studied cyanotoxin, named microcystin (MC). Moreover the study is limited to acute intoxication of mammals. The aim of the study is to explain the absorption, distribution, metabolism and elimination of MC. Furthermore the toxic mechanisms and the acute effects of the toxin are described.

MC causes extensive necrosis and hemorrhage in the liver. This liver-specific distribution is a result of the high expression of organic anion transporting polypeptides, OATPs. These transporters are responsible for the MC uptake to the hepatocytes. Some studies indicate that OATPs also facilitate the MC uptake in the intestine. The metabolism of MC occurs by conjugation with glutathione and cysteine, and the metabolites are excreted in urine and feces. Other metabolites have been observed but not identified. The principal toxic mechanism of MC is presumed to be the inhibition of protein phosphatase 1 and 2A. Inhibition of these phosphatases causes a hyperphosphorylation in the hepatocyte, which leads to hepatocyte deformation. However, later research indicates that reactive oxidative species (ROS) play an important role in the toxicity of MC.

Additional research, focusing on the intestinal uptake and the toxic mechanisms, is required to understand the mechanisms of MC. Understanding of the mechanisms of the toxin is important to prevent and eventually be able to treat cyanobacterial intoxication.

INLEDNING

Cyanobakterier, även kallade ”blå-gröna alger”, har rapporterats orsaka akuta förgiftningar hos djur världen över. Vissa fall har gett dödlig utgång (Stewart *et al.*, 2008). Detta har skapat ett intresse för cyanobakterier, vars toxiska mekanismer har varit föremål för forskning under flera årtionden (Chorus & Bartram, 1999). Tillväxt av toxinproducerande cyanobakterier är vanligt förekommande i förorenade inlandsvatten över hela världen, men förekommer även vid vissa kustområden. Då tillväxtförhållanden, såsom solljus och näringsstatus i vattnet, är fördelaktiga kan cyanobakterier snabbt föröka sig och ge upphov till en hög densitet. Detta kallas algbloomning. Övergödning, som setts vara en bidragande faktor till algbloomningar, har ökat på flera håll i världen (Chorus & Bartram, 1999). Detta, i kombination med de pågående klimatförändringarna gör att frekvensen av algbloomningar förutspås öka i framtiden (Stewart *et al.*, 2008).

Cyanobakterier är fototrofa prokaryoter och innefattar en bred grupp av olika arter. Vissa arter bildar sekundära metaboliter, så kallade cyanotoxiner, som är toxiska för både människor och djur. Dessa cyanotoxiner kan delas in i följande grupper; cykliska peptider, alkaloider och lipopolysackarider (Chorus & Bartram, 1999). Mikrocytin, som tillhör gruppen cykliska peptider, är det vanligaste producerade cyanotoxinet. Detta toxin är levertoxiskt (Svircev *et al.*, 2010; Chorus & Bartram, 1999).

Risken för allvarliga förgiftningar hos djur vid mer frekventa algbloomningar gör cyanobakterier och deras toxiner till ett aktuellt ämne inom veterinärmedicinen. Omfattande forskning har gjorts gällande mikrocytin, men deras toxiska mekanismer är endast delvis kartlagda (Svircev *et al.*, 2010). Detta är en litteraturstudie som behandlar mikrocytin och dess patologi. Vidare avgränsar sig studien till akut intoxikation hos däggdjur, varför långtidseffekter som tumörbildning inte kommer att tas upp. Syftet med litteraturstudien är att svara på följande frågor: 1) Hur sker absorption, distribution, metabolism och elimination av mikrocytin? 2) Vilka är de toxiska mekanismerna för mikrocytin? 3) Vilka akuta toxiska effekter ses vid intoxikation av mikrocytin?

MATERIAL OCH METODER

Litteraturstudien baseras främst på vetenskapliga artiklar. De databaser som används för att söka artiklar är PubMed, Web of Knowledge och Google Scholar. En rapport från Världshälsoorganisationen har även används.

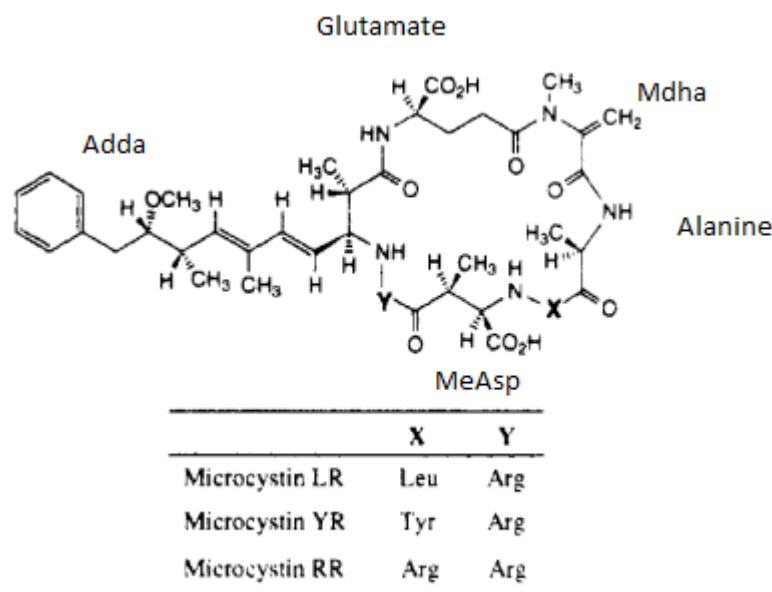
I början av studien användes följande sökord; cyanobacteria OR ”cyanobacterial toxins” OR mikrocytins AND ”animal intoxication”. Flera relevanta reviews hittades vilket gav en översikt över ämnet, varvid sökningarna sedan kunde specificeras. Några reviews gav även relevanta referenser som användes i arbetet. De senare sökningarna inkluderade sökord som mikrocytins AND uptake OR oatp OR mechanisms OR distribution OR metabolism OR detoxification OR elimination OR toxic effects OR ros.

Då intensiv forskning bedrivits på området hittades en mängd vetenskapliga artiklar. De artiklar med mest relevans användes i litteraturstudien.

LITTERATURÖVERSIKT

Bakgrund

Mikrocystin (MC) är det vanligaste förekommande cyanotoxinet i sötvatten och finns spritt över hela världen. Toxinet isolerades först från *Microcystis spp*, vilket gett toxinet dess namn. Numera har man dock påvisat att MC produceras av ett flertal arter av cyanobakterier, nämligen av *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nostoc* och *Anabaenopsis* och *Hapalosiphon* generat. MC dominerar ofta i näringsrikt vatten. Gränsvärdet för i MC-LR i dricksvatten är $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (Chorus & Bartram, 1999).



Figur 1. Kemiska strukturen hos mikrocystin LR, YR och RR. Adapted with permission from (Kondo *et al.*, 1992). Copyright (2013) American Chemical Society.

MC är en cyklisk peptid med den kemiska strukturen cyclo-(D-alanine¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-glutamate⁶-Mdha⁷) (figur 1). Den cykliska peptiden består av 7 olika aminosyror, varav alla kan ha strukturella skillnader (Chorus & Bartram, 1999). MC är därför en bred grupp av peptider och man har idag detekterat över 80 olika varianter av toxinet (Svircev *et al.*, 2010). De vanligaste varianterna av MC är MC-LR och MC-RR, vars strukturella skillnad endast beror på en aminosyra (Chorus & Bartram, 1999).

Exponering och absorption

Förgiftning hos däggdjur kan ske vid konsumtion av vatten rikt på toxin, eller genom direkt konsumtion av cyanobakterier som innehåller toxiner. De flesta vilda och tama djur undviker att dricka kraftigt kontaminerat vatten. Förgiftning hos dessa djur sker endast då djuren inte har tillgång till rent vatten och därmed tvingas dricka av det giftiga vattnet. Det har dock observerats att vissa individer har svårt att skilja mellan förorenat och icke förorenat vatten.

Hundar har dessutom uppvisat ett aktiv sökande och konsumerande av cyanobakterier (Stewart *et al.*, 2008).

Eftersom MC är levertoxiskt och intas oralt av djuren, måste toxinet först tas upp av magtarmkanalen för att sedan kunna utöva sin toxiska effekt på levern. MC har dålig förmåga att passera cellmembran, vilket gör att upptaget måste ske genom aktiv transport (Eriksson *et al.*, 1990a). År 1990 föreslog forskare att upptaget av MC till hepatocyter sker med hjälp av organiska anjontransportörer, OATPs (Eriksson *et al.*, 1990a). OATPs består av en bred grupp av transportörer vars subfamiljer finns uttryckta i levern, blodhjärnbarriären, njurarna och tarmen (Shitara *et al.*, 2013). Falconer *et al.* (1992) misstänkte att dessa transportörer även kunde ansvara för upptaget av MC i tarmen. De ville undersöka om inhibering av OATPs kunde skydda mot MCs skadeverkningar på enterocyter. Detta skulle indikera huruvida upptaget av MC sker med hjälp av OATPs eller ej. Obehandlade enterocyter jämfördes med enterocyter behandlade med gallsyran deoxycholat och de två OATP-inhibitorerna, rimfampicin och bromosulphothalein. Efter exponering av MC hos de två grupperna sågs en signifikant skillnad i skadeverkan. De behandlade enterocyterna skyddades mot cellskador eftersom MC hindrades från att tas upp i enterocyterna då OATPs blockerades. Studien indikerar därför att OATP är ansvarig för upptaget av MC i tarmen. I en senare studie undersöktes humana carcinoma colonciller (caco-2 celler) som uttryckte OATP4A1 och OATP3A1 (Zeller *et al.*, 2011). Transportörerna i denna studie konstaterades ha förmågan att transportera MC, vilket stödjer teorin om att OATPs underlättar upptaget av MC från tarmen.

Tabell 1. Subfamiljer av OATP hos gnagare och dess distribution (Shitara *et al.*, 2013)

		Organ	
Lever	Njure	Tarm	Blodhjärnbarriär
OATP1a1	OATP1a1	OATP1a5	OATP1a4
OATP1a4		OATP2b1	OATP1c1
OATP1b2			

Fastän forskare har visat att OATPs har förmåga att transportera MC till enterocyter så är det inte kartlagt vilken eller vilka subfamiljer av transportören som är ansvarig för upptaget i tarmen (Zeller *et al.*, 2011). Vidare skiljer sig subfamiljer av OATPs åt mellan djur och människor. Hos gnagare har man lokaliserat subfamiljerna OATP1A5 och OATP2B1 till tarmen (tabell 1) (Shitara *et al.*, 2013).

Distribution

Genom att radioaktivt märka MC har man sett att toxinet ackumuleras i levern efter intravenös injektion (tabell 2), vilket också är målorganet (Robinson *et al.*, 1991). I vissa fall har man även sett att MC verkar neurotoxiskt och att toxinet kan påverka hjärtat, njurarna och reproduktionsorganen (Svircev *et al.*, 2010). Då MC tagits upp i tarmen går toxinet ut i blodet och passera levern via det portala blodflödet. Hepatocyterna kommer då i kontakt med MC och toxinet tas upp (Svircev *et al.*, 2010). Som tidigare nämnt kan MC inte effektivt passera cellmembran och därför måste upptaget ske genom aktiv transport (Eriksson *et al.*, 1990a).

Tabell 2. Distribution av radioaktivt märkt markör över tiden. Reprinted with permission from (Robinson *et al.*, 1991). Copyright (2013) American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics

Values are mean \pm S.E., $n = 6$. Heart, lung and spleen constituted $< 0.1\%$ of dose at all time points.

Time	% Dose				
	Liver	Kidney	Intestine	Carcass	Plasma
<i>min</i>					
1	23 \pm 5	2.0 \pm 0.2	5.2 \pm 0.9	30 \pm 3	25.0 \pm 4.0
3	56 \pm 6	4.6 \pm 0.6	4.6 \pm 0.5	27 \pm 4	8.0 \pm 0.8
6	55 \pm 2	2.1 \pm 0.3	7.1 \pm 0.5	20 \pm 5	3.5 \pm 0.7
10	50 \pm 1	1.1 \pm 0.1	4.7 \pm 0.5	16 \pm 4	2.7 \pm 0.3
15	60 \pm 5	1.2 \pm 0.1	5.8 \pm 0.7	17 \pm 4	1.4 \pm 0.3
20	66 \pm 5	0.8 \pm 0.2	6.1 \pm 1.3	11 \pm 3	0.5 \pm 0.0
30	71 \pm 3	0.7 \pm 0.1	6.8 \pm 0.7	3 \pm 1	0.2 \pm 0.0 ^a
40	69 \pm 5	0.9 \pm 0.1	10.5 \pm 1.0	6 \pm 2	0.1 \pm 0.0
60	67 \pm 4	0.8 \pm 0.1	8.6 \pm 0.7	6 \pm 2	T ^b

^a Plasma values at 30 and 40 min not significantly different.

^b Trace amount.

Organtropismen hos MC tros bero på den aktiva transporten med hjälp av OATPs, vilka finns högt uttryckta i levern (Fischer *et al.*, 2005). Eriksson *et al.* (1990a) uppmärksammade att en inhibering av gallsyretransportörerna, med hjälp av antamanid, rifampicin och sulfobromophthalein, hindrade upptaget av MC till hepatocyterna. Studien visade även att upptaget av MC kunde inhiberas av gallsyror i tillräckligt höga doser. I en senare studie undersöktes vilka subfamiljer av OATP som är ansvariga för upptaget till hepatocyterna och blodhjärnbarriären. Resultatet indikerade att subfamiljen OATP1B är aktiv i transporten av MC till hepatocyten. De humana OATP1B1 och OATP1B3 identifierades som aktiva transportörer av MC, och hos gnagare påvisades den leverspecifika OATP1b2. I blodhjärnbarriären ansågs OATP1A2 ansvara för upptaget av MC hos människor. Emellertid kunde inte transportörer av MC i blodhjärnbarriären hos djur identifieras. En möjlig kandidat ansågs dock vara OATP1c1 (Fischer *et al.*, 2005).

Metabolism

Det är allmänt känt att metabolism av toxiska ämnen sker via en fas 1 reaktion tillsammans med konjugering i en fas 2 reaktion (Kondo *et al.*, 1996). Kondo *et al.* (1992) misstänkte att MC kunde metaboliseras genom konjugering med glutation (GSH). MC konjugerat med GSH (MC-GSH) och cystein (MC-Cys) framställdes syntetiskt och kunde sedan undersökas angående formation och toxicitet. GSH och Cys visades binda till Mdha på MC (figur 1), medan Adda-domänen lämnades oförändrad. Studien visade även att LD50-värdet för konjugerat MC var betydligt högre än för okonjugerat MC och att möss behandlade med GSH före exponering av MC skyddades från dödliga skador. Dock var toxiciteten hos konjugerat MC oförändrad. Kondo *et al.* (1992) föreslog därför att konjugeringen framför allt är viktig för eliminationen av MC. Dessutom ansågs Mdha-domänen inte påverka toxiciteten då MC fortfarande visade sig vara toxiskt efter strukturella förändringar vid Mdha.

I en senare studie undersöktes metabolismen av MC genom intraperitoneal injektion av möss och råttor. Endast en liten andel av dosen injicerat MC detekterades i levern då den undersöktes 3, 6 och 24 timmar efter injektion, vilket indikerar att en metabolism ägde rum. Ämnen med kortare retentionstid än MC detekterades, varav MC-GSH och MC-Cys kunde identifieras som två av dessa ämnen. Både GSH och Cys var bundna till Mdha. En annan metabolit, modifierad i både Adda och Mdha, kunde även detekteras. Ytterligare metaboliter detekterades, men identifierades inte (Kondo *et al.*, 1996).

Elimination

MC utsöndras via njurarna och tarmen (Ito *et al.*, 2002; Robinson *et al.*, 1991). Genom att radioaktivt märka MC har man kunnat detektera metaboliter i både urin och faeces efter intravenös injektion av möss. Eliminationen efter intravenös injektion visade sig vara konstant i faeces under hela studien medan större delen av urineliminationen ägde rum under den första dagen. Den avtagande eliminationen via njurarna föreslogs bero på snabbt sjunkande plasmakoncentration av MC sekundärt till att MC togs upp i vävnad. Elimination via njurarna och tarmen ledde till en total minskning av mängden MC i vävnaden hos möss, med undantag för levern. MC band kovalent till högmolekylära komponenter i hepatocyterna, troligtvis till proteiner. Detta ansågs vara orsaken till att mängden MC i levern inte minskade i relation till eliminationen via faeces och urin (Robinson *et al.*, 1991). Vidare studier har identifierat metaboliterna i urin och faeces som MC-GSH och MC-Cys (Ito *et al.*).

Vid undersökning av skillnad i toxicitet mellan MCLR, MCRR och konjugerat MCLR, föreslogs eliminationen vara en viktig faktor. MCLR ackumulerades gradvis i levern vid letala doser. Vid subletala doser av MCRR, MCLR-GSH och MCLR-Cys uteblev ackumulering i levern och en distribution till digestions- och utsöndringsorgan (njurar och tarm) kunde observeras. Även leverskadorna uteblev, trots att doserna för de tre komponenterna (MCRR, MCLR-GSH och MCLR-Cys) var högre än de letala doserna för MCLR. Resultaten tyder på att konjugerat MC har en hög affinitet för utsöndringsorganen, vilket föreslogs vara anledningen till uteblivna leverskadorna. MCRR, MCLR-GSH och MCLR-Cys kunde detekteras i digestionsorganen hos bågarceller, lamina propria och mukosan. Tunntarmen hade låg sekretion till mukosan. Trots att MCLR-Cys distribuerats till mukosan efter 7 timmar skedde ingen sekretion. Både i caecum och colon påvisades en hög sekretion av MCRR, och till viss del även MCLR-GSH. Detektionen av MCLR-Cys var dock låg. I njurarna påvisades motsatt mönster, där MCLR-Cys var den mest frekventa av de tre komponenterna. Även MCLR-GSH kunde detekteras i njurarna. De båda komponenterna påvisades i medulla och cortex. Resultaten i studien indikerar att MCLR-Cys endast utsöndras från njurarna, medan MCLR-GSH utsöndras från både njurarna och tarmen (Ito *et al.*, 2002).

Toxicitet

Toxiska mekanismer

Inhibering av PP1 och PP2A

MC-LR har identifierats som en specifik inhibitor av protein fosfat 1 (PP1) och 2A (PP2A). Fosfataser är en grupp av enzymer som defosforilerar olika regulatoriska proteiner i cellen

(Cohen, 1989). Den toxiska mekanismen har bevisats genom att andra substrat och inhibitorer till fosfataserna hindrar bindningen av MC-LR till de katalytiska domänerna på PP1 och PP2A. Interaktionen mellan fosfatasernas katalytiska domäner och toxinet har visat sig vara stark (Mackintosh *et al.*, 1990). Senare studier har bekräftat att MC-LR är en potent hämmare av PP1 och PP2A, men även visat att MC-RR har samma toxiska mekanism. MC-RR behöver dock ges i större mängd än MC-LR för att generera skador i samma omfattning. Orsaken till denna skillnad ansågs vara den lägre affiniteten för OATPs i hepatocyternas cellmembran (Eriksson *et al.*, 1990b).

Eriksson *et al.* (1990b) visade att inhibering av PP1 och PP2A gav en hyperfosforylering i hepatocyterna. En förhöjd fosforylering av cytoskelettet och cytosola proteiner detekterades efter 5 minuters exponering av MC-LR. Även om en ökad fosforylering intracellulärt kunde fastslås identifierades inga enskilda mål för fosforyleringen. Inhibering av PP1 och PP2A sågs leda till morfologiska förändringar av hepatocyterna. Eriksson *et al.* (1990b) visade även att deformationen av hepatocyterna ökade i takt med ökande doser av MC. Doser av MC-LR som gav en markant ökning av fosforyleringsnivån intracellulärt, gav samtidigt ökade skador på cytoskelettet. Nätverket av mikrofilament i hepatocyten, som normalt ses, skadades. Dessutom gav lägre doser av MC-LR mindre uttalad deformation av hepatocyterna. Inhiberingen av PP1 och PP2A föreslogs därför vara orsaken till deformationer i hepatocyterna vid intoxication av MC.

ROS

Senare forskning har indikerat att reaktiva syreföreningar (ROS, reactive oxidative species) spelar en viktig roll för toxiciteten av MC (Ding *et al.*, 2001). ROS, som även bildas vid normal metabolism, är involverad i en rad olika processer i cellen, däribland signalöverföring och enzymatiska reaktioner. Då balansen rubbas i redoxjämvikten eller nivån av antioxidanter sjunker kan förhöjda nivåer av reaktiva syreföreningar leda till att cellskador uppstår (Bayir, 2005). Formation av ROS har kunnat detekteras kort efter inkubation av hepatocyter med MC-LR. Väteperoxid (H_2O_2) och superoxidjoner ($O_2^{\cdot-}$) kunde detekteras och ROS uppskattades vara tre gånger högre än normalt efter 15 minuters exponering av MC-LR. De morfologiska förändringarna av hepatocyterna, det vill säga skador på mikrotubuli och mikrofilament, som kunde ses efter behandling med MC uteblev helt då man förbehandlade cellerna med 4-hydroxy-2,2,6,6-tetrametylpiperidin-N-oxyl (TEMPOL) och uteblev delvis vid förbehandling med deferrioxamin (DFO). TEMPOL, som är ett superoxid-dismutans-härmande ämne, skyddar effektivt mot $O_2^{\cdot-}$. DFO är en järnkelator och kan indirekt reducera bildningen av ROS. Forskarna hävdade därför att formation av ROS var den viktigaste orsaken till MCs levertoxicitet. $O_2^{\cdot-}$ föreslogs vara den reaktiva jon som till störst del orsakade deformation av cytoskelettet (Ding *et al.*, 2001). Det finns dock studier som visar resultat som strider mot detta påstående. Franz *et al.* (1988) behandlade möss med alloxan, DFO och butylerad hydroxyanisol som skyddar mot ROS, innan de utsattes för MC. De möss som förbehandlats med 45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ butylerad hydroxyanisol visade minskade patologiska förändringar i levern, och en svag ökning av livslängd kunde även ses hos dessa möss. Vid de övriga doserna som användes (30, 68, 101, 152 och 228 $\mu\text{g}/\text{kg}$) visades ingen skillnad mellan

de tre grupperna jämfört med kontrollgruppen. Franz *et al.* (1988) hävdade därför att ROS inte spelade en stor roll i toxiciteten av MC.

Kliniska symtom

I en studie utsattes får för olika doser av MC, varav 990 mg/kg och 1040 mg/kg gav milda symtom. De milda symtomen yttrade sig som minskade ruminala ljud, inappitens och matthet, och anträdde efter 48 timmar. Fåren uppvisade inga förändringar i kroppstemperatur eller hjärt- och andningsfrekvens. Doser mellan 1040 mg/kg och 1840 mg/kg visade sig ge kraftiga symtom. Dessa uppträdde ca 15 timmar efter den intraruminala injektionen. Symtom som vag depression, frekvent liggande ställning, ökning av kroppstemperatur (1.5 till 2.5° C), ökad hjärtfrekvens, varierande andningsfrekvens och upphörande ruminala ljud observerades. 21 timmar efter injektion av MC visades de första muskelryckningarna, vilka till en början var lokaliserade till ögonlock och öron. Muskelryckningarna spred sig senare till muskulaturen i ansiktet och extremiteterna. Likande muskelryckningar har observerats vid studier på möss (Falconer *et al.*, 1981). Strax innan fåren dog uppvisades vevande rörelser med benen, samtidigt som de kippade efter luft. En mild nystagmus och förlorade reflexer i ögat kunde även observeras. Dessa neurologiska symtom föreslogs bero på den mätbara hypoglykemin, men även de akuta skadorna på levern och hjärnan som kan förväntas uppstå vid förgiftning av MC. Flertalet av de får som injicerats med dödliga doser dog inom 24 timmar efter injektion (Jackson *et al.*, 1984).

Patologiska fynd

Makroskopiska fynd

De toxiska effekterna av MC har undersökts både genom intraperitoneal injektion hos möss (Falconer *et al.*, 1981) och intraruminal injektion hos får (Jackson *et al.*, 1984). Studierna visar att målorganet levern drabbas av utbredda blödningar vid höga doser av MC. De övriga organen, med undantag av små förändringar i lungan, visar inga primära skador. Levern blev svullen och ökade kraftigt i vikt, vilket antogs bero på den ökade blodmängden i organet (Jackson *et al.*, 1984; Falconer *et al.*, 1981). Hos de behandlade fåren sågs en blek lever med ett lobulärt mönster, bestående av små blodansamlingar och petechier (Jackson *et al.*, 1984). I motsats till detta sågs mössen få en fläckig lever som sedan övergick till mörkt röd då doserna av MC höjdes (Falconer *et al.*, 1981). Hos fåren observerades petechier och echymer i varierande frekvens över hela kroppen. Orsaken till de generella blödningarna föreslogs vara en minskning av koagulationsfaktorer i blodcirkulationen då den skadade levern inte hade förmågan att ersätta de som förbrukats. Slaktkropparna påvisade dessutom en lindrig förekomst av gulsot. Vidare observerades en gul vätska i slaktkropparnas kaviteter, samt vätskande subperitoneala ödem runt njurarna och gallblåsan. Ödemen föreslogs bero på portal hypertension, varvid blodgenomströmningen i levern minskar. Lungorna hos fåren visade även de tecken på ödem, vilka dock sågs som måttliga (Jackson *et al.*, 1984).

Mikroskopiska fynd

Intoxikation av MC ger en utbredd nekros i levern. Hos nekrotiserade celler har degeneration av cellkärnan och cytoplasmatiska strukturer detekterats. Infiltration av erythrocyter och

neutrofiler kunde även ses vid de nekrotiska områdena och en nedbrytning av det sinusoidala endotelet detekterades. Därutöver kunde en mild lipidos ses hos hepatocyterna (Jackson *et al.*, 1984; Falconer *et al.*, 1981). De nekrotiska områdena hos fåren kunde initialt endast detekteras i de centrilobulära områdena, varvid nekrosen efter hand spred sig över hela loben (Jackson *et al.*, 1984). Detta är i motsats till vad som sågs i levern från möss, då nekrosen började i periferin och sedan spreds sig (Falconer *et al.*, 1981). De olika resultaten föreslogs bero på de olika administreringsvägarna, då mössen får ett snabbare intoxikationsförlopp. En annan skillnad var att hepatocyter från fåren visade en kraftig aggregation av slätt endoplasmatisk retikulum (SER), vilket medförde att övriga cellorganeller hamnade i periferin av cellen (Jackson *et al.*, 1984). Detta sågs inte hos hepatocyter från möss (Falconer *et al.*, 1981).

Förutom levern uppvisade även lungorna histologiska förändringar. Lungorna var svagt ödematösa, med en förtjockning av alveolarväggarna och lindrig atelektas (Jackson *et al.*, 1984; Falconer *et al.*, 1981). I lunga från möss syntes dessutom en ansamling av trombocyter och erythrocyter. Dödsorsaken hos de injicerade mössen ansågs därför vara cirkulatorisk kollaps i lungan som en effekt av chock och intravaskulär koagulation vid den massiva leverskadan (Falconer *et al.*, 1981). Huruvida detta är den allmänna dödsorsaken vid intoxikation av MC är inte fastställt, då studien på får inte visade samma förändringar i lungorna. Dock sågs en infiltration av neutrofiler i nästintill varje arteriol i lungan (Jackson *et al.*, 1984). Inga histologiska förändringar detekterades i hjärnan, hjärtat, njurarna och gastrointestinkanalen hos de två djurslagen (Jackson *et al.*, 1984; Falconer *et al.*, 1981), med undantag för generella blödningar hos fåren (Jackson *et al.*, 1984).

DISKUSSION

Denna litteraturstudie har fokuserat på mekanismer och effekter av MC. Omfattande forskning har gjorts, varvid distribution, metabolism, elimination och de toxiska mekanismerna delvis kartlagts. De toxiska effekterna av MC har undersökts i studier på djur. Dock finns det mekanismer som ännu inte är helt kartlagda, varvid absorption från tarmen är ett exempel.

Målorganet för MC är levern (Robinson *et al.*, 1991), vilken drabbas av utbredda nekroser och blödningar vid förgiftning (Jackson *et al.*, 1984; Falconer *et al.*, 1981). Den specifika distributionen till levern tros bero på det höga uttrycket av OATPs. Dessa transportörer har observerats vara ansvarig för upptaget av MC till hepatocyterna (Fischer *et al.*, 2005; Eriksson *et al.*, 1990a). OATPs finns även uttryckta i andra ställen av kroppen, bland annat blodhjärnbarriären. Förgiftade djur har i vissa fall även visat neurologiska symtom (Jackson *et al.*, 1984). Studier gällande rollen av OATPs uttryckta i blodhjärnbarriären vid förgiftning av MC skulle vara intressant, då de neurologiska symtomen skulle kunna härstamma från ett upptag till hjärnvävnaden. I en studie föreslogs det att de neurologiska symtomen delvis kunde bero på hyperglykemi, men även på grund av akuta skador på hjärnan (Jackson *et al.*, 1984). Genom att radioaktivt märka MC har man även sett en distribution till njurar och tarm efter intravenös injektion (Robinson *et al.*, 1991). Det radioaktiva utslaget i dessa organ kan

dock förklaras med att metaboliter av MC har setts ha en hög affinitet för utsöndringsorganen (Ito *et al.*, 2002).

Metabolismen av MC har observerats ske med hjälp av GSH och Cys. Ytterligare metaboliter har detekterats, bland annat en metabolit modifierad i både Adda och Mdha, men inte kunnat identifieras (Kondo *et al.*, 1996). Forskare har visat att konjugeringen med GSH och Cys sker i Mdha-domänen av MC, och att detta inte påverkar toxiciteten. Dock har metaboliterna som tidigare nämnts en hög affinitet för ut söndringsorganen (Kondo *et al.*, 1996; Kondo *et al.*, 1992). Eliminationen av MC sker via tarm och njure (Ito *et al.*, 2002; Robinson *et al.*, 1991). I en studie visades att metaboliten MC-GSH utsöndras i både tarm och njure, medan metaboliten MC-Cys enbart utsöndrades i njuren (Ito *et al.*, 2002). Den huvudsakliga metabola vägen är ännu inte identifierad, varvid vidare studier gällande metabolismen och eliminationen skulle vara intressant. Det är möjligt att någon av de identifierade metaboliterna är en primär metabolit som sedan behöver omvandlas för att aktivt utsöndras.

De toxiska mekanismerna för MC har undersökts grundligt. Det har länge varit känt att MC är en potent inhibitor av protein fosfatas 1 (PP1) och 2A (PP2A) (Mackintosh *et al.*, 1990) och mycket forskning har inriktat sig på denna mekanism. Inhibering av dessa fosfataser leder till en hyperfosforering intracellulärt i hepatocyterna, vilket ger skador på cytoskelettets mikrotubuli och mikrofilament. Vidare leder detta till deformation av hepatocyterna (Eriksson *et al.*, 1990b). Emellertid har senare studier visat att bildning av ROS har en stor betydelse för skadeverkningarna på hepatocyterna. Då hepatocyterna förbehandlades med TEMPOL, som är känd för att reducera ROS, kunde en total avsaknad av skador påvisas. Förbehandling med DFO visade liknande resultat (Ding *et al.*, 2001). Detta tyder på att ROS har en ytterst viktig roll i skadeverkningen på hepatocyterna. I motsats till detta presenterade Franz *et al.* (1988) resultat som visade att ämnen som reducerar ROS inte inhiberade skador på hepatocyter. Ding *et al.* (2001) föreslog dock att resultaten i studien berodde på de låga doserna av ämnena. Det är svårt att säga vilken mekanism som är huvudorsaken till skadorna på hepatocyterna vid förgiftning av MC, troligtvis är det en kombination av båda. Vidare studier gällande betydelsen av ROS som toxisk mekanism skulle vara intressant.

Förgiftning av MC leder som tidigare nämnt till utbredda nekrosor och blödningar i levern (Jackson *et al.*, 1984; Falconer *et al.*, 1981). De toxiska effekterna av MC koncentreras till levern då övriga organ, med lungorna som undantag, inte visar några primära skador. Dock förekommer generella blödningar i kroppen (Jackson *et al.*, 1984). Studier på möss har visat ansamlingar av blodplättar och erythrocyter i lungorna, varför dödsorsaken hos dessa möss ansågs vara en kollaps av lungcirkulationen som en följd av den massiva leverskadan (Falconer *et al.*, 1981). I studier på får kunde inte dessa lungförändringar observeras. En annan skillnad mellan studierna var lokaliseringen av den initiala nekrosen i levern. Hos möss började nekrosen i periferin av leverloberna (Falconer *et al.*, 1981), medan den hos får började centrilobulärt (Jackson *et al.*, 1984). Orsaken till skiljaktigheterna föreslogs bero på de två olika administreringsvägarna som använts i studierna (Jackson *et al.*, 1984). De exakta skadorna och dödsorsaken vid förgiftning av MC är ännu inte helt kartlagt. Det är dock inte etiskt försvarbart att utföra studier där djur får lida och slutligen dör av sina skador. Istället

vore det lämpligt att fokusera på orsaken till skadorna som setts och försöka finna medel för att motverka dessa.

Ett område som kräver fler omfattande studier är absorption av MC från tarmen. Den naturliga administreringsvägen av MC är oralt. Det organ som drabbas mest vid intoxication av MC är levern, och det är därför logisk att anta att en absorption sker i tarmen. Mekanismerna bakom denna absorption är inte helt klarlagd, men då MC har en låg förmåga att passera cellmembran måste den ske med en aktiv transport (Eriksson *et al.*, 1990a). Studier har visat att OATPs i tarmen har förmågan att transportera MC (Zeller *et al.*, 2011). Dessutom har inhibering av OATPs hos enterocyter visat en signifikant minskning av skadeverkan på cellerna vid exponering av MC (Falconer *et al.*, 1992). Därför har OATPs föreslagit underlätta upptaget av MC i tarmen. Fastän OATPs visats ha förmågan att transportera MC in till enterocyten, är det ännu inte känt vilken transportör som ansvarar för transporten från enterocyten till blodomloppet.

Sammanfattningsvis behövs fortsatt forskning gällande MC, med fokus på absorptionen i tarmen och de toxiska mekanismerna. Risken är stor att giftiga algblomningar kommer att öka i framtiden, i takt med övergödning och klimatförändringar. Hundar som observerats aktivt söka och konsumera cyanobakterier kan då komma att drabbas oftare. Även kor, får och andra betesdjur kan drabbas då deras vattenresurser förorenas. Det är därför viktigt att förstå de grundläggande mekanismerna hos toxinet för att i framtiden kunna förhindra och förhoppningsvis kunna behandla intoxicationer hos djur orsakade av MC.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Bayir, H. (2005). Reactive oxygen species. *Critical Care Medicine*, 33, 498-501.
- Chorus, I. & Bartram, J. (1999). *Toxic cyanobacteria in water : a guide to their public health consequences, monitoring and management*. 1. upplag. London. E and FN Spon.
- Cohen, P. (1989). The structure and regulation of protein phosphatases. *Annual Review of Biochemistry* 58, 453-508.
- Ding, W.X., Shen, H.M. & Ong, C.N. (2001). Critical role of reactive oxygen species formation in microcystin-induced cytoskeleton disruption in primary cultured hepatocytes. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 64, 507-519.
- Eriksson, J.E., Gronberg, L., Nygard, S., Slotte, J.P. & Meriluoto, J.A. (1990a). Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1025, 60-66.
- Eriksson, J.E., Toivola, D., Meriluoto, J.A.O., Karaki, H., Han, Y.G. & Hartshorne, D. (1990b). Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 173, 1347-1353.
- Falconer, I.R., Dornbusch, M., Moran, G. & Yeung, S.K. (1992). Effect of the cyanobacterial (blue-green algal) toxins from *Microcystis aeruginosa* on isolated enterocytes from the chicken small intestine. *Toxicon* 30, 790-793.
- Falconer, I.R., Jackson, A.R.B., Langley, J. & Runnegar, M.T. (1981). Liver pathology in mice in poisoning by the blue-green-alga *microcystis-aeruginosa*. *Australian Journal of Biological Sciences* 34, 179-187.
- Fischer, W.J., Altheimer, S., Cattori, V., Meier, P.J., Dietrich, D.R. & Hagenbuch, B. (2005). Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203, 257-263.
- Franz, D.R., Leclaire, R.D., Lawrence, W.B. & Bunner, D.L. (1988). No effect of modulators of reactive oxygen-induced pathology on microcystin-LR intoxication. *Toxicon*, 26, 1098-1101.
- Ito, E., Takai, A., Kondo, F., Masui, H., Imanishi, S. & Harada, K. (2002). Comparison of protein phosphatase inhibitory activity and apparent toxicity of microcystins and related compounds. *Toxicon*, 40, 1017-1025.
- Jackson, A.R., McInnes, A., Falconer, I.R. & Runnegar, M.T. (1984). Clinical and pathological changes in sheep experimentally poisoned by the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Veterinary Pathology*, 21, 102-113.
- Kondo, F., Ikai, Y., Oka, H., Okumura, M., Ishikawa, N., Harada, K., Matsuura, K., Murata, H. & Suzuki, M. (1992). Formation, characterization, and toxicity of the glutathione and cysteine conjugates of toxic heptapeptide microcystins. *Chemical Research in Toxicology*, 5, 591-596.
- Kondo, F., Matsumoto, H., Yamada, S., Ishikawa, N., Ito, E., Nagata, S., Ueno, Y., Suzuki, M. & Harada, K. (1996). Detection and identification of metabolites of microcystins formed in vivo in mouse and rat livers. *Chemical Research in Toxicology*, 9, 1355-1359.
- Mackintosh, C., Beattie, K.A., Klumpp, S., Cohen, P. & Codd, G.A. (1990). Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatase-1 and phosphatase-2A from both mammals and higher-plants. *Febs Letters*, 264, 187-192.

- Robinson, N.A., Pace, J.G., Matson, C.F., Miura, G.A. & Lawrence, W.B. (1991). Tissue distribution, excretion and hepatic biotransformation of microcystin-LR in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 256, 176-182.
- Shitara, Y., Maeda, K., Ikejiri, K., Yoshida, K., Horie, T. & Sugiyama, Y. (2013). Clinical significance of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug disposition: their roles in hepatic clearance and intestinal absorption. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 34, 45-78.
- Stewart, I., Seawright, A.A. & Shaw, G.R. (2008). Cyanobacterial poisoning in livestock, wild mammals and birds - an overview. I: *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. Serie: Advances in experimental medicine and biology, 619. New York. Springer. Kap. 28.
- Svircev, Z., Baltic, V., Gantar, M., Jukovic, M., Stojanovic, D. & Baltic, M. (2010). Molecular Aspects of Microcystin-induced Hepatotoxicity and Hepatocarcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, 28, 39-59.
- Zeller, P., Clement, M. & Fessard, V. (2011). Similar uptake profiles of microcystin-LR and -RR in an in vitro human intestinal model. *Toxicology*, 290, 7-13.