

Mikrocystiner och nodulariner

Riskvärdering

Denna titel kan laddas ner från: www.livsmedelsverket.se/publicerat-material/.

Citera gärna Livsmedelsverkets texter, men glöm inte att uppge källan. Bilder, fotografier och illustrationer är skyddade av upphovsrätten. Det innebär att du måste ha upphovsmannens tillstånd att använda dem.

© Livsmedelsverket, 2018

ISSN 1104-7089

Handläggare: Ulla Beckman Sundh, UN/RN

Frågeställare: UV/KE, LK/SU

Diarienummer: RN 05/2017

Riskvärderingsunderlag angående mikrocystiner och nodulariner

Bakgrund: Toxinerna har identifierats i vatten som används vid dricksvattenberedning i Sverige.

Övergripande frågeställning: Begäran om utredning av riskerna med olika cyanotoxiner i svenskt dricksvatten. Behövs det specifika rekommendationer om riskhanteringsåtgärder för olika cyanotoxiner i svenskt dricksvatten. Detta underlag rör mikrocystiner och nodularier.

Underlaget ska användas till/målgrupp: Underlaget ska användas av Livsmedelsverket som riskvärderingsunderlag för ställningstagande och inriktningsbeslut för myndighetsutövning (i.e. riskhanteringsåtgärd), i praktiken för vägledning/rådgivning. Dokumentet ska vara av sådan kvalitet att det kan vidarebefordras till kommuner och vid behov publiceras på hemsidan.

Underlaget rapporteras som: Skriftligt dokument.

Inledning

Mikrocystiner och nodulariner är toxiner som kan bildas av flera olika arter av cyanobakterier (blå-gröna alger). Toxinerna är ringformiga peptider som kan variera strukturellt genom variation av ingående aminosyror, eller till exempel genom metylering eller demetylering. Mikrocystiner och nodulariner är strukturlika, de skiljer sig genom att nodulariner innehåller fem aminosyror och mikrocystiner sju, och deras toxicitet bygger till stor del på samma strukturelement och gemensam verkningsmekanism. Av det skälet behandlas mikrocystiner och nodulariner i ett gemensamt dokument.

Cyanobakterier är encelliga organismer som inte sällan lever i kolonier. Olika släkten och arter av cyanobakterier förekommer över hela världen, i alla klimat från polerna till tropikerna. Cyanobakterier finns i jord och mark och lever ibland i symbios med växter, de arter som är mest märkbara är dock de som finns i vattendrag, sjöar och hav. Vid blomningar (massförekomst i vatten) kan cyanobakterier vara synliga för blotta ögat, som en massa i vattnet.

Många arter av cyanobakterier har förmåga att bilda toxiner. Toxinerna är sekundära metaboliter, vilket innebär att de inte produceras under cyanobakteriecellens hela livscykel, utan produktionen av toxiner kan slås på beroende på faktorer som ännu till stor del är okända. Toxinerna bildas och finns inom cellen, men kan frisättas och lösas ut i omgivande vatten. Cirka en tredjedel till hälften av blomningar av cyanobakterier beräknas vara toxiska (WHO, 1999). När en toxinbildande art blommar kan det bli höga toxinnivåer i vattnet. Toxinfrisättning från en blomning ökar under slutfasen av tillväxten, för att öka ytterligare under den stationära fasen av blomningen (WHO, 1999). När en blomning kollapsar och cellerna dör sker en stor frisättning av toxiner som funnits inneslutna i cellerna ut i omgivande vatten (Jones&Orr, 1994; WHO, 1999). Arter som kan producera mikrocystiner förekommer i söt- och brackvatten liksom i marina vatten. Nodulariner förekommer framförallt i brackvatten, men har även återfunnits i sötvatten.

Cyanobakterier innehåller färgpigment, fykobiliproteiner, som absorberar ljusenergi som utnyttjas vid fotosyntes. Alla cyanobakterier innehåller blått fykocyanin och grönt klorofyll, som ger de flesta cyanobakterier en karakteristisk blå-grön färg. Vissa cyanobakterier innehåller även rött fykoerytrin, och färgen kan då bli röd, brun, violett eller svart. Fykoerytrin har effektiv absorption av grönt ljus som tränger långt ner i en vattenmassa. Cyanobakterier som innehåller alla tre pigmenten kan ändra förhållandet mellan dessa, beroende på vilka ljusförhållanden som råder (Gjolme et al, 2010). Med sin fotosyntes svarar cyanobakterier för en stor del av produktionen av syre i världshaven. I och med fotosyntesen binder de också kol från koldioxid i organiskt kol.

De flesta cyanobakterier innehåller gasvakuoler, som kan fungera som flyttankar, och som kan hjälpa organismerna att samlas i djup där levnadsförhållandena är gynnsamma. Mängden gasvakuoler i cellerna regleras av ljusintensiteten och tillgången på näringsämnen (Gjolme et al, 2010). Att cyanobakterier kan röra sig uppåt och nedåt i vattenmassan innebär att en blomning inte alltid är synlig vid ytan av ett vatten, utan kan ligga flera meter ner.

Vissa arter av cyanobakterier kan fixera kväve, alltså utnyttja kvävgas som är löst i vattnet och inlemma i sin ämnesomsättning. Cyanobakterier kan vid god tillgång på fosfor lagra tillräckligt med fosfor, så att det räcker för att öka biomassan 4-8 gånger, om förhållandena blir mindre gynnsamma. Blomningar av cyanobakterier gynnas av god tillgång på kväve och fosfor.

Cyanobakterier behöver inte lika hög ljusintensitet som exempelvis grönalger och på våra breddgrader är sensommaren och hösten den tid när blomningar av cyanobakterier är vanligast förekommande, men blomningar kan förekomma alla årstider, beroende på art och förhållanden i omgivningen.

Metodik och litteratursökning

Litteratursökning har utförts i PubMed och FSTA. Sökord har varit "nodularin*" kombinerat med "toxic*", samt "microcyst*" kombinerat med "toxic*" och "human*". Sökorden har trunkerats med *, för att fånga alla former av orden. För mikrocytiner kombinerades sökorden även med "human*" i och med att enbart "microcyst*" och "toxic*" gav för många irrelevanta sökträffar. För nodularin gjordes även en sökning med sökorden "nodularin*" kombinerat med "genotox*", utan begränsning i tiden.

Sökningarna gjordes annars med startdatum januari 2015 och slutdatum april 2018 (när denna rapport är skriven). Skäl för valet av startdatum för sökningen var att EFSA 2016 publicerade en "External Scientific Report. Supporting publication" 2016:EN-998N, Review and analysis of occurrence, exposure and toxicity of cyanobacteria toxins in food. Relevant litteratur före 2015 finns refererad i denna publikation.

Detta underlag bygger till stor del på EFSA's Supporting publication 2016:EN-998 samt på nyare reviewartiklar, framförallt Buratti et al (2017).

Släkten och arter med förmåga att producera mikrocytin eller nodularin

Alla arter av cyanobakterier är inte toxinproducerande. Bland släkten som visat sig kunna producera mikrocytiner finns främst: *Microcystis*, *Plankthotrix*, *Oscillatoria*, *Anabaenopsis* och *Dolichosporum/Anabaena/Aphanizomenon*. (Notera att några arter blivit omklassificerade under senaste år, i och med att genbaserade molekylära tekniker använts för att studera fylogenetiska samband.) En välkänd art som har förmåga att producera mikrocytin är *Microcystis aeruginosa*, efter vilken toxinet fått sitt namn. Nodularin bildas främst av släktet *Nodularia*, framför allt brackvattenarten *Nodularia spumigena* (WHO, 1999; Liyanage et al 2016).

Potentiellt kan mikrocystiner kontaminera ytvattentäkter, främst sötvatten men även brack- och saltvatten som används som vattentäkter. Nodulariner förekommer framförallt i brackvatten.

I Sverige kommer cirka hälften av dricksvatten från ytvatten, främst från sjöar eller älvar, och den andra hälften från grundvatten. I Sverige blir det allt vanligare att brackvatten från Östersjön används som dricksvatten efter avsaltning (SLV, 2007).

Toxinernas struktur

Mikrocystiner är ringformiga peptider bestående av sju aminosyror. Den generella strukturen för mikrocystiner är: cyklo-[D-alanin (1) – X (2) – D-meAsp (3) - Y (4) – ADDA (5) – D-glutamat (6) – N-metyldehydroalanin (7)]. De kan variera i struktur speciellt med utbyte av aminosyrorna i position 2 och 4 (X och Y i den generella formeln) och med demetylering i positionerna 3 och 7. Det finns en stor mängd analoger, idag är cirka 100 varianter av mikrocystiner kända.

Aminosyran ADDA [(2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetyl-10-fenyldeca-4,6-diensyra] är en del av molekylen som har stor betydelse för toxiciteten.

Följande figur visar mikrocystin-LR. Hos mikrocystin-LR står epitetet –LR för leucin i position 2 och arginin i position 4.

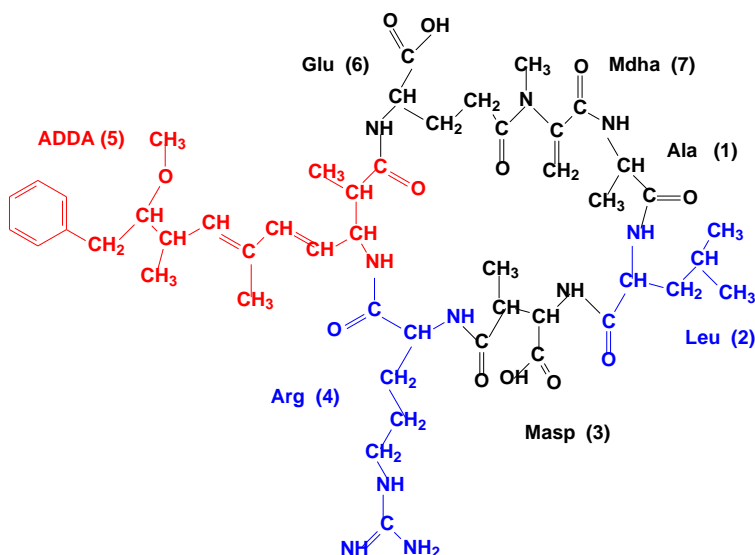


Fig. Mikrocystin-LR

Av andra mikrocystinvarianter har exempelvis mikrocystin-RR arginin i positionerna 2 och 4, medan mikrocystin-YR har tyrosin i position 2 och arginin i position 4. Mikrocystin-WR har tryptofan i position 2 och arginin i position 4.

Nodulariner är ringformiga peptider som består av 5 aminosyror. De har den generella formeln cyklo-[D-MeAsp (1) – Z (2) – ADDA (3) – D-Glu (4) – N-metyldehydrobutyrin]. Liksom mikrocystiner kan nodulariner variera i struktur, det finns idag 8 kända analoger (Buratti *et al*, 2017). Liksom för mikrocystiner är aminosyran ADDA i nodulariner av stor betydelse för toxiciteten.

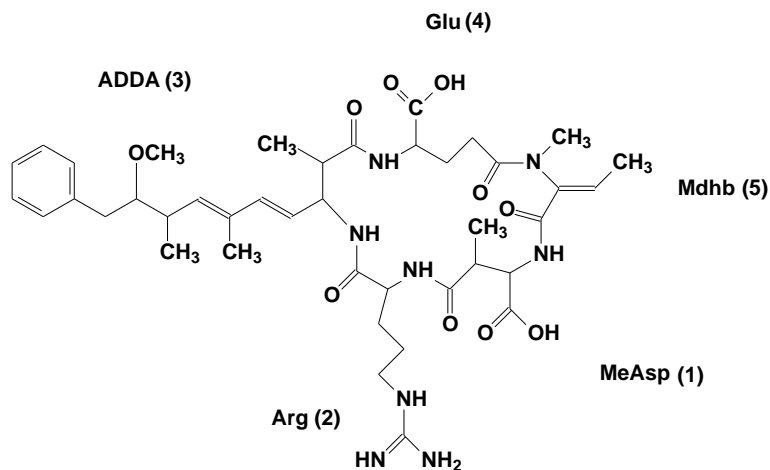


Fig. Nodularin

Produktion av mikrocytiner och nodulariner

Toxinerna är sekundära metaboliter. Detta innebär att deras funktion inte berör normal tillväxt, utveckling och reproduktion. Toxinerna produceras inte under den cellens hela livscykel, utan produktionen kan slås av eller på beroende på cellens behov. Det är fortfarande till stor del oklart vilka faktorer som påverkar toxinproduktion hos cyanobakterier.

Ett peptidsyntetas som syntetiserar mikrocytiner har identifierats, detta kodas av ett genkluster (*mcy*) som är återfunnet hos flera arter av cyanobakterier inklusive *Microcystis*, *Planktothrix* och *Anabaena* (Buratti et al, 2017). *mcy*-gener indikerar att cyanobakterien är potentiellt toxisk, dock tycks det finnas en hög grad av polymorfism hos dessa gener, vilket medför att toxiska och icke-toxiska subpopulationer, som morfologiskt inte går att särskilja, kan finnas i varierande grad i en blomning (Vichi et al, 2016; Buratti et al, 2017).

Toxinerna återfinns framför allt intracellulärt, tills cellen lyserar varvid toxinerna kan finnas fritt lösta i vattenmassan eller bundna till andra material. Intracellulärt kan koncentrationen av mikrocytin variera med en faktor 40 inom samma blomning. Koncentrationer mellan 10 och 420 fg/cell har uppmätts i arten *Planktothrix rubescens* och mellan 100 och 4000 fg/cell hos *Microcystis aeruginosa* (Manganelli et al, 2016; Sabart et al, 2013; Buratti et al, 2017).

Biodegradation

Mikrocytiner och nodulariner är mycket stabila. I steril vattenlösning i mörker kan toxinerna förvaras i årtal utan att förändras.

Ute i naturen bryts toxiner som är lösta i vattenmassan framförallt ned genom mikrobiell nedbrytning. Det dröjer vanligtvis några dagar innan nedbrytningen tar sin början, men denna period kan också vara några veckor beroende på förhållanden i vattenmassan, klimatförhållanden och koncentration av lösta toxiner. När nedbrytningen börjat kan fritt lösta toxiner brytas ned på några timmar, dagar eller veckor (Corbel et al, 2014). Det finns dock exempel på att toxiner funnits kvar i tre månader, vilket är dokumenterat från en sjö i Finland vintertid (Kiviranta et al, 1991; WHO, 1999). En akvatisk bakterieart av släktet *Sphingomonas* initierade ringöppning av mikrocytin-LR och linjärt mikrocytin bildades som en intermediär i den bakteriella nedbrytningen av toxinet (Bourne et al, 1996). Samma bakterie hade ingen påverkan på nodularin. Andra *Sphingomonas*-arter med förmåga att bryta ned nodularin har dock isolerats (Lahti et al, 1997; WHO, 1999).

I solljus kan toxinerna brytas ned genom långsam fotokemisk påverkan. Reaktionen påskyndas vid närvaro av vattenlösliga cellpigment, fykobiliproteiner. I laboratorieförsök har mer än 90% av

mikrocystin brutits ned på mindre än 2 veckor när toxinet utsatts för fullt solljus i närvaro av pigment. I andra försök har det tagit mer än 6 veckor (WHO, 1999).

Mikrocystiner kan oxideras av ozon och andra starka oxidationsmedel, och de kan degraderas av intensiv UV-strålning.

Studier på cellkulturer indikerar att mikrocystiner och nodulariner bryts ned mycket långsamt så länge de återfinns intracellulärt i levande cyanobakterieceller. Ilandflutna kolonier av *Microcystis aeruginosa* i form av skum längs stränder kan innehålla höga koncentrationer mikrocystin i månader, och toxiner kan lösas ut om skummet flyter ut i vattenmassan igen. Det innebär att toxiner kan återfinnas i vatten även utan att det förekommer levande cyanobakterieceller, eller att en blomning förekommit nyligen (WHO, 1999).

Vid hög temperatur och höga eller låga pH har långsam hydrolys observerats. Vid pH 1 tar det ungefär 10 veckor att få mer än 90% nedbrytning av mikrocystin, och vid pH 9 längre tid än 12 veckor (Harada, 1996).

Toxinerna tål kokning utan att påverkas (WHO, 1999).

Mekanism för toxicitet

Toxiciteten av mikrocystiner och nodulariner medieras via en stark bindning till, och inhibering av proteinfosfataser, främst PP2A men även PP1.

Proteinfosorylering

I kroppen sker i varje ögonblick en mycket stor mängd olika biologiska reaktioner som är nödvändiga för att samspelet mellan celler och organ ska fungera. Proteiner är de ämnen som styr och reglerar flöden av energi och substanser i och mellan celler och i organismer.

Enzymer är proteiner som katalyserar biokemiska reaktioner och den tredimensionella strukturen bestämmer hur aktivt och specifikt ett enzym är. Reversibel proteinfosorylering är ett av de viktigaste sätten för organismer att förändra struktur och aktivitet av proteiner efter translation. (Cohen, 2001; Klumpp&Kriegelstein, 2002).

Proteiner fosoryleras via kinaser, och defosoryleras via fosfataser. Denna process är ständigt pågående i ett komplext och hierarkiskt samspel. På enskilda proteiner finns flera positioner där kinaser och fosfataser kan katalysera fosorylering och defosorylering.

När ett protein fosoryleras tillförs en fosoryl-grupp från ATP eller GTP till en sidokedja av en aminosyra i proteinet. Detta medför att en negativt laddad fosfatgrupp tillförs molekylens vilket påverkar dess storlek och laddning, vilket i sin tur kan påverka konfigurationen, till exempel genom att attrahera positivt laddade sidokedjor hos andra aminosyror som ingår i proteinet. Resultatet kan bli att nya bindningställen exponeras på ytan av proteinet, vilka i sin tur kan reagera med andra proteiner eller ligander (Cohen, 2001).

Proteinfosorylering kan aktivera eller deaktivera ett protein, och eftersom proteinfosorylering är reversibel kan denna reaktion fungera som en strömbrytare som startar eller ökar, alternativt minskar eller hejdar fysiologiska processer (Dombradi et al, 2002).

Mikrocystiner och nodulariner och påverkan på proteinfosorylering

Mikrocystiner och nodulariner binder starkt till och inhiberar serin/treonin-fosfataserna PP1 och PP2A. Konfigurationen vid ADDA-delen av molekylens är av vikt för den starka bindningen till proteinfosfataser. Inhibition av fosfataser innebär att balansen mellan fosorylering och

defosforylering rubbas, och ger som resultat en hyperfosforylering av proteiner, vilket påverkar grundläggande funktioner i cellen.

- Mikrocystiner och nodulariner har lever som första målorgan, och en välkänd effekt av toxinerna är påverkan på och nedbrytning av levercellers morfologi genom ökad fosforylering av proteiner i cellskelettet. När levercellerna förlorar sin struktur medför det att de celler som bildar kapillärväggarna i leverns finaste blodkärl förlorar stöd från angränsande leverceller, och kapillärerna kan börja läcka och ge en inre blödning i levern. Vid en svår akut förgiftning av mikrocystiner eller nodulariner kan det bli en så stor inre blödning i levern att individen avlider av hypovolemisk chock. En mindre allvarlig förgiftning kan ge mindre allvarliga, och reversibla skador på leverceller.
- Mikrocystiner kan ge celldöd, apoptos, via ökad fosforylering av vissa intracellulära proteiner. Apoptos kan också uppstå genom att mikrocystiner bidrar till en ökad bildning av reaktiva syreradikaler (ROS, "reactive oxygen species") vilket ger ökad oxidativ stress och/eller genom att detoxifiering av mikrocystiner via glutationkonjugering (GSH-konjugering) kan bidra till minskad tillgång på glutation (GSH). Glutation skyddar mot cellskador orsakade av oxidativ stress dels genom att direkt neutralisera fria radikaler och dels genom att fungera som kofaktor i glutationperoxidasreaktionen, en viktig peroxidreducerande reaktion.
- Mikrocystiner har föreslagits vara tumörpromotorer, som kan bidra till tillväxt av en cancer som initierats av någon annan substans eller händelse. PP2A anses vara en tumörsuppressorer genom reglering av cellsignaler vid cancerutveckling i däggdjursceller. Djurförsök liksom *in vitro*-försök stödjer teorin att en blockering av PP2A bidrar till mikrocystiners effekt som tumörpromotorer.
- Det har även föreslagits att en mikrocystiner, via störd reglering av fosforylering, ger en minskning av aktivitet av DNA-beroende proteinkinaser vilket leder till minskad förmåga för celler att reparera DNA-skador. (Campos&Vasconcelos, 2010; Buratti et al, 2017)

Strukturens betydelse för toxiciteten

I en studie där 8 varieteter av mikrocystin jämfördes med avseende på proteinfosfatasinhibering och akut toxicitet hos möss, visades att mikrocystin-LR var den mest potenta substansen både vad gäller toxicitet hos möss *in vivo* och inhibering av proteinfosfatas *in vitro* (Chen et al, 2006).

Linjära mikrocystiner och nodulariner, vilka kan vara antingen prekursorer eller nedbrytningsprodukter av toxinerna, är avsevärt (mer än hundra gånger) mindre toxiska än motsvarande cirkulära peptider (WHO, 1999).

Absorption, biotransformation och eliminering

Mikrocystiner och nodulariner är i första hand levertoxiner, men även andra organsystem kan drabbas av skador.

Anledning till att levern är det organ som i första hand drabbas av toxicitet av mikrocystiner och nodulariner är inte att leverceller är specifikt känsliga, utan att toxinerna transporteras in till leverceller via ett transportsystem, "organic anion transporter system", OATP (Fischer et al, 2005). OATP-systemet är även av vikt för upptag i mag-tarmkanalen. Möss som saknade OATP-systemet var helt resistenta mot levertoxicitet av mikrocystin-LR i ett *in vivo*-försök där mössen injicerades i.p. med mikrocystin, medan möss av vild-typ som behandlades med lika hög dos mikrocystin-LR uppvisade svåra leverskador (Lu et al, 2008). OATP-systemet finns även i andra organ än enterocyter och hepatocyter, det finns även i njurceller och i blod-hjärn-barriären. Detta kan förklara att toxiska effekter uppmärksammats i exempelvis njure, samt neurotoxicitet av kongenerna mic-LF, mic-LW och mic-LR (Fischer et al, 2010; Buratti et al, 2017).

Upptag och distribution i organ och vävnader tycks kunna variera mellan olika mikrocystinvarianter. Meriluoto et al (1990) uppmätte skillnader i upptag in i celler mellan två olika tritium-inmärkt epimerer av dihydromikrocystin-LR, upptaget varierade med en faktor 3.

Fischer et al (2010) demonstrerade att olika affinitet för OATP transportörer kan ha stor påverkan på toxiciteten av olika varianter av mikrocystiner. Medan mikrocystin-LW och -LF i *in vitro*-försök uppvisade lika hög förmåga att inhibera proteinfosfatas som mikrocystin-LR och -RR, så uppvisade varianterna -LW och -LF högre grad av celltoxicitet i humana hepatocyter. Detta tolkades som en effekt av högre affinitet till OATP-transportörer för varianterna -LW och -LF jämfört med -LR och -RR (Fischer et al, 2010).

Konjugering av kroppsfrämmande ämnen (xenobiotika) med glutation eller vissa andra kroppsegna föreningar är ett metabolismled som leder till ökad vattenlöslighet för konjugatet och i och med detta ökad utsöndringshastighet i urin och galla. I allmänhet minskar också den biologiska aktiviteten.

Konjugering med glutation (GSH) anses vara ett viktigt steg i detoxifiering av mikrocystiner hos däggdjur, och även hos många andra organismer (Campos&Vasconcelos, 2010). Kondo et al (1992) visade att mikrocystiner kan konjugeras med glutation och cystein, och bildar konjugat med minskad toxicitet. Konjugering med glutation kan ske spontant eller katalyserat av glutationtransferas (GST). Efter konjugering återstår endast en bråkdel av toxiciteten i form av förmåga att inhibera proteinfosfatas (Buratti et al, 2017).

Buratti&Testai angav att mikrocystin-RR är mindre toxisk och konjugeras lättare än mikrocystin-LR, speciellt vid låga koncentrationer. Skillnaden var mer märkbar i cytosol från gnagare jämfört med människa (Buratti&Testai, 2015).

Det har inte gått att finna data över absorption, biotransformation och eliminering av nodulariner.

Toxikologiska studier

När det handlar om naturligt förekommande substanser är ofta bristen på ren substans ett problem vad gäller möjligheten att utföra toxikologiska studier. Detta är en viktig anledning till att det ofta saknas både subkroniska och kroniska studier över toxicitet av naturligt förekommande substanser, liksom även studier över reproduktionstoxicitet, teratogenicitet och cancerogenicitet.

För att studera toxicitet av cyanobakterietoxiner har ibland orenade eller delvis rena celler använts, vilka kan ha skördats från blomningar eller tagits från cellkulturer. I samtliga sådana fall går det inte att hänvisa resultatet av studien till någon enskild substans, eller substansgrupp, och det går inte att kvantifiera risken för hälsoskador, eller ta fram ett "no observed adverse effect level" (NOAEL) för något enskilt ämne eller någon substansgrupp utifrån sådana studier.

Akut toxicitet

LD50-studier och liknande är av mindre värde vad gäller bedömningar av ett ämnes toxicitet. Värdet för LD50 kan variera mellan olika laboratorier på grund av variationer i djurmaterial och djurhållning. Värdet varierar även beroende på administrationsätt. Vid LD50-test observeras djuren efter en engångsdos av testsubstansen vanligen under 24 timmar, men det förekommer att de observeras under flera dagar. Vanligtvis görs ingen obduktion, och testet ger alltså mycket lite information om vilka skador testsubstansen kan ge vid en akut engångsdos. Testet ger naturligtvis ingen information om effekter vid flergångsdoser, eller vid längre tids exponering för substansen i fråga. För många naturliga toxiner är LD50 dock ofta den typ av studie som finns att tillgå. Nedan (tabell 1) redovisas LD50 (mikrog/kg kroppsvikt) för några olika mikrocystinvarianter. Värdena är hämtade från Buratti et al (2017).

Tabell 1 LD50-värden för mikrocystiner (från Buratti et al, 2017)

Microcystinvariant	Adm-väg	LD50 (mikrog/kg kv)	Djurslag	Referens
Mic-LR	Oralt	>5 000	råtta	Fawell et al 1999
Mic-LR	Oralt	5 000-11 000	mus	Fawell et al 1999; Yoshida et al 1997; Rao et al 2005
Mic-LR	i.p.	72-122	råtta	Moreno et al 2005; Miura et al 1991; Li et al 2015
Mic-LR	i.p.	33-158	mus	Lovell et al 1989; Stotts et al 1993; Stoner et al 1989; Robinson et al 1989; Gupta et al 2003; Fawell et al 1999; Chen et al 2006; Yoshida et al 1997; Rao et al 2005; Wang et al 2012; Chernoff et al 2002
Mic-RR	i.p.	111-650	mus	Stotts et al 1993; Stoner et al 1989; Gupta et al 2003; Chen et al 2006
Mic-WR	i.p.	140, 171	mus	Chen et al 2006; Stotts et al 1993
Mic-FR	i.p.	100, 249	mus	Chen et al 2006; Stotts et al 1993
Mic-AR	i.p.	c:a 249	mus	Stotts et al 1993
Mic-LA	i.p.	39	mus	Stoner et al 1989
Mic-LY	i.p.	91	mus	Stoner et al 1989
[O-demetyl-ADDA ⁵]Mic-LR	i.p.	c:a 97	mus	Stotts et al 1993
[desmetyl ⁷]Mic-RR ([Dha ⁷]Mic-RR)	i.p.	180, 420	mus	Kiviranta et al 1002; Chen et al 2006
[desmetyl ³]Mic-RR ([D-Asp ³]Mic-RR)	i.p.	250, 350	mus	Meriluoto et al 1989; Chen et al 2006
Mic-metionin-S-oxid-R	i.p.	c:a 750	mus	Stotts et al 1993
[desmetyl ³]Mic-FR ([D-Asp ³]Mic-FR)	i.p.	90	mus	Chen et al 2006
[desmetyl ³]Mic-WR ([D-Asp ³]Mic-WR)	i.p.	95	mus	Chen et al 2006
[3H]dihydroMic-LR (epimer 1)	i.p.	120	mus	Meriluoto et al 1990
[3H]dihydroMic-LR (epimer 2)	i.p.	135	mus	Meriluoto et al 1990
Mic-LR-ekvivalenter	i.v.	80	råtta	Wang et al 2008
Mic-RR-ekvivalenter	i.v.	80	råtta	Wang et al 2008
Mic-LR-	i.v.	28	mus	Kondo et al 1992
Mic-YR	i.v.	91	mus	Kondo et al 1992
GSH-Mic-LR-konjugat	i.v.	630	mus	Kondo et al 1992
Cys-Mic-LR-konjugat	i.v.	267	mus	Kondo et al 1992
GSH-Mic-YR-konjugat	i.v.	304	mus	Kondo et al 1992
Cys-Mic-YR-konjugat	i.v.	217	mus	Kondo et al 1992

Tabellen antyder att akut toxicitet av mikrocystiner i form av LD50 kan variera med administreringsätt, liksom med struktur. Notera att det inte går att jämföra olika studier med varandra.

En skillnad som tycks tydlig i tabellen är den minskade toxiciteten av mikrocystiner konjugerade med GSH eller cystein (Cys) jämfört med samma icke-konjugerade strukturvariant (Kondo et al, 1992).

Främsta målorganet för akut toxicitet är, som nämnts tidigare, levern. För vissa mikrocystiner har även neurotoxicitet rapporterats, till exempel för mikrocystin-LF, mikrocystin-LW och mikrocystin-LR på neuron *in vitro* (Feurstein et al, 2011) och för mikrocystin-LR efter intraperitoneal injektion hos råtta (Li et al, 2012).

Subakuta/subkroniska toxicitetsstudier

För att bestämma ett NOAEL för toxiner som intas oralt (via munnen), är toxicitetsstudier där andra intagsvägar använts av mindre relevans än orala studier.

13-veckors studie, mikrocystin-LR, dosering varje dag via sond

Den studie som fortfarande, efter nära tjugo år, fortfarande är av högst relevans för att fastställa ett NOAEL är en 13-veckors studie på möss av Fawell et al (1999). Mikrocystin-LR köptes från Calbiochem Novabiochem. I studien gavs mikrocystin-LR löst i vatten till möss via sondmatning en gång om dagen varje dag i 13 veckor. Varje dosgrupp innehöll 15 hanar och 15 honor. Dosnivåer valdes utgående från en 'dose-ranging' study som varade 14 dagar där NOAEL var 200 mikrogram mikrocystin-LR/kg kroppsvikt och dag. Samma doser som i 14-dagarsstudien valdes för 13-veckorsstudien; 0, 40, 200 och 1000 mikrogram mikrocystin-LR/kg kroppsvikt och dag. Koncentrationen i testlösningar konfirmerades via HPLC-UV. Under studiens gång observerades djurens beteende, och kliniska observationer gjordes. Kroppsvikt och födointag mättes. Under den sista veckan av studien togs blodprover, proverna från 7 djur per grupp användes för undersökning av hematologiska parametrar respektive för biokemisk analys. Alla vävnader från kontroll och högdosdjur undersöktes histopatologiskt, för övriga djur undersöktes lungor, lever och njurar.

I högdosgruppen dog en hona under första försöksveckan och en hane avlivades under den sista försöksveckan på grund av sjukdomssymtom.

Ingen dos-respons observerades vad gäller födointag och kroppsviktsökning.

Den enda hematologiska förändringen som observerades var en statistiskt signifikant ökning av hemoglobinkoncentration, mängd röda blodkroppar, samt hematokrit hos honor i högdosgruppen.

Biokemiska förändringar i serum var extremt förhöjda värden av transaminaser (ASAT och ALAT) samt alkaliskt fosfat (ALP) hos samtliga djur i högdosgruppen (1000 µg/kg kv dag). Hos djuren i mellandosgruppen (200 mikrogram mikrocystin-LR/kg kroppsvikt och dag) noterades en förhöjning av transaminaser hos hanar.

Histopatologiskt märktes en dosberoende ökning av kronisk leverinflammation. Hos högdosdjuren noterades hemosiderindeponering hos samtliga djur och hepatocytdeneration hos 23 av 29 djur. NOAEL i studien bestämdes till 40 mikrogram mikrocystin-LR/kg kroppsvikt och dag, den lägsta dosen som gavs i studien.

1-månads studie, mikrocystin-LR, dosering varannan dag via sond

I en studie av Sedan et al (2015) exponerades hanmöss varannan dag under en månad för mikrocystin-LR i vattenlösning via sond. Mikrocystin var frampreparerat från en blomning av *Mikrocystis aeruginosa*, struktur och renhet kontrollerades via HPLC-MS och jämfördes med en standard från Sigma Chemical Inc. Totalt 12 möss, 4 per grupp, gavs 0 (grupp 1), 50 (grupp 2) eller 100 (grupp 3) mikrogram mikrocystin-LR/kg kroppsvikt varannan dag. Dosen till lågdosgruppen (grupp 2), 50 mikrogram/kg kroppsvikt, valdes för att den är nära det värde för NOAEL som framkommit i studien av Fawell et al (1999).

Inga dödsfall förekom bland mössen, och inga kliniska symtom observerades. Histopatologiskt förekom vakuoler i cytoplasma centrilobulärt i lever hos grupp 2, vilket tyder på ackumulering av lipider. I den högre dosgruppen, grupp 3 var utbredningen och förekomsten avsevärt mer markerad. Förändringarna tyder på leversteatos, utbredningen var $3,6 \pm 0,6\%$ hos grupp 2 och $15,3 \pm 1,6\%$ hos grupp 3. Biokemiska analyser av levertransaminaser (ASAT, ALAT) och alkaliska fosfataser (ALP) i serum visade inga skillnader mellan grupperna. Histopatologiska förändringar observerades också i tunntarm i form av en dosberoende minskning av antal intraepiteliala lymfocyter i villi. Mängden mikrocystin-LR mättes i lever hos försöksdjuren efter studiens slut. I genomsnitt återfanns 1,4% av den totala givna dosen i lever hos mössen i högdosgruppen (grupp 3) och 0,2% av den totala dosen hos djuren i grupp 2.

Författarna drog slutsatsen att låga doser, doser som ligger nära det NOAEL som bestämdes i studien av Fawell et al (1999), kan ge skador i lever och även i tunntarm utan att ge kliniska symtom. Enligt studien kan även immunsystemet påverkas av kontinuerlig lågdosexponering för mikrocystin-LR, den slutsatsen drogs på grundval av en minskning av intraepiteliala lymfocyter i tunntarm, vilket ansågs kunna ge en påverkan på immunsystemet.

6-månaders studie, mikrocystin-LR, exponering via dricksvatten

En annan studie har undersökt påverkan på lungor och alveoler efter lågdosexponering för mikrocystin-LR via dricksvatten (Wang et al, 2016). Tio honmöss ingick i varje dosgrupp, mängden mikrocystin-LR i dricksvattnet var 0, 1, 10 respektive 40 mikrogram mikrocystin-LR/L dricksvatten. Försökets längd var 6 månader. I studien har mössens konsumtion av dricksvatten ej mätts, vilket gör att det inte går att bestämma de faktiska doserna som mössen exponerats för, doserna kan endast uppskattas utgående från normal vattenkonsumtion hos möss. Lungvävnad var det enda organ som undersöktes i studien.

Resultatet visade att med ökande dos mikrocystin-LR i dricksvattnet ökade incidensen av alveolär kollaps i lungorna hos de behandlade mössen samt apoptos hos celler i lungvävnaden och skadade intracellulära förbindelser. Ingen inflammatorisk respons kunde observeras.

Författarna drog slutsatsen att kronisk oral lågdosexponering av mikrocystin-LR kan ge skador på lungorna genom påverkan på cellkommunikationen.

Intraperitoneal dosering med mikrocystin-LR och mikrocystin-YR

I en studie som fokuserar på njurskador har mikrocystin-LR och mikrocystin-YR administrerats intraperitonealt varannan dag i 8 månader i en dos motsvarande mikrogram/kg kroppsvikt. Författarna angav att exponering för mikrocystin-LR gav allvarligare skadorna än exponering för mikrocystin-YR (Milutinovic et al, 2003).

Nodulariner

Det har inte gått att finna data över subakut och subkronisk toxicitet för nodulariner.

Kronisk toxicitet och cancerogenicitet

Det saknas studier över kronisk toxicitet och cancerogenicitet för både mikrocystiner och nodulariner.

Reproduktionstoxicitet, teratogenicitet (studier av fosterskador)

Mikrocystin-LR till dräktiga möss

I en studie gavs dräktiga möss 0, 200, 600 eller 2000 mikrogram mikrocystin-LR i vattenlösning via sond en gång dagligen under dräktighetsdagar 6 till och med 15. Tjugosex djur ingick i varje dosgrupp. Moderdjuren avlivades dag 18, och undersöktes makroskopiskt, fostren undersöktes vad gäller yttre, inre och skelettmisbildningar.

I den högsta dosgruppen dog 7 av 26 djur och ytterligare 2 avlivades på grund av att de mådde mycket dåligt. För de kvarvarande djuren i dosgruppen sågs ingen letalitet eller teratogenicitet hos embryon och inte heller någon påverkan på implantation eller fosteröverlevnad. Vid den högsta dosen fanns uttryck för embryotoxicitet i form av avsevärt lägre fostervikt jämfört med kontroll och försenad förbening av skelettet. Embryotoxicitet var förväntad i denna dosgrupp, i och med att moderdjuren var påverkade och mådde mycket dåligt. I denna studie angav författarna 600 mikrogram som NOAEL (Fawell et al, 1999).

Nodulariner

Det har inte gått att finna data över reproduktionstoxicitet och teratogenicitet för nodulariner.

Mutagenicitet och gentoxicitet

EFSAs genomgång (2016) och reviewartikeln av Buratti et al (2017) sammanfattar båda kunskapen om genotoxicitet för mikrocystin-LR, och vad som är känt för övriga mikrocystinvarianter liksom för nodularin. En reviewartikel som är något äldre av Zegura et al (2011) ger även den en god genomgång av kunskapsläget.

Enligt de studier och litteraturgenomgångar som behandlar genotoxicitet av mikrocystiner och nodulariner, och som finns refererade i de ovan nämnda sammanställningarna, är det inte visat att substanserna skulle vara genotoxiska. Underlaget är dock till delar bristfälligt. Det finns ett antal studier som behandlar mikrocystin-LR, men vad gäller andra mikrocystiner än mikrocystin-LR är underlaget mycket knapphändigt och för nodulariner finns mycket få studier. Vidare har vissa studier har försöksupplägg som gör dem svårtolkade, till exempel kan orenade extrakt av cyanobakterier ha använts i försöken.

När det gäller den rena substansen mikrocystin-LR finns dock resultat från tillgängliga studier som är övertygande. I samtliga av följande testsystem; Ames test, mikrokärntest i humana lymfocyter och mikrokärntest *in vivo* i mus, visas inte någon genotoxisk effekt i studier av god relevans (Ding et al, 1999; Sieroslawska 2013; Abramsson-Zetterberg et al, 2010).

Det finns dock möjlighet att substanserna kan vara carcinogena via andra mekanismer än genotoxicitet. Som nämnt i avsnittet "Mekanismer för toxicitet" ger mikrocystiner en inhibering av PP2A, som anses vara en tumörsuppressor och skulle genom detta kunna bidra till tumörpromotion.

I en mycket citerad studie av Nishiwaki-Matsushima et al (1992) gavs den cancerinitierande substansen dietylnitrosamin (DEN) till råttor som hade blivit partiellt hepatektomiserade (delar av levern hade opererats bort, för att öka celledelningstakten och påskynda effekten av DEN). Med ökande doser av mikrocystin-LR i.p. följde ökande antal, och ökad area av, glutation-S-transferas-positiva foci i råttlevrarna, vilket tolkades som en indikation på tumörpromotion. Det bör dock noteras att glutation-S-transferas positiva foci inte *per se* är ett uttryck för tumörpromotion.

Likartade studier av Ohta et al (1994) och Sekijima et al (1999) gav likartade resultat med ökat antal leverfoci, samt ökad area och volym av leverfoci hos råttor som först initierats med DEN och sedan injicerats i.p. med mikrocystin-LR. I studien av Ohta et al (1994) användes även nodularin, vilket även detta resulterade i ökat antal, ökad area av och ökad volym av leverfoci. Vid samma dos, 25

mikrog/kg kroppsvikt, gav nodularin upphov till något fler leverfoci jämfört med mikrocystin-LR, och arean och volymen av leverfoci var större för nodularin jämfört med mikrocystin-LR.

En studie av Song et al (1999) bekräftar uppkomst av glutation-S-transferas positiva leverfoci hos råttor som initerats med DEN och sedan injicerats i.p. två gånger i veckan i 10 veckor med nodularin (25 mikrog/kg kroppsvikt). Djuren avlivades i omgångar fram till vecka 22 efter det att försöket inletts. Efter det att injektionerna av nodularin upphört minskade leverfoci. Hos de djur som fått DEN plus nodularin noterades neoplastiska levernoduler, detta togs som tecken på att nodularin är en promotor som inducerar hepatocytproliferation.

En studie av Ito et al (1997) visade uppkomst av neoplastiska levernoduler efter att möss blivit injicerade i.p. med 20 mikrog mikrocystin-LR/kg kroppsvikt mikrocystin-LR under 28 veckor, totalt 100 ggr. Denna studie innehöll dock mycket få djur, 13 djur i försöksgrupp och 3 i obehandlad kontrollgrupp, studien saknade en positiv kontrollgrupp och mikrocystin-LR gavs endast i en dos. I samma studie undersöktes även peroral administrering. När 80 mikrog/kg kroppsvikt gavs p.o. under 28 veckor, totalt 100 gånger via sond, gjordes inga fynd av levernoduler (Ito et al, 1997).

I en studie av Labine&Minuk (2014) ingick 4 grupper om 20 möss vardera. Grupperna doserades dagligen via sond i 28 veckor. En grupp var kontroll och fick enbart vatten, en grupp fick mikrocystin-LR (1 mikrog mikrocystin-LR/L vatten), en grupp fick tiocetamid i vatten och en grupp fick både mikrocystin-LR och tiocetamid. Inga tumörer hittades hos grupperna som fått enbart vatten eller vatten med enbart mikrocystin-LR, medan levertumörer noterades hos 4-5 möss i grupperna som fått tiocetamid eller tiocetamid plus mikrocystin-LR. Resultatet indikerar att mikrocystin-LR peroralt inte initierar cancer.

International Agency for Research on Cancer (IARC)

International Agency for Research on Cancer (IARC) klassificerade mikrocystin-LR som "possibly carcinogenic to humans", grupp 2 B (IARC, 2010). Skälet till klassificeringen var att det då inte fanns tillräckligt underlag, för människa och djur, för att visa carcinogenicitet av mikrocystin-LR.

Nodularin har av IARC klassificerats som "suspected to be a human carcinogen", grupp 3 (IARC, 2010).

Toxicitet, sammanfattning

Mikrocystiner och nodulariner är i första hand levertoxiner, detta är på grund av att toxinerna transporteras in i celler via OATP-systemet. Även andra organ än lever kan drabbas av skador. Konfigurationen kring ADDA-delen av toxinmolekylen är av vikt för toxiciteten. Linjära mikrocystiner och nodulariner, där ringstrukturen som brutits upp är mindre toxiska än de cirkulära peptiderna.

I subkroniska djurförsök där djur givits mikrocystin-LR peroralt har detta framförallt givit effekter på lever; biokemiskt i form av förhöjda värden för levertransaminaser och histopatologiskt i form av skador på leverceller och på organisationen av celler.

Underlaget är ytterst magert vad gäller teratogenicitet/reproduktionstoxicitet. Det underlag som finns visar inte att mikrocystin-LR skulle vara fosterskadande, doser som inte gav toxicitet hos moderdjuren gav inga påvisbara effekter på fostren. Doser som gav toxicitet hos moderdjuren medförde effekter även hos foster.

De studier som finns publicerade ger inte anledning att tro att mikrocystiner är genotoxiska eller att de kan initiera cancer vid peroral administrering. Det finns studier som anger att mikrocystiner kan verka som tumörpromotorer.

Nodulariner kan på motsvarande sätt som mikrocystiner bidra till tumörpromotion. Det finns en studie som antyder att nodularin kan ha en större potential som tumörpromotor än mikrocystin-LR, men detta skulle behöva bekräftas genom ytterligare underlag för att kunna ligga till grund för någon generell slutsats.

Det har inte gått att finna studier över kronisk toxicitet eller carcinogenicitetsstudier för mikrocystiner eller nodulariner.

NOAEL för mikrocystin-LR

Underlaget är magert vad gäller toxicitetsstudier. Den studie som (fortfarande) är mest lämpad för att bestämma ett NOAEL är den studie som publicerades 1999 av Fawell et al., NOAEL i studien bestämdes till 40 mikrogram mikrocystin-LR/kg kroppsvikt (Fawell et al, 1999).

Andra mikrocystiner än mikrocystin-LR

För andra mikrocystiner än mikrocystin-LR saknas studier över oral toxicitet (EFSA, 2016; Buratti et al, 2017).

Jämförelse av toxicitet mellan mikrocystin-LR och andra mikrocystiner

Det anges ofta att mikrocystin-LR är den mest toxiska, eller en av de mer toxiska, av mikrocystinerna. Det finns data, *in vitro* eller via andra administreringsätt än peroralt, som indikerar att högre toxicitet för mikrocystin-LR jämfört med vissa andra mikrocystinvarianter (Kondo et al, 1992; Stoner, 1989; Milutinovic et al, 2003), men det finns också försök som indikerar att andra varianter av mikrocystiner kan ha högre toxicitet än mikrocystin-LR (Stoner, 1989; Fischer et al, 2010).

Sammantaget finns det för lite data för att dra någon generell slutsats.

Avsaknad av toxicitetsdata för nodulariner

Det saknas underlag för nodulariner i ännu högre grad än för mikrocystiner.

Flera faktorer kan påverka toxiciteten av olika varianter av mikrocystiner liksom för nodulariner; affinitet för OATP-transportörer som kan transportera toxinerna är av vikt för i vilken mån toxinerna ska kunna nå organ och celler och ge skador; graden av affinitet till proteinfosfatas är av vikt för hur allvarliga effekterna kan bli; tillgång på glutathiontransferas och glutathion som kan detoxifiera toxinerna kan ha betydelse för hur allvarliga effekterna av toxinerna kan bli.

Mikrocystin-LR är den enda mikrocystinvariant för vilken det finns ett NOAEL. I avsaknad av data vad gäller toxiciteten av andra mikrocystinvarianter liksom för nodulariner kan möjligheten beaktas att utnyttja NOAEL för mikrocystin-LR för bedömningar av toxicitet även av andra mikrocystiner liksom nodulariner. Detta skulle då ske utgående från toxinernas strukturlikhet och kunskapen om att de har en gemensam verkningsmekanism i form av inhibering av proteinfosfataser.

Fallbeskrivningar, förgiftning av människor eller djur av mikrocystin eller nodularin

Häromåret fann Dr John Hutson vid Flinders University en tidig beskrivning av dödsfall hos husdjur som kan ha orsakats av cyanobakterier. Beskrivningen gjordes 1672 av Christofer Kirkby, en handelsresande och självlärd forskare. Han beskrev i *Philosophical Transactions of the Royal Society* en sjö nära Danzig som några månader varje sommar blev grön imitten med en "hairy efflorescence", vilken kunde nå stranden om vinden förde den dit. Dödsfall förekom hos boskap, hundar och höns efter det att djuren druckit vatten från den del av sjön där den gröna massan fanns (Kirby, 1672).

En annan tidig publikation i vetenskaplig litteratur som berör boskapsdöd som sannolikt orsakats av cyanobakterietoxiner är från Australien 1878, och är publicerad i tidskriften Nature, "Poisonous Australian lake" (Francis, 1878). Den beskriver förgiftning av kor, hästar, hundar, grisar och får i samband med en blomning av *Nodularia spumigena* i Lake Alexandrina i Australien.

De effekter och symtom som i första hand kan förväntas efter exponering för mikrocystiner och nodulariner i nivåer som ger akut påverkan är förhöjning av laboratorievärden för levertransaminaser (ASAT, ALAT) och alkaliskt fosfat (ALP), som kan tyda på påverkan och skada på leverceller eller inflammation i levern. Personer som förgiftas akut kan drabbas av sjukdomskänsla, illamående och kräkning. Vid allvarlig påverkan kan gulsot och andra allvarligare symtom på leverskada uppträda.

Bland människor finns de som löper större risk än andra för skador efter exponering för levertoxiner från cyanobakterier. Till dessa hör personer som redan har skador på organ som påverkas av toxinerna, till exempel personer med hepatit, levercirrhos, toxisk leverskada av annat ursprung eller njurskada. Dialyspatienter kan vara en utsatt grupp därför att de vid dialys exponeras för stora mängder vatten i bukhålan (intraperitonealt) eller intravenöst (hemodialys).

Det har förekommit fall där människor misstänks ha fått hälsoproblem på grund av att de utsatts för toxiner från cyanobakterier, men det är i få fall som orsaksambandet kunnat bevisas i form av analyser.

År 1981 hade en dricksvattenreservoar, Malpas, i New South Wales, Australien, en massiv blomning av *Microcystis aeruginosa*, vilken behandlades med kopparsulfat, vilket leder till att cellerna dör (och eventuella inneslutna toxiner kan läcka ut i vattenmassan). Medan blomningen pågick förekom klagomål på dålig smak och lukt på dricksvattnet som hade ursprung i reservoaren. Det gjordes en retrospektiv epidemiologisk studie över leverfunktion i samband med blomningen, där personer som fick sitt vatten från reservoaren med blomningen jämfördes med personer som fick sitt dricksvatten från annat håll. Blodprover 6 veckor före blomningen, under blomningen och 6 veckor efter blomningen jämfördes i de olika populationerna. Resultatet visade en ökning av gammaglutamyltransferas (GTP, ett leverenzym) hos gruppen som hade Malpas som dricksvattenkälla under blomningen samt efter det den lyserats med kopparsulfat, jämfört med samma grupp före och efter blomningen samt jämfört med grupper som hade annan dricksvattenkälla. Medan förhöjningen av GTP var måttlig i medeltal, så var den hos enstaka individer så hög att den indikerade genomgripande leverskada. Toxinet i reservoaren karakteriserades senare som mikrocystin-YM (WHO, 1999).

En allvarlig förgiftning skedde vid en dialysklinik i Brasilien i februari 1996. Vid kliniken upplevde 117 av 136 patienter symtom som synrubbing, illamående, kräkning, muskelsvaghet och smärtsam leverförstoring efter rutinmässig hemodialys. Hundra av patienterna utvecklade leversvikt efter hand, och 50 av dem avled av detta (Jochimsen et al, 1998; Azevedo et al, 2002). Symtombilden gjorde att cyanobakterietoxiner misstänktes som orsak till sjukdomsfallen. Analys av kol från dialyscentrets vattenreningssystem visade resultat som överensstämde med mikrocystin. Blodserum från insjuknade och kontrollpatienter analyserades, liksom levervävnad från avlidna patienter. I serum hittades mikrocystin i nivåer upp till 10 nanog/ml och i levervävnad fann man mikrocystin i nivåer mellan 0,1 och 0,5 nanog/millig. Slutsatsen drogs att mikrocystin förorenat det vatten som användes till dialys. Vid tillfället var dialyscentrets vattenreningssystem defekt, och det hade även skett en felaktig hantering av vatten som forslades via tankbil från stadens vattenverk till dialyscentret. Syndromet har sedan blivit kallat Caruaru-syndromet. Överensstämmelser kan ses med skador som uppkommit hos djur som utsatts för mikrocystiner i laboratorieförsök.

Farokarakterisering

WHO (2003) har beräknat ett interimistiskt tolerabelt dagligt intag, ett interimistiskt TDI (provisional TDI) för mikrocystin-LR utgående från Fawell et al (1999). I studien var NOAEL angivet till 40 mikrogram mikrocystin-LR/kg kroppsvikt. För att beräkna TDI har WHO tillämpat en osäkerhetsfaktor 1000 (10 för att kompensera för artskillnader, 10 för att kompensera för skillnader mellan individer och 10 för att kompensera för de osäkerheter det innebär att det endast är en studie över subkronisk toxicitet och det saknas data för kronisk toxicitet och carcinogenicitet). "Provisional TDI" blir då 0,04 mikrog mikrocystin-LR/kg kroppsvikt och dag.

Riskkaraktärisering för mikrocystin i dricksvatten

WHO har angett ett "provisional guidance value" för mikrocystin-LR, 1 mikrog/L dricksvatten. Detta är beräknat för en vuxen person som väger 60 kg och som intar 2 L vatten/dag. I beräkningen har 80% av intaget av mikrocystin-LR allokerats till dricksvatten.

Enligt WHO ska *värdet ge en säkerhet vid en livslång daglig konsumtion av dricksvatten som innehåller toxinet. Värdet kan överskridas under kortare perioder utan en ökad risk.*

Det "provisional TDI" som WHO använt för att beräkna "provisional guidance value" för mikrocystin-LR i dricksvatten kan användas för att beräkna ungefärlig storleksordning på riktvärden/nivågränser vid vilka eventuella åtgärder kan behöva vidtas för att säkerställa en säker dricksvattenförsörjning för olika åldersgrupper i befolkningen.

Nedanstående är en beräkning av storleksordning på Högsta hälsomässigt acceptabla Halter (HhaH) av mikrocystin-LR (eller mikrocystin-LR-ekvivalenter) i dricksvatten, för olika åldersgrupper, baserat på "provisional TDI" 0,04 mikrogram/kg kroppsvikt från WHO.

I beräkningarna nedan har 100% av intaget allokerats till dricksvatten, då det inte finns någon annan uppenbar intagsväg. Kroppsvikt för en vuxen antas vara 70 kg, den vuxenvikt som används inom EU. För den yngsta åldersgruppen (spädbarn) har antagandet gjorts att barnen endast konsumerar modersmjölksersättning beredd med toxininnehållande dricksvatten.

Tabell 2. Beräkning av värden som kan ange storleksordning på en högsta hälsomässigt acceptabel halt (HhaH). Beräkningen bygger på interimistiskt TDI (WHO) på 0,04 mikrog mikrocystin-LR/kg kroppsvikt och dag.

Befolkningsgrupp	Personens vikt (kg)	Vattenkonsumtion (mL/dag)	Beräknad HhaH baserad på att 100% av intaget kommer från dricksvatten* (mikrog/L)
spädbarn 3 veckor	4,2	700	0,24
spädbarn > 4 månader	6,6	800	0,33
4-åringar	18	1600	0,45
8-åringar	31	1600	0,78
12-åringar	42	2100	0,80
Vuxna	70**	2000	1,4

Vikten vid olika åldrar baseras på Livsmedelsverket (2012;2006)

Vattenkonsumtion vid olika åldrar baseras på EFSA (2010)

* WHO har allokerat 80% av intag av mikrocystin till dricksvatten vid beräkning av guidance value

** WHO har angett 60kg som kroppsvikt för vuxen

Osäkerheter

Det finns stora osäkerheter i de beräkningar av möjliga högsta hälsomässigt acceptabla halter som presenteras i tabell 2.

Eftersom dataunderlaget är begränsat har beräkningen av möjliga högsta hälsomässigt acceptabla halter av mikrocystin-LR i dricksvatten baserats på ett "provisional TDI" som bygger på en djurstudie över subkronisk toxicitet. Detta ger en grundläggande osäkerhet.

Vidare ska "provisional TDI" ge en säkerhet vid en livslång daglig konsumtion av dricksvatten som innehåller toxinet, och värdet ska kunna överskridas under kortare perioder utan en ökad risk. Det finns idag inte underlag som kan ligga till grund för nivågränser vid kortare överskridanden av TDI. Det saknas underlag som kan ange hur högt över TDI det går att gå under en kortare tidsperiod, liksom det saknas underlag som kan ange under hur lång tid TDI kan överskridas vid olika toxinhalter.

Det saknas data som kan ligga till grund för beräkning av TDI för andra varianter av mikrocystiner än mikrocystin-LR, även för nodulariner saknas data som kan ligga till grund för beräkning av TDI eller motsvarande.

Gränsvärden och motsvarande i olika länder

WHO's "provisional guidance value" 1 mikrog mikrocystin-LR/L dricksvatten tillämpas i många länder. (Riktvärden som ligger mellan 1 och 1,5 mikrog mikrocystin-LR (eller mikrocystiner) tillämpas i Australien, Brasilien, Kanada, Tjeckien, Danmark, Frankrike, Nya Zeeland, Singapor, Spanien, Turkiet, Uruguay och Sydafrika. Se även tabell 3.)

I tabell 3 anges gränsvärden eller motsvarande för mikrocystiner och nodulariner i dricksvatten (EFSA, 2016). De flesta regleringar behandlar mikrocystin-LR, mikrocystin-LR-ekvivalenter eller summan av mikrocystiner. Endast ett land, Nya Zeeland har någon form av reglering av nodularin, anledning till detta är troligen att nodularin framförallt förekommer i brackvatten och att de flesta länder inte ser någon anledning att toxinet ska förekomma i deras ytvattentäkter som består av sötvatten.

I de fall länder helt saknar gränsvärden eller motsvarande för mikrocystiner och nodulariner är förklaringen ofta att landet enbart eller till största delen använder sig av grundvatten för sin dricksvattenförsörjning, och inte av ytvatten.

Tabell 3. Gränsvärden eller motsvarande för mikrocystiner och nodulariner i dricksvatten enligt EFSA (2016)

Land/organisation	Toxin, samt eventuell kommentar/beskrivning	Halt toxin	Typ av värde*
WHO	Mikrocystin-LR	1,0 mikrog/L	"Provisional guidance value"
Australien	Mikrocystiner, toxicitetsekvivalenter av MC-LR	1,3 mikrog/L	"Guidance value"
Brasilien	Mikrocystiner	1 mikrog/L	Gränsvärde
Finland	Summa av alla mikrocystiner. Gräns för införande av vissa åtgärder. Vid enstaka överskridanden fall-fall-bedömning.	>1 mikrog/L	"Guidance value"
	Summa av alla mikrocystiner. Vatten får endast användas för toaletter i hushållen.	>10 mikrog/L	"Guidance value"
Frankrike	Summa av alla mikrocystiner.	1 mikrog/L	Gränsvärde
Italien	Summa av alla mikrocystiner som mic-LR-ekvivalenter	1 mikrog/L	Gränsvärde
Kanada (olika provinser)	Mikrocystin-LR, alternativt summa av alla mikrocystiner	1,5 mikrog/L	Maximalt acceptabel halt
Nya Zeeland	Mikrocystiner, som mikrocystin-LR ekvivalenter	1 mikrog/L	(Interimistisk) maximalt tillåten halt
	<i>Nodularin</i>	<i>1 mikrog/L</i>	<i>(Interimistisk) maximalt tillåten halt</i>
Portugal	Mikrocystin-LR	1 mikrog/L	Indikator parameter
Singapor	Mikrocystin-LR, fritt och cellbundet	1 mikrog/L	Gränsvärde
Spanien	Mikrocystiner	1 mikrog/L	Gränsvärde
Sydafrika	Mikrocystin-LR	1 mikrog/L	"Guidance value"
Uruguay	Mikrocystin-LR	1 mikrog/L	Gränsvärde
USA, EPA	Mikrocystiner, barn under 6 år	0,3 mikrog/L	"Health advisory"
	Mikrocystiner, barn över 6 år och vuxna	1,6 mikrog/L	"Health advisory"
USA, Florida	Mikrocystiner, kroniskt	1 mikrog/L	"Health advisory level"
	Mikrocystiner, 90 dagar	10 mikrog/L	"Health advisory level"
USA, Minnesota	Mikrocystiner	0,04 mikrog/L	"Guidance value/alert level"
USA, Ohio	Mikrocystiner	1 mikrog/L	Maximalt acceptabel koncentration
USA, Oregon	Mikrocystiner	1 mikrog/L	"Guidance value"

* De uttryck som förekommer i kolumnen är de som används i respektive lands råd, regler eller motsvarande. Vad uttrycken innebär i praktiken är inte beskrivet i de publikationer som är tillgängliga.

Slutsatser och sammanfattning

Arter som bildar mikrocystiner finns i svenska sjöar och i Östersjön, och toxinerna har återfunnits i sjöar i Sverige liksom i Östersjön (SLV-rapport 19/1997, SLV-rapport 4/2000). Arter som bildar nodulariner finns i Östersjön. Sjövatten används som ytvattentäkter i Sverige, och brackvatten från Östersjön används som dricksvatten efter avsaltning, se även Rapport 1-2007 i Livsmedelsverkets rapportserie (SLV, 2007). Det finns dock inte underlag som kan ge en uppfattning om ifall människor har exponerats för mikrocystiner eller nodulariner via dricksvatten i Sverige.

Främsta målorgan för toxicitet av mikrocystiner liksom för nodulariner är lever. Det finns inte indikation på att mikrocystiner skulle kunna inducera cancer, dock finns indikationer på att substanserna kan bidra till tumörpromotion.

Det finns endast en studie av tillräcklig kvalitet för att bestämma ett NOAEL för en mikrocystinvariant, mikrocystin-LR, NOAEL är i studien bestämt till 40 mikrog/kg kroppsvikt. Utifrån detta NOAEL har WHO beräknat ett interimistiskt TDI (provisional TDI) till 0,04 mikrogram mikrocystin-LR/kg kroppsvikt. Ett TDI ska ge en säkerhet vid en daglig konsumtion under en livstid, och kortare överskridanden av TDI bör kunna ske utan negativa effekter. Utifrån TDI har WHO också beräknat ett "provisional guidance value" för mikrocystin-LR i dricksvatten på 1 mikrogram/liter.

Även om mikrocystin-LR ofta benämns vara en av de mest, eller den mest toxiska mikrocystinvarianten, så finns det ett begränsat underlag som kan ge substans åt påståendet, eller ge tydliga indikationer på i vilken grad toxiciteten kan variera mellan olika mikrocystinvarianter. Inte heller finns det tillförlitligt underlag som kan ange hur toxiciteten av nodulariner förhåller sig till mikrocystin-LR. Flera faktorer kan påverka toxiciteten av olika varianter av mikrocystiner liksom för nodulariner; affinitet för OATP-transportörer; graden av affinitet till proteinfosfatas; liksom tillgång på glutationtransferas och glutation i cellen. Att dessa faktorer kan påverka toxiciteten kan förutsättas utgående från kunskapen om hur toxinerna absorberas, mekanismen för toxicitet samt hur toxinerna kan detoxifieras i kroppen. Det går däremot inte att utifrån denna generella kunskap uttala sig om enskilda toxiner.

I dagsläget är det "provisional TDI" och det "provisional guidance value" för mikrocystin-LR som är framtaget av WHO, det enda och det bästa värdet som finns att tillgå för att få grepp om vid vilken storleksordning av intag resp. vid vilken halt i dricksvatten som mikrocystiner och nodulariner kan börja innebära en hälsofara.

Mikrocystin-LR är den enda mikrocystinvariant för vilken det finns ett NOAEL. I avsaknad av data vad gäller toxiciteten av andra mikrocystinvarianter liksom för nodulariner kan möjligheten beaktas att utnyttja NOAEL för mikrocystin-LR för bedömningar av toxicitet även av andra mikrocystiner liksom nodulariner. Detta skulle då ske utgående från toxinerens strukturlikhet och kunskapen om att de har en gemensam verkningsmekanism i form av inhibering av proteinfosfataser.

Tabell 2 i detta dokument ger en teoretisk beräkning av storleksordning av möjliga "aktionsvärden" (HhAH) för dricksvatten vid olika åldrar/vattenintag, utgående från WHO:s "provisional TDI". Beräkningarna innehåller stora osäkerheter.

Handläggare	Ulla Beckman Sundh
Granskad	Stina Wallin

Referenser

Abramsson-Zetterberg L, Beckman Sundh U, Mattson R. 2010. Cyanobacterial extracts and microcystin-LR are inactive in the micronucleus assay *in vivo* and *in vitro*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 699:5-10.

Bourne D, Jones GJ, Blakeley RL, Jones A, Negri AP, Riddles P. 1996. Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *Appl Env Microbiol* 62:4086-4094.

Buratti FM, Testai E. 2015. Species- and congener-differences in microcystin-LR and -RR GSH conjugation in human, rat, and mouse hepatic cytosol. *Toxicol Lett* 232(1):133–140.

Buratti FM, Manganeli M, Vichi S, Stefanelli M, Scardala S, Testai E, Funari E. 2017. Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Arch Toxicol* 91(3):1049-1130.

Campos A, Vasconcelos V (2010) Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. *Int J Mol Sci* 11(1):268–287.

Chen Y, Lee T, Lee S, Huang H, Huang R, Shou H. 2006. Comparison of protein phosphatase inhibition activities and mouse toxicities of microcystins. *Toxicol* 47:742-746.

Cohen P. 2001. The role of protein phosphorylation in human health and disease. *Eur J Biochem* 268:5001-5010.

Corbel S, Mougou C, Bouaïcha N. 2014. Cyanobacterial toxins: modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. *Chemosphere* 96:1–15.

Ding WX, Shen HM, Zhu HG, Lee BL, Ong CN. 1999. Genotoxicity of microcystic cyanobacteria extract of a water source in China. *Mutat Res-Gen Tox En* 442(2):69–77.

Dombradi V, Kriegelstein J, Klumpp S. 2002. Regulating the regulators. *EMBO reports* 3(2):120-124.

EFSA. 2016. External Scientific Report. Review and analysis of occurrence, exposure and toxicity of cyanobacteria toxins in food. Istituto Superiore di Sanità-Rome Italy, ANSES- Maisons-Alfort and Fougères, France. EFSA Supporting publication 2016:EN-998N.

Fawell JK, Mitchell RE, Everett DJ, Hill RE. 1999. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I. Microcystin-LR. *Hum Exp Toxicol* 18:162–167.

Feurstein D, Stemmer K, Kleinteich J, Speicher T, Dietrich DR. 2011. Microcystin congener- and concentration-dependent induction of murine neuron apoptosis and neurite degeneration. *Toxicol Sci* 124(2):424–431.

Fischer WJ, Altheimer S, Cattori V, Meier PJ, Dietrich DR, Hagenbuch B. 2005. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol Appl Pharmacol* 203(3):257–263.

Fischer A, Hoeger SJ, Stemmer K, Feurstein DJ, Knobloch D, Nussler A, Dietrich DR. 2010. The role of organic anion transporting polypeptides (OATPs/SLCOs) in the toxicity of different microcystin

congeners in vitro: a comparison of primary human hepatocytes and OATP-transfected HEK293 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 245(1):9–20.

Francis G. 1878. Poisonous Australian lake. *Nature*, 18:11.

Gjolme N, Krogh T, Utkilen H. 2010. Cyanobakterier (blågrønnalger) oppblomstring og toksinproduksjon. Folkehelseinstituttet Rapport 2010:4.

Harada KI, Tsuji K, Watanabe MF. 1996. Stability of microcystins from cyanobacteria –III. Effect of PH and temperature. *Phycologia* 35(6-supplement):83-88.

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2010), Ingested nitrate and Nitrite and Cyanobacterial Peptide Toxins Vol. 94.

Ito E, Kondo F, Terao K, Harada K. 1997. Neoplastic nodular formation in mouse liver induced by repeated intraperitoneal injections of microcystin-LR. *Toxicon* 35(9):1453–1457.

Jochimsen EM, Carmichael WW, An J, Caedo DM, Cookson ST, Holmes CEM, Antunes MB de C, Filho DA de M, Lyra TM, Barreto VST, Azevedo SMFO, Jarvis WR. 1998. Liver failure and death after wxposure to microcystins at a haemodialysis center in Brazil. *New Engl J Med* 338(13):873-878.

Jones GJ, Orr PT. 1994. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. *Wat Res* 28:871-876.

Kirkby C. (1672) A relation of an inland-sea, near Danzick, yielding at a certain season of the year a green substance, which causeth certain death: Together with an observation about white amber: Communicated by Mr. Kirkby, in a letter written to the publisher from Danzick Decemb.19, 1671. *Philosophical Transactions (1665-1678) vol 7:4069-4070*. Royal Society.

Kiviranta J, Sivonen K, Luukkainen R, Lahti K, Niemelä SI. 1991. Production and biodegradation of cyanobacterial toxins; a laboratory study. *Arch Hydrobiol* 121:281-294.

Klumpp S, Krieglstein J. 2002. Phosphorylation and dephosphorylation of histidine residues in proteins. *Eur J Biochem* 269:1067-1071.

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. *Chem Res Toxicol* 5(5):591–59.

Labine M, Minuk GY. 2014. Long-term, low-dose exposure to microcystin toxin does not increase the risk of liver tumor development or growth in mice. *Hepatal Res* 45(6):683–692.

Lahti K, Rapala J, Färdig M, Niemelä M, Sivonen K. 1997a. Persistence of cyanobacterial hepatotoxin, microcystin-LR, in particulate material an dissolved in lake water. *Wat Res* 31(5):1005-1012.

Lahti K, Niemi MR, Rapala J, Sivonen K. 1997b. Biodegradation of cyanobacterial hepatotoxins – characterization of toxin degrading bacteria. *Proceedings of the VII International Conference on Harmful Algae*.

Li G, Yan W, Cai F, Li C, Chen N, Wang J. 2012. Spatial learning and memory impairment and pathological change in rats induced by acute exposure to microcystin-LR. *Environ Toxicol*

29(3):261–268.

Livsmedelsverket. 2006. Riksmaten – barn 2003. Livsmedels och näringsintag bland barn i Sverige.

Livsmedelsverket. 2012. Livsmedels- och näringsintag bland vuxna i Sverige. Resultat från matvaneundersökning genomförd 2010-2011.

Liyanage HM, Magana Arachchi DN, Abeysekara T, Guneratne L. 2016. Toxicology of freshwater cyanobacteria. *J Env Sci Health, Part C*, 34 (3):137-168.

Lu H, Choudhuri S, Ogura K, Csanaky IL, Lei X, Cheng X, Song PZ, Klaassen CD. 2008. Characterization of organic anion transporting polypeptide 1b2-null mice: essential role in hepatic uptake/toxicity of phalloidin and microcystin-LR. *Toxicol Sci* 103(1):35–45.

Manganelli M, Stefanelli M, Vichi S, Andreani P, Nascetti G, Scialanca F, Scardala S, Testai E, Funari E. (2016) Cyanobacteria biennial dynamic in a volcanic mesotrophic lake in central Italy: strategies to prevent dangerous human exposures to cyanotoxins. *Toxicon* 115:28–40.

Milutinović A, Zivin M, Zorc-Pleskovic R, Sedmak B, Suput D. 2003. Nephrotoxic effects of chronic administration of microcystins -LR and -YR. *Toxicon* 42(3):281–288.

Nishiwaki-Matsushima R, Ohta T, Nishiwaki S, Suganuma M, Kohyama K, Ishikawa T, Carmichael WW, Fujiki H. 1992. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J Cancer Res Clin Oncol* 118(6):420–424.

Ohta T, Sueoka E, Iida N, Komori A, Suganuma M, Nishiwaki R, Tatematsu M, Kim SJ, Carmichael WW, Fujiki H. 1994. Nodularin, a potent inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A, is a new environmental carcinogen in male F344 rat liver. *Cancer Res* 54(24):6402–6406.

Sabart M, Misson B, Descroix A, Duffaud E, Combourieu B, Salencon M-J et al (2013) The importance of small colonies in sustaining *Microcystis* population exposed to mixing conditions: an exploration through colony size, genotypic composition and toxic potential. *Environ Microbiol Rep* 5(5):747–756.

Sedan D, Laguens M, Copparoni G, Aranda JO, Giannuzzi L, Marra CA, Andrinolo D. 2015. Hepatic and intestine alterations in mice after prolonged exposure to low oral doses of Microcystin-LR. *Toxicon* 104:26–33.

Sekijima M, Tsutsumi T, Yoshida T, Harada T, Tashiro F, Chen G, Yu SZ, Ueno Y. 1999. Enhancement of glutathione S-transferase placental-form positive liver cell foci development by microcystin-LR in aflatoxin B1-initiated rats. *Carcinogenesis* 20(1):161–165.

Sieroslawska A. 2013. Assessment of the mutagenic potential of cyanobacterial extracts and pure cyanotoxins. *Toxicon* 74:76–82.

SLV. 1997. Algtoxiner i sjö- och dricksvatten. Hult A, Beckman Sundh U, Möller T, Willén E, Erlandsson B. SLV Rapport 19/97.

SLV. 2004. Reduktion av microcystiner vid dricksvattenberedning. Möller T, Hult A, Brostedt S, Willén E, Beckman Sundh U. SLV Rapport 4-2000.

SLV. 2007. Algtoxiner i avsaltat dricksvatten. SLV Rapport 1-2007.

Song KY, Lim IK, Park SC, Lee SO, Park HS, Choi YK, Hyun BH. 1999. Effect of nodularin on the expression of glutathione S-transferase placental form and proliferating cell nuclear antigen in N-nitrosodiethylamine initiated hepatocarcinogenesis in the male Fischer 344 rat. *Carcinogenesis* 20(8):1541–1548.

Stoner RD, Adams WH, Slatkin DN, Siegelman HW. 1989. The effects of single L-amino acid substitutions on the lethal potencies of the microcystins. *Toxicon* 27(7):825–828.

Vichi S, Buratti FM, Testai E (2016) Microcystins: toxicological profile. In: Gopalakrishnakone P et al (eds) *Marine and freshwater toxins*. Toxinology, Springer Science + Business Media Dordrecht, pp 219–238

Wang C, Gu S, Yin X, Yuan M, Xiang Z, Li Z, Cao H et al. 2016. The toxic effect of microcystin-LR on mouse lungs and alveolar typ II epithelial cells. *Toxicon* 115:81-88.

WHO. 1999. Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. Chorus I and Bartram J, eds. Taylor and Francis. New York and London.

WHO. 2003. Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. WHO/SDE/WSH/03.04/57.

Zegura B, Straser A, Filipic M. 2011. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins. A review. *Mut Res* 727:16–41.

