

Annex zur SKLM-Stellungnahme „Microcystine in Algenprodukten zur Nahrungsergänzung“ vom 28. September 2005

Übersicht und Auswertung der Literatur zu Microcystinen

Autor: Barbara Engeli*

* Bundesamt für Gesundheit, Sektion Ernährungs- und Toxikologische Risiken, Zürich

Der folgende Annex unterstützt die toxikologische Bewertung für Microcystine in der Stellungnahme der SKLM vom 28. September 2005 *“Microcystine in Algenprodukten zur Nahrungsergänzung“*. Der Annex beinhaltet Daten zu Metabolismus und Toxikologie von Microcystin-LR, zu analytischen und biochemischen Aspekten, eine Expositionsabschätzung und einen umfangreichen Literaturnachweis. Die Datensammlung basiert auf dem 1999 erschienenen Bericht der WHO und relevanten Publikationen aus den Jahren 1997-2004. Studien, die mit *Microcystis* Extrakten durchgeführt wurden, sind aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung und der daraus resultierenden unklaren Aufnahmemengen schwierig zu bewerten und werden nur in Ausnahmefällen aufgeführt.

Inhalt

- 1 Biochemische Aspekte
 - 1.1 Strukturmerkmale der Microcystine
 - 1.2 Absorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion
 - 1.3 Biotransformation
 - 1.4 Effekte auf Enzyme und andere Zellkomponenten
- 2 Toxikologie von Microcystinen
 - 2.1 Akute Toxizität
 - 2.2 Subakute und subchronische Toxizität
 - 2.3 Chronische Toxizität/ Kanzerogenität
 - 2.4 Genotoxizität
 - 2.5 Fortpflanzungstoxizität
 - 2.6 Immunotoxizität
- 3 Toxikologie von Metaboliten
- 4 Mechanistische Studien: Auswirkungen auf Cytoskelett, mitotische Zellteilung, Apoptose und oxidativen Stress
- 5 Microcystin-Konzentrationen in Algenprodukten, Trinkwasser und Lebensmitteln
- 6 Expositionsabschätzung
- 7 Analytik
- 8 Bewertungen internationaler Gremien
 - 8.1 TDI-Herleitung und Trinkwasser Richtwert der WHO
 - 8.2 Weitere Risikobewertungen und Richtwerte
- 9 Literatur und Abkürzungen

1 BIOCHEMISCHE ASPEKTE

1.1 STRUKTURMERKMALE DER MYCROCYSTINE

Microcystine sind zyklische Heptapeptide, die von *Microcystis aeruginosa*, einer Blaualge (Cyanobakterium) gebildet werden. Bis heute sind über 60 Microcystin-Kongeneren bekannt, die die allgemeine Struktur Cyclo-(D-Ala¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-Glu⁶-Mdha⁷) aufweisen, siehe Abb.1. Sie enthalten die ungewöhnliche Aminosäure ADDA (3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid). MeAsp steht für *Erythro*- β -methylaspartat, Mdha für *N*-Methyl-dehydroalanin, X und Z sind variable Aminosäuren, siehe Tab 1. Das Molekulargewicht der Microcystine liegt zwischen 800-1100 Da. Die meisten Kongeneren sind hydrophil (WHO, 1999).

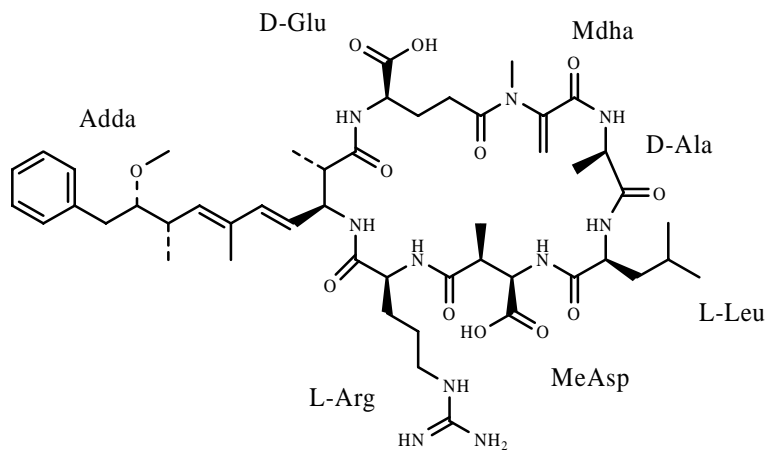


Abb.1: Struktur der Microcystine

Tab. 1. Microcystine.

Microcystin-Kongener	Aminosäure X ²	Aminosäure Z ⁴	CAS-Nummer	Molekulargewicht [Da]
-LA	L-Leu	L-Ala		
-LR	L-Leu	L-Arg	101043-37-2	995.17
-RR	L-Arg	L-Arg		
-YA	L-Tyr	L-Ala		
-YM	L-Tyr	L-Met		
-YR	L-Tyr	L-Arg		

1.2 ABSORPTION, DISTRIBUTION, METABOLISMUS UND EXKRETION

Bei oraler Verabreichung an Mäuse konnte gezeigt werden, dass Microcystin-LR vorwiegend im Dünndarm absorbiert und systemisch verteilt wird (Ito *et al*, 2000). Die Aufnahme von Microcystin-LR erfolgt durch Gallensäuretransporter (multispecific organic ion transport system), die sowohl beim Tier als auch beim Mensch im Dünndarm und in Hepatozyten vorkommen (WHO, 1999, Fischer *et al*, 1999). Auch in der Blut-Hirn-Schranke gibt es möglicherweise Transportsysteme für Microcystine (Fischer *et al*, 2005).

Nach einmaliger i.v. Applikation von 0.035 mg ³H-Microcystin-LR/kg Körpergewicht (KG) an Mäuse wurde die Substanz in zwei Phasen aus dem Plasma eliminiert mit einer ersten Halbwertszeit von 0.8 Min. und einer zweiten von 6.9 Min. Eine Stunde bis 6 Tage nach Applikation war ca. 70% der Dosis in der Leber lokalisiert. Innerhalb von 6 Tagen nach Verabreichung wurden 9.2% der Dosis über den Urin und 14.5% über die Fäzes ausgeschieden. 6 bzw. 12 Std. nach Verabreichung waren in Urin und Fäzes 60% der Radioaktivität den nicht verstoffwechselten Microcystinen zuzuordnen. Metaboliten wurden in Urin, Fäzes und im Leberzytosol nachgewiesen, jedoch nicht näher identifiziert (Robinson *et al*, 1991). Bei i.p. Verabreichung von radioaktiv markierten Microcystinen sowohl bei Mäusen als auch Ratten waren rund 70% des Toxins in der Leber lokalisiert (WHO, 1999, Brooks & Codd, 1987).

Microcystin-LR war nach einmaliger i.p. Injektion (0.02-0.1 mg/kg KG) an Mäusen in Leberextrakten nur in gebundener Form (Proteinphosphatase 1- bzw. 2A-Addukte) und nicht in freier Form nachweisbar (Detektionsgrenze der HPLC-Methode 0.15 µg) (Yoshida *et al*, 1998).

In einer Studie an Ratten wurden 2.5 oder 5 mg Microcystin-LR/kg KG direkt ins Lumen eines *in situ* isolierten Segments des Ileum oder Jejunum verabreicht, die Tiere 6 Stunden danach getötet und auf relative Lebervergrößerung untersucht. In allen mit Microcystin behandelten Tieren war das relative Lebergewicht größer, die Leber dunkelrot verfärbt und mikroskopische Läsionen wurden beobachtet. Bei Applikation ins Ileum waren die Effekte dosisabhängig und signifikant ausgeprägter als bei Verabreichung ins Jejunum. Die Autoren folgerten hieraus, dass die Microcystin-LR Aufnahme bei Ratten v.a. im Ileum erfolgt (Dahlem *et al*, 1989).

Laut WHO wurden keine Pharmakokinetikstudien mit oral verabreichten Microcystinen durchgeführt (WHO, 1999). Auch in der neueren Literatur findet man keine Daten,

insbesondere fehlen Angaben zur oralen Bioverfügbarkeit. Es gibt jedoch Hinweise, dass Microcystin-LR oral weniger gut aufgenommen wird. Ein Vergleich der LD₅₀-Werte zeigt, dass oral verabreichtes Microcystin-LR ca. 100-fach weniger toxisch war als parenteral verabreichtes (siehe Kapitel 2.1 Akute Toxizität). Ferner wurden bei Mäusen nur nach i.p. Verabreichung von Microcystin-LR Leberneoplasien beobachtet, nicht aber nach oraler Verabreichung der vierfachen Dosis (siehe Kapitel 2.3 Chronische Toxizität/Kanzerogenität, Ito *et al*, 1997b).

1.3 BIOTRANSFORMATION

Nach i.p. Verabreichung von 0.01-0.02 mg Microcystin-RR/Maus bzw. 0.004 mg Microcystin-LR/Ratte wurden mehrere Metabolite in der Leber nachgewiesen. Bei beiden Tierspezies wurde der Mdha-Teil mit Glutathion oder Cystein konjugiert und bei einem Glutathionkonjugat zusätzlich eine Sulfatgruppe an die ADDA-Aminosäure eingefügt (WHO, 1999 bzw. Kondo *et al*, 1996).

1.4 EFFEKTE AUF ENZYME UND ANDERE ZELLKOMPONENTEN

Effekte auf Enzyme

Microcystine binden im Cytosol der Leber über N-Methyl-dehydroalanin (Mdha) kovalent an Cys-273 bzw. Cys-266 der Ser/Thr Proteinphosphatasen 1 und 2A (WHO, 1999, Matsushima *et al*, 1990, Runnegar *et al*, 1995, MacKintosh *et al*, 1990, Yoshida *et al*, 1998, Gehringer 2004, MacKintosh *et al*, 1995). Die Bindung und Inhibition der Phosphatasen wird als grundlegender Mechanismus für die Toxizität der Microcystine betrachtet (Hitzfeld *et al*, 2000). Die Inhibition der Proteinphosphatasen 1 und 2A wurde *in vitro* (Honkanen *et al*, 1994, MacKintosh *et al*, 1990) und *in vivo* bei Mäusen (Runnegar *et al*, 1993, Runnegar *et al*, 1995) und Ratten (Solter *et al*, 1998) gezeigt. Der IC₅₀-Wert der Phosphataseinhibition lag für Microcystin-LR bei 0.1-1.0 nM (Runnegar *et al*, 1995) bzw. 0.05 nM (Tsuji *et al*, 1997). Microcystin-LR und Microcystin-LA inhibierten *in vitro* auch die aus Rinderhirn isolierte Ser/Thr Proteinphosphatase 3 (Honkanen *et al*, 1994). Synthetische Microcystinanaloge, die aus der ADDA-Seitenkette und 1-3 weiteren Aminosäuren bestanden, inhibierten *in vitro* ebenfalls die Proteinphosphatasen 1 und 2A, aber deutlich schwächer als Microcystine (Gulledge *et al*, 2003a Gulledge *et al*, 2003b).

Microcystin-LR war in Balb/c Mäusen nach einmaliger i.p. Verabreichung einer letalen (0.1 mg/kg KG) oder subletalen (0.012, 0.023 und 0.045 mg/kg KG) Dosis zu gleichen

Anteilen im Zytosol und im Zellkern von Hepatozyten lokalisiert. Nur bei der letalen Dosis wurden die Proteinphosphatasen 1 und 2A in Zellkernextrakt von Hepatozyten inhibiert. (*Anmerkung*: Keine Angabe zur Proteinphosphatase-Inhibition im Zytoplasma). Die Verabreichung sub-letaler Dosen führte zur Hyperphosphorylierung des Tumorsuppressorproteins p53 in Hepatozyten, welches eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Apoptose und Zellproliferation durch oxidativen Stress und DNA-Schäden besitzt (Guzman *et al*, 2003).

In mit Microcystin-LR behandelten Zelllysaten aus Mel-7 (Humane Melanomzellen) und J3 Zellen (Interspezies Hybridom aus Backenhörnchen Hepatozyten und Ratten Hepatoma H4TG) wurden drei Proteinaddukte mit Microcystin identifiziert. Microcystin-LR band an die katalytischen Untereinheiten der Proteinphosphatasen 1 und 2A und an die beta-Untereinheit der ATP-Synthase (Mikhailov *et al*, 2003).

2 TOXIKOLOGIE

2.1 AKUTE TOXIZITÄT

Der LD₅₀-Wert von Microcystin-LR lag bei Mäusen nach oraler Verabreichung bei 5-10.9 mg/kg KG und bei i.p. Verabreichung im Bereich von 0.025-0.15 mg/kg KG. Die i.p. LD₅₀-Werte anderer Microcystine (Microcystin-LA, -YR, -YM) lagen in der gleichen Größenordnung oder, wie für Microcystin-RR, geringfügig höher als Microcystin-LR (WHO 1999), siehe Tab 2.

Der orale LD₅₀-Wert für Ratten lag über 5 mg Microcystin-LR/kg KG (Mortalität 1/5 Männchen bei 5 mg/kg KG) (Fawell *et al*, 1999).

Tab. 2. Akute Toxizität von Microcystinen

Microcystin Kongener	Tierspezies	Verabreichungsweg	LD ₅₀ [mg/kg KG]	Literatur
-LR	Maus	oral	5-10.9	WHO, 1999
-LR	Maus	i.p.	0.025-0.15	WHO, 1999
-LR	Maus	i.p.	0.043	Gupta <i>et al</i> , 2003
-LR	Maus	i.p.	0.05	Tsuji <i>et al</i> , 1995
-LR	Maus (männl.)	i.v.	0.04	Kondo <i>et al</i> , 1992
-LR	Ratte	oral	>5	Fawell <i>et al</i> , 1999
-LR	Ratte (männl.)	i.p.	0.05	Towner <i>et al</i> , 2002
-LR	Ratte (gefüttert)	i.p.	0.122	Miura <i>et al</i> , 1991
-LR	Ratte (nicht gefüttert)	i.p.	0.072	Miura <i>et al</i> , 1991
-RR	Maus	i.p.	0.235	Gupta <i>et al</i> , 2003
-YR	Maus	i.p.	0.11	Gupta <i>et al</i> , 2003
-YR	Maus (männl.)	i.v.	0.09	Kondo <i>et al</i> , 1992
9 Kongenere (nicht -LR)	Maus	i.p.	0.1-0.75	Stotts <i>et al</i> , 1993
Gereinigtes Toxin aus <i>Microcystis aeruginosa</i>	Maus	i.p.	0.125	Brooks & Codd, 1987
Toxine aus <i>Microcystis aeruginosa</i> Extrakt	Maus	i.p.	0.098	Falconer <i>et. al.</i> , 1988, 1991 und 1994

Nach i.p. und i.v. Verabreichung an Nager waren Microcystine primär akut hepatotoxisch. Es traten schwerwiegende Leberschäden auf durch Schädigung der Hepatozyten und Sinusoide, sowie erhöhtes Lebergewicht infolge innerer Blutungen. Microcystine wirkten aber auch auf Nieren, Lungen und Darm (genauere Angaben siehe nachfolgende Studienbeschreibungen). Microcystin-LR war im Vergleich zu Microcystin-YR und -RR toxischer (WHO, 1999, Gupta *et al*, 2003).

Bei BALB/c Mäusen waren einmalig 0.058-0.101 mg Microcystin-LR/kg KG i.p. letal. Es geht jedoch aus dem Artikel nicht hervor, wie hoch die Mortalität bei den einzelnen Dosisgruppen war (Yoshida *et al*, 1998).

2-19 Std. nach einmaliger oraler Verabreichung von 0.5 mg Microcystin-LR/kg KG an 5- und 32-Wochen alte Mäuse wurden bei 62% der älteren Mäuse mikroskopisch sichtbare Leberveränderungen gefunden. Keine der jüngeren Mäuse zeigte diese Effekte. Grund für diese altersabhängige Toxizität könnte gemäss Autoren die mit steigendem Alter zunehmende Degeneration der Darmmucosa Zellen und des Dünndarmepithels sein, die dann bei älteren Tieren eventuell zu einer erhöhten Microcystinaufnahme aus dem Darm und zu einer entsprechend ausgeprägteren Lebertoxizität führen könnte (Ito *et al*, 1997a).

Intranasal verabreichtes Microcystin-LR verursachte Nekrosen im Nasenepithel von Mäusen. Der intranasale LD₅₀-Wert war gleich groß wie nach i.p. Verabreichung (WHO, 1999).

Der i.p. LD₅₀-Wert von *Microcystis aeruginosa* Extrakt lag für Ratten bei 15.8 mg lyophilisierten Algenzellen/kg KG (Rao *et al*, 1995). Die Tiere starben innerhalb von 2-6 Std. nach Verabreichung der 1- oder 2-fachen LD₅₀-Dosis. Davor zeigten sie Anzeichen von Sedation, Bewegungsstörungen, Spasmen, Spreizung der Hinterextremitäten und starke Krämpfe. Die Leber war vergrößert und mit Blut gefüllt (Rao *et al*, 1995, Rao *et al*, 1998).

2.2 SUBAKUTE UND SUBCHRONISCHE TOXIZITÄT

Mäuse

Gruppen von 15 männlichen und 15 weiblichen Mäusen wurde während 13 Wochen per Gavage 0, 0.04, 0.2 oder 1 mg Microcystin-LR/kg KG/Tag verabreicht und die Tiere auf Körpergewicht, Futteraufnahme, Effekte auf Augen und Hämatologie untersucht. Nach Behandlungsende wurden Leber, Nieren und Lunge histopathologisch untersucht.

Als sensitivster Endpunkt wurden histopathologische Veränderungen der Leber ab 0.2 mg/kg KG/Tag gefunden. Bei der höchsten Dosierung von 1 mg/kg KG/Tag wurden bei allen Tieren, und bei 0.2 mg/kg KG/Tag bei einigen Tieren chronische Leberentzündung, fokale Degeneration von Hepatozyten in den Leberlobuli und Hämosiderin-Ablagerungen in der Leber beobachtet. Bei männlichen Mäusen war die Körpergewichtszunahme bei 0.2 mg/kg KG/Tag signifikant und bei 0.04 und 1 mg/kg KG/Tag tendenziell reduziert, bei weiblichen Mäusen bei 0.2 mg/kg KG/Tag im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Bei männlichen Mäusen ab 0.04 mg/kg KG/Tag bzw. bei weiblichen Mäusen bei der höchsten Dosis traten signifikant erhöhte Aktivitäten der Alanin- und der Aspartat-Aminotransferase im Serum auf. Bei der höchsten Dosis war bei beiden Geschlechtern die Aktivität der alkalischen Phosphatase erhöht und die Menge an Albumin und Gesamtprotein im Serum bei männlichen Tieren geringfügig aber signifikant reduziert. Die Autoren sind sich nicht sicher

hinsichtlich der Relevanz der Resultate aus der Blutchemie, geben aber einen klaren NOAEL von 0.04 mg Microcystin-LR/kg KG/Tag für die Leberveränderungen an (Fawell *et al.*, 1999).

Mäuse (insgesamt 430 Tiere) erhielten bis zu 1 Jahr über das Trinkwasser *Microcystis aeruginosa* Extrakt mit 0, 1/16, 1/8, 1/4 Verdünnung. Es wurden 7 „interim kills“ durchgeführt (5 Tiere/Geschlecht/Dosisgruppe). Vorzeitig gestorbene Tiere wurden aus einem dosisentsprechenden Reservepool (110 Tiere) ersetzt (Hauptstudie). Wegen geringer Mortalität wurde eine 10 Wochenstudie mit einer Kontrollgruppe und zwei Dosisgruppen (1/2 Verdünnung und unverdünnter Extrakt) mit 2 „interim kills“ durchgeführt (insgesamt 90 Tiere). Zur Bestimmung des Extrakt-Toxingehaltes wurde von Falconer *et al.* die i.p. LD₅₀ des Extraktes experimentell auf 1.7 mg Extrakt/kg KG ermittelt und daraus ein Toxingehalt von 56.6 µg Toxin/ml Extrakt abgeleitet (i.p LD₅₀ 98 µg Toxin/kg KG, siehe Falconer *et al.*, 1994).

Resultate der 1-Jahresstudie (0, 1/16, 1/8, 1/4 Verdünnung, vermutlich äquivalent 0, 0.75, 1.5, 3 mg Toxin/kg KG/Tag*): Bei männlichen Tieren war die Mortalität bei 1/4 Verdünnung und bei weiblichen Tieren bei 1/16 und 1/4 Verdünnung signifikant erhöht. In der Leber wurden keine Neoplasien und keine histopathologischen Veränderungen gefunden.

Resultate der 10 Wochenstudie (0, 1/2, unverdünnter Extrakt, vermutlich äquivalent 0, 6, 12 mg Toxin/kg KG/Tag*): Ab 1/2 Verdünnung war die Mortalität dosisabhängig erhöht und histopathologische Leberveränderungen (Hepatozytenschädigungen, Nekrose, Leukozyteninfiltration, Fibrose) wurden beobachtet (Falconer *et al.*, 1988).

In der Zusammenfassung der WHO (1999) wird diese Studie wie folgt zusammengefasst: Mäuse erhielten bis zu 1 Jahr über das Trinkwasser *Microcystis aeruginosa* Extrakt in 5 Dosen, äquivalent zu 0.75-12 mg Microcystin-YM/kg KG/Tag. Bei den höheren Dosen traten erhöhte Mortalität, Bronchopneumonie (endemisch in der Kolonie) und chronische Leberschäden auf. Es gab keine Hinweise auf eine erhöhte Lebertumorinzidenz. Es konnte kein klarer NOAEL abgeleitet werden (WHO 1999, Originalliteratur Falconer *et al.*, 1988).

**Anmerkung zu Dosisangaben:* Es ist anzunehmen, dass sich die von der WHO angegebene höchste Microcystin-YM-Dosis von 12 mg/kg KG/Tag auf unverdünnten Extrakt (eigene Berechnung unter Zugrundelegung der Extrakttoxinkonzentration von 56,6 µg Toxin/ml Extrakt, KG Maus 20 g, 5 ml Flüssigkeit/Tag → 283 µg Toxin/Tier Tag → ~14 mg Microcystin-YM/kg KG) und somit auf die höchste Dosis der 10 Wochenstudie (nicht der 1 Jahresstudie) bezieht.

Ratten

0, 0.016, 0.032 oder 0.048 mg Microcystin-LR/kg KG/Tag wurde während 28 Tagen i.p. an Gruppen von 5 männlichen Sprague-Dawley Ratten verabreicht. Ab 0.016 mg/kg KG/Tag waren die Microcystin-LR Konzentrationen im Leberzytosol dosisabhängig erhöht. Mittels immunohistologischer Färbung wurde gezeigt, dass Microcystin-LR v.a. in Zone 3 Hepatozyten lokalisiert ist. Ab 0.032 mg/kg KG/Tag wurden in histopathologischen Untersuchungen der Leber Apoptose und zytosolische Vakuolisierung von Zone 3 Hepatozyten beobachtet. Weiter waren ab dieser Dosis die Aktivitäten der Sorbitol-Dehydrogenase und alkalischen Phosphatase im Serum dosisabhängig und signifikant erhöht, die Menge an Serumalbumin signifikant erniedrigt und die Aktivitäten der Proteinphosphatasen 1 und 2A in der Leber dosisabhängig und signifikant erniedrigt. Die Aktivität der Proteinphosphatase 2A war stärker herabgesetzt als diejenige der Proteinphosphatase 1. Bei 0.048 mg/kg KG/Tag war die Körpergewichtszunahme signifikant reduziert und im Serum die Aktivitäten der Aspartat-Aminotransferase und Gamma-Glutamyl-Transferase und die Gallensäurekonzentration signifikant erhöht. Der Mitoseindex blieb bei allen Tieren unverändert (Solter *et al*, 1998).

0, 0.016, 0.032 oder 0.048 mg Microcystin-LR/kg KG/Tag wurden während 28 Tagen i.p. an Gruppen von 4 männlichen Sprague-Dawley Ratten verabreicht. In der Leber nahmen ab 0.016 mg/kg KG/Tag Aktivität, Konzentration und mRNA-Menge der Alanin Aminotransferase (ALT) dosisabhängig ab. Die Effekte waren ab der niedrigsten Dosis signifikant, mit Ausnahme der Menge an mRNA, die nur bei der höchsten Dosis signifikant reduziert war. Die Aktivität der ALT im Serum war bei der höchsten Dosisgruppe tendenziell, aber nicht signifikant, erhöht. Die Autoren folgerten hieraus, dass die Messung der ALT-Aktivität im Serum ein wenig sensitiver Marker für eine Leberschädigung ist (Solter *et al*, 2000).

0, 0.016, 0.032 oder 0.048 mg/kg KG/Tag Microcystin-LR wurden während 28 Tagen i.p. an Gruppen von 3 männlichen Sprague-Dawley Ratten verabreicht. Ab 0.032 mg/kg KG wurden dosisabhängig Leberentzündungen mit Infiltration von Lymphozyten, Makrophagen und Neutrophilen, zentrilobuläre Fibrose, Apoptose und Leberverfettung beobachtet. Die ALT-Aktivität in der Leber war ab der mittleren Dosis signifikant erniedrigt. Die Malondialdehyd-Konzentration (Marker der Lipidperoxidation) in der Leber nahm ab 0.032 mg/kg KG/Tag signifikant und dosisabhängig zu und war bei der höchsten Dosisgruppe gegenüber der Kontrolle rund vierfach erhöht. Leberschnitte von mit Microcystin-LR behandelten Ratten

waren empfindlicher gegenüber dem zytotoxischen Effekt von *tert*-butyl Hydroperoxid (ROS generierende Substanz). Die Autoren folgerten aus den histologischen und biochemischen Befunden, dass oxidativer Stress eine signifikante Rolle bei der chronischen Toxizität von Microcystin-LR spielen könnte (Guzman & Solter, 1999).

In einer Studie wurden Effekte von Microcystin-LR und -YR auf die Nieren genauer untersucht. Dazu wurden jeweils 5 männlichen Wistar Ratten während 8 Monaten jeden zweiten Tag 0.01 mg Microcystin-LR/kg KG oder 0.01 mg Microcystin-YR/kg KG i.p. verabreicht. Es traten histopathologische Veränderungen in der Niere auf, die bei Verabreichung von Microcystin-LR ausgeprägter waren als bei Microcystin-YR. In den Nieren wurden kollabierte Glomeruli mit verdickten Basismembranen, erweiterte Tubuli mit eosinophilen Ablagerungen und eine Ansammlung von Zytoplasma und Aktinfilamenten in epithelialen Tubulizellen beobachtet (Milutinovic *et al*, 2003).

Schweine

Gruppen von 5 männlichen Schweinen wurde über das Trinkwasser 44 Tage *Microcystis aeruginosa* Extrakt verabreicht. Über den i.p. Mausbioassay wurden Dosen von 0.28, 0.8 und 1.31 mg Microcystin/kg KG/Tag abgeschätzt. Der Extrakt enthielt mindestens 9 verschiedene Microcystine, als Hauptkomponente wurde Microcystin-YR vermutet. Ab 0.8 mg/kg KG/Tag wurden dosisabhängig histopathologische Leberveränderungen (zytoplasmatische Degeneration, Nekrosen einzelner Hepatozyten, periacinäre Degeneration, verstopfte Gallengänge und Kupfferzell-Proliferation) beobachtet, bei der niedrigsten Dosis war ein Tier betroffen. Ab 0.8 mg/kg KG/Tag war im Serum die Albuminkonzentration erniedrigt; die Aktivitäten der Gammaglutamyl-Transpeptidase und der alkalischen Phosphatase erhöht und der Bilirubingehalt erhöht. Es wurde ein LOAEL von 0.28 mg Microcystin/kg KG/Tag von der WHO abgeleitet. Schätzungen der Autoren zufolge entspricht dies einem LOAEL von 0.1 mg Microcystin-LR-Äquivalenten/kg KG/Tag. (Die Autoren bestimmten die Toxizität ihres Extraktes mittels i.p. Mausbioassay, HPLC und Phosphatase-Inhibition, für die Umrechnung wurde eine i.p. LD₅₀ von 0.1 mg/kg KG angenommen) (WHO 1999 bzw. Falconer *et al*, 1994).

Rinder

Vier Yearling Fleischkühen wurde während 28 Tagen *Microcystis aeruginosa* (10^8 Zellen/L) über das Trinkwasser verabreicht. Es traten keine Effekte auf bezüglich Trinkwasser-, Futterkonsum und Blutplasmaparameter (Gamma-Glutamyltransferase, Glyceraldehyd Dehydrogenase, Aspartat-Aminotransferase, Bilirubin) auf. Im Plasma wurde kein freies Microcystin nachgewiesen (HPLC, ELISA), in der Leber kein freies oder gebundenes (HPLC und GC-MS). Mittels ELISA wurden hingegen 0.92 mg Microcystin-LR/kg Leber nachgewiesen. Die Autoren zweifeln diesen Befund an, da mit HPLC und GC-MS kein Microcystin nachweisbar war (Nachweisgrenze mehr als 1000-fach niedriger als ELISA-Befund). Der Wert scheint sehr hoch zu sein, denn selbst unter der Annahme, dass alles verabreichte Microcystin aufgenommen und in der Leber akkumuliert wird, wären gemäss Autoren maximal ca. 3 mg Microcystin/kg Leber zu erwarten (Orr *et al*, 2003).

2.3 CHRONISCHE TOXIZITÄT/KANZEROGENITÄT

Es sind keine Langzeitstudien zur chronischen Toxizität oder Kanzerogenität verfügbar.

Von Seiten der IARC ist zu Microcystin-LR keine Evaluation wegen unzulänglichen Tierdaten vorgesehen (Internet IARC-Seite).

Mäuse

Bei ICR Mäusen, denen während 28 Wochen insgesamt 100-mal 0.02 mg Microcystin-LR/kg KG i.p. verabreicht wurde (5-mal/Woche), wurden bei allen 13 behandelten Tieren neoplastische Knötchen („neoplastic nodules“) bis 5 mm Durchmesser in der Leber beobachtet (*Anmerkung*: die Anzahl der Verabreichungen ist unklar: $5 \times 28 = 140$, nicht 100). Die Neoplasien traten ohne vorherige Verabreichung eines Tumorinitiators auf und waren auch noch 2 Monate nach der letzten Behandlung vorhanden (5 Tiere wurden unmittelbar nach Behandlungsende untersucht, 8 Tiere 2 Monate danach). Microcystin-LR wurde v.a. als Cysteinkonjugat in der Leber nachgewiesen. Nach Verabreichung von insgesamt 100-mal 0.08 mg Microcystin-LR/kg KG während 28 Wochen über eine Schlundsonde, wurde bei Mäusen keine Knötchenbildung und keine Leberschädigungen beobachtet (10, 5 und 7 Tiere wurden nach 80 oder 100 Behandlungen bzw. 2 Monate nach der letzten Behandlung getötet). (Ito *et al*, 1997b). *Anmerkung*: Es fehlen Angaben über die Tumorinzidenz in Kontrolltieren

(3 Tiere). Dieses Experiment weist darauf hin, dass Microcystine möglicherweise schlecht aus dem Gastrointestinaltrakt aufgenommen werden.

Gruppen von 30 männlichen C3H/HeN Mäusen wurde 0, 0.0125 und 0.025 mg Microcystin-LR/kg KG einmal wöchentlich i.p. während 14 Monaten verabreicht, ohne vorherige Gabe eines Tumorinitiators. Die Inzidenz von Leberadenomen und Adenocarcinomen nahm dosisabhängig zu (2+1 von 25, 5+5 von 22, 2+15 von 22 Tieren*). Bei Verabreichung von [D-Asp³-(E)-Dhb⁷]microcystin-LR (Dh-LR) (gleiche Versuchsanordnung) waren die Lebertumorinzidenzen nicht erhöht. Zwei und 14 Monate nach Versuchsbeginn wurde 8-Hydroxy-2-deoxy-Guanosin (8-OHdG) in der Leber und im Plasma bestimmt. Gemäss den Autoren stimmte die Bildung von 8-OHdG 2 Monate nach Versuchsbeginn für beide Substanzen mit der Tumorinzidenz überein (Sano *et al*, 2004). *Anmerkung: Die Studie ist nur von begrenzter Aussagekraft, da Angaben fehlen zur Signifikanz der Effekte und zur Todesursache der 5 Kontrolltiere und je 8 Tiere der beiden Microcystin-LR Dosisgruppen, die vor Ablauf der 14 Monate starben. Es scheint, als seien diese Tiere bei den Tumorinzidenzen nicht mitberücksichtigt worden.

20 weiblichen Swiss Albino Mäusen wurde einmalig 0.5 mg 7,12-Dimethylbenzanthracen (DMBA) dermal und eine Woche später *Microcystis aeruginosa* Extrakt (gemäss WHO 80 mg Microcystin-YM pro Liter, was 50 mg Microcystin-LR-Äquivalenten/L entspricht) über das Trinkwasser verabreicht. Wasser und Krotonöl (Tumorpromotor) dienten als Negativ- bzw. Positivkontrollen. 52 Tage nach Verabreichung von DMBA wurde bei Tieren, denen *Microcystis* Extrakt verabreicht wurde, eine 1.6-fach erhöhte Anzahl und ein 7-fach erhöhtes Durchschnittsgewicht von Hautpapillomas (gutartigen Tumoren) beobachtet (Falconer, 1991). Die WHO erläutert, dass die Interpretation der Studie schwierig sei, da schwerwiegende Leberschäden auftraten und der Wirkmechanismus unklar sei, da Microcystine (-LR, -YR, -RR) bei Mäusen kaum in Epidermiszellen der Haut dringen (WHO 1999 bzw. Matsushima *et al*, 1990).

Männlichen C57Bl/6J Mäusen (20-60 Tiere pro Dosisgruppe) wurde dreimal im 7 Tage Intervall 5 mg Azoxymethan/kg KG i.p. verabreicht, um Foci aberranter Kolonkrypten (aberrant crypt foci) zu induzieren. 19 Tage danach erhielten die Tiere während 30 Wochen *Microcystis* Extrakt (0, 0.382 und 0.693 mg Microcystin-LR-Äquivalente/kg KG/Tag) über das Trinkwasser. Die Microcystinkongeneren konnten nicht identifiziert werden, es handelte sich gemäss HPLC und Kapillarelektrophorese weder um Microcystin-LR, -YR oder -RR. (Anmerkung: Die Berechnung der Microcystin-LR-Äquivalente ist unklar). Mäuse wurden

getötet und Blutzellen, Serumenzyme und Organe untersucht. In der höchsten Dosisgruppe war die Fläche der Foci durchschnittlich um 20% größer als in der niedrigeren Dosisgruppe, die Anzahl durch Azoxymethan induzierter Foci/Kolon blieb jedoch etwa gleich. Kolontumore wurden je bei einem Tier der niederen bzw. der höheren Microcystindosis beobachtet, sowie bei einem Kontrolltier, dem nur Azoxymethan verabreicht wurde. Bei der höheren Dosis traten in der Leber 5–10-mal mehr Foci aus weissen Blutzellen auf als in der niedrigen Dosisgruppe. Bei Verabreichung von Microcystin nahm die Serumalbuminkonzentration dosisabhängig ab und die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Serum dosisabhängig und signifikant zu. Die weiteren Serumparameter (Gesamtproteinmenge, Globulin, Alanin- sowie Aspartat-Aminotransferase, Gamma-Glutamyltransferase und Gesamt-Bilirubin) sowie die Körpergewichtszunahme blieben unverändert (Humpage *et al*, 2000).

Schwarze C57 Mäuse (insgesamt 155 Tiere) erhielten zur Tumorinitiation 2-mal 40 mg N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff/kg KG im Abstand von einer Woche, dann während rund 20 Wochen 0, 10 und 40 mg *Microcystis* Toxin/L (entspricht gemäss Autoren 0, 1.2, 4.2 mg Toxin/kg KG/Tag) über das Trinkwasser. Bei allen initiierten Tieren (mit und ohne Verabreichung von *Microcystis* Toxin) war die Mortalität ab Woche 10 stark erhöht (10-40% Überlebende in Woche 18), es wurden Adenome und Adenokarzinome im Zwölffingerdarm und lymphoide Tumore in Leber, Thymus und Milz beobachtet. Die Verabreichung von *Microcystis* Extrakt führte nicht zu einer Tumorpromotion. Bei beiden Dosisgruppen wurde eine signifikante Zunahme der Sorbitol-Dehydrogenase- und Alanin-Aminotransferase-Aktivität im Serum nachgewiesen (Falconer & Humpage, 1996).

Ratten

18 männliche Fischer 344 Ratten erhielten während 10 Wochen zweimal pro Woche i.p. 0.025 mg Microcystin-LR/kg KG. Nur bei Tieren, die zuvor Diethylnitrosamin (DEN, Lebertumorinitiator) erhalten hatten, waren Fläche und Anzahl der Leberzellfoci (Glutathion S-Transferase placental-form positive liver cell foci) erhöht (Ohta *et al*, 1994).

Männlichen Fischer 344 Ratten wurde einmalig 0.5 mg Aflatoxin B1/kg KG oder 200 mg Diethylnitrosamin/kg KG (Lebertumorinitiatoren) i.p. verabreicht, 2 Wochen später 0.001 oder 0.01 mg Microcystin-LR/kg KG i.p. zweimal/Woche während 6 Wochen. Bei Verabreichung von Microcystin-LR ohne Initiator war die Anzahl an Leberzellfoci

(Glutathion S-Transferase placental-form positive liver cell foci) nicht erhöht. Bei vorheriger Verabreichung von Aflatoxin B1 führten beide Microcystin-LR Dosen bzw. bei Diethylnitrosamin die höhere Dosis zu einer signifikant erhöhten Anzahl und grösseren Fläche der Leberzellfoci (Sekijima *et al*, 1999).

Fischer F344 Ratten wurden mit 0.2 mg Diethylnitrosamin/kg KG i.p. initiiert, zweimal 0.001 bzw. 0.01 mg Microcystin-LR/kg KG i.p. verabreicht und partiell hepatektomiert (um durch Stimulation der Zellteilung die Sensitivität des Tests zu erhöhen). In zwei separaten Experimenten wurden anschliessend während 8 Wochen zweimal wöchentlich 0.001 und 0.01 bzw. 0.01, 0.025 und 0.05 mg Microcystin-LR/kg KG i.p. verabreicht. Ab 0.01 mg/kg KG wurde dosisabhängig eine bis zu 3-fache Erhöhung der Anzahl und eine bis zu 11-fache Vergrösserung der Fläche von Leberzellfoci (Glutathion S-Transferase placental-form positive liver cell foci; GST-P) beobachtet. Wurde nur Microcystin-LR ohne Diethylnitrosamin verabreicht, wurden keine Leberzellfoci induziert. Der NOEL lag bei 0.001 mg/kg KG. Nach Verabreichung von 0.01 mg Microcystin-LR/kg KG vor bzw. 0.05 mg/kg KG nach partieller Hepatektomie wurden makroskopisch sichtbare neoplastische Knötchen beobachtet (Nishiwaki-Matsushima *et al*, 1992).

Mittels DNA-Microarray wurde eine erhöhte Transkription der Glutathion-S-Transferase Gene in der Leber männlicher Wistar Ratten nachgewiesen, denen einmalig 0.05 mg Microcystin-LR/kg KG i.p. verabreicht worden war. Es wurden keine histopathologischen Veränderungen in Hepatozyten und keine erhöhten Leberenzymaktivitäten im Serum beobachtet (Bulera *et al*, 2001).

Sprague-Dawley Ratten (keine Angabe zur Anzahl der Tiere) wurde einmalig DEN i.p. verabreicht und 2 Wochen später Microcystin-LR während 7 Wochen (0.01, 0.04 und 0.08 mg/kg KG/Tag per Gavage oder 3-mal wöchentlich 0.01 mg/kg KG i.p.). 3 Wochen nach Beginn der Microcystingabe wurden die Tiere partiell hepatektomiert. Am Ende der Behandlung waren bei 0.08 mg/kg KG oral und bei 0.01 mg/kg KG i.p. GST-P-positive Foci erhöht (Charbonneau *et al.*, 2004 unveröffentlichte Daten; zitiert in Dietrich & Hoeger, 2005). *Anmerkung:* Ohne nähere Angaben zur Grösse der Dosisgruppen und zu den Effekten ist die Studie von beschränkter Aussagekraft.

2.4 GENOTOXIZITÄT

Tabelle 3 und 4 geben eine Übersicht über Genotoxizitätstests, die mit Microcystin-LR bzw. mit Microcystin-haltigen Cyanobakterienextrakten durchgeführt wurden.

In einer *in vivo* Studie an Mäusen traten in der Leber zeit- und dosisabhängige DNA-Strangbrüche nach einmaliger Verabreichung einer hohen i.p. Dosis Microcystin-LR (21.5-86 µg/kg KG = 0.5–2-fache LD₅₀) auf (Rao & Bhattacharya, 1996). In einer Studie an Ratten wurde nach Verabreichung einer einmaligen i.p. Dosis von 50 µg Microcystin-LR/kg KG (≈40% der LD₅₀) signifikant mehr 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosin in der Leber gebildet, was auf oxidative DNA-Schäden hinweist (Maatouk *et al*, 2004).

In vitro war Microcystin-LR nicht mutagen im Ames-Test (+/- S9-Mix) mit *S. typhimurium* (Ding *et al.*, 1999, Tsuji *et al.*, 1997, Tsuji *et al.*, 1995), stimulierte hingegen bei *E. coli* die DNA-Reparatur (Mankiewicz *et al*, 2002). Extrakte von *Microcystis aeruginosa* und anderen Cyanobakterien waren im Ames Test in einer Studie positiv (Ding *et al*, 1999), in zwei anderen Studien negativ (Repavich *et al*, 1990, Runnegar & Falconer, 1982). In Genotoxizitätstests mit Säugerzellen (Hepatozyten und Embryo-Fibroblasten bei Mäusen, Rattenhepatozyten, Ovar- und Nierenzellen bei Hamstern, Lymphozyten und Hepatomazellen beim Menschen) zeigten sich bei Microcystin-LR und Cyanobakterienextrakte mehrheitlich positive Resultate (siehe Tab. 3 und Tab. 4). Die meisten Tests wurden mit hohen Dosen durchgeführt, bei denen Apoptose und/oder Zytotoxizität beobachtet wurde. Neueste Genotoxizitätstests mit Rattenhepatozyten und humanen Hepatomazellen zeigen allerdings auch DNA-Schäden bei geringen Konzentrationen, als nicht-zytotoxisch bezeichnet, auf und weisen einen Zusammenhang mit oxidativem Stress hin (Zegura *et al*, 2003, Zegura *et al*, 2004, Maatouk *et al*, 2004).

Tab. 3. Genotoxizitätsstudien mit Microcystin-LR

Testsystem	Dosis bzw. Konzentration	Resultat	Literatur
<i>In vitro</i>			
- Bakterien:			
<i>S. typhimurium</i> TA-97, TA-98, TA-100, TA-102 ; mit und ohne S9	2.5 µg/ml	Negativ	Ding <i>et al</i> , 1999
<i>S. typhimurium</i> TA-98, TA-100; mit und ohne S9	Bis 20 bzw. bis 50 µg. (keine Angabe ob pro ml oder pro Agarplatte)	Negativ	Tsuji <i>et al</i> , 1997; Tsuji <i>et al</i> , 1995

<i>E. coli</i> PQ37, SOS-Chromotest	1-10 µM (entspricht 1-10 µg/ml)	Positiv. Stimulation des SOS-Reparatur-systems bei 8-10 µM. Toxizität: (unklar. Erniedrigte Phosphatase Aktivität, erhöhte beta-Galaktose Aktivität)	Mankiewicz <i>et al.</i> , 2002
- <i>Maus</i> :			
Männl. C3H/HeJ Maus, primäre Hepatozyten. (Untersucht: Zellproliferation, DNA- Synthese, DNA- Gehalt/Zelle, Zelltod)	Einmalig 1-10 nM (entspricht 0.001- 0.01 µg/ml) bzw. 3 „Dosen“ 0.01-100 nM (d.h. neues Medium nach 0, 22 und 46 Std.), Messungen nach 65 Std.	Positiv <i>Einmalig</i> : Signifikant erhöhte Zellzahl und totaler DNA-Gehalt (nicht aber DNA/Zelle). 50% tote Zellen bei 10 nM. <i>Dreimalig</i> : Signifikant erhöhte Zellzahl bei 0.01- 0.1 nM. Im Gegensatz zu einmalig 10 nM war bei 3x 10 nM Mortalität nicht erhöht (keine Angabe, ab wann zytotoxisch)	Humpage & Falconer, 1999
Maus Embryofibroblasten Zellkulturen (MEF)	1 µg/ml, 1 bzw. 3 Std. Exposition	Positiv. Signifikant erhöhte DNA-Fragmentation (50-60% versus 18% bei Kontrollen) Zytotoxizität: vorhanden (60 bzw. 40% überlebende Zellen nach 1 bzw. 3 Std. Expositionen versus 85% bei Kontrolle)	Rao <i>et al.</i> , 1998
- <i>Ratte</i> :			
Primäre Ratten- hepatozyten (keine Angabe des Rattenstammes), Comet-Assay (Einzelzell- gelelektrophorese)	1 µg/ml	Positiv. DNA-Schäden bei rund 40% der Zellen. Toxizität: morphologische Zellveränderungen (unregelmässige und raue Zellkernoberfläche, geschrumpfte Zellen)	Ding <i>et al.</i> , 1999
Primäre Rattenhepatozyten (Sprague-Dawley), oxidative DNA-Schäden	0.002 und 0.01 µg/ml	Positiv. Dosis- und zeitabhängige Bildung von 8- oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosin Toxizität: Keine morphologisch ersichtlichen Anzeichen von Zytotoxizität (aber keine weiteren Tests durchgeführt)	Maatouk <i>et al.</i> , 2004
Primäre Rattenhepatozyten (Sprague-Dawley), DNA-Replikation	0.001-10 µg/ml	Negativ. Keine Inhibition der DNA-Replikation. Toxizität: 75% intakte Zellen bei Inkubation mit 1 µg/ml. Intrazelluläre Konzentration von 1 µM (= 1 µg/ml) führte gemäss Berechnungen der Autoren zu Apoptose in 50% der Zellen.	Mellgren <i>et al.</i> , 1993
- <i>Hamster</i> :			
Chinesische Hamster Ovarialzellen (CHO-K1) (Untersucht: Zellzyklus, Anaphase, Chromosomensegregatio n durch mitotischen Spindelapparat, Apoptose)	25-100 µg/ml während 14, 18 oder 22 Std.	Dosis- und zeitabhängige Erhöhung des Mitoseindex, vermehrt abnormales G(2)/M- Verhältnis mit hyperkondensierten Chromosomen, abnorme Anaphase mit fehlerhafter Chromosomenverteilung und polyploide Zellen. Die meisten mitotischen Zellen zeigten monopolare und multipolare Spindeln (multipolare Asterne), zudem waren Mikrotubulibündel in Interphasezellen vorhanden. Toxizität: Anzahl toter Zellen korrelierte positiv mit Anzahl polyploider Zellen. Die Resultate weisen gemäss Autoren darauf hin, dass Microcystin-LR dosis- and zeitabhängig Apoptose und Nekrose induziert.	Lankoff <i>et al.</i> , 2003
BHK-21 (Baby Hamster Kidney) Zellkulturen	1 µg/ml, 1- und 3stündige Exposition	Positiv. DNA-Fragmentation (50-70% versus 20% bei Kontrollen) Zytotoxizität vorhanden (40 bzw. 2% überlebende Zellen nach 1 bzw. 3 Std. Exposition versus 80% bei Kontrollen).	Rao <i>et al.</i> , 1998

- Mensch:			
Humane Lymphozyten, alkalischer Comet Assay	0.25-4 µg/ml	Positiv. DNA-Brüche DNA-Brüche waren zeitabhängig mit einem Maximum bei 12-18stündiger Exposition, keine Angabe ob signifikant. Toxizität: Keine Angabe	Mankiewicz <i>et al</i> , 2002
Humane Lymphozyten (peripheres Blut), alkalischer Comet Assay, Chromosomenaberrationen	1, 10, 25 µg/ml für 6, 12, 18 und 24 Std.	- Positiver Comet Assay: Zeitabhängige DNA-Schäden. - Negativ bezügl. Chromosomenaberration Toxizität: Dosis- und zeitabhängige Zunahme apoptotischer Zellen ab geringster Dosis und kürzester Inkubationszeit (Messungen mit TUNEL Methode und Comet Assay) Die Resultate weisen darauf hin, dass DNA-Schäden eher auf Zytotoxizität als auf Genotoxizität zurückzuführen sind.	Lankoff <i>et al</i> , 2004
Humane Lymphozyten (peripheres Blut), DNA-Reparatur	1 µg/ml für 4 Std., dann mit 2 Gy bestrahlt (einzige getestete Microcystin-LR-Konzentration und Zeit)	Positiv. Microcystin-LR verlangsamte/inhibierte die Reparatur von DNA-Schäden, die durch Bestrahlung verursacht worden waren. (Kontrollen: DNA-Reparatur wurde induziert durch Bestrahlung (ohne Microcystin-LR), kein Hinweis auf DNA-Reparatur bei Inkubation mit Microcystin-LR (ohne Bestrahlung)). Toxizität: keine Angabe für diesen Test. In der gleichen Publikation (siehe obige Zeile, Comet Assay) wurde dosisabhängige Zunahme apoptotischer Zellen ab 1 µg/ml beschrieben)	Lankoff <i>et al</i> , 2004
Humane Hepatomazelllinie HepG2	0.01-1 µg/ml	Positiv. Zeit- und dosisabhängige DNA-Strangbrüche. Transiente Effekte mit Maximum nach 4 Std. Exposition. Toxizität: nicht zytotoxisch bei getesteten Konzentrationen (Bestimmung der optischen Dichte nach Behandlung mit MTT)	Zegura <i>et al</i> , 2003
Humane Hepatomazelllinie HepG2, Comet Assay	0.01, 0.1 und 1 µg/ml für 4, 8 und 12 Std.	Positiv. Dosisabhängige DNA-Strangbrüche ab geringster Konzentration bei 4 Std. Exposition. Bei 8- und 12 Std. Exposition nur signifikant mehr DNA-Schäden im Vergleich zur Kontrolle, wenn DNA-Reparatur-Inhibitoren AraC/HU (=beta-D-Arabinofuranosid Hydrochlorid) und HU (Hydroxyharnstoff) zugegeben wurden. Weist darauf hin, dass Microcystin-LR verursachte DNA-Schäden effizient repariert werden. Zeit- und dosisabhängige Zunahme intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Toxizität: Vermutlich nicht bestimmt. Autoren verweisen auf Zegura <i>et al</i> . 2003.	Zegura <i>et al</i> , 2004
Humane lymphoblastoide Zelllinie TK6	20-80 µg/ml, 4 bzw. 24 Std. Behandlung	Positiv nach 24 Std. Behandlung: klastogen, LOH (Loss of heterozygosity), d.h. grössere genetische Veränderungen als Punktmutationen. Negativ nach 4 Std. Standardbehandlung. Zytotoxizität: 2 Parameter gemessen: RS (relativer Ausplattierungserfolg direkt nach Exposition) und RSG (rel. Zellwachstum 3 Tage nach Exposition). - 4 Std. Behandlung: nicht signifikant zytotoxisch bis 80 µg/ml - 24 Std. Behandlung: dosisabhängig zytotoxisch ab 20 µg/ml. RSG signifikant, RS tendenziell (nicht-signifikant). Nur genotoxische Effekte bei zytotoxischen Konzentrationen	Zhan <i>et al</i> , 2004

Humane RSa Zelllinie (=humane Embryo-fibroblasten, infiziert mit Simian Virus 40 und Rous Sarkomavirus)	7.5-15 µg/ml	Positiv ab 7.5 µg/ml: Ouabain-Resistenz-Mutationen und Basensubstitutionsmutationen am K-ras Codon 12. Toxizität: 80% bzw. 35% überlebende Zellen bei 10 bzw. 15 µg/ml.	Suzuki <i>et al</i> , 1998
In vivo			
Männl. Swiss Albino Maus, Hepatozyten (keine Angabe der Gruppengröße)	21.5, 43, 86 µg/kg KG i.p. (=0.5, 1 und 2-mal LD50)	Positiv. Zeit- und dosisabhängige DNA-Strangbrüche ab geringster Dosis. Toxizität: Tiere starben i.d.R. innerhalb 120-150 Min. nach Verabreichung. Tiere wurden nach 60 Min. (Dosisabhängigkeits-Studie) getötet, bzw. nach 0, 15, 30, 60, 90, 120 Min. (Zeitabhängigkeits-Studie)	Rao & Bhattacharya, 1996
Männl. Sprague-Dawley Ratten (n=4), oxidative DNA-Schäden	50 µg/kg KG i.p. (=ca. 40% der LD50)	Positiv. Signifikante Zunahme von 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in Leber-DNA 24 und 48 Std. nach Verabreichung (Maximum nach 24 Std.)	Maatouk <i>et al</i> , 2004

Tab. 4. Genotoxizitätsstudien mit Cyanobakterienextrakten

Extrakt/Toxin	Testsystem	Dosis bzw. Konzentration	Resultat	Referenz
In vitro				
- Bakterien				
<i>Microcystis</i> Extrakt (hauptsächlich Microcystin-LR)	<i>S. typhimurium</i> TA-97, TA-98, TA-100, TA-102 (mit und ohne S9)	1.25-125 µg lyophil. Algen/ml	Positiv ab 12.5 µg/ml (dosisabhängig)	Ding <i>et al</i> , 1999
Cyanobakterien-Extrakte (<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Gloetrichia</i>) und gereinigtes Hepatotoxin*	<i>S. typhimurium</i> TA-98, TA-100, TA-102 (mit und ohne S9)	0.9 mg Hepatotoxin/ml (Positiv im i.p. Maus Bioassay)	Negativ	Repavich <i>et al</i> , 1990
Gereinigtes Hepatotoxin (Peptid) aus <i>Microcystis</i>	<i>S. typhimurium</i> TA-98 und TA-100 (mit und ohne S9)	0.2-20 µg Toxin/Platte	Negativ	Runnegar & Falconer, 1982
Cyanobakterien-Extrakte (<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Gloetrichia</i>) und gereinigtes Hepatotoxin*	<i>Bacillus subtilis</i> Multigen-Sporulationstest; Stämme 168 und hcr-9	0.9 mg Hepatotoxin/ml (Positiv im i.p. Maus Bioassay)	Negativ	Repavich <i>et al</i> , 1990
Cyanobakterien Extrakt (hauptsächlich <i>Microcystis aeruginosa</i>) und Microcystin-LR als Standard	SOS Chromotest mit <i>E. coli</i> PQ37	2-100 mg Cyano-bakterien/ml	Stimulation des SOS DNA-Reparatursystems (Konzentrationsangabe schwierig)	Mankiewicz <i>et al</i> , 2002
- Maus				
<i>Microcystis aeruginosa</i> Extrakt	MEF (Mouse Embryo Fibroblast) Zellen	100 µg Toxin/ml	DNA-Fragmentation bei vorhandener Zytotoxizität	Rao <i>et al</i> , 1998
- Ratte				
<i>Microcystis</i> Extrakt (hauptsächlich Microcystin-LR)	Primäre Ratten-Hepatozyten. Comet Assay (Einzelzell-Gelelektrophorese)	1.25-125 µg lyophil. Algen/ml	Positiv. Dosisabhängige DNA-Schäden bei rund 40% der Zellen.	Ding <i>et al</i> , 1999

Cyanobakterien Extrakt (Microcystin-LR, -RR, -YR, -WR)	Primäre Ratten-Hepatozyten	0.05-1 µM MC-LR, (entspricht 0.1-2.7 µM MC-LR Äquivalenten, wenn alle Kongenere betrachtet) 0.5-2 Std. Inkubation	DNA-Fragmentation, Kondensation von Chromatin als typisches Apoptosezeichen. <i>Anmerkung:</i> Negativkontrolle fehlt.	Mankiewicz <i>et al</i> , 2001
<i>- Hamster</i>				
<i>Microcystis aeruginosa</i> Extrakt	2stufiger Transformationsassay mit Syrischen Hamster Embryo (SHE) Zellen (Initiator Methylcholanthren, Promoter 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-Acetat (TPA))	Keine Angabe	Negativ bezügl. Initiation Positiv bezügl. Promotion	Wang & Zhu, 1996
<i>Microcystis aeruginosa</i> Extrakt	BHK-21 (Baby Hamster Kidney)	100 µg Toxin/ml	DNA-Fragmentation bei leichter Zytotoxizität	Rao <i>et al</i> , 1998
<i>- Mensch</i>				
Gereinigtes Hepatoxin*	Humane Lymphozyten	0.009-0.9 µg Toxin/ml	Positiv (dosisabhängige Chromosomenbrüche)	Repavich <i>et al</i> , 1990
Cyanobakterien Extrakt (hauptsächlich <i>Microcystis aeruginosa</i>)	Humane Lymphozyten, Comet Assay	Extrakte mit 0.25-1 µM Microcystinen	DNA-Brüche (zeitabhängig) Bei 24stündiger Inkubation apoptotische Lymphozyten mit schwerwiegender DNA-Fragmentation	Mankiewicz <i>et al</i> , 2002
Cyanobakterien Extrakt (Microcystin-LR, -RR, -YR, -WR)	Humane Lymphozyten (peripheres Blut)	0.25-1 µM MC-LR, (entspricht 0.7-2.7 µM MC-LR Äquivalenten, wenn alle Kongenere betrachtet) 24 oder 48 Std. Inkubation	DNA-Fragmentation und Kondensation von Chromatin als typisches Apoptosezeichen, gemäss Autoren ab 0.75 µM MC-LR, 48 Std., <i>(Anmerkung:</i> Negativkontrolle fehlt)	Mankiewicz <i>et al</i> , 2001
<i>In vivo</i>				
<i>Microcystis</i> Extrakt (hauptsächl. Microcystin-LR)	Maus-Micronukleustest	1-100 mg lyophil. Algen/kg KG	Positiv. Dosisabhängige Chromosomenschäden ab geringster Dosis	Ding <i>et al</i> , 1999
<i>Microcystis aeruginosa</i> Extrakt (UTEX 2385)	Maus Leber (männl. Swiss albino Maus)	32.7, 65.4, 130.8 mg Toxin/kg KG i.p. (=0.5, 1 und 2-mal LD ₅₀)	DNA-Fragmentation	Rao <i>et al</i> , 1998

*Aus der Publikation geht nicht klar hervor, ob Microcystin gemeint ist.

2.5 REPRODUKTIONSTOXIZITÄT

Es sind keine Mehrgenerationenstudien an Nagern vorhanden.

Mäuse

Gruppen von 26 weiblichen Mäusen wurde 0, 0.2, 0.6 oder 2 mg/kg KG/Tag Microcystin-LR oral (per Gavage) vom Trächtigkeitstag 6 bis 15 verabreicht. Am Trächtigkeitstag 18 wurden die Muttertiere getötet und untersucht. Bei der höchsten Dosisgruppe war die Mortalität der Muttertiere erhöht, das Gewicht der Feten verringert und die Skelettverknöcherung verzögert. Microcystin-LR hatte bei den Feten keinen Einfluss auf Mortalität, Geschlechterverhältnis, Anzahl Implantationen, Postimplantationsverluste und auf viszerale und Skelettabnormitäten. Der NOAEL für Maternotoxizität und Fetotoxizität war 0.6 mg/kg KG/Tag (WHO 1999 bzw. Fawell *et al.*, 1999).

8 weibliche und 2 männliche Mäuse erhielten 1/4 verdünnten *Microcystis aeruginosa* Extrakt über das Trinkwasser (vermutlich äquivalent 3 mg Microcystin/kg KG/Tag - siehe Anmerkung zu Falconer *et al.* 1988 im Kapitel 2.2 Subchronische Toxizität) von der Entwöhnung (3. Lebenswoche) bis zur Verpaarung in der 20. Lebenswoche. Die Fertilität, das Geschlechter-verhältnis und das Gewicht der Neugeborenen war nicht verändert. Bei 7 von 73 Neugeborenen wurden eine reduzierte Hirngrösse und Veränderungen im Hippocampus gegenüber 0 von 67 Kontrolltieren beobachtet (Falconer *et al.*, 1988).

Trächtigen Mäusen wurde an zwei aufeinander folgenden Tagen vom Trächtigkeitstag 7-8, 9-10 bzw. 11-12 0.002-0.128 mg Microcystin-LR/kg KG i.p. verabreicht. Am 17. Trächtigkeitstag wurden die Muttertiere getötet und die Feten auf Anomalien untersucht. Ein Teil der Muttertiere der Dosisgruppen ab 0.032 mg/kg KG wurden am Leben gelassen und ihre Nachkommen untersucht. Microcystin-LR war nicht teratogen und es waren keine Hinweise auf reproduktionstoxische Effekte ersichtlich (Chernoff *et al.*, 2002).

In vitro Experimente

Mausembryokulturen im Neurulationsstadium wurden während 24 Std. *in vitro* mit 50-1000 nM Microcystin-LR behandelt. Dabei wurden mehr Abnormitäten (nicht signifikant) beobachtet, die Entwicklung verlief ohne Verzögerung (Chernoff *et al.*, 2002).

Embryos und Embryozellkulturen von Kaninchen wurden *in vitro* mit 10-100 µM Microcystin-LR behandelt. Es wurden keine Effekte auf Grösse, Entwicklung und

Zytoskelett-organisation des in die zona pellucida eingebetteten Embryos gefunden. Bei Embryozell-kulturen führten 10-20 μM zu veränderter Aktin- und Mikrotubuliorganisation, 100 μM zur Loslösung und Zerstörung von Zellen (Frangez *et al*, 2003).

2.6 IMMUNOTOXIZITÄT

Die i.p. Verabreichung von *Microcystis* Extrakt in subletalen Dosen von 16, 32 bzw. 64 mg lyophilisierten Algenzellen/kg KG (0.005, 0.010, 0.020 mg Microcystin-Äquivalente/kg KG, berechnet gemäss LD_{50} des Extraktes) während 14 Tagen führte zu Immunsuppression bei BALB/c Mäusen. Das relative Milzgewicht war bei der mittleren Dosis signifikant vergrössert und bei der höchsten Dosis signifikant verringert im Vergleich zu Kontrolltieren. Das relative Thymusgewicht war bei der höchsten Dosis signifikant verringert. Die durch Lipopolysaccharide induzierte Proliferation von B-Lymphozyten war ab der geringsten Dosis verringert, die durch Concanavalin induzierte Proliferation von T-Lymphozyten blieb unverändert. Der Allgemeinzustand der behandelten Tiere war beeinträchtigt, sie waren inaktiv, die Körpergewichtszunahme reduziert, die Leber vergrössert und es traten Leberblutungen auf. Wurden die Mäuse mit Schafserythrozyten (sRBC) immunisiert, war ab der mittleren Dosis die Umwandlung der B-Zellen in antikörper-bildende Plasmazellen signifikant beeinträchtigt (Shen *et al*, 2003).

3 TOXIKOLOGIE VON METABOLITEN

In Ratten und Mäusen (Leber) vorkommende Metaboliten:

Microcystin-LR und -YR waren bei männlichen Mäusen nach i.v. Verabreichung akut ca. 2–20-mal toxischer als die entsprechend synthetisierten Konjugate mit Glutathion und Cystein. Die i.v. LD_{50} -Werte für Microcystin-LR und dessen Glutathion- und Cystein-Konjugate lagen bei Mäusen bei 0.04, 0.63, 0.27 mg/kg KG. Die i.v. LD_{50} -Werte für Microcystin-YR, Glutathion- und Cystein-Konjugate bei Mäusen lagen bei 0.09, 0.30 bzw. 0.22 mg/kg KG (Kondo *et al*, 1992).

Bei der Trinkwasseraufbereitung durch Ozonierung und Chlorierung entstehende Metaboliten:

Microcystin-LR wurde durch Chlorierung mit Natriumhypochlorit rasch zu vielen Metaboliten umgewandelt, wobei u. a. durch Anlagerung von zwei Chloratomen an die konjugierten Doppelbindungen der ADDA-Aminosäure und anschliessender Hydrolyse

Dihydroxymicrocystin gebildet wurde. Tsuji *et al.* (1997) vermuten, dass es sich bei den weiteren Metaboliten um dessen Stereoisomere und/oder Regioisomere handelt. Sie untersuchten die Reaktionsprodukte auf akute Toxizität, Mutagenität und Inhibition der Proteinphosphatase. Bei Mäusen war die akute Toxizität nach i.p. Verabreichung der Reaktionsprodukte bei 3 bzw. 24-stündiger Chlorierung reduziert (LD₅₀ i.p. Maus 0.05, >1 bzw. >3 mg/kg KG für Microcystin-LR, Metaboliten nach 3 Std. bzw. nach 24 Std. Chlorierung; keine Angabe zu Dihydroxymicrocystin). Die Inhibierung der Proteinphosphatase 2A war ebenfalls reduziert (IC₅₀ 8 µg/L für Dihydroxymicrocystin bzw. 700 µg/L für einen nicht weiter definierten Metaboliten versus 0.05 µg/L für Microcystin-LR). Die Reaktionsprodukte waren nicht mutagen im Ames Test mit *S. typhimurium* TA98 und TA100 ohne S9 bis 20 µg. (*Anmerkung:* Es fehlt die Angabe, ob die 20 µg pro Platte oder pro ml sind) (Tsuji *et al.*, 1997).

Microcystin-LR (keine Konzentrationsangabe) wurde in einem Laborversuch mit 0.5 mg/L Ozon behandelt bis kein Ozon mehr messbar war. Im Proteinphosphataseinhibitionsassay zeigte eine HPLC-Fraktion mit ähnlicher Retentionszeit wie die Ausgangsverbindung ebenfalls inhibierende Wirkung auf die Proteinphosphatasen 1 und 2A. (Hoeger *et al.*, 2000). *Anmerkung:* Die Substanz konnte bisher nicht rein isoliert werden (persönliche Mitteilung D. Dietrich, 2004).

Wurden 10 µg/L Microcystin-LR mit 0.5, 1 bzw. 1.5 mg/L Ozon behandelt, war direkt bzw. 60 Min. nach Ozonierung praktisch keine Proteinphosphatase-inhibierende Wirkung mehr vorhanden (90-100% Aktivität vorhanden versus 60-70% vor Ozonierung). Wurde das analoge Experiment mit *Microcystis aeruginosa* Extrakt (50000 Zellen/ml) durchgeführt, lagen die Proteinphosphatase-Aktivitäten bei rund 0.5, 40-80 bzw. 80-90% vor, unmittelbar nach, bzw. 60 Min. nach Ozonierung (Hoeger *et al.*, 2002). *Anmerkung:* Aus dem Artikel geht nicht hervor, ob die inhibierende Wirkung nach Ozonierung auf eine verbleibende Menge der Ausgangsverbindung oder auf Ozonolyse-Produkte zurückzuführen ist.

Gemäss Hitzfeld *et al.* (2000) und Höger *et al.* (2002) wurden bisher weder Struktur noch Toxizität von Ozonolyse-Produkten untersucht.

Microcystine wurden in Anwesenheit von Cyanobakterienpigmenten rasch durch Sonnenlicht abgebaut zu 6(Z)-Adda-Microcystin-LR und weiteren Isomeren. Zwei der Metaboliten, 6(Z)-Adda-Microcystin und 4(Z)-Adda-Microcystin, waren akut weniger toxisch als die Ausgangsverbindung (LD₅₀ i.p. Maus >1.5 mg/kg KG für beide Metabolite, 0.05 mg/kg KG

für Microcystin-LR) und sie inhibierten die Proteinphosphatase 2A weniger stark (IC_{50} 5000 $\mu\text{g/L}$ versus 0.05 $\mu\text{g/L}$). Die Ausgangsverbindung und die untersuchten zwei Photometaboliten waren nicht mutagen im Ames Test mit *S. typh.* TA98 und TA100 mit und ohne metabolische Aktivierung bei Dosen bis zu 50 μg (keine Angabe, ob 50 $\mu\text{g/ml}$ oder pro Agarplatte) (Tsuji *et al.*, 1995).

4 MECHANISTISCHE STUDIEN: AUSWIRKUNGEN AUF ZYTOSKELETT, MITOTISCHE ZELLTEILUNG, APOPTOSE UND OXIDATIVEN STRESS

Der Mechanismus der durch Microcystin-LR induzierten Hepatotoxizität und Tumorpromotion ist nicht vollständig aufgeklärt. Eine Vielzahl von Publikationen, zusammengefasst in den Übersichtsartikeln von Gehringer (2004) und Ding & Nam (2003), behandelt Auswirkungen von Microcystin-LR auf Zytoskelett, mitotische Zellteilung, Apoptose und oxidativen Stress.

Auswirkungen auf das Zytoskelett

Ratten Hepatozyten, Nierenzellen und Hautfibroblasten wurden während maximal einer Stunde mit 13.3 μM Microcystin-LR inkubiert und Effekte auf das Zytoskelett untersucht. Bei allen Zelltypen kondensierten und kollabierten Intermediärfilamente (Vimentin und Zytokeratin), Mikrofilamente und Mikrotubuli (Khan *et al.*, 1996).

Ratten Nierenepithelzellen und Fibroblasten wurden während 6-18 Std. mit 100 oder 200 μM Microcystin-LR inkubiert, Ratten Hepatozyten während maximal einer Std. mit 1 oder 10 μM Microcystin-LR. Bei Fibroblasten und einigen Hepatozyten wurden Veränderungen des Zytoskelettes beobachtet, die eingeleitet wurden durch Desorganisation der Intermediärfilamente und Mikrotubuli, gefolgt von einem raschen Zusammenbruch von Zytoskelettkomponenten um den Zellkern herum. Später wurden auch Mikrofilamente verändert, indem Aktin aggregierte, kondensierte und kollabierte. Die Autoren folgerten aus den ähnlichen Effekten bei verschiedenen Zelltypen auf einen gemeinsamen Wirkmechanismus und postulieren, dass vermutlich mindestens zwei verschiedene Phosphorylierungsstellen betroffen sind, da die Kinetik des Auseinanderfallens der Intermediärfilamente und der Mikrotubuli unterschiedlich ist (Wickstrom *et al.*, 1995).

Desmosomen, die Verbindungen zwischen benachbarten Zellen herstellen, sind über Desmoplakin I und II mit Keratinfilamenten in Epithelzellen verbunden. 1 μM Microcystin-LR führte nach 12 Min. bei primären Rattenhepatozyten durch Schädigung von Desmoplakin I und II zum Auseinanderfallen von Desmosomen, gefolgt von einer Umorganisation von Mikro- und Intermediärfilamenten, wobei sich letztere um einen Kern aus Aktin konzentrierten. Es wurde gezeigt, dass Microcystin-LR zur Hyperphosphorylierung von Keratin 8 und 18 (bilden als Heterodimere die Grundstrukturen der Keratin-Intermediärfilamente) und von Desmoplakin I und II führt. Ursache dafür ist möglicherweise die Hemmung der Proteinphosphatasen 1 und 2A (Toivola *et al*, 1997).

Keratin 8 und 18 in primären Ratten-Hepatozyten wurden durch 1 μM Microcystin-LR hyperphosphoryliert (Ohta *et al*, 1994).

0.05-0.5 μM Microcystin inhibierte in Ratten-Hepatozyten dosisabhängig die Häufigkeit, Geschwindigkeit und Weglänge Mikrotubuli-abhängiger Vesikelbewegungen und die Aktivitäten der Proteinphosphatasen 1 und 2A. Die Mikrotubuliorganisation blieb hingegen selbst bei der höchsten Microcystin-Konzentration unverändert (Hamm-Alvarez *et al*, 1996).

Auswirkungen auf die mitotische Zellteilung

Es wird postuliert, dass Microcystine über die Hemmung der Proteinphosphatasen 1 und 2A in die Regulation von Proteinen eingreifen, die Auswirkungen auf die Ausbildung des mitotischen Spindelapparats und auf die Zellteilung haben. So werden z. B. Proteine, die für die Tubulin-Polymerisation und die Stabilität von Mikrotubuli verantwortlich sind, durch De-/Phosphorylierung reguliert. Das Tumorsupressorprotein p53 ist ebenfalls Substrat der Proteinphosphatasen 1 und 2A (Lankoff *et al*, 2003).

Chinesische Hamster Ovarialzellen (CHO-K1) wurden mit 0, 25, 50 und 100 μM Microcystin-LR und mit Cyanobakterienextrakten während 14, 18 oder 22 Std. inkubiert und Effekte auf Zellzyklus, Beginn der Anaphase, Chromosomensegregation durch den mitotischen Spindelapparat und Apoptose untersucht. Es wurde eine dosis- und zeitabhängige Erhöhung des Mitoseindex, ein vermehrt abnormales G(2)/M-Verhältnis mit hyperkondensierten Chromosomen, eine abnorme Anaphase mit fehlerhafter Chromosomenverteilung und polyploiden Zellen beobachtet. Die meisten mitotischen Zellen zeigten mono- und multipolare Spindeln (multipolare Astern), zudem waren Mikrotubulibündel in Interphasezellen vorhanden. Die Anzahl toter Zellen korrelierte positiv

mit der Anzahl polyploider Zellen. Die Resultate weisen gemäss Autoren darauf hin, dass Microcystin-LR dosis- und zeitabhängig Apoptose und Nekrose induziert (Lankoff *et al*, 2003).

Bei mit *Microcystis* Extrakt inkubierten Syrischen Hamster Embryo Zellen (SHE) wurden die Transkriptionsfaktoren c-fos und c-jun während der 6-stündigen Versuchsdauer bis 6 Std. danach überexprimiert und 45% der Zellen induziert, von der ruhenden G(0)/G(1) in die S-Phase einzutreten. Die Autoren postulieren, dass durch Heraufregulierung der Transkriptionsfaktoren (Proto-Onkogene) c-fos und c-jun eine abnorme Zellproliferation verursacht wird, was zu Krebs führen kann (Zhao & Zhu, 2003, Originalartikel in Chinesisch).

Apoptose

Hohe Microcystin-LR Dosen, wie folgend genauer aufgeführt, induzierten *in vivo* bei Mäusen (Yoshida *et al*. 1998 Yoshida *et al*, 1998) und Ratten (Guzman & Solter, 1999) und *in vitro* bei Rattenhepatozyten, humanen Lymphozyten und andern Säugerzellen innerhalb weniger Minuten Apoptose (Fladmark *et al*, 1999, Fladmark *et al*, 2002, Boe *et al*, 1991, McDermott *et al*, 1998, Mankiewicz *et al*, 2001 und Übersichtsartikel [Gehring, 2004, Ding & Nam, 2003]).

in vivo

Mit immunohistochemischen Methoden wurde gezeigt, dass Microcystin-LR nach einmaliger i.p. Verabreichung von 0.02-0.1 mg/kg KG an Mäuse in den zentrilobulären Regionen in der Leber Addukte mit den Proteinphosphatasen 1 und 2A bildete. In denselben Regionen wurden auch Hämorrhagien und apoptotische Zellen gefunden, letztere waren z. T. immunopositiv (monoklonale Antikörper gegen Microcystin-LR). In der midlobulären Region der Leber, wo v. a. Nekrosen auftraten, waren alle Zellen immunonegativ und es konnten keine Microcystinaddukte nachgewiesen werden (Yoshida *et al*, 1998).

Bei i.p. Verabreichung von 0.048 mg/kg KG/Tag Microcystin-LR während 28 Tagen wurden bei Ratten (3 Tiere/Dosis) apoptotische Zellen (Apoptosekörperchen mit und ohne Chromatin) in der perizentralen (Zone 3) Region der Leber beobachtet. Bei 0.016 bzw. 0.032 mg/kg KG/Tag waren die Effekte weniger ausgeprägt (keine näheren Angaben) (Guzman & Solter, 1999).

in vitro

Microcystin-LR induzierte *in vitro* Apoptose in verschiedenen Säugerzelltypen. Bereits 0.8 μM Microcystin-LR führten in primären Rattenhepatozyten innerhalb weniger als 15 Min. zu typischen apoptotischen Effekten (Knospung der Zelloberfläche, Zellschrumpfung, Organellenumverteilung, Kondensation von Chromatin im Zellkern und teilweise Fragmentierung des Zellkerns, intakte Mitochondrien in apoptotischen Bläschen bzw. an einem Pol der Zelle). Bei den getesteten Nicht-Leberzellen (humane Fibroblasten, Endothelzellen und Promyelozyten) waren 100fach höhere Konzentrationen nötig (100 μM) und Effekte traten erst nach 6-8 Std. auf (McDermott *et al.*, 1998). *Anmerkung:* Aus dem Artikel geht nicht hervor, wie lange und auf welchem Applikationsweg Microcystin-LR verabreicht wurde. Vermutlich wurden die Zellen inkubiert, nicht mikroinjiziert. Da Nicht-Hepatozyten keinen Aufnahmemechanismus für Microcystine haben, ist eine höhere benötigte Konzentration bei Inkubation der Zellen plausibel.

2 Min. nach Zugabe von 16 μM Microcystin-LR wurden bei 50% der inkubierten primären Rattenhepatozyten Apoptose induziert. Vier Min. nach Zugabe verringerten sich Zytoplasma- und Kernvolumen um 20% und ein starkes Knospen der Zelloberfläche mit Loslösen von Apoptosekörperchen (enthielten Mitochondrien) begann. Fünfzehn Min. nach Zugabe enthielten die meisten Zellen keine Mikrovilli und kein Glykogen mehr. Nach zwei Stunden kondensierte das Chromatin im Zellkern. Für einen raschen Zelltod mussten sowohl die Proteinphosphatasen 1 als auch 2A inhibiert werden. In einem andern Experiment führte die Mikroinjektion (da nur bei Hepatozyten gute Aufnahme) von Microcystin-LR (keine Dosisangabe) innerhalb weniger Min. zu intensivem Knospen und Abrunden von Zellen bei Swiss 3T3 Fibroblasten, humanen HEK 293 Zellen und normalen Ratten Nierenzellen (NRK) (Fladmark *et al.*, 1999).

Mikroinjektion von 100-200 μM Microcystin-LR induzierte Apoptose in Rattenhepatozyten. In einem weiteren Experiment mit Rattenhepatozyten führte die Inkubation mit 1 μM Microcystin-LR zu erhöhter Proteinphosphorylierung. Wurde zusätzlich ein Inhibitor der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) zugegeben, wurde die Apoptose verhindert und die Proteinphosphorylierung war nicht erhöht. Die Autoren folgerten hieraus, dass Microcystin-LR durch Inhibition der Proteinphosphatasen 1 und 2A in einem CaMKII-abhängigen Prozess zu vermehrter Phosphorylierung von Proteinen und dadurch zu Apoptose führt (Fladmark *et al.*, 2002).

Inkubation von Rattenhepatozyten mit 0.8 μM Microcystin-LR führte zu Zellfragmentierung, kondensiertem Chromatin im Zellkern und Aggregaten aus internen Membranen an einem Pol der Zelle (Boe *et al.*, 1991).

Inkubation mit 0.0125-0.05 μM Microcystin-LR führte zu morphologischen Veränderungen in primären humanen Hepatozyten und in Rattenhepatozyten. Das Aktinnetzwerk kollabierte und aggregierte in der Zellmitte, Chromatin im Zellkern kondensierte, zudem lösten sich Zellen aus dem Zellverband und zerfielen unter Bildung von Bläschen, Fragmenten und Apoptosekörperchen. Der geschätzte EC_{50} -Wert (effective concentration) nach 6stündiger Exposition lag bei primären humanen Hepatozyten bei 0.025 μM , bei Rattenhepatozyten bei 0.05 μM (Batista *et al.*, 2003).

Auswirkungen auf oxidativen Stress und Lipidperoxidation

in vivo

Gruppen von 3 Ratten erhielten 0, 0.016, 0.032 und 0.048 mg Microcystin-LR/kg KG/Tag i.p. während 28 Tagen. Die Konzentration an Malondialdehyd nahm in der Leber ab 0.032 mg/kg KG/Tag signifikant und dosisabhängig zu und war bei der höchsten Dosisgruppe gegenüber der Kontrolle rund vierfach erhöht. Leberschnitte von mit Microcystin behandelten Ratten waren empfindlicher gegenüber dem zytotoxischen Effekt von tert-butyl Hydroperoxid (ROS generierende Substanz). Die Autoren folgerten aus den histologischen und biochemischen Befunden, dass oxidativer Stress eine signifikante Rolle bei der chronischen Toxizität von Microcystin spielt (Guzman & Solter, 1999).

8 männlichen Ratten wurde einmalig 0.05 mg/kg KG Microcystin-LR (=LD₅₀) i.p. verabreicht und der oxidative Lipidmetabolismus bis 3 Std. nach Verabreichung spektroskopisch untersucht. In der Leber behandelter Tiere wurden signifikant mehr Lipidradikale gefunden; Glutamin/Glutamat- und Laktatkonzentrationen waren signifikant erniedrigt. Signifikant erhöhte Enzymaktivitäten der Alanin-Aminotransferase und der Aspartat-Aminotransferase im Serum weisen auf Leberschädigung hin. Die Autoren folgern aus diesen Befunden, dass oxidativer Stress eine wichtige Rolle bei durch Microcystin-LR induzierter Hepatotoxizität spielt (Towner *et al.*, 2002).

in vitro

Fünfstündige Inkubation mit 0.01, 0.1 und 1 mg Microcystin-LR/ml (0.01, 0.1, 1 mM) induzierte intrazellulär reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in humanen Hepatoma HepG2

Zellen. *Anmerkung:* Die Autoren bezeichnen die getesteten Konzentrationen als nicht-zytotoxisch, verweisen aber auf Zegura et al. 2003 (Zegura *et al.*, 2004).

0.01-1 µg/ml Microcystin-LR (nicht-zytotoxische Konzentrationen) induzierte zeit- und dosisabhängig DNA-Strangbrüche in der humanen Hepatomazelllinie HepG2. Die Effekte waren vorübergehend, mit einem Maximum nach 4stündiger Exposition. Bei Zugabe der DNA-Reparatur-Inhibitoren Cytosin, Arabinosid und Hydroxyharnstoff akkumulierten DNA-Strangbrüche. In einem weiteren Experiment wurde DNA mit Endonuklease III und Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase (FPG) behandelt, die spezifisch an Stellen oxidativ modifizierter DNA-Basen zusätzliche Strangbrüche einfügen. Dabei wurden bei mit Microcystin-LR behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen vermehrt DNA-Strangbrüche beobachtet. Durch Zugabe des Hydroxylradikalfängers DMSO traten bei mit Microcystin-LR behandelten Zellen signifikant weniger DNA-Schäden auf als ohne DMSO. Die Autoren folgerten, dass Microcystin-LR die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies induziert, die dann zu DNA-Schäden führen (Zegura *et al.*, 2003).

Bei Inkubation primärer Rattenhepatozyten mit 0.002 und 0.01 µg Microcystin-LR/ml (0.002 und 0.01 µM) wurden signifikant erhöhte intrazelluläre Glutathionkonzentrationen (reduzierte Form GSH) beobachtet (transiente Erhöhung nach 3 Std., Basiswerte nach 24 und 48 Std.), es wurden reaktive Sauerstoffspezies gebildet und die Malondialdehydkonzentration war erniedrigt. Die getesteten Konzentrationen waren nicht zytotoxisch (getestet mittels MTT-Test). Die LC₅₀ betrug 0.048 µg Microcystin-LR/ml bei 24 Std. Inkubation (Bouaicha & Maatouk, 2004).

Einfluss anderer Substanzen auf Microcystin-LR induzierte Toxizität

Weiblichen Mäusen wurde einmalig 0.1 mg Microcystin-LR/kg KG i.p. (letale Dosis) zusammen mit biologisch aktiven Substanzen verabreicht, um deren Einfluss auf die durch Microcystin-LR induzierte Toxizität anhand der Mortalitätsrate, des Todeszeitpunkts und der Laktatdehydrogenase-Aktivität im Serum zu untersuchen. Membranaktive Antioxidantien wie Vitamin E, Silymarin, Glutathion und der Monoethylester des Glutathions schützten Mäuse signifikant vor Letalität. Rifampicin und Cyclosporin-A, zwei membranaktive Substanzen, die immunsuppressiv wirken und auch den Gallensäuretransport in Hepatozyten inhibieren, sowie Penicillin G unterdrückten den letalen Effekt von Microcystin-LR vollständig. Glucose verzögerte den Todeszeitpunkt signifikant. Calciumkanal-Blocker (Verapamil, Nifedipine), freie Radikal-Fänger (Allopurinol, Mannitol, Glycerin, Ethanol), und weitere Substanzen wie

z.B. Vitamin C und Dioxine hatten keinen signifikanten Einfluss auf die untersuchten Parameter (Hermansky *et al.*, 1991).

5 MICROCYSTIN-KONZENTRATIONEN IN ALGENPRODUKTEN, TRINKWASSER UND LEBENSMITTELN

Microcystin-Konzentrationen in Algenprodukten

USA und Kanada

In einer Messkampagne der Oregon Health Division wurde in 85 von 87 AFA-Algenprodukten aus dem Klamath Lake Microcystin-LR nachgewiesen, wobei 63 Proben (72%) höhere Konzentrationen als 1 µg/g aufwiesen. Die 1996-1999 untersuchten Algenproben stammten aus dem Handel bzw. direkt von den vier größten Herstellern. Einzelwerte lagen zwischen 0.04 und 18.4 µg Microcystin/g, Mittelwerte zwischen 0.4 und 10.9 µg Microcystin/g (Werte gemittelt pro Jahr und Hersteller). Die Auftrennung zweier Proben mittels HPLC und anschließender Quantifizierung im ELISA zeigte, dass mehr als 90% des Microcystins als Microcystin-LR vorlag. Gemäss Autoren stimmt dies überein mit Resultaten anderer Autoren (im Paper als „persönliche Mitteilung“ referenziert). Durchschnittliche Microcystin-LR Gehalte in 15 Spirulina Produkten, die von der Oregon Health Division 1998 und 1999 gesammelt wurden, lagen bei 0.15 bzw. 0.52 µg/g, bei einer Probe bei 2.12 µg/g (Gilroy *et al.*, 2000).

In 117 Algenprodukten (AFA, Spirulina, unidentifizierte Spezies) in Kanada wurden mittels ELISA, Proteinphosphatase-Inhibitions-Assay (PPA), LC-MS und LC-MS-MS Microcystin-Konzentrationen bestimmt. In den 50 tabellarisch aufgelisteten Produkten waren 0.1-10 µg/g und in einer Probe über 30 µg/g Microcystin enthalten. Bei dieser Probe wurden mittels LC-MS, LC-MS-MS und ELISA 25-35 µg/g und mittels PPA 49 µg/g Microcystin gemessen (jew. 1-3 Messwerte, Durchschnitt aller Messwerte = 33 µg/g Microcystin-LR und -LA). Die Autoren gehen nicht auf diesen deutlich erhöhten Wert ein. In allen positiven Proben wurde Microcystin-LR nachgewiesen und als einziges weiteres Kongener Microcystin-LA. Die Interlaborstudie (4 Laboratorien) wurde im Auftrag von Health Canada durchgeführt und zeigte eine gute Übereinstimmung der Messwerte zwischen den verschiedenen Laboratorien und bei Konzentrationen zwischen 0.5-35 µg/g. Die stark auf analytische Aspekte fokussierte Publikation gibt keine Auskunft, auf welche Algenprodukte (AFA, Spirulina, andere Spezies)

sich die Microcystin-Konzentrationen beziehen und welche Konzentrationen in den nicht tabellierten Produkten gemessen wurden (Lawrence *et al*, 2001).

1984 wurden für eine Fütterungsstudie bei Mäusen AFA-Algen aus dem Upper Klamath Lake geerntet, gewaschen und lyophilisiert, und nach rund 13 Jahren Aufbewahrung bei Raumtemperatur sechs Algenproben mittels HPLC, ELISA und PPA auf ihren Microcystin-LR-Gehalt untersucht. Es wurden 11-24.7 µg Microcystin-LR/g AFA-Alge gemessen, mit einem Durchschnitt von 20.0 ± 5.0 µg/g (Schaeffer *et al*, 1999).

Seit der Einführung der akzeptierbaren Höchstmenge von 1 µg Microcystin-LR/g AFA-Algenprodukt durch das Oregon Department of Agriculture im Jahr 1997 werden von Herstellern Chargenprüfungen frisch geernteter AFA-Algen durchgeführt und nur Chargen mit Gehalten unter 1 µg/g zur Herstellung von AFA-Algenprodukten verwendet. Bei einer ausführlichen Untersuchung von Algenproben aus dem Upper Klamath Lake (1994-1998) lagen Microcystin-Konzentrationen mehrheitlich deutlich über 1 µg/g. Die meisten Werte lagen zwischen 0.2-10 µg/g, Maximalwerte bei 25 µg/g. Proben wurden mittels ELISA und PPA gemessen, wobei mit ELISA gemessene Werte jeweils deutlich höher lagen (Carmichael *et al*, 2000). *Anmerkung:* Aus der Publikation geht nicht hervor, wie viele Proben analysiert wurden und auch nicht, wie repräsentativ die Stichproben waren.

In einer von Health Canada durchgeführten breit angelegten Messkampagne wurden in Kanada in keiner Spirulina-Probe Microcystine nachgewiesen im Gegensatz zu anderen Algenprodukten (*Anmerkung:* keine Angaben, wie viele Proben untersucht wurden, mit welcher Methode und bei welcher Nachweisgrenze) (Health Canada online, 2001).

Deutschland und Schweiz

AFA-Algen in Nahrungsergänzungsmitteln, die in Deutschland und in der Schweiz erhältlich sind, stammen ebenfalls aus dem Upper Klamath Lake, weshalb vergleichbare Microcystingehalte wie in Kanada und den USA zu erwarten sind.

Schweiz: Der Microcystin-LR-Gehalt in 7 AFA-, 3 Chlorella- und einem Spirulina-Algenprodukt wurde mittels ADDA-ELISA (Dreifachbestimmung) und kolorimetrischem PPA untersucht und je Produkt 5 Stichproben analysiert. Die Algenproben stammten vom Schweizer Markt oder wurden von den Antragstellern beim Bundesamt für Gesundheit (BAG) eingereicht. Bei 6 AFA-Algenprodukten wurden 0.4-1.4 µg Microcystin-LR Äquivalente/g Trockengewicht gemessen, bei einer Probe 5.3 µg Microcystin-LR Äquivalente/g Trockengewicht. Die Resultate der beiden Untersuchungsmethoden stimmten

gut überein. In Chlorella- und Spirulina-Algenprodukten wurden mittels ELISA 0.01-0.02 µg und mittels PPA 0.1-0.3 µg Microcystin-LR Äquivalente/g Trockengewicht gemessen (*Anmerkung*: Keine Angabe der Nachweisgrenzen) (BAG, 2003, interner Bericht). Tabelle 5 fasst die Microcystingehalte in AFA-Algenprodukten nochmals zusammen.

Deutschland: Keine Ergebnisse vorliegend.

Tab. 5. Microcystingehalt in AFA-Algenprodukten aus dem Upper Klamath Lake (USA)

Microcystingehalt [µg/g]	Anzahl Proben	Microcystin-Kongener	Anmerkungen	Literatur
0.04-18.4	87	90% als -LR	98% Proben positiv 72% >1 µg/g	Gilroy <i>et al.</i> , 2000
0.1-10, 33	>100* (1 Probe)	-LR und -LA	*nicht nur AFA	Lawrence <i>et al.</i> , 2001
11-24.7	6	-LR		Schäffer <i>et al.</i> , 1999
0.4-1.4, 5.3	7 (1 Probe)	-LR		BAG, 2003, interner Bericht

Microcystin-Konzentrationen im Trinkwasser

Die WHO empfiehlt einen Trinkwasser-Richtwert von 1 µg Microcystin-LR /L (WHO 1999). Dieser Wert scheint in Deutschland und der Schweiz eingehalten zu werden (SKLM, 2003, Hoeger, 2003, Chorus, 2001). In einer Zusammenstellung weltweit gemessener Microcystin-Konzentrationen lagen Trinkwasserwerte mit wenigen Ausnahmen bei 0.01-0.4 µg/L. Es wurden aber auch deutlich höhere Werte zitiert, so z. B. 1.9 µg/L in China, 7.8 µg/L in der Tschechei und 90 µg/L in den USA (Hoeger, 2003, Hoeger *et al.*, 2005).

Microcystine werden bei der Trinkwasseraufbereitung effizient durch Ozonbehandlung aus dem Rohwasser eliminiert. Wird zu wenig Ozon eingesetzt, z. B. bei hohen Zelldichten einer Algenblüte, werden Cyanobakterienzellen lysiert, die Toxine freigesetzt und nur partiell abgebaut (Hoeger *et al.*, 2002).

Microcystin-Konzentrationen in tierischen Lebensmitteln

Es liegen Untersuchungen zu Microcystin-Konzentrationen in Fischen, Muscheln und Schalentieren aus Portugal (Vasconcelos, 1999), Brasilien (Magalhaes *et al.*, 2003, Mohamed *et al.*, 2003) und den USA (Hathaway, 2001) vor, die allerdings keine repräsentativen

Aussagen erlauben, da die Probenzahl meist gering war und kaum detaillierte Angaben zu den Probenahmebedingungen gemacht wurden. Je nach Studie wurden in Fischen maximal 0.5 mg Microcystin-LR-Äquivalente/kg gefunden (Mohamed *et al*, 2003), in Hummer bis zu 2.7 mg Microcystin-LR/kg (Vasconcelos, 1999) und in Krabben maximal 0.1 mg Microcystin-LR-Äquivalente/kg (Magalhaes *et al*, 2003). In Muscheln wurden in einer Publikation bis zu 16 mg Microcystin-LR/kg gemessen (Vasconcelos, 1999), in einer andern Publikation hingegen nur max. 0.11 mg Microcystin/kg in Muschelleber (Hathaway, 2001).

Weiter liegen Untersuchungen zum Übergang von Microcystin in die Kuhmilch vor. Vier laktierende Kühe (Holstein Friesian dairy cattle) erhielten *Microcystis aeruginosa* Extrakt (10^8 Zellen/L Wasser, Stamm MASH01-A19) während 21 Tagen über das Trinkwasser verabreicht. (*Anmerkung*: ab 10^6 Zellen/L Wasser spricht man von einer Algenblüte). Die Kühe nahmen total 15 mg Microcystin-LR auf bzw. durchschnittlich 1.21 µg/kg KG/Tag. Es wurde weder mit HPLC noch mit ELISA Microcystin-LR in der Milch nachgewiesen. Die Nachweisgrenze der ELISA-Methode lag bei 0.002 µg/L, diejenige der weniger sensitiven HPLC-Methode wurde nicht angegeben (Orr *et al*, 2001).

Microcystin-Konzentrationen in Badegewässern

In 55% der untersuchten 155 Gewässer in Deutschland (325 Proben) wurden Cyanobakterien nachgewiesen. Messwerte lagen durchschnittlich bei 45 µg Microcystin/L und maximal bei 566 µg/L (Wolf & Frank, 2002).

6 EXPOSITIONSABSCHÄTZUNG

Gemäss WHO (1999) nimmt der Mensch Cyanobakterientoxine v. a. über das Trinkwasser auf. Der Konsum von Algenprodukten als Nahrungsergänzungsmittel stellt eine zusätzliche Exposition dar. Als weitere Quellen werden Schwimmen in Badegewässern, Konsum von Gemüse von bewässerten Feldern und von Fischen und Muscheln diskutiert (WHO, 1999, Höger Dissertation 2003).

Microcystin-LR Aufnahme aus Verzehr von AFA-Algenprodukten

Die von Herstellern empfohlene Tagesportion liegt im Bereich von 1 bis 3 g AFA-Algen. Unter der Annahme, dass ein Erwachsener (60 kg) täglich 2 g AFA-Algen aufnimmt, die 1 µg Microcystin-LR/g enthalten (Oregon Richtwert), wird der PTDI der WHO von 0.04 µg/kg KG/Tag gerade ausgeschöpft. Dabei werden andere Expositionswege (z.B. Trinkwasser) als vernachlässigbar angesehen. In AFA-Algenprodukten wurden z. T. deutlich höhere Microcystingehalte von bis zu 33 µg/g gemessen (siehe Tab. 5), und die von Herstellern empfohlenen Mengen liegen z. T. über 2 g/Tag, so dass eine erhebliche Überschreitung der täglichen tolerierbaren Aufnahmemenge (PTDI) möglich ist. Da Nahrungsergänzungsmittel täglich und über einen längeren Zeitraum konsumiert werden können, ist eine Gefährdung der Gesundheit nicht auszuschliessen. Kinder sind wegen der höheren Aufnahme pro kg Körpergewicht besonders gefährdet.

Microcystin-LR Aufnahme aus Trinkwasser

Eine verlässliche Abschätzung der Exposition durch Trinkwasser ist auf Grund der Datenlage zurzeit nicht möglich. Der WHO Trinkwasser-Richtwert von 1 µg Microcystin-LR/L scheint in Deutschland und in der Schweiz eingehalten zu werden, Konzentrationen scheinen in der Regel unter 0.4 µg/L zu liegen. Aus den Literaturdaten geht allerdings nicht hervor, wie repräsentativ die Messwerte sind (keine Angaben ob Spitzenwerte nach Algenblüten oder Durchschnittswerte) (Hoeger, 2003, Chorus, 2001). Erwachsene (60 kg), die täglich 2 L Trinkwasser mit 0.4 µg Microcystin-LR/L konsumieren, nehmen 0.013 µg/kg KG/Tag auf, was bereits 33% des PTDI der WHO ausschöpft. Damit scheint u. U. auch das Trinkwasser ein nicht vernachlässigbarer Expositionsweg zu sein.

Andere Expositionswege, wie Schwimmen in Badegewässern, Verzehr von Fischen, Meeresfrüchten und Gemüse von bewässerten Feldern tragen vermutlich nicht zu einer nennenswerten chronischen Microcystin-Aufnahme bei.

7 ANALYTIK VON MICROCYSTIN-LR UND VON MICROCYSTINEN

Microcystine können mit flüssigkeitschromatographischen Verfahren, Enzyme-linked immunosorbent Assays (ELISA) und Protein Phosphatase Inhibitions Assays (PPA) nachgewiesen werden (Weller, 2002).

Zur Bestimmung der Microcystine -LR, -RR und -YR in Trinkwasser wurde eine ISO-Methode (ISO/DIS 20179: 2004) etabliert, mit der auch nach entsprechender Aufarbeitung Algen und Algenprodukte untersucht werden können. Methoden für den Nachweis von Microcystinen in Algenprodukten zur Nahrungsergänzung wurden u. a. von Lawrence *et al.* (2001), Gilroy *et al.* (2000) und Codd *et al.* (2001; Review) beschrieben. Lawrence *et al.* (2001) zeigen eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse von immunochemischen und chromatographischen Methoden für verschiedene Algenprodukten (AFA, Spirulina und nicht-identifizierte Cyanobakterienspezies) im Bereich von 0.5-35 µg Microcystin pro g Algenprodukt.

Chromatographische Methoden

Flüssigkeitschromatographische Verfahren mit UV/VIS und oder massenspektrometrischer Detektion existieren und werden eingesetzt, wobei bisher nur für einige Microcystine, u.a. Microcystin-LR, Referenzsubstanzen zur Verfügung stehen (Hummert *et al.*, 2000, Dahlmann *et al.*, 2003). Für die Strukturbestimmung ist neben Kernresonanzspektrometrie und Tandem-Massenspektrometrie auch die Aminosäurebestimmung nach saurer Hydrolyse nützlich (Weller, 2002).

Immunoassays

Hohe Empfindlichkeit, Selektivität, Schnelligkeit und niedrige Kosten sprechen für immunochemische Methoden. Im ELISA lassen sich mit entsprechenden Antikörpern Microcystin-LR (Chu *et al.*, 1990, Gilroy, 2000), andere Microcystine (Yu *et al.*, 2002) oder aufgrund der gemeinsamen seltenen Aminosäure ADDA die Summe aller Microcystine und Nodularine nachweisen (Fischer *et al.*, 2001, An & Carmichael, 1994, Lawrence *et al.*, 2001).

Inhibitionstest

Mittels PPA werden generell Substanzen nachgewiesen, die die Aktivitäten der Proteinphosphatase 1 (An & Carmichael, 1994) oder 2A (Heresztyn & Nicholson, 2001) hemmen. Da nicht nur Microcystin-LR inhibierend wirkt, werden auch weitere Microcystin-Kongenere, Nodularine und evtl. noch andere in den aufgereinigten Extrakten enthaltene Substanzen erfasst.

8 BEWERTUNGEN INTERNATIONALER GREMIEN

8.1 TDI-HERLEITUNG UND TRINKWASSER RICHTWERT DER WHO (WHO, 1998 UND 1999)

Die WHO leitete einen provisorischen TDI (PTDI) von 0.04 µg/kg KG/Tag für Microcystin-LR ab, basierend auf dem NOAEL von 40 µg/kg KG/Tag aus der subchronischen oralen 13 Wochen Studie bei Mäusen (Studie von Fawell *et al.*, 1999). Die WHO verwendete dabei einen Unsicherheitsfaktor von 1000, der sich aus einem Faktor 10 für die Tier-Mensch-Extrapolation, einem Faktor 10 für die Empfindlichkeitsunterschiede innerhalb der menschlichen Population und einem Faktor 10 für die ungenügende Datenbasis zur Toxikologie von Microcystin-LR (fehlende chronische Studien und Kanzerogenitätsstudien) zusammensetzt. Zu diesem Zeitpunkt lagen erst wenige Studien zur Genotoxizität von Microcystin-LR vor.

Die WHO leitete einen weiteren PTDI ab, ausgehend vom LOAEL von 0.1 mg Microcystin-LR-Äquivalenten/kg KG/Tag aus der 44 Tage-Trinkwasser-Studie bei Schweinen (Studie von Falconer *et al.*, 1994). Die WHO verwendete dabei einen Sicherheitsfaktor von 1500, d.h. einen Faktor 3 für die Tier-Mensch-Extrapolation (Schweine sind dem Menschen physiologisch ähnlicher als Nager), einen Faktor 10 für Empfindlichkeitsunterschiede innerhalb der menschlichen Population, Faktor 5 für die Extrapolation vom LOAEL zum NOAEL (10 schien ungerechtfertigt wegen der niedrigen Inzidenz der Effekte und dem Verlauf der Dosis-Wirkungsbeziehung) und einen Faktor 10 wegen der kurzen Studiendauer. Daraus resultiert ein PTDI von 0.067 µg/kg KG/Tag.

Die beiden PTDIs liegen in der gleichen Grössenordnung. Der niedrigere Wert von 0.04 µg/kg KG/Tag wurde für die Herleitung des provisorischen Trinkwasser-Richtwertes herangezogen.

Trinkwasser Richtwert (WHO, 1998 und 1999)

Basierend auf dem PTDI von 0.04 µg/kg KG/Tag, einer täglichen Trinkwasseraufnahme von 2 L pro Person (60 kg KG) und der Annahme, dass 80% des Microcystins über das Trinkwasser aufgenommen wird, empfiehlt die WHO für Microcystin-LR einen Trinkwasser-Richtwert von 1 µg/L (freie und zellgebundene Form).

Trinkwasser-Richtwert = $(0.04 \mu\text{g/kg KG} \times 60 \text{ kg} \times 0.8) / 2\text{L} = 0.96 \mu\text{g/L}$ (gerundet: 1 µg/L)

Für alle anderen Microcystine war die Datenlage ungenügend, sodass für diese keine Trinkwasser-Richtwerte hergeleitet werden konnten.

8.2 WEITERE RISIKOBEWERTUNGEN UND RICHTWERTE

TDI

Die Risikobewertungen von Kuiper-Goodman (Kuiper-Goodman, 1997) (Health Canada, food directorate) und Duy *et al.* (Duy *et al.*, 2000) für Microcystin-LR beruhen wie bei der WHO auf dem NOAEL von 40 µg/kg KG/Tag aus der oralen 13 Wochenstudie bei Mäusen. Kuiper-Goodman und Duy *et al.* schlagen unter Verwendung eines Unsicherheitsfaktors von 3000 einen provisorischen TDI von 0.013 µg/kg KG/Tag vor. Der Unsicherheitsfaktor setzt sich zusammen aus einem Faktor 100 für Intra- und Interspeziesvariationen, 10 wegen kurzer Studiendauer und einem zusätzlichen Faktor 3, der der tumorpromovierenden Wirkung und der schwachen Evidenz für eine mögliche humankanzerogene Wirkung Rechnung trägt.

Regulatorischer Höchstwert für Microcystin in Nahrungsergänzungsmitteln auf Algenbasis in Oregon

Oregon Health Division und Oregon Department of Agriculture führten 1997 für Erwachsene eine regulatorische Höchstkonzentration von 1 µg Microcystin/g in Blue Green Algae-(BGA)-Produkten ein. Sie gilt für Produkte, die in Oregon verkauft werden und basiert auf dem PTDI von 0.04 µg/kg KG/Tag der WHO, einem täglichen Verzehr von 2 g Algenprodukten und einem Körpergewicht von 60 kg (Gilroy *et al.*, 2000).

9 LITERATUR

- An, J., and Carmichael, W.W (1994) Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. *Toxicon*. 32 (12):1495-1507.
- Batista,T., de Sousa,G., Suput,J.S., Rahmani,R. & Suput,D. (2003) Microcystin-LR causes the collapse of actin filaments in primary human hepatocytes. *Aquat.Toxicol*, **65**, 85-91.
- BgVV (2001) AFA Algen und AFA Algenprodukte, Stellungnahme vom 23.09.2001.
- BgVV (2002) BGVVund BfArM warnen: Nahrungsergänzungsmittel aus AFA-Algen können keine medizinische Therapie ersetzen. Gemeinsame Pressemitteilung, 21.03.2002.
- Boe,R., Gjertsen,B.T., Vintermyr,O.K., Houge,G., Lanotte,M. & Doskeland,S.O. (1991) The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces morphological changes typical of apoptosis in mammalian cells. *Exp.Cell Res*, **195**, 237-246.
- Bouaicha,N. & Maatouk,I. (2004) Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. *Toxicol Lett.*, **148**, 53-63.
- Brooks,W.P. & Codd,G.A. (1987) Distribution of Microcystis aeruginosa peptide toxin and interactions with hepatic microsomes in mice. *Pharmacol.Toxicol*, **60**, 187-191.
- Bulera,S.J., Eddy,S.M., Ferguson,E., Jatkoie,T.A., Reindel,J.F., Bleavins,M.R. & De La Iglesia,F.A. (2001) RNA expression in the early characterization of hepatotoxicants in Wistar rats by high-density DNA microarrays. *Hepatology*, **33**, 1239-1258.
- Bundesamt für Gesundheit (BAG) (2003) Interner Bericht
- Carmichael,W.W., Drapeau,C. & Anderson,D.M. (2000) Harvesting of Aphanizomenon flos- quae Ralfs ex Born. & Flah. var. flos-aquae (Cyanobacteria) from Klamath Lake for human dietary use. *J.Appl.Phycol.*, **12**, 585-595.
- Chernoff,N., Hunter,E.S., III, Hall,L.L., Rosen,M.B., Brownie,C.F., Malarkey,D., Marr,M. & Herkovits,J. (2002) Lack of teratogenicity of microcystin-LR in the mouse and toad. *J.Appl.Toxicol.*, **22**, 13-17.
- Chorus, I. ed. (2001) Cyanotoxins. Occurrence, Causes and Consequences. Springer, Berlin.
- Chu, F.S., Huang, X., and Wei R.D. (1990) Enzyme-linked immunosorbent assay for microcystins in blue-green algal blooms. *J Assoc. Off Anal. Chem.* 73 (3):451-456.
- Codd, G.A., Metcalf, J.S., Ward, C.J., Beattie, K.A., and Bell, S.G. (2001) Analysis of Cyanobacterial Toxins by Physicochemical and Biochemical Methods. *J Assoc Off Anal Chem.* 84 (5):1626-1635.
- Dahlem,A.M., Hassan,A.S., Swanson,S.P., Carmichael,W.W. & Beasley,V.R. (1989) A model system for studying the bioavailability of intestinally administered microcystin-

- LR, a hepatotoxic peptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Pharmacol.Toxicol*, **64**, 177-181.
- Dahlmann J., Budakowski W.R, and Luckas B. (2003) Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry based method for the simultaneous determination of algal and cyanobacterial toxins in phytoplankton from marine waters and lakes followed by tentative structural elucidation of microcystins. *J Chromatography A*. 994: 45-57.
- Dietrich,D. & Hoeger,S. (2005) Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): a reasonable or misguided approach? *Toxicol Appl.Pharmacol*, **203**, 273-289.
- Dietrich, D. (2004) Universität Konstanz, Arbeitsgruppe Umwelttoxikologie, Deutschland. Persönliche Mitteilungen.
- Ding,W.X. & Nam,O.C. (2003) Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. *FEMS Microbiol.Lett.*, **220**, 1-7.
- Ding,W.X., Shen,H.M., Zhu,H.G., Lee,B.L. & Ong,C.N. (1999) Genotoxicity of microcystic cyanobacteria extract of a water source in China. *Mutat.Res*, **442**, 69-77.
- Duy,T.N., Lam,P.K., Shaw,G.R. & Connell,D.W. (2000) Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. *Rev.EnvIRON Contam Toxicol*, **163:113-85.**, 113-185.
- Falconer,I.R. (1991) Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Environ Toxicol Water*, **6**, 177-184.
- Falconer,I.R., Burch,M.D., Steffensen,D.A., Choice,M. & Coverdale,O.R. (1994) Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. *J.EnvIRON.Toxicol.Water Qual.*, **9**, 131-139.
- Falconer,I.R. & Humpage,A.R. (1996) Tumour promotion by cyanobacterial toxins. *Phycologia*, **35**, 74-79.
- Falconer,I.R., Smith,J.V., Jackson,A.R., Jones,A. & Runnegar,M.T. (1988) Oral toxicity of a bloom of the Cyanobacterium *microcystis Aeruginosa* administered to mice over periods up to 1 year. *J.Toxicol.EnvIRON.Health*, **24**, 291-305.
- Fawell,J.K., Mitchell,R.E., Everett,D.J. & Hill,R.E. (1999) The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I microcystin-LR. *Hum.Exp.Toxicol.*, **18**, 162-167.
- 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. *Toxicol Appl.Pharmacol*, **203**, 257-263.
- Fischer,W.J., Hagenbuch,B., Cattori,V., Meier,P.J. & Dietrich,D.R. (1999) The cyclic heptapeptide microcystin, a cyanobacterial toxin, is transported by the human OATP. *Hepatology*, **30**, 465A

- Fischer, W.J., Garthwaite, I., Miles, C.O., Ross, K.M., Aggen, J.B., Chamberlin, A.R., Towers, N.R., and Dietrich, D.R. (2001) Congener-independent immunoassay for microcystins and nodularins. *Environ Sci Technol.* 35 (24):4849-4856.
- Fladmark, K.E., Brustugun, O.T., Hovland, R., Boe, R., Gjertsen, B.T., Zhivotovsky, B. & Doskeland, S.O. (1999) Ultrarapid caspase-3 dependent apoptosis induction by serine/threonine phosphatase inhibitors. *Cell Death Differ.*, **6**, 1099-1108.
- Fladmark, K.E., Brustugun, O.T., Mellgren, G., Krakstad, C., Boe, R., Vintermyr, O.K., Schulman, H. & Doskeland, S.O. (2002) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is required for microcystin-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **277**, 2804-2811.
- Frangez, R., Zuzek, M.C., Mrkun, J., Suput, D., Sedmak, B. & Kosec, M. (2003) Microcystin-LR affects cytoskeleton and morphology of rabbit primary whole embryo cultured cells in vitro. *Toxicol.*, **41**, 999-1005.
- Gehring, M.M. (2004) Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. *FEBS Lett.*, **557**, 1-8.
- Gilroy, D.J., Kauffman, K.W., Hall, R.A., Huang, X. & Chu, F.S. (2000) Assessing potential health risks from microcystin toxins in blue-green algae dietary supplements. *Environ Health Perspect*, **108**, 435-439.
- Gulledge, B.M., Aggen, J.B. & Chamberlin, A.R. (2003a) Linearized and truncated microcystin analogues as inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 2903-2906.
- Gulledge, B.M., Aggen, J.B., Eng, H., Sweimeh, K. & Chamberlin, A.R. (2003b) Microcystin analogues comprised only of Adda and a single additional amino acid retain moderate activity as PP1/PP2A inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 2907-2911.
- Gupta, N., Pant, S.C., Vijayaraghavan, R. & Rao, P.V. (2003) Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice. *Toxicology*, **188**, 285-296.
- Guzman, R.E. & Solter, P.F. (1999) Hepatic oxidative stress following prolonged sublethal microcystin LR exposure. *Toxicol Pathol.*, **27**, 582-588.
- Guzman, R.E., Solter, P.F. & Runnegar, M.T. (2003) Inhibition of nuclear protein phosphatase activity in mouse hepatocytes by the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Toxicol.*, **41**, 773-781.
- Hamm-Alvarez, S.F., Wei, X., Berndt, N. & Runnegar, M. (1996) Protein phosphatases independently regulate vesicle movement and microtubule subpopulations in hepatocytes. *Am. J. Physiol.*, **271**, C929-C943
- Hathaway, R. A. (2001) Mussels as biomonitors of lake water microcystin: A final report for the summer 2000 microcystin. Monitoring study.
- Health Canada online (14-9-2001) Blue-green algae (cyanobacteria) and their toxins. Internet

- Heresztyn, T. and Nicholson, B.C. (2001) Determination of cyanobacterial hepatotoxins directly in water using a protein phosphatase inhibition assay. *Water Res.* 35 (13):3049-3056.
- Hermansky, S.J., Stohs, S.J., Eldeen, Z.M., Roche, V.F. & Mereish, K.A. (1991) Evaluation of potential chemoprotectants against microcystin-LR hepatotoxicity in mice. *J. Appl. Toxicol.*, **11**, 65-73.
- Hitzfeld, B.C., Hoyer, S.J. & Dietrich, D.R. (2000) Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environ Health Perspect*, **108 Suppl 1:113-22.**, 113-122.
- Hoeger, S. J. (2003) Problems during drinking water treatment of cyanobacterial-loaded surface waters: Consequences for human health. Dissertation, Universität Konstanz, Fakultät für Biologie.
- Hoeger, S. J., Dietrich, D. R., and Hitzfeld, B. C. (2000) Microcystin-LR Ozonation by-products: Chemical and Toxicological Characterization. 39th annual meeting of Society of Toxicology, Philadelphia, PA, USA, März 2000.
- Hoeger, S.J., Dietrich, D.R. & Hitzfeld, B.C. (2002) Effect of ozonation on the removal of cyanobacterial toxins during drinking water treatment. *Environ Health Perspect*, **110**, 1127-1132.
- Hoeger, S.J., Hitzfeld, B.C. & Dietrich, D.R. (2005) Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in drinking water treatment plants. *Toxicol Appl. Pharmacol.*, **203**, 231-242.
- Honkanen, R.E., Codispoti, B.A., Tse, K., Boynton, A.L. & Honkanen, R.E. (1994) Characterization of natural toxins with inhibitory activity against serine/threonine protein phosphatases. *Toxicon*, **32**, 339-350.
- Hummert C., Reichelt M., and Luckas B. (2000) New strategy for the determination of microcystins and diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins, two potent phosphatase 1 and 2A inhibitors and tumor promoters. *Fresenius J Anal Chem.* 366: 508-513.
- Humpage, A.R. & Falconer, I.R. (1999) Microcystin-LR and liver tumor promotion: Effects on cytokinesis, ploidy, and apoptosis in cultured hepatocytes. *Environ Toxicol*, **14**, 61-75.
- Humpage, A.R., Hardy, S.J., Moore, E.J., Froschio, S.M. & Falconer, I.R. (2000) Microcystins (cyanobacterial toxins) in drinking water enhance the growth of aberrant crypt foci in the mouse colon. *J. Toxicol. Environ. Health A*, **61**, 155-165.
- ISO/DIS 20179: 2004, Water quality - Determination of microcystins - Method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection.
- Ito, E., Kondo, F. & Harada, K. (1997a) Hepatic necrosis in aged mice by oral administration of microcystin-LR. *Toxicon*, **35**, 231-239.

- Ito,E., Kondo,F. & Harada,K. (2000) First report on the distribution of orally administered microcystin-LR in mouse tissue using an immunostaining method. *Toxicol*, **38**, 37-48.
- Ito,E., Kondo,F., Terao,K. & Harada,K. (1997b) Neoplastic nodular formation in mouse liver induced by repeated intraperitoneal injections of microcystin-LR. *Toxicol*, **35**, 1453-1457.
- Khan,S.A., Wickstrom,M.L., Haschek,W.M., Schaeffer,D.J., Ghosh,S. & Beasley,V.R. (1996) Microcystin-LR and kinetics of cytoskeletal reorganization in hepatocytes, kidney cells, and fibroblasts. *Natural Toxins*, **4**, 206-214.
- 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. *Chem.Res.Toxicol.*, **9**, 1355-1359.
- Kondo,F., 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**, 591-596.
- Kuiper-Goodman,T. (1997) Risk assessment of microcystins in Canada. *WaBoLu-Hefte*, **4**, 9-12.
- Lankoff,A., Banasik,A., Obe,G., Deperas,M., Kuzminski,K., Tarczynska,M., Jurczak,T. & Wojcik,A. (2003) Effect of microcystin-LR and cyanobacterial extract from Polish reservoir of drinking water on cell cycle progression, mitotic spindle, and apoptosis in CHO-K1 cells. *Toxicol Appl.Pharmacol.*, **189**, 204-213.
- Lankoff,A., Krzowski,L., Glab,J., Banasik,A., Lisowska,H., Kuszewski,T., Gozdz,S. & Wojcik,A. (2004) DNA damage and repair in human peripheral blood lymphocytes following treatment with microcystin-LR. *Mutat.Res*, **559**, 131-142.
- Lawrence,J.F., Niedzwiedek,B., Menard,C., Lau,B.P., Lewis,D., Kuper-Goodman,T., Carbone,S. & Holmes,C. (2001) Comparison of liquid chromatography/mass spectrometry, ELISA, and phosphatase assay for the determination of microcystins in blue-green algae products. *JAOAC Int.*, **84**, 1035-1044.
- Maatouk,I., Bouaicha,N., Plessis,M.J. & Perin,F. (2004) Detection by (32)P-postlabelling of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in DNA as biomarker of microcystin-LR- and nodularin-induced DNA damage in vitro in primary cultured rat hepatocytes and in vivo in rat liver. *Mutat.Res*, **564**, 9-20.
- MacKintosh,C., Beattie,K.A., Klumpp,S., Cohen,P. & Codd,G.A. (1990) Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett.*, **264**, 187-192.
- MacKintosh,R.W., Dalby,K.N., Campbell,D.G., Cohen,P.T., Cohen,P. & MacKintosh,C. (1995) The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1. *FEBS Lett.*, **371**, 236-240.

- Magalhaes,V.F., Marinho,M.M., Domingos,P., Oliveira,A.C., Costa,S.M., Azevedo,L.O. & Azevedo,S.M. (2003) Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicol*, **42**, 289-295.
- Mankiewicz,J., Tarczynska,M., Fladmark,K.E., Doskeland,S.O., Walter,Z. & Zalewski,M. (2001) Apoptotic effect of cyanobacterial extract on rat hepatocytes and human lymphocytes. *Environ Toxicol*, **16**, 225-233.
- Mankiewicz,J., Walter,Z., Tarczynska,M., Palyvoda,O., Wojtysiak-Staniaszczyk,M. & Zalewski,M. (2002) Genotoxicity of cyanobacterial extracts containing microcystins from Polish water reservoirs as determined by SOS chromotest and comet assay. *Environ Toxicol*, **17**, 341-350.
- Matsushima,R., Yoshizawa,S., Watanabe,M.F., Harada,K., Furusawa,M., Carmichael,W.W. & Fujiki,H. (1990) In vitro and in vivo effects of protein phosphatase inhibitors, microcystins and nodularin, on mouse skin and fibroblasts. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **171**, 867-874.
- McDermott,C.M., Nho,C.W., Howard,W. & Holton,B. (1998) The cyanobacterial toxin, microcystin-LR, can induce apoptosis in a variety of cell types. *Toxicol*, **36**, 1981-1996.
- Mellgren,G., Vintermyr,O.K., Boe,R. & Doskeland,S.O. (1993) Hepatocyte DNA replication is abolished by inhibitors selecting protein phosphatase 2A rather than phosphatase 1. *Exp.Cell Res*, **205**, 293-301.
- Mikhailov,A., Harmala-Brasken,A.S., Hellman,J., Meriluoto,J. & Eriksson,J.E. (2003) Identification of ATP-synthase as a novel intracellular target for microcystin-LR. *Chem.Biol.Interact.*, **142**, 223-237.
- Milutinovic,A., Zivin,M., Zorc-Pleskovic,R., Sedmak,B. & Suput,D. (2003) Nephrotoxic effects of chronic administration of microcystins -LR and -YR. *Toxicol*, **42**, 281-288.
- Miura,G.A., Robinson,N.A., Lawrence,W.B. & Pace,J.G. (1991) Hepatotoxicity of microcystin-LR in fed and fasted rats. *Toxicol*, **29**, 337-346.
- Mohamed,Z.A., Carmichael,W.W. & Hussein,A.A. (2003) Estimation of microcystins in the freshwater fish *Oreochromis niloticus* in an Egyptian fish farm containing a *Microcystis* bloom. *Environ Toxicol*, **18**, 137-141.
- Nishiwaki-Matsushima,R., Ohta,T., Nishiwaki,S., Suganuma,M., Kohyama,K., Ishikawa,T., Carmichael,W.W. & Fujiki,H. (1992) Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.*, **118**, 420-424.
- Ohta,T., Sueoka,E., Iida,N., Komori,A., Suganuma,M., Nishiwaki,R., Tatematsu,M., Kim,S.J., Carmichael,W.W. & 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**, 6402-6406.
- Orr,P.T., Jones,G.J., Hunter,R.A. & Berger,K. (2003) Exposure of beef cattle to sub-clinical doses of *Microcystis aeruginosa*: toxin bioaccumulation, physiological effects and human health risk assessment. *Toxicol*, **41**, 613-620.

- Orr,P.T., Jones,G.J., Hunter,R.A., Berger,K., De Paoli,D.A. & Orr,C.L. (2001) Ingestion of toxic *Microcystis aeruginosa* by dairy cattle and the implications for microcystin contamination of milk. *Toxicon*, **39**, 1847-1854.
- Pouria,S., de Andrade,A., Barbosa,J., Cavalcanti,R.L., Barreto,V.T., Ward,C.J., Preiser,W., Poon,G.K., Neild,G.H. & Codd,G.A. (1998) Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet*, **352**, 21-26.
- Rao,P.V. & Bhattacharya,R. (1996) The cyanobacterial toxin microcystin-LR induced DNA damage in mouse liver *in vivo*. *Toxicology*, **114**, 29-36.
- Rao,P.V., Bhattacharya,R., Pant,S.C. & Bhaskar,A.S. (1995) Toxicity evaluation of *in vitro* cultures of freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*: I. Hepatotoxic and histopathological effects in rats. *Biomed. Environ Sci.*, **8**, 254-264.
- Rao,P.V., Bhattacharya,R., Parida,M.M., Jana,A.M. & Bhaskar,A.S. (1998) Freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (UTEX 2385) induced DNA damage *in vivo* and *in vitro*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **5**, 1-6.
- Repavich,W.M., Sonzogni,W.C., Standridge,J.H., Wedepohl,R.E. & Meisner,L.F. (1990) Cyanobacteria (blue-green algae) in Wisconsin (USA) waters: Acute and chronic toxicity. *WATER RES*, **24**, 225-232.
- 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. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **256**, 176-182.
- Runnegar,M., Berndt,N., Kong,S.M., Lee,E.Y. & Zhang,L. (1995) *In vivo* and *in vitro* binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A. *Biochem.Biophys.Res Commun.*, **216**, 162-169.
- Runnegar,M. & Falconer,I.R. (1982) The *in vivo* and *in vitro* Biological Effects of the Peptide Hepatotoxin from the Blue-green Alga *Microcystis aeruginosa*. *S Afr J Sci*, **78**, 363-366.
- Runnegar,M.T., Kong,S. & Berndt,N. (1993) Protein phosphatase inhibition and *in vivo* hepatotoxicity of microcystins. *Am.J.Physiol*, **265**, G224-G230
- Sano,T., Takagi,H., Sadakane,K., Ichinose,T., Kawazato,H. & Kaya,K. (2004) Carcinogenic effects of microcystin-LR and Dhb-microcystin-LR on mice liver. *Sixth International Conference on Toxic Cyanobacteria, Bergen, Norway*, pp.59.Abstract,
- Schaeffer,D.J., Malpas,P.B. & Barton,L.L. (1999) Risk assessment of microcystin in dietary *Aphanizomenon flos-aquae*. *Ecotoxicol.Environ.Saf*, **44**, 73-80.
- Sekijima,M., Tsutsumi,T., Yoshida,T., Harada,T., Tashiro,F., Chen,G., Yu,S.Z. & 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**, 161-165.

- Shen,P.P., Zhao,S.W., Zheng,W.J., Hua,Z.C., Shi,Q. & Liu,Z.T. (2003) Effects of cyanobacteria bloom extract on some parameters of immune function in mice. *Toxicol Lett.*, **143**, 27-36.
- SKLM (2003) Stellungnahme der DFG-Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln (SKLM) zu Algentoxinen.
- Solter,P., Liu,Z. & Guzman,R. (2000) Decreased hepatic ALT synthesis is an outcome of subchronic microcystin-LR toxicity. *Toxicol Appl.Pharmacol.*, **164**, 216-220.
- Solter,P.F., Wollenberg,G.K., Huang,X., Chu,F.S. & Runnegar,M.T. (1998) Prolonged sublethal exposure to the protein phosphatase inhibitor microcystin-LR results in multiple dose-dependent hepatotoxic effects. *Toxicol Sci.*, **44**, 87-96.
- Stotts,R.R., Namikoshi,M., Haschek,W.M., Rinehart,K.L., Carmichael,W.W., Dahlem,A.M. & Beasley,V.R. (1993) Structural modifications imparting reduced toxicity in microcystins from *Microcystis* spp. *Toxicon*, **31**, 783-789.
- Suzuki,H., Watanabe,M.F., Wu,Y., Sugita,T., Kita,K., Sato,T., Wang,X., Tanzawa,H., Sekiya,S. & Suzuki,N. (1998) Mutagenicity of microcystin-LR in human RSa cells. *Int.J.Mol.Med.*, **2**, 109-112.
- Toivola,D.M., Goldman,R.D., Garrod,D.R. & Eriksson,J.E. (1997) Protein phosphatases maintain the organization and structural interactions of hepatic keratin intermediate filaments. *J.Cell Sci.*, **110**, 23-33.
- Towner,R.A., Sturgeon,S.A. & Hore,K.E. (2002) Assessment of in vivo oxidative lipid metabolism following acute microcystin-LR-induced hepatotoxicity in rats. *Free Radic.Res*, **36**, 63-71.
- Tsuji,K., Watanuki,T., Kondo,F., Watanabe,M.F., Nakazawa,H., Suzuki,M., Uchida,H. & Harada,K. (1997) Stability of microcystins from cyanobacteria--IV. Effect of chlorination on decomposition. *Toxicon*, **35**, 1033-1041.
- Tsuji,K., Watanuki,T., Kondo,F., Watanabe,M.F., Suzuki,S., Nakazawa,H., Suzuki,M., Uchida,H. & Harada,K.I. (1995) Stability of microcystins from cyanobacteria--II. Effect of UV light on decomposition and isomerization. *Toxicon*, **33**, 1619-1631.
- Vasconcelos,V.M. (1999) Cyanobacterial toxins in Portugal: effects on aquatic animals and risk for human health. *Braz.J.Med.Biol.Res*, **32**, 249-254.
- Wang,H.B. & Zhu,H.G. (1996) Promoting activity of microcystins extracted from waterblooms in SHE cell transformation assay. *Biomed.Enviro Sci.*, **9**, 46-51.
- Weller,G (2002): Algengifte im Wasser, *Nachrichten aus der Chemie*, 50, Juni 2002.
- WHO (1998) Guidelines for Drinking-Water Quality. Second edition, Addendum to Volume 2, Health Criteria and Other Supporting Information. World Health Organization, Geneva.

- WHO (1999) Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management.
- Wickstrom,M.L., Khan,S.A., Haschek,W.M., Wyman,J.F., Eriksson,J.E., Schaeffer,D.J. & Beasley,V.R. (1995) Alterations in microtubules, intermediate filaments, and microfilaments induced by microcystin-LR in cultured cells. *Toxicol Pathol.*, **23**, 326-337.
- Wolf, H. U. and Frank, C. (2002) Häufigkeit, Ursachen, toxikologische Relevanz sowie Massnahmen zur Abwehr und Reduzierung von Massenentwicklungen toxikologischer Cyanobakterien (Blaualgen) in Badegewässern zum Schutz von Badenden. Forschungsbericht FZKA-BWPLUS, Universitätsklinikum Ulm, Abteilung Pharmakologie und Toxikologie.
- Yoshida,T., Makita,Y., Tsutsumi,T., Nagata,S., Tashiro,F., Yoshida,F., Sekijima,M., Tamura,S., Harada,T., Maita,K. & Ueno,Y. (1998) Immunohistochemical localization of microcystin-LR in the liver of mice: a study on the pathogenesis of microcystin-LR-induced hepatotoxicity. *Toxicol Pathol.*, **26**, 411-418.
- Yu, F.Y., Liu, B.H., Chou, H.N. and Chu, F.S. (2002) Development of a sensitive ELISA for the determination of microcystins in algae. *J Agric.Food Chem.* 50 (15):4176-4182.
- Yu,S.Z., Huang,X.E., Koide,T., Cheng,G., Chen,G.C., Harada,K., Ueno,Y., Sueoka,E., Oda,H., Tashiro,F., Mizokami,M., Ohno,T., Xiang,J. & Tokudome,S. (2002) Hepatitis B and C viruses infection, lifestyle and genetic polymorphisms as risk factors for hepatocellular carcinoma in Haimen, China. *Jpn.J.Cancer Res*, **93**, 1287-1292.
- Zegura,B., Lah,T.T. & Filipic,M. (2004) The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. *Toxicology*, **200**, 59-68.
- Zegura,B., Sedmak,B. & Filipic,M. (2003) Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicol*, **41**, 41-48.
- Zhan,L., Sakamoto,H., Sakuraba,M., Wu,d.S., Zhang,L.S., Suzuki,T., Hayashi,M. & Honma,M. (2004) Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutat.Res*, **557**, 1-6.
- Zhao,J.M. & Zhu,H.G. (2003) [Effects of microcystins on cell cycle and expressions of c-fos and c-jun]. *Zhonghua Yu Fang Yi.Xue.Za Zhi.*, **37**, 23-25.
- Zhou,L., Yu,H. & Chen,K. (2002) Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer. *Biomed.Enviro Sci.*, **15**, 166-171.

Abkürzungen:

ADDA	3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid
ADI	akzeptierbare tägliche Aufnahmemenge

AFA	Aphanizomenon flos aquae
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II
DEN	Diethylnitrosamin
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GST-P	Glutathion S-Transferase placental-form positive liver cell foci
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
i.p.	Intraperitoneal
KG	Körpergewicht
LD ₅₀	Lethal Dose
LOAEL	Lowest observed adverse effect level
NOAEL	No observed adverse effect level
PPA	Protein Phosphatase Inhibitions Assay
PTDI	Provisorische tolerierbare tägliche Aufnahmemenge
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
WHO	Weltgesundheitsorganisation