

## Vloga mikrocinov pri razvoju boleznih parenhimskih organov\*

## The role of microcystins in the development of parenchymal disorders\*

Andrej Repež\*\*, Valentina Otja Giacomelli\*\*\*

Ključne besede  
cianobakterije – toksičnost  
bakterijski toksini  
jetra – patologija  
podgane

Key words  
cyanobacteria – toxicity  
bacterial toxins  
liver – pathology  
rats

**Izvleček.** Mikrocinov pripradanejo jetrno tkivo z delovanjem na sestavine citoskeleta in ostale celične procese hepatocitov z inhibicijo serin/treonin beljakovinskih fosfatov. Parenhimske jetrne celice se skrčijo in ločijo med seboj. Razmaknejo se tudi endotelijske celice jetrnih sinusoidov in kri uhaja v jetrno tkivo. Notranja krvavitev lahko vodi v hipovolemični šok. Onesnaženost voda s cvetenji toksičnih cianobakterij je resen problem tudi v severovzhodni Sloveniji, kjer intenzivno kmetijstvo povzroča visoko stopnjo eutrofikacije voda. O akutni človeški zastrupitvi s smrtnim izidom še niso poročali. Pri ljudeh je pomembnejša kronična izpostavljenost subletalnim odmerkom toksinov. Z vpeljavo metode izolacije hepatocitov sva preverila primerljivost učinkov izbranega toksina z opisi v literaturi. V raziskavi sva ugotavljala, ali se bodo v akutnem poskusu *in vivo* pokazale spremembe v krvnih parametrih kot posledica krvavitve, kakšne so spremembe na jetrnih izvidih in jetrni morfologiji pri kroničnem napajanju podgan z vodo, onesnaženo z mikrocinovimi LR in RR. Preverila sva, ali je slikanje z magnetno resonanco ustrezna metoda za zasledovanje akutnih in kroničnih sprememb jetrnega parenhima po delovanju zmesi mikrocinov. Znanosti sva žrtvovala 37 poskusnih živali. Za izolacijo hepatocitov s perfuzijo jeter *in situ* sva žrtvovala 10 poskusnih živalih. Z magnetno resonanco sva ugotavljala akutne učinke zmesi mikrocinov na skupini 10 poskusnih živali. V kroničnem poskusu sva 12 poskusnih živali izpostavljala subletalnim odmerkom zmesi mikrocinov v pitni vodi in v tem času dvakrat slikala jetra z magnetno resonanco. Spremem-

**Abstract.** Microcystins damage liver tissue by disorganizing the cytoskeleton and inhibiting serine threonine protein phosphatases. Liver cells shrink and blood penetrates the liver tissue. Internal bleeding may lead to haemorrhagic shock. Water pollution associated with the blooming of toxic cyanobacteria as a result of intensive agriculture has been well-documented in the north-eastern Slovenia. We undertook to develop a method for isolation of hepatocytes, and to assess the potency of microcystin RR isolated from the polluted water in Slovenia. By acute exposure of rats to a mixture of microcystins RR and LR we wanted to ascertain whether internal bleeding reflects changes in the haematocrit count. Morphological changes following chronic exposure of animals to microcystin mixture were studied. Simultaneously, we tested the hypothesis that magnetic resonance (MR) imaging is a suitable technique for assessing acute and chronic toxicity of microcystins. The experiments were performed on 37 male Wistar rats. Twenty animals were sacrificed during acute experiments. The effects of the chosen toxin on the isolated hepatocytes obtained by *in situ* perfusion technique were tested in half the animals, while in another half the toxin mixture effects were assessed *in vivo* using MR imaging. For chronic tests the animals were fed with microcystins for two months. Blood was drawn from the inferior caval vein for complete blood count and serum analysis. The liver was removed and weighed and liver specimens were obtained for histological examination. The hepatocyte isolation method afforded a 83% cell survival. The hepatotoxicity of microcystin RR

\*Objavljeno delo je bilo nagrajeno s Prešernovo nagrado za študente v letu 1997.

\*\*Andrej Repež, štud. med., Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, 1000 Ljubljana.

\*\*\*Valentina Otja Giacomelli, štud. med., Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, 1000 Ljubljana.

be sva po končanem poskusu ugotavljala s pregledom krvne slike, biokemičnimi testi seruma, jetrnimi testi, s tehtanjem jeter in histološkim pregledom jetrnega tkiva. Pri metodi izolacije hepatocitov s perfuzijo smo dosegli 83 % preživetje celic. Izbrani mikrocistin RR povzroči na izoliranih hepatocitih spremembe, ki ustrezajo opisom v literaturi. Zmes mikrocistinov je v akutnih poskusih povzročila povečanje teže za 35 %, površine prereza jeter na magnetnoresonančnih slikah pa za 19,3 %. Hematokrit je upadel za 13 %. Histološki pregled je pokazal žariščne krvavitve. V kroničnih poskusih smo ugotovili značilne spremembe v histoloških preparatih in magnetnoresonančnih slikah. Jetrni testi so pokazali izrazite patološke odklone, koncentracija prostega železa v serumu se je znižala za 39,5 %. Povprečna vsebnost in koncentracija hemoglobina v eritocitu ter prostornina eritocita so se zmanjšali. Zaključujeva, da je slikanje z magnetno resonanco primerna metoda za ugotavljanje akutnih zastrupitev z mikrocistini, kjer se krvavitve izraža še z izrazitim padcem hematokrita. V kroničnih poskusih so spremembe jetrnih testov in mikrocitna anemija dokaz patološkega dogajanja v jetrnem tkivu, medtem ko slikanje z magnetno resonanco ni zanesljiv pokazatelj patoloških sprememb.

was comparable to that of microcystins used in previous studies. In acute experiments, the weight of the liver increased by 35 % and its cross-sectional area by 19.3% on MR images. Histological studies revealed focal intrahepatic haemorrhages. The haematocrit decreased by 13 %. Chronic administration of microcystins led to unspecific changes in the morphological pattern and MR images. Liver function tests showed several abnormalities, including a drop in free serum iron by 39.5%. The mean corpuscular haemoglobin, mean corpuscular haemoglobin levels and mean corpuscular volume decreased. MR imaging is a suitable method for assessing acute intoxication. Internal haemorrhage can be monitored by haematocrit determinations. Pathological liver tests and microcytic hypochromic anaemia constitute changes characteristic of chronic intoxication, whereas histological studies and MR imaging yield only unspecific findings.

## Uvod

Strup je vsaka snov, ki lahko že v majhni množini, vnesena po katerikoli poti v telo, zaradi svojih kemičnih lastnosti hudo škoduje zdravju ali celo povzroči smrt organizma (1). Toksini so kemično natančno opredeljene sestavine strupov živalskega, rastlinskega ali mikrobnega izvora (2).

## Zastrupitve s cianobakterijami in njihovimi toksini

Cianobakterije so gramnegativne bakterije, ki občasno v obliki cvetenja modrozeleno barve prepredejo vodno gladino. Zanimanje za toksine cianobakterij je staro že 120 let. V prvem zapisu o njihovih škodljivih učinkih (3) so opisali povezavo med pitjem s cianobakterijami onesnažene vode in zastrupitvami ter smrtjo domačih in divjih živali, o katerih poročajo z vsega sveta (4). Cianobakterije izvrstno uspevajo, ko so zagotovljeni štirje pogoji: blag veter, zmerna vodna temperatura od 15 do 30 stopinj Celzija, pH vode med 6 in 9 ter visoka vsebnost dušičnih in fosforjevih hranilnih snovi. Cianobakterije zaradi zračnih vakuol lebdijo v vodi. Živali, ki pijejo onesnaženo vodo, lahko zaužijejo usodno količino toksinov.

O akutni človeški zastrupitvi s smrtnim izidom do danes še niso poročali, čeprav naj bi bili ljudje na te toksine enako občutljivi kot druge živali. Grenkoba in vonj onesnažene vode človeka odvrneta od pitja (4). Bolj kot akutne zastrupitve je za človeka pomembna kronična izpostavljenost subletalnim odmerkom toksinov (5).

Evtrofikacija vodnih zajetij postaja vedno bolj pereč in globalen problem. Prenasičenost vode s hranili (nitrat in fosfat), ki je posledica gospodinjstkih in industrijskih odpadkov ter spiranja gnojil s obdelovalnih površin, omogoča čezmerno širjenje in bohotenje cianobakterij. Testi, s katerimi po različnih predelih Evrope in Združenih držav preverjajo onesnaženost voda s cianobakterijami, kažejo v poletnem času vsaj v 40% prisotnost cianobakterijskih toksinov (4). Z naraščajočimi koncentracijami toksinov v vodi se lahko v prihodnje bojimo hujših akutnih zastrupitev tudi pri ljudeh.

### Cianobakterije v Sloveniji

Cvetenje toksičnih cianobakterij je resen problem v severovzhodnem predelu Slovenije, kjer intenzivno kmetijstvo povzroča visoko stopnjo evtrofikacije voda. V raziskavi *Biotoksini v sladkih vodah in morju ter njihov vpliv na človeka in okolje* so proučili prisotnost toksičnih cianobakterij v naših vodah (6). V dvoletnem opazovanju so ugotovili 18 cvetenjih cianobakterij, od tega 15 hepatotoksičnih, kar so dokazali z biološkim poskusom na miših. V cvetenju je prevladovala vrsta *Microcystis aeruginosa*. Rezultati preiskave kažejo, da so v Sloveniji cvetenja toksičnih cianobakterij pogost pojav in jih najdemo tudi v vodah, priljubljenih za rekreacijo in ribolov (Koseški bajer v Ljubljani in Blejsko jezero) (7).

### Toksini cianobakterij

Cianobakterije izdelujejo raznovrstne toksine. Na podlagi testov, s katerimi preverjamo njihovo delovanje, jih delimo na citotoksine in biotoksine (4). Učinke biotoksinov proučujemo na malih laboratorijskih živalih (biološki poskus).

#### Kemična struktura cianobakterijskih biotoksinov

Med biotoksini cianobakterij ločimo nevrotoksične alkaloide in hepatotoksične peptide (4). Nevrotoksini cianobakterij so anatoksin-a, anatoksin-a (s), saksitoksin in neosaksitoksin. Prva dva, anatoksin-a in anatoksin-a (s), sta značilna za cianobakterije, medtem ko najdemo saksitoksin tudi pri morskih algah in dinoflagelatih.

#### Hepatotoksini cianobakterij

Hepatotoksini so presnovki cianobakterij (8) rodov *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria* in *Nodularia*, ki naseljujejo sladke in polsladke vode po vsem svetu. Strukturno so toksini monociklični peptidi. Ločimo dve podskupini: mikrocistini in nodularin. Imeni sta povezani z rodovi *Microcystis* in *Nodularia*, iz katerih so jih prvič izolirali (2, 9, 10).

**Mikrocistini** so monociklični heptapeptidi (2) z osnovno kemično strukturo: ciklo-D-Ala-L-X-eritro-β-metil-D-isoAsp-L-Y-Adda-D-isoGlu-N-metil-dehidro-Ala. Posebnost je nenavadna 3-amino-9-metoksi-10-fenil-2,6,8-trimetil-deka-4,6-dienoična kislina (Adda aminokislina) (11).

Poimenovanje posameznih mikrocistinov (2, 8) temelji na kombinaciji dveh črk, ki označujeta imeni L-aminokislin na mestih X in Y (tabela 1). Najbolj raziskani so mikrocistini LR, LA, YA, YM, YR in RR, ki so jih izolirali iz vrst *Mycrocystis aeruginosa*, *M. viridis*, *Anabaena flos-aquae* in *Oscillatoria agardhii* (4).

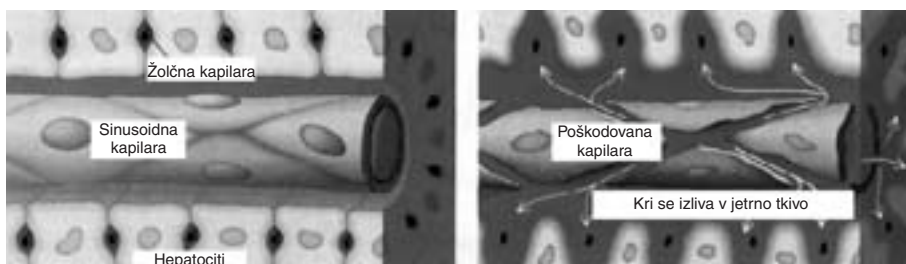
Tabela 1. Aminokisliline, ki lahko zasedajo mesti X in Y v kemični strukturi mikrocistina, in njihovi simboli, ki jih uporabljamo pri poimenovanju toksinov.

Aminokisliline na mestu X	Aminokisliline na mestu Y
levcin (L)	arginin (R)
arginin (R)	alanin (A)
tirozin (Y)	metionin (M)

### Mehanizmi delovanja cianobakterijskih hepatotoksinov

Cianobakterije vstopijo v telo skozi prebavila. Toksini se zaradi prebave v želodcu sproščajo iz celic in se absorbirajo v predelih črevesja, kjer so prisotni prenašalci žolčnih kislin. Prve poškodbe so zato opazne že na črevesnih celicah, jetrne celice pa so pri vseh prizadetih živalih osrednji cilj te skupine toksinov. Selektivnost toksinov za jetrno tkivo je posledica amfipatične kemične strukture, ki preprečuje vstop v vse celice brez specifičnega prenašalnega sistema za organske anione oziroma žolčne kisline, ki je lasten le parenhimskemu jetrnim celicam (12). Hepatotoksini povzročijo, da se hepatociti skrčijo in ločijo med seboj (13). Razmaknejo se tudi endotelijske celice jetrnih sinusoidov, zaradi česar se kri nabira v jetrnem tkivu. Notranja krvavitev povzroča lokalno okvaro jetrnega tkiva (slika 1) in lahko vodi v hipovolemični šok.

Morfologija hepatocita se spremeni zaradi delovanja mikrocistinov na citoskelet, ki je izrazito dinamična struktura in se v normalnih pogojih hitro obnavlja (14, 15). Mikrocistini poškodujejo jetrno tkivo, tako da premaknejo ravnotežje v smer razgradnje. Intermediarni filamenti so prizadeti najprej, nato se okvarijo mikrofilamenti (13). Poškodba citoskeleta povzroči skrčenje prstastih izrastkov, s katerimi se jetrne celice povezujejo med seboj in z endotelijskimi celicami sinusoidov. Prekinitev medceličnih povezav in skrčenje hepatocitov porušita normalno jetrno zgradbo, zato pride do krvavitve iz sinusoidov.



Slika 1. Prikaz mehanizma krvavitve v jetrno tkivo. Levo – normalna jetra pred dodatkom toksina. Desno – po dodatku toksina. Povzeto po (13).

### Molekularna raven delovanja mikrocistinov

Mikrocistini (16) so močni inhibitorji serin/treoninskih proteinskih fosfatov ( $K_i = 0,5-5 \text{ nM}$ ). Reverzibilna fosforilacija beljakovin s proteinskimi kinazami in fosfatazami na serinskih, treoninskih in tirozinskih ostankih ima velik pomen za celično homeostazo in velja za temeljni mehanizem, s katerim se evkariontska celica odzove na zunajcelični dražljaj (17). Med najpomembnejše proteinske fosfataze evkariontske celice spadata proteinski fosfatazi 1 in 2A (PP1 in PP2A). Njuna funkcija je defosforiliranje serin/treoninskih aminokislinskih ostankov različnih pomembnih celičnih beljakovin (18). PP1 in PP2 sta pomembni pri nadzoru in vzdrževanju strukture sestavin citoskeleta. Mikrocistini so specifični zaviralci PP1 in PP2A. Citoskelet prizadenejo z motnjo normalnega ravnotežja med fosforilacijo in defosforilacijo. Neuravnotežena aktivnost proteinskih kinaz kot posledica inhibicije fosfatov vodi v čezmerno fosforilacijo sestavin citoskeleta oziroma beljakovin, ki nanj vplivajo (19–21).

Mikrocistini spodbujajo razvoj tumorjev kot tumorski promotorji (22, 23). Molekularni mehanizmi, s katerimi ti inhibitorji vplivajo na diferenciacijo in proliferacijo celic, še niso popolnoma jasni. Spoznanje, da inhibirajo PP1 in PP2A, je porodilo vprašanje o pomenu teh dveh encimov pri preprečevanju nenadzirane celične rasti in razmnoževanja (17).

### Poskusi z mikrocistini *in vitro*

Fujiki in sodelavci (22) so s poskusi na izoliranih podganjih jetrnih celicah opazovali morfološke spremembe. Sveže izolirani hepatociti so se po dvehurni inkubaciji z mikrocistinom spremenili iz normalne okrogle v vretenasto obliko, prišlo pa je tudi do zlivanja celic med seboj. Z vitalnim barvanjem s tripsanskim modrilom so s svetlobnim mikroskopom opazovali obarvanje celic po dodatku toksina. Glede na izsledke tega poskusa so sklepali, da toksin ne povzroči celične smrti (23). V mediju niso zaznali povečanja aktivnosti aspartatne aminotransferaze (AST), ki se sprosti iz odmrlih celic. Deoksiholat, holat, bromosulfitalein in rifampicin imajo zaščitni učinek na jetra pred vplivi toksina, verjetno zaradi tekmovanja za prenašalni sistem (24).

Učinke mikrocistina *in vitro* so na izoliranih hepatocitih spremljali s transmisijskim elektronskim mikroskopom (EM) (23). Spremembe so opazili v 5 minutah po dodatku toksina. Opazili so nastanek mehurčkov na membrani celic po dodatku mikrocistinov (25). Avtorji opisujejo, da iz svežih okroglih celic z dobro izraženimi mikrovili na površini celice, številnimi mitohondriji in drugimi organeli, ki so enakomerno razporejeni po citoplazmi, nastanejo po 20-minutni inkubaciji z mikrocistini očitne spremembe v celični obliki, izginitve mikrovilov, v citosolu pa se oblikujejo agregati, ki so neenakomerno nakopičeni po citoplazmi celice.

Primerjava učinka mikrocistinov na izvleček proteinskih fosfatov jeter in ledvic je pokazala, da sta fosfatazi obeh izvorov enako občutljivi za inhibicijo s tem toksinom (26). Selektivno delovanje na jetra je zagotovljeno le s specifičnim prenašalnim sistemom v membrani jetrne celice.

Preučevanje učinkov mikrocistina LR na izolirane endotelijske celice goveje pljučne arterije ni pokazalo poškodb endotelijskih celic (27). Zato so menili, da vzrok jetrnih krvavitev po delovanju toksina niso primarne poškodbe endotelijskih celic jetrnih sinusoidov, temveč je odločilno delovanje na hepatocite.

### Poskusi z mikrocistini *in vivo*

Po intraperitonealnem (ip.) vbrizganju so na miših opazovali porazdelitev z radioaktivnim izotopom označenih mikrocistinov po organizmu. Ugotovili so kopičenje peptidov v jetrih, v drugih organih pa je bilo toksin zaznati le v sledovih (28, 29).

Mikrocistin LR povzroči smrt miši v 1–2 urah po ip. ali intravenski (iv.) injekciji. Toksični odmerki mikrocistinov povzročijo hude intrahepatične krvavitve z obilnim povečanjem jetrne mase poskusne živali, kar je značilno za akutno zastrupitev. S  $^{51}\text{Cr}$  označenimi eritrociti so zasledili razpad jetrnih sinusoidov in obilne krvavitve v jetrno tkivo (30, 31). Kljub temu, da so jetra tarčni organ za ta toksin, pa hitrega nastopa letalnih učinkov ne moremo razložiti zgolj z akutno odpovedjo jetrne funkcije.

V raziskavi *in vivo* so z izotopnimi označevalci ugotovili razporeditev krvi po vbrizgu toksina, ki se je razlikovala od tiste pri kontrolni skupini (27). Po 20 minutah se kri nakopiči v jetrnem tkivu, ki postane večje in težje. Hkrati se močno poveča koncentracija serumske alaninske aminotransferaze (ALT). Normalna količina krvi miši je znašala 6,8 % telesne teže. Jetra se po vbrizganju toksina povečajo s 5,7 % telesne teže na 6,3 %. Ugotovili so, da se v jetrih zadržuje približno trikratna prostornina krvi v primerjavi s kontrolo. Povečanje jeter gre izključno na račun nakopičene krvi.

V raziskavi *in vivo* so na miših proučevali povezavo med inhibicijo proteinskih fosfatov in akutno hepatotoksičnostjo (26). Zastrupitev se pokaže kot povečanje jeter zaradi krvavitve. Inhibicija PP1 in PP2A nastopi že po nekaj minutah, medtem ko se jetra opazno povečajo šele po pol ure. Po eni uri se teža jeter poveča na okoli 10 % telesne teže.

Toksičnost pitne vode, onesnažene z zmesjo mikrocistinov, so opazovali na prašičih (32). V 71-dnevnem kroničnem poskusu so dajali prašičem piti vodo, onesnaženo s cianobakterijami. Po žrtvovanju so opazovali spremembe v koncentracijah serumskih faktorjev, makroskopske in mikroskopske spremembe organov. Koncentracije AST, ALT, laktatne dehidrogenaze (LDH) in celokupnih beljakovin niso pokazale sprememb. Ugotovili pa so povečanje koncentracij gama glutaminske transferaze ( $\gamma$ -GT), alkalne fosfataze (AF), celotnega bilirubina in znižanje plazemske koncentracije albuminov. Makroskopsko niso opazili izrazitih sprememb. Na prečnem prerezu jeter so opazili blago zrnatost. Jetrna teža se ni bistveno spremenila. Mikroskopsko niso opazili sprememb na srcu, ledvicah, pljučih, možganih, modih in na posameznih delih prebavil, mikroskopsko pa so na jetrih opazili posamezne spremembe celic.

Na poskusnih živalih (33, 34) so proučevali karcinogene učinke mikrocistinov pri kroničnem izpostavljanju subletalnim odmerkom. V raziskavi tumor promotorskega učinka mikrocistinov so dokazali domnevo, da mikrocistini olajšujejo nastanek jetrnega karcinoma.

### Učinki toksičnih cianobakterij na ljudi

Toksini cianobakterij v zajetjih pitne vode povzročajo občasne zastrupitve ljudi (35). Najhuje so ogroženi ljudje v deželah, kjer evtrofične površinske vode uporabljajo za pridobivanje pitne vode. Cianobakterijski toksini so odporni proti standardnim procesom

prečiščevanja vode. Dodajanje bakrovega sulfata vodnim zajetjem povzroči le razpad celic in sproščanje toksinov. Vodilna bolezenska znamenja zastrupitve so odvisna od vrste toksina. Ločimo hepatotoksikozo, perakutno nevtotoksikozo, gastrointestinalne in respiratorne motnje ter alergične reakcije. Retrospektivna preiskava zastrupitve s hepatotoksičnimi mikrotoksini v Avstraliji (36) je pokazala povečanje koncentracije  $\gamma$ -GT.

Kot način zdrave prehrane je zelo razširjena uporaba posušenih vlaknatih cianobakterij *Spirulina*. Preskušanje na laboratorijskih živali ni pokazalo toksičnosti tega rodu (35). Poleg rodu *Spirulina* najdemo v trgovinah pripravke iz drugih rodov cianobakterij. Ti proizvodi predstavljajo potencialno nevarnost, saj lahko med nenevarnimi vsebujejo tudi toksične cianobakterije. Tovrstne izdelke bi morali pred prodajo na tržišče skrbno preučiti. Glede na tumorsko promotorsko aktivnost *Microcystis*, je vprašljivo, ali bi preprosto testiranje akutne toksičnosti obvarovalo rednega uživalca cianobakterij pred kroničnim tveganjem.

### Namen raziskave in delovne hipoteze

Namen pričujoče raziskave je proučiti vpliv mikrocistinov na degenerativne spremembe parenhimskih organov. Ob pregledu literature s tega področja sva razbrala, da mikrocistini delujejo skoraj izključno na jetra zaradi specifičnega prenašalnega sistema v plazmalemii jetrne celice. Navkljub obširnosti preiskav s področja toksinov cianobakterij sva ugotovila pomanjkljivo poznavanje nekaterih patofizioloških učinkov in pristopov k proučevanju teh toksinov.

Primarne celične kulture, pridobljene z izolacijo jetrnih celic, so zelo primerno orodje za ugotavljanje učinkov mikrocistinov *in vitro*. Zato smo tudi na Inštitutu za patološko fiziologijo vpeljali metodo izolacije jetrnih celic. Dosedanje raziskave akutnih učinkov mikrocistinov na izoliranih jetrnih celicah, so pokazale, da se te razobličijo, toksini pa ne povzročijo akutne celične smrti. Prva hipoteza je, da toksin, izbran za najino raziskavo, povzroči podobne spremembe na izoliranih jetrnih celicah kot opisani učinki drugih mikrocistinov, ki sva jih zasledila v literaturi. Domnevo bova potrdila ali ovrgla s spremljanjem učinkov na celicah po dodatku izbranega toksina v medij celičnih kultur.

Akutni učinek letalnih odmerkov povzroči obilno krvavitve, ki močno poškoduje jetrno tkivo. V odvisnosti od obsežnosti krvavitve v jetra se lahko razvije hipovolemični šok. Druga hipoteza je, da se bodo v akutnem poskusu pokazale spremembe v vrednosti hematokrita kot posledica krvavitve. Domnevo bova potrdila ali ovrgla s spremljanjem vrednosti hematokrita.

Spremembe zaradi kronične izpostavljenosti mikrocistinom so razmeroma slabo dokumentirane. Kronično izpostavljanje prašičev subletalnim odmerkom mikrocistinov povzroči nekatere spremembe v izvidih jetrnih testov in neznačilne morfološke spremembe. Tretja hipoteza je, da se bodo pri kroničnem dodajanju mikrocistinov v pitno vodo pokazale spremembe v jetrni morfologiji in jetrnih izvidih podgan. Domnevo bova potrdila ali ovrgla s pregledom jetrnih testov in jetrne morfologije s svetlobnim in elektronskim mikroskopom.

V literaturi ni zaslediti uporabe neinvazivnih slikovnih metod *in vivo*, ki bi omogočale spremljanje časovnega razvoja patoloških sprememb. V medicini je za prikaz mehkih tkiv najprimernejše slikanje z magnetno resonanco. Četrta hipoteza je, da bodo spremembe zaradi učinkov mikrocistinov v akutni in kronični zastrupitvi zaznavne s slikovnimi metodami *in vivo*. Domnevo bova potrdila ali ovrgla s slikanjem jeter z magnetno resonanco (MR).

## Materiali in metode

### Materiali

#### Poskusne živali

Pri načrtovanju in izvedbi poskusa sva se trudila žrtvovati čim manjše število poskusnih živali. Poskuse sva opravila na 37 laboratorijskih albino podganah (Wistar). Raziskovalno delo je zajemalo akutne in kronične poskuse. Za vsak poskus sva potrebovala posebno skupino preiskovanih in kontrolnih živali.

Za akutne poskuse sva žrtvovala 20 od 201 do 249 g težkih samcev. Polovico sva jih uporabila v poskusu *in vivo*, kjer sva opazovala spremembe na jetrih z MR. Preostalih 10 živali sva uporabila za izolacijo hepatocitov z metodo *in situ* kolagenazne perfuzije jeter.

V kroničnem poskusu sva žrtvovala 17 samcev, ki so bili na začetku poskusa težki od 211 do 284 g. Pet živali je služilo kontroli, ostalih 12 pa sva dva meseca izpostavljala mikrocistinom, raztopljenim v pitni vodi.

#### Toksini in raztopine

Toksini so darilo dr. Bojana Sedmaka iz Oddelka za biologijo, Biotehnična fakulteta Univerze v Ljubljani. Pri vseh poskusih sva uporabljala neprečiščeno zmes toksinov v obliki liofiliziranih cianobakterij v razmerju *Microcystis wessenbergii* 75 % in *Microcystis aeruginosa* 25 %. Gram liofiliziranega vzorca vsebuje:

- 0,31 mg **mikrocistina RR** in
- 0,16 mg **mikrocistina LR**.

Z biološkimi poskusi na miših so ugotovili, da je LD<sub>100</sub> vrednost 160 mg suhe teže cianobakterij na kilogram telesne mase miši in povzroča povečanje mase jeter na 7,3 % telesne teže (7).

Pri poskusih na celičnih kulturah sva uporabila prečiščen **mikrocistin RR**. Postopki liofilizacije, izoliranja in prečiščevanje toksina so opisani v literaturi (7).

Pufri za izolacijo jetrnih celic:

- pufer I: 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 25 mM NaHCO<sub>3</sub>;
- pufer II je enak pufri I z dodatkom 3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM Mg SO<sub>4</sub> in kolagenazo (0,2–0,4 mg/ml);
- pufer III je kot pufer II brez kolagenaze.

Pripravki za anestezijo: Ketanest<sup>®</sup>, Parke-Davis, Berlin in Rompun<sup>®</sup>, Bayer, Leverkusen.



## Metode

### Anestezija

Živali sva pred izvedbo vseh poskusov uvedla v splošno anestezijo. Anestezijo sva uporabljala tudi pri neinvazivni metodi slikanja z MR, da bi žival mirovala v času slikanja.

V eksperimentalni kirurgiji na poskusnih živalih sta se uveljavili dve metodi uvajanja splošne anestezije (37):

- inhalacijska anestezija s hlapnim anestetikom (halotan),
- parenteralna anestezija s kombinacijo anestetikov in z mišičnim relaksantom.

Med možnimi stranskimi učinki hlapnega anestetika halotana je pojav akutne jetrne nekroze, verjetno zaradi preobčutljivostne reakcije, povezane z dedno presovno motnjo, kjer se iz halotana tvorijo toksični presnovki (38). Verjetnost stranskega učinka se povečuje s ponovnim izpostavljanjem, zato sva izbrala kombinacijo anestetikov, ki na jetra ne učinkujejo. Mešanico sestavin, ki sva jo uporabila za ip. anestezijo, sva povzela po literaturi (37, 39): 0,6 mg Ketanesta® in 0,4 mg Rompuna® na kg telesne teže.

### Postopki pri akutnem poskusu

Živali sva omamila in jim ip. vbrizgala 25 mg zmesi toksinov, raztopljenih v fiziološki raztopini. Z metodo MR sva dve uri spremljala poskus in spremembe na jetrih primerjala s posnetkom pred vbrizgom. Po poskusu sva živalim odvzela kri iz spodnje votle vene (*vena cava inferior*) za hemogram. Po izkrvavitvi sva živali raztelesila in odvzela jetra za zunanji in histološki pregled.

### Slikanje jeter z metodo magnetne resonance

MR je neinvazivna diagnostična slikovna tehnika (40–42). Jetra sva slikala z 2,35-T-MR-tomografo Bruker na Inštitutu Jožefa Stefana. Pri slikanju sva anestezirano žival hrbtno položila na sondno mizico. Da bi preprečila sploščitev telesa v prsnem in trebušnem predelu in kožne gube, ki kazijo MR-slike, sva podgano z obeh strani podprla s klinastima kosoma stiroporja.

Z izbiro dveh parametrov slikanja, časa ponavljanja zaporedja (TR) in časa odmeva (TE), izbiramo med T1- in T2-poudarjenim slikanjem (43, 44). Slikala sva T1-poudarjene slike. Najboljše razmerje med kakovostjo slike in zamudnostjo slikanja sva dosegla s parametri TR = 600 ms, TE = 30 ms, številom povprečenj 6 in celotnim časom slikanja okoli 10 minut. Debelina prereza je bila 5 mm, velikost vidnega polja 15 cm in matriks 256 × 256. S pomočjo hitre orientacijske slike v frontalni ravnini sva izbrala tri prečne prereze skozi jetra v različnih višinah in jih posnela sočasno, kar ni vplivalo na kakovost ali čas slikanja.

Živali iz kroničnega poskusa sva po T1-poudarjenem slikanju posnela še z metodo DECH (*double echo*), ki uporablja dva spinska odmeva in izdelava T2-poudarjene slike. Uporabila sva parametre RT = 2000 ms, 1. odmev = 33 ms, 2. odmev = 90 ms, celotni čas 35 minut. Na takšnih slikah izstopijo strukture z drugimi relaksacijskimi časi. Z njimi sva želela prikazati morebitna področja nehomogenosti v jetrih, ki pri T1-poudarjenih slikah ne bi izstopala iz ozadja ostalih jeter.

### **Kvantitativna ocena spremembe velikosti jeter na magnetnoresonančnih slikah pri akutnih poskusih**

V akutnem poskusu sva živali slikala 9-krat v četrturnih časovnih presledkih. Pri vsakem slikanju sva hkrati posnela tri prečne prereze skozi najširši del jeter. Hkrati z jetri sva slikala tudi posodico z vodo, ki je služila kot kontrolna snov za oceno sprememb intenzitete MR-signala. Vse slike sva prenesla s trdega diska Brukerjevega slikovnega sistema na osebni računalnik. S programskim paketom Autocad® sva kvantitativno ocenila velikost jetrne površine na vsakem posameznem prerezu. Jetra sva na sliki obrisala in določila površino, ki jo je izračunal program. Iz treh različnih prerezov sva izračunala povprečno površino jetrnega preseka v danem času.

### **Potek kroničnega poskusa**

Skupino 12 podgan sva v dvomesečnem kroničnem poskusu vsak dan izpostavljala majhnim koncentracijam mikrocistinov, raztopljenih v vodi. Dnevno so živali prejele 1,85 mg toksina na kilogram telesne teže. Po dveh mesecih, ko sva zaključila poskus in živali žrtvovala, so bile težke od 375 do 429 g. Dvakrat sva jetra poskusnih in kontrolnih živali *in vivo* slikala z MR. Prvič sva jih slikala mesec dni po začetku, drugič pa mesec kasneje, ob koncu poskusa. Po drugem slikanju sva živali žrtvovala z izkrvavitvijo v anesteziji. Za biokemično preiskavo jetrnih encimov in hemogram sva odvzela kri. Vse živali sva raztelesila in odvzela vzorce jeter za histološko preiskavo. Manjše koščke jeter sva pripravila za transmissijsko EM.

### **Odvzem krvi za hemogram in biokemično analizo**

Živalim sva ob koncu kroničnega poskusa v anesteziji pred odvzemom jeter vzela vzorec krvi za hemogram in biokemično analizo. Posebne epruvete za hemogram z EDTA sva napolnila z 2 ml krvi. Del vzorca, namenjen biokemični analizi, sva centrifugirala pri 3000 obratih/minuto 8 minut z laboratorijsko centrifugo Tehnica Železniki LC 243. Serum sva odpipetirala v posebno epruveto brez dodatkov. Vse vzorce so analizirali na Inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Kliničnega centra v Ljubljani.

### **Transmissijska elektronska mikroskopija**

V kroničnem poskusu sva zaradi pričakovane subtilnosti sprememb histološke metode dopolnila z EM. Ob raztelesenju po kroničnem poskusu sva od jeter odščipnila 1 mm<sup>3</sup> velik košček za EM. Poldnevni fiksaciji v mešanici 2 % glutaralaldehida in 2 % paraformaldehida je sledilo dveurno spiranje z veronalnim pufrom (pH 7,4), nato dodatno enourno fiksiranje v 2 % ozmijevem tetraoksidu. Vse opisane raztopine so bile ohlajene na 4°C.

Nato sva vzorce dehidrirala z naraščajočo koncentracijo etanola (od 30 do 100 %). Dehidriran vzorec sva za 20 minut potopila v propilenoksid, zatem pa za pol dneva v mešanico plastika s trdilcem in propilenoksida. Vzorce sva vložila v čisti plastik s trdilcem. Prvi dan sva jih trdila pri 60°C in naslednje tri dni pri 70°C. Bloke z vloženi vzorci tkiva sva narezala z ultramikrotomom Jung Ultracut E.

Ultratanke rezine, debele 40 do 50 nm, sva dvojno kontrastirala, najprej 15 minut v uranil acetatu, nato 10 minut v svinčevem citratu. Preparate sva proučevala in slikala na elektronskem mikroskopu Jeol JEM 100 CX.

#### **Priprava vzorcev za histološki pregled**

Po zunanjem pregledu in tehtanju sva jetra potopila v puferirani nevtralni formalin (10 %, pH 7,0) za fiksacijo. Po enotedenski fiksaciji v formalinu sva izbrane koščke vzorca vklopila v parafin (dehidracija z naraščajočimi koncentracijami etanola, bistrenje s ksilenom in vklop v parafinsko smolo). Z drsnim mikrotomom Zeiss sva od vklopljenega vzorca odrezala 4 do 6 mikrometrov debele rezine.

Standardno barvanje s hematoksilinom in eozinom (45) sva pri kroničnih vzorcih dopolnila s trikromatično metodo po Massonu (46), ki omogoča dober prikaz vezivnega tkiva. Histološke preparate sva proučila s svetlobnim mikroskopom Opton MC 100 Axioskop in ustrezne vzorce posnela na diafilm Kodak 50 ASA.

#### **Izolacija hepatocitov z jetrno perfuzijo *in situ***

Podganje hepatocite smo izolirali po metodi perfuzije *in situ* s kolagenazo po Berryu in Friendu (47). Jetra so pri tej metodi še v telesu, ko skozi kirurški postopkom najprej vzpostavimo ustrezen pretok, nato pa jih perfundiramo s tremi različnimi raztopinami. Prednost izbrane metode je, da razmere ustrezajo fiziološkim in omogočajo izolacijo v velikem odstotku nepoškodovanih hepatocitov.

Jetra sva perfundirala s tremi različnimi raztopinami, ogreti na 37°C. Pretok skozi sistem je poganjala kirurška črpalka za zunajtelesni krvni obtok. Hitrost pretoka sva nastavila na 40 do 50 ml/min.

Anestezirano žival sva hrbtno pritrdila na kirurško mizico. Trebuh sva odprla z vzdolžnim medianim rezom in dvema prečnima v višini ledvic. Odmaknila sva črevesje v levo in s tem odkrila portalno in spodnjo votlo veno. Portalno veno sva kanulirala s kanulo Venflon 1,2 Ø pol centimetra pred jetri. Vključila sva črpalko in začela spirati s prvo raztopino. Prerezala sva spodnjo votlo veno pod desno ledvico. Odprla sva prsni koš in skozi desni atrij potisnila kanulo Venflon 2,0 Ø v prsni del spodnje votle vene, trebušni del pa podvezala. S pufrom I (brez kalcija) sva jetra spirala približno deset minut, dokler niso nabrekli in pobledela (slika 2).

Takrat sva zamenjala raztopino s pufrom II (kolagenaza), s katerim sva perfundirala jetra 10 do 20 minut, odvisno od ocene stanja jeter. Zunanji videz jeter in test z odtisom topega predmeta na njihovi površini lahko uporabimo kot kazalec zadostne obdelave s kolagenazo. Pri zadostno encimsko razgrajenih jetrih ostane površina vtisnjena. Med perfuzijo s pufrom II začne ta pronicati skozi jetrno površino. Nazadnje jetra 3 minute perfundiramo s pufrom III. Jetra izrežemo in prenesemo v petrijevko z raztopino III. Izolirana jetra nato pri 37°C 10 minut tresemo (60–70 tresljajev na minuto). Skozi najlonsko mrežico filtriramo razpadlo jetrno tkivo. S tremi počasnimi centrifugiranjem (2 minuti pri 50 g) ločimo hepatocite od celičnega debrisa in manjših celic jeter. Hepatociti so v temnorjavem sedimentu.



Slika 2. Operacija poskusne živali za izolacijo jetrnih celic s perfuzijo.

Število oziroma koncentracijo celic sva določila s celičnim števcem. Preživetje celic sva ocenjevala z barvanjem s tripanskim modrilom. Celice sva v sterilnih razmerah vsadila na petrijevke. Tako pripravljene primarne celične kulture so v primernih pogojih gojili na Inštitutu za histologijo in embriologijo, MF v Ljubljani.

#### **Poskus *in vitro* na primarnih celičnih kulturah hepatocitov**

Na nekaj dni starih celičnih kulturah sva z invertnim svetlobnim mikroskopom Nikon TMD2 proučila morfološke spremembe hepatocitov po dodatku mikrocistina. Poskus sva izvedla s prečiščenim mikrocistinom RR. Po raztapljanju v fiziološki raztopini in dodatnem razredčenju v mediju za celične kulture je bila končna koncentracija toksina v kulturi 10  $\mu$ M. Spremembe celic v primarni kulturi po dodatku toksina smo beležili s fotoaparatom Nikon F 600.

#### **Statistične metode**

Za oceno statističnih značilnosti dveh majnih neodvisnih vzorcev sva uporabila metode opisne statistike in Student t-test (48, 49). Vrednosti so izražene z aritmetično sredino  $\pm$  SD (standardna deviacija povprečja). Za statistično analizo sva uporabila programske pakete MS Excel® in Corel QuatroPro®.

## **Rezultati**

#### **Analiza uspešnosti izolacije hepatocitov**

Uspešnost metode sva ocenila z deležem preživetja parenhimskih jetrnih celic. Po končanem postopku izolacije sva celice vitalno obarvala s tripanskim modrilom. Celice, ki so se obarvale modro, sva štela za mrtve, delež preživelih celic pa je bil 83 %.

### Rezultati poskusa na celični kulturi

Enoslojne celične kulture hepatocitov sva opazovala pred dodatkom mikrocistina RR in po njem. Prve spremembe sva opazila po 25 minutah. Celice so vidno spremenile obliko: iz poligonalnih celic, pripetih na dno petrijevke, so nastale celice zaokroženih oblik, ki so se odlepile s podlage. Barvanje s tripanjskim modrilom je pokazalo, da so celice spremenjene oblike še vedno žive.

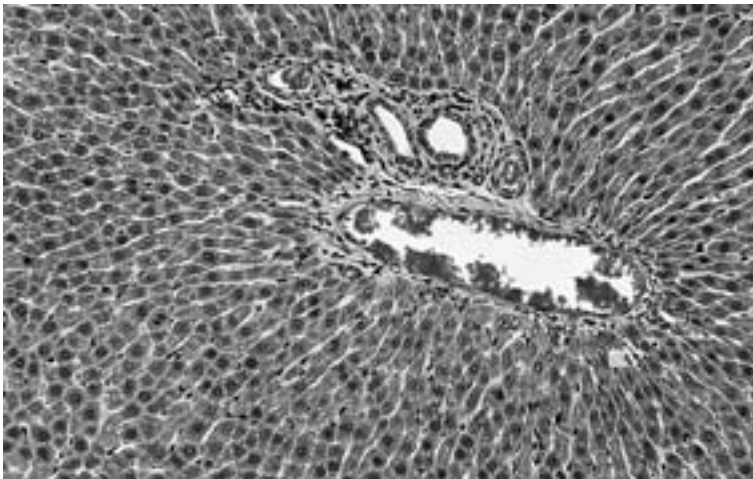
### Analiza rezultatov poskusov *in vivo*

#### Analiza akutnega poskusa *in vivo*

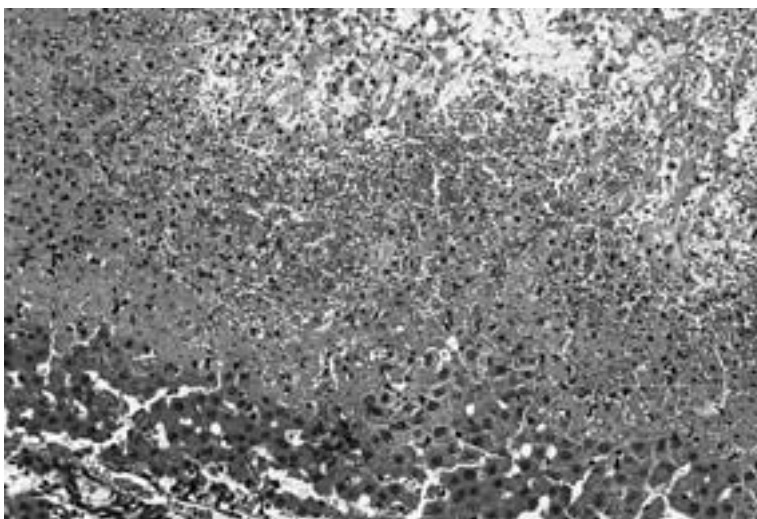
Poskusnim živalim smo vbrizgali subletalni odmerek mikrocistina. V primerjavi s kontrolno skupino (slika 3) so bila jetra ob razteženju težja za 35 % in temnejše rdeče-rjave barve. Z rezne ploskve se je izcejala rdečkasta tekočina. Histološki pregled je pokazal mestoma hudo poškodovano zgradbo jetrnega tkiva zaradi krvavitev (slika 4). Struktura tkiva je v žarišču krvavitve popolnoma razpadla. Sledi pas razobličnih parenhimskih jetrnih celic s svetlejšo zrnčavo citoplazmo in piknotičnimi jedri. Med celicami se kopičijo rdeče krvničke. Ponekod je že opaziti izstopanje vnetnega infiltrata. Predeli jeter zunaj krvavitev niso spremenjeni.

Pri spremljanju površine prereza jeter z MR se ta v času dveh ur po dodatku mikrocistina poveča za 19,3 %. Slika 5 prikazuje relativno povečanje prereza v odvisnosti od časa po vbrizgu toksina. Sprememba je izražena v deležu površine tik pred dodatkom toksina. Glede na kontrolni objekt se intenzivnost signala iz jeter ni spremenila.

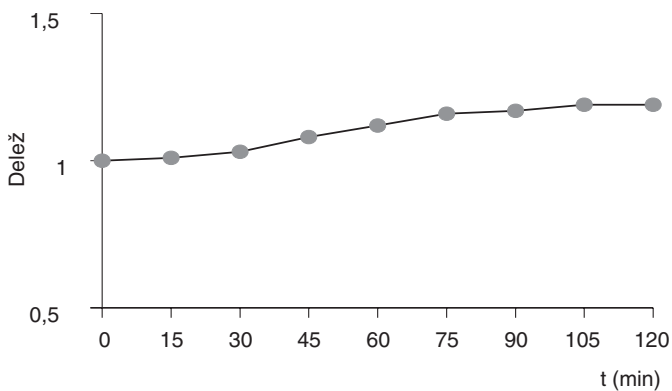
Hematokrit (Ht) se v akutnem poskusu zmanjša za 13 % (tabela 2). Spremembe so statistično značilne ( $p < 0,01$ ).



Slika 3. Histologija zdravih podganjih jeter. Barvanje s hematoksilin-eozinom. 200-kratna povečava.



Slika 4. Mikroskopske spremembe trabekularne zgradbe podganjih jeter po delovanju mikroocistinov v akutnem poskusu in vivo. Barvanje s hematoksilin-eozinom. 200-kratna povečava.



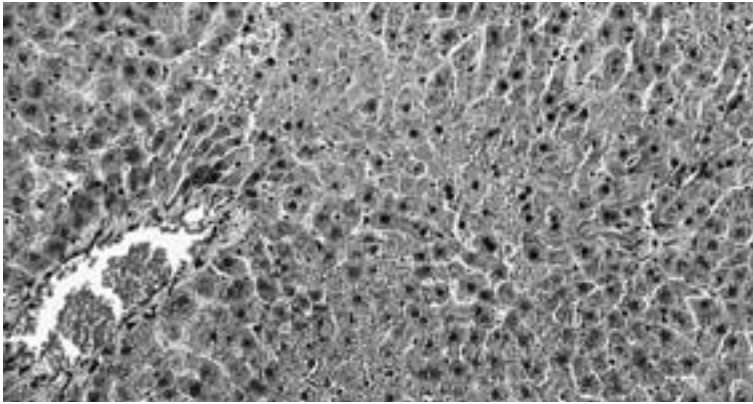
Slika 5. Prikaz povečanja površine prereza jeter v odvisnosti od časa.

Tabela 2. Hematokrit (Ht) v akutnem poskusu. SD – standardna deviacija.

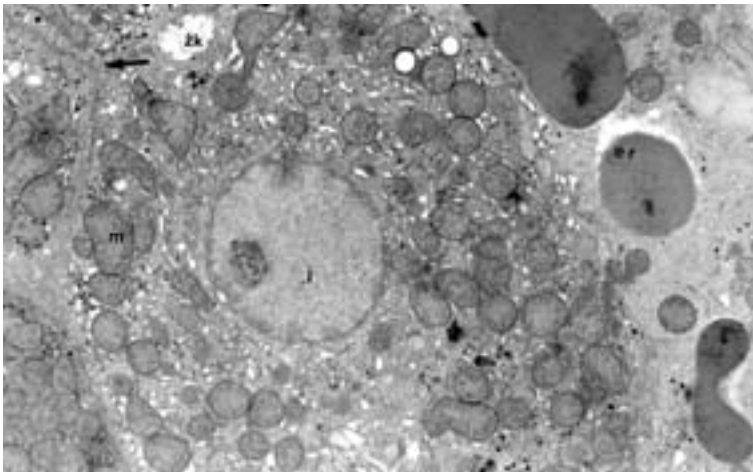
Poskusna žival	Ht ( $\bar{x} \pm SD$ )
<b>Kontrola</b>	<b>0,45 <math>\pm</math> 0,02</b>
<b>Akutno</b>	<b>0,39 <math>\pm</math> 0,01</b>

### **Analiza kroničnega poskusa *in vivo***

Tehtanje jeter po kroničnem poskusu ni pokazalo statistično pomembnih sprememb ( $p < 0,05$ ). Zunanji videz jeter ni kazal posebnosti. Histološko sva v jetrnem tkivu zasledila področja jetrnih parenhimskih celic z eozinofilno citoplazmo in piknotičnimi jedri, ki se jasno razlikujejo od predelov celic z običajno, temnejšo barvo citoplazme in okroglimi jedri z rahlo kromatinsko strukturo in izraženimi jedrci (slika 6). Citoplazma posameznih celic kaže drobnokapljico maščobno preobrazbo. S trikromatsko barvno tehniko po Massonu sva po primerjavi s kontrolno skupino izključila pomnožitev veziva v jetrnem tkivu.

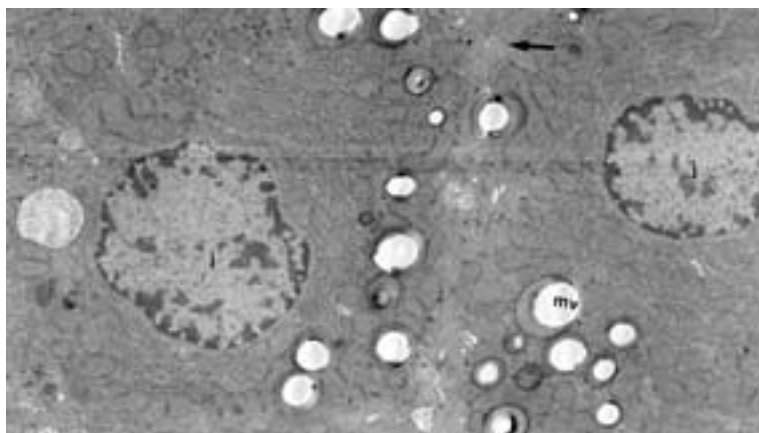


Slika 6. Histološke spremembe jetrnega tkiva po kroničnem poskusu *in vivo*. Barvanje s hematoksilin-eozinom. 200-kratna povečava.



Slika 7. Ultrastruktura normalne jetrne celice. Puščica kaže stik treh celic, žk – žolčna kapilara, j – jedro, m – mitohondrij, er – eritrocit v sinusoidu. 6600-kratna povečava.





Slika 8. Patološke spremembe v ultrastrukturi jetrne celice. Puščica kaže širok medcelični stik, j – jedro, mv – maščobna vakuola. 6600-kratna povečava.

V primerjavi z ultrastrukturo normalne jetrne celice (slika 7), katere jedro je okroglo z enakomerno razpršenim evkromatinom, najdemo pri jetrni celici v kroničnem poskusu nekoliko nagubano jedrno membrano, grudice heterokromatina pa so nakopičene ob notranji jedrni membrani. Jetrne celice, ki običajno mejijo druga na drugo v tankih ravnih stikih, se v poskusu razobličijo in razmaknejo. V citoplazmi jetrnih celic opazimo pomnožene maščobne vakuole (slika 8). Izven svetline krvnih žil najdemo rdeče krvničke in pomnožene vnetne celice.

Koncentracija hemoglobina v krvi (Hb) in povprečni volumen eritrocita (MCV) se zmanjšata za 10 %, povprečna vsebnost hemoglobina v eritrocitu (MCH) za 25 %, povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitu (MCHC) pa za 8 % (tabela 3). Vse spremembe se statistično značilno razlikujejo od kontrolne vrednosti ( $p < 0,05$ ).

Tabela 3. Učinki kronične izpostavljenosti mikrocistinom na rdečo krvno sliko. Ht – hematokrit, Hb – koncentracija hemoglobina v krvi, MCV – povprečni volumen eritrocita, MCH – povprečna vsebnost hemoglobina v eritrocitu, MCHC – povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitu, SD – standardna deviacija.

Poskusna žival	Ht ( $x \pm SD$ )	Hb (g/l) ( $x \pm SD$ )	MCV (fl) ( $x \pm SD$ )	MCH (pg) ( $x \pm SD$ )	MCHC (g/dl) ( $x \pm SD$ )
Kontrola	0,45 $\pm$ 0,02	168,3 $\pm$ 1,52	52,8 $\pm$ 2,15	22,5 $\pm$ 1,52	368,4 $\pm$ 10,89
Toksin	0,42 $\pm$ 0,01	154,7 $\pm$ 6,15	48,01 $\pm$ 2,3	17,9 $\pm$ 1,23	339,1 $\pm$ 14,05

Primerjava s kontrolno vrednostjo je pokazala statistično značilno spremembo koncentracije prostega železa v serumu ( $p < 0,05$ ), ki pade za 39,5 % (tabela 4).



Tabela 4. Koncentracija prostega železa v krvnem serumu v kroničnem poskusu *in vivo*. SD – standardna deviacija.

Poskusna žival	Železo ( $\mu\text{mol/l}$ ) ( $x \pm \text{SD}$ )
<b>Kontrola</b>	<b>55,9 <math>\pm</math> 6,52</b>
<b>Toksin</b>	<b>33,8 <math>\pm</math> 6,39</b>

Serumske vrednosti encimov, ki prikazujejo jetrno funkcijo, so se značilno povečale v primerjavi s kontrolno vrednostjo ( $p < 0,05$ ). Najbolj se poveča koncentracija AF za 27 %, sledijo koncentracija  $\gamma$ -GT za 25 %, AST za 19,2 % in ALT za 12 % (tabela 5).

Tabela 5. Serumske vrednosti jetrnih encimov v kroničnem poskusu. AST – koncentracija aspartatne aminotransferaze, ALT – koncentracija alaninske aminotransferaze,  $\gamma$ -GT – koncentracija gama glutaminske transferaze, AF – koncentracija alkalne fosfataze, SD – standardna deviacija.

Poskusna žival	AST ( $\mu\text{kat/l}$ ) ( $x \pm \text{SD}$ )	ALT ( $\mu\text{kat/l}$ ) ( $x \pm \text{SD}$ )	$\gamma$ -GT ( $\mu\text{kat/l}$ ) ( $x \pm \text{SD}$ )	AF ( $\mu\text{kat/l}$ ) ( $x \pm \text{SD}$ )
<b>Kontrola</b>	<b>1,15 <math>\pm</math> 0,17</b>	<b>0,4 <math>\pm</math> 0,1</b>	<b>0,61 <math>\pm</math> 0,03</b>	<b>1,28 <math>\pm</math> 0,54</b>
<b>Toksin</b>	<b>1,38 <math>\pm</math> 0,48</b>	<b>0,45 <math>\pm</math> 0,12</b>	<b>0,76 <math>\pm</math> 0,07</b>	<b>1,62 <math>\pm</math> 0,28</b>

Koncentracija celotnega bilirubina v serumu se v kroničnem poskusu poveča za 10 %, serumskega albumina pa za 8,2 % (tabela 6). Spremembi se statistično značilno razlikujeta od kontrolne vrednosti ( $p < 0,05$ ).

Tabela 6. Spremembe celotnega bilirubina in albumina v serumu. SD – standardna deviacija.

Poskusna žival	Celotni bilirubin ( $\mu\text{mol/l}$ ) ( $x \pm \text{SD}$ )	Albumin (g/l) ( $x \pm \text{SD}$ )
<b>Kontrola</b>	<b>10,6 <math>\pm</math> 4,72</b>	<b>31,7 <math>\pm</math> 1,58</b>
<b>Toksin</b>	<b>11,8 <math>\pm</math> 1,49</b>	<b>29,3 <math>\pm</math> 0,87</b>

Koncentracija glukoze naraste za 62 %. Sprememba je statistično značilna ( $p < 0,05$ ).

## Razpravljanje

### Učinki toksinov cianobakterij *in vivo*

Mikrocistine so proučevali v mnogih raziskavah *in vivo*, ki so obravnavale akutne učinke letalnih odmerkov na različne živali, porazdelitev toksinov v organizmu in mehanizem delovanja na tarčno tkivo. Poskusi, pri katerih sva živalim vbrizgala subletalni odmerek izbrane zmesi mikrocistinov, so pokazali akutne učinke, podobne tistim, ki so že dokumentirani v literaturi. S primerjavo z že objavljenimi rezultati sva potrdila domnevo, da najina zmes toksinov deluje ustrezno opisom v literaturi.

Z metodo MR zanesljivo ugotovimo akutne spremembe velikosti jeter zaradi delovanja mikrocistinov. Spremembe v vrednosti hematokrita so kazale na notranjo krvavitve. Vse te rezultate je bilo smiselno dopolniti z nekaterimi v literaturi že ustaljenimi postopki. Tako smo s tehtanjem jeter lahko primerjali povezavo med povečanjem mase jeter, ki kažejo v homogenem organu, kot so jetra, tudi na povečanje prostornine za enak delež, in povečanjem površine prereza jeter, ki smo ga izmerili z MR. Povečanje mase jeter smo lahko ob upoštevanju nekaterih patofizioloških mehanizmov primerjali tudi s spremembo vrednosti hematokrita.

Bistveno manj je v literaturi podatkov v zvezi s kroničnimi učinki subletalnih odmerkov mikrocistinov, ki so z medicinskega vidika bolj pomembni zaradi dolgotrajne izpostavljenosti ljudi ob vse bolj onesnaženih vodnih zajetjih. Želela sva ugotoviti, ali je slikanje z MR učinkovit pripomoček za ugotavljanje sprememb zaradi kronične izpostavljenosti mikrocistinom. Če bi uspela potrditi to domnevo, bi bile nadaljnje raziskave, ki bi raziskovale kronični učinek na poskusnih živalih, preprostejše, saj bi lahko z neinvazivno diagnostično metodo proučevali časovni potek bolezni na manjšem vzorcu živali. Kronični poskusi z mikrocistini bodo zaradi tumor promotorskega delovanja v prihodnosti še bolj zanimivi, saj bo potrebno pripraviti varnostne standarde tudi glede vsebnosti cianobakterijskih hepatotoksinov v vodnih zajetjih in različnih prehrabnih izdelkih.

Poskus, ki sva ga zastavila, še zdaleč ne more veljati za primerjalno raziskavo uporabnosti diagnostičnih metod pri spremljanju učinkov teh toksinov. Želela sva le oceniti, kakšne spremembe povzroča kronična zastrupitev z mikrocistinom in s katero metodo so najlažje zaznavne.

#### **Morfološke spremembe jeter v akutnem in kroničnem poskusu z mikrocistini *in vivo***

Histološki preparati kontrolne skupine živali kažejo običajno sliko jetrnega parenhima (50, 51). Hepatocit meji tako na sinusoide kot tudi na žolčne kapilare in ima zato sprememba njegove oblike velik vpliv na obe strukturi. Po dodatku toksina v akutnem poskusu so v histoloških preparatih vidne žariščne krvavitve z osrednjim in obrobim pasom, česar v literaturi ni bilo zaslediti. Osrednji razobličeni pas meji s predelom močno poškodovanih hepatocitov, v katerem je kri razmaknila gredice jetrnih celic. Iz preparata je moč sklepati, da toksin ni prodril v vse dele jeter v enakih koncentracijah, saj so razdejanja žariščna. Verjetno je vzrok subletalni odmerek toksina, ki je v tej koncentraciji poškodoval le celice v bližini žil, po katerih je vstopil v tkivo. Sklepava, da je toksin prodril v jetra s portalnim obtokom, vendar velikost posameznega žarišča presega velikost portalnega polja in tako onemogoča natančno razpoznavo vstopnega mesta toksina v jetrni režnjič.

Pri akutnem poskusu sva ugotovila povečanje mase jeter, ki je ustrezalo povečanju spremembe prostornine jeter, ocenjene iz MR-slik. V kroničnem poskusu se mase jeter v primerjavi s kontrolo niso statistično pomembno razlikovale. Čeprav histološke spremembe pokažejo posamezna mesta nekrotičnih sprememb hepatocitov z opaznim kopičenjem rdečih krvničk ali vnetnih celic, je lahko razumeti, da bistveno manjše krvavitve kot pri akutni zastrupitvi ne morejo povzročiti velikega povečanja mase jeter. Z MR nama ni uspelo zaslediti nobenih sprememb v primerjavi s kontrolo, kar je razumljivo, saj je histo-

loški pregled pokazal, da so spremembe majhne in enakomerno razporejene po vsem jetrnem tkivu.

Dogajanje na ultrastrukturni ravni celice bolje prikažemo z metodo EM. Osnovna jetrna struktura se poruši zaradi specifičnega učinka toksina na citoskelet hepatocitov, ki se skrčijo in razmaknejo, s tem motijo vpetost sinusoidov v jetrni parenhim. Te spremembe so torej potrdile domnevne patološke procese. Glede na podatke iz literature, ki govorijo o mehanizmu delovanja na citoskelet, bi bilo zanimivo ugotavljati podrobnejše spremembe posameznih struktur citoskeleta z EM.

#### **Spremembe v sestavi krvi v akutnem in kroničnem poskusu z mikrocistinini *in vivo***

Dosedanji izsledki akutnih poskusov so natančno opisali obseg in način krvavitve v jetrni parenhim, pomanjkljivo pa so obravnavali vpliv obsežne jetrne krvavitve na sestavo krvi. Razmerje med prostornino plazme in prostornino rdečih krvnih teles se v primeru akutne hipovolemije različnih etiologij značilno spreminja. Vrednost hematokrita je upadla za 19 %, kar je skladno z znano dinamiko prestopa tekočine v kapilarah.

Pri kronični izpostavljenosti hepatotoksinom je bilo pričakovati poškodbe večjega dela jetrnega parenhima, zato sva poleg rdeče krvne slike spremljala tudi serumske koncentracije AST, ALT,  $\gamma$ -GT, celokupnega bilirubina in albuminov ter prostega železa. V rdeči krvni sliki sva opazila zmanjšanje vseh parametrov (Ht, MCV, MCHC, MCH), sklepava, da gre za mikrocitno hipokromno anemijo. Ugotovljeno anemijo bi lahko razložili s kroničnim izgubljanjem majhnih količin krvi v jetrih. Stanje spremlja zmanjšana vrednost prostega železa v serumu, histološko pa opazimo kopičenje zrnatega, rumenorjavega pigmenta v jetrih, ki bi lahko bil endogeni hemosiderin, kot posledica povečanega razpada eritrocitov in hemoglobina. Najina raziskava je pokazala, da lahko pri kronični izpostavljenosti mikrocistinom pride do anemije in drugih motenj v presnovi železa. To domnevo bi lahko pojasnile nadaljnje histološke raziskave, pri katerih bi morali uporabiti specifično barvanje hemosiderina z berlinskim modrilom, s katerim dokazujemo železov pigment s kalijevim ferocianidom. Potrebno bi bilo meriti tudi serumsko koncentracijo transferina, njegovo zasedenost z železom in koncentracijo serumskega feritina. Na tak način bi dokazali, ali se železo obilno nalaga v makrofagnem tkivu in vranici.

Ugotovila sva nekoliko povišano koncentracijo celokupnega bilirubina, kar je lahko posledica hemolize krvi in razpada hemoglobina na hemosiderin in hem. Ločevanje med direktnim in indirektnim bilirubinom z Van der Berghovo reakcijo in spektrofotometrijo bi pojasnilo, ali se je koncentracija celokupnega bilirubina povečala na račun koncentracije konjugiranega ali nekonjugiranega bilirubina. V najini raziskavi temu problemu nisva posvetila večje pozornosti, ker je bil porast serumske koncentracije celotnega bilirubina razmeroma majhen, natančnejše določanje vzroka hiperbilirubinemije pa ne bi bistveno prispevalo k razumevanju hepatotoksičnosti mikrocistinov. Le-ti lahko namreč posredno ali neposredno vplivajo tudi na prenašalne mehanizme v celični membrani hepatocita, česar pa z razpoložljivo metodologijo ni bilo možno natančneje proučevati.

Kljub temu da so jetra največji organ v telesu z osrednjo vlogo v intermediarni presnovi, žal ni funkcijskih jetrnih testov, ki bi nedvomno pokazali patofiziološke procese v tem

organu že pri majhni prizadetosti (52). Rezultati testov postanejo patološki šele, ko je okvarjen velik del parenhima. Funkcijo jeter določamo s preskusom presnovnih procesov, ki potekajo v tem organu. Univerzalnega testa, katerega rezultati bi bili patognomonični, ni.

Encimski testi so dober kazalec za oceno stopnje parenhimske poškodbe jeter in zapore žolčnih vodov. Encima, katerih povečane serumske vrednosti najbolj zanesljivo kažejo na okvaro jetrnih celic, sta aminotransferazi ALT in AST, katerih koncentraciji pa sta v naših poskusih porasli manj kot aktivnosti AF in  $\gamma$ -GT. Encima ALT in AST pospešujeta reakciji prenosa  $\gamma$ -amino skupin aspartata in alanina na  $\gamma$ -keto skupino ketoglutarata. Stopnji poškodbe hepatocitov ustreza stopnja povečanja koncentracije aminotransferaz v serumu.

AF je encim, ki v alkalnih pogojih pospešuje hidrolizo fosfatnih estrov. Pri bolnikih s hepatocelularno okvaro (hepatitis, ciroza) je koncentracija malo povišana, večje povišanje zasledimo pri intra- in ekstarhepatični holestazi.  $\gamma$ -GT pospešuje prenos  $\gamma$ -glutamilne skupine s peptidov (glutaciona) na aminokislino. Povišanje serumskih koncentracij  $\gamma$ -GT spremlja porast vrednosti AF. Skupaj sta encima najbolj občutljiva kazalca bolezni sistema žolčnih vodov. Povečanje serumskih koncentracij AF in  $\gamma$ -GT v kroničnem poskusu je bolj izrazito kot povečanje koncentracij ALT in AST, kar lahko razlagamo s spremenjeno morfologijo jeter, ki zaradi sprememb oblike hepatocitov in stikov med njimi moti normalno odtekanja žolča do te mere, da je spodbujena tvorba teh dveh encimov. Pripomniti morava, da očitne zlatenice pri poskusnih živalih nisva opazila. Povečanje koncentracij ALT in AST sva pričakovala, saj toksin povzroča kronično odmiranje manjših predelov hepatocitov.

Koncentracija serumskega albumina je bila ob koncu kroničnega poskusa zmanjšana, kar verjetno označuje moteno sintezo beljakovin v jetrih. Koncentracija glukoze v krvi je narasla. Porast je bil izrazit, vendar iz eksperimentalnih podatkov, ki sva jih dobila med najinim delom, ni možno nedvoumno sklepati na razlog za hiperglikemijo. Najpreprosteje bi bilo porast koncentracije glukoze razložiti z aktivacijo simpatičnega živčevja med izkrvavitvijo pri žrtvovanju, vendar bi potem lahko enak porast pričakovali tudi pri kontrolnih, na enak način žrtvovanih podganah. Ne moremo izključiti tudi vpletenosti mikrocistinov v razvoj hiperglikemije. V literaturi ni zaslediti podatkov o spremembah serumske koncentracije glukoze.

#### **Analiza primernosti metodoloških pristopov k meritvam *in vivo***

Dosedaj uporabljene metode ugotavljanja kroničnih učinkov toksinov cianobakterij so bile invazivne in so zahtevale veliko število žrtvovanih poskusnih živali. Ti načini tudi niso omogočali spremljanja časovnega razvoja sprememb na posamezni živali.

V najini raziskavi sva uporabila več metodoloških pristopov, s katerimi sva ocenjevala prizadetost jeter, hkrati pa sva lahko primerjala zanesljivost posamezne metode. Pri opazovanju spremembe velikosti jeter je zagotovo najbolj neposredna in na prvi pogled najbolj zanesljiva pot odstranitev in tehtanje jeter. Napake lahko nastanejo tudi pri tako preprosti metodi, saj je precejšnja razlika, če poskusno žival pred odvzemom jeter izkr-

vavimo, ali pa jetno žilje prej podvežemo in jetra odstranimo šele po izkrvavitvi. Ker sva ta postopek standardizirala, sva tehtanje vzela kot izhodišče za primerjavo z drugimi metodami.

Če natančneje primerjamo rezultate obeh meritev, s katerimi sva ocenjevala spremembo velikosti jeter pri akutnem poskusu (tehtanje organa in sprememba površine prereza na MR-slikah) in spremembo hematokrita v akutnem poskusu, opazimo, da so vsi trije rezultati v tesni zvezi. Zavedava se, da ocenjevanje povezave rezultatov teh treh metod temelji na nekaterih poenostavitvah in parametrih, ki jih nisva neposredno merila. S spremembo mase jeter je mogoče oceniti delež izkrvavljene krvi, če vemo, koliko krvi ima zdrava žival in po literaturi (27) predpostavimo, da gre vse povečanje mase na račun kopičenja krvi v jetrih. Z znanimi patofiziološkimi kompenzatornimi mehanizmi pri krvavitvi (53) lahko razložimo dogajanja pri akutno zastrupljeni živali, ki je notranje izkrvavela v jetra. Pri krvavitvi vazomotorično refleksno zmanjšanje prostornine krvnega žilnega sistema delno kompenzira padec krvnega tlaka, drugi mehanizem pa je prestop tekočine iz intersticija v krvni žilni sistem. Vstop intersticijske tekočine v krvne žile je posledica spremenjenih Starlingovih sil v mikrocirkulaciji ob krvavitvi. Zmanjšanje hidrostatskega tlaka ob nespremenjenem onkotskem tlaku povzroča zmanjšano filtracijo v arteriolnem delu kapilare, v venskem delu pa povzroči povečano reapsorpcijo iz intersticija. Na ta način se v krvi poveča prostorninski delež plazme in zmanjša prostorninski delež krvnih celic, kar opazimo kot padec hematokritske vrednosti. Količina, za katero se poveča masa jeter, je enaka kot masa oziroma prostornina izgubljene krvi. Ocenimo lahko zmanjšanje hematokrita, ki naj bi sledilo znanemu deležu akutno izgubljene krvi. Da je relativno zmanjšanje hematokrita manjše kot delež izgubljene krvi, je razumljivo, saj je refleksna vazokonstrikcija kompenzirala del padca tlaka.

Ob primerjavi mase jeter, ki posredno opisuje tudi prostornino, saj so jetra homogen organ, in površine prereza jeter na MR lahko privzamemo, da oba opisujeta polkrožen predmet, kar je sicer grobo poenostavljeno oblike jeter, omogoča pa preprosto oceno povezanosti obeh parametrov. Masa ali prostornina jeter sta sorazmerna tretji potenci radija namišljenega polkrožnega predmeta, površina s kvadratno potenco. Če se torej prostornina poveča za 35 %, bi se morala največja površina prereza tega istega predmeta povečati za približno 22 %. Zavedava se, da so najini rezultati, ki tej napovedi v precejšnji meri ustrezajo, v zvezi s to predpostavko le semikvantitativno interpretirani, vendar v skladu s postopkom za oceno sprememb prostornin, izračunanih iz zaporednih presekov znane debeline preiskovanega organa. Zaradi ustrezne povezave med povečanjem prostornine jeter, ocenjene iz povečanja površine prečnih presekov na MR-slikah in porastom mase jeter, izrezanih po koncu akutnega poskusa ter upadom hematokrita, sklepamo, da je MR v akutnih poskusih razmeroma zanesljiva neinvazivna metoda za ocenjevanje obsega prizadetosti jeter.

Z MR v akutnih poskusih nismo uspeli zanesljivo ugotoviti kvalitativnih sprememb jeter, čeprav smo jih potrdili s histološkim pregledom in z EM. Hipotezo o uporabnosti MR za zaznavanje takih sprememb pri akutnih poskusih bi lahko ovrgli, vendar je treba upoštevati pridržek, da smo izvedli poskuse le s standardnim protokolom, po katerem smo v teh poskusih opazovali le T1-poudarjene slike.

V kroničnem poskusu nismo opazili nikakršnih sprememb, četudi smo uporabili tudi T2-poudarjeno slikanje. Spremembe, opažene na histoloških vzorcih kroničnega poskusa, niso bile niti izrazite niti specifične, zato tudi npr. z jetrno biopsijo ne bi mogli nedvoumno postaviti diagnoze, ugotovili pa bi patološke spremembe. Vprašanje je, ali je bil čas kroničnega izpostavljanja mikrocistinom dovolj dolg. Kot najbolj preprosta in tudi najcenejša metoda za ugotavljanje delovanja mikrocistinov se je izkazala preprosta krvna analiza, katere rezultati pa niso specifični. V prihodnosti bo potrebno izdelati obsežnejšo in predvsem dolgotrajnejšo progresivno raziskavo na poskusnih živalih, ali pa po vzoru nekaterih avtorjev (36) izvesti natančno retrogradno raziskavo pri ljudeh. Te so zapletene zaradi nezadostne dokumentacije izvidov in relativno velikega pokrivanja kazalcev tovrstne okvare z ostalimi jetrnimi poškodbami.

V najini raziskavi nisva zasledila razvoja tumorjev. Razlago je možno razen v prekratkem kroničnem poskusu poiskati tudi v dejstvu, da toksin, kot vsi promotorji, potrebuje za promotorski učinek prisotnost drugih karcinogenih dejavnikov.

Za zgodnje odkrivanje negativnih učinkov na ljudi bo potrebno izboljšati metode za ugotavljanje akutnih in kroničnih sprememb.

### **Ocena učinkovitosti izolacije parenhimskih celic podganjih jeter**

Z rezultati *in vitro* poskusa sva dokazala, da izbrani toksin učinkuje na celične kulture podobno kot drugi mikrocistini, opisani v literaturi. Celice so se zaoblile, odlepile od podlage in odplavale na površino medija. S temi poskusi sva potrdila, da mikrocistini, ki sva jih uporabljala v naših poskusih, delujejo na enak način kot tisti, ki jih je uporabljala večina raziskovalcev. Pri izvedbi poskusov je bila najbolj kritična izolacija hepatocitov, ki nam jo je, glede na preživetja celic, uspelo izvesti uspešno v primerjavi s podatki iz literature (54). Na preživetje pomembno vpliva hitrost izvedbe postopka. Rezultati raziskave so pokazali, da so mikrocistini, ki jih najdemo v sladkih vodah v Sloveniji, hepatotoksični. Z metodo elektronske paramagnetne resonance smo v preliminarnih poskusih preverili stabilnost fluidnosti celičnih membran po postopku izolacije in ugotovili, da je populacija celic homogena, celice pa so v dobrem stanju.

### **Zaključki**

Izbrani toksin, ki sva ga uporabljala pri vseh poskusih, ima na primarne celične kulture z v literaturi opisanimi učinki mikrocistinov primerljiv učinek. V akutnem poskusu se po intraperitonealnem vbrizganju toksina razvije notranja krvavitev. Opazila sva značilno spremembo vrednosti hematokrita in jetrne teže. Pri kroničnem poskusu sva izpopolnila dosedanje znanje o spremembah v jetrni morfologiji in jetrnih testih. Metoda MR je primerna za zasledovanje akutnih učinkov mikrocistinov, pri kroničnih učinkih pa ni zaznati značilnih sprememb.

### **Zahvala**

Za neprecenljivo pomoč pri delu se najlepše zahvaljujeva gospema Cvetki Juršič in Alenki Štrukelj, mentorju najine raziskovalne naloge, prof. dr. Dušanu Šuputu, prof. dr. Bo-

janu Sedmaku za zmes mikrocistinov, gospe Ani Sepe in dr. Igorju Serši z Inštituta Jožef Stefan za pomoč pri slikanju z magnetno resonanco, gospe Magdi Pezdirc in prof. dr. Rudi Pleskovič - Zorc za pomoč pri pripravi celičnih kultur, prof. dr. Alojzu Pleskoviču za strokovno kirurško pomoč pri metodi jetrne perfuzije, prof. dr. Meti Zorc in Andreji Lesar za pomoč pri pripravi histoloških preparatov, gospema Duši Čuček in Simoni Pucihar za pomoč pri pripravi EM preparatov, prof. dr. Rudiju Pavlinu in kolegici Vesni Tlaker za podroben lektorski pregled najine naloge.

---

## Literatura

1. Milčinski J. *Sodna medicina*. Ljubljana: Državni sekretariat za notranje zadeve LRS, 1956: 214.
2. Thelestam M, Gross R. Toxins acting on the cytoskeleton. In: Shier TW, Mebs D. *Handbook of toxicology*. New York: Dekker, 1990: 424–77.
3. Francis G. Poisonous Australian Lake. *Nature* 1878; 18: 11–2.
4. Carmichael WW. Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. *J Applied Bacteriol* 1992; 72: 445–59.
5. Falconer IR, Beresford AM, Runnegar MTC. Evidence of liver damage by toxin from a bloom of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Med J Aust* 1983; 1: 511–4.
6. Sedmak B, Kosi G, Kolar B. Cyanobacteria and their relevance. *Period Biol* 1996; 96: 428–30.
7. Sedmak B, Kosi G. Microcystins in Slovene freshwaters (Central Europe) – first report. *Nat Toxins* 1997; 5: 64–73.
8. Carmichael WW, Beasley V, Bunner DL, Eloff JN, et al. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon* 1988; 26: 971–3.
9. Yoshizawa S, Matsushima R, Watanabe MF, et al. Inhibition of protein phosphatases by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity. *J Cancer Res Clin Oncol* 1990; 116: 609–14.
10. Carmichael WW, Eschedor JT, Patterson GML, Moore RE. Toxicity and partial structure of hepatotoxic peptide produced by cyanobacteria *Nodularia spumigena*. *Appl Environ Microbiol* 1988; 54: 2257–63.
11. Rinehart KL, Harada K, Namikoshi M, Chen C, et al. Nodularin, microcystin, and the configuration of Adda. *J Am Chem Soc* 1988; 110: 8557–8.
12. Petzinger E. Transport of organic anions in the liver. An update on bile acid, fatty acid, monocarboxylate, anionic amino acid, cholephilic organic anion, and anionic drug transport. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1994; 123: 47–211.
13. Carmichael WW. The toxins of Cyanobacteria. *Scientific American* 1994; 270: 78–86.
14. Kralj M, Sterle M, Pšeničnik M. *Navodila za vaje iz biologije celice*. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice, 1992: 15.
15. Alberts, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Publishing, 1989: 613–76.
16. Macintosh C, Beattie KA, Klumpp S, Cohen P, Codd GA. Cyanobacterial Microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatase-1 and phosphatase 2A in both mammals and higher plants. *FEBS Letters* 1990; 264: 187–92.
17. Holmes CFB, Boland MP. Inhibitors of protein phosphatase-1 and -2A; two of the major serine/threonine protein phosphatases involved in cellular regulation. *Current Opinon in Structural Biology* 1993; 3: 934–43.
18. Shenolikar S, Nairn AC. Protein phosphatases: recent progres. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1991; 23: 1–121.
19. Takai A, Katsunori S, Hiroshi N, Mieskes G, et al. Inhibition of specific binding of okadaic acid to protein phosphatases 2A by microcystin-LR, calyculin-A and tautomycin: method of analysis of interactions of tight-binding ligands with target protein. *Biochem J* 1995; 306: 657–65.



20. Bialojan C, Takai A. Inhibition of protein phosphatases by the black sponge toxin okadaic acid. *Biochem J* 1988; 256: 283–90.
21. Cohen P, Holmes CFB, Tsukitani Y: Okadaic acid: a new probe for studying cellular regulation. *Trends Biochem Sci* 1990; 15: 98–102.
22. Suganuma M, Fujiki H, Suguri H, Yoshizawa S, Hirota M et al. Okadaic acid: An additional non-phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type tumor promoter in mouse skin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 1768–71.
23. Suganuma M, Suttaji M, Suguri H Ojika M, et al. Specific binding of okadaic acid, a new tumor promoter in mouse skin. *FEBS Lett* 1989; 250: 615–8.
24. Runnegar MTC, Falconer IR, Silver J. Deformation of isolated hepatocytes by peptide hepatotoxin, from blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1981; 317: 268.
25. Runnegar MT, Falconer IR. Effect of toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ultrastructural morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes. *Toxicon* 1986; 24: 109–15.
26. Runnegar MT, Kong S, Berndt N. Protein phosphatase inhibition and *in vivo* hepatotoxicity of microcystins. *Am J Physiol* 1993; 265: 224–30.
27. Adams WHJ, Stone JP, Silvester B, Stoner RD, Slatkin DN, Tempel NR, Siegelman HW. Pathophysiology of cyanoginosin-LR: *in vivo* and *in vitro* studies. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988; 96: 248–57.
28. Falconer IR, Buckley T, Runnegar MT. Biological half-life, organ distribution and excretion of  $I^{125}$ -labelled toxic peptid from blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Aus J Biol Sci* 1981; 39: 179–87.
29. Robinson NA, Miura GA, Matson CF, Dinterman RE, Pace JG. Characterisation of chemically tritiated microcystin-LR and its distribution in mice. *Toxicon* 1986; 24: 109–15.
30. Falconer IR, Jackson ARB, Langley J, Runnegar MT. Liver pathology in mice in poisoning by blue-green alga *microcystis aeruginosa*. *Aus J Biol Sci* 1981; 34: 179–87.
31. Hooser SB, Beasley VR, Lovell RA, Carmichael WW, Haschek WM. Toxicity of microcystin-LR, a cyclic heptapeptide hepatotoxin from *Microcystis aeruginosa*, to rats and mice. *Vet Pathol* 1989; 26: 246–52.
32. Falconer IR et al. 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. *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal* 1994; 9: 131–9.
33. Nishiwaki-Matsushima R, Ohta T, Nishiwaki S, Suganuma M, Kohyama K, et al. Liver cancer promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J Cancer Res Clin Oncol* 1992; 118: 420–4.
34. Falconer IR, Buckley RH. Tumor promotion by *Microcystis*, a blue-green alga occurring in water supplies. *Med J Aus* 1989; 150: 351.
35. Carmichael WW, Falconer IR. Diseases related to freshwater blue-green algal toxins, and control measures. In: Falconer IR, eds. *Algal toxins in seafood and drinking water*. London: Academic Press, 1993: 187–209.
36. Falconer IR, Beresdorf AM, Runnegar MTC. Evidence of liver damage by toxin from a bloom of blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. *Med J Aust* 1983; 1: 511–4.
37. Sok M. *Temelji eksperimentalne kirurgije in poskusov na živalih*. Podvinski 1996: 77–95.
38. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Pathologic basis of disease*. Philadelphia: Saunders, 1994: 383–5.
39. Giacomelli OV. *In vivo učinki aktinoporinov, izoliranih iz Actiniae equinae*. Prešernova naloga. Ljubljana: Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, 1996.
40. Demšar F, Jevtič V, Batčič GG. *Slikanje z magnetno resonanco*. Ljubljana: Littera picta, 1996.
41. Blinc A. Tomografija in spektroskopija z jedrsko magnetno resonanco v medicini. *Med Razgl* 1986; 25: 457–76.
42. Pavčnik D. Magnetna resonanca. In: Tabor L, Jevtič V, Pavčnik D. *Radiologija*. Ljubljana: Med Razgl, 1996: 39–42.
43. Cameron IL, Ord VA, Fullerton GD. Characterisation of proton NMR relaxation times in normal and pathological tissues by correlation with other tissue parameters. *Magn Reson Imaging* 1984; 2: 97–106.
44. Stark DS, Bradley WG. *Magnetic resonance imaging*. St. Louis: Mosby, 1988: 1–83, 934–1059.
45. Mašera A, Staniša O. *Laboratorijske tehnike v patologiji*. Ljubljana: Srednja šola za farmacijo in zdravstvo, 1987: 95.



46. Bancroft JD, Cook HC. *Manual of histological techniques and their diagnostic application*. London: Churchill Livingstone, 1994: 35–43.
47. Berry NM, Friend DS. High yield preparation of isolated rat liverparenchymal cells. *J Cell Biol* 1969; 43: 506–20.
48. Adamič Š. *Temelji biostatistike*. Ljubljana: Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, 1989: 44–53, 65–81.
49. Ferligoj A. *Osnove statistike*. Ljubljana: Samozaložba, 1995: 106–57.
50. Kališnik M. *Oris histologije z embriologijo*. Ljubljana: DZS in Acta Stereologica, 1990: 255–62.
51. Leonhardt H. *Histologie, Zytologie und Mycroanatomie des Menschen*. Stuttgart: Thieme, 1977: 354–60.
52. Isselbacher KJ, Podolsky DK. Diagnostic tests in liver disease. In: Isselbacher KJ, Adams RD, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL. *Harrison's principles of internal medicine*. New York: Mc Graw-Hill, 1994: 1444–8.
53. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology*. Philadelphia: Saunders, 1994: 527–60.
54. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. In: Prescott DM, ed. *Methods in cell biology*. New York: Academic, 1976: 29–83.

Prispelo 10. 7. 1998