

# Azaspiracidi - struktura i biotransformacije

---

**Pomper, Dina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:635378>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-20**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Science](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Splitu  
Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu  
Odjel za kemiju

Dina Pomper

# **Azaspiracidi - struktura i biotransformacije**

Završni rad

Split, 2024.

Sveučilište u Splitu  
Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu  
Odjel za kemiju

Dina Pomper

# **Azaspiracidi – struktura i biotransformacije**

Završni rad

Split, 2024.

Ovaj rad izrađen na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Splitu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Stjepana Orhanovića, predan je na ocjenu Odjelu za kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja prvostupnica biologije i kemije.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Odjel za kemiju  
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

Završni rad

### AZASPIRACIDI – struktura i biotransformacije

Dina Pomper

Azaspiracidi su morski toksini, koji se akumuliraju u školjkašima i drugim organizmima koji se hrane filtriranjem morske vode. Konzumacijom kontaminiranih morskih plodova dolazi do azaspiracidnog trovanja školjkašima, pri čemu se javljaju neugodni gastrointestinalni simptomi kao što su mučnina, povraćanje, proljev i grčevi u želudcu. Azaspiracide proizvode dinoflagelati *Azadinium spinosum*, *Azadinium poporum*, *Azadinium dexteroporum* i manje poznata vrsta *Amphidoma languida*. Struktura ovih toksina uključuje ciklički amin, jedinstveni spiro-sklop i karboksilnu skupinu. Do otkrića dinoflagelata koji proizvode azaspiracide, analozi ovih toksina bili su izolirani isključivo iz školjaka. Nakon identifikacije vrste *A. spinosum*, opisano je 26 novih analoga algalnog podrijetla. Azaspiracidi akumulirani u školjkama podliježu različitim biotransformacijama, koje rezultiraju stvaranjem brojnih analoga azaspiracida. Neke biotransformacije poput metilacije i epimerizacije povećavaju toksičnost azaspiracida, dok ostale uglavnom stvaraju manje toksične analoge.

**Ključne riječi:** azaspiracidi, toksini, dinoflagelati, toksičnost, školjkaši, biotransformacije

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

**Rad sadrži:** 20 stranica, 8 grafičkih prikaza, 2 tablice i 14 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Stjepan Orhanović, izvanredni profesor

**Ocjenjivači:** izv. prof. dr. sc. Stjepan Orhanović, izvanredni profesor

doc. dr. sc. Andrea Paut, docent

mag. educ. biol. et chem. Doris Crnčević, viši asistent

Rad prihvaćen: 20. rujna 2024.

## Basic documentation card

University of Split  
Faculty of Science  
Department of Chemistry  
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

B. Sc. Thesis

### AZASPIRACIDS – structure and biotransformations

Dina Pomper

Azaspiracids are marine toxins that accumulate in shellfish and other filter-feeding marine organisms. Consuming contaminated seafood leads to azaspiracid shellfish poisoning, which can cause unpleasant gastrointestinal symptoms such as nausea, vomiting, diarrhea and stomach cramps. Azaspiracids are produced by the dinoflagellates *Azadinium spinosum*, *Azadinium poporum*, *Azadinium dexteroporum* and the lesser-known species *Amphidoma languida*. The structure of these toxins includes a cyclic amine, a unique spiro assembly and a carboxyl group. Until the discovery of azaspiracid-producing dinoflagellates, analogues of these toxins were isolated exclusively from shellfish. After the identification of the species *A. spinosum*, 26 new analogues of algal origin were described. Azaspiracids accumulated in shellfish undergo various biotransformations, which result in the formation of different azaspiracid analogues. Some biotransformations, such as methylation and epimerization, increase the toxicity of azaspiracids, while the others mainly generate less toxic analogues.

**Keywords:** azaspiracids, toxins, dinoflagellates, toxicity, shellfish

Thesis deposited in the library of Faculty of Science, University of Split

**Thesis consists of:** 20 pages, 8 figures, 2 tables and 14 references, original in: Croatian

**Mentor:** Stjepan Orhanović, Ph.D. *Associate Professor*

**Reviewers:** Stjepan Orhanović, Ph.D. *Associate Professor*

Andrea Paut, Ph.D., *Assistant Professor*

Doris Crnčević, *The Master of Science in biol. and chem. educ.*, *Assistant*

Thesis accepted: September 20<sup>th</sup> 2024.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. RAZRADA</b> .....	2
2.1. Azaspiracidi.....	2
2.1.1. Prvi slučajevi azaspiracidnog trovanja školjkašima .....	2
2.2. Struktura i analozi .....	3
2.3. Proizvođači azaspiracida.....	7
2.4. Rasprostranjenost azaspiracida i vrsta koje ih proizvode .....	9
2.4.1 Azaspiracidi u Jadranskom moru.....	10
2.5. Biotransformacije u tkivima školjkaša .....	11
2.5.1. Hidroksilacija.....	11
2.5.2. Dehidratacija.....	11
2.5.3. C-demetilacija .....	12
2.5.4. Oksidacija .....	12
2.5.5. Dekarboksilacija.....	12
2.5.6. Epimerizacija .....	13
2.6. Toksičnost.....	15
2.6.1. Utjecaj na ljude .....	15
2.6.2. Utjecaj na miševе.....	15
2.6.3. Citotoksičnost .....	17
<b>3. ZAKLJUČAK</b> .....	18
<b>4. LITERATURA</b> .....	19

# 1. UVOD

Dinoflagelati su slobodni plivajući fitoplanktonski organizmi koji imaju dva međusobno okomito položena biča pomoću kojih se kreću. Fitoplanktonom se hrane sve filtrirajuće životinje, a to su školjkaši, spužve, neki rakovi i ribe. Neke fitoplanktonske vrste proizvode toksične spojeve pa prilikom hranjenja školjkaša može doći do akumulacije morskih toksina u tkivu školjaka. Za ove organizme, morski toksini najčešće nisu toksični, već se u njihovom organizmu koncentriraju i prenose dalje hranidbenim lancem. Toksini se primarno nakupljaju u probavnom traktu školjkaša, posebice u hepatopankreasu i crijevima. Međutim, niže koncentracije toksina mogu se naći u mišićima i drugim mekim tkivima školjkaša. Akumulacija morskih toksina može imati štetan utjecaj za sisavce, ptice i ostale organizme koji konzumiraju kontaminirane školjkaše. Njihove povišene koncentracije u morskom okolišu često su povezane sa fenomenom poznatim kao cvjetanje mora. Cvjetanje mora posljedica je naglog rasta i razmnožavanja algi, često uzrokovanog povoljnim okolišnim uvjetima kao što su povišena temperatura i dostupnost hranjivih tvari. Iako je cvjetanje mora prirodna sezonska pojava, češće se događa zbog eutrofikacije uzrokovane ljudskim utjecajem pa može imati katastrofalne posljedice za ostale morske organizme, ribarstvo i industriju hrane. Zbog toga je potrebno osigurati pravilno testiranje hrane iz mora i praćenje pojave toksina u svrhu minimiziranja negativnih posljedica.

Morski toksini su grupirani u skupine na temelju simptoma koje izazivaju kod ljudi. To su PSP (paralitičko trovanje školjkašima), NSP (neurotoksično trovanje školjkašima), DSP (dijareičko trovanje školjkašima) i AZP (azaspiracidno trovanje školjkašima).

U ovom radu поближе ćemo se upoznati sa azaspiracidima, s naglaskom na njihovu strukturu i biotransformacije u tkivima školjkaša. Proizvode ih neke vrste dinoflagelata iz porodice Amphidomataceae, najčešće rodovi *Azadinium* i *Amphidoma*. Vrsta dinoflagelata koja je uzrokovala prvo zabilježeno trovanje azaspiracidima bila je *Azadinium spinosum*. Danas su poznata još tri proizvođača azaspiracida, a to su *Azadinium poporum*, *Azadinium dexteroporum* i manje poznata vrsta *Amphidoma languida*. Konzumacija kontaminiranih školjaka može uzrokovati azaspiracidno trovanje školjkašima, koje kod ljudi izaziva niz gastrointestinalnih simptoma, ali bez dugoročnih posljedica.



## 2. RAZRADA

### 2.1. Azaspiracidi

Azaspiracidi su relativno novootkriveni morski toksini. Prvo je trovanje zabilježeno u Nizozemskoj 1995. godine, uzrokovano konzumacijom školjaka iz Killary Harbora u Irskoj. Iako su prvotno nazvani Killary toksinima ili KT-3, kasnije im je ime promijenjeno u azaspiracide kako bi bolje odrazilo kemijsku strukturu ovih spojeva (Yang et al, 2024). Mehanizam djelovanja zasad nije dobro proučen, ali je poznato da azaspiracidi djeluju na citoskeleton te da mogu utjecati na interakcije među stanicama.

#### 2.1.1. Prvi slučajevi azaspiracidnog trovanja školjkašima

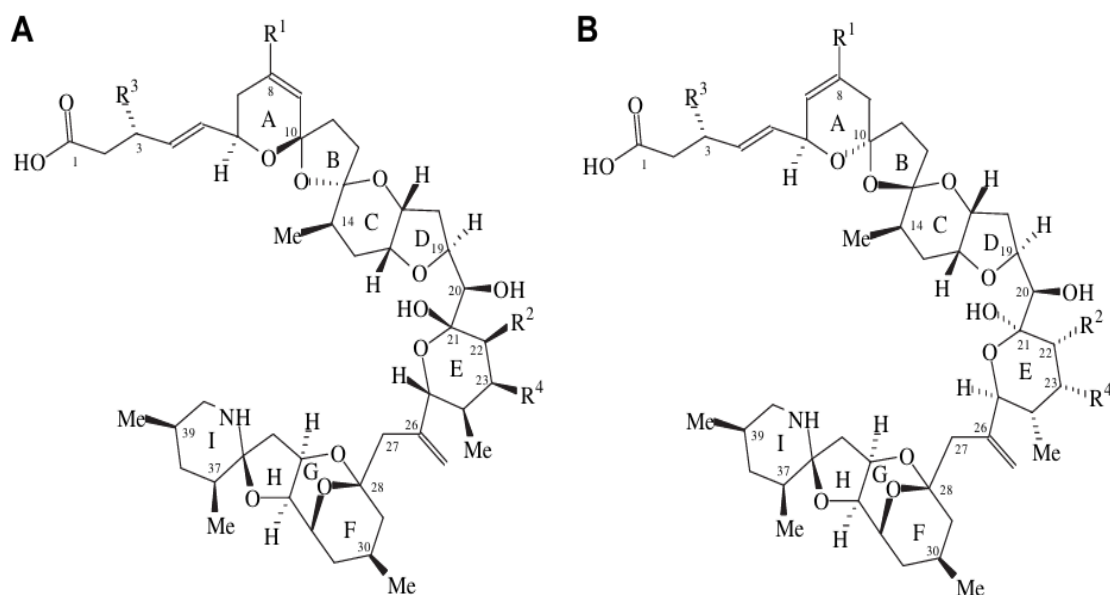
Sva dosad zabilježena trovanja azaspiracidima u Europi bila su uzrokovana konzumacijom dagnji (*Mytilus edulis*) uzgojenih na obalama Irske. S obzirom da su simptomi trovanja nalik dijaretičnom trovanju školjkama (DSP) velika je vjerojatnost da su neki slučajevi prošli nezamijećeni. Prvi prijavljeni slučaj bio je u Nizozemskoj, nastao konzumacijom dagnji iz mjesta Killary Harbour u Irskoj.

Samo dvije godine nakon toga, dvanaestoro ljudi na otoku Arranmore otrovalo se konzumacijom lokalno uzgojenih dagnji. Konzumacijom dagnji sa sjeverozapadne obale Irske uzrokovana su trovanja na području Italije, Francuske i Engleske.

Azaspiracidi su prvi puta detektirani u dagnjama kultiviranim u Danskoj nakon velikog slučaja trovanja DSP toksinima. Doduše, bili su prisutni samo u vrlo malim dozama. Također su pronađeni u školjkama uzgojenim u Engleskoj, Francuskoj te u dagnjama iz sjeverozapadne Španjolske, pokazujući da su ovi toksini već dobro rasprostranjeni po obalama Europe.

## 2.2. Struktura i analozi

Struktura azaspiracida-1 prvi je put opisana 1998. godine nakon uspješne izolacije toksina iz plave dagnje (*M. edulis*). Utvrđeno je da se AZA1 sastoji od cikličkog amina ili aza-skupine, jedinstvenog spiro-sklopa i karboksilne skupine, zbog čega su ovi toksini i dobili naziv azaspiracidi (Satake et al., 1998). Nakon sinteze navedenog spoja 2003. godine, utvrđeno je da prvotno opisana struktura sadrži grešku (Slika 1.). Naime, sintetizirani spoj pokazao je drugačije kromatografsko ponašanje i odstupanja u spektru nuklearne magnetske rezonancije u odnosu na izolirani spoj. Dodatne analize NMR spektara rezultirale su revizijom strukture 2004. godine (Twiner et al., 2008).



Slika 1. Struktura AZA-1: A) inicijalno pretpostavljena struktura B) Revidirana struktura 2004. godine (Preuzeto iz A. Furey et al., *Toxicon* 56 (2009), 73–190)

Ubrzo nakon razjašnjavanja strukture AZA1, otkrivena su četiri dodatna analoga toksina te im je određena struktura MS i NMR tehnikama. Tri od ovih izoliranih analoga razlikuju se samo u broju metilnih skupina. U usporedbi s AZA1, AZA3 nema metilni ostatak na C22, a AZA2 posjeduje dodatni metilni ostatak na položaju C8. Druga dva analoga toksina (AZA4 i AZA5) pokazala su se analozima AZA3, sa dodatnom hidroksilnom skupinom na C3 (AZA4) ili na C23 (AZA5) položaju (Twiner et al., 2008).

Do otkrića dinoflagelata koji proizvode azaspiracide, analozi azaspiracida bili su izolirani isključivo iz školjaka i opisivani kao metaboliti AZA1, AZA2, AZA3 ili AZA6. Od strane Rehmana i sur. (2008.) prijavljeno je više od dvadeset metabolita azaspiracida u plavim dagnjama (*M. edulis*). Otkriveni analozi, njihova nomenklatura i supstituenti navedeni su u Tablici 1.

Tablica 1. Nomenklatura azaspiracida i metilnih estera azaspiracida izoliranih iz plave dagnje (*M. edulis*) (Preuzeto iz Rehmann et al., Rapid Communications in Mass Spectrometry 22 (2008), 549–558)

Abbreviation	Original analog	Substituent	Name
AZA1			azaspiracid
AZA2			8-methylazaspiracid
AZA3			22-desmethyl-azaspiracid
AZA4	AZA3	OH	22-desmethyl-3-hydroxyazaspiracid
AZA5	AZA3	OH	22-desmethyl-23-hydroxyazaspiracid
AZA6			22-desmethyl-8-methylazaspiracid
AZA7	AZA1	OH	3-hydroxyazaspiracid
AZA8	AZA1	OH	23-hydroxyazaspiracid
AZA9	AZA6	OH	22-desmethyl-3-hydroxy-8-methylazaspiracid
AZA10	AZA6	OH	22-desmethyl-23-hydroxy-8-methylazaspiracid
AZA11	AZA2	OH	3-hydroxy-8-methylazaspiracid
AZA12	AZA2	OH	23-hydroxy-8-methylazaspiracid
AZA13	AZA3	2 OH	22-desmethyl-3,23-dihydroxyazaspiracid
AZA14	AZA1	2 OH	3,23-dihydroxyazaspiracid
AZA15	AZA6	2 OH	3,23-dihydroxy-8-methylazaspiracid
AZA16	AZA2	2 OH	22-desmethyl-3,23-dihydroxy-8-methylazaspiracid
AZA17	AZA3	COOH	carboxy-22-desmethylazaspiracid
AZA18	AZA1	COOH	carboxyazaspiracid
AZA19	AZA6	COOH	carboxy-22-desmethyl-8-methylazaspiracid
AZA20	AZA2	COOH	carboxy-8-methylazaspiracid
AZA21	AZA3	COOH + OH	carboxy-22-desmethyl-3-hydroxyazaspiracid
AZA22	AZA1	COOH + OH	carboxy-3-hydroxyazaspiracid
AZA23	AZA6	COOH + OH	carboxy-22-desmethyl-3-hydroxy-8-methylazaspiracid
AZA24	AZA2	COOH + OH	carboxy-3-hydroxy-8-methylazaspiracid
AZA25	AZA3	-H <sub>2</sub> O	21-22-dehydro-22-desmethylazaspiracid
AZA26	AZA1	-H <sub>2</sub> O	21-22-dehydroazaspiracid
AZA27	AZA6	-H <sub>2</sub> O	21-22-dehydro-22-desmethyl-8-methylazaspiracid
AZA28	AZA2	-H <sub>2</sub> O	21-22-dehydro-8-methylazaspiracid
AZA29	AZA3	COOCH <sub>3</sub>	22-desmethyl-azaspiracid-1-methyl ester
AZA30	AZA1	COOCH <sub>3</sub>	Azaspiracid-1-methyl ester
AZA31	AZA6	COOCH <sub>3</sub>	22-desmethyl-8-methyl-azaspiracid-1-methyl ester
AZA32	AZA2	COOCH <sub>3</sub>	8-methyl-azaspiracid-1-methyl ester

Od kada je *Azadinium spinosum* identificiran kao prvi proizvođač azaspiracida 2007. godine, opisano je 26 novih analoga ovih biotoksina algalnog podrijetla (Tablica 2.). Najmanji poznati azaspiracid je AZA-33, s molekulskom masom od 715 Da. Proizvodi ga *A. spinosum* u Sjevernom moru. Najveći je AZA-56, s molekulskom masom od 885 Da. Njega proizvodi *A. dexteroporum* u Sredozemnom moru. Stoga, taj raspon molekulskih masa od 715 do 885 Da obuhvaća molekulsku masu svih zasad poznatih azaspiracida (Krock et al., 2019).

Tablica 2. Azaspiracidi, vrste dinoflagelata koje ih proizvode i reference. Nedostaju azaspiracidi koji su metaboliti školjkaša i analozi koji su već navedeni u Tablici 1. (Preuzeto i prilagođeno iz Krock et al., Harmful Algae 82 (2019), 254–263)

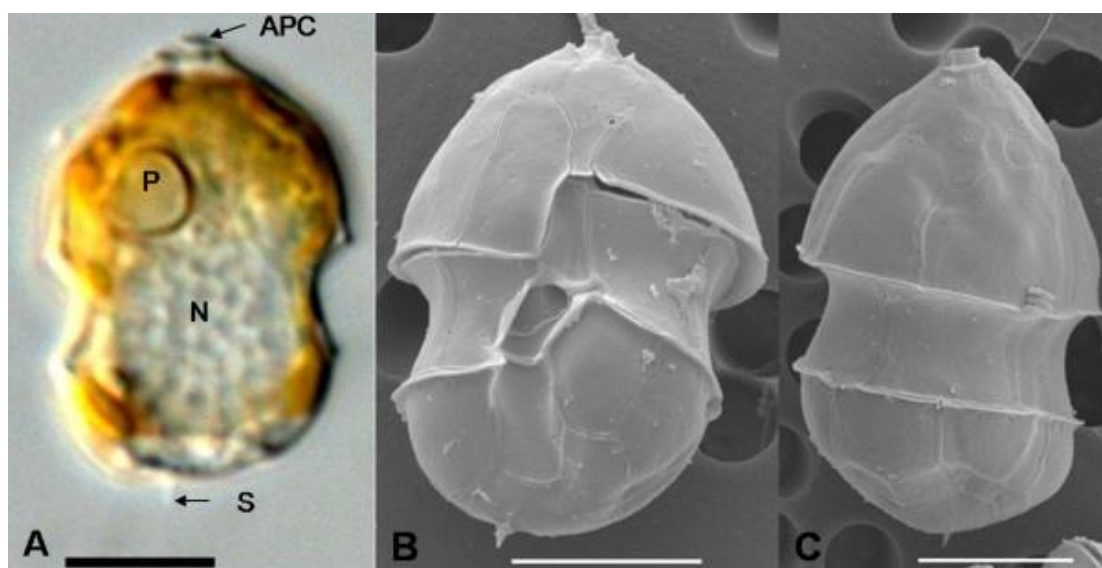
#	AZA	Producer	Reference
1	AZA-1	<i>Az. spinosum</i>	Krock et al., 2009
2	AZA-2	<i>Az. spinosum</i>	Krock et al., 2009
		<i>Az. poporum</i>	Krock et al., 2014
		<i>Am. languida</i>	Tillmann et al., 2017a
3	epi-AZA-7	<i>Az. dexteroporum</i>	Rossi et al., 2017
4	AZA-11	<i>Az. spinosum</i>	Tillmann et al., 2018
		<i>Az. poporum</i>	Krock et al., 2014
5	AZA-33	<i>Az. spinosum</i>	Kilcoyne et al., 2014
6	AZA-34	<i>Az. spinosum</i>	Kilcoyne et al., 2014
7	AZA-35	<i>Az. spinosum</i>	Kilcoyne et al., 2014
		<i>Az. dexteroporum</i>	Rossi et al., 2017
8	AZA-36	<i>Az. poporum</i>	Krock et al., 2015
9	AZA-37	<i>Az. poporum</i>	Krock et al., 2015
10	AZA-38	<i>Am. languida</i>	Krock et al., 2012
11	AZA-39	<i>Am. languida</i>	Krock et al., 2012
12	AZA-40	<i>Az. poporum</i>	Krock et al., 2014
13	AZA-41	<i>Az. poporum</i>	Krock et al., 2014
14	AZA-42	<i>Az. poporum</i>	This work
15	AZA-43	<i>Am. languida</i>	Tillmann et al., 2017a
16	AZA-50	<i>Az. spinosum</i>	Tillmann et al., 2018
17	AZA-51	<i>Az. spinosum</i>	Tillmann et al., 2018
18	AZA-52	<i>Am. languida</i>	Tillmann et al., 2018
19	AZA-53	<i>Am. languida</i>	Tillmann et al., 2018
20	AZA-54	<i>Az. dexteroporum</i>	Rossi et al., 2017
21	AZA-55	<i>Az. dexteroporum</i>	Rossi et al., 2017
22	AZA-56	<i>Az. dexteroporum</i>	Rossi et al., 2017
23	AZA-57	<i>Az. dexteroporum</i>	Rossi et al., 2017
24	AZA-58	<i>Az. dexteroporum</i>	Rossi et al., 2017
25	AZA-59	<i>Az. poporum</i>	Kim et al., 2017
26	AZA-62	<i>Az. poporum</i>	This work

Osim azaspiracida navedenih u Tablici 2, nedavno je otkriveno da su vrste koje proizvode azaspiracide također sposobne proizvesti i njihove fosforilirane oblike. Njihova je m/z vrijednost 80 Da veća od matičnih azaspiracida, ali imaju gotovo identične CID spektre. Ovi fosforilirani oblici nisu uključeni u numeraciju AZA, već se nazivaju fosfatima odgovarajućih matičnih spojeva (Krock et al., 2019.).

Do sada su strukture AZA-1 do -6, te AZA-26, -33, -34, -36 i -37 potvrđene NMR tehnikama, dok su strukturni analozi svih ostalih azaspiracida izvedeni iz MS/MS fragmenata i kemijske derivatizacije. Prema općoj konvenciji, azaspiracidi se numeriraju kronološki ovisno o vremenu njihovog otkrića, što rezultira mješavinom azaspiracida koje proizvode dinoflagelati i metaboliti školjkaša.

### 2.3. Proizvođači azaspiracida

Iako se nakon samog otkrića azaspiracida smatralo da je *Protoperdinium crassipes* vrsta dinoflagelata odgovorna za njihovu produkciju, ta je tvrdnja ubrzo opovrgnuta. Pravi izvorni dinoflagelat otkriven je tijekom oceanografske ekspedicije u Sjevernom moru 2007. godine (Krock et al., 2009). U pitanju je *Azadinium spinosum* (Slika 2.), danas najpoznatija i najbolje proučena vrsta iz ovog roda. Tada je bio prepoznat samo kao proizvođač AZA1 i AZA2, a danas je dokazano da je odgovoran za proizvodnju još 6 analoga: AZA-11, -33, -34, -35, -50 i -51. Otkriven je korištenjem svjetlosne mikroskopije i LC-MS/MS tehnike. Brzo nakon njegova otkrića, opisane su još dvije vrste istoga roda, *A. poporum* i *A. deksteroporum*. Glavni razlog kasnog otkrića ovih dinoflagelata upravo je njihova veličina (~10-15  $\mu\text{m}$ ) i neupadljivost. Zahvaljujući nedavnom razvoju molekularnih metoda olakšano je otkrivanje takvih neupadljivih organizama, posebice toksičnih dinoflagelata.



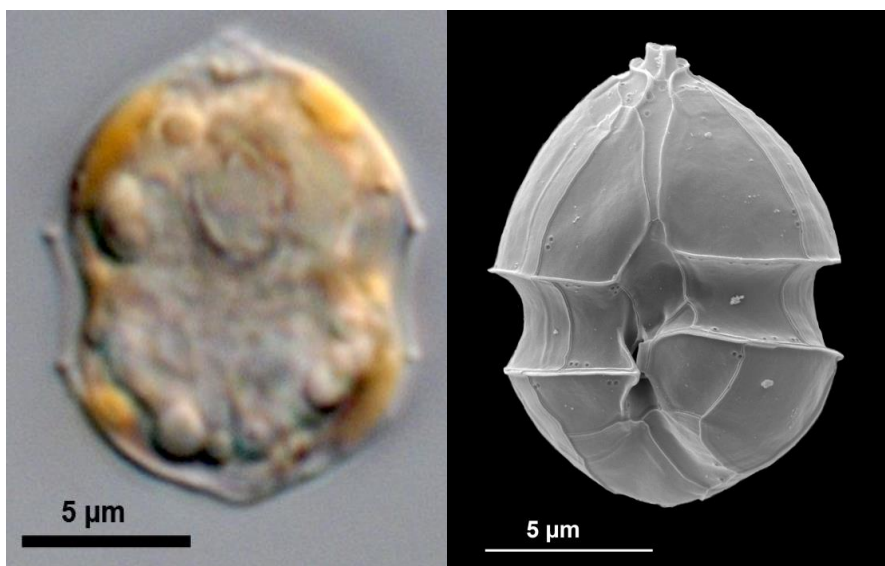
Slika 2. *Azadinium spinosum*, svjetlosni mikroskopski prikaz(A); elektronski mikroskopski prikaz (B,C) (Preuzeto i prilagođeno s izvora: Salas et al., Harmful Algae 127 (2011), 102471.)

*Azadinium poporum* (Slika 3.) trenutno je vrsta koja proizvodi najveću raznolikost azaspiracida, što vjerojatno odražava činjenicu da je prikupljena iz različitih dijelova svijeta, uključujući sjeverni Tih ocean, Kinesko more, argentinske obalne vode i Sredozemno more (Krock et al., 2019). Sintetizira čak devet različitih analoga azaspiracida, kao što su AZA-2, -11, -36, -37, -40, -41, -42, -59 i -62, uz dodatne fosforilirane oblike. Raznolikost u proizvodnji analoga i široka geografska distribucija ukazuju na visoku ekološku prilagodljivost ove vrste dinoflagelata, što joj omogućuje uspješno preživljavanje u različitim okolišnim uvjetima.



Slika 3. *Azadinium poporum*, svjetlosni i elektronski mikroskopski prikaz (Preuzeto i prilagođeno s izvora: <https://www.marinespecies.org/photogallery.php?album=1033&pic=72270> )

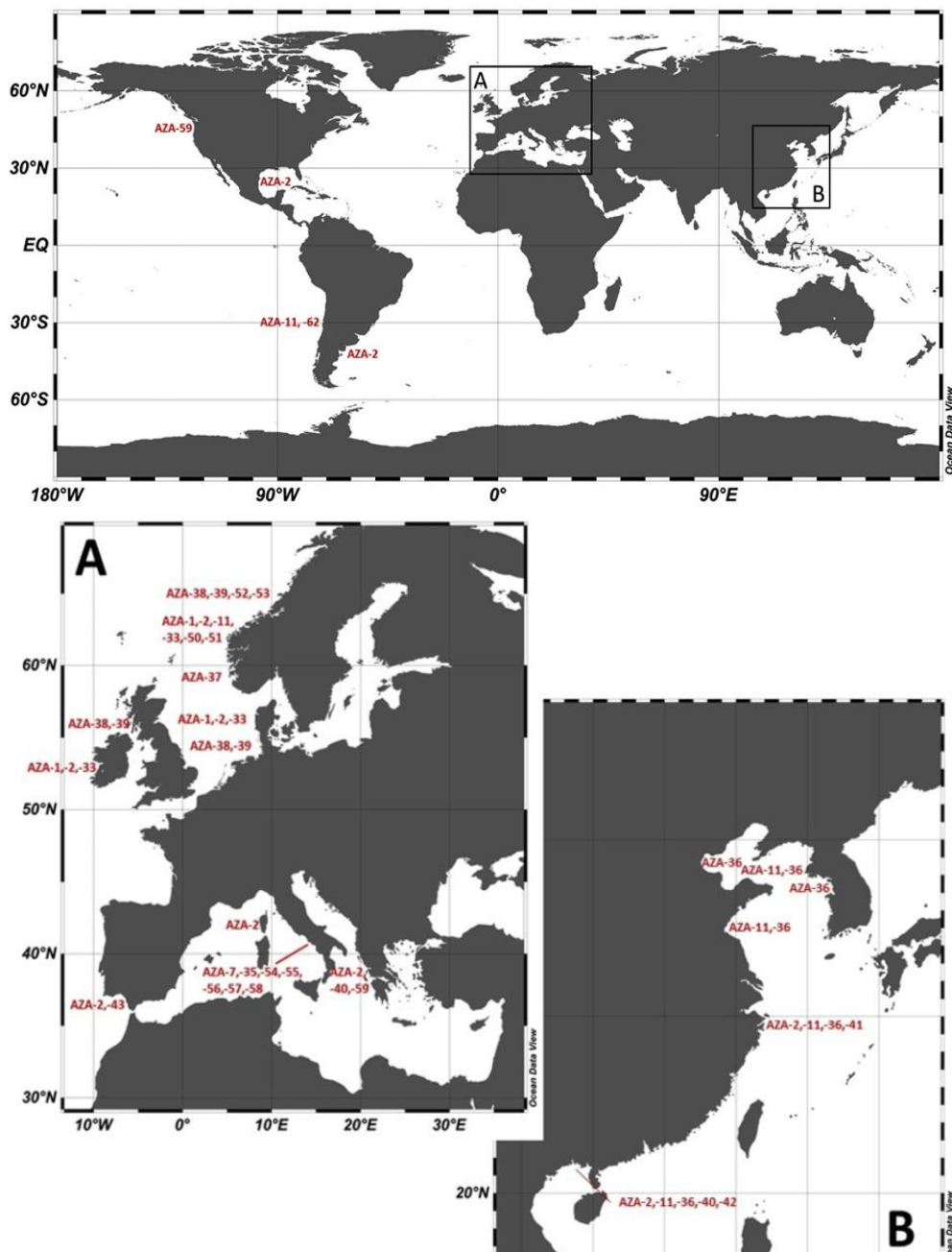
*Azadinium dexteroporum* je pronađen u Sredozemnom moru, ali s obzirom na ograničen broj istraživanja, njegova rasprostranjenost vjerojatno je šira nego što je trenutno poznato. Ova vrsta proizvodi najveći poznati azaspiracid, AZA-56 te šest drugih analoga epi-AZA-7, AZA-35, -54, -55, -57 i -58. Iako manje poznata, i vrsta *Amphidoma languida* (Slika 4.) također je identificirana kao proizvođač azaspiracida, posebice AZA-2, -38, -39, -43, -52 i -53. S obzirom da su vrste ovog roda manje proučavane, njihov doprinos proizvodnji azaspiracida nije u potpunosti razjašnjen. Geografski, *Amphidoma languida* je identificirana u Atlantskom oceanu, posebno uz južnu obalu Španjolske.



Slika 4. *Amphidoma languida*, svjetlosni i elektronski mikroskopski prikaz ( Preuzeto i prilagođeno s izvora: <https://www.marinespecies.org/photogallery.php?album=1033&pic=72286> )

## 2.4. Rasprostranjenost azaspiracida i vrsta koje ih proizvode

Zahvaljujući vrstama dinoflagelata koje ih proizvode, neki su azaspiracidi šire rasprostranjeni od drugih. Primjerice, AZA-2 je prisutan u gotovo svim sojevima proizvođača azaspiracida, uz iznimku vrste *A. dexteroporum*, te je kao takav jedan od najrasprostranjenijih azaspiracida. Jednako vrijedi i za AZA-11. Karta na Slici 5. jasno ilustrira da azaspiracidi nisu ograničeni na jednu specifičnu geografsku regiju, već su široko rasprostranjeni u različitim morskim ekosustavima diljem svijeta.



Slika 5. Geografski prikaz rasprostranjenosti proizvođača AZA sa analogima koje proizvode (Preuzeto iz Krock et al., *Harmful Algae* 82 (2019), 254–263)



Geografska distribucija planktonskih azaspiracida na Slici 5 također odražava područja u kojima su provedena istraživanja o ovim toksinima. Stoga, nedostatak azaspiracida u nekim dijelovima mora i oceana vjerojatno više odražava manjak sličnih istraživanja, a ne nužno stvarnu odsutnost azaspiracida i njihovih proizvođača.

#### 2.4.1 Azaspiracidi u Jadranskom moru

U istraživanju provedenom 2012. i 2013. godine u središnjem Jadranu, azaspiracidi su detektirani u tragovima. Rezultati istraživanja pokazali su da je pretežito dominantan spoj bio AZA2. AZA1 bio je prisutan ispod granice kvantifikacije, dok AZA3 nije utvrđen u uzorcima. Također su primijećene povišene koncentracije navedenih toksina u ljetnom i jesenskom periodu, pri čemu su maksimalne vrijednosti iznosile oko 7 µg po kilogramu jestivog tkiva školjaka. Prisutnost fitoplanktona koji proizvodi azaspiracide nije zabilježena u morskoj vodi srednjeg Jadrana tijekom razdoblja istraživanja, ali su nisku razinu kontaminacije mogle proizvesti stanice toksičnih mikroalgi prisutne ispod granice detekcije.

U istraživanju provedenom 2017. godine, AZA2 je detektiran u koncentracijama nešto iznad razine detekcije, dosegnuvši u Neumskom zaljevu maksimalnu vrijednost od 3,5 µg/kg (kolo-voz 2017.). AZA2 je također detektiran u Makarskom zaljevu samo u jednom uzorku, prikupljenom u srpnju u koncentraciji od 3,8 µg/kg. (Talić et al., 2020.)

Prema regulativi Europske Unije, maksimalna dozvoljena količina azaspiracidnih toksina u školjkama iznosi 160 µg/kg. Stoga, detektirane koncentracije ne predstavljaju rizik za ljudsko zdravlje, ali sugeriraju potrebu za praćenjem i identificiranjem ovih spojeva, njihovog biogenog podrijetla i njihovog utjecaja na sastav populacije fitoplanktona (Bacchiocchi et al., 2015).

## 2.5. Biotransformacije u tkivima školjkaša

Neki analozi azaspiracida proizvedeni su od strane toksičnih dinoflagelata, dok su drugi otkriveni kao metaboliti školjkaša. Kada se azaspiracidi akumuliraju u školjkašima, prolaze niz metaboličkih transformacija koje utječu na njihovu toksičnost. Najčešće strukturne modifikacije u tkivu dagnji uključuju hidroksilaciju, dehidrataciju, C-demetilaciju, oksidaciju, dekarboksilaciju i epimerizaciju. Također je važno spomenuti da vanjski faktori kao što su pH vrijednost i temperatura bitno utječu na ove procese.

Iako ostali školjkaši i rakovi mogu akumulirati azaspiracide, samo su dagnje do sada bile povezane sa azaspiracidnim trovanjem kod ljudi. One također sadrže veliku raznolikost azaspiracidnih analoga koji su posljedica različitih biotransformacija u tkivima. Stoga su plave dagnje (*M. edulis*) postale odlični modeli za proučavanje akumulacije i metabolizma ovih toksina u morskim organizmima.

### 2.5.1. Hidroksilacija

Hidroksilacija je proces dodavanja hidroksilne skupine na određene atome u strukturi azaspiracida. Ova biotransformacija može imati značajan utjecaj na toksičnost azaspiracida, ali taj utjecaj ovisi o položaju i broju hidroksilnih skupina unutar molekule. Stoga, može rezultirati smanjenjem toksičnosti molekula, ali ju isto tako može i povećati. AZA4 i AZA5 su primjeri metabolita koji imaju hidroksilne skupine na položajima C3 i C23. Kao rezultat hidroksilacije, potentnost ovih analoga znatno je smanjena u odnosu na AZA1. Manje efikasno se vežu za ciljne biomolekule unutar stanica, što rezultira smanjenjem njihove citotoksičnosti (Kilcoyne et al., 2018).

### 2.5.2. Dehidratacija

Dehidratacija je proces u kojem dolazi do gubitka molekule vode između određenih atoma, što dovodi do formiranja dvostruke veze i rezultira stvaranjem novih analoga azaspiracida. Do ove modifikacije može doći spontano ili može biti izazvana enzimatskim procesima unutar organizma. Dehidrirani analozi azaspiracida su obično manje toksični, jer je dvostruka veza u molekuli često manje reaktivna. Primjerice, AZA25 je dehidrirani analog AZA3, koji nastaje gubitkom molekule vode između atoma C21 i C22. Dobiveni analog manje je reaktivan u interakcijama sa staničnim membranama i receptorima, što dovodi do smanjene citotoksičnosti u odnosu na početni azaspiracid (Kilcoyne et al., 2018).

### 2.5.3. C-demetilacija

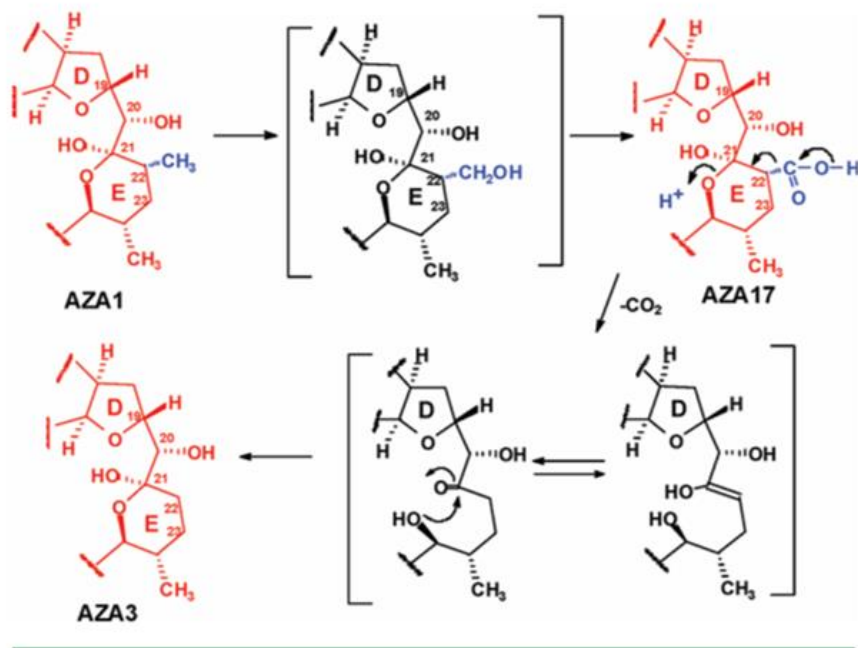
C-demetilacija se odnosi na uklanjanje metilne skupine sa specifičnih položaja u molekuli azaspiracida. Ova strukturna modifikacija je česta u metaboličkim procesima koji se odvijaju u tkivima dagnji. Demetilacija smanjuje toksičnost azaspiracida jer uklanjanje metilne skupine utječe na prostornu strukturu molekule i njen afinitet za ciljne biomolekule.

### 2.5.4. Oksidacija

Oksidacija je proces koji uključuje uvođenje karbonilne ili hidroksilne skupine na različite položaje u molekuli azaspiracida. Ova modifikacija mijenja fizikalna i kemijska svojstva molekula, često smanjujući njihovu toksičnost. Kod školjkaša ova se reakcija često koristi za neutralizaciju toksina. Primjerice, AZA26 je nastao oksidacijom AZA5. Tijekom ove modifikacije, hidroksilna grupa na položaju C23 prelazi u keto skupinu, a nastali AZA26 je otprilike 30 puta manje toksičan od AZA1 (Kilcoyne et al., 2018).

### 2.5.5. Dekarboksilacija

Dekarboksilacija je uklanjanje karboksilne skupine iz molekule azaspiracida. Ova modifikacija se može spontano javiti u organizmu školjkaša ili biti potaknuta određenim uvjetima, poput povišene temperature ili promjene pH vrijednosti. Dekarboksilacija rezultira stvaranjem novih analoga azaspiracida, koji su obično manje toksični. Slika 6. prikazuje mehanizam biotransformacije AZA1 do AZA3 koji se zbiva u dagnjama. Započinje oksidacijom AZA1, nakon čega nastaje međuprodukt poznat kao AZA17. Zatim se ovaj karboksilirani analog podvrgava dekarboksilaciji, to jest gubi CO<sub>2</sub> skupinu, dajući AZA3. Nastajanje AZA17 se smatra ključnim korakom u procesu biokonverzije i igra ključnu ulogu u proizvodnji AZA3. Ovaj primjer posebno je zanimljiv jer je produkt koji nastaje toksičniji od početnog azaspiracida (Kilcoyne et al, 2018).

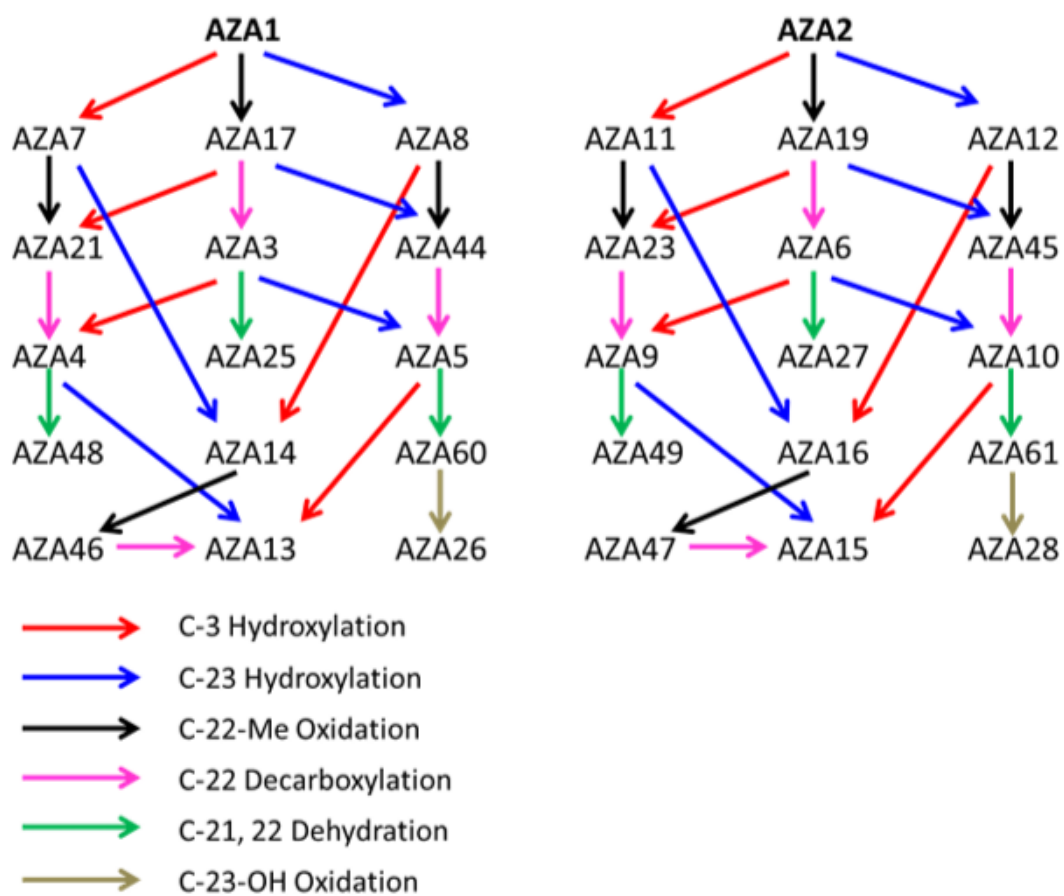


Slika 6. Pretpostavljeni mehanizam za nastajanje AZA3 u dagnjama (*M. edulis*) (Preuzeto iz O'Driscoll et al., Environ Sci Technol (2011), 47)

### 2.5.6. Epimerizacija

Epimerizacija je proces promjene konfiguracije na specifičnom kiralnom centru molekule. U slučaju azaspiracida, epimerizacija može promijeniti 3D strukturu molekule, što može značajno utjecati na njenu toksičnost. Ova modifikacija mijenja način na koji se azaspiracidi vežu za ciljane molekule, često povećavajući ili smanjujući toksičnost. Primjerice, 37-epi-AZA1 je epimer AZA1, koji je nastao promjenom konfiguracije na položaju C37. Ova promjena rezultira povećanjem toksičnosti, jer je 37-epi-AZA1 oko 5 puta toksičniji od svog epimera. Epimerizacija u ovom slučaju povećava stabilnost molekule i njen afinitet za interakciju sa staničnim membranama.

Ovim strukturnim modifikacijama može se opisati nastajanje većine analoga u tkivima dagnji (Slika 7.). Razumijevanje točnih mehanizama svih navedenih transformacija ključno je za razvoj boljih sigurnosnih protokola i regulatornih mjera za sprječavanje zdravstvenih incidenata povezanih sa azaspiracidima.



Slika 7. Biotransformacije nekih analoga azaspiracida u tkivima dagnje (Preuzeto iz Kilcoyne et al., J. Mol. Evol. (2018), 885–893.)

## 2.6. Toksičnost

### 2.6.1. Utjecaj na ljude

U usporedbi sa drugim dobro opisanim morskim toksinima, o azaspiracidima se ne zna mnogo. Kod ljudi simptomi obično počinju nekoliko sati nakon konzumacije kontaminiranih školjkaša i mogu trajati nekoliko dana, bez dugoročnih posljedica. Slično kao i kod DSP toksina, trovanje azaspiracidima očituje se simptomima kao što su mučnina, povraćanje, proljev i grčevi u želudcu. Kod prvih zabilježenih trovanja azaspiracidima, zbog gotovo identičnih simptoma inicijalno se sumnjalo na dijareično trovanje školjkašima, no odsutnost značajne razine okadaične kiseline ili DTX2 toksina doveli su do identifikacije azaspiracida-1 u uzorcima. Zbog limitiranih podataka o azaspiracidnim trovanjima, gotovo svi toksikološki podaci dobiveni su iz kontroliranih in vitro i in vivo eksperimenata.

### 2.6.2. Utjecaj na miševе

Simptomi koji su uočeni kod miševa izloženim azaspiracidima, znatno se razlikuju od simptoma koje uzrokuje okadaična kiselina. Kod miševa, intraperitonealno (IP) ubrizgane doze azaspiracida uzrokuju usporenost, respiratorne poteškoće, grčeve, progresivnu paralizu i smrt unutar 20-90 minuta. Dijareja, koja je jedan od glavnih simptoma kod ljudi nije zabilježena kod miševa.

Minimalna letalna doza djelomično pročišćenog AZA-1 iznosi 150 µg/kg. Autopsijom je otkriveno oticanje želuca i jetre te reducirana veličina/težina timusa i slezene. Primijećeno je i nakupljanje masnih kiselina u hepatocitima, piknoza parenhimskih stanica u gušterači, te erozija i krvarenje u želucu. (Twiner et al., 2008)

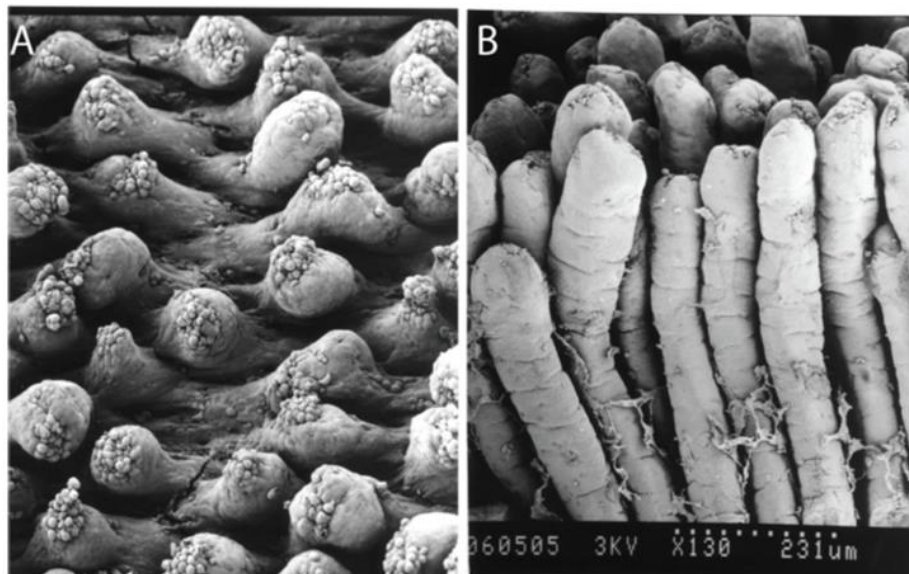
Patološke promjene izazvane azaspiracidima ipak se znatno razlikuju od onih izazvanih dijaretičnim, paralitičkim i amnezijskim trovanjem školjkama. Usporedbom različitih analoga azaspiracida i njihove potentnosti, dokazano je da su IP minimalne smrtonosne doze AZA2 i AZA3 bile 110 i 140 µg/kg, što ukazuje na veću razinu toksičnosti u odnosu na AZA1. Međutim, AZA4 i AZA5 su manje toksični sa smrtonosnim dozama od 470 i <1000 µg/kg. Uz pretpostavku ekvivalentnih stupnjeva čistoće, redoslijed analoga AZA je: AZA2 > AZA3 > AZA1 > AZA4 > AZA5.

Dodatna istraživanja s pročišćenim materijalom AZA1 otkrile su više o njegovim učincima na miševе. Ispitivanim miševima dane su pojedinačne oralne doze AZA1 u rasponu od 300 do 900 µg/kg. Kod oralnog uzimanja, minimalna letalna doza za AZA1 iznosi oko 500 µg/kg.

Pri nižim dozama od 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , zabilježeno je nakupljanje kapljica masne kiseline u jetri unutar jednog sata. Nakon toga, uslijedila je sporadična degeneracija i erozija mikrovila tankog crijeva (Slika 8.), zatim degeneracija vakuola u epitelnim stanicama i atrofija lamine proprije.

Srednje doze AZA1 (500 do 700  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) za posljedicu imale progresivnu intestinalnu eroziju i kontinuiranu atrofiju lamine proprije nakon 24 sata. Međutim, nakon 24h bilo je manje degeneriranih epitelnih stanica u mikrovilima što ukazuje na neke znakove oporavka. Također je primijećeno da je jetra porasla u težini za 38% u skupini koja je primala dozu od 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Twiner et al., 2008).

Kod dugoročnog izlaganja miševa malim dozama azaspiracida (20-50 mikrograma/kg) primijećeno je skraćenje mikrovila tankog crijeva, blage upale jetre te značajan utjecaj na dišni sustav. Svi miševi razvili su upalu pluća, a čak 20% razvilo je tumor na plućima koji je bio evidentan tek 2-3 mjeseca nakon administracije. Iako je istraživana skupina bila premala za određivanje direktne povezanosti, postoji mogućnost da je AZA-1 incijator tumora (A. Furey et al., 2009).



Slika 8. A) Mikrovili tankog crijeva miša 8h nakon oralne doze 700  $\mu\text{g}/\text{kg}$  AZA1 B) Neoštećeni mikrovili za usporedbu (Preuzeto iz E. Ito et al, Toxicon 40 (2002), 193–203)

### 2.6.3. Citotoksičnost

Izloženost miševa azaspiracidima može izazvati širok spektar učinaka na različite vrste tkiva, a među njima su najbolje proučeni učinci AZA1. Ovaj toksin pokazuje citotoksične učinke na različite vrste stanica, uključujući stanice bubrega, pluća, neurone i imunološke stanice, pri čemu su posebno osjetljivi T limfociti i stanice hipofize (Twiner et al., 2008). Neuromorfološke studije pokazale su da AZA1 uzrokuje nepovratne promjene neurona već pri vrlo niskim koncentracijama. Ove promjene uključuju gubitak aksona i zaobljenje stanica, što sugerira da AZA1 može imati ozbiljne neurotoksične učinke kod ljudi koji konzumiraju kontaminirane morske plodove. Također, AZA1 ima značajan utjecaj na citoskelet stanica, osobito na raspored F-aktina, koji je ključan za staničnu pokretljivost i oblik. Dugoročna izloženost toksinu uzrokuje reorganizaciju F-aktina i smanjenje broja pseudopodija, što upućuje na specifičan mehanizam djelovanja ovog toksina na citoskelet.

Ono što AZA1 čini jedinstvenim u usporedbi s drugim morskim toksinima jest potreba za duljim vremenskim razdobljem djelovanja (>24h) kako bi se postigao potpuni citotoksični učinak i inducirala stanična smrt.

Ukratko, azaspiracidi predstavljaju ozbiljnu prijetnju zbog svoje sposobnosti da izazovu citotoksičnost u raznim tkivima i stanicama, s potencijalom da potaknu tumorske procese i uzrokuju oštećenje organa. Zbog tih karakteristika, azaspiracidi se smatraju vrlo opasnim morskim toksinima, što nalaže strogu kontrolu njihovih koncentracija u školjkašima.



### 3. ZAKLJUČAK

Azaspiracidi su morski toksini, koji se akumuliraju u školjkašima i drugim organizmima koji se hrane filtriranjem morske vode. Konzumacijom kontaminiranih morskih plodova dolazi do azaspiracidnog trovanja školjkašima, pri čemu se javljaju neugodni gastrointestinalni simptomi kao što su mučnina, povraćanje, proljev i grčevi u želudcu. Prvi potvrđeni slučaj azaspiracidnog trovanja školjkašima bio je u Nizozemskoj 1995. godine. Uzrokovao ga je AZA1, koji se sastoji od cikličkog amina, jedinstvenog spiro-sklopa i karboksilne skupine, zbog čega su ovi toksini i dobili naziv azaspiracidi. Do otkrića dinoflagelata koji proizvode azaspiracide, analozi ovih toksina bili su izolirani isključivo iz školjaka. Nakon identifikacije vrste *Azadinium spinosum*, opisano je 26 novih analoga algalnog podrijetla. Azaspiracidi akumulirani u školjkama podliježu različitim biotransformacijama, koje rezultiraju stvaranjem brojnih analoga azaspiracida. Neke biotransformacije poput metilacije i epimerizacije povećavaju toksičnost azaspiracida, dok ostale uglavnom stvaraju manje toksične analoge.

Kod izlaganja miševa oralnim dozama azaspiracida, ciljane tkiva su tanko crijevo, jetra i slezena. Prilikom dugoročnog izlaganja malim dozama azaspiracida primijećeno je skraćivanje mikrovila tankog crijeva, blage upale jetre te značajan utjecaj na dišni sustav. Također su citotoksični za različite vrste stanica.

Iako je azaspiracidno trovanje školjkašima povezano sa 40ak različitih toksina, samo se koncentracije tri analoga AZA1, -2 i -3 reguliraju. Mnoge su države, uključujući države članice Europske Unije, odredile maksimalne dopuštene koncentracije azaspiracida u školjkama namijenjenim ljudskoj konzumaciji. U Europskoj uniji ova granica iznosi 160 µg/kg.

## 4. LITERATURA

Bacchiocchi, S., Siracusa, M., Ruzzi, A., Gorbi, S., Ercolessi, M., Cosentino, M.A., Ammazalorso, P., Orletti, R. (2015) Two-year study of lipophilic marine toxin profile in mussels of the North-central Adriatic Sea: First report of azaspiracids in Mediterranean seafood, *Toxicon* 108, 115-125, doi: 10.1016/j.toxicon.2015.10.002.

Furey, A., O'Doherty, S., O'Callaghan, K., Lehane, M., James, K.J. (2010) Azaspiracid poisoning (AZP) toxins in shellfish: Toxicological and health considerations. *Toxicon* 56, 73–190. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.09.009.

Ito, E., Satake, M., Ofuji, K., Higashi, M., Harigaya, K., McMahon, T., Yasumoto, T. (2002) Chronic effects in mice caused by oral administration of sublethal doses of azaspiracid, a new marine toxin isolated from mussels. *Toxicon* 40, 193–203. doi: 10.1016/s0041-0101(01)00226-4

Kilcoyne, J., McCarron, P., Twiner, M.J., Rise, F., Hess, P., Wilkins, A.L., Miles, C.O. (2018) Identification of 21,22-dehydroazaspiracids in mussels (*Mytilus edulis*) and in vitro toxicity of Azaspiracid-26. *J. Mol. Evol.*, 885–893. doi: 10.1021/acs.jnatprod.7b00973.

Krock, B., Tillmann, U., John, U., Cembella, A.D. (2009) Characterization of azaspiracids in plankton size-fractions and isolation of an azaspiracid-producing dinoflagellate from the North Sea. *Harmful Algae* 82, 254–263. doi: 10.1016/j.hal.2008.06.003.

Krock, B., Tillmann, U., Tebben, J., Trefault, N., Gu, H. (2019) Two novel azaspiracids from *Azadinium poporum*, and a comprehensive compilation of azaspiracids produced by *Amphidomataceae*, (*Dinophyceae*) *Harmful Algae* 82; 1-8, doi: 10.1016/j.hal.2018.12.005.

O'Driscoll, D., Skrabáková, Z., O'Halloran, J., van Pelt, F.N., James, K.J. (2011) Mussels increase xenobiotic (azaspiracid) toxicity using a unique bioconversion mechanism *Environ Sci Technol*, 47, doi: 10.1021/es103612c.

Rehmann, N., Hess, P., Quilliam, M.A. (2008) Discovery of new analogs of the marine biotoxin azaspiracid in blue mussels *Mytilus edulis* by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22, 549–558. doi: 10.1002/rcm.3385

- Salas, R., Murphy, E., Doohan, R., Tillmann, U., Thomas, O.P. (2023) Production of the dinoflagellate *Amphidoma languida* in a large scale photobioreactor and structure elucidation of its main metabolite AZA-39. *Harmful Algae* 127, 102471. doi: 10.1016/j.hal.2023.102471.
- Satake, M., Ofuji, K., Naoki, H., James, K.J., Furey, A., McMahon, T., Silke, J., Yasumoto, T. (1998) Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, *Mytilus edulis*. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 9967–9968. doi: 10.1021/ja981413r.
- Talic, S., Skobic, D., Dedic, A., Nazlic, N., Ujevic, I., Ivankovic, A., Pavela-Vrancic, M. (2020) The occurrence of lipophilic toxins in shellfish from the Middle Adriatic Sea. *Toxicon*, 186, 19–25. doi: 10.1016/j.toxicon.2020.07.026.
- Twiner, M.J., Rehmann, N., Hess, P., Doucette, G.J., (2008) Azaspiracid shellfish poisoning: a review on the chemistry, ecology and toxicology with an emphasis on human health impact. *Marine Drugs* 6, 39–72. doi: <https://doi.org/10.3390/md20080004>.
- Wietkamp, S., Krock, B., Clarke, D., Voß, D., Salas, R., Kilcoyne, J., et al. (2020) Distribution and abundance of azaspiracid-producing dinophyte species and their toxins in North Atlantic and North Sea waters in summer 2018. *PLoS ONE* 15(6). doi: 10.1371/journal.pone.0235015
- Yang, J., Sun, W., Sun, M., Cui, Y., Wang, L. (2024) Current Research Status of Azaspiracids. *Mar. Drugs*, 22, 79. doi: 10.3390/md22020079.