

Jesotoksini

Radnić, Gabriela

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:166:908491>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-19**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
PRIRODOSLOVNO MATEMATIČKI FAKULTET
Odjel za Kemiju

Gabriela Radnić

JESOTOKSINI

Završni rad

Split, rujan 2022.

Izjava

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

Završni rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za kemiju

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

JESOTOKSINI

Gabriela Radnić

Jesotoksini su lipofilni, sulfonirani polieteri koji pripadaju skupini morskih fiktoksina, proizvedenih od algi, najčešće dinoflagelata vrste *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedra* i *Gonyaulax spinifera*. Od prvog otkrića, kada su izolirani iz vrste *Patinopecten yessoensis* u Japanu, pa sve do danas, njihova prisutnost sve je veća širom svijeta te su s vremenom otkriveni i brojni analozi. Provedena su razna istraživanja i analize na temelju kojih su donekle razjašnjeni mehanizmi djelovanja i toksičnost ovih toksina. Utvrđena je citotoksična aktivnost jesotoksina kroz promjene razina koncentracija kalcija i cAMP-a u stanici, aktivacije kaspaza, otvaranje tranzicijskih pora mitohondrija te modifikacije citoskeleta. Osim toga, djeluju i na imunološki sustav, metabolizam glukoze te imaju zanimljiv utjecaj u liječenju Alzheimerove bolesti. Budući da nisu prijavljeni slučajevi trovanja ljudi, Europska unija povećala je granicu jesotoksina u školjkama s 1 na 3,75 mgYTX/kg školjkaša radi prevencije.

Ključne riječi: jesotoksini, fiktoksini, mehanizam djelovanja, toksičnost

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

Rad sadrži: 26 stranica, 13 grafičkih prikaza i 14 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

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

Neposredni voditelj: dr.sc. Nenad Vuletić, viši asistent

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

dr. sc. Nenad Vuletić, viši asistent

mag. educ. biol. et chem. Ivana Žaper, asistent

Rad prihvaćen: 21. rujna 2022.

Basic documentation card

University of Split

Bachelor's Thesis

Faculty of Science

Department of Chemistry

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

YESSOTOXINS

Gabriela Radnić

Yessotoxins are lipophilic, sulfonated polyethers that belong to the group of marine phycotoxins, produced by algae, most often dinoflagellates of the species *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedra* and *Gonyaulax spinifera*. From the first discovery, when they were isolated from the species *Patinopecten yessoensis* in Japan, until today, their presence is increasing all over the world, and over time numerous analogues have been discovered. Various researches and analyzes were carried out, which clarified to some extent the mechanisms of action and toxicity of these toxins. The cytotoxic activity of yessotoxin was determined through changes in the cellular level of calcium and cAMP, caspase activation, opening of mitochondrial transition pores and modifications of the cytoskeleton. In addition, it also affects the immune system, glucose metabolism and has an interesting effect in the treatment of Alzheimer's disease. Since no cases of human poisoning have been reported, the European Union increased the limit of yessotoxin in shellfish from 1 to 3.75 mgYTX/kg of shellfish for prevention.

Keywords: yessotoxins, phycotoxins, mechanism of action, toxicity

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

Thesis consists of: 26 pages, 13 figures and 14 references. Original in: Croatian

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

Assistant Supervisor: Nenad Vuletić, Ph.D. *Assistant Professor*

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

Nenad Vuletić, Ph.D., *Assistant Professor*

Ivana Žaper, The Master of Science in biol. and chem. educ., *Assistant*

Thesis accepted: September 21th 2022

Sadržaj

Uvod	1
1. Fikotoksini	2
1.1. Utjecaj toksičnosti na okoliš i na zdravlje ljudi.....	2
1.2. Rasprostranjenost.....	7
2. Jesotoksini	8
3. Proizvođači jesotoksina	9
3.1. <i>Protoceraium reticulatum</i>	9
3.2. <i>Lingulodinium polyedra</i>	10
3.3. <i>Gonyaulax spinifera</i>	11
4. Struktura jesotoksina	12
5. Toksičnost i mehanizam djelovanja jesotoksina	13
5.1. In vivo istraživanja	13
5.2. In vitro istraživanja.....	14
5.3. Utjecaj jesotoksina na Alzheimerovu bolest	15
5.4. Utjecaj jesotoksina na metabolizam glukoze.....	16
5.5. Utjecaj jesotoksina na imunološki sustav	16
6. Rasprostranjenost jesotoksina u svijetu.....	18
6.1. Pojava u Jadranskom moru.....	18
7. Regulacija i dopuštene koncentracije jesotoksina	20
Zaključak	21
Literatura	22
Popis kratica	24
Popis slika.....	26

Uvod

Današnja prehrana ljudi sve je bogatija plodovima mora, posebice školjkama. Međutim, prehranom s plodovima mora povezana su brojna trovanja s različitim simptomima. Ono što uzrokuje trovanja su toksini akumulirani u tkivima školjkaša koji se hrane filtracijom hranjivih tvari, a time i toksičnih algi koje proizvode spomenute toksine. Njima pripadaju jesotoksini, okadaična kiselina, domoična kiselina, azaspiracidi, brevetoksini, palitoksini, pektenotoksini, saksitoksini, ciguatoksini i ciklički imini.

Mnogi morski toksini, zbog sve veće pojavnosti i različite aktivnosti, predstavljaju izazove u istraživanjima, a posebice jesotoksini, o kojem je i glavna riječ u ovom radu.

Metodama kao što je spektroskopija nuklearnom magnetskom rezonancijom (NMR – nuclear magnetic resonance) i upotreba masenog spektrometra dobiveni su podaci o strukturi ovih toksina, postavljajući temelje u otkrivanju daljnjih informacija vezanih i za toksičnost i za pozitivne učinke koji ovi spojevi mogu imati.

Brojne analize i istraživanja doveli su do zaključka da jesotoksini, osim što potencijalno narušavaju zdravlje ljudi, mogu imati i bitnu ulogu u terapiji i liječenju nekih bolesti.

Cilj ovog rada je opisati dosadašnje spoznaje o jesotoksinima, njihovom djelovanju na razne biološke procese, rasprostranjenosti te potencijalne učinke na zdravlje ljudi.

1. Fikotoksini

Morski fikotoksini predstavljaju biološki aktivne kemijske spojeve koje proizvode najčešće dinoflagelati roda *Dynophysis*, *Alexandrium*, *Gymnodinium*, *Protoperdinium*, *Protoceratium*, *Ostreopsis*, *Gamberdiscus*, *Karenia* te dijatomeje roda *Pseudo-nitzschia*. Neproteinske su, termostabilne molekule, čija molekulska masa varira od malih do vrlo velikih vrijednosti, a prema topljivosti su podijeljeni na toksine topljive u vodi i na one koji su topljivi u mastima. S obzirom na različite kemijske strukture, postoje jesotoksini (YTX), okadaična kiselina (OA) i njeni derivati, domoična kiselina (DA), pektenotoksini (PTX), azaspiracidi (AZA), ciklički imini (CI), saksitoksini (STX), ciguatoksini (CTX), brevetoksini (BTX) i palitoksini (PITX). [1]

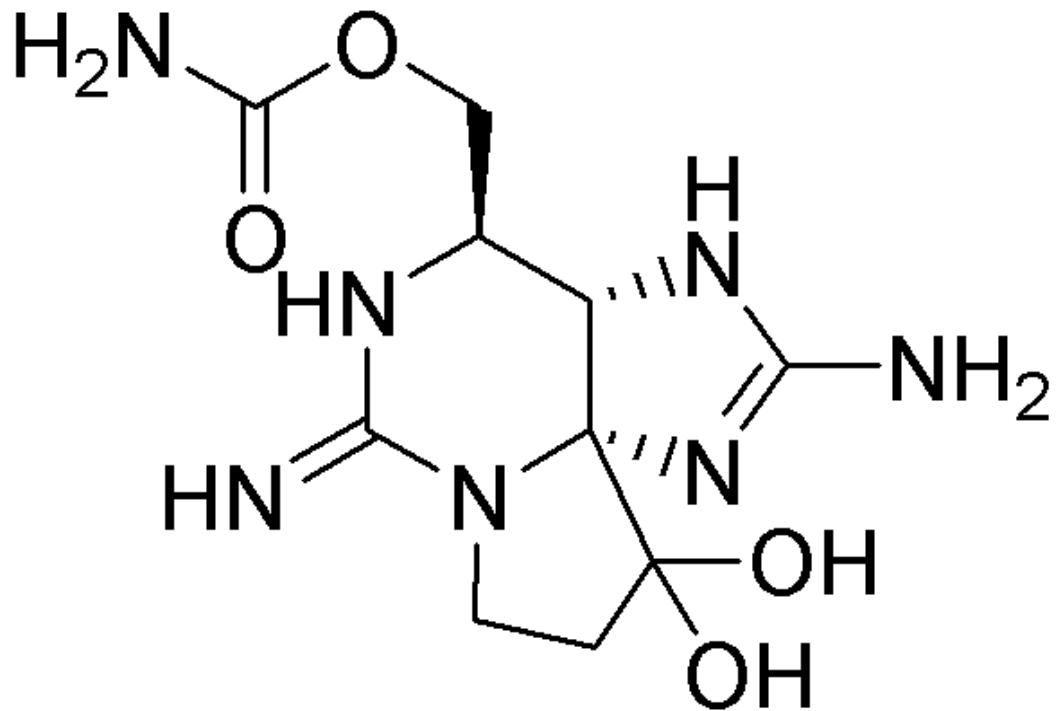
1.1. Utjecaj toksičnosti na okoliš i na zdravlje ljudi

Razni predstavnici školjkaša pripadaju skupini koja se naziva „filter-feeders“, akumuliraju spomenute toksine u svojim tkivima uzrokujući razne intoksikacije kod ljudi. Izloženost potrošača tim toksinima ovisi o količini unesenih toksina te o koncentraciji toksina prisutnih u školjkašima. Konzumirajući ih, ljudi obolijevaju na razne načine, a u težim slučajevima dolazi i do smrti. Raspon simptoma trovanja je širok, od raznih probavnih do živčanih smetnji. Na temelju različitih simptoma trovanja klasificiraju se kao toksini koji uzrokuju amnezijско trovanje školjkašima (amnesic shellfish poisoning - ASP), paralitičko trovanje školjkašima (paralytic shellfish poisoning - PSP), dijaretičko trovanje školjkašima (diarrhetic shellfish poisoning - DSP), neurotoksično trovanje školjkašima (neurotoxic shellfish poisoning - NSP), trovanje ribom Ciguatera (Ciguatera fish poisoning – CFP) i trovanje azaspiracidima (azaspiracid poisoning - AZP). Međutim, postoje i drugi sindromi, a svaka vrsta trovanja povezana je s određenom skupinom toksina. [2]

Trovanja plodovima mora uzrokovana su morskim biotoksinima koji se prirodno proizvode tijekom štetnog cvjetanja algi (HAB – harmful algal blooms). U pogodnim okolišnim uvjetima, fitoplanktonske vrste, najčešće dinoflagelati i dijatomeje, eksponencijalno se razmnožavaju i proizvode toksine. [3]

Na temelju mehanizma djelovanja toksine je moguće podijeliti na:

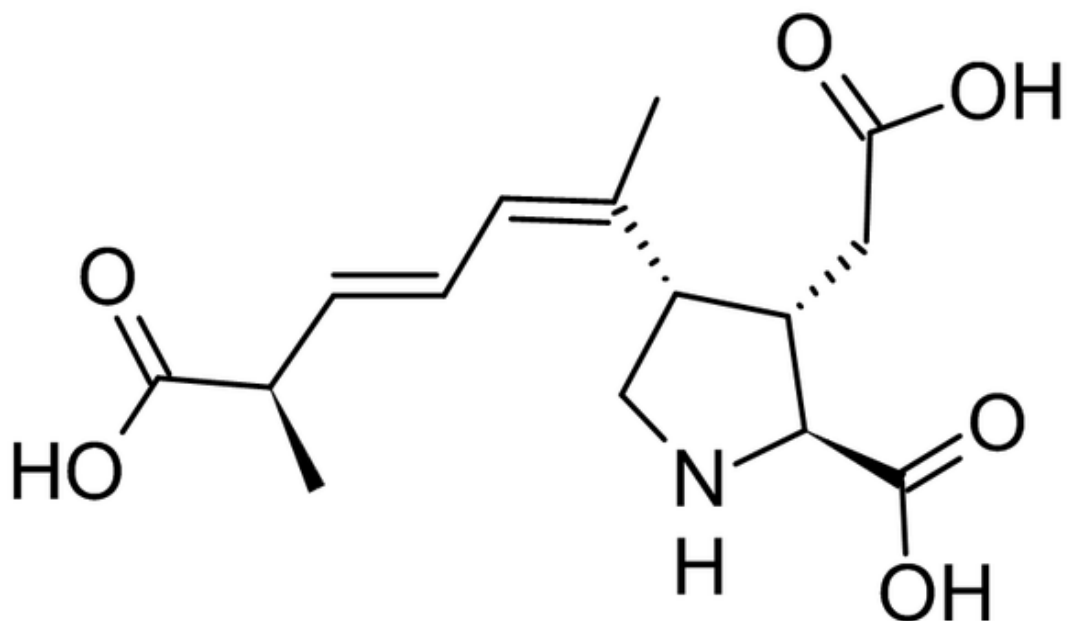
- neurotoksine, kao što su BTX (uzrokuju NSP), STX (Slika 1) (odgovorni za PSP) i TTX, koji djeluju na naponski-zatvoren natrijev kanal (VGSC – voltage-gated sodium channel) uzrokujući gubitak neuromuskularne funkcije i paralizu mišića



Slika 1 Kemijska struktura saksitoksina

(izvor: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/68/Saxitoxin_structure.png)

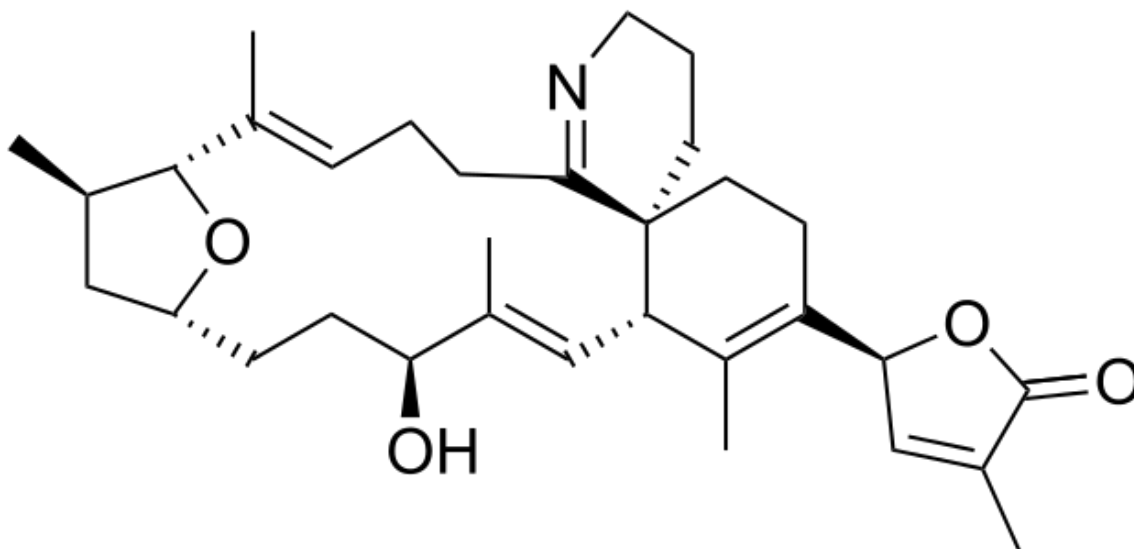
- ekscitacijske neurotransmitere, poput DA (Slika 2) i analoga odgovornih za ASP (uključuje gastrointestinalne i neurološke simptome), koji se vežu na specifične receptore u neuronima



Slika 2 Kemijska struktura domoične kiseline

(izvor: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0b/Domoic_acid.png)

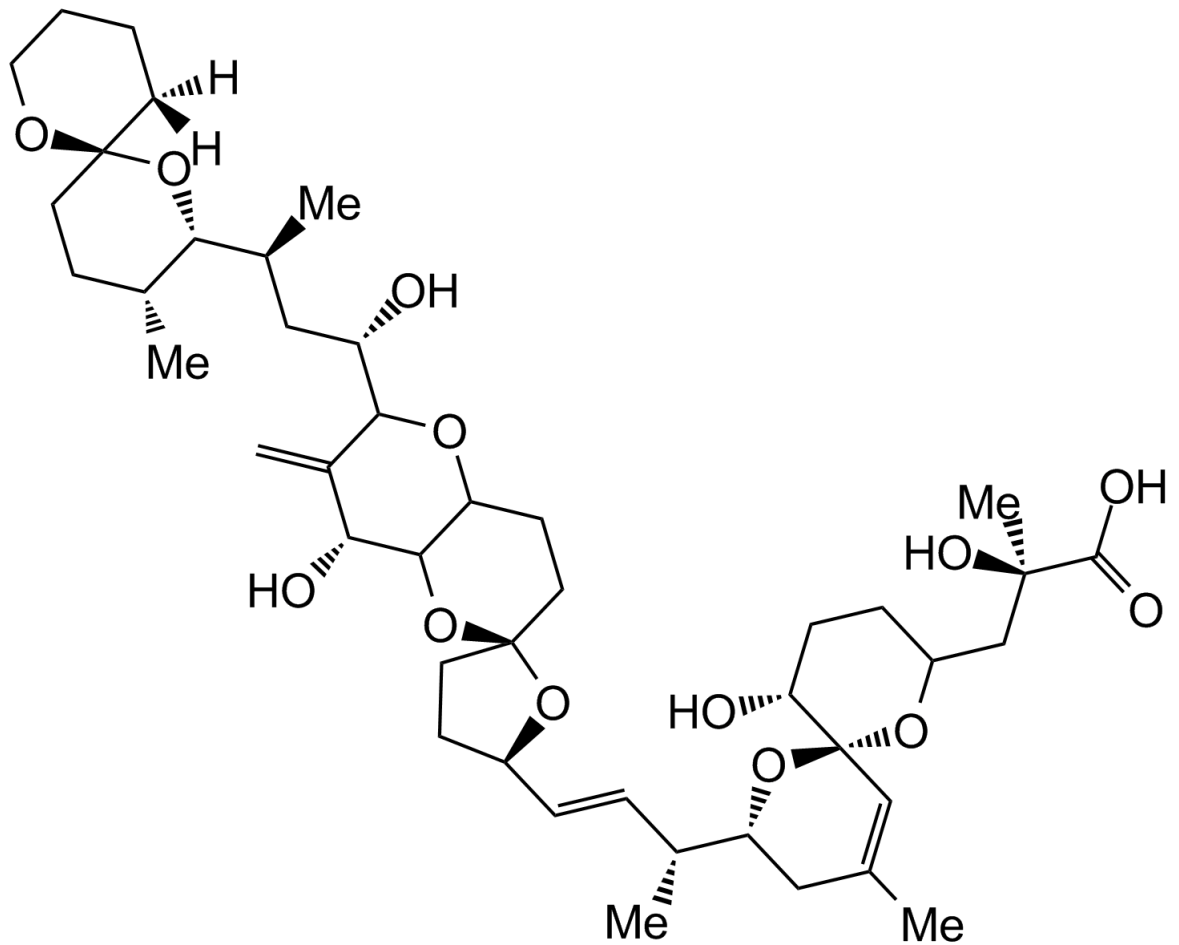
- brzodjelujući CI, kao što su gimnodimini (GYM) (Slika 3), spiroliidi (SPX) i pinatoksini (PnTX), blokiraju nikotinske acetilkolinske receptore, uzrokujući paralizu mišića



Slika 3 Kemijska struktura gimnodimina

(izvor: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/4e/Gymnodimine_A.svg/640px-Gymnodimine_A.svg.png)

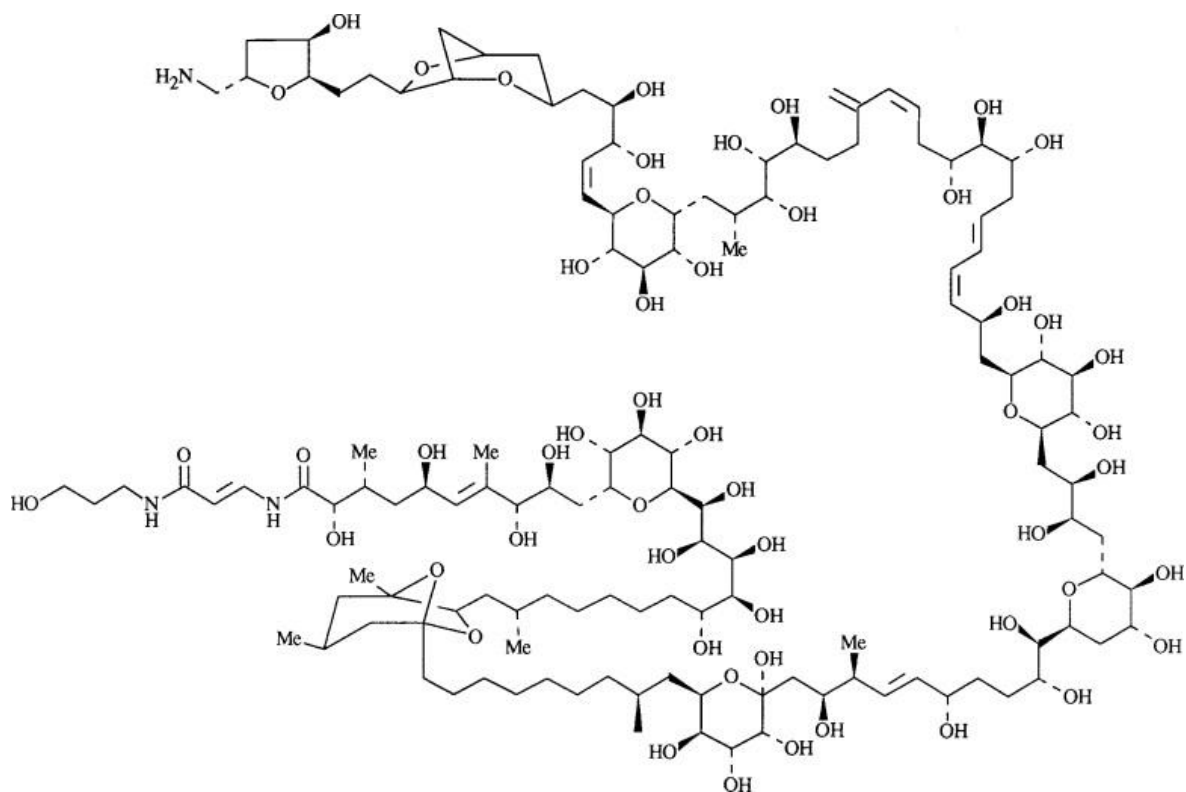
- polieteri masnih kiselina, poput OA (Slika 4) i dinofizitoksini (DTX), koji inhibiraju proteinske fosfataze in vitro, a uzrokuju DSP



Slika 4 Kemijska struktura okadaične kiseline

(izvor: <https://www.apexbt.com/media/diy/images/struct/A4540.png>)

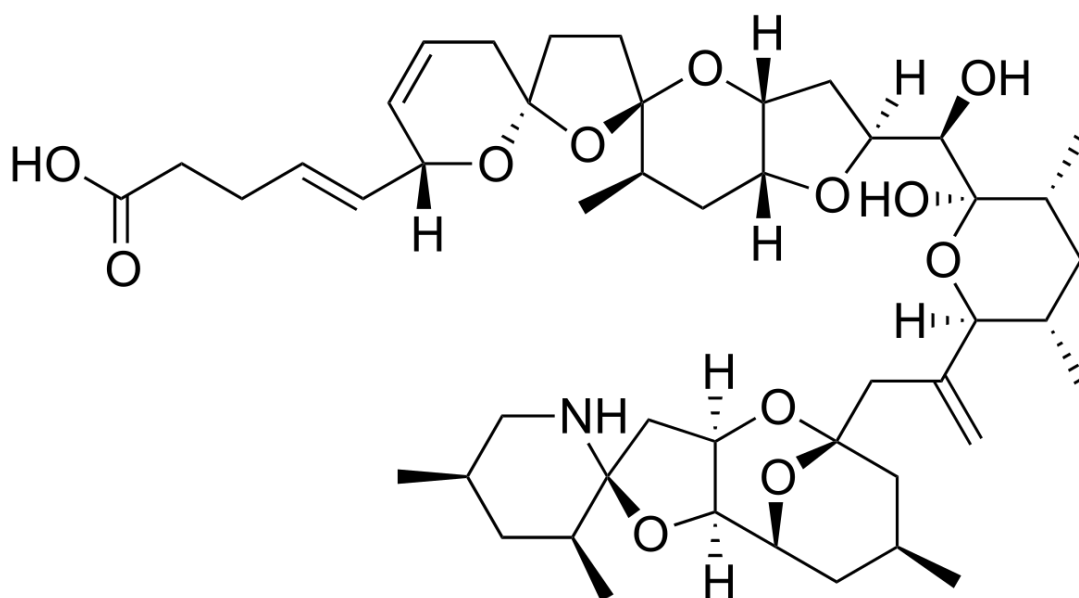
- veliki hidrofilni polialkoholi, PITX (Slika 5), koji se vežu za natrij-kalij pumpu, narušavajući njen mehanizam i uzrokujući nekontrolirani transport iona kroz plazmatsku membranu



Slika 5 Kemijska struktura palitoksina

(izvor: <https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-B9780121852665500300-gr1.jpg>)

- YTX, AZA (Slika 6), PTX čiji mehanizam djelovanja i toksičnosti nije u potpunosti upoznat, te se zasebno razmatraju i zakonski propisuju [2]



Slika 6 Kemijska struktura azaspiracida

(izvor: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/a3/Azaspiracid-1.svg/1200px-Azaspiracid-1.svg.png>)

1.2. Rasprostranjenost

Tijekom zadnjih nekoliko desetljeća, pojava i intenzitet trovanja fikotoksinima povećali su se usporedno s porastom štetnog cvjetanja algi po čitavom svijetu. Tijekom 1990-ih godina profili fikotoksina istraživali su se i u sjevernom Jadranu gdje su do sredine 90-ih godina dominirali DTX i OA, a zatim su najučestaliji kontaminanti postali YTX.

Antropogeni učinak i globalne klimatske promjene dovele su do sve većeg pojavljivanja i rasprostranjenosti cvjetanja algi, što je rezultiralo pojavom velikog broja fikotoksina u morskim organizmima na raznim mjestima, pa tako i na onima gdje prije nisu bili prisutni. Koncentracija i vrsta fikotoksina koji se nalaze u školjkašima uvelike zavise o vrsti zastupljenih fitoplanktona, o vrsti određenih školjkaša te o lokalitetu. [4]

2. Jesotoksini

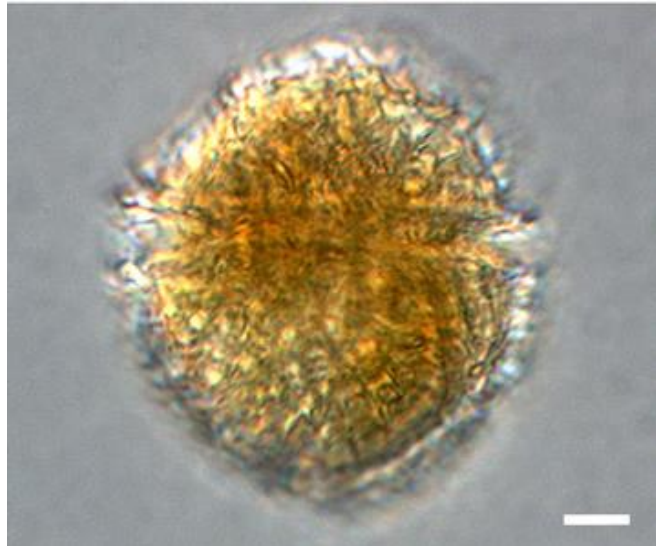
Jesotoksini (YTX) su sulfatizirani polieteri koji pripadaju skupini lipofilnih fiktoksina, a najčešće ih proizvode dinoflagelati vrste *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedra* i *Gonyaulax spinifera*. Prvi put su izolirani 1986. godine u Japanu, iz probavnih žlijezda školjkaša vrste *Patinopecten yessoensis*, odakle i potječe samo ime toksina, a zatim je njihova prisutnost detektirana diljem svijeta. Od početnog otkrića YTX-a, otkrivene su i opisane druge strukture kao što su 45-hidroksiYTX, homoYTX, 45-hidroksihomoYTX, carbonYTX, 1-desulfoYTX i mnogi drugi. Određeno je otprilike 100 analoga, od kojih je mnogima kemijska struktura u potpunosti utvrđena, dok ostali i dalje nisu jasno definirani. Ovi toksini akumuliraju se filtriranjem morske vode u organizam jestivih školjkaša što im omogućava ulazak u hranidbeni lanac. [9]

3. Proizvođači jesotoksina

Opisane su tri vrste koje proizvode jesotoksine: *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedra* i *Gonyaulax spinifera*. U pogodnim ekološkim i klimatskim uvjetima, dolazi do njihovog povećanog razmnožavanja pri čemu proizvode toksina.

3.1. *Protoceratium reticulatum*

Dinoflagelat *Protoceratium reticulatum* (Slika 7) kozmopolitska je i potencijalno otrovna vrsta. Posjeduje stadij ciste, a pokretni stadij i morfologija ciste ove vrste pokazuju fenotipsku plastičnost. Izolirane su neke pojedinačne ciste ili stanice s područja na sjevernoj hemisferi (Arktik i subtropska područja) kao i južnoj hemisferi (Čile i Novi Zeland). Utvrđena su ukupno 34 soja, a ciste i stanice ispitivane su pomoću svjetlosnog i elektronskog mikroskopa. Rezultati provedene molekularne filogenije pokazali su da se *Protoceratium reticulatum* sastoji od najmanje tri ribotipa, označenih kao A, B i C. U ribotip A ubrajaju se sojevi iz arktičkih i umjerenih područja, u ribotip B sojevi samo iz umjerenih područja i ribotip C sojevi iz subtropskih i umjerenih područja. Ispitivanje rasta jednog soja iz svakog ribotipa pri različitim temperaturama dovelo je do zaključka da sojevi ribotipova A, B i C pokazuju optimalan rast na 15 °C, 20 °C, 20-25 °C, što odgovara hladnim, umjerenim i toplim ekotipovima. Istraživani jesotoksini ispitani su za 25 sojeva pomoću tekućinske kromatografije-spektrometrije masa (LC-MS/MS). Roditeljski YTX proizveli su ribotipovi A i B. S druge strane, sojevi ribotipa C proizveli su samo analog YTX-a, homoYTX. [5]

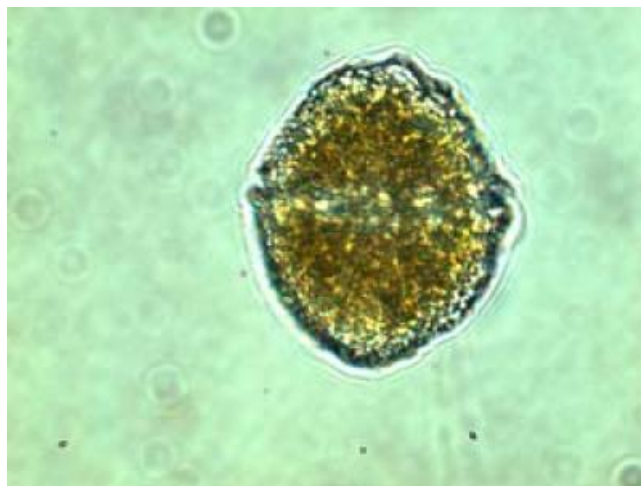


Slika 7 Mikroskopski prikaz vrste *Protoceratium reticulatum*

(izvor: http://toxinology.no/wp-content/uploads/2018/06/P_ret_lys.jpg)

3.2. *Lingulodinium polyedra*

Otkriveno je da vrsta *Lingulodinium polyedra* (Slika 8) reagira na dušični stres, kao i većina biljaka i mikroalgi, tako što zaustavlja rast stanica i smanjuje razinu unutarnjeg dušika, posebice u obliku proteina i klorofila. Utvrđeno je da ova vrsta proizvodi YTX u Italiji, Ujedinjenom Kraljevstvu, Irskoj, Španjolskoj i Kaliforniji gdje su cvjetanja ove vrste alge u obalnim vodama zabilježeni još od 1901. godine. [6]

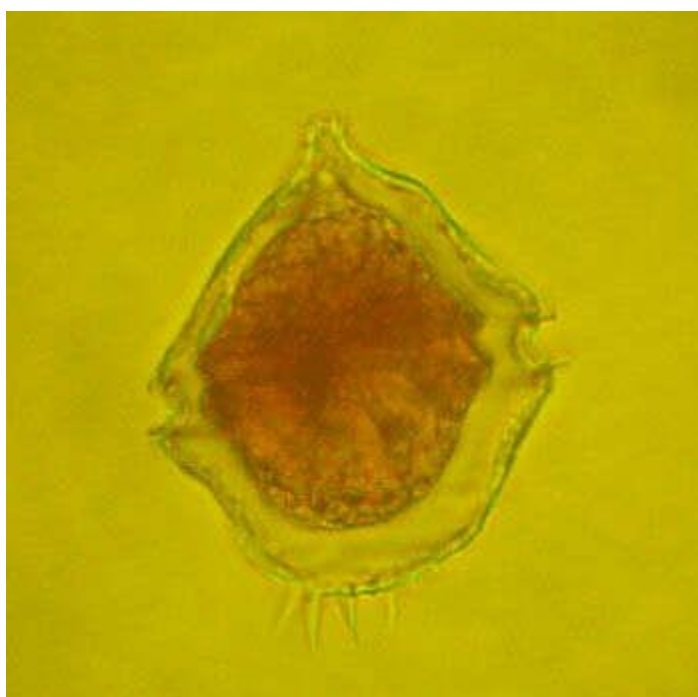


Slika 8 Mikroskopski prikaz vrste *Lingulodinium polyedra*

(izvor: <https://earimediaproductweb.azurewebsites.net/Api/v1/Multimedia/677ddba1-9221-438d-a2d3-433394da8687/Rendition/low-res/Content/Public>)

3.3. *Gonyaulax spinifera*

Tijekom provođenja uzorkovanja fitoplanktona u Walvis Bayu, u Namibiji 2011. godine, pokazalo se da vrsta *Gonyaulax spinifera* (Slika 9) proizvodi više analoga jesotoksina. Najzastupljeniji među njima bili su YTX, homoYTX i hidroksilirani analog koji nije odgovarao nijednoj prethodno utvrđenoj strukturi YTX-a. Nizom postupaka i metoda identificiran je novi analog, 24-hidroksiYTX, koji je pročišćen te zatim kvantificiran NMR-om. 24-hidroksiYTX pokazao je smanjenu toksičnost u odnosu na YTX. [7]

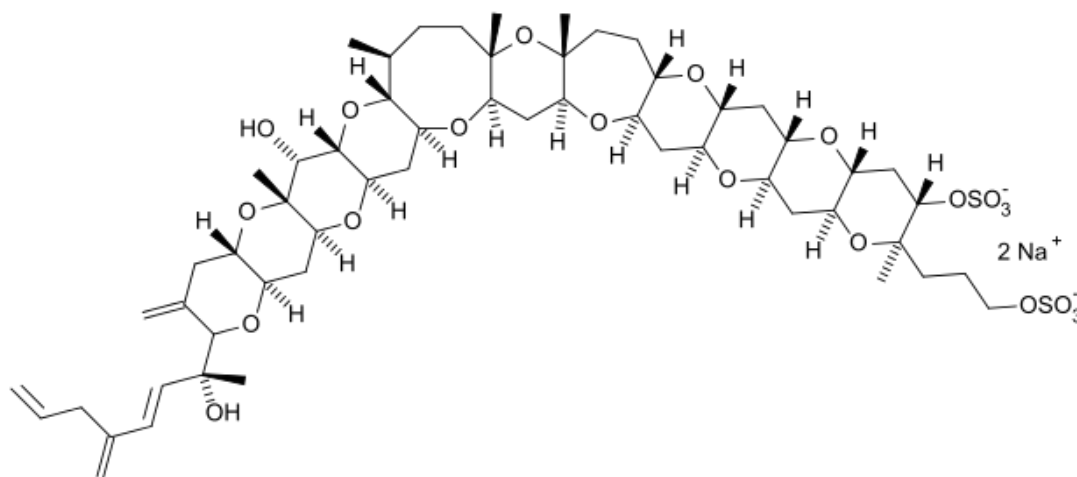


Slika 9 Mikroskopski prikaz vrste *Gonyaulax spinifera*

(izvor: <https://content.eol.org/data/media/9f/74/77/776.27474306.jpg>)

4. Struktura jesotoksina

Korištenjem masene spektrometrije i NMR spektroskopije dobivena je molekulska formula jesotoksina ($C_{55}H_{82}O_{21}S_2Na_2$). Radi se o disulfoniranom policikličkom eteru u obliku ljestvi koji na suprotnim stranama lanca ima vezana dva supstituenta, od kojih je jedan alifatski lanac i nosi na sebi formulu jedinku natrijeva sulfata, a drugi supstituent je kratki polien ili karbonilna skupina (Slika 10). Odnosi strukture i aktivnosti jesotoksina su istraživani i uočeno je da su strukturne promjene, koje su uključivale terminalni lanac C9, negativno utjecale na aktivnost. Spomenuti podaci doveli su do zaključka da promjena ove terminalne grupe dovodi do značajnih promjena u toksičnosti. Tipične modifikacije na okosnici YTX-a mogu biti sljedeće: umetanje metilne skupine između C1 i C2 (na primjer 1a-homoYTX), kao i između C41 i C42 (41a-homoYTX), glikozilacija C32 (glikoYTX A), zatim nekoliko modifikacija na nezasićenom bočnom lancu kao što su karboksilacija (carboksiYTX), hidroksilacija (45-hidroksiYTX), dodavanje amida (41a-homoYTX), eliminacija različitih dijelova (ketoYTX, ketohomoYTX), odsutnost prstena A (nor-ring-A-YTX), desulfonacija (1-d YTX) mnoge druge varijacije. Nadalje, budući da je prisutna sulfo-eterska skupina, raste polarnost ovih molekula te ih čini najpolarnijima u skupini lipofilnih toksina. [8]



Slika 10 Kemijska struktura jesotoksina

(izvor: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/c5/Yessotoxin.svg/300px-Yessotoxin.svg.png>)

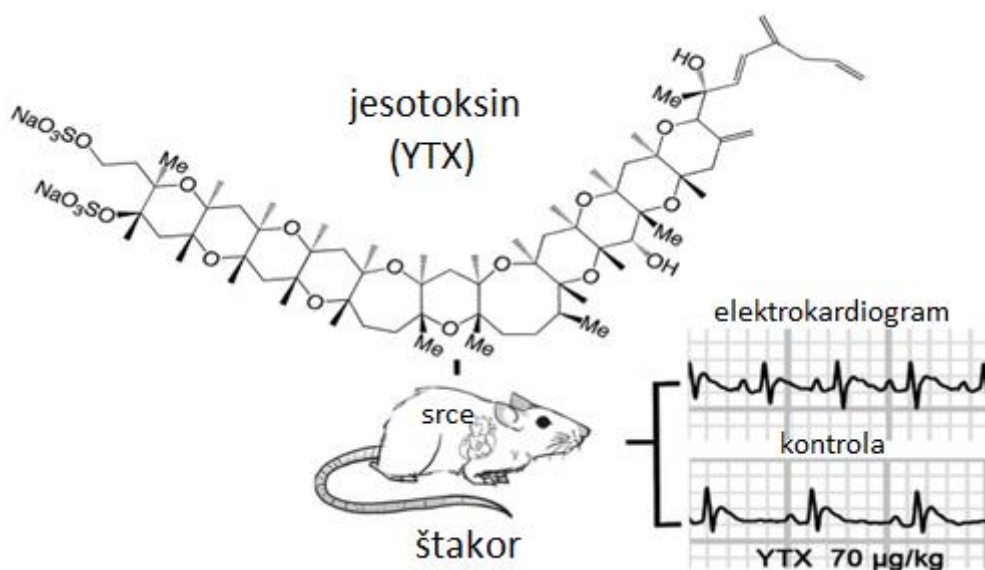
5. Toksičnost i mehanizam djelovanja jesotoksina

Dosadašnje informacije o toksičnosti jesotoksina su poprilično ograničene. Naime, spoznaje su prikupljene uglavnom na osnovi njihove toksičnosti kod miševa, na kojima su se provodila istraživanja, a sve do danas nije zabilježen nijedan slučaj intoksikacije kod ljudi. Jesotoksine se u početku svrstavalo u skupinu fiktoksina koji uzrokuju dijaretičko trovanje školjkašima, budući da su se pojavljivali zajedno s okadaičnom kiselinom. Ipak, daljnjim istraživanjima pokazalo se da im se mehanizam djelovanja razlikuje i zbog toga se danas smatraju zasebnom skupinom koja je samostalno regulirana. [14]

Mehanizam djelovanja nije još u potpunosti razjašnjen. Međutim, smatra se da YTX narušava ulazak kalcija u stanice, te da utječe i na imunološki sustav tako što potiče ekspresiju gena koji kodiraju citokine, povećavajući na taj način njihovu razinu. [9]

5.1. In vivo istraživanja

Prema podacima in vivo eksperimenata, ciljni organ jesotoksina i pojedinih analoga je srce, točnije stanice srčanog mišića. Pokusi provedeni na glodavcima i podaci prikupljeni na temelju njihovih rezultata se u pojedinim dijelovima razlikuju, posebice u pogledu koncentracije letalne doze. Nakon intraperitonealne injekcije, odnosno primjene injekcijom u potrbušnu šupljinu, razvili su se simptomi poput nemira, skakanja, drhtavice, ultrastrukturnih srčanih promjena i u konačnici nastupi smrt u dozama u rasponu od 0,1 i 0,5 mg/kg. Nasuprot tome, oralna primjena je pokazala značajno smanjenu toksičnost, a smrt nije uopće nastupila (Slika 11). [10]



Slika 11 Subakutna kardiotsiĉnost jesotoksina: in vivo istraŹivanja

(modificirano s izvora: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrestox.6b00012>)

5.2. In vitro istraŹivanja

In vitro analize potvrdile su djelovanje jesotoksina na promjene koncentracije kalcija i cikličkog adenzin monofosfata (cAMP), induciranje sinteze kaspaza koje aktiviraju apoptozu, otvaranje tranzicijskih pora mitohondrija te modifikacije citoskeleta. YTX po kemijskoj strukturi nalikuje na strukturu BTX-a, Źto upućuje na mogućnost negativnog utjecaja toksina na naponski zatvorene natrijeve kanale (VGSC). Ipak, određena istraŹivanja su pokazala da YTX nema utjecaja na natrijeve kanale, ali izravna posljedica aktivacije kalcijevih kanala je njegov učinak na razinu koncentracije kalcija u citosolu. Neka su se istraŹivanja usredotočila na modulaciju homeostaze kalcijevih iona u limfocitima pomoću YTX-a putem aktivacije homeostaze. [2]

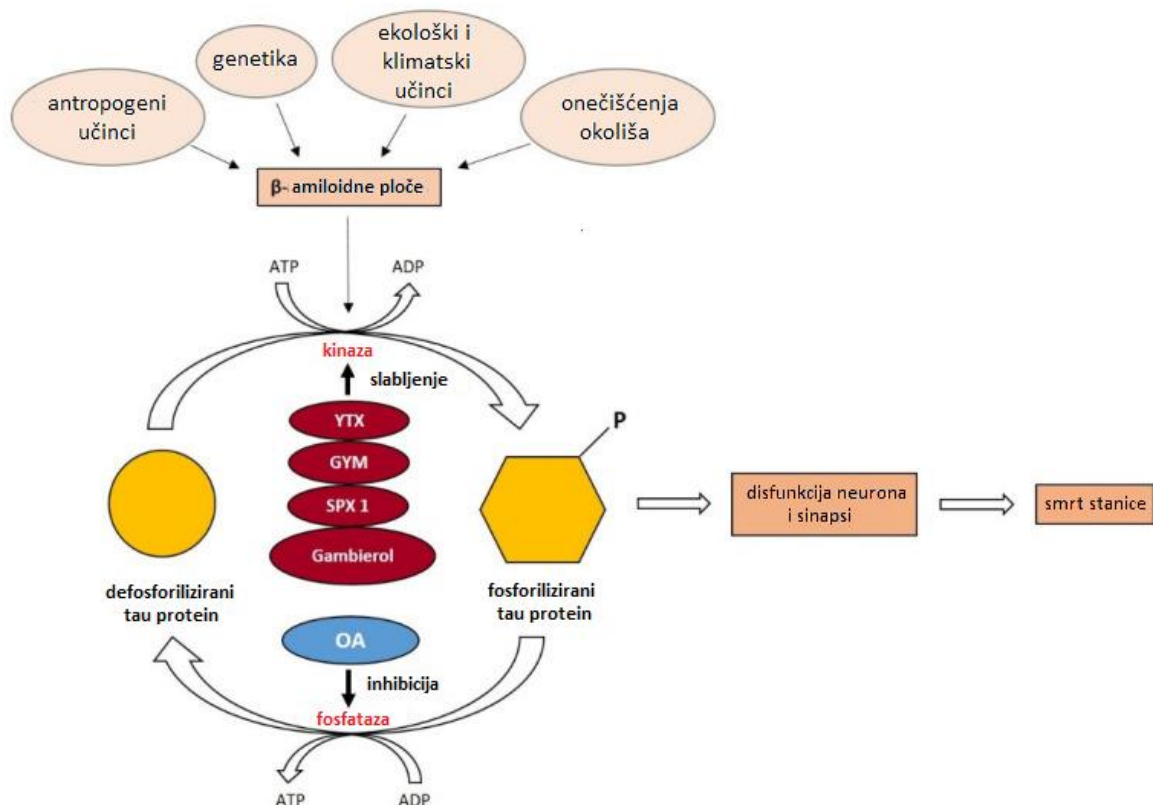
Također, YTX su pokazali djelovanje na translokaciju protein kinaze C u primarnim kortikalnim neuronima. Protein kinaza C (PKC) je protein koji ima veoma bitnu ulogu u regulaciji staniĉnog metabolizma i ukljuĉen je u različite biološke procese. ZabiljeŹeno je da nekoliko podtipova PKC ima utjecaj na metaboliĉke putove koje aktivira YTX u primarnim kortikalnim neuronima i u mišjoj staniĉnoj liniji limfocita EL-4. Na temelju opisanih istraŹivanja, trebalo bi uzeti u obzir potencijalnu toksiĉnost za ljude, budući da je uoĉeno da mogu uzrokovati oštećenja mozga na razini neurona. [12]

5.3. Utjecaj jesotoksina na Alzheimerovu bolest

Alzheimerova bolest (AD) najčešća je irreverzibilna neurodegenerativna bolest koja se očituje progresivnim nedostatkom pamćenja i prisutnošću kognitivnih poremećaja. AD nastaje složenim patofiziološkim mehanizmom, a rezultira smrću neurona, gubitkom sinapsi, oštećenjem mozga i, na kraju, smrću stanice. Bolest napreduje porastom β -amiloidnih plakova i hiperfosforilacijom tau proteina. Na taj način, dolazi do stvaranja neurofibrilnih čvorova koji dovode do nastanka progresivne degeneracije neurona. [11]

Zanimljiv farmakološki učinak na staničnu patologiju Alzheimerove bolesti opisan je nakon liječenja YTX-om. YTX u „in vitro“ modelu Alzheimerove bolesti pokazao je poboljšanje razine Tau i β -amiloida kroz mehanizam povezan s aktivacijom i translokacijom na plazmatsku membranu citosolne PKC (proteinska kinaza C). Inače, poznato je da pacijenti s Alzheimerovom bolešću imaju smanjenu razinu PKC. Opet, odgovor je različit ovisno o staničnom modelu. Odgovor na YTX u primarnim transgenim neuronima s tri mutacije i primarnim normalnim neuronima bio je različit u odnosu na PDE4 (fosfodiesteraza 4). YTX je povećao razine PDE4 za 65% u normalnim neuronima, dok modifikacije u razinama PDE4 u transgenim neuronima nisu primjećene. Osim toga, u neuronima, razine cAMP-a nisu bile modificirane u prisutnosti YTX-a (Slika 12). [13]

Prema svim ovim podacima, učinak YTX-a na neurone Alzheimerove bolesti bliži je terapiji nego toksikologiji.



Slika 12 Shematski prikaz mehanizma razvoja AD-a i mogućeg utjecaja fiktoksina

(modificirano s izvora:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/instance/9029327/bin/marinedrugs-20-00253-g001.jpg>)

5.4. Utjecaj jesotoksina na metabolizam glukoze

Nakon liječenja glioma stanica YTX-om, opisane su važne promjene u metabolizmu lipida i glukoze. Dokazano je da analog di-desulfo-YTX inducira masnu degeneraciju u jetri i gušterači. Deregulacija u metabolizmu lipida uočena je u glioma stanicama kao posljedica stresa endoplazmatskog retikuluma. Navedeni učinak dovodi do povećanog sadržaja kolesterola koje se može objasniti povećanjem koncentracije citosolnog kalcija koje uzrokuje toksin. Na temelju spomenutih činjenica, pretpostavilo se da je YTX jedna od vodećih molekula u liječenju i/ili prevenciji metaboličkih bolesti. [12]

5.5. Utjecaj jesotoksina na imunološki sustav

Izlaganjem dagnji jesotoksinu otkrivene su promjene oblika imunocita i, unatoč tome što te stanice nisu bile aktivirane, zabilježena je povećana aktivnost drugih aktivatora. Ovaj učinak uključuje i izvanstanični kalcij i cAMP. Stoga, očito je da je YTX na određeni

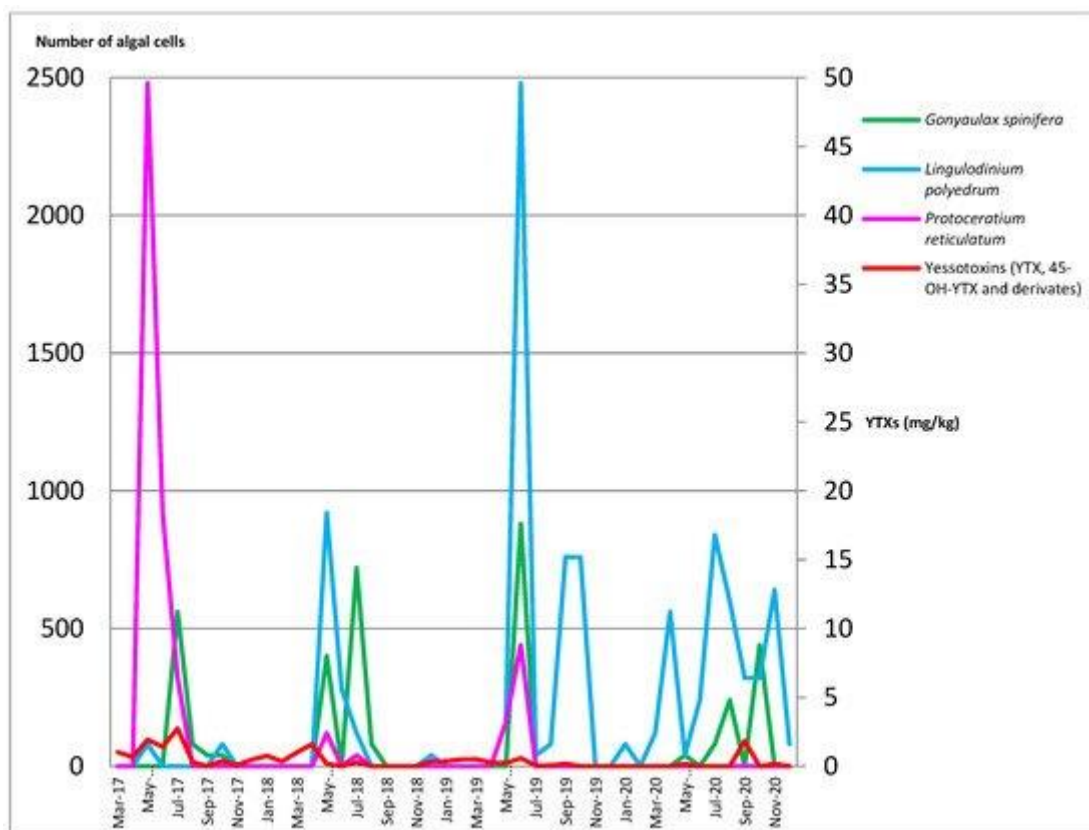
način povezan s imunološkim odgovorom. Između ostalog, proučen je i utjecaj YTX-a u mastocitima štakora i u linijama ljudskih mastocita. Mastociti su stanice vezivnog tkiva koje su uglavnom uključene u upalne procese i imunološki odgovor. U prisutstvu YTX-a, aktivacija mastocita, inducirana nakon imunološke reakcije, bila je veoma inhibirana. Opisani podaci upućuju na činjenicu da YTX ima zanimljivu ulogu u alergijskim procesima koju je još potrebno istražiti. [12]

6. Rasprostranjenost jesotoksina u svijetu

Nakon otkrića u Japanu izolacijom iz školjkaša *Patinopecten yessoensis*, jesotoksini su detektirani i širom svijeta. Zabilježeni su u vrstama *Mytilus edulis* u Norveškoj, *Mytilus chilensis* u Čileu, *Mytilus galloprovincialis* u Španjolskoj, *Mytilus galloprovincialis* u Italiji, *Perna canaliculus* u Novom Zelandu, *Mytilus edulis* i *Mytilus galloprovincialis* u Rusiji. Pripadnik dinoflagelata, *Protoceratium reticulatum*, prvi je jednostanični organizam koji je definiran kao proizvođač YTX-a, detektiranog na raznim područjima u Japanu, Italiji, Španjolskoj, Kanadi, Norveškoj i mnogim drugima. U Južnoj Africi tijekom 2017. godine zabilježena je smrtnost milijuna predstavnika morskog puža vrste *Haliotis midae* tijekom cvjetanja *Lingulodinium polyedra* i *Gonyaulax spinifera*, koji proizvode YTX. [13]

6.1. Pojava u Jadranskom moru

U Jadranskom moru također su zabilježene vrste koje produciraju YTX. Prvi put su detektirani na sjeverozapadnoj obali Jadranskog mora 1995. godine. Zatim su 2004. godine zabilježeni u školjkama sjeveroistočnog Jadranskog mora, a nedavno je potvrđeno da je YTX najčešći biotoksin u istočnom i srednjem dijelu Jadranskog mora. Otkako su se pojavili u Jadranskom moru, jesotoksini se neprestano detektiraju u fitoplanktonu i školjkašima (Slika 13).



Slika 13 Fitoplankton sjeverozapadne obale Jadranskog mora i prisutnost YTX-a u školjkama (2017.-2020.)

(izvor: https://www.mdpi.com/toxins/toxins-13-00634/article_deploy/html/images/toxins-13-00634-g002-550.jpg)

7. Regulacija i dopuštene koncentracije jesotoksina

Premda nema informacija o toksičnom utjecaju jesotoksina na ljude, zbog štetnosti i dokazane akutne toksičnosti na pokusnim životinjama, nužno je voditi evidenciju o njihovoj koncentraciji kako bi se zaštitilo zdravlje ljudi, a posebice srčanih bolesnika. S obzirom da nema konkretnih dokaza o štetnim učincima na ljude, Europska unija je nedavno povećala granicu YTX-a u školjkašima s 1 na 3,75 mg YTX/kg školjkaša kao preventivnu mjeru. Analitičke metode kao što su biološki test na miševima (MBA – mouse bioassay) i biološki test na štakorima (RBA – rat bioassay) pokazale su neke nedostatke, osim etičkih, poput velike varijabilnosti rezultata, nedovoljne sposobnosti detekcije i ograničene specifičnosti. Zbog toga su se razvile alternativne biološke metode, a metoda tekućinske kromatografije-masene spektrometrije (LC-MS/MS) potvrđena je i priznata kao službena metoda. [14]

Zaključak

Fitoplanktonski dinoflagelati proizvode policikličke eterske spojeve, jesotoksine, koji se nakupljaju u organizmima koji se hrane filtriranjem vode. Kontaminirane organizme, koji su najčešće školjkaši, ljudi unose hranom i na taj način oboljevaju. Postoji više vrsta trovanja poput otrovanja školjkašima koje uzrokuje gubitak pamćenja (ASP), otrovanja školjkašima koje uzrokuje paralizu (PSP), otrovanja školjkašima koje uzrokuju dijareju (DSP) i azaspiracidno otrovanje školjkašima (AZP), te neurotoksično otrovanje školjkama (NSP).

Istaknute vrste dinoflagelata koje proizvode jesotoksine su *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedra* i *Gonyaulax spinifera*. Jesotoksini pripadaju skupini lipofilnih toksina, a prisutnost sulfo-etarske skupine čini ih najpolarnijima među njima. Na početku su bili pridruženi skupini fiktoksina koja uzrokuje dijaretičko trovanje školjkašima, no pokazalo se da im se mehanizam djelovanja razlikuje od ostalih. Stoga se smatraju kao zasebna, samostalno regulirana skupina. Pored jesotoksina, otkrivene su i kemijske strukture brojnih njegovih analoga koji su također uključeni u razne biološke procese.

Aktivnost i mehanizam kojim djeluju jesotoksini nije sasvim istražen te postoje mnoge karakteristike i utjecaji koje je tek potrebno otkriti. Toksični učinci na ljude i dalje nisu zabilježeni. Ipak, istraživanja na pokusnim životinjama pokazala su negativna djelovanja i toksičnost te je zbog toga potrebno kontrolirati njihove koncentracije sprječavajući tako mogući štetan utjecaj i na zdravlje ljudi.

Literatura

- [1] Kvrđić, Kristina, Natalija Džafić i Jelka Pleadin. "Fikotoksini u morskim organizmima - potencijalna prijetnja sigurnosti potrošača." *Veterinarska stanica* 52, br. 6 (2021): 739-749. <https://doi.org/10.46419/vs.52.6.13>
- [2] Farabegoli F, Blanco L, Rodríguez LP, Vieites JM, Cabado AG. Phycotoxins in Marine Shellfish: Origin, Occurrence and Effects on Humans. *Mar Drugs*. 2018 May 29;16(6):188. doi: 10.3390/md16060188. PMID: 29844286; PMCID: PMC6025170.
- [3] Louzao MC, Vilariño N, Vale C, Costas C, Cao A, Raposo-Garcia S, Vieytes MR, Botana LM. Current Trends and New Challenges in Marine Phycotoxins. *Mar Drugs*. 2022 Mar 8;20(3):198. doi: 10.3390/md20030198. PMID: 35323497; PMCID: PMC8950113.
- [4] Gerssen A, Pol-Hofstad IE, Poelman M, Mulder PP, van den Top HJ, de Boer J. Marine toxins: chemistry, toxicity, occurrence and detection, with special reference to the Dutch situation. *Toxins (Basel)*. 2010 Apr;2(4):878-904. doi: 10.3390/toxins2040878. Epub 2010 Apr 23. PMID: 22069615; PMCID: PMC3153220.
- [5] Wang N, Mertens KN, Krock B, Luo Z, Derrien A, Pospelova V, Liang Y, Bilien G, Smith KF, De Schepper S, Wietkamp S, Tillmann U, Gu H. Cryptic speciation in *Protoceratium reticulatum* (Dinophyceae): Evidence from morphological, molecular and ecophysiological data. *Harmful Algae*. 2019 Sep;88:101610. doi: 10.1016/j.hal.2019.05.003. Epub 2019 May 17. PMID: 31582156.
- [6] Dagenais Bellefeuille S, Dorion S, Rivoal J, Morse D (2014) The Dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* Responds to N Depletion by a Polarized Deposition of Starch and Lipid Bodies. *PLoS ONE* 9(11): e111067. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111067>
- [7] Rajotte I, Rafuse C, Wright EJ, Achenbach JC, Ellis LD, McCarron P. Structure Elucidation and Relative Toxicity of (24*R*)-24-Hydroxyessotoxin from a Namibian Isolate of *Gonyaulax spinifera*. *J Nat Prod*. 2019 Jul 26;82(7):1945-1952. doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b00318. Epub 2019 Jul 8. PMID: 31283224.

- [8] Rubini S, Albonetti S, Menotta S, Cervo A, Callegari E, Cangini M, Dall'Ara S, Baldini E, Vertuani S, Manfredini S. New Trends in the Occurrence of Yessotoxins in the Northwestern Adriatic Sea. *Toxins (Basel)*. 2021 Sep 9;13(9):634. doi: 10.3390/toxins13090634. PMID: 34564638; PMCID: PMC8471916.
- [9] Bagryantseva OV, Evstratova AD, Khotimchenko SA. [Yessotoxin: risk assessment for public health. Justification of regulations of content in seafood]. *Vopr Pitan*. 2018;87(3):18-29. Russian. doi: 10.24411/0042-8833-2018-10027. Epub 2018 May 11. PMID: 30592876
- [10] Benjamin Seymour, Athena Andreosso, Jamie Seymour. Chapter 7 – Cardiovascular Toxicity from Marine Envenomation, Editor(s): Meenakshisundaram Ramachandran, *Heart and Toxins*, Academic Press, 2015, Pages 203-223, ISBN 9780124165953, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416595-3.00007-4>.
- [11] Botelho MJ, Milinovic J, Bandarra NM, Vale C. Alzheimer's Disease and Toxins Produced by Marine Dinoflagellates: An Issue to Explore. *Mar Drugs*. 2022 Apr 2;20(4):253. doi: 10.3390/md20040253. PMID: 35447926; PMCID: PMC9029327.
- [12] Alfonso A, Vieytes MR, Botana LM. Yessotoxin, a Promising Therapeutic Tool. *Mar Drugs*. 2016 Jan 28;14(2):30. doi: 10.3390/md14020030. PMID: 26828502; PMCID: PMC4771983.
- [13] Paz B, Daranas AH, Norte M, Riobó P, Franco JM, Fernández JJ. Yessotoxins, a group of marine polyether toxins: an overview. *Mar Drugs*. 2008 May 7;6(2):73-102. doi: 10.3390/md20080005. PMID: 18728761; PMCID: PMC2525482.
- [14] Mudadu AG, Lorenzoni G, Bazzoni AM, Bazzardi R, Tedde G, Arras I, Sanna G, Santucciu C, Marongiu E, Virgilio S. Yessotoxin detection in bivalve molluscs: A case study from coastal mussel farms (Sardinia, Italy). *Ital J Food Saf*. 2018 Feb 26;6(4):7015. doi: 10.4081/ijfs.2017.7015. PMID: 29564241; PMCID: PMC5850047.

Popis kratica

AD – Alzheimerova bolest (*engl. Alzheimer's disease*)

ASP – Amnezijsko trovanje školjkašima (*engl. Amnesic shellfish poisoning*)

AZA – Azaspiracid (*engl. Azaspiracid*)

AZP – Trovanje azaspiracidima (*engl. Azaspiracid poisoning*)

BTX – Brevetoksin (*engl. Brevetoxin*)

cAMP – ciklički adenzin monofosfat (*engl. cyclic adenosine monophosphate*)

CFP – Trovanje ribom Ciguatera (*engl. Ciguatera fish poisoning*)

CI – Ciklički imini (*engl. Cyclic imine*)

CTX – Ciguatoksin (*engl. Ciguatoxin*)

DA – Domoična kiselina (*engl. Domoic acid*)

DSP – Dijaretičko trovanje školjkašima (*engl. Diarrheic shellfish poisoning*)

DTX – Dinofizitoksin (*engl. Dinophysitoxin*)

GYM – Gimnodimin (*engl. Gymnodimine*)

HAB – Štetno cvjetanje algi (*engl. Harmful algal bloom*)

LC-MS/MS – Tekućinska kromatografija-masena spektrometrija (*engl. Liquid chromatography-mass spectrometry*)

MBA – Biološki test na miševima (*engl. Mouse Bioassay*)

NSP – Neurotoksično trovanje školjkašima (*engl. Neurotoxic shellfish poisoning*)

NMR- Nuklearna magnetska rezonanca (*engl. Nuclear magnetic resonance*)

OA – Okadaična kiselina (*engl. Okadaic acid*)

PDE – Fosfodiesteraza (*engl. Phosphodiesterase*)

PITX – Palitoksin (*engl. Palytoxin*)

PKC – Protein kinaza C (*engl. Protein kinase C*)

PnTX – Pinatoksin (*engl. Pinnatoxin*)

PSP – Paralitičko trovanje školjkašima (*engl. Paralytic shellfish poisoning*)

PTX - Pektenotoksin (*engl. Pectenotoxin*)

RBA – Biološki test na štakorima (*engl. Rat Bioassay*)

SPX – Spirolid (*engl. Spirolide*)

STX – Saksitoksin (*engl. Saxitoxin*)

VGSC – Naponski-zatvoren natrijev kanal (*engl. Voltage-gated sodium channel*)

YTX – Jesotoksin (*engl. Yessotoxin*)

Popis slika

Slika 1 Kemijska struktura saksitoksina.....	3
Slika 2 Kemijska struktura domoične kiseline.....	4
Slika 3 Kemijska struktura gimnodimina.....	4
Slika 4 Kemijska struktura okadaične kiseline.....	5
Slika 5 Kemijska struktura palitoksina.....	6
Slika 6 Kemijska struktura azaspiracida.....	6
Slika 7 Mikroskopski prikaz vrste <i>Protoceratium reticulatum</i>	10
Slika 8 Mikroskopski prikaz vrste <i>Lingulodinium polyedra</i>	10
Slika 9 Mikroskopski prikaz vrste <i>Gonyaulax spinifera</i>	11
Slika 10 Kemijska struktura jesotoksina	12
Slika 11 Subakutna kardiotoksičnost jesotoksina: in vivo istraživanja	14
Slika 12 Shematski prikaz mehanizma razvoja AD-a i mogući utjecaj fiktoksina	16
Slika 13 Fitoplankton sjeverozapadne obale Jadranskog mora i prisutnost YTX-a u školjkama (2017.-2020.)	19