

# Gimnodimini

---

**Škare, Margita**

**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:166:446860>

*Rights / Prava:* [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-14**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Science](#)



Sveučilište u Splitu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Odjel za kemiju

Margita Škare

# **GIMNODIMINI**

Završni rad

Split, 2022.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Završni rad

### GIMNODIMINI

Margita Škare

Gimnodimini pripadaju skupini spojeva nazvanih ciklički imini. To su morski, fiktoksini koje proizvode alge dinoflagelati. Gimnodimine proizvode vrste *Karenia selliformis*, *Alexandrium peruvianum* i *Alexandrium ostenfeldii*. Gimnodimini imaju makrociklički prsten od 16 atoma ugljika sa spiroketalnim prstenskim sustavom i iminskom skupinom. Ova skupina toksina djeluje na način da blokira nikotinske acetilkolinske receptore na mioneuralnom spoju. Gimnodimini nisu toksični za ljude, ali testiranja na miševima su pokazala rapidne neurotoksične simptome. Uglavnom se nakupljaju u tkivu školjkaša, a za njihovu identifikaciju u ekstraktu tkiva školjkaša se koriste tehnike tekućinske kromatografije i masene spektrometrije. Iako ne predstavljaju neposrednu opasnost za ljudsko zdravlje važno je provoditi programe monitoringa školjkaša, naročito na mjestima raširenog uzgoja.

**Ključne riječi:** gimnodimin, dinoflagelati, toksičnost, ciklički imini, acetilkolinski receptori, školjkaši, monitoring, Jadransko more, tekućinska kromatografija, masena spektrometrija

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

**Rad sadrži:** 20 stranica, 6 grafičkih prikaza i 29 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

**Mentor:** Dr. sc. Stjepan Orhanović, izvanredni profesor

**Ocjenjivači:** Dr. sc. Stjepan Orhanović, izvanredni profesor

Dr. sc. Nenad Vuletić, viši asistent

Mag. educ. biol.et chem. Ivana Žaper

Rad prihvaćen: 27. rujna 2022.

## Basic documentation card

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

B. Sc. Thesis

### GYMNODIMINES

Margita Škare

Gymnodimines belong to a larger group of compounds called cyclic imines. These are marine phycotoxins produced by dinoflagellate algae. Gymnodimines are produced by the species *Karenia selliformis*, *Alexandrium peruvianum* and *Alexandrium ostenfeldii*. Gymnodimines have a macrocyclic ring of 16 carbon atoms with a spiroketal ring system and an imine group. This group of toxins works by blocking nicotinic acetylcholine receptors at the myoneural junction. Gymnodimines have no toxic effect on humans, but in mouse bioassay they show rapid neurotoxic symptoms. They are mainly accumulated in the tissue of bivalves, so liquid chromatography and mass spectrometry techniques are used for their identification the extract of the shellfish tissue. Although they do not pose a direct danger to human health, it is important to carry out shellfish monitoring programs, especially in places of widespread cultivation.

**Keywords:** gymnodimines, dinoflagellates, toxicity, cyclic imines, acetylcholine receptors, shellfish, monitoring, Adriatic Sea, liquid chromatography, mass spectrometry

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

**Thesis consists of:** 20 pages, 6 figures and 29 references, original in: Croatian

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

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

Nenad Vuletić, Ph.D.

Ivana Žaper

Thesis accepted: September 27<sup>th</sup> 2022.

## Sadržaj

1	Uvod.....	1
1.1	Dinoflagelati .....	2
1.1.1	Toksični dinoflagelati.....	2
1.2	Vrste trovanja .....	3
1.3	Cvjetanje mora.....	4
2	Gimnodimini .....	6
2.1	Ciklički imini.....	6
2.1.1	Svojstva gimnodimina.....	6
2.2	Srodni spojevi gimnodimina.....	7
2.3	Laboratorijska sinteza gimnodimina .....	8
2.4	Mehanizam djelovanja.....	8
2.5	Rasprostranjenost.....	9
2.5.1	Pojavljivanje u Jadranskom moru .....	9
3	Identifikacija .....	11
3.1	Tekućinska kromatografija (LC) .....	11
3.2	Masena spektrometrija (MS) .....	12
3.3	LC-MS/MS .....	12
3.4	NMR tehnika .....	12
4	Toksičnost.....	14
4.1	Utjecaj gimnodimina na miševe .....	14
4.2	Utjecaj gimnodimina na ljude.....	15
4.3	Utjecaj gimnodimina i njegovih metabolita na školjkaše.....	16
4.4	Monitoring školjkaša .....	16
5	Zaključak.....	19
6	Bibliografija .....	20

# 1 Uvod

Dinoflagelati su fitoplanktonski organizmi koji najčešće žive u moru, a mogu biti opasni za ljudsko zdravlje zbog proizvodnje toksina. U tkivu školjkaša dolazi do akumulacija toksina čija konzumacija u obliku kontaminirane hrane može uzrokovati razne zdravstvene probleme. Postoji nekoliko vrsta trovanja školjkašima: amnezijsko (ASP), paralitičko (PSP), neurotoksično (NSP), dijaretično (DSP) i trovanje azaspiracidima (AZP) za koje su odgovorni različiti toksini iz različitih vrsta dinoflagelata. U određenim uvjetima u moru dolazi do pojave zvane cvjetanje mora. Razmnožavanje dinoflagelata je povećano pa je i koncentracija toksina u moru veća. U Jadranskom moru ova pojava je sve češća, a kao najveći uzročnik se ističe negativan utjecaj ljudi na okoliš. Uzgoj školjkaša ima veliki gospodarski značaj pa se detaljno prate uvjeti u kojima se uzgajaju kako bi se minimizirao njihov loš utjecaj na ljudsko zdravlje. Monitoring školjkaša provodi se u uzgajalištima i na raznim lokacijama u Jadranu dok su koncentracije toksina u vrstama poput dagnji i kamenica također od velikog interesa.

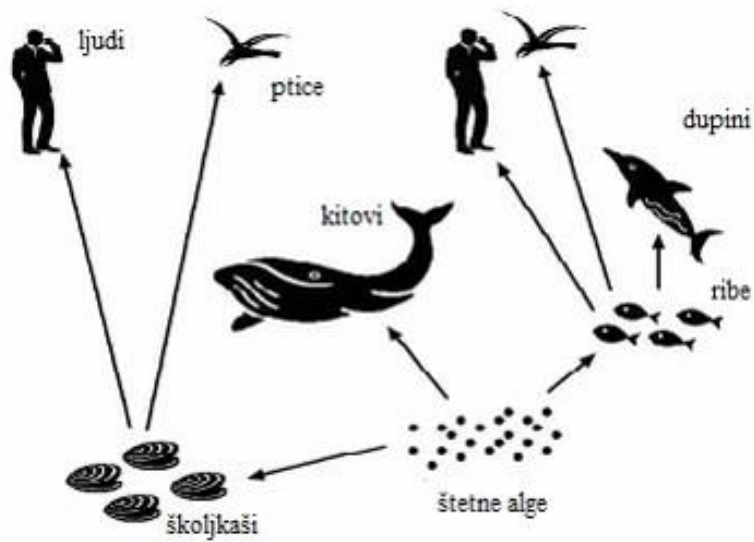
U ovom radu pobliže ćemo se upoznati s toksinima iz grupe gimnodimini, koji pripadaju većoj skupini spojeva nazvanih ciklički imini. To su brzodjelujući fiktoksini koji imaju makrocikličku strukturu 14-27 atoma ugljika s dvije karakteristične skupine – iminski prsten i spiroketalni prstenski sustav. U ovu skupinu spojeva spadaju gimnodimini, spiroolidi, pinatoksini, prorocentrolidi, spiro-prorocentrimini, pteriatoksini i portimini. Gimnodimini su se pokazali kao brzodjelujući neurotoksini u eksperimentima na miševima, dok za ljude, kod oralnog unosa, nisu pokazali akutnu toksičnost. Gimnodimini su prvo izolirani na Novom Zelandu 1994. godine i to je opisan GYM-A. Kasnije su pronađeni i drugi analozi gimnodimina na različitim lokacijama po svijetu, a uglavnom ih proizvode vrste dinoflagelata *Karenia selliformis*, *Alexandrium peruvianum* i *Alexandrium ostenfeldii*. Pojavljivanje GYM-A zabilježeno je i u Jadranu, prvi put 2006. godine.

## 1.1 Dinoflagelati

Svjetleći bičaši, lat. *Dinoflagellata* su fitoplanktonski organizmi, pretežno planktonski iako su poznati i bentonski predstavnici. Većina ih živi u moru, a neke je moguće pronaći i u slatkoj vodi. To su eukariotski mikroorganizmi, najčešće pokretni jednostaničari. Na površini njihovih stanica se nalazi amfijeza kao modifikacija periplasta. Tvrda amfijeza naziva se teka ili oklop, a dinoflagelati s tvrdom amfijezom tekatni. Vrste bez celuloznih ploča nazivaju se netekatni ili goli. Razmnožavaju se binarnom diobom, ali je poznato i razmnožavanje gametama, češće izogamije, a rjeđe anizogamije. Spolno razmnožavanje često završava stadijem cista. Dinoflagelati su važni za evoluciju jer se smatra da predstavljaju prijelazni stadij između biljnog i životinjskog svijeta. Dinoflagelati se mogu brzo razmnožavati pa u pogodnim uvjetima mogu stvoriti veliki broj jedinki koje mogu obojiti more i uzrokovati pojavu koju zovemo cvjetanje mora.

### 1.1.1 Toksični dinoflagelati

Neke vrste dinoflagelata mogu proizvoditi toksine, među kojima su najčešći neurotoksini koji utječu na živčani sustav. Još uvijek nije poznato zašto ili kako dinoflagelati proizvode toksine (Spector 1984.). Međutim toksini predstavljaju opasnost za brojne organizme, kao što su ribe, ali i za čovjeka koji može konzumirati toksine akumulirane u organizmima poput školjkaša. Slika 1. U školjkaša toksini se uglavnom akumuliraju u probavnim žlijezdama i nemaju utjecaj na taj isti organizam. (Gerssen A 2010.) Rodovi dinoflagelata koji najčešće proizvode toksine su: *Alexandrium*, *Gymnodinium*, *Dinophysis*, *Protoperidinium*, *Protoceratium*, *Karenia*, *Gambierdiscus* i *Ostreopsis* .Slika 2. (K. Kvrđić 2021.)

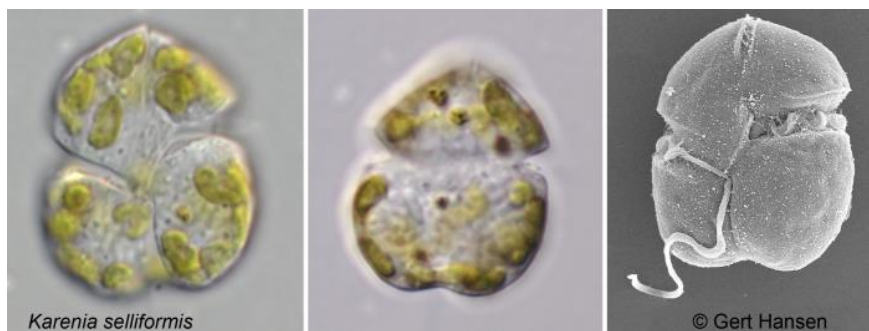


Slika 1. Prikaz utjecaja algi proizvođača toksine na druge organizme (Gerssen A 2010.)

## 1.2 Vrste trovanja



Školjkaši se hrane filtriranjem vode, te tako osim hranjivih tvari mogu akumulirati i toksine koji se nalaze u njihovoj blizini, posebice tijekom cvjetanja mora. Razlikujemo nekoliko vrsta trovanja školjkašima: ASP (Amnesic shellfish poisoning)- uzrokuje gubitak pamćenja, PSP (Paralytic shellfish poisoning)- izaziva paralizu, DSP (Diarrhetic shellfish poisoning)- izaziva diareju, NSP (Neurotoxic shellfish poisoning)- neurotoksično djelovanje i AZP (Azaspiracid poisoning)- azaspiracidno trovanje. ASP trovanje uzrokuje toksin koji se naziva domoična kiselina (DA), a proizvode je alge kremenjašice, *Pseudo-nitzschia sp.* i *Nitzschia sp.* Za PSP trovanje su odgovorni saksitoksini (STX) koje proizvode dinoflagelati roda *Alexandrium*. DSP trovanje je uzrokovano različitim toksinima, a najvažniji su: okadaična kiselina (OA) i njeni derivati (DTX) , pectenotoksini (PTX) i yessotoksini (YTX). -NSP trovanje je prouzročeno brevetoksinima (BTX) koje stvaraju dinoflagelati vrste *Karenia brevis*. AZP trovanje uzrokuje toksin azaspiracid. (Ribarić 2012.)



Slika 2. *Karenia selliformis*, vrsta *Dinoflagellata* koja proizvodi toksin gimnodimin (Hansen n.d.)

### 1.3 Cvjetanje mora

Cvjetanje mora je prirodna pojava koja se javlja u izvanrednim uvjetima kao što je povećana količina padalina ili promjena temperature, a događa se zbog povećane količine hranjivih tvari u moru (soli dušika i fosfata). Cvjetanje mora označava naglo razmnožavanje algi ili cijanobakterija što za posljedicu ima obojenje mora i stvaranje sluzavih nakupina na površini. Ova pojava je opasna iz više razloga: smanjena je količina kisika u takvom moru, što dovodi do ugibanja organizama, pomora ribe, opasnosti za kupaće, a u slučaju cvjetanja toksičnih vrsta fitoplanktona može se naći veća količina proizvedenih toksina. U Jadranskom moru ova pojava se sve češće javlja od 1988. godine, dok se od 2000. javlja svake godine. Uglavnom se

pojavljuje u razdoblju od svibnja do kolovoza. Cvjetanje je često potaknuto antropogenim djelovanjem na okoliš, posebice kroz komunalne i industrijske otpadne vode( deterdženti, šamponi). (Rade Knežević 2005.)

## 2 Gimnodimini

### 2.1 Ciklički imini

Ciklički imini su brzodjelujući fiktoksini. Ovoj skupini spojeva pripadaju spiroolidi, gimnodimini, pinatoksini, prorocentrolidi, pteriatoksini, spiro-prorocentrimini i portimini. Ciklički imini imaju nekoliko zajedničkih karakteristika zbog kojih ih možemo svrstati u ovu skupinu, a to su: makrociklički prsten koji se sastoji od 14 do 27 atoma ugljika, šesteročlani ili sedmeročlani iminski prsten, peteročlane ili šesteročlane cikloeterske jedinice u makrociklu, cikloheksenilni prsten sa spiro vezom na ciklo-iminu (osim prorocentrolida), para supstitucija na cikloheksenilnom prsten. Gimnodimine proizvode vrste *Karenia selliformis*, *Alexandrium peruvianum* i *Alexandrium ostenfeldii*, prorocentrolide i spiro-prorocentrimine proizvode rodovi dinoflagelata *Prorocentrum*. Spirolide, koji su i najbolje istražena grupa, proizvode *Alexandrium ostenfeldii* i *Alexandrium peruvianum*, a pinatoksine vrste iz roda *Vulcanodinium*. (Allan Cembella 2008.)

#### 2.1.1 Svojstva gimnodimina

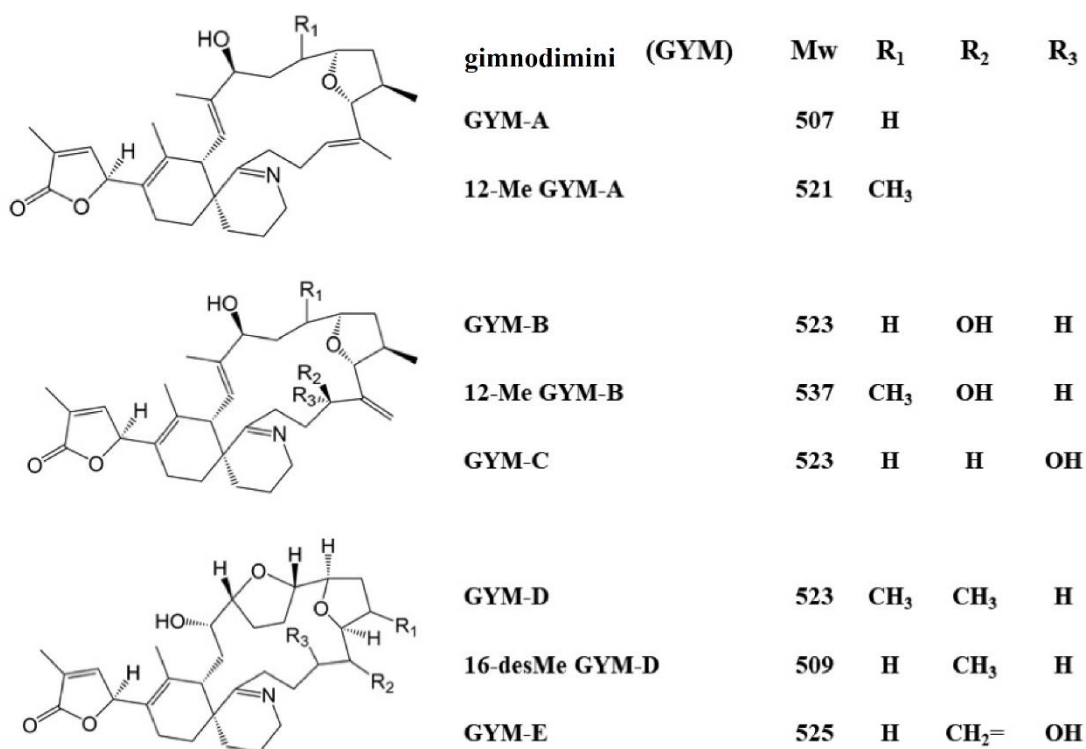
Molekulska formula gimnodimina je  $C_{32}H_{45}NO_4$ , a molekulska masa iznosi oko 500 Da pa su oni najmanje molekule među cikličkim iminima. (Allan Cembella, 2008.). Gimnodiminski makrociklički prsten sastoji se od 16 atoma ugljika te ima jedan eterski most i šesteročlani iminski prsten. (Allan Cembella, 2008.) Gimnodimine A, B i C proizvodi vrsta dinoflagelata *Karenia selliformis*, dok druge gimnodiminske izomere (-12-metil gimnodimin A i 12-metil gimnodimin B) proizvode vrste *Alexandrium peruvianum* i *Alexandrium ostenfeldii*. (Jordi Molgó, 2017.) Ovaj toksin spada u lipofilne toksine (topljivi su u acetonu i u etilnom acetatu (Allan Cembella, 2008.)), a postoje još i hidrofilni (domoična kiselina, saksitoksin). (Gerssen A, 2010.)

Gimnodimini na iminskom prstenu imaju karakteristični tetrahidrofuranski prsten, a nemaju metilne supstituente. (Botelho MJ 2022.) Također, imaju kratki bočni lanac na cikloheksenilnom prstenu, a karboksi skupina tog lanca je kondenzirana u lakton (Allan Cembella, 2008.)

## 2.2 Srodni spojevi gimnodimina

Dosada opisani spojevi su GYM A, GYM B, GYM C, GYM D, GYM E, 16-desmetil GYM D, 12- metil GYM A i 12-metil GYM B. (Zurhelle C 2018.) Ovi spojevi su opisani koristeći NMR i MS tehnike. Gimnodimini nastaju iz linearnih nascentnih poliketidnih lanaca, a ti lanci su nastali povezivanjem manjih kiselih jedinica kao što su acetat i glicin. (Zurhelle C 2018.) GYM A je izoliran prvi, 1994. godine iz kamenica na Novom Zelandu, a ustanovljeno je da potječe od vrste dinoflagelata *Karenia selliformis* kao i njegovi hidroksilirani analozi GYM B i GYM C. 12-metil GYM A je pronađen u vrsti *Alexandrium ostenfeldii* na istočnoj obali SAD-a i to je prvi zabilježeni pronalazak gimnodimina u vrsti *Alexandrium*. (Kirsi Harju 2016.) Slika 3. Prikaz struktura spojeva srodnih gimnodiminu Slika 3.

Gimnodimin B, za razliku od gimnodimina A, sadrži egzociklički metilen na C-17 i alilnu hidroksilnu skupinu na C-18. Gimnodimin C je izomer s GYM-B na C-18 i oksidirani je analog gimnodimina A. (Riadh MARROUCHI 2009.)



Slika 3. Prikaz struktura spojeva srodnih gimnodiminu (Bacchiocchi, i dr. 2020.)

### 2.3 Laboratorijska sinteza gimnodimina

Uspješna sinteza gimnodimina je provedena konvergentnim spajanjem dva glavna fragmenta: tetrahidrofurana i spiroolaktama, koji su pripremljeni u enantiomerskom višku i u količini od više grama, putem anti-aldolne reakcije i katalitičke asimetrične Dies-Alderove reakcije. Makrociklizacija je postignuta korištenjem intramolekularne Barbierove reakcije na sobnoj temperaturi s alkilnim jodidom i s tert-butillitijem. Za vezivanje labilnog butenolidnog dijela gimnodimina, viniloga Mukaiyamina aldolna reakcija  $\alpha$ -alkil ketona predstavlja učinkovit put. (Kong K 2011.)

### 2.4 Mehanizam djelovanja

Mehanizam djelovanja ovog toksina dokazan je pokusima s miševima, koji su prethodno tretirani s inhibitorom acetilkolinesteraze. Ti miševi nisu pokazivali simptome trovanja, dok su oni koji nisu bili tretirani takvim inhibitorom pokazivali simptome. Stoga je predloženo da gimnodimin-A djeluje blokirajući nikotinske acetilkolinske receptore na mioneuralnom spoju (Kharrat R 2008.), odnosno u kemijskoj sinapsi između motornog neurona i mišićnog vlakna. GYM-A je izazvao niz trzajnih reakcija u preparatima hemidijafragma šest izoliranih miševa. Te reakcije su bile ovisne o vremenu i koncentraciji i izazvane su stimulacijom živaca. Ovo nije imalo utjecaja na izazvane trzaje mišića što pokazuje da GYM-A mijenja neuromuskularni prijenos bez utjecaja na proces spajanja ekscitacije i kontrakcije. (Molgó 2017.) Ovaj toksin blokira mišićni nikotinski acetilkolinski receptor jer pokazuje visoki afinitet za taj receptor. (Kharrat R 2008.) Sintetizirani su neki 6,6-spiroiminski analozi gimnodimina-A i pokazano je da su i oni blokirali nikotinske struje izazvane acetilkolinom. Ovo pokazuje da je upravo 6,6-spiroimin ključni strukturni čimbenik kod gimnodiminskih spojeva odgovoran za blokiranje nikotinskih acetilkolinskih receptora. (E. B. Jordi Molgó 2015.) Blokada uzrokovana GYM-A mogla se poništiti unutar 30 minuta ispiranjem toksina s medija pa kažemo da je GYM-A reverzibilni inhibitor visokog afiniteta. (Kharrat R 2008.)

## 2.5 Rasprostranjenost

Gimnodimin je prvo otkriven u Novom Zelandu, a poznato je da se pojavljuje i na drugim lokacijama po svijetu. Uočeno je njegovo prisustvo na sjevernoj obali Španjolske od travnja 2017. do prosinca 2019. (J.Pablo Lamas 2021.) Pronađen je i na istočnoj obali SAD-a kao i na obalama Nizozemske. Vrsta *Alexandrium ostenfeldii* pronađena je i u sjevernom Baltičkom moru, a iz tih uzoraka je otkriven novi spoj, GYM-D. Također je pronađen na obalama Tunisa, Južne Afrike, Kine, Sjeverne Amerike i Europe. Slika 4. (Ji Ying 2020.)

### 2.5.1 Pojavljivanje u Jadranskom moru

U Jadranskom moru, gimnodimin-A je prvi put zabilježen 2006. godine, ali s koncentracijom ispod granica kvantifikacije ( $<12 \mu\text{g/kg}$ ). Gimnodimin je pronađen u Savudriji na sjeveroistoku Jadrana. Uzorci u kojima je pronađen prikupljeni su tjedno od kolovoza do listopada 2006. godine na uzgajalištima školjkaša. (Nincevic Gladan Z 2011.)

U 2014. i 2015. godini provedeno je prikupljanje dagnji u Italiji u Jadranskom moru. U tom istraživanju pronađen je jedino spoj GYM-A iz grupe gimnodimina. U 84% analiziranih dagnji GYM-A je pronađen u mjerljivim koncentracijama ( $>\text{LOD} = 0.15 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). U 68% uzoraka koncentracija je bila iznad dopuštenih koncentracija ( $0.45 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Početkom 2014. i 2015. godine gimnodimin je pronađen u samo nekoliko uzoraka, dok su početkom ljeta rasle koncentracije. Maksimalna koncentracija ( $12.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) je dosegnuta krajem ljeta i početkom jeseni. Ovakvi podatci pokazuju da se alge koje proizvode GYM-A najviše razmnožavaju u toplijim morima. (Bacchiocchi, i dr. 2020.)



Slika 4. Prikaz rasprostranjenosti gimnodimina po svijetu (Bacchiocchi, i dr. 2020.)

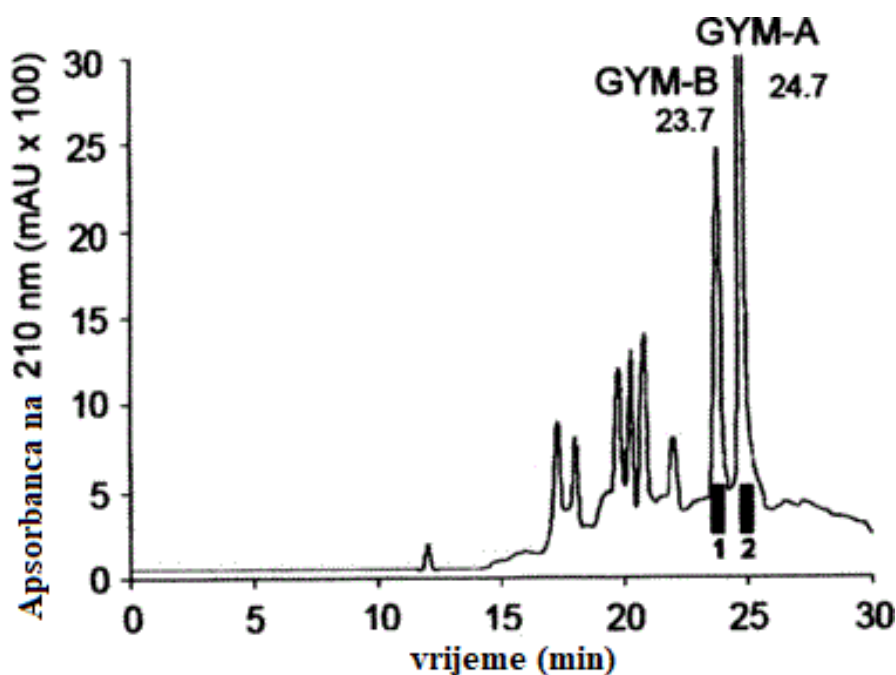
### 3 Identifikacija

Za identifikaciju gimnodimina uglavnom se koriste metode tekućinske kromatografije (LC), masene spektrometrije (MS) i nuklearna magnetna rezonanca (NMR).

#### 3.1 Tekućinska kromatografija (LC)

Tekućinska kromatografija je metoda koja se temelji na razdvajanju analita na temelju raspodjele mase između mobilne i stacionarne faze. Ova tehnika se koristi zbog svoje visoke mogućnosti razdvajanja i selektivnosti jer se korištenjem različitih faza, temperature i pH mogu razdvojiti gotovo sve skupine analita. (Grubešić 2020.)

Vrsta tekućinske kromatografije koja se često koristi je HPLC, odnosno tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti. Ona se temelji na propuštanju tekućine kroz kolonu pod



visokim tlakom što razdvajanje čini boljim. Slika 5.



Slika 5. Primjer kromatografskog prikaza HPLC analize na koloni s reverznom fazom diklormetanskog ekstrakta dobivenog iz uzorka školjki. Crni pravokutnici označavaju frakcije određene biotestom i odgovaraju GYM-A i GYM-B. (Kharrat R 2008.)

### **3.2 Masena spektrometrija (MS)**

Masena spektrometrija je tehnika koja se temelji na razvrstavanju spojeva prema omjeru mase i naboja u elektromagnetskom polju. Koristi se za određivanje sastava nepoznatog uzorka, potvrdu prisutnosti spoja u uzorku, određivanje izotopskog sastava uzorka, određivanje molarne mase molekule i dr. Da bi se uzorak mogao analizirati, prvo ga moramo ionizirati. Ionizacija se provodi na različite načine kao što su elektronska ionizacija, kemijska ionizacija, elektrosprej ionizacija i druge. Nastali ioni se provode kroz analizator koji ih razdvaja na temelju omjera mase i naboja. Nakon analizatora idu na detektor, te računala integriraju signal iz detektora i rezultat je maseni spektar kao ovisnost intenziteta o omjeru mase i naboja.

### **3.3 LC-MS/MS**

Ova analitička tehnika kombinira razdvajanje tekućinske kromatografije i analizu masene spektrometrije. Dok kromatografija razdvaja različite komponente smjese, masena spektrometrija daje informacije koje pomažu u identifikaciji svih odvojenih komponenata uzorka. Ova tehnika se koristi za analizu biokemijskih, organskih i anorganskih spojeva koji se često nalaze u složenim uzorcima, pa se tako koristi i kod otkrivanja toksina i ostalih spojeva u tkivima školjkaša. Ova tehnika je korisna i vrlo raširena jer brzo daje informacije bitne za identifikaciju spoja kao i o molarnoj masi pa se često koristi i u razvoju lijekova.

### **3.4 Nuklearna magnetna rezonanca (NMR)**

Ova tehnika se koristi kod proučavanja strukture spojeva, a ne kod potvrđivanja prisutnosti nekog spoja u analitu.

Nuklearna magnetna rezonanca (NMR) je vrsta spektroskopije koja koristi magnetska svojstva jezgri atoma za istraživanje interakcija uzorka s elektromagnetskim zračenjem. Ovom tehnikom dobivamo korisne informacije o strukturi i svojstvima molekule. Za ovu tehniku je nužno magnetno polje da bi se zapazile energijske promjene atomskih jezgara. Da bi jezgra mogla proizvesti signal mora imati neparan broj protona, tj. neutrona, ili neparan maseni broj. (Kraljević n.d.) Takve jezgre imaju nuklearni magnetski moment. Elektroni imaju spinski kvantni broj  $\frac{1}{2}$ , vrijednosti mogu biti  $+\frac{1}{2}$  ili  $-\frac{1}{2}$  te spin ima pridruženo magnetno polje što znači da se elektron ponaša kao magnet i ima magnetski moment. Također postoji djelomično zasjenjene jezgre jer je jezgra okružena oblakom elektrona, a taj efekt je temelj NMR spektroskopije jer svaka jezgra apsorbira pri različitim frekvencijama ovisno o njenoj elektronskoj okolini. Na taj način dobivamo informacije o vrsti atoma u molekuli i načinu na koji su oni međusobno povezani.

## 4 Toksičnost

U posljednje vrijeme uočena je učestalija pojava morskih biotoksina, među njima i gimnodimina, (Nieva, i dr. 2020.) stoga je važno promotriti njihov utjecaj na ljude kao i na ostale organizme. Osim biotestova na miševima i *in vitro* testova inhibicije provode se i elektrofiziološka mjerenja specifičnih receptora. (Nieva, i dr. 2020.) Umjesto eksperimenata na živim miševima sve se češće koriste *in vitro* testovi jer pokazuju slične informacije, a provode se izvan živog organizma pa nema etičkih pitanja vezanih za eksperimente sa životinjama. (Botana 2008.)

### 4.1 Utjecaj gimnodimina na miševe

Biotestovima na miševima pokazano je da su gimnodimini brzodjelujući toksini jer su izazvali rapidne neurotoksične simptome nakon intraperitonealne injekcije ili pri oralnoj administraciji. (Nieva, i dr. 2020.) Gimnodimin nije uzrokovao razgradnju stanične membrane u eritrocitima miševa, a nije uzrokovao ni toksične simptome u mišjim stanicama neuroblastoma NB41, kao ni u stanicama leukemije P388 *in vitro* pri koncentraciji od 10  $\mu\text{M}$ . (Munday 2008.) Minimalna letalna doza gimnodimina intraperitonealnom injekcijom je utvrđena za miševe i iznosi 450  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Druga istraživanja su pokazala da je srednja letalna doza LD50 (koncentracija kojom ugiba 50% ispitivane populacije) 96  $\mu\text{g}/\text{kg}$  pri kojima su korišteni čisti uzorci toksina. (Munday 2008.)

Nakon intraperitonealne injekcije letalne doze gimnodimina miševi su postali hiperaktivni, ali već nakon jedne minute su počeli sporije hodati i nakon toga je uslijedila paraliza zadnjih nogu. Miševi su onda postali potpuno nepokretni, a brzina disanja se smanjila dok u potpunosti nisu prestali disati. Izražena egzoftalmija (izbočenje očne jabučice) je uočena nakon petnaest minuta od injekcije, kratko prije smrti. (Munday 2008.)

Pri dozama koje nisu smrtno uočeni su respiratorni problemi i slabost, ali su simptomi nestali nakon trideset minuta i miševi su se u potpunosti oporavili. Nisu uočene ni histološke promjene na bubrezima, mozgu, jetri i slezeni kod takvih doza. (Munday 2008.)

Kod letalnih doza koje su miševi primili intraperitonealno smrt je spriječena s kratkodjelujućim inhibitorima kolinesteraze. (Munday 2008.)

Rezultati koji su provedeni u *in vivo* uvjetima kada je miševima zajedno s toksinom dan i kolinergički inhibitor pokazali su brže razvijanje simptoma i smrt je nastupila ranije. (Nieva, i dr. 2020.)

Pri oralnoj primjeni sondom gimnodimin je manje toksičan i tu srednja letalna doza LD50 iznosi 755 µg/kg. Gimnodimin koji je bio apsorbiran u mišjoj hrani nije doveo ni do kakvih simptoma pri dozi od 7500 µg/kg. Gimnodimin pri dozi od 1225 µg/kg iz prirodno kontaminiranih školjki nije uzrokovao nikakve simptome trovanja kada je dan oralno putem sonde. (Munday 2008.)

Kada je ovaj toksin dan miševima intracerebroventrikularnom injekcijom (injekcija koja se daje direktno u cerebrospinalnu tekućinu u moždanim komorama kako bi se zaobišla krvno-moždana barijera) uočena je mnogo veća toksičnost (oko 26 puta veća), a LD50 je iznosio 3 µg/kg. Ovo upućuje na djelovanje toksina kako na centralni živčani sustav tako i na periferni. (Kharrat R 2008.) Toksin je, međutim pokazao puno manju toksičnost kada je miševima dan potkožno, sa LD50 od 100 µg/kg. (Riadh MARROUCHI 2009.)

GYM-B je također toksičan za miševima, ali kod njega je LD50 800 µg/kg nakon intraperitonealne injekcije, što znači da je oko deset puta manje toksičan od GYM-A. (Riadh MARROUCHI 2009.)

## 4.2 Utjecaj gimnodimina na ljude

Do danas nije zabilježeno trovanje gimnodiminima kod ljudi. Nisu utvrđeni neurotoksični simptomi nakon konzumacije školjkaša koji su bili zaraženi gimnodiminom. (Botelho MJ 2022.)

Gimnodimini su prepoznati kao korisni alat u razvoju lijekova za liječenje neurodegenerativnih bolesti kao što je Alzheimerova bolest. Istražena je dugotrajna izloženost gimnodimina na kortikalnim neuronima *in vitro*. Tretiranje kortikalnih neurona gimnodiminom u koncentraciji od 50 nM dovelo je do smanjenja intracelularnog nakupljanja β-amiloida, a antitijela AT8 i AT100 su prepoznala razine hiperfosforiliranih izomorfa tau proteina. Pretpostavlja se da je dugotrajna izloženost kortikalnih neurona toksinu izazvala povećanje sinteze acetilkolina, smanjenje razine aktivne izoforme ERK1/2 kinaze i povećanje neaktivne izoforme glikogen sintaze kinaze-3. Također, gimnodimini u slučaju Alzheimerove

bolesti mogu biti korisni jer smanjuju aktivnost ekscitatornih neurotransmitera i neurotoksičnost izazvanu glutamatom *in vitro*. (Botelho MJ 2022.)

Prema EFSA-i (-European Food Safety Authority) trenutno nema postavljenih granica dozvoljenih koncentracija cikličkih imina u školjkašima u svijetu. Poznato je i da se gimnodimini mogu biotransformirati metabolizmom mekušaca, uključujući detoksikaciju redukcijom, ali takve biotransformacije kod sisavaca nisu poznate. ((CONTAM) 2010.)

### 4.3 Utjecaj gimnodimina i njegovih metabolita na školjkaše

Mogući pokazatelj oksidativnog stresa i zdravlja organizma školjkaša je aktivnost antioksidativnog enzima koji je pod utjecajem ROS (reaktivnih spojeva kisika). Povećanjem proizvodnje ROS-a, povećava se i antioksidativni odgovor koji rezultira oksidativnim stresom. U školjkaša vrste-*Mytilus galloprovincialis* i *Patinopecten yessoensis* u kojima je bio prisutan toksin odgovoran za paralitičko trovanje, uočen je oksidativni stres. (Ji Ying 2020.)

U istraživanju (Ji Ying 2020.) pokazano je da su u četiri vrste školjkaša (*Antigona lamellaris*, *Atrina pectinata*, *Crassostrea sp.*, *Batillaria zonalis*) pronađene različite koncentracije GYM-A. Acilni esteri GYM-A su bili prisutni samo u vrstama *Antigona lamellaris* i *Atrina pectinata*. Školjkaši su bili hranjeni algama koje proizvode gimnodimin (*Karenia selliformis*), a toksin je pronađen u mišićnom tkivu i probavnim žlijezdama. Najveća ukupna koncentracija GYM-A i njegovih estera u mišićnom tkivu je bila  $\sim 760 \text{ nmol kg}^{-1}$  nakon 120 sati, a koncentracija u probavnim žlijezdama je bila četiri puta veća, nakon 96 sati.

Školjkaši hranjeni algama koje proizvode gimnodimin nisu pokazali povećanje proizvodnje reaktivnih spojeva kisika, kao ni antioksidativnih enzima, što pokazuje da ovaj toksin nema utjecaja na antioksidativni enzimski sustav školjkaša. (Ji Ying 2020.)

### 4.4 Monitoring školjkaša

Plan praćenja kakvoće mora i monitoring školjkaša je važan zbog očuvanja zdravlja ljudi i okoliša. Posebno je važno praćenje kvalitete školjkaša radi velike raširenosti uzgoja školjkaša u Hrvatskoj, posebno na Pelješkom poluotoku i u Malostonskom zaljevu. (Ujević 2012.)

Monitoring školjkaša se u Hrvatskoj kontinuirano odvija od lipnja 2000.godine, a uključuje 25 mjesta za uzorkovanje. (Ujević 2012.)

Svrha provedbe ovakvog plana je:

1. provjera mikrobiološke kakvoće živih školjkaša na mjestima uzgoja i područjima za ponovno polaganje,
2. provjera moguće prisutnosti toksičnih planktona na mjestima uzgoja i područjima za ponovno polaganje,
3. provjera moguće prisutnosti kemijskih zagađivača u živim školjkašima,
4. izbjegavanje zlouporaba u odnosu na podrijetlo živih školjkaša,
5. obavljanje analiza novih područja uzgoja. (POLJOPRIVREDE 2013.)

Vrste koje se uglavnom prikupljaju su dagnje, kamenice, Jakobove kapice, prnjavice, kunjke, kućice i neke druge ekonomski manje značajne vrste. Slika 6. Na različitim mjestima uzorkovanja prikupljaju se različite vrste na nekoliko načina. Uzorkovanje za određivanje biotoksina provodi se na uobičajen način za komercijalno izlovljavanje. Školjkaši koji se uzgajaju vertikalno uzorkuju se na vrhu, sredini i dnu. Oni koji rastu na morskom dnu uzorkuju se ronjenjem ili horizontalnim povlačenjem specifičnim ribolovnim alatima po izlovnom području. Prikupljene uzorke preuzima ovlaštenu veterinar ili službena osoba laboratorija uz prisutnost veterinara i prisutnost biotoksina utvrđuje se različitim metodama za različite toksine. U Hrvatskoj se testiraju školjkaši za PSP, ASP, i DSP toksine. (POLJOPRIVREDE 2013.)



Slika 6. Vrste školjkaša koji se uglavnom prikupljaju prilikom monitoringa školjkaša (Bogunović 2012. )

## 5 Zaključak

Toksin gimnodimin iz grupe cikličkih imina ne pokazuje akutno toksično djelovanje na ljudski organizam, iako pokazuje veliku toksičnost u miševa. Dokazano je da utječe na nikotinske acetilkolinske receptore na mioneuralnom spoju i blokira vezanje acetilkolina na receptor i tako sprječava prijenos signala. Za procjenu rizika od izlaganja ovim toksinima potrebno je više podataka jer ne znamo dovoljno o kroničnoj izloženosti gimnodiminima. Također mogu predstavljati opasnost za druge životinje koje se hrane kontaminiranim školjkašima. Ovaj toksin bi mogao biti koristan za pripravu lijekova za neurodegenerativne bolesti kao što je Alzheimerova bolest. Istraživanja vezana uz liječenje ovih bolesti morskim toksinima su otežana zbog nedovoljne dostupnosti toksina zbog komplicirane sinteze ovih spojeva i malih količina dostupnih za vrijeme cvjetanja toksičnih dinoflagelata. Iako gimnodimini ne predstavljaju opasnost za ljude, od iznimne je važnosti provoditi programe praćenja kakvoće mora i monitoring školjkaša da bi se na vrijeme uočio porast količine toksina ili pojava novih toksina. Ovakvi programi su važni jer školjkaši predstavljaju bogat izvor hrane i važno je da oni nisu kontaminirani toksinima.



## 6 Bibliografija

- (CONTAM), EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. 2010. »Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Cyclic imines (spirolides, gymnodimines, pinnatoxins and pteriatoxins).« *EFSA Journal*.
- Allan Cembella, Bernd Krock. 2008. »Cyclic Imine Toxins: Chemistry, Biogeography, Biosynthesis, and Pharmacology.« U *Seafood and freshwater toxins*, 561-581. Crc press.
- Bacchiocchi, S., M. Siracusa, D. Campacci, M. Ciriaci, A. Dubbini, T. Tavoloni, A. Stramenga, S. Gorbi, i A. Piersanti. 2020. »Cyclic Imines (CIs) in Mussels from North-Central Adriatic Sea: First Evidence of Gymnodimine A in Italy.« *Toxins* .
- Bogunović, Tanja. 2012. . »Službeno uzorkovanje proizvoda ribarstva i školjkaša Zdravstveni uvjeti i fizikalno-kemijske metode određivanja za žive školjkaše i proizvode ribarstva.« Split.
- Botana, Luis M. 2008. »The Mouse Bioassay as a Universal Detector.« U *Seafood and Freshwater Toxins*, autor Luis M. Botana, 149-163. crc press.
- Botelho MJ, Milinovic J, Bandarra NM, Vale C. 2022. »Alzheimer's Disease and Toxins Produced by Marine Dinoflagellates: An Issue to Explore.« *Marine drugs*, 2. travanj.
- Gerssen A, Pol-Hofstad IE, Poelman M, Mulder PP, van den Top HJ, de Boer J. 2010. »Marine toxins: chemistry, toxicity, occurrence and detection, with special reference to the dutch situation.« *Toxins*, 878-904.
- Grubešić, Saša. 2020. »NAJNOVIJA DOSTIGNUĆA U DVODIMENZIONALNOJ TEKUĆINSKOJ KROMATOGRAFIJI.« srpanj.
- Hansen, Gert. n.d. Pokušaj pristupa 22. kolovoz 2022.  
<https://www.marinespecies.org/HAB/aphia.php?p=image&tid=246594&pic=21987>.
- J.Pablo Lamas, Fabiola Arévalo, Ángeles Morono, Jorge Correa, Araceli E. Rossignoli, Juan Blanco. 2021. »Gymnodimine A in mollusks from the north Atlantic Coast of Spain: Prevalence, concentration, and relationship with spirolides.« *Environmental Pollution*.
- Ji Ying, Che Yijia, Wright Elliott J., McCarron Pearse, Hess Philipp, Li Aifeng. 2020. »Fatty acid ester metabolites of gymnodimine in shellfish collected from China and in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to *Karenia selliformis*.« *Harmful Algae*.
- Jordi Molgó, Evelyne Benoit, Rómulo Aráoz, Armen Zakarian, Bogdan Iorga. 2015. »Spirolides and Cyclic Imines: Toxicological Profile.« U *Marine and Freshwater Toxins*, 193-217. Springer Netherlands.
- Jordi Molgó, P. Marchot, Rómulo Aráoz, Evelyne Benoit, Bogdan I Iorga, et al.. 2017. »Cyclic imine toxins from dinoflagellates: a growing family of potent antagonists of the nicotinic acetylcholine receptors.« *Journal of Neurochemistry*, 41-51.
- K. Kvrđić, N. Džafić i J. Pleadin. 2021. »FIKOTOKSINI U MORSKIM ORGANIZMIMA – POTENCIJALNA PRIJETNJA SIGURNOSTI POTROŠAČA.« *Veterinarska stanica*.

- Kharrat R, Servent D, Girard E, Ouanounou G, Amar M, Marrouchi R, Benoit E, Molgó J. 2008. »The marine phycotoxin gymnodimine targets muscular and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes with high affinity.« *J Neurochem*, studeni .
- Kirsi Harju, Harri Koskela, Anke Kremp, Sanna Suikkanen, Pablo de la Iglesia, Christopher O. Miles, Bernd Krock, Paula Vanninen. 2016. »Identification of gymnodimine D and presence of gymnodimine variants in the dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* from the Baltic sea.« *Toxicon*, 68-76.
- Kong K, Moussa Z, Lee C, Romo D. 2011. »Total synthesis of the spirocyclic imine marine toxin (-)-gymnodimine and an unnatural C4-epimer.« *J Am Chem Soc*.
- Kraljević, Tatjana Gazivoda. n.d. »Određivanje struktura organskih spojeva.« *Nastavni tekst*.
- Molgó, J., Marchot, P., Aráoz, R., Benoit, E., Iorga, B. I., Zakarian, A., Taylor, P., Bourne, Y., & Servent, D. 2017. »Cyclic imine toxins from dinoflagellates: a growing family of potent antagonists of the nicotinic acetylcholine receptors.« *Journal of neurochemistry*, 41-51.
- Munday, Rex. 2008. »Toxicology of Cyclic Imines: Gymnodimine, Spirolides, Pinnatoxins, Pteriatoxins, Procentrolide, Spiro-Procentrimine, and Symbioimines.« U *Seafood and Freshwater Toxins*, autor Luis M. Botana, 581-595. crc press.
- Nieva, J.A., B. Krock, U. Tillmann, J. Tebben, C. Zurhelle, i U. Bickmeyer. 2020. »Gymnodimine A and 13-desMethyl Spirolide C Alter Intracellular Calcium Levels via Acetylcholine Receptors.« *Toxins*.
- Nincevic Gladan Z, Ujevic I, Milandri A, Marasovic I, Ceredi A, Pigozzi S, Arapov J, Skejic S. 2011. »Lipophilic toxin profile in *Mytilus galloprovincialis* during episodes of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) in the N.E. Adriatic Sea in 2006.« *Molecules*., 888–899.
- POLJOPRIVREDE, MINISTARSTVO. 2013. »Plan praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša.« Narodne novine .
- Rade Knežević, Dora Smolčić Jurdana, Dragan Magaš. 2005. »CVJETANJE MORA NA MORSKIM PLAŽAMA.« *TOURISM AND HOSPITALITY MANAGEMENT*.
- Riadh MARROUCHI, Evelyne BENOIT, Riadh KHARRAT, Jordi MOLGO. 2009. »Gymnodimines: a family of phycotoxins contaminating shellfish.« U *Toxins and Signalling, Collection Rencontres en Toxinologie*. SFET Publications.
- Ribarić, B., L. Kozačinski, B.Njari, Ž.Cvrtila. 2012. »Toksini školjkaša.« *Meso*.
- Spector, David L. 1984. *Dinoflagellates* . Houston: Academic press, inc .
- Ujević, I., Roje, R., Ninčević-Gladan, Ž. & Marasović, I. 2012. »First report of Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from eastern Adriatic Sea (Croatia).« *FOOD CONTROL*, 285-291.

Zurhelle C, Nieva J, Tillmann U, Harder T, Krock B, Tebben J. 2018. »Identification of Novel Gymnodimines and Spirolides from the Marine Dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*.« *Marine drugs*.

## Popis slika

Slika 1. Prikaz utjecaja algi proizvođača toksine na druge organizme (Gerssen A, 2010.).....	3
Slika 2. <i>Karenia selliformis</i> , vrsta <i>Dinoflagellata</i> koja proizvodi toksin gimnodimin (Hansen, n.d.).....	4
Slika 3. Prikaz struktura spojeva srodnih gimnodiminu (Zurhelle C, 2018.).....	7
Slika 4. Prikaz rasprostranjenosti gimnodimina po svijetu (Bacchiocchi, et al., 2020.).....	10
Slika 5. Primjer kromatografskog prikaza HPLC analize na koloni s reverznom fazom diklormetanskog ekstrakta dobivenog iz uzorka školjki. Crni pravokutnici označavaju frakcije određene biotestom i odgovaraju GYM-A i GYM-B. (Kharrat R, 2008.).....	12
Slika 6. Vrste školjkaša koji se uglavnom prikupljaju prilikom monitoringa školjkaša (Bogunović, 2012. ).....	18