

Azaspiracidi - toksičnost, mehanizam djelovanja i detekcija

Novak, Dujam

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:166:721708>

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

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

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Odjel za kemiju

Dujam Novak

**AZASPIRACIDI - TOKSIČNOST,
MEHANIZAM DJELOVANJA I DETEKCIJA**

Završni rad

Split, rujan 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 prvostupnika Biologije i kemije.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu

Završni rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za kemiju

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

AZASPIRACIDI – TOKSIČNOST, MEHANIZAM DJELOVANJA I DETEKCIJA

Dujam Novak

Azaspiracidi su vrsta polieterskih toksina koji su prvobitno otkriveni u trovanju koje se dogodilo 1995.-e u Irskoj gdje je nekolicina ljudi pretrpjela simptome trovanja nakon konzumacije dagnji *Mytilus edulis*. Ime su dobili po svojim kemijskim karakteristikama, imaju cikličku amino skupinu (AZA skupina), tri spiro skupine (-SPIR-) i skupinu karboksilne kiseline (-ACID). Od 1995.-te pa sve do danas, prijavljena su mnoga trovanja azaspiracida konzumacijom školjkaša diljem svijeta. Trovanje školjkašima izazvano azaspiracidima slično je sindromu dijaretičkog trovanja školjkašima. Simptomi kao što su grčevi, povraćanje, mučnina i proljev javljaju se neposredno nakon konzumiranja. 1998. godine je utvrđena njegova prva struktura i do danas je uspješno izolirano barem 60 analoga. Informacije o toksikologiji su dobivene iz kontroliranih *in vivo* i *in vitro* eksperimenata. Metoda detekcije koje su se koristile za detekciju azaspiracida su: test na miševima koji je bio usvojen kao službeni test regulatornih laboratorija, danas je zamijenjen puno efikasnijom LC-MS metodom. Regulatorna dozvoljena doza azaspiracida u mesu školjkaša je 160 µg/kg.

Ključne riječi: azaspiracidi, fiktoksini, mehanizam djelovanja, toksičnost, *Azadinium*, *Amphidoma*

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

Rad sadrži: 23 stranice, 11 grafičkih prikaza i 16 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku

Mentor: Dr. sc. Stjepan Orhanović, izvanredni profesor

Ocjenjivači: Dr. sc. Andrea Paut, docent

Mag. educ. biol. et chem. Martina Gudelj, asistent

Rad prihvaćen: 20. rujna 2024.

Basic documentation card

University of Split

Bachelor's Thesis

Faculty of Science

Department of Chemistry

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

AZASPIRACIDS – TOXICITY, MECHANISM AND DETECTION

Dujam Novak

Azaspiracids are a type of polyether toxins that were first discovered in 1995 in a poisoning incident in Ireland, where several people showed symptoms of poisoning after eating *Mytilus edulis* mussels. Their name is derived from their chemical properties: They contain a cyclic amino group (AZA group), three spiro groups (-SPIR-) and a carboxylic acid group (-ACID). Since then, numerous cases of poisoning due to the consumption of shellfish have been reported worldwide. Shellfish poisoning caused by azaspiracids is similar to the syndrome of diarrheic shellfish poisoning. Symptoms such as cramps, vomiting, nausea and diarrhea occur shortly after ingestion. In 1998, the first structure of azaspiracid was determined, and to date at least 60 analogs of this compound have been successfully isolated. The information on toxicology comes from controlled *in vivo* and *in vitro* experiments. Detection methods for the identification of azaspiracids include the mouse bioassay, a regulated test for toxins that has been largely replaced by the more effective LC-MS (liquid chromatography-mass spectrometry). The legally permitted dose for the consumption of azaspiracids is 160 µg/kg.

Keywords: azaspiracids, phycotoxins, toxic mechanism, toxicity, *Azadinium*, *Amphidoma*

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

Thesis consists of: 23 pages, 11 figures and 16 references. Original in: Croatian

Mentor: Stjepan Orhanović, Ph.D., Assistant Professor

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

Andrea Paut, Ph.D., Assistant Professor

Martina Gudelj, The Master of Science in biol. and chem. educ., Assistant

Thesis accepted: September 20th 2024.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Razrada teme.....	2
2.1. Fikotoksini	2
2.1.1. Vrste toksičnosti i utjecaji na okoliš i zdravlje čovjeka	2
2.1.2. Cvjetanje mora	6
2.2. Azaspiracidi.....	7
2.2.1. Proizvođači azaspiracida.....	8
2.2.2. <i>Azadinium spinosum</i>	8
2.2.3. <i>Azadinium poporum</i>	8
2.3. Struktura azaspiracida	10
2.3.1. Analози azaspiracida	11
2.4. Toksičnost i mehanizam djelovanja azaspiracida	13
2.4.1. <i>In vivo</i> istraživanja	13
2.4.2. <i>In vitro</i> istraživanja	15
2.5. Metode detekcije	17
2.6. Rasprostranjenost azaspiracida	18
2.6.1. Azaspiracidi u Jadranu	19
2.7. Regulacija i dopuštene koncentracije azaspiracida.....	20
3. Zaključak.....	21
4. Literatura.....	22

1. Uvod

Još od početaka 20.og stoljeća ljudi progresivno iskorištavaju i istražuju morske resurse. Primarno se ti morski resursi kao što su ribe, glavonošci, rakovi, školjkaši itd. koriste za ljudsku konzumaciju. Međutim, postoji određeni rizik pri konzumaciji bilo kakve hrane, pa tako i u ovom slučaju pri konzumaciji školjkaša. Školjkaši se hrane raznolikim vrstama planktonskih algi od kojih određene vrste proizvode toksine i druge štetne stvari koji se nakupljaju u tkivu školjkaša pa mogu nauditi čovjekovom zdravlju.

Azaspiracidi su vrsta polieterskih toksina koji su prvobitno otkriveni u trovanju koje se dogodilo 1995.-e u Irskoj gdje je nekolicina ljudi pretrpjela simptome trovanja nakon konzumacije dagnji, što je dovelo do izolacije i identifikacije ovih toksina. Ime su dobili po svojim kemijskim karakteristikama, imaju cikličku amino skupinu (AZA skupina), tri spiro skupine (-SPIR-) i skupinu karboksilne kiseline (-ACID) što sveukupno čini naziv AZA-SPIR-ACID. Ispostavilo se da ove toksine proizvode vrste protista *Azadinium* i *Amphidoma*. Toksini su otkriveni u raznim vrstama školjkaša, kao što su kamenice, Jakobove kapice i ostale školjke.

Cilj ovog rada je pobliže se upoznati s azaspiracidnim toksinima, njihovom djelovanju na razne biološke procese, planktonskim vrstama u kojima se one nalaze te njihove utjecaje na čovjekovo zdravlje i načine njihove identifikacije.

2. Razrada teme

2.1. Fikotoksini

Fikotoksini predstavljaju skupinu prirodnih kemijskih toksina koje najčešće proizvode razni rodovi dinoflagelata. Oni su termostabilne, neproteinske molekule malih do vrlo velikih molekulskih masa. Prema topljivosti se dijele na topljive u vodi i topljive u mastima. Prema kemijskom strukturi dijele se u 8 skupina: azaspiracidi (AZA), okadaična kiselina (OA) i njeni derivati, pektenotoksini (PTX), jesotokini (YTX), ciklički imini (CI), domoična kiselina (DA), saksitoksini (STX) i brevetoxini (BTX). [1]

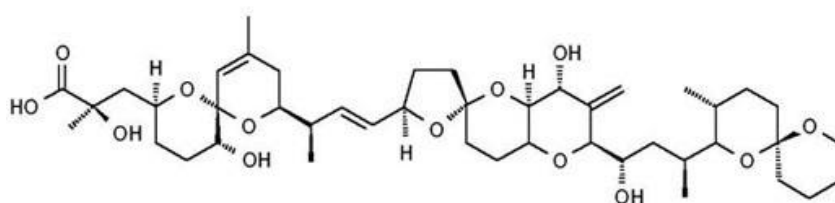
2.1.1. Vrste toksičnosti i utjecaji na okoliš i zdravlje čovjeka

Mnoge vrste školjkaša se hrane filtracijom velikih količina morske vode. To predstavlja rizik za sve one koji konzumiraju morske plodove, jer ukoliko se u moru nalazi velika količina fitoplanktona koji produciraju toksine, morski organizmi postaju vektori i mogu izazvati intoksikacije u ljudi i životinja koji se njima hrane. Konzumirajući ih, ljudi obolijevaju na razne načine, a u težim slučajevima intoksikacija može dovesti i do smrtnog ishoda.

Prema vrsti simptoma ili sindroma koje uzrokuju, možemo ih podijeliti na nekoliko skupina: dijaretičko trovanje školjkašima (diarrhetic shellfish poisoning – DSP), amnezijско trovanje školjkašima (amnesic shellfish poisoning – ASP), paralitičko trovanje školjkašima (paralytic shellfish poisoning – PSP), neurotoksično trovanje školjkašima (neurotoxic shellfish poisoning – NSP), trovanje ribom Ciguareta (Ciguareta fish poisoning – CTP) i trovanje azaspiracidima (azaspiracid poisoning – AZP). [1]

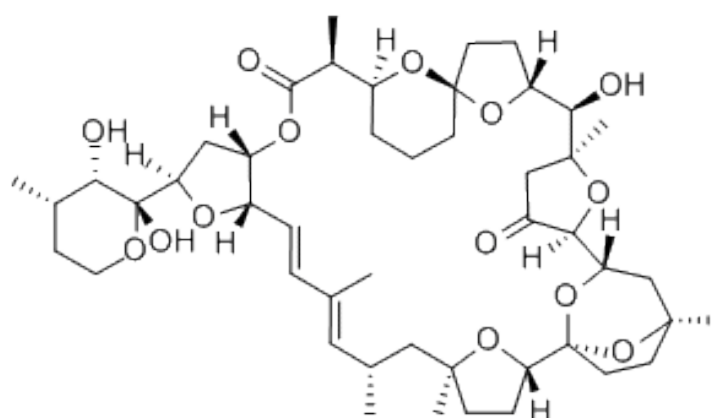
- Dijaretičko trovanje školjkašima je prouzročeno trima fikotoksinima, okadaičnom kiselinom (OA) (Slika 1) i njenim derivatima dinofizistoksinima (DTX1, DTX2, DTX3), pektenotoksinima (PTX) (Slika 2) i jesotoksinima (YTX) (Slika 3). Glavni simptomi trovanja su: proljev, mučnina, povraćanje i grčevi. OA i njezini derivati djeluju kao inhibitori enzima protein fosfataze 1 (PP1) i 2A (PP2A), narušavaju propusnost i potiču upalne procese u probavnom sustavu. Također, OA i DTX1

promotori su rasta tumora. PTX stvaraju promjene na citoskeletu i mijenjaju F-aktin u različitim vrstama stanica. YTX utječu na regulaciju kalcija i koordinaciju fosfodiesteraze. Kod pektonotoksina i jesotoksina nema prijavljenih štetnih učinaka na čovjekovo zdravlje, dok je kod testnih životinja dokazana akutna toksičnost koja je u većini slučajeva rezultirala smrću. S ciljem zaštite zdravlja provodi se praćenje koncentracije ovih toksina u morskim školjkašima. [2]



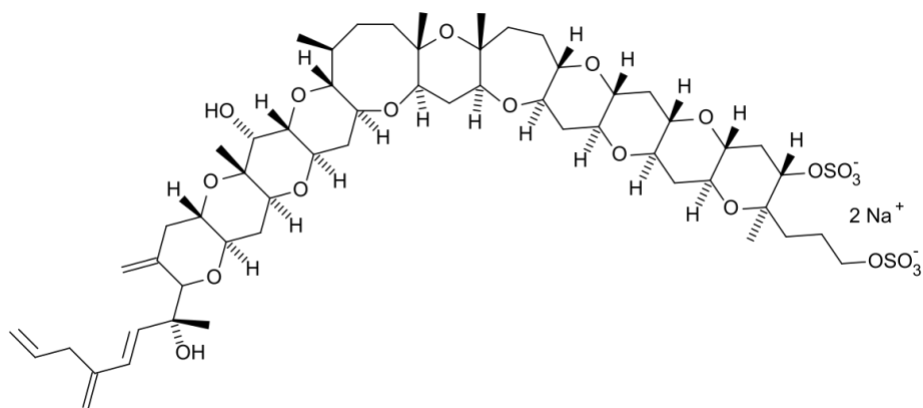
Slika 1. Kemijska struktura okadaične kiseline

(izvor: https://media.cellsignal.com/product/image/5934_fig04_20210423082536.jpg)



Slika 2. Kemijska struktura pektenotoksina

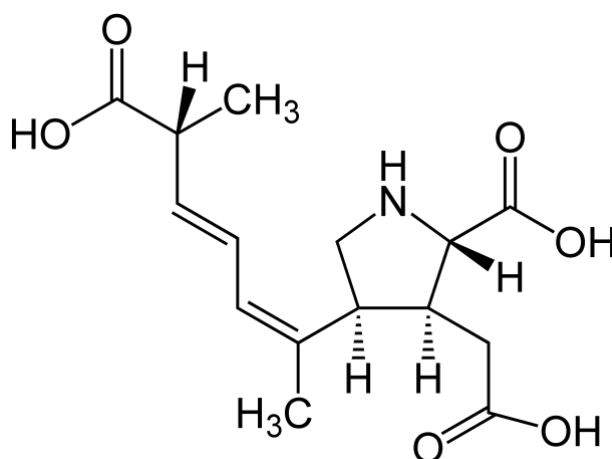
(izvor: <https://www.chemicalbook.com/CAS/GIF/119166-88-0.gif>)



Slika 3. Kemijska struktura jesotoksina

(izvor: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/c5/Yessotoxin.svg/1200px-Yessotoxin.svg.png>)

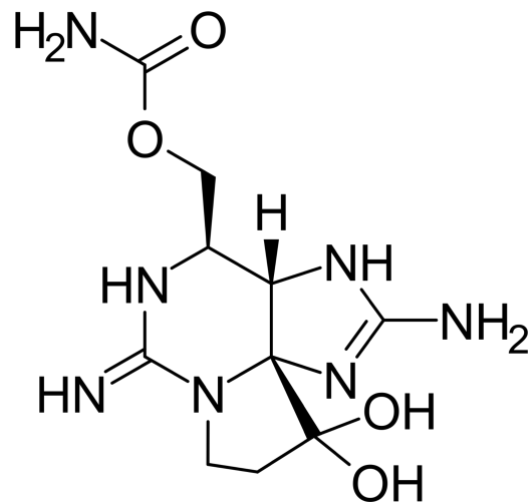
- Amnezijsko trovanje školjkašima je trovanje koje izaziva gubitak pamćenja. Domoična kiselina (DA) (Slika 4) je jedini fiktotoksin koji uzrokuje ove simptome. DA je hidrofilna ciklička kiselina i vrlo je opasna kao neurotoksin. U tijelu čovjeka dolazi do mozga i veže se na receptore glutaminske kiseline, N-metil-D-aspartatne receptore (NMDA), pri čemu dolazi do depolarizacije membrane i nekontroliranog povećanja koncentracije kalcija unutar stanica što dovodi do njihovog odumiranja. Stvaraju se lezije unutar hipotalamusa a posljedica je gubitak pamćenja. [1,2]



Slika 4. Kemijska struktura domoične kiseline

(izvor: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e7/Domoinic_Acid_Structural_Formulae.png)

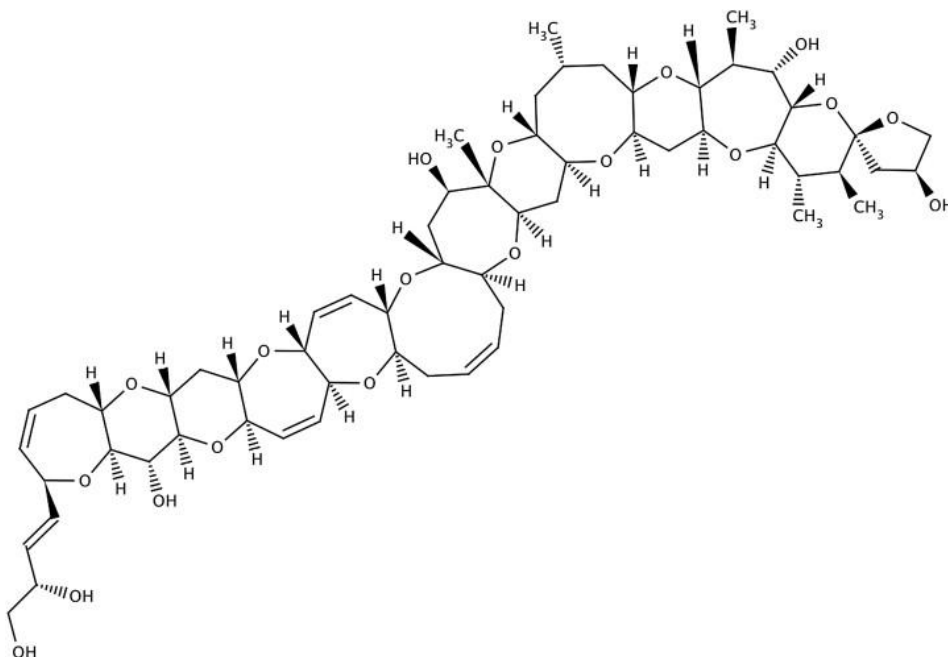
- Paralitičko trovanje školjkašima je najstarije poznato trovanje školjkašima i uzrokovano je saksitoksinima (STX) (Slika 5). Opisano je 57 analoga u ovoj skupini toksina, a svi djeluju blokiranjem neuronske aktivnosti čvrstim vezanjem na vezno mjesto u kanalima natrija. Simptomi su u širem rasponu od blagih simptoma kao što su trnci, glavobolja i utrnulost do težih simptoma poput paralize, teškog disanja, gušenja što može dovesti i do smrti [1].



Slika 5. Kemijska struktura saksitoksina

(izvor: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c1/Saxitoxin_neutral.svg)

- Trovanje ribom Ciguareta se razlikuje od ostalih trovanja fikotoksinima, jer se prenosi ribama. Od poznatih 41 vrsta ciguatoksina (Slika 6), 12 ih se može naći na području Kariba i tropskih predjela Atlanskog oceana, dok je 29 vrsta detektirano na području Pacifika. Ciguatoksini posjeduju širi raspon simptoma koji se najčešće razlikuju ovisno o njihovoj geografskoj lokaciji. Na Karibima, gastrointestinalni simptomi poput mučnine, povraćanja i proljeva će se javiti prije neuroloških simptomi. Na području Pacifika i Indijskog oceana pojavit će se neurološki prije gastrointestinalnih koje karakteriziraju simptomi tjeskobe, gubitka pamćenja, poteškoća u koncentraciji i u nekim slučajevima halucinacija [3].



Slika 6. Kemijska struktura ciguatoksina

(izvor: <https://ars.els-cdn.com/content/image/3-s2.0-B9780123864543009830-f00983-03-9780123864543.jpg>)

2.1.2. Cvjetanje mora

Cvjetanje mora sve je učestalije u obalnim područjima širom svijeta i predstavlja ozbiljnu prijetnju ekosustavu i ljudskom zdravlju. Do ovog fenomena dolazi zbog eutrofikacije mora koje se događa: prirodnim procesima, poput unosa hranjivih tvari riječnim tokovima te zbog ljudskog djelovanja unosom hranjivih tvari otpadnim vodama i kao posljedica intenzivne poljoprivrede. Velike nakupine morskih mikroorganizama, uključujući mikroalge, fitoplanktone i heterotrofne protiste, uzrokuju promjene boje mora, dajući mu zelene, smeđe ili crvene nijanse. Ove nakupine plutaju na površini mora, često prekrivajući plaže biomasom ili pjenu. Neke vrste alga unutar tih nakupina su izuzetno opasne jer proizvode toksine koji štetno djeluju na brojne organizme. Ova pojava poznata je kao štetno cvjetanje algi (Harmful Algal Blooms - HAB) jer dolazi do njihovog naglog razmnožavanja, čime stvaraju ozbiljnu opasnost od unošenja fitoplanktonskih toksina u hranidbeni lanac [4].

2.2. Azaspiracidi

Azaspiracidi su lipofilni toksini s više od 60 poznatih analoga (Slika 7), koji su poredani rednim brojevima po njihovom vremenu otkrića. Najznačajniji analozi azaspiracida su AZA-1, AZA-2, AZA-3, AZA-6 i AZA-7. Po strukturi ovo su polieterski spojevi s tri spiro spoja u molekuli, heterocikličkim prstenom s amino skupinom te terminalno smještenom alifatskom karboksilnom skupinom. Osim što su termostabilni, stabilni su i u uvjetima snižene pH vrijednosti. Trovanje školjkašima izazvano azaspiracidima slično je sindromu dijaretičkog trovanja školjkašima, no mehanizam trovanja još nije dobro proučen. Simptomi kao što su grčevi, povraćanje, mučnina i proljev javljaju se neposredno nakon konzumiranja školjka. Citotoksičnost, neurotoksičnost i kardiotoksičnost, su dokazani kod azaspiracida [5].

AZA-1	AZA-2	AZA-3	AZA-6	AZA-7
AZA-8	AZA-11	AZA-4	AZA-9	AZA-35
AZA-14	AZA-12	AZA-5	AZA-10	AZA-54
AZA-18	AZA-16	AZA-13	AZA-15	AZA-55
AZA-22	AZA-20	AZA-17	AZA-19	AZA-56
AZA-26	AZA-24	AZA-21	AZA-23	AZA-57
AZA-30	AZA-28	AZA-25	AZA-27	AZA-58
AZA-33	AZA-32	AZA-29	AZA-31	
AZA-34	AZA-41	AZA-43		
AZA-36	AZA-42			
AZA-37	AZA-62(AZA-11)			
AZA-38				
AZA-39				
AZA-40				
AZA-50				
AZA-51				
AZA-59				
AZA-63(AZA-37)				
AZA-52(AZA-38)				
AZA-53(AZA-38)				

Slika 7. Tablica poznatih azaspiracida

(izvor: [11])

2.2.1. Proizvođači azaspiracida

Dinoflagelati (*Dinoflagellates*) ili svjetleći bičaći pripadaju carstvu protista. Oni su velika i raznolika grupa bičaća kojoj pripada oko 2000 vrsta, od čega su samo polovica fotosintetske. Biokemijski se razlikuju po fotosintetskom pigmentu i u sposobnosti stvaranja toksina. Mogu biti domaćini unutarstaničnim simbiotima ili i sami mogu biti endosimbionti [6].

Po indentifikaciji azaspiracida 1995. godine, opisanu su i rodovi dinoflagelata koji ih proizvode, i to rodovi *Azadinium* i *Amphidoma*. Najpoznatije i najistraženije vrste koje proizvode azaspiracide s *Azadinium spinosum* *A. poporum* [7].

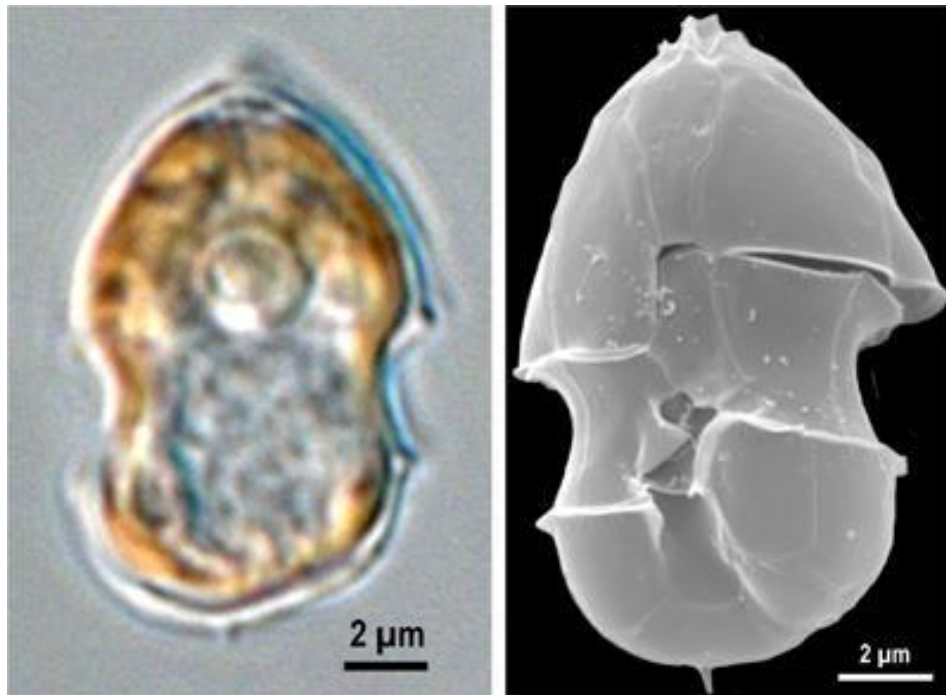
2.2.2. *Azadinium spinosum*

Azadinium spinosum (Slika 8.) je glavni proizvođač azaspiracida među algama roda *Azadinium*. Promatrajući sojeve *Azadinium spinosum* na području obala europskih država pronađeni su tragovi azaspiracida AZA-1, AZA-2 i izomera AZA-30 AZA-32 AZA-33 i AZA-34. *A. spinosum* je mala alga dužine 12-16 μm i širine 7-11 μm . Ovo je fotosintetski dinoflagelat koji sadrži pigment peridin. Vanjskim izgledom nalikuje na tijelo violine, jezgra je velika, sferična i smještena je posteriorno, dok je jedini kloroplast parijetalni i režnjeviti. Pripadnost vrste *A. spinosum* dinoflagelatima potvrđena je molekularnom filogenetskom analizom četiri gena: SSU rDNA, LSU rDNA (regija D1/D2), ITS i citokrom oksidaze. U skladu s morfološkim opisom, filogenetska analiza nije pokazala posebnu blisku povezanost s redovima Peridinales ili Gonyaulacales, niti s bilo kojim drugim redom dinoflagelata prisutnim u molekularnim bazama podataka. Kao rezultat toga, osnovao se novi rod, *Azadinium*. Međutim, pripadnost ovog roda određenom redu ostaje nejasna [5,7].

2.2.3. *Azadinium poporum*

Azadinium poporum je mali dinoflagelat iz porodice *Amphidomaceae* karakterističan po njegovom potencijalu za proizvodnju azaspiracida. Morfološki se ne razlikuje od *A. spinosum*. *A. poporum* je zabilježen u morima Europe i zapadnog Pacifika. Testirajući sojeve koji se

nalaze na kineskim obalama, pokazalo se da od 16 sojeva 13 ih proizvodi azaspiracide. Sojevi su sadržavali kombinacije izomera AZA-2, AZA-11, AZA-36, AZA-40 i AZA-41[8].



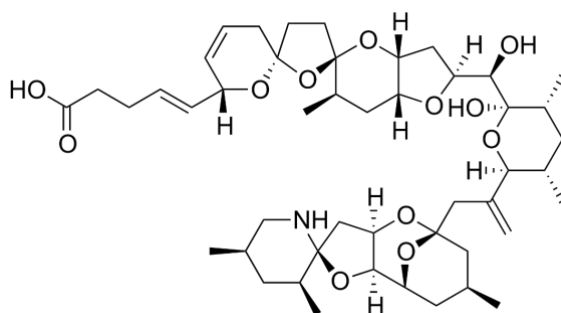
Slika 8. Mikroskopski prikaz *Azadinium spinosum*

(izvor: <https://earimediaproductweb.azurewebsites.net/Api/v1/Multimedia/8d9a15cc-f785-46fa-8e3c-90064f3db451/Rendition/low-res/Content/Public>)

2.3. Struktura azaspiracida

Pri otkriću 1995. godine nepoznati toksin je nazvan Killary toksin (KT-3) po luci u Irskoj gdje je i otkriven. 1998. izolacijom iz školjaka dobiven je čisti azaspiracid (Slika 9) molekulske mase 842.5 Da. Određivanje strukture je uglavnom izvršeno NMR tehnikom. Koristeći se HR-FAB MS (Masena spektrometrija bombardiranjem brzim atomima visoke razlučivosti) predložena je bila formula $C_{47}H_{71}NO_{12}$ koja se kasnije i pokazala točnom.

Spektri H NMR (protonska nuklearna magnetska rezonancija), C NMR (nuklearna magnetska rezonancija ugljika-13) i HSQC (heteronuklearna jednostruka kvantna koherencija) pokazali su da azaspiracid sadrži 6 metilnih skupina, 15 metilenskih skupina, 19 metinskih skupina i 7 kvarternih atoma ugljika. Azaspiracid je sastavljen od tri spiro strukture, neobičnog azaspiro prstena koji je spojen s 2,9-dioksabiciklo[3.3.1] nonanskim prstenom i karboksilnom kiselinom. Za razliku od drugih toksina, azaspiracid posjeduje ciklični amin umjesto cikličnog imina, a molekula ne sadrži karbociklični ili laktonski prsten. Azaspiracid je amorfna, bezbojna krutina bez mirisa. Postojan je kao zwitterion što daje deterdžentska svojstva ovoj molekuli. Ovim potencijalno ionskim karakterom AZA mogu utjecati na biološke procese u tijelu. Termostabilna je molekula do temperature od 90°C, a na višoj temperature se počinje degradirati [9,10].



Slika 9. Kemijska struktura azaspiracida

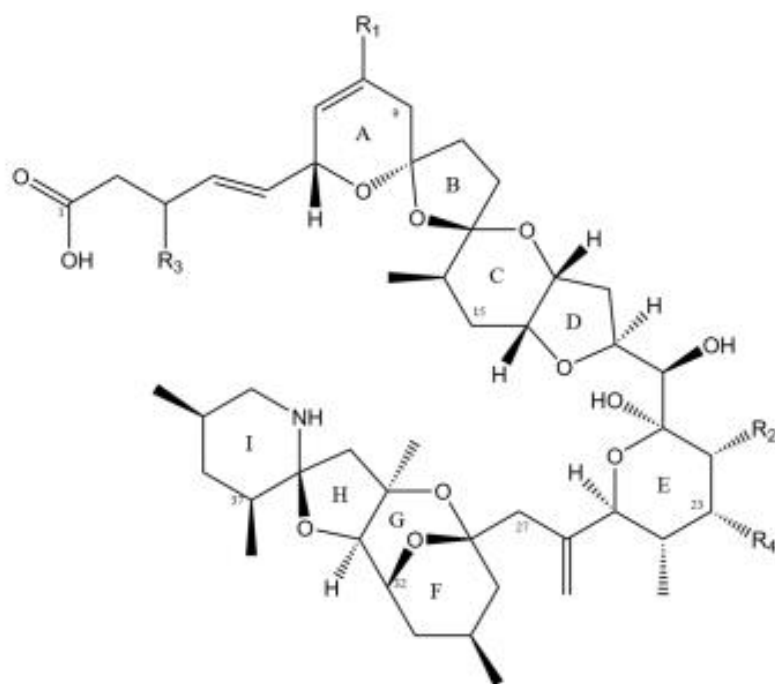
(izvor: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/a3/Azaspiracid-1.svg/1920px-Azaspiracid-1.svg.png>)

2.3.1. Analози azaspiracida

Azaspiracid ima mnogo analoga, preko 60 različitih spojeva koji su nastali derivacijom najzastupljenijih 5 homologa AZA-1, AZA-2, AZA-3, AZA-6 i AZA-7. Svi se razlikuju samo po nekoliko različitih skupina (Tablica 1) na točno određenim mjestima u njihovoj strukturi (Slika 10). Iz ovih 5 homologa, nastaju svi ostali azaspiracidi. Oni su diferenciraniji od početnih 5 i više se razlikuju po kemijskoj formuli i molekulskoj strukturi. *A. poporum* izoliran iz dva različita mjesta (Sjeverno more i Južna Koreja) sintetizira različite homologe. Iz područja Sjevernog mora izoliran je AZA-37 molekulske mase 845 Da i NMR spektroskopijom je dobivena njegova formula 39-desmetil-7,8-dihidro-3-hidroksi-AZA-1. Iz područja Južne Koreje AZA-36 je molekulske mase 857 i formule 39-desmetil-3-hidroksi-AZA-2 [5,12].

Osim azaspiracida koji potječu iz dinoflagelata, azaspiracidi se modificiraju metabolizmom školjkaša, davajući nove homologe. Samo glavnih 5 homologa je zasad dokazano da su izvorni metaboliti dinoflagelata, dok svi ostali mogu biti analozi nastali metabolizmom školjkaša (izuzev AZA-11). Školjkaši transformiraju AZA na dva načina: hidroksilacijom na ugljiku C3 i C23, karboksilacijom na C22 i naknadnom dekarboksilacijom. Plava dagnja (*Mytilus edulis*) karboksilacijom ugljika C22 metabolizira AZA-1 i AZA-2 u AZA-17 i AZA-19 [5,12].

Mehanizam toksičnosti kod azaspiracida nije još objašnjen, ali s obzirom na jačinu toksičnosti, homolozi se značajno razlikuju. AZA-2, AZA-3 i AZA-6 su toksičniji od AZA-1 za 8,3, 4,5 i 7 puta. 37-epi-AZA-1 je također 5 puta toksičniji od AZA-1, a AZA-36 i AZA-37 su 6 i 3 puta manje toksični. Razlike u njihovoj toksičnosti se mogu povezati s razlikama u strukturi [5,12].



Slika 10. Kemijska struktura azaspiracida s naznačenim mjestima diferencijacije

(izvor: [11])

Tablica 1. Diferencija azaspiracida

TOKSIN	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
AZA-1	H	CH ₃	H	H
AZA-2	CH ₃	CH ₃	H	H
AZA-3	H	H	H	H
AZA-6	CH ₃	H	H	H
AZA-7	H	CH ₃	OH	H

2.4. Toksičnost i mehanizam djelovanja azaspiracida

Za razliku od ostalih fiktoksina i vrsta toksičnosti, jako malo se zna o mehanizmu djelovanja azaspiracida. Slično toksinima DSP, trovanje azaspiracidima može rezultirati teškim akutnim simptomima koji uključuju mučninu, povraćanje, proljev i grčeve u želucu [11].

Zbog male količine informacija dobivenih iz trovanja azaspiracidima, gotovo sve informacije o toksikologiji su dobivene iz kontroliranih *in vivo* i *in vitro* eksperimenata [11].

2.4.1. *In vivo* istraživanja

In vivo istraživanja AZA-1 provedena su na glodavcima, točnije intraperitonealnim (IP) ubrizgivanjima i oralnom primjenom na miševima. Intraperitonealnim ubrizgivanjem acetonskih ekstrakta kontaminiranih školjki, miševi su manifestirali simptome neurotoksičnosti u obliku tromosti, poteškoća u disanju, grčevima, progresivnom paralizom i smrću unutar 20-90 minuta. Iz dobivenih podataka letalna doza parcijalno pročišćenog AZA-1 je 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$. IP ubrizgivanje letalne doze AZA-1 ($\geq 150\mu\text{g}/\text{kg}$) izazvalo je oticanje želuca, smanjivanje timusa i slezene. Došlo je do formiranja vakuola, piknoze parenhimskih ćelija u pankreasu, prikupljanja mrtvih limfocita u timusu i slezeni te erozije i krvarenja u želucu. Patološke promjene izazvane trovanjem AZA su karakteristične za ove toksine, za razliku od onih izazvanih PSP, DSP i ASP. Letalne doze AZA-2 i AZA-3 su 110 odnosno 140 $\mu\text{g}/\text{kg}$ što ih čini opasnijima od AZA- [12].

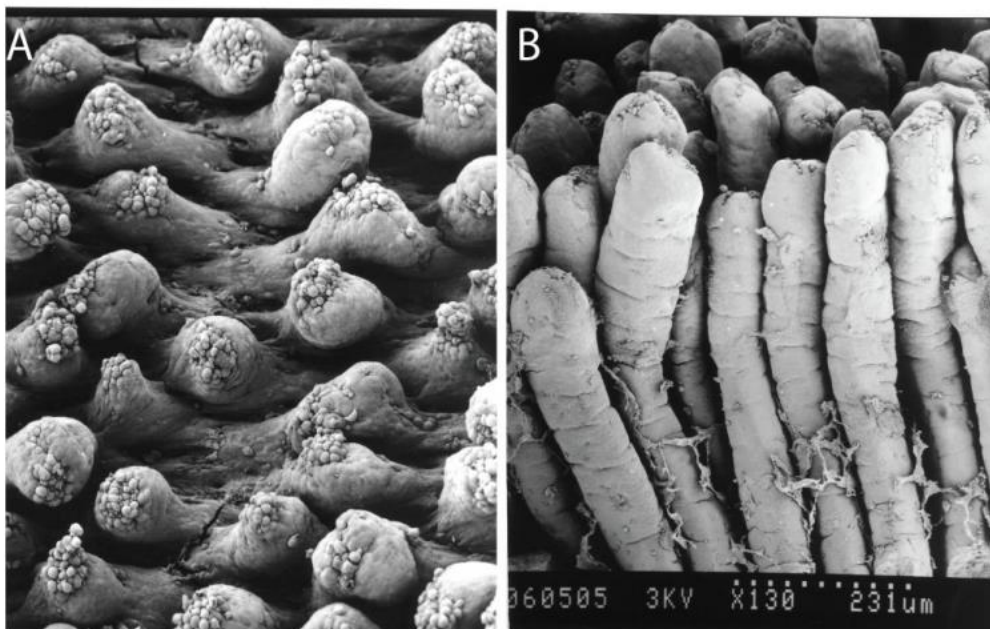
Nakon oralne primjene subletalnih doza AZA-1 (100-300 $\mu\text{g}/\text{kg}$) miševima izmjerene su količine toksina u različitim tkivima. Nakon 24 sata od unosa toksina, preostalo je samo 2% od početne doze toksina u tkivima miševa, s najvećom koncentracijom u želucu, dvanaesniku, bubrezima, slezeni, plućima, jejunumu, srcu i jetri tim redom [5].

Kod oralnog unošenja većih doza nečistog AZA-1 (900 mg/kg), što je 6 puta veća doza od letalne doze koja se unosi IP ubrizgavanjem, svi miševi su preživjeli. Međutim, autopsijom miševa 4 sata nakon unosa, zabilježene su različite gastrointestinalne promjene, uključujući akumulaciju tekućine u ileumu i nekrozu epitelnih ćelija na mikrovilama. Nakon 8 sati efekti su se pogoršali, ali nakon 24 sata, simptomi su se povukli ili nestali [5,12].

Kasnija istraživanja s pročišćenim AZA-1 detaljnije su proučila njegove učinke na miševima. Miševi su primali oralno doze AZA-1 u rasponu od 300 do 900 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tijekom 24 sata. Svi miševi kojima je primijenjena doza od 900 $\mu\text{g}/\text{kg}$ su umrli. Iako nije primijećen jasan odnos između doze i odgovora, što se može pripisati malom broju eksperimentalnih ponavljanja, procijenjena minimalna letalna oralna doza za pročišćeni AZA-1 bila je oko 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Niže doze od 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ izazvale su nakupljanje masnih kiselina u jetri unutar jednog sata, nakon čega su uslijedile privremena degeneracija i oštećenje mikrovila u tankom crijevu, degeneracija vakuola u epitelnim stanicama te atrofija lamina proprie u roku od četiri sata.

Srednje doze AZA-1 (500 do 700 $\mu\text{g}/\text{kg}$) izazvale su postupno oštećenje crijeva u osmom satu (Slika 11), dok je atrofija lamina propria nastavljena do 24 sata, s manjim brojem degenerativnih epitelnih stanica, što upućuje na određene znakove oporavka. U isto vrijeme, težina jetre povećala se za 38% u grupi koja je primila dozu od 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Zabilježeni su vremenski i dozno ovisni učinci na nekrozu limfocita u timusu, slezeni i Peyerovim pločama u tankom crijevu. Doze AZA-1 od 600 i 700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ smanjile su broj ne-granulocita za 33%, uglavnom T i B limfocita. Nisu primijećene promjene u bubrezima, srcu i plućima[5].



Slika 11. Prikaz mikrovila u tankom crijevu elektronskim mikroskopom u: A) miša 8 h nakon doze od 700 $\mu\text{g}/\text{kg}$, B) zdravog miša

(izvor: [12])

2.4.2. *In vitro* istraživanja

Od njihovog otkrića, azaspiracidi se svrstavaju u zasebnu grupu fiktoksina. Mnoge različite mete i potencijalni mehanizmi njihovog trovanja su testirani. S obzirom na njihove gastrointestinalne simptome koji naliče onima DSP trovanju (OA i DTX), čiji mehanizam je inhibicija protein fosfataze (PP), AZA su se također smatrali DSP toksinima. Međutim, učinci ekstrakta AZA iz školjkaša nisu pokazivali znakove inhibicije enzima PP1, niti PP2A. Nadalje, AZA su naknadno testirani na ne-receptorsku fosfotirozinsku proteinsku fosfatazu (PTP1B) i T-staničnu proteinsku tirozinsku fosfatazu (TCPTP), pri čemu nije zabilježena promjena u aktivnosti enzima. Iz prikupljenih podataka dokazano je da azaspiracidi nisu PP inhibitori [5].

Slično proteinskim fosfatazama, stanične kinaze igraju ključnu ulogu u staničnoj signalizaciji, komunikaciji, metabolizmu i staničnoj smrti. Mitogen-aktivirane proteinske kinaze (MAPKs), put cAMP, proteinska kinaza C i fosfatidilinozitol-3-kinaza su bili testirani kao mogući ciljevi napada AZA toksina. Međutim AZA nije imao utjecaja na ove kinaze, ni na ispitanih 40 drugih kinaza [5].

Dokazano je da azaspiracidi mogu utjecati na morfološke i citoskeletne promjene kod uzgojenih stanica. AZA nisu direktno izmjenili polimerizaciju i depolimerizaciju aktina *in vitro*, nego se vjeruje da su izmjene nastale indirektnim toksikološkim efektom [5].

Pokazalo se da azaspiracidi imaju utjecaj na električnu aktivnost stanice, djeluju na ionske kanale kalija, kalcija, klora i natrija. Točnije, na natrijev ionski kanal (Na^+) djeluju tako da ograničavaju brzinu protoka kroz kanal, ne izazivaju deaktivaciju kanala. Pri visokim koncentracijama (200 nM), udio inhibicije kanala može doseći 60%, ozbiljno utječući na proces depolarizacije membrane stanica.

Što se tiče utjecaja na kanale za kalij (K^+), pokazano je da AZA mogu inhibirati hERG kanale (hERG kanali igraju vrlo važnu ulogu u repolarizaciji miokarda), a eksperimentalni podaci ukazuju da mogu utjecati na količinu hERG u membrani stanice štakora.

Štakori tretirani različitim dozama toksina (11 ili 55 $\mu\text{g}/\text{kg}$) imali su djelomično produženje PR intervala i promjene u brzini rada srca uslijed blokade kalijevih kanala. Inhibicija kanala kalcija (Ca^{2+}) dovodi do pojave neuroloških simptoma. Također, neki eksperimenti ukazuju da azaspiracidi mogu djelovati kao inicijatori nastanka tumora [11].

Ukratko, AZA toksini ne djeluju kao inhibitori protein fosfataza (PP), kinaza ili G-protein spregnutih receptora (GPCR), niti inhibiraju polimerizaciju/depolimerizaciju aktina. Međutim, pokazano je da su citotoksični, utječu na raspored citoskeleta te inhibiraju kalijeve (hERG) i naponski regulirane natrijeve kanale [5].

2.5. Metode detekcije

Test na miševima (MBA – mouse bioassay) je široko priznata i povijesno korištena metoda detekcije toksičnosti školjkaša. Međutim, preporuka stručnjaka je da metodu kao što je MBA treba zamijeniti čim budu dostupne druge međunarodno validirane metode. Ovom regulacijom se odražava sve veći trend prema razvoju etičnijih, osjetljivijih i pouzdanijih metoda detekcije [16].

Budući da AZA nemaju izražen kromofor ili fluorofor, izravna analiza pomoću LC-a s detekcijom ultraljubičaste apsorpcije (UVD) i fluorescencije (FLD) nije moguća, što znači da je trenutno LC–MS jedina široko dostupna tehnika za određivanje AZA.

LC-MS (tekućinska kromatografija–masena spektrometrija) je analitička tehnika koja kombinira sposobnosti fizičke separacije tekućinske kromatografije s mogućnošću analize mase pomoću masene spektrometrije. Intenzivno se koristi u detekciji toksina. Prva primjena LC-MS za detekciju azaspiracida je bila 1999.-te godine pri čemu je postignuta granica detekcije od 50 pg (pikograma), 80000 puta osjetljivija od testa s miševima. Naknadno je LC-MS metoda dodatno optimizirana što omogućuje detekciju od 4 pg toksina te razlučivanje više vrsta azaspiracida [11,16].

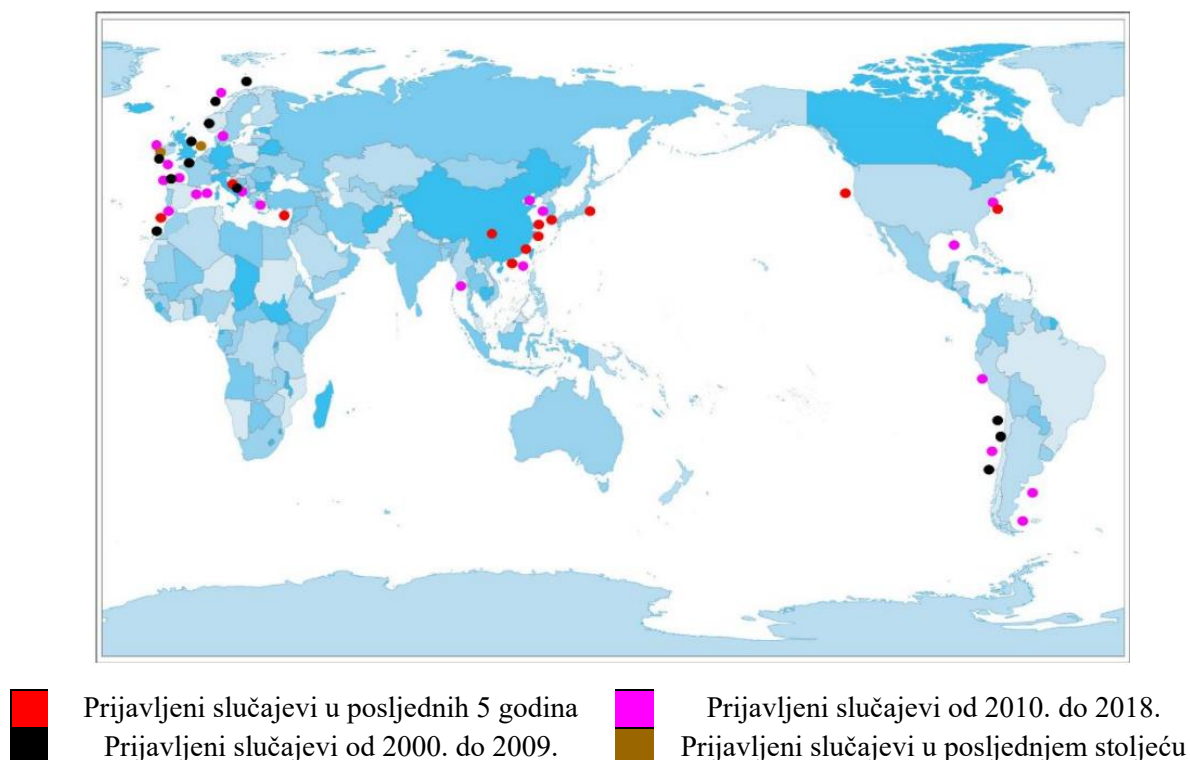
Ovisno o potrebama koriste se različite modifikacije LC-MS metode:

- UHPLC/HPLC-MS (ultra visokotlačna tekućinska kromatografija-MS) – koristeći se ovom metodom istraživači su masenu spektrometriju uz ESI (elektrosprej ionizaciju) povezali s velikom mogućnosti razdvajanja ove kromatografske tehnike. Optimizacijom metode moguće je postići detekciju više azaspiracida odjednom, uz sniženje razine detekcije i smanjene utjecaja matrice na rezultate [11].
- LC-HRMS (LC - masena spektrometrija visoke rezolucije) služi pri detekciji i prepoznavanju novih analoga toksina [11].
- LC-MS+NMR (LC-MS+ spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije) isključivo se koristi za otkriće novih AZA i detekcije strukture i koncentracije toksina [11].
- LC-MS + ostale metode kao što su qPCR (kvantitativni PCR u realnom vremenu), micro-LC-MS-MS (mikro-tekućinska kromatografija–tandem masena spektrometrija), SIM (praćenje odabranog iona), MRM (praćenje više iona), te korištenje gela za selektivno hvatanje i oslobađanje AZA [11].

2.6. Rasprostranjenost azaspiracida

Prvo potvrđeno trovanje se dogodilo u studenom 1995.-te u Irskoj (KT-3). Zatim u Nizozemskoj iste godine. Tada su se dijagnosticirali kao DSP toksini, s obzirom na simptome otrovanih. S povećanjem broja otrovanih ljudi povećalo se i zanimanje za toksinom pa se pokazalo da ne pripada skupini DSP toksina, nego je posve drugi spoj. Spoj je 1998.-te godine izoliran iz školjkaša *Mytilus edulis*. Tada nazvan Killary toxin (KT-3) a kasnije je dobio svoj trenutni naziv, azaspiracid [11,14].

Postoje izvješća trovanja azaspiracidima na svim nastanjivim kontinentima diljem svijeta, osim Australije (Slika 12) . Od njegovog otkrića, AZA toksini su otkriveni u nekoliko vrsta morskih mekušaca i rakova iz različitih dijelova Europe (Švedska, Danska, Portugal, Francuska, Engleska, Norveška, Irska), Japana, Kine, Sjeverne Amerike i Maroka. Školjkaši u kojima su dosad nađeni tragovi azaspiracida su: dagnje (*Mytilus edulis* i *Mytilus galloprovincialis*), kamenice (*Crassostrea gigas* i *Ostrea edulis*), kapice (*Pecten maximus*), školjke (*Tapes philippinarum*, *Ensis siliqua* i *Donas spp.*) te rakovi (*Cancer pagurus*) [11,14].



Slika 12. Slučajevi trovanja azaspiracidima po kontinentima

(izvor: [11])

2.6.1. Azaspiracidi u Jadranu

Na području Hrvatske napravljeno je više testova u potrazi za azaspiracidima. U jednom od testiranja prikupljene su dagnje *Mytilus galloprovincialis* sa sjevera Jadrana. Izolacijom azaspiracida iz mesa, pronađeni su azaspiracidi u tragovima, međutim koncentracije su bile ispod granice kvantifikacije [14,15].

Do danas nije bilo dokazanih slučajeva trovanja azaspiracidima u Hrvatskoj. Međutim, testiranjem dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) na obalnim područjima Makarske i Neuma pronađeni su tragovi azaspiracida, ali tek u tolikim količinama da dopuštaju identifikaciju. Količine azaspiracida izolirane iz dagnji su ispod dopuštenih za sigurnu konzumaciju (svega nekoliko $\mu\text{g}/\text{kg}$), što znači da do sada nije bilo opasnosti od trovanja [14,15].

2.7. Regulacija i dopuštene koncentracije azaspiracida

S obzirom da dugoročni učinci izloženosti azaspiracidima nisu poznati te s obzirom na činjenicu da je opasnost od svih ostalih toksina procijenjena samo prema akutnom toksičnom potencijalu, stručnjaci su uzeli u obzir samo poznate učinke prilikom određivanja sigurnih razina AZA toksina u školjkama. Procjena dozvoljenog unosa azaspiracida zahtjeva evaluaciju ponovljenog unosa i konstatne izloženosti, što u ovom slučaju nije poznato. Stoga je predložena regulatorna količina AZA određena pomoću akutnih doza trovanja. Dogovorima između FSA (Engleska agencija za procjenu kvalitete hrane), WHO (Svjetske zdravstvene organizacije) i EU komisije dobivena regulatorna dozvoljena doza konzumacije azaspiracida kod čovjeka je 160 µg/kg [12].

3. Zaključak

Dinoflagelati porodica *Amphidoma* i *Azadinium* proizvode fiktoksine azaspiracide, polieterske spojeve s tri spiro spoja u molekuli, heterocikličkom amino skupinom te terminalno smještenom alifatskom karboksilnom skupinom (AZA-SPIR-ACID). Nakupljaju se u školjkašima i drugim morskim organizmima koji se hrane filtriranjem vode. Azaspiracidi su jedna od 8 skupina fiktoksina. U tih 8 fiktoksina spadaju: okadaična kiselina (OA) i njeni derivati, pektenotoksini (PTX), jesotokini (YTX), ciklički imini (CI), domoična kiselina (DA), saksitoksini (STX), brevetoxini (BTX) i azaspiracidi (AZA).

Spomenuti fiktoksini izazivaju nekoliko različitih sindroma toksičnosti (DSP, ASP, NSP, CTP) dok azaspiracidi imaju svoju zasebnu istoimenu vrstu trovanja, azaspiracidno trovanje školjkašima (AZP).

Azaspiracidi su relativno novo otkrivena vrsta fiktoksina. Od prvog trovanja i izolacije toksina 1998.-e godine, izolirano je preko 60 izomera azaspiracida različitih struktura i jačina toksičnosti. Još se proučavaju utjecaj na čovjekovo zdravlje i mogući vektori unosa. Međutim, mnogo toga je još nepoznato po pitanju azaspiracida. O njihovom mehanizmu djelovanja i dugoročnim posljedicama na čovjekovo zdravlje znamo jako malo, gotovo sve informacije o toksikologiji azaspiracida imamo iz *in vivo* i *in vitro* istraživanja na eksperimentalnim životinjama i potencijalnim biokemijskim metama.

4. Literatura

- [1] Kvrđić, K., Džafić, N. i Pleadin, J. (2021). *Fikotoksini u morskim organizmima - potencijalna prijetnja sigurnosti potrošača*. *Veterinarska stanica*, 52 (6), 739-749. Adresa stranice: <https://doi.org/10.46419/vs.52.6.13> Pristupljeno 10.7.2024.
- [2] Farabegoli, F.; Blanco, L.; Rodríguez, L.P.; Vieites, J.M.; Cabado, A.G. *Phycotoxins in Marine Shellfish: Origin, Occurrence and Effects on Humans*. *Mar. Drugs* 2018, 16(9), 188. Adresa stranice: <https://doi.org/10.3390/md16060188> Pristupljeno 12.7.2024.
- [3] Darracq, M. A. (2014). Ciguatoxin. *Encyclopedia of Toxicology*, 17(13), 963–965. Adresa stranice: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00712-0>, Pristupljeno 27.7.2024.
- [4] Sellner, K. G., Doucette, G. J., & Kirkpatrick, G. J. (2003). *Harmful algal blooms: causes, impacts, and detection*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(7), 383–406. Adresa stranice: <https://doi:10.1007/s10295-003-0074-9> Pristupljeno 2.8.2024
- [5] Hess, P., Twiner, M. J., Kilcoyne, J., & Sosa, S. (2015). *Azspiracid Toxins: Toxicological Profile*. *Marine and Freshwater Toxins*, 3(7) 1–19. Adresa stranice: https://doi:10.1007/978-94-007-6650-1_20-1, Pristupljeno 1.8.2024
- [6] Taylor, F. J. R., Hoppenrath, M., & Saldarriaga, J. F. (2007). *Dinoflagellate diversity and distribution*. *Biodiversity and Conservation*, 17(2), 407–418. Adresa stranice: <https://doi:10.1007/s10531-007-9258-3>, Pristupljeno 1.8.2024
- [7] Urban Tillmann, Malte Elbrächter, Bernd Krock, Uwe John & Allan Cembella (2009) *Azadinium spinosum gen. et sp. nov. (Dinophyceae) identified as a primary producer of azaspiracid toxins*, *European Journal of Phycology*, 44(1), 63-79. Adresa stranice: <https://doi:10.1080/09670260802578534>, Pristupljeno 1.8.2024
- [8] Krock, B., Tillmann, U., Witt, M., & Gu, H. (2014). *Azspiracid variability of Azadinium poporum (Dinophyceae) from the China Sea*. *Harmful Algae*, 36(23), 22–28. Adresa stranice: <https://doi:10.1016/j.hal.2014.04.01>, Pristupljeno 1.8.2024
- [9] Satake, M., Ofuji, K., Naoki, H., James, K. J., Furey, A., McMahon, T., Yasumoto, T. (1998). *Azspiracid, a New Marine Toxin Having Unique Spiro Ring Assemblies, Isolated from Irish Mussels, Mytilus edulis*. *Journal of the American Chemical Society*, 120(38), 9967–9968. Adresa stranice: <https://doi:10.1021/ja981413r>, Pristupljeno 20.8.2024

- [10] 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(2), 193–203. Adresa stranice: [https://doi:10.1016/s0041-0101\(01\)00226-4](https://doi:10.1016/s0041-0101(01)00226-4), Pristupljeno 6.9.2024
- [11] Yang, J.; Sun, W.; Sun, M.; Cui, Y.; Wang, L. *Current Research Status of Azaspiracids*. *Mar. Drugs* 2024, 22(79), 1-17. Adresa stranice: <https://doi.org/10.3390/md22020079>, Pristupljeno 20.8.2024
- [12] Twiner, M. (2008). *Azaspiracid Shellfish Poisoning: A Review on the Chemistry, Ecology, and Toxicology with an Emphasis on Human Health Impacts*. *Marine Drugs*, 6(2), 39–72. Adresa stranice: <https://doi:10.3390/md20080004>, Pristupljeno 20.8.2024
- [13] Rossi, R., Dell'Aversano, C., Krock, B., Ciminiello, P., Percopo, I., Tillmann, U., Zingone, A. (2016). *Mediterranean Azadinium dexteroporum (Dinophyceae) produces six novel azaspiracids and azaspiracid-35: a structural study by a multi-platform mass spectrometry approach*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(4), 1121–1134. Adresa stranice: <https://doi:10.1007/s00216-016-0037-4>, Pristupljeno 7.9.2024
- [14] Bacchiocchi, S., Siracusa, M., Ruzzi, A., Gorbi, S., Ercolessi, M., Cosentino, M. A., 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(11), 115–125. Adresa stranice: <https://doi:10.1016/j.toxicon.2015.10.002>, Pristupljeno 7.9.2024
- [15] Giuliani, M. E., Accoroni, S., Mezzelani, M., Lugarini, F., Bacchiocchi, S., Siracusa, M., Gorbi, S. (2019). *Biological Effects of the Azaspiracid-Producing Dinoflagellate Azadinium dexteroporum in Mytilus galloprovincialis from the Mediterranean Sea*. *Marine Drugs*, 17(10), 595. Adresa stranice: <https://doi:10.3390/md17100595>, Pristupljeno 8.9.2024
- [16] McCarron, P., Giddings, S. D., Miles, C. O., & Quilliam, M. A. (2011). *Derivatization of azaspiracid biotoxins for analysis by liquid chromatography with fluorescence detection*. *Journal of Chromatography A*, 1218(44), 8089–8096. Adresa stranice: <https://doi:10.1016/j.chroma.2011.09.017>, Pristupljeno 13.9.2024