

# Otrovi morskih organizama

---

Šimac, Fran

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:813171>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-06**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

Fran Šimac

Otrovi morskih organizama

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2020.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za farmakologiju i toksikologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Predstojnica: doc. dr. sc. Jelena Šuran

Mentorica: prof. dr. sc. Andreja Prevendar Crnić

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Prof. dr. sc. Emil Srebočan
2. Doc. dr. sc. Jelena Šuran
3. Prof. dr. sc. Andreja Prevendar Crnić
4. Prof. dr. sc. Frane Božić (zamjena)

## **Zahvala**

*Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Andreji Prevendar Crnić na trudu, pomoći i prenesenom znanju pri izradi ovog diplomskog rada. Hvala mojim prijateljima i dragim ljudima koji su bili uz mene. Hvala mojoj Marini na iskrenoj ljubavi i strpljenju. I na kraju, hvala mojoj obitelji što vjeruju u mene i bez kojih ništa od ovoga ne bi bilo moguće.*

## Popis kratica

AOAC - Međunarodno udruženje službenih analitičkih kemičara (*eng.* Association of Official Agricultural chemists)

ARfD - Akutna referentna doza (*eng.* Acute reference dose)

ASP - Otrovanje školjkašima koje uzrokuje gubitak pamćenja (*eng.* Amnesic shellfish poisoning)

AZP - Azaspiracidno otrovanje školjkašima (*eng.* Azaspiracid shellfish poisoning)

BAL - Bronho-alveolarna lavaža

CC - Kronična ciguatera (*eng.* Chronic ciguatera)

CFIA - Kanadska agencija za inspekciju hrane (*eng.* Canadian food inspection agency)

CTX - Ciguatoksin

DA - Domoična kiselina

DSP - Otrovanje školjkašima koji uzrokuju dijareju (*eng.* Diarrhetic shellfish poisoning)

EFSA - Europska agencija za sigurnost hrane (*eng.* European Food Safety Authority)

ELISA - Enzimski imunosorbentni test (*eng.* Enzyme-linked immunosorbent assay)

FSAI - Irska služba za sigurnost hrane (*eng.* Food Safety Authority of Ireland)

HPLC-UV - Tekućinska kromatografija s UV detektorom

i.m. - Intramuskularno

i.p. - Intraperitonealno

i.v. - Intravenozno

KA - Kainska kiselina

LC-MS/MS - Tekućinska kromatografija vezana sa spektrometrom masa (*eng.* Liquid chromatography with tandem mass spectrometry)

LD<sub>50</sub> - Doza toksične supstance koja ubija 50% testne populacije (*eng.* Lethal dose 50%)

LOAEL - Najniža koncentracija kod koje je vidljiv štetni učinak (*eng.* Lowest-observed-adverse-effect level)

MBA - Mišji biološki test (*eng.* Mouse bioassay)

MTX - Maitotoksini

NSP - Neurotoksično otrovanje školjkašima

OA - Okadaična kiselina

p.o. - Kroz usta (*lat.* Per os)

PbTx - Brevetoksini

PP2A - Protein fosfataza 2

PSP - Otrovanje školjkašima koje uzrokuju paralizu (*eng.* Paralytic shellfish poisoning)

PTX - Pektenotoksini

s.c. - Subkutano

STXs - Saksitoksini

TTX - Tetrodotoksin

YTX - Yessotoksini

## Popis slika

Slika 1. Kemijska struktura saksitoksina (OSHIMA, 1995.) .....	4
Slika 2. Kemijska struktura tetrodotoksina (LAGO i sur., 2015.) .....	9
Slika 3. Kemijska struktura domoične kiseline i njezinih izomera (VAN APELDOORN i sur., 1999.).....	13
Slika 4. Kemijska struktura okadaične kiseline (GERSSEN i sur., 2010).....	20
Slika 5. Kemijska struktura yessotoksina (GERSSEN i sur., 2010) .....	25
Slika 6. Kemijska struktura azaspirnih kiselina (FAO, 2004.).....	28
Slika 7. Kemijska stuktura pektenotoksina-2 (PTX2) (GERSSEN i sur., 2010.) .....	32
Slika 8. Kemijska struktura cikličkih imina (MOLGÓ i sur., 2017.).....	35
Slika 9. Kemijska struktura palitoksina (PATOCKA i STREDA, 2002.) .....	38
Slika 10. Kemijska struktura pacifičkih (P) i karipskih (C) ciguatoksina (FAO, 2004.) .....	45
Slika 11. Kemijska struktura maitotoksina (NICOLAOU, 2011.).....	49
Slika 12. Kemijska struktura brevetoksina (tip A i B) (VILARINO, 2018.).....	52

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA .....	2
2.1. Otrovi morskih organizama u Mediteranskom moru .....	3
2.1.1. Saksitoksini .....	3
2.1.2. Tetrodotoksin.....	8
2.1.3. Domoična kiselina i analozi .....	12
2.1.4. Okadaična kiselina i derivati .....	18
2.1.5. Yessotoksini .....	24
2.1.6. Azaspirna kiselina .....	27
2.1.7. Pektenotoksini .....	31
2.1.8. Ciklički imini.....	34
2.2. Ostali otrovi morskih organizama .....	37
2.2.1. Palitoksin i njegovi analozi .....	37
2.2.2. Ciguatoksini i maitotoksini.....	42
2.2.3. Brevetoksini.....	51
3. RASPRAVA.....	56
4. ZAKLJUČCI.....	57
5. POPIS LITERATURE .....	58
6. SAŽETAK.....	74
7. SUMMARY .....	75
8. ŽIVOTOPIS .....	76



# 1. UVOD

Otrovi morskih organizama su odgovorni za trovanje ptica, masovne pomore riba, sanitarne, ekološke i ekonomske probleme. Doduše, ovdje spomenuti otrovi morskih organizama, nisu klasični otrovi. Oni se akumuliraju iz okoline i ne proizvodi ih specijalizirana žlijezda. Intoksikacija ljudi i životinja je najčešće posljedica konzumiranja kontaminirane hrane (ISBISTER i KIERNAN, 2005.). Iako mogu kontaminirati ribe, dominantno su to školjkaši zbog načina njihove prehrane, odnosno filtracije hranjivih tvari a time i toksičnih algi zbog čega se nad njima vrši opsežni monitoring.

Većina slučajeva teških intoksikacija nastaju zbog rekreacijskog sakupljanja školjkaša od strane ne-educiranih ljudi, nedovoljno učinkovitog monitoringa komercijalnih školjkaša s aspekta sigurnosti hrane. Najčešće su to različiti sindromi uzrokovani ingestijom školjki kao što su trovanje školjkašima koje uzrokuje gubitak pamćenja (ASP), trovanje školjkašima koje uzrokuje paralizu (PSP), trovanje školjkašima koje uzrokuju dijareju (DSP) i azaspiracidno trovanje školjkašima (AZP) koji se događaju diljem svijeta, te neurotoksično trovanje školjkama (NSP) koje je ograničeno na SAD i Novi Zeland (AUNE, 2008.). Bez obzira na specifični mehanizam toksičnosti, mnogi otrovi morskih organizama predstavljaju izazove u toksikološkim istraživanjima. Konkretno, radi se o ograničenoj dostupnosti velike količine visoko pročišćenih otrova koji su potrebni za toksikološka ispitivanja. U mnogima se koristi ograničen broj životinja, a kako bi se uvećao toksični učinak vrlo često se koristi parenteralni način aplikacije otrova. S druge strane, vrlo malo je istraživanja koje se bave učincima peroralnog unosa, koji je češći način ulaska u organizam.

Cilj ovog rada je pregledno obraditi otrove morskih organizama prvenstveno iz Mediterana i onih prisutnih u cijelom svijetu. Obradit će se njihova toksokinetika, toksičnost za ljude i eksperimentalne životinje, mehanizam toksičnog djelovanja i postupci kod otrovanja. Obradit će se najznačajniji otrovi morskih organizama, to jest saksitoksini, tetrodotoksin, ciguatoksini, maitotoksini, domoična kiselina i njeni analozi, brevetoksin, palitoksin i njegovi analozi, okadaična kiselina i njeni derivati, azaspirna kiselina te drugi lipofilni toksini.

## 2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

Otrovi morskih organizama su strukturno i toksikološki grupa različitih biološki aktivnih spojeva. To su ne-proteinski, termostabilni spojevi, manji od 1000 Da. Iznimka su tetrodotoksini koji su bakterijskog podrijetla.

Oni su sekundarni metaboliti mikroalga, poznatiji kao fiktoksini. Uloga sekundarnih metabolita nije sasvim razjašnjena, ali se smatra da ih koriste kao obrambeni mehanizam. Dinoflagelati proizvode većinu otrova morskih organizama, slijede ih alge kremenjašice, cijanobakterije i jednostanične alge.

Značajno je da imaju velike genome, čak 100 puta veće od ljudskog (LIN, 2006.), što otežava upotrebu modernih genetskih pristupa u nekim studijama biosinteze (KALAITZIS i sur., 2010.). Većina, ali ne svi otrovi morskih organizama pokazuju toksični učinak na živčani sustav, dok drugi utječu na fosforilaciju proteina i druge vitalne biokemijske procese. Među neurotoksinima postoji značajna razlika u mehanizmu toksičnog djelovanja, pri čemu se neki vežu za o naponu-ovisne natrijeve kanale, drugi za aminokiselinske receptore i ometaju prenošenje akcijskog potencijala.

U posljednjih nekoliko desetljeća, detaljno znanje o otrovima morskih organizama, koje je bilo osporavano zbog primjene bioloških ispitivanja na miševima u njihovom otkrivanju, brzo raste. Zbog sve veće upotrebe kemijskih metoda u determinaciji pojedinih otrova morskih organizama, poznate su varijacije unutar profila, regionalne varijacije među toksičnim algama i odnosi između vektorskih vrsta kao što su ribe i školjke od 1980-ih. Povećana upotreba tekućinske kromatografije kao laboratorijske tehnike, *in vitro* studija i komercijalna dostupnost toksina, uvelike je proširilo znanje i shvaćanje o samim otrovima morskih organizama kao i njihov metabolizam i biotransformaciju na različitim razinama hranidbenog lanca. Štoviše, detaljnije razumijevanje i otkriće novih metabolita omogućuje nam razvoj i primjenu novih metoda za praćenje kontaminacije hrane morskog podrijetla, što rezultira postupnom zamjenom zastarjelih i nespecifičnih metoda kao što je biološka analiza.

## 2.1. Otrovi morskih organizama u Mediteranskom moru

### 2.1.1. Saksitoksini

Saksitoksini (STXs) su porodica hidrofilnih toksina. Ime ove skupine toksina potječe od *Saxidomus giganteus*, školjke iz koje je prvi puta izdvojen. Otkriveni su prošlog stoljeća, te mogu kontaminirati morske organizme koji se konzumiraju i pitku vodu. Ingestija morske hrane kontaminirane saksitoksinom izaziva paralitički sindrom poznatiji kao otrovanje školjkašima koje uzrokuje paralizu (PSP). Iako se PSP ne može klasificirati kao javno-zdravstveni problem zbog relativno male incidencije, opravdan je razlog istraživanja ovog toksina zbog mogućih fatalnih posljedica nakon konzumacije samo jedne kontaminirane školjke. Nadalje, saksitoksin je jedini prirodni morski proizvod koji je deklariran kao kemijsko oružje (LLEWELLYN, 2006.).

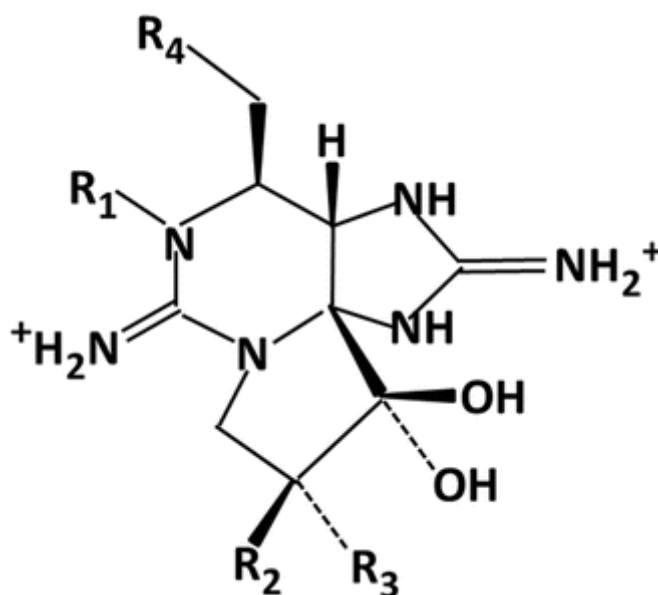
Toksini odgovorni za PSP (uključujući STX, njegove derivate i goniatoksine (slika 1.)) su tetrahidropurinski spojevi, koji su među najmoćnijim poznatim neurotoksinima. Topivi su u vodi i termostabilni. Kemijska struktura STX-a sastoji se od dvije gvanidinske skupine povezane stabilnom azaketalnom vezom. Izolirano je više od 30 prirodnih analoga STX-a, a razlikuju se po različitim kombinacijama hidroksilne i sulfatne skupine na 4 mjesta na molekuli, kao i nastankom epimernih parova otvaranjem i zatvaranjem prstena.

Saksitoksini se mogu podijeliti u 4 skupine: karbamatni toksini, sulfo-karbamoilni toksini, dekarbamoilni toksini i deoksidekarbamoilni toksini. Toksine sintetiziraju morski dinoflagelati, uključujući *Alexandrium spp.*, *Pyrodinium bahamense var. Compressum*, i *Gymnodinium onteratum*, te crvene alge roda *Jania*. Također, toksini koji uzrokuju PSP izolirani su i u plavozelenim algama (cijanobakterijama), ali nije zabilježen niti jedan slučaj otrovanja u ljudi saksitoksinima iz cijanobakterija.

Slučajevi PSP-a zabilježeni su u Čileu, Tajvanu, Japanu, Južnoj Africi, Australiji, Indiji, Engleskoj, Gvatemali, Kostariki, Singapuru, Kanadi, Španjolskoj i Meksiku (GESSNER, 2000.; LLEWELLYN, 2006.). STX-i se akumuliraju u školjkašima kao što su kamenice, dagnje i češljače, ali i u rakovima, ribama napuhačama, mekušcima i glavonošcima. Školjkaši su dugi vremenski period nakon izlaganja toksičnim mikroalgama kontaminirani, iako imaju mehanizme pomoću kojih se mogu očistiti od toksina. PSP uzrokovan ingestijom kontaminiranih predatorskih rakova iz porodice *Xanthidae*, moguće je naći u tropskim područjima te također mogu biti fatalni za ljude. Također, od početka 2000. godine, uz obalu

Sardinije i Sicilije (Zaljev Syracuse) pojavili su se toksini odgovorni za PSP što je rezultiralo višestrukim zatvaranjima farmi školjkaša, čiji su glavni uzrok bili bentoski dinoflagelati *Alexandrium minutum* i *pacificum* (LUGLIÈ i sur., 2017.)

Posljednjih godina, ribe napuhače *Sphoeroides nephelus* na Floridi, uzrokovale su trovanja 12 ljudi velikom količinom toksina koji uzrokuju PSP (LLEWELLYN, 2006.). Također, STX, kao glavni toksin, nađen je u ribi napuhači *Arothron firmamentum* (NAKASHIMA i sur., 2004.). Odgovoran je i za smrt grbavih kitova koji su hranjeni kontaminiranim skušama te se smatra da njihova prilagodba za ronjenje i drugi fiziološki parametri povećavaju njihovu osjetljivost za STX (GERACI i sur., 1989.). Također, zabilježena su uginuća morskih medvjedica nakon izloženosti STX-u (REYERO i sur., 1999.).



Slika 1. Kemijska struktura saksitoksina (OSHIMA, 1995.)

#### 2.1.1.1. Toksokinetika

Iako je mehanizam djelovanja STX-a poznat na molekularnoj razini, vrlo malo se zna o njegovoj apsorpciji, distribuciji, biotransformaciji i eliminaciji. STX se u crijevima apsorbira unutar par minuta nakon ingestije i ne eliminira iz organizma putem fecesa testnih životinja (LLEWELLYN, 2006.). Istraživanja u životinja i dokazi trovanja PSP-om u ljudi ukazuju da se većina STX-a eliminira putem urina (STAFFORD i HINES, 1995., GESSNER i sur., 1997.;

ANDRINOLO i sur., 1999., 2002.). Također, dokazana je prisutnost toksina u jetri, slezeni i mozgu (ANDRINOLO i sur., 1999.).

Vrlo je malo poznatih studija o metaboličkoj transformaciji PSP toksina u sisavaca. Serum i urin intoksiciranih ljudi ukazuju na sulfaciju GTX 2 što je kontradiktorno nalazima kod štakora, gdje nema metaboliziranja STX-a prilikom prolaska kroz organizam.

Razlika između sastava toksina u pojedenim školjkama i ljudskom serumu, kao i sličan profil toksina, ukazuju na to da se PSP toksin metabolizira na razini gastrointestinalnog sustava i/ili jetre (GESSNER i sur., 1997.).

Mora se uzeti u obzir da je transformacija PSP toksina u sisavaca, posljedica biokemijskih procesa i uvjeta kojima je izložen toksin, kao što je želučani sok, koji može pretvoriti male količine sulfiranog PSP-a do puno moćnijih spojeva (LLEWELLYN, 2006.).

Ranija studija o vremenu eliminacije PSP toksina iz ljudskog seruma govori o manje od 24 sata (GESSNER i sur., 1997.), dok su detaljniji podaci dobiveni 2007. godine (ETHERIDGE i sur., 2007.) nakon izbijanja PSP-a kod ljudi. Primjećena je brza eliminacija iz seruma, a eliminacija preko bubrega je ovisila o klasi toksina. Goniatoksini su eliminirani 3 puta brže nego saxitoksini i neosaxitoksini.

#### **2.1.1.2. Mehanizam toksičnog djelovanja**

STX je moćan neurotoksin koji selektivno blokira natrijeve kanale (CESTÉLE i CATTERALL, 2000.), spriječavajući ulazak natrijevih iona u stanice, te tako blokira prijenos impulsa između živaca te nastanak motoričkih i senzoričkih abnormalnosti. Svi analozi STX-a se vežu za isti receptor, iako s različitim afinitetima (ISBISTER i KIERNAN, 2005.). Ovo mjesto vezanja dijeli se sa drugim toksinima koji blokiraju natrijeve kanale, kao što je tetrodotoksin. Vezujuća mjesta za natrijeve kanale ovisne o naponu, za spomenute druge morske toksine i ostale prirodne toksine, mapirana su tijekom ispitivanja ionskih kanala (CESTÉLE i CATTERALL, 2000.).

#### **2.1.1.3. Toksičnost**

Najčešći simptom PSP-a, koji se pojavljuje kod gotovo svih je perioralna parestezija, opisana kao ukočenost ili trnci. Kod težih slučajeva, mogući su gastrointestinalni simptomi (mučnina, povraćanje, abdominalna bol i proljev). Jače intoksikacije uzrokuju neurološke simptome,

uključujući slabost, disartriju, diplopija, ataksija, vrtoglavica i u nekim slučajevima respiratorni arrest ili smrt. Nije u potpunosti razjašnjen utjecaj PSP-a na miokard (LAGOS i ANDRINOLO, 2000.). Zabilježena je dijastolička i sistolička hipertenzija u gotovo svih 11 pacijenata intoksiciranih PSP-om (GESSNER i sur., 1997.).

Eksperimentalna istraživanja koja su uključivala pse i mačke, potvrdila su hipotenzivni učinak nakon i.v. aplikacije visokih doza STX-a i hipertenzivni učinak pri niskim dozama (LAGOS i ANDRINOLO, 2000.). Nema dugoročnih kliničkih stanja uzrokovanih PSP-om (GESSNER, 2000.).

Izloženost STX-u procijenjena je na temelju 20 incidenata PSP-a koji su se dogodili u Kanadi između 1970. i 1990. godine, uključujući približno 60 ljudi (u dobi od 3-72 godine). Simptomi su zabilježeni kao blagi, umjereno teški ili izrazito teški. Blagi slučajevi su bili izloženi STX-u u dozi od 2-30 µg/kg, dok je u težim slučajevima izloženost STX-u bila u dozi većoj od 10-300 µg/kg. Na temelju tih podataka utvrđena je razina najnižeg opaženog štetnog učinka (LOAEL) od 2 µg/kg (FAO/IOC/WHO, 2005.).

#### **2.1.1.4. Eksperimentalna toksičnost**

Jednokratna aplikacija

LD<sub>50</sub> za miševе (letalna doza 50) STX-a za i.v., i.p., i p.o. način aplikacije su koncentracije od 3,4 µg/kg, 10 µg/kg i 263 µg/kg. Razlike u peroralnoj toksičnosti između vrsta nisu otkrivene. Potentnost različitih STX-ova se uvelike razlikuje. Nakon i.p. aplikacije u miševa, karbamati i derivati karbamoila su najtoksičniji PSP spojevi, dok su derivati sulfokarbamoila najmanje toksični (ANDRINOLO i sur.,1999.; LLEWELLYN, 2006.).

#### **2.1.1.5. Klinička slika**

Otrovane jedinke razvijaju simptome PSP-a unutar 5-30 minuta nakon konzumacije kontaminiranog školjkaša. Od simptoma, prvo se očituje parestezija sa pečenjem i peckanjem jezika i usta, što se kasnije proširuje na lice, vrat, prste na rukama i nogama. U težim slučajevima, moguća je utrnulost u prstima na rukama i nogama, koja unutar 4-6 sati napreduje prema rukama, nogama i vratu.

Smrt je obično uzrokovana respiratornom paralizom, a bez pomoći mehaničkog respiratora, stopa smrtnosti je između 5-10%. Dobru prognozu imaju pojedinci koji prežive više od 12h, iako i dalje može biti prisutna mišićna slabost. Manji dio simptoma koji su također prijavljeni, su osjećaj vrtoglavice i lebdenja (zbog poremećaja osjeta i propriocepcije), generalizirana parastezija, slabost nogu i ruku i ataksija. Glavobolja, mučnina i povraćanje, također se mogu pojaviti u početnoj fazi otrovanja. Refleksi su normalni ili odsutni, te su pacijenti svjesni okoline. U pacijenata sa slabijim do srednjim intenzitetom otrovanja, simptomi nestaju nakon 2 do 3 dana, dok u težim slučajevima mogu trajati do 1 tjedna (ISBISTER i KIERNAN, 2005.; LLEWELLYN, 2006.).

#### **2.1.1.6. Liječenje**

Dijagnostika PSP-a temelji se na pojavi karakterističnih neuroloških kliničkih znakova kao i nedavnoj ingestiji školjkaša. Simptome trovanja PSP-a je teško razlikovati od trovanja tetradotoksinom zbog farmakološke sličnosti tih toksina.

Liječenje za PSP je potporno. Intenzivna njega potrebna je samo u umjerenim do teškim slučajevima radi spriječavanja respiratornog zatajenja. Vrlo je važno promatrati pacijente u ranim fazama otrovanja radi brze reakcije u slučaju paralize i respiratornog zatajenja.

#### **2.1.1.7. Analitičke metode i dopuštene koncentracije**

Internacionalno priznati mišji biološki test (MBA) od strane AOAC-a koristi se u programima praćenja i zdravstvene zaštite (FAO/IOC/WHO, 2005.). Trima miševima se intraperitonealno aplicira ekstrakt kontaminiranih školjki i njihova su vremena preživljavanja uspoređuju s onima u miševima kojima se apliciraju različite koncentracije STX-a. Granica detekcije je 0,5 µg/kg STX-a (LUCKAS, 1992.). Razvijene su razne druge metode za detekciju paralitičkih toksina, uključujući ispitivanja citotoksičnosti, vezanja za receptore, imunološki testovi, površinska plazmonska rezonanca i nekoliko kromatografskih metoda (DEGRASSE i sur., 2010.).

Validirane metode od strane AOAC-a uključuju tekućinsku kromatografiju s fluorescentnim detektorom **AOAC 2005.06** (LAWRENCE i sur., 2005.), oksidacijsku metodu od CFIA (ROURKE i sur., 2008.; VAN DE RIET i sur., 2011.) **AOAC 2011.02**. Obje metode

fluoresceinske tekućinske kromatografije detektiraju većinu STX-a (izuzevši GTX6 i deNEO) i većinu toksičnih spojeva.

U Europi, metoda 2005.06 odobrena je 2006. godine uz manja ograničenja, kao alternativna metoda MBA-u u programima praćenja.

EU je utvrdila dopuštenu razinu od 800 µg ekvivalenta saksitoksina 2-HCl/kg školjke (GERSSSEN i sur., 2010.). Također, EFSA je 2009. godine objavila mišljenje o grupi saksitoksina kojim preporučuje sigurnosnu razinu koja iznosi 75 µg ekvivalenta saksitoksina 2-HCl/kg kako bi se izbjeglo prekoračenje ARfD (GERSSSEN i sur., 2010.).

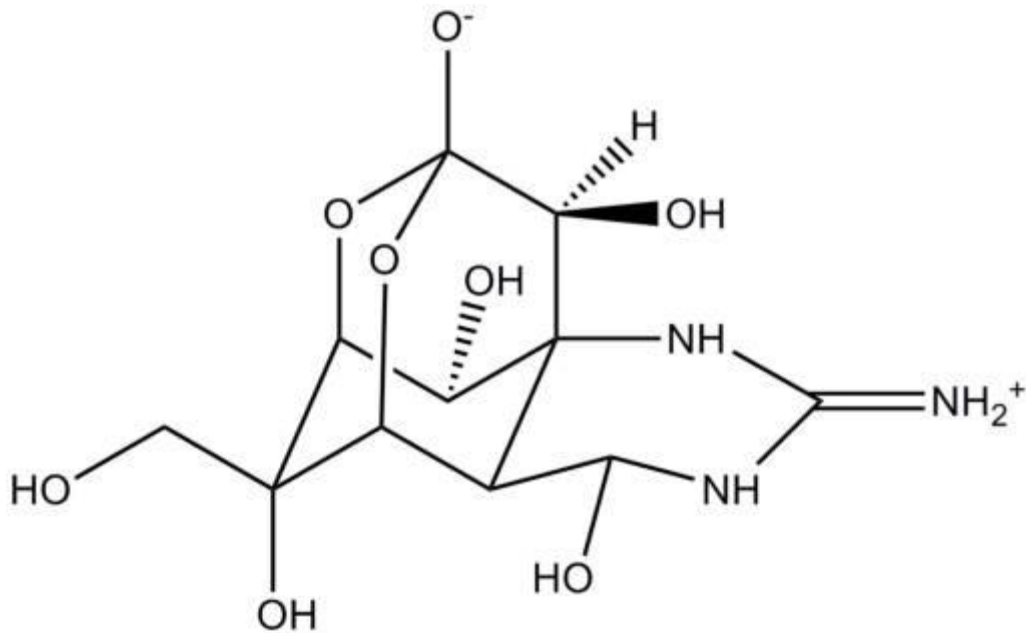
### 2.1.2. Tetrodotoksin

Riba napuhača (fugu) je cijenjena delicija u Japanu unatoč prisutnosti smrtonosnog toksina tetrodotoksina (TTX) u njezinim spolnim žlijezdama, jetri, utrobi i koži. TTX i analozi su topivi u vodi, termostabilni heterociklični spojevi s gvanidijskom skupinom pozitivnog naboja u biološkom rasponu pH (YOTSU-YAMASHITA i sur., 2003.); ne proizvode ih mikroalge nego ostali mikroorganizmi. Potvrđeno je da bakterija, klasificirana kao *Pseudomonas sp.*, kasnije izmjenjena kao *Shewanella sp.*, proizvodi TTX (YASUMOTO, 2000.). Listu bakterija koje proizvode TTX objavili su YU i sur. (2004.).

YU i sur. (2004.) i WU i sur. (2005.) otkrili su i druge bakterije koje sintetiziraju TTX, kao što su: *Microbacterium arabinogalactanolyticum*, *Serratia marcescens* i aktinomicete *Nocardiosis dassonvillei*. TTX se uglavnom koncentrira u ribama iz porodice *Tetraodontiae*, koja uključuje i ribe napuhače. Također, TTX se nalazi i u rakovima iz porodice *Xantidae*, potkovastim rakovima, nekim vodozemcima poput žaba i plavoprstenastoj hobotnici.

Otrovanja ribama napuhačama, uglavnom se događaju u Aziji, gdje je fugu riba poznata delikatesa, ali sve se više slučajeva prijavljuje i u Europi. U prvoj polovici 20. stoljeća, u Japanu je zabilježeno oko 100 smrti godišnje uzrokovanih otrovanjem fugu ribom. Stopa smrtnosti značajno se smanjila sa strožim zakonima oko pripreme i stavljanja u promet fugu riba, iako je trovanje TTX-om i dalje glavni uzrok smrtonosnih trovanja hranom u Japanu (ISBISTER i KIERNAN, 2005.).





Slika 2. Kemijska struktura tetrodotoksina (LAGO i sur., 2015.)

### 2.1.2.1. Toksokinetika

Iako toksikokinetika nije u potpunosti razjašnjena kod ljudi, serumska koncentracija TTX-om brzo pada i postaje nedetektibilna nakon 12-24 sata. Suprotno tome, TTX se u urinu može se utvrditi do 5 dana nakon ingestije (ISBISTER i KIERNAN, 2005.). Nakon jedne subkutane aplikacije u štakora, TTX je bio prisutan u bubrezima, srcu, jetri, plućima, crijevima, mozgu i krvi, dostignuvši vrhunac 20 min. nakon aplikacije. Najviše koncentracije bile su prisutne u bubrezima i srcu, dok su najniže bile u krvi i mozgu. Uočena je brza pojava visokih koncentracija u bubrezima i spor nestanak, što sugerira da se značajna količina nepromijenjenog toksina izlučuje u urinu (KAO, 1966.).

### 2.1.2.2. Mehanizam toksičnog djelovanja

TTX djeluje na živčani sustav sprječavajući širenje živčanog impulsa. Blokira provodljivost natrija, ekstracelularnim vezanjem na prvo mjesto receptora natrijevih kanala kako bi začepio vanjske pore i na taj način spriječio pristup monovalentnim kationima, blokirajući depolarizaciju membrane (ISBISTER i KIERNAN, 2005.).

### **2.1.2.3. Toksičnost**

Otrovanje TTX-om se obično manifestira u roku od nekoliko minuta, rijetko više od 6 sati nakon konzumacije kontaminirane ribe. Intoksikacija TTX-om je kategorizirana u 4 stadija. Prvi stadij uključuje oralnu paresteziju sa ili bez gastrointestinalnim simptomima. U drugom stadiju javlja se parestezija u drugim područjima i motoričku paralizu. Treći stadij uključuje mišićnu nekoordinaciju, afoniju, disfagiju, respiratorni distress, cijanozu i hipotenziju, dok u četvrtom stadiju nastupi respiratorna paraliza i jaka hipotenzija.

### **2.1.2.4. Eksperimentalna toksičnost**

#### Jednokratna aplikacija

Iako je mehanizam djelovanja TTX-a dobro poznat, o njegovoj toksičnosti za životinje imamo vrlo ograničene i zastarjele podatke. Učinci TTX-a testirani su na različitim vrstama životinja. Nakon i.p. aplikacije u miševa, minimalna letalna doza bila je 8 µg/kg, te je procijenjeno da LD<sub>50</sub> iznosi 10 µg/kg, a doze u rasponu od 12-14 µg/kg ubijaju sve miševe. Nakon s.c. i p.o. aplikacije, LD<sub>50</sub> bio je 332 i 16 µg/kg (KAO, 1966.). Slični rezultati dobiveni su u istraživanju u kojem LD<sub>50</sub> nakon i.p., s.c. i p.o. aplikacije iznose 10.7, 12.5 i 532 µg/kg. Minimalna letalna doza i letalna doza kod kunića iznosile su 3.1 i 5.3 µg/kg nakon i.m. te 3.8 i 5.8 µg/kg nakon i.v. aplikacije (XU i sur., 2003.). Kod skoro svih životinjskih vrsta, simptomi su bili slični i usporedivi. Toksični učinci uglavnom se manifestiraju na perifernom neuromuskularnom sustavu s pojavom različitih stupnjeva paralize.

TTX je jak emetik tako da je povraćanje vrlo čest simptom otrovanja kod mačaka i pasa. Štoviše, izražena je dugotrajna hipotenzija kao i hipotermija (KAO, 1966.).

### **2.1.2.5. Klinička slika**

Klinički simptomi razvijaju se brzo: raniji simptomi su senzorni, uključujući perioralnu i distalnu ukočenost i paresteziju. U blagim slučajevima otrovanja, prisutni su samo senzorni simptomi povezani s manjim gastrointestinalnim problemima (uglavnom mučnina i povraćanje). U umjereno teškim slučajevima trovanja, pacijenti razvijaju slabost distalnih mišića i slabost mišića lica, a kasnije i ataksiju s nekordinacijom uz očuvanje normalnih refleksa. Moguća je i vrtoglavica sa osjećajem "letenja". Teško otrovanje uzrokuje generaliziranu flacidnu paralizu, respiratorni zastoj i afoniju. U teškim i po život opasnim

otrovanjima, kardiovaskularni simptomi (bradikardija, hipotenzija i disritmije) nastaju zajedno s respiratornim zastojem i komom. Većina umjerenih i težih slučajeva uglavnom se razriješe nakon 5 ili više dana. U blažih slučajeva otrovanja, do potpunog oporavka dolazi u roku od nekoliko sati (ISBISTER i KIERNAN, 2005.).

#### **2.1.2.6. Liječenje**

Simptomi su vrlo slični PSP-u zbog sličnog mehanizma djelovanja toksina. Anamneza (ukoliko je moguće), zajedno sa analizom ostataka ribe i analiza seruma ili mokraće dovoljna je za potvrdu dijagnoze otrovanja tetrodotoksinom.

Ne postoji protuotrov za kliničku upotrebu. Za liječenje respiratornog zastoja i srčanih problema preporučuje se promatranje otrovanog pacijenta. Intenzivna njega nužna je u umjerenim i teškim slučajevima kako bi se spriječile komplikacije. U slučajevima teškog otrovanja može se koristiti atropin za liječenje bradikardije. Respiratorna potpora može biti potrebna tijekom 24-72 sata. Ukoliko je pacijent paraliziran i pri punoj svijesti, potrebna je sedacija. Pacijenti koji nisu umrli u roku od 24 sata, obično se potpuno oporavljaju. Kao i kod PSP-a, simptomi trovanja TTX-om u potpuno se povlače unutar 1 ili 2 dana (GESSNER, 2000.). Zanimljivo je, da bi se TTX zbog svog paralitičkog djelovanja mogao koristiti u medicini kao analgetik za liječenje bolova uzrokovanih karcinomima (LAGO i sur., 2015.).

#### **2.1.2.7. Analitičke metode i dopuštene koncentracije**

Službena metoda za otkrivanje TTX-a kod riba napuhača u Japanu je MBA (biološki testovi na miševima) (YASUMOTO, 1991.). U Sjedinjenim Američkim Državama nisu utvrđena ograničenja za TTX, ali je zabranjen uvoz ribe napuhače (GESSNER, 2000.). Istraživanje EFSA-e o rizicima za javno zdravstvo za TTX i analoge TTX-a prikupilo je podatke iz Ujedinjenog Kraljevstva, Nizozemske i Grčke o pojavnosti spomenutih toksina u školjkašima od 2006. do 2016. godine te je utvrđeno da koncentracije manje od 44 µg TTX-a ili njegove ekvivalentne toksične količine analoga po kilogramu mesa ne uzrokuju štetne učinke na ljude (Temeljeno na veličini porcije 400 g, odraslom čovjeku od 70 kg tjelesne težine i ARfD od 0.25 µg/kg) (KNUTSEN i sur., 2017.).

Razvijene su i razne druge metode za otkrivanje TTX-a, uključujući LC-MS/MS, recenzirano od TAYLOR i sur. (2008) u njihovom opisu površinskog plazmanskog rezonancijskog senzora za TTX.

Zbog ozbiljnosti intoksikacije TTX-om, javna edukacija je ključna kao oblik prevencije otrovanja ribom napuhačom (HOW i sur.,2003.). Niska stopa smrtnosti postignuta je nakon uvođenja legislative povezane sa pripremom i stavljanjem na tržište u Japanu (ISBISTER i KIERNAN, 2005.).

### 2.1.3. Domoična kiselina i analozi

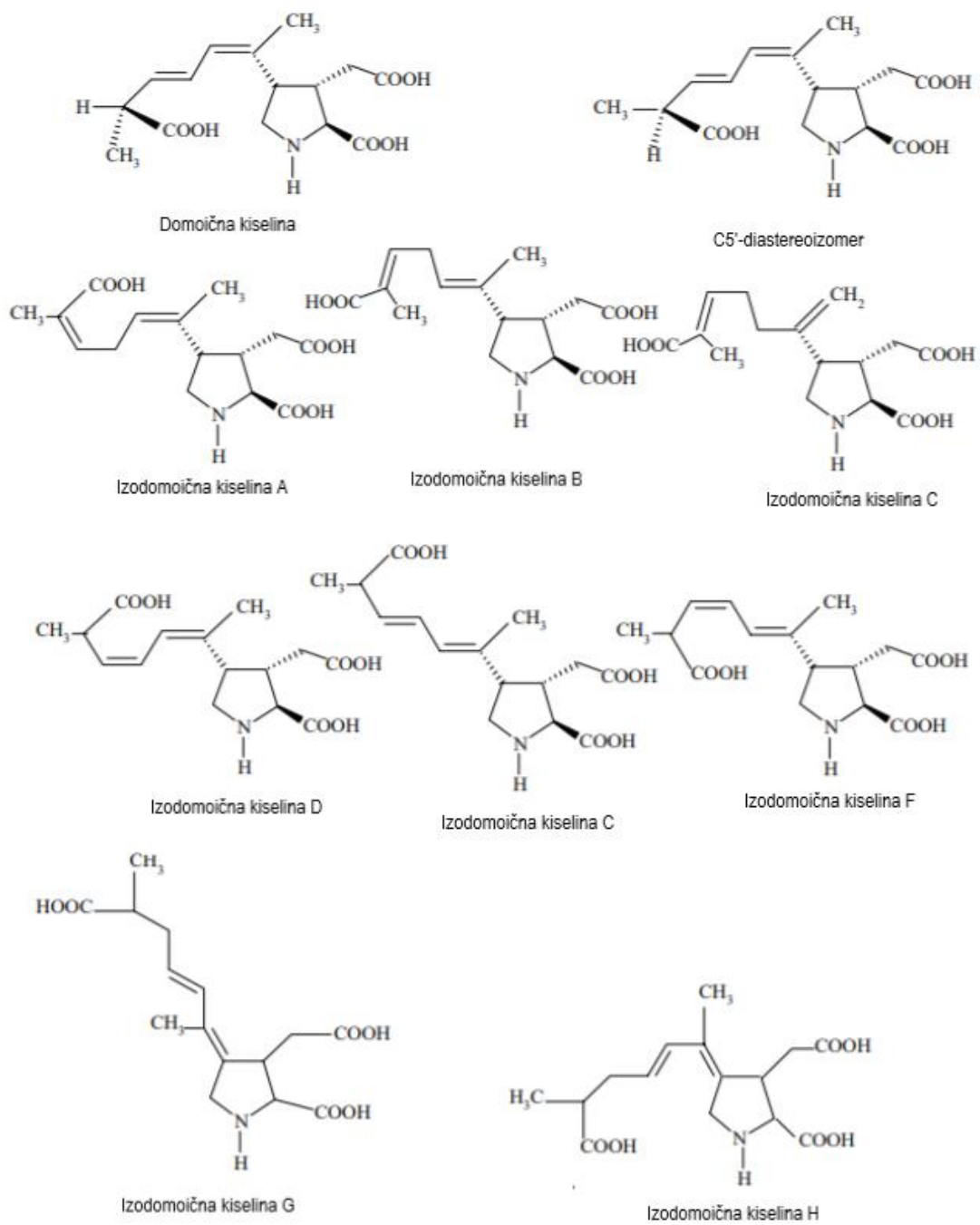
Domoična kiselina (DA) uzrokuje sindrom koji se naziva otrovanje školjkašima koje uzrokuje gubitak pamćenja (ASP) zbog konzumacije kontaminiranih školjaka. ASP se razlikuje od većine drugih neurotoksičnih morskih otrovanja po tome što ima glavni učinak na središnji živčani sustav (ISBISTER i KIERNAN, 2005.).

DA je aminokiselina kanoidne klase spojeva i 10 izomera DA-e (izodomoične kiseline A-H i DA 5'-diastereoizomer) (slika 2.) koji su manje toksični od izvornog spoja. DA i njegovi izomeri su termostabilne trikarboksilne aminokiseline koje su topive u vodi.

U početku, DA je izdvojena samo iz crvenih algi *Chorndria armata*. Nakon 1987. godine, otkrilo se da alge kremenjašice roda *Pseudonitzschia* kao *P. multiseriis*, *P. pseudodelicatissima* i *P. australis* sintetiziraju DA. Također, dokazano je da alga *Pseudonitzschia navis-varingica* sintetizira izodomoične kiseline A i B kao glavne toksine (KOTAKI i sur., 2005.).

Pokazalo se da se DA nakuplja u školjkama kao što su *Mytilus edulis*, *M. Galloprovincialis* i *Perna canaliculus* kao i kod ostalih školjkaša, poput koklina (*Cerastoderma edule*), britvaste školjke (*Siliqua patula*), čubak/češljače (*Pecten maximus*), rakova (*Cancer magister*), također i brazdaste školjke (*Scrobicularia plana*) i incuna (JEFFERY i sur., 2004.).

Školjke kontaminirane DA-om i potencijalno toksične *Pseudonitzschia ssp.* otkrivene su diljem svijeta. Iako je DA uzrokovala smrtnost ptica (putem otrovnih incuna) i ostalih životinja, jedino otrovanje ljudi potvrđeno je u Kanadi 1987. godine.



Slika 3. Kemijska struktura domoične kiseline i njezinih izomera (VAN APELDOORN i sur., 1999.)

### **2.1.3.1. Toksokinetika**

Dostupni su vrlo ograničeni podaci o apsorpciji, distribuciji, metabolizmu i izlučivanju DA, te nema značajne razlike u učincima nakon i.p. ili p.o. aplikacije. Smatra se da se DA slabo apsorbira nakon uobičajenog načina izlaganja (JEFFERY i sur., 2004.). Nadalje, u dvije studije koje uspoređuju p.o. i i.p. aplikaciju u glodavaca, uključujući male grupe (N=51 ili 2/doza) (IVERSON i sur., 1989.), DA se gotovo u potpunosti izlučio fecesom, podupirući hipotezu o svojoj apsorpciji. TRUELOVE i sur. (1996.) izvjestili su da samo 2% peroralno apliciranih doza DA (5mg/kg/dan) u glodavaca (N=510) se izlučuje urinom. Slični rezultati (Srednja vrijednost DA, dnevnog urinarnog izlučivanja bila je u rasponu od 4% do 7%) dobiveni su u majmuna *cynomolgus* (N 53) koji su bili tretirani sa subtoksičnim dozama DA tijekom 32 dana (TRUELOVE i sur., 1997.).

Nakon apsorpcije, DA se slabo metabolizira. Otprilike 75% doze DA primjenjene i.v. štakorima (N=58) izlučuje se nepromijenjeno urinom unutar 160 minuta, što ukazuje na to da se DA ne metabolizira u značajnoj mjeri prije uklanjanja iz organizma.

Nadalje, u drugoj studiji o distribuciji i izlučivanju i.v. aplicirane DA u štakora (500 i 1000 µg/kg) i majmuna, vrijeme poluraspada iznosi otprilike 20 i 110 minuta, prividni volumen raspodjele približno 300 i 180 ml/kg i klirensi od 10 i 1 ml/min/kg.

Iako je uključen ograničen broj životinja u studijama, podaci pokazuju da se i.v. aplicirana DA dobro distribuira u tjelesnim tekućinama u obje vrste te se vrlo brzo eliminira iz organizma (TRUELOVE I IVERSON, 1994.). Nakon i.v. primjene DA u štakora, ona slabo prolazi hemato-encefalnu barijeru i to ne preko specifičnog transportnog nosača (PRESTON I HYNIE, 1991.). Međutim, unatoč ograničenom transferu preko hemato-encefalne barijere, mozak je primarni organ gdje DA izaziva toksičnost.

### **2.1.3.2. Mehanizam toksičnog djelovanja**

Poznato je da se toksičnost DA u živčanom sustavu očituje na ekscitacijskim receptorima aminokiselina i sinaptičkom prijenosu. Dvije aminokiseline, L-glutamat i L-aspartat, smatraju se neurotransmiterima i djeluju na nekoliko tipova receptora. Tri podtipova receptora su opisani za ekscitacijske aminokiseline, kao npr. receptori za kainsku kiselinu (KA) i N-metil-D-aspartat. DA djeluje putem pre- i post- sinaptičkih receptora na način sličan KA, otvaranjem kanala za Ca<sup>2+</sup> i izazivanjem stanične smrti. Zbog strukturne sličnosti DA glutaminskoj kiselini i KA, DA ima snažan afinitet prema potklasama kainskih receptora. Receptori KA široko su

rasprostranjeni u mozgu sisavaca i posebno su koncentrirani u regijama CA1-CA3 hipokampusa kod glodavaca, u CA2 i CA3 regijama primata i u regiji CA3 kod ljudi. Visoki afinitet DA prema receptorima KA i lokalizacija tih receptora na mjestima gdje DA uzrokuje oštećenja mozga glodavaca i primata, ukazuju na to da receptori DA i KA igraju glavnu ulogu u toksičnom odgovoru. Čini se da vezanje DA na podtipove receptora glutamata potiče pucanje neurona, izazivajući ekscitacijski odgovor *in vivo* i *in vitro*.

Iako točan mehanizam neuronske stimulacije koja dovodi do oštećenja tkiva mozga nije u potpunosti shvaćen, uočen je priljev iona  $Ca^{2+}$  u stanice tkiva mozga izloženih DA i povećana razina  $Ca^{2+}$  u hipokampalnim piramidalnim neuronima. Čini se da vezanje DA za receptore glutamata u specifičnim regijama mozga dovodi do ekscitacija, što rezultira prilivom  $Ca^{2+}$  i neuspješnim održavanjem intracelularne homeostaze iona i konačno smrti stanice (JEFFERY i sur., 2004.).

### **2.1.3.3. Toksičnost**

Izbijanje ASP-a u Kanadi, 1987. godine nakon ingestije dagnji (*M. edulis*) očitivalo se gastrointestinalnim i neobičnim neurološkim simptomima. Iako je zabilježeno otprilike 150 izvještaja o ovoj bolesti, samo je 107 pojedinaca imalo kliničku dijagnozu otrovanja (JEFFERY i sur., 2004.). Najčešći gastrointestinalni simptomi bili su povraćanje (76%), grčevi u trbuhu (50%) i proljev (42%); najčešći neurološki simptomi su bili glavobolja (43%) i gubitak kratkoročnog pamćenja (25%) (NIJJAR I NIJJAR, 2000.). Teška otrovanja koja su rezultirala hospitalizacijom očitivala su se kod 19 ljudi: 12 pojedinaca s posebno teškim simptomima (npr. napadaji, koma, nestabilan krvni tlak) zahtijevali su liječenje u jedinicama intenzivne njege. U većine pacijenata bila je prisutna somnolencija, u nekim slučajevima i koma, a u blaže otrovanih pacijenata uznemirenost. Kardiovaskularni simptomi (tahikardija, hipotenzija i aritmije) najvjerojatnije su posljedica disfunkcije središnjeg živčanog centra, jer nije bilo prisutnih poremećaja kardiovaskularnog sustava. U većine pacijenata simptomi nestaju za nekoliko tjedana, ali mogući su perzistirajući poremećaji pamćenja (DOBLE, 2000.). Tri hospitalizirana pacijenta umrla su 11-24 dana nakon konzumacije dagnji, a četvrti pacijent je umro od infarkta miokarda u roku od 3 mjeseca.

Postmortem histološka pretraga utvrdila je nekrozu neurona i astrocitozu, najistaknutiju u hipokampusu i jezgrama amigdale (NIJJAR I NIJJAR, 2000.). U devet slučajeva otrovanja, procjena izloženosti DA izvedena je iz analize školjaka prikupljenih u kućanstvima i

restoranima. Količina unesene DA kretala se u rasponu od 60 do 290 mg u otrovanih ljudi. Stoga se čini da je količina od 60 mg DA/osobi (<1 mg/kg) dovoljna da bi izazvala gastrointestinalne simptome, dok je ingestija 270 mg DA/kg (<4.5 mg/kg) dovoljna za izazivanje neuroloških poremećaja (JEFFERY i sur., 2004.).

#### **2.1.3.4. Eksperimentalna toksičnost**

##### **Jednokratna aplikacija**

Nakon i.p. aplikacije ekstrakta kontaminiranih dagnji u miševa, vrijednosti LD<sub>50</sub> za dvije različite studije bile su 2.4 i 3.6 mg DA/kg. Primjećeni su klinički simptomi poput svrbeža, tremora i napadaja i u smrtonosnim i subletalnim dozama ekstrakta.

Lezije na mozgu (edem u hipotalamusu i hipotalamičkoj lučnoj jezgri i neuronske degeneracije u različitim područjima hipokampusa) miševa i štakora su pronađene nakon i.p. i p.o. aplikacije ekstrakta školjki koje sadrže DA (IVERSON i sur., 1989.). Slični učinci zabilježeni su u studijama primata nakon i.p. i i.v. aplikacije. Jaka povraćanja i svrbež zabilježeni su nakon jednokratne i.v. aplikacije DA (0.24, 0.5, 1, 1.25, 1.5, 2 i 4 mg/kg) u majmuna *cynomolgus* s različitim vremenom pojave simptoma ovisno o dozi.

Doze DA veće od 1.0 mg/kg izazvale su smrt zbog prestanka disanja u 4 od 7 životinja. Postmortem pregledom utvrđene su lezije u hipokampusu (SCALLET, 1995.), a u sličnom istraživanju koje je upotrebljavalo specijaliziranu histokemiju, čini se da je talamus također zahvaćen (SCHMUED i sur., 1995.).

##### **Ponavljane aplikacije**

Nakon 64-dnevne p.o. izloženosti mužjaka i ženki štakora (0.01 ili 5 mg/kg/dan DA), nije bilo promjena u kliničkoj slici, hematološkim i biokemijskim nalazima ili histopatološkim parametrima (JEFFERY i sur., 2004.). Ni kliničkih simptoma, niti značajnih promjena tjelesne težine, hematoloških, biokemijskih ili histoloških (mozak) parametara nije bilo nakon izloženosti *cynomolgus* majmuna DA (0.5 mg/kg/dan tijekom 15 dana i 0.75 mg/kg/dan za daljnjih 15 dana) (TRUELOVE i sur., 1997.).



### **2.1.3.5. Teratogenost**

Istraženi su učinci DA (0-2 mg/kg) dnevno aplicirane gravidnim štakoricama od 7 do 16 gestacijskog dana te ispitivanje rezultata 22. gestacijskog dana na majkama i potomcima. Smrt majki je zabilježena samo u viših doza DA (6/12 i 6/9 pri 1.75 i 2.0 mg/kg). U dozama većim od 0.5 mg/kg/dan zabilježena su uginuća fetusa, ali broj uginulih nije bio ovisan o većoj dozi. Nije bilo značajnog porasta broja fetusa sa visceralnim i skeletalnim anomalijama (KHERA i sur., 1994.).

### **2.1.3.6. Genotoksičnost**

Budući da struktura DA sadrži dio butadiena, postoji mogućnost za formiranje DNA reaktivnih epoksida *in vivo*. Iako su na raspolaganju samo ograničeni podaci o mogućoj genotoksičnosti, DA (87 ili 174 uM) ne povećava učestalost mutacije u V79 plućnim stanicama kineskog hrčka *in vitro*, mjerenih rezistencijom na tioguanin ili ouabain, izmjenom sestrinskih kromatida ili mikrojezgrenim testom, niti ne povisuje razinu DNA reaktivnih metabolita (JEFFERY i sur., 2004.). Nema podataka o karcinogenosti DA *in vivo*.

### **2.1.3.7. Klinička slika**

Otrovanje se prvi put pojavljuje u Kanadi 1987. godine kada su nakon konzumiranja kontaminiranih dagnji, ljudi razvili gastrointestinalne simptome u roku od 24 sata (povraćanje, abdominalni grčevi i proljev) i/ili neurološki simptomi unutar 48 sata (glavobolja, gubitak kratkoročnog pamćenja, dezorijentacija, letargija, napadaji a ponekad konvulzije i koma). Budući da je najrelevantniji klinički učinak bio gubitak pamćenja, stanje je nazvano ASP. Gubitak pamćenja pacijenata, intoksiciranih kontaminiranim školjkama bio je sličan simptomima Alzheimerove bolesti. Međutim, simptomi Alzheimerove bolesti su uglavnom prisutni u starijih ljudi i intenziviraju se sa dobi, dok na gubitak memorije u pacijenata kontaminiranih DA-om ne utječe dob.

### **2.1.3.8. Liječenje**

Dijagnoza se temelji ingestiji školjkaša praćenoj karakterističnim simptomima. Programi nadzora fitoplanktona u rizičnim regijama mogu nam ukazati na mogućnost postojanja otrovanja. Zbog rizika od konvluzija, nije uputno izazivati povraćanje. Teški slučajevi

zahtjevaju intenzivnu njegu i nadzor zbog konvulzija, depresije centralnog živčanog sustava, kardiovaskularnog kolapsa ili želučanih krvarenja. Liječenje je simptomatsko i nema protuotrova (GULLAND i sur., 2002.).

#### **2.1.3.9. Analitičke metode i dopuštene koncentracije**

Nakon izbijanja ASP-a 1987. godine, regulatorne granice za meso školjkaša uvedene su u Kanadi i kasnije u drugim državama. Granica od 20 mg/kg, temelji se na retrospektivnoj procjeni količine DA u školjkama iz 1987. koje su rezultirale izbijanjem ASP-a u Kanadi i uvođenja sigurnosnih protokola.

Također, u istraživanju o prisutnosti DA u školjkašima od strane Belgijskog programa kontrole hrane od 2004. do 2009. godine, utvrđeno je da je najviši postotak pozitivnih uzoraka bio u češljačama i mekušcima (ANDJELKOVIC i sur., 2012). Slična studija u Hrvatskoj koja je obuhvatila iste vrste školjkaša, otkrila je da u razdoblju od 2006. do 2008. godine DA bila najzastupljenija u plavoj dagnji (*Mytilus galloprovincialis*), a slijede ju Europska kamenica (*Ostrea edulis*), jakobova kapica (*Pecten jacobaeus*) i proteus školjka (*Flexopecten proteus*) (UJEVIĆ i sur., 2010).

Zbog svjetske distribucije dijetomeja koje proizvode DA, granica koju koristi Kanada je također i granica koja je na snazi u Europskoj uniji, SAD-u, Novom Zelandu i Australiji (JEFFERY i sur., 2004.). Kao metoda izbora, HPLC-UV se preferira u raznim zemljama (FAO/IOC/WHO, 2005.).

EFSA je 2009. godine objavila mišljenje kojim preporučuje da je sigurno konzumirati školjke koje sadrže manje od 4.5 mg DA/kg školjkaša, kako se ne bi prekoračila akutna referentna doza (ALEXANDER i sur., 2009a.).

#### **2.1.4. Okadaična kiselina i derivati**

Okadaična kiselina (OA) i njeni derivati izazivaju nastanak bolesti koja se naziva DSP (otrovanje školjkašima koji uzrokuju dijareju). Bolest nije fatalna te bez ikakvog liječenja prolazi u roku od 3 dana. Ipak, DSP je važan uzrok oboljevanja u cijelom svijetu, što uzrokuje ozbiljne probleme industriji školjaka i zakonskoj regulaciji.

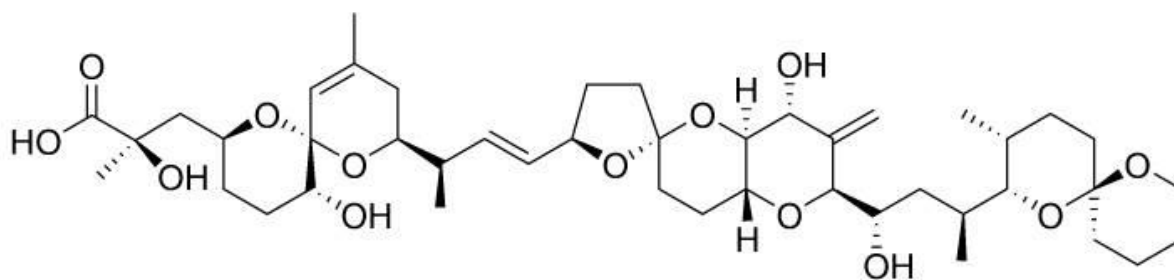
DSP toksini su topljivi u lipidima i termostabilni polieteri, uključujući OA i njezine derivate, dinofizne toksine (DTX), od kojih su najzastupljeniji DTX-1, DTX-2 i DTX-3. OA,

glavni toksin koji uzrokuje DSP koji je izoliran iz spužve *Halichondria okadai*, sintetiziraju dinoflagelati roda *Dinophysis*, slično kao i DTX-1 i DTX-2. Ove spojeve također sintetiziraju dinoflagelati roda *Prorocentrum*, ali se sporadično otkrivaju u fitoplanktonu tijekom izbijanja DSP-a. DTX-3, mješavina OA, DTX-1 i/ili DTX-2 (esterificirani s masnom kiselinom na 7-hidroksidnoj grupi) je metabolički produkt školjki, a ne algalni metabolit (TUBARO i sur., 2008a). Prva dokumentirana vrsta dinoflagelata uključena u DSP bila je *D. fortii* u Japanu te kasnije i u drugim područjima. Ostale vrste, poput *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. caudata*, *D. mitra*, *D. norvegica*, *D. rotundata*, *D. tripos*, *D. sacculus* i *D. trunculus* su također prijavljeni kao izvori DSP toksina.

Prozvodnja toksina se znatno razlikuje između vrsta i može varirati s obzirom na regionalne i sezonske monotipove unutar jedne vrste (HALLEGRAEFF, 2003.). Nekoliko školjkaša, poput dagnji, češljača, kamenica i drugih, filtriranjem morske vode i toksičnog fitoplanktona, mogu akumulirati toksine i izazvati otrovanja nakon ingestije.

Prva dokumentirana intoksikacija ljudi uzrokovana DSP-om bila je u Nizozemskoj 1961. godine. Danas se visoke razine toksina skupine OA prijavljuju u školjkama ili algama uz obale Europe (Velika Britanija, Irska, Danska, Švedska, Norveška, Francuska, Španjolska, Italija, Portugal, Nizozemska i Belgija), Kanade, Južne Amerike (Čile), Japana, Australije i Afrike (Maroko) (GERSSEN i sur., 2010.).

Jedan od velikih slučajeva izbijanja DSP-a, u koji je bilo uključeno više od 300 ljudi, dogodio se u Italiji u rujnu 2010. godine. Kasnije, 2011. godine, prvo dokumentirano izbijanje DSP-a u Sjevernoj Americi dogodilo se na sjeverozapadu Tihog oceana: prijavljeno je više od 60 slučajeva koji se dovode u vezu sa školjkama prikupljenim na otoku Salt Spring, British Columbia, Canada i na jugu, 3 slučaja povezanih sa školjkama u Sequim Bay-u i Washingtonu (NOAA, 2011.). LC-MS/MS analiza otkrila je prisutnost DTX-a i njegovih estera masnih kiselina. Čini se da su slučajevi DSP-a i produkti alga u obliku OA u porastu, ali moguće je da na takvu percepciju utječe opširnije znanje o samoj bolesti i programi nadzora.



Slika 4. Kemijska struktura okadaične kiseline (GERSSEN i sur., 2010)

#### 2.1.4.1. Toksokinetika

24 sata nakon jednokratne peroralne aplikacije [ $^3\text{H}$ ] OA u miševa (50 i 90  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), toksin je detektiran u svim organima i tekućinama, uključujući kožu, a najviše koncentracije bile su u urinu, crijevnom sadržaju i crijevu. Sporo uklanjanje OA ukazivalo je na enterohepatičku cirkulaciju (MATIAS i sur., 1999.). Studija autora ITO i sur. (2002a.) utvrdila je da nakon većih oralnih doza OA u miševa (75-250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), toksin se brzo apsorbira iz tankog crijeva, uglavnom jejunuma, te ulazi u jetru unutar 5 minuta.

Distribucija toksina, prosuđena imuno obojavanjem, zahvaćalo je cijelo tijelo, a u plućima, jetri, srcu, bubrezima i crijevima mogao se otkriti čak i nakon 2 tjedna. Izlučivanje iz bubrega i crijeva počinje 5 minuta nakon aplikacije, dok se eliminacija kroz izmet nastavlja kroz 4 tjedna.

Druga imunohistokemijska studija nakon akutne oralne aplikacije OA u miševa (115 i 230  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) pokazala je prisutnost niskih količina toksina u jetri 24, odnosno 48 sati kasnije; toksin je otkriven u dvanaestniku i ileumu (lokaliziran u mukoznom sekretu vrčastih stanica), ali ne i u izlučevinama debelog crijeva (LE HÉGARAT i sur., 2006.). Dakle, nakon akutne peroralne primjene miševima, OA se distribuirala sljedećim redosljedom: sadržaj crijeva > urin > izmet > crijeva > tkivo > pluća > jetra > želudac > bubreg > krv (TOYOFUKU, 2006.). Nakon i.p. ubrizgavanja [ $^3\text{H}$ ] OA miševima (14 $\mu\text{Ci}/0.2\text{mL}$ ), većina radioaktivnosti (33%) otkrivena je u gastrointestinalnom sadržaju 3 sata kasnije, dok je 5% bilo izmjereno nakon 19 sati. U jetri je 27 i 16% radioaktivnosti otkriveno nakon 3 i 19 sati, što vjerojatno ukazuje na hepatobilijarnu cirkulaciju (FUJIKI i SUGANUMA, 1993.; NISHIWAKI i sur., 1994.).

Nakon i.m. injekcije  $^3\text{H}$  OA u miševa (25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), toksin je otkriven u žuči i sadržaju crijeva 1 sat kasnije, a njegov oblik eliminacije ukazivao je na bilijarnu ekskreciju i

enterohepatičku cirkulaciju. Opažen je i prolazak OA preko placente kod miševa (MATIAS i CREPPY, 1996.).

U slučajevima otrovanja ljudi uslijed ingestije dagnji kontaminiranih DTX-3-om, utvrđeno je da se DTX-3 biotransformira u DTX-1, što je bio jedini DSP toksin otkriven u izmetu (GARCIA i sur., 2005.). *In vitro* studija koja je koristila Caco-2 stanice kao model ljudske crijevne barijere otkrila je da izloženost jednoslojnih stanica niskoj razini OA (20-200nM) omogućava samo ograničeni prolazak toksina iz lumena u krv, što ukazuje na aktivni transportni mehanizam za eliminaciju OA (EHLERS i sur., 2011.).

Druga studija *in vitro*, otkrila je biotransformaciju OA u oksigenirane metabolite pomoću dva jetrena P450 citokroma – proces za koji se čini da ne detoksicira OA (GUO i sur., 2010.).

#### **2.1.4.2. Mehanizam toksičnog djelovanja**

OA i DTX-1 uglavnom inhibiraju proteinske fosfataze 1 i 2A, dva enzima koji defosforiliraju serinske/treoninske ostatke eukariotskih staničnih proteina (BIALOJAN i TAKAI, 1988.). Proljev i degenerativne promjene u apsorpcijskom epitelu tankog crijeva inducirane toksinima posljedica su povećanih razina fosforiliranih proteina koji kontroliraju izlučivanje iona u stanicama crijeva i citoskeleta i/ili elemenata koji reguliraju propusnost otopljenih tvari: ovi procesi rezultiraju pasivnim gubitkom tekućine (DOMÍNGUEZ i sur., 2010.). Inhibicija proteinskih fosfataza također je uključena u druge procese, uključujući tumor-promotorska svojstva ovih toksina (FUJIKI i SUGANUMA, 1993.).

#### **2.1.4.3. Toksičnost**

Utvrđena je LOAEL (najniža razina pri kojoj je vidljiv štetni učinak) od 0.8 µg OA ekvivalenta/kg te ARfD (akutna referentna doza) od 0.3 µg OA/kg (EFSA, 2008a.).

Jednokratna primjena

Nakon pojedinačnih i.p. injekcija u miševa, raspon  $d_{50}$  OA bio je od 192 do 225 µg/kg (TUBARO i sur., 2008.a). LD<sub>50</sub> od 352 µg/kg za DTX-2, te relativna jakost od 0.6 procijenjena u odnosu na OA, koja je pripisana aksijalnoj 35-metilnoj skupini DTX-2 koja bi dovela do nižeg afiniteta za PP2A (AUNE i sur., 2007.; HUHN i sur., 2009.). I.p. aplikacija OA ili DTX-1 (≥ 200 i 375 µg/kg) u glodavaca (miševi i štakori) uzrokovala je oštećenja na crijevnoj sluznici, osobito dvanaesniku i gornjem dijelu jejunuma, unutar 15 minuta.

Oštećenja se mogu podijeliti u 3 uzastopna stadija: povećanja propusnost kapilara i ekstavazacija seruma u lamini propriu vila, degeneracija apsorpcijskog epitela vila i deskvamacija degeneriranog epitela lamine proprie. U subletalnim dozama, ove su promjene reverzibilne, te proces oporavka je potpun u roku od 24 sata (TERAO i sur., 1986., 1993.; ITO i TERA0, 1994.).

Morfološke promjene izazvane DTX-3-om manje su izražene i sastoje se samo od dilatacije cisterni Golgijevog aparata i prisutnosti vezikula u citoplazmi apsorptivnog epitela (TERAO i sur., 1993.). I.p. injekcija OA, DTX-1 ili DTX-3 kod glodavaca također izaziva oštećenje jetre, vakuolizaciju i/ili nekrozu hepatocita (TERAO i sur., 1993.; ITO i TERA0, 1994.; AUNE i sur., 1998.; TUBARO i sur., 2003.). Oštećenje jetre nakon i.v. aplikacije u štakora, sa kongestijom krvi u jetri i otapanjem epitelnih stanica jetre i žuči (BERVEN i sur., 2001.). OA, DTX-1 i DTX-3 su p.o. manje toksični nego i.p..

Peroralnim putem, LD<sub>50</sub> za OA kod miševa je 1 i 2 mg/kg (TUBARO i sur., 2003.). Pored proljeva, znakovi toksičnosti slični su onima koji su primjećeni nakon i.p. aplikacije. DTX-1 i DTX-3 također uzrokuju degeneraciju površinskih stanica sluznice želuca (TERAO i sur., 1993.; ITO i TERA0, 1994.; ITO i sur., 2000.; BERVEN i sur., 2001.).

#### Ponovljena primjena

Svakodnevno ponavljano peroralno davanje OA miševima (1 mg/kg/dan tijekom 7 dana) izazvalo je proljev, gubitak tjelesne težine, smanjenu potrošnju hrane i smrt 2 od 5 miševa nakon 5 dana. Toksični učinci zabilježeni su na potrbušnici i jetri, dok su ultrastrukturalne promjene uočene u kardiomiocitima (mitohondriji i vlakna) (TUBARO i sur., 2004.).

#### **2.1.4.4. Mutageno i genotoksično djelovanje**

Iako OA nije mutagena u *S. typhimurium* u odsutnosti ili prisutnosti metaboličke aktivacije, ona je mutagena u različitim eukariotskim stanicama *in vitro* (AUNE i YNDESTAD, 1993.; FESSARD i sur., 1996.). Nema podataka o genotoksičnosti za DTX-2 i DTX-3. Genotoksični učinci od strane OA, poput stvaranja mikronukleusa, zaustavljanja mitoze i poliploidija uočene su u ljudskim Caco-2 stanicama (LE HÉGARAT i sur., 2006.). OA nije prijavljena ni na jednom od popisa Međunarodne agencije za istraživanje raka.

#### **2.1.4.5. Aktivnost koja potiče nastanak tumora**

OA I DTX-1 su promotori rasta tumora, o čemu svjedoče 2 studije karcinogeneze na mišjoj koži (FUJIKI i SUGANUMA, 1993.) i žlijezdanom želucu štakora (SUGANUMA i sur., 1992.).

#### **2.1.4.6. Klinička slika**

Simptomi DSP-a su uglavnom probavni poremećaji, proljev, mučnina, povraćanje i abdominalni grčevi koji nastaju između 30 min. i nekoliko sati nakon konzumacije kontaminiranih školjkaša. Intoksikacija može brzo oslabiti kroz nekoliko dana, te nisu zabilježeni smrtni slučajevi od DSP-a. Potpuni oporavak unatoč liječenju nastupa za 3 dana.

#### **2.1.4.7. Liječenje**

Liječenje DSP-a je simptomatsko i potporno u vidu nadoknade tekućine i elektrolita. Općenito, hospitalizacija nije potrebna. Ostale bolesti koje uzrokuju proljev, povezane sa konzumacijom školjkaša, poput bakterijske i virusne kontaminacije, treba isključiti na temelju anamneze pacijenata (AUNE i YNDESTAD, 1993.).

#### **2.1.4.8. Analitičke metode i dopuštene koncentracije**

Monitoring DSP-a se provodi praćenjem toksina u morskoj hrani: učestalost uzrokovanja treba osigurati da kontaminacija ne poraste na opasne razine s obzirom na vrijeme ili mjesto uzrokovanja. Programi monitoringa također bi trebali ocijeniti fitoplanktonske organizme koji sintetiziraju toksin. Kada se to postigne u stvarnom vremenu, potencijalno toksično "cvijetanje" može se otkriti ranije s obzirom na naknadni postupak otkrivanja kontaminacija školjaka pomoću kemijske analize.

Primjer za to je potvrđena OA u američkim školjkama: iako je OA bila kasnije otkrivena u Teksaskim školjkama pomoću LC-MS/MS (DEEDS i sur., 2010.), žetva školjaka je obustavljena zbog otkrivanja "cvijetanja" (*Dinophysis*) instrumentom "FlowCytobot" (CAMPBELL i sur., 2010.).

Za analizu DSP toksina razvijene su različite metode, uključujući in vivo biotestove i in vitro biokemijska ili biološka ispitivanja, kao i neke kemijske analize. MBA je prihvaćena

metoda za određivanje DSP toksina u školjkama, jer može otkriti sve DSP toksine, iako ostali lipofilni spojevi mogu interferirati sa njima. Ta metoda procijenjuje vrijeme preživljavanja za miševе s i.p. apliciranom suspenzijom ekstrakta školjki tijekom 24-satnog razdoblja promatranja (FERNÁNDEZ i sur., 2003.).

Imunološka ispitivanja uključuju Imunoenzimni test (ELISA kitovi su komercijalno dostupni) ili radioimunotest i imunokromatografski testovi s bočnim protokom koji se temelje na referentnim vrijednostima, te su sada komercijalizirani. Testovi inhibicije proteinske fosfataze 2A posebno su osjetljivi testovi, temeljeni na mehanizmu djelovanja OA i komercijalizirani u formatima testnih kompleta. Kemijske metode analize uključuju HPLC, kapilarnu elektroforezu i LC-MS tehniku (QUILLIAM, 2003.).

Najveća dopuštena razina ovih toksina je 160 µg OA ekvivalenata/kg mesa školjkaša (EUROPSKA KOMISIJA, 2002.). EFSA je 2008. godine dala mišljenje o OA i analogima, kojim preporučuju da ne bi smjeli prelaziti 45 µg OA-ekvivalenta/kg školjki kako ne bi premašili ARfD. Što se tiče kontrole DSP toksina, njihova regulacija u većini zemalja temelji se na negativnim rezultatima MBA uzoraka školjkaša. Europska unija postupno ukida MBA (EUROPSKA KOMISIJA, 2011.), koja će biti zamijenjena LC-MS/MS metodom koja je interlaboratorijski validirana u Europskom referentnom centru za Morske biotoksine (VILLAR-GONZÁLEZ i sur., 2011.).

Alternativne ili komplementarne metode mogu biti korištene ukoliko su validirane; međutim, postoje bitne prednosti u korištenju LC-MS/MS za praćenje lipofilnih toksina, jer je moguće otkriti nekoliko klasa toksina odjednom.

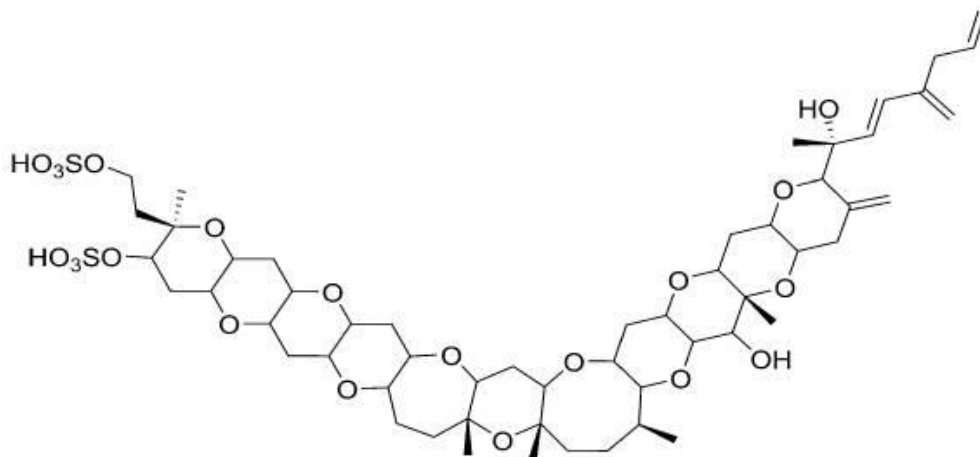
### **2.1.5. Yessotoksini**

Yessotoksini (YTX) su policiklički eteri u obliku ljestvi koji je prvi put izoliran iz školjke *Patinopecten yessoensis*. YTX i njegovi analogi u početku su bili uključeni u DSP skupinu, a otkriveni su s OA i ostalim lipofilnim toksinima tijekom ekstrakcije školjkaša za biološku analizu DSP-a.

Nakon toga, YTX su odvojeno klasificirani i regulirani, jer ne izazivaju proljev. Više od 30 analoga YTX izolirano je od školjkaša ili mikroalgi, a do danas je otkriveno oko 100 analoga. YTX proizvode dinoflagelati poput *Protoceratium reticulatum* (= *Gonyaulax grindley*), *Lingulodinium polyedrum* (= *Gonyaulax polyeda*) i *Gonyaulax spinifera*. Budući da su ove vrste



algi uobičajene u obalnim vodama mnogih regija, YTX se pojavljuju širom svijeta, a uslijed njihove karakteristične prehrane filtriranjem, jestive školjke mogu koncentrirati ove spojeve (PAZ i sur., 2008.).



Slika 5. Kemijska struktura yessotoksina (GERSSSEN i sur., 2010)

#### 2.1.5.1. Toksokinetika

Dvadeset i četiri sata nakon p.o. aplikacije YTX-a u miševa (1 i 5 mg/kg), najviše razine toksina pronađene su u ileumu, a slijede ga kolon, jejunum i duodenum, bubrezi, slezena, srce i krv (AASEN i sur., 2011.). Dvadeset i četiri sata nakon posljednjeg davanja miševima (1 mg YTX/kg/dan tijekom 7 dana), TUBARO i sur. (2008b.) otkrili su srednju koncentraciju YTX-a u krvi od otprilike 6 ng/ml (5nM) metodom ELISA. Nema podataka o metabolizmu YTX-a.

#### 2.1.5.2. Mehanizam toksičnog djelovanja

Iako niske koncentracije YTX-a utječu na mnoge sustave *in vitro*, neki od ovih učinaka nisu potvrđeni *in vivo* nakon p.o. izloženosti. Mehanizam djelovanja YTX-a još nije utvrđen. Smatra se da YTX inducira kaspaze koje aktiviraju apoptozu, otvara tranzicijske pore mitohondrija, narušava odlaganje proteina i fagocitnu aktivnost, kako bi utjecali na citoskeletne komponente i modulirali unutarstaničnu razinu  $Ca^{2+}$  i cAMP-a. Također, YTX smanjuje srčanu frekvenciju (TUBARO i sur., 2010.).

### 2.1.5.3. Toksičnost

Nema podataka o trovanju ljudi YTX-ima. Doza od 5 mg/kg je usvojena kao najviša razina ne primjećениh nuspojava za akutnu kardiotoksičnost YTX-a, temeljenih na rezultatima svjetlosne mikroskopije u miševa. Uutvrđen je ARfd od 25 µg YTX ekvivalenata/kg (EFSA, 2008c.). Samo su YTX, de-sulfo-YTX, homo-YTX i 45-OH-homoYTX podvrgnuti stvarnim toksikološkim studijama.

#### Jednokratna primjena

Nakon i.p. aplikacije u miševa, vrijednosti LD<sub>50</sub> varirale su od 100 do 750 µg/kg za YTX i homoYTX, dok 45-OH-homoYTX nije bio smrtonosan pri 750 µg/kg (TUBARO i sur., 2010.). Svjetlosnim mikroskopom uočen je samo mali unutarstanični edem u srcu kod životinja tretiranim s 750 i 1000 µg/kg (AUNE i sur., 2002.). Elektronskim mikroskopom otkriveno je oticanje kardiomiocita i zaobljeni mitohondriji (TERAO i sur., 1990.; AUNE i sur., 2002.; TUBARO i sur., 2003.).

Uočena su oštećenja Purkinjeovih stanica malog mozga nakon i.p. injekcije YTX-a (420 µg/kg), ali to nije potvrđeno nakon p.o. primjene (HUNGERFORD, 2006.). Nakon p.o. primjene, YTX-i su mnogo manje toksični. Nisu zabilježeni znakovi toksičnosti ili smrtnost kod miševa nakon akutne primjene YTX-a (0.5-10 mg/kg). Samo su primjećene ultrastrukturne promjene u miokardu, slične onima opisanim nakon i.p. injekcije (TERAO i sur., 1990.; AUNE i sur., 2002.; TUBARO i sur., 2003.).

Iako YTX inducira apoptozu *in vitro* u različitim staničnim linijama, nisu primjećene apoptotske promjene u miokardu miševa TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) bojanjem *in situ* (TUBARO i sur., 2003.).

#### Ponovljena primjena

Nakon višekratne p.o. primjene kroz 7 dana, nisu zabilježena uginuća, promjene u ponašanju, rastu ili makroskopske promjene za YTX (1 i 2 mg/kg/dan), homoYTX i 45-OH-homo YTX (1 mg/kg/dan).

Jedino su zabilježene ultrastrukturne promjene u kardiomiocitima (zaobljeni mitohondriji i promjene graničnih stanica) (TUBARO i sur., 2004.). Ove ultrastrukturne promjene su također primjećene 30 dana nakon posljednje primjene YTX-a (1 mg/kg/dan), ali nestaju unutar 90 dana (TUBARO i sur., 2008.b).

U drugoj studiji, miševi su bili izloženi YTX-u sedam puta u 21 dan (1-5 mg/kg) i žrtvovani 3 dana nakon posljednjeg tretmana: elektronskim mikroskopom u miokardu nađene su vakuole pri najvećim dozama toksina (ESPENES i sur., 2006.).

#### **2.1.5.4. Analitičke metode i dopuštene koncentracije**

Zbog nedostatka dokaza o štetnim učincima na ljude te značajno smanjene potentnosti nakon peroralne primjene u usporedbi s i.p. aplikacijom u miševa, utvrđena je razina od 1 mg ekvivalenta YTX/kg školjki. Razine YTX-a koje prelaze trenutnu zakonom propisanu najvišu razinu u EU (1 mg/kg) povremeno su pronađene u Italiji, Norveškoj i Portugalu (DRAISCI i sur., 1999.; AASEN i sur., 2005a.; VALE i sur., 2008.). Prema istraživanju EFSE, ukoliko školjke ne prelaze koncentraciju od 3,75 mg YTX-ekvivalenta/kg školjke, smatraju se sigurnim za potrošače (ALEXANDER i sur., 2009b.).

Za regulatorne potrebe, LC-MS/MS je usvojena kao referentna metoda za otkrivanje YTX-a u školjakama u Europskoj Uniji, ali se mogu koristiti i alternativne ili komplementarne metode (EUROPSKA KOMISIJA, 2011.).

#### **2.1.6. Azaspirna kiselina**

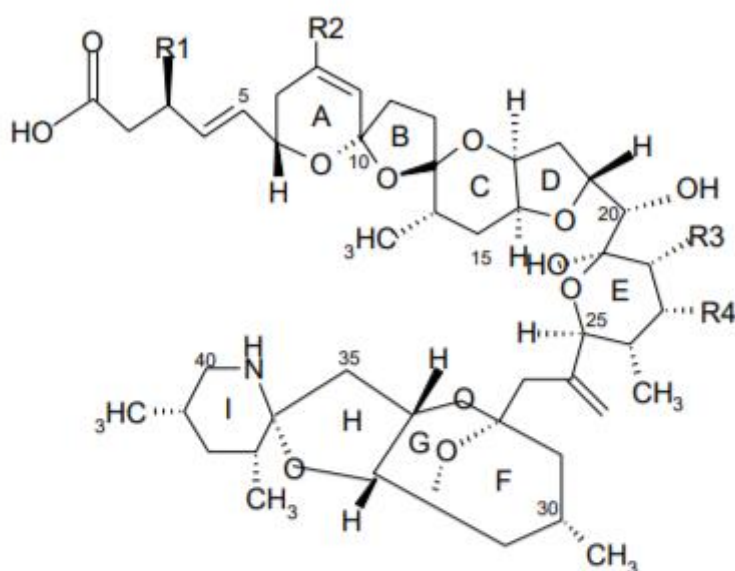
Otrovanje Azaspirnom kiselinom (AZP) relativno je nedavna pojava. Prvi put, bolest je prijavljena 1995. godine u Nizozemskoj kada se osam osoba razboljelo nakon ingestije plavih dagnji iz Irske. Žrtve su razvile simptome vrlo slične simptomima DSP-a, unatoč niskom sadržaju OA i njegovih derivata. Nakon toga, otkrivena je grupa Azaspirnih toksina.

Stukturalna shema prvog AZP toksina, azaspiracid 1 (AZA1), otkrila je njegovu poliestersku strukturu s jedinstvenim spiralnim prstenom, cikličkim aminom i karboksilnom kiselinom. Identificirano je više od 30 analoga, ali AZA1, AZA2 i AZA3 su najzastupljeniji prema pojavnosti i toksičnosti (TWINER i sur., 2008.; EFSA, 2008.b).

AZA-i, prvi puta identificirani u plavim dagnjama (*M. edulis*), pronađeni su i u drugim školjkama, uključujući druge Mytilus vrste, kamenice (*Crassostrea gigas* i *Ostrea edulis*), češljače (*Pecten maximus* i *Argopecten purpuratus*), srčanke (*C. edule*), ostale školjke (*Tapes philippinarium*, *Ensis siliqua* i *Donax spp.*) i kod rakova (*Cancer pagurus*) (TWINER i sur., 2008.; LÓPEZ-RIVERA i sur., 2010.).

Izvešća o trovanjima AZA-om i/ili kontaminiranom školjkom dokumentirana su u nekoliko europskih zemalja, uključujući Irsku, Ujedinjeno Kraljevstvo, Norvešku, Nizozemsku, Francusku, Španjolsku i Italiju. Izvor AZA-a su dinoflagelati *Azodinium spinosum*. Iako su uglavnom otkriveni u zapadnoj Europi, nedavno se pojavljuju i u sjeverozapadnoj Africi, Istočnoj Kanadi i jugu Amerike.

AZP je vrlo rasprostranjena, ali je rijetko dijagnosticirana jer su njezini gastrointestinalni simptomi vrlo slični simptomima DSP-a ili trovanjima bakterijskim enterotoksinima (FUREY i sur., 2010.).



	<u>R<sub>1</sub></u>	<u>R<sub>2</sub></u>	<u>R<sub>3</sub></u>	<u>R<sub>4</sub></u>
(AZA 1)	H	H	CH <sub>3</sub>	H
(AZA 2)	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
(AZA 3)	H	H	H	H
(AZA 4)	OH	H	H	H
(AZA 5)	H	H	H	OH

Slika 6. Kemijska struktura azaspirnih kiselina (FAO, 2004.)

### 2.1.6.1. Toksokinetika

AASEN i sur. (2010., 2011.) utvrdili su apsorpciju AZA1 nakon akutnog p.o. davanja miševima (100-300 µg/kg). Uočeno je povećanje koncentracije toksina ovisno o dozi u tkivima, a nakon 24 sata najviše razine AZA1 pronađene su u gastrointestinalnim tkivima (želudac > duodenum> jejunum> ileum> debelo crijevo); u ostalim organima redoslijed je bio: pluća> srce> jetra, dok je u mozgu toksin bio u tragovima. Nakon 7 dana, razina AZA1 značajno se smanjila u svim organima, osim u bubrezima. Najveća količina toksina bila je u jetri, a slijede je bubrezi, pluća, slezena i srce. Nakon 24 sata, ukupna količina toksina u unutarnjim organima bila je otprilike 2% primjenjene doze.

### 2.1.6.2 Mehanizam toksičnog djelovanja

Mehanizam djelovanja AZA-e nije jasan. Međutim, zabilježeno je nekoliko učinaka na *in vitro* stanične kulture za AZA1, uključujući izmjene citoskeleta i smanjene bazene F-aktina, s ireverzibilnim učincima nakon povlačenja toksina; međustaničnih proteina i razgradnje E-kadherina; aktivacije/apoptoze; smanjenje kolesterola na membrani; modulacija citosolnog Ca<sup>2+</sup> i CAMP-a; i promjena ekspresije različitih staničnih proteina i metabolizma energije, kao i signalizacija neuronskih stanica (RYAN i sur., 2008.; VILARIÑO, 2008.; FUREY i sur., 2010.).

AZA-om inducirani F-aktin i izmjene citoskeleta i međustaničnih proteina mogle bi biti odgovorne za neke od *in vivo* toksičnih učinaka, poput gastrointestinalne toksičnosti i proljeva. Mogući faktor koji pridonosi povećanoj sekreciji u proljeva izazvanog AZA-om, je povećana paracelularna propusnost crijevnog epitela, kako sugeriraju nalazi *in vitro* u ljudskim crijevnim stanicama Caco-2.

Zapravo, promjene u razini i lokalizaciji međustaničnih proteina, koji su uključeni u regulaciju funkcije crijevne barijere povezani su sa povećanom paracelularnom propusnošću (RYAN i sur., 2008.; JAMES i sur., 2010.).

### 2.1.6.3. Toksičnost

LOAEL je procijenjena na 1.9 µg AZA1 ekvivalenata/kg i ARfd (akutna referentna doza) od 0.2 µg AZA1/kg (EFSA, 2008b.).

Jednokratna primjena

I.p. ubrizgavanjem, ustanovljena je letalna doza AZA1 u miševa od 200 µg/kg; AZA2 i AZA3 su toksičnije (110, odnosno 140 µg/kg) te manje toksične AZA4 (470 µg/kg) i AZA5 (< 1 mg/kg). Iako je proljev glavni simptom kod ljudi, AZA, i.p. aplicirana ne izaziva proljev kod miševa. Prije uginuća, miševi su pokazivali progresivnu paralizu udova, dispneju i konvulzije (JAMES i sur., 2004.; TWINER i sur., 2008.).

Nakon peroralne primjene AZA1 ( $\geq 300$  µg/kg) u miševa, primjećena je nekroza lamine proprie tankog crijeva, timusa, slezene i Peyerovih ploča (nekrotični T i B limfociti). Moguće su i promjene u obliku masne jetre. Autori su pretpostavili da je peroralna toksičnost 2.5 puta veća od one nakon i.p. injekcije, ali nema dostupnih podataka o LD<sub>50</sub> (ITO i sur., 2000.).

Nakon subletalnog doziranja AZA1 u miševa (100-300 µg/kg), patološke promjene otkrivene su u duodenumu nakon 24h (blago stanično odvajanje na vrhovima vila, širenje kripta i nekrotične/apoptotičke promjene u lamini propriae i neutrofilna infiltracija) te nestaju nakon 7 dana (AASEN i sur., 2010.). Nema podataka o peroralnoj toksičnosti za AZA analoge.

#### Ponovljena primjena

Nakon ponovljenih p.o. primjena subletalnih doza AZA1 (250-450 µg/kg), kod nekih miševa je nastupila smrt i ozbiljni gastrointestinalni, plućni i jetreni problemi koji su perzistirali duže vrijeme kod miševa koji su preživjeli. Ponovljena peroralna primjena AZA1 jednom ili dva puta tjedno (20-50 µg/kg tijekom 10-20 tjedana) uzrokovala je intersticijsku pneumoniju, skraćenje crijevnih vila i smrt nekih miševa.

Tumori pluća su se razvili u 4/20 miševa tretiranih s 20 ili 50 µg AZA1/kg, ali potrebne su daljnje studije da se potvrdi kancerogenost ovog toksina (ITO i sur., 2002b). Nema podataka o genotoksičnosti i nema konačnih zaključaka o toksičnosti za ljude (EFSA, 2008.b; TWINER i sur., 2008.).

#### **2.1.6.4. Liječenje**

Simptomi otrovanja ljudi uključivali su mučninu, povraćanje, teške proljeve i abdominalne grčeve (JAMES i sur., 2010.). Kao i za DSP, niti za AZP nije dostupan specifični protuotrov. Liječenje je samo simptomatsko i potporno.

### 2.1.6.5. Analitičke metode i dopuštene koncentracije

Europska unija je utvrdila maksimalnu ukupnu razinu azaspirne kiseline od 160 µg ekvivalenta AZA1/kg jestivog mesa (EUROPSKA KOMISIJA, 2002.).

Biološki test na miševima ili štakorima može otkriti AZA-e s ograničenjem detekcije od oko 160 µg/kg, ali moguće je da drugi lipofilni toksini interferiraju sa njima. Europska upotreba MBA za AZA-e se postupno ukida, a zamjenjuje se LC-MS/MS metodologijom odobrenom za OA i druge lipofilne morske toksine (VILLAR-GONZÁLEZ i sur., 2011.).

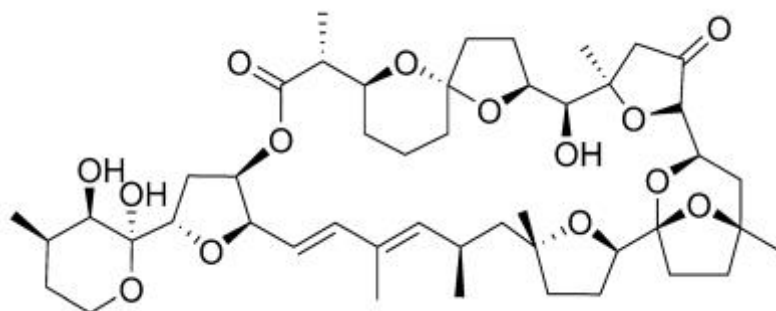
Alternativne ili komplementarne metode mogu se koristiti nakon međunarodne validacije (EUROPSKA KOMISIJA, 2011.).

### 2.1.7. Pektenotoksini

Pektenotoksini (PTXs) su hepatotoksični spojevi koji su u početku bili klasificirani kao DSP toksini, jer su često bili otkriveni zajedno s tim spojevima u školjakama i fitoplanktonu. Unatoč činjenici da je PTX derivat povezan sa bolestima koje uzrokuju proljeve u Australiji, stvarni dijarogeni potencijal PTX-a i stvarna prijetnja zdravlju za konzumente kontaminiranih dagnji nisu jasni (EFSA, 2009b.; DOMÍNGUEZ i sur., 2010.).

PTX-i su polieterski makrolidi koji sadrže spiroketalnu skupinu, tri suptituirana oksolana, bi-ciklički ketal i šesteročlani ciklički hemiketal. Otkriveni su u školjkama i/ili fitoplanktonu iz mnogih dijelova svijeta, uključujući Japan, Australiju, Novi Zeland i Europu. Prvi slučaj otkrivanja DSP toksina u Europi dogodio se u sjevernom Jadranskom moru (Obala Emilia-Romagna), koji je otkriven u dinoflagelatu *Dinophysis fortii* (DRAISCI i sur., 1996.).

Više od 20 PTX analoga identificirano je u fitoplanktonu ili školjkama, a niz njih potječe od matičnog PTX-a koji se metabolizira u školjkama. Najčešći PTX u algama je PTX-2, sintetiziran od dinoflagelata iz roda *Dinophysis*. Oni se nakupljaju u probavnim žlijezdama školjkaša koje se hrane filtriranjem, poput češljača (*Patinopecten yessoensis*), zelenousne dagnje (*Perna canaliculus*), plave dagnje (*M.gallopvncialis* i *M.edulis*), srčanke (*C. edule*) i pipi školjke (*Donax delatoides*), nakon filtracije stanica roda *Dinophysis* (MUNDAY, 2008b.; SUZUKI, 2008.; DOMÍNGUEZ i sur., 2010.).



Slika 7. Kemijska struktura pektenotoksina-2 (PTX2) (GERSSEN i sur., 2010.)

### 2.1.7.1. Toksokinetika

Distribucija PTX-2 i PTX-2 seco kiseline proučavana je na miševima nakon p.o. i i.p. aplikacije. Nakon p.o. unosa, oba toksina pronađena su u sadržaju gastrointestinalnog trakta i/ili izmeta, samo je mali dio toksina pronađen u gastrointestinalnom tkivu, a izuzetno mala količina PTX-2 seco kiseline pronađena je u jetri. Nakon i.p. ubrizgavanja, raspodjela toksina bila je slična, s nešto većom prisutnošću u jetri i uočljivih razina u krvi i bubrezima. Štoviše, znatna količina PTX-2 pretvorena je u PTX-2 seco kiselinu iz 7-epi-PTX-2 seco kiseline. Stoga se smatra da se PTX-ovi ne apsorbiraju lako nakon oralnog unosa (MUNDAY, 2008b.).

### 2.1.7.2. Mehanizam djelovanja

Mehanizmi hepatotoksičnog djelovanja PTX-a još nisu poznati. PTX-ovi su citotoksični za nekoliko staničnih linija, a dokazano je da PTX-1 i PTX-2 izazivaju apoptotičke učinke. *In vitro* studije otkrile su poremećaj citoskeleta aktina pomoću PTX-1, PTX-2 i PTX-6. Nadalje, PTX-6 je izmjenio razinu cAMP-a u ljudskim limfocitima (LEIRA i sur., 2002.; ESPIÑA i RUBIOLO, 2008.; DOMÍNGUEZ i sur., 2010.).

### 2.1.7.3. Toksičnost

PTX-ovi su povezani s teškim bolestima koje karakterizira proljev diljem svijeta. Međutim, iako su školjke uključene u otrovanje sadržavale PTX-2 seco kiselinu, gastrointestinalni problemi kasnije su pripisani esterima OA. Posljedično tome, nema dostupnih



dokaza o gastrointestinalnim ili drugim štetnim učincima PTX-a za ljude. Za crijevnu toksičnost kod miševa, utvrđen je LOAEL od 250 µg/kg i ARfd od 0.8 µg/kg (EFSA, 2009.b).

#### Jednokratna administracija

Nakon i.p. aplikacije miševima, LD<sub>50</sub> PTX-a bio je 250 µg/kg (PTX-1 i PTX-11), 219-260 µg/kg (PTX-2), 350 µg/kg (PTX-3), 770 µg/kg (PTX-4) i 500 µg/kg (PTX-6), dok je LD<sub>50</sub> od PTX-7, PTX-8, PTX-9, PTX-2 seco kiseline i 7-epi-PTX-2 seco kiseline bio veći od 5 mg/kg. Stoga se čini da oksidacija supstituenta u C-18, koja se događa u probavnim žlijezdama školjki, smanjuje toksičnost PTX-a (DRAISCI i sur., 2000.; DOMÍNGUEZ i sur., 2010.). Primjećen je hepatotoksični učinak kod miševa koji sisaju za PTX-1, kao i za PTX-1, PTX-2 i PTX-6 za odrasle miševe i štakore. Niti jedan od toksina nije izazvao proljev i nije uočeno oštećenje na crijevnoj stijenci kod miševa koji sisaju nakon i.p. aplikacije do 1 mg PTX-1/kg. S druge strane, PTX-1 i -2 uzrokovali su povećanu propustljivost kapilara u probavnom traktu, skupljanje tekućine u grudnom košu i perikardu te ascites kod odraslih miševa i štakora (375 µg/kg) (TERAO i sur., 1986., 1993.). Uočeni su i hepatotoksični učinci za PLT-6, koji su uzrokovali ozbiljna krvarenja u jetri, dok PTX-2 uzrokuje kongestiju jetre zbog poremećaja cirkulacije (ITO i sur., 2008.). Iako su neki podaci o toksičnosti PTX-a nakon p.o. primjene kontroverzni, TERA0 i sur. (1993.) su primjetili da PTX-1 i PTX-2 (750 µg/kg) ne izazivaju promjene na crijevima štakora i miševa. Nisu zabilježeni smrtni ishodi i proljevi za PTX-2, PTX-2 seco kiselinu i PTX-6 kod miševa u dozi od 5 mg/kg (MILES i sur., 2004.; ITO i sur., 2008.). Nakon p.o. primjene PTX-6 štakorima (2 mg/kg), primjećene su erozije na jejunumu uzrokovane edemom. Osim toga, nije primjećena sinergistična toksičnost PTX-6 s OA ili PTX-2 nakon p.o. primjene na miševima (ITO i sur., 2008.).

#### 2.1.7.4. Analitičke metode i dopuštene koncentracije

Europska unija nije postavila maksimalnu razinu samo za PTX u školjkama, jer se utvrđena razina od 160 µg/kg jestivih dijelova odnosi na zbroj PTX-a i toksina koji uzrokuju dijareju i OA grupe (EUROPSKA KOMISIJA, 2002.). Međutim, prema preporuci EFSA-e PTX-i bi se trebali klasificirati pojedinačno, te s obzirom na to EFSA je predložila dopuštenu razinu od 120 µg/kg PTX2 ekvivalenata (GERSSSEN i sur., 2010.).

MBA može otkriti PTX-ove, ali ne i seco kiseline. Prisutnost drugih lipofilnih toksina, poput AZA i DSP toksina, može se otkriti pomoću mišjeg biotesta. Budući da se PTX-i

sintetiziraju od strane istih mikroalgi koje sintetiziraju OA i njezine derivate, vrlo je važno razlikovati ove dvije skupine toksina.

LC-MS/MS je usvojen u Europskoj uniji kao referentna metoda za otkrivanje PTX-1 i PTX-2 u školjkama, ali alternativne ili komplementarne metode, poput imunokemijskih ispitivanja, mogu se koristiti ako su ispravno validirane (EUROPSKA KOMISIJA, 2011.).

### 2.1.8. Ciklički imini

Ciklički imini su skupina makrocikličnih spojeva sa iminskom- i spiro- skupinom koja je otkrivena pomoću MBA zbog svoje iznimno velike letalnosti. Ti toksini uključuju spirolide, gimnodimine, pinnatoksine, pteriatoksine i prorocentrolide, ali njihov način djelovanja još nije u potpunosti shvaćen (CEMBELLA i KROCK, 2008.; MUNDAY, 2008.c). Nekoliko spirolida, koji posjeduju spiro-, tricikličku strukturu etera i iminsku iliaminsku skupinu, identificirani su u školjkama i fitoplanktonu. To su spirolidi A-G i njihovi derivati, među kojima su spirolidi E i F netoksični metaboliti proizvedeni u školjkama. (HU i sur., 1996.; FALK i sur., 2001.; AASEN i sur., 2005b.).

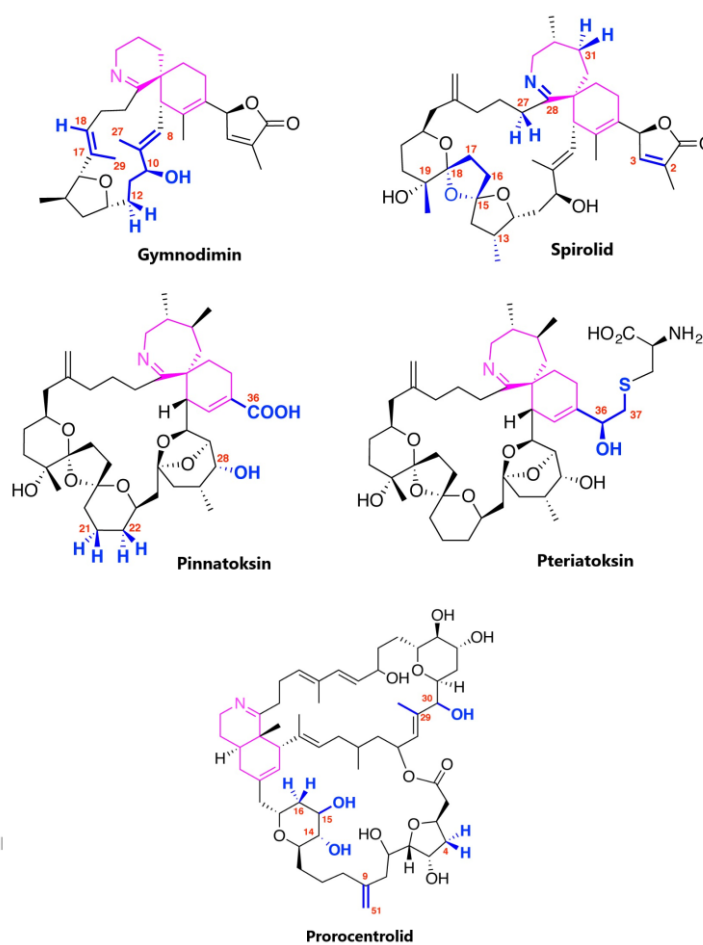
Spirolidi, koje proizvode dinoflagelati *Alexandrium ostenfeldii* nakupljaju se u školjkama koje se hrane filtriranjem, poput dagnja, kamenica i dr. školjaka. Otkriveni su u SAD-u, Kanadi, Čileu, Norveškoj, Danskoj, Škotskoj, Španjolskoj, Francuskoj i Italiji (CEMBELLA i sur., 2001.; MUNDAY, 2008.c; ALVAREZ i sur., 2010.).

Gimnodimine, koji sadrže spiro- i iminsku- skupinu, strukturno su povezani sa spirolidima, sintetiziraju dinoflagelati roda *Gymnodinium* (*Karenia*) i akumuliraju se u školjkama poput kamenica (*C. gigas*, *Tiostrea chilensis*), zelenousne dagnje (*Perna canaliculus*), plave dagnje (*M. edulis*) i dr. školjke (*Pecten novaezelandiae*), ali se također nakupljaju i u tkivima izvan probavne žlijezde. Ovi toksini su otkriveni na Novom Zelandu i drugim zemljama poput Tunisa i Kanade (MUNDAY, 2008.c).

Pinnatoksini su spojevi koji se sastoje od 20-članog prstena sa 5,6-biciklo, 6,7-azaspiro, i 6,5,6-triketalne skupine u njihovoj strukturi. Nakupljaju se u školjkama roda *Pinna*, koja je česta hrana u Japanu i Kini. U tim zemljama, konzumiranje tih školjaka uzrokovalo je otrovanje ljudi što se u početku pripisalo pinnatoksinima (KURAMOTO i sur., 2004.), ali se kasnije pokazalo da su onečišćene vrstama *Vibrio* (FAO / IOC / WHO, 2005.).

Pteriatoksini su strukturno slični pinnatoksinima, razlikujući se po tome što bočni lanac cikloheksenila završava u cisteinu. Pretpostavlja se da se pteriatoksini biotransformiraju iz pinnatoksina u školjkama (EFSA, 2010.).

Ostali ciklički imini podrijetla od algi su ciklički polieteri proocentrolidi i njegov analogni proocentrolid B koje proizvode dinoflagelati roda *Prorocentrum* (MUNDAY, 2008.c).



Slika 8. Kemijska struktura cikličkih imina (MOLGÓ i sur., 2017.)

### 2.1.8.1. Toksokinetika

Nema podataka o apsorpciji, metabolizmu, distribuciji i eliminaciji cikličkih imina.

### 2.1.8.2. Mehanizam toksičnog djelovanja

Mehanizam djelovanja cikličkih imina nije u potpunosti poznat. Biološke studije o spiroolidima pretpostavljaju da su njihova glavna mjesta toksičnog djelovanja hipokampus i moždano deblo, s tim da toksini djeluju kao antagonisti muskarinskih receptora i slabi aktivatori transmembranskih kalcijevih kanala L-tipa (GILL i sur., 2003.; SLENO i sur., 2004.; WANDSCHEER i sur., 2010.). Čini se da je aktivna farmakofora ovih spojeva - ciklički iminski dio, jer spiroolidi E i F, koji nemaju tu strukturu su neaktivni (LUCKAS i sur., 2005.).

S druge strane, gymnodimin blokira mišićne i neuronske nikotinske receptore acetilkolina (MUNDAY i sur., 2004.; KHARRAT i sur., 2008.), te također i pinnatoksini djeluju na te receptore neuromuskularnog spoja (EFSA, 2010.; ARAOZ i sur., 2011.).

### 2.1.8.3. Toksičnost

Nije dokumentiran niti jedan sindrom otrovanja čovjeka od cikličkih imina. Zbog nedostatka odgovarajućih kvantitativnih podataka o peroralnoj toksičnosti za cikličke imine, ARfd nije utvrđen od strane Europske komisije za sigurnost hrane i kontaminanta u prehrambenom lancu (EFSA, 2010.).

#### Jednokratna aplikacija

Nakon i.p. aplikacije u miševa, spiroolidi su uzrokovali smrt u roku od nekoliko minuta, što je prethodilo neurotoksičnim simptomima kao što je piloerekcija, abdominalni grčevi, hiperekstenzija leđa i zakrivljenje repa (GILL i sur., 2003.; CIMINIELLO i FATTORUSSO, 2004.). I.p. aplikacijom, spiroolidi B i D su sličnog toksičnog potencijala, dok su spiroolidi E i F u kojima je uništena cikličko iminska cijelina, mnogo manje toksični. LD<sub>50</sub> u miševa za mješavinu spirovida utvrđena je na približno 40 µg/kg nakon i.p. aplikacije, sa smrtnosti otprilike 25 puta većom od one nakon p.o. primjene (LD<sub>50</sub>=1 mg/kg). Vrijednosti LD<sub>50</sub> za p.o. aplikaciju za čisti desmetil spiroolid C i 20-metil spiroolid G bile su u rasponu od 157-176 µg/kg (CEMBELLA i sur., 2002.; MUNDAY, 2008c.). Za i.p. aplikaciju u miševa, LD<sub>50</sub> za gymnodimin je bio od 96 µg/kg, te je izazivao paralizu i respiratorne tegobe (MUNDAY i sur., 2004.). Nakon prisilne aplikacije pomoću cijevi, izračunat je LD<sub>50</sub> od 755 µg/kg, ali nije opažena toksičnost ako je toksin davan s mljevenom suspenzijom hrane u razini koja odgovara dozi od otprilike 7500 µg/kg (MUNDAY i sur., 2004.). I.p. aplikacijom u miševa, LD<sub>50</sub> za pinnatoksine, koji su nedavno izolirani iz Japanskih školjki, utvrđeno je: E (45 µg/kg), F (16 µg/kg), G (50 µg/kg). Prije smrti, miševi su bili hipoaktivni, abdominalno disali, istezali

stražnje noge, imali nisku frekvenciju disanja i egzoftalmiju (SELWOOD i sur., 2010.). Podaci o akutnoj i.p. toksičnosti pteriatoksina kod miševa sastoji se od LD<sub>99</sub> pteriatoksina A (100 µg/kg), koji je bio toksičniji od smjese (1:1) pteriatoksina B i C (LD<sub>99</sub> = 88 µg/kg) (MUNDAY, 2008c.). Letalitet za prorocontrolide, aplicirane i.p. u miševa, utvrđen je na razini od 400 µg/kg, pri čemu je smrt nastupila unutar nekoliko minuta (TORIGOE i sur., 1988.).

#### **2.1.8.4. Analitičke metode i dopuštene koncentracije**

Iako su ciklički imini smrtonosni za miševe ako se apliciraju i.p. i kontaminiraju školjke u različitim područjima svijeta, nije zabilježen nijedan slučaj štetnih učinaka na ljude. Prema tome, za njih ne postoji maksimalna dopuštena razina (EFSA, 2010.). Nadalje, rađena je studija na uzorcima iz 8 zemalja (Italija, Portugal, Slovenija, Španjolska, Irska, Norveška, Nizozemska i Danska), gdje su se tijekom 2 godine sakupljali uzorci sirovih i prerađenih školjkaša i analizirali na LC-3200QTRAP and LC-HRMS masenom spektrometru. Dobiveni rezultati utvrdili su niske koncentracije samo 2 ciklička imina (0,1–12 µg/kg pinnatoksina G i 26–66 µg/kg 13-desmetilspirolida C, te je na temelju dobivenih rezultata utvrđeno da je vrlo malo vjerojatno, da postoji potencijalni rizik za zdravlje konzumacijom morskih plodova (RAMBLA-ALEGRE i sur., 2018.).

MBA se tradicionalno koristila za utvrđivanje cikličkih imina u kontaminiranih školjkaša, a zbog njihove visoke i.p. toksičnosti, ti spojevi kompliciraju upotrebu MBA za lipofilne toksine. Druge metode za kvantificiranje ovih toksina, kao što je LC-MS, imaju mogućnost otkriti pojedinačne cikličke imine, ali nijedna od postojećih metoda nije formalno potvrđena (EFSA, 2010.).

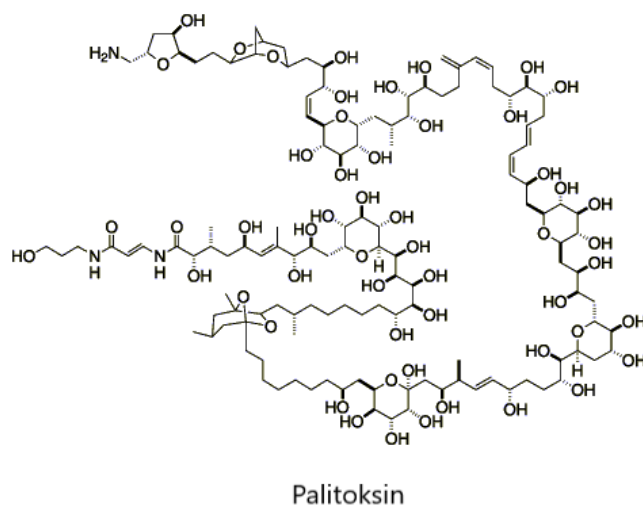
## **2.2. Ostali otrovi morskih organizama**

### **2.2.1. Palitoksin i njegovi analozi**

Palitoksin (PLTX) je jedan od najtoksičnijih ne-proteinskih spojeva, izvorno izoliran iz koralja *Palythoa toxica* na Havajima. Topiv je u vodi, sadrži dugu, djelomično nezasićenu alifatsku polihidroksiliranu okosnicu s razmaknutim cikličkim eterima, 64 kiralna centra i dvije amidne skupine.

PLTX i niz njegovih analoga, kao homoPLTX, bishomoPLTX, neoPLTX, deoxyPLTX i 42.hydroxyPLTX naknadno su identificirani u vrstama *Palythoa*. Štoviše, PLTX i njegovi analozi, uključujući ostreocin-d, mascarenotoksin-a, -b i -c i ovatoksin-a, -b, -c, -d i -e identificirani su u bentoskim dinoflagelatima iz roda *Ostreopsis*, za koji postoji pretpostavka da su izvor palitoksina, dok u istraživanjima autora KATIKOU (2008.) i CIMINIELO i sur. (2011.) se spominju bakterije kao izvor.

Ove vrste cvjetaju u tropskim i subtropskim obalnim vodama, ali njihova distribucija je u posljednjih nekoliko godina izuzetno porasla i u umjerenim vodama, poput Sredozemnog mora (RHODES, 2011.). Također, Niz otrovanja kod ljudi povezan je s PLTX-ovima te različitim načinima unosa, iako često nedostaju podaci koji potvrđuju izravnu vezu između bolesti i PLTX-a. Pojava toksičnih vrsta *Ostreopsis* može rezultirati nakupljanjem PLTX-a u jestivim morskim organizmima. Bolest i smrtni ishodi u ljudi koji proizlaze iz konzumacije rakova i riba kontaminiranih ili sumnjivih na kontaminaciju PLTX-om zabilježeni su u tropskim i subtropskim područjima.



*Slika 9. Kemijska struktura palitoksina (PATOČKA i STREDA, 2002.)*

### 2.2.1.1. Toksokinetika

Nema farmakokinetičkih/toksikokinetičkih ispitivanja na PLTX-ima. Pokušaj korištenja Caco-2 staničnih linija za predviđanje apsorpcije ometala je njegova citotoksičnost (PELIN i sur., 2011.).

### 2.2.1.2. Mehanizam toksičnog djelovanja

Glavno mjesto toksičnog djelovanja na molekularnoj razini PLTX-a je  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza, membranska pumpa uključena u održavanje transmembranskih ionskih gradijenata životinjskih stanica, esencijalna za stanične funkcije.

Interakcija PLTX-a s  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazom inducira promjenu u konformaciji proteina koja rezultira konverzijom u neselektivni kanal za monovalentne katione. Stoga se "vrata" na dvije strane membrane simultano otvaraju sa posljedičnim ulaskom  $\text{Na}^+$  u stanice i izlaskom  $\text{K}^+$  iz stanice, uzrokujući depolarizaciju i izazivajući niz štetnih bioloških učinaka (WU, 2009.; ROSSINI i BIGIANI, 2011.).

### 2.2.1.3. Toksičnost

Oboljenja ljudi pripisana PLTX-ima pojavila su se nakon konzumiranja morskih plodova, ali i nakon udisanja te kožnih i sistemskih izloženosti aerosoliziranoj morskoj vodi za vrijeme cvjetanja alge *Ostreopsis* ili od rukovanja zoantidima u akvarijima. Otrovanja p.o. putem, s ponekim fatalnim ishodom, dogodili su se u tropskim i subtropskim područjima.

Stvarni toksikološki potencijal PLTX-a tek treba u potpunosti procijeniti (TUBARO i sur., 2011a.). Unatoč ograničenim toksikološkim podacima o PLTX-ovima, utvrđena je akutna oralna referentna doza (ARfD) od 0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (zbroy PLTX-a i ostreocina-d) korištenjem podataka o eksperimentalnoj toksičnosti (EFSA, 2009.a).

#### Jednokratna aplikacija

Akutna toksičnost PLTX-a za sisavce ovisi o putu izloženosti. PLTX je najotrovniji putem parenteralne primjene. Zec, pas *rezus* majmun i štakor su najosjetljivije vrste na PLTX nakon i.v. primjene, dok je miš najmanje osjetljiv, iako postoje velike razlike u procijenjenim vrijednostima  $\text{LD}_{50}$  (0.025-0.53  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). To je iz razloga što su se koristili preparati PLTX-a različite čistoće, posebno u prvim studijama. PLTX je manje toksičan i.p. nego i.v. primjenom, s vrijednostima  $\text{LD}_{50}$  kod miševa u rasponu od 0.31 do 1.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (i.p. toksičnost za miševa, PLTX-ovog analoga ostreocina-d bila je niža (letalna doza  $> 4 \mu\text{g}/\text{kg}$ )). Vrijednosti  $\text{LD}_{50}$  PLTX-a za i.p. primjenu slične su onima nakon i.m. i s.c. primjene. PLTX-ovi su također vrlo toksični nakon intratrahealne instilacije: Smrtonosna doza PLTX-a i ostreocina-d bila je veća od 2, odnosno 11-13  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (WILES i sur., 1974.; ITO i YASUMOTO, 2009.). PLTX je puno manje toksičan nakon primjene p.o. putem: kod miševa vrijednosti  $\text{LD}_{50}$  iznose 510 i 767  $\mu\text{g}/\text{kg}$

(MUNDAY, 2008a., SOSA i sur., 2009.). Uspoređena letalnost u miševa za 42-hidroksi-PLTX iznosi  $LD_{50} = 651 \mu\text{g/kg}$ , dok za ostreocin-d nije bilo letalnih slučajeva pri dozama od  $300 \mu\text{g/kg}$  (ITO i YASUMOTO, 2009.). PLTX i ostreocin-d ( $200 \mu\text{g/kg}$ ) također su toksični nakon sublingualne primjene u miševa (ITO i YASUMOTO, 2009.).

Nakon i.p. primjene u miševa, primjećene su adhezije u peritoneumu sa ascitesom i dilatacijom tankog crijeva. Histološki, toksin je uzrokovao pojedinačnu staničnu nekrozu u srcu te nekrozu timusa i limfocita slezene. Krvarenje, edemi i nekroze su također pronađeni u tankom crijevu. Elektronskom mikroskopijom uočeno je nakupljanje mitohondrija i odvajanje organela u miocitima, gubitak mikrovila u tubulima bubrega i vakuolizacija pankreasnih acinusnih stanica (TERAO i sur., 1992.; ITO i sur., 1996.). Injekcija ostreocina-D i.p. uzrokuje erozije želuca i crijeva (ITO i YASUMOTO, 2009.).

Intratrahealna instilacija PLTX-a kod miševa uzrokovala je alveolarna krvarenja, plućne edeme, gastrointestinalne erozije i glomerularnu atrofiju. Slične ozljede pluća su uočene na miševima koji su tretirani ostreocinom-d, ali su pokazali sporiji napredak i oporavak nego od onih tretiranim PLTX-om (ITO i YASUMOTO, 2009.). Nakon oralne primjene PLTX-a, zabilježene su povećane razine kreatin fosfokinaze, laktat dehidrogenase i aspartat transaminaze u krvnoj plazmi. Na histološkoj razini, uočena je upala potrbušnice u miševa koji požive 24h nakon aplikacije; ostale nespecifične promjene tkiva zabilježene su u jetri i gušterači, dok stanice srca i skeletnog mišića otkrivaju samo ultrastrukturne promjene vidljive elektronskim mikroskopom (SOSA i sur., 2009.). Slični nalazi su zabilježeni kod miševa tretiranim 42-hidroksiPLTX-om, gdje je zabilježen porast kalijevih iona u plazmi (TUBARO i sur., 2011b.). Primjena PLTX-a na mišjem uhu uzrokuje iritaciju, a iznos doze koja uzrokuje eritem u 50% miševa bila je  $0.02 \mu\text{g/uhu}$  (FUJIKI i sur., 1986.).

#### Ponovljena primjena

Nakon ponovljene i.p. aplikacije PLTX-a u miševa ( $0.25 \mu\text{g/kg}$ , pet puta tjedno; ukupne injekcije: 5, 10, 15, i 29), zabilježeni su proljevi i peritonitis nakon 29 doza (60% miševa). Također, uočena je i nekroza limfocita timusa i slezene. Osim toga, smanjena težina timusa i povećana težina slezene zabilježeni su nakon 10-15 doza. Te su promjene bile reverzibilne unutar 1 mjeseca nakon 29. doze (ITO i sur., 1997.).



#### **2.2.1.4. Mutageno i genotoksično djelovanje**

PLTX je bio negativan u Amesovim mutagenim testovima koristeći sojeve *Salmonella typhymurium* sa ili bez mikrosomske aktivacije. Nadalje, nije djelovao kao pokretač testa *in vitro* BALC/c3T3 transformacije stanica ili u mišjoj koži *in vivo* (FUJIKI i sur., 1986.; MUNDAY, 2011.).

#### **2.2.1.5. Aktivnost koja potiče tumore**

PLTX je promotor rasta tumora, što dokazuje ispitivanja kancerogeneze u dvije faze: na mišjoj koži i *in vitro* BALB/c3T3 ispitivanje stanične transformacije (FUJIKI i sur., 1986.; MUNDAY, 2011.).

#### **2.2.1.6. Klinička slika**

Najčešći simptomi uključuju gastrointestinalne poremetnje, mijalgiju, grčeve mišića, srčane disfunkcije, respiratorne probleme i cijanozu s rabdomiolizom (sa povišenim serumskim razinama kreatin fosfokinaze i mioglobinurijom) kao najčešćom prijavljenom komplikacijom. Nedavni slučajevi otrovanja ljudi bili su povezani sa inhalacijskom, kožnom ili sistemskom izloženosti nakon izravnog kontakta s aerosoliziranom morskom vodom tijekom cvjetanja vrste *Ostreopsis* u Europi ili tijekom održavanja akvarija koje sadrže zoanthide. U tim slučajevima, najčešći simptomi bili su respiratorni distres, iscjedak iz nosa, kašalj i vrućica i u ponekim slučajevima i dermatitis.

#### **2.2.1.7. Liječenje**

Identifikacija i/ili kvantifikacija toksina često je nepotpuna ili nedostaje, a slučajevi otrovanja se pripisuju PLTX-ima na osnovi simptoma, anamneze i okolišnim/epidemiološkim podacima (postupanje sa zoantidima i ingestija određene vrste riba ili rakova) (TUBARO i sur., 2011a.).

Liječenje otrovanja PLTX-om uglavnom je potporno i ovisi o putu unosa. Nakon peroralnog unosa, mogu se primijeniti tretmani poput lavaže želuca, prisilna diureza, umjetno disanje i tekućinska terapija, ali u nekim slučajevima se ne mogu spriječiti smrtni ishodi. Nakon inhalacijskog/kožnog izlaganja mogu se koristiti kortikosteroidi, NSPUL, antihistaminici,

nebulizirani  $\beta$ -agonisti i/ili terapija kisikom radi ublažavanja simptoma, uz oporavak u roku od nekoliko sati ili dana (TUBARO i sur., 2011.a).

#### **2.2.1.8. Analitičke metode i dopuštene koncentracije**

Unatoč povećanju pojava vrsta *Ostreopsis* koje proizvode PLTX u umjereno toplim obalnim područjima, ne postoje propisi za PLTX-ove u školjkama. Nadalje, iako su prijavljena cvjetanja vrste *Ostreopsis* u Francuskoj, Grčkoj, Italiji i Španjolskoj, vrlo je malo podataka da se napravi procjena izloženosti putem hrane PLTX toksinima u Europi (EFSA, 2009.).

Uzimajući u obzir nedostatak kvantitativnih podataka o toksičnosti PLTX-a kod ljudi i LOAEL od 200  $\mu\text{g}$  PLTX/kg za akutnu oralnu toksičnost na miševima kao referentnu točku, ARfD od 0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , primijenjenu na zbroj PLTX-a i ostreocina-d, utvrđenu od strane Europske agencije za sigurnost hrane, 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  se predlaže kao dopuštena koncentracija u mesu školjkaša (EFSA, 2009a.).

Za otkrivanje PLTX-a u školjkama, razvijena su ispitivanja na staničnoj razini poput analize citotoksičnosti na stanicama neuroblastoma i test hemolize, ali do sada nisu standardizirani.

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti i LC-MS/MS su obećavajući alati za detekciju PLTX-a. Međutim, potrebna je njihova optimizacija i validacija, kao i razvoj certificiranih referentnih materijala i standarda (EFSA, 2009a.; CIMINIELLO i sur., 2011.).

#### **2.2.2. Ciguatoksini i maitotoksini**

U tropskim područjima, mnoge vrste riba koje sadrže ove toksine, mogu izazvati neurološke, gastrointestinalne i ponekad kardiovaskularne simptome otrovanja. Prehrana ovim kontaminiranim ribama, u ljudi uzrokuje ciguateru, otrovanje morskom ribom koja uzrokuje različite i dugotrajne zdravstvene probleme. Iako je ovo otrovanje rijetko fatalno (0.1%), procijenjuje se da svake godine oboli više od 25000 ljudi.

Ciguatera otrovanje karakteriziraju umjereni do teški gastrointestinalni simptomi (povraćanje, proljev i grčevi u trbuhu), neurološki znakovi (mialgija, parestezija, alo dinija i ataksija), pruritus i manje uobičajeni kardiovaskularni simptomi. Gastrointestinalni simptomi karakteriziraju prvu fazu otrovanja i prevladavaju u području Karipskog mora. Simptomi se obično pojavljuju u roku od 2-12 sati od ingestije kontaminirane ribe, a to su uglavnom

mučnina, povraćanje, proljev i abdominalna bol. Neurološki simptomi su karakteristični za područje Pacifika i razvijaju se unutar 21 sata, iako jačina simptoma može varirati čak i kod pacijenata koji jedu istu ribu. Klinički simptomi kronične ciguaterne (CC), koji utječu na oko 5% žrtvi ciguatera toksina su umor, artralgiya, mijalgija, glavobolja i pruritus. Abnormalnosti imunološkog sustava zbog CC-a zajedno sa sindromom sistemnog upalnog odgovora primjećeni su u nekoliko pacijenata s kroničnim bolestima (SHOEMAKER i sur., 2010.). Također, smatra se da su depresija i anksioznost povezani sa CC-om (ISBISTER I KIERNAN, 2005.). Kardiovaskularni simptomi, iako ne baš česti, uključuju bradikardiju i hipotenziju.

U početku, simptomi ovakve vrste otrovanja mogu sličiti trovanju školjkama ili hranom kontaminiranom mikroorganizmima, stoga su nam anamnestički podaci vrlo važni. Blaži slučajevi ciguaterne često se pogrešno dijagnosticiraju kao uobičajene bolesti npr. gripa ili prehlada. Iako su simptomi hladne alodinije indikativni za ciguateru, potrebno je uzeti u obzir i druge diferencijalne dijagnoze neuropatija (GLAZIOU i LEGRAND, 1994.; ISBISTER i KIERNAN, 2005.).

Ciguatoksini (CTX) ulaze u prehrambeni lanac preko epifitičnog bentoskog dinoflagelata *Gambierdiscus toxicus*. Ova vrsta je česta u vodama koraljnih grebena i živi na temperaturama od 20 do 34 °C, u uvjetima niskog saliniteta i dubinama od 3-15 metara. Njen rast je povećan u područjima gdje dolazi do degradacije uzrokovane prirodnim ili ljudskim faktorima. Različiti sojevi *G. toxicus* proizvode kemijski različite lipo- i vodotopljive toksine, nazvane cigustoksini (CTX) i maitotoksini (MTX) (LEHANE i LEWIS, 2000.; LEWIS, 2001.).

Zbog toga što nije sasvim razjašnjena uloga MTX-a u ciguateri, ova dva toksina se tretiraju zasebno. Akumulacija ovih toksina kroz prehrambeni lanac ide preko biljojednih riba koji unesu *G. toxicus*, te ih pojedu ribe mesožderke. CTX-i su koncentrirani u unutarnjim organima (jetra, crijeva i gonade) i u ribljim mišićima, dok su MTX-i ograničeni samo na unutarnje organe. Pacifičke i Karipske grebenske vrste povezane sa ciguaterom su *Lutjanidae* (crveni grgeč i zubatac), *Serranidae* (grebenska kirnja sa Velikog koraljnog grebena, lubin i kirnja), *Ephinephelus* (bakalari, cvijetni i točkasti bakalari), *Lethrinidae* (carevi), *Muraenidae* (murine), *Scombridae* (skuše, španjolske skuše i tune), *Carangidae* (bitnice) i *Sphyraenidae* (barakude) (LEHANE i LEWIS, 2000.; YASUMOTO, 2001.; ISBISTER i KIERNAN, 2005.).

Ciguatera je endemična u suptropskim i tropskim regijama zapadnog Indijskog i Pacifičkog oceana i u području Karipskog mora (LEHANE i LEWIS, 2000.). Prva izbijanja ciguaterne blizu zapadne obale Afrike i Kanarskih otoka (BOADA i sur., 2010.), dogodila su se 2004. i 2008.-2009. godine, najvjerojatnije zbog klimatskih promjena. Jedan od glavnih razloga

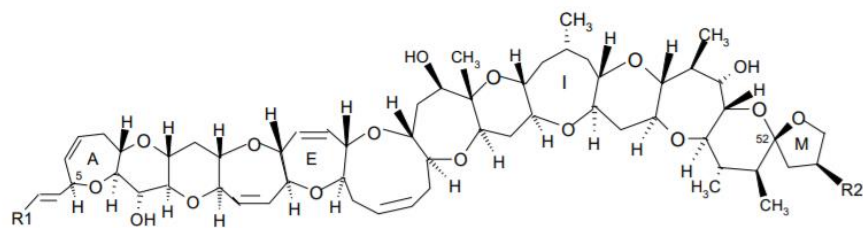
širenja ciguaterre iz tropskih područja je trgovina ribom. Epidemiološka karakterizacija ciguatera toksina je ograničena nedostatkom laboratorijskih testiranja kojim bi se potvrdila prisutnost toksina (LEWIS i sur., 2000.). Predloženo je također ispitivanje uloge morskih cijanobakterija u ciguatera otrovanjima (GOLUBIC i sur., 2010.).

### **2.2.2.1. Ciguatoksini**

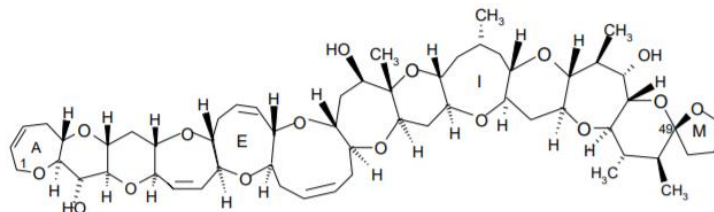
Toksini odgovorni za ciguateru su CTX, polieteri topljivi u lipidima i termostabilni, sastavljeni od 10-14 prstenova u ljestvičastu strukturu, slični strukturi brevetoksina (PbTx<sub>s</sub>). Prisutne su strukturne razlike CTX-ova izoliranih u različitim regijama, tako da Pacifički (P-CTX) i Karipski (C-CTX) CTX-i se spominju odvojeno (LEHANE i LEWIS, 2000.; YASUMOTO, 2001.).

Pacifički CTX-i su najpotentniji i najviše istraživani, stoga se oznaka Pacifičkog oceana izostavlja. Pacifički CTX je CTX1B, najtoksičniji spoj od svih CTX-a, štoviše, ukupna toksičnost uzoraka izražava se u ekvivalentima CTX1B. Čak i među Pacifičkom grupom CTX-a, postoji značajna regionalna raznolikost među CTX profilima kongenera (YOGI i sur., 2011.).

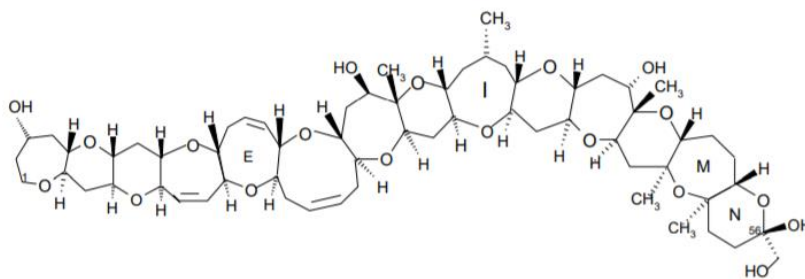
Mnogo godina se mislilo da je oksidacija manje toksičnih spojeva koje sintetiziraju alge (CTX4A i CTX3C), enzimima citokroma u jetri ribe (LEHANE i LEWIS, 2000.; YASUMOTO, 2001.; CEMBELLA, 2003.) bila ključna za stvaranje toksičnijih, oksidiranih CTX oblika koji su zaslužni za ekspanziju ciguaterre u Pacifičkoj regiji (prvenstveno CTX1B i 51-hydroxyCTX3C). Međutim, YOGI i sur. utvrdili su da neki oksidirani oblici CTX-a također se izravno pojavljuju u *G. toxicus*, uključujući 52-epi-54-deoxyCTX1B, 54-deoxyCTX1B i 51-hydroxyCTX3C. Dakle, uloga ribljeg metabolizma i krajnje toksičnosti CTX-a u hranidbenom lancu mora se preispitati.



	<u>R1</u>	<u>R2</u>
P-CTX-1:	$^1\text{CH}_2\text{OHCHOH}$	OH
P-CTX-3 (P-CTX-2):	$^1\text{CH}_2\text{OHCHOH}$	H
P-CTX-4B (P-CTX-4A):	$^1\text{CH}_2\text{CH}$	H



P-CTX-3C



C-CTX-1 (C-CTX-2)

Slika 10. Kemijska struktura pacifičkih (P) i karipskih (C) ciguatoksina (FAO, 2004.)

### 2.2.2.1.1. Toksikinetika

O apsorpciji, distribuciji, metabolizmu i ekskreciji CTX-a dostupni su samo ograničeni podaci. Većina podataka o toksokinetici nije dobivena iz stvarnih studija, nego često proizlazi iz izravnih kliničkih istraživanja ili hipotetiziranih shema na temelju kemijskih svojstava CTX-a. Apsorpcija peroralnim putem ovih toksina zbog svoje lipofilnosti trebala bi biti potpuna ili gotovo potpuna. Smatralo se da bi CTX mogao prodrijeti kroz kožu i mukozne membrane zbog učinaka na ljude prilikom lokalnog izlaganja (LEHANE i LEWIS, 2000.). CTX-i mogu proći kroz placentu (PEARL i sur., 1982.), izlučuju se u majčino mlijeko, iako hiperestezija bradavica može ometati dojenje (BAGNIS i LEGRAND, 1987.). Krv miševa koji su bili izloženi subletalnoj dozi C-CTX-1, sadržavala je koncentracije toksina od 0.25 i 0.12 ng/mL, 30 minuta i 12 sati nakon izlaganja (BOTTEIN DECHRAOUI i sur., 2005.).

### 2.2.2.1.2. Mehanizam toksičnog djelovanja

CTX-i povećavaju propusnost stanice za natrij, naponski osjetljivih natrijevih kanala (CESTÈLE i CATTERALL, 2000.), koji se otvaraju pri normalnom potencijalu membrane. Stoga se da zaključiti da CTX-i utječu na razne mehanizme za povećanje ekscitabilnosti membrane. Oni također induciraju mobilizaciju intracelularnih  $Ca^{2+}$  iona i potiču oticanje stanica. Učinci CTX-a najizraženiji su u živcima (LEWIS i sur., 2000.). Djelovanje ciguatoksina i njegovih prekursora ovisi o strukturi toksina, s većim utjecajem gambiertoksina (P-CTX4B) na  $K^+$  nego na  $Na^+$  kanale (SCHLUMBERGER i sur., 2010.).

### 2.2.2.1.3. Toksičnost

Izbijanja ciguatere samo ponekad uzrokuju smrtne ishode. Postmortem analizom nalazi se akutna visceralna kongestija sa eozinofilnim nekrotičnim lezijama u jetri (gledano svjetlosnim mikroskopom) i ultrastrukturnim promjenama u suralnom živcu sa otečenjem Schwannovih stanica, aksonalnom kompresijom i vezikularnom degeneracijom mijelina (LEHANE i LEWIS, 2000.; TERAQ, 2000.).

CTX-1B predstavlja rizik za zdravlje u koncentracijama većim od 0.1 pg/g (PEARN, 2001.), što se donekle slaže s objavljenim podacima od 0.175 pg/g (OSHIRO i sur., 2010.). Pacijenti s bradikardijom i hipotenzijom mogu zahtijevati intenzivnu njegu, jer pojava kardiovaskularnih simptoma ima loš prognostički značaj. Smatra se da kardiovaskularni simptomi mogu biti rezultat pozitivnog inotropnog učinka i reakcije miokarda na unutarstanično povećanje kalcija (LEHANE i LEWIS, 2000.; LEWIS i sur., 2000.).

#### Jednokratna primjena

Nakon jednokratne primjene na miševima, toksičnost je bila slična nakon peroralne ili intraperitonealne aplikacije, što nam ukazuje na gotovo potpunu p.o. apsorpciju. P-CTX-i i C-CTX-i pokazuju različite potentnosti pri i.p. aplikaciji. Vrijednosti  $LD_{50}$ , nakon i.p. aplikacije miševima su 0.25, 2.3 i 0.9 g/kg za P-CTX-1, -2, -3 te  $LD_{50}$  za C-CTX-1 i -2. vrijednosti su 3.6 i 1.0  $\mu$ g/kg. Intraperitonealna injekcija ili peroralna aplikacija P-CTX-1 ili P-CTX-4C (0.7  $\mu$ g/kg) kod miševa izazivaju slične znakove otrovanja.

Ciljni organi su srce, srž nadbubrežne žlijezde, autonomni živci i penis. Analiza svjetlosnim mikroskopom pokazuje izrazito oticanje i fokalnu nekrozu srčanih mišićnih stanica. Također, primjećena je degeneracija stanica u srži nadbubrežnih žlijezdi. Izraženi edem pluća,

sa kongestijom alveolarnih prostora i bronhiola, uočeni su kod miševa sa teškom dispnejom. Kontinuirana erekcija prisutna je kod 15% miševa koji su intoksicirani ciguatoksinom (LEHANE i LEWIS, 2000.; TERAQ, 2000.). Hipotermija je također uočena kod miševa, a toksogenomske studije pokazuju da nakon toga slijedi aktiviranje puteva detoksikacije faze I i faze II (MOREY i sur., 2008.).

Korištenjem mišjih makrofaga, pokazalo se da CTX-i moduliraju mRNA ekspresiju proupalnih i protuupalnih citokina i inducibilne sintaze dušičnog oksida, a u goveđim kromafinskim stanicama potiču izlučivanje kateholamina (NGUYEN – HUU i sur., 2010.).

#### Ponovljena primjena

Nakon ponovljene intraperitonealne i peroralne aplikacije (100 ng/kg P-CTX-1 ili P-CTX-4C) tijekom 15 dana, uočeno je oticanje srčanih stanica i stanica endotela krvnih kapilara u srcu. Iako pojedinačne doze istih toksina nisu izazvale promjene koje bi bile vidljive makroskopski, svjetlosnim mikroskopom, čak ni na ultrastrukturnim razinama srca miša, ponavljana primjena CTX-a rezultirala je teškim morfološkim, ali reverzibilnim srčanim promjenama. Na ultrastrukturnoj razini, promjene izazvane ponovljenim davanjem CTX-a bile su slične onima kod miševa koji su primali CTX jednokratno (700 ng/kg ili više) (TERAQ, 2000.).

#### **2.2.2.1.4. Klinička slika**

U svom tipičnom obliku, ciguateru karakterizira pojava intenzivnog povraćanja, proljeva i bolova u abdomenu u roku od nekoliko sati od ingestije ribe, ali neurološki simptomi su ipak najistaknutiji i najduže traju. Uključuju poremećaje osjetila, kao što su generalizirani svrbež, utrnulost oko usta, dugotrajna slabost i umor, i neobična osjetilna nelagoda koju izazivaju hladni podražaji (hladna alodinija).

#### **2.2.2.1.5. Liječenje**

Za liječenje ciguateru postoji samo potporno i simptomatsko liječenje npr. tekućinska terapija i kontrola elektrolita, jer antidot nije dostupan. Rijetke kardiovaskularne komplikacije, kao bradikardija i teške hipotenzije mogu zahtjevati intenzivno liječenje. Najčešća terapija u akutnim fazama je i.v. infuzija manitola, ali su objavljeni kontroverzni podaci o njegovoj učinkovitosti: provedeno je istraživanje u kojem nema razlike između tretmana manitolom i

fiziološkom otopinom. Također, lokalni anestetici i antidepressivi mogu biti korisni u liječenju (LEHANE i LEWIS, 2000.; LEWIS, 2001.; ISBISTER i KIERNAN, 2005.).

#### **2.2.2.1.6. Analitičke metode i dopuštene koncentracije**

Najčešće korištena metoda za praćenje je MBA, na temelju kliničkih znakova (izražena hipotermija) i uginuća, promatrano do 48 sati nakon i.p. aplikacije 20 mg ekstrakta iz ribljeg mišića. Zbog slabe osjetljivosti, ovaj test ne može otkriti prisutnost CTX-a u ribama kontaminiranim niskim dozama ciguatere (LEHANE i LEWIS, 2000.).

Razvoj modernih metoda za otkrivanje CTX-a je bilo vrlo komplicirano, jer su pročišćeni toksini rijetko dostupni, čak i u malim količinama. LEWIS i sur. (2009.) opisali su brzu proceduru detekcije CTX-a za LC-MS/MS, a veliki napredak napravili su YOGI i sur. (2011.) u otkrivanju 16 različitih oblika CTX-a pomoću 12 toksinskih standarda sintetiziranih ili izoliranih iz prirode.

Protočna citometrija nudi odabir najosjetljivijih stanica u takvim ispitivanjima omogućavajući brzu procjenu toksičnosti CTX u ekstraktima ribe (MANGER i sur., 2007.). Iako su ispitivanja citotoksičnosti i vezanje korisna u istraživanjima i analizama ciguatere, uključujući radioimunološku analizu i imunoenzimni test (ELISA), još uvijek postoji potreba za jednostavnim dijagnostičkim testovima i metodama za CTX (DICKEY i PLAKAS, 2010.). Pokušaji razvoja komercijalno dostupnog brzog testa za CTX-ove imali su probleme sa lažno pozitivnim i lažno negativnim rezultatima i nisu bili službeno odobreni od AOAC-a (HUNGERFORD, 2009.; WONG i sur., 2005.).

Ukupna sinteza CTX3C i fragmenata dominantnog toksina CTX1B pokazuju obećavajuće rezultate u budućem razvoju "sandwich" ELISE temeljene na 2 sintetička fragmenta (TSUMURAYA i sur., 2010.). Međutim, križna reaktivnost antitijela (dobivenih od CTX3C) za CTX1B nije dovoljna da se omogući primjena za ispitivanje toksičnih riba.

U travnju 2011., Američka Uprava za lijekove i hranu utvrdila prve regulatorne (preporučene) razine za ciguatoksine na 0.01 ng C-CTX1 ekvivalenata/g ribe za Pacifik i 0.1 ng C-CTX1 ekvivalenata/g ribe za Karibe (DICKEY i PLAKAS, 2010.; FDA, 2011.). Ove vrijednosti određene su procjenama epidemija ciguatere u ljudi korištenjem podataka iz ispitivanja citotoksičnosti N2A (MANGER i sur., 1993.) u kombinaciji sa LC-MS/MS (DICKEY i PLAKAS, 2010.) te iz rasprava između stručnjaka za Sjedinjene Američke Države, Japana i Australije.

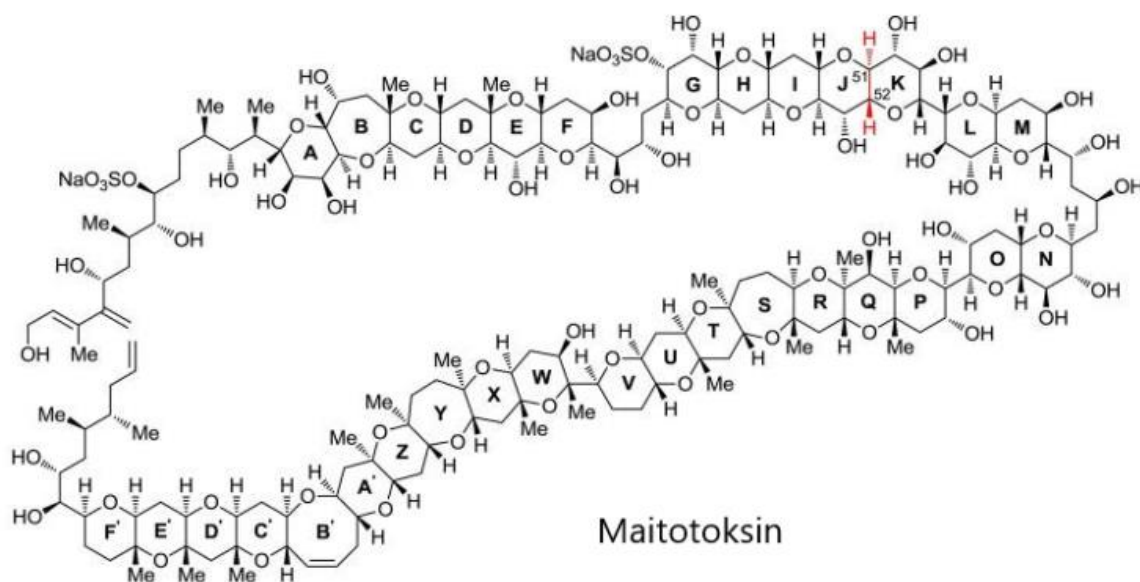


### 2.2.2.2. Maitotoksini

MTX, spoj topiv u vodi, izoliran zajedno sa CTX-om smatra se jednim od biotoksina koji uzrokuju ciguateru (YASUMOTO, 2001.). Međutim, budući da je količina u mesu ribe neznatna i peroralna toksičnost je vrlo niska, maitotoksin ima ograničenu ulogu u pojavi ciguateru (ESTACION, 2000.; YASUMOTO, 2000.).

MTX, koji se naziva i MTX-1, je policiklički polijeter s izuzetkom biopolimera, najveći izolirani prirodni spoj čija je struktura dobro poznata (C<sub>164</sub>H<sub>256</sub>O<sub>68</sub>S<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>; molekularna masa (MW) = 3422) (YASUMOTO, 2001.).

Proizvodi ga epifitski dinoflagelat *Gambierdiscus toxicus* i akumulira se u ribljnoj jetri ribe kirurga i papigače. MTX je prvi puta otkriven u utrobi ribe *Ctenochaetus striatus* (maito – naziv koji potječe s Tahitija), po kojoj je MTX dobio ime. Analoz MTX-a (MTX-2, MW=3298; i MTX-3, MW=1060) su pročišćeni od sojeva *G. toxicus* (HOLMES i LEWIS, 1994.; BOUAKCHA i sur., 1997.; TERAU, 2000.).



Slika 11. Kemijska struktura maitotoksina (NICOLAOU, 2011.)

#### **2.2.2.2.1. Toksokinetika**

Nema podataka o apsorpciji, distribuciji, biotransformaciji i eliminaciji MTX-a.

#### **2.2.2.2.2. Mehanizam toksičnog djelovanja**

MTX je moćan aktivator unosa  $\text{Ca}^{2+}$  preko neselektivnih kationskih kanala u velikom broju stanica, što uzrokuje porast razine unutarstaničnog  $\text{Ca}^{2+}$  koji pokreće procese ovisne o kalciju, uključujući staničnu smrt (ESCOBAR i sur., 1998.; ESTACION, 2000.; MORALES-TLALPAN i VACA, 2002.).

#### **2.2.2.2.3. Toksičnost**

Toksičnost MTX-a kod ljudi nije jasna, jer njegova uloga u nastanku ciguatere nije u potpunosti razjašnjena (ESTACION, 2000.).

Jednokratna primjena

Nakon i.p. aplikacije miševima,  $\text{LD}_{50}$  MTX-a bio je 500 ng/kg (YASUMOTO, 2000.). I.p. aplikacija MTX-a u miševa (200-400 ng/kg) i štakora (400 ng/kg) uzrokuje promjene na želučanoj sluznici, srčanom mišiću i limfoidnom tkivu, kao i porast kortizola u plazmi koji sudjeluje u involuciji limfoidnog tkiva (TERAO, 2000.). Također je zabilježen hipotermički učinak nakon i.p. aplikacije u štakora (338 ng/kg) (GORDON i RAMSDELL, 2005.).

Ponovljena primjena

Svakodnevno ponavljana i.p. aplikacija MTX-a miševima (45 ng/kg u trajanju od 13 dana) rezultirala je atrofijom limfoidnog tkiva, smanjenim cirkulirajućim leukocitima i serumskim imunoglobulinima M razreda, kao i povećanjem udjela kalcija u adrenima i kortizola u plazmi (TERAO, 2000.).

#### **2.2.2.2.4. Analitičke metode i dopuštene koncentracije**

Iako se MTX akumulira u utrobi biljojednih riba i najvjerojatnije ima marginalnu ulogu u nastanku ciguatere, ne smije se zanemariti s obzirom na praksu jedenja ribe bez uklanjanja njihovih unutarnjih organa (YASUMOTO, 2000.). Dakle, vrlo je važna detekcija MTX-a u ribama i fitoplaktonu, stoga su u skladu s time razvijene metode temeljene na tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti (HPLC) i zonskoj elektroforezi (FESSARD i sur., 1994.; LEWIS i sur., 1994.; VAN DOLAH i sur., 1994.; BOUAÏCHA i sur., 1997.).

Nadalje, prema istraživanju TAGIALATELA i sur. (1990.), izvjesno je da bi mogao biti osmišljen test na temelju depolarizacije sinaptosomske plazma membrane pomoću MTX-a i boje osjetljive na napon.

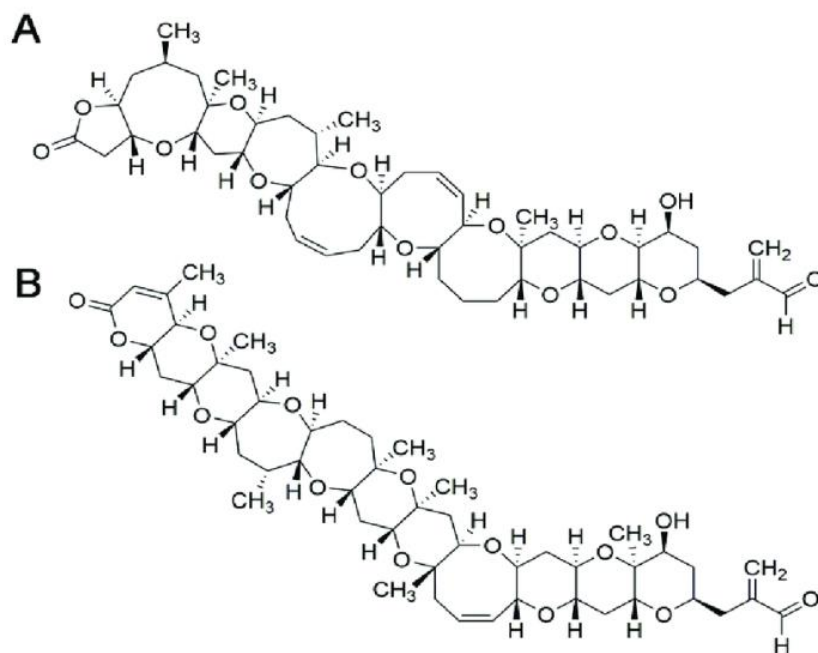
### 2.2.3. Brevetoksini

Brevetoksini (PbTx) su neurotoksični polieteri koje proizvode dinoflagelati iz roda *Karenia* (uglavnom *K. brevis*, ranije poznat kao *Gymnodinium breve* ili *Ptychodiscus breve*) koji uzrokuju "crvenu plimu" duž obale Floride i Meksičkog zaljeva. Ovo štetno cvjetanje mora uzrokuje masovni pomor riba i ostalih morskih organizama. Također, uzrokuju respiratorne tegobe nakon inhalacije morske prašine i iritacije očiju i kože nakon kupanja u moru. Uginuća delfina i lamantina se dovode u vezu sa PbTx-ima nađenih u morskom hranidbenom lancu (FLEWELLING i sur., 2005.). Budući da su školjke otporne na PbTx i akumuliraju ove spojeve, njihova ingestija može izazvati stanje koja se naziva otrovanje neurotoksičnim školjkama (NSP) (LANDSBERG, 2002.).

PbTx-ovi su termostabilni policiklički eterski spojevi topivi u lipidima, grupirani u dvije vrste (A i B) prema njihovim strukturama, najmanje 15 PbTx može se naći u kulturama i prirodnim cvjetovima *K. brevis* (PLAKAS i DICKEY, 2010.). Metabolizam toksina unutar školjaka, prvi su utvrdili ISHIDA i sur. (2004), no danas su informacije opsežnije (PLAKAS i DICKEY, 2010.), te se zna da postoje raznoliki metaboliti brevetoksina, od kojih su neki polarniji od PbTx-a. Neki od ovih konjugata su toksičniji od algalnih oblika; npr., metaboliti BTX-B1 i BTX-B4 su četiri i dva puta toksičniji od njihovih prekursora, PbTx-2.

Nakon epidemije NSP-a, pojavili su se dodatni metaboliti brevetoksina identificirani u ljudskom urinu. Ostale vrste *Karenia* su bile uključene u NSP, a za neke rafidofite (*Chattonella marina*, *C. antiqua*, *Fibrocapsa japonica* i *Heterostigma akashiwo*) utvrđeno je da proizvode spojeve slične brevetoksinu, ali nema dokumentiranih slučajeva NSP-a uzrokovane tim vrstama (LANDSBERG, 2002.; HALLEGRAEFF, 2003.; CIMINIELLO i FATTURUSSO, 2004.).

Cvjetanje vrste *Karenia* pojavilo se uglavnom u Meksičkom zaljevu, gdje je NSP povijesno ograničen, ali povremeno cvjetanje povezano sa NSP-om, također je zabilježeno uz srednju i južnu obalu Atlantika SAD-a i Novom Zelandu. Školjkaši koji uzrokuju NSP su uglavnom kamenice, srčanke i dagnje (LANDSBERG, 2002.).



Slika 12. Kemijska struktura brevetoksina (tip A i B) (VILARINO, 2018.)

### 2.2.3.1. Toksokinetika

Nakon peroralne primjene [<sup>3</sup>H] - označenog PbTx-3 štakorima, utvrđeno je da se toksin distribuira u sve organe te se koncentrira uglavnom u jetri. Eliminira se u ekvivalentnim količinama putem urina i izmeta: otprilike 80% doze izluči se u roku od 7 dana (u prvih 48 sati, PbTx-3 se izlučuje putem fecesa, a nakon toga uglavnom putem urina) (CATTET i GERACI, 1993.).

Nakon i.p. aplikacije PbTx-3 miševima, koncentracija toksina u krvi bila je maksimalna između 0.5 i 4 sata. Nakon 24 sata, smanjena je za jednu trećinu, te je još uvijek bila detektibilna i nakon 7 dana. Značajan dio PbTx-3 u krvnoj plazmi veže se za lipoproteine visoke gustoće (FAIREY i sur., 2001.; WOOFTER i sur., 2003., 2005.). Kod štakora, nakon i.p. aplikacije PtPx-2 i PtBx-3, toksini su detektirani u krvi unutar 1 sata, a za PbTx-2 je karakterističan brz metabolizam i eliminacija urinom tijekom 24 sata (RADWAN i sur., 2005.).

I.v. primjena obilježnog PbTx-3 štakorima pokazala je da se toksin vrlo brzo uklonio iz krvi (<10% je ostalo nakon 1 minute) i distribuira uglavnom do jetre, skeletnih mišića i gastrointestinalnog trakta (18, 70 i 8 % doze nakon 30 minuta). U roku od 24 sata, koncentracija PbTx-3 u skeletnim mišićima se smanjuje na 20% doze, dok u jetri ostaje konstantna te

povećana u gastrointestinalnom traktu i fecesu, zbog izlučivanja putem žuči. Šestog dana se izlučilo otprilike 14% toksina putem urina i 75% u izmetu, također u više oblika polarnih metabolita (POLI i sur., 1990.).

Intratrahealnom instilacijom [<sup>3</sup>H] - označenog PbTx-3 štakorima, utvrđeno je da više od 80% doze bude uklonjeno iz pluća u roku od pola sata i distribuirano po cijelom tijelu (49%), crijevima (32%) i jetri (8%). Krv, mozak i mast su sadržavali najmanje razine toksina. Otprilike 20% početne razine toksina se zadržavalo u tkivima 7 dana. Većina PbTx-3 se izlučuje u roku od 48 sati izmetom (60%) i mokraćom (30%) (BENSON i sur., 1999.).

Također, nakon intratrahealne instilacije kod miševa, PbTx-3 se brzo distribuira u tkiva, uglavnom u jetru i gastrointestinalni trakt, dok se 90% ekskrecije događa unutar 4 dana urinom (11%) i izmetom (64%) (TIBBETTS i sur., 2006.). Nakon ponavljane inhalacije PbTx-3 štakora u vremenu od 5 ili 22 dana, otkrivene su male količine toksina u slezeni i peribronhalnom limfoidnom tkivu, kao i u jetri u kojoj nije došlo do nakupljanja brevetoksina (BENSON i sur., 2004., 2005.).

Kožnom primjenom [<sup>3</sup>H] - označenog PbTx-3 na svinjskoj koži ustanovljen je vrlo brz prodor toksina u dermis, s maksimalnom dermalnom akumulacijom za 4h (KEMPPAINEN i sur., 1991.)

### **2.2.3.2. Mehanizam toksičnog djelovanja**

PbTx i BTX se vežu na 5. mjesto  $\alpha$  podjedinice o naponu ovisnih natrijevih kanala u staničnim membranama (CESTÈLE i CATTERALL, 2000.). Ovi se kanali normalno otvaraju kao odgovor na depolarizaciju membrane i nakon toga se deaktiviraju, vraćajući se u zatvorenu konfiguraciju tijekom repolarizacije membrane. Vezanje toksina otvara naponski ovisne natrijeve kanale zbog negativnog pomaka akcijskog potencijala, što rezultira kontinuiranim prilivom Na<sup>+</sup> i depolarizacijom membrane. Također, postoje alteracije u normalnim promjenama konfiguracije o naponu ovisnih natrijevih kanala tijekom procesa depolarizacije/repolarizacije. One utječu na membranska svojstva ekscitabilnih stanica i osnova su neurotoksičnih učinaka toksina.

Studije vezanja receptora sa sinoptosomskim pripravcima iz mozga bolesnika pokazale su tritirano vezanje PbTx-3 s afinitetom nešto nižim od onog kod štakora i slično onom od ekscitabilnih tkiva riba (TRAINER i BADEN, 1999.; CIMINIELLO i FATTURUSSO, 2004.). Ostali simptomi koji utječu na bronhokonstrikciju i/ili imunološke učinke na respiratorni trakt

povezani su sa stimulacijom oslobađanja neurotransmitera i degranulacijom mastocita, kao i s inhibicijom lizosomalnih proteinaza fagocitnih stanica, poznatijih kao katepsini (ABRAHAM i sur., 2005.; BADEN i sur., 2005.).

### 2.2.3.3. Toksičnost

Konsumacija PbTx-a i njihovih metabolita koji se nalaze u kontaminiranim školjkama, može izazvati NSP sindrom koji se očituje slično kao ciguatera, ali je manje opasan. Simptomi se javljaju u roku od 30 minuta do 3 sata, traju nekoliko dana, a uključuju mučninu, povraćanje, proljev, groznicu, znojenje, glavobolje, slabost mišića i bolove u zglobovima, parestezija, aritmije, otežano disanje, midrijazu, dvostruki vid, probleme u govoru i gutanju. Mogući su slučajevi pojave kome, ali nisu zabilježeni smrtni ishodi ili kronični simptomi (BADEN i ADAMS, 2000.; ISBISTER i KIERNAN, 2005.). Zbog krhkosti stanica *Karenia*, PbTx može biti otpušten u morsku vodu i aerosoliziran vjetrom, s mogućnošću inhalacije spojeva koji uzrokuju respiratorne tegobe i iritacije očiju i sluznice respiratornog trakta. Naravno, ovi simptomi su reverzibilni ukoliko se napusti kontaminirano područje. Glavni toksin odgovoran za respiratorne probleme je PbTx-3. Tijekom plivanja, direktan kontakt s toksičnim spojevima može uzrokovati iritaciju kože, nosa i očiju (LANDSBERG, 2002.).

#### Jednokratna aplikacija

Nakon i.p. aplikacije miševima, LD<sub>50</sub> od PbTx -1, -2, -3 bili su 100, 200 i 170 µg/kg. Simptomi uključuju trenutnu nadražljivost, nakon čega slijedi paraliza zadnjeg dijela, dispneja, salivacija, suženje, mokrenje, defekacija i smrt od respiratorne paralize (LANDSBERG, 2002.; FAO/IOC/WHO, 2005). LD<sub>50</sub> nakon p.o. primjene miševima kreće se od 520 µg/kg za PbTx-3 do 6600 µg/kg za PbTx-2 (FAO / IOC / WHO, 2005.). PbTx-3 uzrokovao je tremore praćene izrazitim mišićnim kontrakcijama ili fascikulacijama, podizanjem repa, otežanim disanjem i smrću (VAN APELDORN i sur., 2001.).

#### Ponovljena primjena

Provedena su istraživanja ponavljane izloženosti PbTx- ima u štakora nakon udisanja PbTx-3. Izloženost 500 µg PbTx-3/m<sup>3</sup> inhalacijom na nos 0.5 ili 2 h/ dan tijekom 5 dana (što odgovara 8.3 i 33 µg/kg/dan) izazvala je smanjenje tjelesne težine pri najvećoj dozi, ali nije bilo oštećenja tkiva niti znakova citotoksičnosti i upala u bronhoalveolarnoj tekućini dobivenom BAL-om. Također, dulje izlaganje štakora inhalaciji PbTx-3 u trajanju od 22 dana (što odgovara 0.9 i 5.8 µg/kg/dan) pokazalo je slične rezultate: smanjenu tjelesnu težinu u obje skupine

štakora, supresiju humoralnog imuniteta, kao i minimalnu alveolarnu hiperplaziju makrofaga i povećan broj retikulocita u krvi (BENSON i sur., 2004., 2005.).

Toksičnost za ribe i ostale morske životinje

PbTx su snažni ihtiotoksini koji su odgovorni za uginuće milijarde riba tijekom godina. Smatra se da se ovi toksini apsorbiraju kroz škrge, ali ingestija i smrtni ishod se mogu dogoditi u prisutnosti oko 250 *K. brevis* stanica/mL. Znakovi intoksikacije u riba uključuju nasilno uvijanje, nepravilno plivanje, defekaciju i regurgitaciju, paralizu prsne peraje, zakrivljenost kaudalne peraje, gubitak ravnoteže, vazodilataciju, konvuzije i smrt zbog zatajenja disanja. Kronično intoksicirane ribe pokazuju vrlo malo patoloških promjena osim blage hemolize. Kronična hemoliza je otkrivena zbog postojanja anemije, cijanoze, viskozne krvi, splenomegalije, hemosideroze jetre i dehidracije. Ptice se nerijetko nalaze na umoru ili uginule, osobito kormorani s dvostrukim grimizom, mali ronac, mala crnika, delfini i lamantini (LANDSBERG, 2002.).

#### **2.2.3.4. Klinička slika**

Simptomi NSP-a su akutni gastrointestinalni i neurološki simptomi, uključujući mučninu, povraćanje, proljev, drhtavicu, znojenje, glavobolju, slabost mišića i bolovi u zglobovima, parestezije, aritmije, otežano disanje, midrijaza, dvostruki vid i poteškoće u gutanju i govoru. Oporavak nastupa za 2 ili 3 dana te do sada nisu prijavljeni fatalni ishodi NSP-a (BADEN i ADAMS, 2000.; HALLEGRAEFF, 2003.; ISBISTER i KIERNAN, 2005.).

#### **2.2.3.5. Liječenje**

Liječenje je simptomatsko i potporno. Oporavak se očekuje za 2 ili 3 dana (VAN APELDORN i sur., 2001.).

#### **2.2.3.6. Analitičke metode i dopuštene koncentracije**

U Sjedinjenim Američkim Državama i drugim zemljama uspostavila se regulatorna razina od 80 µg PbTx-3 ekvivalenta/100g školjki. Monitoring NSP toksina se provodi pomoću MBA, zasnovanog na vremenu preživljavanja miševa nakon i.p. aplikacije ekstrakta školjkaša. Brevetoksini se intenzivno metaboliziraju u školjkama, a metode koje se koriste za praćenje školjki za brevetoksine su ELISA I LC-MS/MS alternative (PLAKAS i DICKEY, 2010.).

### 3. RASPRAVA

Otrovi morskih organizama uzrokuju otrovanja nakon konzumacije različitih kontaminiranih školjkaša i riba. Zbog svojeg specifičnog načina prehrane filtracijom fitoplanktona, otrovi se mogu akumulirati i koncentrirati u školjkašima te predstavljati opasnost za konzumente (NSW, 2015.). Otrovanje kontaminiranim školjkama uzrokuje sindrome od kojih su najpoznatiji: otrovanje školjkašima koje uzrokuje gubitak pamćenja (ASP), otrovanje školjkašima koje uzrokuje paralizu (PSP), otrovanje školjkašima koje uzrokuju dijareju (DSP), azaspiracidno otrovanje školjkašima (AZP) i neurotoksično otrovanje školjkama (NSP) (AUNE, 2008.), otrovanje ciguaterom te izuzetak - otrovanje tetrodotoksinom koji je zapravo bakterijskog podrijetla (YASUMOTO, 2000.). Trovanje takvim školjkama predstavlja rizik za rekreativne sakupljače školjaka i komercijalne proizvođače. Zbog toga je monitoring vrlo važan, kako bi se rizik sveo na minimum. Uzroci širenja otrova morskih organizama su prvenstveno balastne vode, promjena klime, acidifikacija oceana te uvoz ili izvoz školjkaša (FSAI, 2016.). Također, moguće je da je incidencija otrovanja u porastu zbog boljih programa monitoringa te komercijalne dostupnosti spojeva uključenih u dijagnostiku otrovanja (MURK i sur., 2019.).

Metode koje se koriste za analizu otrova, moraju biti validirane od strane međunarodnih organizacija kako bi se zaštitilo javno zdravlje i smanjio ekonomski utjecaj (BOTANA i sur., 2013.). Predloženo je nekoliko metoda kao što su mišji biološki test MBA, tekućinska kromatografija (HPLC) s fluorescentnom (FL) ili, ultraljubičastima (UV) detektorom ili masenom spektrometrijom (MS) i imunološka analiza. Mišji biološki test se dugo vremena koristio kao referentna metoda, ali zbog zaštite zdravlja životinja i načela 3R tj. smanjenja, zamjene i poboljšanja, zamjenjuje se alternativnim metodama (HESS i sur., 2006.). Bilo koja metoda, predložena kao alternativa ne bi trebala biti manje učinkovita od MBA i mora osigurati jednaku zaštitu javnog zdravlja (BOTANA i sur., 2013.).

Iako postoji mnogo izbora za analizu i otkrivanje otrova morskih organizama, trenutna zakonska regulativa zahtijeva uporabu LC-MS, sa izuzetkom DA i saksitoksina koji se mogu analizirati i HPLC-om (BOTANA i sur., 2013.). Kemijska kompleksnost otrova morskih organizama i otkrivanje analoga različitih skupina svake godine ističe važnost dostupnosti analitičkih metoda. Zbog toga je od velike važnosti nastaviti s razvojem metoda koje daju brze i točne podatke o prisutnosti otrovnih spojeva u hrani i opasnostima za sigurnost hrane za subjekte koji se bave uzgojem školjkaša i riba (BOTANA i sur., 2013.).



## 4. ZAKLJUČCI

1. Veliku većinu otrova morskih organizama proizvode dinoflagelati, cijanobakterije, alge kremenjašice i jednostanične alge.
2. Otrovanje ljudi i životinja najčešće je posljedica konzumiranja kontaminirane hrane: riba i školjaka zbog specifičnog načina njihove prehrane
3. S obzirom na mehanizam toksičnog djelovanja, otrovi morskih organizama najčešće izazivaju promjene na živčanom, probavnom, kardiovaskularnom i dišnom sustavu.
4. Dijagnostika se temelji na anamnestičkim podacima, kliničkim znakovima otrovanja, pato-histološkom nalazu i laboratorijskom (analitičkom) nalazu .
5. Prognoza i liječenje ovisi o vrsti i količini otrova, putu unosa i kliničkim znakovima. Specifičnog antidota nema, a terapija je simptomatska i potporna.
6. Uporabom novijih kemijskih metoda i komercijalnom dostupnosti samih otrova, uvelike se povećava znanje o otrovima morskih organizama te njihovom metabolizmu i biotransformaciji na različitim razinama u hranidbenom lancu.
7. Procjenom rizika za otrove morskih organizama bave se međunarodna tijela kao FAO, WHO i EFSA, te se njihove preporuke baziraju na pouzdanim znanstvenim činjenicama o toksičnosti i izloženosti.
8. Moguće je da će slučajevi otrovanja postati češći zbog globalnih promjena u klimi.
9. Potrebno je više znanstvenih istraživanja i uključivanje velikog broja zemalja da bi se dobili što točniji podaci o monitoringu i opasnostima za ljude i životinje
10. Republika Hrvatska trebala bi imati Centar za praćenje otrova morskih organizama kako bi se na vrijeme otkrila prisutnost otrovnih spojeva i da bi se moglo eventualno reagirati u što kraćem vremenu. Naročito zbog razvijene industrije školjaka i mnoštva raznolike ribe.

## 5. POPIS LITERATURE

- AASEN, J. A. B., A. ESPENES, C.O. MILES, T.A. SAMDAL, P. HESS, T. AUNE (2011): Combined oral toxicity of azaspiracid-1 and yessotoxin in female NMRI mice. *Toxicol.* 57, 909-917.
- AASEN, J. A. B., A. ESPENES, P. HESS, T. AUNE (2010): Sub-lethal dosing of azaspiracid-1 in female NMRI mice. *Toxicol.* 56, 1419-1425.
- AASEN, J., I. A. SAMDAL, C. O. MILES, E. DAHL, L. R. BRIGGS, T. AUNE (2005a): Yessotoxins in Norwegian blue mussels (*Mytilus edulis*): uptake from *Protocerastrum reticulatum*, metabolism and depuration. *Toxicol.* 45, 265-272.
- AASEN, J., S. L. MACKINNON, P. LEBLANC, J. A. WALTER, P. HOVGAARD, I. AUNE, M. A. QUILLIAM (2005b): Detection and identification of spirolides in Norwegian shellfish and plankton. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 509-515.
- ABRAHAM, W. M., A. J. BOURDELAIS, A. AHMED, I. SEREBRIAKOV, D. G. BADEN (2005): Effects of inhaled brevetoxins in allergic airways: toxin-allergen interactions and pharmacologic intervention. *Environ. Health Perspect.* 113, 632-637.
- ALEXANDER, J., D. BENFORD, A. BOOBIS, S. CECCATELLI, J. P. CRAVEDI, A. D. DOMENICO, D. DOERGE, E. DOGLIOTTI, L. EDLER, P. FARMER, M. FILIPIC, J. FINK-GREMMELS, P. FURST, T. GUERIN, H. K. KNUTSEN, C. LIVESEY, M. MACHALA, A. MUTTI, J. SCHLATTER, R. VAN LEEUWEN, P. VERGER (2009a): Marine biotoxins in shellfish—Domoic acid. *EFSA J.* 1181, 1–61
- ALEXANDER, J., D. BENFORD, A. COCKBURN, J. P. CRAVEDI, E. DOGLIOTTI, M. FERNÁNDEZ-CRUZ, J. FINK-GREMMELS, P. FÜRST, C. GALLI, P. GRANDJEAN, J. GZYL, G. HEINEMEYER, N. JOHANSSON, A. MUTTI, J. SCHLATTER, R. LEEUWEN, C. PETEGHEM, P. VERGER, M. ESKOLA (2009b): Marine biotoxins in shellfish-Yessotoxin group, *EFSA Scientific Opinion*. *EFSA J.* 907, 1-62.
- ALVAREZ, G., E. URIBE, P. AVALOS, C. MARIÑO, J. BLANCO (2010): First identification of azaspiracid and spirolides in *Mesoderma donacium* and *Mulinia edulis* from northern Chile. *Toxicol.* 55, 638-641.
- ANDJELKOVIC, M., S. VANDEVIJVERE, J. VAN KLAVEREN, H. VAN OYEN, J. VAN LOCO (2012): Exposure to domoic acid through shellfish consumption in Belgium. *Environ. Int.* 49, 115-119.
- ANDRINOLO, D., L. E. MICHEA, N. LAGOS (1999): Toxic effects, pharmacokinetics and clearance of saxitoxin, a component of paralytic shellfish poison (P), in cats. *Toxicol.* 37, 447-464.
- ANDRINOLO, D., V. IGLESIAS, C. GARCIA, N. LAGOS (2002): Toxicokinetics and toxicodynamics of gonyautoxins after an oral toxin dose in cats. *Toxicol.* 40, 699-709.
- ARAOZ, R., D. SERVENT, J. MOLGÓ, B. I. LORGA, C. FRUCHART-GAILLARD, E. BENOIT, Z. GU, C. STIVALA, A. ZAKARIAN (2011): Total synthesis of pinnatoxins A and G and revision of the mode of action of pinnatoxin A. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 10499-10511.

- AUNE, T. (2008): Risk Assessment of Marine Toxins. In: *Seafood and Freshwater toxins*. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton. London. New York, 2008. 5, 6, 8.
- AUNE, T., M. YNDESTAD (1993): Diarrhetic shellfish poisoning. In: *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*, 1<sup>st</sup> edition (Falconer I. R., Ed.). Academic Press, London, pp. 87-104.
- AUNE, T., O. B. STABELL, K. NORDSTOGA, K. TJOTTA (1998): Oral toxicity in mice of algal toxins from the diarrhetic shellfish toxin (DST) complex and associated toxins. *J. Nat. Toxins*. 7, 141-158.
- AUNE, T., R. SORBY, T. YASUMOTO, H. RAMSTAD, T. LANDSVERK (2002): Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of yessotoxin towards mice. *Toxicon*. 40, 77-82.
- AUNE, T., S. LARSEN, J. A. B. AASEN, N. REHMANN, M. SATAKE, P. HESS (2007): Relative toxicity of dinophysistoxin-2 (DTX-2) compared to okadaic acid, based on acute intraperitoneal toxicity in mice. *Toxicon*. 49, 1-7.
- BADEN, D. G., A. J. BOURDELAIS, H. JACOCKS, S. MICHELLIZA, J. NAAR (2005): Natural and derivative brevetoxins: historical background, multiplicity, and effects. *Environ. Health. Perspect.* 113, 621-625.
- BADEN, D. G., D. J. ADAMS (2000): Brevetoxins: chemistry, mechanism of action, and methods of detection. In: *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, (Botana L. M., Ed.) Dekker, New York, pp. 505-532.
- BAGNIS, R. A., A. M. LEGRAND (1987): Clinical features on 12,980 cases of ciguatera (fish poisoning) in French Polynesia. In: *Progress in Venom and Toxin Research: Proceedings of the 1st Asia-Pacific Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins*, (Gopalakrishnakone P, Tan C. K., Eds.). National University of Singapore, Singapore, pp. 372-381.
- BENSON, J. M., D. L. TISCHLER, D. G. BADEN (1999): Uptake, tissue distribution, and excretion of brevetoxin 3 administered to rats by intratracheal instillation. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 56, 345-355.
- BENSON, J. M., F. F. HAHN, T. H. MARCH, J. D. MCDONALD, A. P. GOMEZ, M. J. SOPORI, A. J. BOUDELAIS, J. YAAR, J. ZAIAS, G. D. BOSSART, D. G. BADEN (2005): Inhalation toxicity of brevetoxin 3 in rats exposed for twenty two days. *Environ. Health Perspect* 113, 626-631.
- BENSON, J., F. HAHN, T. MARCH, J. MCDONALD, M. SOPORI, J. SEAGRAVE, A. GOMEZ, A. BOURDELAIS, J. NAAR, J. ZAIAS, G. BOSSART, D. BADEN (2004): Inhalation of brevetoxin 3 in rats exposed for 5 days. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 67, 1443-1456.
- BERVEN, G., F. SÆTRE, K. HALVORSEN, P. O. SEGLEN (2001): Effects of the diarrhetic shellfish toxin, okadaic acid, on cytoskeletal elements, viability and functionality of rat liver and intestinal cells. *Toxicon*. 39, 349-362.
- BIALOJAN, C., A. TAKAI (1988): Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. *Biochem. J.* 256, 283-290.
- BOADA, L. D., M. ZUMBADO, O. R. MANUEL, M. LUZARDO, S. M. ALMEIDA-GONZALEZ, S. M. PLAKAS, R. GRANADE, R. HUDSON, A. ABRAHAM, E. L. E.

- JESTER, R. W. DICKEY (2010): Ciguatera fish poisoning on the west Africa coast: an emerging risk in the Canary Islands (Spain). *Toxicon*. 56, 1516-1519
- BOTANA, A. M., P. OTERO, P. RODRÍGUEZ, A. ALFONSO, L. M. BOTANA (2013): Current situation on analysis of marine toxins. *Rev. Anal. Chem.* 32, 15–34.
- BOTTEIN DECHRAOUI, M. Y., Z. WANG, J. TURQUET, M. CHINAIN, T. DARIUS, P. CRUCHET, F. E. RADWAN, R. V. W. DICKEY, J. S. RAMSDELL (2005): Biomonitoring of ciguatoxin exposure in mice using blood collection cards. *Toxicon*. 46, 243-251.
- CAMPBELL, L., R. J. OLSON, H. M. SOSIK, A. ABRAHAM, D. W. HENRICH, C. J. HYATT, E. J. BUSKEY (2010): First harmful *Dinophysis* (Dinophyceae, Dinophysiales) bloom in the U.S. is revealed by automated imaging flow cytometry. *J. Phycol.* 46, 66-75.
- CATTET, M., J. R. GERACI (1993): Distribution and elimination of ingested brevetoxin (PbTx-3) in rats. *Toxicon*. 31, 1483-1486.
- CEMBELLA, A. D. (2003): Chemical ecology of eukaryotic microalgae in marine ecosystems. *Phycologia*. 42, 420-447.
- CEMBELLA, A. D., A. BAUDER, S. MAC KINNON, M. QUILLIAM, D. RICHARD, J. WALTER, A. WINDUST (2002): Spirolides: emerging phycotoxins in plankton and shellfish from the North Atlantic. *Proceeding of the Fourth International Conference on Molluscan Shellfish Safety*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, Paris.
- CEMBELLA, A. D., B. KROCK (2008): Cyclic imine toxins: chemistry, biogeography, biosynthesis and pharmacology. In: *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, (Botana L.M., Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 561-580.
- CESTÈLE, S., W. A. CATTERALL (2000): Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie*. 82, 883-892.
- CIMINIELLO, P., C. DELL'AVERSANO, E. DELLO IACOVO, E. FATTORUSSO, M. FORINO, L. TARTAGLIONE (2011): LC-MS of palytoxin and its analogues: state of the art and future perspectives. *Toxicon*. 57, 376-389
- CIMINIELLO, P., E. FATTORUSSO (2004): Shellfish toxins: chemical studies on northern Adriatic mussels. *Eur. J. Org. Chem.* 2004, 2533-2551.
- DEEDS, J. R., K. WILES, G. B. HEIDEMAN, K. D. WHITE, A. ABRAHAM (2010): First U.S. report of shellfish harvesting closures due to confirmed okadaic acid in Texas Gulf coast oysters. *Toxicon*. 55, 1138-1146.
- DEGRASSE, S. L., J. VAN DE RIET, R. HATFIELD, A. TURNER (2010): Pre- versus post-column oxidation liquid chromatography fluorescence detection of paralytic shellfish toxins. *Toxicon*. 57, 619-624.
- DICKEY, R. W., S. M. PLAKAS (2010): Ciguatera: a public health perspective. *Toxicon*. 56, 123-136.
- DOBLE, A. (2000): Pharmacology of domoic acid. In: *Seafood and Freshwater toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection*, (Botana L. M., Ed.). Dekker, New York, pp. 359-372.
- DOMÍNGUEZ, H. J., B. PAZ, A. H. DARANAS, M. NORTE, J. M. FRANCO, J. J. FERNÁNDEZ (2010): Dinoflagellate polyether within the yessotoxin, pectenotoxin and

okadaic acid toxin group: characterization, analysis and human health implications. *Toxicon*. 56, 191-217.

DRAISCI R., L. LUCENTINI, L. GIANNETTI, P. BORIA, R. POLETTI (1996): First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe. *Toxicon*. 34, 923-935.

DRAISCI, R., E. FERRETTI, L. PALLESCHI, C. MARCHIAFAVA, R. POLETTI, A. MILANDRI, A. CEREDI, M. POMPEI (1999): High levels of yessotoxin in mussels and presence of yessotoxin and homoyessotoxin in dinoflagellates of the Adriatic Sea. *Toxicon*. 37, 1187-1193.

DRAISCI, R., L. LUCENTINI, A. MASCIONI (2000): Pectenotoxins and yessotoxins: chemistry, toxicology, pharmacology, and analysis. In: *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, (Botana L.M., Ed.). Dekker, New York, pp. 289-324.

EFSA, EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2009): Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Palytoxin group1 EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. *CONTAM* 7, 1393.

EFSA, EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2008a): Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Marine Biotoxins in Shellfish: okadaic acid and analogues. *EFSA J.* 589, 1-62.

EFSA, EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2008b): Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Marine Biotoxins in Shellfish: azaspiracids. *EFSA J.* 723, 1-52.

EFSA, EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2008c): Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Marine Biotoxins in Shellfish: yessotoxin group. *EFSA J.* 907, 1-56.

EFSA, EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2009a): Scientific opinion on marine biotoxins in shellfish: palytoxin group. *EFSA J.* 7, 1393.

EFSA, EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2009b): Scientific opinion on marine biotoxins in shellfish: pectenotoxin group. *EFSA J.* 1109, 1-47.

EFSA, EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2010): Scientific opinion on marine biotoxins in shellfish: cyclic imines (spirolides, gymnodimines, pinnatoxins and pteriatoxins). *EFSA J.* 8, 1628.

EHLERS, A., J. SCHOLZ, A. THESE, S. HESSEL, A. PREISS-WEIGERT, A. LAMPEN (2011): Analysis of the passage of the marine biotoxin okadaic acid through an in vitro human gut barrier. *Toxicology*. 279, 196-202.

ESCOBAR, L. I., C. SALVADOR, M. MARTINEZ, L. VACA (1998): Maitotoxin, a cationic channel activator. *Neurobiology*. 6, 59-74.

ESPENES, A., J. AASEN, M. SATAKE, A. SMITH, N. ERAKER, T. AUNE (2006): Toxicity of yessotoxin in mice after repeated oral exposure. In: *Molluscan Shellfish Safety: Proceedings of the 5th International Conference on Molluscan Shellfish Safety*, June 14-18, 2004, Galway, Ireland, (Henshilwood K., Deegan B., McMahon I., Cusack C., Keaveney S., Silke J., o'Cinneide M., Lyons D., Hess P., Eds.) Marine Institute, Galway, Ireland, pp. 419-423.

- ESPIÑA, B., A. RUBIOLLO (2008): Marine toxins and the cytoskeleton: pectenotoxins, unusual macrolides that disrupt actin. *FEBS J.* 275, 6082-6088.
- ESTACION, M. (2000): Ciguatera toxins: mechanism of action and pharmacology of maitotoxin. In: *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, (Botana L. M., Ed.). Dekker, New York pp. 473-503.
- ETHERIDGE, S., V. RIVERA, K. WHITE, J. ROACH, M. POLI (2007): Determination of paralytic shellfish Poisoning toxins using the Lawrence method: application to human urine and serum. In: *Proceedings of the Fourth Symposium on Harmful Algae in the US*, Woods Hole, MA, October 28. - November 1., 2007.
- EUROPSKA KOMISIJA (2002): Commission decision of 15 March 2002 Laying down detailed rules for the implementation of Council Directive 91/492/ECC as regards the maximum levels and the methods of analysis of certain marine biotoxins in bivalve molluscs, echinoderms, tunicates and marine gastropods (2002/225/EC). *Off. J. Eur. Commun.* 175, 62-64.
- EUROPSKA KOMISIJA (2011): Commission regulation (EU) No. 15/2011 of 10 January 2011 amending regulation (EC) No. 2074/2005 as regards recognised testing methods for detecting marine biotoxins in live bivalve molluscs. *Off. J. Eur. Union.* L6/3-L6/6.
- FAIREY, E. R., N. G. SHUART, M. BUSMAN, P. D. R. MOELLER, J. S. RAMSDELL (2001): Biomonitoring brevetoxin exposure in mammals using blood collection cards. *Environ. Health Perspect* 109, 717-720.
- FALK, M., I. W. BURTON, T. HU, J. A. WALTER, J. L. C. WRIGHT (2001): Assignment of the relative stereochemistry of the spirolides, macrocyclic toxins isolated from shellfish and from the cultured dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. *Tetrahedron.* 57, 8659-8665.
- FAO, Food and Agriculture Organization (2004) Marine biotoxins Food and Nutrition Paper 80. <http://www.fao.org/3/a-y5486e.pdf> (Posjećeno 20.8.2020)
- FAO/IOC/WHO (2005): Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Molluscan Bivalves, Oslo, Norway 27. September-1. October 2004. ([http://www.fao.org/es/ESN/food/risk\\_biotoxin\\_en.stm](http://www.fao.org/es/ESN/food/risk_biotoxin_en.stm).)
- FDA, Food and Drug Administration (2011): Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance. (<http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/Seafood/FishandFisheries/ProductsHazards-andControlsGuide/default.htm>). (posjećeno 20.8.2020)
- FERNÁNDEZ, M. L., D. J. A. RICHARD, A. D. CEMBELLA (2003): *In vivo* assays for phycotoxins. In: *Manual on Harmful Marine Microalgae*, (Hallegraeff G. M., Anderson D. M., Cembella A. D., Eds.). UNESCO, Saint-Berthevin, France, pp. 347-380.
- FESSARD, V., Y. GROSSE, A. PTOHL-LESZKOWICZ, S. PUISEUX-DAO (1996): Okadaic acid treatment induces DNA adduct formation in BHK21 Cl3 fibroblasts and HESV keratinocytes. *Mutat. Res.* 361, 133-141
- FESSARD, V., G. DIOGENE, A. DUBREUIL, S. PUISEUX-DAO (1994): Selection of cytotoxic responses to maitotoxin and okadaic acid and evaluation of toxicity of dinoflagellate extracts. *Nat. Toxins* 2, 322-328.

FLEWELLING, L. J., J. P. NAAR, J. P. ABBOTT, D. G. BADEN, N. B. BARROS, G. D. BOSSART, M. Y. BOTTEIN DECHRAOUI, D. G. HAMMOND, E. M. HAUBOLD, C. A. HEIL, M. S. HENRY, H. H. JACOBS, T. A. LEIGHFIELD, R. H. PIERCE, T. D. PITCHFORD, S. A. ROMMEL, P. S. SCOTT, K. A. STEIDINGER, E. W. TRUBY, F. M. VAN DOLAN, J. H. LANDSBERG (2005): Brevetoxicosis: red tides arnd marine mammal mortalities. *Nature*. 435, 755-756.

FSAI, Food Safety Authority of Ireland (2016): The Occurrence of Marine Biotoxins and Risk of Exposure to Seafood Consumers in Ireland. Report of the Scientific Committee of the Food Safety Authority of Ireland. Abbey Court, Lower Abbey St Dublin 1 DO1 W2H4

FUJIKI, H., M. SUGANUMA (1993): Tumor promotion by inhibitors protein phosphatases 1 and 2A: the okadaic acid class or compounds. *Adv. Cancer. Res.* 61, 143-194.

FUJIKI, H., M. SUGANUMA, T. NAKAYASU, M. TAKAYAMA, H. HAKII, S. HORIUCTU, T. SUGIMURA (1986): Palytoxin is a non 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate type tumor promoter in two-stage skin carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 7, 707-710.

FUREY, A., S. O'DOHERTY, K. O'CALLAGHAN, M. LEHANE, K. J. JAMES (2010): Aspiracid poisoning (AZP) toxins in shellfish: toxicological and health considerations. *Toxicon*. 56, 173-190.

GARCIA, C., D. TRUAN, M. LAGOS, J. P. SANTELICES, J. C. DIAZ, N. LAGOS (2005): Metabolic transformation of dinophysistoxin-3 into dinophysistoxin-1 causes human intoxication by consumption of O-acyl-derivatives dinophysistoxin contaminated mussels. *J. Toxicol. Sci.* 30, 287-296.

GERACI, J. R., D. M. ANDERSON, R. J. TIMPERI, D. J. ST. AUBIN, G. A. EARLY, J. H. PRESCOTT, C. A. MAYO (1989): Humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) fatally poisoned by dinoflagellate toxin. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46, 1895-1898.

GERSSSEN, A., I. E. POL-HOFSTAD, M. POELMAN, P. P. J. MULDER, H. J. VAN DEN TOP, J. DE BOER (2010): Marine Toxins: Chemistry, Toxicity, Occurrence and Detection, with Special Reference to the Dutch Situation. *Toxins*. (Basel) 4, 878–904.

GILL, S., M. MURPHY, J. CLAUSEN, D. RICHARD, M. QUILLIAM, S. MACKINNON, P. LABLANC, R. MUELLER, O. PULIDO (2003): Neural injury biomarkers of novel shellfish toxins, spirolides: a pilot study using immunochemical and transcriptional analysis. *Neurotoxicology*. 24, 593-604.

GLAZIOU, P., A. M. LEGRAND (1994): The epidemiology of ciguatera fish poisoning. *Toxicon*. 32, 863-873.

GOLUBIC, S., R. M. M. ABED, K. PALINSKA, S. PAUILLAC, M. CHINAIN, D. LAURENT (2010): Marine toxic cyanobacteria: diversity, environmental responses and hazards. *Toxicon*. 56, 836-841.

GORDON, C. J., J. S. RAMSDELL (2005): Effects of marine algal toxins on thermoregulation in mice. *Neurotoxicol. Teratol.* 27, 727-731.

GULLAND, F. M., M. E. HAULENA, D. FAUQUIER, G. LANGLOIS, M. E. LANDER, T. ZABKA, R. DUERR (2002): Domoic acid toxicity in Californian sea lions (*Zalophus californianus*): clinical signs, treatment and survival. *Vet. Rec.* 150, 475-480.

GUO, F., T. AN, K. S. REIN (2010): The algal hepatotoxin okadaic acid a substrate for human cytochromes CYP3A4 arnd CYP3A5. *Toxicon*. 55, 325-332.

- HALLEGRAEFF, G. M. (2003): Harmful algal blooms: a global overview. In: Manual on Harmful Marine Microalgae, (Hallegraeff G.M., Anderson D.M., Cembella A.D., Eds.). UNESCO, Saint- Berthevin, France, pp. 25-49.
- HESS, P., B. GRUNE, D. B. ANDERSON, i sur. (2006): Three Rs Approaches in Marine Biotxin Testing. The Report and Recommendations of a joint ECVAM/DG SANCO Workshop (ECVAM Workshop 54). *Altern. Lab. Anim.* 34,193-224.
- HOLMES, M. J., R. J. LEWIS (1994): Purification and characterization of large and small maitotoxins from cultured *Gambierdiscus toxicus*. *Nat. Toxins.* 2, 64-72.
- HOW, C. K., C. H. CHERN, Y. C. HUANG, L. M. WANG, C. H. LEE (2003): Tetrodotoxin poisoning. *Am. J. Emerg. Med.* 21, 51-54.
- HU, T., A. S. W. DEFREITAS, J. M. CURTIS, Y. OSHIMA, J. A. WALTER, J. L. C. WRIGHT (1996): Isolation and structure of prorocentrolide B, a fast-acting toxin from *Prorocentrum maculosum*. *J. Nat. Prod.* 59, 1010-1014.
- HUHN, J., P. D. JEFREY, K. LARSEN, T. RUNDBERGERT, F. RISE, N.R. COX, V. ARCUS, Y. SHI, C. O. MILES (2009): A structural basis for the reduced toxicity of dinophysistoxin-2. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 1782-1786.
- HUNGERFORD, J. M. (2006): Marine and freshwater toxins: committee on natural toxins and food allergens. *J. AOAC Int.* 89, 248-269.
- HUNGERFORD, J. M. (2009): Marine and freshwater toxins: committee on natural toxins and food allergens. *J. AOAC Int.* 92, 3B-6B.
- ISBISTER, G. K., M. C. KIERNAN (2005): Neurotoxic marine poisoning. *Lancet. Neurol.* 4, 218-228.
- ISHIDA, H., A. NOZAWA, H. NUKAYA, L. RHODES, P. MCNABB, P. T. HOLLAND, K. TSUJI (2004): Confirmation of brevetoxin metabolism in cockle *Austrovenum stutchburyi*, and Greenshell mussel, *Perna canaliculus*, associated with New Zealand neurotoxic shellfish poisoning, by controlled exposure to *Karenia brevis* culture. *Toxicon.* 43, 701-712.
- ITO, E., K. TERAOKA (1994): Injury and recovery process of intestine caused by okadaic acid and related compounds. *Nat. Toxins.* 2, 371-377.
- ITO, E., M. OHKUSU, K. TERAOKA, T. YASUMOTO (1996): Intestinal injuries caused by experimental palytoxicosis in mice. *Toxicon.* 34, 643-652.
- ITO, E., M. OHKUSU, K. TERAOKA, T. YASUMOTO (1997): Effects of repeated injections of palytoxin on lymphoid tissues in mice. *Toxicon.* 35, 679-688.
- ITO, E., M. SATAKE, K. OFUJI, M. HIGASCHI, K. HARIGAYA, T. MCMAHON, T. YASUMOTO (2002b): Chronic effects in mice caused by oral administration of sublethal doses of azaspiracid, a new marine toxin isolated from mussels. *Toxicon.* 40, 193-203.
- ITO, E., M. SATAKE, K. OFUJI, N. KURITA, T. MCMAHON, K. JAMES, T. YASUMOTO (2000): Multiple organ damage caused by a new toxin azaspiracid, isolated from mussels produced in Ireland. *Toxicon.* 38, 917-930.
- ITO, E., T. SUZUKI, Y. OSHIMA, T. YASUMOTO (2008): Studies of diarrhetic activity on pectenotoxin-6 in the mouse and rat. *Toxicon.* 5, 707-716.



- ITO, E., T. YASUMOTO (2009): Toxicological studies on palytoxin and ostreocin-d administered to mice by three different routes. *Toxicon*. 54, 244-251.
- ITO, E., T. YASUMOTO, T. AKIRA, S. IMANISHI, K. HARADA (2002a): Investigation of the distribution and excretion of okadaic acid in mice using immunostaining method. *Toxicon*. 40, 159-165.
- IVERSON, F., J. TRUELOVE, E. NERA, L. TRYPHONAS, J. CAMPBELL, E. LOK (1989): Domoic acid poisoning and mussel-associated intoxication: preliminary investigations into the response of mice and rats to toxic mussel extracts. *Food. Chem. Toxicol.* 27, 377-384.
- JAMES, K. J., B. CAREY, J. O'HALLORAN, F. N. VAN PELT, Z. ŠKRABÁKOVÁ (2010): Shellfish toxicity: human health applications of marine algal toxins. *Epidemiol. Infect.* 138, 927-940.
- JAMES, K. J., M. J. SAEZ, A. FUREY, M. LEHANE (2004): Azaspiracid poisoning, the food-borne illness associated with shellfish consumption. *Food Addit. Comtam.* 9, 879-892.
- JEFFERY, B., T. BARLOW, K. MOIZER, S. PAUL, C. BOYLE (2004): Amnesic shellfish poison. *Food Chem. Toxicol.* 42, 545-557.
- KALAITZIS, J. A., R. CHAU, G. S. KOHLI, S. A. MURRAY, B. A. NEILAN (2010): Biosynthesis of toxic naturally-occurring seafood contaminants. *Toxicon*. 56, 244-258.
- KAO, C. Y. (1966): Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena. *Pharmacol. Res.* 18, 997-1049.
- KATIKOU, P. (2008): Palytoxin and analogues: ecobiology and origin, chemistry, metabolism, and chemical analysis. In: *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, (Botana L.M., Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 631-663.
- KEMPPAINEN, B. V., W. G. REIFENRATH, R. G. STAFFORD, M. MEHTA (1991): Methods for in vitro skin absorption studies of a lipophilic toxin produced by red tide. *Toxicology*. bb, 1-17.
- KHARRAT, R., D. SERVENT, E. GIRARD, G. OUANOUNOU, M. AMAR, R. MARROUCHI, E. BENIT, J. MOLGÓ (2008): The marine phycotoxin gymnodimine targets muscular and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes with high affinity. *Neurochem.* 107, 952-963.
- KHERA, K. S., C. WHALEN, G. ANGERS, D. L. ARNOLD (1994): Domoic acid: a teratology and homeostatic study in rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 18-24.
- KNUTSEN, H. K., J. ALEXANDER, L. BARREGÅRD, M. BIGNAMI, B. BRÜSCHWEILER, S. CECCATELLI, B. COTTRILL, M. DINOVI, L. EDLER, B. GRASL-KRAUPP, C. HOGSTRAND, L. HOOGENBOOM, C. S. NEBBIA, I. P. OSWALD, M. ROSE, A. C. ROUDOT, T. SCHWERDTLE, C. VLEMINCKX, G. VOLLMER, H. WALLACE, N. ARNICH, D. BENFORD, L. BOTANA, B. VIVIANI, D. ARCELLA, M. BINAGLIA, Z. HORVATH, H. STEINKELLNER, M. VAN MANEN, A. PETERSEN (2017): Scientific opinion on the risks for public health related to the presence of tetrodotoxin (TTX) and TTX analogues in marine bivalves and gastropods. *EFSA J.* 15, 4752 – 4765.
- KOTAKI, Y., E. F. FURIO, M. SATAKE, N. LUNDHOLM, T. KATAYAMA, K. KOIKE, V. P. FULGUERAS, F. A. BAJARIAS, Y. TAKATA, K. KOBAYASHI, S. SATO, Y.

- FUKUYO, M. KODAMA (2005): Production of isodomoid acids A and B as major toxin components of a pennate diatom *Nitzschia navis-varingica*. *Toxicon*. 46, 946-953.
- KURAMOTO, M., H. ARIMOTO, D. UEMURA (2004): Bioactive alkaloids from the sea: Andrinolo a review. *Mar. Drugs* 1, 39-54.
- LAGO, J., L. P. RODRÍGUEZ, L. BLANCO, J. M. VIEITES, A. G. CABADO (2015): Tetrodotoxin, an Extremely Potent Marine Neurotoxin: Distribution, Toxicity, Origin and Therapeutical Uses. *Mar. Drugs* 13, 6384-6406.
- LAGOS, N. W., D. ANDRINOLO (2000): Paralytic shellfish poisoning (PSP): toxicology and kinetics. In: *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, (Botana, L. M., Ed.), Dekker, New York, pp. 203-216.
- LANDSBERG, J. H. (2002): The effects of harmful algal blooms on aquatic Organisms. *Rev. Fish Sci.* 10, 113-390.
- LAWRENCE, J. E., B. NIEDZWIADK, C. MENARD (2005): Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection: collaborative study. *J. AOAC Int.* 88, 1714-1732.
- LE HÉGARAT, L., A. G. JACQUIN, E. BAZIN, V. FESSARD (2006): Genotoxicity of the marine toxin okadaic acid in human Caco-2 cells and in mice gut cells. *Environ. Toxicol.* 21, 55-64.
- LEHANE, L., R. J. LEWIS (2000): Ciguatera: recent advanced but the risk remains. *Int. J. Food Microbiol.* 61, 91-125.
- LEIRA, F., A. G. CABADO, M. R. VIEYTES, Y. ROMAN, A. ALFONSO, L. M. BOTANA, T. YASUMOTO, C. MALAGUTI, G. P. ROSSINI (2002): Characterization of F-actin depolymerization as a major toxic event induced by pectenotoxin 6 in neuroblastoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 63, 1979-1988.
- LEWIS, R. J. (2001): The changing face of ciguatera. *Toxicon*. 39, 97-106.
- LEWIS, R. J., A. YANG, A. JONES (2009): Rapid extraction combined with LC tandem mass spectrometry (CREM-LC/MS/MS) for the determination of Ciguatoxins in ciguateric fish flesh. *Toxicon*. 54, 897.
- LEWIS, R. J., J. MOLGÓ, D. J. ADAMS (2000): Ciguatera toxins: pharmacology of toxins involved in ciguatera and related fish poisonings. In: *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology. Physiology and Detection* (Botana, L. M., Ed.). Dekker, New York, pp. 419-448.
- LEWIS, R. J., M. J. HOLMES, P. F. ALEWOOD, A. JONES (1994): Ion spray mass spectrometry of ciguatoxin-1, maitotoxin-2 and -3, and related marine polyether toxins. *Nat. Toxins* 2, 56-63.
- LIN, S. (2006): The smallest dinoflagellate genome is yet to be found. a comment on Lajeunesse et al. "*Symbodinium* (Pyrrophyta) genome sizes (DNA content) are smallest among dinoflagellates. *J. Phycol.* 42, 746-748.
- LLEWELLYN, L. (2006): Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Nat. Prod. Rep.* 23, 200-222.

- LÓPEZ-RIVERA, A., K. CALLAGHAN, M. MORIARTY, D. O'DISCOLL, B. HAMILTON, M. LEHANE, K. J. JAMES, A. FUREY (2010): First evidence of azaspiracids (AZAs) a family of lipophilic polyether marine toxins in scallops (*Argopecten purpuratus*) and mussels (*Mytilus chilensis*) collected in two regions of Chile. *Toxicon*. 55, 692-701.
- LUCKAS, B. (1992): Phycotoxins in seafood: toxicological and chromatographic aspects. *J. Chromatogr.* 624, 439-456.
- LUCKAS, B., J. DAHLMANN, K. ERLER, G. GERDTS, N. WAMUND, C. HUMMERT, P. D. HANSEN (2005): Overview of key phytoplankton toxins and their recent occurrence in the North and Baltic Seas. *Environ. Toxicol.* 20, 1-17.
- LUGLIÈ, A., M. G. GIACOBBE, E. RICCARDI, M. BRUNO, S. PIGOZZI, M. A. MARIANI, C. T. SATTA, D. STACCA, A. M. BAZZONI, T. CADDEO, P. FARINA, B. M. PADEDDA, S. PULINA, N. I. SECHI, A. MILANDRI (2017): Paralytic Shellfish Toxins and Cyanotoxins in the Mediterranean: New Data from Sardinia and Sicily (Italy), *Microorganisms* 5, 72.
- MANGER, R. L., D. WOOKLLE, A. BERGER, M. HUNGERTORA (2007): Flow cytometric detection of biological toxins: promising approaches to toxicity-based detection. *Proceedings of Biological Toxins 1: Globalization of Efforts for Methods Development and Validation*. September 18, 2007 Anaheim CA. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- MANGER, R. L., L. S. LEJA, S. Y. LEE, I. M. HUNGERFORD, M. M. WEKELL (1993): Tetrazolium-based cell bioassay for neurotoxins active on voltage-sensitive sodium channels semiautomated assay for saxitoxin, brevetoxin, and ciguatoxin. *Anal. Biochem.* 214, 190-194.
- MATIAS, W. G., A. TRAORE, E. E. CREPPY (1999): Variations in the distribution of okadaic acid in organs and biological fluids of mice related to diarrhoeic syndrome. *Hum. Exp. Toxicol.* 18, 345-350.
- MATIAS, W. K., E. E. CREPPY (1996): Evidence for enterohepatic circulation of okadaic acid in mice. *Tox. Subst. Mech.* 15, 405-414.
- MILES, C. O., A. WILKINS, I. A. SAMDAL, M. SNOWIK, D. PETERSEN, M. A. QUILLIAM, L. J. NAUSTVOLL, T. RUNDBERGET, T. TORGENSEN, P. HOVGAARD, D. J. JENSEN, J. M. COONEY (2004): A novel pectenotoxin, PTX-12, in *Dinophysis* spp. and shellfish from Norway. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1423-1433.
- MOLGÓ, J., P. MARCHOT., R. ARÁOZ, E. BENOIT, B. I. IORGA, A. ZAKARIAN, P. TAYLOR, Y. BOURNE, D. SERVENT (2017): Cyclic imine toxins from dinoflagellates: a growing family of potent antagonists of the nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurochem.* 142, 41-51.
- MORALES-TLALPAN, V., L. VACA (2002): Modulation of the maitotoxin response by intracellular and extracellular cations. *Toxicon*. 40, 493-500.
- MOREY, J. S., J. C. RYAN, M. Y. BOTTEIN DECHRAOUI, A. H. REZVANI, E. D. LEVIN, C. J. GORDON, J. S. RAMSDELL, F. M. VAN DOLAH (2008): Liver genomic responses to ciguatoxin: evidence for activation of phase I and phase II detoxification pathways following an acute hypothermic response in mice. *Toxicol. Sci.* 103, 298-310.

- MUNDAY, R. (2008a): Occurrence and toxicology of palytoxins. In: *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, (Botana L.M., Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 693-713.
- MUNDAY, R. (2008b): Toxicology of the pectenotoxins. In: *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, (Botana L.M., Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 371-380.
- MUNDAY, R. (2008c): Toxicology of cyclic imines: gymnodimine, spirolides, pinnatoxins, pteriatoxins, prorocentrolide, spiro-prorocentrimine, symbioimines. In: *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, (Botana L.M., Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 581-594.
- MUNDAY, R. (2011): Palytoxin toxicology: animal studies. *Toxicon*. 57, 470-477.
- MUNDAY, R., N. R. TOWERS, L. MACKENZIE, V. BEUZENBERG, P. T. HOLLAND, C. O. MILES (2004): Acute toxicity of gymnodimine to mice. *Toxicon*. 44, 173-178.
- MURK, A., J. NICOLAS, F. SMULDERS, C. BÜRK, A. GERSSEN (2019): Marine biotoxins: types of poisoning, underlying mechanisms of action and risk management programmes. 10.3920/978-90-8686-877-3\_09.
- NAKASHIMA, K., O. ARAKAWA, S. TANIYAMA, M. NONAKA, T. TAKATANI, K. YAMAMORI, Y. FUCHI, T. NOGUCHI (2004): Occurrence of saxitoxins as a major toxin in the ovary of a marine puffer *Arothron firmamentum*. *Toxicon*. 43, 207-212.
- NGUYEN-HUU, T. D., C. MATTEI, P. J. NEN, A. J. BOURDELAIS, R. J. LEWIS, E. BENOIT, D. G. BADEN, J. MOLGO, F. A. MEUNIER (2010): Ciguatoxin-induced catecholamine secretion in bovine chromaffin cells: mechanism of action and reversible inhibition by brevenal. *Toxicon*. 56, 792-796.
- NICOLAOU, K. C., R. J. AVERSA (2011): Maitotoxin: An Inspiration for Synthesis. *Isr. J. Chem.* 51, 359-377.
- NIJJAR, M. S., S. S. NIJJAR (2000): Ecobiology, clinical symptoms, and mode of action of domoic acid, an amnesic shellfish toxin. In: *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*. (Botana, L. M., Ed.). Dekker, New York, pp. 325-358.
- NISHIWAKI, R., T. OHTA, E. SUEOKA, M. SUGANUMA, K. HARADA, M. E. WATANABE, H. FUJIKI (1994): Two significant aspects of microcystin-LR: specific binding and liver specificity. *Cancer. Lett.* 83, 283-289.
- NOAA, National Oceanic and Atmospheric Administration (2011): Harmful Algal Blooms: Diarrhetic Shellfish Poison (DSP). ([http://www.nwtsc.noaa.gov/hab/habs/toxins/marine\\_bio-toxins/dsp/index.html](http://www.nwtsc.noaa.gov/hab/habs/toxins/marine_bio-toxins/dsp/index.html)) (posjećeno 3.7.2020.)
- NSW, Department of Primary Industries, Food Authority (2015): Marine biotoxin Management plan. [https://www.foodauthority.nsw.gov.au/sites/default/files/Documents/industry/marine\\_bio\\_toxin\\_management\\_plan.pdf](https://www.foodauthority.nsw.gov.au/sites/default/files/Documents/industry/marine_bio_toxin_management_plan.pdf) (posjećeno 11.7.2020)
- OSHIMA, Y. (1995): Post-column derivatisation liquid chromatography method for paralytic shellfish toxins. *J. AOAC* 78, 528-32.

- OSHIRO, N., K. YOGI, S. ASATO, T. SASAKI, K. TAMANAHA, M. HIRAMA, T. YASUMOTO, Y. INAFUKU (2010): Ciguatera incidence and fish toxicity in Okinawa, Japan. *Toxicon*. 56, 656-661.
- PATOCKA J., L. STREDA (2002): Brief review of natural nonprotein neurotoxins. *ASA newsletter*. 02-2, 16-24.
- PAZ, B., A. H. DARANAS, M. NORTE, P. RIOBÓ, J.M. FRANCO, J. J. FERNÁNDEZ (2008): Yessotoxins, a group of marine polyether toxins: an overview. *Mar. Drugs*.4, 73-102.
- PEARN, J. (2001): Neurology of ciguatera. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 70, 4-8.
- PEARN, J., P. HARVEY, W. DE AMBROSIS, R. LEWIS, R. MCKAY (1982): Ciguatera and pregnancy. *Med. J. Aust.* 1, 57-58.
- PELIN, M., S. SOSA, R. DELLA LOGGIA, M. POLI, A. TUBARO, G. DECORTI, C. FLORIO (2011): The cytotoxic effect of palytoxin on Caco-2 cells hinders their use for in vitro absorption studies. *Food. Chem. Toxicol.* doi:10.1016/j.fct.2011.10.032.
- PLAKAS, S. M., R. W. DICKEY (2010): Advances in monitoring and toxicity assessment of brevetoxins in molluscan shellfish. *Toxicon*. 56, 137-149.
- POLI, M. A., C. B. TEMPLETON, W. L. THOMPSON, F. J. HEWETSON (1990): Distribution and elimination of brevetoxin PbTx-3 in rats. *Toxicon*. 28, 903-910.
- PRESTON, E., I. HYNIE (1991): Transfer constants for blood-brain barrier permeation of the neuroexcitatory shellfish toxin, domoic acid. *Can. J. Neurol. Sci.* 18, 39-44.
- QUILLIAM, M. A. (2003): Chemical methods for lipophilic shellfish. In: *Manual on Harmful Marine Microalgae*, (Hallegraeff G. M., Anderson D. M., Cembella A. D., Eds.). UNESCO, Saint-Berthevin, France, pp. 211-265.
- RADWAN, F. F. Y., Z. WANG, J. S. RAMSDELL (2005): Identification of a rapid detoxification mechanism for brevetoxin in rats. *Toxicol. Sci.* 85, 839-846.
- RAMBLA-ALEGRE, M., C. O. MILES, P. DE LA IGLESIA, M. FERNANDEZ-TEJEDOR, S. JACOBS, I. SIOEN, W. VERBEKE, I. A. SAMDAL, M. SANDVIK, V. BARBOSA, A. TEDIOSI, E. MADORRAN, K.GRANBY, M. KOTTERMAN, T.CALIS i SUR. (2018): Occurrence of cyclic imines in European commercial seafood and consumers risk assessment. *Environ. Res.* 161, 392-398.
- REYERO, M., E. CACHO, A. MARTINEZ, J. VÁZQUEZ, A. MARINA, S. FRAGA, J. M. FRANCO (1999): Evidence of saxitoxin derivatives as causative agents in the 1997 mass mortality of monk seals in the Cape Blanc peninsula. *Nat. Toxins* 7, 311-315.
- RHODES, L. (2011): World-wide occurrence of the toxic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt. *Toxicon*. 57, 400-407.
- ROSSINI, G. P., A. BIGIANI (2011): Palytoxin action on the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and the disruption of ion equilibria in biological systems. *Toxicon*. 57, 429-439.
- ROURKE, W. A., C. J. MURPHY, G. PITCHER, J. M. VAN DE RIET, B. G. BURNS (2008): Rapid postcolumn methodology for determination of paralytic shellfish toxins in shellfish tissue. *J. AOAC Int.* 91, 589-597.

- RYAN, G., K. CUNNINGHAM, M. P. RYAN (2008): Pharmacology and epidemiological impact of azaspiracids. In: *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, (Botana L. M., Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 755-761.
- SCALLET, A. C. (1995): Quantitative histological evaluation of neurotoxic hippocampal damage. *Ann. NY Acad. Sci.* 765, 303.
- SCHLUMBERGER, S., C. MATTEI, J. MOLGO, E. BENOIT (2010): Dual, action of a dinoflagellate-derived precursor of Pacific ciguatoxins (P-CTX-4B) on voltage-dependent K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> channels of single myelinated axons. *Toxicon.* 56, 768-775.
- SCHMUED, L. C., A. C. SCALLET, W. SLIKKER, JR (1995): Domoic acid-induced neuronal degeneration in the primate forebrain revealed by degeneration specific histochemistry. *Brain. Res.* 695, 64-70.
- SELWOOD, A. I., C. O. MILES, A. L. WILKINS, R. VAN GINKEL, R. MUNDAY, F. RISE, P. MCNABB (2010): Isolation, structural determination and acute toxicity of pinnatoxins E, F and G. *J. Agric. Food. Chem.* 58, 6532-6542.
- SHOEMAKER, R., D. HOUSE, C. RYAN (2010): Defining the neurotoxin derived illness chronic ciguatera using markers of chronic systemic inflammatory disturbances: a case/control study. *Neurotoxicol. Teratol.* 32, 633-639.
- SLENO, L., A. J. WINDUST, D. A. VOLMER (2004): Structural study of spirolide marine toxins by mass spectrometry: Part I. Fragmentation pathways of 13-desmethyl spirolide C by collision-induced dissociation and infrared multiphoton dissociation mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 969-976.
- SOSA, S., G. DEL FAVERO, M. DE BORTOLI, F. VITA, M. R. SORANZO, D. BELTRAMO, M. ARDIZZONE, A. TUBARO (2009): Palytoxin toxicity after acute oral administration in mice. *Toxicol. Lett.* 191, 253-259.
- STAFFORD, R. G., H. HINES (1995): Urinary elimination of saxitoxin after intravenous injection. *Toxicon.* 33, 1501-1510.
- SUGANUMA, M., M. TATEMATSU, J. YATSUNAMI, S. YOSHIZAWA, S. OKABE, D. UEMURA, H. FUJIKI (1992): An alternative theory of tissue specificity by tumor promotion of okadaic acid in glandular stomach of SD rats. *Carcinogenesis* 13, 1841-1845.
- SUZUKI, T. (2008): Chemistry, metabolism and chemical detection methods of pectenotoxins. In: *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, (Botana L. M., Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 343-359.
- TAGIALATELA, M., L. M. T. CANZONIERO, A. FATATIS, G. DI RENZO, T. YASUMOTO, L. ANNUNZIATO (1990): Effect of maitotoxin on cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels and membrane potential in purified rat brain synaptosomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1026, 126-132.
- TAYLOR, A. D., J. LADD, S. ETHERIDGE, J. DEEDS, H. HALL, S. JIANG (2008): Quantitative detection of tetrodotoxin (TTX) by resonance (SPR) a surface plasmon sensor. *Sensors Actuators B* 130, 120-128.
- TERAO, K. (2000): Ciguatera toxin: toxicology. In: *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, (Botana L. M., Ed.) Dekker, New York pp. 449-472.

- TERAO, K., E. ITO, M. OHKUSU, T. YASUMOTO (1993): A comparative study of the effects of DSP-toxins on mice and rats. In: Toxic Phytoplanktons Blooms in the Sea, (Smayda T. J., Shimizu Y., Eds). Elsevier, New York, pp. 581-586.
- TERAO, K., E. ITO, M. OARADA, M. MURAT, T. YASUMOTO (1990): Histopathological studies on experimental marine toxic poisoning: 5. The effects in mice of yessotoxin isolated from *Patinopecten yessoensis* and of a desulfated derivative. *Toxicon*. 28, 1095-1104.
- TERAO, K., E. ITO, T. YANAGI, T. YASUMOTO (1986): Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning: I. Ultrastructural changes in the small intestine and liver of suckling mice induced by dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-1. *Toxicon*. 24, 1141-1151.
- TERAO, K., E. ITO, T. YASUMOTO (1992): Light and electron microscopic observation of experimental palytoxin poisoning in mice. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 85, 494-496.
- TIBBETTS, B. M., D. G. BADEN, J. M. BENSON (2006): Uptake, tissue distribution, and excretion of brevetoxin-3 administered to mice by intratracheal instillation. *J. Toxicol. Environ. Health. A* 69, 1325-1335.
- TORIGOE, K., M. MURATA, T. YASUMOTO (1988): Prorocentrolides, a toxic nitrogenous macrocycle from a marine dinoflagellate *Procentrum lima*. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 7876-7877.
- TOYOFUKU, H. (2006): Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins. *Mar. Pol. Bull.* 52, 1735-1745.
- TRAINER, V. L., D. G. BADEN (1999): High affinity binding of red tide neurotoxins to marine mammal brain. *Aquat. Toxicol.* 46, 139-148.
- TRUELOVE, J., F. IVERSON (1994): Serum domoic acid clearance and clinical observations in the cynomolgus monkey and Sprague-Dawley rat following a single i.v. dose. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 52, 479-486.
- TRUELOVE, J., R. MUELLER, O. PULIDO, L. MARTIN, S. FERNIE, F. IVERSON (1997): 30-Day oral toxicity study of domoic acid in *cynomolgus* monkeys: lack of overt toxicity at doses approaching the acute toxic dose. *Nat. Toxins*. 5, 111-114.
- TRUELOVE, J., R. MUELLER, O. PULIDO, F. IVERSON (1996): Subchronic toxicity study of domoic acid in the rat. *Food. Chem. Toxicol.* 34, 525-529.
- TSUMURAYA, T., L. FUJII, M. HIRAMA (2010): Production of monoclonal antibodies for sandwich immunoassay detection of Pacific ciguatoxins. *Toxicon*. 56, 797-803.
- TUBARO, A., A. GIANGSPERO, M. ARDIZZONE, M. R. SORANZO, E. VITA, T. YASUMOTO, J. M. MAUCHER, J. S. RAMSDELL, S. SOSA (2008b): Ultrastructural damage to heart tissue from repeated oral exposure to yessotoxin resolves in 3 months. *Toxicon*. 51, 1225-1235.
- TUBARO, A., G. DEL FAVERO, D. BELTRAMO, M. ARDIZZONE, M. FORINO, M. DE BORTOLI, M. PELIN, M. POLI, G. BIGNAMI, P. CIMINIELLO, S. SOSA (2011b): Acute oral toxicity in mice of a new palytoxin analogue: 42-hydroxy-palytoxin. *Toxicon*. 57, 75-763.

- TUBARO, A., P. DURANDO, F. DEL FAVERO, F. ANSALDI, G. ICARDI, J. R. DEEDS, S. SOSA (2011a): Case definitions for human poisonings postulated to palytoxins exposure. *Toxicon*. 57, 478-495.
- TUBARO, A., S. SOSA, A. BORNANCIN, J. HUNGERFORD (2008a): Pharmacology and toxicology of diarrheic shellfish toxins. In: *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, (Botana L. M., Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 229-253.
- TUBARO, A., S. SOSA, G. ALTINIER, M. R. SORANZO, M. SATAKE, R. DELLA LOGGIA, T. YASUMOTO (2004): Short-term oral toxicity of homoyessotoxins, yessotoxin and okadaic acid in mice. *Toxicon*. 43, 439-445.
- TUBARO, A., S. SOSA, M. CARBONATTO, G. ALTINIER, F. VITA, M. MELATO, M. SATAKE, T. YASUMOTO (2003): Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice. *Toxicon*. 41, 783-792.
- TUBARO, A., V. DELL'OVO, S. SOSA, C. FLORIO (2010): Yessotoxins: a toxicological overview. *Toxicon*. 56, 163-172.
- TWINER, M. J., N. REHMANN, P. HESS, G. DOUCETTE (2008): Azaspiracid shellfish poisoning: a review on the chemistry, ecology, and toxicology with emphasis on human health impact. *Mar. Drugs*. 6, 39-72.
- UJEVIĆ I., Ž. NINČEVIĆ-GLADAN, R. ROJE, S. SKEJIĆ, J. ARAPOV, I. MARASOVIĆ (2010): Domoic acid - a new toxin in the Croatian adriatic shellfish toxin profile. *Molecules*. 15, 6835-6849.
- VALE, P., M. J. BOTELHO, S. M. RODRIGUES, S. S GOMES, M. A. D. SAMPAYO (2008): Two decades of marine biotoxin monitoring in bivalves from Portugal (1986–2006): A review of exposure assessment. *Harmful Algae* 7, 11–25.
- VAN APELDOORN, M. E., H. P. VAN EGDMOND, G. J. A. SPEIJERS (1999): Amnesic Shellfish poisoning: A review. RIVM report 388802 019
- VAN APELDORN, M. E., H. P. VAN EGDMOND, G. J. A. SPEIJERS (2001): Neurotoxic Shellfish Poisoning: A Review, RIVM Keport 388802023. National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands, pp. 1-70.
- VAN DE RIET, J. M., R. S. GIBBS, P. M. MUGGAH, M. A. QUILLIAM (2011): Liquid chromatography post-column oxidation (PCOX) method for determination the of paralytic shellfish toxins in mussels, clams, oysters and Scallops: collaborative study. *J. AOAC Int.* 94, 1154-1176.
- VAN DOLAH, F. M., E. L. FINLEY, B. L. HAYNES, G. J. DOUCETTE, P. D. MOELLER, J. S. RAMSDELL (1994): Development of rapid and sensitive high throughput pharmacologic Toxins assay for marine phycotoxins. *Nat. Toxins* 2, 189-196.
- VILARIÑO, N. (2008): Marine toxins and the cytoskeleton: azaspiracids. *FEBS J.* 275, 6075-6081.
- VILARINO, N., M. C. LOUZAO, P. ABAL, E. CAGIDE, C. CARRERA, M. VIEYTES, L. BOTANA (2018): Human Poisoning from Marine Toxins: Unknowns for Optimal Consumer Protection. *Toxins*. 10, 324.



- VILLAR-GONZÁLEZ, A., M. L. RODRÍGUEZ-VELASCO, A. GAGO-MARTÍNEZ (2011): Single-laboratory validation of a procedure for lipophilic toxins determination by LC-MS/MS. *J. AOAC Int.* 94, 909-922.
- WANDSCHEER, C. B., N. VILARIÑO, B. ESPÍÑA, M. C. LOUZAO, L. M. BOTANA (2010): Human muscarinic acetylcholine receptors are a target of the marine toxin 13-desmethyl C spirolide. *Chem. Res. Toxicol.* 23, 1753-1761.
- WILES, J. S., J. A. VICK, M. K. CHRISTIANSEN (1974): Toxicological evaluation of palytoxin in several animal species. *Toxicon.* 12, 427-433.
- WONG, C. K., P. HUNG, K. H. L. LEE, K. M. KAM (2005): Study of an outbreak of ciguatera fish poisoning in Hong Kong. *Toxicon.* 46, 563-571.
- WOOFER, R. T., P. C. SPIESS, J. S. RAMSDELL (2005): Distribution of brevetoxin (PbTx-3) in mouse plasma: association with high-density lipoproteins. *Environ. Health Perspect.* 113, 1491-1496.
- WOOFER, R., M. Y. BOTTEIN DECHRAOUI, I. GARTHWAITE, N. R. TOWERS, C. I. GORDON, J. CÓRDOVA, J. S. RAMSDEL (2003): Measurement of brevetoxin levels by radioimmunoassay of blood collection cards after acute, long-term, and low-dose exposure in mice. *Environ. Health Perspect.* 111, 1595-1600.
- WU, C.H. (2009): Palytoxin: membrane mechanisms of action. *Toxicon.* 54, 1183-1189.
- WU, Z., L. XIE, G. XIA, J. ZHANG, Y. NIE, J. HU, S. WANG, R. ZHANG (2005): A new tetrodotoxin-producing actinomycete, *Nocardioopsis dassonvillei*, isolated from the ovaries of puffer fish *Fugu rubripes*. *Toxicon.* 45, 851-859.
- XU, Q., K. HUANG, L. GAO, H. ZHANG, K. RONG (2003): Toxicity of tetrodotoxin towards mice and rabbits. *Wei Sheng Yan Jiu* 32, 371-374.
- YASUMOTO, T. (1991): In: *The Manual for the Methods of Food Sanitation tests*. Bureau of Environmental Health and Welfare, Japan Food Hygienic Association, Tokyo, pp. 296.
- YASUMOTO, T. (2000): Historic considerations regarding seafood safety. In: *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, (Botana L. M. Ed.). Dekker, New York, pp. 1-17.
- YASUMOTO, T. (2001): The chemistry and biological function of natural marine toxins. *Chem. Rev.* 1, 228-242.
- YOGI, K., N. OSHIRO, Y. INAFUKU, M. HIRAMA, T. YASUMOTO (2011): Detailed LC-MS/MS analysis of Pacific Ocean ciguatoxins revealing distinct regional and species characteristics in fish and causative alga. *Anal. Chem.* 83, 8886-8891.
- YOTSU-YAMASHITA, M., D. URABE, M. ASAI, T. NISHIKAWA, M. ISOBE (2003): Biological activity of 8,11-dideoxytetrodotoxin: lethality to mice and the inhibitory activity to cytotoxicity of ouabain and veratridine in mouse neuroblastoma cells, Neuro-2A. *Toxicon.* 42, 557-560.
- YU, C.F., P. H. F. YU, P. L. CHAN, Q. YAN, P. K. WONG (2004): Two novel species of tetrodotoxin-producing bacteria isolated from toxic marine puffer fishes. *Toxicon.* 44, 641-647.

## 6. SAŽETAK

Fran Šimac

### Otrovi morskih organizama

Otrovi morskih organizama uzrokuju otrovanja ptica, riba i ljudi te ekološke i ekonomske probleme. Cilj ovog rada je detaljan opis najčešćih otrova morskih organizama i prikaz opisanih slučajeva otrovanja diljem svijeta, kako bi se informirala javnost o opasnostima i rizicima od kontaminiranih morskih plodova. Otrovanje je posljedica ingestije kontaminiranih školjkaša i riba iz komercijalnih izvora ili rekreacijskog sakupljanja. U ovome radu opisani su otrovi koji se najčešće nalaze u Europskom području sa naglaskom na Mediteransko more i drugdje u svijetu. Opisani su saksitoksini (STX), tetrodotoksini (TTX), domoična kiselina (DA) i analozi, okadaična kiselina (OA) i derivati, yessotoksini (YTX), azaspirna kiselina (AZA), pektenotoksini (PTX), ciklički imini te palitoksin (PLTX) i analozi, ciguatoksini (CTX), maitotoksini (MTX) i brevetoksini (PbTx). Za svaki od navedenih objašnjena je toksokinetika, mehanizam toksičnog djelovanja, eksperimentalna toksičnost, klinička slika, liječenje, analitičke metode i dopuštene koncentracije.

**Ključne riječi:** otrovi morskih organizama, školjkaši, ribe, Mediteransko more, kontaminirani morski plodovi

## 7. SUMMARY

Fran Šimac

### **Marine biotoxins**

Marine biotoxins causes poisoning of birds, fish and people, as well as environmental and economic problems. The aim of this paper is a detailed description of the most common toxins of poisonous marine organisms with described cases worldwide, in order to inform the public about the dangers and risks of contaminated seafood. Poisoning is the result of ingestion of contaminated shellfish and fish from commercial sources or recreational collection. This paper describes poisons found in European area with an emphasis on the Mediterranean Sea and elsewhere in the world. Saxitoxins (STX), tetrodotoxins (TTX), domoic acid (DA) and analogs, okadaic acid (OA) and derivatives, yessotoxins (YTX), azaspiric acid (AZA), pectenotoxins (PTX), cyclic imines, palytoxin (PLTX) and analogs, ciguatoxins (CTX), maitotoxins (MTX) and brevetoxins (PbTx) have been described. Toxokinetics, toxicity mechanism, experimental toxicity, clinical signs, treatment, analytical methods and permissible concentrations were explained for each of the above.

**Ključne riječi:** marine biotoxins, shellfish, fish, Mediterranean Sea, contaminated seafood

## 8. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 29. listopada 1993. godine u Zagrebu, Republika Hrvatska. Svoje obrazovanje započeo sam u Osnovnoj školi Gustava Krkleca u Zagrebu. Obrazovanje nastavljam u općoj XIII. Gimnaziji. Veterinarski fakultet upisujem 2012.godine. Kliničko-stručnu praksu odradio sam u Veterinarskoj stanici Velika Gorica. Također, koautor sam znanstveno-istraživačkog rada pod nazivom: *Evaluation of urinalysis test strip in the detection of presence of blood cells in canine urine*. Koristim se engleskim i njemačkim jezikom.