

Neurotoksyny syntetyzowane przez sinice

Jan BIAŁCZYK, Zbigniew LECHOWSKI, Beata BOBER

BIAŁCZYK J., LECHOWSKI Z., BOBER B. 2008. **Neurotoxins synthesized by cyanobacteria.** *Wiadomości Botaniczne* 52(3/4): 43–53.

Cyanobacterial neurotoxins constitute one of the most toxic substances synthesized by living organisms. They are characterised by an unusually quick action that brings about the death of humans or animals within seconds or a few minutes of their consumption without the possibility of administering an antidote. The mechanism by which they act involves disturbance of the process of Na⁺ ions transportation in the neuromuscular systems. The neurotoxins contain nitrogen in their composition and are mostly alkaloids. They are synthesized by cyanobacteria living at all ecological niches. Certain species of free-living cyanobacteria (for example, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Scytonema* sp.) or those entering into symbiosis with plants (for example *Nostoc* sp.) produce β -methylaminoalanine. This non-protein amino acid may act as a 'slow toxin' inducing neurodegenerative diseases (*amyotrophic lateral sclerosis*, *parkinsonism*, *dementia complex*). The article discusses the classification and chemical composition of cyanobacterial neurotoxins, the mechanism of their action as well as the environmental threats that arise with the appearance of cyanobacterial blooms.

KEY WORDS: cyanobacterial blooms, secondary metabolites, toxins

Jan Białczyk, Zbigniew Lechowski, Beata Bober, Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Roślin Uniwersytetu Jagiellońskiego, ul. Gronostajowa 7, 30-386 Kraków, e-mail: bialczyk@mol.uj.edu.pl

WSTĘP

Okresowo pojawiające się zakwity niektórych gatunków sinic, żyjących w słodkowodnych i zasolonych zbiornikach były obserwowane od wielu lat. Autorem pierwszego w literaturze naukowej doniesienia o ich występowaniu w przyrodzie był Francis (1878), a dotyczyło ono masowego pojawienia się *Nodularia* sp. u ujścia rzeki Murray River w Australii. Od tego czasu częstotliwość pojawiania się zakwitów sinicowych stale wzrasta, co jest wynikiem eutrofizacji zbiorników wody powodowanej między innymi przedostawaniem się do nich zwiększonych ilości odpadów komunalnych i przemysłowych, w tym detergentów oraz nawozów sztucznych

z pól (Antoniou et al. 2005). Sinice syntetyzują i wydają do środowiska metabolity wtórne o różnej bioaktywności. Wiele z tych związków wykazuje toksyczne działanie i staje się przyczyną zatrucia ludzi, bydła, psów, ptaków oraz zwierząt żyjących w wodzie między innymi: ryb, małży, ślimaków i stawonogów (Gorham et al. 1964, Gugger et al. 2005, Dittmann, Wiegand 2006). Toksyny sinicowe oddziałują na organizmy w wyniku: kontaktu ze skórą, picia zanieczyszczonej wody lub konsumpcji organizmów wodnych stanowiących różne ogniwa łańcucha troficznego. Do chwili obecnej zidentyfikowano około 40 rodzajów sinic, które syntetyzują związki o różnej budowie chemicznej, wykazujące potencjalne działanie toksyczne.

Na podstawie efektów ich oddziaływania u kręgowców, związki te zostały sklasyfikowane jako: hepatotoksyny (mikrocystyna, nodularyna), cytotoksyny (np. cylindrospermopsyna), neurotoksyny (np. anatoksyna, saksitoksyna) i dermatotoksyny wywołujące choroby i podrażnienia skóry (np. lipopolisacharydy, lyngbyatoksyna). Niektóre gatunki sinic mogą produkować kilka rodzajów toksyn równocześnie, wykazujących odmienny mechanizm działania i wywołujących choroby różnych organów człowieka i zwierząt. Wykazano, że występowanie wielu groźnych chorób, między innymi nowotworów, było w niektórych regionach świata, np. w Chinach i Australii, skorelowane z zawartością toksyn sinicowych w wodzie pitnej i/lub ich stężeniem w konsumowanych zwierzętach wodnych. Z tych względów, zawartość toksyn powinna być monitorowana w zbiornikach wody pitnej i rekreacyjnej.

Przedstawiany obecnie artykuł obejmuje informacje skoncentrowane na opisie neurotoksyn pochodzenia sinicowego, związków należących do jednych z najbardziej toksycznych substancji produkowanych przez żywe organizmy. Zagrożenia związane z ich działaniem dotyczą zaburzeń procesu transportu jonów w neurosystemach organizmów zwierzęcych. Zawierają one w swoim składzie azot i w większości należą do alkaloidów (Gerwick et al. 2001). Budowa chemiczna niektórych z nich została poznana już w latach siedemdziesiątych XX wieku. Odkrywane są jednak stale nowe związki, często o niezwykle wysokim stopniu toksyczności. Neurotoksyny produkowane przez sinice słodkowodne i morskie charakteryzują się niezwykle szybkim działaniem, prowadząc do śmierci osobnika, często w czasie kilku sekund lub minut, bez możliwości zastosowania ratującego życie antidotum. Występowanie neurotoksyn nie jest ograniczone jedynie do słodkowodnych i morskich środowisk. Wzrastająca liczba informacji potwierdza fakt, że stwardnienie boczne zanikowe-choroba Parkinsona-kompleks demencji (ALS-PD) mogą być powodowane przez konsumpcję β -metyloaminoalaniny (BMAA). Synteza i akumulacja tego związku zostały

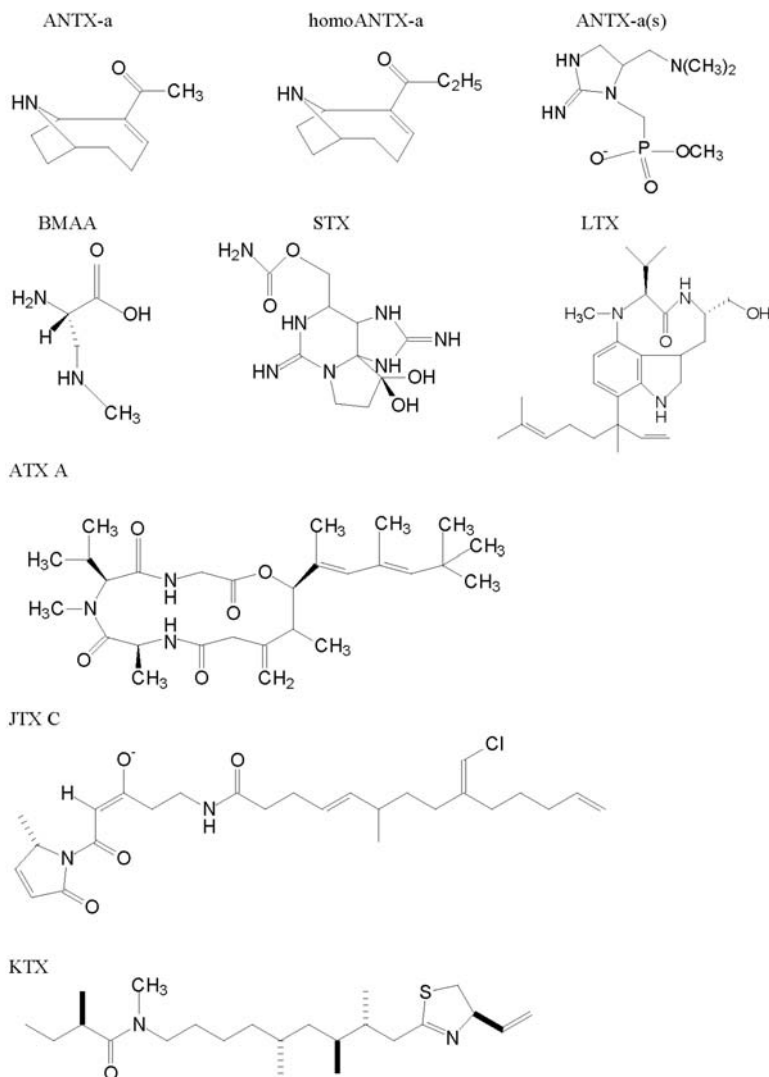
stwierdzone u przedstawicieli gatunków wszystkich sekcji sinic, w tym także tych wchodzących w symbiozę z tkankami niektórych roślin.

W drodze syntezy chemicznej otrzymano analogi prawie wszystkich neurotoksyn. Neurotoksyny są również nieocenionym narzędziem biochemicznym wykorzystywanym do badań funkcji receptorów kanałów jonowych. Ponadto, mają one zastosowanie w farmacji oraz jako środki owadobójcze.

W niniejszym artykule zostanie przedstawiony przegląd neurotoksyn pochodzenia sinicowego, ich budowa chemiczna, właściwości, mechanizm działania, jak również zagrożenia środowiskowe, pojawiające się wraz z wystąpieniem zakwitu sinic o określonym składzie gatunkowym.

NEUROTOKSYNY SINIC SŁODKOWODNYCH

Do grupy tych związków zalicza się: anatoksynę-a, homoanatoksynę-a i anatoksynę-a(s). Anatoksyna-a (Ryc. 1, ANTX-a) jest niesymetryczną, dicykliczną, wtórną aminą posiadającą szkielet homotropanowy, który strukturalnie zbliżony jest do alkaloidu kokainy. W toksycznych ilościach jest ona produkowana przy masowym pojawianiu się następujących sinic: *Aphanizomenon* sp., *Anabaena flos-aquae*, *A. circinalis*, *Cylindrospermum* sp., *Planktothrix* sp. (dawniej *Oscillatoria*), *Microcystis aeruginosa* (Devlin et al. 1977, Sivonen et al. 1989, Edwards et al. 1992) i *Phormidium favosum* (Gugger et al. 2005). Śmierć organizmu następuje w ciągu kilku minut po kontakcie lub konsumpcji anatoksyny-a, dlatego często jest ona nazywana „bardzo szybkim czynnikiem śmierci” (Gorham et al. 1964). Anatoksyna-a jest ekstremalnie silnym agonistą receptorów nikotyno-acetylocholinowych (nACh). Wiąże się ona z neuronowymi receptorami nACh, co prowadzi do aktywacji nerwowo-mięśniowych receptorów nACh (Costa et al. 1990, Wonnacott et al. 1991, Wonnacott, Gallagher 2006). Pozoruje ona działanie naturalnego neurotransmitera, jakim jest acetylocholina (ACh), prowadząc



Ryc. 1. Budowa chemiczna neurotoksyn sinicowych. ANT-X-a – anatoksyna-a, homoANT-X-a – homoanatoksyna-a, ANT-X-a(s) – anatoksyna-a(s), BMAA – β-metyloaminoalanina, STX – saksitoksyna, LTX – lyngbyatoksyna, ATX A – antillatoksyna A, JTX (typ C) – jamaikamid (typ C), KTX – kalkitoksyna.

Fig. 1. Chemical structure of cyanobacterial neurotoxins. ANT-X-a – anatoxin-a, homoANT-X-a – homoanatoxin-a, ANT-X-a(s) – anatoxin-a(s), BMAA – β-methylaminoalanine, STX – saxitoxin, LTX – lyngbyatoxin, ATX A – antillatoxin A, JTX (type C) – jamaicamide (type C), KTX – kalkitoxin.

do depolaryzacji błon komórek nerwowych i mięśni. Anatoksyna-a wykazuje większe powinowactwo do receptora nACh niż sama ACh (Carmichael et al. 1979), przez co silnie i trwale wiąże się z tym receptorem. Odmienne niż ACh, anatoksyna-a nie jest hydrolizowana

przez Ach-esterazę. Te dwie właściwości anatoksyny-a powodują nadstymulację tkanek nerwowo-mięśniowych i peryferycznych mięśni szkieletowych. Staje się to przyczyną paraliżu funkcji oddechowych, a objawami są drgawki, konwulsje i śmierć, która jest następstwem

uduszenia się organizmu (Carmichael et al. 1979, Carmichael 1997, Holladay et al. 1997). W badaniach przeprowadzonych *in vitro*, w zależności od organizmu, dawka letalna wahała się od 20 do 200 nM/kg (Swanson et al. 1986). Anatoksyna-a wykazuje większą stereoselektywność niż inni agoniści receptorów nikotynowych. Jest to wynikiem wiązania się silniej tej toksyny z receptorem poprzez trzy lub więcej miejsc interakcji. W warunkach naturalnych neurotoksyna ta występuje w formie dwóch enancjomerów. Enancjomer (+)-anatoksyny-a może być nawet do 1000 razy bardziej biologicznie aktywny niż (–)-anatoksyna-a (Swanson et al. 1986, Macallan et al. 1988). Enancjomer (+)-anatoksyny-a wiąże się z wysokim powinowactwem do receptora nikotynowego $\alpha 4\beta 2$ ($K_i = 0,34$ nM) w porównaniu do $\alpha 3\beta 4$ i $\alpha 7$ receptorów nikotynowych ($K_i = 2,5$ i 91 nM, odpowiednio) (Daly 2005). Obecnie nie jest znane antidotum dla zatruc powodowanych przez anatoksynę-a. Jedyną możliwością uniknięcia zatrucia pozostaje więc wczesne jej wykrywanie w zbiornikach wody poprzez stałe ich monitorowanie, a przede wszystkim ochrona przed nadmiernym rozwojem w nich sinic. Anatoksyna-a jest wrażliwa na działanie światła słonecznego, alkaliczne pH i temperaturę powyżej 40°C. Metabolity powstające w wyniku fotochemicznej i/lub pośredniczonej tlenem degradacji anatoksyny-a, np. dihydroksyanatoksyny-a, tracą toksyczne właściwości. Te utlenione produkty są ważne jako biomarkery toksyczności i mogą być wykorzystywane w badaniach nad mechanizmem działania anatoksyny-a (James et al. 1998).

Homoanatoksyna-a (Ryc. 1, homoANTX-a) produkowana jest przez sinice *Planktothrix* sp. (Skulberg et al. 1992, Furey 2003) i *Raphidopsis mediterranea* (Namikoshi et al. 2003). Jest ona rzadkim analogiem anatoksyny-a, w którym w miejscu C11 w łańcuchu występuje grupa metylowa. Homoanatoksyna-a jest potencjalnie aktywnym agonistą postsynaptycznych receptorów nACh w kompleksach kanałów jonowych o podobnej aktywności jak anatoksyna-a (Lilleheil et al. 1997).

Anatoksyna-a(s) (Ryc. 1, ANTX-a(s)) jest

syntetyzowana przez *Anabaena flos-aquae* i *A. lammermanii* (Mahmood, Carmichael 1986, Onodera et al. 1997). Symptomy zatruc powodowane przez anatoksynę-a(s) są podobne do wywoływanych przez anatoksynę-a, a różni je dodatkowo stymulacja produkcji śliny u kręgowców. (S) w nazwie pochodzi od angielskiego słowa *salivation* wskazującego na ślinienie (Carmichael 1997). Jej struktura chemiczna, jak i mechanizm działania, są jednak całkowicie odmienne od dwóch poprzednio opisywanych toksyn. Anatoksyna-a(s) jest naturalnie występującym fosforanem organicznym, który w swoim działaniu jest podobny do syntetycznie otrzymywanych tego typu związków, stosowanych jako środki owadobójcze (Matsunaga et al. 1989). Syntezę organicznych fosforanów będących inhibitorami ACh-esterazy wykazano również u lądowych bakterii, np. u *Streptomyces antibioticus* (Neumann, Peter 1987). Anatoksyna-a(s) jest produkowana wyłącznie przez sinice. Hamuje ona aktywność ACh-esterazy w sposób nieodwracalny (Hyde, Carmichael 1991), przez co uniemożliwia degradację ACh i prowadzi do nadstymulacji mięśni (Mahmood, Carmichael 1986, 1987).

NEUROTOKSYNY SINIC SŁODKOWODNYCH I LĄDOWYCH

Stwardnienie boczne zanikowe-choroba Parkinsona i kompleks demencji (ALS-PD) są chorobami neurodegradującymi. Nasilenie tych chorób obserwowano często w niektórych regionach Wschodniego Pacyfiku (Indonezja, Japonia, wyspa Guam) (Duncan et al. 1988). Są to choroby górnych i dolnych nerwów motorycznych, a ich objawami są: atrofia mięśni, osłabienie, paralityczne skurcze, spowolnienie ruchu, drżenie, zanik elastyczności mięśni, brak zdolności rozpoznawania i demencja podobna do diagnozowanej w chorobie Alzheimera (Weiss et al. 1989, Brownson et al. 2002). Częstotliwość występowania ALS-PD w tych regionach była 50–100 razy powszechniejsza niż w krajach rozwiniętych (Moore et al. 1992). Intensywne studia nad genealogią tych chorób wykluczyły

uwarunkowania genetyczne jak również następstwo ewentualnych infekcji. Wskazywały natomiast na oddziaływanie czynników środowiskowych (Weiss et al. 1989). W tych regionach świata powszechnie spożywane są produkty roślinne uzyskiwane od przedstawicieli rodziny *Cycadaceae*. Konsumpcja nasion lub innych części roślin pochodzących z sześciu spośród dziewięciu występujących rodzajów sagowców inicjowała rozwój ALS-PD (Vega, Bell 1967, Schneider et al. 2002). Potwierdzono doświadczalnie w Australii i Wschodnich Indiach, że karmienie bydła liśćmi cykasów powodowało objawy nieodwracalnego paraliżu (Seawright et al. 1990), podobnego do klasycznego latryzmu, choroby układu nerwowego, stwierdzonej u zwierząt po konsumpcji β -oxyloaminoalaniny (BOAA) występującej u *Lathyrus sativus* (Weiss et al. 1989). Ponadto wykazano, że w morfologicznie wyspecjalizowanych bulwiastych korzeniach cykasów rosnących nad powierzchnią gleby (corraloidach) występowała w przestworach międzykomórkowych kory pierwotnej symbiotyczna sinica *Nostoc* sp. zdolna do wiązania azotu atmosferycznego. W tkance tej wykazano β -metyloaminoalaninę (Ryc. 1, BMAA) w ilości około 0,3 $\mu\text{g/g}$ świeżej masy. Podobnie w przypadku paproci wodnej *Azolla filiculoides* i krzewu *Gunnera kaudiensis* zdolnych do symbiozy z *Nostoc* sp. wykazano, że zawartość BMAA w ich tkankach ulegała podwyższeniu odpowiednio do wartości 2 i 4 $\mu\text{g/g}$ świeżej masy. Symbiotyczne sinice produkują BMAA, która jest następnie transportowana do troficznymi liści i nasion sagowców (Cox et al. 2003). Z nasion wyciskany jest sok, olej oraz produkowana mąka, które to produkty konsumuje tubylcza ludność. Stopniowy, opóźniony rozwój ALS-PD u ludności spożywającej mąkę otrzymywaną z nasion cykasów był efektem częściowego wymywania BMAA podczas wstępnych procesów technologicznych. Z dokładnych analiz wynika, że zawartość BMAA w 100 g świeżej masy nasion wynosiła początkowo od 64 do 143 μg , a po procesie wymywania o około 80% mniej (Duncan et al. 1988). Dodatkowym źródłem BMAA w łańcuchu pokarmowym

ludności Chamorro (Guam) było spożywanie nietoperzy (*Pteropus mariannus*) karmionych wcześniej nasionami cykasów (Banack, Cox 2003, Cox et al. 2003).

W tkankach skóry tych nietoperzy, pobranych z muzeum zoologicznego w Berkeley (USA), stwierdzono zawartość od 1287 do 7502 μg BMAA/g suchej masy (Duncan 1992). Zmniejszenie populacji nietoperzy w tym regionie spowodowało po 10–20 latach ograniczenie liczby przypadków chorób neurologicznych (Cox et al. 2003). W dalszych badaniach wykazano, że BMAA występuje również u niektórych gatunków reprezentujących wszystkie sekcje sinic niezależnie od środowiska życia (Cox et al. 2005). Zawartość BMAA u niektórych słodkowodnych sinic może być niezwykle wysoka, np. u *Cylindrospermopsis raciborskii* wynosiła 6478 $\mu\text{g/g}$ świeżej masy w formie wolnej, natomiast u *Scytonema* sp. występowała w formie związanej z białkami w ilości 1733 $\mu\text{g/g}$ świeżej masy. Fakt, że większość sinic produkuje BMAA sugeruje, że to poprzez łańcuch troficzny dochodzi do podwyższenia ich poziomu do toksycznego stężenia w białkach ludzkich. Efekty spożywania BMAA ujawniają się dopiero po długim czasie, być może kumulowanego ich działania, a choroba często jest diagnozowana dopiero u osób po 40 roku życia. Sugerowało to, że działa ona jako „wolno działająca toksyna” (Armon 2003). Postuluje się, że BMAA, która jest aminokwasem niebiałkowym, jest związana lub stowarzyszona z białkiem. Murch et al. (2004) stwierdzili, że BMAA występuje w ilości od 87 do 240 razy większej w formie związanej z białkiem niż jako wolna pula aminokwasowa w większości troficznych ekosystemów wyspy Guam. BMAA funkcjonuje w białkach jako endogenne, neurotoksyczne czynniki. Inkorporacja niebiałkowego aminokwasu do białka prowadzi do powstawania białek o aberacyjnej funkcji (Murch et al. 2004). Efekty działania BMAA mogą być związane z depolaryzacją postsynaptycznych neuronów. Związane jest to z uwalnianiem mechanizmu blokady jonów Mg^{2+} w Ca^{2+} – kanałach, a przez to napływem wapnia do komórek nerwowych, co w konsekwencji powoduje ich

degradację (Alam et al. 1990, Allen et al. 1993). Mechanizm działania BMAA jest podobny do wywieranego przez kwas domoinowy produkowany przez morskie okrzemki (Brownson et al. 2002). Nie można również wykluczyć interakcji efektów oddziaływania dwóch lub więcej czynników chemicznych, takich jak np. cykasyny i BMAA, ponieważ obydwa rodzaje związków występują w cykasach równocześnie (Tanner, Kurland 1993, Murch et al. 2004).

NEUROTOKSYNY SINIC SŁODKOWODNYCH I MORSKICH

Do najbardziej neurotoksycznych alkaloidów należy saksitoksyna (STX) (Ryc. 1, STX). Znana jest ona głównie jako „toksyna paraliżująca ryby przyszelkowe” ale wywiera również efekt letalny na inne gatunki zwierząt wodnych, między innymi na małże (Llewellyn 2006). Produkowana jest ona przez kilka taksonów sinic (*Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena* sp., *Cylindrospermopsis* sp., *Planktothrix* sp., *Trichodesmium* sp. i *Lyngbya wollei*) (Carmichael et al. 1997, Pomati et al. 2000, 2004a, b, Carmichael, Wayne 2001), jak również przez taksonomicznie odległe grupy organizmów (wiciowiec *Gonyalax tamariensis*, mięczak *Saxidonus giganteus*, krasnorost *Jania* sp. oraz bakteria *Protogonyalax tamariensis*) (Kodama et al. 1988). Pojawiające się zakwity sinic produkujących STX mogą występować w płytkich, małych zbiornikach wód powierzchniowych, zatokach przybrzeżnych obszarów morskich, jak również w jeziorach. Przykładem może być zakwit *Anabaena circinalis*, gatunku neurotoksycznego i hepatotoksycznego w 1991 roku w Australii, obejmujący obszar około 1000 km² (Humpage et al. 1993). Konsekwencją działania STX jest paraliż układu oddechowego prowadzący do śmierci organizmu. Letalna dawka STX dla człowieka nie jest znana, jednak udało się określić jej przybliżoną wartość poprzez liczne porównawcze ilościowe analizy małży konsumowanych przez ofiary zatrucia. W literaturze naukowej istnieje tylko jedno doniesienie, w którym opisano, że przyjęcie 1 mg STX jest dawką wystarczającą

do zabicia człowieka (Tennant et al. 1955). LD₅₀ (dawka półletalna) dla STX w wyniku iniekcji dootrzewnej dla 20 g myszy wynosiła około 10 µg/kg. Zwierzęta większych rozmiarów wykazują większą tolerancję na STX. Bardziej odporne na jej działanie są zwierzęta zimnokrwiste niż stałocieplne (Twarog et al. 1972). Występuje wiele gatunków zwierząt, u których STX nie wywołuje efektu chorobowego, należą do nich między innymi niektóre stawonogi, szkarłupnie, ślimaki, małże, a nawet ryby i żachwy (Llewellyn 2006).

Obecnie znanych jest ponad 40 naturalnych analogów STX. Różnice w budowie chemicznej dotyczą głównie stopnia hydratacji i sulfatacji pierścienia. Do analogów należą pochodne hydroksylowe, np. neosaksitoksyna (neoSTX), jak również dekarboksylowane pochodne znane jako gonyautoksyny (GTX) (Bordner et al. 1975, Walkers, Kao 1980, Koehn et al. 1981, Alam et al. 1982, Schantz 1986). Oczyszczona STX jest białą higroskopijną substancją rozpuszczalną w wodzie, nie absorbującą promieniowania UV powyżej 210 nm. W formie soli dihydrochlorku STX jest stabilna w roztworze kwaśnym, natomiast traci aktywność w zakresie pH od 7 do 9 (Schantz et al. 1958). STX jest heterocykliczną guanidyną, która w sposób selektywny niezwykle szybko blokuje kanały sodowe regulowane zmianami napięcia (VGSC) w pobudzonych błonach komórek systemów neuromięśniowych (Kao 1966, Catterall 1980). Jedną z ważnych cech STX i jej analogów jest obecność dwóch dodatnio naładowanych grup guanidynowych. Reszta guanidynowa jest jednym z kilku kationów, które mogą efektywnie działać jako substytut sodu w czasie tworzenia potencjału czynnościowego. Hipotetyczny mechanizm działania STX oparty jest na tej właściwości. Grupy guanidynowe STX, podobnie jak sód, wchodzi do kanału, ale wiążą się trwale z białkami kanałowymi, co uniemożliwia transport sodu do komórki (Kao, Nishiyama 1965).

STX oddziałuje nie tylko na mięśnie oddechowe, ale również na inne neuromięśniowe systemy, np. na układ sercowo-naczyniowy. Obniżenie wydajności pracy serca może być

efektem hamowania przez STX szybko działających kanałów sodowych mięśnia sercowego i włókien Purkiniego. Szok sercowo-mięśniowy wywołany dużą dawką STX prowadzi do spadku ciśnienia krwi w naczyniach, osłabienia pracy serca, zaniku obiegu żylnego krwi i w ostateczności do hipoksji (Kao et al. 1967, Borison et al. 1980, Chang et al. 1993, Andrinolo et al. 1999). Wyniki badań sugerują, że STX może interagować z podtypami obydwu Ca^{2+} - i K^{+} -kanałów (Wang et al. 2003). K^{+} -kanały odgrywają ważną rolę w repolaryzacji mięśnia sercowego (Warmke, Ganetzky 1994, Sanguinetti et al. 1995). STX modyfikuje w sposób kompleksowy mechanizm działania tych kanałów (Wang et al. 2003). Podobnie L - typ Ca^{2+} -kanałów występujących w mięśniu sercowym uniemożliwia napływ wapnia do komórek podczas interakcji pobudzenie–kontrakcja w miocytach komory serca (Adachi-Akahane et al. 1997). STX częściowo hamowały aktywność L-typów Ca^{2+} -kanałów, a efekt ich działania był zależny od wielkości zastosowanej dawki (Su et al. 2004).

NEUROTOKSYCZNE ALKALOIDY MORSKICH SINIC

Badania nad tą grupą toksyn koncentrowały się głównie na metabolitach wtórnych syntetyzowanych przez pochodzące z różnych regionów geograficznych szczepy morskiej sinicy *Lyngbya majuscula*. Gatunek ten występuje powszechnie w wodach lagun i zatok większości mórz na świecie. Sinica ta produkuje kilka metabolitów o charakterze alkaloidów wywierających różnorodne efekty toksyczne na żywe organizmy. W latach 70. XX wieku stwierdzono, że szczep pochodzący z wód laguny Wysp Marshalla, zatok wokół Hawajów oraz innych regionów Pacyfiku produkuje alkaloid indolowy nazwany lyngbyatoksyną (Ryc. 1, LTX). Kontakt skórny z tym związkiem (np. podczas kąpieli lub surfingu) wywołuje podrażnienia skóry u ludzi i może być również toksyczny dla roślin (Cardellina et al. 1979). Ponadto, promuje on powstawanie nowotworów i ma własności zabójcze dla nicieni i roztoczy (Fujiki et al. 1988). Wyniki dalszych

badań doprowadziły do odkrycia trzech alkaloidów lyngbyatoksyny (A, B i C) o podobnym mechanizmie działania. Wszystkie lyngbyatoksyny są potencjalnymi aktywatorami kinazy białkowej C i dekarboksylazy ornitynowej. Aktywacja kinazy białkowej C i wzmocnienie fosforylacji histonów indukuje powstawanie nowotworów. Natomiast aktywacja $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ antyportu indukuje powolny rozwój kontrakcji aorty (Robinson 1991). Oprócz oddziaływania drażniącego skórę, lyngbyatoksyna ma również właściwości hepatotoksyczne.

Lyngbya majuscula jest producentem kilku niezwykle groźnych neurotoksyn. Toksyny te oddziałują w różny sposób na modulowanie funkcji kanałów sodowych. W 1991 roku stwierdzono, że ekstrakt ze szczepu tej sinicy pochodzącej z wód otaczających Curacao był silnie toksyczny dla wielu zwierząt, m.in. ślimaków, stawonogów i ryb. Wyizolowana neurotoksyna nazwana została rybotoksyną, a następnie sklasyfikowana jako antillatoksyna (ATX). Biotesty toksyczności wykonane na rybach należących do gatunku *Carasius carasius* wykazały, że śmierć w ich przypadku następowała w czasie mikrosekundowym, a LD_{50} wynosiła około 50 ng/ml wody (Orjala et al. 1995). ATX jest tripeptydem (złożonym z L-alaniny, L-N-metylowaliny i glicyny) połączonym z nienasyconym lipidem zawierającym liczne grupy metylowe (siedem z 17 atomów węgla występuje w grupach metylowych (ATX A) (Ryc. 1, ATX A) (Li et al. 2004). Wyizolowano drugi rodzaj ATX B, który różni się od ATX A występowaniem L-N-metylohomofenyloalaniny w miejsce L-N-metylowaliny (Nogle et al. 2001). W biotestach toksyczności aktywność ATX B była około 10 razy mniejsza niż ATX A. Stwierdzono występowanie naturalnego stereoizomeru (4R, 5R), który był około 25 razy bardziej bioaktywny w porównaniu do pozostałych trzech innych konfiguracyjnych izomerów (4S, 5R; 4R, 5S; 4S, 5S) (Li et al. 2004).

Ze szczepu *Lyngbya majuscula*, pochodzącego z wód przybrzeżnych Jamajki, wyizolowano trzy nieznane wcześniej lipopeptydy określone jako jamaikamidy A, B, C (Manger et al. 1995)

(Ryc. 1, JTX C). Biotesty toksyczności dla linii komórkowych mysich neuroblastów neuro-2a wykazały, że LD_{50} wynosił około 15 μ M. Wszystkie te trzy komponenty blokowały aktywność kanałów sodowych przy stężeniu 5 μ M. W testach letalności przeprowadzonych dla złotej rybki jamaikamid B był najbardziej aktywny (100% śmiertelności obserwowano po 90 min. przy stężeniu 5 μ M w wodzie), następnie jamaikamid C (100% śmiertelności po 90 min. przy stężeniu 10 μ M) i jamaikamid A (subletalna toksyczność po 90 min. przy stężeniu 10 μ M) (Meyer et al. 1982). Jamaikamidy nie wykazywały (A, B) lub wykazywały słabą toksyczność dla kreketek (jamaikamid C przy stężeniu 10 μ M powodował 25% śmiertelność). Pod względem budowy chemicznej jamaikamidy są poliketoni zbudowanymi z dziewięciu jednostek octanowych oraz trzech aminokwasów (L-alaniny, β -alaniny i S-metylometyoniny) (Edwards et al. 2004). Jamaikamidy hamują aktywność kanałów sodowych zależnych od napięcia, obniżając wpływ jonów Na^+ do komórek.

W 1996 roku ze szczepu *L. majuscula*, występującego w wodach zatoki wokół Playa Kalki (Curacao), wyizolowano kalkitoksynę (KTX). Wykazuje ona silną aktywność toksyczną dla ryb (LC_{50} , czynnik wysokiej toksyczności, wynosił około 700 nM) i kreketek (LC_{50} około 170 nM). KTX jest lipoamidem z pięcioma stereogenicznymi centrami, czterema grupami metylowymi na łańcuchu węglowym, N-metyloamidem i pierścieniem tiazolowym (Ryc. 1, KTX). Neurotoksyczność KTX była testowana na szczurach i wykazywała zależność od stężenia (LD_{50} wynosił 3,9 μ M/kg). Jednakże toksyczność KTX charakteryzowała się niezwykle długim czasem działania – 22 godziny od momentu ekspozycji (Berman et al. 1999). Działa ona w podobny sposób na kanały sodowe jak opisano w przypadku powyżej scharakteryzowanych toksyn.

PODSUMOWANIE

Opisane w artykule metabolity wtórne syntetyzowane przez wybrane gatunki sinic stanowią przykład niezwykle silnych neurotoksyn

o różnorodnym, szerokim spektrum oddziaływania na środowisko przyrodnicze. Wydaje się, że w miarę rozwoju metod analitycznych liczba poznawanych nowych związków syntetyzowanych przez sinice o podobnych toksycznych właściwościach będzie w najbliższych latach wzrastała.

Artykuł powstał w ramach współpracy z Miejskim Przedsiębiorstwem Wodociągów i Kanalizacji w Krakowie.

LITERATURA

- ADACHI-AKAHANE S., LU L. Y., LI Z. P., FRANK J. S., PHILIPSON K. D., MORAD M. 1997. Calcium signaling in transgenic mice overexpressing cardiac Na^+ - Ca^{2+} exchanger. *J. Gen. Physiol.* **109**: 717–729.
- ALAM M., OSHIMA Y., SHIMIZU Y. 1982. About gonyatotoxins-I, II, III and IV. *Tetrah. Lett.* **23**: 321–322.
- ALAM N., ODAKA H., SAKAI S. J. 1990. Lyngbyatoxins B and C, two new irritants from *Lyngbya majuscula*. *J. Nat. Prod.* **53**: 1593–1596.
- ALLEN C. N., SPENCER P. S., CARPENTER D. O. 1993. Beta-N-methylamino-L-alanine in the presence of bicarbonate is an agonist at non-N-methyl-D-aspartate-type receptors. *Neuroscience* **54**: 567–574.
- ANDRINOLO D., MICHEA L. F., LAGOS N. 1999. Toxic effects, pharmacokinetics and clearance of saxitoxin, a component of paralytic shellfish poison (PSP), in cats. *Toxicol.* **37**: 447–467.
- ANTONIOU M. G., DE LA CRUZ A. A., DIONYSIOU D. D. 2005. Cyanotoxins: New generation of water contaminations. *J. Environ. Engineer. (ASCE)* **131**: 1239–1243.
- ARMON C. 2003. Western Pacific ALS/PDS and flying foxes: What's next? *Neurology* **61**: 291–292.
- BANACK S. A., COX P. A. 2003. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins in flying foxes: implications for ALS-PDC in Guam. *Neurology* **61**: 387–389.
- BERMAN F. W., GERWICK W. H., MURRAY T. F. 1999. Antilatoxin and kalkitoxin, ichthyotoxins from the tropical cyanobacterium *Lyngbya majuscula*, induce distinct temporal patterns of NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *Toxicol.* **37**: 1645–1648.
- BORDNER J., THIESSEN W. E., BATES H. A., RAPOPORT H. 1975. The structure of a crystalline derivative of saxitoxin. The structure of saxitoxin. *J. Am. Chem. Soc.* **97**: 6008–6012.
- BORISON H. L., CULP W. J., GONSALVES S. F., MCCARTHY L. E. 1980. Central respiratory and circulatory depression caused by intravascular saxitoxin. *Brit. J. Pharmacol.* **68**: 301–309.

- BROWNSON D. M., MABRY T. J., LESLIE S. W. 2002. The cycad neurotoxic amino acid, β -N-methylamino-L-alanine (BMAA), elevates intracellular calcium levels in dissociated rat brain cells. *J. Ethnopharmacol.* **82**: 159–167.
- CARDELLINA J. H., MARNER F. J., MOORE R. E. 1979. Seaweed dermatitis. Structure of lyngbyatoxin. *Science* **204**: 193.
- CARMICHAEL W. W. 1997. The cyanotoxins. *Adv. Bot. Res.* **27**: 211–256.
- CARMICHAEL W. W., WAYNE W. 2001. Health effects of toxin-producing cyanobacteria: “The Cyano-HABs”. *Hum. Ecol. Risk Assess.* **7**: 1393–1407.
- CARMICHAEL W. W., BIGGS D. F., PETERSON M. A. 1979. Pharmacology of anatoxin-a, produced by freshwater cyanophyte *Anabaena flos-aquae* NCR-44-1. *Toxicon* **17**: 229–236.
- CARMICHAEL W. W., EVANS W. R., YIN Q. Q., BELL P., MOCZYDLOWSKI E. 1997. Evidence for paralytic shellfish poisons in the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) comb.nov. *J. Appl. Env. Microbiol.* **63**: 3104–3110.
- CATTERALL A. W. 1980. Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **20**: 15–43.
- CHANG F. C. T., BENTON B. J., LENZ R. A., CAPACIO B. R. 1993. Central and peripheral cardiorespiratory effects of saxitoxin (STX) in urethane-anaesthetized guinea-pigs. *Toxicon* **31**: 645–647.
- COSTA A. C. S., SWANSON K. L., ARACAVA Y., ARONSTAM R. S., ALBUQUERQUE E. X. 1990. Molecular effects of dimethylanatoxin on the peripheral acetylcholine receptor. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **252**: 507–516.
- COX P. A., BANACK S. A., MURCH S. J. 2003. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **100**: 13380–13383.
- COX P. A., BANACK S. A., MURCH S. J., RASMUSSEN U., TIEN G., BIOLIGARE R. R., METCALF J. S., MORRISON L. F., CODD G. A., BERGMAN B. 2005. Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **102**: 5074–5078.
- DALY J. W. 2005. Nicotinic agonists, antagonists, and modulators from natural sources. *Cell. Mol. Neurobiol.* **25**: 513–552.
- DEVLIN J. P., EDWARDS O. E., GORHAM P. R., HUNTER N. R., PIKE R. K., STAVRIC B. 1977. Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NCR-44h. *Can. J. Chem.* **55**: 1367–1371.
- DIRTMANN E., WIEGAND C. 2006. Cyanobacterial toxins—occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Mol. Nut. Food. Res.* **50**: 7–17.
- DUNCAN M. W. 1992. β -methylamino-L-alanine (BMAA) and amyotrophic lateral sclerosis-Parkinsonism dementia of the Western Pacific. *Ann. New York Acad. Sci.* **648**: 161–168.
- DUNCAN M. W., KOPIN I. J., GARRUTO R. M., LAVINE L., MARKEY S. P. 1988. 2-amino-3(methylamino)-propionic acid in cycad-derived food in an unlikely cause of amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism. *Lancet* **2**: 631–632.
- EDWARDS C., BEATTIE K. A., SCRIMGEOUR C. M., COOD G. A. 1992. Identification of anatoxin-a in benthic cyanobacteria (blue-green algae) and in associated dog poisonings at Loch Insh, Scotland. *Toxicon* **30**: 1165–1175.
- EDWARDS D. J., MARQUEZ B. L., NAGLE L. M., MCPHAIL K., GOEGER D. E., ROBERTS M. A., GERWICK W. H. 2004. Structure and biosynthesis of the jamaicamides, new mixed polyketide-peptide neurotoxins from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Chem. Biol.* **11**: 817–833.
- FRANCIS G. 1878. Poisonous Australian Lake. *Nature* **18**: 11–12.
- FUJIKI H., SUGANUMA M., NINOMIYA M., YOSHIZAWA S., YAMASHITA K., TAKAYAMA S., HITOTSUYANAGI Y., SAKAI S., SHUDO K., SUGIMURA T. 1988. Similar, potent tumor-promoting activity of all isomers of teleocidins A and B in a two-stage carcinogenesis experiment on the skin of CD-1 mice. *Cancer Res.* **48**: 4211–4214.
- FUREY A., CROWLEY J., SHUILLEABHAIN A. N., SKULBERG A. M., JAMES K. J. 2003. The first identification of the rare cyanobacterial toxin, homoanatoxin-a in Ireland. *Toxin* **41**: 297–303.
- GERWICK W. H., TAN L. T., SITACHITTA N. 2001. Nitrogen-containing metabolites from marine cyanobacteria. *Alkal. Chem. Biol.* **57**: 75–184.
- GORHAM P. R., MCLACHLAN J., HAMMAR U. T., KIM W. K. 1964. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *Verh. Inst. Ver. Limnol.* **15**: 796.
- GUGGER M., LENOIR S., BERGER C., LEDREUX A., DRUART J. C., HUMBERT J. F., GUETTE C., BERNARD C. 2005. First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicon* **45**: 919–925.
- HOLLADAY M. W., DART M. J., LYNCH J. K. 1997. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors as targets for drug discovery. *J. Med. Chem.* **40**: 4169–4194.
- HUMPAGE A. R., ROSITANO J., BAKER P. D., NICHOLSON B. C., STEFFENSEN D. A., BRETAG A. H., BROWN R. K. 1993. Paralytic shellfish poisons from freshwater blue-green algae. *Med. J. Aust.* **159**: 423.

- HYDE E. G., CARMICHAEL W. W. 1991. Anatoxin-a(s), a naturally occurring organophosphate, is an irreversible active site-directed inhibitor of acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7). *J. Bioch. Toxicol.* **6**: 195–201.
- JAMES K. J., FUREY A., SHERLOCK I., STACK M. A., TWOHIG M., CAUDWELL F. B., SKULBERG O. M. 1998. Sensitive determination of anatoxin-a, homoanatoxin-a and their degradation products by liquid chromatography with fluorometric detection. *J. Chromat.* **798**: 147–157.
- KAO C. Y. 1966. Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena. *Pharmacol. Rev.* **18**: 997–1008.
- KAO C. Y., NISHIYAMA A. 1965. Actions of saxitoxin on peripheral neuromuscular systems. *J. Physiol.* **180**: 50–66.
- KAO C. Y., SUZUKI T., KLEINHAUS A. L., SIEGMAN M. J. 1967. Vasomotor and respiratory depressant actions of tetrodotoxin and saxitoxin. *Arch. Int. Pharmacol. Ther.* **165**: 438–450.
- KODAMA M., OGATA T., SATO S. 1988. Bacterial production of saxitoxin. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 1075.
- KOEHN F. E., GHAZAROSSIAN V. E., SCHANTZ E. J., SCHNOES H. K., STRONG F. M. 1981. Derivatives of saxitoxin. *Bioorg. Chem.* **10**: 412–428.
- LI W. J., MARQUEZ B. L., OKINO T., YOKOKAWA F., SHIOIRI T., GERWICK W. H., MURRAY T. F. 2004. Characterization of the preferred stereochemistry for the neuropharmacologic actions of antillatoxin. *J. Nat. Prod.* **67**: 559–568.
- LLEWELLYN L. 2006. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Nat. Prod. Rep.* **23**: 200–22.
- LILLEHEIL G., ANDERSEN R. A., SKULBERG O. M., ALEXANDER J. 1997. Effects of a homoanatoxine-a-containing extract from *Oscillatoria formosa* (Cyanophyceae/cyanobacteria) on neuromuscular transmission. *Toxicon* **35**: 1275–1289.
- MACALLAN D. R. E., LUNT G. G., WONNACOTT S., SWANSON K. L., RAPOPORT H., ALBUQUERQUE E. X. 1988. Methyllycaconitine and (+)-anatoxin-a differentiate between nicotinic receptors in vertebrate and invertebrate nervous systems. *FEBS Lett.* **226**: 357–363.
- MAHMOOD N. A., CARMICHAEL W. W. 1986. The pharmacology of anatoxin-a(s), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. *Toxicon* **24**: 425–434.
- MAHMOOD N. A., CARMICHAEL W. W. 1987. Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. *Toxicon* **25**: 1221–1227.
- MANGER R. L., LEJA L. S., LEE S. Y., HUNGERFORD I. M., HOKAMA Y., DICKEY R. W., GRANADE H. R., LEWIS R., YASUMOTO T., WEKELL M. M. 1995. Detection of sodium channel toxins: directed cytotoxicity assays of purified ciguatoxins, brevetoxins, saxitoxins, and seafood extracts. *J. AOAC Int.* **78**: 521–527.
- MATSUNAGA S., MOORE R. E., NIEMCZURA W. P., CARMICHAEL W. W. 1989. Anatoxin-a(s), a potent anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae*. *J. Am. Chem. Soc.* **111**: 8021–8023.
- MEYER B. N., FERRIGINI N. R., PUTNAM J. E., JACOBSEN L. B., NICHOLS D. E., MCLAUGHLIN J. L. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* **45**: 31–34.
- MOORE B. S., OHTANI I., DEKONING C. B., MOORE R. E., CARMICHAEL W. W. 1992. Biosynthesis of marine natural products: microorganisms and macroalgae. *Tetrah. Lett.* **33**: 6595–6598.
- MURCH S. J., COX P. A., BANACK S. A. 2004. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **101**: 12228–12231.
- NAMIKOSHI M., MURAKAMI T., WATANABE M. F., ODA T., YAMADA J., TSUJIMURA S., NAGAI H., OISHI S. 2003. Simultaneous production of homoanatoxin-a, anatoxin-a and a new non-toxic 4 hydroxyhomoanatoxin-a by a cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja. *Toxicon* **42**: 533–538.
- NEUMANN R., PETER H. H. 1987. Insecticidal organophosphates: Nature made them first. *Cell. Mol. Life Sci.* **43**: 1235–1237.
- NOGLE L. M., OKINO T., GERWICK W. H. 2001. Antillatoxin B, a neurotoxic lipopeptide from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *J. Nat. Prod.* **64**: 983–985.
- ONODERA H., OSHIMA Y., HENRIKSEN P., YASUMOTO T. 1997. Confirmation of anatoxin-a(s), in the cyanobacterium *Anabaena lemmermannii*, as the cause of bird kills in Danish lakes. *Toxicon* **35**: 1645–1648.
- ORJALA J., NAGLE D. G., HSU V., GERWICK W. H. 1995. Antillatoxin: an exceptionally ichthyotoxic cyclic lipopeptide from the tropical cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *J. Am. Chem. Sci.* **117**: 8281–8282.
- POMATI F., BURNS B. P., NEILAN B. A. 2004a. Identification of an Na⁺-dependent transporter associated with saxitoxin-producing strains of the cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *Appl. Env. Microbiol.* **70**: 4711–4719.
- POMATI F., MOFFITT M. C., CAVALIERE R., NEILAN B. A. 2004b. Evidence for differences in the metabolism of saxitoxin and C1+2 toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Bioch. Bioph. Acta* **1674**: 60–67.
- POMATI F., SACCHI S., ROSSETTI C., GIOVANNARDI S., ONODERA H., OSHIMA Y., NEILAN B. A. 2000. The freshwater cyanobacterium *Planktothrix* sp. FP1: molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *J. Phycol.* **36**: 553–562.

- ROBINSON C. P., FRANZ D. R., BONDURA M. E. 1991. Effect of lyngbyatoxin A from the blue-green alga *Lyngbya majuscula* on rabbit aorta contractions. *Toxicon* **29**: 1009–1017.
- SANGUINETTI M. C., JIANG C. G., CURRAN M. E., KEATING M. T. 1995. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I_{Kr} potassium channel. *Cell* **81**: 299–307.
- SCHANTZ E. J. 1986. Chemistry and biology of saxitoxin and related toxins. *Ann. New York Acad. Sci.* **479**: 15–23.
- SCHANTZ E. J., MCFARREN E. F., SCHAFER M. L., LEWIS K. H. 1958. Purified shellfish poison for bioassay standardization. *J. Assoc. Official Agr. Chem.* **41**: 160–170.
- SCHNEIDER D., WINK M., SPORER F., LOUNIBOS P. 2002. Cycads: their evolution, toxins, herbivores and insect pollinators. *Naturwissenschaften* **89**: 281–294.
- SEAWRIGHT A. A., BROWN A. W., NOLAN C. C., CAVANAGH J. B. 1990. Selective degeneration of cerebellar cortical neurons caused by cycad neurotoxin, L-beta-methylaminoalanine (L-BMAA), in rats. *Neuropath. Appl. Neurobiol.* **16**: 153–169.
- SIVONEN K., KONONEN K., CARMICHAEL W. W., DAHLEM A. M., RINEHART K. L., KIVIRANTA J., NIEMELA S. J. 1989. Occurrence of the hepatotoxic cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea and structure of the toxin. *Appl. Env. Microb.* **55**: 1990–1995.
- SKULBERG O. M., CARMICHAEL W. W., ANDERSEN R. A., MATSUNAGA S., MOORE R. E., SKULBERG R. 1992. Investigation of a neurotoxic *Oscillatorialean* strain (*Cyanophyceae*) and its toxin, isolation and characterization of homoanatoxin-a. *Env. Tox. Chem.* **11**: 321–329.
- SU Z., SHEETS M., ISHIDA H., LI F. H., BARRY W. H. 2004. Saxitoxin blockers L-type ICa. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **308**: 324–329.
- SWANSON K. L., ALLEN C. N., ARONSTAM R. S., RAPPOPORT H., ALBUQUERQUE E. X. 1986. Molecular mechanisms of the potent and stereospecific nicotinic receptor agonist (+)-anatoxin-a. *Mol. Pharmacol.* **29**: 250–257.
- TENNANT A. D., NAUBERT J., CORBELL H. E. 1955. An outbreak of paralytic shellfish poisoning. *Can. Med. Assoc. J.* **72**: 436–439.
- TANNER C. M., KURLAND L. T. 1993. Amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonian-dementia complex on Guam. W: M. B. STERN, W. C. KOLLER (red.), Parkinsonian syndromes. Marcel Dekker, New York, s. 279–296.
- TWAROG B. M., HIDAKA T., YAMAGUCHI H. 1972. Resistance to tetrodotoxin and saxitoxin in nerves of bivalve mollusks. Possible correlation with paralytic shellfish poisoning. *Toxicon* **10**: 273–276.
- VEGA A., BELL E. A. 1967. α -amino- β -methylaminopropionic acid, a new amino acid from seeds of *Cycas circinalis*. *Phytochemistry* **6**: 759–762.
- WALKERS S., KAO C. Y. 1980. Neurotoxic alkaloids from cyanobacteria. *Fed. Proc.* **39**: 380–386.
- WANG J. X., SALATA J. J., BENNETT P. B. 2003. Saxitoxin is a gating modifier of HERG K^+ -channels. *J. Gen. Physiol.* **121**: 583–598.
- WARMKE J. W., GANETZKY B. 1994. A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **91**: 3438–3442.
- WEISS J. H., KOH J. Y., CHOI D. W. 1989. Neurotoxicity of beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) and beta-N-oxolylamino-L-alanine (BOAA) on cultured cortical neurons. *Brain Res.* **497**: 64–71.
- WONNACOTT S., GALLAGHER T. 2006. The chemistry and pharmacology of anatoxin-a and related homotropanes with respect to nicotinic acetylcholine receptors. *Mar. Drugs* **4**: 228–254.
- WONNACOTT S., JACKMAN S., SWANSON K. L., RAPOPORT H., ALBUQUERQUE E. X. 1991. Nicotinic pharmacology of anatoxin analogs. II. Side chain structure-activity relationship at neuronal nicotinic ligand binding sites. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **259**: 387–391.