

Kwas domoikowy – toksyna syntetyzowana przez morskie okrzemki

Kornelia ZABAGŁO, Michał ADAMSKI, Ewelina CHRAPUSTA

ZABAGŁO K, ADAMSKI M, CHRAPUSTA E. 2016. **Domoic acid – toxin synthesized by marine diatoms.** *Wiadomości Botaniczne* 60(3/4): 73–84.

Marine algae synthesize a variety of secondary metabolites, which are often toxic to animals and humans. One of them is domoic acid (DA), a potent neurotoxin produced by marine diatom species of the genus *Pseudo-nitzschia*. This toxin causes a human illness known as Amnesic Shellfish Poisoning. The main route of exposure to DA is the consumption of DA-contaminated filter-feeding shellfish and finfish that accumulate toxin during diatom blooms. The occurrence of DA in seawater leads to huge economic losses in the aquaculture of marine organisms. DA activates glutamate receptors in neurons and it induces histopathological effects in the vertebrate central nervous system. The clinical symptoms of acute poisoning also include gastrointestinal distress, confusion, disorientation, memory loss, coma, and even death. Moreover, the latest research results have shown that DA impairs the functioning of other organs such as heart, liver or kidneys. Toxic blooms of *Pseudo-nitzschia* appear along the coast almost all of the continents increasing the threat to wildlife and human health. The goal of the review is to characterize producers of DA, its physicochemical properties, biological activity and symptoms of intoxication.

KEY WORDS: diatoms, domoic acid, neurotoxin

Kornelia Zabagło, Michał Adamski, Ewelina Chrapusta, Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Roślin, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków, e-mail: kornelia.zabaglo@uj.edu.pl, michal.adamski@uj.edu.pl, ewelina.chrapusta@uj.edu.pl

WSTĘP

Powszechność występowania zakwitów glonów morskich, a zwłaszcza uwalniania metabolitów wtórnych do środowiska wodnego w czasie zamierania tworzących je organizmów oraz ich bioakumulacji w ciałach zwierząt, były przyczyną światowej popularności tematyki badawczej związanej z tymi zagadnieniami (Van Dolah 2000). Wiele metabolitów wtórnych syntetyzowanych przez glony morskie stanowi cenne źródło bioaktywnych substancji wykorzystywanych w medycynie (Daigo 1959). Inne spośród nich,

ze względu na swoje toksyczne właściwości, są przyczyną licznych chorobowych objawów, szczególnie niebezpiecznych dla zdrowia i życia zwierząt morskich oraz człowieka (Perl et al. 1990). Związki te mogą wnikać do organizmu bezpośrednio przez skórę i drogi oddechowe oraz pośrednio poprzez konsumpcję skażonych nimi organizmów morskich (Van Dolah 2000, Lelong et al. 2012). Biotoksyny morskich glonów akumulowane w tkankach owoców morza można zakwalifikować do różnych grup w zależności od efektów wywieranych w organizmie człowieka. Odpowiednio są to związki: paraliżujące

(choroba: Paralityczne Zatrucie Mięczakami), zaburzające funkcjonowanie układu nerwowego (Neurotoksyczne Zatrucie Mięczakami), indukujące problemy gastryczne (Biegunkowe Zatrucie Mięczakami) oraz powodujące amnezję (Amnestyczne Zatrucie Mięczakami) (Van Dolah 2000, La Barre et al. 2014, Schroeder et al. 2015). Etiologia Amnestycznego Zatrucia Mięczakami (ang. *Amnesic Shellfish Poisoning*, ASP) związana jest z kwasem domoikowym (DA) syntetyzowanym przez niektóre morskie krasnorosty i okrzemki. Pierwszy opisany przypadek toksycznego odziaływania DA odnotowano w 1987 roku na wschodnim wybrzeżu Wyspy Księcia Edwarda (Kanada). W następstwie konsumpcji skażonych małż (*Mytilus edulis*) 143 osoby wymagały natychmiastowej hospitalizacji, a 4 inne zmarły (Wright et al. 1989, Perl et al. 1990). Objawy zatrucia DA obejmowały zarówno problemy gastryczne (wymioty, biegunka, bóle brzucha) jak i neurologiczne (dezorientacja, drgawki, krótko- lub długotrwała utrata pamięci, śpiączka, a nawet śmierć) (Perl et al. 1990). Dokładne analizy skażonych małż wykazały, że źródłem toksyny była okrzemka *Pseudo-nitzschia multiseries*, stanowiąca główny składnik ich pożywienia. W kolejnych latach wykazano także toksyczny wpływ DA na organizmy zwierzęce reprezentujące różne poziomy łańcucha troficznego. DA był przyczyną masowych chorób i śmierci: ryb, ptaków, lwów morskich, fok oraz wielorybów (Lefebvre, Robertson 2010, Trainer et al. 2012, La Barre et al. 2014). W związku z tymi wydarzeniami DA jak również syntetyzujące go organizmy stały się podmiotem intensywnych badań. Jednak wiedza opisująca charakterystykę tego związku jest nadal niekompletna. Systematycznie wzrasta liczba nowych gatunków zdolnych do jego syntezy. Do dnia dzisiejszego nie udało się w pełni wyjaśnić funkcji DA, jaką pełni on w środowisku morskim (Lelong et al. 2012). Ponadto w literaturze pojawiają się nowe informacje o toksycznym wpływie DA obejmującym nie tylko uszkodzenia układu nerwowego, ale także innych organów kręgowców (Lefebvre et al. 2007, Lefebvre, Robertson 2010, Pizzo et al. 2015). Organizm człowieka jest najbardziej narażony na ekspozycję DA poprzez

spożywanie zawierających toksynę owoców morza (małży, skorupiaków, ostryg) oraz ryb, dla których często toksyczny zakwit glonów jest bogatym i podstawowym źródłem pożywienia. Zwierzęta te wykazują w swoich tkankach wysoki potencjał bioakumulacji DA. W ciałach tych zwierząt toksyna może być akumulowana w bardzo wysokich stężeniach, zwłaszcza w ich przewodzie pokarmowym (Bates et al. 1989, Schroeder et al. 2015). Małże, które były przyczyną licznych zatruc ludzi w 1987 roku, zawierały aż 790 µg DA/g świeżej masy omułka. Po wypadku w Kanadzie ustalono dopuszczalne wartości dla stężenia toksyny w owocach morza przeznaczonych do konsumpcji na poziomie 20 µg/g mięczaka. Została ona następnie przyjęta jako obowiązująca norma światowa (Wekell et al. 1994). Podczas trwania zakwitu *Pseudo-nitzschia* sp. wysokie stężenie DA potwierdzono także w ciałach organizmów bentonicznych i planktonowych, stanowiących kolejne źródło toksyny dla: ryb, drapieżników i ptaków morskich (Kvitek et al. 2008, Suriyanti, Usup 2015).

Toksyczne zakwity okrzemek stały się problemem globalnym. Zwiększona częstotliwość ich występowania na wszystkich szerokościach geograficznych Ziemi powoduje tymczasowe lub czasem nawet długoletnie zamykanie wielu prowadzonych hodowli organizmów morskich. Prowadzi to w konsekwencji do ogromnych strat ekonomicznych (Trainer et al. 2012). W ostatnich latach obserwuje się dynamiczny wzrost konsumpcji owoców morza; pociąga to za sobą konieczność stałej aktualizacji wiedzy określającej potencjalne zagrożenia bezpośrednie DA, a w szczególności źródeł jego pochodzenia i wpływie na szeroko pojęte środowisko. Głównym celem prezentowanego artykułu jest charakterystyka: producentów DA, jego właściwości fizyczno-chemicznych i biologicznej aktywności oraz skutków intoksykacji dla kręgowców.

ŹRÓDŁA KWASU DOMOIKOWEGO

Mieszkańcy japońskiej wyspy Yakushima izolowali kwas domoikowy z krasnorostu *Chondria*

armata zwanego w ich języku narodowym „domoi”. Był on podawany dzieciom jako środek przeciwgrzybiczy i przeciwbaczy, bez zauważalnych skutków ubocznych. Wówczas gatunek ten był jedynym znanym źródłem tego związku (Daigo 1959, Takemoto, Daigo 1958). Zainteresowanie DA narastało stopniowo aż do czasu masowego zatrucia mieszkańców Wyspy Księcia Edwarda po spożyciu małży *Mytilus edulis* w 1987 roku. Było to pierwsze doniesienie o produkcji tej biotoksyny przez morską okrzemkę *Pseudo-nitzschia multiseries*, jak również o wysokim potencjale jej bioakumulacji przez morskie organizmy (Wright et al. 1989, Bates et al. 1989, Perl et al. 1990). Pierwszy przypadek licznych zatruc i śmierci morskich kręgowców (*Pelecanus occidentalis*, *Phalacrocorax penicillatus*) w następstwie konsumpcji zawierających DA sardeli miał miejsce w roku 1991 w zatoce Monterey Bay w Kalifornii. Dokładne analizy ciała ryb wykazały, że źródłem toksyny była okrzemka *Pseudo-nitzschia australis* (Fritz et al. 1992, Work et al. 1993). Dodatkowo w kolejnych latach zdolność do syntezy DA wykazano u innych morskich okrzemek z rodzajów: *Pseudo-nitzschia*, *Nitzschia* i *Amphora*, (informacja ta w przypadku ostatniego rodzaju została jednak zakwestionowana) (Shimizu et al. 1989, Bates 2000). Spośród 45 dotychczas opisanych gatunków *Pseudo-nitzschia* ostatecznie 19 uznano za toksyczne (Teng et al. 2015). W zależności od gatunku okrzemki ilość syntetyzowanego DA waha się od 1 do 100 pg DA/komórkę. Gatunki: *P. multiseries*, *P. australis* i *P. seriata* uważane są w morzach świata za głównych producentów DA. Toksyczne zakwitę *Pseudo-nitzschia* sp. występują wzdłuż wybrzeży wszystkich kontynentów za wyjątkiem Antarktydy. DA oraz organizmy go syntetyzujące stwarzają także poważny problem w wodach europejskich. Toksynę zidentyfikowano w owocach morza pochodzących z hodowli w wielu krajach europejskich, między innymi w Wielkiej Brytanii, Irlandii i Francji. W Europie około 59% testowanych małż zawierało DA w stężeniach wyższych od dopuszczalnego limitu. W efekcie stało się przyczyną zamykania wielu akwakultur organizmów morskich w: Szkocji,

Irlandii, Francji, Portugalii i Danii (EFSA 2009, Trainer et al. 2012).

CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA SYNTEZĘ KWASU DOMOIKOWEGO

Czynniki stymulujące syntezę DA przez *Pseudo-nitzschia* sp. przedstawiono na Ryc. 1. Wyniki przeprowadzonych analiz dowiodły, że jednym z istotniejszych jest temperatura otoczenia (Bates et al. 1989). Zakres temperatury indukujący wzmożoną produkcję toksyny jest ściśle związany z tworzącym zakwit gatunkiem rodzaju *Pseudo-nitzschia*. W temperaturze 25°C stwierdzono 4-krotnie wyższe natężenie syntezy DA przez kulturę *Pseudo-nitzschia multiseries* w porównaniu do wyników doświadczeń przeprowadzonych w 5°C (Lewis et al. 1993). W przeciwieństwie do tych wyników w przypadku komórek *Pseudo-nitzschia seriata* najwyższy poziom syntezy DA odnotowano w temperaturze 4°C (1,0 – 33,6 pg DA/komórkę), a najniższą w 15°C (0,31 – 1,6 pg DA/komórkę) (Lundholm et al. 2004). Innym czynnikiem fizyczno-chemicznym przyczyniającym się do wzrostu toksyczności zakwitu okrzemek jest wzrost zasolenia wody, co wskazuje na potencjalną rolę DA jako osmolita w środowisku morskim (Doucette et al. 2008).

Wzrost natężenia syntezy DA może być również związany z funkcją obronną okrzemek przed konsumpcją przez zooplankton. Najnowsze doniesienia prezentowane przez Tammilehto et al. (2015) i Harðardóttir et al. (2015) wykazały, że obecność widłonogów (*Calanus hyperboreus* i *C. firmarchicus*) powodowała wzmożoną syntezę DA. Podobne rezultaty uzyskano również bez bezpośredniego kontaktu organizmów, poprzez ich oddzielenie od siebie za pomocą membrany. Opisany efekt autorzy tłumaczą zachodzącą wówczas, pod wpływem zooplanktonu, zmianą chemizmu wody. Wyniki tych badań mogą świadczyć o tym, że w środowisku morskim może to być główny biologiczny czynnik stymulujący pojawianie się toksycznych zakwitów okrzemek (Tammilehto et al. 2015, Harðardóttir et al. 2015). Jedną z najbardziej powszechnych hipotez

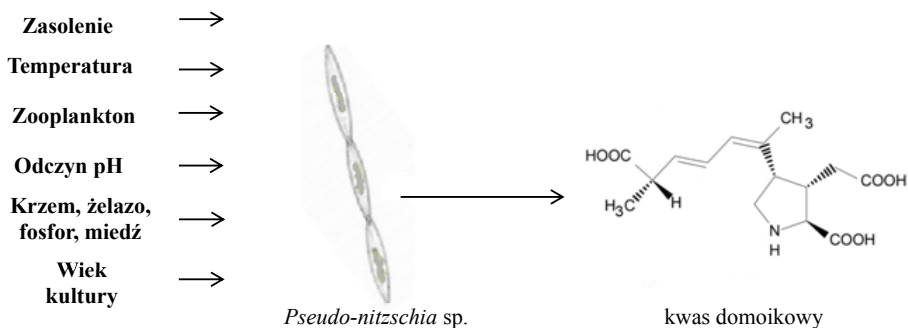
dotyczących produkcji toksycznych metabolitów wtórnych przez morskie glony zakłada ich funkcję regulacyjną określonej dynamiki i składu współzrzuśającego fitoplanktonu. W przypadku kultywowania toksycznego szczepu *P. multiseri* równocześnie z *Chrysochromulina ericina*, *Heterocapsa triquetra*, *Eutreptiella gymnastica* oraz *Rhodomonas marina* nie wykazano jednak żadnych efektów allelopatycznych (Lundholm et al. 2005). Podobnie nie uzyskano takiego rezultatu dodając DA do innych 11 kultur fitoplanktonu (Windust 1992, Lundholm et al. 2005).

Lundholm i wsp. (2004) i Trimborn i wsp. (2008) wykazali wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia DA w kulturze *Pseudo-nitzschia multiseri* wraz ze zmieniającymi się warunkami pH środowiska (1,9 pg DA/komórkę w pH 7,9; 4,2 pg DA/komórkę w pH 8,4 i 140 pg DA/komórkę w pH 8,9). Ostatnia z przedstawionych wartości syntezy DA w pH 8,9 jest najwyższą spośród opisanych w historii tego gatunku okrzemki. Wyniki szeregu długoletnich analiz dowiodły, że niedobór w środowisku takich pierwiastków jak: krzem, fosfor i żelazo oraz nadmiar miedzi zwiększają natężenie syntezy DA. Biosynteza DA wymaga dużych nakładów energii w formie ATP, w związku z tym sugeruje się, że proces ten może być skuteczną strategią wykorzystywaną przez okrzemki do eliminacji nadmiaru absorbowanej energii powstającej w fazie jasnej fotosyntezy (Pan et al. 1998). Dodatkowo wpływ na produkcję

DA odgrywają także występujące w zakwiecie okrzemek różnorodne bakterie. Wywierają one niekorzystny wpływ na rozwój okrzemek, a w konsekwencji mogą przyczyniać się do podwyższenia natężenia syntezy DA (Kaczmarek et al. 2005, Kodama et al. 2006). Bates i wsp. (1999) sugerowali, że DA może pełnić nieznaną dotąd funkcję w rozmnażaniu płciowym okrzemek. Autorzy zaobserwowali, że duże komórki które nie przeszły jeszcze wielu podziałów wegetatywnych, produkują znacznie wyższe ilości DA w porównaniu do małych, starszych komórek o zakończonej fazie wzrostu (Bates et al. 1999, Hiltz et al. 2000).

OBJAWY INTOKSYKACJI KWASEM DOMOIKOWYM

Systematyczne podawanie japońskim dzieciom DA jako leku przeciw robaczego, w stężeniach od 0,4 – 0,8 mg DA/kg masy ciała nie wywierało doraźnie zauważalnych negatywnych efektów. Jednak brak jest w literaturze informacji o stanie zdrowia tych osób czy ewentualnych późniejszych chorobach, które mogły być konsekwencją zażywania DA w dzieciństwie (Daigo 1959). Efekty toksycznego wpływu DA zaobserwowano u lwów morskich dopiero po kilkudziesięciu dniach od czasu ekspozycji, wówczas gdy toksyna była już całkowicie z ich organizmu usunięta



Ryc. 1. Czynniki fizykochemiczne i biologiczne wpływające na syntezę kwasu domoikowego przez *Pseudo-nitzschia* sp. (podane za Zabagło et al. 2016, oprac. K. Zabagło, M. Adamski, E. Chrapusta).

Fig. 1. Physicochemical and biological factors affecting the synthesis of domoic acid by *Pseudo-nitzschia* sp. (presented by Zabagło et al. 2016, by K. Zabagło, M. Adamski, E. Chrapusta).

(Pulido 2008). DA jest eliminowany z tkanek wraz z moczem i kałem w formie chemicznie niezmienionej w ciągu 24 godzin od czasu jego przyjęcia (Truelove et al. 1997). Po 30 minutach od czasu zatrucia DA stwierdzono w nerkach 4-krotnie wyższe stężenie toksyny w porównaniu do wątroby, serca i mózgu (Funk et al. 2014). Najnowsze wyniki badań wykazały, że prze-wlekła ekspozycja na niewielkie dawki DA, poniżej ustalonego dopuszczalnego limitu (<20 µg DA/g ciała mięczaka), zaburzała funkcję mitochondriów, nerek oraz znacząco zmieniła transkrypcję genów włączonych w procesach kontrolujących prawidłowe funkcjonowanie i rozwój układu nerwowego kręgowców (Lefebvre, Robertson 2010, Hiolski et al. 2014). Długotrwała ekspozycja na DA osłabia także pracę układu immunologicznego, co w konsekwencji prowadzi do zmniejszonej odporności organizmu na jego toksyczne oddziaływanie w przyszłości (Lefebvre, Robertson 2010). Konsumpcja dawki DA w ilości od 0,2 – 0,3 mg DA/kg masy ciała nie wywoływała natychmiastowych żadnych zauważalnych objawów. Po 24 godzinach od czasu zatrucia po przyjęciu DA od 0,9 – 2,0 mg DA/kg masy ciała pojawiły się problemy gastryczne (wymioty, biegunka, bóle brzucha). Następstwa neurologiczne, takie jak zaburzenia funkcji poznawczych w tym: drgawki, chwiejność emocjonalna, agresja, krótko- i długotrwała utrata pamięci i śpiączka, zdiagnozowane zostały u pacjentów po 48 – 72 godzinach od czasu konsumpcji DA na poziomie 4,2 mg DA/kg masy ciała (Perl et al. 1990). Ponadto u niektórych pacjentów wystąpiły: obfita wydzielina z dróg oddechowych, niestabilne ciśnienie krwi i arytmia serca (Teitelbaum et al. 1990, Gao et al. 2007). Rok po zatruciu DA u 84-letniego mężczyzny z Kanady zdiagnozowano padaczkę spowodowaną stopniową śmiercią neuronów w płacie skroniowym (Perl et al. 1990).

Wyniki badań wykazały, że człowiek jest bardziej wrażliwy na toksyczne działanie DA w porównaniu do gryzoni. Myszy i szczury tolerują doustne przyjęcie dawki DA w ilości do 60 mg DA/kg masy ciała bez zauważalnych objawów neurologicznych (Iverson et al. 1990, Lefebvre, Robertson 2010). W przypadku kalifornijskich

lwów morskich występowały podobne objawy zatrucia jak u ludzi po wprowadzeniu do organizmu porównywalnych ilości DA. Sugeruje się, że ten ssak morski może być dobrym organizmem testowym do ustalania bezpiecznego limitu DA w tkankach owoców morza przeznaczonych do spożycia (Gulland et al. 2002). Inne informacje wykazały, że DA wpływał również na funkcjonowanie układu hormonalnego i rozrodczego. DA hamował produkcję hormonów takich jak hormon tyreotropowy (TSH) i hormon adrenokortykotropowy (ACTH) (Arufe et al. 1995, Gulland et al. 2012). Tiedeken et al. (2005) wykazali, że jeśli poddać jaja *Danio rerio* (danio pręgowany) działaniu DA w stężeniu od 0,12 do 17 µg DA/g masy jaja, to wpływa ono na zmniejszenie liczby wylęgu, a larwy po 4 dniach były pozbawione odruchów dotykowych. Ekspozycja na DA może być przyczyną licznych przedczesnych poro-dów i poronień u kalifornijskich lwów morskich (Brodie et al. 2006). Pizzo et al. (2015) po raz pierwszy wykazali, że DA jest bezpośrednio odpowiedzialny za zaburzenia funkcjonowania układu rozrodczego u ssaków. Hamuje on wydzielanie progesteronu i estradiolu przez jajniki. DA może przenikać przez łożysko, a jego obecność została potwierdzona w płynie owodniowym i mózgu płodu szczura (Dakshinamurti et al. 1993, Levin et al. 2005). Ekspozycja szczurów w okresie prenatalnym na DA prowadziła do poważnych zaburzeń neurorozwojowych (Tanemura et al. 2009). Szczególnie narażone na działanie DA były noworodki, przyjmujące go wraz z mlekiem matki. Ponadto u ciężarnych samic szczurzych stwierdzono wydłużenie czasu wydalania DA z organizmu. Wyniki badań przeprowadzonych przez Carvalho et al. (2006) wykazały, że DA jest związkami klastogennym i może stymulować powstawanie nowotworów przewodu pokarmowego u osób narażonych na jego działanie. DA wywoływał zmiany strukturalne chromosomów i indukował powstawanie mikrojąder w ludzkich komórkach jelita grubego (Caco-2) w następstwie uszkodzenia wrzeczona kariokinetycznego (Carvalho et al. 2006).

U lwów morskich, które zmarły po zatruciu DA, wykazano dodatkowo uszkodzenia narządu

wzroku a w szczególności siatkówki odbierającej bodźce wzrokowe (Silvagni et al. 2005). Objawy intoksykacji DA zależą nie tylko od ilości toksyny wprowadzonej do organizmu, ale także od stanu zdrowia, płci oraz wieku osobnika. Przyjmuje się, że ważnym czynnikiem wywierającym efekty intoksykacji DA jest wiek. Wszystkie cztery osoby zmarłe po konsumpcji skażonych małż na Wyspie Księcia Edwarda przekroczyły 70 rok życia (Perl et al. 1990). Efekt ten tłumaczy się wyższą podatnością osób starszych na utratę pamięci oraz wolniejszym tempem usuwania DA z organizmu przez nerki. Wyniki uzyskane na szczurach po iniekcji do organizmu podobnych ilości DA potwierdziły, że bardziej wrażliwe na toksyczność DA są samce w porównaniu do samic (Costa et al. 2010, Baron et al. 2013). Konsumpcji owoców morza pochodzących z nieznanego źródła powinny unikać także osoby o obniżonej odporności, w szczególności cierpiące na przewlekłe choroby takie jak: cukrzyca, niewydolność nerek i wątroby (Schroeder et al. 2015). Złą wiadomością jest także ta, że nadal w fazie badawczej pozostają poszukiwania skutecznego leku na wywołane przez DA zatrucia.

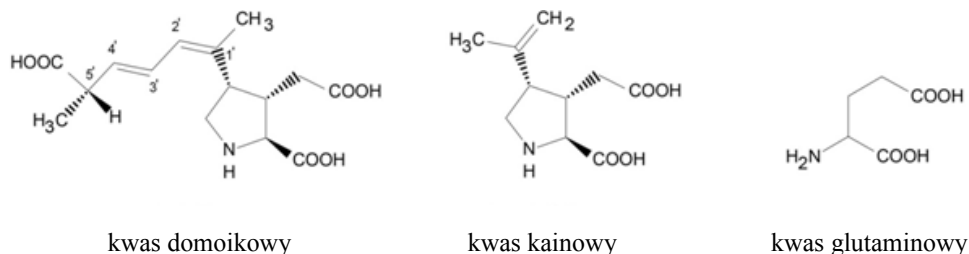
STRUKTURA KWASU DOMOIKOWEGO ORAZ JEGO POCHODNYCH

Kwas domoikowy jest związkiem bardzo dobrze rozpuszczalnym w wodzie (8 mg/ml), polarnym, niebiałkowym egzogennym aminokwasem pobudzającym centralny układ nerwowy (CUN) kręgowców (Costa et al. 2010). Czysty związek opisywany jest jako: bezbarwna, drobnokryształiczna substancja o gęstości 1,273 g / cm³, z maximum absorpcji w zakresie UV (λ_{\max} = 242 nm) i masie cząsteczkowej 311 Da (Lefebvre et al. 2007, La Barre et al. 2014, Zabaglo et al. 2016). Strukturalnie i funkcjonalnie DA jest bardzo podobny do innej morskiej neurotoksyny – kwasu kainowego (KA). Obydwa te związki są analogami kwasu glutaminowego – neurotransmitera w CUN (Wright et al. 1989, Hampson et al. 1992). Strukturę tych związków prezentuje Ryc. 2. DA jest zbudowany z grupy iminowej, pierścienia

proliny oraz warunkujących jego hydrofilowość trzech grup karboksylowych. Za toksyczność całej cząsteczki i interakcję z receptorami glutaminowymi komórek nerwowych odpowiadają dwa sprzężone wiązania pomiędzy 1 i 2 atomem węgla w łańcuchu bocznym (Hampson et al. 1992, Walter et al. 1992). Dotychczas zidentyfikowano i scharakteryzowano właściwości fizyczno-chemiczne i biologiczne 11 form pochodnych DA. Należą do nich kwasy izodomoikowe (8 izomerów oznaczonych A – H), diastereoizomer (kwas epidomoikowy) oraz domoikolaktony (2 izomery – A i B) (Lelong et al. 2012, La Barre et al. 2014). Niektóre z tych form są syntetyzowane przez krasnorost *Chondria armata* i okrzemki: *Nitzschia navis-varingica*, *Pseudo-nitzschia seriata* i *P. australis*. Obecność pozostałych wykazywana w tkankach mięczaków jest produktem degradacji samego DA (Holland et al. 2005, Kotaki et al. 2005, Hansen et al. 2011). Izomery DA występują w środowisku morskim w bardzo niskich stężeniach, nie zagrażających zdrowiu i życiu zwierząt morskich oraz ludzi. Ponadto są one mniej toksyczne niż DA. Powinowactwo kwasu izodomoikowego B do receptorów glutaminowych jest 95 razy mniejsze w porównaniu do powinowactwa w tej reakcji z aktywnością biologiczną DA. Jest to następstwem, jak się uważa, braku podwójnego wiązania pomiędzy 1 i 2 atomem węgla w strukturze molekularnej kwasów izodomoikowych (Hampson et al. 1992, Holland et al. 2005).

STABILNOŚĆ KWASU DOMOIKOWEGO

Kwas domoikowy i jego pochodne są związkami stosunkowo stabilnymi. Przechowywany DA w wodnym roztworze acetonitrylu w temperaturze pokojowej i w warunkach pH od 5 do 7 nie ulega degradacji przez okres 9 miesięcy (Quilliam 2003). Thomas et al. (2008) wykazali 12% obniżenie zawartości DA w porównaniu do kontroli w próbce poddanej działaniu temperatury 50°C. Dekompozycję DA uzyskano natomiast podczas ekspozycji na oddziaływanie tlenu, w warunkach zarówno bardzo kwaśnych (pH < 2) oraz skrajnie



Ryc. 2. Struktura chemiczna kwasu domoikowego, kwasu kainowego i kwasu glutaminowego (podane za Zabagło et al. 2016, oprac. K. Zabagło, M. Adamski, E. Chrapusta).

Fig. 2. The chemical structure of domoic acid, kainic acid and glutamic acid (presented by Zabagło et al. 2016, by K. Zabagło, M. Adamski, E. Chrapusta).

alkalicznych (pH > 12) (Quilliam 2003). DA jest odporny na działanie tych czynników, szczególnie gdy jest zakumulowany w tkankach organizmów morskich. Poddanie tkanek małża skażonych DA autoklawowaniu w temperaturze 121°C nie redukowało jego stężenia (McCarron, Hess 2006). Podobne rezultaty potwierdzające wysoką stabilność cząsteczki DA zostały wykazane przez Hatfield i wsp. (1995) testujących wpływ ujemnej temperatury (-23°C). Wyniki tych badań dowiodły, że poddanie gotowaniu czy zamrażaniu owoców morza przed ich spożyciem jest w eliminacji toksyny z tkanek procesem nieskutecznym (Hatfield et al. 1995, McCarron, Hess 2006). Główną drogą usuwania DA uwolnionego do środowiska morskigo w trakcie masowego zamierania okrzemek jest UV-degradacja (Bouillon et al. 2006). Wyniki badań wykazały, że najszybsze tempo degradacji DA zachodziło przy długości fali $\lambda = 330$ nm. Na powierzchni wody UV-A eliminuje do 90% toksyny a UV-B 9%. Proces ten jest jednak ograniczany jedynie do głębokości 5 metrów. Każdego dnia w taki sposób usuwane jest z całkowitej ilości występującej w wodzie morskiej około 3,5% DA (Bouillon et al. 2006).

Napromieniowanie zakresem UV-A nie jest jedynym czynnikiem eliminującym DA ze środowiska. Stewart i wsp. (1998) testowali zdolność degradacji DA przez różne bakterie oraz inne organizmy występujące w wodzie morskiej. Rozkład DA następował tylko w obecności bakterii z rodzajów *Alteromonas* i *Pseudomonas* wyizolowanych z małż (*Mytilus edulis* i *Mya*

arenaria) i współwystępujących w wodach z toksycznym zakwitem okrzemek (Stewart et al. 1998). Przyjmuje się, że bakterie te są aktywne w szybkim tempie degradacji zakumulowanego DA w tkankach tych gatunków małż. Poziom DA w ich ciałach był niewykrywalny już w ciągu tygodnia od czasu zaniku zakwitu w porównaniu do innych organizmów morskich wykazujących wysoką zdolność bioakumulacji DA, u których nawet po upływie roku od momentu ekspozycji stwierdzano jego obecność (Wekell et al. 1994, Blanco et al. 2002, Lefebvre, Robertson 2010).

BIOLOGICZNA AKTYWNOŚĆ KWASU DOMOIKOWEGO

Kwas domoikowy jest zaliczany do neurotoksyn. Działa jako analog kwasu glutaminowego w CUN (Larm et al. 1997, Pulido 2008). Tworzy on wiązania z receptorami glutaminowymi (GLUR) (receptory kainowe (KA), α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolu propionianu (AMPA) i *N*-metylo-D asparaginianu (NMDA)) znajdującymi się w błonach neuronów. Powinowactwo DA do GLUR jest 100 razy większe niż samego neurotransmitera (Todd 1993, Jeffery et al. 2004). Egzogeny DA wiążąc się z receptorami AMPA i KA kanałów sodowych w błonach komórek nerwowych prowadzi do ich otwarcia i napływu jonów Na^+ do wnętrza komórki. Efektem tego jest obniżenie ujemnego potencjału elektrycznego błony komórkowej, co

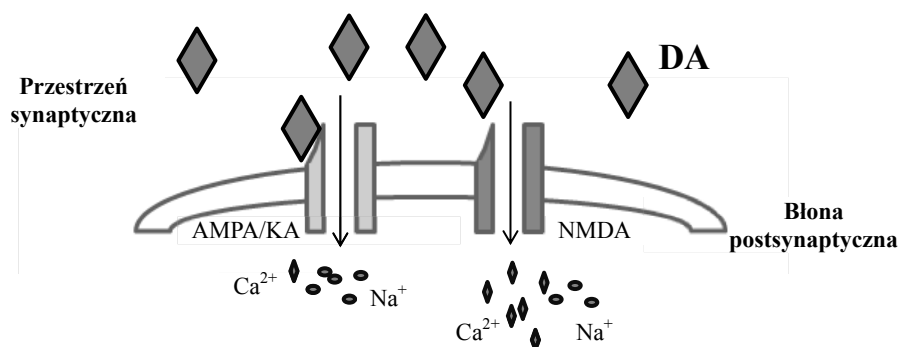
w następstwie stymuluje długotrwałą aktywację receptorów NMDA w kanałach wapniowych i sodowych (Ryc. 3) (La Barre et al. 2014). Wpływ i nadmiar gromadzonego wewnątrzkomórkowo Ca^{2+} wywołuje: obrzęk neuronów, powstawanie reaktywnych form tlenu, zaburzenia neurologiczne, uszkodzenia DNA, peroksydację lipidów, uszkodzenia mitochondriów (obniżenie procesu produkcji energii), a następnie śmierć komórki (Lefebvre, Robertson 2010).

Spośród wszystkich części mózgu najbardziej wrażliwy na toksyczny efekt DA jest hipokamp, a w szczególności neurony piramidowe zlokalizowane w jego rejonach CA3, CA1 i CA4 (Sutherland et al. 1990, Strain, Tasker 1991, Scallet et al. 2005). Te obszary mózgu zabezpieczają głównie zdolność zapamiętywania i procesy poznawcze, stąd nazwa choroby indukowanej przez DA – Amnestyczne Zatrucie Mięczakami. Wprowadzony do organizmu kręgowców DA w formie czystej jest mniej toksyczny w porównaniu do konsumpcji skażonych owoców morza (Novelli et al. 1992). Zwiększona neurotoksyczność DA zakumulowanego w ciałach małż jest spowodowana synergią występującą pomiędzy DA a kwasem glutaminowym i asparaginowym obecnymi w wysokich stężeniach w tkankach skorupiaków (Lelong et al. 2012, Pizzo et al. 2015). Ponadto wyniki badań laboratoryjnych przeprowadzonych

na myszach wykazały, że DA wywierał bardziej toksyczny efekt podczas dootrzewnowego dawkowania (Dawka śmiertelna dla 50% osobników (LD_{50}) = 3,6 mg/kg masy ciała) niż w przypadku doustnej aplikacji (LD_{50} = 68 mg/kg masy ciała) (Todd 1993, Jeffery et al. 2004).

PODSUMOWANIE

Rosnąca świadomość społeczna dotycząca korzyści zdrowotnych płynących ze spożywania owoców morza przyniosła również znaczący i wciąż wzrastający popyt na te produkty na całym świecie. Jednocześnie wzmożona częstotliwość pojawiania się toksycznych zakwitów okrzemek syntetyzujących DA przyczyniała się w ciągu ostatnich kilkunastu lat do systematycznego wzrostu liczby zatruc ludzi oraz zwierząt morskich. Główną drogą narażenia organizmu na działanie tej toksyny jest konsumpcja skażonych owoców morza. Pomimo intensyfikacji badań nadal brak jest skutecznej metody usuwania DA z tkanek zwierząt i człowieka. Ponadto najnowsze wyniki badań laboratoryjnych przynoszą informacje o nieznanym dotychczas długotrwałych efektach intoksykacji DA po wprowadzeniu nawet małych jego ilości do organizmu, także o wartościach poniżej dopuszczalnego limitu. DA ma toksyczny



Ryc. 3. Mechanizm działania kwasu domoikowego w komórce nerwowej kręgowców: DA – kwas domoikowy, AMPA/Ka – receptory α -amino-3-hydrokso-5-metylo-4-izoksazolu propionianu i kainowe, NMDA – *N*-metylo-D asparaginian (oprac. K. Zabagło, M. Adamski, E. Chrapusta).

Fig. 3. The mechanism of action of domoic acid in the nerve cell of vertebrates: DA – domoic acid, AMPA/Ka – α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate and kainate receptors, NMDA – *N*-methyl-D-aspartate receptor (by K. Zabagło, M. Adamski, E. Chrapusta).

wpływ nie tylko na układ nerwowy kręgowców, ale również uszkadza inne ich organy takie jak: serce, wątrobę i nerki. Poznanie czynników ograniczających rozwój okrzemek oraz roli DA w środowisku pozwoliłoby w przyszłości ograniczyć negatywne efekty jego oddziaływania oraz zmniejszyć liczbę występujących zatruc ludzi i organizmów morskich.

LITERATURA

- ARUFE M. C., ARIAS B., DURÁN R., ALFONSO M. 1995. Effects of domoic acid on serum levels of TSH and thyroid hormones. *Endocrine Research* **21**: 671–680.
- BARON A. W., RUSHTON S. P., RENS N., MORRIS C. M., BLAIN P. G., JUDGE S. J. 2013. Sex differences in effects of low level domoic acid exposure. *Neurotoxicology* **34**: 1–8.
- BATES S. S. 2000. Domoic-acid-producing diatoms: another genus added! *J. Phycol.* **36**: 978–983.
- BATES S. S., BIRD C. J., DE FREITAS A. S. W., FOXALL R., GILGAN M., HANIC L. A., JOHNSON G. R., MCCULLOCH A. W., ODENSE P., POCKLINGTON R., QUILLIAM M. A., SIM P. G., SMITH J. C., SUBBA RAO D. V., TODD E. C. D., WALTER J. A., WRIGHT J. L. C. 1989. Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island, Canada. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic and Science* **46**(7): 1203–1215.
- BATES S. S., HILTZ M. F., LÉGER C. 1999. Domoic acid toxicity of large new cells of *Pseudo-nitzschia multiseries* resulting from sexual reproduction. W: J. L. MARTIN, K. HAYA (eds), Proceedings of the Sixth Canadian Workshop on Harmful Marine Algae. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences* **2261**: 21–26.
- BLANCO J., BERMÚDEZ DE LA PUENTE M., ARÉVALO F., SALGADO C., MOROÑO A. 2002. Depuration of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) contaminated with domoic acid. *Aquatic Living Resources* **15**: 53–60.
- BOUILLON R. C., KNIERIM T. L., KIEBER R. J., SKRABAL S. A., WRIGHT J. L. C. 2006. Photodegradation of the algal toxin domoic acid in natural water matrices. *Limnology and Oceanography* **51**(1): 321–330.
- BRODIE E. C., GULLAND F. M. D., GREIG D. J., HUNTER M., JAAKOLA J., LEGER J. ST., LEIGHFIELD T. A., VAN DOLAH F. M. 2006. Domoic acid causes reproductive failure in California Sea Lions (*Zalophus californianus*). *Marine Mammal Science* **22**(3): 700–707.
- CARVALHO P. S., CATIAN R., MOUKHA S., MATIAS W. G., CREPPY E. E. 2006. Comparative study of domoic acid and okadaic acid induced-chromosomal abnormalities in the Caco-2 cell line. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **3**(1): 4–10.
- COSTA L. G., GIORDANO G., FAUSTMAN E. M. 2010. Domoic acid as a developmental neurotoxin. *Neurotoxicology* **31**(5): 409–423.
- DAIGO K. 1959. Studies on the constituents of *Chondria armata*. II. Isolation of an anthelmintic constituent. *Pharmaceutical Society of Japan* **79**: 353–356.
- DAKSHINAMURTI K., SHARMA S. K., SUNDARAM M., WATANABE T. 1993. Hippocampal changes in developing postnatal mice following intrauterine exposure to domoic acid. *Journal of Neuroscience* **13**(10): 4486–4495.
- DOUCETTE G. J., KING K. L., THESSAN A. E., DORTCH Q. 2008. The effect of salinity on domoic acid production by the diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*. *Nova Hedwigia* **133**: 31–46.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2009. Marine biotoxins in shellfish – domoic acid – scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA Journal* **1181**: 1–61.
- FRITZ L., QUILLIAM M. A., WRIGHT J. L. C., BEALE A. M., WORK T. M. 1992. An outbreak of domoic acid poisoning attributed to the pennate diatom *Pseudonitzschia australis*. *J. Phycol.* **28**(4): 439–442.
- FUNK J. A., JANECH M. G., DILLON J. C., BISSLER J. J., SIROKY B. J., BELL P. D. 2014. Characterization of renal toxicity in mice administered the marine biotoxin domoic acid. *Journal of the American Society of Nephrology* **25**(6): 1187–1197.
- GAO X., XU X., PANG J., ZHANG C., DING J. M., PENG X., LIU Y., CAO J. M. 2007. NMDA receptor activation induces mitochondrial dysfunction, oxidative stress and apoptosis in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Physiological Research* **56**(5): 559–569.
- GULLAND F. M., HALL A. J., GREIG D. J., FRAME E. R., COLLEGROVE K. M., BOOTH R. K., WASSER S. K., SCOOT-MONCRIEFF J. C. 2012. Evaluation of circulating eosinophil count and adrenal gland function in California sea lions naturally exposed to domoic acid. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **241**(7): 943–949.
- GULLAND F. M., HAULENA M., FAUQUIER D., LANGLOIS G., LANDER M. E., ZABKA T., DUERR R. 2002. Domoic acid toxicity in Californian sea lions (*Zalophus californianus*): clinical signs, treatment and survival. *Veterinary Record* **150**(15): 475–480.
- HAMPSON D. R., HUANG X., WELLS J. W., WALTER J. A., WRIGHT J. L. C. 1992. Interaction of domoic acid and several derivatives with kainic acid and AMPA binding sites in rat brain. *European Journal of Pharmacology* **218**(1): 1–8.
- HANSEN L. R., SOYLU S., KOTAKI Y., MOESTRUP Ø., LUNDHOLM N. 2011. Toxin production and temperature-induced morphological variation of the diatom *Pseudo-nitzschia seriata* from the Arctic. *Harmful Algae* **10**(6): 689–696.
- HARBARDÓTTIR S., PANČIĆ M., TAMMILEHTO A., KROCK B., MØLLER E. F., NIELSEN T. G., LUNDHOLM N. 2015.

- Dangerous relations in the Arctic marine food web: interactions between toxin producing *Pseudo-nitzschia* diatoms and *Calanus copepodites*. *Marine Drugs* **13**(6): 3809–3835.
- HATFIELD C. L., GAUGLITZ E. J., BARNETT H. J., LUND J. A. K., WEKELL J. C., EKLUND M. 1995. The fate of domoic acid in Dungeness crab (*Cancer magister*) as a function of processing. *Journal of Shellfish Research* **14**: 359–363.
- HILT M. F., BATES S. S., KACZMARSKA I. 2000. Effect of light: dark cycles and cell apical length on the sexual reproduction of *Pseudo-nitzschia multiseriis* (Bacillariophyceae) in culture. *Phycologia* **39**(1): 59–66.
- HIOLSKI E. M., KENDRICK P. S., FRAME E. R., MYERS M. S., BAMMLER T. K., BEYER R. P., FARIN F. M., WILKERSON H., SMITH D. R., MARCINEK D. J., LEFEBVRE K. A. 2014. Chronic low-level domoic acid exposure alters gene transcription and impairs mitochondrial function in the CNS. *Aquatic Toxicology* **155**: 151–159.
- HOLLAND P. T., SELWOOD A. I., MOUNTFORT D. O., WILKINS A. L., MCNABB P., RHODES L. L., DOUCETTE G. J., MIKULSKI C. M., KING K. L. 2005. Isodomoic acid C, an unusual amnesic shellfish poisoning toxin from *Pseudo-nitzschia australis*. *Chemical Research in Toxicology* **18**(5): 814–816.
- IVERSON F., TRUETOLOVE J., TRYPHONAS L., NERA E. A. 1990. The toxicology of domoic acid administered systemically to rodents and primates. *Canadian Diseases Weekly Report* **16 Suppl 1E**: 15–19.
- JEFFERY B., BARLOW T., MOIZER K., PAUL S., BOYLE C. 2004. Amnesic shellfish poison. *Food and Chemical Toxicology* **42**(4): 545–557.
- KACZMARSKA I., EHRMAN J. M., BATES S. S., GREEN D. H., LÉGER C., HARRIS J. 2005. Diversity and distribution of epibiotic bacteria on *Pseudo-nitzschia multiseriis* (Bacillariophyceae) in culture, and comparison with those on diatoms in native seawater. *Harmful Algae* **4**(4): 725–741.
- KODAMA M., DOUCETTE G. J., GREEN D. H. 2006. Relationships between bacteria and harmful algae. W: E. GRANÉLI, T. TURNER (eds), Ecology of harmful algae. Ecological Studies, 189. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, s. 243–255.
- KOTAKI Y., FURIO E. F., SATAKE M., LUNDHOLM N., KATAYAMA T., KOIKE K., FULGUERAS V. P., BAJARIAS F. A., TAKATA Y., KOBAYASHI K., SATO S., FUKUYO Y., KODAMA M. 2005. Production of isodomoic acids A and B as major toxin components of a pennate diatom *Nitzschia navis-varingica*. *Toxicon* **46**(8): 946–953.
- KVITEK R. G., GOLDBERG J. D., SMITH G. J., DOUCETTE G. J., SILVER M. W. 2008. Domoic acid contamination within eight representative species from the benthic food web of Monterey Bay, California, USA. *Marine Ecology Progress Series* **367**: 35–47.
- LA BARRE S., BATES S. S., QUILLIAM M. A. 2014. Domoic acid. W: S. LA BARRE, J.-M. KORNPBOST (eds), Outstanding Marine Molecules: Chemistry, Biology, Analysis. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, s. 189–216.
- LARM J. A., BEART P. M., CHEUNG N. S. 1997. Neurotoxin domoic acid produces cytotoxicity via kainate- and AMPA-sensitive receptors in cultured cortical neurones. *Neurochemistry International* **31**(5): 677–682.
- LEFEBVRE K. A., NOREN D. P., SCHULTZ I. R., BOGARD S. M., WILSON J., EBERHART B. T. L. 2007. Uptake, tissue distribution and excretion of domoic acid after oral exposure in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquatic Toxicology* **81**(3): 266–274.
- LEFEBVRE K. A., ROBERTSON A. 2010. Domoic acid and human exposure risks: a review. *Toxicon* **56**(2): 218–230.
- LELONG A., HÉGARET H., SOUDANT P., BATES S. S. 2012. *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: revisiting previous paradigms. *Phycologia* **51**(2): 168–216.
- LEVIN E. D., PIZARRO K., PANG W. G., HARRISON J., RAMSDELL J. S. 2005. Persisting behavioral consequences of prenatal domoic acid exposure in rats. *Neurotoxicology and Teratology* **27**(5): 719–725.
- LEWIS N. I., BATES S. S., MCLACHLAN J. L., SMITH J. C. 1993. Temperature effects on growth, domoic acid production, and morphology of the diatom *Nitzschia pungens* f. *multiseriis*. W: T. J. SMAYDA, Y. SHIMIZU (eds), Toxic phytoplankton blooms in the sea. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, s. 601–606.
- LUNDHOLM N., HANSEN P. J., KOTAKI Y. 2004. Effect of pH on growth and domoic acid production by potentially toxic diatoms of the genera *Pseudo-nitzschia* and *Nitzschia*. *Marine Ecology Progress Series* **273**: 1–15.
- LUNDHOLM N., HANSEN P. J., KOTAKI Y. 2005. Lack of allelopathic effects of the domoic acid-producing marine diatom *Pseudo-nitzschia multiseriis*. *Marine Ecology Progress Series* **288**: 21–33.
- MCCARRON P., HESS P. 2006. Tissue distribution and effects of heat treatments on the content of domoic acid in blue mussels, *Mytilus edulis*. *Toxicon* **47**(4): 473–479.
- NOVELLI A., KISPERT J., FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ M. T., TORREBLANCA A., ZITKO V. 1992. Domoic acid-containing toxic mussels produce neurotoxicity in neuronal cultures through a synergism between excitatory amino acids. *Brain Research* **577**(1): 41–48.
- PAN Y., BATES S. S., CEMBELLA A. D. 1998. Environmental stress and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia*: a physiological perspective. *Natural Toxins* **6**(3-4): 127–135.
- PERL T. M., BÉDARD L., KOSATSKY T., HOCKIN J. C., TODD E. C. D., REMIS R. S. 1990. An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. *The New England Journal of Medicine* **322**(25): 1775–1780.
- PIZZO F., CALONI F., SCHREIBER N. B., SCHUTZ L. F., TOTTY M. L., ALBONICO M., SPICER L. J. 2015. Direct effects of the algal

- toxin, domoic acid, on ovarian function: Bovine granulosa and theca cells as an *in vitro* model. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **113**: 314–320.
- PULIDO O. M. 2008. Domoic acid toxicologic pathology: a review. *Marine Drugs* **6**(2): 180–219.
- QUILLIAM M. A. 2003. Chemical methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin. W: G. M. HALLEGRAEFF, D. M. ANDERSON, A. D. CEMBELLA (eds), *Manual on Harmful Marine Microalgae*, Monographs on Oceanographic Methodology, Intergovernmental Oceanographic Commission, UNESCO, Paryż, s. 247–266.
- SCALLET A. C., SCHMUEDE L. C., JOHANNESSEN J. N. 2005. Neurohistochemical biomarkers of the marine neurotoxicant, domoic acid. *Neurotoxicology and Teratology* **27**(5): 745–752.
- SCHROEDER G., BATES S. S., SPALLINO J. 2015. Amnesic Shellfish Poisoning: Emergency Medical Management. *Journal of Marine Science Research and Development* **6**: 179–182.
- SHIMIZU Y., GUPTA S., MASUDA K., MARANDA L., WALKER C. K., WANG R. 1989. Dinoflagellate and other microalgal toxins: chemistry and biochemistry. *Pure and Applied Chemistry* **61**(3): 513–516.
- SILVAGNI P. A., LOWENSTINE L. J., SPRAKER T., LIPSCOMB T. P., GULLAND F. M. 2005. Pathology of domoic acid toxicity in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Veterinary Pathology* **42**(2): 184–191.
- STEWART J. E., MARKS L. J., GILGAN M. W., PFEIFFER E., ZWICKER B. M. 1998. Microbial utilization of the neurotoxin domoic acid: blue mussels (*Mytilus edulis*) and soft shell clams (*Mya arenaria*) as sources of the microorganisms. *Canad. J. Microbiol.* **44**(5): 456–464.
- STRAIN S. M., TASKER R. A. R. 1991. Hippocampal damage produced by systemic injections of domoic acid in mice. *Neuroscience* **44**(2): 343–352.
- SURIYANTI S. N. P., USUP G. 2015. First report of the toxicogenic *Nitzschia navis-varingica* (Bacillariophyceae) isolated from Tebrau Straits, Johor, Malaysia. *Toxicon* **108**: 257–263.
- SUTHERLAND R. J., HOESING J. M., WHISHAW I. Q. 1990. Domoic acid, an environmental toxin, produces hippocampal damage and severe memory impairment. *Neuroscience Letters* **120**(2): 221–223.
- TAKEMOTO T., DAIGO K. 1958. Constituents of *Chondria armata*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **6**: 578–580.
- TAMMILEHTO A., NIELSEN T. G., KRÖCK B., MØLLER E. F., LUNDHOLM N. 2015. Induction of domoic acid production in the toxic diatom *Pseudo-nitzschia seriata* by calanoid copepods. *Aquatic Toxicology* **159**: 52–61.
- TANEMURA K., IGARASHI K., MATSUGAMI T. R., AISAKI K. I., KITAJIMA S., KANNO J. 2009. Intrauterine environment-genome interaction and children's development (2): Brain structure impairment and behavioral disturbance induced in male mice offspring by a single intraperitoneal administration of domoic acid (DA) to their dams. *J. Toxicol. Sci.* **34** Suppl 2: 279–86.
- TEITELBAUM J., ZATORRE R. J., CARPENTER S., GENDRON D., CASHMAN N. R. 1990. Neurological sequelae of domoic acid intoxication. *Canada Diseases Weekly Report* **16**, Suppl 1E: 9–12.
- TENG S. T., LIM P. T., LIM H. C., RIVERA-VILARELLE M., QUIJANO-SCHEGGIA S., TAKATA Y., QUILLIAM M. A., WOLF M., BATES S. S., LEAW C. P. 2015. A non-toxicogenic but morphologically and phylogenetically distinct new species of *Pseudo-nitzschia*, *P. sabit* sp. nov. (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* **51**(4): 706–725.
- THOMAS K., TREMBLAY M. L., WALTER J. A., QUILLIAM M. A. 2008. NRC CRM-DA-f, a certified calibration solution reference material for domoic acid. *CRMP Technical Report*, Czerwiec.
- TIEDEKEN J. A., RAMSDELL J. S., RAMSDELL A. F. 2005. Developmental toxicity of domoic acid in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicology and Teratology* **27**(5): 711–717.
- TODD E. C. D. 1993. Domoic acid and amnesic shellfish poisoning – a review. *Journal of Food Protection* **56**(1): 69–83.
- TRAINER V. L., BATES S. S., LUNDHOLM N., THESSEN A. E., COCHLAN W. P., ADAMS N. G., TRICK C. G. 2012. *Pseudo-nitzschia* physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health. *Harmful Algae* **14**: 271–300.
- TRIMBORN S., LUNDHOLM N., THOMS S., RICHTER K. U., KROCK B., HANSEN P. J., ROST B. 2008. Inorganic carbon acquisition in potentially toxic and non-toxic diatoms: the effect of pH-induced changes in seawater carbonate chemistry. *Physiol. Pl.* **133**(1): 92–105.
- TRUELOVE J., MUELLER R., PULIDO O., MARTIN L., FERNIE S., IVERSON F. 1997. 30-day oral toxicity study of domoic acid in cynomolgus monkeys: lack of overt toxicity at doses approaching the acute toxic dose. *Natural Toxins* **5**(3): 111–114.
- VAN DOLAH F. M. 2000. Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. *Environmental Health Perspectives* **108** Suppl 1: 133–141.
- WALTER J. A., LEEK D. M., FALK M. 1992. NMR study of the protonation of domoic acid. *Canad. J. Chem.* **70**(4): 1156–1161.
- WEKELL J. C., GAUGLITZ E. J., BARNETT H. J., HATFIELD C. L., SIMONS D., AYRES D. 1994. Occurrence of domoic acid in Washington state razor clams (*Siliqua patula*) during 1991–1993. *Natural Toxins* **2**(4): 197–205.
- WINDUST A. 1992. The response of bacteria, microalgae, and zooplankton to the diatom *Nitzschia pungens* forma *multiseriata*, and its toxic metabolite domoic acid. MS thesis. Dalhousie University, Halifax, Nowa Szkocja, Kanada.
- WORK T. M., BARR B., BEALE A. M., FRITZ L., QUILLIAM M. A., WRIGHT J. L. C. 1993. Epidemiology of domoic acid poisoning in brown pelicans (*Pelecanus occidentalis*) and

- Brandt's cormorants (*Phalacrocorax penicillatus*) in California. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **24**(1): 54–62.
- WRIGHT J. L. C., BOYD R. K., DE FREITAS A. S. W., FALK M., FOXALL R. A., JAMIESON W. D., LAYCOCK M. V., MCCULLOCH A. W., MCINNES A. G., ODENSE P., PATHAK V. P., QUILLIAM M. A., RAGAN M. A., SIM P. G., THIBAUT P., WALTER J. A., GILGAN M., RICHARD D. J. A., DEWAR D.
1989. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. *Canad. J. Chem.* **67**(3): 481–490.
- ZABAGLO K., CHRAPUSTA E., BOBER B., KAMINSKI A., ADAMSKI M., BIALCZYK J. 2016. Environmental roles and biological activity of domoic acid: A review. *Algal Research* **13**: 94–101.