

# МОРСКИ ТРОПИЧЕСКИ ОРГАНИЗМИ - ИЗТОЧНИЦИ НА ОПАСНИ ТОКСИНИ

Надежда Хвърчанова, Мариета Георгиева

*Катедра „Фармакология, Токсикология и Фармакотерапия“, Факултет по  
фармация, Медицински университет „Проф. д-р П. Стоянов“ - Варна*

## TROPICAL MARINE SPECIES - SOURCE OF DANGEROUS TOXINS

Nadezhda Hvarchanova, Marieta Georgieva

*Department of Pharmacology, toxicology and pharmacotherapy, Faculty of Pharmacy,  
Medical University of Varna*

### РЕЗЮМЕ

Сакситоксин и тетродотоксин са сред най-моцните познати морски невротоксини. Специфични са за някои морски организми характерни за тропиците, но поради глобалното затопляне и смяната в температурата те мигрират към необичайни за тях води. Рибата фугу се среща вече и в Хърватска - в южната част на адриатическото крайбрежие.

Сакситоксин и тетродотоксин могат да бъдат използвани за убийство или самоубийство. Сакситоксин е включен в списък 1 от конвенцията за химически оръжия, което засилва интереса на правителствените агенции към него, но отдръпва учените, проучващи морски токсини, а също така и производителите на морска храна. Тетродотоксин е познат от рибата фугу (риба балон) и от историята на Хаити – като главен елемент от ритуалите за създаване на зомбита от вуду шаманите там. Предумишлена интоксикация с тези токсини се наблюдава рядко, като по-често се касае за зле приготвени ястия с рибата фугу или миди, съдържащи сакситоксин. Прецизно поставената диагноза е от съществено значение.

На клетъчно ниво сакситоксин и тетродотоксин имат идентичен механизъм на действие, като основният им ефект е мускулна слабост, която може да прогресира до тотална парализа, наблюдават се и сензорни смущения. Двата токсина имат директно парализиращо действие върху напречно набраздената скелетна мускулатура, както и върху нервните влакна. Не всички случаи завършват със смърт (в след-

### ABSTRACT

Saxitoxin (STX) and tetrodotoxin (TTX) are two of the most potent marine neurotoxins known. They are specific to some tropical marine species, but because of the global warming and the temperature shift they have begun moving to different areas. Fugu fish has been seen in Croatia in the southern part of the Adriatic coast.

Both can be used as a means for suicide and murder. STX is included in Schedule 1 of the Chemical Weapons Convention, which made it attractive for many government agencies and no longer interesting for toxinologists and seafood producers. TTX is known as the “fugu” (puffer fish) poison and also as the main agent in Haitian voodoo zombification rituals. However, intentional intoxications by STX and TTX are often not as toxic as badly prepared fugu meals or saxitoxin-infested shellfish.

A precise diagnosis can determine whether a victim has been intentionally intoxicated. At the cellular level STX and TTX have an identical action – they block the passage of sodium ions upon the same site of the voltage-gated sodium channel. Their chief effect is to produce a muscular weakness that may progress to total paralysis, but sensory disturbances are also common. Both poisons have a direct paralyzing effect on skeletal (striated) muscles as well as on nerve fibers. Death due to respiratory failure may not always be the outcome, but rather an incapacitation. The treatment of intoxication by STX and TTX is based on gastric evacuation, symptomatic relief and the body's natural recovery mechanisms. Both toxins have some potential as pharmaceutical agents, but they are still associated

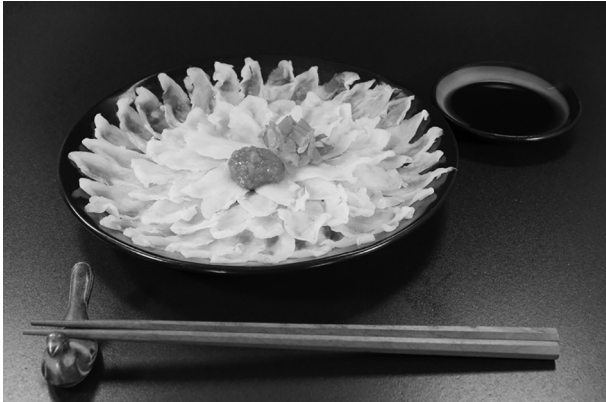
ствие на дихателна недостатъчност), но настъпва недееспособност.

Лечението на интоксикацията със сакситоксин и тетродотоксин се базира на гастрален лаваж, симптоматично лечение и естествените възстановителни способности на организма. Токсините имат фармакологичен потенциал, но той е все още в процес на проучване и ограничени опити с експериментални животни.

**Ключови думи:** сакситоксин, тетродотоксин, морски невротоксини, химическо оръжие, лечение, фармакологичен потенциал

## УВОД

Тетродотоксин е познат като отрова, характерна за рибата фугу (риба балон). Фугу е и най-прочутото ястие, деликатес в японската кухня. Приготвя се от готвачи, специално обучени да отстраняват отровната тъкан, така че продуктът да е безопасен за консуматора „Фиг. 1“. Тетродотоксин е също известен от историята с това, че е бил използван за създаване на зомбита от вуду шаманите в Хаити – факт установен за пръв път 1983 година от харвардския учен и етноботаник Уейд Дейвис (8).



Фиг. 1. Ястие от риба фугу  
източник - <http://gourmetfoodreview.com/fugu-fish-risky-japanese-delicacy-english-version/>

Сакситоксин – фармакологично близък до тетродотоксин е единственият натурален, не-протеинов токсин, обявен за химическо оръжие в първи списък от конвенцията на химическите оръжия (CWC). За да бъде регистриран в конвенцията има определени характеристики, които трябва веществото да притежава:

- Да бъде разработено, създадено и използвано като химическо оръжие.

*with small animal experiments and need more examination and financing to advance.*

**Keywords:** saxitoxin, tetrodotoxin, marine neurotoxins, chemical weapon, treatment, pharmaceutical agents

- Да има потенциал за употреба в активности, забранени според конвенцията, поради една или повече от следните причини:
  - Химическа структура близка до друго токсично вещество, включено в списък първи от конвенцията или съизмерими свойства.
  - Токсичност, с летални или увреждащи последствия, която би способствала употребата му като химическо оръжие.
  - Липса на друго предназначение, освен като химическо оръжие.

За да се работи със сакситоксин е необходимо разрешение, както от правителството на държавата за която е предназначено, така и от държавата от която произхожда, а също така и от организацията, забраняваща химическите оръжия и организацията на обединените нации, която ръководи CWC. Тези условия повлияват негативно неврологичните и токсикологични проучвания за известно време след като CWC влиза в сила, поради ограничената възможност на изследователите да си набавят сакситоксин, радиоактивно маркиран с тритий. Тази трудност е преодоляна чрез наемане на фирми със съоръжения за радиоактивно маркиране, които да са разположени в същата страна и така се избягва първоначалния интернационален трансфер. Така радиоактивно маркираният сакситоксин става достъпен за изследвания, както и за биологични анализи за мониторинг на токсичността му, с цел предотвратяване на навлизането на токсична морска храна във веригата на доставки.

### Механизъм на действие и ефекти

Сакситоксин и Тетродотоксин осъществяват действието си като селективно блокират потенциал - зависимите натриеви канали. Така те възпрепятстват провеждането на нервните импулси, което води до загуба на чувствителност и па-

рализа на волевата мускулатура, включително диафрагмата и междуребрните мускули и спирание на дишането.

Изходът не винаги е смърт, по-често е неспособност. Сакситоксин и тетродотоксин водят до мускулна парализа, която възпрепятства жертвата на интоксикация да изпълнява каквито и да е действия или функции.

Именно временна неспособност, а не смърт е била целта на карибските шамани. Те са създавали зомбита чрез специална пудра, съдържаща черен дроб от риба фугу (чиято отрова е основно тетродотоксин). В пудрата имало още натрошено стъкло за да могат жертвите, вървейки върху нея да порязват краката си и отровата да навлиза директно в кръвообращението им през техните рани. Токсинът водел до тотална, но не фатална парализа на цялото тяло, от която жертвата се възстановява, а шаманът се прославя с голямата си сила. Твърдението на Уейд Дейвис, че тетродотоксинът в пудрата за зомбита е основната причина за зомбирането, за пръв път става обществено достояние в научна статия 1983 година и в книгата му „Змията и дъгата“, публикувана 1985 година (8). Това се оказва в противоречие с токсикологичния анализ на пудрата. При него се откриват само следи от тетродотоксин, което води до неяснота дали така жертвата може да получи ефективна доза (10).

#### **Източници на сакситоксин и тетродотоксин, токсикологична характеристика**

Сакситоксин и тетродотоксин имат потенциала да бъдат използвани като оръжие. Входна врата на интоксикацията може да бъде гастроинтестиналният тракт и белият дроб. Също така чрез игла или друго устройство увреждащо кожата токсините могат да бъдат доставени директно до кръвообращението и от там до мястото си на действие. Има случаи на опити за убийство чрез сакситоксин и тетродотоксин, но най-често отравяне настъпва след консумация на морска храна, съдържаща токсините.

Тези токсини са наранили преднамерено повече хора в сценариите на телевизионни предавания, филми и книги, отколкото в реалния живот. Някои от тези филми са „Коломбо“, „Морски патрул“, „Досиетата хикс“.

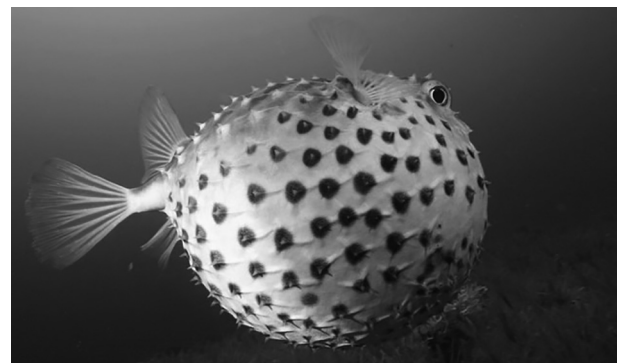
Сакситоксин и тетродотоксин са изключително мощни токсини. Само 1 nmol/kg от тях, приложен директно в кръвообращението, е достатъчен за да бъдат убити някои животни. Двата токсина имат сходна токсичност при мишки, инжектирани интраперитонеално само с 8-10  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

Пероралната им токсичност е няколко стотици пъти по-слаба от парентералната, но все пак остава в порядъка на стотици микрограма на килограм.

Приложен като инхалаторен аерозол на мишки, сакситоксинът е многократно по-токсичен ( $\text{LD}_{50}$  на само 2  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) и осъществява токсичността си много по-бързо, често причинявайки смърт в рамките на минути от употребата му.

Както вече беше споменато, интоксикацията настъпва най-често при консумация на морска храна. Тетродотоксин се открива главно в черния дроб и половите органи на някои риби, като риба фугу „Фиг. 2“ и други представители на семейство Tetraodontidae, а също така и някои амфибии, октоподи (синьопръстенните октоподи „Фиг. 3“) и медузи. Наличието на сакситоксин в някои морски видове, като стриди и различни видове миди „Фиг. 4“, обикновено е свързано с консумацията им на токсични микроводорасли.

Симптомите на перорална интоксикация с тетродотоксин и сакситоксин започват след 5 до 30 минути. Проявяват се със слабо изтръпва-



Фиг. 2. Риба фугу

източник - <http://ashlandmarinebio.blogspot.bg/2016/03/tetrodotoxin-ttx.html>



Фиг. 3. Представител на род синьопръстенни октоподи

източник - <http://ashlandmarinebio.blogspot.bg/2016/03/tetrodotoxin-ttx.html>



Фиг. 4. Миди, възможни източници на сакситоксин  
източник - <http://beaglebioproducts.com/uncategorized/the-hab-five-saxitoxin/>

не на пръстите, което продължава с леко усещане за мравучкане или изтръпване около устните, врата и лицето. В по-сериозните случаи жертвите са с липса на координация и дихателни затруднения, стягане в гърлото, затруднено преглъщане, несвързана реч, замаяност, гадене, повръщане и миоза. Пълна парализа настъпва в рамките на 2 – 12 часа от интоксикацията, като смъртта е в следствие на дихателна недостатъчност. Ако до 12 часа не е настъпила смърт, пациентът започва бавно да се възстановява, без остатъчни ефекти няколко дни след отравянето. При друг път на въвеждане на отровата - интравенозен или като аерозол, симптомите настъпват много по-бързо и ако не се вземат спешни мерки, пациентите не оцеляват за дълго. Лесно симптомите могат да бъдат объркани с алергия или заболяване, което да доведе до погрешно лечение и фатален резултат.

#### **Насоки за лечение**

При орална интоксикация се прави спешна стомашна промивка (гастрален лаваж), за да се предотврати по нататъшната резорбция на токсина от стомашното съдържимо. Активен въглен може също да бъде използван в ранния етап на интоксикацията, за да се свърже с токсините. И сакситоксин и тетродотоксин съдържат гуанидинови групи, които са есенциални за токсичността им - когато тези групи са заредени, те също могат да се свържат с активния въглен.

Тежките интоксикации изискват поддръжка на дихателната функция до намаляване на ефектите от леталната доза, което може да продължи и часове (11). При най-тежките случаи има риск от сърдечен арест и поддържането на дишането не е достатъчно. Антидотите са средството на избор за детоксикация при инжекционен или ин-

халаторен път на въвеждане, когато молекулите на токсина са навлезли вече в кръвообращението и могат да достигнат до своя фармакологичен таргет. Съществуват антидоти, но ефектът им зависи от времето на въвеждане, тъй като действието им е забавено. Лекарството 4-аминопиридин има потенциал да антагонизира действието на сакситоксин и тетродотоксин, но все още тази негова индикация е обект на проучване върху експериментални животни.

Хелирането на сакситоксин и тетродотоксин с антитела е възможен механизъм за предотвратяване на интоксикация (7). За да се образуват антитела е нужно токсините да бъдат свързани с протеин носител и така антителата да бъдат насочени срещу създадения епитоп. Има няколко антитела срещу сакситоксин, доказани при експериментални животни изложени на токсина. Проблемът при тях е, че са специфични за сакситоксин и не могат да се свържат с негови аналози, или се свързват с по-малък афинитет, което не е благоприятно.

Алтернативни антитела свързващи протеини, с потенциал на антидоти са саксифилините, както и фамилия на сакситоксин и тетродотоксин – свързващи протеини, открити в рибата фугу. Те са протеини, характерни за кръвообращението и за това едновременно са безопасни и остават ефективни като хелатори на токсините. Те също така свързват сакситоксин и тетродотоксин на наномоларно и субнаномоларно ниво, значително по-здраво от предходните методи, тоест по-ефективно се конкурират с токсините за волтаж-зависимите натриеви канали. При работа с животни е проучено лекарството 4-аминопиридин, което предпазва от ефекта на двата токсина и им противодейства. Повишава намаленото кръвно налягане при експерименталните животни и засилва невромускулната трансмисия, за да позволи на диафрагмата им да работи. За да подейства 4-аминопиридин са нужни големи дози, което е свързано със сериозни странични ефекти, но при провеждане на лечението в болница и мониторирането им те могат да бъдат овладяни и да бъде спасен животът на жертвата (12).

#### **Структура на потенциал-зависимите натриеви канали и бъдещи фармакологични перспективи**

Открито е, че клетките в някои видове рак имат свръхекспресия на чувствителни на тетродотоксин натриеви канали. Волтаж-зависимите натриеви канали представляват макромолекулен протеинов комплекс, който се състои от по-

ра-образуващи алфа субединици и не пора-образуващи по-малки бета субединици. Те са експресирани в метастатичните клетки в няколко вида рак. В тези клетки, натриевите йони, пренасяни от алфа субединиците повишават миграцията, инвазията и метастазите *in vivo*. Бета субединицата медира клетъчната адхезия и задълбочаването на процеса. Преобладаващата хипотеза е, че волтаж-зависимите натриеви канали са с повишена плътност при карцином, предимно предопределящи инвазивен/метастатичен фенотип, въпреки не напълно изяснения механизъм. Експресията на Nav1.5 алфа субединицата се свързва с лоша прогноза при типове рак на гърдата, прогнозирайки ползата от волтаж-зависимите натриеви канали като прогностичен маркер за прогресията на рака. Сменянето на предназначението на вече съществуващи блокери на волтаж-зависимите натриеви канали, би предоставило нова стратегия да се подобри прогнозата при пациенти страдащи от метастатично заболяване.

Алфа субединицата на волтаж зависимите натриеви канали потенцира голям брой клетъчни отговори, свързани с метастази. При клетъчни линии от рак на гърдата, простатата и белия дроб, блокертът на волтаж-зависимите натриеви канали тетродотоксин инхибира процеса на растеж/разпространение, галванотаксис (9), миграция (4,5,9), ендцитоза (9), везикуларна структура, отделяне от субстрата, генна експресия (5) и инвазия (6,9,14). Тетродотоксин не инхибира пролиферацията на раковите клетки (14), поради което се предполага че волтаж-зависимите натриеви канали са свързани повече с прогресията на метастазите, отколкото с туморогенезата (13). Проучвания са доказали, че волтаж-зависимите натриеви канали също така участват в регулацията на ангиогенните свойства на ендотелните клетки, включително и пролиферацията индуцирана от съдовия ендотелен растежен фактор, тубулната диференциация и адхезия (3). Точното функционално участие на волтаж-зависимите натриеви канали към процеса на канцерогенеза вероятно зависи от типа клетки, прогнозата и стадия на тумора (15).

Сакситоксин и тетродотоксин са проучвани като анестетици, със способността си да спират невроналната функция без необратимо да повредят нерва, а също така като добавка към други анестетици, както и заедно с вазоконстриктор, където да подсилват действието им и да позволят да бъде постигнат същият резултат при редуцирана доза на основния анестетик. Устано-

вено е че честотата и средната продължителност на блокадата могат да се повишат и системната токсичност на тетродотоксин (или сакситоксин) да се понижи, ако той бъде приложен с вазоконстриктор. Проучванията демонстрират, че ако се приложат допустими концентрации на тетродотоксин, заедно с локален анестетик се демонстрират висока честота на блокада, характеризираща се с краткотрайна латентност и дълга продължителност има и индиректни доказателства, че локалните анестетици засилват активността на тетродотоксин, като обратимо повишават пермеабилитета на множество невронални бариери за тетродотоксин (2). При други експериментални проучвания е демонстрирано приложение на допустими концентрации на сакситоксин, заедно с вазоконстриктор и локален анестетик, при което ефектите на системна токсичност не се изясняват, а блокадата е с бързо начало и висока честота на блокиращите характеристики на локалния анестетик, както и значително повишаване на активността на сакситоксин (1).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сакситоксин и тетродотоксин не са характерни за нашите географски ширини, но поради глобалното затопляне и миграцията на морските организми това не е абсолютен факт. Познаването на източниците на интоксикация, симптомите и лечението е важно както за любителите на морска храна, така и за лекарите, за приемане на спешни мерки при евентуално умишлено или случайно отравяне. От фармакологична гледна точка, познаването на механизма им на действие и развиването на техния потенциал като бъдещи лекарства, би било много ценно за лечебната практика.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Adams HJ, Blair MR Jr, Takman BH. The local anesthetic activity of saxitoxin alone and with vasoconstrictor and local anesthetic agents. *PubMed. Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1976 Dec; 224(2):275-82.
2. Adams HJ, Blair MR Jr, Takman BH. The local anesthetic activity of tetrodotoxin alone and in combination with vasoconstrictors and local anesthetics. *PubMed. Anesth Analg.* 1976 Jul-Aug;55(4):568-73.
3. Andrikopoulos P, Fraser SP, Patterson L, Ahmad Z, Burcu H, Ottaviani D, et al. Angiogenic functions of voltage-gated

- Na<sup>+</sup> Channels in human endothelial cells: modulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling. *J Biol Chem.* 2011;286:16846–60. doi: 10.1074/jbc.M110.187559.
4. Brackenbury WJ, Chioni AM, Diss JK, Djamgoz MB. The neonatal splice variant of Nav1.5 potentiates in vitro invasive behaviour of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;101:149–60. doi: 10.1007/s10549-006-9281-1.
  5. Brackenbury WJ, Djamgoz MB. Activity-dependent regulation of voltage-gated Na<sup>+</sup> channel expression in Mat-LyLu rat prostate cancer cell line. *J Physiol.* 2006;573:343–56. doi: 10.1113/jphysiol.2006.106906.
  6. Carrithers MD, Chatterjee G, Carrithers LM, Offoha R, Iheagwara U, Rahner C, et al. Regulation of podosome formation in macrophages by a splice variant of the sodium channel SCN8A. *J Biol Chem.* 2009;284:8114–26. doi: 10.1074/jbc.M801892200.
  7. Davio SR. Neutralization of saxitoxin by anti-saxitoxin rabbit serum. *Toxicon.* 1985;23:669-75.
  8. Davis, W. 1983. The ethnobiology of the Haitian zombie. *Journal of Ethnopharmacology*, 9, 85–104.
  9. Fraser SP, Diss JK, Chioni AM, Mycielska ME, Pan H, Yamaci RF, et al. Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res.* 2005;11:5381–9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0327.
  10. Kao, C.Y., and T. Yasumoto. 1986. Tetrodotoxin and the Haitian zombie. *Toxicon*, 24, 747–749.
  11. Kao, C.Y. Paralytic Shellfish Poisoning. In: Falconer IR, editor. *Algal toxins in seafood and drinking water.* London: Academic; 1993. P. 75-86.
  12. Lyndon E. Llewellyn. *Marine Biotoxins in History: Misuse and Mayhem.* Springer. *Toxinology* pp 1-16
  13. Onkal R, Djamgoz MB. Molecular pharmacology of voltage-gated sodium channel expression in metastatic disease: clinical potential of neonatal Nav1.5 in breast cancer. *Eur J Pharmacol.* 2009;625:206–19. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.08.040.
  14. Roger S, Besson P, Le Guennec JY. Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1616:107–11. doi: 10.1016/j.bbamem.2003.07.001.
  15. William J. Brackenbury. Voltage-gated sodium channels and metastatic disease. *NCBI. Channels (Austin).* 2012 Sep 1; 6(5): 352–361. doi: 10.4161/chan.21910

**Адрес за кореспонденция:**

Надежда Хвърчанова  
 Катедра „Фармакология, Токсикология и Фармакотерапия“,  
 Медицински университет  
 „Проф. д-р П. Стоянов“ - Варна  
 бул. Цар Освободител 84, ет. 4, каб. 411, каб. 410  
 e-mail: nhvarchanova@yahoo.com