

Mehanizam multiksenobiotičke otpornosti u školjkaša (Bivalvia, Mollusca)

Cvitanić, Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:366950>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

**MEHANIZAM MULTIKSENOBIOTIČKE OTPORNOSTI U
ŠKOLJKAŠA (BIVALVIA, MOLLUSCA)**

**MECHANISM OF MULTIXENOBIOTIC RESISTANCE IN BIVALVES
(BIVALVIA, MOLLUSCA)**

ZAVRŠNI SEMINAR

Marija Cvitanić

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Jasna Lajtner

Zagreb, 2014.

POPIS KRATICA

ABC proteini – ATP-vezujuće kazete (engl. *ATP-binding cassette*)

ADP – adenzin difosfat

ATP – adenzin trifosfat, energetska bogata molekula

BCRP protein – (engl. *breast cancer resistance protein*), član ABC proteina

CFTR transporter – (engl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), član ABC proteina

MRP – (engl. *multidrug resistance-associated proteins*), član ABC proteina

MXR mehanizam – mehanizam multiksenobiotičke otpornosti (engl. *mechanism of multixenobiotic resistance*)

NBD – nukleotidno-vezujuća domena (engl. *nucleotide-binding domain*)

P-gp – P-glikoprotein, član ABC proteina

TMD – transmembranska domena (engl. *transmembrane domain*)

SADRŽAJ RADA

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Štetne tvari u vodenom ekosustavu | 1 |
| 2. ŠKOLJKAŠI KAO TEST ORGANIZMI | 3 |
| 3. MEHANIZAM MULTIKSENOBIOTIČKE OTPORNOSTI | 6 |
| 3.1. ABC transportni proteini | 7 |
| 3.2. Građa ABC transportnih proteina | 7 |
| 3.3. Mehanizam transporta ABC proteina | 8 |
| 3.4. ABC transportni proteini u školjkaša | 10 |
| 3.5. Inhibicija ABC transportnih proteina | 11 |
| 4. LITERATURA | 14 |
| 5. SAŽETAK | 20 |
| 6. SUMMARY | 21 |

1. UVOD

Oko 71 % površine Zemlje prekriva voda što je razlog da su vodeni ekosustavi najbrojniji ekosustavi na Zemlji. Voda je, obogaćena otopljenim anorganskim i organskim hranjivima, najvrednija karika biogeokemijskog kruženja tvari u prirodi (Kaštelan-Macan i Petrović, 2013). Voda je od neizmjerne važnosti čovjeku s obzirom da čini oko 50 do 70 % ljudskog tijela i medij je u kojemu se odvijaju sve biokemijske reakcije važne za život (Guyton i Hall, 2006). S obzirom na njenu važnost jasno je da se puno ulaže u kontroliranje vode, kako one za piće tako i ostalih vodenih površina koje nastanjuju brojni organizmi. Stockholmska konvencija donesena je 2001. godine, a zemlje potpisnice trebaju smanjiti ili zaustaviti proizvodnju, uporabu ili ispuštanje određenih skupina spojeva tzv. dvanaest okaljanih (engl. *dirty dozen*): *Aldrin*, *Klordan*, *DDT*, *Dieldrin*, *Endrin*, *Heptaklor*, *Heksaklorbenzen*, *Mirex*, *Toksafen*, *PCB*, *poliklorirani dioksini i furani* (Kaštelan-Macan i Petrović, 2013).

1.1. Štetne tvari u vodenom ekosustavu

Voda je izvrsno otapalo za mnoge anorganske i organske tvari te neke plinove. Topljivost tvari u vodi omogućuje prijenos minerala i hranjivih tvari u prirodi, ali i širenje onih tvari koje su opasne za okoliš i živa bića (toksini). Štetne tvari u okoliš ulaze kontrolirano (npr. otpad) ili nekontrolirano (nesreće nuklearnih elektrana, tankera itd.). Brojni toksini nastaju prirodno u vodi kao rezultat metabolizma vodenih organizama ili djelovanjem vulkana (CO₂, SO₂ itd.) (Walker i sur., 2012). Ukoliko unesena štetna tvar uzrokuje štetne posljedice za živa bića i ljudsko zdravlje onda govorimo o zagađenju. S druge strane, onečišćenje je pojava neke tvari u okolišu na kratko vrijeme i na točno ograničenom području te ne uzrokuje štetu kao zagađenje (Kaštelan-Macan i Petrović, 2013). Štetne tvari unesene od strane čovjeka u okoliš nazivaju se ksenobiotici. Toksičnost neke tvari ovisi o 1) vremenu izlaganja, 2) koncentraciji te tvari, 3) biotičkim i abiotičkim čimbenicima (Tablica 1) (Walker i sur., 2012).

Tablica 1. Biotički i abiotički čimbenici toksičnosti neke tvari

| Biotički čimbenici | Abiotički čimbenici |
|---------------------------|----------------------------|
| Osjetljivost vrste | Temperatura vode |
| Spol jedinke | Vrijednost pH |
| Starost | Koncentracija kisika |
| Zdravstveno stanje | Intezitet svjetlosti |
| Kondicija organizma | UV zračenje |
| Genotip | / |

Osim što toksične tvari dospjele u vodeni okoliš neposredno ugrožavaju zdravlje čovjeka (voda za piće, higijena itd.) djeluju i posredno. Brojni vodeni organizmi koji su pod utjecajem toksina koriste se u prehrani (mekušci, ribe, morski ježinci itd.) (Bošnjak i sur., 2013). Najpopularniji među njima su školjkaši. Toksične tvari ulaze u tkiva vodenih organizama pasivnom difuzijom preko kože ili respiratornog organa (škrge), a prenose se hemolimfom kroz organizam (Walker i sur., 2012). Vodeni organizmi većinom nakupljaju kemijske spojeve izravno iz abiotičkog okoliša (vode) te iz izvora hrane, a proces se naziva bioakumulacija (Kaštelan-Macan i Petrović, 2013). Stoga je vrlo važno kontrolirati kvalitetu vode i bioakumulaciju štetnih tvari u organizmima od interesa čovjeku.

2. ŠKOLJKAŠI KAO TEST ORGANIZMI

Školjkaši (Bivalvia) su razred unutar koljena mekušci (Mollusca). Karakterizira ih meko tijelo bez glave koje je smješteno unutar školjke. Tijelo školjkaša građeno je od utrobne vreće, stopala i škrge koje obavija plašt koji izlučuje ljušturu. Svi školjkaši su vodeni organizmi. Školjkaši su filtratori u vodenim ekosustavima i upravo su njihovi respiratorni organi prvo na što djeluju štetne tvari iz vodenog okoliša (Matoničkin i sur., 1998; Habdija i sur., 2011).

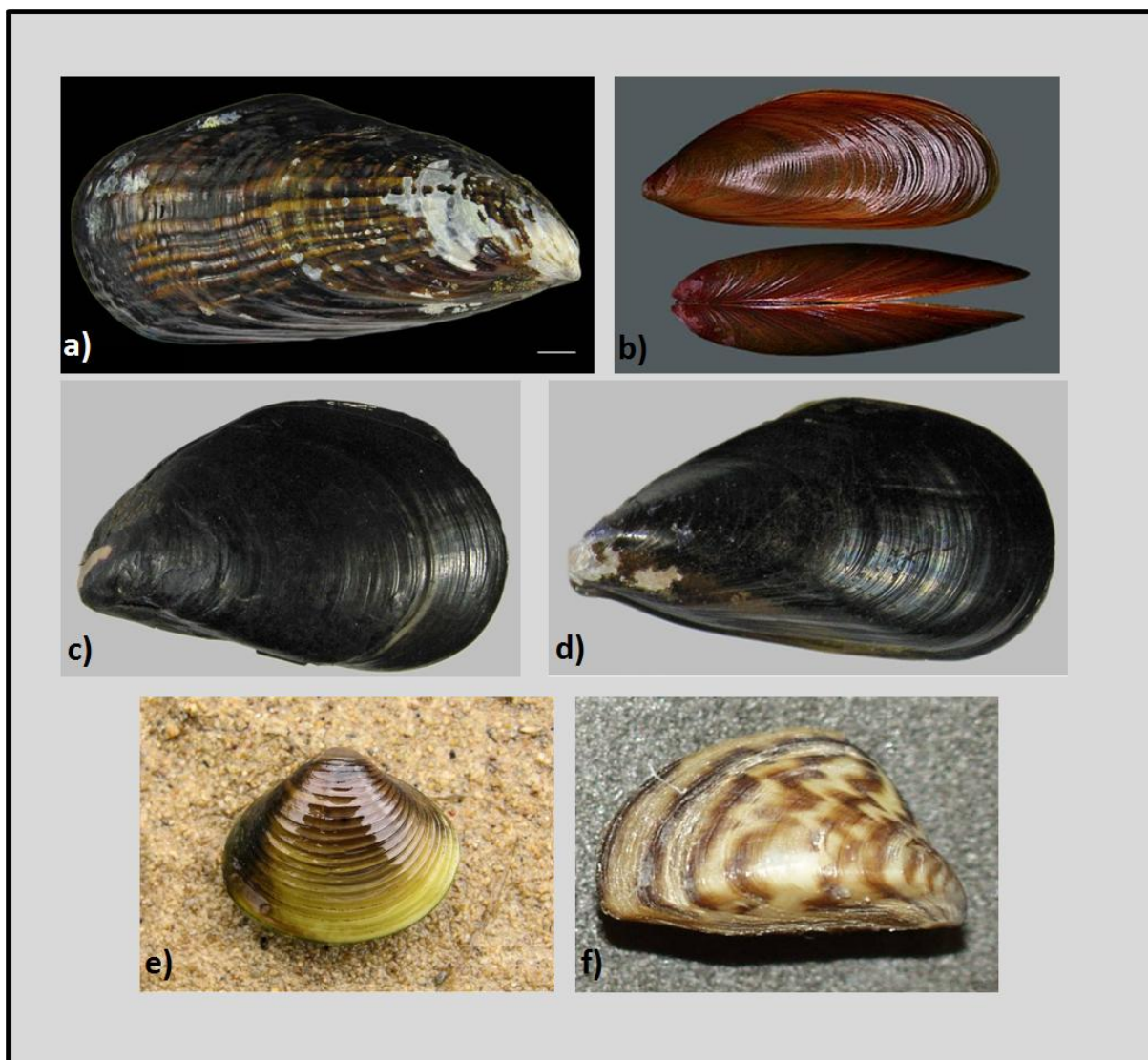
Već sredinom prošlog stoljeća školjkaši su prepoznati kao odlični organizmi na kojima se mogu vršiti istraživanja toksičnosti nekih tvari na živi sustav. Školjkaši su kozmopolitski rasprostranjeni, te se neke vrste mogu pronaći posvuda u svijetu što olakšava proces uspoređivanja ili nadogradnje već postojećih podataka sakupljenih na nekom drugom mjestu. Na taj način može se dobiti rezultat nekog istraživanja na globalnoj razini. Nadalje, školjkaši imaju veliku toleranciju na mnoge vrste zagađivala i mogu obitavati u zagađenim staništima. To je sjedilačka ili polusjedilačka skupina životinja stoga bolje predstavlja stanište na kojem se nalazi od neke pokretne skupine. Školjkaši najčešće dolaze u velikom broju i u grupama pa uzimanja većeg broja jedinki ne predstavljaju problem. Vrlo su jednostavna skupina za sakupljanje i dovoljno su prilagodljivi te ih se može postaviti u akvarije i provoditi istraživanje u laboratorijskim uvjetima. Ti organizmi su dugoživući što omogućava istraživanja kroz dulje vremensko razdoblje. Variraju u dimenzijama, ali često su dovoljno veliki da se iz njih može izolirati odgovarajuća količina tkiva za analizu. Konačno, školjkaši su vrlo cijenjena prehrambena namirnica i istraživanja toksičnosti njihovih tkiva bitna su za zdravlje ljudi (Goldberg, 1980).

Škrge, probavna žlijezda i gonade su idealna tkiva za istraživanje toksičnosti i uočavanje histopatoloških promjena što je dokazano brojnim istraživanjima (Hietanen i sur., 1988; Lajtner i sur., 1996; Klobučar i sur., 1997; Lajtner i sur., 2003; Della Tore i sur., 2013;).

Najčešće korištene vrste morskih i slatkovodnih školjkaša navedene su u Tablici 2 i prikazane na Slici 1.

Tablica 2. Najčešće korištene vrste morskih i slatkovodnih školjkaša u pokusima.

| Vrsta morskog školjkaša: | Hrvatski naziv | Literatura |
|--------------------------------------|-----------------------------|---|
| <i>Mytilus californianus</i> | kalifornijska dagnja | Eufemia i Epel, 2000; Luckenbach i Epel, 2008 |
| <i>Mytilus edulis</i> | plava dagnja | Hietanen i sur., 1988 |
| <i>Mytilus galloprovincialis</i> | dagnja, mediteranska dagnja | Kurelec i sur., 2000; Smital i sur., 2003; Della Torre i sur., 2013 |
| <i>Perna perna</i> | smeđa dagnja | Franco i sur., 2006 |
| Vrsta slatkovodnog školjkaša: | | |
| <i>Corbicula fluminea</i> | krupnorebrasta kotarica | Achard i sur., 2004 |
| <i>Dreissena polymorpha</i> | raznolika trokutnjača | Kurelec i sur., 2000; Smital i sur., 2003 |



Slika 1. Najčešće korištene vrste školjkaša u pokusima. Pod a), b), c) i d) su morske vrste, a pod e) i f) slatkovodne vrste školjkaša. a) *Mytilus californianus*; b) *Perna perna*; c) *Mytilus edulis*; d) *Mytilus galloprovincialis*; e) *Corbicula fluminea* i f) *Dreissena polymorpha*. Fotografije su preuzete s ovih internet stranica: <http://www.bily.com/pnwsc/web-content/Family%20Pages/Bivalves%20-%20Mytilidae.html> ; http://www.cenemar.org.br/foto_do_dia/foto_11.html; <http://www.aquaportail.com/fiche-invertebre-2984-corbicula-fluminea.html> ; http://en.wikipedia.org/wiki/Zebra_mussel

3. MEHANIZAM MULTIKSENOBIOTIČKE OTPORNOSTI

Vodeni organizmi, filtrirajući vodu kako bi se prehranili i opskrbili kisikom, unose u svoj organizam i štetne tvari dospjele u vodeni okoliš. Prva linija obrane kod tih organizama su najčešće škrge tj. respiratorno tkivo. Stanice škrge na svojim membranama nose transportne proteine (tzv. ABC transportni proteini) koji su uključeni u procese unosa (import) hranjivih tvari u tkivo i procese iznosa (eksport) štetnih produkata metabolizma ili štetnih tvari iz okoliša dospjelih u njihov organizam. Rad tih membranskih proteina koji štite organizam od toksičnih tvari naziva se mehanizam multiksenobiotičke otpornosti ili MXR mehanizam (engl. *mechanism of multixenobiotic resistance*). Ksenobiotici su štetne tvari antropogenog podrijetla koje su strane tom organizmu (Walker i sur., 2012). Pojam MXR mehanizma prvi je u znanost uveo naš akademik Branko Kurelec 1992. Godine, a u međuvremenu je pronađen kod svih vodenih organizama (Kurelec i sur., 1992; Smital i sur., 2000; Hamdoun i sur., 2004).

Ekotoksikološki važna karakteristika obrambenog sustava u vodenih organizama je inducibilnost kao odgovor na povišenu količinu štetnih tvari (stres) (Smital i sur., 2003). Organizam koji se nalazi u okolišu s konstantno povišenim količinama štetnih tvari pokazuje veću ekspresiju MXR transportnih proteina tj. aktivnije izbacuje toksine iz tkiva nego organizam koji se nalazi u čistijem okolišu (Kurelec i sur., 2000). Međutim, neka istraživanja nisu pokazala jasnu vezu između aktivnosti MXR mehanizma i količine štetnih tvari u okolišu. Istraživanja na kamenicama *Crasostrea virginica* i *C. gigas* pokazala su da postoji razlika MXR mehanizma među vrstama i da ne grade uvijek isti proteini MXR mehanizam (Smital i sur., 2003).

Postoji širok spektar tvari koje same po sebi nisu toksične, a supstrat su MXR transportnim proteinima. Takve tvari mogu kompetirati toksičnim tvarima te inhibirati MXR mehanizam. Nazivaju se kemosenzitoriji i brojniji su u zagađenom okolišu (Kurelec, 1997).

3.1. ABC transportni proteini

MXR mehanizam tvore svi membranski proteini koji služe u izbacivanju štetnih tvari iz organizma. Takvi proteini su tzv. ABC transportni proteini (engl. *ATP-binding cassette*) koji koriste energiju ATP-a za aktivan transport tvari (Higgins i sur., 1985; Bishop i sur., 1989). ABC transportni proteini prisutni su u svim organizmima od bakterija do čovjeka tj. nalaze se na membranama svih živih stanica. Time se ističe njihova uloga u održavanju stanične homeostaze: unose bitne nutrijente, a izbacuju okolišne toksine ili endotoksine nastale metabolizmom stanice (Jones i George, 2004). Upravo prema smjeru transporta postoji podjela na importere (unos hranjivih tvari) i eksportere (iznos štetnih tvari) (Hollenstein i sur., 2007; Davidson i sur., 2008).

3.2. Građa ABC transportnih proteina

ABC transportni protein građen je od četiri strukturne domene: dvije hidrofobne transmembranske domene (TM domene; TMD1 i TMD2) i dvije ATP-vezne hidrofilne citoplazmatske domene tzv. nukleotidno-vezne domene (NBD, engl. *nucleotide-binding domain*; NBD1 i NBD2) (Higgins, 1992; Dean i sur., 2001; Jones i George, 2004; Hollenstein i sur., 2007). TM domene građene su od uzastopno ponavljajućih α uzvojnica integriranih u membranski dvosloj i grade transmembranski kanal. Zadužene su za prepoznavanje i vezanje širokog spektra različitih supstrata (Jones i George, 2004; Hollenstein i sur., 2007). NBD su smještene u citoplazmi i predstavljaju „motor“ ABC proteina tj. predstavljaju domenu koja veže i hidrolizira ATP. Ove domene su visoko konzervirane regije i građene su od dviju poddomena: veće katalitičke i manje α -helikaze koja je jedinstvena samo za ABC proteine. Katalitička domena je građena od tzv. Walker A i Walker B motiva. Walker A je zadužen za vezanje nukleotida, a Walker B za hidrolizu ATP-a i interakciju NBD s TM domenama. Manja podjedinica je tzv. C motiv koji stvara kontakt nukleotida s ATP-veznim mjestom.

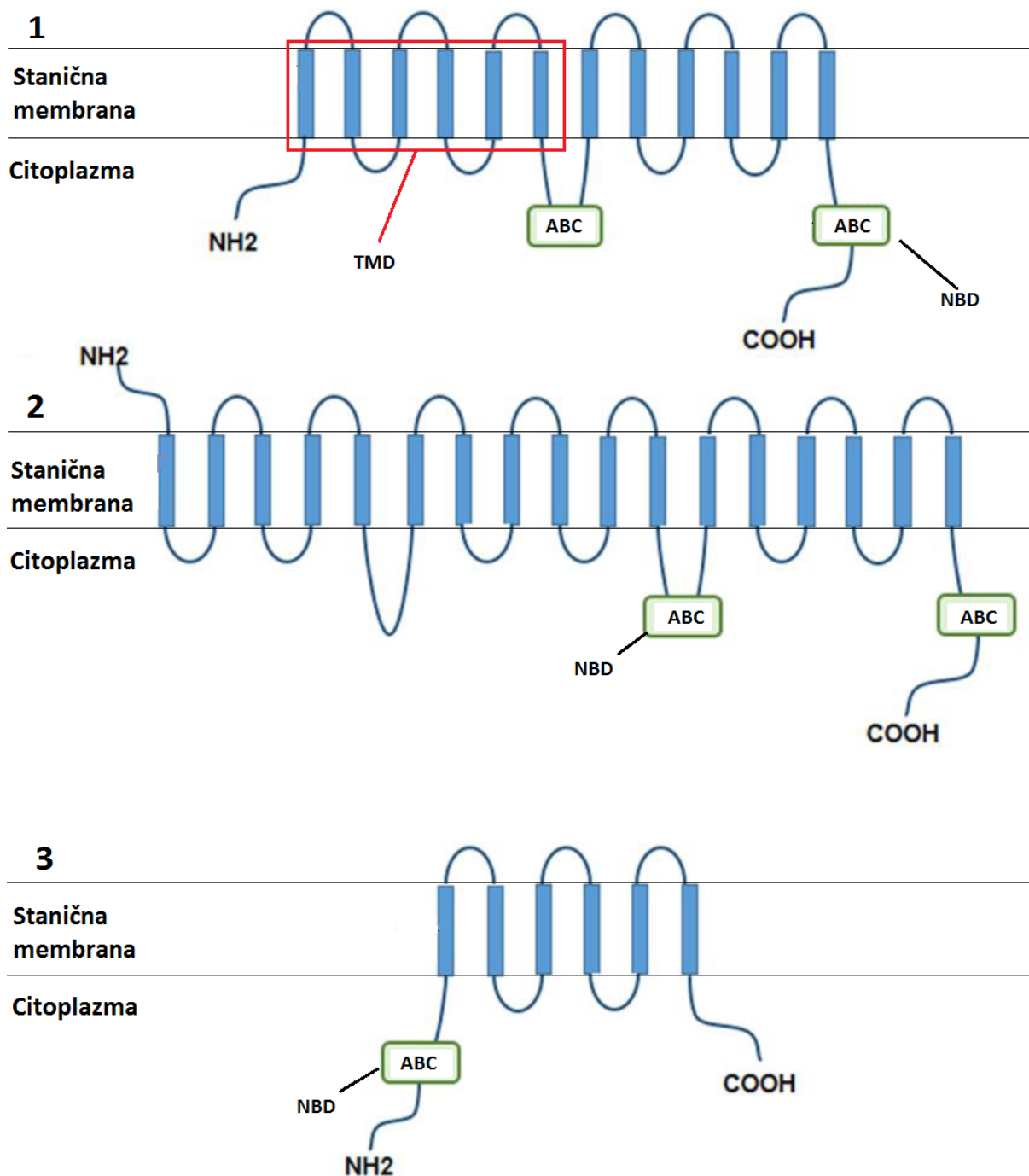
Kod prokariota sve četiri domene nisu međusobno povezane. Za njihovo povezivanje u funkcionalan transporter potreban je izvanstanični pomoćni supstrat-vezni protein (Dean i sur., 2001; Higgins, 2001; Jones i George, 2004; Hollenstein i sur., 2007). Eukariotski ABC transporteri mogu biti građeni od četiri domene koje su zajedno povezane u jedinstveni i funkcionalni polipeptid te govorimo o potpunim transporterima (engl. *full transporters*). Međutim, mogu biti građeni od jedne NBD i jedne TM domene koje se naknadnom

dimerizacijom povezuju u funkcionalan transporter - tzv. polustransporter (engl. *half transporters*) (Higgins, 2001; Ambudkar i sur., 2006; Hollenstein i sur., 2007). Nadalje, pojedini eukariotski potpuni transporteri mogu imati i treću TM domenu (tzv. TMD0) no ta domena nije potrebna za sami mehanizam transporta (Dean i sur., 2001). Shematski prikaz građe ABC proteina prikazan je na Slici 2.

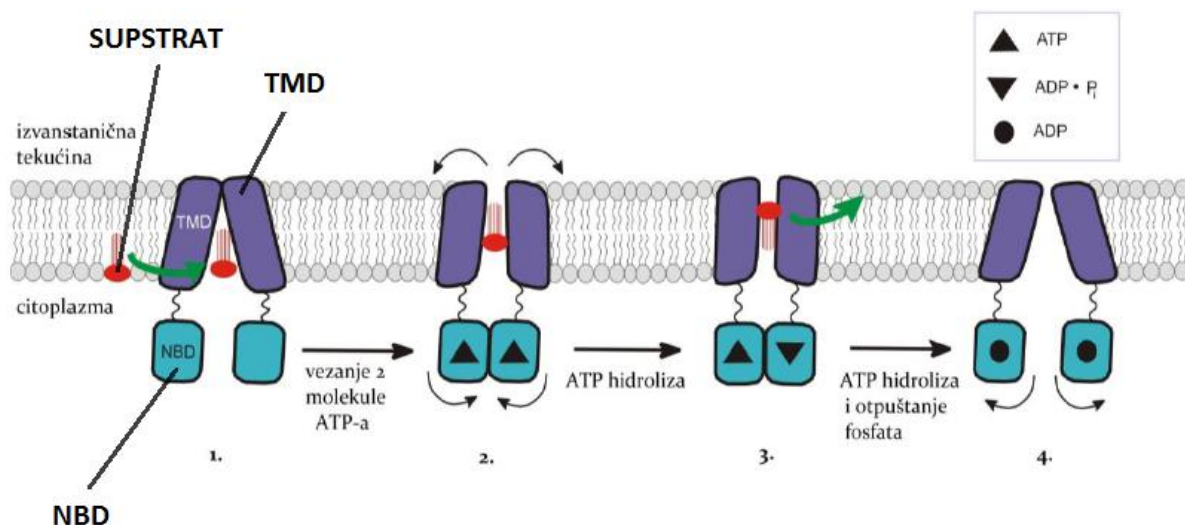
3.3. Mehanizam transporta ABC proteina

Zbog slične građe i importeri i eksporteri imaju zajednički transportni mehanizam aktivnog prijenosa tvari. Kristalografske slike ovih transportera upućuju da se mehanizam transporta zasniva na postojanju dviju različitih konformacija transportera, svaka s otvorom na suprotnoj strani stanične membrane (Dong i sur., 2005).

Na Slici 3 prikazan je mehanizam transporta ABC proteina. U stanju mirovanja dvije TM domene imaju oblik otvorenog dimera unutar kojeg se nalazi vezno mjesto za supstrat. Kod importera u stanju mirovanja otvor je na izvanstaničnoj strani, a kod eksportera na citoplazmatskoj strani. Kad se supstrat (npr. toksična tvar) veže za eksporter dolazi do prve konformacijske promjene TM domene što omogućava vezanje dvije ATP molekule za NBD. Vezanje ATP-a uzrokuje konformacijsku promjenu NBD domena koje poprimaju oblik zatvorenog dimera. Ta promjena uzrokuje otvaranje TM domena na suprotnoj strani (budući je riječ o eksporteru na izvanstaničnoj strani membrane). Dolazi do smanjivanja afiniteta za supstrat i on se otpušta s TM domena izvan stanice. U sljedećem koraku dolazi do hidrolize ATP-a tj. otpušta se fosfat, a ADP vraća transporter u početno stanje (Higgins, 2001; Jones i George, 2004; Dong i sur., 2005).



Slika 2. Građa ABC transportnog proteina. **1.** Potpuni transporter građen od dviju transmembranskih domena (TMD) i dviju nukleotidno-veznih domena (NBD). Domena TMD građena je od 6 α uzvojnica. Domena NBD sadrži ABC potpis: A = Walker A, B = Walker B i C = motiv C. **2.** Potpuni transporter s tri transmembranske domene (TMD). **3.** Polutransporter koji je građen od samo jedne transmembranske domene (TMD) i jedne nukleotidno-vezne domene (NBD). Slika je preuzeta i prilagođena iz Alisi i sur., 2013.



Slika 3. Predloženi mehanizam transporta supstrata putem ABC transportera (izbacivanje ili eksport). **1.** Početno stanje. Transmembranske domene (TMD) imaju takvu konformaciju da je struktura transportera (eksportera) otvorena prema citoplazmi. Supstrat se veže za TMD i uzrokuje vezanje 2 molekule ATP-a za nukleotidne vezne domene (NBD). **2.** Vezanje ATP-a uzrokuje konformacijsku promjenu NBD domena (tzv. zatvorena dimerna konformacija), a samim time i TM domena. **3.** Struktura transportera je sada otvorena prema izvanstaničnom prostoru. Supstrat se otpušta s TM domena. Dolazi do hidrolize ATP-a. **4.** ADP vraća transporter u početno stanje. Slika je preuzeta i prilagođena iz Dong i sur., 2005.

3.4. ABC transportni proteini u školjkaša

Transportni proteini pronađeni u tkivima školjkaša pripadaju trima potporodicama: ABCB, ABCC i ABCG (Luckenbach i Epel, 2008; Paetzold i sur., 2009; Della Torre i sur., 2013).

Prvi identificirani eukariotski ABC transportni protein opisali su Juliano i Ling 1976. godine i nazvan je P-glikoprotein (P-gp), a spada u potporodicu ABCB. Upravo taj protein je jedan od najbolje proučenih proteina MXR mehanizma u školjkaša (Eufemia i Epel, 2000; Kurelec i sur., 2000; Smital i sur., 2003). Masa proteina je 170 kDa i prema građi pripada potpunim transporterima tj. ima dvije TM domene i dvije NBD koje su povezane u funkcionalni peptid.

P-gp građen je od dviju transmembranskih domena (TMD1 i TMD2), građene od 6 α uzvojnica, koje grade transportnu poru (kanal). Svaka od dvije TMD je povezana sa dvije

NBD (NBD1 i NBD2) koje se nalaze u citosolu i koje na sebi imaju vezno mjesto za ATP. Svaka NBD građena je od β nabranih ploča i 3 karakteristična motiva: Walker A, Walker B, potpis C (Sharom, 2007). Glavna funkcija P-gp proteina je obrana tkiva od širokog spektra različitih ksenobiotika, naročito lipofilnih, organskih tvari (Ambdukar i sur., 2003).

Članovi ABCC potporodice nazivaju se i MRP proteini (engl. *multidrug resistance-associated proteins*). Prvi opisani naziva se MRP1 i ima masu 190 kDa (Cole i sur., 1992). Najpoznatiji član ove skupine je ABCC7, poznatiji kao CFTR transporter (engl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), a funkcionira kao ionski kanal koji primarno omogućava prolaz Cl^- ionima kroz membranu. Gubitak funkcije ovog proteina uzrokuje bolest cističnu fibrozu. Bolest se očituje u poremećaju prehrane, bakterijskoj infekciji pluća i neplodnosti u muškaraca (Dean i sur., 2001). Do danas je otkriveno da je 9 od ukupno 13 poznatih MRP transportera iz ABCC potporodice uključeno u mehanizam detoksikacije organizma, obranu od ksenobiotika i oksidativnog stresa (Borst i sur., 2000; Dean i sur., 2001). Dijele se na dvije grupe: „duže“ i „kraće“. „Duži“ MRP transporteri su građeni od 3 TM domene (imaju TMD0) i 2 NBD domene, a „kraći“ imaju 2 TMD i 2 NBD te su strukturno slični P-glikoproteinu. Kao i P-gp, i MRP ima široki spektar različitih supstrata. Najbolje transportiraju organske anione i njihove konjugate, glutation te spojeve konjugirane sulfatom (Borst i sur., 2000).

U ABCG potporodici nalazi se zadnji u nizu toksikološki relevantnih ABC proteina transportera. Otkrili su ga Doyle i suradnici 1998. godine, a naziva se BCRP (engl. *breast cancer resistance protein*) iako se ne nalazi samo u stanicama tkiva raka dojke. Drugi naziv mu je i ABCG2 protein. Taj protein pripada polustransporterima tj. potpuno funkcionalan postaje tek u obliku homodimera (Kusuhara i Sugiyama, 2007). Eksporter je sa širokim spektrom specifičnosti za negativno ili pozitivno nabijene organske ione, te spojeve konjugirane sulfatom (Staud i Pavsek, 2005).

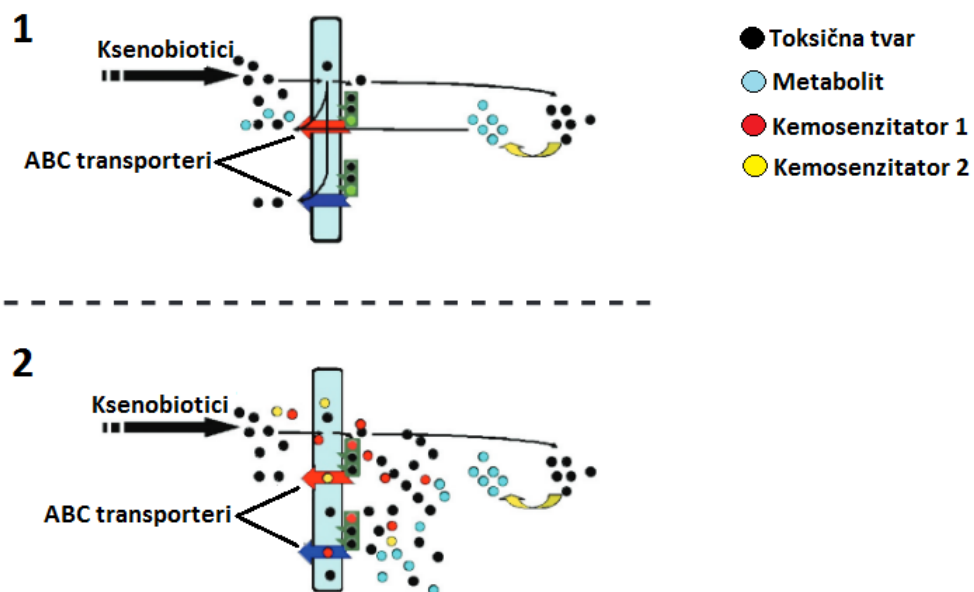
3.5. Inhibicija ABC transportnih proteina

Spojevi koji inhibiraju rad transportera nazvani su kemosenzitatori. Prvi otkriveni kemosenzitator P-glikoproteina bio je verapamil (Tsuruo i sur., 1981). Znanstvenici se služe inhibicijom MXR transportera kako bi ustanovili mehanizam funkcioniranja tih transportera ili otkrili svojstva koja posjeduje neka tvar koja djeluje inhibitory na transportere (Kurelec i

sur., 2000; Luckenbach i Epel, 2008). Danas je od iznimne važnosti kontrolirati spektar takvih inhibitornih tvari kako bi se zaštitio živi svijet, a naročito vodeni organizmi koji se nažalost nalaze u prostoru koji je sve više izložen onečišćenju. Inhibicija MXR transportera dovodi do nakupljanja ksenobiotika unutar stanica (Slika 4). Iako koncentracija drugih ksenobiotika u okolišu može biti mala, zbog prisutnosti inhibitora organizam neće moći spriječiti akumulaciju drugih ksenobiotika što će dovesti do neočekivanog i neobjašnjivog toksičnog efekta. Ako uzmemo u obzir da se školjkaši vrlo rado konzumiraju u prehrani jasno je koliko je važno kontroliranje ovakvih spojeva u okolini za čovjekovo zdravlje.

Tablica 3. Popis najznačajnijih inhibitora P-gp, MRP i BCRP/ABCG2 eksportera.

| Inhibitor | Kemijska formula | Ciljani ABC eksporter | Literatura |
|----------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------|
| Ciklosporin A | $C_{62}H_{11}N_{11}O_{12}$ | P-glikoprotein MRP BCRP/ABCG2 | Maki i sur., 2003 |
| Verapamil | $C_{27}H_{38}N_2O_4$ | P-glikoprotein | Maki i sur., 2003 |
| MK571 | $C_{26}H_{26}ClN_2O_3S_2 \times Na$ | MRP | Gekeler i sur., 1995 |
| Naringenin | $C_{15}H_{12}O_5$ | BCRP/ABCG2 | Robey i sur., 2007 |



Slika 4. Shematski prikaz funkcionalnog MXR mehanizma (1) i nefunkcionalnog MXR mehanizma narušenog djelovanjem kemosenzitatora (2). 1. ABC transporteri izbacuju štetne tvari iz stanice. 2. Stanična obrana je narušena kemosenzitatorima koji blokiraju aktivnost ABC transportera. Posljedica je nemogućnost izbacivanja štetnih tvari iz stanice. Slika je preuzeta i prilagođena iz Epel i sur., 2008.

4. LITERATURA

- Achard, M., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J. P. (2004) Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquatic Toxicology* 67: 347-357
- Alisi, A., Cho, W. C. Locatelli, F., Fruci, D. (2013) Multidrug Resistance and Cancer Stem Cells in Neuroblastoma and Hepatoblastoma. *International Journal of Molecular Science* 14 (12): 24706-24725
- Ambudkar, S. V., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z. E., Gottesman, M. M. (2003) P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *The Oncogene* 22: 7468-7485
- Bishop, L., Agbayani, R. Jr, Ambudkar, S. V., Maloney, P. C., Ames, G. F. (1989) Reconstitution of a bacterial periplasmic permease in proteoliposomes and demonstration of ATP hydrolysis concomitant with transport. *Proceedings of the National Academy Science USA* 86: 6953-6957
- Borst, P., Evers, R., Kool, M., Wijnholds, J. (2000) A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *Journal of the National Cancer Institute* 92: 1295-1302
- Bošnjak, I., Zaja, R., Klobučar, R. S., Šver, L., Franekić, J., Smital, T. (2013) Identification of ABC transporter genes in gonad tissue of two Mediterranean sea urchin species: black, *Arbacia lixula* L., and rocky, *Paracentrotus lividus* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 91 (4): 415-419
- Davidson, A. L., Dassa, E., Orelle, C., Chen, J. (2008) Structure, function, and evolution of bacterial ATP binding cassette systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72: 317-364
- Dean, M., Hamon, Y., Chimini, G. (2001) The human ATP binding cassette (ABC) transporter superfamily. *The Journal of Lipid Research* 42: 1007-1017

- Della Torre, C., Bocci, E., Ettore Focardi, S., Corsi, I. (2013) Differential ABCB and ABCC gene expression and efflux activities in gills and hemocytes of *Mytilus galloprovincialis* and their involvement in cadmium response. *Marine Environmental Research* 93: 56-63
- Dong, J., Yang, G., McHaourab, H. S. (2005) Structural basis of energy transduction in the transport cycle of MsbA. *Science* 308: 1023-1028
- Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L. V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K., Ross, A. D. (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95: 15665-15670
- Epel, D., Stevenson, C. N., MacManus-Spencer, L. A., Luckenbach, T., Hamdoun, A. M., Smital, T. (2008) Efflux transporters: newly appreciated roles in protection against pollutants. *Environmental Science and Technology* 42: 3914–3920
- Eufemia, N. A., Epel, D. (2000) Induction of the multixenobiotic defense mechanism (MXR), P-glycoprotein, in the mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to environmental stresses. *Aquatic Toxicology* 49 (1): 89-100
- Franco, J. L., Trivella, B. B. D., Trevisan, R., Dinslaken, D. F., Marques, M. R. F., Bainy, A. C. D., Dafre, A. L. (2006) Antioxidant status and stress proteins in the gills of the brown mussel *Perna perna* exposed to zinc. *Chemicobiological Interactions* 160 (3): 232-240
- Gekeler, V., Ise, W., Sanders, K. H., Ulrich, W. R., Beck, J. (1995) The Leukotriene LTD4 receptor antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 8: 345-352
- Goldberg, E. D. (1980) The International Mussel Watch. Report of a Workshop sponsored by the Environmental Studies Board. Commission on Natural Resources. National Research Council. National Academy of Sciences. Washington, 248 str.

- Guyton, A. C., Hall, J. E. (2006) Medicinska fiziologija, 11. Izdanje, Medicinska naklada, Zagreb, str. 3
- Habdija, I., Primc Habdija, B., Radanović, I., Špoljar, M., Matoničkin Kepčija, R., Vujčić Karlo, S., Miliša, M., Ostojić, A., Sertić Perić, M. (2011) Protista-Protozoa i Metazoa-Invertebrata. Strukture i funkcije. ALFA, Zagreb, str. 264-267
- Hamdoun, A. M., Cherr, G. N., Roepke, T. A., Epel, D. (2004) Activation of multidrug efflux transporter activity at fertilization in sea urchin embryos (*Strongylocentrotus purpuratus*). *Developmental Biology* 276: 452-462
- Hietanen, B., Sunila, I., Kristoffersson, R. (1988) Toxic effects of zinc on the common mussel *Mytilus edulis* L. (Bivalvia) in brackish water. 1. Physiological and histopathological studies. *Annales Zoologici Fennici*, 25 (4): 341-347
- Higgins, C. F. (2001) ABC transporters: physiology, structure and mechanism-an overview. *Research in Microbiology* 152: 205-210
- Higgins, C. F., Hiles, I. D., Whalley, K., Jamieson, D. J. (1985) Nucleotide binding by membrane components of bacterial periplasmic binding protein-dependent transport systems. *The EMBO Journal* 4: 1033-1039
- Higgins, C. F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology* 8: 67-113
- Hollenstein, K., Dawson, R. J. P., Locher, K. P. (2007) Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Current Opinions in Structural Biology* 17: 412-418
- Jones, P. M., George A. M. (2004) The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61: 682-699

- Juliano, R. L., Ling, V. (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta* 455: 152-162
- Kaštelan-Macan, M., Petrović, M. (2013) Analitika okoliša. HINUS i Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, str. 30-103
- Klobučar, G. I. V., Lajtner, J., Erben, R. (1997) Lipid peroxidation and histopathological changes in the digestive gland of a freshwater snail *Planorbarius corneus* L. (Gastropoda, Pulmonata) exposed to chronic and sub-chronic concentration of PCP. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 58: 128-134
- Kurelec, B. (1992) The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Critical Reviews in Toxicology* 22: 23-43
- Kurelec, B. (1997) A new type of hazardous chemical: the chemosensitizers of multixenobiotic resistance. *Environmental Health Perspectives* 105 (4): 855-860
- Kurelec, B., Smital, T., Pivčević, B., Eufemia, N. I. Epel, D. (2000) Multixenobiotic resistance, P-glycoprotein and chemosensitizers. *Ecotoxicology* 9: 307-327
- Kusuhara, H., Sugiyama, Y. (2007) ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). *The European Journal of Physiology* 453: 735-744
- Lajtner, J., Erben, R., Klobučar, G. I. V. (1996) Histopathological effects of phenol on the digestive gland of *Amphimelania holandrii* Fér. (Gastropoda, Prosobranchia). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 57: 458-464
- Lajtner, J., Erben, R., Klobučar, G. I. V., Maguire, I., Lucić, A. (2003) Histopathological changes in the gill of a freshwater snail *Amphimelania holandrii* Fér. (Gastropoda, Prosobranchia) exposed to phenol. *Periodicum biologorum* 105: 157-162

- Luckenbach, T., Epel, D. (2008) ABCB and ABCC type transporters confer multixenobiotic resistance and form an environment tissue barrier in bivalve gills. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 294 (6): R1919-R1929
- Maki, N., Hafkemeyer, P., Dey, S. (2003) Allosteric modulation of human P-glycoprotein. Inhibition of transport by preventing substrate translocation and dissociation. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 18132-18139
- Matoničkin, I., Habdija, I., Primc Habdija, B. (1998) Beskralješnjaci, biologija nižih avertebrata. Školska knjiga, Zagreb, str. 599-602
- Paetzold, S. C., Ross, N. W., Richards, R. C., Jones, M., Hellou, J., Bard, S. M. (2009) Up-regulation of hepatic ABCC2, ABCG2, CYP1A1 and GST in multixenobiotic-resistant killifish (*Fundulus heteroclitus*) from the Sydney Tar Ponds, Nova Scotia, Canada. *Marine Environmental Research* 68: 37-47
- Robey, R. W., Polgar, O., Deeken, J., To, K. W., Bates, S. E. (2007) ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance. *Cancer and Metastasis Reviews* 26: 39-57
- Sharom, F. J. (2007) Multidrug resistance protein: P-glycoprotein. U: You, G., Morris, M. E. (eds.) *Drug Transporters: Molecular Characterization and Role in Drug Disposition*. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, str. 223-262
- Smital, T., Sauerborn, R., Hackenberger, B. K. (2003) Inducibility of the P-glycoprotein transport activity in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* and the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Aquatic Toxicology* 65 (4): 443-65
- Smital, T., Sauerborn, R., Pivčević, B., Krča, S., Kurelec, B. (2000) Interspecies differences in P-glycoprotein mediated activity of multixenobiotic resistance mechanism in several marine and freshwater invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 126 (2): 175-186

Staud, F., Pavek, P. (2005) Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 37: 720-725

Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S., Sakurai, Y. (1981) Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Research* 41: 1967-1972

Walker, C. H., Sibly, R. M., Hopkin, S. P., Peakall, D. B. (2012) Principles of Ecotoxicology, Fourth Edition, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, str. 9-69

Korištene internet stranice:

<http://www.bily.com/pnwsc/web-content/Family%20Pages/Bivalves%20-%20Mytilidae.html> , pristupljeno 18.7.2014.

http://www.cenemar.org.br/foto_do_dia/foto_11.html , pristupljeno 18.7.2014.

<http://www.aquaportail.com/fiche-invertebre-2984-corbicula-fluminea.html> , pristupljeno 18.7.2014.

http://en.wikipedia.org/wiki/Zebra_mussel , pristupljeno 18.7.2014.

5. SAŽETAK

Školjkaši (Bivalvia) pripadaju koljenu mekušaca (Mollusca). Sjedilački su ili polusjedilački vodeni organizmi koji se hrane filtriranjem vode. Strujom vode im u organizam dopijeva kisik i hranjive tvari, ali i štetne tvari dospjele u vodeni okoliš. Sama životinja ima brojne načine kako izbaciti te štetne tvari iz organizma, a jedan od njih je mehanizam multiksenobiotičke otpornosti, skraćeno MXR mehanizam. Mehanizam izbacivanja štetnih tvari čine ABC transportni proteini koji korištenjem energije ATP-a prebacuju štetnu tvar iz citoplazme u izvanstaničnu tekućinu. Međutim, MXR mehanizam se može narušiti. Pronađene su tvari koje djeluju kao inhibitori ABC transportnih proteina, tzv. kemosenzitatori. Inhibicijom MXR mehanizma školjkaš akumulira ogromnu količinu štetnih tvari u svom tijelu (škrge, probavna žlijezda, gonade i dr.). Ukoliko čovjek konzumira tog školjkaša doći će do trovanja koje može rezultirati i smrću. Upravo zato se danas u ekotoksikološkim laboratorijima diljem svijeta proučava MXR mehanizam. Bitno je uočiti koje tvari djeluju kao kemosenzitatori i pri kojim koncentracijama kako bi se mogao odrediti raspon dopuštenih koncentracija tih tvari u vodi.

6. SUMMARY

Bivalves (Bivalvia) belong within phylum of mollusks (Mollusca). They are sedentary or half-sedentary aquatic organisms which feed by filtering water. Supply of water in their body brings oxygen and nutrients, also contaminants due to the aquatic environment. Animal itself possess numerous ways to throw those harmful substances out of the organism. One of those ways is mechanism of multixenobiotic resistance, shortened MXR mechanism. This mechanism consists of ABC transport proteins that transfer harmful substance from cytoplasm to extracellular fluid by using ATP molecules as energy source. However, MXR mechanism can be disrupted. There were found compounds which acts as an inhibitors of ABC transport proteins, the so-called chemosensitizers. Inhibition of MXR mechanism causes enormous accumulation of toxic substances in bivalve tissues (gills, digestive gland, gonads, etc.). If people consume these bivalves, poisoning will occur which can result in death. Therefore today in ecotoxicological laboratories around the world the MXR mechanism is studied. It is important to notice which substances act as chemosensitizers and at what concentrations in order to determine a range of allowed concentrations of these substances in water.