

# Otrovi u pauka

---

Ilić, Krunoslav

Undergraduate thesis / Završni rad

2012

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:217:884654>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEU ILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO–MATEMATI KI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**OTROVI U PAUKA**

**SPIDER VENOM**

**SEMINARSKI RAD**

**Krunoslav Ili**  
Preddiplomski studij molekularne biologije  
Undergraduate Study of Molecular Biology  
Mentor: prof. dr. sc. Biserka Primc

Zagreb, 2012.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	2
2. OTROV.....	3
2.1 Sastav otrova.....	5
2.1.1 Komponente male molekulske mase.....	5
2.1.2 Peptidne komponente.....	7
2.1.3 Proteinske komponente.....	11
3. EVOLUCIJA OTROVA.....	13
4. OPASNOST PO LJUDE.....	15
5. ZAKLJUČAK.....	18
6. LITERATURA.....	19
7. SAŽETAK.....	20
8. SUMMARY.....	20

## 1. UVOD

Pauci (red Araneae, razred Arachnida, potkoljeno Chelicerata, koljeno Arthropoda) su, nakon kukaca, druga najuspješnija i najraširenija skupina kopnenih životinja. Opisano je preko 42 000 vrsta ija se staništa nalaze na svim kontinentima osim na Antarktici (Kuhn-Nentwig i sur., 2011.). Njihovi se fosilni nalazi mogu pratiti od kasnog karbona (prije otprilike 300 milijuna godina), dok su fosili starijih pau njaka, srodnih precima današnjih pauka, stari i preko 400 milijuna godina, što ih ini jednom od najstarijih skupina kopnenih životinja (Penney i Selden, 2005.). Svoju uspješnost pauci duguju zna ajkama koje ih razlikuju od svih ostalih životinjskih skupina. Prije svega, njihova sposobnost pređenja pau ine omogu uje im izvanredan uspjeh u lovu. Velika raznolikost oblika mreža, kao i molekulski sastav svile, razli it od sastava svile nekih kukaca, otvara široke mogu nosti za predaciju kako prizemnih, tako i lete ih beskralješnjaka i kralješnjaka (Heiling i Herberstein, 2005.; Vollrath i Porter, 2006.). Osim za lov, pauci koriste svilu i u druge svrhe, npr. za omatanje paketa sperme ili oplo enih jaja, kao „padobran“ pomo u kojeg mogu prelaziti velike udaljenosti, ili kao“sigurnosno uže“ kojim se pri vrste za podlogu prije riskantnog skoka – takve uporabe svile nalazimo i kod pauka koji ne koriste mrežu za lov (Craig, 2003.). Unutarnja gra a tako er im daje prednost kao predatorima: za ekstenziju nogu, umjesto miši a ekstenzora, pauci koriste hemolimfu. Hidrauli ki tlak hemolimfe fino je ugo en pomo u sustava cijevi koje se protežu tijelom. Zbog nepostojanja ekstenzora, otvoren je ve i prostor za razvoj miši a fleksora unutar nogu, koji su deblji i ja i u usporedbi sa fleksorima kukaca i olakšavaju savladavanje plijena (Kuhn-Nentwig i sur. 2011.). Otrovn e žlijezde i njihove izlu evine, koje e biti podrobnije opisane, još su jedna prilagodba za brzo i u inkovito savladavanje plijena, ili za obranu od ve ih predatora.

Pauci se svrstavaju u koljeno lankonožaca te sa ostalim pripadnicima koljena dijele neke karakteristike: osim lankovitih nogu, kojih imaju etiri para, posjeduju hitin-proteinski egzoskelet i otvoren optjecajni sustav. Njihovo je tijelo podijeljeno na dva dijela: prosomu i opistosomu, po emu se razlikuju od trodijelnog plana gra e kukaca i rakova. Gra a ženskog spolnog poklopca (epiginum) i muških eljusnih nožica (pedipalpa), pomo u kojih mužjak prenosi paketi sperme do ženskog spolnog otvora, specifi na je za svaku vrstu i služi kao determinacijsko svojstvo. Pretpostavlja se da je takav mehanizam „klju -brava“, u kojem se mogu spojiti samo pedipalp i epiginum iste vrste pauka, odgovoran za veliku radijaciju vrsta (Kuhn-Nentwig i sur. 2011.).

Želudac pauka ne može probaviti vrstu hranu, pa u ulovljenu žrtvu pauci ubrizgavaju probavne enzime koji ju dovoljno omekšaju za usisavanje, ostavljaju i praznu ljušturu. Neki pauci mogu djelomično smrvti žrtve pomoću u klijesta i prvog članka (basisa) predpalpa, dok u isto vrijeme izlučuju probavne sokove (<http://en.wikipedia.org/wiki/Spider>).

Osjetila pauka razlito su razvijena kod pojedinih skupina, ovisno o tome na koji način love plijen. Kemoreceptori i mehanoreceptori nalaze se u dlakama (setae) raspoređenima po cijelom tijelu, a posebni receptori za vibracije (sensillae) nalaze se u zglobovima nogu. Ovi osjetni sustavi imaju glavnu ulogu kod pauka koji čekaju plijen u mreži (Barth i Geethabali, 1982.). Pauci koji aktivno love plijen imaju dobro razvijen vid za što su zaslužna četiri oka. Dok sekundarna oka (smještene iza prednjih oka) mogu opažati samo kretanje i izvor svjetla, prednja oka omogućuju stvaranje slike. Najrazvijeniji vid kod pauka nalazimo u porodici Salticide („pauci skakači“). Njihove prednje oka sastavljene su od posebnog sustava leća i četveroslojne mrežnice zbog čega imaju najbolji vid među kopnenim beskralježnjacima (Dacke i sur., 2001.).

## 2. OTROV

Otrov pauka važna je prilagodba za savladavanje plijena kao i za obranu od većih predatora. Njegova je uporaba i evolucija snažno obilježila fiziologiju i ekologiju ove skupine. Proizvodi se u otrovnim žlijezdama koje se uglavnom nalaze u prosomi (prednjem dijelu tijela), a izlučuje se kroz otvore blizu vrhova klijesta (chelicerae).

Razvoj otrovnih žlijezda možemo rekonstruirati pomoću danas živu ih porodica. U najstarije skupine pauka, Mesothelae, nalazimo male otrovne žlijezde unutar klijesta, u njihovom bazalnom segmentu. Te se žlijezde otvaraju relativno daleko od vrha klijesta što ne omogućuje veliku ulogu otrova u lovu. Kod Mygalomorpha se uočava drukčija gradnja: žlijezde su znatno veće i otvaraju se bliže vrhu klijesta, čime se osigurava lakše ubrizgavanje otvora u plijen. Svi ostali pauci (Araneomorphae) imaju još odvedeniji plan gradnje: njihove se otrovne žlijezde nalaze u prosomi gdje su dosegle veličinu koja unutar klijesta ne bi bila moguća. Također, otvaraju se blizu vrha klijesta (Kuhn-Nentwig i sur. 2011.).

Među paucima nalazimo samo tri porodice, ukupno manje od stotinu vrsta, koje ne koriste otrovne žlijezde. Pauci porodice Uloboridae svoj plijen vrsto omotaju u svilu, a zatim ubrizgaju jake probavne enzime koji brzo usmrte žrtvu. Dvije vrste roda *Holarchaea* iz porodice Holarchaeiidae nemaju otvor za otrovne žlijezde na vrhu klijesta, što ukazuje na

gubitak funkcije otrova. Za Symphytognathidae, malu porodicu od 65 vrsta, dugo se smatralo kako ne posjeduju otrovne žlijezde jer su vrhovi njihovih kliješta spojeni, zbog čega je dovedena u pitanje njihova mogućnost ubrizgavanja otrova. Međutim, na tim se kliještima ipak nalazi otvor koji bi mogao voditi do otrovnih žlijezda te nije potpuno sigurno koriste li ti pauci otrov u lovu.

Upadljiva karakteristika otrova pauka je njegova univerzalna inkovitost - pauci ga koriste protiv velikog broja beskralješnjaka i kralješnjaka. Razlog tome je što su receptori za aktivne supstance otrova prisutni u velikoj većini životinja; ti receptori i molekularni mehanizam djelovanja otrova bit će detaljnije opisani. Evolucijska prednost otrova koji djeluje na širok spektar životinja je šira mogućnost predacije, kao i obrana od velikog broja većih životinja. Među paucima postoje i rodovi specijalizirani za pojedinu vrstu plijena: primjerice, rodovi *Ero* i *Mimetus* gotovo se isključivo hrane paucima koji grade mreže; u porodicama Salticidae, Clubionidae, Theridiidae i Gnaphosidae nalazimo rodove koji se gotovo isključivo hrane mravima. Ipak, pauci specijalizirane prehrane čine tek 2% od ukupnog broja opisanih vrsta. Također, još nije poznato je li i do koje mjere otrov tih pauka prilagođen isključivo savladavanju odabranog plijena i je li manje inkovitan na drugim životinjama kojima se ostali pauci hrane (Kuhn-Nentwig i sur. 2011.).

Uzinci otrova mogu se podijeliti na dvije kategorije: neurotoksni i citolitički; neurotoksni ne tvore ometaju životne funkcije, zbog čega žrtva izgubi kontrolu nad svojim pokretima, dok citolitičke tvore razaraju stanice i tkiva. Otrovi mogu sadržavati komponente obje kategorije u različitim omjerima, što pridonosi njihovoj većini u inkovitosti.

Općenito se kod evolucije otrova pauka mogu primijetiti četiri bitne karakteristike: i) otrov se sastoji od više aktivnih supstanci sa različitim načinima djelovanja i supstratima, čime se proširuje spektar potencijalnih žrtava; ii) aktivne komponente otrova su visoko specifične za svoje supstrate (primjerice receptore na staničnoj membrani), tako da u maloj količini stvaraju specifičan i snažan učinak; iii) sinergizam – združeni u inak sastavnica otrova već je nego zbroj njihovih zasebnih učinaka, tj. međudjelovanje aktivnih komponenti pojačava djelovanje otrova; iv) biomolekularna raznolikost – postojanje mnogih sličnih molekula, poglavito peptida, sa vrlo bliskom strukturom i funkcijom, ali različite specifičnosti i mehanizma djelovanja. Komponente otrova rezultat su prepisivanja mnogih genskih porodica koje kodiraju za slične proteine; međutim, evolucijski način nastajanja takve raznolikosti još nije poznat (Kuhn-Nentwig i sur. 2011.).

Treba napomenuti da je sastav i djelovanje otrova pauka slabo istraženo područje – jedna ili više aktivnih komponenti otrova otkrivena je kod 174 vrste, što čini manje od 0.5%

od ukupnog broja od preko 42.000 opisanih vrsta. Velika raznolikost vrsta pauka i njihovih otrova ini ogromni potencijal za otkrivanje bioaktivnih tvari u znanstvene ili farmakološke svrhe.

## 2.1 Sastav otrova

Otrov pauka smjesa je raznolikih biološki aktivnih komponenti, od anorganskih soli do velikih proteinskih struktura (sl. 1), a sastav mu ovisi ne samo o vrsti, nego i o spolu, prehrani, okolišnim uvjetima i sl. Meto otrova su raznolike, npr. ionski kanali, membranski receptori ili polisaharidi na vanjskoj strani stani ne membrane, na koje komponente otrova mogu utjecati na različite načine (Vassilevski i sur., 2009.). Glavne sastavnice otrova ovdje e biti podijeljene po molekulskoj masi u tri kategorije: komponente male molekulske mase (<1 kDa), peptidi (1-10 kDa) i tvari velike molekulske mase (>10 kDa). Ovakva je podjela uobičajena u prouavanju sastava otrova.

### 2.1.1 Komponente male molekulske mase (low molecular mass compounds, LMM)

Komponente male molekulske mase, npr. anorganske i organske soli, ugljikohidrati, biogeni amini, aminokiseline i sl. dio su otrova veine pauka (sl. 1). Meutim, istraživanja otrova pauka se fokusiraju uglavnom na velike polipeptide, iako i navedene manje komponente mogu imati biološko djelovanje. Iznimka su pauci roda *Scytodes*, kod kojih ne nalazimo tvari ove kategorije. Takav sastav na odgovarajućin odražava ulogu otrova ove skupine – njihove su otrovne žlijezde jako modificirane da proizvode posebne ljepljive glikoproteine koje pauk potom ispljune na žrtvu (Kuhn-Nentwig i sur. 2011.).

Male molekule u otrovu mogu pojačavati neurotoksianu inakveih komponenti. Primjerice, visoka koncentracija kalijevih iona, kao kod pauka *Cupiennius salei* i više vrsta tarantula, može uzrokovati depolarizaciju membrane neurona, što dovodi do paralize plijena (zasićenjem ionskih kanala velikom koncentracijom iona kalcija ili natrija onemogućuje se uspostavljanje transmembranskog potencijala te se više ne mogu stvarati živani impulsi). Depolarizacijom se također aktiviraju membranski kanali regulirani naponom, koji su meta neurotoksina; ioni stoga djeluju sinergistički sa proteinskim toksinima veine molekulske mase (Vassilevski i sur., 2009.).

Kod mnogih pauka u otrovu nalazimo i limunsku kiselinu. Postoji više mogućih razloga za njenu prisutnost: limunska je kiselina u inkovito antibakterijsko sredstvo; kao kelatiraju i agens, može sprječavati djelovanje aktivnih enzima otrova koji imaju metalne kofaktore – takvi bi enzimi postali u inkoviti tek kad bi se ubrizgavanjem otrova razrijedila njena koncentracija; može služiti kao pufer i stabilizator pozitivno nabijenih poliamina prisutnih u otrovu. Ove su funkcije pretpostavljene na temelju istraživanja otrova zmija i pčela, koji također sadrže limunsku kiselinu, jer otrovi pauka nisu dovoljno istraženi da bi se neovisno utvrdila uloga ove kiseline (Kuhn-Nentwig i sur. 2011.).

Nukleozidi sa sulfatnom skupinom također su važna sastavnica otrova (npr. adenzin, gvanozin i inozin sa jednom ili više sulfatnih skupina). To su analozi metaboličkih puteva dobivanja energije, a neke od njih same za sebe mogu paralizirati žrtvu. Primjerice, inozin iz otrova kolonijalnog pauka *Parawixia bistriata* može uzrokovati paralizu termitskih radnika i vojnika. Osim toga, ovi nukleozidi mogu djelovati sinergistički sa ostalim komponentama (Kuhn-Nentwig i sur. 2011.).

Uz navedene tvari, u otrovu se mogu naći i druge organske molekule, npr. biogeni amini (serotonin, histamin, noradrenalin) ili aminokiseline (glutamat, taurin,  $\gamma$ -amino masna kiselina) koji imaju ulogu neuromodulatora u kukaca, kao i kod drugih životinja. Osim što sami po sebi u koncentracijama kakve nalazimo u otrovu (više od 10 mM) poremećuju funkcije neurona žrtve, ove tvari mogu aktivirati membranske receptore na koje djeluju neurotoksini (slično kao i kalijevi ioni kod vrste *C. salei*) (Vassilevski i sur., 2009.).

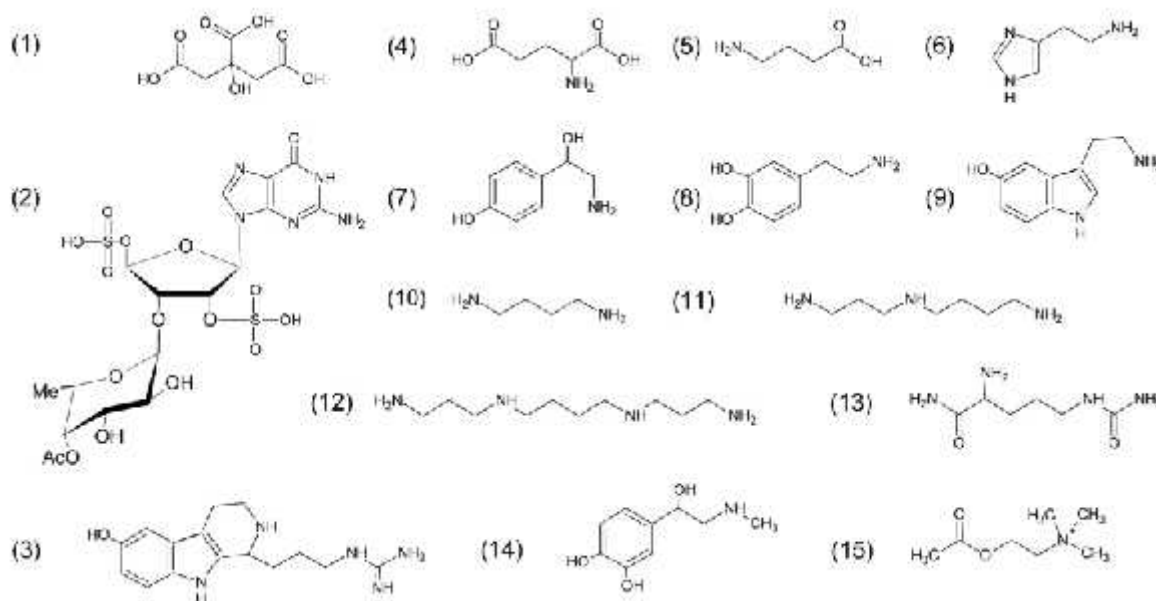
Jedan od amina prisutan u otrovima velikog broja porodica je histamin. U beskrležnjacima i kralježnjacima histamin je prisutan kao neurotransmiter i neuromodulator (kod člankonožaca histamin ima ulogu neurotransmitera za aktivaciju fotoreceptora i mehanoreceptora). Budući da kukci imaju većinu prehrane pauka, uloga histamina u prijenosu signala živčanog sustava kukaca temelj je njegovog toksičnog djelovanja u velikoj koncentraciji, kakvu nalazimo u otrovima npr. roda *Loxosceles*, *Lampona* i *Lycosa*. Otrovom ubrizgani histamin otvara kloridne kanale regulirane histaminom, što remeti transmembranski potencijal živanih stanica. Osim što na taj način paralizira žrtvu, histamin sinergistički djeluje sa peptidnim komponentama otrova, kao kod vrste *C. salei* (Kuhn-Nentwig i sur. 2011.).

Pretpostavljalo se da histamin u otrovima pauka može služiti obrani od kralježnjaka, budući da kod njih također ima ulogu u živčanom sustavu. Za ovu su pretpostavku bitna dva uinka histamina: i) uzrokuje bol, stoga može služiti kao obrambeno sredstvo; međutim, samo su neki veliki pauzi (Ctenidae, Sparassidae, Theraposidae) dio prehrane kralježnjaka, dok je



histamin raširen kod ve eg broja porodica pauka koji su premali da bi se kralježnjaci njima hranili; ii) uzrokuje pove anje lokalnog protoka krvi i permeabilnost stanica te tako olakšava širenje otrova; opet, ovaj je u inak histamina zna ajan samo za manji broj pauka (Mygalomorphae) koji se ponekad hrane manjim kralježnjacima. Uloga histamina za obranu pretpostavljena je na temelju prou avanja otrova p ela i osa, kod kojih histamin upravo tome služi.

Važna skupina spojeva male molekulske mase u kontekstu otrova su acilpoliamini, tj. poliamini koji sadržavaju indolne ili fenolne aromatske prstenove. Zbog velikog broja mogu ih struktura i položaja aromatskih prstena, ova je skupina spojeva jako raznolika. Me utim, svima je zajedni ki pozitivan naboj amino skupina zbog ega imaju i jednak princip djelovanja – blokiranje kationskih kanala na membrani živ anih stanica što uzrokuje brzu paralizu plijena. Ovi su spojevi od velike važnosti za porodice Nephilidae i Araneidae jer se u inak njihova otrova prvenstveno oslanja na acilpoliamine, a ne na proteine (Kuhn-Nentwig i sur. 2011.).



**Slika 1.** Kemijske strukture tvari prona enih u otrovima pauka: (1) limunska kiselina, (2) HF-7 (fukozilirani gvanozin-disulfat), (3) PwTx-I (6-hidroksitriparagin), (4) glutaminska kiselina, (5)  $\gamma$ -aminomasla na kiselina, (6) histamin, (7) oktopamin, (8) dopamin, (9) serotonin, (10) putrescin, (11) spermidin, (12) spermin, (13) FrPbAII (2-amino-5-ureidopentanamin), (14) adrenalin, (15) acetilkolin. Preuzeto iz Kuhn-Nentwig i sur. 2011.

### 2.1.2 Peptidne komponente

Peptidi (molekule sastavljene od manjeg broja aminokiselina) koji se nalaze u otrovima pauka mogu se ugrubo podijeliti po tome sadrže li disulfidne veze. Osim što su

peptidi bez disulfidnih veza linearni, kao sastavnice otrova uglavnom imaju citolitički efekt. Ova podjela, međutim, nije stroga i ne mora se pokazati korisnom kako napreduju istraživanja otrova pauka i njihova usporedba sa drugim otrovima.

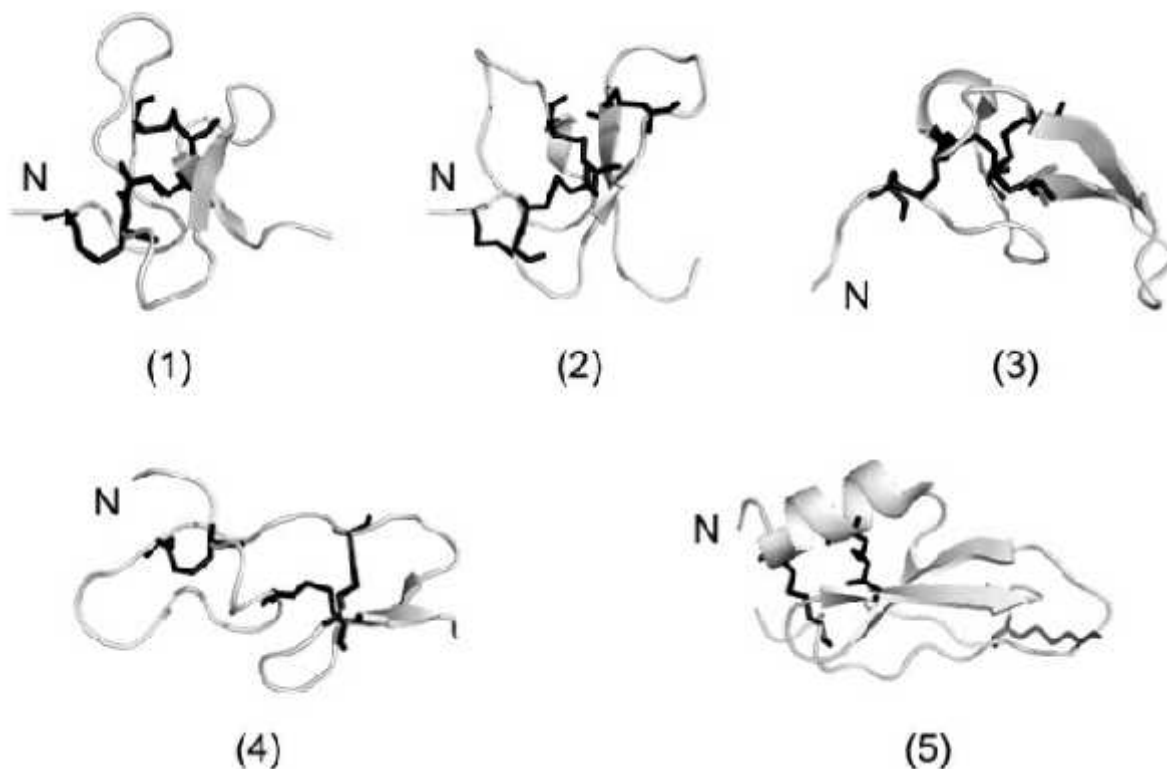
Mali kationski peptidi (*small cationic peptides*, SCP) koji ne sadrže disulfidne veze, sastoje se od <50 aminokiselina, imaju velik pozitivan naboj u neutralnoj otopini, sklone su stvaranju  $\alpha$ -zavojnica, amfoterne su molekule (sadrže i hidrofilne i hidrofobne domene) i imaju velik afinitet za fosfolipidne membrane. Ta svojstva čine ih vrlo slična antimikrobnim peptidima (*antimicrobial peptides*, AMP), velikoj skupini spojeva jako raširenih među životinjama i biljkama koja služi zaštiti od patogenih mikroorganizama. Osim strukture, zajednički im je i način djelovanja: ti peptidi u citoplazmi nemaju uređenu sekundarnu strukturu. Međutim, u dodiru sa staničnom membranom, koji je olakšan elektrostatskim djelovanjem pozitivnih naboja peptida i negativnog naboja fosfatne skupine fosfolipida, stvaraju  $\alpha$ -zavojnicu. Ta se zavojnica zatim ugrađuje u fosfolipidni dvosloj. Kod velike koncentracije peptida, njihova ugradnja narušava strukturu membrane, što uzrokuje staničnu smrt. Tri su modela predložena za objašnjavanje citolitičkog efekta ugradnje SCPa, kao i AMPa: i) *barrel-stave* model pretpostavlja da peptidi formiraju oligomere koji zajednički probijaju fosfolipidni dvosloj. Njihove su hidrofilne domene okrenute jedne prema drugima i odvojene tako da formiraju pore, dok su hidrofobne domene u interakciji s lipidima u dvosloju. Ovakav mehanizam djelovanja dokazan je za antibiotik alamethicin; ii) prema modelu tepiha, peptidi se nakon ugradnje orijentiraju paralelno s površinom membrane te su njihove hidrofilne domene u interakciji s fosfatnom skupinom, a hidrofobne s lipidima. Kada se postigne određena koncentracija peptida u membrani, ona je dovoljno nestabilna da se stvaraju velike pore; iii) model toroidalnih pora predviđa da se peptidi ugrađuju okomito na membranu i kroz elektrostatske interakcije s fosfatnim skupinama stvaraju velike pore u membrani (Vassilevski i sur., 2009.).

Citolitički učinak u inak kationskih peptida čini ih kandidatom za nekoliko uloga, ne samo kao sastavnica otrova, nego i u širem fiziološkom kontekstu. Njihovo otrovno djelovanje svakako se nameće kao prva pretpostavka njihove evolucijske važnosti. Međutim, treba napomenuti da su u toj ulozi korisni samo ako su glavna biološki aktivna komponenta otrova (što znači da se u otrovu nalaze u velikoj koncentraciji), a u protivnom je njihov citolitički učinak u inak zanemariv. Eksperimentalno je dokazano njihovo sinergističko djelovanje s neurotoksinima, ali točan mehanizam me udjelovanja nije utvrđen. Pretpostavlja se da CPI omogućuju dopiranje neurotoksina kroz stanice i membrane koje okružuju neurone (primjerice glija stanice ili mijelinski ovoj). Oita analogija sa antimikrobnim peptidima

upu uje na zaklju ak da i CPi imaju antimikrobni u inak. Korist od toga je zaštita otrova i otrovnih žlijezda od infekcije, kao i konzerviranje plijena. CPi tako er djelomi no sudjeluju i u probavi (Vassilevski i sur., 2009.).

Peptidi kod kojih nalazimo disulfidne veze razlikuju se od linearnih po strukturi i funkciji. Za toksi an efekt ovih peptida u sastavu otrova, disulfidni mostovi sami po sebi nisu zna ajni nego je važna tercijarna struktura koju oni stabiliziraju, odnosno strukturni motivi tih peptida. Najvažniji i najrašireniji strukturni motiv toksi nih peptida koji ne nalazimo samo kod pauka ve i kod drugih životinja, gljiva, biljaka i virusa inhibitorski je cistinski vor (*inhibitor cystine knot*, ICK) (slika 2.). Za stvaranje tog vora potrebno je šest cisteinskih bo nih ogranaka, razmaknutih me usobno za 1-17 drugih aminokiselina, koji stvaraju tri cistinska dimera. Dvije disulfidne veze stvaraju prsten kroz koji prolazi tre a. Treba napomenuti da postoje peptidi sli ne primarne strukture i rasporeda disulfidnih veza koji ipak ne stvaraju ICK, tako da se struktura ovakvog vora ne može pretpostaviti na temelju aminokiselinskog sastava. Osim ICKa, ovi peptidi redovito sadržavaju i  $\beta$ -ukosnicu, što je važno za utvr ivanje evolucije njihove strukture. Naime, drugi esti motiv kojeg nalazimo kod toksi nih peptida je  $\beta$ -ukosnica usmjerena s dvije disulfidne veze (*disulfide-directed S-hairpin*, DDH) (slika 2.). Po aminokiselinskom sastavu i rasporedu disulfidnih veza, ovi peptidi su sli ni *knottinima* (peptidi koji formiraju ICK). Pretpostavlja se da se motiv DDH pojavio ranije od ICK i da je bio osnova za evoluciju cistinskog vora (Kuhn-Nentwig i sur. 2011.).

Tre i zna ajan strukturni motiv je Kunitz motiv (slika 2.), koji osim  $\beta$ -ukosnice sadržava i  $\alpha$ -zavojnice, koje ne nalazimo kod dvije gore navedene strukture. Kao i ICK i DDH, ova struktura je raširena u prirodi – nalazimo je primjerice kod žarnjaka i zmija. Kunitz motiv specifi an je za inhibitore proteaza i kalijevih kanala.



**Slika 2.** Modeli struktura nekih peptida sa ICK motivom: (1) Huwentoksin-IV iz vrste *Haplopelma schmidtii*, (2) U2-hexatoxin-Hi1a iz vrste *Hadronyche infensa*, (3) o-atracotoxin-Hv1 iz vrste *Hadronyche versuta*, (4) Huwentoksin-II iz *Haplopelma schmidtii*, predstavnik peptida sa DDH motivom, (5) Huwentoksin-XI iz *Haplopelma schmidtii*, peptid sa Kunitz motivom. Cisteini su obojani crno, a N-terminalni kraj peptida označen je sa N. Preuzeto iz Kuhn-Nentwig i sur. 2011.

Mete peptida sa disulfidnim vezama su raznolike i postoji više mehanizama njihovog djelovanja. Oni ciljaju proteine koji se nalaze u membranama stanica podražljivih naponom, tj. neurona i miocita. Osim ionskih kanala, mete za ove peptide su i kemo-, mehano- i termosenzitivni receptori, a mehanizme toksičnosti možemo podijeliti na dvije kategorije: 1) blokiranje ionskih kanala – nemogućnost provođenja iona sprečava stvaranje i provođenje akcijskog potencijala. Na takav način djeluje npr. toksin Tx1 iz otrova brazilskog lutajućeg pauka (*Phoneutria nigriventer*) - vezanjem ovog toksina inhibira se funkcija  $\text{Na}^+$  membranskog kanala. Drugi toksini ove vrste blokiraju kalijeve ili kalcijeve kanale, a značajna karakteristika ove skupine peptida je homologija s peptidima koje nalazimo u otrovima drugih životinja – primjerice, konotoksin, koji nalazimo kod nekih puževa, ima isto djelovanje kao Tx1. 2) modulatori aktivnosti – toksini ove skupine vezanjem utječu na funkciju svoje mete. Primjerice,  $\delta$ -atracotoksin usporava inaktivaciju  $\text{Na}^+$  kanala, zbog čega stanica teže uspostavlja normalan transmembranski potencijal i usporava stvaranje i prenošenje živanih impulsa. Taj toksin nalazimo kod rodova *Atrax* i *Hadronyche*, čiji su

predstavnicima jedni od rijetkih pauka opasnih za ljude, kao i spomenuti rod *Phoneutria* (Vassilevski i sur., 2009.).

Vežanje peptida sa disulfidnim mostovima za receptore može biti neovisno o stani noj membrani ili može ovisiti o kontaktu sa fosfolipidnim dvoslojem. U slučaju peptida kojima je za vežanje potrebna interakcija sa membranom možemo na i raspored hidrofilnih i hidrofobnih aminokiselina sličan rasporedu kod linearnih peptida, što omogućuje uspješnu interakciju peptida i membrane. Takvi amfipatični peptidi mogu također u nekoj mjeri imati citolitički efekt, ali on nije bitan, uzimajući u obzir da se važniji neurotoksini u svakom slučaju postižu vežanjem za membranske receptore (Vassilevski i sur., 2009.).

Kao što je spomenuto, osim ionskih kanala peptidi iz otrova mogu se vezati i za membranske receptore različitih namjena. Primjerice, u otrovu pauka *Psalmopoeus cambridgei* nalaze se vanilotoksini koji aktiviraju kapsaicinske termoreceptore, što uzrokuje bol. Još zanimljivije komponente otrova istog pauka su psalmopeotoksin I i II koji pokazuju antimalarijsko djelovanje: specifično uništavaju eritrocite unutar kojih se razvija *Plasmodium falciparum*, a ne pokazuju nikakve druge neurotoksine, citolitičke ili antimikrobne učinke, zbog čega je njihova stvarna funkcija još nejasna (Kuhn-Nentwig i sur. 2011.).

### 2.1.3 Proteinske komponente

Proteinske komponente otrova pauka raznolike su veličinom, strukturom i funkcijom. Oni su najvažnija sastavnica otrova samo kod tri roda porodice Theridiidae - *Latrodectus*, *Steatoda* i *Achaearanea* (ta je porodica poznata po visoko specijaliziranim mrežama prilagođenima raznolikim načinima lova, kao i aspektima socijalnog života kod nekih vrsta) i kod roda *Loxosceles* iz porodice Sicariidae (tu spada zloglasni *Loxosceles reclusa*, „brown recluse spider“). Kod drugih porodica, proteine možemo naći i kao pomoćne komponente otrova, o čemu će više riječi biti poslije.

Otrov pauka roda *Loxosceles* netipičan je po velikoj količini i raznolikosti proteina. U njemu se nalazi širok spektar fosfolipaza i proteaza, dok je najvažnija biološki aktivna sastavnica sfingomijelinaza D, enzim koji razgrađuje sfingomijelin kojeg se može naći u stani noj membrani. Aktivnost tog enzima ima citotoksičan učinak, koji kod ljudi može uzrokovati ozbiljna oštećenja tkiva. Točan mehanizam djelovanja i specifičnost ovog enzima u sastavu otrova nisu poznati, ali su uspješno proizvedena antitijela kojima se zaustavlja njegovo djelovanje (Vassilevski i sur., 2009.).

Otrov pauka roda *Latrodectus* pobu uje veliki interes, prvenstveno zbog prijetnje koju ugriz ovih pauka predstavlja za ljude. Poznate i kao crne udovice, vrste ovog roda nalazimo širom svijeta, a istraživanja su usmjerena na tri najpoznatije vrste, zapadnoameričku *L. mactans*, euroazijsku *L. tredecimguttatus* i australsku *L. hasselti*. Utvrđeno je da se sedam biološki aktivnih proteina mogu podijeliti na tri skupine: i)  $\alpha$ -latrotoksin, koji je najviše istražen zbog svoje specifičnosti za kralježnjake; ii) pet latroinsektotoksina (nazvanih  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - i  $\varepsilon$ -insektotoksin) koji djeluju na kukce; iii) latrokrustotoksin, čije je djelovanje usmjereno na rakove.

Svi latrotoksini djeluju tako da uzrokuju nekontrolirano ispuštanje neuromodulatora iz aksonskih završetaka, zbog čega se onemogućuje prijenos akcijskog potencijala preko sinapsi i sprječava prenošenje živanih impulsa. Za proteine ove skupine također je karakteristična velika specifičnost – latroinsektotoksini su djelotvorni samo protiv kukaca, a latrokrustotoksin i  $\alpha$ -latrotoksin djeluju samo na rakove, odnosno kralježnjake.

Latrotoksini utječu na ispuštanje neuromodulatora povećanjem unutarstanične koncentracije iona kalcija (poznato je da su ioni kalcija signal za sekreciju vezikula s neuromodulatorima u sinaptičku pukotinu). Do toga dolazi na dva načina; latrotoksini u prisutnosti iona magnezija ili kalcija u membranskom prostoru mogu tvoriti stabilne simetrične tetramere koji se ugrađuju u staničnu membranu i služe kao kanal za kalcijeve ione iz membranskog prostora. Drugi je način posredno djelovanje – vezanjem za receptore na površini stanice (neureksin  $I\alpha$ , latrofilin i tirozin-fosfataza  $\sigma$  u slučaju  $\alpha$ -latrotoksina) aktivira se stanični signalni put za ispuštanje kalcija, a time i ispuštanje neuromodulatora.

Osim ovih sedam toksina, u sastavu otrova crne udovice uvijek se nalazi peptid od 8 kDa, poznat kao latrodektin, koji nema toksično djelovanje i ne može formirati membranske pore, ali stabilizira tetramerne strukture latrotoksina i time pojačava njihov učinak (Kuhn-Nentwig i sur. 2011.).

Primijećeno je kako su ugrizi pauka rodova *Steatoda* i *Achaearanea* manje opasni, ali po simptomima jako slični ugrizu crne udovice. Iz toga se može pretpostaviti da ovi pauci na sličan način koriste proteinske toksine, ali ovu pretpostavku tek treba eksperimentalno potvrditi.

Drugi proteini koje nalazimo u sastavu otrova pomažu u širenju toksina. Uglavnom se radi o enzimima koji razgrađuju ili polimere izvanstaničnog matriksa, ili polisaharide i slične sastavnice stanične membrane. Osim što na taj način olakšavaju prodiranje toksina u tkiva i stanice, neki od ovih enzima također pomažu u digestiji plijena.

Prvi enzim za kojeg je utvrđeno da se nalazi u otrovu kao pomoćna komponenta je hijaluronidaza, čija je uloga razgradnja hijaluronske kiseline, važne sastavnice izvanstaničnog matriksa. Ovaj je enzim široko rasprostranjen kod pauka i jedan je od najvažnijih faktora u širenju otrova. Sličnu ulogu imaju i kolagenaze – enzimi koji razgrađuju kolagen, proteinski polimer koji kao i hijaluronska kiselina održava konzistentnost tkiva (Kuhn-Nentwig i sur. 2011.).

Enzimi koji razgrađuju fosfolipidni dvosloj ili neke komponente stanične membrane (kao fosfatidil-kolin ili sfingomijelin) sastavnice su otrova pauka koji kod ljudi mogu uzrokovati ozbiljna oštećenja tkiva i jaki upalni odgovor, a prvenstveno služe za preoralnu digestiju plijena. Donedavno je jedan takav enzim, sfingomijelinaza D, bio poznat samo kod porodice Sicariidae i bakterija roda *Corynebacterium*, zbog čega se spekuliralo o horizontalnom prijenosu gena između vrsta ove dvije skupine. Međutim, u novije vrijeme sfingomijelinaza D i slični proteini koji razgrađuju lipide pronađeni su kod veće brojne porodice pauka i nekih krpelja te se smatra da su ti enzimi rezultat konvergentne evolucije. Osim roda *Loxosceles*, poznatog po ugrizima koji uzrokuju jaku dermonekrozu, fosfodiesteraze su utvrđene u otrovima crne udovice i australskog pauka *Atrax robustus* (Kuhn-Nentwig i sur. 2011.).

### 3. EVOLUCIJA OTROVA

O evolucijskom putu toksina pauka teško je išta reći i sa sigurnošću, prvenstveno zbog jako malo dostupnih podataka. Kao što je napomenuto, sastav otrova je potpuno ili djelomično utvrđen tek kod 174 vrste pauka, što čini manje od 0.5% od ukupnog broja vrsta. Od tog broja, većina istraživanja usmjerena je na toksine od medicinskog značaja za ljude (rodovi *Latrodectus*, *Phoneutria*, *Loxosceles* i *Atrax*) ili na dovoljno velike pauke za relativno jednostavnu izolaciju otrova (primjerice Theraphosidae). Za rekonstrukciju evolucijske prietotrovnih žlijezda neophodno je temeljito istraživanje evolucijski najstarije živuće skupine pauka, Mesothelae. Iz danas dostupnih činjenica o toksinima pauka, mogu se donijeti neki zaključci koje će daljnja istraživanja potvrditi ili opovrgnuti.

Pokazano je da većina skupina pauka u svom otrovu sadržava peptide, ili tzv. mini-proteine, bilo kao glavnu aktivnu komponentu ili kao sinergistički faktor. Njihovo djelovanje na ionske kanale ili membranske receptore čini se kao najstariji toksični mehanizam. Međutim, među mini-proteinima postoji raznolikost uloga i strategija djelovanja, što pokazuje

da se ve u inkovit mehanizam dodatno izmijenio. Tako su peptidi dobili nove funkcije, a u nekim su slu ajevima izgubili ulogu glavne biološki aktivne sastavnice otrova. Osim toga, u sastavu otrova pojavile su se mnoge druge komponente, najvažnije od kojih su tvari male molekulske mase (acilpoliamini, sulfatirani nukleotidi itd.) i veliki proteini, daju i otrovima pun širi spektar djelovanja, a u nekim slu ajevima preuzimaju i zada u glavne komponente. Zaključak da su se peptidi pojavili kao prve sastavnice otrova donesen je samo na temelju njihove raširenosti iako je moguće da su oni nastali tek naknadno i osigurali svoju ulogu u otrovu jakim toksinim u inkom ili povoljnim međudjelovanjem sa ostalim komponentama. Potvrda ove pretpostavke i daljnja istraživanja (Kuhn-Nentwig i sur. 2011.).

Velika raznolikost sastavnica otrova pobuđuje poseban interes. Iako su mehanizmi nastajanja mnogobrojnih različitih peptida i proteina još nepoznati, pretpostavlja se da su povezani sa evolucijom kukaca. Uzimaju i u obzir da kukci i insekte u prehrani pauka, i oni se logičnim pretpostaviti da se otrov prilagodio u inkovitom savladavanju sve odvedenijeg plijena. U 300 milijuna godina zajedničke evolucije, pauci su razvili lepezu tvari raznolikog utjecaja na stanišne mehanizme, neke od kojih kukci dijele sa ostalim skupinama, zbog čega su otrovi pauka djelotvorni protiv jako velikog broja životinja. Prirodnom selekcijom se sastav i koncentracija toksina nastalih ovakvom varijacijom optimizirala za maksimalan učinak. Ovakva velika varijabilnost toksina prvenstveno se odnosi na proteine i peptide. Kod njih jedna mutacija može uzrokovati veliku promjenu u funkciji i specifičnosti što otvara mogućnost velike raznolikosti. Kod manjih komponenti sa biosintetskim putevima koji uključuju više enzima, varijabilnost je znatno manja. Zbog ovakve velike raznolikosti proteina, nasuprot koje je ograničen arsenal komponenti male molekulske mase, ukupan broj toksina teško je procijeniti i može znatno varirati između vrstama. Primjerice, vrste porodica Araneidae i Nephilidae, koje se prvenstveno oslanjaju na acilpoliamine, posjeduju manje toksina od pauka roda *Loxosceles*, u kojima se otrovu nalazi velik broj različitih proteina.

Već napomenuta karakteristika otrova je sinergističko djelovanje prisutnih komponenti. Osim međudjelovanja kalijevih iona i glavne bioaktivne komponente, CSTX-1, kod vrste *C. salei* sinergistički učinak pripisuje se također i histaminu i peptidu kupienin 1a, koji razaranjem tkiva olakšavaju širenje toksina. Sličan se mehanizam može pretpostaviti i za druge vrste kod kojih nalazimo visoku koncentraciju iona u otrovu ili citolitičke peptide u premaloj koncentraciji da bi zasebno usmrtili žrtvu. Glavna evolucijska prednost ovakve strategije je štednja energije – primjerice, mala koncentracija latrodektina mnogostruko povećava aktivnost latrotoksina, čime se smanjuje njegova potrebna koncentracija za uspjeh u lovu. Budući da je paucima potrebno 7-16 dana da u potpunosti obnove sadržaj otrovnih



žlijezda, svaka ušteda toksina je opravdana. Tako se i ponašanje pauka prilagodilo što manjoj potrošnji otrova – pauk vrste *C. salei* prilagođava ubrizganu količinu otrova veličini žrtve, nikad ne koriste i sav otrov na raspolaganju. Ukoliko pauk procijeni da je plijen prevelik da ga otrov savlada, uopće ga ne napasti (Kuhn-Nentwig i sur. 2011.).

Uzimaju i u obzir veliku uspješnost pauka u lovu, može se reći da je njihov otrov, bez obzira koja je glavna komponenta i način djelovanja, izuzetno oružje i jedan od glavnih razloga brojnosti i raširenosti ove skupine. Zbog toga je za razumijevanje njihovog evolucijskog puta bitno utvrditi kako je došlo do velike raznolikosti toksina, na koji se način dogodio odabir pojedine skupine spojeva kao glavne aktivne komponente i koje su bile prve otrovne tvari na raspolaganju davnih predaka današnjih vrsta.

#### 4. OPASNOST PO LJUDE

Strah od ugriza pauka potpuno je neproporcionalan stvarnoj opasnosti koju ugriz predstavlja. Od ogromnog broja danas poznatih vrsta, svega nekolicina pauka može ozbiljno ugroziti zdravlje čovjeka ili ga u rijetkim slučajevima usmrtiti. Nasuprot tome, ovu uglavnom bezopasnu skupinu životinja prati glas nemilosrdnih ubojica koje treba izbjegavati. Koji su razlozi takve paranoje, u kojoj su mjeri uzrok arahnofobije i zašto je opasnost pauka po ljude poznata „injenica“, teško je reći. U svakom slučaju, ugrizi gotovo svih pauka potpuno su bezopasni po čovjeka. Prije svega, većina pauka ne može kliještima probiti relativno debeli sloj kože da ubrizga otrov. Osim toga, količina toksina koju pauk posjeduje prilagođena je savladavanju kukaca, a ne velikih kraljevnjaka. Svakako je najbitnija injenica da se pauci bježe od čovjeka kad god je to moguće, pribjegavaju i otrovu samo ako nemaju nikakav drugi izbor.

Dosad su navedeni pauci koji mogu ozbiljno ugroziti čovjeka i neka svojstva njihovih toksina. Treba primijetiti da je zajednička značajka njihovih otrova neurotoksičnost i točinak – zbog djelovanja na živčani sustav, simptomi uključuju cijeli organizam, a smrt može nastupiti u slučaju ometanja funkcije srčanog mišića. Iznimka je *Loxosceles reclusa*, čiji otrov ima citolitički efekt. Ugriz toga pauka ne može usmrtiti čovjeka već izaziva lokalna oštećenja tkiva čija ozbiljnost varira ovisno o količini ubrizganog otrova i zdravstvenom stanju žrtve (Vassilevski i sur., 2009.).

Najopasniji pauci spadaju u dva roda, *Atrax* i *Hadronyche*, iz porodice Hexathelidae. Mehanizam djelovanja njihova otrova već je opisan, a ugriz uzrokuje veliku bol, grčeve mišića, tahikardiju i dezorijentiranost. Ove pauke nalazimo u Australiji, gdje žive uglavnom

izvan gradova. Iznimka je *Atrax robustus* (Slika 3.), čije je središte rasprostranjenosti Sydney, Australija, i koji je odgovoran za većinu slučajeva ugriza. Kod ostalih vrsta ovih rodova, opasnost predstavljaju mužjaci koji u potrazi za ženkama znaju ulaziti u gradska naselja i kuće. Uspješno je proizveden protuotrov za njihove toksine i od početka njegove uporabe 1981. nije potvrđeno ni jedan smrtni slučaj kao posljedica ugriza ovih pauka.



**Slika 3.** *Atrax robustus*. Preuzeto iz Nieuwenhuys E, 2008.

Vrste roda *Latrodectus* nalazimo raširene po cijelom svijetu, a u Hrvatskoj najpoznatija je vrsta crna udovica, *L. tredecimguttatus*. Njihov ugriz također uzrokuje veliku bol i grčevite mišice, uz nepravilno disanje i crvenilo na mjestu uboda. Protuotrov za toksine ove vrste ima marginalan učinak, ali u većini slučajeva nije ni potreban - simptomi se liječe analgeticima i miorelaksantima, a otrov nije dovoljno jak da usmrti zdravu osobu. Zadnji zabilježeni smrtni slučaj kao posljedica ugriza crne udovice dogodio se prije 30 godina. Ove neagresivne životinje koje se klone gradskih naselja ne predstavljaju veliku opasnost. Ugriz mužjaka crne udovice, koji je nekoliko puta manji od ženke, bezopasan je.

Pauci roda *Phoneutria* (Slika 4.) razlikuju se od ostalih po velikoj agresivnosti – suočeni sa opasnošću, ne bježe već zauzeti prijete i položaj podizanjem prednjih nogu. Aktivni su danju, a noću traže sklonište te znaju ulaziti u kuće, zbog čega su ugrizi ovih pauka puno opasniji od ostalih. Iako njihov otrov uzrokuje jaku bol, osim oticanja i crvenila nema drugih značajnih simptoma i u velikoj većini slučajeva ne predstavlja opasnost.



**Slika 4.** *Phoneutria nigriventer*. Preuzeto iz Nieuwenhuys E, 2008

Navedeni rodovi pauka, koji ukupno broje dvjestotinjak vrsta, svojim ugrizom mogu uzrokovati bol ili, u jako rijetkim slučajevima, ozbiljnije posljedice. Postoje i druge vrste koje prati glas izuzetno opasnih, primjerice australski mišji pauk roda *Missulena*, ili noćni pauk *Dysdera crocata*, čiji ugrizi mogu uzrokovati kratkotrajnu bol, ali ni u kojem slučaju nisu opasni po život ljudi. Prijetnja koju pauci predstavljaju uglavnom je preuveličana. Kliničke studije pokazale su da su ugrizi samo u izuzetnim okolnostima smrtonosni, a za otrove nekih pauka proizveden je i protuotrov ili antitijelo, kao npr. za sfigomijelinazu D iz otrova *L. reclusa* (<http://ednieuw.home.xs4all.nl/Spiders/Nasty-Spiders/Demystification-toxicity-spiders.htm>).

## 5. ZAKLJUČAK

Otrovi u pauka veliko su i slabo istraženo područje koje zaslužuje pozornost iz nekoliko razloga. Prije svega, specifičnost i efikasnost toksina pauka obećava stvaranje farmaceutskih pripravaka nove generacije, temeljene na saznanjima koje nam toksikologija pruža. Interakcije komponenti otrova sa receptorima nam osim medicinske uporabe pomaže i širiti znanje o fiziologiji živanih sustava, poglavito o građini i ulozi receptora na staničnoj membrani neurona. Veliki izazov s kojim se istraživači suočavaju je razumijevanje ogromnog diverziteta i nastanka silnog mnoštva peptida i proteina iz arsenala pauka, od kojeg smo tek dio uspješno upoznati. To poglavlje evolucije donijeti će ne samo spoznaje o skupini Araneae, nego i širu perspektivu molekularnih mehanizama bioraznolikosti. Dakako, prije nego se upustimo u raspletanje evolucijskog puta pauka potrebna su iscrpna istraživanja sastava otrova svih rodova, ne samo onih koji predstavljaju potencijalnu opasnost. Svako novo istraživanje treba tumačiti u svjetlu ekološke uloge ove skupine, njihove izvanredne učinkovitosti u lovu, potrebe da se otrov uštedi koliko je moguće i imperativa samoobrane koliko i napada. Teško je pretpostaviti što sve možemo očekivati, ali sigurno je da nam ove životinje kriju još iznenađenja.

## 6. LITERATURA

- Barth F, Geethabali D, 1982. Spider Vibration Receptors: Threshold Curves of Individual Slits in the Metatarsal Lyriform Organ. *Journal of Comparative Physiology* **148**, 175-185
- Craig C, 2003. Spiderwebs and silk: Tracing Evolution from Molecules to Genes to Phenotypes. Oxford University Press, 230 str.
- Dacke M, Doan T, O'Carroll D, 2001. Polarized light detection in spiders. *The journal of experimental biology* **204**, 2481-2490
- Heiling A, Herberstein M, 2000. Interpretations of orb-web variability. *Ekológia (Bratislava)* **19**, 97-106
- Kuhn-Nentwig L, Stöcklin R, Nentwig W, 2011. Venom Composition and Strategies in Spiders: Is Everything Possible? *Advances in insect physiology* **40**, 1-86
- Penney D, Selden P, 2005. Phylogeny of Spiders: a review of the strictly fossil spider families. *Acta zoologica bulgarica*, Suppl. No. 1, 25-39
- Vassilevski A, Kozlov S, Grishin E, 2009. Molecular diversity of spider venom. *Biochemistry (Moscow)* **74**, 1505-1534
- Vollrath F, Porter D, 2006. Spider silk as archetypal protein elastomer. *The Royal Society of Chemistry* **2**, 377-385
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Spider>
- <http://ednieuw.home.xs4all.nl/Spiders/Nasty-Spiders/Demystification-toxicity-spiders.htm>

## **7. SAŽETAK**

Pauci su jedna od evolucijski najuspješnijih skupina životinja. Najvažnije prilagodbe koje su im omogućile veliku raširenost i raznolikost su sposobnost izgradnje mreža od svile i uporaba otrova u savladavanju plijena i samoobrani. U ovom radu ukratko su navedene glavne sastavnice dosad istraženih otrova pauka, na njihova djelovanja i opasnost koju predstavljaju po ljude. Predložene su neke mogućnosti za istraživanja u svrhu upotpunjavanja znanja o toksinima pauka, kao i za njihovu komercijalnu uporabu.

## **8. SUMMARY**

Spiders are one of the evolutionary most successful groups of animals. The most important adaptations which enabled their great diversity and variability are web-spinning and the use of venom for prey subduction and self-defence. In this paper, main components of the spider venom, their mechanisms of action and the threat they pose for humans are discussed. Possibilities for further studies in the aim of extending our knowledge of spider toxins, as well as their commercial use, are presented.