



Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Jana Munivrana

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **MEHANIZAM DJELOVANJA TOKSINA OUABAINA I PALITOKSINA**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Zagreb, 2020.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

7. srpnja 2020.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

11. rujna 2020.

Mentor rada: doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Potpis:



## Sadržaj

<b>§ POPIS KRATICA .....</b>	<b>VII</b>
<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>IX</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPaza.....</b>	<b>1</b>
<i>1.1.1. Uloga u stanici.....</i>	<i>1</i>
<i>1.1.2. Struktura.....</i>	<i>1</i>
<i>1.1.3. Mehanizam djelovanja .....</i>	<i>4</i>
<b>1.2. Ouabain.....</b>	<b>6</b>
<b>1.3. Palitoksin.....</b>	<b>7</b>
<b>§ 2. OUABAIN.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1. Vezno mjesto ouabaina na Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPazu.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2. Mehanizam djelovanja toksina ouabaina .....</b>	<b>11</b>
<b>2.3. Uloga ouabaina u fiziološkim i patološkim procesima.....</b>	<b>15</b>
<b>2.4. Primjena ouabaina.....</b>	<b>16</b>
<b>§ 3. PALITOKSIN .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1. Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPaza kao ciljna struktura palitoksina .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2. Mehanizam djelovanja palitoksina.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3. Usporedba palitoksina s ouabainom.....</b>	<b>23</b>
<b>3.4. Toksičnost palitoksina .....</b>	<b>23</b>
<b>§ 4. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>27</b>



## § POPIS KRATICA

ACTH	adrenokortikotropni hormon
ASK-1	<i>apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
ATP	adenozin-trifosfat
BSEP	eksportna pumpa žučne soli
CaMK II	kalmodulin-ovisna protein kinaza II
CD	citosolna domena
DAG	diacilglicerol
EGFR	receptor epidermalnog faktora rasta
ER	endoplazmatski retikulum
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
GDP	gvanozin-difosfat
GPCR	receptori spregnuti s G proteinima
GSK3	kinaza glikogen sintaze 3
GTP	gvanozin-trifosfat
IP3	inozitol-1,4,5-trifosfat
IP3R	inozitol-trifosfat receptor
JNK	c-Jun N-kraj kinaza
KLF5	<i>Kruppel-like factor 5</i>
LD <sub>50</sub>	<i>lethal dose 50 %</i>
MAPK	mitogenom aktivirana protein kinaza
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NCX	Na <sup>+</sup> Ca <sup>2+</sup> izmjenjivač
NF-κB	<i>nuclear factor-kappa B</i>
PI-3K	fosfoinozimid-3-kinaza
PIP2	fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat
PIP3	fosfatilinozitol-3,4,5-trisfosfat
PKC	protein kinaza C
PLC	fosfolipaza C

---

PST 2238	17 $\beta$ -(-3-furil)-5 $\beta$ -androstan-3 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ -triol
PTX	palitoksin
ROC	<i>receptor operated channel</i>
ROS	reaktivne kisikove vrste
RYR	rianodin receptor
SAPK	<i>stress-activated protein kinases</i>
SERCA	<i>sarcoendoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>ATPase</i>
SOC	<i>store operated channel</i>
Src	Schmidt-Ruyspin A-2 viralni onkogen homolog avian
STAT 1	<i>signal transducer and activator of transcription 1</i>
STAT 3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
TM	transmembranska zavojnica
TRPC	<i>transient receptor potential channel</i>



## § Sažetak

Ouabain i palitoksin toksini su čije je djelovanje usmjereno na primarni antiporterski aktivni prenositelj  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPazu čija je glavna zadaća održavanje transmembranskog potencijala prijenosom iona usprkos elektrokemijskom gradijentu. Vežanjem ouabaina na  $\alpha$ -podjedinicu  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPaze dolazi do zaključavanja pumpe u konformaciju otvorenu samo prema izvanstaničnom prostoru te se na taj način inhibira aktivni prijenos iona  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  preko membrane i aktivira receptorska uloga  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPaze u putu prijenosa signala u stanici. Ovisno o prisutnoj izoformi  $\alpha$ -podjedinice vežanjem ouabaina na pumpu pokreću se različiti putevi prijenosa signala različitih ishoda.

Palitoksin je jedan od najotrovnijih morskih toksina s dozom lijeka koja prouzročuje smrt 50 % pokusnih životinja  $\text{LD}_{50}$  od 25 ng/kg za zečeve. Vežanjem na  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPazu uzrokuje otvaranje kationskog kanala unutar pumpe. Takav je kanal neselektivan za ione  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  što za posljedicu ima depolarizaciju stanične membrane, a zatim i niz naknadnih promjena u stanici koje se ostvaruju potaknutom aktivnošću prenositelja kao što su  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$  izmjenjivač,  $\text{Ca}^{2+}$  ATPaza,  $\text{Na}^+\text{H}^+$  izmjenjivač i kalcijevi kanali.



## § 1. UVOD

### 1.1. Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPaza

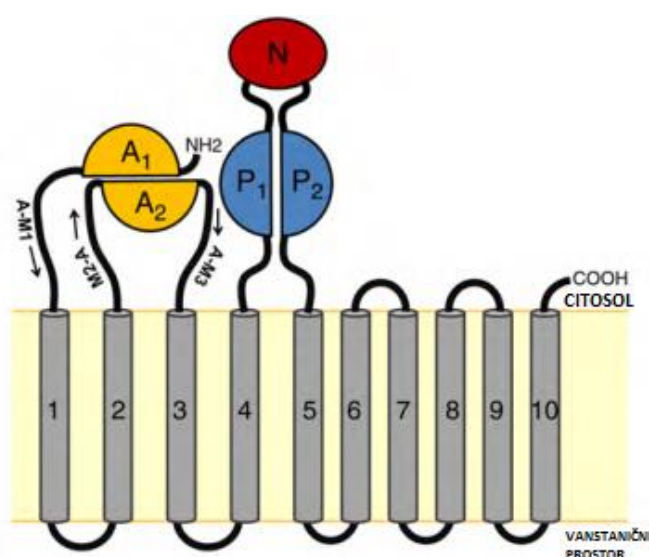
#### 1.1.1. Uloga u stanicima

Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPaza je primarni antiporterski aktivni prenositelj monovalentnih kationa Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup> preko stanične membrane. Glavna zadaća Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPaze je održavanje transmembranskog potencijala prijenosom iona usprkos elektrokemijskom gradijentu – pumpa potaknuta energijom oslobođenom hidrolizom jedne molekule ATP prenosi ione tako da tri Na<sup>+</sup> izlaze, a dva K<sup>+</sup> ulaze u stanicu, odnosno gibaju se s mjesta niže na mjesto više koncentracije. Budući da u jednom ciklusu dolazi do prijenosa različitog broja monovalentnih kationa preko membrane proces je elektrogen – stvara se razlika električnog potencijala između izvanstaničnog i unutarstaničnog prostora. Transmembranski potencijal u većini animalnih stanica iznosi od -50 do -70 mV te je nužan čimbenik ekscitabilnosti živčanih i mišićnih stanica. Gradijent iona Na<sup>+</sup> pokreće unos aminokiselina i vitamina u stanicu, Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> antiporter te simporter Na<sup>+</sup> i glukoze. Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPaza osim transportne uloge ima i ulogu u prijenosu signala u stanicima. Pumpa je vezana na Src (Schmidt-Ruyspin A-2 viralni onkogen homolog avian) u kaveolama, a vezanjem kardiotonih steroida, kao što je primjerice ouabain, na pumpu aktivira se Src i pokreće kaskadu prijenosa signala. Vezanjem kardiotonih steroida dolazi i do transaktivacije receptora epidermalnog faktora rasta što također pokreće kaskadu prijenosa signala. O važnosti Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPaze govori podatak da u mirovanju troši 20-80 % ukupne energije stanice ovisno o tkivu.<sup>1</sup>

#### 1.1.2. Struktura

Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPaza pripada u skupinu ATPaza P-tipa. One se dijele u pet podskupina P<sub>I</sub>-P<sub>V</sub>, a Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPaza pripada u P<sub>II</sub> podskupinu zajedno s Ca<sup>2+</sup> ATPazom i H<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPazom. Zajednički strukturni čimbenik svih ATPaza P-tipa je α-podjedinica koja se sastoji od transmembranske domene sa šest do dvanaest α-zavojnica koje premošćuju membranu i tako tvore strukturu za vezanje iona za transport te tri citosolne domene s ATPaznom aktivnošću: N-domena (engl. *nucleotide-binding*) koja veže γ-fosforilnu skupinu molekule ATP i pozicionira ju za nukleofilni napad, P-domena (engl. *phosphorylation*) koja na aspartatski bočni ogranak veže fosforilnu skupinu pritom stvarajući intermedijer visoke energije te posljednja A-domena (engl.

*actuator*) koja pozicionira molekulu vode za hidrolizu ATP. Tercijarna struktura  $\alpha$ -podjedinice pretpostavljena je izgradnjom homolognog modela strukture  $\text{Ca}^{2+}$  pumpe u sarko/endoplazmatskom retikulumu (SERCA). Transmembransku i citoplazmatske domene povezuju povezne regije koje su duljine optimalne za rad pumpe. AM-1 i AM-3 poveznici duljine su dovoljno dugačke za translokaciju A-domene prilikom fosforilacije i defosforilacije te dovoljno kratke kako bi se naprezanjem otvorio prolaz za ione u transmembranskoj domeni. Proteolitičkim cijepanjem poveznika M2-A i A-M3 prekida se ciklus prijenosa iona prekidom komunikacije među domenama ATPaze.<sup>2</sup>



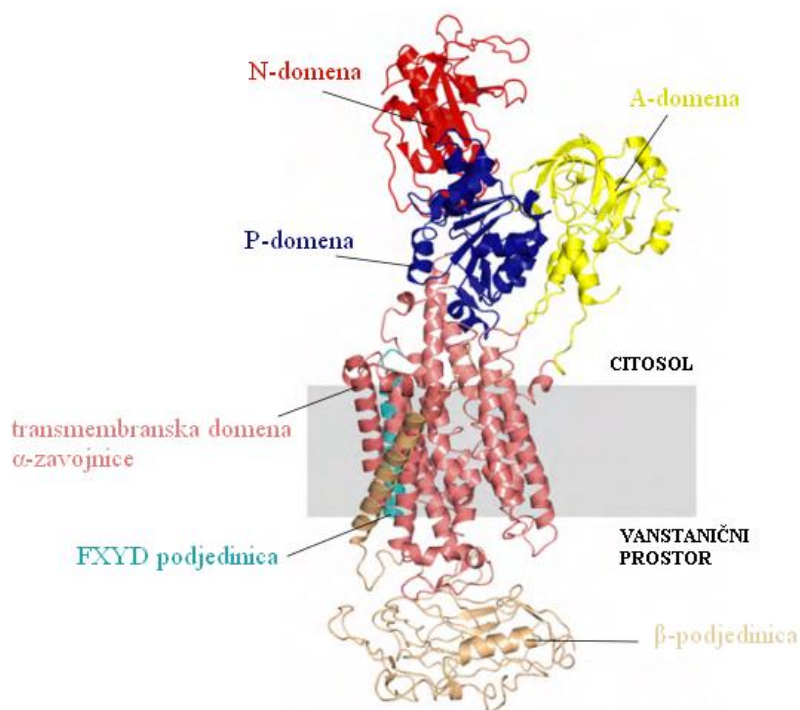
Slika 1. Topološki dijagram tipične  $\alpha$ -podjedinice ATPaze P-tipa s 10 transmembranskih zavojnica (1-10). N-, P- i A-domene naznačene su redom crvenom, plavom i žutom bojom.

Slika je preuzeta i doručena iz izvora 2.

$\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPaza ima još jednu dodatnu podjedinicu  $\beta$ . Ona se sastoji od glikoziliranog izvanstaničnog te transmembranskog dijela koji je usidern blizu C-kraja  $\alpha$ -podjedinice. Uloga  $\beta$ -podjedinice je sudjelovanje u procesu sazrijevanja pumpe, stabilizacija intermedijera u kojem je prisutna okluzija  $\text{K}^+$  i regulacija transporta iona modulacijom aktivnosti  $\alpha$ -podjedinice. Kao ključan faktor utjecaja  $\beta$ -podjedinice na relativnu stabilnost fosforiliranih formi enzima pokazao se kut između  $\beta$ -TM regije i C-kraja  $\alpha$ -podjedinice koji utječe na njihove interakcije.<sup>3</sup> Uz  $\alpha$ - i  $\beta$ -podjedinicu u stukturi  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPaze nalazi se i FXYD protein koji modulira kinetiku  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPaze i njezin afinitet za  $\text{Na}^+$ . U svinjskoj bubrežnoj ATPazi nalazi se FXYD2 protein (jedan od sedam FXYD proteina, naziva se i  $\gamma$ -podjedinicom) koji preko središta svoje

transmembranske domene ostvaruje interakciju s bočnim ogrankom Glu953 u okviru  $\alpha$ -podjedinice. Ta se interakcija pokazala ključnom za funkciju FXYD. Uz Glu953 nalazi se Glu954 koji ima važnu ulogu u stvaranju tri vezna mjesta za vezanje  $\text{Na}^+$ . Vjerojatno je da preko Glu953-Glu954 motiva FXYD podjedinica alosterički utječe na vezanje  $\text{Na}^+$ .<sup>4</sup>

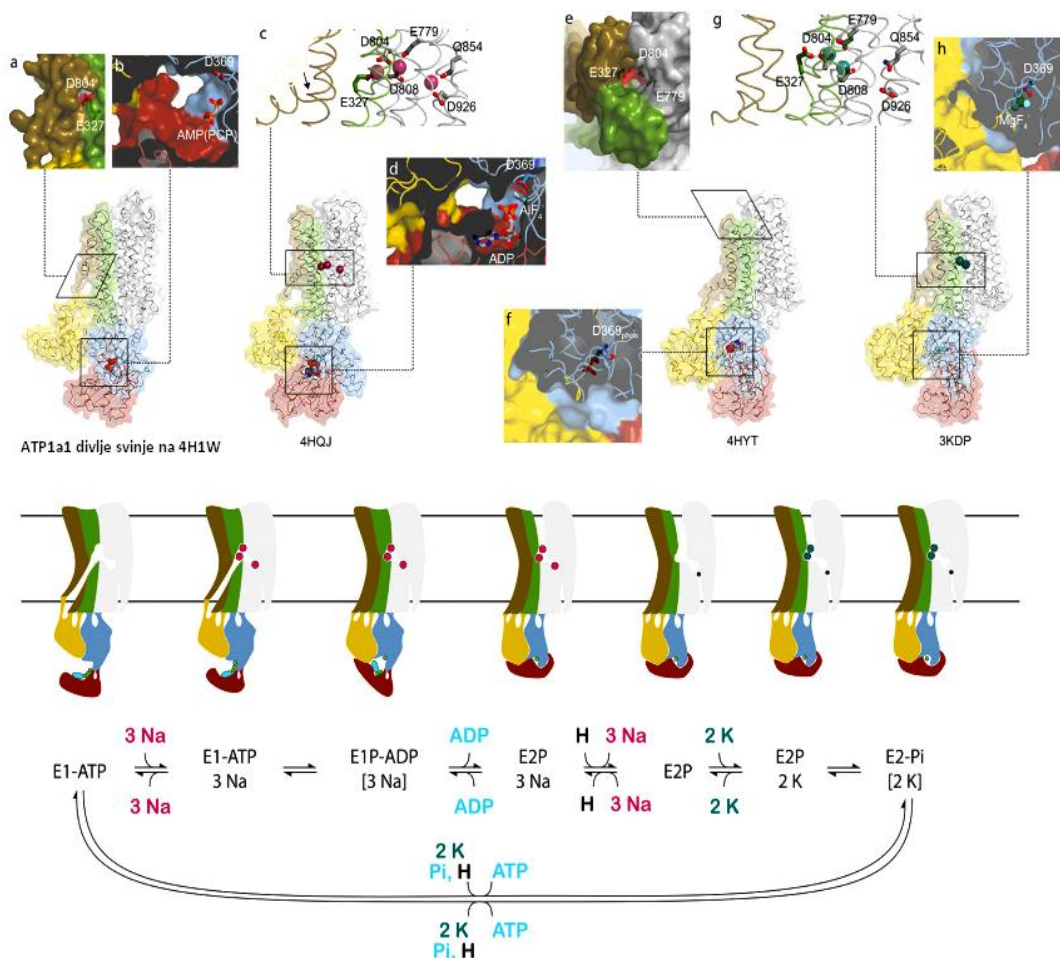
Raznolikost  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPaza posljedica je postojanja  $\alpha$ -podjedinice u četiri izoforme ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  i  $\alpha 4$ ) te  $\beta$ -podjedinice u tri izoforme ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ , i  $\beta 3$ ). Svaka je izoforma  $\alpha$ -podjedinice kodirana različitim genima i eksprimirana ovisno o tkivu. Samo je  $\alpha 1$  eksprimirana u svim tkivima, dok su ostale eksprimirane u nekoliko određenih vrsta tkiva.<sup>5</sup> Izoforme  $\alpha$ -podjedinice međusobno su vrlo slične strukture.  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  i  $\alpha 3$  izoforma dijele cca. 87 % identiteta, a najrazličitija od njih  $\alpha 4$  s  $\alpha 1$  izoformom dijeli 78 % identiteta. Regije polipeptidnog lanca u kojima se razlikuju imaju najveću strukturnu varijabilnost. Razlike u aminokiselinskom slijedu N-kraja  $\alpha$ -polipeptidnog lanca daju izoformnu specifičnost brzine oslobađanja  $\text{K}^+$ . U slučaju  $\alpha 1$  izoforme aminokiselinski slijed N-kraja polipeptidnog lanca sadrži dva mjesta za fosforilaciju protein kinazom C. Prva izvanstanična petlja je mjesto vezanja kardiotonih steroida, a treća citosolna domena sadrži slijed od 11 aminokiselina uključen u izoformno specifičnu regulaciju protein kinazom C.<sup>6</sup>



Slika 2. 3D struktura  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPaze svinje u E2-P konformaciji (PDB ID: 3KDP). Slika je preuzeta i doradana iz izvora 2.

### 1.1.3. Mehanizam djelovanja

Moguća su dva konformacijska oblika  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPaze – defosforilirani E1 (visokog afiniteta za  $\text{Na}^+$  i niskog za  $\text{K}^+$ ) te fosforilirani E2 (visokog afiniteta za  $\text{K}^+$  i niskog za  $\text{Na}^+$ ) između kojih pumpa alternira. N-domena  $\alpha$ -podjedinice prepoznaje i veže ATP preko  $\gamma$ -fosforilne skupine pozicionirajući ga za nukleofilni napad. Slijedi fosforilacija Asp bočnog ogranka P-domene. Fosforilacijom enzim mijenja konformaciju iz E1 u E2 tako da je kationska šupljina sada otvorena prema izvanstaničnom prostoru. Oslobađaju se tri vezana  $\text{Na}^+$  te zamjenjuju protonom i dvama kalijevim ionima za koje enzim u ovom konformacijskom obliku ima visok afinitet. Pozitivan naboj kationa kompenziraju bočni ogranci Asp i Glu u kationskoj šupljini. Po vezanju kationa u kationsku šupljinu zatvara se pumpa i defosforilira Asp P-domene tako što Glu bočni ogranak A-domene pozicionira molekulu vode za hidrolizu i oslobađanje fosforilne skupine. Slijedi vezanje nove molekule ATP, otvaranje kationske šupljine prema citosolnoj strani (E1), oslobađanje dvaju  $\text{K}^+$  iz mjesta I i II te protona iz mjesta III i vezanje  $\text{Na}^+$  za koje se vjeruje da se zbiva klizanjem TM1 zavojnice<sup>7</sup> te ponovno zatvaranje, fosforilacija i ponavljanje ciklusa. U jednom se ciklusu van stanice prenesu tri  $\text{Na}^+$  i unesu dva  $\text{K}^+$ .

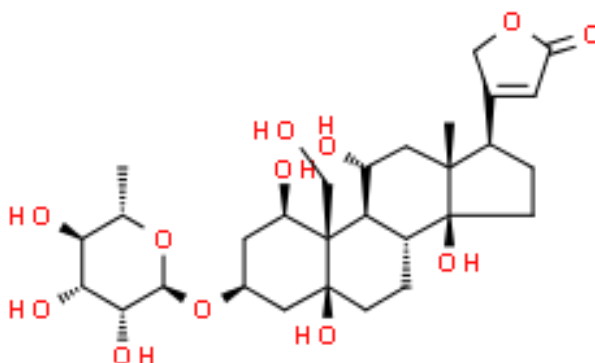


Slika 3. Shematski prikaz konformacijskih promjena i reakcija unutar jednog katalitičkog ciklusa  $Na^+K^+$  ATPaze (dolje) koji prate naglasci ključnih strukturnih promjena (gore, a-h)

**a** Homologni model ATPaze divlje svinje na SERCA pumpi u E1 stanju (PDB ID: 4H1W) pruža prikaz konformacije u kojoj je kationska šupljina s Asp804 i Glu327 otvorena prema citosolnoj strani. **b** Nehidrolizirajući analog ATP AMPPCP prikazuje pozicioniranje  $\beta$ - i  $\gamma$ -fosfata za reakciju s Asp369. (PDB ID: 4H1W) **c, d** Pomicanje zavojnice TM1 nakon vezanja triju  $Na^+$ , zatvaranje citoplazmatskog otvora do kationske šupljine, stezanje citoplazmatskih domena oko ATP za reakciju s Asp369. (PDB ID: 4HQJ) **e** ADP se otpušta nakon okluzije  $Na^+$  te ioni izlaze kroz otvoreni prolaz u izvanstanični prostor. Vidljivi su ogranci za vezanje iona: Asp804, Glu327 i Glu779 prikazani na slici strukture enzima s vezanim ouabainom (PDB ID: 4HYT) bez prikaza inhibitora. **f** Unutarstanične domene su potpuno omotane oko fosforiliranog Asp369 (PDB ID: 4HYT) **g** Vežu se dva  $K^+$ . (PDB ID: 3KDP) **h** Zatvara se prolaz prema izvanstaničnom prostoru i defosforilira Asp369. (PDB ID: 3KDP) Slika je preuzeta i dorađena iz izvora 7.

## 1.2. Ouabain

Ouabain  $C_{29}H_{44}O_{12}$  je steroidni hormon koji je po strukturi polihidroksilirani  $\alpha$ -L-ramnozil kardenolid (slika 4.). Kardenolidi imaju steroidnu jezgru i peteročlani laktonski prsten. Ouabain je poznat i pod nazivima G-strofantin te  $(1\beta,3\beta,5\beta,11\alpha)$ -3-[(6-deoksi- $\alpha$ -L-manopiranozil)oksi]-1,5,11,14,19-pentahidroksikard-20(22)-enolid (IUPAC).



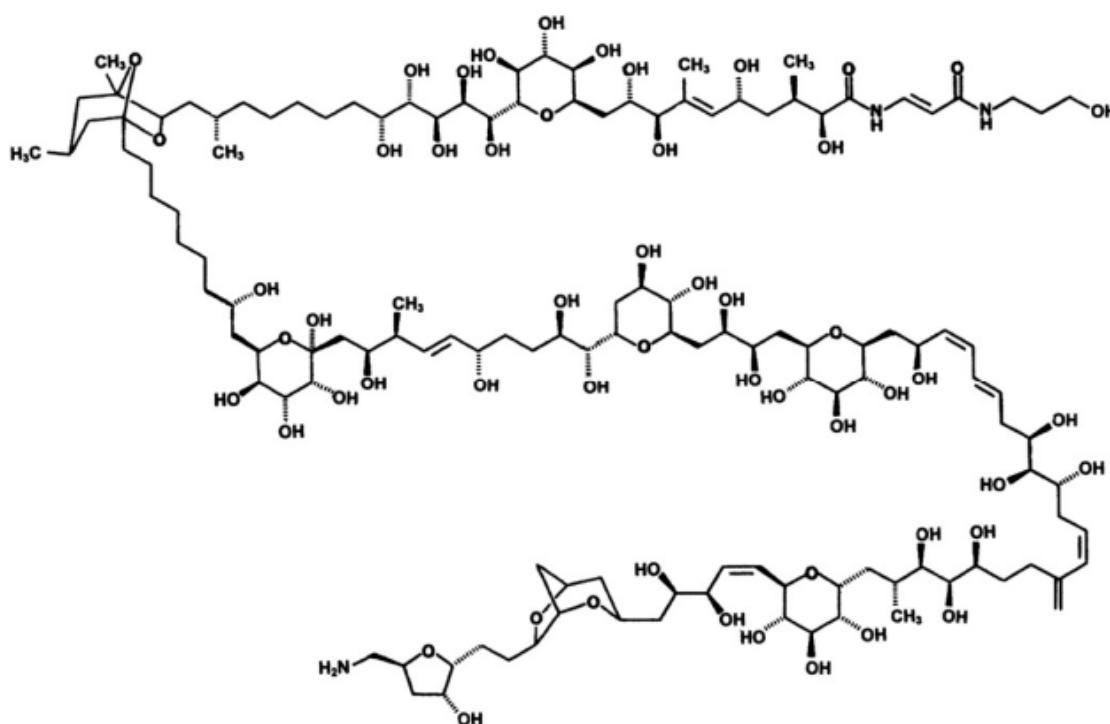
Slika 4. Kemijska struktura ouabaina. Slika je preuzeta s web stranice chemspider.com (ChemSpider ID: 388599)

Izoliran je iz biljaka *Strophanthus gratus*, *Acocanthera ouabaio* i roda *Digitalis*, a prvi je to učinio i identificirao ga francuski kemičar Leon-Albert Arnaud 1888. godine. Korišten je kao otrov na strelicama, odakle potječe i ime ouabain, koje su koristili afrički lovci (somalski *wabayo*: otrov). Toksičnost ovog srčanog glikozida posljedica je inhibicijskog djelovanja na  $Na^+K^+$  ATPazu. 1991. godine identificiran je endogeni ouabain kojeg sintetiziraju hipotalamus, hipofiza i nadbubrežne žlijezde te ga je bilo nemoguće strukturno, biološki i imunološki razlikovati od onog izoliranog iz biljaka.<sup>8</sup> Osim što je toksičan ouabain je danas farmakološki istraživan kao potencijalni lijek za ventrikularnu insuficijenciju, srčani udar te kao muško kontracepcijsko sredstvo.<sup>9</sup> Uz  $Na^+K^+$  ATPazu ligand je i za ljudski KLF5 (*Kruppel-like factor 5*), eksportnu pumpu žučne soli (BSEP) te transkripcijske faktore STAT1 i STAT3.<sup>10</sup>



### 1.3. Palitoksin

Palitoksin  $C_{129}H_{223}N_3O_{54}$  (PTX) jedan je od najvećih i najkompleksnijih poznatih prirodnih spojeva ( $M_r = 2680,139$  Da) (slika 5.). Kemijska struktura PTX ne sadrži ponavljajuće jedinice što rezultira velikim brojem kiralnih centara, a PTX ih ima čak 64. Ipak, apsolutna stereokemija PTX je određena analizom  $^1H$  NMR i  $^{13}C$  NMR spektara produkata razgradnje palitoksina izoliranog iz nekoliko *Palythoa* vrsta dobivenih raznim metodama, primjerice ozonolizom *N*-(*p*-bromo-benzoil)palitoksina<sup>11,12</sup>.



Slika 5. Kemijska struktura palitoksina. Slika je preuzeta iz izvora 15.

PTX je prvotno izoliran iz morskih organizama koralja roda *Palythoa*, a otkrile su ga istovremeno tri skupine u *P. caribeaorum* i *P. mammilosa* na Jamajci i Bahamima, u *P. tuberculosa* na Okinawi i u *P. toxica* na Havajima. Osim u organizmima roda *Palythoa* PTX i njegovi analozi prisutni su u sastavu mnoštva morskih organizama: korastih moruzgvi, svijetlećih bičša, algi, mnogočetinaša, rakova i riba. 1989. godine laboratorijski je sintetizirana palitoksin karboksilna kiselina fiziološke aktivnosti vrlo slične samom palitoksinu.<sup>13</sup>

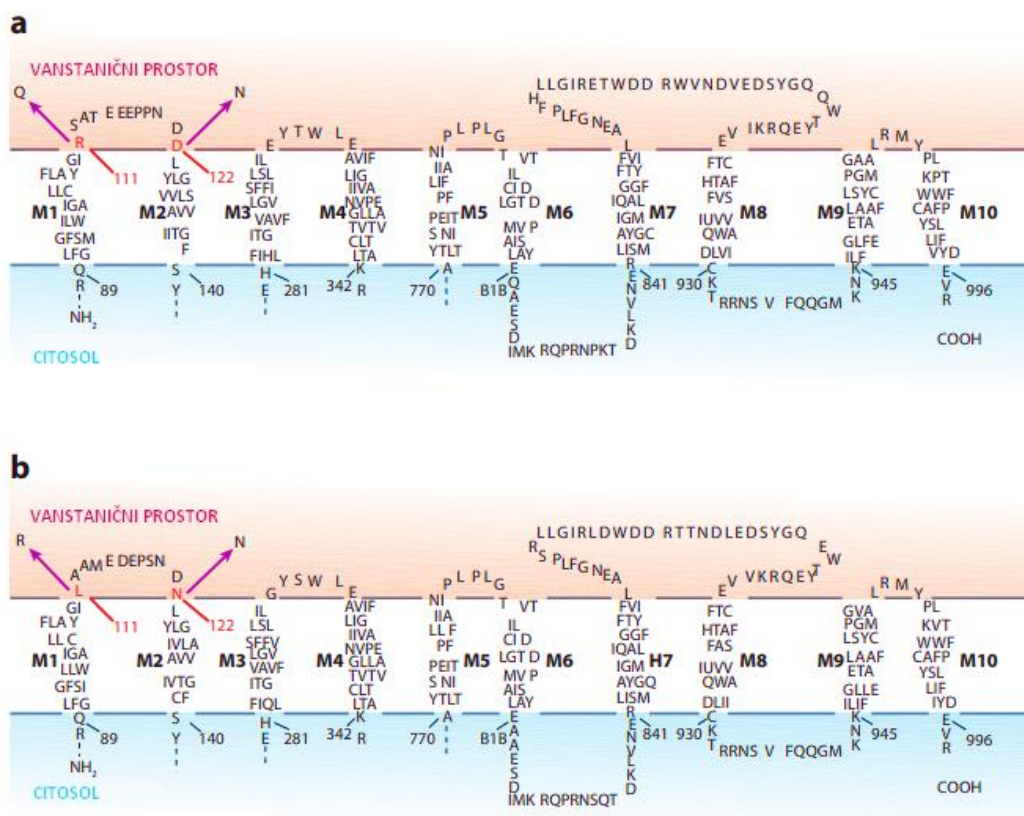
PTX je jedan od najmoćnijih morskih toksina. Djeluje tako da prepoznaje i veže se na  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPazu te ju pretvara u nespecifični kanal za monovalentne katione sprječavanjem zatvaranja vanjskog otvora pumpe ili poremetnjom usklađenosti otvaranja i zatvaranja dvaju otvora pumpe što rezultira nizom po život opasnih učinaka. O tome svjedoči podatak da je  $\text{LD}_{50}$  za zečeve svega 25 ng/kg, a za miševe 50 ng/kg. Budući da je PTX jedan od glavnih uzročnika ciguatera trovanja ribom, bitno je moći ga brzo detektirati i kvantificirati u uzorku hrane. Osim ciguatera trovanja trovanja opasnost predstavlja i kao jedan od uzročnika trovanja cvjetanjem roda *Ostreopsis* koje je zabilježeno duž talijanske obale 2005. godine. PTX i njegov analog ovatoksin zabilježeni su kao produkti cvjetanja roda *Ostreopsis* i u Jadranskom moru na rovinjskoj obali 2010. godine.<sup>14</sup> Trovanje palitoksinom uzrokuje niz farmakoloških učinaka, primjerice oslobađanje neurotransmitera, kontrakciju skeletnih i srčanog mišića te depolarizaciju ekscitabilnog tkiva.<sup>15</sup> Budući da su fiktoksini palitoksin i njegov analog ovatoksin nastali cvjetanjem algi te ciguatera trovanje ribom prijetnja za javno zdravlje, 1983. godine objavljena je uhodana, pojednostavljena metoda izolacije PTX iz *Palythoa caribaeorum* u istraživačke svrhe.<sup>16</sup>

## § 2. OUABAIN

### 2.1. Vezno mjesto ouabaina na Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPazu

Vezno mjesto ouabaina na Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPazi evolucijski je vrlo očuvano kod više organizama: *Drosophila*, žaba, glodavaca, ovaca, zamoraca, patuljastih marmozeta i ljudi. Taj podatak svjedoči o važnosti fiziološkog utjecaja ouabaina. Kod nekih su organizama koji konzumiraju biljke bogate kardiotonim steroidima vezna mjesta evolucijski izmijenjena što je rezultiralo Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPazom neosjetljivom na ouabain. Primjeri takvih organizama su zlatice i leptir monarh kod kojih je došlo do zamjene Asn122His u  $\alpha$ -podjedinici. Upravo položaj 122 skupa s položajem 111 na izvanstaničnoj strani pumpe pokazao se ključnim za objašnjavanje relativne neosjetljivosti  $\alpha 1$  izoforme Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPaze na ouabain kod miševa i štakora, dok su preostale izoforme:  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  i  $\alpha 4$  osjetljive na toksin. Kod izoformi osjetljivih na ouabain na tim se položajima nalaze aminokiseline nenabijenih bočnih ogranaka, dok se kod neosjetljivih nalaze aminokiseline nabijenih bočnih ogranaka. Primjerice kod miševa u  $\alpha 1$  izoformi neosjetljivoj na ouabain nalaze se Arg111 i Asp122, a u  $\alpha 2$  izoformi osjetljivoj na ouabain Leu111 i Asn122. Supstitucijom aminokiselina nenabijenih bočnih ogranaka s aminokiselinama nabijenih bočnih ogranaka na položajima 111 i 122 kod  $\alpha 2$  izoforme dobivena je relativna neosjetljivost Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPaze na ouabain. Obrnuto je moguće učiniti i za  $\alpha 1$  izoformu te je rezultat Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPaza osjetljiva na ouabain (slika 6.). Učinjeni su pokusi na pumpama s izoformom  $\alpha 2$  izmijenjene osjetljivosti tako što je miševima davan adrenokortikotropni hormon (ACTH) koji kod miševa s pumpama neizmijenjenih osjetljivosti uzrokuje ACTH induciranu hipertenziju. Hipertenzija se nije pojavila te se došlo do zaključka da ona ovisi o prisutnosti ouabain-osjetljive  $\alpha 2$  izoforme Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPaze, a time i da vezno mjesto ouabaina ima fiziološku ulogu. Slični primjeri koji navode na isti zaključak o fiziološkoj ulozi veznog mjesta ouabaina su sljedeći pokusi. Tijekom trudnoće kod miševa i ljudi zabilježen je sniženi krvni tlak. Kod miševa s  $\alpha 2$  izoformom neosjetljivom na ouabain krvni tlak je niži u prvom i trećem tromjesječju u odnosu na miševe s regularnom ouabain osjetljivom  $\alpha 2$  izoformom. Budući da endogeni ligand sličan ouabainu ne može ostvariti interakciju s pumpom, ne aktivira se Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> izmjenjivač, membranski protein s ulogom antiporterskog prenositelja iona i ne povećava se vaskularna kontraktilnost koja bi se protivila snižavanju krvnog tlaka. Osim o fiziološkoj ulozi veznog mjesta, navedeni eksperimenti govore i o postojanju endogenog liganda koji se na pumpu veže na vezno mjesto

ouabaina.<sup>5</sup> Endogeni ouabain kod sisavaca igra ulogu u modulaciji krvnog tlaka tako što cilja tkiva srca, krvnih žila i bubrega. Antagonist ouabaina 17 $\beta$ -(-3-furil)-5 $\beta$ -androstan-3 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ -triol (PST 2238) ima antihipertenzijsko djelovanje<sup>16</sup> što je u skladu s pretpostavkom da endogeni ouabain onesposobljavanjem Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPaze povećava vaskularnu kontraktilnost, a time i povisuje krvni tlak.



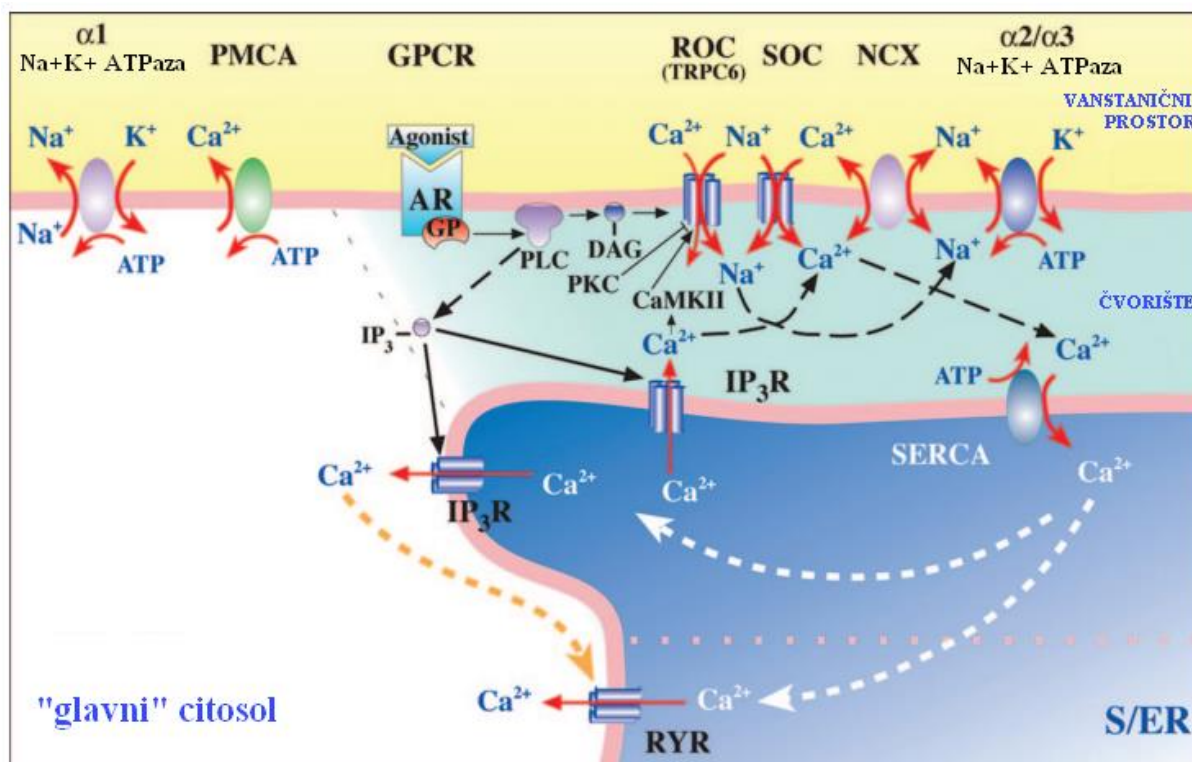
Slika 6. Aminokiselinski slijed  $\alpha 1$  (a) i  $\alpha 2$  (b) izoforme Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPaze miša. Crvenim slovima su označene aminokiseline odgovorne za relativnu osjetljivost odnosno neosjetljivost pumpe na ouabain, a ljubičastom strelicom i crnim slovima supstitucija kojom se mijenja osjetljivost izoforme na ouabain. Slika je preuzeta i dorađena iz izvora 5.

## 2.2. Mehanizam djelovanja toksina ouabaina

Ouabain inhibira  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPazu tako što vezanjem „zaključava“ enzim u konformaciju sličnu E2 konformaciji.<sup>17</sup> Djelovanje ouabaina na  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPazu je dvojako – ono inhibira aktivni transport iona preko membrane, ali i aktivira receptorsku ulogu pumpe pokrećući kaskadu prijenosa signala.

Ovisno o izoformi  $\alpha$ -podjedinice  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPaze, vezanje ouabaina na pumpu pokreće različite puteve prijenosa signala. U slučaju  $\alpha 2$  i  $\alpha 3$  izoforme pumpa se nalazi u mikrodomeni stanične membrane skupa s njoj prostorno bliskim  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$  izmjenjivačem (NCX, engl.  *$\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$  exchanger*). U blizini mikrodomene gdje su lokalizirani, nalazi se endoplazmatski retikulum (ER), a sve se skupa kao funkcionalna jedinica naziva PLazmaERosom. Pokretanje kaskade prijenosa signala u toj jedinici ovisi o unutarstaničnoj koncentraciji  $\text{Ca}^{2+}$ . N-kraj  $\alpha$ -podjedinice  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPaze smješten je na čvorištu ER i stanične membrane odakle spregom s NCX i SERCA regulira homeostazu  $\text{Ca}^{2+}$ . Vezanje ouabaina inducira lokalne promjene koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  koje zatim pokreću  $\text{Ca}^{2+}$ -ovisnu signalizaciju. Volumen citosola u čvorištu stanične membrane i ER je reda veličine  $10^{-19}$ - $10^{-18}$  L što omogućava lokalizaciju koncentracijskog gradijenta  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  u čvorišnom citosolu i citosolu van čvorišta.<sup>18</sup> Budući da je i mala promjena koncentracije  $\text{Na}^+$  osjetna u lokaliziranom dijelu stanice, mala je količina endogenog ouabaina potrebna za pokretanje kaskade prijenosa signala. Citoskeletni protein ankirin-B stabilizira  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPazu u signalnoj mikrodomeni<sup>19</sup> te osigurava komunikaciju inozitol-trifosfat receptora (IP3R), SERCA i NCX.<sup>6</sup> Promjena unutarstanične koncentracije  $\text{Na}^+$  nastala kao posljedica vezanja ouabaina na  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPazu pokreće NCX za unos  $\text{Ca}^{2+}$  u stanicu.  $\text{Ca}^{2+}$  može prelaziti kroz membranu i kanalima ROC i SOC (engl. *receptor/store operated channel*) sastavljenih od kation-selektivnih TRP (engl. *transient receptor potential*) kanala kao što je TRPC6. Receptori spregnuti s G proteinima (GPCR) također su dio PLazmaERosoma. Izmjenom vezanog GDP s GTP otpušta se G protein i stimulira fosfolipaza C (PLC) koja zatim proizvodi diacilglicerol (DAG) i inozitol-1,4,5-trifosfat (IP3) hidrolizom fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfata (PIP2). Vezanjem IP3 na IP3 receptor smješten u membrani sarko/endoplazmatskog retikuluma aktivira se  $\text{Ca}^{2+}$  kanal unutar samog receptora i otpušta  $\text{Ca}^{2+}$  u citosol. Osim transportom putem IP3R i SERCA,  $\text{Ca}^{2+}$  se preko membrane sarko/endoplazmatskog retikuluma izmješta i pomoću rianodin receptora (RYR). DAG aktivira ROC (engl. *receptor operated channel*) što rezultira povećanjem lokalne koncentracije  $\text{Na}^+$ , a time i povećanjem unosa  $\text{Ca}^{2+}$  u stanicu putem NCX.  $\text{Ca}^{2+}$  u citosolu i DAG u staničnoj

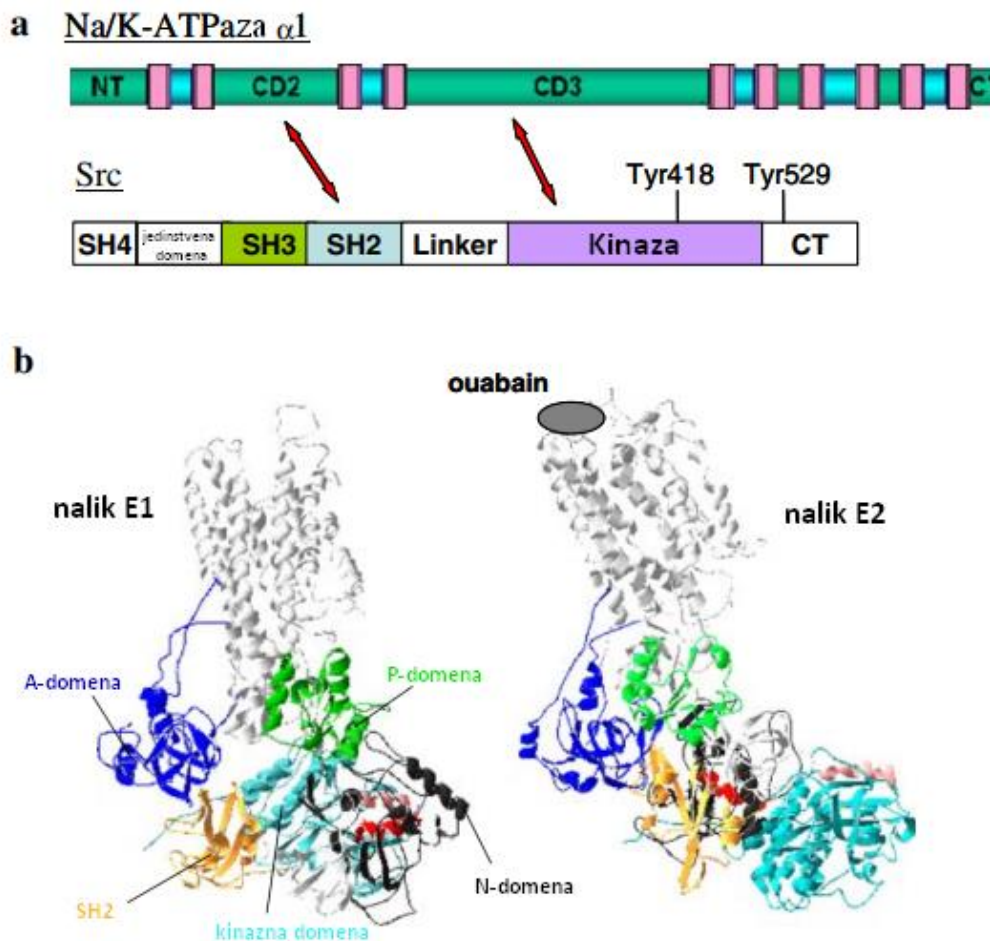
membrani aktiviraju protein kinazu C (PKC) na površini stanične membrane koja može fosforilirati stanične proteine i tako inducirati daljnje odgovore na podržaj.  $\text{Ca}^{2+}$  kalmodulin ovisna protein-kinaza II (CaMK II) djeluje preko kalmodulina osjetljivog na koncentraciju  $\text{Ca}^{2+}$  kao aktivator ROC. CaMK II i DAG su aktivatori ROC, a PKC inaktivator (slika 7.).<sup>20</sup>



Slika 7. Shematski prikaz prijenosa signala u PLazmaERosomu (desno, plavo) uspoređen s ostalim dijelovima stanice van mikrodomene (lijevo, bijelo) u kojima se  $\text{Ca}^{2+}$  preko stanične membrane prenosi  $\text{Ca}^{2+}$  ATPazom (PMCA). Slika je preuzeta i dorađena iz izvora 20.

U slučaju  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPaze s  $\alpha 1$  izoformom  $\alpha$ -podjedinice, pumpa se nalazi u signalosomu gdje je smještena skupa s drugim proteinima te o njihovim interakcijama ovisi prijenos signala.  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPaza u kaveolama ostvaruje interakciju sa Src (Schmidt-Ruyspin A-2 viralni onkogen homolog avian) preko dva moguća vezna mjesta – SH2 domena Src veže se na drugu citosolnu petlju (CD2)  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPaze koja povezuje zavojnice TM2 s TM3 i sadrži A-domenu podjedinice. Kinazna domena Src se pak veže na pumpu preko njene N-domene sadržane u trećoj citosolnoj petlji (CD3)  $\alpha$ -podjedinice.<sup>19</sup> Interakcija kinazne domene Src s N-domenom pumpe inhibira Src. Vezanjem ouabaina na  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPazu mijenja se konformacija iz E1 u E2

i oslobađa se kinazna domena Src (slika 8.b). Na taj se način aktivira Src. Dakle,  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPaza vezana na Src ponaša se kao receptor.<sup>17</sup>



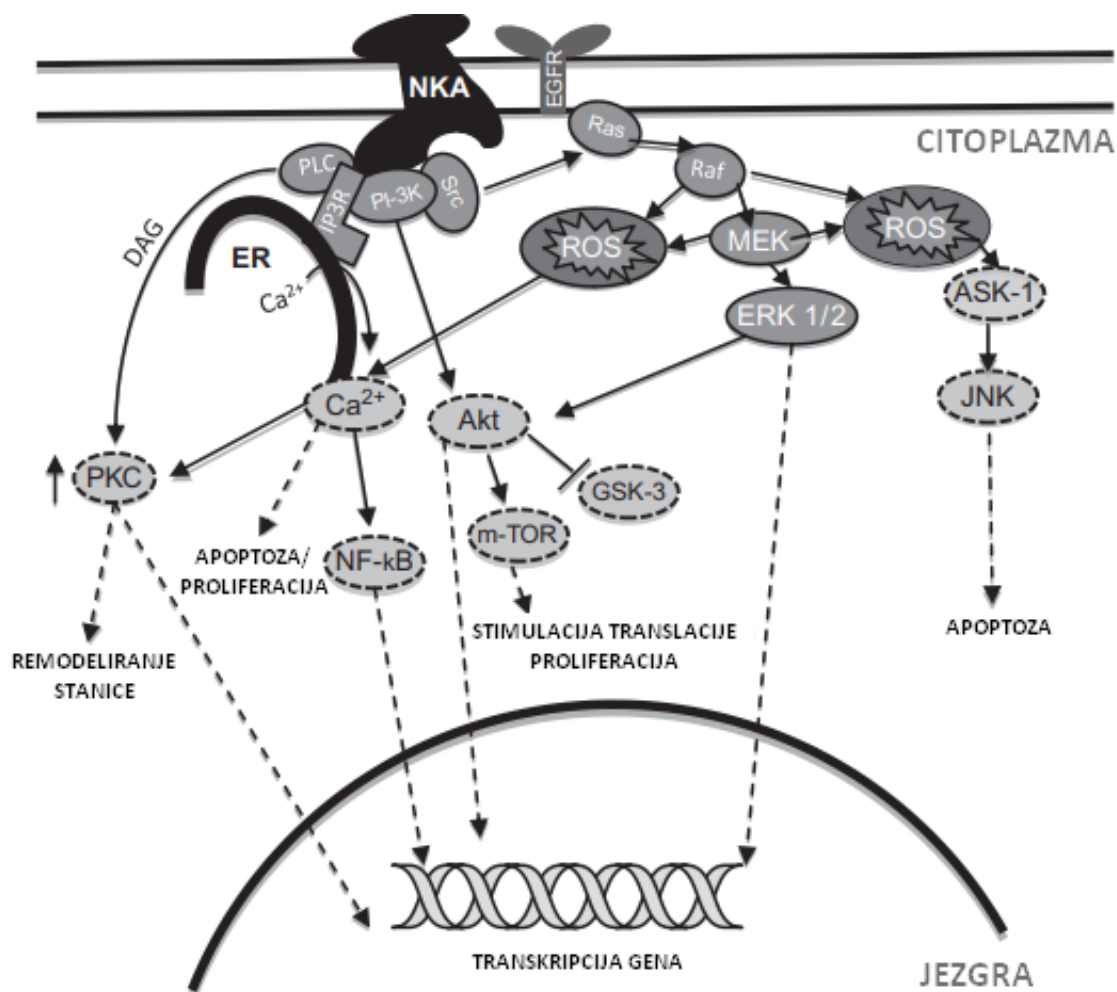
Slika 8. Shematski (a) i strukturni (b) prikaz interakcije  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPaze i Src. **a** Strelicama su označene domene  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPaze i Src koje ostvaruju interakcije **b** Modeli struktura dviju konformacija  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPaze temeljeni na strukturama SERCA1a (PDB ID: 1SU4 i 1IWO)

Slika je preuzeta i doradena iz izvora 17.

Aktivirana Src kinaza fosforilira receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR) te ga na taj način transaktivira. Sch, adaptorski proteina čija je uloga regrutacija signalnih molekula, prima se zatim na kompleks i pokreće se Ras/Raf/MEK/ERK kaskada prijenosa signala (kaskada MAP kinaza). ERK ulazi u jezgru gdje fosforilacijom aktivira nekoliko transkripcijskih faktora (STAT1/3, c-fos, CREB, Elk-1) koji zatim stimuliraju transkripciju gena. MAPK kaskadom nastaju reaktivne kisikove vrste u stanici (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS), modulatori

redoks puteva prijenosa signala povezani s raznim bolestima i štetnim učincima na stanicu i organizam u cjelini. Djelujući na ASK-1 (kinaza regulacije signala apoptoze) reaktivne kisikove vrste sudjeluju u apoptozi stanice. Drugi mogući put prijenosa signala je putem aktivacije fosfoinozimid-3-kinaze (PI-3K). Na temelju zapažanja u srčanim miocitima, postavljena je hipoteza da interakcijom  $\alpha$ -podjedinice  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPaze s p58 podjedinicom PI-3K klase IA pumpa regrutira kinazu na staničnu membranu. Na taj se način PI-3K aktivira nakon što se na pumpu veže ouabain. Češće se PI-3K klase IA aktivira pomoću receptora faktora rasta s fosforiliranim Tyr bočnim ogrankom koji PI-3K regrutiraju na staničnu membranu. Djelovanjem PI-3K nastaje PIP3 koji regrutira Akt protein, a on se dalje aktivira fosforilacijom. Aktivirani Akt protein, poznat i kao protein kinaza B, regulira funkciju proteina uključenih u proliferaciju npr. aktivira mTOR (meta rapamicina u sisavaca, zadužen za regulaciju inicijacije translacije i biogeneze ribosoma) te inaktivira GSK3 (kinaza glikogen sintaze 3) koja je sudionik u apoptozi i metabolizmu glukoze. Osim o PI-3K, fosforilacija Akt može biti ovisna i o MAPK kaskadi zajedno s PI-3K. Djelovanjem PLC stvara se DAG u citosolu koji kao i povećana koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$  stimulira PKC. Rezultat aktivnosti PKC je aktivacija transkripcije gena, remodeliranja stanice te kontrakcija mišića. Promjena koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  u stanici kao rezultat vezanja ouabaina na  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPazu važna je stavka u prijenosu signala. Pokazano je da koncentracija ouabaina koja uzrokuje oscilacije u unutarstaničnoj koncentraciji  $\text{Ca}^{2+}$  ne utječe na unutarstaničnu koncentraciju  $\text{Na}^+$ , stoga je predloženo da je N-kraj  $\alpha 1$  izoforme sposoban vezati se na IP3R, a CD3  $\alpha 1$ -podjedinice ostvaruje interakciju s PLC.  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPaza u tom slučaju interagira s PLC za enzimsku katalizu reakcije hidrolize PIP2 u IP3 i DAG u fosfolipidnom dvosloju. Na taj se način osigurava efikasan prijenos signala. Vezanjem ouabaina na  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPazu moguća je modulacija stanične funkcije aktivacijom samo određenih puteva prijenosa signala. IP3R veže molekule IP3 nastale djelovanjem PLC aktivirane Src-ovisnom fosforilacijom i otpušta  $\text{Ca}^{2+}$  iz ER. Otpušteni  $\text{Ca}^{2+}$  zatim aktivira transkripcijski faktor NF- $\kappa$ B (engl. *nuclear factor-kappa B*) anti-apoptozne uloge. U miocitima svinje te stanicama bubrega oposuma i svinje aktivirani su Src, MAPK i PI-3K putevi prijenosa signala, dok su u ljudskim stanicama raka dojke i prostate aktivirani samo Src i MAPK putevi. Citoskeletni protein ankirin B može vezati IP3R smješten u membrani ER na  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPazu i tako sudjelovati u dodatnom putu prijenosa signala čija se prisutnost može objasniti činjenicom da se ankirini eksprimiraju specifično za tip stanice. Put prijenosa signala induciran ouabainom ovisi i o koncentraciji ouabaina.<sup>19</sup>





Slika 9. Shematski prikaz prijenosa signala u signalosomu. NKA, Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPaza; JNK, c-Jun N-kraj kinaza. Slika je preuzeta i doradena iz izvora 19.

Ouabain u neuronima uzrokuje porast [Ca<sup>2+</sup>], pad pH vrijednosti unutar stanice te depolarizaciju membrane.<sup>21</sup>

### 2.3. Uloga ouabaina u fiziološkim i patološkim procesima

Evolucijska očuvanost veznog mjesta ouabaina na Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPazu i otkriće endogenog ouabaina svjedoče o važnosti ovog kardiotonog steroida primarno u fiziološkim procesima. Primarnu ulogu ima u modulaciji krvnog tlaka i održavanju homeostaze tjelesnih elektrolita. Postavljena je hipoteza da ouabain djeluje kao natriuretički hormon u pojedinim uvjetima. Natriureza je pojačano izlučivanje Na<sup>+</sup> u urinu. Ipak, neka istraživanja ne pokazuju jasno natriuretički efekt. U jednom je istraživanju primjerice pokazano da osim što je koncentracija ouabaina povišena kod povećanog unosa soli prehranom, ona je povišena i prilikom trošenja

Na<sup>+</sup>. U slučaju ozljede endogeni ouabain sudjeluje u važnom procesu rasta stanica aktivacijom signalnih puteva koji dovode do rasta i diferencijacije stanica, a kod stanica raka dovodi do apoptoze. Pokazano je da je aktivacija renin-angiotenzinskog sustava ovisna o endogenom ouabainu, a iz toga slijedi da je ouabain važan faktor regulacije krvnog tlaka. Istraživanjem efekta ouabaina na pumpu  $\alpha 2$  podjedinice neosjetljive na ouabain pokazano je i da su kardiotoni steroidi sudionici u specifičnim tipovima učenja i modulaciji ponašanja lokomotora posredovanog dopaminom.

Putevi prijenosa signala aktivirani ouabainom povezani su s nekim patološkim procesima. Podržaji stresa, unosa soli i tjelovježbe stimuliraju lučenje endogenog moždanog ouabaina što zatim aktivira simpatički sustav. Posljedično dolazi do vazokonstrukcije kontrakcijom vaskularnog mišićnog tkiva, povišenja krvnog tlaka (hipertenzije) i promjena u izmjeni Na<sup>+</sup> bubrežima. Iako mehanizam nije poznat, pokazano je da u bubrežima kontrola homeostaze elektrolita utječe na pojavu i održavanje hipertenzije. Promjene u sastavu signalosoma kao što je genetička varijacija citoskeletnih proteina ili pak u generiranju sekundarnih glasnika mogu ugroziti put prijenosa signala induciranog vezanjem ouabaina i rezultirati povećanom aktivnošću Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPaze. Indukcija apoptoze stanica raka još je jedan od učinaka ouabaina. Mehanizmi uključeni u inhibiciju proliferacije stanica raka ouabainom su: povećanje koncentracije ROS u stanici, selektivna aktivacija PKC i modulacija adhezijskih molekula. Postoje indicacije da endogeni kardiotoni steroidi imaju ulogu u stanjima EPH gestoze, depresije, dijabetesa, ovisnosti o etanolu i abnormalnog ponašanja.<sup>19</sup>

#### **2.4. Primjena ouabaina**

Ouabain je jedinstveni srčani glikozid zbog profilaktičke i terapijske upotrebe kod niza srčanih bolesti: srčane astme, koronarne skleroze, kongestivnog zatajenja srca bez izražene hipertrofije te zatajenja srca induciranog tjelesnom aktivnošću, kardiogene hipertenzije, insuficijencije lijeve komore, angine pectoris i aritmije. Koristi se kao protuotrov kod trovanja digitalisom djelujući na digitalisom prouzročenu aritmiju i abnormalnosti u elektrokardiogramu (EKG). Djelovanjem se razlikuje od strukturno mu sličnih derivata digitalisa, digitoksina i digoksina. Za razliku od navedenih derivata digitalisa, za ouabain nije nužan ulazak u stanicu kako bi djelovao na nju, već u izvanstaničnom prostoru ouabain ostvaruje svoj učinak koji je trenutni i postiže svoj maksimum 5 minuta nakon intravenske injekcije te traje 5-7 sati. Početak djelovanja digoksina sporiji je, bilježi se 5-30 minuta nakon intravenske injekcije, a maksimalni

učinak postiže u rasponu 1-4 sata nakon injekcije. Navedene razlike u farmakokinetici srčanih glikozida objašnjavaju njihove različite učinke na srce kao posljedicu različitih njima pripadnih receptora. Ouabain je stimulans miokardijalnog metabolizma. Kod srčanih bolesnika ouabain smanjuje koncentraciju mliječne kiseline u krvi povećavajući iskoristivost iste te stimulira iskoristivost masnih kiselina u srčanom mišiću, stoga je nazivan „srčanim inzulinom“. Digitoksin čini suprotno, djeluje inhibicijski na iskoristivost mliječne kiseline i masnih kiselina. Stimulacija sinteze proteina u srčanom mišiću također je jedan od efekata ouabaina. Pokazano je da kod muških štakora povećava omjer acetyl koenzim A/koenzim A u srčanom mišiću. Ouabain pojačava stimulaciju metabolizma acetilkolinom te inhibira adrenalinom induciranu povećanu potrošnju kisika. Kod zečeva i štakora zakiseljavanje miokardijalnog prostora pokreće niz reakcija koje u infarktu dovode do stanične smrti. Ouabain povećava pH vrijednost u miokardijalnom tkivu u nekoliko minuta za 0,5 pH jedinica. Povećavanjem plastičnosti eritrocita utječe na reološka svojstva krvi. Jedan od učinaka ouabaina je i poboljšana tjelesna izdržljivost. Kliničko iskustvo pokazatelj je jedinstvenosti i učinkovitosti ovog srčanog glikozida.<sup>22</sup> Potencijalnu primjenu ouabain bi uskoro mogao naći u muškoj kontracepciji. Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPaza s  $\alpha 4$  izoformom podjedinice membranski je protein eksprimiran u testisima ključan za kapacitaciju spermija. Inhibicijom pumpe ouabainom mogla bi se postići neplodnost muškarca uz minimalne nuspojave.<sup>23</sup>

Inhibicijsko djelovanje ouabaina na Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPazu čini ga korisnim alatom za istraživanje pumpe. Primjenu nalazi u istraživanju procesa u kojima Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPaza igra ulogu. Primjerice, ouabain u stanicama hipokampusa inducira depolarizaciju i nagle promjene koncentracije K<sup>+</sup> u izvanstaničnom prostoru što su glavne odlike šireće depresije koja je povezivana s migrenama s aurom. Na taj se način istražuje uloga Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPaze u kortikalnoj širećoj depresiji – valu depolarizacije kortikalnih neurona i glija stanica.

## § 3. PALITOKSIN

### 3.1. Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPaza kao ciljna struktura palitoksina

Do zaključaka o veznom mjestu palitoksina (PTX) u membrani došlo je istraživanjem na eritrocitima sisavaca usprkos tome što su učinci toksina prvo uočeni na ekscitabilnim stanicama. Djelovanjem palitoksina na eritrocite očekivana je bila hemoliza koja je nastupila zakašnjelo (tek nakon nekoliko sati), dok je u roku nekoliko minuta od administracije palitoksina došlo do istjecanja K<sup>+</sup> iz stanice. Također je uočeno da osjetljivost eritrocita na PTX ovisi o unutarstaničnim koncentracijama Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup>. U ljudskim eritrocitima te eritrocitima glodavaca koji imaju veću koncentraciju K<sup>+</sup> u citosolu pri nižim je dozama palitoksina postignuta središnja djelotvorna doza ED<sub>50</sub>, doza pri kojoj lijek ostvaruje jedan od dvaju unaprijed definiranih, a međusobno isključivih učinaka u 50 % pokusnih životinja, nego u eritrocitima ovaca i stoke s većom koncentracijom Na<sup>+</sup> u citosolu. Na temelju tog opažanja o ovisnosti učinka palitoksina o osmolarnosti medija predložena je hipoteza o djelovanju palitoksina na Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPazu.<sup>25</sup>

Provedeni su eksperimenti sa srčanim glikozidom ouabainom, inhibitorom Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPaze na način da su se eritrociti preinkubirali s ouabainom dovoljno dugo, a zatim je dodan PTX. Ouabain se pokazao kao antagonist palitoksina što je jasno pokazalo da je mjesto djelovanja upravo Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPaza. Budući da su rezultati eksperimenata varirali ovisno o vremenu djelovanja antagonista ouabaina prije dodatka palitoksina bilo je potrebno dizajnirati eksperimente koji će potvrditi hipotezu bez korištenja tog inhibitora Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPaze. Primjer je obilježavanje palitoksina radioizotopom <sup>125</sup>I čime se pokazalo da se toksin veže na Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPazu. Tome je u prilog išao neuspjeh nimodipina, blokatora kalcijevih kanala, da antagonizira depolarizaciju membrane te neuspjeh apamina i 4-aminopiridina, blokatora natrijevih kanala, da antagoniziraju istjecanje K<sup>+</sup> iz citosola uzrokovanog palitoksinom. Jedan od glavnih dokaza da se PTX veže i djeluje na Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPazu bilo je istraživanje provedeno uz pomoć stanica kvasca. One, nalik stanicama bakterija, biljaka i gljivica, osmolarnost održavaju pomoću rigidnih staničnih ovojnica različitih od staničnih membrana građenih od fosfolipidnog dvosloja. Kvaščeve stanice nemaju Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPazu i stoga su otporne na PTX. Stanice su transformirane umetanjem cDNA sekvenci koje kodiraju za α- i β-podjedinicu pumpe, stoga je došlo do ekspresije Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPaze u staničnoj membrani. Posljedično, stanice

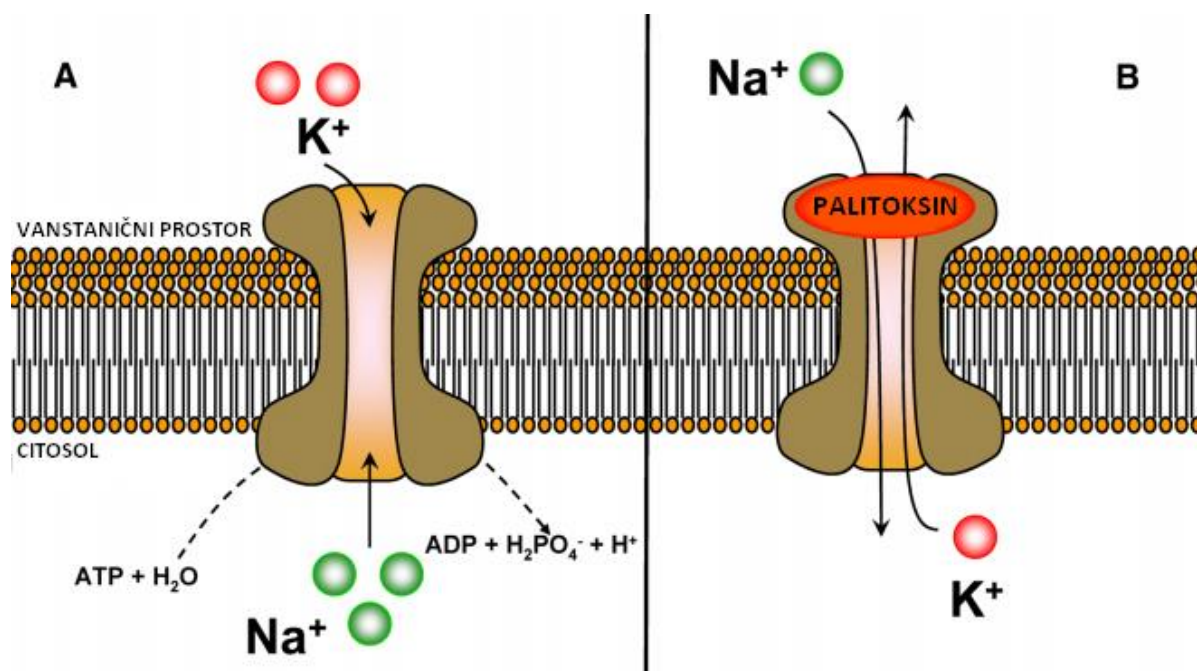
kvasca postaju osjetljive na PTX i njegovim djelovanjem dolazi do istjecanja  $K^+$  i utjecanja  $Na^+$  u stanicu. Ipak, opažena je smanjena osjetljivost stanica kvasca na PTX u odnosu na native životinjske stanice što se pripisuje razlikama u pripadnim im posttranslacijskim modifikacijama. Drugi važan dokaz hipoteze bilo je istraživanje u kojem je korištena  $Na^+K^+$  ATPaza sintetizirana *in vitro* u sustavu bez stanica te ugrađena u lipidni dvosloj. Dodatkom palitoksina nastaju karakteristični kationski kanali električne vodljivosti od ~10 pS. Na temelju navedenih, istraživanja hipoteza o vezanju i djelovanju palitoksina na  $Na^+K^+$  ATPazu je usvojena.<sup>15, 25</sup>

Pokazano je da oba kraja molekule palitoksina interagiraju s veznim mjestom.<sup>15</sup> Ouabain vezan na pumpu onemogućava vezanje palitoksina, dok obrnuto nije slučaj. Vezna mjesta ouabaina i palitoksina nisu identična, ali su na neki način spregnuta. Imobilizacijom  $Na^+K^+$  ATPaze na dekstranu pokazano je da se PTX ne veže na imobiliziranu pumpu. Nameće se pretpostavka da je za djelovanje palitoksina na pumpu potrebna interakcija sa susjednim regijama stanične membrane.<sup>21</sup>

Istraživano je djelovanje palitoksina na još dvije ATPaze P-tipa: želučanu  $H^+K^+$  ATPazu i SERCA. Prva se pokazala neosjetljivom na PTX, dok je kod SERCA opažena inhibicija ATPazne katalitičke aktivnosti na polovinu maksimalne inhibicije za koncentraciju palitoksina ~0,4  $\mu M$  što je u rasponu koncentracija koje inhibiraju i  $Na^+K^+$  ATPazu. Pritom toksin nije inducirao otvaranje kanala unutar SERCA.<sup>15</sup>

### 3.2. Mehanizam djelovanja palitoksina

Nagađanja o mehanizmu djelovanja palitoksina navodila su zaključak da se toksin ponaša kao ionofor, međutim to se nije pokazalo točnim. PTX prepoznaje već postojeću strukturu u membrani –  $Na^+K^+$  ATPazu, veže se na nju u izvanstaničnom prostoru i pretvara ju iz aktivnog u pasivni transporter odnosno u kationski kanal (slika 10.) tako što sprječava vanjski otvor pumpe da se zatvori. Moguće je i da PTX poremeti usklađenost otvaranja i zatvaranja vanjskog i unutarnjeg otvora pumpe, stoga kada su oba otvora istovremeno otvorena ioni slobodno prolaze kroz kanal niz elektrokemijski gradijent.<sup>15</sup>



Slika 10. Shematski prikaz mehanizma Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPaze (A) i palitoksinom induciranoг kanala (B). Slika je preuzeta i dorađena iz izvora 26.

U živčanim stanicama PTX uzrokuje depolarizaciju membrane ovisno o dozi. Značajne razlike u depolarizaciji membrana kontrolnih stanica cerebelarnih granula (CG) i stanica tretiranih palitoksinom uočavaju se pri koncentracijama toksina jednakim ili višim od 10 nM. Depolarizacija membrane uključuje utjecanje Na<sup>+</sup> u stanicu, stoga potiče rad Na<sup>+</sup>Ca<sup>2+</sup> izmjenjivača te kanala za ione kalcija koji se otvara pod utjecajem promjene membranskog potencijala. Na taj način PTX inducira povećanje koncentracije Ca<sup>2+</sup> u citosolu. Kod CG stanica tretiranih palitoksinom uočen je značajni porast koncentracije Ca<sup>2+</sup> pri koncentracijama toksina jednakim ili višim od 1 nM. Maksimalni učinak postignut je pri koncentracijama palitoksina od 10 nM i 50 nM. Povećanje koncentracije Ca<sup>2+</sup> trenutno je po dodatku palitoksina, postiže maksimalnu vrijednost unutarstanične [Ca<sup>2+</sup>], a zatim se polagano smanjuje i postiže određenu vrijednost (plato faza).<sup>21</sup> PTX potiče oslobađanje neurotransmitera u stanicama tumora srži nadbubrežne žlijezde foekromocitoma, te u sinaptosomima mozga štakora. Pri visokim koncentracijama palitoksina lučenje neurotransmitera neovisno je o izvanstaničnom Na<sup>+</sup>.<sup>27</sup> PTX regulira i pH unutar stanice. Pretpostavljalo se da PTX djeluje aktivirajuće na Na<sup>+</sup>H<sup>+</sup> izmjenjivač ovisno o dozi i posljedično zakiseljava unutarstanični prostor, dok Na<sup>+</sup> istječe iz stanice,<sup>27</sup> ali je u neuronima zapravo riječ o istiskivanju Ca<sup>2+</sup> plazmalemalnom Ca<sup>2+</sup> ATPazom koja istovremeno prenosi H<sup>+</sup> i na taj način zakiseljava stanični prostor.<sup>21</sup>

U srčanim stanicama PTX također izaziva depolarizaciju membrane, povećanje koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  i zakiseljavanje staničnog prostora. Inducira nastajanje kationskog kanala propusnog za  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$ , ali ne i za  $\text{Ca}^{2+}$ . Utjecanje  $\text{Na}^+$  u stanicu potiče aktivnost NCX i L-tipa kalcijevih kanala. Utjecanje velike količine  $\text{Ca}^{2+}$  u stanicu pokreće istjecanje  $\text{K}^+$  iz stanice što dovodi do skraćivanja akcijskih potencijala. Blokiranjem L-tipa kalcijevih kanala i NCX te tretiranjem kardiomiocita pilića dolazi do porasta  $\text{Ca}^{2+}$  što ukazuje na postojanje još nekog neidentificiranog načina ulaska  $\text{Ca}^{2+}$  u stanicu posredovanog palitoksinom. Toksinom uzrokovano povećanje propusnosti membrane za  $\text{H}^+$  dolazi do zakiseljavanja staničnog prostora, izmjene  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , utjecanja  $\text{Na}^+$  i naposljetku izmjene funkcije NCX.<sup>27</sup>

Skeletne mišićne stanice, treći tip stanica ekscitabilnog tkiva, pokazuju sporu i ireverzibilnu depolarizaciju stanične membrane kao odgovor na tretman palitoksinom. Inducira se struja iona  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$  ili  $\text{CH}_3\text{N}_3^+$  ovisna o koncentraciji  $\text{Na}^+$  koja je uzrok depolarizacije stanične membrane i kontrakcije skeletnih mišićnih stanica.

PTX djeluje i na krvne žile preko nekoliko tipova stanica. U vaskularnim glatkim mišićnim stanicama inducira nastajanje neselektivnog kationskog kanala električne vodljivosti 11-14 pS ovisnog o  $\text{Ca}^{2+}$ , ali nepropusnog za te ione. Posljedično se depolarizira stanična membrana, aktivira L-tip kalcijevih kanala, utječe  $\text{Ca}^{2+}$  u stanicu te dolazi do vazokonstrukcije. Ona se djelomično može obrnuti pomoću antagonista L-tipa kalcijevih kanala. Na živčane terminale PTX djeluje pokretanjem kaskade prijenosa signala poticanjem oslobađanja norepinefrina. Vežanjem norepinefrina na adrenergični receptor pokreće se kaskada prijenosa signala koja rezultira kontrakcijom glatkog mišićnog tkiva.<sup>27</sup> Posljednji tip stanice koji sudjeluje u odgovoru krvnih žila na palitoksin su vaskularne endotelne stanice u kojima PTX može pokrenuti kaskadu prijenosa signala za staničnu smrt.<sup>28</sup> Navedeni učinci palitoksina mogu imati različite ishode navedene u tablici 1.

Tablica 1. Mogući procesi u stanici inducirani djelovanjem palitoksina na  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPazu.  $P_X$  propusnost membrane za ion X,  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$  koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$  unutar stanice,  $\text{pH}_{\text{in}}$  vrijednost pH unutar stanice. Preuzeto i doručeno iz izvora 25.

PRIMARNI DOGAĐAJ	2. KORAK	3. KORAK	4. KORAK	5. KORAK	6. KORAK
pretvorba $\text{Na}^+\text{K}^+$ ATPaze u neselektivni kationski kanal ( $\uparrow P_{\text{Na}}, \uparrow P_{\text{K}}$ )	depolarizacija membrane (kao posljedica $\uparrow P_{\text{Na}}$ )	otvaranje kanala $\text{Ca}^{2+}$ koji se otvara pod utjecajem promjene membranskog potencijala ( $\uparrow P_{\text{Ca}}$ )	$\uparrow [\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$	egzocitoza vezikula - lučenje  mišićna kontrakcija  aktivacija protein kinaza	
	utjecanje $\text{Na}^+$ (kao posljedica $\uparrow P_{\text{Na}}$ )	obrnuta izmjena NCX	$\uparrow [\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$	otvaranje $\text{Ca}^{2+}$ -ovisnih kanala  aktivacija kaskade signala stanične smrti	istjecanje $\text{K}^+$ ( $\uparrow P_{\text{K}}$ ) utjecanje $\text{Ca}^{2+}$ ( $\uparrow P_{\text{Ca}}$ )
		nateknuće stanice	istezanje membrane	otvaranje TRP kanala  otvaranje anionskih kanala	utjecanje $\text{Na}^+$ ( $\uparrow P_{\text{Na}}$ ) utjecanje $\text{Ca}^{2+}$ ( $\uparrow P_{\text{Ca}}$ )  utjecanje $\text{Cl}^-$ ( $\uparrow P_{\text{Cl}}$ )
		obrnuta izmjena $\text{Na}^+/\text{H}^+$	$\downarrow \text{pH}_{\text{in}}$	nekoliko učinaka uključujući i programiranu staničnu smrt	
	gubitak $\text{K}^+$ (kao posljedica $\uparrow P_{\text{K}}$ )	aktivacija protein kinaza			

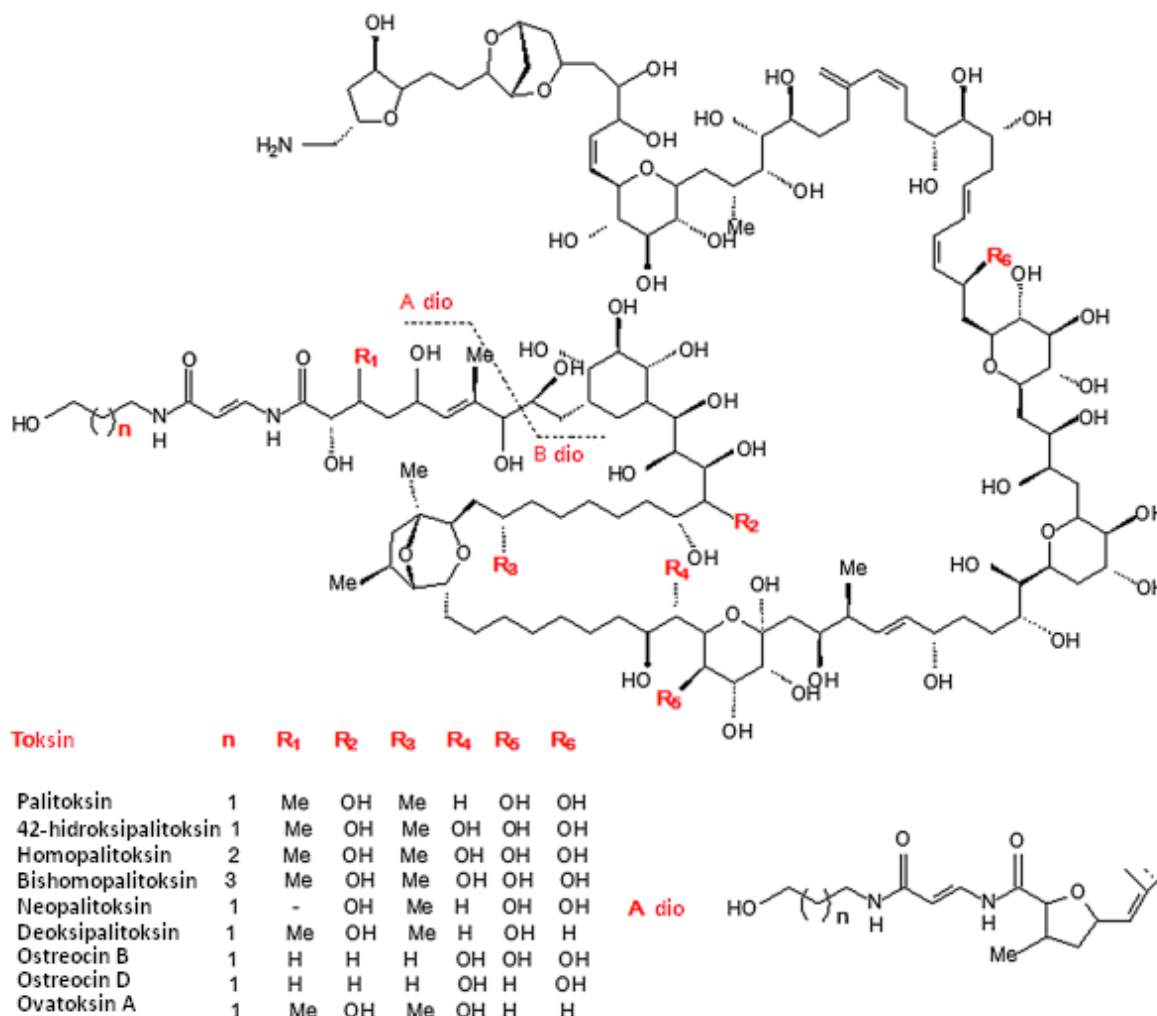


### 3.3. Usporedba palitoksina s ouabainom

Administracija ouabaina, a zatim palitoksina antagonizira djelovanje palitoksina, dok obrnuto nije slučaj. Slijedi da vezna mjesta dvaju toksina na  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPazi nisu identična. Korištenjem biosenzora rezonantnog zrcala pokazano je da se ouabain veže na imobiliziranu  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPazu što nije slučaj kod palitoksina. Taj podatak ukazuje na moguću potrebu palitoksina za dodatnim proteinima koji bi služili kao mjesto pričvršćenja pumpe u staničnu membranu i na taj način omogućavali vezanje palitoksina na nju. Preostaje i argument da zbog veličine molekule palitoksina postoje steričke prepreke u vezanju na imobiliziranu pumpu, ali ipak razlika u molekulskoj masi palitoksina i ouabaina nije navedena kao značajna što se tiče biosenzora.<sup>21</sup> Razlika između toksina je i način djelovanja na  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPazu. Ouabain „zaključava“ pumpu u određenoj konformaciji koja je dio katalitičkog ciklusa, dok PTX inducira nastajanje neselektivnog kationskog kanala za  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  unutar same strukture. Ne postoji poveznica između osjetljivosti tkiva pojedinih vrsta na dva toksina. Dok su stanice štakora manje osjetljive na ouabain jer su eksprimirane izoforme  $\alpha$ -podjedinice  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPaze relativno neosjetljive na ouabain, eritrociti štakora kao i drugih životinja koje eksprimiraju ouabain-osjetljivu izoformu pokazuju jednaku osjetljivost na PTX.<sup>27</sup>

### 3.4. Toksičnost palitoksina

Palitoksin je tumorski promotor, ne oštećuje DNA izravno, već uzrokuje promjene u putevima provođenja signala stimulacijom aktivnosti protein kinaza. S druge strane, palitoksinom tretirane mišje tumorske stanice bivaju razorene u 75 % jedinki, dok kontrolne stanice ne pokazuju regresiju tumora. U tumorskim stanicama djelovanje palitoksina očituje se u otpuštanju laktat dehidrogenaze i ekspresiji gena  $\alpha 1$ -podjedinice  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPaze što ukazuje na narušenu cjelovitost stanične membrane. PTX pokreće niz odgovora stanice na toksin: inhibiciju proliferacije, poticanje zaobljenja stanice, odvajanje od supstrata i poremećaje F-aktina. Kod HaCaT stanica, humanih keratinocita, tretiranih palitoksinom dolazi do nastanka morfoloških promjena karakterističnih za nekrozu. Pokazana je i sposobnost palitoksina da inhibira sintezu proteina čime dolazi do aktivacije stres kinaza SEK1/MKK4, SAPK/JNK1, i p38/HOG1. Pretpostavljeno je da je istjecanje  $\text{K}^+$  uzrokovano palitoksinom odgovorno za aktivaciju SAPK/JNK1 i inhibiciju translacije proteina.



Slika 11. Srodnici palitoksina. Slika je preuzeta i doradena iz izvora 26.

Citotoksičnost srodnika palitoksina (slika 11.) još nije potpuno rasvijetljena. Toksičnost sličnu palitoksinu pokazuje 42-hidroksipalitoksin koji uzrokuje štetu u stanicama skeletnih mišića i nateknuće stanice zbog povećane propusnosti membrane za Na<sup>+</sup>. Ipak, djelovanje 42-hidroksipalitoksina ne pokazuje ovisnost o Ca<sup>2+</sup> kao ono palitoksina što navodi na zaključak o različitom tj. specifičnom mehanizmu. Još jedan srodnik palitoksina ovatoksin A pokazuje značajnu toksičnost pri nanomolarnim koncentracijama, ali ipak manju *in vitro* od palitoksina.

Toksičnost palitoksina za životinje ovisna je o dozi i načinu unosa (tablica 2.). Primjerice, kod miševa je toksičnost manja za primjenu toksina oralno, nego intraperitonealno iz razloga što je PTX relativno velika i hidrofilna molekula te stoga slabije apsorbirana kroz gastrointestinalni trakt. Smrtni ishodi unosa toksina kod životinja nastupaju vazokonstrikcijom, povećanjem krvog tlaka i infarktom. Topikalna primjena palitoksina na kožu ili oči uzrokuje

iritaciju, ali ne i smrtni ishod. Simptomi koji nastupaju popratno unosu toksina kod životinja su razni, primjerice to su: ataksija, slabost, proljev, krvarenje, pojava plućnog edema itd.

Tablica 2. Akutna toksičnost (LD<sub>50</sub>) palitoksina. i.p. intraperitonealno, i.v. intravenozno, i.m. intramuskularno, i.t. intratrahealno, s.c. potkožna injekcija. Preuzeto i doručeno iz izvora 26.

ORGANIZAM	PUT	LD <sub>50</sub> (ng/kg)	IZVOR
miš	i.p.	50	Kaul, Daftari (1986.)
miš	i.v.	150 (LD <sub>50</sub> )	Moore, Scheuer (1971.)
miš	i.v.	740	Mahnir et al. (1992.)
miš	oralno	767	Sosa et al. (2009.)
miš	oralno	651	Tubaro et al. (2011.)
miš	oralno	510	Aligizaki et al. (2011.)
štakor	i.m.	240	Vick, Wiles (1975.)
štakor	i.p.	710	Vick, Wiles (1975.)
štakor	i.v.	89	Vick, Wiles (1975.)
štakor	i.t.	360	Vick, Wiles (1975.)
štakor	oralno	> 40	Vick, Wiles (1975.)
štakor	rektalno	>10	Vick, Wiles (1975.)
štakor	s.c.	400	Vick, Wiles (1975.)
domaći zamorčić	i.v.	110	Vick, Wiles (1975.)
domaći zamorčić	parenteralno	25	Webber, Ruggieri (1974.)
zec	i.v.	25	Vick, Wiles (1975.)
majmun	i.p.	78	Vick, Wiles (1975.)
pas	i.v.	33	Vick, Wiles (1975.)
pas	oralno	50	Webber, Ruggieri (1974.)

Podaci o reakciji ljudskog organizma na PTX šturiji su. Najčešće susretani načini unosa palitoksina su udisanjem, konzumacijom hrane i kožnim putem. Ističe se opasnost trovanja pri čišćenju akvarija koji sadrže neke od pripadnika reda *Zoanthidea*. Često prijavljivani simptomi uključuju: glavobolju, mučninu, vrtoglavicu, bol u mišićima, povišene vrijednosti kreatin fosfokinaze, slabost, kašalj, otežano disanje i trnce. Trovanje palitoksinom kod ljudi često ima smrtni ishod. Liječenje trovanja provodi se u skladu sa simptomima. Ispiranjem želuca,

prisilnim mokrenjem, umjetnim disanjem i ispijanjem tekućine nakon oralne primjene te terapijom kisikom, kortikosteroidima, antagonistima histamina,  $\beta$ -agonistima te nesteroidnim protuupalnim lijekovima nakon udisanja i kožne primjene palitoksina u nekim se slučajevima može izbjeći smrtni ishod.

U svrhu prevencije trovanja palitoksinom i njegovim srodnicima EU razmatra reviziju sadašnjih regulativa morskih biotoksina, budući da vrlo opasni i štetni toksini kao što su palitoksin i tetrodotoksin nisu regulirani. Testiranjem na životinjama predloženi su vazodilatatori papaverin i izosorbid dinitrat kao protuotrovi palitoksina djelotvorni samo ako se smjesta po unosu toksina injektiraju u srce.<sup>26</sup>

## § 4. LITERATURNI IZVORI

1. C. Michiels, *Am. J. Pathol.* **164** (2004) 1875-1882.
2. M. Bublitz, H. Poulsen, J. P. Morth, P. Nissen, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20** (2010) 431-439
3. F. Hilbers, W. Kopec, T. J. Isaksen, T. H. Holm, K. Lykke-Hartmann, P. Nisse, H. Khandelia, H. Poulsen, *Sci. Rep.* **6** (2016) 20442
4. M. Dyla, M. Kjærgaard, H. Poulsen, P. Nissen, *Annu. Rev. Biochem.* **89** (2020) 4.1-4.21
5. J. B. Lingrel, *Annu. Rev. Physiol.* **72** (2010) 395-412
6. S. V. Pierre, Z. Xie, *Cell Biochem. Biophys.* **46** (2006) 303-315
7. M. V. Clausen, F. Hilbers, H. Poulsen, *Front. Physiol.* **8** (2017) 371
8. P. L. Jacob, J. A. Leite, A. K. A. Alves, Y. K. S. Rodrigues, F. M. Amorim, P. L. N. Nêris, M. R. Oliveira, S. Rodrigues-Mascarenhas, *Parasitol. Res.* **112** (2013) 1313-1321
9. C. S. Chaboo, R. K. Hitchcock, J. Bradfield, L. Wadley, u P. Wexler (ur.), *Toxicology in Antiquity*, 2. izdanje, Academic Press, 2019, str. 34,37
10. <http://www.bindingdb.org/bind/chemsearch/marvin/MolStructure.jsp?monomerid=50286739> (preuzeto 17. svibnja 2020.)
11. J. K. Cha, W. J. Christ, J. M. Finan, H. Fujioka, Y. Kishi, L. L. Klein, S. S. Ko, J. Leder, W. W. McWhorter Jr., K.-P. Pfaff, M. Yonaga, D. Uemura, Y. Hirata, *J. Am. Chem. Soc.* **104** (1982) 7369-7371
12. R. E. Moore, G. Bartolini, J. Barchi, A. A. Bothner-By, J. Dadok, J. Ford, *J. Am. Chem. Soc.* **104** (1982) 3776-3779
13. Y. Kishi, *Pure Appl. Chem.* **61** (1989) 313-324
14. M. Godrijan, *Istraživanje toksičnih dinoflagelata roda *Ostreopsis* na javnoj plaži sjeverno od Rovinja*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2011, str. 43.
15. C. H. Wu, *Toxicon* **54** (2009) 1183-1189
16. L. Béress, J. Zwick, H. J. Kolkenbrock, P. N. Kaul, O. Wassermann, *Toxicon* **21** (1983) 285-290
17. Z. Li, Z. Xie, *Eur. J. Physiol.* **457** (2009) 635-644

18. M. P. Blaustein, J. Zhang, L. Chen, H. Song, H. Raina S. P. Kinsey, M. Izuka, T. Iwamoto, M. I. Kotlikoff, J. B. Lingrel, K. D. Philipson, W. G. Wier, J. M. Hamlyn, *Hypertension* **53** (2009) 291-298
19. E. Silva, P. Soares-da-Silva, *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **294** (2012) 99-132
20. M. P. Blaustein, W. G. Wier, *Circ. Res.* **101** (2007) 959-961
21. C. Vale-Gonzalez, M. J. Pazos, A. Alfonso, M. R. Vieytes, L. M. Botana, *Toxicol* **50** (2007) 541-552
22. H. Fürstenwert, *Int. J. Clin. Pract.* **64** (2010) 1591-1594
23. S. S. Syeda, G. Sánchez, H. H. Kwon, J. E. Hawkinson, G. I. Georg, G. Blanco, *J. Med. Chem.* **61** (2018) 1800-1820
24. M. Balestrino, J. Young, P. Aitken, *Brain Res.* **838** (1999) 37-44
25. G. P. Rossini, A. Bigiani, *Toxicol* **57** (2011) 429-439
26. J. Patočka, E. Nepovimova, Q. Wu, K. Kuca, *Arch. Toxicol.* **92** (2017) 143-156
27. C. Frelin, C. Van Renterghem, *Gen. Pharmac.* **26** (1995) 33-37
28. W. P. Schilling, D. Snyder, W. G. Sinkins, M. Estacion, *Am. J. Physiol.: Cell Physiol.* **291** (2006) C657-C667