

Primjena stichodactyla toksina u liječenju autoimunih bolesti

Bovan, Srećko

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:226:295730>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-30**



Repository / Repozitorij:

[Repository of University Department of Marine Studies](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA
PREDDIPLOMSKI STUDIJ BIOLOGIJA I EKOLOGIJA MORA

Srećko Bovan

PRIMJENA STICHODACTYLA TOKSINA U
LIJEČENJU AUTOIMUNIH BOLESTI

Završni rad

Split, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA
PREDDIPLOMSKI STUDIJ BIOLOGIJA I EKOLOGIJA MORA

PRIMJENA STICHODACTYLA TOKSINA U
LIJEČENJU AUTOIMUNIH BOLESTI

Završni rad

Kolegij: Biokemija 2

Mentor:

Prof. dr. sc. Maja Pavela-Vrančić

Student:

Srećko Bovan

Split, rujan 2018.

Sveučilište u Splitu
Sveučilišni odjel za studije mora
Preddiplomski studij Biologija i ekologija mora

Završni rad

PRIMJENA STICHODACTYLA TOKSINA U LIJEČENJU AUTOIMUNIH BOLESTI

Srećko Bovan

Sažetak

Stichodactyla helianthus (Ellis, 1768) je vrsta vlasulje prisutna u Karipskom moru. Sadrži neurotoksine koji prvenstveno služe za obranu od predatora. Proučavanje peptida ShK iz ove vrste pokazalo je da osim toksičnog učinka postoji i moguća terapijska primjena. Stichodactyla toksin ShK djeluje tako da blokira Kv1.3 kanale i zbog toga može suzbiti imunološke odgovore bitne za patogenezu brojnih bolesti kao što su multipla skleroza, psorijaza, reumatoidni artritis, itd. Napravljeno je mnogo sintetičkih analoga ovoga spoja od kojih su najbitniji ShK-Dap22, ShK-F6CA, D-allo-ShK, ShK-170, ShK-192 te ShK-186 koji je pod nazivom dalazatid ušao u kliničko ispitivanje za liječenje plak psorijaze.

(15 stranica, 10 slika, 1 tablica, 33 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: Stichodactyla toksin, ShK, Kv1.3 kanali, dalazatid, autoimune bolesti

Mentor: Prof. dr. sc. Maja Pavela-Vrančić

Ocjenjivači: 1. Doc. dr. sc. Zvezdana Popović-Perković
2. Prof. dr. sc. Maja Pavela-Vrančić
3. Doc. dr. sc. Frane Škeljo

University of Split
Department of Marine Studies
Undergraduate study Marine Biology and Ecology

BSc Thesis

**APPLICATION OF STICHODACTYLA TOXIN IN THE TREATMENT OF
AUTOIMMUNE DISEASES**

Srećko Bovan

Abstract

Stichodactyla helianthus (Ellis, 1768) is a species of anemone present in the Caribbean Sea. It contains neurotoxins that are primarily used as a defense against predators. Investigation of the ShK peptide, derived from this species, showed that besides the toxic effect there is also a possible therapeutic application. Stichodactyla toxin ShK works by blocking Kv1.3 channels and therefore can suppress the immune responses essential for the pathogenesis of numerous diseases such as multiple sclerosis, psoriasis, rheumatoid arthritis, etc. Many synthetic analogues of this compound have been made, the most important of which are ShK-Dap22, ShK-F6CA, D-allo-ShK, ShK-170, ShK-192, and ShK-186 now called dalazatide, which has entered clinical trials for treating plaque psoriasis.

(15 pages, 10 figures, 1 table, 33 references, original in: Croatian)

Keywords: Stichodactyla toxin, ShK, Kv1.3 channels, dalazatide, autoimmune diseases

Supervisor: Maja Pavela-Vrančić, PhD / Full Professor

Reviewers:

1. Zvezdana Popović-Perković, PhD / Assistant Professor
2. Maja Pavela-Vrančić, PhD / Full Professor
3. Frane Škeljo, PhD / Assistant Professor

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
1.1 Kalijevi kanali u T-stanicama.....	2
1.1.1 Kalijevi kanali i imunološki odgovori.....	2
1.2 Struktura Stichodactyla toksina.....	3
1.3 Djelovanje Stichodactyla toksina	4
2. RAZRADA TEME	5
2.1 Selektivniji analozi.....	5
2.1.1 ShK-Dap22	5
2.1.2 Shk-F6CA.....	6
2.1.3 Shk-170, ShK-186, ShK-192 i ShK-EWSS.....	7
2.1.4 D-allo-ShK.....	9
2.2 Učinkovitost analoga na životinjskim modelima.....	10
2.2.1 Eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis – model za multiplu sklerozu	10
2.2.2 Artritis induciran pristanom – model za reumatoidni i psorijatični artritis.....	10
2.2.3 Autoimune bolesti kože.....	11
2.2.4 Buđenje iz anestezije.....	11
2.2.5 Sprječavanje oštećenja mozga nakon terapije zračenjem.....	12
2.2.6 Moguća primjena u liječenju Alzheimerove bolesti	12
2.3 Kliničko ispitivanje ShK-186 za liječenje plak psorijaze	12
2.3.1. Primijećene nuspojave	13
2.3.2 Promjena stanja kroz tretman	13
2.3.3 Djelovanje dalazatida na T-stanice	14
2.3.4 Zaključci kliničkog ispitivanja.....	14
3. ZAKLJUČCI	15
4. LITERATURA	16

1. UVOD

Stichodactyla helianthus (Ellis, 1768) (Slika 1) je česta vrsta vlasulje koja naseljava Karipsko more oko Kube. Castaneda i sur. su 1995. godine otkrili da ekstrakti *S. helianthus*, primijenjeni na miševe intraperitonealno, izazivaju preosjetljivost na dodir i zvuk, pretjerano izlučivanje sline, suzenje, znojenje, smanjenu koordinaciju pokreta i paralizu. Ovi simptomi podsjećaju na trovanje inhibitorima kolinesteraze (Castaneda i Harvey, 2009; Castaneda i sur., 1995), međutim slaba inhibicija kolinesteraze u ekstraktima ukazuje na to da su uočeni simptomi djelovanja *Stichodactyla* toksina (ShK) posljedica drugačijeg molekuskog mehanizma.

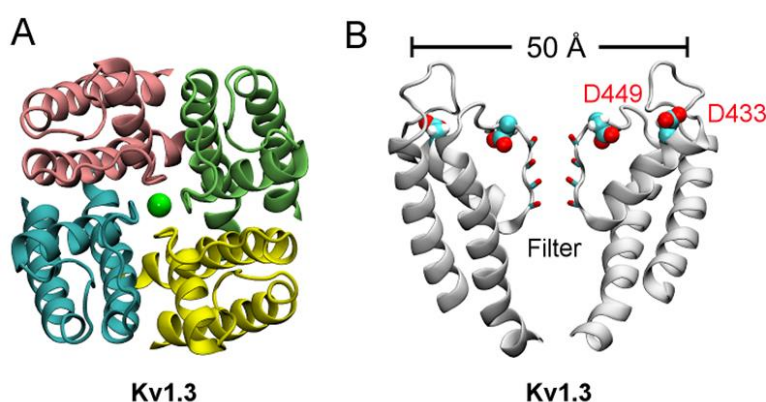


Slika 1. *S. helianthus* (izvor: https://www.123rf.com/photo_48964781_sea-anemone-stichodactyla-helianthus-commonly-called-sun-anemone-caribbean-sea-panama.html).

Shvativši da slične simptome uzrokuje zmijski dendrotoksin koji blokira kalijeve kanale putem pojačanih kolinergičkih impulsa, znanstvenici su koristeći metodu temeljenu na vezanju 125 I-dendrotoksina na neurone identificirali peptid ShK, blokator kalijevih kanala u kulturi neurona (Castaneda i sur., 1995). Ubrzo nakon toga, Pennington i sur. (1995) sintetizirali su ShK peptid, određena je njegova trodimenzionalna struktura (Tudor i sur., 1996) te se pokazalo da ShK blokira Kv1.3 kanale u T-stanicama s pikomolarnim afinitetom (Pennington i sur., 1996). ShK zbog mehanizma djelovanja ima moguću primjenu u liječenju autoimunih bolesti (Chi i sur., 2012).

1.1. Kalijevi kanali u T stanicama

Godine 1984. otkriven je naponski K^+ kanal u humanim T-stanicama koji se u to vrijeme zvao n-tip kanala, a kasnije je identificiran kao Kv1.3 (Slika 2). Uočeno je da taj kanal potencijalno može imati ulogu u imunosupresiji. Međutim, uskoro je postalo očito da ekspresija Kv kanala varira ovisno o diferencijaciji T-stanica u timusu te da se mijenja nakon aktivacije. Nakon otkrića kalcijem aktiviranih K^+ kanala (IKCa1) u humanim i mišjim T i B stanicama te saznanja da se njihova ekspresija povećava s aktivacijom, postalo je sve jasnije da će se uloge različitih K^+ kanala morati pojedinačno razmatrati koristeći inhibitore specifične za svaki kanal posebno. Korišteno je više selektivnih Kv1.3 i IKCa1 blokatora za ispitivanje doprinosa Kv1.3 i IKCa1 u aktivaciji humanih T-stanica. Proliferacija T-stanica, koje su prethodno aktivirane tijekom 48 sati, a zatim izložene K^+ blokatorima, bila je neosjetljiva na blokadu Kv1.3, ali osjetljiva na blokadu IKCa1 kanala. Ovi rezultati upućuju na zaključak da se odmarajuće T-stanice oslanjaju na Kv1.3, a da je IKCa1 funkcionalno dominantni K^+ kanal u aktiviranim T-stanicama (Lam i Wulff, 2011).

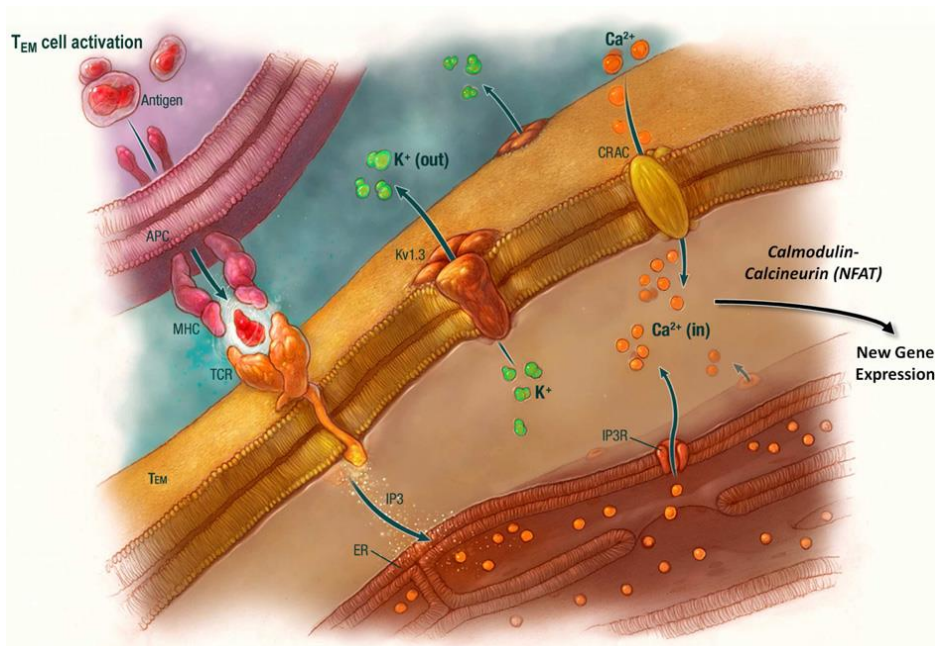


Slika 2. Struktura Kv1.3 kanala (izvor: https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-Kv13-and-ChTx-In-A-and-B-the-view-is-parallel-and-perpendicular-to_fig2_299396522)

1.1.1. Kalijevi kanali i imunološki odgovori

Kv1.3 i IKCa1 neizravno reguliraju unos Ca^{2+} tijekom aktivacije T-stanica, moduliranjem membranskog potencijala. Receptor za T-stanice, tijekom imunog odgovora, aktivira ulaz Ca^{2+} kroz kalcijev kanal nazvan CRAC (engl. *calcium release activated calcium*

channel), što rezultira povećanjem koncentracije Ca^{2+} u citosolu, a koji je potreban za translokaciju NFAT (engl. *nuclear factor of activated T cells*, nuklearni faktor aktiviranih T-stanica) u jezgru i pokretanje transkripcije, što u konačnici rezultira izlučivanjem citokina i proliferacijom T-stanica (Slika 3). Unos Ca^{2+} moguć je samo ako T-stanica može zadržati negativan membranski potencijal izlučivanjem K^+ kroz Kv1.3 i/ili IKCa1. Blokada ovih dvaju K^+ kanala depolarizira membranu T-stanice i inhibira signalizaciju pomoću Ca^{2+} , čime se sprječava aktivacija T-stanice. Iz navedenoga slijedi da bi se blokatori IKCa1 mogli iskoristiti za suzbijanje akutnih imunoloških odgovora, dok bi se Kv1.3 blokatori mogli koristiti u liječenju autoimunih bolesti kao što su psorijaza i multipla skleroza (Lam i Wulff, 2011).



Slika 3. Prolaz iona kroz Kv1.3 i CRAC, otpuštanje NFAT (izvor: Chi i sur., 2012).

1.2. Struktura Stichodactyla toksina

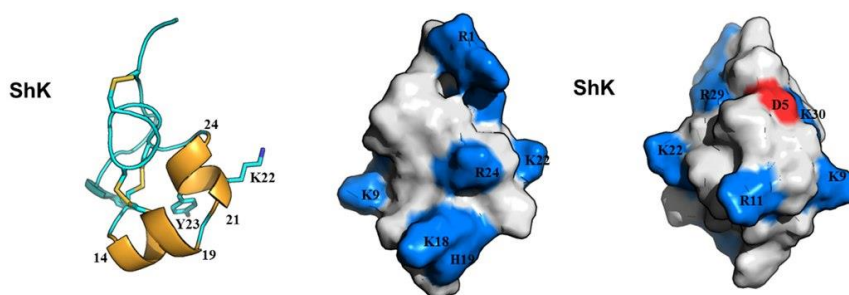
ShK je peptid sastavljen od 34 aminokiselinska ostatka (Slika 4), čija je trodimenzionalna struktura stabilizirana pomoću tri disulfidna mosta: Cys3-Cys35, Cys12-Cys28 i Cys17-Cys32.



Slika 4. Primarna struktura i disulfidni mostovi kod Shk

(izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Stichodactyla_toxin#/media/File:ShK_seq.png)

Struktura ShK otkriva dvije kratke α -uzvojnice koje sadrže ostatke 14-19 i 21-24 (Slika 4). Osam N-terminalnih ostataka zauzima izduženu konformaciju, nakon čega slijedi par okreta koji nalikuju 3_{10} heliksi. C-terminalni Cys35 stvara gotovo cikličku strukturu preko disulfidne veze sa Cys3 (https://en.wikipedia.org/wiki/Stichodactyla_toxin).



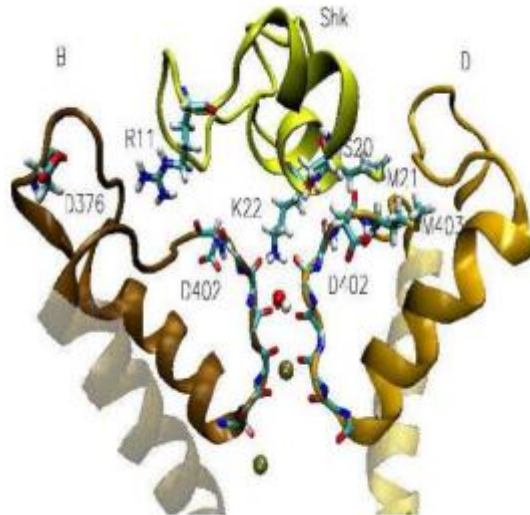
Slika 5. Struktura Stichodactyla toksina

(izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Stichodactyla_toxin#/media/File:ShK_toxin_Fig_3.tiff)

1.3. Djelovanje Stichodactyla toksina

ShK je blokator pore tetramernog kanala za kalijeve ione (Slika 5). Veže se na sve četiri podjedinice stvarajući interakcije s plitkim predvorjem na vanjskom ulazu u poru. Usidren je u vanjskom predvorju pomoću dvije ključne interakcije: prvu stvara Lys22, koji ulazi u poru kanala poput "plutenog čepa" i blokira prolaz ionima kalija; drugu stvara susjedni Tyr23, koji zajedno s Lys22 tvori "funkcionalnu jedinicu" potrebnu za blokadu kanala. Mnogi peptidi koji blokiraju K^+ kanale sadrže takvu kombinaciju lizina i susjednog aromatskog ili alifatskog aminokiselinskog ostatka. Dodatne interakcije doprinose jakosti vezanja i selektivnosti; na primjer Arg11 je važan za vezanje na kanale u Jurkat T-limfocitima kod ljudi, a Ile7, Ser20 i Phe27 pridonose vezanju na kanale u mozgu štakora. Prema prvotnom modelu ShK, ostatak Lys22 prolazi u kanal za provođenje iona, ali njegov bočni lanac nije u izravnom kontaktu s bočnim lancima Tyr400 i Asp402 u Kv1.3 kanalu. Ostatak Arg11 leži u blizini His404 u jednoj od podjedinica Kv1.3, a druga dva His404 ostatka u tetrameru su u neposrednoj blizini ostataka Met21 i Arg29. Nakon toga je model kanala redefiniran i prema

njemu se ShK usidri pomoću većeg broja aminokiselinskih ostataka. Kombinacija ova dva modela je pogodna osnova za daljnja istraživanja vezanja ShK i za eksperimente s toksinima koji kao i ShK djeluju tako da vezanjem u vestibularnoj regiji pore blokiraju K^+ kanale (Pennington i sur., 2009).



Slika 6. ShK u kompleksu s Kv1.3 kanalom

(izvor: <http://aups.org.au/Proceedings/41/77P/77P.pdf>)

2. RAZRADA TEME

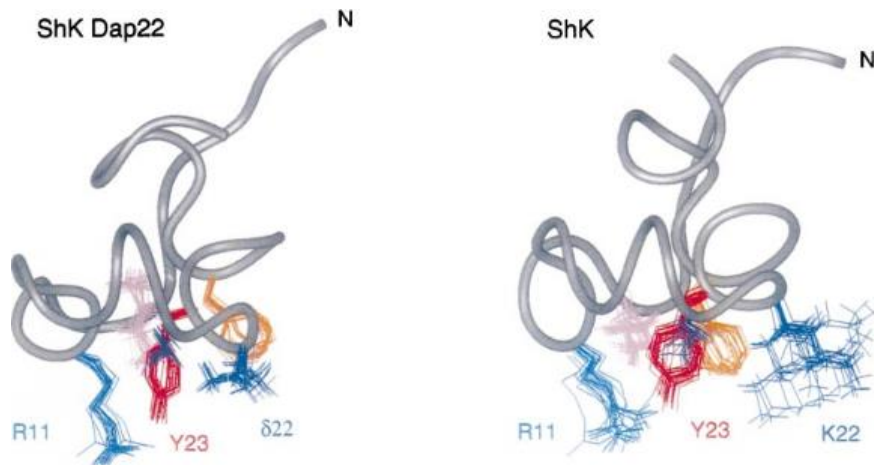
2.1. Selektivniji analozi ShK

ShK blokira Kv1.3 ($K_d = 11$ pM) i srodne Kv1-kanale, Kv1.1 ($K_d = 16$ pM), Kv1.4 ($K_d = 31$ pM), Kv1.6 ($K_d = 165$ pM). Potencijalni problem u terapijskoj primjeni ShK je nedovoljna selektivnost za Kv1.3 u odnosu na Kv1.1 kanale u neuronima, pa može imati neurotoksični učinak. S ciljem povećanja selektivnosti za Kv1.3 kanale stvoren je veliki broj sintetičkih analoga (Norton i sur., 2015).

2.1.1. ShK-Dap22

Kako bi se provjerila važnost duljine lanca u položaju 22 u ShK, Lys22 zamijenjen je kraćim pozitivno nabijenim ostatkom 1,3-diaminopropionske kiseline (Dap). Ovaj analog

nazvan je ShK-Dap22 (Slika 7). Smatralo se da se amino skupina ovog ostatka može ciljano vezati na prsten ostatka His404 koji se nalazi na vanjskoj strani ulaza u poru kanala Kv1.3. Ispostavilo se da je ShK-Dap22 vrlo moćan i visoko selektivni blokator Kv1.3. ShK i ShK-Dap22 vežu se na Kv1.3 vrlo sličnim afinitetom. Međutim, elektrofiziološkim eksperimentima utvrđeno je da je blokada s ShK-Dap22 reverzibilna, dok je izvorni ShK "ljepljiviji" i vrlo ga je teško ukloniti. Također, za razliku od ShK, koji je jednako moćan blokator Kv1.1 i samo 15 puta manje efikasan blokator Kv1.6, ShK-Dap22 pokazuje 80, odnosno 450 puta manji afinitet prema ovim kanalima. Osim toga, za ShK-Dap22 je utvrđeno da je oko 103 puta manje djelotvoran inhibitor aktivacije humanih T-stanica od samog ShK (Norton i sur., 2005).



Slika 7. Usporedba strukture Shk i Shk-Dap22

(izvor https://www.researchgate.net/figure/Solution-structure-of-ShK-Dap-22-A-stereo-view-of-the-best-20-structures-of-ShK-Dap-22_fig5_13456772:)

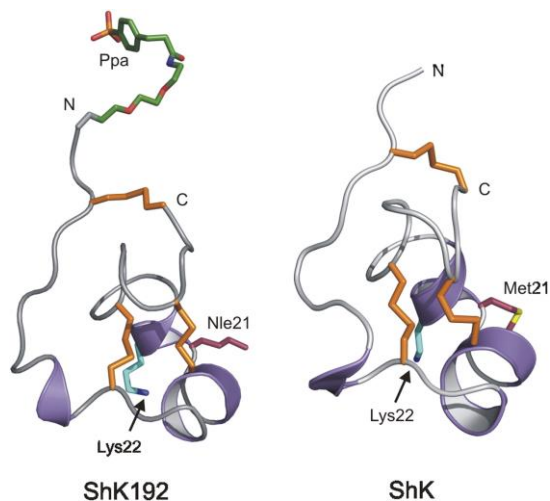
2.1.2. ShK-F6CA

ShK-F6CA je fluoresceinom obilježeni analog ShK koji ima potencijalnu primjenu u protočnoj citometriji za detekciju TEM stanica s visokim udjelom Kv1.3 kanala. ShK-F6CA je 160 puta manje djelotvoran ($K_d = 4,0 \pm 0,3$ nM) od ShK u blokiranju Kv1.1 kanala koji su izraženi u stanicama L929 i pokazao je 83 puta veći afinitet za Kv1.3 u odnosu na Kv1.1. Poboljšana specifičnost ShK-F6CA za Kv1.3 u odnosu na Kv1.1 može se objasniti činjenicom

da je F6CA negativno nabijen. Ako je u kanalu Kv1.1, ima istu geometriju kao i u Kv1.3, a prisutnost tri glutamata u Kv1.1 mogu elektrostatski odbiti F6CA jedinicu. Negativno nabijeni ostaci kanala u susjednim petljama također doprinose smanjenom afinitetu ShK-F6CA za Kv1.1 (https://en.wikipedia.org/wiki/Stichodactyla_toxin; Norton i sur., 2015).

2.1.3. ShK-170, ShK-186, ShK-192 i ShK-EWSS

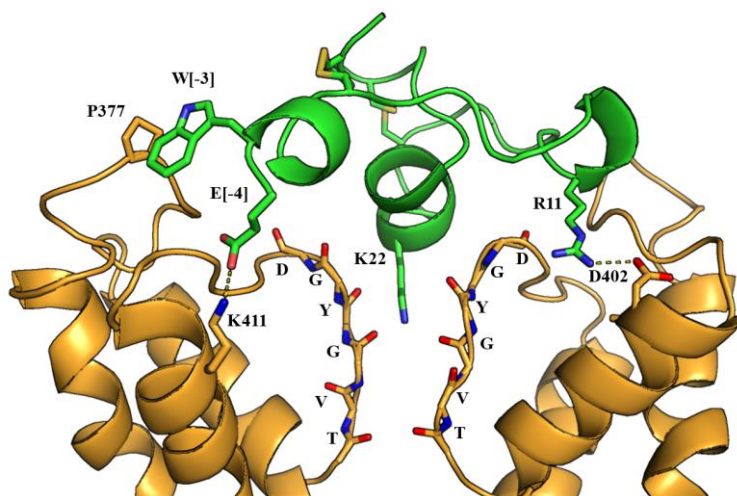
Na temelju ShK-F6CA, niz analoga ShK dizajniran je kako bi se pojačala selektivnost za Kv1.3 kanale u odnosu na ostale K⁺ kanale. Budući da je poboljšana selektivnost dobivena ugradnjom planarnog aromatskog ostatka s anionskom skupinom, ShK-170, ShK-186 i ShK-192 priređeni su vezanjem derivata aminokiselina kao što su fosfo-Tyr i p-fosfono-Phe na N-kraj ShK preko AEEA linkera koji je prethodno korišten za vezanje F6CA. ShK-170, koji je nastao vezanjem L-fosfotirozina na ShK preko AEEA linkera, blokira Kv1.3 kanale i 100 puta je selektivniji u odnosu na Kv1.1 kanale te je 700 puta selektivniji za Kv1.3 u odnosu na druge K⁺, Na⁺ i Ca²⁺ kanale. *In vitro* istraživanja stabilnosti nisu pružila dokaze o razgradnji ShK-170 na sobnoj temperaturi (22 °C) i pri pH 4-8. Na 40 °C, ShK-170 bio je stabilan pri fiziološkom pH, ali se razgradio u kiselim pH uvjetima, uglavnom zbog defosforilacije L-fosfotirozinskog ostatka vezanog na Arg1 i oksidacije Met21. ShK-170 sadrži više mjesta za cijepanje tripsinom i kimotripsinom, a inkubacija peptida s jednim ili oba ova enzima dovela je do brze razgradnje ShK-170 u fragmente stabilizirane disulfidnim vezama. Ovaj peptid stoga nije prikladan za oralnu primjenu bez odgovarajuće zaštite. ShK-186 je identičan ShK-170, osim što je njegov C-terminalni cistein amidiran. Ova modifikacija ne utječe na selektivnost prema Kv1.3 u odnosu na Kv1.1 kanale, ali bi trebala smanjiti osjetljivost C-terminalnog kraja na cijepanje karboksipeptidazom, što može poboljšati poluzivot peptida *in vivo*. ShK-186 pokazuje istu *in vitro* stabilnost kao ShK-170 pri kiselom pH i 40 °C, ali je manje stabilan u alkalnom pH području (Norton i sur., 2005). L-fosfotirozin u ShK-170 i ShK-186 se brzo defosforilira u *in vivo* uvjetima stvarajući analog ShK-198 koji ima smanjenu specifičnost za Kv1.3. Kako bi se prevladao taj problem, razvijeni su ShK-192 (Slika 8) i ShK-EWSS. U ShK-192, N-terminalni L-fosfotirozin zamijenjen je nehidrolizirajućim para-fosfonofenilalaninom (Ppa), a Met21 je zamijenjen norleucinom kako bi se izbjegla oksidacija metionina (https://en.wikipedia.org/wiki/Stichodactyla_toxin).



Slika 8. Usporedba strukture Shk i Shk-192

(izvor: <http://molpharm.aspetjournals.org/content/75/4/762/tab-figures-data>)

U ShK-EWSS, AEEA linker i L-fosfotirozin zamjenjuju se glutaminskom kiselineom (E), triptofanom (W) i s dva serina (S). I ShK-192 i ShK-EWSS vrlo su specifični za Kv1.3 (Slika 9).



Slika 9. Shk-EWSS u kompleksu s Kv1.3 kanalom

(izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Stichodactyla_toxin)

2.1.4. D-allo-Shk – analog otporan na endogene proteaze

D-allo-ShK je zrcalna slika prirodnog ShK koji se sastoji isključivo od aminokiselina u D-konfiguraciji. Stvoren je zbog toga da bi bio otporan na proteolizu kao rezultat

nemogućnosti endogenih proteaza da prepoznaju ostatke D-aminokiselina. Blokira Kv1.3 kanale skoro 2800 puta slabije od ShK, ali je jednako selektivan u odnosu na Kv1.1 kanale kao i ShK. Značajna razlika u načinu na koji ShK i D-allo-ShK blokiraju Kv1.3 kanale je u tome što se ShK može vezati i blokirati Kv1.3 kanale u bilo kojoj konformaciji (otvoren, zatvoren i inaktiviran), dok se D-allo-ShK ne može vezati za zatvorene kanale. Lošiji afinitet D-allo-ShK za Kv1.3 je uzrokovan kiralnim ostacima. D-allo-ShK ima potencijalne primjene u ekstremnom okolišu poput gastrointestinalnog trakta za liječenje bolesti poput kolitisa ili Crohnove bolesti (Norton i sur., 2015). U tablici 1 je prikazana selektivnost D-allo-ShK i ostalih analoga za kalijeve kanale.

Tablica 1. Selektivnost ShK i njegovih analoga za kalijeve kanale izražena preko IC50 vrijednosti u pM (Beeton i sur., 2012).

Channel	ShK	ShK-Dap ²²	ShK-F6CA	ShK-170	ShK-186	ShK-192	D-allo-ShK
Kv1.1	16	1,800	4,000	7,000	6,900	22,000	83,000
Kv1.2	9,000	39,000	100,000 (N.E.)	48,000			10 ⁶ (N.E.)
Kv1.3	11	23	48	70	70	140	36,000
Kv1.4	312	3,700	100,000 (N.E.)	13,700		100,000 (N.E.)	10 ⁶ (N.E.)
Kv1.5	100,000 (N.E.)	100,000 (N.E.)	100,000 (N.E.)	100,000 (N.E.)		100,000 (N.E.)	10 ⁶ (N.E.)
Kv1.6	165,000	10,500		18,000		11,000	
Kv1.7	12,000	100,000 (N.E.)	100,000 (N.E.)	100,000 (N.E.)			10 ⁶ (N.E.)
Kv3.1	100,000 (N.E.)	100,000 (N.E.)	100,000 (N.E.)	100,000 (N.E.)			
Kv3.2	300 – 6,000			20,000		4,000	
Kv3.4	100,000 (N.E.)	100,000 (N.E.)					

2.2 Učinkovitost analoga na životinjskim modelima

Za razliku od mišjih T-stanica, T-stanice štakora jako slične humanim T-stanicama u smislu njihove ekspresije K^+ kanala, pokazujući da su njihovi modeli korisni za ispitivanje učinkovitosti Kv1.3 blokatora kod ljudi (Beeton i sur., 2015).

2.2.1 Eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis – model za multiplu sklerozu (MS)

Mijelinski specifične T-stanice u bolesnika s MS su pretežno CCR7-TEM-efektor stanice s povišenom ekspresijom Kv1.3 kanala (Beeton i sur., 2006; Wulff i sur., 2003). Kako bi se utvrdilo mogu li takve stanice potaknuti bolest, mijelinski specifične CCR7-TEM efektorske stanične linije štakora su ubačene u zdrave jedinke te je promatrana njihova sposobnost induciranja eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa (EAE). Stanice koje su izražavale veliki broj Kv1.3 kanala izazvale su teški EAE u usporedbi sa stanicama s nižim brojem Kv1.3 kanala (Beeton i sur., 2001; 2005). Utvrđeno je da ShK-170 potiskuje proliferaciju CCR7-TEM-efektor stanica i da njegova dnevna primjena (10 mg/kg/dan) sprječava i učinkovito liječi inducirani EAE (Beeton i sur., 2005). U istom modelu, Amgenov analog ShK-Q16K-PEG [20K] spriječio je induciranje EAE, kada je primijenjen jednom dnevno potkožnom injekcijom (Sullivan i sur., 2010). Većina bolesnika s MS-om ima relapsacijski i remitirajući klinički tijek bolesti. EAE sa sličnim obrascem relapsa i remitiranja može se inducirati i kod štakora. Ova bolest naziva se kronični relapsacijski remitirajući EAE (CR-EAE). T-stanice u središnjem živčanom sustavu ovih štakora pretežno su CCR7-TEM/TEM-efektorske tijekom kronične faze povratka-remitiranja bolesti (Matheu i sur., 2008). ShK-186, koji se primjenjuje jednom dnevno potkožnim injekcijama (100 mg/kg/dan) ublažava bolest smanjujući širenje upalnog procesa u središnji živčani sustav i smanjuje demijelinizaciju (Matheu i sur., 2008; Chi i sur., 2012).

2.2.2 Artritis induciran pristanom – model za reumatoidni i psorijatični artritis

Štakori kojima je ubrizgan pristan razvijaju artritis unutar 7-10 dana. Za taj oblik bolesti vjeruje se da je sličan reumatoidnom i psorijatičnom artritisu (Hultqvist i sur., 2006). Kod štakora tretiranih fiziološkom otopinom, težina bolesti se kontinuirano pogoršavala s vremenom. Značajni periostitis, propadanje i deformacije bili su vidljivi prilikom X-zračenja

zglobova, a patološka procjena pokazala je izraziti sinovitis, tešku upalu i ulceraciju hrskavice. ShK-186, primijenjen od početka simptoma potkožnim injekcijama jednom dnevno (100 mg/kg/dan) znatno je smanjio broj zahvaćenih zglobova, a štakori su pokazali značajno poboljšanje u radiološkim i histopatološkim nalazima (Chi i sur., 2012).

2.2.3 Autoimune bolesti kože

Transplantacija ljudske psorijatične kože na štakore prouzročila je stanje nalik psorijazi, a lokalne injekcije ShK-186 poboljšale su stanje znatno smanjujući broj stanica koje eksprimiraju Kv1.3 kanale (Gilhar i sur., 2011). Pokazalo se da klofazimin, lijek kojim se tretira pustularna psorijaza kod ljudi (Chuaprapaisilp i Piamphongsant, 1978; Nair i Shereef, 1991), blokira Kv1.3 kanale specifično preko usko povezanih kanala (Ren i sur., 2008). Sedam desetljeća kliničke upotrebe pokazalo je da je klofazimin općenito siguran, iako kod mnogih bolesnika uzrokuje promjenu boje nekih dijelova kože, a produljena terapija s visokim koncentracijama klofazimina rezultira stvaranjem kristala u tkivima, što dovodi do problema s očima i slezenom, a u jednom slučaju i do smrti (Craythorn i sur., 1986; McDougall i sur., 1980; Parizhskaya i sur., 2001; Mathew i sur., 2006). Ova izvješća naglašavaju moguću primjenu blokatora Kv1.3 kao što je ShK-186 za liječenje autoimunih kožnih bolesti. ShK-186 je prvi analog koji je došao do faze testiranja na ljudima (Chi i sur., 2012; Tarcha i sur., 2017).

2.2.4. Buđenje iz anestezije

Sevofluran je čest anestetik koji se koristi za izazivanje opće anestezije tijekom operacije. Štakori koji su neprekidno izloženi sevofluranu gube refleks uspravljanja zbog gubitka svijesti. U tim štakorima, mikroinfuzija ShK u središnju medijalnu jezgru talamusa (CMT) poništila je anesteziju induciranu sevofluranom. Štakori tretirani s ShK-om potpuno su obnovili svijest unatoč stalnoj izloženosti sevofluranu. Mikroinfuzija ShK u susjedne regije mozga nije imala takav učinak. Sevofluran je pojačao strujanje kalija u CMT, dok su ShK i ShK-186 imali suprotan učinak. Ova istraživanja pokazuju da su K^+ kanali u CMT, koji su osjetljivi na ShK, važni za suzbijanje buđenja tijekom anestezije (https://en.wikipedia.org/wiki/Stichodactyla_toxin).

2.2.5. Sprječavanje oštećenja mozga nakon terapije zračenjem

Zračenje mozga koristi se za liječenje tumora glave, vrata i mozga, ali ovaj tretman nosi značajan rizik od neuroloških ozljeda. Ozljede nastaju djelomično zbog aktivacije mikroglia i oštećenja neurona posredovanih mikroglijama. Neuroprotektivne terapije za ozljede mozga uzrokovane zračenjem još uvijek su ograničene. U mišjem modelu zračenja mozga, ShK-170 obrnuo je neurološka oštećenja i zaštitio neurone od zračenja supresijom aktivacije mikroglia (izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Stichodactyla_toxin)

2.2.6 Moguća primjena u liječenju Alzheimerove bolesti

Mikroglia stanice značajno doprinose patofiziologiji Alzheimerove bolesti, ali učinkoviti terapijski pristup ciljan na mikroglia stanice još uvijek nije dostupan. Kalijev kanal Kv1.3 ima važnu ulogu u regulaciji imunoloških odgovora i prisutan je u "M1 upalnom" stanju mikroglia. Koristeći PAP-1 koji je kao i ShK blokator Kv1.3 kanala, Maezawa i sur. (2018) su pokazali da je za upalne i neurotoksične odgovore mikroglia stanica potrebna aktivnost Kv1.3. Nadalje je opaženo da je Kv1.3 visoko eksprimiran u mikroglia stanica miševa s transgeničnim modelom Alzheimerove bolesti kao i kod oboljelih ljudi. Zbog toga je pretpostavljeno da blokiranje Kv1.3 kanala može smanjiti negativne učinke amiloidnih plakova u neuronima. Tretiranje APP/PS1 transgenskih miševa 5 mjeseci oralnom primjenom PAP-1, počevši od 9 mjeseci starosti, kada životinje već pokazuju kognitivne deficite i amiloidne plakove, smanjuje neuroinflamaciju, amiloidne plakove u mozgu, povećava hipokampalnu aktivnost neurona i poboljšava deficite u ponašanju. Ovi rezultati pružili su dovoljno uvida da bi se blokatori Kv1.3 unaprijedili u kliničko ispitivanje za liječenje Alzheimerove bolesti (Maezawa i sur., 2018).

2.3 Kliničko ispitivanje za liječenje plak psorijaze

Tvrtka Kineta Inc. u Seattleu je provela slijepo placebo kontrolirano istraživanje u dva kanadska centra. ShK-186 su prethodno nazvali dalazatid. Prihvatljivi pacijenti bili su odrasli muškarci i žene u dobi od 18 do 65 godina, s aktivnom plak psorijazom (> 3% površine tijela zahvaćeno). Kriteriji za uključivanje obuhvaćali su psorijazne plakove od najmanje 2 cm koji nisu bili smješteni na glavi, preponama, genitalijama, pregibima,

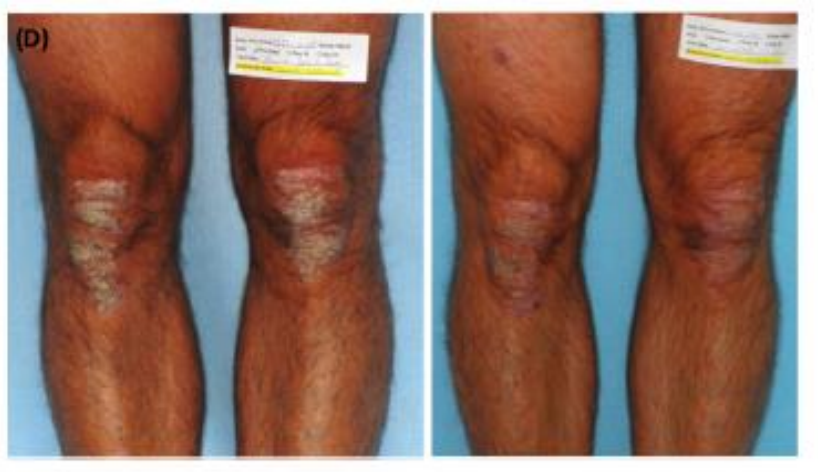
dlanovima ili stopalima. Primarni cilj bio je procijeniti sigurnost ponovljenih doza dalazatida kod odraslih osoba s blagom do umjerenom plak psorijazom. Ukupno 24 pacijenata je bilo nasumično podijeljeno u omjeru 5:5:2. Deset ih je primalo dozu dalazatida od 30 mcg, drugih deset je primalo dozu od 60 mcg, a četvero je primalo placebo. Dalazatid su primali dvaput tjedno potkožnom injekcijom u abdomen dok nisu primili ukupno 9 doza tijekom 29 dana (Tarcha i sur., 2017).

2.3.1 Primijećene nuspojave

Svi bolesnici su općenito dobro podnijeli dalazatid, bez ozbiljnih nuspojava ili prekida liječenja. Najčešće nuspojave bile su hipoestezija (n = 20, 75% placebo, 85% dalazatid) i parestezija (n = 15, 25% placebo, 70% dalazatid). Parestezija je najčešće zahvatila ruke, noge ili perioralno područje. Hipoestezija ili parestezija su se uvijek spontano razriješile nakon svake doze unutar 12 sati. Sve pojave hipoestezije i parestezije su bile blage ozbiljnosti. Udio pacijenata s hipoestezijom i parestezijom nije bio povišen u skupini koja je primala doze od 60 mcg. Ostale prijavljene nuspojave bile su nazofaringitis (n = 8, 50% placebo, 30% dalazatid), grčevi u mišićima (n = 7, 0% placebo, 35% dalazatid), glavobolja (n = 4, 25% placebo, 15% dalazatid) i osjetljivost zuba (n = 4; 0% placebo, 20% dalazatid). Nije bila primijećena niti jedna laboratorijska abnormalnost niti promjena vitalnih znakova tijekom istraživanja. Sveukupno, većina nuspojava bila je blage do umjerene težine. Niti jedan pacijent nije razvio antitijela na dalazatid (Tarcha i sur., 2017).

2.3.2 Promjena stanja kroz tretman

Glavni parametri prema kojima je praćena promjena stanja na lezijama su TLIGA (engl. *Target Lesion Investigator Global Assessment*) s vrijednostima od 0 do 4 i PASI (engl. *Psoriasis Area and Severity Index*) s vrijednostima od 0 do 72. Na početku, ozbiljnost bolesti prema procjeni TLIGA bila je umjerena (ocjena 3) za 23 od 24 bolesnika, a jedan pacijent imao je tešku bolest (ocjena 4). Poboljšanje ciljanih lezija dogodilo se već u 15. danu i stanje se nastavilo poboljšavati tijekom 4 tjedna praćenja. Primjer poboljšanja ciljanih lezija nakon tretmana dalazatidom prikazana je na slici 10.



Slika 10. Povoljanje ciljanih lezija nakon tretmana dalazatidom (izvor: Tarcha i sur.,2017)

2.3.3. Djelovanje dalazatida na aktivaciju T-stanica

Da bi se utvrdilo je li tretman dalazatida utjecao na aktivaciju podskupina T-stanica, alikvoti PBMC (periferni krvne mononuklearne stanice) bolesnika iz placebo i 60 mcg grupe analizirani su na ekspresiju specifičnih markera podskupina T-stanica, kao što su markeri povezani s kožnim limfocitima (CLA), CD45RO, CCR7 kao i markeri aktivacije T-stanica. CLA+T-stanice pridonose imunopatogenezi psorijaze i drugih kožnih bolesti posredovanih T-stanicama. TEM, TCM i regulatorne T-stanice su analizirane kako bi se utvrdilo je li tretman dalazatidom utjecao na sastav podskupina T-stanica i smanjio udio T-stanica koje ekspresiraju upalne markere. U uzorcima iz bolesnika liječenih s dalazatidom postotak CD4+TEM stanica koje ekspresiraju HLA-DR je smanjen u uzorcima od 29. dana u usporedbi s uzorcima uzetim na prvi dan. Ekspresija HLA-DR na aktiviranim T-stanicama povezana je sa psorijazom i drugim autoimunim bolestima. Slično, analiza CLA+TEM stanica bolesnika liječenih dalazatidom otkrila je statistički značajno smanjenje postotka CD4+HLA-DR+stanica u usporedbi s uzorcima skupine placebo. Liječenje dalazatidom nije utjecalo na ekspresiju HLA-DR kod TCM i regulatornih T-stanica kada se uspoređuju dalazatid i placebo skupina (Tarcha i sur., 2017).

2.3.4 Zaključci kliničkog ispitivanja

Dalazatid je procijenjen kao siguran i kod zdravih dobrovoljaca, kao i kod pacijenata s plak psorijazom. Najčešće nuspojave, povezane s liječenjem dalazatidom, bile su parestezija i

hipoestezija koja je donekle ovisna o dozi. Odnos između blokatora kalijevih kanala i parestezije dobro je poznat. Naime, prolazna blokada kalijevih kanala prisutnih u leđnim ganglijima i kožnim osjetilnim živčanim vlaknima rezultira funkcionalnim poremećajima koji se očituju kao parestezija. Mehanizam djelovanja dalazatida je različit od tradicionalnih terapija usmjerenih na T-stanice. Tradicionalne terapije blokiraju aktivaciju ili migraciju svih populacija T-stanica. Takve terapije su jako imunosupresivne, što može dovesti do ozbiljnih štetnih učinaka. Dalazatid je jedinstven, jer blokira samo podskup kronično aktiviranih T-stanica uključenih u patogenezu autoimunih bolesti. Liječenje dalazatidom može inhibirati proizvodnju upalnih citokina i stoga imati širi potencijalni učinak od terapija usmjerenih na jedan citokin. Ovo ispitivanje prvenstveno je dizajnirano za procjenu sigurnosti, podnošljivosti i farmakodinamike dalazatida. Zbog male veličine uzorka bolesnika, kratkog trajanja liječenja (4 tjedna) i toga što su pacijenti imali blagi do umjereni stadij bolesti, pozitivni klinički odgovori nisu bili očekivani. Poboľšanja u rezultatima ciljne lezije, PASI, IGA, PGA i DLQI kao i smanjenje količine upalnih citokina i aktivacijskih markera za T-stanice upućuju na to da dugotrajnije liječenje, uz češće doziranje, izračunato prema tjelesnoj težini bolesnika, može dovesti do daljnje kliničke koristi (Tarcha i sur., 2017).

3. Zaključci

Otkad je peptid ShK prvi put izoliran iz *S. helianthus* (1995.) pa do danas, napravljeno je mnogo istraživanja na njemu. Definiran je njegov mehanizam djelovanja na kalijeve kanale i uočena je moguća primjena u liječenju autoimunih bolesti zbog visoke selektivnosti za Kv1.3 kanale koji imaju ključnu ulogu u imunološkim odgovorima. Sintetiziran je veliki broj analoga s ciljem dobivanja veće selektivnosti i stabilnosti u organizmu. Nakon što su se godinama dobivali pozitivni rezultati u liječenju raznih bolesti na životinjskim modelima bez nepoželjnih nuspojava, tvrtka Kineta Inc. je 2015. prva dovela analog Stichodactyla toksina do kliničkog ispitivanja na ljudima. Dalazatid, prethodno zvan ShK-186 primijenjen je za liječenje plak psorijaze kod 20 od 24 dobrovoljca i dobiveni su obećavajući rezultati. Zaključeno je da se doza može povećati ovisno o tjelesnoj težini pacijenta te da bi napredak u bolesti bio još veći. Temeljem činjenice da su se u više od 20 godina istraživanja ovog spoja dobili skoro isključivo pozitivni rezultati u primjeni protiv autoimunih bolesti, može se zaključiti da se u budućnosti može očekivati još veći napredak po pitanju kliničkih ispitivanja, pa čak i razvoja lijekova protiv bolesti kao što su multipla skleroza, Alzheimerova bolest, razni oblici artritisa, itd.

4. Literatura

- Beeton C, Wulff H, Barbaria J, Clot-Faybesse O, Pennington M, Bernard D, Cahalan MD, Chandy KG, Beraud E. 2001. Selective blockade of T lymphocyte K_v channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 13942–13947.
- Beeton C, Pennington MW, Wulff H, Singh S, Nugent D, Crossley G, Khaytin I, Calabresi PA, Chen CY, Gutman GA, Chandy KG, 2005. Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channels for therapy of autoimmune diseases. *Molecular Pharmacology* 67, 1369–1381.
- Beeton C, Wulff H., Standifer NE, Azam P, Mullen KM, Pennington MW, Kolski-Andreaco, A, Wei E, Grino A, Counts DR, Wang PH, Leehealey CJ, Andrews BS, Sankaranarayanan A, Homerick D, Roeck WW, Tehranzadeh J, Stanhope KL, Zimin P, Havel PJ, Griffey S, Knaus HG, Nepom GT, Gutman GA, Calabresi PA, Chandy KG, 2006. Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 17414–17419.
- Castaneda O, Sotolongo V, Amor AM, Stocklin R, Anderson AJ, Harvey, AL, Engstrom A, Wernstedt C, Karlsson E, 1995. Characterization of a potassium channel toxin from the Caribbean sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 33, 603–613.
- Castaneda O, Harvey AL, 2009. Discovery and characterization of Cnidarian peptide toxins that affect neuronal potassium ion channels. *Toxicon* 54, 1119–1124.
- Chi V, Pennington MW, Norton RS, Tarcha EJ, Londono LM, Sims-Fahey B, Upadhyay SK, Lakey JT, Iadonato S, Wulff H, Beeton C, Chandy KG, 2012. Development of a sea anemone toxin as an immunomodulator for therapy of autoimmune diseases. *Toxicon*. 59 (4): 529–46.

- Chuaprapaisilp T, Piamphongsant T, 1978. Treatment of pustular psoriasis with clofazimine. *British Journal of Dermatology* 99, 303–305.
- Craythorn JM, Swartz M, Creel DJ, 1986. Clofazimine-induced bull's eye retinopathy. *Retina* 6, 50–52.
- Gilhar A, Bergman R, Assay B, Ullmann Y, Etzioni A, 2011. The beneficial effect of blocking Kv1.3 in the psoriasiform SCID mouse model. *Journal of Investigative Dermatology* 131, 118–124.
- Hultqvist M, Olofsson P, Gelderman KA, Holmberg J, Holmdahl R, 2006. A new arthritis therapy with oxidative burst inducers. *Public Library of Science Medicine* 3, e348.
- Lam J, Wulff H, 2011. The lymphocyte potassium channels Kv1.3 and KCa3.1 as targets for immunosuppression. *Drug Development Research* 72:573–584.
- Maezawa I, Nguyen HM, Di Lucente J, Jenkins DP, Singh V, Hilt S, Kim K, Rangaraju S, Levey AI, Wulff H, Jin LW, 2018. Kv1.3 inhibition as a potential microglia-targeted therapy for Alzheimer's disease: preclinical proof of concept. *Brain* 141(2):596-612.
- Mathew BS, Pulimood AB, Prasanna CG, Ramakrishna BS, Chandy SJ, 2006. Clofazimine induced enteropathy – a case highlighting the importance of drug induced disease in differential diagnosis. *Tropical Gastroenterology* 27, 87–88.
- Matheu MP, Beeton C, Garcia A, Chi V, Rangaraju S, Safrina O, Monaghan K, Uemura MI, Li D, Pal S, de la Maza LM, Monuki E, Flugel A, Pennington MW, Parker I, Chandy KG, Cahalan MD, 2008. Imaging of effector memory T cells during a delayed-type hypersensitivity reaction and suppression by Kv1.3 channel block. *Immunity* 29, 602–614.
- McDougall AC, Horsfall WR, Hede JE, Chaplin AJ., 1980. Splenic infarction and tissue accumulation of crystals associated with the use of clofazimine (Lamprene; B663) in

- the treatment of pyoderma gangrenosum. *British Journal of Dermatology* 102, 227–230.
- Nair LV, Shereef PH, 1991. Successful treatment of generalized pustular psoriasis with clofazimine. *Journal of Investigative Dermatology* 30, 151.
- Norton RS, Pennington MW, Wulff H, 2005. Potassium channel blockade by the sea anemone toxin ShK for the treatment of multiple sclerosis and other autoimmune diseases. *Current Medicinal Chemistry*. 11 (23): 3041–52.
- Norton RS, Pennington MW, Beeton C, 2015. Case Study 2: transforming a toxin into a therapeutic: the sea anemone potassium channel blocker ShK toxin for treatment of autoimmune diseases. In G. F. King (Ed.), *Venoms to Drugs: Venom as a Source for the Development of Human Therapeutics* (Veljača 2015, 255-274).
- Parizhskaya M, Youssef NN, Di Lorenzo C, Goyal RK, 2001. Clofazimine enteropathy in a pediatric bone marrow transplant recipient. *Journal of Pediatrics* 138, 574–576.
- Pennington MW, Byrnes M, Zaydenberg I, Khaytin I, de Chastonay J, Krafte D, Hill R, Mahnir V, Volberg W, Gorczyca W, Kem WR, 1995. Chemical synthesis and characterization of ShK toxin: a potent potassium channel inhibitor from a sea anemone. *International journal of peptide and protein research* 346, 354–358.
- Pennington MW, Beeton C, Galea CA, Smith BJ, Chi V, Monaghan KP, Garcia A, Rangaraju S, Giuffrida A, Plank D, Crossley G, Nugent D, Khaytin I, Lefievre Y, Peshenko I, Dixon C, Chauhan S, Orzel A, Inoue T, Hu X, Moore RV, Norton RS, Chandy KG, 2009. Engineering a stable and selective peptide blocker of the Kv1.3 channel in T lymphocytes. *Molecular Pharmacology*. 75 (4): 762–73.
- Ren YR, Pan F, Parvez S, Fleig A, Chong CR, Xu J, Dang Y, Zhang J, Jiang H, Penner R, Liu JO, 2008. Clofazimine inhibits human Kv1.3 potassium channel by perturbing calcium oscillation in T lymphocytes. *Public Library of Science ONE* 3, e4009.

Sullivan JK, Miranda LP, Gegg CV, Hu S, Belouski EJ, Murray JK, Nguyen H, Walker KW, Arora T, Jacobsen FW, Li Y, Boone TC, 2010. Selective and Potent Peptide Inhibitors of Kv1.3. WO 2010/ 108154A2. Amgen, p. 288.

Tarcha EJ, Olsen CM, Probst P, Peckham D, Muñoz-Elías EJ, Kruger JG, Iadonato SP, 2017. Safety and pharmacodynamics of dalazatide, a Kv1.3 channel inhibitor, in the treatment of plaque psoriasis: A randomized phase 1b trial. Public Library of Science One 12 (7): e0180762.

Tudor JE, Pallaghy PK, Pennington MW, Norton RS, 1996. Solution structure of ShK toxin, a novel potassium channel inhibitor from a sea anemone. Nature structural biology 3, 317–320.

Wulff H, Calabresi PA, Allie R, Yun S, Pennington M, Beeton C, Chandy KG, 2003. The voltage-gated Kv1.3 K_v channel in effector memory T cells as new target for MS. Journal of Clinical Investigation 111, 1703–1713.

https://en.wikipedia.org/wiki/Stichodactyla_toxin

https://www.123rf.com/photo_48964781_sea-anemone-stichodactyla-helianthus-commonly-called-sun-anemone-caribbean-sea-panama.html

https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-Kv13-and-ChTx-In-A-and-B-the-view-is-parallel-and-perpendicular-to_fig2_299396522

<http://aups.org.au/Proceedings/41/77P/77P.pdf>

https://www.researchgate.net/figure/Solution-structure-of-ShK-Dap-22-A-stereo-view-of-the-best-20-structures-of-ShK-Dap-22_fig5_13456772

<http://molpharm.aspetjournals.org/content/75/4/762/tab-figures-data>