

In vivo* učinki aktinoporinov, izoliranih iz *Actinae equinae** *In vivo* effects of actinoporins, isolated from *Actinia equina*

Valentina Otja Giacomelli**

Ključne besede
morska vetrnica
toksinologija
elektrokardiografija
krvni pritisk
pletizmografija
citotoksini

Key words
sea anemones
toxinology
electrocardiography
blood pressure
plethysmography
cytotoxins

Izvleček. Aktinoporini, toksične beljakovine, izolirane iz morske vetrnice *Actinae equinae*, oblikujejo selektivne pore za katione v celičnih membranah in s tem povzročijo citolizo. V nalogi sem raziskovala mehanizme toksičnosti aktinoporina ekvinatoksina I. Učinke ekvinatoksina I sem ugotavljala z merjenjem I. odvoda EKG, dihalnega volumna in arterijskega pritiska, z sledovanjem hematoloških in biokemičnih sprememb krvi ter patohistoloških sprememb v tkivu srčne mišice in pljuč. Krvni tlak po vbrizgu ekvinatoksina I pade na vrednost srednjega cirkulacijskega tlaka, nastopi tahipnoe in izrazita bradikardija, ki ji sledi obdobje relativne tahikardije. V času bradikardije je opaziti zmanjšanje amplitude valov P in podaljšanje intervala P-Q. Končno nastopi ventrikularna ekstrasistolija in valovi P izginejo. Po obdobju tahipnoe dihanje preneha, nato začne poskusna žival ponovno dihati, končno pa dihanje preneha. Poskusna žival pogine zaradi zastoja dihanja in delovanja srca. Analiza krvi je pokazala hemolizo in hiperkaliemijo, padec hematokrita in povečanje plazemske koncentracije kalija za štirikrat. Patomorfološki pregled je razkril pljučni edem s krvavitvami, v srčni mišici pa zgodnjo nekrozo srčne mišičnine. Ekvinatoksin I za razliko od drugih aktinoporinov deluje na vzdražnost predvorov, saj po njegovem delovanju valovi P v EKG-zapisu izginejo. Hiperkaliemija kot vzrok smrti poskusne živali ni zadostna. Rezultati raziskave dovoljujejo sklep, da ekvinatoksin I povzroči akutno nekrozo srčne mišice, ki je poleg pljučnega edema v veliki meri odgovorna za smrt poskusne živali.

Abstract. The mechanism of action of the actinoporins, substances from the sea anemone *Actinia equina*, is by cation selective pore formation in the cellular membranes that consequently cause cell lysis. The aim of the present study was to investigate the mechanism of the toxicity of actinoporin equinatoxin I. In *in vivo* experiments the measurements of ECG (lead I), respiratory activity and arterial blood pressure were taken, the hematological and biochemical analysis of the blood samples were performed. The tissue samples were taken for pathomorphologic examination. After application of equinatoxin I there was a fall in the arterial pressure. A prominent bradycardia was followed by the phase of the relative tachycardia. During the bradycardia the amplitude of P waves was diminished and the P-Q interval was prolonged. Eventually ventricular extrasistole developed and P waves disappeared. The tachypnoe was followed by the breathing cessation. In a while the animal started to breath and terminated again. The experimental animals died due to the cardio-respiratory arrest. The blood samples revealed haemolysis and hyperkalemia, fall of hematocrit and rise in potassium plasma concentration for four times. Pathomorphological examination showed pulmonary edema with hemorrhages and early necrosis of cardiomyocytes. The lethality of actinoporins is due to cardiorespiratory arrest. Equinatoxin I differentiates from the other actinoporins in the special activity on the excitability of the atrium, as the P waves in ECG disappeared. The induced hyperkalemia was not sufficient to explain the lethality of the toxin. Equinatoxin I induces acute necrosis of myocardium. Together with pulmonary edema this is the most important mechanism that leads to the death of experimental animals.

*Objavljeno delo je bilo nagrajeno s Prešernovo nagrado za študente v letu 1996.

**Valentina Otja Giacomelli, štud. med., Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, 1000 Ljubljana.

Uvod

Toksini so snovi naravnega izvora, ki lahko v razmeroma nizki koncentraciji povzročijo smrt poskusne živali. Po naključnem ali načrtovanem odkritju bioaktivne snovi sledi izolacija učinkovin in njihova biokemična analiza. Izolirani snovi določimo toksičnost, ki jo navadno izrazimo z LD_{50} . To je odmerek snovi, ki se izkaže kot letalen v polovici poskusov. Kadar je LD_{50} razmeroma majhna, bioaktivno snov poimenujemo toksin.

Raziskovalni pristopi v toksinologiji

Biokemična zgradba snovi sama po sebi večinoma ne izdaja mehanizma delovanja. Podobnost zgradbe z bioaktivnimi snovmi z znanim mehanizmom delovanja je lahko dobra iztočnica za načrtovanje usmerjenih poskusov *in vitro* in *in vivo*. Pri poskusih *in vivo* homeostatski mehanizmi zmanjšujejo vpliv toksina na organizem in s tem popačijo patogenetsko sliko ter otežijo ugotavljanje prijemališč delovanja toksina. Poskusi *in vivo* so zato zapleteni. Z njimi ugotavljamo, na katere organske sisteme toksin prvenstveno deluje. S poskusi *in vivo* lahko najbolje proučujemo spremembe vitalnih funkcij.

Ko spoznamo prvenstveni tarčni organ delovanja toksina, preverjamo s poskusi *in vitro* neposredne učinke toksina. S poskusi na izoliranih organih in celičnih kulturah, kjer je mogoče poskusne razmere sorazmerno dobro nadzirati, lahko sproti spremljamo akutne spremembe opazovanih fizioloških parametrov glede na kontrolno vrednost pred vbrizgom toksina. Najbolj neposreden odgovor o mehanizmu delovanja toksina pa dajo raziskave učinkov na celični in molekularni ravni. Dobljenih rezultatov poskusov *in vitro* pa kljub temu ni vedno preprosto projicirati v patofiziološko sliko procesa *in vivo*. Posamezna raziskava zato le težko daje dokončen odgovor o mehanizmu delovanja biološko aktivne snovi.

Citolitični toksini

Citolitični toksini (1) poškodujejo celično membrano. Povzročijo akutno letalno okvaro celice. Citoplazemska membrana ali plazmalema predstavlja namreč prepreko med znotrajceličnim, visoko uravnanim citoplazemskim okoljem in zunajcelično tekočino. Plazmalema vzdržuje tudi elektrokemični gradient med zunanjo in notranjo stranjo, kar je podlaga vzdražnosti nekaterih celic, ki so sposobne proženja akcijskih potencialov. Membrane v grobem sestavlja ogrodje iz lipidnega dvosloja, ki sestoji iz ambifilnih fosfolipidov, s hidrofobnimi konci v notranjosti membrane in hidrofilnimi glavami na zunanjih straneh membrane. Holesterol vpliva na njeno fluidnost, različni glikolipidi in glikoproteini pa določajo funkcionalne značilnosti membrane. Posamezni tipi celic se razlikujejo po količini in vrsti membranskih lipidov in beljakovin. Med citolitičnimi toksini so za to nalogo najpomembnejši porini, ki povzročijo lizo celic z nastankom por v plazmalemi.

Porini – toksini, ki oblikujejo membranske pore

Porini predstavljajo veliko heterogeno skupino toksinov, ki se med seboj razlikujejo po izvoru in velikosti por. Polmer odprtine pore lahko znaša od 0,2 nm pri nekaterih antibiotikih do 15 nm pri bakterijskih toksinih. V odvisnosti od velikosti in števila nastalih por

izgubi prizadeta celica nadzor nad normalno ionsko sestavo znotrajceličnega prostora in vitalne molekule začnejo uhajati v medceličnino. Hkrati pride do kopičenja Na^+ v celi in nabiranja vode z nabrekanjem in končno lizo celice.

V mehanizmu nastanka por opazimo podobnost med nekaterimi bakterijami, virusi, porini in fiziološko reakcijo vezave kompleksa. Najbolj znani citolitični toksini, ki oblikujejo pore v celični membrani, so bakterijski toksini streptokokov, stafilokokov, bacilusov, klostridijev, listerije, nekateri antibiotiki in toksini morskih vetrnic.

Aktinoporini – citolitični toksini morskih vetrnic

Iz morskih vetrnic so ekstrahirali mnogo citolitičnih in še zlasti hemolitičnih dejavnikov, manj pa so jih izolirali in analizirali (tabela 1). Večina toksinov je bazičnih beljakovin z molekularno maso okrog 20 kDa. Litični učinek lahko večinoma preprečimo s poprejšnjo inkubacijo toksinov s sfingomielinom. Ta fosfolipid naj bi bil tudi receptor za omenjene toksine. Med seboj se razlikujejo v imunoloških in fizikalnih lastnostih ter aminokislinski sestavi. V doslej analiziranih zaporedjih aminokislilin pa so kljub temu našli določeno stopnjo homologije, še posebej v aktivnem delu toksinske molekule.

Tabela 1. *Citolitični toksini morskih vetrnic.*

Toksin	Morska vetrnica, ki toksin vsebuje
Citolizin III	<i>Stoichactis heliantus</i>
Kentin	<i>Stoichactis kenti</i>
Epiactini A, B, C	<i>Epiactis prolifera</i>
Variolizin	<i>Pseudoactinia varia</i>
Parasitotoksin	<i>Parascyonyx actinostoloides</i>
Tealiatoksin	<i>Tealia felina</i>
Ekvinatoksin I, II in III	<i>Actinia equina</i>
Karitoksin I in II	<i>Actinia cari</i>
Condylactis toksin	<i>Condylactis gigantea</i>

Morske vetrnice izvirajo iz rodu ožigalkarjev (*Cnidaria*) in imajo specializirane organele nematociste, v katerih se nahajajo različni toksini. Nekatere vetrnice prebivajo tudi v Jadranskem morju (*Actinia equina*, *Actinia cari*, *Anemonia sulcata*). Veliko zanimanje za toksine morskih vetrnic je nastopilo po izolaciji številnih toksinov z različnimi mehanizmi delovanja. Ti toksini so večinoma polipeptidi. V nekaterih vetrnicah prevladujejo manjši (2–6 kDa) nevrotoksini, ki niso litični, v drugih pa večji polipeptidi (okrog 20 kDa) citolizini (1).

Nevrotoksični polipeptidi delujejo na prevodnost napetostno odvisnih kationskih kanalčkov. Najbolj so raziskani nevrotoksini, ki vplivajo na aktivacijo ali inaktivacijo Na^+ -kanalčkov, našli pa so tudi toksine, ki blokirajo K^+ -kanalčke.

Citolizini spadajo v skupino bazičnih polipeptidov z veliko afineteto do sfingomielina, ki se vklopijo v lipidni dvosloj membrane in oblikujejo pore. Pri nas so izolirali citolizine iz

A. equine in *A. cari* (2, 3). Podobni citolizini so bili izolirani še iz avstralske morske vetrnice *A. tenebrosae* (tenebrosin A, B, C) (4), karibske morske vetrnice *Stoichactis heliantus* (5) in drugih vrst morskih vetrnic.

Leta 1977 je Bernheimer (6) predlagal poimenovanje citolitičnih polipeptidov, izoliranih iz morskih vetrnic, sestavljeno iz imena vrste in »končnice« – lizin (ekvinalizin za EqT). Leta 1988 pa je Kem (7) predlagal skupno ime aktinoporini zaradi značilne tvorbe membranskih por. Ti toksini spadajo med najbolj toksične do zdaj znane naravne snovi. Kljub temu pa toksini večine morskih vetrnic, s katerimi se srečujemo, niso nevarni za ljudi, ker strupni organ ni razvit tako, da bi predril človeško kožo. Pomembni so za proučevanje dogajanj na ravni celičnih membran in interakcij med fosfolipidi in beljakovinami. So tudi potencialne kardioestimulantne (8) in protitumorske učinkovine (9). Na velik pomen teh toksinov kaže tudi dejstvo, da jih že izdelujejo laboratorijsko z genetskim inženiriranjem (5). Za študijo smo izbrali ekvinatoksin I, ki je eden najmanj raziskanih, a hkrati najbolj toksičnih aktinoporinov.

Aktinoporini, izolirani iz *Actiniae equinae*

Ekvinatoksin je bil prvič izoliran leta 1974 iz morske vetrnice *Actinia equina* L (2) in je bil med prvimi izoliranimi aktinoporini. Kasneje so izolirali in opredelili tri izotoksine, ki vsi spadajo v skupino aktinoporinov (3).

Kemična struktura in lastnosti

Leta 1986 so izotoksine iz *Actiniae equinae* tudi biokemično analizirali in opredelili kot ekvinatoksine I, II in III (EqT I, II in III). Ti so letalne in citolitične beljakovine (3), ki so velike 20 kDa, močno bazične (pI = 9,8 za EqT I, pI = 10,5 za EqT II, III) in termostabilne do 80°C. Pepsin in tripsin jih razgrajujeta. V izoliranem materialu je največ izotoksina EqT II, ki je tudi edini izotoksin, ki ga najdemo v lovkah te živali. Iz telesa vetrnic pa so izolirali vse tri izotoksine. Pred odkritjem treh izotoksinov in izboljšanjem izolacijskih postopkov so v poskusih uporabljali nejasno opredeljen EqT, ki sta ga prva izolirala in opisala Ferlan in Lebez leta 1974 (2). Učinki EqT verjetno ustrezajo predvsem učinkom EqT II, saj je tega toksina v izoliranem materialu največ. Kljub temu pa moramo upoštevati možnost, da sta za posamezne takrat opisane specifične učinke EqT odgovorna tudi preostala dva ekvinatoksina.

Učinki ekvinatoksinov I, II in III na celičnih membranah

Citolitična in še zlasti hemolitična aktivnost (10) je glavna značilnost izotoksinov *Actinia equine* in je verjetno eden od mehanizmov delovanja na kardiorespiratorni sistem. Ekvinatoksini povzročijo citolizo z nastankom por, zato sodijo v skupino aktinoporinov. Funkcionalni polmer por je 1,1 nm. Receptorska molekula v membrani eritrocita in drugih celic je sfingomielin (11). Pore se oblikujejo z vstavljanjem in oligomerizacijo toksinskih molekul v celične membrane. Pora sestoji iz posameznih citolizinskih monomerov in je neselektivno prepustna za katione. Oblikovanje por vodi v koloidno-osmotski tip celične poškodbe in propad celice. Poleg tega je za okvaro celice pomemben tudi porast aktivnosti citosolnega Ca²⁺ (kot univerzalnega sekundarnega prenašalca), ki vstopi v celico

skozi novonastale kanale in lahko sproži različne nepovratne spremembe v celični fiziologiji in morfologiji, končno tudi celično smrt.

Kinetika hemolize in vpliv nekaterih ionov

Študijo kinetike hemolize so napravili s spektrofotometričnim opazovanjem sproščanja hemoglobina iz eritrocitov (12). Ugotovili so sigmoidni tip kinetike, ki je značilen tudi za druge citolitične encime in je odvisen od koncentracije ter tipa izotoksina. Hitrost hemolize se večja s količino sfingomielina v membrani, hkrati pa je tudi funkcija pH in koncentracije različnih ionov v mediju: aktivnostni optimum doseže hemoliza pri pH 8,8, nad pH 10 in pod 6,5 pa učinkovitost toksina izrazito upade. Dodajanje Ca^{2+} v medij hemolizo pospešuje, Mg^{2+} , Ba^+ , Li^{2+} in EDTA pa jo upočasnjujejo. Toksin ne kaže fosfolipazne aktivnosti.

Med posameznimi ioni ima največji vpliv Ca^{2+} . EqT sicer kaže močan hemolitični učinek tudi v odsotnosti Ca^{2+} -ionov, ob njegovi prisotnosti pa hemolitična aktivnost narašča. Za hemolizo je pomembna tudi neposredna aktivacija od Ca^{2+} odvisnih K^+ -kanalčkov z EqT II (13).

Morfološke spremembe celic po aplikaciji EqT II

Morfološke spremembe celic po aplikaciji EqT II so s transmisijsko elektronsko mikroskopijo opazovali na fibroblastni celični kulturi V-79-379 (14). Ob dodatku EqT II v sublitničnih koncentracijah ($5,8 \times 10^{-11}$ – $5,3 \times 10^{-10}$) so bile citotoksične ultrastrukturalne spremembe očitne. Številni mehurčki se kopičijo na površini celic, kjer so opazili tudi znižanje mikrovilov. Golgijev aparat in mitohondriji so nabrekli, celično jedro pa je ostalo nespremenjeno. Po dodajanju visokih koncentracij EqT II ($5,8 \times 10^{-9}$) v medij celične kulture so opazili razpad celice.

Vpliv EqT na agregacijo trombocitov

EqT povzroči agregacijo spranih zajčjih trombocitov pri koncentraciji 0,01 ng/ml (15). Pri tem so opazili sproščanje ATP, ne pa tudi tromboksana B_2 . Agregacija trombocitov je bila odporna proti dodajanju indometacina, kreatin-fosfat/kreatin fosfokinaze ali antagonistov trombocite aktivirajočega dejavnika (angl. *platelet-activating factor*, PAF). Agregacijo pa so zavirali imipramin, Na^+ nitroprusid, mepakrin, teofilin, prostaglandin E_1 in EDTA. Verapamil inhibira tako agregacijo kot tudi reakcijo sproščanja, ki jo EqT povzroči pri koncentracijah Ca^{2+} v zunajcelični tekočini od 0,01 do 15 mM. Velike koncentracije EqT so povzročile razpad trombocitov. Agregacija trombocitov, povzročena z EqT, je neodvisna od ADP, tromboksana ali PAF. Vpletena je fosfoinozitolfosfatna pot, ki se sproži z aktivacijo fosfolipaze C.

Učinki EqT na živčno-mišični sistem

Na skeletni mišici in mieliniziranem živčnem vlaknu so ugotavljali vpliv EqT II na membranski potencial (16, 17) z mikroelektrodno tehniko in z *vaseline-gap voltage-clamp* metodo. Pri skeletni mišici (*m. gastrocnemius*, *m. extensor longus digiti IV* in *m. semitendinosus* žabe) so opazili ireverzibilni padec membranskega potenciala. Takoj po aplikaciji EqT II

je mogoče zaznati močno povečano nespecifično prevodnost membrane (angl. *leakage currents*), katere velikost je premosorazmerna s koncentracijo in trajanjem dodajanja toksina. EqT I in II na skeletni mišici ireverzibilno blokirata Na⁺-kanalčke. Za EqT II so ugotovili, da blokira natrijev tok ob nespremenjenem ravnotežnem potencialu za Na⁺, iz česar je lahko sklepati, da EqT II deluje neposredno na Na⁺-kanale. Nasprotno pa EqT III zmanjšuje amplitudo akcijskih potencialov in natrijevega toka v veliki meri preprosto s tem, da Na⁺ vdre v celico in tako zmanjša koncentracijsko razliko med notranjim in zunanjim celičnim prostorom, s tem pa tudi elektrokemijski gradient.

Na izoliranem mieliniziranem senzoričnem živčnem vlaknu ishiadičnega živca žabe EqT II reverzibilno blokira repolarizacijski kalijev tok, EqT III pa močno poveča nespecifično membransko prevodnost (17). EqT II pa tu ne vpliva na Na⁺-tokove. V primerjavi z mišico je živčno vlakno bolj odporno na litični učinek toksinov. To verjetno lahko razložimo s pufrajočim učinkom mielinske ovojnice, kjer je sfingomielin v veliki količini.

Učinki EqT na srce in žilje

Na izoliranem preparatu atrijskega prašička (18) so pri perfuziji tkiva z EqT opazili prehodnega negativnega dromotropnega in inotropnega učinka, čemur je po 30–60 sekundah sledila faza s pozitivnim dromotropnim in inotropnim učinkom, ki je trajala do 30 minut. Podobna opažanja na tenebrozinu iz *Actinia tenebrosa* so avtorje napeljala k misli, da bi toksin lahko bil prototip novih kardiostimulatornih zdravil. Kasnejše študije pa so pokazale, da sta EqT II in tenebrozin pravzaprav istovetna, da gre le za dvojno poimenovanje iste snovi in iste morske vetrnice (4).

Na Langendorffovem preparatu srca morskega prašička so ugotavljali vpliv EqT II na koronarni pretok, EKG in moč krčenja prekatov (19–22). Učinki EqT II so bili odvisni od koncentracije toksina v perfuzijski tekočini. Pri koncentraciji 10 nM do 1 μM se pretok skozi koronarne žile zmanjša na 10 % začetne vrednosti. Tudi sila krčenja se zmanjša na 10 % začetne vrednosti, izmerjene pred perfuzijo izoliranega srca z EqT II. Frekvenca upade na 30 % začetne vrednosti, EKG pa pokaže bradikardijo. Električna aktivnost prekatov povsem izgine, valovi P pa ostanejo neprizadeti, kar kaže na atrio-ventrikularni blok, ali pa je prekatna mišica postala nevzdražna. Srce se ustavi v 5–7 minutah.

Pri farmakološki študiji učinkov EqT II na Langendorffovem preparatu srca morskega prašička ob prisotnosti nitroglicerina in verapamila so ugotovili, da prvi blokira negativni inotropni učinek EqT II in povzroči manjši upad koronarnega pretoka, verapamil pa poleg zgornjega tudi močnejše varuje pred nastopom aritmije (19). Ti rezultati podpirajo domnevo, da je podlaga kardiotoksičnih učinkov dvig koncentracije znotrajceličnega Ca²⁺ in vazospazem koronarnih žil.

Učinki EqT na pljučni krvni obtok

Pri poskusih s perfuzijo izoliranih pljuč buder z EqT II (23) so ugotovili nastanek pljučnega edema, katerega obširnost je odvisna od odmerka EqT v perfuzijski tekočini. Pri majhnih koncentracijah (pod 150 ng/ml) je tekočina omejena na znotrajcelični in delno tudi na intersticijski prostor, pri koncentraciji, ki je enaka ali večja od 150 ng/ml, pa se

edemska tekočina razlije v alveolarne prostore. EqT torej močno poveča prepustnost pljučnih žil. Hkrati so z aplikacijo Na⁺-kromolina dokazali, da v primeru EqT pljučni edem ni posredovan z degranulacijo mastocitov, torej s histaminom, čeprav je morfološko podobno.

Učinki ekvinatoksinov *in vivo*

Toksični učinki ekvinatoksinov so pestri. Nekoliko podrobneje poznamo le učinke EqT II. Pri treh izotoksinih obstaja zanimiva raznolikost med hemolitičnostjo (3) in toksičnostjo. Hemolitična aktivnost je obratnosorazmerna z LD₅₀ posameznih izotoksinov, torej, tem manj ko je izotoksin hemolitičen, tem bolj je toksičen. To je še zlasti izrazito pri EqT I, katerega učinke *in vivo* obravnavamo v tej študiji. Toksični učinki posameznih izotoksinov torej ne morejo biti posledica le hemolitičnosti, temveč tudi katerega drugega, še neznanega mehanizma. LD₅₀ posameznih izotoksinov so navedene v tabeli 2.

Tabela 2. Akutne LD₅₀ določene na podlagi opazovanja pogina podgan v prvih 12 urah po vbrizgu izotoksina v repno veno. LD₅₀ je odmerek snovi, ki se izkaže kot letalen v polovici poskusov.

Toksin	LD ₅₀
EqT I	23 µg/kg
EqT II	35 µg/kg
EqT III	83 µg/kg

Ekvinatoksini imajo visoko afiniteto vezave na sfingomielin. Poprejšnja inkubacija EqT II s sfingomielinom, kot že rečeno, prepreči hemolizo po vbrizganju v kri poskusne živali. Tudi dodajanje EqT, poprej inkubiranega s sfingomielinom, suspenziji eritrocitov nima merljivih hemolitičnih učinkov.

V poskusih *in vivo* na laboratorijskih podganah je Sket s sodelavci (24) opazoval spreminjanje EKG, arterijskega tlaka in akcijskih potencialov (AP) na frenični živec. Med seboj je primerjal rezultate enakih poskusov na intaktnih, vagotomiranih in umetno predihanih podganah. Ugotovil je inhibitorno-stimulatorne vplive EqT. Minuto po vbrizgu toksina so izginili AP na freničnem živcu. S tem je zamrla dihalna aktivnost, hkrati je nastopila bradikardija s padcem tlaka. Inhibitorna faza je trajala 15–20 sekund. Sledila je stimulatívna faza s 3–7 minutnim porastom tlaka in povečano srčno frekvenco, ki pa ni preseгла normalne. Pulzni in arterijski tlak sta nato postopoma upadala. Pri umetno predihanih in vagotomiranih podganah je bil časovni potek dogodkov kvalitativno in kvantitativno primerljiv z opažanji na intaktni podgani. Frenični živec je bil tudi po tem, ko ni bilo več zaznati dihalne aktivnosti, sposoben prevajati impulze, sprožene z električno stimulacijo, diafragma pa se je krčila skladno s frekvenco električnih impulzov.

Učinki EqT II *in vivo*

Leta 1986 so izolirali in opredelili posamezne izotoksine *A. equine*. Pojavilo se je vprašanje, kateremu izmed njih ustrezajo rezultati prve *in vivo* študije. V okviru raziskovalne

naloge za Prešernovo nagrado je Bunc (25, 26) preskusil EqT II, ki ga je v izvlečku morskimi vetrnici največ. Opazoval je spremembe EKG in dihanja po vbrizgu EqT II v repno veno laboratorijskih podgan. Že v prvi minuti po vbrizgu toksina je opazil postopno zmanjševanje frekvence dihanja, ki je v drugi minuti nenadoma povsem prenehalo. Nekaj trenutkov ni bilo zaznani dihalnih gibov, nato pa je sledila ponovna dihalna aktivnost, ki je končno zamrla po 1–2 minutah. Spremembe električne aktivnosti v srcu v obliki različnih motenj ritma je zaznal hkrati s spremembami dihanja, značilno pa je bilo to, da se je atrijska aktivnost v obliki dvofaznih P-valov ohranila še dolgo po tem, ko so QRS-kompleksi izginili. Hematokrit krvi podgan, ki so poginile zaradi učinkov EqT II, se je zmanjšal. Izrazil je bil porast koncentracije kalijevih ionov v plazmi. Pri avtopsijskem pregledu organov je opazil edematoznost pljuč, površinske žariščne krvavitve in ishemične blede lise. Črevo je kazalo znake srčnega zastoja.

Učinki EqT III *in vivo*

V okviru magistrskega dela je Frangež (27) preučeval učinke EqT III *in vivo*. Podobno kot pri EqT II je bilo opaziti motnje dihanja in srčnega ritma. Tudi v primeru EqT III so na koncu večinoma ostali dvofazni valovi P, medtem ko je aktivnost prekatov usahnila. Arterijski tlak je upadel, nato pa je prehodno narastel nad normalo, končno pa je progresivno padal proti vrednosti srednjega cirkulacijskega tlaka. Pri tem je porasla koncentracija K⁺ v plazmi, hematokrit pa je upadel. Pri avtopsijskem pregledu je opazil podobne spremembe na pljučih, kot je bilo opisano za EqT II.

Namen naloge in delovne hipoteze

Nekateri raziskovalci menijo, da je hemoliza s posledično hiperkaliemijo glavni razlog za letalnost aktinoporinov. Raziskave učinkov ekvinatoksina II in III pa so pokazale, da je hiperkaliemija, ki jo opazimo po delovanju aktinoporinov *in vivo*, zagotovo pomemben patogenetski dejavnik, ne pa edini in odločujoč za pogin poskusne živali. Zato je čedalje bolj zanimiv EqT I, ki je najmanj hemolitičen in najbolj toksičen med ekvinatoksini, torej lahko predpostavimo, da bodo za njegove letalne učinke pomembni tudi drugi dejavniki. Kljub intenzivnosti raziskav na tem področju je o natančnem mehanizmu delovanja aktinoporinov bolj malo zadržno znanega. Na podlagi pregleda do zdaj objavljene literature s področja splošne toksinologije in aktinoporinov sem ugotovila, da z EqT I praktično še ni bilo narejene nobene študije. Opisani Sketovi poskusi *in vivo* z EqT, ko posamezni izotoksini še niso bili znani, najverjetneje ustrezajo učinkom EqT II, ki ga je v izvlečku morske vetrnice *A. equinae* največ. Z EqT I je bila poleg izolacije določena le njegova toksičnost (23 µg/kg telesne teže).

Podatki iz literature jasno kažejo na to, da je za učinek EqT II in III kardiorespiratorni sistem primarni tarčni organski sistem. Prva hipoteza je, da bo tudi EqT I glede na kemično, fizikalno, fiziološko in biološko podobnost z EqT II in III imel prvenstveni toksični in letalni učinek na kardiorespiratorni sistem. Domnevo bom potrdila ali ovrgla z opazovanjem sprememb EKG, arterijskega tlaka in dihanja ter s primerjavo s podobnimi poskusi, izvedenimi z drugimi aktinoporini.

Zaradi podobnosti ekvintoksinov lahko dalje predpostavljamo, da bo zaradi citolitičnih učinkov in intravaskularne hemolize po injiciranju EqT I porasla koncentracija kalijevih ionov v zunajcelični tekočini. Drugo hipotezo, da bo po delovanju EqT I nastopila hiperkalemija, bom preverjala z analizo elektrolitov krvne plazme po intravenski aplikaciji treh letalnih odmerkov EqT I. Hkrati bom ugotavljala pojav drugih sprememb v krvi, ki so jih opazili pri raziskavah EqT II in III.

Pri poskusih z EqT II in III so ugotovili, da hemoliza s posledično hiperkalemijo ni edini in zadostni mehanizem toksičnega delovanja. Tretja hipoteza je, da EqT I ne povzroči dovolj velikega porasta plazemske koncentracije KCl, da bi že sama hiperkalemija lahko povzročila pogin poskusne živali. To domnevo bom preverila s primerjavo rezultatov, ki jih bom dobila po vbrizgu 3 LD₅₀ v jugularno veno, s podatki o vplivu intravenske aplikacije raztopine KCl, ki povzroči enako stopnjo hiperkalemije.

EqT II in III po mnenju večine raziskovalcev povzročata spazem koronarnih arterij. Zaradi ishemije bi lahko nastala nekroza srčne mišice. Nekrozo zaradi ishemije (28, 29) bi v histološkem preparatu, barvanem s hematoksilinom in eozinom, lahko opazovali šele po 7 do 8 urah. Prej kot v tem času pa so ishemične spremembe zaznavne le z elektronskim mikroskopom. V histoloških preparatih, barvanih s hematoksilinom in eozinom in odvzetih za histološko preiskavo nekaj minut po smrti, torej ne bi smelo biti razpoznavnih nekrotičnih predelov srčne mišice, če so ti posledica ishemije. Prav tako se ne bi v tem času smele bistveno spremeniti vrednosti presnovnih encimov kot posledica uhajanja iz ishemično-nekrotičnih vlaken srčne mišice. Četrta hipoteza je, da EqT I lahko z oblikovanjem por v membrani kardiomiocitov povzroči akutno nekrozo miokarda, ki ni posledica ishemije srčne mišice zaradi vazospazma, temveč akutnega zvečanja aktivnosti citosolnega kalcija. To delovno hipotezo bom preverila s histološkim pregledom miokarda. Popolno potrditev ali zavrnitev te hipoteze samo s to študijo je iluzorno pričakovati, saj zahteva širšo raziskavo, ki sega tudi na molekularno raven in zahteva elektrofiziološke, imunohistološke, elektronskomikroskopske in druge metode, kar presega okvir moje naloge.

Materiali in metode

Poskusne živali

Poskuse sem izvedla na 25 laboratorijskih albino podganah (sev Wistar), samcih, ki so bili težki od 301 do 398 g. Trudila sem se, da bi bilo število poskusov čim manjše, a še vedno zadovoljivo za statistično obdelavo. Raziskovalni protokol je sprejela etična komisija za ocenjevanje primernosti poskusov na živalih. Poleg 10 podgan, ki so umrle s končnim žrtvovanjem med urjenjem kirurškega postopka in kanuliranja v veno ter arterijo, sem znanosti žrtvovala le dodatnih 15 podgan. Pri 5 podganah sem zasledovala spremembe EKG in dihanja, pri 5 tudi spremembe arterijskega pritiska, 5 poskusov pa je bilo kontrolnih. Avtopsične vzorce sem odvzela 5 podganam, ki so poginile zaradi učinkov toksina EqT I, in eni kontrolni podgani. Kri za analize sem odvzela 10 podganam, katerim sem vbrizgala toksin, in 3 kontrolnim podganam.

Anestezija

Pred izvedbo poskusov sem živali uvedla splošno anestezijo. Takrat je žival izgubila zavest, občutek za bolečino (analghezija), ugasnili so refleksi in sprostilo se je skeletno mišičje. Postopek sem povzela po literaturi (25–27, 30) in ga preskusila ter priredila na 10 podganah med urjenjem kirurškega posega. Izbrala sem razmerje sestavin, primerno za doseg plitve in dovolj dolge splošne anestezije, potrebne za izvedbo poskusa. Mešanico sestavin sem aplicirala intraperitonealno. Za splošno anestezijo sem uporabila (v mg/kg telesne teže):

- Ketanest (0,6), Parke-Davis, Berlin. Farmakološko delovanje: splošni anestetik.
- Rompun (0,4), Bayer, Leverkusen. Farmakološko delovanje: mišični relaksant, sedativ, analgetik.

Količino mešanice sem sproti prilagajala telesni teži poskusne živali.

Za preprečitev pretirane sekrecije v bronhialnem vejevju in iatrogenih vplivov na srce zaradi draženja vagusa, čemur se med pristopom k skupni karotidni arteriji ni dalo izogniti, sem mešanici dodala atropin (Atropin, Belupo, Koprivnica. Farmakološko delovanje: inhibitor muskarinskih acetilholinskih receptorjev – farmakološka vagotomija).

Za preprečevanje strjevanja krvi v plastičnih kanulah, ki sem jih vstavila v jugularno veno za vbrizg toksina in v skupno karotidno arterijo za merjenje arterijskega tlaka, sem uporabljala heparin. Razredčila sem ga v standardni Tyrodejevi raztopini tik pred uporabo (Heparin, Novo Nordisk Farma BV, Danska. Farmakološki učinek: antikoagulant).

Kri za analizo sem shranila v posebnih epruvetah Becton Dickinson Vacutainer, Meylan Cedex, Francija. Epruvetam za hemogram je bila dodana količina EDTA (K_3), ki je zadoščala za 2 ml krvi. V epruvetah za biokemijske analize ni bilo dodatkov.

Toksin EqT I sta podarila prof. dr. Peter Maček in prof. dr. Tom Turk z Oddelka za biologijo Biotehnične fakultete Univerze v Ljubljani. Toksin je bil izoliran in pripravljen kot že opisano (3) ter liofiliziran. Celotno količino toksina sem raztopila v vodi do končne koncentracije 10^{-5} M. Neposredno pred poskusom sem ustrezno količino toksina razredčila v 1 ml Tyrodejeve raztopine. Vsaki poskusni živali sem vbrizgala 3 LD_{50} EqT I v jugularni veni. LD_{50} za EqT I znaša 23 μ g/kg telesne teže.

Kirurški postopki in meritve

Podgano sem vzela iz kletke in jo stehala, nato pa sem jo anestezirala. Čas do nastopa kirurške anestezije je v povprečju znašal 5 minut. Podgano sem pritrdila na ogrevalno mizico tipa Harvard, katere temperatura se samodejno prilagaja rektalni temperaturi podgane.

Postopek ni potekal v asepsi, kajti žival je med poskusom poginila. Uporabljala sem pribor za oftalmološko kirurgijo. V sprednjem vratnem predelu sem odprla štirikotno polje podkožja (1 × 1 cm). V rahlem vezivu levega stranskega vratnega trikotnika sem s topo preparacijo dosegla jugularno veno, v desnem pa skupno karotidno arterijo. Sledila je kanulacija žil. Premer hepariniziranih plastičnih kanul sem s potegom prilagodila premeru žil. Kanula za jugularno veno je bila pritrjena na brizgo z raztopino toksina.

Kanula za skupno karotidno arterijo je bila del naprave za krvavo merjenje krvnega tlaka v žili. Žilo sem napela s pinceto od spodaj, nato pa sem vstavila kanulo v zarezo. Kanulo sem s sukancem utrdila v žili. Arterijo sem zgoraj podvezala, spodaj pa sem jo prehodno zaprla s primernim stiščkom, jo kanulirala in jo utrdila v žili. Stišček sem nato odstranila. Vstavila sem igelne elektrode za merjenje EKG – v obe ročici in ozemljitev v nožico. Na prsni koš sem položila vodoravno kontaktno ploščo mehanskoelektričnega pretvornika (angl. *strain gauge*), s katerim sem opazovala premike prsnega koša.

Meritev EKG, dihanja in arterijskega pritiska

Zasledovane parametre sem snemala minuto do dve pred vbrižgom toksina, raztopljene v 1 ml Tyrode (standard) raztopini. Spremembe parametrov po vbrižgu sem primerjala s podatki pred njim. Slednje sem uporabila za referenčne (normalne) vrednosti parametrov pri anestezirani podgani.

Merila sem I. standardni odvod EKG. Nerjaveče igelne elektrode sem živali zabodla v mišičje udov. Elektrode sem s 30 cm dolgimi izoliranimi žičkami priključila na osciloskop Tetrax 7313/R, ki je služil kot analogni ojačevalec (ojačenje $\times 100$). Izhod osciloskopa sem povezala z vhodi AD/DA pretvornika Digidata 1200, Axon Instruments in podatke shranjevala na trdi disk IBM-računalnika.

Arterijski tlak sem merila s krvavo metodo v žili. S Tyrodejevo raztopino napolnjen mehanskoelektrični pretvornik Elcomatic EM 751, ki se je zaključeval v plastično kanulo, sem vstavila v skupno karotidno arterijo. Signali so se ojačili na Harvard polygraph peresnem zapisovalniku in ojačevalcu. Izhod ojačevalca sem povezala prek AD/DA-pretvornika z računalnikom. Pred začetkom celotnega poskusa sem napravo umerila s pomočjo vodnega stolpca. Merila sem spremembo arterijskega in pulznega tlaka v odvisnosti od časa. Primerjala sem vrednosti tlakov pred vbrižgom toksina in po njem.

Za natančno meritev sprememb dihanja je najbolj primerna pletizmografska metoda. Ta način pa se je v predhodnih poskusih izkazal za tehnično nesprejemljiv, saj je potrebno podgano vložiti v pletizmografsko komoro, s tem pa si onemogočimo dostop do vratnih žil. Kot nadomestni metodi uporabljamo izolirano pletizmografijo prsnega koša z balonom in meritve odmikov prsnega koša z mehanskoelektričnim pretvornikom (angl. *strain gauge*). Ta dva načina, predhodno umerjena z pletizmografsko metodo, sta se izkazala kot primerna za spremljanje sprememb dihanja.

Na prsni koš sem položila vodoravno kontaktno ploščo mehanskoelektričnega pretvornika, s katerim sem opazovala premike prsnega koša. Po končanih poskusih sem podatke analizirala. Z umeritveno krivuljo sem izračunala dihalni volumen in spremembe rezidualnega volumna. Iz časovnega poteka premikov pa sem izrazila spremembe v frekvenci dihanja, ki so nastopile po vbrižgu toksina.

Prek AD/DA-pretvornika so se okrepljeni in v digitalno obliko pretvorjeni podatki shranjevali na trdem disku računalnika. Poleg EKG sem na vhode pretvornika speljala tudi signala dihanja in arterijskega pritiska. Z računalniško programsko opremo AxoScope 1.1[®] sem v digitalno obliko spremenjene podatke vseh treh merjenih parametrov sproti

opazovala na zaslonu in si tako na računalniku oblikovala protokol z vsemi značilnostmi posameznega poskusa.

Priprava vzorcev za analizo krvi

Potem ko EKG-zapis ni več kazal električne aktivnosti, sem podgano z vzdolžnim rezom od vratu do medenice odprla in s prerezom spodnje votle vene prišla do krvi za pregled krvne slike ter hemogramskih kazalcev. Za biokemične analize odvzeto kri pa sem centrifugirala pri 3500 obratih/minuto 10 minut. Plazmo sem odpipetirala v posebno epruveto brez dodatkov. Vsebino obeh epruvet so analizirali na Inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Kliničnega centra v Ljubljani.

Poskuse sem izvajala na anestetiziranih podganah, zato sem morala ugotoviti spremembo krvnih parametrov kot posledico anestezije. Kot normalne vrednosti sem uporabila laboratorijske analize krvi 3 kontrolnih poskusov, pri katerih sem uporabila enako anestezijo.

Avtopsijski pregled in priprava vzorcev za histološki pregled

Makroskopskemu pregledu organov (pljuča, srce, ledvice, mehur, črevo) *in situ* je sledilo raztelesenje. Vzorce organov sem vložila v 10 % raztopino formalina za fiksacijo (pufferirani nevtralizirani formalin). Po nekajdnevni fiksaciji v formalinu sem preparate vklopila v parafin (dehidracija z naraščajočimi koncentracijami etanola, bistrenje s ksilenom, vklop v parafinsko smolo). Enakomerno narezane tanke mikroskopske rezine z drsnim mikrotomom Zeiss sem barvala s hematoksilinom in eozinom. Preparate sem preučila s svetlobnim mikroskopom Olympus BH-2, nato pa sem izbrane vzorce posnela na diafilm Agfa 50 ASA s fotoaparatom tipa Olympus C-35AD-4. Enak postopek sem izvedla tudi pri kontrolni podgani.

Statistične metode

Za oceno statističnih značilnosti dveh majhnih ($N \leq 30$) neodvisnih vzorcev z normalno porazdelitvijo sem uporabila metode opisne statistike in Studentovega t-testa (34, 35). Vrednosti so izražene s povprečno vrednostjo \pm S.E.M. (standardna napaka povprečja). Za statistično analizo sem uporabila programske pakete Axon Instruments AxoLab®, MS Excel®, Jandel SigmaPlot® in Corel QuatroPro®.

Rezultati

Analiza učinkov EqT I na kardiorespiratorni sistem

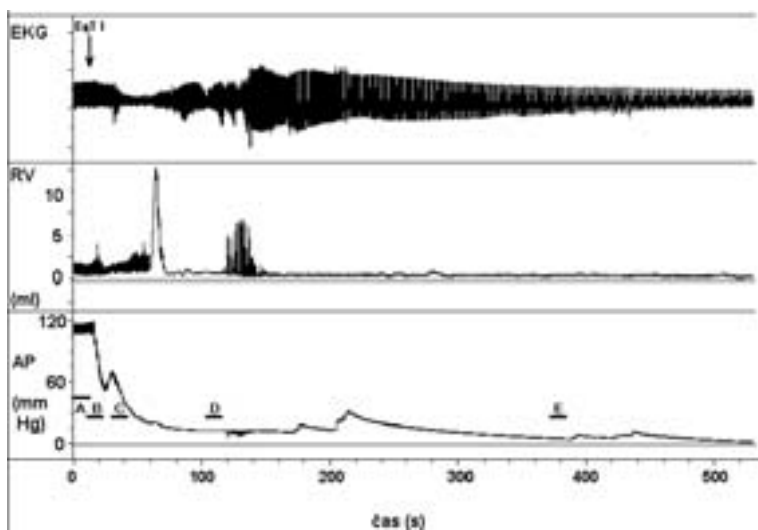
Učinki treh LD₅₀ EqT I, vbrizganega v jugularno veno poskusne živali, se pokažejo že v $7 (\pm 0,355)$ sekundah. Na sliki 1 vidimo, da najprej upade krvni tlak, merjen v skupni karotidni arteriji. Pritisk se prehodno dvigne po $6,7 \pm 1,8$ sekundah, nato pa po $22,4 \pm 5,9$ sekundah doseže vrednost srednjega cirkulacijskega tlaka.

Po vbrizgu toksina opazimo tudi izrazito tahipnejo. Frekvenca se poveča od kontrolne vrednosti $10,78 \pm 0,06 \text{ min}^{-1}$ na $69,2 \pm 3,61 \text{ min}^{-1}$ ($p < 0,01$). Hkrati se zmanjšuje dihalni

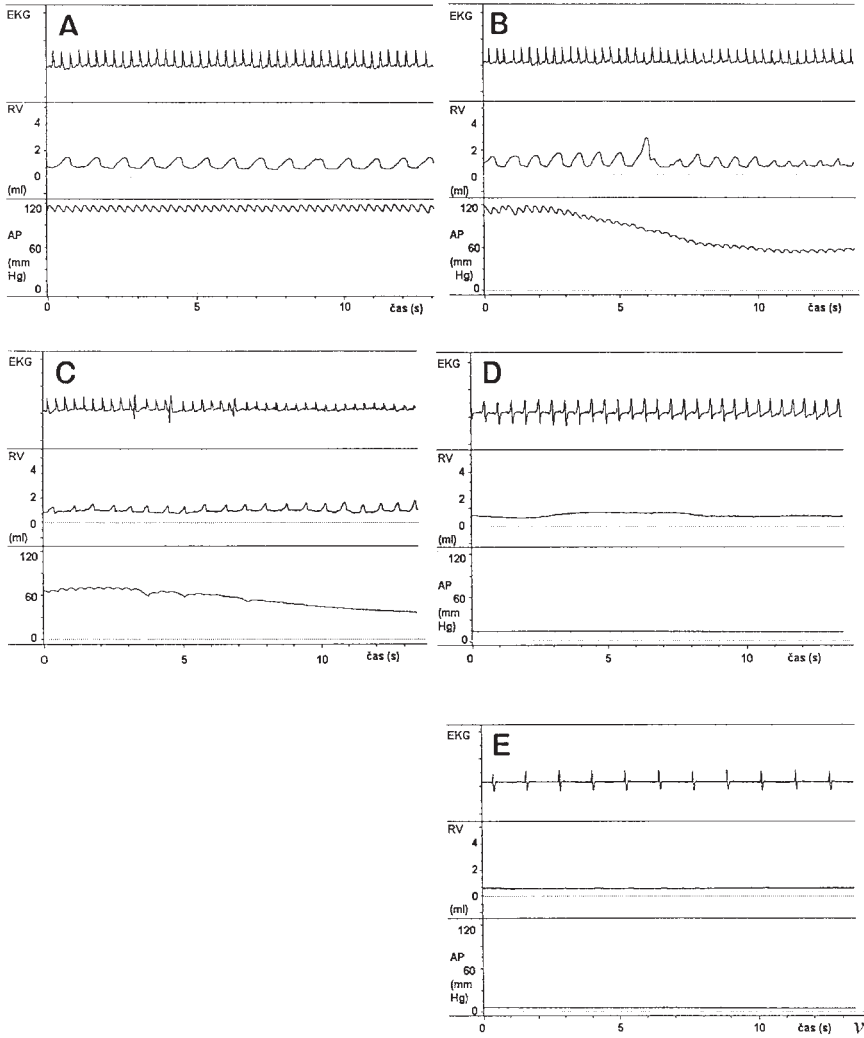
volumen. Analiza hitrosti vdihla in izdihla, izražena v $\Delta V/\Delta t$, ni pokazala nikakršnih sprememb. Tudi rezidualni pljučni volumen se ni statistično značilno spremenil. Po fazi tahipnoje sledita globok vdih in izdih, nato pa dihanje preneha, običajno po $44 \pm 12,4$ sekundah od vbrizga toksina. Poskusna žival začne ponovno dihati po $110,8 \pm 31,3$ sekunde s frekvenco $21,3 \pm 3,3 \text{ min}^{-1}$, ki je statistično značilno višja od kontrolne ($p < 0,01$). Po naslednjih $38,6 \pm 8,2$ sekundah pa dihanje dokončno preneha.

Pred vbrizgom EqT I zasledimo kontrolno frekvenco srčnega ritma $250,8 \pm 5,7 \text{ min}^{-1}$. Po vbrizgu nastopi najprej izrazita bradikardija $83,2 \pm 3,5 \text{ min}^{-1}$ ($p < 0,05$), ki se po $6,7 \pm 1,8$ sekundah vrača proti normalnemu ritmu, vendar ga ne doseže ($167,2 \pm 9,6 \text{ min}^{-1}$). Faza relativne »tahikardije« je trajala povprečno $18,6 \pm 1,6$ sekunde. V času bradikardije je opaziti zmanjšanje amplitude P-valov in variabilno podaljšanje intervala P-Q. Po naslednjih $5,6 \pm 8,6$ sekundah se začne prekatna ekstrasistolija, pojavi se tudi prekatna fibrilacija. Valovi P dokončno izginejo.

Slika 1 kaže tipičen potek poskusa *in vivo*. Takšen potek sprememb je bilo z manjšimi razlikami opaziti pri vseh poskusih. Spremembe so statistično značilne. Na hitrejši



Slika 1. *In vivo* učinki intravenskega vbrizga $3 LD_{50}$ ekvinatoksina I na kardiorespiratorni sistem podgane. Na preglednem prikazu celotnega poskusa vidimo, da je normalni sistolični pritisk 120 mmHg in normalni dihalni volumen (RV) približno $1,5 \text{ ml}$. Takoj po aplikaciji toksina so opazne spremembe amplitude EKG-valov, kasneje lahko razločimo tudi spremembe srčne frekvence. Meritve dihalnega volumna (RV) pokažejo, da eno minuto po vbrizgu ekvinatoksina I poskusna žival preneha dihati. V naslednji minuti je ponovno opaziti globoke respiratorne gibe, ki v 30 sekundah dokončno prenehajo. Ni opaziti morebitnih sprememb osnovne linije, ki izraža vrednosti rezidualnega pljučnega volumna. Takoj po vbrizgu ekvinatoksina I upade arterijski tlak (AP). Padec arterijskega pritiska je bifazen. Kasneje vidimo, da tlak v karotidni arteriji nekoliko niha, vendar takrat ni zaznati pulznega tlaka (glej tudi odsek C na sliki 2). Po petih minutah je AP enak srednjemu cirkulacijskemu tlaku. Učinki EqTI na EKG in spremembe dihalnega volumna ter arterijskega pritiska so natančneje predstavljene na slikah 2A–2E, ki ustrezajo odsekom, označenim na sliki 1.



Slika 2. Spremembe EKG, dihanja in arterijskega tlaka po dodatku EqTI. Na sliki 2A vidimo normalni srčni ritem, razpoznavni so kompleksi QRS in valovi P. Zapis RV kaže redne dihalne gibe, dihalni volumen je 1,5 ml. Sistolični arterijski tlak je 120 mmHg. Takoj po vbrizgu ekvinoxina I (zapis 2B) AP začne hitro upadati. Hkrati se zmanjšuje amplituda dihalnih volumnov. Na zapisu EKG je opaziti razvoj rahle bradikardije, amplituda valov P upada, doba P-QRS pa se podaljšuje. Aritmija se v naslednjih v 20 sekundah še stopnjuje (2C), opaziti je tudi posamezne ekstrasistole. Dihanje je plitvo in arterijski tlak nadalje upada. Iz slike 2D, zabeležene dve minuti po vbrizgu ekvinoxina I, je razvidno, da preddvorne električne aktivnosti ni več. Opaziti je le preklatno ekstrasistolijo. Dihanje je prenehalo in arterijski pritisk je upadel na 15 mmHg. Pulzni tlak ni več merljiv. Na sliki 2E, posneti po naslednjih petih minutah, vidimo poleg aritmije tudi popoln zastoj dihanja in zastoj cirkulacije. Arterijski tlak v skupni karotidni arteriji je 7 mmHg in je enak srednjemu cirkulacijskemu tlaku.

časovni bazi lahko omenjene spremembe EKG, arterijskega pritiska in dihanja analiziramo natančneje (slika 2). Odseki istega poskusa, označeni na sliki 3 s črkami A-E, ustrezajo slikam 4 od A do E.

Analiza sprememb v krvi po delovanju EqTI *in vivo*

Hemolitično aktivnost EqTI *in vivo* sem ugotavljala z merjenjem hematokrita in koncentracije eritrocitov. Spremljala sem tudi povprečni volumen eritrocitov (MCV), povprečno vsebnost hemoglobina v eritrocitih (MCH) in povprečno koncentracijo hemoglobina v eritrocitu (MCHC). V tabeli 3 so zbrani rezultati meritev, ki kažejo, da hematokrit, koncentracija eritrocitov in vsebnost hemoglobina v eritrocitih upadejo, medtem ko se volumen eritrocitov poveča. Spremembe so statistično značilne ($p < 0,02$).

Tabela 3. Analiza hemolitičnih učinkov EqTI *in vivo*. Vse razlike so statistično značilne ($p < 0,02$). Prikazane so povprečne vrednosti s standardno napako povprečja ($x \pm S.E.M.$). Ht – hematokrit, Er – eritrociti, Hb – hemoglobin, MCV – povprečni volumen eritrocitov, MCH – povprečna vsebnost hemoglobina v eritrocitih in MCHC – povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitu.

Spremenljivke	Kontrola ($x \pm S.E.M.$)	EqTI (3 LD ₅₀) ($x \pm S.E.M.$)
Ht (%)	0,44 ± 0,03	0,40 ± 0,01
število Er (10 ¹² /l)	8,22 ± 0,41	7,01 ± 0,22
Hb (g/l)	167,33 ± 6,12	149,89 ± 2,59
MCV (fl)	52,20 ± 3,46	57,07 ± 0,80
MCH (pg)	21,62 ± 0,36	19,43 ± 0,35
MCHC (g/dl)	362,00 ± 6,15	378,44 ± 3,97

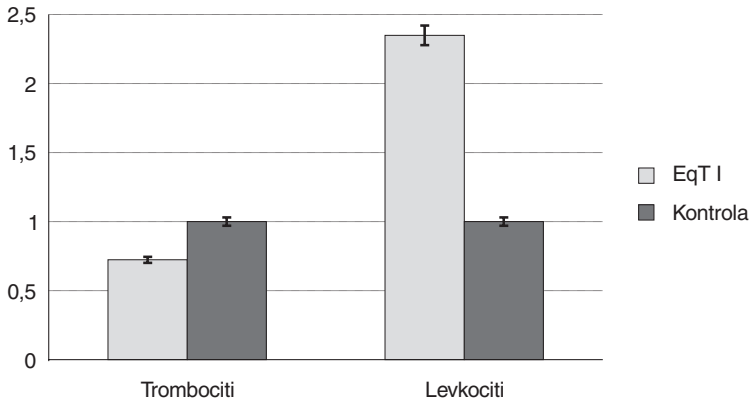
Iz analize teh rezultatov je razvidno, da najbolj upade število eritrocitov, poraste pa njihov volumen. Hematokrit se je zmanjšal za 9,1 %, število eritrocitov v volumski enoti krvi pa za 14,7 %. Podobno, za 10,1 %, se je zmanjšala tudi koncentracija hemoglobina. Nasprotno pa je za 8,5 % porastel volumen eritrocitov.

Tabela 4. Analize koncentracij trombocitov in levkocitov v krvi po dodatku ekvinatoksina I (EqTI). Razlike so statistično značilne ($p < 0,01$). Prikazane so povprečne vrednosti s standardno napako povprečja ($x \pm S.E.M.$). LD₅₀ je odmerek snovi, ki se izkaže kot letalen v polovici poskusov.

Koncentracija celic	Kontrola ($x \pm S.E.M.$)	EqTI (3 LD ₅₀) ($x \pm S.E.M.$)
Trombociti (10 ⁹ /l)	898,67 ± 6,49	651,44 ± 81,16
Levkociti (10 ⁹ /l)	9,77 ± 0,58	22,97 ± 4,04

Očitne so tudi spremembe v koncentraciji trombocitov in belih krvničk v venozni krvi, kar je razvidno iz tabele 4. Število trombocitov močno upade, hkrati pa opazimo izrazito levkocitozo. Granulociti so degranulirani. Izjema so eozinofilni granulociti, ki so videti neobčutljivi za delovanje ekvinatoksinov.

Analiza podatkov je prikazana na sliki 3, kjer so vrednosti podane v deležih kontrolne vrednosti. Že iz slike je razvidno, da so razlike značilne, kar je tudi potrdila statistična analiza ($p < 0,01$). Število trombocitov v krvi upade za 27,5 %, število belih krvničk pa naraste za 133,3 %.

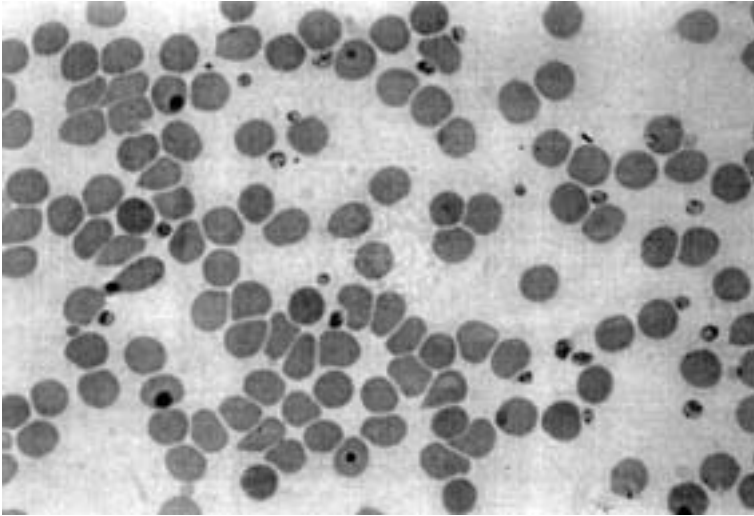


Slika 3. Spremembe koncentracij trombocitov in levkocitov v krvi po delovanju ekvinoxina I in vivo. Spremembe so prikazane v deležih kontrolne vrednosti. Očiten je padec koncentracije trombocitov in nekajkratna porast koncentracije levkocitov.

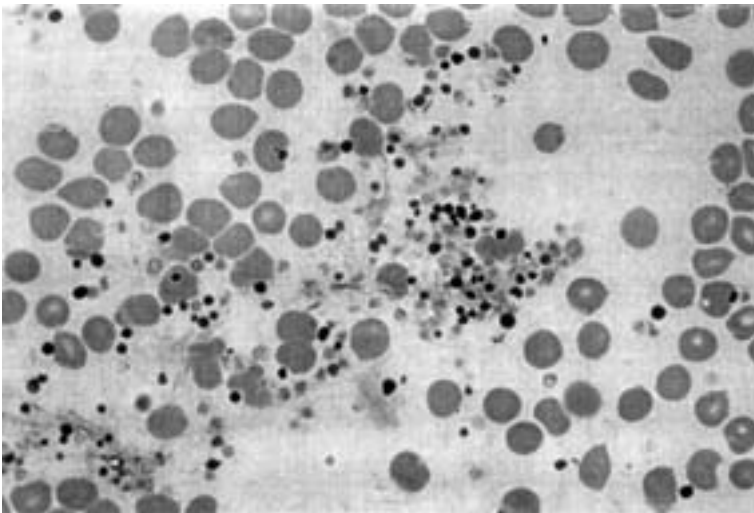
V razmazu krvi, barvanem po Giemsi, najdemo v primerjavi s kontrolo očitne spremembe v krvi po vbrizgu EqT I. V krvi kontrolne živali opazimo normalne eritrocite s posameznimi trombociti in levkociti, medtem ko je v krvi poskusne živali, ki je podlegla učinkom EqT I, najdemo agregacije trombocitov in skupke eozinofilnih snovi, verjetno fibrina, hemoglobina in razpadnih produktov celic. Posamezni eritrociti že kažejo znake hemolize, granulociti pa so degranulirani. Slika 4 kaže razmaz normalne krvi, slika 5 pa razmaz krvi, odvzete poskusni živali, ki sem ji intravensko aplicirala 3 LD₅₀ EqT I. Na sliki 5, nasprotno od slike 4, vidimo posamezne agregate trombocitov. Na teh mestih je opaziti tudi začne znake hemolize na posameznih eritrocitih.

Tabela 5. Koncentracije elektrolitov v krvi po dodatku ekvinoxina I. Razlike so statistično značilne za kalcijeve ione ($p < 0,005$), ne pa tudi za kalcijeve ($p < 0,8$) in natrijeve ione ($p < 0,02$). Prikazane so povprečne vrednosti s standardno napako povprečja ($x \pm S.E.M.$). LD₅₀ je odmerek snovi, ki se izkaže kot letalen v polovici poskusov.

Elektroliti	Kontrola ($x \pm S.E.M.$)	EqT I (3 LD ₅₀) ($x \pm S.E.M.$)
K⁺ (mM)	5,07 ± 0,27	19,72 ± 1,63
Na⁺ (mM)	143,33 ± 2,33	135,78 ± 3,04
Ca⁺⁺ (mM)	2,5 ± 0,08	2,46 ± 0,15



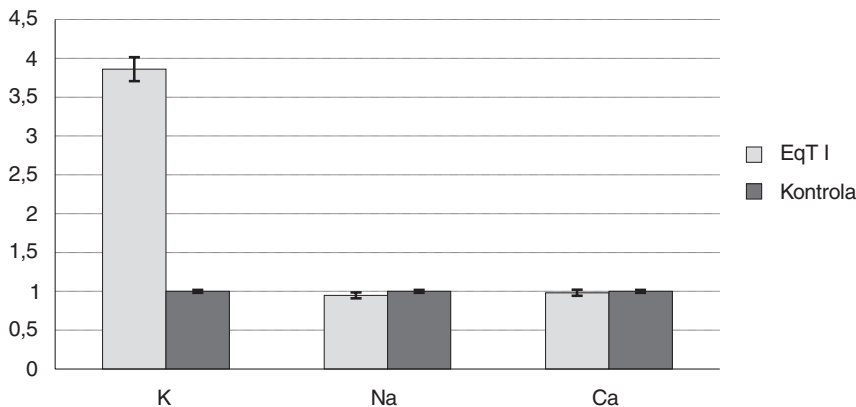
Slika 4. Razmaz krvi kontrolne podgane. Opazimo številne eritrocite in posamezne trombocite.



Slika 5. Razmaz krvi poskusne živali po delovanju ekvinatoksina I. Živali sem odvzela kri iz sublingvalne vene eno minuto po intravenoznem vbrizgu ekvinatoksina I. Puščica kaže blede vijolične agregate trombocitov.

Izrazite so spremembe v plazemski koncentraciji kationov. Značilen je skoraj štirikraten porast plazemske koncentracije kalijevih ionov ($p < 0,005$). Nasprotno pa koncentracija natrijevih ionov v plazmi nekoliko pade, vendar padec ni statistično značilen ($p < 0,02$). Koncentracija kalcijevih ionov v plazmi se ne spremeni statistično značilno ($p < 0,8$). Rezultati so zbrani v tabeli 5.

Analiza podatkov je prikazana na sliki 6, kjer so vse vrednosti plazemskih koncentracij za posamezne ione preračunane v deleže kontrolne vrednosti.



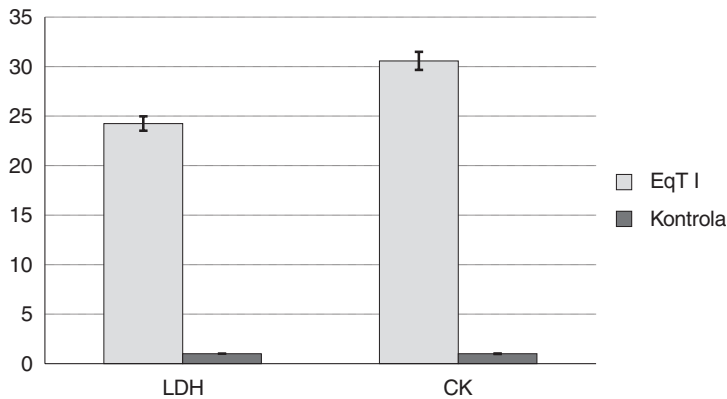
Slika 6. Analize koncentracij elektrolitov v krvi po dodatku ekvinatoksina I. Očiten je skoraj štirikraten porast plazemske koncentracije kalijevih ionov, medtem ko so spremembe koncentracij natrijevih in kalcijevih ionov manj opazne.

Vrednosti koncentracij encimov v plazmi se prav tako statistično značilno spremenijo. Koncentracija laktatne dehidrogenaze v plazmi naraste za 24-krat ($p < 0,01$), plazemska koncentracija kreatinske kinaze pa se zveča na 22-kratno vrednost ($p < 0,02$).

Tabela 6. Analiza koncentracij encimov laktatne dehidrogenaze (LDH) in kreatinske kinaze (CK) v krvi po dodatku ekvinatoksina I. Spremembe so statistično značilne ($p < 0,01$ za laktatno dehidrogenazo, $p < 0,02$ za kreatinsko kinazo). Prikazane so povprečne vrednosti s standardno napako povprečja ($x \pm S.E.M.$). LD_{50} je odmerek snovi, ki se izkaže kot letalen v polovici poskusov.

Encimi	Kontrola ($x \pm S.E.M.$)	EqT I (3 LD_{50}) ($x \pm S.E.M.$)
LDH (mM)	9 ± 0,17	218,28 ± 18,9
CK (mM)	6,65 ± 0,06	203,33 ± 24,41

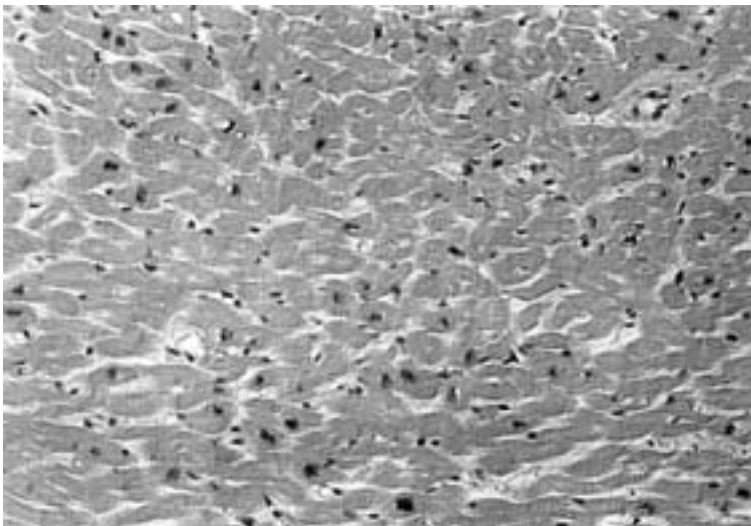
Analiza rezultatov je prikazana na sliki 7, kjer so spremembe izražene v deležih kontrolne vrednosti.



Slika 7. Analiza koncentracij encimov v krvi po dodatku ekvinatoksina I. Porast koncentracije laktatne dehidrogenaze (LDH) in kreatinske kinaze (CK) v plazmi je očiten.

Makro- in mikroskopske patomorfološke spremembe organov

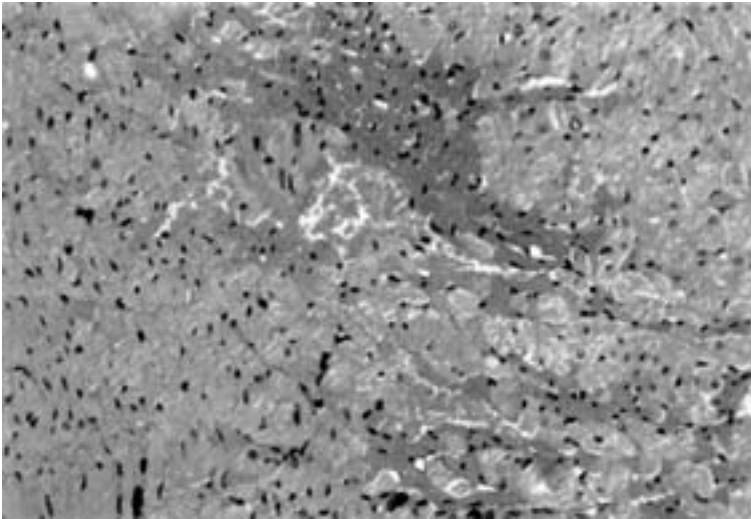
Po vbrizgu treh LD₅₀ EqT I so opazne makroskopsko vidne spremembe na notranjih organih. Pljuča so edematozna in kongestirana. Na površini so jasno vidne fokalne krvavitve velikosti vsaj 2 × 2 mm, obdajajo pa jih blede ishemične lise. S površine na prerezu teče penasta rdečkasta tekočina. Na površini srca so drobna bleda točkasta področja,



Slika 8. Slika prikazuje normalno histološko sliko miokarda podgane, žrtvovane s CO₂. Povečava je 20-kratna.

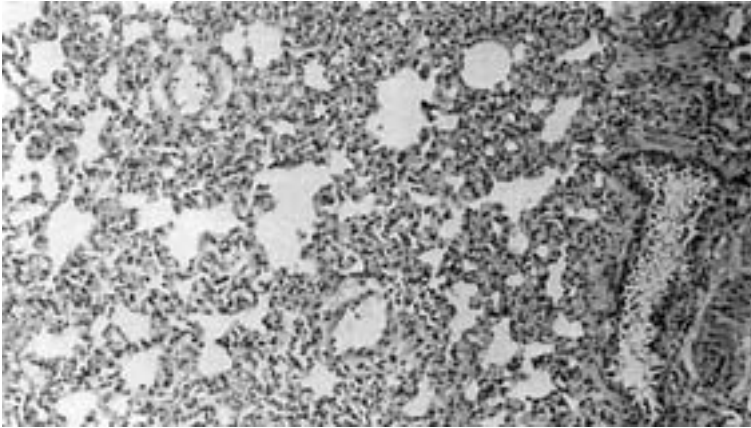
ki se ločijo od okolne temnejše barve. Na prerezu opazimo stenske strdke kot posledica ventrikularne aritmije in prizadetosti endokarda. Ledvici sta na površini drobno blede do temno rdeče lisasti. Tekočina v mehurju je temno rumena do rdečkasta. Črevo kaže znake srčnega zastoja. Na luminalni strani je edematozno zadebeljeno.

V histoloških preparatih vzorcev srčne mišice sem v vseh petih primerih opazila žarišča temnejših, eozinofilnih miokardialnih vlaken, ki večinoma ležijo v neposredni okolici hiperemične žile, polne hemoliziranih eritrocitov. Jedra teh vlaken so piknotična in temna. Ta področja ležijo med svetleje eozinofilnimi, bledimi in nabuhlimi celicami. Jedra teh celic so svetlejša in razpadajoča. Žile po vsem miokardu so hiperemične. V svetlini prekatov je opaziti stagnacijski rdeči tromb kot značilno posledico zastoja krvi v prekatih, ki se zaradi aritmije niso več izpraznjevali. Endotelijske celice so na številnih žilah odmaknjene ali pa celo povsem manjkajo, vendar ta pojav ni homogen. Na posameznih področjih miokarda je intima žil morfološko neprizadeta.

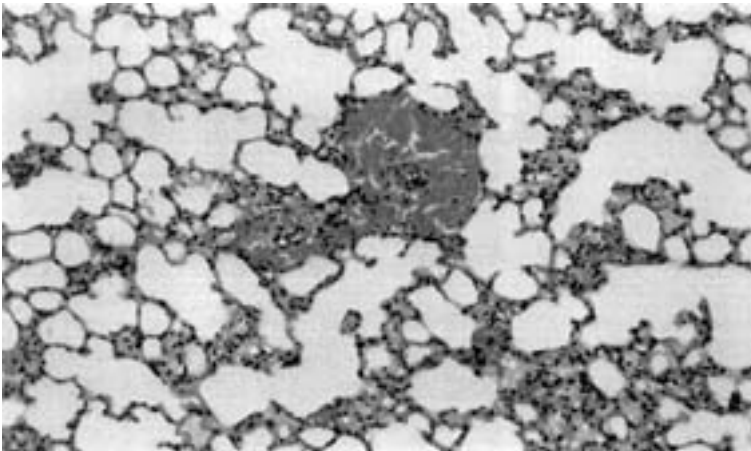


Slika 9. Mikroskopske poškodbe mišičnih viter podganjega srca po delovanju ekvinoxina I in vivo. Vidno je temnejše eozinofilno področje miokardialnih vlaken s piknotičnimi jedri okrog hiperemične žile z okolnim bledim področjem celic z notrajceličnim edemom. Povečava je 20-kratna.

V posameznih področjih pljuč je edem omejen na intersticij pljučnih pretinov, v okolici pa se edemska tekočina lahko razlije v alveolarni prostor. Pljučno žilje torej ni povsod enako prepustno. Zanimiv je pojav izpraznjenih večjih žil z obročastim razlitjem krvi v njihovo neposredno okolico. Prepustnost pljučnih žil večjega premera je torej močno povečana. V posameznih področjih najdemo emfizemsko razširjene prostore z raztrganimi alveolarnimi pretini, ki lahko na periferih delih pljuč oblikujejo celo emfizemske bule.



Slika 10. Normalna histološka slika pljuč podgane, žrtvovane s CO_2 . Povečava je 10-kratna.



Slika 11. Histopatološka slika podganih pljuč po delovanju ekvinatoksina I *in vivo*. Opaziti je obročasto razlitje krvi v neposredno okolico žile večjega premera. Vidni so znaki emfizema s potrganimi alveolarnimi pretini. Povečava 20-kratna.

Razpravljanje

Učinki aktinoporinov *in vivo*

Vsi do zdaj raziskani aktinoporini so letalne beljakovine z razmeroma majhnimi letalnimi odmerki. Raziskave učinkov *in vivo* teh snovi so pokazale, da poskusna žival pogine zaradi kardiorespiratornega zastoja. Natančnih raziskav je bilo narejenih malo, eksperimentalne metode pa so bile večinoma zelo preproste. Kljub temu pa lahko

rezultate svoje raziskave primerjam s podatki iz literature, saj so pri večini dosedanjih študij merili enake ali podobne spremenljivke. Metodološko je ta raziskava podobna raziskavi *in vivo* učinkov Eq_t II in III (25–27), nekoliko so modificirane le meritve dihalne aktivnosti.

Ocena primernosti metodoloških pristopov k meritvam *in vivo*

Meritve električne aktivnosti srca (EKG) sem izvedla z igelnimi elektrodami, zato je bil signal ustrezne jakosti. Šum sem zmanjšala z ozemljitvijo poskusne živali in z diferencialnim merjenjem EKG-signala. Pri tem sem pazila, da sta bili merilni žici v vseh podrobnostih enaki. Tako sem dobila razmerje signal : šum najmanj 1 : 100, v večini poskusov pa je bilo razmerje vsaj še za razred velikosti ugodnejše v korist signala.

Meritve krvnega tlaka so narejene s krvavo metodo v skupni karotidni arteriji. Umeritvene krivulje pred poskusom in po vsakem poskusu so pokazale, da je odgovor merilnega instrumenta linearen v območju mojih meritev. Metoda je torej omogočala natančno merjenje arterijskega tlaka.

Meritve respiracijske aktivnosti sem opravila z mehanskoelektričnim pretvornikom. Primerjalni rezultati s pletizmografijo vsega telesa in s pletizmografijo prsnega koša (oprema Harvard Instruments) so pokazali, da lahko z natančno izmerjeno umeritveno krivuljo dobimo enake rezultate glede dihalnega volumna z vsemi tremi metodami. Večje razlike pa so nastale pri meritvah rezidualnega volumna, kjer se je pletizmografija vsega telesa izkazala kot najustreznejša. Meritev rezidualnega volumna z mehanskoelektričnim pretvornikom je bila bolj variabilna, zato sprememb le-tega nisem natančno ocenjevala. Meritve z mehanskoelektričnim pretvornikom pa lahko pokažejo tudi mišične trzaje, npr. kadar uporabimo snov, ki vpliva na vzdražnost mišic in živčevja, ali pa pri snoveh, ki povzročijo konvulzije. Pri teh meritvah takšnih artefaktov ni bilo, saj toksin ne povzroča mišičnih krčev. Ocenjujem torej, da so meritve dihalnega volumna z metodo, ki sem jo uporabila, zanesljive, medtem ko je meritve rezidualnega volumna možno ocenjevati le kvalitativno in predvsem takrat, kadar gre za razmeroma velike odmike od normalnih vrednosti.

Meritve elektrolitov in encimov v krvi so opravili v biokemičnem in hematološkem laboratoriju Kliničnega centra. Velikost krvnih celic se sicer razlikuje med podganami in človekom, vendar so predhodne meritve pri raziskavah učinkov ekvinatoksina II in III pokazale, da lahko uporabimo iste merilne instrumente, ne da bi pri tem tvegali natančnost meritve. Zaradi hemolitične aktivnosti ekvinatoksinov bi lahko hemoliza potekala tudi postmortalno. Zaradi tega sem spremembe v hematokritu ter plazemskih koncentracijah kationov in encimov ocenila kot največje možne po delovanju 3 LD₅₀ Eq_t I. Da bi bila napaka čim manjša, sem kri odvzela takoj po smrti poskusne živali in nemudoma izmerila hematokrit ter ločila plazmo od celičnih elementov. Poleg tega rezultati hemolize, izvedeni *in vitro* (12), kažejo na to, da je hitrost procesa hemolize takšna, da v naših razmerah ni pričakovati večjih odstopanj od realnih vrednosti, ki bi jih dobili, če bi obstajala metodološka možnost spremljanja teh sprememb v realnem času med poskusom. Te meritve torej lahko ocenim kot zanesljive.

Spremembe v sestavi krvi po učinkovanju EqT I

V poskusih sem opazila padec hematokrita in koncentracije eritrocitov s hkratnim povečanjem plazemske koncentracije kalijevih ionov. Značilen je tudi porast volumna eritrocitov. Rezultati so podobni rezultatom, ki so jih dobili drugi avtorji v različnih poskusnih razmerah po delovanju različnih aktinoporinov. Porast plazemske koncentracije K^+ najverjetneje lahko pripišemo hemolizi, čeprav ne moremo izključiti možnosti, da EqT I povzroči izstop K^+ tudi iz drugih celic, s katerimi pride v stik. To domnevo potrjujejo tudi meritve sprememb voluma na NG108-15 celicah (31).

Podobno kot so opisali za EqT (15) in EqT II (26), sem tudi pri svojih poskusih opazila agregacijo trombocitov. Pojav je lahko potencialno zelo pomemben za razlago zmanjšanja perfuzije srca *in vivo*, vendar najverjetneje ni odločujoč. Močno zmanjšanje perfuzije so namreč opazili tudi po učinkovanju EqT II na Langendorffov preparat srca, kjer v perfuzijski tekočini ni bilo celičnih elementov. Teng (15) opisuje tudi sproščanje vazoaktivnih snovi iz trombocitov. Tega v prisotnih poskusnih razmerah ni bilo mogoče spremljati. Kljub temu pa nekateri podatki kažejo na možnost, da tudi v teh poskusnih razmerah pride do neselektivnega spodbujanja eksocitoze iz krvnih celic. To je opaziti predvsem na nevtrofilnih granulocitih, ki so po delovanju EqT I popolnoma degranulirani.

Učinki na srce in žilje

Podobno kot drugi aktinoporini tudi EqT I povzroči takojšen padec arterijskega tlaka in aritmijo. Večina avtorjev meni, da sta za to odgovorna vsaj dva učinka aktinoporinov, hemoliza ter vazospazem (15, 24).

Hemoliza s posledično hiperkaliemijo je zagotovo pomemben vzročni dejavnik za aritmijo in odpoved srca. Poskusi, pri katerih so z intravenskim vbizgavanjem hipertonične raztopine KCl dosegli celo višjo stopnjo hiperkaliemije, pa so pokazali, da aritmija sicer nastopi med samim vbizgavanjem, ko je lokalno koncentracija KCl verjetno še nekajkrat večja. Po nekaj minutah, ko je KCl porazdeljen po zunajceličnem prostoru in je njegova koncentracija povsod enaka in primerljiva s koncentracijo, opaženo po delovanju ekvinatoksinov, pa resnejših motenj ritma ni. Tudi arterijski tlak takrat ne odstopa bistveno od normale. Očitno je za letalnost EqT I pomembnejši kak drug, še neopredeljen mehanizem.

Vazokonstrikcija, ki jo omenjajo številni avtorji, je drug možen mehanizem delovanja aktinoporinov. V svojih poskusih te možnosti nisem neposredno preverjala, saj problem predstavlja obsežno tematiko, ki terja samostojno raziskavo. Žilje je namreč razmeroma zapleten sistem, ki ga gradijo specializirane strukture (36, 37). Plast endotelijskih celic (*tunica intima*) je v neposrednem stiku z vsebino žilne svetline. Endotelijskih celice poleg drugih funkcij izločajo tudi vazodilatacijske in vazokonstriksijske snovi, ki vplivajo na tonus gladkih mišičnih celic v *tunici medii*. Te dve plasti stene sta najbolj izpostavljeni delovanju aktinoporinov, zato bi lahko pričakovali spremembe v tonusu žilja.

Veliko podatkov iz literature govori v prid domnevi, da aktinoporini povzročijo vazokonstrikcijo bodisi neposredno z delovanjem na gladke mišične celice ali prek sproščanja vazokonstriksijskih snovi. Neposrednih dokazov za to domnevo ni, celo nasprotno,

ugotovili so namreč, da EqT II ne vpliva na tonus izoliranih arterij in ven celo v koncentraciji 5×10^{-7} M (26). Podrobnejša analiza časovnega poteka sprememb arterijskega tlaka pa pokaže, da po prenehanju delovanja srca kot črpalke, torej, ko ni več opaziti pulznega tlaka, pritisk v arterijah ne pada enosmerno proti vrednosti srednjega venskega tlaka. Vmesni rahli porast tlaka v skupni karotidni arteriji je v teh poskusih možno pripisati krčenju gladkih mišičnih celic predvsem v venah. Za potrditev ali zavrnitev te možnosti bi bilo treba opraviti še študijo vpliva ekvinatoksina na kontraktilnost gladkih mišičnih celic v posameznih odsekih ožilja.

V literaturi so bili že opisani učinki ekvinatoksinov I, II in III na vzdražne celice (17, 18), zato ni mogoče izključiti možnosti neposrednega delovanja EqT I na vzdražnost srčne mišice, ki je specializirana prečno progasta mišica iz prevodnega in delovnega mišičja. Specializirani prevodni sistem sestavljajo (38) sinoatrijski vozle (SA), atrijske internodalne poti, atrioventrikularni vozle (AV), desni in levi atrioventrikularni snop in His-Purkinjeva vlakna. Na medceličnih stikih posameznih mišičnih celic (*discus intercalares*) je celična membrana razmeroma dobro prepustna za ione, zato srčna mišica deluje kot sincicij. Elektrofiziološke posebnosti AV-vozla so vzrok za upočasnitev prevajanja, ki je odgovorno za normalno zakasnitev v AV-prevajanju. V EKG-zapisu opazujemo to zakasnitev kot interval P-R(Q). Prevodni sistem srca lahko prizadenejo aktinoporini neposredno ali preko učinkov na žilje, ki ta sistem oskrbuje s krvjo. V vseh poskusih z EqT I je opaziti izginotje P-valov že v prvi minuti, iz česar lahko sklepam, da EqT I prizadene neposredno SA-vozle ali pa celotno mišičnino preddvorov. Delovanje EqT I se v tem bistveno razlikuje od delovanja EqT II in EqT III, saj so pri drugih dveh sicer sorodnih aktinoporinih opazili, da valovi P ostanejo še dolgo po tem, ko električna aktivnost prekatov popolnoma zamre (25–27). Tega učinka EqT I tudi ne gre pripisati vazokonstrikciji koronarnih arterij, saj bi ga sicer opazili pri vseh toksinih, ki zmanjšajo perfuzijo skozi koronarno ožilje. EqT I prizadene tudi preostali prevodni sistem, saj se podaljša interval P-Q. Električna aktivnost prekatov pa ostane še dolgo v obliki ekstrasistol ali ventrikularne tahikardije.

Na avtomatizem srca vplivajo tudi zunanji vplivi, predvsem vegetativno živčevje in sredica nadledvične žleze (39). Analiza sprememb arterijskega tlaka in zapisa EKG po delovanju EqT I pokaže, da gre verjetno takoj po začetnem padcu arterijskega tlaka za izrazito aktivacijo simpatičnega živčevja; morda za ishemično reakcijo osrednjega živčevja. Ko arterijski tlak pade na 60 mmHg, namreč opazimo ponoven porast arterijskega tlaka in frekvenca srca se poveča, vendar še obstaja bradikardija. Primerjavo naših rezultatov z rezultati drugih raziskovalcev je v večini primerov težko izvesti, saj je opis deskriptiven; manjkajo slike, iz katerih bi lahko ponovno izračunali spremembe frekvence srca. V primerih, ko je bilo to mogoče, smo opazili, da raziskovalci omenjajo fazo tahikardije, vendar gre le za relativno tahikardijo glede na začetno bradikardijo, ki jo povzroči aplikacija aktinoporinov.

Motnje ritma, ki so jih opazili po delovanju aktinoporinov, se lahko pojavijo zaradi različnih patofizioloških stanj. Ob hiperkaliemiji postane srce ohlapno in razširjeno, prevajanje akcijskih potencialov iz preddvorov v prekate skozi AV-snop se upočasni ali popolnoma zavre. Vzrok je padec membranske potencialne razlike in s tem amplitude

akcijskega potenciala. Pri ishemiji srčne mišice zaradi zmanjšanega pretoka skozi koronarne žile pa lahko proženje akcijskega potenciala namesto SA-vozla prevzamejo ekotopična žarišča kjerkoli v miokardu. S tem si razlagamo tudi ekstrasistolijo, ki jo opazimo v vseh poskusih.

Učinki na dihala

Aktinoporini, vključno z EqT I, močno prizadenejo dihala (23). Poskusna žival preneha dihati in pljuča so hemoragična in edematozna. Sket (24) je opisal zastoj dihanja že pri delu z EqT. Ugotovil je, da razlog ni niti v motenem prevajanju po živcu niti v delovanju mišice in ne v živčno-mišičnem stiku, saj se po električnem draženju freničnega živca diafragma krči. Vzrok za zastoj dihanja je torej verjetno v neposrednem delovanju na dihalni center ali pa v draženju perifernih receptorjev, ki bi zavirali dihanje.

Respiracijski živčni center, ki uravnava aktivnost dihalnih mišic, leži v retikularni formaciji podaljšane hrbtenjače in ponsa. Nadzoruje ritmičnost in nastanek dihalnih gibov (40–42). Pomembno je tudi kemično uravnavanje dihalne aktivnosti. Periferni kemoreceptorji ležijo v aortnem loku in v razcepišču karotidnih arterij in posredujejo informacije predvsem o parcialnem tlaku O_2 , manj pa tudi CO_2 in pH. Sprednji del podaljšane hrbtenjače na dnu IV. ventrikla je kemosenzitivno področje, občutljivo predvsem na spremembe pCO_2 in pH v likvorju. Ti osrednji kemoreceptorji so bistveni za uravnavanje alveolarne ventilacije v normalnih in patoloških razmerah. Pomembno vlogo igrajo tudi refleksni loki iz pljuč, obtočil, dihalnih mišic in kit ter popljučnice. Neposrednih dokazov, da EqT I deluje na dihalne centre, nisem našla, nekateri podatki pa podpirajo tako domnevo. Opazili so namreč, da EqT II poruši krvnomožgansko prepreko (43), torej lahko pride tudi v stik z nevroni dihalnega centra. Po drugi strani pa podatki poskusov z nevroblastomskimi celicami NG108-15 (31) kažejo, da se po delovanju EqT I njihov volumen močno poveča. Vkolikor bi se to zgodilo tudi z nevroni v osrednjem živčevju, ki je prostorsko omejen, bi to pomenilo znaten porast intrakranialnega tlaka, s tem pa bi lahko prišlo tudi do vkleščenja medule oblongate v *foramen magnum*. Za potrditev te domneve bi bilo potrebno izvesti še podrobnejšo študijo, da bi ugotovili morebitne neposredne učinke na osrednje živčevje *in vivo*.

Sprememb rezidualnega volumna pljuč, ki bi lahko nakazovale morebitno bronhokonstrikcijo (44), nisem opazila. Slednjo bi lahko pričakovali zato, ker EqT I, II in III povzročijo vdor kalcijevih ionov v citoplazmo gladkomišičnih celic (31). Metoda merjenja dihalnih gibov z mehanskoelektričnim pretvornikom je sicer zanesljiva pri merjenju dihalnega volumna, ni pa najustreznejša za meritev sprememb rezidualne prostornine. Patomorfološke preiskave so namreč pokazale pljučni edem z emfizemom, ki smo ga opazili v histoloških preparatih, kar govori v prid povečanja volumna pljuč. Najpreprostejša razlaga za te učinke je povečanje prepustnosti pljučnih kapilar. Opaziti pa je tudi razgaljenje intime večjih žil in krvavitve, ki segajo preko cele debeline stene.

Učinki aktinoporinov so pestri. Tudi učinki posameznih izotoksinov iz *Actinae equine* se v podrobnostih razlikujejo. Na splošno pa lahko ugotovimo, da je za letalne učinke teh beljakovin bistvenega pomena neposredno delovanje na celice srčne mišice in pljuč, manj pa posredno delovanje preko povzročanja hiperkaliemije.

Sklep

1. Letalnost vseh aktinoporinov, izoliranih iz *Actinae equinae*, je posledica kardiorespiratornih učinkov.
2. EqI se razlikuje od preostalih dveh izotoksinov v tem, da deluje tudi na vzdražnost atrijev, saj po njegovem delovanju valovi P v EKG-zapisu izginejo. Nasprotno pa po delovanju ekvinatoksina II in III opazimo valove P še dolgo po tem, ko električne aktivnosti ventriklov ni več zaznati.
3. Aktinoporini iz *Actinae equinae* po vbrižu v vratno veno povzročijo hiperkaliemijo, ki pa ni zadosti visoka, da bi bila lahko že sama po sebi vzrok smrti poskusne živali.
4. Rezultati raziskave dovoljujejo sklep, da EqI povzroči akutno nekrozo miokarda, ki je poleg pljučnega edema v veliki meri odgovorna za smrt poskusne živali.

Zahvala

Zahvaljujem se vsem, ki so mi pomagali pri raziskovalnem delu: Matjažu Buncu, dr. med., dr. Robertu Frangežu, dr. vet. med., mag. Ireni Horvat - Žnidaršič, dipl. biol., gospe Cvetki Juršič, gospe Alenki Štrukelj in mentorju raziskovalne naloge, prof. dr. Dušanu Šuputu, ki je pokazal veliko potrpežljivosti, iznajdljivosti in pedagoškega znanja.

Zahvaljujem se prof. dr. Veri Ferlan - Marolt, ki je odstopila svoj mikroskop in omogočila fotografiranje histoloških preparatov, in prof. dr. Rudiju Pavlinu za podroben lektorski pregled naloge.

Literatura

1. Shier TW, Mebs D. *Handbook of toxinology*. New York: Dekker, 1990: 1–66.
2. Ferlan I, Lebez D. Equinatoxin, a lethal protein from *Actinia equina*. I. Purification and characterisation. *Toxicon* 1974; 12: 57–61.
3. Maček P, Lebez D. Isolation and characterisation of three lethal and haemolytic toxins from sea anemone. *Actinia equina* L. *Toxicon* 1988; 26 (5): 441–51.
4. Norton R. Purification and characterisation of proteins with cardiac stimulatory and haemolytic activity from sea anemone *Actinia tenebrosa*. *Toxicon* 1990; 28: 163.
5. Pennington MW, Byrnes ME, Zaydenberg I, Khaytin I, De Chastonay J, Krafe DS, Hill R, Mahnir VM, Volberg WA, Gorzycya AR, Kem WR. Chemical synthesis and characterisation of ShK toxin: a potent potassium channel inhibitor from sea anemone. *Int J Peptide Protein Res* 1995; 46: 354–8.
6. Bernheimer AW. Proposed nomenclature for cytotoxic toxins of sea anemones. *Toxicon* 1986; 24: 1031.
7. Kem WR. Sea anemone toxin structure and action. In: Tong LR, eds. *The biology of nematocysts*. New York: Academic Press 1988: 375–405.
8. Galettis P, Norton RS. Biochemical and Pharmacological studies of mechanism of tenebrosin C, a cardiac stimulatory and haemolytic protein from sea anemone *Actinia tenebrosa*. *Toxicon* 1990; 28: 696–706.
9. Giraldi T, Ferlan I, Romeo D. Antitumor activity of equinatoxin. *Chem Biol Interactions* 1988; 13: 199–203.
10. Turk T, Maček P. Effect of different membrane lipids on haemolytic activity of equinatoxin II from *Actinia equina*. *Periodicum Biologicorum* 1986; 88: 216–7.
11. Belmonte G, Pederzoli C, Maček P, Menestrina G. Pore formation by sea anemone cytolysin Equinatoxin II in red blood cells and model lipid membranes. *J Membrane Biol* 1991; 25: 131.

12. Maček P, Lebez D. Kinetics of haemolysis induced by equinatoxin, a cytotoxic toxin from sea anemone *Actinia equina*. Effect of some ions and pH. *Toxicon* 1981; 19: 233–40.
13. Šput D, Schwarz W. Equinatoxin II activates calcium dependent potassium channels in human erythrocytes. In: Gopalakrishnakone P, Tan CK, eds. *Recent Advances in Toxinology*. Singapore: Singapore University Press, 1992: 397–401.
14. Batista U, Jezernik K. Morphological changes of V-79 cells after equinatoxin II treatment. *Cell Biology Reports* 1992; 2: 115–23.
15. Teng CM, Lee LG, Lee CY, Ferlan I. Platelet aggregation induced by equinatoxin. *Thromb Res* 1988; 52: 401–11.
16. Šput D. Effects of equinatoxin on the membrane of skeletal muscle fibre. *Periodicum biologicorum* 1986; 88: 210–11.
17. Šput D, Rubly N, Meves H. Effects of equinatoxins on single myelinated nerve fibres. In: Gopalakrishnakone P, Tan CK, eds. *Progress in Venom and Toxin Research*. Singapore: Singapore University Press, 1987: 467–70.
18. Ho CL, Ko JL, Lue HM, Lee CY, Ferlan I. Effect of Equinatoxin on guinea-pig atrium. *Toxicon* 1987; 25 (6): 659–64.
19. Budihna M, Šput D, Maček P. Cardiac arrhythmia and negative inotropic effect induced by equinatoxin II. In: *Ann Int Conf IEEE Eng Med Biol*. Orlando: IEEE, 1990: 656–7.
20. Budihna M, Maček P, Šput D. Some possible mechanisms involved in cardiotoxicity of equinatoxin II. Cardiac arrhythmia and negative inotropic effect induced by equinatoxin II. In: Gopalakrishnakone P, Tan CK, eds. *Recent Advances in Toxinology*. Singapore: Singapore University Press, 1992: 402–6.
21. Budihna M, Maček P, Šput D. Effect of Equinatoxin on isolated guinea-pig heart. *Toxicon* 1990; 28 (2): 145–6.
22. Budihna M, Maček P, Šput D. Effect of Equinatoxin on isolated guinea-pig heart. *Eur J Pharmacol* 1990; 183: 2051–2.
23. Lafranconi WM, Ferlan I, Russel FE, Huxtable RJ. The action of equinatoxin, a peptid from a venom sea anemone, *Actinia Equina*, on isolated lung. *Toxicon* 1984; 22 (3): 347–52.
24. Sket D, Drašlar K, Ferlan I, Lebez D. Equinatoxin, a lethal protein from *Actinia equina* II. Pathophysiological action. *Toxicon* 1987; 25 (6): 63–8.
25. Bunc M. *Učinki equinatoksina na gladko mišico koronarne arterije – možni vzroki kardiotoksičnosti*. Prešernova naloga. Ljubljana: Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, 1992.
26. Bunc M, Frangež R, Horvat I, Turk T, Šput D. Effect of equinatoxins in vivo. Possible role of degranulation of thrombocytes and granulocytes. In: Šput D, Zorec R, eds. *Toxins and exocytosis*. New York: Annals New York academy of science, 1994: 163–7.
27. Frangež R. *Učinki equinatoksina III na kardiorespiratorni sistem*. Magistrsko delo. Ljubljana: Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, 1995.
28. LiVoisi VA, Merino MJ, Brooks JSJ, Saul SH, Tomaszewski JE. *Pathology*. Philadelphia: Harwal, 1994: 137–55.
29. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Pathologic basis of disease*. Philadelphia: Saunders 1994: 1–35, 517–83.
30. Sok M. *Temelji eksperimentalne kirurgije in poskusov na živalih*. Ljubljana: Podvinski 1996: 77–95.
31. Benoit E, Meunier F, Frangež R, Šput D, Molgo J. Mouvements d'eau dus a un desequilibre en ions calcium, provoque par l'equinatoxine II, dans le neuroblastome et l'axone myelinise. (1996, v tisku).
32. Betz WJ, Mao F, Bewick GS. Activity-dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals. *J Neurosci* 1992; 12: 363–75.
33. Smith CB, Betz WJ. Simultaneous independent measurement of exocytosis and endocytosis. *Nature* 1996; 380: 531–4.
34. Adamič Š. *Temelji biostatistike*. Ljubljana: Medicinska fakulteta univerze v Ljubljani, 1989: 44–53, 65–81.
35. Ferlgoj A. *Osnove statistike*. Ljubljana: Samozaložba, 1995: 106–57.
36. Kališnik M. *Oris histologije z embriologijo*. Ljubljana: DZS in Acta Stereologica, 1990: 206–23.
37. Leonhardt H. *Histologie, Zytologie und Mycroanatomie des Menschen*. Stuttgart: Thieme, 1977: 2–9, 173–84.

38. Josephson ME, Marchlinski FE, Buxton AE. In: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL, eds. *Harrison's principles of internal medicine*. New York: Mc Graw-Hill, 1994: 1011–47.
39. Hille B. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Massachusetts: Sinauer, 1992: 59–115.
40. De Groot J. *Correlative Neuroanatomy*. Norwalk: Appleton-Lange 1995: 73–87.
41. Duus P. *Topical diagnosis in Neurology*. New York: Thieme Medical Publishers, 1989: 121–5.
42. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*. Philadelphia: Saunders, 1994: 527–30.
43. Vodopivec B, Rotter A, Šput D. Hematoencephalic barrier damage by equinatoxin II. *Pathol Res Pract* 1991; 15: 785.
44. Bullock J, Boyle J, Wang MB, Ajello RR. *Physiology*. Philadelphia: Harwal, 1984: 139–75.

Prispelo 1. 6. 1997