



INFLUENCE OF HEXAVANADATES ON  
Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>- ATPase ACTIVITY

UTICAJ HEKSAVANADATA NA AKTIVNOST  
Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze

Aleksandra Zdravković<sup>1</sup>, Danijela Krstić<sup>2</sup>

<sup>1</sup> University of Belgrade, Faculty of Medicine, Serbia

<sup>2</sup> Mentor: University of Belgrade, Faculty of Medicine, Institute of Medical Chemistry, Serbia

Correspondence: sandrazdr2@gmail.com

ABSTRACT

**Introduction:** There is a great interest in use of polioxometalates in clinical medicine, primary as antibacterial, antiviral and antitumoral agents. Considering the key role of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in normal functioning of most animal cells, as well as pivotal roles in cancer cell migration, the aim of this paper was to examine the influence of new synthesized hexavanadates [V<sub>6</sub>-CH<sub>3</sub>][Na]<sub>2</sub>, [V<sub>6</sub>-NO<sub>2</sub>][TBA]<sub>2</sub>, [V<sub>6</sub>-C3][H]<sub>2</sub>, [V<sub>6</sub>-C5d][TBA]<sub>2</sub> on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity.

**Material and methods:** The enzymatic activity of porcine cerebral cortex Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase was followed in both the absence and presence of increasing concentration of [V<sub>6</sub>-CH<sub>3</sub>][Na]<sub>2</sub>, [V<sub>6</sub>-NO<sub>2</sub>][TBA]<sub>2</sub>, [V<sub>6</sub>-C3][H]<sub>2</sub>, [V<sub>6</sub>-C5d][TBA]<sub>2</sub> (within the range 10<sup>-8</sup> - 10<sup>-3</sup> mol/L). The released Pi, liberated from the enzymatic hydrolysis of ATP, was determined by spectrophotometric method, using Perkin Elmer Lambda 35 UV-VIS spectrophotometer.

**Results:** Investigated compounds inhibit the activity of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in dose-dependent manner within the investigated range. Obtained results indicate that all investigated compounds inhibit the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity, but with different inhibiting power. [V<sub>6</sub>-NO<sub>2</sub>][TBA]<sub>2</sub> (IC<sub>50</sub> = 1,87 × 10<sup>-5</sup> mol/L) was the most potent inhibitor of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, while [V<sub>6</sub>-C5d][TBA]<sub>2</sub> showed the least potent inhibiting power (IC<sub>50</sub> = 1,31 × 10<sup>-4</sup> mol/L). The results are consistent with previously published concentration-dependent inhibitory effect of polyoxometalates (including polioxovanadates) on ATPase activity from different model systems.

**Conclusion:** Based on the results, we can conclude that the examined compounds inhibit Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in a dose-dependent manner. Inhibiting power of tested hexavanadates are different, and weaker than inhibiting power of decavanadates (tested earlier) on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity, which is probably due to differences in charge, size and shape of these polioxometalates. Considering the role of these enzymes in the functioning of healthy cells and the development of the pathological conditions, it is possible that the inhibition of these enzymes with polyoxometalates contributions (both in vitro and in vivo confirmed) an anti-tumor, anti-viral and anti-bacterial properties of polyoxometalates.

**Key words:**

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase,  
polyoxometalates,  
inhibition,  
hexavanadate (V6)

## SAŽETAK

**Uvod:** Poslednjih godina postoji veliko interesovanje za primenu polioksometalata u kliničkoj medicini, pre svega kao antikancera i antibakterijskih, antivirusnih i antikoagulantnih agensa. Polazeći od ključne uloge natrijum/kalijum-adenozin-trifosfataze (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze) u normalnom funkcionisanju gotovo svih animalnih ćelija, razvoju nekih patoloških stanja i toksikološkog značaja ovog enzima, cilj ovog rada je ispitivanje in vitro uticaja četiri novosintetisana heksavanadata: [V<sub>6</sub>-CH<sub>3</sub>][Na]<sub>2</sub>, [V<sub>6</sub>-NO<sub>2</sub>][TBA]<sub>2</sub>, [V<sub>6</sub>-C3][H]<sub>2</sub>, [V<sub>6</sub>-C5d][TBA]<sub>2</sub> na aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze.

**Materijal i metode:** U eksperimentu je praćena enzimaska aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze cerebralnog korteksa svinje u odsustvu i prisustvu različitih koncentracija heksavanadata (u opsegu od 10<sup>-8</sup> do 10<sup>-3</sup> mol/l) [V<sub>6</sub>-CH<sub>3</sub>][Na]<sub>2</sub>, [V<sub>6</sub>-NO<sub>2</sub>][TBA]<sub>2</sub>, [V<sub>6</sub>-C3][H]<sub>2</sub>, [V<sub>6</sub>-C5d][TBA]<sub>2</sub>. Specifična aktivnost enzima praćena je spektrofotometrijskim merenjima na Perkin Elmer Lambda 35 UV-VIS spektrofotometru, merenjem koncentracije neorganskog fosfata oslobođenog enzimskom hidrolizom ATP.

**Rezultati:** Ispitivana jedinjenja inhibiraju aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze na dozno zavisnan način u ispitivanom opsegu koncentracija. Dobijeni rezultati pokazuju da sva ispitivana jedinjenja inhibiraju aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze, ali da imaju različite inhibitorne moći. Jedinjenje [V<sub>6</sub>-NO<sub>2</sub>][TBA]<sub>2</sub> je najpotentniji inhibitor Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze (IC<sub>50</sub> = 1,87 × 10<sup>-5</sup> mol/l), dok jedinjenje [V<sub>6</sub>-C5d][TBA]<sub>2</sub> pokazuje najslabiji inhibitorni uticaj (IC<sub>50</sub> = 1,31 × 10<sup>-4</sup> mol/l). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa ranije pokazanim inhibitornim efektom polioksometalata (uključujući polioksovanadate) na aktivnost ATP-aza različitog porekla.

**Zaključak:** Na osnovu dobijenih rezultata možemo da zaključimo da ispitivani heksavanadati na fiziološkoj pH vrednosti inhibiraju aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze, kao i da je dobijena inhibicija dozno zavisna. Inhibitorne moći heksavanadata testiranih u ovom radu međusobno se razlikuju i slabije su od inhibitornog efekta (ranije ispitivanog) deksavanadata na aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze, što je verovatno posledica razlika u naelektrisanju, veličini i obliku ovih polioksometalata. Imajući u vidu ulogu ovih enzima u funkcionisanju zdrave ćelije i razvoju patoloških stanja, moguće je da inhibicija ovih enzima polioksometalatima doprinosi (in vitro i in vivo potvrđenim) antitumorskim, antiviralnim i antibakterijskim osobinama polioksometalata.

### Keywords:

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aza,  
polioksometalati,  
inhibicija,  
heksavanadati (V6)

## Uvod

Polioksometalati (POM) su polianjonski oligomerni agregati prelaznih metala povezanih kiseoničnim mostovima, sa velikom gustinom negativnog naelektrisanja. Novija naučna istraživanja pokazuju da ova jedinjenja poseduju antitumorsku (1-4), antiviralnu (5-12), antibakterijsku (13, 14) i antikoagulantnu aktivnost (15, 16). Glavna prepreka šire primene POM-a je njihova neorganska priroda, usled čega ispoljavaju toksična dejstva u in vivo uslovima. Iz tog razloga se teži sintetisanju novih polioksometalata, sa ciljem smanjenja njihove toksičnosti (1). Zbog svog negativnog naelektrisanja slični su nukleotidima, usled čega utiču na aktivnost enzima zavisnih od nukleotida (5, 6).

Natrijum/kalijum-ATP-aza je membranski enzim koji svojom aktivnošću obezbeđuje visoku koncentraciju kalijuma i nisku koncentraciju natrijuma u ćeliji, koje su neophodne za normalno funkcionisanje većine životinjskih ćelija, kao i za ekscitabilnost nervnih i mišićnih ćelija (17). Novija istraživanja pokazuju da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aza interakcijom sa susednim proteinima učestvuje u intracelularnoj kaskadnoj transdukciji signala ka organelama (18). Ovo svojstvo Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze objašnjava njeno učešće u patogenezi tumora (migraciji tumorskih ćelija). Zbog toga Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aza može da predstavlja potencijalno dobro

ciljno mesto za dejstvo antitumorskih lekova.

Imajući u vidu uloge navedene ATP-aze u funkcionisanju zdravih ćelija i razvoju patoloških stanja s jedne, i inhibitorno dejstvo polioksometalata na enzime zavisne od nukleotida s druge strane, cilj ovog rada je ispitivanje in vitro uticaja četiri sintetisana heksavanadata (V6) (prilog 1) na aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze. Jedinjenja V6 testirana u ovom radu su novosintetisana i njihova biološka aktivnost do sada nije ispitivana.

## Materijal i metode

### Sinteza V6 jedinjenja

Jedinjenja V6 1, 2, 3 i 4 (**prilog 1**) sintetisana su prema procedurama opisanim u literaturi (19, 20).

### Priprema V<sub>6</sub> rastvora


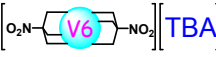
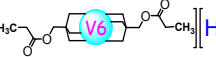
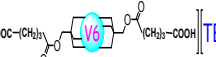
Rastvori 2 i 4 (0,1 mol/l) pripremljeni su rastvaranjem čvrstih jedinjenja u dimetil-sulfoksidu (DMSO), dok su jedinjenja 1 i 3 rastvorena u vodi. Radni rastvori su pripremani svakodnevno, razblaživanjem vodom do željenih koncentracija, neposredno pre upotrebe.

## Određivanje aktivnosti Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze

Standardni medijum sadrži (u mmol/l): 50 tris-hlo-  
rovodonika (Tris-HCl) (pH 7,4), 100 natrijum-hlorida  
(NaCl), 20 kalijum-hlorida (KCl), 5 magnezijum-hlorida  
(MgCl<sub>2</sub>), 2 ATP i 290 mg/l proteina komercijalno dostu-  
pnog enzimskog preparata iz cerebralnog korteksa svinje,  
u finalnoj zapremini od 200 μl. Nakon preinkubacije od 10  
minuta na 37 °C, reakcija je inicirana dodavanjem ATP-a

i zaustavljena nakon 20 minuta dodavanjem 22 μl hladne  
3 mol/l perhlorne kiseline (HClO<sub>4</sub>) i momentalnim hlade-  
njem na ledu. Finalni zapreminski udeo rastvora DMSO u  
inkubacionom medijumu na prelazi 1%. Neorganski fosfat  
(Pi), oslobođen hidrolizom ATP-a, određivan je modifi-  
kovanom spektrofotometrijskom metodom (21). Spektro-  
fotometrijska merenja su rađena na Perkin Elmer Lambda  
35 UV-VIS spektrofotometru.

**Prilog 1.** Prikaz molekularnih formula i struktura ispitivanih V6 jedinjenja

Oznaka	Jedinjenje	Formula/ Mr	Struktura
1	[V <sub>6</sub> -CH <sub>3</sub> ][Na] <sub>2</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>19</sub> V <sub>6</sub> 793,87	
2	[V <sub>6</sub> -NO <sub>2</sub> ][TBA] <sub>2</sub>	C <sub>40</sub> H <sub>84</sub> N <sub>4</sub> O <sub>23</sub> V <sub>6</sub> 1294,76	
3	[V <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ][H] <sub>2</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> O <sub>23</sub> V <sub>6</sub> 894,03	
4	[V <sub>6</sub> -C <sub>5</sub> d][TBA] <sub>2</sub>	C <sub>56</sub> H <sub>114</sub> N <sub>2</sub> O <sub>27</sub> V <sub>6</sub> 1553,15	

TBA-tetrabutilamonijum

## Rezultati

Uticao četiri sintetizovana V6 jedinjenja (**prilog 1**) na aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze iz cerebralnog korteksa svinje ispitan je in vitro izlaganjem enzimu u rasponu koncentracija 1 × 10<sup>-8</sup> - 1 × 10<sup>-3</sup> mol/l. Eksperimentalno dobijene zavisnosti aktivnosti enzima od koncentracije inhibitora izražene su kao procenat od kontrolne vrednosti (aktivnost enzima dobijena bez inhibitora) i prate sigmoidnu funkciju (**prilog 2**):

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^n} + A_2 \quad (1)$$

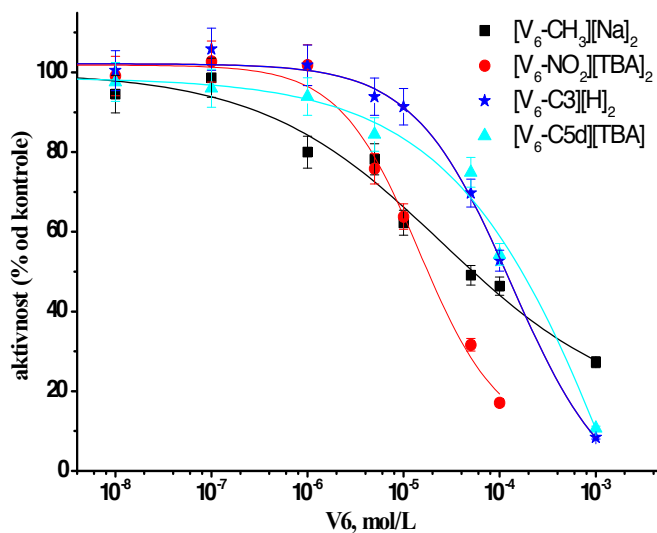
gde su A<sub>1</sub> i A<sub>2</sub> konstantni parametri (A<sub>1</sub> ≈ 100, A<sub>2</sub> ≈ 0), y preostala aktivnost enzima, a x koncentracija inhibitora; x<sub>0</sub> odgovara IC<sub>50</sub> vrednosti, dok n odgovara vrednosti Hilove (Hill) koeficijenta.

Dobijeni rezultati pokazuju da rastuće koncentracije ispitivanih jedinjenja indukuju inhibiciju enzimske aktivnosti na koncentraciono zavisnan način (**prilog 2**). Veoma indikativan parametar pri praćenju modulacije enzimske aktivnosti je vrednost IC<sub>50</sub>, koja predstavlja onu koncentraciju inhibitora čije prisustvo u smeši smanjuje aktivnost enzima za 50% u odnosu na kontrolnu vrednost. Vrednosti IC<sub>50</sub> izračunate su primenom Hilove jednačine (2) koja predstavlja linearnu transformaciju sigmoidne funkcije (1):

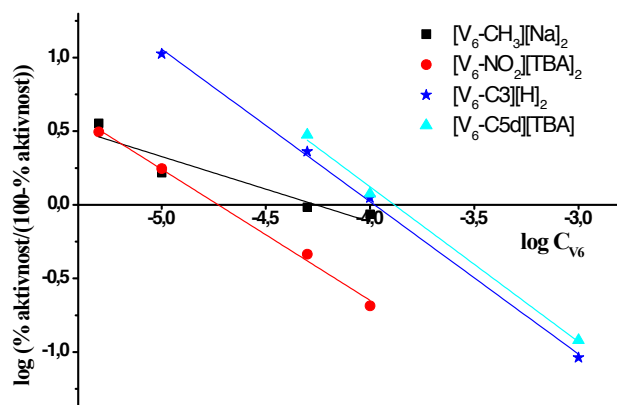
$$\log\left(\frac{\% \text{ aktivnost}}{100 - \% \text{ aktivnost}}\right) = -n \log[I] + n \log IC_{50} \quad (2)$$

gde je % preostala aktivnost enzima nakon inhibicije, odnosno % od kontrolne vrednosti, n je Hilov koeficijent i [I] koncentracija inhibitora. Vrednost inhibitornih para-

metara, IC<sub>50</sub> i n određuju se iz vrednosti nagiba i odsečka linearne zavisnosti log (% aktivnost/(100 - % aktivnost)) - log[I]. Hilove zavisnosti za sva ispitivana V6 jedinjenja prikazana su u **prilogu 3**.



**Prilog 2.** Uticaj različitih koncentracija V6 jedinjenja na aktivnost prečišćene Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze iz cerebralnog korteksa svinje. Preostala aktivnost enzima, dobijena u prisustvu odgovarajućih koncentracija inhibitora, izražena je kao procenat od kontrolne vrednosti (aktivnost enzima dobijena u odsustvu inhibitora). Vrednosti su izražene kao srednje vrednosti dobijene iz tri eksperimentalna merenja ± standardna greška merenja (engl. standard error measurement, S.E.M). Eksperimentalno dobijene vrednosti prilagođene su sigmoidnom funkcijom (sigmoidal fit, Origin 6.0).



**Prilog 3.** Hilova analiza inhibicije Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze iz cerebralnog korteksa svinje izazvane V6 jedinjenjima

Vrednosti IC<sub>50</sub> i n za sva ispitivana V6 jedinjenja date su u **prilogu 4**.

**Prilog 4.** Vrednosti inhibitornih parametara (IC<sub>50</sub> i Hilovog koeficijenta n) dobijene Hilovom analizom inhibicije Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze V6 jedinjenjima (1-4)

Oznaka	V6 jedinjenje	IC <sub>50</sub> vrednosti, mol/l	n
1	[V <sub>6</sub> -CH <sub>3</sub> ][Na] <sub>2</sub>	5,50 × 10 <sup>-5</sup>	0,44
2	[V <sub>6</sub> -NO <sub>2</sub> ][TBA] <sub>2</sub>	1,87 × 10 <sup>-5</sup>	0,89
3	[V <sub>6</sub> -C3][H] <sub>2</sub>	1,05 × 10 <sup>-4</sup>	0,98
4	[V <sub>6</sub> -C5d][TBA]	1,31 × 10 <sup>-4</sup>	0,99

Izračunati inhibitorni parametri sumirani su u tabeli 2 (**prilog 4**). Dobijeni rezultati pokazuju da svi ispitivani heksavanadati inhibiraju aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze, ali da se njihove inhibitorne moći međusobno razlikuju. Pokazano je da jedinjenje 2 naj snažnije inhibira enzimsku aktivnost i da pri koncentraciji od 1,0 × 10<sup>-4</sup> mol/l skoro u potpunosti inhibira enzim, dok najslabiji inhibitor (jedinjenje 4) pri istoj koncentraciji smanjuje aktivnost enzima za svega 30%. Dobijene vrednosti Hilovih koeficijenata za sva ispitivana V6 jedinjenja (**prilog 4**) ukazuju da ne postoji pozitivna kooperativnost pri vezivanju za enzim.

## Diskusija

U ovom radu ispitivan je in vitro uticaj četiri novosintetisana heksavanadata: [V<sub>6</sub>-CH<sub>3</sub>][Na]<sub>2</sub>, [V<sub>6</sub>-NO<sub>2</sub>][TBA]<sub>2</sub>, [V<sub>6</sub>-C3][H]<sub>2</sub>, [V<sub>6</sub>-C5d][TBA]<sub>2</sub> na aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze cerebralnog korteksa svinje. Dobijeni rezultati pokazuju da sva četiri jedinjenja u ispitivanom opsegu koncentracija inhibiraju aktivnost enzima, kao i da je procenat inhibicije proporcionalan koncentraciji inhibitora u inkubacionoj smeši. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa podacima iz literature, prema kojima neki polioksometalati na dozno zavisnan način inhibiraju ATP-aze P-tipa i druge enzime zavisne od nukleotida (1, 21-23). Pored toga, pokazano je i da se inhibitorni potencijali ispitivanih heksavanadata međusobno razlikuju, tj. da je [V<sub>6</sub>-NO<sub>2</sub>][TBA]<sub>2</sub> najpotentniji inhibitor (IC<sub>50</sub> = 1,87 × 10<sup>-5</sup> mol/l) i da je oko šest do sedam puta jači inhibitor aktivnosti Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze od [V<sub>6</sub>-C3][H]<sub>2</sub> i [V<sub>6</sub>-C5d][TBA]<sub>2</sub>.

Iako prema našim saznanjima u literaturi nema

podataka o biološkoj aktivnosti heksavanadata, dobijeni rezultati su u saglasnosti sa ranije pokazanim koncentracijono zavisnim inhibitornim efektom deksavanadata na aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze, ecto ATP-aze i Ca<sup>2+</sup>-ATP-aze iz različitih sistema modela (22). Poređenjem dobijenih inhibitornih parametara heksavanadata (prilozi 2 i 4) sa inhibitornim parametrima deksavanadata (IC<sub>50</sub> = 1,30 × 10<sup>-6</sup>) za isti modelni sistem iz literature (22) očigledno je da su heksavanadati, ispitivani u ovom radu, 50-100 puta slabiji inhibitori enzimске aktivnosti od deksavanadata. Snažniji inhibitorni efekti deksavanadata u odnosu na heksavanadate verovatno su posledica razlika u naelektrisanju, veličini i obliku ovih polioksometalata. Razlog različite reaktivnosti ispitivanih polioksometalata pokušaćemo da razjasnimo u toku naših daljih istraživanja, upoređivanjem dobijenih inhibitornih parametara Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze sa rezultatima dobijenim kristalografskom analizom ispitivanih polioksomovanadata i ab initio izračunavanjima.

Ovakav pristup, koji kombinuje teorijska hemijska izračunavanja i rezultate eksperimentalnih inhibitornih studija, doprinosi pronalaženju potentnog, ali u isto vreme selektivnog i specifičnog inhibitora Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze, jednog od ključnih enzima u funkcionisanju zdrave ćelije i razvoju patoloških stanja.

## Zahvalnica

Rezultati saopšteni u ovom radu deo su istraživanja u okviru bilateralnog projekta između Srbije i Francuske: Experimental and theoretical studies of some polyoxovanadates interaction with Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and Ca<sup>2+</sup>-ATPase.

## Literatura

- Rhule JT, Hill CL, Judd DA, Schinazi RF. Polyoxometalates in Medicine. Chem Rev. 1998; 98: 327-357.
- Mioč UB, Todorović MR, Davidović M, Colombar Ph, Holclajtner-Antunović I. Heteropoli compounds-From proton conductors to biomedical agents. Solid State Ionics. 2005; 176: 2837-3044.
- Li J, Tan R, Li R, Wang X, Li E, Zhai F et al. Syntheses, properties and biological activity of organogermanium substituted heteropolytungstates. Inorg Chem Commun. 2007; 10: 216-219.
- Wang X, Li F, Liu S, Pope MT. New liposome-encapsulated-polyoxometalates: synthesis and antitumoral activity. J Inorg Biochem. 2005; 99: 452-457.
- Yamamoto N, Schols D, De Clercq E, Debyser Z, Pauwels R, Balzarini J et al. Mechanism of anti-human immunodeficiency virus action of polyoxometalates, a class of broad-spectrum antiviral agents. Mol Pharmacol. 1992; 42: 1109-1117.
- Inouye Y, Fujimoto Y, Sugiyama M, Yoshida T, Yamase T. Structure-activity relationship and strain specificity of polyoxometalates in anti-human immunodeficiency virus activity. Biol Pharm Bull. 1995; 18: 996-1000.
- Ikeda S, Nishiya S, Yamamoto A, Yamase T, Nishimura C, De Clercq E. Activity of keggin polyoxotungstate pm-19 against herpes simplex virus type 2 infection in immunosuppressed mice: Role of peritoneal macrophage activation. J Med Virol. 1993; 41: 191-195.
- Huffman JH, Sidwell RW, Barnard DL, Morrison A, Otto

- MJ, Hill CL et al. Influenza virus-inhibitory effects of a series of germanium and silicon centred polyoxometalates. *Antivir Chem Chemother.* 1997; 8: 75–83.
9. Barnard DL, Hill CL, Gage T, Matheson JE, Huffman JH, Sidwell RW et al. Potent inhibition of respiratory syncytial virus by polyoxometalates of several structural classes. *Antivir Res.* 1997; 34: 27–37.
  10. Shigeta S, Mori S, Watanabe J, Baba M, Khenkin A.M., Hill C.L. et al. In vitro antimyxovirus and anti-human immunodeficiency virus activities of polyoxometalates. *Antiv Chem and Chemother.* 1995; 6: 114–122.
  11. Shigeta S, Mori S, Watanabe J, Baba M, Khenkin A.M., Hill C.L. et al. In-vitro anti myxovirus activity and mechanism of anti-influenzavirus activity of polyoxometalates PM-504 and PM-523. *Antivir Chem and Chemother.* 1996; 7: 346–352.
  12. Shigeta S, Mori S, Watanabe J, Soeda S, Takahashi K, Yamase T. Synergistic anti-influenza virus A (H1N1) activities of PM-523 (polyoxometalate) and ribavirin in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Ch.* 1997; 41: 1423–1427.
  13. Fukuda N, Yamase T, Tajima Y. Inhibitory effect of polyoxotungstates on the production of penicillin-binding proteins and  $\beta$ -lactamase against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biol Pharm Bull.* 1999; 22: 463–470.
  14. Fukuda N, Yamase T. In vitro antibacterial activity of vanadate and vanadyl compounds against *Streptococcus pneumoniae*. *Biol Pharm Bull.* 1997; 20: 927–930.
  15. Tajima Y, Shizuka R, Oshitani S, Amagai H. Phosphotungstate as a useful eluent for antithrombin III purification by heparin-agarose affinity chromatography. *Thromb Res.* 1990; 57: 697–704.
  16. Tajima Y, Amagai H, Okamura N. Phosphotungstate shows a heparin-like anticoagulant effect but inhibits heparin. *Thromb Res.* 1989; 55: 329–339.
  17. Skou JC, Essman M. The Na,K-ATPase. *J Bioenerg Biomembr.* 1992; 24: 249–261.
  18. Lefranc F, Mijatović T, Kondo Y, Sauvage S, Roland I, Krstić D et al. Targeting the  $\alpha$ 1 subunit of the sodium pump to combat glioblastoma cells. *Neurosurgery* 2008; 62:211–222.
  19. Q. Chen, J.A. Zubieta. Structural investigation of the hexavanadate core in oxidized, mixed valence and reduced clusters of the type [V<sub>6</sub>-nv VnIv O<sub>13</sub>-n(OH)S{(OCH<sub>2</sub>)-3CR}2]2<sub>n=0.3.6</sub>. *Inorg Chim Acta.* 1992; 95: 198–200.
  20. P.Wu, J.Chen, P.Yin, Z.Xiao, J.Zhang, A.Bayaguud, Y.We, Solvent induced supramolecular chiralityswitching of bis (trisalkoksy) hexavanadate. *Polyhedron.* 2013; 52: 1344–1348.
  21. Čolović M, Bajuk-Bogdanović D, Avramović N, Holclajtner-Antunović I, Bošnjaković-Pavlović N, Vasić V, Krstić D. Inhibition of rat synaptic membrane Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases by 12-tungstosilicic and 12-tungstophosphoric acid. *Bioorgan Med Chem.* 2011; 19(23): 7063–7069.
  22. Krstić D, Čolović M, Bošnjaković-Pavlović N, Spasojević-de Bire A, Vasić V. Influence of Decavanadate on Rat Synaptic Plasma Membrane ATPases Activity. *Gen Physiol and Bioph.* 2009; 28: 302–308.
  23. Fraqueza G, Andre Ohlin C, Casey W H, Aureliano M. Sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interactions with decaniobate, decavanadate, vanadate, tungstate and molybdate. *J Inorg Biochem.* 2012; 107: 82–89.