

# Učinci sastavnica otrova poskoka na pokazatelje srčane funkcije na modelu izoliranog štakorskog srca

---

**Karabuva, Svjetlana**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2017**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:082866>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-10**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Svjetlana Karabuva**

**Učinci sastavnica otrova poskoka na pokazatelje srčane funkcije  
na modelu izoliranog štakorskog srca**

**Doktorska disertacija**

**Split, 2017.**

SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET

Svjetlana Karabuva

Učinci sastavnica otrova poskoka na pokazatelje srčane funkcije  
na modelu izoliranog štakorskog srca

Doktorska disertacija

Split, 2017.

Biokemijski postupci razdiobe cjelokupnog otrova poskoka i elektroforetski prikaz izoliranih sastavnica izrađeni su u laboratoriju Odsjeka za molekularne i biomedicinske znanosti u Institutu Jožef Štefan pri Međunarodnoj poslijediplomskoj školi u Ljubljani.

Mjerenja na modelu izoliranog štakorskog srca provedena su u laboratoriju Katedre za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Mostaru.

Laboratorijski obrada biokemijskih pokazatelja srčanog oštećenja izvršena je u Zavodu za medicinsko-laboratorijsku dijagnostiku u Kliničkom bolničkom centru Split.

Statistička raščlamba podataka izračunata je u Klinici za infektologiji u Kliničkom bolničkom centru Split.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Boris Lukšić, dr. med.

## SADRŽAJ

Popis oznaka, kratica i simbola .....	4
<b>1. UVOD .....</b>	<b>9</b>
1.1. Zmije otrovnice .....	10
1.1.1. Obitelj <i>Viperidae</i> i podobitelj <i>Viperinae</i> .....	13
1.1.2. Rod <i>Vipera</i> .....	15
1.1.3. Vrsta <i>Vipera ammodytes</i> .....	18
1.2. Zmijski otrovi .....	18
1.2.1. Glavne toksične sastavnice otrova zmija obitelji <i>Viperidae</i> .....	22
1.2.1.1. Cink-ovisne metaloproteinaze .....	22
1.2.1.2. Sekrecijske fosfolipaze A <sub>2</sub> .....	32
1.2.2. Hemostatski aktivne sastavnice otrova podvrste <i>Vipera ammodytes ammodytes</i> .	39
1.3. Klinička obilježja ofidizma .....	43
1.4. Kardiotoksični učinak cjelokupnog otrova <i>Vipera ammodytes ammodytes</i> .....	60
<b>2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>62</b>
<b>3. MATERIJALI I POSTUPCI .....</b>	<b>64</b>
3.1. Ustroj istraživanja .....	65
3.2. Ishodi istraživanja .....	65
3.3. Protokol čitavog istraživanja .....	66
3.4. Snaga istraživanja .....	66
3.5. Materijali .....	66
3.5.1. Kemijske tvari i otopine .....	66
3.5.2. Otrovi poskoka .....	68

3.5.3. Pokusne životinje .....	69
3.5.3.1. Etička načela .....	70
3.5.4. Laboratorijska oprema .....	70
3.6. Postupci .....	71
3.6.1. Biokemijski postupci razdiobe cjelokupnog otrova poskoka .....	71
3.6.1.1. Kolonska gelska kromatografija .....	71
3.6.1.2. RP HPLC .....	72
3.6.2. Izračun korištenih koncentracija izoliranih sastavnica otrova poskoka .....	74
3.6.3. Elektroforeza izoliranih sastavnica otrova poskoka .....	75
3.6.4. Amoditin L iz cjelokupnog otrova poskoka .....	75
3.6.5. Model izoliranog štakorskog srca .....	76
3.6.6. Protokol primjene izoliranih sastavnica otrova poskoka .....	81
3.7. Statistička raščlamba podataka .....	82
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>84</b>
4.1. Kolonska gelska kromatografija .....	85
4.2. Elektroforetski prikaz frakcija otrova poskoka .....	87
4.3. RP HPLC .....	88
4.4. Elektroforetski prikaz podfrakcija otrova poskoka .....	89
4.5. Kardiotoksični učinci frakcija otrova poskoka .....	90
4.5.1. Elektrofiziološki pokazatelji .....	90
4.5.2. Kontraktilni pokazatelji .....	97
4.5.3. Biokemijski pokazatelji .....	103
4.6. Kardiotoksični učinci podfrakcija otrova poskoka i amoditina L.....	104

<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>108</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>114</b>
<b>7. SAŽETAK .....</b>	<b>116</b>
<b>8. SUMMARY .....</b>	<b>118</b>
<b>9. POPIS LITERATURE .....</b>	<b>120</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>135</b>

## Popis oznaka, kratica i simbola

AA	arahidonska kiselina (engl. <i>arachidonic acid</i> )
ADP	adenozin difosfat
A <sub>280</sub>	apsorbanca na valnoj duljini od 280 nm
ACN	acetonitril
AcOH	octena kiselina (100%, (v/v))
AMP	adenozin monofosfat
$\alpha$ II <sub>b</sub> $\beta$ III <sub>a</sub>	trombocitni glikoprotein $\alpha$ II <sub>b</sub> $\beta$ III <sub>a</sub>
$\alpha$ <sub>2</sub> -MG	$\alpha$ <sub>2</sub> -makroglobulin
$\alpha$ <sub>2</sub> -PI	$\alpha$ <sub>2</sub> -antiplazmin (engl. <i><math>\alpha</math><sub>2</sub>-plasmin inhibitor</i> )
AgNO <sub>3</sub>	srebrov nitrat
ANOVA	analiza varijance
AP	aktivator plazminogena
APC	aktivirani protein C
APS	amonijev persulfat (engl. <i>ammonium persulfate</i> )
APTV	aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme
AST	aspartat aminotransferaza
AT-III	antitrombin III
Atn	amoditin (engl. <i>ammodytin</i> )
Atn-I <sub>1</sub>	amoditin I <sub>1</sub>
Atn-I <sub>2</sub>	amoditin I <sub>2</sub>
Atn-L	amoditin L
Atx	amoditoksin (engl. <i>ammodytoxin</i> )
Atx-A	amoditoksin A
Atx-B	amoditoksin B
Atx-C	amoditoksin C
ATP	adenozin trifosfat
AU	jedinica apsorbance (engl. <i>absorbance unit</i> )
AV	atrijsko-ventrikulski
BSA	albumin iz goveđeg seruma (engl. <i>Bovine serum albumin</i> )
Ca <sup>2+</sup>	kalcijev ion
CaCl <sub>2</sub>	kalcijev klorid
cADP	ciklički adenzin difosfat



cAMP	ciklički adenzin monofosfat
CF	koronarni protok (engl. <i>coronary flow</i> )
cGDP	ciklički gvanozin difosfat
cGMP	ciklički gvanozin monofosfat
CK	kreatin kinaza (engl. <i>creatine kinase</i> )
CO <sub>2</sub>	ugljičkov dioksid
CRISP	cisteinom bogati sekretorni protein (engl. <i>cysteine-rich secretory protein</i> )
devLVP	razvijeni tlak lijeve klijetke (engl. <i>developed left ventricular pressure</i> )
dH <sub>2</sub> O	destilirana voda
DIK	diseminirana intravaskularna koagulacija
dLVP	dijastolički tlak lijeve klijetke (engl. <i>diastolic left ventricular pressure</i> )
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
DTT	ditiotreitol (engl. <i>dithiothreitol</i> )
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EKG	elektrokardiogram
ESI-MS	engl. <i>electrospray ionisation mass spectrometry</i>
EtOH	etanol (96%, (v/v))
F II	čimbenik zgrušavanja II
F II <sub>a</sub>	aktivirani čimbenik II
F V	čimbenik zgrušavanja V
F V <sub>a</sub>	aktivirani čimbenik V
F VII	čimbenik zgrušavanja VII
F VII <sub>a</sub>	aktivirani čimbenik VII
F VIII	čimbenik zgrušavanja VIII
F VIII <sub>a</sub>	aktivirani čimbenik VIII
F IX	čimbenik zgrušavanja IX
F IX <sub>a</sub>	aktivirani čimbenik IX
F X	čimbenik zgrušavanja X
F X <sub>a</sub>	aktivirani čimbenik X
F XI	čimbenik zgrušavanja XI
F XI <sub>a</sub>	aktivirani čimbenik XI
F XIII	čimbenik zgrušavanja XIII
F XIII <sub>a</sub>	aktivirani čimbenik XIII
FDP	razgradni produkti fibrina (engl. <i>fibrin degradating products</i> )

gRNK	glasnička ribonukleinska kiselina
HCl	klorovodična kiselina
HMW	visoka molekulska masa (engl. <i>high molecular weight</i> )
HMWK	kininogen velike molekulske mase (engl. <i>high molecule weight kininogen</i> )
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>high performance liquid chromatography</i> )
HR	srčana frekvencija (engl. <i>heart rate</i> )
i.m.	intramuskularan, koji se daje u mišić (lat. <i>intramuscularis, -e</i> )
INR	engl. <i>international normalized ratio</i>
i.p.	intraperitonealan, koji se daje u trbušnu šupljinu (lat. <i>intraperitonealis, -e</i> )
IU	međunarodna jedinica (engl. <i>international unit</i> )
i.v.	intravenski, koji se daje u venu (lat. <i>intravenosus, -a, -um</i> )
K <sup>+</sup>	kalijev ion
KCl	kalijev klorid
kDa	kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	kalijev dihidrogenfosfat
LAOO	oksidaze L-amino kiselina (engl. <i>L-amino acid oxidases</i> )
LC	tekućinska kromatografija (engl. <i>liquid chromatography</i> )
LDH	laktat dehidrogenaza
LMW	niska molekulska masa (engl. <i>low molecular weight</i> )
Mg <sup>2+</sup>	magnezijev ion
MgSO <sub>4</sub>	magnezijev sulfat
min	minuta
MP	metaloproteinaza
M <sub>w</sub>	molekularna masa (engl. <i>molecular weight</i> )
NaCl	natrijev klorid
NaHCO <sub>3</sub>	natrijev hidrogenkarbonat
NGF	čimbenik rasta živca (engl. <i>neuronal growth factor</i> )
NO	dušikov monoksid, dušikov (II) oksid
O <sub>2</sub>	kisik
PAGE	poliakrilamid gel (engl. <i>polyacrylamide gel</i> )
PAI-1	inhibitor plazminogen aktivatora-1 (engl. <i>plasminogen activator inhibitor-1</i> )
PAF	čimbenik aktivacije trombocita (engl. <i>platelet activating factor</i> )

PAF-AH	acetilhidrolaza čimbenika aktivacije trombocita ( <i>engl. platelet-activating factor acetylhydrolase</i> )
PC	protein C
PCR	lančana reakcija polimerizacije ( <i>engl. polymerase chain reaction</i> )
pEKW	<i>engl. pyroglutamic acid-Lysine-Tryptophan (pyroGlu-Lys-Trp)</i>
PLA <sub>2</sub>	fosfolipaza A <sub>2</sub> ( <i>engl. phospholipase A<sub>2</sub></i> )
PS	protein S
PV	protrombinsko vrijeme
RNK	ribonukleinska kiselina
RP HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti na obrnutim fazama ( <i>engl. reverse phase high performance liquid chromatography</i> )
RVV-X	aktivator čimbenika X iz otrova vrste <i>Vipera russelli</i> ( <i>engl. specific factor X activator from Vipera russelli snake venom</i> )
s	sekunda
SA	sinus-atrijski
s.c.	subkutan, koji se daje pod kožu ( <i>lat. subcutaneus, -a, -um</i> )
SDS	natrij-dodecil sulfat ( <i>engl. sodium-dodecyl sulphate</i> )
SDS-PAGE	poliakrilamidna elektroforeza u prisutnosti natrij-dodecil sulfata
sLVP	sistolički tlak lijeve klijetke ( <i>engl. systolic left ventricular pressure</i> )
SP	serinska proteinaza ( <i>engl. serine proteinase</i> )
SK	streptokinaza
snaclecs	lektini C-tipa u zmijskim otrovima ( <i>engl. snake C-type lectins</i> )
sPLA <sub>2</sub>	sekretorna fosfolipaza A <sub>2</sub> ( <i>engl. secretory phospholipase A<sub>2</sub></i> )
SVMP	metaloproteinaza izolirana iz otrova zmija ( <i>engl. snake venom metalloproteinase</i> )
SVSP	serinska proteinaza izolirana iz otrova zmija ( <i>engl. snake venom serine proteinase</i> )
TCA	trikloroocetna kiselina ( <i>engl. trichloroacetic acid</i> )
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
TF	tkivni čimbenik ( <i>engl. tissue factor</i> )
TFA	trifluoroocetna kiselina ( <i>engl. trifluoroacetic acid</i> )
TFPI	inhibitor puta tkivnog čimbenika ( <i>engl. tissue factor pathway inhibitor</i> )
3FTX	troprstni toksin ( <i>engl. three-finger toxin</i> )
t-PA	tkivni aktivator plazminogena ( <i>engl. tissue plasminogen activator</i> )

TRIS	trihidroksimetilaminometan (2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol)
TXA <sub>2</sub>	tromboksan A <sub>2</sub>
UK	urokinaza
u-PA	urokinaza plazminogen aktivator (engl. <i>urokinase plasminogen activator</i> )
V.	vipera, zmija ljutica (lat. <i>Vipera</i> , -ae, f.)
Vaa	<i>Vipera ammodytes ammodytes</i> (V. a. <i>ammodytes</i> )
VAFXA-I	aktivator I čimbenika X izoliran iz otrova V. a. <i>ammodytes</i> (engl. <i>Vipera ammodytes ammodytes activating factor X I</i> )
VAFXA-II	aktivator II čimbenika X izoliran iz otrova V. a. <i>ammodytes</i> (engl. <i>Vipera ammodytes ammodytes activating factor X II</i> )
VaH1	hemoragična metaloproteinaza 1 izolirana iz otrova V. a. <i>ammodytes</i> (engl. <i>Vipera ammodytes ammodytes haemorrhagic metalloproteinase 1</i> )
VaH2	hemoragična metaloproteinaza 2 izolirana iz otrova V. a. <i>ammodytes</i> (engl. <i>Vipera ammodytes ammodytes haemorrhagic metalloproteinase 2</i> )
VaH3	hemoragična metaloproteinaza 3 izolirana iz otrova V. a. <i>ammodytes</i> (engl. <i>Vipera ammodytes ammodytes haemorrhagic metalloproteinase 3</i> )
VaH4	hemoragična metaloproteinaza 4 izolirana iz otrova V. a. <i>ammodytes</i> (engl. <i>Vipera ammodytes ammodytes haemorrhagic metalloproteinase 4</i> )
VCAM-1	engl. <i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	čimbenik rasta krvožilnog endotela (engl. <i>vascular endothelial growth factor</i> )
VF	ventrikularna fibrilacija
VLFXA	aktivator čimbenika X iz otrova vrste <i>Vipera lebetina</i> (engl. <i>Vipera lebetina factor X activator</i> )
VT	ventrikularna tahikardija
vWF	von Willebrandov čimbenik (engl. <i>von Willebrand factor</i> )
XI <sub>a</sub> /IX	kompleks aktiviranog čimbenika zgrušavanja XI i čimbenika IX
Zn <sup>2+</sup>	cinkov ion

## **1. UVOD**

## 1.1. Zmije otrovnice

Ugrizi i ubodi otrovnih životinja značajan su medicinski problem. Otrovnice životinje načelno možemo podijeliti u dvije skupine i to životinje otrovnice i otrovne životinje u užem smislu riječi. Životinje otrovnice (engl. *venomous animals* = životinje otrovnice), nazivom i aktivno otrovne ili fanerotoksične životinje (grč. *phaneros* = očit, jasan), posjeduju posebne sustave; otrovne aparate namijenjene za proizvodnju i izravan unos otrova (engl. *venom* = otrov) u tijelo žrtve s ciljem samoobrane ili hvatanja plijena (1,2). Za razliku od njih, otrovne životinje u užem smislu riječi (engl. *poisonous animals* = otrovne životinje) nemaju zaseban otrovni aparat, a nazivaju se i pasivno otrovne ili kriptotoksične životinje (grč. *kryptos* = skriven, neprimjetan) (2,3). Otrovi ovakvih životinja raspoređeni su u tijelu, osobito po unutarnjim i spolnim organima, te do otrovanja čovjeka najčešće dolazi tek nakon što takva životinja bude progutana (3). S obzirom na rasprostranjenost i značajnu opasnost koju predstavljaju za čovjeka, među životinjama otrovnicama najznačajnije su zmije (lat. *Serpentes*, grč. *Ophidia*) koje se ubrajaju u podred unutar razreda gmazova (lat. *Reptilia*). Red gmazova obuhvaća nekoliko živućih obitelji koje su na temelju morfoloških obilježja i sličnosti u mitohondrijskoj DNK podijeljene u podredove s oko 3 000 do sada opisanih vrsta (4,5). Na svijetu je do sada istraženo 2 500 do 3 000 vrsta zmija, a približno se 375 vrsta smatra otrovnim (6,7). Procijenjeno je kako vjerojatno oko 250 različitih vrsta može uzrokovati teška sustavna otrovanja u ljudi (6,7).

Otrovanje zmijskim otrovom naziva se ofidizam (grč. *ofis* = zmija). Otrovni aparat životinja otrovnice sadrži smjesu brojnih otrovnih sastavnica, a smješten je u temporalnoj regiji zmijske glave, posteriorno u odnosu na oči, i u načelu se sastoji od otrovne žlijezde, izvodnog kanala i otrovnog zuba. Glavna otrovna žlijezda građena je od mnogo tubula koji se nalaze oko središnjeg lumena u kojem je smještena većina otrova. Otrovnica žlijezda okružena je snažnim mišićjem uslijed čije kontrakcije posredstvom izvodnih kanala otrov iz otrovnih zubi biva ubrizgan u žrtvu (2,8). Osim proizvodnje otrova, ova žlijezda ima i pomoćnu ulogu koja u potpunosti nije još razjašnjena, no smatra se kako je ista povezana sa skladištenjem proizvedenog otrova, te aktivacijom litičkih sastavnica koje su do trenutka ubrizgavanja otrova bile neaktivne uslijed niskog pH u lumenu žlijezde kao i prisutnosti endogenih inhibitora (2,8). Morfološka obilježja zmija; raspored ljuski, razmještaj zubi, te raspored kostiju, mišića i osjetljivih organa samo su neka od obilježja temeljem kojih se vrši klasifikacija zmija unutar obitelji (3). Prema vanjskim znacima, kao što su primjerice boja,

duljina, oblik tijela, repa i glave, mogu se ponekad razlikovati otrovne od neotrovnih zmija, no najsigurniji znak ipak jest veličina, oblik i razmještaj ljuski na glavi, kao i građa otrovnog aparata (3,8). Razvoj tehnika koje omogućavaju raščlambu DNK omogućio je još detaljniju klasifikaciju zmija unutar rodova i vrsta (2). U Tablici 1. i 2. pregledno je prikazana podjela zmija; razred *Reptilia*, podrazred *Squamata*, te red *Ophidia* (*Serpentes*).

**Tablica 1.** Prikaz neotrovnih zmija – red *Ophidia* (4).

Podred	Nadobitelj	Obitelj
<i>Cholopidia</i>		<i>Typhlopidae</i>
<i>Scolecophidia</i>		<i>Anomalepidae</i> <i>Leptotyphlopidae</i>
		<i>Boidae</i> <i>Pythonidae</i> <i>Erycidae</i> <i>Xenopeltidae</i> <i>Loxocemidae</i>
<i>Alethinophidia Henophidia</i>		<i>Anomochilidae</i> <i>Bolyeriidae</i> <i>Aniliidae</i> <i>Cylindrophiiidae</i> <i>Uropeltidae</i> <i>Tropidophiidae</i>
<i>Alethinophidia Caenophidia</i>	<i>Acrochordoidae</i>	<i>Acrochordidae</i>
<i>Alethinophidia Caenophidia</i>	<i>Colubroidea</i>	Vidjeti Tablicu 2.

S obzirom na građu otrovnog aparata i različitosti u građi otrovnog zuba, razlikujemo četiri vrste otrovnih zmija i to:

- *Solenoglypha* (cjevozubice)
- *Proteroglypha* (prednjožljebozubice)
- *Opistoglypha* (stražnjožljebozubice)
- *Aglypha* (glatkozubice).

Cjevozubice (*Solenoglypha*) imaju šuplje otrovne zube kroz koje se cijedi otrov. U trenutku kada se cjevasti otrovni zub zabode u plijen, pokušaj bijega plijena omogućuje nastanak šupljine između ubodenog tkiva i zuba, te je stvorena šupljina dovoljna za istjecanje otrova (3). Zmije iz ove skupine imaju najsavršeniji otrovni zub; dug, pokretan i uložen u sluznični nabor, a posjeduju ga prave ljutice (*Viperinae*) i čegrtuše (*Crotalinae*), koje se smatraju najbržim napadačima od svih otrovnih zmija (3). Otrovni zubi prednjožljebozubica (*Proteroglypha*) nalaze se u prednjem dijelu gornje čeljusti, dok su iza njih poredani manji neotrovni zubi. U ovu skupinu ubrajaju se morske zmije (*Hydrophiinae*), te neke od najotrovnijih zmija na svijetu, poput mambe i kobre (*Elapinae*). Žljebasti zub smješten sprijeda pogodniji je za hvatanje plijena od zuba u skupini gdje se nalazi straga. U slučaju žljebastih zubi koji su smješteni u stražnjem dijelu gornje čeljusti ispred kojih su poredani manji neotrovni zubi, otrov teče po žlijebu, te se ovakve zmije nazivaju stražnjožljebozubice (*Opistoglypha*). Glatkozubice (*Aglypha*) imaju oštre, prema natrag zakrivljene zube, jednake veličine kojima sprječavaju bijeg uhvaćenog plijena, a uglavnom su neotrovne zmije (3). Bjelouška (*Natrix natrix*) ima samo otrovnu žlijezdu i izvodne kanale, te se otrovni sekret izliva izravno u usnu šupljinu, a otrovni aparat omogućuje joj hranjenje.

Svrha zmijskog ugriza je prehrana ili obrana, stoga s obzirom na količinu ubrizganog otrova u žrtvu ili napadača, razlikujemo dvije vrste ugriza; ugriz u svrhu prehrane ili obrane (2,3). U zmija čija je svrha ugriza prehrana, namjera je usmrćivanje žrtve; zmija ugrize žrtvu te unese veliku količinu otrova, a plijen proguta tek nakon što ga usmrti. Ugrizom u svrhu obrane zmija u žrtvu injicira manju količinu otrova jer nastoji pobjeći i time se obraniti. Ugriz u kojem otrovnica ne isprazni otrovne žlijezde naziva se suhi ugriz (3).



### 1.1.1. Obitelj *Viperidae* i podobitelj *Viperinae*

Sve otrovnice kao razvojno najnaprednija skupina zmija raspodijeljene su u četiri obitelji:

- *Viperidae* – ljutice
- *Elapidae* – guje
- *Colubridae* – guževi
- *Atractaspididae* – podzemne otrovnice Afrike i Srednjeg Istoka (3,4).

**Tablica 2.** Prikaz zmija otrovnica – red *Ophidia*, podred *Alethinophidia*, te nadobitelj *Colubridae* (4).

Obitelj	Podobitelj
<i>Viperidae</i>	<i>Viperinae</i>
	<i>Crotalinae</i>
<i>Elapidae</i>	<i>Elapinae</i>
	<i>Hydrophiinae</i>
<i>Colubridae</i>	<i>Boodontinae</i>
	<i>Calamariinae</i>
	<i>Colubrinae</i>
	<i>Dipsadinae</i>
	<i>Homalopsinae</i>
	<i>Natricinae</i>
	<i>Pareatinae</i>
	<i>Psammophiinae</i>
	<i>Pseudoxenodontinae</i>
	<i>Pseudoxyrhopiinae</i>
<i>Xenodermatinae</i>	
<i>Xenodontinae</i>	
<i>Atractaspididae</i>	

Doticaj zmiya iz obitelji *Viperidae* i *Elapidae* s čovjekom jest čest, kao i broj ugriza, a s tim je posljedično povezan morbiditet i mortalitet kojeg uzrokuju (6,9). Tijekom evolucije *Colubridae* su izgubile svoje otrovne žlijezde, te su samo neki primjerci poput *Dispholidus typus* opasni za ljude.

Obitelj *Viperidae* obuhvaća dvije podobitelji:

- *Viperinae* – prave ljutice
- *Crotalinae* – jamičarke.

*Viperinae* imaju plosnatu glavu, na vrhu usku, a na zatiljku proširenu, te eliptičnu i vertikalnu zjenicu koja ukazuje na noćnu aktivnost. *Crotalinae* imaju lične jamice između nosnice i oka, koje su ujedno i termoreceptori koji im služe za pomoć pri pronalaženju toplokrvnog plijena (9).

Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije u skupinu zmiya otrovnica s najvišim medicinskim značajem ubrajaju se vrste koje su široko rasprostranjene na gusto naseljenim geografskim područjima gdje uzrokuju ugrize koji posljedično rezultiraju visokom učestalošću morbiditeta, invaliditeta i mortaliteta, potom vrste koje su slabo istražene, ali za koje postoji snažna indicija da bi mogle predstavljati značajan rizik za čovjeka, te konačno vrste čiji ugrizi, unatoč tome što nisu česti, u načelu dovode do teškog i po život opasnog sustavnog otrovanja (10).

Ofidizam je vrlo učestala pojava u tropskom i subtropskom području; najčešći je u zemljama Azije, Afrike, Srednje i Južne Amerike, posebice u ruralnim područjima (10). Ipak, ofidizam susrećemo i u područjima s umjerenom klimom, pa tako i u Europi (6,7,10). Na svakom kontinentu, osim Australije, broj vrsta zmiya neotrovnica veći je od broja vrsta otrovnica (10). Zmije iz obitelji *Elapidae*, podobitelji kobri (*Naja*), najrasprostranjenije su otrovnice svijeta, a nalaze se na području Azije, Afrike, Amerike i Australije (10). Zmije iz obitelji *Viperidae* obitavaju na svim kontinentima, osim Australije (6,7,10). *Crotalinae* su najrasprostranjenije u Sjevernoj, Srednjoj i Južnoj Americi, a *Viperinae* obitavaju na području od Europe, preko Afrike do srednje i jugoistočne Azije (6,7,10). Područja u svijetu na kojima uglavnom ne obitavaju otrovne zmije su Novi Zeland, Nova Kaledonija, te određeni otoci Antila i Galapagosa. Zmije otrovnice nisu pronađene ni na Islandu, Balearima, Korzici niti na Sardiniji (3,10).

### 1.1.2. Rod *Vipera*

Na području Europe gdje prirodno obitavaju samo članovi obitelji *Viperidae*, prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije o skupini zmija otrovnica s najvišim medicinskim značajem, ubrajaju se samo tri blisko srodne vrste svrstane u podobitelj *Viperinae*:

- *Vipera berus* (*V. berus*) – ridovka
- *Vipera aspis* (*V. aspis*) – talijanska ljutica
- *Vipera ammodytes* (*V. ammodytes*) – poskok (6,7,10,11).

Svaka od navedenih proizvodi otrov specifičnog biokemijskog sastava što se odražava u promjenjivim osobitostima i težini kliničkih manifestacija otrovanja koje uzrokuju (3,6).

**Tablica 3.** Pregledni prikaz raspodjele zmija obitelji *Viperidae* na području Europe (3).

Obitelj	<i>Viperidae</i>	
Podobitelj	<i>Viperinae</i>	
Rod	<i>Vipera</i>	Rasprostranjenost
	<i>Vipera ammodytes</i>	jugoistočna Europa, sjeverna Italija, Austrija i Turska
	<i>Vipera berus</i>	gotovo cijela Europa, osim Irske
	<i>Vipera aspis</i>	Italija, Francuska, južna Njemačka
Vrsta	<i>Vipera ursinii</i>	ograničena područja središnje i istočne Europe
	<i>Vipera latasti</i>	Pirinejski poluotok
	<i>Vipera xantina</i>	Cipar, Turska, zapadna Azija, sjeverna Afrika
	<i>Vipera palestinae</i>	Bliski istok

Područja na kojima se ugrizi navedenih europskih zmija otrovnica smatraju značajnom pojavom samo se djelomično preklapaju s uobičajenom biogeografskom raspodjelom ovih zmija (2,6,10). Tim slijedom ugrizi uzrokovani sa *V. berus* najznačajniji su na području Rusije, Švedske i Ujedinjenog Kraljevstva, uz iznimku Sjeverne Irske (2,6,7,10). U Sloveniji,

zapadno od Soče nalazi se i *V. aspis*, koja je najčešća u zapadnoj Europi, posebice u Italiji i Francuskoj. *V. ammodytes* obitava na usko ograničenom području jugoistočne Europe, prvenstveno na Balkanskom poluotoku (6,7,10).

U Hrvatskoj obitava četrnaest vrsta zmija, od kojih su samo tri otrovne, dvije poluotrovne, a devet ih je neotrovno (12). Postoje mjesta u Hrvatskoj na kojima otrovnice nisu uočene, primjerice na Cresu, Lošinju, Visu, Lastovu i Kornatima (12). Zmije otrovnice u Hrvatskoj navedene su kako slijedi:

- *Vipera ammodytes* (*V. ammodytes*) – poskok
- *Vipera berus* (*V. berus*) – ridovka
- *Vipera ursinii macrops* (*V. ursinii macrops*) – planinski žutokrug (12).

Poskok (*V. ammodytes*) je najveća i najotrovnija europska zmija otrovnica, te ujedno i zmija s najvećim značajem u Hrvatskoj. U Europi uglavnom obitava na Balkanskom poluotoku, u sjevernoj i sjeveroistočnoj Italiji, jugoistočnoj Austriji, jugoistočnoj Rumunjskoj, sve do Peloponeza i jugozapadne Azije (3,6,10). U Hrvatskoj je poskok osobito čest u Dalmaciji, budući da češće obitava u suhim i krševitim područjima nego u ravničarskim krajevima (12). U Hrvatskoj uglavnom obitava podvrsta poskoka *V. a. ammodytes*. Poskok ima promjenjivu boju tijela; može biti pepeljasta, sivo-zelenkasta, smeđe-crvenkasta ili tamno siva (Slika 1.). Mužjaci, uobičajeno veći od ženki, obično su pepeljasto sivi, ponekad s dodacima žućkaste boje, dok su ženke obično smeđe boje. Oba spola posebna su zbog poprečno-prugaste *cik-cak* linije duž leđa, te prosječne duljine od 80 cm do jednog metra. Obilježje po kojem se poskok najčešće prepoznaje jest trokutasta glava s jasno uočljivim roščićem na vrhu glave (Slika 1.). Poskok se uglavnom hrani miševima, krticama, gušterima i pticama. Ova zmija pari se u proljeće, te ženke u srpnju i kolovozu izlegu približno pet do dvadeset živih mladih koji su odmah sposobni zadati otrovni ugriz. U otrovnim žlijezdama odrasli primjerci imaju prosječno od 10 do 45 mg otrova, a jednim ugrizom izlučuju količinu od prosječno 20 mg otrova, što za čovjeka može biti smrtonosna doza (13). Otrov *V. ammodytes* antigenski je posve srodan otrovima drugih europskih zmija otrovnica (6,7,10).



**Slika 1.** Poskok – *V. a. ammodytes*. Izvorna fotografija.

Riđovka (*V. berus*) najrasprostranjenija je europska zmija, a nalazi se sve do 67. paralele na sjeveru (10). Nalazimo je na zapadu i sjeveru Engleske i Švedske, u srednjoj i jugoistočnoj Europi, te u srednjoj Aziji. U Bosni i Hercegovini, osim podvrste *V. berus berus*, živi i bosanska šarena riđovka – *V. berus bosniensis*. Za razliku od poskoka, riđovka zalazi u vodu, no nalazi se i na visinama višim od 1 000 metara nadmorske visine. Ima karakterističnu bjelkastu prugu uz rub gornje čeljusti. Boja joj varira; ovisno o okolišu, od sive do bakrene (*Kupferrotter*) i crne (*V. berus var. Prester*). Na leđima ima, kao i poskok, jasno uočljivu cik-cak krivulju. Veličina joj je do približno 75 cm. Mužjaci su uglavnom manji od ženki, a odrasla jedinka posjeduje prosječno od 5 do 20 mg otrova, te jednim ugrizom izlučuje količinu od prosječno 14 mg otrova.

Žutokrug (*V. ursinii*) smatra se podrijetlom najstarijom europskom zmijom otrovnicom. Planinski žutokrug (*V. ursinii macrops*) najmanja je otrovnica u Hrvatskoj, a nastanjuje planine Dinaru i Velebit (12). U Dalmaciji i na otoku Krku obitava podvrsta krški oštroglavi žutokrug – *V. ursinii ursinii*, a u Slavoniji podvrsta *V. ursinii rakosiensis*. U svojim otrovnim

žlijezdama žutokrug ima male količine uglavnom slabo toksičnog otrova, te za čovjeka nije niti približno opasan kao druge otrovnice (13).

### **1.1.3. Vrsta *Vipera ammodytes***

S obzirom na ozbiljnost sustavnog otrovanja kojeg može uzrokovati, a čiji ishod može biti i smrtonosan, *V. ammodytes* predstavlja najopasniju europsku zmiju otrovnicu (6,7,13,14). Složeni taksonomski status ove vrste čija se sustavna podjela zasniva na morfološkim osobitostima, ali je još uvijek nedosljedno uporabljena, razlog je nedovoljno ujednačenoj podjeli ove vrste (2). Ipak, neovisno o do sada znanstveno priznatom broju podvrsta, dvije poznate podvrste istaknut su klinički problem – *Vipera ammodytes ammodytes* (*V. a. ammodytes*) i *Vipera ammodytes meridionalis* (*V. a. meridionalis*) (15). Navedene podvrste *V. ammodytes* nastanjuju geografski podijeljena područja s jasnim granicama raspodjele – *V. a. ammodytes* obitava na području Slovenije, Hrvatske, Srbije i zapadne Bugarske, dok je *V. a. meridionalis* pronađena u Grčkoj, Rumunjskoj, istočnoj Bugarskoj, Albaniji i Turskoj (10,11,15).

## **1.2. Zmijski otrovi**

Od svih otrova prirodnog podrijetla one koje stvaraju zmije otrovnice smatraju se najsloženijima s obzirom da sadrže uglavnom više od sto različitih bioaktivnih molekula promjenjive (varijabilne) toksičnosti i patofizioloških učinaka koje iskazuju pojedinačnim i/ili udruženim (sinergističkim) djelovanjem (2). Izražena heterogenost otrova omogućava zmijama da u skladu sa svojom biološkom ulogom uzrokuju izuzetno širok raspon farmakoloških djelovanja s promjenjivim učinkom na različita tkiva, organe i/ili organske sastave plijena i/ili čovjeka (2,9,16-18). Zmijski otrov odmah po lučenju je bezbojan, vrlo viskozozan, gorkog okusa, te slabe kisele reakcije (3). Svježe sakupljen otrov je nestabilan, stoga je sušenje; liofilizacija potrebna za održavanje njegove biološke aktivnosti tijekom duljeg vremenskog razdoblja (3).

Zmijski otrovi istražuju se u načelu zbog dva glavna razloga. Temeljito istraživanje sastava cjelokupnog otrova, posebice uvidom u strukturne i funkcionalne osobitosti toksičnih sastavnica koje sadrže, omogućava detaljnije prepoznavanje kliničke slike otrovanja te učinkovitije liječenje žrtava otrovanja (2,17). Također, zmijski otrovi neistraženi su izvor medicinski vrijednih prirodnih tvari čija se aktivnost sve učestalije primjenjuje u izradi močebitnih učinkovitih lijekova, posebice u slučajevima dobro poznate specifičnosti, selektivnosti i učinkovitosti u djelovanju prema ciljnim molekulama (2,19-23).

Glavnina znanstvenih istraživanja u današnje vrijeme usmjerena je prema proučavanju biokemijskih i farmakoloških djelovanja sastavnica otrova koji uzrokuju kliničku sliku otrovanja (6,7,9,10). Tim slijedom uvriježena je jednostavna i općenita podjela sastavnica zmijskih otrova na one s neurotoksičnim, hematotoksičnim, kardiotoksičnim, nefrotoksičnim i miotoksičnim djelovanjem (2,3,6,7,24). Sastavnice otrova mogu se podijeliti i s obzirom na mjesto djelovanja i to na sastavnice s lokalnim te sustavnim djelovanjem (2,3). U one s lokalnim djelovanjem ubrajamo različite enzime s proteolitičkom aktivnošću; primjerice, serinske i cisteinske proteinaze, egzopeptidaze, te metaloproteinaze (2,3,24). Sastavnice s toksičnim djelovanjem na živčani sustav u načelu iskazuju učinak na pre- i/ili postsinaptičkoj membrani, dok sastavnice s toksičnim učinkom na srčano-žilni (kardiovaskularni) sustav djeluju poput kardiotoksina, safrotoksina, metaloproteinaza, serinskih proteinaza i/ili (ne)enzimatski aktivnih inhibitora zgrušavanja (2,3,24,25). Naposljetku, pojedine sastavnice iskazuju i mješovitu aktivnost (2,3).

Prema biokemijskom sustavu, zmijski otrovi složene su smjese proteina i polipeptida koje čine više od 90% cjelokupne suhe tvari čitavog otrova, te organskih molekula niskih molekularnih masa, uključujući amine, slobodne aminokiseline i lipide, ugljikohidrate, citrate, nukleozide, te različite anorganske ione; prvenstveno natrij, cink i kalcij (2,6,7,26,27). Dosadašnja proteomska istraživanja ističu kako međusobne razlike između zmijskih otrova u načelu proizlaze iz promjenjive zastupljenosti pojedinih proteinskih sastavnica koje se u osnovi ubrajaju u mali broj glavnih proteinskih obitelji, a čija se razlika temelji na prisutnosti ili odsutnosti enzimatskog djelovanja (2,28-32). U dosadašnjim istraživanjima tijekom ispitivanja šesnaest vrsta zmija, uglavnom članova obitelji *Viperidae* u otrovima navedenih na razini gRNK izolirano je najviše petnaest različitih proteinskih obitelji (2,33). Ovisno o obitelji, vrsti, čak i podvrsti, u zmijskim otrovima prisutni su različiti enzimatski aktivni proteini, kao primjerice fosfolipaze A<sub>2</sub> (engl. *phospholipase A<sub>2</sub>*; PLA<sub>2</sub>), cink-ovisne (Zn<sup>2+</sup>-ovisne) metaloproteinaze, serinske proteinaze (engl. *serine proteinase*; SP), oksidaze L-amino

kiselina (engl. *L-amino acid oxidase*; LAOO), te acetilkolinesteraze (2,3,25). Katalitički inaktivne sastavnice otrova; proteini bez enzimatske aktivnosti, do sada su izolirani i nazvani kako slijedi; troprstni toksini (engl. *three-finger toxin*; 3FTX),  $\alpha$ -neurotoksini, disintegrini, lektini C-tipa (engl. *C-type lectins*), natriuretski peptidi, miotoksini, sekrecijski proteini bogati cisteinom (engl. *cysteine-rich secretory protein*; CRISP), čimbenici rasta živca (engl. *neuronal growth factor*; NGF) i krvožilnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor*; VEGF), cistatini te inhibitori proteinaza Kunitzovog tipa (2,3,23-25).

S obzirom na patogenezu reakcije žrtve, zmijski otrovi mogu se općenito podijeliti na one s hematotoksičnim, neurotoksičnim i miotoksičnim (kardiotoksičnim) djelovanjem (3). Do sada je dobro poznat hematotoksični učinak otrova zmija iz obitelji *Viperidae*, dok neurotoksični učinci uglavnom prevladavaju nakon ugriza zmija iz obitelji *Elapidae*. Izražen miotoksični učinak iskazuju otrovi zmija iz obitelji *Hydrophidae*, a isti se očituje oštećenjem poprečno-prugastih mišića, a uslijed rabdomiolize nastaju i druge možebitne komplikacije otrovanja u smislu akutnog zatajenja bubrega u žrtava zmijskog ugriza. Otrovi zmija iz obitelji *Viperidae* i *Elapidae* sadrže uglavnom veliki broj proteina koji se ubrajaju u određenu obitelj glavnih proteina čiji pripadnici predstavljaju izoforme s velikom sličnošću u trodimenzionalnoj strukturi i koji su specijalizirani za različite farmakološke učinke koji proizlaze iz razlika koje ih odlikuju (2,31,34). Pretpostavlja se kako je prilagođenost na različitu prehranu također jedan od čimbenika koji je rezultirao heterogenošću u sastavu zmijskih otrova (28,35). Navedeno se iskazalo postojanjem početnih proteinskih obitelji i njihovom promjenjivošću; gubitkom pojedinih, te stvaranjem novih obilježja koja su se pojavila u određenim obiteljima (36). Tim slijedom otrovima zmija iz obitelji *Elapidae* uglavnom nedostaju hidrolitičke sastavnice, dok glavninu otrova čine polipeptidi, i to uglavnom troprstni toksini (3FTX) i fosfolipaze A<sub>2</sub> iz grupe I (2,36). Otrovi zmija iz obitelji *Viperidae* gotovo u potpunosti obiluju hidrolitičkim sastavnicama među kojima prednjače serinske proteinaze u skupini sastavnica srednjih, te Zn<sup>2+</sup>-ovisne metaloproteinaze u skupini sastavnica visoko molekularnih masa (2,23-25).

Temeljem istraživanja biološkog djelovanja, primjerice smrtonosne toksičnosti, kao i biokemijskih i imunokemijskih opažanja dobro je poznat fenomen tzv. unutarvrstne promjenjivosti (intraspecijske varijabilnosti) koji osobito vrijedi za obitelj *Viperidae* (2,6,7,37). Navedeno predstavlja glavni problem u dobivanju visoko standardiziranih smjesa otrova bitnih za očuvanje jednakosti u učinkovitom liječenju otrovanja koje se temelji na proizvodnji prikladnih protuotrova (38,39). Epidemiološka istraživanja pokazala su kako je



promjenjivost, raznolikost u biokemijskom djelovanju otrova unutar iste vrste zmijske izražena posebice u onih koje obilježava široka biogeografska rasprostranjenost (6,7,37). Štoviše, određeni istraživači naglašavaju geografsku promjenjivost kao čimbenik odgovoran za različitu kliničku sliku otrovanja uzrokovanu ugrizom iste vrste zmijske ovisno o području obitavanja pojedine zmijske (6,7). Također, osim biogeografske rasprostranjenosti, na unutarvrstnu genotipsku promjenjivost utječu i drugi čimbenici i to najčešće sezonske promjene, spolni dimorfizam, ontogenetski stadij, prehrana zmijske i slično. Spomenuto doprinosi različitostima u biokemijskom sastavu i posljedično različito iskazanom patofiziološkom djelovanju otrova (6,7). Utjecaj sezonskih razdoblja na sastav ukupnog zmijskog otrova opisan je u ranijim istraživanjima koja su pokazala primjerice, kako u otrovu podvrste *V. a. ammodytes* dobivenom manualnom mužnjom navedene podvrste tijekom zime nedostaju dvije bitne smrtonosne sastavnice (40). Ipak, sami utjecaj godišnjih doba kao čimbenika unutarvrstne promjenjivosti još uvijek nije do kraja istražen (6,7). Spolni dimorfizam također je proučavan kao jedan od čimbenika koji potiče spomenutu promjenjivost. U zmijske vrste *Bothrops jararaca* otrovi ženki jasno se razlikuju od otrova muških jedinki (41,42). Istraživanja na području ontogenetske promjenjivosti pokazala su kako se otrovi mladih (juvenilnih) vrsta zmijske razlikuju od starijih (adultnih) jedinki iste vrste po snažnijoj ukupnoj letalnoj toksičnosti i slabijoj proteolitičkoj aktivnosti koja potječe od  $Zn^{2+}$ -ovisnih metaloproteinaza što bi se barem djelomično moglo objasniti različitim dobno uvjetovanim prehranbenim navikama zmijske (2,6,7). Također, istraživanjem proteoma vrste *Crotalus o. oreganus*, osim zabilježenih razlika u farmakološkom i enzimatskom djelovanju, otrov mladih i starijih jedinki obilježava i različita zastupljenost pojedinih proteinskih sastavnica unutar cjelokupne smjese otrova; u otrovima mladih jedinki prevladavaju visoko molekularne metaloproteinaze iz skupine P-III, dok otrovi starijih jedinki obiluju niskomolekulskim metaloproteinazama iz skupine P-I (2,6,7). Istraživanja o otrovima vrste *Bothrops atrox* i *Bothrops asper* ukazuju na slične rezultate, stoga takvo mišljenje vjerojatno vrijedi i za ostale pripadnike obitelji *Viperidae* (43,44).

Unatoč navedenom, razlike u proteomskom sastavu otrova valja tumačiti s oprezom jer svaku smjesu otrova obilježava i tzv. pojedinačna promjenljivost (individualna varijabilnost) koja je neovisna o nabrojenim okolnim čimbenicima, te je u određenoj mjeri obilježena i genetskom kontrolom (44,45). Općenito, što je određena populacija zmijske veća, a time i genetički raznolikija, njezina će pojedinačna promjenjivost biti izražajnije što u konačnici dovodi do sve heterogenijih cjelokupnih otrova u sljedećim generacijama jedinki (6,7).

Suprotno tome, u manjim te posljedično reproduktivno izoliranim populacijama, uz ograničenost u postojećem genetskom materijalu, otrovi uglavnom zadržavaju homogenost (6,7).

### **1.2.1. Glavne toksične sastavnice otrova zmija obitelji *Viperidae***

Proteini iz otrova zmija koji iskazuju toksično djelovanje općenito se mogu podijeliti u sedam glavnih skupina navedenih kako slijedi: sarafotoksini, miotoksični peptidi, dendrotoksini, disintegrini, 3FTX toksini, fosfolipaze A<sub>2</sub>, te hemoragini (46). Ugrizi zmija iz obitelji *Elapidae* uglavnom uzrokuju klinički vidljiva neurotoksična djelovanja koja mogu uzrokovati po život opasnu respiracijsku paralizu u podlozi koje je farmakološka aktivnost fosfolipaza A<sub>2</sub> iz grupe I te 3FTX toksina na pre- i postsinaptičkim dijelovima živčano-mišićne spojnice (47-49). Otrovi zmija pripadnika obitelji *Viperidae* uglavnom uzrokuju hematotoksično oštećenje tkiva iskazano pojavom otekline, crvenila i boli na mjestu ugriza, a katkada i razvoj dermonekroze i nekroze poprečno-prugastih mišića, za što su većinom odgovorni članovi dviju enzimatski aktivnih proteinskih skupina – hemoragične cink-ovisne metaloproteinaze i miotoksične fosfolipaze A<sub>2</sub> iz grupe II (50,51). Uslijed složenosti proteoma, otrovi zmija iz posljednje navedene obitelji često uzrokuju sustavne poremećaje koagulacije i hemodinamsku nestabilnost, kao i neurotoksičnost, te kardiotoksičnost (51,52). Hemoragini i fosfolipaze A<sub>2</sub>, glavne toksične sastavnice ovih otrova, uzrokuju različito iskazanu kliničku sliku otrovanja koja ovisno o različitom farmakološkom djelovanju doprinosi neurotoksičnim, hematotoksičnim i kardiotoksičnim pojavnostima otrovanja.

#### **1.2.1.1. Cink-ovisne metaloproteinaze**

Cink-ovisne metaloproteinaze uobičajene su sastavnice otrova zmija iz obitelji *Viperidae* i čine približno trećinu njihovog ukupnog proteinskog sastava (2,53). Navedene se smatraju glavnim toksinima odgovornim za lokalno oštećenje tkiva na mjestu ugriza, poglavito krvarenja tijekom (sustavnog) otrovanja (2,50). Metaloproteinaze podrijetlom iz otrova zmija (engl. *snake venom metalloproteinase*; SVMP) predstavljaju cink-ovisne enzime

različitih molekularnih masa koji sadrže visoko homologne metaloproteinazne domene i niz dodatnih, nekatalitičkih domena (2,54,55). Biološko djelovanje prvotno je posredovano katalitičkim i adhezivnim svojstvima, kao i sposobnošću izravne stanične aktivacije i oslobađanja endogenih bioaktivnih sastavnica, usmjerenim prema proteinima bazalne membrane, čimbenicima zgrušavanja krvi, trombocitima, endotelnim i proupalnim stanicama, čime se iskazuje učinak istih na hemostazu (2,25,56). Članove SVMP odlikuje promjenjiv stupanj strukturne složenosti, stoga je temeljem razlika u multidomenskoj organizaciji predložena njihova prva klasifikacija u četiri glavne grupe; P-I, P-II, P-III, te P-IV (57). U P-I grupu metaloproteinaza ubrojani su najjednostavniji članovi koji imaju samo metaloproteinaznu domenu, a iskazuju širok raspon bioloških aktivnosti; mionekrotičnost, fibrino(geno)lizu, upalni odgovor, apoptozu, te rjeđe, hemoragičnost (54). Osim u broju i uzorku disulfidnih mostova, pripadnici ove grupe dijelom se razlikuju i u strukturnim svojstvima područja koje posreduje u vezanju supstrata što doprinosi različito iskazanom proteolitičkom i biološkom djelovanju (50,54). P-II grupa sadržava članove s metaloproteinaznom i disintegrinskom domenom, te je razdijeljena na pet podgrupa; P-IIa, P-IIb, P-IIc, P-IId i P-IIe (50,58). Osim članova P-II grupe koji su u zmijskim otrovima zastupljeni u obliku slobodnih disintegrina, pronađena su i dva pripadnika sastavljena i od proteinazne i od disintegrinske domene – homodimerni bilitoksin-I iz otrova vrste *Agkistrodon bilineatus* te jerdonitin iz otrova vrste *Trimeresurus jerdonii* (2). Slobodni disintegrini čine raznoliku skupinu polipeptida iz otrova zmijske obitelji *Viperidae* građenih od 40 do 100 aminokiselinskih ostataka i povezanih promjenjivim brojem disulfidnih mostova (59,60). Njihovo farmakološko djelovanje povezano je sa sposobnošću selektivnog blokiranja funkcije površinskih staničnih receptora iz obitelji integrina koji adhezivno vežu sastavnice izvanstaničnog matriksa ili membrana susjednih stanica, te doprinose očuvanju tkivnog integriteta (2). Metaloproteinaze grupe P-III sadrže uz katalitičku i disintegrinsku, još i domenu bogatu cisteinom (50). Ova skupina uzrokuje brojne patofarmakološke učinke mnogo izražajnije nego druge skupine metaloproteinaza; izraženu hemoragičnost, proteolitičko cijepanje von Willebrandovog čimbenika, aktivaciju protrombina i čimbenika zgrušavanja X, inhibiciju agregacije trombocita, te apoptotičko djelovanje (50,58). Većina učinaka koje iskazuje ova grupa metaloproteinaza ovisi o proteolitičkoj aktivnosti njihove metaloproteinazne domene, a značajnu ulogu u iskazivanju toksičnosti imaju i nekatalitičke domene zbog sposobnosti antagonističkog djelovanja, te ciljanog usmjeravanja toksina prema određenim proteinima koji su predviđeni za proteolitičko djelovanje (2,50,54). Domena nalik disintegrinskoj stupa u međudjelovanje s agregacijom trombocita induciranom kolagenom i

staničnom adhezijom posredovanom integrinima, a ima ulogu i u migraciji, te proliferaciji stanica (2,50). Domena bogata cisteinom iskazuje izraženu prijemčivost prema proteinima izvanstaničnog matriksa, kolagenu XII i XIV (2,50). U usporedbi s grupom P-I metaloproteinaza, pripadnici P-III grupe nisu podložni proteinaznoj inhibiciji posredovanoj  $\alpha$ 2-makroglobulinom u plazmi s obzirom da ih dodatne domene čine otpornim na njegovo djelovanje, omogućujući im da nesmetano i bez gubitka proteolitičke i hemoragične aktivnosti sustavno cirkuliraju po organizmu (2,50). P-IV grupa metaloproteinaza sastoji se od najstroženijih članova obilježenih dvjema dodatnim podjedinicama nalik lektinima C-tipa koji su s glavnim proteinaznim lancem povezani disulfidnim mostovima (50,54).

U načelu SVMP prilikom otrovanja uzrokuju različit raspon lokalnih i sustavnih učinaka od kojih je najizraženiji onaj hemoragični kojeg uglavnom uzrokuju članovi biološki najaktivnije P-III grupe metaloproteinaza (2,61). Krvarenje koje nastaje u području oko mjesta ugriza, a katkad i sustavno, uglavnom je posljedica narušavanja strukturne cjelovitosti mikrovaskulature što uzrokuje istjecanje krvi u okolno tkivo – ekstravazaciju. Mehanizam nastanka krvarenja objašnjen je selektivnom proteolitičkom degradacijom sastavnica kapilarne stijenke obložene endotelnim stanicama uklopljenim u okolni izvanstanični matriks koji je sastavljen od kolagena tipa IV, laminina, heparan sulfat proteoglikana i nidogena, te agrina, osteopontina, fibulina i drugih tipova kolagena međusobno umreženih u visoko organiziranu strukturu – bazalnu membranu (50,52). Pretpostavlja se kako hemoragične metaloproteinaze svoju aktivnost iskazuju i na bazalnoj membrani i endotelnim stanicama (2,50). Cink-ovisne metaloproteinaze stupaju u adhezijsko međudjelovanje sa stanicama okolnog izvanstaničnog matriksa zbog hidrolitičkog ili antagonističkog djelovanja prema adhezijskim proteinima endotela, integrinima i kadherinima (52). Narušavanje strukture bazalne membrane najvjerojatnije rezultira slabljenjem kapilarne stijenke i nizom međudjelovanja s okolnim izvanstaničnim matriksom koji se uslijed gubitka mehaničke potpore tenzijski rasteže sve dok se endotel ne stanji toliko da se na pojedinim mjestima njegova strukturna cjelovitost potpuno ne izgubi (50). Posljedica navedenog je istjecanje eritrocita i ostalih plazmatskih sastavnica u izvanžilni (ekstravaskularni) prostor, pri čemu svoj učinak iskazuje i fenomen hemodinamičkih biofizičkih sila koji djeluje u mikrocirkulaciji (Tablica 4.).

**Tablica 4.** Lokalni učinci Zn<sup>2+</sup>-ovisnih metaloproteinaza u zmijskim otrovima (50).

Ciljno mjesto	Pokusni opaženi učinak	Patofiziološka posljedica
Mikrovaskulatura	Narušavanje cjelovitosti kapilarne stijenke	Krvarenje
	Smanjenje gustoće kapilarne mreže	Ishemija
		Mionekroza
Izvanstanični matriks	Degradacija matriksa	Otežano obnavljanje mišićnog tkiva
	Oslobađanje farmakološki aktivnih peptida	Međudjelovanje s obnavljanjem lokalno oštećenog tkiva i procesom angiogeneze
Koža	Razdvajanje dermalno-epidermalnog spoja	Pojava mjehura i ulceracija
	Odvajanje epidermisa	Dermonekroza
Makrofagi, fibroblasti, endotelne stanice	Aktivacija stanica	Edem
	Oslobađanje upalnih medijatora i čimbenika rasta	Bol
	Leukocitna infiltracija	Lokalno oštećenje tkiva

Histološka istraživanja patogeneze lokalnog hemoragičnog učinka na ultrastrukturnoj razini stanice pokazala su kako se patofiziološki proces koji dovodi do ekstravazacije uglavnom odvija tzv. *per rhexis* mehanizmom (50,52). Navedeni se zbiva u kapilarama i obilježen je morfološkim i funkcionalnim promjenama endotelnih stanica poput smanjenja broja pinocitotičkih vezikula, postupnim gubitkom sloja bazalne lamine, odvajanja mjehurića s citoplazmatskim sadržajem u lumen krvne žile, stanjivanja, te oblikovanja pukotina kroz koje plazmatski sadržaj istječe u intersticijski prostor (2,50,52,61). U venulama prevladava tzv. *per diapedesis* mehanizam u čijoj je osnovi proces širenja međustaničnih spojeva uslijed kontrakcija morfološki nepromijenjenih endotelnih stanica, te koji je najvjerojatnije uzrokovan lokalnim upalnim zbivanjima i oslobođenim medijatorima odgovornima za porast vaskularne propusnosti (50,52).

Unatoč zabilježenim *in vitro* promjenama, u *in vivo* istraživanjima ovakav način nastanka krvarenja razvija se tijekom dva glavna susljedna procesa – početnog selektivnog proteolitičkog cijepanja glavnih peptidnih veza u sastavnicama bazalne membrane zaslužnim za gubitak mehaničke stabilnosti kapilarnog zida, a potom slijedi tenzijsko rastezanje prouzrokovano djelovanjem hemodinamičkih sila što uzrokuje gubitak strukture cjelovitosti endotelnih stanica (50,52). Uz hemoragični sindrom kao najznačajniji učinak prilikom otrovanja, jedna od tipičnih patoloških promjena koja obilježava otrovanje izazvano ugrizom zmija iz obitelji *Viperidae* podrazumijeva i pojavu mjehura (bula) na mjestu ugriza, te razvoj ulceracija za što su izravno odgovorne SVMP i njihova izražena sposobnost hidrolize glavnih proteina u dermalno-epidermalnom spoju, najvjerojatnije integrina  $\alpha_6\beta_4$ , laminina i brojnih filamentoznih struktura, što posljedično uzrokuje odvajanja epidermisa (50). Osim neizravne uloge u poticanju mionekroze kao akutnog oštećenja mišićnog tkiva koje najvjerojatnije nastaje kao posljedica narušavanja strukturne cjelovitosti mikrovaskulature, prekida dotoka krvi te ishemije, hemoraginima iz zmijskih otrova pridaje se i određeni značaj u međudjelovanju s procesom obnavljanja mišićnih stanica (2,50). Naime, kao što je pokazano u pokusima s miotoksinima iz skupine sekrecijskih fosfolipaza A<sub>2</sub> koji isključivo uzrokuju mionekrozu, daljnji oporavak od njihovog toksičnog djelovanja prati brz i uspješan proces obnavljanja zahvaćenog mišića, za razliku od onog koji je u slučaju intramuskularne primjene metaloproteinaza gotovo u potpunosti onemogućen. Također, cink-ovisne metaloproteinaze, neovisno o hemoragičnom fenotipu, posreduju i u nastajanju složenog upalnog odgovora, s obzirom kako je primijećeno da uslijed povećanja krvožilne propusnosti uzrokuju pojavu otekline (edema), što se ne pripisuje samo njihovoj sposobnosti hidrolize sastavnica bazalne membrane, već i ulozi koju iskazuju u oslobađanju upalnih citokina iz zimogenih prekursora, te infiltriranih leukocita i fibroblasta, kao i raznih kemotaktičkih produkata nastalih aktivacijom sustava komplementa (50,52). Pretpostavlja se kako bi medijatori upalnog procesa svakako mogli dodatno doprinosti patogenezi otrovom uzrokovanog lokalnog oštećenja tkiva.

Osim lokalnih učinaka, SVMP doprinose i brojnim sustavnim učincima otrovanja koji ne proizlaze samo iz njihove sposobnosti oštećenja krvožilnog endotela, već i iz djelovanja na čimbenike zgrušavanja krvi i međudjelovanje s funkcijom trombocita, vrlo vjerojatno kako bi narušavanjem hemostaze dodatno poticale krvarenja u organskim sustavima udaljenima od mjesta ugriza (Tablica 5.).

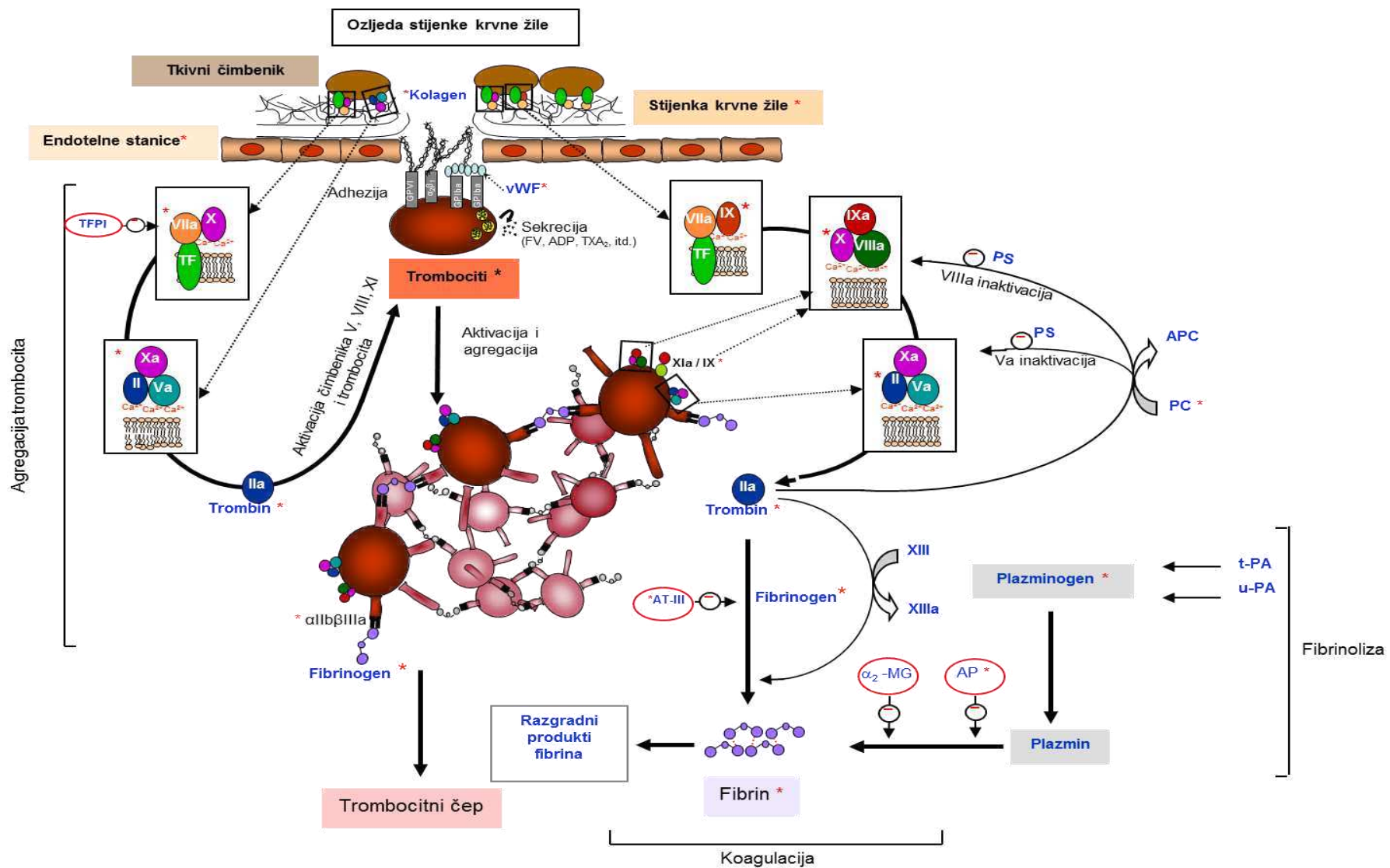
**Tablica 5.** Sustavni učinci  $Zn^{2+}$ -ovisnih metaloproteinaza u zmijskim otrovima (50).

Ciljno mjesto	Pokusni opaženi učinak	Patofiziološka posljedica
Mikrovaskulatura	Narušavanje cjelovitosti kapilarnog zida	Krvarenje u različitim organskim sustavima
		Kardiovaskularni šok
Čimbenik zgrušavanja X i protrombin	Aktivacija Prokoagulacijski učinak	Defibrin(ogen)acija Potenciranje krvarenja
Trombociti	Inhibicija agregacije	Hipoagregacija Potenciranje krvarenja
von Willebrandov čimbenik	Vežanje i hidroliza	Narušavanje hemostaze
		Potenciranje krvarenja

U normalnim uvjetima u krvi i tkivima prevladavaju antikoagulantne tvari, te se krv ne zgrušava dok protječe kroz krvne žile, no u trenutku oštećenja endotela, u području ozljede krvne žile aktiviraju se prokoagulantne tvari koji stvaraju ugrušak u cilju sprječavanja krvarenja (62). Oštećenjem krvne žile aktiviraju se tri mehanizma odgovorna za zaustavljanje krvarenja; kontrakcija krvne žile, stvaranje trombocitnog ugruška (adhezija i agregacija), te stvaranje i održavanje fibrina (sustav koagulacije). Vazokonstrikcija krvne žile ima ulogu u neposrednom zaustavljanju krvarenja iz malih krvnih žila, no učinak je prolazan i od manje važnosti u većini tkiva. Trombociti u hemostazi predstavljaju osnovnu sastavnicu fiziološkog procesa koagulacije (62). Trombociti priliježu (adheriraju) na stjenku ozlijeđene krvne žile, a potom tijekom reakcije adhezije i agregacije oslobađaju vazoaktivne tvari (primjerice, vazokonstriktor tromboksan  $A_2$ ), te stvaraju trombocitne agregate (Slika 2.). Također, površina trombocita privlači i čimbenike koagulacije čime se ubrzava proces zgrušavanja. Oštećenjem endotela veže se adhezivni protein von Willebrandov čimbenik (vWF) s kompleksom trombocitnih glikoproteina Ib/IX/V, te fibrinogen i fibronektin na integrinske receptore (62). Takvi adhezivni mostovi sudjeluju u stvaranju mosta između trombocita i subendotela. Nakon adhezije, trombociti se agregiraju i u toj reakciji se vežu trombocitni glikoproteini Iib/IIIa ( $\alpha II_b \beta III_a$ ) s fibrinogenom, von Willebrandovim čimbenikom,

fibronektinom i vitronektinom (62). Na membrani trombocita nalaze se i receptori za agoniste kao što su trombin, epinefrin, ADP, kolagen i arahidonska kiselina koji potiču sekreciju vazoaktivnih tvari iz trombocitnih granula (62). Tijekom aktivacija trombociti ispoljavaju (eksprimiraju) različite receptore na svojoj površini, pa tako i receptore za određene čimbenike zgrušavanja, osobito aktivirani čimbenik V ( $F V_a$ ) koji veže aktivirani čimbenik X ( $F X_a$ ) i aktivira protrombin u trombin (62). Aktivaciju trombocita i njegove učinke modulira nekoliko regulatornih tvari od kojih je najvažniji cAMP. Tvari koje povećavaju cGMP inhibiraju aktivaciju trombocita. cAMP u dovoljnoj koncentraciji može inhibirati agregaciju, sekreciju i promjenu oblika trombocita, kao i njihovu adheziju. Stimulacijom endotelne stanice agonistima stvara se NO, snažan vazodilatator, koji inhibira funkciju trombocita porastom trombocitnog cGMP. Čak i sami trombociti mogu stvarati NO što dovodi do porasta koncentracije cGMP koji je unutarstanični regulator aktivnosti trombocita. U procesu koagulacije sudjeluje mnogo različitih čimbenika (Tablica 6., Slika 2.).





Slika 2. Shematski prikaz hemostaze (25,62).

Proces sustava koagulacije tradicionalno se dijeli na dva puta; vanjski (*in vivo*) i unutarnji (*in vitro*). Glavna sastavnica aktivacije vanjskog puta zgrušavanja je tkivni čimbenik (TF) koji ima jak afinitet za čimbenik VII (F VII), a predstavlja membranski protein. Kompleks TF-F VII<sub>a</sub> aktivira čimbenik IX (F IX<sub>a</sub>) i čimbenik X (F X<sub>a</sub>), te nastaje trombin iz protrombina. Čimbenik VIII (F VIII) se u plazmi nalazi u nekovalentnom kompleksu s vWF, a koagulacijska kaskada ubrzava pretvorbu čimbenika X u aktivirani čimbenik X (F X<sub>a</sub>) uz aktivirani čimbenik IX (F IX<sub>a</sub>). Moguća je i izravna pretvorba čimbenika X u aktivni oblik (F X<sub>a</sub>) kompleksom čimbenika F VII<sub>a</sub>-TF, te se na takav način zaobilazi čimbenik VIII ili čimbenik IX. Takva aktivacija je kratkotrajna jer ju inhibira inhibitor puta tkivnog čimbenika (TFPI). Usporedno s vanjskim putem, odvija se unutarnji put zgrušavanja koji započinje sa četiri kontaktna čimbenika koagulacije; čimbenik XII i XI, prekalikrein te kininogeni velike molekulske mase (engl. *high molecule weight kininogen*; HMWK). Kompleks međudjelovanja navedenih proteina s površinom naziva se reakcija kontaktne aktivacije (62). Spomenuta reakcija završava aktivacijom čimbenika XI (F XI<sub>a</sub>), a potom F XI<sub>a</sub> aktivira čimbenik IX (F IX<sub>a</sub>) koji katalizira pretvorbu čimbenika F X u aktivni oblik (F X<sub>a</sub>) u prisutnosti čimbenika VIII (F VIII) i fosfolipida. Jednom stvoreni čimbenik X (F X) pretvara protrombin u trombin. Trombin je glavna sastavnica u procesu stvaranja hemostatskog ugruška; katalizira pretvorbu čimbenika XIII (F XIII) u aktivni oblik (F XIII<sub>a</sub>) koji tvori stabilni ugrušak (62). Na većini mjesta u procesu koagulacije krvi nužni su i kalcijevi ioni (Ca<sup>2+</sup>). Nakon stvaranja, ugrušak se može vezivno organizirati ili razgraditi. Fibrinoliza održava krv tekućom i bitna je u uklanjanju prekomjernog fibrinskog depozita. Sustav fibrinolize sličan je kaskadnom sustavu koagulacije i također ima pretvorbu zimogena u enzim. Plazminogen je neaktivni oblik koji aktivatori (tkivni aktivator plazminogena, urokinaza, streptokinaza) pretvaraju u plazmin. Složenom ravnotežom različitih prokoagulacijskih i protukoagulacijskih, kao i profibrinoličkih i protufibrinoličkih mehanizama, ugrušak se postupno razgrađuje te od fibrina nastaju njegovi razgradni produkti (engli. *fibrin degrading products*; FDP). Protrombinsko vrijeme (PV) je vrijeme potrebno da se u citratnoj plazmi nakon dodatka tkivnog tromboplastina stvori ugrušak. Taj test ovisi o čimbenicima koagulacije II, V, VII, X i fibrinogenu. Rezultati PV izražavaju se u sekundama (s), postotkom aktivnosti u odnosu na kontrolnu, normalnu plazmu i omjerom između PV plazme i PV kontrolne plazme. Produženo PV nalazimo u poremećajima s manjkom i/ili oštećenjem jednog od čimbenika koagulacije II, V, VII i X, s aktivnošću manjom od 50% i fibrinogenom manjim od 80-100 mg/dL (62).

**Tablica 6.** Čimbenici zgrušavanja i njihove istoznačnice (62,63).

Čimbenici zgrušavanja	Istožnačnice
Fibrinogen	Čimbenik I
Protrombin	Čimbenik II
Tkivni čimbenik	Čimbenik III
Tkivni tromboplastin	
Kalcij (Ca <sup>2+</sup> )	Čimbenik IV
Proakcelerin	Čimbenik V
Ac globulin (Ac-G)	
Labilni čimbenik	
Prokonvertin	Čimbenik VII
Serumski akcelerator pretvorbe protrombina (SPCA)	
Stabilni čimbenik	
Antihemofilijski čimbenik (AHF)	Čimbenik VIII
Antihemofilijski globulin (AHG)	
Antihemofilijski čimbenik A	
Sastavnica plazmatskog tromboplastina (PTC)	Čimbenik IX
Christmasov čimbenik	
Antihemofilijski čimbenik B	
Stuartov čimbenik	Čimbenik X
Stuart-Prowerov čimbenik	
Preteča plazmatskog tromboplastina	Čimbenik XI
Antihemofilijski čimbenik C	
Hagemanov čimbenik	Čimbenik XII
Čimbenik stabilizacije fibrina	Čimbenik XIII
Fletsherov čimbenik	Prekalikrein
Fitzgeraldov čimbenik	Kininogen velike molekularne mase
Trombociti	Krvne pločice

Aktivacijski ili inhibicijski učinci koje SVMP iskazuju na različitim razinama složene koagulacijske kaskade u većini slučajeva rezultiraju iscrpljenjem fibrinogena i/ili fibrina uslijed defibrin(ogen)acije kao jednim od najspecifičnijih posljedica povezanim s otrovanjem

izazvanim ugrizom zmija iz obitelji *Viperidae* (2,50). Među hemostatskim aktivnostima usmjerenima prema čimbenicima zgrušavanja krvi osobito se ističe njihova sposobnost aktivacije čimbenika X i protrombina. Do sada su najtemeljitije istraženi aktivatori čimbenika X iz otrova vrste *Vipera russelli* – RVV-X (engl. *specific factor X activator from Vipera russelli snake venom*), te VLFXA (engl. *Vipera lebetina factor X activator*) iz otrova vrste *Vipera lebetina* kao pripadnici P-IIIId podgrupe metaloproteinaza (25,64). Prokoagulacijsko djelovanje SVMP posredovano njihovom opetovanom aktivacijom čimbenika zgrušavanja najvjerojatnije se očituje kao izraženo iscrpljenje dostupnih zaliha fibrinogena u plazmi neophodnih za učinkovito zgrušavanje krvi prilikom ozljede krvne žile (2,50). Također, s obzirom na prisustvo izražene proteolitičke aktivnosti, vrlo je izgledno kako defibrin(ogen)aciji doprinosi i izravni degradacijski učinak kojeg iskazuju na fibrinogenu i krvnim ugrušcima bogatima fibrinom. Znan broj istraženih fibrin(ogen)aza odlikuje osjetljivost na plazmatske inhibitore poput  $\alpha_2$ -makroglobulina, te njihov možebitni farmakološki značaj u uzrokovanju poremećaja sustava hemostaze još uvijek nije u potpunosti razjašnjen (2). SVMP međudjeluju i s trombocitima, iskazujući inhibitorni učinak na njihovu agregaciju koja se narušavanjem hemostaze odvija istovremeno s aktivacijom čimbenika zgrušavanja krvi. Uslijed ozljede krvne žile, vWF kao veliki plazmatski protein dolazi u dodir s izloženim subendotelnim kolagenom, istovremeno privlačeći trombocite koji ga reverzibilno vežu posredstvom svog glikoproteinskog receptora GPIba (25,65). Tijekom doticaja s oštećenim endotelom, trombociti čvrsto adheriraju uz kolagen tipa I i/ili III koji na njihovoj površini prepoznaje integrin  $\alpha_2\beta_1$  te receptor GPVI. Međudjelovanje trombocita i kolagena potiče njihovu aktivaciju, te izražajnost velikog broja površinskih integrina iz skupine  $\alpha_{IIb}\beta_{IIIa}$  s kojima međudjeluju i fibrinogen i vWF, te posljedično ireverzibilno stvaraju čvrste aggregate. Pojedini predstavnici SVMP stupaju u međudjelovanje i s vWF-ovisnom adhezijom trombocita za ozlijeđeni endotel, prvenstveno zahvaljujući sposobnosti specifičnog vezanja i/ili hidrolize samog vWF, te njegovog receptora GPIba.

### 1.2.1.2. Sekrecijske fosfolipaze $A_2$

Fosfolipaze  $A_2$  (engl. *phospholipases A<sub>2</sub>*; PLA<sub>2</sub>) jedna su od najbolje istraženih sastavnica zmijskih otrova i ujedno u prirodi široko rasprostranjena proteinska obitelj esterolitičkih enzima koji kataliziraju hidrolizu *sn*-2 esterske veze glicerolske okosnice 1,2-

diacil-3-*sn*-fosfoglicerida uz oslobađanje biološki aktivnih masnih kiselina i lizofosfolipida (66,67). Temeljem strukturnih i funkcionalnih osobitosti fosfolipaze A<sub>2</sub> dijele se u pet glavnih tipova – sekrecijske, citosolne, lizosomske, Ca<sup>2+</sup>-neovisne, te acetilhidrolaze čimbenika aktivacije trombocita (engl. *platelet-activating factor acetylhydrolase*; PAF-AH) (68). Prema trenutno prihvaćenoj klasifikaciji, superobitelj PLA<sub>2</sub> obuhvaća petnaest grupa (I-XV) podijeljenih u podgrupe, a većina do sada istraženih članova iskazuje biološku aktivnost (68,69). PLA<sub>2</sub> sisavaca imaju ključnu ulogu u brojnim fiziološkim procesima, uključujući oplodnju, staničnu proliferaciju i kontrakciju glatkih mišića, a posreduju i u staničnim funkcijama povezanim s biosintezom prostaglandina i leukotriena kao sekundarnih glasnika u prijenosu signala, kao i u održavanju homeostaze biomembrana (22,70). PLA<sub>2</sub> iz otrova zmija (engl. *snake venom phospholipase A<sub>2</sub>*; sPLA<sub>2</sub>) jedne su od najmoćnijih poznatih toksina koji uzrokuju širok raspon farmakoloških učinaka; samostalno ili u međudjelovanju s dodatnim molekulama. Naime, iako dijele čak približno 40-99% homolognosti u slijedu aminokiselina, te visok stupanj sličnosti u trodimenzionalnoj strukturi, sPLA<sub>2</sub> odlikuje izuzetno heterogen način iskazivanja brojnih učinka nastalih nakon otrovanja zbog čega ove sastavnice i dalje predstavljaju veliki izazov za daljnja istraživanja (23,25,67,70). Temeljem aminokiselinskog slijeda, trodimenzionalne strukture i uzorka disulfidnih mostova PLA<sub>2</sub> kao sekrecijski enzimi izolirani iz zmijskih otrova pripadaju grupi I, odnosno II PLA<sub>2</sub> (71). Članovi PLA<sub>2</sub> grupe I, posebno zastupljeni u obiteljima *Elapidae* i *Colubridae*, u najvećoj mjeri homologni su onima iz probavnog soka gušterače (72).

sPLA<sub>2</sub> djeluju kao jedinstveni Ca<sup>2+</sup>-ovisni esterolitički enzimi, a tijekom otrovanja najčešće iskazuju neurotoksičnost ili pak miotoksičnost na živčano-mišićnom sustavu i to samostalno kao monomeri ili oblikovanjem brojnih oligomernih sastavnica zaslužnih za izražajnije iskazivanje toksičnog djelovanja (67,72,73). Ovisno o međudjelovanju ovakvih sastavnica, PLA<sub>2</sub> kompleksi dijele se na kovalentne i nekovalentne (2). Jedine poznate kovalentne strukture su β-bungarotoksini karakteristični za rod *Bungarus* koje sačinjavaju katalitički aktivni polipeptid A homologan PLA<sub>2</sub> grupe I i polipeptid B podudaran s dendrotoksinima i inhibitorima serinskih proteinaza Kunitzovog tipa (74). S obzirom na svoju funkciju, kao i većina ostalih PLA<sub>2</sub> kompleksa, i β-bungarotoksini farmakološki djeluju kao β-neurotoksini, te vezanjem za specifične receptore u presinaptičkoj membrani ireverzibilno inhibiraju oslobađanje acetilkolina u živčano-mišićnoj spojnici te time uzrokuju potpuni prekid prijenosa signala u motoneuronima (21,74). Tijekom navedenog djelovanja polipeptid A neurotoksičnost iskazuje svojom fosfolipaznom aktivnošću, a polipeptid B blokiranjem K<sup>+</sup>-

kanala ovisnim o naponu (21,22,74). Nekovalentne komplekse, koji mogu biti heterodimerni, homodimerni ili oligomerni, u pravilu sačinjava najmanje jedna funkcionalna PLA<sub>2</sub> te iz nje izvedena molekula koja (ne)posjeduje katalitičku aktivnost (72). Najbolje istraženi predstavnici najzastupljenije skupine heterodimera su krotoksin, vipoksin, te viperotoksin F. Krotoksin predstavlja glavnu toksičnu sastavnice otrova vrste *Crotalus durissus* (75). Vipoksin je toksična sastavnica izolirana iz otrova podvrste *V. a. meridionalis*, te ujedno jedini poznati  $\alpha$ -neurotoksični kompleks zaslužan za blokiranje vezanja acetilkolina na postsinaptičkoj membrani živčano-mišićne spojnice, čime predstavlja jedinstveni primjer modulacije katalitičke i toksične funkcije jedne podjedinice u kompleksu s drugom, srodnom i strukturno homolognom, koja zbog zamjene histidinskog ostatka u aktivnom mjestu nije enzimski funkcionalna (76). Naime, vipoksin čine relativno nestabilna bazična PLA<sub>2</sub> i njezin kiseli, prirodni inhibitor koji, dok su međusobno spojeni, smanjuje fosfolipaznu aktivnost i iskazanu toksičnost (76). Dakle, u usporedbi s ostalim oligomernim neurotoksinima gdje izdvojena toksična sastavnica iskazuje znatno slabiju smrtnost od samog kompleksa zahvaljujući dodatnom proteinskom čimbeniku koji povećava njezin patofiziološki učinak, PLA<sub>2</sub> podjedinica vipoksina postaje biološki aktivna tek kad se oslobodi od svog inhibitora (76). Viperotoksin F, glavna sastavnica otrova vrste *Vipera russelli formosensis*, također sadrži bazičnu PLA<sub>2</sub> presinaptičkog djelovanja u kompleksu s kiselim, netoksičnom i izuzetno slabo enzimski aktivnom podjedinicom koja, za razliku od one izolirane u vipoksinu, povećava njezin smrtni učinak (66). Poznato je kako porast strukturne složenosti pojedinih sastavnica zmijskih otrova značajno doprinosi stupnju smrtnosti kakvog iskazuju; najvjerojatnije posredstvom konformacijskih promjena potaknutim formiranjem kompleksa koje dovode do funkcionalnih promjena aktivnog mjesta ili izlaganja novih biološki aktivnih područja nedostupnim u pojedinačnim podjedinicama (74).

Svaka toksična PLA<sub>2</sub> iz zmijskog otrova usko je specijalizirana za izražavanje (ekspresiju) ograničenog broja specifičnih farmakoloških učinaka usmjerenih prema samo određenim vrstama tkiva koji su osjetljivi na njihovo toksično djelovanje (16,70). PLA<sub>2</sub> podrijetlom iz otrova zmija, uz aktivno mjesto, posjeduju i posebnu farmakološku regiju s visokim afinitetom za odgovarajuća receptorska mjesta izložena na površini ciljnih stanica koja su sukladna u naboju, hidrofobnosti i van der Waalsovima silama na dodirnim površinama (2). Pojedine PLA<sub>2</sub> mogu iskazati isti farmakološki učinak različitim mehanizmima djelovanja, (ne)ovisnim o enzimskoj aktivnosti koju iskazuju (70). Naime, njihovi specifični patofiziološki učinci najčešće su potaknuti oslobođenim masnim kiselinama i

lizofosfolipidima kao prethodnicima u biosintezi medijatora širokog raspona bioloških aktivnosti, ili pak oštećenjem membrane prouzrokovane hidrolizom fosfolipida kao građevnih jedinica. Također, i kompetitivno agonističko, odnosno antagonističko vezanje PLA<sub>2</sub> za ciljne proteine, receptore i/ili ionske kanale može biti dovoljno za narušavanje njihovog međudjelovanja s fiziološkim ligandima što uzrokuje poticanje, odnosno sprječavanje sinteze i oslobađanja sekundarnih glasnika, primjerice kalcijevih iona i cAMP, te sprječavanje unutarstaničnog ili međustaničnog prijenosa signala (2,23,25,70).

PLA<sub>2</sub> izolirane iz otrova zmija opisane su uglavnom kao presinaptički, te rjeđe, postsinaptički neurotoksini s djelovanjem na razini kolinergičnih živčanih završetaka perifernih motoneurona, odnosno membrana mišićnih vlakana živčano-mišićne spojnice čija se izražena toksičnost pripisuje udruženom djelovanju (sinergizmu) njihove neurospecifičnosti i enzimske aktivnosti (77). Prema jednom od molekularnih modela kojima se pokušava razjasniti mehanizam presinaptičke aktivnosti, do specifičnog djelovanja neurotoksičnih PLA<sub>2</sub> najvjerojatnije dolazi u područjima aktivne neuroegzocitoze gdje se posredstvom fosfolipidne hidrolize oslobađaju masne kiseline i lizofosfolipidi (77,78). Zahvaljujući svojim biofizičkim svojstvima nataloženi hidrolitički produkti najvjerojatnije potiču lokalnu promjenu sastava i oblika lipidnog dvosloja čime se potiče nastanak pozitivnih uvrtnja (invaginacija) presinaptičke membrane, dok se ujedno uzrokuju i oštećenja u aksolima. Uslijed porasta propusnosti membrane, kalcijevi ioni ulaze u citosol, te djeluju kao signal za neuroegzocitozu. Međutim, kako oblikovana membranska zakrivljenja inhibiraju i spajanje kao obrnuti proces ključan za endocitozu i recikliranje sinaptičkih vezikula, u konačnici nastaje njihovo potpuno iscrpljenje i trajno sprječavanje provođenja živčanih podražaja posredstvom acetilkolina. Također, značajan porast koncentracije kalcijevih iona u citosolu pokreće i cijeli niz drugih patoloških reakcija, uključujući poremećaj rada mitohondrija i aktivaciju unutarstaničnih Ca<sup>2+</sup>-ovisnih proteinaza, tzv. kalpaina, i endogenih PLA<sub>2</sub> odgovornih za razgradnju neurofilamenata kao ključnih sastavnica citoskeleta, odnosno potpomaganje daljnje hidrolize staničnih membranskih sustava (2,73). Sve veći broj istraživanja potvrđuje kako presinaptičke PLA<sub>2</sub> djeluju i unutar paraliziranog, blokiranog živčanog završetka gdje se s visokim afinitetom vežu za razne citoplazmatske i mitohondrijske proteine, doprinoseći njegovoj degeneraciji i odumiranju (79).

PLA<sub>2</sub> iz zmijskih otrova također iskazuju sposobnost uzrokovanja lokalne i/ili sistavne nekroze skeletnih mišića (67,73). Katalitički aktivni miotoksini uzrokuju hidrolizu fosfolipida i potiču membransku nestabilnost; izravno ili oslobađanjem masnih kiselina i lizofosfolipida,

što rezultira slabljenjem cjelovitosti i poremećajem organizacije dvosloja plazmatske membrane, te u konačnici uzrokuje oštećenje i nekrozu miocita. Neovisno o mehanizmu, miotoksični učinak u osnovi se ispoljava u obliku brzih, izraženih i ireverzibilnih biofizičkih promjena sarkoleme uslijed rušenja cjelovitosti membrana i poremećaja depolarizacije (2,23). Porast propusnosti stanične membrane praćen je gubitkom citoplazmatskih biljega; mioglobina, kreatin kinaze i laktat dehidrogenaze, te slično kao i kod neurotoksičnog djelovanja, prodorom kalcijevih iona u citosol što dovodi do započinjanja serije degenerativnih događaja – hiperkontrakcije miofilamenata zaslužne za daljnje mehaničko oštećenje sarkoleme, morfološkog i funkcionalnog propadanja mitohondrija, te smanjenog stvaranja ATP, kao i aktivacije unutarstaničnih o  $\text{Ca}^{2+}$ -ovisnih proteinaza i  $\text{PLA}_2$  koji vode staničnoj smrti i nekrozi.

Iz otrova podvrste *V. a. ammodytes* u posljednjih nekoliko godina izolirano je i detaljno opisano nekoliko  $\text{Zn}^{2+}$ -ovisnih metaloproteinaza (Tablica 7.) (23,25). Unatoč tome što sve do sada istražene iskazuju proteolitičku aktivnost na biološki sukladnim modelima, VaH1 (engl. *Vipera ammodytes ammodytes haemorrhagic metalloproteinase 1*), VaH2 (engl. *Vipera ammodytes ammodytes haemorrhagic metalloproteinase 2*), VaH3 (engl. *Vipera ammodytes ammodytes haemorrhagic metalloproteinase 3*) i VaH4 (engl. *Vipera ammodytes ammodytes haemorrhagic metalloproteinase 4*) izravno uzrokuju značajne hemoragične učinke (80-82). Amoditazi se pripisuje izražena fibrin(ogen)ičnost, a sastavnicama označenima kao VAFXA-I (engl. *Vipera ammodytes ammodytes activating factor X I*) i VAFXA-II (engl. *Vipera ammodytes ammodytes activating factor X II*) sposobnost aktivacije koagulacijskog čimbenika X (24,83,84).



**Tablica 7.** Svojstva Zn<sup>2+</sup>-ovisnih metaloproteinaza iz otrova *V. a. ammodytes* (24,80-84).

Sastavnica	Grupa	Aktivnost	Farmakološki učinci
VaH1	P-IIIa	Hidroliza $\alpha$ -lanca fibrinogena i azokazeina	Hemoragičnost
VaH2	P-IIIa	Hidroliza azokazeina	Hemoragičnost
VaH3	P-IIIc	Hidroliza protrombina i čimbenika X Proteoliza kolagena tipa IV, fibronektina i nidogena	Hemoragičnost
VaH4	P-IIIc	Razgradnja $\alpha$ -lanca fibrinogena	Hemoragičnost Citotoksičnost
Amoditaza	P-IIIa	Razgradnja $\alpha$ - i $\beta$ lanca fibrinogena, te fibrina Slaba hidroliza kolagena tipa IV i fibronektina	Fibrin(ogen)oliza
VAFXA-I	P-III d	Hidroliza određene veze u čimbeniku X Slaba hidroliza $\alpha$ -lanca fibrinogena, protrombina, kolagena tipa IV, fibronektina i nidogena	Aktivacija čimbenika X Inhibicija agregacije trombocita inducirana kolagenom
VAFXA-II	P-III d	Hidroliza određene veze u čimbeniku X Slaba hidroliza $\alpha$ -lanca fibrinogena, protrombina i fibronektina	Aktivacija čimbenika X Inhibicija agregacije trombocita inducirana kolagenom

Također, otrov poskoka sadrži i nekoliko vrsta funkcionalno različitih PLA<sub>2</sub> koje su strukturno podudarne s ostalim pripadnicima grupe IIA među kojima se osobito ističu visoko

bazični amoditoksini A, B i C (engl. *ammodytoxins*; Atx-A, B i C) (85). Njihov patofiziološki učinak ponajprije dolazi do izražaja na živčano-mišićnoj spojnici perifernog živčanog sustava gdje blokiraju oslobađanje acetilkolina pri čemu iskazuju značajno različitu smrtonosnost. Amoditoksini predstavljaju izoforme koje se u aminokiselinskom slijedu međusobno razlikuju samo na pet položaja od ukupno njih 122, te se Atx-B može smatrati trostrukim, a Atx-C dvostrukim prirodnim mutantom amoditoksina A. Atx-A je izraženo najpotentnija izoforma amoditoksina (*i.v.* LD<sub>50</sub> = 0,021 mg/kg), dok su Atx-B i C prema toksičnom učinku slabiji čak 28, odnosno 17 puta (85-88). Mjesto na kojem amoditoksini iskazuju svoje neurotoksično djelovanje raspoređeno je po cijeloj molekularnoj površini spojnice, te se smatra kako u tijeku nastanka patofiziološkog procesa iskazivanja toksičnosti posreduju udaljeni dijelovi toksina koji stupaju u međudjelovanje s odgovarajućim farmakološki važnim receptorima (85). Prekid prijenosa živčanog signala u živčano-mišićnoj spojnici potaknut djelovanjem amoditoksina odvija se u tri glavne faze navedene kako slijedi. Prvu fazu odlikuje vezanje za specifične receptore u presinaptičkoj membrani, najvjerojatnije neuronske receptore N-, odnosno M-tipa, ili pak za slabo istražena neproteinska specifična vezna mjesta. Druga faza obilježena je značajnim porastom oslobođenog acetilkolina koji stupa u međudjelovanje s K<sup>+</sup>-kanalima ovisnim o naponu. Tijekom treće faze nastaje potpuna te ireverzibilna paraliza, koja za razliku od prethodno dviju navedenih faza, nedvojbeno ovisi i o hidrolizi brojnih membranskih sustava. Do sada je poznato kako amoditoksini ne djeluju samo na izvanstaničnom dijelu presinaptičke membrane, već se uklapaju i u unutrašnjost živčanog završetka u kojem s visokim afinitetom ulaze u međudjelovanje kalmodulinom zadržavajući biološku aktivnost unatoč reducirajućem okolišu citosola (85). Također, osim predominirajuće presinaptičke neurotoksičnosti, sve tri izoforme amoditoksina iskazuju i izražen antikoagulacijski učinak mehanizmom neovisnim o enzimskoj aktivnosti i egzogenim fosfolipidima kojim učinkovito inhibiraju formiranje protrombinskog kompleksa neophodnog za stvaranje fibrinskog ugruška prilikom ozljede krvne žile, prvenstveno zahvaljujući sposobnosti izravnog vezanja aktiviranog čimbenika X (23,25,89).

Također, osim neurotoksičnih PLA<sub>2</sub> iz otrova podvrste *V. a. ammodytes* izoliran je i njihov miotoksični, katalitički nefunkcionalni Ser49 homolog nazvan amoditin L (engl. *ammodytin L*; Atn-L) s kojim dijele značajan stupanj identiteta; približno 74%, kao i dvije farmakološki nedjelotvorne izoforme neutralnih amoditina – I<sub>1</sub> i I<sub>2</sub> (Atn-I<sub>1</sub> i Atn-I<sub>2</sub>), koje odlikuje naglašena fosfolipazna aktivnost (90,91).

### 1.2.2. Hemostatski aktivne sastavnice otrova podvrste *Vipera ammodytes ammodytes*

U načelu je dobro poznato kako otrov poskoka sadrži različite sastavnice koje stupaju u međudjelovanje s hemostatskim sustavom (23,25). Spomenute sastavnice mogu biti enzimatski aktivne molekule, poput proteinaza, sekretornih fosfolipaza A<sub>2</sub>, oksidaza L-amino kiselina i 5-nukleotidaza (23,25). Također, otrov *V. a. ammodytes* sadrži i proteine bez enzimске aktivnosti, kao primjerice lektine C-tipa (engl. *C-type lectins*), disintegrine (engl. *disintegrines*) i tzv. troprstne otrove (3FTX). Raznoliki učinci na hemostazu posljedica su djelovanja proteinaza; serinskih ili cink-ovisnih metaloproteinaza. Metaloproteinaze uzrokuju krvarenja protolizom staničnog zida krvne žile, degradacijom sastavnica fibrinogena i fibrinskog čepa, te aktivacijom čimbenika zgrušavanja X i protrombina. Određene metaloproteinaze iz zmijskog otrova inhibiraju agregaciju trombocita antagonizirajući međudjelovanje između receptora trombocitnih glikoproteina Ib,  $\alpha_2\beta_1$  i  $\alpha II_b \beta III_a$ , te njihovih liganda; von Willebrandova čimbenika, kolagena i fibrinogena (23,25).

Serinske proteinaze iz zmijskog otrova (engl. *snake venom serine proteinase*; SVSP); molekule nalik na tripsin, formiraju fibrinogen ili ga pak degradiraju, izravno ili neizravno. SVSP mogu također aktivirati čimbenike zgrušavanja; čimbenik VII (F VII), V (F V), X (F X), protrombin (F II) kao i protein C. Navedene vrste proteina; SVMP i SVSP, dokazano inaktiviraju serpine, inhibitore serinskih proteinaza u ljudskoj plazmi. Protein C i serpini tvore dio unutarnjeg puta zgrušavanja koji usporava proces zgrušavanja krvi. Za neke je SVSP opisano da djeluju kao agonisti  $\alpha$ -trombin receptora, GPIb i receptora aktiviranih proteinazama 1 i 4 (engl. *proteinase activated receptors 1 and 4*).

Sekretorne PLA<sub>2</sub>, enzimi približne molekularne mase 14 kDa, inhibiraju proces zgrušavanja krvi i agregaciju trombocita putem hidrolize fosfolipida trombocita djelujući time na mjesta na kojima se stvaraju kompleksi koagulacije (25). Također, navedene mogu djelovati na hemostazu neovisno o svojoj fosfolipidnoj aktivnosti (25). Disintegrini, obitelj malih cisteinom bogatih proteina monomerne ili dimerne građe, sadrže posebne Arg-Gly-Asp dijelove ili dijelove nalik na Arg-Gly-Asp koji im omogućavaju vezanje s integrinima trombocita,  $\alpha II_b \beta_3$  i  $\alpha V \beta_3$  (25). Navedenim načinom, dezintegrini antagoniziraju povezivanje fibrinogena i agregaciju trombocita.

Lektini C-tipa iz zmijskog otrova (engl. *snake C-type lectins*; *snacles*) su disulfidnim mostovima premreženi heterodimeri veličine 25-30 kDa ili oligomerni kompleksi

heterodimera (25). Navedeni utječu na hemostazu vežući se za čimbenik zgrušavanja X i/ili IX sprječavajući time stvaranje koagulacijskog kompleksa ili pak vežući se za  $\alpha$ -trombin čime posljedično inhibiraju njegovu enzimatsku aktivnost. *Snacles* u formi dimera inhibiraju agregaciju trombocita vezujući se za receptor GPIb ili integrin  $\alpha_2\beta_1$  (25). Multimerni oblici *snacles* mogu također uzrokovati aglutinaciju trombocita djelujući istovremeno na GPIb receptore nekoliko trombocita (25).

Zbog specifičnih i djelotvornih učinaka sastavnica zmijskog otrova na hemostazu, pojedine od navedenih korištene su u razvoju novih lijekova za liječenje intravaskularnih tromboza, te u postupku dijagnosticiranja određenih poremećaja zgrušavanja krvi. S obzirom na ranije opisane poremećaje hemostaze u osoba otrovanih otrovom poskoka, mnoga istraživanja zabilježila su proteinske sastavnice s jasnim učinkom na hemostazu, te istaknula molekule zanimljive za daljnja istraživanja. Dosadašnja proteomska istraživanja, različitim biokemijskim i molekularnim postupcima jasno su opisala izolirane sastavnice otrova *V. a. ammodytes* (24,80,81,83,92). Tim slijedom, unutar frakcije A zabilježene su proteinske sastavnice približno velike molekularne mase; 60-110 kDa (24,80,81,83,92). Smatra se kako su sastavnice s izraženom hemoragičnom aktivnošću sadržane u ovoj frakciji cjelokupnog otrova *V. a. ammodytes* i to su uglavnom SVMP P-III grupe. Iz skupine navedenih, VaH1 i VaH2 su monomeri, a amoditagin i VaH3 dimeri (24,80,81,83,92). U cilju uzrokovanja krvarenja, ove molekule razgrađuju sastavnice bazalne membrane i izvanstaničnog matriksa, primjerice kolagen tip IV, fibronektin i nidogen, kao i pojedine proteine plazme uključene u proces zgrušavanja krvi, kao fibrinogen, protrombin i čimbenik zgrušavanja X (24,80,81,83,92)

Osim navedenih hemoragičnih, frakcija A sadrži i ne-hemoragične (engl. *non-haemorrhagic*) SVMP. Amoditaza (engl. *ammodytase*), monomerna SVMP, degradira fibrinske naslage (24). S obzirom da ne aktivira, a niti degradira plazminogen ili protrombin, ne pokazuje učinak na o kolagenu- i/ili ADP-ovisnoj agregaciji trombocita, te ima vrlo dobra obilježja za kliničku uporabu kao antitrombotična tvar. Druge dvije dobro poznate ne-hemoragične SVMP su VAFXA-I i VAFXA-II, molekule iz skupina P-IIIId SVMP (83). S medicinskog gledišta najzanimljivije obilježje ovih molekula jest njihova sposobnost aktivacije čimbenika zgrušavanja F X u F X<sub>a</sub>. Ovim putem, VAFXA I i II troše čimbenik X u krvi te time povećavaju hemoragičnu aktivnost otrova poskoka. Ovakva pak aktivnost može biti korisna u poremećajima zgrušavanja krvi nastalim zbog neaktivnih čimbenika IX<sub>a</sub> ili VII<sub>a</sub> što za posljedicu ima nedostatnu koncentraciju čimbenika X<sub>a</sub>. Do sada neistražene sastavnice

frakcije A očito imaju sposobnost aktivirati čimbenik IX i/ili protrombin u trombin što je mjerljivo u skraćenju vremena APTV i PV pokazanom pri ispitivanju učinka frakcija A u međudjelovanju s plazmom.

U frakciji B pronađeni su proteini približne molekularne mase 25-40 kDa. Navedeni su opisani kao SVMP P-I grupe, SVSP, CRISP, *snacles* i dimeri disintegrini (25). Proteinaze u velikoj mjeri doprinose visokoj fibrino(geno)litičkoj aktivnosti ukupnog otrova *V. a. ammodytes*. Spomenute brzo degradiraju  $\alpha$ - i  $\beta$ -lance fibrinogena što onemogućava stvaranje fibrinskih naslaga (25). Frakcija B također iskazuje umjerenu aktivnost u aktiviranju čimbenika zgrušavanja IX i X, a ovakav učinak povezuje se s aktivnošću SP jer isti izostaje davanjem SP inhibitora. Cjelokupno izražen antikoagulantni učinak frakcije B utemeljen je na pojavnosti trošenja fibrinogena putem aktivacije koagulacijskog kompleksa F IX/F X (25). Frakcija B također snažno inhibira o vWF-ovisnu aglutinaciju trombocita. Prema dosadašnjim spoznajama, ovakva aktivnost može biti propisana *snacles* molekulama koje blokiraju međudjelovanje između trombocitnog receptora GPIb i vWF (2,23,25). S obzirom na prisutnost disintegrina, frakcija B vrlo učinkovito blokira o kolagenu- i ADP-ovisnu agregaciju trombocita. Umjerena sposobnost inhibicije agregacije i aglutinacije trombocita također je zabilježena u frakciji C i D, no način ovakvog djelovanja suprotan je navedenom unutar frakcija A i B (25).

**Tablica 8.** Obilježja otrova podvrste *V. a. ammodytes* i glavne sastavnice izoliranih frakcija (A, B i C) (23-25,80,82-84,89,92,93).

Frakcija	Krvarenje	Fibrinogen	Fibrin	Aktivacija F IX	Aktivacija F X	Aktivacija protrombin a	Inhibicija agregacije trombocita			Vremena krvarenja		Glavne sastavnice
							Kolagen- ovisna	ADP- ovisna	vWF-ovisna aglutinacija	APTV	PV	
Čitav otrov	++	++	np	+	++	–	++	++	++	<	>>	
A	++	++	+	+	++	+	+	+	+	<	<	P-III MP
B	–	–	–	+	+	–	+	+	++	>	>	SP, P-I MP, CRISP, <i>snaclec</i> , disintegrini
C	–	–	–	–	–	–	++	+	++	>>	>>	sPLA <sub>2</sub> , CRISP

*Skraćenice:* –: bez djelovanja; +: blago do umjereno djelovanje; ++: jako djelovanje; <: skraćeno vrijeme; >: produljeno vrijeme; F IX: čimbenik zgrušavanja IX; F X: čimbenik zgrušavanja X; vWF-ovisna aglutinacija: o von Willebrand čimbeniku ovisna aglutinacija; APTV: aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme; PV: protrombinsko vrijeme; P-III MP: engl. *metalloproteinases class-III*; SP: engl. *serine protease*; P-I MP: engl. *metalloproteinases class-I*; CRISP: engl. *cysteine-rich secretory protein*; *snaclec*: engl. *snake C-type lectins*; sPLA<sub>2</sub>: engl. *secreted phospholypase A<sub>2</sub>*.

Glavne sastavnice frakcije C su sPLA<sub>2</sub>, amoditoksini A, B i C (Atn-A, Atn-B i Atn-C), te amoditini L, I<sub>1</sub> i I<sub>2</sub> (Atn-L, Atn-I<sub>1</sub> i Atn-I<sub>2</sub>) (25,85). Osim sPLA<sub>2</sub>, druge vrste proteina kao primjerice CRISP pronađeni su također unutar frakcije C. Ipak, najzastupljenije sastavnice unutar frakcije C su sPLA<sub>2</sub> i to one koje nisu prisutne u frakciji A i B. Izrazito značajniji antikoagulantni učinak frakcije C u odnosu na ostale ranije navedene, vjerojatno je posljedica amoditoksina za koje je poznato kako inhibiraju stvaranje protrombinskog kompleksa vežući se za aktivirani čimbenik X (89). Peptidi i njihovi analozi temeljem građenih jedinica s izraženom antikoagulantnom aktivnošću poput amoditoksina, koji su ključni za međudjelovanje s F X<sub>a</sub>, možebitno su korisni u sprječavanju procesa zgrušavanja krvi. Male molekule sa specifičnim i učinkovitim antikoagulantnim djelovanjem nezamjenjivi su u kliničkim stanjima i/ili slučajevima u kojima krvarenje treba biti strogo nadzirano, kao primjerice prilikom operacijskih postupaka.

Unutar frakcije D utvrđen je samo kratki peptid izoliran postupkom ESI-MS (engl. *electrospray ionisation mass spectrometry*), te je nazvan pEKW (engl. *pyroglutamic acid-Lysine-Tryptophan; pyroGlu-Lys-Trp*). pEKW i njemu slični peptidi također su pronađeni u otrovima zmijske porodice *Viperidae*, a za koje je poznato da su reverzibilni inhibitori metaloproteinaza (25). Sveukupno, unutar ukupnog otrova *V. a. ammodytes* do sada su pronađene sastavnice članice jedanaest različitih proteinskih obitelji (25).

### **1.3. Klinička obilježja ofidizma**

U svijetu ugriz zmijske otrovnice godišnje doživi više od tri milijuna osoba, dok ih umire približno 125 000 (6). U Europi, uključujući europski dio Rusije i Tursku, zabilježeno je godišnje približno 7 500 zmijskih ugriza, od čega oko 1 000 slučajeva teške kliničke slike sustavnog otrovanja, te četiri smrtna ishoda (6,7). Smrtnost od ugriza europskih otrovnica iznosi 0,3-5%, a u Hrvatskoj 0,4-1,8% (6,7,13).

Uslijed velikog medicinskog značenja otrovanja uzrokovanim ugrizom poskoka, osobito u djece, istraživanju u kojem su detaljnije proučavani kardiotoksični učinci sastavnica otrova poskoka na životinjskom modelu, prethodilo je istraživanje u kojem su opisana obilježja ofidizma u djece kao razumna klinička potkrjepa koja prethodi laboratorijskom pokusu u proučavanju kardiotoksičnih učinaka otrova poskoka (94).

Dakle, u spomenutom istraživanju prikazano je stošezdesetero djece i adolescenata (N = 160) u dobi od nula do osamnaest (0-18) godina, otrovanih zmijskim otrovom u području južne Hrvatske, a koji su bili liječeni u Klinici za infektologiju u Kliničkom bolničkom centru Split tijekom razdoblja od 1. siječnja 1979. do 31. prosinca 2013. godine. U navedenom istraživanju bilježeni su podatci kako slijedi: opći i epidemiološki, klinički i laboratorijski pokazatelji, te podatci o primijenjenom liječenju (94).

Uobičajena klasifikacija otrovanja zmijskim otrovom koja se često koristi u svakodnevnoj kliničkoj praksi u cilju prikaza težine kliničke slike otrovanja, izvorno je napravljena prema Reidu i modificirana prema Perssonu, a navedena je kako slijedi:

- vrlo blaga reakcija – pojava lokalnog edema, bez općih znakova i simptoma, osim bolesnikovog straha
- blaga reakcija – pojava lokalnog ili proširenog edema, s ili bez gastrointestinalnih znakova i simptoma, ali bez pojave općih simptoma
- srednje teška reakcija – pojava opsežnog edema, šoka koji traje manje od dva sata, te pojava drugih znakova i simptoma srednje teškog otrovanja
- teška reakcija – pojava šoka koji traje duže od dva sata ili ponovljena pojava šoka, te pojava drugih znakova i simptoma teškog sustavnog otrovanja
- smrtni ishod – očigledni znakovi sustavnog otrovanja koji završavaju smrtnim ishodom (95-97).

Klasifikacija težine kliničke slike koja se također vrlo često koristi u Europi, a koja opisuje težinu otrovanja nastalog nakon ugriza europskih zmija otrovnica pregledano je prikazana u Tablici 9. (98-101).



**Tablica 9.** Klasifikacija težine kliničke slike otrovanja nastale nakon ugriza europskih zmija otrovnica (98-101).

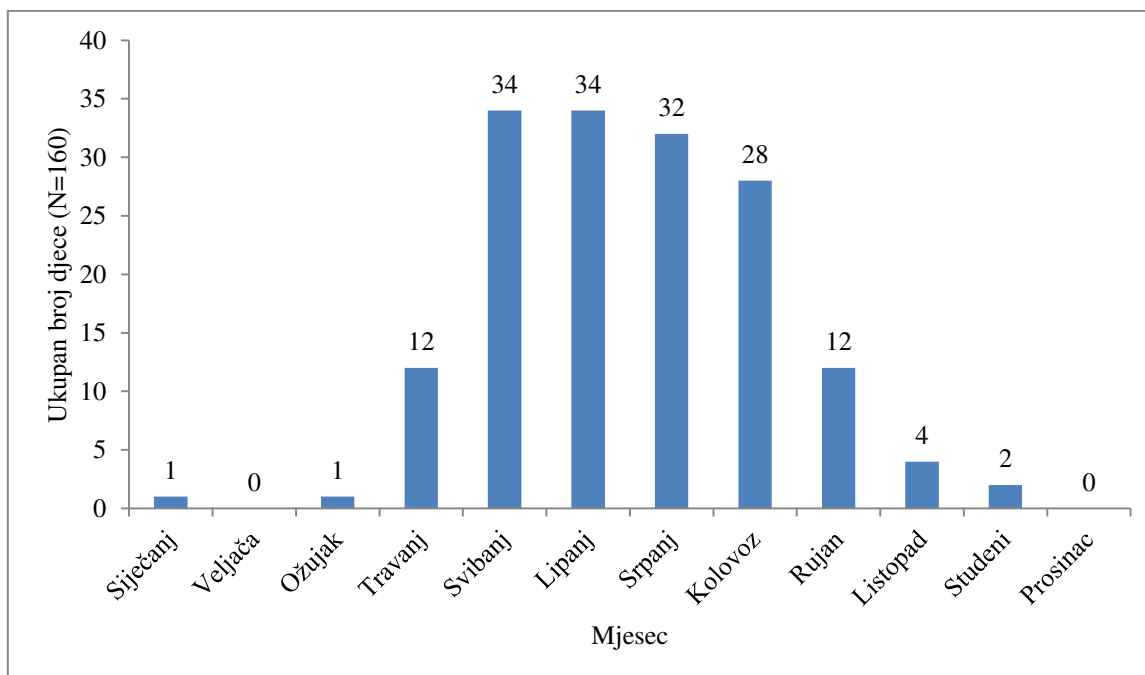
Stupanj	Težina kliničke slike	Klinička obilježja	Liječenje	Prosječna koncentracija otrova u krvi
0	Suhi ugriz	Vidljiva ugrizna rana, no bez lokalnih znakova i simptoma otrovanja	Toaleta rane	1,0 ± 0,3 ng/mL
1	Blaga	Bolnost i oteklina uz odsustvo sustavnih znakova i simptoma otrovanja	Simptomatsko	5,0 ± 1,8 ng/mL
2	Umjerena (srednje teška)	Izražena oteklina i/ili crvenilo uz hematom s blagim ili umjerenim sustavnim znakovima i simptomima otrovanja	Protuotrov	32,0 ± 7,0 ng/mL
3	Teška	Izraženi sustavni simptomi i znakovi otrovanja	Protuotrov	126,0 ± 50,0 ng/mL

U navedenom razdoblju liječeno je ukupno 114 (71%) dječaka i 46 (29%) djevojčica. Promatrajući raspodjelu zmijskih ugriza prema spolu, u Europi, kao i u svijetu, u načelu zabilježena je veća učestalost ugriza u muškaraca (6). U pedijatrijskoj populaciji žrtve zmijskog ugriza također su češće dječaci što je sukladno našem istraživanju (6,13,102-104).

Medijan dobi sve djece u prikazanom istraživanju iznosio je 10,5 godina (min-max: 1-18 godina); medijan dobi u dječaka bio je 11 godina (min-max: 1-18 godina) i 10 godina (min-max: 2-18 godina) u djevojčica (94).

U južnoj Hrvatskoj zmije iz podobitelji *Viperinae* aktivne su od početka proljeća do kasne jeseni, stoga se zmijski ugrizi na ovom području najčešće događaju tijekom toplih

mjeseci kada se ljudi bave poljoprivrednim aktivnostima, a djeca borave u prirodi (13,14). Osim poljoprivrednih radova, povećane sportske i turističke aktivnosti u ruralnim područjima u današnje vrijeme također uzrokuju znatno veću učestalost zmijskih ugriza u ljudi, posebice u djece (6,7). U načelu, u europskim zemljama sezonska raspodjela učestalosti zmijskih ugriza vrlo je slična (6,7,95,96,99,105). U našem istraživanju većina ugriza dogodila se tijekom toplih mjeseci; od početka svibnja do kraja kolovoza (ukupno 80%), a najviše tijekom svibnja (N = 34) i lipnja (N = 34), te srpnja (N = 32) (94). U veljači i prosincu nije zabilježen niti jedan ugriz otrovnice (Slika 3.). Razlozi za ovakvu razdiobu učestalosti ugriza su zemljopisni položaj opisanog područja, blaga klima, zimski san zmija otrovnica i opisane djelatnosti stanovništva tijekom proljeća i ljeta. Najveća učestalost ugriza zmija otrovnica u južnoj Hrvatskoj u odraslih zabilježena je u također svibnju, dok je u Turskoj opisana u lipnju, u Italiji u kolovozu, a u Francuskoj općenito tijekom ljeta (6,13,97,99,102).



**Slika 3.** Razdioba zmijskih ugriza u djece prema mjesecima u godini (94).

Promatrajući mjesto ugriza, u našem istraživanju češće su zabilježeni ugrizi za gornje udove (59%), u odnosu na ugrize za donje udove (40%) i druga područja (1%; Tablica 10.) (94). Ugrizi za gornje udove nešto su češće opisivani od ugriza za donje udove, posebice u

vrijeme obavljanja poljoprivrednih radova, što je u sukladnosti s ranije provedenim istraživanjima u Hrvatskoj, Italiji, Švicarskoj i Švedskoj (13,96,97,105,106). Suprotno tome, drugi istraživači zabilježili su češće ugrize za donje udove (102,104,107,108).

**Tablica 10.** Raspodjela učestalosti ugriza prema mjestu injiciranja zmijskog otrova (94).

Mjesto ugriza	N (%)
Gornji udovi	94 (59)
Donji udovi	64 (40)
Prsni koš	1 (0,5)
Vrat	1 (0,5)

Slučajevi izravnog ubrizgavanja otrova u krvotok i/ili drugdje u blizinu srca posebno su opasni. Inokulacija otrova izravno u krvotok uobičajeno dovodi do nastanka toksičnog šoka koji može vrlo brzo završiti smrtnim ishodom, kao što se to dogodilo u četrdesetpet dana starog dječaka koji je zabilježen u našem istraživanju, a koji je bio ugrizen izravno za vrat, te koji je preminuo šest sati nakon ugriza poskoka unatoč specifičnom liječenju i primjeni svih potpornih mjera (109). Na području Izraela opisana su dva slučaja u djece koja su doživjela ugriz zmijske *Vipera palestinae* za glavu i vrat, no nije bilo zabilježenih smrtnih ishoda (107). U istraživanju Seiferta i sur. provedenom u Sjedinjenim Američkim Državama zabilježena je smrtnost od ugriza zmijske iz obitelji *Viperidae* i *Elapidae* koja je iznosila 0,06%, no u većini slučajeva nije bila poznata točna vrsta zmijske koja je uzrokovala ugriz (110). U Francuskoj De Haro i sur. opisali su tri slučaja (2,0%) odraslih osoba sa smrtnim ishodom nakon ugriza zmijske *V. aspis*, dok su Jollivet i sur. zabilježili jedan slučaj smrti (0,4%) nakon ugriza europskih zmijske otrovnice (99,111). U našem istraživanju zabilježen je samo jedan slučaj smrtnog ishoda u djeteta (0,6%) (94). Promatrajući populaciju u Europi, godišnje se zabilježe približno četiri smrtna ishoda nakon ugriza zmijske otrovnice (6,7). Ipak, navedena istraživanja proučavala su općenito ugrize zmijske iz porodice *Viperinae*, stoga se ne izdvajaju posebno ugrizi *V. ammodytes* u djece.

Klinička slika otrovanja uzrokovana otrovom poskoka posljedica je hematotoksičnog, neurotoksičnog i kardiotoksičnog djelovanja otrova (13,23,25,94,109,112). Oteklina, crvenilo

i krvni podljev na mjestu ugriza uobičajeno se pojavljuju vrlo brzo nakon što je otrov injiciran, ili unutar dva do četiri sata od ugriza, te takve kliničke znakove koristimo u svakodnevnoj kliničkoj praksi za razlikovanje ugriza otrovnih zmija od neotrovnih. U istraživanju Lukšića i sur. provedenom u južnoj Hrvatskoj, otekline, crvenilo i krvni podljev zabilježeni su u gotovo svih žrtava zmijskog ugriza (13). U istraživanju Tekina i sur. zabilježena je vrlo slična pojava navedenih lokalnih znakova otrovanja u odraslih i djece u Turskoj (102). Otekline i crvenilo na mjestu ugriza zabilježeni su u sve djece u našem istraživanju, što je suglasno s gore opisanim istraživanjima (Tablica 11., Slika 4. i 5.) (94).



**Slika 4.** Otekline i krvni podljev nastali nakon ugriza poskoka za dorzum lijeve šake u četverogodišnjeg dječaka. Izvorna fotografija.

Druga istraživanja u Europi također su opisala iste lokalne znakove i simptome otrovanja, ali bila su provedena u odraslih i uglavnom nakon ugriza zmija iz porodice *Viperinae* općenito (6,7,95-97,99,103,105,106).



**Slika 5.** Izražena oteklina desne noge nastala nakon ugriza poskoka za distalnu trećinu desne potkoljenice u šestogodišnjeg djeteta. Izvorna fotografija.

Krvni podljev, utvrđen u 97,5% djece, bio je različite veličine; od male i jedva primjetne u području oko mjesta ugriza, pa do znatno veće u slučajevima kada bi zahvaćao čitavu ruku ili nogu, a katkad i trup (Slika 6.) (94).



**Slika 6.** Krvni podljev nastao nakon ugriza poskoka za treći prst desne šake koji se proteže duž čitave desne ruke u osamnaestogodišnjeg djeteta. Izvorna fotografija.

Povećani i/ili bolni regionalni limfni čvorovi opisani su u 48% bolesnika, dok je povraćanje zabilježeno u 21%, te proljev u 2,5% bolesnika (Tablica 11.) (94).

**Tablica 11.** Klinički simptomi i znakovi ofidizma u djece (94).

Klinički simptomi i znakovi	N (%)
Oteklina i/ili crvenilo kože	160 (100,0)
Krvni podljev	156 (97,5)
Povećani limfni čvorovi	77 (48,0)
Povraćanje	34 (21,0)
Proljev	4 (2,5)

Najčešća lokalna komplikacija u naših bolesnika bila je hemoragična bula, zabilježena u 20% djece (Tablica 12., Slika 7.), dok je incizija bule, kao postupak izbora liječenja, napravljena u 15,6% djece (94). Lukšić i sur. opisali su pojavu nastanka hemoragične bule u 13% žrtava ugriza zmija otrovnica u južnoj Hrvatskoj (13). Tekin i sur. zabilježili su nastanak

ove lokalne komplikacije u 18,6% odraslih, te u 24,4% djece nakon ugriza zmije *V. lebetina* (102).



**Slika 7.** Hemoragična bula nastala u četverogodišnjeg djeteta nakon ugriza poskoka za peti prst desne šake. Izvorna fotografija.

Nakon hemoragične bule, sljedeća po učestalosti od lokalnih komplikacija u naših bolesnika bila je pojava kompartment sindroma (7,5%; Tablica 12.), najozbiljnije kirurške komplikacije nakon zmijskog ugriza u djece (94). Nekroza kože i/ili mišića na mjestu ugriza utvrđena je u 4,4% djece, dok su tromboza i/ili tromboflebitis krvnih žila u blizini ugriza rijetko opisivani (0,6%), kao i sekundarne infekcije kože i/ili mekih tkiva (0,6%; Tablica 12.) (94).

**Tablica 12.** Lokalne i opće komplikacije ofidizma u djece (94).

Komplikacije	N (%)
Lokalne	
Hemoragična bula	32 (20,0)
Sindrom mišićnih odvojaka	12 (7,5)
Nekroza kože i/ili mišića	7 (4,4)
Tromboza i/ili tromboflebitis	1 (0,6)
Infekcije	1 (0,6)
Opće	
Kljenuit moždanih živaca	18 (11,2)
(Pred)šokno stanje	11 (7,0)
Somnolencija	8 (5,0)
Sopor ili koma	1 (0,6)
Poremećaji zgrušavanja krvi	5 (3,1)
Oštećenje bubrega	4 (2,5)
Oštećenje jetre	3 (2,0)

Pojavnost navedenih sekundarnih infekcija u naših bolesnika sukladna je s drugim istraživanjima u kojima su celulitis i absces opisani u svega 0,9% ispitanika (13,94). Ovakvi rezultati posljedica su visokog postotka profilaktičke upotrebe antibiotika. Ozay i sur. u Turskoj opisali su visoku učestalost nastanka nekroze tkiva (13%) u djece na mjestu ugriza zmije otrovnice (113). Druga istraživanja opisala su pak nekrozu tetiva mišića i kontrakturu udova (114). U našem istraživanju nekroza okolnog tkiva zabilježena je u 4,4% djece, a nekrektomija je izvršena samo u slučajevima izrazito opsežne nekroze tkiva (94). U istraživanju Tekina i sur. napravljena je statistička usporedba kliničke slike otrovanja u odraslih i djece, te je opisan statistički značajno češći nastanak nekroze tkiva na mjestu zmijskog ugriza u djece u odnosu na odrasle (29,3% prema 9,6%), a zabilježen je i statistički značajno učestaliji nastanak lokalnih komplikacija u djece u usporedbi s odraslim bolesnicima (33,3 % prema 7,8%) (102).

Najučestalije opće komplikacije sustavnog otrovanja, nastale uslijed neurotoksičnog djelovanja zmijskog otrova, u našem istraživanju bile su kljenuti moždanih živaca (11,2%;



Tablica 12.), i to najčešće trećeg moždanog živca, što se klinički manifestiralo obostranom ptozom kapaka, opisanom u sve djece (Slika 8.) (94).



**Slika 8.** Obostrana ptoza kapaka u četverogodišnjeg djeteta nastala dva sata nakon ugriza poskoka. Izvorna fotografija.

Osim ptoze kapaka, 4,4% bolesnika imalo je i opftalmoplegiju, 2,0% disfagiju, a jedno dijete (0,6%) imalo je i disfoniju i disfagiju (94). Neurološka oštećenja uobičajeno su se javljala dva do šest sati nakon ugriza, te bi u potpunosti nestala nakon 72 sata (94). Bolesnici koji su imali druga navedena neurološka oštećenja, osim ptoze kapaka, potpuno su se oporavila nakon prosječno četiri do šest dana od trenutka ugriza (94).

Lukšić i sur. u Hrvatskoj opisali su 16,0% bolesnika s parezom moždanih živaca, te 5,9% bolesnika s izoliranom depresijom središnjeg živčanog sustava nastaloj bez pojave šoka i/ili druge hemodinamske nestabilnosti (13). U navedenom istraživanju opisana je i pareza i/ili paraliza VI. i IX. moždanog živca klinički iskazana kao oftalmoplegija, disfagija i disfonija

(13). De Haro i sur. zabilježili su 8% bolesnika s neurotoksično iskazanim djelovanjem otrova zmijske *V. aspis*, dok su Jollivet i sur. opisali 1,8% bolesnika s neurološkim oštećenjem nastalim nakon ugriza europskih zmijskih otrovnica u Francuskoj (99,111). U istraživanju De Haro i sur. ptoza kapaka zabilježena je u svih bolesnika s neurološkim ispadom, a većina bolesnika imala je i oftalmoplegiju, a manji broj osoba imao je i disfoniju i disfagiju, dok su paraliza mišića usnica, slabost mišića udova i parestezije bile manje učestale (99). Malina i sur. zabilježili su slučaj nastanka neuroloških simptoma otrovanja u prethodno zdrave dvanaestogodišnje djevojčice nakon ugriza zmijske *V. berus* u Mađarskoj (115). U navedenom prikazu slučaja opisane su umjereno proširene zjenice, blaži poremećaj akomodacije zjenica, obostrana ptoza kapaka i fotosenzitivnost (115). Lonati i sur. opisali su ukupno 24 slučaja neurotoksičnih manifestacija nastalih nakon ugriza europskih zmijskih otrovnica u Italiji, od kojih je bilo devetnaestero odraslih i petero djece (106). U sve djece zabilježeni su ptoza kapaka i poremećaji vida, dok je dvoje djece imalo oftalmoplegiju, opću mišićnu slabost, te slabost žvačnih mišića (106). U spomenutom istraživanju nije bilo zabilježenih slučajeva disfagije i disfonije (106). U suprotnosti s navedenim istraživanjima, Boels i sur. tijekom desetogodišnjeg razdoblja u Francuskoj opisali su 268 slučajeva umjerene i teške kliničke slike sustavnog otrovanja, no bez zabilježenih slučajeva neurotoksičnih manifestacija otrovanja nakon ugriza europskih zmijskih otrovnica (116).

U našem istraživanju klinički vidljive manifestacije neurotoksičnog djelovanja otrova poskoka bile su jasno uočljive dva do šest sati od trenutka ugriza, što je u skladnosti s drugim provedenim istraživanjima (13,94,106). Trajanje neuroloških oštećenja u naših bolesnika trajalo je približno 72 sata, što je jednako opisanom u istraživanju autora Lonati i sur. (94,106). Sastav otrova europskih zmijskih otrovnica složena je mješavina brojnih proteina s enzimatskim, poglavito neurotoksičnim, hematotoksičnim i kardiotoksičnim djelovanjem (25). Neurotoksini s djelovanjem poput fosfolipaze A<sub>2</sub> na živčano-mišićnoj spojnici ometaju prijenos signala pre- i postsinaptički uzrokujući klinički vidljiva neurološka oštećenja (11,85). Fosfolipaza A<sub>2</sub> koja učinak iskazuje presinaptički, kao primjerice amoditoksin sa svojim izoformama, te heterodimerni neurotoksini s djelovanjem na postsinaptičkom dijelu spojnice, kao primjerice vipoksin i vaspin, već su ranije izolirani uglavnom iz otrova zmijske *V. ammodytes* i *V. aspis* (11,23,25,84,85,92,106). Različita količina ubrizganog otrova, te promjenjiv udio fosfolipaze A<sub>2</sub> u ukupnom otrovu, kao i osobitosti pojedinca žrtve doprinose različito iskazanoj kliničkoj slici neurološkog oštećenja (11,13,106).

Kvantitativni poremećaji svijesti u našem istraživanju zabilježeni su u ukupno 5,6% djece; somnolencija je zabilježena kao najučestalija (5,0%), dok je jedno dijete bilo soporozno, a potom u komi (0,6%; Tablica 12.) (94). Suprotno navedenom, druga istraživanja nisu opisala poremećaje stanja svijest ni depresiju središnjeg živčanog sustava u odsustvu šoknog stanja ili stanja prijetećeg šoka, u odraslih i djece nakon ugriza europskih otrovnica (102-104,107,116). S obzirom da su u našem istraživanju opisani većinom slučajevi uzrokovani ugrizom poskoka, za razliku od ostalih navedenih istraživanja koja su proučavala ugrize europskih otrovnica općenito, pokazana razlika mogla bi biti rezultat izravnog djelovanja neurotoksične sastavnice cjelokupnog otrova poskoka na središnji živčani sustav.

Simptomi šoka ili prijetećeg šoka praćeni tahikardijom, hipotenzijom, tahidispnejom, te teškim poremećajima općeg stanja zabilježeni su u 7% djece u našem istraživanju (Tablica 12.) (94). Ozay i sur. u Turskoj opisali su pojavu šoka u 5,2% djece, što je vrlo slično (5,1%) s istraživanjem provedenim u Hrvatskoj (13,113). Malina i sur. u Mađarskoj opisali su jedan slučaj nastanka šoka nakon ugriza poskoka, no bez jasno navedene dobi žrtve (103). Drugi autori u Europi ne ističu nastanak šoka u osoba koje su doživjeli zmijski ugriz (102,107). Poremećaji zgrušavanja krvi, kao izraz hematotoksičnog djelovanja otrova poskoka, zabilježeni su u 3,1% naših bolesnika (Tablica 12.) (94). Najmanje učestale i blage opće komplikacije bile su oštećenja bubrega (2,5%) i jetre (2,0%) zabilježene kao prolazan porast specifičnih laboratorijskih biljega (Tablica 12.) (94).

Doza otrova injicirana u ljudski organizam ovisna je o veličini zmijske, lokalizaciji ugriza i obilježjima žrtve. Zbog relativno manje tjelesne mase, djeca dobivaju veću dozu otrova na jedinicu tjelesne mase. Iako ugrizi zmijske otrovnice imaju sličnu kliničku sliku u odraslih i djece, težina kliničke slike otrovanja ozbiljnija je u djece, te su komplikacije zmijskog otrovanja češće u dječjoj dobi (6,7).

U našem istraživanju teška klinička slika otrovanja opisana je u 24,4% sve djece, a u dobnoj skupini od 0-7 godina, zabilježen je najveća učestalost teške i srednje teške kliničke slike otrovanja (Tablica 13.) (94). Paret i sur. u Izraelu opisali su isti postotak (40,5%) djece sa teškom i srednje teškom kliničkom slikom ofidizma i to nakon ugriza zmijske *V. palestinae* (107).

**Tablica 13.** Prikaz težine kliničke slike ofidizma u djece (94).

Težina otrovanja	Dobna skupina (godine)				Trajanje hospitalizacije (prosjeak u danima)
	0-7	8-14	15-18	Ukupan N (%)	
Blaga	2	7	6	15 (9,4)	3
Umjerena	10	28	18	56 (35,0)	6
Srednje teška	18	17	14	49 (30,6)	9
Teška	19	14	6	39 (24,4)	13
Smrtni ishod	1	0	0	1 (0,6)	1

Tekin i sur. u Turskoj zabilježili su 56,9% slučajeva umjereno teškog otrovanja u djece nakon ugriza zmije *V. lebetina*, te 8,1% djece s blagom kliničkom slikom otrovanja (102). De Haro i sur. u Francuskoj zabilježili su ukupno 25% slučajeva blage kliničke slike otrovanja u djece, te 58% slučajeva umjerene i 17% slučajeva teške kliničke slike otrovanja nakon ugriza zmije *V. aspis* (99). U našem istraživanju opisano je 30,6% djece s umjerenom, te 9,4% s blagom kliničkom slikom otrovanja (94). Prosječno trajanje hospitalizacije bilo je trinaest dana u slučajevima teške kliničke slike otrovanja, te devet dana prilikom umjereno iskazane kliničke slike ofidizma u djece (Tablica 13.). Prosječno trajanje hospitalizacije u našem istraživanju bilo je nešto duže nego što je to opisano u drugim istraživanjima, što korelira s težinom kliničke slike otrovanja i dobi djece (94,96,97,99,106,116). U našem istraživanju smrtno je stradalo jedno dijete (0,6%) u kardiorespiratornoj insuficijenciji i hemoragijskom šoku, i to nakon što je doživjelo izravan ugriz poskoka za vrat (94,109).

Otrovanje zmijskim otrovom medicinsko je stanje koje zahtijeva hitno zbrinjavanje. U trenutku ugriza žrtva bi trebala mirovati, ugrizno mjesto bi trebalo očistiti, te u slučaju ugriza za udove, ekstremitet bi trebao biti imobiliziran. Nije preporučeno ikakav drugi oblik alternativne i/ili laičke pomoći ili samopomoći na terenu. Ukupno 26% djece u našem istraživanju primilo je prvu medicinsku pomoć u izvanbolničkim uvjetima, dok je 74% istih prvu stručnu pomoć primilo u bolničkoj ustanovi (94). Određeni broj naših bolesnika primio je prvu pomoć na mjestu događaja od strane nestručne osobe i/ili si je pružio samopomoć, a raspodjela navedenog zabilježena je kako slijedi; 74,4% djece nije primilo nikakvu pomoć prije dolaska u medicinsku ustanovu, dok je 16,2% djece dovedeno liječniku s postavljenim podvezom (94). U 3,2% slučajeva opisano je isisavanje otrova iz ranica, te je u 6,2%

slučajeva prethodno isisan otrov uz naknadno stavljanje podveza (94). Zanimljivo je istaknuti kako imobilizacija ekstremiteta nakon ugriza otrovnice nije primijenjena niti u jednog djeteta. Ovakav oblik laičke prve pomoći nakon ugriza otrovnice koristi se vrlo rijetko u praksi, iako je primjena istog opravdana i vrlo važna. Naime, imobilizacijom se ekstremitet drži u mirnom položaju čime se sprječava brzo širenje otrova s mjesta ugriza u krvotok. Malina i sur. u Mađarskoj također su opisali različitu učestalost nestručne pomoći žrtvama na terenu (103). Kada je žrtvi pružena prva nestručna pomoć na mjestu događaja, bolesnika treba prevesti u najbližu zdravstvenu/medicinsku ustanovu kako bi se pružila stručna medicinska pomoć i liječenje.

U medicinskoj ustanovi bolesnik treba biti stalno nadziran (monitoriran) kako bi se na vrijeme uočili znakovi i simptomi otrovanja koji bi ukazali na razvoj umjerenog ili teškog sustavnog otrovanja, te kako bi se procijenila težina kliničke slike otrovanja i poduzele potrebne mjere liječenja. Prilikom dolaska u bolnicu svi naši bolesnici primili su antiviperini serum i antitetaničku profilaksu, a gotovo svi bolesnici primili su i antibiotike (96%), kortikosteroide (84%), te antihistaminike (71%; Tablica 14.) (94). Raspodjela bolesnika prema dozi antiviperinog seruma bila je sljedeća; 78,1% bolesnika primilo je jednu, 20,6% dvije i 1,3% djece primilo je tri doze specifičnog seruma (94).

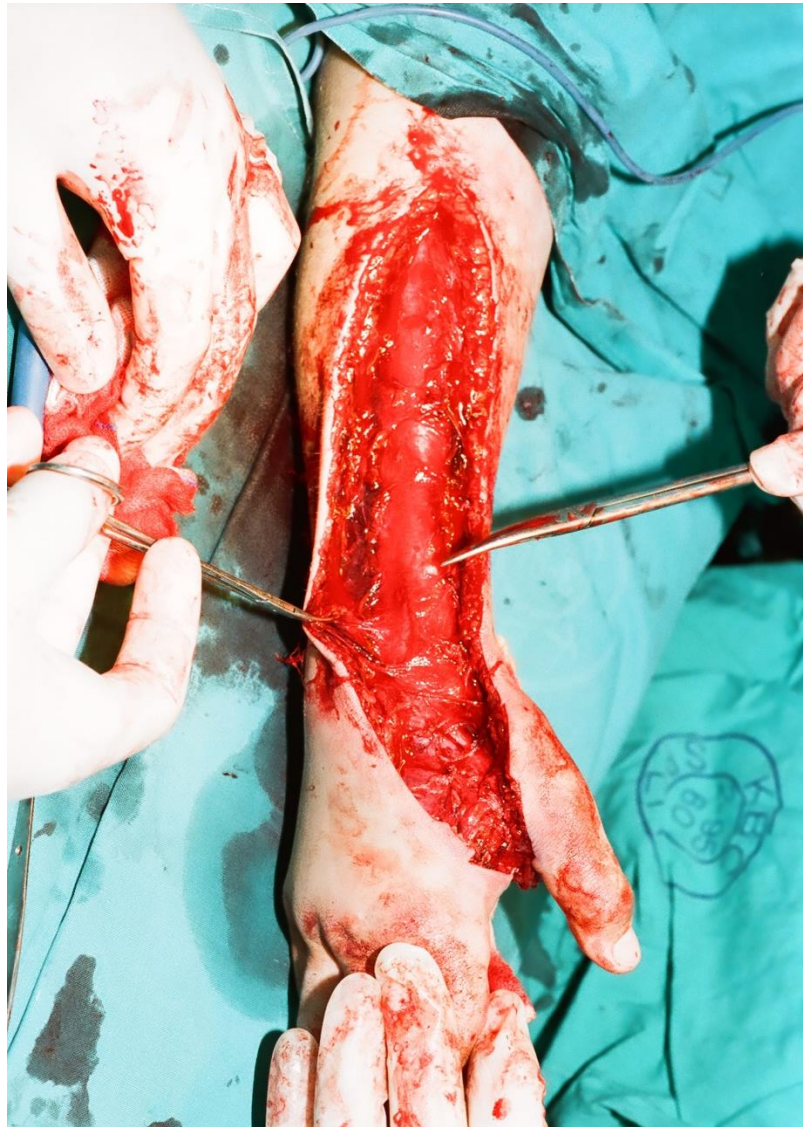
**Tablica 14.** Raspodjela primijenjenog liječenja u slučajevima ofidizma u djece (94).

Primijenjeno liječenje	N (%)
Antiviperini serum	160 (100)
Antitetanička profilaksa	160 (100)
Antibiotici	153 (96)
Kortikosteroidi	135 (84)
Antihistaminici	113 (71)
Kirurška intervencija	41 (26)

U našem istraživanju zabilježena je nešto češća primjena protuotrova nego što je to zabilježeno u drugim istraživanjima i preporukama u drugim zemljama (6,7,94,104,107,108). U našem području primjena antiviperinog seruma preporuča se u slučajevima srednje teške i

teške kliničke slike otrovanja, posebno u djece, stoga je uporaba istog zabilježena nešto češće nego što je to u skladnosti s težinom kliničke slike otrovanja. U istraživanju Lukšića i sur. sve žrtve zmijskog ugriza primile su antiviperini serum, a komplikacije nakon njegove primjene bile su rijetke (13). Druga brojna istraživanja opisala su različite preporuke za primjenu specifičnog protuotrova, kao i pojavu komplikacija nakon davanja istog. U istraživanju Tekina i sur. sve žrtve koja su doživjela ugriz zmijske *V. lebetinae* primila su protuotrov, dok ih je dvoje doživjelo alergijsku reakciju na primjenu istog (102). U suprotnosti s navedenim, druga istraživanja opisala su nisku učestalost davanja protuotrova. Paret i sur. opisali su primjenu antivenoma u 43% žrtava koji su doživjeli ugriz zmijske *V. palestinae* (107). Malina i sur. u Mađarskoj liječili su 31,1% žrtava specifičnim protuotrovom, a dva bolesnika (3,3%) doživjela su anafilaktičku ili anafilaktoidnu reakciju nakon primjene seruma (103). Boles i sur. u Francuskoj koristili su antiviperini serum Viperfav<sup>®</sup> u svim slučajevima umjerene i teške kliničke slike otrovanja u odraslih i djece, te nisu zabilježili anafilaktičke reakcije na primijenjeni serum, dok je dvoje bolesnika 9-11 dana nakon primanja seruma doživjelo serumsku bolest (116). De Haro i sur., kao i Jollivet i sur., nisu zabilježili niti jednu ranu kao ni kasnu alergijsku reakciju nakon primjene antiviperinog seruma Viperfav<sup>®</sup> (99,111). U ovom istraživanju korišten je antiviperini serum kojeg je proizvodio Imunološki zavod u Zagrebu, te nije zabilježena niti jedna rana i/ili kasna komplikacija nakon njegove primjene (94).

Izrazita oteklina na mjestu ugriza povećava tkivni tlak unutar tijesnog koštano-mišićnog prostora što može uzrokovati nastanak sindrom mišićnih odvojaka, tzv. kompartment sindrom (13,14,117). Kompartiment sindrom u odraslih i djece uobičajeno nastaje češće nakon ugriza za gornje udove (102,103). Ukupno 26% djece u našem istraživanju bilo je podvrgnuto kirurškoj intervenciji (94). Najučestaliji kirurški zahvat bila je incizija hemoragične bule (15,6%), a potom je slijedila fasciotomija (7,5%) koja je bila izvršena u svim slučajevima nastanka kompartment sindroma (Slika 9.) (94).



**Slika 9.** Fasciotomija na području desne podlaktice izvršena u trinaestogodišnjeg dječaka koji je doživio ugriza poskoka. Izvorna fotografija.

Malina i sur. u Mađarskoj zabilježili su izvođenje fasciotomije u 8,3% bolesnika koji su doživjeli ugriz egzotične zmiје, te nisu zabilježili niti jedan slučaj nastanka kompartment sindroma u žrtava izloženih ugrizu zmiја *V. berus* i *V. ursinii* u općoj populaciji (103). Ozay i sur. u Turskoj opisali su također relativno visok postotak nastanka kompartment sindroma (9,1%) i to nakon ugriza europskih zmiја otrovnica u djece (113). U istraživanju Tekina i sur. kompartment sindrom bio je najčešća zabilježena komplikacija zmijskog ugriza u odraslih nakon ugriza *V. lebetine*; opisan u 3% slučajeva, dok su Paret i sur. u Izraelu zabilježili 5,4% slučajeva nastanka kompartment sindroma u djece nakon ugriza *V. palestinae* (102,107).

Nasuprot tome, Campbell i sur. u Sjedinjenim Američkim Državama opisali su vrlo nisku učestalost izvođenja fasciotomije (1,8%) u djece izložene zmijskom ugrizu općenito (104). Lukšić i sur. u Hrvatskoj opisali su pojavu nastanka kompartment sindroma u 1,8% žrtava ugriza europskih otrovnica, te je u svih napravljena fasciotomija (13). Izvođenje kirurških intervencija samo po sebi u načelu može uzrokovati komplikacije i trajna oštećenja, stoga se trebaju racionalno koristiti i primjenjivati samo u bolesnika s objektivnim indikacijama. Fasciotomija bi trebala biti napravljena u svih bolesnika s kliničkom slikom kompartment sindroma u kojih je isti procijenjen neurovaskularnim pregledom, te potvrđen mjerenjem tlaka u mišićnom odvojkju koji iznosi više od 30 mmHg (13,104). U naših bolesnika procjena nastanka kompartment sindroma izvršena je samo kliničkom procjenom neurovaskularnog statusa, dok tlak mišićnog odvojka nije bio mjeren zbog nedostupnosti uređaja (94). Nekrektomija (2,5%) je u naših bolesnika rađena samo u slučajevima izrazito opsežne nekroze kože i mišića na mjestu ugrizne rane (94). U našem istraživanju nije zabilježeno izvođenje amputacije dijela ili čitavog ekstremiteta (94). Svi bolesnici koji su bili liječeni kirurškim postupcima uspješno su se oporavili (94).

#### **1.4. Kardiotoksični učinak cjelokupnog otrova *Vipera ammodytes ammodytes***

Kardiovaskularni šok jedan je od najozbiljnijih posljedica ugriza poskoka, te je opisan kao druga po učestalosti najzastupljenija komplikacija sustavnog otrovanja u djece (94,99,113). Do sada opisani slučajevi teške kliničke slike otrovanja i smrtnih ishoda, svjedoče o važnosti možebitnog izravnog kardiotoksičnog djelovanja otrova (94,109). Naime, srčana insuficijencija i pojava šoka, patofiziološka su objašnjenja nastanka smrtnih slučajeva uz patohistološku potvrdu izravnog oštećenja srca (13,94). U srednje teškoj i/ili teškoj kliničkoj slici sustavnog otrovanja uzrokovanim ugrizima zmija podobitelji *Viperinae* do sada su opisani i različiti poremećaji (kardio)vaskularne funkcije, kao primjerice poremećaji srčanog ritma, hipertenzivne krize, infarkt miokarda s uzdignućem ST spojnice, nebakterijski trombotični endokarditis, tamponada srca, kao i stanja prijetećeg šoka (13,94,109,118-120). Točna sastavnica otrova *V. a. ammodytes* odgovorna za navedene (kardio)toksične manifestacije otrovanja, do sada nije izolirana, no postoje teorije prema kojima su proteini iz skupine sekretornih fosfolipaza A<sub>2</sub>, kao što su primjerice amoditini – poznate miotoksične sastavnice otrova, možebitne tvari odgovorne za srčana oštećenja (85,121).



U pretkliničkim istraživanjima uobičajeno su nakon izlaganja životinjskih modela otrovima zmijski podobitelji *Viperinae* zabilježeni nagli pad arterijskog tlaka praćen nespecifičnim promjenama srčanog ritma (122-126). Navedena oskudna istraživanja bila su izvođena u tehnički nekontroliranim uvjetima uz uporabu nestandardiziranog otrova poskoka čime su u današnjima vremenima zastarjela i time nedovoljno predstavljajuća. Lukšić i sur. već su ranije opisali o dozi ovisne kardiotoksične učinke nastale nakon izlaganja štakorskog srca čitavom, standardiziranom otrovu poskoka, naglašavajući depresiju srčane kontraktilnosti i elektrofiziološku nestabilnost (127). Kako bi se pomnije istražili ovi učinci, u ovom istraživanju, biokemijskim postupcima razdijeljen je cjelokupni otrov poskoka na pojedine sastavnice, te su u različitim dozama primijenjene iste na modelu izoliranog štakorskog srca s ciljem istraživanja koja sastavnica, te s kakvim učinkom djeluje na mjerene pokazatelje srčane funkcije. Naime, do sada nisu poznate sastavnice otrova poskoka koje uzrokuju izravna srčana oštećenja.

## **2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA**

Glavni ciljevi ovog istraživanja su sljedeći:

- usporediti razlike u srčanoj funkciji i/ili oštećenju na modelu izoliranog štakorskog srca izloženom različitim izoliranim (pod)frakcijama cjelokupnog otrova poskoka
- utvrditi razlike u približnoj molekularnoj masi izoliranih (pod)frakcija otrova.

Sporedni ciljevi ovog istraživanja su sljedeći:

- utvrditi o dozi ovisan kardiotsični učinak pojedinih izoliranih (pod)frakcija cjelokupnog otrova poskoka
- istražiti učinak amoditina L na srčanu funkciju na modelu izoliranog štakorskog srca.

Hipoteze u ovom istraživanju su sljedeće:

- jedna od izoliranih sastavnica cjelokupnog otrova poskoka čija molekularna masa iznosi približno 14-15 kDa uzrokuje značajna oštećenja srca na modelu izoliranog štakorskog srca u odnosu na druge sastavnice, te je ta tvar, vjerojatno amoditin, možebitni vodeći kardiotsin u cjelokupnom otrovu poskoka
- možebitno izolirana kardiotsična tvar iskazuje o dozi ovisan učinak.

### **3. MATERIJALI I POSTUPCI**

### 3.1. Ustroj istraživanja

U svrhu istraživanja učinaka pojedinih izoliranih sastavnica cjelokupnog otrova poskoka na pokazatelje srčane funkcije i/ili oštećenja na modelu izoliranog štakorskog srca provedeno je prema pristupu i specifičnom ustroju temeljno eksperimentalno, a prema razini i namjeni primijenjeno istraživanje. Prema načinu dobivanja podataka ovo istraživanje je intervencijsko, a u odnosu na vremensku orijentaciju prospektivno. Uključivanje u istraživanje bilo je randomizirano. Za potrebe ovog istraživanja korišteni su primarni izvori podataka; rezultat su prikupljanja vlastitih podataka.

### 3.2. Ishodi istraživanja

S obzirom kako je glavni cilj ovog istraživanja usporediti razlike u srčanoj funkciji i/ili oštećenju između različitih izoliranih sastavnica čitavog otrova poskoka, glavna mjera ishoda je kardiotsičnost. Također, cilj je i utvrditi razlike u približnoj molekularnoj masi (kDa) (pod)frakcija što je provedeno elektroforezom izoliranih sastavnica otrova poskoka.

Kardiotsičnost je u ovom istraživanju iskazana elektrofiziološkim, kontraktilnim i biokemijskim pokazateljima oštećenja na način kako slijedi.

- Elektrofiziološki pokazatelji srčane funkcije i/ili oštećenja – vrsta srčanog ritma i pojava aritmija (sinus ritam, atrijsko-ventrikularni blok, ventrikularna tahikardija i fibrilacija, asistolija; broj i postotak), kao i srčana frekvencija (otkucaj/min).
- Mjereni pokazatelji kontraktilne funkcije – tlakovi u lijevoj klijetci (sistolčki, razvijeni tlak lijeve klijetke, te dijastolički tlak – mmHg), kao i vrijednosti koronarnog protoka (mL/min).
- Biokemijski pokazatelji srčanog oštećenja iz odljeva srčanog perfuzata – kreatin kinaza – CK (IU/L), laktat dehidrogenaza – LDH (IU/L), aspartat aminotransferaza – AST (IU/L) i troponin I ( $\mu\text{g/L}$ ).

S obzirom kako je sporedni cilj istraživanja utvrditi o dozi ovisan možebitni kardiotsični učinak pojedinih (pod)frakcija, svaka od izoliranih sastavnica ispitivana je na modelu izoliranog štakorskog srcu u tri različite koncentracije. Također, cilj je istražiti i

učinak amoditina L na modelu izoliranog štakorskog srca što je provedeno mjerenjem navedenih elektrofizioloških, kontraktilnih i biokemijskih pokazatelja srčane funkcije.

### **3.3. Protokol čitavog istraživanja**

Protokol cjelokupnog istraživanja izveden je kako slijedi:

1. Pretraživanje literature i plan istraživanja
2. Biokemijski postupci razdiobe cjelokupnog otrova poskoka
3. Elektroforeza izoliranih sastavnica otrova poskoka
4. Priprema različitih koncentracija izoliranih sastavnica otrova poskoka
5. Mjerenja na modelu izoliranog štakorskog srca
6. Prikaz i statistička raščlamba dobivenih podataka
7. Tumačenje rezultata
8. Izrada izvornih znanstvenih radova.

### **3.4. Snaga istraživanja**

Procjena potrebne veličine uzorka, uz  $\alpha$ -grešku od 0,05 i snagu istraživanja od 80%, sukladna je radu Lukšića i sur. na čije zaključke se i nastavlja ovo istraživanje (3,127). Za svaku ispitivanu koncentraciju svake pojedine izolirane sastavnice otrova korišteno je po deset štakora. Kontrolnu skupinu životinja činilo je deset štakora.

### **3.5. Materijali**

#### **3.5.1. Kemijske tvari i otopine**

Sve kemijske tvari, otopine i puferi upotrebljavani u ovom istraživanju navedeni su abecedno i prikazani u Tablici 15.

**Tablica 15.** Kemijske i biološke tvari upotrebljavane u ovom istraživanju.

Tvar	Proizvođač, grad i zemlja podrijetla proizvođača
Acetonitril	Sigma-Aldrich, St. Louis, Montana, SAD
AcOH, 100% (v/v)	Merck, Darmstadt, Njemačka
Agaroz	Sigma-Aldrich, St. Louis, Montana, SAD
AgNO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Montana, SAD
Akrilamid	Serva, Heidelberg, Njemačka
APS	Serva, Heidelberg, Njemačka
BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis, Montana, SAD
CaCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Montana, SAD
DTT	BioVectra Inc., Charlottetown, Kanada
EDTA	Serva, Heidelberg, Njemačka
EtOH, 96% (v/v)	Carlo Erba, Rodano, Italija
Formaldehid	Merck, Darmstadt, Njemačka
Glicin	Serva, Heidelberg, Njemačka
Glicerol	Carlo Erba, Rodano, Italija
Glukoza	Merck, Darmstadt, Njemačka
HCl, 37% (v/v)	AllpiChem GmbH, Darmstadt, Njemačka
Heparin	Hospitalia, Zagreb, Hrvatska
Imidazol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Montana, SAD
Inzulin	Hospitalia, Zagreb, Hrvatska
KCl	Merck, Darmstadt, Njemačka
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, Njemačka
Limunska kiselina	Serva, Heidelberg, Njemačka
Manitol	Kemika, Zagreb, Hrvatska
MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt, Njemačka
MgSO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, Njemačka
NaCl	Merck, Darmstadt, Njemačka
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Serva, Heidelberg, Njemačka
NaHCO <sub>3</sub>	Serva, Heidelberg, Njemačka
NaOH	Merck, Darmstadt, Njemačka
Natrijev piruvat	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka
Otrov poskoka	Imunološki zavod, Zagreb, Hrvatska

Tvar	Proizvođač, grad i zemlja podrijetla proizvođača
Proteinski standardi	Fermentas, Vilnius, Lithuania
Saharoza	Serva, Heidelberg, Njemačka
SDS	Serva, Heidelberg, Njemačka
TEMED	Merck, Darmstadt, Njemačka
TFA	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD
Tiurea	AllpiChem GmbH, Darmstadt, Njemačka
Trietilamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Montana, SAD
Tripsin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Montana, SAD
TRIS	Sigma-Aldrich, St. Louis, Montana, SAD
Urea	Kemika, Zagreb, Hrvatska
Uretan	Kemika, Zagreb, Hrvatska
ZnCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Montana, SAD

### 3.5.2. Otrovi poskoka

Cjelokupni standardizirani otrov poskoka (*V. a. ammodytes*) dobiven je iz Imunološkog zavoda u Zagrebu. Otrovi su prikupljeni ručnom mušnjom poskoka (Slika 10.).

Korištene su zmijske s krapinskog i samoborskog područja u navedenom omjeru: 70% otrova (0,7 g) dobiveno je iz Krapine (Krapina – Krapina, Krapinsko-zagorska županija, Republika Hrvatska), a 30% (0,3 g) iz Samobora (Brezje – Sveta Nedelja, Zagrebačka županija, Republika Hrvatska). Ukupan otrov u kristaloidnom obliku (1 g) bio je pohranjen u tamnim i suhim bočicama, te čuvan na tamnom i hladnom mjestu pri temperaturi + 4 °C sve do daljnje uporabe u istraživanju. Otopine otrova korištene u pokusima na izoliranom srcu pripremane su prije svakog pojedinog pokusa otapanjem suhog otrova u 1 mL modificirane Krebs-Henseleitovoj otopine sljedećeg sastava: 120 mM NaCl, 23 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2 mM natrijevog piruvata, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5,9 mM KCl, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,4 mM CaCl<sub>2</sub>, 11,5 mM glukoze, 16 mM manitola, te 5 IU/L inzulina.





**Slika 10.** Manualna mužnja otrova poskoka. Izvorna fotografija.

### 3.5.3. Pokusne životinje

U ovom istraživanju korišteni su laboratorijski štakori roda *Rattus*, vrste *Rattus norvegicus*, bijele (albino) boje krzna koji su bili standardizirani nesrođeni sojevi. Sve pokusne životinje bili su mužjaci, tjelesne mase  $300 \pm 20$  g, starosti 12-15 tjedana. Hranili su se svakodnevno s 12-20 g suhe hrane nabavljene od registriranog proizvođača te 40-50 mL vode. Hranu i vodu uzimali su *ad libitum*. Pokusne životinje boravile su u nastambi za životinje na Katedri za farmakologiju Medicinskog fakulteta u Mostaru, te su bile podjednako izložene dnevnom svjetlu i tami (12 sati/12 sati) pri sobnoj temperaturi od  $24 \pm 0,2$  °C. Tijekom pokusa životinje su bile pošteđene bilo kakvog nepotrebnog stresa i/ili boli, a vodeći brigu o istima u pokuse je bio uključen minimalan broj životinja potreban za znanstvena zaključivanja.

### **3.5.3.1. Etička načela**

Ovo znanstveno istraživanje sukladno je svim primjenjivim svjetskim i europskim smjernicama i preporukama čiji je cilj osigurati pravilno ophođenje i rukovanje s pokusnim životinjama. Također, sukladno je dokumentu *Međunarodni pregled principa za biomedicinska istraživanja u kojima se koriste laboratorijske životinje* koje je donijelo Vijeće međunarodnih organizacija za medicinske znanosti (*Council for International Organization of Medical Sciences*; CIOMS), a što je u skladu sa *Zakonom o dobrobiti životinja* i *Zakonom o zaštiti životinja* i važećim zakonima u Republici Hrvatskoj i državi u kojoj se istraživanje provodi te s pravilnicima, smjernicama i zakonima Europske unije. Ovo istraživanje odobrilo je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Mostaru (Ur. br.: 01-1-359/16), a sukladno odredbi članka 16. Etičkog kodeksa Medicinskog fakulteta u Splitu Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Splitu (Ur. br.: 2181-198-03-04-16-0014) potvrdilo je suglasnost kako je ovo istraživanje u skladu s odredbama Etičkog kodeksa koji usklađuje istraživanja na ljudima i životinjama u znanstvenom, istraživačkom i stručnom radu i etičkim načelima Helsinške deklaracije.

### **3.5.4. Laboratorijska oprema**

Sva laboratorijska oprema upotrebljavana u ovom istraživanju navedena je abecedno i prikazana u Tablici 16.

**Tablica 16.** Laboratorijska oprema upotrebljavana u ovom istraživanju.

Naziv uređaja	Proizvođač, grad i zemlja podrijetla proizvođača
Acidobazni uređaj	IL-1610 Instrumentation Laboratory, Milano, Italija
BioRad	Bio-Rad, Hercules, California, SAD
Dimension Xpand Plus Siemens	Siemens Inc., Malvern, Pennsylvania, SAD
Fraction Collector Frac-100	Amersham Biosciences AB, Uppsala, Švedska
Hewlett-Packard Series 1100	GMI, Ramsey, Minnesota, SAD
MiVac Duo Concentrator	SP Scientific Industries, Warminster, Pennsylvania, SAD
NaNoDrop 2000c UV/VIS Spectrophotometer	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD
Olympus AU 2700	Diamond Diagnostic, Holliston, Massachusetts, SAD
Rotina 380/380R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Njemčka
RP-C4 kolona	PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, SAD
Sephacryl S-200 Superfine	GE Healthcare Bio-Science, Pittsburgh, Pennsylvania, SAD
Supradex 75 10/300 GL	GE Healthcare Bio-Science, Pittsburgh, Pennsylvania, SAD
Vaga	Tehtnica, Slovenija
Vakuumski koncentrator	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD

### 3.6. Postupci

#### 3.6.1. Biokemijski postupci razdiobe cjelokupnog otrova poskoka

##### 3.6.1.1. Kolonska gelska kromatografija

U ovom istraživanju čitav otrov poskoka mase 1 g u kristaloidnom obliku bio je rastopljen u 15 mL otopine pufera sljedećeg sastava: 20 mM TRIS, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 300 mM

NaCl, pH 7,0. Ovakva neutralna otopina čitavog otrova potom se analizirala kolonskom gelskom kromatografijom, te su dobivene pojedine sastavnice – frakcije otrova; u ovom istraživanju nazvane frakcija A, B, C i D (vidjeti poglavlje *Rezultati*). Dakle, navedena otopina čitavog otrova poskoka stavljena je na kolonu *Sephacryl-S200 Superfine* duljine 100 cm i promjera 4 cm, te je prolazila navedenom kolonom protokom 0,56 mL/min. Čitav proces odvijao se tijekom noći pri temperaturi okoline od + 4°C. Pomoću kolektora *Fraction Collector Frac-100* svakih 15 minuta u pojedinu epruvetu odvajao se određeni volumen otopine (mL) za pojedinačni uzorak. Potom je svakom uzorku iz epruvete posebno mjerena apsorbanca na valnoj duljini od 280 nm ( $A_{280}$ ) na uređaju *NaNo Drop 2000c UV/VIS Spectrophotometer*. Ovakvim postupkom uzorci sličnih apsorbance – istog vrha, udruženi su u jedan, zajednički vrh na kromatogramu, u ovom istraživanju redom nazvan; frakcija A, B, C i D (vidjeti poglavlje *Rezultati*). Također, tijekom izvođenja kolonske gelske kromatografije prilikom eluiranja frakcije C zabilježena su četiri različita vrha; u ovom istraživanju nazvani podfrakcija C1, C2, C3 i C4 (vidjeti poglavlje *Rezultati*).

### 3.6.1.2. RP HPLC

U ovom istraživanju u svrhu razdvajanja podfrakcija C1-4 na pojedine sastavnice korišten je postupak tekućinske kromatografije pod visokim tlakom na obrnutoj fazi (*engl. reverse phase high performance liquid chromatography*; RP HPLC) izvršen na uređaju *Hewlett-Packard Series 1100*, koji je prikazan na Slici 11.

Podfrakcije C1-4 analizirane su na RP-C4 koloni (Aquapore BU-300, 30 x 4,6 mm, 7 cm), koja je prethodno bila uravnotežena ispiranjem s 0,1% (v/v) otopinom TFA u vodi (otopina A). 500  $\mu$ L svake podfrakcije razrijeđeno je otopinom A do 1 mL i stavljeno na RP-C4 kolonu uz protok od 1 mL/min. Vezane sastavnice eluirale su se otopinom B (90% acetonitril u otopini A) uz isti protok koristeći sljedeće linearne gradijente: 0 – 20% u 5 min; 20 – 45% u 15 min; 45 – 60% u 5 min; 60 – 100% u 5 min. Proteini i peptidi zabilježeni su praćenjem apsorbance na 215 nm. Frakcije su ručno prikupljane i sušene u vakuumskom koncentratoru. Razdioba je izvršena na sobnoj temperaturi pri  $24 \pm 0,1$  °C.



**Slika 11.** Uređaj za RP HPLC korišten u ovom istraživanju. Izvorna fotografija.

### 3.6.2. Izračun korištenih koncentracija izoliranih sastavnica otrova poskoka

U cilju utvrđivanja o dozi ovisnih možebitnih kardiotoksičnih učinaka pojedinih sastavnica otrova poskoka na modelu izoliranog štakorskog srca, svaka izolirana frakcija i podfrakcija priređena je u tri različite koncentracije i to na sljedeći način. U radu Lukšića i sur. opisan je o dozi; korištenjem tri različite doze (3, 9 i 15 mg/mL), ovisan kardiotoksični učinak cjelokupnog standardiziranog otrova poskoka (3,127). Otapanjem suhog otrova u 1 mL modificirane Krebs-Henseleitovoj otopine, otopina otrova injicirala se u srčani perfuzat tijekom deset minuta kao 1% od ukupnog koronarnog protoka, stoga je svako pojedino srce tijekom pokusa bilo izloženo konačnim koncentracijama od 30, 90 i 150 µg/mL (3,127).

Iz kromatograma izrađenog u ovom istraživanju (vidjeti poglavlje *Rezultati*) vidljivo je kako svaka pojedina izolirana frakcija (A, B, C i D) čini udio od 25% od ukupnog otrova poskoka, te su u ovom istraživanju korištene doze od 0,75, 2,25 i 3,75 mg/mL za svaku izoliranu frakciju, stoga je svako ispitivano srce naposljetku bilo izloženo konačnim koncentracijama od 7,5, 22,5 i 37,5 µg/mL svake izolirane frakcije otrova. Također, iz kromatograma izrađenog u ovom istraživanju razvidno je kako podfrakcija C1 čini 30% od ukupne frakcije C, podfrakcija C2 16%, podfrakcija C3 21%, a podfrakcija C4 33% od cjelokupne frakcije C otrova poskoka (vidjeti poglavlje *Rezultati*). Temeljem navedenog izračunate su doze za svaku podfrakciju C1-4. Jasan prikaz konačnih koncentracija podfrakcija kojima je bilo izloženo svako izolirano štakorsko srce naveden je u Tablici 17.

**Tablica 17.** Pregledni prikaz konačnih koncentracija podfrakcija otrova poskoka.

Podfrakcija	Koncentracija (µg/mL)		
	Najniža	Srednja	Najviša
C1	2,3	6,8	11,3
C2	1,2	3,6	6,0
C3	1,6	4,7	7,9
C4	2,5	7,4	12,4

### 3.6.3. Elektroforeza izoliranih sastavnica otrova poskoka

U cilju istraživanja molekularne mase proteinskih sastavnica otrova poskoka izolirane frakcije i podfrakcije analizirane su gel elektroforezom u prisutnosti natrij-dodecil sulfata – SDS-PAGE na 12,5% (w/v) poliakrilamidnom gelu u redukcijskim i neredukcijskim uvjetima (128).

Gel za elektroforezu napravljen je na sljedeći način (ukupan volumen otopine 10 mL): 3,175 mL 4% akrilamida, 2,5 mL 1,5 M TRIS/HCl, pH 8,8, 100 µL 10% natrij-dodecil sulfata, 7,5 µL TEMED, 50 µL APS, te 4,1675 mL destilirane vode, a pufer također kako slijedi (ukupan volumen otopine 1 L): 30,3 g TRIS, 144 g glicina, 10 g SDS, te destilirana vode koliko je potrebno do konačnog volumena.

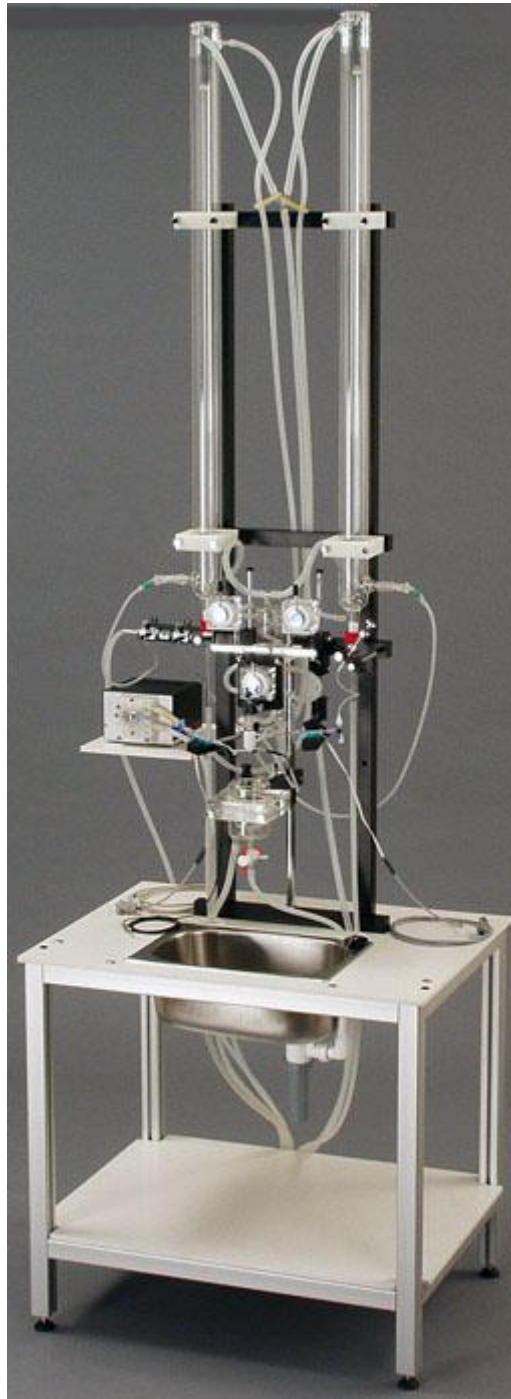
SDS-PAGE analiza izvršena je na uređaju BioRad s jakošću struje od 20 mA pri sobnoj temperaturi  $24 \pm 0,1$  °C tijekom 45 min. Potom je gel tijekom 30 min fiksiran u otopini koja se sastojala od 100 mL 30% etanola i 100 mL 10% octene kiseline, a zatim je tijekom 10 min ispiran destiliranom vodom. Tada je gel tijekom narednih 30 min stavljen u otopinu koja je sadržavala 100 mL destilirane vode sa 500 µL DTT, a potom je isti tijekom 60 min stavljen u otopinu koja se sastojala od 100 mL destilirane vode i 100 mg srebrovog nitrata. Razvijanje gela izvršeno je u otopini koja je sadržavala 3% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i 0,05% formaldehid, a reakcija je prekinuta sa 5 g limunske kiseline u trenutku kada su linije postale dovoljno jasno vidljive. Korišteni proteinski standardi za određivanje približne molekularne mase izoliranih sastavnica nabavljeni su od tvrtke Fermentas. Proteini su obojani srebrovim nitratom prema uputi proizvođača (128).

### 3.6.4. Amoditin L iz cjelokupnog otrova poskoka

Amoditin L dobiven je kao već izolirana tvar iz cjelokupnog standardiziranog otrova poskoka i korišten je u koncentraciji od 100 µg/mL (90,129,130). S obzirom na prikazani model izoliranog štakorskog srca svako srce je tijekom pokusa bilo izloženo konačnoj koncentraciji amoditina L u iznosu od 1,0 µg/mL.

### 3.6.5. Model izoliranog štakorskog srca

Čitav sustav na kojem su rađena mjerenja na Langendorffovom modelu izoliranog štakorskog srca prikazan je na Slici 12.



**Slika 12.** Sustav za mjerenje na Langendorffovom modelu srca (3).



Pokusne životinje su nakon intraperitonealne primjene uretana (1,2 g/kg) i 1000 IU heparina postale neosjetljive na bolni podražaj, stoga je započet postupak izolacije (ekstripacije) srca. Kanulirala se aorta distalno od aortalnih zalistaka i odmah je započeta retrogradna perfuzija. Gornja i donja šuplja vena podvezale su se, te potom distalno od podveza i presjekle, a srce se oslobodilo i izvadilo iz tijela štakora.

Sva štakorska srca tijekom ovog pokusa bila su perfundirana modificiranom Krebs-Henseleitovom otopinom pri stalnom perfuzijskom tlaku od 50 mmHg koji je bio mjereno na razini aortne kanule. Sastav perfuzat naveden je kako slijedi: 120 mM/L NaCl, 23 mM/L NaHCO<sub>3</sub>, 2 mM/L natrijevog piruvata, 1,2 mM/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5,9 mM/L KCl, 1,2 mM/L MgSO<sub>4</sub>, 1,4 mM/L CaCl<sub>2</sub>, 11,5 mM/L glukoze, 16 mM/L manitola te 5 IU/L inzulina. Prije utoka u srce perfuzat je bio filtriran na disk filterima s porama veličine 5 µm. Temperatura perfuzata i kupelji u koju je srce bilo uranjano tijekom pokusa bila je 37 ± 0,2 °C, a održavala se termostatom i zagrijanom cirkulirajućom vodom. U perfuzat se neprekidno dovodila smjesa plinova 96% O<sub>2</sub> i 4% CO<sub>2</sub>. Parcijalni tlak kisika u otopini iznosio je 580-610 mmHg, a pH otopine bio je 7,35-7,45.

Tlakovi u lijevoj klijetci mjerili su se izovolumetrijskim pretvaračem spojenim na lateks balon ispunjen tekućinom koji je kroz otvor na lijevoj pretklijetci, te kroz mitralni zalistak bio uvučen u lijevu klijetku i tu pričvršćen. Volumen balona namještao se tako da dijastolički tlak lijeve klijetke tijekom početnog razdoblja bude 0 mmHg (3,131). Temeljem izmjenjenog sistoličkog i dijastoličkog tlaka lijeve klijetke izračunata je vrijednost pulsno tlaka koja je predstavljala razliku između navedenih tlakova (mmHg). Tlak otopljenog O<sub>2</sub> i pH perfuzijske otopine mjerio se u određenim vremenskim točkama na acidobaznom uređaju. U ovom istraživanju mjereni su sljedeći tlakovi u lijevoj klijetci (engl. *left ventricular pressure*; LVP) izraženi u mmHg; sistolički (engl. *systolic left ventricular pressure*; sLVP), razvijeni tlak lijeve klijetke (engl. *developed left ventricular pressure*; devLVP), te dijastolički tlak lijeve klijetke (engl. *diastolic left ventricular pressure*; dLVP).

Elektrokardiografska aktivnost pretklijetki i klijetki, prikazana na Slici 13., pratila se putem dva para bipolarnih srebrnih elektroda obloženih teflonom, promjera 125 µm, koje su se subepikardijalno postavile na desnu pretklijetku i desnu klijetku. Iz elektrokardiografskog zapisa određivali su se srčani ritam i frekvencija, vrsta aritmije, te atrijsko-ventrikularno (AV) vrijeme provođenja (ms). Elektronski pojačani signali iz elektroda bilježili su se i usporedno prikazivali na osciloskopu i zaslonu računala. Ritam i frekvencija pretklijetki određivala se

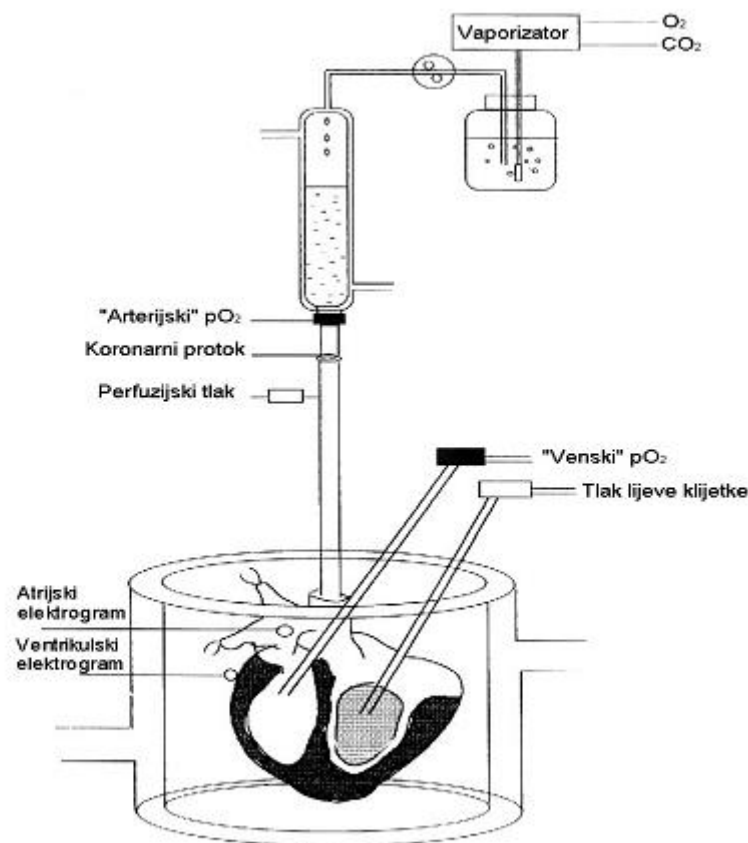
mjerenjem vremenskog razdoblja između otkucaja pretkljetke zabilježenih kao otkucaj/min. AV vrijeme provođenja (ms) predstavljao je vrijeme između bilježenja signala desne pretkljetke i desne kljetke. U cilju analiziranja srčanog ritma bilježene su sljedeće fiziološke i/ili patološke promjene ritma (broj, %): sinus ritam, AV blok, ventrikularna tahikardija i fibrilacija, te srčani arrest (asistolija).



**Slika 13.** Primjer elektrokardiografske aktivnosti srca na korištenom modelu srca. Izvorna fotografija.

Sinus ritam definiran je kao pravilna ritmična aktivnost srca. AV blok označavao je djelomično ili potpuno razdvajanje elektrokardiografske aktivnosti pretkljetke i kljetke. Ventrikularna tahikardija definirala se kao prisutnost četiri i/ili više uniformnih i/ili multiformnih signala iz kljetke s frekvencijom većom od frekvencije pretkljetke (otkucaj/min). Prisutnost kaotične električne aktivnosti kljetke uz odsutnost mjerljive kontraktilne aktivnosti lijeve kljetke smatrala se ventrikularnom fibrilacijom. Srčani arrest (asistolija) bio je definiran kao odsutnost mjerljive električne i mehaničke aktivnosti pretkljetke i kljetke (3,131).

Koronarni protok (engl. *coronary flow*; CF) – mL/min, mjerio se ultrazvučnim mjerjačem smještenim u liniji koronarnog utoka (Slika 14.). Perfuzijski tlak otopine (mmHg) stalno se, radi provjere, mjerio pretvaračem u razini srca.

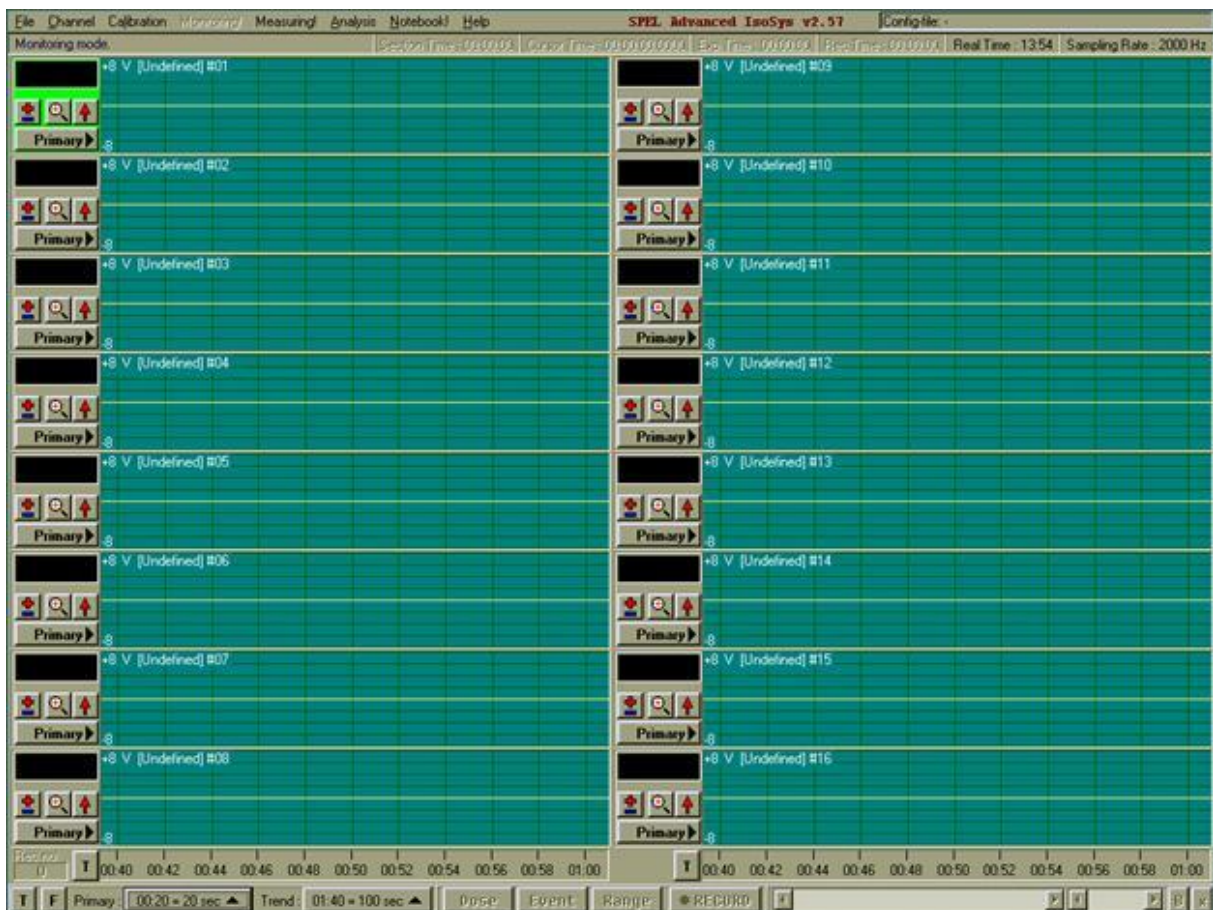


**Slika 14.** Model izoliranog štakorskog srca (3).

Prikupljanje perfuzata iz koronarnog sinusa vršilo se cjevčicom uvedenom u desnu klijetku kroz ušće plućne arterije, a uz već podvezanu gornju i donju šuplju venu (3,131). U prikupljenim uzorcima odljeva srčanog perfuzata, radi utvrđivanja biokemijskih pokazatelja možebitnog srčanog oštećenja ili praćenja srčane funkcije, mjereni su sljedeći pokazatelji; kreatin kinaza – CK (IU/L), laktat dehidrogenaza – LDH (IU/L), aspartat aminotransferaza – AST (IU/L) i troponin I ( $\mu\text{g/L}$ ). Uzorci odljeva iz srčanog perfuzata prikupljeni su u trećoj

minuti od početka davanja možebitno toksične tvari. Za određivanje enzima CK, LDH i AST u navedenim uzorcima koristio se dijagnostički test tvrtke Olympus (Cork, Irska) na uređaju Olympus AU 2700. Za određivanje vrijednosti troponina I u uzorcima odljeva iz srca koristio se dijagnostički test tvrtke Dade Behring (Beč, Austrija) na uređaju Dimension Xpand Plus Siemens.

Elektrokardiografska aktivnost, koronarni protok, te kontraktilni pokazatelji pomoću analogno – digitalnog pretvarača, prikazivali su se na zaslonu i bilježili u računalu za kasniju detaljniju raščlambu (Slika 15.).



**Slika 15.** Prikaz mjerenih pokazatelji na zaslonu računala. Izvorna fotografija.

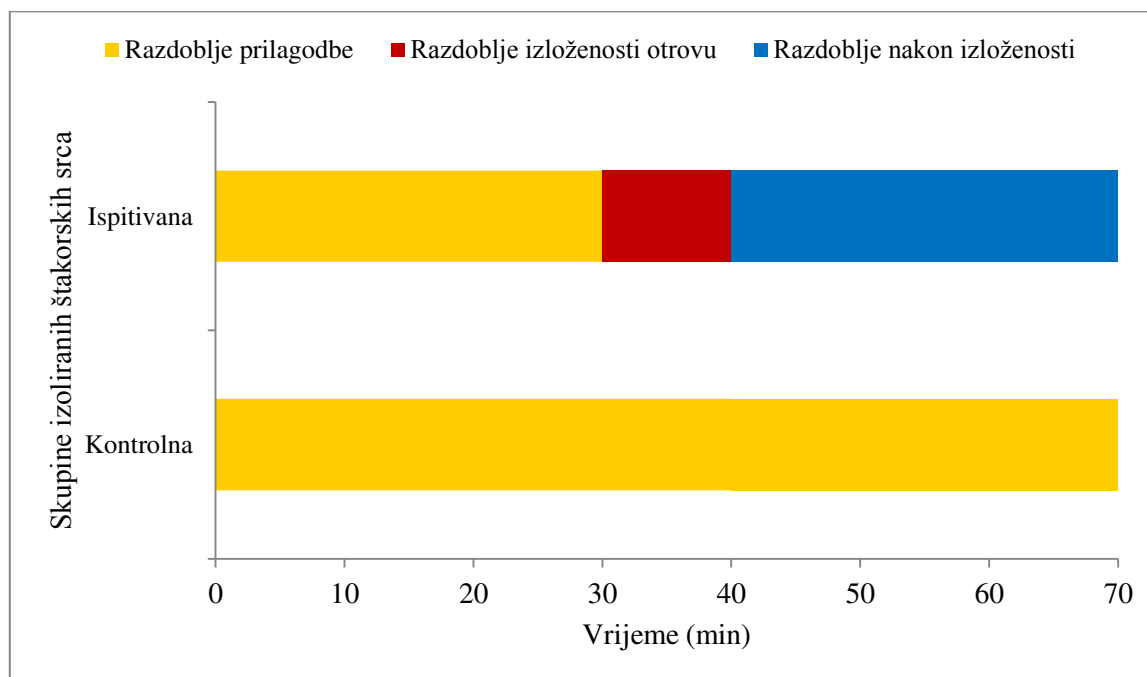
U prvom dijelu istraživanja ispitivan je učinak svake izolirane frakcije (A, B i C) na modelu izoliranog srca štakora u tri različite koncentracije kako je i ranije navedeno. Nakon

što je ispitan učinak svih izoliranih frakcija, a kako se učinak čitave frakcije C pokazao kao sastavnica koja ima najizraženiji kardiotoksični učinak (vidjeti poglavlje *Rezultati*), u drugom dijelu istraživanja ispitan je učinak svake od izoliranih podfrakcija C1-4 također u tri različite koncentracije. Također, u drugom dijelu istraživanja ispitan je i učinak amoditina L u jednoj koncentraciji kako je ranije navedeno.

Frakcija D zbog svoje male molekularne mase (< 0,5 kDa) bila je nestabilna za čuvanje u puferu, te nije korištena u ovom istraživanju. Također, unutar frakcije D već je ranije izolirana samo jedna sastavnica; kratki peptid nazvan pEKW (engl. *pyroglutamic acid-Lysine-Tryptophan*; *pyroGlu-Lys-Trp*) za kojeg je poznato kako je reverzibilni inhibitor metaloproteinaza (23).

### 3.6.6. Protokol primjene izoliranih sastavnica otrova poskoka

Kontrolna skupina izoliranih srca (N = 10) nije bila izložena niti jednoj ispitivanoj tvari, a pokazatelji srčane funkcije promatrani su tijekom sedamdeset minuta (Slika 16.).



**Slika 16.** Protokol primjene izoliranih sastavnica na modelu izoliranog srca.

U skupinama srca koja su bila izložena sastavnicama otrova (skupina ispitivanih srca), tijekom 30 minuta mjereni su početni pokazatelji srčane funkcije (razdoblje prilagodbe), a potom su primijenjene izolirane sastavnice otrova; frakcije, podfrakcije i amoditin L, u planiranim koncentracijama, tijekom deset minuta (razdoblje izloženosti otrovu). Nakon razdoblja izloženosti slijedilo je razdoblje promatranja (razdoblje nakon izloženosti) koje je trajalo ukupno trideset minuta i u kojem srca nisu bila izložena niti jednoj sastavnici otrova, već su bila perfundirana modificiranom Krebs-Henseleitovom otopinom.

Svi pokazatelji srčane funkcije mjereni su u početku davanja pojedine sastavnice, što je u ovom istraživanju označeno kao nulta minuta (0 min) u razdoblju izloženosti, a predstavlja i tridesetu minutu ukupnog trajanja pokusa. Potom su isti srčani pokazatelji mjereni i u trećoj minuti (3. min) izloženosti otrovu, što je predstavljalo četrdeset i treću minutu od početka pokusa. Naposljetku su navedeni srčani pokazatelji mjereni i u trinaestoj minuti (13. min) od početka davanja otrova, što je ujedno predstavljalo treću minutu nakon prestanka davanja otrova, odnosno treću minutu u razdoblju nakon izloženosti ispitivanim sastavnicama (Slika 16.).

### 3.7. Statistička raščlamba podataka

Kategorijske varijable (srčani ritam, aritmije) iskazane su kao broj i postotak (N, %). Kvantitativne varijable (srčana frekvencija – broj otkucaja/min; koronarni protok – mL/min; sistolički i dijastolički, te razvijeni tlak lijeve klijetke – mmHg; CK, LDH, te AST – IU/L, i troponin I –  $\mu\text{g/L}$ ) prikazane su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SV  $\pm$  SD). D'Agostino-Pearsonov i Kolmogorov-Smirnov test korišteni su za provjeru raspodjele kvantitativnih podataka. Imajući u vidu relativno mali uzorak, ali i simetričnu raspodjelu podataka, u ovom istraživanju koristili smo parametrijske testove te neparametrijske inačice za nezavisne uzorke u prikladnim testiranjima.

Za izračun statističke značajnosti učestalosti mjerenih aritmija korišten je  $\chi^2$ -test za nezavisne uzorke. Dvosmjerna analiza varijance (engl. *two-way ANOVA*) i Kruskal-Wallisov test korišteni su za usporedbu kvantitativnih varijabli. Od *post-hoc* testova korišteni su Bonferoni i Tukeyev test. Podatci su bilježeni u programu *Microsoft Office Excel 2007* (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, SAD), a za izračun statističke značajnosti

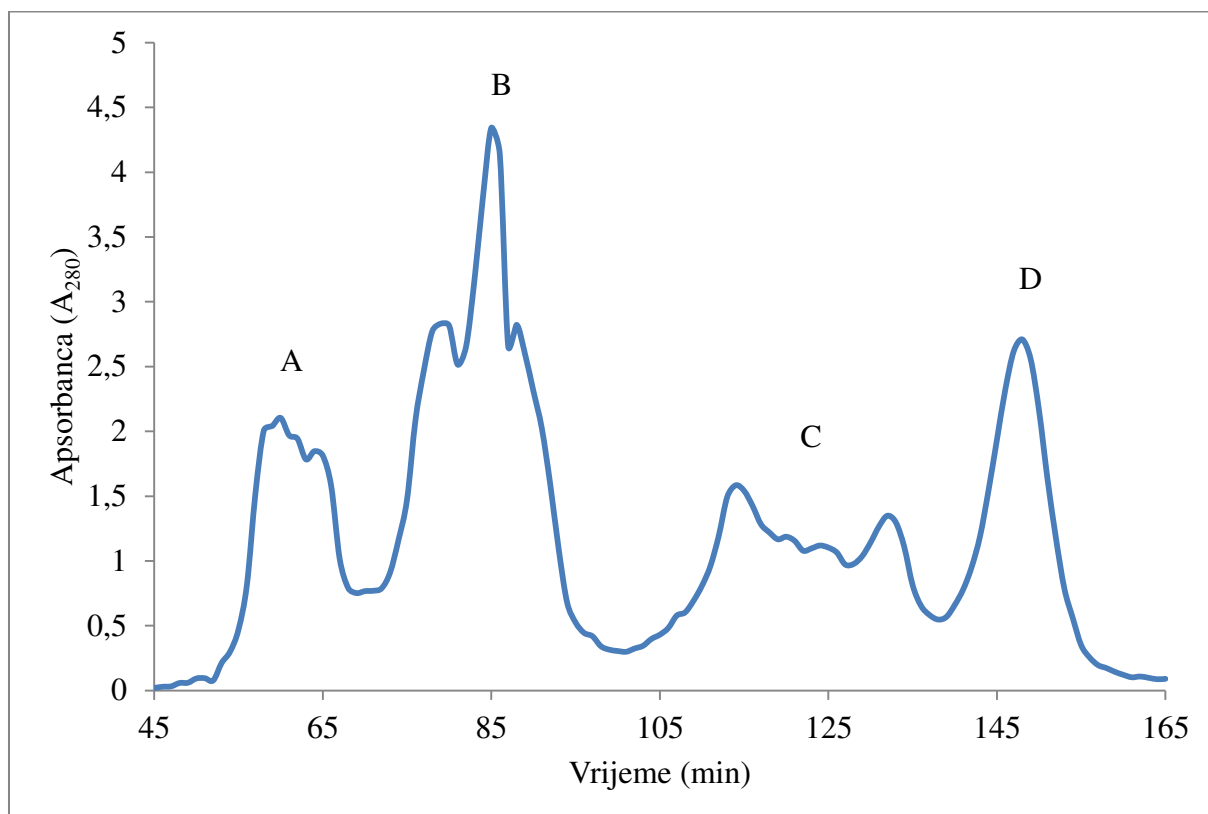
korišteni su programi *SPSS Statistics* (verzija 14.0, SPSS INC., Chicago, Illinois, SAD), te *GraphPad Prism* (verzija 6.00 za Windows, GrafPad Software, San Diego, California, SAD). Rezultati su prikazani tablično i grafički. Razina statističke značajnosti navedena je kao  $P < 0,01$ .

#### **4. REZULTATI**



#### 4.1. Kolonska gelska kromatografija

Kolonskom gelskom kromatografijom cjelokupnog otrova poskoka dobivene su četiri različite frakcije; u ovom istraživanju nazvane frakcije A, B, C i D, koje su razdvojene temeljem veličine sastavnica u pojedinoj frakciji (Slika 17.).

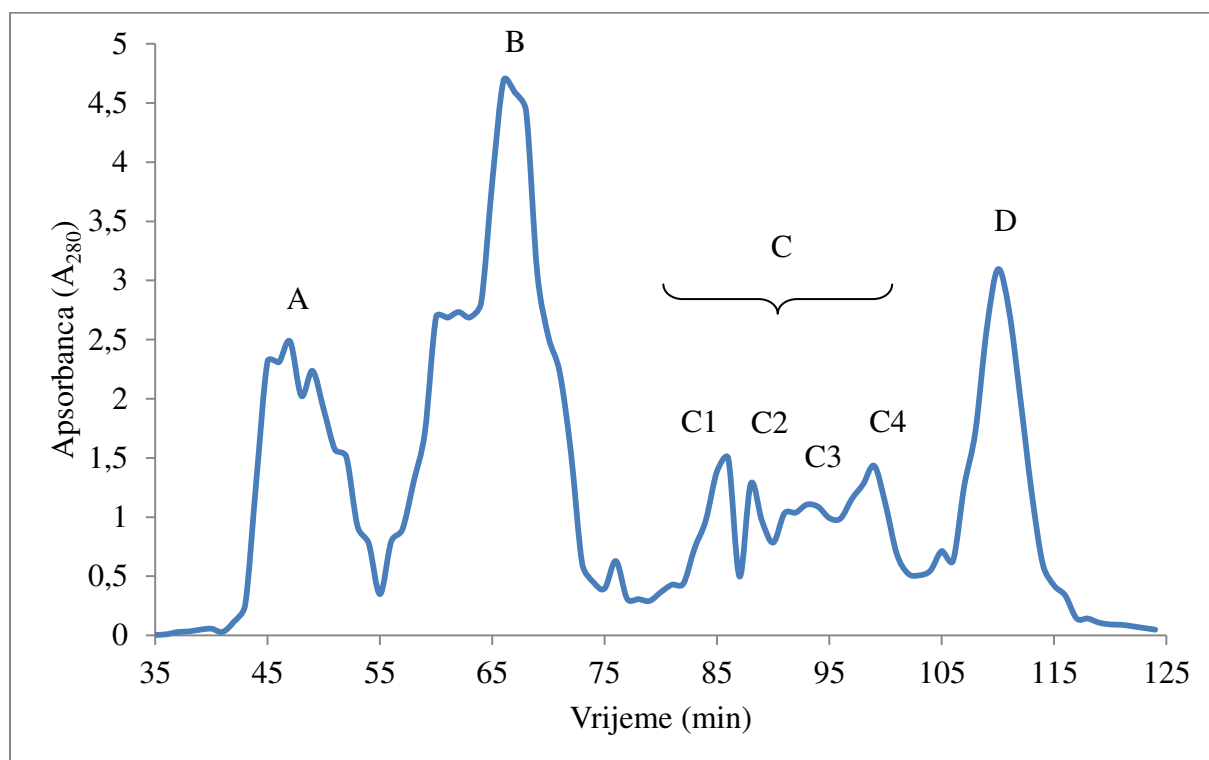


**Slika 17.** Kolonska gelska kromatografija cjelokupnog otrova poskoka.

Tijekom eluiranja otopine čitavog otrova poskoka prva je izolirana frakcija A, a potom su slijedile frakcije B, C i D. Svaka od navedenih frakcija činila je približno 25% od ukupnog, čitavog otrova poskoka (Slika 17.).

Također, cjelokupna frakcija C kolonskom gelskom kromatografijom raspodijelila se na četiri podfrakcije; u ovom istraživanju nazvane podfrakcije C1, C2, C3 i C4 (Slika 18.). Iz kromatograma je vidljivo da je prvo eluirana podfrakcija C1, a potom su redom slijedile

podfrakcije C2-4. Podfrakcija C1 čini 30% od ukupne frakcije C, podfrakcija C2 16%, podfrakcija C3 21%, a podfrakcija C4 33% od ukupne frakcije C (Slika 18.).

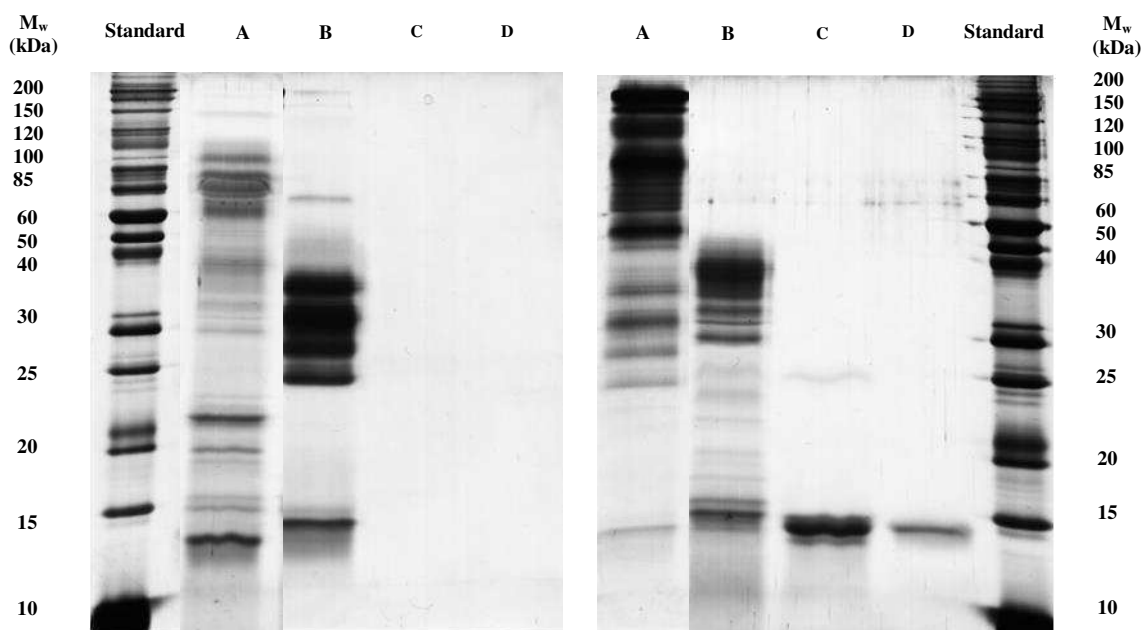


**Slika 18.** Kolonska gelska kromatografija frakcija A-E te prikaz podfrakcija C1-4.

Na modelu izoliranog štakorskog srca ispitivani su učinci frakcija A-C, kao i učinci podfrakcija C1-4 primijenjeni u tri različite koncentracije (vidjeti poglavlje *Kardiotoksični učinci frakcija otrova poskoka*, te *Kardiotoksični učinci podfrakcija otrova poskoka i amoditina L*).

## 4.2. Elektroforetski prikaz frakcija otrova poskoka

Nakon što su izolirane četiri glavne sastavnice (frakcije A-D) iz ukupnog otrova poskoka, veličina svake pojedine ispitivana je na SDS-PAGE elektroforezi izvedenoj postupkom redukcije i neredukcije (Slika 19a. i 19b.).



**Slika 19a.**

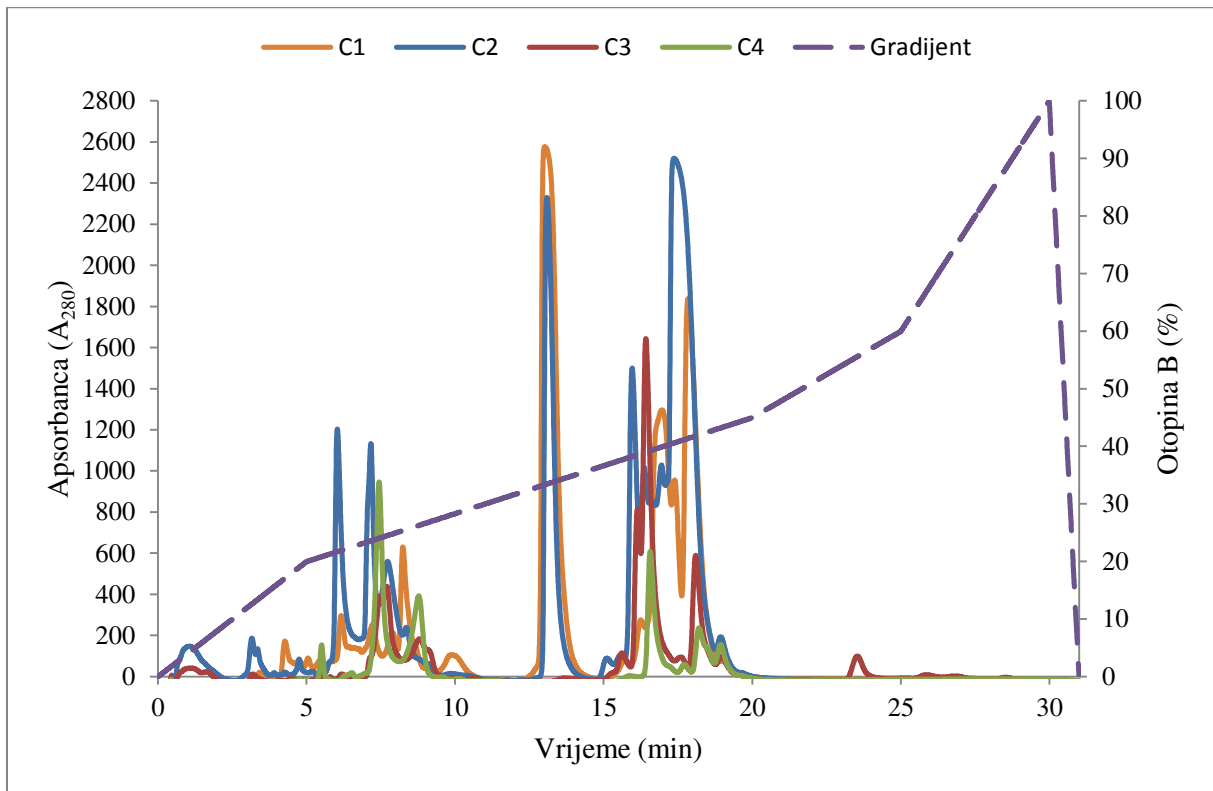
**Slika 19b.**

**Slika 19.** SDS-PAGE elektroforeza frakcija (A-D) otrova poskoka; Slika 19a.) postupak redukcije, Slika 19b.) postupak neredukcije.

Unutar frakcije A zabilježene su sastavnice otrova približne molekularne mase oko 60-100 kDa, koje su bile najbrojnije (Slika 19a. i 19b.). Većina sastavnica frakcije B imala je približnu molekularnu masu između 30-40 kDa. Prilikom izvođenja postupka redukcije pojedine sastavnice (proteini) frakcije C i D nisu bile vidljive jer su manje od 10 kDa (Slika 19b.), no nakon postupka neredukcije zabilježene su sastavnice frakcije C čija je molekularna masa iznosila približno 14-15 kDa, jednako kao i sastavnice frakcije D koja je također sadržavala proteine približno takve molekularne mase (oko 14 kDa), no u manjoj količini (Slika 19a. i 19b.).

### 4.3. RP HPLC

Podfrakcije C1-4 koristeći postupak RP HPLC razdijeljene su na pojedine sastavnice na temelju razlika u hidrofobnosti (Slika 20.).

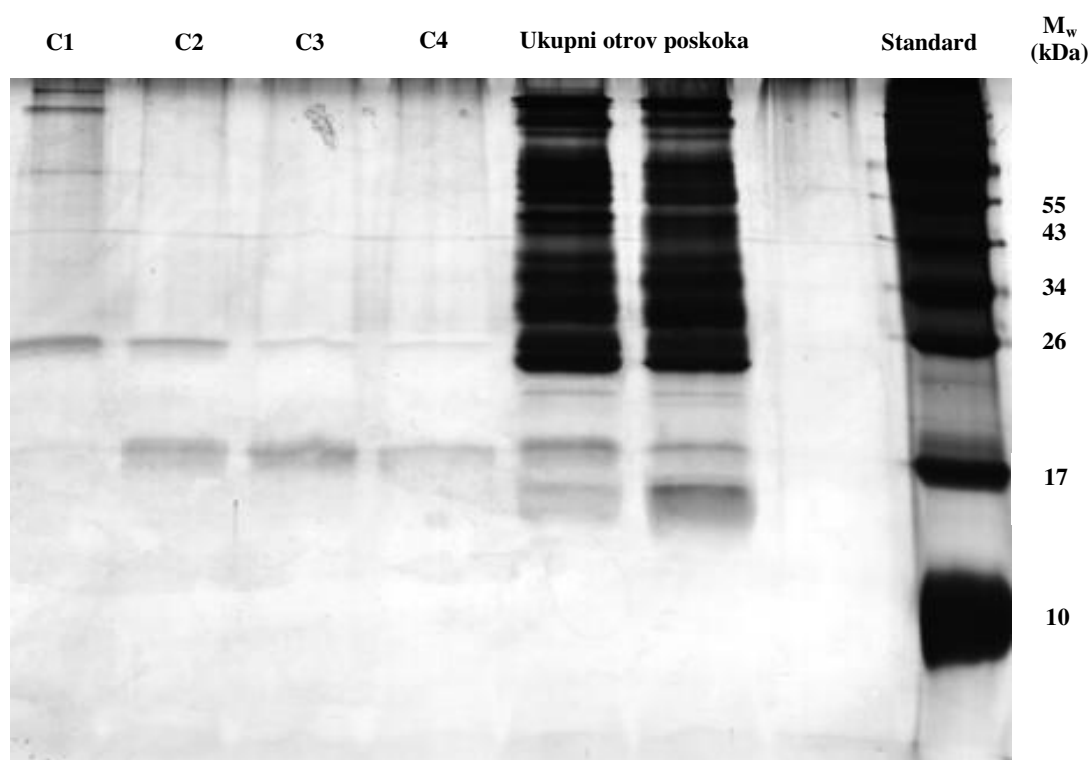


**Slika 20.** Podfrakcije C1-4 razdijeljene RP HPLC postupkom.

U prvih deset minuta kromatografije eluirali su se peptidi, gdje smo N-terminalnim sekvencioniranjem i maseno-spektrometrijskom analizom odredili natriuretične peptide i tripeptidni inhibitor metaloproteinaza (Slika 20.). Vrhovi, koji su se eluirali od dvanaeste minute i dalje, sadržavaju uglavnom različite PLA<sub>2</sub>, amoditoksine i amoditine, te sekretorne proteine bogate s cisteinima (25).

#### 4.4. Elektroforetski prikaz podfrakcija otrova poskoka

SDS-PAGE elektroforezom izvedenom postupkom neredukcije zabilježene su sljedeće veličine proteina (Slika 21.).



**Slika 21.** SDS-PAGE elektroforeza podfrakcija (C1-4) i čitavog otrova poskoka izvedena postupkom neredukcije.

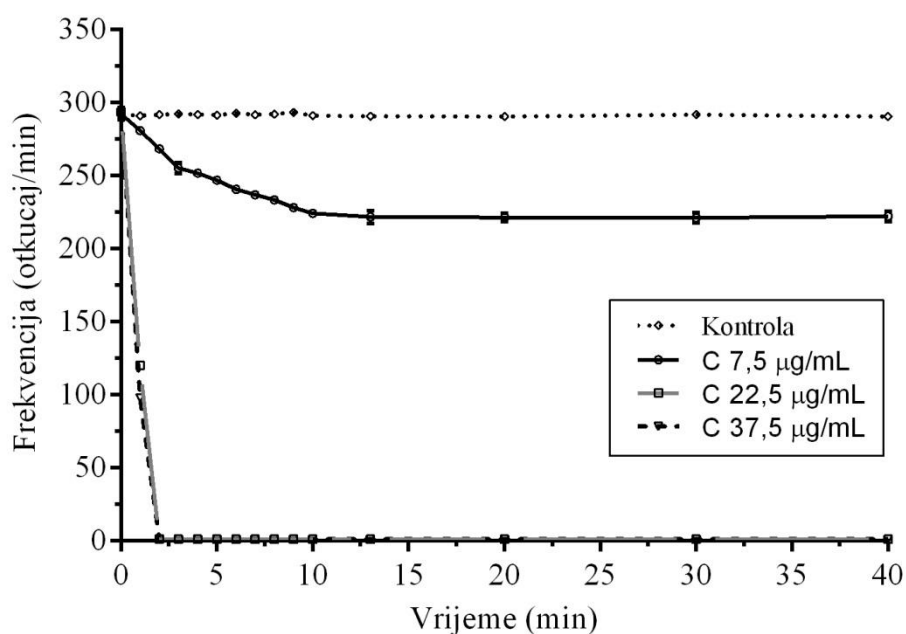
Cjelokupni otrov poskoka sadržavao je najveći dio proteina približne molekularne mase u rasponu od 26-80 kDa (Slika 21.). Unutar podfrakcije C1 i C2 zabilježeni su oligomerni proteini približne molekularne mase oko 26 kDa. Takvi proteini zabilježeni su i unutar podfrakcija C3 i C4, ali u mnogo manjoj količini. Proteini približne molekularne mase oko 17 kDa bili su prisutni unutar podfrakcija C2-C4 (Slika 21.).

## 4.5. Kardiotoksični učinci frakcija otrova poskoka

### 4.5.1. Elektrofiziološki pokazatelji

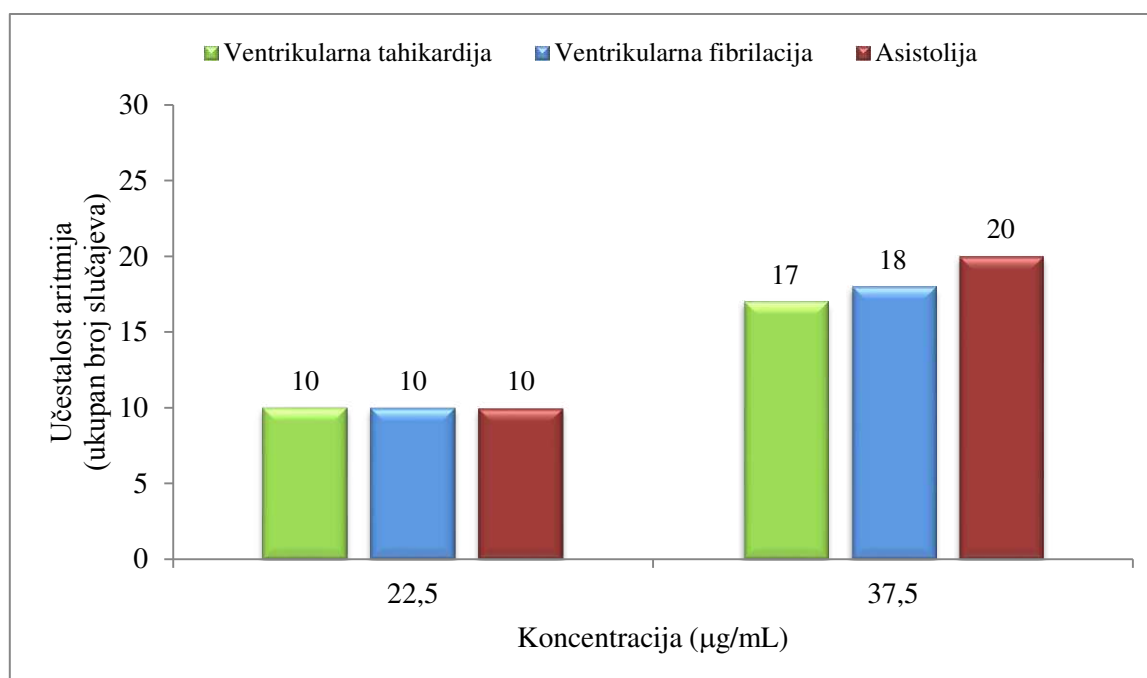
Sinus ritam bio je vodeći ritam u svih srca u razdoblju prilagodbe tijekom pokusa, te nije bilo statistički značajne razlike u vrijednostima srčane frekvencije u početku mjerenja (Tablica 18.). Promjene srčane frekvencije tijekom izloženosti izoliranim frakcijama A, B i C otrova poskoka (vidjeti detaljnije Sliku 17.) u tri različite koncentracije prikazane su u Tablici 18., a za frakciju B i C također i grafički na Slici 22. i Slici 23.

Frakcija C uzrokovala je najznačajniju promjenu broja srčanih otkucaja na modelu izoliranog štakorskog srca (Tablica 18. i Slika 22.). Srca izložena konačnim koncentracijama od 7,5  $\mu\text{g/mL}$  frakcije C doživjela su statistički značajan pad srčane frekvencije u trećoj i trinaestoj minuti od početka primjene navedene sastavnice u odnosu na početne vrijednosti frekvencije ( $255,0 \pm 3,6$  i  $221,5 \pm 4,2$  prema  $292,0 \pm 2,2$  otkucaj/min,  $P < 0,01$ ). Osobito je značajan pad broj otkucaja u trinaestoj naspram treće minute ( $221,5 \pm 4,2$  prema  $255,0 \pm 3,6$  otkucaj/min,  $P < 0,01$ ; Tablica 18. i Slika 22.), što su rezultati mjerenja zabilježeni tri minute nakon završetka izloženosti frakciji C.



**Slika 22.** Promjene vrijednosti srčane frekvencije tijekom izloženosti frakciji C.

Tijekom ovih mjerenja sinus ritam bio je vodeći, te promjene vrste ritma nisu zabilježene. Srčana frekvencija koja je bila niža tijekom razdoblja izloženosti frakciji C ostala je također niska i nakon ovog razdoblja, te se nije oporavila do kraja pokusa (Slika 22.). Nakon primjene frakcije C u konačnim koncentracijama od 22,5 i 37,5  $\mu\text{g/mL}$ , zastoj rada srca zabilježen je u svih izloženih srca i to nakon približno dvije minute od početka dovođenja ove sastavnice (Slika 22.), što je potvrđeno statističkom značajnošću ( $P < 0,01$ ; Tablica 18.). U svim navedenim slučajevima srčanog zastoja ( $N = 20$ ), ventrikularna tahikardija ( $N = 20$ ) i fibrilacija ( $N = 20$ ) prethodile su asistoliji (Slika 24.).



**Slika 24.** Učestalost svih zabilježenih aritmija u skupini srca izloženih frakcijama B i C u koncentracijama od 22,5 i 37,5  $\mu\text{g/mL}$ .

Frakcija B u konačnoj koncentraciji od 7,5  $\mu\text{g/mL}$  uzrokovala je klinički neznačajne promjene srčane frekvencije (Tablica 18. i Slika 23.). Koncentracija pak od 22,5  $\mu\text{g/mL}$  frakcije B uzrokovala je statistički značajno i reverzibilno sniženje broja srčanih otkucaja ( $P < 0,01$ ; Tablica 18. i Slika 23.), no aritmije nisu zabilježene.

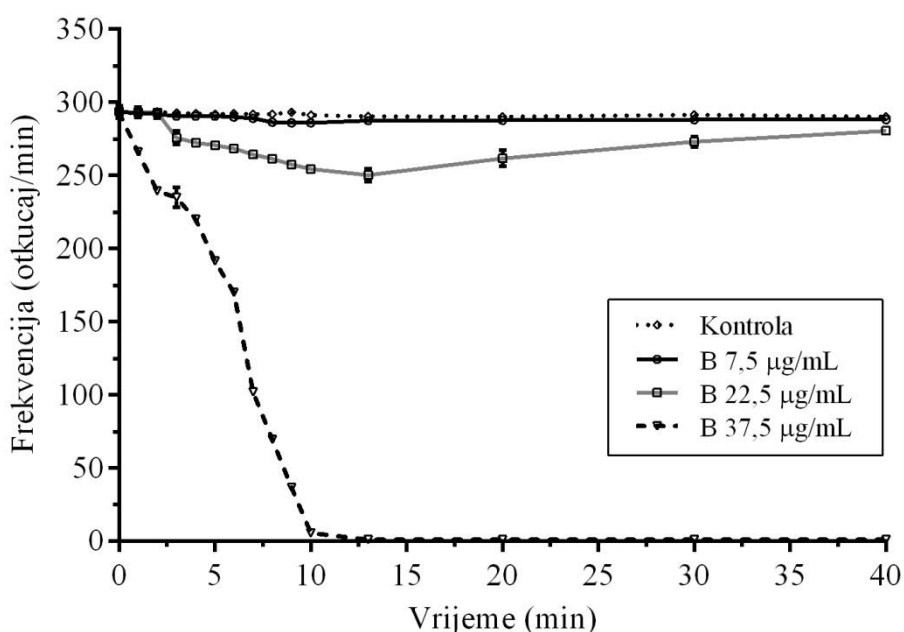
**Tablica 18.** Mjereni pokazatelji srčane funkcije na modelu izoliranog štakorskog srca tijekom ispitivanja učinaka izoliranih frakcija A, B i C.

Frakcija ( $\mu\text{g/mL}$ )	Vrijeme (min)	Srčani pokazatelji (SV $\pm$ SD)				
		HR* (otkucaj/min)	CF <sup>†</sup> (mL/min)	sLVP <sup>‡</sup> (mmHg)	devLVP <sup>§</sup> (mmHg)	dLVP <sup>  </sup> (mmHg)
Kontrola		289,6 $\pm$ 1,6	11,1 $\pm$ 0,1	116,0 $\pm$ 2,3	116,0 $\pm$ 2,3	0
<b>A (7,5)</b>						
	0	289,8 $\pm$ 1,5	11,1 $\pm$ 0,1	116,5 $\pm$ 2,5	116,5 $\pm$ 2,5	0
	3	288,3 $\pm$ 1,5	11,1 $\pm$ 0,1	115,8 $\pm$ 1,7	115,8 $\pm$ 1,7	0
	13	286,3 $\pm$ 1,5	11,1 $\pm$ 0,1	116,0 $\pm$ 2,2	116,0 $\pm$ 2,2	0
<b>A (22,5)</b>						
	0	295,8 $\pm$ 2,5	11,2 $\pm$ 0,2	116,8 $\pm$ 2,8	116,8 $\pm$ 2,8	0
	3	291,8 $\pm$ 2,9	11,2 $\pm$ 0,2	115,3 $\pm$ 1,3	115,3 $\pm$ 1,3	0
	13	289,5 $\pm$ 2,6	11,2 $\pm$ 0,1	114,8 $\pm$ 1,7	114,8 $\pm$ 1,7	0
<b>A (37,5)</b>						
	0	292,8 $\pm$ 1,7	11,1 $\pm$ 0,2	117,8 $\pm$ 1,7	117,8 $\pm$ 1,7	0
	3	291,5 $\pm$ 1,3	11,1 $\pm$ 0,3	115,3 $\pm$ 1,3	115,3 $\pm$ 1,3	0
	13	288,0 $\pm$ 2,2	11,1 $\pm$ 0,2	114,5 $\pm$ 1,3	114,5 $\pm$ 1,3	0
Kontrola		293,1 $\pm$ 2,5	11,1 $\pm$ 0,1	116,0 $\pm$ 1,8	116,0 $\pm$ 1,8	0
<b>B (7,5)</b>						
	0	293,3 $\pm$ 3,0	11,1 $\pm$ 0,2	116,5 $\pm$ 1,3	116,5 $\pm$ 1,3	0
	3	290,8 $\pm$ 2,1	11,2 $\pm$ 0,2	116,3 $\pm$ 1,3	116,3 $\pm$ 1,3	0
	13	287,5 $\pm$ 2,1	11,0 $\pm$ 0,1	114,5 $\pm$ 1,3	114,5 $\pm$ 1,3	0
<b>B (22,5)</b>						
	0	293,8 $\pm$ 3,9	11,0 $\pm$ 0,3	117,0 $\pm$ 2,2	117,0 $\pm$ 2,2	0
	3	275,8 $\pm$ 4,6 <sup>¶</sup>	9,4 $\pm$ 1,1	115,3 $\pm$ 2,1	114,0 $\pm$ 2,2	1,3 $\pm$ 0,5
	13	250,3 $\pm$ 4,3 <sup>¶</sup>	8,1 $\pm$ 0,2 <sup>¶</sup>	97,0 $\pm$ 2,2 <sup>¶</sup>	95,5 $\pm$ 2,1 <sup>¶</sup>	1,5 $\pm$ 0,6
<b>B (37,5)</b>						
	0	293,3 $\pm$ 3,9	11,2 $\pm$ 0,2	116,8 $\pm$ 1,0	116,8 $\pm$ 1,0	0
	3	235,0 $\pm$ 6,7 <sup>¶</sup>	9,1 $\pm$ 1,0 <sup>¶</sup>	132,8 $\pm$ 2,2 <sup>¶</sup>	92,5 $\pm$ 1,3 <sup>¶</sup>	40,3 $\pm$ 1,0 <sup>¶</sup>
	13	1,0 $\pm$ 0,0 <sup>¶</sup>	4,6 $\pm$ 0,3 <sup>¶</sup>	129,5 $\pm$ 1,7 <sup>¶</sup>	92,8 $\pm$ 1,0 <sup>¶</sup>	36,8 $\pm$ 1,0 <sup>¶</sup>
Kontrola		292,2 $\pm$ 2,4	11,1 $\pm$ 0,1	115,9 $\pm$ 1,2	115,9 $\pm$ 1,2	0
<b>C (7,5)</b>						
	0	292,0 $\pm$ 2,2	11,1 $\pm$ 0,3	115,8 $\pm$ 1,0	115,8 $\pm$ 1,0	0
	3	255,0 $\pm$ 3,6 <sup>¶</sup>	9,9 $\pm$ 0,7	96,8 $\pm$ 1,0 <sup>¶</sup>	94,0 $\pm$ 0,8 <sup>¶</sup>	2,8 $\pm$ 0,5
	13	221,5 $\pm$ 4,2 <sup>¶</sup>	8,6 $\pm$ 0,7 <sup>¶</sup>	97,0 $\pm$ 1,6 <sup>¶</sup>	94,3 $\pm$ 1,3 <sup>¶</sup>	2,8 $\pm$ 0,5
<b>C (22,5)</b>						
	0	293,3 $\pm$ 3,2	11,1 $\pm$ 0,2	115,5 $\pm$ 1,3	115,5 $\pm$ 1,3	0
	3	1,0 $\pm$ 0,0 <sup>¶</sup>	4,5 $\pm$ 0,7 <sup>¶</sup>	47,8 $\pm$ 1,5 <sup>¶</sup>	1,3 $\pm$ 0,5 <sup>¶</sup>	46,5 $\pm$ 1,3 <sup>¶</sup>
	13	1,0 $\pm$ 0,0 <sup>¶</sup>	3,8 $\pm$ 0,2 <sup>¶</sup>	47,0 $\pm$ 1,8 <sup>¶</sup>	1,5 $\pm$ 0,6 <sup>¶</sup>	45,5 $\pm$ 1,3 <sup>¶</sup>
<b>C (37,5)</b>						
	0	292,5 $\pm$ 4,2	11,1 $\pm$ 0,1	117,5 $\pm$ 1,3	117,5 $\pm$ 1,3	0
	3	1,0 $\pm$ 0,0 <sup>¶</sup>	4,5 $\pm$ 0,3 <sup>¶</sup>	52,0 $\pm$ 1,6 <sup>¶</sup>	1,3 $\pm$ 0,5 <sup>¶</sup>	50,8 $\pm$ 1,3 <sup>¶</sup>
	13	1,0 $\pm$ 0,0 <sup>¶</sup>	3,7 $\pm$ 0,5 <sup>¶</sup>	52,3 $\pm$ 1,0 <sup>¶</sup>	1,0 $\pm$ 0,0 <sup>¶</sup>	51,3 $\pm$ 1,0 <sup>¶</sup>

\*HR – srčana frekvencija (engl. *heart rate*); <sup>†</sup>CF – koronarni protok (engl. *coronary flow*); <sup>‡</sup>sLVP – sistolički tlak u lijevoj klijetci (engl. *systolic left ventricular pressure*); <sup>§</sup>devLVP – razvijeni tlak u lijevoj klijetci (engl. *developed left ventricular pressure*); <sup>||</sup>dLVP – dijastolički tlak u lijevoj klijetci (engl. *diastolic left ventricular pressure*); <sup>¶</sup>P < 0,01 prema kontroli.



Suprotno navedenom, koncentracija od 37,5  $\mu\text{g/mL}$  frakcije B uzrokovala je značajni pad broja otkucaja u trećoj minuti od početka izloženosti ovoj frakciji, a potom je tijekom dvanaeste minute nastupio srčani zastoj ( $235,0 \pm 6,7$  prema  $1,0 \pm 0,0$  otkucaj/min,  $P < 0,01$ ; Tablica 18. i Slika 23.). Nakon prestanka izloženosti navedenoj koncentraciji, niti jedno srce nije se oporavilo, stoga je arrest bio ireverzibilan (Slika 23.).

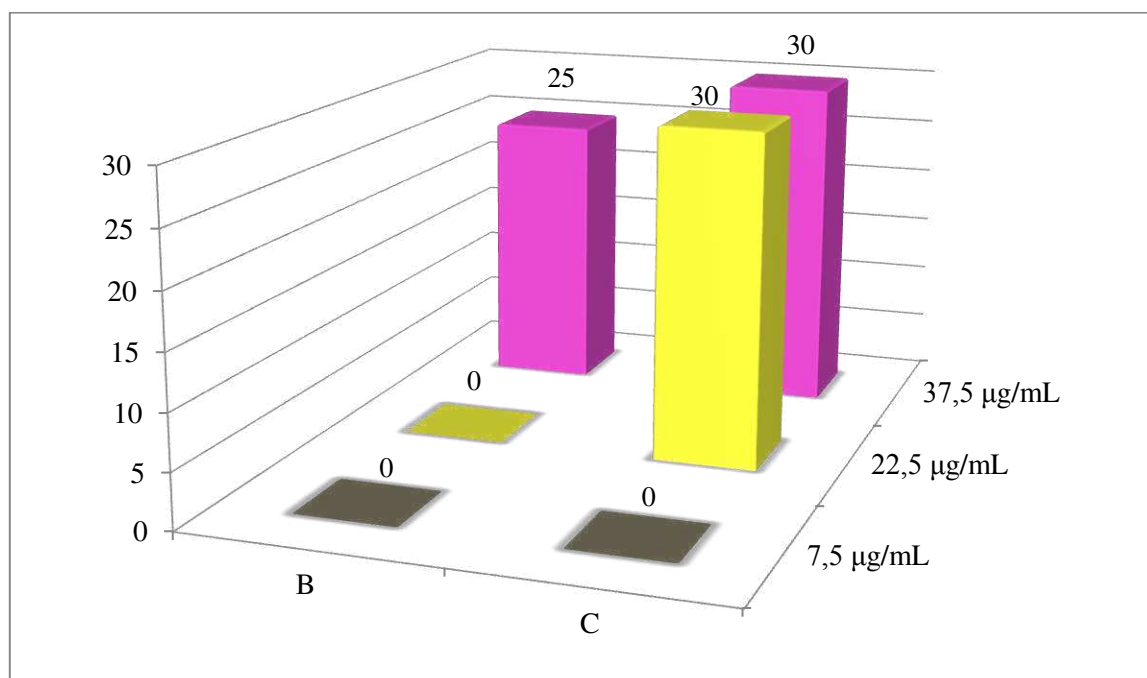


**Slika 23.** Promjene vrijednosti srčane frekvencije tijekom izloženosti frakciji B.

U navedenim slučajevima, prije prestanka srčanog rada, sinus ritam promijenio se u ventrikularnu tahikardiju ( $N = 7$ ), a potom i u ventrikularnu fibrilaciju ( $N = 8$ ) koja je u konačnici prešla u asistoliju zabilježenu u svim slučajevima ( $N = 10$ ). Pregledni prikaz svih zabilježenih aritmija prikazan je na Slici 24.

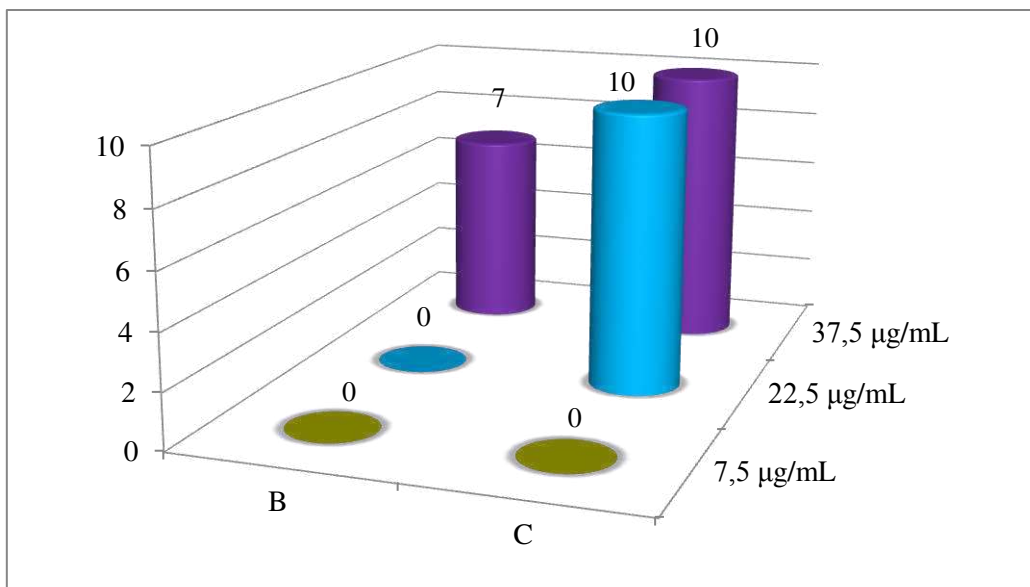
Sinus ritam bio je također vodeći ritam u srcima nakon razdoblja izloženosti frakciji A. Tijekom ispitivanja frakcije A u svim koncentracijama nije zabilježena statistički i klinički značajna promjena vrijednosti srčane frekvencije (Tablica 18.). Također, frakcija A nije uzrokovala aritmije u niti jednom izvedenom pokusu.

Sve zabilježene aritmije statistički su bile značajno učestalije tijekom pokusa s frakcijama B i C, u koncentracijama od 37,5  $\mu\text{g/mL}$  u odnosu na iste u dozi od 22,5  $\mu\text{g/mL}$  (Slika 24. i Slika 25.). Od ukupno 85 svih slučajeva zabilježenih aritmija, frakcija C uzrokovala je 71%, a frakcija B 29% istih ( $P < 0,01$ ). U ovom dijelu istraživanja nije zabilježena pojava AV blokova (Slika 24). Ukupan broj svih zabilježenih aritmija nastalih tijekom ispitivanja različitih koncentracija frakcija B i C prikazan je na Slici 25.



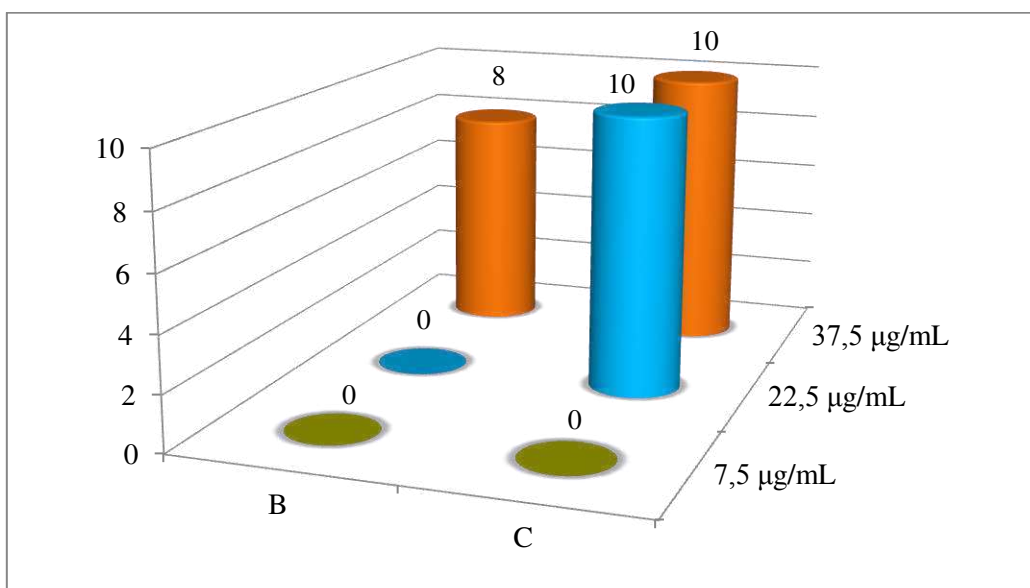
**Slika 25.** Prikaz učestalosti svih aritmija zabilježenih tijekom ispitivanja različitih koncentracija izoliranih frakcija B i C.

Učestalost ventrikularne tahikardije nastale tijekom ispitivanja različitih koncentracija izoliranih frakcija B i C prikazana je na Slici 26.



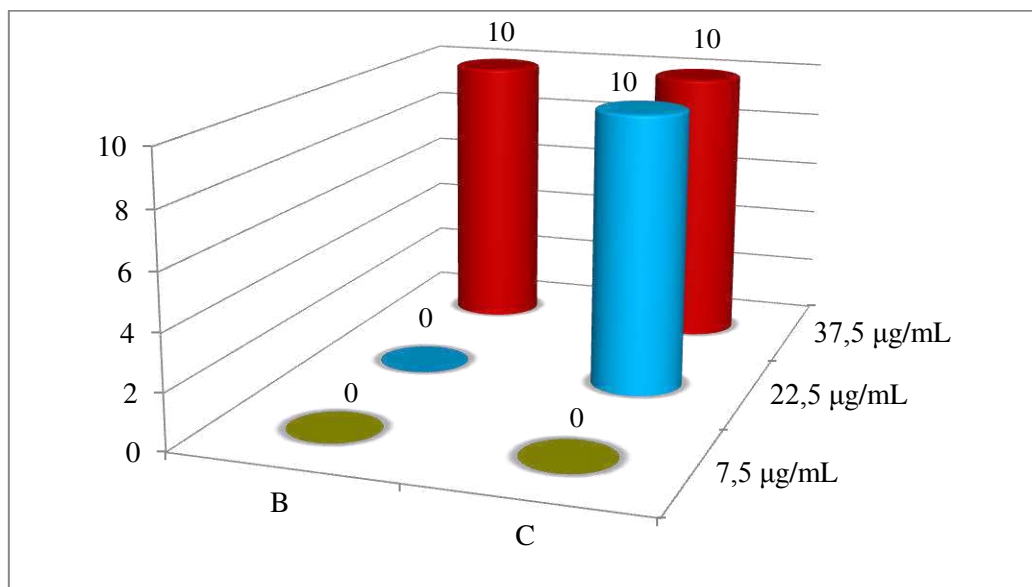
**Slika 26.** Prikaz učestalosti ventrikularne tahikardije nastale tijekom ispitivanja različitih koncentracija izoliranih frakcija B i C.

Učestalost ventrikularne fibrilacije nastale tijekom ispitivanja različitih koncentracija izoliranih frakcija B i C prikazana je na Slici 27.



**Slika 27.** Prikaz učestalosti ventrikularne fibrilacije nastale tijekom ispitivanja različitih koncentracija izoliranih frakcija B i C.

Učestalost asistolije nastale tijekom ispitivanja različitih koncentracija izoliranih frakcija B i C prikazana je na Slici 28.

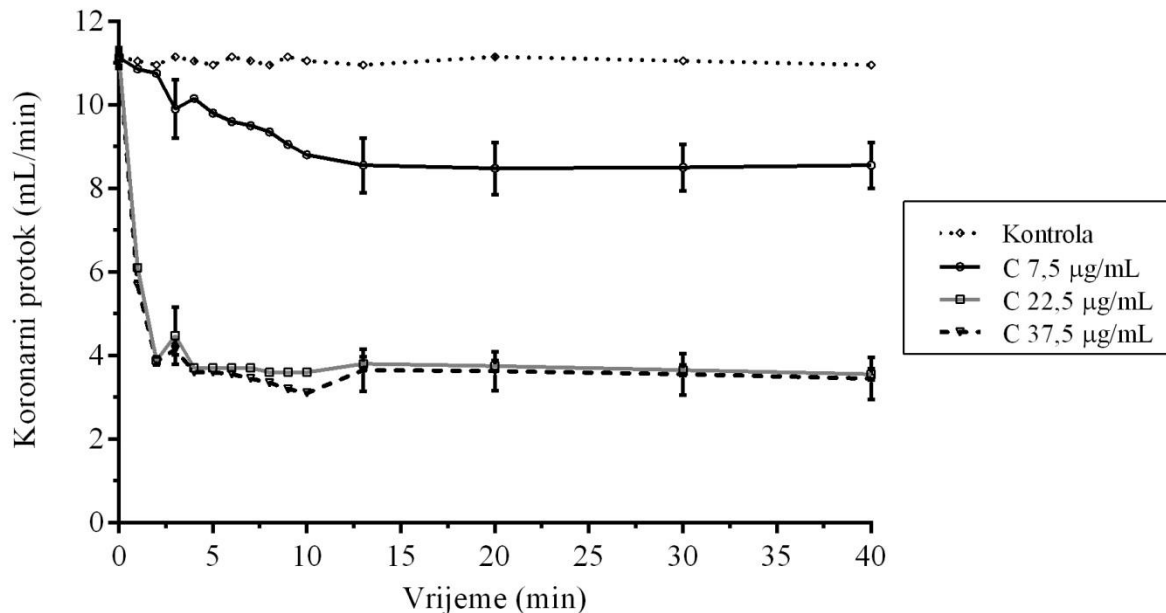


**Slika 28.** Prikaz učestalosti asistolije nastale tijekom ispitivanja različitih koncentracija izoliranih frakcija B i C.

#### 4.5.2. Kontraktilni pokazatelji

Promjene vrijednosti koronarnog protoka tijekom pokusa na izoliranim srcima izloženim frakcijama A, B i C otrova *V. a. ammodytes* (vidjeti detaljnije Sliku 17.) primijenjene u tri različite koncentracije prikazane su u Tablici 18., a za frakciju B i C također i grafički na Slici 29. i Slici 30. Tijekom početka mjerenja koronarni protok bio je približno jednak u svih izoliranih srca (Tablica 18.).

Najznačajnije promjene koronarnog protoka zabilježene su tijekom izloženosti frakciji C pri svim ispitivanim dozama (Tablica 18. i Slika 29.).

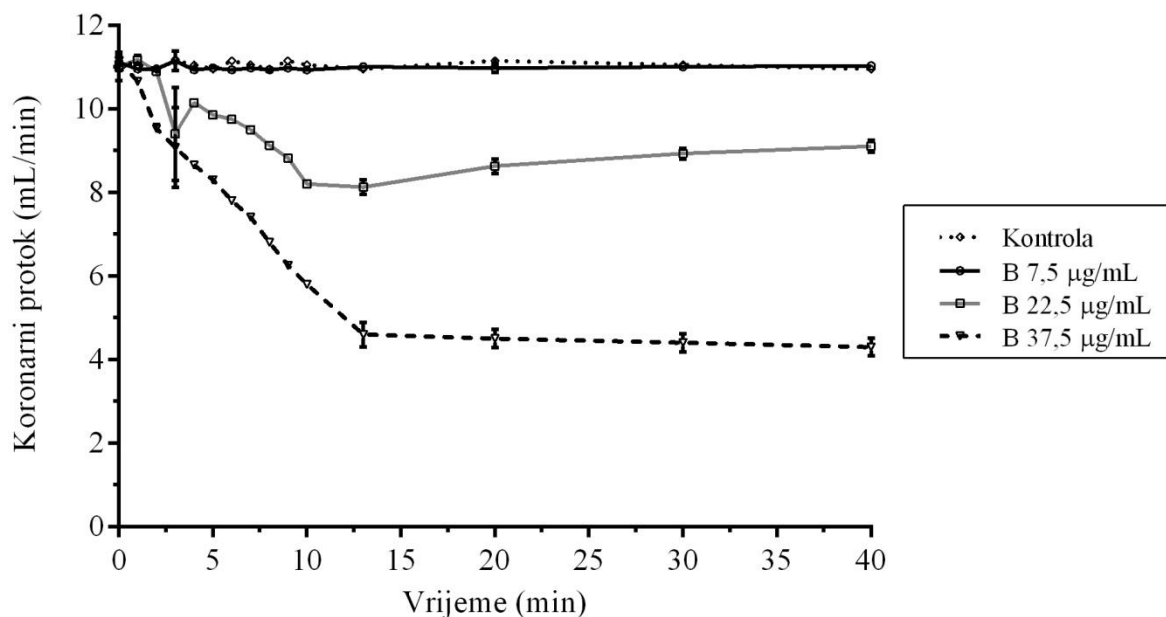


**Slika 29.** Promjene vrijednosti koronarnog protoka tijekom izloženosti frakciji C.

Sva srca izložena konačnim koncentracijama od 22,5 i 37,5 µg/mL frakcije C doživjela su ireverzibilnu kontrakturu u približno drugoj minuti od početka izloženosti navedenim koncentracijama (Slika 29.). Spomenuto je rezultiralo prekidom koronarnog protoka što je iskazano značajnim padom vrijednosti koronarnog protoka ( $P < 0,01$ ; Tablica 18.). Nakon

primjene najniže doze frakcije C; 7,5 µg/mL, koronarni protok također je značajno pao ( $P < 0,01$ ), te ostao nizak sve do kraja mjerenja (Slika 29.).

Tijekom izloženosti konačnoj koncentraciji od 7,5 µg/mL frakcija B u srcima nisu zabilježene klinički značajne promjene koronarnog protoka (Slika 30.), no doza od 22,5 µg/mL frakcije B uzrokovala je značajan pad vrijednosti protoka u trinaestoj minuti ( $P < 0,01$ ), što je tri minute nakon prestanka dovođenja navedene stvari. Zanimljivo, od tog trenutka pa sve do kraja promatranja koronarna cirkulacija polako se oporavljala (Slika 30.). Pri najvišoj korištenoj dozi frakcije B; 37,5 µg/mL, koronarni protok značajno je pao uslijed, u dvanaestoj minuti nastalog, srčanog zastoja (Slika 30.). Naravno, pad protoka bio je statistički značajan ( $P < 0,01$ ), te su sva izložena srca trajno bila u kontrakturi (Slika 30.).

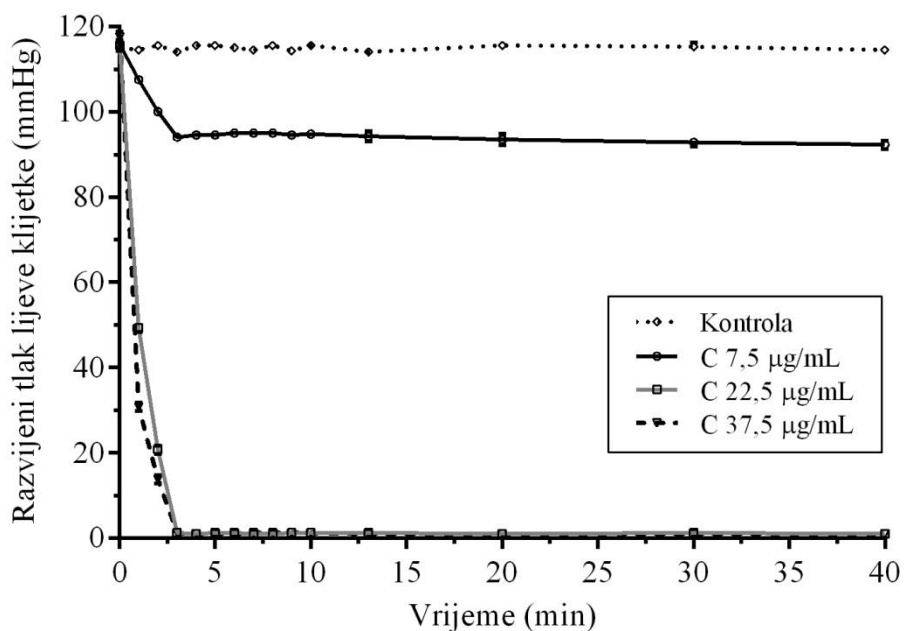


**Slika 30.** Promjene vrijednosti koronarnog protoka tijekom izloženosti frakciji B.

Frakcija A pri ispitivanju svih koncentracija nije uzrokovala značajnu promjenu vrijednosti koronarnog protoka (Tablica 18.).

Promjene vrijednosti razvijenog i dijastoličkog tlaka lijeve klijetke tijekom izloženosti frakcijama otrova *V. a. ammodytes* (vidjeti detaljnije Sliku 17.) prikazane su u Tablici 18., te grafički za frakciju C i B. Frakcija A nije iskazala nikakav učinak na navedene tlakove u lijevoj klijetci, dok je frakcija C uzrokovala najznačajnije promjene navedenih pokazatelja (Tablica 18.).

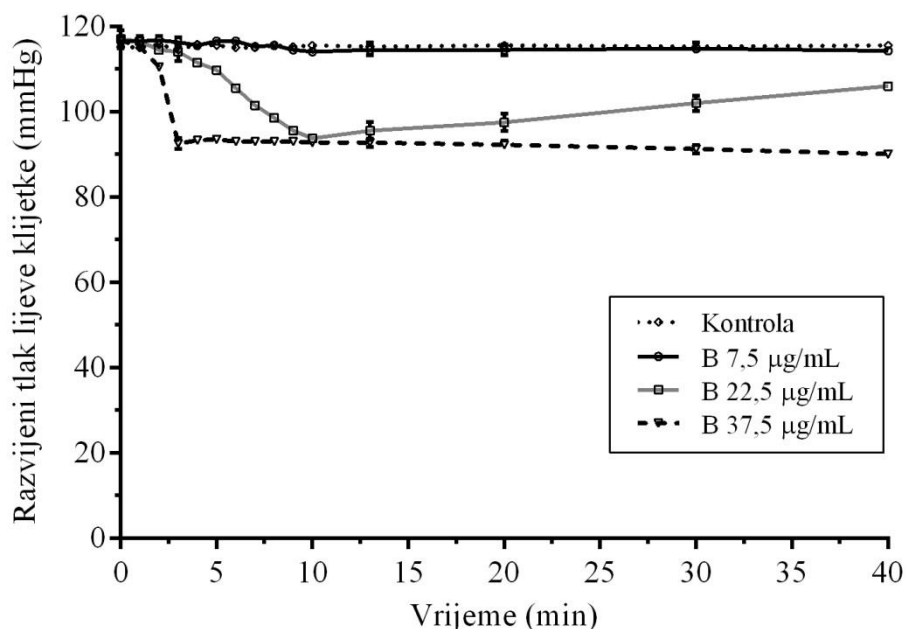
Pri ispitivanju učinaka najniže koncentracije; 7,5 µg/mL, frakcija C uzrokovala je nezamjetno smanjenje vrijednosti razvijenog tlaka lijeve klijetke, no koncentracije od 22,5 i 37,5 µg/mL iskazale su izražen pad ovih pokazatelja na nemjerljive vrijednosti već dvije minute nakon primjene navedenih koncentracija (Slika 31.).



**Slika 31.** Promjene vrijednosti razvijenog tlaka lijeve klijetke tijekom izloženosti frakciji C.

U pokusima s konačnom koncentracijom od 37,5 µg/mL frakcije B smanjenje razvijenog tlaka lijeve klijetke bilo je približno jednako kao i u istima pri ispitivanju koncentracije od 7,5 µg/mL frakcije C (Tablica 18. i Slika 32.). Zanimljivo, pri promatranju učinaka srednje doze frakcije B; 22,5 µg/mL, razvijeni tlak lijeve klijetke u početku mjerenja

se smanjivao, te se potom približno oko desete minute vratio na početne vrijednosti (Slika 32.).

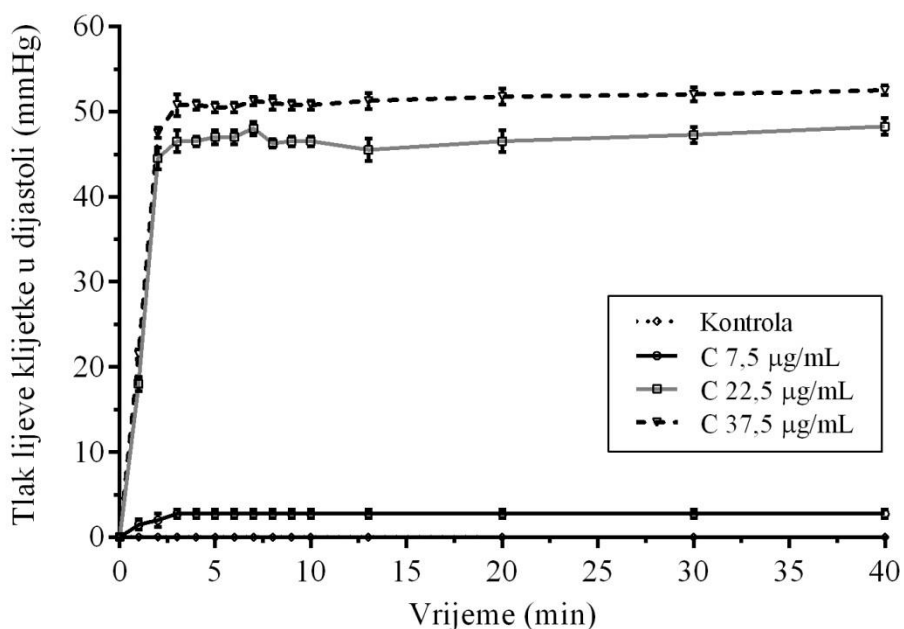


**Slika 32.** Promjene vrijednosti razvijenog tlaka lijeve klijetke tijekom izloženosti frakciji B.

Promjene vrijednosti dijastoličkog tlaka lijeve klijetke mijenjale su se suprotno od razvijenog tlaka pri ispitivanju učinaka frakcija B i C u rastućim koncentracijama (Tablica 18., Slika 33. i Slika 34.). Vrijednosti dijastoličkog tlaka lijeve klijetke rastle su se s ispitivanjem viših koncentracija frakcija B i C, uz mnogo izražajniji učinak same frakcije C (Tablica 18.). Značajno smanjenje sistoličkog i razvijenog tlaka lijeve klijetke u trećoj minuti od početka ispitivanja učinka pojedine tvari, te u trećoj minuti nakon prestanka djelovanja možebitne otrovne sastavnice bilo je povezano s povišenjem dijastoličkog tlaka lijeve klijetke čak i pri ispitivanju najniže koncentracije frakcije C; 7,5 µg/mL ( $P < 0,01$ ; Slika 31. i Slika 33.). U pokusima na srcima u kojima su korištene konačne koncentracije od 22,5 i 37,5 µg/mL frakcije C, razvijeni tlak lijeve klijetke bio je gotovo nemjerljiv uslijed izraženog porasta i dijastoličkog tlaka (Slika 31. i 33.), što je zabilježeno statističkom značajnošću u usporedbi s početnim vrijednostima spomenutih pokazatelja ( $P < 0,01$ ; Tablica 18.).

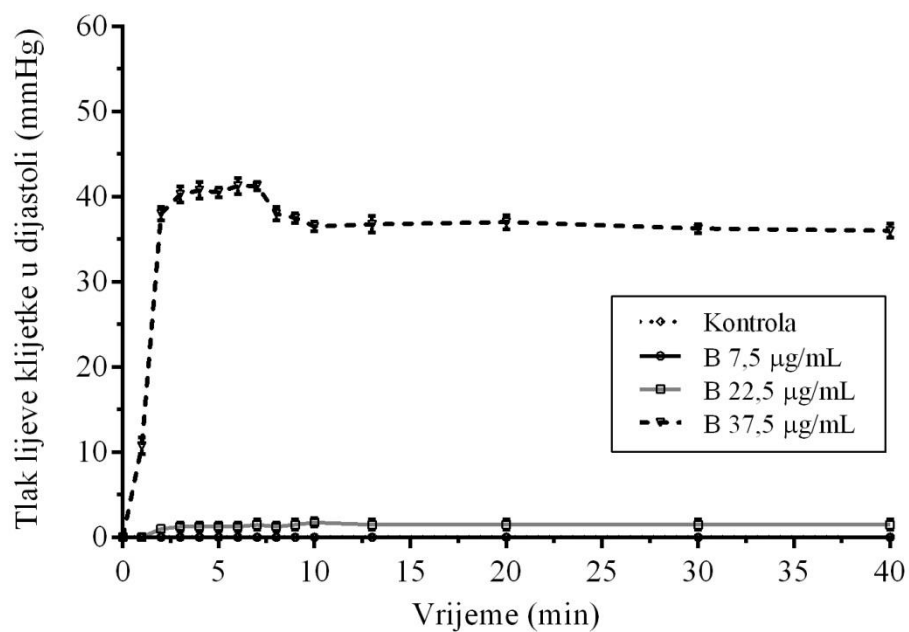


Navedeno je u suglasnosti s ireverzibilnom kontrakturom srčanog mišića zabilježenom tijekom primjene frakcije C u navedenim koncentracijama.



**Slika 33.** Promjene vrijednosti dijastoličkog tlaka lijeve klijetke tijekom izloženosti frakciji C.

Frakcija B uzrokovala je značajne te ireverzibilne promjene vrijednosti sistoličkog i razvijenog tlaka lijeve klijetke, kao i zamjetno povišenje razvijenog tlaka samo pri ispitivanju učinaka najviše koncentracije; 37,5 µg/mL ( $P < 0,01$ ), kada su sva srca trajno ostala u ireverzibilnoj kontrakaturi, te u konačnici doživjela zastoj u približno dvanaestoj minuti od početka primjene ove sastavnice (Slika 32. i 34.). Tijekom ispitivanja učinaka frakcije B u koncentraciji od 22,5 µg/mL, u trećoj minuti pokusa zabilježen je nezamjetan porast vrijednosti dijastoličkog tlaka lijeve klijetke koji je trajao do približno tri minute nakon prestanka izloženosti spomenutoj sastavnici (Tablica 18. i Slika 34.). Ovakvi učinci bili su praćeni značajnim smanjenjem vrijednostima sistoličkog ( $97,0 \pm 2,2$  prema  $117,0 \pm 2,2$  mmHg,  $P < 0,01$ ) i razvijenog tlaka lijeve klijetke ( $95,5 \pm 2,1$  prema  $117,0 \pm 2,2$  mmHg,  $P < 0,01$ ; Tablica 18.) Svi navedeni učinci bili su reverzibilni (Slika 32. i 34.).



**Slika 34.** Promjene vrijednosti dijastoličkog tlaka lijeve klijetke tijekom izloženosti frakciji B.

Pri ispitivanju učinaka svih izoliranih frakcija u najmanjoj dozi; 7,5 µg/mL, nisu zabilježene promjene u vrijednostima mjerenih tlakova u lijevoj klijetci (Tablica 18.).

### 4.5.3. Biokemijski pokazatelji

Početne vrijednosti biokemijskih pokazatelja srčane funkcije i srčana oštećenja nastala uslijed primjene izoliranih frakcija A, B i C prikazane su u Tablici 19. Frakcija C primijenjena u svim koncentracijama uzrokovala je najistaknutija, statistički značajna srčana oštećenja što je u sukladnosti s drugim mjerenim pokazateljima srčane funkcije (Tablica 18. i Tablica 19.). Frakcija B u koncentracijama od 22,5 i 37,5  $\mu\text{g/mL}$  uzrokovala je statistički značajan porast biokemijskih biljega srčanog oštećenja (Tablica 19.). Jednako kao i u drugim mjerenim pokazateljima, frakcija A nije uzrokovala klinički značajna srčana oštećenja (Tablica 18. i Tablica 19.).

**Tablica 19.** Biokemijski pokazatelji srčane funkcije i/ili oštećenja mjereni u trećoj minuti od početka izloženosti srca različitim koncentracijama izoliranih frakcija A, B i C.

Frakcija	Koncentracija ( $\mu\text{g/mL}$ )	Biokemijski pokazatelji (SV $\pm$ SD)			
		CK* (IU/L)	LDH† (IU/L)	AST‡ (IU/L)	Troponin I§ ( $\mu\text{g/L}$ )
Kontrola		2,13 $\pm$ 0,69	0,27 $\pm$ 0,13	3,13 $\pm$ 0,92	0,01 $\pm$ 0,01
<b>A</b>					
	7,5	2,34 $\pm$ 0,70	0,78 $\pm$ 0,11	4,18 $\pm$ 1,16	0,03 $\pm$ 0,01
	22,5	2,41 $\pm$ 0,81	0,92 $\pm$ 0,30	7,32 $\pm$ 0,98	0,07 $\pm$ 0,02
	37,5	2,50 $\pm$ 0,89	0,98 $\pm$ 0,43	11,60 $\pm$ 1,75	0,12 $\pm$ 0,03
Kontrola		2,23 $\pm$ 0,40	0,53 $\pm$ 0,20	3,49 $\pm$ 1,01	0,02 $\pm$ 0,01
<b>B</b>					
	7,5	2,27 $\pm$ 0,41	4,26 $\pm$ 1,70 <sup>¶</sup>	64,25 $\pm$ 2,28 <sup>¶</sup>	1,22 $\pm$ 0,02
	22,5	15,17 $\pm$ 1,13 <sup>¶</sup>	17,91 $\pm$ 0,69 <sup>¶</sup>	175,34 $\pm$ 3,28 <sup>¶</sup>	4,01 $\pm$ 0,03 <sup>¶</sup>
	37,5	61,23 $\pm$ 1,75 <sup>¶</sup>	92,73 $\pm$ 1,28 <sup>¶</sup>	321,43 $\pm$ 6,26 <sup>¶</sup>	4,24 $\pm$ 0,03 <sup>¶</sup>
Kontrola		2,37 $\pm$ 0,73	0,49 $\pm$ 0,17	3,57 $\pm$ 0,70	0,03 $\pm$ 0,01
<b>C</b>					
	7,5	19,22 $\pm$ 1,97 <sup>¶</sup>	12,69 $\pm$ 1,21 <sup>¶</sup>	289,62 $\pm$ 4,96 <sup>¶</sup>	4,78 $\pm$ 0,05 <sup>¶</sup>
	22,5	65,37 $\pm$ 2,01 <sup>¶</sup>	164,32 $\pm$ 1,33 <sup>¶</sup>	373,81 $\pm$ 5,31 <sup>¶</sup>	6,23 $\pm$ 0,07 <sup>¶</sup>
	37,5	71,49 $\pm$ 1,99 <sup>¶</sup>	181,89 $\pm$ 1,71 <sup>¶</sup>	378,62 $\pm$ 5,79 <sup>¶</sup>	7,95 $\pm$ 0,08 <sup>¶</sup>

\*CK – kreatin kinaza; †LDH – laktat dehidrogenaza; ‡AST – aspartat aminotransferaza; §Troponin I – specifičan srčani biljeg; ¶ $P < 0,01$  prema kontroli.

#### 4.6. Kardiotskični učinci podfrakcija otrova poskoka i amoditina L

Promjene mjerenih pokazatelja srčane funkcije tijekom izloženosti izoliranim podfrakcijama C1-4 otrova poskoka (vidjeti detaljnije Sliku 18.) u tri različite koncentracije, te amoditina L u koncentraciji od 1 µg/mL prikazane su u Tablici 20. i 21.

**Tablica 20.** Mjereni pokazatelji srčane funkcije na modelu izoliranog štakorskog srca tijekom ispitivanja učinaka izoliranih podfrakcija C1 i C2.

Podfrakcija (µg/mL)	Vrijeme (min)	Srčani pokazatelji (SV ± SD)				
		HR* (otkucaj/min)	CF† (mL/min)	sLVP‡ (mmHg)	devLVP§ (mmHg)	dLVP¶ (mmHg)
Kontrola		289,6 ± 1,6	11,1 ± 0,1	116,0 ± 2,3	116,0 ± 2,3	0
<b>C1 (2,3)</b>						
	0	288,8 ± 1,4	11,3 ± 0,2	116,3 ± 2,4	116,3 ± 2,4	0
	3	287,5 ± 1,4	11,2 ± 0,1	115,6 ± 1,5	115,6 ± 1,5	0
	13	286,2 ± 1,3	11,1 ± 0,1	115,1 ± 2,0	115,1 ± 2,0	0
<b>C1 (6,8)</b>						
	0	296,4 ± 2,1	11,2 ± 0,2	116,6 ± 2,6	116,6 ± 2,6	0
	3	293,2 ± 2,7	11,2 ± 0,1	115,1 ± 1,2	115,1 ± 1,2	0
	13	289,3 ± 2,5	11,1 ± 0,1	114,5 ± 1,4	114,5 ± 1,4	0
<b>C1 (11,3)</b>						
	0	291,2 ± 3,9	11,2 ± 0,2	116,4 ± 1,2	116,4 ± 1,2	0
	3	1,0 ± 0,0¶	4,3 ± 0,2¶	60,4 ± 1,4¶	1,2 ± 0,4¶	59,2 ± 1,2¶
	13	1,0 ± 0,0¶	3,6 ± 0,4¶	62,3 ± 1,0¶	1,0 ± 0,0¶	53,2 ± 1,1¶
Kontrola		293,1 ± 2,5	11,1 ± 0,1	116,0 ± 1,8	116,0 ± 1,8	0
<b>C2 (1,2)</b>						
	0	291,2 ± 2,7	11,2 ± 0,2	116,2 ± 1,2	116,2 ± 1,2	0
	3	288,8 ± 2,4	11,2 ± 0,1	115,8 ± 1,3	115,8 ± 1,3	0
	13	286,5 ± 1,9	11,0 ± 0,1	115,3 ± 1,2	115,3 ± 1,2	0
<b>C2 (3,6)</b>						
	0	289,2 ± 2,3	11,0 ± 0,3	116,9 ± 2,3	116,9 ± 2,3	0
	3	287,9 ± 2,1	10,9 ± 0,1	116,6 ± 2,1	116,6 ± 2,1	0
	13	286,5 ± 2,3	10,9 ± 0,2	115,3 ± 2,0	115,3 ± 2,0	0
<b>C2 (6,0)</b>						
	0	292,1 ± 3,7	11,1 ± 0,2	116,7 ± 1,2	116,7 ± 1,2	0
	3	235,0 ± 6,7¶	9,3 ± 1,0	94,3 ± 2,1¶	91,2 ± 1,2¶	3,1 ± 0,6
	13	233,7 ± 5,6¶	8,0 ± 0,1¶	94,0 ± 1,3¶	91,1 ± 1,1¶	2,9 ± 0,4

\*HR – srčana frekvencija (engl. *heart rate*); †CF – koronarni protok (engl. *coronary flow*); ‡sLVP – sistolički tlak u lijevoj klijetci (engl. *systolic left ventricular pressure*); §devLVP – razvijeni tlak u lijevoj klijetci (engl. *developed left ventricular pressure*); ¶dLVP – dijastolički tlak u lijevoj klijetci (engl. *diastolic left ventricular pressure*); ¶P < 0,01 prema kontroli.

Najznačajniju promjenu vrijednosti srčane frekvencija uzrokovala je podfrakcija C1 prilikom primjene najviše koncentracije; 11,3 µg/mL (Tablica 20.). Sva srca izložena navedenoj koncentraciji doživjela su ireverzibilni srčani zastoj u trećoj minuti od početka davanja toksične sastavnice. Također, u svih izloženih srca zabilježena je pojava ventrikularne tahikardije (N = 10) i fibrilacije (N = 10) koje su prethodile pojavi asistolije (N = 10). Sukladno opisanom, zabilježeno je značajno smanjenje vrijednosti koronarnog protoka u trećoj minuti ( $11,1 \pm 0,1$  prema  $4,3 \pm 0,2$  mL/min,  $P < 0,01$ ), kao i smanjenje vrijednosti razvijenog tlaka lijeve klijetke ( $116,0 \pm 2,3$  prema  $1,2 \pm 0,4$  mmHg,  $P < 0,01$ ), te povišenje dijastoličkog tlaka lijeve klijetke ( $59,2 \pm 1,2$  prema  $0$  mmHg,  $P < 0,01$ ; Tablica 20.). Podfrakcija C1 prilikom primjene srednje i najmanje doze nije uzrokovala bitnije promjene mjerenih srčanih pokazatelja (Tablica 20.).

Podfrakcija C2 samo je pri testiranju najviše koncentracije; 6,0 µg/mL, uzrokovala statistički značajne promjene srčane funkcije, i to smanjene srčane frekvencije u trećoj i trinaestoj minuti, kao i pad vrijednosti koronarnog protoka u odnosu na početne vrijednosti (Tablica 20.). Navedeno je bilo praćeno statistički značajnim smanjenjem vrijednosti razvijenog tlaka lijeve klijetke i neznčajnim povišenjem dijastoličkog tlaka u lijevoj klijetci (Tablica 20.). Tijekom svih pokusa s podfrakcijom C2 nisu zabilježene promjene vrste srčanog ritma.

Podfrakcije C3 i C4 korištene u svim koncentracijama nisu uzrokovale značajnije promjene mjerenih pokazatelja srčane funkcije (Tablica 21.).

Amoditin L uzrokovao je značajno smanjenje vrijednosti srčane frekvencije u trećoj i trinaestoj minuti u odnosu na početne vrijednosti ( $221,0 \pm 4,3$  i  $219,4 \pm 5,1$  prema  $292,1 \pm 3,7$  otkucaj/min,  $P < 0,01$ ), kao i vrijednosti koronarnog protoka u navedenim odnosima ( $8,1 \pm 0,2$  i  $7,7 \pm 0,1$  prema  $11,0 \pm 0,1$  mL/min,  $P < 0,01$ ; Tablica 21.). Također, u trećoj i trinaestoj minuti zabilježeno je značajno smanjenje razvijenog tlaka lijeve klijetke praćeno povišenjem tlaka lijeve klijetke u dijastoli (Tablica 21.). Tijekom pokusa s amoditinom L zabilježena je pojava AV bloka u svih izloženih srca (N = 10) u trećoj minuti od početka primjene istog. Prilikom izlaganja srca koncentraciji amoditina L od 1 µg/mL niti jedno srce nije doživjelo drugu vrstu aritmije, kao ni srčani zastoj.

**Tablica 21.** Mjereni pokazatelji srčane funkcije na modelu izoliranog štakorskog srca tijekom ispitivanja učinaka izoliranih podfrakcija C3 i C4, te amoditina L (Atn-L).

Podfrakcija ( $\mu\text{g/mL}$ )	Vrijeme (min)	Srčani pokazatelji (SV $\pm$ SD)				
		HR* (otkucaj/min)	CF <sup>†</sup> (mL/min)	sLVP <sup>‡</sup> (mmHg)	devLVP <sup>§</sup> (mmHg)	dLVP <sup>  </sup> (mmHg)
Kontrola		289,6 $\pm$ 1,6	11,1 $\pm$ 0,1	116,0 $\pm$ 2,3	116,0 $\pm$ 2,3	0
<b>C3 (1,6)</b>						
	0	286,8 $\pm$ 1,5	11,2 $\pm$ 0,1	116,3 $\pm$ 1,9	116,3 $\pm$ 1,9	0
	3	284,7 $\pm$ 1,4	11,1 $\pm$ 0,2	115,8 $\pm$ 1,4	115,8 $\pm$ 1,4	0
	13	283,2 $\pm$ 1,4	11,1 $\pm$ 0,1	114,9 $\pm$ 2,0	114,9 $\pm$ 2,0	0
<b>C3 (4,7)</b>						
	0	294,7 $\pm$ 2,2	11,1 $\pm$ 0,2	115,8 $\pm$ 2,7	115,8 $\pm$ 2,7	0
	3	292,8 $\pm$ 2,5	11,2 $\pm$ 0,1	115,3 $\pm$ 1,3	115,3 $\pm$ 1,3	0
	13	288,5 $\pm$ 2,1	11,2 $\pm$ 0,1	114,8 $\pm$ 1,6	114,8 $\pm$ 1,6	0
<b>C3 (7,9)</b>						
	0	291,7 $\pm$ 1,7	11,3 $\pm$ 0,2	116,6 $\pm$ 1,6	116,6 $\pm$ 1,6	0
	3	290,5 $\pm$ 1,6	11,3 $\pm$ 0,2	115,5 $\pm$ 1,2	115,5 $\pm$ 1,2	0
	13	289,7 $\pm$ 2,3	11,1 $\pm$ 0,1	115,7 $\pm$ 1,5	115,7 $\pm$ 1,5	0
Kontrola		293,1 $\pm$ 2,5	11,1 $\pm$ 0,1	116,0 $\pm$ 1,8	116,0 $\pm$ 1,8	0
<b>C4 (2,5)</b>						
	0	292,2 $\pm$ 2,8	11,1 $\pm$ 0,1	115,7 $\pm$ 1,2	115,7 $\pm$ 1,2	0
	3	290,7 $\pm$ 2,4	11,2 $\pm$ 0,1	115,9 $\pm$ 1,3	115,9 $\pm$ 1,3	0
	13	288,6 $\pm$ 2,3	11,0 $\pm$ 0,1	114,8 $\pm$ 1,3	114,8 $\pm$ 1,3	0
<b>C4 (7,4)</b>						
	0	292,7 $\pm$ 2,9	11,0 $\pm$ 0,3	116,3 $\pm$ 2,3	116,3 $\pm$ 2,3	0
	3	289,6 $\pm$ 2,3	10,9 $\pm$ 1,1	116,6 $\pm$ 2,1	116,6 $\pm$ 2,1	0
	13	291,1 $\pm$ 3,1	11,1 $\pm$ 0,2	115,6 $\pm$ 2,7	115,6 $\pm$ 2,7	0
<b>C4 (12,4)</b>						
	0	293,1 $\pm$ 2,6	11,2 $\pm$ 0,2	115,9 $\pm$ 2,0	115,9 $\pm$ 2,0	0
	3	287,5 $\pm$ 2,7	11,0 $\pm$ 0,1	116,0 $\pm$ 1,8	116,0 $\pm$ 1,8	0
	13	291,0 $\pm$ 2,1	11,1 $\pm$ 0,2	115,8 $\pm$ 2,2	115,8 $\pm$ 2,2	0
Kontrola		292,6 $\pm$ 2,3	11,1 $\pm$ 0,2	116,2 $\pm$ 1,7	116,3 $\pm$ 1,4	0
<b>Atn-L (1,0)</b>						
	0	292,1 $\pm$ 3,7	11,0 $\pm$ 0,1	115,8 $\pm$ 1,3	115,8 $\pm$ 1,3	0
	3	221,0 $\pm$ 4,3 <sup>¶</sup>	8,1 $\pm$ 0,2 <sup>¶</sup>	90,1 $\pm$ 1,6 <sup>¶</sup>	77,8 $\pm$ 1,5 <sup>¶</sup>	12,3 $\pm$ 0,4 <sup>¶</sup>
	13	219,4 $\pm$ 5,1 <sup>¶</sup>	7,7 $\pm$ 0,1 <sup>¶</sup>	89,2 $\pm$ 1,2 <sup>¶</sup>	76,2 $\pm$ 1,8 <sup>¶</sup>	13,1 $\pm$ 0,6 <sup>¶</sup>

\*HR – srčana frekvencija (engl. *heart rate*); <sup>†</sup>CF – koronarni protok (engl. *coronary flow*); <sup>‡</sup>sLVP – sistolički tlak u lijevoj klijetci (engl. *systolic left ventricular pressure*); <sup>§</sup>devLVP – razvijeni tlak u lijevoj klijetci (engl. *developed left ventricular pressure*); <sup>||</sup>dLVP – dijastolički tlak u lijevoj klijetci (engl. *diastolic left ventricular pressure*); <sup>¶</sup>P < 0,01 prema kontroli.

Biokemijski pokazatelji srčanog oštećenja očekivano su značajno povisili za vrijeme izloženosti podfrakcijama C1 i C2 u najvišim koncentracijama, a isto je zabilježeno i prilikom mjerenja učinaka amoditina L (Tablica 22.).

**Tablica 22.** Biokemijski pokazatelji srčane funkcije i/ili oštećenja mjereni u trećoj minuti od početka izloženosti srca različitim koncentracijama izoliranih podfrakcija C1-4, te amoditina L (Atn-L).

Podfrakcija	Koncentracija ( $\mu\text{g/mL}$ )	Biokemijski pokazatelji (SV $\pm$ SD)			
		CK* (IU/L)	LDH <sup>†</sup> (IU/L)	AST <sup>‡</sup> (IU/L)	Troponin I <sup>§</sup> ( $\mu\text{g/L}$ )
Kontrola		2,11 $\pm$ 0,65	0,24 $\pm$ 0,16	3,18 $\pm$ 0,88	0,01 $\pm$ 0,01
C1					
	2,3	2,22 $\pm$ 0,98	0,77 $\pm$ 0,15	3,23 $\pm$ 1,11	0,02 $\pm$ 0,01
	6,8	2,43 $\pm$ 0,88	0,91 $\pm$ 0,34	6,65 $\pm$ 0,99	0,07 $\pm$ 0,02
	11,3	79,14 $\pm$ 2,02 <sup>¶</sup>	198,08 $\pm$ 1,88 <sup>¶</sup>	399,78 $\pm$ 4,43 <sup>¶</sup>	7,78 $\pm$ 0,04 <sup>¶</sup>
Kontrola		2,22 $\pm$ 0,51	0,33 $\pm$ 0,20	3,94 $\pm$ 1,11	0,02 $\pm$ 0,01
C2					
	1,2	2,25 $\pm$ 0,62	1,27 $\pm$ 1,34	3,88 $\pm$ 1,28	0,03 $\pm$ 0,01
	3,6	3,17 $\pm$ 1,15	1,91 $\pm$ 0,69	5,03 $\pm$ 2,32	0,07 $\pm$ 0,03
	6,0	14,68 $\pm$ 2,10 <sup>¶</sup>	19,71 $\pm$ 1,24 <sup>¶</sup>	178,34 $\pm$ 2,78 <sup>¶</sup>	5,01 $\pm$ 0,02 <sup>¶</sup>
Kontrola		2,36 $\pm$ 0,76	0,54 $\pm$ 0,19	3,76 $\pm$ 0,68	0,03 $\pm$ 0,01
C3					
	1,6	2,22 $\pm$ 0,97	0,79 $\pm$ 0,13	3,77 $\pm$ 1,15	0,03 $\pm$ 0,01
	4,7	3,46 $\pm$ 1,01	0,99 $\pm$ 0,43	4,43 $\pm$ 0,97	0,02 $\pm$ 0,01
	7,9	3,73 $\pm$ 0,99	1,21 $\pm$ 0,37	4,73 $\pm$ 1,01	0,01 $\pm$ 0,01
Kontrola		2,88 $\pm$ 0,27	0,44 $\pm$ 0,16	3,79 $\pm$ 0,74	0,03 $\pm$ 0,01
C4					
	2,5	2,61 $\pm$ 0,62	0,86 $\pm$ 0,14	3,98 $\pm$ 1,19	0,03 $\pm$ 0,01
	7,4	2,46 $\pm$ 1,11	1,13 $\pm$ 0,55	4,39 $\pm$ 1,10	0,02 $\pm$ 0,01
	12,4	2,73 $\pm$ 1,13	1,26 $\pm$ 0,26	4,53 $\pm$ 1,13	0,01 $\pm$ 0,01
Kontrola		2,76 $\pm$ 0,23	0,45 $\pm$ 0,11	3,26 $\pm$ 0,66	0,02 $\pm$ 0,01
Atn-L					
	1,0	15,37 $\pm$ 2,13 <sup>¶</sup>	24,23 $\pm$ 2,16 <sup>¶</sup>	173,64 $\pm$ 4,26 <sup>¶</sup>	5,78 $\pm$ 0,04 <sup>¶</sup>

\*CK – kreatin kinaza; <sup>†</sup>LDH – laktat dehidrogenaza; <sup>‡</sup>AST – aspartat aminotransferaza; <sup>§</sup>Troponin I – specifičan srčani biljeg; <sup>¶</sup> $P < 0,01$  prema kontroli.

## **5. RASPRAVA**



Imajući u vidu značajan medicinski problem koji predstavljaju otrovanja uzrokovana otrovom *V. a. ammodytes* u određenim područjima Europe, kao primjerice u mediteranskim zemljama (13,94), cilj ovog rada bio je detaljnije razložiti učinak otrova za kojeg je ranije opisano kako cjelokupan uzrokuje značajnu kardiotoksičnost (127).

Inokulacija zmijskog otrova izravno u krvotok i/ili drugdje u blizinu srca uobičajeno uzrokuje tešku kliničku sliku sustavnog otrovanja koja može rezultirati hemodinamskom nestabilnošću s razvojem toksičnog šoka i posljedičnim smrtnim ishodom (109). Klinički slučajevi u kojima je opisan smrtni ishod u djece i odraslih nastao nakon ugriza zmijske *Vipera aspis* i *V. a. ammodytes* svjedoče o velikoj medicinskoj važnosti teškog sustavnog otrovanja (99,109). Unatoč pravovremenoj primjeni protuotrova i drugim potpornim mjerama liječenja, smrtni ishod u ovim slučajevima rezultat je udruženih poremećaja, najčešće teškog poremećaja hemostaze i izravnog srčanog oštećenja. U prilog tome govore i patohistološke promjene otkrivene na srcu pri obdukciji odraslih osoba žrtava ugriza zmijske *V. aspis* (99). U osoba s teškom kliničkom slikom sustavnog otrovanja nastalom nakon ugriza zmijske iz porodice *Viperinae* uobičajeno su opisana stanja prijetećeg šoka, promjene u elektrokardiografskoj aktivnosti srca, po život ozbiljna krvarenja, poremećaji disanja, te oštećenja bubrega i jetre (13,94,102,106,116).

Potaknuti kliničkim značajem spomenutih otrovanja, znanstvenici temeljnih znanosti pokušavali su napraviti sustav s ciljem analiziranja izravnih učinaka zmijskih otrova na životinjskim modelima s posebnim naglaskom na učinak istih na kardiovaskularni sustav. Kinjo i sur. proučavali su značajke otrova *Trimeresurus flavoviridans* na štakorima *in vivo* te na izoliranim aortnim prstenovima *in vitro* (125). Alloatti i sur. istraživali su pak učinak otrova zmijske *Vipera nasicornis* na izoliranom srcu odrasle svinje (126). Oba navedena istraživanja opisala su uglavnom samo nespecifične promjene u elektrokardiografskom zapisu srčane aktivnosti, bez naglašavanja ozbiljnih hemodinamskih aritmija, te samo s nekoliko mjerenih pokazatelja srčane funkcije koji imaju kliničko obilježje kardiotoksičnosti (125,126). Također, ova istraživanja ispitivala su učinak nestandardiziranog otrova u nekontroliranom sustavu, a uglavnom su za cilj imala ispitati možebitne zaštitne tvari za srce kao farmakološke alate za neutralizaciju otrova (125,126).

Model srca kakav je korišten u ovom istraživanju, primjer je istog u kontroliranim uvjetima u kojem se koristi izolirano perfundirano štakorsko srce (127). Međutim, ovakav model također ima nekoliko nedostataka o kojima treba razmišljati prilikom tumačenja

rezultata dobivenih na izoliranom srcu. Naime, ovakav sustav ne može prikazati u potpunosti sustavni odgovor čitavog organizma u trenutku otrovanja, jer se primjerice u slučaju hemodinamske nestabilnosti aktiviraju potporni (kompenzacijski) mehanizmi kao što su bubrežne arterije i periferna cirkulacija koji pomažu podržati srčanu nedostatnost u održavanju sustavne cirkulacije. Iz navedenog je razvidno kakve nedostatnosti obilježavaju model izoliranog srca.

U cilju detaljnijeg proučavanja izravnih kardiotskičnih učinaka *V. a. ammodytes* otrova, koristeći kolonsku gelsku kromatografiju razdijelili smo cjelokupni otrov poskoka na četiri frakcije (127). Možebitni kardiotskični učinak izoliranih sastavnica (frakcija A, B i C) pretpostavljen je temeljem poznatog proteinskog sastava svake od navedenih frakcija (15,25).

U našem istraživanju frakcija A nije iskazala kardiotskičnost na prikazanom modelu. Sastavnice ove frakcije su proteini približne molekularne mase 60-100 kDa, i to uglavnom metaloproteinaze grupe III; (ne)hemoragične metaloproteinaze i oksidaze L-amino kiselina (23-25,81,83,84).

Frakcija B, sastavljena od proteina približne molekularne mase 30-40 kDa, iskazala je kardiotskičnost u punini samo u najvišoj ispitivanoj koncentraciji; 37,5 µg/mL. Svako srce koje je bilo izloženo ovoj koncentraciji frakcije B doživjelo je maligne aritmije, te u konačnici i asistoliju. Aritmogeni učinak može biti uzrokovan (mio)toksičnim sastavnicama ove frakcije s posljedičnom hiperkontrakciom i zastojem srca, te nastankom promijenjenih, neuobičajenih (aberrantnih) provodnih puteva u oštećenom srcu. Srednja doza frakcije B; 22,5 µg/mL, reverzibilno je utjecala na srčanu funkciju. Ovakav učinak može se objasniti prvenstveno hematotskičnim obilježjem frakcije B (25). Reverzibilne promjene srčanih pokazatelja opisane su i u radu Lukšića i sur. prilikom ispitivanja najmanje doza cjelokupnog otrova poskoka; 30 µg/mL (127). Zabilježene promjene na srcu, ireverzibilne i rezervibilne, mogu biti posljedica različitih učinaka svih sastavnica unutar ukupnog otrova *V. a. ammodytes*. Spomenuta ireverzibilna srčana oštećenja sukladna su istraživanju De Haro i sur. u kojem su opisane patohistološke promjene na srcu odrasle osobe smrtno stradale od ugriza zmijske *V. aspis*, vrlo srodne poskoku (99). Suprotno tome, rezervibilnost kardiotskičnih učinaka ovisi i o koncentraciji (kardio)toksičnih tvari u cjelokupnom otrovu.

Proteini različitih skupina sastavni su dio frakcije B; serinske proteaze, metaloproteinaze grupe I, sekretorni proteini bogati cisteinom, lektini C-tipa prisutni u zmijskim otrovima i disintegrini (25). Miotoksična aktivnost frakcije B, možebitni uzrok

zabilježene kardiotoksičnosti, može biti posljedica CRISP proteina koji inhibiraju depolarizacijom uzrokovanu kontrakciju glatkih mišića stupajući u međudjelovanje s voltažno ovisnim  $\text{Ca}^{2+}$ - i  $\text{K}^{+}$ -kanalima, te blokiraju kanale ovisne o cikličkim nukleotidima (132-134). Miotoksična aktivnost ove frakcije može biti uzrokovana i amoditinom L, glavnim miotoksinom ukupnog otrova *V. a. ammodytes*. Amoditin L, zapravo je vrsta sekretorne fosfolipaze  $\text{A}_2$  čija približna molekularna masa iznosi 14 kDa, a kako se često nalazi u formi dimera sigurno je u određenoj mjeri prisutna i u frakciji B (25,90). Prema dosadašnjim istraživanjima, SVSP, SVMP, *snacles* i disintegrini u frakciji B utječu prvenstveno na hemostatski sustav, no možebitna kardiotoksična aktivnost nekih od navedenih molekula ne može se u potpunosti isključiti (23,25).

U ovom istraživanju glavnina kardiotoksičnih učinaka na prikazanom modelu povezana je s djelovanjem izolirane frakcije C. Kardiotoksičnost je iskazana kao značajno smanjene srčane frekvencije i koronarnog protoka zajedno s povećanjem dijastoličkog te smanjenjem sistoličkog i razvijenog tlaka lijeve klijetke, uz značajno povišenje biokemijskih pokazatelja srčanog oštećenja. Štakorska srca izložena koncentracijama frakcije C od 22,5 i 37,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  doživjela su ireverzibilni srčani zastoj; asistoliju, već nakon približno dvije minute od početka primjene ove frakcije. Također, frakcija C uzrokovala je značajno učestaliju pojavu srčanih aritmija u odnosu na druge frakcije. Kardiotoksični učinci frakcije C sukladni su učinku cjelokupnog otrova korištenog u istom pokusnom modelu temeljem čega je kardiotoksična aktivnost očita sastavnica unutar frakcije C (127). Najnaglašeniji opisani učinak bio je depresija srčane kontraktilnosti značajno povezan s o dozi ovisnom porastu biokemijskih pokazatelja srčanog oštećenja (127). Također, u istom istraživanju zabilježeni su i elektrofiziološki poremećaji srčanog ritma iskazani kao kratko, prolazno razdoblje ubrzanja srčane frekvencije praćeno potom o dozi ovisnom usporenju srčanih otkucaja (127). Ovakav učinak zabilježen je i s ukupnim otrovom zmija *Vipera lebetina* i *Bitis nasicornis* (126,135,136). S obzirom kako su pozitivni kronotropni učinci poništeni upotrebom propranolola i ranitidina,  $\beta$ -adrenergičkim i histaminskim blokatorima, pretpostavljeno je kako su ovakvi učinci posredovani katekolaminima i histaminom otpuštenim iz srčanog tkiva. (126,135,136). Poremećaji srčanog ritma, kao primjerice AV blokovi i ventrikularne maligne aritmije koje su prethodile asistoliji također su zabilježene i u istraživanju Lukšića i sur. u kojem je produljenje AV vremena provođenja srčanih podražaja tijekom razdoblja otrovanja bilo stalno; ovisno o dozi cjelokupnog otrova (127). U našem istraživanju zabilježeno je produljenje AV vremena samo u pokusima s amoditinom L, no ventrikularna tahikardija i

fibrilacija, te asistolija zbile su se učestalije no što je to prikazano u istraživanju Lukšića i sur. pri uporabi čitavog standardiziranog otrova poskoka (127,137). Ovakve uočene razlike u pojavi i učestalostima aritmija prilikom ispitivanja učinaka čitavog otrova i izolirane frakcije C vjerojatno su posljedica udruženog međudjelovanja različitih sastavnica unutra ukupnog otrova od kojih neke nisu pak zastupljene u frakciji C. Povišenje dijastoličkog i sniženje sistoličkog tlaka lijeve klijetke zabilježeno u ovom istraživanju pri pokusima s frakcijom C u suglasnosti je s rezultatima opisanim u istraživanju Lukšića i sur., pri ispitivanju učinaka cjelokupnog otrova na navedene srčane pokazatelje (127,137). Izrazito smanjenje koronarnog protoka zabilježeno u ovom istraživanju tijekom promatranja učinaka frakcije C, kao i čitavog otrova, vjerojatno nije posljedica izravnog oštećenja koronarnih arterija, već rezultat kontrakture srčanog mišića i zaustavljanja koronarne cirkulacije (127). Pretpostavljeni način za pojašnjavanje učinaka frakcije C na srčanu kontraktilnost jest oštećenje unutarstaničnih kalcijevih kanala koje uzrokuje nekontrolirani ulazak kalcijevih iona i povišenje citosolnog  $Ca^{2+}$  u miocitima, prvenstveno kao posljedica oštećenja stanične cjelovitosti, što u konačnosti rezultira kontrakturom miokarda i povišenjem potrošnje energije što dodatno doprinosi kontrakturi klijetke, uz povišenje biokemijskih biljega srčanog oštećenja u odljevu srčanog perfuzata (73,127). Lukšić i sur. zaključili su kako je potrošnja kisika bila relativno visoka u usporedbi s depresijom kontraktilnosti ukazujući na potrošnju kisika i energije u modelima izoliranog srca izloženom čitavom otrovu poskoka (127).

Frakcija C sadrži proteine približne molekularne mase 14 kDa. Sastavnice ove frakcije uglavnom su sPLA<sub>2</sub>, neurotoksični amoditoksini, netoksični amoditin, te enzimatski neaktivni miotoksin amoditin L (85,90,91). S obzirom kako klasični kardiotoksini, toksini približne molekularne mase 6 kDa sa strukturom tzv. troprstnog toksina (3TFX), nisu sastavni dio otrova *V. a. ammodytes*, vrlo vjerojatno je kardiotoksičnost cjelokupnog otrova posljedica djelovanja jedne ili više sPLA<sub>2</sub> u otrovu (15,25,138). S obzirom na o dozi otrova ovisnom porastu biokemijskih pokazatelja srčanog oštećenja zaključujemo o citolitičkom te kardiotoksičnom djelovanju otrova poskoka (127). Temeljem neizravnih pokusnih dokaza, miotoksični analog – amoditin L vrlo vjerojatno je jedan od proteina s kardiotoksičnim djelovanjem. Međudjelovanje nekih sPLA<sub>2</sub> unutar zmijskog otrova s različitim vrstama izoliranih stanica dobro su poznata, a izravan učinak navedenih na srce također je istraživao (70,139). Tako je primjerice, sPLA<sub>2</sub> iz otrova zmije *Bothrops marajoensis* uzrokovala hipotenziju i tahikardiju s blokom u provođenju srčanih podražaja, a spomenuta sPLA<sub>2</sub> iz otrova *Naja nigricollis* skraćenje, neovisno o enzimatskoj aktivnosti, amplitude membranskog

potencijala mirovanja i trajanje akcijskog potencijala umanjujući na ovakav način kontraktilnost desne klijetke izoliranog štakorskog srca (140,141). Izloženost otrovu zmijske *Bothrops jararacussu* uzrokuje ireverzibilnu, o dozi ovisnu kontrakturu izolirane pretklijetke štakora što je i kvantitativno potvrđeno razinom povišenja kreatin kinaze iz srčanog mišića, te histološkim promjenama oštećenih miocita (142). Navedena kardiotoksičnost neutralizirana je prethodnom primjenom inhibitora sPLA<sub>2</sub> (142). Također, miotoksičnost i kardiotoksičnost otrova zmijske *Bungarus fasciatus* može biti antagonizirana tvarima koje inhibiraju aktivnost sPLA<sub>2</sub> pretpostavljajući time kako toksičnost čitavog otrova potječe od sPLA<sub>2</sub> (143).

Neurotoksično i hematotoksično djelovanje otrova *V. a. ammodytes* dobro je poznato, no kardiotoksičnost do sada je slabo istražena. Pretklinička istraživanja s različitim frakcijama cjelokupnog otrova dobivenim gelskom kromatografijom na izoliranom perfundiranom štakorskom srcu pokazala su kako kardiotoksičnost sastavnica ukupnog otrova u daljnjem istraživanjima treba biti ispitivana vjerojatno unutar skupine sPLA<sub>2</sub> (137). Frakcija čitavog otrova *V. a. ammodytes* koja uglavnom sadržava sPLA<sub>2</sub> molekule uzrokovala je značajan pad srčane frekvencije i koronarnog protoka, povišenje dijastoličkog, te smanjenje sistoličkog i razvijenog tlaka lijeve klijetke, uz značajno povišenje biokemijskih biljega srčanog oštećenja. Ova frakcija uzrokovala je i brzi ireverzibilni zastoj srca, asistoliju te prethodne ventrikularne fibrilacije i tahikardije. U skupini sPLA<sub>2</sub>, amoditin L – miotoksični analog sPLA<sub>2</sub>, čini se kao možebitno zanimljiva tvar za daljnja istraživanja kardiotoksične aktivnosti cjelokupnog otrova *V. a. ammodytes*.

## **6. ZAKLJUČCI**

Temeljem uspoređivanja razlika u srčanoj funkciji i/ili oštećenju na modelu izoliranog štakorskog srca izloženom različitim izoliranim frakcijama cjelokupnog otrova poskoka zaključujemo kako sastavnica otrova približne molekularne mase 14 kDa, u ovom istraživanju nazvana frakcija C, iskazuje kardiotskično djelovanje u svim ispitivanim koncentracijama, te je učinak ovisan o dozi. Također, frakcija B čija je približna molekularna masa 30-40 kDa, iskazuje kardiotskični učinak u koncentracijama od 22,5 i 37,5 µg/mL.

Rezultati dobiveni istraživanjem učinka podfrakcija C1-4 na modelu izoliranog štakorskog srca nisu dovoljno specifični kako bi se detaljnije razložilo koja sastavnica; tvar unutar cjelokupnog otrova, frakcije i/ili podfrakcije uzrokuje kardiotskična oštećenja.

Amoditin L u određenoj mjeri, kao i podfrakcije C1 i C2, iskazuje kardiotskično djelovanje na modelu izoliranog srca, a ujedno je i jedina sastavnica otrova poskoka koja je na prikazanom modelu uzrokovala pojavu AV bloka.

Potrebna su daljnja istraživanja u kojima bi se potvrdio ili opovrgnuo kardiotskični učinak sekrecijskih fosolipaza A<sub>2</sub> u cjelokupnom otrovu poskoka, imajući u vidu blisko međudjelovanje svih do sada poznatih sastavnica otrova poskoka i njihovih nadopunjujućih učinaka na organizam i srce.

## **7. SAŽETAK**



Poskok (lat. *Vipera ammodytes ammodytes*) najotrovnija je europska zmija. Otrov poskoka uobičajeno iskazuje hematotoksično, miotoksično i neurotoksično, kao i kardiotoksično djelovanje. U cilju detaljnijeg istraživanja kardiotoksičnosti, biokemijskim postupcima razdijeljen je cjelokupni otrov poskoka na četiri frakcije (A-D) i podfrakcije (C1-4). Učinci frakcija A, B i C, kao i navedenih podfrakcija, te amoditina L, ispitani su na modelu izoliranog štakorskog srca.

Srčana frekvencija (HR), učestalost aritmija (atrijsko-ventrikularni (AV) blok, ventrikularna tahikardija (VT), ventrikularna fibrilacija (VF) i asistolija), koronarni protok (CF), sistolički (sLVP), razvijeni (devLVP) i dijastolički tlak lijeve klijetke (dLVP), mjereni su prije, za vrijeme i nakon primjene izoliranih sastavnica otrova poskoka u tri različite koncentracije. Biokemijski pokazatelji srčanog oštećenja (kreatin kinaza – CK, laktat dehidrogenaza – LDH, aspartat aminotransferaza – AST, i troponin I) također su mjereni tijekom razdoblja izloženosti spomenutim sastavnicama.

Frakcija A koja je sadržavala proteine približne molekularne mase 60-100 kDa nije pokazala nikakav učinak na izoliranom srcu štakora. Frakcije B i C poremetile su srčanu funkciju na sličan način, ali s različitim potencijalom, te je posljednje navedena pokazala snažniji učinak na srce. Spomenuto se manifestiralo značajnim padom vrijednosti HR i CF, te povišenjem dLVP, kao i sniženjem devLVP i sLVP, uz značajno povišenje biokemijskih biljega srčanog oštećenja. Sva srca izložena frakciji C u konačnim koncentracijama od 22,5 i 37,5 µg/mL doživjela su brz i ireverzibilan nastanak asistolije bez AV bloka, ali uz prethodni nastanak ventrikularne tahikardije i fibrilacije. Frakcija B samo prilikom primjene najveće koncentracije uzrokovala je asistoliju u svih srca, ventrikularnu fibrilaciju u 80%, te ventrikularnu tahikardiju u 70% izloženih srca. Frakcija C potaknula je nastanak ukupno 71% svih bilježenih poremećaja srčanog ritma, što je bilo značajnije nego što je to uzrokovala frakcija B (29%).

Sekretorne fosfolipaze A<sub>2</sub> najzastupljenije su sastavnice unutar frakcije C, te bi daljnja istraživanja trebala detaljnije istražiti možebitne kardiotoksične tvari unutar ove skupine proteina.

## **8. SUMMARY**

The nose-horned viper (*Vipera ammodytes ammodytes*) is the most venomous European snake. Its venom is known as haematotoxic, myotoxic and neurotoxic, but it exerts also cardiotoxic effects. To further explore the cardiotoxicity of the venom, with biochemical methods we separated it into four fractions (A-D) and four subfractions (C1-4). Three fractions that contain polypeptides (A, B, and C), and four mentioned subfractions, along with ammodytin L, were tested for their effects on the isolated rat heart.

Heart rate (HR), incidence of arrhythmias (atrioventricular (AV) blocks, ventricular tachycardia, ventricular fibrillation, and asystolia), coronary flow (CF), systolic (sLVP), developed (devLVP), and diastolic left ventricular pressure (dLVP) were measured before, during, and after the application of venom (sub)fractions in three different concentrations. Biochemical markers of myocardial damage (creatine kinase – CK, lactate dehydrogenase – LDH, aspartate aminotransferase – AST, and troponin I) were also analyzed during exposure to mentioned compounds.

Fraction A, containing proteins of 60-100 kDa, displayed no effect on the rat heart. Fractions B and C disturbed heart functioning in similar way, but with different potency that was higher by the latter. This was manifested by significant decrease of HR and CF, the increase of dLVP, and the decrease of sLVP and devLVP, accompanied with significant increase of biochemical heart damage values. All hearts treated with fraction C in the final CF concentrations 22.5 and 37.5 mg/mL suffered rapid and irreversible asystolia without AV blockade. They underwent also ventricular fibrillation and ventricular tachycardia. Fraction B affected hearts only at the highest dose inducing asystolia in all hearts, ventricular fibrillation in 80%, and ventricular tachycardia in 70% of the hearts. Venom fraction C induced 71% of all recorded heart rhythm disturbances, significantly more than fraction B, which induced 29%.

Most abundant proteins in fraction C were secreted phospholipases A<sub>2</sub> among which the venom component acting on the heart is most probably to be looked for.

## **9. POPIS LITERATURE**

1. Isbister GK, Kiernan MC. Neurotoxic marine poisoning. *Lancet Neurol.* 2005;4:219-8.
2. Kurtović T. Uloga glavnih toksičnih komponenti otrova poskoka (*Vipera ammodytes*) u njegovoj imunogenosti s posebnim osvrtom na hemoragične metaloproteinaze (doktorski rad). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu; 2013.
3. Lukšić B. Učinci standardiziranog otrova poskoka na parametre srčane funkcije i mogućnosti farmakološke zaštite na modelu štakorskog srca (doktorska disertacija). Split: Sveučilište u Splitu; 2009.
4. Ménez A. Classification of snakes. U: Moses V, urednik. *The Subtle Beast: Snakes, from Myth to Medicine.* London: Taylor & Francis; 2003. str. 51-64.
5. Vidal N, Delmas AS, David P, Cruaud C, Couloux A, Hedges SB. The phylogeny and classification of caenophidian snakes inferred from seven nuclear protein-coding genes. *C. R. Biol.* 2007;330:182-7.
6. Chippaux JP. Epidemiology of snakebites in Europe: a systematic review of the literature. *Toxicon.* 2012;59:86-99.
7. Chippaux JP, Saz-Parkinson Z, Amate Blanco JM. Epidemiology of snakebite in Europe: comparison of data from the literature and case reporting. *Toxicon.* 2013;76:206-13.
8. Mackessy SP, Baxter LM. Bioweapons synthesis and storage: The venom gland of front-fanged snakes. *Zool. Anz.* 2006;245:147-59.
9. Weinstein SA, Tamara LS, Kardong KV. Reptile venom glands: form, function, and future. U: Mackessy SP, urednik. *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles.* London: Taylor & Francis; 2010. str. 65-91.
10. WHO Expert Committee on Biological Standardization. *WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins.* Geneva; Switzerland: 2010.
11. Ferquel E, de Haro L, Jan V, Guillemain I, Jourdain S, Teynié A, d'Alayer J, Choumet V. Reappraisal of *Vipera aspis* venom neurotoxicity. *PLoS One.* 2007;2:e1194.

12. Mohorovčić A, Božinović S, Prpić B, Ilijanić Lj, Huber Đ, Tvrtković N, i sur. Prirodna baština Hrvatske. Zagreb: Buvina d.o.o. 1995/1996;2:209-12.
13. Lukšić B, Bradarić N, Prgomet S. Venomous snakebites in southern Croatia. Coll Antropol. 2006;30:191-7.
14. Radonić V, Budimir D, Bradarić N, Lukšić B, Sapunar D, Vilović K. Envenomation by the horned viper (*Vipera ammodytes*). Mil Med. 1997;162:179-82.
15. Georgieva D, Risch M, Kardas A, Buck F, von Bergen M, Betzel C. Comparative analysis of the venom proteomes of *Vipera ammodytes ammodytes* and *Vipera ammodytes meridionalis*. J Proteome Res. 2008;7:866-86.
16. Kini RM. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. Biochem. J. 2006;397:377-87.
17. Eble JA. Matrix biology meets toxinology. Matrix Biol. 2010;29:239-47.
18. Warrell DA. Snake bite. Lancet. 2010;375:77-88.
19. Marsh N, Williams V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. Toxicon. 2005;45:1171-81.
20. Swenson S, Markland FS. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. Toxicon. 2005;45:1021-39.
21. Koh DCI, Armugam A, Jeyaseelan K. Snake venom components and their applications in biomedicine. Cell. Mol. Life Sci. 2006;63:3030-41.
22. Koh CY, Kini RM. From snake venom toxins to therapeutics – cardiovascular examples. Toxicon. 2012;59:497-506.
23. Sajevic T, Leonardi A, Križaj I. Haemostatically active proteins in snake venoms. Toxicon. 2011;57:627-45.
24. Leonardi A, Fox JW, Trampuš-Bakija A, Križaj I. Ammodytase, a metalloprotease from *Vipera ammodytes ammodytes* venom, possesses strong fibrinolytic activity. Toxicon. 2007;49:833-42.

25. Sajevic T, Leonardi A, Križaj I. An overview of hemostatically active components of *Vipera ammodytes ammodytes* venom. *Toxin Reviews*. 2013;33:33-6.
26. Markland FS. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*. 1998;36:1749-1800.
27. Ramos OHP, Selistre-de-Araujo HS. Snake venom metalloproteases – structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comp. Biochem. Phys.* 2006;142:328-46.
28. Calvete JJ, Marcinkiewicz C, Sanz L. Snake venomomics of *Bitis gabonica gabonica*. Protein family composition, subunit organization of venom toxins, and characterization of dimeric disintegrins bitisgabonin-1 and bitisgabonin-2. *J. Proteome Res.* 2007;6:326-36.
29. Calvete JJ, Juárez P, Sanz L. Snake venomomics. Strategy and applications. *J. Mass Spectrom.* 2007;42:1405-14.
30. Lomonte B, Escolano J, Fernández J, Sanz L, Angulo Y, Gutiérrez JM, Calvete JJ. Snake venomomics and antivenomics of the arboreal neotropical pitvipers *Bothriechis lateralis* and *Bothriechis schlegelii*. *J. Proteome Res.* 2008;7:2445-57.
31. Sanz L, Ayvazyan N, Calvete JJ. Snake venomomics of the Armenian mountain vipers *Macrovipera lebetina obtusa* and *Vipera radei*. *J. Proteomics.* 2008;71:198-209.
32. Rey-Suárez P, Núñez V, Gutiérrez JM, Lomonte B. Proteomic and biological characterization of the venom of the redbellied coral snake, *Micrurus mipartitus* (*Elapidae*), from Colombia and Costa Rica. *J. Proteomics.* 2011;75:655-67.
33. Corrêa-Netto C, Teixeira-Araujo R, Aguiar AS, Melgarejo AR, De-Simone SG, Soares MR, Foguel D, Zingali RB. Immunome and venome of *Bothrops jararacussu*: a proteomic approach to study the molecular immunology of snake toxins. *Toxicon*. 2010;55:1222-35.
34. Calvete JJ, Escolano J, Sanz L. Snake venomomics of *Bitis* species reveals large intragenus venom toxin composition variation: application to taxonomy of congeneric taxa. *J. Proteome Res.* 2007;6:2732-45.

35. Sanz L, Gibbs HL, Mackessy SP, Calvete JJ. Venom proteomes of closely related *Sistrurus* rattlesnakes with divergent diets. *J. Proteome Res.* 2006;5:2098-112.
36. Fry BG, Wüster W. Assembling an arsenal: origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences. *Mol. Biol. Evol.* 2004;21:870-83.
37. Gutiérrez JM, Lomonte B, León G, Alape-Girón A, Flores-Díaz M, Sanz L, Angulo Y, Calvete JJ. Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *J. Proteomics.* 2009;72:165-82.
38. Calvete JJ, Sanz L, Pérez A, Borges A, Vargas AM, Lomonte B, Angulo Y, Gutiérrez JM, Chalkidis HM, Mourão RH, Furtado MF, Moura-Da-Silva AM. Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. *J. Proteomics.* 2011;74:510-27.
39. Lang Balija M, Vrdoljak A, Habjanec L, Dojnović B, Halassy B, Vrandešić B, Tomašić J. The variability of *Vipera ammodytes ammodytes* venoms from Croatia – biochemical properties and biological activity. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2005;140:257-63.
40. Gubenšek F, Sket D, Turk V, Lebez D. Fractionation of *Vipera ammodytes* venom and seasonal variation of its composition. *Toxicon.* 1974;12:167-71.
41. Furtado MF, Travaglia-Cardoso SR, Rocha MM. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (*Serpentes: Viperidae*). *Toxicon.* 2006;48:401-10.
42. Menezes MC, Furtado MF, Travaglia-Cardoso SR, Camargo AC, Serrano SM. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. *Toxicon.* 2006;47:304-12.
43. Guércio RA, Shevchenko A, Shevchenko A, López-Lozano JL, Paba J, Sousa MV, Ricart CA. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. *Proteome Sci.* 2006;4:11.



44. Alape-Girón A, Sanz L, Escolano J, Flores-Díaz M, Madrigal M, Sasa M, Calvete JJ. Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. *J. Proteome Res.* 2008;7:3556-71.
45. Saldarriaga MM, Otero R, Núñez V, Toro MF, Díaz A, Gutiérrez JM. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. *Toxicon.* 2003;42:405-11.
46. Tamiya T, Fujimi TJ. Molecular evolution of toxin genes in *Elapidae* snakes. *Mol. Divers.* 2006;10:529-43.
47. Ciscotto PH, Rates B, Silva DA, Richardson M, Silva LP, Andrade H, Donato MF, Cotta GA, Maria WS, Rodrigues RJ, Sanchez E, De Lima ME, Pimenta AM. Venomic analysis and evaluation of antivenom cross-reactivity of South American *Micrurus* species. *J. Proteomics.* 2011;74:1810-25.
48. Corrêa-Neto C, Junqueira-de-Azevedo Ide L, Silva DA, Ho PL, Leitão-de-Araújo M, Alves ML, Sanz L, Foguel D, Zingali RB, Calvete JJ. Snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, *Micrurus altirostris* and *M. corallinus*. *J. Proteomics.* 2011;74:1795-809.
49. Marcon F, Nicholson GM. Identification of presynaptic neurotoxin complexes in the venoms of three Australian copperheads (*Austrelaps* spp.) and the efficacy of tiger snake antivenom to prevent or reverse neurotoxicity. *Toxicon.* 2011;58:439-542.
50. Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T. Snake venom metalloproteinases: biological roles and participation in the pathophysiology of envenomation. U: Mackessy SP, urednik. *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles.* London: Taylor & Francis; 2010. str. 115-38.
51. Gutiérrez JM, Theakston RD, Warrell DA. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: The need for a global partnership. *PLoS Med.* 2006;3:e150.
52. Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Díaz C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon.* 2005;45:997-1011.

53. Fox JW, Serrano SMT. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS J.* 2008;275:3016-30.
54. Fox JW, Serrano SMT. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. *Toxicon.* 2005;45:969-85.
55. Takeda S, Takeya H, Iwanaga S. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012;1824:164-76.
56. Moura-da-Silva AM, Furlan MS, Caporrino MC, Grego KF, Portes-Junior JA, Clissa PB, Valente RH, Magalhães GS. Diversity of metalloproteinases in *Bothrops neuwiedi* snake venom transcripts: evidences for recombination between different classes of SVMPs. *BMC Genet.* 2011;12:94.
57. Bjarnason JB, Fox JW. Snake venom metalloendopeptidases: reprolysin. *Methods Enzymol.* 1995;248:345-68.
58. Fox JW, Serrano SMT. Snake venom metalloproteinases. U: Mackessy SP, urednik. *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles.* London: Taylor & Francis; 2010. str. 95-113.
59. Calvete JJ, Marcinkiewicz C, Monleón D, Esteve V, Celda B, Juárez P, Sanz L. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon.* 2005;45:1063-74.
60. Juárez P, Comas I, González-Candelas F, Calvete JJ. Evolution of snake venom disintegrins by positive Darwinian selection. *Mol. Biol. Evol.* 2008;25:2391-407.
61. Escalante T, Rucavado A, Fox JW, Gutiérrez JM. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *J. Proteomics.* 2011;74:1781-94.
62. Vrhovec B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B, urednici. *Interna medicina.* Zagreb: Naklada Ljevak; 2008.
63. Guyton AC, Hall JE, urednici. *Medicinska fiziologija.* Zagreb: Medicinska naklada; 2006.

64. Lu Q, Clemetson JM, Clemetson KJ. Snake venoms and hemostasis. *J. Thromb. Haemost.* 2005;3:1791-99.
65. Kamiguti AS. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. *Toxicon.* 2005;45:1041-9.
66. Kang TS, Georgieva D, Genov N, Murakami MT, Sinha M, Kumar RP, Kaur P, Kumar S, Dey S, Sharma S, Vrieland A, Betzel C, Takeda S, Arni RK, Singh TP, Kini RM. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. *FEBS J.* 2011;278:4544-76.
67. Lomonte B, Gutiérrez JM. Phospholipases A<sub>2</sub> from viperidae snake venoms: how do they induce skeletal muscle damage? *Acta Chim. Slov.* 2011;58:647-59.
68. Burke JE, Dennis EA. Phospholipase A<sub>2</sub> biochemistry. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 2009;23:49-59.
69. Schaloske RH, Dennis EA. The phospholipase A<sub>2</sub> superfamily and its group numbering system. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006;1761:1246-59.
70. Kini RM. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. *Toxicon.* 2003;42:827-40.
71. Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: classification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000;1488:1-19.
72. Doley R, Zhou X, Kini RM. Snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. U: Mackessy, SP, urednik. *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles.* London: Taylor & Francis; 2010. str. 173-205.
73. Montecucco C, Gutiérrez JM, Lomonte B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008;65:2897-912.
74. Doley R, Kini RM. Protein complexes in snake venom. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009;66:2851-71.

75. Sampaio SC, Hyslop S, Fontes MR, Prado-Franceschi J, Zambelli VO, Magro AJ, Brigatte P, Gutierrez VP, Cury Y. Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. *Toxicon*. 2010;55:1045-60.
76. Betzel C, Genov N, Rajashankar KR, Singh TP. Modulation of phospholipase A<sub>2</sub> activity generated by molecular evolution. *Cell. Mol. Life Sci*. 1999;56:384-97.
77. Montecucco C, Rossetto O, Caccin P, Rigoni M, Carli L, Morbiato L, Muraro L, Paoli M. Different mechanisms of inhibition of nerve terminals by botulinum and snake presynaptic neurotoxins. *Toxicon*. 2009;54:561-4.
78. Rigoni M, Caccin P, Gschmeissner S, Koster G, Postle AD, Rossetto O, Schiavo G, Montecucco C. Equivalent effects of snake PLA<sub>2</sub> neurotoxins and lysophospholipid-fatty acid mixtures. *Science*. 2005;310:1678-80.
79. Pungerčar J, Križaj I. Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A<sub>2</sub>. *Toxicon*. 2007;50:871-92.
80. Leonardi A, Gubenšek F, Križaj I. Purification and characterisation of two hemorrhagic metalloproteinases from the venom of the long-nosed viper, *Vipera ammodytes ammodytes*. *Toxicon*. 2001;40:55-62.
81. Sajevic T, Leonardi A, Kovačič L, Lang-Balijsa M, Kurtović T, Pungerčar J, Halassy B, Trampuš-Bakija A, Križaj I. VaH3, one of the principal hemorrhagins in *Vipera ammodytes ammodytes* venom, is a homodimeric P-IIIc metalloproteinase. *Biochimie*. 2013;95:1158-70.
82. Leonardi A, Sajevic T, Kovačič L, Pungerčar J, Lang Balijsa M, Halassy B, Trampuš Bakija A, Križaj I. Hemorrhagin VaH4, a covalent heterodimeric P-III metalloproteinase from *Vipera ammodytes ammodytes* with a potential antitumour activity. *Toxicon*. 2014;77:141-55.
83. Leonardi A, Fox JW, Trampus-Bakija A, Križaj I. Two coagulation factor X activators from *Vipera a. ammodytes* venom with potential to treat patients with dysfunctional factors IXa or VIIa. *Toxicon*. 2008;52:628-37.
84. Leonardi A, Sajevic T, Latinović Z, Pungerčar J, Balijsa ML, Bakija AT, Vidmar R, Halassy B, Križaj I. Structural and biochemical characterisation of VaF1, a P-IIIa

- fibrinogenolytic metalloproteinase from *Vipera ammodytes ammodytes* venom. *Biochimie*. 2015;109:78-87.
85. Križaj I. Ammodytoxin: a window into understanding presynaptic toxicity of secreted phospholipases A<sub>2</sub> and more. *Toxicon*. 2011;58:219-29.
  86. Ritonja A, Gubenšek F. Ammodytoxin A, a highly lethal phospholipase A<sub>2</sub> from *Vipera ammodytes ammodytes* venom. *Biochim. Biophys. Acta*. 1985;828:306-12.
  87. Ritonja A, Machleidt W, Turk V, Gubenšek F. Amino-acid sequence of ammodytoxin B partially reveals the location of the site of toxicity of ammodytoxins. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. 1986;367:919-23.
  88. Križaj I, Turk D, Ritonja A, Gubenšek F. Primary structure of ammodytoxin C further reveals the toxic site of ammodytoxin. *Biochim. Biophys. Acta*. 1989;999:198-202.
  89. Prijatelj P, Charnay M, Ivanovski G, Jenko Z, Pungercar J, Križaj I, Faure G. The C-terminal and  $\beta$ -wing regions of ammodytoxin A, a neurotoxic phospholipase A<sub>2</sub> from *Vipera ammodytes ammodytes*, are critical for binding to factor Xa and for anticoagulant effect. *Biochimie*. 2006;88:69-76.
  90. Križaj I, Bieber AL, Ritonja A, Gubenšek F. The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Vipera ammodytes venom*. *Eur. J. Biochem*. 1991;202:1165-8.
  91. Križaj I, Liang NS, Pungercar J, Štrukelj B, Ritonja A, Gubenšek F. Amino acid and cDNA sequences of a neutral phospholipase A<sub>2</sub> from the long-nosed viper (*Vipera ammodytes ammodytes*) venom. *Eur. J. Biochem*. 1992;204:1057-62.
  92. Kurtović T, Brgles M, Leonardi A, Bališa ML, Križaj I, Allmaier G, Marchetti-Deschmann M, Halassy B. Ammodytagin, a heterodimeric metalloproteinase from *Vipera ammodytes ammodytes* venom with strong hemorrhagic activity. *Toxicon*. 2011;58:570-82.
  93. Kurtović T, Brgles M, Leonardi A, Lang Bališa M, Sajevec T, Križaj I, Allmaier G, Marchetti-Deschmann M, Halassy B. VaSP1, catalytically active serine proteinase from *Vipera ammodytes ammodytes* venom with unconventional active site triad. *Toxicon*. 2014;77:93-104.

94. Karabuva S, Vrkić I, Brizić I, Ivić I, Lukšić B. Venomous snakebites in children in southern Croatia. *Toxicon*. 2016;112:8-15.
95. Reid HA. Adder bites in Britain. *Br Med J*. 1976;2:153-6.
96. Persson H, Irestedt B. A study of 136 cases of adder bite treated in Swedish hospitals during one year. *Acta Med Scand*. 1981;210:433-9.
97. Pozio E. Venomous snake bites in Italy: epidemiological and clinical aspects. *Trop Med Parasitol*. 1988;39:62-6.
98. De Haro L. Les envenimations par les serpents de France et leur traitement. *Presse Méd*. 2003;32:1131-7.
99. De Haro L, Glaizal M, Tichadou L, Blanc-Brisset I, Hayek-Lanthois M. Asp Viper (*Vipera aspis*) envenomation: experience of the Marseille Poison Centre from 1996 to 2008. *Toxins (Basel)*. 2009;1:100-12.
100. Audebert F, Sorkine M, Bon C. Envenoming by viper bites in France: clinical gradation and biological quantification by ELISA. *Toxicon*. 1992;30:599-609.
101. Audebert F, Sorkine M, Robbe-Vincent A, Bon C. Viper bites in France: clinical and biological evaluation; kinetics of envenomations. *Hum Exp Toxicol*. 1994;13:683-8.
102. Tekin R, Sula B, Cakir G, Aktar F, Deveci Ö, Yolbas I, Çelen MK, Bekcibasi M, Palanci Y, Dogan E. Comparison of snakebite cases in children and adults. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19:2711-6.
103. Malina T, Krecsák L, Korsós Z, Takács Z. Snakebites in Hungary – Epidemiological and clinical aspects over the past 36 years. *Toxicon*. 2008;51:943-51.
104. Campbell BT, Corsi JM, Boneti C, Jackson RJ, Smith SD, Kokoska ER. Pediatric snakebites: lessons learned from 114 cases. *J Pediatr Surg*. 2008;43:1338-41.
105. Stahel E, Wellauer R, Freyvogel TA. [Poisoning by domestic vipers (*Vipera berus* and *Vipera aspis*). A retrospective study of 113 patients]. [Article in German]. *Schweiz Med Wochenschr*. 1985;115:890-6.
106. Lonati D, Giampreti A, Rossetto O, Petrolini VM, Vecchio S, Buscaglia E, Mazzoleni M, Chiara F, Aloise M, Gentilli A, Montecucco C, Coccini T, Locatelli CA.

- Neurotoxicity of European viperids in Italy: Pavia Poison Control Centre case series 2001-2011. *Clin Toxicol (Phila)*. 2014;52:269-76.
107. Paret G, Ben-Abraham R, Ezra D, Shrem D, Eshel G, Vardi A, Winkler E, Barzilay Z. *Vipera palaestinae* snake envenomations: experience in children. *Hum Exp Toxicol*. 1997;16:683-7.
  108. Jamieson R, Pearn J. An epidemiological and clinical study of snake-bites in childhood. *Med J Aust*. 1989;150:698-702.
  109. Lukšić B, Čulić V, Stričević L, Brizić I, Poljak NK, Tadić Z. Infant death after nose-horned viper (*Vipera ammodytes ammodytes*) bite in Croatia: A case report. *Toxicon*. 2010;56:1506-9.
  110. Seifert SA, Boyer LV, Benson BE, Rogers JJ. AAPCC database characterization of native U.S. venomous snake exposures, 2001-2005. *Clin Toxicol (Phila)*. 2009;47:327-35.
  111. Jollivet V, Hamel JF, de Haro L, Labadie M, Saponi JM, Cordier L, Villa A, Nisse P, Puskarczyk E, Berthelon L, Harry P, Boels D. European viper envenomation recorded by French poison control centers: A clinical assessment and management study. *Toxicon*. 2015;108:97-103.
  112. Maretić Z. Electrocardiographic changes following bites and stings of venomous animals. *Arh Hig Rada Toksikol*. 1982;33:325-34.
  113. Ozay G, Bosnak M, Ece A, Davutoglu M, Dikici B, Gurkan F. Clinical characteristics of children with snakebite poisoning and management of complications in the pediatric intensive care unit. *Pediatrics International*. 2005;47:669-75.
  114. Dowey DJ, Omer GE, Moneim MS. New Mexico rattlesnake bites: demographic review and guidelines for treatment. *J Trauma*. 1991;31:1380-6.
  115. Malina T, Babocsay G, Krecsák L, Erdész C. Further clinical evidence for the existence of neurotoxicity in a population of the European adder (*Vipera berus berus*) in eastern Hungary: second authenticated case. *Wilderness Environ Med*. 2013;24:378-83.

116. Boels D, Hamel JF, Bretaudeau Deguigne M, Harry P. European viper envenomings: Assessment of Viperfav™ and other symptomatic treatments. *Clin Toxicol (Phila)*. 2012;50:189-96.
117. Buntain WL. Successful venomous snakebite neutralization with massive antivenin infusion in a child. *J Trauma*. 1983;23:1012-4.
118. Moore RS. Second-degree heart block associated with envenomation by *Vipera berus*. *Arch Emerg Med*. 1988;5:116-8.
119. Singh S, Dass A, Jain S, Varma S, Bannerjee AK, Sharma BK. Fatal non-bacterial thrombotic endocarditis following viperine bite. *Intern Med*. 1998;37:342-4.
120. Silva A, Pilapitiya S, Siribaddana S. Acute myocardial infarction following a possible direct intravenous bite of Russell's viper (*Daboia russelli*). *BMC Res Notes*. 2012;5:500.
121. Šribar J, Oberčkal J, Križaj I. Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A<sub>2</sub>: an update. *Toxicon*. 2014;89:9-16.
122. Valora N, Bruno C, Fidanza A. [Effect of *Vipera ammodytes* venom on the rat electrocardiogram. I]. [Article in Italian] *Boll Soc Ital Biol Sper*. 1970;46:67-71.
123. Valora N, Bruno C, Fidanza A. [Action of *Vipera ammodytes* venom on the rat electrocardiogram. II]. [Article in Italian] *Boll Soc Ital Biol Sper*. 1970;46:373-5.
124. Sket D, Gubensek F, Adamic S, Lebez D. Action of a partially purified basic protein fraction from *Vipera ammodytes* venom. *Toxicon*. 1973;11:47-53.
125. Kinjo N, Noguchi K, Hirayama K, Sakanashi M. Characteristics of cardiovascular effects of the venom of habu (*Trimeresurus flavoviridis*) in rats. *Jpn J Pharmacol*. 1990;54:151-61.
126. Alloatti G, Gattullo D, Losano G, Marsh NA, Pagliaro P, Vono P. The mechanical effects of rhinoceros horned viper (*Bitis nasicornis*) venom on the isolated perfused guinea-pig heart. *Exp Physiol*. 1991;76:611-4.
127. Lukšić B, Brizić I, Lang Balija M, Modun D, Culić V, Halassy B, Salamunić I, Boban M. Dose dependent effects of standardized nose-horned viper (*Vipera ammodytes*



- ammodytes*) venom on parameters of cardiac function in isolated rat heart. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2008;147:434-40.
128. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-5.
  129. Gubenšek F, Ritonja A, Zupan J, Turk V. Basic proteins of *Vipera ammodytes* venom. *Studies structure and function Period. Biol*. 1980;82:443-7.
  130. Thouin Jr LG, Ritonja A, Gubenšek F, Russell FE. Neuromuscular and lethal effects of phospholipase A from *Vipera ammodytes venom* *Toxicon*. 1982;20:1051-8.
  131. Boban M, Stowe DF, Kampine JP, Goldberg AH, Bošnjak ZJ. Effects of 2,3-butanedione monoxime in isolated hearts: protection during reperfusion after global ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1993;105:532-40.
  132. Yamazaki Y, Hyodo F, Morita T. Wide distribution of cysteine-rich secretory proteins in snake venoms: isolation and cloning of novel snake venom cysteine-rich secretory proteins. *Arch Biochem Biophys*. 2003;412:133-41.
  133. Yamazaki Y, Morita T. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. *Toxicon*. 2004;44:227-31.
  134. Ramazanova AS, Starkov VG, Osipov AV, Ziganshin RH, Filkin SY, Tsetlin VI, Utkin YN. Cysteine-rich venom proteins from the snakes of *Viperinae* subfamily - molecular cloning and phylogenetic relationship. *Toxicon*. 2009;53:162-8.
  135. Alloatti G, Camino E, Cedrini L, Losano G, Marsh NA, Whaler BC. The effects of Gaboon viper (*Bitis gabonica*) venom on the electrical and mechanical activity of the guinea-pig myocardium. *Toxicon*. 1986;24:47-61.
  136. Fatehi-Hassanabad Z, Fatehi M. Characterisation of some pharmacological effects of the venom from *Vipera lebetina*. *Toxicon*. 2004;43:385-91.
  137. Karabuva S, Brizić I, Latinović Z, Leonardi A, Križaj I, Lukšić B. Cardiotoxic effects of the *Vipera ammodytes ammodytes* venom fractions in the isolated perfused rat heart. *Toxicon*. 2016;121:98-104.

138. Kini RM, Doley R. Structure, function and evolution of three-finger toxins: mini proteins with multiple targets. *Toxicon*. 2010;56:855-67.
139. Doumanov J, Mladenova K, Aleksandrov R, Danovski G, Petrova S. Interactions of pharmacologically active snake venom sPLA<sub>2</sub> with different cell lines. *Biotechnol Biotechnol Equip*. 2014;28:918-22.
140. Evangelista IL, Martins AM, Nascimento NR, Havt A, Evangelista JS, de Norões TB, Toyama MH, Diz-Filho EB, Toyama Dde O, Fonteles MC, Monteiro HS. Renal and cardiovascular effects of *Bothrops marajoensis* venom and phospholipase A<sub>2</sub>. *Toxicon*. 2010;55:1061-70.
141. Barrington PL, Soons KR, Rosenberg P. Cardiotoxicity of *Naja nigricollis* phospholipase A<sub>2</sub> is not due to alterations in prostaglandin synthesis. *Toxicon*. 1986;24:1107-16.
142. Rodrigues MA, Dias L, Rennó AL, Sousa NC, Smaal A, da Silva DA, Hyslop S. Rat atrial responses to *Bothrops jararacussu* (*jararacuçu*) snake venom. *Toxicology*. 2014;323:109-24.
143. Gomes A, Bhattacharya S, Mukherjee S, Inn-ho-Tsai, Gomes A. Inhibition of toxic actions of phospholipase A<sub>2</sub> isolated and characterized from the Indian Banded Krait (*Bungarus fasciatus*) venom by synthetic herbal compounds. *Indian J Med Res*. 2012;136:40-5.

## **10. ŽIVOTOPIS**

## OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Svjetlana Karabuva, dr. med.

Ustanova zaposlenja: Klinika za infektologiju, Šoltanska 1, Klinički bolnički centar Split

Elektronička pošta: [svjetlana.karabuva@gmail.com](mailto:svjetlana.karabuva@gmail.com)

## RADNO ISKUSTVO

- 2011. – 2012. – liječnik pripravnik u Kliničkom bolničkom centru Split, Spinčićeva 1, Split
- 2012. – 2013. – liječnik opće medicine u ordinaciji obiteljske medicine, otok Brač
- 2013. – 2014. – liječnik opće medicine u Ispostavama Zavoda za hitnu medicinu Splitsko-dalmatinske županije, Spinčićeva 1, Split
- 2014. – liječnik na specijalizaciji iz infektologije u Kliničkom bolničkom centru Split, Spinčićeva 1, Split

## IZOBRAZBA

- 1993. – 2001. – Osnovna škola *Mertojak* u Splitu
- 2001. – 2005. – III. gimnazija u Splitu
- 2005. – 2011. – integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij *Medicina*, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
- 2011. – 2016. sveučilišni poslijediplomski doktorski studij *Klinička medicina utemeljena na dokazima*, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

## JEZICI

- Hrvatski jezik – materinski jezik
- Engleski i talijanski jezik
- Hrvatski znakovni jezik

## ČLANSTVA

- 1996. – član Hrvatskoga matematičkoga društva
- 2012. – član Hrvatske liječničke komore

- 2013. – član Hrvatskog društva za hitnu medicinu Hrvatskog liječničkog zbora
- 2015. – član Hrvatskog društva za infektivne bolesti Hrvatskog liječničkog zbora
- 2015. – član Hrvatskog liječničkog zbora

#### POPIS RADOVA

1. Karabuva S. Raspodjela i težina koronarne ateroskleroze u odnosu na krvne grupe sustava ABO (diplomski rad). Split: Sveučilište u Splitu; 2011. 32. str.
2. Batinić T, Bulat C, Karabuva S, Zekanović D, Šušak Z, Bonacin D, Carević V, Fabijanić D. Background of extreme weight loss and weakness – right atrial myxoma. *Med Jad.* 2013;43(1-2):73-6.
3. Bozić I, Capkun V, Bozić D, Karabuva S, Caljkusić K, Trgo G, Carević V, Fabijanić D. [Anticoagulant therapy in patients with permanent atrial fibrillation – evidence based medicine and clinical practice]. [Article in Croatian] *Lijec Vjesn.* 2013;135(5-6):129-34.
4. Karabuva S, Carević V, Radić M, Fabijanić D. The association of ABO blood groups with extent of coronary atherosclerosis in Croatian patients suffering from chronic coronary artery disease. *Biochem Med (Zagreb).* 2013;23(3):351-9.
5. Fabijanic D, Carevic V, Karabuva S, Radic M. Relation of ABO blood groups to coronary lesion complexity in patients with stable coronary artery disease. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2014;14(6):561-2.
6. Karabuva S, Vrkić I, Brizić I, Ivić I, Lukšić B. Venomous snakebites in children in southern Croatia. *Toxicon.* 2016;112:8-15.
7. Karabuva S, Brizić I, Latinović Z, Leonardi A, Križaj I, Lukšić B. Cardiotoxic effects of the *Vipera ammodytes ammodytes* venom fractions in the isolated perfused rat heart. *Toxicon.* 2016;121:98-104.