

Uloga glavnih toksičnih komponenti otrova poskoka (Vipera ammodytes) u njegovoj imunogenosti s posebnim osvrtom na hemoragične metaloproteinaze

Kurtović, Tihana

Doctoral thesis / Disertacija

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:225807>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-05**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Tihana Kurtović

**ULOGA GLAVNIH TOKSIČNIH KOMPONENTI OTROVA
POSKOKA (*Vipera ammodytes*) U NJEGOVOJ
IMUNOGENOSTI S POSEBNIM OSVRTOM NA
HEMORAGIČNE METALOPROTEINAZE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2013.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE
DIVISION OF BIOLOGY

Tihana Kurtović

**ROLE OF THE MAJOR TOXIC COMPONENTS FROM
Vipera ammodytes VENOM IN ITS IMMUNOGENICITY
WITH SPECIAL EMPHASIS ON HEMORRHAGIC
METALLOPROTEINASES**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2013.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Imunološkom zavodu, pod vodstvom dr. sc. Beate Halassy, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

**ULOGA GLAVNIH TOKSIČNIH KOMPONENTI OTROVA
POSKOKA (*Vipera ammodytes*) U NJEGOVOJ IMUNOGENOSTI S POSEBNIM
OSVRTOM NA HEMORAGIČNE METALOPROTEINAZE**

TIHANA KURTOVIĆ

Imunološki zavod d.d., Rockefellerova 10, 10 000 Zagreb

Otrov poskoka (*Vipera a. ammodytes*) se koristi u proizvodnji protuotrova protiv ugriza europskih zmija otrovnica. O strukturnim i funkcionalnim osobitostima njegovih glavnih toksičnih komponenti, amoditoksina (Atx-a) i hemoragina, postoje brojni literaturni podaci. Međutim, njihova imunogenost, tj. uloga u stvaranju zaštitnih antitijela sposobnih neutralizirati toksične učinke otrova, nije poznata. Stoga je cilj istraživanja bio pripremiti serume definirane specifičnosti imunizacijom kunića s pročišćenim komponentama – Atx-om A, ukupnom hemoraginskom frakcijom, odnosno kombinacijom Atx-a i hemoragina kako bi ispitali njihov zaštitni doprinos u neutralizaciji letalne toksičnosti inducirane cijelim otrovom. Prema rezultatima primijenjenog ED₅₀ testa, jedine regulatorno priznate metode za procjenu potencije protuotrova protiv ugriza europskih zmija otrovnica, potpuno funkcionalna anti-Atx antitijela iskazuju iznimno slabu zaštitnu moć, dok ona specifična za ukupnu hemoraginsku frakciju uopće ne osiguravaju protekciju, iako su u životinjskom pokusnom modelu sama po sebi dostatna za neutralizaciju lokalnog hemoragičnog učinka.

U kontekstu hemoragičnog efekta kao dominantne kliničke manifestacije otrovanja u ljudi za koju su zaslužne Zn²⁺-ovisne metaloproteinaze, cilj rada bio je i sustavno istražiti strukturu i funkciju potpuno novog reprezentativnog predstavnika skupine nazvanog amoditagin. Na njegovom primjeru je ispitan i doprinos antitijela specifičnih za jedan izdvojeni protein hemoragičnog fenotipa u neutralizaciji ukupne hemoragičnosti eksprimirane od strane otrova poskoka. Amoditagin je glikozilirani, blago kiseli heterodimer od 108 kDa s multidomenskom organizacijom jedinstvenom za pripadnike P-IIIc podgrupe koji je okarakteriziran kao enzim široke proteolitičke specifičnosti. Novoizolirani protein djeluje i kao jaki hemoragin. Prema rezultatima proizašlima iz ispitivanja njegove supstratne specifičnosti, hemoragičnost amoditagina najvjerojatnije je povezana s proteolitičkim efektom kojeg iskazuje na pojedine komponente bazalne membrane te faktore zgrušavanja krvi. Serum specifičan za amoditagin se pokazao dostatnim za neutralizaciju hemoragične aktivnosti cijelog otrova, što sugerira da bi indukcija nastanka anti-amoditagin antitijela mogla predstavljati bitni čimbenik u dobivanju terapijski djelotvornog protuotrova.

(150 + VII strana, 36 slika, 8 tablica, 254 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: otrov poskoka, toksične komponente, amoditoksini, hemoragini, zaštitna moć, Zn²⁺-ovisna metaloproteinaza

Mentor: Dr. sc. Beata Halassy, viša znan. sur.

Ocjenjivači: Dr. sc. Jasmina Rokov Plavec, doc.

Dr. sc. Beata Halassy, viša znan. sur.

Dr. sc. Anica Horvat Knežević, znan. sur.

**ROLE OF THE MAJOR TOXIC COMPONENTS FROM *Vipera ammodytes* VENOM
IN ITS IMMUNOGENICITY WITH SPECIAL EMPHASIS ON
HEMORRHAGIC METALLOPROTEINASES**

TIHANA KURTOVIĆ

Institute of Immunology, Rockefellerova 10, 10 000 Zagreb

The venom of horn-nosed viper (*Vipera a. ammodytes*) has been used as an antigen for the production of antivenom against European vipers. In contrast to the detailed knowledge on structural and functional properties of ammodytoxins and hemorrhagins as its main toxic components, almost nothing has been known about their immunogenicity. Our research goal was to prepare the rabbit antisera containing antibodies specific for both classes of the pathology-inducing venom constituents and to evaluate the involvement of the obtained antibodies in neutralisation of the whole venom toxicity in mice. According to ED₅₀ test, the only regulatory approved assay for the estimation of antivenom potency, fully functional antibodies specific for ammodytoxins participate in neutralisation of the whole venom's lethal toxicity only partially. Antibodies specific for hemorrhagins are not protective at all, despite their sufficiency in neutralisation of the local hemorrhagic effect *in vivo*.

Furthermore, since hemorrhage as the prevalent clinical manifestation of envenoming in human is due to action of Zn²⁺-dependent metalloproteinases, structural and functional characterisation of the group representative, named ammodytagin, was of special research interest. Also, role of antibodies specific for individual protein exhibiting hemorrhagic phenotype in neutralisation of the whole venom hemorrhagicity was defined. Ammodytagin is a glycosylated, slightly acidic heterodimer of 108 kDa with multidomain organisation unique for members of P-IIIc subgroup which is characterised as enzyme of broad proteolytic specificity. The novel protein also acts as a strong hemorrhagin. Investigation of a substrate specificity revealed that hemorrhagic activity of ammodytagin might be the result of its involvement in cleavage of basal membrane components and depletion of coagulation factors in blood circulation. Finally, antiserum raised against ammodytagin was able to completely neutralise the hemorrhagic activity of the whole venom, suggesting it might be one of the key molecules towards which effective antivenom should be directed.

(150 + VII pages, 36 figures, 8 tables, 254 literature citations, original in Croatian)

Keywords: horn-nosed viper venom, toxic components, ammodytoxins, hemorrhagins, protective efficacy, Zn²⁺-dependent metalloproteinase

Supervisor: Dr. Beata Halassy, Sen. Res. Assoc.

Reviewers: Dr. Jasmina Rokov Plavec, Asst. Prof.

Dr. Beata Halassy, Sen. Res. Assoc.

Dr. Anica Horvat Knežević, Res. Assoc.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	5
2.1. ZMIJE OTROVNICE	5
2.1.1. EUROPSKE ZMIJE OTROVNICE OD NAJVIŠEG MEDICINSKOG ZNAČAJA	7
2.2. ZMIJSKI OTROVI – BIOKEMIJSKI SASTAV, BIOLOŠKA FUNKCIJA, EVOLUCIJSKO PODRIJETLO I UZROCI VARIJABILNOSTI	8
2.3. GLAVNE TOKSIČNE KOMPONENTE OTROVA ZMIJA PORODICE <i>VIPERIDAE</i>	14
2.3.1. Zn ²⁺ -OVISNE METALOPROTEINAZE	15
2.3.1.1. STRUKTURNE OSOBITOSTI	16
2.3.1.1.1. P-I grupa	19
2.3.1.1.2. P-II grupa	20
2.3.1.1.3. P-III grupa	22
2.3.1.2. EVOLUCIJSKO PODRIJETLO	26
2.3.1.3. FUNKCIONALNA KOMPLEKSNOST I ULOGA U PATOFIZIOLOGIJI OTROVANJA	28
2.3.1.3.1. Lokalni patofiziološki učinci	28
2.3.1.3.2. Sistemski patofiziološki učinci – interferiranje s hemostazom	32
2.3.2. SEKRECIJSKE FOSFOLIPAZE A ₂	35
2.3.2.1. PODJELA I STRUKTURNE OSOBITOSTI PLA ₂ IZ OTROVA ZMIJA	37
2.3.2.2. FARMAKOLOŠKA SPECIFIČNOST I PATOFIZIOLOŠKI UČINCI	40
2.3. Zn ²⁺ -OVISNE METALOPROTEINAZE I SEKRECIJSKE FOSFOLIPAZE GRUPE IIA IZ OTROVA PODVRSTE <i>VIPERA A. AMMODYTES</i>	43
3. MATERIJALI I METODE	45
3.1. MATERIJALI	47
3.1.1. KEMIKALIJE	47
3.1.2. PUFERI	48
3.1.3. KROMATOGRFSKE KOLONE	50
3.1.4. OPREMA	50
3.1.5. ŽIVOTINJE ZA <i>IN VIVO</i> TESTOVE	51
3.1.6. OTROV I NJEGOVE KOMPONENTE	51
3.2. METODE	51
3.2.1. KARAKTERIZACIJA SERUMA SPECIFIČNIH ZA GLAVNE TOKSIČNE KOMPONENTE OTROVA PODVRSTE <i>VIPERA A. AMMODYTES</i>	51
3.2.1.1. PRIPRAVA SERUMA SPECIFIČNIH ZA PROČIŠĆENE KOMPONENTE – AMODITOKSINE I HEMORAGINE	51
3.2.1.2. ODREĐIVANJE KOLIČINE ANTITIJELA SPECIFIČNIH ZA AMODITOKSINE I HEMORAGINE U SERUMIMA IMUNIZIRANIH KUNIĆA	52
3.2.1.3. TEST NEUTRALIZACIJE LETALNE TOKSIČNOSTI	53
3.2.1.4. TEST NEUTRALIZACIJE HEMORAGIČNE AKTIVNOSTI	54
3.2.1.5. TEST PROTEOLITIČKE AKTIVNOSTI	55

3.2.1.6. WESTERN BLOT ANALIZA PROTEINA OTROVA S ANTI-H SERUMOM.....	55
3.2.1.7. STATISTIČKA ANALIZA	56
3.2.2. PROČIŠĆAVANJE TE BIOKEMIJSKA I BIOLOŠKA KARAKTERIZACIJA	
Zn ²⁺ -OVISNE METALOPROTEINAZE	56
3.2.2.1. PROČIŠĆAVANJE	56
3.2.2.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE	57
3.2.2.3. SDS-PAGE ANALIZA	57
3.2.2.4. IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE	58
3.2.2.5. DVODIMENZIONALNA (2D) SDS-PAGE ANALIZA	58
3.2.2.6. ANALIZA MASENOM SPEKTROMETRIJOM.....	59
3.2.2.7. ODREĐIVANJE AMINOKISELINSKE SEKVENCE	59
3.2.2.8. N-DEGLIKOZILACIJA I ODREĐIVANJE UDJELA UKUPNIH ŠEĆERA	60
3.2.2.9. PROTEOLITIČKA AKTIVNOST	60
3.2.2.10. FIBRINOGENOLITIČKA AKTIVNOST	61
3.2.2.11. PROTEOLITIČKI UČINAK NA FAKTORE ZGRUŠAVANJA KRVI	62
3.2.2.12. RAZGRADNJA MATRIGELA I KOMPONENTI EKSTRACELULARNOG MATRIKSA.....	62
3.2.2.13. HIDROLIZA B-LANCA INZULINA	62
3.2.2.14. TEST HEMORAGIČNE AKTIVNOSTI	63
3.2.2.15. IMUNIZACIJSKI PROTOKOL I DETEKCIJA ANTITIJELA SPECIFIČNIH ZA	
METALOPROTEINAZU IZ OTROVA U SERUMU IMUNIZIRANOG KUNIĆA	63
3.2.2.16. TEST NEUTRALIZACIJE HEMORAGIČNE AKTIVNOSTI	64
3.2.2.17. WESTERN BLOT ANALIZA	64
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	65
4.1. ULOGA ANTITIJELA SPECIFIČNIH ZA GLAVNE TOKSIČNE KOMPONENTE OTROVA	
POSKOKA U NEUTRALIZACIJI NJEGOVE LETALNE TOKSIČNOSTI	65
4.1.1. PRIPREMA SERUMA SPECIFIČNIH ZA POJEDINAČNE KOMPONENTE OTROVA I	
NJIHOVA KARAKTERIZACIJA..	65
4.1.2. PROVJERA FUNKCIONALNOSTI ANTI-ATX I ANTI-H ANTITIJELA	70
4.1.2.1. Funkcionalnost anti-Atx antitijela.....	70
4.1.2.2. Funkcionalnost anti-H antitijela	74
4.1.3. Implikacije nedostatnosti ED ₅₀ testa u kontroli kvalitete protuotrova	83
4.2. BIOKEMIJSKA, BIOLOŠKA I PATOFIZIOLOŠKA SVOJSTVA Zn ²⁺ -OVISNE	
METALOPROTEINAZE IZ OTROVA POSKOKA TE ULOGA ZA NJU SPECIFIČNIH	
ANTITIJELA U NEUTRALIZACIJI HEMORAGIČNOSTI.....	84
4.2.1. PROČIŠĆAVANJE I BIOKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA	85
4.2.2. PROTEOLITIČKA AKTIVNOST I SPECIFIČNOST	100
4.2.3. BIOLOŠKA AKTIVNOST	103
4.2.3. UČINAK NA BIOLOŠKI RELEVANTNE SUPSTRATE – KOMPONENTE	
EKSTRACELULARNOG MATRIKSA I FAKTORE ZGRUŠAVANJA KRVI	109
4.2.4. UČINAK NA FAKTORE ZGRUŠAVANJA KRVI.....	112

5. ZAKLJUČCI	116
6. POPIS LITERATURE.....	120
7. POPIS OZNAKA, SIMBOLA I KRATICA	144
8. ŽIVOTOPIS	147

1. UVOD

Zmijski otrovi predstavljaju složene smjese bioaktivnih proteina i polipeptida koje se upotrebljavaju za imunizaciju životinja u svrhu biotehnoške proizvodnje protuotrova – jedinog specifičnog terapijskog sredstva učinkovitog u prevenciji i suzbijanju simptoma otrovanja kod žrtava ugriza (Gutiérrez i sur., 2006). Međutim, njihove komponente, kao i komponente bilo kojeg drugog kompleksnog antigena, karakterizira ne samo različita sposobnost stvaranja humoralne ili stanične imunoreakcije, tzv. imunogenost, već i varijabilni doprinos razvijenog imunološkog odgovora u zaštiti od štetnih envenomacijskih efekata (Laloo i Theakston, 2003). Naime, iako zmijske otrove odlikuje izrazito heterogeni sastav i, posljedično, široki spektar farmakoloških aktivnosti koje iskazuju, većina njihovog proteinskog materijala nema nikakav funkcionalni doprinos patologiji otrovanja kod ljudi. Unatoč tome, u postupku dobivanja protuotrova kao kompleksni antigeni se koriste čitave nefrakcionirane smjese, neovisno o patofiziološkom učinku kojeg eksprimiraju njihove pojedinačne komponente (Sriprapat i sur., 2003) zbog čega nastanak neutralizirajućih antitijela odgovornih za zaštitu nije uvijek pouzdano i u odgovarajućoj mjeri usmjeren prema onim najtoksičnijim, dovodeći u pitanje kvalitetu imunobiološkog preparata (Laloo i Theakston, 2003; El-Kady i sur., 2009). Stoga upravo identifikacija te biokemijska i toksinološka karakterizacija manjeg broja glavnih grupa proteina sposobnih potaknuti adekvatnu zaštitnu imunoreakciju predstavlja jedan od neophodnih koraka u unapređenju proizvodnje protuotrova s ciljem poboljšanja njihove terapijske učinkovitosti i sigurnosti (Gutiérrez, 2011). Nadalje, uvid u neutralizacijski doprinos antitijela varijabilnog spektra specifičnosti ujedno se smatra relevantnim čimbenikom i u razvoju novih metoda kontrole kvalitete, osobito *in vitro* alternativa koje bi pouzdano zamijenile postojeće i sa stajališta dobrobiti životinja često neprihvatljive *in vivo* testove za provjeru efikasnosti u laboratorijskom okruženju. Jedan od njih je i test neutralizacije letalne toksičnosti na miševima, tzv. ED₅₀ test, koji kao zlatni standard ujedno predstavlja i jedinu regulatorno priznatu metodu za predkliničko vrednovanje kvalitete protuotrova protiv ugriza europskih otrovnica (WHO, 2010).

Poskok (*Vipera ammodytes ammodytes*) je podvrsta najopasnije europske otrovnice čiji se ugriz, s obzirom na učestalost i težinu kliničkih simptoma koji se razvijaju uslijed otrovanja, na području jugoistočne Europe smatra pojavom od najvišeg medicinskog značaja (WHO, 2010). Njegov otrov, slično kao i otrovi ostalih pripadnika porodice *Viperidae*, kod ugrizanih ljudi prvenstveno izaziva lokalne patofiziološke učinke koji su u većini slučajeva

posljedica naglašenog hemoragičnog i nekrotizirajućeg djelovanja, dok neurotoksični efekti koje iskazuje do izražaja dolaze iznimno rijetko (Lukšić i sur., 2006). Za hemoragičnost su zaslužne Zn^{2+} -ovisne metaloproteinaze (Bjarnason i Fox, 1994). Neurotoksičnost se pripisuje amoditoksinima (Atx-ima) kao članovima sekrecijskih fosfolipaza A_2 (Gubenšek i Križaj, 1997). Kako se otrov podvrste *V. a. ammodytes* koristi za dobivanje polispecifičnog protuotrova hiperimunizacijskim postupkom u konja već dugi niz godina, strukturna i funkcionalna svojstva amoditoksina i nekolicine hemoragina, njegovih glavnih toksičnih komponenti čiji se doprinos kliničkom fenotipu otrovanja kod ljudi smatra vrlo izglednim, u literaturi su detaljno opisana. Međutim, o njihovoj imunogenosti ne postoje publicirani izvještaji što je, uz slabo poznavanje proteomske kompleksnosti, jedan od glavnih razloga neznatnih pomaka u optimizaciji imunizacijskog protokola i izostanka racionalnijeg pristupa dizajnu protuotrova (Halassy i sur., 2008). S obzirom da imunološki status komponenti otrova poskoka odgovornih za neurotoksičnost i hemoragičnost još uvijek nije definiran, glavni ciljevi našeg istraživanja su bili sljedeći:

- imunizacijom kunića s odgovarajućim antigenom/antigenima pripremiti serume specifične za Atx-e i hemoragine, odnosno njihovu kombinaciju
- enzimskim imunotestom u pripremljenim serumima kvantificirati količinu anti-Atx i anti-hemoragin IgG-a kao mjeru njihove kvalitete te potvrditi izostanak križne reaktivnosti Atx-a i hemoragina
- odgovarajućim *in vivo* i/ili *in vitro* metodama provjeriti funkcionalnost razvijenih antitijela
- ED_{50} testom na miševima odrediti protektivnu efikasnost seruma specifičnih za pojedinačne komponente te je usporediti s onom koju iskazuje kontrolni serum visoke neutralizacijske učinkovitosti dobiven imunizacijom s cijelim otrovom kako bi ispitali funkcionalnu ulogu anti-Atx i anti-hemoragin antitijela u zaštiti od sveukupne letalne toksičnosti.

S obzirom da je poznato da detaljni uvid u sastav otrova, a samim tim i povećanje opsega znanja o biokemijskim te biološkim svojstvima toksina koje sadrže, predstavlja nužni preduvjet kojeg je potrebno ispuniti za postizanje što učinkovitijeg i sigurnijeg liječenja žrtava otrovanja (Eble, 2010), nije iznenađujuće što je glavnina istraživačkog interesa usmjerena upravo prema obitelji metaloproteinaza čiji su članovi izravno odgovorni za hemoragičnost kao najnaglašeniju i medicinski najznačajniju patofiziološku manifestaciju envenomacije povezanu s ugrizom zmija iz porodice *Viperinae* (Chippaux, 2012). Metaloproteinaze kao široko rasprostranjene sastavnice njihovih otrova predstavljaju Zn^{2+} -ovisne enzime varijabilnih molekularnih masa koji dijele visoko homologne metaloproteinazne domene, a u

mnogim slučajevima i niz dodatnih, nekatalitičkih smještenih C-terminalno od proteinazne (Fox i Serrano, 2005, 2008, 2009). Mnoge od njih podliježu i posttranslacijskim modifikacijama i procesiranju, uglavnom glikozilaciji i homo/heterodimerizaciji. Zahvaljujući strukturnoj raznolikosti, metaloendopeptidaze iz otrova zmija funkcionalno iskazuju široki spektar štetnih patoloških aktivnosti koje su uglavnom povezane s narušavanjem hemostaze, a od kojih je daleko najdrastičnija ona hemoragična. Hemoragičnost proizlazi iz njihove sposobnosti da selektivnom proteolitičkom degradacijom komponenti bazalne membrane koja okružuje i podržava endotel krvnih žila naruše strukturni integritet stijenke kapilara i venula i potaknu istjecanje krvi u okolno tkivo, tzv. ekstravazaciju (Gutiérrez i sur., 2005). Zn^{2+} -ovisne metaloproteinaze posreduju i u brojnim drugim lokalnim učincima, npr. mionekrozi, apoptozi te upalnom odgovoru (Gutiérrez and Rucavado, 2000; Rucavado i sur., 2004; Gutiérrez i sur., 2005), a pridonose i promoviranju sistemskih alteracija koje zahvaćaju različita ciljna tkiva i organske sustave udaljene od mjesta ugriza, uglavnom narušavanjem hemostaze djelovanjem na faktore zgrušavanja krvi i interferiranjem s funkcijom trombocita (Kamiguti, 2005).

Iz otrova poskoka je dosad okarakterizirano nekoliko Zn^{2+} -ovisnih metaloproteinaza varijabilnih bioloških učinaka (Leonardi i sur., 2001, 2007, 2008) koje najvjerojatnije u velikoj mjeri doprinose njegovom dominantnom envenomacijskom efektu. Međutim, imunogenost izoliranih hemoragina u okvirima neutralizacijske učinkovitosti za njih specifičnih antitijela nikad nije sustavno istraživana, što predstavlja značajan propust s obzirom da bi mogla predstavljati kritični čimbenik u dobivanju protuotrova poboljšane kvalitete, potencije i sigurnosti. Stoga smo naglasak stavili i na sljedeće:

- razvoj metode za pročišćavanje još neopisanog hemoragičnog predstavnika skupine Zn^{2+} -ovisnih metaloproteinaza
- njegovu sustavnu strukturnu i funkcionalnu analizu
- definiranje doprinosa antitijela specifičnih za novoizolirani protein u neutralizaciji lokalnog hemoragičnog efekta otrova poskoka.

Identifikacija glavnih zaštitnih toksičnih sastavnica otrova podvrste *V. a. ammodytes*, uz povećanje opsega znanja o njihovoj biokemiji i toksinologiji koje smo prikupiti kroz naše istraživanje, predstavlja važan doprinos u nastojanjima da se postupak pripreve protuotrova učini racionalnijim, a konačni proizvod terapijski efikasnijim i sigurnijim. Također, karakterizacija novog proteina iz skupine Zn^{2+} -ovisnih metaloproteinaza izravno uključenog u envenomacijsku patologiju ubuduće bi u znatnoj mjeri mogla pridonijeti razumijevanju

strukturnih osobitosti odgovornih za široki spektar farmakoloških aktivnosti hemoragina podrijetlom iz zmijskih otrova općenito.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. ZMIJE OTROVNICE

Životinje klasificirane kao otrovnice (engl. *venomous animals*; fanerotoksične životinje) su one koje posjeduju specijalizirane sustave, tzv. venomne aparate, namijenjene za proizvodnju i izravan unos otrova (engl. *venom*) u tijelo žrtve s ciljem hvatanja plijena ili samoobrane (Isbister i Kiernan, 2005; Junghanss i Bodio, 2006; Isbister, 2010). Stoga ih je potrebno razlikovati od otrovnih životinja (engl. *poisonous animals*; kriptotoksične životinje) koje najčešće moraju biti progutane da bi njihov otrov (engl. *poison*), koji je uglavnom akumuliran iz okoliša i kao sekundarni metabolit raspršen po tkivu, izazvao toksični učinak. S obzirom na njihovu rasprostranjenost te izravnu opasnost koju predstavljaju za ljude među životinjama otrovnicama ključno mjesto zauzimaju zmiје (lat. *Serpentes*) kao podred unutar razreda gmazova (lat. *Reptilia*) koji obuhvaća 19 živućih porodica koje su na osnovu morfoloških karakteristika i sličnosti u mitohondrijskoj DNA podijeljene u infraredove *Scolecophidia* (sljeparice) i *Alethinophidia* ("prave" zmiје) (Ménez, 2003) s oko 3 000 dosad opisanih vrsta (Vidal i sur., 2007) (Tablica 1). Sve otrovnice kao evolucijski najnaprednija i najbolje specijalizirana grupa zmiја taksonomski su svrstane u nadporodicu *Caenophidia* (ili *Colubroidea*) ("napredne" zmiје), odnosno porodice *Viperidae*, *Elapidae*, *Colubridae* i *Atractaspididae*, pri čemu su samo vrste iz prvih dviju navedenih prepoznate kao one od visokog medicinskog značaja. Naime, njihov kontakt s ljudima je učestao, a broj ugriza, kao i s njim povezani morbiditet, invaliditet i mortalitet, značajan zbog čega predstavljaju ozbiljni javno-zdravstveni problem (Weinstein i sur., 2010). Jedan od razloga se krije i u činjenici što zmiје iz porodica *Viperidae* i *Elapidae* odlikuje posebno dizajnirani venomni aparat čija građa omogućuje da se samo s jednim ugrizom u tijelo žrtve otrov strateški unese u količini dostatnoj za izuzetno brzo i učinkovito onesposobljavanje/usmrćivanje plijena što u velikoj mjeri utječe i na ozbiljnost ishoda envenomacije kod ugrizanih ljudi (Mackessy, 2010; Weinstein i sur., 2010). Njihov sustav za injektiranje oralnog sekreta kao koktela raznovrsnih toksičnih komponenti je smješten u temporalnoj regiji, posteriorno u odnosu na oči, i u osnovi je sastavljen od para specijaliziranih žlijezda s velikim bazalnim lumenom za ekstracelularnu pohranu secerniranog otrova. Venomne žlijezde su okružene s kompresorskim mišićjem čijom se kontrakcijom posredstvom provodnih kanala povezanih s prednje postavljanim, šupljim i povećanim zubima postiže neposredna implementacija otrova u tkivo recipijenta, i posljedično, envenomacija kao kompleksni sindrom u čijoj je osnovi simultana disregulacija brojnih homeostatskih mehanizama. Sa svakom glavnom žlijezdom je povezana i jedna

pomoćna čija funkcija još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, iako prevladava mišljenje da bi mogla biti povezana s kondicioniranjem otrova i aktivacijom njegovih litičkih komponenti koje se do trenutka izbacivanja drže inaktivnima zahvaljujući niskoj pH vrijednosti bazalnog lumena i endogenim inhibitorima (Mackessy i Baxter, 2006).

Tablica 1. Klasifikacija zmija (preuzeto iz Ménez, 2003).

Podred: *Serpentes*

Infrared	Nadporodica	Porodica
<i>Cholophidia</i>		
<i>Scolecophidia</i>		
		<i>Typhlopidae</i>
		<i>Anomalepidae</i>
		<i>Leptotyphlopidae</i>
<i>Alethinophidia</i>	<i>Henophidia</i>	<i>Boidae</i>
		<i>Pythonidae</i>
		<i>Erycidae</i>
		<i>Xenopeltidae</i>
		<i>Loxocemidae</i>
		<i>Anomochilidae</i>
		<i>Bolyeriidae</i>
		<i>Aniliidae</i>
		<i>Cylindrophiidae</i>
		<i>Uropeltidae</i>
		<i>Tropidophiidae</i>
<i>Alethinophidia</i>	<i>Caenophidia</i>	<i>Acrochordoidea</i>
		<i>Acrochordidae</i>
<i>Alethinophidia</i>	<i>Caenophidia</i>	<i>Colubroidea</i>
		<i>Viperidae</i>
		<i>Elapidae</i>
		<i>Colubridae</i>
		<i>Atractaspididae</i>

2.1.1. EUROPSKE ZMIJE OTROVNICICE OD NAJVIŠEG MEDICINSKOG ZNAČAJA

Prema WHO kategorizaciji (WHO, 2010) u zmije otrovnice od najvišeg medicinskog značaja (prva kategorija) se ubrajaju vrste koje su široko rasprostranjene na gusto naseljenim geografskim područjima gdje uzrokuju brojne ugrize koji za posljedicu imaju visoku incidenciju morbiditeta, invaliditeta i mortaliteta, zatim vrste koje su slabo poznate, ali za koje postoji snažna indikacija da bi mogle predstavljati značajan rizik za ljude te, konačno, vrste čiji ugrizi, unatoč tome što nisu učestali, u pravilu dovode do teškog i po život opasnog otrovanja. Na području Europe gdje prirodno obitavaju samo članovi porodice *Viperidae* navedene uvjete ispunjavaju samo tri morfološki blisko srodne vrste svrstane u podporodicu *Viperinae* – *Vipera berus* (ridovka), *Vipera aspis* (talijanska ljutica) te *Vipera ammodytes* (poskok) (Ferquel i sur., 2007). Svaka od njih producira otrov specifičnog biokemijskog sastava što se odražava u varijabilnim osobitostima i težini kliničkih manifestacija otrovanja koje induciraju (Chippaux, 2012). Također, područja na kojima se ugriz navedenih vrsta smatra relevantnom pojavom samo se manjim dijelom preklapaju s njihovom uobičajenom biogeografskom distribucijom. Konkretno, *V. berus* je od najvišeg medicinskog značaja na teritoriju Rusije, Švedske i Ujedinjenog Kraljevstva (uz iznimku Sjeverne Irske), *V. aspis* u Francuskoj i Italiji, a *V. ammodytes* na usko ograničenom dijelu jugoistočne Europe koji primarno obuhvaća Balkanski poluotok (WHO, 2010).

S obzirom na ozbiljnost envenomacijske patologije koja se povezuje s njegovim ugrizom (Frangides i sur., 2006), a čiji ishod iznimno može biti čak i letalan (Radonić i sur., 1997; Lukšić i sur., 2006, 2010), poskok, *V. ammodytes* (Slika 1), nosi oznaku najopasnije zmije južne Europe (Gubenšek i sur., 1974) kojoj, osim fizičkih svojstava poput duljine tijela koju postižu odrasli primjerci te veličine modificiranih zubi venomnog aparata, u najvećoj mjeri doprinosi visoka toksičnost otrova kojeg producira kao i njegova značajna količina koju ugrizom može injektirati u tijelo žrtve (O'Shea, 2005). Kompleksni taksonomski status vrste *V. ammodytes*, čija se sistematizacija zasniva samo na morfološkim osobitostima kao dijagnostičkim markerima, zbog nedosljednosti u njihovoj upotrebi još uvijek nije potpuno razjašnjen te i dalje izaziva brojne kontroverze (Ursenbacher i sur., 2008). Međutim, neovisno o broju dosad znanstveno priznatih podvrsta od kojih se glavnina može naći samo na ograničenim lokalitetima barem dvije su nedvojbeno u kategoriji onih koje predstavljaju javno-zdravstveni problem – *V. a. ammodytes* i *V. a. meridionalis* (Georgieva i sur., 2008). Podvrste poskoka nastanjuju geografski odijeljene regije s jasnim granicama distribucije. Naime, *V. a. ammodytes* se prvenstveno može naći na području Slovenije, Hrvatske, Srbije i

zapadne Bugarske. S druge strane, *V. a. meridionalis* dominantno obitava u Grčkoj, Rumunjskoj, istočnoj Bugarskoj te Albaniji i Turskoj.



Slika 1. Poskok, *Vipera ammodytes*.

2.2. ZMIJSKI OTROVI – BIOKEMIJSKI SASTAV, BIOLOŠKA FUNKCIJA, EVOLUCIJSKO PODRIJETLO I UZROCI VARIJABILNOSTI

Zmije otrovnice su predatori s posebno inovativnom strategijom hranjenja koja se zasniva na upotrebi otrova kao sekreta specijaliziranih žlijezda modificiranog u visoko sofisticirani arsenal kemijskih toksina čija se ciljana i kontrolirana dostava u tijelo žrtve ostvaruje posredstvom posebno građenog venomnog aparata kao i niza specifičnih obrazaca ponašanja (Mackessy, 2010). Razvoj otrova te sustava za njegovu produkciju i sekreciju vremenski koincidira s velikom evolucijskom eksplozijom ptica te malih, brzih sisavaca iz perioda miocena zbog čega, prema jednoj od hipoteza, najvjerojatnije predstavlja odgovarajuću prilagodbu na novonastale uvjete okoliša proizašlu iz potrebe za novim pristupom svladavanju plijena – kemijskim umjesto dotadašnjim mehaničkim (Isbell, 2006), koja je, kako se smatra, odigrala ključnu ulogu u diverzifikaciji "naprednih" zmija (Calvete i sur., 2007a, 2007b, 2007c). Od svih otrova prirodnog podrijetla, oni koje produciraju zmije otrovnice se smatraju najkompleksnijima s obzirom da, neovisno o vrsti, uglavnom sadrže preko sto različitih bioaktivnih molekula varijabilne toksičnosti i patofizioloških funkcija koje ostvaruju bilo individualnim, bilo sinergističkim djelovanjem. Njihova izražena heterogenost im omogućuje da u skladu sa svojom biološkom ulogom ekspimiraju izuzetno široki spektar

farmakoloških aktivnosti s drastičnim učinkom na različite organske sustave i osnovne životne funkcije plijena čiji je krajnji cilj njegovo efikasno onesposobljavanje, usmrćivanje i probava (Kini, 2006; Eble, 2010; Warrell, 2010; Weinstein i sur., 2010). Međutim, većina aspekata evolucijskog i funkcionalnog značaja otrova danas je iz praktičnih razloga gotovo potpuno zanemarena. Naime, sve raširenija svijest o zmijskom ugrizu kao ozbiljnom javnozdravstvenom problemu s vremenom je glavninu istraživačkog interesa usmjerila prema razotkrivanju biokemijske podloge onih njihovih patoloških efekata za koje je uočeno da prilikom envenomacije izazivaju pojavu medicinski relevantnog kliničkog fenotipa (Weinstein i sur., 2010) i na osnovu kojih se, radi jednostavnosti, u posljednjih pola stoljeća i uvriježila opća podjela otrova koje produciraju na neuro-, kardio-, nefro- i hepatotoksične, zatim, miolitičke, (anti)koagulirajuće, hemostatičke te hemoragične (Chippaux i sur., 1991).

Istraživanje zmijskih otrova u osnovi pokreću dva glavna motiva. Naime, već duže vremena je poznato da upravo detaljni uvid u njihov sastav, a samim tim i povećanje opsega znanja o strukturnim i funkcionalnim svojstvima toksina koje sadrže, predstavlja jedan od nužnih preduvjeta koje je potrebno ispuniti za postizanje što učinkovitijeg i sigurnijeg liječenja žrtava otrovanja (Eble, 2010). S druge strane, otrovi koje produciraju zmijske odnedavno su zanimljivi i kao veliki, gotovo neistraženi izvor medicinski vrijednih prirodnih lijekova čiji se biološki aktivni toksini u sve većem opsegu primjenjuju i kao platforme pogodne za dizajn novih terapijski djelotvornih agensa, prvenstveno zahvaljujući njihovoj evolucijskoj adaptiranosti za izuzetnu specifičnost, selektivnost i učinkovitost u prepoznavanju pripadajućih ciljnih molekula, što su ujedno i glavne predispozicije poželjne kod odabira dobrog farmakona (Marsh i Williams, 2005; Swenson i Markland, 2005; Koh i sur., 2006; Eble, 2010; Sajevec i sur., 2011; Koh i Kini, 2012).

S biokemijskog stajališta, zmijski otrovi su kompleksne smjese prvenstveno proteina i polipeptida na koje otpada više od 90 % cjelokupne suhe tvari te, u neznatnoj mjeri, organskih molekula niskih molekulskih masa, uključujući biogene amine, slobodne aminokiseline i lipide, ugljikohidrate, citrate te nukleozide, kao i različitih anorganskih iona, uglavnom natrija, cinka i kalcija (Markland, 1998; Ramos i Selistre-de-Araujo, 2006). Stoga nije iznenađujuće što, prema rezultatima sve obuhvatnijih transkriptomskih i proteomskih analiza, njihove međusobne razlike u prvom redu proizlaze iz varijabilne relativne zastupljenosti pojedinih proteinskih komponenti koje sadrže od kojih većina u osnovi pripada samo neznatnom broju glavnih obitelji među kojima se razlikuju enzimi s jedne, i proteini bez katalitičke aktivnosti s druge strane (Calvete i sur., 2007a, 2007c; Georgieva i sur., 2008;

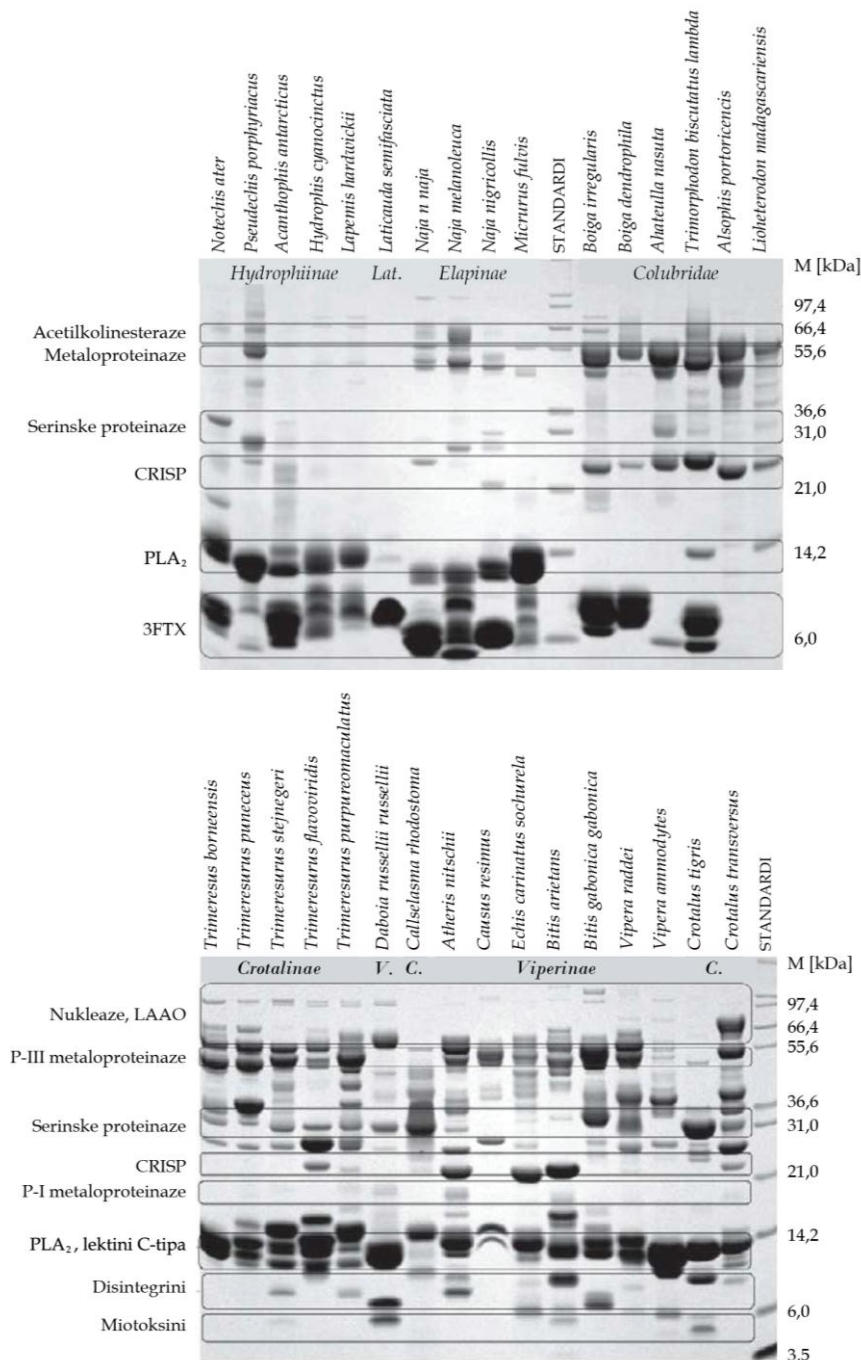
Lomonte i sur., 2008; Sanz i sur., 2008; Corrêa-Netto i sur., 2010, 2011; Rey-Suárez i sur., 2011). Naime, kao što je eksperimentalno potvrđeno karakterizacijom transkriptoma venomnih žlijezda pojedinih vrsta kojoj je do 2010. godine podvrgnuto ukupno njih 16, većinom pripadnika porodice *Viperidae*, u njihovim otrovima se na nivou mRNA eksprimira najviše 15 različitih proteinskih obitelji, od kojih je većina uspješno potvrđena i na proteomskoj razini pristupom uvriježenim i pod nazivom venomika (engl. *venomics*) (Corrêa-Netto i sur., 2010). S obzirom da njihov profil nije konzerviran, ovisno o porodici, vrsti, pa čak i populaciji, od enzima u određenom otrovu mogu biti prisutne fosfolipaze A₂ (engl. *phospholipase A₂*; PLA₂) iz grupe I ili II, Zn²⁺-ovisne metaloproteinaze, serinske proteinaze, oksidaze lijevih aminokiselina (engl. *L-amino acid oxidase*; LAAO) te acetilkolinesteraze, dok su katalitički inaktivne komponente prepoznate kao 3FTX (engl. *three-finger toxin*) α -neurotoksini, disintegrini, lektini C-tipa, natriuretski peptidi, miotoksini, sekrecijski proteini bogati cisteinom (engl. *cysteine-rich secretory protein*; CRISP), faktori rasta živaca i krvožilnog endotela te cistatini i inhibitori proteinaza Kunitzovog tipa.

Otrovi zmija su evoluirali u specifičnom biološkom kontekstu koji je pretežno uvjetovan s trofičkim adaptacijama te interakcijama predatora i plijena (Mackessy i sur., 2010). Međutim, zanimljivo je da sve veći broj eksperimentalnih dokaza podržava hipotezu prema kojoj njihovi uobičajeni konstituenti potječu iz ograničenog skupa proteina s normalnim fiziološkim funkcijama koji su neposredno prije nastupa glavne evolucijske radijacije nadporodice *Colubroidea* s ciljem formiranja kemijskog arsenala regrutirani iz različitih i udaljenih tkiva u jedinstveni proteom, uz iznimku CRISP-ova i kalikreina kao zasad jedinih dviju grupa toksina za koje postoje indikacije da su nastali modifikacijom produkata postojećih gena eksprimiranih u žlijezdama slinovnicama (Fry and Wüster, 2004; Fry, 2005). Kod odabira su najvjerojatnije favorizirani sekrecijski proteini ekstenzivno umreženi disulfidnim mostovima podrijetlom iz funkcionalno različitih multigenskih obitelji. Međutim, kako je svaka vrsta visoko specijalizirana u kontekstu plijena s kojim se hrani, vrlo je izgledno da se upravo adaptiranost na različitu prehranu koja je pratila diverzifikaciju "naprednih" zmija s vremenom nametnula kao čimbenik koji je doveo do drastične heterogenosti u sastavu otrova koje produciraju (Sanz i sur., 2006; Calvete i sur., 2007a), rezultirajući visokim stupnjem varijabilnosti u kontekstu početnih proteinskih obitelji koje su se zadržale, odnosno izgubile te novih, dodatnih koje su se kao neovisni evolucijski događaji pojavile u pojedinim porodicama (Fry and Wüster, 2004). Npr. u otrovima zmija iz porodice *Elapidae* u kojima dominiraju polipeptidi, u prvom redu 3FTX toksini i fosfolipaze A₂ iz

grupe I, uglavnom nedostaju hidrolitičke komponente koje su gotovo ekskluzivne za otrove zmijske porodice *Viperidae*, od kojih se među onima srednjih molekularnih masa ističu serinske proteinaze, dok od visokomolekulskih prevladavaju Zn^{2+} -ovisne metaloproteinaze (Mackessy, 2010) (Slika 2). Međutim, unatoč manje ili više izraženim kvantitativnim razlikama, brojne proteinske obitelji prisutne u zmijskim otrovima taksonomski su ipak široko rasprostranjene.

Otrove zmijske porodice *Viperidae* i *Elapidae* u pravilu sačinjava veliki broj proteina svrstanih u nekolicinu glavnih obitelji čiji članovi predstavljaju homologe/izoforme s visokim stupnjem sličnosti u trodimenzionalnoj strukturi koji su specijalizirani za različite farmakološke učinke zahvaljujući diskretnim razlikama koje ih odlikuju (Calvete i sur., 2007b; Sanz i sur., 2008). Stoga nije iznenađujuće što iz molekularno-filogenetskih studija proizlazi da je za njihov nastanak najvjerojatnije zaslužan proces sukcesivne duplikacije ancestralnih gena praćen ubrzanom molekularnom evolucijom, i posljedično, neofunkcionalizacijom proizašlih kopija (Kordiš i Gubenšek, 2000). Naime, duplikacija gena kao osnova procesa adaptivne evolucije u genomu stvara redundantnost koja njegovim kopijama, unatoč sve većem broju akumuliranih mutacija, određeni vremenski period osigurava zaštitu od negativne selekcije (Kordiš i Gubenšek, 2000). Međutim, uslijed jakog selektivnog pritiska u konačnici većina onih s insercijama/delecijama, besmislenim mutacijama i pomakom okvira čitanja podliježe eliminaciji konverzijom u pseudogene, dok samo manji broj varijanti s favoriziranim nesinonimnim supstitucijama koje su najkorisnije po stečenoj funkciji ostaje sačuvan djelovanjem prirodne selekcije ili genetičkog drifta, pridonoseći funkcionalnoj kompleksnosti proteoma otrova neophodnoj za učinkovito svladavanje različitih tipova plijena (Kordiš i Gubenšek, 2000; Wong i Belov, 2012). Njihovi produkti u žrtvi mogu djelovati individualno, ekspimirajući farmakološke učinke na širokom spektru fiziološki relevantnih ciljnih molekula ili pak kooperativno s ciljem postizanja jačeg, sinergističkog efekta (Wong i Belov, 2012). Iako su pripadnici multigenjskih obitelji nastalih duplikacijom gena i adaptivnom evolucijom identificirani među brojnim grupama proteina, prvenstveno PLA_2 izoenzimima, njihovim inhibitorima, 3FTX toksinima i serinskim proteinazama (Kordiš i Gubenšek, 2000), u njihovoj evoluciji i razvoju novih strukturnih varijanti mogu posredovati i dodatni mehanizmi (Wong i Belov, 2012) poput fuzije gena čiji je transkripcijski kimerni produkt s domenama koje odgovaraju Kunitzovom inhibitoru i vaprinu identificiran u vrsti *Sistrurus catenatus edwardsii* (Pahari i sur., 2007), zatim, alternativnog prekrajanja mRNA koje zahvaća transkripte pojedinih gena za serinske

proteinaze u vrstama *Vipera lebetina* (Siigur i sur., 2001a) i *Bitis gabonica rhinoceros* (Vaiyapuri i sur., 2011), i konačno, gubitka/odcjepljenja domena osobito izraženog kod Zn²⁺-ovisnih metaloproteinaza (Casewell i sur., 2011).



Slika 2. SDS-PAGE prikaz proteinskih obitelji u otrovima odabranih predstavnika glavnih taksonomskih skupina zmija otrovnica. *V.* = *Viperinae*; *C.* = *Crotalinae*; CRISP = *cysteine-rich secretory protein* (engl.), sekrecijski protein bogat cisteinom; PLA₂ = fosfolipaza A₂; 3FTX = *three-finger toxin* (engl.), toksin sa strukturnim motivom tri prsta; LAAO = *L-amino acid oxidase* (engl.), oksidaza lijevih aminokiselina (preuzeto iz Mackessy, 2010).

Kao što je uočeno iz raznih epidemioloških studija, *in vivo* testova mjerenja biološke aktivnosti poput letalne toksičnosti ili hemoragičnosti te biokemijskih i imunokemijskih analiza, osim već spomenute raznolikosti njihovog sastava koja dolazi do izražaja između različitih taksonomskih grupa, otrove zmijske odlikuje i dobro dokumentirani fenomen tzv. unutarvrstne ili intraspecijske varijabilnosti koji je zamjetan na razini populacije, pa čak i jedinke određene vrste i učestao u tolikoj mjeri da se prije smatra pravilom nego izuzetkom, što osobito vrijedi za porodicu *Viperidae* (Chippaux i sur., 1991; Gutiérrez i sur., 2009). Iako intraspecijska varijabilnost predstavlja glavnu prepreku u dobivanju visoko standardiziranih smjesa bitnih za očuvanje konzistencije u terapijskoj učinkovitosti iz njih proizvedenih protuotrova (Calvete i sur., 2011; Segura i sur., 2012), mehanizmi koji bi mogli posredovati u njenom podrijetlu i regulaciji još uvijek nisu u potpunosti definirani (Mackessy, 2010). Varijacije u biokemijskom profilu otrova uočene unutar iste vrste osobito su izražene kod onih koje karakterizira široka biogeografska rasprostranjenost (Gutiérrez i sur., 2009), bilo u simpatričkim, fizički neodijeljenim, ali reproduktivno izoliranim, bilo u prostorno razdvojenim populacijama (Chippaux i sur., 1991). Iako epidemiološke studije pokazuju da naglašenost geografskih varijacija ponekad može biti toliko drastična da prilikom ugriza rezultira potpuno različitom simptomatologijom otrovanja ovisno o regiji, neki autori sugeriraju da su njima uglavnom zahvaćene komponente s manje značajnom biološkom ulogom, dok glavne toksične frakcije kao odlika vrste ostaju sačuvane, uz pojedine izuzetke među kojima se osobito ističe vrsta *Crotalus s. scutulatus* s mojavom toksinom koji, iako predstavlja dominantnu neurotoksičnu komponentu odgovornu za karakteristične envenomacijske simptome, u potpunosti nedostaje u otrovima pojedinih prostorno izoliranih populacija (Chippaux i sur., 1991; Massey i sur., 2012). Također, osim biogeografske rasprostranjenosti, na intraspecijsku fenotipsku raznolikost najvjerojatnije utječu i drugi faktori među kojima se u literaturi najčešće navode sezonske promjene, ishrana, ontogenetski stadij te spolni dimorfizam i čija je povezanost s varijabilnošću u biokemijskom sastavu i patofarmakološkim učincima otrova uglavnom znatno slabije istražena (Chippaux i sur., 1991). Npr. pretpostavka o mogućem utjecaju sezonskih promjena koja je proizašla iz ranih kliničkih opažanja dosad je uspješno demonstrirana samo na nekolicini primjera, uključujući i podvrstu *V. a. ammodytes* u čijem otrovu dobivenom mužnjom zmijske u zimskom periodu godine u potpunosti nedostaju dvije ključne letalne komponente (Gubenšek i sur., 1974). Zbog nedostatnog broja eksperimentalnih dokaza, relevantnost godišnjeg doba kao potencijalnog čimbenika u indukciji intraspecijske varijabilnosti još je uvijek diskutabilna (Chippaux i sur., 1991; Mackessy, 2012). Sličan status dijeli i spolni dimorfizam, uz iznimku

onog potvrđenog u vrsti *Bothrops jararaca* gdje su otrovi producirani od strane ženskih, odnosno muških jedinki jasno diferencirani kako po kvalitativnom i kvantitativnom profilu nekoliko različitih, još neidentificiranih proteinskih grupa, tako i po proteolitičkoj aktivnosti i supstratnoj specifičnosti (Furtado i sur., 2006; Menezes i sur., 2006). Međutim, biološki značaj identificiranih spolno uvjetovanih razlika nije poznat. Nadalje, istraživanja posvećena ontogenetskim varijacijama su pokazala da se kod većine analiziranih vrsta otrovi juvenilnih jedinki fenotipski razlikuju od onih adultnih po potentnijoj sveukupnoj letalnoj toksičnosti koju iskazuju prema preferiranom tipu plijena kao i po znatno slabijoj proteolitičkoj aktivnosti koja potječe od Zn^{2+} -ovisnih metaloproteinaza što sugerira da bi barem u pojedinim slučajevima uočene ontogenetske varijacije mogle biti odraz različitih dobno uvjetovanih prehrambenih navika (Chippaux i sur., 1991; Mackessy, 2010). Također, kao što se ispostavilo analizom proteoma vrste *Crotalus o. oreganus*, osim varijacija izraženih na nivou njihovih farmakoloških i enzimskih aktivnosti, juvenilne i adultne otrove karakterizira i ontogenetski pomak u zastupljenosti pojedinih proteinskih komponenti koje sadrže (Mackessy, 2010). Naime, u otrovima mlađih jedinki dominiraju visokomolekulske metaloproteinaze grupe P-III, dok se u onima starijih uglavnom eksprimiraju niskomolekulski P-I članovi. Sličan nalaz je naknadno dobiven i za otrove vrsta *B. atrox* te *B. asper* (Guércio i sur., 2006; Alape-Gíron i sur., 2008) što implicira da bi mogao predstavljati svojstvo široko rasprostranjeno i među ostalim pripadnicima porodice *Viperidae*. Međutim, bitno je naglasiti da je rezultatima dobivenima u radu s objedinjenim ("puliranim") zmijskim otrovima potrebno pristupiti s određenom dozom zadržke s obzirom da svakog od njih karakterizira i individualna varijabilnost neovisna o okolišnim čimbenicima koja potvrđuje da njihov proteinski sastav u znatnoj mjeri stoji i pod čvrstom genetičkom kontrolom (Saldarriaga i sur., 2003; Alape-Gíron i sur., 2008). Generalno gledajući, što je neka populacija veća i posljedično, genetički raznolikija, njena individualna varijabilnost će biti izraženija, vodeći pojavi sve heterogenijih otrova u sukcesivnim generacijama (Chippaux i sur., 1991). Naprotiv, u manjim i ujedno reproduktivno izoliranim populacijama, zbog ograničenosti njihovom postojećom zalihom gena, otrovi u pravilu zadržavaju homogenost.

2.3. GLAVNE TOKSIČNE KOMPONENTE OTROVA ZMIJA PORODICE VIPERIDAE

Proteini podrijetlom iz otrova zmijski koji iskazuju toksično djelovanje generalno se mogu klasificirati u najmanje sedam glavnih grupa od kojih svaka izaziva specifične

patofiziološke učinke: (1) sarafotoksine; (2) miotoksične peptide; (3) dendrotoksine; (4) disintegrine; (5) 3FTX toksine; (6) fosfolipaze A₂ te (7) hemoragine (Tamiya i Fujimi, 2006). Prilikom ugriza zmija iz porodice *Elapidae* prvenstveno do izražaja dolaze po život opasni sistemski neurotoksični simptomi otrovanja koji vode respiracijskoj paralizi induciranoj fosfolipazama A₂ iz grupe I te 3FTX toksinima kao presinaptičkim i/ili postsinaptičkim polipeptidima čija se farmakološka aktivnost ispoljava u neuromuskularnim sinaptičkim pukotinama (Blacklow i sur., 2010a, 2010b; Ciscotto i sur., 2011; Corrêa-Netto i sur., 2011; Marcon i Nicholson, 2011). S druge strane, klinički fenotip koji se povezuje s pripadnicima porodice *Viperidae* u najvećem broju slučajeva se manifestira kao drastično lokalno oštećenje tkiva koje podrazumijeva ekstenzivno krvarenje praćeno pojavom edema, plikova i boli, a često i razvojem dermonekroze te nekroze skeletnih mišića za što su u najvećoj mjeri zaslužni pripadnici dviju enzimski aktivnih proteinskih obitelji – hemoragičnih Zn²⁺-ovisnih metaloproteinaza i miotoksičnih fosfolipaza A₂ iz grupe II (Gutiérrez i Rucavado, 2000; Gutiérrez i Ownby, 2003; Gutiérrez i sur., 2006). Očekivano, zbog već spomenute kompleksnosti njihovog proteoma, otrovi zmija iz porodice *Viperidae* u žrtvama ugriza često izazivaju i štetne efekte koji odstupaju od karakterističnog envenomacijskog profila, poput sistemskih koagulacijskih i hemodinamičkih poremećaja, nefrotoksičnosti, neurotoksičnosti i kardiotoksičnosti (Gutiérrez i sur., 2005). Međutim, opća prihvaćenost hemoragina i fosfolipaza A₂ kao glavnih toksičnih komponenti koji u patogenezi ekspimiraju i brojne druge, uglavnom rjeđe ili slabije izražene biološke aktivnosti, zahtijeva posebni osvrt upravo na njihove strukturne i funkcionalne osobitosti kao i na dosad identificirane molekularne mehanizme koji se nalaze u podlozi farmakološkog djelovanja ekspimiranog prilikom otrovanja.

2.3.1. Zn²⁺-OVISNE METALOPROTEINAZE

Zn²⁺-ovisne metaloproteinaze su uobičajene komponente otrova pripadnika porodice *Viperidae* koje, kako se procjenjuje, sačinjavaju najmanje trećinu njihovog ukupnog proteinskog sadržaja, ovisno o vrsti (Fox i Serrano, 2008). Stoga nije iznenađujuće što su prepoznate i kao toksini kojima se pripisuje ključna uloga u promoviranju lokalnog oštećenja tkiva, dominantno hemoragije, kao najnaglašenije patološke manifestacije koja se razvija uslijed otrovanja (Gutiérrez i Rucavado, 2000). Zahvaljujući progresivnom istraživanju sve većeg broja predstavnika dostupnih u pročišćenom obliku, započetom tijekom 60-ih godina prošlog stoljeća, danas raspoložemo iznimnom količinom informacija o njihovim proteinskim

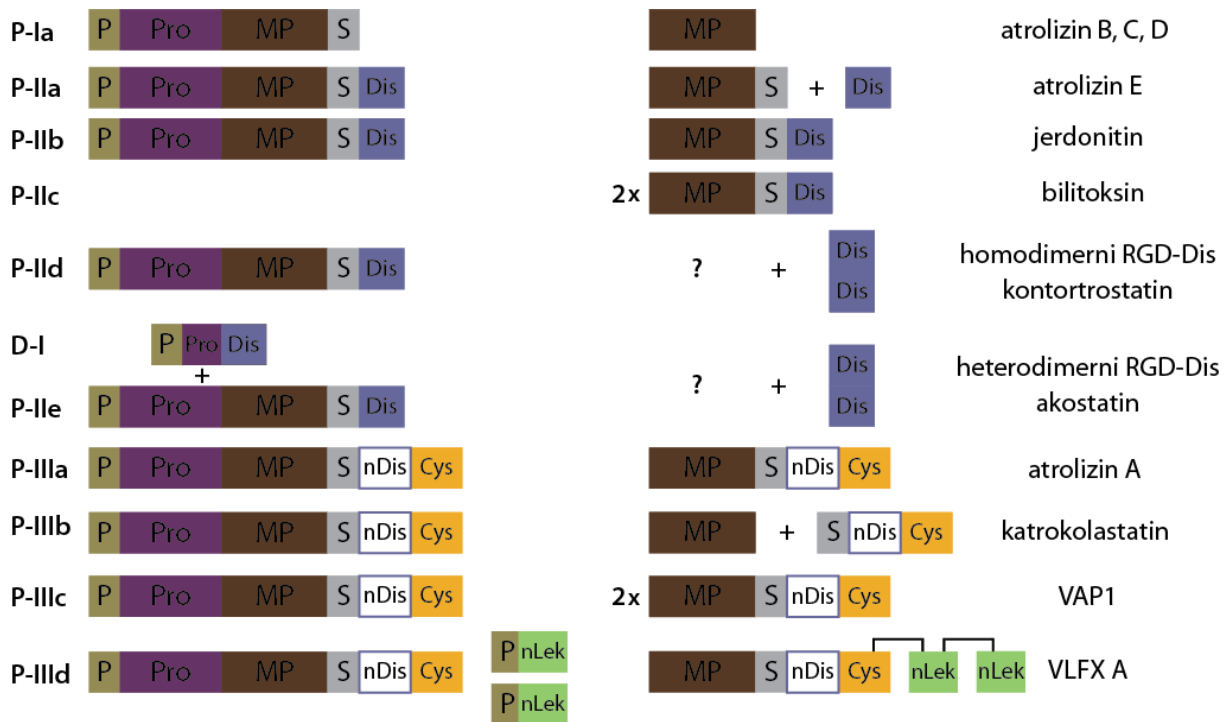
i cDNA sljedovima, kristalnim strukturama, sintezi, procesiranju, supstratnoj specifičnosti, evolucijskom podrijetlu, ulozi metalnih iona u strukturi i funkciji te relativnoj zastupljenosti. Međutim, mnoga relevantna pitanja vezana uz metaloproteinaze zmijskih otrova još uvijek nisu razjašnjena, osobito ona vezana uz kritične osobitosti njihovog molekularnog fenotipa koje bi bile zaslužne za raznolikost fizioloških učinaka izraženih u envenomacijskoj patogenezi (Fox i Serrano, 2009).

2.3.1.1. STRUKTURNE OSOBITOSTI

Metaloproteinaze podrijetlom iz otrova zmija, kao i njihovi najbliži filogenetski srodnici ADAM (engl. *a disintegrine and metalloproteinase*) i ADAMTS (engl. *ADAM with thrombospondin type-1 motif*) proteini, predstavljaju Zn^{2+} -ovisne enzime varijabilnih molekularnih masa koji dijele visoko homologne metaloproteinazne domene, a u mnogim slučajevima i niz dodatnih, nekatalitičkih smještenih C-terminalno od proteinazne (Fox i Serrano, 2005; Takeda i sur., 2012). Zahvaljujući podudarnoj domenskoj organizaciji, metaloproteinaze zmijskih otrova, ADAM i ADAMTS proteini pripadaju zajedničkoj obitelji tzv. reprotizina, odnosno M12B klanu metaloendopeptidaza, koji su zajedno s još pet ostalih proteinskih obitelji – metaloproteinazama matriksa (matriksinima), astacinima, seralizinima, snapalizinima i leišmanolizinima, klasificirani u endopeptidaznu superobitelj metcinkina. Njene pripadnike, uz topološki ekvivalentnu trodimenzionalnu strukturu, karakterizira i prisutnost virtualno identičnog Zn^{2+} -veznog mjesta s konsenzusnim slijedom HEXXHXXGXXH te konformacijski sličnog metioninskog okreta prostorno smještenog ispod aktivnog mjesta gdje oblikuje hidrofobnu bazu za katalitički važan Zn^{2+} ion koordiniran s tri histidinska ostatka (Bode i sur., 1993; Gomis-Rüth, 2003). Prema opće prihvaćenom mišljenju, visoki stupanj strukturne sličnosti članova obitelji reprotizina je izravan odraz njihovog zajedničkog evolucijskog podrijetla s obzirom da su među genima čiji su produkti regrutirani u proteom otrova nedvojbeno identificirani i pojedini koji kodiraju za proteine nalik današnjim ADAM-ima, a koji su tijekom rane radijacije "naprednih" zmija podvrgnuti duplikaciji i ubrzanoj molekularnoj evoluciji iz njih proizašlih kopija čime je postavljena osnova za daljnju funkcionalnu diverzifikaciju Zn^{2+} -ovisnih metaloproteinaza zaslužnu za stjecanje njihovih brojnih toksinoloških aktivnosti, između ostalog i onih envenomacijski relevantnih (Fry, 2005). Njihovo biološko djelovanje koje je prvenstveno posredovano katalitičkim i adhezivnim svojstvima, ali i sposobnošću izravne stanične aktivacije te oslobađanja endogenih bioaktivnih komponenti iz odgovarajućih prekursora, najvećim

dijelom je usmjereno prema proteinima bazalne membrane, faktorima zgrušavanja krvi, trombocitima, endotelnim te proupalnim stanicama, čime do izražaja dolazi njihov potencijal narušavanja hemostaze (Moura-da-Silva i sur., 2011). S druge strane, ADAM i ADAMTS proteini, široko rasprostranjeni multifunkcionalni konstituenti različitih tkiva koji su identificirani u brojnim vrstama, dominantno posreduju u uobičajenim fiziološkim procesima razvoja i morfogeneze pri čemu se osobito ističe njihova modulatorna funkcija u staničnoj komunikaciji, interakciji i adheziji koju ostvaruju proteolitičkim odcjepljivanjem ektodomena prekursora membranskih proteina poput faktora rasta, citokina, njihovih receptora i raznih adhezijskih molekula te njihovom aktivacijom, kao i doprinos u oslobađanju biološki aktivnih peptida iz ekstracelularnog matriksa i njegovom remodeliranju (Gutiérrez i sur., 2010).

Zn²⁺-ovisne metaloproteinaze identificirane u zmijskim otrovima čine izrazito heterogenu proteinsku obitelj čije članove odlikuje varijabilni stupanj strukturne kompleksnosti. Zahvaljujući dostatnom broju raspoloživih aminokiselinskih sekvenci, početkom 90-ih godina prošlog stoljeća Bjarnason i Fox su predložili njihovu prvu klasifikaciju u četiri glavne grupe izvedene na osnovu razlika u multidomenskoj organizaciji uočenih na razini u to vrijeme poznatih primarnih struktura izoliranih proteina i njima odgovarajućih mRNA transkripata (Bjarnason i Fox, 1995). P-I grupa je obuhvaćala najjednostavnije pripadnike samo s metaloproteinaznom domenom, a P-II grupa one koji uz metaloproteinazu sadrže i disintegrinsku. U P-III grupu su bili svrstani predstavnici s domenom bogatom cisteinom kao trećom u nizu. Zasebna P-IV grupa je okupljala najkompleksnije članove karakteristične zbog dviju dodatnih podjedinica nalik lektinima C-tipa koje su s glavnim proteinaznim lancem povezane disulfidnim mostovima. Međutim, iscrpnom analizom sve dostupnijih cDNA sekvenci u međuvremenu se ispostavilo da u otrovima postoje i multimodularne strukture koje su rezultat posttranslacijskih modifikacija i/ili proteolitičkog procesiranja zbog čega je tijekom posljednjih nekoliko godina originalna klasifikacijska shema postupno nadograđivana uvođenjem P-II i P-III podgrupa. Daljnjom subklasifikacijom u osnovi je kompenzirano otkriće onih metaloproteinaza koje prilikom pretvorbe iz nascentnog u zreli oblik podliježu bilo odcjepljivanju nekatalitičkih domena, bilo dimerizaciji (Fox i Serrano, 2005, 2008, 2009, 2010) (Slika 3). Također, u najnovijoj kategorizaciji P-IV grupa je izostavljena u skladu s hipotezom prema kojoj njeni članovi najvjerojatnije predstavljaju samo posttranslacijsku modifikaciju kanoničke P-III strukture s obzirom da u literaturi zasad nije zabilježen niti jedan slučaj identificiranog P-IV mRNA transkripta (Fox i Serrano, 2008).



Slika 3. Klasifikacija Zn^{2+} -ovisnih metaloproteinaza podrijetlom iz otrova zmija i shematski prikaz organizacije njihove multimodularne arhitekture zastupljen u nascentnom (lijevo) i zrelom, secerniranom obliku (desno) s naznačenim reprezentativnim predstavnicima svake podgrupe. P = signalni peptid, prepeptid; Pro = propeptid; MP = metaloproteinazna domena; S = razmaknica (engl. *spacer*); Dis = disintegrinska domena; nDis = domena nalik disintegrinskoj; Cys = domena bogata cisteinom; nLek = podjedinica nalik lektinu C-tipa, ? = nepotvrđena strukturna forma (preuzeto iz Fox i Serrano, 2009).

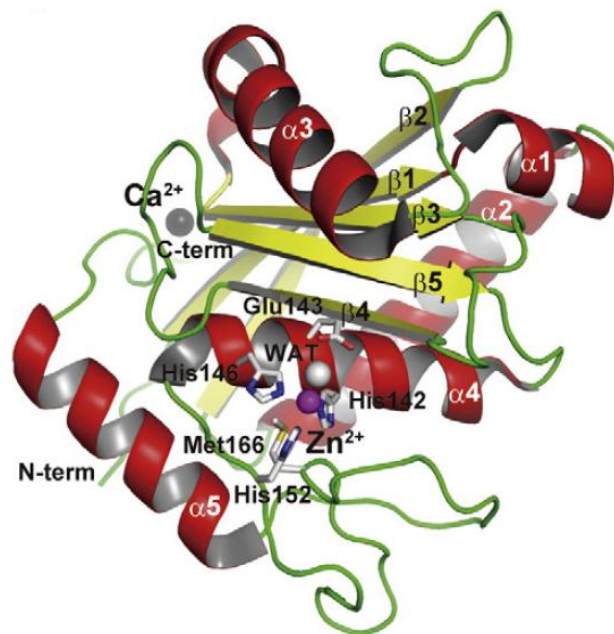
Zahvaljujući informacijama proizašlima iz analize njihovih cDNA sekvenci između ostalog je demonstrirano i da se sve metaloproteinaze koje su prisutne u otrovima kao izvanstanični, sekretorni proteini sintetiziraju sa signalnim peptidom, odnosno prepeptidom od 18 aminokiselinskih, uglavnom hidrofobnih ostataka, u prvom redu zaslužnim za ciljano usmjeravanje nascentnog polipeptidnog lanca prema endoplazmatskom retikulumu u kojem se odvija njegovo uklanjanje, smatanje preostale slobodne strukture u ispravnu konformaciju uz formiranje većeg broja disulfidnih veza, te, u pojedinim slučajevima, glikozilacija i multimerizacija. Također, za nascentni oblik metaloproteinaza iz otrova zmija je karakterističan i visoko homologni propeptid od 200 aminokiselinskih ostataka koji ih mehanizmom cisteinske sklopke (engl. *Cys-switch*) održava u katalitički inaktivnom, zimogenom obliku za što je odgovoran cisteinski ostatak iz očuvanog slijeda PKMCVGT. Naime, njegova tiolna skupina helira katalitički važan Zn^{2+} ion iz aktivnog mjesta, blokirajući

autodigestiju i održavajući strukturni i funkcionalni integritet inhibirane molekule sve dok sekrecijska vezikula, koja se postupno odvaja od trans-Golgijske mreže, ne oslobodi svoj sadržaj u lumen venomne žlijezde (Grams i sur., 1993; Ramos i Selistre-de-Araujo, 2006). Uzevši u obzir da dosad ni jedna metaloproteinaza nije izolirana s propeptidom kao sastavnim dijelom strukture zrelog proteina, njihova aktivacija u otrovu, kako se pretpostavlja, nužno zahtijeva njegovo prethodno odcjepljenje (Takeda i sur., 2012). Signalni peptid, propeptid i proteinazna domena su homologni među pripadnicima svih grupa (Calvete i sur., 2005).

2.3.1.1.1. P-I grupa

U P-I grupu su klasificirani članovi koji posjeduju samo katalitičku, metaloproteinaznu domenu od oko 215 aminokiselinskih ostataka koja je topološki ekvivalentna s onima ostalih reprotolizina i u nascentnom obliku omeđena s N-terminalnom pre-pro-sekvencom te kratkom C-terminalnom razmaknicom (Ramos i Selistre-de-Araujo, 2006; Fox i Serrano, 2010). Proteolitičkim procesiranjem rubnih segmenata nastaje zreli protein s dvije poddomene odijeljene pukotinom aktivnog mjesta i fizički povezane s dvije ili tri disulfidne veze koje su agregirane u unutrašnjosti molekule i kao stabilizirajući elementi odgovorne za njenu kompaktnu, globularnu strukturu. Do danas su razjašnjene kristalne strukture čak devet reprezentativnih predstavnika skupine (Kang i sur., 2011) (Slika 4), prvenstveno s tendencijom da se s prikupljenim informacijama doprinese definiranju relevantnih strukturnih osobitosti koje bi odražavale njihovu funkcionalnu kompleksnost. Naime, iako su organizacijski izrazito jednostavne, metaloproteinaze P-I grupe iskazuju široki spektar bioloških aktivnosti, poput mionekrotičnosti, fibrino(geno)lize, inflamacijskog odgovora, apoptoze, te rjeđe, hemoragičnosti, koje se zasad pripisuju isključivo njihovoj potentnoj proteolitičkoj aktivnosti s obzirom da sve dosad identificirane funkcioniraju kao aktivne metal-ovisne endopeptidaze (Fox i Serrano, 2005). Naime, unatoč varijabilnom broju i položaju cisteinskih ostataka, i posljedično, različitom uzorku disulfidnih mostova, P-I članovi dijele većinu glavnih determinirajućih karakteristika sekundarne i tercijarne strukture, osobito onih u regiji s Zn^{2+} -veznim motivom i metioninskim okretom iz kojih, između ostalog, proizlazi i njihov zajednički katalitički mehanizam (Fox i Serrano, 2010). Ukratko, kao i kod ostalih predstavnika glavnih proteinskih obitelji metcinkina, u njegovoj osnovi je porast stupnja polarizacije molekule vode ukomponirane između karboksilne skupine Glu^{335} iz katalitičke konsenzusne sekvence koji služi kao baza i tetraedarski koordiniranog Zn^{2+} iona (Stöcker i Bode, 1995). Njenom aktivacijom dolazi do nukleofilnog napada na karbonilnu

skupinu peptidne veze supstrata i prijenosa karboksilnog protona glutaminske kiseline na amidni dušik što rezultira oslobađanjem nastalih hidrolitičkih produkata, dok se slobodni enzim regenerira zahvaljujući ugradnji nove molekule vode. Osim u broju i uzorku disulfidnih mostova, metaloproteinaze P-I grupe manjim dijelom se razlikuju i u strukturnim svojstvima regija koje posreduju u vezanju supstrata, primarno hidrofobnom džepu na S1' kraju aktivnog mjesta što implicira mogući utjecaj uočenih varijacija na njihovu proteolitičku specifičnost, i posljedično, biološku aktivnost (Fox i Serrano, 2005; Gutiérrez i sur., 2010).



Slika 4. Model 3D strukture adamalizina II, reprezentativnog predstavnika P-I grupe s naznačenim očuvanim aminokiselinskim ostacima iz konsenzusnog slijeda. WAT = katalitička molekula vode (preuzeto iz Kang i sur., 2011).

2.3.1.1.2. P-II grupa

Kompleksnost metaloproteinaza pročišćenih iz zmijskih otrova ne proizlazi samo iz njihove genomske i transkriptomске strukture, već i iz posttranslacijskih modifikacija. Uz glikozilaciju osobito je izraženo i formiranje intermolekulskih disulfidnih mostova zaslužnih za stvaranje multimernih kompleksa čija heterogenost dolazi do izražaja na razini P-II, odnosno P-III grupe (Fox i Serrano, 2008). P-II grupa metaloproteinaza, koje u nascentnom obliku karakterizira prisutnost disintegrinske domene smještene C-terminalno od razmaknice, prema trenutno prihvaćenoj klasifikaciji uključuje pet jasno diferenciranih podgrupa (Fox i Serrano, 2010). P-IIa i P-IIb podgrupe se razlikuju ovisno o tome da li se disintegrinska

domena posttranslacijski odcjepljuje u aktivnu molekulu ili zadržava kao sastavni dio strukture zrelog proteina. P-IIc podgrupa uključuje članove sastavljene od proteinazne i disintegrinske domene koje podliježu dimerizaciji. I konačno, P-IIId i P-IIe podgrupe okupljaju homo-, odnosno heterodimerne disintegrine, ovisno o tome da li obje njihove podjedinice potječu iz identičnih procesiranih P-II metaloproteinaza ili, kao što se smatra, jedna od njih predstavlja produkt zasebnog gena (Fox i Serrano, 2008). Naime, iako je već duže vremena poznato da disintegrini predstavljaju uobičajene komponente zmijskih otrova, tek je transkriptomskim analizama nedvojbeno potvrđeno da se gotovo svi dosad otkriveni sintetiziraju kao sastavni dio većih, multidomenskih pripadnika metaloproteinazne proteinske obitelji (Fox i Serrano, 2005; Ramos i Selistre-de-Araujo, 2006). U prilog tome govori i činjenica da je u literaturi opisana samo nekolicina cDNA sekvenci kodirajućih za pojedinačne strukture koje nisu sastavni dio P-II prekursora, uključujući akostatin, piscivostatin te gabonine, što upućuje na njihovo alternativno podrijetlo povezano s ekspresijom novih, zasebnih gena ili procesiranjem na razini mRNA. Nadalje, osim pripadnika P-II grupe koji su u zmijskim otrovima zastupljeni u obliku slobodnih disintegrina, na proteinskoj razini su identificirana i njena dva člana sastavljena i od proteinazne i od disintegrinske domene – homodimerni bilitoksin-I iz otrova vrste *Agkistrodon bilineatus* te jerdonitin iz otrova vrste *Trimeresurus jerdonii*. Njihovoj strukturalnoj osobitosti pridonose jedinstveni cisteinski ostaci, Cys²²² u razmaknici te Cys²⁴¹ u disintegrinskoj domeni, za koje se pretpostavlja da formiraju dodatni, interdomenski disulfidni most odgovoran za prevenciju autoproteolitičkog procesiranja.

Slobodni disintegrini čine raznoliku grupu polipeptida iz otrova zmijske porodice *Viperidae* sačinjenih od 40 do 100 aminokiselinskih ostataka i umreženih varijabilnim brojem disulfidnih mostova (Calvete i sur., 2005; Juárez i sur., 2008). Njihov farmakološki profil u prvom redu je povezan sa sposobnošću selektivnog blokiranja funkcije površinskih staničnih receptora iz obitelji integrina koji adhezivno vežu komponente ekstracelularnog matriksa ili membrana susjednih stanica i posreduju u očuvanju tkivnog integriteta. Naime, većina disintegrina oslobođenih autolizom njihovih P-II prekursora u tzv. inhibicijskoj petlji sadrži kanonički RGD motiv koji je kao ligand relevantan za vezanje integrina iz skupine β_1 , odnosno β_3 (Juárez i sur., 2008). β_1 integrini dominantno djeluju kao receptori za komponente ekstracelularnog matriksa – kolagen, laminin, fibronektin, tenascin i vitronektin, dok pojedini reagiraju i sa staničnim receptorima VCAM-1 i MadCAM-1. Integrini iz skupine β_3 uglavnom vežu fibrinogen i vitronektin. Također, osim RGD, u literaturi su opisani i KGD ili WGD

disintegrini s evolucijski izmijenjenim konsenzusnim tripeptidom koji su prepoznati kao potentni inhibitori $\alpha_{IIb}\beta_3$ trombocitnog receptora za fibrinogen. Funkcionalna uloga disintegrinske domene u P-II metaloproteinazama koje ne podliježu proteolitičkom procesiranju još nije definirana, iako se u posljednje vrijeme spekulira da bi u slučaju bilitoksina-I mogla biti povezana s potenciranjem njegove hemoragičnosti, po uzoru na značaj koji se pripisuje dodatnim domenama visokomolekulskih članova P-III grupe (Nikai i sur., 2000; Gutiérrez i sur., 2010). S druge strane, disintegrinska domena jerdonitina, druge intaktne P-II metaloproteinaze bez hemoragične aktivnosti, najvjerojatnije posreduje u njegovom antagonističkom vezanju za $\alpha_{IIb}\beta_3$ receptor trombocita i, posljedično, inhibiciji njihove agregacije, za razliku od one bilitoksina-I u čijoj je disintegrinskoj petlji, umjesto kanoničkog RGD motiva, detektirana MGD sekvenca kao varijacija odgovorna za promjenu specifičnosti prema integrinima (Nikai i sur., 2000; Chen i sur., 2003).

2.3.1.1.3. P-III grupa

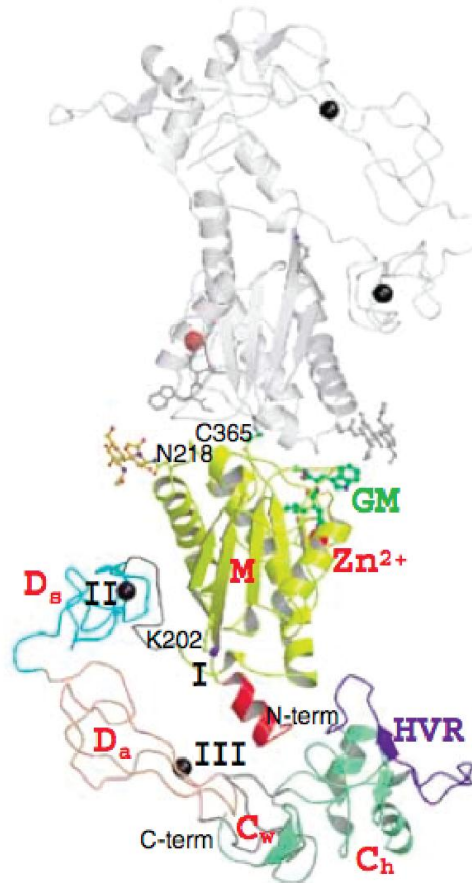
U P-III grupu su svrstani predstavnici metaloproteinazne proteinske obitelji čiji nascentni oblik odlikuje najveći stupanj kompleksnosti, s obzirom da uz katalitičku i disintegrinsku sadrži još i domenu bogatu cisteinom što je ujedno i struktura aktivnih monomernih te manjeg broja poznatih dimernih metaloproteinaza koje pripadaju njenoj P-IIIa, odnosno i P-IIIc podgrupi, dok su one koje autoproteolizom gube dodatne domene zajedno s razmaknicom kvalificirane kao P-IIIb članovi (Fox i Serrano, 2010). Bivši pripadnici ukinute P-IV grupe s dvije posttranslacijski dodane podjedinice nalik lektinima C-tipa kodirane zasebnim cDNA sekvencama su svrstani u P-IIId podgrupu. Iako disintegrinska domena P-III metaloproteinaza dijeli određeni stupanj homologije s onom karakterističnom za P-II članove, među njima postoje izražene razlike, uglavnom povezane s uzorkom disulfidnih mostova i motivom koji tvori vezno mjesto za integrine, iz čega proizlazi i njihova varijabilna funkcionalnost (Fox i Serrano, 2005). Stoga je za disintegrinsku domenu P-III pripadnika uvriježen i naziv domena nalik disintegrinskoj. Mehanizam ili strukturalna osnova koji bi bili zaslužni za očuvanje intaktne domenske organizacije, odnosno promoviranje proteolitičkog procesiranja zasad nisu identificirani, iako postoje indikacije da bi mogli biti povezani s rasporedom disulfidnih veza i konformacijskim smatanjem. Naime, neki od biološki aktivnih proteina koji se po sekvenci podudaraju s domenom nalik disintegrinskoj te onoj bogatom cisteinom, uključujući jararhagin C, alternagin C i katrolastatin C karakterističnih za vrste *Bothrops jararaca*, *B. alternatus*, odnosno *Crotalus atrox*, iz odgovarajućih otrova ujedno su

izolirani i kao kompletne metaloproteinaze koje odgovaraju njihovim neprocesiranim prekursorima (Gutiérrez i sur., 2010). U skladu s objašnjenjem kojeg su ponudili Moura-da-Silva i suradnici (2003), opaženi fenomen sugerira da je svaki od njih u otrovu simultano prisutan u najmanje dvije izoforme s alternativno sparenim cisteinskim ostacima zaslužnima za njihovu različitu osjetljivost na hidrolitičko cijepanje čime se postiže dodatni stupanj strukturne i funkcionalne kompleksnosti. Naime, svi dosad poznati P-III članovi koji podliježu posttranslacijskom procesiranju u metaloproteinaznoj domeni posjeduju sedmi cisteinski ostatak konzerviran na položaju 195, kod ostalih detektiran na varijabilnim pozicijama, za koji se smatra da predstavlja neophodnu, ali ne i jedinu strukturnu odrednicu sklonosti kontroliranoj proteolizi (Fox i Serrano, 2005). Cys¹⁹⁵ je najvjerojatnije prisutan u reduciranom stanju ili obliku s vezanim aduktom što pri određenim uvjetima stvara izuzetno reaktivnu situaciju koja ga potiče na formiranje disulfidne veze s jednim od preostalih šest konzerviranih cisteinila, rezultirajući promjenom ustaljenog uzorka disulfidnih mostova i destabilizacijom proteinske strukture. Sudbina odcjepljene metaloproteinazne domene autoliziranih P-III članova nije poznata, međutim, s obzirom da ni u jednom slučaju nije izolirana u intaktnom obliku, prevladava mišljenje da je odlikuje visoki stupanj nestabilnosti i podložnosti proteolitičkoj degradaciji.

S P-III metaloproteinazama se povezuju patofarmakološki učinci koji po raznolikosti i potentnosti daleko premašuju toksične efekte pripadnika preostalih dviju grupa, poput hemoragičnosti, apoptotičkog djelovanja, proteolitičkog cijepanja von Willebrandovog faktora (vWF), aktivacije protrombina i faktora X te inhibicije agregacije trombocita (Fox i Serrano, 2010). Iako glavna biološka funkcija koje eksprimiraju ovisi o proteolitičkoj aktivnosti metaloproteinazne domene, značajna uloga u funkcionalnoj modulaciji toksičnosti P-III članova nedvojbeno pripada onim dodatnim, nekatalitičkim, čiji je doprinos najvjerojatnije posredovan njihovom sposobnošću antagonističkog djelovanja te ciljanog usmjeravanja toksina prema relevantnim proteinima predodređenima za proteolizu (Fox i Serrano, 2005). Naime, domena nalik disintegrinskoj, koja u većini slučajeva umjesto RGD, sadrži karakteristični XCD motiv (najčešće DCD ili ECD), prema rezultatima istraživanja provedenima na izdvojenim domenskim segmentima, interferira s agregacijom trombocita induciranom kolagenom te staničnom adhezijom posredovanom integrinima, kao i s migracijom te proliferacijom (Gutiérrez i sur., 2010). Slično, domena bogata cisteinom iskazuje izraženi afinitet prema proteinima ekstracelularnog matriksa s domenom A vWF-a, uključujući vWF, FACIT (engl. *fibril-associated collagens with interrupted triple helices*)

kolagene XII i XIV te matrilin 1, 3 i 4. Međutim, identifikacija uloge nekatalitičkih domena u kontekstu sveukupnog patološkog fenotipa pripadnika P-III grupe s posebnim naglaskom na definiranje molekularnog mehanizma kojim prepoznaju ciljne molekule i dalje predstavlja svojevrsan izazov, što i nije iznenađujuće ako se uzme u obzir da je zadovoljavajući pomak u razjašnjenju njihovih trodimenzionalnih struktura ostvaren tek nedavno. Do danas je okarakterizirano sedam reprezentativnih predstavnika skupine (Takeda i sur., 2012), među kojima i atipični homodimerni VAP-1 protein izoliran iz otrova vrste *Crotalus atrox* kao prvi koji je uspješno podvrgnut kristalografskoj analizi (Takeda i sur., 2006). Njegovu multimodularnu arhitekturu odlikuju dvije nasuprotno orijentirane proteinazne domene s konsenzusnom sekvencom QDHSK u dodirnoj površini dvaju monomera koja se, uz intermolekulski disulfidni most kojeg formiraju konzervirani cisteinski ostaci na položaju 374, smatra ključnim faktorom odgovornim za promoviranje dimerizacije (Slika 5). Na svaku katalitičku domenu se nadovezuju dvije dodatne koje zahvaljujući vezanim Ca^{2+} ionima i strogo definiranom uzorku disulfidnih veza poprimaju rigidnu konformaciju "C" oblika s konkavnim dijelom usmjerenim prema katalitičkom segmentu čime se ostvaruje neposredni kontakt između proteolitičke i adhezivne domene, bilo one nalik disintegrinskoj, bilo one bogate cisteinom, odgovoran za njihovo moguće funkcionalno međudjelovanje. Međutim, s obzirom da je disintegrinska petlja s otprije prepoznatim afinitetom za integrine sterički zaklonjena N-terminalnim dijelom domene bogate cisteinom, njen položaj je najvjerojatnije čini nedostupnom za proteinske interakcije u kojima se veći značaj pridaje distalnom kraju molekule označenom kao hipervarijabilna regija. Naime, osim što je odgovorna za površinske osobitosti P-III metaloproteinaza općenito, hipervarijabilnu regiju karakterizira i pozicioniranost u neposrednoj blizini aktivnog mjesta što ne implicira samo njenu potencijalnu ulogu u definiranju specifičnosti prema supstratu i posredovanju u adheziji, već i doprinos u približavanju "uhvaćenog" ciljnog proteina hidrolitički djelotvornoj metaloproteinaznoj domeni. Pretpostavku o adheziji posredovanoj domenom bogatom cisteinom koja je proizašla iz strukturnih studija VAP-1 proteina podupiru i eksperimentalni dokazi njene funkcionalne relevantnosti u biološkoj aktivnosti analiziranih P-III članova, prvenstveno u kontekstu njihove interakcije s trombocitima i domenom A vWF-a (Fox i Serrano, 2010). Npr. Kamiguti i suradnici (2003) su kod jararagina u domeni bogatoj cisteinom identificirali regije koje posreduju u inhibiciji agregacije trombocita, najvjerojatnije zahvaljujući njihovoj naknadno demonstriranoj sposobnosti vezanja vWF-a (Pinto i sur., 2007). Biološki značaj domene nalik disintegrinskoj, kojoj se u svjetlu strukturnih studija zasad pripisuje samo potporna uloga u prostornom razdvajanju dviju funkcionalnih jedinica,

najvjerojatnije dolazi do izražaja tek proteolitičkim procesiranjem kojem podliježu pojedine P-III metaloproteinaze, a na koje se stoga može gledati kao na još jedan mogući izvor raznolikosti njihovih farmakoloških aktivnosti (Gutiérrez i sur., 2010).



Slika 5. Struktura dimernog VAP-1 proteina, reprezentativnog predstavnika P-IIIc podgrupe. M = metaloproteinazna domena; D_s, D_a = poddomene domene nalik disintegrinskoj; C_w, C_h = poddomene domene bogate cisteinom; HVR = hipervarijabilna regija; GM = vezani inhibitor 3-(*N*-hidroksikarboamido)-2-izobutil-propanoil-Trp-metilamid; C365 = konzervirani Cys³⁶⁵ iz intermolekulskog disulfidnog mosta. Crni i crveni kružići označavaju Ca²⁺-, odnosno Zn²⁺-vezna mjesta (preuzeto iz Takeda i sur., 2006).

Nadalje, kao što su pokazali Igarashi i suradnici (2007), VAP-1 dimer je strukturno izrazito podudaran s katrokolastatinom kao monomernim predstavnikom skupine, također iz otrova vrste *C. atrox*, što sugerira da dimerizacija ima neznatan utjecaj na terciarnu strukturu metaloproteinaza. Jedina bitna razlika koja ih diferencira je značajno viši stupanj fleksibilnosti demonstriran za katrokolastatin koji je najvjerojatnije povezan s konformacijskim svojstvima njegove razmaknice i zaslužan za široki spektar orijentacija koje

domena nalik disintegrinskoj može poprimiti u odnosu na onu proteinaznu. Funkcionalni značaj dinamičnosti multidomske arhitekture monomernih P-III metaloproteinaza bi se mogao očitovati u modulaciji relativnog prostornog razmještaja njihovih proteolitičkih i adhezijskih domena tijekom katalize, definiranju specifičnosti prema supstratu i regulaciji mehanizma posttranslacijskog procesiranja (Takeda i sur., 2012).

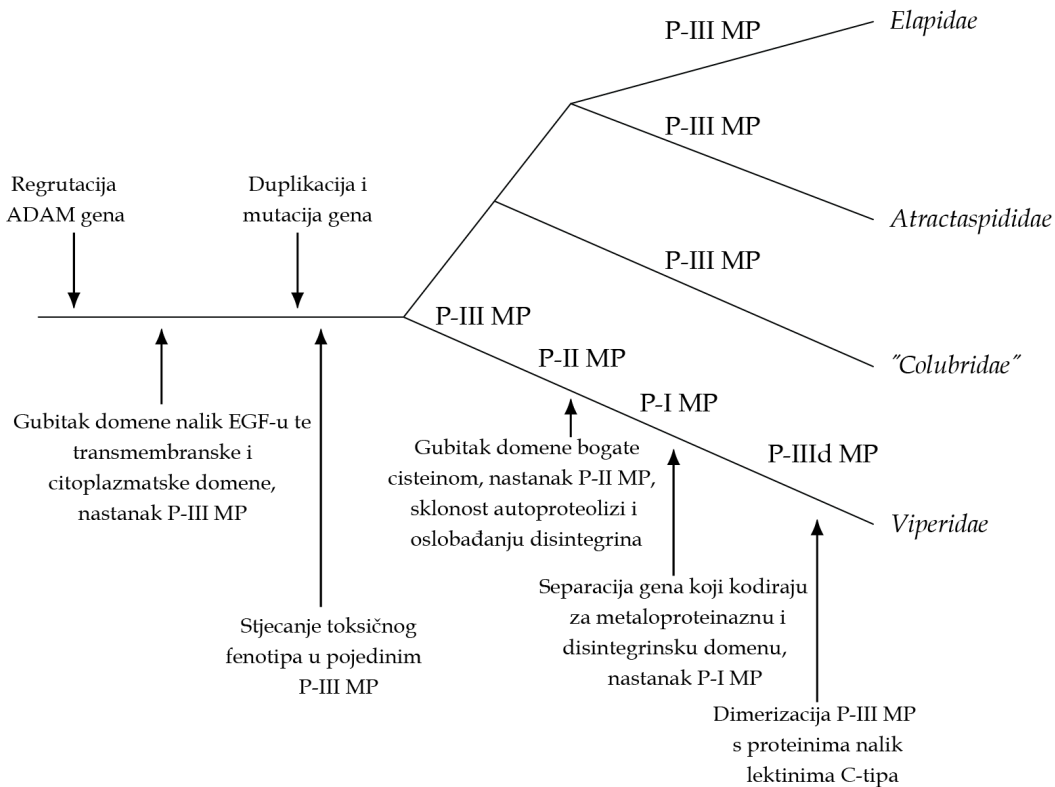
2.3.1.2. EVOLUCIJSKO PODRIJETLO

Heterogenost struktura i funkcionalnog djelovanja metaloproteinaza iz otrova zmija, osim posttranslacijskim modifikacijama nascentnih toksina, značajnim dijelom se pripisuje i ubrzanoj molekularnoj evoluciji kao glavnim pokretačem razvoja varijabilnosti (Moura-da-Silva i sur., 2011). Njihov ancestralni protein, iz čijeg su gena evoluirale, najvjerojatnije je bio multidomenski protein nalik nekatalitičkoj metaloproteinazi ADAM 7 ili metaloproteinazi ADAM 29 proteolitički aktivnoj na ekstracelularnom matriksu pri čemu je gubitkom njegove citoplazmatske, transmembranske i domene nalik EGF-u (engl. *epidermal growth factor*) postavljena osnova za formiranje P-III strukture (Fry, 2005). Kao što su istaknuli Casewell i suradnici (2011), njegova regrutacija u proteom i, posljedično, primarna duplikacija gena koji ga kodira, najvjerojatnije su nastupili neposredno prije divergencije "naprednih" zmija, što objašnjava njihovu zastupljenost u svim taksonomskim grupama nadporodice *Caenophidia* (Slika 6). Međutim, daljnja genska diverzifikacija je započela tek evolucijskim odvajanjem porodice *Viperidae* zbog čega su P-I i P-II metaloproteinaze te iz njih procesirani disintegrini kod elapida i atraktaspidida potpuno odsutni. Naime, prema trenutno najizglednijem scenariju, evolucijska prošlost metaloproteinaza zmijskih otrova je bila okarakterizirana višestrukim epizodama minimizacije njihovih dupliciranih gena i posljedičnim gubitkom domena, prvo one bogate cisteinom čime je postavljena osnova za formiranje P-II strukture, a zatim i one nalik disintegrinskoj kao konvergentnim događajem koji je nastupio neovisno u više različitih rodova i iz kojeg je proizašla P-I molekularna okosnica. Također, filogenetskom analizom je utvrđeno da su dimerne strukture evolucijski starije od onih monomernih što sugerira da gubitak dimerizma predstavlja funkcionalnu prednost u kontekstu redukcije veličine toksina koja bi mogla biti povezana s njegovom bržom difuzijom i kraćim vremenskim periodom potrebnim da eksplicira svoj patofiziološki učinak. Nadalje, nesinonimnim mutacijama u kodirajućim regijama proizašlih kopija dupliciranih gena uvedenima ubrzanom molekularnom evolucijom i sačuvanima pod utjecajem jake pozitivne selekcije prvenstveno su modificirani aminokiselinski ostaci izloženi na molekularnoj površini

i stoga najvjerojatnije odgovorni za proteinske interakcije, što implicira značaj uloge adaptivne evolucije u neofunkcionalizaciji i optimizaciji bioloških aktivnosti Zn^{2+} -ovisnih metaloproteinaza podvrgnutih gubitku njihovih C-terminalnih domena koji je osobito evidentan na primjeru P-II prekursora. Naime, izlaganjem veznih motiva za integrine postignutim njihovim odcjepljenjem u slobodne strukture disintegrini su stekli novu, potentnu sposobnost inhibicije agregacije trombocita koja je kod P-III metaloproteinaza, najvjerojatnije zbog njihove steričke zaklonjenosti domenom bogatom cisteinom, odsutna ili znatno slabije izražena. Osim na disintegrinsku domenu, djelovanje selektivnog pritiska je bilo usmjereno i na onu metaloproteinaznu, što osobito dolazi do izražaja usporedbom stabilnosti Zn^{2+} -ovisnih metaloproteinaza koje podliježu posttranslacijskom procesiranju s obzirom da se samo kod članova P-II grupe proteolitičkim odcjepljenjem oslobađaju dva funkcionalna produkta otporna na degradaciju.

Uz mehanizam gubitka domena koji je predložen kao jedan od katalizatora diverzifikacije metaloproteinaza iz otrova zmija, u generiranju njihove raznolikosti dodatnu ulogu najvjerojatnije je odigrala i rekombinacija između P-II disintegrinske domene i one katalitičke podrijetlom iz P-I, odnosno P-III strukture, vođena ili miješanjem egzona (engl. *exon shuffling*) na razini genoma ili posttranskripcijskim modifikacijama mRNA transkripata kao evolucijskim događajima koju su nastupili nakon divergencije primarnih kopija gena kodirajućih za svaku od tri glavne molekularne okosnice (Moura-da-Silva i sur., 2011). Naime, kladističkom analizom cDNA sekvenci podrijetlom iz vrste *Bothrops neuwiedi* je ustanovljeno da se one koje odgovaraju P-II metaloproteinazama jasno raščlanjuju u tri različita tipa – uobičajene P-IIb sljedove koji rezultiraju proteinima kompletne strukture, P-IIa sljedove segregirane uz one P-I članova s kojima dijele 100 %-tnu homologiju u 5'-terminalnom fragmentu koji kodira za metaloproteinaznu domenu što ukazuje na rekombinaciju njihovih primarnih mRNA transkripata čije bi dodatno procesiranje moglo generirati i P-I prekursore te slobodne disintegrine, i konačno, nove P-IIx sljedove proizašle iz miješanja egzona zasebnih gena s ekspresijskim produktima kao još nepotvrđenim strukturama koji bi bili sastavljeni od katalitičke domene nehemoragičnih P-III članova i neovisno evoluirane disintegrinske domene s RGD motivom. Proteini predviđeni analiziranim cDNA sekvencama iskazuju glavne osobitosti aminokiselinskih sljedova odgovarajućih grupa metaloproteinaza podrijetlom iz otrova, s iznimkom P-IIb članova čija disintegrinska domena sadrži i dva dodatna, karboksilno pozicionirana cisteinska ostatka odsutna kod zasad na proteinskoj razini potvrđenih struktura, slično kao i ona P-IIx predstavnika. Također, s

obzirom da zasad ne postoje naznake o postojanju neprocesiranog oblika formiranog asocijacijom katalitičke i RGD disintegrinske domene, cDNA sekvenca detektirana u otrovu vrste *B. neuwiedi* koja kodira za P-IIx strukturu najvjerojatnije predstavlja pseudogen.



Slika 6. Prikaz hipotetskih događaja tijekom evolucije metaloproteinaza (MP) iz otrova "naprednih" zmijsa. ADAM = engl. *a disintegrine and metalloproteinase*; EGF = engl. *epidermal growth factor* (preuzeto iz Gutiérrez i sur., 2010).

2.3.1.3. FUNKCIONALNA KOMPLEKSNOŠĆ I ULOGA U PATOFIZIOLOGIJI OTROVANJA

2.3.1.3.1. Lokalni patofiziološki učinci

Zahvaljujući strukturoj raznolikosti metaloproteinaze prisutne u zmijskim otrovima prilikom envenomacije promoviraju niz lokalnih i sistemskih štetnih učinaka od visokog patofiziološkog značaja sažetih u Tablicama 2 i 3 među kojima je daleko najdrastičniji onaj hemoragični za koji su, generalno gledajući, prvenstveno zaslužni članovi biološki najaktivnije P-III grupe (Escalante i sur., 2011). Hemoragija koja uglavnom predstavlja lokalni događaj u blizini mjesta ugriza, rjeđe sistemski, prvenstveno je posljedica njihove sposobnosti da naruše strukturni integritet mikrovaskulature i potaknu istjecanje krvi u okolno tkivo, tzv. ekstravazaciju (Slika 7). Naime, iako detaljni mehanizam hemoragičnosti još uvijek

nije u potpunosti razjašnjen, prevladava mišljenje da je u njegovoj osnovi selektivna proteolitička degradacija komponenti kapilarnog zida definiranog s endotelnim stanicama usidrenima u okolni ekstracelularni matriks koji je sastavljen od kolagena tipa IV, laminina, heparan sulfat proteoglikana (perlekana) i nidogena te, u manjoj mjeri, agrina, osteopontina, fibulina i drugih tipova kolagena međusobno umreženih u visoko organiziranu rešetku, tzv. bazalnu membranu (Gutiérrez i Rucavado, 2000; Gutiérrez i sur., 2005, 2010). Kao što sugerira iznimno veliki broj provedenih biokemijskih i imunohistokemijskih studija, hemoragične metaloproteinaze svoju aktivnost eksprimiraju i na bazalnoj membrani i na endotelnim stanicama (Gutiérrez i sur., 2010). Međutim, s obzirom da i one bez hemoragičnog fenotipa pokazuju sposobnost hidrolize njihovih komponenti *in vitro*, degradacija biološki relevantnih supstrata najvjerojatnije nije dostatna za indukciju patološkog fenotipa *per se* zbog čega se u posljednje vrijeme sve veći funkcionalni značaj pridaje i faktoru selektivnosti u kontekstu proteolitičkog cijepanja specifičnih peptidnih veza relevantnih za strukturnu i mehaničku stabilnost bazalne membrane (Gutiérrez i Rucavado, 2000). Također, Zn^{2+} -ovisne metaloproteinaze interferiraju i s adhezijom, bilo susjednih stanica, bilo stanica i okolnog ekstracelularnog matriksa, u prvom redu zahvaljujući hidrolitičkom ili antagonističkom učinku kojeg iskazuju prema adhezijskim proteinima endotela, integrinima i kadherinima (Gutiérrez i sur., 2005).



Slika 7. Hemoragični učinak izazvan otrovom vrste *V. ammodytes*
(preuzeto iz Lukšić i sur., 2006).

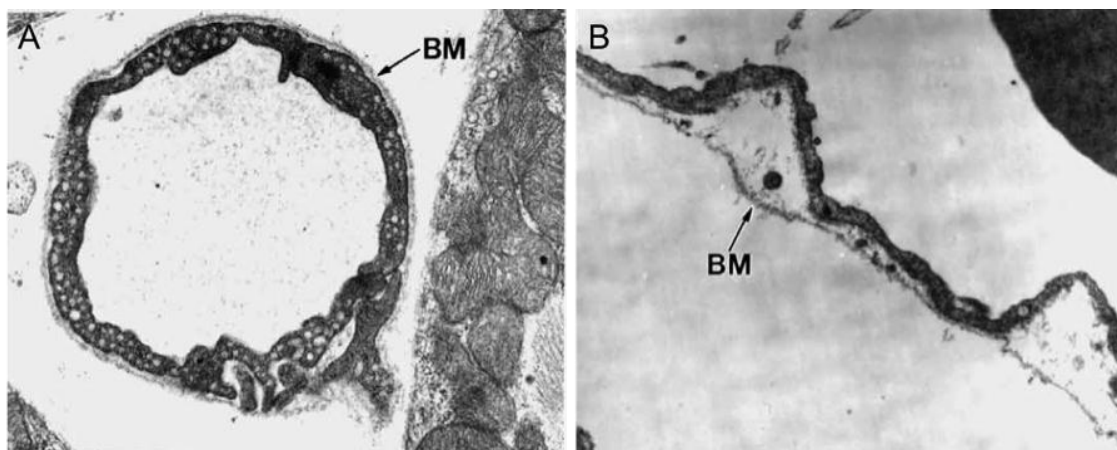
Prema trenutačno prihvaćenoj hipotezi, narušavanje supramolekularne organizacije bazalne membrane najvjerojatnije rezultira slabljenjem kapilarnog zida i perturbacijom njegovih interakcija s okolnim ekstracelularnim matriksom koji se uslijed gubitka mehaničke potpore tenzijski rasteže sve dok se krvožilni endotel ne stanji toliko da se na pojedinim

mjestima njegov strukturni integritet potpuno ne izgubi (Gutiérrez i sur., 2010). Posljedica je istjecanje eritrocita i ostalih plazmatskih komponenti u ekstravaskularni prostor u čemu bi ključnu ulogu mogao imati i fenomen hemodinamičkih biofizičkih sila koje djeluju u mikrocirkulaciji. Naime, njegov značaj je osobito očit ako se uzme u obzir da u usporedbi s drastičnim i izuzetno brzim patološkim promjenama koje zahvaćaju endotelne stanice *in vivo*, njihova višesatna inkubacija s pojedinim metaloproteinazama pročišćenima iz otrova u kulturi tkiva rezultira samo indukcijom citotoksičnosti, i posljedično, apoptozom kao najizraženijim efektom najvjerojatnije prouzrokovanim gubitkom staničnog kontakta s ekstracelularnim matriksom uslijed narušavanja funkcije integrina.

Histološka istraživanja patogeneze lokalnog hemoragičnog efekta na ultrastrukturnoj razini *in vivo* su pokazala da se patofiziološki proces koji vodi do ekstravazacije u većini slučajeva odvija tzv. *per rhexis* mehanizmom koji je primijećen u kapilarama i okarakteriziran drastičnim morfološkim i funkcionalnim promjenama endotelnih stanica poput redukcije broja pinocitotičkih vezikula, separacije od sloja bazalne lamine koji se postupno sasvim gubi, odvajanja mjehurića s citoplazmatskim sadržajem u lumen krvne žile, stanjivanja te, konačno, formiranja lezija ili pukotina kroz koje plazmatski sadržaj istječe u intersticijski prostor (Gutiérrez i Rucavado, 2000; Gutiérrez i sur., 2005; Escalante i sur., 2011) (Slika 8). S druge strane, u venulama prevladava alternativni, tzv. *per diapedesis* mehanizam u čijoj je osnovi fenomen širenja međustaničnih spojeva uslijed kontrakcija morfološki nepromijenjenih endotelnih stanica koji je najvjerojatnije induciran lokalnim upalnim procesom i oslobođenim medijatorima odgovornima za porast vaskularne permeabilnosti. Ukratko, iako su eksperimentalni dokazi prikupljeni biokemijskim, te osobito *in vivo* studijama zasad još uvijek nekompletni i često oprečni, ipak s dostatnom uvjerljivošću navode na zaključak da se indukcija hemoragičnog fenotipa odvija kroz dva glavna sukcesivna koraka – početnog selektivnog proteolitičkog cijepanja ključnih peptidnih veza u komponentama bazalne membrane zaslužnog za gubitak mehaničke stabilnosti kapilarnog zida nakon kojeg slijedi njegovo tenzijsko rastezanje prouzrokovano djelovanjem hemodinamičkih sila i praćeno stanjivanjem te, posljedično, gubitkom strukturnog integriteta endotelnih stanica (Gutiérrez i sur., 2005, 2010).

Iako se hemoragična aktivnost pripisuje metaloproteinazama varijabilnih molekulskih masa, one najpotentnije, uz pojedine iznimke, pripadaju P-III grupi što dodatno naglašava činjenica da se jedino s njima povezuje i sposobnost induciranja sistemskog krvarenja (Fox i Serrano, 2005; Escalante i sur., 2011). Uzevši u obzir visoki stupanj strukturne sličnosti

metaloproteinaznih domena P-I i P-III članova, fenomen izražene razlike u njihovoj hemoragičnosti nedvojbeno proizlazi iz funkcionalnih svojstava multidomske organizacije (Gutiérrez i sur., 2010). Naime, sekvence prisutne u domeni nalik disintegrinskoj i onoj bogatoj cisteinom najvjerojatnije imaju ključnu ulogu u ciljanom usmjeravanju P-III metaloproteinaza prema relevantnim mjestima njihovog djelovanja u mikrovaskulaturi, npr. zahvaljujući sposobnosti vezanja integrina u membrani endotelnih stanica kapilarnog zida ili proteina ekstracelularnog matriksa s domenom A vWF-a poput FACIT kolagena i matrilina neophodnih za stabilizaciju ostalih komponenti bazalne membrane i očuvanje njene mehaničke čvrstoće. Zatim, u usporedbi s P-I metaloproteinazama, one klasificirane u P-III grupu nisu podložne proteinaznoj inhibiciji posredovanoj α_2 -makroglobulinom u plazmi s obzirom da ih dodatne domene čine rezistentnima na njegovo djelovanje, omogućujući im da neometano i bez gubitka proteolitičke i hemoragične aktivnosti sistemski cirkuliraju po organizmu. I konačno, pojedine od njih iskazuju i sposobnost izravne hidrolize vWF-a i fibrinogena te inhibicije agregacije trombocita koja se pripisuje interakciji sekvenci prisutnih u njihovim nekatalitičkim domenama s integrinom $\alpha_2\beta_1$ kao trombocitnim receptorom za kolagen. Naime, prema jednoj od hipoteza, upravo narušavanje mehanizma hemostaze interferiranjem s funkcijom faktora zgrušavanja krvi i trombocita neophodnih za zaustavljanje krvarenja iz ozlijeđene krvne žile doprinosi potenciranju patogeneze hemoragičnosti (Kamiguti i sur., 1998).



Slika 8. Ultrastrukturne promjene u kapilarama mišjeg skeletnog mišića inducirane hemoragičnom metaloproteinazom BaH1 iz otrova vrste *Bothrops asper*. (A) Mikrografski prikaz normalne kapilare. (B) Mikrografski prikaz kapilare 1 min nakon injektiranja BaH1 s uočljivim odvajanjem stanjenih endotelnih stanica reduciranog broja pinocitotičkih vezikula od okolne bazalne membrane (BM) (preuzeto iz Gutiérrez i sur., 2005).

Tablica 2. Lokalni eksperimentalno opaženi patofiziološki učinci Zn^{2+} -ovisnih metaloproteinaza podrijetlom iz zmijskih otrova i njihove patofiziološke posljedice *in vivo* (preuzeto iz Gutiérrez i sur., 2010).

Ciljno mjesto	Eksperimentalno opaženi učinak	Patofiziološka posljedica
Mikrovaskulatura	Narušavanje integriteta kapilarnog zida, redukcija gustoće kapilarne mreže	Hemoragija, ishemija, mionekroza, otežana regeneracija skeletnog mišićnog tkiva
Ekstracelularni matriks	Degradacija matriksa, oslobađanje farmakološki aktivnih peptida	Interferiranje s regeneracijom lokalno oštećenog tkiva i procesom angiogeneze
Koža	Separacija dermalno-epidermalnog spoja, odvajanje epidermisa	Pojava mjehura i ulceracija, dermonekroza
Makrofagi, fibroblasti, endotelne stanice	Aktivacija stanica, oslobađanje upalnih medijatora i faktora rasta, leukocitna infiltracija	Edem, bol, lokalno oštećenje tkiva (npr. dermonekroza)

Uz hemoragični sindrom kao najdrastičniji envenomacijski efekt, jedna od tipičnih patoloških promjena koja karakterizira otrovanje izazvano ugrizom zmija iz porodice *Viperidae* podrazumijeva i pojavu mjehura na mjestu ugriza te razvoj ulceracija za što su izravno odgovorne Zn^{2+} -ovisne metaloproteinaze i njihova potentna sposobnost hidrolize ključnih proteina u dermalno-epidermalnom spoju, najvjerojatnije integrina $\alpha_6\beta_4$, laminina i raznih filamentoznih struktura, čime dolazi do odvajanja epidermisa (Gutiérrez i Rucavado, 2000). Također, osim indirektno uloge u induciranju mionekroze kao akutnog oštećenja mišićnog tkiva koje najvjerojatnije nastupa kao posljedica narušavanja strukturnog integriteta mikrovaskulature, prekida dotoka krvi i ishemije, hemoraginima iz zmijskih otrova se pripisuje i relevantni značaj u interferiranju s procesom njegove regeneracije, također usko povezanim s učinkom kojeg iskazuju na krvožilni sustav (Gutiérrez i sur., 2010). Naime, kao što je demonstrirano eksperimentima s miotoksinima iz skupine sekrecijskih fosfolipaza A_2 koji promoviraju isključivo mionekrozu, daljnji oporavak od njihovog toksičnog djelovanja prati brzi i uspješni regenerativni proces zahvaćenog mišića, za razliku od onog koji je u slučaju intramuskularne primjene metaloproteinaza gotovo potpuno onemogućen. I konačno, Zn^{2+} -ovisne metaloproteinaze, neovisno o hemoragičnom fenotipu, posreduju i u

kompleksnom i multifaktorskom upalnom odgovoru, s obzirom da je primijećeno da uslijed povećanja vaskularne permeabilnosti induciraju pojavu edema, što se ne pripisuje samo njihovoj sposobnosti hidrolize komponenti bazalne membrane, već i ulozi koju iskazuju u oslobađanju upalnih citokina iz zimogenih prekursora te infiltriranih leukocita i fibroblasta kao i raznih kemotaktičkih produkata generiranih aktivacijom sustava komplementa (Gutiérrez i Rucavado, 2000; Gutiérrez i sur., 2010). Kako se pretpostavlja, medijatori upalnog procesa bi mogli dodatno potencirati patogenezu otrovom induciranog lokalnog oštećenja tkiva. Pojedini predstavnici su opisani i kao aktivatori matriksilina, endogenih metaloproteinaza iz mišićnog tkiva i kože, čija bi prekomjerna ekspresija, kako se spekulira, također mogla biti zaslužna za promoviranje degradacije ekstracelularnog matiksa i, posljedično, razvoj dermo- i/ili mionekroze koji odlikuju simptomatologiju otrovanja viperidnim otrovima.

2.3.1.3.2. Sistemski patofiziološki učinci – interferiranje s hemostazom

Metaloproteinaze iz otrova, uz izražene lokalne, eksprimiraju i razne sistemske envenomacijske efekte koji ne proizlaze samo iz njihove sposobnosti destabilizacije krvožilnog endotela, već i iz djelovanja na faktore zgrušavanja krvi i interferiranja s funkcijom trombocita, najvjerojatnije kako bi narušavanjem hemostaze dodatno promovirale krvarenje i potencirale hemoragično stanje u organskim sustavima udaljenima od mjesta ugriza (Kamiguti, 2005) (Tablica 3). Aktivacijski ili inhibicijski učinci koje iskazuju na različitim razinama koagulacijske kaskade u većini slučajeva rezultiraju iscrpljenjem fibrinogena/fibrina, tzv. defibrin(ogen)acijom kao jednim od najkarakterističnijih simptoma povezanim s otrovanjem izazvanim ugrizom zmija iz porodice *Viperidae* (Gutiérrez i sur., 2010). Među hemostatskim aktivnostima usmjerenima prema faktorima zgrušavanja krvi osobito se ističe njihova sposobnost aktivacije faktora X (FX) i protrombina. Od FX aktivatora trenutačno su najpodrobnije istraženi RVV-X iz otrova vrste *Vipera russelli* te VLFXA iz otrova vrste *V. lebetina* kao pripadnici P-III_d podgrupe s dodatnom lektinskom podjedinicom zaslužnom za njihov Ca^{2+} -ovisni afinitet prema Gla domeni ciljne molekule u kojoj hidroliziraju Arg^{52} - Ile^{53} peptidnu vezu teškog lanca (Lu i sur., 2005; Sajevic i sur., 2011). Kao aktivatori protrombina metaloproteinaze iz otrova zmija pripadaju isključivo grupama A i B, ovisno o tome da li funkcioniraju bez dodatnih kofaktora ili za ekspresiju svoje aktivnosti trebaju Ca^{2+} ione (Kini, 2005). I jedne i druge kataliziraju hidrolizu peptidne veze na položaju Arg^{320} - Ile^{321} , oslobađajući meizotrombin koji se spontano autolizira u α -

trombin kao aktivni oblik (Sajević i sur., 2011). Grupu A sačinjavaju P-IIIa metaloproteinaze, poput ekarina i beritaktivaze koje karakterizira izuzetno visoki stupanj glikoziliranosti što implicira potencijalnu ulogu njihovih glikana u interakciji s protrombinom, dok one grupe B s P-III d karinaktivazom-1 kao reprezentativnim predstavnikom, slično kao i FX aktivatori, za ciljano prepoznavanje njegove Gla domene u Ca^{2+} -vezanoj konformaciji koriste podjedinicu nalik lektinu C-tipa (Fox i Serrano, 2005; Kini, 2005). U kontekstu envenomacijske patofiziologije prokoagulacijsko djelovanje metaloproteinaza zmijskih otrova posredovano njihovom opetovanom aktivacijom ključnih koagulacijskih faktora najvjerojatnije se manifestira kao drastično iscrpljenje dostupnih zaliha fibrinogena u plazmi neophodnih za učinkovito zgrušavanje krvi prilikom ozljede krvne žile (Gutiérrez i sur., 2010). S druge strane, uzevši u obzir njihovu potentnu proteolitičku aktivnost, vrlo je izgledno da defibrin(ogen)aciji doprinosi i izravni degradacijski učinak kojeg eksprimiraju na fibrinogenu i krvnim ugrušcima bogatima fibrinom. Međutim, s obzirom da je poznato da znatan broj identificiranih fibrin(ogen)aza odikuje osjetljivost na plazmatske inhibitore poput α_2 -makroglobulina, njihov potencijalni farmakološki značaj u narušavanju hemostaze još uvijek nije u potpunosti razjašnjen.

Tablica 3. Sistemski eksperimentalno opaženi patofiziološki učinci Zn^{2+} -ovisnih metaloproteinaza podrijetlom iz zmijskih otrova i njihove patofiziološke posljedice *in vivo* (preuzeto iz Gutiérrez i sur., 2010).

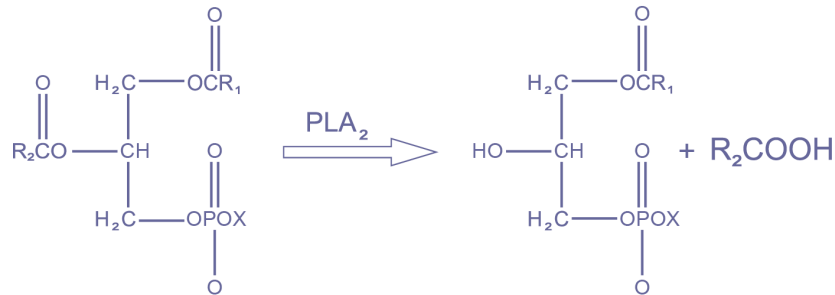
Ciljno mjesto	Eksperimentalno opaženi učinak	Patofiziološka posljedica
Mikrovaskulatura	Narušavanje integriteta kapilarnog zida	Hemoragija raznih organskih sustava, kardiovaskularni šok
Faktor X i protrombin	Aktivacija, prokoagulacijski efekt	Defibrin(ogen)acija, potenciranje hemoragičnog stanja
Trombociti	Inhibicija agregacije	Hipoagregacija, potenciranje hemoragičnog stanja
von Willebrandov faktor	Vezanje i hidroliza	Narušavanje hemostaze, potenciranje hemoragičnog stanja

Metaloproteinaze iz otrova zmija međudjeluju i s trombocitima, iskazujući inhibitory učinak na njihovu agregaciju koja se narušavanjem hemostaze odvija simultano s aktivacijom faktora zgrušavanja krvi. Naime, uslijed ozljede krvne žile, vWF kao veliki plazmatski protein dolazi u kontakt s izloženim subendotelnim kolagenom, istovremeno privlačeći trombocite koji ga reverzibilno vežu posredstvom svog glikoproteinskog receptora GPIba (Kamiguti, 2005; Sajevec i sur., 2011). Dok se kotrljaju preko ozlijeđenog mjesta trombociti čvrsto adheriraju uz kolagen tipa I i/ili III koji na njihovoj površini prepoznaje integrin $\alpha_2\beta_1$ te receptor GPVI. Interakcija trombocita i kolagena promovira njihovu aktivaciju, ekspresiju velikog broja površinskih integrina iz skupine $\alpha_{IIb}\beta_{IIIa}$ s kojima interagiraju fibrinogen i vWF kao dva liganda s RGD integrin-veznim motivom, i posljedično, ireverzibilno formiranje čvrstih agregata. *In vitro* eksperimentalni nalazi sugeriraju da, slično kao i RGD disintegrini koji zahvaljujući visokom afinitetu za integrin $\alpha_{IIb}\beta_{IIIa}$ učinkovito inhibiraju odgovore trombocita na većinu agonista, i brojne P-II i P-III metaloproteinaze posredstvom sekvenci prisutnih u njihovim nekatalitičkim domenama također ekspimiraju hipoagregacijski učinak induciran degradacijom ili fizičkim blokiranjem integrina $\alpha_2\beta_1$ te glikoproteina GPVI čime se najvjerojatnije narušava vezanje kolagena kao okidača trombocitne aktivacije. Pojedini predstavnici interferiraju i s vWF-ovisnom adhezijom trombocita za ozlijeđeni endotel, primarno zahvaljujući sposobnosti specifičnog vezanja i/ili hidrolize samog vWF-a te njegovog receptora GPIba.

2.3.2. SEKRECIJSKE FOSFOLIPAZE A₂

Fosfolipaze A₂ (fosfatid 2-acilhidrolaze, EC 3.1.1.4) su jedna 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 (Kang i sur., 2011; Lomonte i Gutiérrez, 2011) (Slika 9). Na osnovu strukturnih i funkcionalnih osobitosti se dijele u pet glavnih tipova – sekrecijske, citosolne, lizosomske, Ca²⁺-neovisne te acilhidrolaze čimbenika aktivacije trombocita (engl. *platelet-activating factor acetylhydrolase*; PAF-AH) (Burke i Dennis, 2009). Intracelularni oblici koji su univerzalno prisutni u svim živim stanicama predstavljaju visokomolekulske enzime sa serinskim ostatkom u aktivnom mjestu čije hidrolitičko djelovanje ne zahtijeva prisutnost Ca²⁺ iona (Doley i sur., 2010). S druge strane, oni sekrecijski su okarakterizirani kao znatno manji proteini molekulskih masa u rasponu od oko 13 do 18 kDa koji su stabilizirani sa šest

visoko konzerviranih disulfidnih mostova te jednim ili dva dodatna, varijabilno pozicionirana, i u čijem Ca^{2+} -ovisnom katalitičkom mehanizmu s relativno niskim stupnjem supstratne selektivnosti prema fosfolipidima s različitim polarnim glavama i masnim kiselinama, umjesto serinskog, posreduje histidinski ostatak (Schaloske i Dennis, 2006).



Slika 9. Reakcija hidrolize glicerofosfolipida posredovana PLA_2 .

Na osnovu aminokiselinskog slijeda, molekulske mase, trodimenzionalne strukture, uzorka disulfidnih mostova, katalitičkog mehanizma i mjesta tkivno specifične ekspresije PLA_2 superobitelj prema trenutno prihvaćenoj klasifikaciji obuhvaća 15 grupa (I-XV) podijeljenih u podgrupe (A, B, C...) (Schaloske i Dennis, 2006; Burke i Dennis, 2009). Većina njihovih dosad identificiranih članova je biološki aktivna. Npr. PLA_2 sisavaca imaju ključnu ulogu u brojnim fiziološkim procesima, uključujući fertilizaciju, staničnu proliferaciju, kontrakciju i hipersenzitaciju glatkih mišića, a posreduju i u staničnim funkcijama povezanima s biosintezom prostaglandina i leukotriena kao sekundarnih glasnika u prijenosu signala te održavanjem homeostaze biomembrana (Kini, 2003). S druge strane, unatoč strukturnoj i katalitičkoj podudarnosti, u kontekstu patofiziološkog značaja kao njihova suprotnost se ističu PLA_2 iz otrova zmija koje su u skladu sa svojom biološkom funkcijom probave, imobilizacije i usmrćivanja plijena evoluirale u jedne od najpotentnijih poznatih toksina uopće sposobnih za indukciju širokog spektra farmakoloških učinaka, bilo samostalno, bilo u interakciji s dodatnim molekulama. Naime, iako dijele čak od 40 do 99 % homologije u aminokiselinskom slijedu, i posljedično, visoki stupanj sličnosti u trodimenzionalnoj strukturi, PLA_2 podrijetlom iz zmijskih otrova odlikuje izuzetno visoki stupanj funkcionalne heterogenosti što mehanizam koji se nalazi u podlozi toksinološkog potencijala kojeg iskazuju, unatoč detaljnom poznavanju njihovih strukturnih i biokemijskih svojstava, patoloških efekata te bioaktivnosti, i dalje čini vrlo intrigantnim (Kini, 2003; Lomonte i Gutiérrez, 2011).

2.3.2.1. PODJELA I STRUKTURNE OSOBITOSTI PLA₂ IZ OTROVA ZMIJA

Na osnovu aminokiselinskog slijeda, trodimenzionalne strukture i uzorka disulfidnih mostova PLA₂ kao sekrecijski enzimi izolirani iz zmijskih otrova prema opće prihvaćenom klasifikacijskom sustavu pripadaju grupi I, odnosno II (Six i Dennis, 2000). S obzirom na njihovo podrijetlo, većina je objedinjena u podgrupi A, uz iznimku manjeg broja dosad identificiranih predstavnika koji su zbog raznih strukturnih odstupanja svrstani u zasebne skupine. Članovi grupe I koji su karakteristični za porodice *Elapidae* i *Colubridae* u najvećoj mjeri su homologni onima iz probavnog soka gušterače (Doley i sur., 2010). Specifičnost njihove strukture proizlazi iz jedinstvenog položaja jednog od sedam disulfidnih mostova kojeg tvore cisteinski ostaci konzervirani na položajima 11 i 77 te površinske, tzv. elapidne petlje kao poveznice između katalitičke α -uzvojnice i β -krila. S druge strane, PLA₂ II pripadnici iz otrova zmijske porodice *Viperidae* strukturno su najpodudarniji s enzimima iz humane sinovijalne tekućine s kojima dijele jedinstvenu C-terminalnu ekstenziju od 5 do 7 aminokiselinskih ostataka, a čiji cisteinski ostatak zajedno s onim smještenim u neposrednoj blizini aktivnog mjesta posreduje u formiranju specifično pozicionirane disulfidne veze kao dodatne odlike njihove strukture. Preostali glavni strukturni elementi većine PLA₂ iz grupe I, odnosno II, osobito oni koji posreduju u vezanju i pozicioniranju supstrata te katalitičkom mehanizmu, evolucijski su najvećim dijelom ostali potpuno sačuvani (Montecucco i sur., 2008). Međutim, kod pojedinih članova grupe II konzervirani aspartatni ostatak iz aktivnog mjesta je zamijenjen s lizinom, te rjeđe, serinom, glutaminom, asparaginom ili argininom kao supstitucijama koje se drastično odražavaju na vezanje Ca²⁺ iona, neophodnog katalitičkog kofaktora, i rezultiraju slabljenjem ili potpunim gubitkom hidrolitičke aktivnosti što se često koristi kao osnova za daljnju subklasifikaciju na klasične Asp49 PLA₂ i njihove enzimski inaktivne homologe (Lomonte i Gutiérrez, 2011). Međutim, unatoč katalitičkoj inertnosti, PLA₂ homolozi također eksprimiraju raznolike patofiziološke učinke, uglavnom posredstvom izmijenjene C-terminalne regije s visokim udjelom pozitivno nabijenih i hidrofobnih aminokiselinskih ostataka kao strukturnom determinantom njihove toksičnosti s izravnim destabilizirajućim učinkom na fosfolipidni dvosloj bioloških membrana, što je osobito evidentno na primjeru miotoksičnih Lys49 predstavnika (Montecucco i sur., 2008).

PLA₂ iz otrova zmijske djeluju kao jedinstveni Ca²⁺-ovisni esterolitički enzimi s obzirom da unatoč visokom stupnju hidrofilnosti hidroliziraju u vodi netopive supstrate pri čemu adsorpcijom za graničnu površinu između polarne vodene faze i nepolarnih lipida primjenjuju mehanizam tzv. međupovršinske katalize čija se efikasnost drastično povećava agregacijom

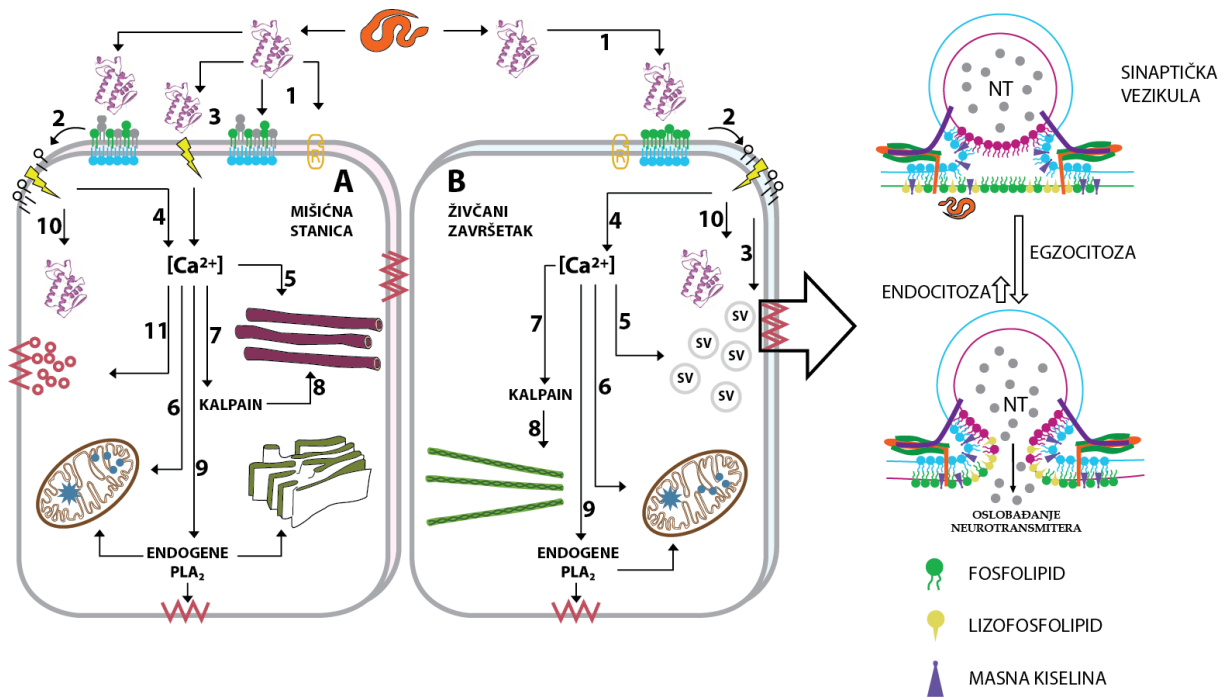
raspršenih monomernih fosfolipida u strukture višeg reda organizacije kao što su micelle, monoslojevi, dvosloji, vezikule ili membrane (Kini, 2003). Osim specifičnosti aktivnog mjesta, njihovu katalitičku učinkovitost definiraju i adsorpcijska svojstva tzv. "i" regije koja interreagira s međupovršinom vode i lipida te dovodi do neophodnih strukturnih promjena zaslužnih za aktivaciju enzima što ujedno predstavlja i koncept tzv. dvojnog prepoznavanja zahvaljujući kojem je razjašnjen paradoksalni izostanak korelacije između farmakološkog potencijala i hidrolitičke aktivnosti mjerene na modelnim supstratima *in vitro* uočen na primjeru velikog broja dosad okarakteriziranih predstavnika (Lomonte i Gutiérrez, 2011). S druge strane, u envenomacijskom kontekstu funkcionalno im se najčešće pripisuje uloga toksina varijabilnih farmakoloških učinaka od kojih su patofiziološki najrelevantniji neuro- ili miotoksičnost koje na razini neuromuskularnog sustava u većini slučajeva induciraju samostalno kao monomeri, te rjeđe, formiranjem raznih oligomernih kompleksa zaslužnih za potenciranje njihovog mehanizma djelovanja i biološke aktivnosti te, posljedično, sveukupne letalne toksičnosti otrova (Montecucco i sur., 2008; Doley i sur., 2010; Lomonte i Gutiérrez, 2011). Ovisno o interakcijama između njihovih sastavnih komponenti PLA₂ kompleksi se dijele na kovalentne i nekovalentne. Jedine poznate kovalentne strukture su tzv. β -bungarotoksini karakteristični za rod *Bungarus* koje sačinjavaju katalitički aktivni polipeptid A homologan PLA₂ grupe I i polipeptid B podudaran dendrotoksinima i inhibitorima serinskih proteinaza Kunitzovog tipa čiji je inhibicijski efekt narušen uslijed konformacijske modifikacije u C-terminalnoj regiji (Doley i Kini, 2009). Dvije podjedinice su međusobno povezane s jednom disulfidnom vezom. S funkcionalnog stajališta, kao i većina ostalih PLA₂ kompleksa, i β -bungarotoksini farmakološki djeluju kao β -neurotoksini s obzirom da vezanjem za specifične receptore u presinaptičkoj membrani ireverzibilno inhibiraju oslobađanje acetilkolina u neuromuskularnom spoju živčanih završetaka motoneurona i dovode do potpunog prekida neurotransmisije pri čemu polipeptid A neurotoksičnosti doprinosi svojom fosfolipaznom aktivnošću, a polipeptid B blokiranjem K⁺ kanala reguliranih naponom (Koh i sur., 2006; Doley i Kini, 2009). Nekovalentne komplekse koji mogu biti heterodimerni, homodimerni ili oligomerni u pravilu čine najmanje jedna funkcionalna PLA₂ i iz nje izvedena molekula sa ili bez katalitičke aktivnosti (Doley i sur., 2010). Reprezentativni i najbolje istraženi predstavnici najzastupljenije skupine heterodimera su krotoksin, vipoksin te viperotoksin F. Krotoksin predstavlja glavnu toksičnu komponentu otrova vrste *Crotalus durissus* sastavljenu od kisele, netoksične i enzimski inaktivne podjedinice s tri disulfidno umrežena polipeptidna lanca podrijetlom iz procesirane molekule nalik PLA₂, tzv. krotapotina, te bazične, intaktne PLA₂ grupe II koja je katalitički funkcionalna i unatoč tome

sama po sebi relativno slabo toksična (Sampaio i sur., 2010). Naime, iako i izdvojena biološki aktivna podjedinica može u određenoj mjeri promovirati blokiranje neuromuskularne transmisije, zahvaljujući sinergističkom djelovanju njegovih komponenti nativni krotoksin je za najmanje jedan red veličine farmakološki potentniji za što je prvenstveno zaslužan krotapotin koji kao šaperon sprečava nespecifično vezanje toksina za presinaptičku membranu i posreduje u njegovom ciljanom usmjeravanju prema relevantnim receptorima u neuromuskularnom spoju. Vipoksin izoliran iz otrova podvrste *Vipera ammodytes meridionalis*, jedini poznati α -neurotoksični kompleks zaslužan za blokiranje vezanja acetilkolina za postsinaptičku membranu neuromuskularnog spoja, predstavlja jedinstveni primjer modulacije katalitičke i toksične funkcije jedne podjedinice u kompleksu s drugom, srodnom i strukturno homolognom, koja zbog supstitucije histidinskog ostatka u aktivnom mjestu nije enzimski funkcionalna (Betzel i sur., 1999). Naime, vipoksin čine relativno nestabilna bazična PLA₂ i njen kiseli, prirodni inhibitor koji, dok su međusobno asocirani, reducira i njenu fosfolipaznu aktivnost i njenu toksičnost kako bi je stabilizirao s ciljem dugoročnog očuvanja farmakološkog potencijala. Znači, u usporedbi s ostalim oligomernim neurotoksinima gdje izdvojena toksična komponenta eksplicira znatno slabiju letalnost od samog kompleksa zahvaljujući dodatnom proteinskom faktoru koji potencira njen patofiziološki učinak, PLA₂ podjedinica vipoksina postaje biološki aktivna tek kad disocira od svog inhibitora. Viperotoksin F, glavna komponenta otrova vrste *V. russelli formosensis*, također sadrži bazičnu PLA₂ presinaptičkog djelovanja (RV-4) u kompleksu s kiselom, netoksičnom i izuzetno slabo enzimski aktivnom podjedinicom (RV-7) koja za razliku od one identificirane u vipoksinu potencira njen letalni učinak, ujedno reducirajući onaj katalitički (Kang i sur., 2011). Jedini zasad identificirani homodimerni PLA₂ kompleks je trimukrotoksin kao komponenta otrova vrste *Trimeresurus mucrosquamatus* s dvije identične podjedinice homologne PLA₂ grupe II koje su strukturno, imunološki i farmakološki izuzetno slične bazičnoj podjedinici krotoksina, dok se u one najkompleksnije ubrajaju heterotrimerni taipoksin te heteropentamerni tekstilotoksin karakteristični za vrstu *Oxyuranus s. scutellatus*, odnosno *Pseudonaja textilis* te jedni od najpotentnijih toksina animalnog podrijetla uopće (Doley i sur., 2010). Naime, već duže vremena je poznato da porast strukturne kompleksnosti pojedinih komponenti zmijskih otrova značajno doprinosi stupnju letalnosti koju iskazuju, najvjerojatnije posredstvom konformacijskih promjena induciranih formiranjem kompleksa koje dovode do funkcionalnih modifikacija aktivnog mjesta ili izlaganja novih biološki aktivnih regija nedostupnih u zasebnim podjedinicama (Doley i Kini, 2009). Alternativno objašnjenje pretpostavlja da oligomerizacija kao jedan od oblika adaptivne evolucije

osigurava povećanje adsorpcijske površine, omogućujući brže i efikasnije afinitetne interakcije multimerne strukture s njenim pripadajućim ciljnim receptorom ili ionskim kanalom (Pungerčar i Križaj, 2007; Montecucco i Rosetto, 2008).

2.3.2.2. FARMAKOLOŠKA SPECIFIČNOST I PATOFIZIOLOŠKI UČINCI

Svaka toksična PLA₂ zmijskog otrova je usko specijalizirana za ekspresiju ograničenog broja specifičnih farmakoloških učinaka usmjerenih samo prema određenim tipovima tkiva koji su osjetljivi na njihovo toksično djelovanje (Kini, 2003). Naime, prema modelu kojeg su krajem 80-ih godina predložili Kini i Evans (1989), PLA₂ podrijetlom iz otrova, uz aktivno mjesto, posjeduju i zasebnu farmakološku regiju s visokim afinitetom za odgovarajuća receptorska mjesta izložena na površini ciljnih stanica koja su joj komplementarna u smislu naboja, hidrofobnosti i van der Waalsovih dodirnih površina. Kako se pretpostavlja, njihovu farmakološku specifičnost prvenstveno određuju visoko afinitetne protein-protein interakcije koje ostvaruju s fiziološki relevantnim (gliko)proteinskim akceptorima, pri čemu ni mogući doprinos susjednih fosfolipidnih domena nije sasvim isključen. Također, bitno je naglasiti da pojedine PLA₂ mogu ekspimirati isti farmakološki učinak različitim mehanizmima djelovanja, bilo ovisnim, bilo neovisnim o enzimskoj aktivnosti koju iskazuju (Kini, 2003). Naime, njihovi specifični patofiziološki efekti su najčešće inducirani oslobođenim masnim kiselinama i lizofosfolipidima kao prekursorima u biosintezi medijatora širokog spektra bioloških aktivnosti ili, alternativno, oštećenjem membrane prouzrokovanim hidrolizom intaktnih fosfolipida kao građevnih jedinica s izraženim utjecajem na njenu fluidnost, pakiranje, kvalitetu ili propusnost za različite ione i molekule. S druge strane, i samo kompetitivno agonističko, odnosno antagonističko vezanje PLA₂ za ciljne proteine, receptore ili ionske kanale može biti dovoljno za narušavanje njihovih interakcija s fiziološkim ligandima, vodeći indukciji, odnosno blokiranju sinteze i oslobađanja sekundarnih glasnika, npr. Ca²⁺ iona i cAMP-a, te inhibiciji unutarstaničnog ili međustaničnog prijenosa signala. Također, s obzirom da su fosfolipidi plazma membrane izuzetno gusto pakirani, hidrolitički, i posljedično, farmakološki potencijal PLA₂ iz zmijskih otrova u znatnoj mjeri ovisi i o stupnju njihove penetrabilnosti kao svojstvu za koje su u najvećoj mjeri zaslužni površinski pozitivno nabijeni aminokiselinski ostaci što je osobito evidentno ako se uzme u obzir da su bazični predstavnici općenito gledajući znatno potentniji u izazivanju farmakoloških učinaka od onih kiselih ili neutralnih. Međutim, odlike bazičnosti i penetrabilnosti, iako poželjne, same po sebi nisu dovoljne za ekspresiju toksičnog fenotipa.



Slika 10. Shematski prikaz mehanizma djelovanja miotoksičnih i neurotoksičnih PLA₂ iz otrova zmiya na skeletne mišićne stanice, odnosno motoričke živčane završetke. (A) Miotoksin se veže za visoko-afinitetni specifični proteinski receptor (R) ili nisko-afinitetnu lipidnu domenu (1), hidrolizira fosfolipide plazma membrane (2) ili, ako pripada katalitički inaktivnim PLA₂ homolozima, izravno narušava njen integritet (3) što rezultira membranskom depolarizacijom i porastom permeabilnosti te prodorom Ca²⁺ iona u citosol (4), hiperkontrakcijom miofilamenata (5), propadanjem mitohondrija (6), aktivacijom kalpaina (7) s proteolitičkim utjecajem na komponente mioskeleta (8) te endogenih PLA₂ zaslužnih za daljnu hidrolizu raznih membranskih sustava (9). Kroz membranska oštećenja u unutrašnjost miocita dopijevaju i dodatne toksične molekule (10), dok istovremeno započinje regenerativni proces posredstvom vezikula koje fuzioniraju s mehanički oštećenim membranskim segmentima (11). (B) Neurotoksin se veže za visoko-afinitetni specifični proteinski receptor (R) ili nisko-afinitetnu lipidnu domenu (1), hidrolizira fosfolipide plazma membrane (2) čiji produkti lokalno mijenjaju sastav i konfiguraciju lipidnog dvosloja (3) što promovira egzocitozu (5) i prodor Ca²⁺ iona u citosol (4) odgovornih za hiperkontrakciju neurofilamenata (5), narušavanje funkcije mitohondrija (6), aktivaciju kalpaina (7) s proteolitičkim utjecajem na komponente citoskeleta (8) te endogenih PLA₂ koje provode daljnu hidrolizu raznih membranskih sustava (9). Kroz membranska oštećenja u unutrašnjost živčanog završetka dopijevaju i dodatne toksične molekule (10). NT = neurotransmitter; SV = sinaptička vezikula (preuzeto iz Montecucco i sur., 2008).

PLA₂ pročišćene iz otrova zmijsa su najbolje okarakterizirane kao presinaptički, te rjeđe, postsinaptički neurotoksini s djelovanjem na razini kolinergičnih živčanih završetaka perifernih motoneurona, odnosno membrana mišićnih vlakana neuromuskularnog spoja čija se potentna toksičnost pripisuje sinergizmu njihove neurospecifičnosti s jedne te enzimske aktivnosti zaslužne za modifikaciju brojnih staničnih konstituenata s druge strane (Montecucco i sur., 2009). Iako zasad ni jedna ekstracelularna akceptorska molekula u presinaptičkoj membrani nije nedvojbeno potvrđena kao relevantna za neurotoksični efekt koji iskazuju, uz iznimku one za β -bungarotoksin čija katalitički inaktivna podjedinica strukturno podudarna dendrotoksinima prepoznaje K⁺ kanale regulirane naponom, kao potencijalni kandidati su predloženi neuronski receptori N-, odnosno M-tipa identificirani upotrebom toksina 2 iz otrova vrste *Oxyuranus s. scutellatus* (OS₂) kao liganda, neuronski pentraksin (NP1) s afinitetom prema taipoksinu te razni proteoglikani, uključujući glipikan I i polisijalogangliozide (Pungerčar i Križaj, 2007). Prema jednom od molekularnih modela kojima se pokušava razjasniti mehanizam njihove presinaptičke aktivnosti, do specifične asocijacije neurotoksičnih PLA₂ najvjerojatnije dolazi u zonama aktivne neuroegzocitoze gdje se posredstvom fosfolipidne hidrolize koju provode oslobađaju masne kiseline i lizofosfolipidi (Rigoni i sur., 2005; Montecucco i sur., 2009) (Slika 10). Zahvaljujući svojim biofizičkim svojstvima akumulirani hidrolitički produkti najvjerojatnije potiču lokalnu promjenu sastava i konfiguracije lipidnog dvosloja čime se promovira nastanak pozitivnih invaginacija presinaptičke membrane "Ω" oblika zaslužnih za nekontrolirano fuzioniranje sinaptičkih vezikula, dok ujedno induciraju i defekte u aksolemi. Uslijed porasta njene permeabilnosti Ca²⁺ ioni ulaze u citosol, djelujući kao signal za neuroegzocitozu. Međutim, kako formirana membranska zakrivljenja inhibiraju i fiziju kao obrnuti proces ključan za endocitozu i recikliranje sinaptičkih vezikula, u konačnici dolazi do njihovog potpunog iscrpljenja i perzistentne blokade provođenja živčanih impulsa posredstvom acetilkolina. Također, drastični porast koncentracije Ca²⁺ iona u citosolu pokreće i cijeli niz drugih patoloških događaja, uključujući disfunkcionalnost mitohondrija uslijed njihove akumulacije vođene gradijentom elektrokemijskog potencijala te aktivaciju unutarstaničnih Ca²⁺-ovisnih proteinaza, tzv. kalpaina, i endogenih PLA₂ odgovornih za razgradnju neurofilamenata kao ključnih komponenti citoskeleta, odnosno promoviranje daljnje hidrolize staničnih membranskih sustava (Montecucco i sur., 2008). Rastući broj eksperimentalnih dokaza potvrđuje da presinaptičke PLA₂ djeluju i unutar paraliziranog živčanog završetka gdje se s visokim afinitetom vežu za razne citoplazmatske i mitohondrijske proteine, poput kalmodulina i 14-3-3 proteina te R25 receptora, doprinoseći njegovoj degeneraciji i

odumiranju (Pungerčar i Križaj, 2007). Međutim, s obzirom na njihovu nedostupnost, intracelularni receptori vjerojatno nisu ključni za ostvarivanje početne interakcije s ciljnom stanicom iako se spekulira o njihovom mogućem doprinosu indukciji celularnog patološkog stanja jednom kad neurotoksična PLA₂ internalizacijom dospije u unutrašnjost. Međutim, pitanje mehanizma odgovornog za njenu translokaciju kroz lipidni dvosloj još nije razriješeno.

Nadalje, s PLA₂ iz zmijskih otrova se povezuje i sposobnost indukcije lokalne ili sistemske nekroze skeletnih mišića (Montecucco i sur., 2008; Lomonte i Gutiérrez, 2011). Katalitički aktivni PLA₂ miotoksini u nekrozi posreduju hidrolizom fosfolipida koja promovira membransku nestabilnost bilo izravno, bilo oslobađanjem masnih kiselina i lizofosfolipida s destabilizirajućim učinkom na integritet plazmatske mebrane, dok u perturbacijskom mehanizmu njihovih enzimski nefunkcionalnih homologa, kao što je npr. Lys49 varijanta, ključnu ulogu ima C-terminalna regija bogata kationskim i hidrofobnim ostacima čije umetanje među fosfolipidne konstituente rezultira disorganizacijom strukture dvosloja, i posljedično, oštećenjem i lizom miocita (Slika 10). Međutim, njihovi relevantni membranski receptori zasad nisu identificirani. Neovisno o strategiji koju primjenjuju, konačni miotoksični učinak u osnovi se manifestira u obliku brzih, drastičnih i ireverzibilnih biofizičkih promjena sarkoleme zaslužnih za narušavanje njenog integriteta, depolarizaciju, i konačno, porast permeabilnosti praćen gubitkom citoplazmatskih markera, npr. mioglobina, kreatin kinaze i laktat dehidrogenaze, te slično kao i kod onog neurotoksičnog, prodorom Ca²⁺ iona kao okidačem serije degenerativnih događaja – hiperkontrakcije miofilamenata zaslužne za daljnje mehaničko oštećenje sarkoleme, morfološkog i funkcionalnog propadanja mitohondrija te, posljedično, redukcije produkcije ATP-a kao i aktivacije intracelularnih Ca²⁺-ovisnih proteinaza i PLA₂, a koji vode staničnoj smrti i nekrozi.

2.3. Zn²⁺-OVISNE METALOPROTEINAZE I SEKRECIJSKE FOSFOLIPAZE GRUPE IIA IZ OTROVA PODVRSTE *VIPERA A. AMMODYTES*

Iz otrova podvrste *V. a. ammodytes* u posljednjih nekoliko godina je pročišćeno, okarakterizirano i opisano nekoliko Zn²⁺-ovisnih metaloproteinaza s mogućim doprinosom envenomacijskoj patologiji (Sajevec i sur., 2011). Njihova svojstva su sažeta u Tablici 4. Iako sve identificirane iskazuju proteolitičku aktivnost na biološki relevantnim supstratima, samo dvije od njih, VaH1 i VaH2, izravno induciraju potentne hemoragične efekte (Leonardi i sur., 2001). S druge strane, amoditazi se pripisuje izražena fibrin(ogen)ičnost, a predstavnicima

označenima kao VAFXA-I, odnosno VAFXA-II, sposobnost aktivacije koagulacijskog faktora X (Leonardi i sur., 2007, 2008).

Tablica 4. Svojstva Zn^{2+} -ovisnih metaloproteinaza (MP) iz otrova podvrste *V. a. ammodytes*.

MP	Grupa	Biokemijska svojstva	Aktivnost	Farmakološki učinci
VaH1	P-IIIa	M = 70 kDa; pI \approx 5,5; specifičnost za Leu na P1' položaju; glikoprotein	Hidroliza azokazeina i $A\alpha$ -lanca fibrinogena	Hemoragičnost
VaH2	P-IIIa	M = 70 kDa; pI \approx 5,5; glikoprotein	Hidroliza azokazeina	Hemoragičnost
Amoditaza	P-IIIa	M = 70 kDa; pI = 6,6; specifičnost za Leu, Phe i His na P1' položaju; glikoprotein	Razgradnja $A\alpha$ - i $B\beta$ lanca fibrinogena te fibrina; slaba hidroliza kolagena tipa IV i fibronektina	Fibrin(ogen)oliza
VAFXA-I	P-III d	M = 58 kDa; glikoprotein s teškim i dva laka lanca nalik lektinima C-tipa	Hidroliza Arg^{52} - Ile^{53} veze u FX; slaba hidroliza $A\alpha$ -lanca fibrinogena, protrombina, kolagena tipa IV, fibronektina i nidogena	Aktivacija faktora X; inhibicija agregacije trombocita inducirana kolagenom
VAFXA-II	P-III d	M = 70 kDa glikoprotein s teškim i dva laka lanca nalik lektinima C-tipa	Hidroliza Arg^{52} - Ile^{53} veze u FX; slaba hidroliza $A\alpha$ -lanca fibrinogena, protrombina i fibronektina	Aktivacija faktora X; inhibicija agregacije trombocita inducirana kolagenom

Također, otrov poskoka sadrži i nekoliko tipova funkcionalno različitih PLA₂ koje su strukturno podudarne s ostalim pripadnicima grupe IIA među kojima se osobito ističu visoko bazični amoditoksini A, B i C (Atx-i A, B i C) (Križaj, 2011). Njihov patofiziološki učinak primarno dolazi do izražaja na razini neuromuskularnog spoja perifernog živčanog sustava gdje blokiraju oslobađanje acetilkolina pri čemu iskazuju drastično različitu letalnost za što je najvjerojatnije zaslužna nekolicina aminokiselinskih supstitucija akumuliranih u njihovoj C-terminalnoj regiji. Naime, amoditoksini predstavljaju izoforme koje se u aminokiselinskom slijedu međusobno razlikuju samo na pet položaja od sveukupno 122 zbog čega se Atx B može smatrati trostrukim (Y115H/R118M/N119Y), a Atx C dvostrukim prirodnim mutantom Atx-a A (F124I/K128E). Međutim, u usporedbi s Atx-om A kao daleko najpotentnijom izoformom (*i.v.* LD₅₀ = 0,021 mg kg⁻¹), Atx-i B i C su po toksičnom efektu slabiji čak 28, odnosno 17 puta (Ritonja i Gubenšek, 1985; Ritonja i sur., 1986; Križaj i sur., 1989). Također, C-terminalna regija amoditoksina se smatra neophodnom, ali ne i jedinom determinatom toksičnosti koju iskazuju s obzirom da je njihovo "neurotoksično mjesto" najvjerojatnije raspršeno po cijeloj molekularnoj površini što sugerira da u različitim fazama patofiziološkog procesa posreduju udaljeni segmenti toksina koji reagiraju s odgovarajućim farmakološki važnim receptorima (Križaj, 2011). Naime, mutagenetskim studijama je ustanovljeno da je neurotoksičnost amoditoksina najvjerojatnije definirana kombinacijom hidrofobnih i bazičnih aminokiselinskih ostataka grupiranih između položaja 115 i 124, zatim Met⁷, Gly¹¹ i Phe²⁴ na N-terminalnom kraju proteina kao i katalitički važne regije koja prepoznaje međupovršinu vode i lipida ciljnog supstrata. Prekid komunikacije u neuromuskularnom spoju induciran amoditoksinima se odvija u tri glavne faze. Prvu odlikuje vezanje za specifične akceptore u presinaptičkoj membrani, najvjerojatnije neuronske receptore N-, odnosno M-tipa ili još slabo istražena neproteinska specifična vezna mjesta, a drugu koja je praćena drastičnim porastom oslobođenog acetilkolina, kako se pretpostavlja, interferiranje s funkcijom K⁺ kanala reguliranih naponom. I konačno, treća faza koja vodi kompletnoj i ireverzibilnoj paralizi, za razliku od prethodnih dviju, nedvojbeno ovisi i o hidrolizi raznih membranskih sustava. Kao što je eksperimentalno demonstrirano, amoditoksini ne djeluju samo s ekstracelularne strane presinaptičke membrane, već se internaliziraju i u unutrašnjost živčanog završetka u kojem s visokim afinitetom reagiraju s kalmodulinom, 14-3-3 proteinima te R25 receptorom, zadržavajući biološku aktivnost unatoč reducirajućem okolišu citosola. Nadalje, osim presinaptičke neurotoksičnosti kao envenomacijski najrelevantnijeg efekta, sve tri izoforme amoditoksina iskazuju i izražen antikoagulacijski učinak mehanizmom neovisnim o enzimskoj aktivnosti i egzogenim

fosfolipidima kojim učinkovito inhibiraju formiranje protrombinaznog kompleksa neophodnog za stvaranje fibrinskog ugruška prilikom ozljede krvne žile, prvenstveno zahvaljujući sposobnosti izravnog vezanja aktiviranog faktora X posredstvom C-terminalne regije i β -krila kao dvaju kritičnih farmakoloških regija (Priatelj i sur., 2006; Sajevic i sur., 2011).

I konačno, osim neurotoksičnih PLA₂ iz otrova podvrste *V. a. ammodytes* je izoliran i njihov miotoksični, katalitički nefunkcionalni Ser49 homolog nazvan amoditin L s kojim dijele značajan stupanj identiteta od oko 74 %, kao i dvije farmakološki nedjelotvorne izoforme neutralnih amoditina, I₁ i I₂, koje odlikuje naglašena fosfolipazna aktivnost (Križaj i sur., 1991, 1992).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. KEMIKALIJE

U istraživanju smo koristili sljedeće kemikalije:

albumin iz goveđeg seruma (BSA) (Sigma-Aldrich, SAD), 4-(2-aminoetil)benzensulfonil fluorid hidroklorid (Pefabloc) (Sigma-Aldrich, SAD), anti-kunićji IgG konjugiran s peroksidazom iz hrena (anti-kunićji IgG-HRP) (Bio-Rad Laboratories, SAD), azokazein (Sigma-Aldrich, SAD),

BD Matrigel Matrix Growth Factor Reduced (BD Biosciences, SAD), B-lanac inzulina (Sigma-Aldrich, SAD),

cinkov klorid (Kemika, Hrvatska), **Coomassie Brilliant Blue R250** (Sigma-Aldrich, SAD), **dinatrijeva sol etilendiamintetraoctene kiseline** (Na_2EDTA) (Sigma-Aldrich, SAD), **dinatrijev hidrogenfosfat** (Kemika, Hrvatska), **ditiotreitol (DTT)** (Sigma-Aldrich, SAD),

endopeptidaza Lys-C (Roche Diagnostics, Njemačka),

faktor X (Haemotologic Technologies, SAD), **fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF)** (Sigma-Aldrich, SAD), **fibrinogen** (AB KABI, Švedska), **fibronektin** (Sigma-Aldrich, SAD),

glicerol (Kemika, Hrvatska), **glicin** (Sigma-Aldrich, SAD),

jodoacetamid (Sigma-Aldrich, SAD),

kalcijev klorid (Kemika, Hrvatska), **kalijev dihidrogenfosfat** (Kemika, Hrvatska), **kalijev klorid** (Kemika, Hrvatska), **kloridna kiselina** (Kemika, Hrvatska), **3-[(3-kolamidopropil)dimetilamonij]-1-propansulfonat (CHAPS)** (Sigma-Aldrich, SAD),

laminin (Sigma-Aldrich, SAD), **L-cistein hidroklorid monohidrat** (Merck, Njemačka), **L-glutaminska kiselina** (Sigma, SAD), **limunska kiselina monohidrat** (Kemika, Hrvatska),

magnezijev klorid (Kemika, Hrvatska), **β -merkaptotanol** (Sigma-Aldrich, SAD), **metanol** (J. T. Baker, SAD), **Montanide ISA 206 i ISA 720** (Seppic, Francuska),

natrijev dihidrogenfosfat monohidrat (Kemika, Hrvatska), **natrijev dodecilsulfat (SDS)** (Sigma-Aldrich, SAD), **natrijev hidrogenkarbonat** (Kemika, Hrvatska), **natrijev hidroksid** (Kemika, Hrvatska), **natrijev karbonat** (Kemika, Hrvatska), **natrijev klorid** (Kemika, Hrvatska), **natrijev sulfat** (Kemika, Hrvatska), **N-glikozidaza F (PNGaza F)** (Sigma-Aldrich, SAD),

o-fenilendiamin dihidroklorid (OPD) (Sigma-Aldrich, SAD),

peptidoglikanski monomer (PGM) (Pliva, Hrvatska), 2-propanol (Merck, Njemačka),
protrombin (Haemotologic Technologies, SAD),
srebrov nitrat (Kemika, Hrvatska), sumporna kiselina (Kemika, Hrvatska),
tri-klor octena kiselina (TCA) (Kemika, Hrvatska), timerosal (Sigma-Aldrich, SAD),
Tris(hidroksimetil)aminometan (Tris) (Sigma-Aldrich, SAD), Tween 20 (Sigma-Aldrich,
SAD),
urea (Sigma-Aldrich, SAD),
vodikov peroksid (Kemika, Hrvatska)

3.1.2. PUFERI

Pufere smo pripremili u vodi za injekcije koju smo za HPLC analize dodatno pročistili na sustavu Simplicity 185 (Millipore, SAD). Također, sve pufere za kromatografiju smo profiltrirali kroz 0,45 µm filter (Millipore, SAD).

puferi za HPLC analizu na CM CIM diskovima

puffer za vezanje

$$m(\text{Tris}) = 6,05 \text{ g}$$

$$m(\text{CaCl}_2) = 0,22 \text{ g} / 1 \text{ L}$$

$$\text{pH} = 9,0$$

puffer za eluiranje

$$m(\text{Tris}) = 6,05 \text{ g}$$

$$m(\text{CaCl}_2) = 0,22 \text{ g}$$

$$m(\text{NaCl}) = 58,44 \text{ g} / 1\text{L}$$

$$\text{pH} = 9,0$$

puffer za HPLC analizu na TSK-GEL koloni

$$m(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 6,14 \text{ g}$$

$$m(\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}) = 8,84 \text{ g}$$

$$m(\text{Na}_2\text{SO}_4) = 14,2 \text{ g} / 1 \text{ L}$$

$$\text{pH} = 6,7$$

puferi za ELISA-u

karbonatni puffer

$$m(\text{NaHCO}_3) = 0,29 \text{ g}$$

$$m(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 0,16 \text{ g} / 100 \text{ mL}$$

$$\text{pH} = 9,6$$

20 × PBST

$$m(\text{NaCl}) = 160 \text{ g}$$

$$m(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 22 \text{ g}$$

$$m(\text{KCl}) = 4 \text{ g}$$

$$m(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 4 \text{ g}$$

$$m(\text{timerosal}) = 2 \text{ g}$$

$$V(\text{Tween 20}) = 10 \text{ mL} / 1 \text{ L}$$

$$\text{pH} = 7,4$$

pufer za blokiranje/inkubacijski pufer

$$0,5 \% (w / V) \text{ BSA u PBST-u}$$

citrat-fosfatni pufer

$$m(\text{limunska kiselina} \times \text{H}_2\text{O}) = 1,03 \text{ g}$$

$$m(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 141,96 \text{ g} / 100 \text{ mL}$$

$$\text{pH} = 5,0$$

puferi za testove proteolitičke aktivnosti

pufer za test azokazeinolitičke aktivnosti otrova poskoka

$$m(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 11,92 \text{ g}$$

$$m(\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}) = 2,2 \text{ g} / 1 \text{ L}$$

$$\text{pH} = 7,5$$

pufer za test azokazeinolitičke aktivnosti Zn^{2+} -ovisne metaloproteinaze

$$m(\text{Tris}) = 6,05 \text{ g} / 1 \text{ L}$$

$$\text{pH} = 8,5$$

pufer za testove proteolitičke aktivnosti Zn^{2+} -ovisne metaloproteinaze na biološki relevantnim supstratima

$$m(\text{Tris}) = 6,05 \text{ g}$$

$$m(\text{CaCl}_2) = 0,22 \text{ g} / 1 \text{ L}$$

$$\text{pH} = 8,4$$

pufer za test proteolitičke aktivnosti Zn^{2+} -ovisne metaloproteinaze na Matrigelu

$$m(\text{Tris}) = 3,03 \text{ g}$$

$$m(\text{NaCl}) = 8,77 \text{ g}$$

$$m(\text{CaCl}_2) = 0,55 \text{ g} / 1 \text{ L}$$

$$\text{pH} = 7,4$$

3.1.3. KROMATOGRAFSKE KOLONE

U istraživanju smo koristili sljedeće kromatografske nosače:

karboksimetil (engl. *carboxymethyl*; CM) CIM (engl. *Convective Interaction Media*) (BIA Separations, Slovenija)

TSK-GEL G3000SW_{XL}, 300 × 7,8 mm (Tosoh Bioscience, Japan)

ChromSpher 5 C8, 100 × 3 mm (Chrompack, Nizozemska)

3.1.4. OPREMA

Od opreme smo koristili sljedeće sustave:

kromatografski sustav

In-Line Degasser AF (Waters, SAD)

600 Pump (Waters, SAD)

600 System Controller (Waters, SAD)

2996 Photodiode Array Detection System (Waters, SAD)

Empower Software (Waters, SAD)

MS sustav

Axima TOF² i CFR⁺ (Shimadzu Biotech – Kratos Analytical, UK)

centrifuge

5810 R (Eppendorf, Njemačka)

vakuum koncentrator – Vacufuge plus (Eppendorf, Njemačka)

uređaj za vizualizaciju western blot signala

Image Station 440 CF (Eastman Kodak, SAD)

inkubator

Memmert (Njemačka)

spektrofotometar

Multiskan Spectrum (Thermo Scientific, Finska)

perač mikrotitracijskih pločica

Washer 430 (Organon Teknika, Nizozemska)

sustav za elektroforezu, izoelektrično fokusiranje i western blot analizu

Electrophoresis Power Supply EV233 (Consort, Belgija)

XCell SureLock Mini-Cell (Invitrogen, SAD)

ZOOM IPGRunner System (Invitrogen, SAD)

XCell II Blot Module Kit (Invitrogen, SAD)

3.1.5. ŽIVOTINJE ZA *IN VIVO* TESTOVE

Testiranja na životinjama su obavljena u skladu s Hrvatskim zakonom o dobrobiti životinja (2006). Za testove hemoragične aktivnosti, neutralizacije letalne toksičnosti te neutralizacije hemoragičnosti koristili smo srodene miševe NIH/Ola Hsd soja, mase od 18 do 20 g, te srodene štakore Lewis soja, mase oko 250 g, uzgojene u Imunološkom zavodu d.d. Za imunizacijske eksperimente koristili smo kuniće križance sojeva New Zealand White i California, mase od oko 2,5 do 3 kg, nabavljene od lokalnog uzgajivača.

3.1.6. OTROV I NJEGOVE KOMPONENTE

Otrov podvrste *V. a. ammodytes* (*Vaa* otrov) je prikupljen mužnjom zmija serpentarija Imunološkog zavoda d.d., osušen u eksikatoru na sobnoj temperaturi i pohranjen u tami na 4 °C do upotrebe. Amoditoksini i hemoragini su za potrebe istraživanja pripremljeni u Institutu Jožef Stefan, Ljubljana. Ukratko, nativni amoditoksini A (Atx A) i C (Atx C) su pročišćeni prema postupku opisanom u radu Gubenšeka i suradnika (1980). Rekombinantni Atx A, po strukturi identičan nativnom, proizveden je metodom koju su razvili Liang i suradnici (1993). Ukupna hemoraginska frakcija (H) koja sadrži Zn²⁺-ovisne metaloproteinaze hemoragičnog djelovanja molekulskih masa u rasponu od 50-100 kDa izolirana je prema otprije razvijenom protokolu (Leonardi i sur., 2001).

3.2. METODE

3.2.1. KARAKTERIZACIJA SERUMA SPECIFIČNIH ZA GLAVNE TOKSIČNE KOMPONENTE OTROVA PODVRSTE *VIPERA A. AMMODYTES*

3.2.1.1. PRIPRAVA SERUMA SPECIFIČNIH ZA PROČIŠĆENE KOMPONENTE – AMODITOKSINE I HEMORAGINE

Za pripravu seruma specifičnih za pojedinačne komponente *Vaa* otrova proveli smo dva vremenski odvojena, ali gotovo identična imunizacijska postupka. U oba eksperimenta anti-amoditoksin (anti-Atx) serume smo proizveli imunizacijom kunića s rekombinantnim Atx-om A, a anti-hemoragin (anti-H) serume imunizacijom kunića s ukupnom hemoraginskom frakcijom izoliranom iz otrova poskoka.¹ U prvom eksperimentu serume specifične i za Atx-e i za hemoragine (anti-Atx+H) smo pripravili imunizacijom kunića s

¹ Za rad s pokusnim životinjama je zaslužna dr. sc. Maja Lang Balijska.

ukupnom hemoraginskom frakcijom u kombinaciji s nativnim Atx-om C, a u drugom imunizacijom kunića s ukupnom hemoraginskom frakcijom u kombinaciji s rekombinantnim Atx-om A. Naime, Atx-i A i C su antigeni koje karakterizira iznimno visoki stupanj imunološke križne reaktivnosti s obzirom da se razlikuju samo u dva aminokiselinska ostatka (Halassy i sur., 2008). Svaka pokusna skupina se sastojala od pet životinja. Imunizacijski protokol je uključivao tri potkožne imunizacije s odgovarajućim antigenom (ili antigenima) formuliranim u ISA 206^{PGM} adjuvantu (Halassy i sur., 2007). Razmak među imunizacijama je iznosio 28 dana. Atx-e smo aplicirali u dozi od 100 µg po imunizaciji, a hemoragine u dozi od 50 µg po imunizaciji, u oba slučaju u volumenu od 500 µL raspodijeljenom na dva mjesta. Krvarenje pokusnih životinja iz marginalne ušne vene proveli smo 14 dana nakon prvog, tzv. 1. pokusnog vađenja, odnosno 14 dana nakon drugog, zadnjeg docjepljivanja, tzv. 2. pokusnog vađenja. Sakupljenu krv smo ostavili da odstoji na 37 °C 30 min, a zatim na 4 °C preko noći da bi nastali ugrušak istisnuo što veću količinu seruma kojeg smo odijelili centrifugiranjem na $2700 \times g$ 10 min. S ciljem što dugoročnijeg očuvanja stabilnosti pripremljenih antitijela dobivene supernatante smo dekomplementirali zagrijavanjem na 56 °C 30 min čime smo inaktivirali serumske proteinaze, alikvotirali i pohranili na -20 °C do analize.

3.2.1.2. ODREĐIVANJE KOLIČINE ANTITIJELA SPECIFIČNIH ZA AMODITOKSINE I HEMORAGINE U SERUMIMA IMUNIZIRANIH KUNIĆA

Antitijela IgG klase u serumima imuniziranih kunića detektirali smo enzimskim imunotestom na čvrstoj fazi (engl. *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*; ELISA) izvedenim u mikrotitracijskoj pločici s 96 bazenčića (Costar, SAD). Nakon oblaganja s otopinom odgovarajućeg antigena – čistog Atx-a A, ukupne hemoraginske frakcije (H) ili *Vaa* otrova ($c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$) u 0,05 mol dm⁻³ karbonatnom puferu (pH = 9,6) (100 µL / bazenčić) i inkubacije na sobnoj temperaturi preko noći, pločicu smo isprali 3 puta PBST-om na peraču mikrotitracijskih pločica te blokirali inkubacijskim puferom (200 µL / bazenčić) na 37 °C najmanje 2 h. U idućem koraku u prethodno ispranu pločicu dodali smo pet binarnih serijskih razrjeđenja svakog seruma nanešenih u duplikatu. Kao pozitivna kontrola poslužio nam je serum s antitijelima specifičnima za sve komponente pripremljen imunizacijom kunića s *Vaa* otrovom (anti-*Vaa* otrov serum). Osim uzoraka, u svaku pločicu smo nanijeli i binarna serijska razrjeđenja odgovarajućeg standarda – otprije pripremljenog seruma s visokim titrom antitijela specifičnih za Atx-e (anti-Atx standard), hemoragine (anti-H standard), odnosno

cijeli otrov (anti-*Vaa* otrov standard) od kojih smo svakom dogovorno i proizvoljno dodijelili vrijednost od 10 000 jedinica / mL (PJ mL⁻¹). Inkubacija se odvijala na sobnoj temperaturi preko noći. Suvišak primarnih antitijela smo uklonili ispiranjem te nanijeli anti-kunićji IgG konjugiran s peroksidazom iz hrena (engl. *horse-radish peroxidase*; HRP) (100 µL / bazenčić) pripremljen u razrjeđenju od 1:10 000 za detekciju anti-Atx i anti-*Vaa* otrov antitijela, odnosno u razrjeđenju od 1:20 000 za detekciju anti-H antitijela. Inkubacija se odvijala na 37 °C 2 h. Nakon ispiranja uslijedio je korak polusatne inkubacije s *o*-fenilendiamin dihidrokloridom (OPD-om) ($c = 0,6 \text{ mg mL}^{-1}$) u citrat-fosfatnom puferu (pH = 5,0) s H₂O₂ (0,5 µL 30 %-tne (V / V) otopine / mL otopine OPD-a) (100 µL / bazenčić) na sobnoj temperaturi u tami. Bezbojni OPD (donor vodika) je supstrat peroksidazi iz hrena koja ga u prisutnosti H₂O₂ oksidira pri čemu nastaje žuto do narančasto obojeni reakcijski produkt koji se može detektirati spektrofotometrijski. Reakciju smo zaustavili dodatkom 12,5 %-tne (V / V) H₂SO₄ (50 µL / bazenčić) i apsorbanciju nastalog produkta izmjerili na 492 nm ($A_{492 \text{ nm}}$).

Anti-Atx, anti-H i anti-*Vaa* otrov IgG-e u analiziranim serumima kvantitativno smo odredili testom paralelnih pravaca pomoću kompjutorskog programa pri čemu se na temelju udaljenosti među pravcima konstruiranima iz linearne ovisnosti vrijednosti $A_{492 \text{ nm}}$ o razrjeđenju i ispitivanih uzoraka i odgovarajućeg standarda izračunava vrijednost proizvoljnih jedinica / mL (PJ mL⁻¹) što s obzirom na veliku međutestnu varijabilnost omogućuje usporedbu neovisno dobivenih rezultata. Također, nužno je da pravci zadovoljavaju kriterij paralelnosti koji ukazuje da antitijela u analiziranim serumima imaju potpuno istu specifičnost kao i ona u standardu s kojim ih uspoređujemo. Rezultate smo prikazali kao srednju vrijednost iz tri neovisna određivanja ± SE.

3.2.1.3. TEST NEUTRALIZACIJE LETALNE TOKSIČNOSTI

Moć kunićjih seruma da neutraliziraju letalnu toksičnost *Vaa* otrova odredili smo *in vivo* testom neutralizacije letalne toksičnosti koji se izvodi na miševima (Eu. Ph., 2010). Binarna serijska razrjeđenja svakog seruma smo preinkubirali s jednakim volumenom otopine otrova poznate koncentracije na 37 °C 30 min, nastale imuno-komplekse istaložili centrifugiranjem 5 min na 3000 × *g* i bistre supernatante ($V = 0,5 \text{ mL}$) intravenski aplicirali skupini od četiri miša. Svaka životinja je primila približno 2,5 srednje letalne doze (engl. *median lethal dose*; LD₅₀,) otrova, pri čemu jedna predstavlja onu količinu suhe tvari (u µg) koja uzrokuje uginuće 50 % miševa u testiranoj populaciji. Pozitivna kontrola je bio serum kunića imuniziran s cijelim otrovom (anti-*Vaa* otrov serum). U test smo uključili i grupu kojoj

smo, umjesto seruma, aplicirali fiziološku otopinu preinkubiranu sa samim otrovom kako bi bili sigurni da korištena "challenge" doza uzrokuje 100 %-tnu smrtnost. Pomoću Spearman-Kärber metode iz broja životinja preživjelih nakon 48 h odredili smo srednju efektivnu dozu (engl. *median effective dose*; ED₅₀) seruma izraženu kao volumen (u μL) koji neutralizira letalni učinak upotrijebljene količine otrova u 50 % testiranih jedinki. Zaštitnu moć (R), odnosno broj LD₅₀ doza otrova koji može biti inhibiran s 1 mL nerazrijeđenog seruma izračunali smo iz izraza $R = (T_v - 1) / ED_{50}$ i koristili kao mjeru neutralizacijske učinkovitosti pripremljenih seruma. Tv faktor, stvarni broj LD₅₀ doza apliciranih po mišu, eksperimentalno smo odredili iz stope preživljenja u pokusnim skupinama koje su primile niz koncentracija otrova podešenih da pokrivaju uski raspon oko njegove deklarirane toksičnosti (2,5 LD₅₀ po mišu). Eksperiment smo ponovili najmanje tri puta i rezultate izrazili kao srednju vrijednost \pm SE.

Prema istom protokolu odredili smo i moć kunićjih seruma da neutraliziraju letalnu toksičnost pročišćenog, nativnog Atx-a A kojeg smo testirali u dozi od 3 LD₅₀ po mišu.

3.2.1.4. TEST NEUTRALIZACIJE HEMORAGIČNE AKTIVNOSTI

Sposobnost anti-Atx, anti-H i anti-Atx+H seruma da neutraliziraju hemoragičnu aktivnost *Vaa* otrova ispitali smo *in vivo* testom na štakorima. Serume smo pripremili u razrjeđenjima od 1:1, 1:5 te 1:25, inkubirali s jednakim volumenom otopine otrova ($c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$) na 37 °C i nakon 30 min alikvot (V = 100 μL) intradermalno aplicirali skupini od dvije prethodno anestetizirane životinje. Pozitivna kontrola u testu je bio serum kunića imuniziran s cijelim otrovom (anti-*Vaa* otrov serum) u razrjeđenjima od 1:5 te 1:25. Kao negativna kontrola nam je poslužila fiziološka otopina umjesto seruma. Svaki štakor je s dorzalne strane tijela primio ukupno šest injekcija – otrov preinkubiran ili s nerazrijeđenim, 5, odnosno 25 puta razrijeđenim ispitivanim serumom ili s 5, odnosno 25 puta razrijeđenim anti-*Vaa* otrov serumom te jednaku količinu samog otrova. Svi aplicirani alikvoti su sadržavali oko 2,2 minimalne hemoragične doze (engl. *minimal hemorrhagic dose*; MHD) ($m = 50 \mu\text{g}$) otrova, pri čemu jedna predstavlja onu količinu suhe tvari (u μg) koja uzrokuje pojavu hemoragične lezije promjera 10 mm 24 h kasnije. Nastale lezije s unutrašnje strane uklonjene kože smo analizirali mjerenjem njihovih poprečnih promjera, odnosno računanjem odgovarajućih površina iz kojih smo odredili njihovu srednju vrijednost za svaku apliciranu dozu. Rezultate smo izrazili kao $[(P_O - P_{O+S}) / (P_O)] \times 100 \pm \text{SE}$, gdje P_O predstavlja srednju vrijednost

površine lezija izazvanih samim otrovom, a P_{O+S} srednju vrijednost površine lezija izazvanih otrovom preinkubiranim s određenim serumom.

3.2.1.5. TEST PROTEOLITIČKE AKTIVNOSTI

Proteolitičku aktivnost *Vaa* otrova smo izmjerili na azokazeinu kao supstratu čijom se hidrolizom u okolni medij oslobađa azo boja koja se može detektirati spektrofotometrijski pri čemu smo slijedili otprije opisani protokol (Jorge da Silva i Aird, 2001). Reakcijsku smjesu ($V = 1$ mL) pripravljenu od azokazeina ($m = 2$ mg) i otrova ($m = 35$ μ g) u $0,1$ mol dm^{-3} fosfatnom puferu ($\text{pH} = 7,5$) inkubirali smo na 37 °C. U određenim vremenskim razmacima enzimsku reakciju smo zaustavili dodatkom hladne 10 %-tne (w / V) tri-klor octene kiseline (TCA) ($V = 430$ μ L), nerazgrađeni supstrat istaložili centrifugiranjem na $3000 \times g$ 15 min i apsorbanciju supernatanta izmjerili na 342 nm ($A_{342 \text{ nm}}$). Dobivene $A_{342 \text{ nm}}$ vrijednosti smo prikazali u ovisnosti o vremenskom trajanju inkubacije te nagib konstruiranog pravca koji predstavlja brzinu enzimске reakcije koristili kao mjeru proteolitičke aktivnosti otrova.

Također, azokazeinolitičku aktivnost smo ispitali i u prisutnosti odgovarajućih proteinaznih inhibitora preinkubacijom otrova s $0,005$ mol dm^{-3} Na_2EDTA i/ili PMSF-om na 37 °C 30 min prije dodatka supstrata. Brzini enzimске reakcije koju smo dobili za intaktni otrov pripisali smo 100 % proteolitičke aktivnosti kako bi rezultate postignute za uzorke inhibirane s Na_2EDTA i/ili PMSF-om mogli prikazati u relativnom odnosu. Svaki test smo ponovili tri puta i dobivene postotke proteolitičkih aktivnosti izrazili kao njihovu srednju vrijednost \pm SE.

In vitro test neutralizacije proteolitičke aktivnosti smo izveli preinkubacijom svakog od kunićjih seruma specifičnih za hemoragine s jednakim volumenom otopine otrova ($c = 2$ mg mL^{-1}) prethodno tretiranog PMSF-om ($c = 0,005$ mol dm^{-3}). Nastale imuno-komplekse smo uklonili centrifugiranjem na $3000 \times g$ 5 min i u alikvotima supernatanta ($V = 35$ μ L) odredili rezidualnu proteolitičku aktivnost. Anti-*Vaa* otrov serum smo koristili kao pozitivnu, a serum neimuniziranog kunića, tzv. normalni kunićji serum (NKS), kao negativnu kontrolu.

3.2.1.6. WESTERN BLOT ANALIZA VENOMSKIH PROTEINA S ANTI-H SERUMOM

Vaa otrov ($m = 10$ μ g, odnosno $m = 20$ μ g) smo podvrgli SDS-PAGE analizi na gradijentnom gelu (4 - 12 % (w / V) umreženosti) pod nereducirajućim uvjetima. Odijeljene proteinske vrpce smo prenijeli na PVDF membranu (GE Healthcare, SAD) pretretiranu

metanolom te ispranu vodom i puferom za transfer (5 mmol dm^{-3} Tris/HCl, $1,92 \text{ mmol dm}^{-3}$ glicin i $0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ Na_2EDTA u 10 %-tnom (V / V) metanolu, pH = 8,6) za što smo upotrijebili sustav Xcell II Blot Module Kit, pri čemu smo slijedili uputu proizvođača (Invitrogen, SAD). Učinkovitost prijenosa smo provjerili bojanjem s 0,1 %-tnom (w / V) otopinom Ponceau S. Preostala slobodna mjesta na membrani s imobiliziranim proteinima otrova smo blokirali njenim namakanjem u 5 %-tnom (w / V) nemasnom mlijeku u prahu pripremljenim u PBST-u na $4 \text{ }^\circ\text{C}$ preko noći. U idućim koracima membranu smo inkubirali prvo s anti-H serumom (7) (1:800 000), a zatim s anti-kunićjim IgG-HRP-om (1:10 000), u oba slučaja na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 1 h. Između svake inkubacije smo proveli nekoliko koraka ispiranja da bi što efikasnije uklonili suvišak antitijela i spriječili njihovo nespecifično vezanje za membranu. Za detekciju imunospecifičnog prepoznavanja upotrijebili smo komercijalni reagens ECL plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare, SAD) sa supstratom koji u prisutnosti vodikovog peroksida podliježe oksidaciji s peroksidazom iz hrena pri čemu se oslobađa fluorescentni intermedijer koji se može vizualizirati pomoću CCD kamere.

3.2.1.7. STATISTIČKA ANALIZA

Povezanost između neutralizacijske moći seruma kunića imuniziranih s Atx-om A, odnosno kombinacijom Atx-a i ukupne hemoraginske frakcije, izražene kao R vrijednost, i njihove anti-Atx IgG količine, izražene u PJ mL^{-1} određenima odgovarajućom ELISA-om, testirali smo Spearmanovim testom korelacije rangova na 99 %-tnom nivou zaključivanja, odnosno s greškom od $p = 0,01$ te s N-2 stupnja slobode ($df = 7$).

3.2.2. PROČIŠĆAVANJE TE BIOKEMIJSKA I BIOLOŠKA KARAKTERIZACIJA Zn^{2+} -OVISNE METALOPROTEINAZE

3.2.2.1. PROČIŠĆAVANJE

Suhi Vaa otrov smo otopili u $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris/HCl puferu za vezanje (pH = 9,0) s $0,002 \text{ mol dm}^{-3}$ CaCl_2 u konačnoj koncentraciji od 40 mg mL^{-1} , profiltrirali da uklonimo eventualne nečistoće i frakcionirali HPLC-om pomoću četiri slaba kationska izmjenjivača – karboksimetil (engl. *carboxymethyl*; CM) CIM diska ($V = 0,34 \text{ mL}$) umetnuta u zajedničko kućište. Protok je iznosio 3 mL min^{-1} . U svakoj kromatografskoj analizi na kolonu smo aplicirali alikvot od $200 \text{ } \mu\text{L}$. Nakon koraka nanošenja uzorka diskove smo isprali puferom za vezanje ($V = 18 \text{ mL}$) i materijal vezan za izmjenjivač eluirali stupnjevitim gradijentom od

0,04, 0,08, 0,12, odnosno 1 mol dm⁻³ natrijevog klorida pripremljenog u puferu za vezanje ($V = 18$ mL) čime smo odijelili četiri glavne frakcije. Sadržaj druge (EF2) i treće elucijske frakcije (EF3) smo sakupili, ugustili pomoću centrifugalnog sustava za ultrafiltraciju s membranom pora veličine od 10 kDa (Ultracel, Millipore, SAD) te dodatno pročistili gel-filtracijom na TSK-GEL G3000SW_{XL} koloni ($300 \times 7,8$ mm) u 0,2 mol dm⁻³ fosfatno-sulfatnom puferu (pH = 6,7) pri protoku od 1 mL min⁻¹. Frakciju s najkraćim retencijskim vremenom dobivenu kromatografskim pročišćavanjem EF2, odnosno EF3 ultrafiltracijom smo isprali s 10 mmol dm⁻³ Tris/HCl puferom za čuvanje (pH = 8,0) te koncentrirali na željeni volumen, alikvotirali i pohranili na -20 °C do analize. Tijekom ionsko-izmjenjivačke i gel-filtracijske kromatografije proteine smo pratili mjerenjem apsorbancije na 214 ($A_{214 \text{ nm}}$), odnosno 280 nm ($A_{280 \text{ nm}}$).

3.2.2.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE

Za određivanje koncentracije pročišćenog proteina u sukcesivno prikupljenim kromatografskim izolatima primjenili smo spektrometrijsku metodu po Ehresmannu (1973) i sljedeću formulu: $(A_{228,5 \text{ nm}} - A_{234,5 \text{ nm}}) \times 0,3175 \times \text{faktor razrjeđenja} = [\text{mg mL}^{-1}]$, pri čemu smo vodili računa da izmjerene vrijednosti apsorbancija budu između 0,1 i 1 što predstavlja raspon u kojem je, kako smo potvrdili u preliminarnim analizama, njihova ovisnost o mjenom parametru linearna.

3.2.2.3. SDS-PAGE ANALIZA

Homogenost izolata smo provjerili SDS-PAGE analizom na NuPAGE Novex Bis-Tris gradijentnom gelu (4-12 % (w / V) umreženosti (Invitrogen, SAD) u NuPAGE MES SDS puferu (Invitrogen, SAD), koristeći sustav za elektroforezu Xcell SureLock Mini-Cell prema uputi proizvođača (Invitrogen, SAD). Reducirani i nereducirani uzorak ($m = 6 \mu\text{g}$) smo pripremili razrjeđivanjem u odgovarajućem volumenu NuPAGE LDS pufera (Invitrogen, SAD) sa, odnosno bez reducirajućeg NuPAGE Sample Reducing agensa, odnosno DTT-a dodanog u konačnoj koncentraciji od $c = 50$ mmol dm⁻³ (Invitrogen, SAD). Osim uzoraka na gel smo nanijeli i SeeBlue Plus2 Pre-Stained standard (Invitrogen, SAD) s proteinima molekularskih masa u rasponu od 3-188 kDa. Proteinske vrpce smo detektirali bojanjem s 0,1 %-tnom (m / V) otopinom Coomassie Brilliant Blue R250, odnosno 0,1 %-tnom (m / V) otopinom AgNO₃ po Shevchenkovom protokolu (Shevchenko i sur., 1996).

3.2.2.4. IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE

Izoelektrično fokusiranje (IEF) pročišćene komponente smo izveli na gelu s pH gradijentom raspona od 3 do 10. Izoelektričnu točku (pI) smo prvo pokušali odrediti tzv. neravnotežnom gel-elektroforezom u pH gradijentu (engl. *non-equilibrium pH gradient electrophoresis*; NEPHGE) koja se preporuča za optimalnu analizu proteina ekstremno visokih pI vrijednosti. Prema protokolu proizvođača (Serva, Njemačka) uzorak ($m = 10 \mu\text{g}$) smo razrijedili jednakim volumenom IEF pufera, bilo nereduciran, bilo reduciran s 50 mmol dm^{-3} DTT-om, nanijeli na gel te promijenili polarnost jedinice za elektroforezu tako što smo anodni, vanjski prostor s 20 mmol dm^{-3} NaOH spojili na katodu, a katodni, unutrašnji s 400 mmol dm^{-3} L-glutaminskom kiselinom na anodu. Također, s ciljem optimizacije postupka izoelektričnog fokusiranja uzorak smo pripremili i u 50 mmol dm^{-3} Tris/HCl puferu (pH = 8,0) sa 6 mol dm^{-3} ureom te pomiješali s komercijalnim puferom za nanošenje, zatim u 50 mmol dm^{-3} Tris/HCl puferu (pH = 8,0) s glicerolom, bez i sa 50 mmol dm^{-3} DTT-a, i konačno, u 50 mmol dm^{-3} Tris/HCl puferu (pH = 8,0) s ureom, glicerolom i reducensom. Na gel smo nanijeli i SERVA IEF Marker 3-10 Liquid Mix reagens (Serva, Njemačka) s proteinima poznatih izoelektričnih točaka, kao i smjesu Atx-a i inhibitora kimotripsina ($m = 15 \mu\text{g}$) te amoditin L ($m = 10 \mu\text{g}$) koji su nam kao bazični proteini podrijetlom iz *Vaa* otrova poslužili kao interni standardi. Po završetku elektroforeze (60 min na 100 V, 20 min na 200 V te 5 min na 500 V) proteinske vrpce smo fiksirali s 10 %-tnom (w / V) TCA i detektirali bojanjem s Coomassie Brilliant Blue R250.

Osim NEPHGE tehnike, proveli smo i standardno izoelektrično fokusiranje na gelu s pH gradijentom raspona od 3 do 10 u komercijalnom anodnom i katodnom puferu prema uputi proizvođača (Serva, Njemačka) pri čemu smo uzorak ($m = 20 \mu\text{g}$) pripremili u jednakom volumenu IEF pufera za nanošenje, bilo intaktan, bilo denaturiran sa 6 mol dm^{-3} ureom ili reduciran s 50 mmol dm^{-3} DTT-om. Na gel smo nanijeli i IEF Marker 3-10 Liquid Mix reagens (Serva, Njemačka). Po završetku elektroforeze (60 min na 50 V, 60 min na 200 V te 30 min na 500 V) proteinske vrpce smo fiksirali s 10 %-tnom (w / V) TCA i detektirali bojanjem s Coomassie Brilliant Blue R250.

3.2.2.5. DVODIMENZIONALNA (2D) SDS-PAGE ANALIZA

Izoelektrično fokusiranje kao prvi korak dvodimenzionalne gel-elektroforeze smo izveli u ZOOM IPGRunner sustavu prema protokolu preporučenom od strane proizvođača

(Invitrogen, SAD). Ukratko, vrpce s imobiliziranim pH gradijentom (IPG) linearnog raspona od 3 do 10 smo rehidrirali u komercijalnom puferu za nanošenje ($V = 140 \mu\text{L}$) u kojem smo prethodno razrijedili $25 \mu\text{g}$ proteinskog uzorka. Inkubacija je trajala sat vremena na sobnoj temperaturi. Nakon fokusiranja (20 min na 200 V, 15 min na 450, 15 min na 750 V te 60 min na 2000 V) pročišćeni protein imobiliziran na IPG vrpce smo ekvilibrirali u otopini DTT-a ($c = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$), odnosno jodoacetamida ($c = 125 \text{ mmol dm}^{-3}$) pripremljenima u NuPAGE LDS puferu (Invitrogen, SAD). Postupak razdvajanja na osnovu razlike u molekularnoj masi je uključivao standardnu SDS-PAGE analizu prethodno reducirane i alkilirane komponente izvedenu na NuPAGE Novex Bis-Tris ZOOM gelu (Invitrogen, SAD) kao što je opisano u poglavlju 3.2.2.3.

3.2.2.6. ANALIZA MASENOM SPEKTROMETRIJOM

Sve analize masenom spektrometrijom (MS-om) smo izveli na AXIMA TOF² ili AXIMA CFR⁺ instrumentima s dušikovim laserima od 20 Hz optimiziranim za detekciju pozitivno nabijenih iona primjenom akceleracijskog napona od 20 keV, pri čemu smo s ciljem postizanja poboljšane rezolucije primijenili odgođenu ekstrakciju.² Za određivanje molekulske mase u intaktnom obliku uzorak smo pročistili C₄ ZipTip-om prema preporuci proizvođača (Millipore, SAD) i podvrgnuli mjerenju vremena leta (engl. *time of flight*; TOF) uz linearni način snimanja. U svrhu identifikacije izoliranog proteina primijenili smo metodu otiska prsta (engl. *peptide mass fingerprint*; PMF) i tandemnu MS (MS/MS) tehniku. Nakon što smo proveli SDS-PAGE analizu pod reducirajućim uvjetima, odijeljene proteinske vrpce smo izrezali iz gela, razgradili s tripsinom, pročistili C₁₈ ZipTip-om te s određenim monoizotopnim m/z vrijednostima nastalih triptičkih peptida pretražili Mascot bazu podataka.

3.2.2.7. ODREĐIVANJE AMINOKISELINSKE SEKVENCE

Prethodno odsoljeni uzorak proteina smo razgradili endopeptidazom Lys-C, nastale peptide odijelili kromatografijom reverzne faze i eluirali linearnim gradijentom od 0 do 90 % (V/V) 0,1 %-tne (V/V) tri-fluor octene kiseline (TFA) u acetonitrilu ($t = 60 \text{ min}$) pri protoku od 1 mL min^{-1} .³ Sekvence osam nasumično odabranih peptida smo odredili tehnikom Edmanove odgradnje i nakon pretraživanja NCBI baze podataka srazmerno odgovarajućim

² MS eksperimente je izvela dr. sc. Marija Brgles.

³ N-terminalno sekvenciranje je provela dr. sc. Adrijana Leonardi.

segmentima najhomolognijih metaloproteinaza podrijetlom iz zmijskih otrova koristeći program ClustalW (Thompson i sur., 1994).

3.2.2.8. N-DEGLIKOZILACIJA I ODREĐIVANJE UDJELA UKUPNIH ŠEĆERA

Uzorak proteina ($m = 6 \mu\text{g}$) osušen pomoću centrifugalnog vakuum koncentratora smo denaturirali u 1 %-tnom (w / V) SDS-u ($100 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 min), pomiješali s 1,5 %-tnim (w / V) CHAPS-om u $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ Na_2HPO_4 ($\text{pH} = 7,5$) i, nakon temperiranja, inkubirali s PNGazom F (0,5 U) na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ preko noći. Reakcijsku smjesu smo podvrgnuli SDS-PAGE analizi na gradijentnom gelu (4-12 % (w / V) umreženosti) pod nereducirajućim i reducirajućim uvjetima kako bi vizualno usporedili elektroforetsku pokretljivost intaktnog uzorka i uzorka tretiranog s *N*-glikozidazom. Proteinske vrpce smo detektirali bojanjem s Coomassie Brilliant Blue R250.

Udio ukupnih šećera u pročišćenom proteinu smo procijenili pomoću komercijalno dostupnog kita Glycoprotein Carbohydrate Estimation Kit (Pierce, SAD) koji se zasniva na oksidaciji glikoproteina natrijevim *meta*-perjodatom. Reakcija između nastalog aldehida i reagensa za detekciju rezultira ružičastim obojenjem s apsorpcijskim maksimumom na 550 nm čiji je intenzitet proporcionalan udjelu ukupnih šećera u glikoproteinu. Test smo izveli u mikrotitracijskoj pločici (Sarstedt, Njemačka) u kojoj smo osim uzorka analiziranog u duplikatu, u triplikatu priredili i proteinske standarde poznatog udjela ukupnih šećera – lizozim i albumin iz govedeg seruma (neglikozilirani proteini kao negativne kontrole) te ovalbum (3,2 %), apo-transferin (5,8 %) i fetuin (22,9 %) (varijabilno glikozilirani proteini kao pozitivne kontrole). Mjerenjem apsorpcije ($A_{550 \text{ nm}}$) i izračunavanjem optičke gustoće ($OD_{550 \text{ nm}}$) od koje smo oduzeli $OD_{550 \text{ nm}}$ vrijednost dobivenu za uzorak u koji smo umjesto analiziranog proteina dodali reakcijski pufer, konstruirali smo baždarnu krivulju prema kojoj smo kvantificirali udio ukupnih šećera u izoliranoj metaloproteinazi.

3.2.2.9. PROTEOLITIČKA AKTIVNOST

Proteolitičku aktivnost Zn^{2+} -ovisne metaloproteinaze smo izmjerili koristeći azokazein kao supstrat kao što je opisano u poglavlju 3.2.1.5. Reakcijsku smjesu ($V = 1 \text{ mL}$) smo pripravili od azokazeina ($m = 2 \text{ mg}$) i pročišćenog enzima ($m = 3,5 \mu\text{g}$) u $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris/HCl puferu ($\text{pH} = 8,5$) te je inkubirali na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ kroz 5 h.

Učinak DTT-a ($c = 0,001 \text{ mol dm}^{-3}$) i L-cistein hidroklorid monohidrata ($c = 0,005 \text{ mol dm}^{-3}$), dvovalentnih kationa – CaCl_2 , ZnCl_2 i MgCl_2 ($c = 0,005 \text{ mol dm}^{-3}$ u sva tri slučaja) ili proteinaznih inhibitora – Na_2EDTA ($c = 0,005 \text{ mol dm}^{-3}$) i PMSF-a ($c = 0,001 \text{ mol dm}^{-3}$) na proteolitičku aktivnost izoliranog enzima ispitali smo njegovom preinkubacijom sa svakom od nabrojanih komponenti na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 min neposredno prije dodatka azokazeina. Kao kontrolni uzorci su nam poslužili cijeli otrov ($m = 3,5 \text{ } \mu\text{g}$), odnosno sami pufer dodani u reakcijsku smjesu umjesto testiranog proteina. S obzirom da smo PMSF iz praktičnih razloga otopili u 2-propanolu, po istom postupku smo provjerili i mogući utjecaj organskog otapala. $A_{342 \text{ nm}}$ vrijednosti dobivenoj za čisti protein smo dodijelili 100 % proteolitičke aktivnosti kako bi rezultate ostalih analiziranih uzoraka mogli prikazati u relativnom odnosu. Svaki test smo izveli tri puta i dobivene vrijednosti mjerenja iz neovisno provedenih eksperimenata izrazili kao njihovu srednju vrijednost $\pm \text{SE}$.

3.2.2.10. FIBRINOGENOLITIČKA AKTIVNOST

Fibrinogenolitičku aktivnost metaloproteinaze smo ispitali metodom koju su opisali Ouyang i Teng (1976), ali uz određene modifikacije, kako slijedi. Ukratko, $200 \text{ } \mu\text{L}$ otopine humanog fibrinogena ($c = 5 \text{ mg mL}^{-1}$) smo inkubirali sa $100 \text{ } \mu\text{L}$ uzorka ($c = 0,6 \text{ mg mL}^{-1}$) na $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Reakcijsku smjesu smo pripremili u $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris/HCl puferu ($\text{pH} = 8,4$) s $0,002 \text{ mol dm}^{-3}$ CaCl_2 . U određenim vremenskim intervalima izdvojili smo alikvot ($V = 15 \text{ } \mu\text{L}$) u kojima smo enzimsku reakciju zaustavili dodatkom $0,02 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris/HCl pufera za redukciju ($\text{pH} = 8,0$) s $0,002 \text{ mol dm}^{-3}$ Na_2EDTA , 5 %-tnim (w/V) SDS-om, 0,02 %-tnom (w/V) bojom bromofenol plavo i 10 %-tnim (V/V) β -merkaptotanolom ($V = 5 \text{ } \mu\text{L}$). Nakon njihovog odjeljivanja elektroforezom na 12,5 %-tnom (w/V) gelu pod reducirajućim uvjetima, fragmente fibrinogena smo prenijeli na PVDF membranu prema protokolu preporučenom od strane proizvođača (Millipore, SAD) i detektirali bojanjem s Coomassie Brilliant Blue R250. Sve jasno vidljive proteinske vrpce smo izrezali te podvrgli N-terminalnom određivanju aminokiselinskog slijeda na instrumentu Procise 492A Automated Sequencing System (Applied Biosystems, SAD).

U testu inhibicije fibrinogenolitičke aktivnosti izolirani enzim smo preinkubirali s $0,005 \text{ mol dm}^{-3}$ Na_2EDTA ili $0,001 \text{ mol dm}^{-3}$ Pefabloc-om kao inhibitorom serinskih proteinaza na sobnoj temperaturi 15 min neposredno prije analize opisane u prethodnom odlomku.

3.2.2.11. PROTEOLITIČKI UČINAK NA FAKTORE ZGRUŠAVANJA KRVI

Proteinolitički učinak pročišćene metaloproteinaze na goveđi protrombin i faktor X smo ispitali njenom inkubacijom ($m = 4,5 \mu\text{g}$) sa svakim od navedenih supstrata ($m = 90 \mu\text{g}$) na $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Ukupni volumen reakcijske smjese pripremljene u $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris/HCl puferu ($\text{pH} = 8,4$) s $0,002 \text{ mol dm}^{-3}$ CaCl_2 iznosio je $250 \mu\text{L}$. Nakon 2, 4 i 24 h izdvojene alikvote smo ispitali SDS-PAGE analizom provedenom na $12,5 \%$ -tnom (w / V) gelu pod reducirajućim uvjetima. Odijeljene proteinske fragmente smo prenijeli na membranu kako bi im odredili N-terminalnu sekvencu kao što je opisano u poglavlju 3.2.2.10.

3.2.2.12. RAZGRADNJA MATRIGELA I KOMPONENTI EKSTRACELULARNOG MATRIKSA

Matrigel ($m = 11,2 \mu\text{g}$), komercijalno dostupnu topivu preparaciju bazalne membrane ekstrahiranu iz Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) mišjeg sarkoma, i pročišćeni protein ($m = 0,3 \mu\text{g}$) smo pripremili u $0,025 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris/HCl puferu ($\text{pH} = 7,4$) s $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl i $0,005 \text{ mol dm}^{-3}$ CaCl_2 ($V = 20 \mu\text{L}$) te kao zasebne alikvote inkubirali na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ kroz 15, 60, 180, odnosno 360 min. Svaku reakcijsku smjesu smo podvrgnuli SDS elektroforezi na $7,5 \%$ -tnom (w / V) gelu pod reducirajućim uvjetima nakon čega smo odijeljene proteinske fragmente prenijeli na membranu i sekvencirali postupkom opisanim u poglavlju 3.2.2.10.

Pojedinačne komponente ekstracelularnog matriksa – laminin ($m = 25 \mu\text{g}$), odnosno fibronektin ($m = 25 \mu\text{g}$) smo inkubirali s izoliranim enzimom ($m = 1 \mu\text{g}$) na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ kroz 3 i 24 h. Reakcijsku smjesu smo pripremili u $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris/HCl puferu ($\text{pH} = 8,4$) s $0,002 \text{ mol dm}^{-3}$ CaCl_2 tako da je njen ukupni volumen iznosio $60 \mu\text{L}$. Fragmente nastale proteolitičkom razgradnjom laminina smo odijelili na $7,5 \%$ -tnom (w / V), a one podrijetlom iz fibronektina na 10% -tnom (w / V) gelu. U oba slučaja gel-elektroforezu smo izveli pod reducirajućim uvjetima.

3.2.2.13. HIDROLIZA B-LANCA INZULINA

Proteolitičku specifičnost Zn^{2+} -ovisne metaloproteinaze smo odredili na oksidiranom B-lancu inzulina podrijetlom iz goveđe gušterače. Ukratko, pomiješali smo $245 \mu\text{L}$ ispitivanog supstrata ($m = 100 \mu\text{g}$) pripremljenog u $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris/HCl puferu ($\text{pH} = 8,4$) s $0,002 \text{ mol dm}^{-3}$ CaCl_2 i $5 \mu\text{L}$ uzorka ($m = 3 \mu\text{g}$). Reakcijsku smjesu smo inkubirali na $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Nakon 30 min te 1, 3 i 24 h izdvojili smo alikvote od $50 \mu\text{L}$ koje smo dodali u $250 \mu\text{L}$ $0,1 \%$ -tne (V / V) TFA te analizirali kromatografijom reverzne faze na ChromSpher 5 C8 koloni (100

× 3 mm). Preostali nerazgrađeni supstrat kao i njegove degradacijske produkte smo eluirali linearnim gradijentom acetonitrila od 0 do 60 % (V/V) 0,1 %-tne (V/V) TFA ($t = 30$ min) pri protoku od 1 mL min^{-1} , detektirali mjerenjem apsorbancije na 215 nm ($A_{215 \text{ nm}}$), zasebno sakupili i podvrgnuli sekvenciranju s N-terminalnog kraja kako bi identificirali susjedne aminokiselinske ostatke među kojima je u oksidiranom B-lancu inzulina došlo do hidrolize peptidne veze posredovane izoliranim enzimom.

3.2.2.14. TEST HEMORAGIČNE AKTIVNOSTI

Hemoragičnu aktivnost metaloproteinaze smo ispitali na štakorima otprije opisanim postupkom (Theakston i Reid, 1983; Lang Balijsa i sur., 2005). Prethodno anesteziranim životinjama uklonili smo dlaku na dorzalnoj strani tijela te na šest mjesta intradermalno aplicirali po $100 \mu\text{L}$ fiziološke otopine s 1,25, 2,5, 5, 10, odnosno $20 \mu\text{g}$ čistog proteina te $50 \mu\text{g}$ cijelog otrova koji nam je poslužio kao pozitivna kontrola. Idući dan usmrćenim štakorima smo odstranili kožu kako bi s njene unutrašnje strane izmjerili poprečne promjere nastalih hemoragičnih lezija iz kojih smo izračunali njihovu srednju vrijednost. Na osnovu dobivenih rezultata izradili smo krivulju ovisnosti veličine lezije o dozi iz koje smo očitali najmanju količinu apliciranog proteina koja uzrokuje pojavu hemoragije promjera 10 mm 24 h kasnije, tzv. minimalnu hemoragičnu dozu (MHD).

Za usporedbu, test hemoragične aktivnosti smo izveli i na miševima koji su primili po $50 \mu\text{L}$ fiziološke otopine s 0,33, 0,41, 0,51, 0,64, 0,8 ili $1 \mu\text{g}$ izoliranog proteina. Promjer nastalih hemoragičnih lezija smo očitali 2 h nakon aplikacije.

U oba testa svaku dozu smo testirali na tri životinje i rezultate mjerenja dobivene iz neovisnih određivanja izrazili kao srednju vrijednost.

3.2.2.15. IMUNIZACIJSKI PROTOKOL I DETEKCIJA ANTITIJELA SPECIFIČNIH ZA METALOPROTEINAZU IZ OTROVA U SERUMU IMUNIZIRANOG KUNIĆA

Antitijela specifična za Zn^{2+} -ovisnu metaloproteinazu smo proizveli potkožnom imunizacijom kunića s pročišćenim proteinom ($50 \mu\text{g}$ po dozi) kao antigenom formuliranim u ISA 720^{PGM} adjuvantu (Halassy i sur., 2007). Imunizacijski protokol se sastojao od imunizacije i dva docjepljivanja provedena u razmacima od 28 dana. Krv smo izvadili 14 dana nakon zadnje imunizacije. Odijeljeni serum smo dekomplementirali zagrijavanjem na 56°C 30 min, alikvotirali i pohranili na -20°C do analize.

Učinkovitost imunizacijskog postupka smo provjerili ELISA testom kao što je opisano u poglavlju 3.2.1.2. Ukratko, mikrotitracijsku pločicu smo obložili otopinom izoliranog enzima ($c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$) i, nakon koraka blokiranja, dodali niz binarnih serijskih razrjeđenja kuničjeg seruma nanešenih u duplikatu. Anti-kuničji IgG-HRP smo pripremili u razrjeđenju od 1:20 000. Nakon inkubacije s otopinom OPD-a i H_2O_2 te zaustavljanja enzimske reakcije, apsorbanciju nastalog obojenog produkta smo izmjerili na 492 nm ($A_{492 \text{ nm}}$). Također, u istom eksperimentu usporedno smo proveli i oblaganje neiskorištenog dijela pločice s ukupnom hemoraginskom frakcijom ($c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$) kako bi ispitali u kojoj mjeri antitijela iz pripremljenog seruma nanešenog u razrjeđenjima koja smo koristili i kod analize pročišćenog proteina prepoznaju ostale hemoragine iz *Vaa* otrova.

3.2.2.16. TEST NEUTRALIZACIJE HEMORAGIČNE AKTIVNOSTI

Neutralizacijsku moć seruma kunića imuniziranog s izoliranim toksinom smo provjerili *in vivo* testom u kojem smo binarni serijski niz njegovih razrjeđenja prvo preinkubirali s jednakim volumenom otopine otrova ($c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$) na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ i nakon 30 min alikvota ($V = 100 \mu\text{L}$) intradermalno aplicirali skupini od tri štakora. Kao kontrolni uzorak nam je poslužila fiziološka otopina koju smo dodali u reakcijsku smjesu umjesto analiziranog seruma. Svaka životinja je primila ukupno četiri injekcije s oko 2,2 MHD ($m = 50 \mu\text{g}$) otrova preinkubiranog s nerazrijeđenim, dva, odnosno četiri puta razrijeđenim serumom kao i jednaku količinu samog otrova. Hemoragične lezije s unutrašnje strane uklonjene kože inducirane svakom od ispitivanih otopina smo analizirali 24 h kasnije i konačni rezultat testa neutralizacije izrazili kao srednju vrijednost prosjeka njihovih poprečnih promjera dobivenih na svakom od tri štakora \pm SE.

3.2.2.17. WESTERN BLOT ANALIZA

Western blot analizu pročišćenog proteina ($m = 10 \mu\text{g}$) i cijelog otrova ($m = 20 \mu\text{g}$) s kuničjim serumom specifičnim za Zn^{2+} -ovisnu metaloproteinazu pripremljenim u razrjeđenju od 1:50 000 proveli smo kao što je opisano u poglavlju 3.2.1.6.

4. REZULTATI I RASPRAVA

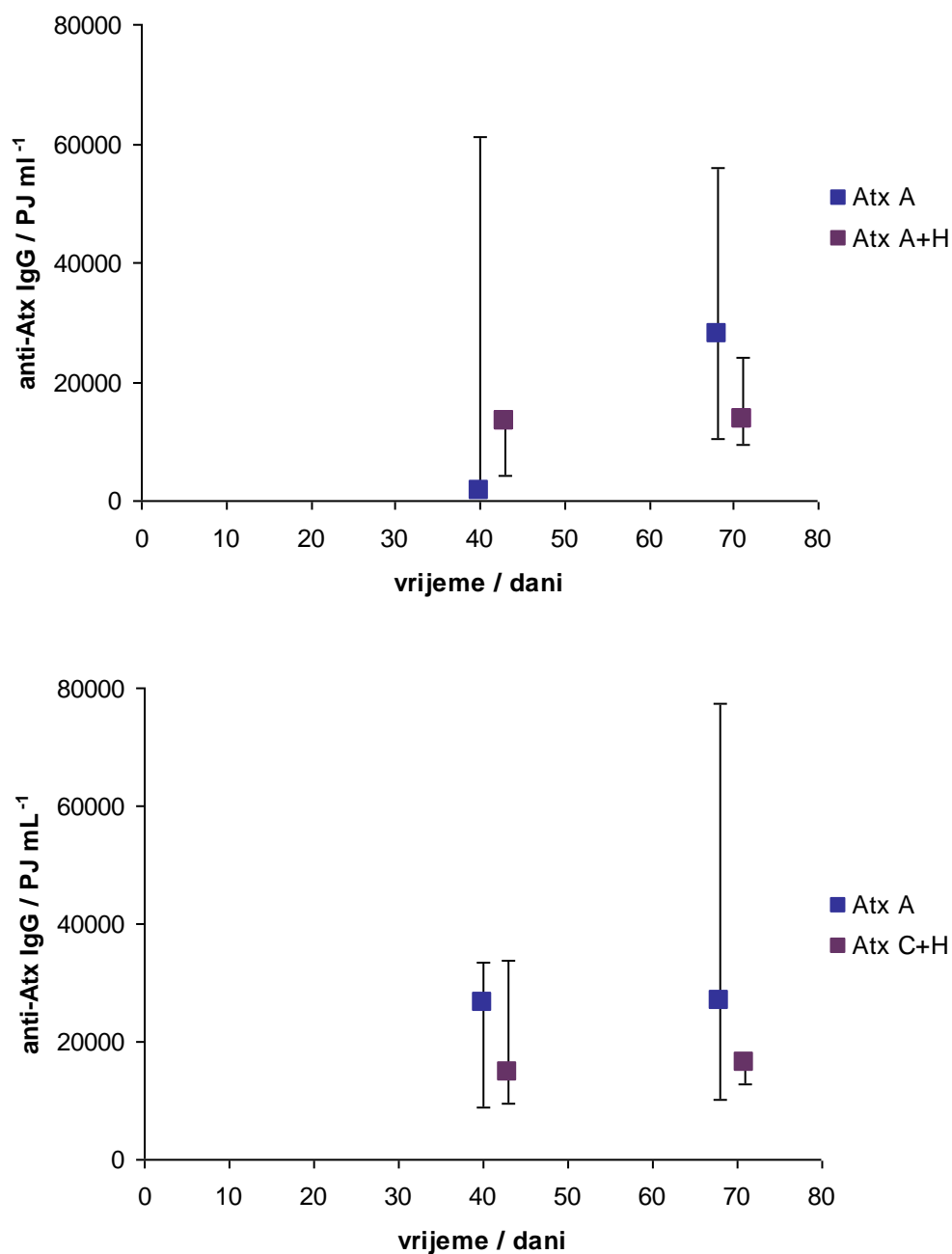
4.1. ULOGA ANTITIJELA SPECIFIČNIH ZA GLAVNE TOKSIČNE KOMPONENTE OTROVA POSKOKA U NEUTRALIZACIJI NJEGOVE LETALNE TOKSIČNOSTI

Zahvaljujući dugogodišnjoj upotrebi otrova podvrste *V. a. ammodytes* (*Vaa* otrova) kao kompleksnog antigena u dobivanju polispecifičnog protuotrova hiperimunizacijskim postupkom u konja, biokemijska te patofiziološka svojstva amoditoksina (Atx-a) i nekolicine hemoragina, njegovih glavnih toksičnih komponenti čiji se doprinos indukciji kliničkog fenotipa otrovanja kod ljudi smatra vrlo izglednim, u literaturi su detaljno opisana. Međutim, o njihovoj imunogenosti ne postoje publicirani izvještaji što je jedan od glavnih razloga neznatnih pomaka u optimizaciji imunizacijskog protokola i izostanka racionalnijeg pristupa dizajnu protuotrova (Halassy i sur., 2008). Stoga je cilj našeg istraživanja bio pripremiti serume definirane specifičnosti imunizacijom kunića s pročišćenim komponentama – Atx-om A, ukupnom hemoraginskom frakcijom, odnosno kombinacijom Atx-a i hemoragina kako bi ispitali njihovu funkcionalnu ulogu u neutralizaciji sveukupne letalne toksičnosti inducirane cijelim *Vaa* otrovom primjenom standardnog testa Europske farmakopeje za mjerenje potencije protuotrova protiv ugriza europskih otrovnica (Ph. Eur., 2010), te je usporedili s ukupnom zaštitnom moći seruma s antitijelima na široki spektar njegovih proteinskih sastavnica, tzv. anti-*Vaa* otrov seruma.

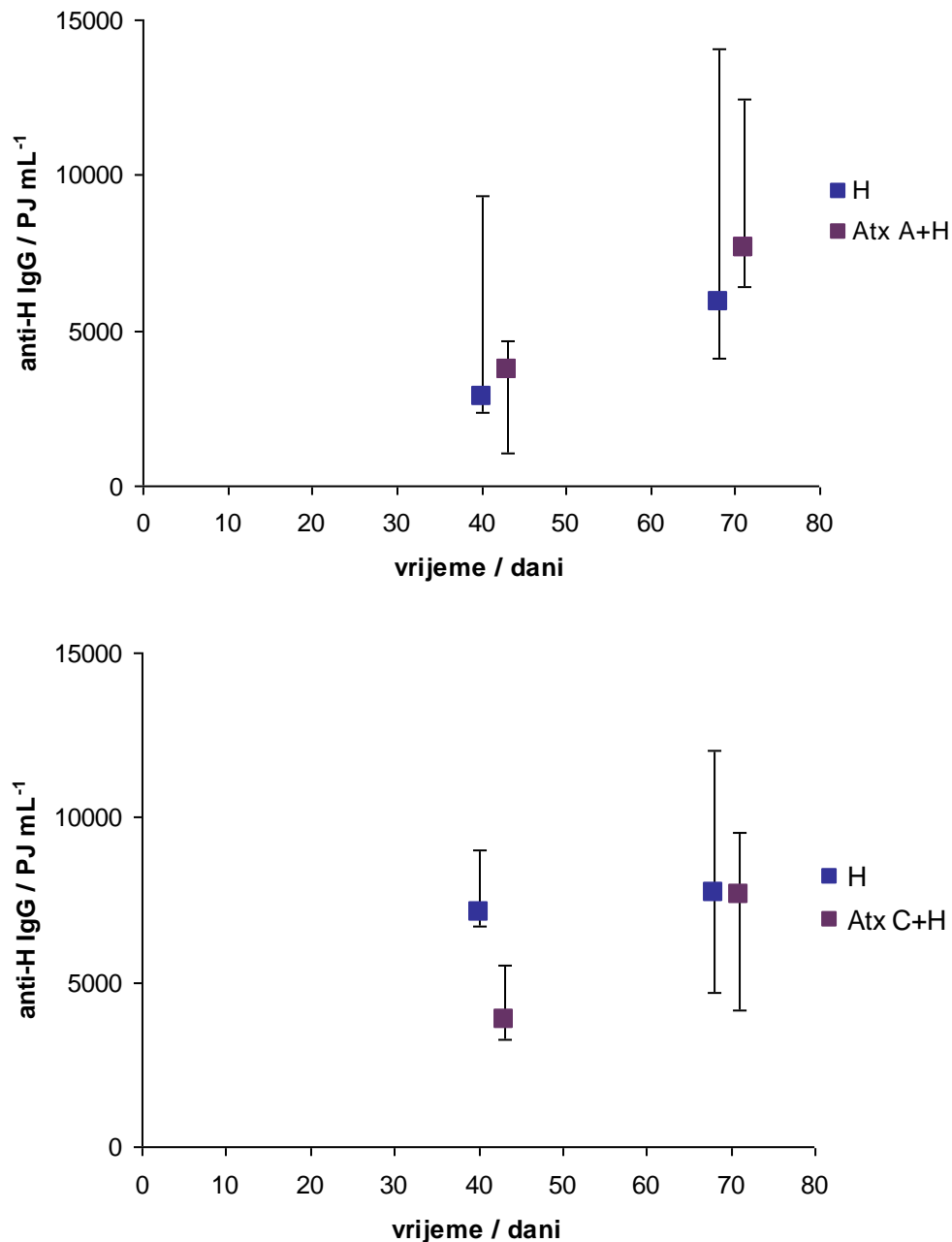
4.1.1. PRIPREMA SERUMA SPECIFIČNIH ZA POJEDINAČNE KOMPONENTE OTROVA I NJIHOVA KARAKTERIZACIJA

Imunizaciju kunića smo proveli po ustaljenom protokolu koji daje serume visokog titra specifičnih antitijela IgG klase, a uključuje definirane doze antigena, broj te razmake među docjepljivanjima, volumen imunizacijske suspenzije po mjestu aplikacije te način dostave kao parametre eksperimentalno optimizirane za postizanje maksimalne imunoreakcije (Halassy i sur., 2008, 2010). Svaku od ispitivanih komponenti otrova smo formulirali u komercijalnom nemineralnom uljnom adjuvantu Montanide ISA 206. Njihovim miješanjem nastaje emulzija voda/ulje/voda koja djeluje kao depo iz koje se antigen u organizmu oslobađa postupno čime smo ujedno postigli i adekvatnu zaštitu imuniziranih životinja od mogućeg toksičnog djelovanja amoditoksina, odnosno hemoragina. Da bi dobili dovoljno jak imunološki odgovor, uz antigen(e), u ulje smo ugradili i peptidoglikanski monomer (PGM)

kao netoksičnu i apirogenu molekulu snažnog adjuvantskog djelovanja koja nadopunjuje uljni adjuvant u stimuliranju nastanka antitijela (Halassy i sur., 2007).



Slika 11. Kinetika razvoja anti-Atx IgG-a u kunića imuniziranih s Atx-om A, odnosno kombinacijom Atx-a A ili C i ukupne hemoraginske frakcije. Prikazane su vrijednosti medijana te minimalna i maksimalna vrijednost za svaku pokusnu skupinu.



Slika 12. Kinetika razvoja anti-H IgG-a u kunića imuniziranih s ukupnom hemoraginskom frakcijom, odnosno kombinacijom Atx-a A ili C i ukupne hemoraginske frakcije. Prikazane su vrijednosti medijana te minimalna i maksimalna vrijednost za svaku pokusnu skupinu.

Za vrednovanje kvalitete eksperimentalnih seruma pripremljenih kroz dva neovisno provedena imunizacijska protokola uspostavili smo ELISA test koji je potvrdio da smo u imuniziranim kunićima uspješno proizvesti antitijela zadovoljavajuće visokog titra specifična i za amoditoksine i za hemoragine. Porast njihove količine postignut docjepljivanjem s odgovarajućim antigenom (ili antigenima) u ovisnosti o trajanju imunizacijskog postupka prikazan je na Slikama 11 i 12. Serumi životinja imuniziranih s Atx-

om A sadržavali su antitijela specifična samo za amoditoksine, a serumi životinja imuniziranih s ukupnom hemoraginskom frakcijom antitijela specifična samo za hemoragine čime smo dokazali da te dvije grupe komponenti u imunološkom smislu nisu križno reaktivne te ispunili nužni preduvjet za proučavanje njihove pojedinačne uloge u neutralizaciji letalne toksičnosti *Vaa* otrova (Tablica 5). Očekivano, u anti-Atx+H serumima detektirali smo antitijela obiju specifičnosti, a svi koje smo proizveli također su prepoznali i cijeli otrov kao smjesu velikog broja različitih antigena. Nadalje, analizom pripremljenih seruma uočili smo i da su pokusne životinje imunizirane sa samim Atx-om A razvile znatno veću količinu specifičnih IgG-a od onih koje su ga primile u kombinaciji s ukupnom hemoraginskom frakcijom iako je njegova količina u obje eksperimentalne skupine bila podjednaka. Opažena pojava najvjerojatnije je posljedica fenomena antigenske kompeticije do koje dolazi uslijed simultane administracije dvaju antigena gdje jedan, zahvaljujući svojstvu peptida nastalih njegovim procesiranjem da se s većim afinitetom vežu za MHC molekule klase II profesionalnih antigen prezentirajućih stanica, djeluje dominantno u procesu aktivacije humoralne imunoreakcije te suprimira imunološki odgovor koji se razvija na drugi, slabije antigenični (Klein i Hořejší, 1997).

U skladu s 3R konceptom (engl. *reduce, refine, replace*) i, posljedično, tendencijom redukcije broja pokusnih životinja potrebnih za nastavak istraživanja, iz svake Atx A, H, odnosno Atx+H skupine, od ukupno 10 proizvedenih, u konačnici smo na osnovu preliminarnih rezultata odabrali po 4 najkvalitetnija seruma s najvećom količinom specifičnih IgG-a koje smo sa svrhom njihove daljnje karakterizacije ponovno analizirali ELISA testom, ali ovaj put usporedno i zajedno s pozitivnom kontrolom za koju nam je poslužio otprije pripremljeni serum kunića imuniziran s cijelim *Vaa* otrovom izrazito visoke neutralizacijske učinkovitosti (anti-*Vaa* otrov serum). Da bi određeni sadržaj anti-Atx, anti-H i anti-*Vaa* otrov antitijela bio što vjerodostojniji, enzimski imunotest smo ponovili tri puta i neovisno dobivene rezultate prikazali kao srednju vrijednost količine IgG-a u svakom od 12 eksperimentalnih seruma kao i u serumu specifičnom za *Vaa* otrov (Tablica 5). Njihovu neutralizacijsku moć smo izmjerili zasad još uvijek jedinom regulatorno priznatom metodom koja se primjenjuje za procjenu kvalitete protuotrova protiv ugriza europskih zmija (Ph. Eur., 2010), tzv. *in vivo* testom neutralizacije letalne toksičnosti gdje se binarna serijska razrjeđenja testiranih seruma preinkubiraju s otrovom koji sadržava poznati broj LD₅₀ doza te intravenski administriraju skupini miševa kako bi se iz stope preživljenja u svakoj grupi odredio onaj volumen koji štiti 50 % populacije od uginuća (ED₅₀ doza). Umnožak njegove recipročne vrijednosti i broja

LD₅₀ doza inokuliranih po mišu umanjen za jednu koja je odgovorna za letalni efekt kod preostalih 50 % nezaštićenih jedinki daje konačni rezultat *in vivo* testa – R vrijednost ili broj LD₅₀ doza otrova koje mogu biti neutralizirane s 1 mL testiranog seruma. Ukratko, što je R vrijednost veća, njegova neutralizacijska učinkovitost je bolja. Nedavno provedena istraživanja su pokazala da ukupna zaštitna moć seruma dobivenih imunizacijom kunića s *Vaa* otrovom snažno korelira s količinom antitijela specifičnih za njegove najtoksičnije komponente dosad opisane – amoditoksine, na osnovu čega je zaključeno da upravo anti-Atx IgG-i imaju kritičnu ulogu u indukciji nastanka anti-*Vaa* otrov seruma visoke neutralizacijske učinkovitosti (Halassy i sur., 2008). Preliminarni rezultati proizašli iz rada sa serumima specifičnima za cijeli otrov su nam sugerirali da bi antitijela na Atx-e razvijena u dovoljnoj količini mogla imati zaštitni potencijal usporediv s onim kojeg iskazuju antitijela dobivena na različite komponente širokog spektra biokemijskih svojstava i patofarmakoloških aktivnosti. Međutim, u ED₅₀ testu kojeg smo postavili s ciljem definiranja zaštitne uloge antitijela na amoditoksine i hemoragine te njihovu kombinaciju najkvalitetnijim se pokazao kontrolni, anti-*Vaa* otrov serum visoke neutralizacijske učinkovitosti, dok su u usporedbi s njim oni specifični za Atx A iskazali iznenađujuće slabu zaštitnu moć unatoč najmanje dvaput većem sadržaju anti-Atx IgG-a (Tablica 5). Nadalje, serumi dobiveni imunizacijom kunića s ukupnom hemoraginskom frakcijom su bili potpuno neefikasni u zaštiti miševa od letalnog efekta *Vaa* otrova.

Tablica 5. Količina anti-Atx, anti-H i anti-Vaa otrov IgG-a, određena odgovarajućim ELISA testom, te neutralizacijska moć (R) anti-Atx (1-4), anti-H (5-8) i anti-Atx+H (9-12) seruma protiv letalne toksičnosti inducirane Vaa otrovom. Serum kunića imuniziranog s cijelim otrovom (anti-Vaa otrov serum) (13) je pozitivna kontrola. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SE iz tri neovisno izvedena eksperimenta.

Serum	Uzorak	Anti-Atx IgG (PJ* mL ⁻¹)	Anti-H IgG (PJ mL ⁻¹)	Anti-Vaa otrov IgG (PJ mL ⁻¹)	Zaštitna moć (R**)
anti-Atx	1	72459 \pm 3420	0	25996 \pm 477	14,45 \pm 2,51
	2	64843 \pm 1324	0	19221 \pm 104	13,65 \pm 2,14
	3	35282 \pm 841	0	12688 \pm 332	12,06 \pm 2,55
	4	73115 \pm 1953	0	19090 \pm 54	14,87 \pm 3,23
anti-H	5	0	9703 \pm 78	98865 \pm 1249	0
	6	0	10239 \pm 296	88658 \pm 2092	0
	7	0	10220 \pm 115	90540 \pm 340	0
	8	0	6289 \pm 211	54858 \pm 475	0
anti-Atx+H	9	3743 \pm 32	2573 \pm 73	13961 \pm 77	21,96 \pm 6,47
	10	10269 \pm 287	5695 \pm 68	59987 \pm 1011	14,09 \pm 1,16
	11	30879 \pm 549	11055 \pm 571	112449 \pm 3123	16,38 \pm 3,59
	12	31380 \pm 313	5244 \pm 171	62076 \pm 2381	9,88 \pm 2,25
anti-Vaa otrov	13	29965 \pm 378	5086 \pm 61	127999 \pm 1628	> 60

*proizvoljna jedinica; **R označava broj LD₅₀ doza otrova koje mogu biti neutralizirane s 1 mL nerazrijeđenog seruma.

4.1.2. PROVJERA FUNKCIONALNOSTI ANTI-ATX i ANTI-H ANTITIJELA

4.1.2.1. Funkcionalnost anti-Atx antitijela

S obzirom da ishod ED₅₀ testa nije bio u skladu s očekivanim, posumnjali smo da anti-Atx antitijela koja smo proizveli nemaju odgovarajući afinitet za farmakološki aktivnu formu amoditoksina ili da se za nju ne vežu s dovoljno jakom avidnošću, što je neophodno za njihovu efikasnu neutralizacijsku aktivnost u procesu eliminacije antigena. Naime, priprava

imunizacijske suspenzije formuliranjem Atx-a u uljnom adjuvantu mogla je narušiti njihovu tercijarnu strukturu, i posljedično, prilikom imunizacije životinja, stimulirati nastanak specifičnih IgG-a neučinkovitih ili slabo učinkovitih u prepoznavanju intaktnih molekula očuvane konformacije. Stoga je naš idući korak bio ispitati njihovu funkcionalnost procjenom sposobnosti Atx-specifičnih seruma da *in vivo* neutraliziraju letalnu toksičnost izazvanu s 3 LD₅₀ doze pročišćenog, nativnog Atx-a A. Kao i kontrolni, anti-*Vaa* otrov serum, i svi eksperimentalni serumi s anti-Atx IgG-ima, bilo oni dobiveni imunizacijom s Atx-om A, bilo oni dobiveni imunizacijom s Atx-ima u kombinaciji s hemoraginima, u testu na miševima su pokazali izrazito visoku zaštitnu učinkovitost protiv Atx-om induciranoeg patološkog efekta što nam je poslužilo kao nedvojbeni dokaz zaštitnog potencijala proizvedenih antitijela (Tablica 6).

Ukratko, unatoč zadovoljavajuće visokom titru i fiziološkoj funkcionalnosti, neutralizacijska moć koju su anti-Atx serumi iskazali u inhibiciji toksičnog učinka induciranoeg cijelim otrovom nije se pokazala zadovoljavajućom, posebno ako se uzme u obzir da je u literaturi opisano nekoliko slučajeva gdje je s antitijelima također razvijenima samo na pročišćene toksine kod pokusnih životinja uspješno postignuta rezistencija na učinak pripadajućeg zmijskog otrova primijenjenog u letalnoj dozi. Jedno od najreprezentativnijih istraživanja je provedeno s krotoksinom kao glavnim neurotoksinom vrste *Crotalus durissus* sastavljenim od bazične sPLA₂ i kiselog, katalitički inaktivnog krotapotina s funkcijom šaperona koji osigurava specifično vezanje i ciljano djelovanje farmakološki aktivne podjedinice u kompleksu čime se znatno potencira njena presinaptička toksičnost (Sampaio i sur., 2010). Npr. Freitas i suradnici (1990) su demonstrirali da prethodno provedena imunizacija miševa s krotoksinom može osigurati njihovu potpunu zaštitu od letalnog efekta izazvanog s čak 50 *i.p.* LD₅₀ doza cijelog otrova. Na njihovo istraživanje se nadovezuje ono koje su proveli Rodriguez i suradnici (2006) s izoliranim kunićjim IgG-ima specifičnima samo za njegovu PLA₂ podjedinicu čija se zaštitna efikasnost protiv otrova vrste *C. durissus* u testu na miševima pokazala čak i boljom od one koja je postignuta upotrebom komercijalnog protuotrova. Jedno od mogućih objašnjenja postignute neutralizacijske učinkovitosti anti-krotoksin seruma bi moglo biti povezano s činjenicom da su upravo krotoksin i njegovi homolozi u najvećoj mjeri zaslužni za visoki stupanj toksičnosti otrova vrste *C. durissus* povezan s njihovim neurotoksičnim, miotoksičnim i nefrotoksičnim djelovanjem (Oshima-Franco i sur., 1999; Cruz, 2009), s obzirom da, ovisno o podvrsti, sačinjavaju više od 50 % njegovog proteinskog sadržaja (Boldrini-França i sur., 2009, 2010;

Calvete i sur., 2010). Za usporedbu, u *Vaa* otrovu procijenjeni udio Atx križno reaktivnog materijala je znatno niži i, ovisno o geografskoj lokaciji, varira od 2 do 11 % (Halassy i sur., 2010). Nadalje, podjednaki uspjeh u kompletnoj inhibiciji letalne toksičnosti su postigli i Pratanaphon i suradnici (1997) koji su imunizacijom konja s potentnim postsinaptičkim neurotoksinom 3 (NK3) vrste *Naja kaouthia* konjugiranim bilo s tetanusnim, bilo s difterijskim toksoidom uspjeli pripremiti serum po neutralizacijskoj aktivnosti usporediv s onim specifičnim za cijeli otrov. Kao i krotoksin, i NK3 predstavlja visokozastupljenu komponentu koje u otrovu količinski može biti i do 30 % (Karlsson, 1979).

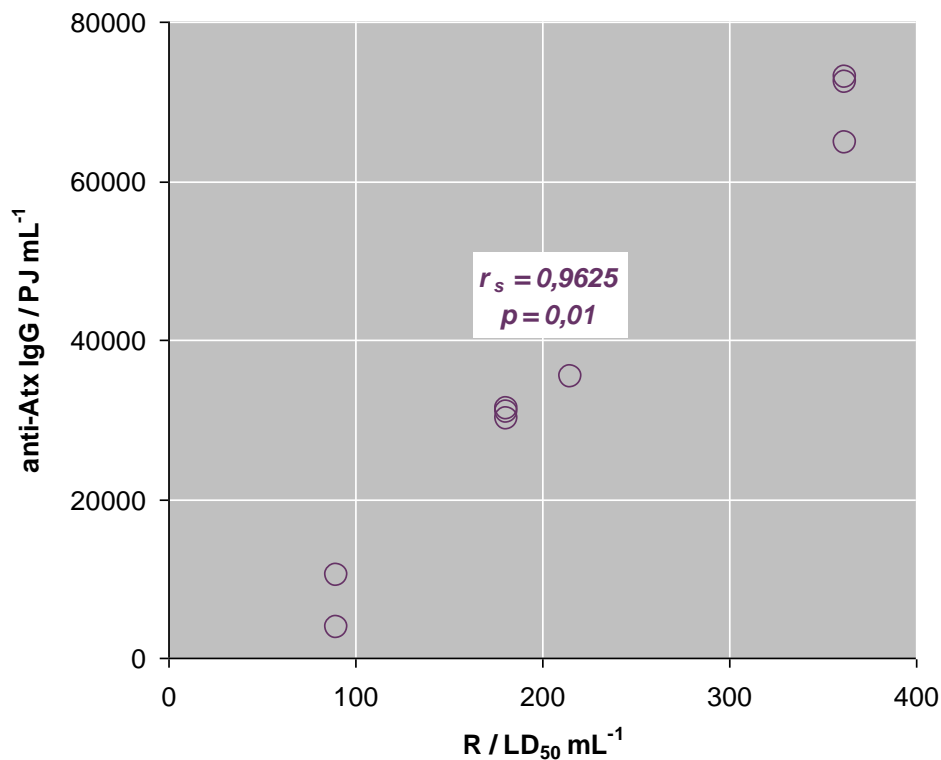
Tablica 6. Neutralizacijska moć (R) anti-Atx (1-4) i anti-Atx+H (9-12) seruma protiv letalne toksičnosti inducirane čistim Atx-om A. Anti-*Vaa* otrov serum (13) je pozitivna kontrola.

Serum	Uzorak	Anti-Atx IgG (PJ* mL ⁻¹)	Zaštitna moć (R**)
anti-Atx	1	72459	>362
	2	64843	>362
	3	35282	215
	4	73115	>362
anti-Atx+H	9	3742	91
	10	10269	91
	11	30879	181
	12	31380	181
anti- <i>Vaa</i> otrov	13	29700	181

*proizvoljna jedinica; **R označava broj LD₅₀ doza otrova koje mogu biti neutralizirane s 1 mL nerazrijeđenog seruma.

Na osnovu rezultata Spearmanovog testa korelacije rangova s 99 %-tnom sigurnošću ($p = 0,01$) smo zaključili da neutralizacijska moć seruma kunića imuniziranih s Atx-om A, odnosno kombinacijom Atx-a i ukupne hemoraginske frakcije, izražena kao R vrijednost, snažno korelira s njihovom anti-Atx IgG količinom (PJ mL⁻¹) (Slika 13). Znači, kunićji serum u kojima smo detektirali veći sadržaj specifičnih antitijela na Atx-e nego u

kontrolnom, *Vaa* otrov-specifičnom serumu, u usporedbi s njim ispoljili su i znatno bolju zaštitnu moć te bili učinkovitiji u zaštiti od toksičnosti izazvane s letalnom dozom Atx-a A.



Slika 13. Povezanost između zaštitne učinkovitosti (R) anti-Atx i anti-Atx+H seruma protiv letalne toksičnosti inducirane čistim Atx-om A i količine njihovih IgG-a specifičnih za Atx-e određena Spearmanovim testom korelacije rangova ($p = 0,01$; $df = 7$).

Zbog relativno slabog doprinosa funkcionalnih anti-Atx antitijela u neutralizaciji sveukupnog letalnog učinka *Vaa* otrova došli smo do zaključka da njegov proteom najvjerojatnije sadrži još neopisane komponente s toksičnim efektom po snazi usporedivim s onim kojeg iskazuje Atx A kao najletalnija molekula dosad opisana te da stupanj njihove međusobne križne reaktivnosti, ako i postoji, nije dovoljan za postizanje protektivne efikasnosti na razini one koju pokazuje anti-*Vaa* otrov serum kao pozitivna kontrola. Naime, proteom *Vaa* otrova, čija je izrazita kompleksnost potvrđena kombinacijom 2D elektroforeze i MS/MS analize, sačinjava minimalno 139 različitih proteina svrstanih među sekrecijske fosfolipaze iz skupine A₂, metaloproteinaze, serinske proteinaze, L-amino oksidaze, sekrecijske proteine bogate cisteinom, disintegrine te faktore rasta (Georgieva i sur., 2008). Međutim, farmakološka svojstva najvećeg dijela identificiranih molekula kao i njihov značaj u envenomacijskoj patologiji još uvijek nisu razotkriveni. Također, drugo moguće objašnjenje je da Atx A kao presinaptički neurotoksin u indukciji patofiziološkog učinka ne djeluje

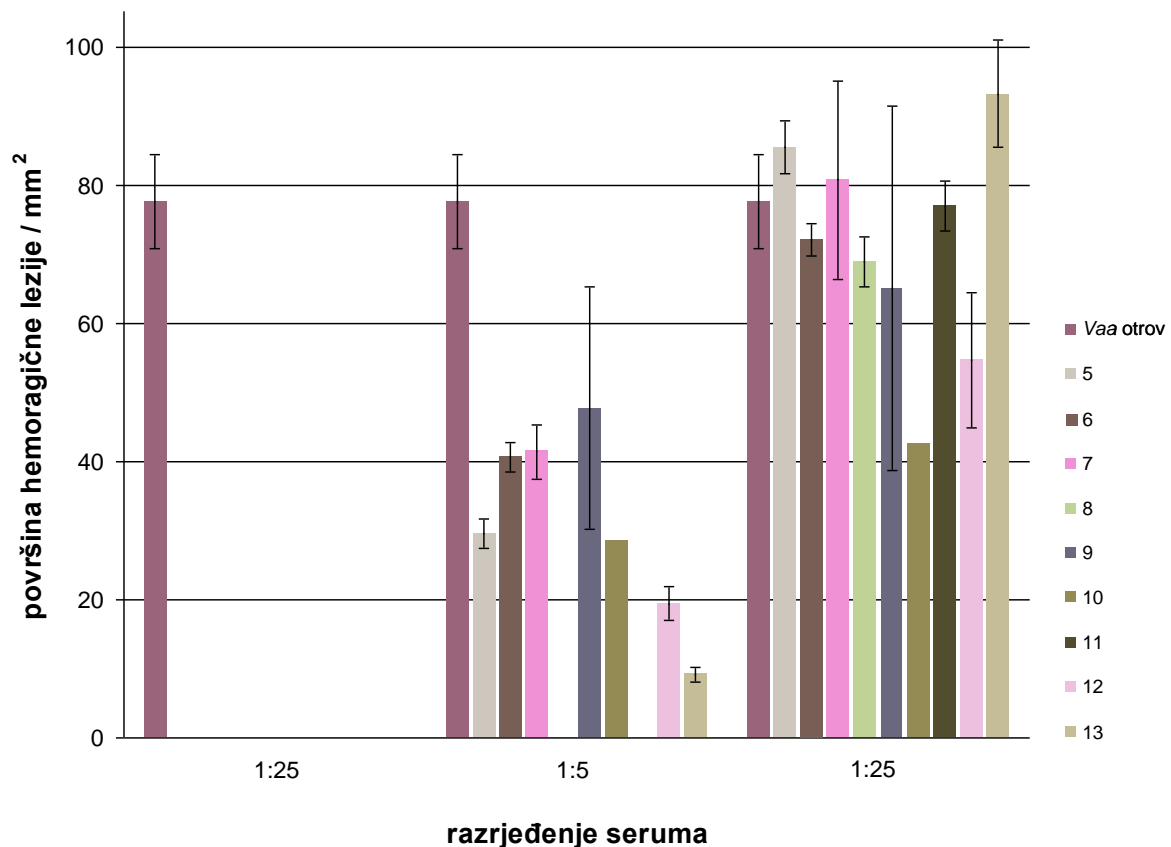
samostalno kao monomer, već u nekovalentnom kompleksu s dodatnim proteinskim faktorom koji zaklanja njegove epitope i onemogućuje vezanje neutralizirajućih antitijela. Naime, dimeri/oligomeri sastavljeni od najmanje jedne podjedinice s fosfolipaznom aktivnošću i funkcionalno različite molekule koja modulira njenu biološku aktivnost nisu neuobičajena pojava u otrovima zmija, osobito onih evolucijski mlađih iz porodice *Viperidae* (Betzel i sur., 1999; Kini 2003; Doley i Kini, 2009). Ujedno su karakteristični i za podvrstu *V. a. ammodytes* u čijem su otrovu Georgieva i suradnici (2008) zasad potvrdili prisutnost samo jednog takvog kompleksa identičnog/homolognog vipoksinu. Vipoksin je prvobitno identificiran isključivo u otrovu srodne podvrste *V. a. meridionalis* (Bardarov i Aleksiev, 2002). Njegova enzimski aktivna podjedinica disocirana od inhibitora se smatra jednom od najtoksičnijih fosfolipaza podrijetlom iz zmijskih otrova uopće (Perbandt i sur., 1997; Georgieva i sur., 2003).

4.1.2.2. Funkcionalnost anti-H antitijela

Hemoragične Zn^{2+} -ovisne metaloproteinaze, za razliku od fosfolipaza A_2 neurotoksičnog djelovanja kojima pripadaju i amoditoksini, u pravilu same po sebi ne iskazuju patofiziološki učinak koji bi rezultirao smrtnim ishodom, već najvjerojatnije djeluju sinergistički s ostalim komponentama kako bi potencirale sveukupnu letalnost otrova. Npr. poznato je da upravo njihova najnaglašenija biološka aktivnost koja se prilikom otrovanja očituje kao strukturna destabilizacija mikrovaskulature ostalim toksinima omogućuje izuzetno brzo i neometano širenje po cirkulaciji čime se u kratkom vremenskom periodu postiže akumulacija štetnih sistemskih efekata (Anai i sur., 2002). Iz tog razloga smo očekivali da će u neutralizacijskom eksperimentu na miševima hemoragin-specifična antitijela barem dijelom povećati otpornost pokusnih životinja na letalni efekt induciran cijelim otrovom, međutim, anti-H serumi su se pokazali potpuno nedjelotvornima (Tablica 5). Zaštitni doprinos anti-Atx+H seruma je bio podjednak onom kojeg su iskazali anti-Atx serumi iz čega proizlazi da njihova neutralizacijska moć potječe samo od antitijela razvijenih na Atx-e. S obzirom da je rezultat ED_{50} testa doveo u pitanje kvalitetu pripremljenih anti-H antitijela, prije donošenja konačnog zaključka o potpunom izostanku njihove uloge u postizanju barem djelomične zaštite protiv letalne toksičnosti *Vaa* otrova, u idućem koraku smo provjerili njihovu funkcionalnost u biološkom i biokemijskom testu.

Kao mjera fiziološke djelotvornosti anti-H antitijela ispitane *in vivo* testom nam je poslužila sposobnost hemoragin-specifičnih seruma da neutraliziraju lokalno izraženi efekt *Vaa* otrova čijom se intradermalnom aplikacijom s unutrašnje strane kože štakora razvijaju

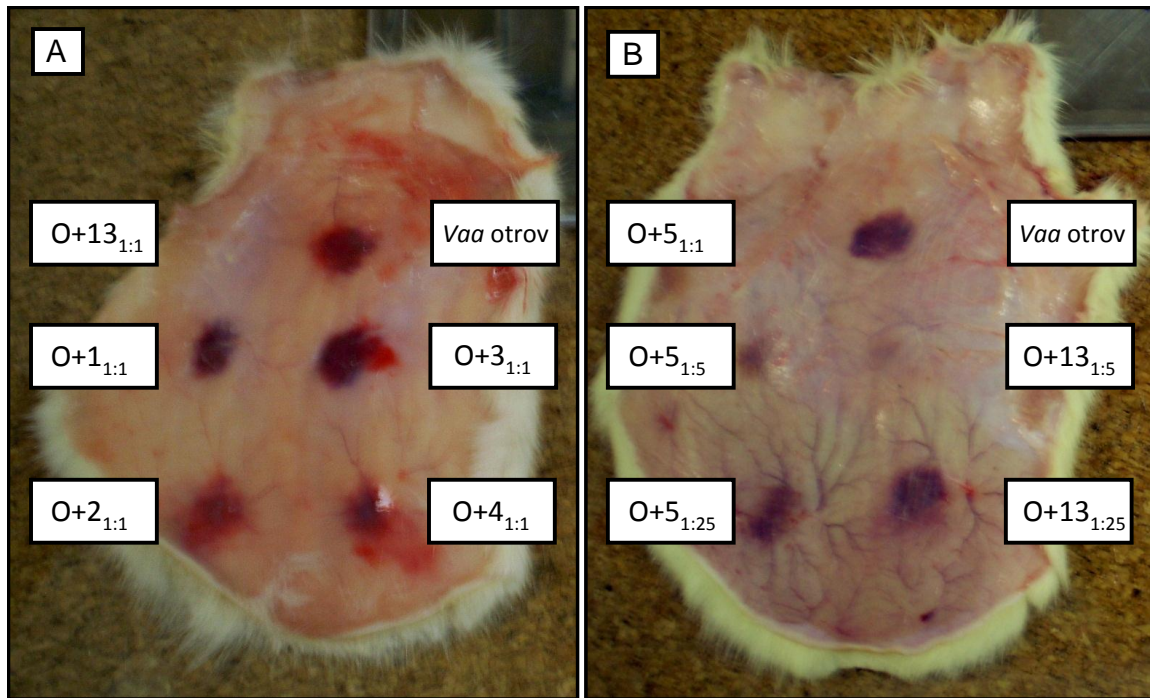
patološke promjene u obliku jasno vidljivih i lako mjerljivih hemoragičnih lezija. Dobiveni rezultati su pokazali da su svi pripremljeni anti-H i anti-Atx+H serumi po zaštitnom potencijalu usporedivi s anti-*Vaa* otrov serumom (Slika 14, Tablica 7, Slika 15B) s obzirom da su u nerazrijeđenom obliku sa 100 %-tnom efikasnošću uspjeli spriječiti eksperimentalno izazvanu hemoragičnost cijelog otrova. Nadalje, većina analiziranih hemoragin-specifičnih seruma, jednako kao i pozitivna kontrola, u razrjeđenju od 1:5 eksprimirala je djelomičnu neutralizacijsku učinkovitost, neovisnu o količini izmjerenih anti-H IgG-a, koja je tek njihovim daljnjim razrjeđivanjem zamjetno oslabila ili potpuno izostala. Naprotiv, kod kunićjih seruma s antitijelima samo na Atx-e nismo uočili nikakav zaštitni doprinos (Tablica 3, Slika 15A).



Slika 14. *In vivo* test neutralizacije hemoragične aktivnosti *Vaa* otrova testiranog u količini koja sadrži približno 2,2 MHD ($m = 50 \mu\text{g}$) s nerazrijeđenim te 5 i 25 puta razrijeđenim anti-H i anti-Atx+H serumima. Svaki stupac predstavlja srednju površinu hemoragičnih lezija izazvanih samim otrovom, odnosno otrovom preinkubiranim s određenim anti-H (5-8), anti-Atx+H (9-12) te kontrolnim, anti-*Vaa* otrov serumom (13), a okomita linija standardnu grešku ($n = 2$).

Tablica 7. Neutralizacija hemoragične aktivnosti *Vaa* otrova s nerazrijeđenim te 5 i 25 puta razrijeđenim serumima kunića imuniziranih s Atx-om A (1-4), ukupnom hemoraginskom frakcijom (5-8), odnosno kombinacijom Atx-a i hemoragina (9-12). Anti-*Vaa* otrov serum (13) je pozitivna kontrola. Rezultati su izraženi kao $[(P_O - P_{O+S}) / (P_O)] * 100 \pm SE$, gdje P_O predstavlja srednju vrijednost površine lezija izazvanih samim otrovom, a P_{O+S} srednju vrijednost površine lezija izazvanih otrovom preinkubiranim s određenim serumom. Neutralizacijski učinak svakog seruma je testiran na 2 štakora ($n = 2$) te, gdje god je bilo moguće, izračunata je standardna greška.

Serum	Uzorak	Neutralizacija hemoragične aktivnosti [%]		
		Razrjeđenje seruma		
		1:1	1:5	1:25
anti-Atx	1	0	/	/
	2	0	/	/
	3	0	/	/
	4	0	/	/
anti-H	5	100	61,8 ± 4,3	0
	6	100	47,7 ± 5,3	7,2 ± 8,7
	7	100	46,6 ± 6,9	0
	8	100	100	11,4 ± 9,1
anti-Atx+H	9	100	38,5 ± 23,2	16,2 ± 34,7
	10	100	63,3	45,1
	11	100	100	0
	12	100	74,9 ± 3,8	29,7 ± 14,1
anti- <i>Vaa</i> otrov	13	100	88,1 ± 1,7	0



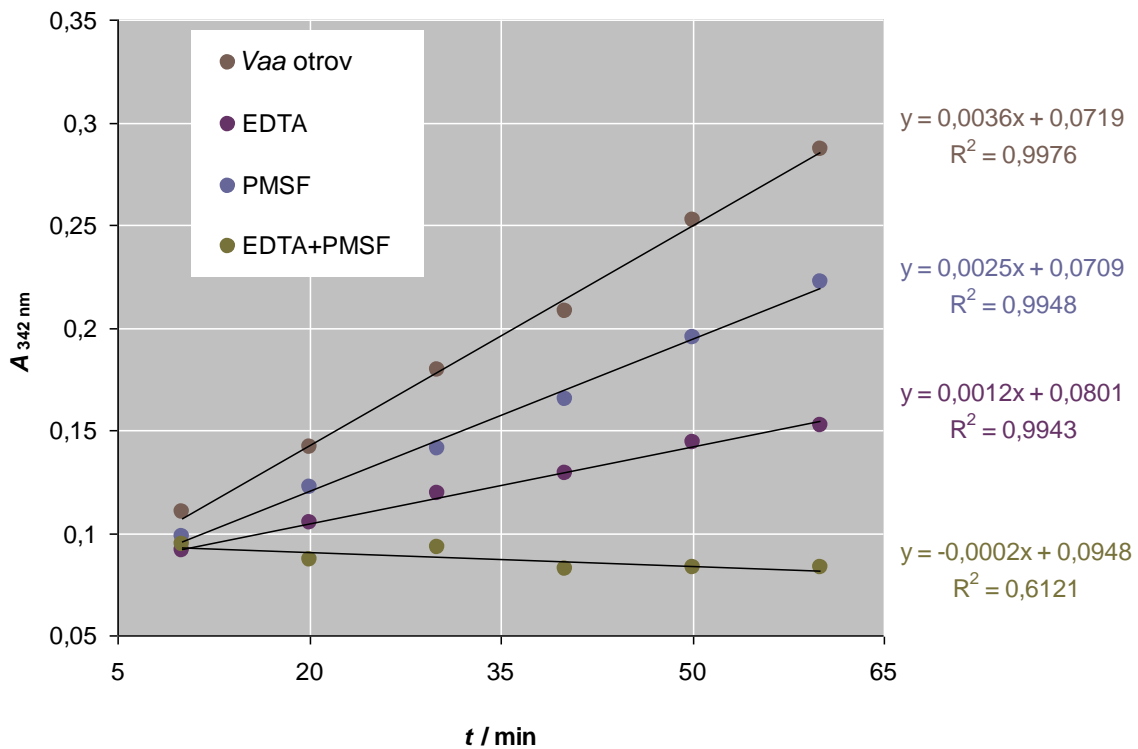
Slika 15. Reprezentativni rezultat *in vivo* testa neutralizacije hemoragične aktivnosti *Vaa* otrova testiranog u količini koja sadrži približno 2,2 MHD ($m = 50 \mu\text{g}$) izvedenog na štakorima. (A) Nerazrijeđeni serumi kunića imuniziranih s Atx-om A ($\text{O}+1_{1:1}$, $\text{O}+2_{1:1}$, $\text{O}+3_{1:1}$, $\text{O}+4_{1:1}$) nisu neutralizirali hemoragičnost. (B) Nerazrijeđeni serum kunića imuniziranog s H (5) u potpunosti je neutralizirao hemoragičnost ($\text{O}+5_{1:1}$), u razrjeđenju od 1:5 neutralizacija je bila djelomična ($\text{O}+5_{1:5}$), a u razrjeđenju od 1:25 neutralizacijski učinak je sasvim izostao ($\text{O}+5_{1:25}$). Otrovi preinkubirani s 5 ($\text{O}+13_{1:5}$), odnosno 25 puta razrijeđenim anti-*Vaa* otrov serumom ($\text{O}+13_{1:25}$) je služio kao pozitivna kontrola.

Osim što nam je pružio pouzdanu potvrdu funkcionalnosti proizvedenih anti-H seruma, *in vivo* test neutralizacije hemoragične aktivnosti ujedno je demonstrirao i da su za zaštitnu učinkovitost protiv eksperimentalno inducirane hemoragičnosti *Vaa* otrova ključna samo antitijela specifična za njegovu ukupnu hemoraginsku frakciju koja su sama po sebi dostatna za postizanje kompletne inhibicije, najvjerojatnije uz uvjet da su prisutna u dovoljnoj količini. Bitno je naglasiti da je izvedeni zaključak primjenjiv samo u laboratorijskom okruženju, međutim, u određenoj mjeri dozvoljava ekstrapolaciju i na realnu kliničku situaciju, s obzirom da prema epidemiološkim studijama kod ljudi kao žrtava ugriza zmiya iz podporodice *Viperinae* upravo hemoragični efekt predstavlja dominantnu patologiju otrovanja manifestiranu kao naglašeno istjecanje krvi u okolno tkivo, i posljedično, ekstenzivno oticanje ugrizenog dijela tijela koje u težim slučajevima otrovanja zahvaća i trup (Reid, 1976; Theakston i Reid, 1976; Karlson-Stiber i Persson; 1994; Radonić i sur., 1997; Frangides i sur.,

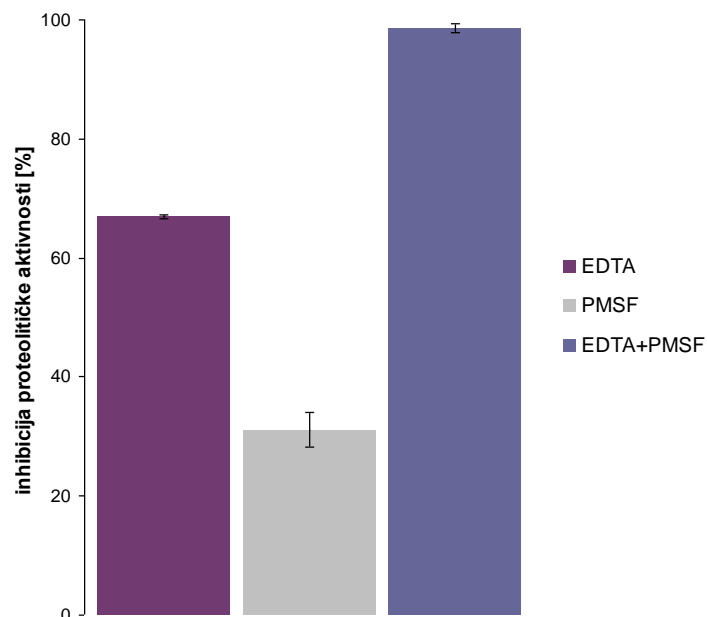
2006; Karlson-Stiber i sur., 2006; Lukšić i sur., 2006; Warrell, 2005; de Haro i sur., 2009; Chippaux, 2012). Kako su navedeni simptomi najvećim dijelom posljedica oštećenja mikrovaskulature za koje je zaslužno proteolitičko djelovanje metaloendopeptidaza iz otrova (Gutiérrez i Rucavado, 2000; Gutiérrez i sur., 2005; Escalante i sur., 2011), njihova imunogenost bi mogla predstavljati kritični čimbenik u dobivanju terapijski učinkovitih protuotrova visokog sadržaja neutralizirajućih anti-H antitijela kao aktivnom komponentom s izravnim doprinosom u liječenju patologije otrovanja.

Svojstvo hemoragičnosti zmijskih otrova izravno proizlazi iz enzimske aktivnosti njihovih metaloendopeptidaza (Fox i Serrano, 2009). Stoga nam se učinilo relevantnim serume s anti-H IgG-ima analizirati i u kontekstu njihove sposobnosti da inhibiraju hidrolitičko djelovanje *Vaa* otrova *in vitro*, koristeći azokazein kao nespecifični supstrat. Primarni cilj nam je bio izmjeriti neutralizacijski potencijal antitijela pripremljenih imunizacijom kunića s ukupnom hemoraginskom frakcijom upotrijebiti kao dodatnu potvrdu njihove funkcionalnosti, uspješno demonstriranu biološkim testom. Kao što smo ustanovili prilikom uspostavljanja eksperimentalnih uvjeta, PMSF, inhibitor serinskih proteinaza, reducira približno 30 %, a Na₂EDTA, inhibitor Zn²⁺-ovisnih metaloproteinaza, oko 70 % proteolitičke aktivnosti *Vaa* otrova. Njihovom simultanom administracijom se postiže 100 %-tna inaktivacija azokazeinolize (Slika 16) što je u skladu s literaturnim podacima koji navode da su za sveukupno hidrolitičko djelovanje otrova zmijska u osnovi zaslužni upravo pripadnici tih dviju proteinskih obitelji (Bjarnason i Fox, 1994; Siigur i sur., 2001b; Paes Leme i sur., 2011), s obzirom da su svi postojeći dokazi o mogućem doprinosu ostalih tipova proteinaza, prvenstveno aspartatnih i tiolnih, zasad samo indirektni i nedovoljno uvjerljivi (Matsui i sur., 2000). Da bi eliminirali frakciju enzimske aktivnosti koja potječe od serinskih proteinaza i, posljedično, povećali osjetljivost primijenjenog testa inhibicije, kao proteolitički agens smo upotrijebili cijeli otrov prethodno obrađen PMSF-om. Kao što je vidljivo iz Slike 17, kontrolni, anti-*Vaa* otrov serum je iskazao potpuni neutralizacijski učinak njegovog rezidualnog hidrolitičkog djelovanja. Međutim, svi analizirani serumi specifični za ukupnu hemoraginsku frakciju su se pokazali podjednako efikasima, neovisno o sadržaju njihovih anti-H IgG-a, neočekivano reducirajući u prosjeku samo $73,6 \pm 1,2$ % proteolitičke aktivnosti PMSF-om tretiranog otrova za koju su zaslužne isključivo Zn²⁺-ovisne metaloproteinaze čije hemoragično djelovanje u testu na pokusnim životinjama, naprotiv, neutraliziraju u potpunosti.

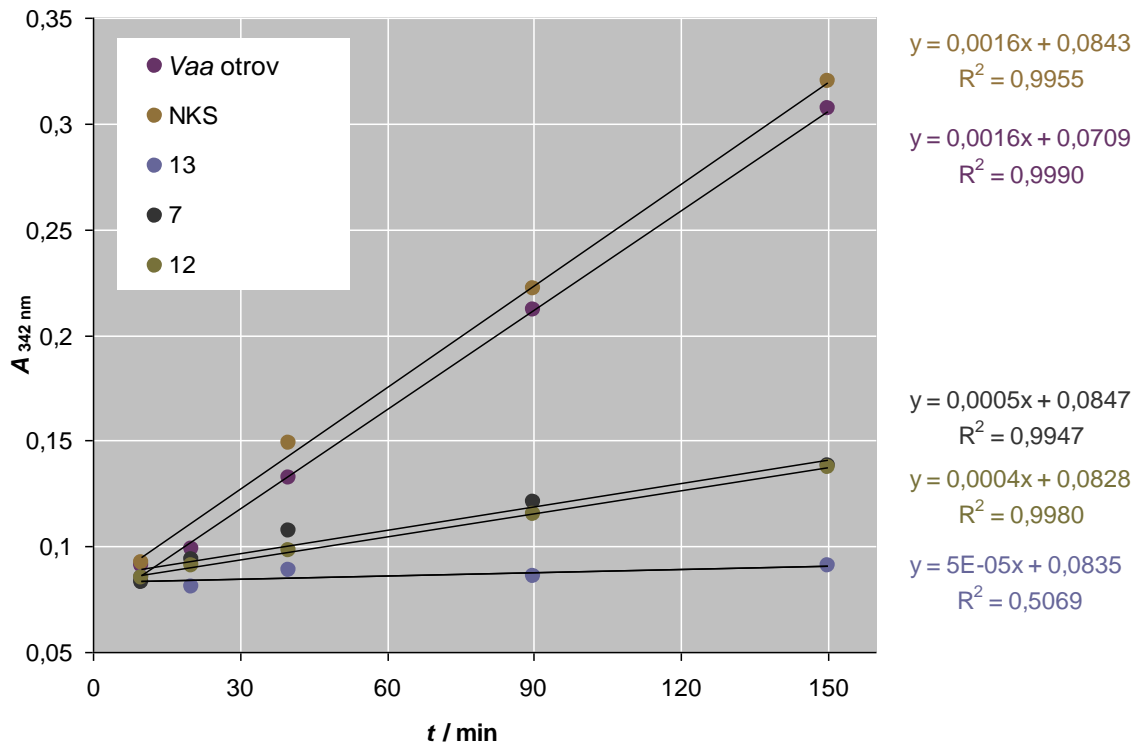
A



B



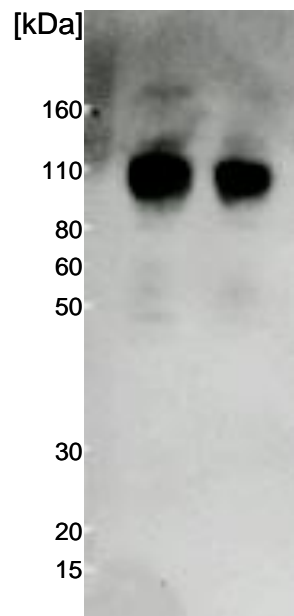
Slika 16. Proteolitička aktivnost *Vaa* otrova. (A) Intenzitet nastalog obojenja kojim rezultira hidrolitička reakcija na azokazeinu izmjereno je na 342 nm ($A_{342 \text{ nm}}$) i prikazan u ovisnosti o vremenu inkubacije. Nagib dobivenog pravca je korišten kao mjera proteolitičke aktivnosti. (B) Proteolitička aktivnost otrova inhibiranog s PMSF-om i/ili Na_2EDTA ($c = 0,005 \text{ mmol dm}^{-3}$) prikazana je relativno u odnosu na intaktni otrov kojem je pripisano 100 % proteolitičke aktivnosti. Test je izveden tri puta i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SE.



Slika 17. Reprezentativni rezultat određivanja inhibicije proteolitičke aktivnosti *Vaa* otrova. U svakom setu eksperimenata PMSF-om inhibirani otrov je preinkubiran s ispitivanim anti-H, odnosno anti-Atx+H serumima. U pojedinačnim analizama usporedno su testirana dva seruma te pozitivna (anti-*Vaa* otrov serum) i negativna kontrola (serum neimuniziranog kunića, normalni kunićji serum; NKS). U prikazanom primjeru anti-*Vaa* otrov serum (13) u potpunosti je inhibirao proteolitičku aktivnost – njegov pravac nema nagib, negativni kontrolni serum je dao pravac s istim nagibom kao i sam otrov, dok su dva testirana anti-H seruma (7 i 12) iskazali djelomični neutralizacijski učinak – nagibi njihovih pravaca su veći od onog dobivenog s pozitivnom kontrolom te znatno manji od onih koji su dobiveni s NKS-om, odnosno samim otrovom.

Jedno od najvjerojatnijih objašnjenja za uočenu nedosljednost u izmjerenoj *in vivo*, odnosno *in vitro* funkcionalnoj djelotvornosti anti-H antitijela bi moglo biti sljedeće. Naime, opće je poznato da metaloproteinaze P-I grupe koje posjeduju samo katalitičku, metaloproteinaznu domenu, unatoč tome što su generalno izuzetno učinkovite kao proteinaze aktivne na širokom spektru supstrata, u životinjskom modelu uglavnom ekspiriraju ili iznimno slabi hemoragični fenotip ili uopće ne induciraju pojavu hemoragija (Bernardes i sur., 2008; Gomes i sur., 2009, 2011; Oliveira i sur., 2009; Patiño i sur., 2010; Naves de Souza i sur., 2012). P-I metaloproteinaze su identificirane i u *Vaa* otrovu (Georgieva i sur., 2008). Iako u literaturi trenutačno nema raspoloživih eksperimentalnih podataka o biološkim

aktivnostima koje iskazuju, s obzirom da još ni jedna nije izolirana u pročišćenom obliku, Leonardi i suradnici (2001) su demonstrirali da hemoragičnost cijelog otrova u osnovi nije povezana s niskomolekulskim proteinima što ujedno isključuje mogućnost njihovog hemoragičnog djelovanja. Nadalje, ako se uzme u obzir da smo za pripremu anti-H seruma pokusne životinje imunizirali s ukupnom hemoraginskom frakcijom koja sadrži proteine čiji raspon molekularnih masa od 50 do 100 kDa implicira da je najvjerojatnije riječ o metaloproteinazama P-III grupe, vrlo je izgledno da za njih specifična antitijela nisu učinkovita u prepoznavanju P-I pripadnika koji onda i u njihovoj prisutnosti zadržavaju sposobnost hidrolitičkog djelovanja. Pretpostavku o izostanku križne reaktivnosti između članova tih dviju grupa smo potvrdili i western blot analizom cijelog *Vaa* otrova izvedenom s reprezentativnim serumom specifičnim za ukupnu hemoraginsku frakciju (7) koja je pokazala da anti-H antitijela prepoznaju isključivo proteinske komponente molekularnih masa većih od 50 kDa, a prvenstveno one visokomolekulske od oko 100 kDa (Slika 18). Ukratko, dobiveni rezultati sugeriraju da pripremljeni anti-H serumi imaju sposobnost potpune neutralizacije hemoragičnog efekta otrova zahvaljujući njihovoj visokoj imunospecifičnosti za hemoraginske epitope. S druge strane, njegovo hidrolitičko djelovanje mogu inhibirati samo u određenoj mjeri jer nehemoragične, i unatoč tome, proteolitički aktivne metaloproteinaze prepoznaju izuzetno slabo ili ih uopće ne prepoznaju.



Slika 18. Western blot analiza *Vaa* otrova

($m = 10 \mu\text{g}$ u prvoj, odnosno $m = 20 \mu\text{g}$ u drugoj liniji) s anti-H serumom (7).

Međutim, uvjerljivost ponuđenog objašnjenja fenomena opaženog na primjeru *Vaa* otrova čiji članovi P-III grupe nisu križno reaktivni sa svojim strukturno jednostavnijim P-I homolozima gubi na snazi ako se uzme u obzir da visoko konzervirane katalitičke domene svih metaloproteinaza, neovisno o grupi kojoj pripadaju, karakterizira izniman stupanj sličnosti (Jia i sur., 1996) i s postojećim saznanjima ga možemo razjasniti samo ako problem sagledamo u svjetlu relevantnih istraživanja drugih autora. Npr. sličnu pojavu su prilikom razvoja brze metode za izolaciju metaloproteinaza iz otrova vrste *Bothrops jararaca* uočili i Oliveira i suradnici (2009) koji su pokazali da antitijela specifična za HF3 iz P-III grupe u western blot analizi uopće ne reagiraju s BJ-PI iz P-I grupe, iako su učinkovita u prepoznavanju preostala dva ispitana P-III predstavnika – botropasina te DC proteina s autoliziranim metaloproteinaznom domenom. Njihov rezultat je u skladu s onim Howesa i suradnika (2005) proizašlim iz komparativne studije relativne imunogenosti triju Zn^{2+} -ovisnih metaloproteinaza iz otrova vrste *Echis ocellatus*, jedne nehemoragične iz P-I grupe nazvane EoVMP1, i dviju hemoragičnih iz P-III grupe, nazvanih EoVMP2, odnosno EoVMP3. Naime, serum kojeg su autori pripravili imunizacijom kunića s EoVMP1 se pokazao efikasnim u prepoznavanju sva tri pročišćena proteina, dok je onaj specifičan za EoVMP2 reagirao samo sa svojim pripadnim antigenom kao i s EoVMP3. Na osnovu dobivenih rezultata Howes i suradnici su pretpostavili da domena nalik disintegrinskoj, odnosno domena bogata cisteinom kao motivi karakteristični za P-III članove posjeduju znatno veći stupanj imunogenosti u usporedbi s metaloproteinazom s kojom najvjerojatnije ne dijele zajedničke epitope zbog čega antitijela razvijena na dodatne segmente metaloproteinaza višeg reda strukturne organizacije nisu imunoreaktivna s onim koji je antigenski konzerviran među pripadnicima obiju grupa. Njihovu pretpostavku podupire nekolicina drugih, neovisno provedenih istraživanja. Npr. Tanjoni i suradnici (2003a, 2003b) su s ciljem identifikacije filogenetski konzerviranih i funkcionalno bitnih epitopa u Zn^{2+} -ovisnim metaloproteinazama razvili monoklonska antitijela (MoAt) specifična za različite regije u disintegrinskoj domeni jararagina, hemoragičnog P-III predstavnika iz otrova vrste *B. jararaca*. S jednim od pripremljenih MoAt označenim kao MAJar 3 autori su uspjeli postići potpunu neutralizaciju hemoragičnog efekta izazvanog širokim spektrom otrova zmija iz roda *Bothrops* što su pripisali njegovom visokom i ekskluzivnom afinitetu za njihove metaloproteinazne komponente molekulskih masa uskog raspona od 50 do 80 kDa – pripadnike P-III grupe i najpotentnije hemoragične faktore. Nadalje, do istog zaključka su došli Harrison i suradnici (2000, 2003) koji su demonstrirali da je za neutralizaciju više od 70 % hemoragične aktivnosti cijelog otrova vrste *B. jararaca* posredovanu antitijelima induciranim imunizacijom miševa s plazmidom koji kodira za

nekatalitičke domene jararhagina također zaslužna njihova imunološka reaktivnost usmjerena isključivo prema antigenima podudarnih molekulskih masa (50-60 kDa) i različitih izoelektričnih točaka. I konačno, u svom radu Fernandes i suradnici (2010) su kao mogući razlog neefikasne neutralizacije hemoragičnosti otrova vrste *Bothrops asper* s monoklonskim antitijelima proizvedenima na njegovu P-I metaloproteinazu, tzv. BaP1, naveli odsutnost ili nedostupnost za njih specifičnih epitopa u metaloproteinaznoj domeni strukturno kompleksnijih P-III članova dominantno odgovornih za sveukupno hemoragično djelovanje. Iz naših rezultata također proizlazi da su dodatne domene metaloproteinaza P-III grupe u kontekstu imunogenosti superiornije u odnosu na onu metaloproteinaznu zbog čega ih ne odlikuje križna reaktivnost s onima P-I grupe, ili alternativno, da metaloproteinazne domene P-I i P-III članova ne dijele zajedničke konzervirane strukturne epitope. Dok za komparativnu imunokemijsku analizu domena Zn^{2+} -ovisnih metaloproteinaza *Vaa* otrova ne budemo u pročišćenom obliku raspolagali s barem jednom koja bi po strukturnim osobitostima bila klasificirana u P-I grupu, obje mogućnosti ostaju otvorenima.

4.1.3. Implikacije nedostatnosti ED_{50} testa u kontroli kvalitete protuootrova

ED_{50} test predstavlja zlatni standard za vrednovanje kvalitete i predkliničke efikasnosti protuootrova općenito (WHO, 2010) i jedinu regulatorno priznatu metodu za rutinsku procjenu potencije protuootrova protiv ugriza europskih otrovnica (Ph. Eur., 2010). Kao takav se primarno koristi u svrhu detekcije antitijela različitih, iako nedefiniranih specifičnosti, koja predstavljaju njihovu aktivnu komponentu zaslužnu za neutralizaciju različitih aspekata kliničkih simptoma otrovanja. U našem istraživanju se pokazao pogodnim i za definiranje zaštitne uloge seruma specifičnih za amoditoksine i hemoragine kao dviju glavnih grupa toksina prisutnih u *Vaa* otrovu. Kako se ispostavilo, potpuno funkcionalna antitijela specifična za amoditoksine su odgovorna za neutralizaciju dijela njegove letalne toksičnosti, dok ona specifična za hemoragine uopće ne osiguravaju protekciju iako su, s druge strane, u životinjskom pokusnom modelu sama po sebi dostatna za neutralizaciju hemoragičnog efekta induciranog cijelim otrovom. Posljedično, dobiveni rezultat implicira da u slučaju protuootrova specifičnog za *Vaa* otrov *in vivo* test na miševima zbog neodgovarajuće osjetljivosti nije pogodan za mjerenje antitijela koja se prilikom imunizacije razvijaju na onu frakciju čije se sudjelovanje u envenomacijskoj patogenezi kod ljudi smatra vrlo izglednim te da kao takav s regulatorne točke gledišta ne ispunjava svoj primarni zadatak. Problematika sve evidentnijih fizioloških ograničenja *in vivo* testova koji prethode puštanju protuootrova na tržište i,

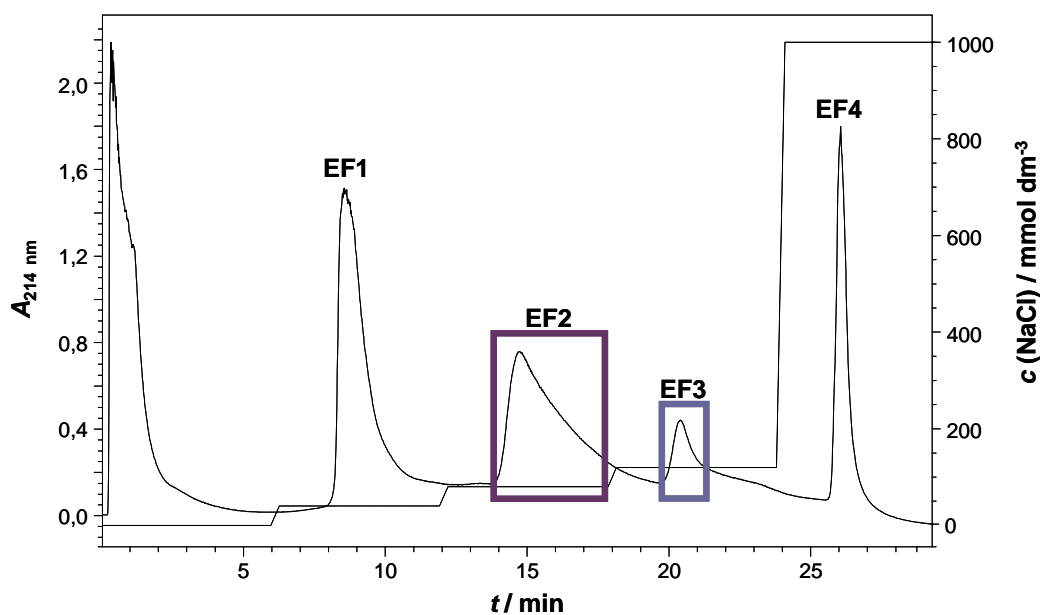
posljedično, njihova loša korelacija s efikasnošću terapije u stvarnom kliničkom okruženju, u literaturi je već dokumentirana (Isbister, 2010; WHO, 2010; Theakston i sur., 2003). U svjetlu postojećih indikacija o slabostima mišjeg testa neutralizacije letalne toksičnosti naš nalaz na primjeru *Vaa* otrova pruža samo još jednu eksperimentalnu potvrdu njegove nedostatnosti u kontroli kvalitete protuotrova protiv ugriza onih zmija čiji otrovi, osim neurotoksičnog, induciraju i neke druge medicinski relevantne efekte.

4.2. BIOKEMIJSKA, BIOLOŠKA I PATOFIZIOLOŠKA SVOJSTVA Zn^{2+} -OVISNE METALOPROTEINAZE IZ OTROVA POSKOKA TE ULOGA ZA NJU SPECIFIČNIH ANTITIJELA U NEUTRALIZACIJI HEMORAGIČNOSTI

Iz *Vaa* otrova je dosad pročišćeno i biokemijski okarakterizirano nekoliko Zn^{2+} -ovisnih metaloproteinaza varijabilnih bioloških aktivnosti (Leonardi i sur., 2001, 2007, 2008) koje najvjerojatnije u značajnoj mjeri doprinose njegovom hemoragičnom djelovanju. Međutim, neutralizacijska učinkovitost za njih specifičnih antitijela nikad nije sustavno istraživana, što predstavlja ozbiljan propust s obzirom da bi njeno poznavanje moglo predstavljati jedan od kritičnih čimbenika u dobivanju protuotrova poboljšane kvalitete, potencije i sigurnosti. Uzevši u obzir potpuni nedostatak literaturnih podataka o imunogenosti komponenti odgovornih za patološki efekt koji se kod otrovanja manifestira kao hemoragija, u drugom dijelu našeg istraživanja usredotočili smo se na doprinos antitijela specifičnih samo za jedan izdvojeni protein hemoragičnog fenotipa u neutralizaciji ukupne hemoragičnosti eksprimirane od strane *Vaa* otrova. Kao antigen za imunizaciju kunića i pripremu specifičnog seruma upotrijebili smo još neopisanu Zn^{2+} -ovisnu metaloproteinazu. Osim što smo razvili metodu za njeno pročišćavanje i identifikaciju, ujedno smo je podvrgnuli i sustavnoj stuktornoj te funkcionalnoj analizi, u prvom redu kako bi razotkrili biokemijsku i biološku podlogu njene hemoragičnosti te na taj način pridonijeli razumijevanju mehanizma koji se nalazi u osnovi patološkog djelovanja metaloproteinaza podrijetlom iz zmijskih otrova općenito. Također, karakterizacija novog farmakološki aktivnog proteina u širem kontekstu bi se mogla pokazati značajnom i u procesu unaprijeđenja postojećeg imunizacijskog protokola koji se primjenjuje u svrhu dobivanja protuotrova, s obzirom da upravo uvid u proteomsku kompleksnost otrova kao i definiranje imunogenih svojstava njihovih glavnih toksičnih komponenti predstavljaju neke od nužnih preduvjeta optimizacije proizvodnog procesa i dobivanja konačnog produkta visoke terapijske učinkovitosti (Rucavado i sur., 2004).

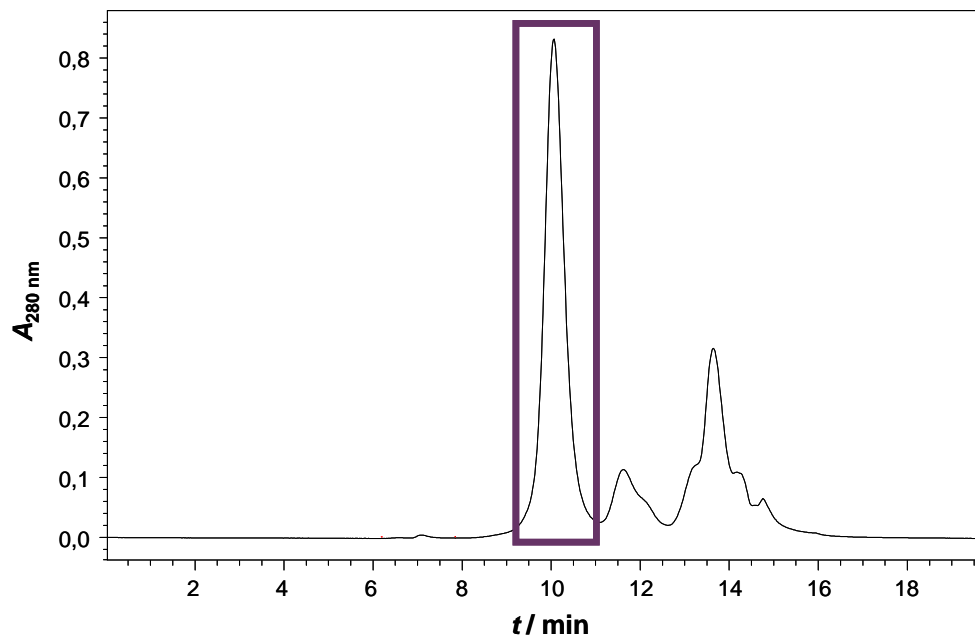
4.2.1. PROČIŠĆAVANJE I BIOKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA

Zn^{2+} -ovisnu metaloproteinazu purificirali smo do homogenosti kombinacijom dviju kromatografskih tehnika – kationske izmjene i gel-filtracije. U prvom koraku *Vaa* otrov smo otopili u puferu za vezanje, nanijeli na CM CIM diskove pri bazičnim uvjetima ($pH = 9,0$) i frakcionirali stupnjevitim gradijentom rastuće koncentracije soli (Slika 19). U drugom koraku vezani materijal eluiran s natrijevim kloridom koncentracije $c = 80 \text{ mmol dm}^{-3}$ (EF2), odnosno $c = 120 \text{ mmol dm}^{-3}$ (EF3) dodatno smo pročistili gel-filtracijskom kromatografijom na TSK-GEL koloni (Slika 20). U oba slučaja kromatografski pik s najkraćim retencijskim vremenom sadržavao je čisti protein kojeg smo nazvali amoditagin, uzevši u obzir njegovo podrijetlo – otrov vrste *ammodytes*, i dominantnu biološku aktivnost isprofiliranu kroz daljnje eksperimente – hemoragičnost. Metoda se pokazala izuzetno učinkovitom s prosječnim prinomom od 1,99 % (w / w) izračunatim na osnovu omjera količine amoditagina dobivene iz pet uzastopno provedenih izolacijskih postupaka i početne količine upotrijebljenog materijala, a koji ujedno ukazuje i na relativno visoku zastupljenost izoliranog toksina u *Vaa* otrovu.

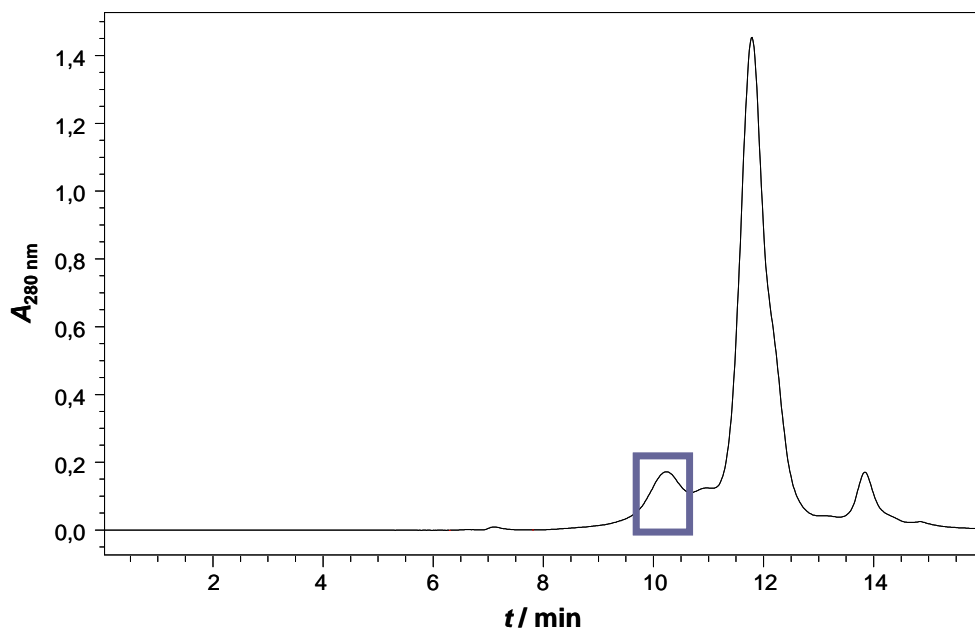


Slika 19. Kromatografija *Vaa* otrova (8 mg po analizi) kationskom izmjenom na CM CIM diskovima ekvilibriranima u $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris/HCl puferu za vezanje ($pH = 9,0$) s $0,002 \text{ mol dm}^{-3}$ $CaCl_2$ pri protoku od 3 mL min^{-1} . Vezani materijal je eluiran stupnjevitim gradijentom rastuće koncentracije natrijevog klorida u puferu za vezanje (isprekidana linija). Proteini su praćeni mjerenjem apsorbanije na 214 nm ($A_{214 \text{ nm}}$) (puna linija). Frakcije eluirane s $0,08 \text{ mol dm}^{-3}$ (EF2) i $0,12 \text{ mol dm}^{-3}$ soli (EF3) (uokvireni pikovi) su sakupljene za daljnje pročišćavanje gel-filtracijskom kromatografijom.

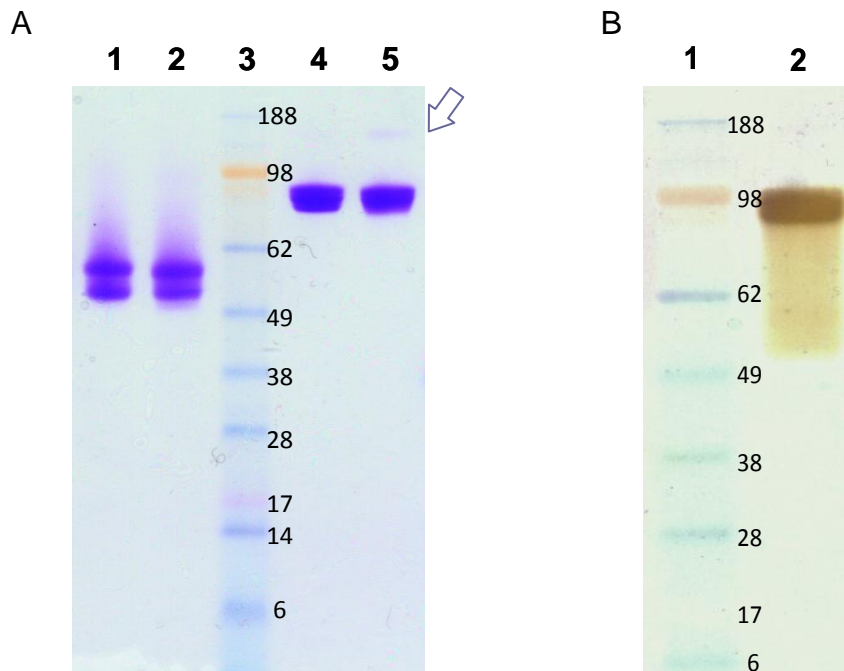
A



B



Slika 20. Pročišćavanje frakcija *Vaa* otrova sakupljenih ionskom izmjenom. (A) Gel-filtracija frakcije EF2 eluirane s $0,08 \text{ mol dm}^{-3}$ natrijevim kloridom. (B) Gel-filtracija frakcije EF3 eluirane s $0,12 \text{ mol dm}^{-3}$ natrijevim kloridom. U oba slučaja kao mobilna faza je korišten $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ fosfatno-sulfatni pufer ($\text{pH} = 6,7$). Protok je iznosio 1 mL min^{-1} . Elucijski profil je dobiven mjerenjem apsorbancije na 280 nm ($A_{280 \text{ nm}}$) (puna linija). Kromatografski materijal s najkraćim retencijskim vremenom proizašao iz gel-filtracije frakcija EF2 i EF3 (uokvireni pikovi) sadrži pročišćeni protein.



Slika 21. (A) SDS-PAGE analiza amoditagina ($m = 6 \mu\text{g}$) na gradijentnom gelu s 4-12 % (w / V) umreženosti koji je detektiran bojanjem s Coomassie Brilliant Blue R250. Linija 1, reducirani amoditagin iz frakcije EF2; linija 2, reducirani amoditagin iz frakcije EF3; linija 3, standardi; linija 4, nereducirani amoditagin iz frakcije EF2; linija 5, nereducirani amoditagin iz frakcije EF3. Dimer pročišćenog proteina je naznačen strelicom. (B) SDS-PAGE analiza amoditagina ($m = 5 \mu\text{g}$) na gradijentnom gelu s 4-12 % (w / V) umreženosti koji je detektiran bojanjem s AgNO_3 . Linija 1, standardi; linija 2, nereducirani amoditagin.

Preparaciju pročišćene komponente smo provjerili SDS-PAGE analizom provedenom pod nereducirajućim i reducirajućim uvjetima na gradijentnom gelu s 4-12 % (w / V) umreženosti (Slika 21). Glavnina nereduciranog uzorka putovala je kao jedinstvena proteinska vrpca molekulske mase od oko 90 kDa. Međutim, na gelu smo pri višoj molekulskoj masi uočili i jednu dodatnu, ali znatno slabije izraženu za koju smo kombinacijom metode otiska prsta (engl. *peptide mass fingerprint*; PMF) i tandemne MS (MS/MS) tehnike naknadno potvrdili da također odgovara proteinu od interesa što nam je otklonilo sumnju u moguću kontaminiranost uzorka, ali i poslužilo kao indicacija njegovog dimerizacijskog potencijala. Naime, tendencija proteina da u nativnom stanju međusobno reverzibilno asociiraju u topive homoagregate posredstvom slabih nekovalentnih interakcija relativno je čest fenomen prouzrokovan bilo intrinzičkim svojstvima njihove primarne, odnosno sekundarne strukture, bilo okolišnim čimbenicima (Wang, 2005; Cromwell i sur., 2006; Wang i sur., 2010). Pri reducirajućim uvjetima na gelu smo detektirali dvije proteinske vrpce molekulskih masa od

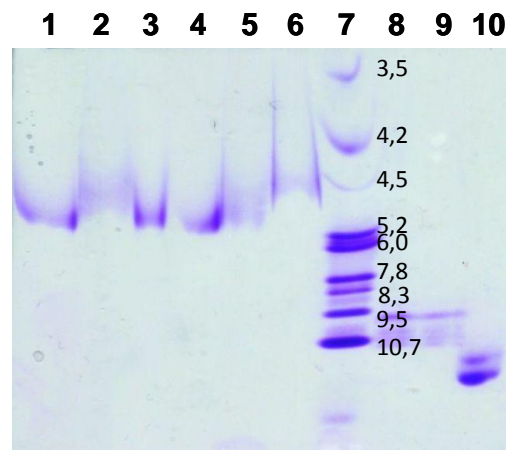
približno 50 i 60 kDa. Znači, amoditagin je heterodimer sastavljen od dva polipeptidna lanca međusobno povezana s jednim ili više disulfidnih mostova. Razlika u njihovoj molekularnoj masi proizlazi ili iz varijabilnog aminokiselinskog sastava ili iz diferencijalnog udjela eventualno vezanih šećera.

U ionsko-izmjenjivačkoj kromatografiji biomolekule se međusobno odjeljuju na osnovu razlike u ukupnom površinskom naboju mehanizmom reverzibilne adsorpcije koja se ostvaruje posredstvom elektrostatskih interakcija s nosačem koji nosi pozitivno (anionska izmjena) ili negativno nabijene funkcionalne skupine (kationska izmjena). Separacija se postiže selektivnom desorpcijom (npr. povećanjem ionske jakosti, promjenom pH vrijednosti) koja je uvjetovana varijabilnim afinitetom molekula za ionski izmjenjivač, odnosno količinom naboja distribuiranog po njihovoj površini. S obzirom da proteini predstavljaju amfoterne polielektrolite, njihova sposobnost vezanja za anionski, odnosno kationski nosač teoretski je ograničena samo s pH vrijednošću kromatografskog okruženja kojem su podvrgnuti tijekom analize (Ion Exchange Chromatography priručnici). U kromatografiji ionskom izmjenom izvedenoj pri pH = 9,0 amoditagin se adsorbirao za kationski nosač i kao vezani materijal eluirao povećanjem koncentracije soli. Na osnovu kromatografskog ponašanja koje je iskazao pretpostavili smo da je riječ o izrazito pozitivno nabijenoj molekuli zbog čega smo s ciljem određivanja njegove izoelektrične točke prvo primijenili tzv. NEPHGE tehniku koja omogućuje poboljšano razlučivanje proteina ekstremno visokih izoelektričnih točaka (Lopez, 2002). Međutim, za nativni, denaturirani i reducirani protein smo dobili pI vrijednost usporedivu s onom β -laktoglobulina – proteinskog standarda s pI = 5,2 (Slika 22A). Loša rezolucija proteinskih vrpca, neovisna o mediju u kojem je uzorak pripremljen, poslužila nam je kao dodatna potvrda da se izolirana metaloproteinaza, suprotno početnoj pretpostavci, ipak ne može okarakterizirati kao bazična. Pozitivne kontrole – Atx-i A, B i C, inhibitor kimotripsina te amoditin L na gelu su se ponašali sukladno svojim izoelektričnim točkama i dali oštre proteinske vrpce unatoč tome što njihove pI vrijednosti premašuju 9,5. Na osnovu rezultata standardno izvedenog izoelektričnog fokusiranja smo zaključili da je amoditagin blago kiseli protein koji se pri nativnim, denaturirajućim, odnosno reducirajućim uvjetima fokusira pri pI \approx 6,2 (Slika 22B), što smo dodatno potvrdili i dvodimenzionalnom (2D) gel-elektroforezom gdje smo, s ciljem poboljšanja rezolucije, podjedinice reduciranog i alkiliranog proteina prethodno imobiliziranog na vrpca s linearnim pH gradijentom dodatno razdvojili na osnovu razlike u njihovoj molekularnoj masi (Slika 23). I jedna i druga posjeduju

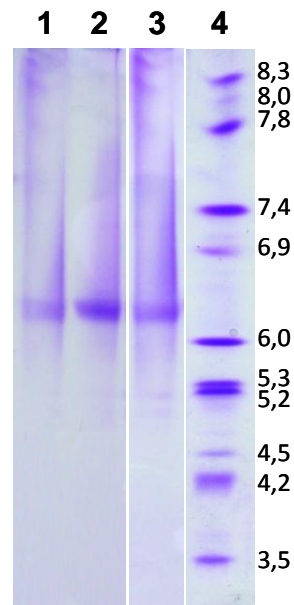
identičnu ili približno sličnu izoelektričnu točku čija se vrijednost kreće u rasponu od oko 5 do 5,5.

S obzirom da je eksperimentalno određena izoelektrična točka amoditagina znatno niža od pH vrijednosti mobilne faze primijenjene u kromatografskoj frakcionaciji otrova, njegova adsorpcija za kationski izmjenjivač najvjerojatnije se odvija posredstvom pozitivno nabijenih domena izloženih na površini molekule što bi ujedno moglo objasniti i pojavu eluiranja s nižom (u slučaju vezanja putem regije s manjom količinom naboja), odnosno višom koncentracijom soli (u slučaju vezanja putem regije s većom količinom naboja). Predložena hipoteza odstupa od pojednostavljenog pristupa ionsko-izmjenjivačkoj kromatografiji gdje je vezni afinitet molekule za nosač ograničen samo s njenim ukupnim površinskim nabojem i u skladu je s novijim literaturnim podacima koji ističu znatno veću kompleksnost adsorpcijskog procesa na molekularnoj razini (Yamamoto i Ishihara, 1999; Malmquist i sur., 2006; Dimer i sur., 2008). Naime, s obzirom da su proteini složene makromolekule koje karakterizira izrazita heterogenost i asimetričnost u distribuciji naboja, njihovo retencijsko ponašanje je prvenstveno uvjetovano njegovom lokalnom gustoćom, ali i molekulskom veličinom, oblikom te hidrofobnim karakterom površine (Xu i Glatz, 2009). Posljedično, imobilizacija se dominantno ostvaruje putem ograničenog broja visoko nabijenih aminokiselinskih ostataka koji tvore tzv. kontaktne regije (DePhillips i Lenhoff, 2001). Ovisno o njihovom broju i dostupnosti protein na adsorbentu može zauzeti višestruke prostorne orijentacije koje onda u različitoj mjeri doprinose kromatografskoj retenciji. S druge strane, na adsorpcijski potencijal utječe i heterogenost kemijskih te fizikalnih svojstava same stacionarne faze pri čemu je njena selektivnost također primarno određena s raspodjelom nabijenih liganada. Naime, njihova visoka gustoća favorizira specifičnu interakciju s definiranim veznim mjestima proteina, dok se pri niskoj retenciji odvija posredstvom njegovog ukupnog površinskog naboja i vodi nasumičnoj prostornoj orijentaciji (Dimer i Hubbuch, 2010; Hartvig i sur., 2011). U tom slučaju devijantno ponašanje proteina na ionskom izmjenjivaču proizlazi iz promjene njegovog ukupnog površinskog naboja uslijed izloženosti električnom polju suprotno nabijenog nosača (Ståhlberg i Jönsson, 1996; Lund i Jönsson, 2005). Ukratko, eksperimentalno potvrđeni literaturni navodi govore u prilog činjenici da u kromatografiji ionskom izmjenom retenciju malih molekula u prvom redu promovira ukupna količina površinskog naboja, dok je u adsorpcijskom procesu proteina relevantnija njegova distribucija, odnosno lokalna gustoća što je ujedno najvjerojatniji razlog opaženog odstupanja u kromatografskom ponašanju amoditagina.

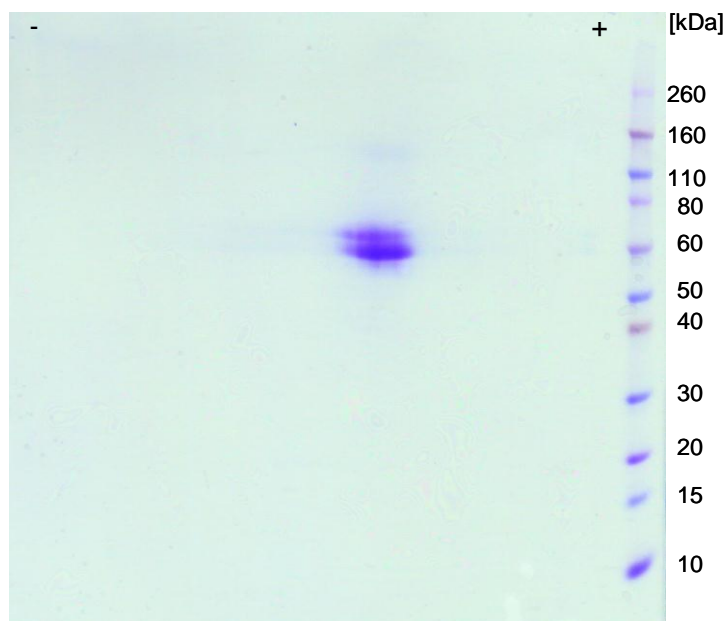
A



B



Slika 22. (A) NEPHGE IEF analiza amoditagina ($m = 10 \mu\text{g}$). Linija 1, nativni amoditagin; linija 2, reducirani amoditagin; linija 3, denaturirani amoditagin; linija 4, nativni amoditagin; linija 5, reducirani amoditagin; linija 6, denaturirani i reducirani amoditagin; linija 7, IEF standardi; linije 8 i 9, smjesa Atx-a i inhibitora kimotripsina; linija 10, amoditin L. U linijama 1, 2, 3 i 8 uzorci su pripremljeni u komercijalnom puferu za nanošenje, a u linijama 4, 5, 6, 9 i 10 u 50 mmol dm^{-3} Tris/HCl puferu ($\text{pH} = 8,0$) s glicerolom. (B) Standardna IEF analiza amoditagina ($m = 20 \mu\text{g}$). Linija 1, nativni amoditagin; linija 2, denaturirani amoditagin; linija 3, reducirani amoditagin; linija 4, IEF standardi. Uzorci su pripremljeni u komercijalnom puferu za nanošenje. Pokraj svakog proteinskog standarda je naznačena njegova pI vrijednost.

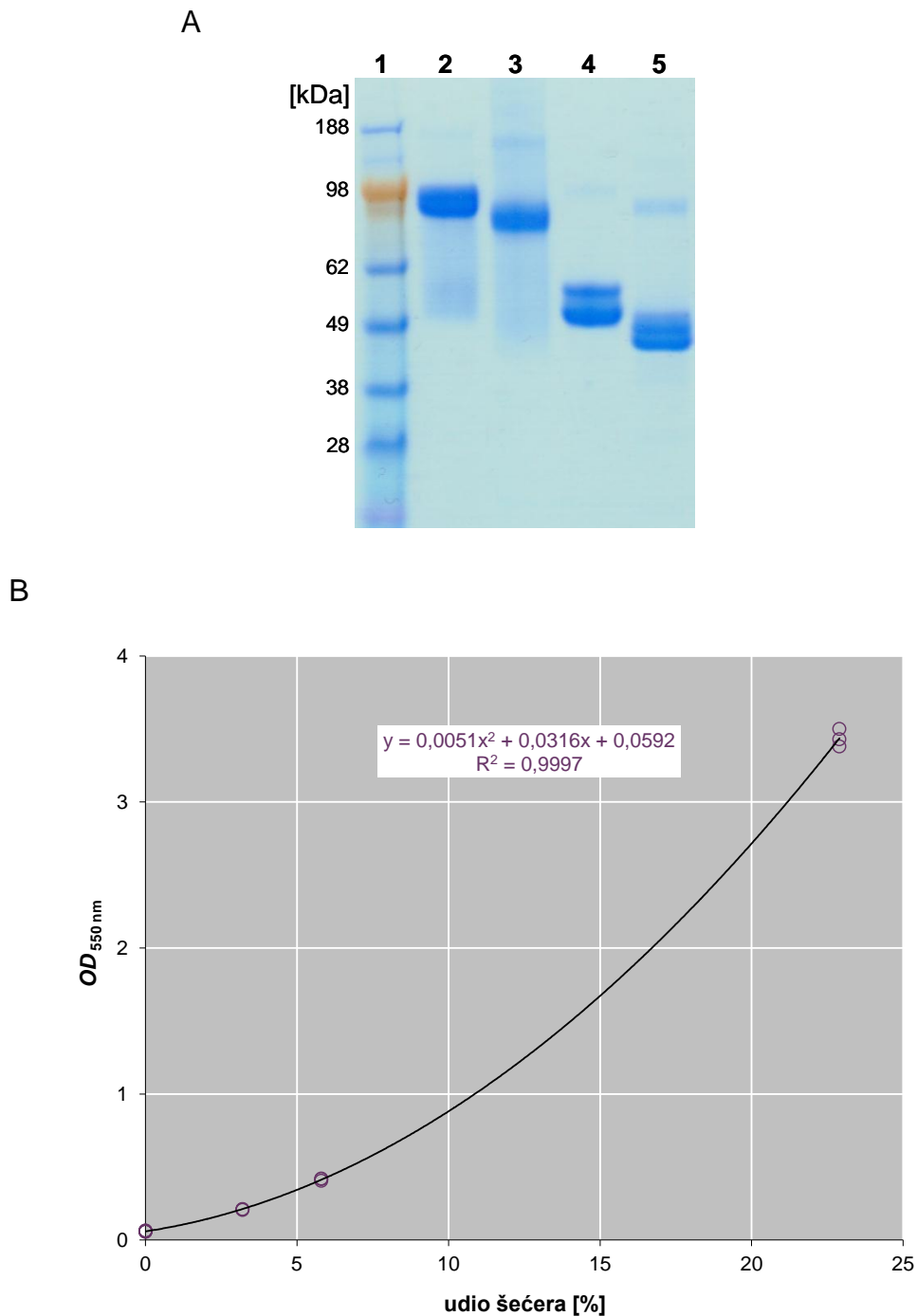


Slika 23. 2D SDS-PAGE analiza podjedinica reduciranog i alkiliranog amoditagina ($m = 25 \mu\text{g}$) prethodno imobiliziranog na vrpce s pH gradijentom linearnog raspona od 3 do 10.

Glikoziliranost Zn^{2+} -ovisnih metaloproteinaza predstavlja jedan od najčešćih oblika posttranslacijske modifikacije, osobito među onima grupe P-III (Takeya i sur., 1990; Gowda i sur., 1994; Ito i sur., 2001; Laing i Moura-da-Silva, 2005; Wang i sur., 2005; Wang, 2007; Sanchez i sur., 2007). Međutim, iako je poznato da molekularna varijabilnost glikokonjugata značajno doprinosi kompleksnosti proteoma zmijskih otrova, njihova relevantnost u kontekstu patofarmakološkog djelovanja još uvijek nije dovoljno istražena (Zelanis i sur., 2012). Naime, s ciljem definiranja korelacije između promjene u glikozilaciji i biološke aktivnosti Zn^{2+} -ovisnih metaloproteinaza zasad je provedena tek nekolicina studija (Escalante i sur., 2011) iz kojih proizlazi da se negativni utjecaj *N*-deglikozilacije dominantno očituje kroz djelomičnu ili potpuno inhibiciju njihove hemoragičnosti (García i sur., 2004; Oliveira i sur., 2010). S obzirom da bi vezani šećeri mogli predstavljati jedan od bitnih čimbenika u kompleksnoj molekularnoj osnovi hemoragičnog potencijala metaloproteinaza iz otrova posredstvom kojih se ostvaruje njihova interakcija s biološki relevantnim supstratima (Ramos i Selistre-de-Araujo, 2004; Oliveira i sur., 2010), istražili smo glikoziliranost amoditagina. S ciljem detekcije glikozilacije, novoizoliranu komponentu smo tretirali PNG-azom F i u SDS-PAGE analizi uočili elektroforetski pomak vrpce koja odgovara pročišćenom proteinu prema nešto nižoj molekularnoj masi (Slika 24A) uslijed glikozidazom posredovanog odcjepljenja njegovih *N*-acetil-D-glukozaminskih jedinica koji su amidnom vezom pričvršćeni za asparaginske ostatke (Tarentino i sur., 1985). Glikoziliranost amoditagina objašnjava i širinu njegove

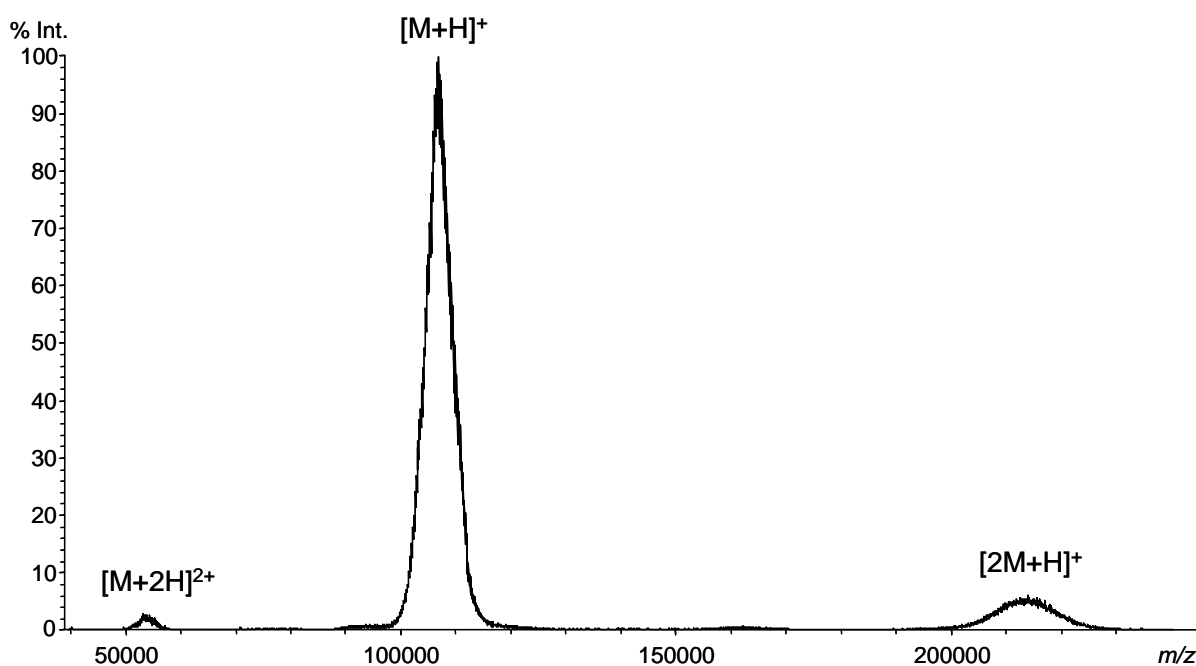
proteinske vrpce koju daje u gel-elektroforezi (Slike 21A i 24A) s obzirom da je poznato da u populaciji molekula jednog glikoproteina na određenom glikozilacijskom mjestu mogu biti vezani strukturno različiti glikani što rezultira fenomenom poznatim i kao mikroheterogenost (An i sur., 2009). Elektroforetski pomak prouzročen deglikozilacijom smo uočili i kad smo eksperiment izveli pod reducirajućim uvjetima, ali zbog loše rezolucije proteinskih vrpca nismo uspjeli zaključiti da li *N*-glikozilacija zahvaća obje ili samo jednu od podjedinica. Udio ukupnih šećera amoditagina određen prema baždarnoj krivulji dobivenoj za varijabilno glikozilirane proteinske standarde komercijalno dostupnim kitom smo procijenili na $7,31 \pm 0,25$ % (Slika 24B).

Međutim, daljnje istraživanje funkcionalne uloge *N*-glikana u biološkoj aktivnosti pročišćenog proteina je bilo onemogućeno s obzirom da je amoditagin enzimskim uklanjanjem oligosaharida izgubio svojstvo topivosti koje se očitovalo njegovom precipitacijom. Naime, iz literature je poznato da većinu glikoproteina karakterizira značajno veći stupanj konformacijske stabilnosti u usporedbi s njihovim neglikoziliranim ekvivalentima, čak i ako odcjepljenje vezanih ugljikohidratnih sastavnica ne izaziva drastičnije promjene u samoj strukturi proteina (Imperiali i O'Connor, 1999). Osim što pospješuju topivost, vezani šećeri, između ostalog, povećavaju i termalnu otpornost, osiguravaju zaštitu od proteolize te inhibiraju agregaciju (Li i d'Anjou, 2009), pri čemu se stabilizacija proteina posredovana glikanima ostvaruje doprinosom različitih čimbenika, između ostalog, uvođenjem dodatnih hidrofilnih jedinica, formiranjem vodikovih veza s polipeptidnom okosnicom i/ili površinskim hidrofilnim aminokiselinskim ostacima te steričkim međudjelovanjem s okolnim peptidima (Wang i sur., 2008). S obzirom da prostorni razmještaj glikoziliranih mjesta najčešće nije relevantan za stabilizacijski učinak, smatra se da je utjecaj oligosaharida na očuvanje strukturnog integriteta glikoproteina općenit te da se prvenstveno postiže posredstvom nespecifičnih interakcija (O'Connor i Imperiali, 1996).



Slika 24. *N*-(de)glikozilacija amoditagina. (A) Amoditagin ($m = 6 \mu\text{g}$) je inkubiran bez (linije 2 i 4), odnosno sa PNG-azom F (0,5 U) (linije 3 i 5) na 37°C preko noći i podvrgnut SDS-PAGE analizi na gradijentnom gelu s 4-12 % (w/V) umreženosti pod reducirajućim (linije 4 i 5) i nereducirajućim uvjetima (linije 2 i 3). Standardi su u liniji 1. Gel je obojan s Coomassie Brilliant Blue R250. (B) Baždarna krivulja za procjenu udjela ukupnih šećera u amoditaginu koji je izražen kao srednja vrijednost od dvaju određivanja \pm SE.

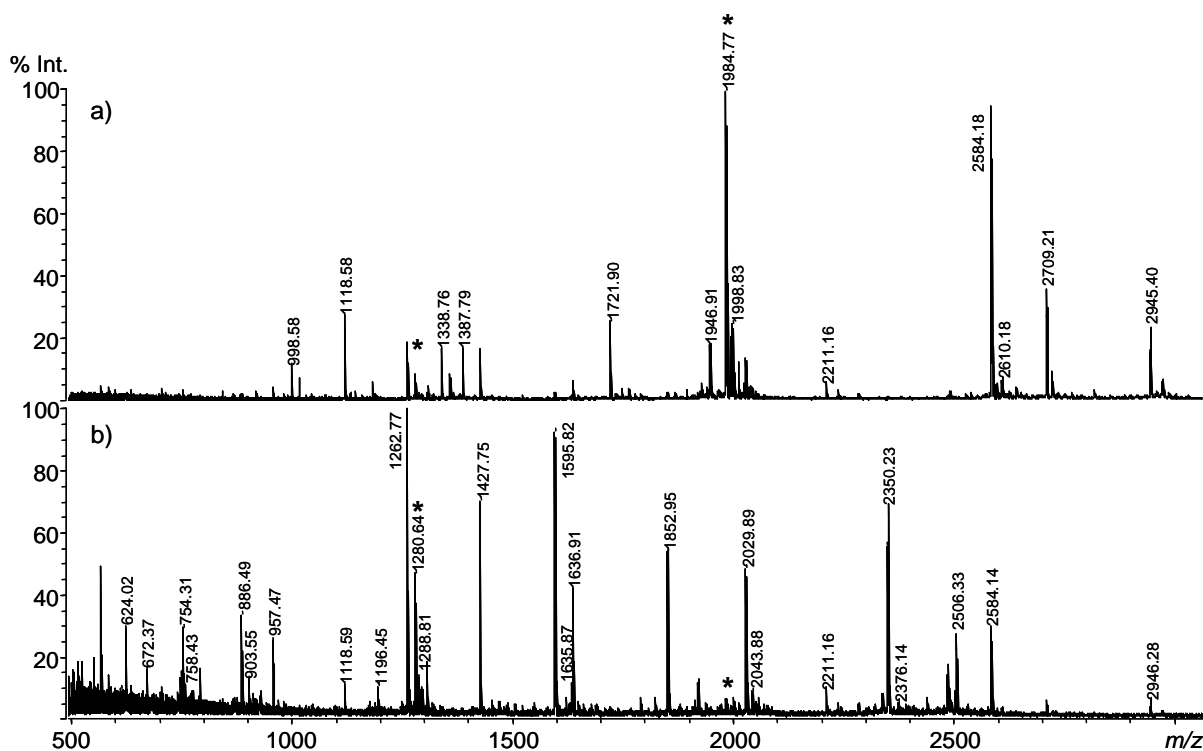
Za detaljni uvid u biokemijska svojstva amoditagina i njegovu preciznu identifikaciju u nastavku istraživanja smo primijenili metodologiju masene spektrometrije (engl. *mass spectrometry*; MS) koja kao analitička tehnika za karakterizaciju ioniziranih molekula koristi princip njihovog razdvajanja na osnovu razlike u omjeru mase i naboja (m/z). Molekulska masa intaktnog proteina određena MS metodom koja kombinira ionizaciju potpomognutu matricom uz desorpciju laserskim zračenjem te mjerenje vremena leta (engl. *matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight*; MALDI-TOF) uz linearan način snimanja (engl. *linear positive ion mode*) i izvedena na osnovu m/z signala jednostruko nabijene molekule iznosi 108 000 Da što amoditagin svrstava u visokomolekulske proteine *Vaa* otrova (Slika 25). MS signal kod $m/z = 215\ 000$, prema rezultatima metode otiska prsta (engl. *peptide mass fingerprint*; PMF) i tandemne MS (MS/MS) tehnike, odgovara njegovom dimeru te potvrđuje tendenciju amoditagina da u otopini stvara oligomere uočene i na SDS-PAGE gelu (Slike 21A i 24A).



Slika 25. MALDI-TOF maseni spektar pozitivno nabijenih iona intaktnog amoditagina uz linearan način snimanja.

Da bi novoizoliranu komponentu identificirali na razini pripadajuće proteinske obitelji, njene podjedinice, prethodno odijeljene gel-elektroforezom pri reducirajućim uvjetima, podvrgnuli smo proteolitičkom cijepanju tripsinom *in situ* i većinu nastalih peptidnih fragmenata podrijetlom iz manje, odnosno veće podjedinice analizirali MALDI-TOF MS/MS

tehnikom (Slika 26). Dva triptička peptida iz veće podjedinice (CADGKVCNSNR i LTPGSQCADGVCCDQCR) s uspješno određenim aminokiselinskim slijedom smo upotrijebili za pretraživanje SwissProt proteinske baze podataka. S obzirom da smo potpuno homologne peptidne sekvence identificirali isključivo među članovima metaloproteinazno/disintegrinske obitelji proteina iz zmijskih otrova, amoditagin smo nedvojbeno klasificirali kao Zn^{2+} -ovisnu metaloproteinazu. Identične triptičke peptide naknadno smo potvrdili i u preparaciji podjedinice manje molekulske mase. Također, usporedbom PMF spektara zasebno analiziranih podjedinica utvrdili smo da je čak oko 75 % od ukupnog broja peptida dobivenih tripsinskom digestijom međusobno podudarno iz čega proizlazi da, unatoč razlici u molekulskoj masi, polipeptidni lanci amoditagina na razini primarne strukture dijele značajan stupanj podudarnosti.



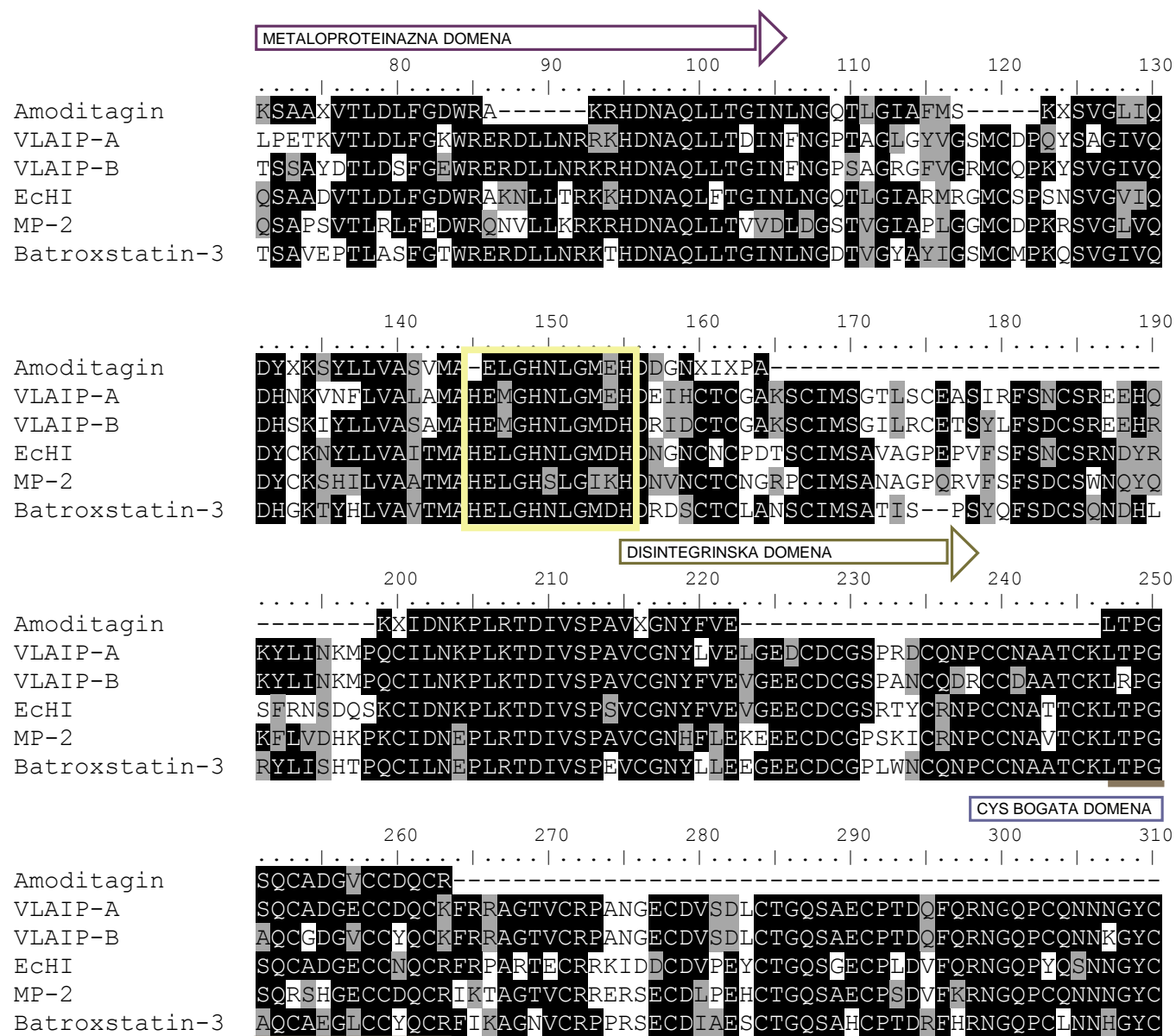
Slika 26. PMF spektar triptičkih peptida veće (a) i manje (b) podjedinice amoditagina dobiven MALDI-TOF MS analizom pozitivno nabijenih iona uz linearan način snimanja. Većina pikova je podvrgnuta MS/MS analizi. Pikovi koji su označeni zvjezdicom su identični peptidnim sekvencama iz metaloproteinazno/disintegrinske obitelji proteina podrijetlom iz zmijskih otrova.

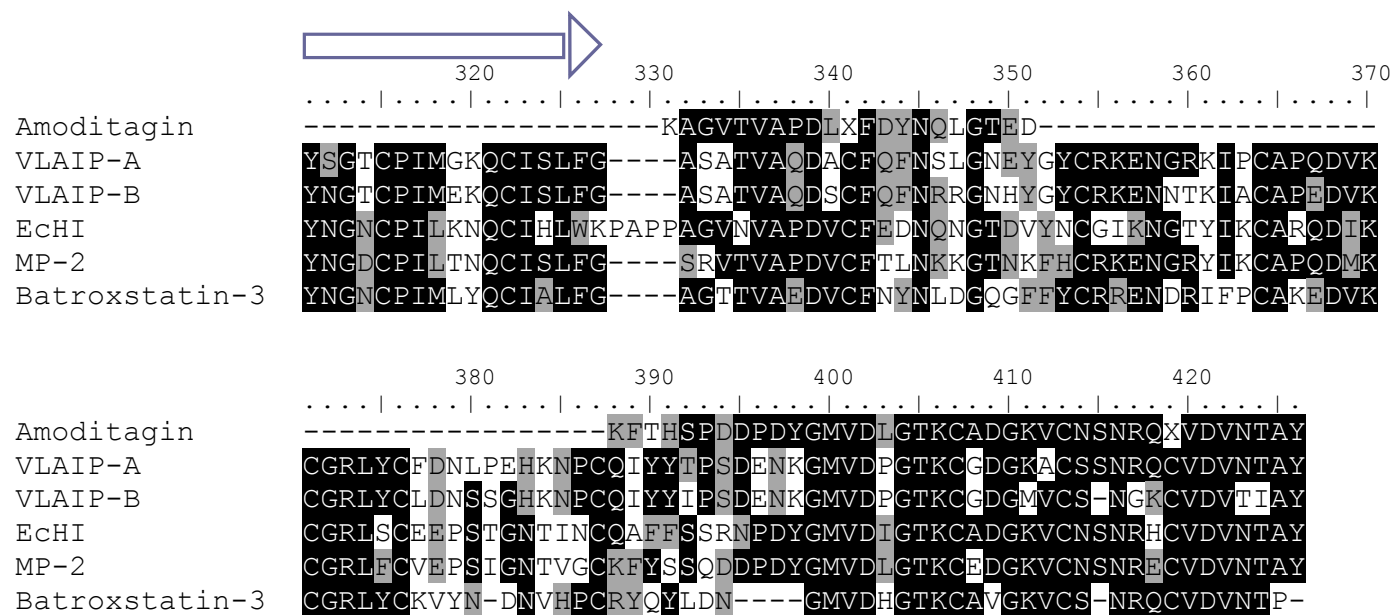
Djelomičnu aminokiselinsku sekvencu pročišćene Zn^{2+} -ovisne metaloproteinaze smo odredili postupkom Edmanove odgradnje koji se zasniva na reakciji kemijske modifikacije

slobodne α -amino skupine proteina s fenilizotiocijanatom pri čemu u bazičnim uvjetima nastaje intermedijerni feniltiokarbamilni polipeptid (Simpson, 2003). Snižavanje pH vrijednosti promovira njegovu pretvorbu u heterociklički N-terminalni derivat – anilintiazolinon koji se spontano odcjepljuje, selektivno ekstrahira pomoću nepolarnog otapala i konvertira u stabilniji oblik – fenilhidantoin pogodan za kromatografsku identifikaciju. Rekonstrukcija N-terminalnog slijeda preostalog dijela polipeptidnog lanca skraćenog za jedan aminokiselinski ostatak se postiže sukcesivnim ponavljanjem ciklusa derivatizacije, odcjepljenja i konverzije. Međutim, analizom amoditagina Edmanovom odgradnjom nije postignut nikakav rezultat što sugerira da je njegov N-kraj blokiran. Naime, N-terminalni ostatak eukariotskih proteina ponekad zahvaćaju modifikacije u obliku formilacije, acetilacije, acilacije ili ciklizacije glutaminskog ostatka (Brown i Roberts, 1976; Bateman i sur., 1990; Resh, 1999; Wisniewski i sur., 2008) koje inhibiraju vezanje fenilizotiocijanata i onemogućuju direktno sekvenciranje. Blokirani N-kraj koji najvjerojatnije ima ulogu u zaštiti proteina od proteolitičke degradacije posredstvom aminopeptidaza (Brown, 1979) također je detektiran i kod velikog broja ostalih Zn^{2+} -ovisnih metaloproteinaza pročišćenih iz otrova pripadnika porodice *Viperidae*, najčešće kao piroglutamat (Cominetti i sur., 2003; Wan i sur., 2006; Guo i sur., 2007; Han i sur., 2007; Leonardi i sur., 2007; Patiño i sur., 2010). S obzirom da se amoditagin pokazao rezistentnim na izravni postupak Edmanove odgradnje, ponovni pokušaj određivanja njegovog aminokiselinskog slijeda je zahtijevao uvođenje dodatnog koraka enzimske digestije. Od velikog broja peptidnih fragmenata nastalih djelovanjem endoproteinaze Lys-C i odijeljenih kromatografijom reverzne faze, s obzirom na zahtjevnost metode, sekvenciranju smo podvrgnuli nekolicinu nasumično odabranih.

Na osnovu djelomične aminokiselinske sekvence određene kombinacijom MALDI-TOF MS/MS analize zasebnih podjedinica i Edmanove odgradnje peptida podrijetlom iz intaktnog proteina pouzdano smo zaključili da najmanje jedan polipeptidni lanac amoditagina posjeduje katalitičku domenu s Zn^{2+} -veznim motivom HELGHNLGMEH. Također, obje njegove podjedinice sadrže i potpuno identične peptide koji pripadaju dvjema dodatnim domenama (Slika 27). Ukratko, od sedam sekvenciranih peptida s ukupno 183 aminokiselinska ostatka, četiri potječu iz metaloproteinazne, a dva iz domene bogate cisteinom, dok jedan obuhvaća i domenu nalik disintegrinskoj i onu bogatu cisteinom što amoditagin svrstava u P-III grupu strukturno najkompleksnijih predstavnika Zn^{2+} -ovisnih metaloproteinaza (Bjarnasson i Fox, 1994) s obilježjima koja karakteriziraju i druge članove reprotizinske podobitelji. Naime, pretraživanjem neredundantne NCBI proteinske baze

podataka provedenim s određenom sekvencom i identifikacijom lokalno podudarnih regija upotrebom protein-protein BLAST algoritma (engl. *protein-protein basic local alignment search tool*) najznačajniju mjeru homologije u primarnoj strukturi smo pronašli upravo kod ostalih metaloendopeptidaza podrijetlom iz zmijskih otrova, pri čemu se po stupnju sličnosti s amoditaginom osobito ističu EchI iz vrste *Echis pyramidum leakeyi* (Paine i sur., 1994), VLAIP-A i VLAIP-B iz vrste *Vipera lebetina* (Trummal i sur., 2005), MP-2 iz vrste *Bitis arietans* (AAX86634) i batrokstatin-3 iz vrste *Bothrops atrox* (Tavares i sur., 2008) (Slika 27) koji su, uz iznimku VLAIP proteina, potvrđeni samo na razini mRNA iz koje je i izvedena njihova aminokiselinska sekvenca. S obzirom na geografsku i taksonomsku udaljenost koja razdvaja nabrojane vrste, visoka filogenetska konzerviranost strukturnih motiva među kojima smo detektirali podudarnost bi mogla ukazivati na njihov mogući funkcionalni značaj. Nadalje, posebnost amoditagina leži i u (hetero)dimernoj prirodi njegove native strukture koja ga klasificira među pripadnike P-IIIc podgrupe (Fox i Serrano, 2005, 2008, 2009) i čini zasad jedinim poznatim predstavnikom iz *Vaa* otrova. Što je još značajnije, u literaturi je dosad opisan izuzetno mali broj P-IIIc članova koji u procesu posttranslacijskog procesiranja podliježu homo-, odnosno heterodimerizaciji kao višem redu strukturne organizacije, uključujući tri faktora indukcije apoptoze endotelnih stanica – VAP1 iz vrste *Crotalus atrox* (Masuda i sur., 1997), HV1 iz vrste *Trimeresurus flavoviridis* (Masuda i sur., 2001) i već spomenuti VLAIP iz vrste *Vipera lebetina*, inhibitor proliferacije endotelnih stanica TSV-DM iz vrste *Trimeresurus stejnegeri* (Wan i sur., 2006), inhibitor agregacije trombocita inducirane ADP-om BaG iz vrste *Bothrops alternatus* (Cominetti i sur., 2003) te aktivator faktora X VBFXAEII iz vrste *Vipera b. berus* (Samel i sur., 2003). Predispoziciju za dimerizacijski potencijal najvjerojatnije uvjetuje prisutnost sedmog, dodatnog cisteinskog ostatka konzerviranog na položaju 365 metaloproteinazne domene (Cys³⁶⁵) koji je usporedbom primarnih struktura velikog broja metaloproteinaza pronađen isključivo kod P-IIIc članova (Takeda i sur., 2006; Igarashi i sur., 2007). Njegov izravni doprinos formiranju intermolekulskog disulfidnog mosta je zasad eksperimentalno potvrđen samo kod VAP1 predstavnika (Takeda i sur., 2012), s obzirom da kristalne strukture ostalih još uvijek nisu razjašnjene. Osim Cys³⁶⁵, postoje indikacije da je za dimerizaciju neophodna i konsenzusna sekvenca QDHSK u kontaktnoj površini dviju podjedinica posredstvom koje se ostvaruje međusobna koordinacija Ne atoma Lys³²⁴ jednog monomera sa šest atoma kisika drugog i postiže sveukupna stabilnost molekule (Igarashi i sur., 2007). Međutim, zbog nedovoljne pokrivenosti s aminokiselinskom sekvencom u amoditaginu nismo uspjeli potvrditi prisutnost navedenih strukturnih motiva jedinstvenih za dimerne Zn²⁺-ovisne metaloproteinaze.





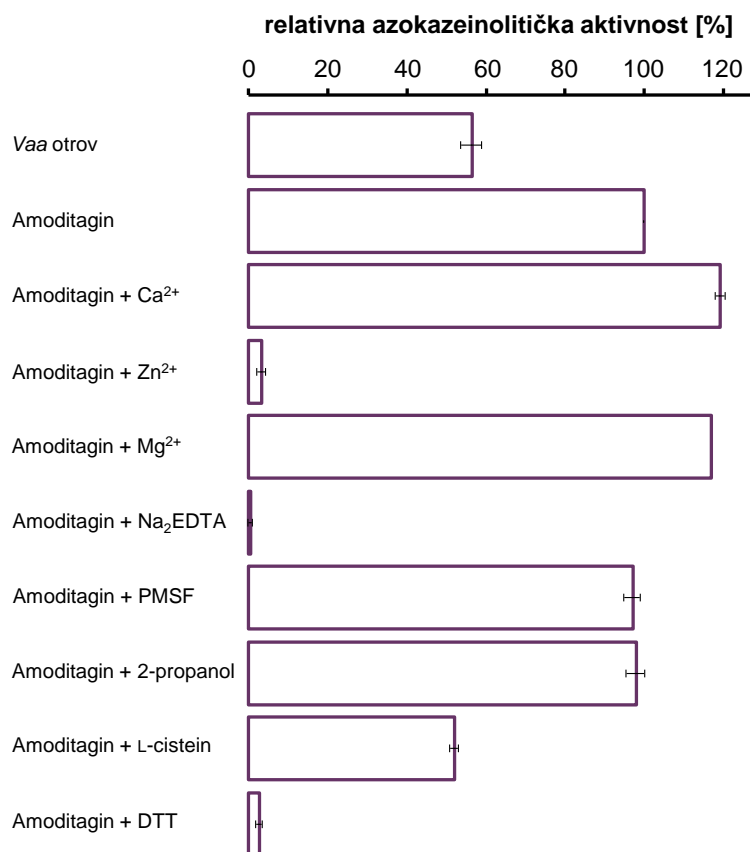
Slika 27. Djelomična aminokiselinska sekvenca amoditagina određena kombinacijom MS/MS analize i Edmanove odgradnje sravnjena s odgovarajućim segmentima najhomolognijih Zn^{2+} -ovisnih metaloproteinaza iz zmijskih otrova: proteinima VLAIP-A i VLAIP-B iz vrste *Vipera lebetina*, EcHI iz vrste *Echis pyramidum* i MP-2 iz vrste *Bitis arietans* te batrokstatinom-3 iz vrste *Bothrops asper*. Brojevi odgovaraju onima u sekvenci proteina VLAIP-A. Identične aminokiseline su označene crnom, a slične sivom bojom. "X" označava neidentificirani ostatak. Sekvence određene MS/MS analizom su podcrtane da bi se razlikovale od onih određenih Edmanovom odgradnjom. Zn^{2+} -vezni motiv je zaokružen. Naznačene su i metaloproteinazna domena, domena nalik disintegrinskoj te domena bogata cisteinom.

4.2.2. PROTEOLITIČKA AKTIVNOST I SPECIFIČNOST

Pročišćeni protein smo enzimski okarakterizirali definiranjem dvaju parametara – njegovog hidrolitičkog potencijala i selektivnosti koju iskazuje s obzirom na preferirana mjesta cijepanja u ponuđenom supstratu.

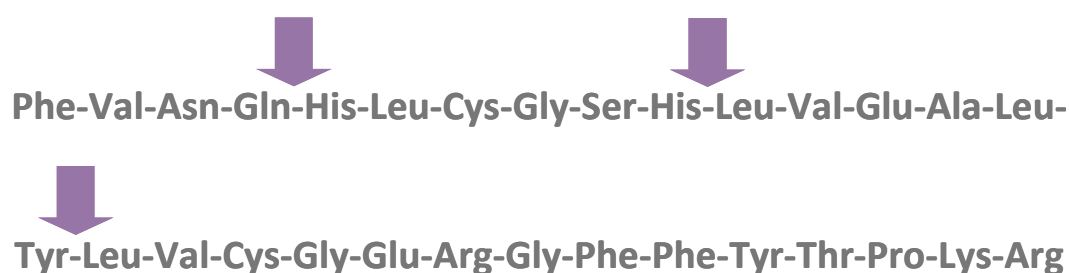
Endopeptidaznu aktivnost amoditagina smo ispitali na azokazeinu kao nespecifičnom supstratu pri čemu nam je intenzitet obojenja razvijenog uslijed njegove razgradnje poslužio kao mjera enzimske aktivnosti. Kao pozitivnu kontrolu smo upotrijebili cijeli *Vaa* otrov testiran u podjednakoj količini koji je u usporedbi s čistim proteinom iskazao gotovo upola slabiji potencijal azokazeinolize (Slika 28). Također, testom na azokazeinu smo provjerili i mogući aktivacijski, odnosno inhibicijski učinak odabranih reagensa. Na₂EDTA kao helirajući agens je pokazao kompletni inhibicijski efekt, dok je utjecaj PMSF-a kao inhibitora serinskih proteinaza izostao, potvrđujući metaloproteinaznu prirodu izoliranog enzima. Također, inaktivacija proteolitičkog djelovanja amoditagina je postignuta i narušavanjem strukturnog integriteta proteina kroz redukciju intra- i/ili intermolekulskih disulfidnih mostova izazvanu djelovanjem DTT-a. Što je zanimljivo, njegova enzimska aktivnost je gotovo potpuno izostala i u uvjetima izloženosti suvišku Zn²⁺ iona. Sličan inhibicijski učinak je opažen i kod nekih drugih metaloproteinaza iz otrova zmija kao što su rFIV_a iz vrste *Deinakistrodon acutus* (Xu i sur., 2006), leukurolizin-B iz vrste *Bothrops leucurus* (Sanchez i sur., 2007) te patagonfibraza iz vrste *Philodryas patagoniensis* (Peichoto i sur., 2007). Opažena modifikacija proteolitičke aktivnosti vrlo vjerojatno je prouzrokovana konformacijskom promjenom uslijed vezanja Zn²⁺ iona za nekatalitička vezna mjesta. Nadalje, kao i Na₂EDTA, DTT i suvišak Zn²⁺ iona, i L-cistein je izazvao ukidanje hidrolitičkog potencijala amoditagina, iako samo jednim dijelom. Uočeni fenomen bi mogao biti posljedica sposobnosti njegove tiolne skupine da iz aktivnog mjesta izoliranog enzima helira katalitički važan Zn²⁺ ion, što ujedno predstavlja jedan od pristupa koji se primjenjuje kod dizajniranja selektivnih inhibitora tkivnih metaloproteinaza koje sudjeluju u remodeliranju i degradaciji ekstracelularnog matriksa (Whittaker i sur., 1999). Alternativno objašnjenje pretpostavlja da slabljenje proteolitičkog potencijala u prisutnosti L-cisteina proizlazi iz njegovog reducirajućeg djelovanja. Za razliku od ostalih ispitanih reagensa, Ca²⁺ i Mg²⁺ ioni su iskazali blagi aktivacijski učinak što sugerira važnost dvovalentnih kationa u općoj stabilizaciji konformacije amoditagina, i posljedično, njegovoj enzimskoj aktivnosti. Naime, P-III članovi posjeduju tri potencijalna Ca²⁺-vezna mjesta (Takeda i sur., 2006; Igarashi i sur., 2007; Takeda i sur., 2012). Jedno se nalazi nasuprot aktivnog mjesta, ali unatoč tome nema izravnu ulogu u katalitičkom mehanizmu, visoko je

konzervirano među metaloproteinazama svih grupa i najvjerojatnije relevantno za strukturni integritet proteinazne domene te kompaktno, globularno pakiranje molekule (Bode i sur., 1994; Gong i sur., 1998; Ramos i Selistre-de-Araujo, 2006), dok su preostala dva integrirana u domeni nalik disintegrinskoj i zaslužna za rigidnost strukture te njenu otpornost prema autoproteolitičkoj degradaciji (Igarashi i sur., 2007; Takeda i sur., 2012).



Slika 28. Proteolitička aktivnost amoditagina ($m = 3,5 \mu\text{g}$) određena njegovom inkubacijom s azokazeinom ($c = 2 \text{ mg mL}^{-1}$) na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ kroz 5 h. Kao pozitivna kontrola je upotrijebljen cijeli *Vaa* otrov ($m = 3,5 \mu\text{g}$). U testu analize inhibirajućeg, odnosno aktivirajućeg djelovanja odabranih reagensa inkubaciji s otopinom supstrata je prethodio tretman pročišćenog enzima s dvovalentnim kationima – CaCl_2 , MgCl_2 i ZnCl_2 ($c = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$), proteinaznim inhibitorima – Na_2EDTA ($c = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$) i PMSF-om ($c = 0,001 \text{ mmol dm}^{-3}$), 1 %-tnim (V / V) 2-propanolom, L-cisteinom ($c = 0,005 \text{ mmol dm}^{-3}$) i DTT-om ($c = 0,001 \text{ mmol dm}^{-3}$). Nakon zaustavljanja enzimske reakcije i precipitacije nerazgrađenog supstrata, apsorbancija supernatanta je izmjerena kod 342 nm ($A_{342 \text{ nm}}$). $A_{342 \text{ nm}}$ vrijednosti dobivenoj za intaktni amoditagin pripisano je 100 % proteolitičke aktivnosti (relativna azokazeinolitička aktivnost), a rezultati postignuti za ostale uzorke prikazani su u relativnom odnosu kao srednja vrijednost $\pm \text{SE}$ iz triju neovisnih eksperimenata.

U oksidiranom B-lancu inzulina, široko prihvaćenom modelnom oligopeptidnom supstratu za studiranje proteolitičke specifičnosti Zn^{2+} -ovisnih metaloproteinaza zmijskih otrova (Chen i sur., 2008) te standardu pogodnom za usporedbu njihovih preferiranih mjesta cijepanja (Paes Leme i sur., 2011), amoditagin je katalizirao hidrolizu peptidne veze s leucinskim ili histidinskim ostatkom na P1' položaju. Naime, selektivno cijepanje je detektirano na tri različita mjesta (Gln^4 - His^5 , His^{10} - Leu^{11} i Tyr^{16} - Leu^{17}) (Slika 29, Tablica 8) koja su uobičajeno preferirana od strane metaloendopeptidaza pročišćenih iz otrova zmija (Fox i sur., 1986). Također, dobiveni rezultati su skladu s opažanjima proizašlima iz rendgenskih strukturnih analiza njihovih topološki identičnih aktivnih mjesta okarakteriziranih kao veliki i plitki hidrofobni džep osobito prikladan za smještaj dužih alifatskih ili aromatskih nepolarnih aminokiselinskih bočnih ogranaka (Gomis-Rüth i sur., 1993; Zhang i sur., 1994) s mikrookolišem koji prilikom vezanja liganda dozvoljava određenu dozu fleksibilnosti ujedno zaslužnu za niski stupanj proteolitičke specifičnosti Zn^{2+} -ovisnih proteinaza općenito (Takeda i sur., 2012). Uzorak degradacije najbliži onom dobivenom za amoditagin u literaturi je opisan za proteinazu iz otrova vrste *Ophiophagus hannah* koja B-lanac inzulina razgrađuje na još dva dodatna položaja (Yamakawa i Omori-Satoh, 1988). Također, inkubacija amoditagina s testiranim supstratom u trajanju dužem od 30 min nije rezultirala pojavom novih peptidnih fragmenata što implicira da pročišćeni enzim ne diskriminira identificirana mjesta cijepanja, s obzirom da sva tri hidrolizira podjednako brzo s usporedivo visokim afinitetom.



Slika 29. Proteolitička specifičnost amoditagina određena na oksidiranom B-lancu inzulina kao modelnom supstratu. U različitim vremenskim intervalima alikvoti reakcijske smjese su podvrgnuti RP-HPLC analizi pri čemu su nastali degradacijski produkti eluirani s linearnim gradijentom acetonitrila od 0 do 60 % (V/V) 0,1 %-tne (V/V) TFA, sakupljeni i podvrgnuti N-terminalnom sekvenciranju. Identificirani susjedni aminokiselinski ostaci među kojima je u B-lancu inzulina došlo do hidrolize peptidne veze izazvane amoditaginom naznačeni su strelicama.

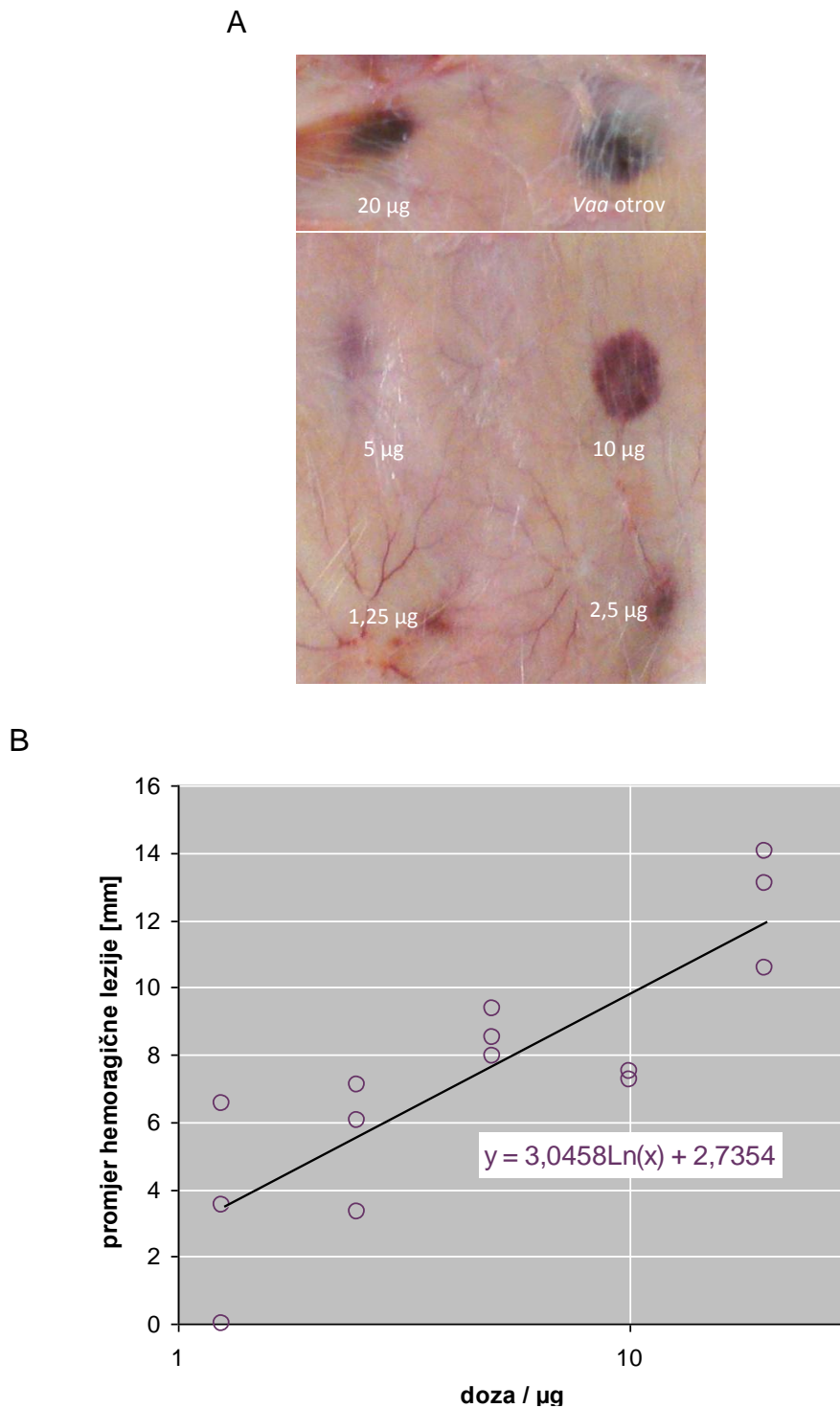
4.2.3. BIOLOŠKA AKTIVNOST

Primijenjenom biokemijskom metodologijom amoditagin je okarakteriziran kao Zn^{2+} -ovisna metaloproteinaza s multidomenskom organizacijom jedinstvenom za članove P-IIIc podgrupe koja i u visoko pročišćenom obliku zadržava sposobnost proteolitičkog djelovanja čime strukturno i funkcionalno ispunjava sve potrebne preduvjete za iskazivanje snažnog hemoragičnog potencijala (Kamiguti i sur., 1998; Gutiérrez i Rucavado, 2000; Gutiérrez i sur., 2005; Oliveira i sur., 2010; Escalante i sur., 2011). U pravilu hemoragini iz otrova zmija pripadaju strukturno najkompleksnijoj skupini metaloendopeptidaza, uz izuzetak pojedinih koje su ili slabo hemoragične, ili uopće ne iskazuju hemoragičnu aktivnost (Loría i sur., 2003; Silva i sur., 2003; Leonardi i sur., 2007, 2008). Kako hemoragični efekt proizlazi iz selektivne degradacije fiziološki bitnih supstrata za koju je odgovorna katalitička domena visoko homologna među proteinazama svih grupa, bitna razlika u njihovom funkcionalnom djelovanju najvjerojatnije potječe od disintegrinske i domene bogate cisteinom (Escalante i sur., 2011). Naime, njihove strukturne determinante oblikuju tzv. egzomjesta zaslužna za ciljano usmjeravanje toksina prema mjestima njegovog djelovanja u mikrovaskulaturi te rezistenciju na inhibiciju posredovanu plazmatskim α_2 -makroglobulinom odgovornu za neometano cirkuliranje hemoragina po organizmu i, posljedično, izazivanje njegovih sistemskih efekata. Ukratko, proteolitička aktivnost za koju je odgovorna metaloproteinazna domena je kritična predispozicija za induciranje hemoragije, ali ono što jake hemoragine općenito diskriminira od slabih ili nehemoragičnih je prisutnost dviju dodatnih karakterističnih za pripadnike P-III grupe.

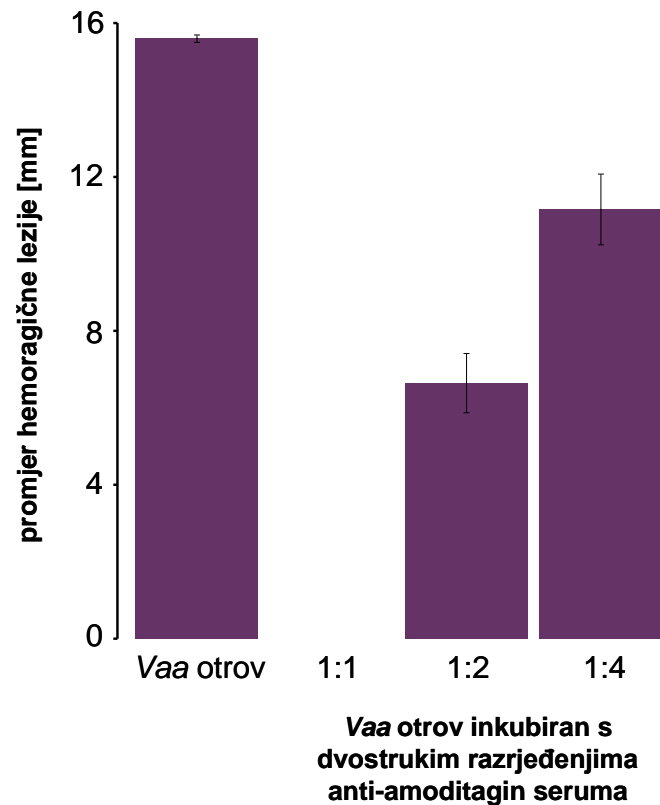
Pretpostavku o mogućoj uključenosti amoditagina u patofiziologiji otrovanja smo potvrdili *in vivo* testom na miševima i štakorima provedenim intradermalnom aplikacijom rastućih doza čistog proteina te mjerenjem poprečnih promjera nastalih patoloških promjena 2 h (u slučaju izvedbe na miševima), odnosno 24 h (u slučaju izvedbe na štakorima) nakon primjene. Minimalna hemoragična doza (MHD) kao mjera hemoragičnog potencijala kvantificiranog iz krivulje ovisnosti dimenzija hemoragičnih lezija o apliciranoj dozi za miševu je iznosila 0,65 μ g, a za štakore 10,86 μ g što amoditagin u kontekstu hemoragičnosti čini najtoksičnijim predstavnikom (Leonardi i sur., 2001, 2007) i kvalificira kao izuzetno jaki hemoragin od potencijalno visokog medicinskog značaja (Ramos i Selistre-de-Araujo, 2004) koji je čak dva puta potentniji od cijelog *Vaa* otrova (Halassy i sur., 2011) (Slika 30). Po hemoragičnosti amoditagin je usporediv s patagonfibrazom iz vrste *Philodryas patagoniensis* (Peichoto i sur., 2007), jararhaginom iz vrste *Bothrops jararaca* (Laing i Moura-da-Silva,

2005), alternaginom iz vrste *Bothrops alternatus* (Souza i sur., 2000) te daborhaginima iz vrste *Daboia siamensis*, odnosno *Daboia russelli* (Chen i sur., 2008) čija je MHD vrijednost eksperimentalno određena testom na miševima također znatno niža od 1 µg. Međutim, bitno je naglasiti da je relevantnost usporedbe MHD vrijednosti amoditagina i ostalih hemoragičnih Zn²⁺-ovisnih metaloproteinaza vrlo upitna zbog generalno niskog stupanja standardiziranosti *in vivo* testa za određivanje hemoragične aktivnosti i neusklađenosti njegove izvedbe od strane različitih autora s obzirom na vrstu upotrijebljene pokusne životinje (miš/štakor), put inokulacije toksina (intradermalno/subkutano) te vremenski period koji prethodi očitavanju rezultata (2/3/24 h) kao čimbenicima koji prema literaturnim podacima najčešće variraju.

S ciljem analize imunogenosti, pročišćeni protein smo upotrijebili kao antigen za imunizaciju kunića i pripravu anti-amoditagin seruma s visokim titrom specifičnih antitijela detektiranih enzimskim imunotestom koji je u *in vivo* testu na štakorima iskazao izuzetno visoku moć neutralizacije lokalnog hemoragičnog efekta cijelog *Vaa* otrova ispitanog u količini koja sadržava približno 2,2 MHD (Halassy i sur., 2011). Naime, u nerazrijeđenom obliku pripravljeni serum je uspio sa 100 %-tnom efikasnošću spriječiti hemoragičnost induciranu otrovom s obzirom da je pojava patoloških promjena na koži štakora u potpunosti izostala, dok je u razrjeđenju od 1:2, odnosno 1:4 ekspimirao djelomičnu, ali ipak zadovoljavajuću zaštitnu učinkovitost, reducirajući promjer hemoragičnih lezija za 57, odnosno 29 % (Slika 31) iz čega proizlazi da bi indukcija nastanka amoditagin-specifičnih antitijela mogla predstavljati jedan od bitnih parametara u dobivanju terapijski djelotvornog protuotrova.



Slika 30. Hemoragična aktivnost amoditagina. (A) Reprezentativni rezultat određivanja minimalne hemoragične doze amoditagina *in vivo* testom na štakorima. Kod svake hemoragične lezije je naznačena doza apliciranog proteina. Kao pozitivna kontrola korišten je cijeli *Vaa* otrov u dozi od $m = 50 \mu\text{g}$. (B) Baždarni pravac za određivanje minimalne hemoragične doze amoditagina konstruiran iz više neovisno dobivenih rezultata ($n = 3$).



Slika 31. *In vivo* test neutralizacije hemoragične aktivnosti *Vaa* otrova s amoditagin-specifičnim serumom – usporedba promjera hemoragičnih lezija induciranih samim otrovom i otrovom preinkubiranim s nerazrijeđenim, dva, odnosno 4 puta razrijeđenim serumom kunića imuniziranog s amoditaginom. Stupci predstavljaju njihovu srednju vrijednost \pm SE ($n = 3$).

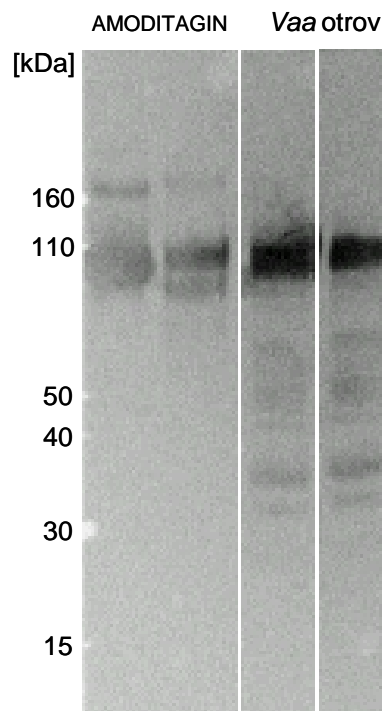
Rezultat *in vivo* testa neutralizacije hemoragične aktivnosti *Vaa* otrova s anti-amoditagin serumom u skladu je s istraživanjima opisanima u literaturi. Jedno od prvih je provedeno s monospecifičnim serumom protiv BaH1, P-III metaloproteinaze vrste *Bothrops asper* izraženog hemoragičnog djelovanja, koji se pokazao zaslužnim za potpunu neutralizaciju lokalnog hemoragičnog efekta inducirano­g čak i s otrovima nekolicine blisko srodnih vrsta (Lomonte i sur., 2009). Nadalje, na primjeru neuviedaze, male metaloproteinaze iz otrova vrste *Bothrops neuwiedi* koja posjeduje samo katalitičku domenu, Rodrigues i suradnici (2000) su demonstrirali da i nehemoragične ili slabo hemoragične komponente iznimno mogu poslužiti kao kvalitetni imunogeni sposobni potaknuti nastanak neutralizirajućih antitijela učinkovitih protiv potentnih visokomolekulskih hemoragičnih toksina što ujedno otvara i mogućnost njihove potencijalne primjene u proizvodnji protuotrova bez nuspojava štetnih za proizvodne životinje. Također, osim poliklonskim serumima specifičnima za izdvojene Zn^{2+} -ovisne metaloproteinaze varijabilnog hemoragičnog potencijala, visoku neutralizacijsku moć je moguće postići čak i upotrebom monoklonskih

antitijela (MoAt) što potvrđuju primjeri iz nekoliko neovisno provedenih studija. Npr. Estêvão-Costa i suradnici (2000) su sintetizirali MoAt reaktivno protiv nehemoragične P-I metaloproteinaze karakteristične za vrstu *Lachesis muta*, tzv. mutalizina-II, koje su okarakterizirali kao relevantni čimbenik zaslužan za postizanje kompletne ili djelomične inhibicije hemoragičnosti inducirane cijelim otrovom. Daljnji napredak su postigli Tanjoni i suradnici (2003a, 2003b) s monoklonskim antitijelom MAJar3 koje, unatoč tome što u jarahaginu kao glavnom hemoraginu iz otrova vrste *Bothrops jararaca* prepoznaje ograničeni disintegrinski segment, efikasno blokira ne samo cijeli niz njegovih bioloških aktivnosti povezanih s metaloproteinaznom domenom, već i lokalne hemoragične učinke otrova ostalih predstavnika filogenetski ograničenih na rod *Bothrops*.

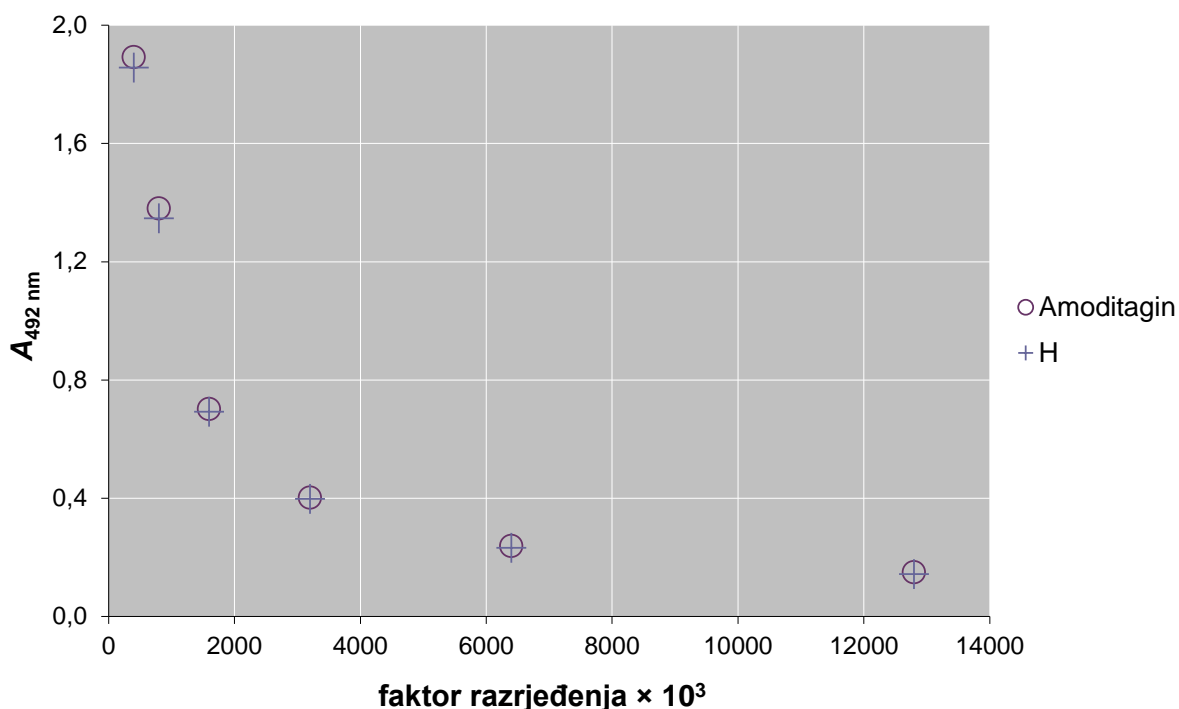
Neutralizacijski test implicira da amoditagin predstavlja dominantni toksin *Vaa* otrova s ključnim doprinosom hemoragičnoj aktivnosti koju iskazuje. Alternativno objašnjenje je da sve njegove hemoragične Zn^{2+} -ovisne metaloproteinaze, uključujući i amoditagin, dijele zajedničke epitope relevantne za antitijelima posredovanu neutralizaciju u svrhu postizanja adekvatne zaštite od njihovog patofarmakološkog djelovanja. S obzirom da je u literaturi opisan značajan broj intra- i interspecijskih metaloendopeptidaza s homolognim strukturnim elementima koji tvore konzervirane antigenske domene snažnog imunogenog potencijala (Franceschi i sur., 2000; Loría i sur., 2003; Sanchez i sur., 2003; Mazzi i sur., 2004; Howes i sur., 2005), drugu, izgledniju interpretaciju postignute učinkovitosti pripremljenog seruma utemeljenu na mogućem fenomenu visokog stupnja imunološke križne reaktivnosti između amoditagina i ostalih hemoragina eksperimentalno smo provjerili western blot (WB) analizom cijelog *Vaa* otrova s anti-amoditagin serumom. Kao kontrolni antigen nam je poslužio čisti protein za membranu imobiliziran u dva puta manjoj količini. Proteinski imunoblot eksperiment je pokazao da antitijela specifična za amoditagin reagiraju s komponentama širokog spektra molekulskih masa, ali da prvenstveno prepoznaju one od oko 100 kDa (Slika 32). Naime, pri toj molekulskoj masi je dobiven WB signal po intenzitetu znatno jači od onog proizašlog iz imunodetekcije čistog proteina, a koji bi stoga mogao biti neposredni pokazatelj izuzetno velike zastupljenosti visokomolekulskih proteina u *Vaa* otrovu koji, s obzirom da su antigenski srodni amoditaginu, najvjerojatnije također pripadaju skupini Zn^{2+} -ovisnih metaloproteinaza. Naime, u ELISA testu provedenim usporednim oblaganjem pločice s čistim proteinom, odnosno ukupnom hemoraginskom frakcijom izoliranom iz *Vaa* otrova te njihovom inkubacijom s anti-amoditagin serumom, pri svakom njegovom razrjeđenju su dobivene međusobno potpuno podudarne $A_{492\text{ nm}}$ vrijednosti (Slika 33) što potvrđuje da su

anti-amoditagin antitijela specifična i za ostale hemoragine koje prepoznaju s podjednakom efikasnošću kao i antigen s kojim je u pokusnoj životinji induciran njihov nastanak.

Demonstrirana *in vivo* učinkovitost amoditagin-specifičnog seruma u eliminaciji lokalno izražene hemoragičnosti *Vaa* otrova za koju je najvjerojatnije zaslužna križna reaktivnost amoditagina i njegovih ostalih hemoragina daje prostora za spekulaciju o mogućem kliničkom potencijalu izolirane metaloproteinaze. Naime, s obzirom da novi, racionalniji pristup dizajnu protuotrova promovira poboljšanje njihove kvalitete, potencije i sigurnosti upotrebom antiseruma usmjerenih samo protiv kombinacije medicinski važnih patogenih determinanti (Harrison i sur., 2003), daljnjim povećanjem opsega znanja o biokemiji, toksinologiji i imunologiji *Vaa* otrova amoditagin ima potencijal da preuzme ulogu reprezentativnog hemoragičnog predstavnika u pažljivo osmišljenoj imunizacijskoj smjesi definiranog sastava i kapaciteta dostatnog za neutralizaciju arsenala njegovih glavnih toksičnih aktivnosti.



Slika 32. Imunološka specifičnost anti-amoditagin seruma ispitana western blot analizom amoditagina ($m = 10 \mu\text{g}$), odnosno cijelog *Vaa* otrova ($m = 20 \mu\text{g}$).



Slika 33. Prepoznavanje amoditagina i hemoragina (H) iz *Vaa* otrova s anti-amoditagin antitijelima u ELISA testu. Na *x*-osi naznačena su korištena razrjeđenja seruma specifičnog za amoditagin, a na *y*-osi izmjerene $A_{492\text{ nm}}$ vrijednosti.

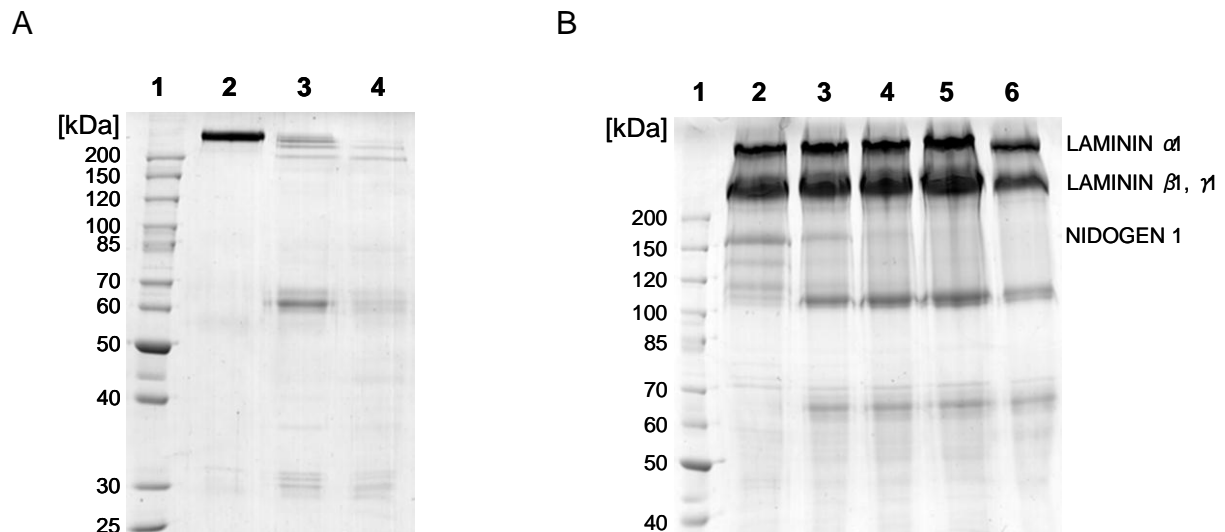
4.2.3. UČINAK NA BIOLOŠKI RELEVANTNE SUPSTRATE – KOMPONENTE EKSTRACELULARNOG MATRIKSA I FAKTORE ZGRUŠAVANJA KRVI

Uz pronalazak ključnih molekularnih osobina odgovornih za modulaciju patofarmakološkog djelovanja, jedan od najrelevantnijih zadataka u toksinološkoj karakterizaciji Zn^{2+} -ovisnih metaloproteinaza iz otrova zmija podrazumijeva identifikaciju njihovih prirodnih supstrata (Ramos i Selistre-de-Araujo, 2006; Paes Leme i sur., 2011), između ostalog i onih koji podliježu strukturnim ili funkcionalnim modifikacijama s patogenetskim ishodom koji se kod otrovanja povezanim s ugrizom zmija iz porodice *Viperidae* eksprimira kao hemoragija. Iako detaljni mehanizam oštećenja mikrovaskulature još uvijek nije potpuno razjašnjen, prevladava mišljenje da najvećim dijelom proizlazi iz selektivne proteolitičke degradacije komponenti bazalne membrane zaslužnih za mehaničku stabilnost krvnih žila (Gutiérrez i Rucavado, 2000; Gutiérrez i sur., 2005; Ramos i Selistre-de-Araujo, 2006; Escalante i sur., 2011).

Učinak amoditagina na supstrate čija se hidroliza povezuje s indukcijom hemoragičnog fenotipa smo provjerili inkubacijom pročišćenog proteina bilo s pojedinačnim

komponentama ekstracelularnog matriksa, bilo s Matrigelom kao komercijalno dostupnom topivom preparacijom bazalne membrane (<http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=17841>) te SDS-PAGE analizom eventualno nastalih degradacijskih produkata. S obzirom da je laminin ostao intaktan čak i nakon što je 24 h bio izložen djelovanju enzima, hemoragična aktivnost amoditagina bi mogla biti povezana s gubitkom integriteta krvožilnog endotela uslijed njegovog proteolitičkog efekta na drugi analizirani protein, fibronektin (Slika 34A). Naime, funkcionalni značaj fibronektina, velikog dimernog glikoproteina samoorganiziranog u netopive fibrile deponirane u bazalnoj membrani, dominantno se očituje kroz ulogu posrednika koji pomoću visokoafinitetnih veznih mjesta za veliki broj različitih tipova integrina – strukturno, imunokemijski i funkcionalno srodnih transmembranskih adhezijskih receptora, endotelnim stanicama krvnih žila omogućuje da se usidre u okolni ekstracelularni matriks i zadobiju odgovarajuću potporu neophodnu za mehaničku stabilnost mikrovaskulature (Romberger, 1997; Plow i sur., 2000). Nadalje, s obzirom da djeluje i kao višestruki ligand i za brojne druge biološki važne molekule, uključujući heparan-sulfat proteoglikane, fibrin te (denaturirani) kolagen, fibronektin također posreduje i u adheziji stanica te njihovoj migraciji u fibrinski ugrušak prilikom ozljede krvne žile (Pankov i Yamada, 2002). Međutim, uzevši u obzir da hidroliza uočena na pročišćenim proteinima *in vitro* ne odražava nužno stvarnu proteolitičku osjetljivost supstrata *in vivo* gdje je njihova dostupnost djelovanju enzima ograničena interakcijama s ostalim tkivnim komponentama (Gutiérrez i sur., 2005), kao alternativni, kompleksni supstrat smo upotrijebili i Matrigel najvećim dijelom sastavljenim od laminina, kolagena tipa IV, nidogena i heparan-sulfat proteoglikana integriranih u definiranu strukturu koja oponaša fiziološki relevantan okoliš. Kao što smo potvrdili N-terminalnim sekvenciranjem njegovih degradacijskih produkata odijeljenih gel-elektroforezom, laminin i kolagen tipa IV su se pokazali potpuno rezistentnima na hidrolitički učinak amoditagina čije je djelovanje bilo usmjereno isključivo prema nidogenu (Slika 34B). Nidogen je široko rasprostranjeni konstituent bazalne membrane koji zauzima središnju ulogu u njoj supramolekularnoj organizaciji zahvaljujući sposobnosti da formira ternarne komplekse u kojima simultanom interakcijom s umreženim polimerima kolagena tipa IV, odnosno laminina kao i s perlekanom te fibulinima premošćuje glavne građevne jedinice ekstracelularnog matriksa (Aumailley i sur., 1993; Ries i sur., 2001; Yurchenco i sur., 2004; Yurchenco i Patton, 2009) zbog čega je izgledno da bi u kontekstu biološke aktivnosti amoditagina njegova selektivna proteolitička degradacija za posljedicu mogla imati gubitak stabilnosti kapilarnog zida. Naime, izlaganjem Matrigela amoditagu do degradacije nidogena je došlo na dva položaja čime su generirani proteinski fragmenti

molekulskih masa od približno 70 i 110 kDa koje smo na gelu prvi put uočili SDS-PAGE analizom reakcijske smjese inkubirane u trajanju od 15 min. Mjesto cijepanja detektirano na položaju Val⁴²²-Phe⁴²³ (Tablica 8) smješteno je unutar globularne G2 domene koja sadrži vezne regije za kolagen tipa IV, perlekan te fibuline (Ries i sur., 2001) i koja inače pokazuje iznenađujuće visok stupanj otpornosti na proteolizu (Mayer i sur., 1993). U kontekstu svestranosti veznih aktivnosti povezanih s G2 domenom, njena razgradnja najvjerojatnije narušava funkciju nidogena kao premosnika u molekularnoj arhitekturi bazalne membrane. Drugo identificirano mjesto cijepanja, Tyr³⁵²-Asn³⁵³ (Tablica 8), zahvaća fleksibilnu, filamentoznu regiju kao poveznicu između dviju susjednih globularnih domena, G1 i G2, i ujedno već prepoznatu kao proteolitički najosjetljiviji segment molekule (Aumailley i sur., 1993; Mayer i sur., 1993).



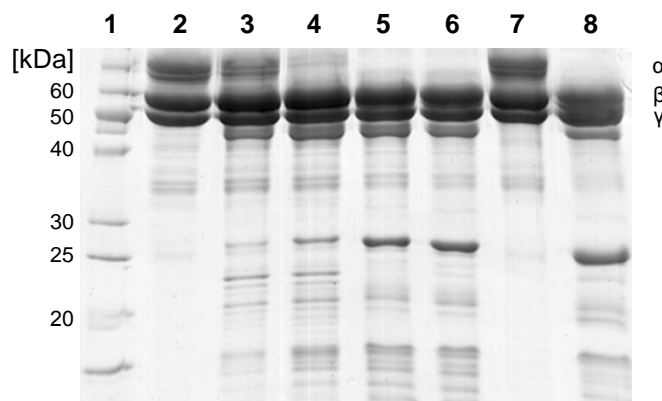
Slika 34. Proteolitički učinak amoditagina na fibronektin i Matrigel – topivu preparaciju bazalne membrane. (A) Fibronektin ($m = 25 \mu\text{g}$) i amoditagin ($m = 1 \mu\text{g}$) su inkubirani na 37 °C kroz 3 i 24 h te podvrgnuti SDS-PAGE analizi pod reducirajućim uvjetima na gradijentnom gelu s 7,5 % (w / V) umreženosti (linije 3 i 4). Linija 1, standardi; linija 2, kontrola – fibronektin inkubiran bez amoditagina na 37 °C kroz 24 h. Gelovi su obojani s Coomassie Brilliant Blue R250. (B) Matrigel ($m = 11,2 \mu\text{g}$) i amoditagin ($m = 0,3 \mu\text{g}$) su inkubirani na 37 °C kroz različite vremenske intervale i podvrgnuti SDS-PAGE analizi pod reducirajućim uvjetima na gradijentnom gelu s 7,5 % (w / V) umreženosti. Linija 1, standardi; linija 2, kontrola – Matrigel inkubiran bez amoditagina na 37 °C kroz 360 min; linije 3-6, Matrigel inkubiran s amoditaginom na 37 °C kroz 15, 60, 180 i 360 min.

4.2.4. UČINAK NA FAKTORE ZGRUŠAVANJA KRVI

Osim što izravno sudjeluju u oštećenju krvožilnog endotela, većina dosad okarakteriziranih hemoragičnih Zn^{2+} -ovisnih metaloproteinaza pokazuje i izraženu sposobnost narušavanja hemostaze djelovanjem na koagulacijske faktore ili interferiranjem s funkcijom trombocita kako bi dodatno potencirale hemoragično stanje promoviranjem ekstravazacije krvi u okolno tkivo i ujedno potpomogle cirkulaciju ostalih toksina iz otrova ključnih u indukciji nastanka sistemskih patofizioloških efekata (Kamiguti, 2005; Lu i sur., 2005; Kini, 2006). Fenomeni deplecije faktora zgrušavanja krvi i inhibicije agregacije trombocita udruženi s proteolitičkom digestijom bazalne membrane smatraju se glavnim mehanizmom koji vodi nastanku hemoragije inducirane metaloproteinazama podrijetlom iz zmijskih otrova (Ramos i Selistre-de-Araujo, 2006).

U kontekstu razjašnjenja molekularne osnove hemoragičnosti amoditagina, uz komponente ekstracelularnog matriksa, njegovom proteolitičkom djelovanju smo podvrgnuli i fibrinogen, protrombin te faktor X. Vremenski tijek amoditaginom posredovane hidrolize fibrinogena humanog podrijetla smo pratili SDS-PAGE analizom pri reducirajućim uvjetima koja je pokazala da je njegova enzimska aktivnost najvećim dijelom usmjerena prema $A\alpha$ -lancu molekule čije smo degradacijske produkte prvi put uočili nakon samo jedne minute, dok je cjelokupna razgradnja bila kompletno dovršena unutar petominutne inkubacije (Slika 35). Cijepanje $B\beta$ -lanca analiziranog faktora zgrušavanja krvi se odvijalo znatno sporije. Naprotiv, njegov γ -lanac je ostao potpuno netaknut, čak i u slučaju kad je inkubacija s pročišćenim enzimom bila produžena na 6 h. Očekivano, prisutnost Na_2EDTA u reakcijskoj smjesi potpuno je onemogućila fibrinogenolitičku aktivnost Zn^{2+} -ovisne metaloproteinaze. Naprotiv, Pefabloc, inhibitor serinskih proteinaza, nije pokazao nikakav učinak na njeno proteolitičko djelovanje. Nastale degradacijske produkte fibrinogena smo podvrgli i N-terminalnom sekvenciranju kako bi identifikacijom hidroliziranih peptidnih veza definirali preferirana mjesta cijepanja amoditagina (Tablica 8). Razgradnju $A\alpha$ -lanca smo detektirali na višestrukim položajima, uključujući $Ser^{220}-Gln^{221}$, $Lys^{413}-Leu^{414}$, $Glu^{422}-Leu^{423}$ i $Glu^{520}-Phe^{521}$ te, pri manjoj brzini razgradnje (poslije 6 h), na još tri dodatna mjesta ($Asn^{109}-Arg^{110}$, $Arg^{239}-Met^{240}$ i $Arg^{491}-His^{492}$). U $B\beta$ -lancu do cijepanja je došlo samo kod $Lys^{22}-Arg^{23}$ peptidne veze. Prema podjeli koju su predložili Swenson i Markland (2005), Zn^{2+} -ovisne metaloproteinaze iz zmijskih otrova, ovisno o dominantnom afinitetu kojeg iskazuju za pojedine lance fibrinogena, pripadaju ili α - ili β -fibrinogenazama, s obzirom da je u literaturi dosad opisana samo jedna, metaloendopeptidaza karakteristična za vrstu *Crotalus atrox*, koja kao supstrat

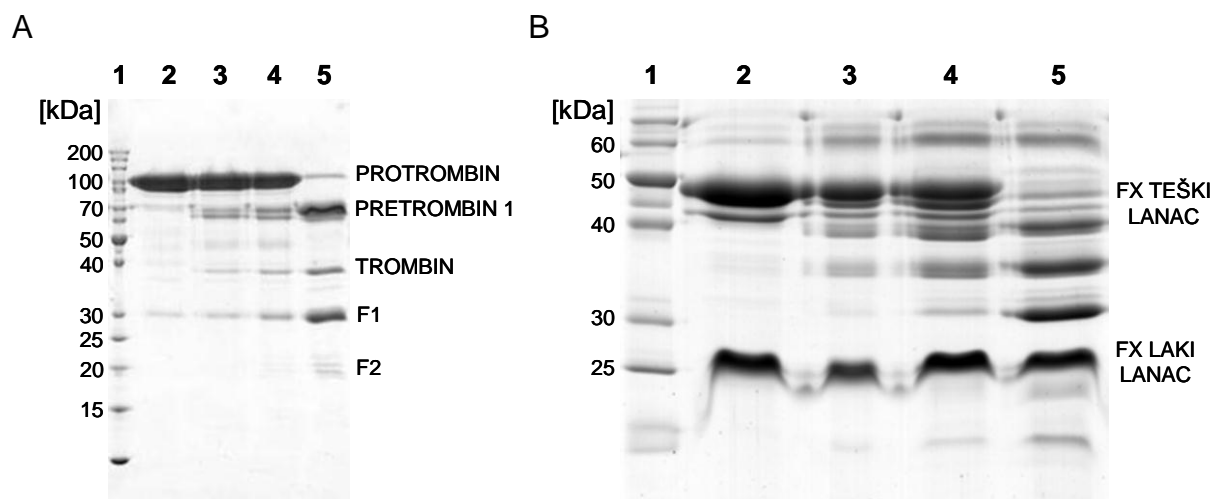
preferira njegov γ -lanac (Matsui i sur., 2000). Na osnovu rezultata SDS-PAGE analize i N-terminalnog sekvenciranja amoditagina smo kvalificirali kao α -fibrinogenazu koja brzo i efikasno hidrolizira α -lanac fibrinogena, iskazujući samo ograničenu aktivnost prema njegovom β -lancu. Među ostalim hemoragičnim Zn^{2+} -ovisnim metaloproteinazama P-III grupe slična specifičnost je, između ostalih, opisana i za BjuSSuMP-I iz vrste *Bothrops jararacussu* (Mazzi i sur., 2004), baltergin iz vrste *Bothrops alternatus* (Gay i sur., 2005) te alsofinazu iz vrste *Alsophis portoricensis* (Weldon i Mackessy, 2012).



Slika 35. Hidroliza humanog fibrinogena ($m = 1$ mg) s amoditaginom ($m = 3$ μ g) u ovisnosti o trajanju enzimske reakcije. SDS-PAGE analiza alikvota reakcijske smjese je provedena pri reducirajućim uvjetima na gelu s 12,5 % (w / V) umreženosti. Za detekciju je korišten Coomassie Brilliant Blue R250. Fibrinogen je podvrgnut inkubaciji na 37 °C kroz 60 min bez amoditagina (linija 2), kroz 1, 5, 30 i 60 min s amoditaginom (linije 3-6) te kroz 60 min s amoditaginom prethodno tretiranim s Na_2EDTA (linija 7) ili Pefabloc-om (linija 8). Standardi su u liniji 1.

Također, amoditagin je pokazao i sposobnost digestije preostala dva ispitana supstrata. Razgradnjom protrombina u osnovi dovršenom unutar 24 h najvjerojatnije su generirani pretrombin 1, trombin te fragmenti F1 i F2 koje smo identificirani na osnovu njihove elektroforetske pokretljivosti u SDS-PAGE analizi (Slika 36A), dok je do cijepanja faktora X (Slika 36B), kao što smo potvrdili N-terminalnim sekvenciranjem njegovih konačnih degradacijskih produkata, došlo isključivo kod Gln^{49} - Cys^{50} peptidne veze u lakom lancu te kod Asp^{173} - Leu^{174} peptidne veze u teškom lancu molekule (Tablica 8). Demonstrirana razgradnja testiranih faktora zgrušavanja krvi u ovisnosti o trajanju enzimske reakcije *in vivo* bi najvjerojatnije rezultirala njihovom deplecijom što otvara mogućnost za spekulaciju o antikoagulacijskim svojstvima amoditagina koja su, kao što je najizglednije, povezana s

njegovim snažnim fibrinogenolitičkim potencijalom. Naime, fibrinogen je jedan od glavnih sudionika u koagulacijskoj kaskadi i agregaciji trombocita (You i sur., 2006) čije iscrpljenje u krvotoku rezultira defibrinogenacijom i prolongacijom vremena zgrušavanja krvi (Gutiérrez i sur., 2010). Također je poznato i da fibrinski ugrušak nastao polimerizacijom neadekvatno pocijepane molekule fibrinogena nije dovoljno učinkovit u formiranju mehaničke barijere prilikom oštećenja endotela krvnih žila, i posljedično, zaustavljanju krvarenja i održavanju hemostaze (Kini, 2006).



Slika 36. Uzorak digestije amoditaginom tretiranog protrombina i faktora X podrijetlom iz govedeg seruma. Svaki supstrat ($m = 90 \mu\text{g}$) je inkubiran s amoditaginom ($m = 4,5 \mu\text{g}$) na 37°C kroz različite vremenske intervale. Alikvoti reakcijske smjese su analizirani SDS-PAGE metodom pri reducirajućim uvjetima na gelu s 12,5 % (w / V) umreženosti obojanim s Coomassie Brilliant Blue R250. (A) Linija 1, standardi; linija 2, kontrola – protrombin inkubiran bez amoditagina na 37°C kroz 24 h; linije 3-5, protrombin inkubiran s amoditaginom kroz 2, 4 i 24 h. (B) Linija 1, standardi; linija 2, kontrola – faktor X inkubiran bez amoditagina na 37°C kroz 24 h; linije 3-5, faktor X inkubiran s amoditaginom kroz 2, 4 i 24 h.

S obzirom na opseg značaja koji se u okvirima patofarmakološkog ishoda otrovanja pridaje proteolitičkoj specifičnosti metaloproteinaza prisutnih u zmijskim otrovima, uz pronalazak najrelevantnijih supstrata, sve je naglašenija i potreba za definiranjem njihovih preferiranih položaja cijepanja (Paes Leme i sur., 2011). Kako B-ianac inzulina kao općeprihvaćeni model sadrži ograničen broj kombinacija susjednih aminokiselinskih ostataka na P, odnosno P' položajima, s ciljem što boljeg uvida u selektivnost koju amoditagin iskazuje prema ponuđenim peptidnim vezama, mjesta njegovog hidrolitičkog djelovanja smo

identificirali i u nekolicini informativnijih supstrata – nidogenu, A α - i B β -lancima fibrinogena te faktoru X (Tablica 8). Njihova preliminarna analiza dozvoljava da se amoditagin okarakterizira kao enzim široke proteolitičke specifičnosti, osobito izražene na primjeru A α -lanca fibrinogena, koji ne pokazuje isključivi zahtjev za hidrofobnim aminokiselinskim bočnim ogrankom na P1' položaju (Leu, Met, Phe, His, Cys), gdje tolerira i određene polarne (Gln, Asn), pa čak i nabijene ostatke (Arg). Sličan fenomen je uočen i kod lebetaze, atrolizina E, mokratagina i kaoutiagina kao Zn²⁺-ovisnih metaloproteinaza koje također izlaze iz uobičajenog okvira preferiranih mjesta cijepanja s obzirom da kataliziraju hidrolizu peptidne veze i na N-terminalnom kraju lizina, serina, glutamina te asparaginske kiseline (Matsui i sur., 2000; Trummal i sur., 2000; Siigur i sur., 2001b).

Tablica 8. Mjesta hidrolitičkog djelovanja amoditagina u B-lancu inzulina i biološki relevantnim supstratima.

Supstrat	Mjesta hidrolitičkog djelovanja
B-lanac inzulina	Gln ⁴ -His ⁵ His ¹⁰ -Leu ¹¹ Tyr ¹⁶ -Leu ¹⁷
A α -lanac fibrinogena	Asn ¹⁰⁹ -Arg ¹¹⁰ Ser ²²⁰ -Gln ²²¹ Arg ²³⁹ -Met ²⁴⁰ Lys ⁴¹³ -Leu ⁴¹⁴ Glu ⁴²² -Leu ⁴²³ Arg ⁴⁹¹ -His ⁴⁹² Glu ⁵²⁰ -Phe ⁵²¹
B β -lanac fibrinogena	Lys ²² -Arg ²³
Faktor X	Gln ⁴⁹ -Cys ⁵⁰ Asp ¹⁷³ -Leu ¹⁷⁴
Nidogen	Tyr ³⁵² -Asn ³⁵³ Val ⁴²² -Phe ⁴²³

5. ZAKLJUČCI

Amoditoksini i hemoragini u imunološkom smislu nisu križno reaktivni. Naime, kao što je potvrđeno ELISA testom, serumi kunića imuniziranih s Atx-om A sadržavali su antitijela specifična samo za amoditoksine, a serumi kunića imuniziranih s ukupnom hemoraginskom frakcijom antitijela specifična samo za hemoragine. U anti-Atx+H serumima detektirana su antitijela obiju specifičnosti.

U ED₅₀ testu postavljenim s ciljem definiranja zaštitne uloge antitijela na amoditoksine i hemoragine te njihovu kombinaciju najkvalitetnijim se pokazao kontrolni, anti-*Vaa* otrov serum visoke neutralizacijske učinkovitosti. U usporedbi s njim oni specifični za Atx A su iskazali iznenađujuće slabu zaštitnu moć unatoč najmanje dvaput većem sadržaju anti-Atx IgG-a. Nadalje, serumi dobiveni imunizacijom kunića s ukupnom hemoraginskom frakcijom su bili potpuno neefikasni u zaštiti miševa od letalnog efekta induciranog cijelim *Vaa* otrovom.

Fiziološka djelotvornost anti-Atx antitijela je ispitana procjenom sposobnosti Atx-specifičnih seruma da *in vivo* neutraliziraju letalnu toksičnost izazvanu čistim, nativnim Atx-om A. Kao i kontrolni, anti-*Vaa* otrov serum, i svi eksperimentalni serumi s anti-Atx IgG-ima, bilo oni dobiveni imunizacijom s Atx-om A, bilo oni dobiveni imunizacijom s Atx-ima u kombinaciji s hemoraginima, u testu na miševima su pokazali izrazito visoku zaštitnu učinkovitost protiv toksičnosti Atx-a A. Neutralizacijska moć seruma kunića imuniziranih s Atx-om A, odnosno kombinacijom Atx-a i ukupne hemoraginske frakcije snažno korelira s njihovom anti-Atx IgG količinom.

Relativno slabi doprinos anti-Atx antitijela neutralizaciji sveukupnog letalnog učinka *Vaa* otrova implicira da njegov proteom najvjerojatnije obuhvaća i još neopisane komponente s toksičnim efektom po snazi usporedivim s onim kojeg iskazuje Atx A te da stupanj njihove međusobne križne reaktivnosti, ako i postoji, nije dovoljan za postizanje protektivne efikasnosti na razini one koju pokazuje anti-*Vaa* otrov serum. Drugo moguće objašnjenje je da Atx A kao presinaptički neurotoksin u indukciji patofiziološkog učinka ne djeluje samostalno kao monomer, već u nekovalentnom kompleksu s dodatnim proteinskim faktorom koji zaklanja njegove epitope i onemogućuje vezanje neutralizirajućih antitijela.

Kao što je pokazano *in vivo* testom, pripremljeni anti-H i anti-Atx+H serumi imaju sposobnost kompletne neutralizacije lokalnog hemoragičnog efekta *Vaa* otrova iz čega

proizlazi da su antitijela koja sadrže potpuno funkcionalna i visoko imunospecifična za hemoraginske epitope. Njihova fiziološka djelotvornost je također demonstrirana i u kontekstu inhibicijskog potencijala hidrolitičkog djelovanja *Vaa* otrova *in vitro*. U biokemijskom testu, neovisno o sadržaju anti-H IgG-a, svi hemoragin-specifični serumi su se pokazali podjednako efikasnim, reducirajući samo frakciju njegove proteolitičke aktivnosti. Najizgledniji razlog je taj što, prema western blot analizi, nehemoragične, i unatoč tome, proteolitički aktivne metaloproteinaze prepoznaju izuzetno slabo ili ih uopće ne prepoznaju.

Funkcionalna antitijela specifična za amoditoksine su odgovorna za djelomičnu zaštitu od letalne toksičnosti *Vaa* otrova, dok ona specifična za hemoragine uopće ne osiguravaju protekciju iako su, s druge strane, u životinjskom pokusnom modelu sama po sebi dostatna za neutralizaciju njegovog lokalnog hemoragičnog efekta. Dobiveni rezultat sugerira da u slučaju *Vaa* protuotrova ED₅₀ test na miševima zbog neodgovarajuće osjetljivosti nije pogodan za mjerenje antitijela koja se prilikom imunizacije razvijaju na onu frakciju otrova čije se sudjelovanje u envenomacijskoj patogenezi kod ljudi smatra vrlo izglednim te da kao takav s regulatorne točke gledišta ne ispunjava svoj primarni zadatak.

Doprinos antitijela specifičnih samo za jedan izdvojeni protein hemoragičnog fenotipa u neutralizaciji ukupne hemoragičnosti eksprimirane od strane cijelog *Vaa* otrova istražen je na primjeru još neopisane Zn²⁺-ovisne metaloproteinaze nazvane amoditagin.

Amoditagin je glikozilirani, blago kiseli heterodimer od 108 kDa sastavljen od dva polipeptidna lanca s izoelektričnim točkama između 5 i 5,5 koji se prilikom kromatografske frakcionacije otrova izvedene pri pH = 9,0 za kationski nosač najvjerojatnije adsorbira posredstvom pozitivno nabijenih domena izloženih na površini molekule.

Kao što je zaključeno analizom djelomične aminokiselinske sekvence određene kombinacijom MALDI-TOF MS/MS analize i Edmanove odgradnje, najmanje jedan polipeptidni lanac amoditagina posjeduje katalitičku domenu s Zn²⁺-veznim motivom HELGHNLGMEH. Također, obje njegove podjedinice sadrže i potpuno identične peptide koji pripadaju domeni nalik disintegrinskoj kao i onoj bogatoj cisteinom što ga svrstava u P-III grupu strukturno najkompleksnijih predstavnika Zn²⁺-ovisnih metaloproteinaza.

Posebnost amoditagina leži i u dimernoj prirodi njegove native strukture koja ga klasificira među pripadnike P-IIIc podgrupe, s obzirom da u procesu posttranslacijskog procesiranja podliježe heterodimerizaciji kao višem redu strukturne organizacije.

Novoizolirani protein je katalitički aktivan na azokazeinu kao nespecifičnom supstratu. Potpuna ili djelomična inaktivacija proteolize posredovane amoditaginom je postignuta djelovanjem Na₂EDTA, DTT-a, suviška Zn²⁺ iona te L-cisteina. Blagi aktivacijski učinak je ostvaren u uvjetima izloženosti Ca²⁺ i Mg²⁺ ionima.

U B-lancu inzulina amoditagin je katalizirao hidrolizu peptidne veze s leucinskim ili histidinskim ostatkom na P1' položaju. Selektivno cijepanje je detektirano na tri različita mjesta (Gln⁴-His⁵, His¹⁰-Leu¹¹ i Tyr¹⁶-Leu¹⁷) koja su uobičajeno preferirana od strane metaloendopeptidaza iz otrova zmijsa. S ciljem što boljeg uvida u selektivnost koju iskazuje prema ponuđenim peptidnim vezama, mjesta njegovog hidrolitičkog djelovanja su identificirana i u nekolicini informativnijih supstrata – nidogenu, A α - i B β -lancima fibrinogena te faktoru X. Preliminarna analiza generiranih degradacijskih produkata dozvoljava da se amoditagin okarakterizira kao enzim široke proteolitičke specifičnosti koji ne pokazuje isključivi zahtjev za hidrofobnim aminokiselinskim bočnim ogrankom na P1' položaju (Leu, Met, Phe, His, Cys), gdje tolerira i određene polarne (Gln, Asn), pa čak i nabijene ostatke (Arg).

S biološkog stajališta, amoditagin djeluje kao jaki hemoragin od potencijalno visokog medicinskog značaja koji je čak dva puta potentniji od cijelog *Vaa* otrova. Njegova MHD doza određena testom na štakorima i miševima nešto je niža od 11 μ g, odnosno 1 μ g.

Među ispitanim komponentama ekstracelularnog matriksa kao biološki relevantnim supstratima čija se hidroliza povezuje s indukcijom hemoragičnog fenotipa, amoditagin je iskazao sposobnost degradacije fibronektina i nidogena iz Matrigela, dok je u kontekstu učinka na faktore zgrušavanja krvi okarakteriziran i kao α -fibrinogenaza koja, osim fibrinogena, hidrolizira i protrombin te faktor X. Demonstrirana razgradnja testiranih faktora zgrušavanja krvi u ovisnosti o trajanju enzimske reakcije *in vivo* bi najvjerojatnije rezultirala njihovom deplecijom što otvara mogućnost za spekulaciju o antikoagulacijskim svojstvima izolirane metaloproteinaze koja su, kao što je najizglednije, povezana s njenim snažnim fibrinogenolitičkim potencijalom.

S ciljem analize imunogenosti, pročišćeni protein je upotrijebljen i kao antigen za imunizaciju kunića i pripravu anti-amoditagin seruma koji je u *in vivo* neutralizacijskom eksperimentu pokazao izuzetno visoku moć inhibicije lokalno izražene hemoragične aktivnosti cijelog *Vaa* otrova, najvjerojatnije zahvaljujući značajnom stupnju križne

reaktivnosti amoditagina i njegovih ostalih hemoragina, kao što je pokazano western blot analizom i ELISA testom.

6. POPIS LITERATURE

Alape-Girón, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-Díaz, M., Madrigal, M., Sasa, M., Calvete, J.J., 2008. Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. *J. Proteome Res.* 7, 3556-3571.

An, H.J., Froehlich, J.W., Lebrilla, C.B., 2009. Determination of glycosylation sites and site-specific heterogeneity in glycoproteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13, 421-426.

Anai, K., Sugiki, M., Yoshida, E., Maruyama, M., 2002. Neutralization of a snake venom hemorrhagic metalloproteinase prevents coagulopathy after subcutaneous injection of *Bothrops jararaca* venom in rats. *Toxicon* 40, 63-68.

Aumailley, M., Battaglia, C., Mayer, U., Reinhardt, D., Nischt, R., Timpl, R., Fox, J.W., 1993. Nidogen mediates the formation of ternary complexes of basement membrane components. *Kidney Int.* 43, 7-12.

Bardarov, V., Aleksiev, B., 2002. Fractionation of Bulgarian viper (*Vipera ammodytes*) venoms. Relation of venom content and subspecies affiliation of the snakes. *Chromatographia* 56, 345-349.

Bateman, A., Solomon, S., Bennett, H.P., 1990. Post-translational modification of bovine pro-opiomelanocortin. Tyrosine sulfation and pyroglutamate formation, a mass spectrometric study. *J. Biol. Chem.* 265, 22130-22136.

Bernardes, C.P., Santos-Filho, N.A., Costa, T.R., Gomes, M.S., Torres, F.S., Costa, J., Borges, M.H., Richardson, M., dos Santos, D.M., de Castro Pimenta, A.M., Homs-Brandeburgo, M.I., Soares, A.M., de Oliveira, F., 2008. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon* 51, 574-584.

Betzel, C., Genov, N., Rajashankar, K.R., Singh, T.P., 1999. Modulation of phospholipase A₂ activity generated by molecular evolution. *Cell. Mol. Life Sci.* 56, 384-397.

Bjarnason, J.B., Fox, J.W., 1994. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol. Ther.* 62, 325-372.

Bjarnason, J.B., Fox, J.W., 1995. Snake venom metalloendopeptidases: reprolysins. *Methods Enzymol.* 248, 345-68.

- Blacklow, B., Escoubas, P., Nicholson, G.M., 2010a. Characterisation of the heterotrimeric presynaptic phospholipase A₂ neurotoxin complex from the venom of the common death adder (*Acanthophis antarcticus*). *Biochem. Pharmacol.* 80, 277-287.
- Blacklow, B., Konstantakopoulos, N., Hodgson, W.C., Nicholson, G.M., 2010b. Presence of presynaptic neurotoxin complexes in the venoms of Australo-Papuan death adders (*Acanthophis* spp.). *Toxicon* 55, 1171-1180.
- Bode, W., Gomis-Rüth, F.X., Stöckler, W., 1993. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett.* 331, 134-140.
- Bode, W., Kress, L.F., Meyer, E.F., Gomis-Rüth, F.X., 1994. The crystal structure of adamalysin II, a zinc-endopeptidase from the snake venom of the eastern diamondback rattlesnake *Crotalus adamanteus*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27, 2049-2068.
- Boldrini-França, J., Rodrigues, R.S., Fonseca, F.P., Menaldo, D.L., Ferreira, F.B., Henrique-Silva, F., Soares, A.M., Hamaguchi, A., Rodrigues, V.M., Otaviano, A.R., Homs-Brandeburgo, M.I., 2009. *Crotalus durissus collilineatus* venom gland transcriptome: analysis of gene expression profile. *Biochimie* 91, 586-595.
- Boldrini-França, J., Corrêa-Netto, C., Silva, M.M., Rodrigues, R.S., De La Torre, P., Pérez, A., Soares, A.M., Zingali, R.B., Nogueira, R.A., Rodrigues, V.M., Sanz, L., Calvete, J.J., 2010. Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. *J. Proteomics* 73, 1758-1776.
- Brown, J.L., Roberts, W.K., 1976. Evidence that approximately eighty per cent of the soluble proteins from Ehrlich ascites cells are N^α-acetylated. *J. Biol. Chem.* 251, 1009-1014.
- Brown, J.L., 1979. A comparison of the turnover of alpha-N-acetylated and nonacetylated mouse L-cell proteins. *J. Biol. Chem.* 254, 1447-1449.
- Burke, J.E., Dennis, E.A., 2009. Phospholipase A₂ biochemistry. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 23, 49-59.
- Calvete, J.J., Marcinkiewicz, C., Monleón, D., Esteve, V., Celda, B., Juárez, P., Sanz, L., 2005. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon* 45, 1063-1074.

- Calvete, J.J., Marcinkiewicz, C., Sanz, L., 2007a. 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.* 6, 326-336.
- Calvete, J.J., Escolano, J., Sanz, L., 2007b. Snake venomomics of *Bitis* species reveals large intragenus venom toxin composition variation: application to taxonomy of congeneric taxa. *J. Proteome Res.* 6, 2732-2745.
- Calvete, J.J., Juárez, P., Sanz, L., 2007c. Snake venomomics. Strategy and applications. *J. Mass Spectrom.* 42, 1405-1414.
- Calvete, J.J., Sanz, L., Cid, P., de la Torre, P., Flores-Díaz, M., Dos Santos, M.C., Borges, A., Bremó, A., Angulo, Y., Lomonte, B., Alape-Girón, A., Gutiérrez, J.M., 2010. Snake venomomics of the Central American rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive pedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. *J. Proteome Res.* 9, 528-544.
- Calvete, J.J., Sanz, L., Pérez, A., Borges, A., Vargas, A.M., Lomonte, B., Angulo, Y., Gutiérrez, J.M., Chalkidis, H.M., Mourão, R.H., Furtado, M.F., Moura-Da-Silva, A.M., 2011. Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Pedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. *J. Proteomics* 74, 510-527.
- Casewell, N.R., Wagstaff, S.C., Harrison, R.A., Renjifo, C., Wüster, W., 2011. Domain loss facilitates accelerated evolution and neofunctionalization of duplicate snake venom metalloproteinase toxin genes. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2637-2649.
- Chen, H.-S., Tsai, H.-Y., Wang, Y.-M., Tsai, I.-H., 2008. P-III hemorrhagic metalloproteinases from Russell's viper venom: Cloning, characterization, phylogenetic and functional site analyses. *Biochimie* 90, 1486-1498.
- Chen, R.Q., Jin, Y., Wu, J.B., Zhou, X.D., Lu, Q.M., Wang, W.Y., Xiong, Y.L., 2003. A new protein structure of P-II class snake venom metalloproteinases: it comprises metalloproteinase and disintegrin domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310, 182-187.
- Chippaux, J.-P., Williams, V., White, J., 1991. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon* 29, 1279-1303.

- Chippaux, J.-P., 2012. Epidemiology of snakebites in Europe: A systematic review of the literature. *Toxicon* 59, 1-14.
- Ciscotto, P.H., Rates, B., Silva, D.A., Richardson, M., Silva, L.P., Andrade, H., Donato, M.F., Cotta, G.A., Maria, W.S., Rodrigues, R.J., Sanchez, E., De Lima, M.E., Pimenta, A.M., 2011. Venomic analysis and evaluation of antivenom cross-reactivity of South American *Micrurus* species. *J. Proteomics* 74, 1810-1825.
- Cominetti, M.R., Ribeiro, J.U., Fox, J.W., Selistre-de-Araujo, H.S., 2003. BaG, a new dimeric metalloproteinase/disintegrin from the *Bothrops alternatus* snake venom that interacts with $\alpha_5\beta_1$ integrin. *Arch. Biochem. Biophys.* 416, 171-179.
- Corrêa-Netto, C., Teixeira-Araujo, R., Aguiar, A.S., Melgarejo, A.R., De-Simone, S.G., Soares, M.R., Foguel, D., Zingali, R.B., 2010. Immunome and venom of *Bothrops jararacussu*: a proteomic approach to study the molecular immunology of snake toxins. *Toxicon* 55, 1222-1235.
- Corrêa-Neto, C., Junqueira-de-Azevedo Ide, L., Silva, D.A., Ho, P.L., Leitão-de-Araújo, M., Alves, M.L., Sanz, L., Foguel, D., Zingali, R.B., Calvete, J.J., 2011. Snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, *Micrurus altirostris* and *M. corallinus*. *J. Proteomics* 74, 1795-1809.
- Cromwell, M.E., Hilario, E., Jacobson, F., 2006. Protein aggregation and bioprocessing. *AAPS J.* 8, E572-579.
- Cruz, L.S., Vargas, R., Lopes, A.A., 2009. Snakebite envenomation and death in the developing world. *Ethn. Dis.* 19, 42-46.
- de Haro, L., Glaizal, M., Tichadou, L., Blanc-Brisset, I., Hayek-Lanthois, M., 2009. Asp viper (*Vipera aspis*) envenomation: experience of the Marseille Poison Centre from 1996 to 2008. *Toxins* 1, 100-112.
- DePhillips, P., Lenhoff, A.M., 2001. Determinants of protein retention characteristics on cation-exchange adsorbents. *J. Chromatogr. A* 933, 57-72.
- Dismer, F., Petzold, M., Hubbuch, J. 2008. Effects of ionic strength and mobile phase pH on the binding orientation of lysozyme on different ion-exchange adsorbents. *J. Chromatogr. A* 1194, 11-21.
- Dismer, F., Hubbuch, J., 2010. 3D structure-based protein retention prediction for ion-exchange chromatography. *J. Chromatogr. A* 1217, 1343-53.

- Doley, R., Kini, R.M., 2009. Protein complexes in snake venom. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 2851–2871.
- Doley, R., Zhou, X., Kini, R.M., 2010. Snake venom phospholipase A₂ enzymes, u: Mackessy, S.P. (ur.) *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*, Taylor & Francis, Boca Raton, London, New York, pp. 173-205.
- Eble, J.A., 2010. Matrix biology meets toxinology. *Matrix Biol.* 29, 239-47.
- Ehresmann, B., Imbault, P., Weil, J.H., 1973. Spectrophotometric determination of protein concentration in cell extracts containing tRNA's and rRNA's. *Anal. Biochem.* 54, 454-463.
- El-Kady, E.M., Ibrahim, N.M., Wahby, A.F., 2009. Assessment of the anti-*Naja haje* antibodies elicited in a low dose multi-site immunization protocol. *Toxicon* 54, 450-459.
- Escalante, T., Rucavado, A., Fox, J.W., Gutiérrez, J.M., 2011. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *J. Proteomics* 74, 1781-1794.
- Estêvão-Costa, M.I., Martins, M.S., Sánchez, E.F., Diniz, C.R., Chávez-Olórtegui, C., 2000. Neutralization of the hemorrhagic activity of *Bothrops* and *Lachesis* snake venoms by a monoclonal antibody against mutalysin-II. *Toxicon* 38, 139-144.
- European Directorate for Quality of Medicines, 2010. Viper Venom Antiserum, European (01/2008:0145), u: European Pharmacopoeia. pp. 953-954.
- Fernandes, I., Assumpção, G.G., Silveira, C.R.F., Faquim-Mauro, E.L., Tanjoni, I., Carmona, A.K., Alves, M.F.M., Takehara, H.A., Rucavado, A., Ramos, O.H.P., Moura-da-Silva, A.M., Gutiérrez, J.M., 2010. Immunochemical and biological characterization of monoclonal antibodies against BaP1, a metalloproteinase form *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 56, 1059-1065.
- Ferquel, E., de Haro, L., Jan, V., Guillemin, I., Jourdain, S., Teynié, A., d'Alayer, J., Choumet, V., 2007. Reappraisal of *Vipera aspis* venom neurotoxicity. *PLoS One* 2: e1194. doi:10.1371/journal.pone.0001194.
- Fox, J.W., Campbell, R., Beggerly, L., Bjarnason, J.B., 1986. Substrate specificities and inhibition of two hemorrhagic zinc proteases Ht-c and Ht-d from *Crotalus atrox* venom. *Eur. J. Biochem* 156, 65-72.

- Fox, J.W., Serrano, S.M.T., 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* 45, 969-985.
- Fox, J.W., Serrano, S.M.T., 2008. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS J.* 275, 3016-3030.
- Fox, J.W., Serrano, S.M.T., 2009. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. *J. Proteomics* 72, 200-209.
- Fox, J.W., Serrano, S.M.T., 2010. Snake venom metalloproteinases, u: Mackessy, S.P. (ur.) *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*, Taylor & Francis, Boca Raton, London, New York: pp. 95-113.
- Franceschi, A., Rucavado, A., Mora, N., Gutiérrez, J.M., 2000. Purification and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon* 38, 63-77.
- Frangides, C.Y., Koulouras, V., Kouni, S.N., Tzortzatos, G.V., Nikolaou, A., Pneumaticos, J., Pierrakeas, C., Niarchos, C., Kounis, N.G., Koutsojannis, C.M., 2006. Snake venom poisoning in Greece. Experiences with 147 cases. *Eur. J. Intern. Med.* 17, 24-27.
- Freitas, T.V., Fortes-Dias, C.L., Diniz, C.R., 1990. Protection against the lethal effects of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom in animals immunized with crotoxin. *Toxicon* 28, 1491-1496.
- Fry, B.G., Wüster, W., 2004. Assembling an arsenal: origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences. *Mol. Biol. Evol.* 21, 870-883.
- Fry, B.G., 2005. From genome to "venome": molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome Res.* 15, 403-420.
- Furtado, M.F., Travaglia-Cardoso, S.R., Rocha, M.M., 2006. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). *Toxicon* 48, 401-410.
- García, L.T., Parreiras e Silva, L.T., Ramos, O.H., Carmona, A.K., Bersanetti, P.A., Selistre-de-Araujo, H.S., 2004. The effect of post-translational modifications on the hemorrhagic

activity of snake venom metalloproteinases. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 138, 23-32.

Gay, C.C., Leiva, L.C., Maruñak, S., Teibler, P., Acosta de Pérez, O., 2005. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. *Toxicon* 46, 546-554.

Georgieva, D.N., Genov, N., Nikolov, P., Aleksiev, B., Rajashankar, K.R., Voelter, W., Betzel, C., 2003. Structure-function relationships in the neurotoxin Vipoxin from the venom of *Vipera ammodytes meridionalis*. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 59, 617-627.

Georgieva, D., Risch, M., Kardas, A., Buck, F., von Bergen, M., Betzel, C., 2008. Comparative analysis of the venom proteomes of *Vipera ammodytes ammodytes* and *Vipera ammodytes meridionalis*. *J. Proteome Res.* 7, 866-886.

Gomes, M.S., Mendes, M.M., de Oliveira, F., de Andrade, R.M., Bernardes, C.P., Hamaguchi, A., de Alcântara, T.M., Soares, A.M., Rodrigues, V.M., Homs-Brandeburgo, M.I., 2009. BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon* 53, 24-32.

Gomes, M.S., de Queiroz, M.R., Mamede, C.C., Mendes, M.M., Hamaguchi, A., Homs-Brandeburgo, M.I., Sousa, M.V., Aquino, E.N., Castro, M.S., de Oliveira, F., Rodrigues, V.M., 2011. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 153, 290-300.

Gomis-Rüth, F.X., Kress, L.F., Bode, W., 1993. First structure of a snake venom metalloproteinase: a prototype for matrix metalloproteinases/collagenases. *EMBO J.* 12, 4151-4157.

Gomis-Rüth, F.X., 2003. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Mol. Biotechnol.* 24, 157-202.

Gong, W., Zhu, X., Liu, S., Teng, M., Niu, L., 1998. Crystal structures of acutolysin A, a three-disulfide hemorrhagic zinc metalloproteinase from the snake venom of *Agkistrodon acutus*. *J. Mol. Biol.* 283, 657-668.

- Gowda, D.C., Jackson, C.M., Hensley, P., Davidson, E.A., 1994. Factor X-activating glycoprotein of Russell's viper venom. Polypeptide composition and characterization of the carbohydrate moieties. *J. Biol. Chem.* 269, 10644-10650.
- Grams, F., Huber, R., Kress, L.F., Moroder, L., Bode, W., 1993. Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism. *FEBS Lett.* 335, 76-80.
- Gubenšek, F., Sket, D., Turk, V., Lebez, D., 1974. Fractionation of *Vipera ammodytes* venom and seasonal variation of its composition. *Toxicon* 12, 167-171.
- Gubenšek, F., Ritonja, A., Zupan, J., Turk, V., 1980. Basic proteins of *Vipera ammodytes* venom. Studies of structure and function. *Period. biol.* 82, 443-447.
- Gubenšek, F., Križaj, I., 1997. Ammodytoxins (*Vipera ammodytes ammodytes*), u: Rappuoli, R., Montecucco, C. (ur.), *Guidebook to Protein Toxins and Their Use in Cell Biology*, Oxford Univ. Press, New York, pp. 224–226.
- Guércio, R.A., Shevchenko, A., Shevchenko, A., López-Lozano, J.L., Paba, J., Sousa, M.V., Ricart, C.A., 2006. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake snake *Bothrops atrox*. *Proteome Sci.* 4, 11.
- Guo, X.-X., Zeng, L., Lee, W.-H., Zhang, Y., Jin, Y., 2007. Isolation and cloning of a metalloproteinase from king cobra snake venom. *Toxicon* 49, 954-965.
- Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., 2000. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 82, 841-850.
- Gutiérrez, J.M., Ownby, C.L., 2003. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon* 42, 915-931.
- Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T., Díaz, C., 2005. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* 45, 997-1011.
- Gutiérrez, J.M., Theakston, R.D., Warrell, D.A., 2006. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: The need for a global partnership. *PLoS Med* 3, e150.
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., León, G., Alape-Girón, A., Flores-Díaz, M., Sanz, L., Angulo, Y., Calvete, J.J., 2009. Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *J. Proteomics* 72, 165-182.

- Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T., 2010. Snake venom metalloproteinases: biological roles and participation in the pathophysiology of envenomation, u: Mackessy, S.P. (ur.) *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*, Taylor & Francis, Boca Raton, London, New York, pp. 115-138.
- Gutiérrez, J.M., León, G., Burnouf, T., 2011. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: the road ahead. *Biologicals* 39, 129-142.
- Halassy, B., Vdović, V., Habjanec, L., Lang Balija, M., Gebauer, B., Sabioncello, A., Šantek, T., Tomašić, J., 2007. Effectiveness of novel PGM-containing incomplete Seppic adjuvants in rabbits. *Vaccine* 25, 3475-3481.
- Halassy, B., Habjanec, L., Brgles, M., Lang Balija, M., Leonardi, A., Kovačić, L., Prijatelj, P., Tomašić, J., Križaj, I., 2008. The role of antibodies specific for toxic sPLA₂s and haemorrhagins in neutralizing potential of antisera raised against *Vipera ammodytes ammodytes* venom. *Comp. Biochem. Physiol. C* 148, 178-183.
- Halassy, B., Habjanec, L., Lang Balija, M., Kurtović, T., Brgles, M., Križaj I., 2010. Ammodytoxin content of *Vipera ammodytes ammodytes* venom as a prognostic factor for venom immunogenicity. *Comp. Biochem. Physiol. C* 148, 178-183.
- Halassy, B., Brgles, M., Habjanec, L., Balija, M.L., Kurtović, T., Marchetti-Deschmann, M., Križaj, I., Allmaier, G., 2011. Intraspecies variability in *Vipera ammodytes ammodytes* venom related to its toxicity and immunogenic potential. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 153, 223-30.
- Han, Y.P., Lu, X.Y., Wang, X.F., Xu, J. 2007. Isolation and characterization of a novel P-II class snake venom metalloproteinase from *Trimeresurus stejnegeri*. *Toxicon* 49, 889-898.
- Harrison, R.A., Moura-Da-Silva, A.M., Laing, G.D., Wu, Y., Richards, A., Broadhead, A., Bianco, A.E., Theakston, R.D., 2000. Antibody from mice immunized with DNA encoding the carboxyl-disintegrin and cysteine-rich domain (JD9) of the haemorrhagic metalloprotease, Jararhagin, inhibits the main lethal component of viper venom. *Clin. Exp. Immunol.* 121, 358-363.
- Harrison, R.A., Wüster, W., Theakston, R.D., 2003. The conserved structure of snake venom toxins confers extensive immunological cross-reactivity to toxin-specific antibody. *Toxicon* 41, 441-449.

Hartvig, R.A., van de Weert, M., Ostergaard, J., Jorgensen, L., Jensen, H., 2011. Protein adsorption at charged surfaces: the role of electrostatic interactions and interfacial charge regulation. *Langmuir* 27, 2634–2643.

Howes, J.M., Theakston, R.D., Laing, G.D., 2005. Antigenic relationships and relative immunogenicities of isolated metalloproteinases from *Echis ocellatus* venom. *Toxicon* 45, 677-680.

<http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=17841> [pristupljeno 20. ožujka 2013.]

Igarashi, T., Araki, S., Mori, H., Takeda, S., 2007. Crystal structures of catrocollastatin/VAP2B reveal a dynamic, modular architecture of ADAM/adamalysin/reprolysin family proteins. *FEBS Lett.* 581, 2416-2422.

Imperiali, B., O'Connor, S.E., 1999. Effect of *N*-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3, 643–649.

Ion Exchange Chromatography: Principles and Methods. Handbook from Pharmacia LKB Biotechnology.

Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing: Principles and Methods. Handbook from GE Healthcare.

Isbell, L.A., 2006. Snakes as agents of evolutionary change in primate brains. *J. Hum. Evol.* 51, 1-35.

Isbister, G.K., Kiernan, M.C., 2005. Neurotoxic marine poisoning. *Lancet Neurol.* 4, 219-228.

Isbister, G.K., 2010. Antivenom efficacy or effectiveness: The Australian experience. *Toxicology* 268, 148-154.

Ito, M., Hamako, J., Sakurai, Y., Matsumoto, M., Fujimura, Y., Suzuki, M., Hashimoto, K., Titani, K., Matsui, T., 2001. Complete amino acid sequence of kaouthiagin, a novel cobra venom metalloproteinase with two disintegrin-like sequences. *Biochemistry* 40, 4503-4511.

Jia, L.G., Shimokawa, K., Bjarnason, J.B., Fox, J.W., 1996. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. *Toxicon* 34, 1269-1276.

Jorge da Silva, N., Aird, S.D., 2001. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. *Comp. Biochem. Physiol. C* 128, 425-456.

Juárez, P., Comas, I., González-Candelas, F., Calvete, J.J., 2008. Evolution of snake venom disintegrins by positive Darwinian selection. *Mol. Biol. Evol.* 25, 2391-2407.

- Junghanss, T., Bodio, M., 2006. Medically important venomous animals: biology, prevention, first aid, and clinical management. *Clin. Infect. Dis.* 43, 1309-1317.
- Kamiguti, A.S., Zuzel, M., Theakston, R.D., 1998. Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31, 853-862.
- Kamiguti, A.S., Gallagher, P., Marcinkiewicz, C., Theakston, R.D., Zuzel, M., Fox, J.W., 2003. Identification of sites in the cysteine-rich domain of the class P-III snake venom metalloproteinases responsible for inhibition of platelet function. *FEBS Lett.* 549, 129-134.
- Kamiguti, A.S., 2005. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. *Toxicon* 45, 1041-1049.
- Kang, T.S., Georgieva, D., Genov, N., Murakami, M.T., Sinha, M., Kumar, R.P., Kaur, P., Kumar, S., Dey, S., Sharma, S., Vrieling, A., Betzel, C., Takeda, S., Arni, R.K., Singh, T.P., Kini, R.M., 2011. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. *FEBS J.* 278, 4544-4576.
- Karlson-Stiber, C., Persson, H., 1994. Antivenom treatment in *Vipera berus* envenoming – report of 30 cases. *J. Int. Med.* 235, 57-61.
- Karlson-Stiber, C., Salmonson, H., Persson, H., 2006. A nationwide study of *Vipera berus* bites during one year – epidemiology and morbidity of 231 cases. *Clin. Toxicol.* 44, 25-30.
- Karlsson, E., 1979. Chemistry of protein toxins in snake venoms, u: Lee, C.Y. (ur.) *Handbook of Experimental Pharmacology* 52, Springer, Berlin, pp. 159-212.
- Kini, R.M., Evans, H.J., 1989. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. *Toxicon* 27, 613-635.
- Kini, R.M., 2003. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon* 42, 827-840.
- Kini, R.M., 2005. The intriguing world of prothrombin activators from snake venom. *Toxicon* 45, 1133-1145.
- Kini, R.M., 2006. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. *Biochem. J.* 397, 377-387.
- Klein, J., Hořejší, V., 1997, *Immunology*, Oxford: Blackwell Science, Amsterdam.
- Koh, D.C.I., Armugam, A., Jeyaseelan, K., 2006. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 3030-3041.

- Koh, C.Y., Kini, R.M., 2012. From snake venom toxins to therapeutics – cardiovascular examples. *Toxicon* 59, 497-506.
- Kordiš, D., Gubenšek, F., 2000. Adaptive evolution of animal toxin multigene families. *Gene* 261, 43-52.
- Križaj, I., Turk, D., Ritonja, A., Gubenšek, F., 1989. Primary structure of ammodytoxin C further reveals the toxic site of ammodytoxin. *Biochim. Biophys. Acta.* 999, 198-202.
- Križaj, I., Bieber, A.L., Ritonja, A., Gubenšek, F., 1991. The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Vipera ammodytes* venom. *Eur. J. Biochem.* 202, 1165-1168.
- Križaj, I., Liang, N.S., Pungerčar, J., Strukelj, B., Ritonja, A., Gubenšek, F., 1992. Amino acid and cDNA sequences of a neutral phospholipase A₂ from the long-nosed viper (*Vipera ammodytes ammodytes*) venom. *Eur. J. Biochem.* 204, 1057-1062.
- Križaj, I., 2011. Ammodytoxin: a window into understanding presynaptic toxicity of secreted phospholipases A₂ and more. *Toxicon* 58, 219-229.
- Laing, G.D., Moura-da-Silva, A.M., 2005. Jararhagin and its multiple effects on hemostasis. *Toxicon* 45, 987-996.
- Lang Baliija, M., Vrdoljak, A., Habjanec, L., Dojnović, B., Halassy, B., Vranešić, B., Tomašić, J., 2005. The variability of *Vipera ammodytes ammodytes* venoms from Croatia – biochemical properties and biological activity. *Comp. Biochem. Phys. C* 140, 257-263.
- Laloo, D.G., Theakston, R.D.G., 2003. Snake antivenoms. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 41, 277–290.
- Leonardi, A., Gubenšek, F., Križaj, I., 2001. Purification and characterisation of two hemorrhagic metalloproteinases from the venom of the long-nosed viper, *Vipera ammodytes ammodytes*. *Toxicon* 40, 55-62.
- Leonardi, A., Fox, J.W., Trampuš-Bakija, A., Križaj, I., 2007. Ammodytase, a metalloproteinase from *Vipera ammodytes ammodytes* venom, possesses strong fibrinolytic activity. *Toxicon* 49, 833-842.
- Leonardi, A., Fox, J.W., Trampuš-Bakija, A., Križaj, I., 2008. Two coagulation factor X activators from *Vipera a. ammodytes* venom with potential to treat patients with dysfunctional factors IXa or VIIa. *Toxicon* 52, 628-637.

- Li, H., d'Anjou, M., 2009. Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 678-684.
- Liang, N.-S., Pungerčar, J., Križaj, I., Štrukelj, B., Gubenšek, F., 1993. Expression of fully active ammodytoxin A, a potent presynaptically neurotoxic phospholipase A₂, in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 334, 55-59.
- Lomonte, B., Escolano, J., Fernández, J., Sanz, L., Angulo, Y., Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., 2008. Snake venomomics and antivenomics of the arboreal neotropical pitvipers *Bothriechis lateralis* and *Bothriechis schlegelii*. *J. Proteome Res.* 7, 2445-2457.
- Lomonte, B., León, G., Angulo, Y., Rucavado, A., Núñez, V., 2009. Neutralization of *Bothrops asper* venom by antibodies, natural products and synthetic drugs: contributions to understanding snakebite envenomings and their treatment. *Toxicon* 54, 1012-1028.
- Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., 2011. Phospholipases A₂ from viperidae snake venoms: how do they induce skeletal muscle damage? *Acta Chim. Slov.* 58, 647-659.
- Lopez, M.F., 2002. Nonequilibrium pH gel electrophoresis (NEPHGE), u: Walker, J.M. (ur.), *The Protein Protocols Handbook*, Humana Press, pp. 181-183.
- Loría, G.D., Rucavado, A., Kamiguti, A.S., Theakston, R.D., Fox, J.W., Alape, A., Gutiérrez, J.M., 2003. Characterization of 'basparin A,' a prothrombin-activating metalloproteinase, from the venom of the snake *Bothrops asper* that inhibits platelet aggregation and induces defibrination and thrombosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 418, 13-24.
- Lu, Q., Clemetson, J.M., Clemetson, K.J., 2005. Snake venoms and hemostasis. *J. Thromb. Haemost.* 3, 1791-1799.
- Lukšić, B., Bradarić, N., Prgomet, S., 2006. Venomous snakebites in southern Croatia. *Coll. Antropol.* 30, 191-197.
- Lukšić, B., Culić, V., Stričević, L., Brizić, I., Poljak, N.K., Tadić, Z., 2010. Infant death after nose-horned viper (*Vipera ammodytes ammodytes*) bite in Croatia: A case report. *Toxicon* 56: 1506-1509.
- Lund, M., Jönsson, B., 2005. On the charge regulation of proteins. *Biochemistry* 44, 5722-5727.
- Mackessy, S.P., Baxter, L.M., 2006. Bioweapons synthesis and storage: The venom gland of front-fanged snakes. *Zool. Anz.* 245, 147-159.

- Mackessy, S.P., 2010. The field of reptile toxinology: snakes, lizards, and their venoms, u: Mackessy, S.P. (ur.) *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*, Taylor & Francis, Boca Raton, London, New York, pp. 3-23.
- Malmquist, G., Nilsson, U.H., Norrman, M., Skarp, U., Strömngren, M., Carredano, E., 2006. Electrostatic calculations and quantitative protein retention models for ion exchange chromatography. *J. Chromatogr. A* 1115, 164-186.
- Marcon, F., Nicholson, G.M., 2011. 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* 58, 439-542.
- Markland, F.S., 1998. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 36, 1749-1800.
- Marsh, N., Williams, V., 2005. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon* 45, 1171-1181.
- Massey, D.J., Calvete, J.J., Sánchez, E.E., Sanz, L., Richards, K., Curtis, R., Boesen, K., 2012. Venom variability and envenoming severity outcomes of the *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave rattlesnake) from Southern Arizona. *J. Proteomics* 75, 2576-2587.
- Masuda, S., Araki, S., Yamamoto, T., Kaji, K., Hayashi, H., 1997. Purification of a vascular apoptosis-inducing factor from hemorrhagic snake venom. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 235, 59-63.
- Masuda, S., Hayashi, H., Atoda, H., Morita, T., Araki, S., 2001. Purification, cDNA cloning and characterization of the vascular apoptosis-inducing protein, HV1, from *Trimeresurus flavoviridis*. *Eur. J. Biochem.* 268, 3339-3345.
- Matsui, T., Fujimura, Y., Titani, K., 2000. Snake venom proteases affecting haemostasis and thrombosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1477, 146-156.
- Mayer, U., Mann, K., Timpl, R., Murphy, G., 1993. Sites of nidogen cleavage by proteases involved in tissue homeostasis and remodelling. *Eur. J. Biochem.* 217, 877-884.
- Mazzi, M.V., Marcussi, S., Carlos, G.B., Stábeli, R.G., Franco, J.J., Tieli, F.K., Cintra, A.C., França, S.C., Soares, A.M., Sampaio, S.V., 2004. A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization. *Toxicon* 44, 215-223.

- Ménez, A., 2003. Classification of snakes, u: Moses, V. (ur.) *The Subtle Beast: Snakes, from Myth to Medicine*, Taylor & Francis, London, New York: pp. 51-64.
- Menezes, M.C., Furtado, M.F., Travaglia-Cardoso, S.R., Camargo, A.C., Serrano, S.M., 2006. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. *Toxicon* 47, 304-312.
- Montecucco, C., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 2008. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2897-2912.
- Montecucco, C., Rossetto, O., 2008. On the quaternary structure of taipoxin and textilotoxin: The advantage of being multiple. *Toxicon* 51, 1560-1562.
- Montecucco, C., Rossetto, O., Caccin, P., Rigoni, M., Carli, L., Morbiato, L., Muraro, L., Paoli, M., 2009. Different mechanisms of inhibition of nerve terminals by botulinum and snake presynaptic neurotoxins. *Toxicon* 54, 561-564.
- Moura-da-Silva, A.M., Della-Casa, M.S., David, A.S., Assakura, M.T., Butera, D., Lebrun, I., Shannon, J.D., Serrano, S.M., Fox, J.W., 2003. Evidence for heterogeneous forms of the snake venom metalloproteinase jararhagin: a factor contributing to snake venom variability. *Arch. Biochem. Biophys.* 409, 395-401.
- Moura-da-Silva, A.M., Furlan, M.S., Caporrino, M.C., Grego, K.F., Portes-Junior, J.A., Clissa, P.B., Valente, R.H., Magalhães, G.S., 2011. Diversity of metalloproteinases in *Bothrops neuwiedi* snake venom transcripts: evidences for recombination between different classes of SVMPs. *BMC Genet.* 12, 94.
- Naves de Souza, D.L., Gomes, M.S., Ferreira, F.B., Rodrigues, R.S., Achê, D.C., Richardson, M., Borges, M.H., Rodrigues, V.M., 2012. Biochemical and enzymatic characterization of BpMP-I, a fibrinogenolytic metalloproteinase isolated from *Bothropoides pauloensis* snake venom. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 161, 102-109.
- Nikai, T., Taniguchi, K., Komori, Y., Masuda, K., Fox, J.W., Sugihara, H., 2000. Primary structure and functional characterization of bilitoxin-1, a novel dimeric P-II snake venom metalloproteinase from *Agkistrodon bilineatus* venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 378, 6-15.
- O'Connor, S.E., Imperiali, B., 1996. Modulation of protein structure and function by asparagine-linked glycosylation. *Chem. Biol.* 3, 803-812.

- Oliveira, A.K., Paes Leme, A.F., Assakura, M.T., Menezes, M.C., Zelanis, A., Tashima, A.K., Lopes-Ferreira, M., Lima, C., Camargo, A.C., Fox, J.W., Serrano, S.M., 2009. Simplified procedures for the isolation of HF3, bothropasin, disintegrin-like/cysteine-rich protein and a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon* 53, 797-801.
- Oliveira, A.K., Paes Leme, A.F., Asega, A.F., Camargo, A.C., Fox, J.W., Serrano, S.M., 2010. New insights into the structural elements involved in the skin haemorrhage induced by snake venom metalloproteinases. *Thromb Haemost.* 104, 485-497.
- O'Shea, M., 2005. *Venomous Snakes of the World*, New Holland Publishers (UK) Ltd.
- Oshima-Franco, Y., Hyslop, S., Prado-Franceschi, J., Cruz-Höfling, M.A., Rodrigues-Simioni, L., 1999. Neutralizing capacity of antisera raised in horses and rabbits against *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and its main toxin, crotoxin. *Toxicon* 37, 1341-1357.
- Ouyang, C., Teng, C.-M., 1976. Fibrinogenolytic enzymes of *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. *Biochim. Biophys. Acta.* 420, 298-308.
- Paes Leme, A.F., Escalante, T., Pereira, J.G.C., Oliveira, A.K., Sanchez, E.F., Gutiérrez, J.M., Serrano, S.M.T., Fox, J.W., 2011. High resolution analysis of snake venom metalloproteinase (SVMP) peptide bond cleavage specificity using proteome based peptide libraries and mass spectrometry. *J. Proteomics* 74, 401-410.
- Pahari, S., Mackessy, S.P., Kini, R.M., 2007. The venom gland transcriptome of the Desert Massasauga rattlesnake (*Sistrurus catenatus edwardsii*): towards an understanding of venom composition among advanced snakes (Superfamily Colubroidea). *BMC Mol. Biol.* 8.
- Paine, M.J.I., Moura-da-Silva, A.M., Theakston, R.D.G., Crampton, J.M., 1994. Cloning of metalloprotease genes in the carpet viper (*Echis pyramidum leakeyi*). *Eur. J. Biochem.* 224, 483-488.
- Pankov, R., Yamada, K.M., 2002. Fibronectin at a glance. *J. Cell Sci.* 115, 3861-3863.
- Patiño, A.C., Pereañez, J.A., Núñez, V., Benjumea, D.M., Fernandez, M., Rucavado, A., Sanz, L., Calvete, J.J., 2010. Isolation and biological characterization of Batx-I, a weak hemorrhagic and fibrinogenolytic PI metalloproteinase from Colombian *Bothrops atrox* venom. *Toxicon* 56, 936-943.
- Peichoto, M.E., Teibler, P., Mackessy, S.P., Leiva, L., Acosta, O., Gonçalves, L.R.C., Tanaka-Azevedo, A.M., Santoro, M.L., 2007. Purification and characterization of

patagonfibrase, a metalloproteinase showing α -fibrinogenolytic and hemorrhagic activities, from *Philodryas patagoniensis* snake venom. *Biochim. Biophys. Acta* 1770, 810-819.

Perbandt, M., Wilson, J.C., Eschenburg, S., Mancheva, I., Aleksiev, B., Genov, N., Willingmann, P., Weber, W., Singh, T.P., Betzel, C., 1997. Crystal structure of vipoxin at 2.0 Å: an example of regulation of a toxic function generated by molecular evolution. *FEBS Lett.* 412, 573-577.

Pinto, A.F., Terra, R.M., Guimaraes, J.A., Fox, J.W., 2007. Mapping von Willebrand factor A domain binding sites on a snake venom metalloproteinase cysteine-rich domain. *Arch. Biochem. Biophys.* 457, 41-46.

Plow, E.F., Haas, T.A., Zhang, L., Loftus, J., Smith, J.W., 2000. Ligand binding to integrins. *J. Biol. Chem.* 275, 21785-21788.

Pratanaphon, R., Akewan, S., Khaw, O., Sriprapat, S., Ratanabanangkoon, K., 1997. Production of highly potent horse antivenom against the Thai cobra (*Naja kaouthia*). *Vaccine* 15, 1523-1528.

Prijatelj, P., Charnay, M., Ivanovski, G., Jenko, Z., Pungercar, J., Krijazaj, I., Faure, G., 2006. The C-terminal and beta-wing regions of ammodytoxin A, a neurotoxic phospholipase A₂ from *Vipera ammodytes ammodytes*, are critical for binding to factor Xa and for anticoagulant effect. *Biochimie* 88, 69-76.

Pungercar, J., Krijazaj I., 2007. Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A₂. *Toxicon* 50, 871-892.

Radonić, V., Budimir, D., Bradarić, N., Luksić, B., Sapunar, D., Vilović, K., 1997. Envenomation by the horned viper (*Vipera ammodytes* L.). *Mil. Med.* 162, 179-182.

Ramos, O.H.P., Selistre-de-Araujo, H.S. 2004. Comparative analysis of the catalytic domain of hemorrhagic and non-hemorrhagic snake venom metalloproteinases using bioinformatic tools. *Toxicon* 44, 529-538.

Ramos, O.H.P., Selistre-de-Araujo, H.S., 2006. Snake venom metalloproteinases – structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comp. Biochem. Phys. C* 142, 328-346.

Reid, H.A., 1976. Adder bites in Britain. *Brit. Med. J.* 2, 153-156.

Resh, M.D., 1999. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1451, 1-16.

- Rey-Suárez, P., Núñez, V., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 2011. Proteomic and biological characterization of the venom of the redbellied coral snake, *Micrurus mipartitus* (Elapidae), from Colombia and Costa Rica. *J. Proteomics* 75, 655-667.
- Ries, A., Göhring, W., Fox, J.W., Timpl, R., Sasaki, T., 2001. Recombinant domains of mouse nidogen-1 and their binding to basement membrane proteins and monoclonal antibodies. *Eur. J. Biochem.* 268, 5119-5128.
- Rigoni, M., Caccin, P., Gschmeissner, S., Koster, G., Postle, A.D., Rossetto, O., Schiavo, G., Montecucco, C., 2005. Equivalent effects of snake PLA₂ neurotoxins and lysophospholipid-fatty acid mixtures. *Science* 310, 1678-1680.
- Ritonja, A., Gubenšek, F., 1985. Ammodytoxin A, a highly lethal phospholipase A₂ from *Vipera ammodytes ammodytes* venom. *Biochim. Biophys. Acta* 828, 306-312.
- Ritonja, A., Machleidt, W., Turk, V., Gubenšek, F., 1986. Amino-acid sequence of ammodytoxin B partially reveals the location of the site of toxicity of ammodytoxins. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* 367, 919-923.
- Rodrigues, V.M., Soares, A.M., Guerra-Sá, R., Rodrigues, V., Fontes, M.R., Giglio, J.R., 2000. Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 381, 213-224.
- Rodriguez, J.P., De Marzi, M., Maruñak, S., Malchiodi E.L., Leiva, L.C., Acosta, O., 2006. Rabbit IgG antibodies against phospholipase A₂ from *Crotalus durissus terrificus* neutralize the lethal activity of the venom. *Medicina (B. Aires)* 66, 512-516.
- Romberger, D.J., 1997. Fibronectin. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 29, 939-943.
- Rucavado, A., Escalante, T., Gutiérrez, J.M., 2004. Effect of the metalloproteinase inhibitor batimastat in the systemic toxicity induced by *Bothrops asper* snake venom: understanding the role of metalloproteinases in envenomation. *Toxicon* 43, 417-424.
- Sajevic, T., Leonardi, A., Križaj I., 2011. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon* 57, 627-645.
- Saldarriaga, M.M., Otero, R., Núñez, V., Toro, M.F., Díaz, A., Gutiérrez, J.M., 2003. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. *Toxicon* 42, 405-411.

- Samel, M., Vija, H., Subbi, J., Siigur, J., 2003. Metalloproteinase with factor X activating and fibrinogenolytic activities from *Vipera berus berus* venom. *Comp. Biochem. Phys. B* 135, 575-582.
- Sampaio, S.C., Hyslop, S., Fontes, M.R., Prado-Franceschi, J., Zambelli, V.O., Magro, A.J., Brigatte, P., Gutierrez, V.P., Cury, Y., 2010. Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. *Toxicon* 55, 1045-1060.
- Sanchez, E.F., Souza, C.T., Bello, C.A., Richardson, M., Oliveira, E.B., Magalhaes, A., 2003. Resolution of isoforms of mutalysin II, the metalloproteinase from bushmaster snake venom. *Toxicon* 41, 1021-1031.
- Sanchez, E.F., Gabriel, L.M., Gontijo, S., Gremski, L.H., Veiga, S.S., Evangelista, K.S., Eble, J.A., Richardson, M., 2007. Structural and functional characterization of a P-III metalloproteinase, leucurolysin-B, from *Bothrops leucurus* venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 468, 193-204.
- Sanz, L., Gibbs, H.L., Mackessy, S.P., Calvete, J.J., 2006. Venom proteomes of closely related *Sistrurus* rattlesnakes with divergent diets. *J. Proteome Res.* 5, 2098-2112.
- Sanz, L., Ayvazyan, N., Calvete, J.J., 2008. Snake venomomics of the Armenian mountain vipers *Macrovipera lebetina obtusa* and *Vipera radei*. *J. Proteomics* 71, 198-209.
- Schaloske, R.H., Dennis, E.A., 2006. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 1246-1259.
- Segura, A., Herrera, M., Villalta, M., Vargas, M., Uscanga-Reynell, A., de León-Rosales S.P., Jiménez-Corona, M.E., Reta-Mares, J.F., Gutiérrez, J.M., León, G., 2012. Venom of *Bothrops asper* from Mexico and Costa Rica: intraspecific variation and cross-neutralization by antivenoms. *Toxicon* 59, 158-162.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850-858.
- Siigur, E., Aaspõllu, A., Siigur, J., 2001a. Sequence diversity of *Vipera lebetina* snake venom gland serine proteinase homologs – result of alternative-splicing or genome alteration. *Gene* 263, 199-203.
- Siigur, J., Aaspõllu, A., Tõnismägi, K., Trummal, K., Samel, M., Vija, H., Subbi, J., Siigur, E., 2001b. Proteases from *Vipera lebetina* venom affecting coagulation and fibrinolysis. *Haemostasis* 31, 123-132.

- Silva, M.B., Schattner, M., Ramos, C.R., Junqueira-de-Azevedo, I.L., Guarnieri, M.C., Lazzari, M.A., Sampaio, C.A., Pozner, R.G., Ventura, J.S., Ho, P.L., Chudzinski-Tavassi, A.M., 2003. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. *Biochem. J.* 369, 129-139.
- Simpson, R., 2003. Amino- and carboxy-terminal sequence analysis, u: *Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual*, CSHL Press, pp. 287-342.
- Six, D.A., Dennis, E.A., 2000. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta.* 1488, 1-19.
- Souza, D.H., Iemma, M.R., Ferreira, L.L., Faria, J.P., Oliva, M.L., Zingali, R.B., Niewiarowski, S., Selistre-de-Araujo, H.S., 2000. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits $\alpha_2\beta_1$ integrin-mediated cell adhesion. *Arch. Biochem. Biophys.* 384, 341-350.
- Sriprapat, S., Aeksowan, S., Sapsutthipas, S., Chotwiwatthanakun, C., Suttijitpaisal, P., Pratanaphon, R., Khaw, O., Sitprija, V., Ratanabanangkoon, K., 2003. The impact of a low dose, low volume, multi-site immunization on the production of therapeutic antivenoms in Thailand. *Toxicon* 41, 57-64.
- Ståhlberg, J., Jönsson, B., 1996. Influence of charge regulation in electrostatic interaction chromatography of proteins. *Anal. Chem.* 68, 1536-1544.
- Stöcker, W., Bode, W., 1995. Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 383-390.
- Swenson, S., Markland, F.S., 2005. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. *Toxicon* 45, 1021-1039.
- Takeda, S., Igarashi, T., Mori, H., Araki, S., 2006. Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. *EMBO J.* 25, 2388-2396.
- Takeda, S., Takeya, H., Iwanaga, S., 2012. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1824, 164-176.
- Takeya, H., Oda, K., Miyata, T., Omori-Satoh, T., Iwanaga, S., 1990. The complete amino acid sequence of the high molecular mass hemorrhagic protein HR1B isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. *J. Biol. Chem.* 265, 16068-16073.

- Tamiya, T., Fujimi, T.J., 2006. Molecular evolution of toxin genes in Elapidae snakes. *Mol. Divers.* 10, 529-543.
- Tanjoni, I., Butera, D., Bento, L., Della-Casa, M.S., Marques-Porto, R., Takehara, H.A., Gutierrez, J.M., Fernandes, I., Moura-da-Silva, A.M., 2003a. Snake venom metalloproteinases: structure/function relationships studies using monoclonal antibodies. *Toxicon* 42, 801-808.
- Tanjoni, I., Butera, D., Spencer, P.J., Takehara, H.A., Fernandes, I., Moura da Silva, A.M., 2003b. Phylogenetic conservation of a snake venom metalloproteinase epitope recognized by a monoclonal antibody that neutralizes hemorrhagic activity. *Toxicon* 42, 809-816.
- Tarentino, A.L., Gomez, C.M., Plummer Jr., T.H., 1985. Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide: *N*-glycosidase F. *Biochemistry* 24, 4665–4671.
- Tavares, N.A.C., Correia, J.M., Guarnieri, M.C., Lima-Filho, J.L., Prieto-da-Silva, A.R.B., Rádis-Baptista, G., 2008. Expression of mRNAs coding for VAP1/crotastatin-like metalloproteases in the venom glands of three South American pit vipers assessed by quantitative real-time PCR. *Toxicon* 52, 897-907.
- Theakston, R.D., Reid, H.A., 1976. Effectiveness of Zagreb antivenom against envenoming by the adder, *Vipera berus*. *Lancet* 17: 121-123.
- Theakston, R.D.G., Reid, H.A., 1983. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bull. WHO* 61, 949-956.
- Theakston, R.D.G., Warrell, D.A., Griffiths, E., 2003. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon* 41, 541–557.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Trummal, K., Vija, H., Subbi, J., Siigur, J., 2000. MALDI-TOF mass spectrometry analysis of substrate specificity of lebetase, a direct-acting fibrinolytic metalloproteinase from *Vipera lebetina* snake venom. *Bichim. Biophys. Acta* 1476, 331-336.
- Trummal, K., Tõnismägi, K., Siigur, E., Aaspõllu, A., Lopp, A., Sillat, T., Saat, R., Kasak, L., Tammiste, I., Kogerman, P., Kalkkinen, N., Siigur, J., 2005. A novel metalloprotease from *Vipera lebetina* venom induces human endothelial cell apoptosis. *Toxicon* 46, 46-61.

- Ursenbacher, S., Schweiger, S., Tomović, L., Crnobrnja-Isailović, J., Fumagalli, L., Mayer, W., 2008. Molecular phylogeography of the nose-horned viper (*Vipera ammodytes*, Linnaeus (1758)): evidence for high genetic diversity and multiple refugia in the Balkan peninsula. *Mol. Phylogenet. Evol.* 46, 1116-1128.
- Vaiyapuri, S., Wagstaff, S.C., Harrison, R.A., Gibbins, J.M., Hutchinson, E.G., 2011. Evolutionary analysis of novel serine proteases in the venom gland transcriptome of *Bitis gabonica rhinoceros*. *PLoS One* 6, e21532. doi: 10.1371/journal.pone.0021532
- Vidal, N., Delmas, A.-S., David, P., Cruaud, C., Couloux, A., Hedges, S.B., 2007. The phylogeny and classification of caenophidian snakes inferred from seven nuclear protein-coding genes. *C. R. Biol.* 330, 182-187.
- Wan, S.-G., Jin, Y., Lee, W.-H., Zhang, Y., 2006. A snake venom metalloproteinase that inhibited cell proliferation and induced morphological changes of ECV304 cells. *Toxicon* 47, 480-489.
- Wang, W. 2005. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *Int. J. Pharm.* 289, 1-30.
- Wang, W., Antonsen, K., Wang, Y.J., Wang, D.Q., 2008. pH dependent effect of glycosylation on protein stability. *Eur. J. Pharm. Sci.* 33, 120-127.
- Wang, W., Nema, S., Teagarden, D., 2010. Protein aggregation – pathways and influencing factors. *Int. J. Pharm.* 390, 89-99.
- Wang W.-J., Shih, C.-H., Huang, T.-F., 2005. Primary structure and antiplatelet mechanism of a snake venom metalloproteinase, acurhagin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Biochimie* 87, 1065–1077.
- Wang, W.-J., 2007, Purification and functional characterization of AAV1, a novel P-III metalloproteinase, from *Formosan Agkistrodon acutus* venom. *Biochimie* 89, 105-115.
- Warrell, D.A., 2005. Treatment of bites by adders and exotic venomous snakes. *Brit. Med. J.* 331, 1244-1247.
- Warrell, D.A., 2010. Snake bite. *Lancet* 375, 77-88.
- Weinstein, S.A., Tamara, L.S., Kardong, K.V., 2010. Reptile venom glands: form, function, and future, u: Mackessy, S.P. (ur.) *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*, Taylor & Francis, Boca Raton, London, New York: pp. 65-91.

- Weldon, C.L., Mackessy, S.P., 2012. Alsophinase, a new P-III metalloproteinase with α -fibrinogenolytic and hemorrhagic activity from the venom of the rear-fanged Puerto Rican Racer *Alsophis portoricensis* (Serpentes: Dipsadidae). *Biochimie* 94, 1189-1198.
- Whittaker, M., Floyd, C.D., Brown, P., Gearing, A.J.H., 1999. Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. *Chem. Rev.* 99, 2735-2776.
- WHO Expert Committee on Biological Standardization, 2010. WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. Geneva, Switzerland.
- Wisniewski, J.R., Zougman, A., Mann, M., 2008. N^ε-formylation of lysine is a widespread post-translational modification of nuclear proteins occurring at residues involved in regulation of chromatin function. *Nucleic Acids Res.* 36, 570-577.
- Wong, E.S.W., Belov, K., 2012. Venom evolution through gene duplications. *Gene* 496, 1-7.
- Xu, L., Glatz, C.E., 2009. Predicting protein retention time in ion-exchange chromatography based on three-dimensional protein characterization. *J. Chromatogr. A* 1216, 274-280.
- Xu, L.-P., Jiang, W.-J., Ma, T., Qiu, P.-X., Hou, J., Huang, Y.-J., Chen, J.-S., Yan, G.-M., 2006. Expression, purification and molecular modeling of recombinant fibrinogenase [IV], a metalloproteinase from *Deinakistrodon acutus* venom. *Toxicon* 47, 241-248.
- Yamakawa, Y., Omori-Satoh, T., 1988. A protease in the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*): Purification, characterization and substrate specificity on oxidized insulin B-chain. *Toxicon* 26, 1145-1155.
- Yamamoto, S., Ishihara, T., 1999. Ion-exchange chromatography of proteins near the isoelectric points. *J. Chromatogr. A* 852, 31-36.
- You, W.-K., Jang, Y.-J., Chung, K.-H., Jeon, O.-H., Kim, D.-S., 2006. Functional roles of two distinct domains of halysase, a snake venom metalloprotease, to inhibit human platelet aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 339, 964-970.
- Yurchenco, P.D., Amenta, P.S., Patton, B.L., 2004. Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. *Matrix Biol.* 22, 521-538.
- Yurchenco, P.D., Patton, B.L., 2009. Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly. *Curr. Pharm. Des.* 15, 1277-1294.

Zelanis, A., Serrano, S.M., Reinhold, V.N., 2012. *N*-glycome profiling of *Bothrops jararaca* newborn and adult venoms. *J. Proteomics*. 75, 774-782.

Zhang, D., Botos, I., Gomis-Rüth, F.X., Doll, R., Blood, C., Njoroge, F.G., Fox, J.W., Bode, W., Meyer, E.F., 1994. Structural interaction of natural and synthetic inhibitors with the venom metalloproteinase, atrolysin C (form d). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8447-8451.

7. POPIS OZNAKA, SIMBOLA I KRATICA

3FTX	engl. <i>three-finger toxin</i>
A	apsorbancija
ADAM	engl. <i>a disintegrine and metalloproteinase</i>
ADAMTS	engl. <i>a disintegrine and metalloproteinase with thrombospondin type-1 motif</i>
ATP	adenozin trifosfat
Atx	amoditoksin
BLAST	engl. <i>basic local alignment search tool</i>
BSA	engl. <i>bovine serum albumin</i>
cAMP	ciklički adenzin monofosfat
CBB	engl. <i>Coomassie Brilliant Blue</i>
cDNA	engl. <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CHAPS	3-[(3-kolamidopropil)dimetilamonij]-1-propansulfonat
CM CIM	engl. <i>carboxymethyl convective interaction media</i>
CRISP	engl. <i>cysteine-rich secretory protein</i>
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	ditiotreitol
ED ₅₀	srednja efektivna doza
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EGF	engl. <i>epidermal growth factor</i>
ELISA	engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Eu. Ph.	Europska Farmakopeja
FACIT	engl. <i>fibril-associated collagens with interrupted triple helices</i>
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
FX	faktor zgrušavanja krvi X
H	ukupna hemoraginska frakcija
HPLC	engl. <i>high-performance liquid chromatography</i>
IEF	izoelektrično fokusiranje
IgG	imunoglobulin G

IgG-HRP	imunoglobulin G konjugiran s peroksidazom iz hrena
IPG	imobilizirani pH gradijent
ISA	engl. <i>incomplete Seppic adjuvant</i>
kDa	kilodalton
LAAO	engl. <i>L-amino acid oxidase</i>
LD ₅₀	srednja letalna doza
M	molekulska masa
MadCAM-1	engl. <i>mucosal vascular addressin vascular cell adhesion molecule-1</i>
MALDI	engl. <i>matrix assisted laser desorption/ionization</i>
MES	2-(<i>N</i> -morfolin)etansulfonska kiselina
MHC	engl. <i>major histocompatibility complex</i>
MHD	minimalna hemoragična doza
MoAt	monoklonsko antitijelo
mRNA	engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>
MS	masena spektrometrija
MS/MS	tandemna masena spektrometrija
NCBI	engl. <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NEPHGE	engl. <i>non-equilibrium pH gradient electrophoresis</i>
OD	engl. <i>optical density</i>
OPD	<i>o</i> -fenilendiamin dihidroklorid
PAF-AH	engl. <i>platelet-activating factor acetylhydrolase</i>
PGM	peptidoglikanski monomer
PJ	proizvoljna jedinica
PLA ₂	engl. <i>phospholipase A₂</i>
PMF	engl. <i>peptide mass fingerprint</i>
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorid
PNGaza F	peptidna <i>N</i> -glikozidaza F
PVDF	polivinil difluorid
R	zaštitna moć
RP	engl. <i>reversed phase</i>

SDS-PAGE	engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SE	engl. <i>standard error</i>
sPLA ₂	engl. <i>secretory phospholipase A₂</i>
TCA	tri-klor octena kiselina
TFA	tri-fluor octena kiselina
TOF	engl. <i>time of flight</i>
<i>Vaa</i>	lat. <i>Vipera ammodytes ammodytes</i>
VCAM-1	engl. <i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
vWF	von Willebrandov faktor
WB	western blot
WHO	engl. <i>World Health Organization</i>

8. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime	Tihana Kurtović
Adresa	Remetinečki gaj 2F, Zagreb
Mobilni telefon	098 943 3093
Elektronička pošta	tkurtovic@imz.hr
Državljanstvo	hrvatsko
Datum i mjesto rođenja	20.05.1983., Split

RADNO ISKUSTVO

Godina	2008. –
Mjesto	Zagreb, Hrvatska
Ustanova	Imunološki zavod, d.d., Odjel za istraživanje i razvoj
Naziv radnog mjesta	znanstveni novak – asistent

OBRAZOVANJE

Godina	2007.
Mjesto	Zagreb, Hrvatska
Ustanova	Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Zvanje	diplomirani inženjer biologije, smjer molekularna biologija

POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

Sajević, T., Leonardi, A., Kovačić, L., Lang Balija, M., Kurtović, T., Pungercar, J., Halassy, B., Trampuš-Bakija, A., Križaj, I., 2013. VaH3, one of the principal hemorrhagins in *Vipera ammodytes ammodytes* venom, is a homodimeric P-IIIc metalloproteinase. *Biochimie* 95, 1158-1170.

Brgles, M., Bertoša, B., Winkler, W., Kurtović, T., Allmaier, G., Marchetti-Deschmann, M., Halassy, B., 2012. Chromatography, mass spectrometry, and molecular modeling studies on ammodytoxins. *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 2737-2748.

Kurtović, T., Leonardi, A., Lang Balija, M., Brgles, M., Habjanec, L., Križaj, I., Halassy, B., 2012. Standard mouse assay of antivenom quality does not measure antibodies neutralising the haemorrhagic activity of the *Vipera ammodytes* venom. *Toxicon* 59, 709-717.

Kurtović, T., Brgles, M., Leonardi, A., Lang Balija, M., Križaj, I., Allmaier, G., Marchetti-Deschmann, M., Halassy, B., 2011. Ammodytagin, a heterodimeric metalloproteinase from *Vipera ammodytes ammodytes* venom with strong hemorrhagic activity. *Toxicon* 58, 570-582.

Brgles, M., Kurtović, T., Halassy, B., Allmaier, G., Marchetti-Deschmann, M., 2011. Studying Disulfide Bond Rearrangement by MALDI-RTOF PSD and MALDI-TOF/RTOF High-Energy CID (20 keV) Experiments of Peptides Derived from Ammodytoxins. *J. Mass Spectrom.* 46, 153-162.

Halassy, B., Brgles, M., Habjanec, L., Lang Balija, M., Kurtović, T., Marchetti-Deschmann, M., Križaj, I., Allmaier, G., 2011. Intraspecies variability in *Vipera ammodytes ammodytes* venom related to its toxicity and immunogenic potential. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 153, 223-230.

Halassy, B., Habjanec, L., Lang Balija, M., Kurtović, T., Brgles, M., Križaj, I., 2010. Ammodytoxin content of *Vipera ammodytes ammodytes* venom as a prognostic factor for venom immunogenicity. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 151, 455-460.

STRUČNO USAVRŠAVANJE

Godina 2013.

Mjesto Zagreb, Hrvatska

Ustanova Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Područje Osposobljavanje za rad s pokusnim životinjama

Godina 2012.

Mjesto Ljubljana, Slovenija

Ustanova Jožef Stefan institut

Područje Istraživački boravak – biokemija prirodnih toksina

Godina 2010.
Mjesto Ljubljana, Slovenija
Ustanova Jožef Stefan institut
Područje Istraživački boravak – biokemija prirodnih toksina

Godina 2010.
Mjesto Ljubljana, Slovenija
Područje Osnove imunologije

Godina 2009.
Mjesto Rovinj, Hrvatska
Ustanova Institut Ruđer Bošković, Hrvatsko biofizičko društvo
Područje Međunarodna ljetna škola bofizike

Godina 2009.
Mjesto Zagreb, Hrvatska
Ustanova Institut Ruđer Bošković
Područje Molekularna filogenija

NAGRADE I PRIZNANJA

2010. nagrada za najbolje postersko priopćenje dodijeljena na skupu "Monolith summer school and symposium" (Portorož, Slovenija)

ČLANSTVA U ZNANSTVENIM I STRUČNIM DRUŠTVIMA

Hrvatsko imunološko društvo
International Society on Toxinology

NASTAVNA AKTIVNOST

od 2010. suradnik u nastavi u sklopu kolegija "Imunologija", dodiplomski studij mikrobiologije Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

od 2012. suradnik u nastavi u sklopu kolegija "Laboratorijska stručna praksa", preddiplomski studij te diplomski studij imunobiologije i fiziologije Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu