

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE

Milovanović M. Vladimir

**Karakterizacija venoma poskoka (*Vipera ammodytes*) sa teritorije Republike Srbije i
terapeutskog antivenoma**

doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Milovanović M. Vladimir

Characterization of horned viper venom (*Vipera ammodytes*) from the territory of the Republic of Serbia and therapeutic antivenom

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024

Mentor 1

Dr Saša Ivanović, vanredni profesor

Mentor 2

Dr Irena Živković, naučni savetnik

Članovi Komisije

Dr Vitomir Čupić, redovni profesor

Dr Sunčica Borožan, redovni profesor

Dr Rajna Minić, naučni savetnik

Datum odbrane: _____

KRATAK SADŽAJ

U Srbiji postoji 10 vrsta zmija, od kojih su 3 vrste otrovnice i pripadaju familiji *Viperidae*: poskok (*Vipera ammodytes*), šarka (*Vipera berus*) i šargan (*Vipera ursinii*). Najveću toksičnost ima venom poskoka, a zatim venom šarke. Poskok je najzastupljenija zmija otrovnica i po brojnosti i po arealu rasprostranjenosti u Srbiji i na Balkanu. U pogledu sastava, venomi zmija familije *Viperidae* variraju između rodova, vrsta i podvrsta, pa čak i unutar vrsta. Venomi zmija predstavljaju smeše neproteinskih komponenti (aminokiseline, amini, nukleotidi, joni metala, lipidi, ugljeni hidrati) i različitih proteina – sa ili bez toksičnih efekata. Suvu masu venoma *V. ammodytes* čini 90 do 95% proteina. Biohemijski je detektovano oko 139 različitih proteina, od kojih 38 ispoljavaju toksične efekte. Prema svojim karakteristikama, proteini venoma *V. ammodytes* pripadaju jednoj od osam proteinskih familija, od kojih su četiri enzimske: (1) fosfolipaze A₂ (*phospholipases A2 – PLA₂*), (2) oksidaze L-aminkokiselina (*L-amino acid oxidase – LAO*), (3) serin-proteaze (*Snake Venom Serine Protease – SVSP*), (4) metaloproteinaze (*Snake Venom Metalloproteinases – SVMPP*) i četiri neenzimske: (1) dezintegrini (*Disintegrins*), (2) faktor rasta nerava (*Nerve Growth Factor – NGF*), (3) faktor rasta vaskularnog endotela (*Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF*) i (4) sekretorni proteini bogati cisteinom (*Cysteine-Rich Secretory Proteins – CRISPs*). Toksični efekti nakon ujeda poskoka, rede su posledica dominantnog delovanja samo jednog od konstitutivnih proteina venoma, već su uglavnom posledica simultanog delovanja više proteinskih faktora.

Antivenomi su specifični antidoti protiv ujeda zmija. Ova vrsta lekova dobija se iz plazme životinja hiperimunizovanih venomom jedne ili više vrsta zmija otrovnica. Antivenomi su prečišćeni imunoglobulini (IgG) ili imunoglobulinski fragmenti Fab ili F(ab')₂.

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije je karakterizacija venoma poskoka (*Vipera ammodytes*) sa teritorije Republike Srbije i ispitivanja terapijskog dejstva antivenoma. Da bi smo ostvarili ove ciljeve, postavljeni su sledeći zadaci: (1) ispitivanje enzimske aktivnosti komponenti venoma koje su dominantni nosioci toksičnosti venoma; (2) ispitivanje potence kojom poliklonski F(ab')₂ imunoglobulinski fragmenti antivenoma neutrališu aktivnost toksičnih enzimskih komponenti venoma; (3) ispitivanje lokalnih i sistemskih toksičnih efekata venoma poskoka (citotoksičnost, neurotoksičnost, hemotoksičnost) na animalnim modelima i/ili *in vitro*; (4) ispitivanje potence kojom poliklonski F(ab')₂ imunoglobulinski fragmenti antivenoma neutrališu lokalne i sistemske toksične efekte venoma poskoka (citotoksičnost, neurotoksičnost, hemotoksičnost); (5) određivanje korelacije između standardnog testa potence kojim se procenjuje efikasnost antivenoma, sa *in vitro* testovima u kojima se procenjuje sposobnost antivenoma da neutrališe mereni toksični efekat ili enzimsku aktivnost; (6) ispitivanje potence kojom poliklonski F(ab')₂ imunoglobulinski fragmenti antivenoma, dobijeni imunizacijom konja venomom poskoka, neutrališu dejstvo venoma drugih zmija familije *Viperidae*: *Vipera aspis*, *Macrovipera lebetina* i *Montivipera xanthina*.

Laboratorijske životinje korišćene u ovim ispitivanjima potiču iz uzgoja Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“: 60 outbred miševa oba pola Intor:Swiss i 50 outbred pacova Wistar soja, muškog pola. Za proces imunizacije, korišćene su zdrave domaće kobile, starosti od 5 do 10 godina, telesne mase preko 600 kg. Za ispitivanja je korišćen venom podvrste *Vipera ammodytes ammodytes* koja je skoro jedina podvrsta zastupljena u Srbiji. Venom poskoka je dobijan „mužom“ odraslih poskoka.

U cilju ispitivanja toksičnosti venoma i protektivnog dejstva antivenoma poskoka određena je vrednost LD₅₀ na miševima i ona iznosi 12,2 µg/miš venoma. Za određivanje potence antivenoma (ED₅₀), koristio se petostruki umnožak LD₅₀ koji iznosi 61 µg. Potenca antivenoma sa kojom su rađeni svi eksperimenti u ovoj doktorskoj disertaciji iznosila je 130 AJ/ml. Jedna antitoksična jedinica sadrži 0,769 mg proteina.

Ispitivanje lokalnih toksičnih efekata venoma obuhvatilo je ispitivanje *edema*, *miotoksičnosti* i *hemotoksičnosti*. Za ove lokalne efekte venoma, određena je neutralizaciona potenca antivenoma.

Citotoksičnost venoma ispitana je na Vero ćelijskoj liniji. Vrednosti IC₅₀ venoma određene su različitim tehnikama bojenja: MTT, CV, TB, PI i iznosile su: 62,5 µg/ml, 55 µg/ml, 66 µg/ml i 87 µg/ml, redosledom navedenih tehnika bojenja. Vrednosti EC₅₀ su iznosile: 0,01 AJ/ml; 0,3 AJ/ml, 6,5 AJ/ml i 0,25AJ/ml, redosledom navedenih tehnika bojenja.

Rezultati ispitivanja apoptoze nakon FITC AnnexinV/PI bojenja, ukazuju da se pri koncentracijama venoma od 0 do 4 µg/ml prisustvo ranih (AnnexinV⁺/PI⁻) i kasno apoptotičnih (AnnexinV⁺/PI⁺) ćelija povećava, a da se pri većim koncentracijama venoma sve ćelije: vijabilne (AnnexinV⁻/PI⁻), apoptotične i mrtve (AnnexinV⁻

/PI⁺) dezintegrišu. Antivenom prevenira dezintegraciju ćelija i povećava prisustvo vijabilnih i apoptotičnih ćelija, počev od odnosa venom/antivenom 1:0,6 (w/w). Da bi se u potpunosti neutralisao efekat venoma, uključujući indukciju apoptoze, potrebna je velika količinu antivenoma, do odnosa 1:80 (w/w). Prisustvo apoptotičnih ćelija potvrđeno je i AO/EB bojenjem.

Baktericidno dejstvo venoma poskoka dokazano je na *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*.

U okviru ispitivanja neurotoksičnog dejstva antivenoma, rađena su *in vitro* ispitivanja kontraktilnosti preparata izolovane dijafragme pod uticajem venoma i smeša venom/antivenom u različitim masenim odnosima (1:2; 1:10; 1:20), kao i određivanje aktivnosti AChE i Na⁺/K⁺-ATP-aze u dijafragmi. Venom poskoka u vremenskom periodu od 180 minuta, dovodi do progresivnog pada kontrakcija dijafragme na manje od 10% kontrolnih vrednosti kontrakcija. Posle primene smeše V+A=1:2, takođe dolazi do progresivnog pada kontraktilnosti dijafragme i posle 180 minuta ekspozicije vrednost kontrakcija iznosi 10,54% od kontrolnih vrednosti. Smeša V+A=1:10 je posle 180 minuta ekspozicije, dovela do pada kontrakcija dijafragme na 22,61% od kontrolnih vrednosti. Nakon 225 minuta ekspozicije dijafragme smeši V+A=1:20, kontrakcije dijafragme su se zadržale iznad 50% kontrolnih vrednosti (iznosile su 56,90% od kontrole). Nelinearnom regresijom su dobijene preračunate vrednosti ET₅₀: za venom iznosi 60,17±2,43 minuta, za smešu V+A=1:2 iznosi 73,29±3,02 minuta, za smešu V+A=1:10 iznosi 114,80±12,16 minuta i za smešu V+A=1:20 iznosi 317,80±40,46 minuta. Statistički značajna razlika je dokazana između ET₅₀ za venom i ET₅₀ za smeše venom/antivenom u masenim odnosima 1:2 (p<0,05); 1:10 (p<0,001) i 1:20 (p<0,001). Takođe, dokazana je i statistički visoka značajna razlika između vrednosti ET₅₀ za sva tri masena odnosa venom/antivenom (p<0,001). Između aktivnosti enzima AChE u dijafragmi: pod uticajem venoma i pod uticajem smeša venoma/antivenoma u sva tri ispitivana masena odnosa, nije dokazana statistička razlika u poređenju sa kontrolnom grupom (p>0,05). Pod dejstvom venoma poskoka dolazi do inhibicije aktivnosti Na⁺/K⁺-ATPaze u dijafragmi za 52%. Smeša sa najvećim udelom antivenoma (1:20) je gotovo u potpunosti oporavila aktivnost Na⁺/K⁺-ATPaze. Dobijena je veoma jaka pozitivna korelacija (r=0,9150, p<0,001) između aktivnosti Na⁺/K⁺-ATPaze u dijafragmi i primenjenih rastućih masenih udela antivenoma u smeši venom/antivenom.

Ispitana je aktivnost glavnih enzimskih komponenti venoma, kao i potenca antivenoma. Dobijeni su sledeći rezultati: (a) 50% LAAO aktivnosti neutralisano je antivenomom primenom MTT testa; (b) aktivnost enzima PLA2 koji se nalazi u 1 mg venoma, u potpunosti je neutralisan sa 18,12 mg antivenoma; (c) neutralizacija aktivnosti serin-proteaze postignuta je pri masenom odnosu venom/antivenom 1:12,5; (d) antivenom sa 89% efikasnosti neutrališe proteolitičku aktivnost venoma.

Tečnom hromatografijom venoma, antivenoma, kao i njihovih smeša, nedvosmisleno je dokazana reaktivnost antivenoma sa različitim komponentama venoma.

Nakon elektroforetskog razdvajanja antivenoma, dokazano je prisustvo trake od oko 110 kDa. Pod istim uslovima, u uzorcima venoma dokazane su trake najzastupljenijih proteina u rasponu od 200 do 25 kDa. Imunoblotom tehnikom u antivenomu je dokazano prisustvo većeg broja proteinskih traka od 90 kDa do 30 kDa. Antivenom poskoka neutrališe efekte venoma i drugih zmija familije *Viperidae*: *Vipera aspis* i *Vipera berus*, dok u manjoj meri neutrališe efekte venoma *Montivipera xantina* i *Macrovipera lebetina*.

U ovoj doktorskoj disertaciji, efekti venoma poskoka i njegovog antivenoma, ispitani su na kulturama ćelija (Vero ćelije, eritrociti, leukociti periferne krvi), izolovanom organu (dijafragma) i laboratorijskim životinjama (miš, pacov) i predstavljaju prvo pretkliničko ispitivanje antivenoma za terapiju ujeda poskoka sa teritorije Republike Srbije.

Ključne reči: venom poskoka, *Vipera ammodytes*, citotoksičnost, neurotoksičnost, antivenom

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Toksikologija

UDK:

ABSTRACT

There are 10 species of snakes in Serbia, 3 of which are poisonous and belong to the *Viperidae* family: the horned viper (*Vipera ammodytes*), the European common adder or European common viper (*Vipera berus*) and the meadow adder or meadow viper (*Vipera ursinii*). The most venomous is the horned viper, followed by the European common viper. The horned viper is the most common venomous snake in Serbia and the Balkans, both in terms of numbers and distribution area. The composition of the venoms of *Viperidae* snakes varies between genera, species and subspecies and even within species. Snake venoms are mixtures of non-protein components (amino acids, amines, nucleotides, metal ions, lipids, carbohydrates) and various proteins - with or without toxic effects. The dry weight of the venom of *V. ammodytes* consists of 90 to 95% proteins. About 139 different proteins have been identified biochemically, 38 of which have a toxic effect. According to their characteristics, the venom proteins of *V. ammodytes* belong to one of eight protein families, four of which are enzymatic: (1) Phospholipase A2 (PLA2), (2) L-amino acid oxidase (LAAO), (3) Snake Venom Serine Protease (SVSP), (4) Snake Venom Metalloproteinase (SVMP) and four non-enzymatic: (1) Disintegrins, (2) Nerve Growth Factor (NGF), (3) Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and (4) Cysteine-Rich Secretory Proteins (CRISPs). Toxic effects following a horned viper bite are rarely the result of the dominant action of only one of the constitutive proteins of the venom, but usually the result of the simultaneous action of several protein factors.

Antivenoms are specific antidotes against snakebites. This type of medication is obtained from the plasma of animals that have been hyperimmunized with the venom of one or more venomous snake species. Antivenoms are purified immunoglobulins (IgG) or immunoglobulin fragments Fab or F(ab')₂.

The aim of the research of this dissertation is to characterize the venom of the horned viper (*Vipera ammodytes*) from the territory of the Republic of Serbia and to investigate the therapeutic effect of the antivenom. To achieve these goals, the following tasks were defined: (1) investigation of the enzymatic activity of venom components, which are the main carriers of the toxicity of the venom; (2) testing the potency with which polyclonal F(ab')₂ immunoglobulin fragments of the antivenom neutralize the activity of toxic enzymatic components of the venom; (3) testing the local and systemic toxic effects of horned viper venom (cytotoxicity, neurotoxicity, hemotoxicity) in animal models and/or *in vitro*; (4) testing the potency by which polyclonal F(ab')₂ immunoglobulin fragments of the antivenom to neutralize local and systemic toxic effects of horned viper venom (cytotoxicity, neurotoxicity, hemotoxicity); (5) determination of the correlation between a standard potency test to evaluate the efficacy of an antivenom and *in vitro* tests to evaluate the ability of an antivenom to neutralize a measured toxic effect or enzymatic activity; (6) investigation of the potency with which polyclonal F(ab')₂ immunoglobulin fragments of the antivenom obtained by immunization of horses with horned viper venom neutralize the effect of venoms of other snakes of the family *Viperidae*: *Vipera aspis*, *Macrovipera lebetina* and *Montivipera xanthina*.

The laboratory animals used for these tests were bred at the Institute of Virology, Vaccines and Sera "Torlak": 60 outbred mice of both sexes Intor:Swiss and 50 outbred rats of the Wistar strain, male. Healthy domestic mares aged 5 to 10 years and with a body weight of over 600 kg were used for immunization. For the tests, the venom of the subspecies *Vipera ammodytes ammodytes* was used, which is almost the only subspecies found in Serbia. The venom is extracted from adult horned vipers by "milking" the snake.

To test the toxicity of the venom and the protective effect of the horned viper antivenom, the LD₅₀ value was determined in mice, which is 12.2 µg/mouse. Five times the LD₅₀, i.e. 61 µg, was used to determine the potency of the antivenom (ED₅₀). The potency of the antivenom used for all experiments in this dissertation was 130 AU/ml. One antitoxic unit (AU) contains 0.769 mg protein.

The investigation of the local toxic effects of the venom included the testing of edema, myotoxicity and hemotoxicity. The neutralizing potency of the antivenom was determined for these local effects of the venom.

The cytotoxicity of the venom was tested on the Vero cell line. The IC₅₀ values of the venom were determined using different staining techniques: MTT, CV, TB, PI and were: 62.5 µg/ml, 55 µg/ml, 66 µg/ml and 87 µg/ml, in the order of the mentioned staining techniques. The EC₅₀ values were: 0.01AU/ml; 0.3 AU/ml, 6.5AU/ml and 0.25 AU/ml, in the order of the staining techniques mentioned.

The results of the apoptosis test after FITC AnnexinV/PI staining show that at venom concentrations of 0 to 4 µg/ml the presence of early (AnnexinV⁺/PI⁻) and late apoptotic (AnnexinV⁺/PI⁺) cells increases, and that at

higher venom concentrations all cells: viable (AnnexinV⁻/PI⁻), apoptotic and dead (AnnexinV⁺/PI⁺) disintegrate. The antivenom prevents cell disintegration and increases the number of viable and apoptotic cell starting at a ratio of 1:0.6 (w/w) venom/antivenom. To completely neutralize the effect of the venom, including the induction of apoptosis, a large amount of the antivenom is required, up to a ratio of 1:80 (w/w). The presence of apoptotic cells was also confirmed by AO/EB staining.

The bactericidal effect of horned viper venom has been demonstrated for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

As part of the testing of the neurotoxic effect of antivenom, *in vitro* studies of the contractility of isolated diaphragmatic preparations under the influence of venom and mixtures of venom/antivenom in various mass ratios (1:2; 1:10; 1:20) and the determination of the activity of AChE and Na⁺/K⁺-ATPases in the diaphragm were carried out. The horned viper venom leads to a progressive decrease in diaphragmatic contractions to less than 10 % of the control contraction values over a period of 180 minutes. After application of the mixture V+A=1:2, there is also a progressive decrease in the contractility of the diaphragm, and after 180 minutes of exposure the contraction value is 10.54% of the control values. The mixture V+A=1:10 led to a decrease in diaphragmatic contractions to 22.61% of the control values after 180 minutes of exposure. After 225 minutes of exposure of the diaphragm to the mixture V+A=1:20, the contractions of the diaphragm remained above 50% of the control values (they amounted to 56.90% of the control). The calculated ET₅₀ values were determined by non-linear regression: for the venom it is 60.17±2.43 minutes, for the mixture V+A=1:2 73.29±3.02 minutes, for the mixture V+A=1:10 114.80±12.16 minutes and for the mixture V+A=1:20 317.80±40.46 minutes. A statistically significant difference was found between the ET₅₀ for the venom and the ET₅₀ for the mixture of venom/antivenom in the mass ratios 1:2 (p<0.05); 1:10 (p<0.001) and 1:20 (p<0.001). In addition, a statistically significant difference was found between the ET₅₀ values at all three mass ratios of venom/antivenom (p<0.001). No statistical difference was found between the activity of the AChE enzyme in the diaphragm: under the influence of venom and under the influence of venom/antivenom mixtures in all three mass ratios studied compared to the control group (p>0.05). Under the influence of horned viper venom, the activity of the Na⁺/K⁺-ATPase in the diaphragm is inhibited by 52%. The mixture with the highest proportion of antivenom (1:20) almost completely restored the activity of the Na⁺/K⁺-ATPase. A very strong positive correlation (r=0.9150, p<0.001) was found between the activity of the Na⁺/K⁺-ATPase in the diaphragm and the applied increasing mass fractions of the antivenom in the venom/antivenom mixture.

The activity of the most important enzyme components of the venom and the potency of the antivenom, were tested. The following results were obtained: (a) 50% of LAAO activity was neutralized by the application of the antivenom in the MTT assay; (b) the PLA2 enzyme activity found in 1 mg of venom was completely neutralized by 18.12 mg of antivenom; (c) neutralization of serine protease activity was achieved at a mass ratio of venom/antivenom of 1:12.5; (d) the antivenom neutralized the proteolytic activity of the venom with 89% efficiency.

Liquid chromatography of venom, antivenom and their mixtures has clearly demonstrated the reactivity of antivenom with various venom components.

After electrophoretic separation of the antivenom, the presence of a band of about 110 kDa was detected. Under the same conditions, bands of the most abundant proteins in the range of 200 to 25 kDa were detected in the venom samples. The presence of a large number of protein bands from 90 kDa to 30 kDa in the antivenom was detected by the immunoblot technique. The antivenom of the horned viper neutralizes the effect of the venom of other snakes of the *Viperidae* family: *Vipera aspis* and *Vipera berus*, while to a lesser extent it neutralizes the effect of the venom of *Montivipera xantina* and *Macrovipera lebetina*.

In this dissertation, the effects of horned viper venom and its antivenom were tested on cell cultures (Vero cells, erythrocytes, peripheral blood leukocytes), an isolated organ (diaphragm) and laboratory animals (mouse, rat) and represent the first preclinical study of the antivenom for horned viper bite treatment from the territory of the Republic of Serbia.

Keywords: horned viper venom, *Vipera ammodytes*, cytotoxicity, neurotoxicity, antivenom

Scientific field: Veterinary medicine

Narrow scientific field: Toxicology

UDC:

Skraćenice

AO – akridin-oranž
AJ – antitoksična jedinica
aPTT – parcijalno tromboplastinsko vreme
Atx – amoditoksin
CFA – kompletan Froindov adjuvant
CRISP – sekretorni proteini bogati cisteinom
CV – kristal-violet boja
Dis – dezintegrini
ED₅₀ – srednja efektivna doza
EFD – edem–formirajuća doza
Fab – antigen vezujući fragment
FACS – sortiranje fluorescentno aktiviranih ćelija
Fc – konstantni fragment imunoglobulina
FITC – fluorescein-izotiocijanat
GC – glutamil-ciklaza
IC₅₀ – srednja inhibitorna koncentracija
IgG – imunoglobulin G
LAAO – L-aminokiselinska oksidaza
MCD-P – minimalna koagulantna doza merena u plazmi
MCD-F – minimalna koagulantna doza merena u rastvoru goveđeg fibrinogena
MDD-WBC – minimalna defibrinogenišuća doza merena u punoj krvi
MHD – minimalna hemoragijska doza
MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dipeniltetrazolium bromid
NBT/BCIP – plavo tetrazolium/5-bromo-4-hloro-3-indolil-fosfata
NGF – faktor rasta nerava
OPD – o-fenilendiamin
PAGE – poliakrilamidgel elektroforeza
PI – propidijum-jodid boja
PLA₂ – fosfolipaza grupe AII
PMSF – fenilmetil-sulfonilfluorid
PT – protrombinsko vreme
PVDF – poliviniliden-difluorid membrana
SDS – natrijumdodecil sulfat
SEC – hromatografija na osnovu veličine proteina
Snaklecs – lektini venoma C tipa
SVAP – solubilni vaskularni adhezioni protein
SVSM – metaloproteinaza zmijskog otrova
SVSP – serin-proteaza zmijskog otrova
TB – tripan-plava boja
TT – trombinsko vreme
VaH – hemoragin venoma poskoka
VaSP1 – serin-proteaza venoma poskoka
VaaSPH – homolog serin-proteinaze venoma poskoka
VaaSP-VX – serin-proteaza venoma poskoka slična hemotripsinu
VEGF – faktori rasta vaskularnog endotela
VICC – venomom indukovana konzumna koagulopatija

Sadržaj

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Sastav venoma.....	4
2.1.1. Enzimske komponente venoma	5
2.1.2. Neenzimske komponente venoma	9
2.2. Toksični efekti venoma.....	10
2.2.1. Hemotoksičnost	10
2.2.2. Neurotoksičnost	14
2.3. Imunski odgovor.....	18
2.3.1. Humoralni imunski odgovor.....	18
2.3.2. Struktura antitela.....	19
2.4. Principi produkcije antivenoma.....	20
3. CILJEVI I ZADACI.....	22
4. MATERIJAL I METODE	23
4.1. Laboratorijske životinje.....	23
4.1.1. Čuvanje miševa i pacova	23
4.1.2. Čuvanje konja	23
4.1.3. Čuvanje zmija	23
4.2. Određivanje vrednosti LD ₅₀ venoma poskoka i ED ₅₀ antivenoma (potence)	23
4.2.1. Određivanje vrednosti LD ₅₀ venoma poskoka na miševima.....	23
4.2.2. Određivanje vrednosti ED ₅₀ antivenoma (potence) na miševima.....	23
4.2.3. Određivanje LD ₅₀ venoma poskoka na pacovima.....	24
4.3. Lokalni efekti venoma i neutralizaciona potenca antivenoma	24
4.3.1. Određivanje edem-formirajuće jačine venoma i antiedemske potence antivenoma	24
4.3.2. Određivanje hemoragijske aktivnosti venoma i antihemoragijske potence antivenoma.....	24
4.3.3. Miotoksičnost venoma i zaštitna potenca antivenoma	24
4.4. Citotoksičnost.....	25
4.4.1. Određivanje citotoksičnosti venoma i anticitotoksične potence antivenoma	25
4.4.2. Vero ćelijska kultura	25
4.4.3. Priprema humanih leukocita periferne krvi	26
4.5. Hemotoksičnost.....	27
4.5.1. Eritrolitičko dejstvo venoma i antieritrolitička potenca antivenoma na krvnoj podlozi	27

4.5.2. Spektrofotometrijsko određivanje eritrolize	27
4.5.3. Određivanje minimalne koagulacione doze (MCD-P) venoma.....	28
4.5.4. Određivanje minimalne koagulacione doze (MCD-F) venoma.....	28
4.5.5. Određivanje minimalne defibrinogene doze venoma poskoka u punoj krvi (MDD)	28
4.6. Neurotoksičnost.....	28
4.6.1. Ispitivanje kontraktilnosti preparata izolovane dijafragme	28
4.6.2. Određivanje aktivnosti AChE i aktivnosti Na ⁺ /K ⁺ -ATPaze u dijafragmi	30
4.7. Baktericidno dejstvo venoma i inhibicija baktericidnog dejstva venoma antivenomom	30
4.8. Imunohemijske analize.....	30
4.8.1. Nativna i denaturišuća SDS-poliakridamid gel elektroforeza (SDS-PAGE).....	30
4.8.2. Transfer proteina na membranu (Western Blot - WB).....	31
4.8.3. Detekcija IgG ELISA testom	31
4.8.4. Inhibitorni ELISA test.....	31
4.9. Prečišćavanje proteina.....	31
4.9.1. Određivanje koncentracije proteina - Bradford metoda	31
4.9.2. Gel filtraciona hromatografija	32
4.9.3. Jonoizmenjivačka hromatografija na Mono-Q koloni.....	32
4.9.4. Analiza imunskih kompleksa tečnom hromatografijom (HPLC).....	32
4.10. Određivanje enzimske aktivnosti	32
4.10.1. Određivanje LAAO aktivnosti venoma – OPD/H ₂ O ₂ metoda (i potence antivenoma za neutralizaciju LAAO aktivnosti venoma).....	32
4.10.2. Određivanje LAAO aktivnosti venoma – MTT metoda (i potence antivenoma za neutralizaciju LAAO aktivnosti venoma).....	32
4.10.3. Određivanje aktivnosti metaloproteaza i serin-proteaza venoma (i potence antivenoma za neutralizaciju proteolitičke aktivnosti venoma).....	33
4.10.4. Određivanje PLA2 aktivnosti venoma (i potence antivenoma za neutralizaciju PLA2 aktivnosti venoma).....	33
4.10.5. Statistička obrada rezultata	33
5. REZULTATI.....	34
5.1. Određivanje LD ₅₀ venoma poskoka na miševima	34
5.2. Određivanje ED ₅₀ (potence) antivenoma na miševima	34
5.3. Određivanje LD ₅₀ venoma poskoka na pacovima	34
5.4. Određivanje procentualnog udela proteina u venomu Vaa.....	34
5.5. Lokalni efekti	34
5.6. Venomom indukovani edem.....	35

5.7. Miotoksičnost	36
5.8. Hemotoksičnost	37
5.8.1. Minimalna hemoragijska doza (MHD)	37
5.8.2. Eritroliza	39
5.8.3. Ispitivanje koagulacije	41
5.9. Ispitivanje citotoksičnosti venoma	43
5.9.1. MTT-test	43
5.9.2. Kristal-violet bojenje	44
5.9.3. Bojenje tripan-plavim	44
5.9.4. Bojenje propidijum-jodidom	45
5.10. Apoptoza	48
5.10.1. FITC AnnexinV/PI bojenje za detekciju apoptoze protočnom citometrijom	48
5.10.2. AO/EB bojenje za detekciju apoptoze fluorescentnom mikroskopijom	48
5.11. Baktericidno dejstvo venoma i antibaktericidna potencia antivenoma	50
5.12. Neurotoksičnost	51
5.12.1. Ispitivanje kontraktilnosti preparata izolovane dijafragme	51
5.12.2. Određivanje aktivnosti AChE i aktivnosti Na ⁺ /K ⁺ -ATP-aza u dijafragmi	59
5.13. Enzimi venoma	60
5.13.1. Aktivnost L-aminokiselinske oksidaze (LAAO)	60
5.13.2. Aktivnost fosfolipaza A2 (PLA2)	63
5.13.3. Aktivnost proteinaza venoma	65
5.14. Imunološki testovi	67
5.14.1. Tečna hromatografija venoma i antivenoma (HPLC)	67
5.14.2. Elektroforetsko razdvajanje venoma i antivenoma (PAGE)	68
5.14.3. Validacija ELISA testa	68
5.14.4. Inhibitorni ELISA test	69
5.14.5. Ukrštena reaktivnost	70
6. DISKUSIJA	71
6.1. Lokalni efekti venoma i neutralizacija antivenomom	71
6.2. Eritroliza	72
6.3. Koagulotoksičnost	73
6.4. Citotoksičnost	73
6.5. Aktivnost enzima venoma	75
6.5.1. LAAO	75

6.5.2. Proteaze.....	76
6.5.3. PLA2.....	76
6.6. Neurotoksičnost.....	77
6.7. Reaktivnost antigen/antitelo.....	83
7. ZAKLJUČCI.....	85
8. LITERATURA.....	87

1. UVOD

U celokupnoj istoriji čoveka, zmija ima neobično istaknuto mesto u mitologiji, religiji, umetnosti i nauci. Ljudi su od davnina verovali da zmija ima posebne moći, pa su je se plašili ali istovremeno i poštovali, a neki narodi slavili kao božanstvo. Simbolika zmije je veoma kompleksna i nema ultimativno negativnu konotaciju, već se koristi za prikazivanje i dobra i zla, i smrti i besmrtnosti. Konačno, u simbolima medicinskih nauka, zmija se nalazi na Eskulapovom štapu ili uvijena oko pehara boginje Higije i simbolizuje moć izlečenja, moć pretvaranja otrova u lek. U našem narodu, tradicionalno postoji veliki iracionalni strah od svih vrsta zmija, a za zmije otrovnice se često koristi termin „zmije ljutice“ ili „ljute zmije“.

Od oko 3.500 poznatih vrsta zmija u svetu, približno 10% vrsta su otrovnice. Zmije otrovnice su široko rasprostranjene u celom svetu, sa izuzetkom određenih ostrva kao što su Havaji, Irska i Novi Zeland. Interesantno je da se za razliku od Novog Zelanda, u susednoj Australiji nalazi jako veliki broj zmija, naročito otrovnica. Ovakva razlika se objašnjava činjenicom da zmije nikada nisu evoluirale na Novom Zelandu i da pored toga nikada nisu savladale okeansku barijeru sa Australijom.

U Srbiji postoji 10 vrsta zmija, od kojih su 3 vrste otrovnice (familija: *Viperidae*) i 7 vrsta neotrovnih zmija (familija: *Colubridae*). Familiji *Viperidae* pripadaju: poskok (*Vipera ammodytes*), šarka (*Vipera berus*) i šargan (*Vipera ursinii*), a familiji *Colubridae*: eskulapov smuk (*Zamenis longissimus*), stepski smuk (*Dolichophis caspius*), smukulja (*Coronella austriaca*), ribarica (*Natrix tessellata*), belouška (*Natrix natrix*), četvoroprugi smuk (*Elaphe quatuorlineata*) i smuk šilac (*Platyceps najadum*). Osnovna morfološka razlika između ove dve familije zmija je da *Colubridae* imaju okrugle zenice, dok su kod *Viperidae* zenice u obliku vertikalne pukotine. S obzirom da sedam navedenih vrsta iz familije *Colubridae* nisu otrovnice, one nemaju značaj sa aspekta toksikologije.

Od tri otrovnice na teritoriji naše zemlje, najveću toksičnost ima venom poskoka, a zatim venom šarke. Venom šargana je daleko slabijeg inteziteta i dovodi samo lokalne reakcije na mestu ujeda koja je slična ubodu pčele ili ose. Poskok je najzastupljenija zmija otrovnica i po brojnosti i po arealu rasprostranjenosti u Srbiji i na Balkanu. U Srbiji je rasprostranjen južno od Save i Dunava. Može se sresti u nizijskim predelima, kao i na visinama do 2.000 m. Poskok je zaštićena vrsta u Srbiji. Dužina poskoka se kreće uglavnom između 60 i 70 cm, a vrlo retko dostiže dužinu od 100 cm, pri čemu su načelno ženke veće od mužjaka. Mužjaci su svetlo-sive do pepeljasto-sive boje, sa jasno istaknutom tamnom cik-cak šarom, nalik na spojene rombove koji se pružaju dužinom leđa. Ženke su pretežno braonkasto-smeđe do narandžasto-smeđe boje sa tamno braon i ne tako kontrastno istaknutom šarom duž tela. U pogledu boje i izgleda šara, kod različitih podvrsta, kao i kod različitih populacija u okviru iste podvrste mogu postojati varijacije. Morfološka karakteristika koja poskoka izdvaja od svih drugih zmija koje žive na teritoriji Srbije je jasno izražen rog na gornjoj vilici. Rog predstavlja tvorevinu kože i vezivnog tkiva, a njegova tačna uloga još uvek nije poznata. Žlezde koje produkuju venom, nastale su modifikacijom parotidnih pljuvačnih žlezda tokom evolucije, a nalaze se u gornjoj vilici sa obe strane, smeštene iza očiju i obavijene mišićnim omotačem. Kanalićima su povezane sa pripadajućim cevastim očnjacima. Dok su vilice zatvorene, očnjaci su povijeni u nazad i neprohodni za venom. Zmije u tkivo žrtve ubrizgavaju venom tako što prilikom otvaranja vilica izbacuju očnjake napred, čime očnjaci celom dužinom postaju prohodni za venom. Nakon ujeda, mišići oko žlezda se kontrahuju i venom tako istiskuje kroz canaliće i dalje kroz šuplje očnjake u tkivo žrtve. Treba napomenuti da postoje i tzv. „suvi“ ujedi, kada nakon ujeda ne dolazi do istiskivanja venoma iz žlezda. Procenjuje se da ova pojava prati i do 25% ujeda zmija otrovnica.

Trovanje nastalo kao posledica zmijskog ujeda, Svetska zdravstvena organizacija (SZO) definiše kao bolest potencijalno opasnu po život, koja je izazvana venomom zmija otrovnica. U junu 2017. godine, SZO je ujed zmija otrovnica dodala na svoju prioritetnu listu zanemarenih tropskih

bolesti (*WHO, Snakebite envenoming, Neglected Tropical Diseases – NTDs*, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>)

Ujed poskoka može imati za posledicu trajni gubitak funkcija pojedinih tkiva i organa ili još teži ishod kao što je amputacija delova ekstremiteta. U najtežim okolnostima je moguć i letalni ishod. Iako je u Evropi učestalost ujeda zmija otrovnica daleko manja nego u tropskim područjima, ovi slučajevi zbog navedenih potencijalnih posledica, u veterinarskoj i humanoj medicini neizostavno zavređuju pažnju i opreznost, pogotovo u zemljama Balkanskog regiona. U pogledu ugroženosti zdravlja i života ljudi, najugroženijim kategorijama se smatraju deca, starije osobe sa hroničnim bolestima, a posebno žene u trudnoći. U veterinarskoj medicini, podaci iz sveta pokazuju da su ujeđi zmija češći kod pasa i mačaka u poređenju sa drugim vrstama domaćih životinja. Zbog relativno male telesne mase u odnosu na količinu ubrizganog zmijskog venoma, ujed kod ovih vrsta životinja često može biti i sa letalnim ishodom. Pri tome je kod pasa i mačaka smrtnost veća u slučajevima ujeda u predelu glave, toraksa ili abdomena nego u predelu ekstremiteta. Strane studije pokazuju da se kod pasa najveći broj zmijskih ujeda dešava između maja i septembra, obično tokom kasnog popodneva. Žrtve su pretežno psi mlađih kategorija (starosti oko 3,5 godine), sa lokalizacijom ujeda najčešće u predelu glave. Smatra se da su mačke prirodno otpornije od pasa na venom zmija. Međutim, nasuprot tome, češće se nalaze u težim kliničkim stanjima od pasa iz dva razloga: zbog manje telesne mase i zbog kašnjenja terapije, jer se od straha posle ujeda, često kriju i beže od vlasnika. Ujed poskoka za jezik, smatra se kao najteža klinička okolnost jer je procena da je ekvivalentan intravenskom načinu aplikacije venoma. U tom smislu, zbog specifičnog korišćenja jezika za hvatanje vegetacije na ispaši, mali preživari predstavljaju najugroženiju kategoriju životinja na pašnjacima.

Venomi zmija otrovnica su veoma složeni po hemijskom sastavu, u kome su pretežno zastupljeni proteini koji imaju značajnu ulogu u imobilizaciji i varenju plena. Neki od proteina u zmijskom venomu imaju vrlo specifične efekte na različite biološke procese sisara, kao što su: koagulacija krvi, regulacija krvnog pritiska, neurotransmisija. Sve komponente venoma predstavljaju takozvani “venomski koktel” koji na sisarima ispoljava hemotoksični i/ili neurotoksični efekat. Dominantni efekat zmija familije *Viperidae* na ljude je hemotoksičnost, a familije *Elapidae*, neurotoksičnost. Međutim, u venomu *Viperidae* takođe postoje i komponente sa neurotoksičnim dejstvom, kao što i u venomu *Elapidae* postoje komponente sa hemotoksičnim dejstvom.

Jedina specifična terapija kod ujeda zmija otrovnica je primena antivenoma. Njegova proizvodnja započinje imunizacijom životinja (konja, ovaca) punim venomom. Imunski sistem životinje zatim reaguje na venom aktivacijom B limfocita i produkcijom antitela specifičnim za unete antigene. Kako je venom smeša više antigena, u serumu se produkuju poliklonska antitela, a preparat nastao prečišćavanjem ovako nastalih antitela, neutrališe biološke aktivnosti različitih venomskih komponenti. Antitela se vezuju za antigene na osnovu prostornih konformacija koje odgovaraju jedna drugoj po sistemu ključ/brava. Nastala interakcija neutrališe biološku aktivnost antigena (enzima) i oni zbog toga ne mogu da ispolje toksične efekte. Makrofagi i neutrofili zatim prepoznaju nastale komplekse antigen-antitelo, fagocituju ih i time uklanjaju komponente venoma iz krvotoka i tkiva, smanjujući njihovu koncentraciju i toksičnost.

Pretkliničkim ispitivanjima antivenoma, kao i drugih vrsta gotovih lekova, terapijski potencijal se ispituje na kulturama ćelija, izolovanim organima i laboratorijskim životinjama. Zlatni standard za određivanje potence antivenoma je *in vivo* test na miševima, u kome se primenom antivenoma sprečava letalitet miševa kojima je predhodno venom aplikovan intravenski. Osim visokog stepena invazivnosti ogleda i žrtvovanja većeg broja laboratorijskih životinja, ovaj test ima i drugih nedostataka. U tom kontekstu, ova doktorska disertacija predstavlja doprinos, jer su uvedene nove *in vitro* metode za ispitivanje neutralizacije biološke (enzimske) aktivnosti komponenti venoma. Takođe, prvi put je ispitina i neurotoksičnost venoma na modelu izolovane dijafragme pacova, kao i protektivni efekat antivenoma u pogledu očuvanja kontraktilnosti dijafragme, odnosno njene funkcije u respiraciji.

2. PREGLED LITERATURE

Prema zvaničnim podacima Svetske zdravstvene organizacije iz 2018. godine, u svetu se svake godine dogodi oko 5,4 miliona ujeda zmija otrovnica, čiji je ishod trovanje 1,8 do 2,7 miliona ljudi. Ova vrsta trovanja je po toku perakutna ili akutna i protiče sa različito teškim kliničkim manifestacijama, a u najtežim slučajevima završavaju letalno. Godišnje se u svetu registruje između 81.410 i 137.880 smrtnih slučajeva i oko tri puta više teških zdravstvenih posledica kao što su amputacija različitih delova tela i drugih oblika trajnih invaliditeta. Postoji opravdana bojazan da su ovi statistički podaci još nepovoljniji, jer u mnogim delovima sveta ljudi i dalje koriste lokalne tradicionalne lekove/tretmane i ne traže ili nisu u poziciji da traže pomoć zvanične medicine, pa mnogi slučajevi ujeda zmija ostaju neprijavljeni. Samo u jednom distriktu Šri Lanke čak 62,5% smrtnih slučajeva od ujeda zmija otrovnica nije bolnički prijavljeno. Uzimajući u obzir navedene podatke, Svetska zdravstvena organizacija ujed zmija otrovnica ističe kao veoma veliki problem javnog zdravlja posebno u zemljama tropskog i subtropskog regiona (www.who.int/news/item/19-08-2018-who-issues-new-recommendation-on-antivenom-for-snakebites).

U Evropi učestalost ujeda zmija otrovnica i potentnost njihovih venoma imaju daleko manji medicinski značaj nego u tropskim područjima. Međutim, kao što je u uvodnom delu rečeno, ovi slučajevi zbog potencijalno ozbiljnih zdravstvenih posledica neizostavno zaslužuju pažnju, pogotovo na području Balkana. U pogledu incidence ujeda zmija otrovnica i njihovog kliničkog ishoda, koji se odnose na teritoriju naše zemlje, postoji svega nekoliko objavljenih radova. Najnoviji rad je iz 2020. godine i pošto je revijalnog karaktera, predstavlja sveobuhvatnu sistematizaciju svih predhodno objavljenih radova (Nikolić, 2020). Prema podacima iz ovog rada, u Srbiji je za period od 125 godina (1893. do 2018. godine) medicinski dokumentovan mali broj ujeda zmija otrovnica, ukupno 164 slučaja. Pri tome je kontraverzan podatak da su se samo tokom 2017. godine za hospitalizaciju zbog ujeda zmija prijavile 94 osobe (61,7% muškog pola i 38,3% ženskog pola). Ovakva disproporcija je verovatno posledica nesistematskog prijavljivanja slučajeva ujeda. U periodu od 2008. do 2017. godine zabeležena su četiri smrtna slučaja od ujeda zmija: tri ženske (2008., 2013., 2017. godine) i jedne muške osobe (2011. godine). Iako postoje varijacije u godišnjim periodima kada se registruje najveći broj ujeda zmija otrovnica, u Srbiji se najčešće dešavaju u periodu od juna do avgusta (81,9%), a ostatak u periodu od aprila do jula meseca. Lokalizacija ujeda je pretežno za stopala i ruke, znatno ređe za druge delove tela, a najpogođenije kategorije su poljoprivrednici koji u polju često rade bos, sakupljači pečuraka i bobičavog voća u prirodi. U novije vreme, zbog demografskih trendova i promene načina života gradskog stanovništva, postoji porast broja ujeda zmija kod starijih osoba, kod turista i osoba koji se bave sportom na otvorenom (alpinisti) (Nikolić, 2020).

Učestalost ujeda zmija otrovnica, klinička slika i ishod ove vrste trovanja u veterinarskoj medicini, u Republici Srbiji nisu literaturno dokumentovani.

U Evropi se antivenomi protiv zmija otrovnica proizvode u osam zemalja: Srbija, Hrvatska, Bugarska, Francuska, Poljska, Rusija, Velika Britanija i Turska, od kojih bezbednosni listovi (*Safety Data Sheet - SDS*) postoje za sedam zemalja (SDS za ruski antivenom nije dostupan). Od sedam antivenoma sa bezbednosnim listom, šest je dobijeno imunizacijom konja i jedan imunizacijom ovaca. Antivenomi poreklom od konja su F(ab')₂ proizvodi, a poreklom od ovaca Fab proizvod. Dva antivenoma su polivalentna, od kojih je jedan protiv venoma *Vipera aspis*, *Vipera berus* i *Vipera ammodytes*, dok je jedan protiv venoma *Vipera ammodytes*, *Macrovipera lebetina* i *Montivipera xanthina*. Preostalih šest antivenoma je protiv *Vipera berus* ili *Vipera ammodytes*.

2.1. Sastav venoma

Proteini čine 90-95% suve mase venoma i odgovorni su za većinu njegovih bioloških efekata. Preostalih 5-10% čine peptidi, lipidi, nukleozidi, ugljeni hidrati i amini. Proteini venoma na organizam sisara ostvaruju neurotoksično, hemotoksično ili najčešće mešovito dejstvo. Prihvaćeno je da venomi familije *Viperidae* ostvaruju pretežno hemotoksično, a familije *Elapidae* pretežno neurotoksično dejstvo. Ovakva podela se mora oprezno primenjivati, jer venomi zmija koje deluju neurotoksično sadrže i hemotoksične komponente, odnosno hemotoksični venomi sadrže i različite količine neurotoksičnih komponenti. Osim toga, venom jedne vrste zmija može ostvariti različito dejstvo kada dospe u različite vrste plena. Upravo je takav venom poskoka (*Vipera ammodytes*), jer nakon ujeda kod ljudi dominira hemotoksičan efekat, dok se na miševima dominantno ostvaruje neurotoksično dejstvo (Kurtovic i sar., 2012).

Zmijski venomi su smeše različitih proteinskih familija i svaka od tih familija sadrži različite toksine i njihove izoforme. Pošto su otrovne žlezde zmija homologe, smatra se da je predački proteom venoma divergirao u različitim familijama zmija usled genetičkih mutacija, genetičkog drifta i prirodne selekcije. Ovi faktori su uticali na to da venom svake vrste bude specifično toksičan za plen kojim se hrani.

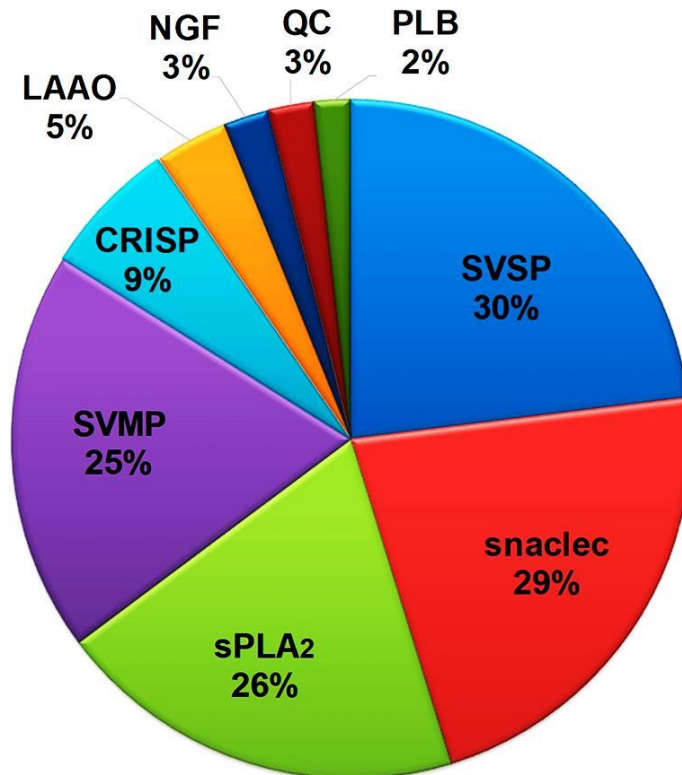
Postoje četiri podvrste vrste *Vipera ammodytes*: *V.a. ammodytes* (*Vaa*), *V.a. montadoni*, *V.a. meridionalis* i *V.a. transcaucasiana* (Hempel i sar., 2018; Tomovic i sar., 2019). Areali rasprostranjenosti ovih podvrsta prikazani su na slici 1. U našem radu korišćen je venom podvrste *Vaa* koja je skoro jedina podvrsta zastupljena u Srbiji. Na osnovu profilisanja proteina i cDNA biblioteka ona je predačka za ostale podvrste.



Slika 1. Areali rasprostranjenosti podvrsta *V. ammodytes* u Evropi i na Bliskom istoku (Hempel i sar., 2018) žuto – *V.a. ammodytes*; plavo – *V.a. montadoni*; zeleno – *V.a. meridionalis*; crveno – *V.a. transcaucasiana*

U literaturi postoje različiti podaci o ukupnom broju proteina venoma *Vaa*. Na osnovu rezultata dvodimenzionalne poliakrilamid elektroforeze (2D PAGE), u literaturi je navedeno da postoji različiti broj proteina venoma *Vaa*: 99, 139 ili 208 (Georgieva i sar., 2008). Postoje i rezultati dobijeni tehnikama proteomike i transkriptomike, tako da tek predstoje istraživanja kojim će se utvrditi tačan broj proteina u ovom venomu. Proteini venoma su članovi proteinskih familija: serin-proteaza (SVSPs), L-aminokiselinskih oksidaza (LAAOs), metaloproteinaza (SVMPS), fosfolipaza grupe II (PLA2s) i pet neenzimskih familija: sekreterni proteini bogati cisteinom (CRISPs), lektini C-tipa (snaclecs), faktori

rasta nerava (NGFs), faktori rasta vaskularnog endotela (VEGFs) i inhibitori proteaza Kunitz-tipa (SPIs). Od ukupnog broja različitih proteina venoma, 22% čine komponente koje ostvaruju svoju toksični efekat različitim mehanizmima dejstva, a među njima su najbolje proučeni enzimi venoma. Posmatrajući količinski udeo enzima u venomima *Viperidae* (67%), dominiraju SVMPs, PLA2s i SVSPs (Leonardi i sar., 2019) (slika 2).



Slika 2. Zastupljenost pojedinih proteina u venomu *Vaa* (Leonardi i sar., 2019)

Serin-proteaze (SVSPs), L-aminokiselinske oksidaze (LAAOs), Metaloproteinaze (SVMPs), Fosfolipaze grupe II (PLA2s), Sekreorni proteini bogati cisteinom (CRISPs), Lektini C-tipa (snaclecs), Faktori rasta nerava (NGFs), Glutamil-ciklaze (QC), Fosfolipaza B (PLB)

Proučavajući efekte pojedinih komponenti venoma, može se doći do saznanja o odnosu predator/plen, evoluciji gmizavaca, pa čak i o lekovitim svojstvima komponenti venoma. Istovremeno treba imati u vidu da dejstvo venoma nije prost zbir pojedinačnih dejstava toksičnih komponenti, već rezultat njihovog sinergističkog dejstva. Uopšteno govoreći, venomi zmija porodice *Viperidae*, pa tako i vrste *Vipera ammodytes* imaju predominantno hemotoksično i neurotoksično dejstvo na čoveka.

2.1.1. Enzimske komponente venoma

2.1.1.1. Serin-proteaze

Serinske proteaze (ili serinske endopeptidaze – SP) su enzimi su koji raskidaju peptidne veze proteina, a u aktivnom mestu enzima je serin. SP venoma zmija su klasifikovane u superfamiliju PA, familiju S1, subfamiliju A, proteolitičkih enzima. Ovakve proteaze su karakteristične po tome da su strukturno vema slične hemotripsinu i poseduju dve šestolančane β -nabrane strukture (Latinovic i sar., 2018).

Dve serin-proteaze iz venoma *V. ammodytes*, mase 31,3 i 34,3 kDa prečišćene su još 1976. godine (Bailey i sar., 1976). Kasnije su opisane VaSP1 fibrinogenaza, enzimski neaktivna VaaSPH-1 i njen homolog SVSP koja deluje antikoagulantno, kao i VaaSP-VX, SVSP koja je potentni prokoagulant, jer deluje kao aktivator faktora V (protrombina) i faktora X u koagulacionoj kaskadi (Georgieva i sar., 2008; Latinovic i sar., 2018).

Kasnija ispitivanja transkriptoma i primena 2D elektroforeze pokazale su postojanje većeg broja serin-proteaza u venomu poskoka (Leonardi i sar., 2019), molekulske mase od 30 do 45 kDa. Veće razlike u masi su posledica različitog stepena glikozilovanja pojedinih serin-proteaza. Uprkos tome što je 50 do 80% aminokiselinskih sekvenci identično, SVSP se značajno razlikuju po specifičnosti supstrata, pa samim tim i njihovoj potencijalnoj terapijskoj primeni. Ovi proteini čine približno jednu trećinu ukupnih proteina venoma poskoka, a primarno deluju na faktor koagulacije X, protrombin, fibrinogenazu i plazminogen (Samel i sar., 2002; Zhu i sar., 2005; Sajevec i sar., 2014). Velika sličnost ovih enzima je primećena i kod SVSP drugih *Viperidae*, na primer kod *Macrovipera lebetina*, *Bitis gabonica*, *Daboia russeli* i *Vipera berus* (Siigur i sar., 2001; Siigur i sar., 2003; Calvete i sar., 2007; Sukkapn i sar., 2011).

2.1.1.2. Fosfolipaze

Fosfolipaze (PL) su enzimi malih molekulske mase (13 do 15 kDa) koji hidrolizuju fosfolipide na masne kiseline i druge lipofilne supstance. U zavisnosti od tipa reakcija koje katalizuju, dele se na četiri različite klase. Fosfolipaze zmijskog venoma pripadaju Grupi A, podgrupi 2 (PLA2) i čine četvrtinu ukupnih proteina venoma poskoka. To su enzimi koji hidrolizuju estarsku vezu na sekundarnom ugljenikovom atomu molekula glicerola, uz oslobađanje arahidonske kiseline i lizofosfolipide (Stoyanova i sar., 2012).

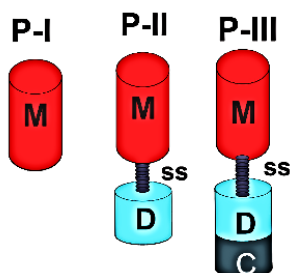
Analizom cDNA i aminokiselinske sekvence, utvrđeno je da u venomu *Vaa* postoji nekoliko različitih PLA2. Najpoznatija i najtoksičnija je PLA2 pod nazivom amoditoksin (Atx), koji postoji u tri različite izoforme: AtxA, AtxB i AtxC (tabela 1). Enzimski su aktivne, deluju kao presinaptički neurotoksini, a u primarnoj sekvenci se razlikuju samo u jednoj do dve aminokiseline, što je dovoljno da ispoljavaju različite vrednosti LD₅₀ (Grubenšek i Križaj, 1997). Amoditin L (AtnL) je strukturni analog amoditoksina A, sa 74% identičnosti. Iako je enzimski neaktivna, ova fosfolipaza ispoljava miotoksično i kardiotoksično dejstvo (Karabuva i sar., 2017). Osim toksičnih, u venomu poskoka postoje i dve enzimski aktivne, ali netoksične fosfolipaze – amoditini I (AtnI): AtnI1 i AtnI2. To su neutralni proteini i homologni su 70% sa amoditoksinom A. Postoji pretpostavka da je u njihovom genomu, tokom vremena, došlo do promena u sekvenci usled kojih su izgubili enzimsko dejstvo, a samim tim i toksičnost (Guillemin i sar., 2003; Prijatelj i sar., 2003).

Tabela 1. Fosfolipaze venoma *Vaa*

Naziv	Skraćenica	Enzimska aktivnost	Delovanje
Amoditoksini - Atx			Presinaptički toksini
Amoditoksin A	AtxA	aktivan	
Amoditoksin B	AtxB	aktivan	45 x manje toksičan od AtxA
Amoditoksin C	AtxC	aktivan	15 x manje toksičan od AtxA
Amoditini - Atn			
Amoditin L	AtnL	neaktivan	miotoksično, kardiotoksično
Amoditin I1	AtnI1	aktivan	netoksičan
Amoditin I2	AtnI2	aktivan	netoksičan

2.1.1.3. Metaloproteinaze

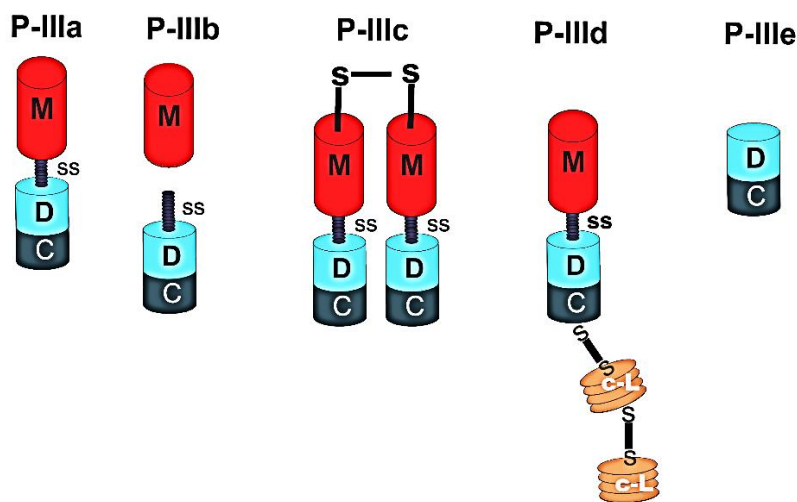
Metaloproteinaze (MP) su proteaze čiji je katalitički mehanizam zavisan od metalnog jona u aktivnom centru. Venom *Vaa* je bogat metaloproteinazama, koje čine 25% proteina venoma. Ovi enzimi su glavni nosioci hemotoksičnosti venoma poskoka (*Leonardi i sar., 2019*). Strukturu metaloproteinaze čine tri domena: metaloproteinazni, dezintegrinski i domen bogat cisteinom. Na osnovu strukture, metaloproteinaze zmijskih venoma su podeljene u tri klase: P-I, P-II i P-III. Metaloproteinaze P-I klase sadrže samo proteinazni domen (oko 25 kDa), klasa P-II osim njega sadrži i domen sličan dezintegrinu (10 kDa) i klasa P-III ima cisteinom-bogati domen (oko 4 kDa) (slika 3). Na svim domenima SVMP postoje mesta koja se mogu glikozilovati, ali su samo neki od njih glikozilovana. Tačna uloga pojedinih domena (osim metaloproteinaznog) u enzimskoj aktivnosti SVMP nije u potpunosti razjašnjena, ali je utvrđeno da njihovo prisustvo doprinosi aktivnosti metaloproteinaza.



Slika 3. Domeni metaloproteinaza venoma (*Olaboja i sar., 2020*)

P-I, P-II i P-III – klase venomskih metaloproteinaza; M - metaloproteinaza; ss – spejser sekvenca; D – dezintegrinski domen; C – region bogat cisteinom

Do sada je ispitana struktura i mehanizam dejstva samo za nekoliko SVMP venoma poskoka. Zajednička biološka aktivnost ovih enzima je da deluju na hemostatski sistem, na više načina: kao hemoragini, kao fibrino(geno)litički agensi, aktivatori ili inhibitori faktora koagulacije krvi (X, IX, protrombin) i inhibiraju agregaciju trombocita. Ove komponente venoma poskoka pripadaju monomernim P-IIIa (VaH1, VaH2, VaF1, amoditaza), homo- ili heterodimernim P-IIIc (VaH3, VaH4, amoditagin) i oligomernim P-III d subklasama SVMP (VAFXA-I i VAFXA-II), kako je prikazano na slici 4. i u tabeli 2.



Slika 4. Podklase metaloproteinaza P-III klase (*Olaboja i sar., 2020*)

Tabela 2. SVMP venoma poskoka (*Olabo* i sar., 2020; *Guillemin* i sar., 2003)

SVMP grupa	Subklase	Toksično dejstvo	Referenca	Primedba
P-IIIa	Amoditaza	Fibrinolitičko i fibrinogenolitičko dejstvo; veoma je slab hemoragin, a deluje samo delimično na neke komponente ekstracelularnog matriksa	10.1016/j.toxicon.2006.12.003	Rastvara krvne ugruške, ne degradira plasminogen, protrombin i kolagen, ne deluje na trombocite i ne izaziva hemoragije
	VaF1	α -fibrinogenoliza i degradacija kolagena, nidogena i fibronektina (ekstracelularni matriks), faktora X, prothrombina, plazminogena	10.1016/j.biochi.2014.12.013	Ne prepoznaje ga antiserum nakon imunizacije kompletnim venomom – nije imunogen
	VaH1 (<i>V.a.</i> hemoragin)	Hemoragičnost	10.1016/S0041-0101(01)00188-X	Aktivan je sa azokazeinom, inhibira ga EDTA
	VaH2	Hemoragičnost	10.1016/S0041-0101(01)00188-X	Aktivan je sa azokazeinom, inhibira ga EDTA
P-IIIc	VaH3	Hemoragija, proteini bazalne membrane i ekstracelularni matriks: kolagen IV, fibronektin, nidogen, fibrinogenaza, razlaže protrombin i faktor X, ali ih ne aktivira	10.1016/j.biochi.2013.01.003	Antitela amoditagina su snažno reagovala sa VaH3 i potpuno neutralisala njegovu hemoragijsku aktivnost kod pacova
P-IIIc	VaH4	Hemoragin, hidroliza komponenti ekstracelularnog matriksa, fibronektin i nidogen, neki koagulacioni proteini, naročito α -lanac fibrinogena. Citotoksično dejstvo	10.1016/j.toxicon.2013.11.009	Kovalentno vezani dimer homologih podjedinica, VaH4a i VaH4b
P-III d	VAFXA-I	Aktivacija faktora X	10.1016/j.toxicon.2008.07.015	
	VAFXA-II	Aktivacija faktora X	10.1016/j.toxicon.2008.07.015	
P-IIIe	Vaa-MPIII-3	glikoprotein (21 kDa) bez metaloproteinaznog domena	10.1016/j.toxcx.2020.100052	

Uz nabrojane MP u tabeli 2., analizom transkriptoma i proteoma (cDNA, 2D PAGE i peptida nakon tripsinske digestije) dokazano je da postoji još oko 60 neopisanih MP u venomu poskoka (*Guillemin* i sar., 2003; *Olabo* i sar., 2020).

2.1.1.4. L-aminokiselinske oksidaze

L-aminokiselinske oksidaze (LAAO) zmijskog otrova su najmanje proučavani enzimi venoma. Ovi enzimi katalizuju stereospecifičnu oksidaciju L-aminokiselina u odgovarajuće α -keto kiseline uz oslobađanje vodonik-peroksida i amonijaka. LAAO su dimerni enzimi zavisni od kofaktora FAD ili FMN (flavin-mononukleotid ili dinukleotid, riboflavin, vitamin B2), koji venomu poskoka daje karakterističnu žutu boju. LAAO postoji u venomu u više izoformi. Iako je LAAO enzim prisutan kod svih *Viperidae*, ima različitu zastupljenost kod različitih vrsta. U venomu poskoka LAAO je zastupljena sa 5%. Patološki efekti ovih oksidaza su indukcija ili inhibicija agregacije trombocita, indukcija apoptoze, hemoliza, hemoragija, antikoagulantna aktivnost i stvaranje edema. LAAO takođe deluju antibakterijski i antivirusno. Ovi efekti su uglavnom posledica oslobađanja vodonik-peroksida tokom aktivnosti LAAO (*Leonardi i sar., 2019*).

2.1.1.5. Glutamil-ciklaze

Glutamil-ciklaza (GC) je protein molekulske mase 40 kDa, identičan u venomima različitih *Viperidae*. Iako je manje zastupljen, ovaj enzim je važan jer učestvuje u posttranslacionoj modifikaciji venomskih proteina i peptida. Oni katalizuju formiranje N-terminalnog piroglutaminskog ostatka u proteinima i peptidima, štiteći ih od razgradnje posredstvom egzopeptidaza (*Leonardi i sar., 2019*).

2.1.1.6. Enzimi prisutni u malim količinama

Neki enzimi su prisutni u venomima veoma retko, i to u malim količinama. U venomu poskoka su takvi glutation peroksidaza (GSH-Px), aspartat-proteaza i 5'-nukleotidaza (*Leonardi i sar., 2019*).

Glutation-peroksidaza je enzim koji katalizuje redukciju vodonik-peroksida u vodu uz prisustvo redukovanog glutationa. Njegova uloga u venomu je da štiti lipide od oksidativnog oštećenja.

Aspartat-proteaza deluje slično kao renin. Renin je sisarska aspartat-proteaza, odnosno prvi član

Renin je asparaginska proteaza sisara koja katalizuje prvi korak na putu renin-angiotenzin u kome se angiotenzinogen konvertuje u angiotenzin I, čiji je krajnji ishod vazokonstrikcija. Tako solubilni vaskularni adhezioni protein (SVAP - *Soluble Vascular Adhesion Protein*) može indukovati hipertenzivni efekat. Do sada ovaj efekat nije zabeležen.

5'-Nukleotidaza venoma poskoka hidrolizuje 5'-nukleotide čime se oslobađa adenozin, koji zatim indukuje farmakološke efekte kao što su vazodilatacija ili inhibicija agregacije trombocita. Time se potencira ukupna toksičnost venoma.

2.1.2. Neenzimske komponente venoma

2.1.2.1. Lektini venoma C-tipa (SNACLECS)

Naziv Snaclecs izveden je kao engleska skraćenica za **SNA**ke **C**-type **LEC**tin**S** čime se izbegava da se ovi proteini zamene sa klasičnim C-tipom lektina. Snaclecs su najzastupljeniji neenzimski proteini u venomu poskoka, sa učešćem od 29%.

Snaclecs su heterodimerni proteini izgrađeni od α - i β -lanaca, a u venomu poskoka to su strukture od ~ 50 ($\alpha\beta$)₂ i ~ 25 kDa ($\alpha\beta$). Klasični lektini C-tipa se vezuju za ugljene hidrate procesom zavisnim od Ca^{2+} . U venomu zmija, osim takvih, postoje i lektini kojima nedostaje petlja za prepoznavanje ugljeno-hidratne komponente u koju se smešta Ca^{2+} i samim tim lektin se ne vezuju za njih. Snacleks proteini i dalje mogu da se vežu za druge fiziološki važne proteine i receptore. Snaclecs se vezuju za receptore na trombocitima, indukujući njihovu inhibiciju ili aktivaciju, izazivajući na taj način trombocitopeniju, doprinose toksičnosti venoma. Činjenica da pri tome ne dolazi do promene u koagulaciji krvi niti u nivou fibrinogena, podržava neenzimatski mehanizam snacleks toksičnosti. Snacleks takođe potenciraju hemoragičnu aktivnost SVMP. To je slučaj sa VAFXA-II, za koju je

snacleks vezan kao podjedinica. Podjedinica se vezuje za supstrat faktora X i tako ga orjentiše u položaj u kome katalitičko mesto MP može da se aktivira (*Leonardi i sar., 2019*).

2.1.2.2. *Dezintegrini (Dis)*

Dezintegrini (Dis) su druga porodica neenzimskih proteina u venomu poskoka. Oni su uobičajene komponente venoma *Viperidae* i deluju kao antagonisti integrina. Integrini su glavni receptori sisarskih ćelija kojima se vezuju za ekstracelularni matriks. Dis blokiraju integrinske receptore ekstraćelijskog matriksa kod različitih tipova ćelija i tako utiču na adheziju između ćelija i ekstracelularnog matriksa, što je od najvećeg značaja za homeostazu tkiva. To dalje rezultira inicijacijom različitih bolesti: kardiovaskularnih, autoimunih i pojavu kancera. U tom smislu, najinteresantniji su dezintegrini koji blokiraju receptore za fibronektin koji su neophodni za angiogenezu. Dokazano je da smeša dezintegrina iz venoma poskoka značajno usporava migraciju ćelija kancera (*Latinovic i sar., 2017*).

2.1.2.3. *Sekretorni proteini bogati cisteinom (CRISP)*

Sekretorni proteini bogati cisteinom su jednonančani glikoproteini mase oko 20–30 kDa. Sadrže 16 visoko konzerviranih cisteinskih rezidua koje formiraju osam disulfidnih veza. Ovi molekuli su nađeni kod svih kičmenjaka, ali osim nekoliko izuzetaka, njihova biološka uloga nije otkrivena.

2.1.2.4. *Faktor rasta nerava (NGF)*

Faktor rasta nerava je pronađen u venomu svih familija otrovnih zmija (*Leonardi i sar., 2019*). Fiziološka uloga NGF je stimulacija rasta senzornih i simpatičkih neravnih vlakana. Za sada nije otkriveno da li i na koji način venomski NGF direktno ostvaruje toksičnost. Postoji pretpostavka da potencira dejstvo drugih toksičnih komponenti venoma (povećana permeabilnost krvnih sudova, dejstvo na imunski sistem). Pretpostavlja se da ima ulogu i u regulaciji proteolitičke aktivnosti SVMP.

2.1.2.5. *VEGF*

Vaskularni endotelijalni faktor rasta je nosilac pro-angiogene aktivnosti, jer deluje kao specifičan mitogen i antiapoptotski faktor endotelijalnih ćelija. VEGF koji je nađen u venomu poskoka i koji je nazvan vamin, vezuje se za receptor Tyr-kinaze VEGFR-2 i aktivira NO put, što rezultira hipotenzijom, kao i povećanjem vaskularne permeabilnosti koja pomaže distribuiranje venoma sa mesta ujeda u druga tkiva (*Leonardi i sar., 2019*).

2.1.2.6. *Peptidi*

Za peptide prisutne u venomima zmija može se reći da modulišu delovanje enzimskih komponenti. Njihova detaljna ispitivanja tek predstoje. Dokazani peptidi u venomu zmija su: inhibitora serin-proteaza Kunitz-tipa (inhibitori tripsina, hemotripsina), natriuretički peptidi (diuretički efekat), vazodilatatorni peptidi (hipotenzivni efekat), bradikinin potencirajući peptidi (vazodilatacija krvnih sudova - hipotenzija), inhibitori metaloproteinaza (reverzibilni inhibitori fibrinogenolitičke aktivnost) (*Leonardi i sar., 2019*).

2.2. Toksični efekti venoma

2.2.1. Hemotoksičnost

Hemotoksini (ili hematotoksini) zmijama otrovnicama služe prvenstveno za ubijanje plena ali i kao pomoć pri varenju, jer proteine razlažu već na mestu ujeda. Hemotoksini uništavaju crvena krvna zrnca (hemoliza), oštećuju krvne sudove (hemoragija), ometaju hemostazu (koagulotoksičnost) i time posledično oštećuju tkiva i organe. Hemotoksični venomi mogu prouzrokovati trajna oštećenja organa,

a u teškim slučajevima i smrt jedinke. Gubitak zahvaćenog ekstremiteta je moguć čak i slučajevima blagovremene terapije. Glavni nosioci hemotoksičnosti venoma su njegovi enzimi.

2.2.1.1. Eritroliza

Na membranama različitih ćelija postoje različiti fosfolipidni domeni koji su osetljivi na dejstvo PLA2. U venomu *Vaa* postoji više izoformi PLA2, koje patološke efekte ispoljavaju različitim mehanizmima. Odnosi strukture i funkcije ove klase proteina (PLA2) još uvek nisu dovoljno ispitani. Oštećenje eritrocita uglavnom nastaje pod dejstvom venomske PLA2, usled hidrolize fosfolipida eritrocitne membrane. Ovi enzimi se vezuju za intaktnu površinu membrana, nakon čega se u aktivno mesto enzima ugrađuje fosfatidilholin (PC) koji se nalazi na spoljašnjoj strani ćelijske membrane i time započinje proces lipolize. Različite izoforme venomske PLA2 pokazuju dramatično različite afinitete za ćelijske membrane, koje su sačinjene od različitih fosfolipidnih polarnih grupa i masnokiselinskih lanaca, što rezultira različitim potencijalom za oštećenje membrana (*Gottlieb M, 1982*). Prema našim saznanjima, do sada u literaturi ne postoje podaci o ispitivanju mehanizma dejstva pojedinih PLA2 venoma *Vaa* na eritrocite.

2.2.1.2. Hemoragija

Nakon višegodišnjeg ispitivanja, biohemijski nalazi su pokazali da su svi hemoragični toksini u venomima *Viperidae* cink-zavisne metaloproteinaze (MP). Hemoragična aktivnost SVMP venoma poskoka je vezana isključivo za grupu P-III SVMPs i subklasu VaH4 (*Latinovic et al. 2016*). Ovaj enzim je ekstemno hemoragičan (*Leonardi i sar., 2014*), a hemoragičnom efektu znatno doprinose i VaH1 i VaH2 (*Leonardi i sar., 2002*). Sve SVMP deluju na bazalnu membranu kapilara (laminin, kolagen tip IV, nidogen i perlekan) i na ekstracelularni matriks (ECM), čime se bazalna membrana i matriks oslabljuju. Krvni pritisak deluje na tako oslabljen krvni sud, dovodi do njegovog istezanja i u jednom trenutku do rupture i ekstravazacije krvi, koja povećava intersticijalni pritisak, a zatim nastaje ishemija i nekroza mišićnog tkiva. Nastalo oštećenje krvnog suda se teško sanira zbog samnjenja faktora X koje je takođe uzrokovano aktivnošću SVMP. Osim toga, neke SVMP deluju na trombocite (inhibiraju agregaciju), dok druge hidrolizuju faktore koagulacije i von Willebrandov faktor, čime se usporavaju primarna i sekundarna faza hemostaze, a u najtežim slučajevima skoro potpuno inhibirane, što dalje može dovesti do kardiovaskularnog šoka.

Zmijski venomi bogati SVMP obično sadrže i njihove inhibitore (SVMPI). To su peptidi niskih molekularnih masa koji efikasno kontrolišu proteolitičku aktivnost MP. Prisustvo inhibitora u venomu ukazuje na njihovu ulogu u smanjenju toksičnih efekata, jer modulacijom aktivnosti MP utiču na lokalne efekte kao što su oštećenje tkiva i inflamacija. Istraživanja o inhibitorima metaloproteinaza zmijskih venoma su u začetku (*Bastos i sar., 2016*).

2.2.1.3. Hemostaza

2.2.1.3.1. Primarna hemostaza

Hemostaza se definiše kao proces zaštite organizma od preteranog gubitka krvi iz oštećenog krvnog suda. Pri manjim oštećenjima tokom primarne hemostaze dolazi do vazokonstrikcije (vaskularna faza) što olakšava zaustavljanje krvarenja. Trombocitna faza hemostaze podrazumeva najpre vezivanje trombocita na povređene kapilare, a potom i njihovu aktivaciju i agregaciju pri čemu se formira trombocitni čep, koji kod najmanjih povreda može biti dovoljan da zaustavi krvarenje. Trombociti se aktiviraju kada dođu u kontakt sa oštećenim zidom krvnog suda. Počinju da bubre, postaju lepljivi, dobijaju nepravilni zvezdasti oblik, sa brojnim površinskim nastavcima. Sekretuju supstance (tromboksan, serotonin, ADP i dr.) koje aktiviraju druge trombocite, a deluju i na krvni sud dovodeći do njegovog sužavanja. Takođe, endotelne ćelije krvnih sudova prilikom oštećenja sintetisuje supstance kao što su fibronektin, laminin, vitronektin, kolagen, za koje postoje receptori na

trombocitima. Aktivacija ovog mehanizma dovodi do suženja krvnog suda i stvaranja trombocitnog čepa čime se završava primarna faza hemostaze (Bernt i sar., 2014).

2.2.1.3.2. Sekundarna hemostaza

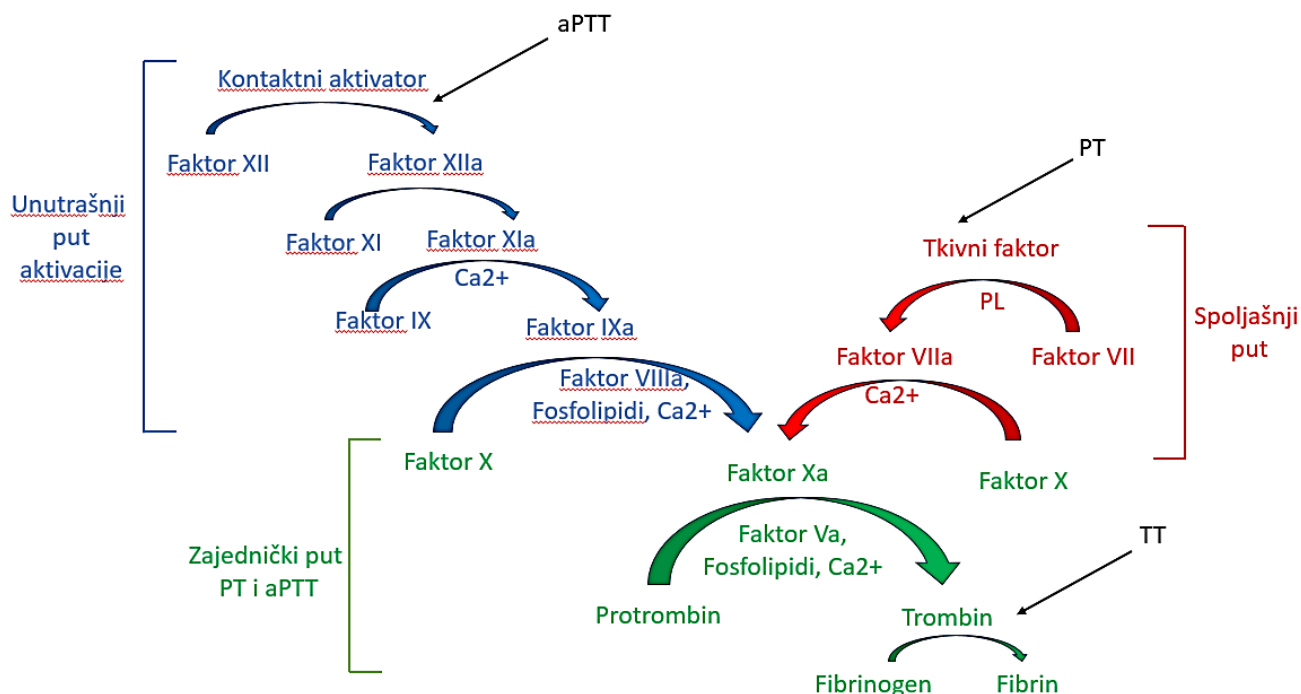
Ukoliko je oštećenje krvnog suda većeg obima, dolazi do formiranja krvnog ugruška (koaguluma), odnosno sekundarne hemostaze. Sekundarna faza hemostaze se odigrava simultano sa primarnom. Koagulaciona kaskada se aktivira kako bi se stabilizovao trombocitni čep, zaustavilo krvarenje i obezbedilo vreme potrebno za obnavljanje krvnog suda. Koagulaciona kaskada, tj. sekundarna hemostaza je serija biohemijskih reakcija kao odgovor na krvarenje iz povređenog tkiva, u kome svaki korak aktivira sledeći, što na kraju rezultira stvaranjem krvnog ugruška i začepljenjem oštećenja krvnog suda. Koagulaciona kaskada aktivira seriju faktora koagulacije. Svaki faktor je serin-proteaza, enzim koji proteolitički utiče na sledeći protein kaskade. Faktori koagulacije se u krvi nalaze u neaktivnom obliku i zovu se zimogeni. Sa svojim glikoproteinskim kofaktorom, faktor zgrušavanja se aktivira i tada je u stanju da katalizuje narednu hemijsku reakciju. Aktiviran faktor se označava sa malim slovom "a" iza odgovarajućeg rimskog broja (npr. kada je aktiviran faktor V postaje faktor Va). Kaskadna reakcija gde jedna supstanca aktivira drugu, a ova sledeću, dovodi do toga da se dejstvo koagulacionih faktora višestruko povećava, a samim tim i koagulacija ubrzava (Green, 2006). U zavisnosti od uzroka povrede krvnog suda, aktivira se spoljašnji ili unutrašnji put koagulacije. Spoljašnji put se aktivira mnogo brže i u slučaju teške povreda do zgrušavanja dolazi za samo 15 sekundi. Unutrašnjem sistemu potrebno je nekoliko minuta da dovede do koagulacije. Iako su ova dva puta indukovana odvojeno, međusobno su povezani i aktivacija jednog sistema aktivira drugi. Kao rezultat aktivnosti ovih puteva je stvaranje enzimskog kompleksa - aktivatora protrombina, čime započinje zajednički završni put, u kome se neaktivni protrombin krvne plazme prevodi u aktivni trombin. Trombin dalje aktivira neaktivni fibrinogen prevodeći ga u monomerni fibrin, koji gradi fibrinsku mrežu i sa krvnim ćelijama formira krvni ugrušak (Green, 2006).

Spoljašnji put koagulacije započinje faktor III (tkivni faktor, tromboplastin) koji u prisustvu Ca^{2+} interaguje sa faktorom VII i prevodi ga u VIIa. Tromboplastin daje signal da je došlo do oštećenja tkiva i da je potrebno otpočinjanje koagulacije. Faktor VII je prisutan u krvi i za njegovo aktiviranje je potreban vitamin K. Faktor VIIa dalje aktivira faktor X koji postaje faktor Xa (trombokinaza). Ovo je tačka u kojoj se spoljašnji i unutrašnji put koagulacije susreću i na dalje odvijaju zajednički. Spoljašnji put koagulacije se opisuje protrombinskim vremenom (PT). U odnosu na unutrašnji, spoljašnji put je kraći put sekundarne hemostaze (slika 5).

Unutrašnji put koagulacije započinje kontaktom krvi sa endotelnim kolagenom iz zida oštećenog krvnog suda. Usled toga dolazi do aktivacije faktora XII (Hagemanovog faktora) i oslobađanja fosfolipida iz oštećenih trombocita. Nakon aktivacije, faktor XIIa aktivira faktor XI koji se prevodi u XIa. Sa kalcijumovim jonima XIa aktivira faktor IX. Faktori IXa i VIIIa, uz Ca^{2+} i fosfolipide trombocita formiraju kompleks koji potom aktivira faktor X. Ovaj put koagulacione kaskade se meri aktiviranim parcijalnim tromboplastinskim vremenom (aPTT) (slika 5).

Zajednički put u kome učestvuju faktori X, V, II, I i XIII

Zajednički put koagulacije počinje aktivacijom faktora X, na kraju oba puta. Nastali faktor Xa sa faktorom Va i jonima kalijuma formira protrombinski kompleks. Protrombinski kompleks aktivira protrombin (faktor II) koji se prevodi u trombin (faktor IIa). U sledećem koraku trombin seče fibrinogen (faktor I) i nastaje fibrin (faktor Ia). Pored toga, trombin seče i faktor stabilizacije (faktor XIII) koji postaje aktiviran XIIIa. XIIIa u prisustvu jona kalcijuma formira fibrinsku mrežu kojom se stabilizuje ugrušak. Trombin ima nekoliko uloga, uključujući aktivaciju trombocita i faktora V, VIII i IX. Promene u zajedničkom putu mere se trombinskim vremenom (TT). PT, aPTT i TT prikazuju vreme potrebno da se formira fibrin (koagulum) nakon aktivacije koagulacije na određenom mestu u kaskadi (slika 5).



Slika 5. Koagulaciona kaskada

Boldovana slova označavaju početne tačke koagulacije u svakom pojedinom testu: **aPTT** – aktivirano parcijalno tromboplastinsko vreme (mera aktivacije unutrašnjeg puta); **PT**- potrombinsko vreme (mera aktivacije spoljašnjeg puta); **TT**- trombinsko vreme (mera aktivacije zajedničkog puta).

(<https://www.learnhaem.com/courses/coagulation/lessons/normal-haemostasis/>)

Hemotoksični efekat venomi ostvaruju delujući i koagulotoksično (Chowdhury i sar., 2021). Izučavanje efekata venoma na koagulacionu kaskadu je naročito komplikovano, jer su koagulacione kaskade krvi i komponente venoma dva istovremeno aktivna enzimska sistema. U literaturi je poznato da venomi zmija koje pripadaju porodici *Viperidae* imaju prokoagulantno dejstvo. Tokom formiranja koaguluma, faktori koagulacije i trombociti se brže troše nego što jetra može da nadoknadi sintezom, tako da dolazi do smanjenja njihove koncentracije u krvi. Ovo stanje je označeno kao potrošna koagulopatija (Maduwage i sar., 2014). Koagulopatija indukovana venomom (*Venom-induced consumption coagulopathy – VICC*) je rezultat aktivacije koagulacionog puta prokoagulantnim toksinima venoma. Venom *V. ammodytes* uzrokuje VICC, a detektuje se aPT, aPTT, fibrinogen i D-dimer testovima. Pri tome dolazi do deficita fibrinogena (Luksic i sar., 2010). Enzimi venoma istovremeno smanjuju količinu fibrinogena u krvi i vrše trombocitolizu, i tako sprečavaju formiranje fibrinske mreže. Posledica aktivnosti ovog mehanizma je izostanak zatvaranja oštećenih krvnih sudova i mogućnost fatalnog gubitka krvi. Rezultat dejstva venoma je nedostatak fibrinogena, često uz fiziološke vrednosti drugih faktora koagulacije.

Uticaj venoma poskoka na hemostazu krvnog sistema sisara, može se ispitati *in vitro* i *in vivo*. Prokoagulantna aktivnost (Chowdhury i sar., 2021) venoma se *in vitro* meri u citratnoj plazmi (MCD-P) ili rastvoru goveđeg fibrinogena (MCD-F), merenjem vremena potrebnog za koagulaciju. Korišćenjem plazme u testu, detektuje se stanje/aktivnost nekoliko tipova prokoagulanata, kao što su trombinu slični enzimi, aktivatori faktora X (P-IIIId SVMP) i protrombin. Protrombinski aktivator, zavisen od Ca^{2+} pripada P-IIIId klasi SVMP. Testom prokoagulantne aktivnosti u kome se koristi rastvor goveđeg fibrinogena, detektuje se samo aktivnost enzima koji utiču na fibrinogen.

Minimalna defibrinogenišuća doza venoma

Fibrinogen (faktor I) je glikoproteinski kompleks, koji se sintetise u jetri i cirkuliše krvotokom svih vertebrata. Fibrinogen čine dva trimera, a svaki trimer je izgrađen od tri različita lanca α -, β -, γ -. Tokom povrede tkiva, i/ili krvnih sudova, pod enzimskim uticajem trombina fibrinogen se pretvara u fibrin i zatim u fibrinski koagulum. Ovi koagulumu prvenstveno služe da zatvore oštećenje krvnog suda i spreče krvarenje. Fibrin se takođe vezuje i redukuje aktivnost trombina (negativnom povratnom spregom). Ova aktivnost, ponekad označena kao antitrombin I, ograničava stvaranje koaguluma. Fibrin takođe posreduje u širenju trombocita i endotelnih ćelija, formaciji kapilarnih sudova i angiogenezi, što sve dovodi do revaskularizacije i zarastanju rana (*Theakston i Raid 1983*).

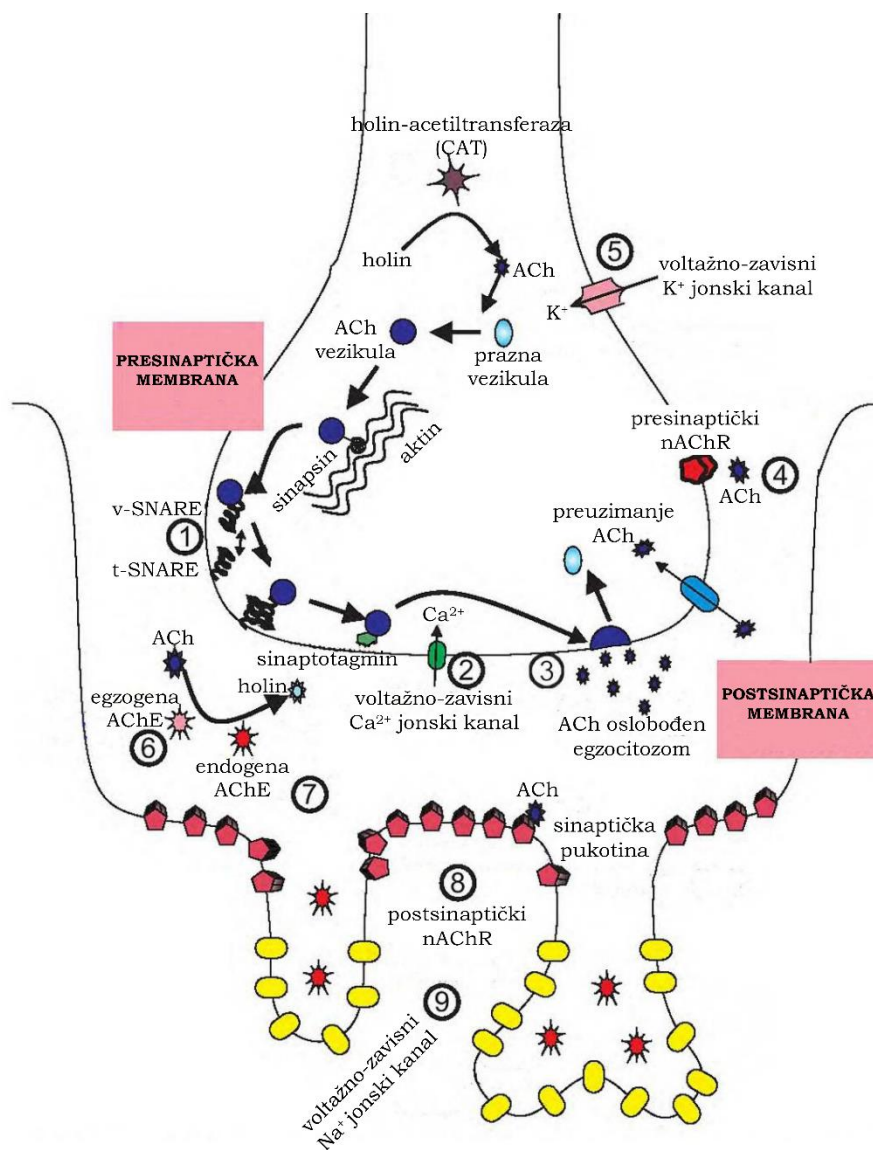
2.2.2. Neurotoksičnost

Neurotoksičnost je jedna od ključnih karakteristika patološkog stanja koje nastaje nakon ujeda zmija otrovnica, a da pri tome ovaj toksični efekat još uvek nije dovoljno razjašnjen. Najvažnija i najteža klinička manifestacija neurotoksičnog dejstva zmijskog venoma je akutna neuromuskularna paraliza sa respiratornom insuficijencijom. Međutim, u literaturi nema dovoljno podataka o drugim akutnim neurotoksičnim manifestacijama, a posebno o efektima koji se odnose na odloženu neurotoksičnost (*Ranawaka i sar., 2013*). Razvoj i oporavak od neurotoksičnih efekata, njihov stepen involviranosti u funkcionisanju respiratorne muskulature, obrasci nastanka respiratorne insuficijencije i odgovor organizma sisara na antivenom, varijabilnog su karaktera i sasvim izvesno zavise od vrste zmija otrovnica, njihovih geografskih varijacija i mehanizama neurotoksičnog dejstva njihovih venoma. Noviji rezultati iz ove oblasti istraživanja, osporavaju tradicionalne i uniformne koncepte tumačenja neurotoksičnosti, a ističu veliki značaj diverziteta neurotoksina zmijskih venoma. Takođe, još uvek ne postoji jedinstveni sistem klasifikacije poremećaja neuromuskularne transmisije, niti modeli za predikciju razvoja respiratorne insuficijencije. Ovi faktori bi svakako doprineli uspešnijoj kliničkoj terapiji ovakvog patološkog stanja, kao i daljim saznanjima u oblasti neurotoksičnosti venoma zmija otrovnica.

U osnovi se smatra da neurotoksini zmijskih venoma uzrokuju dve vrste neuromuskularne blokade: presinaptičku i postsinaptičku (*Warrell, 2010; Ranawaka i sar., 2013*). Većina trenutnih saznanja o neurotoksičnosti venoma potiče iz studija u kojima su korišćeni pojedinačni, prečišćeni neurotoksini (alfa-bungarotoksin, beta-bungarotoksin, taipoksin, kalciseptin, fosfolipaza A₂, kandoksin, dendrotoksin, fascikulin, krotamin). Na slici 6. je prikazana neuromišićna sinapsa i devet potencijalnih mesta delovanja neurotoksina poreklom iz venoma zmija otrovnica, kao i drugih neurotoksina i farmakološki aktivnih supstanci.

U literaturi je opisana različita metodologija ispitivanja poremećene neuromuskularne transmisije nastale pod dejstvom pojedinih neurotoksina zmija otrovnica. Rezimirani prikaz nekih istraživanja je sledeći: (1) *in vitro* – izolovani neuromišićni preparat *n. phrenicus – hemidiaphragm* kod miševa; *in vivo* – neuromišićni preparat *n. ischiadicus – m. soleus* kod pacova (*Dixon i Harris, 1999; Harris i sar., 2000*); (2) mišićni preparat *m. tibialis anterior* kod pacova; neuromišićni preparat *n. phrenicus – hemidiaphragm* kod miševa (*Nirathanan i sar., 2002; 2003*); (3) neuromišićni preparat *n. phrenicus – hemidiaphragm* kod pacova; *m. soleus* kod pacova (*Prasarnpun i sar., 2004; 2005*).

U ovoj doktorskoj disertaciji, neurotoksični efekat venoma poskoka je ispitivan u *in vitro* uslovima, električnom poljnom stimulacijom (*EFS – Electric Field Stimulation*) neuromišićnog preparata dijafragme (sa pripadajućim ograncima *n. phrenicus-a*) poreklom od pacova.



Slika 6. Mesta delovanja zmijskih neurotoksina, drugih toksina i farmakološki aktivnih supstanci na neuromišičnoj sinapsi (*Ranawaka i sar., 2013*)

- ① **Membranski proteini vezani za vezikule:** *Zmijski toksini:* beta-bungarotoksin (*Bungarus spp.*), taipoksin (*O. scutellatus*); *Ostali toksini:* botulinusni toksin, tetanusni neurotoksin.
- ② **Voltažno-zavisni Ca^{++} jonski kanal:** *Zmijski toksini:* kalciseptin (*Dendroaspis spp.*), beta-bungarotoksin (*Bungarus spp.*); *Ostali toksini:* omega-konotoksin (morski puž, *Conus spp.*); *Stanje bolesi:* Lambert-Eaton miastenjski sindrom.
- ③ **Presinaptička membrana:** *Zmijski toksin:* fosfolipaza A_2 .
- ④ **Presinaptički nAChR:** *Zmijski toksin:* kandoksin (*Bungarus candidus*); *Ostali toksini:* kurare; *Farmakološke supstance:* nedepolarizujući (kompetitivni) neuromišični blokatori (pankuronijum, atrakurijum).
- ⑤ **Voltažno-zavisni K^+ jonski kanal:** *Zmijski toksin:* dendrotoksin (*Dendroaspis spp.*); *Stanja bolesi:* neuromiotonija, Isakov sindrom; *Farmakološke supstance:* magnezijum-sulfat, aminoglikozidi.
- ⑥ **ACh:** Hidroliza ACh posredstvom egzogene AChE; *Zmijski toksin:* venom kobre (*Naja spp.*).
- ⑦ **AChE:** Inhibicija endogene AChE; *Zmijski toksin:* fascikulin (*Dendroaspis spp.*).
- ⑧ **Postsinaptički nAChR:** *Zmijski toksin:* alfa-bungarotoksin (*Bungarus spp.*), kandoksin (*B. candidus*), azemiopsin (*A. feae*), vaglerin (*T. wagleri*); *Ostali toksini:* alfa-konotoksin (morski puž, *Conus spp.*); *Stanje bolesi:* miastenia gravis; *Farmakološke supstance:* depolarizirajući neuromišični blokator (sukcinil-holin), nedepolarizujući (kompetitivni) neuromišični blokatori (pankuronijum, atrakurijum).
- ⑨ **Voltažno zavisni Na^+ jonski kanal:** *Zmijski toksin:* krotamin (*Crotalus spp.*); *Ostali toksini:* pompilidotoksin (osa), delta-konotoksin (*Conus spp.*), tetradotoksin (morske ribe, *Tetraodon spp.*).

2.2.2.1. Struktura i funkcija ATPaza

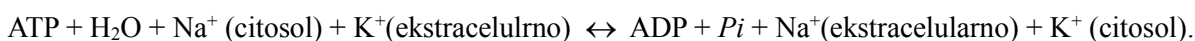
Jedno od potencijalnih mesta dejstva neurotoksičnih komponenti venoma zmija otrovnica je presinaptički nervni završetak. Neurotoksična komponenta venoma *Vaa* PLA2 mogući toksični efekat ostvaruje na presinaptičkom nervnom završetku i utiče na egzocitozu ACh.

Moguće target mesto PLA2 su i adenzin-trifosfataze (ATPaze), koje su lokalizovane u fosfolipidnom dvosloju ćelijske membrane. ATPaze pripadaju familiji hidrolaza i njihova glavna karakteristika jeste sposobnost da koriste hemijsku energiju, skladištenu u molekulu adenzin-trifosfata (ATP), za obavljanje svojih funkcija. Hidrolizom ATP nastaje fosfatni jon i molekul adenzin-difosfata (ADP) ili se pak hidroliza odvija do pirofosfatnog jona i molekula adenzin-monofosfata (AMP). S obzirom na svoju strukturu, molekul ATP i ostali nukleotidi poseduju veliko negativno naelektrisanje i zbog toga je najčešće u reakcijama koje ovi enzimi katalizuju neophodan Mg^{2+} jon. U zavisnosti od biohemijske uloge, ATPaze se mogu podeliti u nekoliko familija: **(1)** fosforilacione ATPaze (F-ATPaze), koje učestvuju u sintezi ATP. Selektivne su za protone (H^+ jone), dok su u pojedinim bakterijskim vrstama selektivne i za Na^+ jone. Smeštene su u membranama bakterija, unutrašnjim membranama hloroplasta i unutrašnjim membranama mitohondrija (Kuhlbrandt., 2019); **(2)** E1-E2 ATPaze (P-ATPaze), nazivaju se i jonskim pumpama, a s obzirom da u toku enzimske aktivnosti zauzimaju dva konformaciona oblika nazivaju se i E1-E2 ATPazama. Nalaze u različitim organizama i dokazane su različite izoforme ovih enzima. P-ATPaze, selektivne su za razne jone alkalnih- i zemnoalkalnih metala, dok kod mikroorganizama mogu biti selektivne i za jone teških metala kao što su olovo, živa i kadmijum. (Kuhlbrandt., 2004); **(3)** Vakuolarne ili vezikularne ATPaze (V-ATPaze), nalaze se u membranama Goldžijevog aparata, endoplazmatičnog retikuluma, lizozoma i drugim ćelijskim organelama. Njihova uloga je pre svega transport protona (H^+ jona) u međućelijski prostor, usled čega dolazi do promene pH sredine (Forgac, 2007). V-ATPaze su od suštinskog značaja za uspostavljanje i održavanje pH homeostaze, imunskog odgovora, ćelijske signalizacije i oslobađanja neurotransmitera (Wang i sar., 2020); **(4)** ATPaze koje se nalaze u nekim vrstama prokariota (A-ATPaze). Po strukturi su slične V-ATPazama, a po funkciji F-ATPazama. Nastale su kao evolutivni odgovor na život u sredini sa niskom pH vrednosti (Forgac, 2007); **(5)** Ekstracelularne ATPaze (E-ATPaze) su enzimi koji imaju veoma široku specifičnost za supstrat (pored adenzin-trifosfat, supstrati su im i drugi nukleotid-trifosfati) (Zhong i Guidotti 1999).

Posebno je značajna familija P-ATPaza, koja je uključena u aktivni transport molekula i jona nasuprot koncentracionom gradijentu, a za njenu funkciju je potrebna velika količina energije. Ovo je naročito izraženo kod ATPaza koje utiču na koncentracije jona alkalnih, zemnoalkalnih metala i vodonika, jer su koncentracija mineralnih materija i osmotski pritisak od suštinskog značaja za homeostazu ćelije. Najzastupljenija među njima i funkcionalno najvažnija ATPaza, koja transportuje jone natrijuma i kalijuma je Na^+/K^+ zavisna adenzin-trifosfataza (Na^+/K^+ -ATPaza) ili “natrijum-kalijumova pumpa” (Jorgensen i sar., 2003).

2.2.2.2. Struktura i funkcija Na^+/K^+ -ATPaza

Na/K -pumpa ili Na^+/K^+ -ATPaza je transmembranski enzim koji pripada P tipu familije ATPaza i odgovorna je za aktivni transport jona Na^+ i K^+ kroz plazma membranu, uz utrošak energije dobijene hidrolizom terminalne fosfatne grupe ATP (Vasilets i Schwarz., 1993). Po jednom enzimskom ciklusu uz utrošak jednog mola ATP, $3Na^+$ jona izlaze iz ćelije dok $2K^+$ jona ulaze u ćeliju, nasuprot njihovom koncentracionom gradijentu. Hidroliza koju katalizuje ovaj enzim data je jednačinom:



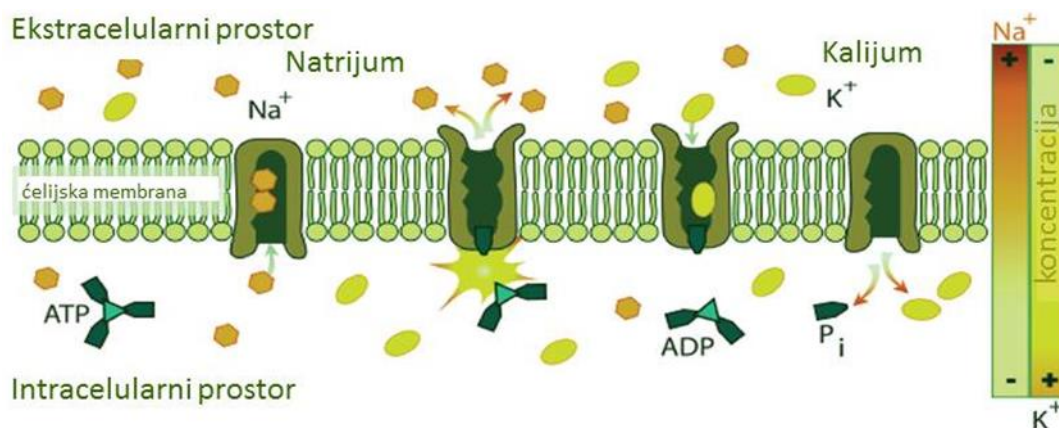
Za održavanje membranskog potencijala, kao i za održavanje sekundarnog aktivnog transporta drugih rastvorenih supstanci, neophodan je koncentracioni gradijent jona Na^+ i K^+ . Pored transportne

uloge, poslednjih godina Na^+/K^+ -ATPazi se pripisuje i uloga u inicijaciji kancera, njegovom rastu i metastazama (Mijatovic i sar., 2008).

Na^+/K^+ -ATPaza je heterodimerni protein izgrađen od α - i β -subjedinica, a može da sadrži još jedan mali tkivno specifični regulatorni protein tzv. FXYD protein ili γ -podjedinica. α -podjedinica je mase oko 112 kDa i ima katalitičku ulogu. Glikozilovana β -podjedinica je prosečne mase 50 kDa i ima ulogu u stabilizaciji α -podjedinice. FXYD protein je prosečne mase 10 kDa i učestvuje u modulaciji funkcije Na^+/K^+ -ATPaze u zavisnosti od tkiva (Toyoshima i sar., 2011). Veliki broj aminokiselina (oko 1000) koje ulaze u sastav α -podjedinice enzima, čine tri domena: A (*actuator*), P (*phosphorylation*) i N (*nucleotide-binding*). Vezivno mesto za ATP i jone Na^+ i K^+ nalazi se na α -podjedinici. U ćelijama sisara postoje 4 različite α -izoforme ($\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3, \alpha 4$), tri β -izoforme ($\beta 1, \beta 2, \beta 3$) i četiri izoforni FXYD proteina (Suhail, 2010). Ekspresija izoforni je različita kod ljudi i glodara i tkivno je specifična (Blanko i sar., 1998).

2.2.2.3. Reakcioni ciklus Na^+/K^+ -ATPaze

Veliki broj studija u kojima je ispitivana aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze u pogledu transporta jona Na^+ i K^+ kroz ćelijsku membranu, uključujući fosforilovanje i defosforilovanje enzima (Post i sar., 1972) i konformacione promene enzima, dale su osnovne informacije o mehanizmu dejstva ovog enzima (Jorgensen i sar., 2003). Reakcioni ciklus Na^+/K^+ -ATPaze je poznat i kao *Albers-Post* mehanizam (slika 7).



Slika 7. Reakcioni ciklus Na^+/K^+ -ATPaze (Suhail, 2010)

Reakcioni ciklus Na^+/K^+ -ATPaze započinje vezivanjem tri jona natrijuma ($\text{Na}^+_{\text{citosol}}$) za deo enzima koji se nalazi u citoplazmi. Zatim dolazi do $\text{Na}^+_{\text{citosol}}$ -zavisne fosforilacije enzima i okluzije jona $\text{Na}^+_{\text{citosol}}$, a istovremeno dolazi do konformacione promene enzima. Otpuštanje Na^+ jona u sledećoj fazi je kuplovano sa konformacionom promenom unutar enzima, za kojim sledi vezivanje dva $\text{K}^+_{\text{ekstracelularno}}$ jona iz ekstracelularne tečnosti. Sledeća faza je $\text{K}^+_{\text{ekstracelularno}}$ - aktivirana defosforilacija i okluzija dva jona $\text{K}^+_{\text{ekstracelularno}}$. Otpuštanjem okludovanih $\text{K}^+_{\text{ekstracelularno}}$ jona u unutrašnjost ćelije završava se jedan reakcioni ciklus Na^+/K^+ -ATPaze (Castillo i sar., 2015).

2.2.2.4. Inhibitori Na^+/K^+ -ATPaze

Poznat je veliki broj sintetskih i prirodnih inhibitora Na^+/K^+ -ATPaze. Najdužu upotrebu u medicini imaju kardiotionični glikozidi. Oni predstavljaju grupu steroidnih glikozida uglavnom poreklom iz biljaka. Sastoje se od ugljeno-hidratnog i steroidnog dela. Aktivni region je steroidni deo koji se vezuje za α -sudjedinicu fosforilovanog enzima i efikasno sprečavaju aktivnost i funkcije enzima. U ćeliji srčanog mišića dolazi do povećanja intracelularnog Na^+ , a kao posledica ovog povećanja dolazi do inhibicije unosa Na^+ jona kroz kompleks koji je $\text{Ca}^{2+}\text{Na}^+$ antiport. Kao posledica

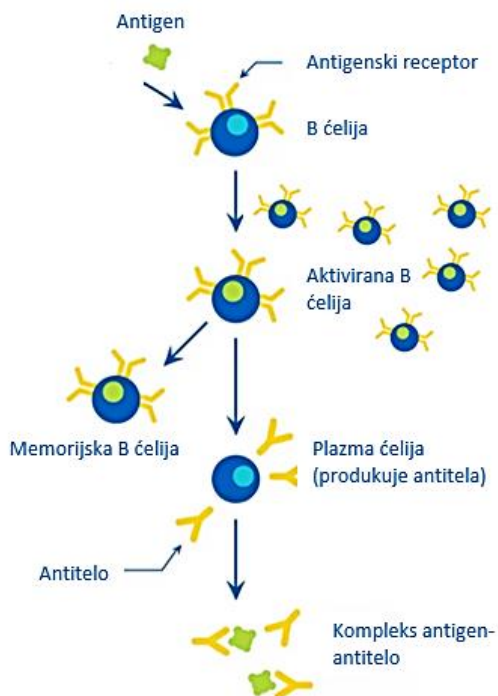
ove inhibicije dolazi do povećanja intracelularnog Ca^{2+} i odložene kontrakcije srčanog mišića. Ovaj biološki efekat karakterističan je za selektivne inhibitore Na^+/K^+ -ATPaze i ispoljava se samo na ćelijama srčanog mišića zbog specifičnog načina na koji je regulisana njihova kontrakcija.

2.3. Imunski odgovor

Imunski sistem je podeljen na urođeni i stečeni (adaptivni). Oba sistema sadrže i humoralne i ćelijske elemente. Oba sistema su međusobno zavisna, komuniciraju molekulima i receptorima čime se međusobno usklađuju, a rezultat toga je prilagođen imunski odgovor specifičnog organizma za odbranu od specifičnog patogena. Antivenom se proizvodi koristeći upravo ovakav imunski sistem životinja (konja, ovaca i drugih). S obzirom na veliki broj proteina venoma i efekte koje ostvaruju u organizmu sisara, jasan je zahtev koji se postavlja imunskom sistemu organizma životinje za proizvodnju antivenoma.

2.3.1. Humoralni imunski odgovor

Humoralni imunski odgovor (slika 8) počinje sazrevanjem B limfocita u kostnoj srži. Tada se na membrani ćelija u velikom broju ekspimiraju B ćelijski receptori (BCR). Ovi proteinski kompleksi su antitela (IgD izotipa) koji su proksimalnim delom uronjeni u membranu, a distalnim krajem za koga se vezuju antigeni, usmereni ka okolnom prostoru ćelije. Svaki pojedini B limfocit na površini ekspimirira jedinstveno antitelo specifično za samo jedan antigen. Zrela B ćelija migrira iz kostne srži do limfnih čvorova ili drugih limfnih organa, gde počinju da se susreću sa patogenima.



Slika 8. Pojednostavljen prikaz humoralnog imunskog odgovora

(<https://microbiologynote.com/humoral-immunity/>)

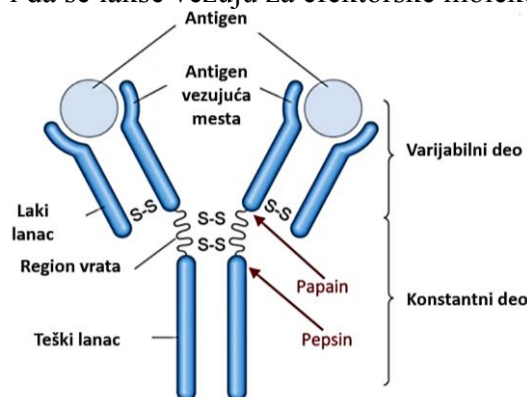
Ukoliko BCR prepozna specifični antigen, aktivira se signal i B limfocit preuzima antigen endocitozom. Unutar B limfocita, antigen se obrađuje i ponovo izlaže na površini B ćelije, ovog puta u sklopu MHCII proteinskog kompleksa. Samo ovako prezentovani antigeni mogu da prepoznaju pomoćnički T-limfociti koji sekrecijom citokina omogućuju B limfocitima da proliferišu, a njihovim

potomcima da se diferenciraju u plazma ćelije. Plazma ćelije sekretuju antitela koja su specifična za antigen koji je preko BCR pokrenuo lanac događaja. Antitela se sekretuju u velikoj količini u krvotok i vezuju se za antigene, neutrališući njihovo dejstvo i formirajući komplekse antigen-antitelo. Na taj način antigen ili kompleks na kome je antigen, neće moći da ostvari svoje patogeno dejstvo. Posebnim mehanizmima kompleksi se odstranjuju iz organizma (fagocitozom, aktivacijom sistema komplementa, prečišćavanjem krvi kroz jetru, slezinu i bubrege ili vezivanjem za Fc receptore na makrofagima. Neki od aktiviranih B limfocita se diferenciraju u memorijske B limfocite, a one nose receptore specifične za antigen koji ih je aktivirao, tako da će pri sledećem susretu produkcija antitela biti mnogo brža.

Imunogeni su supstance sposobne da izazovu imunski odgovor, obično pokretanjem proizvodnje antitela ili aktiviranjem imunskih ćelija. Međutim, na imunski odgovor može uticati toksičnost imunogena i redukovati specifični imunski odgovor. Venom, kao toksična smeša antigena može uticati na imunski odgovor na sledeće načine: (1) ćelijska oštećenja i inflamacija na mestu ujeda mogu uticati na lokalni imunski odgovor privlačenjem imunskih ćelija i uticajem na vrstu generisanog odgovora; (2) visoko toksični imunogeni mogu dovesti do imunosupresije, gde je celokupna funkcija imunskog sistema ugrožena. Ovo dalje dovodi do neadekvatnog imunskog odgovora, što otežava da uspostavljanje efikasne odbrane; (3) nivo toksičnosti i doza imunogena mogu biti kritični faktori. Niske doze blago toksičnog antigena mogu stimulisati imunski odgovor, dok visoke doze ili visoko toksični antigeni mogu dovesti do suboptimalnog ili disfunkcionalnog odgovora organizma (*Schwartz, 2003*).

2.3.2. Struktura antitela

Antitela su glikoproteini veličine od 150 kDa. Sastavljeni su od dva laka (po 25 kDa) i dva teška lanca (po 50 kDa) koji su međusobno spojeni disulfidnim mostovima i aranžirani u tri globularna regiona koji grubo formiraju oblik slova Y (slika 9). Molekul antitela se strukturno sastoji od dva antigen vezujuća fragmenta (*antigen binding - Fab*) i trećeg, konstantnog fragmenta (*crystallisable - Fc*). Između Fab i Fc se nalazi region vrata teškog lanca koji omogućava fleksibilnost strukture. Time se omogućava da se antitelo veže za par epitopa na različitoj udaljenosti, da formiraju komplekse (dimere, pentamere, heksamere) i da se lakše vezuju za efektorske molekule.



Slika 9. Prikaz strukture antitela (IgG)

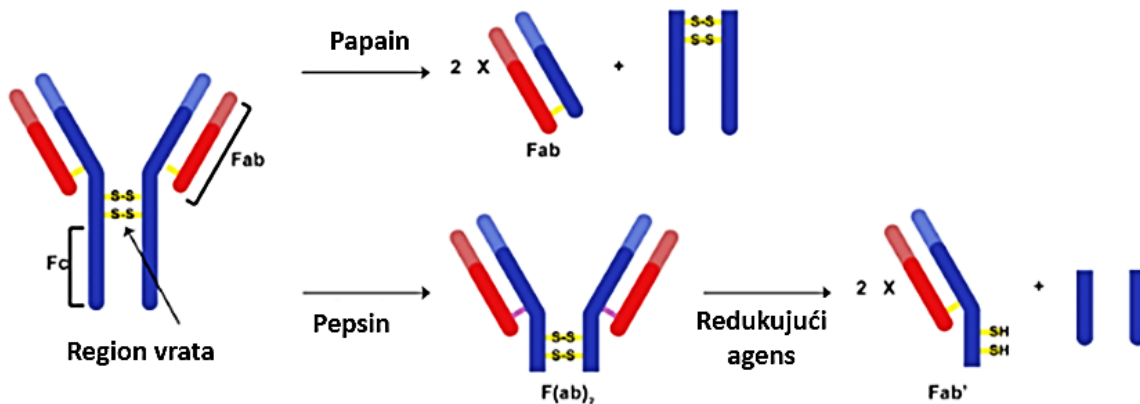
Delovanjem papaina nastaju Fab fragmenti, a delovanjem pepsina $F(ab')_2$ fragmenti imunoglobulina (označeno crvenim strelicama). (<https://www.news-medical.net/life-sciences/The-Structure-of-an-Antibody.aspx>)

Fab domen je poznat u literaturi još i kao varijabilni domen - Fv. Svaki varijabilni domen čine tri hipervarijabilna regiona. U ovim regionima dolazi do najvećih varijacija u aminokiselinama, a prostorna orijentacija je takva da se ti regioni nalaze na površini antitela. Time je omogućeno da se antigen vezujuće mesto na najbolji mogući način prilagodi epitopima antigena tokom sazrevanja imunskog odgovora. Zato se ovi regioni nazivaju komplementarni determinišući region (Complementary determining regions – CDR). Postojanje dva identična antigen-vezujuća mesta

omogućavaju da se molekul antitela jače veže za multivalentni antigen, kao što su ponavljajuća mesta na ćelijskim zidovima bakterija. Nakon ujeda otrovne zmijske, za terapiju se koristi rastvor u kome se nalaze antitela specifična za komponente venoma. Antitela se dobijaju imunizacijom životinja venomom. Postoje pokušaji da se životinje imunizuju detoksikovanim venomom, pojedinim prečišćenim komponentama venoma ili rekombinantnim proteinima venoma. Međutim, na ovaj način se ne dobijaju dovoljno potentni antivenomi.

Antivenom se može proizvesti korišćenjem celih imunoglobulina (IgG), kao i fragmenata $F(ab')_2$ ili Fab. Fragmenti $F(ab')_2$ se dobijaju enzimskim dejstvom pepsina koji raskida disulfidne veze imunoglobulina G, a fragmenti Fab nastaju kao posledica enzimskog raskidanja disulfidnih veza papinom (slika 10).

Prednost pripreme antivenoma korišćenjem celih imunoglobulina je daleko jednostavniji proizvodni proces (niža cena preparata), međutim primene ovako dobijenog antivenoma u 10% slučajeva izaziva značajne alergijske reakcije (tip III hipersenzitivnosti). Proizvodnja antivenoma sa Fab fragmentima je komplikovanija, ali je ovakav antivenom pogodan u terapiji ujeda zmijske sa prevalentno neurotoksičnim efektom (*Elapidae*). Komponente venoma ove familije zmijske su manje i mogu da uđu u krvotok kroz pore kapilara, odnosno brzo stignu do nervnog tkiva, a Fab fragmenti su dovoljno mali da mogu da se transportuju na ovaj način. Krupni proteini venoma *Viperidae* se kreću daleko sporije limfotokom i lečenje $F(ab')_2$ fragmentima je adekvatnije.



Slika 10. Pepsinska i papainska digestija IgG i delovanje redukcionog agensa na dobijene fragmente (<https://www.rockland.com/antibody-modification/antibody-fragmentation/>)

2.4. Principi produkcije antivenoma

Za proizvodnju antivenoma koriste se konji, ovce, magarci, koze i zečevi (*WHO Expert Committee, 2017*). Najčešće se za proizvodnju antivenoma koriste konji zbog svoje veličine, pa se prilikom jednog uzorkovanja krvi može uzeti veća zapremina. Međutim, u pojedinim zemljama koriste se ovce, zbog uspešne indukcije imunskog odgovora kod svake jedinke, mnogo lakšeg podnošenja adjuvansa (veći titar), dugotrajnog održanja titra antitela i značajno manje pojavljivanje neželjenih reakcija kod ljudi u odnosu na preparate poreklom od konja.

Za imunizaciju konja, u cilju dobijanja antivenoma kojim se leči ujed poskoka, koristi se kompletan, nativni venom. Imunizacija se vrši subkutanom aplikacijom venoma na više mesta. Ciklus imunizacije traje 7-8 nedelja, nakon čega se proverava titar neutrališućih antitela. Ukoliko je titar veći od 20 AJ/ml, pristupa se uzorkovanju krvi, a ukoliko je titar manji od te vrednosti, ciklus imunizacije se ponavlja (*Milovanovic i sar., 2018*). Iz pune krvi odvajaju se plazma i ćelije krvi, pogotovu eritrociti. U roku od 24 sata vrši se reinfuzija crvenih krvnih zrnaca, a dobijena plazma se koristi kao sirovina u izradi antivenoma.

Prikupljena plazma se podvrgava precipitaciji proteina pomoću amonijum-sulfata. Time se talože proteini veličine imunoglobulina oko 150 kDa. U daljem postupku, primenjuje se metoda pepsinske digestije na niskom pH. Ovim se denaturišu mnogi preostali proteini koji nisu imunoglobulini, a IgG se iseca na bivalentne $F(ab')_2$ fragmente i peptide dobijene razgradnjom Fc. Dalje prečišćavanje $F(ab')_2$ fragmenata uključuje serije precipitacija i filtracija kako bi se odstranili svi proteini koji nisu $F(ab')_2$, kao i višak amonijum-sulfata. Postoje i druge metode prečišćavanja koje doprinose većoj čistoći preparata ili boljem prinosu u odnosu na početni materijal. Nakon kontrolnih testova (neškodljivost, zaštitna potencia, koncentracija proteina, sterilnost, itd) koji su određeni smernicama EMA (Evropske Medicinske Agencije), WHO (svetske zdravstvene organizacije) i evropskom Farmakopejom, proizvedeni preparat se može koristiti u kliničkoj praksi.

3. CILJEVI I ZADACI

U cilju karakterizacije venoma poskoka (*Vipera ammodytes*) sa teritorije Republike Srbije i ispitivanja terapijskog dejstva antivenoma, postavljani su sledeći zadaci:

1. Ispitivanje enzimskih aktivnosti komponenti venoma koje su dominantni nosioci toksičnosti venoma.
2. Ispitivanje potence kojom poliklonski F(ab')₂ imunoglobulinski fragmenti antivenoma neutrališu aktivnost toksičnih enzimskih komponenti venoma.
3. Ispitivanje lokalnih i sistemskih toksičnih efekata (neurotoksičnost, hemotoksičnost, citotoksičnost), na animalnim modelima i/ili *in vitro*, koje izaziva venom poskoka.
4. Ispitivanje potence kojom poliklonski F(ab')₂ imunoglobulinski fragmenti antivenoma neutrališu lokalne i sistemske toksične efekte (neurotoksičnost, hemotoksičnost, citotoksičnost), koje izaziva venom poskoka.
5. Određivanje korelacije između standardnog testa potence kojim se procenjuje efikasnost antivenoma, sa *in vitro* testovima u kojima se procenjuje sposobnost antivenoma da neutrališe mereni toksični efekat ili enzimsku aktivnost.
6. Ispitivanje potence kojom poliklonski F(ab')₂ imunoglobulinski fragmenti antivenoma, dobijeni imunizacijom konja venomom poskoka, neutrališu dejstvo venoma drugih zmija familije *Viperidae*: *Vipera aspis*, *Macrovipera lebetina* i *Montivipera xanthina*.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Laboratorijske životinje

4.1.1. Čuvanje miševa i pacova

U ispitivanjima su korišćene laboratorijske životinje iz sopstvenog uzgoja (Institut za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“): 60 outbred miševa oba pola Intor: Swiss i 50 outbred pacova Wistar soja. Eksperimentalne životinje su držane u vivarijum, u polikarbonatnim kavezima, po 5 miševa u kavezu i po 2 pacova u kavezu, na konstantnoj temperaturi od 22 ± 1 °C, sa 12-to časovnim ciklusima svetla i mraka (svetlo od 7:00 ujutru do 7:00 uveče). Hrana i voda su bile dostupne *ad libitum*.

4.1.2. Čuvanje konja

Za proces imunizacije, korišćene su zdrave domaće kobile, starosti 5 do 10 godina, telesne mase >600 kg, koje ranije nisu korišćene za imunizaciju sa ciljem proizvodnje antivenoma. Po dolasku, konji su proveli tri meseca u karantinu. Životinje su držane u posebnim boksovima, u štali. Svi konji su proveravani na prisustvo bakterijske ili virusne infekcije (infektivna anemija konja). Sprovodila se regularna antitetanusna imunizacija, kao i rutinska klinička biohemijska i hematološka analiza. Konji su redovno tretirani protiv endoparazita. Životinje su bile hranjene prvenstveno travom, ali im je davano i seno lucerke, kao i zob, uz dodatak vitaminsko-mineralnih suplemenata i stočne soli.

4.1.3. Čuvanje zmija

Venom je dobijan mužom odraslih poskoka (*V. ammodytes*) sa teritorije Srbije. Nakon prispeća u Institut „Torlak“, zmije su pregledane od strane veterinara, nakon čega su držane u karantinu dva meseca. Zmije su smeštane u serpentarijumu Instituta „Torlak“, individualno, na kontrolisanoj temperaturi (23-26°C) i vlažnosti vazduha (60%). Hranjene su živim miševima jednom mesečno. Venom je prikupljan na svakih 30 dana, pritiskom otrovnih žlezda rukom, u kivete od 50 ml prekrivene parafilmom. Venom je čuvan na tamnom mestu, na temperaturi -20°C, pre i nakon liofilizacije.

Rešenja o odobrenju sprovođenja oglada na životinjama pod nazivom “Karakterizacija venoma poskoka (*Vipera ammodytes*) sa teritorije republike Srbije i terapijskog antivenoma”, broj 323-07-02181/2021-05; „Rutinski rad u kontroli humanog preparata Viekvin, antivenoma protiv ujeda šarke i poskoka“, broj 323-07-03666/2021-05/6 i „Proizvodnja antiseruma protiv zmijskog ujeda“, broj 323-07-04516/2021-05 dobijena su od Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije.

4.2. Određivanje vrednosti LD₅₀ venoma poskoka i ED₅₀ antivenoma (potence)

4.2.1. Određivanje vrednosti LD₅₀ venoma poskoka na miševima

Vrednost LD₅₀ određena je na outbred miševima Intor:Swiss, prema uputstvima Evropske farmakopeje (*Council of Europe, 2019*), sa šest razblaženja venoma. Svako razblaženje je ispitano na po šest miševa, telesne mase 18-22 g. Od osnovnog rastvora venoma napravljena je serija razblaženja u intervalu od 5,25 µg do 25 µg po mišu. Venom je razblaživan fiziološkim rastvorom do željene koncentracije i držan na +4 °C do aplikacije. Ukupna zapremina od 0,25 ml razblaženog venoma aplikovana je miševima intravenski (repna vena).

4.2.2. Određivanje vrednosti ED₅₀ antivenoma (potence) na miševima

Test potence je izveden na outbred miševima Intor:Swiss, prema uputstvima Evropske farmakopeje (*Council of Europe, 2019*). Nakon definisanja vrednosti LD₅₀, pripremane su smeše

serijskih razblaženja antivenoma sa količinom od 5LD₅₀ venoma i aplikovane na isti način kao što je opisano kod aplikacije venoma. Dobijeni rezultati su obrađeni Spearman-Kärber metodom da bi se izračunala potencia proizvedene plazme ili antivenoma. Potencia je definisana kao broj LD₅₀ koji se može neutralisati 1 mL antivenoma i izražava se kao broj antitoksičnih jedinica po mililitru (AJ/mL).

4.2.3. Određivanje LD₅₀ venoma poskoka na pacovima

Vrednost LD₅₀ na pacovima Wistar soja (albino, outbred) je ispitana na isti način kao kod miševa, sa tom razlikom da su testirane doze venoma u rasponu od 1,25 do 0,25 mg/pacovu. Razlika između svake dve uzastopne doze iznosila je 0,125 mg.

4.3. Lokalni efekti venoma i neutralizaciona potencia antivenoma

4.3.1. Određivanje edem-formirajuće jačine venoma i antiedemske potence antivenoma

Stepen venomske indukcije edema testirana *in vivo*, na miševima Intor:Swiss (Zivkovic i sar., 2016). U desni mišić *musculus gastrocnemius* (*m. gastrocnemius*) aplikovana je zapremina od 50 µl sveže pripremljenih rastvora venoma različitih koncentracija: 1, 5, 10 i 20 µg/50 µl PBS, pH 7,2. U *m. gastrocnemius* leve noge aplikovana je ista zapremina PBS-a kao kontrola. Četiri sata nakon aplikacije, miševi su eutanazirani cervikalnom dislokacijom, oba mišića su preparirana i zatim izmerena njihova masa. Intenzitet edema je prikazan kao procenat povećanja mase mišića u koji je aplikovan venom u odnosu na masu mišića u koji je aplikovan PBS. Na osnovu dobijenih rezultata definisana je edem-formirajuća doza (EFD) kao (najmanja) količina venoma koja indukuje najveće povećanje mase mišića četiri sata od aplikacije. Ova doza je dalje korišćena za testiranje anti-edemskog potencijala antivenoma. Sposobnost neutralizacije edema antivenomom određivana je aplikovanjem smeše različitih koncentracija antivenoma (1,37; 1,1; 0,8; 0,55; 0,27; 0,1; 0,01; 0,001 i 0 AJ) preinkubiranih (1h na sobnoj temperaturi) sa prethodno određenom EFD-om venoma, a zatim je određivan intenzitet edema (masa mišića).

4.3.2. Određivanje hemoragijske aktivnosti venoma i antihemoragijske potence antivenoma

Za ispitivanje anti-hemoragijske potence antivenoma najpre je određena minimalna hemoragijska doza venoma poskoka na miševima (Theakston i Reid, 1983). Miševi su anestetizirani kombinacijom 1% ketamina i 1mg/mL ksilazina u zapremini od 150 µl. Sa lateralne strane tela je pažljivo uklanjana dlaka, a zatim je svaka doza venoma zapremine 100 µl aplikovana subkutano. Izabrane doze venoma su bile u opsegu od 0,25 do 1 µg venoma/100 µl fiziološkog rastvora. Hemoragične lezije sa unutrašnje strane kože i na peritoneumu su preparisane i zatim izmerena njihova dva prečnika pod pravim uglom. Poluprečnik (*r*) je izračunat na osnovu srednje vrednosti ova dva prečnika i upotrebljen za izračunavanje površine hemoragične lezije ($P=\pi r^2$). Na osnovu dobijenih rezultata definisana je minimalna hemoragijska doza (MHD) kao količina venoma (mg suve mase) koja 24h nakon subkutane aplikacije uzrokuje hemoragijsku leziju prečnika 10 mm.

Sposobnost neutralizacije hemoragičnih lezija antivenomom, određivana je subkutanom aplikacijom smeše različitih koncentracija antivenoma (0,025; 0,05; 0,1; 0,15 i 0,2 AJ), preinkubiranih (1h na sobnoj temperaturi) sa prethodno određenom 5 MHD-om venoma, a životinje su tretirane na isti način kako je prethodno opisano. Anti-hemoragična potencia definisana je kao ona količina antivenoma koja za 50% smanjuje površinu hemoragične lezije izazivanu subkutanom aplikovanjem 5 MHD.

4.3.3. Miotoksičnost venoma i zaštitna potencia antivenoma

Miotoksičnost venoma je definisana kao najmanja koncentracija venoma koja oštećuje mišićno tkivo (Barros i sar., 1994). Za ovaj test su koristili se miševi kojima je venom aplikovan radi merenja edema i anti-edemogene potence antivenoma: miševima su u centralni deo desnog *m. gastrocnemius*-a aplikovane sveže pripremljene, koncentracije venoma poskoka 1, 5, 10 i 20 µg venoma /50 µl PBS, pH

7,2, dok je u levi mišić aplikovana ista zapremina fiziološkog rastvora (negativna kontrola). Četiri sata nakon aplikacije, miševi su eutanazirani cervikalnom dislokacijom, a *m. gastrocnemius* su pažljivo preparirani, izmereni i stavljeni u fiziološki rastvor 5 minuta, a zatim fiksirani u puferisanom 4% formaldehidu. Nakon kalupljenja, pravljene su isečci debljine 5 μm i bojeni hematoksilin/eozin rastvorom. Analiza tkiva vršena je pod svetlosnim mikroskopom, pod uvećanjem 40x. Miotoksična koncentracija venoma je određena na osnovu histološke analize.

Anti-miotoksična potenca antivenoma određivana je aplikacijom smeša različitih koncentracija antivenoma (0-0,2 AJ) preinkubiranih (1h na sobnoj temperaturi) sa prethodno određenom količinom venoma (10 $\mu\text{g}/\text{dozi}$) koja oštećuje mišićno tkivo. Anti-miotoksična potenca antivenoma je vizuelizovana standardnom histološkom analizom (H&E).

4.4. Citotoksičnost

4.4.1. Određivanje citotoksičnosti venoma i anticitotoksične potence antivenoma

Rastvori venoma pripremani su za sve testove citotoksičnosti tako da su se nakon dodavanja u 0,5ml ćelijskih suspenzija (250 000 ćelija/epruveti) finalne koncentracije venoma kretale od 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ do 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Smeše venom/antivenom su pripremane tako da finalne koncentracije antivenoma u ćelijskim alikvotima budu u rasponu od 8×10^{-4} AJ/ml do 6,5 AJ/ml, pri čemu je finalna koncentracija venoma bila 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Pre dodavanja u ćelije, smeše su inkubirane 30 minuta na 37°C. Venom ili venom/antivenom smeše su dodavane u 0,5 ml ćelijske suspenzije (5×10^5 ćelija/ml), koje su nakon blagog mešanja zatvorene i inkubirane u inkubatoru sa 5% CO₂, 1,5 sat na 37°C. Suspenzije su nakon toga ispirane sa 0,5 mL PBS i centrifugirane na 300 g, 5 minuta na sobnoj temperaturi. Ispiranje je ponavljeno tri puta.

Za bojenja sa propidijum-jodidom (PI), akridin-oranžom (AO/EB) i tripan-plavim (TB), talozi su resuspendovani u 0,5 ml of PBS; za AnexinV bojenje u 0,5 ml pufera za vezivanje AnexinV (10 mM HEPES/NaOH, 0,14 M NaCl, 2,5 mM CaCl₂, pH 7,4) i za kristal-violet i tripan-plavo bojenje, u 0,5 mL hranljivog ćelijskog medijuma. Ćelije obojene sa PI, AO/EB, AnexinV i TB su odmah analizirane. Kristal-violet i MTT metode su izvođene u mikrotitarskim pločama sa 96 bunarčića. U svaki bunarčić je dodavano po 100 μl svake ćelijske suspenzije. Sva bojenja su rađena u triplicatu. Ploče su centrifugirane 5 min na 300 g, a navedena bojenja su izvedena nakon 48h.

4.4.2. Vero ćelijska kultura

U cilju merenja citotoksičnog efekta venoma kultivisana je ćelijska linija Vero (ATCC® CCL-81), u sterilnom kompletnom medijumu RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) sa dodatkom 10% fetalnog telećeg seruma (FCS), dekomplementiranog na 56°C, 30 minuta, 100 UI/mL penicilina i 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomicina. Ćelije su gajene u inkubatoru sa 5% CO₂ na 37°C. Kulture su korišćene ili subkultivisane pri konfluentnosti monosloja od 80-90%. U eksperimentima su upotrebljavane kao adhezivne ili u suspenziji.

Suspenzija Vero ćelija dobijana je ispiranjem konfluentnog monosloja tri puta sa PBS, a potom tretiranjem 3-5 minuta na 37°C sa 0,05% tripsinom i 0,02% EDTA u PBS (pH 7,2). Neutralizacija rastvora za odvajanje od podloge vršilo se dodavanjem kompletnog medijuma (sa 10% FCS). Ćelije su potom sakupljane centrifugiranjem (300 g, 5 minuta) i još jednom, pod istim uslovima, ispirane svežim medijumom. Broj ćelija je određivan brojanjem u hematocitometru nakon bojenja tripan-plavim i podešavane u PBS-u na koncentraciju od $0,5 \times 10^6/\text{ml}$.

4.4.3. Priprema humanih leukocita periferne krvi

Uzorci periferne krvi zdravih volontera (5 mL) su prikupljeni u vakutajneru sa EDTA antikoagulansom. Nakon centrifugiranja na 300 g, 5 minuta, vršena je eritroliza rastvorom 0,8% NH₄Cl/0,1 mM EDTA, pH 7,2-7,6. Leukocitna suspenzija je nakon toga ispirana tri puta sa po 5 mL PBS i resuspendovana u hranljivom RPMI medijumu. Suspenzija je pravljenjena od eritrocita pet volontera, gustine 10⁶ ćelija/ml. Ćelije su analizirane pomoću protočnog citometra nakon PI bojenja.

4.4.3.1. MTT-test

Metoda se zasniva na osobini živih ćelija da redukuju MTT žuti supstrat (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolijum bromid) u plavi formazanski produkt. Alikvoti Vero ćelija su nakon inkubacije (1,5 sat na 37°C) sa venomom ili mešavinom venom/antivenom, temeljno ispirani i zatim stavljani u bunarčice mikrotitarskih ploča. Tokom 48 sati ćelije su inkubirane u vlažnoj komori sa 5% CO₂ na 37°C. Medijum za rast je zatim uklonjen, a u svaki bunarčić je dodavano po 100 µl 0,5 µg/ml MTT/RPMI (bez fenol crvenog), a ploča je zatim inkubirana 2 sata na 37°C. Nastali formazanski kristali su potom rastvarani dodavanjem 10% SDS/10 mM HCl (100 µl/bunarčiću). Posle inkubacije preko noći na 37°C, apsorbancija je očitavana na 580 nm u čitaču mikroploča Thermo Scientific™ Labsystems, model Multiscan Ascent V1.24 (U.K.). Svi uzorci su testirani u triplikatu, a rezultati su izraženi kao njihova srednja vrednost ± SD.

4.4.3.2. Kristal-violet bojenje (CV)

Nakon inkubacije sa venomom ili smešom venom/antivenom, ćelijske suspenzije su intenzivno ispirane PBS-om i centrifugiranjem 3x800 g, 5 minuta, a zatim zasejane u mikrotitarsku ploču. Ćelije su inkubirane u inkubatoru sa 5% CO₂ na 37°C 48 sati. Nakon toga, medijum je odbacivan i ćelije su ispirane dva puta sa PBS-om, a u svaki bunarčić je dodavano po 50 µl rastvora CV boje (0,5% w/v CV, 20% metanol). Ploče su držane 20 minuta na sobnoj temperaturi na šejkeru, pri 20 oscilacija/minuti. Bunarčići su ispirani četiri puta vodom i osušeni na vazduhu tokom 2 sata na sobnoj temperaturi. U svaki bunarčić je potom dodavano po 200 µl metanola i inkubirano još 20 min na sobnoj temperaturi uz mešanje. Optička gustina je očitavana na 570 nm u čitaču mikrotitarskih ploča napred navedenog proizvođača (*Feoktistova i sar., 2016*).

4.4.3.3. Bojenje Tripan-plavim

Nakon inkubacije sa venomom ili smešom venom/antivenom i ispiranja, rastvor Tripan-plavog (0,4% w/v u PBS) je dodavan u odgovarajućoj količini (*Strober, 2015*) u alikvot ćelijskih suspenzija. Ćelije su brojane u hematocitometru pod svetlosnim mikroskopom. Ćelijska vijabilnost je određena proporcionalno u odnosu na netretirane ćelije.

4.4.3.4. Bojenje propidium-jodidom i analiza protočnom citometrijom

Jedan mikrolitar rastvora propidium-jodida (50 µg/ml/PBS) je dodavan u 0,5 ml ćelijske suspenzije koja je potom inkubirana 5 minuta na sobnoj temperaturi. Analiza vijabilnosti ćelijskih suspenzija je urađena protočnom citometrijom (FACSVerse; Beckton Dickinson) (*Crowley i sar., 2016*).

4.4.3.5. Annexin V/PI bojenje apoptotičnih ćelija

Za bojenje apoptotičnih ćelija korišćen je FITC-AnnexinV BD Pharmingen kit. Nakon inkubacije sa venomom i ispiranja, ćelije su resuspendovane u odgovarajućem puferu (10 mM Hepes/NaOH, 0,14 M NaCl, 2,5 mM CaCl₂, pH7,4). FITC Annexin V i PI boje su dodavane u 0,5 ml suspenzije Vero ćelija (4x10⁵ ćelija/ml), prema uputstvu proizvođača. Nakon blagog mešanja, uzorci su

analizirani na protočnom citometru. Oštećenje ćelijskih membrana nastalo usled odlepljivanja od podloge je procenjivano na osnovu uzorka ćelija koje nisu inkubirane sa venomom.

4.4.3.6. AO/EB bojenje apoptotičnih ćelija i antiapoptotska potenca antivenoma

Za bojenje apoptotičnih ćelija pripremana je smeša boja akridin-oranž i propidijum-jodid (100µg/ml AO i 100 µg/ml EB u PBS). Nakon inkubacije ćelijskih suspenzija (100 µl) sa venomom (ili smešom venom/antivenom) i PBS ispiranja, u epruvete je dodavan po jedan mikrolitar pripremljene smeše boja. Ćelije su odmah posmatrane na fluorescentnom mikroskopu (Olympus, BH-2), korišćenjem plavog filtera, sa uvećanjima 10x i 100x (Kasibhatla i sar., 2006).

4.4.3.7. Određivanje IC₅₀ i ED₅₀

U 0,5 ml ćelijske suspenzije (250 000 ćelija/eprivetici) dodavana je serija razblaženja venoma u koncentraciji od 1000 µg/ml do 0,5 µg/ml. Ćelije bez venoma su korišćene kao referentna vrednost i predstavljale su 100% živih ćelija. Polovina maksimalne inhibitorne koncentracije preživljavanja ćelija (IC₅₀) je određivan za svaki test.

Procenat ćelijske vijabilnosti nakon inkubacije sa venomom *Vaa* je izračunata:

$$\frac{(Abs. uzorak) - (Abs. blank)}{(Abs. uzorak bez venoma) - (Abs. blank)} * 100$$

Anticitotoksična potenca antivenoma je opisana pomoću EC₅₀, efektivne koncentracije antivenoma koja neutrališe 50% citotoksičnog efekta venoma.

Na osnovu dobijenih rezultata, određena je polovina inhibitorne koncentracije (IC₅₀) venoma. Srednja efektivna doza antivenoma (ED₅₀), kojom se opisuje neutralizaciono dejstvo antivenoma, određivana je mešanjem različitih razblaženja antivenoma sa jednom IC₅₀, 62,5 µg/ml venoma finalno, za svaku ispitivanu metodu.

4.5. Hemotoksičnost

4.5.1. Eritrolitičko dejstvo venoma i antieritrolitička potenca antivenoma na krvnoj podlozi

Eritrolitičko dejstvom venoma testirano je na agaroznim hranljivim podlogama sa 0,5% ovčijih eritrocita (de Lima i sar., 1989). U sterilnim uslovima, na podloge je aplikovano po 50 µl venoma ili smeše venom/antivenom. Ploče su ostavljane pola sata bez pomeranja da bi tečnost difundovala u podlogu. Nakon 24 sata inkubacije u termostatu na 37°C, indukovani efekat je posmatran i ocenjivan prema priloženoj tabeli 3.

Tabela 3. Deskriptivna skala za ocenu providnosti zone eritrolize

Ocena	Izgled prosvetljene zone
0	Neprovidno, bez jasnih ivica
1	Slabo providno, bez jasnih ivica
2	Slabo providno, sa jasnim ivicama
3	Providno, sa jasnim ivicama

4.5.2. Spektrofotometrijsko određivanje eritrolize

Eritrolitičko delovanje *Vaa* venoma u suspenziji RBCs je evalurana koristeći svežu humanu krv (Stoykova i sar., 2013; Xie i sar., 2021). Krv je uzeta aseptično od zdravog volontera, u vakutajnere sa EDTA. RBC su isprani fiziološkim rastvorom (FR), centrifugiranjem na 3000 g, 10 min, na +4°C. Nakon trećeg ispiranja, polovina eritrocita je resuspendovana u FR/10 mM CaCl₂, a polovina u FR/10mM CaCl₂/5% žumance. Kokošije žumance je dodato kao izvor zasićenih masnih kiselina.

Korišćenje ova dva rastvora omogućava detekciju dva različita mehanizma eritrolize: direktnog, kada se enzimski degradiraju fosfolipidi RBC membrane ili indirektnog, kada zasićene masne kiseline koje nastaju kao proizvod PLA₂ aktivnosti, narušavaju strukturu eritrocitne membrane. Koncentracija eritrocita u suspenziji je 5%-tna.

Alikvoti suspenzije (0,3 ml) su inkubirani sa rastućim koncentracijama venoma ili smešom venom/antivenom i inkubirani 30 minuta na 37°C. Supernatant je odvajan centrifugiranjem 10 minuta na 3000 g na +4°C i potom je merena apsorbancija oslobođenog hemoglobina na 540 nm. Negativna kontrola je uzorak bez venoma (0%), a kao pozitivna kontrola su eritrociti kome je dodato 50 µl 2,5% Triton X-100, što je izazvalo potpunu hemolizu (100%) (*Mukhallad i sar., 2012; Accary i sar., 2014*). Najveća finalna koncentracija venoma (u suspenziji sa eritrocitima) je bila 200 µg/ml. Od ove koncentracije serijom razblaženja ispitane su i niže koncentracije venoma na eritrocitima.

4.5.3. Određivanje minimalne koagulacione doze (MCD-P) venoma

Određivanje efekata venoma poskoka na koagulaciju urađena je upotrebom analizatora koagulacije (Dade Behring, Germany). Za izvođenje testa pripremljeno je osam koncentracija venoma 100, 50, 20, 8, 3.3, 1,25, 0,625, 0,25 µg/ml venoma u FR, a zatim je po 50 µl dodavano u analizator. Svakom venomu je potom dodato po 25 µl FR, 50 µl 25 mM CaCl₂, i 50 µl fosfolipida. Nakon 2 minuta inkubacije na 37°C, dodavano je 75 µl humane plazme, a vreme koagulacije je precizno mereno analizatorom (*Chowdhury i sar., 2021*). Za merenje neutralizacione potence antivenoma za indukciju koagulacije, koristio se isti niz razblaženja venoma sa konstantnom količinom venoma od 0,2%.

4.5.4. Određivanje minimalne koagulacione doze (MCD-F) venoma

Minimalna doza venoma koja indukuje koagulaciju rastvora fibrinogena određivana je na isti način kako je određivana doza venoma koja indukuje koagulaciju plazme, s tim da se umesto humane plazme koristio rastvor fibrinogena, koncentracije 2 mg/ml.

4.5.5. Određivanje minimalne defibrinogene doze venoma poskoka u punoj krvi (MDD)

Minimalna defibrinogena doza venoma (MDD) (*Barros i sar., 1994*) definiše se kao najmanja količina venoma koja ne dozvoljava koagulaciju pune krvi *in vivo*. MDD venoma se određivala aplikacijom različitih doza venoma u mišju repnu venu. Za svaku dozu korišćena su po četiri miša. Nakon jednog sata, životinjama je pod anestezijom uzimana krv punkcijom iz retroorbitalnog sinusa u staklenu epruvetu. Krv je ostavljena na sobnoj temperaturi jedan sat. Nakon tog perioda procenjivano je formiranje koaguluma, ocenama od 1 do 5. MDD je definisana kao najmanja doza venoma koja ne dozvoljava formiranje koaguluma. Negativna kontrola je krv miševa kojima je aplikovan PBS bez prisustva venoma.

4.6. Neurotoksičnost

U okviru ovog dela istraživanja, rađena su *in vitro* ispitivanja kontraktilnosti preparata izolovane dijafragme pod uticajem venoma i smeša venom/antivenom u različitim masenim odnosima (1:2; 1:10; 1:20), kao i određivanje aktivnosti AChE i aktivnosti Na⁺/K⁺-ATP-aza u dijafragmi.

4.6.1. Ispitivanje kontraktilnosti preparata izolovane dijafragme

Za ispitivanja na izolovanoj dijafragmi, korišćeni su pacovi Wistar soja, muškog pola, telesne mase 200±20 g. Životinje su držane u standardnim uslovima predviđenim za laboratorijske životinje, sa kontrolisanim svetlosnim ciklusom 12h svetlo/tama, pri temperaturi 21-24°C. Životinje su hranjene kompletnom peletiranom hranom za pacove (Veterinarski zavod Subotica) i pojene *ad libitum*.

Pacovi su žrtvovani u opštoj anesteziji (ketamin 100 mg/kg + ksilazin 10 mg/kg, intraperitonealno), cervikalnom dislokacijom, neposredno pre ispitivanja. Odmah nakon žrtvovanja, pacovima je izvađena kompletna dijafragma na koštanoj osnovi koju čine rebra i grudna kost. Sa kompletne dijafragme makazama se odvoje leva i desna hemisfera, a preparati zatim dobijaju poprečnim isecanjem centralnog dela hemisfere. Isečak se odmah postavlja vertikalno u vodeno kupatilo zapremine 20 mL, sa Tirodovim rastvorom (*Tyrode solution*) pH 7,4 temperiranim na 37°C. Sastav Tirodovog rastvora (mM) je sledeći: NaCl 139,9; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 1,04; NaHCO₃ 11,9; NaH₂PO₄ 0,4 i glukoza 5,5. Jedan kraj preparata dijafragme se fiksira za nepokretni stalak, dok se drugi kraj pričvrsti za izometrijski transdjuser, a preparat zatim pozicionira u središnji prostor između dve paralelno postavljene elektrode. Elektrode od platine obezbeđuju električnu poljnu stimulaciju (*Electrical Field Stimulation – EFS*) preparata izolovane dijafragme i povezane su sa stimulatorom BioSmart 150 (ElUnit, Beograd) koji preko softvera eLAB44 (ElUnit, Beograd) omogućava stimulaciju preparata i beleženje njihovih kontrakcija u realnom vremenu. Oksigenacija Tirodovog rastvora u vodenom kupatilu za izolovani preparat dijafragme, kontinuirano je vršena smešom kiseonika (95%) i ugljen-dioksida (5%). Nakon postavljanja u vodeno kupatilo, preparati dijafragme se izlože početnoj tenziji od 1 g i zatim sačeka da postignu konstantan osnovni tonus u trajanju od najmanje 15 minuta. Preparati izolovane dijafragme su stimulisani tetaničnim pulsevima, sa serijama „paketa“ od po 5 stimulacija na svakih 30 sekundi. Između „paketa“ su pravljene pauze od 5, 15 ili 30 minuta, u zavisnosti od protokola rada. U prvom delu ispitivanja (kontrakcije dijafragme bez prisustva venoma), pauze između prvih 5 „paketa“ su 5 minuta, a zatim do kraja serije 30 minuta, dok su u drugom delu (kontrakcije dijafragme pod dejstvom venoma), pauze između prvih 5 „paketa“ 5 minuta i zatim do kraja serije 15 minuta između „paketa“ kontrakcija. U preostala tri dela ispitivanja, gde je procenjivan uticaj smeša venoma i antivenoma u različitim masenim odnosima (1:2; 1:10; 1:20) na kontrakcije dijafragme, pauze između „paketa“ kontrakcija su 15 minuta tokom kompletnih serija. Za indirektnu EFS korišćeni su sledeći parametri: 35 Hz, 20 μs, 2 s, 15 V, a za direktnu EFS: 100 Hz, 500 μs, 2 s, 50 V. Merene su maksimalno postignute vrednosti kontrakcija i praćena je eventualna pojava tetaničnog slabljenja („*tetanical fade*“) nakon primene venoma.

Za ispitivanje funkcionalnosti preparata dijafragme u prva dva dela ispitivanja neurotoksičnosti venoma, korišćen je nedepolarizujući (kompetitivni) neuromišićni blokator pankuronijum, u fosfatnom puferu (*Phosphate-buffered saline – PBS*). U ispitivanjima su primenjivane dve koncentracije pankuronijuma: 1 i 3 μM. Kod kontrakcija dijafragme bez prisustva venoma, pankuronijum je primenjivan u koncentraciji od 1 μM, a kod kontrakcija dijafragme pod uticajem venoma, pankuronijum u koncentraciji od 3 μM.

Na preparatima izolovane dijafragme pacova, u početnoj fazi je ispitivan uticaj različitih koncentracija venoma na kontraktilnost dijafragme u funkciji vremena. Za ova ispitivanja je korišćen osnovni rastvor sirovog venoma poskoka, koncentracije 20 mg/mL PBS pufera, od koga je pravljena serija razblaženja. Kao odgovarajuća koncentracija sirovog venoma koja utiče na kontraktilnost preparata dijafragme, u završnim ispitivanjima je primenjivana koncentracija od 35 μg/mL Tirodovog rastvora u vodenom kupatilu. Ova koncentracija sirovog venoma odgovara koncentraciji od 10,5 μg/mL neurotoksične komponente (amidotoksina A), s obzirom da u sastavu sirovog venoma ova komponenta učestvuje sa oko 30%.

Protektivni efekat antivenoma u odnosu na kontraktilnost preparata izolovane dijafragme, ispitivan je primenom smeša venom/antivenom u različitim masenim odnosima (w/w): 1:2, 1:10 i 1:20. Pre aplikacije u vodeno kupatilo sa preparatom izolovane dijafragme, smeše su inkubirane 30 minuta na konstantnoj temperaturi od 37°C. Koncentracija proteina u antivenomu koji je korišćen za ova ispitivanja iznosila je 100 mg/mL.

4.6.2. Određivanje aktivnosti AChE i aktivnosti Na⁺/K⁺-ATPaze u dijafragmi

4.6.2.1. Homogenizacija uzoraka dijafragme

Uzorci tkiva dijafragme homogenizovani su u puferu koji sadrži 50 mM Tris HCl pH 7,4; 20 mM EDTA, 1M NaCl i 1% Triton-X100, prema proceduri Krummer-a i saradnika (*Krummer et al., 2002*). Za homogenizaciju je korišćen homogenizer Ultra Turrax (*Janke and Kunkel IKA Works GmbH & Co. KG Staufen*). Odnos tkiva i pufera je 1:5 (w/v), a homogenizacija je vršena na ledu. Homogenat je centrifugiran na +4 °C, nakon čega je odliven supernatant koji je čuvan na -20°C i korišćen za dalje analize.

4.6.2.2. Određivanje aktivnosti acetilholin-esteraze (AChE) u dijafragmi

Aktivnost AChE (*Pari i Murugavel, 2007*) u dijafragmi je određena primenom acetiltioholin-jodida kao supstrata, metodom po Ellman-u (*Ellman i sar., 1961*). Reakcija je praćena spektrofotometrijski, tokom perioda od 5 minuta na 412 nm. Rezultati su izraženi u jedinicama U/mg proteina u dijafragmi. Koncentracija proteina određena je metodom po Lowry-u (*Lowry, 1951*) i izračunata iz jednačine prave $y=0,03267x-0,006328$, $r=0,9987$. Kao standard je korišćen rastvor goveđeg serum albumina (BSA) koncentracije 0,4 mg/mL.

4.6.2.3. Određivanje aktivnosti Na⁺/K⁺-ATPaze u dijafragmi

Određivanje aktivnosti Na⁺/K⁺-ATPaze u dijafragmi je urađeno po metodi Pari i Murugavel (*Pari and Murugavel, 2007*). Supernatant dijafragme je dodat u reakcionu smešu koja sadrži 50 mM Tris HCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 20 mM KCl, pH 7,5 i smeša je zatim inkubirana na 37 °C u prisustvu 10 mM ATP. Reakcija je zaustavljena dodavanjem hladnog rastvora trihlorsirćetne kiseline (TCA). Posle taloženja proteina i centrifugiranja na 10.000 rpm, u supernatantu je određena koncentracija oslobođenog neorganskog fosfora inkubacijom smeše sa rastvorom (NH₄)₆MO₇O₂₄ i vitamina C, a zatim merena apsorbancija na 620 nm. Aktivnost enzima je izražena preko koncentracije neorganskog fosfora u jedinicama U/mg P, a izračunata je iz jednačine prave $y=0,29738x+0,01356$, $r=0,99801$. Kao standard je korišćen 3 mM rastvor primarnog kalijum-fosfata.

4.7. Baktericidno dejstvo venoma i inhibicija baktericidnog dejstva venoma antivenomom

Baktericidno dejstvo venoma testirano je na hranljivim podlogama sa agarom. Na ploče su zasejane *E. coli* (Gram-) i *S. aureus* (Gram+) bakterije. Bunarčići zapremine 100 µl pravljani su u podlogama pomoću sterilnih plastičnih cevečica prečnika 5 mm. Na jednoj ploči pod sterilnim uslovima napravljeno je po 5 bunarčića. U bunarčiće je aplikovano po 35 µl rastvora venoma različitih koncentracija od 7,5 do 37,5 µg dobijenih serijom razblaženja osnovnog rastvora venoma koncentracije 200 µg/ml i smeše venom/antivenom u istim masenim odnosima. Nakon 24 sata inkubacije u termostatu na 37°C, mereni su prečnici zona prosvetljenja oko bunarčića.

4.8. Imunohemijske analize

4.8.1. Nativna i denaturišuća SDS-poliakrilamidgel elektroforeza (SDS-PAGE)

Uzorci su analizirani u neredukujućim i redukujućim (sa β-merkaptetanolom i SDS) uslovima. Pripremani su 8% i 12% homogeni gelovi za razdvajanje debljine 0,75 mm i 4% gelovi za koncentrovanje uzoraka (Mini Protean II System, Bio-Rad, USA). Gelovi su nakon završene elektroforeze bojeni Komasi plavom bojom (*Coomassie brilliant blue R-250-CBB*). Kao marker molekularskih masa je korišćena komercijalna smeša proteina (*Prestained Molecular Weight Marker SDS7B2*).

4.8.2. Transfer proteina na membranu (Western Blot - WB)

Nakon što su proteini venoma poskoka razdvojeni SDS-PAGE na 12% gelu, vršen je elektrotransfer (2117 Multiphor II, LKB Bromma) na nitroceluloznu membranu (NC 45 µm, Milipore Corporation Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany). Da bi se sprečilo nespecifično vezivanje proteina, membrana je inkubirana u 2% BSA/PBS, dva sata na sobnoj temperaturi i zatim ispirana u PBS (2x5 minuta). Membrana je zatim inkubirana sa antivenomom, 2 mg/ml/1% BSA/PBS. Nakon vezivanja antitela tokom jednog sata na sobnoj temperaturi, membrana je ispirana 0,05% Tween 20/PBS, 2x5 minuta, a zatim inkubirana sa biotiničanim zečijim antitelima specifičnim za konjski IgG (Sigma, B 7515), a potom i streptavidin-alkalnom fosfatazom. Vezivanje antivenoma za antigene venoma je detektovano dodavanjem supstrata nitro-tetrazoliumskog plavog (blue tetrazolium/5-bromo-4-hloro-3-indolil-fosfata - NBT/BCIP) (Sigma FAST, Sigma-Aldrich, Germany), rastvorenim u puferu za supstrat (0,1 M Tris, 0,05 M MgCl₂, 0,1 M NaCl, pH 9,5). Nakon razvijanja boje, reakcija je prekidana dodavanjem pufera nižeg pH (0,02 M Tris, 5 mM EDTA, pH 7,5), a zatim su membrane ispirane destilovanom vodom, sušene i skenirane. Svi reagensi su korišćeni prema uputstvima proizvođača.

4.8.3. Detekcija IgG ELISA testom

Detekcija konjskih antitela specifičnih za venom poskoka se izvodila indirektnom ELISA metodom na sledeći način (Zivkovic i sar.,2016). Za oblaganje dna bunarčića ploče Nunc MaxiSorp™ ELISA (Nunc, Roskilde, Denmark) korišćen je liofilizovan pul venoma poskoka. U bunarčiće ELISA ploča je nanošeno po 50 µl rastvorenog venoma (2 µg/ml/PBS). Ploče su zatim inkubirane u vlažnoj komori preko noći, na 4°C. Za saturaciju je nanošeno po 200 µl/bunarčiću 1% w/v BSA/PBS, nakon čega je ploča inkubirana 2 sata na sobnoj temperaturi. Ploča je ispirana nakon saturacije i nakon svih sledećih koraka sa 0,1% Tween 20/PBS četiri puta, sa po 200 µl/bunarčiću. Rastvor antivenoma, 20 µ/ml, u 1% BSA/0.1% Tween/PBS je inkubiran 1 sat na sobnoj temperaturi, sa 50 µl/bunarčiću. Vezivanje venom-specifičnih antitela je detektovano pomoću zečijih antitela specifičnih za ceo konjski IgG molekul i konjugovanih sa peroksidazom (Sigma, A 6917). Za vizuelizaciju reakcije korišćen je o-fenilendiamin/H₂O₂ sistem (OPD). Apsorbanca je merena na 492nm i 629 nm (A_{492/620}). IgG antitela specifična za venome *V. berus*, *V. aspis*, *Montivipera xantina* i *Macrovipera lebetina* detektovana su ELISA metodom na isti način.

4.8.4. Inhibitorni ELISA test

Inhibitornim ELISA testom vršeno je imunohemijsko dokazivanje specifične reakcije antigen/antitelo, odnosno komponente venom/antivenom. Ovaj ELISA test je izveden na identičan način kako je opisano za anti-venom IgG ELISA-u, sa tim da su se uzorci pre nanošenja na ploču pripremali različito. Antivenom, F(ab')₂, finalne koncentracije 2 µg/ml je preinkubiran sa različitim koncentracijama venoma poskoka: 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625 µg/ml, i dalje do 1,2x10⁻⁴ µg/ml. Preinkubacija je vršena jedan sat na sobnoj temperaturi, a potom su uzorci nanošeni u bunarčiće ploče. Sa antigenima koji su oblagali dno mikrotitarske ploče mogla su da reaguju samo ona antitela koja nisu bila inhibirana komponentama venoma tokom preinkubacije.

4.9. Prečišćavanje proteina

4.9.1. Određivanje koncentracije proteina - Bradford metoda

Za određivanje koncentracije proteina korišćena je Bradford (Bradford, 1976) metoda. Reagens za određivanje koncentracije proteina je rastvor boje Komasi-plavo (Coomassie Brilliant Blue G-250) 0,1 mg/ml u 5% etanolnom i 8,5% rastvoru fosforne kiseline. Rastvori proteina nepoznate koncentracije (10 µl) su nanošeni u bunarčiće mikrotitarske ploče sa ravnim dnom, u triplikatu, a zatim

je dodavan radni rastvor boje (200 µl po bunarčiću). Svaki ispitivani uzorak, kao i uzorci standarda su nanošeni u triplikatu. Nakon inkubacije od 5 minuta na sobnoj temperaturi, apsorbance su čitane na 580 nm, dok su koncentracije proteina u uzorcima određivane na osnovu standardne krive BSA u PBS puferu (500, 250, 125, 62,5 i 0 µg/ml).

4.9.2. Gel filtraciona hromatografija

Venom poskoka (50 mg) rastvoren je u 1 ml PBS-a, propušten kroz kolonu za raslojavanje i zatim nanešen na ekvilibrisanu kolonu sa Sephacryl S-300 HR matriksom. Sa kolone zapremine od 25 ml, prikupljano je po 0,5 ml eluata. Brzina protoka kolone slobodnim padom bila je 0,5 ml/min (*Ciscotto i sar., 2009*). Koncentracija proteina u eluatima određivana je Bradford metodom, na osnovu čega je konstruisan elucioni dijagram. Sve eluirane frakcije su testirane MTT i LAAO testovima.

4.9.3. Jonoizmenjivačka hromatografija na Mono-Q koloni

Uzorci aktivnih MTT frakcija (2 mg/ciklusu) aplikovani su na jonoizmenjivačku kolonu (FPLC Mono-Q, Pharmacia) koja je deo ACTA (Pharmacia) sistema. Mono-Q kolona (zapremine 1 ml) je ekvilibrisana sa 20 mM HEPES, pH 8,0. Eluiranje je vršeno linearnim gradijentom koncentracije soli do 0 do 1 M NaCl (25 zapremina kolone), pri protoku od 0,5 ml/min. Sve frakcije su testirane MTT i LAAO testovima.

4.9.4. Analiza imunskih kompleksa tečnom hromatografijom (HPLC)

HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) je upotrebljena za analizu uzorka sa imunskim kompleksima nastalim reakcijom venom/antivenom. Upotrebljena je kolona TSKgel QC-AK GFC 300, pogodna za proteinske uzorke nepoznatih molekulskih masa. Matriks kolone čine silikonske čestice sa diolnom fazom kao aktivnom grupom i na njemu je rađena ekskluziona hromatografija (SEC). Na kolonu je nanošeno 20 µl uzorka, a protok elucionog pufera (0,05 M natrijum-fosfat, pH 7,4) je iznosio 1 ml/min.

4.10. Određivanje enzimske aktivnosti

4.10.1. Određivanje LAAO aktivnosti venoma – OPD/H₂O₂ metoda (i potence antivenoma za neutralizaciju LAAO aktivnosti venoma)

Enzimska aktivnost LAAO određena je merenjem količine nastalog H₂O₂ u reakciji. U tu svrhu korišćena je modifikovana metoda (*Sakurai i sar., 2001*) i sistem OPD/peroksidaza. U bunarčiće mikrotitarskih ploča nanošeno je po 50 µl sveže rastvorenog venoma u 0,2 M TrisHCl pH 7,6 (koncentracije 2, 1, 0,5, 0,25 mg/ml) za konstruisanje standardne krive ili 50 µl smeše venoma i antivenoma. Zatim je u svaki bunarčić dodavano po 100 µl smeše (75 mM L-Phe, 1 mg/ml OPD, streptavidin peroksidaza u 0,2 M TrisHCl pH 7,6). Nakon 20 minuta, reakcija je zaustavljena dodavanjem 50 µl 2 M H₂SO₄, a apsorbance je merena na 492 i 620 nm u čitaču mikrotitarskih ploča.

4.10.2. Određivanje LAAO aktivnosti venoma – MTT metoda (i potence antivenoma za neutralizaciju LAAO aktivnosti venoma)

Aktivnost LAAO je određivana metodom koja se zasniva na enzimskoj reakciji redukcije žutog MTT supstrata u plavi formazanski produkt (*Mosmann, 1983*). Tokom izrade ove doktorske disertacije, postavljena je nova metoda za određivanje aktivnosti LAAO (*Milovanovic i sar., 2021*).

Po 25 µl venoma (ili smeše venom/antivenom) iz serije dvostrukih razblaženja (od 2×10⁻⁵ mg/ml do 4 mg/ml) su mešani u bunarčićima mikrotitarske ploče sa 25 µl smeše od 1 mg/ml MTT u PBS i 0,5 mg/ml L-aminokiselina (L-fenilalnina ili L-leucina). Rastvori venoma, MTT-a i aminokiselina su sveže pripremani za svaki test. Ploče su različito inkubirane na 37°C u zavisnosti od

količine venoma: 30 minuta za miligramske količine venoma ili 48 sati za mikrogramske količine venoma. Svi uzorci su ponavljani u triplikatu. Nakon inkubacije, formazanski kristali su rastvarani dodavanjem po 100 μ l 10% SDS u 10 mM HCl preko noći na 37°C i zatim merena apsorbance na 580 nm.

4.10.3. Određivanje aktivnosti metaloproteaza i serin-proteaza venoma (i potence antivenoma za neutralizaciju proteolitičke aktivnosti venoma)

Proteolitička aktivnost venoma poskoka određivana je kolorimetrijski, upotrebom azokazeina kao supstrata (*Kurtovic i sar., 2012*). Reakciona smeša koju su činili azokazein (2 mg/ml) i venom (35 μ g/ml) u puferu (0,1 M PBS, pH 7,5), je inkubirana na 37°C. U različitim vremenskim tačkama (10, 20, 40, 90, 120 minuta) uziman je 1 ml smeše kome je dodavano 430 μ l hladne trihlorsirćetne kiseline 10% (w/v), čime su proteini denaturisani i reakcija zaustavljena. Supstrat koji nije proteolizovan je odvajan centrifugiranjem (5500 g, 20 minuta), a apsorbance supernatanta je merena na 342 nm. Konstruisana je linearna kriva zavisnosti apsorbance u funkciji vremena. Koeficijent nagiba krive je korišćen kao mera proteolitičke aktivnosti (*da Silva i Aird, 2001*). Proteolitička aktivnost je ispitivana i u prisustvu proteaznih inhibitora: metaloproteinaza (5 mM Na₂EDTA/PBS) i serin-proteaza (5mM PMSF/PBS) (fenilmetilsulfonil-fluorid) inkubiranjem na 37°C, pola sata pre dodavanja rastvoru azokazeina. PMSF je pripreman kao 20 mM štok, rastvoren u apsolutnom etanolu. Istim testom određivan je stepen kojim antivenom inhibira proteolitičku aktivnost venoma. Stepene inhibicije postignuti sa PMSF, Na₂EDTA ili antivenomom su međusobno upoređivani. Brzina reakcije intaktnog venoma smatara se kao 100% proteolitičke aktivnosti, a rezultati dobijeni za inhibiran venom (sa Na₂EDTA, PMSF ili antivenomom) izraženi su u odnosu na nju. Svi testovi su izvedeni sa tri ponavljanja.

4.10.4. Određivanje PLA2 aktivnosti venoma (i potence antivenoma za neutralizaciju PLA2 aktivnosti venoma)

Aktivnost fosfolipaze venoma *Vaa* je određivana po metodi Tan i Tan (*Tan i Tan, 1988*). Deset kokošijih žumanaca (izvor fosfolipida) je pomešano sa jednakom zapreminom rastvora 18,1 mM CaCl₂/ 8,0 mM Na-deoksiholat, pH 8,2. Kiselost rastvora je praćena i podešavana dok nije postala stabilna. Stabilnost je definisana kao promena koja ne prelazi više od 0,02 jedinice tokom 5 minuta. Suspenzija je preko noći ostavljena da se stabilizuje na 4°C, a pre upotrebe je temperirana na 25°C (*Hallasy i sar., 2008*). Test se izvodio u 15 ml rastvora žumanaca kome je dodavano 100 μ l uzorka (venoma ili smeše venom/antivenom). Praćena je promena pH tokom jednog minuta, a rezultat je beležen tačno u 60-toj sekundi. Dobijeni rezultati su predstavljani kao promena pH (Δ pH) u zavisnosti od koncentracije venoma ili antivenoma.

4.10.5. Statistička obrada rezultata

Dobijeni rezultati su statistički obrađeni korišćenjem softvera GraphPad Prism 6.00 (GraphPad Software Inc, San Dijego, Kalifornija, SAD). Statistička analiza je rađena jednosmernom analizom varijanse (one-way ANOVA), Tukey-testom. Efekti venoma i smeša venom/antivenom na kontrakcije dijafragme u logaritamskoj funkciji vremena (srednje efektivno vreme – ET₅₀), analizirani su nelineranom regresijom. Kao statistički značajne, uzete su razlike na nivou p<0,05. Eksperimentalni rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm SD.

Stepen povezanosti između aktivnosti Na⁺/K⁺-ATP-aza u dijafragmi i primenjenih koncentracija antivenoma, utvrđivan je Pirsonovim koeficijentom korelacije (r) i proverom statističke značajnosti koeficijenta korelacije (p<0,05). Jake (r=0,60-0,79) i veoma jake korelacije (r>0,8) definisane su prema smernicama Evansa (*Evans, 1996*).

5. REZULTATI

5.1. Određivanje LD₅₀ venoma poskoka na miševima

LD₅₀ je određena prema zahtevima Evropske farmakopeje i iznosila je 12,2 µg venoma.

5.2. Određivanje ED₅₀ (potence) antivenoma na miševima

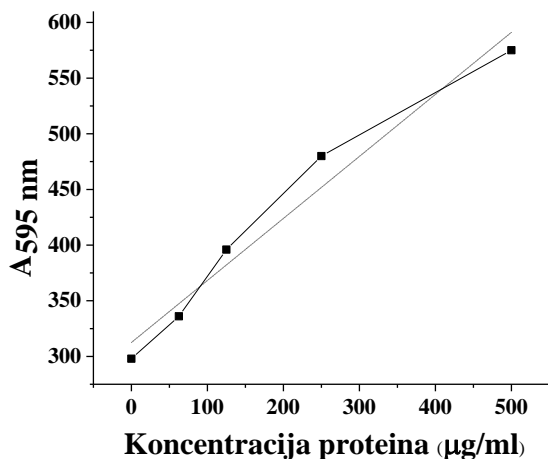
Za određivanje potence antivenoma (ED₅₀), prema zahtevima Evropske farmakopeje, korišćen je petostruki umnožak LD₅₀ (61 µg). Potenca antivenoma sa kojom su rađeni svi eksperimenti u ovom doktoratu, određena je u odnosu na ovaj umnožak i iznosila je 130 AJ/ml (antitoksičnih jedinica po mililitru antivenoma). Kako je koncentracija proteina antivenoma bila 100 mg/ml, jedna antitoksična jedinica je sadržala 0,769 mg proteina.

5.3. Određivanje LD₅₀ venoma poskoka na pacovima

Doze venoma koje su testirane na pacovima bile su u rasponu od 1,25 do 0,25 mg/pacovu, s tim da je raspon između dve doze iznosio 0,125 mg. Dobijena vrednost LD₅₀ za Wistar pacove telesne mase oko 350 g iznosi 0,625 mg/pacov, odnosno 1,79 mg/kg telesne mase.

5.4. Određivanje procentualnog udela proteina u venomu Vaa

Da bi smo odredili udeo proteina u venomu poskoka, liofilizovani uzorak venoma je rastvoren u PBS koncentracije 1 mg/ml, a zatim je metodom po Bradford-u određivana njihova koncentracija. Rezultati analize su prikazani na slici 11.



Slika 11. Standardna kriva proteina BSA, $R^2 = 0,9787$

Na osnovu merenja dva puta razblaženog uzorka, ustanovljeno je da je procentualni udeo proteina u izmerenom uzorku 97%.

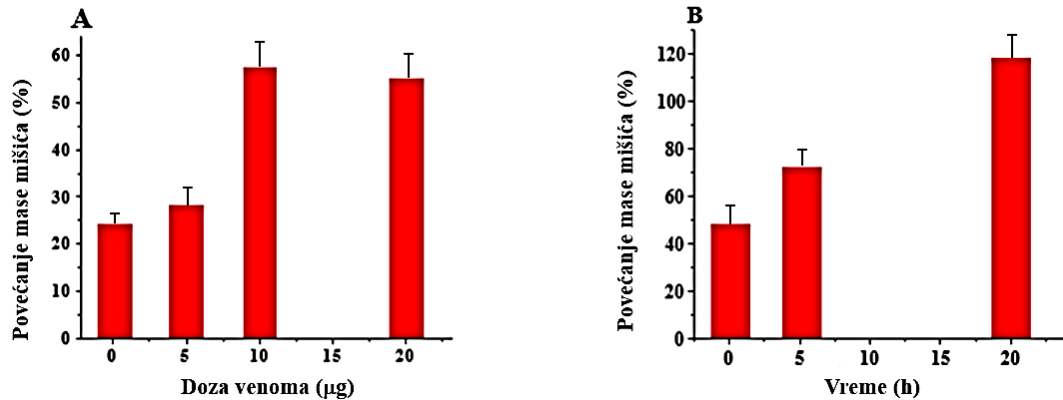
5.5. Lokalni efekti

Najčešće zabeleženi efekti ujeda poskoka su lokalno oštećenje tkiva, lokalna i sistemska hemoragija i neurotoksičnost (*Boda i sar., 2018*). Eksperimentalno ispitivanje lokalnih efekata obuhvatilo je testiranje hemoragije, edema i miotoksičnosti. Ove pojave su posledica aktivnosti PLA₂, LAAO i serin-proteinaza venoma. Efekti ujeda poskoka mogu dovesti do trajnih posledica i gubitka funkcije organa, a u najtežim slučajevima i do letalnog ishoda. Iako je u Evropi učestalost ujeda zmija

otrovnica znatno manja nego u tropskim područjima, ovi slučajevi ipak zavređuju pažnju i opreznost, pogotovo u zemljama Balkanskog regiona.

5.6. Venomom indukovani edem

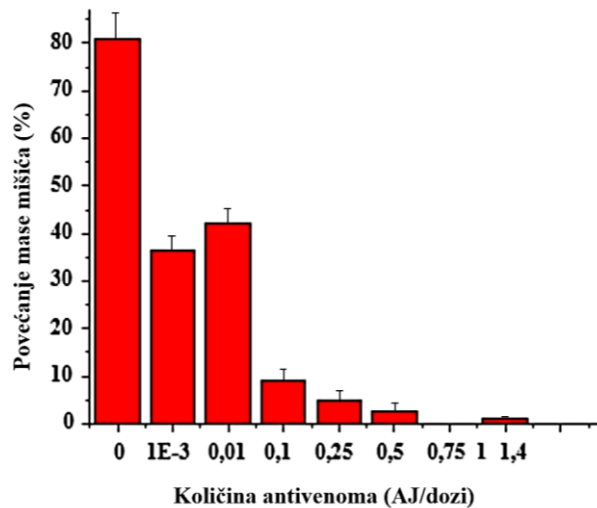
Intenzitet edema je prikazan kao procenat povećanja mase mišića u koji je aplikovan venom u odnosu na masu mišića u koji je aplikovan samo PBS (negativna kontrola). Edem-formirajuća doza (EFD), definisana kao najmanja količina venoma koja indukuje najveće povećanje mase mišića 4 sata nakon aplikacije, na osnovu dobijenih rezultata iznosi 10 μg venoma.



Slika 12. Indukcija edema venomom poskoka: (A) zavisnost povećanja mase *m. gastrocnemius*-a od doze aplikovanog venoma; (B) povećanje mase *m. gastrocnemius*-a u zavisnosti od vremena proteklog nakon aplikacije

Analizom rezultata je ustanovljeno da povećanje doze venoma povećava edem *m. gastrocnemius*-a. Takođe, povećanje vremena nakon aplikacije određene doze venoma (20 μg) dovodi do povećanja edema. Na osnovu dobijenih rezultata (slika 12.) izabrano je da se za testiranje antivenoma koristi doza od 10 μg venoma, a da vreme od aplikacije do žrtvovanja bude četiri sata.

Daljom analizom ispitan je antiedemski potencijal antivenoma, tako što je 10 μg venoma pomešano sa rastućim količinama antivenoma i aplikovan u *m. gastrocnemius* nakon inkubacije od 1 sata na sobnoj temperaturi. Rezultati analize su prikazani na slici 13.

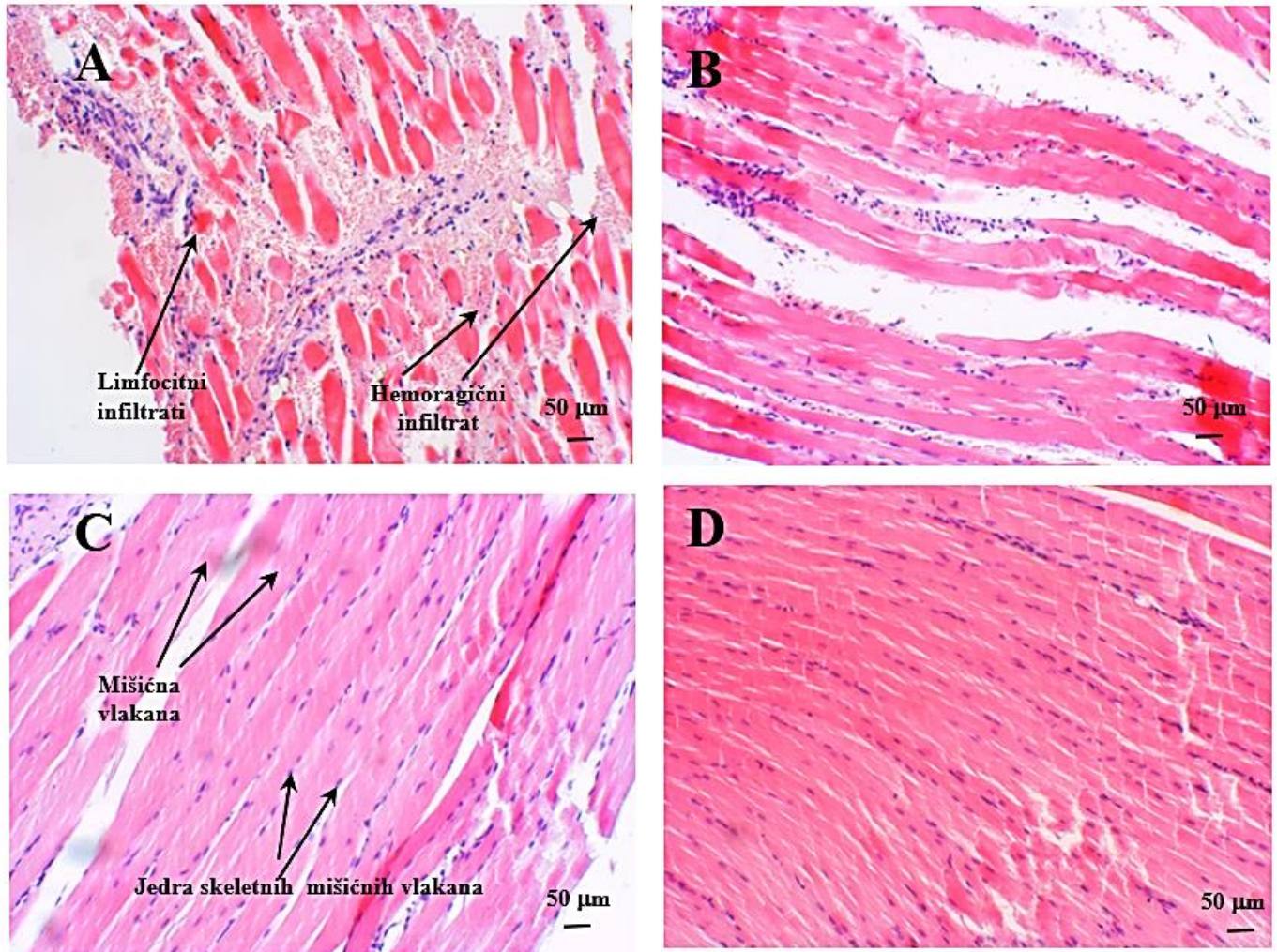


Slika 13. Neutralizacija edema mišića *m. gastrocnemius* izazvanog venomom poskoka u prisustvu različitih količina antivenoma

Rezultati su pokazali da količina antivenoma manja od 0,01AJ ne pruža zaštitu od nastajanja edema koga indukuje 10 µg venoma poskoka na *m. gastrocnemius*-u miša, a da količina antivenoma od 0,1 AJ sprečava nastajanje edema (95%) koje izaziva venom poskoka pod napred uslovima.

5.7. Miotoksičnost

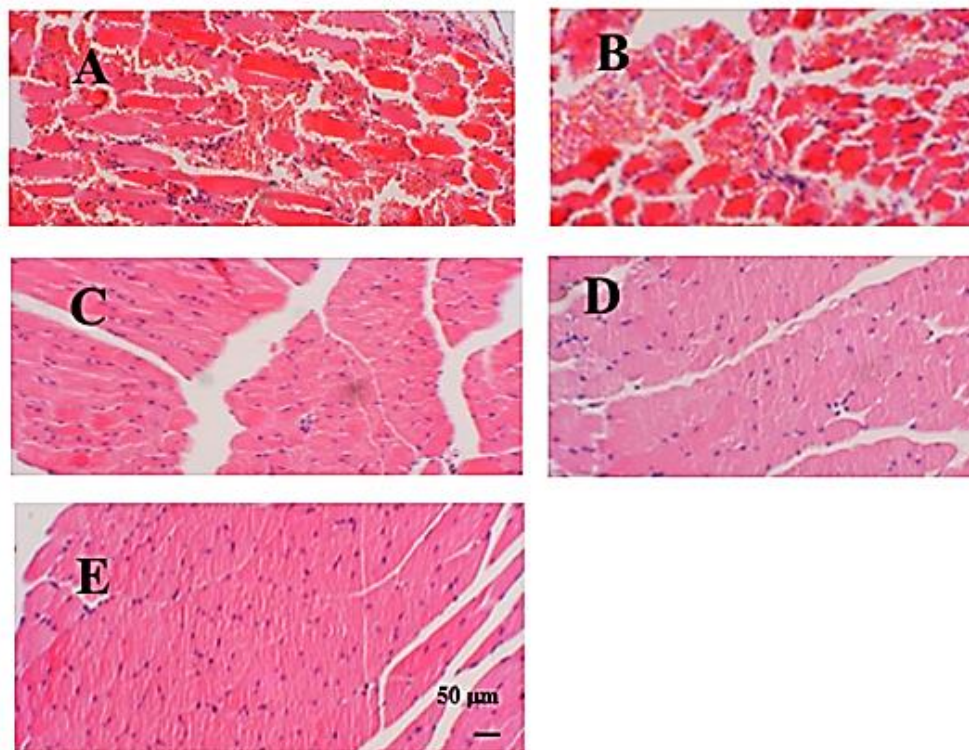
Efekti koje venom poskoka ostvaruje na tkivo *m. gastrocnemius* nakon aplikacije, prikazan je na histološkim preparatima (slika14).



Slika 14. Uzdužni preparati mišićnog tkiva četiri sata nakon aplikacije venoma *Vaa* u *m. gastrocnemius* miša u količini od: (A) 20 µg; (B) 10 µg; (C) 5 µg; (D) PBS-negativna kontrola
Preseci su bojani H&E.

Na histološkim preparatima mišićnog tkiva četiri sata nakon ubrizgavanja 20 µg venoma poskoka zapaža se da je struktura mišićnih vlakana narušena, a u tkivu se pojavljuje prostor sa nakupljenim limfocitnim i hemoragičnim infiltratima (slika 14A). U mišićno tkivu u kome je aplikovano 10 µg i 5 µg venoma (slika 14B i 14C) ove promene su manje izražene, dok se na preparatu negativne kontrole vidi da su mišićna vlakna pravilno organizovana (14D).

Antimiotoksični efekat antivenoma, nakon aplikacije smeše različitih koncentracija antivenoma sa 10 µg venoma, prikazan je na slici 15.



Slika 15. Mišićno tkivo nakon aplikovanja smeše 10 µg venoma i različitih koncentracija antivenoma: (A) bez antivenoma; (B) sa 0,01 AJ; (C) sa 0,05 AJ; (D) sa 0,1 AJ; (E) sa 0,2 AJ antivenoma

Histološkom analizom je ustanovljeno da količina antivenoma od 0,05 AJ značajno (slika 15C), a od 0,1 AJ u potpunosti (slika 15D) neutrališe toksični efekat koji na mišićnom tkivu izaziva 10µg venoma.

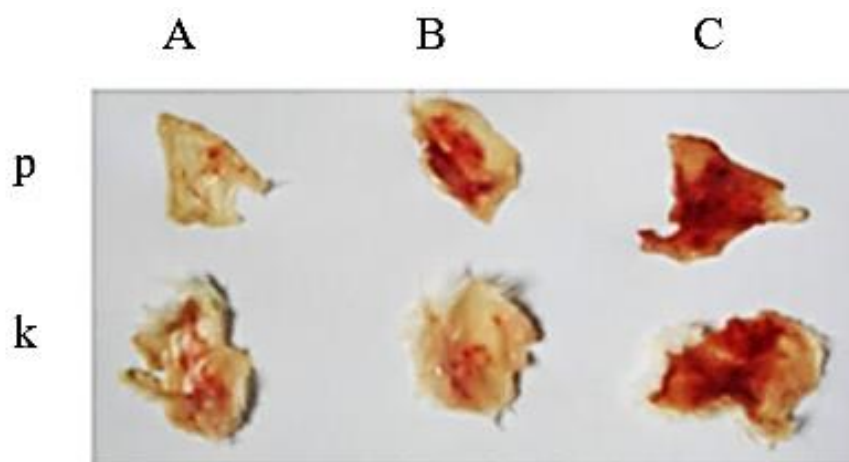
5.8. Hemotoksičnost

5.8.1. Minimalna hemoragijska doza (MHD)

Merenjem hemoragijskih površina sa unutrašnje strane kože i na peritoneumu (tabela 4, slika 16), dokazano je da minimalna hemoragijska doza (MHD) venoma poskoka koja indukuje hemoragijsku leziju prečnika 10 mm, 24 sata nakon subkutane aplikacije venoma, iznosi 0,5 µg/dozi.

Tabela 4. Hemoragijske lezije sa unutrašnje strane kože i na peritoneumu indukovane primenom različitih doza venoma *Vaa*

Venom (mg)	Hemoragija sa unutrašnje strane kože		Hemoragija na peritoneumu	
	Dijametar (mm)	Površina (mm ²)	Dijametar (mm)	Površina (mm ²)
0,25	7	38,5	4	12,6
0,5	10	78	11	95
1,0	16	200,1	16,5	213

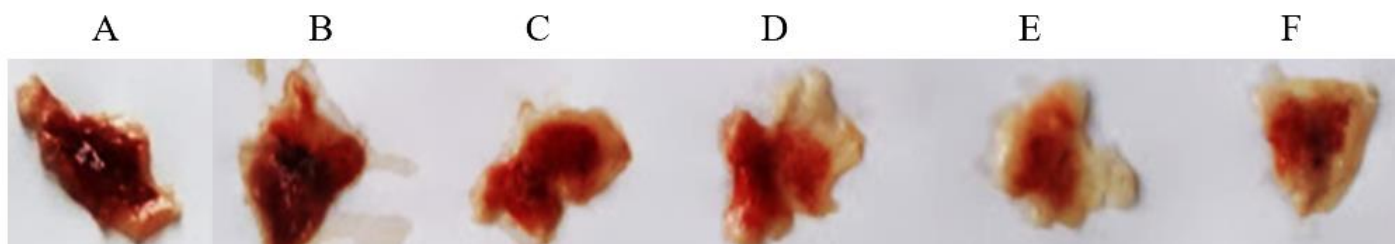


Slika 16. Hemoragijske lezije na peritoneumu (**p**) i sa unutrašnje strane kože (**k**) indukovane primenom različitih doza venoma *Vaa*: (**A**) 0,25 µg; (**B**) 0,5 µg; (**C**) 1 µg

Antihemoragijska potenca antivenoma testirana je sa 5 MHD venoma. Dokazano je da antivenom već od 0,05 AJ neutrališe 50% površine hemoragijske lezije izazvane venomom (tabela 5, slika 17).

Tabela 5. Hemoragijske lezije na peritoneumu i sa unutrašnje strane kože posle primene različitih doza antivenoma

Antihemoragijska potenca (AJ/5 MHD)	Površina hemoragijske lezije (mm ²)
0	490,6
0,025	320,5
0,05	247
0,1	189
0,15	103,9
0,2	113



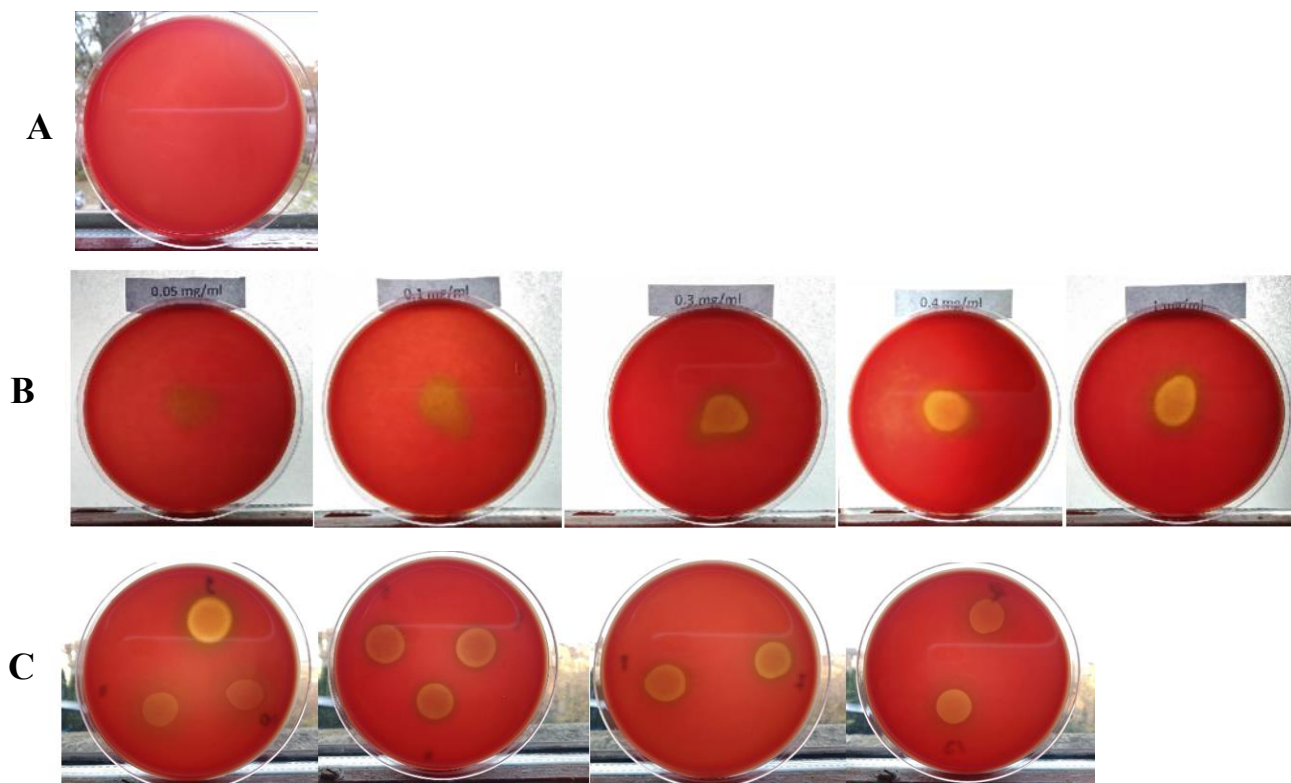
Slika 17. Hemoragijske lezije sa unutrašnje strane kože indukovane primenom 5 MHD venoma neutralisanih sa različitim dozama antivenoma: (**A**) bez antivenoma; (**B**) 0,025 AJ; (**C**) 0,05 AJ; (**D**) 0,1 AJ; (**E**) 0,15 AJ; (**F**) 0,2 AJ antivenoma

5.8.2. Eritroliza

Efekat venoma na eritrolizu i antieritrolitička potenca antivenoma, ispitivani su na krvnom agaru i spektrofotometrijski.

5.8.2.1. Eritroliza na krvnom agaru

Rezultati venomom indukovane eritrolize i antieritrolitička potenca antivenoma na krvnom agaru, prikazani su na slici 18 i tabeli 6.



Slika 18. Efekat koju venom ili smeša venom/antivenom ostvaruje na eritrocitima u krvnom agaru: (A) ploča inkubirana samo sa antivenomom; (B) eritrolitički efekat venoma (raspon koncentracije 0,05 – 1 mg/ml) na ovčije eritrocite; (C) antieritrolitičko dejstvo antivenoma

Finalna koncentracija venoma za antieritrolitički efekat je 0,5 mg/ml, a koncentracija antivenoma u rasponu 5 do 50 mg/ml. Providno prosvetljenje na prvoj ploči je negativni kontrolni uzorak (koncentracija venoma je 0 mg/ml).

Tabela 6. Eritrolitički efekat venoma i antieritrolitički efekat antivenoma procenjivan na osnovu deskriptivne skale od 0 do 3

Venom mg/ml	Ocena providnosti	Venom 0,25 mg/ml/antivenom mg/ml	Ocena providnosti
0,05	0	0	0
0,1	1	1,25	2
0,3	2	5	2
0,4	3	20	2
1,0	3	50	2

Dobijeni rezultati ukazuju: (1) antivenom ni na koji način ne utiče na krvnu podlogu (slika 16 A); (2) sa povećanjem aplikovane količine venoma na ploču dolazi do povećanja intenziteta eritrolize, s tim da je površina prosvetljenja uzrokovana dejstvom venoma na eritrocite imala približno istu površinu, ali drugačiji izgled na ivicama zona (slika 16 B).

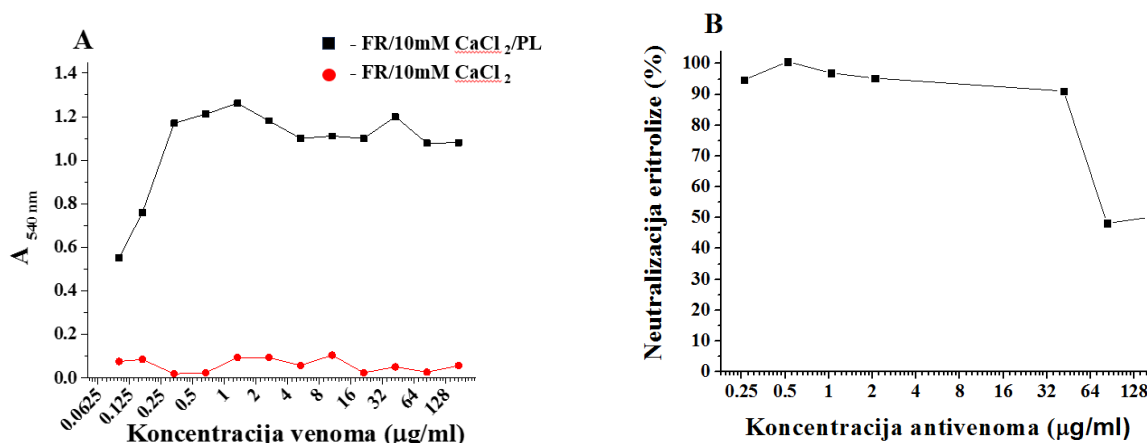
Za testiranje antieritrolitičkog efekta antivenoma, izabrano je da se venom koncentracije 0,25 mg/ml koristi za inkubaciju sa antivenomom koncentracija 5 do 50 mg/ml. Suprotno očekivanjima, efekat koji je antivenom ostvario pri najmanjoj koncentraciji nije se promenio povećanjem njegove koncentracije (slika 16 C; tabela 6). Ostvareni efekat antivenoma je na nivou na kome nema potpune neutralizacije zone providnosti, sličan efektu uzorka venoma koncentracije od 0,25 mg/ml.

Tokom posmatranja eritrolize na agaroznim pločama uočeno je da dominiraju dva tipa prosvetljenja, jedno koje je obojeno tamnijom i/ili svetlijom nijansom braon boje, i drugo, providno. Observacija neutralizacije eritrolitičkog dejstva antivenoma pokazala je da se u potpunosti neutralisala providnost, ali da se istovremeno ne primećuje smanjenje intenziteta braon obojenja. Na kraju se uočava da se sa povećanjem koncentracije antivenoma značajno smanjuje prosvetljenost podloge na mestu nanošenja uzorka i da ne postoji uočljiva gradacija dejstva neinhibiranog venoma. To navodi na zaključak da je antivenom uspešno inhibirao komponentu koja ima eritrolitički efekat, a druge ni malo.

5.8.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje eritrolize indukovane venomom i antieritrolitički potencijal antivenoma

Spektrofotometrijsko određivanje eritrolitičkog dejstva venoma *Vaa* je rađeno sa ciljem kvantifikacije ovog efekta. Kako je iz literature poznato da mehanizam eritrolize može biti direktan ili indirektan, u ovom radu su ispitana oba mehanizma u prisustvu i odsustvu zasićenih masnih kiselina.

Rezultati ove analize prikazani su na slici 19 i 20.



Slika 19. Intenzitet eritrolize određen spektrofotometrijski nakon pola sata inkubacije 5% suspenzije eritrocita na 37°C: (A) venom poskoka u FR/10 mM CaCl₂/fosfolipidi (PL) ili FR/10 mM CaCl₂ (B) smeša venoma (1 μg/ml) i različite koncentracije antivenoma

Primenom spektrometrijske metode (slika 19) dokazano je da najmanja testirana količina venoma (0,160 μg/ml) lizira eritrocite u prisustvu zasićenih masnih kiselina. U prikazanom sistemu potpuno liziranje eritrocita postiže se već sa 1 μg/ml venoma (slika 20). Eritroliza nije mogla biti indukovana bez masnih kiselina. Pozitivna kontrola (liziranje eritrocita izvedeno u prisustvu deterdženta Triton X-100) je imala iste vrednosti apsorbance kao i vrednosti absorbance postignutog visokim koncentracijama venoma, što je ukazalo da je venom u potpunosti lizirao eritrocite u suspenziji. Stepenn neutralizacije eritrolize antivenomom nije bio na nivou negativne kontrole (0% indukovana eritroliza, eritrociti sa fiziološkim rastvorom).

Izabrana koncentracija venoma sa kojom je testirana antieritrolitička potenca antivenoma je 1 $\mu\text{g/ml}$. Eritrolitičko dejstvo ove količine venoma neutralisano je 50%, sa količinom antivenoma od 80 $\mu\text{g/ml}$, a dalje povećanje količine antivenoma nije doprinelo daljoj neutralizaciji eritrolize (slika 19B).



Slika 20. Kivete sa supernatantima nakon eritrolize indukovane venomom

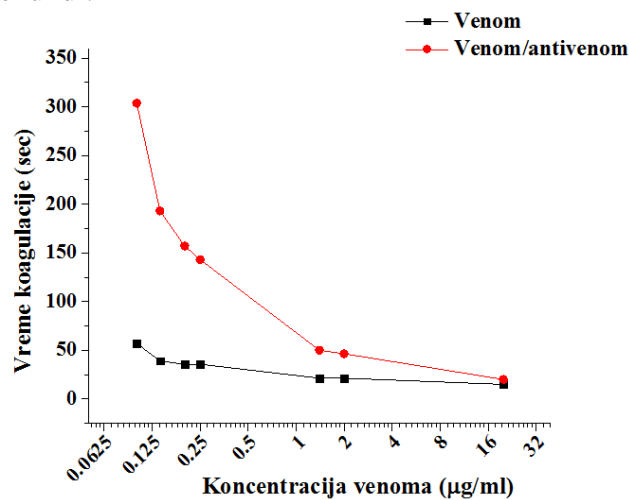
Suspenzija eritrocita 5% inkubirana sa opadajućim nizom dvostukih razblaženja venoma, počevši od koncentracije 1,25 $\mu\text{g/ml}$. U poslednjoj kiveti je negativni kontrolni uzorak.

5.8.3. Ispitivanje koagulacije

5.8.3.1. Minimalna koagulaciona doza venoma merena na krvnoj plazmi (MCD-P)

Minimalna koagulaciona doza venoma definisana je kao najmanja količina venoma (izražena u μg suve mase po ml rastvora) koja koaguliše standardni citrirani rastvor humane plazme za 60 sekundi na 37°C (Barros i sar., 1994).

Humana plazma kojoj nije dodavan venom (negativna kontrola), ne koaguliše na 37°C . Dodavanjem venoma humanoj plazmi, zabeležena je koagulacija i što je veća koncentracija venoma dodavana, manje vremena je bilo potrebno za koagulaciju (slika 21). Najmanja doza venoma u testu za koju je vreme koagulacije bilo najmanje (MCD) iznosi 20 $\mu\text{g/ml}$. Pri koncentracijama venoma većim od 20 $\mu\text{g/ml}$ nije dolazilo do daljeg povećanja brzine koagulacije, odnosno smanjenja potrebnog vremena da plazma koaguliše. Vreme potrebno da humana plazma koaguliše pri ovoj koncentraciji venoma iznosi $18,64 \pm 0,8$ sekundi. Za pozitivnu kontrolu koagulacije plazme upotrebljivan je kaolin i ovo vreme iznosi $50 \pm 0,28$ sekundi.



Slika 21. Zavisnost vremena koagulacije humane plazme od koncentracije venoma *Vaa*

Smeša venoma/antivenoma pravljena je mešanjem istog niza finalnih koncentracija venoma sa konstantnom finalnom količinom antivenoma od 0,2%

Intenzitet neutralizacije koagulacije, označen kao efektivna doza (ED) antivenoma, definisana je kao maseni odnos venom/antivenom pri kom je vreme koagulacije povećano za tri puta u poređenju sa vremenom koagulacije plazme inkubirane samo sa venomom. Potpuna neutralizacija koagulacije 20 µg/ml venoma postignuta je sa 2 mg/ml antivenoma (maseni odnos 1:100) (slika 21).

5.8.3.2. Minimalna koagulaciona doza venoma merena na fibrinogenu (MCD-F)

Za formiranje koaguluma potrebni su fibrinogen i trombin (slika 5). Kada se kao venomski supstrat umesto plazme koristi fibrinogen, do koagulacije ne dolazi. Pošto se fibrinogen nalazi u reakcionoj smeši, zaključuje se da je komponenta koja nedostaje za koagulaciju trombin, odnosno da nedostaju koraci koagulacione kaskade koji dovode do trombina. Kad se u smeši nalazi plazma, komponente venoma utiču na faktore koagulacije koje se aktiviraju, a rezultat je formiranje trombina, potom i koagulacija. To znači da je koagulacija plazme nastala usled aktivacije koagulacionih faktora pod uticajem venoma poskoka, odnosno da je dejstvo venoma u eksperimentanim uslovima prokoagulantno.

5.8.3.3. Minimalna defibrinogenišuća doza venoma (MDD-WBC)

Završna faza koagulacije je formiranje koaguluma kojim se zatvara oštećenje krvnog suda. Da bi došlo do njegovog formiranja, potreban je fibrin koji pod uticajem trombina nastaje od fibrinogena. Nakon ubrizgavanja hemotoksičnih venoma čiji enzimi degradiraju komponente koagulacione kaskade, dolazi do nemogućnosti formiranja koaguluma. Određivanje i praćenje mogućnosti koagulacije krvi pacijenata davalo je doktorima informaciju o intenzitetu njegovog trovanja. Ova metoda je korišćena u istu svrhu na miševima.

Za određivanje minimalna defibrinogenišuće doza venoma, miševima je uzeta krv 1 sat nakon intravenske aplikacije venoma u rasponu od 0 do 9 mg/miš. MDD-WBC je definisana kao ona količina venoma koja ne dovodi do koagulacije krvi ni posle trideset minuta stajanja na sobnoj temperaturi. Rezultati ispitivanja MDD-WBC su prikazani u tabeli 7.

Tokom eksperimenta, ni jedna koncentracija venoma nije inhibirala koagulaciju krvi. Pri aplikovanju subletalne doze, krv miševa je koagulisala za manje od 15 minuta nakon vađenja krvi, a miševi su uginjavali neposredno nakon vađenja krvi. Krv miševa kojima su aplikovane doze manje od subletalne, takođe je koagulisala. Miševi kojima je ubrizgana veća doza od subletalne (6 mg), nisu preživeli do definisanog vremena za uzimanje krvi.

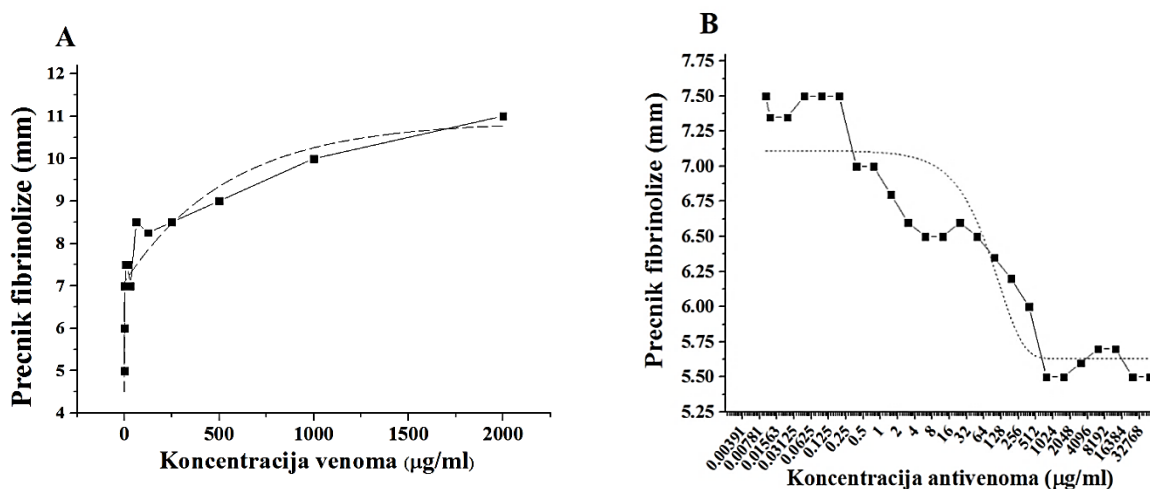
Tabela 7. Određivanje minimalne defibrinogenišuće doze venoma *Vaa*

Redni broj	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Venom mg/miš	0	2	3	4	5	6	7	8	9
koagulacija	+	+	+	+	+	+	/	/	/
preživljavanje	+	+	+	+	±	10 min	-	-	-

Primenom ove metode nije bilo moguće detektovati MDD-WBC (tabela 7). Dobijen rezultat ukazuje da je MDD-WBC doza venoma veća od letalne doze venoma za miševe. Shodno tome, ni neutralizacija defibrinogenacije antivenomom nije mogla biti evaluirana.

5.8.3.4. Fibrinoliza

Rezultati analize fibrinolize prikazani su na slici 22.



Slika 22. (A) Zavisnost razlaganja koagulirane plazme od koncentracije venoma *Vaa*; (B) neutralizacija fibrinolitičkog delovanja venoma antivenomom

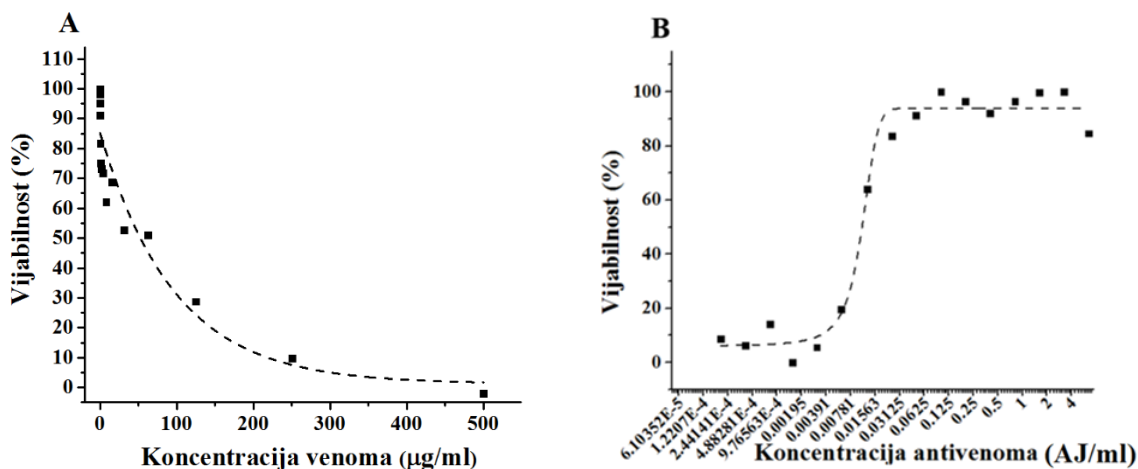
Dobijeni rezultati pokazuju da se venomom finalne koncentracije od 62,5 $\mu\text{g/ml}$ postiže maksimalna fibrinoliza (koja se može postići ovom metodom) od 8,5 mm. Venom ove finalne koncentracije je mešan sa serijom dvostrukih razblaženja antivenoma. Antivenom počinje da ostvaruje neutralizacioni efekat nakon koncentracije od 0,2 $\mu\text{g/ml}$, a maksimalnu neutralizaciju fibrinolitičke aktivnosti 100 $\mu\text{g/ml}$ venoma postiže sa koncentracijom od 750 $\mu\text{g/ml}$ antivenoma.

5.9. Ispitivanje citotoksičnosti venoma

Citotoksičnost venoma ispitana je na Vero ćelijskoj liniji. Vrednost IC_{50} venoma određena je različitim tehnikama bojenja.

5.9.1. MTT-test

MTT-testom je ustanovljeno da najmanje količine venoma u testu utiču na smanjenje vijabilnosti Vero ćelija u suspenziji. Povećanje koncentracije venoma dovodi do eksponencijalnog rasta smrti ćelija u suspenziji. Rezultati analize prikazani su na slici 23A.



Slika 23. MTT aktivnost Vero ćelija nakon inkubacije: (A) različitim količinama venoma; (B) smešama venoma jedne IC_{50} (62,5 $\mu\text{g/ml}$) sa različitim dvostrukim razblaženjima antivenoma

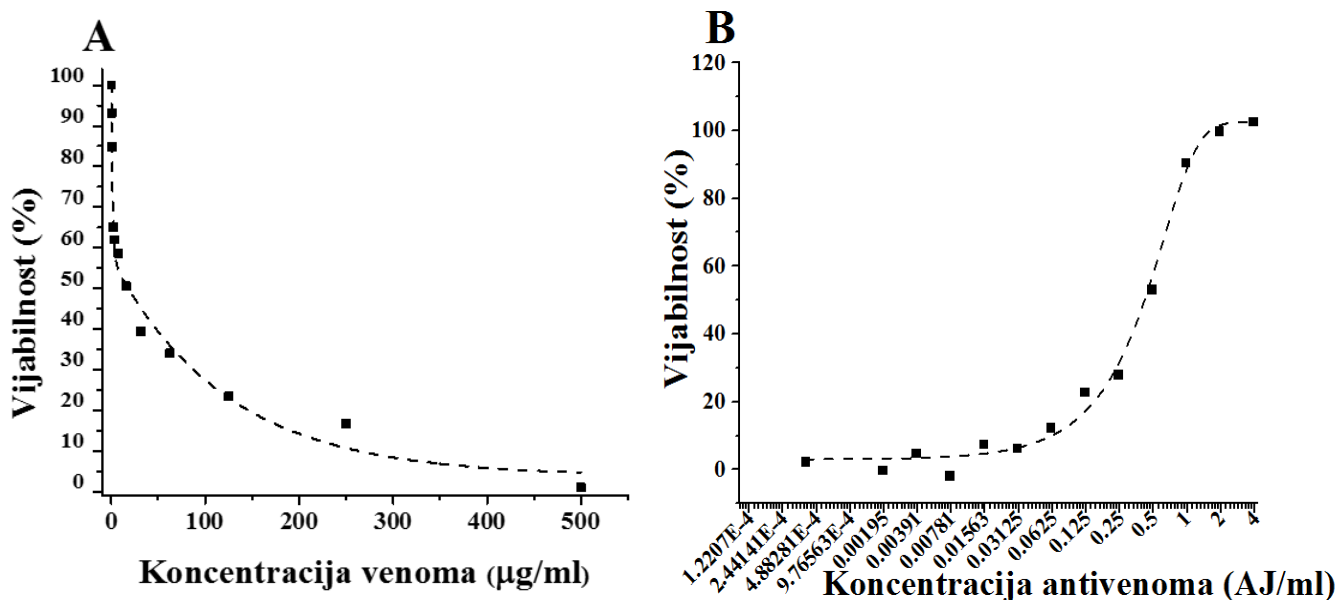
Koncentracija venoma koja dovodi do smanjenja vijabilnosti 50% ćelija u suspenziji (IC_{50}) određena je na osnovu regresione krive dobijene MTT metodom i iznosi $62,5 \mu\text{g/ml}$. Mereno MTT testom, citotoksična aktivnost jedne IC_{50} se ne može neutralisati količinom antivenoma manjom od $0,001 \text{ AJ/ml}$ (slika 23B). Neutralizacija venoma počinje sa povećanjem antivenoma od te koncentracije, a kompletna neutralizacija se postiže sa $0,1 \text{ AJ/ml}$. Kako se ova vrednost poklapa sa vrednosti signala ćelija koje nisu tretirane venomom, rezultat ukazuje na to da su ovom količinom antivenoma u potpunosti neutralisane komponente venoma koje izazivaju smrt ćelija. EC_{50} antivenoma određena MTT testom iznosi $0,01 \text{ AJ/ml}$.

Radi mogućeg poređenja rezultata citotoksičnosti venoma dobijenih različitim metodama (MTT, CV, TB, PI), količina venoma od $62,5 \mu\text{g/ml}$ je korišćena u svim testovima u kojima se određivala efektivna koncentracija antivenoma (EC_{50}), tj. koncentracija koja neutrališe 50% citotoksičnog efekta izabrane količine venoma.

5.9.2. Kristal-violet bojenje

Rezultati analize kristal-violet bojenja prikazani su na slici 24. Bojenjem kristal-violet bojom ustanovljeno je da se pri koncentraciji venoma od $0,5 \mu\text{g/ml}$ ili većoj, ispoljava citotoksični efekat na Vero ćelijama (slika 24A), kao i da je smrt ćelija eksponencijalno zavisna od koncentracije venoma. Ovom metodom dobijena vrednost IC_{50} venoma iznosi $55 \mu\text{g/ml}$.

Zavisnost vijabilnosti ćelija od koncentracije antivenoma sa kojim se preinkubira konstantna količina venoma ($62,5 \mu\text{g/ml}$) je istog oblika kao što je dobijena MTT testom (slika 24B). Kristal-violet bojenjem utvrđena je EC_{50} od $0,3 \text{ AJ/ml}$.

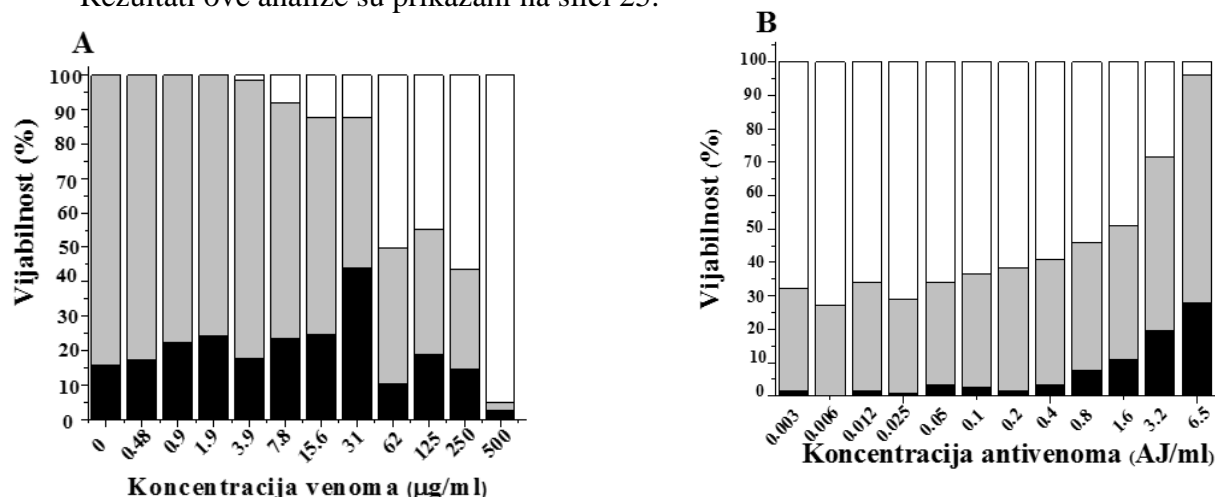


Slika 24. Vijabilnost Vero ćelijske suspenzije određena pomoću kristal-violet bojenja, nakon inkubacije: (A) sa različitim količinama venoma; (B) smešom jedne IC_{50} venoma ($62,5 \mu\text{g/ml}$) i različitim dvostrukim razblaženjima antivenoma

5.9.3. Bojenje tripan-plavim

Boja tripan-plavo omogućava razlikovanje mrtvih i živih ćelija jer boja prolazi kroz ćelijsku membranu samo ukoliko je ona oštećena. Dalje brojanje obojenih ćelija u komori hematocitometra omogućava i određivanje apsolutnog broja ćelija, čime se stiče dodatni uvid u dejstvo venoma.

Rezultati ove analize su prikazani na slici 25.



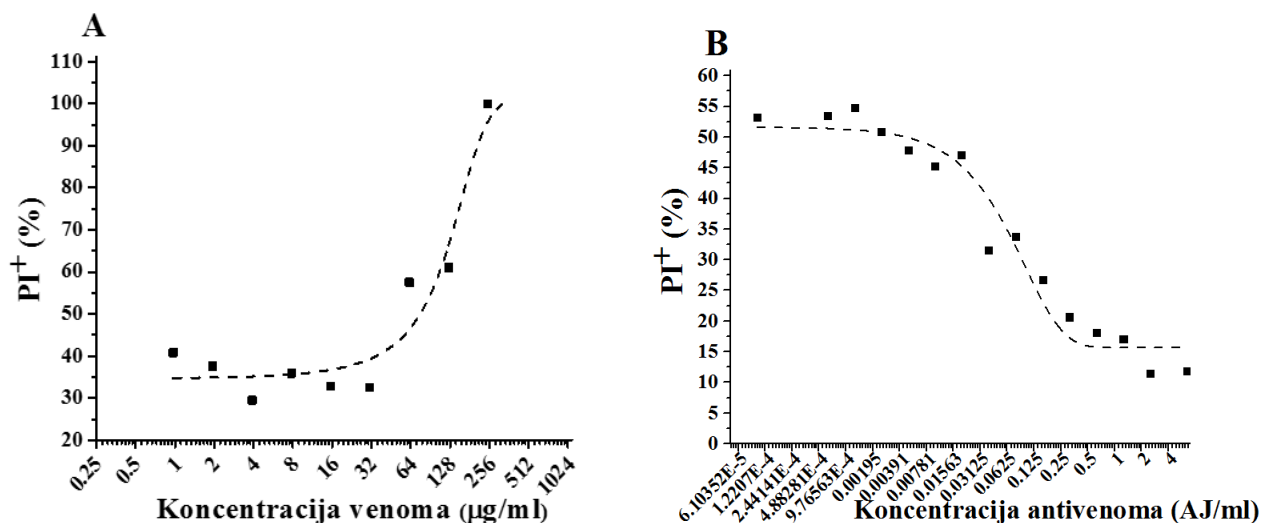
Slika 25. Vijabilnost Vero ćelija merena u hematocitometru nakon bojenja tripan-plavim; ćelije su inkubirane: **(A)** sa različitim količinama venoma; **(B)** sa smešom venom/antivenoma.

Beli deo stubića – dezintegrirane ćelije; crni deo stubića – mrtve ćelije; sivi deo stubića – vijabilne ćelije

Upotrebom tripan plave boje detektovana je smrt ćelija počevši od koncentracije venoma 4 µg/ml. Pri koncentracijama većim od 4 µg/ml, dolazi do degradacije ćelija, kao i daljeg smanjenja broja živih i povećanja broja mrtvih ćelija (slika 25A). IC₅₀ venoma određen ovom metodom iznosi 66 µg/ml. Dalje povećanje koncentracije venoma dovodi do intenzivne degradacije i živih i mrtvih ćelija, a time i do smanjenja ukupnog broja ćelija. Neutralizacija IC₅₀ venoma nakon mešanja sa koncentracijama dvostrukih razblaženja antivenoma pokazala su da je 6,5 AJ/ml količina koja skoro u potpunosti neutrališe citotoksično dejstvo venoma.

5.9.4. Bojenje propidijum-jodidom

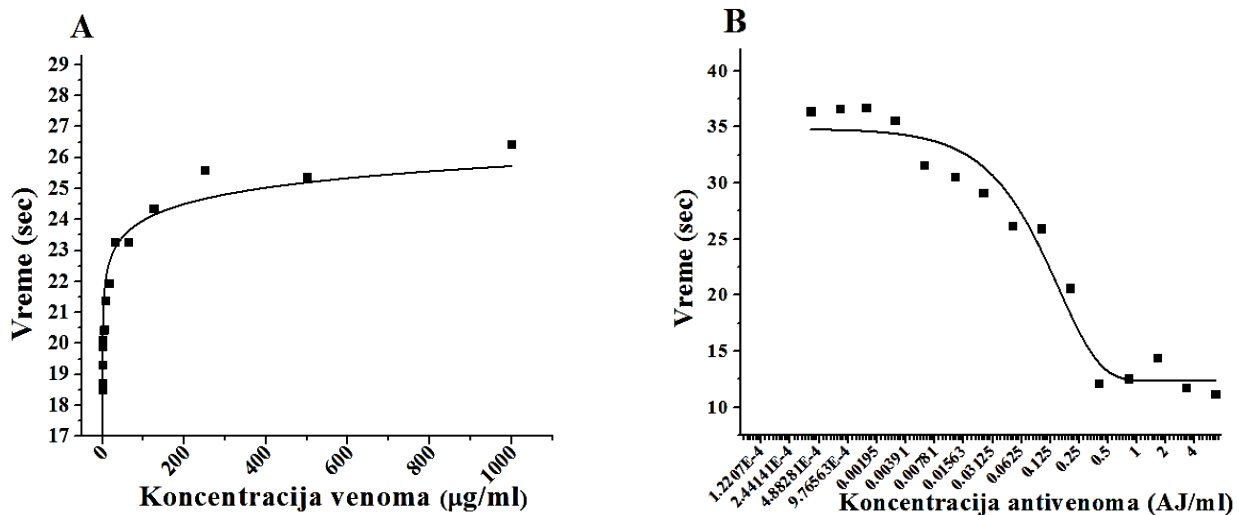
Propidijum-jodid (PI) je boja koja prolazi kroz oštećenu membranu mrtvih ćelija i zatim interkalira između navoja nukleinskih kiselina. Zastupljenost ovako obojenih ćelija određuje se protočnim citometrom (slika 26).



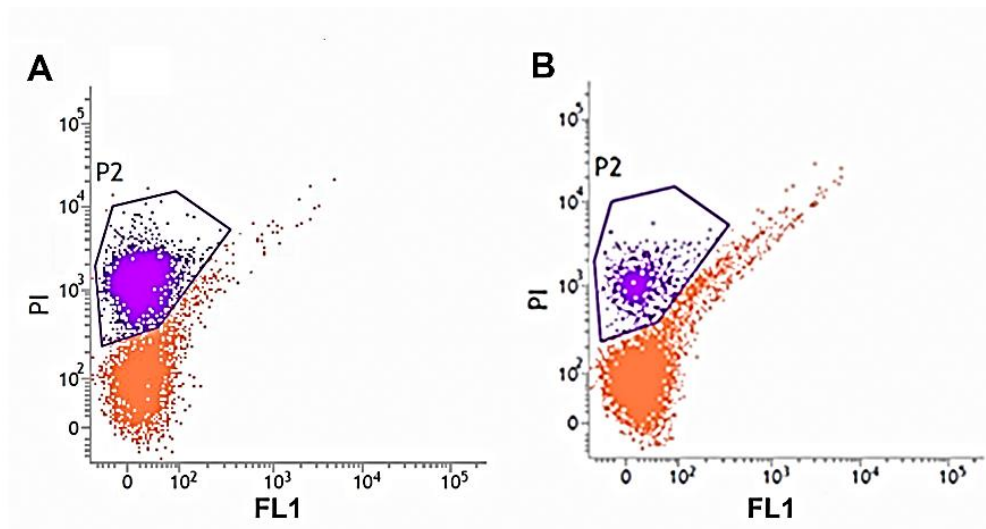
Slika 26. Procenat PI⁺Vero ćelija u suspenziji određen protočnom citometrijom nakon inkubacije: **(A)** sa venomom i **(B)** sa smešom venom/antivenom

Analiza Vero ćelija u suspenziji protočnom citometrijom pokazala je da povećanje koncentracije venoma povećava zastupljenost mrtvih ćelija (PI⁺) (slika 26A). Ovom metodom izmeren IC₅₀ venoma je 87 µg/ml. Pri koncentracijama venoma većim od 250 µg/ml ne mogu se detektovati žive ćelije. Prisustvo mrtvih Vero ćelija u suspenzijama sa koncentracijom venoma manjom od 32 µg/ml venoma se ne detektuje ovim bojenjem (slika 27).

Kako je broj analiziranih ćelija protočnim citometrom bio podešen na 10.000 ćelija za svaku analizu, a protok uvek konstantan, vreme potrebno da se prebroji ovaj broj ćelija može biti korisno u tumačenju rezultata. Potrebno vreme se povećavalo sa povećanjem koncentracije venoma (slika 28). Osim toga, merenje vremena je detektovalo efekat manjih koncentracija venoma nego merenjem PI⁺ ćelija, kao i manji IC₅₀ (20 µg/ml). Analizom vremena nije detektovana ni jedna živa ćelija pri koncentracijama venoma većim od 250 µg/ml.

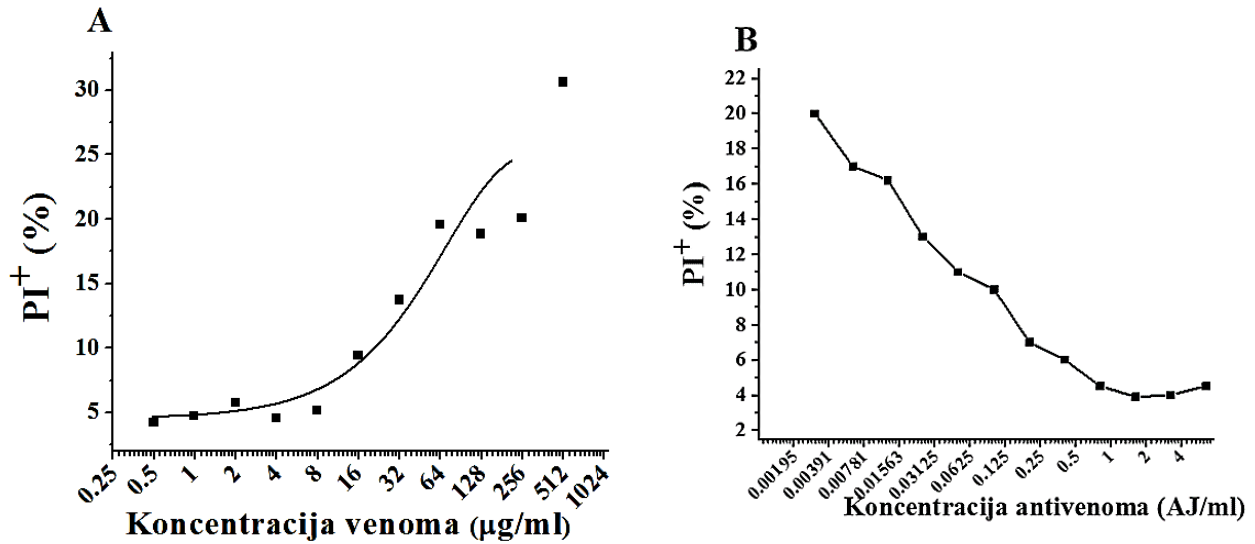


Slika 27. Vreme potrebno da FACSVerse aparat prebroji 10.000 Vero ćelija u suspenzijama inkubiranim: (A) sa venomom i (B) sa smešama venom/antivenom

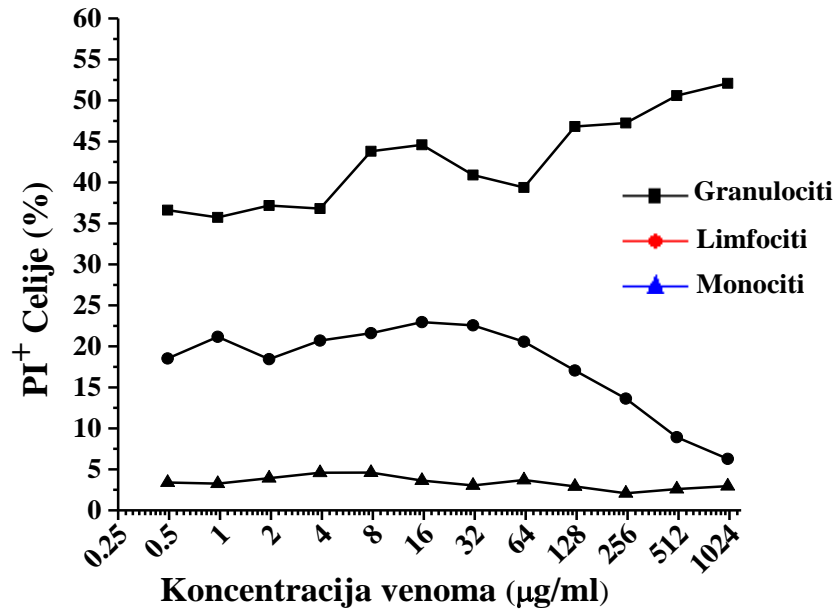


Slika 28. Dot-plot-ovi Vero ćelija obojenih sa PI i analizirani na protočnom citometru; (A) ćelije tretirane venomom; (B) ćelije tretirane smešom venom/antivenom; Gejt P2 su ćelije PI⁺ (mrtve)

Osim na Vero ćelijama, ista analiza citotoksičnosti venoma rađena je i na humanim leukocitima i bojeni PI. Rezultati ove analize su prikazani na slikama 29 i 30.



Slika 29. Procenat PI⁺ humanih leukocita periferne krvi u suspenziji, određen protočnom citometrijom nakon inkubacije: (A) sa venomom; (B) sa smešom venom/antivenom



Slika 30. Procenat PI⁺ humanih leukocita periferne krvi, određen protočnom citometrijom nakon inkubacije sa različitim koncentracijama venoma

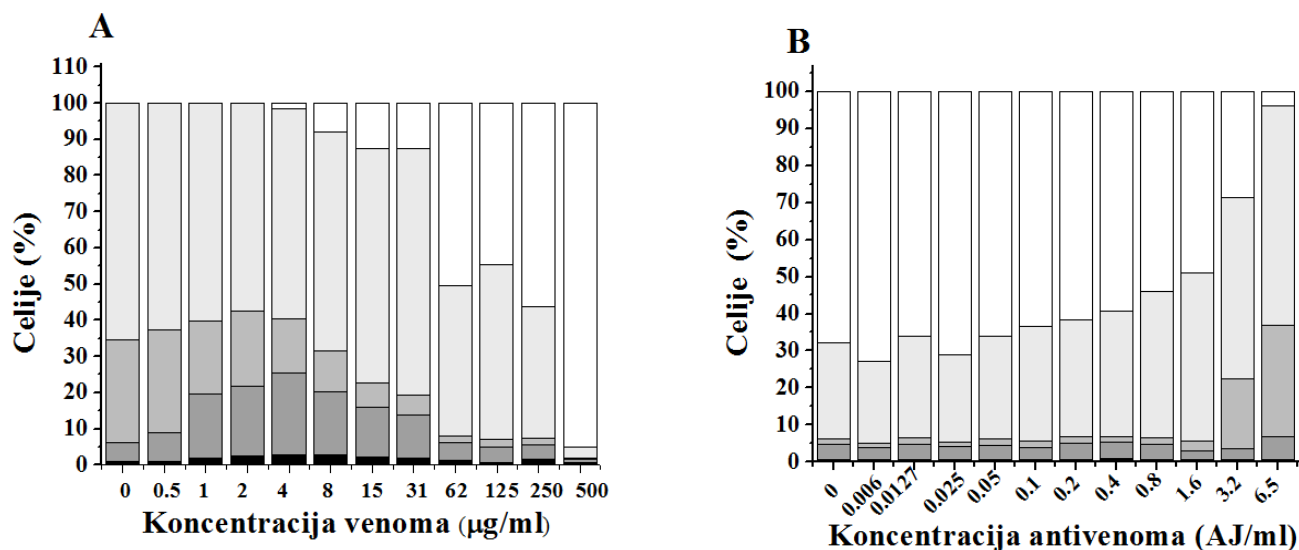
Podatak dobijen ovom metodom ukazuje da su granulociti najosetljivija leukocitna subpopulacija, dok najveću otpornost na dejstvo venoma imaju limfociti (slika 30).

5.10. Apoptoza

Osim što venom indukuje ćelijsku smrt nekrozom, želeli smo da ustanovimo da li venom podstiče i programiranu ćelijsku smrt (apoptozu) i ako je to slučaj, ispitivali smo da li antivenom ima svojstvo da neutrališe ovu pojavu. Za ova ispitivanja primenili smo FITC AnnexinV/PI bojenje i AO/EB bojenje.

5.10.1. FITC AnnexinV/PI bojenje za detekciju apoptoze protočnom citometrijom

Rezultati analize nakon FITC AnnexinV/PI bojenja, prikazani su na slici 31. Procenat dezintegrisanih ćelija dobijen je nakon oduzimanja apoptotičnih i nekrotičnih ćelija od početnog broja ćelija. Očigledno je da se pri koncentracijama venoma 0 do 4 $\mu\text{g/ml}$ prisustvo ranih (AnnexinV⁺/PI⁻) i kasno apoptotičnih (AnnexinV⁺/PI⁺) ćelija povećava, ali se pri većim koncentracijama venoma sve ćelije: vijabilne (AnnexinV⁻/PI⁻), apoptotične i mrtve (AnnexinV⁻/PI⁺) dezintegrišu (slika 31A).



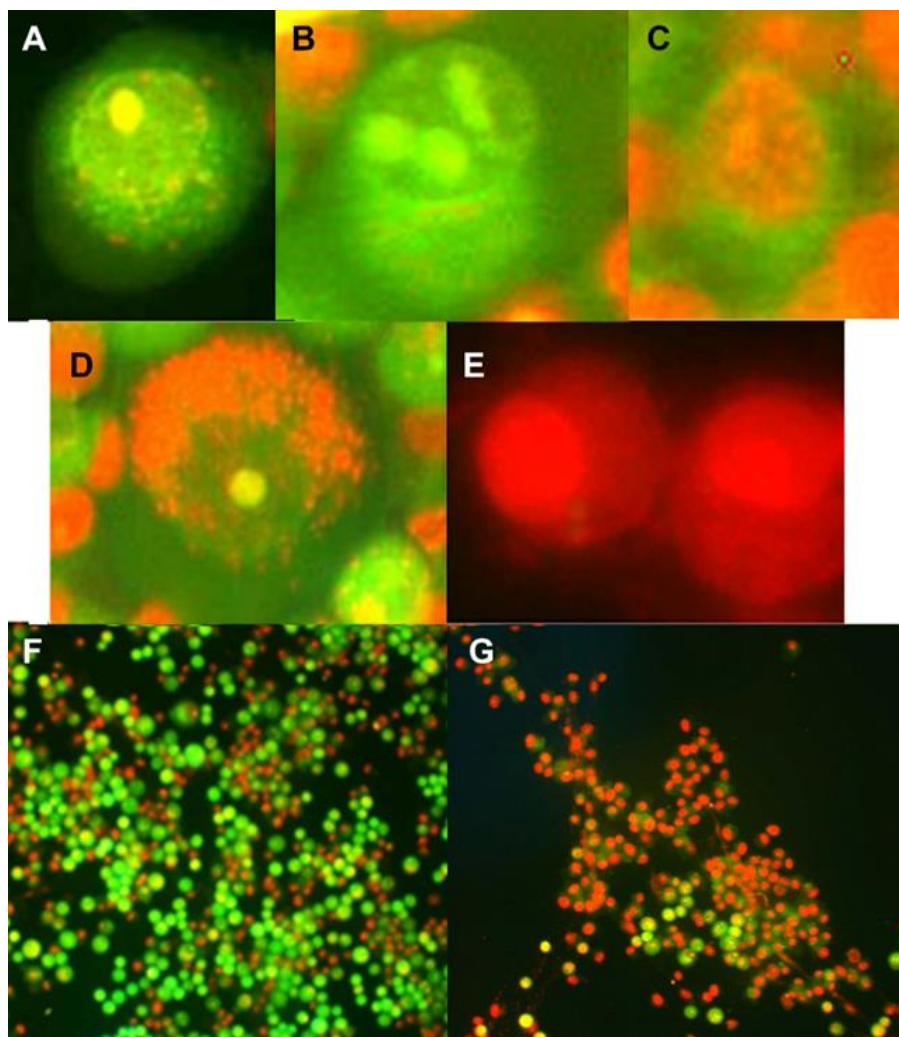
Slika 31. Procenat Vero ćelija u suspenziji; ćelije bojene Annexin V/PI, procenat određen protočnom citometrijom nakon inkubacije: **(A)** sa različitim koncentracijama venoma; **(B)** sa smešom 62,5 $\mu\text{g/ml}$ venoma i različitim koncentracijama antivenoma

Beli deo stubića – dezintegrisane ćelije; Svetlo sivi deo stubića – vijabilne ćelije (Annexin V⁻/PI⁻); Sivi deo stubića – ćelije u ranoj fazi apoptoze (Annexin V⁺/PI⁻); Tamno sivi deo stubića – ćelije u kasnoj fazi apoptoze (Annexin V⁺/PI⁺) i Crni deo stubića – nekrotične ćelije (Annexin V⁻/PI⁺)

Antivenom prevenira dezintegraciju ćelija i povećava prisustvo vijabilnih i apoptotičnih ćelija, počevši od odnosa venom/antivenom 1:0,6 (w/w). Da bi se u potpunosti neutralisao efekat venoma, uključujući indukciju apoptoze, potrebno je upotrebiti veliku količinu antivenoma, do odnosa 1:80 (w/w) mereno ovom metodom (slika 31B).

5.10.2. AO/EB bojenje za detekciju apoptoze fluorescentnom mikroskopijom

Prisustvo apoptotičnih, živih i mrtvih ćelija u suspenzijama Vero ćelija tretiranih venomom ili smešom venom/antivenom potvrđeno je AO/EB bojenjem (slika 32). Time smo i ovom metodom potvrdili da venom podstiče i uvodi ćeliju u programiranu ćelijsku smrt (apoptozu). Takođe, povećanjem koncentracije antivenoma povećava se zastupljenost živih i smanjuje zastupljenost mrtvih ćelija (nije prikazano).



Slika 32. Vero ćelije bojene sa AO/EB, posmatrane pod fluorescenim mikroskopom; Slike **A** do **E** (uvećanje 100x): (**A**) vijabilna ćelija; (**B**) ćelija u ranoj apoptozi; (**C**) ćelije u kasnoj apoptozi; (**D**) ćelija u ranoj nekrozi; (**E**) nekrotična ćelija; Slike **F** i **G** (uvećanje 10x): (**F**) ćelijska suspenzija bez dodatka venoma; (**G**) ćelijska suspenzija sa venomom

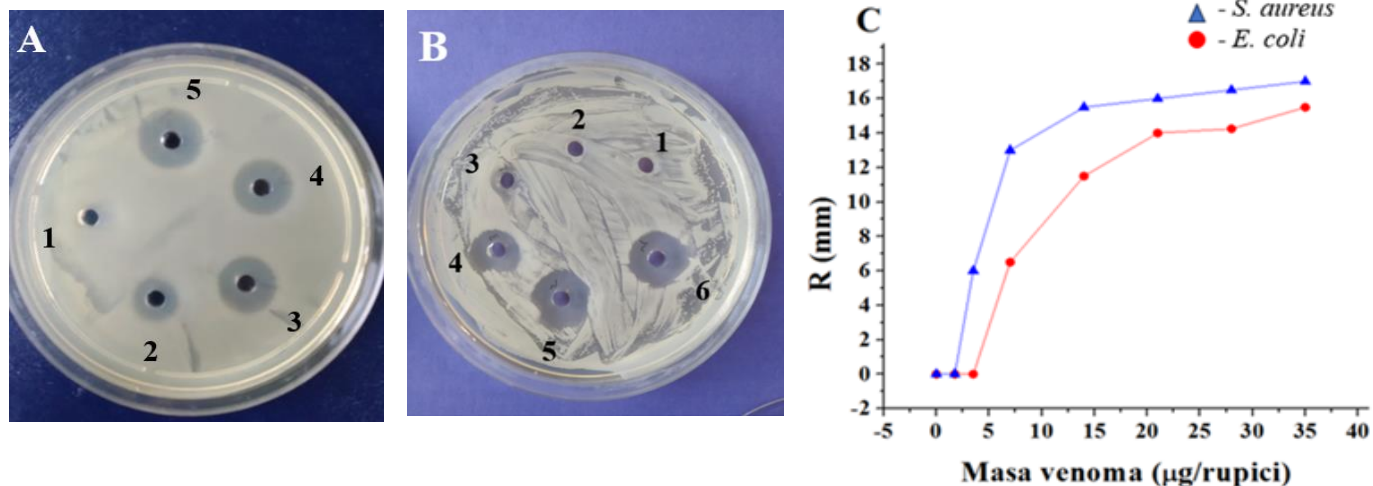
Rezultati određivanja citotoksičnosti venoma na Vero ćelijama, različitim tehnikama bojenja, sumirano su prikazani u tabeli 8.

Tabela 8. Prikaz rezultata dobijenih primenom različitih metoda za određivanje citotoksičnosti

Metod	IC ₅₀ (μg/ml)	EC ₅₀ (AJ/ml)	EC _{min} -EC _{max} (AJ/ml)
MTT	62,5	0,01	0,004-0,125
CV	55	0,3	0,031-2
TB	66	4	0,05-6,5
PI (%)	87	0,08	0,002-0,5
PI (vreme)	20	0,06	0,004-0,5
AO/EB	NA	NA	/

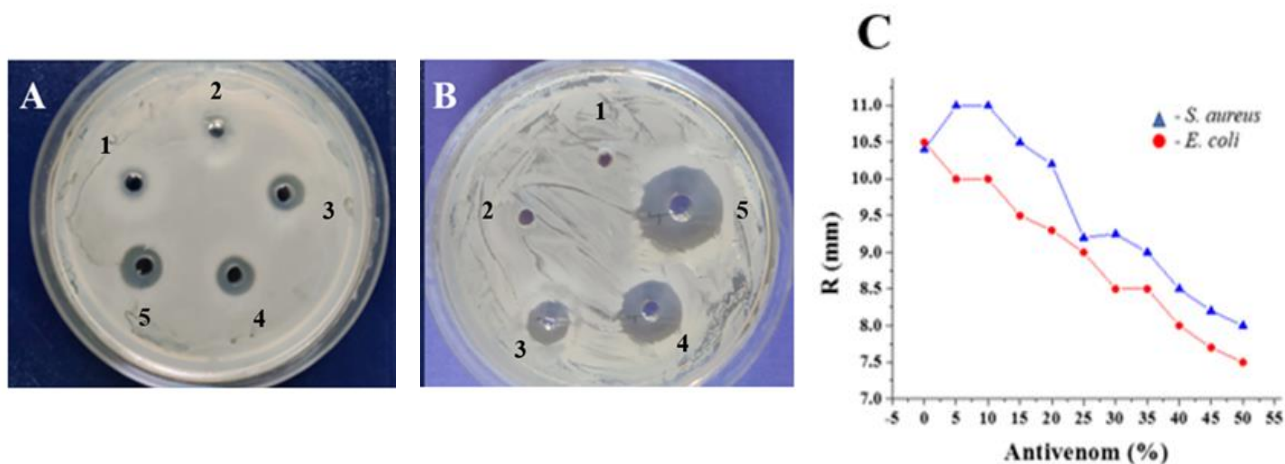
5.11. Baktericidno dejstvo venoma i antibaktericidna potenca antivenoma

Baktericidno dejstvo venoma poskoka praćeno je merenjem inhibitorne zone rasta bakterija na ćvrstoj LB podlozi. Ispitivan je rast *Esherichia coli* (Gram– bakterije) i *Staphylococcus aureus* (Gram+ bakterije) (slika 33).



Slika 33. Uticaj venoma poskoka na rast: (A) *S. aureus* i (B) *E. coli*; (C) povećanje zone inhibicije rasta bakterija zavisno od mase venoma

Mase venoma nanete u rupicu su: 1→0 µg; 2→5 µg; 3→7 µg; 4→14 µg; 5→21 µg;



Slika 34. Inhibicija baktericidnog dejstva venoma poskoka na rast: (A) *S. aureus* i (B) *E. coli* u prisustvu antivenoma; (C) smanjenje zone inhibicije rasta bakterija zavisno od mase antivenoma.

Mase antivenoma nanete u rupicu su: 1→0 µg; 2→5 µg; 3→7 µg; 4→14 µg; 5→21 µg

Na osnovu dobijenih rezultata, moće se zaključiti da venom pokazuje jaći uticaj na inhibiciju rasta *S. aureus* bakterije u odnosu na *E. coli*. Antivenom je efikasniji u neutralizaciji baktericidnog dejstva venoma na rast *E. coli*, u odnosu na rast *S. aureus* (slika 34).

Sumirani efekti dejstva venoma i antivenoma prikazani su u tabeli 9.

Tabela 9. Sposobnost neutralizacije antivenoma

	Neutralizaciona potence antivenoma (%)	m(venom) : m(a-venom)
Edem	95%	1:7,7
Hemoliza	53%	1:70
Hemoragija	61,5% ili 100%	1:38
MCD-P	100%	1: 100
MCD-F	/	/
MDD	/	/
Fibrinoliza	80%	1:12,8
Citotoksičnost	90-100%	Zavisno od metode
Neurotoksičnost	/	1:20
LAAO	50%	1:13
PLA2	100%	1:18
Proteinaze	89%	1:12,5

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 9, zapaža se da je količina antivenoma potrebna da se neutrališe biološki efekat venoma mnogo veći od količine antivenoma koja je potrebna da se neutrališu aktivnosti enzima koji su nosioci toksičnog efekta. Time se još jednom potvrđuje da je efekat venoma daleko kompleksniji od prostog zbira efekata komponenti venoma, naročito enzima. Zato bi antivenom, osim sposobnosti neutralizacije enzimskih komponenti venoma, morao da sadrži i antitela koja bi neutralisala kompleksne interakcije biomolekula venoma.

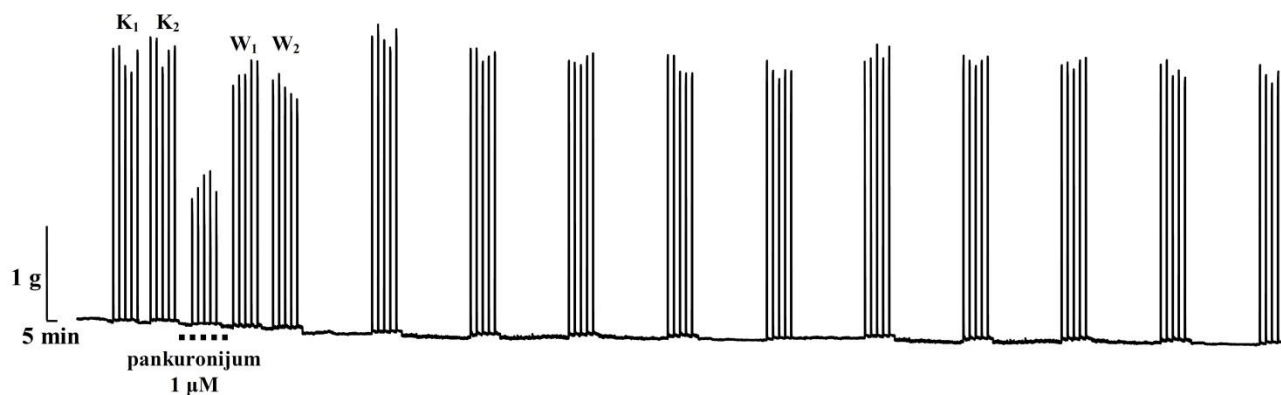
5.12. Neurotoksičnost

5.12.1. Ispitivanje kontraktilnosti preparata izolovane dijafragme

U početnom delu ispitivanja neurotoksičnosti venoma, u cilju validacije metodologije ispitivanja, urađena je serija kontrolnih kontrakcija preparata dijafragme u funkciji vremena.

Reprezentativni zapis kontrakcija preparata dijafragme pacova izazvanih EFS, bez prisustva venoma, prikazan je na slici 35., a na slici 36. procentualni prikaz tih kontrakcija u odnosu na kontrolne kontrakcije K_1 i K_2 u funkciji vremena (minuti).

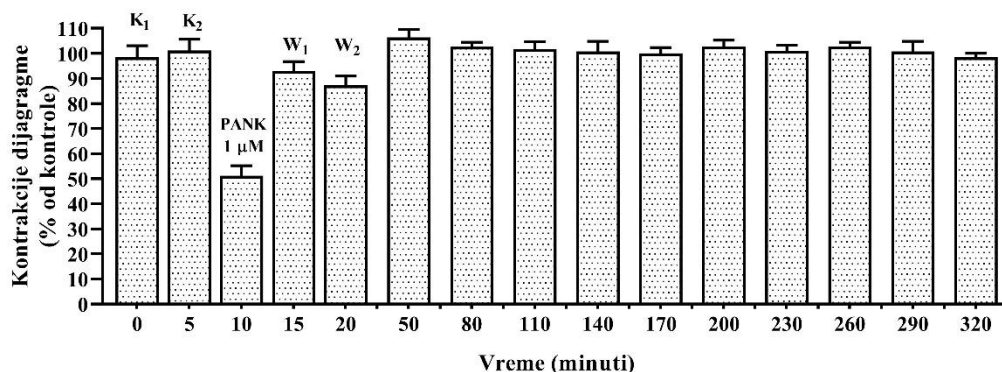
Srednja vrednost kontrakcija dijafragme u prva dva kontrolna „paketa“ kontrakcija (K_1 i K_2) iznosi $2,88 \pm 0,13$ g. Da bi smo dokazali da primenjeni parametri stimulacije: 35 Hz, 20 μ s, 2 s, 15 V izazivaju indirektnu EFS, koja se odvija posredstvom neurotransmitera acetilholina (ACh) i nikotinskog receptora na motornoj mišićnoj ploči (nAChR), primenili smo nedepolarizujući neuromišićni blokator pankuronijum u koncentraciji od 1 μ M. Dobijena srednja vrednost kontrakcija dijafragme pod uticajem 1 μ M pankuronijuma iznosi $1,47 \pm 0,12$ g, što je 51,20% od srednje vrednosti kontrakcija prva dva kontrolna „paketa“ (K_1 i K_2). Efekat blokade pankuronijuma je bio reverzibilan i posle njegovog ispiranja iz vodenog kupatila sa preparatom dijafragme, kontrakcije su se normalizovale i dostigle sledeće vrednosti: prvi „paket“ posle ispiranja pankuronijuma (W_1) ima srednju vrednost kontrakcija $2,68 \pm 0,11$ g (93,02% od kontrolnih kontrakcija K_1 i K_2) i drugi „paket“ posle ispiranja pankuronijuma (W_2) srednju vrednost kontrakcija $2,51 \pm 0,10$ g (87,25% od kontrolnih kontrakcija K_1 i K_2).



Slika 35. Kontrakcije preparata dijafragme pacova izazvane EFS bez prisustva venoma

K₁ i K₂ kontrolne kontrakcije; kontrakcije pod dejstvom 1 µM pankuronijuma; W₁ i W₂ kontrakcije posle ispiranja pankuronijuma; 10 „paketa“ kontrakcija u funkciji vremena

Između prvih pet „paketa“ kontrakcija dijafragme (K₁, K₂, pankuronijum 1 µM, W₁, W₂), kojima je potvrđena indirektna EFS, vremenska pauza je iznosila 5 minuta. Pošto smo za cilj imali da dokažemo takođe i stabilnost kontrakcija dijafragme u funkciji vremena, između narednih deset „paketa“ primenjivali smo pauzu od 30 minuta, odnosno stabilnost kontrakcija kontinuirano pratili tokom 300 minuta. Zapaža se da 1. od deset „paketa“ ima veću srednju vrednost kontrakcija za 6,39% u poređenju sa dva kontrolna „paketa“ K₁ i K₂. Od 2. do 9. paketa srednje vrednosti kontrakcija su više od kontrolnih kontrakcija u rasponu od 0,79% do 2,74%. Poslednji od deset „paketa“, posle ukupno 320 minuta indirektna EFS ima za 1,64% nižu srednju vrednost kontrakcija od kontrolnih. Ovi rezultati potvrđuju da indirektna EFS sa parametrima stimulacije: 35 Hz, 20 µs, 2 s, 15 V, obezbeđuje zahteve da su „paketi“ kontrakcija stabilni u funkciji vremena, a pet kontrakcija u okviru svakog „paketa“ ujednačene po visini kontrakcija, odnosno po standardnim devijacijama (slika 36).

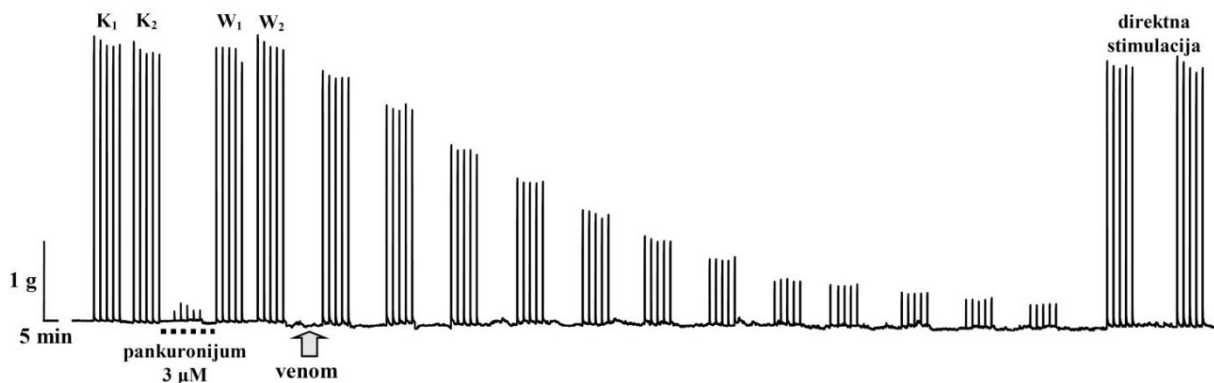


Slika 36. Kontrakcije preparata dijafragme pacova izazvane EFS bez prisustva venoma, prikazane procentualno u odnosu na kontrolne kontrakcije K₁ i K₂ u funkciji vremena (minuti)

K₁ i K₂ kontrolne kontrakcije; kontrakcije pod dejstvom 1 µM pankuronijuma; W₁ i W₂ kontrakcije posle ispiranja pankuronijuma; 10 „paketa“ kontrakcija u funkciji vremena

U sledećem delu ispitivanja urađena je serija kontrakcija preparata dijafragme pod dejstvom venoma u funkciji vremena.

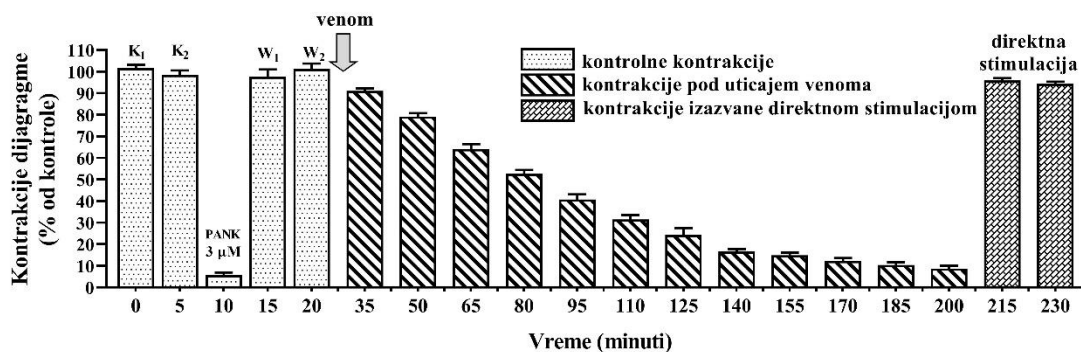
Reprezentativni zapis kontrakcija preparata dijafragme pacova izazvanih EFS pod uticajem venoma, prikazan je na slici 37., a na slici 38. procentualni prikaz tih kontrakcija u odnosu na kontrolne kontrakcije K₁ i K₂ u funkciji vremena (minuti).



Slika 37. Kontrakcije preparata dijafragme pacova izazvane EFS pod uticajem venoma

K₁ i K₂ kontrolne kontrakcije; kontrakcije pod uticajem 3 µM pankuronijuma; W₁ i W₂ kontrakcije posle ispiranja pankuronijuma; 12 „paketa“ kontrakcija pod uticajem venoma; 2 „paketa“ kontrakcija izazvanih direktnom stimulacijom

Slično predhodnom protokolu rada, sa prvih 5 „paketa“ kontrakcija dijafragme još jednom smo potvrdili indirektnu EFS, s tom razlikom što je sada pankuronijum primenjen u tri puta većoj koncentraciji (3 µM), koja je dovela do skoro potpune blokade kontrakcija dijafragme. Na ovaj način je pokazano da pankuronijum dozno-zavisno smanjuje kontrakcije dijafragme izazvane indirektnom EFS (35 Hz, 20 µs, 2 s, 15 V).



Slika 38. Kontrakcije preparata dijafragme pacova izazvane EFS pod uticajem venoma, prikazane procentualno u odnosu na kontrolne kontrakcije K₁ i K₂ u funkciji vremena (minuti)

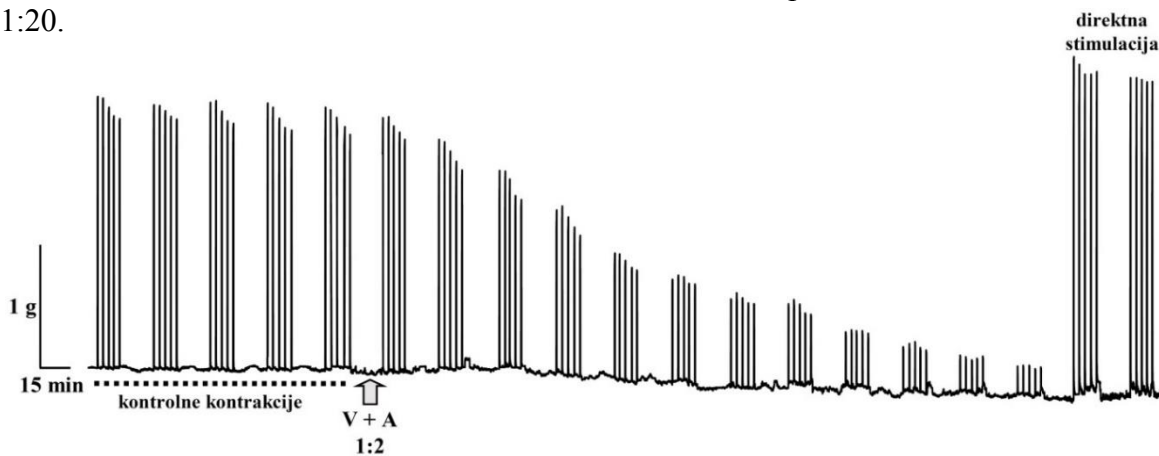
K₁ i K₂ kontrolne kontrakcije; kontrakcije pod uticajem 3 µM pankuronijuma; W₁ i W₂ kontrakcije posle ispiranja pankuronijuma; 12 „paketa“ kontrakcija pod uticajem venoma; 2 „paketa“ kontrakcija izazvanih direktnom stimulacijom

Srednja vrednost kontrakcija dijafragme u prva dva kontrolna „paketa“ kontrakcija (K₁ i K₂) iznosi 3,42±0,08 g. Nakon primene pankuronijum u koncentraciji od 3 µM, srednja vrednost kontrakcija dijafragme je smanjena na 0,19±0,04 g, što je svega 5,62% od srednje vrednosti kontrakcija prva dva kontrolna „paketa“ (K₁ i K₂). I u ovom slučaju efekat blokade pankuronijuma je bio reverzibilan, jer su se posle njegovog ispiranja kontrakcije normalizovale i dostigle vrednosti gotovo iste kontrolnim: prvi „paket“ posle ispiranja (W₁) ima srednju vrednost kontrakcija 3,34±0,12 g (97,63% od kontrolnih kontrakcija K₁ i K₂) i drugi „paket“ posle ispiranja pankuronijuma (W₂) srednju vrednost kontrakcija koja je veća od kontrolnih K₁ i K₂ kontrakcija i iznosi 3,46±0,09 g (101,14% od kontrolnih kontrakcija K₁ i K₂).

Narednih dvanaest „paketa“ kontrakcija, sa pauzama od 15 minuta između „paketa“, prikazuju kontraktibilnost dijafragme pod uticajem venoma u funkciji vremena. Redosledom, od 1. do 12. „paketa“, srednje vrednosti kontrakcija „paketa“ iznose: 90,95%, 79,13%, 64,15%, 52,68%, 40,74%, 31,49%, 24,35%, 16,56%, 14,93%, 12,30%, 10,36% i 8,78% u poređenju sa dva kontrolna „paketa“ K₁ i K₂.

Dobijeni rezultati pokazuju da venom poskoka u vremenskom periodu od 180 minuta, dovodi do progresivnog pada kontrakcija dijafragme. U cilju ispitivanja mehanizma toksičnog delovanja venoma na neuromišićnom nivou, na kraju ove serije smo izazvali 2 „paketa“ kontrakcija dijafragme primenom parametara direktne stimulacije (100 Hz, 500 μ s, 2 s, 50 V). Dobijene srednje vrednosti kontrakcija iznose 95,82% („paket“ na 215 minuta) i 94,29% („paket“ na 230 minuta) u odnosu na kontrolne „pakete“ K_1 i K_2 . Dakle, direktna stimulacija preparata dijafragme u prisustvu venoma, izaziva kontrakcije koje su približno iste kontrolnim (K_1 i K_2). Imajući u vidu da se kontrakcije dijafragme izazvane direktnom stimulacijom, ne generišu posredstvom ACh i nAChR, već direktnim dejstvom na kontraktilnu mišićnu mašineriju, ovakav nalaz dokazuje da venom poskoka u dijafragmi ne dovodi do poremećaja na nivou kontraktilne mišićne mašinerije, odnosno na nivou interakcije aktin – miozin.

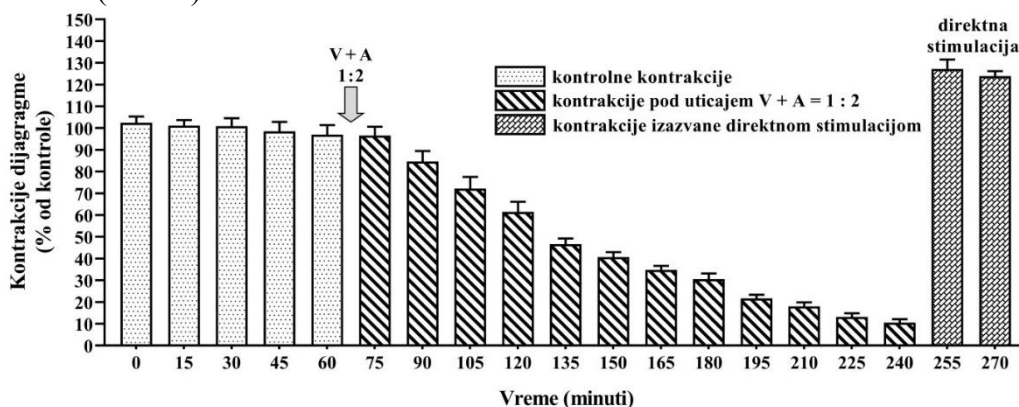
U naredne tri serije ispitivanja, procenjivan je protektivni efekat antivenoma u pogledu sprečavanja progresivnog pada kontraktilnosti dijafragme pod dejstvom venoma. Ove serije ispitivanja su urađene primenom smeša venom+antivenom (V+A) u različitim masenim odnosima (w/w), u kojima je maseni udeo venoma bio isti, dok se maseni udeo antivenoma povećavao: V+A=1:2, V+A=1:10 i V+A=1:20.



Slika 39. Kontrakcije preparata dijafragme pacova izazvane EFS pod uticajem smeše venoma i antivenoma u masenom odnosu 1 prema 2 (V+A=1:2)

5 „paketa“ kontrolnih kontrakcija; 12 „paketa“ kontrakcija pod uticajem smeše venoma i antivenoma u masenom odnosu 1 prema 2 (V+A=1:2); 2 „paketa“ kontrakcija izazvanih direktnom stimulacijom

Reprezentativni zapis kontrakcija preparata dijafragme pacova izazvanih EFS pod uticajem smeše venoma i antivenoma u masenom odnosu 1 prema 2 (V+A=1:2), prikazan je na slici 39., a na slici 40. procentualni prikaz tih kontrakcija u odnosu na prvih 5 „paketa“ kontrolnih kontrakcija, u funkciji vremena (minuti).

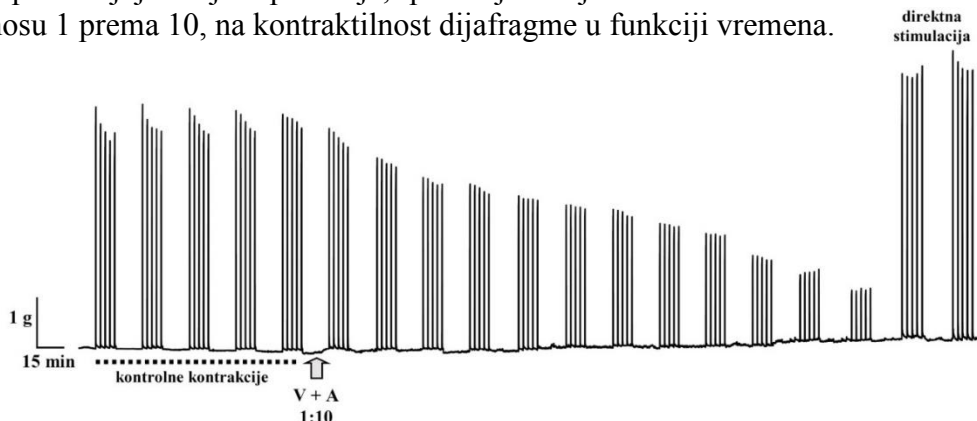


Slika 40. Kontrakcije preparata dijafragme pacova izazvane EFS pod uticajem smeše venoma i antivenoma u masenom odnosu 1 prema 2 (V+A=1:2), prikazane procentualno u odnosu na prvih 5 „paketa“ kontrolnih kontrakcija, u funkciji vremena (minuti)

U predhodna dva protokola ispitivanja, pauze između prvih pet kontrolnih „paketa“ su 5 minuta, a u okviru tih kontrolnih „paketa“ je primenjivan pankuronijum (1 i 3 μ M). U ovoj i naredne dve serije kontrakcija, koristili smo nešto izmenjen protokol. Pošto je za procenu protektivnog efekta antivenoma od ključnog značaja stabilnost kontrakcija dijafragme u funkciji vremena pre primene smeše venom+antivenom, stabilnost kontrakcija smo na početku sve tri serije testirali sa pet kontrolnih „paketa“ tokom 60 minuta. Dobijeni rezultati pokazuju da su „paketi“ kontrakcija stabilni u funkciji vremena, a pet kontrakcija u okviru svakog „paketa“ ujednačeni po visini kontrakcija.

Srednja vrednost kontrakcija dijafragme u prvih pet kontrolnih „paketa“ iznosi $2,14 \pm 0,08$ g. Narednih dvanaest „paketa“ kontrakcija, prikazuju kontraktilnost dijafragme pod uticajem smeše venoma i antivenoma u masenom odnosu 1 prema 2 (V+A=1:2), u funkciji vremena. Redosledom, od 1. do 12. „paketa“, srednje vrednosti kontrakcija „paketa“ iznose: 96,55%, 84,61%, 72,20%, 61,47%, 46,64%, 40,67%, 34,79%, 30,50%, 21,64%, 18,00%, 13,15% i 10,54% u poređenju sa pet kontrolnih „paketa“. Na kraju ove serije, dva „paketa“ kontrakcija su dobijena direktnom stimulacijom, a srednje vrednosti kontrakcija su veće od kontrolnih i iznose 127,19% („paket“ na 255 minuta) i 123,88% („paket“ na 270 minuta) u odnosu na kontrolnih pet „paketa“.

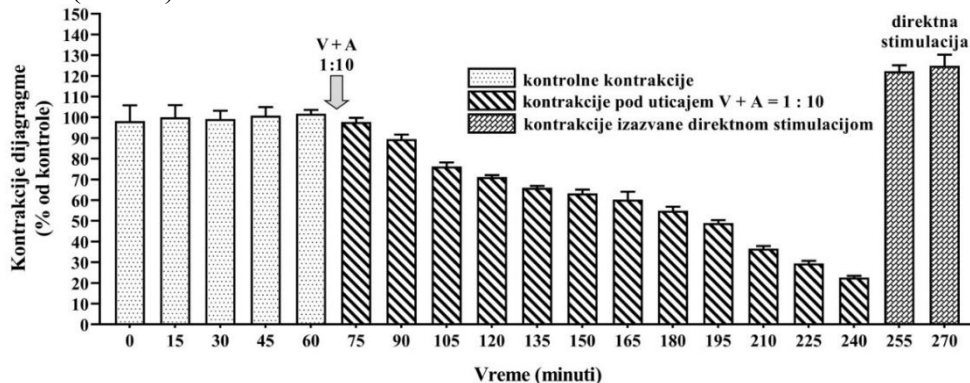
U pretposlednjoj seriji ispitivanja, procenjivan je efekat smeše venoma i antivenoma u masenom odnosu 1 prema 10, na kontraktilnost dijafragme u funkciji vremena.



Slika 41. Kontrakcije preparata dijafragme pacova izazvane EFS pod uticajem smeše venoma i antivenoma u masenom odnosu 1 prema 10 (V+A=1:10)

5 „paketa“ kontrolnih kontrakcija; 12 „paketa“ kontrakcija pod uticajem smeše venoma i antivenoma u masenom odnosu 1 prema 10 (V+A=1:10); 2 „paketa“ kontrakcija izazvanih direktnom stimulacijom

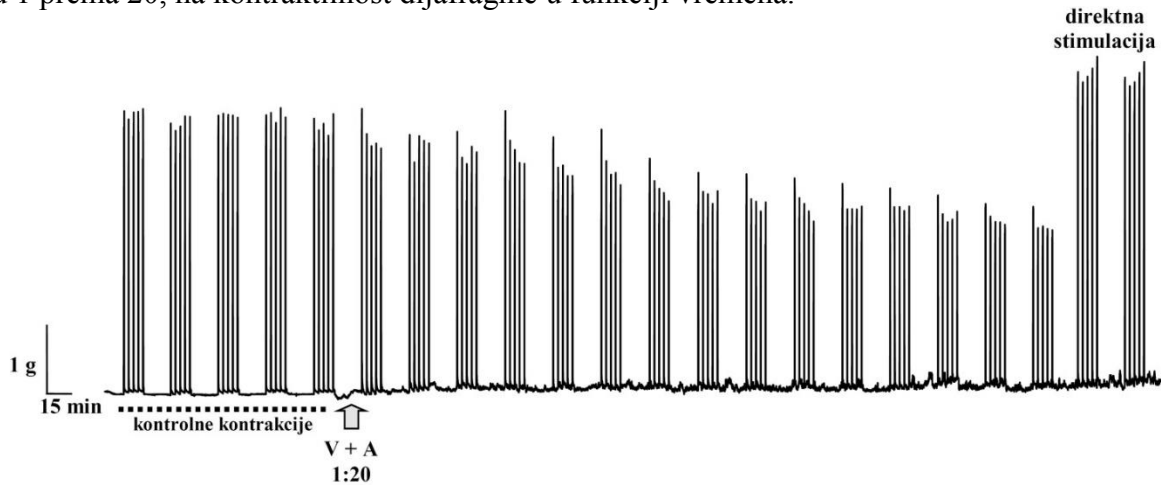
Reprezentativni zapis kontrakcija preparata dijafragme pacova izazvanih EFS pod uticajem smeše venoma i antivenoma u masenom odnosu 1 prema 10 (V+A=1:10), prikazan je na slici 41., a na slici 42. procentualni prikaz tih kontrakcija u odnosu na prvih 5 „paketa“ kontrolnih kontrakcija, u funkciji vremena (minuti).



Slika 42. Kontrakcije preparata dijafragme pacova izazvane EFS pod uticajem smeše venoma i antivenoma u masenom odnosu 1 prema 10 (V+A=1:10), prikazane procentualno u odnosu na 5 „paketa“ kontrolnih kontrakcija u funkciji vremena (minuti)

Srednja vrednost kontrakcija dijafragme u prvih pet kontrolnih „paketa“ iznosi $5,15 \pm 0,25$ g. Narednih dvanaest „paketa“ kontrakcija, prikazuju kontraktilnost dijafragme pod uticajem smeše venoma i antivenoma u masenom odnosu 1 prema 10 ($V+A=1:10$), u funkciji vremena. Srednje vrednosti kontrakcija „paketa“ su opadale sledećim redosledom: 97,78%, 89,51%, 76,26%, 71,13%, 66,01%, 63,21%, 60,30%, 54,86%, 48,91%, 36,56%, 29,45% i 22,61% u odnosu na pet kontrolnih „paketa“. Na kraju ove serije, dva „paketa“ kontrakcija su dobijena direktnom stimulacijom, a srednje vrednosti kontrakcija su veće od kontrolnih i iznose 122,30% („paket“ na 255 minuta) i 124,90% („paket“ na 270 minuta) u odnosu na kontrolnih pet „paketa“.

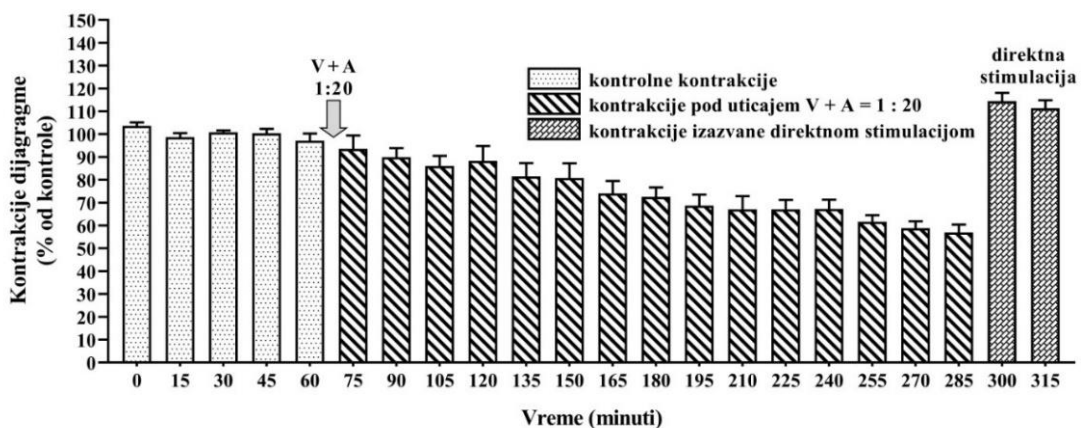
U završnoj seriji ispitivanja, procenjivan je efekat smeše venoma i antivenoma u masenom odnosu 1 prema 20, na kontraktilnost dijafragme u funkciji vremena.



Slika 43. Kontrakcije preparata dijafragme pacova izazvane EFS pod uticajem smeše venoma i antivenoma u masenom odnosu 1 prema 20 ($V+A=1:20$)

5 „paketa“ kontrolnih kontrakcija; 15 „paketa“ kontrakcija pod uticajem smeše venoma i antivenoma u masenom odnosu 1 prema 20 ($V+A=1:20$); 2 „paketa“ kontrakcija izazvanih direktnom stimulacijom

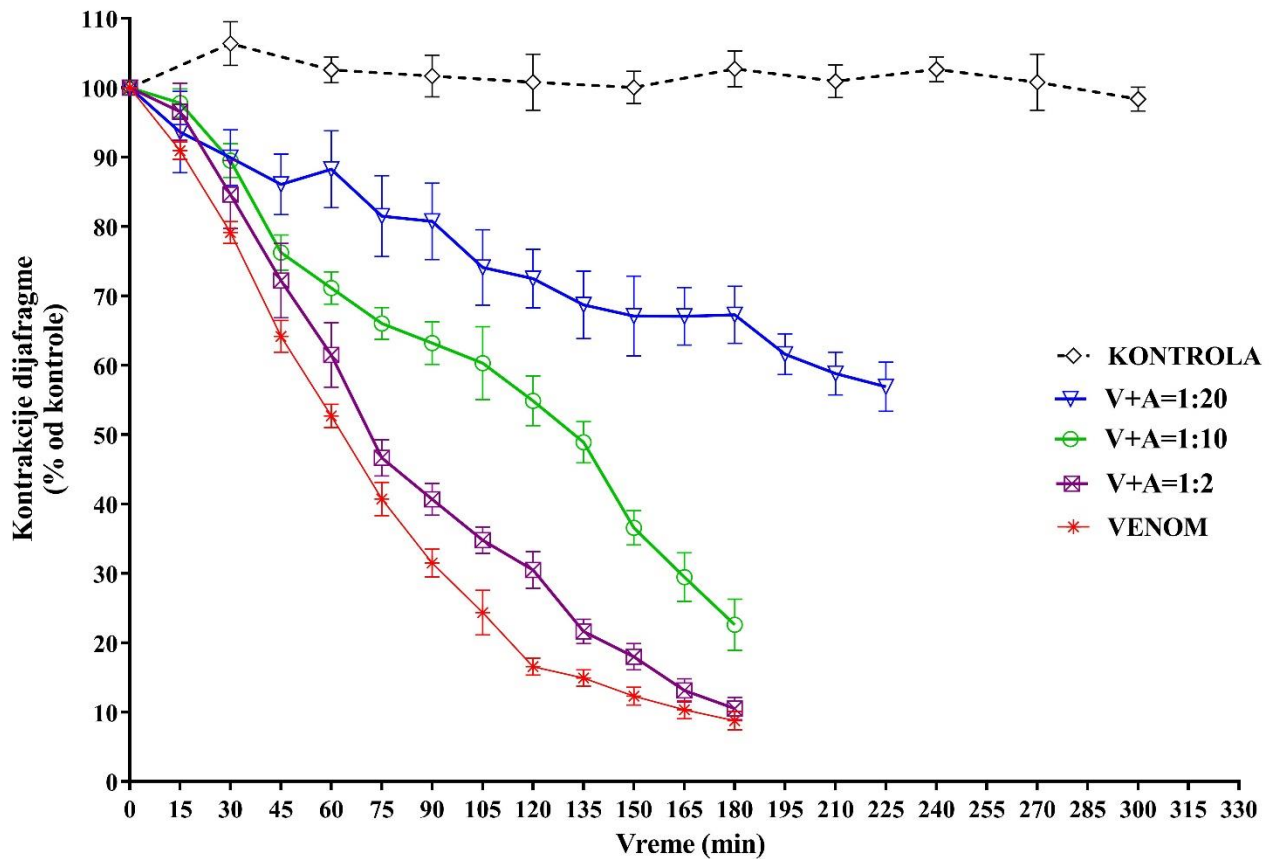
Reprezentativni zapis kontrakcija preparata dijafragme pacova izazvanih EFS pod uticajem smeše venoma i antivenoma u masenom odnosu 1 prema 20 ($V+A=1:20$), prikazan je na slici 43., a na slici 44. procentualni prikaz tih kontrakcija u odnosu na prvih 5 „paketa“ kontrolnih kontrakcija, u funkciji vremena (minuti).



Slika 44. Kontrakcije preparata dijafragme pacova izazvane EFS pod uticajem smeše venoma i antivenoma u masenom odnosu 1 prema 20 ($V+A=1:20$), prikazane procentualno u odnosu na 5 „paketa“ kontrolnih kontrakcija u funkciji vremena (minuti)

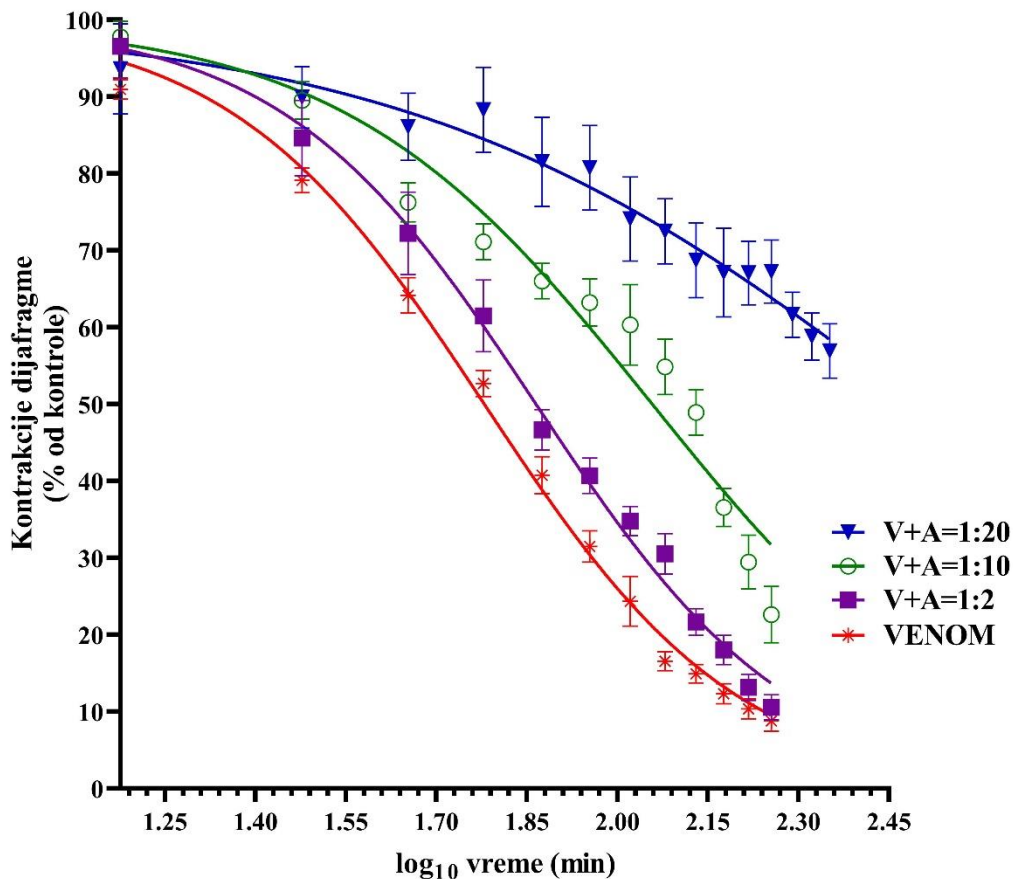
Srednja vrednost kontrakcija dijafragme u prvih pet kontrolnih „paketa“ iznosi $4,02 \pm 0,11$ g. Pošto smo tokom preliminarnih ispitivanja zapazili da pod uticajem smeše venoma i antivenoma u masenom odnosu 1 prema 20 (V+A=1:20), ni posle dvanaest „paketa“ stimulacija, kontrakcije dijafragme ne opadaju ispod 50% kontrolnih vrednosti, u finalnim serijama smo primenjivali petnaest „paketa“ stimulacije. Srednje vrednosti kontrakcija „paketa“ su opadale sledećim redosledom: 93,60%, 89,92%, 86,08%, 88,27%, 81,50%, 80,76%, 74,09%, 72,49%, 68,71%, 67,11%, 67,06%, 67,26%, 61,65%, 58,79% i 56,90% u odnosu na pet kontrolnih „paketa“. Kao što se vidi iz dobijenih rezultata i 15. „paket“ kontrakcija dijafragme ima srednju vrednost kontrakcija koja je iznad 50% srednje vrednosti kontrolnih kontrakcija (56,90% u odnosu na kontrolne kontrakcije). Na kraju ove finalne serije, dva „paketa“ kontrakcija su dobijena direktnom stimulacijom. Njihove srednje vrednosti kontrakcija su veće od kontrolnih i iznose 114,41% („paket“ na 300 minuta) i 111,33% („paket“ na 315 minuta) u odnosu na kontrolnih pet „paketa“.

Rezultati svih pet serija ispitivanja kontraktilnosti dijafragme u funkciji vremena, kumulativno su prikazani na slici 45.



Slika 45. Kumulativni prikaz smanjenja kontrakcija dijafragme u funkciji vremena pod uticajem venoma i smeša venom+antivenom u masenim odnosima 1:2; 1:10 i 1:20, u odnosu na kontrolne kontrakcije

Logaritmovanjem vremena (\log_{10} , minuti), normalizovanjem efekata (% od kontrolnih kontrakcija) i primenom nelinearne regresije, dobijene su sigmoidalne krive smanjenja kontrakcija dijafragme, koje su prikazane na slici 46.



Slika 46. Sigmoidalne krive smanjenja kontrakcija dijafragme u logaritamskoj funkciji vremena pod uticajem venoma i smeša venom+antivenom u masenim odnosima 1:2; 1:10 i 1:20

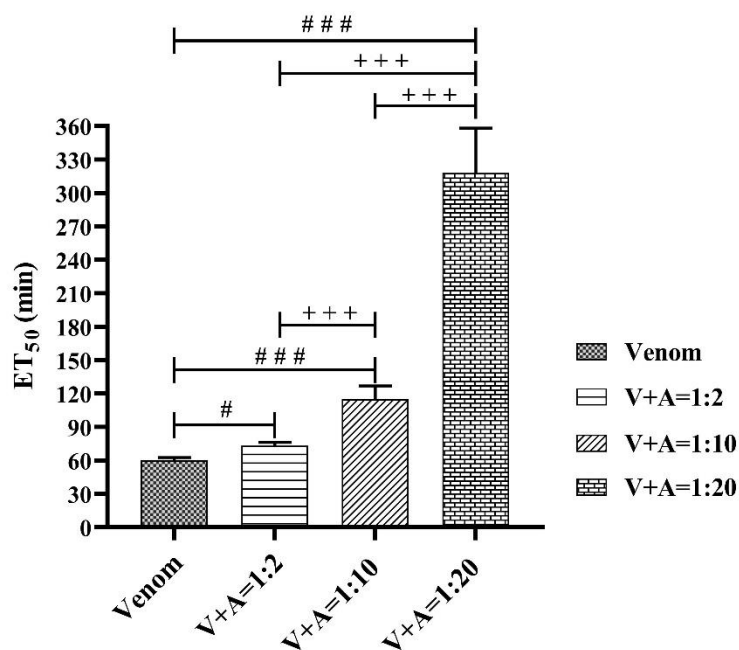
Nelineranom regresijom su dobijene preračunate vrednosti srednjeg efektivnog vremena (ET_{50}) za koje se kontrakcije dijafragme smanje na 50% kontrolnih vrednosti, posle primene venoma i smeša venom+antivenom u različitim masenim odnosima.

Vrednosti ET_{50} su prikazane u tabeli 10.

Tabela 10. Vrednosti ET_{50} (minuti) za koje se kontrakcije dijafragme smanje na 50% kontrolnih vrednosti, posle primene venoma i smeša venom+antivenom u masenim odnosima 1:2; 1:10 i 1:20 (srednja vrednost \pm SD)

Venom i smeše venom+antivenom u različitim masenim odnosima	Venom	V+A=1:2	V+A=1:10	V+A=1:20
ET_{50} (minuti)	60,17 \pm 2,43	73,29 \pm 3,02	114,80 \pm 12,16	317,80 \pm 40,46

Na slici 47. je prikazana statistička značajnost između vrednosti ET_{50} u prisustvu venoma i različitog masenog udela antivenoma u smešama venom+antivenom. Dokazana je statistički značajna razlika između ET_{50} za venom i ET_{50} za smeše venoma i antivenoma u masenim odnosima 1:2; 1:10 i 1:20, $p < 0,05$, $p < 0,001$, $p < 0,001$, po redosledu navođenja. Takođe, postoji i razlika između ED_{50} za različite masene odnose venoma i antivenoma na nivou značajnosti $p < 0,001$.

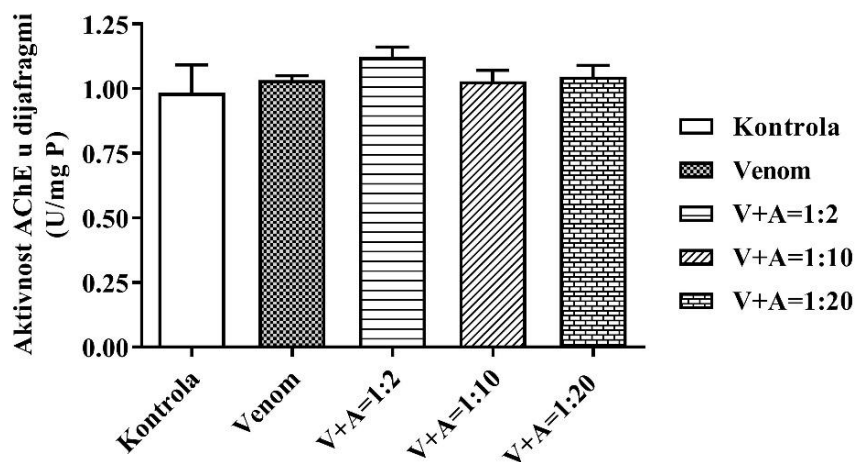


Slika 47. Komparacija srednjih efektivnih vremena (ET_{50}) za koja se kontrakcije dijafragme smanje na 50% kontrolnih vrednosti, posle primene venoma i smeše venoma i antivenoma u masenim odnosima 1:2; 1:10 i 1:20

(srednja vrednost \pm SD, # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ u odnosu na venom; +++ $p < 0,001$ između različitih masenih odnosa venoma i antivenoma)

5.12.2. Određivanje aktivnosti AChE i aktivnosti Na^+/K^+ -ATP-aza u dijafragmi

Rezultati analize aktivnosti AChE u svim ispitivanim uzorcima dijafragme prikazani su na slici 48.

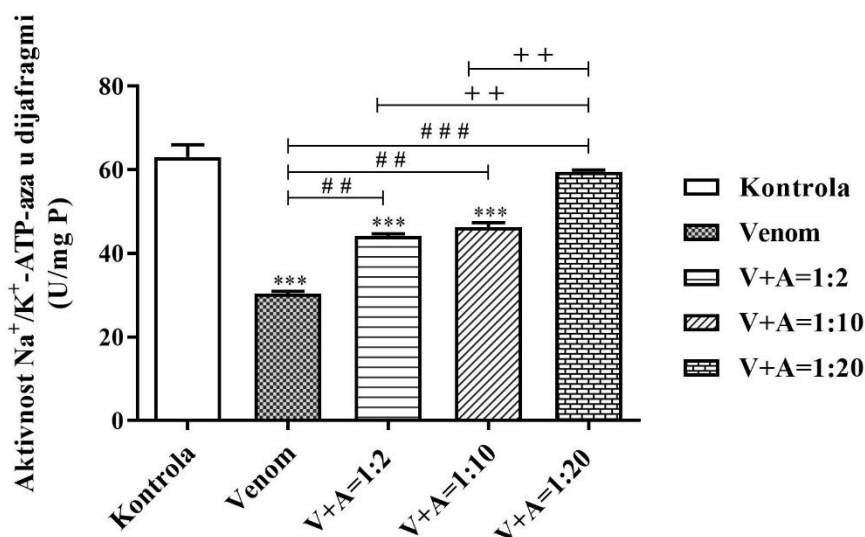


Slika 48. Aktivnost AChE u dijafragmi (U/mg P) bez prisustva venoma (kontrola), pod uticajem venoma i pod uticajem smeše venoma i antivenoma u masenim odnosima 1:2; 1:10 i 1:20

(srednja vrednost \pm SD, $p > 0,05$)

Na osnovu dobijenih rezultata, nije dokazana razlika u aktivnosti enzima AChE u preparatima dijafragme pod uticajem venoma i smeša venom+antivenom u svim ispitivanim masenim odnosima, u poređenju sa kontrolnom grupom ($p > 0,05$). Ovim je pokazano da venom u svom mehanizmu neurotoksičnosti ne deluje posredstvom enzima AChE.

Rezultati analize aktivnosti Na^+/K^+ -ATP-aze u svim ispitivanim uzorcima dijafragme prikazani su na slici 49.



Slika 49. Aktivnost Na^+/K^+ -ATP-aze u dijafragmi (U/mg P) bez prisustva venoma (kontrola), pod uticajem venoma i pod uticajem smeše venoma i antivenoma u masenim odnosima 1:2; 1:10 i 1:20 (srednja vrednost \pm SD, *** p <0,001 u odnosu na kontrolu; ## p <0,01, ### p <0,001 u odnosu na venom; ++ p <0,01 između različitih masenih odnosa venoma i antivenoma)

U pogledu ispitivanja mehanizma neurotoksičnog dejstva venoma poskoka, testirali smo korelaciju između dobijenih vrednosti za aktivnost Na^+/K^+ -ATP-aza u dijafragmi i primenjenih različitih masenih odnosa venom+antivenom: 1:2; 1:10 i 1:20. Sa povećanjem masenog udela antivenoma u smešama venom+antivenom, odnosno koncentracije antivenoma, povećava se enzimska aktivnost Na^+/K^+ -ATP-aza. Pirsonovom korelacijom dobijena je veoma jaka pozitivna korelacija ($r=0,9150$, *** p <0,001) između aktivnosti Na^+/K^+ -ATP-aza i koncentracije antivenoma.

5.13. Enzimi venoma

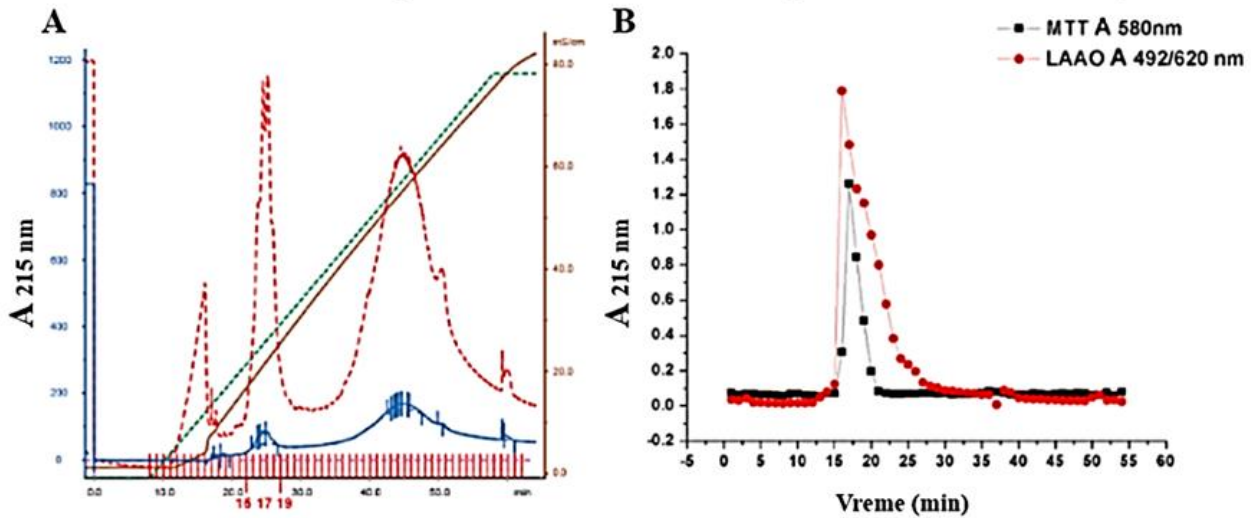
5.13.1. Aktivnost L-aminokiselinske oksidaze (LAAO)

Aktivnost LAAO određuje se na osnovu koncentracije H_2O_2 koji nastaje pod dejstvom enzima LAAO. Sistem peroksidaza (HRP)/o-dianizidin u zavisnosti od količine H_2O_2 stvara lubičasti imino produkt (436 nm). U ovom radu, uslovi testa su prilagođeni za korišćenje supstrata OPD (o-fenilenediamin dihidrohlorid) za HR-peroksidazu, u reakciji koja je takođe zavisna od količine H_2O_2 (492 nm).

Tokom upoređivanja metoda za određivanje citotoksičnosti, detektovana je aktivnost venoma sa MTT supstratom bez prisustva ćelija. Ovo je ukazivalo na to da neka od komponenti venoma redukuje MTT. Dalje istraživanje je dovelo do saznanja da LAAO redukuje MTT i zbog toga su razvijena dva testa: detekcija LAAO na PAGE korišćenjem MTT kao supstrata i druga metoda, detekcija LAAO aktivnosti sa MTT supstratom u mikrotitarskoj ploči.

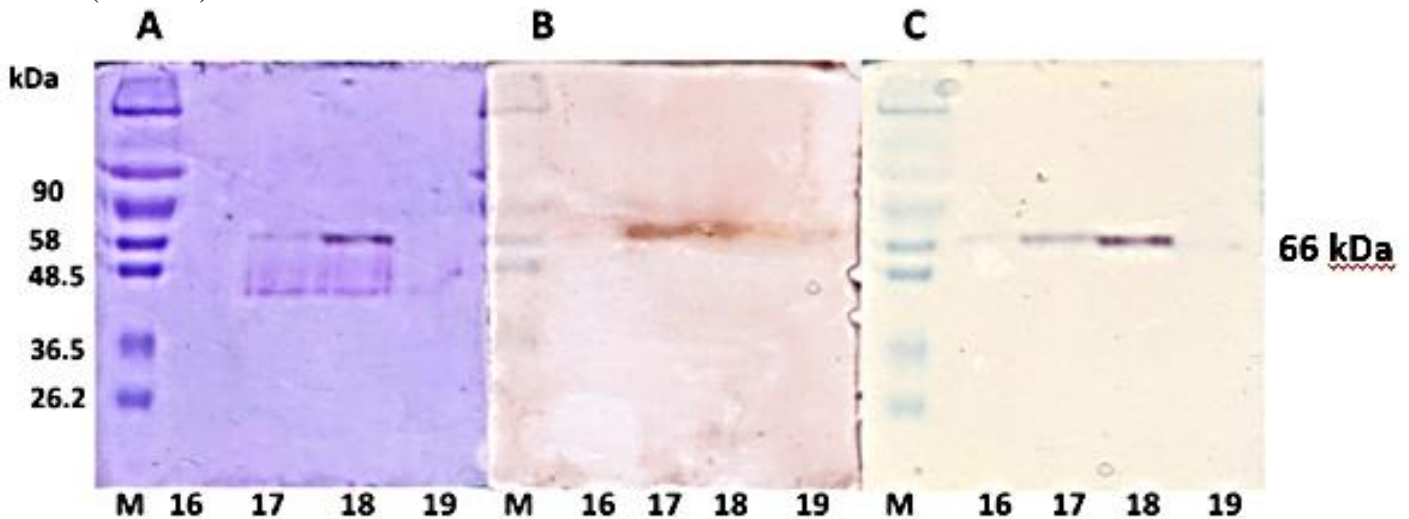
Ukratko, 0,05 g venoma je naneto na gel-filtracioni matiks, na kome je vršeno razdvajanje prema molekularnoj masi proteina. Sve eluirane frakcije su testirane na prisustvo H_2O_2 (standardnim testom) i MTT testom.

Frakcije koje su bile pozitivne navedenim testovima, spojene su i nanete na jonoizmenjivačku kolonu (slika 50A). Nakon jonoizmenjivačkog razdvajanja, dobijene frakcije su testirane istim metodama (slika 50B).



Slika 50. Jonoizmenjivačka hromatografija venoma: (A) elucioni profil uzorka venoma na Mono Q koloni; (B) analiza razdvojenih frakcija venoma sa dve metode (MTT test i standardna metoda)

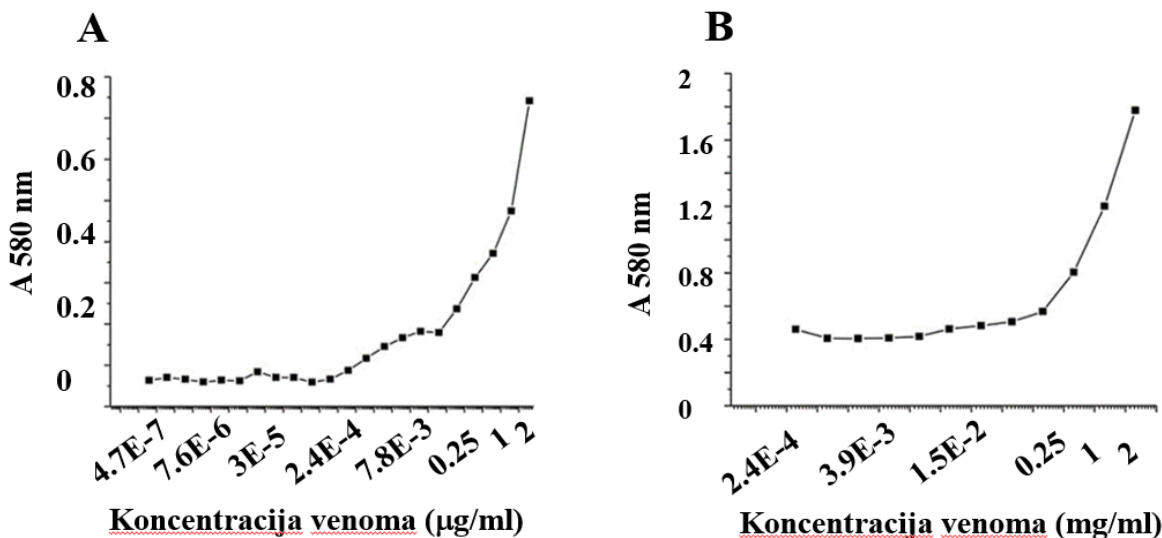
Frakcije koje su bile pozitivne, kao i frakcije pre i nakon njih, 16-19 analizirane su na 9% PAGE (slika 51).



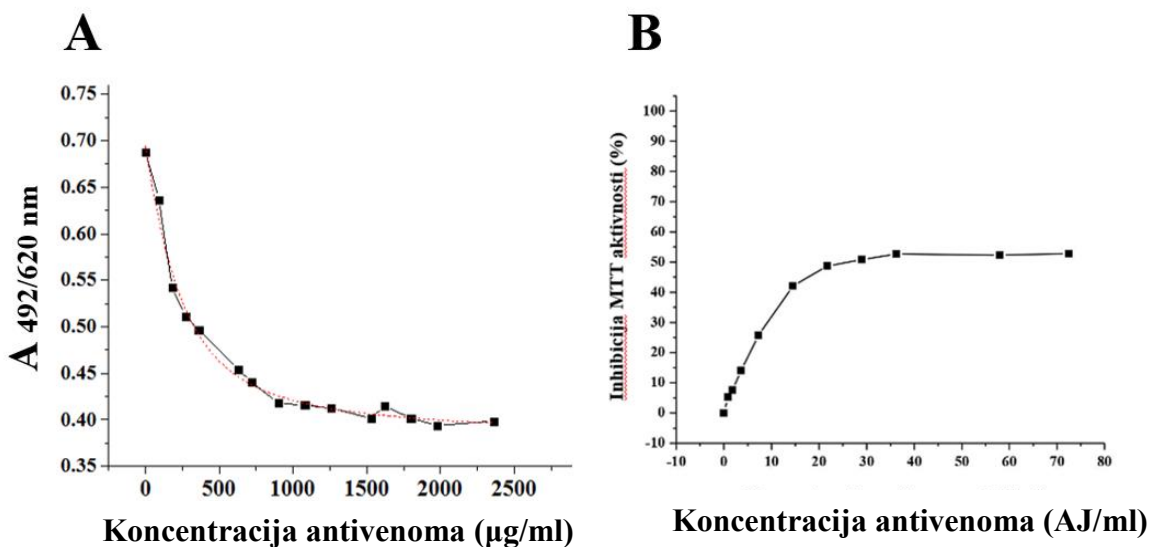
Slika 51. Nedenaturišuća PAG elektroforeza frakcija u kojima je dokazana aktivnost LAAO (16 do 19); (M) Markeri molekularskih masa: (A) CBB bojenje; (B) bojenje sa DAB substratom za detekciju LAAO aktivnosti; (C) MTT-test

Bojenjem CBB-om (slika 51A) detektovana je jedna proteinska traka veličine oko 66 kDa, što odgovara veličini LAAO monomera. Na druga dva gela, na istom mestu su detektovane trake dobijene enzimskom aktivnošću: (B) prisustvo H_2O_2 sa DAB supstratom i (C) traka koju čine formazanski kristali dobijeni redukcijom MTT-a.

Aktivnost LAAO u različitim količinama venoma ispitani su MTT testom (slika 52), kao i inhibiciju aktivnosti ovog enzima u prisustvu antivenoma (slika 53).



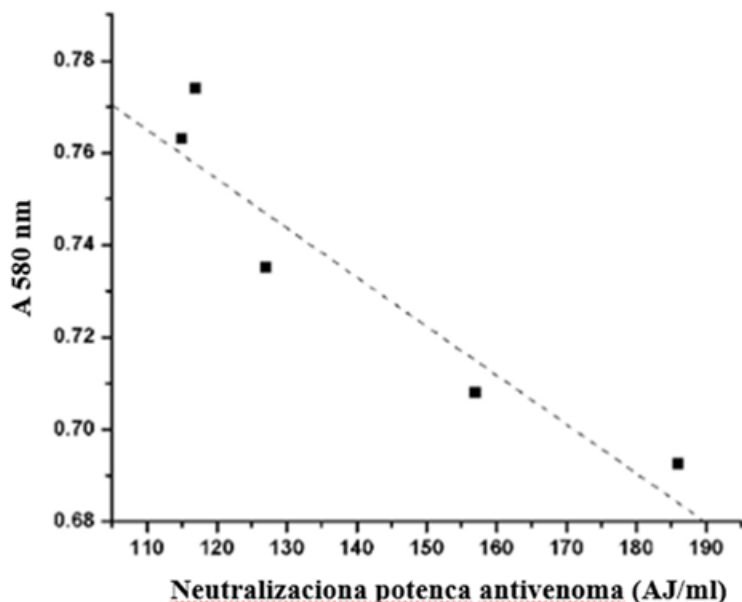
Slika 52. Aktivnosti LAAO: (A) u mikrogramskim; (B) u miligramskim količinama venoma poskoka, merene MTT-testom.



Slika 53. Inhibicija aktivnosti LAAO venoma poskoka (1 mg/ml) rastućim koncentracijama antivenoma: (A) mereno MTT-testom; (B) procenat inhibicije

Oko 52% LAAO aktivnosti u 1 mg/ml venoma je inhibirano sa 15,38 mg (20 AJ/ml) antivenomom (slika 51B). Dalje dodavanje antivenoma ne inhibira LAAO venoma MTT testom. To znači da je 48% LAAO aktivnosti ne može biti neutralisano antivenomom.

Korelacija između testa potence i inhibicije venomske LAAO, prikazana je na slici 54. Korelacioni faktor između testa potence i inhibicije venomske LAAO u jednom miligramu venoma poskoka iznosi $R = 82,57\%$. Pre određivanja korelacije između testa potence i inhibitornog MTT testa, vršeno je oduzimanje absorbance koja nije mogla biti neutralisana. Na taj način korelacija se vršila samo u odnosu na inhibiciju aktivnosti LAAO koja može biti neutralisana antivenomom.

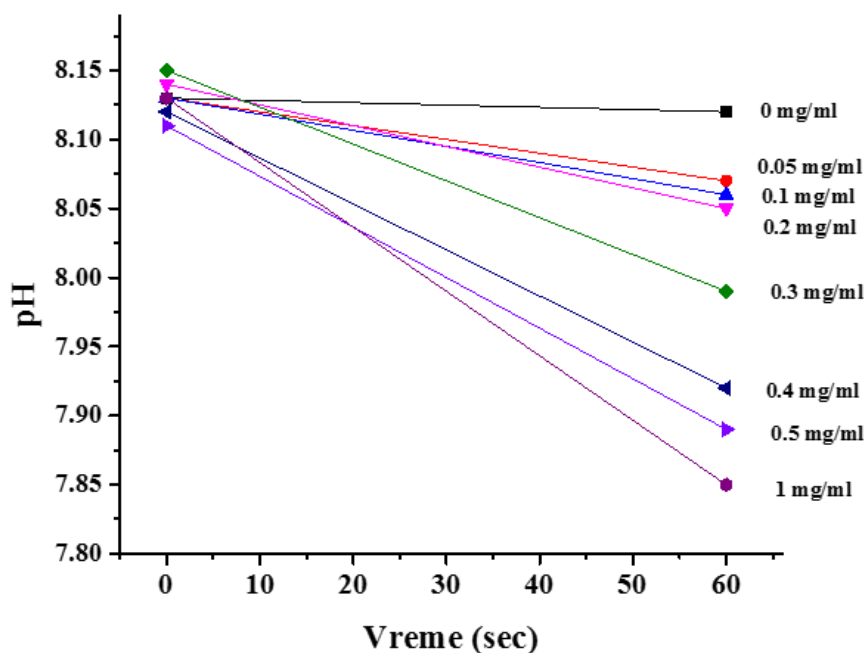


Slika 54. Korelacija između testa potence i inhibicije venomske LAAO merene MTT testom

5.13.2. Aktivnost fosfolipaza A2 (PLA2)

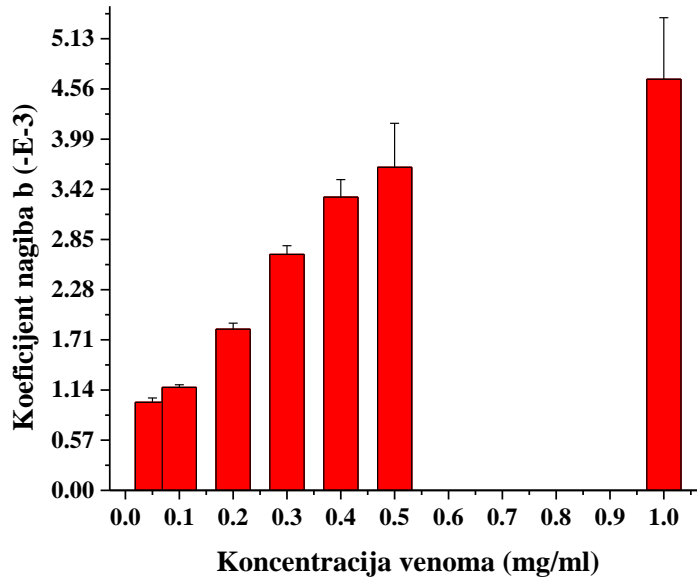
U oblasti toksinologije PLA2 enzimi se smatraju najopasnijim toksinima. Fosfolipaza hidrolizuje fosfolipide, što rezultira stvaranjem arahidonske kiseline i lizofosfolipida. Tokom reakcije dolazi do smanjenja pH, što je iskorišćeno za praćenje aktivnosti enzima.

Rezultati analize promene pH vrednosti u zavisnosti od koncentracije venoma, prikazani su na slici 55.



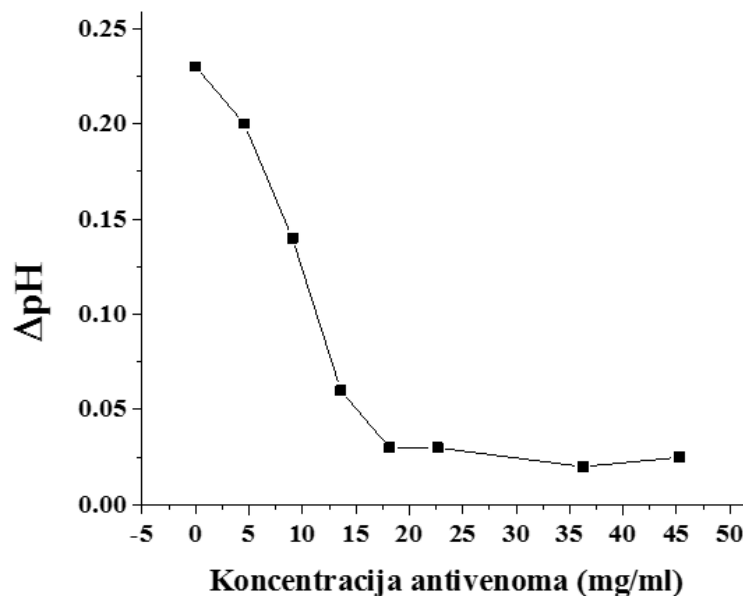
Slika 55. Smanjenje vrednosti pH pod dejstvom PLA2 u funkciji vremena nakon dodavanja različith količina venoma

Na osnovu promene pH i koncentracije venoma određen je nagib prave. Rezultati ove analize prikazani su na slici 56.



Slika 56. Zavisnost koeficijenta nagiba regresione linearne krive za promenu pH od koncentracije venoma

Na osnovu rezultata dobijenih za aktivnost PLA2 venoma poskoka, za procenjivanje anti-PLA2 aktivnosti antivenoma, izabrana je koncentracija venoma od 1 mg/ml (slika 57).



Slika 57. Inhibicija aktivnosti PLA2 enzima venoma različitim koncentracijama antivenoma

Dokazano je da se aktivnost enzima PLA2 koji se nalazi u jednom miligramu venoma, u potpunosti neutrališe sa 18,12 mg antivenoma. Korelacija između antifosfolipidnog dejstva antivenoma u *in vitro* uslovima i testa potence iznosi 88,4%.

5.13.3. Aktivnost proteinaza venoma

Proteolitička aktivnost venoma poskoka određivana je na osnovu brzine razlaganja azokazeina u prisustvu 35 µg/ml venoma. Pri proteolizi se stvara bojeni produkt koji se detektuje spektrometrijski. Najpre je određen raspon vremenskih tačaka u kome apsorbance ispitivanih uzoraka rastu linearno. Na osnovu toga je određeno da se hemijska reakcija zaustavlja u navedenim vremenskim intervalima: 0, 25, 40, 60 i 80-tom minutu reakcije (slika 58, tabela 11). Da bi razlikovali aktivnost serin-proteaza od aktivnosti metaloproteinaza, korišćeni su specifični inhibitori ovih enzima: PMSF i EDTA. Rezultati ove analize prikazani su na slici 59.

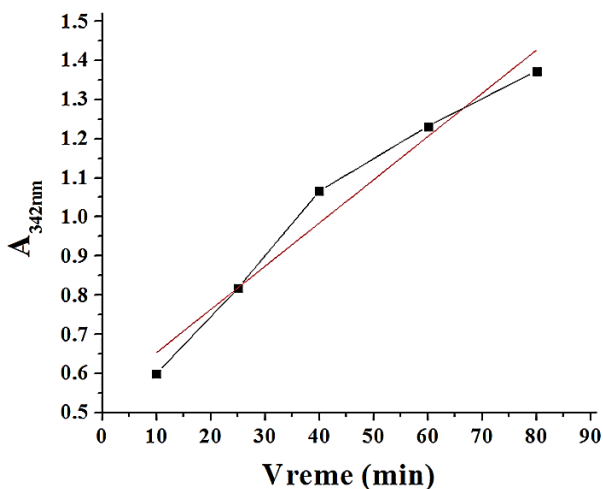
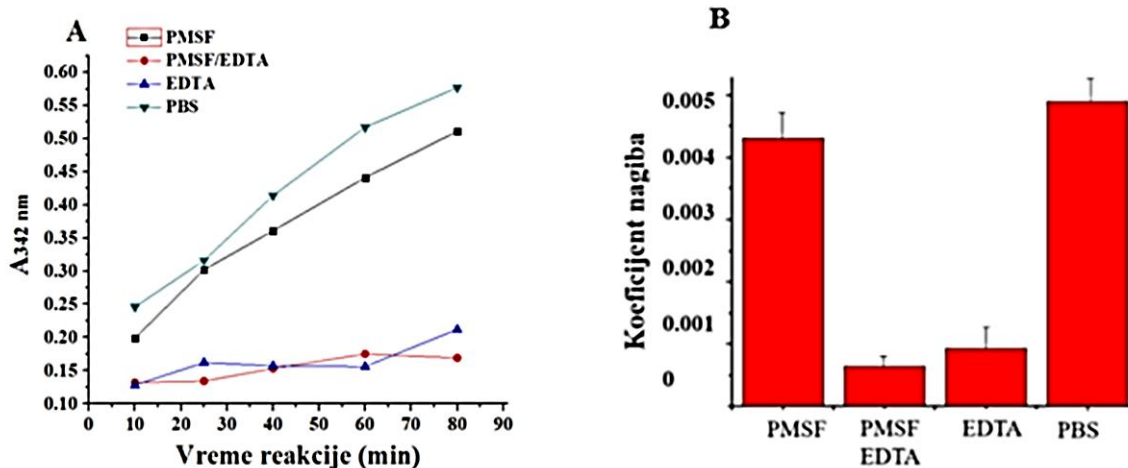


Tabela 11. Parametri regresione krive

Jednačina: $y = a + b \cdot x$, $R^2 = 0,95537$		
	Vrednost	SD
Odsečak	0,5428	0,05893
Nagib	0,0110	0,00119

Slika 58. Merenje aktivnosti proteaza u 35 µg/ml venoma azokazeinskim testom

Kako nagib krive odražava brzinu reakcije, koeficijent nagiba linearne regresione krive (b) je upotrebljen kao pokazatelj brzine reakcije. Koeficijent nagiba krive uzorka venoma kome nije dodan inhibitor ili antivenom, predstavljao je 100% proteazne aktivnosti i u odnosu na ovako predstavljenu ukupnu aktivnost venoma određivane su aktivnosti ostalih uzoraka (slika 59B).

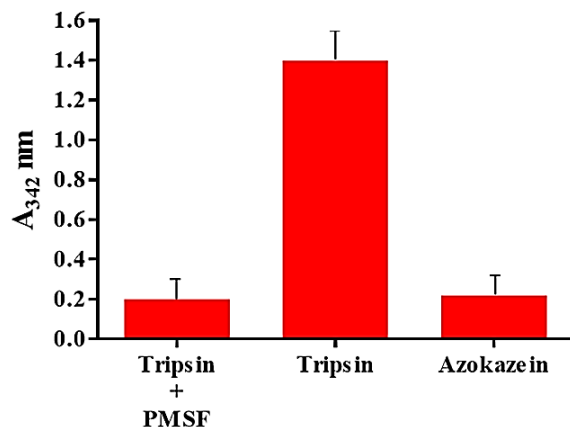


Slika 59. Aktivnost serin-proteaza i metaloproteinaza venoma poskoka nakon inhibicije sa PMSF ili EDTA, prikazana kao: (A) promena apsorbanci tokom enzimske reakcije; (B) koeficijent nagiba regresione prave

Inhibitor metaloproteinaza, EDTA, doveo je do inhibicije 80% proteazne aktivnosti venoma, dok je PMSF doveo do inhibicije 11,8% proteinazne aktivnosti venoma. Istovremena inkubacija

venoma sa oba inhibitora je skoro u potpunosti neutralisala ukupnu proteaznu aktivnost venoma (približno izjednačena sa azokazeinskom kontrolom bez venoma), što ukazuje da druge proteaze venoma nisu detektovane ovom metodom.

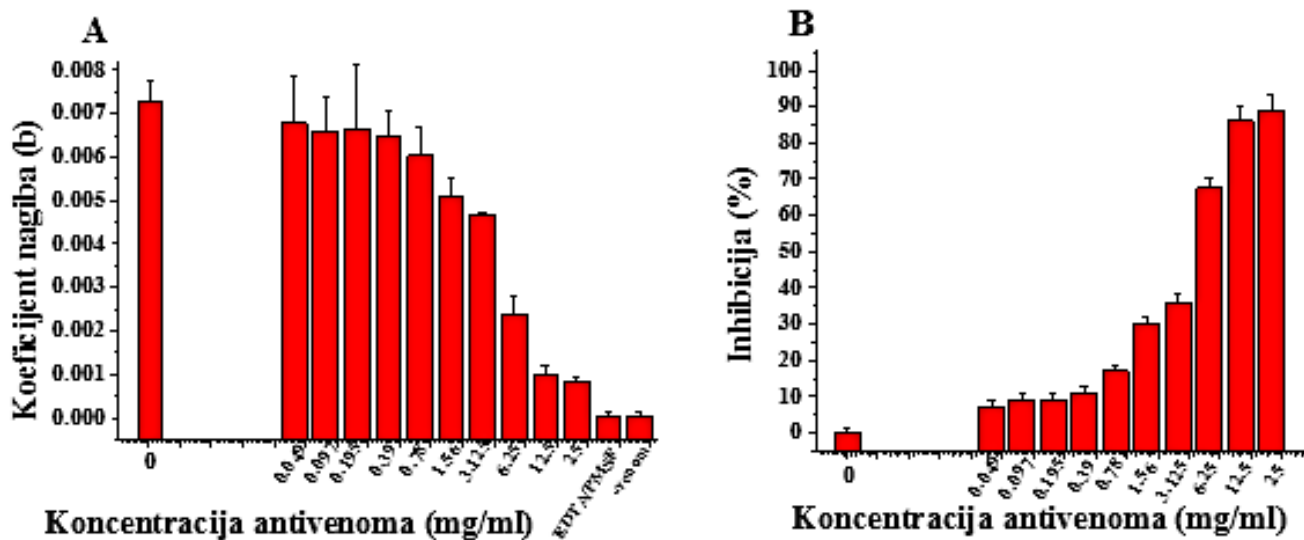
S obzirom na veoma slabu inhibiciju proteazne aktivnosti venoma PMSF postavilo se pitanje da li je izbor inhibitora opravdan. Zato je PMSF testiran u azokazeinskom testu sa tripsinom koji pripada serin-proteazama. Aktivnost tripsina je detektovana testom, a PMSF je u potpunosti neutralisao njegovo proteolitičko dejstva, na osnovu čega je zaključeno da je izbor inhibitora opravdan (slika 60).



Slika 60. Aktivnost tripsina u prisustvu i odsustvu inhibitora određena azokazeinskim testom

Rezultati neutralizacije aktivnosti serin-proteaze antivenomom prikazani su na slici 61.

Dokazano je da pri masenom odnosu venom:antivenom = 1:12,5 antivenom sa 89% neutrališe proteolitičku aktivnost venoma. Ovim se potvrđuje da u antivenomu postoje F(ab')₂ fragmenti koji specifično prepoznaju i serin-protaze i metaloproteaze venoma poskoka.

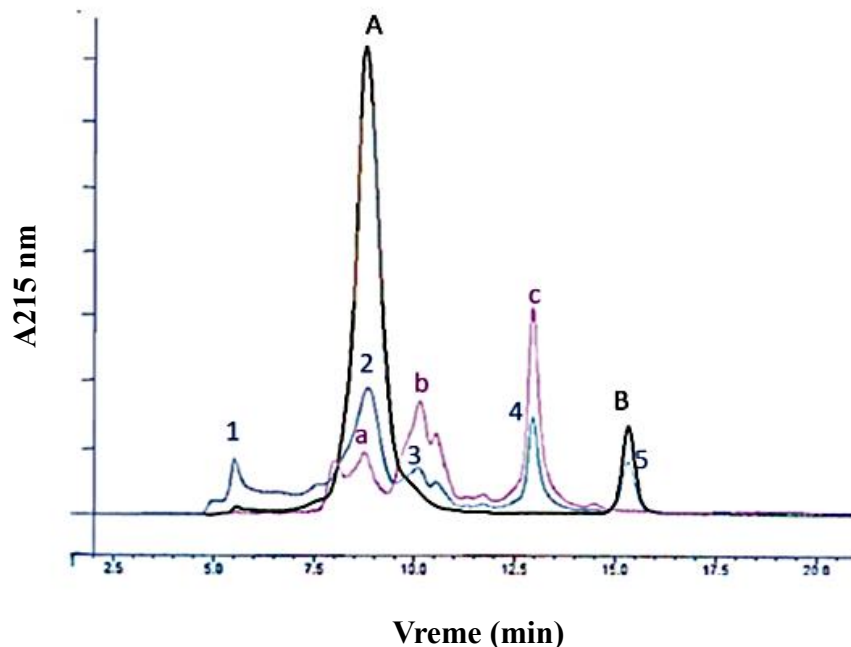


Slika 61. Neutralizacija aktivnosti proteaza venoma u prisustvu antivenoma, prikazana: (A) smanjenjem koeficijenta nagiba; (B) smanjenjem procenta inhibicije (izračunavan u odnosu na uzorak sa potpunom neutralizacijom, b=0 (100%) i uzorak bez antivenoma b=max (0%))

5.14. Imunološki testovi

5.14.1. Tečna hromatografija venoma i antivenoma (HPLC)

Hromatografija razdvajanja po veličini molekula (*Size Exclusion Chromatography – SEC*) razdvaja komponente iz smeše tako što se veći molekuli eluiraju brže sa kolone, dok se manji eluiraju sporije. Ovom metodom se mogu proceniti molekulske interakcije jer se formiranje većih agregata identifikuje kao pomeranje pika u elucionom profilu. Pokazalo se da je ova metoda naročito pogodna za praćenje interakcije antigen-antitelo koja se dešava u smeši venom-antivenom. U uzorku smeše venoma i antivenoma vidi se da smanjenjem pikova venoma (crveni dijagram) i antivenoma (crni dijagram) proporcionalno dolazi do povećanja pikova većih molekulskih masa koji pripadaju smeši venom/antivenom (plavi dijagram) (slika 62).



Slika 62. Hromatogram venoma (crveno), antivenoma (crno) i smeše venom/antivenom (plavo)

Procentualni udeli pojedinih frakcija venoma, antivenoma i smeše venom/antivenom prikazani su u tabeli 12.

Tabela 12. Procentualna zastupljenost pojedinih frakcija venoma poskoka, antivenoma i smeše venom/antivenom razdvojeni HPLC tehnikom

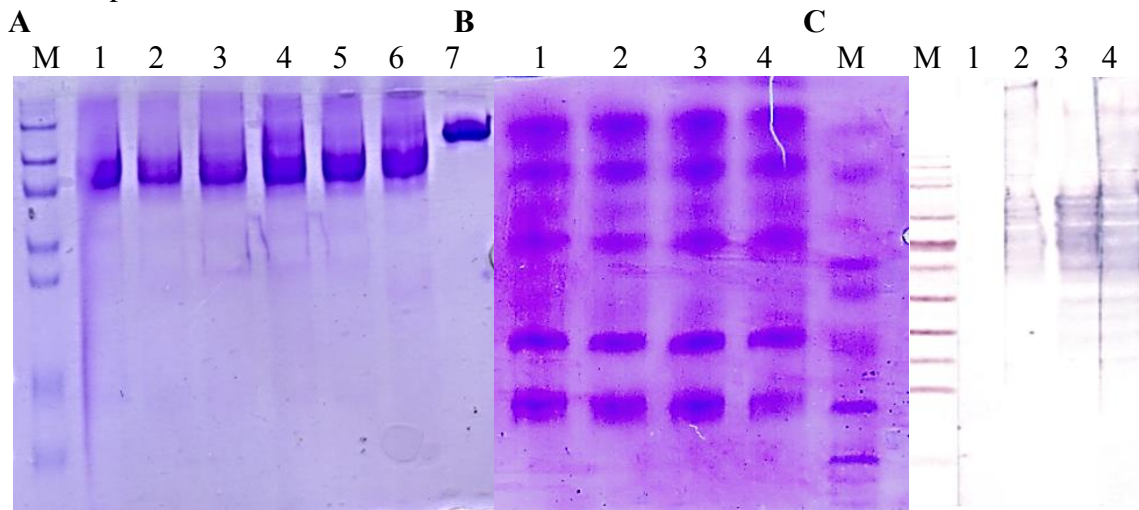
	Kompleks (%)	F(ab') ₂ (%)	Pikovi venoma (%)	V (%)	VI (Fab) (%)
Venom	/	20,6 (a)	54,5 (b)	28,3	/
Antivenom	/	90 (A)	/	/	10 (B)
Venom/Antivenom	17,7 (1)	48,7 (2)	20 (3)	5,7	3,3 (5)

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti sledeće: (1) procentualni sadržaj pojedinih komponenti venoma manjih molekulskih masa (b, c) su se smanjili u odnosu količinu istih komponenti u smeši venom/antivenom (3, 4); (2) oba eluciona maksimuma antivenoma, koga čine F(ab')₂ i Fab (A, B) su se takođe značajno smanjila u smeši venom/antivenom (2, 5); (3) u uzorku venom/antivenom postoje komponente većih molekulskih masa (sa leve strane) koje nisu prisutne ni u venomu ni u antivenomu, odnosno verovatno predstavljaju komplekse antigen/antitelo (komponenta venoma/(Fab')₂). Nedvosmisleno je dokazana reaktivnost antivenoma sa različitim komponentama venoma.

5.14.2. Elektroforetsko razdvajanje venoma i antivenoma (PAGE)

Elektroforetska razdvajanja pod nedenaturišćim uslovima uzoraka venoma i antivenoma, rađena su u cilju određivanja karakteristika venoma i antivenoma kao što su veličina proteina, čistoća, odsustvo degradacionih produkata i drugo.

Na 8% gelu u neredukujućim uslovima (nativna PAGE), naneti su uzorci antivenoma od 1 do 6. Nakon elektroforetskog razdvajanja i bojenja sa CBB (slika 63A), zapaža se prisustvo dominantne trake proteina čija molekulska masa odgovara veličini F(ab')₂ fragmenta imunoglobulina G, u nativnom stanju oko 110 kDa. Kontrolni nativni IgG T26 je odgovarajuće veličine, oko 150 kDa (uzorak 7), dok molekularni marker sadrži smešu proteina molekulskih masa od: 180, 116, 90, 58, i 48,5, 36,5 i 26,2 kDa. Na slici 63B prikazan je elektroforegram venoma i uočljive su trake najzastupljenijih proteina u rasponu od 200 do 25 kDa.



Slika 63. Neredukujuća PAGE antivenoma (8% gel), bojenje CBB: (A) M-marker; 1-6 različite serije antivenoma (Mr 110 kDa); 7- IgG (Mr 150 kDa); (B) 1-4 proteini venoma poskoka; M-marker; (C) Western blot nakon SDS-PAGE (12% gel), M-Marker; 1 → plazma neimunizovanog konja; 2-4 → različita razblaženja antivenoma

Nakon SDS-PAGE na 12% gelu, izvršen je transfer proteina na PVDF membranu Western blotom. Nakon hemijske reakcije antigen-antitelo, dokazano je prisustvo većeg broja proteinskih traka (slika 63C). Prema upotrebljenom markeru SM 0661, koga čine proteini Mr od 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20 i 15 kDa, detektovani proteini su pretežno veličine od 90 kDa do 30 kDa, mada se mogu primetiti i trake slabijeg intenziteta, većih molekulskih masa. Negativnu kontrolu je predstavljao uzorak plazme konja koji nije imunizovan venomom (uzorak 1C).

5.14.3. Validacija ELISA testa

U cilju kontrole prečišćenog antivenoma, tokom izrade ove disertacije ukazala se potreba za testom koji će omogućiti praćenje indukovano titra antitela koja neutrališu komponente venoma. Ovakvi kitovi ne postoje na tržištu, jer je veoma mali broj istraživača koji se bave ovom problematikom. Osim toga, ne postoji univerzalni ELISA test kojim bi se mogla detektovati antitela specifična za sve venome, već se za svaki specifičan par venom/antivenom mora pripremiti odgovarajući ELISA test.

Da bi se razvila tehnika ELISA testa, najpre je optimizovana količina (koncentracija) antigena koja je nanošena na dno bunarčića mikrotitarske ploče. Premala količina antigena daje slabiji signal, a prevelika količina do povećane heterogenosti signala. U procesu optimizacije ispitivani su najpovoljniji uslovi za saturaciju ploče, kao i uslovi ispiranja bunarčića koje se ponavljalo između svakog koraka.

Tokom optimizacije i razvijanja metode bio je uključen i poznati uzorak, koji je predstavljao interni standard i koji se koristio tokom određivanja svih karakteristika metode.

Proces validacije Elisa testa (tabela 13) rađen je prema smernicama EMA (*European Medical Agency, 2005*).

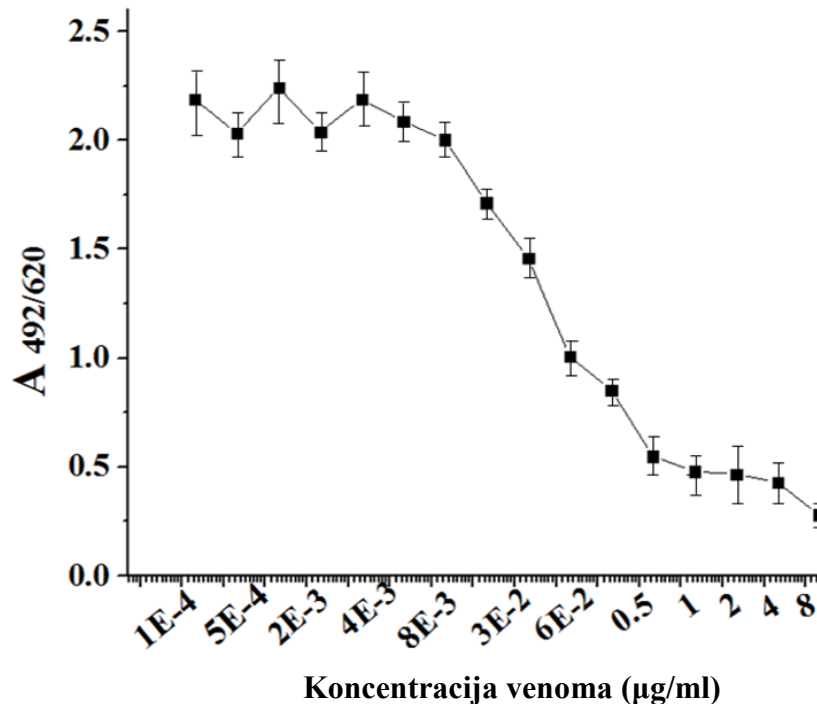
Tabela 13. Validacija ELISA testa za detekciju konjskih IgG specifičnih za komponente venoma

Validaciona karakteristika	Vrednost
Specifičnost	Visoka
Linearnost	1:1 000-1:250 000 razbl. stand. plazme
Opseg	1:3 000-1:105 000 razbl. stand. plazme
Tačnost	Visoka
Limit detekcije	0,02
Robusnost	Dobra
Preciznost	
Repetabilnost ($\leq 10\%$)	3,4%
Srednja preciznost ($\leq 10\%$)	3,4%
Reproducibilnost(10%-15%)	11,1 %

5.14.4. Inhibitorni ELISA test

Inhibitornim ELISA testom dokazana je specifičnost interakcije antigena vezanog za ploču sa antitelima iz plazme konja imunizovanih venomom poskoka.

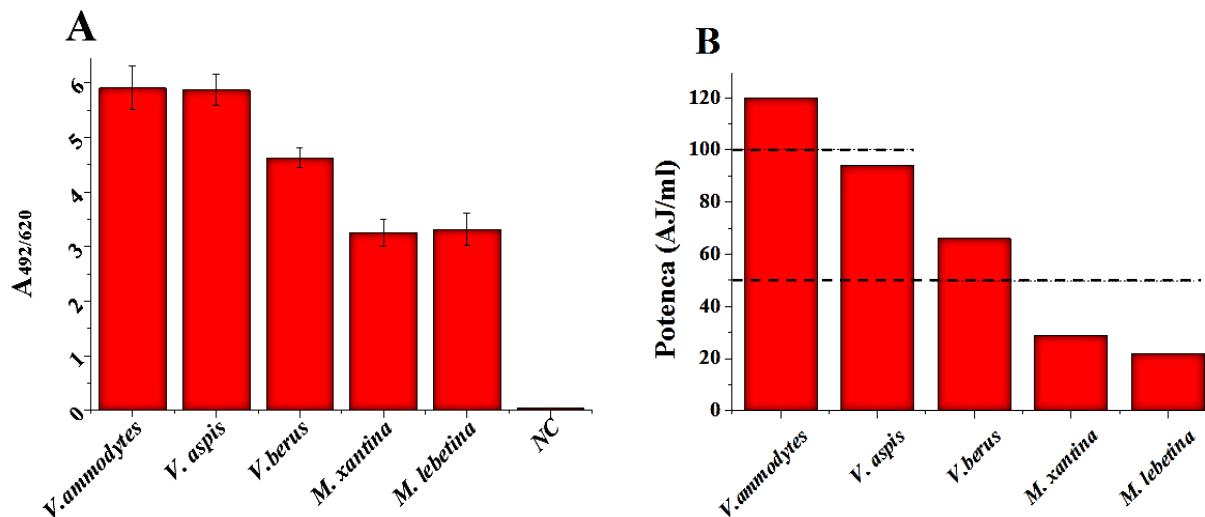
Rezultati inhibitornog ELISA testa ukazuju da F(ab')₂ fragmenti antivenoma specifično interaguju sa komponentama venoma na dozno zavistan način. Pokazano je da 1 µg venoma poskoka skoro u potpunosti inhibira vezivanje 2 µg antivenoma (slika 64).



Slika 64. Inhibicija vezivanja antivenoma pod dejstvom venoma

5.14.5. Ukrštena reaktivnost

S obzirom na to da su venomi zmija koje pripadaju istom rodu slični, imali smo za cilj da ispitamo da li antivenom proizveden za neutralisanje jednog venoma može efikasno prepoznati komponente drugog venoma srodne vrste zmija. Da bi utvrdili da li antivenom poskoka može da neutrališe venome drugih vrsta zmija, izvedeni su ELISA testovi potence (slika 65 i tabela 14).



Slika 65. Ukrštena reaktivnost antivenoma *Vaa* sa venomima drugih vrsta *Viperidae* u Evropi; Koncentracije svih venoma nanošenih na ploču su 2 µg/ml, a razblaženje antivenoma 0,026 AJ/ml (20 µg/ml) za svaki venom; **(A)** NC – negativna kontrola (plazma neimunizovanog konja); **(B)** Rezultati testa potence

(Isprekidane linije predstavljaju zahteve propisane Farmakopejom)

Tabela 14. Zahtevi potence po Farmakopeji i izmerene potence antivenoma

Vrsta	Zahtev (Ph. Eur. 11.0, 1/2023)	Potenca antivenoma
<i>V. ammodytes</i>	100	120
<i>V. aspis</i>	100	94
<i>V. berus</i>	50	66
<i>M. xantina</i>	50	29
<i>M. lebetina</i>	50	22

Dobijeni rezultati potvrđuju da F(ab')₂ fragmenti specifično prepoznaju imunogene venoma poskoka, kojim su konji imunizovani. Osim toga, dalji rezultati testa potence, kao i ELISA testa, pokazuju da antivenom prepoznaje i antigene venoma drugih otrovnica familije *Viperidae* koje nastanjuju Evropu. Antivenom neutrališe venom *V. berus* prema zahtevima Farmakopeje, a venom zapadnoevropske vipere *V. aspis*, neutrališe sa graničnom srednjom vrednošću zaštitne potence. Pokazano je i da antivenom ne reaguje u dovoljnoj meri sa venomima istočnoevropskih vipera, *Montivipera xantina* i *Macrovipera lebetina*.

6. DISKUSIJA

6.1. Lokalni efekti venoma i neutralizacija antivenomom

Svetska Zdravstvena Organizacija je izdala saopštenje u kome se nalazi preporuka da evaluacija antivenoma, osim podataka o sprečavanju letaliteta treba da sadrži i podatke o neutralizaciji ostalih patoloških efekata venoma. Za antivenome koji se primenjuju u terapiji ujeda *Viperidae*, naročito su bitna ispitivanja potence u pogledu neutralizacije lokalnih efekata venoma (*Gutierrez i sar., 1998*). Najčešća lokalna oštećenja tkiva uzrokovana zmijskim ujedom su edem, hemoragija i mionekroza. Patogeneza ovih promena je kompleksna jer je uzrokovana različitim komponentama prisutnim u venomu, kao što su hemoragične metaloproteinaze, LAAO i lektini C-tipa. Pored toga, na mestu lokalnog oštećenja tkiva može doći do razvoja sekundarnih bakterijskih infekcija, kao i pojave akutnog kompartment sindroma koji nastaje zbog povećanog pritiska ekstracelularne tečnosti u ograničenom prostoru i posledičnog poremećaja mikrocirkulacije i ishemije neuromišićnog tkiva.

Neutralizaciju lokalnih efekata primenom antivenoma je teško postići, jer razvoj patoloških promena započinjanje praktično odmah nakon ubrizgavanja venoma u tkivo žrtve. Nakon ujeda poskoka lokalna reakcija tkiva je izražena. Na mestu ujeda nastaju edem, hematomi i nekroza tkiva. Edem na mestu ujeda postaje vidljiv već nakon 15-tak minuta, a za 2 do 3 sata dostiže maksimum. Pored toga, brzo dolazi i do oštećenja kapilarnih krvnih sudova i lokalnog krvarenja, koje nastaje čak i ako je antivenom aplikovan odmah nakon ujeda, jer je potrebno vreme da antitela antivenoma dostignu odgovarajuću koncentraciju na mestu oštećenja tkiva. Zbog toga, svako odlaganje primene antivenoma dovodi u pitanje njegovu terapijsku efikasnost. Iz tog razloga, postoji potreba za terapijskim tretmanom lokalnog krvarenja odmah nakon ujeda zmije. Do sada se kao efikasan način terapije lokalnih efekata ujeda pokazala lokalna primena visokokoncentrovanog antivenoma (*Gutierrez i sar., 1985*). Regeneracija skeletnih mišića posle mionekroze uključuje aktivaciju, proliferaciju i fuziju miogenih ćelija i koordinisani inflamatorni odgovor koji obuhvata fagocitozu nekrotičnih ćelijskih debris i usklađenu sintezu citokina i faktora rasta. Kod venoma koji izazivaju miotoksičnost bez uticaja na krvne sudove, kao što su venomi elapidnih zmija, regeneracija se uspešno odvija. Nasuprot tome, venom zmija iz roda *Viperidae*, koji pored mišićnih vlakana, utiče i na krvne sudove i ekstracelularni matriks, regeneracija je u velikoj meri narušena, mišićna masa je smanjena i zamenjena fibroadipoznim tkivom (*Gutierrez i sar., 2018*).

Cilj naših istraživanja je bio da ispitamo efekte antivenoma na sprečavanju lokalnih efekata ujeda poskoka. Eksperimentalnim životinjama je aplikovana preinkubirana smeša venoma poskoka sa antivenomom, nakon čega su ispitivane potenca antivenoma u sprečavanju formiranja edema, kao i njegova antihemoragijska i antimiotoksična potenca.

U našim eksperimentima, antivenom neutrališe pojavu edema, hemoragije i miotoksičnost za više od 90% od efekata izazvanih venomom. Prema literaturnim podacima, najodgovorniji enzimi za indukovanje ovih lokalnih efekata su metaloproteinaze (*Boda i sar., 2018*).

Takođe, lokalni toksični efekti venoma su posledica aktivnosti PLA2, cink-zavisnih SVMPs i serin-proteaza. Venomske fosfolipaze, oštećuju sarkolemu skeletnih mišića što uzrokuje brz influks Ca^{+2} jona iz ekstraćelijske tečnosti i dovodi do intracelularnih degenerativnih procesa. Sa druge strane, hemoragične SVMPs venoma oštećuju zidove kapilara, usled čega dolazi do obilne ekstrasvazacije, povećanja intersticijalnog pritiska, a zatim i do ishemije neuromišićnog tkiva. Ovi procesi ubrzo dovode do "tačke bez povratka", tj. do nekroze mišićnog tkiva. U našim ispitivanjima, merenje neutralizacije aktivnosti metaloproteinaza izvedeno je azokazeinskim testom, koji je pokazao da antivenom uspešno neutrališe, preko 80% aktivnosti SVMP. Neutralizaciju PLA2 aktivnosti, antivenom postiže sa 50% efikasnosti, a aktivnost serin-proteaza antivenom skoro u potpunosti neutrališe. Rezultati neutralizacije toksičnih efekata enzimskih komponenti venoma su u skladu sa neutralizacionom potencijom lokalnih efekata antivenoma.

Na osnovu naših dobijenih rezultata o uticaju antivenoma na nastajanje edema, hemoragije i miotoksičnosti uzrokovanih venomom poskoka, zaključeno je da antivenom specifično prepoznaje i neutrališe komponente venoma koje su odgovorne za indukovanje navedenih lokalnih promena.

6.2. Eritroliza

Sposobnost venoma poskoka da indukuje eritrolizu ispitivana je na hranljivim podlogama sa ovčijim eritrocitima. Detektovane su dve vrste promena, smeđe obojenje podloge na koju je venom nanet ili providne zone. Ovakve promene su slične alfa- i beta-hemolizi koju na krvnoj podlozi izazivaju pojedini mikroorganizmi (The American Society for Microbiology, 2016). Alfa-hemoliza se definiše kao oksidacija hemoglobina eritrocita u methemoglobin. Do ove reakcije dolazi usled dejstva određenih enzima venoma, pri čemu nastaje vodonik-peroksid koji indukuje oksidativni stres u eritrocitima, a hemoglobin se delimično modifikuje. Agarozna podloga dobija zelenkastu ili smeđu boju, po čemu se prepoznaje alfa-hemoliza. Mikroskopskom analizom u našim ispitivanjima je pokazano da su membrane ovih eritrocita intaktne, na osnovu čega je zaključeno da se oštećenja mikroskopski ne uočavaju, ali da očigledno postoje. Za razliku od alfa-hemolize, kod beta-hemolize se membrana eritrocita i hemoglobin potpuno razlažu i podloga postaje jasno providna, bez obojenja. Iako ne postoje literaturni podaci o hemolizi na krvnim pločama koja je indukovana venomom poskoka, ova metoda se upotrebljavala za ispitivanje hemolize koju su indukovali venomi drugih zmija (*de Lima i sar., 1989*). Rezultati ovih autora ukazali su na neophodnost ispitivanja hemolize i na pločama, i u rastvoru (spektrofotometrijski). Jer neki venomi indukuju hemolizu na krvnim pločama, ali ne i u rastvoru, dok drugi venomi deluju obrnuto.

Antivenom je u našim ispitivanjima uspešno neutralisao nastanak svetlih zona, ali nije uspešno neutralisao promenu boje ploče. To dovodi do zaključka da do eritrolize dolazi pretežno usled aktivnosti komponente (ili više komponenti) venoma koju antivenom neutrališe, ali i manjim delom usled aktivnosti drugih učesnika u eritrolizi koje antivenom ne može neutralisati. Prema tome, jedan od zaključaka ovih eksperimenata bi bio da postoje eritrolitičke komponente u venomu koje nisu imunogene. Ipak, metoda ispitivanja eritrolize na krvnim pločama nije omogućila donošenje zaključaka o dinamici i stepenu indukovane eritrolize ili neutralizacionoj potenci antivenoma. Zato je primenjena metoda spektrofotometrijskog merenja eritrolize omogućila i kvantifikaciju rezultata.

Pošto membrana eritrocita predstavlja fosfolipidni dvosloj, eritroliza je dominantno posledica delovanja enzima PLA2 venoma. Međutim, treba imati u vidu da i neke druge komponente venoma mogu doprineti eritrolizi. PLA2 može eritrolizu indukovati direktno, narušavanjem fosfolipidnog dvosloja eritrocitne membrane i/ili indirektno, dejstvom zasićenih masnih kiselina kao proizvoda hidrolize PLA2 ćelijske membrane eritrocita (*Doltchinkova i sar., 2021*). U našim ispitivanjima je pokazano da do liziranja eritrocita ne dolazi u odsustvu masnih kiselina, na osnovu čega je zaključeno da su membrane eritrocita otporne na direktnu PLA2 aktivnost. Međutim, ako se tokom inkubiranja eritrocita sa venomom dodaju i masne kiseline, indirektnim putem suspenzija će lizirati u potpunosti eritrocitne membrane, što smo i dokazali u toku naših ispitivanja. Prema podacima iz literature (*Atanasov i sar., 2009*), koji su o ovoj temi malobrojni, zasićene masne kiseline destabilišu eritrocitnu membranu svojim hidrofobnim krajevima i membrana tada postaje izložena drugim komponentama venoma, a krajnji rezultat je liza eritrocitne membrane. Antivenom neutrališe 50% eritrolize izazvane venomom. Na osnovu ovih rezultata, može se zaključiti da je liziranje eritrocita skoro u potpunosti posledica aktivnosti PLA2 direktnim i indirektnim putem. Takođe smo dokazali da antivenom neutrališe 50% aktivnosti venomske PLA2, što ukazuje na postojanje i aktivnost bar još jedne fosfolipaze, za koju u konjskom serumu nije indukovana produkcija specifičnog antitela. Iz literature je poznato da u venomu poskoka postoji nekoliko fosfolipaza koje pripadaju amoditoksinima ili amoditinima (*Noetzel i sar. 2002*). Da bi dokazali koja fosfolipaza nije imunogena, potrebno je sprovesti kompletnu proteomiku venoma i antivenoma, što je predmet našeg daljeg ispitivanja.

6.3. Koagulotoksičnost

Koagulotoksičnost venoma poskoka u našim ispitivanjima, procenjavana je na osnovu minimalne koagulišuće doze merene u plazmi (MCD-P) i fibrinogenu (MCD-F) i minimalne defibrinogenišuće doze (MDD). Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima (*Gutierrez i sar., 2017*). Do koagulacije nije dolazilo kada je venomski supstrat bio fibrinogen. Ipak, venom je aktivirao koagulacione faktore u plazmi koji dovode do aktivacije trombina i potom nastajanje koaguluma. Antivenom je skoro u potpunosti neutralisao stvaranje koaguluma u testu sa plazmom. Prokoagulantno dejstvo venoma u najvećem broju slučajeva dovodi do koagulopatije u *in vivo* sistemu. Venomi veoma malog broja zmija izazivaju stvaranje koaguluma *in vivo*, a u Evropi venomi ni jedne vrste zmija. Da bi ovo potvrdili, ispitivali smo minimalnu defibrinogenišuću dozu venoma na miševima. Međutim, ovu dozu nije bilo moguće definisati, jer su miševi uginjavali pre nastanka koagulopatije. Na osnovu ovih eksperimenata jasan je zaključak da miševi nisu osetljivi ili su znatno manje osetljivi na hemotoksično dejstvo venoma poskoka u odnosu na njegovo neurotoksično dejstvo. Venomi koji izazivaju koagulaciju *in vitro*, dovode do defibrinogenacije *in vivo*. Za određivanje MDD i potom anti-defibrinogenišućeg potencijala antivenoma potrebno je umesto miševa koristiti drugi animalni model, koji je manje osetljiv na neurotoksično dejstvo venoma.

Kada se koristi plazma, MCD-P test detektuje nekoliko tipova prokoagulanata, kao što su trombinu slični enzimi, aktivatori faktora X i protrombin. Venomom indukovana koagulopatija rezultat je aktivacije puta koagulacije prokoagulantnim toksinima venoma. U odnosu na deo puta koagulacije na koje utiču, toksini venoma su klasifikovani kao aktivatori faktora V, aktivatori faktora X, aktivatori protrombina, trombinu sličnih enzima ili fibrinogenaze. Izraženost, trajanje i tip koagulopatije zavisi od tipa prokoagulantnog toksina venoma. Kada se koristi rastvor fibrinogena, test detektuje samo trombinu slične enzime. Iz literature je poznato da je venom *V. ammodytes* potentni prokoagulantni (aktivator faktora X) venom, u poređenju sa drugim viperidama, pri čemu je za aktivaciju ovog faktora odgovorna metaloproteinaza P-IIIId SVMP (*Chowdhury i sar., 2021*). Osim nje, u *V. ammodytes* venomu postoje i druge prokoagulantne komponente, kao što je SVSP VaaSP-VX. Ovaj enzim je poseban po tome što istovremeno može da aktivira faktore V i X (*Latinovic i sar., 2020*). Enzim kao što je SVSP VaF1, ima antifibrinogenolitičku aktivnost (*Leonardi i sar., 2015*). VafXA-I i VafXA-II su takođe prokoagulantne komponente venoma (*Leonardi i sar., 2008*). Prokoagulantno dejstvo komponenti venoma poskoka može se odrediti samo nakon dodatnih analiza, kao što su: 2D analize venoma, hromatografsko prečišćavanje i određivanje pro- ili antikoagulantne aktivnosti prečišćenih frakcija. Mora se imati u vidu da ispitivanje aktivnosti izolovane komponente ne može objektivno da prikaže efekat koji ona ostvaruje u smeši sa ostalim venomskim komponentama, koje čak i ne moraju biti toksične (*Ainsworth i sar., 2018*).

6.4. Citotoksičnost

S obzirom da nakon ujeda poskoka nastaje izražena lokalna reakcija tkiva, za *in vitro* procenu toksičnosti venoma ispitivan je citotoksični efekat na Vero ćelijskim linijama. Za ispitivanje citotoksičnosti primenjivali smo standardne metode bojenja kao što su: MTT, bojenje kristal-violetom, bojenje tripan-plavim i propidijum-jodidom Vero ćelija nakon inkubacije sa venomom poskoka.

Navedene metode se zasnivaju na sledećim principima: (1) MTT test je kolorimetrijski test koji detektuje redukciju MTT boje enzimima Krebsovog ciklusa u živim ćelijama; (2) Iako kristal-violet boja boji sve strukture živih i mrtvih ćelija, razlikovanje je moguće jer žive Vero ćelije adheriraju za podlogu a nakon smrti gube kontakt sa podlogom na kojoj se gaje. Kako se nakon inkubacije sa venomom ćelije ispiraju, kristal-violet boja može obojiti samo preživle adherentne ćelije; (3) Tripan-plavo boji citoplazmu, ali ne i ćelijsku membranu. Prema tome, samo ukoliko je došlo do narušavanja integriteta ćelijske membrane boja može da difunduje u unutrašnjost i oboji ćeliju; (4) Propidijum-jodid

je boja koja se interkalira između zavoja nukleinskog materijala, sa kojim može da reaguje samo ukoliko je ćelijska membrana narušena, odnosno ukoliko je došlo do smrti ćelije.

Primenom MTT testa došli smo do zaključka da sam venom reaguje sa MTT-bojom i daje lažno pozitivnu reakciju. Da bi smo uklonili ovaj uticaj venoma, modifikovali smo upotrebljeni test. Potpuno ispiranje ćelija nakon indukcije sa venomom bilo je moguće postići jedino ukoliko se venom inkubirao sa suspenzijom ćelija, umesto da je nanošen u bunarčice sa adherentnim ćelijama. Nakon ovog tretmana ćelije su vraćene u mikrotitarsku ploču, a bojenje je izvedeno nakon 48 sati. Ovakva modifikacija metode omogućila je da se dobije pouzdani rezultat citotoksičnog dejstva venoma. Postupak inkubiranja ćelijske kulture sa venomom je ponovljen i pri bojenju sa kristal-violetom.

Vrednosti IC_{50} definisane kao polovina inhibitorne koncentracije venoma koja maksimalno smanjuje broj živih ćelija bio je približno isti kod tri navedene metode (62,5; 55 i 66 $\mu\text{g/ml}$ za MTT, CV, TB), izuzev bojenja PI gde je vrednost IC_{50} iznosila je 87 $\mu\text{g/ml}$.

Iako se navedenim metodama detektuju bliske vrednosti IC_{50} , svaka od metoda ima svoje prednosti. Prednost metode bojenja tripan-plavim je da se jedino njom može prebrojati apsolutni broj ćelija nakon ekspozicije venomu i poređenjem sa negativnom kontrolom (100% živih ćelija) dobije uvid u broj ćelija koje su pod dejstvom venoma degradirane. Ovom metodom se precizno određuje broj mrtvih ćelija. Pri koncentracijama venoma većim od 30 $\mu\text{g/ml}$, enzimi venoma značajno redukuju broj mrtvih ćelija jer ih u potpunosti degradiraju. Citotoksičnost komponenti venoma se zasniva na njihovoj sposobnosti da se vežu za ćelijsku membranu i uzrokuju promene u organizaciji i funkciji lipidnog dvosloja, što neretko dovodi do smrti ćelija (*Gasarov i sar., 2014*). Činjenica da se ćelije dezintegrišu tokom inkubacije sa venomom ili smešom venoma i antivenoma ne sme se zanemariti, jer ukupni broj ćelija u testu čine mrtve, žive i dezintegrisane ćelije. Dezintegracijom se redukuje ukupni broj ćelija, pa se broj živih ćelija može pogrešno proceniti kao povećan. U tom slučaju će potencia protektivnog dejstva antivenoma biti precenjena. Prema tome, primena TB metode je neophodna da bi se odredila minimalna koncentracija venoma koja dovodi do degradacije ćelija, što je u našem ispitivanju koncentracija od 4 $\mu\text{g/ml}$. Najjednostavnija metoda određivanja citotoksičnosti venoma je bojenje sa PI, kojom se uspešno analizira veliki broj uzoraka za kratak vremenski period.

Navedene metode su korišćene i za određivanje anticitotoksične potence antivenoma. Određene krive vijabilnosti imaju karakterističan s-oblik koji reflektuje reaktivnost rastućih koncentracija antitela sa konstantnom količinom antigena odnosno komponentama venoma. Linearni deo krive predstavlja opseg u kome je aktivnost slobodnog venoma, koji nije neutralisan antivenomom, jasno vidljiv i u kome su vrednosti EC_{50} određene: 0,01 AJ/ml, 0,3 AJ/ml, 4 AJ/ml i 0,08 AJ/ml pomoću MTT, CV, TB i PI metode, navedenim redosledom. Sve metode su pokazale da antivenom skoro u potpunosti neutrališe citotoksičnost venoma, ali su se izmerene vrednosti ED_{50} značajno razlikovale. Ovo se može objasniti činjenicom da se sve četiri metode zasnivaju na različitim principima merenja, odnosno detekciji različitih ćelijskih komponenti: MTT na aktivnosti redukcionih enzima, CV na adherenciji za podlogu, TB na propustljivosti ćelijske membrane i PI na vezivanju za nukleotidni material. S druge strane, antivenom sa različitom efikasnošću neutrališe komponente venoma koje deluju na ove strukture ćelija, verovatno zato što venomske komponente nisu podjednako imunogene ili dovoljno zastupljene.

Citotoksičnost venoma ispitivana je i na humanim perifernim leukocitima (HPL) i ustanovljeno je da su u poređenju sa Vero ćelijama, HPL osetljivije. Daljom analizom pokazano je da su i subpopulacije leukocita različito osetljive na venom poskoka i da su najosetljiviji granulociti (slika 28). Ovakav nalaz predstavlja predmet naših budućih istraživanja.

Ispitivanjem citotoksičnosti ustanovljeno je da venom poskoka degradira Vero ćelije i humane periferne leukocite na dozno zavistan način (od 0 do 100%). Osim direktne degradacije koja dovodi do nekroze, venom indukuje i programiranu ćelijsku smrt. Antivenom skoro u potpunosti neutrališe citotoksično dejstvo venoma (nekrozu i apoptozu), ali tumačenje rezultata zavisi od izabrane metode i

tipa ćelija koje se koriste za ispitivanje. Da bi se anticitotoksična potenca antivenoma mogla i kvantifikovati, potrebna su dalja ispitivanja.

Osnovni mehanizmi citotoksičnog dejstva venoma su indukcija apoptoze, zaustavljanje ćelijskog ciklusa i supresija proliferacije, a enzimi kao glavne komponente venoma PLA2 i LAAO odgovorni za navedene procese (Hiu i Yap, 2020). PLA2, delujući na fosfolipide ćelijske membrane menja fluidnost membrane, što dovodi do njene povećane permeabilnosti i na kraju smrti ćelije. Enzim LAAO tokom aktivnosti oslobađa H₂O₂ koji se akumulira kao ROS i uzrokuje oštećenje ćelijskih membrana. Iako su ove dve komponente venoma najvažniji uzročnici ćelijske smrti, nisu jedini.

Osim na eukariotske, pokazano je da venom deluje i na prokariotske ćelije, odnosno ispoljava baktericidno dejstvo na Gram + i Gram – bakterije. Baktericidni efekta venoma potiče od aktivnosti PLA2, LAAO i malih antimikrobnih peptida. PLA2 deluje na bakterije tako što menja strukturu ćelijske membrane i dovodi do liziranja bakterija. Antimikrobni peptidi imaju antimikrobnu aktivnost širokog spektra jer deluju na membranu i bitne metaboličke procese. Iako je baktericidno dejstvo venoma posledica prisustva više enzima, peptida i drugih komponenti, naši rezultati pokazuju da poliklonski antivenom sadrži antitela koja uspešno neutrališu njihovu aktivnost.

6.5. Aktivnost enzima venoma

Jedini *in vitro* testovi koji bi mogli zameniti test potence kojim se meri neutralizacija letaliteta na miševima su enzimski testovi. Oni se mogu primeniti jedino ako se meri neutralizacija enzima koji dominantno doprinose ukupnom efektu venoma. To je donekle slučaj sa antivenomima kojima se leče ujedri zmija porodice *Elapidae*, jer je PLA2 njihovog venoma najodgovorniji za letalitet. U ostalim slučajevima, rezultati testova pojedinih enzima ne mogu se direktno povezati sa biološkim efektima koje venom uzrokuje. Za to bi bilo potrebno izolovati svaku pojedinu komponentu venoma i potom izvesti enzimске i biološke testove sa punim venomom i izlovanim frakcijama venoma. Čak i tada bi rezultati bili pod znakom pitanja, jer aktivnost venoma nije prosti zbir aktivnosti svake pojedine komponente, već efekat njihovog sinergističkog dejstva.

Opšte je prihvaćeno da je određena vrsta enzimске aktivnosti venoma posledica više od jedne proteinske komponente. Ipak, za procenu potence antivenoma *Viperidae* bi se mogla upotrebiti evaluacija anti-LAAO, anti-PLA2 i antiproteinazni potencijal antivenoma, jer su LAAO, PLA2 i proteinazna aktivnost, glavne toksične komponente venoma.

U našim ispitivanjima određivali smo aktivnost ovih enzima venoma i potencu antivenoma, kao i njihovu korelaciju.

6.5.1. LAAO

LAAO test meri aktivnost LAAO na osnovu količine peroksida oslobođenog tokom LAAO reakcije sa supstratom (Sakurai et al., 2001). U MTT testu, formazanski kristali su se formirali u reakciji LAAO sa MTT, verovatno sličnom reakcijom kao što je redukcija tetrazolijumske boje sa NAD(P)H-zavisnom ćelijskom oksidoreduktazom. Mada smo dokazali sličnu osetljivost ova dva testa, tačan mehanizam kojim LAAO redukuje MTT treba utvrditi.

Potenca antivenoma je posledica sposobnosti antitela da neutrališu aktivnosti određenih enzima koji su deo venoma, uključujući i LAAO enzimsku aktivnost. Postoji bar pet LAAO izoformi u venomu poskoka (Georgieva et al., 2008; Leonardi et al., 2019) i svaka izoforma ima epitope koji mogu biti isti ili različiti. Tokom imunskog odgovora, epitopi generišu populaciju specifičnih antitela, od kojih neki inhibiraju enzimsku aktivnost. Literaturni podaci (Capitanescu et al., 2016) govore da postoje najmanje dve populacije antitela koje neutrališu LAAO enzimatsku aktivnost. Prema našim rezultatima u antivenomu postoji antitelo/antitela koja neutrališu deo LAAO aktivnosti venoma poskoka, ali ne i ukupnu LAAO aktivnost. To znači da neki epitopi esencijalni za funkcionisanje

katalitičkog centra (nekih ili svih izoformi) nisu uključeni u imunski odgovor za vreme imunizacije venomom. Istovremeno, ovaj nalaz ne meri postojanje drugih LAAO specifičnih antitela, koji nisu uključeni u inhibiciju enzimske aktivnosti, ali mogu doprineti bržoj eliminaciji enzima iz organizma.

6.5.2. Proteaze

Naši rezultati analize aktivnosti proteaza venoma su u saglasnosti sa literaturturnim podacima (*Kurtovic i sar., 2012; Leonardi i sar., 2019*). Rezultati dobijeni u našim istraživanjima ukazuju da u ukupnoj proteolitičkoj degradaciji supstrata dominantnu ulogu imaju metaloproteinaze (80%), što je u skladu sa izraženim hemoragičnim dejstvom venoma *Vaa* (*Kurtovic i sar., 2012*). Istovremena inkubacija venoma sa oba inhibitora je skoro u potpunosti neutralisala ukupnu proteaznu aktivnost venoma, što navodi na zaključak da druge (aktivne) proteaze venoma nisu detektovane ovom metodom. Sa druge strane, kako je ukupna zastupljenost serin-proteaza u venomu veća od zastupljenosti metaloproteinaza (slika 2), bilo je očekivano da se detektuje veća aktivnost serin-proteaza od zabeležene, tačnije veća ili makar jednaka aktivnosti metaloproteinaza. Nedostatak ove aktivnosti može se objasniti postojanjem endogenih venomskih inhibitora Kunitz-tipa proteina (*Zuliani i sar., 2009; Harvey i sar., 2014; Yang i sar., 2014*), koji inhibiraju serin-proteaze. Kako aktivnost serin-proteaza ima prokoagulantni efekat, ovi inhibitori ometaju indukciju koagulacije i omogućavaju brže širenje venoma kroz organizam žrtve.

S obzirom na veoma slabu inhibiciju proteazne aktivnosti venoma PMSF-om, postavilo se pitanje da li je izbor PMSF-a kao inhibitora opravdan. Zato je PMSF testiran u azokazeinskom testu sa tripsinom, koji pripada serin-proteazama. Aktivnost tripsina je detektovana testom, a PMSF je u potpunosti neutralisao njegovo proteolitičko dejstvo, na osnovu čega je zaključeno da je izbor inhibitora opravdan.

Iako se test sa azokazeinom često upotrebljava za evaluaciju venomskih proteaza, on ne mora biti pogodan za sve tipove ovih enzima koje se nalaze u venomu. *Leonardi i autori (2019)* detektovali su veći broj serin-proteaza venoma *Vaa* i pokazali da, iako su slične molekulske mase (25-29 kDa), njihove pI vrednosti značajno se razlikuju (4,6-9,1). Zbog toga je vrlo moguće da u neutralnim uslovima testa sa azokazeinom, ne bi mogla da bude detektovana enzimska aktivnost onih serin-proteaza sa pI manjim ili većim od 7. Osim toga, pokazano je da postoji određen broj serin-proteaza koji nemaju proteolitičku aktivnost, ali inhibiraju koagulaciju delujući kao antagonisti faktora IXa (*Leonardi i sar., 2019*). Sve druge proteaze koje hidrolizuju fibrinogen aktiviraju i faktore IX i X, ali ne i protrombin (*Sajevic i sar., 2011; Leonardi i sar., 2019*).

U našim ispitivanjima, antivenom neutrališe 89% ukupne proteolitičke aktivnosti venoma poskoka, na osnovu čega je izveden zaključak da neutrališe i serin-proteaze i metaloproteinaze. To su serin-proteinaza *Vasp1* koja deluje prokoagulantno, tako što degradira faktor X, protrombin, fibrin(ogen)aze i plasminogen; *VaH3* koja raskida protein bazalne membrane i ekstracelularnog matriksa (kolagen IV, fibronektin, nidogen) što izaziva hemoragiju, a takođe hidrolizuje plazma proteine koagulacione kaskade, ne aktivirajući ih; *VaSP1* poseduje antikoagulantne osobine na šta ukazuju produžena pT i pTT vremena. Metaloproteinaze, sa svoje strane doprinose hemotoksičnosti, jer deluju kao hemoragini, aktivatori faktora X, fibrinolitički i fibrinogenolitički (tabela 2). Ovi enzimi su i glavni nosioci hemotoksičnosti, koja je dominantan efekat venoma poskoka nakon ujeda čoveka. Zato je veoma važno da antivenom poseduje visoku potencu neutralizacije ovih proteinaza.

6.5.3. PLA2

Rezultati *in vitro* određivanja aktivnosti venomske PLA2, kao i rezultati koji dokazuju uspešnu neutralizaciju enzimskog dejstva antivenomom, od izuzetnog su značaja za toksinologiju. Komponenta venoma PLA2 je ključna za neurotoksičnost i pored toga za eritrolizu, citotoksičnost i miotoksičnost

venoma. U našim ispitivanjima, dokazana je visoka potentnost antivenoma da neutrališe efekte PLA2 venoma, kao što su neurotoksičnost, eritroliza i citotoksičnost (*Stoyanova i sar. 2012*).

Kao što je pokazano za većinu venomskih enzima i za PLA2 je pokazano da postoji više različitih izoformi. S obzirom da je neutralizacija PLA antivenomom visoka, može se pretpostaviti da su sve izoforme ovog enzima imunogene (uprkos graničnoj veličini proteinskog molekula za dobar imunogen) ili da nisu sve PLA2 aktivne (toksične). Antivenom je efikasan u neutralisanju enzimske i biološke aktivnosti PLA2.

6.6. Neurotoksičnost

Venomi Evropskih *Viperidae* mogu izazvati značajne sistemske toksične efekte, od kojih neurotoksičnost i koagulopatije životno ugrožavaju žrtvu ujeda. Ova dva sistemska toksična efekta obično su znatno više izražena nakon ujeda *Elapidae* u poređenju sa ujedima *Viperidae* (*Warrell, 2005*). I pored toga što se u više Evropskih zemalja proizvode antivenomi protiv *Vipera spp.*, postoji veoma malo pretkliničkih komparabilnih podataka, kao i randomizovanih kontrolisanih studija koje procenjuju efikasnost antivenoma protiv različitih vrsta *Viperidae* (*Lamb i sar., 2017*). Iako ne postoji standardizovani protokol terapije ujeda zmija otrovnica, parenteralna primena antivenoma predstavlja specifični i najvažniji oblik terapije ujeda zmije. Preovlađuju mišljenja da je terapijska efikasnost antivenoma manja nakon intramuskularne aplikacije i da se treba opredeliti za intravensku aplikaciju u cilju postizanja veće terapijske efikasnosti antivenoma. Studije su pokazale da neutralizacija komponenti venoma ne samo u sistemskoj cirkulaciji, već i u limfnom sistemu, može biti od velikog značaja za klinički ishod, jer predstavlja još jedan relevantan telesni kompartment kroz koji se vrši apsorpcija komponenti venoma (*Gamulin i sar., 2023*).

Efikasnost antivenoma, odnosno njegova neutralizaciona potencia, pre svega se zasniva na specifičnosti i koncentraciji antitela. Međutim pored toga, efikasnost antivenoma značajno zavisi i od postizanja pravovremene i dovoljne koncentracije u tkivnim kompartmanima, u kojima se nalaze target mesta za venom. Sastav antivenoma se zasniva ili na celim IgG molekulima ili na njihovim antigen-vezujućim domenima u obliku F(ab')₂ i Fab fragmenata (*Gutiérrez i sar., 2003*). Shodno tome, navedeni molekuli zbog različite molekulske mase pokazuju različite farmakokinetičke osobine. Sposobnost IgG da ostvare uspešnu detoksikaciju, zasniva se na njihovoj sposobnosti da se dovoljno brzo i u visokoj koncentraciji nađu u zajedničkom distributivnom prostoru sa komponentama venoma. Za ishod terapije bi bilo optimalno da se reakcija vezivanja venom-antivenom ostvari još tokom distribucije, odnosno pre dospevanja komponenti venoma do mesta delovanja, jer se nakon pojave simptoma trovanja očekuje smanjena efikasnost antivenoma (*Nikapitiya i Maduwage, 2017*).

Farmakokinetička svojstva antivenoma zasnovanih na IgG, F(ab')₂ i Fab fragmentima, nisu uvek kompatibilna sa komponentama venoma, a ponekad postoji i velika neusklađenost u njihovoj farmakokinetici. Zbog toga izbor optimalne terapije ujeda zmije otrovnice zahteva tačnu procenu toksikokinetike venoma i farmakokinetike antivenoma, kako bi se ustanovila adekvatna terapijska doza i način aplikacije (*Krifi i sar., 1999*).

Ispitivanja su pokazala da Fab antivenomi imaju znatno veći volumen distribucije u poređenju sa onima koji se sastoje od fragmenata F(ab')₂ ili IgG. Ovo je posledica niske molekulske mase Fab fragmenata, koja im omogućava da lako dospeju u ekstravaskularni prostor, gde vežu komponente venoma. Iz istog razloga dolazi i do bržeg pada njihove koncentracije u krvi, uglavnom preko bubrežne filtracije, sa poluvremem eliminacije koje iznosi svega 4 do 24 h. Fragmenti F(ab')₂ i IgG se zbog svoje veće molekulske mase duže zadržavaju u cirkulaciji i imaju produženo poluvreme eliminacije koje se kreće između 2 i 4 dana (*Ho i sar., 1990*). Pored toga, oni poseduju dva mesta vezivanja antigena u poređenju sa monovalentnim Fab fragmentima, što im omogućava da sa komponentama venoma formiraju velike i stabilne imunokomplekse, koji se dominantno eliminišu fagocitnim ćelijama u

retikuloendotelnom sistemu. Zbog navedenih različitih farmakokinetičkih karakteristika, optimalni tretman ujeda zmija otrovnica zahteva najprikladniji “format” antivenoma. Fab antivenomi se smatraju pogodnijim za venome *Elapidae*, koji su bogati toksinima niske molekulske mase, dok formulacije F(ab')₂ i IgG pokazuju svojstva koja su efikasnija u neutralizaciji većih molekula karakterističnih za *Viperidae* (Gutiérrez i sar., 2003).

U pogledu odabira načina aplikacije antivenoma, intravenska aplikacija se smatra najadekvatnijom i preporučuje se kad god je to moguće. Može se izvesti infuzijom ili sporom intravenskom injekcijom, pri čemu je ova druga efikasnija i jeftinija, a takođe omogućava i hitan prekid aplikacije ukoliko dođe do pojave neželjenih reakcija (Pugh i Theakston, 1987).

Neuromišićna paraliza usled toksičnog dejstva venomom, karakteristična je za zmijske iz familije *Elapidae*: krait (rod *Bungarus*), kobre (rod *Naja* i *Ophiophagus*), koralne zmijske (rod *Calliophis* i *Micrurus*), tajpani (rod *Okiauranus*), tigrasta zmija (rod *Notechis*), smrtonosna zmija (rod *Acanthophis*). Mišićna paraliza izazvana venomima ovih zmijski, dovodi do progresivne paralize respiratornih mišića i zahteva brzu primenu mehaničke ventilacije.

Primarna target mesta za delovanje neurotoksina zmijskog venoma je neuromišićna sinapsa skeletnih mišića, odnosno njene strukture: presinaptički nervni završetak i postsinaptički nAChR na motornoj ploči. Ovo dokazuju klinička zapažanja da neurotoksično delovanje venoma gotovo isključivo dovodi do flacidne paralize, koja je posledica blokade neurotransmisije na neuromišićnoj sinapsi (Barber i sar., 2013; Silva i sar., 2017).

U zavisnosti od intenziteta trovanja (količine ubrizganog venoma), sastava venoma i vremena proteklog do primene terapije, neuromišićna paraliza može da varira od blage ili umerene forme, do forme opasne po život. U kliničkoj slici protiče kao klasična descendentna paraliza koja u početku zahvata mišiće očnih kapaka (bilateralna ptoza), obično za nekoliko sati od ujeda. Zatim slede oftalmoplegija i diplopija, slabost facijalne muskulature sa nerazgovetnim govorom kod ljudi i poteškoćama u otvaranju usta (Silva i sar., 2016; Malina i sar., 2011). Paraliza se zatim spušta na mišiće vrata i farinksa, usled čega nastaju teškoće pri gutanju, a ugrožena je i zaštita respiratornih puteva, što je potencijalno opasno po život zbog rizika od aspiracije. Neuromišićna paraliza zatim zahvata respiratornu muskulaturu: dijafragmu i interkostalne mišiće, što dovodi do hipoventilacije i zahteva urgentnu mehaničku plućnu ventilaciju. Kod izrazito teških oblika neurotoksičnog delovanja venoma, neuromišićna paraliza na kraju zahvata i mišiće ekstremiteta. Oporavak neuromišićne funkcije obično sledi obrnutim redosledom od redosleda zahvatanja mišića, pri čemu su ptoza i oftalmoplegija neurološki znaci koji poslednji nestaju. Ova descendentna paraliza i ascendentni oporavak mišića nisu vezani za svojstva neurotoksina zmijske, već potiču od veličine mišića i jedinstvene fiziologije mišića i motornih neurona, odnosno neuromišićne sinapse (Pillai i sar., 2012). Centralni neurološki efekti se retko javljaju kod trovanja zmijskim venomima, a skoro uvek su posledica indirektnih efekata venoma u centralnom nervnom sistemu (krvarenja, tromboze) (Narang i sar., 2009).

Neuromišićna sinapsa je specijalizovana sinapsa između motornog nerva i vlakana skeletnih mišića i služi kao završno kontrolno mesto u neurotransmisiji. Neurotransmiter acetilholin (ACh) se nalazi u vezikulama, unutar presinaptičkog nervnog završetka motornog neurona. Depolarizacija nervnog završetka, otvara voltažno-zavisne Ca²⁺ jonske kanale, što rezultira influskom jona Ca²⁺ u terminalni deo motornog neurona. Ovo pokreće fuziju vezikula ACh sa neurolemom i oslobađanje ACh u sinaptičku pukotinu procesom egzocitoze. nAChR je pentamerni transmembranski protein, koji funkcioniše kao ligand-zavisni Na⁺ jonski kanal. Vezivanje dva molekula ACh za dva vezivna mesta na nAChR dovodi do konformacione promene koja rezultira otvaranjem Na⁺ jonskog kanala i influskom Na⁺, te posledičnom depolarizacijom postsinaptičke membrane i pokretanja procesa kontrakcije mišićnih vlakana (Albuquerque i sar., 2009; Nirathanan i Gwee, 2004). Neurotoksini zmijskih venoma mogu poremetiti proces neurotransmisije presinaptički i/ili postsinaptički. Zmijski neurotoksini čiji je target nervni završetak motornog neurona (presinaptičko dejstvo), deluju tako što sprečavaju

oslobađanje neurotransmitera ACh, dok neurotoksini koji deluju na nAChR na motornoj ploči (postsinaptičko dejstvo), efekat ostvaruju kao antagonisti ovog receptora. U pogledu zastupljenosti presinaptičkih i postsinaptičkih neurotoksina, venomi zmiya mogu da sadrže njihovu kombinaciju, kao i da posebno budu prisutni samo presinaptički ili samo postsinaptički neurotoksini. Primenom proteomike, u novije vreme su identifikovani mnogi potencijalni neurotoksini u zmijskim venomima. Međutim i pored toga, samo mali deo ovih toksina je izolovan i funkcionalno okarakterisan.

Neurotoksini koji deluju presinaptički, izolovani su iz mnogih zmiya koji pripadaju familiji *Elapidae*, kao što su krajt (*Bungarus spp*), tigrasta zmiya (*Notechis spp*), tajpani (*Okiuranus spp*), kao i nekih zmiya iz familije *Viperidae*. Nakon ujeda ovih zmiya, klinički su evidentirani simptomi neurotoksičnosti. Presinaptički toksini *Elapidae* pripadaju grupi I fosfolipaza A2, a *Viperidae* grupi II fosfolipaza A2. Fosfolipaze A2 (PLA2) su grupa enzima zavisnih od Ca^{2+} . Tačni mehanizmi pomoću kojih presinaptički neurotoksini ulaze u presinaptički nervni završetak i započinju svoj efekat, još uvek nisu dovoljno razjašnjeni. Smatra se da je hidroliza fosfolipida neuroleme motornog neurona, primarni mehanizam delovanja presinaptičkih PLA2 neurotoksina (*Prasarnpun i sar., 2004*). Na osnovu eksperimentalnih ispitivanja β -bungarotoksina, koji predstavlja glavni presinaptički neurotoksin venoma kineskog krajta (*B. multicinctus*), ključni patohistološki nalaz posredovan neurotoksinom je nekrotična degeneraciju motornih nervnih završetaka (*Dixon i Harris, 1999*). Na izolovanim nervno-mišićnim preparatima, inhibicija neuromišićne transmisije pod uticajem presinaptičkih toksina, obično protiče u tri faze. U početnoj fazi postoji slaba inhibicija oslobađanja ACh, u drugoj produženoj fazi dolazi do olakšanog oslobađanja ACh i u trećoj fazi do progresivnog opadanja neurotransmisije usled nekrotične degeneracije presinaptičkog nervnog završetka. Proces nekrotične degeneracije obuhvata: gubitak sinaptičkih vezikula zbog njihove smanjene reciklaže, degeneraciju mitohondrija i fragmentaciju neuroleme nervnog terminala. Na kraju dolazi do povlačenja oštećenog nervnog završetka iz sinaptičke pukotine (*Hodgson i Wickramaratna, 2002*). Opisane patološke promene nastaju pod dejstvom venoma *Elapidae*, odnosno PLA2 presinaptičkog neurotoksina. Proces nekrotične degeneracije javlja se u prvih 12 sati od izlaganja neurotoksinu. Oporavak funkcije neuromišićne sinapse procesom reinervacije traje 3 do 5 dana nakon izlaganja toksinu, a za 7 dana reinervacija je potpuna. Mnogi zmijski venomi za koje se zna da izazivaju tešku paralizu kod ljudi, kao što su indijski krajt (*B. caeruleus*), malajski (plavi) krajt (*B. candidus*), kineski trakasti krajt (*B. multicinctus*), morski tajpana (*O. scutellatus*) i tigraste zmiye (*N. scutatus*), sadrže veoma moćne presinaptičke neurotoksine (*Harris i Scott-Davey, 2013*).

Istraživanja pokazuju da opisane promene na presinaptičkom nervnom završetku nastale pod uticajem PLA2 poreklom *Elapidae*, nisu evidentirane nakon dejstva PLA2 poreklom od *Vipera ammodytes*. *Logonder i saradnici (2008)* su u *in vitro* uslovima ispitivali uticaj amoditoksina A (PLA2) iz venoma *Vipera ammodytes* na *m. soleus* miša. Izolovani mišić je preinkubiran sa amoditoksinom A (10 μ g/ml) u trajanju od 3 do 3,5 sata, a zatim su rađene elektronska mikroskopija i histohemijska ispitivanja. Rezultati pokazuju da je kod preparata izloženih amoditoksinu A, struktura presinaptičkog "dugmeta" bila u većini aspekata slična negativnoj kontroli. Izuzetak su predstavljale mitohondrije, koje su bile uvećane, ponekad zgusnutog matriksa, a njihove kriste često nepravilno povezane posle ekspozicije mišićnih preparata amoditoksinu A. Mitohondrije u ćelijama skeletnih mišića izloženih amoditoksinu A, mestimično su bile promenjene ali intenzitet promena i obim zahvaćenih mitohondrija bio je znatno manji nego kod presinaptičkog nervnog završetka. Oštećenja strukture mišićnih vlakana nisu evidentirana. Pod dejstvom amoditoksina A, u motornim nervnim završecima zapaženo je statistički nesignifikantno smanjenje (13,6%) vezikula sa neurotransmitterom ACh, dok se srednje terminalne površine nisu razlikovale između tretiranih i kontrolnih uzoraka mišića. Histohemijska ispitivanja sa fluorescentnim konjugatom α -bungarotoksina, pokazala su da amoditoksin A nema uticaja na nAChR na mišićnoj ploči. Na osnovu dobijenih rezultata, autori zaključuju da je u proces inhibicije neurotransmisije pod dejstvom amoditoksina A, inicijalna faza njegovo selektivno vezivanje

za presinaptički nervni završetak. Pošto su na fosfolipaze A2 izuzetno osetljive mitohondrije, njihova degeneracija dovodi do pada nivoa ATP-a i praktično deenergizacije presinaptičkog nervnog završetka. Usled toga, naknadno nastaje gubitak sprege između depolarizacije presinaptičkog nervnog terminala i oslobađanja neurotransmitera ACh u sinaptičku pukotinu (*Logonder i sar., 2008*).

Ista grupa autora (*Logonder i sar., 2008*) ispitivala je i kontraktilnost dijafragme miševa pod uticajem amoditoksina A. Rezultati ovog dela ispitivanja pokazuju da kontrakcije dijafragme izazvane indirektnom stimulacijom, progresivno opadaju u funkciji vremena pod dejstvom amoditoksina A. Nasuprot tome, direktna stimulacija preparata dijafragme, rezultirala je punim kontraktilnim odgovorom, što dokazuje da amoditoksin A ne dovodi do poremećaja na nivou kontraktilne mišićne mašinerije, odnosno na nivou interakcije aktin – miozin. Ovakav rezultat potvrđuje i nalaz elektronske mikroskopije, da nisu evidentirana oštećenja strukture mišićnih vlakana. Naši rezultati ispitivanja kontraktilnosti dijafragme su u saglasnosti sa rezultatima *Logonder i saradnici (2008)*. Nakon što smo dokazali indirektnu poljnu stimulaciju primenom pankuronijuma, venom poskoka je doveo do progresivnog pada kontrakcija dijafragme, koje su posle 180 minuta ekspozicije iznosile 8,78% od vrednosti kontrolnih kontrakcija. Kao u prethodnoj studiji, takođe smo dokazali da primenom parametara direktne stimulacije, kontrakcije dijafragme gotovo dostižu kontrolne vrednosti (94,29% do 95,82% kontrolnih kontrakcija). Ovim smo potvrdili da se mehanizam neuromišićne toksičnosti venoma poskoka ne ostvaruje posredstvom oštećenja poprečno-pugastih mišićnih vlakana.

Podaci koji se odnose na efikasnost antivenoma kao specifične terapije kod trovanja zmijskim venomom, u naučnoj literaturi su uglavnom dokumentovani revijalnim radovima, koji opisuju tipove antivenoma, značaj pravilnog izbora tipa venoma za efikasnost terapije, farmakodinamiku i farmakokinetiku antivenoma. Zajednička konstatacija ovih radova je da postoji problem nedostatka komparabilnih predkliničkih ispitivanja antivenoma, kao i studija koje procenjuju efikasnost (potencu) antivenoma protiv različitih vrsta *Viperidae*. Ovo se posebno odnosi na nedostatak studija o efikasnosti antivenoma u pogledu eliminacije neurotoksičnog dejstva. Pretragom literature, nismo naišli na radove koji ispituju protektivni efekat antivenoma u odnosu na respiratornu paralizu. Iz ovih razloga, u narednom delu diskutujemo samo naše rezultate o efektu antivenoma u pogledu sprečavanja progresivnog pada kontraktilnosti dijafragme pod dejstvom venoma poskoka. U tom cilju, ispitivanja su urađena primenom smeša venom+antivenom u različitim masenim odnosima (w/w, V+A=1:2, V+A=1:10 i V+A=1:20). Prethodno je naveden naš rezultat da pod dejstvom venoma poskoka dolazi do progresivnog pada kontrakcija dijafragme i da su one posle 180 minuta ekspozicije iznosile 8,78% kontrolnih kontrakcija. Posle primene smeše V+A=1:2 u vodeno kupatilo sa izolovanom dijafragmom pacova, takođe je došlo do progresivnog pada kontraktilnosti dijafragme, a posle 180 minuta ekspozicije srednja vrednost kontrakcija je iznosila 10,54% od kontrolnih vrednosti. Smeša V+A=1:10 je posle 180 minuta ekspozicije, dovela do pada kontrakcija dijafragme na 22,61% od kontrolnih vrednosti. Pošto smo u preliminarnim ispitivanjima uočili da posle primene smeše sa najvećim testiranim udelom antivenoma (V+A=1:20), kontrakcije dijafragme posle 180 minuta ekspozicije ne opadaju ispod 50% kontrolnih vrednosti, u finalnoj seriji smo produžili ekspoziciju za 45 minuta (ukupna ekspozicija 225 minuta). I nakon ove ekspozicije, kontrakcije dijafragme su se zadržale iznad 50% kontrolnih vrednosti (iznosile su 56,90% od kontrole). U literaturi postoji protokol, po kome se u slučaju izrazitog smanjenja kontraktilnosti izolovane dijafragme ili njene potpune paralize pod uticajem neke neurotoksične supstance (npr. botulinusni neurotoksin), za procenu efikasnosti (potentnosti) tretmana primenjuje vrednost – poluvreme paralize (*Zanetti i sar., 2018*). Ova vrednost se definiše kao vreme potrebno da se amplituda kontrakcija dijafragme smanje na 50% kontrolnih vrednosti. Normalizovanjem efekta (% od kontrolnih kontrakcija) i logaritmovanjem vremena (\log_{10}), dobili smo sigmoidne krive za smanjenje kontrakcija dijafragme u logaritamskoj funkciji vremena (slika 46). Zapaža se da su sigmoidne krive za sve tri testirane smeše venom+antivenom, u koordinatnom sistemu pomerene u desno u odnosu na sigmoidnu krivu dobijenu za venom. Preračunate vrednosti srednjeg

efektivnog vremena (ET_{50}) za koje se kontrakcije dijafragme smanje na 50% kontrolnih vrednosti dobijene su nelineranom regresijom i one iznose: za venom $60,17 \pm 2,43$ minuta, za smešu V+A=1:2 $73,29 \pm 3,02$ minuta, za smešu V+A=1:10 $114,80 \pm 12,16$ minuta i za smešu V+A=1:20 $317,80 \pm 40,46$ minuta. Statistički značajna razlika je dokazana između ET_{50} za venom i ET_{50} za smeše venom+antivenom u masenim odnosima 1:2 ($p < 0,05$); 1:10 ($p < 0,001$) i 1:20 ($p < 0,001$). Takođe, postoji i statistički visoko značajna razlika između vrednosti ET_{50} za sva tri masena odnosa venom+antivenom ($p < 0,001$). Zaključujemo da je smeša venom+antivenom u kojoj je maseni udeo antivenoma iznosio 20 (smeša V+A=1:20), ostvarila eksplicitno najefikasniji protektivni efekat u pogledu očuvanja kontraktilnosti dijafragme. Ovaj maseni udeo antivenoma zadržao je kontrakcije dijafragme iznad 50% kontrolnih kontrakcija i posle ekspozicije od 225 minuta, a preračunata vrednost ET_{50} smeše V+A=1:20 je za 2,8 puta veća od vrednosti ET_{50} za smešu V+A=1:10.

U pregledu literature smo naveli da jedno od potencijalnih mesta delovanja venoma u neuromišičnoj sinapsi predstavlja i enzim AChE. Ovaj enzim ima izuzetno važnu ulogu u hidrolizi neurotransmitera ACh u sinaptičkoj pukotini i fiziološkom funkcionisanju neurotransmisije. U toksikologiji, AChE je posebno značajna kao target za neurotoksične supstance. Sa aspekta venoma zmija, postoje dve mogućnosti da aktivnost AChE bude značajno promenjena i tako remeti fiziološku neurotransmisiju. Jedna mogućnost je da venom poseduje visoku aktivnost AChE (egzogena AChE) i da nakon resorpcije venoma, u sinaptičkoj pukotini vrši ubranu hidrolizu ACh. U ovom slučaju do inhibicije neurotransmisije dolazi zbog posledičnog nedostatka neurotransmitera ACh (*Bickler i sar., 2023*). U jednoj studiji je analizirano 45 serija venoma iz 20 različitih vrsta zmija koje potiču iz 3 glavne familije zmija otrovnica (*Elapidae, Viperidae i Crotalidae*). Visoka aktivnost AChE je identifikovana u svim venomima zmija iz familije *Elapidae* (osim iz roda *Dendroaspis*). AChE je posebno bila zastupljena u venomima *Bungarus spp.* (do 8 mg enzima/g liofilizovanog venoma). Nasuprot tome, aktivnost AChE nije pronađena ni u jednoj seriji venoma zmija iz familija iz *Viperidae* ili *Crotalidae* (*Frobert i sar., 1997*). Druga mogućnost je da venom dovodi do inhibicije AChE u sinaptičkoj pukotini (endogena AChE). Ovo je karakteristika venoma familije *Elapidae* (rod *Dendroaspis* – mambe), koji sadrži neurotoksin fascikulin. Usled inhibicije AChE dolazi do nagomilavanja ACh na nAChR na motornoj ploči i njegove prekomerne stimulacije. Kao posledica se javlja fascikulacija i grč poprečno-prugaste muskulature (*Ranawaka i sar., 2013*). Iako se iz prethodnih podataka vidi da venom *Viperidae* nema potencijalni efekat na aktivnost AChE, u cilju kompletnog uvida u mehanizam neurotoksičnog dejstva venoma poskoka, ispitali smo aktivnost AChE u dijafragmi pod uticajem venoma i sve tri smeše venom+antivenom. Na osnovu naših rezultata, nije uočena statistička razlika u aktivnosti AChE u dijafragmi koja je bila izložena dejstvu venoma, u odnosu na kontrolnu grupu ($p > 0,05$). Takođe, pod uticajem smeša venom+antivenom u svim ispitivanim masenim odnosima, nije bilo statistički značajne promene u aktivnosti AChE u poređenju sa kontrolnom grupom. Naši rezultati nedvosmisleno dokazuju da venom poskoka svoj mehanizam neurotoksičnog dejstva ne ostvaruje posredstvom enzima AChE.

Enzim Na^+/K^+ -ATPaza, poznatija kao Na-K pumpa, ima krucijalnu ulogu u generisanju koncentracijskog gradijenta na ćelijskoj membrani i održavanju membranskog potencijala mirovanja aktivnim transportom jona Na^+ iz ćelije i jona K^+ u ćeliju. Ovaj enzim nesumnjivo najveći značaj ima u terapiji srčane insuficijencije, jer se njegovom inhibicijom kardiotoničnim glikozidima povećava snaga kontrakcije srčanog mišića. U nama dostupnoj literaturi ima svega nekoliko radova u kojima je ispitan efekat venoma *Viperidae* na aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze. Takođe, prema našim saznanjima u literaturi ne postoje radovi o uticaju venoma *Viperidae*, kao i antivenoma na aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze u izolovanoj dijafragmi pacova. *Kassak i saradnici (2006)* navode da se na membrani eritrocita mogu identifikovati tri ATPaze (Na^+/K^+ -ATPaza, Ca^{2+} -ATPaza i Mg^{2+} -ATPaza). Sve tri podjedinice formiraju kompleksni sistem vezan za membranu i čine pumpu koja transportuje 3 Na^+ jona u ekstracelularni prostor i 2 K^+ jona intracelularno i tako održava uravnotežen transmembranski potencijal. Značaj ovog

transportnog sistema je i njegovo prisustvo u svim tkivima sisara. Na^+/K^+ -ATPaza se smatra jednim od najvažnijih ATPaza. U *in vitro* ispitivanjima uticaja venoma *Viperidae* na izolovane membrane eritrocita, *Kirakosyan i saradnici* (2016) su dokazali da venom *Viperidae latifi* značajno inhibira aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze. Isti autori su dokazali da istovremeno dolazi do značajnog povećanja aktivnosti eritrocitne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPaze 10 min nakon dodavanja niske koncentracije venoma, u poređenju sa kontrolnim uzorcima membrana eritrocita. Postepeno povećanje koncentracije venoma pokazuje dozno-zavisni način inhibicije aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze za niske, subletalne i letalne koncentracije venoma. Nakon aplikacije subletalne doze venoma, aktivnost $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPaze se veoma značajno povećala u poređenju sa kontrolnim uzorcima. Za najveću koncentraciju venoma (letalna doza) nije bilo moguće dobiti odgovarajuću aktivnost ovog enzima zbog oštećenja membrane i njene potpune lize (*Kirakosyan i sar.*, 2016). Isti autori smatraju da povećana aktivnost ATPaze Ca^{2+} pumpe, nakon tretmana venomom *Viperidae latifi* može biti zaštitni mehanizam za očuvanje funkcije citoskeleta nakon oštećenja membrane. Oštećenje membrane eritrocita može biti reverzibilno u prisustvu niske koncentracije venoma, ali i ireverzibilno kod viših doza toksina. U zaključku ove studije se navodi da komponente venoma *Viperidae latifi* osim što oštećuju lipidni dvosloj membrane eritrocita, izazivaju i značajno povećanje Ca^{2+} jona u eritrocitima i dovode do aktivacije $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPaze. *Jayaraman i saradnici* (1999) navode da kardiotoksini zmijskog venoma (*Naja naja atra*) pokazuju širok spektar biološke aktivnosti kao što su kontrakcija ćelija srčanog mišića, liza eritrocita i selektivna toksičnost za određene vrste tumorskih ćelija. Dokazani kardiotoksini venoma selektivno inhibiraju dejstvo određenih ključnih enzima kao što su Na^+/K^+ -ATPaza i fosfolipid-osetljiva protein-kinaza (*Kuo i sar.*, 1983; *Raynor i sar.*, 1991; *Chiou i sar.*, 1993). Smatra se da kardiotoksin efikasno blokira enzimsku aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze i fosfolipid-osetljive protein-kinaze, kompetitivnim vezivanjem za ATP, koji je ključni supstrat za funkcionisanje navedenih enzima. Ovom studijom je prvi put dokazano vezivanje kardiotoksina za nukleotid-trifosfat (*Jayaraman i sar.*, 1999). Zbog sposobnosti kardiotoksina da se vezuju za nukleotide, dolazi do kompeticije između ATP-a i kardiotoksina, što dovodi do inhibicije enzima zavisnih od ATP-a. Konstanta vezivanja dATP za kardiotoksin II ima isti raspon kao kod fosfolipid-osetljive protein-kinaze (*Chiou i sar.*, 1993) i Na^+/K^+ -ATPaza (*Zhou i sar.*, 1988).

Većina PLA2 venoma sadrži asparaginsku kiselinu u položaju 49. Ovaj ostatak je deo Ca^{2+} -vezujuće petlje i stabilizuje aktivnu konformaciju PLA2. Izoenzimi koji sadrže lizin, umesto asparaginske kiseline na položaju 49 (Lis49 PLA2) su takođe izolovani iz venoma *Viperidae*. Za ove fosfolipaze se smatralo da ne ispoljavaju toksični efekat, međutim *Leite i saradnici* (2006) ispitali su uticaj ovog toksina na aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze na modelu izolovane bešike žabe. Dokazali su da Lis49 PLA2 miotoksin može destabilizovati ćelijsku membranu inhibicijom Na^+/K^+ -ATPaze. Miotiksin dovodi do promene membranske propustljivosti posredovane povećanjem intracelularnog kalcijuma (*Leite i sar.*, 2004a), a ovo povećanje je posledica inhibicije Na^+/K^+ -ATPaza (*Leite i sar.*, 2006)

Rezultati naših ispitivanja pokazuju da pod dejstvom venoma poskoka, dolazi do značajne inhibicije Na^+/K^+ -ATPaze u dijafragmi ($p < 0,001$). Aktivnost ovog enzima u dijafragmi pod dejstvom venoma poskoka iznosi 48,21% u odnosu na kontrolnu vrednost. Primenom smeša venom+antivenom u odnosima 1:2 i 1:10, došlo je do oporavka aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze u dijafragmi, a aktivnost je iznosila 70,09% za odnos 1:2 i 73,51% za odnos 1:10, u odnosu na kontrolu. Ove dve smeše venom+antivenom su statistički značajno oporavljale aktivnost enzima u poređenju sa venomom ($p < 0,01$), a da pri tom između njih nije zabeležena statistički značajna razlika. Smeša sa najvećim udelom antivenoma (1:20) je gotovo u potpunosti oporavila aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze, jer je aktivnost iznosila 94,55% kontrolne vrednosti i statistička značajnost nije postojala ($p > 0,05$) u odnosu na kontrolu. Na ovaj način smo dokazali da postoji jaka veza između aktivnosti ovog enzima i koncentracije antivenoma. Sa povećanjem masenog udela antivenoma u smešama venom+antivenom,

povećava se enzimaska aktivnost Na^+/K^+ -ATP-aze. Pirsonovom korelacijom dobijena je veoma jaka pozitivna korelacija ($r=0,9150$, $p<0,001$) između ova dva ispitivana parametra. Zaključujemo da antivenom sprečava komponente venoma da ispolje inhibitorski efekat na aktivnost Na^+/K^+ -ATP-aze.

6.7. Reaktivnost antigen/antitelo

Poskok je najotrovnija zmija u Evropi. Kao i venom drugih zmija i njen venom je složena smeša proteina i peptida, kao i neproteinskih jedinjenja sa različitim farmakološkim aktivnostima. Neke komponente su veoma toksične, a druge nisu direktno, mada značajno doprinose ukupnoj toksičnosti venoma. Venomi se od 1894. godine koriste za imunizaciju ovaca i konja za proizvodnju specifičnih protivotrova (venom-specifičnih antitela), koji su i dalje jedina specifična terapija kod ujeda zmija. Na ovaj način, u imunizovanim životinjama se proizvode antitela specifična za toksične i netoksične komponente venoma (*Halassy i sar., 2010*). Produkcija antivenoma se do danas nije mnogo promenila. Mnogi proizvođači su se susretali sa brojnim problemima, kao što su različit broj konja respondera, niska potentia indukovano odgovora, velika količina venoma potrebnog za imunizaciju, kao i postojanje neželjenih efekata kod imunizovanih životinja. Značajno poboljšanje je postignuto razvojem boljeg protokola imunizacije "*low dose, low volume multi-site immunization protocol*" po kojoj se koristi suspenzija pripremljena mešanjem male količine venoma sa CFA adjuvansom (*Complete Freund's Adjuvant*). Male zapremine suspenzije se aplikuju na više mesta, umesto ranije aplikacije velike količine venoma bez adjuvansa, na jedno mesto. Na ovaj način sve životinje postaju responderi i ujedno se razvija značajno veći titar antitela kod imunizovanih životinja, bez neželjenih efekata (*Pratanaphon i sar., 1997; Chotwiwatthanakun i sar, 2001*).

U našim radovima, ispitana je interakcija antitelo/antigen, odnosno interakcija $\text{F(ab}')_2$ fragmenata antivenoma sa proteinima venoma. Imunogenost je nesumnjivo potvrđena imunohemijskim metodama: Western-blot, HPLC kompleksa antigen/antitelo, inhibitorska ELISA (*Milovanović i sar., 2021*).

Bojenjem gela nakon elektroforeze venoma poskoka, jasno je uočeno 6 definisanih proteinskih traka od 200 kDa do 20 kDa. S obzirom na to da u venomu poskoka postoji preko 140 proteina, jasno je da se na ovaj način mogu detektovati samo proteini koji su najzastupljeniji u venomu. Imunoblot metodom je detektovano postojanje većeg broja proteina u venomu. Kako se blot razvijao korišćenjem antivenoma kao primarnog antitela, sasvim je sigurno da su detektovani proteini i imunogeni, odnosno da u antivenomu postoje antitela koja ih specifično prepoznaju. Kako u kontrolnoj plazmi (plazmi neimunizovanog konja) ne postoje antitela koja prepoznaju neku od komponenti venoma, može se zaključiti da su sva antitela koja prepoznaju komponente venoma indukovane imunizacijom. Molekulske mase proteina detektovanih ovom metodom nalaze se rasponu od 200 kDa do 30 kDa. Proteini tih masa su idealni za iniciranje humoralnog imunskog odgovora, jer antigen prezentujuće ćelije efikasno procesuiraju i prezentuju molekule tih veličina. Molekuli van ovog opsega veličine, mnogo slabije pokreću imunski odgovor. Osim veličine proteina, na pokretanje i intenzitet imunskog odgovora utiču i način aplikacije venoma, količina antigena, prisustvo i tip adjuvansa, specifične karakteristike proteina, stanje imunizovanog organizma i sveukupan kontekst imunizacije.

Tokom izvođenja imunoblot testa, antitela antivenoma prepoznaju antigene vezane za membranu. Sa druge strane, antitela u organizmu se vezuju za antigene koji nisu vezani za membranu, već su slobodni, zbog čega je više epitopa dostupno za prepoznavanje. Zato je vezivanje antitela za antigene venoma testirano i u rastvoru, inhibitorskim ELISA-testom. Dodavanjem rastuće količine antigena u rastvor specifičnih antitela pre nanošenja na ploču, blokira se sve više antigen-vezujućih mesta, tako da se antitela nakon dodavanja u bunarčice ploče sve manje vezuju za antigene na dnu bunarčića. Ovom metodom je pokazano da su antigeni venoma u potpunosti uspeali da blokiraju

vezivanje antitela, odnosno da su sva antitela antivenoma bila popunjena antigenima venoma još u rastvoru.

Vezivanje antigena venoma i F(ab')₂ fragmenata antivenoma, u našim ispitivanjima dokazano je i analitičkim frakcionisanjem venoma, antivenoma i kompleksa venom/antivenom (HPLC metoda).

Pitanje koje se dalje može postaviti je da li su sve komponente venoma koje deluju toksično na ljude neutralisane antivenomom, odnosno da li su te komponente venoma imunogene. Ispitivanja sprovedena tokom izrade ove teze otkrivaju da je neutralizacija u svim sprovedenim testovima postojala, bez obzira da li su se testovi odnosili na enzimsku aktivnost ili biološku posledicu aktivnosti venoma i u *in vitro*, i u *in vivo* testovima. U nekim testovima antivenom je potpuno neutralisao venomsku aktivnost, a u drugim nepotpuno. Ovakva slika se mogla očekivati, jer u proteinskoj smeši kojom su životinje imunizovane, nije moguće da svi antigeni budu u istoj meri imunogeni.

Veoma je važno da se aktivnost pojedinog toksina analizira u kontekstu kompletnog venoma. Najbolji primer za to je hemoragična aktivnost SVMP čija je aktivnost potencirana komponentama venoma koje utiču na hemostazu. Venom *Viperidae* sadrži niz proteina koji deluju na faktore koagulacije plazme i trombocite. Serinske proteaze i SVMP ispoljavaju prokoagulantne efekte aktivnostima koje su slične trombinu ili aktiviranjem faktora II, V, X na koagulacionu kaskadu. *In vivo*, ovi prokoagulantni efekti rezultiraju defibrinogenacijom i sprečavanjem koagulacije. Sama po sebi, ovakva inkoagulacija ne dovodi nužno do značajnog krvarenja. Uzimajući u obzir i oštećenja koja su nastala dejstvom SVMP, ta ista koagulopatija značajno potencira krvarenje.

Na isti način, da bi se okarakterisao antivenom i njegova zaštitna potencia, ispitivanja treba izvesti u odnosu na kompletan venom. Ovakva "holistička priroda" venoma je razlog zbog koga do sada ni jedan test koji je pratio neutralizaciju jedne komponente ili samo njenog dejstva, nije uspeo da zameni test potence kojim se meri zaštitna moć antivenoma i koji se izvodi na miševima.

Venomi različitih vrsta roda *Viperidae* imaju sličnu kompoziciju venoma, odnosno zajedničke antigene. U našim ispitivanjima ukrštene reaktivnosti pokazano je da antivenom neutrališe i venome zmija *Vipera berus*, *Vipera aspis*, *Macrovipera lebetina* i *Montivipera xanthina*. Osim testom neutralizacije letaliteta, ukrštena reaktivnost je dokazana i ELISA-testom. Kao i ranije, pomenutim imunohemijskim metodama i ELISA-om se detektuje vezivanje antitela za antigene. Kao što je već istaknuto, antivenom je poliklonski preparat dobijen imunizacijom životinje smešom antigena. Tada se može dogoditi da neka od proizvedenih antitela prepoznaju slične epitope drugih antigena, tj. drugog venoma. Moguće je da i u venomu druge zmije, pogotovo ako su filogenetski relativno bliske (evolucionom) postoji isti antigen. Tada je očekivano da neka od antitela prepoznaju taj isti antigen ili je ukrštena reaktivnost posledica obilja različitih monoklonskih antitela koja pojedinačno slabo prepoznaju jedan antigen. Takođe, moguće je da antitela prepoznaju neki epitop i ukupan učinak bude prepoznavanje komponenti drugog venoma. Na osnovu rezultata dobijenih imunohemijskim metodama ne može se doneti zaključak o protektivnom dejstvu antivenoma, mada se tako može smanjiti broj *in vivo* testova i upotreba laboratorijskih miševa. Unakrsna reaktivnost heterologih antivenoma se ipak može pokazati samo *in vivo* eksperimentima, mada je moguće da i ovaj način ima određene nedostatke.

7. ZAKLJUČCI

1. Posle i.m. aplikacije u *m. gastrocnemius* miševa, venom poskoka dovodi do pojave sledećih lokalnih efekata: edem, hemoragije i miotoksičnost. Neutralizaciona potentca 0,1 AJ antivenoma za definisanu edem-formirajuću dozu iznosi 95%. Antihemoragijska potentca 0,1 AJ antivenoma iznosi 61,5%. Patohistološkom analizom *m. gastrocnemius* miševa, na mestu i.m. aplikacije venoma, dokazano je da 0,1 AJ antivenoma u potpunosti neutrališe miotoksični efekat venoma.
2. Venom ispoljava sledeće sistemske hemotoksične efekte: (a) eritrolizu indirektnog tipa u kojoj posreduje više komponenti venoma; (b) aktivira koagulacione faktore spoljašnjeg i unutrašnjeg puta koagulacije u plazmi; (c) dovodi do fibrinolize koagulisane plazme. Defibrinogenišući efekat venoma nije bilo moguće utvrditi zbog dominantnog neurotoksičnog dejstva kod miševa, koje je dovelo do njihovog uginuća. Antivenom neutrališe 50% eritrolize indukovane venomom. Antivenom u potpunosti neutrališe definisanu minimalnu koagulacionu dozu venoma za plazmu i poseduje snažni antifibrinolitički efekat.
3. Venom na kulturi Vero ćelija i leukocitima periferne krvi ispoljava citotoksični efekat. Različitim metodama za određivanje vijabilnosti ćelija, dobijene su veoma slične vrednosti IC_{50} venoma, dok su se vrednosti EC_{50} antivenoma razlikovale. Razlike u vrednostima EC_{50} antivenoma su posledica različite imunogenosti molekula, koji su ključni za mehanizme na kojima je zasnovana svaka pojedina metoda. Dokazano je da venom indukuje ćelijsku smrt nekrozom i apoptozom. Ispitivanjem anticitotoksične potence antivenoma na leukocitima periferne krvi je dokazano da su granulociti najosetljiviji na dejstvo venoma.
4. Dokazano je da venom poskoka deluje baktericidno na *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. Antivenom neutrališe baktericidni efekat venoma na obe bakterije.
5. Venom poskoka dovodi do progresivnog pada kontrakcija dijafragme, koje posle 180 minuta ekspozicije iznose 8,78% od vrednosti kontrolnih kontrakcija. Venom poskoka, u dijafragmi ne dovodi do poremećaja na nivou kontraktilne mišićne mašinerije, odnosno na nivou interakcije aktin – miozin.
6. Sigmoidne krive smanjenja kontrakcija dijafragme u funkciji vremena, za sve tri testirane smeše venom/antivenom, pomerene su u desno u odnosu na sigmoidnu krivu venoma. Posle primene smeše venom/antivenom sa najvećim masenim udelom antivenoma (1:20), postignut je najefikasniji protektivni efekat u pogledu sprečavanja progresivnog pada kontraktilnosti dijafragme pod dejstvom venoma.
7. Aktivnost AChE u preparatima dijafragme koji su izloženi dejstvu venoma, ne razlikuje se statistički značajno u odnosu na aktivnost enzima u kontrolnim preparatima, što dokazuje da venom poskoka ne ostvaruje neurotoksično dejstvo posredstvom AChE.
8. Pod dejstvom venoma poskoka dolazi do inhibicije aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze u dijafragmi za 52%. Posle primene smeše venom/antivenom sa najvećim masenim udelom antivenoma (1:20), aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze iznosi 94,55% kontrolnih vrednosti enzima. Između aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze u dijafragmi i rastućih masenih udela antivenoma u smešama venom/antivenom, dobijena je veoma jaka pozitivna korelacija ($r=0,9150$).

9. Glavni nosioci toksičnosti venoma poskoka su serin-proteaze, metaloproteinaze, L-aminokiselinske oksidaze i fosfolipaza 2. Dokazano je da 80% proteazne aktivnosti potiče od aktivnosti metaloproteaza, a 20% od serin-proteaza, iako su podjednako zastupljene u venomu. Antivenom ispoljava visoku antiproteaznu potencu, jer sa 89% neutrališe aktivnost ovih enzima. Aktivnost L-aminokiselinske oksidaze potiče samo od monomerne jedinice, dok aktivnost ostalih izoformi nije detektovana. Zbog toga je potencia antivenoma delimično niska i iznosi 50%. Aktivnost enzima fosfolipaze 2 venoma, antivenom neutrališe u potpunosti, što je u skladu sa neutralizacijom neurotoksičnog dejstva venoma.
10. Venom poskoka predstavlja smešu proteina. Nativnom elektroforezom dokazano je šest proteinskih traka venoma Mr od 26,2 do 180 kDa, dok je za F(ab')₂ fragmente antivenoma dokazano prisustvo samo jedne trake Mr 110 kDa. Dokazano je da antivenomski fragment reaguje sa komponentama venoma od 25 do 200 kDa, jer komponente venoma manje ili veće mase nisu imunogene. Stvaranje imunog kompleksa antigen/antitelo, koga formiraju venom i antivenom, potvrđeno je HPLC metodom.
11. Antivenom poskoka neutrališe efekte venoma još dve vrste zmija familije *Viperidae*: *Vipera aspis* i *Vipera berus*, dok u manjoj meri neutrališe efekte venoma *Montivipera xantina* i *Macrovipera lebetina*.

8. LITERATURA

1. Antibodies and Antigens, *In*: Abbas A., Lichtman A., Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*, (2021). Ed. 10th Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
2. Accary C., Rima M., Kouzayha A., Hleihel W., Sadek R., Claude Desfontis J., Fajloun Z., Hraoui-Bloquet S. (2014). Effect of the *Montivipera bornmuelleri* snake venom on human blood: coagulation disorders and hemolytic activities, *Open Journal of Hematology*, 5-4. <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=bac1ac73b98565ebd8abd3782040a9e49971072c>
3. Ainsworth S., Slagboom J., Alomran N., Pla D., Alhamdi Y., King S., Bolton F., Gutiérrez JM., Vonk F., Toh CH., Calvete J., Kool J., Harrison R., Casewell N. (2018). The paraspecific neutralisation of snake venom induced coagulopathy by antivenoms. *Communications biology*, 1, 34. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0039-1>
4. Albuquerque E.X., Pereira E.F., Alkondon M., Rogers S.W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiological reviews*, 89(1), 73–120. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2008>
5. Atanasov V., Danchev D., Mitewa M., Petrova S. (2009). Hemolytic and anticoagulant study of the neurotoxin vipoxin and its components-basic phospholipase A2 and an acidic inhibitor. *Biochemistry. Biokhimiia*, 74(3), 276–280. <https://doi.org/10.1134/s0006297909030055>
6. Bailey G.S. Shipolini, R.A. (1976). Purification and properties of a kininogenin from the venom of *Vipera ammodytes ammodytes*. *The Biochemical journal*, 153(2), 409–414. <https://doi.org/10.1042/bj1530409>
7. Balija L.M., Vrdoljak A., Habjanec L., Dojnović B., Halassy B., Vranesić B., Tomasić J. (2005). The variability of *Vipera ammodytes ammodytes* venoms from Croatia--biochemical properties and biological activity. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 140(2), 257–263. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.02.008>
8. Barros A., Fernandes D., Ferreira L., Cristina dos Santos M. (1994). Local Effects Induced by Venoms from Five Species of Genus *Micrurus* sp. (Coral Snakes). *Toxicon*, 32(4):445–452. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90296-8](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90296-8)
9. Bastos V., Gomes-Neto F., Perales J., Gisele A., Neves-Ferreira, Valente R. (2016). Natural Inhibitors of Snake Venom Metalloendopeptidases: History and Current Challenges. *Toxins*, 8(9), 250. <https://doi.org/10.3390/toxins8090250>
10. Barber C.M., Isbister G.K., Hodgson W.C. (2013). Alpha neurotoxins. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 66, 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.01.019>
11. Berndt M., Metharom P., Andrews R.K. (2014). Primary haemostasis: newer insights. *Haemophilia : The official journal of the World Federation of Hemophilia*, 20 Suppl 4, 15–22. <https://doi.org/10.1111/hae.12427>
12. Bickler P.E., Abouyannis M., Bhalla A., Lewin M.R. (2023). Neuromuscular Weakness and Paralysis Produced by Snakebite Envenoming: Mechanisms and Proposed Standards for Clinical Assessment. *Toxins*, 15(1), 49. <https://doi.org/10.3390/toxins15010049>
13. Blanco G., Mercer R.W. (1998). Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *The American journal of physiology*, 275(5), F633–F650. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1998.275.5.F633>
14. Boda F., Banfai K., Garai K., Curticapean A., Berta L., Sipos E., Kvell K. (2018). Effect of *Vipera ammodytes ammodytes* Snake Venom on the Human Cytokine Network. *Toxins (Basel)* 10(7):259 <https://doi.org/10.3390/toxins10070259>
15. Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

16. Buxton R. (2016). Blood Agar Plates and Hemolysis Protocols. *American Society for Microbiology Washington, D.C.* (p. 619, 642, 647).
<https://asm.org/getattachment/7ec0de2b-bb16-4f6e-ba07-2aea25a43e76/protocol-28>
17. Calvete J.J., Marcinkiewicz C., Sanz L. (2007). Snake venomomics of *Bitis gabonica gabonica*. Protein family composition, subunit organization of venom toxins, and characterization of dimeric disintegrins bitisgabonin-1 and bitisgabonin-2. *Journal of proteome research*, 6(1), 326–336.
<https://doi.org/10.1021/pr060494k>
18. Capitanescu C., Macovei Oprescu A., Supeanu A., Coculescu B.I., Strambu V., Alexandru Macovei R., Manole G. (2016). Comparative assay of *Vipera ammodytes* antivenom potency. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 31(6), 1471–1475.
<https://doi.org/10.3109/14756366.2016.1144598>
19. Castillo J.P., Rui H., Basilio D., Das A., Roux B., Latorre R., Bezanilla F., Holmgren M. (2015). Mechanism of potassium ion uptake by the Na(+)/K(+)-ATPase. *Nature communications*, 6, 7622.
<https://doi.org/10.1038/ncomms8622>
20. Chiou S.H., Raynor R.L., Zheng B., Chambers T.C., Kuo, J.F. (1993). Cobra venom cardiotoxin (cytotoxin) isoforms and neurotoxin: comparative potency of protein kinase C inhibition and cancer cell cytotoxicity and modes of enzyme inhibition. *Biochemistry*, 32(8), 2062–2067.
<https://doi.org/10.1021/bi00059a025>
21. Chotwiwatthanakun C., Pratanaphon R., Akesowan S., Sriprapat S., Ratanabanangkoon K. (2001). Production of potent polyvalent antivenom against three elapid venoms using a low dose, low volume, multi-site immunization protocol. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 39(10), 1487–1494. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(01\)00108-8](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(01)00108-8)
22. Chowdhury A., Zdenek C.N., Lewin M.R., Carter R., Jagar T., Ostanek E., Harjen H., Aldridge M., Soria R., Haw G., Fry B.G. (2021). Venom-Induced Blood Disturbances by Palearctic Viperid Snakes, and Their Relative Neutralization by Antivenoms and Enzyme-Inhibitors. *Frontiers in immunology*, 12, 688802. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.688802>
23. Ciscotto P., Machado de Avila R.A., Coelho E.A.F., Oliveira J., Diniz C.G., Farias L.M., de Carvalho M.A.R., Maria W.S., Sanchez E.F., Borges A., Chavez-Olortegui C. (2009). Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon* 53, 330–341. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.12.004>
24. European Directorate for the Quality of Medicines. *European Pharmacopoeia*. 10th ed. Council of Europe; Strasbourg, France. (2019). Viper venom antiserum, European (01/2008:0145)
25. Crowley LC., Scott AP., Marfell BJ., Boughaba JA., Chojnowski G., Waterhouse NJ. (2016). Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*. 7:647-51. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087163>
26. Dixon R.W., Harris J.B. (1999). Nerve terminal damage by beta-bungarotoxin: its clinical significance. *The American journal of pathology*, 154(2), 447–455.
[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65291-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65291-1)
27. Doltchinkova V., Stoylov S., Angelova P.R. (2021). Viper toxins affect membrane characteristics of human erythrocytes. *Biophysical chemistry*, 270, 106532. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2020.106532>
28. Ellman G.L., Courtney K.D., Andreas V., Featherstone R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7 (2), 88-90.
[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
29. Engvall E., Perlmann P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871–874. [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(71\)90454-x](https://doi.org/10.1016/0019-2791(71)90454-x)
30. Evans J.D., 1996. Straight Forward Statistics for the Behavioral Sciences. Brooks/Cole Publishing, Pacific Grove, CA. <https://psycnet.apa.org/record/1995-98499-000>
31. Farber J.L. (1981). The role of calcium in cell death. *Life sciences*, 29(13), 1289–1295.
[https://doi.org/10.1016/0024-3205\(81\)90670-6](https://doi.org/10.1016/0024-3205(81)90670-6)

32. Feoktistova M., Geserick P., Leverkus M. (2016). Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harbor protocols*, 2016(4), pdb.prot087379. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>
33. Forgac M. (2007). Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(11), 917–929. <https://doi.org/10.1038/nrm2272>
34. Frobert Y., Créminon C., Cousin X., Rémy M.H., Chatel J.M., Bon S., Bon C., Grassi J. (1997). Acetylcholinesterases from Elapidae snake venoms: biochemical, immunological and enzymatic characterization. *Biochimica et biophysica acta*, 1339(2), 253–267. [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(97\)00009-5](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(97)00009-5)
35. Gamulin E., Mateljak Lukačević S., Halassy B., Kurtović T. (2023). Snake Antivenoms-Toward Better Understanding of the Administration Route. *Toxins*, 15(6), 398. <https://doi.org/10.3390/toxins15060398>
36. Garcia de Lima É., Inácio da Costa P. and Julio Laure C. (1989). South American Rattlesnake Venom: its Hemolytic Power. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 22(4): 171-175. <https://doi.org/10.1590/s0037-86821989000400002>
37. Gasanov S.E., Dagda R.K., Rael E.D. (2014). Snake Venom Cytotoxins, Phospholipase A2s, and Zn²⁺-dependent Metalloproteinases: Mechanisms of Action and Pharmacological Relevance. *Journal of clinical toxicology*, 4(1), 1000181. <https://doi.org/10.4172/2161-0495.1000181>
38. Georgieva D., Arni R.K., Betzel C. (2008). Proteome analysis of snake venom toxins: pharmacological insights. *Expert review of proteomics*, 5(6), 787–797. <https://doi.org/10.1586/14789450.5.6.787>
39. Green D. (2006). Coagulation cascade. *Hemodialysis international. International Symposium on Home Hemodialysis*, 10 Suppl 2, S2–S4. <https://doi.org/10.1111/j.1542-4758.2006.00119.x>
40. Gottlieb M (1982). Effects of phospholipase A2 treatment of human erythrocyte membranes on the rates of spectrin-actin dissociation. *Biochimica et biophysica acta*, 686(1), 133–136. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(82\)90159-6](https://doi.org/10.1016/0005-2736(82)90159-6).
41. Gubenšek F., Križaj I. (1997). Ammodytoxins (*Vipera ammodytes ammodytes*). In: Rappuoli, R., Montecucco, C. (Eds.), *Guidebook to Protein Toxins and their Use in Cell Biology*. Oxford Univ. Press, New York, pp. 224–226.
42. Guillemain I., Bouchier C., Garrigues T., Wisner A., Choumet V. (2003). Sequences and structural organization of phospholipase A 2 genes from *Vipera aspis aspis*, *V. aspis zinnikeri* and *Vipera berus berus* venom Identification of the origin of a new viper population based on ammodytin II heterogeneity. *European journal of biochemistry*. 270:2697–2706. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03629.x>
43. Gutierrez J.M., Gene A., Rodas G., Cerdas L. (1985). Neutralization of Proteolytic and Hemorrhagic Activities of Costa Rican Snake Venoms by a Polyvalent Antivenom. *Toxicon*, 23(6):887-893. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(85\)90380-0](https://doi.org/10.1016/0041-0101(85)90380-0)
44. Gutierrez J.M., Arroyo O., Chaves F., Lomonte B., Cerdas L. (1986). Pathogenesis of myonecrosis induced by coral snake (*Micrurus nigrocinctus*) venom in mice. *British journal of experimental pathology*. 67, 1-12. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2013068/pdf/brjexppathol00013-0011.pdf>
45. Gutiérrez J.M, León G., Rojas G., Lomonte B., Rucavado A., Chaves F. (1998). Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon*, 36(11):1529-38. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(98\)00145-7](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(98)00145-7)
46. Gutiérrez J.M., León G., Lomonte B. (2003). Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of immunoglobulin therapy for envenomation. *Clinical pharmacokinetics*, 42(8), 721–741. <https://doi.org/10.2165/00003088-200342080-00002>

47. Gutiérrez J.M., Escalante T., Hernández R., Gastaldello S., Saravia-Otten P and Rucavado A. (2018). Why is Skeletal Muscle Regeneration Impaired after Myonecrosis Induced by Viperid Snake Venoms? *Toxins*. 10(5), 182. <https://doi.org/10.3390%2Ftoxins10050182>
48. Gutiérrez J.M., Solano G., Pla D., Herrera M., Segura A., Vargas M., Villalta M., Sánchez A., Sanz L., Lomonte B., León G., Calvete J.J. (2017). Preclinical Evaluation of the Efficacy of Antivenoms for Snakebite Envenoming: State-of-the-Art and Challenges Ahead. *Toxins*, 9, 163. <https://doi.org/10.3390/toxins9050163>
49. Halassy B., Habjanec L., Brgles M., Baliija M.L., Leonardi A., Kovacic L., Prijatelj P., Tomasić J., Krizaj I. (2008). The role of antibodies specific for toxic sPLA2s and haemorrhagins in neutralizing potential of antisera raised against *Vipera ammodytes ammodytes* venom. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*. 148(2):178-83. [doi:10.1016/j.cbpc.2008.05.005](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.05.005).
50. Halassy B., Habjanec L., Lang Baliija M., Kurtović T., Brgles M., Krizaj I. (2010). Ammodytoxin content of *Vipera ammodytes ammodytes* venom as a prognostic factor for venom immunogenicity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 151, 455–460. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.02.001>
51. Harris J.B., Grubb B.D., Maltin C.A., Dixon R., (2000). The neurotoxicity of the venom phospholipases A(2), notexin and taipoxin. *Experimental neurology*, 161(2), 517–526. <https://doi.org/10.1006/exnr.1999.7275>
52. Harris J.B., Scott-Davey T. (2013). Secreted phospholipases A2 of snake venoms: effects on the peripheral neuromuscular system with comments on the role of phospholipases A2 in disorders of the CNS and their uses in industry. *Toxins*, 5(12), 2533–2571. <https://doi.org/10.3390/toxins5122533>
53. Hempel B.F., Damm M., Göçmen B., Karis M., Oguz M.A., Nalbantsoy A., Süßmuth R.D. (2018). Comparative Venomics of the *Vipera ammodytes transcaucasiana* and *Vipera ammodytes montandoni* from Turkey Provides Insights into Kinship. *Toxins* (Basel) 10(1):23. <https://doi.org/10.3390%2Ftoxins10010023>
54. Hiu J.J., Yap M.K.K. (2020). Cytotoxicity of snake venom enzymatic toxins: phospholipase A2 and L-amino acid oxidase. *Biochemical Society transactions*. 48(2):719-731. <https://doi.org/10.1042/bst20200110>
55. Ho M., Silamut K., White N.J., Karbwang J., Looareesuwan S., Phillips R.E., Warrell D.A. (1990). Pharmacokinetics of three commercial antivenoms in patients envenomed by the Malayan pit viper, *Calloselasma rhodostoma*, in Thailand. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 42(3), 260–266. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1990.42.260>
56. Hodgson W.C., Wickramaratna J.C. (2002). In vitro neuromuscular activity of snake venoms. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 29(9), 807–814. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2002.03740.x>
57. ICH Expert Working Group (2005). ICH Harmonized Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1).
58. Jayaraman G., Krishnaswamy T., Kumar S., Yu C. (1999). Binding of nucleotide triphosphates to cardiotoxin analogue II from the Taiwan cobra venom (*Naja naja atra*). Elucidation of the structural interactions in the dATP-cardiotoxin analogue ii complex. *The Journal of biological chemistry*, 274(25), 17869–17875. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.25.17869>
59. Jorgensen P.L., Hakansson, K.O., Karlsh S.J. (2003). Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annual review of physiology*, 65, 817–849. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.65.092101.142558>
60. Karabuva S., Luksic B., Brizic I., Latinovic Z., Leonardi A., Krizaj I. (2017). Ammodytin L is the main cardiotoxic component of the *Vipera ammodytes ammodytes* venom. *Toxicon* 139: 94-100. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.10.003>

61. Kasibhatla S., Amarante-Mendes GP., Finucane D., Brunner T., Bossy-Wetzel E., Green DR. (2006). Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) Staining to Detect Apoptosis. *CSH Protocols*. (3):pdb.prot4493. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4493>
62. Kassák P., Sikurová L., Kvasnicka P., Bryszewska M. (2006). The response of Na⁺/K⁺-ATPase of human erythrocytes to green laser light treatment. *Physiological research*, 55(2), 189–194. <https://doi.org/10.33549/physiolres.930711>
63. Kirakosyan G., Mohamadvarzi M., Ghulikyan L., Zaqaryan N., Kishmiryan A., Ayvazyan N. (2016). Morphological and functional alteration of erythrocyte ghosts and giant unilamellar vesicles caused by *Vipera latifi* venom. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 190, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.08.006>
64. Krifi M.N., Amri F., Kharrat H., El Ayebe M. (1999). Evaluation of antivenom therapy in children severely envenomed by *Androctonus australis garzonii* (Aag) and *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) scorpions. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 37(11), 1627–1634. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(99\)00079-3](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(99)00079-3)
65. Kumar T.K., Jayaraman G., Lee C.S., Arunkumar A.I., Sivaraman T., Samuel, D., Yu, C. (1997). Snake venom cardiotoxins-structure, dynamics, function and folding. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 15(3), 431–463. <https://doi.org/10.1080/07391102.1997.10508957>
66. Kurtovic T., Leonardi A., Lang Balija M., Brgles M., Habjanec L., Krizaj I., Halassy B. (2012). The standard mouse assay of anti-venom quality does not measure antibodies neutralising the haemorrhagic activity of *Vipera ammodytes* venom. *Toxicon* 59:709–717. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.009>
67. Krummer S., Thiermann H., Worek F., Eyer P., (2002). Equipotent cholinesterase reactivation in vitro by the nerve agent antidotes HI 6 dichloride and HI 6 dimethanesulfonate, *Archives of toxicology*. 76:589-595. <https://doi.org/10.1007/s00204-002-0382-2>
68. Kuo J.F., Raynor R.L., Mazzei G.J., Schatzman R.C., Turner R.S., Kem, W.R. (1983). Cobra polypeptide cytotoxin I and marine worm polypeptide cytotoxin A-IV are potent and selective inhibitors of phospholipid-sensitive Ca²⁺-dependent protein kinase. *FEBS letters*, 153(1), 183–186. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(83\)80144-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(83)80144-6)
69. Kühlbrandt W. (2019). Structure and Mechanisms of F-Type ATP Synthases. *Annual review of biochemistry*, 88, 515–549. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-110903>
70. Kühlbrandt W. (2004). Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(4), 282–295. <https://doi.org/10.1038/nrm1354>
71. Lamb T., de Haro L., Lonati D., Brvar M., Eddleston M. (2017). Antivenom for European *Vipera* species envenoming. *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)*. 55(6), 557–568. <https://doi.org/10.1080/15563650.2017.1300261>
72. Latinović Z., Leonardi A., Kovačić L., Yeow Koh C., Šribar J., Trampuš Bakija A., Venkateswarlu D., Manjunatha Kini R., Križaj I. (2018). The First Intrinsic Tenase Complex Inhibitor with Serine Protease Structure Offers a New Perspective in Anticoagulant Therapy. *Thrombosis and haemostasis*. 118(10):1713-1728. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1669785>
73. Latinović Z., Leonardi A., Petan T., Žlajpah M., Križaj I. (2017). Disintegrins from the venom of *Vipera ammodytes ammodytes* efficiently inhibit migration of breast cancer cells. *Acta chimica Slovenica*. 64: 555–559. <https://doi.org/10.17344/acsi.2016.2924>
74. Latinović Z., Leonardi Z., Šribar J., Sajevec T., Žužek M., Frangež R., Halassy B., Trampuš-Bakija A., Pungerčar J., Križaj I. (2016). Venomics of *Vipera berus berus* to explain differences in pathology elicited by *Vipera ammodytes ammodytes* envenomation: Therapeutic implications. *Journal of Proteomics*. 146:34–47. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.06.020>

75. Latinovic Z., Leonardi A., Yeow Koh C., Kini R., Trampuš Bakija A., Pungercar J., Križaj I. (2020). The Procoagulant Snake Venom Serine Protease Potentially Having a Dual, Blood Coagulation Factor V and X-Activating Activity. *Toxins* 12:358. <https://doi.org/10.3390%2Ftoxins12060358>
76. Leite R.S., Pinheiro G.H., Fernandes M.N., Selistre-de-Araujo H.S. (2006). The effect of the myotoxic Lys49 phospholipase A(2) from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom on Na⁺/K⁺ -ATPase activity of toad bladders. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 20(8), 1478–1480. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.05.004>
77. Leonardi A., Grubensek F., Krizaj I. (2002). Purification and characterisation of two hemorrhagic metalloproteinases from the venom of the long-nosed viper, *Vipera ammodytes ammodytes*. *Toxicon*, 40(1):55-62. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(01\)00188-x](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(01)00188-x)
78. Leonardi A., Fox JW., Trampus-Bakija A., Krizaj 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. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.07.015>
79. Leonardi A., Sajevec T., Latinović Z., Pungercar J., Baliija M.L., Bakija A.T., Vidmar R., Halassy B., Križaj I. (2015). Structural and biochemical characterisation of VaF1, a P-IIIa fibrinogenolytic metalloproteinase from *Vipera ammodytes ammodytes* venom. *Biochimie*. 109:78-87. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.12.013>.
80. Leonardi A., Sajevec T., Pungercar J., Križaj I. (2019). Comprehensive Study of the Proteome and Transcriptome of the Venom of the Most Venomous European Viper: Discovery of a New Subclass of Ancestral Snake Venom Metalloproteinase Precursor-Derived Proteins. *Journal of proteome research*. 18:2287-2309. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00120>
81. Logonder U., Krizaj I., Rowan E.G., Harris J.B. (2008). Neurotoxicity of ammodytoxin a in the envenoming bites of *Vipera ammodytes ammodytes*. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 67(10), 1011–1019. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e318188c2d7>
82. Lowry O.H., Roseberg N.J., Farr A.L., Randell R.J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent, *The Journal of biological chemistry*. 193:265-75. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
83. Luksic B., Culic V., Stricevic L., Brizic I., Poljak NK., Tadic Z. (2010). Infant death after nose-horned viper (*Vipera ammodytes ammodytes*) bite in Croatia: A case report. *Toxicon*. 56:1506–1509. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.08.009>
84. Maduwage K., Isbister G. (2014). Current Treatment for Venom-Induced Consumption Coagulopathy Resulting from Snakebite. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 8(10): e3220. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003220>
85. Malina T., Krecsák L., Jelić, D., Maretić T., Tóth T., Siško M., Pandak N. (2011). First clinical experiences about the neurotoxic envenomings inflicted by lowland populations of the Balkan adder, *Vipera berus bosniensis*. *Neurotoxicology*, 32(1), 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2010.11.007>
86. Mijatovic T., Ingrassia L., Facchini V., Kiss R. (2008). Na⁺/K⁺-ATPase alpha subunits as new targets in anticancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets*, 12(11), 1403–1417. <https://doi.org/10.1517/14728222.12.11.1403>
87. Milovanovic V., Dimitrijevic Lj., Petrusic V., Kadric J., Minic R., Živkovic I. (2018). Application of the 3R Concept in the Production of European Antiviperinum on Horses – Multisite, Low Volumes Immunization Protocol and ELISA. *Acta Veterinaria-Beograd*. 68 (4), 401-419. <https://doi.org/10.2478/acve-2018-0033>
88. Milovanovic V., Minic R., Vakić J., Ivanovic S, Cupic V, Borozan S, Nesic A, Zivkovic I. (2021). MTT based L-aminoacid oxidase activity test for determination of antivenom potency against *Vipera ammodytes* envenomation. *Toxicon* 192:57–65. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.01.012>

89. Mohammad M.A., Talafih K., Al-rob O.Y., Gharaibeh N.S., Ayes M. (2014). Osmotic fragility of human erythrocytes in vitro using *Vipera lebetina* venom. *Comparative Clinical Pathology*, 23, 249-254. <https://sci-hub.se/http://dx.doi.org/10.1007/s00580-012-1602-7>
90. Morjen M., Moslah W., Touihri-Baraketi I., Srairi-Abid N., Luis J., Marrakchi N. and Jebali J. (2022). Expression of the First Recombinant Anti-Tumoral Snake Venom Kunitz-Type Serine Protease Inhibitor. *Toxins* 14, 170. <https://doi.org/10.3390/toxins14030170>
91. Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 65(1-2):55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
92. Narang S.K., Paleti S., Azeez Asad M.A., Samina T. (2009). Acute ischemic infarct in the middle cerebral artery territory following a Russell's viper bite. *Neurology India*, 57(4), 479–480. <https://doi.org/10.4103/0028-3886.55594>
93. Nikapitiya B., Maduwage K. (2017). Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Snake Antivenom. *Sri Lanka Journal of Medicine*, 26, 54–65. <https://sljm.sljol.info/articles/10.4038/sljm.v27i1.79>
94. Nikolić S. 2020. Venomous snakebites in Serbia through 125 years: what we do (not) know in comparison with neighboring countries. A literature review. *Acta Medica Medianae*. 59, 95-103. https://publisher.medfak.ni.ac.rs/AMM_1/2020/2020-4-broj/celi_radovi/13Sonja%20Nikolic.pdf
95. Nirthanan S., Charpantier E., Gopalakrishnakone P., Gwee M.C., Khoo H.E., Cheah L.S., Bertrand D., Kini R.M. (2002). Codoxin, a novel toxin from *Bungarus candidus*, is a reversible antagonist of muscle (alphabetagammadelta) but a poorly reversible antagonist of neuronal alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors. *The Journal of biological chemistry*. 277(20), 17811–17820. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111152200>
96. Nirthanan S., Charpantier E., Gopalakrishnakone P., Gwee M.C., Khoo H.E., Cheah L.S., Kini R.M., Bertrand D. (2003). Neuromuscular effects of codoxin, a novel toxin from the venom of the Malayan krait (*Bungarus candidus*). *British journal of pharmacology*, 139(4), 832–844. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705299>
97. Nirthanan S., Gwee M.C. (2004). Three-finger alpha-neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on. *Journal of pharmacological sciences*, 94(1), 1–17. <https://doi.org/10.1254/jphs.94.1>
98. Noetzel C., Chandra V., Perbandt M., Rajashankar K., Singh T., Aleksiev B., Kalkura N., Genov N., Betzel C. (2002). Enzymatic Activity and Inhibition of the Neurotoxic Complex Vipoxin from the Venom of *Vipera ammodytes meridionalis*. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 57(11-12): 1078-1083. <https://doi.org/10.1515/znc-2002-11-1222>
99. Pari L., Murugavel P. (2007). Diallyl tetrasulfide improves cadmium induced alterations of acetylcholinesterase, ATPases and oxidative stress in brain of rats. *Toxicology*, 234(1-2), 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.01.021>
100. Prasarnpun S., Walsh J., Harris J.B. (2004). Beta-bungarotoxin-induced depletion of synaptic vesicles at the mammalian neuromuscular junction. *Neuropharmacology*, 47(2), 304–314. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.04.012>
101. Prasarnpun S., Walsh J., Awad S.S., Harris, J.B. (2005). Envenoming bites by kraits: the biological basis of treatment-resistant neuromuscular paralysis. *Brain : a journal of neurology*, 128(Pt 12), 2987–2996. <https://doi.org/10.1093/brain/awh642>
102. Pillai L.V., Ambike D., Husainy S., Khaire A., Captain A., Kuch U. (2012). Severe Neurotoxic Envenoming and Cardiac Complications after the Bite of a 'Sind Krait' (*Bungarus cf. sindanus*) in Maharashtra, India. *Tropical medicine and health*, 40(3), 103–108. <https://doi.org/10.2149/tmh.2012-08c>
103. Post R.L., Hegyvary C., Kume S. (1972). Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *The Journal of biological chemistry*, 247(20), 6530–6540. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4263199/>

104. Petan T., Krizaj I., Gelb M.H., Pungercar J. (2005). Ammodytoxins, potent presynaptic neurotoxins, are also highly efficient phospholipase A2 enzymes. *Biochemistry*, 44(37), 12535–12545. <https://doi.org/10.1021/bi051024r>
105. Pratanaphon R., Akesowan S., Khaw O., Sriprapat S., Ratanabanangkoon K. (1997). Production of highly potent horse antivenom against the Thai cobra (*Naja kaouthia*). *Vaccine*, 15(14):1523–1528. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(97\)00098-4](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(97)00098-4)
106. Prijatelj-Znidarscic P., Pungercar J. (2012). A recent evaluation of the lethal potencies of ammodytoxins. *Toxicon* 59:642–643. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.02.009>
107. Pugh R.N.H., Theakston R.D.G. (1987) A clinical study of viper bite poisoning, *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 81:2, 135–149. <https://doi.org/10.1080/00034983.1987.11812106>
108. Pungercar J., Krizaj I. (2007). Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A2. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 50(7), 871–892. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.07.025>
109. Ranawaka U.K., Laloo D.G., de Silva H.J. (2013). Neurotoxicity in snakebite-the limits of our knowledge. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(10), 2302. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002302>
110. Raynor R.L., Zheng, B. Kuo, J.F. (1991). Membrane interactions of amphiphilic polypeptides mastoparan, melittin, polymyxin B, and cardiotoxin. Differential inhibition of protein kinase C, Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and synaptosomal membrane Na,K-ATPase, and Na⁺-pump and differentiation of HL60 cells. *The Journal of biological chemistry*, 266(5), 2753–2758. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)49909-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)49909-7)
111. Sakurai Y., Takatsuka H., Yoshioka A., Matsui T., Suzuki M., Titani K., Fujimura Y., (2001). Inhibition of human platelet aggregation by L-amino acid oxidase purified from *Naja naja kaouthia* venom. *Toxicon* 39, 1827–1833. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(01\)00133-7](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(01)00133-7)
112. Samel M., Subbi J., Siigur J., Siigur E. (2002). Biochemical characterization of fibrinolytic serine proteinases from *Vipera lebetina* snake venom. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 40(1), 51–54. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(01\)00187-8](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(01)00187-8)
113. Sanny C.G. (2014). Assessing Venom: Antivenin Binding Using Size-Exclusion High Performance Liquid Chromatography. *Austin Chromatogr.* 1(2): 3. <https://austinpublishinggroup.com/chromatography/fulltext/chromatography-v1-id1006.php>
114. Schwartz R. (2003). T Cell Anergy. *Annual Review of Immunology* 21:305-334 [10.1146/annurev.immunol.21.120601.141110](https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141110)
115. da Silva N.J., Aird S.D. (2001). Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*. 128, 425–456. [https://doi.org/10.1016/s1532-0456\(00\)00215-5](https://doi.org/10.1016/s1532-0456(00)00215-5)
116. Shoji M., Raynor R.L., Berdel W.E., Vogler W.R., Kuo J.F. (1988). Effects of thioether phospholipid BM 41.440 on protein kinase C and phorbol ester-induced differentiation of human leukemia HL60 and KG-1 cells. *Cancer research*, 48(23), 6669–6673. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3180076/>
117. Silva A., Maduwage K., Sedgwick M., Pilapitiya S., Weerawansa P., Dahanayaka N.J., Buckley N.A., Johnston C., Siribaddana S., Isbister G.K. (2016). Neuromuscular Effects of Common Krait (*Bungarus caeruleus*) Envenoming in Sri Lanka. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(2), e0004368. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004368>
118. Silva A., Hodgson W.C., Isbister G.K. (2017). Antivenom for Neuromuscular Paralysis Resulting From Snake Envenoming. *Toxins*, 9(4), 143. <https://doi.org/10.3390/toxins9040143>
119. Siigur E., Aaspõllu A., Siigur J. (2001). Sequence diversity of *Vipera lebetina* snake venom gland serine proteinase homologs-result of alternative-splicing or genome alteration. *Gene*, 263(1-2), 199–203. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(00\)00571-0](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(00)00571-0)

120. Siigur E., Aaspõllu A., Siigur J. (2003). Anticoagulant serine fibrinogenases from *Vipera lebetina* venom: structure-function relationships. *Thrombosis and haemostasis*, 89(5), 826–831. <https://sci-hub.se/10.1055/s-0037-1613468>
121. Stoyanova V., Aleksandrov R., Lukarska M., Duhalov D., Atanasov V., Petrova S. (2012). Recognition of *Vipera ammodytes meridionalis* neurotoxin vipoxin and its components using phage-displayed scFv and polyclonal antivenom sera. *Toxicon*. 60(5):802-9. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.06.003>.
122. Stoykova S., Goranova Y., Pantcheva I., Atanasov V., Danchev D., Petrova S. (2013). Hemolytic activity and platelet aggregation inhibitory effect of vipoxin's basic sPLA2 subunit. *Interdisciplinary Toxicology*. 6(3): 136–140. <https://doi.org/10.2478%2Fintox-2013-0021>
123. Strober W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current protocols in immunology*, 111, A3.B.1–A3.B.3. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>
124. Sukkapan P., Jia Y., Nuchprayoon I., Pérez J.C. (2011). Phylogenetic analysis of serine proteases from Russell's viper (*Daboia russelli siamensis*) and *Agkistrodon piscivorus leucostoma* venom. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 58(2), 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.05.014>
125. Suhail M. (2010). Na, K-ATPase: Ubiquitous Multifunctional Transmembrane Protein and its Relevance to Various Pathophysiological Conditions. *Journal of clinical medicine research*, 2(1), 1–17. <https://doi.org/10.4021/jocmr2010.02.263w>
126. Tan N.H., Tan C.S. (1988). Acidimetric assay for phospholipase A using egg yolk suspension as substrate. *Analytical biochemistry*, 170(2), 282–288. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90632-x](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90632-x)
127. Theakston R., Raid H. (1983). Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms; *Bulletin of the World Health Organization*, 61(6): 949-956.
128. Tomović LJ., Anđelković M., Krizmanić I., Ajtić R., Urošević A., Labus N., Simović A., Maričić M., Golubnović A., Čorović J., Paunović A., Jović D., Krstić M., Lakušić M., Džukić G. (2019). Distribution of Three *Vipera* Species in the Republic of Serbia. *Bulletin of the Natural History Museum*, 12:217-242. <https://doi.org/10.5937/bnhmb1912217T>
129. Tosin Olaoba O., Karina dos Santos P., Sobreiro Selistre-de-Araujo H., Helena Ferreira de Souza D. (2020). Snake Venom Metalloproteinases (SVMPs): A structure-function update. *Toxicon:X* 7:100052. <https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2020.100052>
130. Toyoshima C., Kanai R., Cornelius F. (2011). First crystal structures of Na⁺,K⁺-ATPase: new light on the oldest ion pump. *Structure* (London, England : 1993), 19(12), 1732–1738. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.10.016>
131. WHO Expert Committee on Biological Standardization Sixty-seventh report (2017) Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins, Annex 5, Replacement of Annex 2 of WHO Technical Report Series, 964: 197-388.
132. Xie C., Bittenbinder M., Slagboom J., Arrahman A., Bruijns S., Somsen G., Vonk F., Casewell N., García-Vallejo J., Kool J. (2021). Erythrocyte haemotoxicity profiling of snake venom toxins after nanofractionation. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 1176: 122586. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122586>
133. Zivkovic I., Rajnpreht I., Minic R., Mitic K., Aleksic I., Kadric J., Petrusic V. (2019) Characterization of INTOR:SWISS Albino Mice Adopted in the Institute of Virology, Vaccines and Sera – Torlak, Belgrade in the Early Twentieth Century. *Acta veterinaria – Belgrade* 66(3):279-293 <http://dx.doi.org/10.1515/acve-2016-0025>
134. Vasilets L.A., Schwarz W. (1993). Structure-function relationships of cation binding in the Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochimica et biophysica acta*, 1154(2), 201–222. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(93\)90012-d](https://doi.org/10.1016/0304-4157(93)90012-d)

135. Wang L., Wu, D., Robinson C. V., Wu H., Fu T.M. (2020). Structures of a Complete Human V-ATPase Reveal Mechanisms of Its Assembly. *Molecular Cell*, 80(3), 501–511.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.09.029>
136. WHO, 2018.
<https://www.who.int/news/item/19-08-2018-who-issues-new-recommendation-on-antivenom-for-snakebites>
137. Warrell D.A. (2005). Treatment of bites by adders and exotic venomous snakes. *BMJ (Clinical research ed.)*, 331(7527), 1244–1247. <https://doi.org/10.1136/bmj.331.7527.1244>
138. Xiao H., Pan H., Liao K., Yang M., Huang C. (2017). Snake Venom PLA2, a Promising Target for Broad-Spectrum Antivenom Drug Development. *BioMed research international*. 6592820.
<https://doi.org/10.1155/2017/6592820>
139. Zanetti G., Negro S., Pirazzini M., Caccin P. (2018). Mouse Phrenic Nerve Hemidiaphragm Assay (MPN). *Bio-protocol*, 8(5), e2759.
<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2759>
140. Zhou Q.Z., Raynor R.L., Wood M.G., Jr Menger F.M., Kuo J.F. (1988). Structure-activity relationship of synthetic branched-chain distearoylglycerol (distearin) as protein kinase C activators. *Biochemistry*, 27(19), 7361–7365.
<https://doi.org/10.1021/bi00419a028>
141. Zhong X., Guidotti G. (1999). A yeast Golgi E-type ATPase with an unusual membrane topology. *The Journal of biological chemistry*, 274(46), 32704–32711.
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.46.32704>
142. Zhu Z., Liang Z., Zhang T., Zhu Z., Xu W., Teng M., Niu L. (2005). Crystal structures and amidolytic activities of two glycosylated snake venom serine proteinases. *The Journal of biological chemistry*, 280(11), 10524–10529.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M412900200>

BIOGRAFIJA

Vladimir Milovanović je rođen 26.10.1967. godine u Beogradu. Osnovnu školu "Ivo Andrić" završio je 1981. godine. Po završetku Srednje medicinske škole 1985. godine, upisao je Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, na kom je diplomirao 1995. godine sa prosečnom ocenom 6,67. Nakon diplomiranja zaposlio se i pripravnički staž obavio je u Institutu za virusologiju, vakcine i serume "Torlak" u Beogradu, na Odseku za laboratorijske životinje a zatim prelazi na Odsek za serume na poslove imunizacije konja, prerade krvi i krvnih produkata. Stručni ispit pred komisijom Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, položio je 1997.godine.

Specijalističke akademske studije iz oblasti Klinička patologija i terapija bolesti kopitara, završio je 2005. godine i odbranio specijalistički rad pod nazivom "Primena feroaskorbata u preventivi i terapiji posthemoragičnih anemija konja".

Doktorske akademske studije upisao je školske 2018/2019.godine i položio sve ispite predviđene nastavnim programom sa prosečnom ocenom 9,27.

Zaposlen je na Institutu za virusologiju, vakcine i serume "Torlak". Kao autor ili koautor do sada je objavio četiri naučna i stručna rada, koji su publikovani u časopisima međunarodnog značaja i to po 1 rad u kategorijama M64, M34, M23 i M22.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани _____ Владимир М. Миловановић _____

број уписа _____ 2018/5018 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

_____ Карактеризација венома поскока (*Vipera ammodytes*) са територије Републике Србије _____
_____ и терапеутског антивенома _____

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Владимир М. Миловановић _____

Број уписа _____ 2018/5018 _____

Студијски програм _____ докторске академске студије _____

Наслов рада: Карактеризација венома поскока (*Vipera ammodytes*) са територије Републике Србије и терапеутског антивенома

Ментор: Др Саша Ивановић, ванредни професор; Др Ирена Живковић, научни саветник

Потписани _____ Владимир М. Миловановић _____

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Карактеризација венома поскока (*Vipera ammodytes*) са територије Републике Србије
и терапеутског антивенома
која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.