

# Svojstva i karakteristike $\alpha$ -kobra toksina roda Naja

---

**Matković, Nikolina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2022**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:414265>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-09**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Science](#)



Sveučilište u Splitu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Odjel za kemiju

Nikolina Matković

**SVOJSTVA I KARAKTERISTIKE  $\alpha$ -KOBRA TOKSINA RODA *Naja***

Završni rad

Split, 2022.

Sveučilište u Splitu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Odjel za kemiju

Nikolina Matković

**SVOJSTVA I KARAKTERISTIKE  $\alpha$ -KOBRA TOKSINA RODA *Naja***

Završni rad

Split, 2022.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu

Završni rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za kemiju

Ruđera Boškovića 33, 21 000 Split

### SVOJSTVA I KARAKTERISTIKE $\alpha$ -KOBRA TOKSINA RODA *Naja*

Nikolina Matković

Zmijski otrov je izlučevina preoblikovanih žlijezda slinovnica. Sadrži dvadesetak tvari. Više od 90% suhog zmijskog otrova čine proteini. Neki od njih su toksični, a neki ne pokazuju toksična svojstva. Jedan od toksina je  $\alpha$ -kobra toksin.  $\alpha$ -Kobra toksin spada u  $\alpha$ -neurotoksine s dugim lancem, a pronalazimo ga kod vrsta roda *Naja*.  $\alpha$ -Kobra toksin antagonist je nikotinskog acetilkolinskog receptora (nAChR). Vežanjem na nAChR mišićnog i neuronskog tipa, blokira sposobnost receptora da veže acetilkolin. Na taj način inhibira protok iona kroz postsinaptičku membranu što dovodi do paralize i prestanka disanja. Kod ugriza otrovnica roda *Naja* najčešće se primjenjuju polivalentni protuotrovi.

**Ključne riječi:** zmijski otrov,  $\alpha$ -kobra toksin, rod *Naja*, acetilkolinski receptori, protuotrov

**Rad sadrži:** 37 stranice, 10 slika, 2 tablice. Izvornik je na hrvatskom jeziku

**Mentor:** dr. sc. Viljemka Bučević Popović, doc.

**Neposredni voditelj:** dr. sc. Roko Vladušić, v. pred.

**Ocjenitelji:**

**dr. sc. Viljemka Bučević Popović, doc.**

**dr. sc. Stjepan Orhanović, izv. prof.**

**dr. sc. Roko Vladušić, v. pred.**

## Basic information card

University of Split

Bachelor thesis

Faculty of Science

Department of Chemistry

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

### PROPERTIES AND CHARACTERISTICS OF $\alpha$ -COBRA TOXIN IN THE GENUS

*Naja*

Nikolina Matković

Snake venom is an excretion of transformed salivary glands and contains about twenty substances. More than 90% of dry snake venom consist of proteins. Some of them are toxic and some do not show toxic properties. One of the toxins is  $\alpha$ -cobra toxin.  $\alpha$ -Cobra toxin belongs to  $\alpha$ -neurotoxins with a long chain, and it is found in a species of the genus *Naja*.  $\alpha$ -Cobra toxin is an antagonist of the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR). By binding to muscle and neuronal type nAChR, it blocks the receptor's ability to bind acetylcholine. In this way it inhibits the flow of ions through the postsynaptic membrane, leading to paralysis and cessation of breathing. Polyvalent antivenoms are most often used in the case of bites by venomous snakes of the genus *Naja*.

**Keywords:** snake venom,  $\alpha$ -cobra toxin, *Naja* genus, acetylcholine receptors, antivenom

**Thesis consist of:** 37 pages, 10 pictures, 2 tables. Original language: Croatian

**Mentor:** Viljemka Bučević Popović, Ph. D., assistant proffesor

**Assistant Supervisor:** Roko Vladušić, Ph. D., senior lecturer

**Reviewers:**

**Viljemka Bučević Popović, Ph. D., assistant professor**

**Stjepan Orhanović, Ph. D., associate professor**

**Roko Vladušić, Ph. D., senior lecturer**

Ovaj rad, izrađen u Splitu, 2022. godine, pod neposrednim vodstvom dr. sc. Roka Vladušića, v. pred., predan je na ocjenu Odjelu za kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja prvostupnica biologije i kemije.

## **Zahvala**

Zahvaljujem v. pred. dr. sc. Roku Vladušiću na pomoći, vodstvu i suradnji tijekom izrade ovog završnog rada.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Viljemki Bučević Popović i izv. prof. dr. sc. Stjepanu Orhanoviću na pomoći i susretljivost prilikom izrade ovog završnog rada.

Zahvaljujem obitelji, Niku i prijateljima na podršci koju su mi pružili tijekom studiranja i izrade ovog završnog rada.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Općenito o zmijama.....	1
1.2. Zmije otrovnice .....	1
1.3. Cilj rada .....	3
<b>2. RAZRADA TEME</b> .....	4
2.1. Rod <i>Naja</i> .....	4
2.1.1. Taksonomska podjela roda <i>Naja</i> .....	4
2.1.2. Opis vrsta roda <i>Naja</i> .....	5
2.1.3. Komponente otrova roda <i>Naja</i> .....	7
2.1.3.1. Toksini s tri prsta .....	9
2.1.3.1.1. Kemijska struktura $\alpha$ -kobra toksina.....	10
2.1.3.1.2. Uloga $\alpha$ -kobra toksina .....	13
2.2. Klinička slika ugriza.....	19
2.2.1. Prva pomoć u slučaju ugriza kobre.....	21
2.3. LD <sub>50</sub> test.....	21
2.4. Proizvodnja protuotrova .....	22
2.5. Primjena $\alpha$ -kobra toksina u medicini.....	24
<b>LITERATURA</b> .....	27



## 1. UVOD

### 1.1. Općenito o zmijama

Zmije (Serpentes ili Ophidia) prepoznatljive su po izduženom su tijelu koje je pokriveno rožnatim ljuskama. Glava im je jajolika ili trouglasta (ovisno o vrsti). Po obliku rožnoga pokrivača glave može se odrediti sistematska pripadnost zmija. Tjelesni rožni pokrivač zmije presvlače nekoliko puta godišnje. Nemaju vanjskih udova, a kralježnica, koju čini 400 povezanih kralježaka, omogućuje im veliku pokretljivost. Rebra im završavaju slobodno u tijelo, a lijevo plućno krilo smanjeno je ili zakržljalo. Premda im je slušna košćica dobro razvijena, nemaju ni bubnjić ni slušni kanal. Zato zvučne valove primaju preko podloge. Jezik, dug i rašljast, služi im kao organ opipa i mirisa. Zubi zmijama služe isključivo za hvatanje i pridržavanje plijena. Zmije po načinu prehrane spadaju u mesoždere. Sitne vrste zmija hrane se gujavicama i kukcima, a velike vrste kralježnjacima. Bez hrane mogu izdržati čak i po godinu dana. U umjerenom klimatskom području spavaju zimski san zavlazeći se u pukotine u tlu, dok u tropskim područjima miruju u sušnim razdobljima (Ravić, 2006).

Zmije su taksonomski raspodijeljene u pet porodica: Typhlopidae (Sljeparice), Boidae (Kržljonoške), Columbridae (Guževi ili Smukovi), Elapidae (Guje) i Viperidae (Ljutice).

### 1.2. Zmije otrovnice

U zmije otrovnice svrstavaju se članovi porodice Elapidae i Viperidae. Ugriz zmije otrovnice ostavlja trag dva očnjaka i ponekad trag ostalih zuba dok ugriz neotrovne zmije ostavlja trag dva reda zuba bez traga očnjaka (Young, 1985). Otrovnih aparat sastoji se od tri dijela: otrovne žlijezde s izvodnim kanalom, otrovnog zuba i mišića koji istiskuje otrov pri ugrizu. Histološki gledano, otrovna žlijezda pripada tipu složenih tubularnih žlijezda. Sastoji se od mnogobrojnih tubula koji se izljevaju u zajednički izvodni kanal žlijezde. Mišić je srastao sa vezivnim omotom žlijezde te svojom kontrakcijom, u trenutku ugriza otrovnice, vrši pritisak na žlijezdu i potiskuje otrov u mjesto ugriza (Radovanović, 1965). Otrovnost zmiji služi kako bi: a) paralizirala, usmrtila i započela probavljanje plijena i b) za zaštitu od mogućih predatora i drugih opasnosti.

Otrov sadrži zootoksine. Njih izlučuju preoblikovane žlijezde slinovnice. Otrov sadrži više od dvadesetak komponenti. Među njima je mješavina enzima, proteina i toksina koji omogućavaju imobilizaciju životinje, dok neki enzimi služe u probavi plijena. Više od 90% suhog zmijskog otrova čine proteini. Ostatak čine neproteinske komponente kao što su ugljikohidrati i metali, lipidi, nukleozidi, slobodne aminokiseline i biogeni amini (npr. serotonin, acetilkolin). U proteine spadaju toksini i netoksični proteini (Maretić i Cizelj, 2014).

S obzirom na tkivo ili organske sustave na koje djeluju, razlikujemo:

- **hemotoksine** - uzrokuju bolno i ubrzano oticanje tkiva na mjestu ugriza i nekrozu
- **neurotoksine** - dovode do paralize respiratornih mišića te prestanka disanja
- **citotoksine** - uništavaju tjelesne stanice (prema tipu stanice na koji djeluju dalje se dijele na kardiotoxine, miotoksine, nefrotoksine...)

Neurotoksini zastupljeniji su u otrovu porodice Elapidae dok su hemotoksini zastupljeniji u otrovu porodice Viperidae.

Uz te osnovne skupine toksina, u zmijskom se otrovu nalaze i brojne druge skupine enzima kao što su hijaluronidaze, fosfolipaza A2, metaloproteinaze, endopeptidaze, hidrolaze itd. Hijaluronidaza povećava propusnost tkiva i ubrzava apsorpciju otrova. Fosfolipaza A2 oštećuje mitohondrije, leukocite, eritrocite, trombocite, završetke perifernih živaca, skeletne mišiće, dovodi do presinaptičke neurotoksičnosti, stvara sedativni učinak te uzrokuje otpuštanje histamina. Metaloproteinaze djeluju na krvožilni endotel izazivajući lokalna i sustavna krvarenja te mionekrozu (Maretić i Cizelj, 2014).

Otrovnice porodice Viperidae imaju duge, sklopive zube kroz koje prolazi cjevčica. Nazivamo ih cjevastim zubima otrovnjacima. Kroz cjevčicu zuba otrov se ispušta u plijen uzrokujući unutarnje krvarenje zbog proteina koji uništavaju crvene krvne stanice, a nalaze se u otrovu. Otrov se ubrizgava u većim količinama jer je sporog djelovanja (za razliku od otrova zmija porodice Elapidae). Neke vrste kao jamičarke imaju parne jamice, između očiju i nosnica, koje sadrže termoreceptore. Pomoću njih stvaraju toplinsku sliku svog plijena. Jedan od najpoznatijih predstavnika je poskok (*Vipera ammodytes*), najotrovnija europska zmija.

Otrovnice porodice Elapidae imaju žlijeb koji se proteže duž prednjeg ruba svakog otrovnog zuba. Iz tog se razloga takvi zubi nazivaju žljebasti zubi otrovnjaci. Očnjaci su im smješteni sprijeda na gornjoj čeljusti te su nepomični. Većina guja, a pod tim se misli i na kobre, ima otrov koji djeluje na živčani sustav. Posljedica tog djelovanja je paraliza dišnih mišića.

Nalazimo ih uglavnom u tropskim i suptropskim područjima (Afrika, Jugoistočna Azija, Južna Amerika i Australija). Ovoj porodici pripadaju kobre, mambe i morske zmije (Young, 1985).

Predstavnice otrovnih guja (Elapidae) prepoznajemo po izduženom tijelu s izrazito malom glavom. Trup im je okruglastog oblika. Zbog uzdužnog leđnog grebena tijelo u presjeku izgleda tupo trouglasto. Rep im je kratak, a pri vrhu je šiljastog oblika. Ljuske na glavi, koje se nazivaju štiti, pravilno su poredani (Herder, 1966).

### 1.3. Cilj rada

Cilj rada je opisati kemijsku strukturu i učinak  $\alpha$ -kobra toksina kojeg pronalazimo kod vrsta roda *Naja*. Prikazat ćemo na koji način  $\alpha$ -kobra toksin štetno djeluje na organizam nakon ugriza otrovnice, ali i na koji se način u istraživanjima razmatra kao potencijalni lijek.

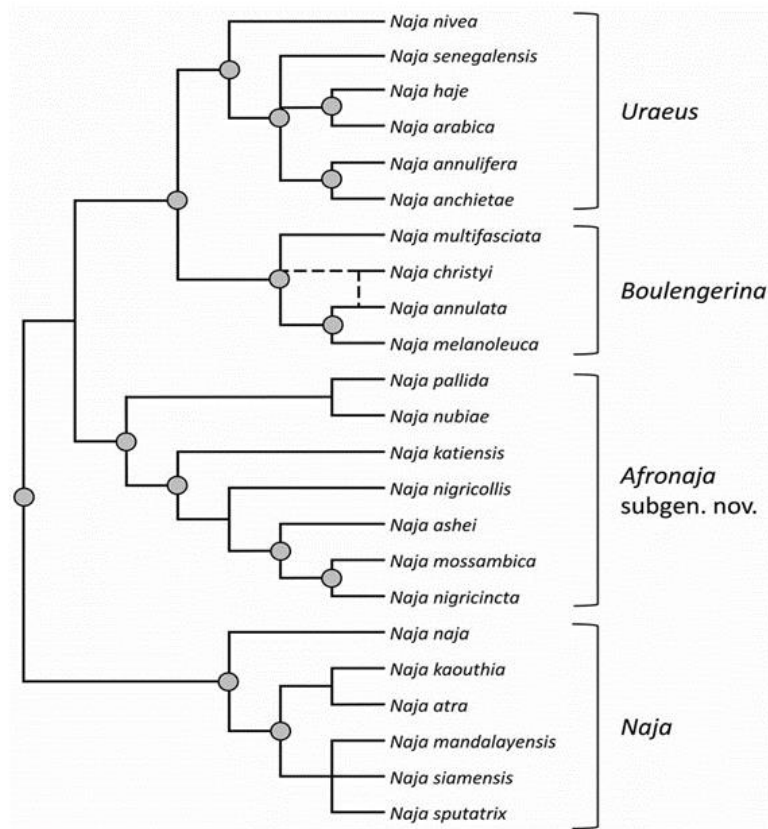
## 2. RAZRADA TEME

### 2.1. Rod *Naja*

#### 2.1.1. Taksonomska podjela roda *Naja*

Pojedine su vrste kobri, poput Kraljevske kobre, svrstane u druge rodove, ali pripadnici roda *Naja* najrasprostranjenije su i najpoznatije vrste kobra pa smo ih zbog toga odlučili istražiti.

Wallach, Wuster i Broadley (2007) navode da se kobre roda *Naja* (Laurenti, 1768) dijele na četiri podroda. Podrod *Naja* ograničen je na 11 azijskih vrsta. Podrod *Uraeus* (Wagler, 1830) čine šest vrsta ne-štrcajućih kobri koje nastanjuju savane i otvorene prostore Afrike i Arabije. Podrod *Boulengerina* (Dollo, 1886) uključuje četiri ne-štrcajuće vrste šumskih kobri. Novi podrod proizašao je od sedam štrcajućih vrsta Afričke kobre (*Afronaja*). Na slici 1 prikazana je njihova taksonomska podjela. Potrebno je napomenuti da na slici nisu dodani preostali nazivi vrsta koje spadaju u podrod *Naja*, a to su: *Naja oxiana*, *Naja philippinensis*, *Naja sagittifera*, *Naja samarensis* i *Naja sumatrana*. (Wallach, Wuster i Broadley, 2009).



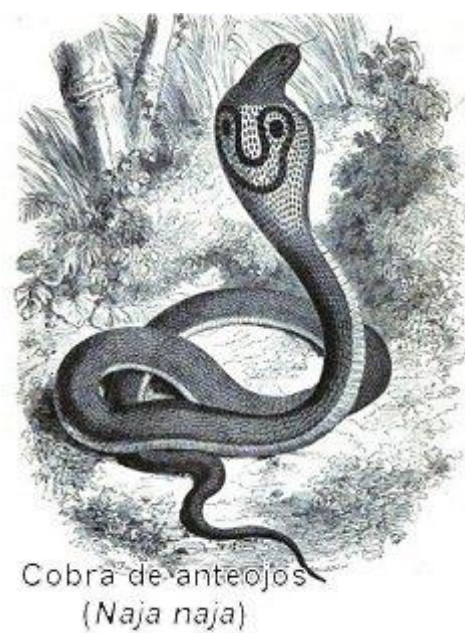
Slika 1. Taksonomska podjela roda *Naja*. Na slici je prikaz podjele roda *Naja* u četiri podroda (*Naja*, *Uraeus*, *Afronaja* i *Boulengerina*) te svih njihovih vrsta. Uz navedene vrste, u podrod *Naja* spada još pet vrsta: *Naja oxiana*, *Naja philippinensis*, *Naja sagittifera*, *Naja samarensis* i *Naja sumatrana* (Wallach, Wuster i Broadley, 2009).

### 2.1.2. Opis vrsta roda *Naja*

U prethodnoj taksonomskoj podjeli roda *Naja* spomenuli smo sve vrste, točnije njih 28, a u nastavku ćemo opisati najpoznatije.

Indijska ili azijska kobra, *N. naja*, može se pronaći od Indije i jugoistočne Azije do Filipina, a podvrste se međusobno razlikuju u bojama i prepoznatljivim oznakama. Može doseći do 2 m duljine. Kapa (kapuljača) kod kobri formira se širenjem osam pari slobodnih rebara. U tom stavu glava zmije podsjeća na šešir. Ostala rebra leže ravno, uz dužinu tijela. Proširenje te kapuljače zmiju u tom trenu čini većom i višom, što je jedan od načina zastrašivanja.

Oznake na kapuljači kod različitih podvrsta govore nam o kojoj je točno zmiji riječ. Na slici 2 prikazana je *N. n. naja* (indijska kobra ili „naočarka“ ili binocelatna kobra) koja na kapuljači ima oznaku u obliku velikog slova U s parom točaka. Često se povezuju s prikazom indijskog svirača frule. Zanimljivo je da kobre, kao ni ostale zmije, ne čuju zvukove. One nisu hipnotizirane glazbom nego se obrambeno njišu na pokrete svirača frule. Kobrama koje krotitelji koriste za redovite predstave, većinom su izvađeni otrovni zubi, a izrezan im je i nabor iz kojega izrasta dopunski otrovni zub koji stupa u akciju ako prvi otrovni zub propadne (Davidson, Schafer i Killfoil, 1995).



Slika 2. Prikaz Indijske kobre (Preuzeto iz: Botanical-online, 2019).

Portugalci su tu vrstu nazvali „Cobra de capello“ što u prijevodu znači zmija šeširača (Harder, 1966).

Monocelatna kobra ili *N. n. kaouthia* na svojoj kapuljači ima jednu oznaku (žute ili narančaste boje) u obliku slova O, dok je kapuljača crne kobre ili *N. n. oxiana* crne boje.

Naja haje poznatija je pod nazivom egipatska kobra. Haui, egipatski krotitelji zmija još uvijek izvode svoje vještine upravo s tom vrstom kobre. Starim Egipćanima predstavlja simbol uzvišenosti. Ova je zmija, nazvana kasnije prema staroegipatskoj riječi ureus, postala je jednom od najpoznatijih zmija svijeta. Ne zna se zašto su Egipćani poštovali baš ovu vrstu. Moguće je da su cijenili njezino posebno držanje što ga je ponekad zauzimala ili korist koju je ljudima

omogućavala uništavajući štakore i miševе. Poznata je i kao „Kleopatrina zmija“ jer se vjeruje da je njenim ugrizom Kleopatra počinila samoubojstvo. *Naja haje* građom je veća od ostalih predstavnika roda *Naja*, budući da potpuno odrasli primjerci narastu do dva metra. Većina ovih zmija, a pogotovo egipatske kobre, izgledaju s gornje strane jednolično žute kao slama, a s donje strane svijetložute. U području vrata imaju nekoliko tamnijih poprečnih pruga različite širine koje se protežu preko nekoliko nizova ljusaka. Postoje, međutim, mnogobrojne varijante koje se s gornje strane tijela razlikuju u bojama, od slamnatožute do crnosmeđe, u svim nijansama (Herder, 1966).

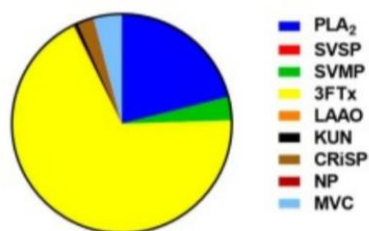
Znanstvenici su uspoređivali morfologiju očnjaka kod azijskih kobri s posebnih osvrtom na pojavu ponašanja štrcanja otrova. Dvije ne-štrcajuće vrste (*Naja naja* i *N. oxiana*), imaju nemodificirane očnjake s velikim otvorima za ispuštanje otrova. Kod ostalih sedam vrsta, za koje se smatra da su štrcajuće (engl. spitter), znanstvenici su uočili različite stupnjeve smanjenja veličine otvora za ispuštanje otrova. Postoje značajne razlike u otvorima, a čini se da samo malo smanjenje veličine otvora omogućuje štrcanje. Neke vrste pokazuju razlike u strukturi očnjaka, a *N. philippinensis* pokazuje spolni dimorfizam u veličini otvora za ispuštanje otrova.

*N. mossambica* ili mozambička štrcajuća kobra spada u spomenutu vrstu štrcajućih zmija. Posebno je opasna zbog sposobnosti izbacivanja otrova na udaljenost do 3 m. Zmija se podiže s tla i spljošti vrat kako bi izgledala veća, a potom oprezno nacilja napadačevu glavu, osobito oči. Otrov može prouzročiti veliku štetu pa čak i sljepoću. Ova vrsta smatra se jednom od najopasnijih zmija u Africi, posebno zbog svog hirovitog ponašanja (Uhlenbroek, 2009).

### 2.1.3. Komponente otrova roda *Naja*

Slika 3 prikazuje zastupljenost pojedinih komponenata otrova kod roda *Naja*. Najveći postotak otrova kod roda *Naja* čine toksini s tri prsta. Ostatak otrova sačinjava fosfolipaza A2, metaloproteaze, sekrecijski proteini bogati cisteinom (CRISP), Kunitzovi inhibitori i ostale manje komponente otrova (Tasoulis i Isbister, 2017).

## Naja (11 vrsta)



Slika 3. Komponente otrova specifične za rod *Naja*. Najveći dio zauzimaju toksini s tri prsta (3FTx) i fosfolipaza A2 (PLA<sub>2</sub>), a ostatak otrova čine metaloproteaze (SVMP), CRISP, Kunitzovi inhibitori (KUN) i ostale manje komponente otrova (MVC) (Preuzeto i prilagođeno iz: Tasoulis i Isbister, 2017).

**Fosfolipaze A2** su enzimi koji hidroliziraju estersku vezu fosfolipida. Prve fosfolipaze A2 iz zmijskog otrova pročišćene su iz otrova *Naja naja* i *Naja tripudians*, a nazvani su hemolizin zbog njihove sposobnosti da razgrađuju fosfolipidne membrane crvenih krvnih stanica. Od tada su izolirane različite vrste fosfolipaza zmijskog otrova. Pokazalo se da postoje u gotovo svim otrovima u porodicama Elapidae i Viperidae. Fosfolipaze A2 zmijskih otrova jednolančani su polipeptidi koji sadrže 115 - 125 aminokiselina (13 – 15 kDa). Fosfolipaza A2 oštećuje mitohondrije, leukocite, eritrocite, trombocite, završetke perifernih živaca, skeletne mišiće, dovodi do presinaptičke neurotoksičnosti, stvara sedativni učinak te uzrokuje otpuštanje histamina. Podaci o proteomu otrova pokazali su da fosfolipaza A2 čini 4 - 31% sadržaja proteina otrova različitih vrsta kobri (*N. naja*, *N. sputatrix*, *N. atra*, *N. kaouthia*, *N. siamensis*, *N. melanoleuca*, *N. nigricollis*, *N. katiensis*, *N. pallida*, *N. nubiae*, *N. mossambica*, *N. ashei*). Otrovi vrste ne-štrcajućih kobri (*N. haje* i *N. nivea*) pokazuju iznimno nisku enzimsku aktivnost fosfolipaze A2 (Hock Tan et al., 2019; Maretić i Cizelj, 2014).

**Inhibitori proteaze tipa Kunitz (Kunitzovi inhibitori)** pripadaju obitelji inhibitora serinskih proteaza koji se nalaze u gotovo svim organizmima. Ovo su mali proteini koji sadrže oko 60 aminokiselinskih ostataka te imaju jedan ili više Kunitz motiva:  $\alpha + \beta$  s dvije  $\beta$  ploče i dva kratka  $\alpha$  heliksa na kraju domene. Domena također sadrži tri disulfidne veze koje su smještene između 6 očuvanih cisteina. Kunitzovi proteini uključeni su u razne fiziološke procese kao što



su: koagulacija krvi, fibrinoliza, upala i blokiranje ionskih kanala (Hernández-Goenaga et al., 2019).

Velika obitelj **sekrecijskih proteina bogatih cisteinom (CRISP)** uključuje proteine različitog podrijetla, a funkcija većine CRISP-ova još uvijek je nepoznata. Za CRISP koji su do sada izolirani iz zmijskog otrova pronađene su dvije vrste aktivnosti: inhibicija nekoliko tipova ionskih kanala te blokiranje kontrakcije glatkih mišića stimuliranih kalijem. Stoga zmijski CRISP-ovi predstavljaju potencijalno vrijedne alate za proučavanje ionskih kanala (Tadokoro et al., 2020).

**Metaloproteinaze** (enzimi) su jedne od dominantnih komponenti zmijskih otrova koje imaju antikoagulacijske ili koagulacijske učinke, a što rezultira teškim krvarenjem. To postižu ometajući zgrušavanje krvi i stvaranjem hemostatskoga čepa ili degradiranjem bazalne membrane ili komponenata izvanstaničnog matriksa. Metaloproteinaze (proteinaze ovisne o cinku) veličine su od 20 do 110 kDa i kategorizirane su u klase P-I, P-II i P-III prema svojim strukturnim domenama. Samo se metaloproteinaze klase P-III nalaze u otrovima porodice Elapidae (Ferraz et al., 2019).

U neurotoksine ubrajamo: **fascikuline, dendrotoksine i  $\alpha$ -neurotoksine**. **Fascikulini** razaraju acetilkolinesterazu na kolinergičnim neuronima što dovodi do tetanije i disfunkcije živaca (npr. kod ugriza mamba – *Dendroaspis* spp.). **Dendrotoksini** paraliziraju živce inhibirajući neurotransmisiju blokiranjem izmjene iona na neuralnoj membrani (Maretić i Cizelj, 2013).

#### *2.1.3.1. Toksini s tri prsta*

**Toksini s tri prsta** ili **three fingered toxins (TFTs)** su proteinska natporodica koja je dobila ime po trima ispruženim  $\beta$ -petljama. Nemaju enzimatsku aktivnost, a pronalazimo ih u svim vrstama otrovnica.

Toksini s tri prsta sadrže jedan polipeptidni lanac, a njihova prostorna struktura okarakterizirana je hidrofobnom jezgrom stabiliziranom s četiri disulfidna mosta koja ograničavaju tri polipeptidne petlje (prsta) tvoreći  $\beta$ -strukturu. U otrovu kobri, toksine s tri prsta predstavljaju u velikoj većini  $\alpha$ -neurotoksini i citotoksini.

Razlikujemo  $\alpha$ -neurotoksine s kratkim lancem i  $\alpha$ -neurotoksine s dugim lancem.  $\alpha$ -neurotoksini s kratkim lancem sadrže 60 - 62 aminokiseline i četiri disulfidna mosta dok  $\alpha$ -neurotoksini s dugim lancem sadrže 65 - 75 aminokiselina s pet disulfidnih mostova (dodatni disulfidni most nalazi se u petlji II).

$\alpha$ -neurotoksini s kratkim lancem uspješno blokiraju nikotinski acetilkolinski receptor (nAChR) mišićnog tipa, a  $\alpha$ -neurotoksini s dugim lancem blokiraju i  $\alpha 7$  neuralni nAChR.

Jedna vrsta  $\alpha$ -neurotoksina s dugim lancem je  **$\alpha$ -kobra toksin** koji se nalazi kod otrovnica roda Naja. Često se  $\alpha$ -kobra toksin, za potrebe istraživanja, izolira iz vrsta *Naja kaouthia* i *Naja naja siamensis* (Betzel et al., 1991; Antil-Delbeke et al., 2000).

#### 2.1.3.1.1. Kemijska struktura $\alpha$ -kobra toksina

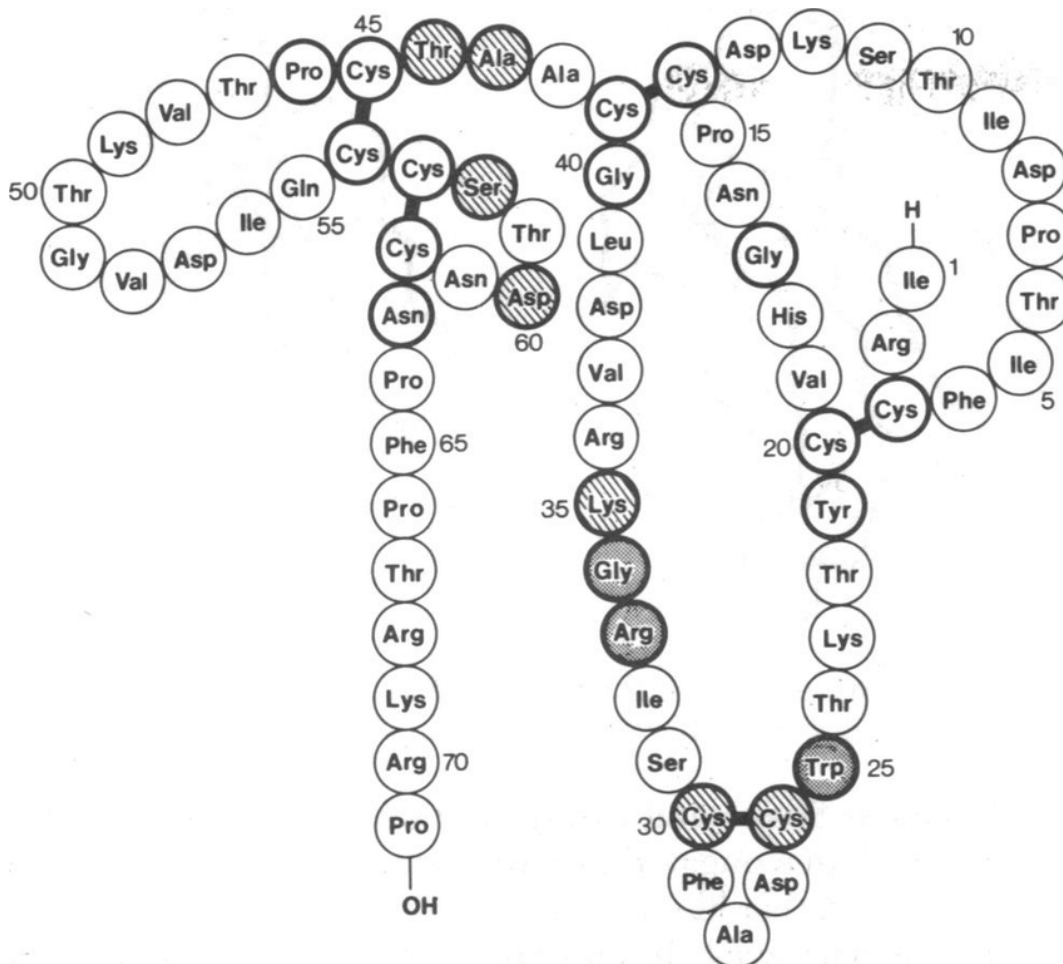
$\alpha$ -Kobra toksin primjer je  $\alpha$ -neurotoksina s dugim lancem (65 - 75 aminokiselina i 5 disulfidnih mostova), molekulske formule  $C_{277} H_{443} N_{97} O_{89} S_8$  i molarne mase 6957 g/mol (PubChem, 2015).

Potpuna struktura  $\alpha$ -kobra toksina utvrđena je istraživanjem kojega su proveli Betzel et al. (1991). Zahvaljujući dobivenoj pročišćenoj kristalnoj strukturi  $\alpha$ -kobra toksina iz vrste *Naja naja siamensis* (pri rezoluciji od 2.4 Å), dobili smo detaljan prikaz svake veze i položaja aminokiselina (Slika 4).



povezane preko četiri disulfidna mosta: *Cys-3 - Cys-20* , *Cys-14 - Cys-41*, *Cys-45 - Cys-56*, *Cys-57 - Cys-62* i jednim dodatnim disulfidnim mostom *Cys-26 - Cys-30* koji je smješten na donjem kraju petlje broj II. Glavna petlja stabilizirana je formacijom  $\beta$ -lista koja se proširuje do aminokiselina 53 - 57 petlje III da bi formirala trolančani, antiparalelni  $\beta$  - list sa desnorukim zavojem.

Rep, aminokiseline 58 - 71, povezan je s ostatkom pomoću disulfidnog mosta *Cys-57 - Cys-62* i s čvrsto povezanom vodikovom vezom s postranim lancem *Asn*<sup>63</sup>. Sve interakcije glavnoga lanca uvrštene su u sekundarne strukturne elemente - trostruka  $\beta$ -nabrana ploča, šest  $\beta$ -zaokreta, dva iskrivljena  $\alpha$ -heliks zaokreta i jedna dodatna veza između petlje II i repa (Betz et al., 1991).



Slika 5. Struktura  $\alpha$ -kobra toksina. Podebljane linije oko krugova označavaju nepromjenjive aminokiseline kod kardiotoksina te  $\alpha$ -neurotoksina s dugim i kratkim lancem. Osjenčani krugovi odgovaraju aminokiselinama nepromjenjivim samo kod  $\alpha$ -neurotoksina s dugim

lancem. Točkasti krugovi odgovaraju aminokiselinama nepromjenjivim kod  $\alpha$ -neurotoksina s dugim i s kratkim lancem (Walkinshaw, Saenger i Maelicke, 1980).

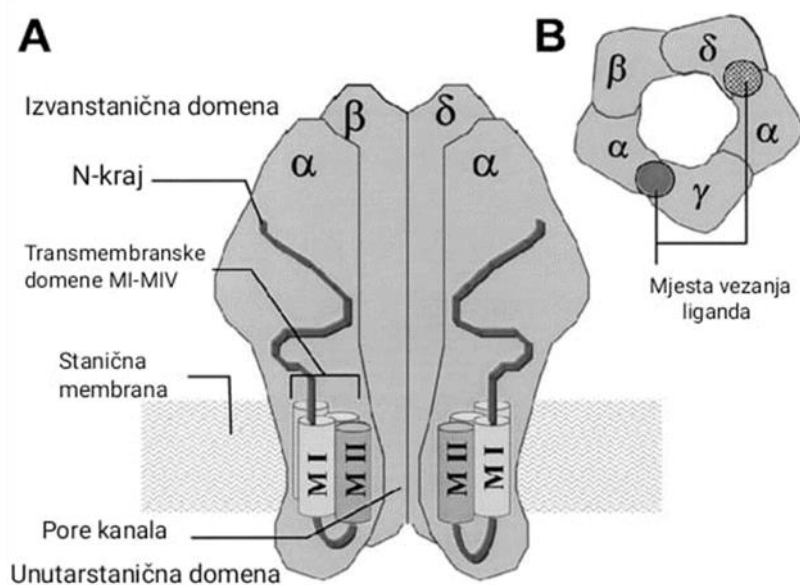
U otrovu kobre *Naja kaouthia* otkriveni su **disulfidni dimeri toksina s tri prsta**, što označava da su toksini s tri prsta povezani disulfidnom vezom. To su homodimeri  $\alpha$ -kobratoksina (dugolančani  $\alpha$ -neurotoksin) i heterodimeri koje tvori  $\alpha$ -kobra toksin s različitim citotoksinima. Toksini u dimerima općenito zadržavaju svoju strukturu. Funkcionalno važan disulfid 26 - 30 u polipeptidnoj petlji II  $\alpha$ -kobratoksinog ostatka ostaje netaknut u obje vrste dimera. Studije biološke aktivnosti pokazale su da citotoksini dimerne strukture potpuno gube citotoksičnost. Međutim, dimeri zadržavaju većinu sposobnosti  $\alpha$ -kobra toksina u natjecanju s  $\alpha$ -bungarotoksinom za vezivanje za *Torpedo* i  $\alpha 7$  nikotinske acetilkolin receptore (nAChRs), kao i za *Lymnea stagnalis* protein koji veže acetilkolin. Elektrofiziološki pokusi na neuronskim nAChR-om pokazali su da dimer  $\alpha$ -kobratoksina ne samo da stupa u interakciju s  $\alpha 7$  nAChR-om, već i da, za razliku od monomera  $\alpha$ -kobratoksina, blokira  $\alpha 3\beta 2$  nAChR. U posljednjoj aktivnosti nalikuje  $\kappa$ -bungarotoksinu, dimeru bez disulfida između monomera. Zaključak je da je dimerizacija bitna za interakciju neurotoksina s tri prsta i heteromernih  $\alpha 3\beta 2$  nAChR (Osipov et al., 2008).

#### 2.1.3.1.2. Uloga $\alpha$ -kobra toksina

$\alpha$ -Kobra toksin antagonist je nAChR-a. Vezanjem na nAChR mišićnog i neuronskog tipa, blokira sposobnost receptora da veže acetilkolin te na taj način inhibira protok iona kroz postsinaptičku membranu što dovodi do paralize i prestanka disanja. Da bi bolje razumjeli djelovanje  $\alpha$ -kobra toksina, moramo objasniti podjelu receptora.

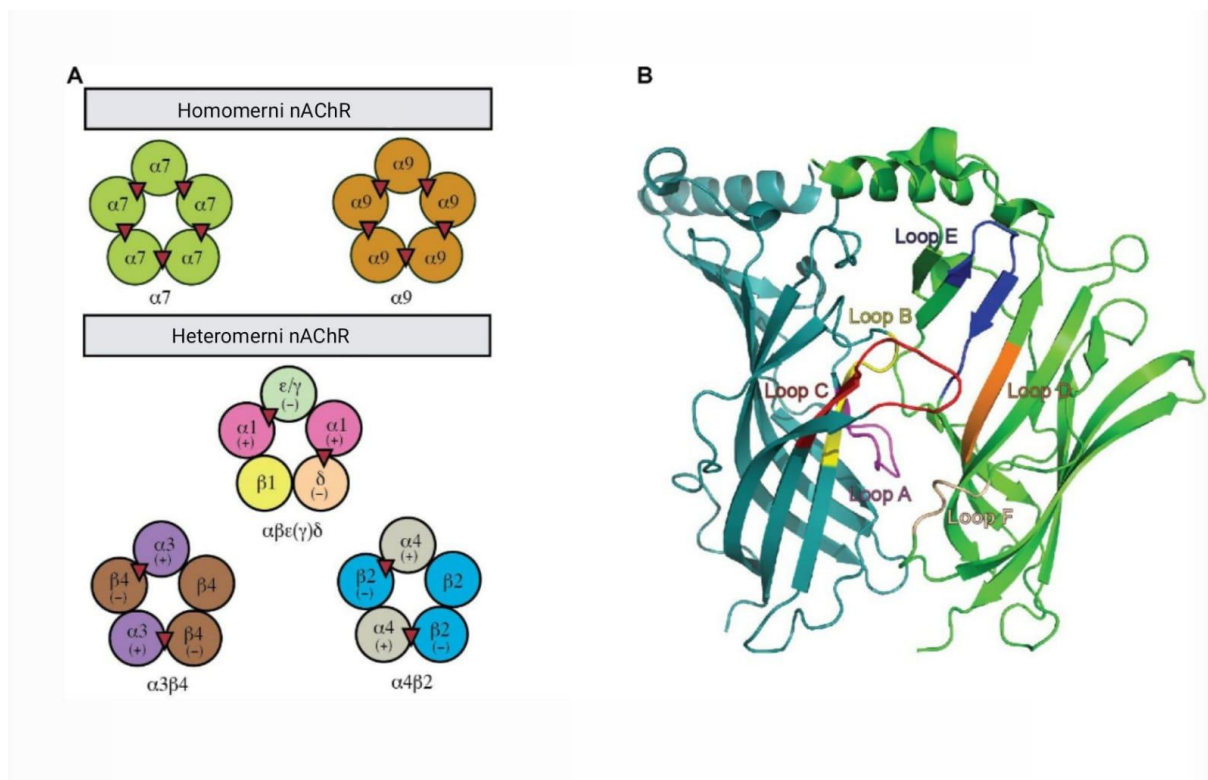
Nikotinske acetilkolinske receptore možemo podijeliti u dvije velike grupe: **receptori mišićnog tipa i receptori neuronskog tipa**.

Receptor koji je nađen u *Torpedo* raži pripada prvoj grupi, tj. **mišićnom tipu** i sastavljen je od pet podjedinica (dvije  $\alpha$  te po jedna  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ ) postavljenih pseudo-simetrično oko centralne osi. Mišićni tip receptora kod sisavaca ima sličnu strukturu uz iznimku  $\epsilon$  podjedinice umjesto  $\gamma$  (u odraslom obliku). Na slici 6 prikazan je mišićni tip receptora  $2\alpha 1\beta 1\gamma\delta$  (Nirthanan i Gwee, 2004).



Slika 6. Shema mišićnog tipa receptora  $(\alpha_1)_2\beta_1\gamma\delta$ . Receptor je prikazan okomito na os ionskoga kanala. Radi jasnoće  $\gamma$  podjedinica nije prikazana. Kao što je prikazano svaka podjedinica sadrži četiri zavojite transmembranske domene (MI, MII, MIII, MIV). Domena MII okružuje pore kanala. U prikazu B vidi se dva udaljena vezna mjesta za acetilkolin ili za druge agoniste i antagoniste (Preuzeto i prilagođeno iz: Nirthanan i Gwee, 2004).

Kod **neuronskog tipa receptora** pronađeno je sedam tipova koji su izgrađeni od  $\alpha$  ( $\alpha_2$ - $\alpha_{10}$ ) i ne- $\alpha$  podjedinica ( $\beta_2$ - $\beta_4$ ). Kod te podjele tipova neuronskog receptora razlikujemo heteromerne (kao kombinacija  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinica) te homomerne (npr. sastav od pet  $\alpha_7$  podjedinica) receptore koji su prikazani na slici 7 (Ho et al., 2020).



Slika 7. Prikaz homomernog i heteromernog neuronskog tipa receptora. U prikazu pod A mjesta vezanja acetilkolina prikazana su kao crveni trokuti. U prikazu B vidimo da se mjesto vezanja liganda nAChR nalazi se između dva susjedna protomera gdje je vezni džep zatvoren petljama (Preuzeto i prilagođeno iz: Ho et al., 2020).

$\alpha$ -neurotoksini zmijskog otrova s kratkim i dugim lancem uspješno blokiraju oba tipa mišićnog acetilkolininskog receptora, no samo  $\alpha$ -neurotoksini s dugim lancima blokiraju i neuronski homomerni  $\alpha 7$  nAChR. Time sprječavaju vezanje acetilkolina na receptor, inhibiraju protok iona što dovodi do paralize, prestanka disanja i u konačnici smrti (Ho et al., 2020).

Analizom nAChR-a znanstvenici su došli do saznanja da postoje vezna mjesta na koja se  $\alpha$ -kobratoksin može vezati, no ostaje pitanje koji su to točno dijelovi  $\alpha$ -kobratoksina koji sudjeluju u vezanju na receptore.

**Trp-25, Asp-27, Phe-29, Arg-33, Arg-36 i Phe-65**  $\alpha$ -kobra toksina uključeni su u vezanje za oba receptora - neuronski i *Torpedo* (mišićni) te neki od njih (Trp-25, Asp-27 i Arg-33) imaju sličnu energiju vezanja za oba receptora. Suprotno tome, **Ala-28, Lys-35, i Cys-26-Cys-30** selektivno se vežu samo na  **$\alpha 7$ -neuronski receptor** dok se **Lys-23 i Lys-49** vežu samo na ***Torpedo* mišićni tip nAChR-a** (slika 8).

Potvrdu da upravo navedene aminokiseline  $\alpha$ -kobra toksina sudjeluju u vezanju za nAChR, dobili smo i istraživanjem koje su proveli Antil-Delbeke et al. (2000). Istraživanjem su utvrđivali kojim se točno aminokiselinama  $\alpha$ -kobratoksin veže na  $\alpha 7$ -nikotinski acetilkolinski receptor.

$\alpha$ -Kobratoksin je u tom istraživanju izoliran iz vrste *Naja naja siamensis*. Kako bi identificirali aminokiseline kojima se  $\alpha$ -kobratoksin veže velikim afinitetom na  $\alpha 7$  neuronski receptor, proizveli su 36 mutanata toksina koji su prikazani u Tablici 1.

Tablica 1. Vrijednosti disocijacijskih konstanti divljeg tipa i mutiranih oblika  $\alpha$ -kobra toksina. Vrijednost  $\Delta G$  predstavlja razliku u slobodnoj energiji vezanja na  $\alpha 7$  receptor između divljeg tipa i mutantnih  $\alpha$ -kobratoksina.  $\Delta G = \Delta G_{dt}$  (razlika slobodne energije divljeg tipa) -  $\Delta G_{mut}$  (razlika slobodne energije mutiranog tipa).  $\Delta G = RT \ln (Kd'/Kd)$  pod uvjetima da je  $R = 1,99$  cal/mol/K i  $T = 293$  K (Antil-Delbeke et al., 2000).

	$K_p$	$K_p'/K_p$	$\Delta\Delta G$
	<i>nM</i>		<i>kcal/mol</i>
Venom Cbtx	7.5 ± 1.5	0.83	-0.11
Cbtx rec	9.0 ± 3	1	0.00
Loop I			
F4A	19.4 ± 4	2.1	0.43
I5A	20.1 ± 2	2.2	0.46
T6A	17.4 ± 3	1.9	0.38
P7A	9.0 ± 1	1	0.00
D8A	11.5 ± 0.5	1.3	0.17
D8R	12.2 ± 1.8	1.4	0.19
I9A	18.1 ± 2	2	0.41
T10A	9.5 ± 0.5	1.1	0.05
S11A	14.2 ± 1	1.6	0.27
K12E	22.3 ± 9	2.5	0.53
D13A	8.3 ± 0.5	0.9	-0.08
Loop II			
Y21F	12.5 ± 1	1.4	0.19



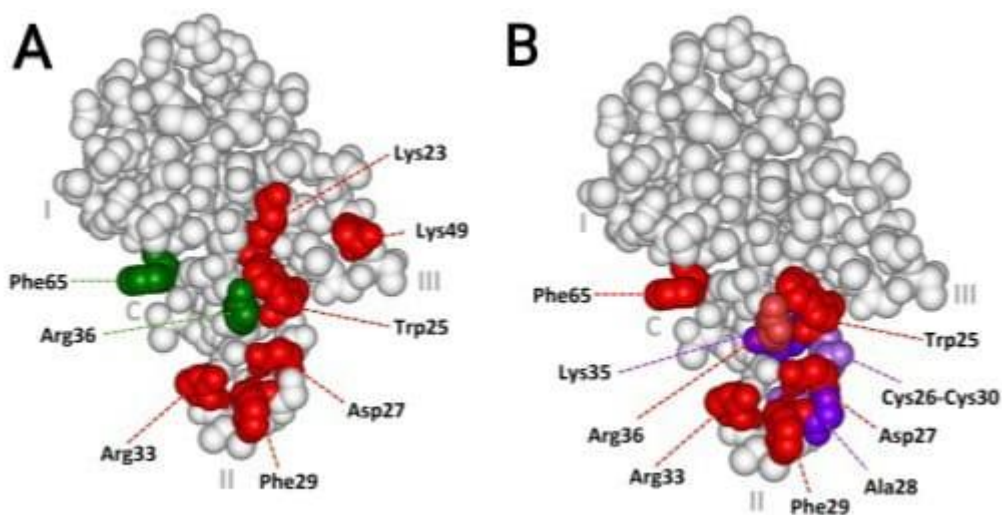
	$K_p$	$K_p'/K_p$	$\Delta\Delta G$
K23E	24.5 ± 2.5	2.7	0.57
W25F	9.1 ± 0.6	1	0.00
W25H	36 ± 4	4	0.81
<b>W25A</b>	53.5 ± 7	<b>6</b>	<b>1.1</b>
D27N	27.2 ± 2.5	3	0.64
<b>D27R</b>	450 ± 85	<b>50</b>	<b>2.28</b>
<b>A28G</b>	48 ± 7	<b>5.4</b>	<b>1</b>
A28R	9.5 ± 2	1.1	0.05
F29L	24.5 ± 4.5	2.7	0.57
F29W	6.1 ± 0.2	0.7	-0.21
<b>F29A</b>	667 ± 128	<b>74</b>	<b>2.51</b>
<b>C26S/C30S</b>	125 ± 27	<b>13.9</b>	<b>1.54</b>
S31A	16 ± 6	1.8	0.34
I32A	18 ± 2	2	0.40
<b>R33E</b>	3055 ± 400	<b>339</b>	<b>3.40</b>
<b>K35A</b>	99 ± 6	<b>11</b>	<b>1.40</b>
<b>R36A</b>	145 ± 15	<b>16</b>	<b>1.62</b>
D38L	4.1 ± 0.5	0.45	-0.46
Loop III			
T47A	9.5 ± 0.6	1.1	0.05
K49E	29 ± 3	3.2	0.68
D53K	7.2 ± 0.4	0.8	-0.13
C-terminal			
<b>F65A</b>	139 ± 26	<b>15.5</b>	<b>1.60</b>
P66A	24 ± 1	2.7	0.57
Δ66	30 ± 4	3.3	0.70

Kao što možemo vidjeti u Tablici 1, sve komponente petlje I su mutirane, ali niti jedna nije pokazivala afinitet povećan više od tri puta, što rezultira promjenom u slobodnoj energiji vezanja od 0, 5 kcal/mol. Zaključili su da nijedan aminokiselinski ostatak u petlji ne sudjeluje u vezanju na  $\alpha 7$  receptor.

U petlji II nalazi se čak devet aminokiselina podložnih mutacijama, s povećanjem afiniteta vezanja od 5 do 340 puta. Mutacija R33E izazvala je najintenzivniju reakciju, s povećanjem afiniteta vezanja od 340 puta, tako da se može zaključiti da **Arg-33** najviše doprinosi procesu vezanja  $\alpha$ -kobratoksina i receptora. Uz Arg-33 i **Arg-36** može se smatrati značajnim. Iz tablice se vidi da je njegova mutacija s alaninom izazvala porast afiniteta vezanja za 16 puta. Mutacija Trp-25 s alaninom uzrokovala je slabi porast afiniteta vezanja. No, kao što se vidi iz Tablice 1, mutacija Trp-25 s fenilalaninom ili histidinom nema nikakav utjecaj na afinitet vezanja toksina. Mutacija Ala-28 s glicinom uzrokovala je porast afiniteta vezanja za 5 puta, što pokazuje da metilna grupa na ovoj poziciji može biti uključena u vezanje za receptor. Mutacija Ala-28 s argininom nije utjecala na afinitet toksina što pokazuje da pozicija 28 može sadržavati bilo koju aminokiselinu čiji bočni lanac ima hidrofobni karakter. Drugi mutacijski podložni ostaci u petlji II (Cys-26-Cys-30 i Lys-35) imaju svoj postrani lanac izložen na konveksnoj strani  $\beta$ -ploče. To bi moglo značiti da bilo koja aminokiselina u petlji II može imati povećani afinitet vezanja. Rezultati istraživanja pokazuju suprotno. Asp-38, Ser-31, Ile-32 i Tyr-21 mogu biti mutirani bez utjecaja na vezanje proteina za receptor. Porast afiniteta kod mutacija **Cys-26-Cys-30** i **Lys-35** ukazuje na uključenost ovih aminokiselina u vezanje s receptorom (Antil-Delbeke et al, 2000).

Istraživanjem C-terminalnog repa toksina, znanstvenici su dobili precizne odgovore. Mutacija F65A (**Phe-65**) izazvala je 16 puta veći porast afiniteta vezanja  $\alpha$ -kobra toksina za receptor, dok mutacija P66A (mutacija Pro-66 i alanina) i mutacija  $\Delta$ 66 nisu imali nikakvog efekta (Antil-Delbeke et al., 2000).

Antil-Debeke et al., (2000) otkrili su da je 10 aminokiselina (**Trp-25, Asp-27, Ala-28, Phe-29, Cys-26-Cys-30, Arg-33, Lys-35, Arg-36 i Phe-65**) mutacijski osjetljivo te da mogu biti uključeni u područja kojima se  $\alpha$ -kobratoksin veže za  **$\alpha$ 7-neuronski tip receptora** (Slika 8).



Slika 8. Prikaz aminokiselinskih ostataka  $\alpha$ -kobra toksina uključenih u vezanje na mišićni (prikaz A) i neuronski tip receptora (prikaz B) (Nirthanan, 2020).

## 2.2. Klinička slika ugriza

Ugrizi kobre uzrokuju veliki broj smrtnih slučajeva u svijetu. Točan broj je teško utvrditi jer se zapisi o ugrizima zmija ne evidentiraju u mnogim dijelovima svijeta. Kobre, kraitovi i Russellove ljutice najbrojnije su zmije koje uzrokuju smrti u Indiji, Šri Lanki i jugoistočnoj Aziji. U ovim se područjima dogodi više od polovine godišnjih 30000 - 40000 smrtnih slučajeva od ugriza zmija u svijetu.

Otrovi kobre uzrokuju različite znakove i simptome. S obzirom da otrov kobre sadrži brojne toksine, ozbiljan ugriz može utjecati na brojne organske sustave. Neurotoksičnost i lokalna oštećenja tkiva najčešće prevladavaju u kliničkoj slici ugriza kobre. Pokazalo se da toksičnost varira među različitim vrstama kobre. Npr. *Naja mossambica* i *Naja nigricollis* učestalo uzrokuju lokalna oštećenja tkiva, no rijetko uzrokuju neurotoksičnost. Za vrstu *Naja naja philippiensis* prijavljeni omjer neurotoksičnosti i nekroze tkiva je 14:1 dok je za vrste *Naja kaouthia* i *Naja sumatrana* prijavljeni omjer 1:3, 7. Kobre iz Malaje, Tajvana, Tajlanda, Kenije, Nigerije i Rodezije izazivaju i neurotoksičnost i lokalnu nekrozu tkiva, ali u različitim omjerima (Davidson, Schafer i Killfoil, 1995).

### Lokalni simptomi

Bol je gotovo uvijek prisutna na mjestu ugriza. Počinje odmah i može trajati nekoliko dana. Lokalno oticanje obično počinje 2 - 3 sata nakon ugriza uz iznimku zmije vrste *Naja naja philippinensis* za čiji se ugriz pokazalo da ne mora uzrokovati lokalno oticanje. Naravno, sve ovisi o količini i sastavu otrova. Tako se oticanje s vremenom može širiti dalje po tijelu, no u većini slučajeva nekroza zahvaća kožu i potkožno tkivo. Oštećenom tkivu potrebno je nekoliko mjeseci da zacijeli. Ako se liječenje ne obavlja pravilno može doći do ozbiljnih posljedica (Davidson, Schafer i Killfoil, 1995).

### Neurotoksičnost

Simptomi neurotoksičnosti obično počinju ptozom (spuštanjem gornje očne vjeđe). To može napredovati do diplopije (dvoslike), disfagije (otežanog gutanja), dizatrije (poremećaja govora), pojačanog lučenja sline i trizmusa (onemogućenog otvaranja usta). Može doći do slabe paralize koja utječe na ekstremitete. Konačno, respiratorni mišići pacijenta postaju paralizirani što uzrokuje prestanak disanja. Obično se pojavljuje razmak od nekoliko sati između ugriza i početka neurotoksičnih simptoma, ali simptomi paralize zabilježeni su već 3 minute nakon ugriza. Paraliza mišića obično traje 2 - 3 dana. U većini slučajeva dolazi do potpunog oporavka ako pacijent uspije preživjeti, tj. ako je pravilno liječen. Rano liječenje protuotrovom može ograničiti neurotoksične simptome. Protuotrov je manje učinkovit ako se daje nakon što je paraliza već nastupila. Ostali simptomi uključuju povraćanje, glavobolju, gubitak svijesti, bljedilo, dijforezu (pojačano znojenje), slab puls, hipotenziju (nizak krvni tlak), regionalnu limfadenopatiju (abnormalnost u veličini, konzistenciji i broju limfnih čvorova) i osjetljivost (Davidson, Schafer i Killfoil, 1995).

### Bubrezi

Bubrežne abnormalnosti nisu česte. Samo je kod vrste *Naja naja sputatrix* zabilježena proteinurija (izbacivanje bjelančevina urinom) (Davidson, Schafer i Killfoil, 1995).

### Oči

Kao što je već spomenuto, nekoliko vrsta kobri može „štrcati“ otrov. Otrovi su bezopasni osim u slučaju kada dođe do očiju. U takvom slučaju prisutna je jaka bol i može doći do ozbiljnih komplikacija (čak i gubitka vida) ako nije pružena medicinska pomoć. Ako se pravilno liječi neće doći do trajnoga oštećenja (Davidson, Schafer i Killfoil, 1995).

### 2.2.1. Prva pomoć u slučaju ugriza kobre

U slučaju ugriza kobre ili bilo koje druge otrovnice, treba znati što možemo učiniti kako bi u najvećoj mjeri spriječili posljedice ugriza. Nakon ugriza otrovnice trebali bi:

1. Utvrditi da je zmija sigurno spremljena ili otjerana tako da ne može ponovno ugristi te ako je moguće otkriti o kojoj je zmijski riječ zbog pravilnog izbora protuotrova
2. Pozvati hitnu pomoć
3. Postaviti žrtvu u ugodan položaj sa što manje micanja
4. Pregledati mjesto ugriza, označiti rubove oštećenog tkiva i vrijeme ugriza kako bi se moglo pratiti napredovanje oštećenja
5. Ukloniti prstenje, narukvice i slično zbog mogućeg oticanja tkiva
6. Ne zarezivati, izrezivati, zagrijavati niti koristiti: led, masti, biljke, struju, alkohol ili stimulanse koji mogu samo pogoršati ishod
7. Mehaničko isisavanje se ne preporučuje
8. Ugroženi ekstremitet imobilizirati i postaviti ispod razine srca
9. Tlačna imobilizacija - omotati elastični zavoj od distalnog mjesta preko ugriza pa što je više (proksimalnije) moguće tlakom između 40 - 70 mmHg (kao kod omatanja kod iščašenja gležnja)
10. Imobilizirati preko elastičnog zavoja
11. Ne uklanjati imobilizaciju do dolaska u bolnicu
12. Upotrijebiti imobilizaciju bez obzira na elastični zavoj (Hitna medicinska služba portal, 2021).

### 2.3. LD<sub>50</sub> test

Vrijednost LD<sub>50</sub> je univerzalna mjera koja pokazuje toksičnost neke tvari. To je doza koja usmrti pola (50%) od ukupnog broja testiranih životinja, takozvana srednja smrtna doza. Mjere se izražavaju u miligramima otrova na 100 grama (ako je testirana životinja manja) ili po kilogramu (ako je veća) tjelesne mase. Zmija je otrovnija što je vrijednost LD<sub>50</sub> manja. Iako otrov kobre nije najtoksičniji, veličina kobre omogućava joj ubrizgavanje velike količine

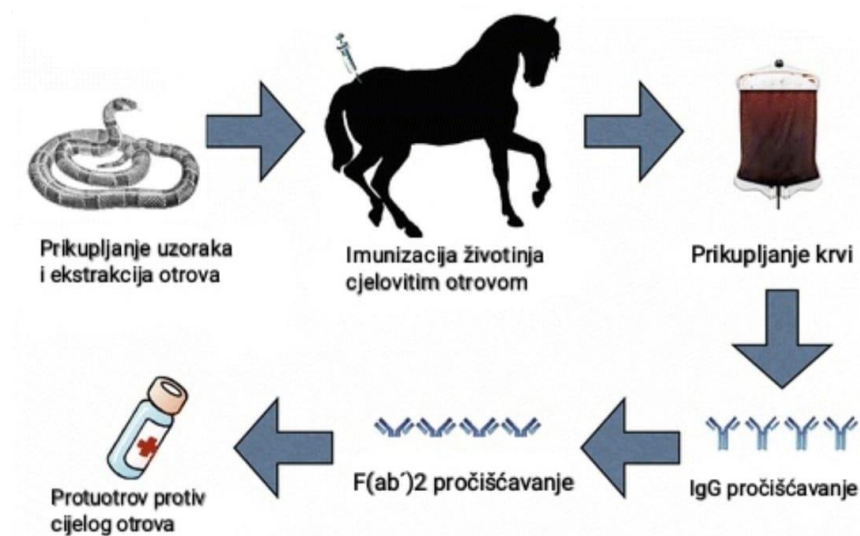
otrova. Prilikom jednog ugriza, kobra ispušta 6 do 7 ml otrova i to joj omogućava da brzo usmrti plijen (Dhanak, Rishipathak i Gide, 2010).

Razina LD<sub>50</sub> za *Naja haje* iznosi 0, 19 mg/kg, za *Naja nigricollis* 0, 23 mg/kg, a za *Naja naja* 0, 28 mg/kg (Untamed science, 2019).

#### 2.4. Proizvodnja protuotrova

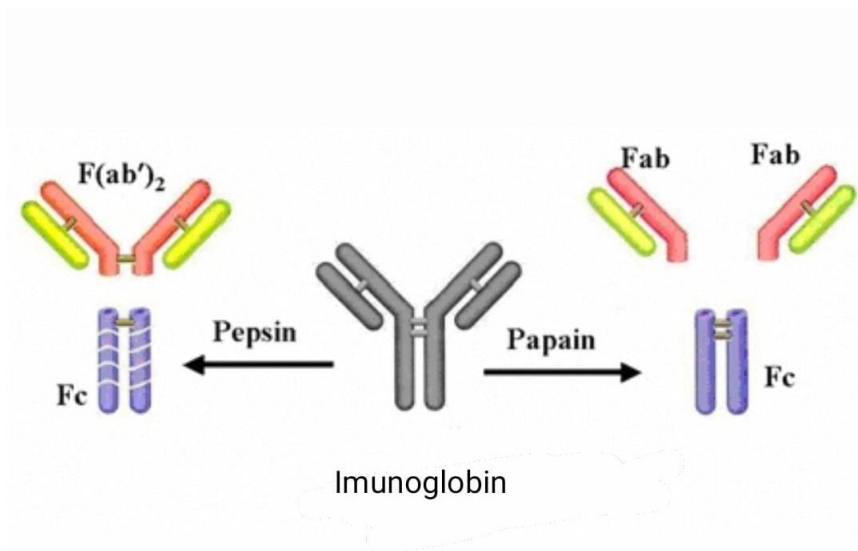
Prvi korak u proizvodnji protuotrova predstavlja uzimanje otrova te pročišćavanje otrova koji će se ubrizgati u pogodnu životinju. U životinju se najprije ubrizgava mala doza otrova koja životinji ne može naštetiti. Toksini koji se nalaze u otrovu potaknut će imunološki sustav na proizvodnju antitijela čija je svrha neutralizacija otrova. Tijekom godine ubrizgava se nekoliko dodatnih doza otrova, tj. postupno se povećava količina otrova. Na taj način životinja proizvodi toliko antitijela da postaje imuna na otrov. Nakon toga životinji se uzme veliki uzorak krvi. Iz krvi znanstvenici izdvajaju plazmu koja sadrži antitijela, a ostatak krvi vraća se u životinju. Iz plazme se dobivaju netaknute IgG molekule,  $F(ab')_2$  fragmenti ili Fab fragmenti (Slika 9). Konji su se pokazali najprikladniji za komercijalnu proizvodnju protuotrova jer su pitomi, izdržavaju u većini klimatskih uvjeta i što je najvažnije, daju najveću količinu plazme. Kao alternativni izbor životinje, znanstvenici otrov ubrizgavaju u ovce. Prednost toga je da će takav protuotrov više odgovarati ljudima koji su previše osjetljivi na proteine konja (Ramos i Ho, 2014).

## **Tradicionalna proizvodnja protuotrova**



Slika 9. Shematski prikaz proizvodnje protuotrova (Ramos i Ho, 2014).

Molekule IgG sadrže dvije Fab komponente i jednu Fc komponentu. Fab je varijabilna regija reko koje antitijelo prepoznaje jedinstvenu molekulu antigena. Fc komponenta zaslužna je za aktivaciju komplementa. Odvajanje fragmenata F(ab)2 i Fab postiže se enzimatski, cijepanjem uz pomoć pepsina, odnosno papaina kao što je prikazano na Slici 10 (WHO, 2017).



Slika 10. Izdvajanje fragmenta Fab i  $F(ab')_2$  pri proizvodnji protuotrova. Odvija se uz pomoć pepsina i papaina (Zolfagharian i Dounighi, 2013).

Protuotrovi se po specifičnosti mogu svrstati u dvije kategorije:

**Monovalentni** - protuotrovi napravljeni kao odgovor na otrov samo jedne vrste zmija

**Polivalentni** - protuotrovi koji su aktivni protiv otrova više vrsta zmija

Polivalentni protuotrovi proizvode se imunizacijom jedne životinje koristeći otrove različitih vrsta zmija. Ovakav način proizvodnje bolji je od miješanja monovalentnih protuotrova. Upotreba polivalentnog protuotrova praktičnija je od upotrebe monovalentnog jer se često dogodi da se ne zna koja je zmija odgovorna za ugriz. Polivalentni protuotrovi također se mogu napraviti na način da pokriju sve poznate vrste otrovnica u zemlji. Nakon ugriza otrovnica iz roda *Naja* najčešće se koristi polivalentni protuotrov (Rojnuckarin, 2015).

## 2.5. Primjena $\alpha$ -kobra toksina u medicini

S obzirom da je glavni učinak  $\alpha$ -kobra toksina blokiranje nikotinskog acetilkolinškog receptora, znanstvenici upravo taj toksin koriste u svojim istraživanjima pronalaska lijekova za razne bolesti.  $\alpha$ -Kobra toksinom dobivenim iz *Naja naja* i *Naja kaouthia* može se liječiti kronična bol



kod slučajeva uznapredovanog raka. U jednom se istraživanju koristio modificirani oblik  $\alpha$ -kobra toksina kao mogući lijek za multiplu sklerozu (MS).

MS je bolna autoimuna bolest u kojoj imunološki sustav napada središnji živčani sustav. MS napada bijelu tvar u području mozga i leđne moždine i tako uništava mijelinsku ovojnicu koja se nalazi oko živčanih vlakana. Uništavanje mijelinske ovojnice onemogućava aksonu neurona provedbu akcijskog potencijala. Posljedica je pojavljivanje različitih neuroloških simptoma te bolest često napreduje do fizičke i kognitivne disfunkcije. Još uvijek se ne zna točan uzrok nastanka MS-a, ali smatra se da je rezultat kombinacije okolišnih i genetičkih faktora (Dhanak, Rishipathak i Gide, 2010).

Kemijska modifikacija  $\alpha$ -kobra toksina provodi se oksidacijom sa supstancama kao što su vodikov peroksid, formijat i ozon. Na takav način mijenja se afinitet prema nikotinskom acetilkolinском receptoru. Rezultat je smanjenje povezanosti s receptorom ili gubitak toksičnosti. U većini se istraživanja kemijska detoksifikacija otrova provodi uz vodikov peroksid. Modificirani  $\alpha$ -kobra toksin pokazao se sigurnim za upotrebu. Ubrizgavanjem modificiranog kobratoksina (5 g/kg) u miševe nisu se pokazali štetni učinci te se navodi da pri korištenju modificiranog  $\alpha$ -kobratoksina nije uginula niti jedna životinja (Reid, 2007).

Istraživanja su pokazala da blokadom  $\alpha$ -7 neuralnog receptora (uz djelovanje  $\alpha$ -kobra toksina) dolazi do inhibicije glutamata koji je poznati okidač za apoptozu (staničnu smrt). Ta su saznanja bitna za istraživanja raznih drugih stanja jer se pokazalo da osobe s amiotrofičnom lateralnom sklerozom (ALS-om) imaju visoku razinu glutamata koja cirkulira u središnjem živčanom sustavu. Kao još jedan važan primjer navode se i pacijenti koji su doživjeli moždani udar. Kod takvog slučaja hipoksičnog stanja okidač je veliki izljev glutamata koji uzrokuje uništenje postsinaptičkog neurona (Dargent et al., 1996).

Modificirani  $\alpha$ -kobra toksin pokazao se kao primarni kandidat za daljnja klinička istraživanja lijekova za MS zbog svoje antivirusne, neuromodulatorne te imunomodulatorne aktivnosti (Dhanak, Rishipathak i Gide, 2010) (Tablica 2).

Tablica 2. Usporedba aktivnosti lijekova za MS i modificiranog  $\alpha$ -kobra toksinom

(Dhanak, Rishipathak i Gide, 2010).

Aktivnost	Interferon	Copaxone	Tysabri	Novatrone	Frampridine	Modificirani $\alpha$ -kobra toksin
Imunomodulacija	+	+	+	+	+	+
Antivirusna aktivnost	+	-	-	-	-	+
Neuromodulacija	-	-	-	-	+	+
Analgetik	-	-	-	-	-	+
Nuspojave	-	+	-	-	-	+

## LITERATURA

Antil-Debeke, S., Servent, D. i Ménez, A. (1999) Variability among the sites by which curaremimetic toxins bind to Torpedo acetylcholine receptor, as revealed by identification of the functional residues of  $\alpha$ -cobratoxin. *Journal of Biological Chemistry*, 274(49), 34851-34858. Dostupno na: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.49.34851>

Antil-Delbeke, S., Gaillard, C., Tamiya, T., Corringer, P.-J., Changeux, J.-P., Servent, D. i Ménez, A. (2000) Molecular determinants by which a long chain toxin from snake venom interacts with the neuronal  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(38), 29594-29601. Dostupno na: <https://doi.org/10.1074/jbc.M909746199>

Betzl, C., Lange, G., Pal, G. P., Wilson, K. S., Maelicke, A. i Saenger, W. (1991) The refined crystal structure of alpha-cobratoxin from *Naja naja siamensis* at 2.4-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 266(32), 21530-21536. Dostupno na: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)54671-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)54671-8)

Botanical-online, *Característica de la cobra real* (2019). Dostupno na: <https://www.botanical-online.com/animales/cobra-real-caracteristicas> (23. 07. 2022.)

Brehm, A. E. (1983) *Život životinja*. Zagreb: Orakul

Cooper i Hausman (2010) *Stanica:molekularni pristup*. Zagreb: Medicinska naklada

Dargent, B., Anac, C., Tricaud, N. i Couraud, F. (1996) Activation of voltage-dependent sodium channels in cultured cerebellar Purkinje cells induces neurotoxicity that is not mediated by glutamate release. *Neuroscience*, 73(1), 209-216. Dostupno na: [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00608-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00608-7)

Davidson, T. M., Schafer, S. i Killfoil, J. (1995) Cobras. *Journal of Wilderness Medicine*, 6, 203-219. Dostupno na: [https://doi.org/10.1580/1080-6032\(1995\)006\[0203:C\]2.3.CO;2](https://doi.org/10.1580/1080-6032(1995)006[0203:C]2.3.CO;2)

Dhanak, A. C., Rishipathak, D. D. i Gide, P. S. (2010) Multiple sclerosis & its treatment with alpha-cobratoxin: a review. *International Journal of PharmTech Research*, 2(1), 740-749.

Ferraz, C. R., Arrahman, A., Xie, C., Casewell, N. R., Lewis, R. J., Kool, J. i Cardoso, C. F. (2019) Multifunctional toxins in snake venoms and therapeutic implications: from pain to hemorrhage and necrosis. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7(218). Dostupno na: <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00218>

Hernández-Goenaga, H., López-Abán, J., Protasio, A. V., Santiago, B. V., del Olmo, E., Vanegas, M., Fernández-Soto, P., Alfonso Patarroyo, M. i Muro, A. (2019) Peptides derived of kunitz-type serine protease inhibitor as potential vaccine against experimental schistosomiasis. *Frontiers in Immunology*, 10(2498). Dostupno na: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02498>

Hitna medicinska služba portal (2021) Dostupno na: <https://hitnapomoc.net/ugrizi-zmija/> (05. 09. 2021.)

Ho, T. N. T., Abraham, N. i Lewis, R. J. (2020) Structure-function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor inhibitors derived from natural toxins. *Frontiers in Neuroscience*, 14(609005). Dostupno na: <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.609005>

Hock Tan, C., Wong Ying, K., Tan Hong, N., Ng Shan T. i Yi Tan, K. (2019) Distinctive distribution of secretory phospholipases A<sub>2</sub> in the venoms of afro-asian cobras (subgenus: *Naja*, *Afronaja*, *Boulengerina* and *Uraeus*). *Toxins*, 11(2), 116. Dostupno na: <https://doi.org/10.3390%2Ftoxins11020116>

Maretić, T. i Cizelj, I. (2013) Venomous snakebites and treatment - on the occasion of the acquisition of new venomous snakes at the Zagreb Zoo and private herpetaria. *Infektološki Glasnik*, 33(1), 11-19.

Nirthanan, S. (2020) Snake three-finger  $\alpha$ -neurotoxins and nicotinic acetylcholine receptors: molecules, mechanisms and medicine. *Biochemical Pharmacology*, 181, 114168. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114168>

Nirthanan, S. i Gwee, M. C. E. (2004) Three-finger  $\alpha$ -neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on. *Journal of Pharmacological Sciences*, 94(1), 1-17. Dostupno na: <https://doi.org/10.1254/jphs.94.1>

Osipov, A. V., Kasheverov, I. E., Makarova, Y. M., Starkov, V. G., Vorontsova, O. V., Ziganshin, Kh. R., Andreeva, T. V., Serebryakova, M. V., Benoit, A., Hogg, R. C., Bertrand, D., Tsetlin, V. I. i Utkin, Y. N. (2008) Naturally occurring disulfide-bound dimers of three-fingered toxins. *Journal of Biological Chemistry*, 283(21), 14571-14580. Dostupno na: <https://doi.org/10.1074/jbc.M802085200>

PubChem (2015). Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/alpha-Cobratoxin> (22. 07. 2021.)

- Radovanović, M. (1965) *Zoologija: Sistematika životinja, 2.dio*. Beograd: Naučna knjiga
- Ramos, H. R. i Ho, P. (2014) Developing snake antivenom sera by genetic immunization: a review. *Clinical Toxicology*, 36-1. Dostupno na: [http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-6288-6\\_36-1](http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-6288-6_36-1)
- Ravlić, S. (2006) *Hrvatska enciklopedija*. Zagreb: Lekisokografski zavod Miroslav Krleža
- Reid, P. F. (2007) Alpha-cobratoxin as a possible therapy for multiple sclerosis: a review of the literature leading to its development for this application. *Critical Reviews™ in Immunology*, 27(4), 291-302. Dostupno na: <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v27.i4.10>
- Rojnuckarin, P. (2015) Clinical uses of snake antivenoms. *Toxinology*, 2,437-452. Dostupno na: [http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-6386-9\\_24](http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-6386-9_24)
- Tadokoro, T., Modahl, C. M., Maenaka, K. i Aoki-Shioi, N. (2020) Cysteine-rich secretory proteins (CRISPs) from venomous snakes: an overview of the functional diversity in a large and underappreciated superfamily. *Toxins*, 12(3), 175. Dostupno na: <https://doi.org/10.3390%2Ftoxins12030175>
- Tasoulis, T. i Isbister, G. K. (2017) A Review and database of snake venom proteomes. *Toxins*, 9(9), 290. Dostupno na: <https://doi.org/10.3390%2Ftoxins9090290>
- Trim, C. M., Byrne, L. J. i Trim, S. A. (2021) Utilisation of compounds from venoms in drug discovery. *Progress in Medicinal Chemistry*, 60, 1-66. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2021.01.001>
- Tsetlin, V. I. i Hucho, F. (2004) Snake and snail toxins acting on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications. *FEBS Letters*, 557(1-3), 9-13. Dostupno na: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01454-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01454-6)
- Uhlenbroek, C. (2009) *Svijet životinja*. Zagreb: Profil
- Untamed science, *Most venomous snakes in the world* (2019). Dostupno na: <https://untamedscience.com/blog/most-venomous-snakes-in-the-world/> (05. 09. 2021.)
- Walkinshaw, M. D., Saenger, W. i Maelicke, A. (1980) Three-dimensional structure of the "long" neurotoxin from cobra venom. *PNAS*, 77(5), 2400–2404. Dostupno na: <https://doi.org/10.1073%2Fpnas.77.5.2400>

Wallach, V., Wuster, W. i Broadley, D.G. (2009) In praise of subgenera: taxonomic status of cobras of the genus *naja laurenti* (serpentes: Elapidae). *Zootaxa*, 2236(2236), 22-36. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.190422>

WHO, *Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins* (2017) Dostupno na: <https://www.who.int/publications/m/item/snake-antivenom-immunoglobulins-annex-5-trs-no-1004> (24. 08. 2021.)

Young, J. Z. (1985) *The life of Vertebrates*. Oxford: Claredon Press

Zolfagharian, H. i Dounighi, N. M. (2013.) Progress and improvement of the manufacturing process of snake antivenom. *Archives of Razi Institute*. Dostupno na: <https://doi.org/10.7508/ARI.2013.01.001>