

Vid Leban<sup>1</sup>, Miran Brvar<sup>2</sup>, Igor Križaj<sup>3</sup>, Adrijana Leonardi<sup>4</sup>, Katarina Černe<sup>5</sup>

## Strupene kače v Sloveniji – sestava in delovanje njihovega strupa

### *Venomous Snakes in Slovenia – Composition and Action of Their Venoms*

#### IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: kačji ugriz, kačji strup, *Viperidae* spp., protiserum

V Sloveniji živijo tri avtohtone vrste strupenih kač iz družine gadov: navadni gad (lat. *Vipera berus*), modras (lat. *Vipera ammodytes*) in laški gad (lat. *Vipera aspis*). Njihov strup je kompleksna zmes številnih beljakovin z zelo zapletenim in še ne docela pojasnenim delovanjem. V osnovi so strupi vseh treh kač podobno sestavljeni. Izzovejo lahko lokalne (oteklina, podplutbe, bolečina), pa tudi sistemske znake zastrupitve (bolečine v trebuhu, bruhanje, driska, padec krvnega tlaka, motnje hemostaze in nevrološke izpade), ki se lahko v izjemnih primerih končajo tudi s smrtjo. Najbolj podrobno so raziskane komponente strupa z nevrotoksičnim delovanjem (sekretorne fosfolipaze A2) in komponente, ki vplivajo na sistem hemostaze (sekretorne fosfolipaze A2, metaloproteinaze, serinske proteaze, L-aminokislinske oksidaze, disintegrini in beljakovine, podobne lektinom tipa C). Poznavanje sestave strupov in delovanja njihovih komponent ima pomembno vlogo pri izdelavi učinkovitih protiserumov in snovanju novih farmakoloških učinkovin.

#### ABSTRACT

KEY WORDS: snake bite, snake venom, *Viperidae* spp., antivenom

There are three indigenous species of venomous snakes of the *Viperidae* family in Slovenia: common adder (lat. *Vipera berus*), nose-horned viper (lat. *Vipera ammodytes*) and aspic viper (lat. *Vipera aspis*). Their venoms are complex mixtures of proteins with different and not yet fully understood functions. Basically, all three vipers have similar venom compositions. Snake venom can elicit local (edema, suffusions, pain) and systemic effects of envenomation (abdominal pain, vomiting, diarrhea, hypotension, bleeding disorders, and neurotoxic effects), which can be fatal in severe cases. The most thoroughly

<sup>1</sup> Vid Leban, dr. med., Center za klinično toksikologijo in farmakologijo, Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 7, 1000 Ljubljana; vidleban@gmail.com

<sup>2</sup> Doc. dr. Miran Brvar, dr. med., Center za klinično toksikologijo in farmakologijo, Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 7, 1000 Ljubljana; Center za klinično fiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup> Prof. dr. Igor Križaj, univ. dipl. kem., Odsek za molekularne in biomedicinske znanosti, Inštitut Jožef Stefan, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana

<sup>4</sup> Doc. dr. Adrijana Leonardi, univ. dipl. kem., Odsek za molekularne in biomedicinske znanosti, Inštitut Jožef Stefan, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana

<sup>5</sup> Doc. dr. Katarina Černe, univ. dipl. biol., Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Korytkova ulica 2, 1000 Ljubljana

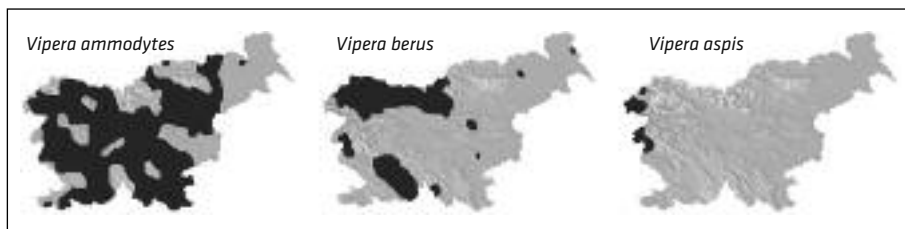
studied are the neurotoxic (secreted phospholipase A2) and haemostatically-active venom components (secreted phospholipases A2, metalloproteinases, serine proteases, L-amino acid oxidases, disintegrins and C-type lectin-like proteins). Knowing venom composition and understanding functional properties of venom components are important prerequisites for the production of effective antisera and the development of innovative pharmacological agents.

## UVOD

V Evropi živi 13 vrst strupenih kač. V družini gožev (*Colubridae* spp.) so šibko strupene vrste črnostrel ali mačjeoka kača (*Teloscopus fallax*) in dve vrsti južnoevropski zrv (*Malpolon monspessulanus*, *Malpolon insignitus*). Ugrizi so redki, pa še ti po večini niso nevarni, saj imajo te kače strupnike nameščene v zadnjem delu ustne votline in do zastrupitve pride le ob neprimernem rokovanju z osebki – če potisnemo prst globoko v njihova usta (1–3). Človeku nevarnejše evropske strupene kače spadajo v družino gadov (*Viperidae* spp.), ki imajo različno velika območja poselitve: navadni gad oz. *Vipera berus* (razširjen po skoraj celi Evropi), laški gad oz. *Vipera aspis* (južna in zahodna Evropa, predvsem Francija in Italija), modras oz. *Vipera ammodytes* (severo-vzhodna Italija, Balkan), *Vipera latastei* (Iberski polotok), *Vipera seoanei* (severni del Iberskega polotoka), *Vipera ursinii* (del Francije, Italije in Balkanskega polotoka), *Vipera renardi* (vzhodna Ukrajina, južna Rusija, severna obala Črnega morja), *Vipera graeca* (Grčija, Albanija) in *Macrovipera lebetina* ter *Montivipera xanthina* (Grčija, Turčija) (2, 4).

V Sloveniji lahko na črnostrela in južnoevropsko zrvo naletimo v priobalnem pasu južne Primorske (1). Navadni gad je pri nas zastopan z dvema podvrstama (*Vipera berus berus* in *Vipera berus bosniensis*), modras (*Vipera ammodytes ammodytes*) in laški gad (*Vipera aspis francisciredi*) pa vsak le z eno podvrsto (1, 5). Modras je splošno razširjen po večjem delu države, navadni gad živi v gorskem svetu Julijskih in Kamniško-Savinjskih Alp, Karavank, Trnovskega gozda, Javornikov in Snežnika, v nižinah pa je redek in vezan na vlažen življenjski prostor. Laški gad je še bistveno redkejši, saj ga najdemo zgolj v skrajnem zahodnem delu Slovenije (Breginjski kot, Kobariški Stol, Korada, Sabotin, Goriško, Plužne pri Bovcu). Razširjenost omenjenih kač prikazujemo na sliki 1 (1, 6–8).

Razširjenost in številčnost posamezne vrste sta glavna dejavnika, ki vplivata na pogostost ugrizov kač v Sloveniji. Medtem ko na svetu po nekaterih ocenah kače letno ugriznejo približno 5.000.000 ljudi (40.000–96.000 jih umre), so kačji ugrizi v Evropi bistveno redkejši. Na območju Evrope, evropskega dela Rusije in Turčije je v ob-



**Slika 1.** Razširjenost modrasa (*Vipera ammodytes*), navadnega gada (*Vipera berus*) in laškega gada (*Vipera aspis*) v Sloveniji (8).

dobju 1970–2010 v povprečju približno 8.000 ugrizov letno, med njimi 1.000 primerov s sistemskimi znaki zastrupitve in štirje smrtni primeri (4, 9). V Sloveniji je bilo po podatkih Registra posvetov Centra za klinično toksikologijo in farmakologijo v letih 1999–2008 zabeleženih 39 ugrizov kač, med njimi deset ugrizov gada, sedem ugrizov modrasa, štirje ugrizi nestrupenih kač in 18 ugrizov neprepoznanih vrst kač (10). Ugrizi laškega gada so pri nas redkost, pomemben delež pa predstavljajo med kačjimi ugrizi v Franciji, Italiji in Švici (11, 12). Večina ugrizov pri nas se je pripetila v zahodnem delu Slovenije (79 %) (10).

## **TOKSIKOKINETIKA IN KLINIČNA SIMPTOMATIKA OB UGRIZU KAČE**

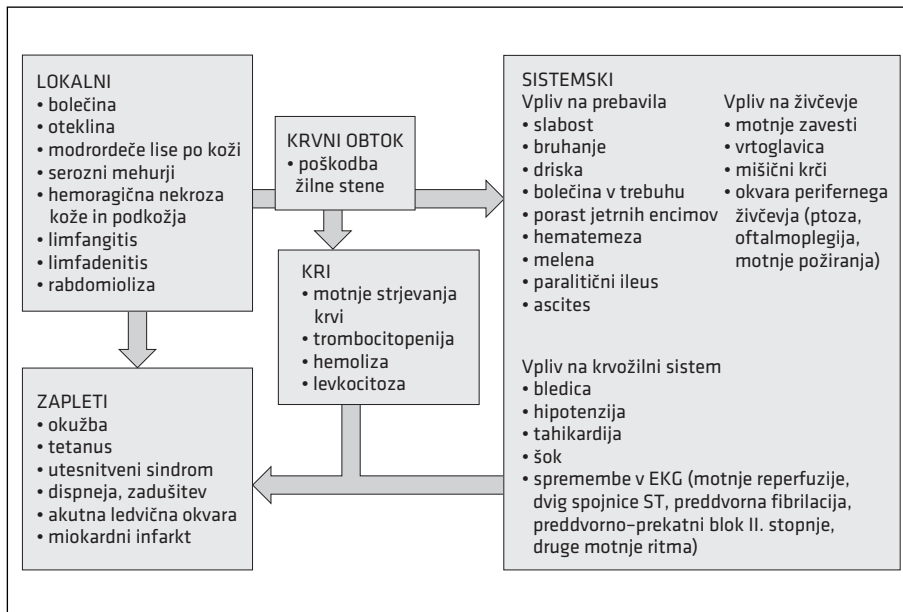
Kače človeka običajno ugriznejo v okončine. Strup izbrizgajo pod pritiskom, saj ugriz traja le nekaj desetink sekunde. Na mestu ugriza največkrat najdemo dve majhni, približno 5 mm oddaljeni ranici, razdalja pa se z večanjem otekline lahko poveča na več kot 1 cm. Redkeje je na mestu ugriza prisotna le ena ali več ranic, včasih pa samo praska. Strup je viskozen kot jajčni beljak. Običajna količina izločenega strupa pri ugrizu naših strupenih kač je približno 15–20 mg suhe snovi, ki bi jo dobili, če bi strup posušili. Večina strupa ostane na mestu ugriza v koži in podkožju, od koder se širi v limfni sistem in krvne žile. V krvi ga lahko zaznamo 30 min po ugrizu, njegova koncentracija doseže vrh v dveh urah po ugrizu in nato postopno upada nekaj dni. Strup laškega gada, ki so ga vbrizgali v podkožje, se dobro porazdeli po telesu, kar kaže tudi visok volumen porazdelitve ( $V_d = 21/\text{kg}$ ), posledica pa je dolg razpolovni čas. Visok volumen porazdelitve je posledica dobrega prehajanja skozi stene žil (13). V 10–50 % primerov kača ob ugrizu strupa ne izloči – takemu ugrizu pravimo suhi ugriz (10, 14). Toksikokinetika strupa narekuje tudi klinično obravnavo zastrupljenca. Zadošča namreč dveurno opazovanje bolnikovega stanja.

Če v tem času ne razvije lokalnih ali sistemskih znakov zastrupitve, lahko sklepamo, da gre za ugriz nestrupene kače ali pa za suhi ugriz.

K izraženosti klinične slike poleg količine vbrizganega strupa prispevajo tudi mesto ugriza, vrsta kače in pridružena bolezenska stanja. Glavni organski sistemi, na katere delujejo kačji strupi, so živčevje, mišičje, kri in krvožilni sistem. Lokalnim znakom zastrupitve (kot so bolečina, oteklina, podkožne podplutbe z mehurji ali s hemoragično nekrozo in vnetje bezgavk) se lahko z zakasnitvijo pridružijo tudi sistemski, med katerimi so najpogostejši zapleti na prebavilih (bolečine v trebuhu, bruhanje in driska), redkejši pa so motnje zavesti, padec krvnega tlaka, motnje srčnega ritma, motnje strjevanja krvi in nevrološki izpadi. Izredno redko se zastrupitev konča smrtno (10). Najpogostejše klinične simptome in znake pri ugrizu naših strupenih kač prikazuje slika 2.

## **Molekularna sestava kačjega strupa**

Kačji strupi so kompleksne mešanice zelo različnih polipeptidov in beljakovin, kratkih peptidov, aminoksilin, lipidov, nukleotidov, kovinskih ionov in ogljikovih hidratov v obliki glikoproteinov (10). Beljakovinske sestavine, ki so lahko encimsko aktivne ali pa ne, so se razvile tekom evolucije z namenom, da imobilizirajo ali ubijejo žrtev ter sodelujejo pri prebavljanju plena. Sklepajo, da imajo strupene kače (ki pripadajo trem omenjenim različnim družinam) po celem svetu skupen razvoj strupnih žlez, zato so tudi nekatere beljakovine v kačjih strupih splošno prisotne. Najbolj splošno razširjene so sekretorne fosfolipaze A2 (angl. *secretory phospholipase A2*, sPLA2). Pri različnih skupinah kač so se pod vplivom genetskih mutacij in naravnega izbora postopno razvile različne komponente, ki so oblikovale sestavo strupa vsake vrste v zmes z optimalnimi toksičnimi lastnostmi glede na



**Slika 2.** Lokalni in sistemski simptomi ter znaki in zapleti, ki se lahko razvijejo po ugrizu navadnega gada, modrasa in laškega gada (10). EKG – elektrokardiogram.

prehranski spekter, ki je odvisen od okolja, v katerem živijo (15). Večino strupenih komponent predstavljajo polipeptidi, ki so lahko encimsko aktivni ali pa ne. Ti imajo pogosto sinergistično usmerjeno delovanje, da zagotovijo hiter učinek na plen. Prehrana kače običajno vsebuje različne živalske vrste. Zato vsebuje kačji strup tako komponente, ki delujejo univerzalno na širok nabor različnih organizmov, kot tudi komponente, usmerjene v specifično molekularno tarčo pri določenem organizmu (16). Beljakovine v kačjem strupu so pogosto podvržene potranslacijski modifikaciji, kar pomeni, da se pogosto pod vplivom ostalih sestavin v strupu spremenijo po tem, ko se s pomočjo ribonukleinskih kislin prevedejo iz genskega zapisa (16). Sestava kačjega strupa je odvisna od vrstne in podvrstne pripadnosti, spola, življenjskega okolja, sezone, starosti in prehrane kače; vendar pa velja, da imajo sorodne kače tudi podobno sestavo in mehanizem delovanja strupa, kar velja tudi za kače, ki živijo pri nas (16–18).

Najbolje proučena sta strupa navadnega gada in modrasa, za katera sta določena tudi proteoma (16, 19, 20). Oba strupa vsebujeta beljakovine, ki jih uvrščamo v 11 različnih beljakovinskih družin (15, 21). Strup navadnega gada je enostavnejši od strupa modrasa, saj je bil pod enakimi pogoji gadov strup z dvodimenzionalno gelsko elektroforezo ločen v 160 različnih beljakovinskih lis, modrasov pa v 260. Gadov strup vsebuje predvsem manj sPLA2 in beljakovin, podobnih lektinom tipa C (angl. *C-type lectin-like proteins*, CLP) (20).

Z razlikami v sestavi strupa lahko do neke mere razložimo tudi razlike v klinični sliki zastrupitve. Nevrološke motnje so razmeroma pogoste pri ugrizih modrasa, a redke pri ugrizih gada, saj strup slednjega ne vsebuje amoditoksinov (angl. *ammoditytoxins*, Atx) oz. nevrotoksičnih sPLA2. Čeprav ima navadni gad gene, ki kodirajo nevrotoksične sPLA2, se ti izražajo le redko in v zelo omejenem obsegu. Tudi krvavitev in motnje strjevanja krvi so običajno huje izražene pri ugrizih modrasa (22).

## SESTAVA IN DELOVANJE MODRASOVEGA STRUPA

Modrasov strup je zelo kompleksna zmes številnih beljakovin in peptidov iz skupine metaloproteinaz (MP) in njihovih tripeptidnih zaviralcev, sPLA2, serinskih proteaz (SP), disintegrinov, CLP, L-aminokislinskih oksidaz (angl. *L-aminoacid oxidase*, LAAO), s cisteinom bogatih izločevalnih beljakovin (angl. *cysteine-rich secretory protein*, CRISP), zaviralcev proteaz Kunitzovega tipa in žilnih rastnih dejavnikov (angl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) (20, 21, 23, 24).

### Lokalni učinki

Modrasov strup na mestu ugriza pogosto povzroči otekline, ki jo spremljata bolečina in podplutba različnega obsega. Pridruženi so lahko tudi serohemoragična nekroza kože in podkožja s seroznimi mehurji, vnetje mezgovnic in področnih bezgavk, ki so otekle in boleče, ter razpad mišičnine. Omenjeni lokalni učinki so predvsem posledica delovanja encimsko aktivnih beljakovin, kot so MP (10, 25). Kačje MP skupaj s človeškimi beljakovinami ADAM (angl. *a disintegrin and metalloproteinase*) in ADAMTS (angl. *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) tvorijo podružino repolizinov (M12B) družine MP M12, ki je podklan metcinkinov, ki vsebujejo vezavno mesto za cinkove  $Zn^{2+}$  ione ter strukturno ohranjen motiv, imenovan Met-obrat (24).

### Nevrotoksičnost

Za nevrotoksični učinek strupa, ki se pojavi po ugrizu modrasa, so odgovorne predvsem sPLA2. Njihovo delovanje na molekularni ravni so podrobno proučevali Križaj in sodelavci (26–32). sPLA2 so ene glavnih komponent kačjih strupov. Katalizirajo od kalcija odvisno hidrolizo estrske vezi na položaju 2 v 1,2-diacil-3-sn-fosfogliceridih, pri čemer se sproščajo maščobne kisline in lizofosfolipidi (22). Med sPLA2 uvrščamo AtxA, AtxB, AtxC in amoditine (angl. *ammodytins*, Atn): AtnL, AtnI1, AtnI2, ki povzročajo tok-

sične učinke na živčevju, mišičju, srčni mišici in zavirajo strjevanje krvi (20, 33–35). Na samega modrasa sPLA2 ne učinkujejo toksično, saj ima ta v serumu specifične glikoproteinske zaviralce Atx, ki oblikujejo oligomere (36).

Atx delujejo predvsem na periferno živčevje, ob neposrednem injiciranju pa so zelo toksični tudi za osrednje živčevje. Poskusi na živčno-mišičnih preparatih so pokazali, da Atx zavirajo posredno spodbujeno krčenje mišic, ne vplivajo pa na neposredno izzvano mišično krčenje (21). Po vnosu v telo se lokalizirajo na mestu živčno-mišičnega stika, kjer se vežejo na doslej še neprepoznane receptorje na presinaptični membrani motoričnega živca (37). V njenem zunanem sloju nato hidrolizirajo fosfolipide, kar spremeni lastnosti aksoleme in olajša zlivanje sinaptičnih mešičkov z aksolemo, na kateri se pojavijo vbokline v obliki grške črke  $\Omega$ . Dodatno se poveča tudi prevodnost nekaterih kalcijevih kanalčkov, kar še dodatno spodbuja sproščanje acetilholina. Število sinaptičnih mešičkov v živčnem končiču se zmanjša (38, 39).

Atx ne delujejo le na aksolemo, ampak vstopajo tudi v živčni končič (38, 39). V citosolu se vežejo na kalmodulin, kar poveča njihovo stabilnost in posredno encimsko aktivnost, ter na beljakovino 14-3-3, ki Atx predvidoma usmeri na mesto, kjer poteka endocitoza sinaptičnih mešičkov (21, 40). Tam Atx hidrolizirajo fosfolipide notranjega sloja plazemske membrane, tako spremenijo njeno lokalno ukrivljenost in ovirajo funkcijo amfifizina, s tem pa zavrejo proces endocitoze sinaptičnega mešička. V citosolu se Atx vežejo tudi na mitohondrije, povzročijo odprtje tranzicijskih por in razklop mitohondrijev, s čimer se prekine nastajanje ATP. Mitohondriji nabreknejo, se vakuolizirajo in poškodujejo. Povečana fosfolipoliza celičnih membran poruši uravnavanje koncentracije kalcijevih  $Ca^{2+}$  ionov v citosolu. Povišana koncentracija  $Ca^{2+}$  ionov poveča aktivnost celičnih hidrolaz (npr.

citosolne fosfolipaze A2 in kalpainov), kar ob pomanjkanju ATP vodi v obsežno degeneracijo živčnega končiča oz. v apoptozo motoričnega živca (21, 41).

V modrasovem strupu je bil odkrit tudi modrasov kimotripsinski zaviralec (angl. *Vipera ammodytes ammodytes chymotrypsin inhibitor*, VaaChi), ki tvori komplekse z AtxA. VaaChi spada med zaviralce proteaz Kunitzovega tipa. Kakšna je vloga teh kompleksov, še ni znano, možno pa je, da vezava VaaChi povečuje strupenost AtxA (42–44).

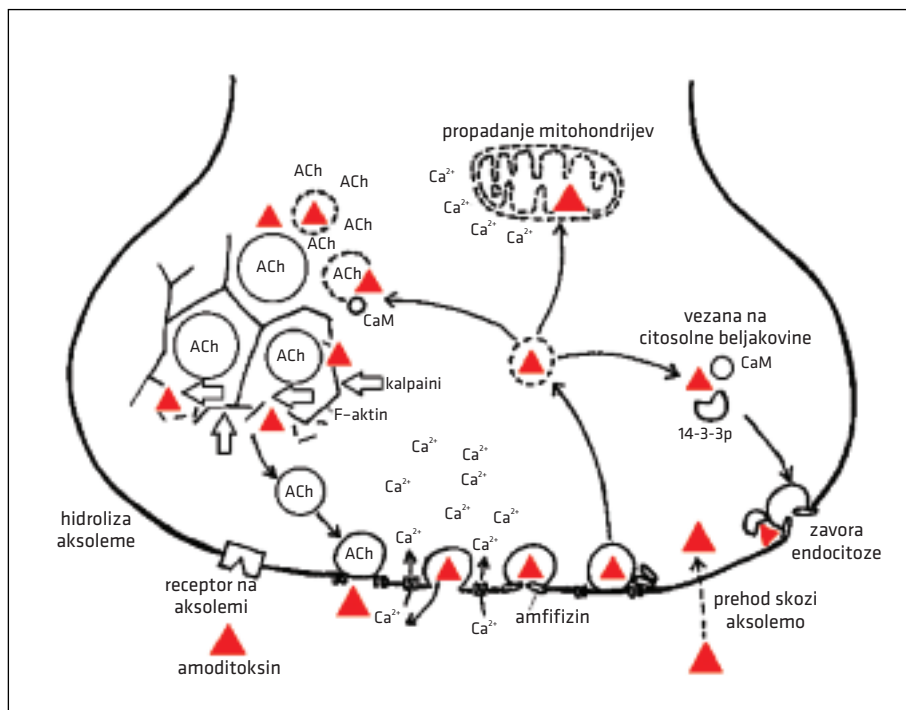
K nevrotoksičnosti modrasovega strupa bi lahko prispevali tudi CRISP. Nekateri od teh namreč vplivajo na prevajanje različnih ionskih kanalčkov, npr. kalijevih kanalčkov, kalcijevih kanalčkov tipa L ali kanalčkov, ki so sklopljeni s cikličnimi nukleotidi (16, 45). Iz modrasovega strupa je bil izoliran VaaCRISP-1 (angl. *Vipera ammodytes ammodytes cysteine-rich secretory protein 1*),

ki je zaenkrat brez dokazane farmakološke aktivnosti (20). Predlagani molekularni mehanizem delovanja Atx je prikazan na sliki 3.

V klinični praksi se je delovanje nevrotoksičnih sestavin modrasovega strupa izrazilo s povešenostjo vek, oftalmoplegijo, disfagijo, disfonijo in oslabeledostjo mišič (25, 46, 47).

## Kardiotoksičnost

Kardiotoksične učinke modrasovega strupa (npr. spremembe frekvence utripanja srca, zmanjšanje pretoka krvi skozi koronarne arterije in motnje srčnega ritma), ki so bili dokazani v *ex vivo* poskusih na izoliranih podganjih srcih, pripisujemo predvsem delovanju miotoksičnega AtnL, encimsko neaktivne sPLA2. Lahko pa imajo delno vlogo tudi CRISP z delovanjem na katerega od ionskih kanalčkov, kar pa eksperimentalno še ni bilo dokazano (34, 35).



**Slika 3.** Predlog molekularnega mehanizma nevrotoksičnega delovanja amoditoksina iz strupa modrasa (21). ACh – acetilholin, CaM – kalmodulin, 14-3-3p – beljakovina 14-3-3.

## Učinki na hemostazo in krvožilni sistem

Hemostatsko aktivne beljakovine modrasovega strupa vplivajo neposredno na krvne žile (vpliv MP), vazokonstrikcijo (vpliv VEGF in SP), koagulacijo (vpliv MP, SP in sPLA2) in agregacijo trombocitov (vpliv MP, sPLA2, CLP in disintegrini) in s tem vzajemno prispevajo k hemoragičnemu učinku strupa (slika 4) (23, 24, 48).

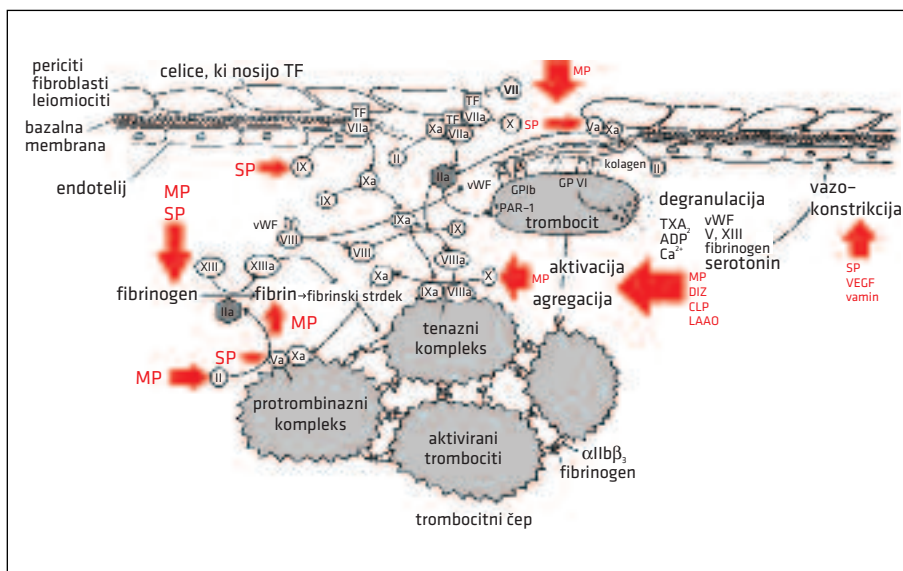
Modrasov strup pri človeku deluje predvsem hemoragično, najbolj izraženi posledici učinkovanja strupa pri odraslih pa sta krvavitev in lokalna poškodba tkiva (25). Surov modrasov strup zavira nastajanje krvnega strdka *in vitro*, na proces koagulacije krvi pa vpliva tako po antikoagulantnih kot tudi prokoagulantnih mehanizmih, kar kaže na obstoj več hemostatsko aktivnih molekul v modrasovem strupu (24).

## Poškodba žilne stene

Zelo pomembne hemostatsko aktivne komponente modrasovega strupa so MP. Uvrščamo jih v tri velike razrede (20):

- P-I (obsega komponente s proteinazno domeno),
- P-II (obsega komponente s proteinazno in disintegrinsko domeno) ter
- P-III (obsega komponente s proteinazno, disintegrinsko in s cisteinom bogato domeno).

Proteolitična aktivnost MP je odvisna od  $Zn^{2+}$  iona v aktivnem mestu encima (20). V strupu modrasa so prisotni tudi tripeptidni zaviralci MP, ki so ene najmanjših komponent strupa. V strupni žlezi preprečujejo katalitično in avtokatalitično aktivnost MP (poleg drugih mehanizmov, kot je izražanje MP v obliki proencima, nizek pH, ki upočasni katalizo, in visoka koncentracija citratnih



**Slika 4.** Mesta delovanja beljakovin iz modrasovega strupa v hemostatskem sistemu (48). TF – tkivni dejavnik (angl. *tissue factor*), MP – metaloproteinaze, VII, VIIa, X, Xa, Va, II, Ila, IX, IXa, VIII, VIIIa – faktorji strjevanja, SP – serinske proteaze, vWF – von Willebrandov dejavnik (angl. *von Willebrand factor*), GP VI – glikoproteinski receptor za kolagen (angl. *glycoprotein VI*), GPIb – trombocitni receptor za glikoprotein Ib (angl. *glycoprotein Ib*), TXA<sub>2</sub> – tromboksan A<sub>2</sub>, DIZ – disintegrini, CLP – beljakovine, podobne lektinom tipa C (angl. *C-type lectin-like proteins*), LAO – L-aminokislinske oksidaze, VEGF – žilni rastni dejavnik (angl. *vascular endothelial growth factor*),  $\alpha$ IIb $\beta$ <sub>3</sub> – trombocitni fibrinogenški receptor (angl. *integrin  $\alpha$ -IIb  $\beta$ <sub>3</sub>*).

ionov, ki kelirajo  $Zn^{2+}$  ione). Iz strupa modrasa je bil zaenkrat izoliran le tripeptid z aminokislinskim zaporedjem piroglutamat-lizin-triptofan (pEKW). pEKW peptid je šibek reverzibilni zaviralec MP, ki z nizko afiniteto do aktivnega mesta na MP in visoko koncentracijo v strupu omogoča učinkovito zavoro MP znotraj strupne žleze in hitro aktivacijo MP v telesu žrtve po ugrizu (20).

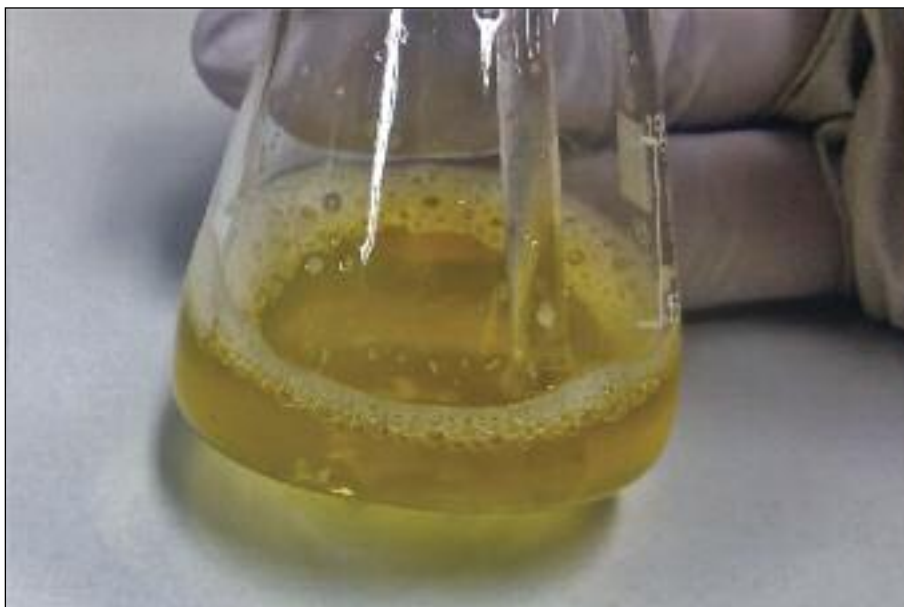
MP vplivajo na žilne stene majhnih kapilar tako, da s proteolitično razgradnjo komponent bazalne membrane in zunajceličnega matriksa oslabijo njihovo strukturo, kar privede do krvavitvev. Omenjene MP *in vitro* razgrajujejo nidogen, fibronektin in kolagen tipa IV (49–52). Izolirani so bili visokomolekularni hemoragini iz družine MP razreda P-IIIa (monomerna *Vipera ammodytes* hemoragina (VaH) 1 in VaH2) ter razreda P-IIIc (homodimerne VaH3 ter heterodimerne amoditagin in VaH4) (50–53). Najdeni so bili tudi njihovi nehemoragični homologi, ki spadajo med MP razreda P-IIIa, monomerna *Vipera am-*

*modytes* fibrinogenaza (VaF) 1 ter P-IIIc, amoditaza, ki pa imajo fibrino- in fibrinogenolitično vlogo, opisano spodaj (49, 54). Intenziteta razgradnje je najverjetneje pogojena z afiniteto interakcije med MP in komponento zunajceličnega matriksa, hemoragična aktivnost MP pa delno odstopnje njihove glikozilacije, katere vloga še ni povsem jasna (55, 56).

Modrasov strup vsebuje tudi najmanj pet različnih izooblik LAAO (19). LAAO, ki običajno nastopajo v homodimerne obliki, dajejo modrasovemu strupu značilno rumenkasto barvo zaradi prostetične skupine, flavin adenin dinukleotida (slika 5). Njihov toksičen učinek naj bi bil povezan z delovanjem vodikovega peroksida, ki se tvori pri reakciji oksidativne deaminacije L-aminokislilin in sproži apoptozo endotelnih celic (48).

#### Vazodilatacija

Hemoragični učinek strupa povečujejo komponente z vazodilatacijskim delovanjem, npr. homodimerne vamin, ki spada v družino



**Slika 5.** Vodna raztopina liofiliziranega modrasovega strupa. Značilno rumeno barvo mu dajejo L-aminokislinske oksidaze.



žilnih rastnih dejavnikov (angl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) tipa F in se s podobno afiniteto kot endogeni VEGF specifično veže na receptor žilnega rastnega dejavnika 2 (angl. *vascular endothelial growth factor receptor 2*, VEGFR-2). Vamin povzroča vazodilatacijo in padeč krvnega tlaka, saj spodbuja tvorbo dušikovega oksida v endoteliju, sproža delitev endotelijskih celic, pospeši angiogenezo in poveča prepustnost kapilar, s čimer olajša tudi absorpcijo kačjih toksinov v krvni obtok (57). Vazodilatatorno delujejo tudi plazemskemu kalikreinu podobne SP, ki z razgradnjo visokomolekularnega kininogena sproščajo vazodilatatorni bradikinin, vazoaktivne snovi iz plazemskih kininogenov in razgrajujejo angiotenzin I (58). Bradikinin sodeluje tudi kot posrednik v nastanku bolečine in lahko v večjih količinah sproži drisko, s čimer bi lahko vsaj teoretično prispeval tudi k izražanju teh simptomov v klinični sliki (slika 2). Drugih učinkov bradikina, kot so kašelj, krčenje gladkih mišic v prebavilih, dihalnih poteh in rodilih ter povečano izločanje nekaterih sluznic, pri bolnikih po ugrizu kače niso zasledili.

### Zaviranje agregacije trombocitov

Komponente modrasovega strupa delujejo tudi na aktivacijo trombocitov. Hemoragični MP VaH3 in VaH4 šibko zavirata od kolagena odvisno agregacijo trombocitov, medtem ko nehemoragični VaF1 in amoditaza nanjo ne vplivata (49, 52). Od kolagena odvisno agregacijo trombocitov zavirata tudi MP podrazreda P-IIIId s sposobnostjo aktivacije faktorja strjevanja X, VAFXA (angl. *Vipera ammodytes ammodytes factor X activator*) I in VAFXA-II (59). MP razreda P-III zavirajo od kolagena odvisno agregacijo trombocitov, tako da preprečijo interakcijo med integrinom  $\alpha_2\beta_1$  in kolagenom (48). Disintegrini z vezavo na integrine *in vitro* intenzivno zavirajo od kolagena in ADP odvisno agregacijo trombocitov. Disintegrini iz modrasovega strupa zavirajo agregacijo

trombocitov tako, da se vežejo na fibronektinski receptor  $\alpha_5\beta_1$ , ki ima pomembno vlogo pri procesih angiogeneze, in zavirajo migracijo rakavih celic (60). Disintegrini se v strup sprostijo na dva načina: s potranslacijsko razgradnjo (proteolizo) modrasovih MP P-II na posamezne domene (MP namreč vsebujejo več domen, ena izmed njih je disintegrinska) ter z izražanjem preko kratkih prepisov informacijske ribonukleinske kisline (angl. *messenger ribonucleic acid*, mRNA), ki kodira le disintegrin (20).

Zaviranje aglutinacije trombocitov, odvisne od ristocetina *in vitro*, je posledica prisotnosti CLP, ki pa niso imeli vpliva na agregacijo trombocitov, odvisno od ADP in kolagena. Na podlagi podobnih CLP iz kačjih strupov domnevamo, da se modrasovi CLP specifično vežejo na trombocitni receptor za glikoprotein (GP) Ib ter *in vivo* preprečijo interakcijo z von Willebrandovim dejavnikom (angl. *von Willebrand factor*, vWF). S tem ovirajo proces od vWF odvisne aglutinacije trombocitov in adhezije trombocitov na subendotelijski kolagen, izpostavljen na mestih poškodovanega žilnega endotelija (24). CLP naj bi bili glavni povzročitelji trombocitopenije, ki je razmeroma pogost klinični znak pri bolnikih po ugrizu navadnega gada ali modrasa (25, 61).

Od kolagena in ADP odvisno agregacijo ter od ristocetina odvisno aglutinacijo trombocitov *in vitro* znatno zavirajo tudi sPLA2 (AtxA, AtxB, AtxC, AtnI1, AtnI2) (27). Predvidevajo, da je vpliv sPLA2 na agregacijo trombocitov posledica njihove fosfolipolitične aktivnosti (48). Na agregacijo trombocitov pa lahko preko še ne povsem pojasnenih mehanizmov vplivajo tudi LAAO, ki jo lahko bodisi zavirajo ali spodbujajo. Vloga LAAO v modrasovem strupu še ni pojasnjena (48).

### Antikoagulantni učinki

Beljakovine modrasovega strupa zavirajo proces koagulacije z razgradnjo fibrinogena, fibrina, protrombina in faktorja X ter

z zaviranjem nastanka protrombinaznega kompleksa. Močno fibrinogenolitične so MP razreda P-III, poleg njih pa tudi MP razredov P-I in SP (49–53). *Vipera ammodytes* serinska proteinaza 1 (VaSP-1) ima širok spekter delovanja, saj poleg fibrinogena in fibrina razgrajuje tudi protrombin, faktor X in plazminogen ter s tem najverjetneje povzroči porabo faktorjev strjevanja v krvi *in vivo* (62). VaH3, VaH4, VaF1 in amoditagin cepijo težko verigo faktorja X, kar ustvari encimsko neaktivne produkte, zavira nastajanje aktivirane oblike faktorja X in posledično fibrina (50). Najizrazitejšo antikoagulantno aktivnost imajo AtxA, AtxB in AtxC, ker z vezavo na aktivirano obliko faktorja X preprečijo nastanek protrombinaznega kompleksa. Močno podaljšajo protrombinski čas in aktivirani delni tromboplastinski čas (63).

### Prokoagulantni učinki

V modrasovem strupu se nahajajo tudi prokoagulantne komponente (nekatero MP in SP), ki aktivirajo faktorje strjevanja IX, X in protrombin in s tem povzročijo njihovo pomanjkanje (24). V redkih primerih lahko s tem povzročijo razširjeno znotrajžilno koagulopatijo (21, 64). Prokoagulantni učinek imata npr. že zgoraj omenjeni VAFXA-I in VAFXA-II (54).

## SESTAVA IN DELOVANJE STRUPA NAVADNEGA GADA

Največji delež beljakovin v gadovem strupu obsegajo nenevrotoksične sPLA2, ki jim sledijo SP, LAAO, CLP in CRISP. Beljakovine, podobne angiotenzinu, kininogenu in MP predstavljajo manjši delež (16, 20).

### Lokalni učinki

Nekrozo, oteklino in hemoragične mehurje po koži poleg MP povzroča tudi hialuronidaza. Ta z razgradnjo hialuronske kisline v zunajceličnem matriksu povečuje prepustnost tkiv in absorpcijo strupa (16).

## Nevrotoksičnost

V strupu navadnega gada je tudi nekaj nevrotoksičnih sestavin, npr. LAAO, ki povzročajo živčno-mišično blokado s poškodbo celične membrane. Med sestavin z možnim nevrotoksičnim delovanjem uvrščamo tudi CRISP, ki bi lahko zavirali prevajanje signala po živčnem vlaknu z delovanjem na napetostno odvisne ionske kanalčke. Nevrotoksične sPLA2 so našli v strupu slovaškega gada, v strupu ruskega gada pa ne (16, 20, 22). Nevrotoksični učinki strupa navadnega gada so zelo redki. Opisani so bili samo v dveh primerih ugrizov, na Madžarskem in v Bolgariji (65, 66). Na Madžarskem sta se pri bolniku po ugrizu navadnega gada prehodno razvila škiljenje in dvojni vid, ki sta trajala 11 ur in nato spontano izzvenela (65). V Bolgariji pa je ugriz gada podvrste *Vipera berus bosniensis* povzročil dvojni vid in obojestransko povešanje veke (66).

## Kardiotoksičnost

V literaturi so opisani tudi primeri kardiotoksičnega delovanja strupa navadnega gada, npr. miokardni infarkt, spremembe vala T in dviga spojnice ST, preddvorno-prekatni blok 2. stopnje, preddvorna fibrilacija in druge motnje srčnega ritma (61, 67–72). Učinke na srčno mišico podobno kot pri modrasovem strupu pripisujemo AtnL, za katerega vemo, da je prisoten tudi v strupu navadnega gada (20, 35).

## Učinki na hemostazo in krvožilni sistem

Strup navadnega gada ima pretežno hematotoksičen učinek, h kateremu prispevajo številne komponente, podobno kot pri modrasu (16, 73–77):

- Različni hemoragini, pa tudi LAAO, ki povečajo krvavitev s poškodbo žilne stene.
- Beljakovine, ki spremenijo delovanje trombocitov in povzročajo trombocitopenijo (LAAO, CLP, disintegrini in nekatere MP).

- Različne komponente z antikoagulacijskim učinkom (predvsem različne SP in sPLA2)
- Aktivatorji faktorjev strjevanja krvi, npr. protrombina in faktorja X (angl. *Vipera berus Factor X Activating Enzyme*, VBFXAE)
- MP, ki delujejo tudi fibrinogenolitično, aktivirajo plazminogen ter razgrajujejo fibrin.

Avtokatalitično delovanje MP tako kot pri modrasu zavira tripeptid pEKW (20). Izoliranih in določenih je bilo osem različnih vrst večinoma homodimernih CLP, ki so homologni CLP iz drugih vrst gadov (16). Opisan je bil heterodimerni disintegrin VB7 (lat. *Vipera berus* 7), ki se močno veže na receptor za fibronektin (integrin  $\alpha_5\beta_1$ ) in s tem zavira adhezijo celic na fibronektin v krvni plazmi in zunajceličnem matriksu (78). Fibronektin ima pomembno vlogo pri celjenju ran in tvorbi krvnega strdka (79). LAAO iz strupa navadnega gada zavirajo z ADP sproženo agregacijo trombocitov *in vitro* in sprožajo apoptozo tumorskih celic (74). V gadovem strupu so prepoznali tudi zaviralca proteaz Kunitzovega tipa, ki je strukturno zelo podoben zaviralcu kimo-tripsina VaaChi v strupu modrasa (20). Zaviralci proteaz Kunitzovega tipa zavirajo aktivnost SP in lahko s tem povzročajo motnje v hemostazi, nekateri pa tudi blokirajo prevajanje kalijevih in kalcijevih kanalčkov. Predpostavljajo, da so vpleteni tudi v nastanek bolečine (20).

V strupu navadnega gada so našli štiri peptide, ki povečujejo delovanje bradikinina in s tem njegov učinek na znižanje krvnega tlaka (16). V strupu so prisotni tudi natriuretični peptidi, ki so s sinergističnim učinkom najverjetneje glavni povzročitelji padca sistemskega krvnega tlaka, opaženega pri nekaterih bolnikih po zastrupitvi s strupom navadnega gada (20, 71). Nasprotni učinek pa imajo aspartatne proteaze, po funkciji in aminokislinskem zaporedju podobne človeškemu reninu. Te s proteolizo pretvarjajo angiotenzinogen v angiotenzin I, ta pa se

dalje cepi v angiotenzin II, ki povzroča vazokonstrikcijo (16, 20). Neposredni učinek vazokonstrikcije skupaj z ostalimi učinki angiotenzina II, kot so povečanje izločanja noradrenalina iz simpatičnega živčevja, zadrževanje soli preko povečanega izločanja aldosterona in reabsorpcije natrija v proksimalnih tubulih, prispeva k zvišanju krvnega tlaka. Z višanjem krvnega tlaka naj bi aspartatne proteaze prispevale k poškodbi tkiva, ki jo povzročajo MP, in olajšale širjenje strupa po krvnem obtoku (20).

## SESTAVA IN DELOVANJE STRUPA LAŠKEGA GADA

Tudi v strupu laškega gada so prisotne proteaze, hialuronidaze, kininogenaze ter komponente z vplivom na hemostatski sistem (npr. aktivatorji protrombina) (14).

### Lokalni učinki

Ugriz laškega gada povzroči predvsem lokalno bolečino in otekanje, ki se jima pri težjih primerih lahko pridružijo tudi sistemski znaki. Opisan je npr. neznačilen primer tromboze v področju iliaikalnih žil s posledičnim infarktom črevesa (80).

### Nevrotoksičnost

Redkeje se lahko takoj po zastrupitvi s strupom laškega gada pojavijo nevrološki izpadi. Najpogosteje se pojavi povešanje veke, redkeje pa oftalmoplegija, dvojni vid in motnje vida, dizartrija, disfonija, paraliza krožne ustne mišice (lat. *m. orbicularis oris*), motnje požiranja in parestezije (12, 81–83). Pojav nespecifičnih nevroloških znakov (npr. zaspanost, omotica, vrtoglavica, oslabelelost) običajno sledi 4–12 ur po ugrizu (84–87). Opisan je celo pojav Guillain-Barréjevega sindroma pri bolniku, ki ga je ugriznil laški gad v Alpah južne Francije in ni prejel protiseruma. Za ta sindrom je značilna nenadna hitro potekajoča avtoimunska okvara perifernega živčevja, ki se kaže z ohlapno mišično oslabelelostjo in blago okvaro distalne senzoričke. Pri omenjenem bolniku so

z metodo prenosa *western* dokazali navzkrižno reaktivnost med monosialičnim gangliozidom 2 (angl. *monosialic ganglioside 2, GM2*) in glikozidnimi epitopi na beljakovinah v kačjem strupu. Nevrološka motnja v tem primeru ni bila posledica nevrotoksinov v strupu, ampak avtoimunske reakcije (88).

Opisani primeri ugrizov z nevrološko simptomatiko se pojavljajo le na manjšem področju jugovzhodne Francije in Italije, najverjetneje zaradi posebnosti v sestavi strupa med geografsko ločenimi populacijami podvrste *Vipera aspis aspis*, ki vsebuje nevrotoksine (82–86, 89). Domnevno so te populacije nastale s križanjem med *Vipera ammodytes ammodytes* in *Vipera aspis aspis* (22). V genetskem zapisu laškega gada so odkrili gene za različne sPLA2, ki imajo glavno vlogo v nevrotoksičnosti strupa laškega gada: heterodimerni vaspin ter monomerne AtxA, AtxB in AtxC (85, 86, 90, 91). Pirazzini in sodelavci so v poskusih na celičnih kulturah živcev dokazali, da sPLA2 v strupu laškega gada povzročajo izbokline na živčnih celicah (92). V poskusih na miših so z injiciranjem strupa laškega gada v mišico povzročili mišično paralizo (odsotnost krčenja mišice soleus) in z elektrofiziološkimi metodami dokazali motnje živčno-mišičnega prenosa. Z imunohistokemičnimi barvanji so ugotovili, da strup laškega gada povzroči propadanje živčnega končiča pri motoričnem nevronu (92).

### **Kardiotoksičnost**

Pri zastrupljenih in poskusnih živalih je strup laškega gada posredno preko sistemskega porasta tumor nekrotizirajočega dejavnika (angl. *tumor necrosis factor, TNF*) povzročil tudi kardiotoksične učinke (85, 93). Citokini, kot je TNF, povečajo vnetni odziv in oslabijo krčljivost srca.

### **Učinki na hemostazo in krvožilni sistem**

Strup laškega gada vsebuje tudi hemoragične komponente, aktivator faktorja X in

komponente, ki povečajo prepustnost kapilar ter povzročajo hipotenzijo preko kalikreinu podobnega delovanja (94–97).

### **PROTISERUMI**

Kljub temu da se sistemski znaki zastrupitve pri ugrizih evropskih strupenih kač razvijajo redkeje kot pri ugrizih številnih drugih kač, imajo lahko zastrupitve resen potek z življenje ogrožajočimi zapleti, predvsem pri otrocih in starejših osebah. Zmerne do hude zastrupitve zahtevajo uporabo protiseruma (98, 99). Protiserume pridobivamo z imunizacijo konjev ali ovac, ki jim v telo vbrizgamo naraščajoče odmerke celotnega strupa. Živali tvorijo proti različnim komponentam strupa usmerjena protitelesa, ki so nato izolirana iz njihove plazme in ustrezno predelana. Nekateri avtorji menijo, da so ovčji protiserumi manj imunogeni (povzročali naj bi manj alergijskih reakcij) in zato varnejši od konjskih (100). Afinitetno očiščeni protiserumi naj bi imeli tudi večjo učinkovitost na miligram fragmentov protiteles kot neočiščeni (101).

### **Sestava protiserumov**

Protitelesa imunoglobulin (Ig) G so sestavljena iz dveh lahkih in dveh težkih verig, ki so medsebojno povezane z disulfidnimi vezmi. Verige enega protitelesa tvorijo dva fragmenta z vezavnim mestom za antigen (angl. *fragment antigen-binding, Fab*) in en fragment za vezavo na druge elemente imunskega sistema (angl. *fragment crystallizable region, Fc*). Vloga nativnih protiteles tipa IgG v organizmu je nevtralizacija mikroorganizmov ali strupov z vezavo na njihove epitope, aktivacija komplemента in opsonizacija. Pri izdelavi protistrupa s pomočjo encimske razgradnje s pepsinom oz. papainom praviloma odstranijo regijo Fc, zato protistrupi vsebujejo samo fragmente z regijami za vezavo antigena (monovalenten Fab ali dvovalenten F(ab')<sub>2</sub>) za različne komponente strupa, ki ohranijo nevtralizacijske lastnosti, do aktivacije komplemента in opsonizacije

pa ne pride (slika 6). Če je regija Fc odstranjena, so fragmenti v protiserumu manj imunogeni, kar povečuje varnost protiseruma (100).

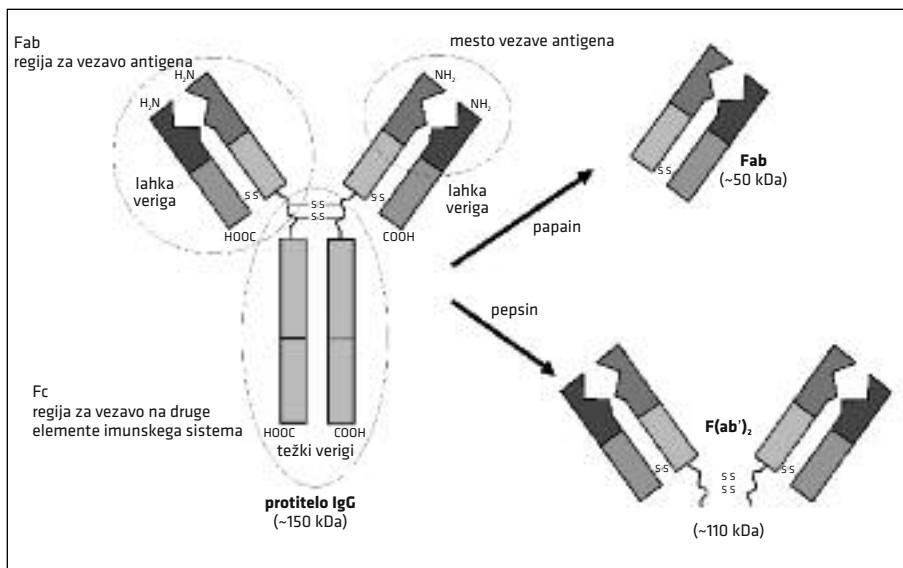
## Pregled farmakoloških lastnosti

Protiserum po uporabi tako veže in nevtralizira komponente strupa, spremeni njegovo porazdelitev po telesu, zato pride manj strupa v tarčna tkiva, in vpliva na njegovo izločanje iz telesa (101). Fragmenti Fab imajo v telesu krajši razpolovni čas od fragmentov F(ab)<sub>2</sub> ali celih protiteles tipa IgG. Zaradi tega je verjetnost, da se pri uporabi protiserumov s fragmenti Fab klinična simptomatika povrne, vsaj teoretično večja, saj se strup počasi absorbira iz mesta ugriza v podkožju in dlje časa zadržuje v telesu kot fragmenti Fab. To lahko zahteva dodatne odmerke protiseruma (101). Višji odmerki protiseruma pa predstavljajo večjo količino heteroloških beljakovin, ki jih pri

zdravljenju prejme bolnik, kar povečuje možnost nastanka serumske reakcije in zvišuje stroške zdravljenja. Po drugi strani pa je pogostost neželenih učinkov pri uporabi protiserumov s fragmenti F(ab)<sub>2</sub> in še posebej IgG bistveno večja (102). Fragmenti Fab in F(ab)<sub>2</sub> so namreč manj imunogeni kot celotno protitelo (100).

Razlika med fragmenti Fab in F(ab)<sub>2</sub> ter celotnimi protitelesi je tudi v njihovi porazdelitvi po telesu, saj fragmenti z manjšo molekulsko maso lažje prodirajo v tkiva in so tako (vsaj teoretično) učinkovitejši. Njihovo učinkovitost po drugi strani zmanjšuje že omenjeno hitrejšo izločanje in zaradi boljšega prodiranja v tkivo tudi večji volumen porazdelitve. Iz teh razlogov je težko vnaprej napovedati, katera vrsta protiseruma je pri zastrupitvi s strupom določene vrste kače bolj učinkovita in varna (100).

Fragmenti protiteles z vezavo na različne komponente kačjega strupa v plazmi zastrupljenca tvorijo neaktivne komplekse,



**Slika 6.** Zgradba imunoglobulina G in dela protitelesa, ki vsebuje vezavna mesta za antigen, ki nastane z encimsko razgradnjo (100). Fab – fragment z enim vezavnim mestom za antigen (angl. *fragment antigen-binding*), Fc – fragment za vezavo na druge elemente imunskega sistema (angl. *fragment crystallizable region*), F(ab)<sub>2</sub> – fragment z dvema vezavnima mestoma za antigen (angl. *fragment antigen-binding*), IgG – imunoglobulin G.

ki jih odstrani monocitno-makrofagni sistem, pri kompleksih manjše velikosti (fragmenti Fab) pa se lahko v manjši meri izločijo iz telesa tudi z urinom (100).

## Uporaba protiserumov v Evropi in v Sloveniji

V Evropi izdelujejo osem različnih vrst protiserumov (Biomed®, Bulbio®, Microgen®, Vetel®, Viekvin®, ViperaTAB®, ViperFAV™ in zagrebški protiserum »*Immunoserum contra venena viperarum europaearum*«), vendar so podatki o njihovem delovanju skromni, primerjave učinkovitosti med njimi pa zelo skope (98, 103). Zelo malo je predkliničnih raziskav protiserumov, randomiziranih kliničnih raziskav, ki bi primerjale njihovo učinkovitost in varnost, pa nimamo. Nobeden od protiserumov na evropskem tržišču ni odobren s strani Evropske agencije za zdravila (European Medicines Agency). Šest proizvajalcev priporoča vnos v mišico, dva pa v veno (98). Lamb in sodelavci so objavili raziskavo učinkovitosti različnih protiserumov, ki temelji na objavljenih predkliničnih raziskavah, kliničnih primerih ter serijah primerov, ki so v glavnem retrospektivnega značaja (98). Njihova raziskava je zajela 2.602 bolnikov, ki so bili zdravljeni z enim od protiserumov. Največ (kar 2.061) bolnikov je prejelo »*Immunoserum contra venena viperarum europaearum*«, ViperFAV™ ali ViperaTAB®. Vnos protiseruma v veno je bil povezan s kratko bolnišnično oskrbo, ki v primeru vnosa v mišico ni bila potrebna. Nekatere raziskave niso zaznale razlike med dolžino bolnišnične oskrbe pri bolnikih z enako stopnjo resnosti zastrupitve, ki so prejeli protiserum ali pa ne. Poročil o večkratnem odmerjanju priporočenega odmerka zaradi slabega učinka ali relapsa klinične simptomatike je malo (230/1.490 primerov), prav tako je malo tudi poročil o neželenih učinkih protiserumov (37/2.408 primerov, med njimi je sedem poročil o pojavu anafilaktične reakcije), kar bi lahko kazalo na to, da so sodobni protiserumi v splošnem varna zdravila (98).

Do nedavnega smo v Sloveniji uporabljali »*Immunoserum contra venena viperarum europaearum*«, ki pa od leta 2012 dalje zaradi neizpolnjevanja zahtev Evropske unije pri nas ni več na razpolago. Kot nadomestilo je bil nato do leta 2015 na voljo ViperFAV™, vendar tudi slednjega v Sloveniji ni več možno kupiti. V zadnjih letih pri zdravljenju zastrupljenec uporabljamo ViperaTAB®. Nova spoznanja o farmakokinetiki protiserumov so prinesle nedavno objavljene raziskave kliničnih primerov bolnikov iz Slovenije (47, 104). Primerjavo omenjenih treh protiserumov predstavlja tabela 1.

## Specifičnost protiseruma ViperaTAB®

V klinični praksi je pogosto težko zanesljivo razlikovati med ugrizom modrasa in navadnega gada. Do nedavnega je bilo vprašanje vrste kače zgolj teoretičnega pomena, danes pa imamo na voljo le monospecifičen protiserum ViperaTAB®, usmerjen proti strupu navadnega gada. Z encimsko imuno-adsorpcijsko preiskavo (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) in imunoblotom so dokazali imunološko navzkrižno reaktivnost med fragmenti Fab protiseruma ViperaTAB® in komponentami strupov vseh treh strupenih kač v Sloveniji. Poleg tega je ViperaTAB® pri miših učinkovito nevtraliziral smrtni učinek strupa vseh treh kač, uporabljeni odmerek strupa pa je bil petkrat višji, kot je smrtni odmerek za miške (4). Vendar pa nekatera klinična spoznanja teh ugotovitev ne podpirajo. Prospektivna raziskava kliničnih primerov Brvarja in sodelavcev je pokazala, da je pri bolnikih, ki jih je ugriznil modras, priporočeni odmerek ViperaTAB® uspešno zaustavil širjenje zmerne oteklina in prehodno nevtraliziral sistemske učinke (npr. trombocitopenijo), pri zastrupitvah s hujšimi oteklinami, prizadetostjo živčevja in višjimi koncentracijami amoditoksina v serumu pa je bil le delno učinkovit (47). Po vnosu ViperaTAB® je koncentracija modrasovega

**Tabela 1.** Nekatere značilnosti protistrupov »*Immunoserum contra venena viperarum europaearum*«, ViperFAV™ in ViperaTAB® (47, 98, 104). Fab – fragment z enim vezavnim mestom za antigen (angl. *fragment antigen-binding*), F(ab')<sub>2</sub> – fragment z dvema vezavnima mestoma za antigen (angl. *fragment antigen-binding*).

Značilnosti	» <i>Immunoserum contra venena viperarum europaearum</i> «	ViperFAV™	ViperaTAB®
Proizvajalec	Imunološki inštitut, Zagreb, Hrvaška	Aventis Pasteur, MSD, Lyon, Francija	MicroPharm Limited, Newcastle Emlyn, Združeno kraljestvo
Izvor	konjski	konjski	ovčji
Vrsta protiseruma	F(ab') <sub>2</sub>	F(ab') <sub>2</sub>	Fab
Vrste kač, proti strupom katerih je izdelan	<i>Vipera ammodytes</i>	<i>Vipera berus</i> , <i>Vipera aspis</i> , <i>Vipera ammodytes</i>	<i>Vipera berus</i>
Koncentracija protiteles	≤ 100 mg/ml	99–116 mg/ml	25 mg/ml
Skupna količina beljakovin v enem odmerku	≤ 1000 mg	396–468 mg	200 mg
Afinitetna očiščenost	ne	ne	da
Priporočen odmerek in pot vnosa	10 ml im. (v hudih primerih do 40 ml iv.)	4 ml iv.	8 ml iv.
Nevtralizirajoče enote protistrupa pri ugrizu <i>Vipera berus</i>	> 50 ml	125 ml	> 100 ml
Nevtralizirajoče enote protistrupa pri ugrizu <i>Vipera ammodytes</i>	> 100 ml	250 ml	ni podano
Nevtralizirajoče enote protistrupa pri ugrizu <i>Vipera aspis</i>	> 100 ml	250 ml	ni podano

strupa v serumu upadla. Na koncentracijo amoditoksina protiserum ni imel vpliva (47).

## Učinkovitost in varnost protiserumov

Vprašljiva je tudi učinkovitost zdravljenja ugriza modrasa z enkratnim priporočenim odmerkom ViperFAV™, ki naj bi bil sicer učinkovit proti strupom vseh treh vrst strupenih kač v Sloveniji. Pri moškem, ki ga je ugriznil modras, je šele po prejemu dveh priporočenih odmerkov ViperFAV™ prišlo do zmanjšanja lokalne otekline in povečanja števila trombocitov, čeprav je bil izračunan razpolovni čas protiseruma med najvišjimi znanimi. Z višjimi odmerki protiseruma narašča tveganje za pojav motenj srčnega

ritma in drugih neželenih učinkov, zato je nujno opazovanje takega bolnika (103). Pri omenjenem moškem se je namreč med infuzijo drugega odmerka ViperFAV™ poslabšala že obstoječa sinusna bradikardija in se je pojavil nadomestni nesinusni ritem. Do podobnih ugotovitev sta prišla tudi Personne in Hultén, ki ocenjujeta, da do ponovitve klinične simptomatike pri bolnikih po ugrizu navadnega gada, ki so prejeli le en odmerek ViperaTAB®, prihaja razmeroma pogosto (pri najmanj 20 % primerov), kar zahteva dodaten odmerek protiseruma (105). Razlog za omenjeni pojav je najverjetneje krajši razpolovni čas protiseruma v primerjavi z razpolovnim časom strupa navadnega gada v krvi bolnika (105).

Pri presoji učinkovitosti in varnosti protiserumov ima pomembno vlogo tudi način vnosa protiseruma v telo. Kinetika pri im. vnosu, ki ga priporoča proizvajalec »*Immuno-serum contra venena vipe-rarum europaea-rum*«, je namreč bistveno drugačna kot pri iv. Fragmenti  $F(ab')_2$  so po vnosu v mišico prisotni v telesu še več tednov, ko strupa kače sploh ni mogoče več dokazati, medtem ko je v času vnosa v mišico, ko je bolnikovo klinično stanje najbolj resno, njihova koncentracija v serumu razmeroma nizka. Vsaj teoretično bi bil daljši čas izločanja protiseruma iz telesa lahko povezan z večjim tveganjem za alergijske reakcije in serumske bolezni.

V želji po večji učinkovitosti in varnosti protistrupov se v zadnjem času razvijajo novejši, selektivno delujoči protistrupi, ki so specifično usmerjeni le proti najbolj toksičnim komponentam kačjega strupa. Obetaven je protiserum, pridobljen z imunizacijo zajcev z amoditaginom, ki je popolnoma nevtraliziral hemoragično aktivnost celotnega strupa v podganah (50). Spodbudne rezultate so pri poskusih na živalih dobili tudi z varespladibom, ki nevtralizira učinke sPLA2 pri 28 vrstah medicinsko pomembnih strupenih kač, med katerimi je tudi navadni gad (106).

## ZAKLJUČEK

Kljub številnim raziskavam in objavam o venomiki kačjih strupov in izjemno raznolikih beljakovinah, ki jih ti vsebujejo, je naše poznavanje njihove sestave in delovanja še vedno nepopolno. Poznavanje bioloških lastnosti, sestave in delovanja kačjih strupov ne omogoča le razvoja novih in učinkovitejših protiserumov, ampak tudi molekularnih orodij za raziskave fizioloških procesov in laboratorijsko diagnostiko (npr. določanje ekarinskega in reptilaznega časa, koncentracije beljakovin C in S, faktorjev V in X, vWF, pomanjkljivosti kompleksa vWF/GPIb). Omogoča nam tudi razvoj (iskanje) spojin vodnic za nova zdravila, uporabna za zdravljenje raka, bolezni živčevja in srčno-žilnih bolezni (16, 60). Raziskave hemostatsko aktivnih beljakovin iz kačjih strupov so že privedle do nastanka antihipertenzivnih (npr. Captopril®), antiagregacijskih (npr. Integrilin®, Aggrastat®), trombolitičnih (npr. Defibrase®) in prokoagulantnih zdravil (npr. Haemocoagulase®) (23, 107). Koncepti imunotromboze, s katerimi si razlagamo povezavo med vnetnimi in trombotičnimi procesi, ki pri nekaterih stanjih potekajo sočasno, pa nudijo osnovo razvoju protivnetnih zdravil. Ugotovljeno je bilo, da disintegrin rodostomin deluje protivnetno preko zaviranja tvorbe citokinov v fagocitih (107).



## LITERATURA

1. Mršič N. Plazilci (Reptilia) Slovenije. Ljubljana: Zavod Republike Slovenije za šolstvo; 1997.
2. Geniez P, Gruber U. Die Schlangen Europas. Schlangen aus Europa, Nordafrika und dem Mittleren Orient. Stuttgart: Kosmos; 2017.
3. Pommier P, de Haro L. Envenomation by Montpellier snake (*Malpolon monsepsulanus*) with cranial nerve disturbances. *Toxicon*. 2007; 50 (6): 868–9.
4. Casewell NR, Al-Abdulla I, Smith D, et al. Immunological cross-reactivity and neutralisation of European viper venoms with the monospecific *Vipera berus* antivenom ViperaTAB. *Toxins (Basel)*. 2014; 6 (8): 2471–82.
5. Zuffi MAL. A critique of the systematic position of the asp viper subspecies *Vipera aspis aspis* (Linnæus, 1758), *Vipera aspis atra* Meisner, 1820, *Vipera aspis francisciredi* Laurenti, 1768, *Vipera aspis hugyi* Schinz, 1833 and *Vipera aspis zinnikeri* Kramer, 1958. *Amphibia-Reptilia*. 2002; 23: 191–213.
6. Torkar G. Najdba laškega gada *Vipera aspis* v Breginjskem kotu poleti 2001. *Natura Sloveniae*. 2003; 5 (2): 65–7.
7. Kumar B. Nove najdbe laškega gada (*Vipera aspis*) v Sloveniji. *Natura Sloveniae*. 2009; 11 (1): 59–63.
8. Krofel M, Cafuta V, Planinc G, et al. Razširjenost plazilcev v Sloveniji: pregled podatkov, zbranih do leta 2009. *Natura Sloveniae*. 2009; 11 (2): 61–99.
9. ChippauxJP. Epidemiology of snakebites in Europe: a systematic review of the literature. *Toxicon*. 2012; 59 (1): 86–99.
10. Grenc D. Ugrizi strupenih kač. *Med Razgl*. 2009; 48 (1–2): 141–51.
11. Petite J. Viper bites: treat or ignore? Review of a series of 99 patients bitten by *Vipera aspis* in an alpine Swiss area. *Swiss Med Wkly*. 2005; 135 (41–42): 618–25.
12. De Haro L. Management of snakebites in France. *Toxicon*. 2012; 60 (4): 712–8.
13. Rivière G, Choumet V, Saliou B, et al. Absorption and elimination of viper venom after antivenom administration. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998; 285 (2): 490–5.
14. Audebert F, Sorkine M, Robbe-Vincent A, et al. Viper bites in France: Clinical and biological evaluation; kinetics of envenomations. *Hum Exp Toxicol*. 1994; 13 (10): 683–8.
15. Tasoulis T, Isbister GK. A review and database of snake venom proteomes. *Toxins (Basel)*. 2017; 9 (9): 290.
16. Bocian A, Urbanik M, Hus K, et al. Proteome and peptidome of *Vipera berus berus* venom. *Molecules*. 2016; 21 (10): 1398.
17. Gubenšek F, Sket D, Turk V, et al. Fractionation of *Vipera ammodytes* venom and seasonal variation of its composition. *Toxicon*. 1974; 12 (2): 167–71.
18. Lang Balija M, Vrdoljak A, Habjanec L, et al. The variability of *Vipera ammodytes ammodytes* venoms from Croatia: Biochemical properties and biological activity. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2005; 140 (2): 257–63.
19. Georgieva D, Risch M, Kardas A, et al. Comparative analysis of the venom proteomes of *Vipera ammodytes ammodytes* and *Vipera ammodytes meridionalis*. *J Proteome Res*. 2008; 7 (3): 866–86.
20. Latinovič Z, Leonardi A, Šribar J, et al. Venomics of *Vipera berus berus* to explain differences in pathology elicited by *Vipera ammodytes ammodytes* envenomation: Therapeutic implications. *J Proteom*. 2016; 146: 34–47.
21. Križaj I. Molekularni vidik toksičnosti slovenskih kač. In: Brvar M, ed. Toksikologija 2015: piki in ugrizi strupenih živali; 2015 Apr 10; Ljubljana: Slovensko zdravniško društvo, Sekcija za klinično toksikologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Center za zastrupitve, Interna klinika; 2015. p. 10–4.
22. Guillemain I, Bouchier C, Garrigues T, et al. Sequences and structural organization of phospholipase A2 genes from *Vipera aspis aspis*, *V. aspis zinnikeri* and *Vipera berus berus* venom. *Eur J Biochem*. 2003; 270 (13): 2697–706.
23. Sajevec T. Hemostatsko-aktivni proteini iz strupa modrasa (*Vipera a. ammodytes*) [doktorsko delo]. Ljubljana: Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana; 2014.
24. Sajevec T, Leonardi A, Križaj I. An overview of hemostatically active components of *Vipera ammodytes ammodytes* venom. *Toxin Rev*. 2013; 33 (1–2): 33–6.
25. Lukšič B, Bradarič N, Prgomet S. Venomous snakebites in southern Croatia. *Coll Antropol*. 2006; 30 (1): 191–7.
26. Pungerčar J, Križaj I. Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A<sub>2</sub>. *Toxicon*. 2007; 50 (7): 871–92.
27. Križaj I. Ammodytoxin: a window into understanding presynaptic toxicity of secreted phospholipases A<sub>2</sub> and more. *Toxicon*. 2011; 58 (3): 219–29.
28. Šribar J, Oberčkal J, Križaj I. Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A(2) – an update. *Toxicon*. 2014; 89: 9–16.
29. Logonder U, Križaj I, Rowan EG, et al. Neurotoxicity of ammodytoxin A in the envenoming bites of *Vipera ammodytes ammodytes*. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2008; 67 (10): 1011–9.

30. Ritonja A, Gubenšek F. Ammodytoxin A, a highly lethal phospholipase A<sub>2</sub> from *Vipera ammodytes ammodytes* venom. *Biochim Biophys Acta*. 1985; 828 (3): 306–12.
31. Kordiš D, Križaj I. Secreted Phospholipases A<sub>2</sub> with β-Neurotoxic Activity. In: Gopalakrishnakone P, Inagaki H, Vogel CW, et al., eds. *Snake Venoms*. Dordrecht: Springer; 2017. p. 67–86.
32. Vardjan N, Mattiazzi M, Rowan EG, et al. Neurotoxic phospholipase A<sub>2</sub> toxicity model: An insight from mammalian cells. *Commun Integr Biol*. 2013; 6 (3): e23600.
33. Lomonte B, Gutiérrez JM. Phospholipases A<sub>2</sub> from viperidae snake venoms: how do they induce skeletal muscle damage? *Acta Chim Slov*. 2011; 58 (4): 647–59.
34. Karabuva S, Brizič I, Latinović Z, et al. Cardiotoxic effects of the *Vipera ammodytes ammodytes* venom fractions in the isolated perfused rat heart. *Toxicon*. 2016; 121: 98–104.
35. Karabuva S, Lukšič B, Brizič I, et al. Ammodytin L is the main cardiotoxic component of the *Vipera ammodytes ammodytes* venom. *Toxicon*. 2017; 139: 94–100.
36. Šribar J, Kovačič L, Draškovič P, et al. The first phospholipase inhibitor from the serum of *Vipera ammodytes ammodytes*. *FEBS J*. 2007; 274 (23): 6055–64.
37. Logonder U, Jenko-Pražnikar Z, Scott-Davey T, et al. Ultrastructural evidence for the uptake of a neurotoxic snake venom phospholipase A<sub>2</sub> into mammalian motor nerve terminals. *Exp Neurol*. 2009; 219 (2): 591–4.
38. Petrovič U, Šribar J, Pariš A, et al. Ammodytoxin, a neurotoxic secreted phospholipase A<sub>2</sub>, can act in the cytosol of the nerve cell. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 324 (3): 981–5.
39. Jenko Pražnikar Z, Kovačič L, Rowan EG, et al. A presynaptically toxic secreted phospholipase A<sub>2</sub> is internalized into motoneuron-like cells where it is rapidly translocated into the cytosol. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1783 (6): 1129–39.
40. Kovačič L, Novinec M, Petan T, et al. Calmodulin is a non-essential activator of secretory phospholipase A<sub>2</sub>. *Biochemistry*. 2009; 48 (47): 11319–28.
41. Jenko Pražnikar Z, Petan T, Pungercar J. A neurotoxic secretory phospholipase A<sub>2</sub> induces apoptosis in motoneuron-like cells. *Ann NY Acad Sci*. 2009; 1152: 215–24.
42. Župunski V, Kordiš D, Gubenšek F. Adaptive evolution in the snake venom Kunitz/BPTI protein family. *FEBS Lett*. 2003; 547 (1–3): 131–6.
43. Ritonja A, Turk V, Gubenšek F. Serine protease inhibitors from *Vipera ammodytes ammodytes* venom. Isolation and kinetic studies. *Eur J Biochem*. 1983; 133 (2): 427–32.
44. Brgles M, Kurtović T, Kovačič L, et al. Identification of proteins interacting with ammodytoxins in *Vipera ammodytes ammodytes* venom by immuno-affinity chromatography. *Anal Bioanal Chem*. 2014; 406 (1): 293–304.
45. Yamazaki Y, Morita T. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. *Toxicon*. 2004; 44 (3): 227–31.
46. Radonić V, Budimir D, Bradarić N, et al. Envenomation by the horned viper (*Vipera ammodytes* L.). *Mil Med*. 1997; 162 (3): 179–82.
47. Brvar M, Kurtović T, Grenc D, et al. *Vipera ammodytes* bites treated with antivenom ViperaTAb: a case series with pharmacokinetic evaluation. *Clin Toxicol (Phila)*. 2017; 55 (4): 241–8.
48. Sajevec T, Leonardi A, Križaj I. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon*. 2011; 57 (5): 627–45.
49. Leonardi A, Fox JW, Trampuš-Bakija A, et al. Ammodytase, a metalloprotease from *Vipera ammodytes ammodytes* venom, possesses strong fibrinolytic activity. *Toxicon*. 2007; 49 (6): 833–42.
50. Kurtović T, Brgles M, Leonardi A, et al. Ammodytagin, a heterodimeric metalloproteinase from *Vipera ammodytes ammodytes* venom with strong hemorrhagic activity. *Toxicon*. 2011; 58 (6–7): 570–82.
51. Sajevec T, Leonardi A, Kovačič L, et al. VaH3, one of the principal hemorrhagins in *Vipera ammodytes ammodytes* venom, is a homodimeric P-IIIc metalloproteinase. *Biochimie*. 2013; 95 (6): 1158–70.
52. Leonardi A, Sajevec T, Kovačič L, et al. Hemorrhagin VaH4, a covalent heterodimeric P-III metalloproteinase from *Vipera ammodytes ammodytes* with a potential antitumour activity. *Toxicon*. 2014; 77: 141–55.
53. Leonardi A, Gubenšek F, Križaj I. Purification and characterisation of two hemorrhagic metalloproteinases from the venom of the long-nosed viper, *Vipera ammodytes ammodytes*. *Proteins*. 2001; 40 (1): 55–62.
54. Leonardi A, Sajevec T, Latinović Z, et al. Structural and biochemical characterisation of VaF1, a P-IIIa fibrinogenolytic metalloproteinase from *Vipera ammodytes ammodytes* venom. *Biochimie*. 2015; 109: 78–87.
55. Chen HS, Chen JM, Lin CW, et al. New insights into the functions and N-glycan structures of factor X activator from Russell's viper venom. *FEBS Journal*. 2008; 275 (15): 3944–58.
56. Oliveira AK, Paes Leme AF, Asega AF, et al. New insights into the structural elements involved in the skin haemorrhage induced by snake venom metalloproteinases. *J Thromb Haemost*. 2010; 104 (3): 485–97.

57. Yamazaki Y, Takani K, Atoda H, et al. Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2). *J Biol Chem.* 2003; 278 (52): 51985–8.
58. Bailey GS, Shipolini RA. Purification and properties of a kininogen from the *Vipera ammodytes ammodytes*. *Biochem J.* 1976; 153: 409–14.
59. Leonardi A, Fox JW, Trampuš-Bakija A, et al. Two coagulation factor X activators from *Vipera ammodytes ammodytes* venom with potential to treat patients with dysfunctional factors IXa or VIIa. *Toxicon.* 2008; 52 (5): 628–37.
60. Latinović Z, Leonardi A, Petan T, et al. Disintegrins from the venom of *Vipera ammodytes ammodytes* efficiently inhibit migration of breast cancer cells. *Acta Chim Slov.* 2017; 64 (3): 555–9.
61. Magdalan J, Trocha M, Merwid-Lad A, et al. *Vipera berus* bites in the region of southwest Poland – a clinical analysis of 26 cases. *Wilderness Environ Med.* 2010; 21 (2): 114–9.
62. Kurtović T, Brgles M, Leonardi A, et al. VaSP1, catalytically active serine proteinase from *Vipera ammodytes ammodytes* venom with unconventional active site triad. *Toxicon.* 2014; 77: 93–104.
63. Prijatelj P, Charnay M, Ivanovski G, et al. The C-terminal and  $\beta$ -wing regions of ammodytoxin A, a neurotoxic phospholipase A<sub>2</sub> from *Vipera ammodytes ammodytes*, are critical for binding to factor Xa and for anticoagulant effect. *Biochimie.* 2006; 88(1): 69–76.
64. Lukšić B, Culić V, Stričević I, et al. Infant death after nose-horned viper (*Vipera ammodytes ammodytes*) bite in Croatia: a case report. *Toxicon.* 2010; 56 (8): 1506–9.
65. Malina T, Krecsak L, Korsós Z, et al. Snakebites in Hungary – epidemiological and clinical aspects over the past 36 years. *Toxicon.* 2008; 51 (6): 943–51.
66. Westerström A, Petrov B, Tzankov N. Envenoming following bites by the Balkan adder *Vipera berus bosniensis*: first documented case series from Bulgaria. *Toxicon.* 2010; 56 (8): 1510–5.
67. Moore RS. Second-degree heart block associated with envenomation by *Vipera berus*. *Arch Emerg Med.* 1988; 5 (2): 116–8.
68. Aravanis C, Ioannidis PJ, Ktenas J. Acute myocardial infarction and cerebrovascular accident in a young girl after a viper bite. *Br Heart J.* 1982; 47 (5): 500–3.
69. Chadha JS, Ashby DW, Brown JD. Abnormal electrodiogram after adder bite. *Br Heart J.* 1968; 30 (1): 138–40.
70. Czajka U, Wiatrzyk A, Lutyńska A. Mechanism of *Vipera berus* venom activity and the principles of antivenom administration in treatment. *Przegl Epidemiol.* 2013; 67 (4): 641–6, 729–33.
71. Hønge BL, Hedegaard SK, Cederstrøm S, et al. Hospital contacts after bite by the European adder (*Vipera berus*). *Dan Med J.* 2015; 62 (3): A5022.
72. Karlson-Stiber C, Salmonson H, Persson H. A nationwide study of *Vipera berus* bites during one year – epidemiology and morbidity of 231 cases. *Clin Toxicol (Phila).* 2006; 44 (1): 25–30.
73. Samel M, Siigur J. Medium molecular weight factor X activating enzyme from *Vipera berus berus* venom. *Toxicon.* 1995; 33 (1): 41–52.
74. Samel M, Vija H, Rönholm G, et al. Isolation and characterization of an apoptotic and platelet aggregation inhibiting L-amino acid oxidase from *Vipera berus berus* (common viper) venom. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1764 (4): 707–14.
75. Samel M, Vija H, Subbi J, et al. Metalloproteinase with factor X activating and fibrinolytic activities from *Vipera berus berus* venom. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2003; 135 (4): 575–82.
76. Samel M, Siigur J. Isolation and characterization of hemorrhagic metalloproteinase from *Vipera berus berus* (common viper) venom. *Comp Biochem Physiol.* 1990; 97 (2): 209–14.
77. Calderón L, Lomonte B, Gutiérrez JM, et al. Biological and biochemical activities of *Vipera berus* (European viper) venom. *Toxicon.* 1993; 31 (6): 743–53.
78. Calvete JJ, Moreno-Murciano MP, Theakston RD, et al. Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. *Biochem J.* 2003; 372 (3): 725–34.
79. Cho J, Mosher DF. Role of fibronectin assembly in platelet thrombus formation. *J Thromb Haemost.* 2006; 4 (7): 1461–9.
80. Beer E, Musiani R. A case of intestinal infarction following *Vipera aspis* bite. *Toxicon.* 1998; 36 (5): 729–33.
81. Schmitt C, Baleine J, Beaupertuis O, et al. Persistent neurologic symptoms despite Viperfav<sup>®</sup> antidote treatment after *Vipera aspis* bite: 2 cases. *Presse Med.* 2016; 45 (6 Pt 1): 601–2.
82. Re G, Trisolino G, Miglio F. Eye muscle paralysis after *Vipera aspis* envenomation. *J Accid Emerg Med.* 1999; 16 (6): 458.
83. Beer E, Putorti F. Dysphonia, an uncommon symptom of systemic neurotoxic envenomation by *Vipera aspis* bite. Report of two cases. *Toxicon.* 1998; 36 (5): 697–701.

84. De Haro L, Robbe-Vincent A, Saliou B, et al. Unusual neurotoxic envenomations by *Vipera aspis* snakes in France. *Hum Exp Toxicol*. 2002; 21 (3): 137–45.
85. De Haro L, Glaizal M, Tichadou L, et al. Asp viper (*Vipera aspis*) envenomation: experience of the Marseille Poison Centre from 1996 to 2008. *Toxins (Basel)*. 2009; 1 (2): 100–12.
86. Ferquel E, de Haro L, Jan V, et al. Reappraisal of *Vipera aspis* venom neurotoxicity. *PLoS ONE*. 2007; 2 (11): E1194.
87. Garrigues T, Dauga C, Ferquel E, et al. Molecular phylogeny of *Vipera Laurenti*, 1768 and the related genera *Macrovipera* (Reuss, 1927) and *Daboia* (Gray, 1842), with comments about neurotoxic *Vipera aspis aspis* populations. *Mol Phylogenet Evol*. 2005; 35 (1): 35–47.
88. Neil J, Choumet V, Le Coupance A, et al. Guillain-Barré syndrome: first description of a snake envenomation aetiology. *J Neuroimmunol*. 2012; 242 (1–2): 72–7.
89. Lonati D, Giampreti A, Rossetto O, et al. Neurotoxicity of European vipers in Italy: Pavia Poison Control Centre case series 2001–2011. *Clin Toxicol (Phila)*. 2014; 52 (4): 269–76.
90. Ramazanova AS, Zavada LL, Starkov VG, et al. Heterodimeric neurotoxic phospholipases A<sub>2</sub> – the first proteins from venom of recently established species *Vipera nikolskii*: implication of venom composition in viper systematics. *Toxicon*. 2008; 51 (4): 524–37.
91. Jan V, Maroun RC, Robbe-Vincent A, et al. Toxicity evolution of *Vipera aspis aspis* venom: identification and molecular modelling of a novel phospholipase A<sub>2</sub> heterodimer neurotoxin. *FEBS Lett*. 2002; 527 (1–3): 263–8.
92. Pirazzini M, Zanetti G, Montecucco C, et al. Molecular and toxicological study of Italian viper venom neurotoxicity. In: 37th International Congress of the European Association of Poisons Centres and Clinical Toxicologists (EAPCCT), 2017 May 16–19; Basel, Switzerland. *Clin Toxicol (Phila)*. 2017, 55 (5): 484.
93. Szold O, Ben-Abraham R, Frolkis I, et al. Tumor necrosis factor as a mediator of cardiac toxicity following snake envenomation. *Crit Care Med*. 2003; 31 (5): 1449–53.
94. Komori Y, Sugihara H. Biological study of muscle degenerating hemorrhagic factor from the venom of *Vipera aspis aspis* (aspic viper). *Int J Biochem*. 1988; 20 (12): 1417–23.
95. Komori Y, Nikai T, Sugihara H. Isolation and characterization of factor X activator from the venom of *Vipera aspis aspis*. *Int J Biochem*. 1990; 22 (9): 1053–60.
96. Komori Y, Sugihara H. Physiological and biochemical properties of a kallikrein-like enzyme from the venom of *Vipera aspis aspis* (aspic viper). *Toxicon*. 1988; 26 (12): 1193–203.
97. Komori Y, Sugihara H. Purification and physiological study of a hypotensive factor from the venom of *Vipera aspis aspis* (aspic viper). *Toxicon*. 1990; 28 (4): 359–69.
98. Lamb T, de Haro L, Lonati D, et al. Antivenom for European *Vipera* species envenoming. *Clin Toxicol (Phila)*. 2017; 55 (6): 557–68.
99. Leban V, Grenc D. Zdravljenje ugrizov strupenih kač v Sloveniji. In: Križman I, ed. 29. strokovni sestanek internistov 2017, zbornik predavanj; 2017 Oct 14–15. Ljubljana: Slovensko zdravniško društvo, Združenje internistov; 2017. p. 116–21.
100. Erdman AR, Dart RC. Snake Antivenoms for the United States. In: Dart RC (ed.) *Medical Toxicology*. Third Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 249–56.
101. Bush SP, Ruha AM, Seifert SA, et al. Comparison of F(ab)<sub>2</sub> versus Fab antivenom for pit viper envenomation: A prospective, blinded, multicenter, randomized clinical trial. *Clin Toxicol (Phila)*. 2015; 53 (1): 37–45.
102. White J. Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon*. 2005; 45 (8): 951–67.
103. Persson H. Envenoming by European vipers antivenom treatment – influence on morbidity. *Przegł Lek*. 2001; 58 (4): 223–5.
104. Kurtović T, Brvar M, Grenc D, et al. A single dose of Viperfav<sup>TM</sup> may be inadequate for *Vipera ammodytes* snake bite: a case report and pharmacokinetic evaluation. *Toxins (Basel)*. 2016; 8 (8): E244.
105. Personne M, Hultén P. The need of a second antivenom dose after snake bites by *Vipera berus*. 37th International Congress of the European Association of Poisons Centres and Clinical Toxicologists (EAPCCT), 2017 May 16–19, Basel, Switzerland. *Clin Toxicol (Phila)*. 2017; 55 (5): 488.
106. Lewin M, Samuel S, Merkel J, et al. Varespladib (LY315920) Appears to be a potent, broad-spectrum, inhibitor of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> and a possible pre-referral treatment for envenomation. *Toxins (Basel)*. 2016; 8 (9): 248.
107. Huang TF, Hsu CC, Kuo YJ. Anti-thrombotic agents derived from snake venom proteins. *Thromb J*. 2016; 14 Suppl 1: 18.