

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Josip Miljković

Spolni dimorfizam u proteinskom sastavu otrova poskoka (*Vipera ammodytes*
ammodytes)

Zagreb, 2020.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za fiziologiju i radiobiologiju i Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Ane Shek Vugrovečki i doc. dr. sc. Mirele Pavić te je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2019./2020.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA	4
3. MATERIJALI I METODE	5
4. REZULTATI.....	8
5. RASPRAVA	13
6. ZAKLJUČCI.....	16
7. ZAHVALE	17
8. POPIS LITERATURE.....	18
9. SAŽETAK	22
10. SUMMARY	23
11. ŽIVOTOPIS	24

1. UVOD

Zmijski otrovi su kemijski složene izlučevine specijaliziranih žlijezda zmijske koji sadrže mnoge biološki aktivne komponente, kao što su polipeptidi i peptidni toksini, polisaharidi, nisko molekularne tvari i ioni (HALASSY i sur., 2011).

Aktivne tvari otrova mogu se razvrstati na osnovu kemijskog sastava u dvije skupine: toksine i enzime (SHEK i sur., 2019). Njihova svrha je imobiliziranje ili usmrćivanje plijena a mogu djelovati sinergijski s drugim komponentama otrova kako bi pojačale svoju aktivnosti (SARHAN i sur., 2017). S obzirom na farmakološko djelovanje, otrove zmijske podijelili smo na tri glavna tipa djelovanja: hemotoksično, neurotoksično i citotoksično (WHO, 2010).

Varijabilnost zmijskog otrova dugo je istraživana i dokumentirana pojava (ZELANIS i sur., 2010; ZELANIS i sur., 2012) Javlja se na nekoliko razina, uključujući varijabilnost među porodicama, rodova, vrstama, ali i unutar same vrste (CHIPPAUX i sur., 1991) što je i predmet ovog istraživanja.

Otrovne životinje imaju značajnu ulogu u održavanju ekosustava na različite načine (JENNER i UNDHEIM, 2017). Istraživanje otrova odnosno derivata proteina iz otrova nekih vrsta životinja značajno napreduje te se koristi i za proizvodnju lijekova, protuotrova te u novije vrijeme čak i u kozmetičke svrhe (JENNER i UNDHEIM, 2017; HAMPEL i sur., 2018). Pa tako, na primjer, otrov Brazilske zmijske (*Bothrops jararaca*) koristi se za liječenje visokog krvnog tlaka, opuštajući krvne žile, a nalazi se u sastavu lijeka Captopril (JENNER i UNDHEIM, 2017). Batroxobin je lijek za liječenje raznih tipova krvarenja i tromboza u čijem sastavu se nalazi derivat otrova kopljoglave zmijske (*Bothrops asper*) (JENNER i UNDHEIM, 2017).

Bazična istraživanja i karakterizacija venoma otrovnih životinja, kao što je i ovo, imaju ključnu ulogu u razvoju novih potencijalnih lijekova, što u veterinarskoj, a posebice u humanoj medicini (HEMPEL i sur., 2018).

U zmijske aparat za stvaranje otrova sastoji se od parnih specijaliziranih žlijezda, tzv. Duvernoyevih žlijezda, smještenih medijalno od gornjih labijalnih ljuskica te iza ili ispod očiju (MACKESSY, 2009).

Poskok, *V. ammodytes* (Linnaeus, 1758) je najotrovnija zmija Europe. Stanište poskoka *V. ammodytes* rasprostire se od Alpa pa sve do Irana (HEMPEL i sur., 2018). Detaljno su opisane četiri podvrste *V. ammodytes* (*V. a. ammodytes*, *V. a. meridionalis*, *V. a. montandoni* i *V. a. transcaucasiana*) (HECKES i sur., 2006; TOMOVIĆ, 2006), a o ostalim podvrstama se još vodi rasprava (HEMPEL i sur., 2018). U Hrvatskoj nalazimo tri vrste otrovnih zmijsa, a to su: poskok (*Vipera ammodytes ammodytes*), riđovka (*Vipera berus*) i planinski žutokrug (*Vipera ursinii*). One sve pripadaju porodici ljutica (MARETIĆ i sur., 2013).

Poskok naseljava suha, otvorena staništa koja su uglavnom do 2000 m nadmorske visine, a to su najčešće kamenite padine, livade s grmljem, kamenjari, kamenolomi, te vinogradi. Prosječna duljina poskoka je od 60 do 80 cm. Na glavi ima karakterističan roščić po kojem ga se lako prepoznaje. Boja mu varira, a duž čitave duljine tijela proteže se cik-cak linija (TADIĆ, 2000).

Otrov poskoka uzrokuje niz patofizioloških promjene, kao što su lokalno oštećenje tkiva, bol, paraliza, krvarenja, groznica, tahikardija, apoptoza i druge sustavne pojave (MARETIĆ i sur., 2013). Koristi se kao antigen za imunizaciju životinja u proizvodnji monovalentnih ili polivalentnih protuotrova za sve europske zmijsa (HALASSY i sur., 2011). Zbog toga se otrov poskoka značajno istražuje posljednjih 20 godina (LANG BALIJA i sur., 2005; HALASSY i sur., 2011).

Razlike u sastavu otrova između različitih vrsta zmijsa dobro je poznata i istraživana problematika. Razlike u sastavu javljaju se i unutar iste vrste pa čak i jedinke. Dokazano je da na sastav otrova može utjecati zemljopisno podrijetlo i stanište, sezona, hranjenje, dob i spol (CHIPPAUX i sur., 1991).

Spolni dimorfizam u veličini, obliku, boji i ponašanju je raširena pojava među životinjama pa tako i u zmijsa. Kod većine vrsta zmijsa ženke premašuju mužjake u veličini tijela (SARHAN i sur., 2017). Osim po veličini, u poskoka je zabilježen i fenotipski spolni dimorfizam, što nije uobičajeno za druge vrste, tj. da se ženke mogu razlikovati od mužjaka po jednoj fenotipskoj karakteristici, a to je da mužjaci imaju obojanu glavu ili tzv. kapicu na glavi.

Varijabilnost u sastavu otrova *Vipera ammodytes ammodytes* opisana je s obzirom na geografsko podrijetlo životinja (LANG BALIJA i sur., 2005) i s obzirom na sezonu (GUBENŠEK i sur., 1974), ali istraživanja o postojanju varijabilnosti s obzirom na spol u literaturi

nisu zabilježena. Varijabilnost otrova s obzirom na spol dokazana je u vrsta *Bothrops jararaca* (MENEZES i sur., 2006), *Crotalus adamanteus* (MEBS i KORNALIK, 1984) i *Cerastes cerastes* (SARHAN i sur., 2017).

2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA

Hipoteza ovog istraživanja je da u proteinskom sastavu otrova poskoka (*Vipera ammodytes ammodytes*) postoji spolni dimorfizam, odnosno spolne razlike u broju i izraženosti proteinskih pruga.

Kako bi se testirala hipoteza, postavljeni su sljedeći specifični ciljevi:

1. Odrediti optimalne uvjete za prikaz proteina otrova SDS-PAGE elektroforezom.
2. Istražiti broj i raspodjelu izraženosti pojedinih proteinskih pruga dobivenih SDS-PAGE elektroforezom.
3. Istražiti moguće spolne razlike u broju i izraženosti pojedinih proteinskih pruga dobivenih SDS-PAGE elektroforezom.

3. MATERIJALI I METODE

Držanje životinja

Zmije su držane na Odjelu za proizvodnju antiseruma i uzgoj pokusnih životinja, Imunološki zavod, Zagreb, Hrvatska. Sve jedinke su držane u jednakim kontroliranim uvjetima, temperature nastambe 24°C sa svjetlosnim režimom od 12 sati. Sve su hranjene miševima sedam dana prije uzimanja uzoraka.

Uzimanje uzoraka

Uzorci otrova su pojedinačno uzeti od dvadeset odraslih jedinki poskoka (*Vipera ammodytes ammodytes*), od kojih je jedanaest mužjaka i devet ženki. Otrov je uzet jednokratno rutinskom mužnjom otrova kako bi se izbjegao utjecaj sezone. Uzorci su uzimani rutinskom mužnjom nakon inducirano ugriza na Petrijevu zdjelicu. Nakon prikupljanja uzorci su pohranjeni pojedinačno u Eppendorf epruvete, te pohranjeni na -80 °C do analiza.

Određivanje koncentracije proteina

Uzorci otrova najprije su centrifugirani 5 minuta na 600 ×g kako bi se uklonio stanični debris. Koncentracija proteina određena je spektrofotometrijskom metodom pomoću programa „*Protein Assay Protocol*“ na mikrovolumenskom spektrofotometru (NanoDrop One, Thermo Scientific, WI, SAD) u nativnim, nerazrijeđenim otrovima. Apsorbancija je izmjerena na valnoj duljini od 280 nm. Izračun za koncentraciju proteina u NanoDrop-ovom „*Protein Assay Protocol*“ temelji se na Beer-Lambertovoj jednadžbi koristeći korigirane vrijednosti apsorbancije proteina. Za provjeru kvalitete uzorka izmjeren je i omjer čistoće A260/A280. Ukupna koncentracija proteina u uzorcima mjerena je u duplikatu.

Denaturirajuća elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Prije denaturirajuće elektroforeze proteina u poliakrilamidnom gelu (natrijev dodecilsulfat-elektroforeza u poliakrilamidnom gelu ili SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)), uzorci su priređeni miješanjem u Laemmli-puferu, tj. puferu za denaturaciju proteina (0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 (22 % v/v), 30 % SDS (12 % v/v), 80 % glicerol (54 % v/v), zajedno sa zasićena otopina bromfenolskog plavila (BPB, engl. *brom-phenol-blue*) (12

% v/v)) s dodatkom ili bez 5 % β -merkaptoetanol (BME). Konačna koncentracija proteina podešena je na 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ u svim uzorcima. Uzorci su zatim dodatno denaturirani zagrijavanjem na različitim temperaturama (37 °C/30 min, 65 °C/15 min, 95 °C/5 min) radi određivanja optimalnih uvjeta za prikaz proteinskih pruga.

Za izvedbu okomite diskontinuirane SDS-PAGE elektroforeze korištena je aparatura Mini Protean II Cell (BioRad, Hercules, CA, SAD) uz konstantan napon od 100 V tijekom 2 sata i PAGE pufer (25 mM Tris, 0,2 M glicin, 1 % SDS) u kojemu su gelovi bili potopljani. Ukupna koncentracija proteina koja se koristila tijekom elektroforeze po uzorku iznosila 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Tijekom elektroforeze proteini najprije prolaze kroz 4 % gel za sabijanje (akrilamid/bis-akrilamid (29 : 1)), a zatim se razdvajaju u električnom polju na temelju molekularne mase u 15 % gelu za razdvajanje (akrilamid/bis-akrilamid (29 : 1)).

Nakon elektroforetskog razdvajanja proteina na temelju molekularne mase, gelovi su najprije bili inkubirani u otopini za fiksaciju proteina (metanol, deH₂O, octena kiselina (5v : 4v : 1v)) tijekom 1 sata na sobnoj temperaturi, a zatim bojani u otopini Coomassie blue (Coomassie Brilliant Blue G-250 (0,1 % m/v) u smjesi metanola, deH₂O i octene kiseline (5v : 4v : 1v)) tijekom 2 sata na sobnoj temperaturi uz stalno miješanje. Nakon bojanja u Coomassie blue otopini, gelovi su ostavljeni u otopini za odbojavanje (metanol, deH₂O, octena kiselina (10v : 7v : 83v)) tijekom noći na sobnoj temperaturi uz stalno miješanje te su na kraju isprani u deH₂O kako bi se uklonila kisela otopina za odbojavanje.

Dobivene proteinske pruge na poliakrilamidnom gelu skenirane su i njihova je gustoća denzitometrijski izmjerena i analizirana pomoću slobodno dostupnog programa ImageJ (NIH, Bethesda, SAD).

Prikaz i statistička obrada podataka

Spolne razlike prikazane su reprezentativnim nalazom za 4 nezavisna uzorka u skupini. Denzitometrijska mjerenja napravljena su na tri različita mjesta na proteinskim prugama te su uprosječna za svaki uzorak posebno i prikazana kao relativne vrijednosti naspram gustoće najjače pruge (vrijednost = 1) izmjerene u kontrolnoj skupini uzoraka. Brojčani podatci prikazani su kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistička analiza dobivenih rezultata istraživanja obrađena je metodom deskriptivne statistike, a ispitivanje značajnosti razlika između skupina,

ovisno o normalnosti raspodjele vrijednosti, Studentovim t-testom ili Mann-Whitneyevim U-testom na razini vjerodostojnosti $p < 0,05$ upotrebom računalnog programa Statistica 12 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD).

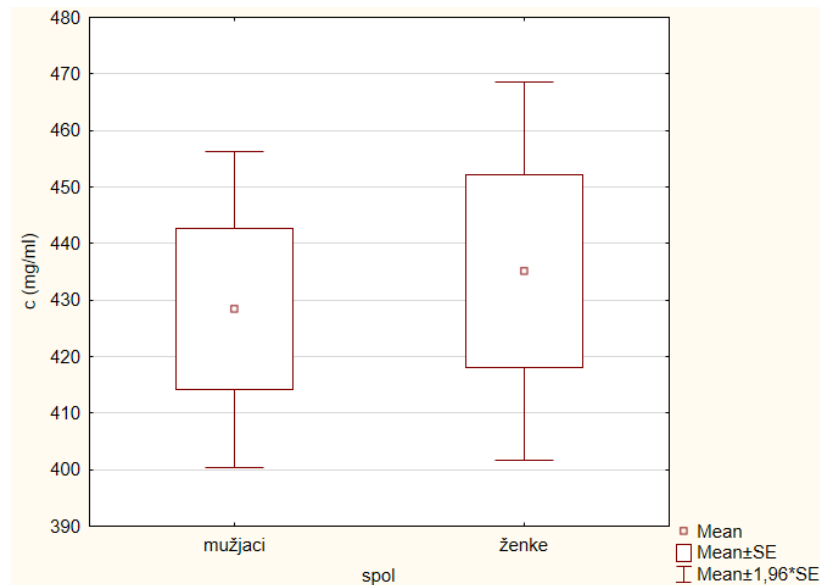
4. REZULTATI

Koncentracija ukupnih proteina u nativnim, nerazrijeđenim uzorcima otrova poskoka ne pokazuje statistički značajne spolne razlike (tablica 1), iako su ženke poskoka imale blago više vrijednosti (graf 1).

Tablica 1. Koncentracija proteina u nerazrijeđenim uzorcima otrova poskoka (*Vipera ammodytes ammodytes*).

	broj uzoraka	c (mg/ml) ± SE	p – vrijednost
mušjaci	11	428,39 ± 14,26	0,76
ženke	9	435,07 ± 17,09	

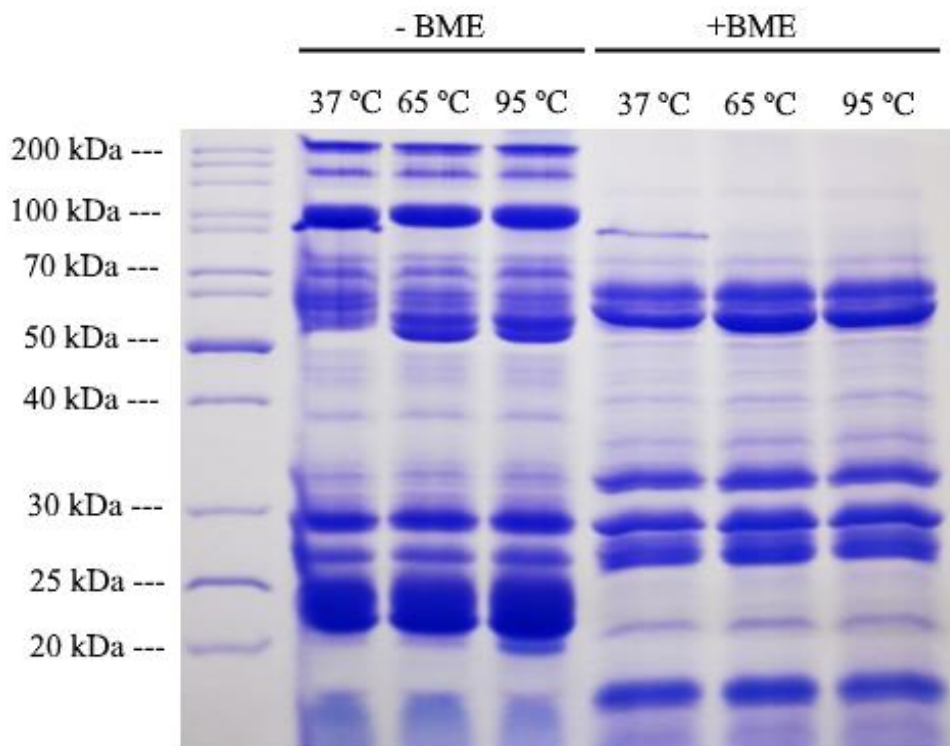
c – koncentracija proteina izražena u mg/ml; SE – standardna greška; $p < 0,05$.



Graf 1. Prikaz raspodjele vrijednosti izmjerenih koncentracija proteina u nerazrijeđenim uzorcima otrova poskoka (*Vipera ammodytes ammodytes*). c – koncentracija proteina izražena u mg/ml; Mean – srednja vrijednost; Mean ± SE – srednja vrijednost ± standardna pogreška; Mean ± 1,96*SE – srednja vrijednost ± 95% raspon pouzdanosti standardne pogreške.

Kako bi se provjerila specifičnost bojanja poliakrilamidnih gelova s Coomassie Blue bojom i postigla što veća učinkovitost vezanja Coomassie Blue boje za proteine u uzorcima, ispitani su optimalni uvjeti za denaturaciju uzoraka tijekom pripreme uzoraka otrova za SDS-PAGE elektroforezu, ali i optimalni uvjeti za izvedbu same SDS-PAGE elektroforeze.

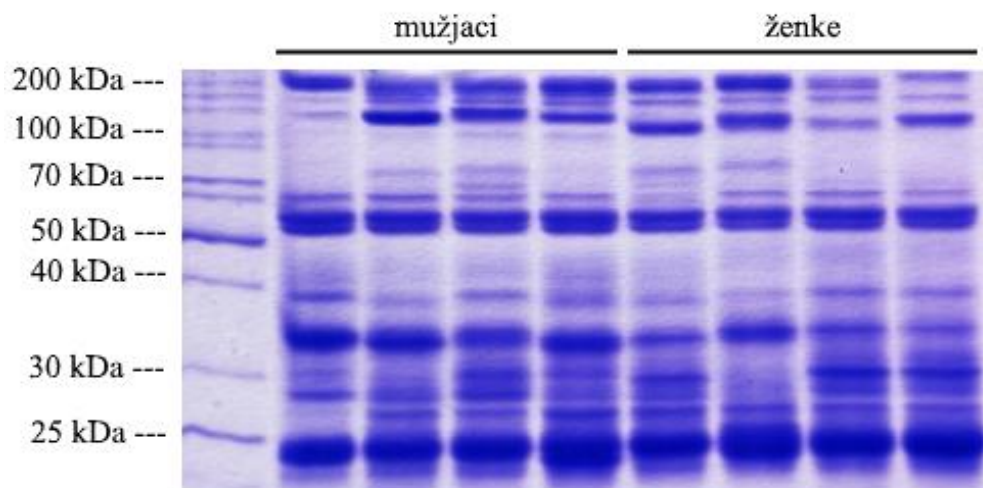
Uzorci otrova denaturirani su zagrijavanjem na različitim temperaturama bez reducirajućih uvjeta (-BME) ili u reducirajućim uvjetima (+BME). Usporedbom broja pojedinih proteinskih pruga, uočava se da uzorci pripremljeni bez BME imaju izraženo 15 do 17 proteinskih pruga molekularne mase od ~200 kDa, ~150kDa, ~100kDa, ~75 kDa, ~70 kDa, ~60 kDa, ~57 kDa, ~55 kDa, ~52 kDa, ~47 kDa, ~43 kDa, ~38 kDa, ~33 kDa, ~30 kDa, ~27 kDa, ~22 kDa i ~17 kDa ovisno o temperaturi pripreme uzorka, dok uzorci pripremljeni s dodatkom BME imaju izraženo od 13 do 14 proteinskih pruga molekularne mase ~120 kDa, ~100 kDa, ~75 kDa, ~60 kDa ~57 kDa, ~55 kDa, ~50 kDa, ~45 kDa, ~40 kDa, ~35 kDa, ~30 kDa, ~27 kDa, ~22 kDa i ~17 kDa. Proteinske pruge od ~55 kDa i ~30 kDa podjednake su debljine u uzorcima pripremljenim na različitim temperaturama bez BME ili s BME. Uzorci pripremljeni bez BME su pri svim temperaturama pokazali deblje proteinske pruge od ~100 kDa i ~22 kDa, dok su uzorci pripremljeni s BME pri svim temperaturama pokazali deblje proteinske pruge od ~57 kDa, ~27 kDa i ~17 kDa. Proteinske pruge od ~200 kDa, ~150 kDa, i ~70 kDa nisu vidljive ili su izrazito slabo izražene u uzorcima pripremljenim na različitim temperaturama s dodatkom BME, dok je proteinska pruga od ~50 kDa vidljiva samo u uzoraka pripremljenih s BME. Ostale proteinske pruge ne pokazuju značajnije razlike u izraženosti kod uzoraka pripremljenih bez BME ili s BME. Proteinske pruge bile su najjasnije izražene nakon obrade uzoraka otrova pri 65 °C tijekom 15 minuta bez obzira da li je uzorak pripremljen bez BME ili s BME (slika 1). Navedeni optimalni uvjeti korišteni su u svim daljnjim pokusima.



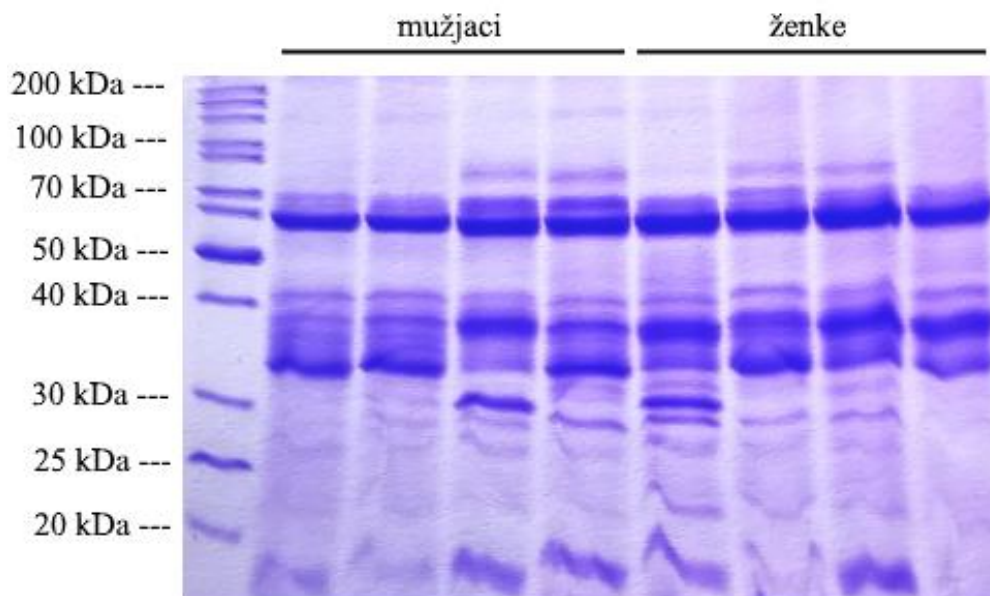
Slika 1. Proteinske pruge nakon SDS-PAGE elektroforeze uzoraka otrova poskoka (*Vipera ammodytes ammodytes*) pripremljenih bez ili uz dodatak BME i zagrijavanih na različitim temperaturama. Prvo mjesto na gelu je marker s oznakama za molekularnu masu proteina: 200 kDa, 150 kDa, 120 kDa, 100 kDa, 85 kDa, 70, kDa, 60 kDa, 50 kDa, 40 kDa, 30 kDa, 25 kDa, i 20 kDa.

Usporedbom broja pojedinih proteinskih pruga između mužjaka i ženki poskoka kod uzoraka pripremljenih bez BME (slika 2) ili s BME (slika 3) ne uočavaju se razlike u broju pojedinih proteinskih pruga.

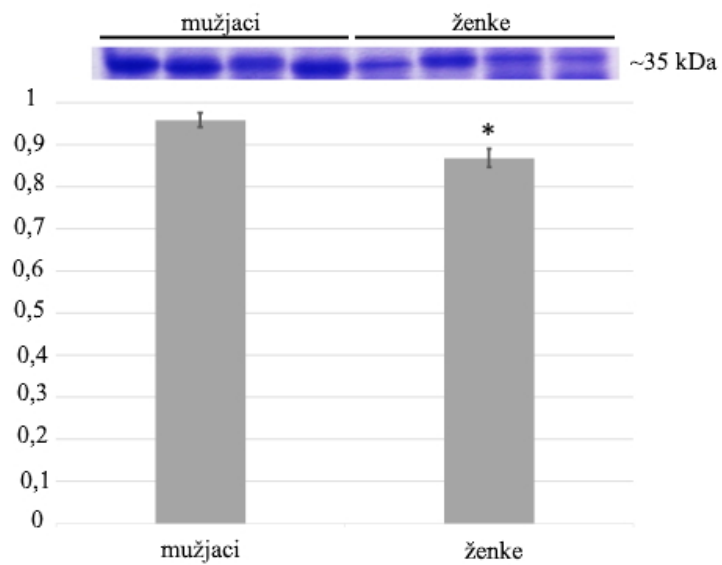
Ukupna denzitometrijska gustoća proteinskih pruga dobivenih SDS-PAGE elektroforezom otrova poskoka ne pokazuje statistički značajne spolne razlike bez obzira bili uzorci pripremljeni bez BME (slika 2) ili s BME (slika 3). Denzitometrijskom analizom pojedinih proteinskih pruga nisu izmjerene statistički značajne razlike između mužjaka i ženki, osim kod proteinske pruge od ~35 kDa u uzorcima pripremljenima bez BME koja ukazuje na značajno jaču izraženost u mužjaka nego u ženki (slika 4).



Slika 2. Proteinske pruge nakon SDS-PAGE elektroforeze uzoraka otrova poskoka (*Vipera ammodytes ammodytes*) pripremljenih bez BME. Prvo mjesto na gelu je marker s oznakama za molekularnu masu proteina: 200 kDa, 150 kDa, 120 kDa, 100 kDa, 85 kDa, 70, kDa, 60 kDa, 50 kDa, 40 kDa, 30 kDa i 25 kDa.



Slika 3. Proteinske pruge nakon SDS-PAGE elektroforeze uzoraka otrova poskoka (*Vipera ammodytes ammodytes*) pripremljenih s dodatkom BME. Prvo mjesto na gelu je marker s oznakama za molekularnu masu proteina: 200 kDa, 150 kDa, 120 kDa, 100 kDa, 85 kDa, 70, kDa, 60 kDa, 50 kDa, 40 kDa, 30 kDa, 25 kDa i 20 kDa.



Slika 4. Značajna spolna razlika (mužjaci > ženke) uočena je u izraženosti proteinske pruge od ~35 kDa kod uzoraka otrova poskoka (*Vipera ammodytes ammodytes*) pripremljenih bez BME. Jedna zvjezdica (*) $p < 0,05$.

5. RASPRAVA

Zmijski otrov se koristi od kraja 19. stoljeća za imunizaciju najčešće ovaca i konja za proizvodnju specifičnih protuotrova. Protuotrovi su i danas jedina specifična terapija za žrtve zmijskih ugriza (HALASSY i sur., 2010).

Osim proizvodnje protuotrova, otrov ljutica potencijalan je izvor novih aktivnih tvari i terapeutika, zbog različitog sastava otrova. Ljutice su rasprostranjene širom svijeta, a posebice u mediteranskom području (HEMPEL i sur., 2018).

Svojstva i sastav otrova *V. ammodytes* proučavane su dugi niz godina, te su opisana njegova toksična svojstva (MUIĆ i PIANTANIDA, 1953), antigenski sastav i frakcioniranje (PIANTANIDA i MUIĆ, 1954) te sezonska varijabilnost otrova (GUBENŠEK i sur., 1974; DEBOGOVIĆ i HEISINGER-PURIĆ, 1981). U novije vrijeme detaljno je određivan i uspoređivan sastav otrova od podvrsta *Vipera ammodytes transcaucasiana* i *Vipera ammodytes montandoni* (HEMPEL i sur., 2018).

U Republici Hrvatskoj, od 1990. godine zmijske se sakupljaju iz različitih krajeva, uzima im se otrov, te se prikupljeni otrov miješa u skupne uzorke koji se čuvaju i koriste u procesu proizvodnje protuotrova. Osim toga, u tim skupnim uzorcima istraživana je, između ostalog, i unutarvrstna varijabilnost toksičnosti i imunogenetski potencijal (HALASSY i sur., 2011) te varijabilnost biokemijskih svojstava s obzirom na geografsko podrijetlo zmijske (LANG BALIJA i sur., 2005).

Najčešći i klinički najteže posljedice u Europi uzrokuje ugriz poskoka (*Vipera ammodytes ammodytes*). Otrovnost poskoka uzrokuje hemoragiju, koagulopatiju i lokalnu nekrozu tkiva. Do sada su opisane četiri metaloproteinaze u sastavu otrova poskoka – *Vipera ammodytes* hemoragin 1 (VaH1), *Vipera ammodytes* hemoragin 2 (VaH2), *Vipera ammodytes* hemoragin 3 (VaH3) i amoditagin (SAJEVIĆ i sur., 2013). Iako u Europi postoji 10 vrsta otrovnih zmijski, istraživanja na njima su najmanje zastupljena u bazama. Prvim sveobuhvatnim istraživanjem sastava proteina u otrovu poskoka (*Vipera ammodytes ammodytes*) ustanovljeno je da se otrov sastoji od 38 aktivnih spojeva koji pripadaju devet različitim proteinskim porodicama (GEORGIEVA i sur., 2008).

SDS-PAGE elektroforeza se u analizi zmijskih otrova, pogotovo u analizi proteinskog sastava te određivanju udjela pojedinih aktivnih tvari u otrovu, već duže vremena koristi

(CHIPPAUX i sur., 1991). No, priprema uzoraka za SDS-PAGE elektroforezu uvelike se razlikuje među istraživanjima. Stoga su se u ovom istraživanju otrovi poskoka pripremili na dva različita načina za SDS-PAGE elektroforezu, odnosno uz dodatak BME kao reducirajućeg, tj. denaturirajućeg sredstva ili bez dodatka BME (SABOLIĆ i sur., 2007). Uočene razlike u broju i izgledu proteinskih pruga između uzoraka pripremljenih bez BME i s BME ukazuju na postojanje potrebe za boljim razumijevanjem same građe proteina koji se nalaze u otrovu poskoka, ali i individualne prilagodbe prilikom pripreme uzoraka. Usporedbom broja proteinskih pruga dobivenih SDS-PAGE elektroforezom u ovom istraživanju uočava se da uzorci pripremljeni bez dodatka BME kao reducirajućeg sredstva pokazuju veći broj proteinskih pruga nego uzorci pripremljeni s dodatkom BME. Slično zapažanje u broju pojedinih proteinskih pruga različite molekulske mase uočeni su i drugih vrsta zmija poput *Bothrops jararaca* (ZELANIS i sur., 2016). Zanimljivo je da je ista skupina autora na istoj vrsti zmije u ranijim istraživanjima dobila veći broj proteinskih pruga u uzorcima pripremljenih s dodatkom BME (MENEZES i sur., 2006).

Ovim istraživanjem su se u reducirajućim uvjetima tijekom SDS-PAGE elektroforeze dobile snažne proteinske pruge od ~55 kDa i ~38 kDa. Iako ne pripadaju istom rodu, analizom proteinskog sastava otrova vrste *Bothrops moojeni* uočene su snažne proteinske pruge na približno istom području koje odgovaraju oksidazi L-aminokiselina (~55 kDa) i serinskoj proteazi (~38 kDa) (AMORIM i sur., 2018). Iako u metodologiji nije opisan postupak pripreme uzoraka, u istraživanju biokemijskih osobitosti otrova poskoka, dobivene najdeblje proteinske pruge (~120 kDa, ~55 kDa i ~22 kDa) (LANG BALIJA i sur., 2005) podudaraju se s najdebljim proteinskim prugama dobivenim ovim istraživanjem kod uzoraka pripremljenih bez BME.

Na sastav proteina u otrovu zmija te posljedično tome vrsno specifičnim razlikama u proteinskom sastavu mogu utjecati različiti okolišni čimbenici, ali i dob, spol te režim prehrane same zmije (DALTRY i sur., 1996; ZELANIS i sur., 2016). Do sada se u istraživanjima malo pozornosti pridavalo spolnim razlikama u sastavu otrova te su se takve razlike uglavnom pripisivale drugim čimbenicima, najčešće individualnim razlikama (CHIPPAUX i sur., 1991; MAGRO i sur., 2001). SARHAN i sur. (2017) u svom istraživanju na vrsti *Cerastes cerastes* uočavaju spolne razlike u broju proteinskih pruga. No, treba uzeti u obzir da su u navedenom istraživanju prikazali proteinske pruge od samo dvije jedinice po spolu. Mali broj uzoraka u istraživanju ne može isključiti individualne razlike koje su prisutne u sastavu otrova unutar iste

vrste. U ovom istraživanju gdje su prikazane po 4 reprezentativne jedinke po spolu, uočavaju se individualne razlike u broju proteinskih pruga unutar istog spola (slika 2 i slika 3). Istraživanjem unutarvrstnih razlika u toksičnosti otrova *Vipera ammodytes ammodytes*, iako nije bio primarni cilj istraživanja, nisu uočene razlike u izraženosti proteinskih pruga u jedinki korištenih u istraživanju (HALASSY i sur., 2011). Proteinski sastav otrova zmije *Bothrops jararaca* (ZELANIS i sur., 2016; AMORIM i sur., 2018) i *Crotalus adamanteus* (MEBS i KORNALIK, 1984) pokazuje spolne razlike gdje su uočene spolno specifične proteinske pruge. Ovako paradoksalni i kontradiktorni rezultati između pojedinih istraživanja najvjerojatnije su posljedica razlike u metodologiji, odnosno u različitim uvjetima u kojima se SDS-PAGE elektroforeza odrađivala, ali, možda i važnije, u samom načinu pripreme uzoraka za elektroforezu.

6. ZAKLJUČCI

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na važnost pripreme samog uzorka za SDS-PAGE elektroforezu. Dodavanjem reducirajućeg sredstva, poput BME, utječe se na broj vidljivih proteinskih pruga. Unatoč individualnim razlikama u broju proteinskih pruga, dodavanjem BME dovelo je do smanjenja broja proteinskih pruga u odnosu na uzorke u kojima nije dodan BME.

U ovom istraživanju nismo utvrdili spolne razlike u koncentraciji proteina u otrovu poskoka (*Vipera ammodytes ammodytes*), niti spolne razlike u broju proteinskih pruga. No, denzitometrijskim mjerenjem proteinske pruge od ~35 kDa u uzorcima pripremljenima bez BME koja ukazuje na značajno jaču izraženost u mužjaka nego u ženki.

Dobiveni kontradiktorni rezultati istraživanja proteinskog sastava otrova zmija može se objasniti u različitim elektroforetskim metodama te različitim načinima pripreme samih uzoraka. Da bi se smanjio utjecaj individualnih razlika, koje mogu biti prisutne u proteinskom sastavu otrova, potrebno je u istraživanja uključiti veći broj zmija.

7. ZAHVALE

Zahvaljujem mentoricama doc. dr. sc. Ani Shek Vugrovečki i doc. dr. sc. Mireli Pavić na uloženom trudu, pomoći te strpljenju tijekom izrade ovog znanstvenog rada. Također se zahvaljujem predstojnici Zavoda za fiziologiju i radiobiologiju, prof. dr. sc. Suzani Milinković Tur i predstojnici Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju, izv. prof. dr. sc. Martini Đuras na ukazanom povjerenju u radu u laboratorijima navedenih zavoda. Zahvaljujem i svim članovima, pod vodstvom prof. dr. sc. Vladimira Mrljaka, Laboratorija za proteomiku na pristupanju potrebnoj opremi za izradu ovog znanstvenog rada. Također zahvaljujem Imunološkom zavodu, posebice Odjelu za proizvodnju antiseruma i uzgoj pokusnih životinja na ustupljenim uzorcima.

8. POPIS LITERATURE

AMORIM, F. G., T. R. COSTA, D. BAIWIR, E. DE PAUW, L. QUINTON, S. V. SAMPAIO (2018): Proteopectidomic, Functional and Immunoreactivity Characterization of *Bothrops moojeni* Snake Venom: Influence of Snake Gender on Venom Composition. *Toxins* 10 (5), 177. doi: 10.3390/toxins10050177

CHIPPAUX, J. P., V. WILLIAMS, J. WHITE (1991): Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon* 29, 1279-1303.

DALTRY, J. C., G. PONNUDURAI, C. K. SHIN, N. H. TAN, R.S. THORPE, W. WQSTER, (1996): Electrophoretic profiles and biological activities - intraspecific variation in the venom of the Malayan pit viper. *Toxicon* 34, 67-79.

DEBOGOVIĆ, Z., A. HEISINGER-PURIĆ (1981): Sezonske varijacije toksičnosti otrova zmijske *Vipera ammodytes* (poskok) iz okolice Slunja kroz period od 5 godina. *Vet. Arh.* 51, 34-36.

GEORGIEVA D., M. RISCH, A. KARDAS, F. BUCK, M. VON BERGEN, C. BETZEL (2008): Comparative Analysis of the Venom Proteomes of *Vipera ammodytes ammodytes* and *Vipera ammodytes meridionalis*. *J. Proteome Res.* 7, 866-886.

GUBENŠEK, F., D. SKET, V. TURK, D. LEBEZ (1974): Fractionation of *Vipera ammodytes* venom and seasonal variation of its composition. *Toxicon* 12, 167-171.

HALASSY, B., M. BRGLES, L. HABJANEC, M. LANG BALIJA, T. KURTOVIĆ, M. MARCHETTI-DESCHMANN, I. KRIŽAJ, G. ALLMAIER (2011): Intraspecific variability in *Vipera ammodytes ammodytes* venom related to its toxicity and immunogenic potential. *Comp. Biochem. Phys. C.* 153 (2), 223-300.

HEMPEL, B. F., M. DAMM, B. GOCMEN, M. KARIS, M. A. OGUZ, A. NALBANTSOY, R. D. SUSSMUTH (2018): Comparative Venomics of the *Vipera ammodytes transcaucasiana* and *Vipera ammodytes montandoni* from Turkey Provides Insights into Kinship, *Toxins* 10 (1), 23. doi:10.3390/toxins10010023

HECKES, U., H. J. GRUBER, N. STUMPEL (2006): Schlangen (Serpentes) III: Viperidae. U: Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. AULA (JÖGER, U., N. STÜMPEL, W. BÖHME, ur.), Aula-Verlag GmbH, Graz, Austrija. 81-151.

JENNER, R., E. UNDHEIM, (2017): *Venom: the secrets of nature's deadliest weapon*. Natural History Museum, London, Ujedinjeno Kraljevstvo.

LANG BALIJA, M., A. VRDOLJAK, L. HABJANEC, B. DOJNOVIĆ, B. HALASSY, B. VRANEŠIĆ, J. TOMAŠIĆ (2005): The variability of *Vipera ammodytes ammodytes* venoms from Croatia – biochemical properties and biological activity. *Comp. Biochem. Phys. C.* 140 (2), 257-263.

MACKESSY, S. P. (2009): *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. CRC Press, Boca Raton, FL, SAD.

MARETIĆ, T., I. CIZELJ, R. ČIVLJAK (2013). Venomous snakebites and treatment - on the occasion of the acquisition of new venomous snakes at the Zagreb Zoo and private herpetaria. *Infektoloski Glas* 33, 11-19.

MAGRO, A. J., R. J. DA SILVA, P. R. R. RAMOS, A. L. CHERUBINI, M. R. ATHAYDE (2001): Intraspecific variation in the venom electrophoretic profile of recently captured *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768) snakes. *J. Venom Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis.* 7, 276-301.

MEBS, D., F. KORNALIK (1984): Intraspecific variation in content of a basic toxin in eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*) venom. *Toxicon* 22 (5), 831-833.

MENEZES, M. C., M. F. FURTADO, S. R. TRAVAGLIA-CARDOSO, A. C. M. CARMAGO, S. M. T. SERRANO (2006): Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. *Toxicon* 47, 304–312.

MUIĆ, N., M., PIANTANIDA (1953): The properties of *Vipera ammodytes* venom. *Rad. JAZU* 3, 207–220.

SABOLIĆ, I., D. BALEN, M. LJUBOJEVIĆ (2007): Priprema uzoraka za razdvajanje proteina iz tkiva i stanica. U: *Metode u molekularnoj biologiji*. 1. izdanje (AMBRIOVIĆ RISTOV, A., ur.), Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska, 565-566.

SAJEVIĆ, T., A. LEONARDI, L. KOVAČIĆ, M. LANG BALIJA, T. KURTOVIĆ, J. PUNGERČAR, B. HALASSY, A. TRAMPUŠ-BAKIJA, I. KRIŽAJ (2013): VaH3, one of the principal hemorrhagins in *Vipera ammodytes ammodytes* venom, is a homodimeric P-IIIc metalloproteinase. *Biochimie* 95, 1158-1170.

SARHAN, M., M. AHMED, E. SERAG, A. REEHEEM, S. SABER (2017): Intersexual Variation in Tail Length, Venom Composition Toxicity, and Anticancer Activity of *Cerastes Cerastes* (Viperidae). *Egypt. J. Hosp. Med.* 66, 81-90.

SHEK VUGROVEČKI, A., J. MILJKOVIĆ, I. ŽURA ŽAJA, M. PAVIĆ (2019): Storage temperature effect on total protein concentration in Nose-horned viper (*Vipera ammodytes ammodytes*) venom. *Proceedings of Eurovenom – Herpetology Conference, Košice, Slovačka*, 22-25.

PIANTANIDA, M., N., MUIĆ (1954): The antigenic composition of Ammodytes viper venom. *J. Immunol.* 73, 115–11.

TADIĆ, Z (2000): Zmije otrovnice Hrvatske. *Drvo znanja* 36 (6) preuzeto: http://www.drvoznanja.com/tekst36_3.html

TOMOVIĆ, L. (2006): Systematics of the Nose-horned Viper (*Vipera ammodytes*, Linnaeus, 1758). *Herpetol. J.* 16, 191-201.

ZELANIS, A., A. K.TASHIMA, M. M. ROCHA, M. F. FURTADO, A. C. CAMARGO, P. L. HO, S. M. SERRANO (2010): Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. *J. Proteome. Res.* 9 (5), 2278-2291.

ZELANIS, A., D. ANDRADE-SILVA, M. M. ROCHA, M. F. FURTADO, S. M. SERRANO, I. L. JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, P. L. HO (2012): A transcriptomic view of the proteome variability of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. *PLoS Negl Trop Dis.* 6 (3), e1554.

ZELANIS, A., M. C. MENEZES, E. S. KITANO, T. LIBERATO, A. K. TASHIMA, A. F. M. PINTO, N. E. SHERMAN, P. L. HO, J. W. FOX, S. M. T. SERRANO (2016): Proteomic

identification of gender molecular markers in *Bothrops jararaca* venom. J. Proteomics 139, 26-37.

WHO (2010): Guidelines for the Prevention and Clinical Management of Snakebite in Afrika.
WHO/AFR/EDM/EDP/10.01

9. SAŽETAK

Josip Miljković: Spolni dimorfizam u proteinskom sastavu otrova poskoka (*Vipera ammodytes ammodytes*)

Zmijski otrovi su po sastavu složene izlučevine specijaliziranih žlijezda koji sadrže mnoge biološki aktivne tvari koje pripadaju skupini enzima ili toksina. Poskok (*Vipera ammodytes ammodytes*) je najotrovnije zmijske Europe i ujedno otrovnica s najviše zabilježenih ugriza ljudi u Europi. Stanište poskoka rasprostire se gotovo po cijelom Balkanskom poluotoku uglavnom do 2000 m nadmorske visine. Iako se proteinski sastav zmijske istražuje već duže vrijeme, zmijske otrovnice Europe relativno su slabo istražene. Spolne razlike u proteinskom sastavu otrova zmijske slabo su istražene te još nije sigurno postoje li zapravo ili su posljedica individualnih razlika u sastavu otrova. Spolne razlike u proteinskom sastavu otrova poskoka (*Vipera ammodytes ammodytes*) do sada nisu dokazane niti istražene. Cilj ovog rada je istražiti i analizirati eventualnu prisutnost spolnog dimorfizma u proteinskom sastavu otrova poskoka (*Vipera ammodytes ammodytes*). Istraživanje je provedeno na otrovima jedanaest mužjaka i devet ženki poskoka (*Vipera ammodytes ammodytes*). Otrovnima je najprije izmjerena koncentracija proteina, a zatim se proteinski sastav analizirao putem SDS-PAGE elektroforeze te su se proteinske pruge denzitometrijski analizirale. Razlike između spolova u koncentraciji proteina u nativnim, nerazrijeđenim uzorcima nisu bile statistički značajne, kao niti ukupni broj dobivenih proteinskih pruga. Značajna spolna razlika (mužjaci > ženke) uočena je u izraženosti proteinske pruge od ~35 kDa u uzorcima pripremljenima bez β -merkaptetoetanolom. Broj i izraženost pojedinih proteinskih pruga dobivenih SDS-PAGE elektroforezom razlikuju se s obzirom na pripremu samog uzorka, odnosno dodavanjem reducirajućeg sredstva. Dodavanjem β -merkaptetoetanolom kao reducirajućeg sredstva dovelo je do smanjenja broja proteinskih pruga u odnosu na uzorke u kojima nije dodan β -merkaptetoetanolom. Zbog uočenih individualnih razlika u broju i izraženosti proteinskih pruga, potrebno je u daljnjim istraživanjima uključiti veći broj životinja te uzeti u obzir i druge čimbenike koji bi mogli utjecati na proteinski sastav otrova.

Ključne riječi: poskok (*Vipera ammodytes ammodytes*), otrov, proteinski sastav, SDS-PAGE elektroforeza

10. SUMMARY

Josip Miljković: Sexual dimorphism in the protein composition of Nose-horned viper (*Vipera ammodytes ammodytes*) venom

Snake venoms are complex secretions of specialized glands that contain many biologically active substances belonging to the group of enzymes or toxins. The Nose-horned viper (*Vipera ammodytes ammodytes*) is the most venomous snake in Europe and also with the most recorded human bites in Europe. Its habitat spreads almost all over the Balkan Peninsula, up to 2000 m above sea level. Although the protein composition of snake venom has been studied for a long time, the venomous snakes of Europe have been relatively poorly researched. Reports of gender differences in the venom protein composition are still lacking and it is not yet certain whether they exist or are due to intraspecies individual differences. Gender differences in the venom protein composition of Nose-horned viper (*Vipera ammodytes ammodytes*) have not been proven or investigated so far. The aim of this study was to investigate and analyze the possible presence of sexual dimorphism in the venom protein composition of Nose-horned viper (*Vipera ammodytes ammodytes*). The study was conducted on the venoms of eleven male and nine female Nose-horned vipers (*Vipera ammodytes ammodytes*). The protein concentration of the venoms was first measured, and then the protein composition was analyzed by SDS-PAGE electrophoresis and the protein bands were densitometrically analyzed. Gender differences in protein concentration in native, undiluted samples were not statistically significant, nor was the obtained total number of protein bands. Significant gender difference (male > female) was observed in the expression of the ~35 kDa protein band in samples prepared without β -mercaptoethanol. The number and expression of individual protein bands obtained by SDS-PAGE electrophoresis differ regarding the preparation of the sample itself, i.e. the addition of a reducing agent. The addition of β -mercaptoethanol as a reducing agent led to a reduction in the number of protein bands compared to samples in which no β -mercaptoethanol was added. Due to the observed individual differences in protein band number and expression, it is necessary to include a larger number of animals in further research and to consider other factors that could affect the protein composition of venoms.

Keywords: Nose-horned viper (*Vipera ammodytes ammodytes*), venom, protein composition, SDS-PAGE electrophoresis

11. ŽIVOTOPIS

Rođen sam u Zadru 11. prosinca 1994. godine gdje sam završio Strukovnu školu Vice Vlatković, smjer Tehničar za računalstvo. 2015. godine upisujem Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu gdje sam trenutno redovni student 6. godine integriranog preddiplomskog i diplomskog studija veterinarske medicine. Od početka studiranja aktivan sam član studentskih udruga (USVM “Equus”, USVM “IVSA” i Udruge “Sport VEF”), a 2017. godine postajem predsjednik Udruge studenata veterinarske medicine, gdje nastavljam organizirati stare i započinem nove projekte kao što su “Dan studenata veterine”, “Upoznajmo pasmine pasa”. Volio bih istaknuti svoju ljubav prema egzotičnim vrstama životinja, odnosno gmazova, koji su jedan od razloga mog studiranja na Veterinarskom fakultetu. Stoga je moj interes za vrijeme studiranja usmjeren prema tom području, a posljednje tri godine sam se počeo baviti istraživanjima otrova poskoka. Kao autor ili koautor preglednih i znanstvenih radova sudjelovao sam na kongresima u Hrvatskoj i inozemstvu kao što su: 1. znanstveno-stručno skup o gmazovima “Reptilia” u Zagrebu, “Eurovenom - herpetology conference” u Košicama, zatim “ICARE - International Conference on Avian Herpetological and Exotic Mammal Medicine” u Londonu.