



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Erika Gamulin

**FARMAKOKINETIKA INTRAVENSKI I
INTRAMUSKULARNO PRIMIJENJENOG
ZMIJSKOG PROTUOTROVA U
EKSPERIMENTALNOM OVČJEM
MODELU**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025.



Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Erika Gamulin

**PHARMACOKINETICS OF SNAKE
ANTIVENOM FOLLOWING
INTRAVENOUS AND INTRAMUSCULAR
ADMINISTRATION IN ENVENOMED
OVINE MODEL**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2025.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Tihane Kurtović, u sklopu Sveučilišnog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

INFORMACIJE O MENTORICI

Dr. sc. Tihana Kurtović diplomirala je molekularnu biologiju na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2007. godine. Doktorski studij biologije upisala je na istom fakultetu te je 2013. godine obranila disertaciju pod naslovom „Uloga glavnih toksičnih komponenti otrova poskoka (*Vipera ammodytes*) u njegovoj imunogenosti s posebnim osvrtom na hemoragične metaloproteinaze“. U vrijeme izrade disertacije bila je zaposlena kao znanstvena novakinja u Odjelu za istraživanje i razvoj Imunološkog zavoda d.d. u Zagrebu.

Tijekom tog razdoblja stekla je vrijedno iskustvo u području toksikologije i imunologije, sudjelujući u projektima vezanim uz imunogenost složenih antigena i pročišćavanje biomolekula. Od 2013. godine zaposlena je u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu, prvo kao poslijedoktorandica, zatim kao znanstvena suradnica (od 2017.), a od 2023. godine kao viša znanstvena suradnica.

Njezin znanstveni interes usmjeren je na istraživanje biokemijskih, toksinoloških, farmakoloških i imunoloških svojstava prirodnih toksina, a veliku pozornost posvećuje praćenju i usporedbi pretkliničke i kliničke efikasnosti dostupnih lijekova protiv otrovanja izazvanih zmijskim ugrizima. Trenutno je njezin znanstveni interes usmjeren na istraživanje i razvoj onkolitičke viroterapije.

Voditeljica je istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost „Farmakokinetika intravenski i intramuskularno primijenjenog antivenoma u velikom animalnom modelu“. Aktivno je sudjelovala na projektima vezanim uz razvoj terapija protiv virusnih infekcija, uključujući i projekt „Stvaranje preduvjeta za uvođenje SARS-CoV-2 seroterapije u Hrvatskoj“. Od 2024. godine sudjeluje u razvoju onkolitičke viroterapije za liječenje raka kod životinja, uključujući pripremu prototipa onkolitičkog virusa i evaluaciju učinkovitosti terapije putem *ex vivo/in vitro* modela.

Tijekom svoje karijere objavila je 30 znanstvenih radova u časopisima indeksiranim u bazi Web of Science, a rezultate svojih istraživanja prezentirala je na brojnim međunarodnim kongresima. Aktivna je članica Hrvatskog imunološkog društva, Međunarodnog društva za toksinologiju i Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama.

ZAHVALE

Iskreno zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Tihani Kurtović na vodstvu, predanom trudu i dragocjenom vremenu koje mi je posvetila tijekom izrade ove doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem dr. sc. Maji Lang Baliji, koja mi nije bila službena mentorica, ali je svojim znanjem, nesebičnom podrškom i toplinom često igrala upravo tu ulogu.

Hvala svim članovima Centra, a posebno dr. sc. Beati Halassy i dr. sc. Sanji Mateljak Lukačević.

Hvala kolegama s Veterinarskog fakulteta prof. dr. sc. Draženu Vnuku i asistentici Ani Smajlović, kao i Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu uključujući prim. dr. sc. Anu Hećimović, prim. dr. sc. Maju Tomičić i dr. med. Jadranku Gulan Harcet.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji na podršci i bezkompromisnoj pomoći.

Zahvaljujem Ivanu, prijateljima, kolegama i svima koji su na bilo koji način bili dio ovog putovanja. Ova disertacija nije samo rezultat znanstvenog rada, već i doprinosa brojnih ljudi koji su svojim znanjem, podrškom i prisutnošću utjecali na njezin nastanak.

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek

**FARMAKOKINETIKA INTRAVENSKI I INTRAMUSKULARNO
PRIMIENJENOG ZMIJSKOG PROTUOTROVA U EKSPERIMENTALNOM
OVČJEM MODELU**

ERIKA GAMULIN

Centar za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji

Sveučilište u Zagrebu

Protuotrovi su jedina specifična terapija protiv otrovanja izazvanih ugrizom fanerotoksičnih životinja. Iako ne postoji standardizirani postupak njihove primjene, prevladava mišljenje da je *i.v.* administracija učinkovitija od *i.m.*, a temelji se na dugogodišnjem praćenju farmakokinetike protuotrova i otrova u sistemske cirkulaciji. Nakon *i.v.* primjene cijela frakcija protuotrova je gotovo trenutačno dostupna u krvotoku za neutralizaciju komponenti otrova. Kada se protuotrovi primjenjuju *i.m.* njihova sistemska apsorpcija je znatno sporija i nepotpuna, što rezultira duljim vremenom potrebnim za postizanje najveće koncentracije i manjom bioraspoloživošću. Nedavno je pokazano da bi neutralizacija otrova u limfnom sustavu mogla biti ključna za klinički ishod. Ovim radom uspoređen je *i.m.* i *i.v.* način primjene u pogledu utjecaja protuotrova na razinu otrova u limfi i krvi, njegove efikasnosti u svladavanju krvnih poremećaja i sigurnosti za upotrebu. Pokazano je da je *i.m.* protuotrov bolji u uklanjanju otrova iz oba tjelesna odjeljka te da je po učinkovitosti u normalizaciji hematoloških i koagulacijskih parametara, kao i po sigurnosnom profilu, usporediv s onim primijenjenim *i.v.*

(145 stranice, 26 slika, 25 tablica, 208 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: protuotrov, *Vipera ammodytes*, farmakokinetika, limfa, krv, pretklinička efikasnost, imunogeničnost, ovčji model

Mentorica: dr. sc. Tihana Kurtović, viša znanstvena suradnica

Ocjenjivači: 1. prof. dr. sc. Silvijo Vince, redoviti profesor

2. izv. prof. dr. sc. Duje Lisičić, izvanredni profesor

3. izv. prof. dr. sc. Sofia Ana Blažević, izvanredna profesorica

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

**PHARMACOKINETICS OF SNAKE ANTIVENOM FOLLOWING
INTRAVENOUS AND INTRAMUSCULAR ADMINISTRATION IN
ENVENOMED OVINE MODEL**

ERIKA GAMULIN

Centre for Research and Knowledge Transfer in Biotechnology
University of Zagreb

Antivenoms are antibody-based products, the only ones providing specific therapy against venomous snakebites. There is no standardized protocol for their administration, but there is a prevailing opinion that the *i.v.* route is more effective than the *i.m.*, based on monitoring of venom/antivenom pharmacokinetics in the systemic circulation only. Following *i.v.* administration, the entire antivenom fraction is immediately available in the bloodstream, allowing for rapid neutralization of venom components that have already entered the circulation. When antivenoms are administered *i.m.*, their entry into the bloodstream is slower and less efficient, resulting in a considerably longer time to peak concentration and lower bioavailability. Recent findings indicate that *i.m.* antivenom-mediated venom neutralization, not only in the bloodstream, but also in the lymphatic system may be important for achieving a favorable clinical outcome. Therefore, the need to reconsider the (dis)advantages of each therapeutic principle has emerged.

(145 pages, 26 figures, 25 tables, 208 references, original in Croatian)

Keywords: antivenom, *Vipera ammodytes*, pharmacokinetics, lymph, blood, preclinical efficacy, immunogenicity, ovine model

Supervisor: Dr. Tihana Kurtović, Senior Research Associate

Reviewers: 1. Full Professor, Silvijo Vince, PhD
2. Associate Professor, Duje Lisičić, PhD
3. Associate Professor, Sofía Ana Blažević, PhD

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Zmijski otrovi i liječenje	4
2.2. Pretkliničke studije	9
2.2.1. Farmakokinetički profil protuotrova u studijama na životinjama	11
2.2.2. Utjecaj protuotrova na otrove škorpiona i zmija iz porodice <i>Elapidae</i>	12
2.2.3. Utjecaj protuotrova na otrove zmija iz porodice <i>Viperidae</i>	15
2.2.4. Uloga limfnog sustava u neutralizaciji otrova	18
2.3. Kliničke studije	18
2.3.1. Farmakokinetički profil protuotrova u kliničkim studijama	20
2.3.2. Klinički ishod nakon <i>i.v.</i> primjene protuotrova	23
2.3.3. Klinički ishod nakon <i>i.m.</i> primjene protuotrova	26
3. MATERIJALI I METODE	31
3.1. Materijali	31
3.1.1. Životinje za <i>in vivo</i> testove	31
3.1.2. Reagensi i kemikalije	32
3.1.3. Puferi	34
3.1.4. Kromatografske kolone	36
3.1.5. Oprema	36
3.2. Metode	37
3.2.1. Eksperimentalni dizajn	37
3.2.2. Priprema i aplikacija ovalbumina, otrova i protuotrova	39
3.2.3. Anestezija i kirurški protokol za uzorkovanje limfe	41
3.2.4. Protokol uzorkovanja krvi	44
3.2.5. Uzorci krvi i limfe	46
3.2.6. Priprava ovalbumin-specifičnih seruma i pročišćavanje IgG-a	47
3.2.7. Određivanje koncentracije ovalbumina u uzorcima seruma i limfe	49
3.2.8. Određivanje koncentracije otrova u uzorcima krvi i limfe ELISA-om	50
3.2.9. Određivanje koncentracije amoditoksina u uzorcima krvi i limfe ELISA-om	51
3.2.10. Određivanje koncentracije protuotrova u uzorcima krvi i limfe ELISA-om	52
3.2.11. Određivanje koncentracije anti-antivenom IgG-a specifičnih za F(ab') ₂ fragmente protuotrova u uzorcima seruma	52
3.2.12. Testovi hemostaze i koagulacije	53

3.2.13. Izračun koncentracija otrova i postavljanje cut-off vrijednosti	53
3.2.14. Statistička analiza	53
4. REZULTATI	55
4.1. Analiza zamoračkih seruma ELISA-om	55
4.2. Pročišćavanje i karakterizacija pročišćenih IgG-a	55
4.3. Mjerenja ovalbumina	57
4.3.1. Uspostava ELISA-e za određivanje koncentracija	57
4.3.2. Ovalbumin u limfi	57
4.3.3. Ovalbumin u serumu	59
4.4. Mjerenja protuotrova, otrova i amoditoksina	61
4.4.1. Uspostava ELISA-e za određivanje koncentracija	61
4.4.2. Protuotrov u limfi	62
4.4.3. Otrov i amoditoksini u limfi	68
4.4.4. Protuotrov u serumu	78
4.4.5. Otrov i amoditoksini u serumu	82
4.5. Hematološki i koagulacijski parametri	95
4.6. Humoralni odgovor na konjske F(ab') ₂ fragmente	97
5. RASPRAVA	99
6. ZAKLJUČCI	113
7. POPIS LITERATURE	114
8. POPIS OZNAKA, SIMBOLA I KRATICA	143
9. ŽIVOTOPIS	145

1. UVOD

Otrovanja izazvana zmijskim ugrizom predstavljaju važan javnozdravstveni problem (Gutiérrez i sur., 2017; Warrell, 2019). Svake godine oko 2,7 milijuna ljudi strada od ugriza zmija, pri čemu više od 400 000 preživjelih ostaje s trajnim fizičkim oštećenjima. Nedavno je Svjetska zdravstvena organizacija (*engl.* World Health Organization; WHO) razvila strategiju za smanjenje posljedica otrovanja osiguravanjem globalnog pristupa sigurnim i učinkovitim protuotrovima, jedinim specifičnim i dokazano djelotvornim terapeutima. Protuotrovi se proizvode iz hiperimune plazme životinjskog podrijetla i sastoje se od cijelih molekula IgG-a ili njihovih derivata (Fab ili F(ab')₂ fragmenata) koji mogu neutralizirati i poništiti toksične učinke otrova (Chippaux i sur., 2015). Njihova parenteralna primjena još je uvijek glavni oslonac u terapiji otrovanja (Gutiérrez i sur., 2011). Najveći problem u liječenju žrtava ugriza u današnje vrijeme predstavlja nestašica protuotrova na svjetskoj razini, osobito u zemljama s niskim prihodima, ali odnedavno i u onim bogatijim. Rješenje uključuje učinkovitiju i isplativiju proizvodnju, racionalnu upotrebu te primjenu jasno definiranih terapijskih protokola (Habib i Brown, 2018; WHO, 2019; Williams i sur., 2010). Učinkovitost imunoterapije protuotrovima ovisi o sposobnosti antitijela da se nađu u istom prostoru raspodjele kao i toksini zmijskog otrova kako bi ih neutralizirali i uklonili te spriječili njihove štetne učinke (Scherrmann, 1994). Osim neutralizacijskog potencijala, na djelotvornost protuotrova utječu i drugi čimbenici, a način primjene ističe se kao jedan od ključnih (Gamulin i sur., 2023). Tenutačno u Europi ne postoji jedinstveni protokol za primjenu protuotrova, kao ni u mnogim drugim dijelovima svijeta (Lamb i sur., 2017).

WHO preporučuje intravensku (*i.v.*) primjenu kad god je moguće jer omogućuje brzu raspoloživost protuotrova u krvotoku i učinkovitiju neutralizaciju otrova, za razliku od intramuskularne (*i.m.*) primjene koja je sporija i manje učinkovita (Pépin-Covatta i sur., 1996; Pepin i sur., 1995; WHO, 2005). *I.m.* put preporučuje se samo kada *i.v.* pristup nije moguć, primjerice u zabačenim krajevima daleko od medicinske skrbi. Ipak, *i.m.* primjena se još uvijek često koristi, a njen pozitivan klinički učinak potvrđuju i mnogobrojni literaturni podaci što i nije iznenađujuće ako se uzme u obzir da su zmijski otrovi mješavine proteina različite molekulске mase koji se najčešće injiciraju u intersticijski prostor putem *i.m.* ili *s.c.* puta (Espino-Solis i sur., 2009). Njihova apsorpcija ovisi o veličini molekula, one veće uglavnom prvo prolaze kroz limfni sustav, dok manje

odlaze izravno u krvotok (Paniagua i sur., 2015). Otrovi zmija iz porodice *Viperidae* uglavnom se apsorbiraju limfnim sustavom koji djeluje kao njihov akumulacijski rezervoar prije ulaska u krvotok (Paniagua i sur., 2012). S druge strane, toksini karakteristični za porodicu *Elapidae* gotovo trenutačno dopijevaju direktno u krv (Gutiérrez i sur., 2003). Protuotrovi, koji sadrže samo velike molekule, nakon *i.m.* primjene mogu dospjeti u krvotok jedino sporom difuzijom putem limfe. Time dolaze u kontakt s otrovom prisutnim u limfnom sustavu gdje ga mogu neutralizirati prije nego što stigne do krvi i dalje se proširi po organizmu. Nedavno je dokazano da se neutralizacija otrova posredstvom *i.v.* protuotrova događa ne samo u krvotoku, nego i u limfi (Paniagua i sur., 2019). Stoga se može zaključiti da limfa nije samo put za širenje otrova, nego i mjesto gdje protuotrov koji ekstravazacijom pristiže iz krvotoka može neutralizirati velik dio otrova prije nego što dopiye u sistemsku cirkulaciju.

Dakle, praćenje djelovanja protuotrova na razinu otrova samo u krvotoku nije jedini pokazatelj uspjeha liječenja. Uloga *i.m.* protuotrova u neutralizaciji otrova u limfi mogla bi biti još važnija, ali zasad nije istražena. Također, nije provedena ni izravna usporedba *i.v.* i *i.m.* primjene s obzirom na njihov učinak na razinu otrova u oba relevantna tjesena odjeljka, sistemskoj cirkulaciji i limfnom sustavu.

Ciljevi istraživanja

- praćenje učinka protuotrova u krvi i limfi ovaca podvrgnutih eksperimentalno izazvanom otrovanju na razinu *s.c.* injiciranog otrova i amoditoksina, glavne neurotoksične komponente, nakon njegove *i.v.* ($n = 8$), odnosno *i.m.* primjene ($n = 8$)
- stjecanje spoznaja o terapijskom pristupu koji je slabije imunogeničan te stoga pogodniji za humanu upotrebu kroz kvantifikaciju antitijela IgG klase specifičnih za protuotrov, odnosno njegove $F(ab')_2$ fragmente kao strane proteine, u uzorcima seruma ovaca iz „rescue-type“ studije ($n = 16$)
- utvrđivanje načina administracije koji je učinkovitiji u suzbijanju kliničkih znakova otrovanja kroz praćenje hematoloških (leukociti, trombociti i eritrociti) i koagulacijskih parametara (D-dimeri, fibrinogen, protrombinsko vrijeme, aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme i stupanj agregacije trombocita) u uzorcima seruma ovaca iz „rescue-type“ studije ($n = 16$) prikupljenih prije i

neposredno nakon eksperimentalnog otrovanja kao i u periodu po provedenoj terapiji

Hipoteze istraživanja

- protuotrov primijenjen *i.m.* se prenosi limfom gdje može neutralizirati dio apsorbiranog otrova prije njegovog dospijanja u krvotok
- limfni sustav ima ulogu u distribuciji otrova gdje se neutralizacijska učinkovitost protuotrova razlikuje ovisno o putu njegove primjene
- *i.v.* protuotrov efikasnije uklanja otrov iz krvotoka od onog primijenjenog *i.m.*
- terapijski pristup koji koristi *i.v.* protuotrov izaziva slabiji imunološki odgovor od onog koji se zasniva na *i.m.* protuotrovu
- *i.v.* primjena podjednako dobro ili bolje suzbija hematološke i koagulacijske poremećaje izazvane otrovanjem u usporedbi s *i.m.* primjenom

U konačnici, ovo istraživanje ima za cilj ili dodatno potvrditi prednost *i.v.* primjene protuotrova ili osporiti negativnu percepciju povezanu s *i.m.* putem, pokazujući da je riječ o jednako učinkovitoj, pa čak i potencijalno boljoj terapijskoj opciji iz perspektive pretkliničke procjene. Osim toga, korišteni istraživački model mogao bi poslužiti kao vrijedan alat za razvoj novih ili poboljšanih terapijskih protokola, i to ne samo za liječenje ugriza zmija, već i za širu primjenu u medicini, posebice u području imunoterapije, otvarajući mogućnosti za oblikovanje učinkovitijih i sigurnijih strategija s ciljem unaprjeđenja zdravstvenih ishoda kod pacijenata.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Zmijski otrovi i liječenje

Otrovi su evoluirali kao vrijedno adaptivno svojstvo koje je odigralo vitalnu ulogu u lakšem preživljavanju i reproduktivnom uspjehu raznih otrovnih vrsta, kao i vrsta otrovnica (Harris i Jenner, 2019). Životinje otrovnice posjeduju specijalizirane egzokrine žlijezde i pripadajuće strukture za sintezu, skladištenje i aktivnu dostavu otrova u organizam žrtve. Otrovi se primarno koriste u svrhu predatorstva, samoobrane ili intraspecifičnog natjecanja (Isbister, 2010; Isbister i Kiernan, 2005; Nekaris i sur., 2020). Među više od 200 000 vrsta otrovnica u svijetu, u većini krajeva zmije se smatraju najznačajnijima s medicinskog aspekta zbog učestalosti njihovih ugriza kao glavnog uzroka otrovanja ljudi (Herzig, 2021). Njihovi otrovi često sadrže više od stotinu različitih farmakološki aktivnih spojeva koji mogu izazvati širok raspon ozbiljnih i često po život opasnih patofizioloških manifestacija (El-Aziz i sur., 2019; Warrell, 2010, 2019). Procjenjuje se da više od 2,7 milijuna ljudi godišnje pati od posljedica otrovanja, a smrtno strada od 81 000 do 138 000 dok, u slučaju preživljavanja, više od 400 000 ostaje trajno narušenog zdravlja (Gutiérrez i sur., 2017; Warrell, 2019; WHO, 2019). Kao takvo, otrovanje zmijskim ugrizom predstavlja značajno opterećenje za javno zdravstvo koje po učestalosti posebno pogađa siromašna i gusto naseljena ruralna tropska područja (Durban i sur., 2011; Warrell, 2010; Zanetti i sur., 2018). Nakon desetljeća nepridavanja važnosti, Svjetska zdravstvena organizacija (*engl.* World Health Organization; WHO) je 2017. godine razvila sveobuhvatnu strategiju s ciljem smanjenja njegovog štetnog utjecaja kroz osiguranje globalne dostupnosti sigurnih i učinkovitih protuotrova (WHO, 2019), specifičnih terapeutika koji potvrđeno spašavaju život, sposobnih neutralizirati i poništiti toksične učinke komponenti otrova koje oštećuju tkiva, ponekad i sa smrtnim ishodom (Espino-Solis i sur., 2009). Danas se cijeli svijet suočava s kritičnom i dugotrajnom nestašicom protuotrova koja prije svega pogađa zemlje u razvoju (Abubakar i sur., 2010; Habib i Brown, 2018; Theakston i Warrell, 2000; Williams i sur., 2011), ali i one visokorazvijene (Jollivet i sur., 2015; Kurtović i sur., 2016; Lukšić i sur., 2006), a čijem bi ublažavanju mogla doprinijeti njihova racionalnija upotreba, razvoj novih, održivih i ekonomski isplativih proizvodnih strategija i provedba dobro osmišljenih protokola liječenja (Habib i Brown, 2018; WHO, 2019; D. Williams i sur., 2010).

Aktivne, djelatne komponente protuotrova su ili cijeli ili enzimima obrađeni konjski, ponekad ovčji imunoglobulini G klase (IgG-i) koji su dobiveni hiperimunizacijom proizvodnih životinja otrovom jedne ili nekoliko medicinski relevantnih vrsta zmija (Gutiérrez i sur., 2011). Njihova proizvodnja započela je prije više od jednog stoljeća kada su postavljeni temelji razvoja pasivne seroterapije (Calmette, 1896). Proces pripreme protuotrova od tada je modificiran u skladu s tehnološkim inovacijama i zahtjevima „Dobre proizvođačke prakse“ (León i sur., 2018; Pucca i sur., 2019), iako još uvijek postoji potreba za njegovim unapređenjem s ciljem dobivanja što učinkovitijih i sigurnijih proizvoda (Gutiérrez i sur., 2014). Alternativni pristupi konvencionalnim protuotrovima uključuju monoklonska antitijela usmjerena protiv najrelevantnijih toksina (Laustsen, Karatt-Vellatt, i sur., 2018), oligonukleotidne aptamere (Chen i sur., 2016), nanočestice (Baudou i sur., 2020; Karain i sur., 2016), peptide (Laustsen i sur., 2016) i inhibitore malih molekula (Lewin i sur., 2016). Iako terapeutici nove generacije također imaju dokazanu pretkliničku sposobnost neutralizacije komponenti otrova od interesa (Knudsen i Laustsen, 2018), nijedan još nije dosegao razinu kliničkih ispitivanja (Pucca i sur., 2019). Stoga, tradicionalni protuotrovi za sada ostaju glavno uporište u liječenju zmijskog ugriza. Općenito, prikladni su za upotrebu kod ljudi sve dok ispunjavaju uvjete sigurnosti i učinkovitosti u uklanjanju štetnih posljedica djelovanja otrova (WHO, 2017). Sigurnost je određena uvjetima proizvodnog postupka koji utječu na čistoću, fizikalno-kemijska svojstva i stabilnost pripravka (Mateljak Lukačević i sur., 2022). Učinkovitost, mjera neutralizirajuće moći (WHO, 2017), uglavnom ovisi o specifičnosti (Gutiérrez i sur., 2003) i koncentraciji antitijela (Habib i Brown, 2018), ali i o njihovoj pravovremenoj dostupnosti unutar istog tjelesnog odjeljka zajedno s ciljnim molekulama, po mogućnosti, bez aktivacije imunološkog odgovora pacijenta (Morais i sur., 2012). Svi trenutno dostupni protuotrovi temelje se ili na cijelim molekulama IgG-a ili na njihovim antigen-veznim domenama u obliku $F(ab')_2$ i Fab fragmenata (Nikapitiya i Maduwage, 2017). Zbog njihove varijabilne molekulske mase protuotrovi iskazuju različite farmakokinetičke profile (Gutiérrez i sur., 2003). Posljedično, sposobnost IgG-a ili njihovih fragmenata u postizanju uspješnog ishoda neutralizacije i eliminacije toksina najvećim dijelom ovisi o njihovoj kompetenciji da se dovoljno brzo i u visokoj koncentraciji nađu s njima u zajedničkom distribucijskom prostoru. Naime, zajednički distribucijski prostor je mjesto gdje se događa vezanje

toksina sa specifičnim antitijelima, njihovo izdvajanje ili redistribucija i konačno, uklanjanje, idealno prije nego što dođe do manifestacije štetnih učinaka (Isbister i sur., 2007; Scherrmann, 1994). Drugim riječima, u najboljem mogućem scenariju vezanje otrova i protuotrova bi trebalo biti postignuto tijekom ili čak prije širenja štetnih komponenti s mjesta ugriza do mjesta djelovanja (Nikapitiya i Maduwage, 2017), s obzirom da je učinkovitost liječenja znatno smanjena jednom kad se simptomi otrovanja pojave (Churchman i sur., 2010; Ghalim i sur., 2000; Isbister i sur., 2013). Međutim, farmakokinetička svojstva protuotrova temeljenih na IgG-ima, F(ab')₂ i Fab fragmentima nisu uvijek kompatibilna s otrovom od interesa. Ponekad dolazi i do značajnog nesklada u njihovom farmakokinetičkom ponašanju. Stoga, odabir optimalne terapije zahtijeva preciznu procjenu toksikokinetike otrova i farmakokinetike protuotrova kako bi se odredila odgovarajuća doza i način primjene lijeka (Krifi i sur., 1999).

Pretkliničke (Rivière i sur., 1998) i kliničke studije (Ho i sur., 1990; Laloo i Theakston, 2003) pokazale su da Fab protuotrovi imaju puno veći volumen distribucije u usporedbi s onima koji se sastoje od F(ab')₂ fragmenata ili IgG-a što je posljedica njihove male molekulske mase koja im omogućuje lakši prodor u ekstravaskularni prostor (Ariaratnam i sur., 1999) i redistribuciju otrova natrag u vaskularni sustav (Theakston i Laing, 2014). Međutim, iz istog razloga se događa i njihovo brže uklanjanje iz organizma, uglavnom putem bubrežne filtracije, s poluvremenom eliminacije između samo 4 i 24 sata (Ariaratnam i sur., 1999; Meyer i sur., 1997). F(ab')₂ fragmenti i IgG-i, zbog svoje veće molekulske mase, ostaju u cirkulaciji kroz bitno dulji vremenski period prije nego što se uklone, s poluvremenom eliminacije koje se proteže između dva i četiri dana (Ho i sur., 1990). Osim toga, oba tipa djelatne tvari protuotrova posjeduju dva antigen-vezna mjesta u usporedbi s monovalentnim Fab fragmentima, što im omogućuje da s toksinima stvaraju velike, stabilne imunokomplekse koji se eliminiraju najviše putem fagocitnih stanica u retikuloendotelnom sustavu (Gutiérrez i sur., 2003). Zbog različitih farmakokinetičkih značajki protuotrova, optimalno liječenje patofizioloških učinaka izazvanih otrovom zahtijeva odabir njihovog optimalnog formata. Fab protuotrovi smatraju se prikladnijima za otrove zmija iz porodice *Elapidae* koji su bogati toksinima male molekulske mase, dok formulacije bazirane na cijelim IgG-ima i njihovim F(ab')₂ fragmentima iskazuju svojstva učinkovitija u suprotstavljanju većim molekulama karakterističnima za otrove zmija iz porodice *Viperidae* (WHO, 2017). Međutim, čak i

ako protuotrov i otrov ostanu u središnjem odjeljku podjednako dugo, odstupanje od idealnog ishoda je i dalje moguće s obzirom da se znakovi recidiva mogu pojaviti i nakon početnog, prolaznog poboljšanja (Ariaratnam i sur., 1999; Nikapitiya i Maduwage, 2017). Takav fenomen povezan je ili s ponovnom distribucijom otrova u cirkulaciju putem spore, kontinuirane apsorpcije iz depoa formiranog na mjestu ugriza nakon preuranjene eliminacije cirkulirajućeg protuotrova ili s reverzibilnim vezanjem otrova i protuotrova (Boyer i sur., 1999). Posljedično, opetovana pojava otrova u cirkulaciji zahtijeva ponovnu primjenu protuotrova kako bi se njegova djelatna tvar održala na terapijskoj razini. Fenomen je prvenstveno karakterističan za Fab pripravke zbog brzine njihovog uklanjanja iz vaskularnog prostora i odsutnosti u kasnijoj fazi otrovanja kada dolazi do ponovne pojave toksina koji nisu neutralizirani (Boyer i sur., 2001). IgG ili F(ab')₂ protuotrovi zadržavaju se u cirkulaciji dulje vrijeme, osiguravajući prisutnost neutralizirajućih antitijela u dovoljno visokim koncentracijama za potpuno uklanjanje cirkulirajućeg otrova (WHO, 2017).

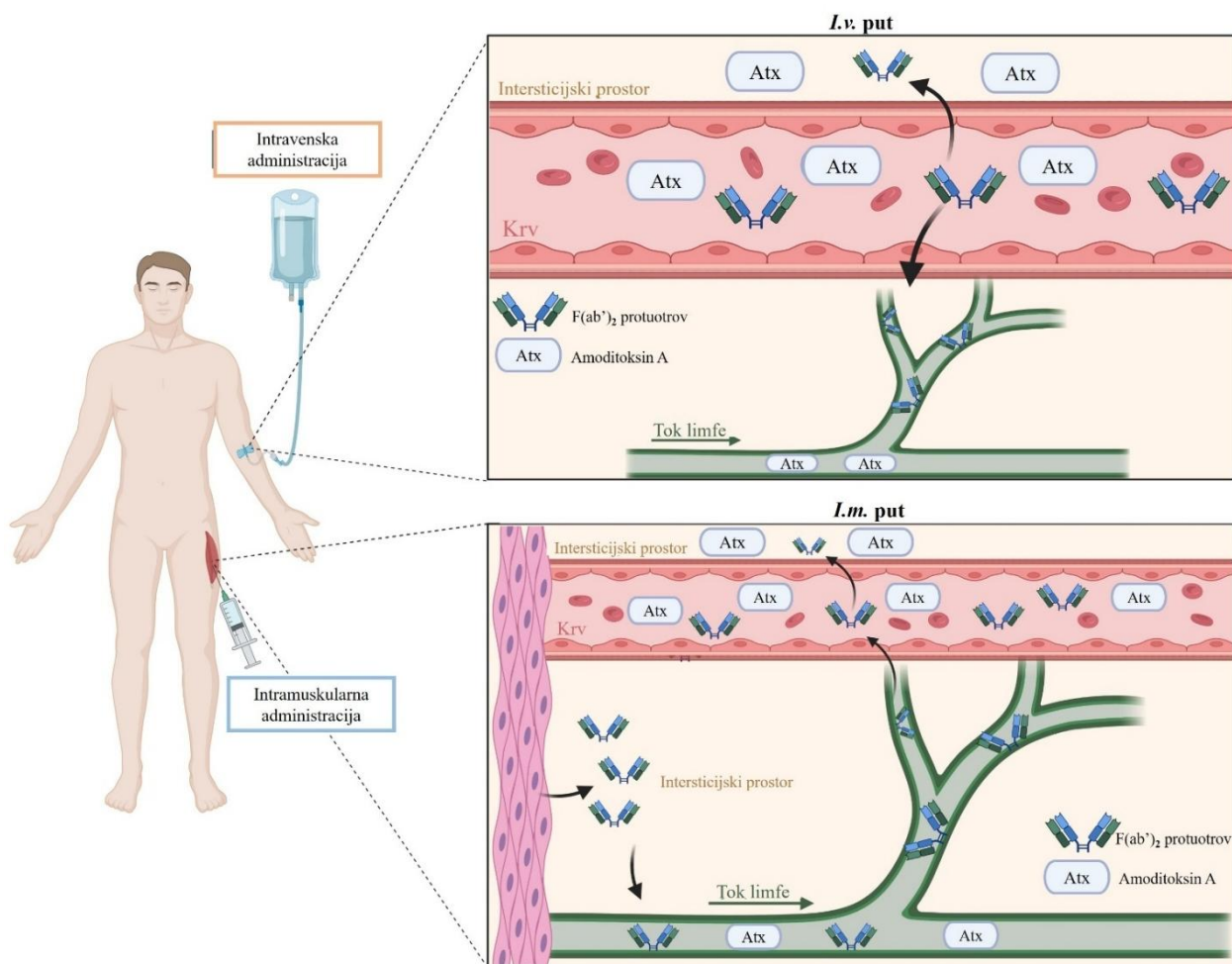
Osim specifičnosti, koncentracije i formata antitijela, na učinkovitost protuotrova može utjecati i način njegove primjene za koji u Europi ne postoji standardizirani protokol, slično kao u mnogim drugim regijama svijeta (Lamb i sur., 2017). Prema preporuci WHO-a (WHO, 2010), protuotrovi protiv zmijskog ugriza trebali bi se, kad god je moguće, primjenjivati intravenski (*i.v.*) zbog brže distribucije i veće bioraspoloživosti neutralizirajućih antitijela u usporedbi s drugim načinima primjene. Osim toga, spora *i.v.* infuzija tijekom 30–45 minuta omogućuje i pravovremeni prekid primjene protuotrova u slučaju razvoja neposrednih nuspojava (Reid, 1980). S druge strane, *i.v.* administracija je logistički zahtjevnija jer se mora odvijati pod strogim nadzorom medicinskog osoblja unutar zdravstvene ustanove čija je dostupnost često otežana zbog udaljenosti od područja na kojima se događaju zmijski ugrizi, a što dovodi do odgođenog transporta i, posljedično, zakašnjelog početka liječenja žrtava, čime se u konačnici smanjuju šanse za uspješan ishod terapije (Alirol i sur., 2010; Gutiérrez, 2012; Kalil i Fan, 2017; Warrell, 2019). Intramuskularna (*i.m.*) primjena nosi znatno manji rizik od razvoja nuspojava povezanih s protuotrovom, a ujedno predstavlja i praktičniju terapijsku opciju u siromašnim, ruralnim područjima bez adekvatne liječničke pomoći (WHO, 2010). Međutim, prevladava mišljenje da je *i.m.* primjena manje učinkovita i da dovodi do niže bioraspoloživosti, duljeg vremena potrebnog za postizanje maksimalne koncentracije te

odgođene, odnosno nepotpune neutralizacije toksina (Gutiérrez i sur., 2003). Razine u krvi nikada ne dosežu one koje se postižu *i.v.* primjenom. Stoga WHO savjetuje *i.m.* put kao alternativni pristup u postajama prve pomoći, kao i u slučajevima kada je *i.v.* primjena otežana (WHO, 2010). Lokalna primjena protuotrova na mjestu ugriza nije preporučljiva jer je izrazito bolna i može dovesti do povećanja intrakompartmentalnog tlaka (WHO, 2010). Prema tome, većina komercijalno dostupnih protuotrova namijenjena je za *i.v.* infuziju. Izuzeci su oni koji se koriste za liječenje ugriza/uboda drugih životinja otrovnica (Jalali i sur., 2011; Nimorakiotakis i Winkel, 2004), a daju se ili isključivo *i.m.*, unatoč sve većoj zabrinutosti zbog moguće slabije učinkovitosti (Isbister, 2002), ili i *i.v.* i *i.m.*, budući da još uvijek nije riješena dilema oko boljeg načina administracije (Isbister i sur., 2008). U slučaju zmijskog ugriza *i.v.* primjena predstavlja metodu izbora kad god je dostupna profesionalna pomoć (Ahmed i sur., 2008; Jalali i sur., 2011; Paniagua i sur., 2015). Međutim, postoji i značajan broj proizvođača čiji se proizvodi i dalje propisuju za *i.m.* i/ili supkutanu (*s.c.*) primjenu (*Bula Com Informações Ao Paciente — Soro Antibotrópico (Pentavalente) e Antilaquético*, n.d.; *Bula Com Informações Ao Paciente — Soro Anticrotático*, n.d.; *Bula Com Informações Ao Paciente — Soro Antielaquético (Bivalente)*, n.d.; *Sera - Products of BB - NCIPD Ltd*, n.d.; *Suero Antiofídico Polivalente Biol*, n.d.; *Vetal Serum - Ürünlerimiz*, n.d.; *Viekvin - Viper Venom Antiserum (Equine)*, n.d.; *Viper Venom Antitoxin*, n.d.). Naime, zmijski otrovi su složena smjesa proteina različitih molekulskih masa koji se u većini slučajeva otrovanja injiciraju u intersticijski prostor *s.c.* ili *i.m.* putem (Gutiérrez i sur., 2017) i čija se apsorpcija u krvotok odvija putem krvnih kapilara ili malih limfnih žila, ovisno o njihovoj veličini (van Helden i sur., 2019). Kao rezultat, komponente otrova iskazuju različite toksikokinetičke profile (Paniagua i sur., 2015). S druge strane, protuotrovi, čiji je sastav ujednačen i uključuje samo velike molekule, primijenjeni istim putem u krvotok dospijevaju isključivo sporom difuzijom kroz male limfne žile, isto kao i komponente otrova veće od 20 kDa (Di Nicola i sur., 2021; Gutiérrez i sur., 2003; Paniagua i sur., 2015). Osim toga, postoje i indikacije da limfni sustav ne samo da igra ulogu u distribuciji otrova i bioraspoloživosti (Paniagua i sur., 2012), već da također služi kao tjelesni odjeljak u kojem protuotrov, ekstravaziran iz krvi nakon *i.v.* primjene, eliminira znatnu količinu toksina prije nego što limfa dopiye u sistemska cirkulaciju (Paniagua i sur., 2019). Za sada nema spoznaja o neutralizaciji posredovanoj *i.m.* primijenjenim protuotrovom u limfnom sustavu.

2.2. Pretkliničke studije

I.m. put (Slika 1) je parenteralni način primjene lijeka putem šprice ili igle u mišićno tkivo, nakon čega lijek difundira u okolnu intersticijsku tekućinu, a zatim u krv. Pripravci za *i.m.* primjenu najčešće se ubrizgavaju u glutealni ili, zbog bolje prokrvljenosti, preferabilno deltoidni mišić (Ducharme i Shargel, 2022; Hess i sur., 2012). *I.m.* put omogućuje brzu apsorpciju određenih lijekova u cirkulaciju i pravovremeni početak djelovanja (Gad i Chengelis, 1998) te se smatra vrlo učinkovitim u hitnim situacijama (Polania Gutierrez i Munakomi, 2023). S druge strane, povezuje se s pojavom medicinskih komplikacija poput traume i boli na mjestu primjene zbog oštine igle i napetosti uzrokovane volumenom lijeka, aseptične upalne reakcije duž formiranog mišićnog kanala, oštećenja živaca i infekcije (Ackerman i sur., 1971).

I.v. primjena (Slika 1) je najbrži i najpouzdaniji način unosa lijeka u krvožilni sustav koji omogućuje trenutnu isporuku velikog volumena tekućine (Ducharme i Shargel, 2022; Karlson-Stiber i sur., 1997). Osim potpune dostupnosti lijeka, osigurava i održavanje njegove stalne koncentracije u plazmi na terapijskoj razini putem kontroliranja brzine primjene (Claassen, 1994). Glavni nedostaci uključuju povećan rizik od nuspojava te potrebu za tehničkom vještinom pri postavljanju infuzijskog seta (Ducharme i Shargel, 2022). U kontekstu liječenja ugriza ili uboda životinja otrovnica, *i.v.* primjena trenutno predstavlja metodu izbora za davanje protuotrova i preporuka je da se primjenjuje kad god je moguće (Chippaux i sur., 2015; WHO, 2005). Provodi se sporom infuzijom ili izravnom „push“ injekcijom, pri čemu se potonja tehnika pokazala sigurnijom opcijom, uz mogućnost nadzora u slučaju pojave nuspojava (Malasit i sur., 1986; Pugh i Theakston, 1987).



Slika 1. Putevi apsorpcije protuotrova primijenjenog intramuskularnim (*i.m.*) ili intravenskim (*i.v.*) putem. Ova slika izrađena je pomoću [BioRender.com](https://www.biorender.com/)

Protuotrovi su velike molekule čija se apsorpcija, kada se daju *i.m.* ili *s.c.*, odvija sporo putem limfnog sustava prije daljnje distribucije (WHO, 2005). Unatoč složenosti puta protuotrova kroz organizam i broju uključenih tjelesnih odjeljaka, prethodne eksperimentalne studije, provedene s ciljem ispitivanja njihove farmakokinetike – bilo samostalno ili u kombinaciji s odgovarajućim otrovom – u velikoj većini slučajeva bile su ograničene isključivo na praćenje koncentracije specifičnih IgG-a ili njihovih fragmenata u sistemske cirkulaciji (Ismail i Abd-Elsalam, 1996; Pépin-Covatta i sur., 1996; Pepin i sur., 1995; Rivière i sur., 1998). Glavni razlog leži u praktičnosti uzorkovanja krvi čijoj širokoj i duboko ukorijenjenoj primjeni doprinosi i činjenica da se djelovanje pojedinih komponenti otrova često povezuje s izraženim, lako uočljivim patofiziološkim promjenama na razini kardiovaskularnog sustava, poput poremećaja koagulacije, mioglobinurije i enzimske disfunkcije (Lukšić i sur., 2018). Osim u krvi,

postoji i praksa praćenja količine protuotrova tijekom vremena i u urinu, a ponekad i u različitim organima, uglavnom radi boljeg uvida u proces eliminacije (Rivière i sur., 1998). Tijekom godina prepoznata je potreba za proširivanjem istraživanja na druge relevantne tjelesne odjeljke, s posebnim naglaskom na limfni sustav. U studijama interakcije otrova i protuotrova među različitim dostupnim životinjskim modelima prednost se daje većim vrstama, kao što su ovce (Paniagua i sur., 2012), svinje (Burgess i sur., 1992; Offerman i sur., 2009), goveda (Rodríguez i sur., 2016) i posebno kunići (Audebert i sur., 1994), u prvom redu jer omogućuju prikupljanje potrebnih količina testnog materijala i njegovo uzorkovanje kroz duži vremenski period. S druge strane, male životinje poput miševa (León i sur., 2001), štakora (Hart i sur., 2014) i zamorčića (K. P. Maduwage i sur., 2016) smatraju se manje korisnima, prvenstveno zbog veličine, male mišićne mase, slabih fizioloških sličnosti s ljudima i, posljedično, upitne mogućnosti translacije dobivenih spoznaja na otrovane i/ili liječene pacijente (A. Silva i sur., 2022). Zanimljivo je da su se u prošlosti psi (Jacome i sur., 2002) i mačići (Barnes i Trueta, 1941) također koristili za farmakokinetičke studije protuotrova, no danas su napušteni. Međutim, imunološki sustav gore spomenutih vrsta razlikuje se od imunološkog sustava životinja koje se koriste za proizvodnju zmijskih protuotrova, a to su najčešće konji te, iznimno, ovce (Laustsen, María Gutiérrez, i sur., 2018), magarci i ljame i sur., 2010). Njihova antitijela su strana životinjskom modelu, što utječe na maksimalnu koncentraciju djelatne tvari u plazmi i njenu brzinu eliminacije, kako je pokazano kod zečeva, miševa, štakora i krava (Ismail i sur., 1998; Pépin-Covatta i sur., 1996; Rojas i sur., 2013). Stoga, pri usporedbi rezultata studija provedenih na različitim vrstama treba voditi računa da o tome da kod njih heterologni IgG-i ili njihovi fragmenti pokazuju varijabilna farmakokinetička svojstva (Lobo i sur., 2004).

2.2.1. Farmakokinetički profil protuotrova u studijama na životinjama

Prema ustaljenom mišljenju, *i.m.* primjena protuotrova rezultira njegovom sporom i otežanom apsorpcijom u krvotok, što rezultira dužim vremenom potrebnim za postizanje maksimalne koncentracije ($t_{\max}$), a koje varira između 48 i 76 sati za IgG-e i F(ab')₂ fragmente (Ismail i Abd-Elsalam, 1996). Fab fragmenti se pojavljuju brže, s $t_{\max}$ od oko 12 sati (Rivière i sur., 1998). Također, *i.m.* primjena protuotrova se povezuje i s njegovom slabom bioraspoloživošću – samo 36–42% ukupne doze dopijeva u sistemsku cirkulaciju

(Pépin-Covatta i sur., 1996; Pepin i sur., 1995), te odgođenom ili nepotpunom neutralizacijom komponenti otrova (Gutiérrez i sur., 2003). U slučaju otrovanja toksini, koji su obično manji, ulaze u krvotok brže od *i.m.* protuotrova zbog čega je općeprihvaćena pretpostavka da on ne može pravovremeno spriječiti njihovo širenje do ciljnog mjesta djelovanja (Gutiérrez i sur., 2003; Pepin i sur., 1995).

2.2.2. Utjecaj protuotrova na otrove škorpiona i zmija iz porodice *Elapidae*

Najčešće se farmakokinetika *i.m.* protuotrova ne podudara s onom ciljnog otrova. Neslaganje je posebno naglašeno kad je otrovanje uzrokovano otrovima čije je djelovanje posredovano neurotoksinima male molekulske mase, kao što su otrovi škorpiona i zmija iz porodice *Elapidae* (Gutierrez i sur., 1991; Ismail i Abd-Elsalam, 1996). Veliku brzinu njihove apsorpcije potvrđuju zapažanja prema kojima su ponekad mjerljivi u krvi samo nekoliko minuta od otrovanja (Krifi i sur., 2001, 2005). Otrovi škorpiona imaju $t_{\max}$ kraći od dva sata (Ismail i sur., 1992; Krifi i sur., 2005), a uglavnom se kreće između 30 i 60 minuta (Calderón-Aranda i sur., 1999; Krifi i sur., 2005; Santana i sur., 1996). Otrov vrste *Walterinnesia aegyptia* smatra se jednim od onih koji se odlikuju gotovo trenutnim unosom u sistemsku cirkulaciju jer doseže maksimalnu koncentraciju unutar 5–20 minuta nakon *i.m.* injekcije (Ismail i sur., 1998). U prilog brznoj apsorpciji otrova zmija iz porodice *Elapidae* govori i činjenica da su u slučaju vrste *Micrurus nigrocinctus* detektabilne koncentracije izmjerene unutar prvih pola sata nakon inokulacije (Amuy i sur., 1997). Štoviše, otrovi škorpiona, ne samo da se apsorbiraju u vrlo kratkom roku, već i gotovo u potpunosti. Npr., dokazano je da oko 70% primijenjene doze otrova vrste *Leiurus quinquestriatus* ulazi u krvotok unutar 15 minuta (Ismail i sur., 1992), 90% otrova vrste *Walterinnesia aegyptia* unutar 60 minuta (Ismail i sur., 1998), a 96% otrova vrste *Androctonus australis hector* unutar 30 minuta (Hammoudi-Triki i sur., 2007). Razina cirkulirajućih antigena progresivno raste i doseže vrhunac približno dva sata nakon injekcije kod kunića, a nešto ranije kod miševa (Amuy i sur., 1997). I distribucija u periferne odjeljke se smatra relativno brzim procesom (Zerrouk i sur., 1991) s poluvremenom kraćim od 30 minuta (Krifi i sur., 2001; Santana i sur., 1996). S druge strane, eliminacija iz tijela obično se mjeri kroz duže vremensko razdoblje (El Hafny i sur., 2002; Santana i sur., 1996).

Farmakokinetička neusklađenost između otrova ubrizganih *i.m.* ili *s.c.*, kao u tipičnom otrovanju, i *i.m.* primijenjenih protuotrova pokazana je kroz niz studija. Prema onoj koju su proveli Krifi i suradnici (2001), potpuna neutralizacija nastupa tek nakon sedam sati. Najvjerojatniji razlozi povezani su s ograničenom bioraspoloživošću *i.m.* primijenjenih protuotrova, koja ne prelazi 50% aplicirane doze, ali i sa njihovim značajno dužim t_{max} , postignutim čak dva dana nakon početka terapije uslijed spore apsorpcije (Pépin-Covatta i sur., 1996; Pepin i sur., 1995). Naime, proteini visoke molekulske mase s mjesta *i.m.* ili *s.c.* injekcije se otpuštaju postupno (Salmonson i sur., 1990), što se odnosi i na cijela IgG antitijela i na njihove fragmente. Hammoudi-Triki i suradnici (2007) proveli su toksikokinetičku analizu otrova vrste *Androctonus australis hector* u otrovanim štakorima nakon njihovog liječenja protuotrovom, bilo u obliku $F(ab')_2$ ili Fab fragmenata. $F(ab')_2$ protuotrov primijenjen *i.m.* neutralizirao je toksine sporije od onog danog *i.v.* Štoviše, ukupna količina slobodnog otrova apsorbirana u krv tijekom definiranog vremenskog perioda bila je veća, a udio toksične frakcije vezane s antitijelima manji. Usporedivi rezultati dobiveni su kada su korišteni Fab fragmenti, ali razlika u količini vezanog otrova između *i.m.* i *i.v.* načina primjene bila je manje izražena.

Rezultati dobiveni praćenjem razine otrova/protuotrova u sistemskej cirkulaciji sugeriraju da *i.m.* protuotrovi nisu prikladni za učinkovitu neutralizaciju smrtonosnih toksina otrova škorpiona i zmija iz porodice *Elapidae* (Krifi i sur., 2001). Njihova farmakokinetika nije vremenski ni količinski prilagođena znatno bržem dolasku komponenti otrova, čiji se toksini, zbog manje veličine i veće sposobnosti difuzije, pojavljuju u krvi puno prije nego neutralizirajuća antitijela. S obzirom na brzinu njihove apsorpcije i distribucije, otrovanja izazvana otrovima bogatima peptidima/proteinima male molekulske mase predstavljaju prijetnju životu i zahtijevaju hitnu medicinsku intervenciju (Krifi i sur., 2005) zbog čega se pravovremena *i.v.* injekcija odgovarajuće doze protuotrova smatra puno adekvatnijim načinom postizanja brze i trajne neutralizacije cirkulirajućih toksina (Ismail i Abd-Elsalam, 1996). U praksi, ni *i.v.* protuotrovi se obično ne uspijevaju primijeniti u dovoljno ranoj fazi otrovanja da bi u potpunosti sustigli cijelu frakciju ubrizganog otrova prisutnu u krvotoku i spriječili njegovo daljnje širenje po organizmu. Međutim, zahvaljujući njihovom izravnom unosu u sistemske cirkulaciju, uslijed stvaranja protuotrov-otrov imunoloških kompleksa, količina slobodnog otrova naglo opada što potiče njegovo premještenje, tzv.

redistribuciju, iz perifernih tkiva natrag u središnji tjelesni odjeljak gdje ponovno postaje dostupan za neutralizaciju posredovanu protuotrovom (Calderón-Aranda i sur., 1999; El Hafny i sur., 2002; Pépin-Covatta i sur., 1996; Yap i sur., 2015). S obzirom na njihovu naglašenu sposobnost mijenjanja farmakokinetike otrova, za imunoterapiju uboda škorpiona i ugriza zmija iz porodice *Elapidae* osobito korisnima se smatraju $F(ab')_2$ fragmenti (El Hafny i sur., 2002; Ismail i sur., 1998; Pépin-Covatta i sur., 1996) što potvrđuje i istraživanje u kojem je jedna grupa kunića po otrovanju primila *i.v* infuziju specifičnog konjskog protuotrova, dok je druga, kontrolna, ostala neliječena. U periodu prije njegove primjene u obje skupine profil koncentracija otrova je bio gotovo identičan. Međutim, s vremenom je u onoj tretiranoj $F(ab')_2$ fragmentima došlo do značajnog porasta ukupnog otrova u plazmi što se smatra posljedicom antitijelima posredovane redistribucije toksina iz perifernog odjeljka natrag u cirkulaciju kao ključnim korakom koji prethodi njihovom uklanjanju (Pépin-Covatta i sur., 1996).

Nakon *i.v.* primjene, protuotrovi temeljeni na $F(ab')_2$ fragmentima obično slijede farmakokinetički model otvorenog tipa s dva (Pépin-Covatta i sur., 1996) ili tri odjeljka (Ismail i sur., 1998; Ismail i Abd-Elsalam, 1996), a koji obuhvaćaju središnji (krvožilni sustav), plitki i duboki tkivni odjeljak (Gutiérrez i sur., 2003). U usporedbi s cijelim IgG-ima, $F(ab')_2$ fragmenti ne samo da imaju kraći t_{max} i kraće poluvrijeme distribucije u cirkulaciji (Ismail i sur., 1998), nego se zbog većeg volumena distribucije intenzivnije šire u ekstravaskularni prostor i iskazuju jači afinitet prema plitkim i dubokim tkivnim odjeljcima u kojima se nalaze ciljni toksini (Gutiérrez i sur., 2003). Terapijsku opravdanost *i.v.* primijenjenih $F(ab')_2$ fragmenata potvrđuje i činjenica da im je potrebno dva do tri puta manje vremena za postizanje t_{max} u ekstravaskularnom prostoru nego IgG-ima i Fab fragmentima (Ismail i sur., 1998). Osim toga, prosječno poluvrijeme distribucije $F(ab')_2$ fragmenata u plitkim i dubokim tkivnim odjeljcima je šest, odnosno pet puta kraće (Ismail i Abd-Elsalam, 1996). S druge strane, *i.m.* primjena protuotrova, neovisno o njegovom formatu, pokazala se manje učinkovitom u terapiji otrovanja škorpiona i zmija iz porodice *Elapidae* zbog čega i $F(ab')_2$ fragmenti imaju ograničenu ulogu u liječenju posljedica njihovog uboda, odnosno ugriza (Ismail i sur., 1998; Pépin-Covatta i sur., 1996). Samo rana *i.v.* aplikacija odgovarajuće doze, po mogućnosti znatno veće od minimalne učinkovite (Ismail i sur., 1998; Yap i sur., 2015), može osigurati brzu i dugotrajnu neutralizaciju cirkulirajućih toksina. Razlika između načina primjene jasno se

očituje na primjeru otrova škorpiona *Androctonus australis garzonii* koji je u potpunosti uklonjen iz krvi u manje od deset minuta kada je specifični protuotrov primijenjen *i.v.*, dok je za njegovo eliminiranje nakon *i.m.* primjene bilo potrebno čak osam sati (Krifi i sur., 2005).

2.2.3. Utjecaj protuotrova na otrove zmija iz porodice *Viperidae*

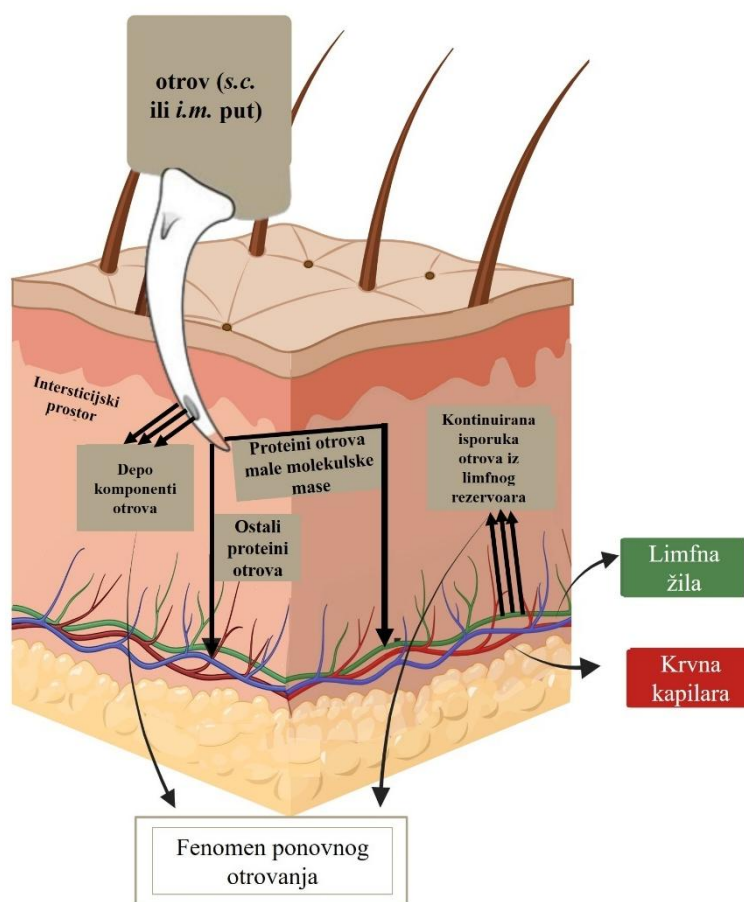
Otrovi zmija iz porodice *Viperidae*, u kojima dominiraju proteini veće molekulske mase, imaju specifičan farmakokinetički profil (Gutiérrez i sur., 2003). U početnoj fazi otrovanja dolazi do njihove vrlo brze apsorpcije u sistemsku cirkulaciju, pri čemu se komponente otrova u krvi mogu detektirati već 10–15 minuta od ugriza (Audebert i sur., 1994; Jacome i sur., 2002), dok im je za postizanje maksimalne koncentracije potrebno nekoliko sati (Audebert i sur., 1994). Nakon početne faze slijedi produljeno razdoblje postupnog otpuštanja otrova iz potkožnog tkiva oko mjesta ugriza u krvotok, osobito oko mjesta ugriza (Tan i sur., 2014), što može potrajati od 24 sata (Barral-Netto i sur., 1990) pa sve do tri dana (Audebert i sur., 1994). Postupno otpuštanje otrova posebno je izraženo prilikom njegove *s.c.* primjene, pri čemu poluvrijeme eliminacije može iznositi i nekoliko dana (Zhao i sur., 2001). Apsorpcija otrova zmija iz porodice *Viperidae* značajno varira, s bioraspoloživošću u rasponu od samo 4% (Tan i sur., 2014) pa do čak 86% (Neri-Castro i sur., 2020). Dio ubrizganog otrova ostaje na mjestu ugriza, stvarajući depo (Seifert i Boyer, 2001) koji vjerojatno doprinosi lokalnom oštećenju tkiva (Sanhajariya i sur., 2018).

Postupni porast koncentracije otrova u krvi najvjerojatnije je povezan s njegovom apsorpcijom posredovanom limfom (Paniagua i sur., 2015). Naime, nakon otrovanja *s.c.* ili *i.m.* aplicirani otrov se prvo dostavlja u intersticijski prostor gdje zatim ulazi u krvotok ili kroz krvne ili kroz limfne kapilare (Paniagua i sur., 2015), ovisno o molekulskoj masi njegovih toksina (Slika 2). Transportni put je drugačiji za male neurotoksine iz otrova škorpiona, odnosno zmija iz porodice *Elapidae* i veće hemotoksine iz otrova zmija iz porodice *Viperidae* (Slagboom i sur., 2017). Peptidi i proteini manji od 9 kDa mogu direktno ući u krvne kapilare, dok se toksini molekulske mase od 20–100 kDa većinom apsorbiraju kroz limfni sustav, a koji služi kao stalni izvor za njihovu kontinuiranu dostavu u sistemsku cirkulaciju (Bermúdez-Méndez i sur., 2018). Opažanje je u skladu s istraživanjem Portera i suradnika (Porter i sur., 2001) koji su proučavali prijenos *s.c.*

apliciranih terapijskih proteina i primijetili da njihova propusnost kroz vaskularni endotel opada kako im se molekulaska masa povećava. Veće molekule se usmjeravaju prema limfnom sustavu. Međutim, njegova uloga u neutralizaciji toksina specifičnim antitijelima zasad je nedostatno istražena, iako bi mogla doprinijeti stjecanju novih spoznaja o sveukupnom procesu apsorpcije i distribucije u organizmu (Si i sur., 2022). Zbog svog malog volumena i relativno sporog protoka, limfni sustav ne utječe samo na vrijeme zadržavanja toksina u tijelu, već i na brzinu kojom se s mjesta injekcije apsorbiraju u sistemsku cirkulaciju. Audebert i suradnici (1994) su pokazali da, iako sav otrov nestaje s mjesta primjene sedam sati nakon *i.m.* injekcije, samo 25% primijenjene doze dopijeva u krvotok što sugerira da limfni sustav predstavlja početni tjelesni odjeljak za apsorpciju, dok oslobađanje otrova u krv slijedi tek naknadno (Rivière i sur., 1998). U studiji kojom je praćen tijek otrovanja uzrokovanog vrstom *Micrurus fulvius* (Paniagua i sur., 2012) utvrđeno je da se oko 70% početne doze apsorbira posredstvom oba odjeljka, pri čemu čak 25% dopijeva u limfni sustav, što potvrđuje da, uz depo koji se formira na mjestu primjene, i limfni sustav djeluje kao stalni izvor otrova koji dopijeva u krvotok (Paniagua i sur., 2012). Njegovo oslobađanje može trajati danima, što često dovodi do fenomena ponovnog otrovanja (Paniagua i sur., 2019). S obzirom na to da se protuotrov eliminira brže od nekih toksina (Seifert i Boyer, 2001), nakon početnog poboljšanja može ponovno doći do lokalnog ili sistemskog pogoršanja. Ukratko, toksini iz porodice *Viperidae* djeluju odgođeno, što naglašava važnost održavanja antitijela u krvi na adekvatno visokoj razini i kroz dovoljno dugi period kako bi se omogućila kontinuirana neutralizacija toksina koji u cirkulaciju dopijevaju naknadno (Gutiérrez i sur., 2003).

Učinkovitost anti-viperidnih protuotrova primijenjenih *i.m.*, isto kao i protuotrova protiv ugriza škorpiona i zmija iz porodice *Elapidae*, čini se upitnom iz više razloga (Rivière i sur., 1997). Prema istraživanju na kunićima, njihova bioraspoloživost je relativno niska (42%), apsorpcija spora, a $t_{\max}$ produljen te kod kunića iznosi čak 48 sati (Pepin i sur., 1995). Osim toga, *i.m.* injekcija može dovesti do stvaranja velikog hematoma na mjestu primjene, i posljedično, sprečavanja zgrušavanja krvi izazvanog otrovom zmija iz porodice *Viperidae* (Warrell, 2017). U usporedbi s cijelim IgG-ima i $F(ab')_2$ fragmentima, Fab fragmenti u krvotok dopijevaju nešto brže (Rivière i sur., 1998). Kod kunića njihov $t_{\max}$ iznosi 12 sati. Međutim, studija u kojoj je korišten otrov vrste *Bothrops asper* na miševima je pokazala da *i.m.* primijenjen Fab format protuotrova

nije rezultirao smanjenjem smrtnosti (Chaves i sur., 2002). Kako su primijetili Riviere i suradnici (1997), kod otrovanja izazvanog *Vipera aspis* otrovom postignuta je odgođena i samo djelomična neutralizacija. Općeprihvaćeno mišljenje o nedostatnoj učinkovitosti *i.m.* protuotrovom postoji već desetljećima. Međutim, iako uzrokuje nepotpunu apsorpciju, duže vrijeme potrebno za postizanje maksimalne koncentracije i nižu maksimalnu koncentraciju (c_{max}), *i.m.* primjena ima i jednu bitnu prednost. Naime, u usporedbi s *i.v.* primjenom, zbog produljenog poluvremena eliminacije (Pepin i sur., 1995) i mogućnosti održavanja stalne koncentracije antitijela (Seifert, 1999), osigurava dugotrajnije zadržavanje protuotrova u krvi te sprečava ponovno pojavljivanje simptoma otrovanja, osobito koagulopatije.



Slika 2. Otrovi zmija iz porodice *Viperidae* obično se ubrizgavaju u intersticijski prostor supkutanim (s.c.) putem. Njihova apsorpcija većinom se odvija putem limfnog sustava, koji služi kao stalni izvor za kontinuirano otpuštanje toksina u sustavnu cirkulaciju. Ova slika izrađena je pomoću [BioRender.com](https://www.biorender.com/).

2.2.4. Uloga limfnog sustava u neutralizaciji otrova

Nova saznanja upućuju na to da usklađenost farmakokinetike otrova i protuotrova u sistemskoj cirkulaciji nije jedini pokazatelj terapijske učinkovitosti, kako se do nedavno smatralo, jer limfni sustav također igra ključnu ulogu u procesu otrovanja i njegovu suzbijanju (Fidler i sur., 1938; Sanhajariya i sur., 2018). Još su 1938. godine Fidler i suradnici (1938) sugerirali da se *s.c.* primijenjeni otrov apsorbira u krvotok putem limfnog sustava, dok su nekoliko godina kasnije Barnes i Trueta (1941) dokazali da toksini velike molekulske mase ne ulaze u sistemsku cirkulaciju kada su limfni putevi blokirani. Tek naknadno Paniagua i suradnici (2019) su otkrili da se neutralizacija otrova ne odvija samo u krvotoku, već i u limfnom sustavu. Koristeći model ovce s centralnom limfnom kanulacijom, prvo su potvrdili značaj limfne apsorpcije otrova pristiglog iz potkožnog tkiva u njenoj daljnjoj distribuciji i bioraspoloživosti (Paniagua i sur., 2012). Njihova studija je pokazala da se 25% primijenjene doze apsorbira limfom gdje otrov postiže 25 puta veću koncentraciju nego u krvi, čime je postignut značajan napredak u razumijevanju njegovog prijenosa s mjesta aplikacije u krvotok. Zatim su u najnovijem istraživanju proširili analizu otrova na njegovu interakciju s protuotrovom, obuhvaćajući istodobno sistemsku cirkulaciju i limfni sustav (Paniagua i sur., 2019). Došli su nekoliko ključnih spoznaja o neutralizaciji *s.c.* injiciranog otrova *i.v.* protuotrovom primijenjenim dva sata nakon otrovanja. Prvo, *i.v.* protuotrov ekstravazacijom može prelaziti iz krvotoka u limfni sustav, eliminirajući oko 70% otrova prije nego što limfa doprije u sistemsku cirkulaciju. Zatim, dok slobodni otrov iz krvi nestaje relativno brzo uslijed visoke koncentracije protuotrova u krvotoku, njegova slobodna, nevezana frakcija još neko vrijeme zaostaje u limfi gdje je dostupna za neutralizaciju posredovanu *i.v.* protuotrovom koji naknadno ekstravazacijom dopijeva iz krvotoka. Na kraju, djelovanje *i.v.* protuotrova u limfnom sustavu je sporo i nepotpuno, vjerojatno zbog njegove niže koncentracije u limfi nego u serumu te kontinuirane apsorpcije otrova iz potkožnog tkiva. Doprinos *i.m.* protuotrova u neutralizaciji otrova apsorbiranog u limfni sustav je također izgledan, ali još nije istražen.

2.3. Kliničke studije

Kliničke studije protuotrova obično se provode s ciljem procjene učinkovitosti i sigurnosti (Chippaux i sur., 2007). Učinkovitost protuotrova ovisi o njegovoj

specifičnosti, dozi i vremenskoj prilagođenosti s kinetikom odgovarajućeg otrova. Način primjene ključan je za usklađivanje interakcije otrova i protuotrova kao neophodnog koraka u procesu neutralizacije i eliminacije toksičnih tvari (Gutiérrez i sur., 2003; Scherrmann, 1994). Optimalni protokol za liječenje ugriza zmija još uvijek nije definiran, uglavnom zbog ograničenog razumijevanja farmakokinetike otrova i protuotrova, kao i njihove interakcije, a što otežava potvrdu validnosti postojećih načina primjene u kliničkoj praksi (Sanhajariya i sur., 2018). Iako se *i.m.* primjena još uvijek koristi, najčešće u terenskim uvjetima (Gutiérrez i sur., 2003; Theakston i Laing, 2014), *i.v.* administracija trenutno se smatra standardom u terapiji protuotrovima, ponajviše zbog snažnih preporuka nadležnih tijela (WHO, 2010), a koje se oslanjaju na zaključke proizašle iz praćenja procesa unutar systemske cirkulacije u sklopu brojnih *in vivo* studija provedenih u kontroliranim uvjetima (Isbister i sur., 2015). Međutim, farmakokinetičko ponašanje protuotrova bitno varira među vrstama što može dovesti do pogrešnih očekivanja pri prijenosu spoznaja sa životinja na ljude (K. Maduwage i sur., 2016; Rojas i sur., 2013).

Studije na zdravim dobrovoljcima i otrovanim pacijentima su ograničene i često manjkave (Theakston i Laing, 2014) te stoga ne pružaju dovoljno podataka za definiranje najučinkovitijeg načina liječenja zmijskog ugriza (Isbister i sur., 2015). Većinom se provode u nekontroliranim uvjetima i uključuju ili pojedinačne slučajeve (Brvar i sur., 2017; Kurtović i sur., 2016; Nielsen i sur., 1978; Ownby i sur., 1996) ili male skupine sudionika (Ariaratnam i sur., 1999; Ho i sur., 1990; Kurtović i sur., 2021; Seifert i Boyer, 2001; Thein-Than i sur., 1985). Nadalje, kako često nije moguće pouzdano identificirati vrstu zmije kao uzročnika otrovanja, odabir protuotrova se temelji na kliničkim znakovima, prvenstveno koagulopatiji, a što dovodi u pitanje specifičnost i, posljedično, učinkovitost primijenjenog lijeka (Ariaratnam i sur., 1999; Ho i sur., 1990; Isbister, 2010; Isbister i sur., 2015). Varijabilnost u vremenu proteklom od ugriza do primjene terapije dodatno otežava usporedbu rezultata iz različitih kliničkih studija (Audebert i sur., 1994; Brvar i sur., 2017; Ho i sur., 1990; Kurtović i sur., 2021). Niska učestalost uzorkovanja nakon primjene protuotrova i kratko, nepotpuno razdoblje praćenja njegovih koncentracija, često prekinuto otpustom pacijenta iz bolnice (Ho i sur., 1990; Kurtović i sur., 2021), također onemogućuju pravilnu farmakokinetičku analizu. Stoga je za

procjenu učinkovitosti načina primjene potrebno integrirati podatke i iz pretkliničkih i iz kliničkih studija, pritom uzimajući u obzir i tijek bolesti.

2.3.1. Farmakokinetički profil protuotrova u kliničkim studijama

2.3.1.1. Farmakokinetička svojstva *i.v.* protuotrova

U kliničkim studijama uglavnom je praćena farmakokinetika protuotrova ovisno o tipu njihove djelatne tvari (IgG, F(ab')₂ ili Fab fragmenti) i načinu primjene (Brvar i sur., 2017; Ho i sur., 1990; Isbister i sur., 2015; Kurtović i sur., 2016, 2021; Meyer i sur., 1997; Seifert i Boyer, 2001; Thein-Than i sur., 1985). Iz njih je proizašlo da *i.v.* primijenjeni protuotrovi pokazuju dvofazni obrazac pada koncentracije u krvotoku. Prvo nastupa brza distribucijska faza koja nastaje uslijed stvaranja otrov-protuotrov imunokompleksa i njihovog uklanjanja iz cirkulacije unutar 5–60 minuta (Ariaratnam i sur., 1999; Ho i sur., 1990), a zatim slijedi sporija faza eliminacije tijekom koje se slobodna antitijela protuotrova uklanjaju putem retikuloendotelnog sustava (Gutiérrez i sur., 2003; Ho i sur., 1990). Međutim, u farmakokinetičkim ispitivanjima kratka početna faza često se zanemaruje što može dovesti do pogrešnog izračuna poluvremena distribucije. Također, IgG i F(ab')₂ fragmenti imaju dugo poluvrijeme eliminacije koje zahtijeva produženo praćenje njihovih koncentracija u krvi, što je u praksi uglavnom teško izvedivo. Zbog navedenih izazova procjena farmakokinetičkih parametara protuotrova manje je pouzdana nego kod drugih vrsta lijekova i najvjerojatniji je uzrok varijacija između različitih studija čak i kad se u njima koristi isti tip djelatne tvari (Ho i sur., 1990).

U literaturi prevladavaju opisi kliničkih studija provedenih na pacijentima liječenima *i.v.* protuotrovima koji sadrže F(ab')₂ fragmente. Prema istraživanju koje je obuhvaćalo skupinu od pet žrtava ugriza vrste *Calloselasma rhodostoma* poluvrijeme distribucije primijenjenog protuotrova (GPO) iznosilo je 20 minuta (Ho i sur., 1990), što je znatno kraće od 4,6, odnosno sedam sati koliko je dobiveno za protuotrov korišten u terapiji otrovanja uzrokovanog vrstom *Daboia russelii* (Isbister i sur., 2015), odnosno protuotrov protiv europskih zmija iz porodice *Viperidae* (Kurtović i sur., 2016). Poluvrijeme eliminacije *i.v.* protuotrova također iskazuje veliku varijabilnost. Kliničko ispitivanje s 22 pacijenta koji su nakon ugriza vrste *Echis ocellatus* primili konjski F(ab')₂

protuotrov (Ipser Africa) pokazalo je da njegovo poluvrijeme eliminacije iznosi 18 sati (Meyer i sur., 1997). U drugoj studiji provedenoj na šest žrtava ugriza vrste *Vipera russelli* poluvrijeme eliminacije protuotrova je bilo dvostruko dulje (Thein-Than i sur., 1985). U nekim slučajevima F(ab')₂ fragmenti zadržavali su se u organizmu čak četiri do šest dana (Ho i sur., 1990; Isbister i sur., 2015). Za sistemski klirens i volumen distribucije uglavnom su dobivene ujednačenije vrijednosti iz različitih ispitivanja i obično su se kretale oko 2 mL / h / kg, odnosno 200 mL / kg (Ho i sur., 1990; Kurtović i sur., 2016).

Protuotrovi temeljeni na IgG molekulama odlikuju se ograničenom raspodjelom u tkivima, dugim poluvremenom eliminacije i učestalom cirkulacijom kroz izvanstanične prostore, prvenstveno zbog svoje veličine (> 150 kDa), odnosno prisutnosti Fc (*engl.* fragment crystallizable) regije (Ho i sur., 1990; Ismail i sur., 1998; Ismail i Abd-Elsalam, 1996). Poluvrijeme eliminacije za dva protuotrova poznata i kao TRC i TWF u prosjeku iznosi 2,7 dana nakon *i.v.* primjene (Ho i sur., 1990). Međutim, izgledno je da nakon istog načina administracije može iznositi i gotovo sedam dana (Nielsen i sur., 1978). Usporedna studija IgG protuotrova protiv ugriza vrste *Calloselasma rhodostoma* dobivenih imunizacijom dviju različitih vrsta proizvodnih životinja istaknula je značajne razlike u njihovim farmakokinetičkim parametrima praćenima kod 13 ispitanika (Ho i sur., 1990). Kozji IgG imao je četiri puta dulje poluvrijeme distribucije (dva sata) u odnosu na konjski (30 minuta) i dva puta kraće poluvrijeme eliminacije (46 vs. 82 sata), što je također dovelo do razlike u njihovim klirensima – 1,3 mL / h / kg za kozji IgG i 0,6 mL / h / kg za konjski IgG. Zanimljivo, volumen distribucije bio je podjednak za oba tipa IgG-a, oko 90 mL / kg (Ho i sur., 1990).

Varijabilnost u farmakokinetičkim parametrima među studijama također je zabilježena i za protuotrove koji sadrže Fab fragmente. Fab protuotrov protiv ugriza vrste *Echis ocellatus* (EchiTab), čija je farmakokinetika praćena na 17 pacijenata, imao je prosječno poluvrijeme eliminacije od 4,3 sata (Meyer i sur., 1997). Znatno duže poluvrijeme eliminacije od 24 sata (raspon 9–50 sati) zabilježeno je kod devet pacijenata liječenih ViperaTAb-om, protuotrovom specifičnim za vrstu *Vipera berus* (Kurtović i sur., 2021), što je u skladu s vrijednostima koje su dobivene iz tri dodatne serije slučajeva (14–56 sati) (Brvar i sur., 2017). U ispitivanju provedenom na četiri pacijenta Fab protuotrov protiv ugriza zmija jamičarki imao je poluvrijeme eliminacije od 18 sati

(Seifert i Boyer, 2001), što se podudara s rezultatima dobivenima za PolongaTAb, protuotrov koji se koristi u liječenju otrovanja izazvanog vrstom *Daboia russelii russelii*, a čije je poluvrijeme eliminacije kod 33 pacijenta iznosilo između 16 i 28 sati (Ariaratnam i sur., 1999). Volumen distribucije iz različitih studija varirao je od 110 mL / kg za protutrova protiv ugriza zmija jamičarki (Seifert i Boyer, 2001) do čak 182–524 mL / kg za protuotrov ViperaTAb (Brvar i sur., 2017; Kurtović i sur., 2021). Poluvrijeme distribucije kretalo se od 1,2 do 3,2 sata (Brvar i sur., 2017; Seifert i Boyer, 2001), a sistemski klirens između 4,3 i 13,4 mL / h / kg za protutrova ViperaTAb i FabAV (Brvar i sur., 2017; Kurtović i sur., 2021; Seifert i Boyer, 2001).

2.3.1.2. Farmakokinetička svojstva *i.m.* protuotrova

Istraživanja farmakokinetike *i.m.* protuotrova su ograničena. Vázquez i suradnici (2005, 2010) su proučavali protuotrov protiv uboda škorpiona kod zdravih volontera, uspoređujući *i.m.* (šest ispitanika) i *i.v.* primjenu (osam ispitanika). Kod *i.m.* primjene u sistemskoj cirkulaciji je detektirano najviše 17% administrirane doze protuotrova, a njegova maksimalna koncentracija postignuta je tek nakon 45 sati. Suprotno tome, kod *i.v.* primjene bioraspoloživost je bila potpuna, a maksimalna koncentracija postignuta je za manje od pet minuta. S *i.m.* primjenom ostvareno je tri puta duže prosječno vrijeme zadržavanja protuotrova u organizmu, što se istaknulo kao njena jedina prednost. Ove razlike u farmakokinetici naglasile su prijašnje zaključke o slabijoj učinkovitosti *i.m.* protuotrova koji bi se stoga u praksi trebali izbjegavati. U drugoj studiji provedenoj na žrtvama ugriza uspoređeni su *i.v.* Fab protuotrov za vrstu *Vipera berus* (ViperaTAb) i *i.m.* F(ab')₂ protuotrov za vrstu *Vipera ammodytes* (Kurtović i sur., 2021). Fab protuotrov imao je 2,5 puta veći volumen distribucije i postigao je maksimalnu koncentraciju u krvi unutar dva sata. Suprotno tome, F(ab')₂ protuotrov postupno se otpuštao iz mišićnog tkiva, a maksimalna koncentracija postignuta je nakon 70 sati. Imao je 25 puta sporiji klirens i 14 puta duže poluvrijeme eliminacije u odnosu na Fab protuotrov. Kinetika *i.v.* Fab fragmenata bila je bolje prilagođena koncentraciji otrova u ranoj fazi otrovanja, dok su *i.m.* F(ab')₂ fragmenti zahtijevali ranu primjenu, ali bez potrebe za dodatnim dozama u svrhu potpunog povlačenja simptoma otrovanja. S druge strane, *i.v.* Fab fragmente je bilo potrebno primijeniti u više navrata kako bi se postigao uspješan terapijski rezultat.

Ove razlike naglašavaju važnost odabira pravog puta primjene u skladu s kliničkim stanjem pacijenta.

2.3.1.3. Klinički ishod

Zmije otrovnice iz porodica *Elapidae* i *Viperidae* izazivaju niz patofizioloških poremećaja (Ahmed i sur., 2008; Osipov i Utkin, 2023). Otrovi elapida prvenstveno utječu na živčani sustav i uzrokuju sistemske učinke s minimalnim oštećenjem lokalnog tkiva, uz iznimku nekih vrsta roda *Micrurus* (Sanz i sur., 2019). Otrovi viperida, osim vrste *Crotalus durissus*, rijetko izazivaju ozbiljne neurotoksične simptome i dominantno interferiraju s koagulacijskom kaskadom, izazivajući razne hematološke poremećaje, uz uobičajenu pojavu nekroze na mjestu ugriza. Iako mnogi simptomi otrovanja mogu biti pokazatelji učinkovitosti protuotrova ovisno o načinu primjene, u narednim poglavljima naglasak će biti na diseminiranoj intravaskularnoj koagulopatiji kao najčešćem stanju koje se javlja uslijed ugriza zmija iz porodica *Elapidae* i *Viperidae* (Isbister, 2010; K. Maduwage i Isbister, 2014; Warrell, 2010). Većina dosad provedenih kliničkih studija bavila se *i.v.* primjenom protuotrova i njezinom učinkovitošću u rješavanju simptoma otrovanja, dok je broj onih usmjerenih na *i.m.* administraciju bitno manji, što ukazuje na potrebu za daljnjim istraživanjima. Također, nedostaju i kliničke studije u kojima bi *i.v.* i *i.m.* protuotrovi bili izravno uspoređeni.

2.3.2. Klinički ishod nakon *i.v.* primjene protuotrova

Dvostruko slijepo usporedno ispitivanje triju protuotrova s IgG ili F(ab')₂ fragmentima za liječenje ugriza zmija iz porodice *Crotalinae* pokazalo je da su svi ispitivani pripravci učinkovito i trajno obnovili koagulabilnost krvi kod većine pacijenata unutar 6 do 24 sata nakon primjene početne doze (Smalligan i sur., 2004). U drugom istraživanju primjenom dvaju protuotrova postignuti su slični rezultati u liječenju sistemskog otrovanja uzrokovanog vrstom *Echis ocellatus*, pri čemu je do trajne korekcije koagulopatije došlo već šest sati nakon liječenja, ali kod nešto manjeg postotka pacijenata (Abubakar i sur., 2010). Iako je vrijeme do poboljšanja variralo, normalizacija hemostatskih poremećaja općenito je nastupila unutar 24 sata. U slučajevima otrovanja europskim ljuticama, konjski F(ab')₂ protuotrov Viperfav brzo je poništio simptome ponovne koagulopatije nakon dodatne doze (Kurtović i sur., 2016). Također, pokazao se

učinkovitim u liječenju ugriza vrsta *Vipera berus* i *Vipera aspis*, pri čemu je normalizacija koagulacije postignuta već nakon jedne doze, bez ponovnih kliničkih ili laboratorijskih odstupanja (Jollivet i sur., 2015). Viperfav i African Antivipmyn pokazali su poboljšanja unutar 6–12 sati, a u nekim slučajevima čak i unutar 2–4 sata, dok je FAV-Africa riješio krvarenje u roku od 24 sata (Boels i sur., 2012; Chippaux i sur., 2007, 1999).

Protuotrovi temeljeni na ovčjim Fab fragmentima uglavnom se koriste za liječenje sistemskog otrovanja uzrokovanog europskim ljuticama (Karlson-Stiber i sur., 1997; Lamb i sur., 2017; Smith i sur., 1992), sjevernoameričkim čegrtušama (Boyer i sur., 1999; Ruha i sur., 2002) i pitonima (Al-Abdulla i sur., 2003; Meyer i sur., 1997). Zbog malih aktivnih spojeva koji brzo prolaze u ekstravaskularni prostor, njihov volumen distribucije je veći od onog kojeg iskazuju $F(ab')_2$ ili IgG protuotrovi što im omogućava gotovo trenutačnu eliminaciju toksina. Međutim, zbog brzog izlučivanja Fab fragmenti često u organizmu ne ostaju dovoljno dugo da bi neutralizirali otrov koji se naknadno apsorbira s mjesta ugriza (Scherrmann, 1994; Seifert i Boyer, 2001), a što rezultira ponovnom pojavom simptoma otrovanja. Fenomen je zabilježen u mnogim kliničkim studijama (Ariaratnam i sur., 1999; Boyer i sur., 1999; Dart i sur., 2001; Meyer i sur., 1997), i to s puno većom učestalošću češće nego kod druga dva tipa protuotrova (Abubakar i sur., 2010; Boels i sur., 2020; Cardoso i sur., 1993; Chippaux i sur., 2007; Ho i sur., 1990). Farmakokinetička analiza ViperATAb protuotrova pokazalo je da, iako Fab fragmenti mogu brzo sniziti razinu otrova, već nekoliko sati od njihove primjene opet dolazi do razvoja teške trombocitopenije koja se vremenski podudara s ponovnom pojavom toksina u cirkulaciji (Brvar i sur., 2017). Slično opažanje zabilježeno je u studiji određivanja terapijske doze protuotrova specifičnog za vrstu *Daboia russelli* (Ariaratnam i sur., 1999), kao i u studiji ispitivanja kliničke učinkovitosti CroTAb protuotrova (Boyer i sur., 1999). Njegovom upotrebom u početnoj fazi liječenja nastupilo je samo privremeno ublažavanje lokalnih simptoma otrovanja, s obzirom da je više od polovice uključenih pacijenata razvilo kasne, dugotrajne ili ponavljajuće poremećaje zgrušavanja krvi koji su trajali i do dva tjedna. Opažanje je u skladu s rezultatima Ruhe i suradnika (2002) koji su kod pacijenata liječenih CroFab protuotrovom također zabilježili samo privremeno poboljšanje – unatoč početnoj učinkovitosti, naknadno su se pojavili odgođeni poremećaji zgrušavanja krvi i teška trombocitopenija. Zaključeno je da kinetika *i.v.* primijenjenih Fab protuotrova vjerojatno bolje odgovara koncentraciji otrova u ranoj fazi trovanja, no

potpuno poboljšanje zahtijeva primjenu višestrukih doza (Ariaratnam i sur., 1999; Brvar i sur., 2017).

Posljedice kratkog zadržavanja Fab fragmenata u plazmi posebno su došle do izražaja u kliničkim ispitivanjima njihove usporedbe s $F(ab')_2$ protuotrovima (Ariaratnam i sur., 2001). Jedna doza PolongaTAb-a, razvijenog da posluži kao sigurnija i učinkovitija zamjena za prethodno korišteni $F(ab')_2$ protuotrov protiv ugriza Russellove ljutice, pokazala se dostatnom za trajnu uspostavu normalne koagulacije samo kod manjeg broja pacijenata. Kod većine bolesnika bile su potrebne dodatne doze kako bi se postigla potpuna kontrola koagulacijskih poremećaja i izbjeglo ponovno pogoršanje stanja. S druge strane, ispitanici liječeni $F(ab')_2$ protuotrovom su pokazali stabilizaciju koagulacijskih procesa već nakon jedne *i.v.* doze. Osim toga, primijećen je i raniji nestanak drugih simptoma otrovanja čime je potvrđena ne samo učinkovitost $F(ab')_2$ protuotrova, već i njegovo brzo djelovanje u otklanjanju svih znakova i simptoma otrovanja. Opisani rezultati su u skladu s drugim kliničkim istraživanjima. Boels i suradnici (2020) također su izvijestili o pacijentima liječenima Fab protuotrovom koji su češće trebali dodatne doze kako bi se održao njegov terapijski učinak. Osim toga, u Fab skupini je zabilježena i veća učestalost pogoršanja simptoma u usporedbi s onom koja je primila $F(ab')_2$ protuotrov. Prilikom praćenja kasne koagulopatije pokazalo se da je $F(ab')_2$ protuotrov znatno učinkovitiji u njenom sprečavanju, bez potrebe za dodatnim dozama. S druge strane, među pacijentima liječenima Fab protuotrovom u većoj mjeri je došlo do razvoja ozbiljnih kasnih komplikacija, uključujući krvarenje, povezanih s ponovnom pojavom toksičnih komponenti u krvotoku te padom broja trombocita i razine fibrinogena (Bush i sur., 2015). Prikupljeni nalazi naglašavaju važnost odabira protuotrova koji osigurava dugotrajniju zaštitu. Također, bez obzira na to koji se oblik IgG derivata primijeni, može se očekivati brzi odgovor na *i.v.* terapiju, osobito u akutnoj fazi otrovanja kada uslijed njene primjene gotovo trenutačno dolazi do normalizacije parametara zgrušavanja krvi (Boyer i sur., 2013). Međutim, upotreba Fab protuotrova koja sa sobom nosi rizik od odgođene ili ponovne pojave koagulacijskih poremećaja (Boyer i sur., 2013) ukazuje na važnost praćenja pacijenata i prilagođavanja terapije u kasnijim fazama otrovanja kako bi se izbjegle ozbiljne komplikacije koje se mogu javiti kada se čini da je stanje već stabilizirano.

2.3.3. Klinički ishod nakon *i.m.* primjene protuotrova

Za sada je dostupnost kliničkih istraživanja koja se bave *i.m.* primjenom protuotrova još uvijek vrlo ograničena. Posebno nedostaju studije usporedbe njegove učinkovitosti s uobičajenom *i.v.* primjenom. Praznina u znanstvenim spoznajama ostavlja mnoge stručnjake bez konkretnih smjernica, osobito u situacijama kada *i.v.* pristup nije odmah dostupan ili je otežan. Jedno od ranijih istraživanja pokazalo je da normalizacija poremećaja koagulacije uzrokovanog otrovom vrste *Ancistrodon rhodostoma* uslijed *i.m.* primjene specifičnog protuotrova u prosjeku nastupa nakon 18 sati (raspon 12–36 sati) (Reid i sur., 1963). Djelovanje *i.m.* protuotrova može se smatrati prilično sporim, osobito u usporedbi s *i.v.* primjenom kod koje se poboljšanje događa gotovo dvostruko brže, u rasponu od 2 do 18 sati (Reid i sur., 1963). Uočena razlika u brzini oporavka bi mogla imati kritičan utjecaj na pacijente jer sporiji odgovor na terapiju rezultira duljim razdobljem tijekom kojeg su izloženi riziku od razvoja ozbiljnih komplikacija. Važno je naglasiti da pri ocjeni učinkovitosti protuotrova ne treba gledati samo način njegove primjene, već i vrijeme koje je prošlo od ugriza do početka liječenja, a koje često igra ključnu ulogu u ishodu terapije jer brža intervencija može značajno povećati šanse za uspješan oporavak (Vázquez i sur., 2005). Kasni dolazak u bolnicu, i posljedično, odgoda u primjeni protuotrova, jedan je od najbitnijih čimbenika koji dovode do lošije prognoze s obzirom da povećava rizik od razvoja teških simptoma otrovanja s potencijalno smrtonosnim posljedicama (Ghalim i sur., 2000; Kalil i Fan, 2017; Krifi i sur., 1999; Nielsen i sur., 1978; Tibballs i sur., 2020; Win-Aung, 2001). Kako se ugrizi zmija najčešće događaju u ruralnim područjima udaljenima od zdravstvenih ustanova, *i.m.* primjena i dalje predstavlja opravdanu metodu liječenja. Iako je poznato da ima nepovoljniju farmakokinetiku u ranoj fazi otrovanja i izaziva bol prilikom aplikacije većih količina protuotrova, ipak može usporiti širenje otrova i spasiti život (WHO, 2010). Naime, pokazalo se da su žrtve ugriza Russellove ljutice, koje su na terenu primile *i.m.* protuotrov unutar dva sata od incidenta, pri dolasku u zdravstvenu ustanovu, a prije početka standardne *i.v.* terapije, imali više nego upola nižu razinu otrova u krvi u usporedbi s pacijentima koji nisu liječeni sve do hospitalizacije (Win-Aung, 2001). Nalaz snažno podupire važnost rane intervencije, čak i kada idealan oblik terapije nije dostupan, jer može značajno doprinijeti neutralizaciji cirkulirajućih toksina. Kao posljedica, broj pacijenata kod kojih su se razvili teži sistemski i biokemijski poremećaji bio je bitno

manji, a stopa smrtnosti niža što dodatno potvrđuje važnost pravovremene prve pomoći na terenu, posebno u uvjetima gdje je pristup bolničkoj skrbi otežan ili odgođen.

Jedan od protuotrova čija je *i.m.* primjena uvedena u praksu u skladu s nacionalnim smjernicama je specifični protuotrov protiv ugriza podvrste poskoka (*Vipera ammodytes ammodytes*), poznat i kao Antitoksin za otrov europskih zmija (konjski) (Zagreb protuotrov, Imunološki zavod d.d., Zagreb, Hrvatska). Klinički je djelotvoran protiv homolognog otrova, ali i protiv otrova nekoliko drugih medicinski važnih europskih zmija. Njegova efikasnost potvrđena je kroz više od 30 godina neprekidne uporabe u liječenju ugriza zmija poput *Vipera aspis* (Italija), *Vipera berus* (UK, Švedska), *Macrovipera lebetina* i *Montivipera xanthina* (Grčka, Turska) (Kurtović i sur., 2014). Unatoč dugogodišnjoj učinkovitosti i ulozi u spašavanju života, proizvodnja Zagreb protuotrova prekinuta je 2015. godine. U retrospektivnim studijama u kojima je korišten analizirano je više od 500 odraslih osoba (Lukšić i sur., 2006) i 160 djece (Karabuva i sur., 2016) kod kojih je klinička slika u većini slučajeva varirala od blage do teške. Gotovo svi pacijenti (99,7%) primili su imunoterapiju. Zabilježen je potpuni oporavak svih ispitanika, uz povlačenje simptoma i kliničkih znakova otrovanja još tijekom bolničkog liječenja. Kliničke manifestacije su u najvećem broju slučajeva bile povezane s hematotoksičnim djelovanjem zmijskog otrova, no pravovremena medicinska skrb i primjena protuotrova omogućile su uspješan ishod, čak i kod teže oboljelih pacijenata. Evidentiran je samo jedan smrtni slučaj, djeteta koje je bilo ugriženo izravno u predjelu vrata, što je rezultiralo izrazito teškim oblikom otrovanja. Lukšić i suradnici (2018) opisali su dva klinička slučaja umjerenog i teškog otrovanja uzrokovanih ugrizom podvrste *Vipera ammodytes ammodytes*. U oba slučaja, *i.m.* primjena protuotrova dovela je do značajnog i brzog poboljšanja zdravstvenog stanja pacijenata. Teška koagulopatija s izraženom trombocitopenijom povukla se unutar manje od tri sata, čak i kada je terapija započela s odgodom od 16 sati nakon ugriza. Nalaz pokazuje da, iako je pravovremena intervencija poželjna, primjena protuotrova i nakon dužeg vremenskog razdoblja može biti učinkovita u ublažavanju teških simptoma i poticanju bržeg oporavka, što može biti presudno za ishod liječenja. Nedavno je opisana prospektivna studija u kojoj su uspoređeni klinički učinci dvaju različitih protuotrova kod žrtava ugriza podvrste *Vipera ammodytes ammodytes*. Dio pacijenata liječen je *i.v.* paraspecifičnim protuotrovom ViperaTAb, a drugi *i.m.* Zagreb protuotrovom (Kurtović i sur., 2021). U studiji su

sustavno ispitane posljedice dvaju različitih terapijskih pristupa u liječenju, pri čemu su ispitanici imali usporedive koncentracije otrova u krvi te slične kliničke znakove i simptome u trenutku dolaska u bolnicu, prije primjene protuotrova. Pokazalo se da su oba načina liječenja bila jednako učinkovita, budući da nije bilo značajnih razlika u ishodima terapije, uključujući stopu preživljenja i duljinu boravka u bolnici. Bez obzira na to jesu li pacijenti primili protuotrov *i.m.* ili *i.v.*, spriječen je razvoj svih klinički značajnih komplikacija. Osobito je važno istaknuti da je uspješno zaustavljeno i normalizirano daljnje pogoršanje trombocitopenije. Jedina iznimka bila je neurotoksičnost na koju ViperaTAb nije djelovao, što je donekle bilo i očekivano s obzirom da ne sadrži antitijela usmjerena na neurotoksične komponente otrova poskoka.

U literaturi postoje i klinički dokazi učinkovitosti nekolicine drugih protuotrova protiv ugriza europskih otrovnica nakon *i.m.* primjene (Garkowski i sur., 2012; Iliev i sur., 2014), čime se dodatno naglašava njezin potencijal kao privremene, ali klinički vrijedne mjere prve pomoći. Trajanje hospitalizacije, kao još jedan pokazatelj učinkovitosti protuotrova, bilo je kraće kod pacijenata koji su prethodno primili *i.m.* terapiju u odnosu na one liječene isključivo *i.v.* putem (u prosjeku šest naspram osam dana) (Win-Aung, 2001). Stoga, pravovremena administracija protuotrova, čak i kada nije riječ o farmakokinetički najpovoljnijem načinu primjene, može pridonijeti bržem kliničkom oporavku i kraćem zadržavanju u bolnici. Dvije velike retrospektivne kliničke studije, koje su proučavale isključivo *i.m.* primjenu protuotrova u liječenju otrovanja uzrokovanog ugrizom podvrste *Vipera ammodytes ammodytes*, pokazale su da prosječno trajanje bolničkog liječenja iznosi između 3 i 13 dana, ovisno o težini kliničke slike (Karabuvu i sur., 2016; Lukšić i sur., 2006). Podudaran raspon trajanja hospitalizacije se postiže i s *i.v.* protuotrovom (Ariaratnam i sur., 2001; Boels i sur., 2012; Chippaux i sur., 1999; de Haro i sur., 2009; Isbister i sur., 2015; Meyer i sur., 1997; Ruha i sur., 2002), što sugerira da bi što brži početak terapije mogao biti kritičan za brzinu oporavka, neovisno o načinu davanja protuotrova, čime se dodatno naglašava važnost pravovremene intervencije i dostupnosti odgovarajuće terapije. Međutim, zmijski ugrizi se rijetko liječe *i.m.* primijenjenim protuotrovima. Stoga su za bolje razumijevanje njihovog potencijala i ograničenja korisne spoznaje proizašle iz istraživanja protuotrova protiv ugriza otrovnih pauka (Kalyan Kumar i sur., 2010; Sutherland i Trinca, 1978) i uboda škorpiona (Ghalim i sur., 2000) za koje se *i.m.* primjena često smatra sigurnijom opcijom, s manjim rizikom

od izazivanja alergijskih reakcija neposrednog tipa koje mogu ozbiljno ugroziti pacijenta (Isbister i sur., 2008). Ipak, rezultati njihove učinkovitosti u odnosu na način primjene još su uvijek prilično proturječni što dodatno otežava donošenje općih preporuka u kliničkoj praksi. Prema izvještaju koji opisuje četiri slučaja teškog otrovanja izazvanog ugrizom crvenoleđe udovice (*engl.* Red-back spider), primjena protuotrova *i.m.* putem rezultirala je slabim ili gotovo nikakvim kliničkim odgovorom. No, kada je pacijentima naknadno dana *i.v.* doza istog protuotrova, došlo je do značajnog poboljšanja te su se gotovo svi simptomi povukli unutar četiri do osam sati nakon primjene (Isbister, 2002), što upućuje na to da, iako *i.m.* primjena može biti korisna u određenim okolnostima, u težim slučajevima *i.v.* pristup predstavlja bolji izbor s obzirom da osigurava bržu i učinkovitiju neutralizaciju otrova te kraće vrijeme oporavka. Slično tome, u kliničkom ispitivanju procjene uspješnosti i sigurnosti novog konjskog $F(ab')_2$ protuotrova u liječenju latrodektizma, otrovanja izazvanog ugrizom crne udovice (*lat.* *Latrodectus*), klinički značajno smanjenje boli je postignuto već unutar 48 sati kod pacijenata koji su primili protuotrov *i.v.* putem, u usporedbi s onima koji su dobili placebo (Dart i sur., 2019). Time se dodatno potvrđuje važnost odabira optimalnog načina primjene lijeka u postizanju terapijskog učinka, osobito u slučajevima kada je bol glavni simptom koji značajno narušava kvalitetu života pacijenta.

S druge strane, u kliničkoj studiji koja je obuhvatila više od stotinu pacijenata s umjerenim do teškim oblikom latrodektizma, Isbister i suradnici (2008) nisu pronašli dovoljno izražene razlike između *i.m.* i *i.v.* primjene protuotrova koje bi opravdale prednost jedne metode nad drugom. Zaključili su da, unatoč razlikama u farmakokinetici, klinički ishod liječenja može biti podjednako učinkovit bez obzira na put primjene, što doprinosi većoj terapijskoj prilagodljivosti u hitnim okolnostima, osobito kada je dostupnost jedne od metoda ograničena. Oba terapijska pristupa pokazala su sličnu djelotvornost u ublažavanju boli već dva sata nakon primjene. Međutim, kod pacijenata koji su primili *i.m.* protuotrov uočeni su izraženiji pozitivni sistemski učinci, dok su oni liječeni *i.v.* putem u manjoj mjeri trebali dodatne doze, a učinak na ublažavanje boli kod njih se češće nastavio i 24 sata nakon započete terapije. Rezultati još jednog komparativnog ispitivanja išli su u korist *i.m.* primjene protuotrova jer je ona značajno smanjila bol kod žrtava ugriza crvenoleđe udovice već sat vremena nakon tretmana, što je osobito važno kada se nastoji što ranije pružiti olakšanje i poboljšati opće stanje

pacijenata. Takav brz i vidljiv učinak nije bio postignut nakon primjene *i.v.* protuotrova (Ellis i sur., 2005). Nakon 24 sata, promatrajući daljnji ishod liječenja, kod pacijenata koji su primili *i.m.* protuotrov nije uočeno značajno kliničko poboljšanje. Takav rezultat protumačen je kao posljedica sporije apsorpcije lijeka i njegove ograničene dostupnosti u organizmu tijekom ranih faza djelovanja. S druge strane, kod onih koji su primili *i.v.* protuotrov, klinička slika bila je značajno povoljnija, što ukazuje na bržu i učinkovitiju raspodjelu lijeka te bolji terapijski učinak u kratkom vremenskom okviru.

Ghalim i suradnici (2000) su pokazali brzo djelovanje *i.m.* primijenjenog protuotrova u suzbijanju simptoma otrovanja izazvanog ubodom škorpiona. Terapija je rezultirala smanjenjem koncentracije otrova u krvi u usporedbi s neliječenom skupinom, što ukazuje na uspješnu neutralizaciju toksina. Osim toga, već tri sata nakon primjene uočeno je značajno ublažavanje lokalnih simptoma poput boli, otoka i crvenila, što dodatno potvrđuje prednost ovog oblika liječenja u akutnim situacijama. Međutim, farmakokinetička analiza *i.m.* protuotrova protiv ugriza udovice pokazala je da u krvi njegove koncentracije ostaju nedetektabilne barem pet sati nakon tretmana. Nasuprot tome, nakon *i.v.* infuzije, mjerljive koncentracije protuotrova u sustavnoj cirkulaciji pojavile su se već 30 minuta nakon završetka primjene (Isbister i sur., 2007). Rezultat ukazuje na sporiju apsorpciju *i.m.* protuotrova, što može utjecati na brzinu početka djelovanja lijeka, posebno u hitnim situacijama gdje je brzo suzbijanje otrova ključno za uspješan ishod liječenja. Također je u skladu s ostalim nalazima koji su pokazali da *i.v.* primjena protuotrova omogućava brzo uklanjanje otrova škorpiona iz krvi, dok *i.m.* primjena ne utječe značajno na njegovu razinu u plazmi, s obzirom da se smanjivala tijekom sljedećih šest sati gotovo istom brzinom kao kod pacijenata koji nisu primili terapiju (Krifi i sur., 1999). Potpuno uklanjanje otrova iz krvi postignuto je tek nakon dodatne *i.v.* doze, što naglašava važnost pravilnog odabira načina primjene protuotrova, osobito u hitnim slučajevima kada je ključno brzo djelovanje radi sprječavanja daljnjih komplikacija otrovanja. Iako se *i.v.* primjena protuotrova smatra poželjnijom zbog bolje usklađenosti s farmakokinetikom otrova, *i.m.* primjena se i dalje koristi u praksi, a njihova usporediva učinkovitost još nije dovoljno objašnjena. Za donošenje jasnog zaključka o optimalnom načinu primjene potrebna su detaljna pretklinička istraživanja koja bi usporedila sve formate protuotrova i njihovu farmakokinetiku u različitim modelima i relevantnim tkivnim sustavima.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Životinje za *in vivo* testove

U istraživanju je korišteno 20 ovaca, 4 zamorčića i 60 miševa (Tablica 1).

Tablica 1. Vrsta, pasmina/soj i broj životinja korištenih u istraživanju.

Vrsta životinje	Pasmina/soj životinje	Broj životinja
ovca	križana pramenka	20
zamorčić	CrI:(HA)BR	4
miš	NIH Ola/Hsd	60

Pokuse je odobrilo Etičko povjerenstvo Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilište u Zagrebu (URBROJ: 251-58-10617-24-30) i Ministarstvo poljoprivrede RH, Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane (URBROJ: 525-10/1338-21-5) čije se odobrenje temeljilo na pozitivnom mišljenju Nacionalnog etičkog povjerenstva (EP 315/2021). Svi predviđeni protokoli za *in vivo* eksperimente su usklađeni sa smjernicama ARRIVE 2.0 (Percie Du Sert i sur., 2020), nacionalnom legislativom (Zakon o zaštiti životinja NN 102/17, 32/19; Pravilnik o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe NN 55/13) i EU Direktivom (2010/63/EU).

3.1.1.1. Ovce

Istraživanje je provedeno na ukupno 20 ovaca križane pasmine pramenka (4 ovce u preliminarnoj fazi istraživanja + 16 ovaca u glavnoj fazi istraživanja), prosječne tjelesne mase 50 kg, nabavljenih s lokalnog obiteljskog gospodarstva Pokupec iz Križevaca (Tablica 1). Bile su smještene na Veterinarskom fakultetu, Heinzelova 55, 10 000 Zagreb (broj registracije: HR-POK-020) u obogaćenim ograđenim nastambama s dovoljno prostora da mogu ležati, preživati i slobodno se kretati. Imale su pristup vodi i hrani *ad libitum*. Cijeli prostor imao je čvrsti pod prekriven slamom, ventilacijski sustav s temperaturom od 18–21 °C, relativnom vlagom od 30–50%, uz minimalno 6 sati mraka. Uzorkovanje limfe i krvi se provodilo na Klinici za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju

Veterinarskog fakulteta u Zagrebu. Životinje korištene za uzorkovanje limfe bile su u eksperimentu 6 sati, a one za uzorkovanje krvi 2 tjedna, tijekom kojih su bile pomno praćene pomoću obrasca za kliničku procjenu, uz česte provjere ponašanja, tjelesne mase i vitalnih funkcija, kao i znakova nelagode zbog razvoja edema interdigitalnog prostora kod testnih skupina. Nakon aplikacije otrova ovce su bile podvrgnute veterinarskom zdravstvenom nadzoru s obzirom na očekivani razvoj težih kliničkih simptoma koji je u konačnici izostao uslijed liječenja protuotrovom. Njihov oporavak je bio potpun, bez komplikacija i promjena u ponašanju ili bilo kojem drugom simptomu koji bi upućivao na bol.

3.1.1.2. Biološki modeli ispitivanja

Za određivanje letalne toksičnosti otrova su korišteni odrasli srođeni miševi ($n = 60$) soja NIH Ola/Hsd, mužjaci i ženke, mase od 18 do 20 g, uzgojeni u Imunološkom zavodu d.d., Zagreb (Tablica 1). Tijekom eksperimenta miševi su bili smješteni u registriranoj nastambi Imunološkog zavoda, gdje su imali neograničen pristup hrani i vodi. Za pripravu specifičnih seruma su korišteni zamorčići ($n = 4$) soja Crl:(HA)BR, mase 250–350 g, uzgojeni u nastambi Odjela za proizvodnju antiseruma i uzgoj pokusnih životinja Imunološkog zavoda d.d. (broj registracije: HR-POK-17) (Tablica 1). Životinje su držane u zajedničkom standardiziranom kavezu uz svakodnevno osiguranje sijena (za skrivanje i igru te nadoknadu vlaknaste hrane u prehrani) i obogaćivanje okoliša (Tapvei, Estonija). Kavez je bio smješten u ventiliranoj prostoriji, na temperaturi od 22 ± 3 °C i vlažnosti od $55 \pm 5\%$, s ciklusom osvjetljenja 12/12 sati. Životinjama je bio omogućen pristup standardiziranoj prehrani (Mucedola Srl., Italija) i vodi *ad libitum*.

3.1.2. Reagensi i kemikalije

Suhi otrov podvrste poskoka *Vipera ammodytes ammodytes* (Vaa) dobiven je mužnjom zmija s područja Slunja (Imunološki zavod d.d., Hrvatska), osušen u eksikatoru na sobnoj temperaturi i čuvan u tami na 4 °C do upotrebe. Rekombinantni amoditoksin (Atx) je pripremljen u Institutu Jožef Stefan, Ljubljana. Antitoksin za otrov europskih zmija (konjski) (serijski broj 190/2) proizveden je u Imunološkom zavodu d.d., Hrvatska.

U istraživanju smo koristili sljedeće kemikalije:

albumin iz goveđeg seruma (BSA) (Sigma-Aldrich, SAD), antiseptik (Skin-Des[®], Antiseptica d.o.o., Hrvatska), anti-konjski IgG konjugiran s peroksidazom iz hrena (anti-konjski IgG-HRP) (Sigma-Aldrich, SAD), anti-zamorački IgG konjugiran s peroksidazom iz hrena (anti-zamorački IgG-HRP) (Sigma-Aldrich, SAD), anti-konjski F(ab')₂ (anti-konjski F(ab')₂ IgG-HRP) (Antibodies Online, Njemačka), anti-ovčji IgG konjugiran s peroksidazom iz hrena (anti-ovčji IgG-HRP) (Antibodies Online, Njemačka),

betadin (Betadine 10%-tna otopina za kožu, Alkaloid d.o.o., Hrvatska), bupivakain (Levobupivakain Kabi 5 mg / mL, Fresenius Kabi d.o.o., Hrvatska),

diazepam (Diazepam Alkaloid[®] 10 mg / 2 mL, ALKALOID-INT d.o.o., Slovenija),

cefazolin (Cefazolin Sandoz 1 g / 15 mL, Sandoz d.o.o., Hrvatska), Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma-Aldrich, SAD),

dinatrijev hidrogenfosfat (Merck, Njemačka),

embutramid (T61, Intervet International BV Boxmeer, Nizozemska),

fentanil (Fentanyl[®] 50 µg / mL, Piramal Critical Care B.V., Nizozemska), fentanilski flaster (DUROGESIC transdermalni flaster 75 µg / h, Johnson & Johnson S.E. d.o.o., Hrvatska),

glicerol (Kemika, Hrvatska),

izofluran (Isoflurin[®] 1000 mg / g, VETPHARMA ANIMAL HEALTH, S.L., Španjolska),

kalijev dihidrogenfosfat (Kemika, Hrvatska), kalijev klorid (Kemika, Hrvatska), ketamin (Ketamidol, VetViva Richter GmbH, Austrija), kloridna kiselina (Kemika, Hrvatska), kristaloidna otopina (Plasma Lyte 148 Viaflo, Baxter, Slovenija), ksilazin (Xylazine 20 mg / mL, Alfasan International B.V., Nizozemska),

lidokain (LIDOKAIN sprej 100 mg / mL, Belupo, Hrvatska), limunska kiselina monohidrat (Kemika, Hrvatska),

meloksikam (Meloxidolor 5 mg / mL, Le Vet. Beheer B.V., Nizozemska), mPAGE MES SDS Running Buffer Powder (Merck Millipore, Njemačka), metilensko modrilo

(LazuLymph S.A.L.F. 2.5%, Salf S.p.A., Italija), Montanide ISA 206 i ISA 720 (Seppic, Francuska),

natrijev dihidrogenfosfat monohidrat (VWR Chemicals BDH[®], UK), natrijev hidrogenkarbonat (Kemika, Hrvatska), natrijev karbonat (Kemika, Hrvatska), natrijev klorid (Merck, Njemačka), natrijev klorid (0,9%) (B. Braun Adria d.o.o., Hrvatska), NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen, SAD),

o-fenilendiamin dihidroklorid (OPD) (Sigma-Aldrich, SAD), ovalbumin (Serva, Njemačka),

pentobarbital (Euthasol 400 mg / mL, GENERA d.d., Hrvatska), Plivasept pjenušavi (PLIVA[®]sept pjenušavi 4,5%, Pliva, Hrvatska),

Ringerova laktatna izotonična otopina (Ringerov laktat Fresenius Kabi, Fresenius Kabi d.o.o., Hrvatska),

sumporna kiselina (Kemika, Hrvatska),

timerosal (Sigma-Aldrich, SAD), tiopental (Thiopental VUAB 1 g, VUAB Pharma Inc., Češka), Tris(hidroksimetil)aminometan (Tris) (Sigma-Aldrich, SAD), Tween 20 (Sigma-Aldrich, SAD),

vodikov peroksid (Kemika, Hrvatska)

3.1.3. Puferi

Puferi za kromatografiju su pripremljeni u vodi tipa I i profiltrirani kroz 0,45 µm filter (Millipore, SAD).

puferi za HPLC pročišćavanje na HiTrap MabSelect Xtra koloni

pufer za vezanje

$m(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,23 \text{ g} / 1 \text{ L}$

$m(\text{NaH}_2\text{PO}_4) = 0,04 \text{ g} / 1 \text{ L}$

$m(\text{NaCl}) = 8,77 \text{ g} / 1 \text{ L}$

pH = 7,4

pufer za eluiranje

$$m (\text{limunska kiselina} \times \text{H}_2\text{O}) = 21 \text{ g} / 1 \text{ L}$$

$$\text{pH} = 2,3$$

puferi za ELISA-u

karbonatni pufer

$$m (\text{NaHCO}_3) = 0,29 \text{ g} / 100 \text{ mL}$$

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

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

20 × PBST

$$m (\text{NaCl}) = 160 \text{ g} / 1 \text{ L}$$

$$m (\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 22 \text{ g} / 1 \text{ L}$$

$$m (\text{KCl}) = 4 \text{ g} / 1 \text{ L}$$

$$m (\text{KH}_2\text{PO}_4) = 4 \text{ g} / 1 \text{ L}$$

$$m (\text{timerosal}) = 2 \text{ g} / 1 \text{ L}$$

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

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

pufer za blokiranje

$$2\% (\text{w} / \text{V}) \text{ BSA u PBST-u}$$

pufer za blokiranje/inkubacijski pufer

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

citrat-fosfatni pufer

$$m (\text{limunska kiselina} \times \text{H}_2\text{O}) = 1,03 \text{ g} / 100 \text{ mL}$$

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

pH = 5,0

3.1.4. Kromatografske kolone

Od kolona smo koristili:

HiTrap MabSelect Xtra kolona (1 mL) (GE Healthcare, SAD)

3.1.5. Oprema

Od opreme smo koristili sljedeće uređaje:

kromatografski sustav

ÄKTA (GE Healthcare, SAD)

uređaji za pripremu pročišćene vode

PURELAB Classic, voda tipa I (Elga LabWater, UK)

PURELAB Pulse, voda tipa II (Elga LabWater, UK)

vage

Cubis analitička vaga (Sartorius Lab Instruments GmbH & Co., Njemačka)

Tehnica tehnička vaga (Tehco, Slovenija)

perač mikrotitracijskih pločica

Inteliwasher 3D-IW8 (Biosan SIA, Latvija)

centrifuga

5810 R (Eppendorf, Njemačka)

inkubator

Memmert (Njemačka)

spektrofotometar

Synergy HTX S1 LFA (BioTek Instruments Inc., SAD)

sustav za elektroforezu

Electrophoresis Power Supply EV233 (Consort, Belgija)

Xcell SureLock Mini-Cell sustav (Invitrogen, SAD)

anesteziološki aparat i monitor

Datex-Ohmeda Aespire View (Datex-Ohmeda Inc., SAD)

CARESCAPE Monitor B650 (GE Healthcare, Finland Oy, Finska)

uređaji za analizu hematoloških i koagulacijskih parametara

CELL-DYN Ruby Hematology Analyzer (Abbott, SAD)

Multiplate Analyzer (Roche, Njemačka)

BCS XP (Siemens Healthineers, Njemačka)

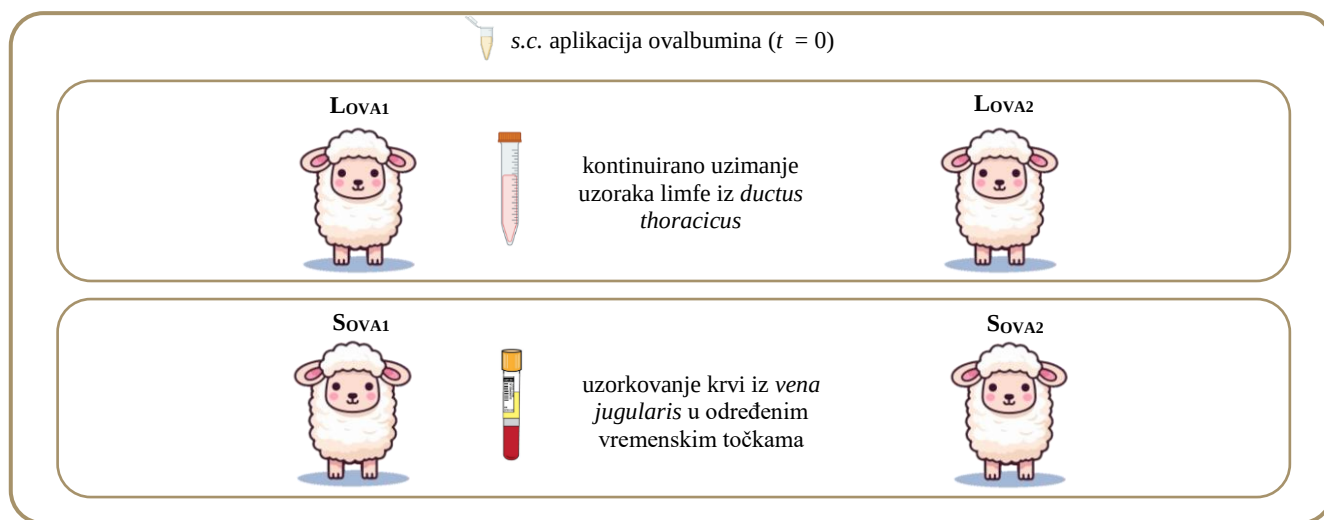
3.2. Metode

3.2.1. Eksperimentalni dizajn

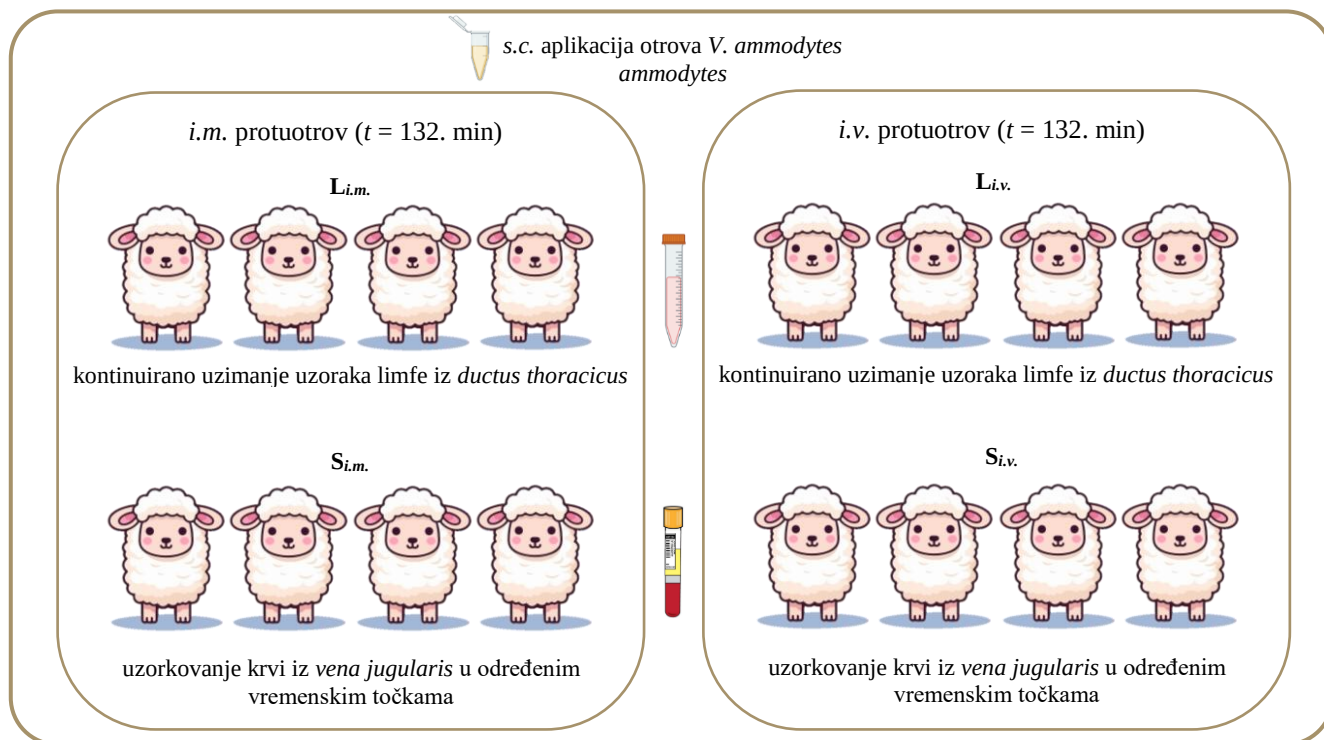
U preliminarnoj fazi istraživanja je uspostavljen ovčji eksperimentalni model kako bi se stekla praksa u izvođenju procedura i kirurških tehnika za uzorkovanje krvi, odnosno limfe. Životinje su bile podijeljene u 2 grupe od po 2 jedinke (ukupno 4 ovce – 2 za uzorkovanje limfe i 2 za uzorkovanje krvi) (Tablica 2), a svaka je supkutano (s.c.) primila injekciju otopine ovalbumina kao modelnog proteina. U glavnoj, "rescue-type" fazi istraživanja, otrovanje je izazvano s.c. aplikacijom *Vaa* otrova. Životinje su bile podijeljene u 2 grupe od po 8 jedinki (ukupno 16 ovaca – 8 za uzorkovanje limfe (podijeljene u grupe $L_{i.v.}$ i $L_{i.m.}$) i 8 za uzorkovanje krvi (podijeljene u grupe $S_{i.v.}$ i $S_{i.m.}$)) (Slika 3). Liječenje se provodilo Antitoksinom za otrov europskih zmija koji se primjenjivao intramuskularno (*i.m.*) u stražnju lijevu nogu tj. istu nogu gdje je bio apliciran i otrov zbog brže limfne drenaže (ukupno 8 ovaca – 4 za uzorkovanje limfe (grupa $L_{i.m.}$) i 4 za uzorkovanje krvi (grupa $S_{i.m.}$)), odnosno intravenski (*i.v.*) kao infuzija kroz 30 minuta u prednju nogu u sagitalnoj ravnini suprotnoj od one na kojoj je bio postavljen venski put za prikupljanje uzoraka krvi (ukupno 8 ovaca – 4 za uzorkovanje limfe (grupa $L_{i.v.}$) i 4 za uzorkovanje krvi (grupa $S_{i.v.}$)) (Slika 4).

Tablica 2. Predviđeni broj životinja podijeljenih u grupe ovisno o putu primjene ovalbumina, odnosno kombinacije otrova i protuotrova te tipu prikupljanog uzorka.

Eksperimentalni uzorak	Broj životinja		
	Ovalbumin (s.c.)	Otrov (s.c.) + protuotrov (i.v.)	Otrov (s.c.) + protuotrov (i.m.)
Krv	2	4	4
Limfa	2	4	4
Ukupno		20	



Slika 3. Životinje tretirane supkutano (s.c.) ovalbuminom bile su podijeljene u 2 grupe. Jedna grupa ($n = 2$) korištena je za uzorkovanje limfe (grupa LOVA1 i LOVA2). Druga polovica korištena je za uzorkovanje krvi (grupa SOVA1 i SOVA2).



Slika 4. Životinje tretirane otrovom bile su podijeljene u 2 grupe, ovisno o načinu davanja protuotrova. U jednoj grupi ($n = 8$) protuotrov je primijenjen kao intramuskularni (*i.m.*) bolus. U drugoj grupi ($n = 8$) protuotrov je primijenjen kao intravenska (*i.v.*) infuzija tijekom 30 minuta. U svakoj grupi polovica životinja korištena je za uzorkovanje limfe (grupe *L_{i.m.}* i *L_{i.v.}*). Druga polovica korištena je za uzorkovanje krvi (grupe *S_{i.m.}* i *S_{i.v.}*).

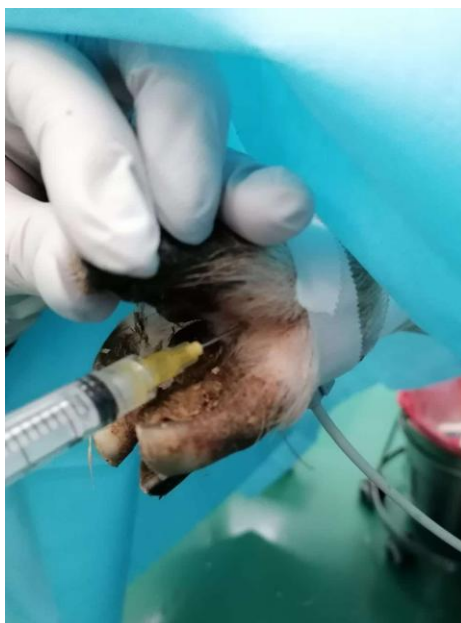
3.2.2. Priprema i aplikacija ovalbumina, otrova i protuotrova

Otopina ovalbumina je pripremljena u 0,9%-tnom NaCl-u u koncentraciji 10 mg / mL, a zatim profiltrirana kroz 0,22 μm filter (TPP, Švicarska) i s.c. primijenjena u interdigitalni prostor stražnje lijeve noge svake od 4 ovce u dozi od 30 mg. Otopina *Vaa* otrova pripremljena je u 0,9%-tnom NaCl-u u koncentraciji 10 mg / mL, a zatim profiltrirana kroz 0,22 μm filter (TPP, Švicarska). Primijenjena je s.c. u interdigitalni prostor stražnje lijeve noge svake ovce iz "rescue-type" faze istraživanja u dozi od 20 mg (Slika 5), što je prosječna količina suhog (dehidriranog) otrova dobivena mužnjom odrasle jedinke zmije. Kao što je određeno testom letalne toksičnosti opisanog u poglavlju 3.2.2.1., 20 mg otrova sadrži 1942 LD₅₀ doza. Antitoksin za otrov europskih zmija (konjski) (Imunološki zavod d.d., Hrvatska) primijenjen je 132 minute nakon otrovanja u

dozi od 400 mg, a koja je dovoljna za zaštitu od 1947 LD₅₀ doza *Vaa* otrova, čime je osigurana njegova potpuna neutralizacija i uklonjen rizik od letalne toksičnosti.

3.2.2.1. Test letalne toksičnosti

Letalna toksičnost *Vaa* otrova ispitana je *in vivo* testom letalne toksičnosti koji se izvodi na miševima. Binarna serijska razrjeđenja otopine otrova poznate koncentracije, priređena u 0,15 M NaCl-u, aplicirana su intravenski ($V = 0,25$ mL) u 3 grupe po 6 miševa. Svaka životinja je primila približno 3 srednje letalne doze (*engl.* median lethal dose; LD₅₀) otrova, pri čemu jedna predstavlja onu količinu suhe tvari (u μ g) koja uzrokuje uginuće 50% miševa u testiranoj populaciji. Iz broja preživjelih životinja nakon 24 h određen je Tv faktor. Tv faktor je stvarni broj LD₅₀ doza apliciranih po mišu određen iz broja preživjelih jedinki koje su primile niz koncentracija otrova podešenih da pokrivaju uski raspon oko njegove deklarirane toksičnosti (oko 3 LD₅₀). Eksperiment je ponovljen tri puta, a rezultat je izražen kao srednja vrijednost.



Slika 5. Intradigitalna aplikacija otrova poskoka.

3.2.3. Anestezija i kirurški protokol za uzorkovanje limfe

3.2.3.1. Anesteziološki protokol

Ovcama je uskraćena hrana 12 sati prije anestezije, uz slobodan pristup vodi. Sedirane su *i.m.* aplikacijom kombinacije ksilazina (Xylazine 20 mg / mL, Alfasan International B.V., Nizozemska) u dozi 0,1 mg / kg i ketamina (Ketamidol, VetViva Richter GmbH, Austrija) u dozi 7,5 mg / kg, te su podvrgnute pripremi za operaciju (priprema operacijskog polja s desne strane prsnog koša – uklanjanjem runa uz pranje i dezinfekciju kože). Nakon smještaja u operacijsku dvoranu, postavljanja im je *i.v.* kanila (Vasofix® Certo 20G, 1,1 × 33 mm, B. Braun Melsungen AG, Njemačka) u cefaličnu venu (lat. *vena cephalica antebrachii*) te je indukcija u anesteziju obavljena primjenom fentanila (Fentanyl® 50 µg / mL, Piramal Critical Care B.V., Nizozemska) u dozi 2 µg / kg, diazepama (Diazepam Alkaloid® 10 mg / 2 mL, ALKALOID-INT d.o.o., Slovenija) u dozi 0,25 mg / kg i tiopentala (Thiopental VUAB 1 g, VUAB Pharma Inc., Češka) u dozi 3,1 mg / kg.

Ovce su zatim intubirane endotrahealnim tubusom (ETT) (VentiSeal™, Flexicare Medical Limited, UK) (10 mm unutarnjeg promjera) tijekom kirurške faze anestezije. Životinje su postavljene u lijevi bočni položaj na operacijski stol i spojene na anesteziološki aparat (Datex-Ohmeda Aespire View, Datex-Ohmeda Inc., SAD) (Slika 6). Intraoperacijska anestezija održavana je udisanjem smjese kisika i inhalacijskog anestetika izoflurana (1,5-2%) (Isoflurin® 1000 mg / g, VETPHARMA ANIMAL HEALTH, S.L., Španjolska) uz mehaničku ventilaciju pluća, a kontinuirana infuzija opioidnog analgetika fentanila (Fentanyl® 50 µg / mL, Piramal Critical Care B.V., Nizozemska) u dozi 0,1-0,2 µg / kg / min omogućila je dodatnu analgeziju. Ringerova otopina (Ringerov laktat Fresenius Kabi, Fresenius Kabi d.o.o., Hrvatska) primijenjena je putem *i.v.* kanile tijekom operacije brzinom od 10 mL / kg / min. Praćeni su vitalni znakovi (EKG, pulsna oksimetrija, kapnografija, arterijski krvni tlak) putem anesteziološkog monitora (CARESCAPE Monitor B650, GE Healthcare, Finland Oy, Finska) i konstantna tjelesna toplina održavana je metodom aktivnog zagrijavanja pacijenta tijekom cijelog postupka (3M™ Bair Hugger™, SAD). Osim toga, provodilo se i uzorkovanje arterijske krvi postavljanjem arterijske kanile (Delta Ven® 22G, 1,1 × 32mm (Delta Med S.p.A, Italija) u desnu srednju ušnu arteriju za mjerenje plinova u krvi

te venske krvi za određivanje elektrolita. Antibiotik cefazolin (Cefazolin Sandoz 1 g / 15 mL, Sandoz d.o.o., Hrvatska) u dozi 22 mg / kg primjenjivan je profilaktički i.v. svakih 90 minuta samo tijekom operacije.



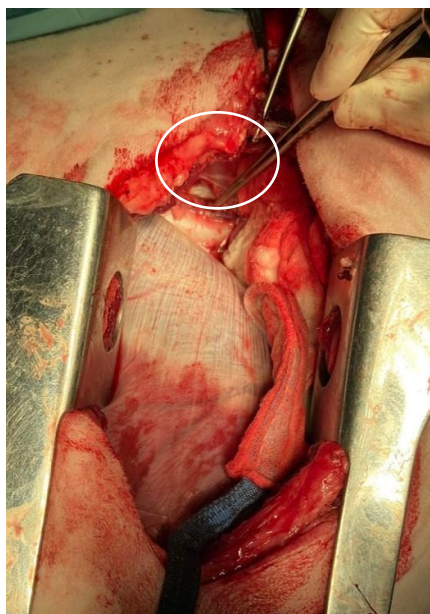
Slika 6. Ovca u općoj inhalacijskoj anesteziji, postavljena u lijevi bočni položaj.

3.2.3.2. Kirurški zahvat i uzorkovanje limfe

Operacijsko polje je dezinficirano korištenjem antiseptičkog sredstva (PLIVA®sept pjenušavi 4,5%, Pliva, Hrvatska). Učinjena je interkostalna torakotomija u osmom međurebrenom prostoru s desne strane. Otopina metilenskog modrila (LazuLymph S.A.L.F. 2,5%, Salf S.p.A., Italija) primijenjena je u stražnju lijevu nogu kako bi se vizualizirao prsni limfovod (lat. *ductus thoracicus*) (Slika 7a). Odmah nakon njegove lokalizacije, uzet je kontrolni uzorak limfe, nakon čega je aplicirana otopina ovalbumina, odnosno otrova. Tijekom sljedeća 4 sata kod ovaca kojima je apliciran ovalbumin, tj. 6 sati kod ovaca kojima je apliciran otrov, limfa je uzorkovana kontinuiranom aspiracijom pomoću šprice od 10 mL (BD Luer-Lok™, Belgija) (Slika 7b) u zasebne epruvete od 15 mL (Sarstedt, Njemačka) koje su se mijenjale svakih 4-10 minuta, ovisno o brzini protoka. Volumen sakupljene limfe zamijenjen je s kristaloidnom otopinom (Plasma Lyte 148 Viaflo, Baxter, Slovenija). Ovcama koje su primile ovalbumin na kraju zahvata podvezan je prsni limfovod i zatvoren interkostalni

torakotomijski rez primjenom produžnog šava poliglikonom debljine USP 0 (Maxon™ 0, Covidien, SAD), a mišići stijenke prsnog koša poliglikonom debljine USP 2-0 (Maxon™ 2-0, Covidien, SAD). Interkostalni blok učinjen je primjenom bupivakaina (Levobupivakain Kabi 5 mg / mL, Fresenius Kabi d.o.o., Hrvatska) u području dva interkostalna živca kranijalno te dva interkostalna živca kaudalno od mjesta reza. Na kraju, potkožje je zatvoreno produžnim šavom poliglikonom debljine USP 2-0 (Maxon™ 2-0, Covidien, SAD), a koža pojedinačnim čvorastim šavom primjenom najlonskog konca debljine 2-0 (Dermalon™ 2-0, Covidien, SAD).

a)



b)



Slika 7. Uzorkovanje limfe. Prsni limfovod je ispunjen metilenskim modrilom (a) što je olakšalo njegovu vizualizaciju i uzorkovanje limfe aspiracijom pomoću šprice (b).

3.2.3.3. Postoperativni postupak

Zdravstveni status životinja koje su primile ovalbumin ($n = 2$) praćen je češće tijekom prvih 6 sati nakon kirurškog zahvata, a zatim svakih 6 sati. Po potrebi je primijenjena dodatna analgezija. Omogućena je s.c. primjenom fentanilskog flastera (DUROGESIC 75 μg / h transdermalni flaster, Johnson & Johnson S.E. d.o.o., Hrvatska) u dozi 75 μg / kg i nesteroidnog protuupalnog lijeka meloksikama (Meloxidolor 5 mg / mL, Le Vet. Beheer B.V., Nizozemska) u dozi 0,1 mg / kg tijekom 5 dana. Za procjenu

jačine boli, patnje ili distresa korištena je standardizirana ljestvica boli (*engl.* Sheep Grimace Scale; SGS) (Häger i sur., 2017). Nakon 7 dana oporavka na Veterinarskom fakultetu ovce su vraćene vlasniku. Životinje koje su primile otrov ($n = 8$) po završetku kirurškog zahvata žrtvovane su sredstvom za eutanaziju životinja (T61, Intervet International BV Boxmeer, Nizozemska) jer je kod njih trajanje anestezije premašilo prag sigurne podnošljivosti. Stoga je procijenjeno da bi postoperativne komplikacije otežale ili potpuno onemogućile njihov oporavak.

3.2.4. Protokol uzorkovanja krvi

3.2.4.1. Postavljanje venskog puta

Za uzorkovanje krvi, ovcama se postavio i fiksirao venski put u jugularnu venu (*lat. vena jugularis*). Na mjestu postavljanja aplicirao se lidokain u spreju (LIDOKAIN 100 mg / mL sprej, Belupo, Hrvatska). Područje jugularnog žlijeba obrijano je aparatom za šišanje te dezinficiran antiseptikom za kožu (Skin-Des[®], Antiseptica d.o.o., Hrvatska) i betadinom (Betadine 10%-tna otopina za kožu, Alkaloid d.o.o., Hrvatska) poštivajući pravila asepsa i antiseptice. Nakon umetanja jedne, odnosno dvije *i.v.* kanile (Delta Ven[®] 20G, 1,1 × 32mm, Delta Med S.p.A, Italija), ovisno o načinu primjene protuotrova, fiksirane su s tri pojedinačna čvorasta šava primjenom neresorptivnog sintetičkog monofilamentnog konca debljine 3-0 (Dafilon[®] 3-0, B. Braun Surgical, S.A., Španjolska). Uzorci krvi su prikupljeni iz jugularne vene u epruvete od 8,5 mL (BD Vacutainer[®] SST[™] II Advance, UK) u određenim vremenskim točkama. Kanile su provjeravane svaki dan, a nakon 3. dana su izvađene i učinjena je toaleta rane.

3.2.4.2. Uzorkovanje krvi za farmakokinetička mjerenja

Nulti uzorak je uzet prije primjene otrova. Po njegovoj aplikaciji ($t = 0$) krv je skupljana u kratkim intervalima tijekom prvog sata, a zatim svakih 15 minuta do primjene protuotrova ($t = 132$ min) (Tablica 3). Zatim su intervali uzorkovanja ponovno skraćeni da bi progresivno postajali sve dulji tijekom sljedećih 6 sati. Uzorci su također prikupljeni 12, 18 i 24 sata po aplikaciji otrova i svakodnevno sljedećih 13 dana. Posljednji prikupljeni uzorak korišten je za mjerenje koncentracije anti-antivenom IgG-a (odnosno

antitijela IgG klase specifičnih za konjske F(ab')₂ fragmente) u uzorcima seruma ovaca tretiranih otrovom i podvrgnutih terapiji protuotrovom.

Tablica 3. Protokol uzorkovanja krvi iz jugularne vene za farmakokinetička mjerenja po aplikaciji otrova tijekom prvog dana s vremenskim točkama izraženima u satima, odnosno minutama unutar svakog sata.

Sati nakon aplikacije otrova	Minute nakon aplikacije otrova
1	2,5 / 5 / 7,5 / 10 / 15 / 20 / 30 / 40 / 50 / 60
2	75 / 90 / 105 / 120
3	135 / 140 / 145 / 150 / 160 / 170 / 180
4	190 / 205 / 220 / 235
5	250 / 280
6	310 / 340
7	370 / 400
8	430 / 460 / 490
12	720
18	1080
24	1440

3.2.4.3. Uzorkovanje krvi za hematološka mjerenja

Za praćenje hematoloških i koagulacijskih poremećaja izazvanih otrovanjem, osim uzoraka krvi za farmakokinetičku analizu, od svih ovaca uključenih u studiju iz jugularne vene su skupljani i dodatni za što su korištene epruvete s EDTA (BD Vacutainer® K2 EDTA (K2E), UK), odnosno natrijevim citratom (BD Vacutainer® Buffered Sodium Citrate (9NC, UK). Uzorci krvi su uzeti neposredno prije otrovanja te 0,5, 1, 1,5 i 2 sata po aplikaciji otrova, zatim svakih sat vremena sljedećih 5 sati, i dnevno tijekom jednog tjedna (Tablica 4). Odmah su dostavljeni i analizirani u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu, Petrova 3. Sve ovce ($n = 10$) kojima je prikupljena krv su preživjele i nakon uspješnog oporavka vraćene vlasniku.

Tablica 4. Protokol uzorkovanja krvi iz jugularne vene za praćenje krvnih poremećaja po aplikaciji otrova tijekom prvog dana s vremenskim točkama izraženima u satima, odnosno minutama unutar svakog sata.

Sati nakon aplikacije otrova	Minute nakon aplikacije otrova
1	30 / 60
2	90 / 120
3	180
4	240
5	300
6	360
7	420
24	1440

3.2.5. Uzorci krvi i limfe

Ukupno je prikupljeno 466 uzoraka limfe i 621 uzorak krvi za farmakokinetička mjerenja te 181 uzorak krvi za hematološka/koagulacijska mjerenja, uključujući i one uzete neposredno prije aplikacije ovalbumina, odnosno otrova (Tablica 5). Svakom uzorku limfe je prvo izmjeren i zabilježen volumen. Nastali ugrušci su uklonjeni centrifugiranjem u centrifugi 5810 R (Eppendorf, Njemačka) na $3000 \times g$ 10 min. Supernatanti su dekantirani i pohranjeni na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analize. Uzorci krvi su centrifugirani na $2000 \times g$ 10 min. Dobiveni serum su pohranjeni na -20°C do analize.

Tablica 5. Ukupan broj prikupljenih uzoraka krvi i limfe.

Eksperimentalni uzorak	Broj uzoraka
Krv	621 + 181
Limfa	466
Ukupno	1268

3.2.6. Priprava ovalbumin-specifičnih seruma i pročišćavanje IgG-a

3.2.6.1. Imunizacija životinja

Antitijela specifična za ovalbumin su bila potrebna kao reagens za uspostavu enzimskog imunotesta na čvrstoj fazi (*engl.* Enzyme Linked Immunosorbent Assay; ELISA) i njegovu kvantifikaciju u uzorcima seruma i limfe ovalbuminom-imuniziranih ovaca. Pripravljena su imunizacijom 4 zamorčića (soj CrI:(H)BR, masa 250 – 350 g) (Imunološki zavod d.d., Hrvatska). Protokol je uključivao 3 s.c. imunizacije s ovalbuminom (Serva, Njemačka) formuliranim u Montanide ISA 720 adjuvantu (Seppic, Francuska), a koje su provedene u razmacima od 28 dana (Tablica 6). U svakoj imunizaciji ovalbumin je apliciran u dozi od 50 µg u volumenu od 500 µL raspodijeljenom na dva mjesta u vratnom dijelu leđa. Dva tjedna nakon posljednjeg docjepljivanja životinje su iskrvarene kardijalnom punkcijom pod općom anestezijom, a zatim istim putem i eutanazirane (Euthasol 400 mg / mL, GENERA d.d., Hrvatska). Sakupljena krv je ostavljena da odstoji nekoliko sati na sobnoj temperaturi. Serumi su odijeljeni centrifugiranjem u centrifugi 5810 R (Eppendorf, Njemačka) na $2000 \times g$ 10 min.

Tablica 6. Protokol za imunizaciju zamorčića ovalbuminom.

Imunizacijski protokol			
primovakcinacija	1. docjepljivanje	2. docjepljivanje	totalno iskrvarenje
0. dan	28. dan	56. dan	70. dan

3.2.6.2. Određivanje količine anti-ovalbumin IgG-a u serumima ovalbuminom-imuniziranih zamorčića ELISA testom

ELISA za detekciju antitijela IgG klase specifičnih za ovalbumin provedena je oblaganjem mikrotitracijske pločice s 96 bazenčića (Costar, SAD) otopinom ovalbumina ($c = 1 \mu\text{g} / \text{mL}$) u 0,05 M karbonatnom puferu ($\text{pH} = 9,6$) ($100 \mu\text{L} / \text{jažici}$). Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi preko noći pločica je isprana 3 puta vodom tipa II, pripremljenom pomoću uređaja PureLab Pulse (Elga, UK), u peraču pločica (Biosan SIA, Latvija). Zatim je blokirana inkubacijskim puferom – 0,5%-tnom (m / V) otopinom

albumina iz goveđeg seruma (BSA) (Sigma-Aldrich, SAD) u PBST-u (pH = 7,4) (200 µL / jažici) tijekom najmanje 2 h na 37 °C u termostatu (Mettler, Njemačka). U idućem koraku u prethodno ispranu pločicu dodani su serumi nanešeni u početnom razrjeđenju 1:1 000 koji su potom serijski razrijeđeni s faktorom 3. Svaki je analiziran u duplikatu. Inkubacija se odvijala na sobnoj temperaturi preko noći nakon čega je u prethodno ispranu pločicu dodana otopina kunićjeg anti-zamoračkog IgG-a konjugiranog s peroksidazom iz hrena (*engl.* horse-radish peroxidase; HRP) (Sigma-Aldrich, SAD) (100 µL / jažici) pripremljena u inkubacijskom puferu u razrjeđenju 1:10 000. Inkubacija se odvijala 2 h na 37 °C. Nakon ispiranja uslijedio je korak polusatne inkubacije s *o*-fenilendiamin dihidrokloridom (OPD-om) (Sigma-Aldrich, SAD) ($c = 0,6 \text{ mg / mL}$) u citrat-fosfatnom puferu (pH = 5,0) s H₂O₂ (0,5 µL 30 %-tne (V / V) otopine / mL otopine OPD-a) (100 µL / jažici) na sobnoj temperaturi u tami. Po dodatku 12,5%-tne (V / V) otopine H₂SO₄ (50 µL / jažici) prekinuta je enzimska reakcija oksidacije OPD-a. Apsorbancija je mjerena na valnoj duljini od 492 nm ($A_{492 \text{ nm}}$) koristeći uređaj Synergy HTX S1 LFA (BioTek Instruments Inc., SAD).

Anti-ovalbumin IgG-i kvantitativno su određeni testom paralelnih pravaca (*engl.* parallel line assay) kojim se na temelju udaljenosti među pravcima dobivenima iz ovisnosti apsorbancija o razrjeđenju ispitivanih uzoraka, odnosno standarda izračunava vrijednost proizvoljnih jedinica po mL (PJ / mL). Kao standard je nasumično odabran jedan od seruma kojem je dogovorno dodijeljena vrijednost od 100 PJ / mL. Za pročišćavanje IgG-a odabran je serum s najvišim titrom ovalbumin-specifičnih antitijela.

3.2.6.3. Pročišćavanje IgG-a

3.2.6.3.1. Postupak izolacije afinitetnom kromatografijom

IgG-i iz zamoračkog seruma u kojem je izmjeren najviši titar ovalbumin-specifičnih antitijela pročišćeni su protein A afinitetnom kromatografijom na HiTrap MabSelect Xtra koloni (1 mL) (GE Healthcare, SAD). Na nosač je u svakoj od ukupno četiri provedene analize nanešeno po 2 mL uzorka prethodno razrijeđenog 2× s 20 mM fosfatnim puferom (pH = 7,4). Isti je korišten i kao pufer za vezanje. Protok je iznosio 1 mL / min. Vezani proteini (IgG-i) su eluirani s 0,1 M limunskom kiselinom (pH = 2,3)

(Kemika, Hrvatska). U svakom prikupljenom eluatu pH je vraćen na neutralnu vrijednost dodatkom odgovarajućeg volumena 1 M Tris-a (pH = 10,0) (Merck, SAD).

Eluati su objedinjeni u jedinstvenu IgG frakciju koja je zatim ultrafiltracijom u Vivacell centrifugalnoj jedinici s membranom veličine pora od 100 kDa (Sartorius, Njemačka) prebačena u 20 mM fosfatni pufer (pH = 7,4), matriks pogodniji za očuvanje stabilnosti tijekom dugotrajne pohrane, te ujedno koncentrirana otprilike 4×.

3.2.6.3.2. Karakterizacija pročišćenih IgG-a

Uzorku IgG-a pročišćenom iz zamoračkog seruma precizno je izmjerena koncentracija proteina spektrofotometrijskom metodom po Ehresmannu (Ehresmann i sur., 1973) primjenom sljedeće formule:

$$(A_{228,5 \text{ nm}} - A_{234,5 \text{ nm}}) \times 0,3175 \times \text{faktor razrjeđenja} = [\text{mg} / \text{mL}].$$

Pri tome je osigurano da izmjerene apsorbancije budu unutar raspona od 0,1 do 1 što predstavlja raspon u kojem je njihova ovisnost o mjenom parametru linearna. Prije alikvotiranja i pohrane na -20 °C čistoća uzorka IgG-a je provjerena SDS-PAGE analizom na NuPAGE Novex Bis-Tris gradijentnom gelu s 4-12% (*m / V*) umreženosti (Invitrogen, SAD) u mPAGE MES SDS puferu (Merck Millipore, Njemačka) pod nereducirajućim i reducirajućim uvjetima. Elektroforeza je provedena korištenjem Xcell SureLock Mini-Cell sustava prema uputi proizvođača (Invitrogen, SAD). Proteinske pruge su detektirane korištenjem 0,1%-tne (*m / V*) otopine za bojanje Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma-Aldrich, SAD).

3.2.7. Određivanje koncentracije ovalbumina u uzorcima seruma i limfe

ELISA za određivanje koncentracije ovalbumina u uzorcima seruma i limfe provedena je oblaganjem mikrotitracijske pločice (Costar, SAD) otopinom in-house kunićjeg anti-ovalbumin IgG-a (*c* = 5 µg / mL) u 0,05 M karbonatnom puferu (pH = 9,6) (100 µL / jažici). Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi preko noći pločica je isprana 3 puta vodom tipa II u peraču pločica te blokirana 2%-tnom (*m / V*) otopinom BSA u PBST-u (pH = 7,4) (250 µL / jažici) tijekom najmanje 4 h na 37 °C u termostatu. U idućem koraku u prethodno ispranu pločicu su dodana radna razrjeđenja uzoraka i standarda.

Radna razrjeđenja uzoraka limfe, odnosno seruma su pripremljena u 0,5%-tnoj (m/V) otopini BSA u PBST-u ($pH = 7,4$), tzv. inkubacijskom puferu, a prema očekivanim vrijednostima njihovih apsorbancija. Uzorci limfe su bili razrijeđeni od 1:2 do 1:2 000, a uzorci seruma 1:200. Svaki uzorak je u pločici dalje binarno razrijeđen. Usporedno s ispitivanim uzorcima na pločicu je u duplikatu nanesen i niz od 7 razrjeđenja standarda ($100 \mu L / \text{jažici}$) – otopine ovalbumina ($c = 1 \text{ mg} / \text{mL}$) (Serva, Njemačka). Niz koncentracija standarda je pripravljen serijskim razrjeđivanjem njegovog radnog razrjeđenja ($c = 5 \text{ ng} / \text{mL}$) s faktorom 2 u inkubacijskom puferu.

Inkubacija se odvijala na sobnoj temperaturi preko noći nakon čega je u prethodno ispranu pločicu prvo dodana otopina in-house zamoračkog anti-ovalbumin IgG-a ($c = 4 \text{ mg} / \text{mL}$), a zatim otopina kunićjeg anti-zamoračkog IgG-HRP-a (Sigma-Aldrich, SAD) obje u razrjeđenju 1:10 000 pripremljenom u inkubacijskom puferu. Svaka inkubacija se odvijala 2 h na 37°C uz međukorak ispiranja. Završni koraci izvedeni su kao što je opisano u poglavlju 3.2.6.2.

3.2.8. Određivanje koncentracije otrova u uzorcima krvi i limfe ELISA-om

ELISA za određivanje koncentracije otrova provedena je oblaganjem mikrotitracijske pločice (Costar, SAD) otopinom in-house kunićjeg anti-venom IgG-a ($c = 5 \mu \text{g} / \text{mL}$) u 0,05 M karbonatnom puferu ($pH = 9,6$) ($100 \mu L / \text{jažici}$). Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi preko noći pločica je isprana 3 puta vodom tipa II u peraču pločica te blokirana 2%-tnom (m/V) otopinom BSA u PBST-u ($pH = 7,4$) ($250 \mu L / \text{jažici}$) tijekom najmanje 4 h na 37°C u termostatu. U idućem koraku u prethodno ispranu pločicu su dodana radna razrjeđenja uzoraka i standarda.

Radna razrjeđenja uzoraka limfe, odnosno seruma su pripremljena u 0,5%-tnoj (m/V) otopini BSA u PBST-u ($pH = 7,4$), tzv. inkubacijskom puferu, a odabrana su prema očekivanim vrijednostima njihovih apsorbancija. Svako je nanešeno na pločicu u duplikatu ($100 \mu L / \text{jažici}$). Usporedno s ispitivanim uzorcima na pločicu je dodan i standard ($100 \mu L / \text{jažici}$) – otopina otrova ($c = 1 \mu \text{g} / \text{mL}$) (Imunološki zavod d.d., Zagreb), također u duplikatu. Niz koncentracija standarda je pripravljen serijskim razrjeđivanjem njegovog radnog razrjeđenja ($c = 15 \text{ ng} / \text{mL}$) s faktorom 1,5 u inkubacijskom puferu s odgovarajućim udjelom (V/V) limfe, odnosno seruma koji su

bili prikupljeni prije primjene otrova. Na taj način je postignuto da standard sadrži isti udio limfe/seruma kao i ispitivani uzorak, odnosno da su pripremljeni u identičnom matriksu. Iznimno, uzorci limfe, odnosno seruma s visokom koncentracijom otrova, a koje je bilo potrebno pripremiti u radnom razrjeđenju od 100 ili više puta, dodatno su u pločici binarno serijski razrijeđeni te analizirani u ukupno pet razrjeđenja. Niz koncentracija standarda je pripremljen binarnim serijskim razrjeđivanjem njegovog radnog razrjeđenja ($c = 20 \text{ ng / mL}$). Kao matriks za razrjeđivanje uzoraka i standarda je korišten inkubacijski pufer. Naime, pri velikim razrjeđenjima utjecaj limfe/seruma ne dolazi do izražaja. Uz ispitivane uzorke i standard u slobodne jažice je dodano i po 100 μL matriksa (inkubacijski pufer s odgovarajućim udjelom (V / V) limfe/seruma, odnosno sami inkubacijski pufer).

Inkubacija se odvijala na sobnoj temperaturi preko noći nakon čega je u prethodno ispranu pločicu prvo dodana otopina in-house konjskog anti-venom IgG-a ($c = 5,7 \text{ mg / mL}$) u razrjeđenju 1:1 000, a zatim otopina kunićjeg anti-konjskog IgG-HRP-a (Sigma-Aldrich, SAD) u razrjeđenju 1:20 000. Obje su pripremljene u inkubacijskom puferu. Svaka inkubacija se odvijala 2 h na 37°C uz međukorak ispiranja. Završni koraci izvedeni su kao što je opisano u poglavlju 3.2.6.2.

3.2.9. Određivanje koncentracije amoditoksina u uzorcima krvi i limfe ELISA-om

Koncentracije Atx-a određene su ELISA-om, slijedeći isti protokol kao i za otrov, uz određene varijacije. Mikrotitracijska pločica obložena je otopinom in-house kunićjeg anti-Atx IgG-a ($c = 5 \text{ } \mu\text{g / mL}$) u 0,05 M karbonatnom puferu ($\text{pH} = 9,6$) (100 μL / jažici). Uzorci limfe i seruma, odnosno otopine Atx-a ($c = 10 \text{ } \mu\text{g / mL}$) koja je korištena kao standard, pripremljeni su i analizirani na isti način kao i oni za kvantifikaciju otrova, uz iznimku radnog razrjeđenja standarda koje je bilo $10\times$ niže. Nakon inkubacije preko noći i ispiranja, pločica je inkubirana prvo s otopinom in-house zamoračkog anti-Atx IgG-a ($c = 1,5 \text{ } \mu\text{g / mL}$) (100 μL / jažici) u razrjeđenju 1:2 000, a zatim s otopinom kunićjeg anti-zamoračkog IgG-HRP-a (Sigma-Aldrich, SAD) (100 μL / jažici) u razrjeđenju 1:10 000. Svaka inkubacija se odvijala 2 h na 37°C . Završni koraci i izračuni izvedeni su kao što je opisano u odjeljku 3.2.6.2.

3.2.10. Određivanje koncentracije protuotrova u uzorcima krvi i limfe ELISA-om

Koncentracije protuotrova (konjskih $F(ab')_2$ fragmenata specifičnih za otrov) određene su ELISA-om oblaganjem mikrotitacijske pločice otopinom *Vaa* otrova ($c = 1 \mu\text{g} / \text{mL}$) u 0,05 M karbonatnom puferu ($\text{pH} = 9,6$) ($100 \mu\text{L} / \text{jažici}$). Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi preko noći, pločica je isprana 3 puta vodom tipa II u peraču pločica te blokirana s inkubacijskim puferom ($200 \mu\text{L} / \text{jažici}$) tijekom najmanje 2 h na 37°C u termostatu. Nakon koraka ispiranja na pločicu su dodana radna razrjeđenja ispitivanih uzoraka i standarda – Antitoksina za otrov europskih zmija (Imunološki zavod d.d., Hrvatska). Radna razrjeđenja uzoraka su pripremljena u inkubacijskom puferu prema očekivanim vrijednostima njihovih apsorbancija, a standarda u koncentraciji od $200 \text{ ng} / \text{mL}$, nanešena na pločicu u duplikatu ($100 \mu\text{L} / \text{jažici}$) i binarno serijski razrijeđena, također u inkubacijskom puferu. Nakon inkubacije preko noći na sobnoj temperaturi i koraka ispiranja, pločica je inkubirana 2 sata na 37°C s kozjim anti-konjskim $F(ab')_2$ IgG-HRP-om (Antibodies Online, Njemačka) ($100 \mu\text{L} / \text{jažici}$) u razrjeđenju 1:5 000. Završni koraci i izračuni izvedeni su kao što je opisano u odjeljku 3.2.6.2.

3.2.11. Određivanje koncentracije anti-antivenom IgG-a specifičnih za $F(ab')_2$ fragmente protuotrova u uzorcima seruma

Koncentracije IgG-a specifičnih za $F(ab')_2$ fragmente protuotrova u uzorcima seruma prikupljenima 2 tjedna od aplikacije antivenoma su izmjerene ELISA-om. Mikrotitacijska pločica je obložena s otopinom Antitoksina za otrov europskih zmija ($1 \mu\text{g} / \text{mL}$) u 0,05 M karbonatnom puferu ($\text{pH} = 9,6$) ($100 \mu\text{L} / \text{jažici}$). Nakon inkubacije preko noći na sobnoj temperaturi, pločica je isprana i blokirana s inkubacijskim puferom ($200 \mu\text{L} / \text{jažici}$) tijekom najmanje 2 h na 37°C . U idućem koraku uzorci seruma su pripremljeni u inkubacijskom puferu prema očekivanim vrijednostima njihovih apsorbancija, nanešeni u prethodno ispranu pločicu u duplikatu ($100 \mu\text{L} / \text{jažici}$) i serijski razrijeđeni s faktorom 3, također u inkubacijskom puferu. Nakon inkubacije preko noći na sobnoj temperaturi i koraka ispiranja, pločica je inkubirana 2 sata na 37°C s otopinom kunićjeg anti-ovčjeg IgG-HRP-a (Antibodies Online, Njemačka) ($100 \mu\text{L} / \text{jažici}$) u razrjeđenju 1:10 000. Završni koraci su izvedeni kao što je opisano u odjeljku 3.2.6.2.

Anti-antivenom IgG-i kvantitativno su određeni testom paralelnih pravaca kao što je opisano u poglavlju 3.2.6.2. Kao standard nasumično je odabran jedan od seruma kojem je dogovorno dodijeljena vrijednost od 100 PJ / mL.

3.2.12. Testovi hemostaze i koagulacije

Trombociti, leukociti i eritrociti su analizirani pomoću uređaja CELL-DYN Ruby Hematology Analyzer (Abbott, SAD). Agregacija trombocita je izmjerena na uređaju Multiplate Analyzer (Roche, Njemačka). Testovi hemostaze (fibrinogen, D-dimeri, trombinsko, protrombinsko, aktivirano parcijalno trombotično vrijeme) su izvedeni u sustavu BCS XP (Siemens Healthineers, Njemačka). Za svaku životinju rezultati su izraženi kao postotak odstupanja od vrijednosti izmjerene u serumu prije primjene otrova.

3.2.13. Izračun koncentracija otrova i postavljanje cut-off vrijednosti

Nakon izmjerenih apsorbancija, iz rezultata dobivenih za standard je izrađena krivulja ovisnosti apsorbancije o koncentraciji opisana polinomom 2. stupnja ($y = ax^2 + bx + c$). Koncentracije analiziranih uzoraka su izračunate iz jednadžbe standardne krivulje, odnosno koeficijenata a , b i c te njihovih apsorbancija.

Kao cut-off vrijednost je uzet prosjek apsorbancija negativne kontrole (limfa, odnosno serum prikupljeni neposredno prije primjene antivenoma i analizirani u najmanjem razrjeđenju u kojem su pripremljeni uzorci) uvećan za 3 standardne devijacije. Svim uzorcima za koje je u testu dobivena apsorbancija niža od cut-off vrijednosti pripisana je koncentracija 0 ng / mL.

3.2.14. Statistička analiza

Svaki test neovisno je ponovljen najmanje 3 puta, a srednja vrijednost rezultata korištena je za sve daljnje izračune. Farmakokinetička analiza izmjerenih koncentracija provedena je pomoću programskog dodatka PKSolver (verzija 2.0, China Pharmaceutical University, Nanjing, Kina) za Microsoft Excel (Zhang i sur., 2010). Jednoprostorni model nakon ekstravaskularne, odnosno intravenske primjene odabran je za izračun poluvremena eliminacije ($t_{1/2}$), vremena za postizanje maksimalne koncentracije u plazmi (t_{max}), maksimalne koncentracije u plazmi (C_{max}), prividnog volumena distribucije tijekom

terminalne faze (V_z), prosječnog vremena zadržavanja (*engl.* mean residence time; MRT), površine ispod krivulje ovisnosti koncentracije u serumu o vremenu (*engl.* area under the curve; AUC) i klirensa (*engl.* clearance; CL). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška (SE) ili medijan s rasponom između donjeg i gornjeg percentila (interkvartilni raspon), osim ako nije drugačije navedeno. Površina ispod krivulje ovisnosti količine u plazmi o vremenu određena je pomoću softvera Prism (verzija 9.0, GraphPad Software Inc., SAD). Za usporedbu dviju grupa primijenjen je dvostrani U-test uz razinu značajnosti $p < 0,05$, također koristeći softver Prism.

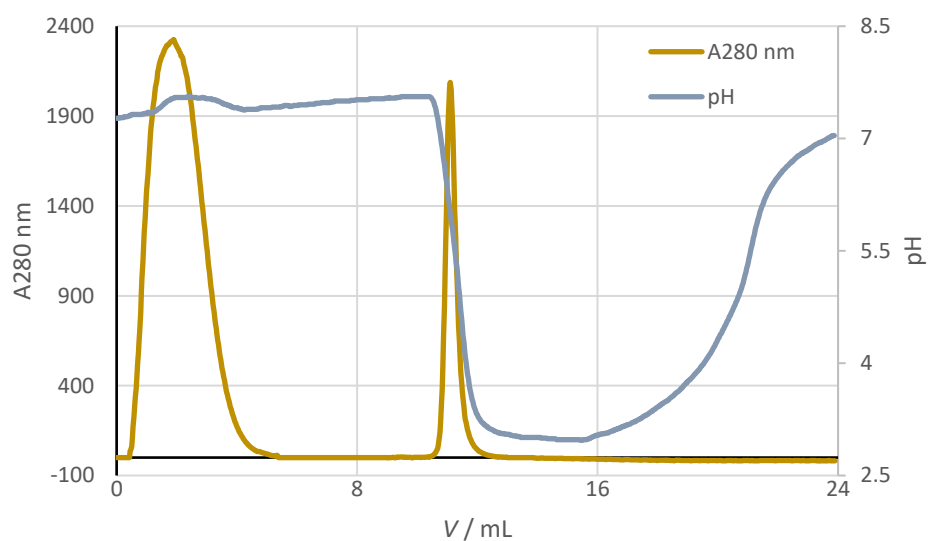
4. REZULTATI

4.1. Analiza zamoračkih seruma ELISA-om

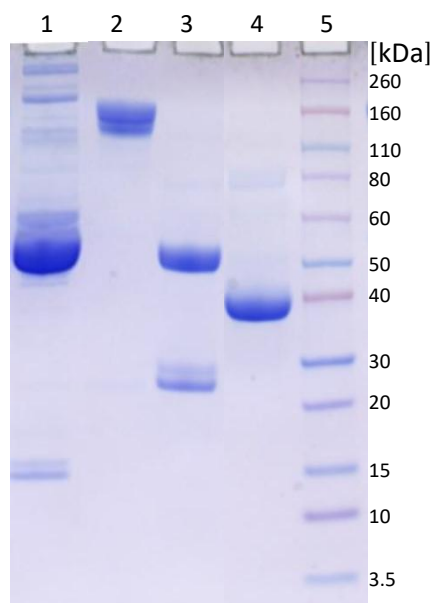
Imunizacija zamorčica provedena je prema standardiziranom protokolu koji osigurava dobivanje seruma s visokim titrom specifičnih antitijela IgG klase. Protokol obuhvaća optimalnu dozu antigena, broj i intervale docjepljivanja, volumen imunizacijske suspenzije po mjestu primjene te način dostave, sve s ciljem postizanja maksimalnog imunološkog odgovora. Otopina ovalbumina je formulirana s komercijalnim nemineralnim uljnim adjuvantom Montanide ISA 206. Miješanjem nastaje emulzija voda/ulje/voda koja djeluje kao depo, omogućujući postupno oslobađanje antigena u organizmu i postupni razvoj imunološkog odgovora. Za procjenu kvalitete hiperimunih zamoračkih seruma razvijen je ELISA test pri čemu je kao standard nasumično odabran jedan od njih, a kojem je dogovorno dodijeljena vrijednost od 100 proizvoljnih jedinica / mL (PJ / mL). U odnosu na njega ostali su redom imali 98, 117, odnosno 126 PJ / mL. Rezultati mjerenja anti-ovalbumin antitijela su potvrdili da je primijenjeni imunizacijski protokol uspješno potaknuo proizvodnju specifičnih IgG-a. Za njihovo pročišćavanje odabran je serum s najvišim titrom ovalbumin-specifičnih antitijela.

4.2. Pročišćavanje i karakterizacija pročišćenih IgG-a

IgG-i iz zamoračkog seruma u kojem je izmjereno 126 PJ / mL ovalbumin-specifičnih antitijela pročišćeni su protein A afinitetnom kromatografijom (Slika 8). Pripravljenom uzorku precizno je izmjerena koncentracija proteina ($4,12 \pm 0,05$ mg / mL). Čistoća mu je provjerena SDS-PAGE analizom provedenom pod nereducirajućim i reducirajućim uvjetima na gradijentnom gelu s 4-12% (w / V) umreženosti (Slika 9). IgG frakcija afinitetno pročišćena iz zamoračkog anti-ovalbumin seruma se pokazala u potpunosti čistom. Na SDS-PAGE gelu pod nereducirajućim uvjetima detektirana je jedinstvena proteinska vrpca koja po molekulskoj masi od oko 150 kDa odgovara IgG-u. Pod reducirajućim uvjetima detektirane su dvije proteinske vrpce koje po molekulskoj masi od oko 25, odnosno 50 kDa odgovaraju lakom, odnosno teškom lancu IgG-a.



Slika 8. Reprezentativni kromatogram dobiven pročišćavanjem IgG-a iz zamoračkog seruma protein A afinitetnom kromatografijom.



Slika 9. SDS-PAGE analiza ovalbumin-specifičnog zamoračkog seruma ($m = 30 \mu\text{g}$) (1), pročišćenog IgG-a ($m = 15 \mu\text{g}$) pod nereducirajućim (2) i reducirajućim uvjetima (3) te ovalbumina korištenog kao antigena za imunizaciju ($m = 15 \mu\text{g}$) (4). Standard je u liniji 5. Za detekciju je korišten CBB R250.

4.3. Mjerenja ovalbumina

4.3.1. Uspostava ELISA-e za određivanje koncentracija

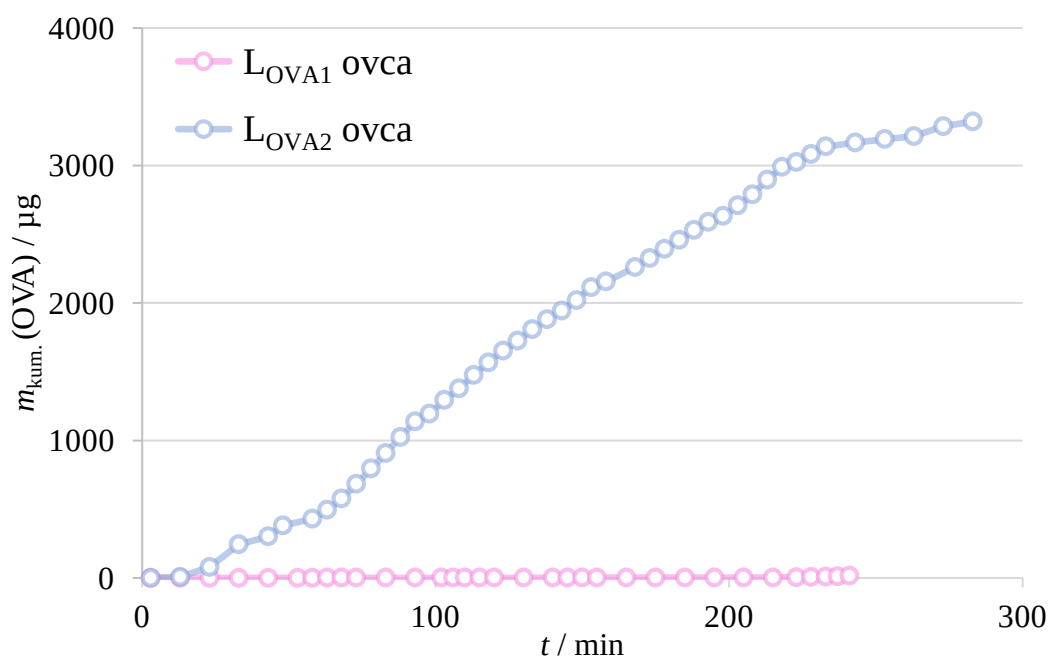
Prilikom uspostave ELISA-e za mjerenje ovalbumina bilo je važno prilagoditi uvjete inkubacije i koncentracije reagensa. Optimizacija je uključivala ispitivanje: masenog udjela (w / V) BSA u puferu za blokiranje od 0,5 i 2%, koncentracije primarnog antitijela (kunićjeg anti-ovalbumin IgG-a) od 1 i 5 $\mu\text{g} / \text{mL}$, sekundarnog antitijela (zamoračkog anti-ovalbumin IgG-a) u razrjeđenjima od 1:200, 1:1 000 i 1:10 000 te HRP konjugata u razrjeđenjima od 1:1 000, 1:5 000, 1:10 000 i 1:20 000. Optimalni signal je dobiven upotrebom 2%-tne otopine BSA, kunićjeg anti-ovalbumin IgG-a u koncentraciji od 5 $\mu\text{g} / \text{mL}$, a zamoračkog anti-ovalbumin IgG-a u razrjeđenju od 1:10 000, isto kao i kunićjeg anti-zamoračkog IgG-HRP-a. Optimizirani protokol je poslužio kao osnova za razvoj ELISA-e u svrhu kvantifikacije otrova i Atx-a.

4.3.2. Ovalbumin u limfi

Limfna apsorpcija s.c. primijenjenog ovalbumina ($m = 30 \text{ mg}$) praćena je mjerenjem njegovih koncentracija ELISA-om u uzorcima limfe ovaca LOVA1 i LOVA2 prikupljenima tijekom razdoblja od 4 ili više sati. Iz izmjerenih koncentracija i volumena u svakom uzorku je određena masa ovalbumina. Zbrajanjem vrijednosti masa svih prethodnih intervala je izračunata kumulativno apsorbirana doza ($m_{\text{kum.}}$) ovalbumina (Tablica 7). Grafički prikaz ovisnosti porasta mase apsorbiranog ovalbumina u ovisnosti o trajanju prikupljanja prikazan je na Slici 10.

Tablica 7. Trajanje uzorkovanja te ukupni prikupljeni broj i kumulativni volumen ($V_{\text{kum.}}$) uzoraka limfe, zajedno s kumulativnom masom ($m_{\text{kum.}}$) apsorbiranog ovalbumina koja je dobivena zbrajanjem vrijednosti njegovih masa svih prethodnih intervala. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri neovisna mjerenja $\pm$ standardna pogreška (SE).

Ovca	Broj uzoraka	Trajanje uzorkovanja / min	$V_{\text{kum.}} / \text{mL}$	$m_{\text{kum.}} (\text{OVA}) / \mu\text{g}$ $\pm \text{SE}$
LOVA1	32	241	333,5	$14,7 \pm 1,2$
LOVA2	45	283	484,5	$3319,1 \pm 36,6$



Slika 10. Kumulativno apsorbirana masa ($m_{\text{kum.}}$) ovalbumina kod ovaca L_{OVA1} i L_{OVA2} po s.c. primjeni doze od 30 mg.

Prosječna brzina protoka limfe bila je podjednaka kod obje grupe (Tablica 8). Kod ovce L_{OVA1} brzina apsorpcije ovalbumina iznosila je 3,7 µg / h, a kod ovce L_{OVA2} 703,7 µg / h, dok je njegova kumulativna masa dosegla 14,7 µg kod prve, odnosno 3319,1 µg kod druge. Po završetku uzorkovanja kod ovce L_{OVA1} u limfu se apsorbirala zanemariva količina primijenjene doze ovalbumina. Kod ovce L_{OVA2} je iznosila 11,1%. Posljedično, kod ovce L_{OVA1} zabilježena je i izrazito niska površina ispod krivulje (AUC_{0-t}) od 0,03 mg × h. Kod ovce L_{OVA2} je iznosila 8,4 mg × h (Tablica 8).

Tablica 8. Parametri određeni po s.c. primjeni ovalbumina ($m = 30$ mg) u uzorcima limfe ovaca LOVA1 i LOVA2. Rezultati kumulativno apsorbirane mase ($m_{\text{kum.}}$) ovalbumina su dani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška (SE). AUC_{0-t} označava površinu ispod krivulje.

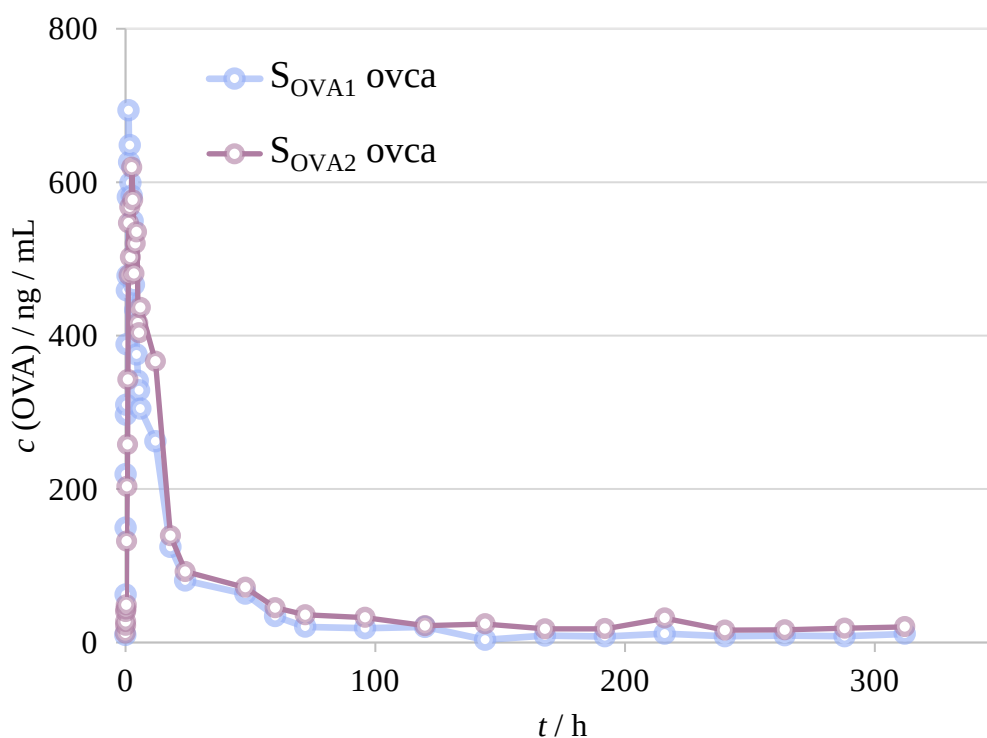
	LOVA1	LOVA2
Način primjene ovalbumina	s.c. ($n = 1$)	s.c. ($n = 1$)
Prosječna brzina protoka limfe [mL / min]	1,7	1,9
Kumulativno apsorbirana masa [μg]	$14,7 \pm 1,2$	$3319,1 \pm 36,6$
Udio kumulativno apsorbirane doze [%]	0,05	11,1
AUC_{0-t} [$\text{mg} \times \text{h}$]	0,03	8,4
Prosječna koncentracija [$\mu\text{g} / \text{mL}$]	0,04	6,9

4.3.3. Ovalbumin u serumu

U uzorcima ovčjeg seruma prikupljenima tijekom razdoblja od 14 dana nakon s.c. aplikacije ovalbumina ($m = 30$ mg) ELISA-om su izmjerene njegove koncentracije. Grafički prikaz ovisnosti koncentracija ovalbumina o trajanju prikupljanja je dan na Slici 11. Kod obje ovce prva mjerljiva koncentracija ovalbumina ($9,7 \text{ ng} / \text{mL}$ kod ovce SOVA1, odnosno $12,3 \text{ ng} / \text{mL}$ kod ovce SOVA2) zabilježena je 2,5 min nakon primjene. Njegova najveća koncentracija (c_{max}) dosegnuta je nakon 75 min kod ovce SOVA1, odnosno 150 min kod ovce SOVA2 (t_{max}) (Tablica 9).

Tablica 9. Najviše izmjerene koncentracije ovalbumina u serumu (c_{max}) te vrijeme potrebno za pojavu njegovih prvih mjerljivih i najviših izmjerenih koncentracija (t_{max}) kod ovaca SOVA1 i SOVA2.

	SOVA1	SOVA2
c_{max} [$\mu\text{g} / \text{mL}$]	693,5	619,4
Vrijeme potrebno za postizanje prve mjerljive koncentracije ovalbumina / min	2,5	2,5
t_{max} / min	75	150



Slika 11. Farmakokinetički profil s.c. primijenjenog ovalbumina ($m = 30$ mg) u uzorcima seruma ovaca S_{OVA1} i S_{OVA2} tijekom 14 dana.

Iz izmjerenih koncentracija ovalbumina su određeni njegovi farmakokinetički parametri u sistemskej cirkulaciji (Tablica 10). Farmakokinetički parametri pokazali su visoki stupanj varijabilnosti između dviju ovaca, pri čemu je poluvrijeme eliminacije ($t_{1/2}$) iznosilo 22,9 h i 59,7 h, a volumen distribucije (V_z) 94,8 L i 144,7 L kod ovce S_{OVA1} , odnosno ovce S_{OVA2} . Također, iako površine ispod krivulja dobivenih grafičkim prikazivanjem ovisnosti koncentracija ovalbumina o trajanju prikupljanja djeluju podudarno, među AUC_{0-t} vrijednostima dviju ovaca je utvrđena gotovo dvostruka razlika ($9808,5$ ($\mu\text{g} \times \text{h}$) / mL kod ovce S_{OVA1} i $15833,2$ ($\mu\text{g} \times \text{h}$) / mL kod ovce S_{OVA2}). Međutim, obje su ovce postigle podjednaku maksimalnu koncentraciju ovalbumina ($693,5$ μg / mL i $619,3$ μg / mL) koje su postignute u različitom vremenskom roku (75 min i 150 min). Koncentracije ovalbumina vratile su se na početnu vrijednost do 4. dana (Slika 11).

Tablica 10. Farmakokinetički parametri ovalbumina nakon njegove s.c. primjene ($m = 30$ mg) izmjereni u uzorcima seruma ovaca SOVA1 i SOVA2 – poluvrijeme eliminacije ($t_{1/2}$), vrijeme za postizanje maksimalne koncentracije ($t_{\max}$), maksimalna koncentracija ($c_{\max}$), volumen distribucije (V_z), srednje vrijeme zadržavanja (MRT), ukupna količina u krvotoku tijekom razdoblja mjerenja (AUC_{0-t}) i klirens (CL).

	SOVA1	SOVA2
način primjene ovalbumina	s.c. ($n = 1$)	s.c. ($n = 1$)
$t_{1/2}$ [h]	22,9	58,7
$t_{\max}$ [min]	75,0	150,0
$c_{\max}$ [$\mu\text{g} / \text{mL}$]	693,5	619,3
V_z [L]	94,8	144,7
MRT [h]	33,9	106,0
AUC_{0-t} [$(\mu\text{g} \times \text{h}) / \text{mL}$]	9808,5	15833,2
CL [mL / min]	47,7	28,5

4.4. Mjerenja protuotrova, otrova i amoditoksina

4.4.1. Uspostava ELISA-e za određivanje koncentracija

Kao osnova za mjerenje protuotrova u uzorcima seruma i limfe ELISA-om poslužio je protokol za kvantifikaciju anti-ovalbumin IgG-a u serumima ovalbuminom-imuniziranih zamorčica opisan u poglavlju 3.2.6.2. Pločica je obložena otopinom Vaa otrova u koncentraciji od $1 \mu\text{g} / \text{mL}$, za blokiranje je korištena 0,5%-tna otopina BSA, a kao konjugat kozji anti-konjski $F(ab')_2$ IgG-HRP u razrjeđenju od 1:5 000.

Kao osnova za mjerenje koncentracije otrova i Atx-a u uzorcima seruma i limfe ELISA-om poslužio je optimizirani protokol za kvantifikaciju ovalbumina čija je uspostava dana u poglavlju 4.3. Reagensi su podešeni ispitivanjem: masenog udjela (w / V) BSA u puferu za blokiranje (u koncentraciji od 0,5 i 2%), starije i svježije priprave primarnog antitijela (kunićjeg anti-venom IgG-a, odnosno kunićjeg anti-Atx IgG-a u koncentraciji od $5 \mu\text{g} / \text{mL}$), starije i svježije priprave sekundarnog antitijela (konjskog anti-venom IgG-a, odnosno zamoračkog anti-Atx IgG-a u razrjeđenjima od 1:300, 1:1

000 i 1:2 000), dvaju tipova HRP konjugata za mjerenje otrova (kunićjeg anti-konjskog IgG-HRP-a i kozjeg anti-konjskog F(ab')₂ IgG-HRP-a u razrjeđenju od 1:20 000) i dviju proizvodnih serija kunićjeg anti-zamoračkog IgG-HRP-a za mjerenje Atx-a (u razrjeđenju od 1:10 000).

Optimalni signal postignut je upotrebom 2%-tne otopine BSA za blokiranje, te svježije pripreve kunićjeg anti-venom IgG-a i anti-Atx IgG-a u koncentraciji od 5 µg/mL (Tablica 11). Sekundarna antitijela, konjski anti-venom IgG i zamorački anti-Atx IgG, pokazala su se najadekvatnijima u razrjeđenju od 1: 1 000, odnosno 1: 2 000, a kunićji anti-konjski IgG-HRP i novija proizvodna serija kunićjeg anti-zamoračkog IgG-HRP-a u razrjeđenju od 1:20 000, odnosno 1:10 000. Razvijeni protokoli su ubuduće korišteni za određivanje koncentracija protuotrova, otrova i Atx-a u prikupljenim uzorcima.

Tablica 11. Konačni protokol za određivanje koncentracija protuotrova, otrova i amoditoksina (Atx-a) u uzorcima seruma i limfe otrovanih i liječenih ovaca.

	PROTUOTROV	OTROV	Atx
Antigen za oblaganje	Vaa otrov (<i>c</i> = 1 µg / mL)	kunićji anti-venom IgG (<i>c</i> = 5 µg / mL)	kunićji anti-Atx IgG (<i>c</i> = 5 µg / mL)
Sekundarno antitijelo	/	konjski anti-venom IgG 1:1 000	zamorački anti-Atx IgG 1:2 000
HRP konjugat	kozji anti-konjski F(ab') ₂ IgG-HRP 1: 5 000	kunićji anti-konjski IgG-HRP 1:20 000	kunićji anti-zamorački IgG-HRP 1: 10 000

4.4.2. Protuotrov u limfi

U prikupljenim uzorcima limfe svake ovce prvo su ELISA-om određene koncentracije protuotrova. U *L_{i.m.}* grupi najviša koncentracija je izmjerena kod ovce *L_{i.m.3}* (*c* = 283,1 µg / mL), a postignuta je nakon 29. do 32. min od administracije (Tablica 12). Najviša razina protuotrova u prosjeku se kretala oko 124,8 µg / mL. U *L_{i.v.}* grupi najviša koncentracija je izmjerena kod ovce *L_{i.v.4}* (*c* = 65,5 µg / mL) u uzorku prikupljanom od 134. do 141. min od administracije. Najviša razina protuotrova u prosjeku se kretala oko 36,5 µg / mL.

Tablica 12. Brzina protoka limfe, najviše izmjerene koncentracije protuotrova ($c_{\max}$) u limfi nakon *i.m.* i *i.v.* primjene ($m = 400$ mg) te vrijeme potrebno za pojavu njegovih prvih mjerljivih i najviših izmjerenih koncentracija ($t_{\max}$). Parametri su dani za svaku jedinku iz $L_{i.m.}$, odnosno $L_{i.v.}$ grupe uz vremenski raspon prikupljanja (+/-).

	$L_{i.m.1}$	$L_{i.m.2}$	$L_{i.m.3}$	$L_{i.m.4}$	$L_{i.v.1}$	$L_{i.v.2}$	$L_{i.v.3}$	$L_{i.v.4}$
Prosječna brzina protoka limfe [mL / min]	2,7	2,5	2,1	1,4	0,4	4,2	4,5	1,9
$c_{\max}$ protuotrova [μg / mL]	58,3	103,2	283,1	54,5	51,4	11,5	17,6	65,5
Vrijeme potrebno za postizanje prve mjerljive koncentracije protuotrova / min	41,5 +/- 12,5	8 +/- 2	5 +/- 2	7,5 +/- 7,5	27 +/- 4	8,5 +/- 3,5	9 +/- 1	8 +/- 1
$t_{\max}$ protuotrova / min	198 +/- 2	18,5 +/- 2,5	30,5 +/- 1,5	32,5 +/- 2,5	186 +/- 5	93,5 +/- 2,5	153 +/- 1	137,5 +/- 3,5

Najbrža pojava protuotrova u limfi zabilježena je unutar grupe $S_{i.m.}$, kao i kod ovaca $L_{i.m.3}$ i $L_{i.v.4}$ u grupi $S_{i.v.}$ (Tablica 12). Kod ovce $L_{i.m.3}$ period od aplikacije $i.m.$ protuotrova do pojave njegove prve mjerljive koncentracije (73,8 ng / mL) iznosio je 5 $\pm$ 2 min (protuotrov je prvi put detektiran u uzorku limfe prikupljanom od 3. do 7. min u odnosu na vrijeme administracije). Kod ovce $L_{i.v.4}$ period od aplikacije $i.v.$ protuotrova do pojave njegove prve mjerljive koncentracije (11,6 ng / mL) iznosio je 8 $\pm$ 1 min (protuotrov je prvi put detektiran u uzorku limfe prikupljanom od 7. do 9. min u odnosu na vrijeme administracije). Najduži period od aplikacije protuotrova do pojave njegove prve mjerljive koncentracije imala je ovca $L_{i.m.1}$ i iznosio je 41,5 $\pm$ 12,5 min (protuotrov je prvi put detektiran u uzorku limfe prikupljanom od 29. do 54. min u odnosu na vrijeme administracije).

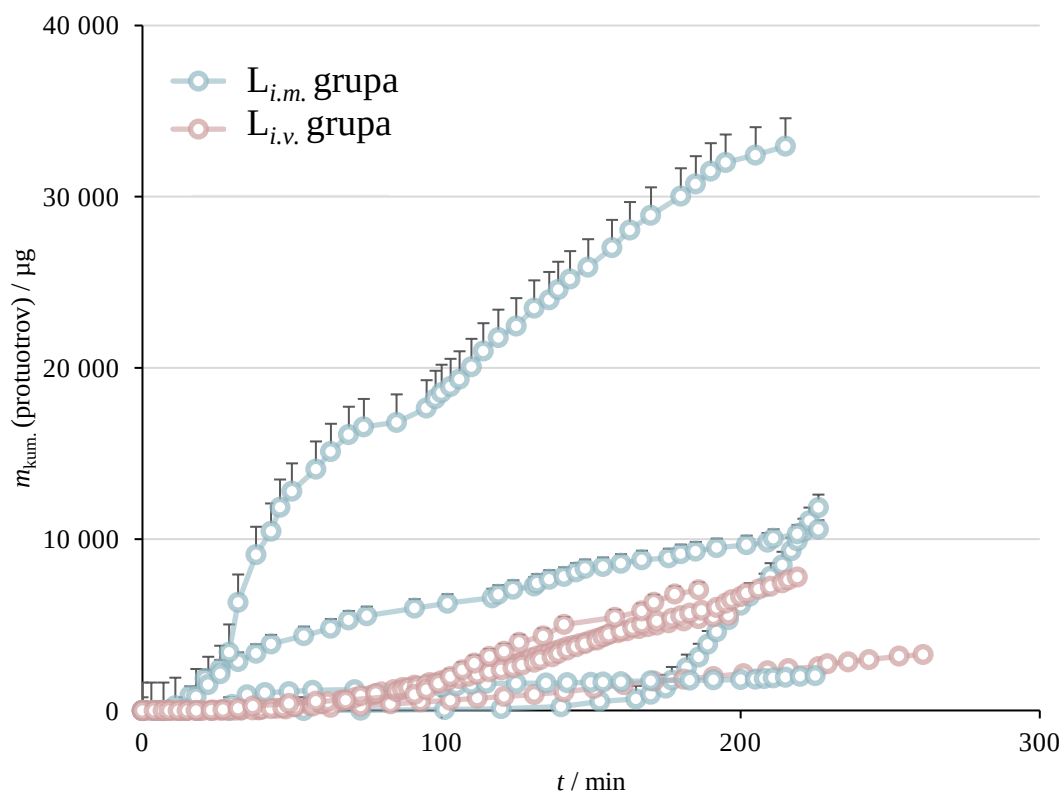
Broj uzoraka, trajanje uzorkovanja i kumulativno prikupljeni volumen limfe ($V_{kum.}$) za svaku jedinku iz $L_{i.m.}$, odnosno $L_{i.v.}$ grupe dani su u Tablicama 13 i 14, zajedno s kumulativnom masom ($m_{kum.}$) protuotrova koja se apsorbirala u limfni sustav i udjelom njegove apsorbirane doze. Porast količine $i.m.$ i $i.v.$ protuotrova u limfi kod pojedinačnih ovaca je prikazan na Slici 12. U grupi koja je protuotrov dobila $i.m.$, najveća kumulativna masa izmjerena je kod ovce $L_{i.m.3}$ ($m_{kum.} = 33,0$ mg), a najmanja kod ovce $L_{i.m.4}$ ($m_{kum.} = 2,0$ mg) (Tablica 13, Slika 12). U grupi koja je protuotrov dobila $i.v.$ najveća kumulativna masa izmjerena je kod ovce $L_{i.v.3}$ ($m_{kum.} = 7,8$ mg), a najmanja kod ovce $L_{i.v.1}$ ($m_{kum.} = 3,3$ mg) (Tablica 14, Slika 12). Po završetku uzorkovanja kod ovce $L_{i.m.3}$ u limfu se tijekom 3,8 h apsorbiralo ukupno 8,2%, a kod ovce $L_{i.v.3}$ tijekom 3,7 h 1,9% administrirane doze protuotrova, što su ujedno i njegovi najveći apsorbirani udjeli unutar svake grupe.

Tablica 13. Broj uzoraka, trajanje uzorkovanja i kumulativno prikupljeni volumen ($V_{\text{kum.}}$) limfe, zajedno s kumulativnom masom ($m_{\text{kum.}}$) protuotrova ($m = 400$ mg) i udjelom njegove apsorbirane doze kod jedinki iz $L_{i.m.}$ grupe. Rezultati kumulativno apsorbirane mase protuotrova su dani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška (SE).

Ovca	Ukupno uzoraka	Trajanje uzorkovanja / min	$V_{\text{kum.}}$ / mL	$m_{\text{kum.}}$ (protuotrov) / $\mu\text{g} \pm \text{SE}$	Apsorbirana doza protuotrova [%]
$L_{i.m.1}$	46	358	539,8	$11837,0 \pm 97,2$	3,0
$L_{i.m.2}$	64	385	704,5	$10580,7 \pm 431,4$	2,6
$L_{i.m.3}$	72	347	645,3	$32953,5 \pm 1446,8$	8,2
$L_{i.m.4}$	55	358	377,4	$2022,9 \pm 117,0$	0,5

Tablica 14. Broj uzoraka, trajanje uzorkovanja i ukupno prikupljeni volumen ($V_{\text{kum.}}$) limfe, zajedno s kumulativnom masom ($m_{\text{kum.}}$) protuotrova ($m = 400$ mg) i udjelom njegove apsorbirane doze kod jedinki iz $L_{i.v.}$ grupe. Rezultati kumulativno apsorbirane mase protuotrova su dani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška (SE).

Ovca	Ukupno uzoraka	Trajanje uzorkovanja / min	$V_{\text{kum.}}$ / mL	$m_{\text{kum.}}$ (protuotrov) / $\mu\text{g} \pm \text{SE}$	Apsorbirana doza protuotrova [%]
$L_{i.v.1}$	41	393	134,7	$3263,1 \pm 0,1$	0,8
$L_{i.v.2}$	89	328	1098,5	$5570,8 \pm 653,3$	1,4
$L_{i.v.3}$	121	351	1428,5	$7797,3 \pm 7,5$	1,9
$L_{i.v.4}$	48	321	463,5	$7036,0 \pm 307,0$	1,8



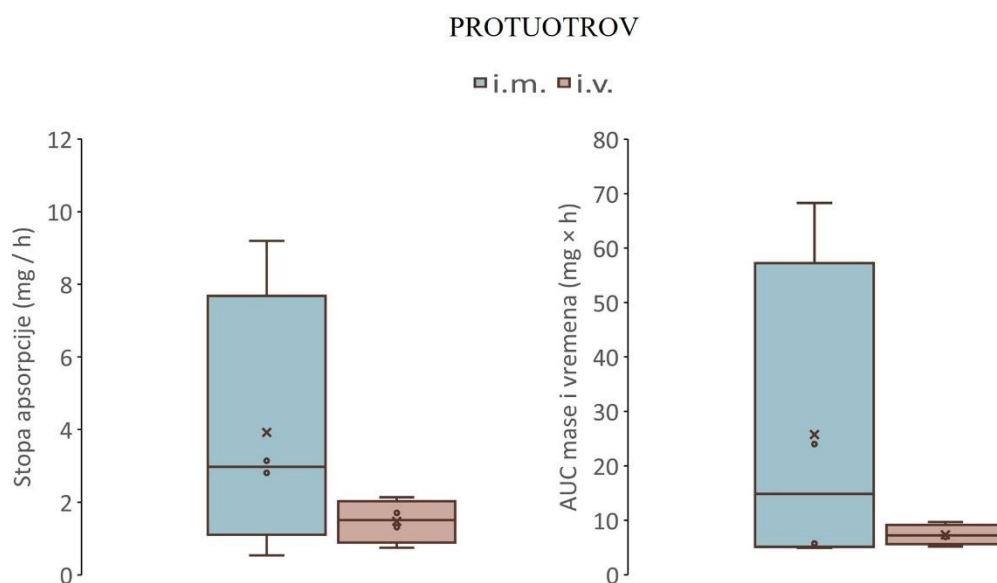
Slika 12. Kumulativni porast količine protuotrova prikupljenog kod ovaca $L_{i.m.1}$, $L_{i.m.2}$, $L_{i.m.3}$ i $L_{i.m.4}$ nakon *i.m.* (plave krivulje) te kod ovaca $L_{i.v.1}$, $L_{i.v.2}$, $L_{i.v.3}$ i $L_{i.v.4}$ nakon *i.v.* primjene protuotrova ($m = 400$ mg) (roza krivulje).

Usporedbom $L_{i.m.}$ i $L_{i.v.}$ grupe primijećeno je da su prosječna brzina apsorpcije *i.m.* protuotrova ($3,9 \pm 1,9$ mg / h) i njegova prosječna ukupna količina koja dospijeva u limfu tijekom perioda uzorkovanja (AUC_{0-t}) ($25,7 \pm 14,9$ mg $\times$ h) veće nego za *i.v.* protuotrov (Tablica 15, Slika 13). Brzina apsorpcije *i.v.* protuotrova je bila $1,5 \pm 0,3$ mg / h, a njegov AUC_{0-t} $7,3 \pm 1,1$ mg $\times$ h. Dobiveni rezultati sugeriraju da je $L_{i.m.}$ grupa bila izložena bržem dolasku veće količine *i.m.* protuotrova tijekom vremena. Međutim, kod nje je uočena velika varijabilnost u apsorpciji protuotrova. Naprotiv, unutar $L_{i.v.}$ grupe postignuta je dosljednija razina izloženosti protuotrovu. U konačnici, ni jedna od razlika se nije pokazala značajnom ($p > 0,05$), kako u pogledu brzine apsorpcije tako i ukupno apsorbirane količine.

Tablica 15. Limfna apsorpcija *i.m.* i *i.v.* protuotrova ($m = 400$ mg). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška (SE), odnosno kao medijan s interkvartilnim rasponom (IQR).

	Način primjene protuotrova			
	<i>i.m.</i> ($n = 4$)		<i>i.v.</i> ($n = 4$)	
	srednja vrijednost $\pm$ SE	medijan (IQR)	srednja vrijednost $\pm$ SE	medijan (IQR)
Brzina apsorpcije protuotrova [mg / h]	$3,9 \pm 1,9$	3,0 (1,1 – 7,7)	$1,5 \pm 0,3$	1,5 (0,9 – 2,0)
AUC _{0-t} (protuotrov)* [mg $\times$ h]	$25,7 \pm 14,9$	14,9 (5,1 – 57,2)	$7,3 \pm 1,1$	7,2 (5,6 – 9,1)

*AUC mase i vremena



Slika 13. Limfna apsorpcija *i.m.* i *i.v.* protuotrova ($m = 400$ mg). Brzina apsorpcije i ukupna količina koja dopijeva u limfu tijekom razdoblja uzorkovanja (AUC_{0-t}) prikazane su u odnosu na način primjene protuotrova. Usporedbe između $L_{i.m.}$ grupe, liječene *i.m.* protuotrovom, i $L_{i.v.}$ grupe, liječene *i.v.* protuotrovom, procijenjene su U-testom s razinom značajnosti od $p < 0,05$. Rezultati ne pokazuju statistički značajne razlike između grupa ($p > 0,05$). Pravokutnik označava interkvartilni raspon (raspon između 25. i 75. percentila), vodoravna crta unutar pravokutnika označava medijan, križić (x) srednju

vrijednost, kružići (o) pojedinačne vrijednosti, a linije koje izlaze iz pravokutnika (*engl. whiskers*) najvišu i najnižu izmjerenu vrijednost.

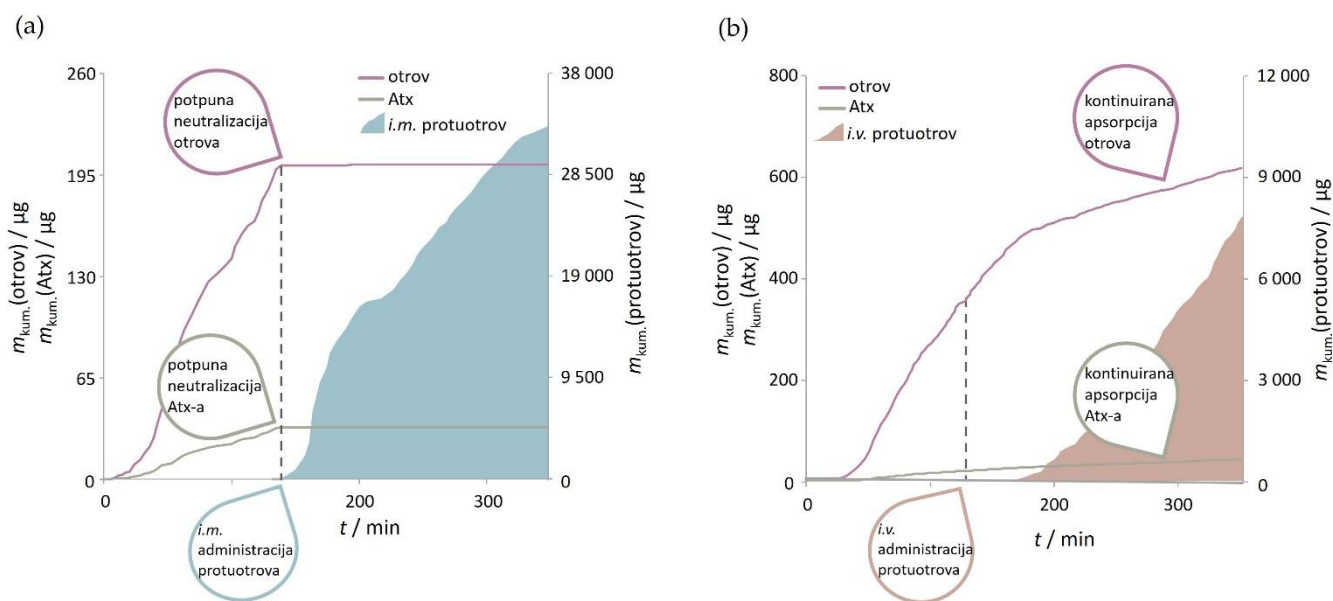
4.4.3. Otrov i amoditoksini u limfi

Nakon protuotrova, u prikupljenim uzorcima limfe svake ovce ELISA-om su određene koncentracije otrova i Atx-a. U *L_{i.m.}* grupi *i.m.* protuotrov je uspio brzo (nakon prosječno 23,3 min) potpuno neutralizirati otrov prisutan u limfnoj cirkulaciji, čak i u niskim dozama (503,8 µg u prosjeku) (Tablica 16, Slika 14a). Atx-i su se potpuno neutralizirali nešto ranije (nakon prosječno 15 min), kada je *i.m.* protuotrov bio apsorbiran u prosječnoj dozi od samo 13 µg. Naprotiv, u *L_{i.v.}* grupi, *i.v.* neutralizacija otrova i Atx-a posredovana protuotrovom bila je samo djelomična (Tablica 16, Slika 14b) i nije postignuta niti u trenutku kada je kumulativna masa apsorbiranog protuotrova iznosila u prosjeku više od 6 mg.

Tablica 16. Vrijeme i kumulativna masa potrebni za neutralizaciju otrova ($m = 20$ mg) i amoditoksina (Atx-a) u limfi nakon *i.m.* i *i.v.* primjene protuotrova ($m = 400$ mg). Parametri su dani za svaku jedinku iz $L_{i.m.}$, odnosno $L_{i.v.}$ grupe uz vremenski raspon prikupljanja (+/-).

	$L_{i.m.1}$	$L_{i.m.2}$	$L_{i.m.3}$	$L_{i.m.4}$	$L_{i.v.1}$	$L_{i.v.2}$	$L_{i.v.3}$	$L_{i.v.4}$
Vrijeme potrebno za neutralizaciju otrova [min]	21,5 +/- 7,5	13 +/- 3	14,5 +/- 3,5	22,5 +/- 7,5	n.p.*	>196	>219	>186
Kumulativna masa protuotrova za neutralizaciju otrova [μ g]	0,2	880,7	790,3	344,0	> 3 263,1	> 5 570,8	> 7 797,3	> 7 036,0
Vrijeme potrebno za neutralizaciju Atx-a [min]	21,5 +/- 7,5	8 +/- 2	5 +/- 2	22,5 +/- 7,5	n.p.*	>196	>219	>186
Kumulativna masa protuotrova za neutralizaciju Atx-a [μ g]	0,2	45,0	0,4	6,4	> 3 263,1	> 5 570,8	> 7 797,3	> 7 036,0

*kod ovce $L_{i.v.1}$ otrov i Atx-i u ni jednom uzorku nisu bili prisutni u mjerljivoj koncentraciji.



Slika 14. Reprezentativni primjer kumulativnog povećanja mase otrova, amoditoksina (Atx-a) i protuotrova apsorbiranih u limfnu cirkulaciju nakon s.c. aplikacije otrova ($m = 20$ mg) i *i.m.* (a) ili *i.v.* aplikacije protuotrova ($m = 400$ mg) (b).

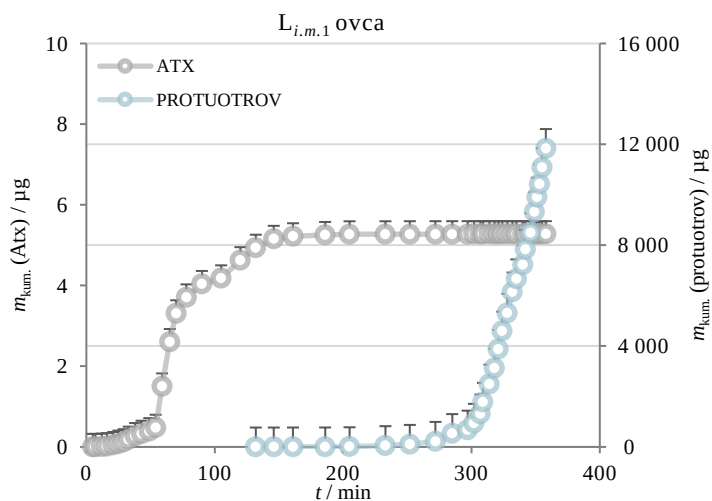
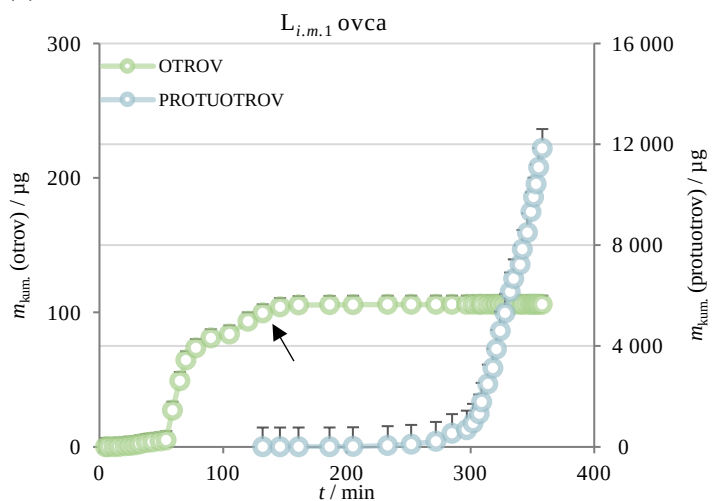
U grupi $L_{i.m.}$ potpuna neutralizacija otrova najbrže je nastupila kod ovce $L_{i.m.2}$ (Slika 15b), 13 ± 3 min nakon primjene protuotrova (otrov je postao nedetektabilan u uzorku limfe prikupljanom od 10. do 16. min u odnosu na vrijeme administracije protuotrova), uz kumulativnu apsorpciju 880,7 μg protuotrova (Tablica 16). Najbrža neutralizacija Atx-a je zabilježena kod ovce $L_{i.m.3}$ (Slika 15c), 5 ± 2 min nakon primjene protuotrova (Atx je postao nedetektabilan u uzorku limfe prikupljanom od 3. do 7. min u odnosu na vrijeme administracije protuotrova), uz kumulativnu apsorpciju 0,4 μg protuotrova (Tablica 16). Kod $L_{i.v.}$ grupe (Slike 16b, c i d) do usporavanja porasta količine otrova je došlo neposredno nakon administracije protuotrova. Potpuna neutralizacija otrova nije postignuta, kao ni Atx-a, pri čemu je ovca $L_{i.v.3}$ imala najveći udio apsorbirane doze otrova i Atx-a (Tablica 17).

Tablica 17. Najviše izmjerene koncentracije ($c_{\max}$) otrova ($m = 20$ mg) i amoditoksina (Atx-a), vrijeme potrebno za pojavu njihovih prvih mjerljivih i najviših izmjerenih koncentracija ($t_{\max}$) u limfi nakon *i.m.* i *i.v.* primjene protuotrova ($m = 400$ mg) te udio njihovih apsorbiranih doza. Parametri su dani za svaku jedinku iz $L_{i.m.}$, odnosno $L_{i.v.}$ grupe. Rezultati su prikazani kao vremenski raspon prikupljanja (+/-).

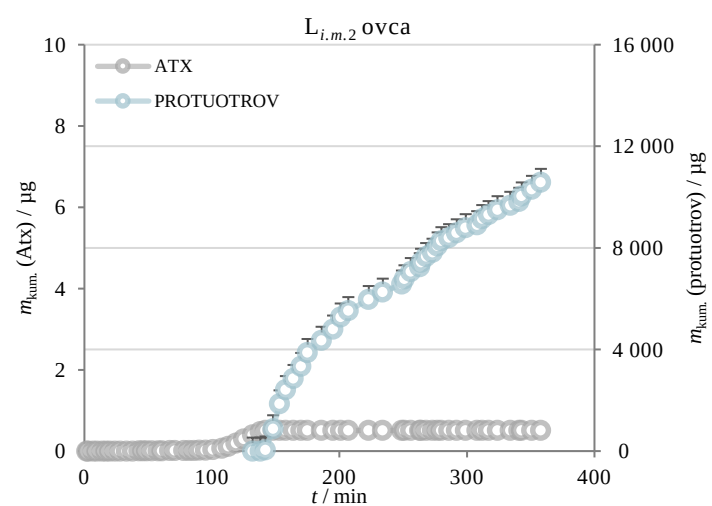
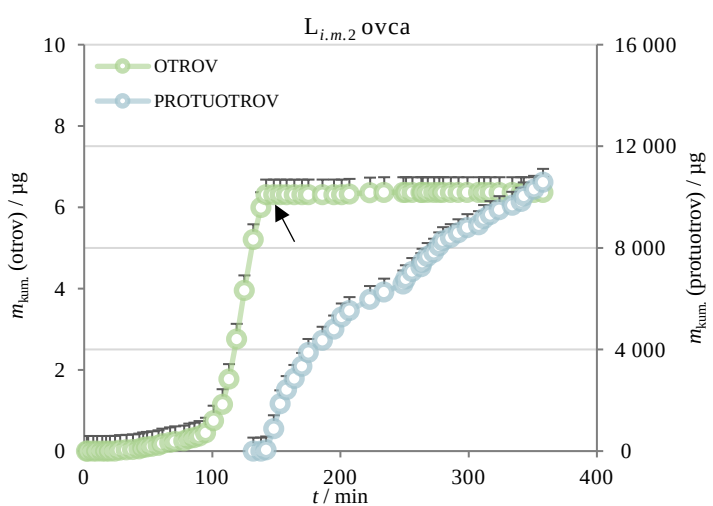
	$L_{i.m.1}$	$L_{i.m.2}$	$L_{i.m.3}$	$L_{i.m.4}$	$L_{i.v.1}$	$L_{i.v.2}$	$L_{i.v.3}$	$L_{i.v.4}$
$c_{\max}$ otrova [ng / mL]	1764,5	105,0	1610,1	993,6	n.p.*	508,7	1712,2	243,9
Apsorbirana doza otrova [%]	0,5	<0,1	1,0	0,5	n.p.*	0,4	3,1	0,1
Vrijeme potrebno za postizanje prve mjerljive koncentracije otrova [min]	9,5 +/- 2,5	18,5 +/- 1,5	7 +/- 2	8 +/- 2	n.p.*	11 +/- 1	8 +/- 1	3 +/- 3
$t_{\max}$ otrova [min]	62 +/- 3	135 +/- 3	55,5 +/- 2,5	73 +/- 2	n.p.*	61 +/- 3	49 +/- 2	128 +/- 7
$c_{\max}$ Atx-a [ng / mL]	88,0	10,2	266,4	158,2	n.p.*	52,5	107,8	235,7
Apsorbirana doza Atx-a [%]	0,3	<0,1	1,7	0,9	n.p.*	0,5	3,5	0,4
Vrijeme potrebno za postizanje prve mjerljive koncentracije Atx-a [min]	9,5 +/- 2,5	35,5 +/- 2,5	7 +/- 2	4,5 +/- 1,5	n.p.*	11 +/- 1	17,5 +/- 0,5	13 +/- 2
$t_{\max}$ Atx-a [min]	62 +/- 3	140 +/- 2	60,5 +/- 2,5	73 +/- 2	n.p.*	55,5 +/- 2,5	49 +/- 2	128 +/- 7

*kod ovce $L_{i.v.1}$ otrov i Atx-i u ni jednom uzorku nisu bili prisutni u mjerljivoj koncentraciji.

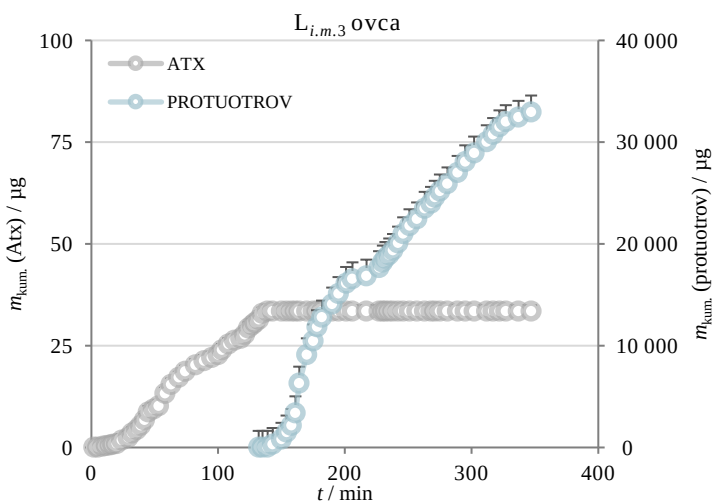
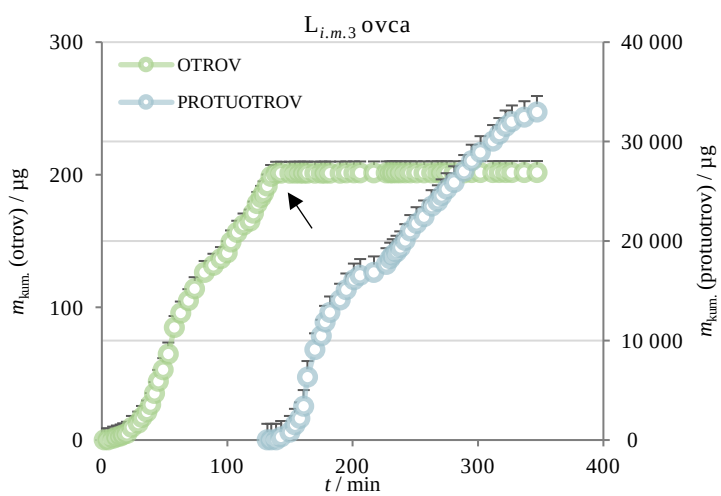
(a)



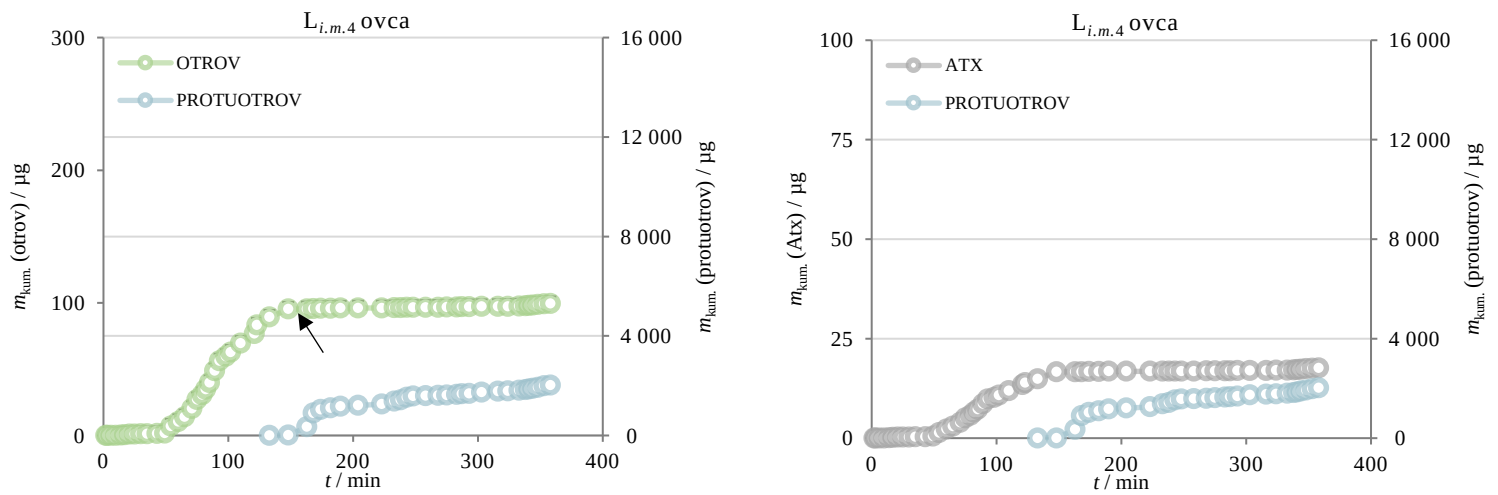
(b)



(c)

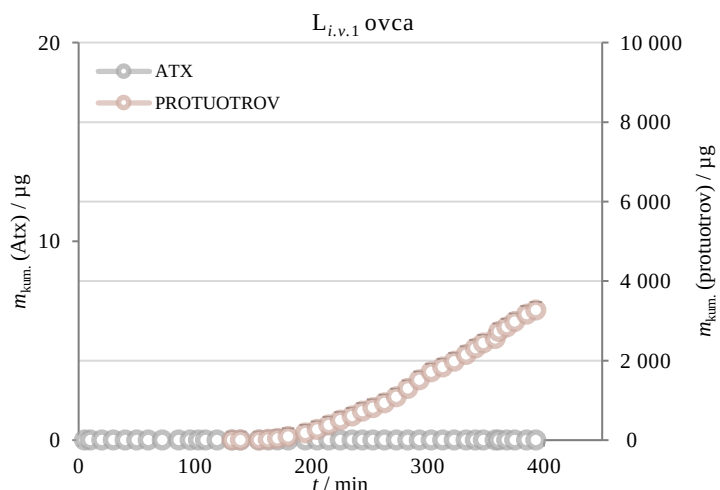
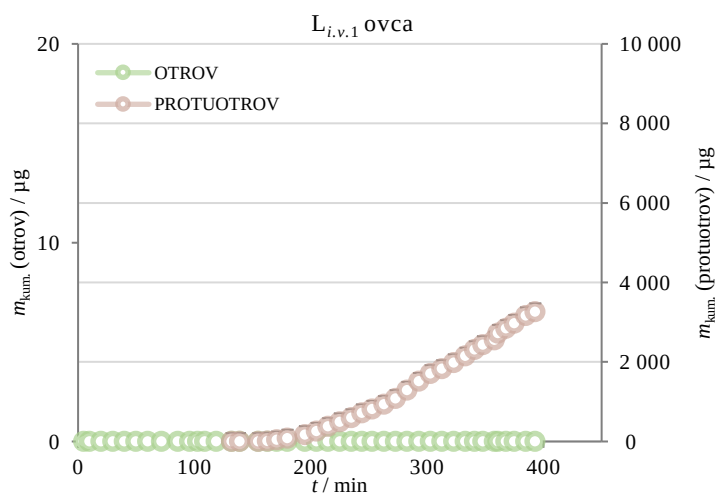


(d)

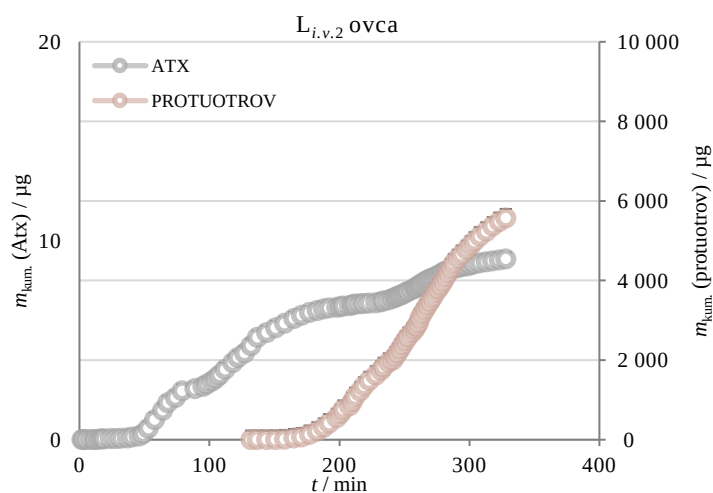
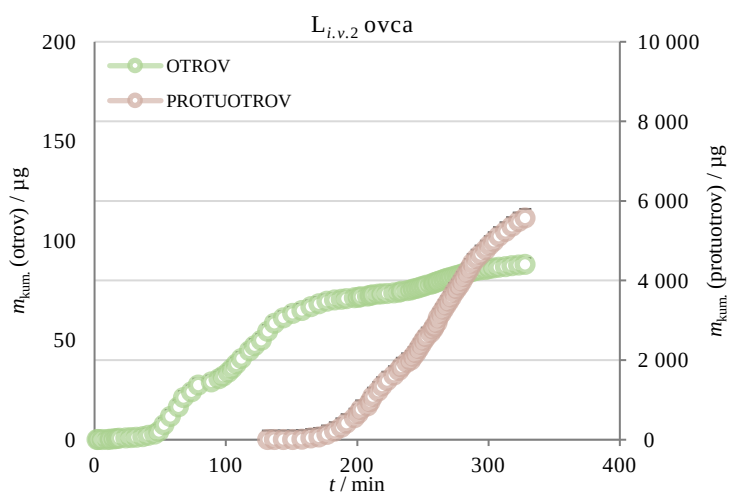


Slika 15. Porast količine otrova (lijevi panel) i amoditoksina (Atx-a) (desni panel), zajedno s porastom količine protuotrova, prikupljenih u uzorcima limfe nakon s.c. injekcije otrova ($m = 20$ mg) i i.m. injekcije protuotrova ($m = 400$ mg) kod ovaca $L_{i.m.1}$ (a), $L_{i.m.2}$ (b), $L_{i.m.3}$ (c) i $L_{i.m.4}$ (d). Neutralizacijski učinak protuotrova je naznačen strelicom.

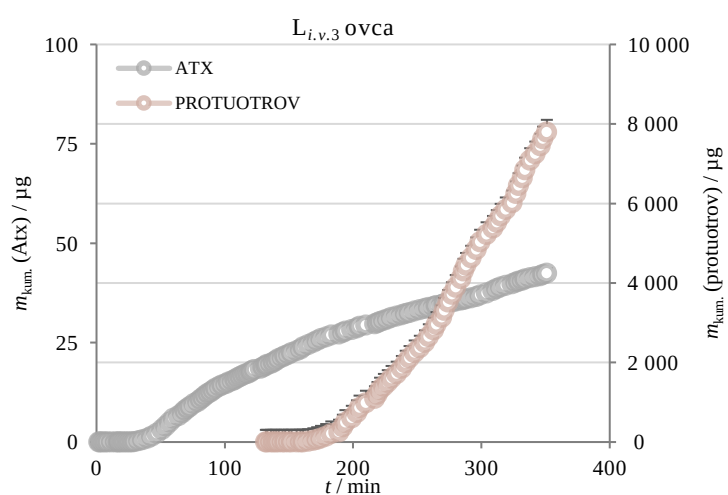
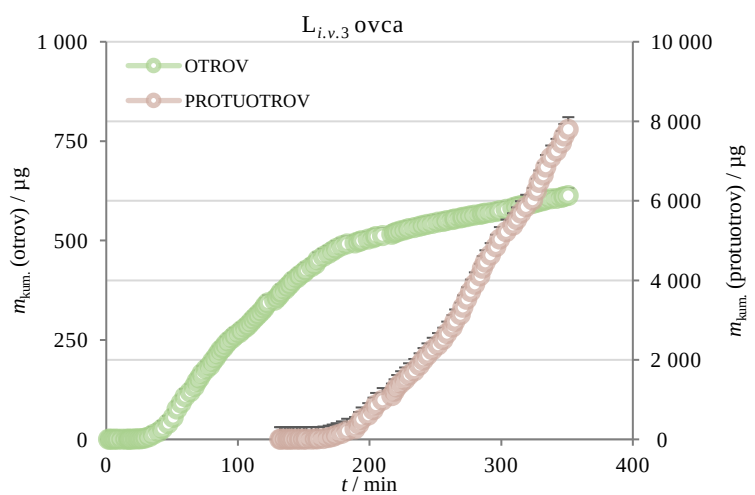
(a)



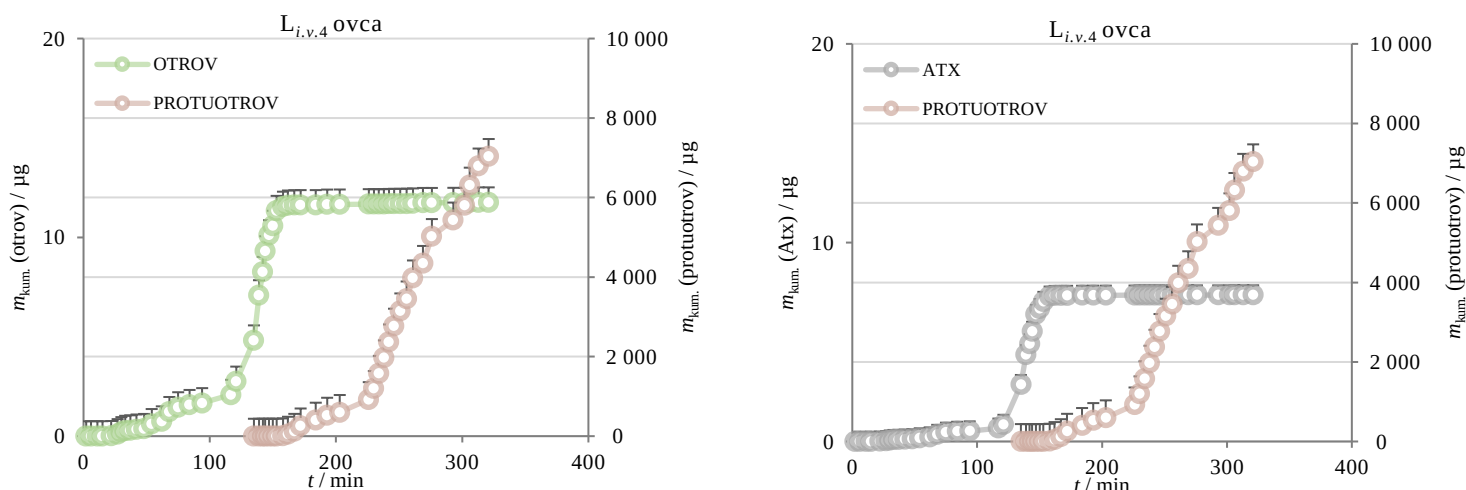
(b)



(c)



(d)



Slika 16. Porast količine otrova (lijevi panel) i amoditoksina (Atx-a) (desni panel), zajedno s porastom količine protuotrova, prikupljenih u uzorcima limfe nakon s.c. injekcije otrova ($m = 20$ mg) i i.v. injekcije protuotrova ($m = 400$ mg) kod ovaca $L_{i,v,1}$ (a), $L_{i,v,2}$ (b), $L_{i,v,3}$ (c) i $L_{i,v,4}$ (d).

Kod ovaca iz grupe $L_{i,m}$ zabilježene su podjednako niske količine kumulativno apsorbiranog otrova koje su se kretale od $> 0,1\%$ aplicirane doze kod ovce $L_{i,m,2}$ do 1% kod ovce $L_{i,m,3}$. Iste ovce su imale i najmanju, odnosno najveću količinu kumulativno apsorbiranog Atx-a. Najveća koncentracija otrova ($1764,5$ ng / mL) je izmjerena kod ovce $L_{i,m,1}$ nakon 62 ± 3 min (u uzorku prikupljanom od 59. do 65. min), a Atx-a ($266,4$ ng / mL) kod ovce $L_{i,m,3}$ nakon $60,5 \pm 2,5$ min (u uzorku prikupljanom od 58. do 63. min). Najkraći period do pojave prve mjerljive koncentracije otrova ($117,1$ ng / mL) od 7 ± 2 min zabilježen je kod ovce $L_{i,m,3}$, a Atx-a ($1,3$ ng / mL) kod ovce $L_{i,m,4}$ (Tablica 17). Iznosio je $4,5 \pm 1,5$ min.

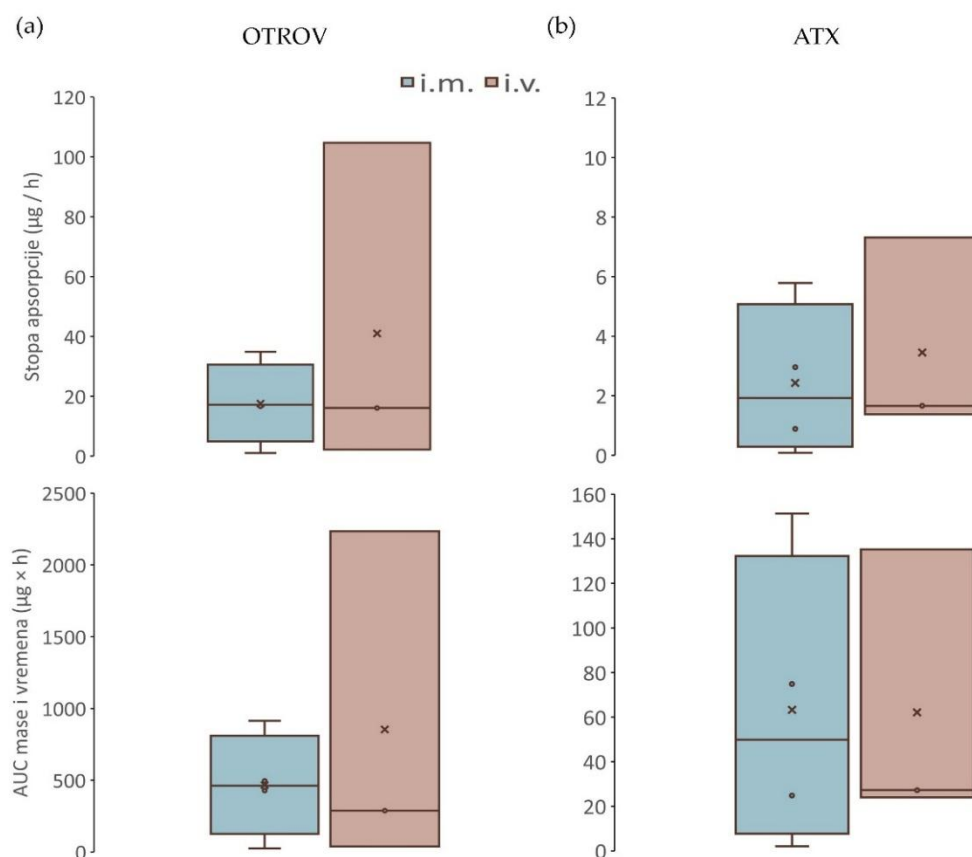
U grupi $L_{i,v}$, ovca $L_{i,v,3}$ istaknula se najbržom i najvišom stopom apsorpcije otrova i Atx-a, s ukupno $3,1\%$ aplicirane doze otrova, od čega $3,5\%$ Atx-a (Tablica 17). Ovca $L_{i,v,4}$ imala je najkraći period od s.c. aplikacije do pojave prve mjerljive koncentracije otrova ($0,3$ ng / mL), a koji je iznosio 3 ± 3 min (otrov je prvi put detektiran u uzorku limfe prikupljanom od 0. do 6. min u odnosu na vrijeme aplikacije). Ovca $L_{i,v,2}$ imala je najkraći period od s.c. aplikacije do pojave prve mjerljive koncentracije Atx-a ($0,6$ ng / mL), a koji je iznosio 11 ± 1 min (Atx je prvi put detektiran u uzorku limfe prikupljanom od 10. do 12. min u odnosu na vrijeme aplikacije). Nasuprot tome, kod ovce

$L_{i.v.1}$ ni u jedno uzorku otrov, odnosno Atx-i nisu detektirani u mjerljivim koncentracijama.

Brzina apsorpcije otrova ($17,6 \pm 6,9 \mu\text{g} / \text{h}$ u odnosu na $41,0 \pm 32,1 \mu\text{g} / \text{h}$) i ukupna količina otrova koja je dospjela u limfu tijekom razdoblja uzorkovanja (AUC_{0-t}) ($465,6 \pm 256,6 \mu\text{g} \times \text{h}$ u odnosu na $853,8 \pm 694,6 \mu\text{g} \times \text{h}$) općenito su bile niže kada je protuotrov dan *i.m.* u odnosu na *i.v.* (Tablica 18, Slika 17a). Zbog velike varijabilnosti u razinama izloženosti otrovu unutar $L_{i.v.}$ grupe, razlike se nisu mogle dokazati kao značajne ($p > 0,05$) niti za jedan od promatranih parametara. Za razliku od otrova, stopa apsorpcije Atx-a i njihov AUC_{0-t} bili su podudarni u obje grupe, bez obzira na put primjene (Tablica 18, Slika 17b).

Tablica 18. Limfna apsorpcija otrova ($m = 20 \text{ mg}$) i amoditoksina (Atx-a) nakon *i.m.* i *i.v.* primjene protuotrova ($m = 400 \text{ mg}$). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška (SE), odnosno kao medijan s interkvartilnim rasponom (IQR).

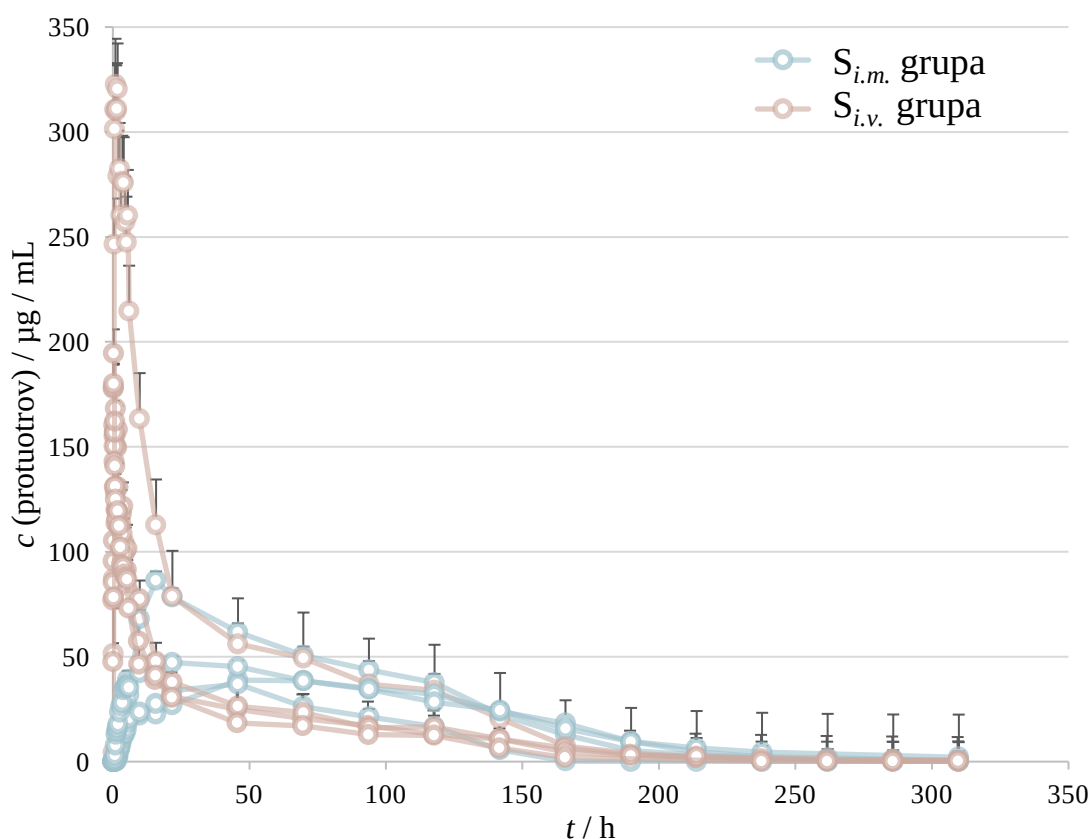
	Način primjene protuotrova			
	<i>i.m.</i> ($n = 4$)		<i>i.v.</i> ($n = 4$)	
	srednja vrijednost $\pm$ SE	medijan (IQR)	srednja vrijednost $\pm$ SE	medijan (IQR)
Brzina apsorpcije otrova [$\mu\text{g} / \text{h}$]	$17,6 \pm 6,9$	17,2 (5,0 – 30,6)	$41,0 \pm 32,1$	16,1 (2,2 – 104,7)
AUC_{0-t} (otrov) [$\mu\text{g} \times \text{h}$]	$465,6 \pm 256,6$	461,7 (126,0 – 809,2)	$853,8 \pm 694,6$	287,8 (25,5 – 2235,4)
Brzina apsorpcije Atx-a [$\mu\text{g} / \text{h}$]	$2,4 \pm 1,3$	1,9 (0,9 – 5,1)	$3,5 \pm 1,9$	1,7 (1,4 – 7,3)
AUC_{0-t} (Atx) [$\mu\text{g} \times \text{h}$]	$63,3 \pm 33,1$	49,8 (7,7 – 132,3)	$62,1 \pm 36,5$	27,2 (24,0 – 135,2)



Slika 17. Limfna apsorpcija otrova ($m = 20$ mg) i amoditoksina (Atx-a). Brzina apsorpcije i ukupna količina koja dospijeva u limfu tijekom razdoblja uzorkovanja (AUC_{0-t}) prikazane su u odnosu na način primjene protuotrova ($m = 400$ mg). Usporedbe između $L_{i.m.}$ grupe, liječene *i.m.* protuotrovom, i $L_{i.v.}$ grupe, liječene *i.v.* protuotrovom, procijenjene su U-testom s razinom značajnosti od $p < 0,05$. Rezultati ne pokazuju statistički značajne razlike između grupa ($p > 0,05$). Pravokutnik označava interkvartilni raspon (raspon između 25. i 75. percentila), vodoravna crta unutar pravokutnika označava medijan, križić (x) srednju vrijednost, kružići (o) pojedinačne vrijednosti, a linije koje izlaze iz pravokutnika (*engl.* whiskers) najvišu i najnižu izmjerenu vrijednost.

4.4.4. Protuotrov u serumu

U prikupljenim uzorcima seruma svake ovce prvo su ELISA-om određene koncentracije protuotrova koje su naknadno korištene za izračun njegovih farmakokinetičkih parametara u sistemske cirkulaciji. Grafički prikaz ovisnosti izmjerenih koncentracija protuotrova u ovisnosti o trajanju prikupljanja prikazan je na Slici 18.



Slika 18. Farmakokinetički profil *i.m.*, odnosno *i.v.* primijenjenog protuotrova ($m = 400$ mg) u sistemske cirkulaciji dobiven za svaku pojedinu ovcu iz grupe $S_{i.m.}$, odnosno $S_{i.v.}$. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri mjerenja $\pm$ standardna pogreška (SE).

Unutar grupe $S_{i.m.}$, najbrža pojava protuotrova u sistemske cirkulaciji zabilježena je kod ovce $S_{i.m.4}$ (Tablica 19). Kod nje je period od aplikacije *i.m.* protuotrova do pojave njegove prve mjerljive koncentracije ($0,1 \mu\text{g/mL}$) iznosio 18 min. Najviša i najbrže postignuta koncentracija protuotrova utvrđena je kod ovce $S_{i.m.1}$, pri čemu je $c_{\max}$ iznosio $86,4 \mu\text{g/mL}$, a $t_{\max}$ 16,0 sati. Kod ovaca $S_{i.m.2}$ i $S_{i.m.3}$ $c_{\max}$ protuotrova od približno $38,0 \mu\text{g/mL}$ zabilježen je u prosjeku 33 sata nakon njegove primjene ($t_{\max}$). Ovca $S_{i.m.1}$ je imala

najduži period od aplikacije *i.m.* protuotrova do pojave njegove prve mjerljive koncentracije (0,1 µg / mL), a iznosio je 48 min. Unutar grupe $S_{i.v.}$, najbrža pojava protuotrova u sistemskoj cirkulaciji zabilježena je kod ovaca $S_{i.v.1}$ i $S_{i.v.3}$ (Tablica 19). Kod njih je period od aplikacije *i.v.* protuotrova do pojave njegove prve mjerljive koncentracije (4,3 µg / mL kod ovce $S_{i.v.1}$ i 47,6 µg / mL kod ovce $S_{i.v.3}$) iznosio 8 min. Također, kod ovce $S_{i.v.1}$ je izmjerena i najviša koncentracija protuotrova ($c_{\max} = 322,7$ µg / mL) te najkraće vrijeme potrebno za njeno postizanje ($t_{\max} = 0,33$ h), isto kao i kod ovce $S_{i.v.4}$.

Tablica 19. Najviše izmjerene koncentracije protuotrova ($c_{\max}$) u serumu nakon *i.m.* i *i.v.* primjene ($m = 400$ mg) te vrijeme potrebno za pojavu njegovih prvih mjerljivih i najviših izmjerenih koncentracija ($t_{\max}$). Parametri su dani za svaku jedinku iz $S_{i.m.}$, odnosno $S_{i.v.}$ grupe.

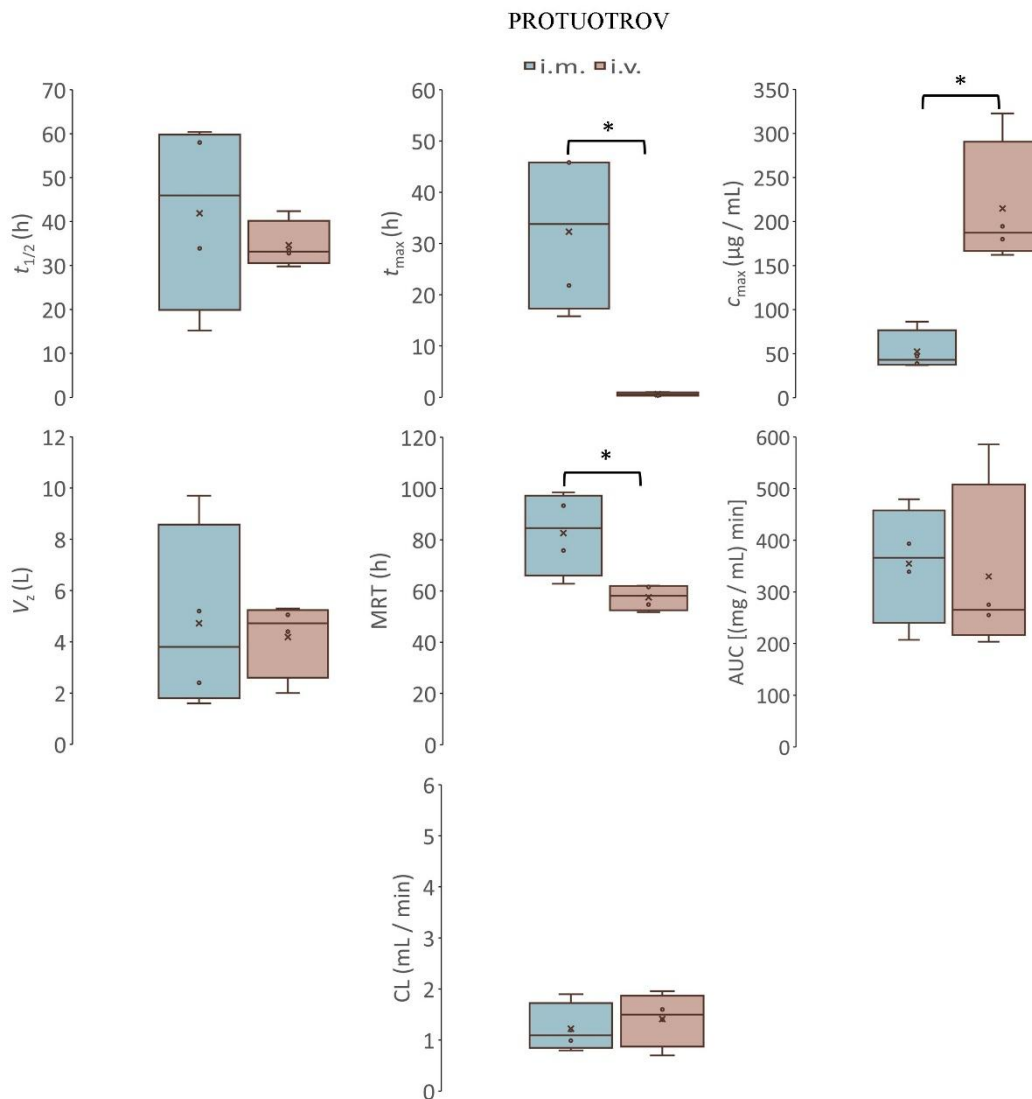
	$S_{i.m.1}$	$S_{i.m.2}$	$S_{i.m.3}$	$S_{i.m.4}$	$S_{i.v.1}$	$S_{i.v.2}$	$S_{i.v.3}$	$S_{i.v.4}$
$c_{\max}$ [µg / mL]	86,4	38,8	37,0	47,2	322,7	194,5	162,1	180,0
Vrijeme potrebno za postizanje prve mjerljive koncentracije protuotrova / min	48	28	38	18	8	15	8	14
$t_{\max}$ / h	15,8	45,8	45,8	21,8	0,97	0,33	0,80	0,33

U sistemskoj cirkulaciji grupe $S_{i.m.}$ $c_{\max}$ protuotrova je iznosio $52,3 \pm 11,6$ µg / mL, a $t_{\max}$ $32,3 \pm 7,9$ h (Tablica 20, Slika 19). U sistemskoj cirkulaciji grupe $S_{i.v.}$ $c_{\max}$ protuotrova je iznosio $214,8 \pm 36,6$ µg / mL, a $t_{\max}$ $0,6 \pm 0,2$ h. Razlike u $c_{\max}$ i $t_{\max}$ pokazale su se značajnim ($p < 0,05$). Oba su pristupa rezultirala podudarnim poluvremenom eliminacije protuotrova ($t_{1/2}$), kao i njegovom ukupnom količinom dospjelom u krvotok tijekom perioda uzorkovanja (AUC_{0-t}), volumenom distribucije (V_z) i klirensom (CL). Međutim, srednje vrijeme zadržavanja (MRT) bilo je značajno dulje ($p < 0,05$) nakon *i.m.* primjene (84,6 (66,1 – 97,2) h) nego nakon *i.v.* primjene (58,2 (52,5 – 62,0) h).

Tablica 20. Farmakokinetički parametri *i.m.* (grupa $S_{i.m.}$) i *i.v.* primijenjenog protuotrova (grupa $S_{i.v.}$) ($m = 400$ mg) u sistemske cirkulaciji – poluvrijeme eliminacije ($t_{1/2}$), vrijeme za postizanje maksimalne koncentracije (t_{max}), maksimalna koncentracija (C_{max}), volumen distribucije (V_z), srednje vrijeme zadržavanja (MRT), ukupna količina u krvotoku tijekom razdoblja mjerenja (AUC_{0-t}) i klirens (CL). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška (SE), odnosno kao medijan s interkvartilnim rasponom (IQR).

	PROTUOTROV			
	$S_{i.m.}$		$S_{i.v.}$	
	srednja vrijednost $\pm$ SE	medijan (IQR)	srednja vrijednost $\pm$ SE	medijan (IQR)
$t_{1/2}$ [h]	41,9 $\pm$ 10,7	46,0 (19,9 – 59,8)	34,6 $\pm$ 2,7	33,2 (30,6 – 40,2)
t_{max} [h]	32,3 $\pm$ 7,9	33,8 (17,3 – 45,8)*	0,6 $\pm$ 0,2	0,6 (0,3 – 1,0)*
C_{max} [μ g / mL]	52,3 $\pm$ 11,6	43,0 (37,4 – 76,6)*	214,8 $\pm$ 36,6	187,2 (166,6 – 290,7)*
V_z [L]	4,7 $\pm$ 1,8	3,8 (1,8 – 8,6)	4,2 $\pm$ 0,8	4,7 (2,6 – 5,2)
MRT [h]	82,6 $\pm$ 8,2	84,6 (66,1 – 97,2)*	57,5 $\pm$ 2,6	58,2 (52,5 – 62,0)*
AUC_{0-t} [(mg / mL) $\times$ min]	354,8 $\pm$ 57,0	366,2 (240,2 – 458,0)	329,9 $\pm$ 86,5	265,3 (216,5 – 508,0)
CL [mL / min]	1,2 $\pm$ 0,2	1,1 (0,8 – 1,7)	1,4 $\pm$ 0,3	1,5 (0,9 – 1,9)

*Značajna razlika između grupe $S_{i.m.}$ i $S_{i.v.}$ ($p < 0,05$).



Slika 19. Farmakokinetički parametri protuotrova ($m = 400$ mg) u serumu otrovanih i protuotrovom tretiranih ovaca – poluvrijeme eliminacije ($t_{1/2}$), vrijeme za postizanje maksimalne koncentracije (t_{max}) i maksimalna koncentracija (c_{max}), volumen distribucije (V_z), srednje vrijeme zadržavanja (MRT), ukupna količina u krvotoku tijekom razdoblja mjerenja (AUC_{0-t}) i klirens (CL) protuotrova u odnosu na put njegovog davanja. Razlike između grupe $S_{i.m.}$, liječene *i.m.* protuotrovom, i grupe $S_{i.v.}$, liječene *i.v.* protuotrovom, procijenjene su U-testom na razini značajnosti $p < 0,05$. Značajne razlike između grupa su označene zvjezdicom. Pravokutnik označava interkvartilni raspon (raspon između 25. i 75. percentila), vodoravna crta unutar pravokutnika označava medijan, križić (x) srednju vrijednost, kružići (o) pojedinačne vrijednosti, a linije koje izlaze iz pravokutnika (*engl.* whiskers) najvišu i najnižu izmjerenu vrijednost.

4.4.5. Otrov i amoditoksini u serumu

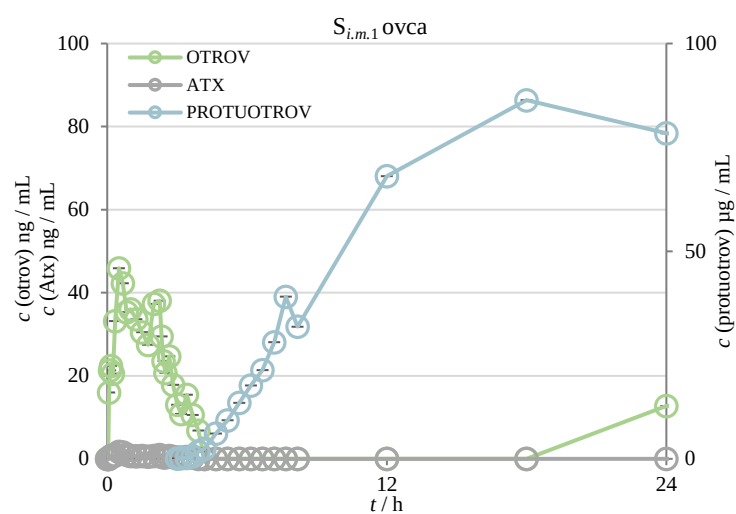
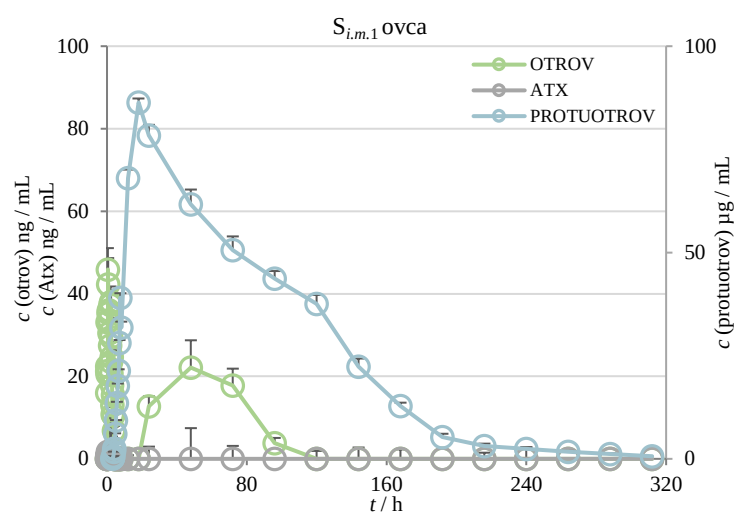
U prikupljenim uzorcima seruma ovaca ELISA-om su izmjerene koncentracije s.c. apliciranog venoma ($m = 20$ mg) i amoditoksina (Atx-a) (Tablica 21).

Kod svih ovaca iz grupe $S_{i.m.}$ period od s.c. aplikacije otrova do pojave njegove prve mjerljive koncentracije je bio podjednak i iznosio je 2,5 – 5 min, slično kao i period do pojave prve mjerljive koncentracije Atx-a (2,5 – 7,5 min) (Tablica 21, Slika 20). Najviša koncentracija otrova ($c_{\max} = 81,6$ ng / mL) je izmjerena kod ovce $S_{i.m.2}$ nakon 120 min ($t_{\max}$) (Tablica 21, Slika 20b), a Atx-a ($c_{\max} = 21,9$ ng / mL) kod ovce $S_{i.m.4}$ nakon 140 min ($t_{\max}$) (Tablica 21, Slika 20d). Najniža maksimalna koncentracija otrova (45,9 ng / mL), odnosno Atx-a (1,7 ng / mL) je izmjerena kod ovce $S_{i.m.1}$, a postignuta je nakon 30 min (Tablica 21, Slika 20a). Do neutralizacije otrova kod $S_{i.m.}$ grupe došlo je u prosjeku 4 dana od primjene *i.m.* protuotrova, u trenutku kada je njegova koncentracija iznosila oko 23 μ g / mL (Tablica 22). Neutralizacija Atx-a je nastupila ranije, u prosjeku nakon 19 h, u trenutku kada je koncentracija *i.m.* protuotrova iznosila oko 14 μ g / mL. Međutim, otprilike 24 h od početka liječenja u sistemskej cirkulaciji svih ovaca je došlo do opetovane pojave otrova, a samim tim i Atx-a (Slika 20). Uočeni fenomen se razriješio nakon najviše 4 – 5 dana.

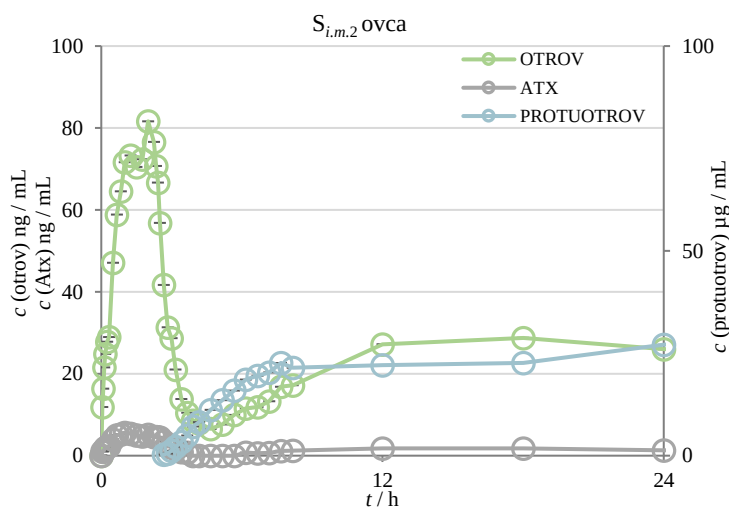
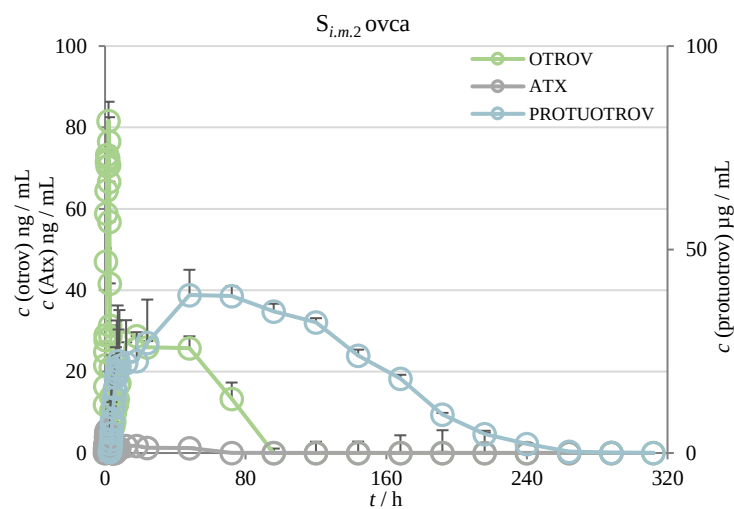
Tablica 21. Najviše izmjerene koncentracije otrova ($m = 20$ mg) i amoditoksina (Atx-a), vrijeme potrebno za pojavu njihovih prvih mjerljivih i najviših izmjerenih koncentracija u limfi nakon *i.m.* i *i.v.* primjene protuotrova ($m = 400$ mg). Parametri su dani za svaku jedinku iz $S_{i.m.}$, odnosno $S_{i.v.}$ grupe.

	$S_{i.m.1}$	$S_{i.m.2}$	$S_{i.m.3}$	$S_{i.m.4}$	$S_{i.v.1}$	$S_{i.v.2}$	$S_{i.v.3}$	$S_{i.v.4}$
$c_{\max}$ otrova [ng / mL]	45,9	81,6	48,5	64,5	52,7	71,6	32,5	81,0
Vrijeme potrebno za postizanje prve mjerljive koncentracije otrova / min	5	2,5	2,5	2,5	2,5	8	7,5	2,5
$t_{\max}$ otrova / min	30	120	140	135	50	105	2880	2880
$c_{\max}$ Atx-a [ng / mL]	1,7	5,6	6,9	21,9	2,8	7,9	10,7	25,4
Vrijeme potrebno za postizanje prve mjerljive koncentracije Atx-a / min	5	2,5	7,5	5	2,5	8	5	2,5
$t_{\max}$ Atx-a / min	30	60	135	140	40	75	1440	1440

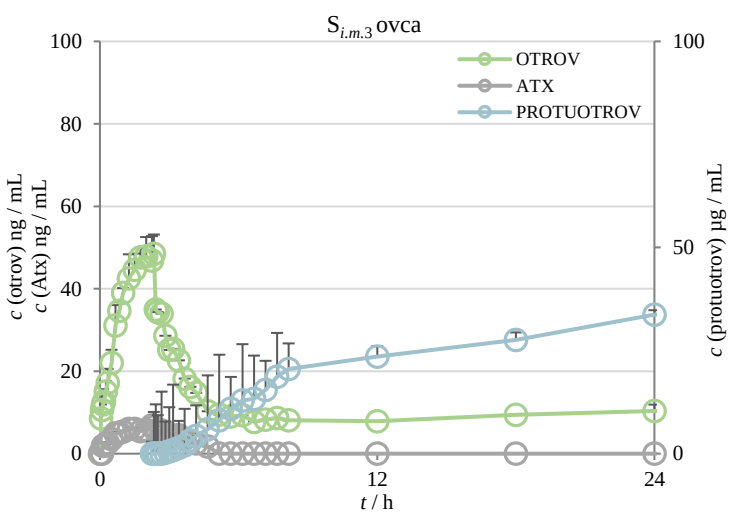
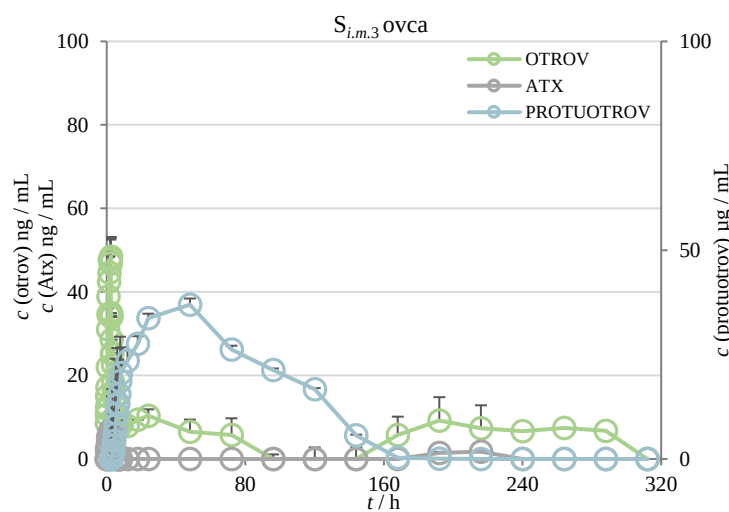
(a)

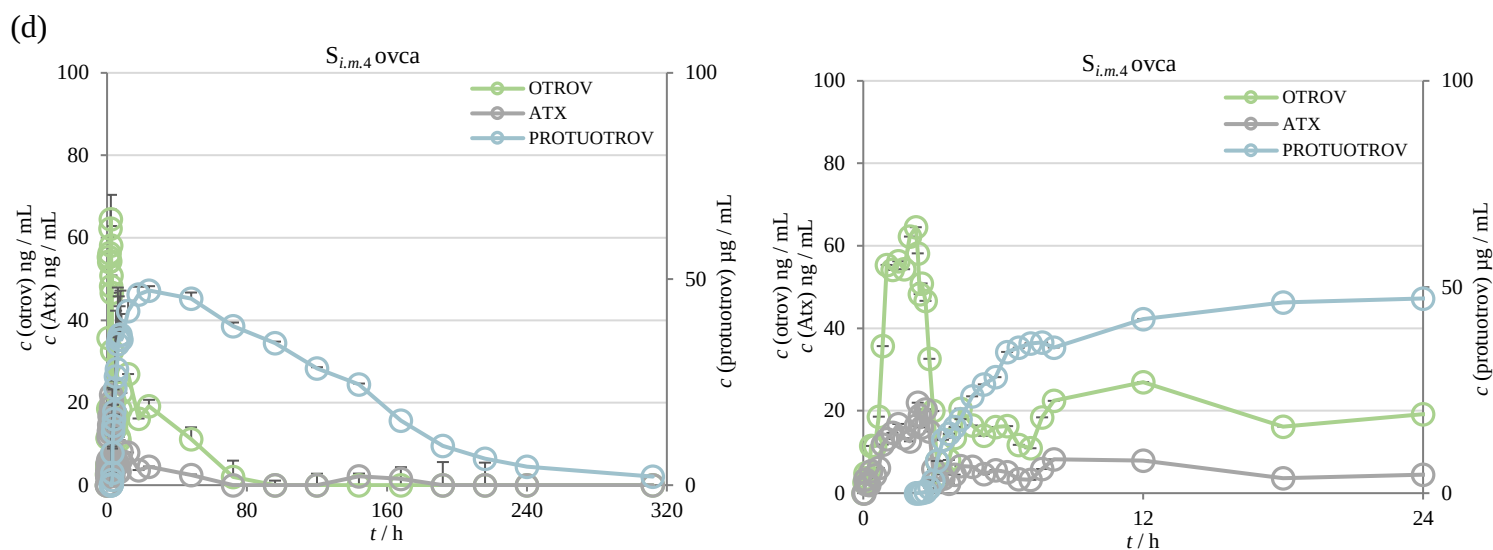


(b)



(c)



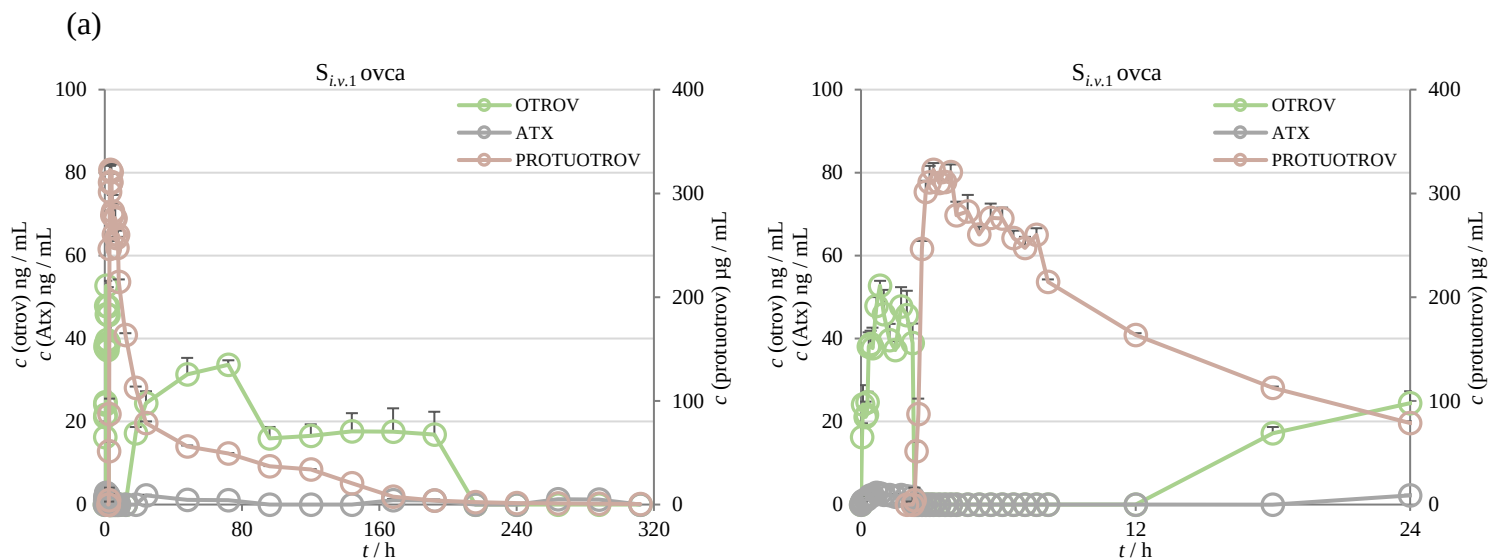


Slika 20. Farmakokinetički profili otrova ($m = 20$ mg), amoditoksina (Atx-a) i *i.m.* protuotrova ($m = 400$ mg) u uzorcima seruma ovaca $S_{i,m,1}$ (a), $S_{i,m,2}$ (b), $S_{i,m,3}$ (c) i $S_{i,m,4}$ (d) tijekom cijelog perioda uzorkovanja (lijevi panel) i tijekom prva 24 h (desni panel). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost triju mjerenja $\pm$ standardna pogreška.

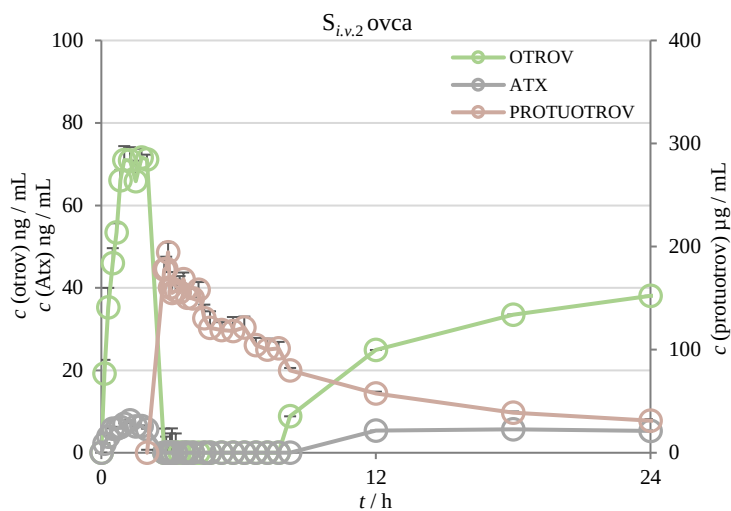
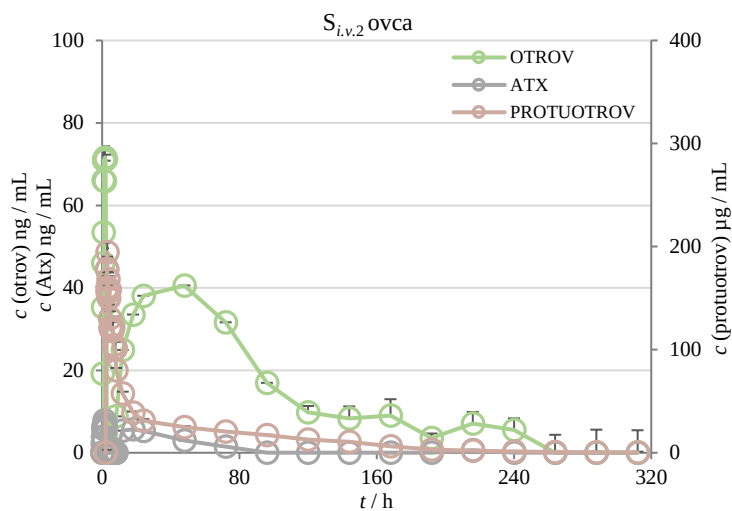
Tablica 22. Vrijeme i koncentracija protuotrova potrebni za neutralizaciju otrova ($m = 20$ mg) i amoditoksina (Atx-a) u serumu nakon njegove *i.m.* i *i.v.* primjene ($m = 400$ mg) te vrijeme do opetovane pojave otrova i Atx-a. Parametri su dani za svaku jedinku iz $S_{i.m.}$, odnosno $S_{i.v.}$ grupe.

	$S_{i.m.1}$	$S_{i.m.2}$	$S_{i.m.3}$	$S_{i.m.4}$	$S_{i.v.1}$	$S_{i.v.2}$	$S_{i.v.3}$	$S_{i.v.4}$
Vrijeme potrebno za neutralizaciju otrova / min	118	5628	5628	5628	7,8	10	3	3
Koncentracija protuotrova u trenutku neutralizacije otrova [$\mu\text{g} / \text{mL}$]	2,5	34,8	21,3	34,4	4,3	177,7	47,6	76,8
Vrijeme potrebno za neutralizaciju Atx-a / min	103	103	178	4188	7,8	10	3	51
Koncentracija protuotrova u trenutku neutralizacije Atx-a [$\mu\text{g} / \text{mL}$]	1,7	7,1	8,1	38,5	4,3	177,7	47,6	131,2
Vrijeme opetovane pojave otrova / h	21,8	/	165,8	/	15,8	5,67	15,8	9,6
Vrijeme opetovane pojave Atx-a / h	/	3,97	189,8	141,8	21,8 165,8 261,8	9,4 213,4	15,8 141,8 285,8	1,0 1,8 3,8 9,6 ≥ 10

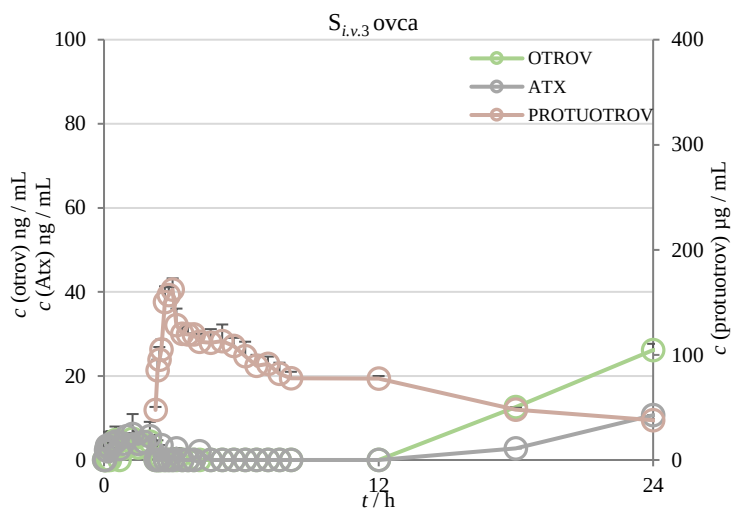
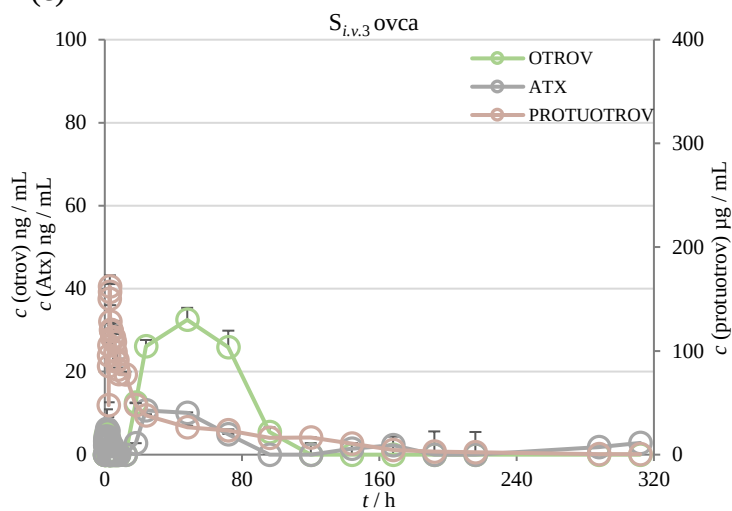
Kod ovaca $S_{i.v.1}$ i $S_{i.v.4}$ period od s.c. aplikacije otrova do pojave njegove prve mjerljive koncentracije (16,2 ng / mL i 19,9 ng / mL) iznosio je 2,5 min, isto kao i period do pojave prve mjerljive koncentracije Atx-a (0,6 ng / mL i 5,4 ng / mL) (Tablica 21, Slika 21a i 21d). Najviša koncentracija otrova ($c_{\max} = 81,0$ ng / mL) i Atx-a ($c_{\max} = 25,4$ ng / mL) izmjerena je kod ovce $S_{i.v.4}$ nakon 48, odnosno 24 h ($t_{\max}$) (Tablica 21, Slika 21d). Kod $S_{i.v.}$ grupe do potpune neutralizacije otrova došlo je u prosjeku 6 min od primjene i.v. protuotrova, u trenutku kada je njegova koncentracija iznosila oko 77 μ g / mL (Tablica 22, Slika 21). Potpuna neutralizacija Atx-a je nastupila samo kod ovaca $S_{i.v.1}$ i $S_{i.v.2}$ (Tablica 22). Kao i kod ovaca iz $S_{i.m.}$ grupe, u sistemskej cirkulaciji je došlo do opetovane pojave otrova i Atx-a nakon prosječno 12 h. Atx je detektiran čak u dva ili više navrata tijekom 2 tjedna (Tablica 22), što je osobito bilo naglašeno kod ovce $S_{i.v.4}$. Kod nje je postignuta kratkotrajna neutralizacija u 51. minuti, nakon čega se Atx opet pojavio u sljedeća četiri mjerenja. Od desetog sata nakon primjene protuotrova pa sve do završetka mjerenja, stalno je bio prisutan u mjerljivim koncentracijama.



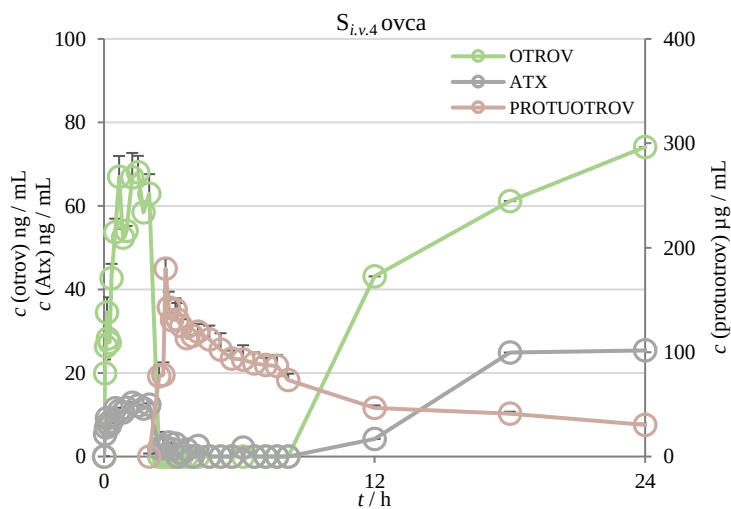
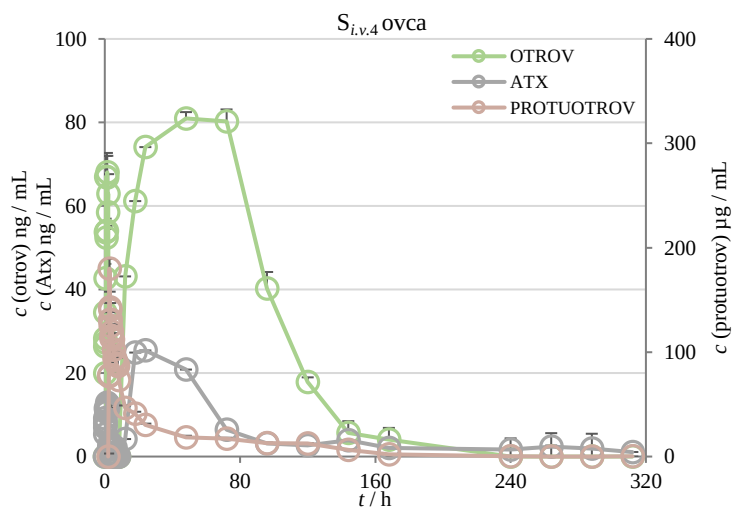
(b)



(c)



(d)



Slika 21. Farmakokinetički profili otrova ($m = 20$ mg), amoditoksina (Atx-a) i *i.v.* protuotrova ($m = 400$ mg) u uzorcima seruma ovaca $S_{i.v.1}$ (a), $S_{i.v.2}$ (b), $S_{i.v.3}$ (c) i $S_{i.v.4}$ (d) tijekom cijelog perioda uzorkovanja (lijevi panel) i tijekom prva 24 h (desni panel). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost triju mjerenja $\pm$ standardna pogreška.

Izmjerene koncentracije otrova i Atx-a (Slike 20 i 21) korištene su za određivanje njihovih farmakokinetičkih parametara (Tablice 23 i 24, Slike 22 i 23). U obje grupe maksimalne koncentracije otrova ($c_{\max}$) bile su podudarne i kretale su se oko 60 ng / mL, ali su postignute u različito vrijeme (Tablica 23). U $S_{i.m.}$ grupi $c_{\max}$ otrova je postignut ili tijekom razdoblja prije primjene protuotrova ili u periodu neposredno nakon njegove primjene, a prije nego što je nastupila neutralizacija. U $S_{i.v.}$ grupi, $c_{\max}$ otrova je postignut ili tijekom razdoblja prije primjene protuotrova ili tek nakon dva dana s obzirom da je početna neutralizacija otrova, koja se dogodila nekoliko minuta nakon primjene protuotrova, bila praćena izraženim sekundarnim porastom njegovih koncentracija u serumu (Slika 24b). Fenomen je također primijećen u $S_{i.m.}$ grupi, ali u manjoj mjeri (Slika 24a). Naime, ukupna izloženost otrovu u razdoblju nakon tretmana bila je tri puta manja kada je protuotrov primijenjen *i.m.* ($95,2 \text{ (}\mu\text{g / mL)} \times \text{min}$) u usporedbi s onim danim *i.v.* ($296,5 \text{ (}\mu\text{g / mL)} \times \text{min}$). Osim toga, *i.m.* protuotrov je omogućio veći volumen distribucije (V_z) i klirens (CL) otrova (Tablica 23, Slika 22). Podudarni rezultati dobiveni su kada se pratila farmakokinetika Atx-a (Tablica 24, Slika 23). *I.v.* primjena protuotrova rezultirala je i duljim poluvremenom eliminacije ($t_{1/2}$) te većom ukupnom izloženošću (AUC_{0-t}), manjim volumenom distribucije (V_z) i klirensom (CL) otrova i Atx-a (Slike 22 i 23, Tablice 23 i 24).

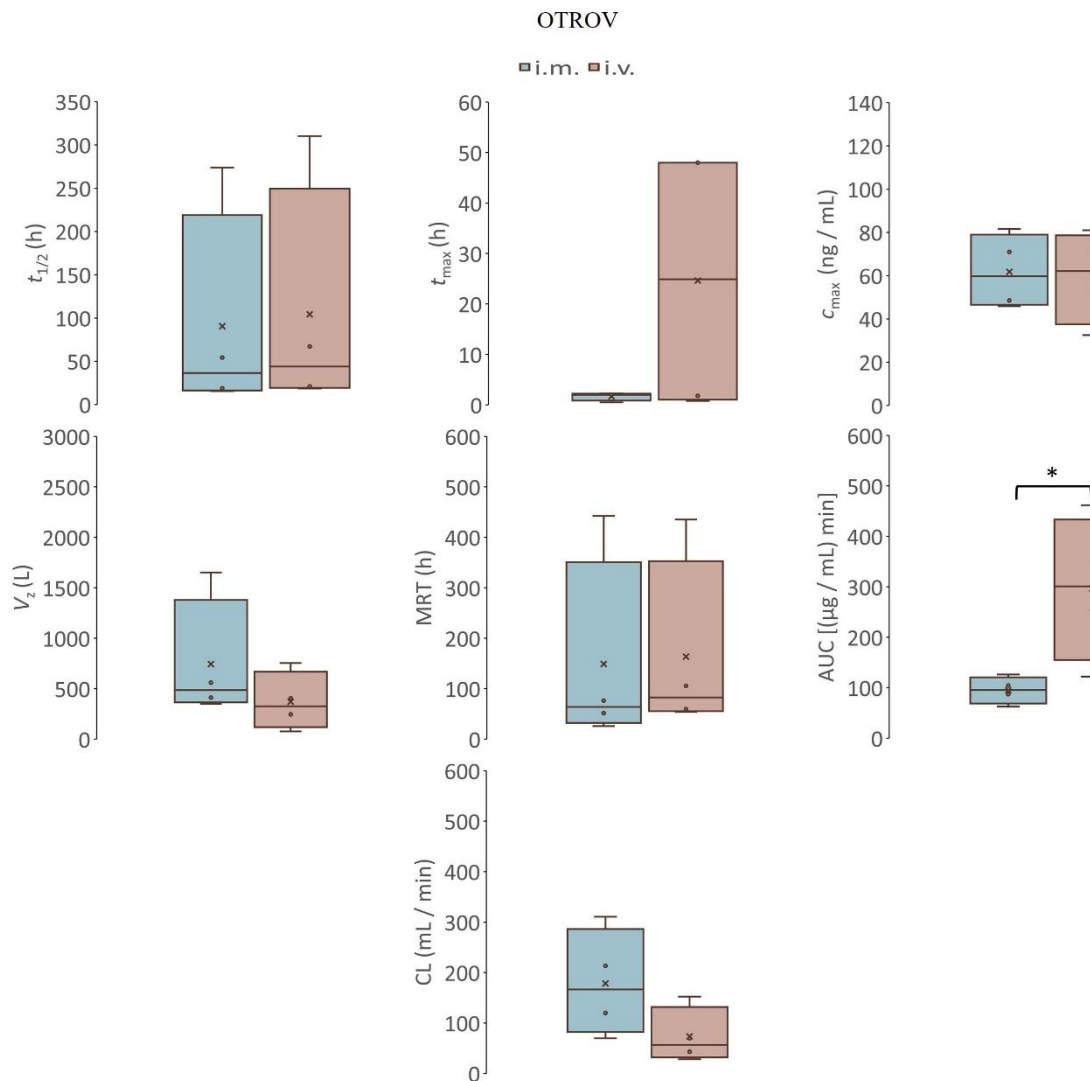
Tablica 23. Farmakokinetički parametri s.c. apliciranog otrova ($m = 20$ mg) u sistemskoj cirkulaciji – poluvrijeme eliminacije ($t_{1/2}$), vrijeme za postizanje maksimalne koncentracije ($t_{\max}$) i maksimalna koncentracija ($c_{\max}$), volumen distribucije (V_z), srednje vrijeme zadržavanja (MRT), ukupna količina u krvotoku tijekom razdoblja mjerenja (AUC_{0-t}) i klirens (CL) protuotrova u odnosu na put njegovog davanja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška (SE), odnosno kao medijan s interkvartilnim rasponom (IQR). Razlike između grupe $S_{i.m.}$, liječene *i.m.* protuotrovom, i grupe $S_{i.v.}$, liječene *i.v.* protuotrovom, procijenjene su U-testom na razini značajnosti $p < 0,05$.

	OTROV			
	$S_{i.m.}$		$S_{i.v.}$	
	srednja vrijednost $\pm$ SE	medijan (IQR)	srednja vrijednost $\pm$ SE	medijan (IQR)
$t_{1/2}$ [h]	90,6 $\pm$ 61,7	36,6 (16,3 – 218,9)	104,3 $\pm$ 69,6	44,0 (19,2 – 249,5)
$t_{\max}$ [h]	1,7 $\pm$ 0,8	2,0 (0,9 – 2,2)	24,7 $\pm$ 13,5	24,9 (1,1 – 48,0)
$c_{\max}$ [ng / mL]	61,7 $\pm$ 8,7	59,7 (46,6 – 78,9)	59,4 $\pm$ 10,7	62,2 (37,5 – 78,6)
V_z [L]	744,0 $\pm$ 306,0	487,5 (365,1 – 1379,6)	371,3 $\pm$ 144,5	326,3 (119,7 – 668,1)
MRT [h]	149,1 $\pm$ 98,3	64,1 (32,4 – 350,9)	163,7 $\pm$ 91,2	82,6 (55,6 – 352,8)
AUC_{0-t} [(μ g / mL) $\times$ min]	95,2 $\pm$ 13,5	95,9 (68,8 – 120,9)*	296,5 $\pm$ 72,0	300,9 (155,2 – 433,3)*
CL [mL / min]	178,4 $\pm$ 53,1	166,7 (82,3 – 286,2)	73,5 $\pm$ 27,7	56,7 (32,1 – 131,9)

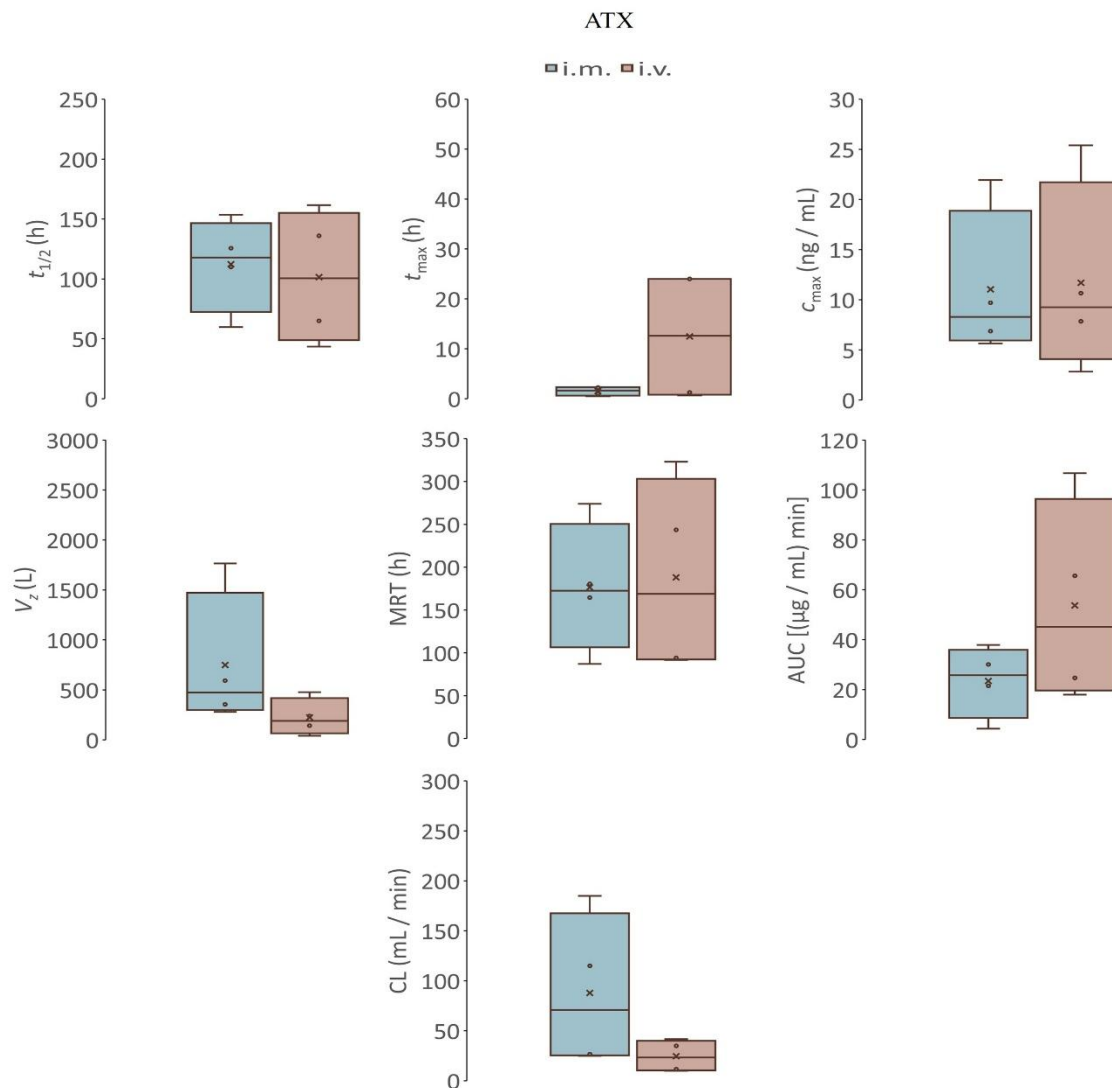
*Značajna razlika između grupe $S_{i.m.}$ i $S_{i.v.}$ ($p < 0,05$).

Tablica 24. Farmakokinetički parametri s.c. apliciranog amoditoksina (Atx-a) u sistemske cirkulaciji – poluvrijeme eliminacije ($t_{1/2}$), vrijeme za postizanje maksimalne koncentracije ($t_{\max}$) i maksimalna koncentracija ($c_{\max}$), volumen distribucije (V_z), srednje vrijeme zadržavanja (MRT), ukupna količina u krvotoku tijekom razdoblja mjerenja (AUC_{0-t}) i klirens (CL) protuotrova u odnosu na put njegovog davanja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška (SE), odnosno kao medijan s interkvartilnim rasponom (IQR). Razlike između grupe $S_{i.m.}$, liječene i.m. protuotrovom, i grupe $S_{i.v.}$, liječene i.v. protuotrovom, procijenjene su U-testom na razini značajnosti $p < 0,05$.

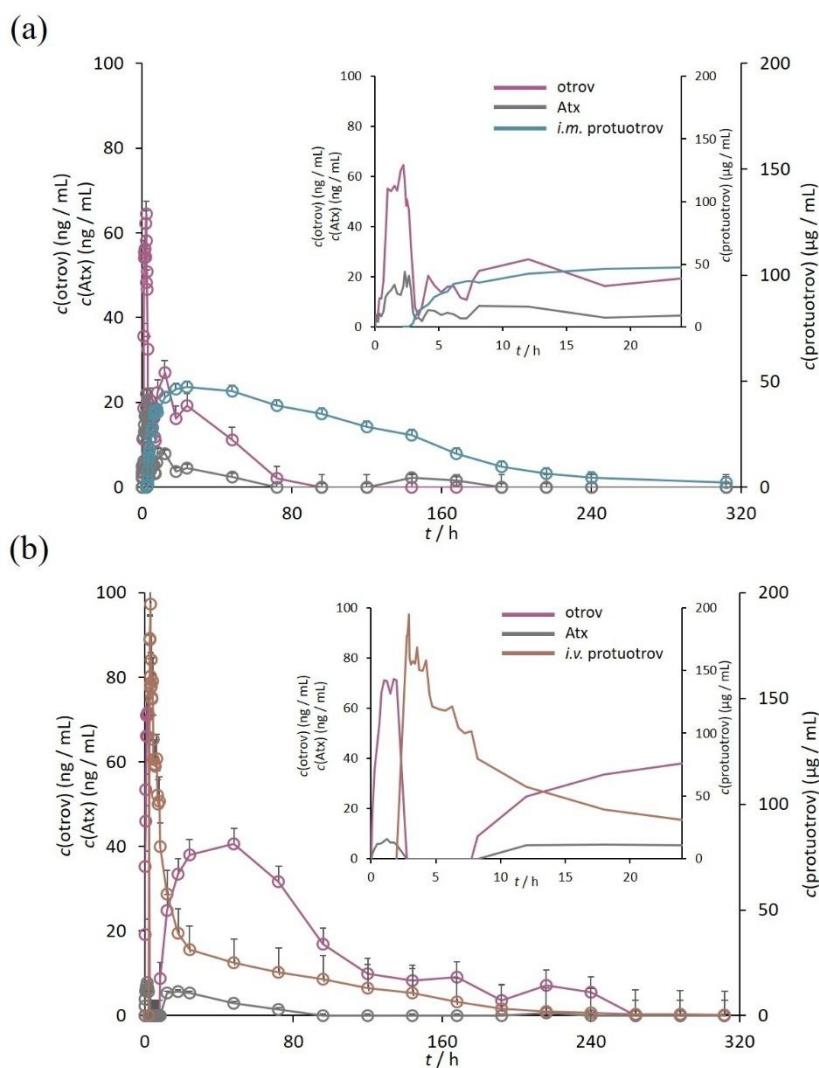
	Atx			
	$S_{i.m.}$		$S_{i.v.}$	
	srednja vrijednost $\pm$ SE	medijan (IQR)	srednja vrijednost $\pm$ SE	medijan (IQR)
$t_{1/2}$ [h]	112,2 $\pm$ 19,7	117,8 (72,3 – 146,5)	101,5 $\pm$ 28,1	100,5 (48,9 – 155,2)
$t_{\max}$ [h]	1,5 $\pm$ 0,5	1,6 (0,6 – 2,3)	12,5 $\pm$ 6,7	12,6 (0,8 – 24,0)
$c_{\max}$ [ng / mL]	11,0 $\pm$ 3,7	8,3 (5,9 – 18,9)	11,7 $\pm$ 4,9	9,3 (4,1 – 21,7)
V_z [L]	748,6 $\pm$ 345,6	474,2 (299,1 – 1472,5)	224,8 $\pm$ 93,5	190,2 (66,2 – 418,0)
MRT [h]	176,5 $\pm$ 38,3	172,5 (106,4 – 250,5)	188,1 $\pm$ 57,3	168,8 (92,3 – 303,2)
AUC_{0-t} [(μ g / mL) $\times$ min]	23,5 $\pm$ 7,2	25,8 (8,6 – 36,0)	53,8 $\pm$ 20,5	45,2 (19,7 – 96,4)
CL [mL / min]	87,9 $\pm$ 38,6	70,9 (25,4 – 167,5)	24,6 $\pm$ 8,1	23,4 (10,4 – 40,0)



Slika 22. Farmakokinetički parametri otrova ($m = 20 \text{ mg}$) u serumu otrovanih i protuotrovom ($m = 400 \text{ mg}$) tretiranih ovaca – poluvrijeme eliminacije ($t_{1/2}$), vrijeme za postizanje maksimalne koncentracije (t_{max}) i maksimalne koncentracije (c_{max}), volumen distribucije (V_z), srednje vrijeme zadržavanja (MRT), ukupna količina u krvotoku tijekom razdoblja mjerenja (AUC_{0-t}) i klirens (CL) u odnosu na put davanja protuotrova. Značajnost razlike između $S_{i.m.}$ grupe, liječene i.m. protuotrovom, i $S_{i.v.}$ grupe, liječene i.v. protuotrovom, procijenjena je U-testom na razini značajnosti $p < 0,05$. Značajne razlike između grupa su označene zvjezdicom. Pravokutnik označava interkvartilni raspon (raspon između 25. i 75. percentila), vodoravna crta unutar pravokutnika označava medijan, križić (x) srednju vrijednost, kružići (o) pojedinačne vrijednosti, a linije koje izlaze iz pravokutnika (*engl.* whiskers) najvišu i najnižu izmjerenu vrijednost.



Slika 23. Farmakokinetički parametri amoditoksina (Atx-a) u serumu otrovanih i protuotrovom ($m = 400$ mg) tretiranih ovaca – poluvrijeme eliminacije ($t_{1/2}$), vrijeme za postizanje maksimalne koncentracije (t_{max}) i maksimalne koncentracije (C_{max}), volumen distribucije (V_z), srednje vrijeme zadržavanja (MRT), ukupna količina u krvotoku tijekom razdoblja mjerenja (AUC_{0-t}) i klirens (CL) u odnosu na put davanja protuotrova. Značajnost razlike između $S_{i.m.}$ grupe, liječene *i.m.* protuotrovom, i $S_{i.v.}$ grupe, liječene *i.v.* protuotrovom, procijenjena je U-testom na razini značajnosti $p < 0,05$. Pravokutnik označava interkvartilni raspon (raspon između 25. i 75. percentila), vodoravna crta unutar pravokutnika označava medijan, križić (x) srednju vrijednost, kružići (o) pojedinačne vrijednosti, a linije koje izlaze iz pravokutnika (*engl.* whiskers) najvišu i najnižu izmjerenu vrijednost.

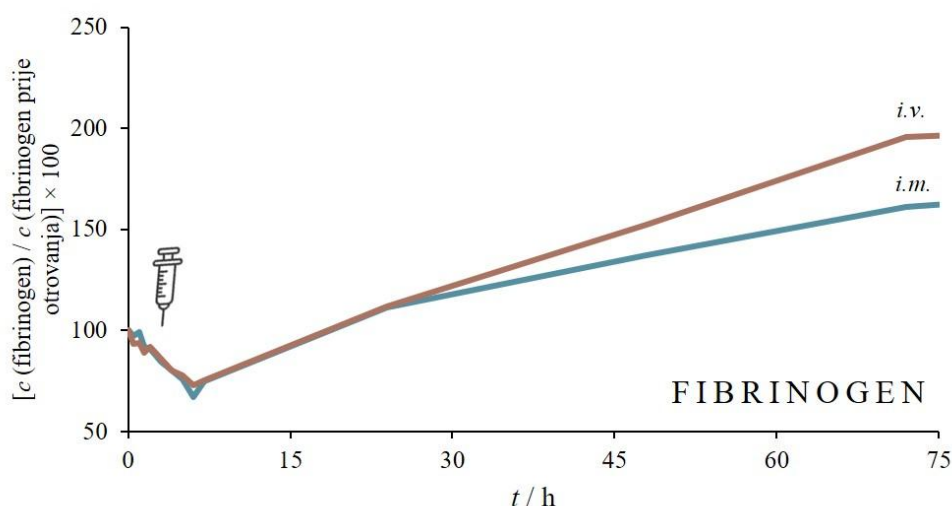


Slika 24. Farmakokinetika otrova ($m = 20$ mg) i protuotrova ($m = 400$ mg) u sistemske cirkulaciji. Reprezentativni farmakokinetički profili otrova, amoditoksina (Atx-a) i *i.m.* primijenjenog protuotrova u sistemske cirkulaciji ovce iz $S_{i.m.}$ grupe tijekom cijelog perioda uzorkovanja i tijekom prva 24 sata (izvadak) (a). Reprezentativni farmakokinetički profili otrova, Atx-a i *i.v.* administriranog protuotrova u sistemske cirkulaciji ovce iz $S_{i.v.}$ grupe tijekom cijelog razdoblja uzorkovanja i tijekom prva 24 h (izvadak) (b). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri neovisna mjerenja $\pm$ standardna pogreška (SE).

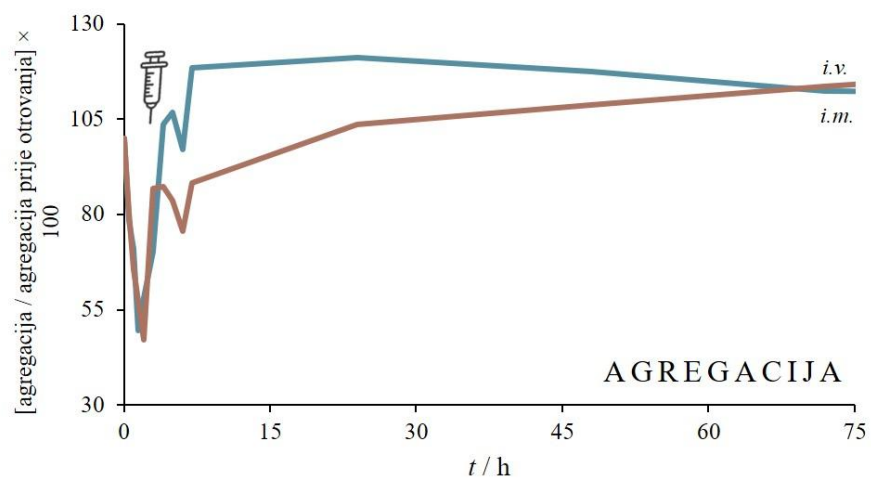
4.5. Hematološki i koagulacijski parametri

Otrovanje je uzrokovalo promjene u razini fibrinogena, broju trombocita i sposobnosti agregacije. Najizraženiji pad koncentracije fibrinogena, od približno 70% u odnosu na početnu vrijednost, izmjeren je 6 sati nakon aplikacije otrova, dok je početak oporavka bio vidljiv 5 sati od primjene protuotrova (Slika 25a). Slično tome, agregacija trombocita se smanjila za oko 50% u odnosu na početnu vrijednost, što je izmjereno 1,5 do 2 sata nakon otrovanja, s poboljšanjem uočenim unutar jednog sata od početka liječenja (Slika 25b). Najizraženiji pad broja trombocita, za otprilike 50% u odnosu na početnu vrijednost, izmjeren je 2 sata nakon otrovanja, dok je početak oporavka bio evidentan 1 sat od primjene protutrova (Slika 25c). Trajanje perioda od početka liječenja do nastupa poboljšanja nije bilo ovisno o načinu primjene protuotrova. Također, otrovanje je bilo popraćeno kontinuiranom leukocitozom, s kratkotrajnim padom broja leukocita koji se dogodilo 4 sata nakon otrovanja (Slika 25d). Protuotrov, neovisno o načinu davanja, nije pokazao utjecaj na daljnji progres leukocitoze. Otrovnost nije imao učinak na protrombinsko vrijeme, aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme, razinu D-dimera i broj eritrocita, koji su ostali unutar fiziološkog raspona tijekom cijelog razdoblja mjerenja.

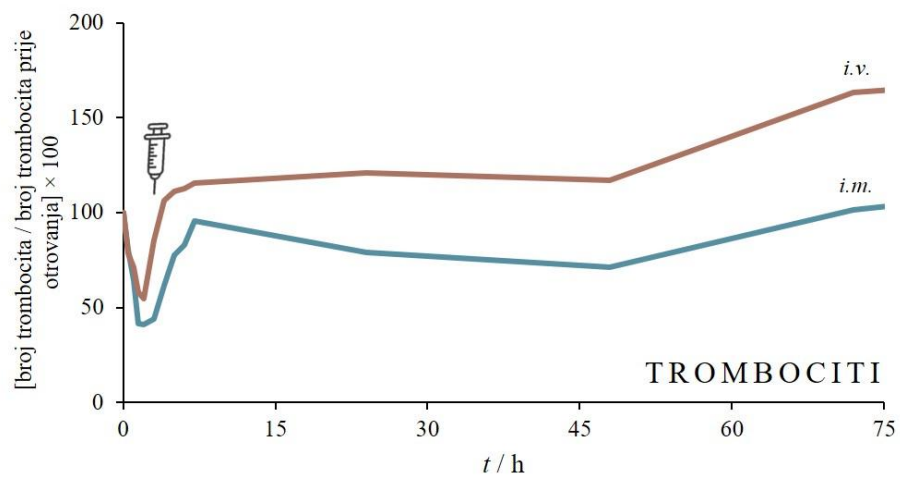
(a)



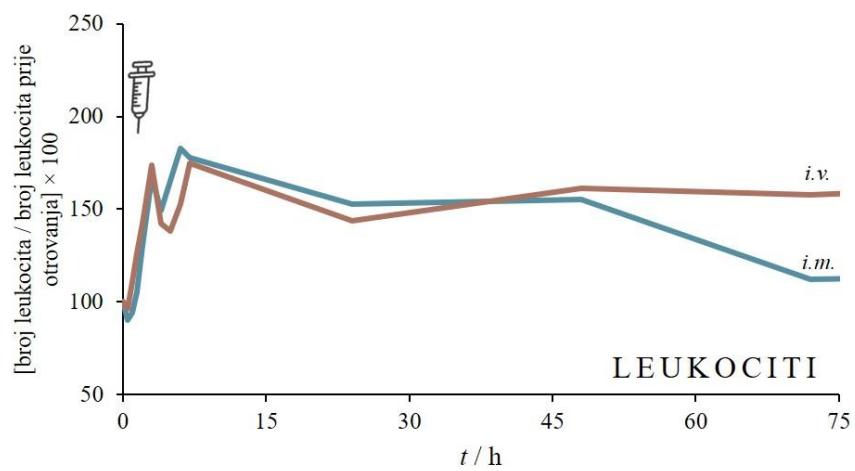
(b)



(c)



(d)



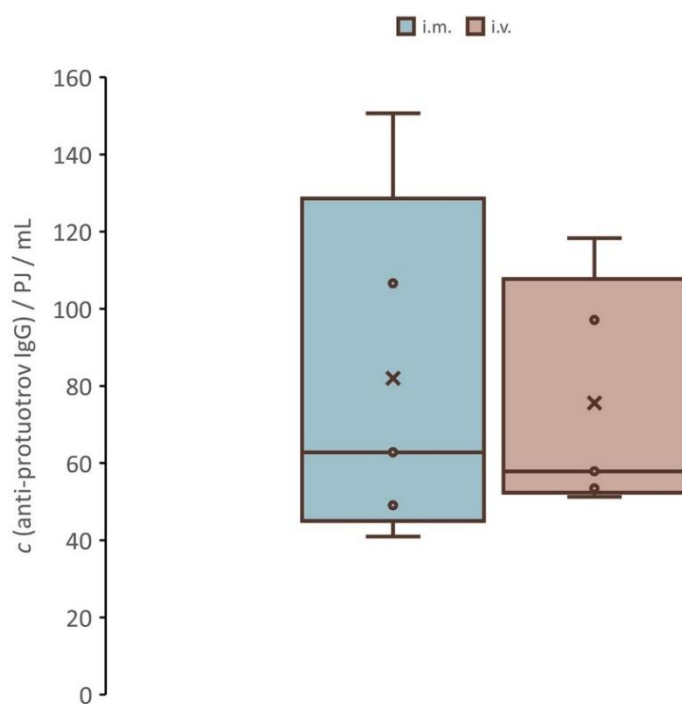
Slika 25. Utjecaj *i.m.* i *i.v.* protuotrova ($m = 400$ mg) na krvne poremećaje izazvane otrovom ($m = 20$ mg). Koncentracija fibrinogena (a), stupanj agregacije (b), broj trombocita (c) i broj leukocita (d) određeni su u uzorcima krvi uzetim prije i nakon otrovanja te tijekom razdoblja nakon tretmana. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost mjerenja dobivenih za sve jedinke u *i.m.*, odnosno *i.v.* grupi. Vrijeme davanja protuotrova je označeno shemom injekcijske šprice.

4.6. Humoralni odgovor na konjske $F(ab')_2$ fragmente

ELISA-om je određena količina IgG-a specifičnih za konjske $F(ab')_2$ fragmente protuotrova u uzorcima seruma životinja iz "rescue-type" faze istraživanja, a koji su prikupljeni dva tjedna nakon terapijske intervencije (Tablica 25). Nije bilo značajne razlike u humoralnom odgovoru između životinja koje su primile protuotrov *i.m.* i onih koje su ga primile *i.v.* putem (U test, $p > 0,05$) (Slika 26). Koncentracije anti-protuotrov IgG-a bili su podudarni u obje grupe, bez obzira na put primjene.

Tablica 25. Usporedba koncentracija anti-protuotrov IgG-a izmjerenih u serumu ovaca ovisno o putu primjene protuotrova ($m = 400$ mg). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška (SE), odnosno kao medijan s interkvartilnim rasponom (IQR). Značajnost razlike između grupa $S_{i.m.}$, liječene *i.m.* protuotrovom, i grupe $S_{i.v.}$, liječene *i.v.* protuotrovom, procijenjena je U-testom.

Anti-protuotrov IgG				
	$S_{i.m.}$		$S_{i.v.}$	
	srednja vrijednost $\pm$ SE	medijan (IQR)	srednja vrijednost $\pm$ SE	medijan (IQR)
c [PJ / mL]	82,0 $\pm$ 4,4	62,8 (49,1 – 128,6)	75,6 $\pm$ 2,9	57,9 (52,3 – 107,7)



Slika 26. Humoralni odgovor na *i.m.* i *i.v.* protuotrov izmjeren 2 tjedna od njegove primjene u dozi od 400 mg. Koncentracije anti-protuotrov IgG-a u uzorcima seruma određene su ELISA testom i izražene u proizvoljnim jedinicama (PJ) po mL (PJ / mL). Razlika između $S_{i.m.}$ grupe, liječene *i.m.* protuotrovom, i $S_{i.v.}$ grupe, liječene *i.v.* protuotrovom, procijenjena je U-testom na razini značajnosti $p < 0,05$.

5. RASPRAVA

Zmije su medicinski najznačajnije fanerotoksične životinje sa specijaliziranim sustavima za proizvodnju i ubrizgavanje otrova izravno u tijelo žrtve čiji ugrizi predstavljaju ozbiljan javnozdravstveni problem (Gutiérrez i sur., 2017; Warrell, 2019). Godišnje se bilježi oko 2,7 milijuna slučajeva otrovanja, a više od 400 000 žrtava ostaju trajni invalidi. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) razvila je sveobuhvatnu strategiju za smanjenje razornih učinaka otrovanja, s naglaskom na važnost globalnog pristupa sigurnim i učinkovitim protuotrovima. Protuotrovi, koji se sastoje od cijelih IgG-a ili njihovih fragmenata specifičnih za otrov, čine glavni oslonac u terapiji otrovanja zmijskih ugriza. Standardizirani protokol za njihovu primjenu ne postoji. Ipak, prevladava mišljenje da *i.m.* administracija ne predstavlja optimalan izbor za postizanje uspješnog ishoda liječenja te se preporuča *i.v.* terapijski princip kao primjereniji za usklađivanje farmakokinetičkog profila protuotrova s onim ciljnog otrova, a koji je dugi niz godina bio praćen isključivo u sistemske cirkulaciji (Ismail i Abd-Elsalam, 1996; Pépin-Covatta i sur., 1996; Pepin i sur., 1995; Rivière i sur., 1998). Tek je nedavno postalo jasno da limfni sustav ne može biti zanemaren u pravilnom razumijevanju interakcije otrova i protuotrova, s obzirom na značaj njegove uloge u transportu intersticijske tekućine sa *s.c.* apliciranim proteinima u sistemske cirkulaciju (Porter i sur., 2001; Mora i sur., 2008; Paniagua i sur., 2015). Provedeno istraživanje predstavlja doprinos boljem razumijevanju prednosti i nedostataka *i.v.* i *i.m.* primijenjenog protuotrova, ne samo kroz praćenje razine otrova u oba relevantna tjelesna odjeljka, već i kroz procjenu njihove učinkovitosti u otklanjanju krvnih poremećaja i sigurnosnog profila, sve s ciljem utvrđivanja optimalnog pristupa u terapiji otrovanja.

Prije izvođenja farmakokinetičke studije na eksperimentalno otrovanim i liječenim životinjama, prvo je uspostavljen ovčji eksperimentalni model na kojem su razvijene procedure i kirurške tehnike za biološko uzorkovanje krvi i limfe, kao i metode za kvantifikaciju ovalbumina, netoksičnog proteina korištenog za probnu imunizaciju, a što je kasnije primijenjeno u glavnoj, „rescue-type“ fazi istraživanja. Iako se ne uzgajaju kao laboratorijske životinje, ovce se smatraju dobrim modelom za proučavanje limfne apsorpcije *s.c.* injiciranih proteina (Porter i sur., 2001; Scheerlinck i sur., 2008) s obzirom da su se dosadašnji rezultati istraživanja pokazali usporedivi s onima dobivenima za ljude

(Porter i sur., 2001; Woo i Jusko, 2007). Također, njihova veličina olakšava izvođenje procedura i kirurških tehnika kao i prikupljanje bioloških uzoraka u potrebnoj količini bez štetnih posljedica po njihovo zdravlje (Scheerlinck i sur., 2008). U preliminarnoj fazi istraživanja četiri ovce su imunizirane s ovalbuminom kao modelnim antigenom u dozi koja približno odgovara količini otrova ubrizganog u tipičnom otrovanju. Implementirane su metode za prikupljanje biološkog materijala – krvi iz jugularne vene i limfe kontinuiranim dreniranjem iz prsnog limfovoda, uspostavljena je ELISA za kvantifikaciju ovalbumina, potvrđeno je da je aplicirana doza dostatna za pojavu mjerljivih koncentracija u limfnoj i sistemske cirkulaciji, i konačno, definiran je optimalni protokol uzorkovanja za pouzdan izračun farmakokinetičkih parametara.

Povećanje količine ovalbumina apsorbiranog u limfni sustav praćeno je njegovom kvantifikacijom u uzorcima limfe i izraženo kao kumulativno apsorbirana doza. Kod jedne ovce apsorbirala se zanemariva količina administrirane doze što ukazuje na neuspješnu aplikaciju, najvjerojatnije zbog primjene pod pogrešnim kutem, prekomjerne sile pri ubrizgavanju ili loše resorpcije, a kod druge zadovoljavajućih 11%, što prati postotak apsorpcije proteina slične molekulske mase kod ovaca (Charman i sur., 2000). Dobiveni rezultati sugeriraju da vrijeme uzorkovanja treba iznositi najmanje četiri sata da bi se postigao plato apsorpcije. Duže vrijeme uzorkovanja nije ni preporučljivo zbog zdravstvenih rizika povezanih s dugotrajnim boravkom u anesteziji. Naime, kod preživača se mogu pojaviti nadutost buraga, regurgitacija i aspiracijska pneumonija (Costea i sur., 2024). Anesteziološki protokol i konačni ishod ovise o složenosti eksperimentalnog zahvata. Ovce se uspješno oporavljaju nakon kraćih anestezija (Sauter-Starace i sur., 2019), a ako je njeno trajanje duže od šest sati, postupak završava terminalno (Grimm i sur., 2021; Paniagua i sur., 2019; Trimmel i sur., 2022).

Promjene u razini ovalbumina u sistemske cirkulaciji praćene su njegovom kvantifikacijom u uzorcima seruma koji su prikupljeni tijekom dva tjedna što se pokazalo i više nego dovoljno dugim periodom za farmakokinetičku analizu. Između dviju ovaca utvrđene su nepodudarnosti u većini mjerenih parametara koje najvjerojatnije proizlaze iz fizioloških razlika među jedinkama, a moguće i iz svojstava apliciranog spoja (Ryman i Meibohm, 2017; Shah i Betts, 2012; Vugmeyster i sur., 2012). Ovca SOVA1 imala je kraće poluvrijeme eliminacije ($t_{1/2}$) nego ovca SOVA2, vjerojatno zato što je kod nje, uslijed slabije raspodjele unutar tkiva, ovalbumin u većoj mjeri ostao dostupan u krvotoku i bio

izložen bržem uklanjanju putem bubrežne filtracije (Briggs, 1938). Stoga je za ovcu SOVA1 dobiven manji volumen distribucije (V_z), odnosno veći klirens (CL) nego za ovcu SOVA2. Rezultati farmakokinetičke analize provedene na ovci SOVA1 su usklađeni s očekivanjima s obzirom da se ovalbumin, kako je opaženo nakon njegove *i.v.* primjene, distribuira samo u jetru, i donekle, slezenu, bez tragova prisutnosti u drugim tkivima (Abramović i sur., 2010). Slična pojava zabilježena je i kod monoklonskih antitijela koja također pokazuju ograničenu tkivnu raspodjelu povezanu s njihovom brzom eliminacijom (Shah i Betts, 2012). Kod obje ovce koncentracija ovalbumina se mijenjala prema tipičnom farmakokinetičkom profilu. Prvo se postupno povećavala, dosežući maksimalnu vrijednost nakon 1 – 2,5 h da bi se uslijed eliminacije vratila na početnu razinu otprilike četvrtog dana od primjene. Iako su krivulje ovisnosti koncentracija o vremenu bile vizualno podudarne, kod ovce SOVA1 je određena bitno manja ukupna izloženost (AUC_{0-t}) ovalbuminu. S obzirom da su za obje životinje dobivene podudarne maksimalne koncentracije koje su bile postignute u različitom vremenskom roku, razlika u AUC_{0-t} vrijednostima najvjerojatnije je rezultat brže apsorpcije i brže eliminacije ovalbumina kod ovce SOVA1, što je dovelo do njegovog kraćeg zadržavanja u organizmu u odnosu na ovcu SOVA2.

Nalazi dobiveni *s.c.* primjenom ovalbumina su se dalje koristili u planiranju i izvedbi glavne faze istraživanja u kojoj su ovce eksperimentalno otrovane i tretirane *i.v.* ili *i.m.* protuotrovom. Njihovi farmakokinetički profili u sistemskej cirkulaciji su se pokazali usporedivi s onima iz literature u kojoj je opisan brži početak djelovanja protuotrova nakon *i.v.* primjene i njegov dugotrajniji učinak nakon *i.m.* primjene (Pepin i sur., 1995). Osim toga, provedenim istraživanjem potvrđena je i važnost limfne apsorpcije u distribuciji protuotrova, neovisno o putu administracije. Time su proširena ranija saznanja iz eksperimenata na ovčjem modelu u kojima je *i.v.* primijenjeni protuotrov odigrao ključnu ulogu u uklanjanju *s.c.* apliciranog otrova iz limfe i, posljedično, učinkovitosti terapije (Paniagua i sur., 2019). Nakon primjene otrova, neanestezirane životinje za uzorkovanje seruma su pokazale odizanje stražnje noge od poda, a na mjestu injekcije u interdigitalnom prostoru razvio se blagi edem koji je riješen primjenom analgetika. Njihov oporavak je bio potpun, bez komplikacija i promjena u ponašanju ili bilo kojem drugom simptomu koji bi upućivao na bol. Svih osam je vraćeno vlasniku. S druge strane, životinje za uzorkovanje limfe po završetku eksperimenta su

žrtvovane u dubokom stadiju anestezije. Naime, zbog uzimanja velikog volumena limfe u kratkom vremenskom periodu procijenjeno je da bi postoperativne komplikacije otežale ili potpuno onemogućile njihov oporavak. Aplikacija otrova i protuotrova bila je uspješna kod svih ovaca uz iznimku jedne kojoj je uzorkovana limfa nakon *i.v.* injekcije protuotrova. Kod nje ni u jednom uzorku otrov, odnosno amoditoksini (Atx) nisu detektirani u mjerljivim koncentracijama. Najizgledniji razlog je povezan s odstupanjem od plana prikupljanja uzoraka limfe. Naime, tijekom operativnog postupka nije bilo moguće identificirati prsni limfovod te je uzorkovanje provedeno iz sporednih limfovoda za koje, po provedenoj analizi, postoji opravdana sumnja da uopće ne dreniraju područje u koje je apliciran otrov ili ga dreniraju s neadekvatnom stopom.

Istraživanjem je dobiveno da se *i.v.* protuotrov u limfi pojavljuje uglavnom za manje od deset minuta, ali u jako niskim koncentracijama, kao što je već demonstrirano u studiji koju su pod sličnim uvjetima proveli Paniagua i suradnici (2019). Međutim, u njihovom radu je zabilježena 8 – 9 puta veća količina kumulativno apsorbiranog protuotrova što bi moglo upućivati na varijacije u njegovoj formulaciji i apliciranoj dozi, kao i na specifične uvjete eksperimenta, poput stimulacije limfnog toka noge u koju je apliciran otrov i kirurškog pristupa limfnom sustavu kroz rez na vratu. Primjenom *i.v.* protuotrova po eksperimentalno izazvanom otrovanju dobiven je prosječni udio apsorbirane doze otrova od 1,2%, dok je u studiji koju su proveli Paniagua i suradnici iznosio 7%. Odstupanje bi moglo biti povezano s različitom vrstom korištenog otrova (*V. ammodytes* vs. *M. fulvius* otrov) i njegovom dozom (20 vs. 5 mg). Iako su rezultati kvantitativno različiti, oba nalaza potvrđuju da se, osim *i.v.* protuotrova, zajedno s njim limfom prenosi i frakcija otrova. Nadalje, istraživanjem je po prvi put dokazano da se *i.m.* protuotrov također apsorbira u limfni sustav. Time je otvoren prostor za usporedbu, ne samo njegove farmakokinetike s onom *i.v.* protuotrova, već i njihovog utjecaja na razinu otrova u limfnom sustavu. Među grupama su uočene razlike u brzini apsorpcije *i.v.* i *i.m.* protuotrova, njihovoj ukupnoj količini koja dospijeva u limfu i sposobnosti neutralizacije cirkulirajućeg otrova. U usporedbi s *i.v.* grupom, u *i.m.* grupi je zabilježena ranija pojava protuotrova u višim koncentracijama, kao i njegova veća kumulativno apsorbirana masa. U konačnici, nijedna od uočenih razlika se nije pokazala statistički značajnom ($p > 0,05$). Zbog boljih apsorpcijskih svojstava, *i.m.* protuotrov se pokazao uspješnijim u usporavanju pristizanja otrova i, posljedično, smanjenju njegove ukupne količine

dospjele u limfu tijekom perioda uzorkovanja. Što je još važnije, samo je protuotrov primijenjen *i.m.* osigurao potpunu neutralizaciju otrova apsorbiranog s mjesta aplikacije. Razlog njegove bolje učinkovitosti mogao bi biti povezan sa sporom, ali izravnom difuzijom $F(ab')_2$ fragmenata iz mišićnog tkiva u limfu gdje se otrov prvotno resorbira s mjesta ugriza prije nego što prijeđe u sistemsku cirkulaciju (Kurtović i sur., 2021; Paniagua i sur., 2015). Moguće je da limfni sustav s cirkulirajućim *i.m.* protuotrovom osigurava rano i lokalizirano uklanjanje otrova i služi kao prva linija obrane od njegovog daljnjeg širenja po organizmu čime se smanjuje rizik od izazivanja ozbiljnih sistemskih poremećaja, uključujući koagulopatiju i neurotoksičnost, kao i lokalnog oštećenja tkiva (Boyer i sur., 1999; Marinov i sur., 2010). Prethodnim istraživanjem protuotrova primijenjenog *i.v.* putem, nevezani otrov također je ostao detektabilan u limfi do kraja eksperimenta (Paniagua i sur., 2019). Autori su fenomen objasnili činjenicom da su koncentracije *i.v.* protuotrova u limfi niže nego u serumu, budući da u limfni sustav dospijevaju ekstravazacijom iz krvi. S druge strane, koncentracije otrova u limfi su više nego u serumu jer se s mjesta injekcije prvo apsorbira u limfni sustav. Mjesto injekcije otrova djeluje kao depo za njegovo produljeno otpuštanje, a limfa kao tzv. „sporo-oslobađajući rezervoar“ odgovoran za dugotrajnu izloženost otrovu koja otežava njegovu neutralizaciju *i.v.* protuotrovom. Odgođeno pristizanje *i.v.* protuotrova iz krvi u limfni sustav može predstavljati ključnu prepreku u postizanju efikasne sistemske zaštite (Paniagua i sur., 2012). Naime, kao što je pokazano provedenim istraživanjem, otrov poskoka se kontinuirano akumulira u limfi čak i nakon primjene *i.v.* protuotrova, što ukazuje na važnost prekida njegove daljnje apsorpcije postignutog *i.m.* protuotrovom. Dobiveni rezultati naglašavaju neusklađenost između brzog ulaska otrova i sporijeg prodora *i.v.* protuotrova u limfni sustav. Nasuprot tome, *i.m.* primjena pruža povoljniji farmakokinetički profil za neutralizaciju toksina unutar limfe, što bi moglo doprinijeti pravovremenoj prevenciji sistemskih komplikacija putem ranog „presretanja“ otrova. Zajedno, nalazi istraživanja govore u prilog potrebi za ponovnom evaluacijom strategija primjene protuotrova, posebno u kontekstu otrovanja izazvanih ugrizima vrsta kod kojih apsorpcija putem limfe predstavlja dominantni put širenja toksina. Prema tome, limfni sustav bi mogao imati centralnu ulogu u širenju otrova zmija iz porodice *Viperidae*, a pravovremena primjena *i.m.* protuotrova u poboljšanju kliničkog ishoda i uklanjanju potrebe za višestrukim dozama (Kurtović i sur., 2016).

Broj studija u kojima su prikazani rezultati izravne usporedbe *i.m.* i *i.v.* protuotrova na farmakokinetički profil otrova u sistemske cirkulaciji je ograničen. Nadalje, razlike u međudjelovanju otrova i protuotrova koje su uočene ne samo između životinja i ljudi, već i između različitih životinjskih modela odabranih ovisno o predmetu istraživanja (K. P. Maduwage i sur., 2016; Rojas i sur., 2013), otežavaju donošenje jednoznačnih zaključaka o učinkovitosti lijeka ovisno o putu njegove primjene, što može predstavljati značajnu prepreku u optimizaciji terapijskog protokola. Izgledno je da ne postoji jedinstveni pristup koji bi bio optimalan za sve vrste ili oblike otrovanja. Jedna od strategija koja može doprinijeti boljem razumijevanju razlika u djelovanju *i.m.* i *i.v.* protuotrova, primijenjena u provedenom istraživanju, temelji se na praćenju njihovih interakcija s otrovom unutar limfnog sustava. Kako pristup sam po sebi, unatoč svojoj jedinstvenosti, ipak nije dostatan za cjelovit uvid u neutralizacijski proces, opisanim istraživanjem je obuhvaćena i sustavna usporedba farmakokinetike *i.m.* i *i.v.* protuotrova te njihov učinak na razinu otrova, odnosno njegove neurotoksične frakcije, u sistemske cirkulaciji. Nakon ugriza, komponente otrova mogu se detektirati u krvi već unutar 15 minuta (Jacome i sur., 2002). Prikazanom studijom je potvrđena njihova brza apsorpcija s obzirom da je pojava otrova u sistemske cirkulaciji zabilježena tri do osam minuta nakon otrovanja. Također, poznato je da *s.c.* aplikacija otrova rezultira njegovim dugim poluvremenom eliminacije ($t_{1/2}$), a koje može iznositi i do pet dana (Zhao i sur., 2001). Rezultat proizašao iz provedenog istraživanja podudara se s literaturnim nalazima i dodatno podupire fenomen dugotrajnog otpuštanja otrova iz tkivnog depoa oko mjesta njegove aplikacije. U periodu prije primjene protuotrova maksimalne koncentracije (C_{max}) otrova bile su usporedive u obje grupe. Međutim, među njima je zabilježena razlika u vremenu potrebnom za njihovo postizanje (t_{max}). Grupa koja je protuotrov primila *i.m.* ostvarila je t_{max} za dva sata, što je u skladu s rezultatima drugih studija (Audebert i sur., 1994; Paniagua i sur., 2012). Kod grupe s *i.v.* primijenjenim protuotrovom t_{max} se pokazao bitno dužim i zabilježen je u prosjeku tek nakon jednog dana. Najvjerojatniji razlog je taj što se, unatoč brzom pristizanju u krv, u trenutku primjene protuotrova većina otrova još uvijek zadržava u perifernim akumulacijskim prostorima, poput limfe i tkiva oko mjesta aplikacije, dok je samo manji udio toksina prisutan u sistemske cirkulaciji (Paniagua i sur., 2019). Stoga, protuotrov u krvi ne može odmah neutralizirati sav otrov apsorbiran u organizam. Dok on postupno pristiže, razina cirkulirajućih antitijela u krvi opada uslijed

njihove sistemske eliminacije, što rezultira sekundarnim porastom koncentracije toksina, posebno naglašenim ako se protuotrov primjenjuje *i.v.* (Gutiérrez i sur., 2003; Seifert i Boyer, 2001). Fenomen je uočen i u provedenom istraživanju. Iako je i kod *i.m.* primjene došlo do naknadne pojave otrova u cirkulaciji, samo su nakon davanja *i.v.* protuotrova njegove koncentracije postigle vrijednosti koje su bile bitno više od onih izmjerenih prije početka terapije. Stoga je i $t_{\max}$ otrova ostvaren s odgodom.

Farmakokinetička analiza je provedena primjenom jednodimenzionalne analize s ciljem dobivanja deskriptivnih parametara bez potrebe za pretpostavljanjem određenog modela raspodjele lijeka. Jednodimenzionalna analiza je jednostavna i u skladu s regulatornim smjernicama. Manje je precizna, ali istovremeno smanjuje mogućnost pogreške prilikom izračuna ključnih parametara, uključujući maksimalnu koncentraciju ($C_{\max}$), vrijeme za postizanje maksimalne koncentracije ($t_{\max}$), površinu ispod krivulje ovisnosti koncentracije u serumu o vremenu (AUC), poluvrijeme eliminacije ($t_{1/2}$), klirens (CL), prividan volumen distribucije tijekom terminalne faze (V_z) i prosječno vrijeme zadržavanja (MRT). Poluvrijeme eliminacije $F(ab')_2$ fragmenata se pokazalo podudarnim za oba načina administracije protuotrova (oko 42 h za *i.m.* i 35 h za *i.v.*) što potvrđuje otprije demonstriranu dosljednost brzine njegovog uklanjanja iz sistemske cirkulacije neovisno o putu primjene (Vázquez i sur., 2005, 2010). Vrijednosti za protuotrov protiv ugriza poskoka su u skladu s ranijim nalazima proizašlima iz dviju studija u kojima je korišten protuotrov protiv ugriza škorpiona (Alacramyn) – u jednoj je dobiveno poluvrijeme eliminacije od 57,8 h za *i.m.*, odnosno 49,5 h za *i.v.* primjenu (Pépin-Covatta i sur., 1996), a u drugoj poluvrijeme eliminacije od 59,6 h za *i.m.*, odnosno 49,7 h *i.v.* primjenu (Pépin i sur., 1995). Dosljednost brzine uklanjanja protuotrova neovisno o putu primjene bi mogla predstavljati klinički koristan podatak, osobito u situacijama kada je jedan od načina administracije otežan ili nedostupan. Međutim, čini se da *i.m.* primjena protuotrova rezultira većim volumenom distribucije otrova iz čega proizlazi da toksini u izraženijoj mjeri napuštaju sistemska cirkulacija i prelaze u ekstravaskularni odjeljak. Upravo se njihova široka distribucija povezuje sa slabijom učinkovitošću *i.m.* protuotrova (Sanhajariya i sur., 2018), budući da cirkulirajuća antitijela teže dolaze u kontakt s frakcijom otrova koja se već proširila u okolna tkiva (Krifi i sur., 2005). Takva raspodjela također može dovesti do dužeg zadržavanja otrova u organizmu i otežane neutralizacije, osobito u fazi kada koncentracija protuotrova krene opadati, čime se potencijalno

produžuje i vrijeme oporavka. S druge strane, kako je pokazano provedenim istraživanjem, *i.m.* primjena protuotrova također osigurava i veći klirens otrova, što je još jedan važan farmakokinetički parametar koji predstavlja mjeru učinkovitosti njegovog ireverzibilnog čišćenja iz organizma. Bitno je napomenuti da su volumen distribucije i klirens u korelaciji te da i jedan i drugi utječu na poluvrijeme eliminacije (Sanhajariya i sur., 2018). Kad otrov ima veći volumen distribucije, odnosno kad se u većoj mjeri širi po tkivima, dulje ostaje u organizmu jer je teže dostupan za neutralizaciju posredstvom protuotrova pa je zato i njegovo poluvrijeme eliminacije duže. S druge strane, ako ga tijelo brže uklanja, odnosno ako pokazuje veći klirens, poluvrijeme eliminacije otrova je kraće. Međutim, opisanim istraživanjem je primijećeno da kod *i.m.* primjene protuotrova otrov ima i veći volumen distribucije i veći klirens, dok su kod *i.v.* primjene oba parametra manja. „Poništavanje“ njihovih učinaka u konačnici dovodi do podudarnog poluvremena eliminacije otrova za oba načina primjene protuotrova. Stoga je za procjenu učinkovitosti protuotrova potrebno uzeti u obzir njegov kumulativni efekt na volumen distribucije i klirens otrova jer svaki parametar, ako se promatra sam za sebe, može dati pogrešnu sliku o njegovom zadržavanju u organizmu.

Ukupna količina protuotrova u krvotoku tijekom razdoblja mjerenja pokazala se usporedivom za oba načina primjene što je u suprotnosti s prijašnjim istraživanjima kojima je utvrđeno da *i.m.* primjena rezultira tri puta manjom dozom apsorbiranom u sistemsku cirkulaciju (Pépin-Covatta i sur., 1996; Pepin i sur., 1995; Rivière i sur., 1997). Nepodudaranje se može objasniti farmakokinetičkim karakteristikama $F(ab')_2$ fragmenata koji se nakon *i.m.* injekcije sporo, ali kontinuirano otpuštaju iz mišićnog tkiva u krv (Salmonson i sur., 1990; Vázquez i sur., 2010), dovodeći do njihovog postupnog nakupljanja koje u konačnici rezultira sličnom sistemskom izloženošću kao i nakon *i.v.* primjene, unatoč nižim koncentracijama u početnoj fazi mjerenja. Kao što proizlazi iz dobivenih rezultata, da bi ukupno apsorbirane količine *i.m.* i *i.v.* protuotrova u krvotoku postigle podjednake vrijednosti, ključno je da razdoblje praćenja njihovih koncentracija bude dovoljno dugo. Do istog opažanja su došli Wright i suradnici (2011). Naime, mjerenje koncentracija samo kroz kraći period, zbog sporog oslobađanja *i.m.* protuotrova s mjesta primjene, može dovesti do pogrešnog zaključka o njenoj puno manjoj sistemskoj izloženosti u usporedbi s onom koja se postiže *i.v.* primjenom. Ukratko,

opisano istraživanje opovrgava razliku u količini protuotrova koja se apsorbira u krvotok ovisno o putu primjene.

Istraživanjem su potvrđene i neke otprije poznate nesrazmjernosti u farmakokinetičkom profilu *i.m.* i *i.v.* protuotrova, osobito njihovoj maksimalnoj koncentraciji dosegnutoj u krvi ($c_{\max}$) i vremenu potrebnom za njeno postizanje ($t_{\max}$). Kada je protuotrov primijenjen *i.m.*, dobivena je značajno niža maksimalna koncentracija (oko 50 µg / mL) i značajno duže vrijeme potrebno za njeno postizanje (oko jednog dana) nego za *i.v.* protuotrov, što se podudara s drugim studijama (Ismail i Abd-Elsalam, 1996; Pépin-Covatta i sur., 1996; Pepin i sur., 1995; Vázquez i sur., 2010). Manja $c_{\max}$ i veća $t_{\max}$ vrijednost su posljedica sporog, postupnog dolaska *i.m.* protuotrova iz mišićnog tkiva u sistemsku cirkulaciju (Kurtović i sur., 2021; Vázquez i sur., 2010) zbog čega se vrhunac njegove koncentracije ostvaruje u manjoj mjeri i s vremenskom odgodom. U periodu nakon primjene protuotrova među grupama su se pojavile razlike u distribuciji (V_z) i prosječnom zadržavanju (MRT) otrova u organizmu. Došlo je i do razlike u ukupnoj izloženosti organizma (AUC_{0-t}) otrovu koja se pokazala značajnom. U *i.m.* grupi, unatoč tome što su se koncentracije otrova u krvi smanjivale postupno, ukupna izloženost bila je tri puta manja nego u *i.v.* grupi. Uočena razlika je posljedica sekundarnog porasta koncentracija otrova koji je nakon *i.m.* primjene bio znatno slabije izražen nego nakon *i.v.* primjene. Znači, unatoč uočenoj sporijoj i slabijoj apsorpciji, *i.m.* protuotrov bi ipak mogao biti u prednosti pred onim primijenjenim *i.v.*, osobito u situacijama koje zahtijevaju kontinuirano otpuštanje lijeka i produljeno održavanje njegove terapijske razine, kao što je liječenje ugriza zmiya iz porodice *Viperidae* kod kojih se otrov iz potkožnog i mišićnog tkiva može otpuštati i tijekom nekoliko dana (Audebert i sur., 1994). Produljeno otpuštanje otrova podrazumijeva da, čak i nakon njegove početne neutralizacije u krvi, nova frakcija stalno iznova pristiže s mjesta ugriza, pri čemu može doći do opetovane pojave sistemskih ili lokalnih učinaka otrovanja ako se u cirkulaciji više ne nalazi dostatna količina protuotrova. Naime, kod *i.v.* primjene protuotrov brzo nestaje iz krvotoka pa je za održavanje njegove visoke razine u krvi često potrebno primijeniti više od jedne doze (Warrell, 2010). *I.m.* primjena omogućuje sporiju apsorpciju protuotrova iz mišićnog tkiva zaslužnu za njegovu dugotrajniju prisutnost u cirkulaciji i, posljedično, održavanje kontinuirane razine antitijela u krvi čime se osigurava stalna neutralizacija naknadno pristiglih toksina kroz duži vremenski period.

Stoga bi mogla biti prikladniji izbor za liječenje ugriza zmija iz porodice *Viperidae*, osobito kada nije dostupna stalna medicinska skrb. Budući da osigurava zaštitu kroz duži vremenski period, učestalost ponovne pojave znakova otrovanja je manja (Boyer i sur., 1999). I rezultati provedenog istraživanja su u skladu s literaturnim spoznajama. Naime, opetovano pojavljivanje otrova u sistemskoj cirkulaciji bilo je znatno slabije izraženo nakon *i.m.* nego nakon *i.v.* administracije s obzirom da je ukupna izloženost toksinima u postterapijskom razdoblju bila čak tri puta manja. Razlika sugerira da *i.m.* protuotrov, s obzirom na dugotrajniju prisutnost u dovoljno visokim koncentracijama, omogućuje da se nova frakcija otrova, koja se s odgodom oslobađa iz potkožnog i mišićnog tkiva oko mjesta ugriza, neutralizira odmah čim uđe u cirkulaciju. I druge studije su pokazale da je *i.m.* primjena učinkovitija u održavanju niske razine otrova u krvi tijekom vremena (Hla-Pe i sur., 1989). U suprotnom, kod *i.v.* primjene odmah po brzom postizanju maksimalne vrijednosti protuotrova uočen je nagli pad koncentracije neutralizirajućih antitijela. Kad je njihova količina postala nedostatna za uklanjanje naknadno pristiglih toksina, ponovno je zabilježen izraženi porast razine otrova u krvi. Osim prerane eliminacije *i.v.* protuotrova iz organizma (Kurtović i sur., 2021), naknadno povećanje razine otrova bi moglo biti i posljedica recirkulacije toksina pohranjenih u perifernim tkivima i limfnom sustavu natrag u krvotok (Seifert i Boyer, 2001). Prema tome, iako *i.v.* primjena pruža brzu pomoć, njezin učinak može oslabiti ako se liječenje ne nastavi davanjem dodatnih doza. S druge strane, *i.m.* primjena, koja omogućuje sporiju, ali kontinuiranu apsorpciju protuotrova i osigurava dugoročniju prisutnost antitijela u krvi, mogla bi rezultirati boljom kontrolom nad kasnijim valovima izloženosti toksinima i smanjiti rizik od ponovnog otrovanja.

Istraživanje je pokazalo da se *i.m.* i *i.v.* protuotrovi razlikuju i u prosječnom vremenu koje molekule lijeka provedu u tijelu prije nego što budu eliminarane, tzv. MRT vrijednosti kao još jednom relevantnom farmakokinetičkom parametru. Za *i.m.* protuotrov je dobivena značajno veća MRT vrijednost koja bi mogla doprinijeti njegovom povoljnom utjecaju na uklanjanje otrova iz sistemske cirkulacije (Vázquez i sur., 2010, 2005). Najvjerojatniji razlog je spora, postupna apsorpcija *i.m.* protuotrova u krvotok zbog koje duže ostaje u cirkulaciji u usporedbi s protuotrovom primijenjenim *i.v.*, a kojeg karakterizira brza distribucija i eliminacija. Time se potencijalno produljuje vrijeme tijekom kojeg protuotrov može djelovati, tj. neutralizirati toksine koji su još prisutni u

krvotoku ili dostupni difuzijom iz tkiva (Gutiérrez i sur., 2003), što može rezultirati boljom učinkovitošću liječenja (Vázquez i sur., 2005). Dakle, *i.m.* primjena vjerojatno pruža ne samo stabilniju i dugotrajniju prisutnost protuotrova u krvotoku, već i njegovu opsežniju distribuciju kroz organizam, što bi moglo doprinijeti učinkovitosti neutralizacije i smanjenju rizika od kasnijeg ponovnog pojavljivanja simptoma otrovanja. Dugo prosječno vrijeme zadržavanja *i.m.* protuotrova u organizmu, u sinergiji s njegovim dugim poluvremenom eliminacije, moglo bi biti od ključnog značaja za uspješnost terapije. Ipak, treba istaknuti da se ponovna pojava otrova u krvi ne događa uvijek. U nekim kliničkim ispitivanjima uopće nije zabilježena. Primjerice, *i.v.* primjenom Fab protuotrova protiv vrste *V. berus*, kao ni *i.m.* primjenom F(ab')₂ prouotrova protiv vrste *V. ammodytes* (Kurtović i sur., 2021), fenomen uočen na ovcama je izostao, vjerojatno jer se ljudima uobičajeno daje nekoliko puta veća doza. Zbog ograničene količine protuotrova istraživanje na ovcama je provedeno s najmanjom mogućom dozom koja po testu neutralizacije na miševima osigurava zaštitu od letalne toksičnosti otrova. Iz toga se može zaključiti da je upravo adekvatna doza protuotrova, uz njegovu specifičnost, jedan od ključnih čimbenika zaslužnih za sprečavanje opetovane pojave otrova u krvi, dok sam način primjene možda i nije toliko presudan.

Dosada sigurnosni profili *i.m.* i *i.v.* protuotrova nisu bili komparativno ispitani. Upotreba protuotrova, osobito ako se primjenjuju *i.v.*, nosi rizik od razvoja štetnih popratnih pojava (Gutiérrez i sur., 2011; WHO, 2010). Posebno su opasne one bazirane na formiranju imunokompleksa uslijed preosjetljivosti pacijenta na proteine životinjskog podrijetla. Rane ili akutne nuspojave obično se javljaju unutar prvih sati nakon primjene i uključuju blage simptome poput svrbeža, mučnine i groznice, ali mogu napredovati do ozbiljnijih reakcija poput angioedema, bronhospazma i anafilaksije. Prema dostupnim podacima, akutne nuspojave mogu se razviti u do 40% slučajeva, ovisno o kvaliteti protuotrova, načinu primjene i individualnoj osjetljivosti (Lalloo i Theakston, 2003; Malasit i sur., 1986; Theakston i sur., 2003). Uzroci navedenih simptoma još uvijek nisu potpuno razjašnjeni. Smatra se da uključuju kombinaciju reakcije preosjetljivosti tipa I, aktivacije komplementa i djelovanja imunoglobulinskih agregata ili njihovih fragmenata (uključujući Fc domenu), a koji se mogu naći čak i u visoko pročišćenim pripravcima (Theakston i Smith, 1997). Reakcije se javljaju i kod osoba bez prethodne izloženosti životinjskim proteinima, što dodatno otežava predviđanje (H. A. De Silva i sur., 2015).

Nadalje, imunološkom sustavu potrebno je otprilike jedan do dva tjedna nakon primjene protuotrova kako bi prepoznao konjska (heterologna) antitijela kao strane antigene i razvio humoralni odgovor s prevladavajućom produkcijom IgG antitijela. Takav imunološki odgovor može rezultirati kasnim nuspojavama, među kojima je najpoznatija serumska bolest, s učestalošću koja se procjenjuje na 5–56% (Dart i sur., 2001; Lavonas i sur., 2011; LoVecchio i sur., 2003; Ruha i sur., 2002). Riječ je o klasičnom primjeru reakcije preosjetljivosti tipa III koja nastaje uslijed stvaranja antitijela domaćina i njihovog vezanja za strane proteine, pri čemu taloženje formiranih imunokompleksa u tkivima može izazvati upalne procese s kliničkim manifestacijama poput groznice, artritisa i limfadenopatije (Dart i McNally, 2001; H. A. De Silva i sur., 2015; León i sur., 2013). Drugim riječima, iako protuotrov može spasiti život, organizam ga s vremenom može prepoznati kao prijetnju i uzvratiti reakcijom koja se pojavljuje danima ili tjednima kasnije. Međutim, sama prisutnost antitijela usmjerenih protiv protuotrova nije dovoljna da bi došlo do kasnih nuspojava (Morais i sur., 2012). Naime, čini se da učestalost serumske bolesti više ovisi o ukupnoj količini unesenog stranog proteina, trajanju izloženosti i obliku u kojem je protuotrov pripremljen (Laustsen, María Gutiérrez, i sur., 2018). Što je ukupna količina antigena veća, to je vjerojatnije da će imunološki sustav stvoriti kritičnu količinu štetnih imunokompleksa (LoVecchio i sur., 2003). Osim toga, protuotrovi bazirani na cijelim IgG antitijelima, F(ab')₂ i Fab fragmentima različito utječu na sposobnost imunološkog sustava da prepozna i odgovori na strane proteine (Bush i sur., 2015; León i sur., 2001). Zbog odsutnosti Fc domene, F(ab')₂ i Fab protuotrovi imaju manju imunogeničnost od IgG protuotrova, čija upotreba potencijalno smanjuje rizik od izazivanja imunoloških reakcija. Razumijevanje cijelog spektra događaja koji posreduju u imunološkom odgovoru te njihove uključenosti u razvoj mogućih kroničnih komplikacija predstavlja ključni korak u poboljšanju sigurnosti protuotrova i terapijskog protokola. Povezanost upotrebe protuotrova s pojavom nuspojava naglašava potrebu za pažljivim praćenjem liječenih pacijenata, posebno onih koji su primili velike doze ili su bili izloženi određenim tipovima protuotrova, s obzirom da je kod njih rizik za razvoj kasnih reakcija povećan (D. J. Williams i sur., 2007). Budući da je niska imunogeničnost lijeka poželjna radi poboljšanja njegovog sigurnosnog profila, jedan od ciljeva prezentiranog istraživanja bio je ispitati utjecaj načina primjene na razvoj humoralnog imunološkog odgovora usmjerenog protiv konjskih F(ab')₂ fragmenata u životinja koje

su protuotrov primile *i.m.* ili *i.v.* Kako je i ranije opisano (Mayers i sur., 2003), nije uočena značajna razlika u količini razvijenih antitijela ovisno o putu primjene protuotrova, što upućuje na to da su oba načina administracije podjednaka u pogledu sigurnosti. Pojava se može objasniti općenito niskom imunogeničnošću $F(ab')_2$ fragmenata. Moguće je da bi situacija bila drugačija da su se u istraživanju koristili imunološki reaktivniji cijeli IgG-i (Gutiérrez i sur., 2011). Iako trenutačno ne postoje jasni dokazi o ozbiljnim sigurnosnim problemima povezanim s *i.m.* primjenom, osobito kod $F(ab')_2$ fragmenata, opravdano je pozvati se na dodatna istraživanja. Ona bi trebala obuhvatiti praćenje dugoročnih učinaka različitih formulacija protuotrova, s posebnim naglaskom na one s izraženijom imunogeničnošću, kako bi se osigurala optimalna ravnoteža između sigurnosti i terapijske učinkovitosti.

Nadalje, kako je poznato, žrtve *V. ammodytes* ugriza često podliježu koagulacijskim poremećajima i rabdomiolizi (Lukšić i sur., 2018) te se uspješnost oporavka uglavnom procjenjuje praćenjem hematoloških parametara. Stoga je proveden nadzor nad vrijednostima onih najrelevantnijih (leukocita, trombocita, D-dimera, fibrinogena, trombinskog, protrombinskog i parcijalnog tromboplastinskog vremena) u uzorcima seruma životinja prikupljenih prije i neposredno nakon eksperimentalno izazvanog otrovanja, kao i u periodu po provedenoj terapiji protuotrovom, kako bi se razotkrio put primjene koji je učinkovitiji u suzbijanju kliničkih znakova. Klinički znakovi otrovanja pojavili su se u svih jedinki gotovo neposredno nakon primjene otrova. Hipofibrinogenemija, trombocitopenija povezana s reduciranom agregacijom trombocita i leukocitoza razvijali su se postupno tijekom vremena, što ukazuje na progresivnu disfunkciju hemostatskog sustava i moguću upalnu reakciju. Drugi mogući uzroci, poput sekundarnih infekcija ili sistemskih reakcija organizma, obično se razvijaju tijekom znatno duljeg vremenskog perioda te se stoga mogu isključiti (Cavalcante i sur., 2023; Mendes i sur., 2022). Podudarni klinički znakovi često se uočavaju i kod ljudskih žrtava ugriza vrste *V. ammodytes* (Dobaja Borak, Babić, i sur., 2023; Dobaja Borak, Grenc, i sur., 2023; Frangides i sur., 2006; Kurtović i sur., 2021; Lukšić i sur., 2006, 2010, 2018; Marinov i sur., 2010). Ipak, važno je naglasiti da njihova učestalost i težina kod ljudi variraju zbog čimbenika kao što su dob, spol, zdravstveno stanje i količina ubrizganog otrova, a koji mogu znatno utjecati na uspješnost liječenja i time otežati izravnu translaciju eksperimentalnih nalaza na pacijente. U provedenom istraživanju primjena

protuotrova povoljno je utjecala na ishod, što se očitovalo u brzom povratku laboratorijskih parametara unutar normalnih vrijednosti. Dobiveni rezultat sugerira da terapijska učinkovitost ne ovisi o putu primjene. Donošenju pouzdanijeg zaključka o učinkovitosti terapije bi pogodovalo da je i kod životinja kojima je uzorkovana limfa bilo moguće provesti praćenje hematoloških parametara kroz duži vremenski period kao i kod onih koje nisu bile eutanazirane. U konačnici, jedino je broj leukocita ostao povišen unatoč primjeni protuotrova, kao što je već opisano (Lukšić i sur., 2010, 2018). Leukocitoza je najvjerojatnije povezana s upalnim odgovorom i pojačanom proizvodnjom citokina (Petricevich, 2004) izazvanom izraženim lokalnim oštećenjem tkiva kao učestalim ishodom ugriza vrste *V. ammodytes* (Sanhajariya i sur., 2018). Iako je bila očekivana, nije potpuno jasno predstavlja li mjeru jačine otrovanja ili samo opću reakciju organizma na djelovanje otrova. Nadalje, nije poznato ni utječe li na oporavak nakon primjene protuotrova niti produljuje li sistemsku reakciju. Stoga bi bila potrebna dodatna istraživanja kako bi se bolje razumjelo gdje je granica između korisne upalne reakcije od potencijalno štetne. Unatoč tome što eksperimentalni modeli i kontrolirani uvjeti istraživanja pružaju korisne uvide u djelovanje protuotrova, oni ipak ne mogu u potpunosti prikazati složenost ljudskog tijela i situacija koje se javljaju u praksi. Stoga je interpretaciju rezultata uvijek potrebno temeljiti i na kliničkom iskustvu te ih promatrati u širem kontekstu.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja doneseni su sljedeći zaključci:

- 1) po prvi put je dokazan neutralizacijski učinak *i.m.* primijenjenog protuotrova u limfnom sustavu što potvrđuje njegovu relevantnost u terapiji zmijskih ugriza, osobito u inicijalnoj fazi širenja otrova
- 2) usporedbom dvaju načina primjene pokazano je da je *i.m.* protuotrov učinkovitiji u uklanjanju otrova iz limfe i krvi što naglašava potrebu za ponovnom procjenom nadmoći *i.v.* puta
- 3) rezultati su u skladu s prethodnim studijama koje ukazuju da *i.m.* protuotrov čak i u niskim koncentracijama u krvi može postići terapijski učinak, osobito u hitnim situacijama kada *i.v.* pristup nije pravovremeno dostupan
- 4) *i.m.* protuotrov je dokazano učinkovit u normalizaciji hematoloških i koagulacijskih poremećaja koji su česti kod otrovanja zmijama iz porodice *Viperidae*, što dodatno potvrđuje njegovu kliničku vrijednost
- 5) put primjene protuotrova ne utječe značajno na humoralni imunološki odgovor uslijed primjene $F(ab')_2$ fragmenata što se može pripisati njihovoj niskoj imunogeničnosti
- 6) učinkovitost protuotrova neovisno o putu primjene zasad je potvrđena samo na primjeru otrova poskoka (*Vipera ammodytes*). Zaključak se ne može generalizirati na ostale kombinacije otrova i protuotrova bez dodatnih istraživanja

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da *i.m.* primjena protuotrova nije samo učinkovita, već i ravnopravna *i.v.* primjeni u neutralizaciji otrova u krvi i limfi, uz sličan sigurnosni profil. Premda se nalazi odnose na otrov poskoka (*Vipera ammodytes*) i specifični $F(ab')_2$ protuotrov, otvaraju mogućnost šire primjene i preispitivanje dosadašnjih terapijskih pristupa.

7. POPIS LITERATURE

- Abramović, Z., Brgles, M., Habjanec, L., Tomai, J., Šentjurc, M., & Frkanec, R. (2010). In vivo and ex vivo EPR detection of spin-labelled ovalbumin in mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47(3), 396–401. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.06.006>
- Abubakar, I. S., Abubakar, S. B., Habib, A. G., Nasidi, A., Durfa, N., Yusuf, P. O., Larnyang, S., Garnvwa, J., Sokomba, E., Salako, L., Theakston, R. D. G., Juszczak, E., Alder, N., & Warrell, D. A. (2010). Randomised controlled double-blind non-inferiority trial of two antivenoms for Saw-scaled or carpet viper (*Echis ocellatus*) envenoming in Nigeria. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(7), e767. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000767>
- Ackerman, H. S., Brodie, B. B., & Gillette, J. R. (Eds.). (1971). Concepts in biochemical pharmacology, Handbook of experimental pharmacology, Volume 28, Part 1. In *Concepts in Biochemical Pharmacology* (1st ed., p. 472). Springer Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-65052-9>
- Ahmed, S., Ahmed, M., Nadeem, A., Mahajan, J., Choudhary, A., & Pal, J. (2008). Emergency treatment of a snake bite: Pearls from literature. *Journal of Emergencies, Trauma, and Shock*, 1(2), 97–105. <https://doi.org/10.4103/0974-2700.43190>
- Al-Abdulla, I., Garnvwa, J. M., Rawat, S., Smith, D. S., Landon, J., & Nasidi, A. (2003). Formulation of a liquid ovine Fab-based antivenom for the treatment of envenomation by the Nigerian carpet viper (*Echis ocellatus*). *Toxicon*, 42(4), 399–404. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(03\)00170-3](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00170-3)
- Alirol, E., Sharma, S. K., Bawaskar, H. S., Kuch, U., & Chappuis, F. (2010). Snake bite in South Asia: A review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(1), e603. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000603>
- Amuy, E., Alape-Girón, A., Lomonte, B., Thelestam, M., & Gutiérrez, J. M. (1997). Development of immunoassays for determination of circulating venom antigens during envenomations by coral snakes (*Micrurus* species). *Toxicon*, 35(11), 1605–1616. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(97\)00045-7](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(97)00045-7)

- Ariaratnam, C. A., Meyer, W. P., Perera, G., Eddleston, M., Kularatne, S. A. M., Attapattu, W., Sheriff, R., Richards, A. M., Theakston, R. D. G., & Warrell, D. A. (1999). A new monospecific ovine Fab fragment antivenom for treatment of envenoming by the Sri Lankan Russell's viper (*Daboia russelii russelii*): A preliminary dose-finding and pharmacokinetic study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61(2), 259–265. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.61.259>
- Ariaratnam, C. A., Sjöström, L., Raziek, Z., Abeyasinghe, S., Kularatne, M., Arachchi, R. W. K. K., Sheriff, M. H. R., Theakston, R. D. G., & Warrell, D. A. (2001). An open, randomized comparative trial of two antivenoms for the treatment of envenoming by Sri Lankan Russell's viper (*Daboia russelii russelii*). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(1), 74–80. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(01\)90339-6](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(01)90339-6)
- Audebert, F., Urtizberea, M., Sabouraud, A., Scherrmann, J. M., & Bon, C. (1994). Pharmacokinetics of *Vipera aspis* venom after experimental envenomation in rabbits. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 268(3), 1512–1517. [https://doi.org/10.1016/S0022-3565\(25\)38643-X](https://doi.org/10.1016/S0022-3565(25)38643-X)
- Barnes, J. M., & Trueta, J. (1941). Absorption of bacteria, toxins and snake venoms from the tissues. Importance of the lymphatic circulation. *The Lancet*, 237(6142), 623–626. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)60977-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)60977-7)
- Barral-Netto, M., Schriefer, A., Vinhas, V., & Almeida, A. R. (1990). Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, 28(9), 1053–1061. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(90\)90143-U](https://doi.org/10.1016/0041-0101(90)90143-U)
- Baudou, F. G., Fusco, L., Giorgi, E., Diaz, E., Municoy, S., Desimone, M. F., Leiva, L., & De Marzi, M. C. (2020). Physicochemical and biological characterization of nanovenoms, a new tool formed by silica nanoparticles and *Crotalus durissus terrificus* venom. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 193, 111128. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111128>
- Bermúdez-Méndez, E., Fuglsang-Madsen, A., Føns, S., Lomonte, B., Gutiérrez, J. M., & Laustsen, A. H. (2018). Innovative immunization strategies for antivenom

- development. *Toxins*, 10(11), 452. <https://doi.org/10.3390/TOXINS10110452>
- Boels, D., Hamel, J. F., Deguigne, M. B., & Harry, P. (2012). European viper envenomings: Assessment of ViperfavTM and other symptomatic treatments. *Clinical Toxicology*, 50(3), 189–196. <https://doi.org/10.3109/15563650.2012.660695>
- Boels, D., Hamel, J. F., Le Roux, G., Labadie, M., Paret, N., Delcourt, N., Langrand, J., Puskarczyk, E., Nisse, P., Sinno-Tellier, S., & de Haro, L. (2020). Snake bites by European vipers in Mainland France in 2017–2018: comparison of two antivenoms Viperfav[®] and Viperatab[®]. *Clinical Toxicology*, 58(11), 1050–1057. <https://doi.org/10.1080/15563650.2020.1726377>
- Boyer, L. V., Chase, P. B., Degan, J. A., Figge, G., Buelna-Romero, A., Luchetti, C., & Alagón, A. (2013). Subacute coagulopathy in a randomized, comparative trial of Fab and F(ab')₂ antivenoms. *Toxicon*, 74, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.07.018>
- Boyer, L. V., Seifert, S. A., & Cain, J. S. (2001). Recurrence phenomena after immunoglobulin therapy for snake envenomations: Part 2. Guidelines for clinical management with crotaline Fab antivenom. *Annals of Emergency Medicine*, 37(2), 196–201. <https://doi.org/10.1067/mem.2001.113134>
- Boyer, L. V., Seifert, S. A., Clark, R. F., McNally, J. T., Williams, S. R., Nordt, S. P., Walter, F. G., & Dart, R. C. (1999). Recurrent and persistent coagulopathy following pit viper envenomation. *Archives of Internal Medicine*, 159(7), 706–710. <https://doi.org/10.1001/archinte.159.7.706>
- Briggs, F. A. (1938). The excretion in the urine of ovalbumin and of blood proteins after the intravenous injection of crystallized ovalbumin. *The Journal of Infectious Diseases*, 63(1), 103–112. <https://doi.org/10.1093/infdis/63.1.103>
- Brvar, M., Kurtović, T., Grenc, D., Lang Baliija, M., Križaj, I., & Halassy, B. (2017). Vipera ammodytes bites treated with antivenom ViperaTAb: a case series with pharmacokinetic evaluation. *Clinical Toxicology*, 55(4), 241–248.

<https://doi.org/10.1080/15563650.2016.1277235>

Bula com informações ao Paciente — soro antibotrópico (pentavalente) e antilaquético. (n.d.). Retrieved May 11, 2023, from <http://www.funed.mg.gov.br/wp-content/uploads/2018/11/1.-Bula-de-soro-antibotrópico-pentavalente-e-antilaquético-para-o-Paciente.pdf>

Bula com informações ao Paciente — soro anticrotático. (n.d.). Retrieved May 11, 2023, from <http://www.funed.mg.gov.br/wp-content/uploads/2020/04/Bula-do-soro-anticrotático-para-o-paciente-2020.pdf>

Bula com informações ao Paciente — soro antielapídico (bivalente). (n.d.). Retrieved May 11, 2023, from <http://www.funed.mg.gov.br/wp-content/uploads/2018/11/1.-Bula-de-soro-antielapídico-bivalente-para-o-Paciente.pdf>

Burgess, J. L., Dart, R. C., Egen, N. B., & Mayersohn, M. (1992). Effects of constriction bands on rattlesnake venom absorption: a pharmacokinetic study. *Annals of Emergency Medicine*, 21(9), 1086–1093. [https://doi.org/10.1016/S0196-0644\(05\)80649-3](https://doi.org/10.1016/S0196-0644(05)80649-3)

Bush, S. P., Ruha, A. M., Seifert, S. A., Morgan, D. L., Lewis, B. J., Arnold, T. C., Clark, R. F., Meggs, W. J., Toschlog, E. A., Borron, S. W., Figge, G. R., Sollee, D. R., Shirazi, F. M., Wolk, R., De Chazal, I., Quan, D., García-Ubbelohde, W., Alagón, A., Gerkin, R. D., & Boyer, L. V. (2015). Comparison of F(ab')₂ versus Fab antivenom for pit viper envenomation: A prospective, blinded, multicenter, randomized clinical trial. *Clinical Toxicology*, 53(1), 37–45. <https://doi.org/10.3109/15563650.2014.974263>

Calderón-Aranda, E. S., Rivière, G., Choumet, V., Possani, L. D., & Bon, C. (1999). Pharmacokinetics of the toxic fraction of Centruroides limpidus limpidus venom in experimentally envenomed rabbits and effects of immunotherapy with specific F(ab')₂. *Toxicon*, 37(5), 771–782. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00216-5](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00216-5)

Calmette, A. (1896). The treatment of animals poisoned with snake venom by the injection of antivenomous serum. *British Medical Journal*, 2(1859), 399–400.

<https://doi.org/10.1136/bmj.2.1859.399>

- Cardoso, J. L. C., Fan, H. W., França, F. O. S., Jorge, M. T., Leite, R. P., Nishioka, S. A., Avila, A., Sano-Martins, I. S., Tomy, S. C., Santoro, M. L., Chudzinski, A. M., Catro, S. C. B., Kamiguti, A. S., Kelen, E. M. A., Hirata, M. H., Mirinodla, R. M. S., Thekston, R. D. G., & Warrell, D. A. (1993). Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. *Qjm*, 86(5), 315–325. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.qjmed.a068818>
- Cavalcante, J. S., de Almeida, D. E. G., Santos-Filho, N. A., Sartim, M. A., de Almeida Baldo, A., Brasileiro, L., Albuquerque, P. L., Oliveira, S. S., Sachett, J. A. G., Monteiro, W. M., & Ferreira, R. S. (2023). Crosstalk of inflammation and coagulation in *Bothrops* snakebite envenoming: endogenous signaling pathways and pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14). <https://doi.org/10.3390/ijms241411508>
- Charman, S. A., Segrave, A. M., Edwards, G. A., & Porter, C. J. H. (2000). Systemic availability and a lymphatic transport of human growth hormone administered by subcutaneous injection. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89(2), 168–177. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6017\(200002\)89:2<168::AID-JPS4>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6017(200002)89:2<168::AID-JPS4>3.0.CO;2-Q)
- Chaves, F., Loría, G. D., Salazar, A., & Gutiérrez, J. M. (2002). Intramuscular administration of antivenoms in experimental envenomation by *Bothrops asper*: Comparison between Fab and IgG. *Toxicon*, 41(2), 237–244. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00283-0](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00283-0)
- Chen, Y.-J., Tsai, C.-Y., Hu, W.-P., & Chang, L.-S. (2016). DNA aptamers against Taiwan banded krait α -bungarotoxin recognize Taiwan cobra cardiotoxins. *Toxins*, 8(3), 66. <https://doi.org/10.3390/toxins8030066>
- Chippaux, J. P., Lang, J., Amadi-Eddine, S., Fagot, P., & Le Mener, V. (1999). Short report: treatment of snake envenomations by a new polyvalent antivenom composed of highly purified F(ab')₂: results of a clinical trial in northern Cameroon. *American*

Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 61(6), 1017–1018.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.61.1017>

Chippaux, J. P., Massougbdji, A., Stock, R. P., Alagon, A., Fassinou, E., Ndamadjo, A., Soglo, R., Tamou, B. E., Mama, A. B., Nguemezi, A., Salako, A., Hounyet, J. P., Koussémou, A., Mongbo, Y. A., Santos, A., Batonon, A., Loukmann, L., Tévoèdjè, M., Yaya, A., ... Agossadou, C. (2007). Clinical trial of an F(ab')₂ polyvalent equine antivenom for african snake bites in Benin. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(3), 538–546. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.77.538>

Chippaux, J. P., Stock, R. P., & Massougbdji, A. (2015). Antivenom safety and tolerance for the strategy of snake envenomation management. In *Snake Venoms* (pp. 1–16). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6648-8_25-1

Churchman, A., O'Leary, M. A., Buckley, N. A., Page, C. B., Tankel, A., Gavaghan, C., Holdgate, A., Brown, S. G. A., & Isbister, G. K. (2010). Clinical effects of red-bellied black snake (*Pseudechis porphyriacus*) envenoming and correlation with venom concentrations: Australian Snakebite Project (ASP-11). *The Medical Journal of Australia*, 193(11–12), 696–700. <https://doi.org/10.5694/J.1326-5377.2010.TB04108.X>

Claassen, V. (1994). *Neglected Factors in Pharmacology and Neuroscience Research* (J. P. Huston (Ed.)). Elsevier. <https://www.elsevier.com/books/neglected-factors-in-pharmacology-and-neuroscience-research/claassen/978-0-444-81871-3>

Costea, R., Iancu, T., Duțulescu, A., Nicolae, C., Leau, F., & Pavel, R. (2024). Critical key points for anesthesia in experimental research involving sheep (*Ovis aries*). *Open Veterinary Journal*, 14(9), 2129–2137. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2024.v14.i9.2>

Dart, R. C., Bush, S. P., Heard, K., Arnold, T. C., Sutter, M., Campagne, D., Holstege, C. P., Seifert, S. A., Lo, J. C. Y., Quan, D., Borron, S., Meurer, D. A., Burnham, R. I., McNally, J., Garcia-Ubbelohde, W., & Anderson, V. E. (2019). The efficacy of antivenin *Latrodectus* (Black widow) equine immune F(ab')₂ versus placebo in the treatment of latrodectism: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical

- trial. *Annals of Emergency Medicine*, 74(3), 439–449.
<https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2019.02.007>
- Dart, R. C., & McNally, J. (2001). Efficacy, safety, and use of snake antivenoms in the United States. *Annals of Emergency Medicine*, 37(2), 181–188.
<https://doi.org/10.1067/mem.2001.113372>
- Dart, R. C., Seifert, S. A., Boyer, L. V., Clark, R. F., Hall, E., McKinney, P., McNally, J., Kitchens, C. S., Curry, S. C., Bogdan, G. M., Ward, S. B., & Porter, R. S. (2001). A randomized multicenter trial of crotalinae polyvalent immune Fab (ovine) antivenom for the treatment for crotaline snakebite in the United States. *Archives of Internal Medicine*, 161(21), 2030–2036.
<https://doi.org/10.1001/archinte.161.16.2030>
- de Haro, L., Glaizal, M., Tichadou, L., Blanc-Brisset, I., & Hayek-Lanthois, M. (2009). Asp viper (*Vipera aspis*) envenomation: experience of the Marseille poison centre from 1996 to 2008. *Toxins*, 1(2), 100–112. <https://doi.org/10.3390/toxins1020100>
- de Silva, H. A., Ryan, N. M., & de Silva, H. J. (2015). Adverse reactions to snake antivenom, and their prevention and treatment. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 81(3), 446–452. <https://doi.org/10.1111/bcp.12739>
- Di Nicola, M. R., Pontara, A., Kass, G. E. N., Kramer, N. I., Avella, I., Pampena, R., Mercuri, S. R., Dorne, J. L. C. M., & Paolino, G. (2021). Vipers of Major clinical relevance in Europe: taxonomy, venom composition, toxicology and clinical management of human bites. *Toxicology*, 453(May), 152724.
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152724>
- Dobaja Borak, M., Babić, Ž., Caganova, B., Grenc, D., Karabuva, S., Kolpach, Z., Krakowiak, A., Kolesnikova, V., Lukšić, B., Pap, C., Puljiz, I., Piekarska-Wijatkowska, A., Radenkova-Saeva, J., Vučinić, S., Zacharov, S., Eddleston, M., & Brvar, M. (2023). Viper envenomation in Central and Southeastern Europe: a multicentre study. *Clinical Toxicology*, 61(9), 656–664.
<https://doi.org/10.1080/15563650.2023.2273761>

- Dobaja Borak, M., Grenc, D., Reberšek, K., Podgornik, H., Leonardi, A., Kurtović, T., Halassy, B., Križaj, I., & Brvar, M. (2023). Reversible and transient thrombocytopenia of functional platelets induced by nose-horned viper venom. *Thrombosis Research*, 229, 152–154. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2023.07.005>
- Ducharme, M. P., & Shargel, L. (Eds.). (2022). *Shargel and Yu's Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, 8e* (8th ed.). McGraw Hill. <https://accesspharmacy.mhmedical.com/book.aspx?bookID=3127>
- Durban, J., Juárez, P., Angulo, Y., Lomonte, B., Flores-Díaz, M., Alape-Girón, A., Sasa, M., Sanz, L., Gutiérrez, J. M., Dopazo, J., Conesa, A., & Calvete, J. J. (2011). Profiling the venom gland transcriptomes of costa rican snakes by 454 pyrosequencing. *BMC Genomics*, 12, 259. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-259>
- Ehresmann, B., Imbault, P., & Well, J. H. (1973). Spectrophotometric determination of protein concentration in cell extracts containing tRNA's and rRNA's. *Analytical Biochemistry*, 54, 454–463. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90374-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90374-6)
- El-Aziz, T. M. A., Soares, A. G., & Stockand, J. D. (2019). Snake venoms in drug discovery: valuable therapeutic tools for life saving. *Toxins*, 11, 564. <https://doi.org/10.3390/toxins11100564>
- El Hafny, B., Chgoury, F., Adil, N., Cohen, N., & Hassar, M. (2002). Intraspecific variability and pharmacokinetic characteristics of *Androctonus mauretanicus* mauretanicus scorpion venom. *Toxicon*, 40(11), 1609–1616. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00178-2](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00178-2)
- Ellis, R. M., Sprivulis, P. C., Jelinek, G. A., Banham, N. D. G., Wood, S. V., Wilkes, C. J., Siegmund, A., & Roberts, B. L. (2005). A double-blind, randomized trial of intravenous versus intramuscular antivenom for red-back spider envenoming. *EMA - Emergency Medicine Australasia*, 17(2), 152–156. <https://doi.org/10.1111/j.1742-6723.2005.00720.x>

- Espino-Solis, G. P., Riaño-Umbarila, L., Becerril, B., & Possani, L. D. (2009). Antidotes against venomous animals: state of the art and perspectives. *Journal of Proteomics*, 72(2), 183–199. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.020>
- Fernández, G. P., Segura, Á., Herrera, M., Velasco, W., Solano, G., Gutiérrez, J. M., & León, G. (2010). Neutralization of Bothrops mattogrossensis snake venom from Bolivia: experimental evaluation of llama and donkey antivenoms produced by caprylic acid precipitation. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 55(2–3), 642–645. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2009.07.031>
- Fidler, H. K., Glasgow, R. D., & Carmichael, E. B. (1938). Pathologic changes produced by subcutaneous injection of rattlesnake (Crotalus) venom into Macaca mulatta monkeys. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 38(5), 892–894. <https://doi.org/10.3181/00379727-38-10054>
- Frangides, C. Y., Koulouras, V., Kouni, S. N., Tzortzatos, G. V., Nikolaou, A., Pneumatics, J., Pierrakeas, C., Niarchos, C., Kounis, N. G., & Koutsojannis, C. M. (2006). Snake venom poisoning in Greece. Experiences with 147 cases. *European Journal of Internal Medicine*, 17, 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2005.10.001>
- Gad, S. C., & Chengelis, C. P. (1998). Safety considerations for the administration of agents by the parenteral routes. In *Acute Toxicology Testing* (pp. 197–220). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012272250-9/50009-5>
- Gamulin, E., Mateljak Lukačević, S., Halassy, B., & Kurtović, T. (2023). Snake antivenoms—toward better understanding of the administration route. *Toxins*, 15(6), 398. <https://doi.org/10.3390/toxins15060398>
- Garkowski, A., Czupryna, P., Zajkowska, A., Pancewicz, Sł., Moniuszko, A., Kondrusik, M., Grygorczuk, S., GoŁebicki, P., Letmanowski, M., & Zajkowska, J. (2012). Vipera berus bites in Eastern Poland – a retrospective analysis of 15 case studies. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 19(4), 793–797.
- Ghalim, N., El-Hafny, B., Sebti, F., Heikel, J., Lazar, N., Moustanir, R., & Benslimane, A. (2000). Scorpion envenomation and serotherapy in Morocco. *American Journal*

- of *Tropical Medicine and Hygiene*, 62(2), 277–283.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2000.62.277>
- Grimm, L. M., Humann-Ziehank, E., Zinne, N., Zardo, P., & Ganter, M. (2021). Analysis of pH and electrolytes in blood and ruminal fluid, including kidney function tests, in sheep undergoing long-term surgical procedures. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 63(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13028-021-00611-0>
- Gutiérrez, J. M. (2012). Improving antivenom availability and accessibility: science, technology, and beyond. *Toxicon*, 60(4), 676–687.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.02.008>
- Gutiérrez, J. M., Burnouf, T., Harrison, R. A., Calvete, J. J., Kuch, U., Warrell, D. A., & Williams, D. J. (2014). A multicomponent strategy to improve the availability of antivenom for treating snakebite envenoming. *Bulletin of the World Health Organization*, 92(7), 526–532. <https://doi.org/10.2471/BLT.13.132431>
- Gutiérrez, J. M., Calvete, J. J., Habib, A. G., Harrison, R. A., Williams, D. J., & Warrell, D. A. (2017). Snakebite envenoming. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17063.
<https://doi.org/10.1038/NRDP.2017.63>
- Gutiérrez, J. M., León, G., & Lomonte, B. (2003). Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of immunoglobulin therapy for envenomation. *Clinical Pharmacokinetics*, 42(8), 721–741. <https://doi.org/10.2165/00003088-200342080-00002>
- Gutiérrez, J. M., León, G., Lomonte, B., & Angulo, Y. (2011). Antivenoms for snakebite envenomings. *Inflammation & Allergy-Drug Targets*, 10(5), 369–380.
<https://doi.org/10.2174/187152811797200669>
- Gutiérrez, J. M., Rojas, G., Perez, A., Arguello, I., & Lomonte, B. (1991). Neutralization of coral snake *Micrurus nigrocinctus* venom by a monovalent antivenom. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 24(7), 701–710.
- Habib, A. G., & Brown, N. I. (2018). The snakebite problem and antivenom crisis from a health-economic perspective. *Toxicon*, 150, 115–123.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.05.009>

- Häger, C., Biernot, S., Buettner, M., Glage, S., Keubler, L. M., Held, N., Bleich, E. M., Otto, K., Müller, C. W., Decker, S., Talbot, S. R., & Bleich, A. (2017). The Sheep Grimace Scale as an indicator of post-operative distress and pain in laboratory sheep. *PLoS ONE*, 12(4), e0175839. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175839>
- Hammoudi-Triki, D., Lefort, J., Rougeot, C., Robbe-Vincent, A., Bon, C., Larabadijebari, F., & Choumet, V. (2007). Toxicokinetic and toxicodynamic analyses of *Androctonus australis hector* venom in rats: optimization of antivenom therapy. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 218(3), 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.11.003>
- Harris, R. J., & Jenner, R. A. (2019). Evolutionary ecology of fish venom: adaptations and consequences of evolving a venom system. *Toxins*, 11, 60. <https://doi.org/10.3390/toxins11020060>
- Hart, A. J., Hodgson, W. C., O’leary, M., & Isbister, G. K. (2014). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the myotoxic venom of *Pseudechis australis* (mulga snake) in the anaesthetised rat. *Clinical Toxicology*, 52(6), 604–610. <https://doi.org/10.3109/15563650.2014.914526>
- Herzig, V. (2021). Animal Venoms—Curse or Cure? *Biomedicines*, 9(413), 1–8. <https://doi.org/10.1049/et.2022.0710>
- Hess, L., Málek, J., Kurzová, A., & Votava, M. (2012). The effect of site (deltoid or gluteus muscle) of intramuscular administration of anaesthetic drugs on the course of immobilisation in macaque monkeys (*Macaca mulatta*). *Acta Veterinaria Brno*, 81(2), 207–210. <https://doi.org/10.2754/avb201281020207>
- Hla-Pe, Thein-Than, Maung-Maung-Thwin, Myint-Lwin, & Tin-Nu-Swe. (1989). Circulating antivenom levels in human subjects following intramuscular administration of Russell’s viper antivenom. *Medical Research Congress Abstract*, 116.
- Ho, M. A. Y., Silamut, K., White, N. J., Karbwang, J., Looareesuwan, S., Phillips, R. E.,

- & Warrell, D. A. (1990). Pharmacokinetics of three commercial antivenoms in patients envenomed by the Malayan pit viper, *Calloselasma rhodostoma*, in Thailand. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 42(3), 260–266. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1990.42.260>
- Iliev, Y. T., Tufkova, S. G., Zagorov, M. Y., & Nikolova, S. M. (2014). Snake venom poisoning in the Plovdiv region from 2004 to 2012. *Folia Medica*, 56(1), 32–37. <https://doi.org/10.2478/folmed-2014-0005>
- Isbister, G. K. (2002). Failure of intramuscular antivenom in red-back spider envenoming. *Emergency Medicine*, 14(4), 436–439. <https://doi.org/10.1046/j.1442-2026.2002.00356.x>
- Isbister, G. K. (2010). Snakebite doesn't cause disseminated intravascular coagulation: Coagulopathy and thrombotic microangiopathy in snake envenoming. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 36(4), 444–451. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1254053>
- Isbister, G. K., Brown, S. G. A., Miller, M., Tankel, A., Macdonald, E., Stokes, B., Ellis, R., Nagree, Y., Wilkes, G. J., James, R., Short, A., & Holdgate, A. (2008). A randomised controlled trial of intramuscular vs. intravenous antivenom for latrodectism - The RAVE study. *QJM: An International Journal of Medicine*, 101(7), 557–565. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcn048>
- Isbister, G. K., Brown, S. G. A., Page, C. B., McCoubrie, D. L., Greene, S. L., & Buckley, N. A. (2013). Snakebite in Australia: A practical approach to diagnosis and treatment. *Medical Journal of Australia*, 199(11), 763–768. <https://doi.org/10.5694/mja12.11172>
- Isbister, G. K., & Kiernan, M. C. (2005). Neurotoxic marine poisoning. *The Lancet Neurology*, 4(April), 219–228. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(05\)70041-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70041-7)
- Isbister, G. K., Maduwage, K., Saiao, A., Buckley, N. A., Jayamanne, S. F., Seyed, S., Mohamed, F., Chathuranga, U., Mendes, A., Abeysinghe, C., Karunathilake, H., Gawarammana, I., Lalloo, D. G., & de Silva, H. J. (2015). Population

- pharmacokinetics of an indian F(ab')₂ snake antivenom in patients with Russell's viper (*Daboia russelii*) bites. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(7), e0003873. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003873>
- Isbister, G. K., O'Leary, M., Miller, M., Brown, S. G. A., Ramasamy, S., James, R., & Schneider, J. S. (2007). A comparison of serum antivenom concentrations after intravenous and intramuscular administration of redback (widow) spider antivenom. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 65(1), 139–143. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2007.03004.x>
- Ismail, M., & Abd-Elsalam, M. A. (1996). Serotherapy of scorpion envenoming: pharmacokinetics of antivenoms and a critical assessment of their usefulness. *Toxicon*, 34(2), 147. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(96\)83665-8](https://doi.org/10.1016/0041-0101(96)83665-8)
- Ismail, M., Abd-Elsalam, M. A., & Al-Ahaidib, M. S. (1998). Pharmacokinetics of ¹²⁵I-labelled Walterinnesia aegyptia venom and its specific antivenins: flash absorption and distribution of the venom and its toxin versus slow absorption and distribution of IgG, F(ab')₂ and F(ab) of the antivenin. *Toxicon*, 36(1), 93–114. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(97\)00062-7](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(97)00062-7)
- Ismail, M., Fatani, A. J. Y., & Dabees, T. T. (1992). Experimental treatment protocols for scorpion envenomation: A review of common therapies and an effect of kallikrein-kinin inhibitors. *Toxicon*, 30(10), 1257–1279. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(92\)90442-8](https://doi.org/10.1016/0041-0101(92)90442-8)
- Jacome, D., Melo, M. M., Santos, M. M. B., & Heneine, L. G. D. (2002). Kinetics of venom and antivenom serum and clinical parameters and treatment efficacy in *Bothrops alternatus* envenomed dogs. *Veterinary and Human Toxicology*, 44(6), 334–338.
- Jalali, A., Pipelzadeh, M. H., Seyedian, R., Rahmani, A. H., & Omidian, N. (2011). In vivo pharmacological study on the effectiveness of available polyclonal antivenom against *Hemiscorpius lepturus* venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 17(2), 142–149. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992011000200004>

- Jollivet, V., Hamel, J. F., De Haro, L., Labadie, M., Saponi, J. M., Cordier, L., Villa, A., Nisse, P., Puskarczyk, E., Berthelon, L., Harry, P., & Boels, D. (2015). European viper envenomation recorded by French poison control centers: A clinical assessment and management study. *Toxicon*, 108, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.09.039>
- Kalil, J., & Fan, H. W. (2017). Production and Utilization of Snake Antivenoms in South America. In P. Gopalakrishnakone, L. J. Cruz, & S. Luo (Eds.), *Toxins and Drug Discovery* (1st ed., pp. 81–101). Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6726-3_26-1
- Kalyan Kumar, B., Nanda, S. S., Venkateshwarlu, P., Kiran Kumar, Y., & Jadhav, R. T. (2010). Antisnake venom serum (ASVS). *International Journal on Pharmaceutical and Biomedical Research*, 1(3), 76–89.
- Karabuva, S., Vrkić, I., Brizić, I., Ivić, I., & Lukšić, B. (2016). Venomous snakebites in children in southern Croatia. *Toxicon*, 112, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.01.057>
- Karain, B. D., Lee, M. K. H., & Hayes, W. K. (2016). C60 fullerenes as a novel treatment for poisoning and envenomation: A proof-of-concept study for snakebite. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(7), 7764–7771. <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.12851>
- Karlson-Stiber, C., Persson, H., Heath, A., Smith, D., Al-Abdulla, I. H., & Sjöström, L. (1997). First clinical experiences with specific sheep Fab fragments in snake bite. Report of a multicentre study of *Vipera berus* envenoming. *Journal of Internal Medicine*, 241(1), 53–58. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.1997.80896000.x>
- Knudsen, C., & Laustsen, A. H. (2018). Recent advances in next generation snakebite antivenoms. *Trop. Med. Infect. Dis.*, 3(2), 42. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed3020042>
- Krifi, M. N., Amri, F., Kharrat, H., & El Ayeb, M. (1999). Evaluation of antivenom therapy in children severely envenomed by *Androctonus australis garzonii* (Aag)

- and *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) scorpions. *Toxicon*, 37(11), 1627–1634. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(99\)00079-3](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(99)00079-3)
- Krifi, M. N., Miled, K., Abderrazek, M., & El Ayeb, M. (2001). Effects of antivenom on *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) scorpion venom pharmacokinetics: Towards an optimization of antivenom immunotherapy in a rabbit model. *Toxicon*, 39(9), 1317–1326. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00083-6](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00083-6)
- Krifi, M. N., Savin, S., Debray, M., Bon, C., El Ayeb, M., & Choumet, V. (2005). Pharmacokinetic studies of scorpion venom before and after antivenom immunotherapy. *Toxicon*, 45(2), 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.10.007>
- Kurtović, T., Brvar, M., Grenc, D., Balija, M. L., Križaj, I., & Halassy, B. (2016). A single dose of viperfavTM may be inadequate for *Vipera ammodytes* snake bite: A case report and pharmacokinetic evaluation. *Toxins*, 8(8), 244. <https://doi.org/10.3390/toxins8080244>
- Kurtović, T., Karabuva, S., Grenc, D., Borak, M. D., Križaj, I., Lukšić, B., Halassy, B., & Brvar, M. (2021). Intravenous *Vipera berus* venom-specific Fab fragments and intramuscular *Vipera ammodytes* venom-specific F(ab')₂ fragments in *Vipera ammodytes*-envenomed patients. *Toxins*, 13(4), 279. <https://doi.org/10.3390/TOXINS13040279>
- Kurtović, T., Lang Balija, M., Ayvazyan, N., & Halassy, B. (2014). Paraspecificity of *Vipera a. ammodytes*-specific antivenom towards *Montivipera raddei* and *Macrovipera lebetina obtusa* venoms. *Toxicon*, 78, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.12.004>
- Lalloo, D. G., & Theakston, R. D. G. (2003). Snake antivenoms. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 41(3), 277–290. <https://doi.org/10.1081/CLT-120021113>
- Lamb, T., de Haro, L., Lonati, D., Brvar, M., & Eddleston, M. (2017). Antivenom for european *Vipera* species envenoming. *Clinical Toxicology*, 55(6), 557–568. <https://doi.org/10.1080/15563650.2017.1300261>

- Laustsen, A. H., Karatt-Vellatt, A., Masters, E. W., Arias, A. S., Pus, U., Knudsen, C., Oscoz, S., Slavny, P., Griffiths, D. T., Luther, A. M., Leah, R. A., Lindholm, M., Lomonte, B., Gutiérrez, J. M., & McCafferty, J. (2018). In vivo neutralization of dendrotoxin-mediated neurotoxicity of black mamba venom by oligoclonal human IgG antibodies. *Nature Communications*, 9(1), 3928. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06086-4>
- Laustsen, A. H., Lohse, B., Gutiérrez, J. M., Lomonte, B., McCafferty, J., & Rasmussen, A. R. (2016). *Recombinant Antivenoms*. Doktorska disertacija, University of Copenhagen. <https://orbit.dtu.dk/en/publications/recombinant-antivenoms>
- Laustsen, A. H., María Gutiérrez, J., Knudsen, C., Johansen, K. H., Bermúdez-Méndez, E., Cerni, F. A., Jürgensen, J. A., Ledsgaard, L., Martos-Esteban, A., Øhlenschläger, M., Pus, U., Andersen, M. R., Lomonte, B., Engmark, M., & Pucca, M. B. (2018). Pros and cons of different therapeutic antibody formats for recombinant antivenom development. *Toxicon*, 146, 151–175. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.03.004>
- Lavonas, E. J., Kokko, J., Schaeffer, T. H., Mlynarchek, S. L., Bogdan, G. M., & Dart, R. C. (2011). Short-term outcomes after fab antivenom therapy for severe crotaline snakebite. *Annals of Emergency Medicine*, 57(2), 128-137.e3. <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2010.06.550>
- León, G., Herrera, M., Segura, Á., Villalta, M., Vargas, M., & Gutiérrez, J. M. (2013). Pathogenic mechanisms underlying adverse reactions induced by intravenous administration of snake antivenoms. *Toxicon*, 76, 63–76. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.09.010>
- León, G., Monge, M., Rojas, E., Lomonte, B., & Gutiérrez, J. M. (2001). Comparison between IgG and F(ab')₂ polyvalent antivenoms: neutralization of systemic effects induced by Bothrops asper venom in mice, extravasation to muscle tissue, and potential for induction of adverse reactions. *Toxicon*, 39(6), 793–801. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00209-9](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00209-9)
- León, G., Vargas, M., Segura, Á., Herrera, M., Villalta, M., Sánchez, A., Solano, G., Gómez, A., Sánchez, M., Estrada, R., & Gutiérrez, J. M. (2018). Current technology

- for the industrial manufacture of snake antivenoms. *Toxicon*, 151, 63–73.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.06.084>
- Lewin, M., Samuel, S., Merkel, J., & Bickler, P. (2016). Varespladib (LY315920) appears to be a potent, broad-spectrum, inhibitor of snake venom phospholipase A2 and a possible pre-referral treatment for envenomation. *Toxins*, 8(9), 248.
<https://doi.org/10.3390/toxins8090248>
- Lobo, E. D., Hansen, R. J., & Balthasar, J. P. (2004). Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93(11), 2645–2668.
<https://doi.org/10.1002/JPS.20178>
- LoVecchio, F., Klemens, J., Roundy, E. B. A., & Klemens, A. (2003). Serum sickness following administration of antivenin (Crotalidae) polyvalent in 181 cases of presumed rattlesnake envenomation. *Wilderness and Environmental Medicine*, 14(4), 220–221.
[https://doi.org/10.1580/1080-6032\(2003\)14\[220:SSFAOA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1580/1080-6032(2003)14[220:SSFAOA]2.0.CO;2)
- Lukšić, B., Bradarić, N., & Prgomet, S. (2006). Venomous snakebites in southern Croatia. *Collegium Antropologicum*, 30(1), 191–197.
- Lukšić, B., Čulić, V., Stričević, L., Brizić, I., Poljak, N. K., & Tadić, Z. (2010). Infant death after nose-horned viper (*Vipera ammodytes ammodytes*) bite in Croatia: a case report. *Toxicon*, 56(8), 1506–1509. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.08.009>
- Lukšić, B., Karabuva, S., Markić, J., Polić, B., Kovačević, T., Mestrović, J., & Križaj, I. (2018). Thrombocytopenic purpura following envenomation by the nose-horned viper (*Vipera ammodytes ammodytes*): two case reports. *Medicine*, 97(52), e13737.
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000013737>
- Maduwage, K., & Isbister, G. K. (2014). Current treatment for venom-induced consumption coagulopathy resulting from snakebite. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(10), e3220. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003220>
- Maduwage, K. P., Scorgie, F. E., Lincz, L. F., O’Leary, M. A., & Isbister, G. K. (2016). Procoagulant snake venoms have differential effects in animal plasmas: implications

- for antivenom testing in animal models. *Thrombosis Research*, 137, 174–177.
<https://doi.org/10.1016/J.THROMRES.2015.12.002>
- Maduwage, K., Silva, A., O’Leary, M. A., Hodgson, W. C., & Isbister, G. K. (2016). Efficacy of Indian polyvalent snake antivenoms against Sri Lankan snake venoms: lethality studies or clinically focussed in vitro studies. *Scientific Reports*, 6(May), 26778. <https://doi.org/10.1038/srep26778>
- Malasit, P., Warrell, D. A., Chanthavanich, P., Viravan, C., Mongkolsapaya, J., Singthong, B., & Supich, C. (1986). Prediction, prevention, and mechanism of early (anaphylactic) antivenom reactions in victims of snake bites. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*, 292(6512), 17–20.
<https://doi.org/10.1136/BMJ.292.6512.17>
- Marinov, I., Atanasov, V. N., Stankova, E., Duhalov, D., Petrova, S., & Hubenova, A. (2010). Severe coagulopathy after *Vipera ammodytes ammodytes* snakebite in Bulgaria: a case report. *Toxicon*, 56(6), 1066–1069.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.06.010>
- Mateljak Lukačević, S., Kurtović, T., Borić, J., & Halassy, B. (2022). Roughness of production conditions: does it really affect stability of IgG-based antivenoms? *Toxins*, 14(7), 483. <https://doi.org/10.3390/toxins14070483>
- Mayers, C. N., Veall, S., Bedford, R. J., & Holley, J. L. (2003). Anti-immunoglobulin responses to IgG, F(ab')₂, and Fab botulinum antitoxins in mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 25(3), 397–408.
<https://doi.org/10.1081/IPH-120024507>
- Mendes, V. K. da G., Pereira, H. da S., Elias, I. C., Soares, G. S., Santos, M., Talhari, C., Cordeiro-Santos, M., Monteiro, W. M., & Sachett, J. de A. G. (2022). Secondary infection profile after snakebite treated at a tertiary referral center in the Brazilian Amazon. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 55, e0244.
<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0244-2021>
- Meyer, W. P., Habib, A. G., Onayade, A. A., Yakubu, A., Smith, D. C., Nasidi, A., Daudu,

- I. J., Warrell, D. A., & Theakston, R. D. G. (1997). First clinical experiences with a new ovine Fab *Echis ocellatus* snake bite antivenom in Nigeria: randomized comparative trial with Institute Pasteur Serum (Ipser) Africa antivenom. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 56(3), 291–300. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.1997.56.291>
- Mora, J., Mora, R., Lomonte, B., & Gutiérrez, J. M. (2008). Effects of *Bothrops asper* snake venom on lymphatic vessels: insights into a hidden aspect of envenomation. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(10), e318. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000318>
- Morais, V., Berasain, P., Ifrán, S., Carreira, S., Tortorella, M. N., Negrín, A., & Massaldi, H. (2012). Humoral immune responses to venom and antivenom of patients bitten by *Bothrops* snakes. *Toxicon*, 59(2), 315–319. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.12.006>
- Nekaris, K. A. I., Campera, M., Nijman, V., Birot, H., Rode-Margono, E. J., Fry, B. G., Weldon, A., Wirdateti, W., & Imron, M. A. (2020). Slow lorises use venom as a weapon in intraspecific competition. *Current Biology*, 30(20), R1252–R1253. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.08.084>
- Neri-Castro, E., Bénard-Valle, M., Paniagua, D., Boyer, L. V., Possani, L. D., López-Casillas, F., Olvera, A., Romero, C., Zamudio, F., & Alagón, A. (2020). Neotropical rattlesnake (*Crotalus simus*) venom pharmacokinetics in lymph and blood using an ovine model. *Toxins*, 12(7), 455. <https://doi.org/10.3390/toxins12070455>
- Nielsen, H., Sørensen, H., Faber, V., & Svehag, S. (1978). Circulating immune complexes, complement activation kinetics and serum sickness following treatment with heterologous anti-snake venom globulin. *Scandinavian Journal of Immunology*, 7(1), 25–33. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1978.tb00423.x>
- Nikapitiya, B., & Maduwage, K. (2017). Pharmacodynamics and pharmacokinetics of snake antivenom. *Sri Lanka Journal of Medicine*, 26(2), 54–65. <https://doi.org/10.4038/sljm.v27i1.79>

- Nimorakiotakis, B., & Winkel, K. D. (2004). Spider bite - the redback spider and its relatives. *Australian Family Physician*, 33(3), 153–157.
- Offerman, S. R., Barry, J. D., Richardson, W. H., Tong, T., Tanen, D., Bush, S. P., & Clark, R. F. (2009). Subcutaneous Crotaline Fab antivenom for the treatment of rattlesnake envenomation in a porcine model. *Clinical Toxicology (Philadelphia, Pa.)*, 47(1), 61–68. <https://doi.org/10.1080/15563650701750613>
- Osipov, A., & Utkin, Y. (2023). What are the neurotoxins in hemotoxic snake venoms? *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2919. <https://doi.org/10.3390/IJMS24032919>
- Ownby, C. L., Reisbeck, S. L., & Russell, A. (1996). Levels of therapeutic antivenon and venom in a human snakebite victim. *Southern Medical Journal*, 89(8), 803–806. <https://doi.org/10.1097/00007611-199608000-00010>
- Paniagua, D., Jiménez, L., Romero, C., Vergara, I., Calderón, A., Benard, M., Bernas, M. J., Rilo, H., De Roodt, A., D'Suze, G., Witte, M. H., Boyer, L., & Alagón, A. (2012). Lymphatic route of transport and pharmacokinetics of *Micrurus fulvius* (coral snake) venom in sheep. *Lymphology*, 45(4), 144–153.
- Paniagua, D., Vergara, I., Boyer, L., & Alagón, A. (2015). Role of lymphatic system on snake venom absorption. In P. Gopalakrishnakone, H. Inagaki, A. K. Mukherjee, T. R. Rahmy, & C.-W. Vogel (Eds.), *Snake Venoms* (pp. 1–19). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6648-8_10-1
- Paniagua, D., Vergara, I., Román, R., Romero, C., Benard-Valle, M., Calderón, A., Jiménez, L., Bernas, M. J., Witte, M. H., Boyer, L. V., & Alagón, A. (2019). Antivenom effect on lymphatic absorption and pharmacokinetics of coral snake venom using a large animal model. *Clinical Toxicology*, 57(8), 727–734. <https://doi.org/10.1080/15563650.2018.1550199>
- Pépin-Covatta, S., Lutsch, C., Grandgeorge, M., Lang, J., & Scherrmann, J. M. (1996). Immunoreactivity and pharmacokinetics of horse anti-scorpion venom F(ab')₂-scorpion venom interactions. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 141(1), 272–

277. <https://doi.org/10.1006/TAAP.1996.0284>

- Pepin, S., Lutsch, C., Grandgeorge, M., & Scherrmann, J. M. (1995). Snake F(ab')₂ antivenom from hyperimmunized horse: pharmacokinetics following intravenous and intramuscular administrations in rabbits. *Pharmaceutical Research*, 12(10), 1470–1473. <https://doi.org/10.1023/A:1016279219619>
- Percie Du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne, W. J., Clark, A., Cuthill, I. C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S. T., Howells, D. W., Karp, N. A., Lazic, S. E., Lidster, K., MacCallum, C. J., MacLeod, M., ... Wuerbel, H. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *BMC Veterinary Research*, 4(1), 242. <https://doi.org/10.1136/bmj-2020-100115>
- Petricevich, V. L. (2004). Cytokine and nitric oxide production following severe envenomation. *Current Drug Targets: Inflammation and Allergy*, 3(3), 325–332. <https://doi.org/10.2174/1568010043343642>
- Polania Gutierrez, J. J., & Munakomi, S. (2023). Intramuscular Injection. *StatPearls [Internet]*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556121/>
- Porter, C. J. H., Edwards, G. A., & Charman, S. A. (2001). Lymphatic transport of proteins after s.c. injection: implications of animal model selection. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50(1–2), 157–171. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00153-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00153-3)
- Pucca, M. B., Cerni, F. A., Janke, R., Bermúdez-Méndez, E., Ledsgaard, L., Barbosa, J. E., & Laustsen, A. H. (2019). History of envenoming therapy and current perspectives. *Frontiers in Immunology*, 10(July), 1598. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01598>
- Pugh, R. N. H., & Theakston, R. D. G. (1987). A clinical study of viper bite poisoning. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 81(2), 135–149. <https://doi.org/10.1080/00034983.1987.11812106>
- Reid, H. A. (1980). Antivenom reactions and efficacy. *The Lancet*, 315(8176), 1024–

1025. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(80\)91455-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(80)91455-5)

- Reid, H. A., Chan, K. E., & Thean, P. C. (1963). Prolonged coagulation defect (defibrination syndrome) in Malayan viper bite. *Lancet (London, England)*, 1(7282), 621–626. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(63\)91269-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(63)91269-8)
- Rivière, G., Choumet, V., Audebert, F., Sabouraud, A., Debray, M., Scherrmann, J. M., & Bon, C. (1997). Effect of antivenom on venom pharmacokinetics in experimentally envenomed rabbits: toward an optimization of antivenom therapy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 281(1), 1–8.
- Rivière, G., Choumet, V., Saliou, B., Debray, M., & Bon, C. (1998). Absorption and elimination of viper venom after antivenom administration. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 285(2), 490–495.
- Rodríguez, C., Estrada, R., Herrera, M., Gómez, A., Segura, A., Vargas, M., Villalta, M., & León, G. (2016). Bothrops asper envenoming in cattle: clinical features and management using equine-derived whole IgG antivenom. *Veterinary Journal*, 207, 160–163. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2015.08.008>
- Rojas, A., Vargas, M., Ramírez, N., Estrada, R., Segura, Á., Herrera, M., Villalta, M., Gómez, A., Gutiérrez, J. M., & León, G. (2013). Role of the animal model on the pharmacokinetics of equine-derived antivenoms. *Toxicon*, 70, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.03.013>
- Ruha, A. M., Curry, S. C., Beuhler, M., Katz, K., Brooks, D. E., Graeme, K. A., Wallace, K., Gerkin, R., LoVecchio, F., Wax, P., & Selden, B. (2002). Initial postmarketing experience with Crotalidae polyvalent immune Fab for treatment of rattlesnake envenomation. *Annals of Emergency Medicine*, 39(6), 609–615. <https://doi.org/10.1067/mem.2002.123698>
- Ryman, J. T., & Meibohm, B. (2017). Pharmacokinetics of monoclonal antibodies. *CPT: Pharmacometrics and Systems Pharmacology*, 6(9), 576–588. <https://doi.org/10.1002/psp4.12224>
- Salmonson, T., Danielson, B., & Wikstrom, B. (1990). The pharmacokinetics of

- recombinant human erythropoietin after intravenous and subcutaneous administration to healthy subjects. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 29(6), 709–713. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2125.1990.TB03692.X>
- Sanhajariya, S., Duffull, S. B., & Isbister, G. K. (2018). Pharmacokinetics of snake venom. *Toxins*, 10(2), 73. <https://doi.org/10.3390/toxins10020073>
- Santana, G. C., Freire, A. C. T., Ferreira, A. P. L., Cháves-Olórtegui, C., Diniz, C. R., & Freire-Maia, L. (1996). Pharmacokinetics of Tityus serrulatus scorpion venom determined by enzyme-linked immunosorbent assay in the rat. *Toxicon*, 34(9), 1063–1066. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(96\)00050-5](https://doi.org/10.1016/0041-0101(96)00050-5)
- Sanz, L., de Freitas-Lima, L. N., Quesada-Bernat, S., Graça-de-Souza, V. K., Soares, A. M., Calderón, L. de A., Calvete, J. J., & Caldeira, C. A. S. (2019). Comparative venomomics of Brazilian coral snakes: Micrurus frontalis, Micrurus spixii spixii, and Micrurus surinamensis. *Toxicon*, 166(April), 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.05.001>
- Sauter-Starace, F., Ratel, D., Cretallaz, C., Foerster, M., Lambert, A., Gaude, C., Costecalde, T., Bonnet, S., Charvet, G., Aksenova, T., Mestais, C., Benabid, A. L., & Torres-Martinez, N. (2019). Long-term sheep implantation of WIMAGINE®, a wireless 64-channel electrocorticogram recorder. *Frontiers in Neuroscience*, 13(August), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00847>
- Scheerlinck, J. P. Y., Snibson, K. J., Bowles, V. M., & Sutton, P. (2008). Biomedical applications of sheep models: from asthma to vaccines. *Trends in Biotechnology*, 26(5), 259–266. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.02.002>
- Scherrmann, J. M. (1994). Antibody treatment of toxin poisoning recent advances. *Clinical Toxicology*, 32(4), 363–375. <https://doi.org/10.3109/15563659409011037>
- Seifert, S. A. (1999). Pharmacokinetic analysis of a crotalid Fab antivenom and theoretical considerations for the prevention of coagulopathic recurrence. *North American Congress of Clinical Toxicology*, 189–195.
- Seifert, S. A., & Boyer, L. V. (2001). Recurrence phenomena after immunoglobulin

- therapy for snake envenomations: Part 1. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of immunoglobulin antivenoms and related antibodies. *Annals of Emergency Medicine*, 37(2), 189–195. <https://doi.org/10.1067/mem.2001.113135>
- Sera - Products of BB - NCIPD Ltd. (n.d.). Retrieved May 11, 2023, from <https://bulbio.com/en/serums.html>
- Shah, D. K., & Betts, A. M. (2012). Towards a platform PBPK model to characterize the plasma and tissue disposition of monoclonal antibodies in preclinical species and human. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 39, 67–86. <https://doi.org/10.1007/s10928-011-9232-2>
- Si, H., Yin, C., Wang, W., Davies, P., Sanchez, E., Suntravat, M., Zawieja, D., & Cromer, W. (2022). Effect of the snake venom component crotoxin on lymphatic endothelial cell responses and lymph transport. *Microcirculation*, 30(2–3), e12775. <https://doi.org/10.1111/MICC.12775>
- Silva, A., Hodgson, W. C., Tasoulis, T., & Isbister, G. K. (2022). Rodent lethality models are problematic for evaluating antivenoms for human envenoming. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 830384. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2022.830384>
- Slagboom, J., Kool, J., Harrison, R. A., & Casewell, N. R. (2017). Haemotoxic snake venoms: their functional activity, impact on snakebite victims and pharmaceutical promise. *British Journal of Haematology*, 177(6), 947–959. <https://doi.org/10.1111/bjh.14591>
- Smalligan, R., Cole, J., Brito, N., Laing, G. D., Mertz, B. L., Manock, S., Maudlin, J., Quist, B., Holland, G., Nelson, S., Laloo, D. G., Rivadeneira, G., Barragan, M. E., Dolley, D., Eddleston, M., Warrell, D. A., & Theakston, R. D. G. (2004). Crotoxin snake bite in the Ecuadorian Amazon: Randomised double blind comparative trial of three South American polyspecific antivenoms. *British Medical Journal*, 329(7475), 1129–1133. <https://doi.org/10.1136/bmj.329.7475.1129>
- Smith, D. C., Reddi, K. R., Laing, G., Theakston, R. G. D., & Landon, J. (1992). An affinity purified ovine antivenom for the treatment of *Vipera berus* envenoming.

- Toxicon*, 30(8), 865–871. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(92\)90384-H](https://doi.org/10.1016/0041-0101(92)90384-H)
- Suero antiofídico polivalente biol. (n.d.). Retrieved May 11, 2023, from [https://www.biol.com.ar/uploads/filemanager/Suero Antiofifico Polivalente Biol.pdf](https://www.biol.com.ar/uploads/filemanager/Suero_Antiofifico_Polivalente_Biol.pdf)
- Sutherland, S. K., & Trinca, J. C. (1978). Survey of 2144 cases of red-back spider bites. Australia and New Zealand, 1963-1976. *Medical Journal of Australia*, 2(14), 620–623. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1978.tb131783.x>
- Tan, C. H., Sim, S. M., Gnanathanan, C. A., Fung, S. Y., & Tan, N. H. (2014). Pharmacokinetics of the Sri Lankan hump-nosed pit viper (*Hypnale hypnale*) venom following intravenous and intramuscular injections of the venom into rabbits. *Toxicon*, 79(January), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.12.011>
- Theakston, R. D. G., & Laing, G. D. (2014). Diagnosis of snakebite and the importance of immunological tests in venom research. *Toxins*, 6(5), 1667–1695. <https://doi.org/10.3390/toxins6051667>
- Theakston, R. D. G., & Smith, D. C. (1997). Antivenoms. *BioDrugs*, 7(5), 366–375. <https://doi.org/10.2165/00063030-199707050-00004>
- Theakston, R. D. G., & Warrell, D. A. (2000). Crisis in snake antivenom supply for Africa. *Lancet*, 356(9247), 2104. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)74319-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)74319-1)
- Theakston, R. D. G., Warrell, D. A., & Griffiths, E. (2003). Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon*, 41(5), 541–557. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00393-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00393-8)
- Thein-Than, T., Kyi-Thein, K., & Mg-Mg-Thwin, M. (1985). Plasma clearance time of Russell's viper (*Vipera russelli*) antivenom in human snake bite victims. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 79(2), 262–263. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(85\)90353-0](https://doi.org/10.1016/0035-9203(85)90353-0)
- Tibballs, J., Padula, A. M., Winkel, K. D., & Jackson, H. D. (2020). Delayed antivenom for life-threatening tiger snake bite: lessons learnt. *Anaesthesia and Intensive Care*,

48(5), 399–403. <https://doi.org/10.1177/0310057X20946047>

- Trimmel, N. E., Hierweger, M. M., Jucker, S., Windhofer, L., & Weisskopf, M. (2022). Physiologic effects of prolonged terminal anesthesia in sheep (*Ovis gmelini aries*). *Comparative Medicine*, 72(4), 257–266. <https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-21-000103>
- van Helden, D. F., Dosen, P. J., O’Leary, M. A., & Isbister, G. K. (2019). Two pathways for venom toxin entry consequent to injection of an Australian elapid snake venom. *Scientific Reports*, 9(1), 8595. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45022-4>
- Vázquez, H., Chávez-Haro, A., García-Ubbelohde, W., Mancilla-Nava, R., Paniagua-Solís, J., Alagón, A., & Sevcik, C. (2005). Pharmacokinetics of a F(ab’)₂ scorpion antivenom in healthy human volunteers. *Toxicon*, 46(7), 797–805. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.08.010>
- Vázquez, H., Chávez-Haro, A., García-Ubbelohde, W., Paniagua-Solís, J., Alagón, A., & Sevcik, C. (2010). Pharmacokinetics of a F(ab’)₂ scorpion antivenom administered intramuscularly in healthy human volunteers. *International Immunopharmacology*, 10(11), 1318–1324. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.08.018>
- Vetal Serum - Ürünlerimiz. (n.d.). Retrieved May 11, 2023, from <http://www.vetalserum.com.tr/en/urunler/polisera-snake-antiserum>
- Viekvin - viper venom antiserum (equine). (n.d.). Retrieved May 11, 2023, from <http://www.torlakinstitut.com/pdf/Viekvin-en.pdf>
- Viper Venom Antitoxin. (n.d.). Retrieved May 11, 2023, from https://www.biodrug.sk/docs/en_viper_venom.pdf
- Vugmeyster, Y., Xu, X., Theil, F.-P., Khawli, L. A., & Leach, M. W. (2012). Pharmacokinetics and toxicology of therapeutic proteins: advances and challenges. *World Journal of Biological Chemistry*, 3(4), 73–92. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v3.i4.73>
- Warrell, D. A. (2010). Snake bite. *The Lancet*, 375(9708), 77–88.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61754-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61754-2)

Warrell, D. A. (2017). Clinical toxicology of snakebite in Asia. In *Handbook of: Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons* (1st ed., pp. 493–594). CRC Press.
<https://doi.org/10.1201/9780203719442-27>

Warrell, D. A. (2019). Venomous bites, stings, and poisoning: an update. *Infectious Disease Clinics of North America*, 33(1), 17–38.
<https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.001>

WHO. (2005). *Guidelines for the Clinical Management of Snake bites in the South-East Asia Region*. WHO Regional Office for South-East Asia.
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/205171/B0241.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

WHO. (2010). *Guidelines for the management of snake-bites*. (D. A. Warrell (Ed.)). WHO Regional Office for South-East Asia.

WHO. (2017). Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. In *WHO Expert Committee on Biological Standardization: Sixty-Seventh Report* (pp. 197–388). World Health Organization.

WHO. (2019). *Snakebite envenoming - A strategy for prevention and control*.
<https://www.who.int/publications/i/item/9789241515641>

Williams, D. J., Gutiérrez, J. M., Calvete, J. J., Wüster, W., Ratanabanangkoon, K., Paiva, O., Brown, N. I., Casewell, N. R., Harrison, R. A., Rowley, P. D., O'Shea, M., Jensen, S. D., Winkel, K. D., & Warrell, D. A. (2011). Ending the drought: new strategies for improving the flow of affordable, effective antivenoms in Asia and Africa. *Journal of Proteomics*, 74(9), 1735–1767.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.027>

Williams, D. J., Gutiérrez, J. M., Harrison, R., Warrell, D. A., White, J., Winkel, K. D., & Gopalakrishnakone, P. (2010). The global snake bite initiative: an antidote for snake bite. *The Lancet*, 375(9708), 89–91. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61159-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61159-4)

- Williams, D. J., Jensen, S. D., Nimorakiotakis, B., Müller, R., & Winkel, K. D. (2007). Antivenom use, premedication and early adverse reactions in the management of snake bites in rural Papua New Guinea. *Toxicon*, 49(6), 780–792. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.026>
- Win-Aung. (2001). Intramuscular Antivenom Administration as an Effective First-Aid Measure in Management of Snakebites. *Management of Snakebite and Research - Report and Working Papers of a Seminar Yangon, Myanmar, 11-12 December 2001*, 29–33.
- Woo, S., & Jusko, W. J. (2007). Interspecies comparisons of pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin. *Drug Metabolism and Disposition*, 35(9), 1672–1678. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.015248>
- Wright, D. F. B., Winter, H. R., & Duffull, S. B. (2011). Understanding the time course of pharmacological effect: a PKPD approach. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 71(6), 815–823. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2011.03925.x>
- Yap, M. K. K., Tan, N. H., Sim, S. M., Fung, S. Y., & Tan, C. H. (2015). The effect of a polyvalent antivenom on the serum venom antigen levels of *Naja sputatrix* (Javan spitting cobra) venom in experimentally envenomed rabbits. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 117(4), 274–279. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12398>
- Zanetti, G., Duregotti, E., Locatelli, C. A., Giampreti, A., Lonati, D., Rossetto, O., & Pirazzini, M. (2018). Variability in venom composition of european viper subspecies limits the cross-effectiveness of antivenoms. *Scientific Reports*, 8(1), 9818. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28135-0>
- Zerrouk, H., Bougis, P. E., Céard, B., Benslimane, A., & Martin-Eauclaire, M. F. (1991). Analysis by high-performance liquid chromatography of *Androctonus mauretanicus mauretanicus* (black scorpion) venom. *Toxicon*, 29(8), 951–960. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(91\)90078-6](https://doi.org/10.1016/0041-0101(91)90078-6)
- Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., & Xie, S. (2010). PKSolver: An add-in program for

pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 99(3), 306–314. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2010.01.007>

Zhao, H., Zheng, J., & Jiang, Z. (2001). Pharmacokinetics of thrombin-like enzyme from venom of *Agkistrodon halys ussuriensis* Emelianov determined by ELISA in the rat. *Toxicon*, 39(12), 1821–1826. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00121-0](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00121-0)

8. POPIS OZNAKA, SIMBOLA I KRATICA

ANOVA	engl. <i>analysis of variance</i>
Atx	amoditoksin
AUC	engl. <i>area under the curve</i>
BSA	engl. <i>bovine serum albumin</i>
$C_{\max}$	engl. <i>the maximum concentration</i>
CL	engl. <i>clearance</i>
ED ₅₀	srednja efektivna doza
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EKG	elektrokardiogram
ELISA	enzimski imunotest na čvrstoj fazi (engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ETT	endotrahealni tubus
F	Fischerov omjer varijanci
$F_{krit.}$	kritična vrijednost
Fab	engl. <i>antigen-binding fragment</i>
$F(ab')_2$	engl. <i>antigen-binding (bivalent) fragment</i>
Fc	engl. <i>fragment crystallizable</i>
GPO	engl. <i>Thai Government Pharmaceutical Organization</i>
HPLC	engl. <i>high-performance liquid chromatography</i>
IgG	imunoglobulin G
IgG-HRP	imunoglobulin G konjugiran s peroksidazom iz hrena
kDa	kilodalton
LD ₅₀	engl. <i>median lethal dose</i> srednja letalna doza

MES	2-(<i>N</i> -morfolin)etansulfonska kiselina
m_{kum}	kumulativna masa
MRT	engl. <i>mean residence time</i>
n	engl. <i>number</i>
OPD	<i>o</i> -fenilendiamin dihidroklorid
p	engl. <i>probability value</i>
PBST	engl. <i>Phosphate Buffered Saline with Tween</i>
PJ	proizvoljna jedinica
PKSolver	engl. <i>Pharmacokinetic Solver</i>
RSD	kriterij prihvatljivosti
SDS-PAGE	engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SE	engl. <i>standard error</i>
SGS	engl. <i>Sheep Grimace Scale</i>
$t_{1/2}$	engl. <i>the elimination half-life</i>
t_{max}	engl. <i>time to peak drug concentration</i>
TWF	engl. <i>TWF Pharmaceutical liquid antivenom</i>
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
Vaa	lat. <i>Vipera ammodytes ammodytes</i>
V_z	engl. <i>apparent volume of distribution during the terminal phase</i>
$V_{\text{kum.}}$	kumulativni volumen
WHO	engl. <i>World Health Organization</i>

9. ŽIVOTOPIS



Erika Gamulin rođena je 24. rujna 1991. godine u Dubrovniku, gdje završava osnovnu i srednju školu. Godine 2010. upisuje integrirani preddiplomski i diplomski studij veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom obrazovanja volontira na Klinici za porodništvo i reprodukciju, radi kao demonstrator u Knjižnici Veterinarskog fakulteta te je aktivna članica Međunarodne udruge studenata veterine (IVSA). Studij završava 2018. godine s diplomskim radom „Biokemijski mehanizmi sinteze spolnih hormona u domaćih životinja“ pod vodstvom prof. dr. sc. Marka Samardžije i prof. dr. sc. Jelke Pleadin. Zapošljava se 2021. godine u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu kao asistent na projektu „Farmakokinetika intravenski i intramuskularno primijenjenog antivenoma u velikom animalnom modelu“ s ciljem istraživanja razotkrivanja optimalnog puta primjene protuotrova i razumijevanja njegovih interakcija s otrovom unutar limfnog sustava pod vodstvom dr. sc. Tihane Kurtović. Iste godine upisuje doktorski studij Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu. Glavni je autor 2 izvorna znanstvena rada indeksirana u bazi Web of Science, a aktivno je sudjelovala na više domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova predstavljanjem svojih istraživanja kroz postere. Također, sudjelovala je u nastavi kao gost predavač na kolegiju „Mikrobiologija patogena“ na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu i kao član Organizacijskog odbora 4. znanstveno-stručnog simpozija „Pokusne životinje u znanstvenim istraživanjima“ održanog 2025. godine.

PUBLIKACIJE

1. **Gamulin E**, Mateljak Lukačević S, Lang Balija M, Smajlović A, Vnuk D, Gulan Harcet J, Tomićić M, Hećimović A, Halassy B, Kurtović T (2025) Pharmacokinetics of Snake Antivenom Following Intravenous and Intramuscular Administration in Envenomed Large Animal Model, *Pharmaceutics*.
2. **Gamulin E**, Mateljak Lukačević S, Halassy B, Kurtović T (2023) Snake Antivenoms – Toward Better Understanding of the Administration Route, *Toxins*.