KOSMOS
PROBLEMY NAUK BIOLOGICZNYCH

Tom 68 2019
Numer 3 (324)
Strony 409–420

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika

KONRAD KAMIL HUS, ALEKSANDRA BOCIAN

Zakład Biotechnologii i Bioinformatyki
Wydział Chemiczny Politechniki Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza
Powstańców Warszawy 6, 35-959 Rzeszów
E-mail: knr.hus@gmail.com

DLACZEGO JADY WĘŻY WYWOŁUJĄ KRWOTOKI? KRÓTKA HISTORIA METALOPROTEINAZ Z JADÓW WĘŻY

WSTĘP

Od stuleci węże wywoływały w ludziach silne emocje, wśród jednych siejąc strach i panikę, u drugich wzbudzając ciekawość i fascynację. W niektórych rejonach świata zwierzęta te do dzisiaj bywają przedmiotem kultu, podczas gdy w innych od zawsze postrzegane były jako symbol grzechu i zła. Szczególną uwagą zwróciły jednak te gatunki węży, które w swoich gruczołach jadowych produkowały wydzielinę pełną zagrażających życiu toksyn. Już w starożytności ludzie interesowali się właściwościami tych mieszanin, które wykorzystywali m.in. do opracowywania trucizn. Jednak dopiero z nadejściem nowoczesnych technik analitycznych zainicjowano badania mające na celu przede wszystkim poznanie składu poszczególnych jadów, zrozumienie mechanizmu ich działania, jak również ich potencjalne wykorzystanie w medycynie (CALVETE 2013, LOMONTE i CALVETE 2017).

Jady węży średnio zawierają od 30 do nawet 100 toksyn pochodzenia białkowego. Niektóre z nich wykazują aktywność enzymatyczną, podczas gdy inne to nieenzymatyczne białka i polipeptydy. Pomimo bardzo dużego zróżnicowania białek obecnych w jadach węży, pod względem strukturalnym zalicza się je tylko do kilku superrodzin. Do najczęściej występujących grup białek należą: fosfolipazy A_2 (PLA_2s), toksyny z motywem trzech palców (3FTxs), metaloproteinazy z jadów węży (SVMPs) oraz proteazy serynowe (SVSPs). Co więcej, białka w obrębie jednej rodziny wykazują zazwyczaj wysoki stopień podobieństwa struktury pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowej, jednak często istotnie różnią się między sobą wywoływanym efektem farmakologicznym (KANG i współaut. 2011). Obecność większości toksycznych komponentów jadu jest najprawdopodobniej wynikiem presji środowiskowej jakiej poddane były węże. Organizmy te ewoluowały w taki sposób, aby składniki ich jadu były jak najbardziej skuteczne w wywoływaniu efektów patologicznych dających przewagę nad ofiarą, która aktualnie występowała na wspólnym terenie. Dlatego to właśnie rodzaj pożywienia obecny w danym środowisku był od zawsze najważniejszym czynnikiem selekcyjnym, wpływającym na ewolucję poszczególnych białek jadu. Nie powinno zatem dziwić, że węże filogenetycznie bardziej od siebie oddalone to zazwyczaj te, które zamieszkują odległe krainy geograficzne. Generalnie, takie osobniki będą znacznie różnić się składem jadu, jak i wywoływanym przez nie efektem patologicznym (MACKESSY 2009). W przypadku węży z rodziny żmijowatych (Viperidae) oraz kilku gatunków z rodziny połozowatych (Colubridae), charakterystycznym następstwem ugryzienia i wstrzyknięcia jadu jest obfity krwotok, który występuje lokalnie w okolicach ugryzienia lub ogólnosystemowo. Rozległe uszkodzenia w strukturze naczyń krwionośnych powodują z kolei niszczenie okolicznych tkanek, co dodatkowo utrudnia późniejszą regenerację mięśni. Objawy te spowodowane są obecnością w jadzie dużej ilości enzymów proteolitycznych z grupy metaloproteinaz, których aktywność jest główną przyczyną gwałtownych wycieków krwi z organizmu (GUTIÉRREZ i współaut. 2016a).

Słowa kluczowe: błona podstawna, jad węży, krwotok, metaloproteinazy

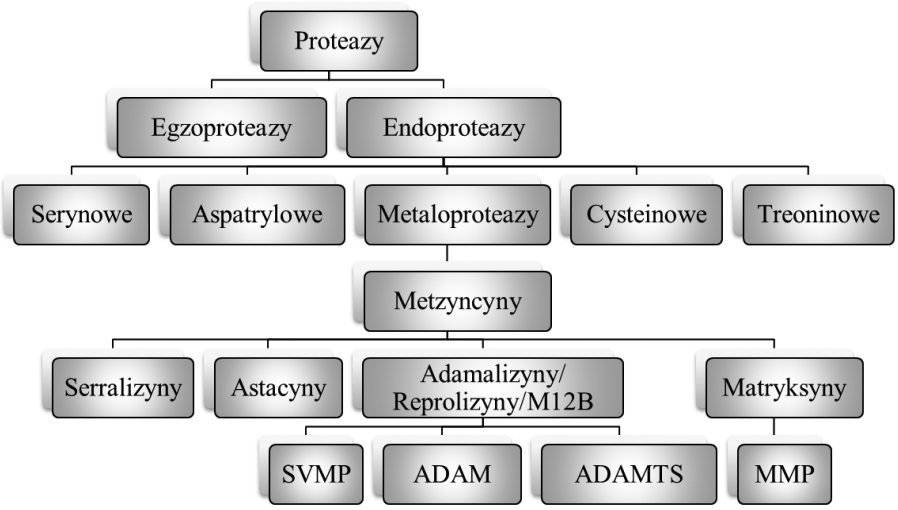
Celem niniejszej pracy przeglądowej było zebranie, przeanalizowanie i przedstawienie obecnego stanu wiedzy na temat przyczyn powstawania krwotoków po ukąszeniach węży, jak również dokładny opis mechanizmu, który do tego prowadzi. Jednak, aby w pełni zrozumieć w jaki sposób składniki jadów węży wywołują krwotoki, na wstępie przedstawiona zostanie ogólna charakterystyka enzymów odpowiedzialnych za ten proces, jak również budowa struktur, które bezpośrednio ulegają zniszczeniom.

BUDOWA I PODZIAŁ METALOPROTEINAZ Z JADÓW WĘŻY

Metaloproteinazy z jadów węży (ang. snake venom metaloproteinases, SVMPs) to grupa enzymów proteolitycznych zaliczanych do podrodziny M12B cynkowych metaloendoproteinaz, która w literaturze określana jest również jako podrodzina repro- lub adamalizyn. Poza SVMPs, do adamalizyn zalicza się również blisko spokrewnione białka ADAM (ang. a disintegrin and metalloproteinase) i ADAMTS (ang. a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif), których skład domenowy jest bardzo zbliżony do siebie (Ryc. 1). Co więcej, w zasadzie wszystkie białka z podrodziny M12B charakteryzują się wysokim podobieństwem strukturalnym podjednostki katalitycznej do metaloproteinaz macierzy komórkowej (MMPs) (HUXLEY-JONES i współaut. 2007, GUTIÉRREZ i współaut. 2016a, TAKEDA 2016).

W jadzie większości węży z rodziny żmijowatych metaloproteinazy są najbardziej liczną grupą białek. Badania proteomiczne wykazały, że enzymy te bardzo często stanowią ponad 30% wszystkich białek jadu żmijowatych, podczas gdy w jadach zdradnicowatych (Elapidae), gleboryjcowatych (Atractaspididae) i niektórych Colubridae stanowią zaledwie promil wszystkich białek. Już sam tak duży udział procentowy tych enzymów w jadach Viperidae wskazuje na ich istotny wpływ na wywoływane przez jad efekty patologiczne, w tym przede wszystkim krwotoki, ale również: skrzepy, obrzęki, stany zapalne czy nekrozy (MOURA-DA-SILVA i współaut. 2016, TAKEDA 2016).

Obecny podział metaloproteinaz oparty jest na składzie i organizacji domen oraz subdomen tworzących poszczególne białka. Wyróżnia się 3 główne klasy (P-I, P-II i P-III), z których grupa druga i trzecia dzieli się na kolejne podklasy. Najprostszą strukturą charakteryzują się metaloproteinazy P-I, które w komórkach gruczołów jadowych syntezowane są w formie nieaktywnych enzymatycznie prekursorów. Następnie w procesie obróbki potranslacyjnej proteolitycznemu odcięciu ulegają nieaktywne fragmenty białka. Na końcu N są to: peptyd sygnałowy (ang. predomain, P) i prodomena (ang. prodomain, Pro), a na końcu C sekwencja rozdzielająca (ang. spacer domain, S). W swojej dojrzałej formie SVMPs P-I zawierają zatem tylko katalityczną domenę metaloproteinazy (ang. metalloproteinase domain, M). Masa molekularna białek tej klasy to ok. 25 kDa (SERRANO i współaut. 2006, FOX i SERRANO 2009, GÂZ FLOREA i współaut. 2016, GUTI-



Ryc. 1. Umiejscowienie SVMPs w ogólnej klasyfikacji proteaz.

Endoproteazy pod względem budowy miejsca aktywnego dzieli się na: serynowe, aspartylowe, cysteinowe, treoninowe i metaloproteazy. Wśród tych ostatnich wyróżnia się rodzinę metzyncyn zawierającą m.in. podrodzinę adamalizyn do których należą: SVMPs, ADAMs i ADAMTs, jak również matryksyn zawierającą metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej (MMPs).

ÉRREZ i współaut. 2016a, MOURA-DA-SILVA i współaut. 2016, TAKEDA 2016).

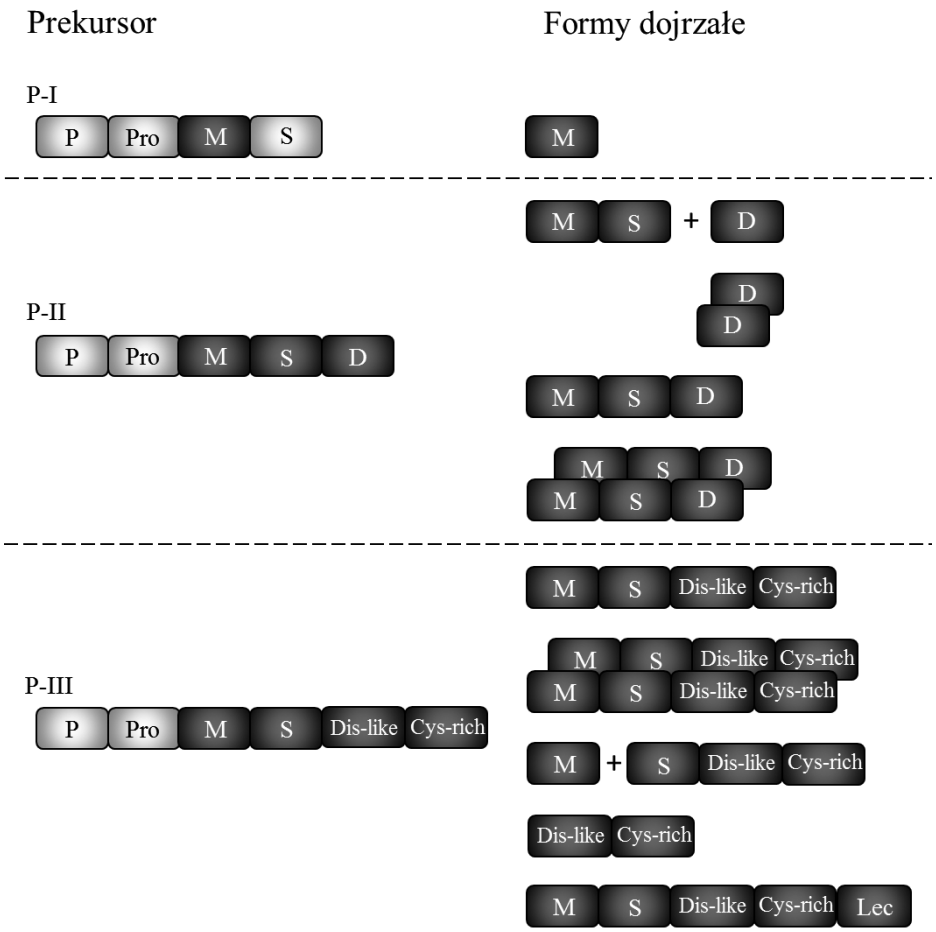
Enzymy z klasy P-II w formie nieaktywnej zbudowane są podobnie do P-I, a różnią się jedynie tym, że na końcu C zawierają dodatkową domenę dezintegryny (ang. disintegrin domain, D). Rozróżnienie enzymów P-II na poszczególne podklasy dokonuje się na podstawie potranslacyjnych modyfikacji domeny dezintegrynowej. Domena ta może być odcinana proteolitycznie i występować w formie wolnej lub pozostawać częścią aktywnego enzymatycznie białka. W obu jednak postaciach domena ta zachowuje aktywność i może wpływać m.in. na regulację procesów adhezji i migracji komórek. Białka z tej klasy mają masę cząsteczkową w przedziale 25-50 kDa (SERRANO i współaut. 2006, FOX i SERRANO 2009, GÂZ FLOREA i współaut. 2016, GUTIÉRREZ i współaut. 2016a, MOURA-DA-SILVA i współaut. 2016, TAKEDA 2016).

Metaloproteinazy P-III, poza domeną M, dodatkowo zawierają domenę dezintegryno-podobną (ang. disintegrin-like domain, Dis-like) oraz domenę bogatą w cysteinę (ang. cysteine rich domain, Cys-rich). Podobnie jak P-II, syntezowane są w formie nieaktywnych proenzymów, które w trakcie obróbki potranslacyjnej w wyniku proteolizy tracą domeny P i Pro. W obrębie tej klasy białek wyróżnia się co najmniej 5 podklas, które różnią się od siebie przede wszystkim innym wzorem modyfikacji po translacji. Zdarza się również, że metaloproteinazy P-III zawierają dwie dodatkowe domeny lektyno-podobne (Lec), które po procesie translacji przyłączają się do struktury za pomocą mostków dwusiarczkowych. Zważając na obecność dodatkowej domeny Cys-rich, metaloproteinazy z klasy III są najcięższe, a ich masa wynosi powyżej 50 kDa (SERRANO i współaut. 2006, FOX i SERRANO 2009, GÂZ FLOREA i współaut. 2016, GUTIÉRREZ i współaut. 2016a, MOURA-DA-SILVA i współaut. 2016, TAKEDA 2016).

Jak wyżej wspomniano, SVMPs syntezowane są w formie nieaktywnych proenzymów (zymogenów). Aktywacja tych białek zachodzi pod wpływem proteolitycznego odcięcia ich prodomeny, najprawdopodobniej w trakcie sekrecji enzymów z komórek wydzielniczych do światła gruczołu. Dzieje się tak, ponieważ w prodomenie SVMPs znajduje się konserwatywny motyw aminokwasowy z wolną cysteiną, która utrzymuje enzym w stanie uśpionym przez mechanizm blokowania miejsca aktywnego (ang. cys-switch mechanism). Wciąż nie wiadomo jednak, w jaki sposób dojrzałe formy metaloproteinaz z jadów węży mogą znajdować się w gruczołach, jednocześnie nie wywołując uszkodzeń w ich strukturach. Uważa się, że jednym z czynników protekcyjnych może być kwasowe pH środowiska gruczołów, które obniża aktywność enzymów. Dowiedziono również, że wysokie stężenie obecnych w jadzie cytrynianów i tripeptydów zawierających piroglutaminian może hamować działanie SVMPs. Co więcej, odcięte prodomeny lub ich fragmenty mogą mieć zdolność do inhibicji enzymu, o ile w swojej sekwencji zawierają kluczowy konserwatywny motyw aminokwasowy. Obecnie podejrzewa się, że dopiero po wstrzyknięciu jadu do organizmu ofiary, ulega on na tyle dużemu rozcieńczeniu, że powyższe czynniki tracą na znaczeniu, przez co enzym odzyskuje swoją aktywność proteolityczną (PORTES-JUNIOR i współaut. 2014, MOURA-DA-SILVA i współaut. 2016).

W obrębie białek z grupy SVMPs dość powszechne jest zjawisko tworzenia się większych struktur, złożonych z kilku cząsteczek enzymów, tzw. multimerów. Najczęściej są to homo- i heterodimery, które bardzo często charakteryzują się podwyższoną aktywnością biologiczną w stosunku do pojedynczych cząsteczek. Enzymy te, podobnie jak inne białka, poddawane są zróżnicowanym procesom glikozylacji, które jeszcze bardziej wpływają na różnorodność metaloproteinaz. Jak widać zatem, pozornie prosty podział metaloproteinaz z jadu węży na 3 klasy, dość mocno komplikuje się przy uwzględnieniu wszystkich modyfikacji potranslacyjnych. Dokładny podział na konkretne klasy wraz z graficznym obrazem poszczególnych struktur przedstawiono na Ryc. 2 (FOX i SERRANO 2009, MOURA-DA-SILVA i współaut. 2016, TAKEDA 2016).

Tak szeroki wachlarz odmian, form i izoform pośród białek należących do grupy SVMPs sprawia, że jednolity i uniwersalny opis aktywności biologicznych i katalitycznych dla całej klasy lub podklasy staje się właściwie niemożliwy. W tym kontekście większość białek z tej grupy należałoby rozpatrywać raczej jako osobne przypadki. I tak, np. podklasa P-II zawiera zarówno białka, które indukują krwotoki, jak i takie, które hamują agregację płytek krwi. Podobnie, do podklasy trzeciej zalicza się enzymy ze zdolnością wywoływania krwotoków czy apoptozy, czyli programowanej śmierci komórki, będącej sekwencyjnym i niewywołującym odpowiedzi immunologicznej naturalnym procesem eliminacji uszkodzonych komórek. Jednocześnie, w obrębie tej grupy znaleźć można białka działające prokoagulacyjnie poprzez aktywację protrombiny i/lub czynnika krzepnięcia krwi X, czy też wykazujące aktywność proteolityczną w stosunku do specyficznych klas białek (FOX i SERRANO 2009, GUTIÉRREZ i współaut. 2018). Na szczęście jednak dość powszechnie stosuje



Ryc. 2. Schemat przedstawia ogólną budowę metaloproteinaz z jadów węży z podziałem na poszczególne klasy.

Rycina obrazuje również skład i kolejność domen obecnych w białku prekursorowym oraz w formach dojrzałych powstałych w wyniku modyfikacji potranslacyjnych. Jasnym kolorem zaznaczono domeny, które podczas dojrzewania białka ulegają odcięciu proteolitycznemu.

się też bardziej ogólny podział na metaloproteinazy krwotoczne i niekrwotoczne czyli takie, które posiadają lub nie posiadają potencjału do wywoływania krwotoków. Generalnie przyjmuje się, że większość metaloproteinaz klasy III (P-III) oraz duża część metaloproteinaz z klasy II (P-II) mają zdolność do wywoływania krwotoków. Z kolei, pomimo dużych podobieństw strukturalnych pomiędzy metaloproteinazami P-I, poszczególne białka z tej grupy mogą bardzo istotnie różnić się potencjałem krwotocznym, począwszy od białek nie wywołujących krwotoków, po takie, które bardzo silnie indukują w organizmie taki efekt. Ogólnie jednak uznaje się, że białka z grup II i III wykazują większą aktywność krwotoczną niż te z grupy I. Co więcej, metaloproteinazy P-III mogą wywoływać krwotoki nie tylko lokalne, ale również ogólnosystemowe. Przyczyną różnic w aktywności enzymów należących do poszczególnych klas jest przede wszystkim obecność dodatkowych domen w strukturze metaloproteinaz P-II i P-III (domena D u P-II oraz domeny Dis-like i Cys-rich u P-III). Te pomocnicze domeny, choć nie uczestniczą bezpośrednio w procesie proteolizy, służą enzymowi do selektywnego wiązania się z docelowym substratem. Do innych czynników, które mogłyby wpływać na potencjał krwotoczny tych białek zalicza się też ich różną odporność na inhibicję i zróżnicowany wzór glikozylacji (FOX i SERRANO 2009; GUTIÉRREZ i współaut. 2016a, 2018; TAKEDA 2016).

Co ciekawe, to nie najprościej zbudowane enzymy z grupy P-I pojawiły się jako pierwsze, ale najbardziej złożone strukturalnie metaloproteinazy P-III, które wyewoluowały z białek z grupy ADAM. Kolejne podklasy (P-II i P-I) pojawiały się stopniowo w wyniku utraty poszczególnych domen i fragmentów sekwencji. Stąd też metaloproteinazy P-III obecne są w jadach gatunków węży z rodzin żmijowatych, zdradnicowatych, gleboryjcowa-

tych oraz połozowatych, podczas gdy enzymy z klas P-I i P-II do tej pory opisano tylko w jadach żmijowatych (TAKEDA 2016).

Efekt krwotoczny wywoływany przez metaloproteinazy spowodowany jest głównie przez ich oddziaływanie na błonę podstawną, która otacza i stanowi rusztowanie dla komórek śródbłonka naczyń krwionośnych. Enzymy te w procesie hydrolizy rozkładają kluczowe elementy tej błony, co przekłada się na rozszczelnienie i przerwanie struktury naczyń krwionośnych (GUTIÉRREZ i współaut. 2009). Kompletny opis mechanizmu powstawania krwotoków uwzględnia jednak wiele zagadnień dotyczących błony podstawnej, struktury, której uszkodzenie inicjuje cały proces. Dlatego też w następnym rozdziale przedstawione zostaną podstawowe informacje na ten temat.

BŁONA PODSTAWNA – OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA I MOLEKULARNY OPIS STRUKTURY

Błony podstawne (ang. basement membrane, BM) to struktury będące wyspecjalizowanymi formami macierzy zewnątrzkomórkowej, które tworzą oparcie dla komórek nabłonka i śródbłonka, jak również często otaczają komórki mięśniowe, tłuszczowe czy nerwowe. Przede wszystkim pełnią one rolę rusztowania dla komórek, chroniąc je przed stresem mechanicznym oraz stanowią platformę do wymiany bliskich i dalekich sygnałów pomiędzy komórkami a ich otoczeniem. Poza tym oddzielają od siebie grupy komórek, dzieląc je na wyspecjalizowane struktury, tkanki czy narządy. Bezpośrednie sąsiedztwo błon podstawnych z komórkami powoduje, że wpływają one na morfologię i zachowanie komórek, w tym przede wszystkim na ich migrację i proliferację. Większość błon podstawnych ma grubość od 50 do 100 nm, jednak niektóre ich wyspecjalizowane odmiany są jeszcze cieńsze (PAULSSON 1992, HOHENESTER i YURCHENCO 2013). Dlatego warto zaznaczyć, że błony podstawne znajdujące się w różnych miejscach organizmu mogą różnić się strukturą, rolą biologiczną czy składem molekularnym (KRUEGEL i MIOSGE 2010). Wiedza i poglądy na temat błon podstawnych ewoluowały na przestrzeni ostatnich lat. Początkowo uważana była za ściśle uporządkowaną i statyczną strukturę złożoną z 3 warstw (LEBLOND i INOUE 1989), a obecnie postrzegana jest raczej jako dynamiczna, supramolekularna struktura zbudowana ze skomplikowanych i sztywnych sieci białek, połączonych ze sobą różnymi oddziaływaniami międzycząsteczkowymi (HOHENESTER i YURCHENCO 2013). Jakkolwiek dokładny skład białkowy określonych rodzajów błon podstawnych może się między sobą różnić, to ogólnie wśród białek tworzących tę sieć znaleźć można: kolagen typu IV, lamininę, nidogen oraz siarczanowo-heparanowe proteoglikany: perlekan i agrynę (HOHENESTER i YURCHENCO 2013). Co ciekawe, struktury te w warunkach *in vivo* mają zdolność do samoorganizacji. Proces ten inicjowany jest przez lamininę, która po wstępnym związaniu się z powierzchnią komórek ulega polimeryzacji. Laminina jest najliczniejszym, niekolagenowym białkiem BM, zaliczanym do grupy białek adhezyjnych, czyli takich, które bezpośrednio uczestniczą w połączeniach komórka-komórka lub komórka-macierz. W przypadku lamininy interakcja ta polega na pośrednictwie w tworzeniu połączeń pomiędzy komórką a błoną podstawną. Cząsteczka lamininy zbudowana jest z 3 łańcuchów tworzących potrójną helisę, która wyglądem przypomina trójzębny widelec. Pojedyncze cząsteczki białka łącząc się ze sobą tworzą długie polimery w kształcie plastra miodu, które stanowią płaską podstawę rusztowania. Jednocześnie polimeryzacji ulega drugie z najważniejszych białek błony podstawnej – kolagen typu IV. Jest to niefibrylarne białko, które stanowi około 50% wszystkich białek błony podstawnej. Podobnie jak laminina, cząsteczka kolagenu typu IV składa się z trzech różnych łańcuchów polipeptydowych, które podobnie też zorganizowane są w potrójną helisę, tworząc funkcjonalny heterotrimer. Kompletne białko w swojej budowie zawiera dwie, charakterystyczne domeny: niekolagenową (ang. non-collagenous domain, NC1) oraz domenę 7S. Cząsteczki tego białka mają zdolność formowania się w większe agregaty na trzy sposoby. Pierwszy z nich polega na połączeniu się czterech cząsteczek kolagenu w miejscu domeny 7S, tworząc w efekcie strukturę przypominającą pająka. Drugi rodzaj połączenia opiera się na wiązaniu się dwóch cząsteczek kolagenu w miejscu NC1, natomiast trzeci sposób obejmuje niekowalencyjne, boczne oddziaływania pomiędzy kilkoma potrójnymi helisami. Jak widać zatem, kolagen typu IV, w oparciu o dwa rodzaje połączeń kowalencyjnych oraz niekowalencyjne oddziaływania pomiędzy łańcuchami, tworzy w błonie podstawnej skomplikowaną, usztywnioną sieć białkową zdolną do przenoszenia względnie dużych obciążeń (LEBLEU i współaut. 2007, YURCHENCO 2011). Zadaniem pozostałych białek błony podstawnej jest przede wszystkim połączenie ze sobą obu struktur (lamininowej i kolagenowej), zwiększenie ich wytrzymałości oraz, w niektórych przypadkach, uczestnictwo w przekazywaniu sygnałów z i do komórki. Przez długi czas uważano, że białkiem, które spaja ze sobą obie wysoko-

cząsteczkowe struktury jest nidogen. Białko to, zwane też entaktyną, ma zdolność do wiązania się zarówno z cząsteczką lamininy, jak i cząsteczką kolagenu IV, stąd też naturalnym wydawało się założenie, że to ono pełni rolę białka łącznikowego (LEBLEU i współaut. 2007, KRUEGEL i MIOSGE 2010, YURCHENCO 2011). Jednak w 2012 r. BEHRENS i współautorzy przeprowadzili badanie, w którym co prawda potwierdzili, że nidogen wykazuje powinowactwo zarówno do sieci opartych na lamininie i kolagenie IV, ale wykazali również, że białko to po wbudowaniu się do jednej ze struktur, całkowicie traci zdolność do wiązania się z drugą. W kontekście wcześniejszych doniesień, wniosek ten okazał się dość zaskakujący, aczkolwiek wskazuje on, że to nidogen mógłby w jakiś sposób stabilizować strukturę, jednak bezpośrednio nie może pełnić funkcji białka łącznikowego. Autorzy tego badania zaproponowali, że rolę białka spajającego obie struktury pełni perlekan, którego białkowy fragment łączy się z siecią lamininy, podczas gdy siarczanowo-heparanowe łańcuchy są częścią sieci kolagenowych (BEHRENS i współaut. 2012). Wciąż nie do końca znana jest rola ostatniego z wymienionych wyżej białek - agryny. Wiadomo, że wykazuje ona powinowactwo do lamininy i niektórych składników błony komórkowej, stąd też mogłaby brać udział w utrwalaniu połączenia pomiędzy tymi strukturami (YURCHENCO 2011). Zważając z kolei na jej podobieństwo strukturalne do perlekanu proponuje się też, że białka te mogą pełnić podobne funkcje, uwzględniając bezpośredni udział w łączeniu struktur opartych na lamininie i kolagenie IV (HOHENESTER i YURCHENCO 2013).

Na potrzeby tej pracy przeglądowej wybrano jedynie najważniejsze zagadnienia konieczne do lepszego zrozumienia wpływu metaloproteinaz na błony podstawne, stąd też opis tych interesujących struktur nie zawiera wszystkich zebranych do tej pory informacji, lecz skupia się raczej na przedstawieniu ogólnego schematu budowy błon podstawnych.

W literaturze dostępne są jednak świetne artykuły wraz z wizualizacjami przedstawiającymi budowę zarówno struktur błon podstawnych, jak i ich pojedynczych komponentów (YURCHENCO i SCHITTNY 1990, LEBLEU i współaut. 2007, YURCHENCO 2011, BEHRENS i współaut. 2012).

AKTYWNOŚĆ KRWOTOCZNA METALOPROTEINAZ Z JADÓW WĘŻY – OPIS MAKROSKOPOWY

Opisany w literaturze molekularny mechanizm indukowania krwotoku przez metaloproteinazy z jadów węży jest z pewnością dosyć złożony, ale przy tym niezwykle fascynujący. Wyjaśnia on zjawiska zarówno na poziomie molekularnym, uwzględniając specyficzne oddziaływania konkretnych enzymów z ich substratami, jak również opisuje makrostruktury, które ulegając uszkodzeniom doprowadzają ostatecznie do nieodwracalnych zmian w całym organizmie. Niemniej ciekawa jest również sama historia odkryć, które na przestrzeni lat stopniowo wzbogacały naszą wiedzę, zmieniając nierzadko aktualnie panujący pogląd dotyczący przyczyn tego zjawiska, a ostatecznie prowadząc do zaproponowania obecnego modelu. Jak to jednak często w nauce bywa, droga ta nie była prosta, a co więcej wciąż nie jest zakończona, gdyż ciągle jeszcze trwają badania mające na celu lepsze zrozumienie zachodzących w organizmie zmian, spowodowanych obecnością w krwiobiegu enzymów krwotocznych.

Jedna z pierwszych obserwacji tego zjawiska pojawiła się już w latach 30. XX w., kiedy Taube i Essex opublikowali swoją pracę naukową, w której opisywali wpływ jadu węża z rodziny żmijowatych na organizm psa (TAUBE i ESSEX 1937). Zarówno ta praca, jak i te publikowane później zawierały wstępny i ogólny opis zmian histopatologicznych, które w konsekwencji prowadziły do krwotoków. Autorzy tych badań przede wszystkim zwracali uwagę na utratę integralności w strukturze naczyń krwionośnych, spowodowaną uszkodzeniem poszczególnych komórek w warstwie śródbłonka (TAUBE i ESSEX 1937, HOMMA i TU 1971).

Dokładniejsze wnioski musiały jednak poczekać na rozwój technologii, w tym przede wszystkim badań ultrastrukturalnych, opartych na nowoczesnych technikach mikroskopii elektronowej. Pierwsze badania z zastosowaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego wskazywały, że wyciek krwi z naczyń krwionośnych następuje w miejscach połączeń międzykomórkowych. Spekulowano więc, że obecność toksyn po pierwsze zaburza strukturę błony podstawnej w pobliżu połączeń międzykomórkowych, a po drugie, powoduje uwalnianie się mediatorów prozapalnych (takich jak serotonina czy histamina), które dodatkowo wpływają na otwieranie się szczelin pomiędzy komórkami i w efekcie wypływ krwi z naczyń. Mechanizm ten nazwano krwotokiem przez diapedezę (ang. hemorrhage per diapedesis), ponieważ w czasie wynaczyniania leukocytów (diapedezy) także dochodzi do rozluźnienia wiązań pomiędzy komórkami śródbłonka naczyniowego, chociaż w tym przypadku nie dochodzi do krwawienia. Co ważne, w przypadku mechanizmu z uwzględnieniem pro-

cesu zbliżonego do diapedezy nie obserwowano uszkodzeń samych komórek śródbłonka, a jedynie fragmentów błony podstawnej (OHSAKA 1979). Jednak niemal równolegle otrzymywano wyniki, które zdawały się przeczyć powyższej hipotezie. Badając najmniejsze naczynia włosowate (kapilary) w tkance mięśniowej myszy, po wcześniejszym domięśniowym wstrzyknięciu toksyn z jadu węża, zaobserwowano wypływ krwi z naczyń poprzez uszkodzone komórki śródbłonka, a nie w miejscach połączeń międzykomórkowych. Co więcej, cały proces był dużo bardziej gwałtowny i powodował szybkie rozrywanie naczyń krwionośnych. Stąd też proces ten nazwano krwotokiem wskutek pęknięcia naczynia (ang. hemorrhage per rhexis) (OWNBY i współaut. 1974, 1978). Większość badań przeprowadzonych później wydawała się potwierdzać mechanizm *per rhexis*. Ostatecznie przyjęto poprawność obu, pozornie wykluczających się mechanizmów, a różnice w otrzymywanych wynikach wytłumaczono różnym materiałem biologicznym wykorzystanym w badaniach. W pierwszym przypadku bowiem mikroskopowo analizowano żyłki, a w drugim obserwowano zachowanie kapilar. Wydawać by się mogło, że nie jest to duża różnica, jednak jedną z charakterystycznych właściwości żyłek jest chociażby to, że receptory komórek budujących ich strukturę oddziałują z wieloma przekaźnikami prozapalnymi powodując kurczenie lub rozszerzanie się połączeń międzykomórkowych, dlatego też w ich przypadku obserwowano mechanizm krwotoku przez diapedezę. Ustalono zatem, że mechanizm krwotoku może się różnić w zależności od badanej tkanki. Jednak w przypadku mięśni szkieletowych, które przeważnie są pierwotnym miejscem ukąszenia, zdecydowanie przeważa mechanizm *per rhexis*, którego skutki widoczne są przede wszystkim w naczyniach włosowatych. Generalnie zaobserwowano, że jest on dużo bardziej powszechny, zatem przyjęto go za mechanizm dominujący (GUTIÉRREZ i współaut. 2016a).

W następnym etapie rozważań przyczyn powstawania krwotoków należałoby się zastanowić, co dokładnie jest przyczyną niszczenia komórek w śródbłonku naczyń krwionośnych. O ile w mechanizmie opartym na procesie zbliżonym do diapedezy nie dochodzi do uszkodzenia śródbłonka, a krew wypływa przez połączenia międzykomórkowe, to w przypadku krwotoku wskutek pęknięcia naczynia najpierw musi dojść do naruszenia struktury komórek śródbłonka. Najprostszym wytłumaczeniem byłoby założenie, że metaloproteinazy po prostu wykazują natychmiastowy efekt cytotoksyczny w stosunku do komórek śródbłonka powodując ich dezintegrację i w konsekwencji tworzenie się otworów w całej konstrukcji naczyń, co rzecz jasna skutkowałoby wyciekiem krwi. Zaskakująco jednak, badania mające potwierdzić tę hipotezę dowiodły czegoś całkowicie przeciwnego. Okazało się, że SVMPs podczas inkubacji z komórkami śródbłonkowymi hodowanymi *in vitro* nie wywołują natychmiastowego efektu cytotoksycznego, który przecież widoczny jest podczas krwotoku. Podczas tego badania zaobserwowano jednak inne zjawisko. Metaloproteinazy powodowały odczepianie się komórek od podłoża hodowli, a po kilku godzinach komórki te podlegały procesowi programowanej śmierci komórkowej (apoptozy). Od początku jednak było oczywiste, że to nie apoptoza odpowiedzialna jest za efekt, który widoczny jest *in vivo* w naczyniach krwionośnych po wstrzyknięciu jadu, gdyż proces programowanej śmierci komórki trwa zbyt długo. Co więcej, dodatkowe badania przeprowadzone na hodowlach komórek śródbłonka, będących komórkami adherentnymi, czyli takimi, które prawidłowo funkcjonują tylko wtedy, gdy są przyczepione do podłoża, wykazały, że mamy do czynienia z wcześniej opisanym zjawiskiem nazwanym anoikis. Jest to odmiana procesu apoptozy, spowodowana odczepieniem się komórek od zewnętrznej macierzy lub od innych komórek. Obserwacja ta okazała się jednak dosyć istotna i częściowo na jej podstawie wydedukowano, że metaloproteinazy nie działają bezpośrednio toksycznie na komórki, ale raczej wpływają na ich połączenia z otoczeniem, powodując odczepianie się komórek od podłoża. Wciąż jednak nie rozwiązywało to całego problemu, ponieważ dane te w niewystarczający sposób tłumaczyły zjawiska zachodzące w organizmie, czyli przede wszystkim gwałtowne uszkodzenie komórek śródbłonka i w efekcie rozerwanie całej struktury naczynia (GUTIÉRREZ i współaut. 2016a). W 2005 r. GUTIÉRREZ wraz ze współautorami zwrócili uwagę na to, że w przypadku procesów zachodzących w organizmie, pod uwagę należy wziąć wszystkie czynniki mogące mieć wpływ na dane zjawisko, uwzględniając również te pozabiologiczne. I tak, zaproponowali oni model, w który włączyli siły fizyczne działające na komórki wynikające z przepływu krwi (tzw. siły hemodynamiczne). W modelu tym uwzględniono, że naczynia krwionośne stale funkcjonują w środowisku narażonym na działanie względnie dużych i intensywnie zmieniających się sił biofizycznych. Kluczowym parametrem naczyń, neutralizującym działanie sił hemodynamicznych jest ich rozciągliwość. Okazuje się, że parametr ten w największym stopniu uzależniony jest od poprawnej struktury błony podstawnej, która

niejako pełni rolę rusztowania dla komórek śródbłonka. Zaburzenie struktury BM powoduje utratę właściwości mechanicznych całej struktury naczynia i pod wpływem sił fizycznych (w tym głównie siły hydrostatycznej) dochodzi do rozciągania naczynia, a następnie przerwania jego integralności. W taki sposób ostatecznie ustalono, że mechanizm powstawania krwotoków obejmuje dwa etapy: w pierwszym etapie dochodzi do hydrolizy kluczowych elementów błony podstawnej i w efekcie do osłabienia właściwości mechanicznych całego naczynia, a w drugim siły hemodynamiczne powodują rozerwanie struktury i wyciek krwi na zewnątrz (GUTIÉRREZ i współaut. 2005, 2016a).

Hipoteza ta została później potwierdzona w badaniach *in vivo* myszy, u których w analizowanej tkance mięśniowej całkowicie zatrzymano przepływ krwi. Wstrzyknięcie SVMPs nie wywołało efektu krwotocznego w przypadku braku obecności sił hemodynamicznych, które, jak widać, są w tym procesie kluczowym elementem (GUTIÉRREZ i współaut. 2016a). Ostatnimi zatem pytaniami wciąż pozostawały: w jaki dokładnie sposób metaloproteinazy z jadów węży oddziałują z błoną podstawną powodując osłabienie jej struktury oraz dlaczego nie wszystkie SVMPs wywołują krwotoki?

AKTYWNOŚĆ KRWOTOCZNA METALOPROTEINAZ Z JADÓW WĘŻY – AKTYWNOŚĆ HYDROLITYCZNA

Jak już wiadomo, główną przyczyną powstawania krwotoków spowodowanych obecnością jadu w krwiobiegu jest niszczenie struktury błony podstawnej naczyń przez toksyny z grupy metaloproteinaz. Natura tych oddziaływań przez długie lata pozostawała jednak nieznana. Wczesne analizy biochemiczne aktywności katalitycznej metaloproteinaz wyłoniły szereg białek, które w obecności tych enzymów pełnią rolę substratów. Baza znalezionych substratów była jednak dość duża, a dodatkowo wiele białek znajdujących się w niej w żaden sposób nie było związanych ze strukturami, które odgrywały znaczenie w tym procesie (GUTIÉRREZ i współaut. 2016a, 2018). Pierwsze próby określenia, które dokładnie białka ulegając proteolizie prowadzą do destabilizacji całej struktury polegały na porównaniu w warunkach *in vitro* aktywności enzymów krwotocznych z metaloproteinazami, które tej zdolności nie posiadają. W tej sytuacji niemałym zaskoczeniem okazał się fakt, że zarówno krwotoczne, jak i niekrwotoczne metaloproteinazy mają zdolność cięcia białek obecnych w błonie podstawnej. Ustalono, że enzymy z obu grup są zdolne do hydrolizy kluczowych białek błony podstawnej: lamininy, nidogenu, kolagenu typu IV i perlekanu. W przypadku dwóch pierwszych białek nie zaobserwowano żadnych różnic w stopniu proteolizy przy wykorzystaniu obu typów enzymów. Co jednak istotne, dokładniejsze analizy wykazały wyraźne różnice w cięciu kolagenu IV i perlekanu. Białka te były łatwiej hydrolizowane przez enzymy zdolne do wywoływania krwotoków (BALDO i współaut. 2010; GUTIÉRREZ i współaut. 2016a, b, 2018). Jedno z miejsc cięcia kolagenu typu IV dotyczyło okolic miejsca odpowiedzialnego za tworzenie się tetramerów, co w oczywisty sposób może wpływać na stabilność całej struktury błony podstawnej. Podobnie, jak degradacja perlekanu, który odpowiada za łączenie polimerowych struktur lamininy i kolagenu. Stąd też nasuwa się oczywisty wniosek, że hydroliza obu tych białek jest kluczowym i niezbędnym etapem w procesie wywoływania krwotoku (GUTIÉRREZ i współaut. 2016a). Podobne badania wykazały dodatkowo, że proteoliza kolagenu typu VI i XV może mieć znaczenie w całym mechanizmie. Wspomniane białka przyczyniają się do utrzymywania stabilności kapilar poprzez łączenie BM z otaczającą ją macierzą zewnątrzkomórkową, zatem zaburzenie ich struktury może wpływać na osłabienie właściwości mechanicznych błony podstawnej (SERRANO i współaut. 2006; GUTIÉRREZ i współaut. 2016a, b).

Innym aspektem, który długo pozostawał niewyjaśniony była różnica w potencjale krwotocznym zarówno pomiędzy enzymami z różnych klas, jak i tymi należącymi do jednej grupy. Obecnie uważa się, że ważną przyczyną różnic w stopniu hydrolizy elementów BM pomiędzy różnymi SVMPs jest nie tyle różnica w ich aktywności katalitycznej, ale bardziej w powinowactwie i sile wiązania enzymu do substratu. Badania immunohistochemiczne pokazały, że generalnie enzymy z klasy P-II i P-III działają w kluczowych miejscach błony podstawnej, podczas gdy metaloproteinazy P-I są bardziej rozproszone i niekoniecznie ściśle umiejscowione w okolicy naczyń włosowatych. Źródła tych dysproporcji upatruje się rzecz jasna w obecności dodatkowych domen niekatalitycznych, które wzmacniają efekt proteolityczny metaloproteinaz P-II i P-III poprzez kierowanie enzymu do odpowiedniego substratu i umożliwienie mu selektywnego związania się z nim (SERRANO i współaut. 2006; FOX i SERRANO, 2009; BALDO i współaut. 2010; GUTIÉRREZ i współaut. 2016a, b, 2018; HERRERA i współaut. 2016). Co więcej okazuje się, że dodatkowe domeny w SVMPs mogą zapobiegać inhibicji enzymu przez obecną w osoczu α_2-makroglobulinę. Generalnie białko to ma zdolność do hamowania aktywno-

ści proteolitycznej różnych enzymów, w tym metaloproteinaz P-I. Jednak w przypadku białek z klas P-II i P-III mechanizm ten jest nieskuteczny, co może wyjaśniać dlaczego enzymy te w przeciwieństwie do tych z klasy pierwszej, mogą powodować nie tylko lokalne, ale również krwotoki ogólnosystemowe (GUTIÉRREZ i współaut. 2016a).

Wydawało się zatem, że gromadzona przez lata wiedza pozwoliła odpowiedzieć na kluczowe pytania dotyczące przyczyn powstawania krwotoków wywoływanych aktywnością metaloproteinaz. W 2017 r. nastąpił jednak dość zaskakujący zwrot. W roku tym bowiem Seo i współautorzy opublikowali pracę, w której zaproponowali mechanizm dość mocno odbiegający od powszechnie przyjętego modelu, który podkreślał rolę kapilar, hydrolizy BM i sił hemodynamicznych. Przedstawiony przez autorów mechanizm opiera się na założeniu, że głównymi substratami dla SVMPs są nie tyle białka błony podstawnej, co białka obecne na powierzchni błony komórek śródbłonka. Tak naprawdę, idea ta zbliżona jest do mechanizmu opartego na procesie podobnym do diapedezy, wszak w tym przypadku wyciek krwi z naczyń również następowałby w miejscach połączeń międzykomórkowych. W uproszczeniu, metaloproteinazy odcinają fragment kompleksu receptorów LRP5/6 (ang. low-density lipoprotein receptor-related protein 5 or 6) i wywołują jego aktywację. W następnym etapie aktywny kompleks powoduje przemieszczenie białek adhezyjnych (kadheryn i katenin) z ich pierwotnego położenia, co skutkuje zerwaniem połączenia pomiędzy dwiema komórkami. Dzieje się tak, ponieważ oba te białka uczestniczą w tworzeniu połączeń międzykomórkowych, natomiast ich relokacja sprawia, że komórki tracą ze sobą kontakt. Dla poparcia swoich tez autorzy przytaczają m.in fakt, że aktywność proteolityczna blisko spokrewnionych z SVMPs, białek z grupy ADAM skierowana jest właśnie głównie na białka błony komórkowej. Co więcej, autorzy zwracają uwagę, że u organizmów odpornych na krwotoki indukowane wstrzyknięciem jadu, znaleziono mutacje w sekwencji białek LRP5/6, co dodatkowo podkreśla ich znaczenie w całym mechanizmie (SEO i współaut. 2017). W rzeczywistości już wcześniej zauważono, że metaloproteinazy pośrednio lub bezpośrednio oddziałują z kadherynami w żyłkach wywołując efekty zbliżone do tych, które obserwowano w mechanizmie opartym na diapedezie (HERRERA i współaut. 2016).

Doniesienia te wciąż pozostają niemałym zaskoczeniem, bowiem wydawało się, że dobrze udowodniony model zjawiska oparty na mechanizmie *per rhexis* dostatecznie tłumaczy cały proces. Ostatecznie, pomimo wielu lat badań, wciąż wiele kwestii związanych z mechanizmem powstawania krwotoków pozostaje niewyjaśniona. Istnieje wiele dowodów eksperymentalnych wskazujących na to, że etap hydrolizy składników błony podstawnej jest kluczowy dla całego procesu. Z drugiej jednak strony, ostatnie doniesienia uwzględniają możliwość istnienia alternatywnego mechanizmu opartego na zaburzaniu połączeń komórka-komórka. Niewykluczone zatem, że w rzeczywistości więcej niż jeden mechanizm może być zaangażowany w prowadzący do krwotoku proces degradacji struktury naczyń krwionośnych. Istnieje również prawdopodobieństwo, że proces ten w kapilarach zachodzi według innego mechanizmu niż w żyłkach (GUTIÉRREZ i współaut. 2018). Kwestie te wciąż pozostają otwarte i są przedmiotem intensywnych badań, które miejmy nadzieję już wkrótce dostarczą brakujących informacji.

PODSUMOWANIE

Niewątpliwie nauka przebyła długą i niełatwą drogę zmierzającą do wyjaśnienia przyczyn powstawania gwałtownych krwotoków po ukąszeniu przez niektóre gatunki jadowitych węży. Do tej pory nie udało się jednak odpowiedzieć na wszystkie z zadanych pytań, a nawet przedstawić kompletnego i ostatecznego mechanizmu tego zjawiska, chociaż przez pewien czas wydawało się, że taki model już istnieje. Udało się jednak zebrać obszerną wiedzę na temat oddziaływań pomiędzy kluczowymi białkami oraz wyjaśnić, jak te interakcje wpływają na większe struktury obecne w organizmach żywych. Co ważne, zgromadzone dotychczas informacje bardzo często zawierają opis zjawiska zarówno na poziomie molekularnym, jak i makroskopowym. Dowiedziono istotnej roli błony podstawnej w całym procesie, ale wciąż nie wyklucza się dużego udziału niektórych białek receptorowych obecnych na błonach komórkowych śródbłonka. Udowodniono, że nie tylko czynniki biologiczne, ale również fizyczne pełnią kluczową funkcję podczas powstawania krwotoków. I wreszcie, bardzo dokładnie poznano strukturę, właściwości i funkcje enzymów krwotocznych, które odpowiedzialne są za cały proces. Wiedza ta w przyszłości może pomóc walczyć z różnymi chorobami i to nie tylko będącymi następstwem ukąszeń przez jadowite węże.

Przed nami pozostaje jednak wiele zagadnień, których rozwiązanie pozwoli na pełne zrozumienie podjętego tematu. Aktualnie najbardziej istotnym wydaje się być wyjaśnienie roli jaką pełnią receptory komórek śródbłonkowych w procesie powstawania

krwotoków. Ważne jest, aby udało się ostatecznie zaproponować jeden, kompletny model opisujący całe zjawisko. Niewykluczone, że w tym celu konieczne będzie znalezienie i zastosowanie nowych środków, które w bardziej dokładny sposób opiszą cały proces.

Do tej pory bowiem, bardzo często dużym ograniczeniem w badaniach był brak odpowiedniego modelu badawczego, jak również odpowiedniej metodyki badań. Dotychczas przeprowadzono wiele badań *in vitro* wskazujących na możliwe oddziaływania pomiędzy białkami jadu a białkami organizmu. Jak wiadomo jednak modele *in vitro* nie odzwierciedlają w pełni tego, co się dzieje w organizmie, przez co nierzadko badaczom umykał pełen obraz sytuacji. Z drugiej strony, skomplikowany system interakcji pomiędzy białkami w żaden sposób nie ułatwiał sytuacji. Dlatego wydaje się, że przyszłość badań nad podobnymi mechanizmami nie będzie skupiona wyłącznie na próbie określenia dokładnych interakcji międzycząsteczkowych, ale również na próbie skonstruowania rzetelnych modeli badawczych, które w jak najwierniejszy sposób będą mogły odzwierciedlać rzeczywistość (GUTIÉRREZ i współaut. 2016b).

Dodatkowo, od długiego czasu w dziedzinie badań nad jadami przeważało podejście, w którym określone zjawisko przypisywano działaniu konkretnej toksyny, stąd większość zaplanowanych badań prowadzono z wykorzystaniem wyizolowanych i czystych frakcji białek. Taka strategia dostarczyła ogromnej liczby wartościowych danych na temat patofizjologii poszczególnych grup białek obecnych w jadach. Jednak jady węży to bardzo skomplikowane mieszaniny toksyn i nie powinno się zapominać, że efekty wywoływane przez toksyny mogą znacznie różnić się w zależności od tego, czy wstrzykiwane są osobno czy razem. Niektóre białka jadu w organizmie człowieka mogą działać synergistycznie, zatem wydaje się, że efekt ten należy uwzględniać w przyszłych badaniach (GUTIÉRREZ i współaut. 2018).

Jak widać zatem, wciąż pozostaje jeszcze dużo do zrobienia w dziedzinie badań wpływu SVMPs na organizm ludzki. Obserwując jednak aktualny postęp w nauce, już wkrótce powinniśmy się spodziewać poznania brakujących elementów w kompletnym opisie mechanizmu wywoływania krwotoków po ukąszeniach węży.

STRESZCZENIE

Każdego roku w wyniku ukąszeń węży na całym świecie umiera około 100.000 ludzi, a co najmniej cztery razy tyle zostaje poważnie okaleczonych. Do najczęstszych objawów obserwowanych po ugryzieniach przez węże z rodziny żmijowatych zalicza się m.in. krwotoki lokalne i ogólnosystemowe. Bezpośrednią przyczyną ich powstawania są metaloproteinazy z jadów węży (SVMPs) i niniejsza praca podsumowuje dotychczas zebraną wiedzę o tych białkach. Ponadto, prezentuje najnowsze hipotezy dotyczące przyczyn powstawania całego procesu, z uwzględnieniem mechanizmów zachodzących na poziomie molekularnym i makroskopowym. Artykuł opowiada również historię odkryć i postępów, które na przestrzeni lat stopniowo wzbogacały wiedzę, ostatecznie prowadząc do zrozumienia przyczyn i skutków aktywności krwotocznej metaloproteinaz z jadów węży.

LITERATURA

BALDO C., JAMORA C., YAMANOUYE N., ZORN T. M., MOURA-DA-SILVA A. M., 2010. *Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: Tissue distribution and in situ hydrolysis*. PLoS Negl. Trop. Dis. 4, e727, 1-10.

BEHRENS D. T., VILLONE D., KOCH M., BRUNNER G., SOROKIN L., ROBENEK H., BRUCKNER-TUNDERMAN L., BRUCKNER P., HANSEN U., 2012. *The epidermal basement membrane is a composite of separate laminin- or collagen IV-containing networks connected by aggregated perlecan, but not by nidogens*. J. Biol. Chem. 289, 18700-18709.

CALVETE J. J., 2013. *Snake venomics: from the inventory of toxins to biology*. Toxicon 75, 44-62.

FOX J. W., SERRANO S. M. T., 2009. *Snake venom metalloproteinases*. [W:] *Handbook of venoms and toxins of reptiles*. MACKESSY S. P. (red.). CRC Press, Boca Ranton, 96-109.

GÂZ FLOREA Ş. A., GÂZ FLOREA A., KELEMEN H., MUNTEAN D.-L., 2016. *Snake venom metalloproteinases*. Acta Med. Marisien. 62, 106-111.

GUTIÉRREZ J. M., RUCAVADO A., ESCALANTE T., DÍAZ C., 2005. *Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage*. Toxicon 45, 997-1011.

GUTIÉRREZ J. M., ESCALANTE T., RUCAVADO A., 2009. *Snake venom metalloproteinases: Biological roles and participation in the pathophysiology of envenomation*. [W:] *Handbook of venoms and toxins of reptiles*. MACKESSY S. P. (red.). CRC Press, Boca Ranton, 116-130.

GUTIÉRREZ J. M., ESCALANTE T., RUCAVADO A., HERRERA C., 2016a. *Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: A journey of discovery and understanding*. Toxins 8, 1-19.

GUTIÉRREZ J. M., ESCALANTE T., RUCAVADO A., HERRERA C., FOX W.F., 2016b. *A comprehensive view of the structural and functional alterations of extracellular matrix by Snake Venom Metalloproteinases (SVMPs): Novel perspectives on the pathophysiology of envenoming*. Toxins 8, 304, 1-21.

GUTIÉRREZ J. M., RUCAVADO A., ESCALANTE T., HERRERA C., FERNÁNDEZ J., LOMONTE B., FOX J. W., 2018. *Unresolved issues in the understanding of the pathogenesis of local tissue damage induced by snake venoms*. Toxicon 148, 123-131.

HERRERA C., VOISIN M.-B., ESCALANTE T., RUCAVADO A., NOURSHARGH S.,GUTIÉRREZ J. M., 2016. *Effects of PI and PIII snake venom haemorrhagic metalloproteinases on the microvasculature: A confocal microscopy study on the mouse cremaster muscle*. PLoS One 11, e0168643, 1-17.

HOHENESTER E., YURCHENCO P. D., 2013. *Laminins in basement membrane assembly.* Cell Adh. Migr. 7, 1-8.

HOMMA M., TU A. T., 1971. *Morphology of local tissue damage in experimental snake envenomation.* Br. J. Exp. Pathol. 52, 538-542.

HUXLEY-JONES J., CLARKE T-K., BECK C., TOUBARIS G., ROBERTSON D. L., BOOT-HANDFORD R. P., 2007. *The evolution of vertebrate metzincins; insights from Ciona intestinalis and Danio rerio.* BMC Evol. Biol. 7, 63.

KANG T. S., GEORGIEVA D., GENOV N., MURAKAMI M. T., SINHA M., KUMAR R. P., KAUR P., KUMAR S., DEY S., SHARMA S., VRIELINK A., BETZEN C., TAKEDA S., ARNI R. K., SINGH T. P., KINI R. M., 2011. *Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis.* FEBS J. 278, 4544-4576.

KRUEGEL J., MIOSGE N., 2010. *Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices.* Cell. Mol. Life Sci. 67, 2879-2895.

LEBLEU V. S., MACDONALD B., KALLURI R., 2007. *Structure and function of basement membranes.* Exp. Biol. Med. 232, 1121-1129.

LEBLOND C. P., INOUE S., 1989. *Structure, composition, and assembly of basement membrane.* Am. J. Anat. 185, 367-390.

LOMONTE B., CALVETE J. J., 2017. *Strategies in 'snake venomics' aiming at integrative view of compositional, functional, and immunological characteristics of venoms.* J. Venom Anim. Toxins Incl. Trop. Dis. 23:26, 1-12.

MACKESSY S. P., 2009. *The field of reptile toxinology: snakes, lizards, and their venoms.* [W:] *Handbook of venoms and toxins of reptiles.* MACKESSY S. P. (red.). CRC Press, Boca Ranton, 3-23.

MOURA-DA-SILVA A. M., ALMEIDA M. T., PORTES-JUNIOR J. A., NICOLAU C. A., GOMES-NETO F., VALENTE R. H., 2016. *Processing of snake venom metalloproteinases: Generation of toxin diversity and enzyme inactivation.* Toxins 8, 183, 1-15.

OHSAKA A., 1979. *Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms.* [W:] *Snake Venoms.* LEE C.-Y. (red.). Springer-Verlag, Berlin, 480-546.

OWNBY C. L., KAINER R. A., TU A. T., 1974. *Pathogenesis of hemorrhage induced by rattlesnake venom.* Am. J. Pathol. 76, 401-414.

OWNBY C. L., BJARNASON J. B., TU A. T., 1978. *Hemorrhagic toxins from rattlesnake (Crotalusatrox) venom. Pathogenesis of hemorrhage induced by three purified toxins.* Am. J. Pathol. 93, 201-218.

PAULSSON M., 1992. *Basement membrane proteins: Structure, assembly, and cellular interactions.* Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 27, 93-127.

PORTES-JUNIOR J. A., YAMANOUYE N., CARNEIRO S. M., KNITTEL P. S., SANT'ANNA S. S., NOGUEIRA F. C. S., JUNQUEIRA M., MAGALHÃES G. S., DOMONT G. B., MOURA-DA-SILVA A. M., 2014. *Unraveling the processing and activation of snake venom metalloproteinases.* J. Proteome Res. 13, 3338-3348.

SEO T., SAKON T., NAKAZAWA S., NISHIOKA A., WATANABE K., MATSUMOTO K., AKASAKA M., SHIOI N., SAWADA H., ARAKI S., 2017. *Haemorrhagic snake venom metalloproteases and human ADAMs cleave LRP5/6, which disrupts cell-cell adhesions in vitro and induces haemorrhage in vivo.* FEBS J. 284, 1657-1671.

SERRANO S. M. T., KIM J., WANG D., DRAGULEV B., SHANNON J. D., MANN H. H., VEIT G., WAGENER R., KOCH M., FOX J. W., 2006. *The cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases is a ligand for von Willebrand factor A domains: Role in substrate targeting.* J. Biol. Chem. 281, 39746-39756.

TAKEDA S., 2016. *ADAM and ADAMTS family proteins and snake venom metalloproteinases: A structural overview.* Toxins 8, 155, 1-35.

TAUBE H. N., ESSEX. H. E., 1937. *Pathologic changes in the tissues of the dog following injections of rattlesnake venom.* Arch. Pathol. 24, 43-51.

YURCHENCO P. D., 2011. *Basement membranes: Cell scaffoldings and signaling platforms.* Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 3, 1-27.

YURCHENCO P. D., SCHITTNY J. C., 1990. *Molecular architecture of basement membranes.* FASEB J. 4, 1577-1590.

KOSMOS Vol. 68, 3, 409–420, 2019

KONRAD KAMIL HUS, ALEKSANDRA BOCIAN

Department of Biotechnology and Bioinformatics, Faculty of Chemistry, Rzeszow University of Technology, 6 Powstańców Warszawy Str., 35-959 Rzeszów, E-mail: knr.hus@gmail.com

HAEMORRHAGES INDUCED BY SNAKE VENOMS. A BRIEF HISTORY OF SNAKE VENOM METALLOPROTEINASES

Summary

Every year, around 100,000 people die from snake bites around the world, and at least four times as many are seriously wounded. The most common symptoms observed after viperid envenomation include local and systemic haemorrhages. Enzymes responsible for their formation are called snake venom metalloproteinases (SVMPs) and this work summarizes currently available knowledge about their structure, properties and activity. In addition, it presents the latest hypotheses regarding the causes of the entire process, including the mechanisms at the molecular and macroscopic level. The article also describes the history of discoveries and advancements that have gradually enriched knowledge in this topic over the years, eventually leading to an understanding of the causes and consequences of hemorrhagic activity of snake venom metaloproteinases.

Key words: basement membrane, haemorrhage, metalloproteinases, snake venoms