Upotreba zmijskih toksina u medicini

Mavrović, Martina

Undergraduate thesis / Završni rad

2010

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:368194

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

UPOTREBA ZMIJSKIH TOKSINA U MEDICINI

THE USE OF SNAKE VENOM TOXINS IN MEDICINE

SEMINARSKI RAD

Martina Mavrović
Preddiplomski studij biologije
(Undergraduate Study of Biology)
Mentor: doc.dr.sc. Zoran Tadić

Zagreb, 2010.

SADRŽAJ

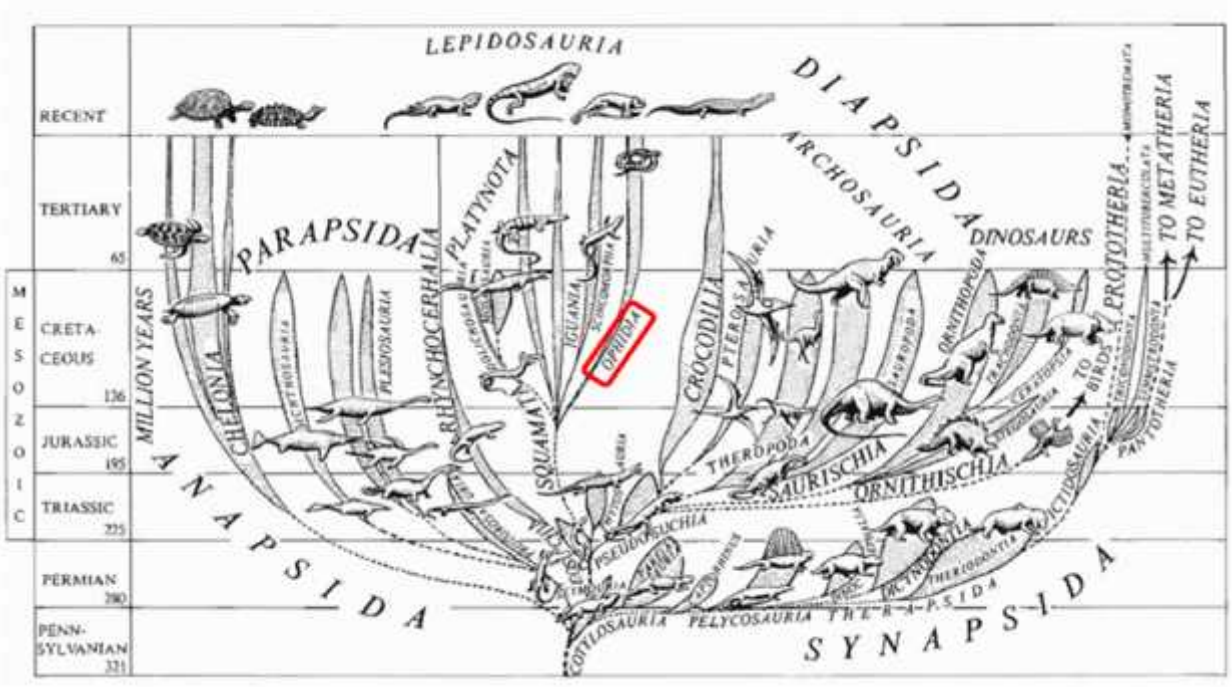
1. UVOD....2
2. BIOLOGIJA ZMIJA....4
3. ZMIJE OTROVNICE....6
4. ZMIJSKI OTROVI....8
4.1. Toksični elementi otrova....9
5. MEDICINSKA UPOTREBA TOKSINA....11
5.1. Antivenini....11
5.2. Lijekovi oblikovani prema toksinima....12
5.3. Toksini u medicinskim istraživanjima....13
6. SAŽETAK....15
7. SUMMARY....15
8. LITERATURA....16

1. UVOD

Do rekonstrukcije evolucijske povijesti zmija došlo se pomnim ispitivanjem fosilnih nalaza te usporedbom anatomije zmija i njihovih srodnika. Fosili zmija su rijetki jer su zmijski kosturi krhki i teško se okamenjuju.

Gmazovi su se razvili iz skupine drevnih vodozemaca poznate kao *Labyritnhodontia* (prvi se put javlja u Devonu, geološkom razdoblju iz ere Paleozoika koje je trajalo od prije 416 do prije 359,2 milijuna godina). Najstariji fosil za kojeg se definitivno može reći da je gmaz je *Hyolonimus* kojeg klasifikacija smješta u skupinu *Cotylosauria*. Prvi se put pojavljuje u Permu (geološko razdoblje Paleozoika koje je trajalo od prije 299 do prije 251 milijuna godina) i smatra se pretkom svih recentnih porodica gmazova.

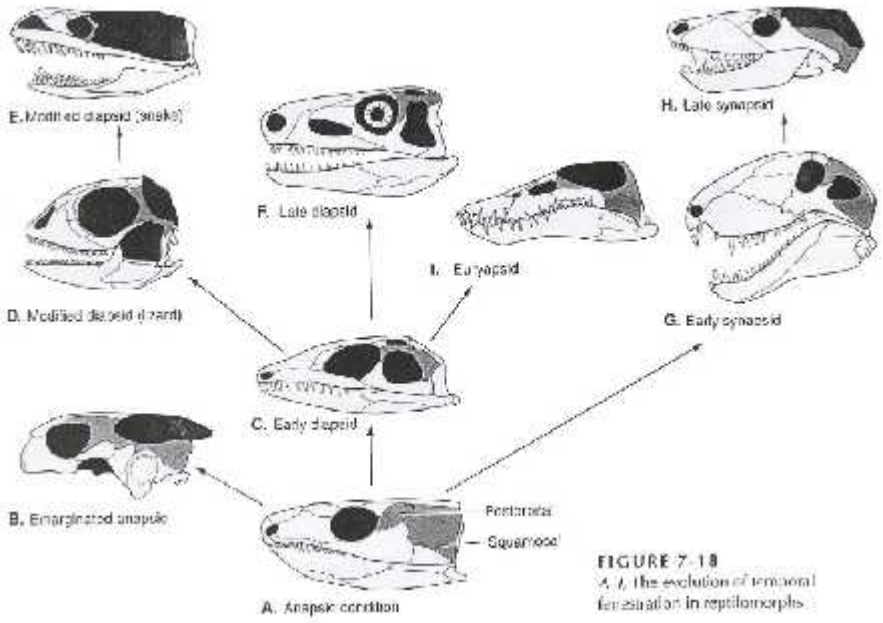
Cotylosauria daljnjom evolucijom divergiraju u tri različite skupine gmazova koje razlikujemo pomoću struktura na lubanji (postojanje otvora u temporalnom dijelu lubanje).(Slika 1.)



Slika 1. Evolucija gmazova od Perma do danas

(Young, J.Z., The Life of Vertebrates, Clarednon Press, Oxford, 1981)

Prvo se odvojila skupina *Anapsida*, koja nije imala niti jedan otvor u temporalnom dijelu. Predstavnici ove skupine preci su današnjih kornjača. Slijedeća se odvaja skupina *Synapsida* koja u temporalnom dijelu lubanje ima jedan otvor. Predstavnici su preci današnjih sisavaca. Treća skupina, *Diapsida*, ima dva otvora u temporalnom dijelu lubanje. Predstavnici te skupine razvili su se u dinosaure, a zatim u današnje guštere i zmije (Slika 2.).



Slika 2. Razvoj temporalnih otvora u ranih gmazova
(nepoznat izvor)

Evolucijska prednost koja je zmije odvojila od ostalih gmazova je između ostalog i mogućnost proizvodnje otrova koji zmija unosi ugrizom. Mogućnost stvaranja otrova zmije su razvile tijekom Miocena (geološko razdoblje Neogena koje je trajalo od prije 23.03 do prije 5.33 milijuna godina). Prije toga bismo zmije mogli svrstati u glomazne predatore koji su napadali iz zasjede i konstrikcijom usmrćivali svoju žrtvu. Promjenom klime otvorene livade zamjenjuju šume. Paralelno se razvijaju manje, brže zmije. Takve životinje teško bi svoju žrtvu mogle ugušiti konstrikcijom, pa su se kod njih razvili drugi mehanizmi imobilizacije plijena, kao što je stvaranje toksina.

U novije se vrijeme zmijski toksini koriste u liječenju. A. Calmete je prije oko 100 godina dokazao da je moguće imunizirati životinju protiv zmijskog otrova i učiniti ju otpornom na njega. Time je počela era moderne protuotrovne seroterapije, kao i drugih medicinskih upotreba zmijskih toksina.

2. BIOLOGIJA ZMIJA

Zmije su gmazovi prekriveni ljuskama, bez nogu, sa izduženim cilindričnim tijelom koji pripadaju redu *Squamata*, podredu *Ophidia* (Ménez 2004).

Imaju sve značajke kopnenih kralješnjaka: kralježnicu, optjecajni, živčani i probavni sustav, respiracijski i ekskretorni aparat te mišiće. Ektotermne su poput ostalih gmazova. Tjelesnu temperaturu održavaju različitim 'tipičnim ponašanjima' poput grijanja na osunčanim površinama ili hlađenja zakopavanjem u zemlju (Ménez 2004).

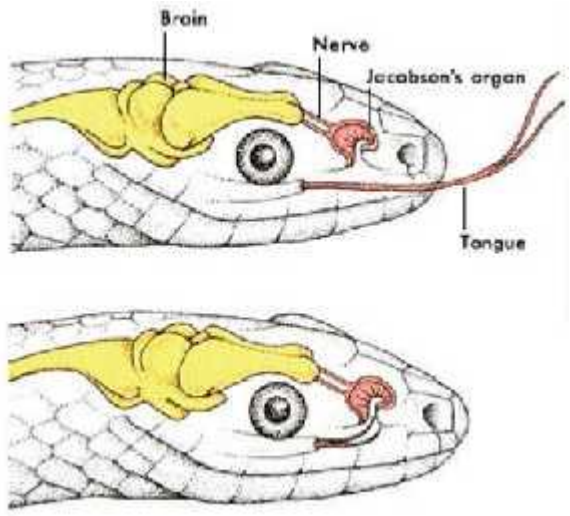
Oko 3000 postojećih vrsta zmija varira u rasponu veličina od 10 cm do 10 m dužine, koju dostižu samo rijetki primjerci. Kozmopolitski su rasprostranjene i morfološki prilagođene različitim staništima (Pough i sur. 2005).

Način kretanja zmija odražava morfološke razlike vezane uz stanište i način predacije. Kod lateralne undulacije zmijsko tijelo je u obliku slova 'S', sa više ili manje zavoja, od kojih svaki gura životinju naprijed. Rektilinearno kretanje koriste zmije teška tijela. Alternirajući dijelovi tijela se odignu od tla i guraju naprijed pomoću rebrenih mišića. Koncertina kretanje koristi se u uskim prolazima, odgurivanjem od stijenki. Postrano kretanje koriste zmije vrućih podneblja (u pustinjama), valovitim kretnjama sa uporištem u 3 točke. Arborealne vrste kombiniraju različite tipove kretanja (Pough i sur. 2005).

Što se tiče hranjenja, zmije kao skupinu možemo nazvati mesojednim generalistima. Međutim, zasebne porodice i rodovi mogu biti specijalizirane poput vrsta koje se hrane isključivo truplima u raspadu. Čime god da se hranile, zmije svoj plijen ne žvaču već ga gutaju. To im omogućuje spoj izrazito fleksibilnih elemenata gornje i donje čeljusti. Plijen se najčešće guta od glave, a kad dođe do jednjaka snažni mišići vrata ga potisnu prema želucu (Pough i sur. 2005).

Glavne značajke predatorstva u zmija jesu konstrikcija i otrov. Te tehnike omogućavaju savladavanje plijena uz vrlo maleni rizik od ozljede. Konstrikcija je karakteristična za pitone, udave i predstavnike porodice *Colubridae.* Plijen umire zbog nemogućnosti širenja ošita (ne može udahnuti), ali najčešće zbog cirkulacijskog kolapsa. Zmije koje mogu injicirati otrov razvile su vrlo sigurnu metodu lova. Kontakt sa plijenom je sveden na minimum. Ovu tehniku lova primjenjuju zmije iz porodica *Viperidae*, *Elaphidae* i neke zmije porodice *Colubridae.* Pojedine su vrste razvile relativno sedentarni tip predacije, pa sakrivene čekaju plijen (Pough i sur. 2005).

Zmije posjeduju sva uobičajena osjetila (vid, miris, okus, dodir, sluh). Za zmije je karakteristično palucanje račvastim jezikom, koji im omogućuje 'mirisanje' okolnog prostora. Jezik hvata hlapljive molekule u zraku koje prepoznaje Jakobsonov (vomeronazalni) organ smješten na krovu usne šupljine (Ménez 2004) (Slika 3.).



Slika 3. Smještaj Jakobsonovog organa
(nepoznat izvor)

Pripadnici skupine udavki imaju receptore osjetljive na infracrvenu svjetlost. Ti su receptori smješteni u dubokim brazdama između nosnica i oka. Pomoću njih zmije 'vide' toplinu koji isijava tijelo toplokrvnih životinja, njihovog čestog plijena.

Vid je kod zmija manje naglašeno osjetilo. Leća njihova oka ne koristi cilijarne mišiće za akomodaciju, već mišiće šarenice tako da povećava tlak intaokularne tekućine. Poput većine gmazova zmije nemaju vanjsko uho. Srednje uho je također slabo razvijeno. Njihov rudimanterni slušni aparat detektira frenvencije od 100-1000 Hz.

Dio tijela koji je u izravnom dodiru sa tlom je osjetljiv na vibracije, tako da zmije putem vibracija tla i okolnog zraka mogu osjetiti da im se neka životinja približava.

Koža je suha i nepropusna, prekrivena ljuskama. U određenim vremenskim intervalima gornji rožnati sloj kože gmazovi presvlače, ali ne presvlače i ljuske.

U društvenom životu zmija koristi se cijeli spektar vizualnih, kemijskih, auditornih i taktilnih signala, s naglaskom na kemijske. Zmije se u komunikaciji najviše služe feromonima (Ménez 2004).

3. ZMIJE OTROVNICE

Zmije pripadaju koljenu *Chordata,* potkoljenu *Vertebrata*, razredu *Reptilia,* podrazredu *Squammata* te redu *Ophidia (Serpentes).* Nadporodica *Colubridea* sadrži porodice zmija: *Elapidae, Colubridae, Viperidae* i *Atracospididae.* Svaka od navedenih porodica posjeduje predstavnike koji mogu lučiti otrov.

Postoji više metoda klasifikacije zmija. Sredinom 19. stoljeća predložena je klasifikacija na temelju denticije. Takva klasifikacija je je jednostavna i često korištena (Ménez, 2004).

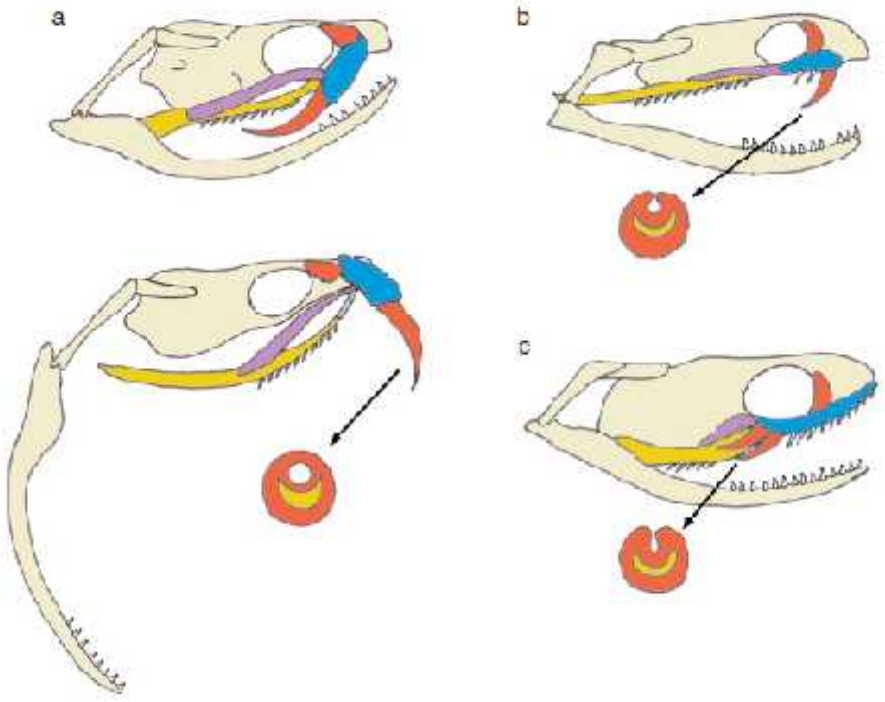
Podjela zuba kod zmija (Slika 4.):

1. Neotrovnice (Aglypha): svi su zubi iste veličine. Poredani su na gornjoj čeljusti i nepčanoj kosti i okrenuti prema natrag.
2. Otrovnice: dolazi do diferencijacije zuba gornje čeljusti. Otrovni zubi su tvrdi, krhki i oštri.
    a) Žljebasti zubi: otrov protječe niz žlijeb
        - Prednježlijebzubice (Proteroglypha): otrovni zube se nalaze na prednjem dijelu gornje čeljusti. Otrov protječe niz žlijeb na zubu.
        - Stražnježljebozubice (Opistoglypha): otrovni zubi smješteni straga na gornjoj čeljusti. Otrov protječe niz žlijeb u zubu.
    b) Cijevasti zubi
        - Cijevozubice (Solenoglypha): otrov protječe kroz cijev u zubu. Cjevasti zubi su ujedno i jedini koji se nalaz na gornjoj čeljusti.

Porodice *Viperidae* i *Atracospididae* spadaju u skupinu Solenoglypha. Uz brojne malene zube duž nepčane kosti, ove porodice posjeduju i dva cjevasta zuba koja provode otrov. Ti zubi mogu biti dugi i do 5 cm. Otrovni zubi su u stanju mirovanja polegnuti, a za vrijeme napada stoje uspravno.

Članovi porodice *Elapidae,* poput kobri i mambi, pripadaju prednježljebozubicama. One imaju par fiksnih zuba na prednjem dijelu gornje čeljusti te nekolicinu malih zuba.

Otrovni pripadnici porodice *Colubridae* spadaju u skupinu stražnježljebozubica. Na stražnjem dijelu gornje željusti nalaze im se otrovni zubi, a ispred njih imaju brojne zubiće.



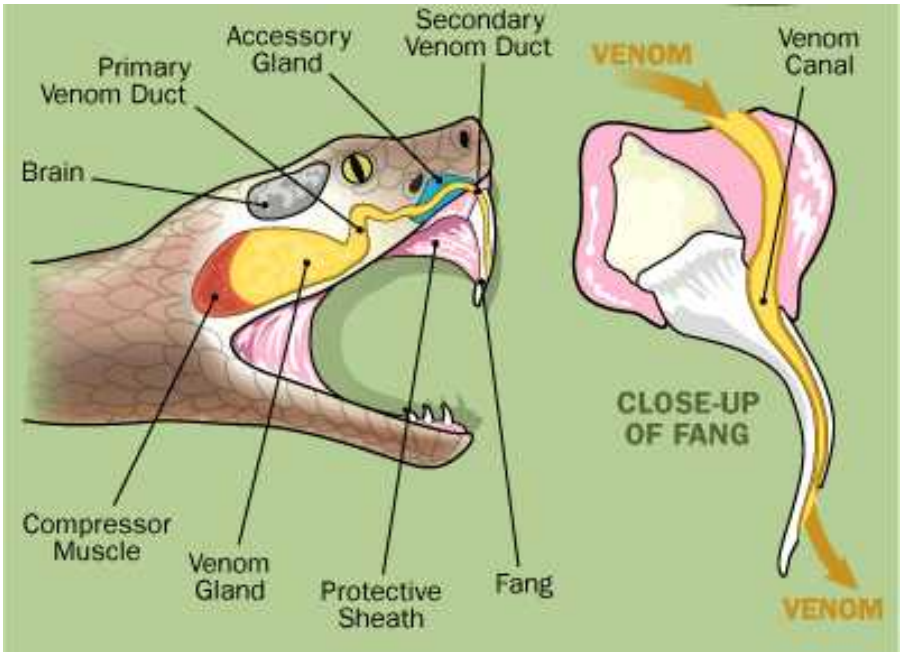
Slika 4. Podjela zuba kod zmija: a) porodica *Viperidae*, b) porodica *Elapidae*, c) porodica *Colubridae*

(Ménez, A., The Subtle Beast, Taylor & Francis, USA, 2003)

4. ZMIJSKI OTROVI

Otrov je izlučevina koja je evoluirala prvenstveno radi lova na plijen (jedini izuzetak čine tzv. kobre pljuvačice). Razvio se iz probavnih enzima. Tijekom evolucije uvelike se izmjenio od originalnog oblika. Nastaje u žlijezdama koje su analogne slinovnicama u ljudi i prenosi se kanalima do velikih maksilarnih zuba, koji su zbog toga nazvani otrovnim zubima. Otrovne žlijezde imaju lumen i odvojen mišić za postizanje tlaka pri injiciranju otrova (Slika 5.).

Otrov je zapravo složena mješavina biološki aktivnih tvari koja ima dvije funkcije: paralizira žrtvu i započinje probavu.



Slika 5. Dijagram glave zmije otrovnice.

(www.howstuffworks.com)

4.1. Toksični elementi otrova

Toksini, jedna od osnovnih komponenati zmijskog otrova, najzaslužniji su njegov za letalni učinak. Biokemijskom analizom utvrđeno da proteini čine 90-95% suhe mase otrova. Ostatak čine neproteinski sastojci kao što su metali, lipidi, amini itd. Otrov omogućuje brzo prodiranje toksičnih proteina do ciljnih mjesta. U tome mu pomažu enzimi koji razgrađuju i razaraju pojedine organe i sustave organa žrtve. Zmijski se otrovi najčešće dijele na hemotoksične, neurotoksične i miotoksične otrove.

1. Hemotoksini: izravno razaraju tkivo na mjestu ugriza i dalje od njega, utječu na krv i organe tako da razaraju krvne stanice, djeluju na sustav koagulacije krvi, a mogu oštetiti i srce, skeletne mišiće, bubrege i pluća.

Neki primjeri hemotoksina su:

- Citotoksini: enzimi koji uništavaju razne stanice. Mogu uzrokovati fatalne hemolize uništavanjem crvenih krvnih stanica.
- Serinske proteaze: enzimi koji stupaju u interakciju sa proteinima uključenim u hemostazu i fibrinolizu. Pretvaraju fibrinogen u ugruške fibrina.
- Metaloproteaze: enzimi koji uzrokuju teška krvarenja. Spriječavaju stvaranje ugruška.
- Mambini: spriječavaju stvaranje ugruška.
- Safarotoksini: djeluju kao snažni vazokonstriktori aorte i koronartnih arterija.

2. Neurotoksini: utječu na živčani sustav izazivajući pritom teže promjene u osjetilnim i motoričkim sustavima. Djeluju specifično na esencijalne biološke funkcije kao što su prijenos živčanog i mišićnog impulsa.

Neki primjeri neurotoksina su:

- α-neurotoksini (kurare oponašajući): blokiraju nikotinske receptore acetilkolina, čime spriječavaju prijenos živčanog impulsa do skeletnog mišića. Posljedica je paraliza.
- β-neurotoksini: presinaptički toksini koji spriječavaju otpuštanje acetilkolina. Posljedica je paraliza.
- K-neurotoksini: vežu se na nikotinske receptore. Uzrokuju paralizu.
- Fascikulini: inhibiraju acetilkolinesterazu (enzim zadužen za razgradnju acetilkolina). Njihovo djelovanje uzrokuje dugotrajno grčenje mišića.

3. Miotoksini: djeluju na mišićno tkivo. Uzrokuju degeneracije i izlučivanje mioglobina u mokraći.

Iako postoji spomenuta podjela, nijedna zmija nema potpuno hemotoksičan, neurotoksičan, odnosno miotoksičan otrov nego posjeduje kombinaciju otrova. U koju ćemo je kategoriju zmiju svrstati, ovisi o količini pojedinih tvari koje prevladavaju u njezinu otrovu.

5. MEDICINSKA UPOTREBA TOKSINA

Krajem 17. stoljeća talijanski znanstvenik Francesco Redi otkriva da žućkasta tekućina sakupljena iz zuba zmije djeluje letalno. Početkom 20. stoljeća otkriven je mehanizam prijenosa otrova u žrtvu. Nađeno je i da su toksini neučinkoviti ako se gutaju, a visoko učinkoviti ako se ubrizgaju u žilu (Ménez 2004).

5.1. Antivenini

Albert Calmete je 1894. godine dokazao da je moguće imunizirati životinju protiv zmijskog otrova i učiniti je otpornom na njega. Time je počela era moderne protuotrovne seroterapije. On je priredio prvi protuotrovni serum i dokazao da bilo koji imunizirajući životinjski serum može spasiti i drugu životinju od ugriza iste zmije (Ménez 2004).

Antiserumi se obično priređuju hiperimunizacijom konja (mogu se koristiti i ovca, koza, kunić...), npr. antiserum za otrov čegrtuša je derivat konjskog seruma.

Postupak imunizacije:

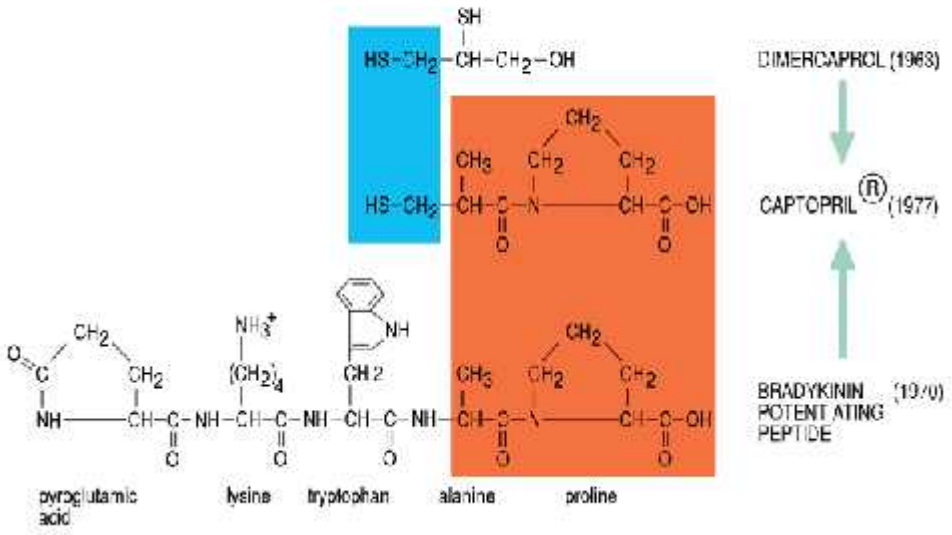
1. Ubrizgavanje malih doza otrova u životinju.
2. Doze se progresivno povećavaju kako jača obrambeni sustav životinje.
3. Uzorci krvi za pripremanje seruma (krvna plazma bez fibrinogena, dobiva se centrifugiranjem) uzimaju se nekoliko dana nakon injekcije završnih doza otrova koje se ubrizgavaju u životinju kad već stekne hiperimunost (2-3 puta na mjesec).

Životinjski serumi sadržavaju brojna protutijela za proteine koji su različiti od onih u otrovu. Zato se pročišćavaju i time povećava učinkovitost samog protuotrova.

5.2. Lijekovi oblikovani prema toksinima

Toksini se mogu koristiti u dizajniranju lijekova jer pružaju trodimenzionalni predložak za kreiranje malih molekula koje mogu oponašati djelovanje toksina. Ujedno su i veoma selektivni (Harvey i sur. 1998).

Komponente otrova netom izolirane ne mogu se koristiti kao lijek. Potrebno je odrediti kemijska svojstva ključna za djelovanje te komponente (Ménez 2004) (Slika 6.).



Slika 6. Peptid izoliran iz otrova zmije *Bothrops sp.*, skupine označene crveno i plavo bile su ishodišne točke u razvoju lijeka.
(Prema Ménez, A., The Subtle Beast, Taylor & Francis, USA, 2003)

Prvi lijek sintetiziran od nekog peptida iz zmijskog otrova je *Captopiril*®, važan pri liječenju povišenog tlaka. Sintetiziran je iz otrova vrste *Bothrops jararaca* (porodica *Viperidae*). Peptid iz otrova navedene vrste poboljšava kontrakcije glatkih mišića odgovornih za vazokonstrikciju i vazodilataciju time što povećava djelovanje hormona odgovornih za širenje stijenki krvnih žila (vazodilataciju). Djeluje i na način da sprječava prijelaz angiotenzina I u angiotenzin II (enzimi odgovorni za sužavanje stijenki krvnih žila, vazokonstrikciju), čime se dodatno naglašava učinak vazodilatacije (Ménez 2004).

Toksini izolirani iz zmijskog otrova mogu sprječavati ili poticati stvaranje krvnih ugrušaka. Enzim batroxobin izoliran iz vrste *Bothrops sp.* (porodica *Viperidae*) izašao je na tržište pod nazivom *Reptilase*®. On oponaša djelovanje enzima trombina (pretvara tekući fibrin u fibrinska vlakna). Takvo djelovanje pomaže brzo stvaranje ugruška na mjestu ozljede žile. Injiciranje manjih doza toga enzima tijekom duljeg vremenskog perioda dovodi do forimranja fibrina i potiče stvaranje ugrušaka. Klasični antikoagulanti poput hirudina i heparina ne djeluju inhibitorno na batroxobin. *Reptilase*® se koristi u liječenju krvarenja tijekom operacija, te u urologiji i ginekologiji (Ménez 2004).

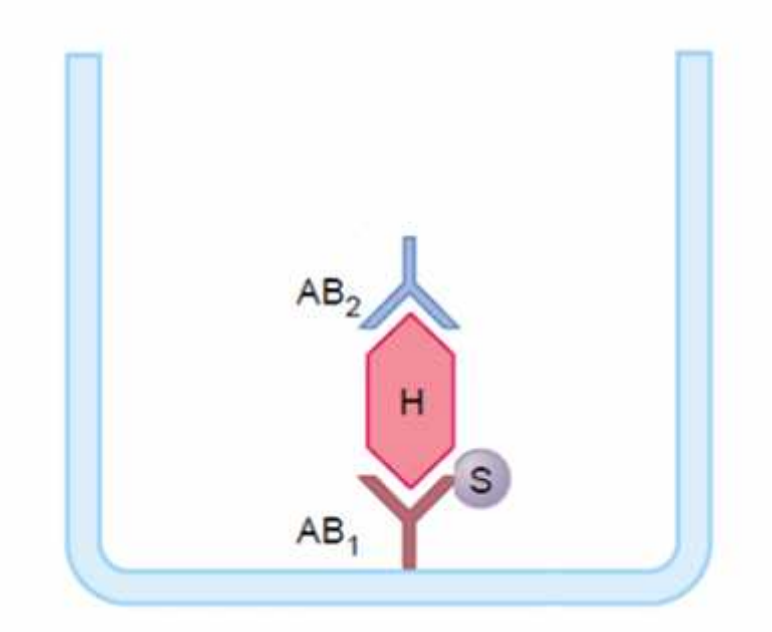
Isti enzim, batroxobin, koristi se i kao antikoagulans. Intravenozno (u samo žilu) ili subkutano (ispod kože) injiciranje batroxobina uklanja fibrinogen iz krvi te time sprječava trombozu, plućnu emboliju i anginu pectoris. Navedeni enzim, izoliran iz vrste *Calloselasma rhodostoma* (porodica *Viperidae*), već se koristi pod komercijalnim nazivom *Defibrase*® (Ménez 2004).

5.3. Toksini u medicinskim istraživanjima

Toksini izolirani iz zmijskog otrova korisni su u identifikaciji receptora vezanih uz pojedine bolesti. Otkriće acetilkolinskih receptora vezano je uz proučavanje djelovanja zmijskih toksina. Neki toksini su korisni u dijagnosticiranju bolesti poput, mijastenije gravis. To je neuromuskularna bolest koja nastaje zbog razaranja acetilkolinskih receptora. Podražaji se sa živca ne mogu prenjeti na mišić koji zbog toga ostaje nekontrahiran. U istraživanju te bolesti bilo je važno prepoznati antitijela specifična za receptore (kod autoimunih bolesti tijelo stvara antitijela protiv tvari i tkiva normalno prisutnih u tijelu, u ovom slučaju receptora na neuromuskularnoj vezi). U tu svrhu sintetizirani tu neurotoksini koji se vežu na acetilkolinske receptore označeni radioaktivnim bojama. Pomiješani su sa izoliranim acetilkolinskim receptorima. Zatim je taj kompleks, radioaktivni toksin-receptor, izložen antitijelima u krvnoj plazmi (*in vitro* uvjeti), čime je nastao veliki radioaktivni kompleks (toksin-receptor-antitijelo). (Slika 7.). Izolacija tog kompleksa omogućila je daljanja istraživanja, te je dala saznanja o koncentraciji antitijela u odnosu na receptore. Važna je činjenica da se navedeni postupak može primijeniti u istraživanju bilo koje autoimune bolesti.

Ispituje se i utjecaj zmijskih toksina na stanice raka. U središtu istraživanja su citotoksični kemotoksini. Nigexin, citotoksični enzim iz otrova kobre, učinkovito uništava različite tipove tumorskih stanica. Problem nastaje zbog činjenice da su primarni cilj tog toksina crvene krvne stanice,

tj. on uzrokuje tešku hemolizu. I kada se hemolitička aktivnost selektivno ukloni nigexin zadržava sposobnost uništavanja tumorskih stanica. Za sada se ispituje samo u laboratorijskim uvjetima.



Slika 7. Primjer medicinskih istraživanja: tvar H (receptor) vezala se na AB_1(toksin); na taj se kompleks vezala tvar AB_2 (antitijelo). S je radioaktivna boja kojom je označen toksin (Prema Guyton i sur. 2006).

6. SAŽETAK

Zmije se unutar skupine gmazova počnju odvajati u Kredi (geološko razdoblje Mezozoika koje je trajalo od prije 136 do pred 65 milijuna godina). Mogućnost stvaranja otrova razvijaju tokom Miocena (geološko razdoblje Neogena koje je trajalo od prije 23.03 do prije 5.33 milijuna godina).

Prije stotinjak godina je dokazano da je moguće imunizirati životinju protiv zmijskog otrova i učiniti je otpornom na njega. Time je počela era moderne protuotrovne seroterapije, kao i drugih medicinskih upotreba toksina iz zmijskog otrova.

Brojni lijekovi već sintetizirani na temelju toksina iz otrova zmija, mnogi se istražuju. Toksini su zanimljivi u proizvodnji lijekova jer pružaju trodimenzionalni predložak za kreiranje malenih molekua koje mogu oponašati djelovanje samog toksina. Izoliranje i proučavanje pojedinih komponenata zmijskog otrova utrli su put ka boljem razumijevanju patofiziologije trovanja, a time i pridonjeli poboljšanju liječenja raznih bolesti.

7. SUMMARY

Snakes have started to diverge from the reptiles in Cretaceus (a geologic era of the Mesosoic which lasted form 136 million years ago untill 65 million years ago). They have developed the possibility of producing venom in Miocene (a geologic era of the Neogene, which lasted from 23.03 million years ago untill 5.33 million years ago).

One hundred years ago it was proved possible to immunise an animal against snake venom, and make it resistant to the venom. With that event started the era of modern serotherapy, as well as other medicinal uses of snake venom toxins.

Numerous drugs have already been synthetised based on toxins from snake venom, and numerous are still under research. Toxins are of interest in drug design because they provide a three-dimensional templade for the creation of small molecules which can mimic the effects of the toxin. The isolation and study of snake venom components has paved the way for a deeper understanding of the pathophisiology of envenomings, as well as opened a possibility to improve therapeutic modalities.

8. LITERATURA

1. Guyton, A.C., Hall, J.E., Textbook of Medical Physiology, 11th edition, Elesevier Saunders, 2006.

2. Ménez, A., The Subtle Beast, Taylor & Francis, USA, 2003.

3. Pough, F.H., Janis, C.M. i Heiser, J.B., Vertebrate Life, 7th edition, Prentice Hall, 2005.

4. Young, J.Z., The Life of Vertebrats, Clarednon Press, Oxford, 1981.

5. Zug, G.R., Vitt, L.J., Caldwell, J.P., Herpetology, 2nd edition, Academic Press, 2001.

6. Harvey, A.L., Bradley, K.N., Cochran, S.A., Rowan, E.G., Pratt, J.A., Quillfeldt, J.A., Jerusalinsky, D.A., 1998. What can toxins tell us for drug discovery?, *Toxicon*, **11**, 1635-1640.

7. www.howstuffworks.com