KOLIKO JE OPASNA CRNA UDOVICA (LATRODECTUS MACTANS TREDECIMGUTTATUS ROSSI, 1790)?

Žigrović, Dora

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:552507

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
ODJEL ZA BIOLOGIJU

Preddiplomski studij biologije

Dora Žigrović

KOLIKO JE OPASNA CRNA UDOVICA (*Latrodectus mactans tredecimguttatus* Rossi, 1790)?

Završni rad

Mentor: Dr. sc. Dubravka Čerba, doc.

Osijek, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Završni rad

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

KOLIKO JE OPASNA CRNA UDOVICA (*Latrodectus mactans tredecimguttatus* Rossi, 1790)?

Dora Žigrović

Rad je izrađen na Zavodu za ekologiju voda, Odjel za biologiju

Mentor: Dr. sc. *Dubravka Čerba*, **doc.**

Kratak sažetak završnog rada

Sve vrste roda *Latrodectus*, kao i vrsta mediteranska crna udovica (*Latrodectus mactans tredecimguttatus* Rossi, 1790), prisutna u našim krajevima, neke su od najotrovnijih vrsta pauka koje svojim otrovom na mnoge životinje djeluju izrazito snažno, dok slabije djeluju na ljude. Nisu agresivne, no ako dođe do uboda, trovanje izazvano ubodom prati niz različitih kliničkih simptoma i naziva se latrodektizam. Do sada su znanstvenici iz otrova mediteranske crne udovice uspješno izolirali najmanje sedam latrotoksina koji imaju ciljano djelovanje na neku skupinu životinja te dva latrodektina koji povećavaju toksičnost latrotoksina, međutim još se uvijek istražuju ostale komponente otrova.

Broj stranica: 16

Broj slika: 3

Broj tablica: 2

Broj literaturnih navoda: 19

Web izvor: 11

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: mediteranska crna udovica, latrotoksini, latrodektini, latrodektizam, toksičnost

Rad je pohranjen u knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku, te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Department of Biology

Bachelor's thesis

Undergraduate university study programme in Biology

Scientific Area: Natural science

Scientific Field: Biology

HOW DANGEROUS IS A BLACK WIDOW SPIDER (*Latrodectus mactans tredecimguttatus* Rossi, 1790)?

Dora Žigrović

Thesis performed at the Subdepartment of Water Ecology, Department of Biology

Supervisor: Dr. sc. Dubravka Čerba, **Assist. Prof.**

Short abstract

Every species of genus *Latrodectus,* as well as the Mediterranean black widow (*Latrodecuts mactans tredecimguttatus* Rossi, 1790) which lives in our area, is one of the most venomous spiders, whose venom has extremely negative affect on most animals, including humans. They are not aggressive, but the bite is poisonous and is followed by a variety of clinical symptoms, what is called latrodectism. Till now, scientists successfully isolated at least seven latrotoxins which target a specific group of animals and two latrodectins which increases toxicity of latrotoxins from black widow spider venom, but the other components of the venom are still unknown.

Number of pages: 16

Number of figures: 3

Number of charts: 2

Number of references: 19

Web source: 11

Original in: Croatian

Key words: Mediterranean black widow, latrotoxins, latrodectins, latrodectism, toxicity

Thesis deposited in the Library of Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek and in the National university library in Zagreb in electronic form. It is also disposable on the web site of Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek.

SADRŽAJ:

1. UVOD……. 1

1.1. Anatomska građa paukova i mediteranske crne udovice…….....… 2

2. OSNOVNI DIO……..... 6

2.1. Otrovnost crnih udovica…..……...…… 6

2.2. Fiziološka analiza……. 7

2.3. Proteomika otrova……...…….…..... 7

2.4. Glavni toksini otrova……...……..... 8

2.4.1. Mehanizam i aplikacija α-LTX……..... 10

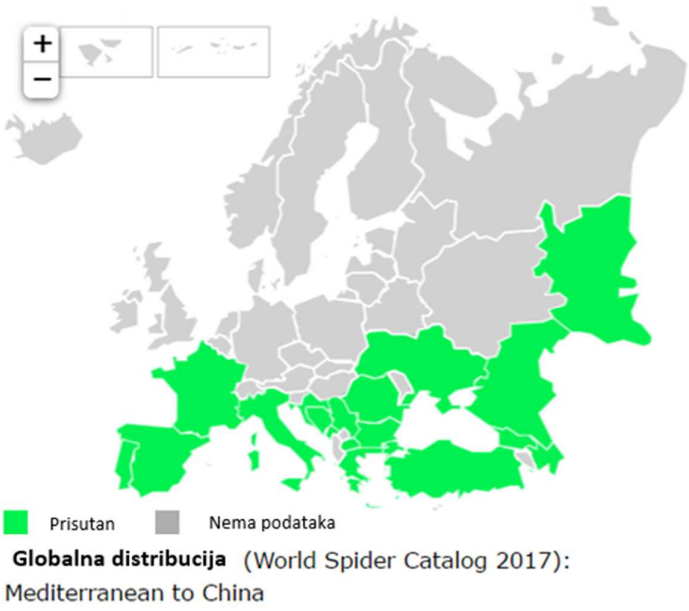
2.5. Toksini izvan otrovnih žlijezda…….……..... 11

3. ZAKLJUČAK…….....… 13

4. LITERATURA…….....….... 14

1. UVOD

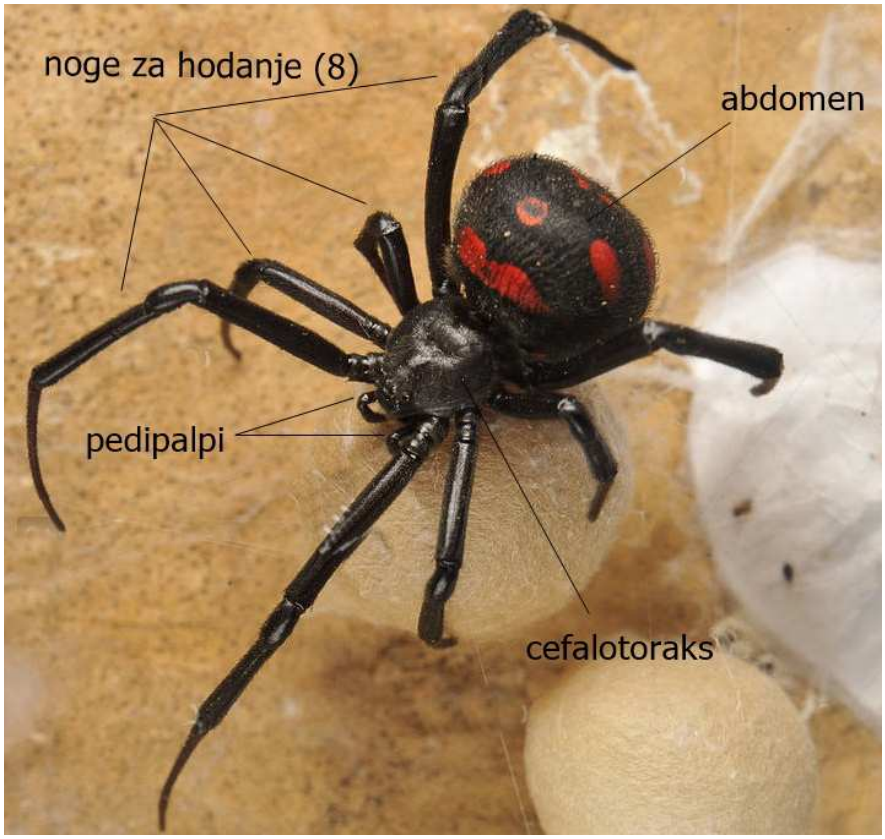
Crna udovica (*Latrodectus tredecimguttatus* Rossi, 1790) pripada carstvu Animalia, koljenu Arthropoda, razredu Arachnida, redu Araneae, podredu Araneomorphae, porodici Theridiidae (udovice) koja broji oko 150 recentnih vrsta te rodu *Latrodectus* (Yan i Wang, 2015). Rossi je prvi puta opisao ovu vrstu 1790.-e godine na Sveučilištu u Pisi te je isprva nazvao *Aranea 13-guttata*, ali je naziv vrste kasnije promijenjen (Bettini i sur., 1978). Latinski naziv vrste crna udovica potječe od riječi lathrodektos što u prijevodu s grčkog znači tajno ubosti, dok je druga riječ latinskog naziva vrste nastala od dvije riječi – tridecim - trinaest i gutta – pjege, dakle trinaest pjega. Prvi se puta u literaturi spominje 1774. godine u djelu Alberta Fortisa "Put po Dalmaciji" u kojem je opisana kao pjegavi pauk kratkih nogu. Između 1948. i 1965. godine na cijelom je Jadranu zabilježena velika pojava crnih udovica, posebno oko Pule i Poreča (Popović i Antić, 1991). Postoji još tridesetak vrsta iz istog roda, npr. *Latrodectus dahli* Levi, 1959, *L. geometricus* C. L. Koch, 1841, *L. hesselti* Thorell, 1870, *L. hesperus* Chamberlin & Ivie, 1935, *L. lilianae* Melic, 2000, *L. pallidus* O. P.-Cambridge, 1872 koje su također otrovne. Rasprostranjene su diljem svijeta, uključujući Kinu, središnju Aziju, Europu, Sjevernu i Južnu Ameriku, Indiju i Australiju (Web 1). Mediteranska crna udovica, *L. mactans tredecimguttatus*, je vrsta rasprostranjena diljem Europe i dijelom u Aziji, a u Hrvatskoj je ima na području Istre, Hrvatskog primorja i Dalmacije (Slika 1) (Web 2).



Slika 1. Rasprostranjenost vrste *Latrodectus mactans tredecimguttatus* Rossi, 1790. (Izvor: Web 2)

1.1. Anatomska građa paukova i mediteranske crne udovice

Mediteranska crna udovica ima hitinsku kutikulu, kao i svi člankonošci, koja sprječava kontinuirani rast, pa se stoga moraju presvlačiti. Na zatku najčešće mogu imati od 0 do 17 crvenih pjega koje se međusobno razlikuju po obliku i rasporedu, po čemu je ova vrsta i prepoznatljiva. Obzirom na dob, boja pjega se mijenja, pa tako dok su mladi, pjege su im bijele, a s vremenom se počinje u sredini pjege pojavljivati narančasta mrlja koja se postupno širi i postaje sve tamnija. Kod ženki pjega pocrveni u potpunosti, dok kod mužjaka ostane bijeli obrub oko pjege (Web 3). Između mužjaka i ženke prisutan je spolni dimorfizam (razlike u veličini muških i ženskih jedinki), pa je tako mužjak puno manji, svega 4 do 7 mm, dok ženka može narasti od 7 do 15 mm (Habdija i sur., 2011). Crnoj udovici, kao i ostalim paucima, tijelo je podijeljeno na dvije tagme – prednju (prosoma ili cefalotoraks) i stražnju (opistosoma ili abdomen) koji su spojeni pedicelom (spojnica) (Slika 2). Tijelo im se sastoji od 20 kolutića, 7 prosoma (uključujući i akron) i 12 opistosoma. Na prvom prosomalnom kolutiću nemaju tjelesnih privjesaka, kliješta (helicere) se nalaze na drugom kolutiću, a na trećem par čeljusnih nogu (pedipalpi), dok se na četvrtom, petom, šestom, i sedmom nalazi četiri para člankovitih nogu za hodanje (Habdija i sur., 2011). Ne posjeduju čeljusti ni ticala (Matoničkin i sur., 2010). Prosoma je sastavljena od karapaksa dorzalno i sternuma ventralno te je većina vanjskih struktura uključujući oči, helicere, dijelove usta, pedipalpe i noge, pričvršćeno na ovu tagmu. Imaju osam nogu za hodanje koje su sastavljene od 7 članaka (coxa, trochanter, femur, patella, tibia, metatarsus, tarsus), od kojih vrh tarsusa ima kandže koje variraju brojem i veličinom. Budući da nemaju ticala, koriste noge kako bi osjetili mirise, vibracije, strujanje zraka i zvukove. Pedipalpi imaju samo šest segmenata (izostaje metatarsus), a coxa, odmah pokraj usta, izmijenjena je da pomaže u hranjenju. Pedicel im omogućuje pomicanje abdomena u svim smjerovima te tako vrte paučinu bez pomicanja prosome (Habdija i sur., 2011).



Slika 2. Vanjska građa tijela mediteranske crne udovice (*Latrodectus mactans tredecimguttatus* Rossi, 1790). (Izvor: Web 4)

Predljive bradavice, koje su preobrazba četvrtog i petog kolutića opistosome i kroz koje se iz predljivih žlijezda izlučuje paučina, te predljivo polje (cribellum), strukture su za predenje. Predljivo dlakavo polje (cribellum) je organ smješten na trbušnoj strani opistosome, ispred predljivih bradavica, a sastoji se od sitnih cjevčica kroz koje izlazi sekret posebnih žlijezda. Kada se paučina nalazi u predljivim žlijezdama u tekućem je stanju, međutim kada kroz predljive bradavice izlazi izvan tijela, nastaju bjelančevinske fibrozne niti. Ispočetka su niti vrlo tanke, ali ih pauk pomoću strukture zvane češljić (calamistrum) upreda u krupnije niti koje su pet puta čvršće i dva puta elastičnije od čelika. Po kemijskom sastavu, paučina je složena bjelančevina uglavnom sastavljena od aminokiselina serina, alanina i glicina. Prvobitna uloga paučine, to jest ispredanje mreža, je hvatanje plijena, no također im može poslužiti za oblaganje nastambe te za parenje (Habdija i sur., 2011).

Tjelesna šupljina, unutar koje su organski sustavi, je po podrijetlu miksocel, a integumentnu funkciju obavlja tanka hitin-proteinska kutikula smještena na jednoslojnoj epidermi (Slika 3).

Živčani sustav je ljestvičastog rasporeda te su gangliji trbušne živčane vrpce spojeni u podždrijelni ganglij. Osjetne dlake (trihobotriji i botriotrihi) imaju ulogu mehanoreceptora i nalaze se po cijeloj površini njihova tijela. Lirasti organi (mehanička osjetila), uske pukotine u kutikuli prekrivene epikutikulom, koji se nalaze pretežito na usnim organima, služe kako bi pauci osjetili eventualne deformacije na kutikuli, a za primanje kemijskih podražaja, imaju kemoreceptivne četine. Imaju do osam jednostavnih očiju, ocela, kod kojih je ponekad moguće da jedan par bude razvijeniji od ostatka te se nalaze s gornje strane na prosomi. Direktne oči su primarne i vidne stanice su tako položene da se rabdomi s fotosenzibilnom tvari nalaze ispod leće, dok su indirektne oči sporedne gdje su rabdomi okrenuti od leće (Habdija i sur., 2011).

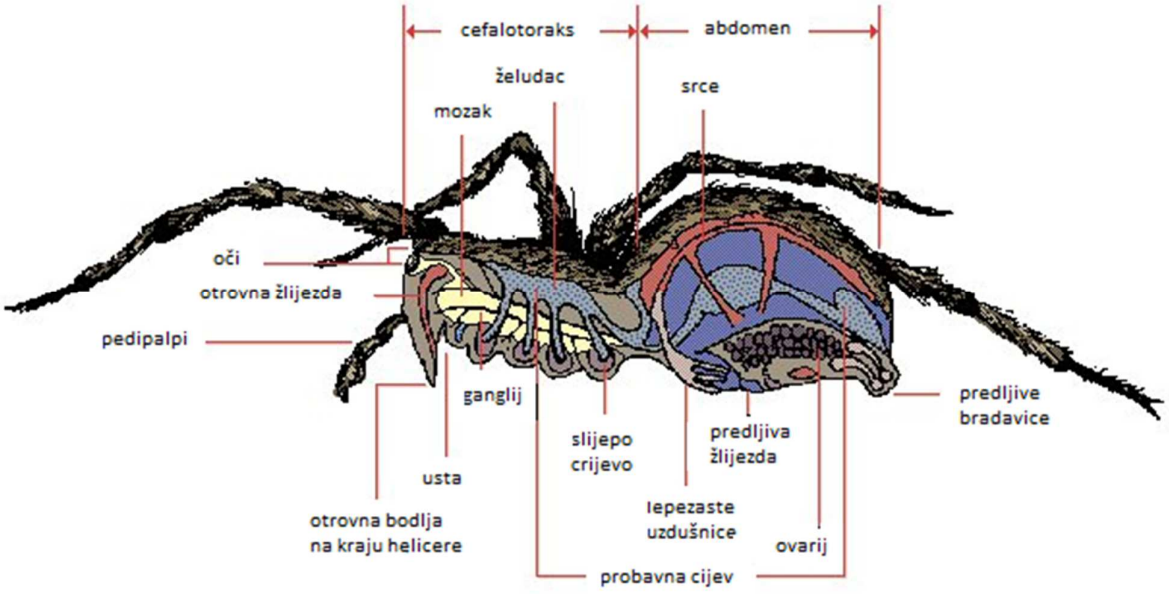
Karnivorni su te mogu uzimati samo tekuću hranu. U plijen izluče sadržaj želuca s enzimima koji unište tkivo te pomoću ždrijela, preobraženog u izrazito mišićavu sisaljku, usisavaju unutarnji sadržaj svog plijena. Probavilo je trodijelno. Sastoji se od ektodermalnog prednjeg dijela - stomodeum, koje obuhvaća ždrijelo, jednjak i želudac; zatim endodermalnog srednjeg dijela (mesenteron) koji se grana u prostrane probavne diventrikule i ektodermalnog stražnjeg dijela (proctodeum) koji povezuje mesenteron s crijevnim otvorom te u kojem dolazi do formiranja fecesa i resorbiranja vode (Habdija i sur., 2011)

Kisik pauci, pa tako i crna udovica, dobivaju iz četiri organa na dnu svog abdomena koji su raspoređeni u prednjem i stražnjem paru, pa je tako anteriorni par u prednjem dijelu abdomena, dok je stražnji par iza prednjeg para. Hemolimfa je tjelesna tekućina koja ispunjava njihovo tijelo, a respiratorni pigment hemocijanin omogućava prenošenje kisika i ugljikova dioksida, dok su traheje cijevi koje im omogućavaju disanje i poduprte su hitinskim prstenovima. Imaju otvoren optjecajni sustav s cjevastim srcem na kojem je segmentalno raspoređeno sedam pari ostiola i koje je smješteno u celomskom perikardu na leđnoj strani opistosome. Prednja i stražnja aorta izlaze iz srca te se granaju u postrane arterije (Web 5).

Što se tiče mehanizama ekskrecije i osmoregulacije, konačan cilj je što manje izlučivanje vode zbog otrovnosti amonijaka te zato što procesi amoniotelije zahtijevaju velike količine vode, a dušikovi se spojevi odstranjuju u obliku mokraćne kiseline, ksantina, adenina i gvanina (neotrovne, teško topljive u vodi). Imaju Malpighijeve cjevčice, izvrate stražnjeg dijela mezenterona u tjelesnu šupljinu, koje pomažu stvarajući kiseli sadržaj koji izbacuje nepotrebne tvari iz njihova tijela (Habdija i sur., 2011).

Razdvojena su spola, pa tako ženke imaju jajovode koji se spajaju u neparnu spolnicu koja se otvara prema van gonoporom (spolni otvor), pomoću kojeg odlažu jaja, a dva sjemena spremišta

povezana su sa spolnicom oplodnim cjevčicama. Kao i kod svih pauka, mužjak najprije preokreće malo sjemene mreže u koju stavlja malu količinu sjemena, tada napuni svoje palpe ili spolne organe sa spermom, napušta stanište, troši znatne napore da pronađe ženku svoje vrste te pri pronalasku vibrira mrežu ženke kako bi bio siguran da je izabrao ispravnu vrstu i da dokaže da je spreman za parenje. Ženka može tijekom ljeta, kada je sezona parenja, proizvesti četiri do devet jajnih vrećica koje mogu sadržavati oko 400 jaja (Web 6). Jaja se inkubiraju oko dvadeset i pet dana, a budući da su crne udovice R stratezi (puno sitnih potomaka, nebriga o potomstvu, rano spolno sazrijevanje, većina potomaka ugiba prije spolne zrelosti, sitne ličinke, prilagođeni na nestabilne uvjete okoliša, visoka stopa populacijskog rasta, veličina populacije ekstremno varira ispod i iznad kapaciteta okoliša, široka ekološka niša, niska kompetitivna sposobnost), samo nekoliko jaja preživi i postane odrasla jedinka. Potrebna su dva do četiri mjeseca da postanu spolno zreli, no šest do devet mjeseci da bi postigli potpunu zrelost (Web 7). Nakon parenja, ženka može pojesti mužjaka, za što je dokazano da postoje evolucijski razlozi, a glavni razlog je razlika u veličini (Web 8). Neki znanstvenici tvrde da je to pravilo, dok drugi smatraju da je to ipak iznimka. Inače preferiraju suha staništa, dine, pješčane i šljunčane plaže, svoju mrežu najčešće grade vrlo blizu tla, ispod kamenja, uz jarke, u travi, u dupljama drveća i pri dnu panjeva, duže vrijeme se mogu zadržati i u stajama, garažama, šupama (Web 9).



Slika 3. Unutrašnja građa tijela pauka. (Izvor: Web 10)

2. OSNOVNI DIO

2.1. Otrovnost crnih udovica

Vrste roda *Latrodectus*, uključujući i mediteransku crnu udovicu s naših područja *(Latrodectus mactans tredecimguttatus*), izrazito su otrovne ne samo za ljude već i za mnoge vrste životinja te su odgovorne za mnogobrojne ubode. Imaju dvije otrovne vrećice u obliku slova S koje su 2 mm duge i 0.5 mm široke, položene su dorzalno i pričvršćene za hitinski oklop na cefalotoraksu te su svijetle, bjeličaste boje. Otrovni se aparat sastoji još od helicera i izvodnih kanala koji ih povezuju s otrovnim žlijezdama. Stijenka žlijezde ima mišiće te kad se oni stisnu, počnu istiskivati otrov koji izvodnim kanalima dolazi do helicera pomoću kojih crna udovica ubrizgava otrov u svoju žrtvu, a također može regulirati i samu količinu izlučenog otrova. Nakon što otrovom umrtvi tkivo žrtve, počne izlučivati slinu koja sadrži enzime za razgradnju kao što su tripsin, lipaza, dijastaza, himosin i proteinaza (enzim koji razgrađuje i biljne bjelančevine). Ima oko 0.02-0.03 mg suhog otrova, a otrov je bijela bistra tekućina koja sadrži toksalbumine i lipoproteine. Toksičnost otrova varira ovisno o godišnjem dobu, pa se kada je hladno smanjuje toksičnost otrova jer se pretvara u kiselinu. Analiziranje otrova moguće je vađenjem otrova iz helicera, izolacijom iz vate u koju je crna udovica ubrizgala otrov. Miševi, štakori i mlade mačke najosjetljiviji su na otrov, a također jako djeluje na konje i deve, dok je djelovanje otrova na čovjeka srednje jačine (Reese, 1944). Otrov crne udovice nakon uboda čovjeka uzrokuje neurotoksične simptome kao što su na primjer oštra bol oko uboda, nakon toga dijaforezu (preznojavanje), hipertenziju (povišeni krvni tlak), izazivaju jaku bol u limfnim čvorovima, grčenje, dehidriranost, može se pojaviti porast ili pad tjelesne temperature, bol u svim dijelovima tijela, pad tjelesne težine, crvenilo, osjećaj sitosti, mučnine te strah od smrti. Sljedećeg se dana bol seli u noge te bolesnik osjeća kao da mu noge gore (Web 11). Iako je smrt rijetkost, karakteristična je neuobičajena i neugodna nelagoda, a u mnogim situacijama razvijena je sustavna manifestacija pod nazivom latrodektizam koja je povezana s otpuštanjem neurotransmitera, naročito norepinefrina i acetilkolina uslijed uboda pauka. Smatra se da je najbolje liječenje nakon uboda crne udovice kombinirana uporaba seruma s kalcijem pri čemu se nakon 10-20 minuta dobivanja seruma osjeća olakšanje, a nakon 3 sata slijedi potpuno ozdravljenje. Istraživanje otrova i toksina imaju glavni značaj ne samo u liječenju latrodektizma, nego i u farmaceutskim istraživanjima i razvoju reagensa koji bi trebao biti koristan za objašnjenje patoloških i fizioloških procesa (Ryan i sur., 2017). Zanimljivo, različito od mnogih drugih otrovnih životinja uključujući zmije i neke druge vrste pauka koji imaju toksine samo u otrovnim žlijezdama, crna udovica ima toksine ne samo u otrovnim žlijezdama,

nego također i po cijelom tijelu, uključujući noge i abdomen, pa čak i u jajima i mladim paucima (Yan i Wang, 2015).

2.2. Fiziološka analiza otrova

Otrov izlučen iz otrovnih žlijezda je kompleksna mješavina komponenti s različitim funkcijama. Puno njih su biološki aktivni proteini i peptidi koji imaju niz adaptivnih uloga: paraliziranje, imobiliziranje, ubijanje i trovanje plijena. Posljednjih godina, sustavne analize otrova crne udovice produbile su znanje o njegovoj toksičnosti. Starija istraživanja učinka otrova čileanske crne udovice (*Latrodectus mactans*) na goveđim spermatozoidima su pokazala da otrov povećava ulaz Ca^{2+} i dolazi do reakcije akrosoma u 43.26 % stanica. Dodavanje kalija (10 mM K^{+}) ili otrova (10 µg/mL) nije utjecalo na morfologiju ili stabilnost DNA sperme. Učinci koje je izazvao visoki udio K^{+} i otrova ukazuju da izravno blokiranje K^{+} mijenja svojstva stanične membrane, što dovodi do ulaska Ca^{2+}. Ovi rezultati pokazuju važnost funkcionalnih promjena induciranih depolarizacijom spermatozoida i otrovom. Ovaj otrov posjeduje jednu ili više molekula koje se mogu koristiti u farmaceutskoj industriji za istraživanje spermatozoida i ima potencijalnu primjenu u reproduktivnoj biotehnologiji. Kada je otrov smeđe udovice (*Latrodectus geometricus*) detaljnije istražen, otkriveno je da uništava nadbubrežnu žlijezdu, tvoreći ozbiljne promjene na stanicama korteksa, rezultirajući smrću zbog akutne adrenalne insuficijencije. Nizom različitih analiza, potvrđeno je da otrov ima proteolitičke aktivnosti, pokazujući specifične učinke na komponente proteina kao na primjer fibronektin, laminin, kolagen tipa IV. Wang i sur. (2007), su detaljno analizirali otrov crne udovice *(Latrodectus tredecimguttatus*) gel elektroforezom i spektrometrijom i dobili su rezultate da je otrov bogat neurotoksinima jer je ubrizgavanje otrova u miša dovelo do očitih simptoma otrovanja. Enzimska analiza pokazala je da otrov sadrži više vrsta hidrolaza, uključujući proteinaze, hijaluronidaze, alkaline i fosfate (Yan i Wang, 2015).

2.3. Proteomika otrova

Napredak u razdvajanju proteina i masenoj spektrometriji omogućio je da se sve komponente otrova mogu efikasno razdvojiti i identificirati. Duan i sur. (2008), su koristili niz metoda kako bi napravili analizu otrova iz žive odrasle crne udovice (*Latrodectus tredecimguttatus*) električnom stimulacijom. Ukupno su u otrovu identificirana 122 aktivna

proteina, od kojih je 75 imalo posebnu funkciju, kao što su: latrotoksini, hidrolaze, proteinaze, fosfolipaze, fosfataze, nukleaze, fukolektin, inhibitori tripsina. Ovi rezultati pomažu u razumijevanju složenih mehanizama djelovanja otrova crne udovice. Do sada, mehanizam djelovanja ovog otrova nije bio potpuno jasan te se mislilo da intoksikacija nakon uboda crne udovice mora biti, uz latrotoksine, povezana s drugim komponentama otrova kao što su hidrolaze. Hidrolaze su također pronađene u otrovima nekih vrsta zmija i drugih vrsta paukova, a proteinaze, kao na primjer metaloproteinaze i serin proteinaze, pokazale su mali udio u štetnim učincima otrova. Očito, hidrolaze i drugi aktivni proteini imaju važnu ulogu u povećanju toksičnosti i jačem djelovanju otrova. Postoji još 47 proteina koji su potencijalno aktivne komponente otrova, što treba dodatno potvrditi. U pokušaju otkrivanja širenja toksina arsena crne udovice, Haney i sur. (2014), su koristili proteomsku strategiju za određivanje proteina otrova iz zapadne crne udovice (*Latrodectus hesperus*). 61 protein je identificiran masenom spektrometrijom iz baze podataka proteina zapadne crne udovice koji se podudaraju s peptidima sakupljenima iz otrova zapadne crne udovice, uključujući 21 latrotoksin, jedan ICK (Intestinal Cell Kinase) i šest CRISP (Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats) toksičnih proteina. U otrovu je identificirano nekoliko vrsta enzima, uključujući hialuroidaze, kitinazu, serinske proteaze i metaloproteaze te rezultati pokazuju da postoji sličnost u toksičnosti otrova između vrsta *Latrodectus hesperus* i *L. tredecimguttatus* na molekularnoj osnovi (Yan i Wang, 2015).

2.4. Glavni toksini otrova

Do sada je iz otrova *Latrodectus tredecimguttatus* izolirano najmanje sedam različitih latrotoksina (LTX) pomoću tehnika kao što su kromatografija ionske izmjene i hidrofobna kromatografija (Tablica 1). Svi proučavani latrotoksini su veliki kiseli proteini (pI~5.0-6.0) s molekularnom masom od 110 do 140kDa. Većina ima učinkovito djelovanje na kukce, ali i druge beskralježnjake, i nazivaju se latroinsektotoksini (LITs) (α, β, γ, δ, ε-LIT). ε-LIT je izrazito toksičan za oblića *Caenorhabditis elegans*, α-latrokrustatoksin (α-LCT) aktivan je samo u rakovima, a α-LTX je jedina poznata komponenta otrova specifična za kralježnjake. Pomoću cDNA određene su primarne strukture četiri gena koje kodiraju četiri latrotoksina, α-LTX, α-LIT, α-LCT i δ-LIT. Korištenjem krio-elektronske mikroskopije, otkriveno je da trodimenzionalna (3D) struktura α-LTX sadrži tri regije: krilo (većina domene II), tijelo (četvrtina domene II i prvih 15-16 ankirinskih ponavljanja) i glavu (oko 4.5 C-terminalnih

ankirinskih ponavljanja). Svi latrotoksini uzrokuju masovno otpuštanje neurotransmitera iz živčanih završetaka nakon vezanja na specifične neuronske receptore. Volkova i sur. (1995), su izolirali dva proteina niske molekulske mase, LMWP i LMWP2 iz otrova crne udovice i oba proteina bila su inaktivna u sisavcima i kukcima. Ti proteini niske molekulske mase nazivaju se latrodektini i čini se da povećavaju neurotoksičnost latrotoksina, vjerojatno povećanjem afiniteta za ciljanu membranu (Yan i Wang, 2015).

Tablica 1. Informacije o glavnim tipovima latrotoksina izoliranima iz otrova crne udovica.

Komponenta otrova	Masa (kDa)	Ciljna aktivnost
α-LTX	130	Kralježnjaci
α-LCT	120	Rakovi
α-LIT	120	Kukci
β-LIT	140	Kukci
γ-LIT	120	Kukci
δ-LIT	110	Kukci
ε-LIT	110	Kukci, *Caenorhabditis elegans*
LMWP	8	Povećanje toksičnosti LTX
LMWP2	9.5	Povećanje toksičnosti LTX

(Izvor: Yan i Wang, 2015)

Najviše proučavani latrotoksin je α-latrotoksin (α-LTX), koji ima molekulsku masu od otprilike 130kDa i smrtonosan je za kralježnjake inducirajući veliko oslobađanje neurotransmitera, djelujući kako u prisutnosti, tako i u odsutnosti Ca^{2+}. Klinički simptomi latrodektizma uglavnom su posljedica prisutnosti homologa α-LTX u otrovu. Općenito je prihvaćeno da je α-LTX prisutan u otrovima svih vrsta roda *Latrodectus*. Međutim, tek je nedavno zabilježen u otrovu čileanske crne udovice (*L. mactans*) (Garb i sur., 2004). Bhere i sur. (2014), su kombiniranjem 33kb genomske DNA s RNA-Seq *Latrodectus hesperus*, nizvodno otkrili paralog 4.5kb. 4kb intron prekida α-LTX kodirajuću sekvencu, dok 10kb introni u 3' UTR regiji paraloga mogu uzrokovati 'non-sense' propadanje (Yan i Wang, 2015).

2.4.1. Mehanizam i aplikacija α-latrotoksina (α-LTX)

Pokazalo se da α-LTX stvara Ca^{2+} propusne kanale u lipidnim slojevima, što uključuje skupljanje toksina u homotetramerne komplekse koji imaju središnji kanal. Influks Ca^{2+} kroz α-LTX kanale u presinaptičkoj membrani, važan je dio mehanizma djelovanja α-LTX-a. Otkrivena su tri proteina u staničnoj membrani: neureksin (NRX), latrofilin (LPH ili CIRL) i protein tirozinska fosfataza σ (PTP σ), koji funkcioniraju kao receptori za α-LTX. Nakon vezanja receptora, α-LTX može djelovati preko dva glavna mehanizma: 1. Ca^{2+} ovisno djelovanje koje uključuje umetanje α-LTX u staničnu membranu i formiranje pora; i 2. Ca^{2+} neovisno djelovanje na temelju signala posredovanih receptorima. Napredak istraživanja o strukturi i funkcijama latrotoksina, osobito α-LTX, uvelike je unaprijedio razumijevanje mehanizama koji reguliraju otpuštanje neurotransmitera. Iako je uloženo mnogo napora u istraživanju α-LTX, mehanizam njegova djelovanja još uvijek nije posve jasan. Kako bi se dodatno proučila i razlikovala dva mehanizma djelovanja α-LTX, Deak i sur. (2009) su primijenili kombinaciju genskog nokauta (tehnika genetičke manipulacije u kojoj se neoperativnim učine geni jednog organizma), elektrofiziologije i drugih srodnih tehnika za ispitivanje učinka α-LTX na sinaptičku egzocitozu neurona hipokampusa te su dokazali da mehanizam α-LTX neovisnog otpuštanja Ca^{2+} zahtijeva sinaptičke SNARE/VAMP, SNAP-25 i Munc13-1 proteine. Od tri specifična receptora za α-LTX, neureksin se veže samo na α-LTX u prisutnosti izvanstaničnog Ca^{2+}, dok se latrofilin i tirozinska fosfataza σ vežu na α-LTX čak i u odsutnosti izvanstaničnog Ca^{2+}. Budući da je doprinos tirozinske fosfataze σ mali, latrofilin je ključni receptor za neovisno izlučivanje Ca^{2+} putem α-LTX. Hiramatsu i sur. (2010), su dokazali da α-LTX uzrokuje povećanje koncentracije unutarstaničnog Ca2+ i dovodi do egzocitoze u prisutnosti izvanstaničnog Ca^{2+}. Međutim, druga opažanja ukazuju da u prisutnosti izvanstaničnog Ca^{2+}, latrofilinski vezani α-LTX mogu djelovati kao Ca^{2+} ionofor. Osim toga, otkriveno je da α-LTX utječe na transdukciju signala u mastocitima fosfolizirajući SNARE proteine, uključujući SNAP-23, sintaksin-4 i VAMP-8 preko protein kinaze C ovisnih i protein kinaze neovisnih puteva. Ovi rezultati pokazuju da se u prisutnosti Ca^{2+}, latrofilinom posredovan toksični učinak α-LTX može vršiti kroz povišenje intracelularnog Ca^{2+} i fosforilacije SNARE proteina, koji poboljšavaju razumijevanja latrofilin posredovanim mehanizmom α-LTX. U zadnjem desetljeću, latrotoksini, konkretno α-LTX iz otrova crne udovice, opsežno su korišteni kao sredstva za istraživanje molekularnih mehanizama koji su uključeni u regulaciju otpuštanja neurotransmitera te su ostvarena postignuća uvelike poboljšala razumijevanje sinaptičkog prijenosa (Yan i Wang, 2015).

2.5. Toksini izvan otrovnih žlijezda

Za razliku od mnogih drugih otrovnih životinja, uključujući zmije i neke druge vrste pauka koji imaju otrove samo u otrovnim žlijezdama, crne udovice nemaju samo toksične spojeve, nego sadrže i neotrovne aktivne supstance. Korištenjem različitih fizioloških i biokemijskih metoda, Yan i sur. (2014), su istraživali vodeni ekstrakt jaja *Latrodectus tredecimguttatus* koja su bila bogata proteinima velike molekulske mase i peptida ispod 4kDa, pokazujući višestruko aktivne hidrolaze i neurotoksična djelovanja na sisavce i kukce. Za ispitivanje odnosa proteina u jajima s toksičnošću jaja, Lietal je analizirala sastav proteina jaja i usporedila ga sa sastavom paukova otrova (Yan i Wang, 2015) (Tablica 2). Pokazano je da je molekularna masa proteina jaja veća od 55 kDa te imaju brojne proteine s molekulskim masama od 60kDa i 130 kDa, kao i neke proteine s manjom masom - oko 34 kDa. Od ekstrakta jaja koji su uključeni u važne stanične funkcije i procese, uključujući katalizu, transport i regulaciju metabolizma, ukupno je identificirano 157 proteina. Usporedba je pokazala da je sastav proteina jaja složeniji od onog iz otrova, a postoji samo nekoliko sličnosti između sastava proteina dvaju uzoraka. U ekstraktu jaja nisu pronađeni proteini tipični za otrov crne udovice, što upućuje na to da jaja imaju svoj poseban mehanizam toksičnosti (Li i sur., 2012). Peng i sur. (2014), izvršili su sustavnu analizu vodenog ekstrakta novo izlegle crne udovice. Ekstrakt je sadržavao 69.42% proteina koji su varirali u molekularnim masama i izoelektričnim točkama te su eksperimentom dokazali da su mladi pauci „bogati“ neurotoksinima i drugim bioaktivnim komponentama koje igraju važne uloge u njihovoj toksičnosti. Zašto su mladi pauci, pa čak i jaja crne udovice, poput otrovnih žlijezda, evoluirali toksične spojeve, još je uvijek neodgovoreno pitanje. Russel i sur. (1979), smatraju da postojanje takvih komponenti pruža određenu zaštitu od drugih člankonožaca.

Tablica 2. Usporedba proteina identificiranih iz jaja i otrova *Latrodectus tridecimguttatus*.

Klasifikacija	Ekstrakt jaja (%)	Otrov (%)[b]
Tipični poznati proteini otrova crne udovice	0	10 (8.2)
Hidrolaze	12 (7.6)	13 (10.7)
Drugi enzimi	51	20 (16.4)
Proteini nepoznate funkcije	14	25 (20.5)
Proteini s povezanom funkcijom	44	23 (18.9)
Drugi proteini	36	31 (25.4)
ukupno	157	122 (100)

(Izvor: Yan iWang, 2015)

3. ZAKLJUČAK

Vrste roda *Latrodectus* neobični su predstavnici člankonožaca, ne samo zbog toga što su jedne od najotrovnijih životinja općenito, već i zbog raspodjele toksina u cijelom tijelu, čak i u jajašcima i izleglim mladima. Do sada su istraživanja na latrotoksinima, posebice α-LTX, bila opsežna, međutim, mehanizam djelovanja toksina nije u potpunosti jasan. S obzirom da otrov crnih udovica ima jače djelovanje na životinje nego na ljude, ubod neke od vrsta iz roda *Latrodectus* neće rezultirati smrću čovjeka, uz moguće iznimke djece, starijih ili bolesnih ljudi, posebice srčanih bolesnika. Ipak, simptomi trovanja biti će iscrpljujući za organizam svakog čovjeka i trajat će nekoliko dana. Nakon uboda uvijek treba potražiti liječničku pomoć kako bi se izbjegle neželjene posljedice, a da do uboda uopće ne dođe, treba obratiti pažnju u području gdje su staništa crnih udovica jer, iako nisu agresivne, na dodir reagiraju instinktivno i ubadaju, posebice u ljetnim mjesecima kada je sezona parenja. Do sada su znanstvenici iz otrova mediteranske crne udovice uspješno izolirali najmanje sedam latrotoksina koji imaju ciljano djelovanje na neku skupinu životinja te dva latrodektina koji povećavaju toksičnost latrotoksina, međutim još se uvijek istražuju ostale komponente otrova.

4. LITERATURA:

Bettini, S., Maroli, M., Maretić, Z., 1978. Venoms of Theridiidae, genus *Latrodectus*. U: *Arthropod venoms*. Springer Berlin Heidelberg. pp. 149-212.

Bhere,K.V., Haney, R.A., Ayoub, N.A. Garb, J.E., 2014. Gene structure, regulatory control, and evolution of black widow venom latrotoxins. FEBS Lett. 588, 3891–3897.

Deák, F., Liu, X., Khvotchev, M., Li, G.; Kavalali, E.T., Sugita, S., Südhof, T.C., 2009. Alpha-latrotoxin stimulates a novel pathway of Ca2+-dependent synaptic exocytosis independent of the classical synaptic fusion machinery. J. Neurosci. 29, 8639–8648.

Duan, Z., Yan, X., Cao, R.; Liu, Z., Wang, X., Liang, S., 2008. Proteomic analysis of *Latrodectus tredecimguttatus* venom for uncovering potential latrodectism-related proteins. J. Biochem. Mol. Toxicol. 22, 328–336.

Habdija, I., Primc Habdija, B., Radanović, I., Špoljar, M., Matoničkin Kepčija, R., Vujčić Karlo S, Miliša, M., Ostojić, A., Sertić Perić, M., 2011. Protista – Protozoa Metazoa – Invertebrata Strukture i funkcije. ALFA, Zagreb, pp. 306-311.

Haney, R.A., Ayoub, N.A., Clarke, T.H., Hayashi, C.Y., Garb, J.E., 2014. Dramatic expansion of the black widow toxin arsenal uncovered by multi-tissue transcriptomics and venom proteomics. BMC Genomics 15, 366–383.

Hiramatsu, H., Tadokoro, S., Nakanishi, M., Hirashima, N., 2010. Latrotoxin-induced exocytosis in mast cells transfected with latrophilin. Toxicon 56, 1372–1380.

Li, J., Liu, H., Duan, Z., Cao, R., Wang, X., Liang, S., 2012. Protein compositional analysis of the eggs of black widow spider (*Latrodectus tredecimguttatus*): Implications for the understanding of egg toxicity. Journal of biochemical and molecular toxicology, 26(12), 510-515.

Matoničkin, I., Klobučar, G., Kučinić, M., 2010. Opća zoologija. Školska knjiga, Zagreb.

Peng, X., Zhang, Y., Liu, J., Yu, H., Chen, J., Lei, Q., Wang, X., Liang, S., 2014. Physiological and biochemical analysis to reveal the molecular basis for black widow spiderling toxicity. J. Biochem. Mol. Toxicol. 28, 198–205.

Pocock, R.I., 1892. On the Myriopoda and Arachnida collected by Dr. Anderson in Algeria and Tunisia. Zoological Society of London, London.

Popović, S., Antić, A., 1991. Pčelarenje za početnike. Autori, Beograd.

Reese, AMt., 1944. The anatomy of the venom glands in the black widow spider, *Latrodectus mactans*. Transactions of the American Microscopical Society 63.2, 170-174.

Russell, F.E.; Maretc´, Z., 1979. Effects of *Latrodectus* egg poison on web building. Toxicon, 17, 649–650.

Ryan, N.M., Buckley N.A., Graudins, A., 2017. Treatments for Latrodectism—A Systematic Review on Their Clinical Effectiveness. Toxins 9.4, 148.

Volkova, T.M., Pluzhnikov, K.A., Woll, P., Grishin, E.V., 1995. Low molecular weight components from black widow spider venom. Toxicon 33, 483–489.

Wang, X.C., Duan, Z.G., Yang, J., Yan, X.J., Zhou, H., He, X.Z., Liang, S.P., 2007. Physiological and biochemical analysis of L. tredecimguttatus venom collected by electrical stimulation. J. Physiol. Biochem. 63, 221–230.

Yan, S., Wang, X., 2015. Recent advances in research on widow spider venoms and toxins. Toxins, 7(12), 5055-5067.

Yan, Y., Li, J., Zhang, Y., Peng, X., Guo, T., Wang, J., Hu, W., Duan, Z., Wang, X., 2014. Physiological and biochemical characterization of egg extract of black widow spiders to uncover molecular basis of egg toxicity. Biol. Res. 47, 17–27.

WEB IZVORI

Web 1. http://spidapedia.wikia.com/wiki/Black_Widow_(Latrodectus) –preuzeto: 02.09.2017.

Web 2. https://araneae.unibe.ch/data/2138 –preuzeto: 02.09.2017.

Web 3. https://animalcorner.co.uk/animals/black-widow-spider/ -preuzeto: 02.09.2017.

Web 4. https://www.google.hr/search?hl=en&biw=1366&bih=662&tbm=isch&sa=1&q=mediterranean+black+widow+spider+&oq=mediterranean+black+widow+spider+&gs_l=psy-ab.3..0i30k1.57676.57676.0.57900.1.1.0.0.0.0.154.154.0j1.1.0....0...1.1.64.psy-ab..0.1.152.-opLIPFOGck#imgrc=fkuW-4Nik2j5uM –preuzeto: 03.09.2017.

Web 5. http://theblackwidowspiderresource.weebly.com/respiration.html -preuzeto: 03.09.2017.

Web 6. http://www.findaspider.org.au/info/Reproduction.htm –preuzeto: 04.09.2017.

Web 7. http://www.bio.miami.edu/tom/courses/bil160/bil160goods/16_rKselection.html – preuzeto: 04.09.2017

Web 8. https://www.livescience.com/7555-creepy-cannibalism-female-spiders-eat-mates.html –preuzeto: 04.09.2017.

Web 9. http://animaldiversity.org/accounts/Latrodectus_mactans/ -preuzeto: 04.09.2017.

Web 10. https://www.google.hr/search?hl=en&biw=1366&bih=662&tbm=isch&sa=1&q=inside+anatomy+of++black+widow+spider&oq=inside+anatomy+of++black+widow+spider&gs_l=psy-ab.3...11551.11551.0.11728.1.1.0.0.0.0.109.109.0j1.1.0....0...1.1.64.psy-ab..0.0.0.MQeTnqGa9jw#imgrc=xUWy61hiLsUACM: -preuzeto: 04.09.2017.

Web 11. http://www.emedicinehealth.com/black_widow_spider_bite/article_em.htm preuzeto: 04.09.2017.