

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**MÉREGVARIÁCIÓK ÉS KLINIKAI JELENTŐSÉGÜK  
EGY IZOLÁLT KELET-MAGYARORSZÁGI KERESZTES  
VIPERA (*VIPERA BERUS*) ÁLLOMÁNYNÁL**

**VENOM VARIATIONS AND THEIR CLINICAL  
SIGNIFICANCE IN CASE OF AN ISOLATED POPULATION  
OF THE COMMON ADDER (*VIPERA BERUS*) IN EASTERN  
HUNGARY**

Malina Tamás

Témavezető

Dr. Vasas Gábor

Tanszékvezető Egyetemi Docens



**DEBRECENI EGYETEM**  
**Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola**  
**Debrecen, 2015**

## Introduction

The common adder (*Vipera berus*) is the most distributed terrestrial venomous snake; its geographical range covers almost the whole Palaearctic region (CARLSSON 2003). Three subspecies are distinguished on the bases of their current taxonomic status: the nominate subspecies, *Vipera berus berus*, the Sakhalin adder (*Vipera berus sachaliensis*), and the Balkan subspecies, *Vipera berus bosniensis* (CARLSSON 2003).

The native herpetofauna of Hungary includes only two venomous snake species, the common adder (*V. berus*) and the Hungarian meadow viper (*V. ursinii rakosiensis*). Up to now, *V. berus* had been described from three main, separated regions in Hungary (KORSÓS & KRECSÁK 2005): 1) the nominate subspecies (*V. b. berus*) native to the north-eastern areas (Zemplén Hills and Eperjes - Tokaj Range (JANISCH 1987)), and in the East 2) in the valley of the Upper River Tisza (AGÓCSY 1958; MARIÁN 1960; JANISCH 1987). Based on their mitochondrial DNA, these two populations belong to two different evolutionary clades (KALAYABINA-HAUF et al. 2004). The Balkan or Bosnian adder (*V. b. bosniensis*) can be found 3) in south-western Hungary, in Somogy (MARIÁN 1956, JANISCH 1987; KORSÓS & KRECSÁK 2005) and Zala counties (FEJÉRVÁRY 1923; JANISCH 1987). *Vipera berus* has the widest distribution range in the north-eastern region and most likely the highest population densities are in the Zemplén Hills. *Vipera berus* is strictly protected species in Hungary. The species' native microhabitat preferences extends in the regions mentioned above that is appropriate for its survival, mainly on woodland edges and wood-cuts, bushy and damp meadows, brambly escarps, blueberry-hedgerows but also on boggy fields, edges of alder marshes and willows (MARIÁN 1956, 1960, JANISCH 1987). Habitats combined with hot and dry microclimate are also not preferred by the adder, while it shows passive activity and/or active only during the early mornings and evenings on the heatwaved-days (MARIÁN 1956). *Vipera berus* hibernates at the end of October/early November and becomes active again usually in March (MARIÁN 1956; ÚJVÁRI et al. 2001), when the maximum air temperature is steadily between +10 and 12°C (MARIÁN 1956). Only a few published data is available about the diet preferences of *V. berus* within its Hungarian territory. The natural diet of adult *V. berus* specimens mainly consists of small rodents (*Apodemus sp.*, *Microtus sp.*, *Arvicola sp.*) and

insectivorous mammals (*Sorex sp.*) but also certain frogs (i.e. *Rana dalmatina*, *R. arvalis*), while juveniles feed on the young specimens of *Zootoca vivipara*, *Lacerta agilis*, and *Triturus vulgaris* (MARIÁN 1956, 1957, 1960).

Intraspecies venom variation of snakes can have scientific interest from ecological, chemotaxonomical, clinico-epidemiological, but also antivenom production points of view (BARLOW et al. 2009). Such venom variations can be found at several levels, e.g. between different populations regionally, including the inter-subspecies venom variations and intra-populations, which covers gender specific, diet/habitat, seasonal and ontogenetic differences (CHIPPAUX et al. 1991; SASA et al. 1999). This venom variability is notably influenced by adaptation to available prey species and can lead to regionally distinct clinical patterns observed in envenomed humans (CHIPPAUX et al. 1991; FERQUEL et al. 2007; BARLOW et al. 2009; BABOCSAY 2010).

The venom of the European viperids has an arsenal of a complex mixture of enzymes. Of the phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), the post-and presynaptically acting neurotoxins, e.g. different isoforms of ammodytoxin and vaspin, are the most significant, which can cause peripheral neurotoxic effects on humans (FERQUEL et al. 2007; JAN et al. 2007). In Europe, individual venom variations are known in *V. aspis* (DETRAIT & DUGUY 1966), *V. latastei* (AREZ et al. 1994) and *V. ammodytes* (HALASSY et al. 2011).

*V. berus* may have the highest clinical significance among the monophyletic genus of *Vipera* in Europe due to it having the broadest distribution range and the highest frequency of snakebite-incidents (PERSSON 1995). The species has three phylogenetically separated main clades (URSENBACHER et al. 2006). Take into account the above facts and the significance of regional variations of a given species (SAINT GIRONS & DETRAIT 1992; BARLOW et al. 2009), the possible implication of venom variations among the phylogenetically distinct clades and sub-clades of *V. berus* very probably have high implication. However, the venom of *V. b. berus* has been extensively studied in the past 20 years, but only the venoms of certain populations from the eastern sub-clade (SIGUR et al. 1979; NEDOSPASOV & RODINA 1992; KRÍŽAJ et al. 1993; CALDERÓN et al. 1994; MALENEV et al. 2007; RAMAZANOVA et al. 2008), and the venoms of some populations from the western sub-clade (SAINT GIRONS & DETRAIT 1992;

GUILLEMIN et al. 2003) have been investigated. One study (MEBS & LANGELÜDDEKE 1992) used venoms from a population, which belongs to the Central European sub-clade (URSENBACHER et al. 2006), while the venom characteristics of other sub-clades of *V. berus* have not yet been studied. These *V. berus* venoms are proven oedema-forming, anti-haemostatic, anticoagulant, fibrinolytic, proteolytic, haemorrhagic and myotoxic activities (SAINT GIRONS & DETRAIT 1978; MEBS & LANGELÜDDEKE 1992; CALDERÓN et al. 1993). According to several authors (KRÍŽAJ et al. 1993; JAN et al. 2002; GUILLEMIN et al. 2003; RAMAZANOVA et al. 2008; DE HARO et al. 2009; MAGDALAN et al. 2010), *V. b. berus* venom is devoid of neurotoxic properties. However, neurological deficits after envenoming by some populations of *V. berus* are occasionally reported (WARRELL 2011). Although, it has been known since the 1930s, the venom of *V. b. bosniensis* is capable of inducing neurological disturbances dominated by cranial nerve dysfunctions (SCHÖTTLER 1938). New cases were published in the last years about unambiguous neurotoxic manifestations following *V. b. berus* bites (i.e. CISZOWSKI & MODLA 2004; GAFENCU et al. 2012). These case reports unambiguously suggest that the venom of certain *V. b. berus* populations may contain neurotoxin(s).

Until now, no study has addressed the nature of venom of *V. b. berus* within its Hungarian distribution range. This is an important mission because the Hungarian *V. b. berus* populations belong to the Carpathian sub-clade (KORSÓS 2007) – which is an ancestral lineage of this taxon (URSENBACHER et al. 2006) – and venom composition differences have a potential implication in understanding the link between phylogeny and intraspecific venom variations (CHIPPAUX et al. 1991), as well as the regionally distinct clinical picture of envenomed patients by the different populations of the same taxon.

## Aims of the study

The present Ph.D. dissertation contains three chapters altogether. Each chapter is based on results published as an impacted paper of the author and/or manuscripts which are under preparation by the author at the time of the preparation of the dissertation.

**Chapter 1.** In Europe, *V. berus* is extensively distributed and causes more bites than any other species within the genus *Vipera*. In Hungary, envenoming by the native *V. berus* is relatively rare compare to other European countries, although, certain cases may have more serious consequences than usual and leading unique and challenging medical emergency situation mainly due to the possible geographical venom variations. This chapter reviews the main epidemiological aspects and significance of incidents inflicted by *V. berus* in Hungary.

**Chapter 2.** Envenomings by *V. berus* result in characteristic systemic symptoms including early ‘anaphylactic’ features (i.e. tachycardia, gastrointestinal symptoms), dizziness, hypotension, shock, coagulopathy and neutrophil leucocytosis. These symptoms resemble those caused by *V. aspis*, reflecting the similarities in the composition of their venoms. Systemic neurotoxicity has been described in patients envenomed by certain populations of some subspecies of *V. aspis* and *V. ammodytes* in Europe. It has been attributed to pre-synaptic or post-synaptic neurotoxic phospholipases A<sub>2</sub> in their venoms. However, neurotoxicity is the most unusual and unexpected clinical feature of *V. berus* envenoming. Two case reports about neurotoxic *V. berus* envenoming are described here from eastern Hungary with other interesting features and review the scanty and somewhat obscure literature on this phenomenon.

**Chapter 3.** Intraspecific venom variability of the taxon may also have important clinical implications. The third aim of the dissertation was to demonstrate experimentally and biochemically the venom individualities of a given population of *V. b. berus* in eastern Hungary, presented in this chapter. This may help to better understand the nature of their venom complexity and the symptoms-manifestation on envenomed humans, and eventually their evolutionary and taxonomic aspects, as well.

## **Materials and methods**

### **Data collection of envenomings**

Hungarian literature was reviewed; searches performed in medical libraries and the private libraries of amateur (hobby) and professional Hungarian reptile experts as well as the online available articles on Medline, PubMed and Google. One case report has based on my personal clinical experience on adder bite published it previously (i.e. MALINA et al. 2008a). The other case report, which has also been published (i.e. MALINA et al. 2013), obtained from the Paediatric Ward of Szatmár-Bereg Hospital (Fehérgyarmat, eastern Hungary) beside the permission of usage of the original medical case record and patient's discharge letter from the Medical Director.

### **Collection and storage of venom**

All venom samples of the eastern Hungarian *V. b. berus* were collected from healthy specimens from both sexes in the field (Upper Tisza River valley, eastern Hungary) during mid-spring in order to avoid differences that may result from seasonal changes of the venom composition from 2010 to 2012. Snakes were milked, their total length were measured and recorded and then, the animals were released. Only individual samples (and not pooled) have been used in this research in order to investigate the individual venom variability, based on CHIPPAUX et al.' (1991) recommendation. Milked venoms were stored in dark at -80°C until use. The Ministry of Water and Environmental Protection of Hungary issued the permit for venom collection (No.: 14/1690-4/2010).

Two venom samples that originated from areas where neurotoxic symptoms have not been reported in human envenomings, were used as control: a non-neurotoxic *V. b. berus* venom collected in the eastern Austrian Alps (Ybbs Mountain) in late May 2006, and a *V. nikolskii* venom collected in the central region of Ukraine (Pidlisne) in early May 2009.

## **Limitations**

The species has much lower venom yield compare to the tropical and subtropical viperid species. Taking into account that venom yield and the successful milking are influenced by several factors (CHIPPAUX et al. 1991), venoms used in the various experimental and biochemical studies in this research are not derived from the same specimen in every case.

## **Protein content determination**

Protein concentration was determined by the method of BRADFORD (1976).

## **Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)**

In order to estimate the molecular mass of the proteins, the individual crude venoms were initially separated by SDS-PAGE as described previously (LAEMMLI 1970). For statistical analysis of SDS-PAGE the band obtained for the individual samples plus the 2 controls have been grouped into eight groups (juvenile female, juvenile male, sub-adult female, sub-adult male, adult female, adult male, and control samples of *V. b. berus* from Austria and *V. nikolskii*). Bands presence (1) and absence (0) were scored, and hierarchical clustering was applied by SYN-TAX 2000 program package.

## **Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS)**

MALDI-TOF-MS measurements of the individual crude venoms were carried out in this research by the method of FAVREAU et al. (2006).

## **Phospholipase A<sub>2</sub> activity assay**

Phospholipase A<sub>2</sub> activity of the venoms was determined by the method of SANTORO et al. (1999). Statistical analysis was performed on MATLAB

Version 7.7.0471 (R2008b) and descriptive statistics were computed with the aid of built-in-routines and one-way ANOVA to test the probability of equal means.

### **Protease activity/gelatin-zymography**

Gelatin-zymography was used to protease activity determination by the method of HASSON et al. (2004) and MALTA et al. (2008).

### **Determination of venom toxicity (LD<sub>50</sub>) on mice and in vivo experiments on chicks**

All experiments were authorised by the Committee of Animal Research of the University of Debrecen. Toxicity was assessed as described previously by THEAKSTON & REID (1983) on Swiss-Webster male mice. Four individual venoms were chosen randomly from the Hungarian adder population and tested together with the controls. The dose range of venoms was: 1.0; 0.8; 0.7; 0.6; 0.5; 0.4; 0.3; and 0.25 µg/g i.v. Control mice were injected with venom free saline solution. LD<sub>50</sub> calculation was performed by probit analysis using Minitab 16 software. Chicks (6-8-day-old males) were injected with undiluted venom (20 µl, unknown dry weight) subcutaneously (s.c.) and observed for developing symptoms and then, symptoms were recorded.

### **Frog nerve-muscle preparation**

Adult frogs (*Pelophylax kl. esculentus*) were used in the experiments. Frog nerve-muscle (FNM) preparations were set-up using *nervus ischiadicus* and *musculus gastrocnemius* as described previously by SCHÖTTLER (1938).

### **Neuromuscular studies on chick *biventer cervicis* (CBC) preparation**

The chick *biventer cervicis* (CBC) preparation is sensitive to snake toxins and allows prejunctional effects to be distinguished from postjunctional effects (HARVEY et al. 1994). The preparations were set up and exposure to venom samples as described previously by HARVEY et al.

(1994). In some experiments, preparations were set up as described and then the Krebs-Henseleit solution was changed to one in which the  $\text{CaCl}_2$  was replaced by  $\text{SrCl}_2$ , as described previously by HARVEY & KARLSSON (1982).

### **Electrophysiology on identified neurons of rat brainstem**

To study the origin of possible neurotoxic effects of the venom on non-cholinergic synaptic transmission, the end-bulbs of Held were investigated. These transitions are formed between the glutamatergic nerve terminals of the acoustic nerve and the cell bodies of the bushy neurones of the cochlear nucleus in the central auditory pathways of the rat (WANG & MANIS 2008). Experiments were performed on thick parasagittal brainstem slices prepared from 10-14-day-old Wistar rats. Data acquisition was achieved by using the Clampex and Fetchex 6.0 software. Data analysis was performed using the Clampfit 9.0 program. During the analysis, paired-pulse-ratio (PPR) was calculated as the ratio of the amplitudes of the second and first postsynaptic currents, respectively (ZUCKER & REGEHR 2002). Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance was determined using Student's two-sample t-test. The level of significance was set to 0.05.

## Results

### Epidemiological data

In Hungary, only *V. berus* can be significant from medical and toxicological points of view (MALINA et al. 2011a). However, *V. ursinii* is also noted as a medically important species in Hungary (WHO 2010) but their envenomings are negligible compare to *V. berus* (KRECSÁK et al. 2011). The issued papers about *V. berus* envenomings that occurred in Hungary are few and, most of them were published in Hungarian and derive from the early literature (i.e. MARIÁN 1952, 1956; DOLECSKÓ 1964; ANONYMOUS 1964b; MAJOR 1965; KOLLÁR 1979; VIRÁGH & TASS 1986). Therefore, these articles do not contain updated information concerning to *V. berus* bites for the native emergency physicians and clinical toxicologists (MALINA et al. 2012). In addition, we still know nothing about the consequences of bites by certain *V. berus* populations within its Hungarian territory, e.g. in Zala county, or, the detailed case reports and clinically oriented papers about their envenomings have been published only in the last couple years (i.e. MALINA et al. 2008a, 2011, 2012, 2013). However, there have been preliminary nationwide study about *V. berus* envenomings (i.e. MALINA 2011) but currently we have no exact epidemiological data about the incidence rate of *V. berus* bites in Hungary. There is no doubt that *V. berus* and *V. ursinii* bites are relatively rare (MALINA et al. 2008b; 2012). Compared with the consequences and frequency of native *Vipera* cases, bites by exotic species, especially the tropical and subtropical viperids, often inflict snakebite incidents (MALINA et al. 2008b; MALINA & KRECSÁK 2008), of which treatment is a major challenge for the Hungarian physicians (MALINA et al. 2008b).

### Case reports from eastern Hungary

These two envenomings below (derive from the Upper Tisza River Valley), had been published previously by MALINA et al. (2008a, 2013).

*Case 1.* A previously healthy 27-year-old man was bitten by an adult female *V. berus* 70-72 cm in total length on 23 April 2007 in Szabolcs-Szatmár-Bereg County. The snake was captured alive and expertly

identified. The victim had no previous snakebites. He was transported to hospital. Tense and tender swelling developed the whole hand and wrist. Erythema was mild, local haemorrhage was confined to the fang marks. Typical systemic symptoms developed – i.e. profuse diarrhoea, one episode of nausea, intense dizziness and increased heart frequency – with some uncommon and very rare symptoms: high and fluctuated blood pressure, true vertigo in lying position and unambiguous neurotoxicity. This latter involved a suddenly evolved double vision (diplopia) and there was definite strabismus - the second image disappeared when one eye was covered -. The gait was found to be unsteady. The differential leucocyte count was mildly abnormal, blood coagulation and urine were normal. Diplopia lasted for 11 h after the bite and resolved spontaneously, intense dizziness gradually wore off within 2 days. The hand was slightly bluish in colour until the third day. The moderate oedema was receding by the fourth day. Tender arthralgia of metacarpal and interphalangeal joints of the bitten hand lasted for 8 days.

*Case 2.* A previously healthy 12-year-old girl was bitten by a snake on 02 May 2012 in Túrístvándi. The snake was photographed with a mobile phone, later was identified as a *V. b. berus* by a keeper from Budapest Zoo, and then it was reconfirmed by a ranger of the Directorate of Hortobágy National Park. The girl was transported to hospital. She had no history of snakebite and no allergies. Local symptoms were throbbing pain, swelling, which extended to the whole hand with hyperaemia. During transportation she was drowsy and nauseated. On arrival she was pale, weak, prostrated and was unable to stand. Of the systemic symptoms, reching, intensive dizziness with increased pulse developed. Her pupils were moderately dilated and mild abnormality of pupillary accommodation was detected. The patient experienced eye movement difficulties. Bilateral impairment was characterized by oculomotor paralysis with obvious partial bilateral ptosis, although, she could partially open her eyes on request. Gaze paresis was medically confirmed, without other cranial nerve or additional neurological deficits. APTI and TT showed an increasing trend but remained within the normal range. All the symptoms and signs of envenoming resolved without antivenom therapy on the third day of incident.

## Snakes and venoms

Overall 37 individuals were milked, their average total length was 52.3cm (average: 50.3 cm in males, average: 54.5 cm in females). The average dry weight of venom was 5.5 mg/specimen in the Hungarian adders (average: 4.7 mg in males, 6.2 mg in females), while it was 2.0 mg in *V. nikolskii*, and 6.3 mg in case of the Austrian *V. b. berus*. The average dry weight of venoms was the following in the given age-groups: i) juveniles: 1.9 mg, ii) subadults 4.1 mg, and iii) adults: 7.9 mg.

## Biochemical and experimental studies

There was an unambiguous variation in the number, the location, the abundance, and the intensity of protein bands among the individual venoms, showed by SDS-PAGE electrophoresis. The number of bands varies between 7 and 18, and there was a great predominance of proteins of molecular masses in the expected range of PLA<sub>2</sub>s. Individual analysis of the venom patterns revealed a few gender-specific differences and similarities. The SDS-PAGE protein profile of *V. nikolskii* venom differs from the Hungarian and Austrian *V. b. berus* venoms only in two protein bands.

According to the molecular masses, 9 main protein groups have been detected by MALDI-TOF-MS. The samples gave from 4 to 7 peaks - depends on the individuals - in the molecular weights that vary between 13548.35 and 14340.17 Da. The most intense peaks were at range of 13800 Da in 92 % of venoms. Venom of female adders gave an average 5.1 peaks while males gave 5.3 peaks between 13000 and 15000 Da. The average number of peaks in the different age-groups was 4.8 in juveniles, 5.4 in subadults and 5.3 in adults; the difference was not significant.

The total PLA<sub>2</sub> activities of the individual venoms were also compared. Of the Hungarian specimens, the lowest was 385 kU/mg, the highest 619 kU/mg. The activity of individual samples is differing from each other but this difference was not significant between the age-groups. The control samples showed 546 kU/mg (Austrian *V. berus*) and 431 kU/mg (*V. nikolskii*), respectively. Clear individual variations of the venoms' proteolytic activity were seen on gelatine-zymograms. Certain samples had

relatively strong protease activity while the others had lower activity but majority of the samples had no proteolytic activity.

Limb-paralysis, floppy-neck and irregular respiration developed prior to death on the venom injected mice during LD<sub>50</sub> testing in case of the Hungarian adders but also in *V. nikolskii* venom. Similar neurotoxic symptoms were observed in chicks following the s.c. injection of multiple amount of lethal dose of the Hungarian adder venoms. These paralysing symptoms were lacked in case of the Austrian *V. berus* venom during the LD<sub>50</sub> testing. Comparison between the Hungarian samples and the comparison of Hungarian samples with the Austrian and the *V.nikolskii* venoms regarding to LD<sub>50</sub>, resulted in significant difference.

Venoms from the Hungarian *V. berus* specimens produced a time-dependent, irreversible block of neurotransmission on both type (*ex vivo* and *in vivo*) of frog nerve-muscle preparations.

Six samples were randomly chosen from the Hungarian *V. berus* venoms and as control (Austrian *V. berus* and *V. nikolskii*) venom tested on CBC preparations. All the Hungarian adder venoms caused a time- and concentration-dependent inhibition of twitches induced by stimulation of the motor nerve, except for the sample of one adult female, which had no effect on the CBC preparation. There was no recovery after wash-out of the venom with venom-free physiological salt solution. Responses to Ach, carbachol and KCl were tested after complete twitch block. When venoms from the Hungarian snakes had blocked twitch responses to nerve stimulation, there were little alterations in the responses to ACh, carbachol and KCl. The effects of venom from *V. nikolskii* were similar, while responses to all three stimuli were markedly reduced in preparations exposed to the Austrian *V. b. berus* sample. There were no obvious differences in effects of venoms from snakes of different maturity or sex. In order to test the possibility that the effects of the venoms on neuromuscular function might be associated with venom phospholipase A<sub>2</sub> activity, some experiments were conducted in Krebs-Henseleit solution in which the CaCl<sub>2</sub> had been replaced by SrCl<sub>2</sub>: the venom effects of the Hungarian adders were greatly reduced in Krebs-Henseleit solution. There was little reduction in the responses to nerve stimulation compared to that in time-matched control preparations in Ca<sup>2+</sup>-containing physiological salt solution.

Whole-cell patch-clamp was performed to investigate the effects of a randomly chosen Hungarian adder venom on the glutamatergic synaptic neurotransmission in the central auditory pathway of the rat. When the auditory nerve fibres were stimulated, a prominent excitatory postsynaptic current was recorded. When the brain slices were exposed to the venom for 5 min, the amplitude of the first postsynaptic current decreased from  $-1069 \pm 20.8$  pA to  $-302 \pm 83.8$  pA. The ratio of the second and first PSC amplitude (PPR) was changed from  $0.95 \pm 0.03$  to  $0.78 \pm 0.06$  ( $p= 0.00045$  for the amplitude and  $0.008$  for the paired pulse ratio,  $n= 3$ ). The effect was irreversible.

## Conclusions

Snake venoms are highly complex biologically active and quite plastic mixtures. Their composition can be influenced by several extrinsic and intrinsic factors, as well. These can affect their biochemical and pharmacological properties, resulting in variations in venom composition within the same species, which is well-documented phenomenon for several species. Venom individualities potentially affect the venom protein-profiles and activities and can have consequent clinical implications (WARRELL 1997). Therefore, the primary focus of the dissertation was in determining the individual variation in venom composition and certain venom features of a defined population of *V. berus* in eastern Hungary, where neurotoxic envenomings had been already reported previously.

The average length of milked specimens captured to our research lags behind a bit compares with MARIÁN's (1960) specimens were also collected in the Upper Tisza River Valley.

It is not easy to determine the venom yield of a given species because it is influenced by several intrinsic but also extrinsic factors, as well (NAULLEAU 1984; CHIPPAUX et al. 1991). The published data about the secreted and milked venom amount of this species vary in the available literature (i.e. BROWN 1973; THEAKSTON & REID 1976; BUBALO et al. 2004). In our research, the average amount of the collected 35 individual Hungarian adder venoms is much closer to BROWN's (1973) data. Venom yield averages is also similarly low in case of the specimens derived from the south-western Hungarian lowland *V. b. bosniensis* populations (MALINA et

al. 2011b). Although, we can only hypothesise that elevation can be a determining factor of venom yield in *V. berus*, consequently, specimens from mountain regions may have higher venom yield. On support of this, NAULLEAU (1976) has already showed that lowland populations of *V. aspis* have lower venom yield than that of the mountainous *V. aspis* populations.

A large number of reports have been issued about the clinical aspects of *V. berus* bites since Reid's (1976) pioneering work but most of them are about the envenomings by the nominate subspecies, while the information about envenomings inflicted by the Bosnian subspecies (*V. b. bosniensis*) is quite limited. The first authenticated case reports and clinically oriented papers about unambiguous neurotoxic *V. b. bosniensis* envenomings were published only in the last few years (i.e. WESTERSTRÖM et al. 2010; MALINA et al. 2011b). Up to now, also a few and with little evidence have been published in the early literature (i.e. OTTO 1929; REUSS 1930; FRANCKE 1937) about the neurotoxic envenomings by the nominate subspecies.

The “*Case report 1*” was the firstly documented neurotoxic envenoming inflicted by *V. b. berus* in eastern Hungary. In 2013, the second authenticated published case, namely “*Case report 2*”, presents further unequivocal evidence for the existence of a neurotoxic population of *V. b. berus* in eastern Hungary. Both patients developed unambiguous neurotoxic envenoming: after ptosis, which is the classical early sign of snakebite neurotoxicity (WARRELL 2003), diplopia resulting from paralysis of extraocular muscles is usually the next effect of the descending paralysis typical of snakebite neurotoxicity (MALINA et al. 2008a). While gaze paresis, is one of the most documented and frequent neurological signs of neurotoxic viper envenomings in Europe (GONZÁLEZ 1982; BEER & PUTORTI 1998; FERQUEL et al. 2007; LUKŠTIĆ et al. 2006; LONATI et al. 2009; DE HARO et al. 2009; MALINA et al. 2008a, 2011b; GAFENCU et al. 2012). The case report of two patients described in this Ph.D. dissertation, presented with moderate local symptoms followed by neurological disturbances primarily manifested as dysfunction of certain cranial nerves, provides unambiguous clinical evidence for the existence of neurotoxic *V. b. berus* populations in a restricted geographical area in eastern Hungary.

*Vipera berus* venoms from the same area where the bite by this subspecies caused neurotoxicity on human victims (MALINA et al. 2008a, 2013) rapidly produced cranial nerve involvement and limb paralysis

progressing to complete flaccidity in envenomed mice and chicks. These symptoms were also observed in mice injected with the control venom of *V. nikolskii* but not in case of the Austrian *V. b. berus* venom. It has been recently shown that neurotoxic PLA<sub>2</sub>s are responsible for the botulinum-like flaccid paralysis in viper envenomations (RIGONI et al. 2008) and was described on mice in other viperid taxa, e.g. in the venom of *Azemipos feae* (VEST 1985), or in case of *Bothrops neuwiedi* venom, as well (BORJA-OLIVEIRA et al. 2007).

The unresponsiveness of both types (*ex-vivo* and *in-vivo*) of frog nerve-muscle preparations to the exogenously applied Ach, is evidence for the prejunctional venom action (HARVEY et al. 1994) as well as the ineffective washing with venom-free physiological solution, which did not led to recovery similarly observed on CBC preparations discussed, below.

All Hungarian adder venoms had neuromuscular effects (except one) on CBC preparations. These caused rapid and irreversible prejunctional block of neuromuscular transmission but each sample was different in the intensity of neuromuscular effects, mirrored in response of CBC preparations to the exogenous chemical and electrical stimuli. Certain Hungarian venom samples showed negligible myotoxic activity, based on the reduced twitches to direct electrical stimulation and/or the reducing response to KCl (HARVEY et al. 1994). Typically, prejunctional block is associated with PLA<sub>2</sub> activity in the venoms and this was consistent with the loss of paralysing activity in experiments in which Ca<sup>2+</sup> was replaced with Sr<sup>2+</sup>. The Austrian *V. berus* venom had only myotoxic activity, while *V. nikolskii* venom also had neurotoxic activity that was prejunctionally active in nature corresponding to the study of RAMAZANOVA et al. (2008) and also showed some myotoxic activity, as well.

The strong, irreversible inhibitory venom effect on excitatory postsynaptic currents in the glutamatergic synapse of rat brainstem is a further evidence of the effect on synaptic neurotransmission, presynaptic side (ZUCKER & REGEHR 2002). Snake venom neurotoxins predominantly affect the peripheral nervous system but our results show that certain viper neurotoxins can act on non-cholinergic synaptic transmission in the CNS *in vitro*; such as the venom of the Russell's viper (*D. russelii*) is able to block non-cholinergic (dopamine, serotonin, norepinephrine) synaptic transmissions (HARVEY 1984).

We could show that these eastern Hungarian adders have developed marked variable individual venom phenotypes, which are reflected not only in their electrophoretic venom pattern but also in protease and PLA<sub>2</sub> activity and LD<sub>50</sub>. We could detect significant heterogeneity in the PLA<sub>2</sub> content of venoms by MALDI-TOF MS. This phenomenon has already been known in case of other *Vipera* species (FERQUEL et al. 2007). The variation of this toxin group (group II PLA<sub>2</sub>s) is thought to be responsible for the different symptoms in patients envenomed by snakes from different regions and has great relevance from clinical and toxicological point of view (WARRELL 1997; MUKHERJEE et al. 2000; FERQUEL et al. 2007).

The taxonomy of certain members within the *V. berus*-complex is not yet completely established and there are still some open questions (JAGER et al. 1997). On the basis of our results, the neurotoxin-content of venom of the members from *V. berus*-species group is not a consistent indicator of taxonomic sub-divisions as others, e.g. RAMAZANOVA et al. (2008) mentioned it, e.g. in case of *V. nikolskii* and *V. berus*. In addition, the protein pattern of *V. nikolskii* is very similar to that of *V. b. berus* and, the venom of *V. nikolskii* and the *V. b. berus* specimens deriving from the studied native population, possesses neurotoxic activity. On account of the above, we believe that the taxonomic revision of the sister taxon, *V. nikolskii* (formerly *V. b. nikolskii*) might be indicated in the near future.

Take into consideration the evolution of PLA<sub>2</sub>s of the European *Vipera* and the phylogeography of *V. berus* – as the Carpathian Basin was one of refugia of *V. berus* and the eastern Hungarian adders belong to an early evolutionary subclade – it can be hypothesized that the neurotoxic activity of their PLA<sub>2</sub>(s) can be an ancient venom character, which maybe lost at most of the centre and the northern geographic distribution of the species during venom evolution. While some of these genes recruited or retained in those *V. berus* populations, i.e. Carpathian subclade and the Balkan subclade, which compose the basal lineage of the phylogenetic hierarchy. This hypothesis could be an explanation for those convincing evidence as neurotoxic envenomings inflicted by *V. b. berus* have been mainly reported from the Carpathian basin (i.e. in eastern Hungary, Transylvania and south-western Romania) and the territory of *V. b. bosniensis*.

## Bevezetés

A keresztes vipera (*Vipera berus*) a legelterjedtebb mérgeskígyó; elterjedési területe majdnem a teljes Palearktikumra kiterjed (SAINT GIRONS 1980; CARLSSON 2003). Jelenlegi taxonómiai státuszuk alapján három alfaját különböztetik meg: a nominális alfajt, *Vipera berus berus*, a Szachalin-szigeti keresztes viperát (*Vipera berus sachaliensis*), és a balkáni vagy boszniai alfajt a *Vipera berus bosniensis* (CARLSSON 2003; NILSON et al. 2005).

Magyarország herpetofaunájához csak két mérgeskígyó faj sorolható, a keresztes vipera (*V. berus*) és a rákosi vipera (*V. ursinii rakosiensis*). Hazánkban a *V. berus* eddig három fő és egymástól elkülönülő régióból írták le (KORSÓS & KRECSÁK 2005): 1) a nominális alfaj (*V. b. berus*) az északkeleti tájegységben honos (Zempléni-hegység, Eperjes-Tokaji hegylánc (JANISCH 1979, 1987)) valamint keleten 2) a Felső Tisza-háton (AGÓCSY 1958; MARIÁN 1960; JANISCH 1979, 1987). A mitokondriális DNS vizsgálatok alapján ez a két populáció két különböző evolúciós kládhoz tartozik (KALAYABINA-HAUF et al. 2004). A balkáni vagy boszniai keresztes vipera (*V. b. bosniensis*) megtalálható 3) Délnyugat-Magyarországon, Somogy (MARIÁN, 1956; DELY & MARIÁN 1960, DELY 1978, JANISCH 1979, 1987; KORSÓS & KRECSÁK 2005) és Zala megyében (FEJÉRVÁRY 1923; JANISCH 1979, 1987). A *Vipera berus*nak az északkeleti régióban a legnagyobb az elterjedési területe és nagyon valószínű, hogy a Zempléni-hegységben élnek a legnagyobb egyedszámú populációk. A faj fokozottan védett Magyarországon. Hazánkban a faj a fentebb említett régiókban a számára megfelelő élőhelyeken mindenütt megtalálható, leginkább erdőszegélyek mentén, erdei vágásokban, fás, bokros réteken, szedres rézsűkben, továbbá lápos területeken, zsombékosokban, bokorfüzesekben és égerlápok szélein is előfordul (MARIÁN 1956, 1960; DELY 1978; JANISCH 1987). A forró, száraz körülményeket nem kedveli, míg kánikulában többnyire passzív vagy csak a kora reggeli órákban és kora este aktív (MARIÁN 1956). A *V. berus* október végén, november elején hibernálódik, és ebből általában márciusban ébred (MARIÁN 1956; ÚJVÁRI et al. 2001), amikor a levegő nappali maximum-hőmérséklete tartósan 10–12 °C körül alakul (MARIÁN 1956). Csak néhány leközölt adat lelhető fel a *V. berus* magyarországi elterjedési területén belül preferált táplálékbázisról. A

kifejlett *V. berus* természetes tápláléka leginkább kisércsálókból (*Apodemus sp.*, *Microtus sp.*, *Arvicola sp.*) és rovarevő emlősökből áll (*Sorex sp.*), de szintén tartalmaz bizonyos békafajokat (i.e. *Rana dalmatina*, *R. arvalis*), míg a juvenilis egyedek fiatal példányait fogyasztják a *Zootoca viviparanak*, *Lacerta agilis*nek, and *Triturus vulgaris*nak (MARIÁN 1956, 1957, 1960).

A kígyómérgek fajon belüli változékonyságát tudományos körökben nagy érdeklődés övezi, mind ökológiai, kemotaxonómiai, kliniko-epidemiológiai de ellenszérum gyártás szempontjából is jelentőséggel bír (WÜSTER et al. 1999; BARLOW et al. 2009). Ezek a mérgeösszetételbeli variációk különböző taxonómiai szinteken figyelhetők meg, pl. regionálisan különböző populációk között, ideértve az alfajok közötti és alfajon belüli méregelegy változékonyságát, amely magába foglalja az ivarspecifikus, a táplálék/élőhely-függő, a szezonális és az ontogenetikus mérgeösszetételbeli különbségeket (CHIPPAUX et al. 1991; SASA et al. 1999; WÜSTER et al. 1999). Az elérhető táplálékbázishoz való alkalmazkodás eredményeként a fajon belüli mérgeösszetétel jelentősen változhat, amely a különböző régiókban bekövetkezett kígyómarások eltérő klinikai képében is megfigyelhető (CHIPPAUX et al. 1991; DALTRY et al. 1997; BELT et al. 1997; FERQUEL et al. 2007; BARLOW et al. 2009; BABOCSAY 2010).

Az európai viperák mérge meglehetősen összetett, számos enzim egyvelege alkotja. A foszfolipázA<sub>2</sub>-es (PLA<sub>2</sub>) molekulák közül a poszt- és preszinaptikusan aktív neurotoxinok pl. az ammodytoxin különböző izoformjai és a vaspin a legjelentősebbek, amelyek hatása a megmart személyek perifériás idegrendszerére korlátozódik (FERQUEL et al. 2007; JAN et al. 2007). Európában, az egyedfüggő mérgevariációk már ismertek a *V. aspis*nál (DETRAIT & DUGUY 1966), a *V. latastein*él (AREZ et al. 1994) és a *V. ammodytes*nél (HALASSY et al. 2011).

Egész Európában vélhetőleg a *V. berus*nak a legnagyobb a klinikai jelentősége a monofiletikus *Vipera genus*ból, óriási elterjedési területe és az általa okozott igen gyakori marások miatt (PERSSON 1995). A fajnak három, filogenetikailag különböző fő kládja ismert (URSENBACHER et al. 2006). Tekintettel egy adott kígyófaj regionális mérgevariációinak jelentőségére (SAINT GIRONS & DETRAIT 1992; DALTRY et al. 1997; BARLOW et al. 2009), a mérgeösszetételbeli változékonyság potenciális jelentősége a *V. berus*nál valószínűleg óriási, ha figyelembe vesszük a filogenetikailag különböző

kládjait is. Bár az elmúlt 20 évben a *V. b. berus* méregösszetételét széles körben tanulmányozták, de csak bizonyos állományok mérget vizsgálták a keleti filogenetikai alcsoportból (SIIGUR et al. 1979; NEDOSPASOV & RODINA 1992; KRIŽAJ et al. 1993; CALDERÓN et al. 1994; MALENEV et al. 2007; RAMAZANOVA et al. 2008), továbbá a nyugati alcsoport néhány populációjának mérgeinek tulajdonságait kutatták (SAINT GIRONS & DETRAIT 1992; GUILLEMIN et al. 2003). Egyetlen (MEBS & LANGELÜDDEKE 1992) tanulmány használt kutatásához a közép-európai alcsoportéhoz tartozó állományból (URSENBACHER et al. 2006) származó mérget, míg a mérge-sajátosságokat a *V. berus* egyéb alcsoportjainál eddig még nem tanulmányozták. A fentebb említett és eddig bevizsgált *V. berus* mérgek bizonyítottan ödémát indukáló, antihemostaticus, antikoaguláns, fibrinolitikus, proteolitikus, haemorrhagikus hatásúak és myotoxikus aktivitással rendelkeznek (SAINT GIRONS & DETRAIT 1978; MEBS & LANGELÜDDEKE 1992; CALDERÓN et al. 1993). Számos szerző szerint a *V. b. berus* mérge mentes a neurotoxinoktól (KRIŽAJ et al. 1993; JAN et al. 2002; GUILLEMIN et al. 2003; RAMAZANOVA et al. 2008; DE HARO et al. 2009; MAGDALAN et al. 2010). Mégis, olykor beszámolnak neurológiai tünetekről, egyes *V. berus* állományhoz tartozó egyedek által okozott marások után (WARRELL 2011). Jóllehet, az 1930-as évek óta ismert, hogy a *V. b. bosniensis* mérge képes neurológiai tüneteket okozni, amelyek között a kraniális idegek diszfunkciója dominál (SCHÖTTLER 1938). Az utóbbi években újabb eseteket publikáltak egyértelműen neurotoxikus *V. b. berus* marásokról (i.e. CISZOWSKI & MODLA 2004; GAFENCU et al. 2012). Ezek az eset tanulmányok egyértelműen arra utalnak, hogy bizonyos *V. b. berus* populációk mérge tartalmazhat neurotoxint(okat).

Mostanáig egyetlen tanulmány sem tűzte ki céljává a magyarországi elterjedési területen belül honos *V. b. berus* állományok mérgeinek vizsgálatát. Ez egy fontos feladat, hiszen a magyar *V. b. berus* populációk a kárpáti alcsoportéhoz tartoznak (KORSÓS 2007), amely egy ősi filogenetikai vonal (URSENBACHER et al. 2006). A méregösszetételbeli különbségeknek potenciális jelentősége van a filogenetika és az intraspecifikus mérgevariációk közötti kapcsolat megértésében (CHIPPAUX et al. 1991), valamint a különböző régiókban bekövetkezett, de egyazon taxon különböző állományához tartozó egyedek által megmart személyeken jelentkező eltérő klinikai kép megértésében.

## Célkitűzések

A jelen Ph.D. értekezés három fejezetből áll. Mindegyik fejezet a szerző impact faktoros lapokban már leközöltetett cikkeinek, valamint jelenleg preparálás alatt álló kéziratainak eredményein alapul.

**1. Fejezet.** A *V. berus* Európában rendkívül széles körben elterjedt, több marást okoz, mint bármely más faj a *Vipera genus*ből. Magyarországon, a hazai *V. berus* által okozott mérgezés relative ritka, más európai országban előforduló esetek számához képest. Néhány eset a “megszokottól” eltérően komolyabb következményekkel járhat a lehetséges méregösszetételbeli változékonyságnak köszönhetően, amely akár egyedülálló és sürgősségi betegellátást igénylő szituációkhoz vezethet. Ez a fejezet mind epidemiológiai, mind a marások valós jelentőségének szempontjából vizsgálva tekinti át a *V. berus* által okozott hazai baleseteket.

**2. Fejezet.** A *V. berus* által okozott mérgezések jellegzetes szisztémás tünetekkel járnak, ideértve a korai “anafilaktikus” tüneteket (i.e. tachycardia és a gastrointestinalis tünetek), a szédülést, vérnyomásesést, sokkot, véralvadási zavarokat és a neutrophil leucocytosist. Ezek a tünetek hasonlítanak a *V. aspis* által okozott marások tüneteire, tükrözve a méregösszetételükben rejlő hasonlóságokat. Európában eddig szisztémás idegmérgezést, egyes *V. aspis* és *V. ammodytes* állományokhoz tartozó marásoknál jegyeztek fel, amelyet mérgük pre-szinaptikusan vagy post-szinaptikusan ható neurotoxikus foszfolipáz A<sub>2</sub> aktivitásának tulajdonítanak. Mindazonáltal a neurotoxicitás az egyik legszokatlanabb és nemvárt kliniai megnyilvánulása a *V. berus* marásoknak. Ebben a fejezetben két kelet-magyarországi neurotoxikus *V. berus* maráreset kerül bemutatásra, áttekinve az irodalomban fellelhető ámde rendkívül ritka és némileg ismeretlen jelenséget.

**3. Fejezet.** Mivel a taxon intraspecifikus méregösszetételbeli változékonyságának köszönhetően számottevő klinikai jelentőséggel bír, az értekezés harmadik célja volt, hogy kísérleti úton és biokémiai módszerekkel mutassa be a méregegyben rejlő egyedi változékonyságot egy adott kelet-magyarországi populációból származó *V. b. berus* egyedénél. Ez segítheti méregösszetételük bonyolultságának és a megmártakon jelentkező tünetek megnyilvánulásának jobb megértését, és végsősoron a jelenség evolúciós és taxonómia tisztázását.

## **Anyag és módszer**

### **Adatgyűjtés a marásokról**

A magyar szakirodalom átnézése: cikkek beszerzése orvosi könyvtárakból és hazai amatőr (hobby) illetve szakképzett hullószakértők magán könyvtárából, valamint az élet- és orvostudomány szakterületeit magába foglaló elektornikus adatbázisokból úm. Medline és PubMed, továbbá a Google kereső segítségével. Az egyik viperamarás bemutatása a saját klinikai tapasztalatom, amely előzőleg már leközlésre került (i.e. MALINA et al. 2008a). A másik, szintén leközlött klinikai jelentés (i.e. MALINA et al. 2013) az osztályos feljegyzésen és a beteg eredeti kórházi zárójelentésén alapszik, amelyet a Szatmár-Beregi Kórház (Fehérgyarmat, Kelet-Magyarország) Gyermekosztályától kaptunk a Kórházigazató engedélye mellett.

### **A mérég begyűjtése és tárolása**

Az összes kelet-magyarországi *V. b. berus* mérégminta begyűjtése a terepen (Felső Tisza-hát, Kelet-Magyarország) történt, mindkét nemtől és egészséges egyedektől a 2010-2012-es tavaszi szezon közepén, elkerülvén a szezonális különbségekből adódó lehetséges mérégösszetételbeli variációkat. A kígyók hossza a mérég lefejtése után lemérésre és feljegyzésre került, majd a befogás helyszínén visszanyerték szabadságukat. Csak egyedi mérégmintákat (és nem több egyed elegyített mintáját) használtunk az egyedi mérégvariációk vizsgálatánál, CHIPPAUX et al.' (1991) ajánlása alapján. A lefejt mérgeket felhasználásukig sötét helyen -80 °C-on tároltuk. A mérégminták begyűjtése az Országos Környezetvédelmi, Természetvédelmi és Vízügyi Főfelügyelőség engedélyének kiadása mellett történt (No.: 14/1690-4/2010). Két mérégmintát használtunk kontrollként, amelyek olyan területről származtak, ahonnan eddig még nem jelentettek neurotoxikus tüneteket okozó viperamarásokat: egy nem neurotoxikus *V. b. berus* mérégminta az osztrák Alpokból (Ybbs Hegység), melyet 2006 késő májusán gyűjtöttek, valamint egy 2009 kora májusában a közép-ukrajnai régióban (Pidlisne) gyűjtött *V. nikolskii* mérégminta.

## **Korlátozások**

A faj jelentősen alacsonyabb méreghozammal rendelkezik, mint más trópusi és szubtrópusi viperaféle. Figyelembevétel, hogy a méregtermelést és a sikeres méregfejést számos tényező befolyásolja (CHIPPAUX et al. 1991), így kutatásunk során az egyes kísérleteinkhez és biokémiai vizsgálatainkhoz felhasznált méregminták nem minden esetben származtak ugyanazon példányoktól.

## **A fehérjetartalom meghatározása**

A fehérje koncentráció meghatározása BRADFORD (1976) módszere alapján történt.

## **Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)**

Azért, hogy a fehérjék molekuláris tömegét megbecsülhessük, az egyedi nyers (nem tisztított) méregmintákat először SDS-PAGE technikával szétválasztottuk (LAEMMLI 1970). Az SDS-PAGE statisztikai elemzésénél az egyéni mintákban és a két kontroll mintában fellelhető a band-eket (sávok) csoportosítottuk, ezeket összesen nyolc csoportba soroltuk (juvenilis nőstény, juvenilis hím, sub-adult nőstény, sub-adult hím, adult nőstény, adult hím és az osztrák *V. b. berus* valamint a *V. nikolskii*, mint control minta). A band-ek osztályozása: jelen volt (1), illetve nem volt jelen (0) az adott mintában. A hierarchikus clusterezés SYN-TAX 2000 programcsomaggal készült.

## **Tömegspektrometriás vizsgálat (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry/MALDI-TOF-MS)**

A tanulmány során az egyedi nyers méregmintákon végzett MALDI-TOF tömegspektrometriás méréseket FAVREAU et al. (2006) módszere alapján végeztük.

## **Foszfolipáz A<sub>2</sub> aktivitás vizsgálata**

A foszfolipáz A<sub>2</sub> aktivitásának mérését SANTORO et al. (1999) módszerét követve végeztük. A kapott értékeket MATLAB (Verzió 7.7.0471 (R2008b)) statisztikai analízissel elemeztük majd egyutas ANOVA-val hasonlítottuk össze.

## **Proteáz aktivitás/zselatin-zymográfia**

Zselatin-zymográfiát HASSON et al. (2004) és MALTA et al. (2008) ajánlása alapján a proteáz aktivitás megbecsüléséhez alkalmaztunk.

## **A mérég toxicitásának meghatározása (LD<sub>50</sub>) egereken és *in vivo* kísérlet napocsirkén**

Az összes állatkísérletet a Debreceni Egyetem engedélye mellett végeztük. A toxicitás meghatározásánál előzőleg THEAKSTON & REID (1983) által leírt protokolt követtük Swiss-Webster, hím egereken. Négy egyed mérégmintáját véletlenszerűen választottuk ki a kelet-magyarországi viperek mintái közül és teszteltük a control mintákkal egyetemben, a következő dózisosokban: 1.0; 0.8; 0.7; 0.6; 0.5; 0.4; 0.3; és 0.25 µg/g i.v. A control egereket mérégmentes fiziológiás oldattal oltottuk be. LD<sub>50</sub> kalkulációjához probit analízist alkalmaztunk Minitab 16 software segítségével. A csirkéket (6-8 napos hímek) subcután (s.c.) oltottuk be higítatlan méréggel (20 µl, száraztömeg ismeretlen), majd a kialakuló tüneteket megfigyeltük és feljegyeztük.

## **Béka ideg-izom preparátum**

Kifejlett kecskebékákat (*Pelophylax* kl. *esculentus*) használtunk a kísérlethez. A béka ideg-izom preparátumok (FNM) a *nervus ischiadicus* és a *musculus gastrocnemius*-ból készültek SCHÖTTLER (1938) módszere alapján.

## **Neuromuscularis vizsgálatok csirke *biventer cervicis* (CBC) preparátumon**

A csirke *biventer cervicis* (CBC) preparátumok érzékenyen reagálnak a kígyómérgekben található neurotoxinokra, és lehetővé teszik a prejunkcionális hatások postjunkcionális hatásoktól való elkülönítését (HARVEY et al. 1994). A preparátumok elkészítése és méreggel való tesztelése HARVEY et al. (1994) módszere alapján történt. Néhány kísérletnél, a preparátumokat felállítás után Krebs-Henseleit oldatba helyeztük, amelyben a  $\text{CaCl}_2$ -ot kicseréltük  $\text{SrCl}_2$ -ra (HARVEY & KARLSSON 1982).

## **Elektrofiziológias kísérlet patkány agytörzsi neuronokon**

Ahhoz, hogy a mérég lehetséges neurotoxikus hatását vizsgáljuk, egy nem-kolinerg szinaptikus áttétet választottunk, ezen tanulmányozva a mérég hatását. Ez a szinaptikus áttét a hallóideg glutamaterg idegvégződéseit képezi és a patkány központi hallópályáján a coheráris nukleust alkotja (WANG & MANIS 2008). A kísérleteket 10-14 napos Wistar patkányok agytörzsi, paraszagittálisan vékonyan metszett cikkejein végeztük. Az adatok kinyerése Clampex és Fetchex 6.0 software-rel történt. Az adatok analíziséhez Clampfit 9.0 programot használtunk. Az analízis során *paired-pulse-ratio*-t (PPR) számoltunk, mint az amplitúdók hányadosát a második és az első posztzinaptikus jelként (ZUCKER & REGEHR 2002). Az adatokat átlagolva jelentettük meg  $\pm$  SEM. A statisztikai szignifikancia meghatározásához a Student-féle kétmintás t-próbát alkalmaztuk. A szignifikancia szint 0.05 volt.

## Eredmények

### Epidemiológiai adatok

Magyarországon csak a *V. berus*nak lehet orvosi és toxikológiai jelentősége (MALINA et al. 2011a). Noha a *V. ursini* is, orvosi szempontból Magyarországon, mint egy fontos fajt jegyzik (WHO 2010), de az általa okozott mérgezések elhanyagolhatók a *V. berus* által okozott marásokhoz képest (KRECSÁK et al. 2011).

Meglehetősen kevés a Magyarországon előfordult *V. berus* marásokról megjelent tanulmányok száma. Ezek legtöbbje magyarul íródott és a korai szakirodalmat képezi (i.e. MARIÁN 1952, 1956; DOLECSKÓ 1964; ANONYMOUS 1964b; MAJOR 1965; KOLLÁR 1979; VIRÁGH & TASS 1986). Az iméntiek miatt ezek az anyagok a *V. berus* marásokról nem tartalmazzák a legújabb ismereteket a hazai sürgősségi betegellátó orvosok és klinikai toxikológusok számára (MALINA et al. 2012). Ráadásul a faj hazai elterjedési területén honos egyes *V. berus* populációk marásának következményeiről a mai napig nem tudunk semmit, e.g. Zala megyében élő populációk, vagy, csak az elmúlt néhány évben jelentek meg részletes esetleírások és klinikai dokumentációk bizonyos populációkhoz tartozó egyedek marása által indukált mérgezésekről (i.e. MALINA et al. 2008a, 2011, 2012, 2013). Bár, készült egy előkészítő országos tanulmány a *V. berus* mérgezésekről (i.e. MALINA 2011), de jelenleg nincs pontos epidemiológiai adat a Magyarországon elforduló *V. berus* marásokról. Azonban kétségtelen, hogy mind a *V. berus*, mind a *V. ursini* marások Magyarországon relative ritkák (MALINA et al. 2008b; 2012). Összehasonlítva a hazai *Vipera* esetek következményeit és gyakoriságát a fogságban tartott egzotikus fajok által gyakorra elszendvedett marásokkal – melyet főleg a trópusi és szubtrópusi viperafélék okoznak (MALINA et al. 2008b; MALINA & KRECSÁK 2008) –, megállapítható, hogy ezen marásetek kezelése jóval nagyobb kihívást jelent a hazai orvosoknak, mint a hazánkban honos két viperafaj marása (MALINA et al. 2008b).

## Esetbemutatók Kelet-Magyarországról

Az alábbi két esetbemutató (a Felső Tiszathátról származik) előzőleg leközlésre került MALINA et al. (2008a, 2013) által.

*Eset 1.* 2007 április 23-án Szabolcs-Szatmár-Bereg megyében, egy előzőleg egészséges, 27 éves férfit mart meg egy kifejlett nőstény *V. berus*, melynek teljes hossza 70-72 cm volt. A kígyót befogáskor szakszerűen azonosították. A marást elszenvedettnek előző kígyómarása nem volt. A beteget kórházba szállították. Feszés, fájdalmas duzzanat bontakozott ki, amely az egész kezet és a csuklót is érintette. Az erithaema enyhe volt, a fognyomok körül helyi bevérzés alakult ki. Tipikus szisztémás tünetek jelentkeztek – ú.m. heves hasmenés, egy epizódbeli hányinger, erős szédülés és emelkedett szívfrekvencia – néhány igen szokatlan és ritka tünettel: magas és fluktuáló vérnyomás, valódi vertigo fekvő pozícióban, és egyértelmű idegmérgezés. Ez utóbbihoz hirtelen kialakult kettős látás (diplopia) tartozott, amelyhez határozott strabismus társult – a második kép eltűnt amikor az egyik szemet letakarták –. A beteg járása bizonytalanak tűnt. A leukocitaszám enyhén tért el a normálistól, míg a véralvadási paraméterek és a vizelet rendben voltak. A marást követően a diplopia 11 órán keresztül fennállt és spontán szűnt, az intenzív szédülés 2 nap alatt szűnt meg teljesen. A kézfej a harmadik napon is enyhén livid színeződést mutatott. A mérsékelt odaema a negyedik napra oldódott. A megmart kéz kéztőcsontjainak és ujjperceinek fájdalmas arthralgiája 8 naping fennállt.

*Eset 2.* 2012 május 2-án, Túristvándiban egy előzőleg egészséges 12 éves leányt egy kígyó mart meg. Az állatot egy mobiltelefonnal lefotózták. Később a Budapesti Állatkert egyik állatgondozója *V. b. berus*ként azonosította. A korrekt fajmeghatározást a Hortobágyi Nemzeti Park egyik természetvédelmi őre is megerősítette. A leányt kórházba szállították. Előző marása nem volt, allergiája nem ismert. Lokális tünetként lüktető fájdalom, és hyperaemiás duzzanat jelentkezett, amely az egész kézre kiterjedt. A kórházba való szállítás során a beteg álomosságra és hányingerre panaszkodott. A felvétel során sápadt és elesett volt, képtelen volt állni. A szisztémás tünetek közül hányinger, erős szédülés jelentkezett szapora pulzussal. A pupillái mérsékeltlen dilatáltak voltak, enyhe akkomodációs zavart észleltek. A beteg szemmozgatási nehézségekről számolt be. Oculomotorikus paralizist diagnosztizáltak következményes bilaterális

gyengüléssel és egyértelmű de részleges ptosisal, bár a beteg szemét kérésre képes volt kinyitni. A tekintetbénulást megerősítették, egyéb craniális idegbénulás vagy további neurológiai deficit nélkül. Az APTI és TT értékek növekvő trendet mutattak, de mindvégig a normális tartományban maradtak. A mérgezés összes klinikai tünete és jele szérumerápia nélkül megszűnt a balesetet követő harmadik napra.

## **Kígyók és méreg**

Összesen 37 példány lett lefejve, melyek átlagos hossza 52,3 cm volt (átlag: 50,3 cm a hímeknél, átlag: 54,5 cm a nőstényeknél). A méreg átlagos száraz tömege 5,5 mg/egyed a magyar viperák esetében (átlag: 4,7 mg a hímeknél, 6,2 mg a nőstényeknél), míg ez 2,0 mg volt *V. nikolskii*, és 6,3 mg az osztrák *V. b. berus* méreg esetében. A méregek átlagos száraz tömege az egyes korcsoportokban a következő volt: i) juvenilis: 1,9 mg, ii) subadult 4,1 mg, és iii) adult 7,9 mg.

## **Biokémiai és kísérleti tanulmányok**

Egyértelmű individuális különbségeket taltálunk az egyes méregminták között az SDS-PAGE futtatás során a fehérjesávok számában, elhelyezkedésében, mennyiségében és intenzitásában. A sávok száma 7 és 8 között változott, és óriási túlsúlyban találtunk fehérjéket a PLA<sub>2</sub>-ók várt molekulatömeg tartományában. Az egyedi méreg lenyomatok elemzésével sikerült némi ivar-függő különbséget és hasonlóságot is kimutatnunk a méregösszetételben. A *V. nikolskii* mérgeének SDS-PAGE fehérje profilja mindössze két fehérje sávban tér el a magyar, és az osztrák *V. b. berus* méregösszetételétől.

A molekulatömeg szerint, 9 fehérje csoportot azonosítottunk a MALDI-TOF tömegspektrometriás mérések során. A minták 4-től 7-ig adtak a "csúcspot" – az adott egyedtől függően – a 13548,35 és a 14340,17 Da-os molekulatömeg tartományban. A legintenzívebb csúcspotokat a minták 92%-ánál a 13800 Da-os tartományban azonosítottuk. A nőstény viperák mérgeének spektrogramja az 13000 és 15000 Da-os molekulatömeg tartományban átlag mintegy 5,1 csúcspot, a hímeké 5,3-mat tartalmazott. Az egyes korcsoportokban a spektrogramok csúcseinak átlageloszlása a

következőképpen alakult: 4,8 a juveniliseknél, 5,4 a sub-adultaknál és 5,3 az adultaknál; a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns.

A minták egyedi, teljes PLA<sub>2</sub> aktivitását is összevetettük egymással. A magyar minták közül a legalacsonyabb aktivitású 385 kU/mg, míg a legmagasabb 619 kU/mg volt. Az egyes minták aktivitása az adott korcsoportban eltért egymástól, azonban ez nem volt szignifikáns különbség. A kontrol minták esetén 546 kU/mg-ot (osztrák *V. berus*) és 431 kU/mg-ot (*V. nikolskii*) mértünk. Nyilvánvaló egyedi különbségeket találtunk a méregminták proteolitikus aktivitásában a zselatin-zymogramokon. Egyes mintáknak viszonylag alacsony, másoknak magas proteolitikus aktivitása volt, de a legtöbb minta nem rendelkezett proteolitikus aktivitással.

Az LD<sub>50</sub> teszt során a leoltott egereken végtagbénulás, a fej-nyaki régió petyhüdt bénulása és szabálytalan légzés jelentkezett mind a magyar viperek mérgeinek beadása után, de a *V. nikolskii* méreggel való injekciózás után is. Hasonló neurotoxikus tüneteket figyelhettünk meg a hazai viperaméreg letális dózisének többszörösével subcutan leoltott csirkéken is. A fenti bénulásos tünetek hiányoztak az osztrák *V. berus* mérge LD<sub>50</sub> tesztelése során. A magyar minták LD<sub>50</sub> értékét összehasonlítva az osztrák és a *V. nikolskii* mérgeinek LD<sub>50</sub> értékével szignifikáns különbséget kaptunk.

A magyarországi *V. berus* egyedek mérge az eltelt idő függvényében a neurotranszmisszió irreverzibilis blokkolását eredményezte a kísérleteinknél használt mindkét típusú (*ex vivo* és *in vivo*) béka ideg-izom preparátumon.

Hat méregmintát véletlenszerűen választottunk ki a hazai *V. berus* minták közül, valamint a két kontrolt (osztrák *V. berus* és *V. nikolskii*) a CBC preparátumokon való teszteléshez. Az összes hazai méregminta idő- és koncentráció függvényében gátolta az izomösszehúzódást a mozgatóideg stimulációja során, kivéve egy felnőtt nőstény példány mérgeét, amelynek semmiféle hatása nem volt a CBC preparátumon. A preparátumok működése a tesztelés után a mérgegmentes fiziológiás oldattal való mosás után sem állt helyre. Az izomösszehúzódás teljes blokkolása után a preparátumok válaszadását teszteltük Ach-ra, carbachol-ra és KCl-ra. Amikor a hazai minták által volt blokkolva a preparátumok izomösszehúzódása, miközben idegstimulációt alkalmaztunk, csak csekély változást lehetett megfigyelni a preparátumok válaszadásában, amelyet az ACh-ra, a carbachol-ra és a KCl-ra adtak. A *V. nikolskii* mérgeinek hatása hasonló volt a fentiekhez, míg az osztrák *V. b. berus* mérge esetében a preparátum válaszadása mind a három

stimulusra jelentős mértékben csökkent. A két ivar, valamint az egyes korcsoportok között sem találtunk nyilvánvaló eltérést a tesztelt mérégminták neuromuscularis hatását tekintve. Azért, hogy ellenőrizzük a mérgek PLA<sub>2</sub>-vel kapcsolatos és lehetséges hatását, amelyet a neuromuscularis funkcióra fejt ki, néhány kísérletet Krebs-Henseleit oldatban végeztünk el, amelyben a CaCl<sub>2</sub>-ot SrCl<sub>2</sub>-dal helyettesítettük: a magyar viprák mérégmintáinak hatása nagy mértékben csökkent a Krebs-Henseleit oldatban. Csekély csökkenést tapasztaltunk a preparátumok válaszadásában idegstimulációkor amikor ezeket összehasonlítottuk a kontrol-preparátumokkal, amelyeket Ca<sup>2+</sup>-ot tartalmazó fiziológiás oldatba merítettünk.

Whole-cell patch-clamp technikát alkalmazva vizsgáltuk egy random kiválasztott hazai mérégminta hatását patkány agytörzsi glutamáterg szinaptikus neurotranszmisszió. A hallóideg rostokat stimulálva egy kiugró excitatorikus posztzinaptikus jelet rögzítettünk. Amikor az agytörzsi metszeteket 5 percig a mérég hatásának tettük ki, az első posztzinaptikus áram amplitudója lecsökkent ( $-1069 \pm 20.8$  pA to  $-302 \pm 83.8$  pA). Az első és második PSC amplitudójának (PPR) értéke 0.95-ről ( $\pm 0.03$ ) 0.78-ra ( $\pm 0.06$ ) változott ( $p = 0.00045$  az amplitudóra vonatkoztatva, míg “*paired pulse*” értéke 0.008;  $n = 3$ ). A hatás irreverzibilis volt.

## Következtetések

A kígyómérgék rendkívül összetett, biológiailag aktív és meglehetősen plaztikus természetű elegyek. Összetételüket számos külső és belső tényező befolyásolhatja. Ezek faktorok képesek befolyásolni a méreg biokémiai és farmakológiai tulajdonságait is, ezzel előidézve a mérgeősszetétel fajon belüli változékonyságát, amely számos fajnál egy már jól dokumentált és megfigyelt jelenség. A méreg egyedi jellegei potenciálisan érintik a méreg fehérje-profilját és aktivitását, amely következményes klinikai jelentőséggel bír (WARRELL 1997). Éppen ezért, a disszertáció elsődlegesen az egyedi mérgevariációk és bizonyos mérgeősszetételbeli tulajdonságok meghatározására fókuszált egy adott kelet-magyarországi területen honos *V. berus* populációból származó egyedektől nyert mérge mintáknál, amely területről előzőleg már beszámoltak neurotoxikus marásokról.

A kutatáshoz befogott és lefejt példányok átlagos hossza némiképp elmaradt MARIÁN (1960) által, szintén a Felső-Tisza vidékén gyűjtött egyedek hosszához képest.

Nem könnyű meghatározni egy adott faj mérge termelését, hiszen ezt is számos külső és belső tényező befolyásolja (NAULLEAU 1984; CHIPPAUX et al. 1991). A publikált adatok alapján, mely az irodalomban fellelhető (i.e. BROWN 1973; THEAKSTON & REID 1976; BUBALO et al. 2004), a faj által szekretált és lefejhető méreg mennyisége különbözik. Kutatásunkban a 35 befogott magyar viperának a lefejt átlagos mérge mennyisége leginkább BROWN (1973) adatához közelít. Ez az átlagos mérge mennyiség, hasonlóan alacsony a délnyugat-magyarországi síkvidéki *V. b. bosniensis* populációkhoz sorolt viperáktól nyert mérge mennyiséghez (MALINA et al. 2011b). Noha csak feltételezzük, de az élőhely tengerszint feletti magassága vélhetőleg a *V. berus* mérge termelését befolyásoló tényező lehet. Következésképpen, azok az egyedek amelyek hegyvidéki régiókból származnak valószínűleg nagyobb mérge hozammal rendelkeznek. Feltételezésünket alátámasztani látszik NAULLEAU (1976) vizsgálata, aki kimutatta, hogy a síkvidéki *V. aspis* populációk mérge termelése elmarad a hegyvidéki *V. aspis* állományokba tartozó példányok mérge termelésétől.

Reid (1976) úttörő munkája óta temérdek tanulmány jelent meg a *V. berus* marások klinikai következményeiről, bár legtöbbjük a nominális alfaj

által okozott mérgezéseket mutatja be, ugyanakkor a boszniai alfaj (*V. b. bosniensis*) marásáról rendelkezésre álló információink meglehetősen korlátozottak. Az egyértelműen neurotoxikus *V. b. bosniensis* marásokat bemutató, első hiteles esetleírásokat és klinikai tanulmányokat csak az elmúlt években publikálták (i.e. WESTERSTRÖM et al. 2010; MALINA et al. 2011b). Eleddig, szintén nagyon kevés feljegyzés áll rendelkezésre a korai szakirodalomban (i.e. OTTO 1929; REUSS 1930; FRANCKE 1937) a nominális alfaj által okozott neurotoxikus marásokról.

Az értekezésben elsőként szereplő eset, “*Eset 1*” volt az első hiteles dokumentálás egy neurotoxikus kelet-magyarországi *V. b. berus* marásról. Majd 2013-ban következett a második esetleírás, “*Eset 2*”, amely további nyilvánvaló bizonyíték, egy kelet-magyarországi neurotoxikus méreggel rendelkező *V. b. berus* populáció létezéséről. Az esetleírásokban szereplő megmartakon félreérthetetlen idegmérgezéses tünetek jelentkeztek: a ptosis után, amely egy klasszikus korai jele a neurotoxikus kígyómarásoknak (WARRELL 2003), a külső szemmozgató izmok bénulása miatt kialakult diplopia általában már a következő tünete a descendáló paralizisnek, amely típusosan a neurotoxikus marásokra jellemző (MALINA et al. 2008a). Míg a tekintetbénulás az egyik leggyakrabban dokumentált és gyakorta előforduló neurológiai jele az európai neurotoxikus viperamarásoknak (GONZÁLEZ 1982; BEER & PUTORTI 1998; FERQUEL et al. 2007; LUKŠIĆ et al. 2006; LONATI et al. 2009; DE HARO et al. 2009; MALINA et al. 2008a, 2011b; GAFENCU et al. 2012). A Ph.D. disszertációban is közzétett maráresetek mérsékelt lokális tünetekkel jártak, melyekhez neurológiai zavarok társultak. E neurológiai tünetekben elsődlegesen az egyes craniális idegek diszfunkciója nyilvánult meg. Ezek a maráresetek egyértelmű bizonyítékai egy jól körülhatárolható, kelet-magyarországi élőhelyen honos neurotoxikus méreggel rendelkező *V. b. berus* populációnak.

Az ugyanazon területről begyűjtött *V. berus* méregminták, ahol ehhez az alfajhoz tartozó egyedek marása neurotoxikus tüneteket okozott a megmartakon (MALINA et al. 2008a, 2013), gyorsan kialakuló agyideg bénulást, végtag paralizist és teljes petyhüdt bénulást okozott egereken és csirkéken egyaránt. Ezek a tünetek a *V. nikolskii* mérgezés esetében szintén jelentkeztek, ellenben hiányoztak az osztrák *V. b. berus* mintánál. Újabb kimuatták, hogy viperamarásoknál a neurotoxikus PLA<sub>2</sub>-ök felelősek a botulizmus-szerű flaccid paralizis kialakulásáért (RIGONI et al. 2008). Ezt

egereken is leírják egyéb viperafélék mérgeinél, e.g. *Azemipos feae* mérgeinek esetében (VEST 1985), vagy a *Bothrops neuwiedi* mérgeinél szintén (BORJA-OLIVEIRA et al. 2007).

Mindkét típusú (*ex-vivo* and *in-vivo*) béka ideg-izom preparátum ACh-ra adott válaszképtelensége alátámasztja a mérgeg prejunkciós hatását (HARVEY et al. 1994), csakúgy mint a preparátumok mérgegmentes fiziológias oldattal való hatástalan irrigálása, amely a CBC preparátumok esetében sem vezetett a preparátumok funkciójának helyreállításához.

Az összes hazai vipera mérge minta (kivéve egyet) neuromuscularis hatást gyakorolt a CBC preparátumokra. Ezek gyorsan kialakuló és irreverzibilis prejunkciós hatások voltak, amelyek gátolták a neurotranszmissziót, bár mindegyik minta hatásának intenzitása eltért egymástól, amely a külsőleg alkalmazott stimulusokra adott válaszokban is megmutatkozott. Némely hazai mintának elhanyagolható myotoxikus aktivitása volt, amely a KCl-ra való válaszádon alapult (HARVEY et al. 1994). A mérgek hatására beálló prejunkciós blokk, tipikusan a  $PLA_2$  aktivitásával kapcsolatos, amely összeegyeztethető a mérgek paralizáló hatásának elvesztésével, amikor is  $Sr^{2+}$ -ot tartalmazó oldatban végeztük a kísérleteket. Az osztrák *V. berus* mérgeinek csak myotoxikus aktivitása volt, míg a *V. nikolskii* mérge szintén rendelkezett némi myotoxikus hatással valamint prejunkciósan ható neurotoxikus aktivitással. Ez utóbbi egybevág RAMAZANOVA et al. (2008) eredményeivel.

A mérgeg erős és irreverzibilis gátlása az excitatorikus posztzinaptikus kurrensen a patkány agytörzsi glutamaterg szinapszisban, szintén alátámasztja a mérgeg szinaptikus transzmisszióra gyakorolt preszinaptikus hatását (ZUCKER & REGEHR 2002). Ugyan a kígyómérgeg neurotoxinjai elsősorban a perifériás idegrendszerre hatnak, eredményeink azt mutatják, hogy egyes viperamérgek neurotoxinjai képesek hatni a központi idegrendszer nem-kolinerg idegátvitelére *in vitro*; hasonlóan, mint a Russell viperá (*D. russelii*) mérgegnek nem-kolinerg (dopamin, szerotonin, norepinephrin) szinaptikus transzmisszió gátló hatását is már kimutatták (HARVEY 1984).

Vizsgálataink során sikerült kimutatnunk a kelet-magyarországi viperák igen változatos és egyedi mérgegösszetételét, amely nem csak mérgegük elektrofiziológiai aktivitása során kapott mintázatban tükröződik, de a proteáz és foszfolipáz  $A_2$  ( $PLA_2$ ) aktivitásban, valamint a toxicitásban ( $LD_{50}$ ) is

megnyilvánul. Jelentős heterogenitást sikerült kimutatnunk mérégük PLA<sub>2</sub> tartalmában is MALDI-TOF tömegspektrometriás mérésel. Ez a jelenség más *Vipera* fajoknál már ismert (FERQUEL et al. 2007). Ennek a toxincsoportnak (II-PLA<sub>2</sub>) a képviselőit tartják felelősnek, a különböző régiókban előfordult de egyazon fajok által okozott marások után a megmar személyeken jelentkező eltérő klinikai kép kialakulásáért, amelyek rendkívüli a klinikai és toxikológiai jelentősége (WARRELL 1997; MUKHERJEE et al. 2000; FERQUEL et al. 2007).

A *Vipera berus*-komplexhez tartozó egyes taxonok rednszertani helyzete még mindig nem megalapozott (JOGER et al. 1997). Eredményeink azt mutatják, hogy a mérég neurotoxikus tulajdonsága a *V. berus*-fajcsoportnál nem lehet kizárólagos meghatározója az egyes renszertani alcsoportoknak és besorolásoknak, mint ahogyan azt mások, pl. RAMAZANOVA et al. (2008) említik, pontosan a *V. nikolskii* és a *V. berus* kapcsán. Ráadásul a *V. nikolskii* és a *V. berus* mérégének fehérje-profilja egymáshoz rendkívül hasonló és mind a *V. nikolskii*, mind az általunk vizsgált hazai *V. b. berus* állományhoz tartozó egyedek mérég neurotoxikus aktivitással rendelkezik. Az iménti tényeket szemelött tartva, a testvér-taxon, azaz a *V. nikolskii* (korábban *V. berus nikolskii*) rednszertani revíziója a jövőre nézve megfontolandó.

Tekintel az európai *Vipera* genusba tartozó fajok foszfolipázainak evolúciójára és a *V. berus* filogeográfiájára – minthogy a Kárpát-medence volt a faj egyik refúgiuma, továbbá a kelet-magyarországi viperák egy ősi evolúciós alcsoporthoz tartoznak –, ezért feltételezzük, hogy mérégük neurotoxikus PLA<sub>2</sub> tartalma egy ősi mérégkarakter, amely a faj közép és északi elterjedési területein élő populációinak mérgeből az evolúció során “elveszett”. Míg azok a *V. berus* populációk, amelyek pl. a kárpáti és a balkáni alcsoportot – azaz a faj két fő filogenetikai vonalát képezik –, az egyéb mérégkomponensek expressziójáért felelős géneket (pl. a neurotoxint kodoló gének) mérégük evolúciója során vagy megtartották, illetve visszanyerték. Ez a hipotézis meggyőző magyarázattal szolgálhat, hogy eddig a *V. b. berus* által okozott neurotoxikus marásokat leginkább csak a Kárpát-medencéből (i.e. Kelet-Magyarország, Erdély és Délnyugat-Románia) és a *V. b. bosniensis* elterjedési területéről jelentettek.

## References - Irodalom

- Agócsy P. 1958. New native locality of the Common Adder (*Vipera berus*). [A keresztes vipera (*Vipera berus*) új hazai előfordulási helye]. *Akvárium-Terrárium*, 3: p. 37. [in Hungarian]
- Anonymous. 1964b. Adder hunting. [Vipera vadászat.] *Magyar Vadász*, 17: p. 12. [in Hungarian]
- Arez AP, Laing GD, do Rosario V, Theakston RDG. 1994. Preliminary studies on the characterization of venom from *Vipera latastei latastei* collected at NW of Portugal. *Toxicon*, 4: 381–529.
- Babocsay G. 2010. Molecular versus morphological methods in taxonomy; a toxic case: the Arabian painted saw-scaled viper (*Echis coloratus*) complex. [A molekuláris és morfológiai módszerek előnyei és hátrányai a rendszertani kutatásokban; egy toxikus példa: avagy az arab fűrészpikkelyes-vipera (*Echis coloratus*) fajcsoport esete.] *Állattani Közlemények*, 2: 179–190. [in Hungarian with English abstract]
- Barlow A, Pook CE, Harrison RA, Wüster W. 2009. Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution. *Proceedings of the Royal Society B*, 276: 2443–2449.
- Beer E, & Putorti F. 1998. Dysphonia an uncommon symptom of systemic neurotoxic envenomation by *Vipera aspis* bite. Report of two cases. *Toxicon*, 36: 697–701.
- Borja-Oliveira CR, Kassab BH, Soares AM, Toyama MH, Giglio JR, Marangoni S, Re L, Rodrigues-Simioni L. 2007. Purification and N-terminal sequencing of two presynaptic neurotoxic PLA<sub>2</sub>, Neuwiedtoxin-I and Neuwiedtoxin-II, from *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Jararaca pintada) venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Disease*, 1: 103–121.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254.
- Brown JH. 1973. Toxicology and Pharmacology of Venoms from Poisonous Snakes. Charles C. Thomas, Springfield. pp. 1–184.
- Bubalo P, Curić I, Fišter K. 2004. Venomous snakebites in Herzegovina. *Croatian Medical Journal*, 1: 50–53.

- Calderón L, Lomonte B, Gutiérrez JM, Tarkowski A, Hanson LA. 1993. Biological and biochemical activities of *Vipera berus* (European viper) venom. *Toxicon*, 31: 743–754.
- Carlsson M. 2003. Phylogeography of the Adder, *Vipera berus*. *PhD Thesis*, Uppsala University, Sweden, pp. 1–32.
- Chippaux J-P, Williams V, White J. 1991. Snake venom variability: methods of study, result and interpretation. *Toxicon*, 11: 1279–1303.
- Ciszowski K, Modla A. 2004. Envenoming by the Common viper (*Vipera berus*) – subject still exist. *Przeg Lek*, 61:427–32 (In Polish with English abstract).
- de Haro L, Glaizal M, Tichadou L, Blanc-Brisset I, Hayek-Lanthois M. 2009. Asp Viper (*Vipera aspis*) envenomation: Experience of the Marseille Poison Centre from 1996 to 2009. *Toxins*, 1: 100–112.
- Detrait J, & Duguy R. 1966. Variations de toxicité du venin au cours du cycle annuel chez *Vipera aspis*. *Annales de l'Institut Pasteur*, 111: 93–99. [in French]
- Dolecskó K. 1964. Viper Danger! “X” on its head. [Viperaveszély! „X” van a fején.] *Esti Hírlap*, 9: p. 1. [in Hungarian].
- Favreau P, Menin L, Michalet S, Perret F, Cheyneval O, Stocklin M, Bulet P, Stocklin R. 2006. Mass spectrometry strategies for venom mapping and peptide sequencing from crude venoms: case applications with single arthropod specimen. *Toxicon*, 47: 676–687.
- Fejérváry G. 1923. On the occurrence of *Vipera berus* L. in the county of Zala, S. Hungary. *Annales Musei Nationalis Hungarici*, 20: 135–140.
- Ferquel E, de Haro L, Jan V, Guillemin I, Jourdain S, Teynié A, d’Alayer J, Choumet V. 2007. Reappraisal of *Vipera aspis* venom neurotoxicity. *PLoS ONE*, 11: 1–18.
- Francke E. 1937. Clinical manifestations and therapy of the Adder envenoming. *Fühner-Wielands Sammlung von Vergiftungsunfällen*, 36: 1–12.
- Gafencu M, Doros G, Badeti R, Vasilie D. 2012. Envenoming by *Vipera berus*: A case report of neurotoxicity. *Clinical Toxicology*, 4: 286.
- González D. 1982. Clinical aspects of bites by viper in Spain. *Toxicon*, 20: 349–353.
- Guillemin I, Bouchier C, Garrigues T, Wisner A, Choumet V. 2003. Sequences and structural organization of phospholipase A<sub>2</sub> genes from

- V. aspis aspis*, *V. aspis zinnikeri*, and *Vipera berus berus* venom. Identification of the origin of a new viper population based on ammodytin II heterogeneity. *European Journal of Biochemistry*, 270: 2697–2706.
- Halassy B, Brgles M, Habjanec L, Balija ML, Kurtović T, Marchetti-Deschmann M, Križaj I, Allmaier G. 2011. Intraspecies variability in *Vipera ammodytes ammodytes* venom related to its toxicity and immunogenic potential. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part C*, 153: 223–230.
- Harvey AL, & Karlsson E. 1982. Protease inhibitor homologues from mamba venoms: facilitation of acetylcholine release and interactions with prejunctional blocking toxins. *British Journal of Pharmacology*, 77: 153–161.
- Harvey AL. 1984. New toxins for different receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 5: 178.
- Harvey AL, Barfaraz A, Thomson E, Faiz A, Preston S, Harris JB. 1994. Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple *in vitro* preparations from rodents and chicks. *Toxicon*, 3: 257–265.
- Hasson SS, Theakston RDG, Harrison RA. 2004. Antibody zymography: a novel adaptation of zymography to determine the protease-neutralising potential of specific antibodies and snake antivenoms. *Journal of Immunology*, 292: 131–139.
- Jan V, Maroun RC, Robbe-Vincent A, de Haro L, Choumet V. 2002. Toxicity evolution of *Vipera aspis aspis* venom: identification and molecular modelling of a novel phospholipase A<sub>2</sub> heterodimer neurotoxin. *FEBS Letters*, 527: 263–268.
- Jan VM, Guillemin I, Robbe-Vincent A, Choumet V. 2007. Phospholipase A<sub>2</sub> diversity and polymorphism in European viper venoms: paradoxical molecular evolution in Viperinae. *Toxicon*, 50: 1140–1161.
- Janisch M. 1987. Dwelling places of the Common adder (*Vipera berus berus*) and the Meadow viper (*Vipera ursinii rakosiensis* Méhely) in Hungary. [A keresztes vipera és parlagi vipera szigetszerű előfordulási helye Magyarországon.] *Borsodi Orvosi Szemle*, 2: 223–225. [in Hungarian]

- Joger U, Lenk P, Baran I, Böhme W, Ziegler T, Heidrich P, Wink M. 1997. The phylogenetic position of *Vipera barani* and *V. nikolskii* within the *Vipera berus* complex. In: Böhme W, Bischoff W, Ziegler T. (Eds.), *Herpetologia Bonnensis*. pp. 185–194.
- Kalyabina-Hauf S, Schweiger S, Joger U, Mayer W, Orlov N, Wink M. 2004. Phylogeny and systematics of adders (*Vipera berus* complex). *Mertensiella*, 15: 7–16.
- Kollár L. 1979. Snakebites in childhood. [Kígyómarások a gyermekkorban.] *Orvosi Hetilap*, 120: 799–800. [in Hungarian]
- Korsós Z, & Krecsák L. 2005. Taxonomy and ecology of the Hungarian populations of the common adder (*Vipera berus*). 5th World Congress of Herpetology, 2005 Jun 19–24. South Africa: Stellenbosch; 2005: 136–137.
- Korsós Z. 2007. Postglacial history of the reptile fauna in the Carpathian Basin. [A magyarországi hüllőfauna története a jégkorszak után.] In: Forró L. (Ed.), *Development of the fauna in the Carpathian Basin*. [A Kárpát-medence állatvilágának kialakulása.] pp. 283–296. Magyar Természettudományi Múzeum, Budapest. [in Hungarian]
- Krecsák L, Zacher G, Malina T. 2011. Clinical picture of envenoming with the Meadow viper (*Vipera (Acridophaga) ursinii*). *Clinical Toxicology*, 49: 13–20.
- Križaj I, Siigur J, Samel M, Cotić V, Gubensek F. 1993. Isolation, partial characterization and complete amino acid sequence of the toxic phospholipase A<sub>2</sub> from venom of *Vipera berus berus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1157: 81–85.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.
- Lonati D, Rossetto O, Cintra-Francischinelli M, Locatelli C, Giampreti A, Vecchio S, Bigi S, Petrolini V, Sacchi R, Bernini F, Gentili A, Manzo L, Montecucco C. 2009. Clinical and experimental evidence of Italian viper venom neurotoxicity. *Clinical Toxicology*, 47: 485–486.
- Lukšić B, Bradarić N, Prgommet S. 2006. Venomous snakebites in southern Croatia. *Collegium Antropologicum*, 30: 191–197.
- Magdalan J, Trocha M, Merwid-Ląd A, Sozański T, Zawadzki M. 2010. *Vipera berus* bites in the region of Southwest of Poland – A clinical

- analysis of 26 cases. *Wilderness & Environmental Medicine*, 21: 114–119.
- Major L. 1965. Our adder-bite cases. [Viperamarásos eseteink.] *Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle*, 41: 36–38. [in Hungarian]
- Malenev AL, Bakiev AG, Zaytseva OV, Shurshina IV. 2007. Toxicity of the venom of the common adder from various spots of the area. *Proceedings of the Samara scientific center RAN*, 1: 259–261. [in Russian]
- Malina T**, & Krecsák L 2008. Clinical aspects and consequences of envenoming by a captive Rhinoceros viper (*Bitis nasicornis*) in Hungary. *Swiss Medical Weekly*, 138: 85–88.
- Malina T**, Krecsák L, Warrell DA. 2008a. Neurotoxicity and hypertension following European adder (*Vipera berus berus*) bites in Hungary: case report and review. *QJM: An International Journal of Medicine*, 101: 801–806.
- Malina T**, Krecsák L, Korsós Z, Takács Z. 2008b. Snakebites in Hungary – Epidemiological and clinical aspects over the past 36 years. *Toxicon*, 51: 943–951.
- Malina T**. 2011. Clinical picture of the envenomings by different populations of the common adder (*Vipera berus*) in Hungary. 17<sup>th</sup> Congress of the European Section of the International Society on Toxinology, Valencia, Spain; 11<sup>th</sup> – 15<sup>th</sup> September 2011. – Abstract Book pp. 32.
- Malina T**, Schuller P, Krecsák L. 2011a. Misdiagnosed *Vipera* envenoming from an unknown adder locality in northern Hungary. *North-Western Journal of Zoology*, 7: 87–91.
- Malina T**, Krecsák L, Jelić D, Maretić T, Tóth T, Šiško M, Pandak N. 2011b. First clinical experiences about the neurotoxic envenomings inflicted by lowland populations of the Balkan adder, *Vipera berus bosniensis*. *Neurotoxicology*, 32: 86–74.
- Malina T**, Babocsay G, Krecsák L, Schuller P, Zacher G, Vasas G. 2012. An overview on envenomings inflicted by the Common adder (*Vipera berus*) and their treatment in Hungary. Facts and beliefs – Part I. [Górcső alatt a keresztes vipera (*Vipera berus*) által okozott marások és kezelésük Magyarországon. Tények és hiedelmek – I rész.] *Orvosi Hetilap*, 28: 1092–1105. [in Hungarian with English abstract]

- Malina T**, Babocsay G, Krecsák L, Erdész Cs. 2013. Further clinical evidence for the existence of neurotoxicity in a population of the European adder (*Vipera berus berus*) in Eastern Hungary: second authenticated case. *Wilderness & Environmental Medicine*, 24: 378–383.
- Malta MB, Lira MS, Soares SL, Rocha GC, Knysak I, Martins R, Guizze SPG, Santoro ML, Barbaro KC. 2008. Toxic activities of Brazilian centipede venoms. *Toxicon*, 52: 255–263.
- Marián M. 1952. The melanistic form of the common adder (*Vipera berus* var. *prester* L.) in Somogy County. [A vipera fekete változatának (*Vipera berus* var. *prester* L.) Somogy megyei előfordulása.] Rippl-Rónai Múzeum, Kaposvár, pp. 1–2. [in Hungarian]
- Marián M. 1956. Data on the distribution of the Adder (*Vipera b. berus* L.) in Somogy County. [Adatok a keresztes vipera (*Vipera b. berus* L.) somogyi elterjedési viszonyaihoz] *Annales historico-naturales Musei nationalis hungarici*, 7: 463–468. [in Hungarian]
- Marián M. 1957. The vertebrates of Baláta. [A Baláta gerinces állatvilága]. *Somogyi Almanach*, 1: 1–59. [in Hungarian]
- Marián M. 1960. Data to the herpetofauna of the Upper Tisza River valley. [Adatok a Felső-Tisza hullőfaunájához] In: Bálint A. ed. Móra Ferenc Múzeum Évkönyve pp. 1958–1959. Szeged. Szegedi Nyomda Vállalat, 259–275. [in Hungarian]
- Mebs D, & Langelüdekke T. 1992. European viper venoms haemorrhagic and myotoxic activities. *Toxicon*, 10: 1303–1306.
- Mukherjee AK, Ghosal SK, Maity CR. 2000. Some biochemical properties of Russell's viper (*Daboia russelli*) venom from Eastern India: correlation with clinic-pathological manifestation in Russell's viper bite. *Toxicon*, 38: 163–175.
- Naulleau G. 1976. La fonction venimeuse chez *Vipera aspis* L. élevée en conditions expérimentales artificielles (en collaboration avec J. Detrait). *Bulletin de la Societe Zoologique de France*, 1976, 101: 728–729. [in French]
- Naulleau G. 1984. Incidence de l'élevage en captivité sur la fonction venimeuse chez *Vipera aspis* et *Vipera ammodytes*. (en collaboration avec J. Detrait). *Acta Zoologica et Pathologica. Antiverpiensia*, 78: 219–236. [in French]

- Nedospasov AA, & Rodina EV. 1992. Age changes of *Vipera berus* venom amidolytic activity. *Toxicon*, 11: 1505–1508.
- Otto R. 1929. Untersuchungen über die Toxine europäischer Vipereinen. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*, 110: 82–92.
- Persson H. 1995. Clinical toxicology of snakebites in Europe. In: Meier J, White J. (Eds.), *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons*. pp. 413–432. CRC Press Inc., Taylor & Francis Group, New York.
- Ramazanova AS, Zavada LL, Starkov VG, Kovyazina IV, Subbotina TF, Kostyukhina EE, Dementieva IN, Ovchinnikova TV, Utkin YU. 2008. Heterodimeric neurotoxic phospholipase A<sub>2</sub> – the first proteins from venom of recently established species *Vipera nikolskii*. Implication of venom composition in viper systematics. *Toxicon*, 51: 524–537.
- Reid HA. 1976. Adder bites in Britain. *British Medical Journal*, 2: 153–156.
- Reuss T. 1930. Über eine neurotoxische Otterngruppe Europas, *Mesocoronis* 1927, und über ihre Stellung unter den Solenoglyphen der Welt. *Glasnik Zemsk Mus Bosn Herc*. 42: 57–114 +3 table + 1 map, Pls. 1–6.
- Rigoni M, Paoli M, Milanese E, Caccin P, Rasola A, Bernardi, P, Montecucco C. 2008. Snake phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxins enter neurons, bind specifically to mitochondria, and open their transition pores. *Journal of Biological Chemistry*, 49: 34013–34020.
- Saint Girons H, & Detrait J. 1978. Communautés antigénique des venins et systématique des vipères européennes. Étude immunoélectrophorétique. *Bulletin de la Societe Zoologique de France*, 103: 155–166. [in French]
- Saint Girons H, & Detrait J. 1992. Etude electrophoretique des venins de Viperinae (Serpentes) de genere *Vipera*: variations des proteinogrammes et implications phylogenetiques. *Bulletin de la Societe Zoologique de France Evolution et Zoologie*, 1174: 399–412. [in French]
- Santoro ML, Sousa-e-Silva MC, Gonçalves LR, Almeida-Santos SM, Cardoso DF, Laporta-Ferreira IL, Saiki M, Peres CA, Sano-Martins IS. 1999. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology –Part C*, 122: 61–73.
- Sasa M. 1999. Diet and snake venom evolution: can local selection alone explain intra specific venom variation? *Toxicon*, 37: 249–252.

- Schöttler WHA. 1938. Die von *Vipera latasti* and *Vipera lebetina*. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*, 120: 408–434.
- Siigur E, Siigur J, Nõmmeots M, Ilomets T. 1979. Fractionation and enzymatic activities of Common viper (*Vipera berus berus*) venom. *Toxicon*, 17: 623–630.
- Theakston RDG, Reid HA. 1976. Effectiveness of Zagreb antivenom against envenoming by the adder, *Vipera berus*. *Lancet*, 2: 121–125.
- Theakston RDG, Reid HA. 1983. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bulletin of the World Health Organisation*, 61: 949–956.
- Ursenbacher S, Carlsson M, Helfer V, Tegelström H, Fumagalli L. 2006. Phylogeography and Pleistocene refugia of the adder (*Vipera berus*) as inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Ecology*, 15: 3425–3437.
- Újvári B, Lazányi I, Farkas B, Korsós Z. 2001. An isolated Adder (*Vipera berus*) population in Hungary. In: Lymberakis P, Valakos E, Pafilis P, Mylonas M. (Eds.), *Herpetologia Candiana*. pp. 127–135. Natural History Museum of Crete & SEH, Irakleio.
- Vest DK. 1985. Preliminary studies on the venom of the Chinese snake *Azemiops feae*, Boulenger (Feas's viper) *Toxicon*, 24: 510–513.
- Virágh I, Tass Gy. 1986. Vipers in Zemplén mountains. Retrospective survey on intoxications. [Viperák a Zempléni Hegységben. Visszatekintő felmérés a mérgezésekről.] *Borsodi Orvosi Szemle*, 2: 209–222. [in Hungarian with English abstract]
- Wang Y, Manis PB. 2008. Short-term synaptic depression and recovery at the mature mammalian endbulb of held synapse in mice. *Journal of Neurophysiology*, 100: 1255–1264.
- Warrell DA. 1997. Geographical and intraspecies variations in the clinical manifestations of envenoming by snakes. In: Thorpe RS, Wüster W, Malhotra A. (Eds.), *Venomous Snakes. Ecology, Evolution and Snakebite*. Symposia of the Zoological Society of London 70: pp. 189–203. Clarendon Press, Oxford.
- Warrell DA. 2003. Injuries, envenoming, poisoning, and allergic reactions caused by animals. In: Warrell DA, Cox TM, Firth JD, Benz EJ. (Eds.), *The Oxford Textbook of Medicine*, 4th edn. Oxford, Oxford University Press, 1: 923–951.

- Warrell DA. 2011. Snake bite envenoming: Clinical and therapeutic aspects. 17<sup>th</sup> Congress of the European Section of the International Society on Toxinology, Valencia, Spain; 11<sup>th</sup> – 15<sup>th</sup> September 2011. – Abstract Book pp. 26.
- Westerström A, Petrov B, Tzankov N. 2010. Envenoming following bites by the Balkan adder *Vipera berus bosniensis* – First documented case series from Bulgaria. *Toxicon*, 56: 1510–1515.
- World Health Organization. 2010. WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. 59<sup>th</sup> meeting of WHO Expert Committee on Biological Standardization, Geneva; 13<sup>th</sup> – 17<sup>th</sup> October 2008. WHO Technical Report Series, pp. 1–141.
- Zucker RS, Regehr WG. 2002. Short-term synaptic plasticity. *Annual Review of Physiology*, 64: 355–405.

## **Malina Tamás publikációi - Tamás Malina's publications**

### **Impakt faktoros közlemények - Papers with impact factor**

**Tamás Malina**, Gergely Babocsay, László Krecsák, Csaba Erdész (2013).

Further clinical evidence for the existence of neurotoxicity in a population of the European adder (*Vipera berus berus*) in Eastern Hungary: second authenticated case. *Wilderness & Environmental Medicine* 24: 378-383. **IF (2013): 1,490**

**Tamás Malina**, László Krecsák, Dušan Jelić, Tomislav Maretić, Tamás Tóth, Marijan Šiško, Nenad Pandak (2011): First clinical experiences about the neurotoxic envenomings inflicted by lowland populations of the Balkan adder, *Vipera berus bosniensis*. *Neurotoxicology* 32: 68-74. **IF (2011): 3,096**

László Krecsák, Gábor Zacher, **Tamás Malina** (2011): Clinical picture of envenoming with the Meadow viper (*Vipera (Acridophaga) ursinii*). *Clinical Toxicology* 49: 13-20. **IF (2011): 2,221**

**Tamás Malina**, Péter Schuller, László Krecsák (2011): Misdiagnosed *Vipera* envenoming from an unknown adder locality in northern Hungary. *North-Western Journal of Zoology* 7(1): 87-91. **IF (2011): 0,747**

**Tamás Malina**, László Krecsák, David A. Warrell (2008): Neurotoxicity and hypertension following European adder (*Vipera berus berus*) bites in Hungary: case report and review. *QJMed: An International Journal of Medicine* 101: 801-806. **IF (2008): 2,483**

**Tamás Malina**, László Krecsák, Zoltán Korsós, Zoltán Takács (2008): Snakebites in Hungary – epidemiological and clinical aspects over the past 36 years. *Toxicon* 51: 943-951. **IF (2008): 2,460**

**Malina T**, & Krecsák L 2008. Clinical aspects and consequences of envenoming by a captive Rhinoceros viper (*Bitis nasicornis*) in Hungary. *Swiss Medical Weekly*, 138: 85–88. **IF (2008): 1,436**

## Egyéb referált közlemények - Other papers

**Tamás Malina**, Gergely Babocsay, László Krecsák, Péter Schuller, Gábor Zacher, **Gábor Vasas (2012)**: An overview on envenomings inflicted by the Common adder (*Vipera berus*) and their treatment in Hungary. Facts and beliefs – Part I. [Górcső alatt a keresztes vipera (*Vipera berus*) által okozott marások és kezelésük Magyarországon. Tények és hiedelmek – I rész] *Orvosi Hetilap* 28: 1092-1105. [in Hungarian with English abstract]

## Konferenciák - Conferences

**Tamás Malina (2011)**: Clinical picture of the envenomings by different population of the Common adder (*Vipera berus*) in Hungary. *Session 3: Snakebite envenoming: clinical and therapeutic aspects - 17th Congress of the European Section of the International Society on Toxinology*, Valencia, Spain; 11th – 15th September 2011. – Abstract Book pp. 32. (Előadás - Presentation: Meghívott főelőadó - Invited keynote speaker).

**Tamás Malina**, László Krecsák, Dušan Jelić, Tomislav Maretić (2010): Reuss “European cobras” - clinical picture of the envenomed patients by a lowland population of the Balkan adder (*Vipera berus bosniensis*). *3rd Biology of the Vipers Conference*, Calci (Pisa) Italy; 30th March – 2nd April 2010. Abstract Book pp. 40. (Előadás – Presentation).

## Elektronikus felületen, „online” megjelentetett közlemények - Electronic, „online” papers

**Malina Tamás (2010)**: Néhány fontos tudnivaló a keresztes vipera marásáról. *Magyar Madártani Egyesület - Kétéltű és Hüllővédelmi Szakosztály weboldala*. (2010.december.06.)[[http://www.khvsz.mme.hu/index.php?option=com\\_content&view=article&id=153%3Anehany-fontos-tudnivalo-a-keresztes-vipera-marasarol&catid=60%3Amergeskigyok&Itemid=101&lang=hu](http://www.khvsz.mme.hu/index.php?option=com_content&view=article&id=153%3Anehany-fontos-tudnivalo-a-keresztes-vipera-marasarol&catid=60%3Amergeskigyok&Itemid=101&lang=hu)]

**Malina Tamás (2011)**: A rákosi vipera marásának következményei. *Magyar Madártani Egyesület - Kétéltű és Hüllővédelmi Szakosztály weboldala*.

(2011.november

11.)[[http://www.khvsz.mme.hu/index.php?option=com\\_content&view=article&id=199%3Aa-rakosi-vipera-marasanak-koevetkezmenyei&catid=60%3Amergeskigyok&Itemid=101&lang=hu](http://www.khvsz.mme.hu/index.php?option=com_content&view=article&id=199%3Aa-rakosi-vipera-marasanak-koevetkezmenyei&catid=60%3Amergeskigyok&Itemid=101&lang=hu)]