

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe eines Koagulationstestes auf die Auswirkungen des pH-Wertes auf die Blutgerinnung eingegangen. Es wurde die Gerinnungsfähigkeit des Plasmas nach Zugabe schwacher Säuren überprüft. Als gerinnungsinduzierende Gifte wurden *Bothrops jararaca*-Toxin und *Echis leucogaster*-Toxin verwendet.

Das Plasma von Schaf und Pferd wurde zunächst mit unterschiedlichen ungepufferten Säurekonzentrationen versetzt. In einem weiteren Schritt wird eine bestimmte Säurekonzentration bis zu einem gewissen Grade mit Hilfe eines 0,1 molaren Phosphatpuffers neutralisiert. In beiden Fällen wurde die Gerinnungszeit gemessen.

Es zeigte sich, daß sich geringe Säurekonzentrationen zunächst verkürzend auf die Gerinnung auswirken, während diese bei größeren Säuremengen stark verlängert wird bzw. ganz unterbleibt.

Die Ursache dafür ist in der pH-abhängigen Veränderung der Gerinnungsfaktoren zu suchen. Ein leicht abgesenkter pH-Wert wirkt sich verkürzend auf die Gerinnungszeit aus, weil dadurch die selbst katalysierte Umformung von Prothrombin zu Thrombin verstärkt wird. Dieser Vorgang hat sein pH-Optimum im leicht sauren Bereich. Wird der pH-Wert noch weiter abgesenkt, kommt es zu einer fortschreitenden Denaturierung der Gerinnungsproteine, was schließlich zu einer völligen Inaktivierung ihrer enzymatischen Fähigkeiten führt.

Zu beachten war aber auch, daß gleiche Konzentrationen verschiedener Säuren im selben Plasma zu unterschiedlichen Gerinnungszeiten führten, so daß auf jeden Fall ein eigenständiger Einfluß der verwendeten Säure vorhanden sein muß.

Der nächste Abschnitt zeigt die mit dem Häkchenkoagulometer gemessenen Gerinnungszeiten von Schaf-, Pferde- und Rinderplasma nach Zusatz von *Echis leucogaster*-Toxin bzw. Gift von *Bothrops jararaca*. Der Testansatz wurde zuvor mit Pflanzeninhaltsstoffen und -extrakten in Verbindung mit Zink- oder Calciumchlorid vorinkubiert.

Es stellte sich heraus, daß die komplexbildenden Pflanzeninhaltsstoffe in der Lage waren, das Gift mit unterschiedlich starken Ausprägungen zu neutralisieren, was sich in einer Verlängerung der Gerinnungszeit im Verhältnis zum Blindwert äußerte.

Wurde dem Gemisch aus Pflanzeninhaltsstoff und Toxin zusätzlich noch Zink- oder Calciumchlorid hinzugefügt, so erlangte das Gift einen Teil seiner ursprünglichen Wirkungsstärke wieder, was sich nun in einer Verkürzung der Gerinnungszeit darstellte, so daß sich dieser Wert wiederum dem ursprünglichen Blindwert annäherte.

Da die Enzyme der Schlangengifte zu einem großen Teil aus Zink-gebundenen Metalloproteinasen bestehen, verlieren sie ihre Wirksamkeit, wenn das Zink-Ion durch Komplexbildner aus dem aktiven Zentrum des Enzyms entfernt wird. Andererseits erlangen sie ihre Aktivität durch das erneute Hinzufügen von Zink-Ionen zu einem gewissen Grade wieder. Die Zugabe von Zinkchlorid erweist sich dabei wesentlich wirksamer als der Zusatz von Calciumchlorid, weil die Metalloproteinasen in ihrer Wirksamkeit spezifisch von Zink abhängig sind.

Im letzten Abschnitt wurden die oben beschriebenen Versuche in gleicher Weise mit den Reinsubstanzen Ecarin und Batroxobin durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, daß Ecarin aufgrund seines metalloproteolytischen Charakters vom Prinzip her die gleichen Reaktionsweisen wie das Vollgift von *Echis leucogaster* aufwies, während der Wirkungsmechanismus von Batroxobin durch die Zugabe von Zinkchlorid nicht aktiviert werden konnte. Bei Batroxobin handelt es sich um eine Serinproteinase und keine Metalloproteinase, was bedeutet, daß das aktive Zentrum nicht metallgebunden ist.

Claudia Imrecke

Metalloproteins and their contribution to haemolytic effects of snake venoms
- neutralisation with complexing agents

SUMMARY

In this doctoral the intention was first of all to deal with the effects of the pH-value on the clotting of the blood by a coagulation test. The coagulability of plasma was examined after adding weak acid. It turned out that a low content has a shortened effect on the coagulation whereas the process is extended by a higher concentrate of acid, or does not occur at all. The coagulation was induced by the venoms of *Bothrops jararaca* und *Echis leucogaster*.

First, plasma of sheep and horse was mixed with various unbuffered acid concentrations. Next, a special acid concentration neutralised with a 0,1 molar phosphathbuffer as far as possible. In both cases the coagulation time was measured.

The cause for this is that the coagulation factors change depending on the pH- value. A slight decrease of the pH-value reduces the clotting time, because it strengthens the self catalytic transformation from prothrombin to thrombin. This process has its pH- optimum in weak acid. The decrease of the pH-value leads to an ongoing denaturation of the coagulation proteins. Finally the enzymatic abilities are completely inactivated.

It had to be taken into consideration that the same concentration of different acids in the same plasma resulted in different coagulation times. Therefore the chosen acid has a direct influence

The next paragraph describes the coagulation time of the different kinds of plasma. The periods were tested after the addition of plant compounds and plant extracts in combination with zinc- or calcium chloride in addition of *Echis leucogaster* toxin or the poison of *Bothrops jararaca*.

It turned out that the complexing plant compounds were more or less able to neutralize the toxin. This fact was manifested by the extension of the clotting time in relation to the blank test.

As soon as zinc- or calcium chloride were added to the mixture of plant compounds and toxin, the poison was regaining ist original degree of effectiveness. This phenomenon was proved by the reduction of the clotting time close to the value of the blank test.

Snake venom enzymes mainly consist of zincbound metalloproteinases. Therefore they are less effective as soon as the zinc-ion is removed from the active site of the enzym by complexing agents. On the other hand they regain activity to a certain degree by adding zinc-ions. The effect of metalloproteinases specifically depend on zinc. Therefore the addition of zinc chloride is much more effective than the addition of calcium chloride.

In the last paragraph the experiments, mentioned above, were carried out the same way with the pure substances ecarin and batroxobin. Thus, it turned out that ecarin- because of its metalloproteinolytic characteristics- showed in principle the same reaction as the crude venom of *Echis leucogaster*.

Batroxobin, which is not a metalloproteinase but a serinproteinase, can be inactivated- just like ecarin- by complexing agents. However, this action has to be differentiated from the complexing of the metalloproteinases, because batroxobin is not metalbound in the active site. Therefore the addition of zinc chloride is ineffective.