

# 1. Zusammenfassung

Gegenstand dieser Dissertation ist es, einen Überblick über die Pathophysiologie der Vergiftung durch BITIS ARIETANS ARIETANS zu geben. Schwerpunkt sind dabei die niedermolekularen Substanzen.

Zunächst wird ein zoologischer Überblick gegeben. Ferner ist die Phylogenie der Schlangen und die Verhaltensweisen der Viperidae beschrieben worden.

Da bisher die hochmolekularen Toxine, Enzyme und biologisch aktiven Substanzen ausführlich beschrieben wurden, soll das Ziel dieser Arbeit nun der Nachweis bradykinin- potenzierender Wirkung niedermolekularer Substanzen im Gift von BITIS ARIETANS ARIETANS sein.

Das klinische Bild einer Vergiftung durch die Gemeine Puffotter ist gekennzeichnet durch folgende Symptomenkomplexe:

## **Lokale Gewebsveränderung:**

Das Zusammenwirken von Proteasen und Phospholipase A sowie Hyaluronidasen bewirkt eine Rötung des Gewebes. Häufig sind um die Bißstelle herum deutlich Gefäße zu erkennen. Eine Zerstörung des Gewebes in Form von Nekrosen tritt bei den Viperiden nicht auf, dieses Vergiftungssymptom ist nach einem Elapidenbiß zu beobachten.

## **Kreislaufschock:**

Proteasen reagieren mit dem Kininogenmolekül im Blutplasma. Das Bradykininmolekül wird abgespalten. Bradykinin erhöht die Permeabilität der Gefäße, es erfolgt ein Blutdruckabfall.

Durch Hämorrhagie kommt es zur Zerstörung des Endothels; endogene Wirkstoffe werden frei. Histamin beispielsweise führt zum anaphylaktischen Schock. Die Kreislaufsituation beim Viperidenbiß wird maßgeblich durch Histamin und Bradykinin bestimmt.

## **Blutgerinnungssystem:**

Hämorrhagine greifen in das Gerinnungssystem ein. Thrombin-ähnliche Faktoren überführen Prothrombin in Thrombin, dadurch wird das Blut ungerinnbar. Die Wirkung der Hämotoxine ist bei einem Unfall mit einer Viper die gefährlichste Reaktion auf den lebenden Organismus. Todesfälle durch eine Viper sind auf Veränderungen des Blutgerinnungssystems zurückzuführen.

Mit Hilfe chemischer und biochemischer Untersuchungen ist die Beteiligung der niedermolekularen Substanzen am klinischen Gesamtbild beurteilt worden.

Schwerpunkt dieser Arbeit sollte die Untersuchung niedermolekularer Substanzen im Gift von *BITIS ARIETANS ARIETANS* sein. Bevor eine chromatographische Auftrennung mittels HPLC erfolgen konnte, mußte das pulverisierte Rohgift vorbehandelt werden. Ziel dieser Bearbeitung war die Trennung der hoch- und niedermolekularen Substanzen. Aus diesem Grunde erfolgte eine Mischung des Giftes mit Ammoniumbicarbonatpuffer, um das Schlangengift in Lösung zu bringen. Anschließend wurden die hochmolekularen Substanzen mit kochendem Ethanol ausgefällt.

Im Anschluß daran erfolgte die HPLC- Chromatographie, bei der die Fraktionen getrennt aufgefangen wurden.

Die biologische Aktivität der einzelnen Fraktionen ist an Meer-schweinchendarm, welcher in Tyrot- Lösung getaucht worden ist, überprüft worden. Bradykinin- potenzierende Wirkung zeigten die beiden ersten Fraktionen. In die Lösung ist Bradykinin getropft worden (zusammen mit den einzelnen Fraktionen), daraufhin kontrahierte der Darm. Da eine Verbindung zwischen Darmabschnitt und einem Schreiber bestand, war die Kontraktur auf Papier sichtbar. Bei den biologisch aktiven Substanzen erfolgte Struktur-aufklärung mittels Massenspektroskopie, Aminosäurezusammensetzung, Dünnschichtchromatographie sowie Aminosäuresequenz-analyse. Die Versuche zeigten, daß bei der ersten Fraktion ein Tripeptid, bei der zweiten Fraktion ein Pentapeptid vorliegt.

Die Sequenz des ersten Peptides beträgt: ALA- LYS- SER bzw. SER- LYS- ALA.

Das Pentapeptid besteht aus: pGLU- LYS- PHE- SER- PRO.

## 12. Summary

Anja Cölfen

Chemical And Biochemical Studies Of Low- Molecular Substances In The Venom Of *BITIS ARIETANS ARIETANS*

This dissertation aims at giving a survey on the pathophysiology of exogenic toxicosis by *BITIS ARIETANS ARIETANS*. It focuses on low- molecular substances.

At first, a general zoologic account is given. In addition, the phylogenesis of snakes and the behaviour of viperidae are described.

As high- molecular toxin, enzymes and biologically active substances have been presented as length, the purpose of this study will be the confirmation of bradykinin- potentiating effects of low- molecular substances in the venom of *BITIS ARIETANS ARIETANS*. The clinical picture of exogenic toxicosis through the common puff adder is characterized by following complex of symptoms:

### **Local tissue change:**

The interaction of protease and phospholipase A as well as hyaluronidase entails a redding of tissue. Vessels are often clearly visible around the bite. Viperidae do not cause the destruction of tissue in the form of necrosis. This symptom is to be found after elapide bites.

### **Circulatory shock:**

Protease reacts with the kininogen molecule in blood plasma. The bradykinin molecule is splitt off. Bradykinin increases the permeability in vessels - a drop in blood pressure follows. Hemorrhagine causes the destruction of endothelium. Endogenous substances are set free. Histamine, for example, leads to anaphylactic shock. The cicu-

latory condition after a viperidae bite is substantially determined by histamine and bradykinin.

Blood coagulation system:

Hemorrhagine intervenes in the coagulation system. Factors similar to thrombin transform prothrombin into thrombin. This makes the blood incoagulable.

In the case of a viper bite, the action of hemotoxin is the most dangerous reaction on the living organism. Death caused by a Viper is to be attributed to changes in the coagulation system.

The study focuses on the investigation of low-molecular substances in the venom of *BITIS ARIETANS ARIETANS*.

Before a chromatographic separation by HPLC could be carried out, the pulverised crude venom had to be prepared. The purpose of this preparation was the isolation of high and low-molecular substances. The venom was therefore mixed with ammonium carbonate buffer in order to obtain a solution. After that, the high-molecular substances were precipitated with boiling ethanol.

This was followed by the HPLC-chromatography, with the fractions being collected separately.

The biological activity of the individual fractions has been confirmed with a piece of guinea-pig intestine, which had been dipped into Tyrode's solution.

The first two fractions showed bradykinin-potentiating effects. Bradykinin was added, together with the individual fractions, to the solution and the intestine contracted. As the piece of intestine was connected to a recorder, the contraction showed on paper.

The structural analysis of the biologically active substances was performed by mass spectroscopy, amino acid analysis, forms of chromatography and sequencanalysis.

As a result, a tripeptide was found on the examination of the first fraction, a pentapeptid on the examination of the second fraction.

The sequence of the first fraction is: ALA- LYS- SER resp. SER- LYS- ALA.

In the pentapeptid are: pGLU- LYS- PHE- SER- PRO.