

## YILAN ZEHİRLERİ: II. ZEHİRSİZ BİLEŞİKLER

Ali BİLGİLİ<sup>1</sup> Gökhan ERASLAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Ankara-TÜRKİYE

<sup>2</sup>Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Kayseri-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 20.07.1999

### Snake Venoms: II. Non-Toxic Compounds

#### SUMMARY

In this review, non-toxic compounds found in snake venom were studied. Biochemical structures and pharmacological aspects of these compounds were mentioned. In particular, their effects on circulation system and coagulation mechanism were discussed in detail. In addition, brief information about non-protein, non-toxic compounds found in snake venoms which affect the enzyme activity, the compounds which inhibit the enzyme inhibitors activity and hemorrhagic proteinases were given.

*Key words:* Snake, venom, non-toxic compound.

#### ÖZET

Bu derleme kapsamında yılan zehirlerinde bulunan zehirsiz bileşikler incelendi. Bu bileşiklerin biyokimyasal yapıları ve farmakolojik yönlerine değinildi. Özellikle dolaşım sistemi ve kan pıhtılaşma mekanizması üzerine olan etkileri ayrıntılı olarak tartışıldı, ayrıca zehirde bulunan protein yapısında olmayan zehirsiz bileşikler, enzim etkinliğini engelleyen bileşikler, enzim inhibitörlerinin etkinliğini engelleyen bileşikler ve hemorajik proteinazlar hakkında da özlü bilgi verildi.

*Anahtar kelimeler:* Yılan, yılan zehiri, zehirsiz bileşikler.

#### GİRİŞ

Yılan zehirleri birbirinden farklı pek çok protein içermektedir. Bu proteinlerin miktarı ve yapısı yılan türünden göre değişkenlik göstermekte olup her birinin kendine özgü biyolojik etkinliği vardır. Bu bileşikler zehirli ve zehirsiz olmakla birlikte, zehirde her iki bileşik de bir arada bulunmaktadır. Zehirli bileşikler arasında nörotoksinler, kardiyotoksinler, dokuları tahrif eden toksinler ve hemolitik faktör yer alır. Zehirsiz bileşikler ise, kobra venom faktör (KVF), sinir üreme faktörü (SÜF), anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü (ADEİ) ve kan pıhtılaşması üzerinde etkili olan bileşiklerdir. Zehir ayrıca, hidrolitik (fosfolipaz A<sub>2</sub>, fosfodiesteraz, fosfomonoesteraz,

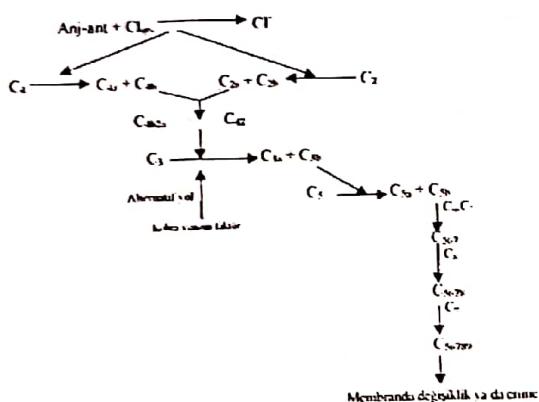
asetilkolin esteraz, proteolitik enzimler, azjinin ve diğer esterazlar, hyaluronidaz ve nikotin amid dinükleotid (NAD) nükleotidaz gibi) ve hidrolitik olmayan (L-amino asit oksidaz, laktat dehidrojenaz, katalaz gibi) enzimler içerir. Yılan zehirlerinde,

protein yapısında olmayan bileşikler de vardır. Zehirde bulunan bileşiklerin bazılarının bilimsel kullanım alanları bulunmaktadır. Bu bileşiklerin başlıcaları; SÜF, post ve presinaptik toksinler, KVF, trombin benzeri enzimler ve fibrin eritiçici enzimlerdir. Bu bölümde yalnızca zehirsiz bileşiklerden bahsedilecektir.

**1. Kobra venom faktör (KVF):** KVF; kobra zehiri ve diğer *Elapidae*'lerden izole edilmiştir. Anti-kor-antijen etkileşmesi olmaksızın komplement sistemi etkinleştirir. Bu etkinleşme bir serum etkinleştirici ile KVF'nin etkileşmesi aracılığıyla gerçekleşir. KVF, alternatif yolu etkinleştirir ve endojen bileşik C<sub>3</sub> (komplement 3)'den, C<sub>3a</sub> ve C<sub>3b</sub>'yi oluşturur. C<sub>3b</sub>, C<sub>5</sub> üzerinden, C<sub>5a</sub> ve C<sub>5b</sub>'yi şekillendirir. Bu reaksiyonlar sonucunda; eğer ortamda bakteri ve eritrosit varsa bunlarda erime, mast hücrelerinden, trombosit ya da lökositlerden, histamin saliverilmesi, fagositozisin

artması, düz kasların kasılması, trombositlerin erimesi veya kümelenmesi, kan pihtlaşma süresinin kısalması gibi sitotik ve sitotik olmayan mekanizmalar etkin hale gelir.

KVF'ün bağılıklık sistemini baskılıyıcı etkisi de vardır. Bu etkiyi  $C_3$ 'ün düzeyinin düşürülmesine bağlı olarak gerçekleştirir. Bu özelliğinden nakledilmiş organların reddini engellemede ve dokuların hayatı kalma süresini uzatmadı faydalıdır. Bunların dışında antikomplement KVF enjekte edilmiş farelerdeki tümoral yapıdaki hücrelerin çoğalmasında hızlanma, mortalite oranında artış ve immunoglobulin seviyesinde düşüş tespit edilmiştir (1, 17, 24).



Şekil 1. Kobra Venom Faktörünün Etki Şekli (1).

**2. Sinir üreme faktörü:** Özellikle *Elapidae*, *Viperidae* ve *Krotalidae* yılan zehirlerinde oldukça sık rastlanan, öldürücü etkinliği olmayan bir glikoproteindir.

Sinirsız ve sinirsız olmayan etkileri vardır. Sinirsız etkiler; periferal sempatik sinirlerin gelişmesini başlatır ve gelişmenin ilk aşamasında bazı duyarlı nöronların şekeleme mesinde rol oynar.

*Naja naja* zehirinden izole edilen SÜF bu şekilde etki oluşturmaktadır. Bununla beraber fare tükrük bezlerinden izole edilen SÜF ile benzer ve farklı yönleri vardır. Amino asit dizilişlerinin yaklaşık %60'ı benzerdir. Fare tükrük bezinden izole edilen SÜF, beta alt ünitesinin etkin olduğu alfa, beta, gamma alt ünitelerinden oluşur. Yılan SÜF'te ise alfa, beta, gamma kompleksi yoktur. Fonksiyonel olarak aynı protein yoğunluklarında tavuk embriyosu üst kol ganglionlarında her iki faktör de aynı düzeyde sinir hücresi üremesine yol açmaktadır (20).

Sinirsız olmayan etkileri ise; *Vipera lebetina* zehirinden izole edilen SÜF; zayıf arjinin esteraz etkinliği göstermektedir. Bütün izoformların molekül ağırlığı özdeş olup 32.500'dür. Ayrıca, SÜF bütün kan hücreleri üzerine etkiyerek histamin salıverilmesine sebep olur. Etkisini  $C_{5a}$ yi etkinleştirerek gösterir; direkt etkisi yoktur (12, 21).

**3. Otofarmakolojik etki:** Bu etki zehirde doğal olarak bulunmayan sakin zehirlenme durumunda vücuttan salıverilen histamin, serotonin ve bradikinin gibi endojen maddelere bağlı olarak şekeleme olur. Etkiler özellikle damar sistemi üzerindedir. Otofarmakolojik maddeler kapiller geçirgenliğini artırır. Buna bağlı olarak doku ödemi, anemi ve dolaşan plazma hacminde düşme görülür. Damarlarda genişlemeye sebep olur; damar genişlemesini, kan basıncında düşme ve kanın çevrede göllenmesi izler. Bu etkisi; *bradikinin şoku* olarak da nitelendirilir. Yılan zehirlerinde; bradikininojeni, bradikinine dönüştüren *bradikinin serbestleştirici enzim* bulunur.

Ayrıca; *Krotalidae* ve *Viperidae* yılanlarının ısrarması sonucunda kinin ve biyojenik aminlerin salınmasına bağlı olarak şiddetli ağrı görülür (1).

**4. Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) etkinliğini engelleyen bileşikler:** ADE etkinliğini engelleyen bileşikler; *bradikinin güçlendirici faktör* olarak bilinir. Çünkü; bu enzimin etkinliğini engelleyen bileşikler, bradikininin kan basıncını düşürücü etkisini artırır. Anjiyotensin dönüştürücü enzimler anjiyotensin I'yi, anjiyotensin II'ye dönüştürür. Anjiyotensin II ise kan basıncını artırır (1).

**5. Kan pihtlaşması üzerinde etkisi olan yılan zehirleri:** Yılan zehirlerinin kan pihtlaşma sistemi üzerinde güçlü etkileri vardır. Bazıları pihtlaşmayı hızlandırırken, bazıları da geciktirir. Yılan zehirleri çoğunlukla pihtlaşma yapan ve pihtlaşmayı önleyen zehirler olmak üzere iki gruba ayrılr. Fakat bu oldukça basit bir yaklaşımdır. Zehirde, hem pihtlaşmayı yapan hem de pihtlaşmayı önleyen faktörlerin bulunması mümkündür. Pihtlaşmayı yapıcı veya pihtlaşmayı önleyici etki, faktörün yoğunluğuna bağlı olarak değişir.

Fibrin eritici etkinlik, pihtlaşma yapan etkinlikten daha güçlü olduğunda fibrin gözlenmez. Çünkü, gerçekte fibrin oluşmaz. Pihtlaşma yapıcı etkinlik, fibrin eritici etkinlikten güçlü olduğu durumlarda ise fibrin şekeleme olur. Zehirde, pihtlaşmayı yapan ve pihtlaşmayı önleyen kısımların oranından zehirin, pihtlaşmayı yapıcı veya pihtlaşmayı önleyici olduğu tesbit edilebilir. *Kobra* ve *mambas* gibi *Elapidae* zehirleri genellikle pihtlaşmayı önler. Yılan zehiri trombus önleyici enzimler, trombosit kümelenmesini engeller-

ken, fibrinolitik sistemi etkinleştirip plazma fibrinojen seviyesini belirgin bir şekilde düşürdüğü görülmüştür (1, 25).

### 5.1. Pihtlaşma yapıcı etki

**5.1.1. Faktör V'in etkinleşmesi:** Russell's viper zehirlerinde, faktör V'i etkinştiren serin proteazları bulunur. Russel viper zehir Faktör V etkinleştiricisi (RVZ-V); faktör V'i, faktör Va'ya dönüştürken tek zincirli peptid bağını parçalar. RVZ-V'in parçaladığı bağ, faktör V'deki trombin duyarlı bağlarından birisidir.

**5.1.2. Faktör X'un etkinleşmesi:** Russell's viper zehirleri, insan kanını pihtlaşdırıcı faktör X'un güçlü bir etkinleştiricisini de içerir. Bu enzim, RVZ-X olarak bilinir. Faktör X etkinleştiricisi *Bothrops atrox* ve birkaç yılın zehirinden de izole edilmiştir. RVZ-X, 59.000 molekül ağırlığında ağır zincir ve 19.500 molekül ağırlığındaki hafif zincirden oluşan ve birbirlerine bir disülfit bağlı ile bağlı glikoproteinlerdir. RVZ-X'un ağır zinciri, metalloproteinazlardan oluşmuştur ve sistein yönünden zengindir. Kalsiyum bağımlı hafif zincir, C tip lektinlere benzerdir. RVZ-X; bu pihtlaşma faktörünün, hafif zincirinin aminoterminal bölgesindeki spesifik peptid bağını ayırarak faktör X'u etkinleştirir. Bu etki insanlardaki kan pihtlaşma

yolunu oluşturan mekanizmayla özdeşdir. *Cerastes cerastes* ve *Rhabdophis subminiatus* zehirleri bu faktörü içerir.

**5.1.3. Faktör IX'un etkinleşmesi:** RVZ-X'un faktör IX'u etkinleştirmesi sonucunda oluşan IXa'nın molekül ağırlığında herhangi bir değişiklik yoktur. Faktör XIa tarafından faktör IX'un etkinleştirilmesinde ise bir peptid salınır ve oluşan IXa'nın molekül ağırlığı düşer (7).

**5.1.4. Protrombinin etkinleşmesi:** Protrombin (faktör II); molekül ağırlığı 72000 olan tek zincirli glikoproteindir. Faktör Xa; faktör Va, fosfolipid ve  $Ca^{+2}$  varlığında protrombinin iki peptid bağını koparak protrombini etkinleştirir.

**i.Grup I etkinleştiriciler:** Molekül ağırlıkları 50.000-70.000 arasında değişen metalloproteinler bu grupta yer alır. Bu grubun üyelerinin protrombin üzerine etkisinde protrombinin etkinleşmesine sebep olan yardımcı etkinleştiricilerin (faktör Va,  $Ca^{+2}$  ve fosfolipaz) herhangi bir rolü yoktur. *Echis carinatus* zehirinden izole edilen *ekarin*, bu grupta yer alır. Arjinin 322-izolöysin 323 arasındaki bağın parçalanması sonucu meizotrombin oluşur.

Tablo 1. Grup I etkinleştiricilerin yapısı ve fonksiyonel özellikleri.

Kaynak	Molekül ağırlığı	Alt üniteleri	Etkinliğini engelleyenler	Yardımcı faktörler	Ürün	
Echis carinatus	55.000 63.000	56.000 85.000	Tek zincir	Kelasyon yapan ve indirgeyici maddeler  EDTA	Yok  Yok	Meizotrombin
Dispholidus typus	50.000	58.000		—	—	Meizotrombin
Rhabdophis tigrinus tigrinus	170.000	84000 52000		—	—	Meizotrombin
Thelotornis kirtlandi capensis	56.000	Tek zincir	İndirgeyici maddeler	Yok	—	
Bothrops atrox	70.000	Tek zincir	Kelasyon yapan ve indirgeyici maddeler	—	Meizotrombin	
Bothrops neuwiedi	60.000	Tek zincir	Kelasyon yapan ve indirgeyici maddeler	Yok	Meizotrombin	

(18)

**ii. Grup II etkinleştiriciler:** Faktör Xa'ya benzerlik gösterir ve protrombindeki her iki peptid bağını da parçalar. Bu grubun üyeleri tek başına protrombine karşı etkisizdir ve etkinliğini  $Ca^{+2}$ , fosfolipid ve faktör Va varlığında gösterir. Bu enzimler *Australya Elapid*

ve *Aslan yılatı* (*Notechis scutatus scutatus*)'dan izole edilmiştir. Reaksiyon sonucunda trombin, meizotrombin ve pretrombin 2 oluşur.

**Tablo 2.** Grup II etkinleştiricilerinin yapısı ve fonksiyonel özellikleri.

Kaynak	Molekül ağırlığı	Alt üniteleri	Etkinliğini engelleyenler	Yardımcı faktörler	Ürün
<i>Notechis scutatus</i>	54.000	32.000 23.000	Benzamidin, DFP, SFTE, $\gamma$ -GGAK	Fosfolipid, Fak. Va, Ca <sup>+2</sup>	Trombin, Meizotrombin, Protrombin 2
<i>Notechis ater tiger</i>	58.000	37.000 23.000	—	Fosfolipid, Fak. Va, Ca <sup>+2</sup>	—

(18) DFP: Dizopropilflorofosfat, SFTEE: Soya fasülyesi tripsin etkinliğini engelleyenler,  $\gamma$ -GGACK : Yoğun Glutamin-Glisin-Arjinin-Klorometilketon

**iii. Grup III etkinleştiriciler:** Protrombinin etkinleşmesi için yalnızca Ca<sup>+2</sup> ve fosfolipide gereklilik gösterir. Fakat faktör Va'ya ihtiyaç duymaz. Bu

etkinleştiriciler, Avustralya Elapid'leri ve Taipan zehirinden izole edilmiştir.

**Tablo 3.** Grup III etkinleştiricilerinin yapısı ve fonksiyonel özellikleri.

Kaynak	Molekül ağırlığı	Alt üniteleri	Etkinliğini engelleyenler	Yardımcı faktörler	Ürün
<i>Oxyuranus scutellatus</i>	300.000 380.000	Çoğul alt ünite	Benzamidin, SFTI, $\gamma$ -GGAK	Fosfolipid, Ca <sup>+2</sup>	Trombin, Meizotrombin
<i>Pseudonaja textilis</i>	>200.000	Çoğul alt ünite	—	Fosfolipid, Ca <sup>+2</sup>	—

(18)

**iii. Grup IV etkinleştiriciler:** Birkaç yılan zehiri; protrombini, trombin ya da meizotrombin gibi katalitik ürünlere dönüştürmeksızın protrombinin

3.(arjinin 135-serin 136) ve 4.(arjinin 286-tirozin 287) bölgelerdeki peptid bağlarını parçalar; oluşan ürünler etkin değildir (18).

**Tablo 4.** Grup IV etkinleştiricilerinin yapısı ve fonksiyonel özellikleri.

Kaynak	Molekül ağırlığı	Etkinliğini engelleyenler	Yardımcı faktörler	Ürün
<i>Agistrodon acutus</i>	33.500	DFP, FMSF	—	Protrombin 1
<i>Agistrodon rhodostoma</i>	25.600	FMSF, Alfa 2-M, AT III	Ca <sup>+2</sup>	Protrombin 2
<i>Agistrodon contortrix</i>	—	—	Ca <sup>+2</sup>	Protrombin 1
<i>Agistrodon atrox</i>	36.000	AT III, DFP, SFTEE, klorometilketonlar	—	Protrombin 2
<i>Crotalus adamanteus</i>	32.700	DFP, klorometilketonlar, 2 ME	Ca <sup>+2</sup> , Fosfolipid	Protrombin 1 Protrombin 2

FMSF: Fenilmetilsülfonilflorit, alfa 2 M: alfa 2- makroglobulin, AT III: Antitrombin III, SFTEE: Soya Fasülyesi Tripsin Etkinliğini Engelleyenler, 2 - ME: 2 - mercaptoetanol, DFP: dizopropilflorofosfat (19).

### 5.1.5. Fibrinojenin fibrine dönüşümü: Bazı yılan zehirleri fibrinojeni fibrine dönüştüren trombin

benzeri enzimlere sahiptir. Bu enzimler *Bitis gabonica*, *Cerastes vipera*, *Agistrodon contortrix contortrix*, *Crotalus adamanteus* ve *Bothrops atrox* yılan zehirlerinde yaygın olarak bulunur. *Yılan zehiri fibrinojen dönüştürücü* enzimler, fibrinojenden fibrinopeptid A ve fibrinopeptid B veya her ikisinin açığa çıkışına durumuna göre birkaç grupta ele alınır (14).

**I-Venombin A:** Bu grupta bulunan enzimler fibrinojenden, fibrinopeptid A açığa çıkarır. *Calloselasma rhodostoma* (*Agistrodon rhodostoma*) zehirinden, *ankrod*; *B. atrox*'dan *batroksobin* ve *C. adamanteus* zehirinden *krotalaz*'ın in vivo olarak verilmesinden birkaç dakika sonra kandaki fibrinojen düzeyi düşer. 1-2 gün arayla tekrarlanarak verilmesini takiben düşüş daha da hızlanır. Bazen bu seviyede 7 hafta kadar kalır. Plazma fibrinojen seviyesinin düşüşü kan viskozitesinin artışı ile sonuçlanır. Test tüplerinde pıhtılaşıcı özelliktedir ve fibrin oluşturur. Bu üç zehir enziminin de yaygın özelliği fibrinojenin A alfa zincirindeki arjinin 16-glisin 17 bağıntı parçalar ve fibrinopeptid A açığa çıkarır ve fibrinojenden, fibrin oluşumuna sebep olur. Enzimlerin faktör XIII üzerindeki etkisi çok zayıftır ve trombosit kümelenmesine sebep olmaz (10, 24).

**Arvin:** pH'ı 2.5-8 arasında bulunan pıhtılaşma sebep olan serin proteazlarındandır. Pıhtılaşıcı etkisinin yanı sıra katalitik etkisi de bulunmaktadır. Fibrinojen; Aalfa, Bbeta ve gama olarak bilinen üç polipeptid zinciri içeren alt ünitelerden oluşur. Trombin, Aalfa ve Bbeta zincirlerinin terminal azota bağlı arjinin-glisin bağıntı hidrolize ettiğinde fibrinopeptid A ve fibrinopeptid B açığa çıkar. Fibrinojenin geri kalan kısmı fibrin oluşturmak için polimerize olur. Arvinde ise fibrinojen, fibrine dönüşürken sadece fibrinopeptid A açığa çıkar. Arvin, trombin benzeri enzim olarak nitelendirilmesine rağmen trombinle özdeşleştirmek doğru olmaz. Trombinin oluşturduğu fibrin, arvinin oluşturduğundan kimyasal yapı ve fiziksel özellik yönünden farklıdır. Normal fibrin birbirine güçlü çapraz bağlarla bağlanmış olmasına rağmen; arvinin oluşturduğu fibrin zayıf bağlardan oluşmuştur ve hızla parçalanır. (2, 3).

**II-Venombin AB:** Trombin benzeri enzimlerin ikinci grubunu fibrinojenden hem fibrinopeptid A hem de fibrinopeptid B salan enzimler oluşturur. *B. gabonica* zehirinden izole edilen enzim bu grubun temsilcisidir ve *gabonaz* olarak adlandırılır. Gabonaz, molekül ağırlığı 30.600 olan glikoproteindir ve serin proteinazdır. Gabonaz'ın pıhtılaşma yapıcı etkisini,

fibrinojendeki Aalfa zincirindeki arjinin 16-glisin 17 bağıntı parçalayıp, fibrinopeptid A'yı salarak gösterir. Bbeta zincirindeki arjinin 15-glisin 16 arasındaki peptid bağıntı ise daha yavaş bir şekilde parçalayıp fibrinopeptid A açığa çıkarır. Gabonaz, fibrin oluşturuğu karışımı eklendiğinde faktör XIII'ü etkinleştirir. Bu fibrinin, alfa zincir polimerleri ve gama zincir dimerlerinin oluşumuyla sonuçlanır (14).

**Halistaz:** iki yerinde azota bağlı karbonhidrat içerir (%13) ve trombin benzeri yılan zehiri serin proteazlarına benzerlik gösterir (%66- %72). Halistaz doku-kallikrein substratını hidrolize eder ve sığır kininojen bradikinin saliverilir. Halistaz, insan plazmasını pıhtılaştmaz fakat 42 nolu arjinin kalıntısının karboksil tarafındaki fibrinojen beta zincirini hızlı fibrinojen alfa zincirini ise yavaşça ayırr. Proteolitik etkinlik dizopropilflorofosfat, fenilmetsülfonilflorid ya da leupeptin ile engellenir. Yapısal olarak trombine benzerlik gösterir. Fakat fibrin oluşumuna sebep olmaz ve fibrinojeni parçalama yerleri trombinden farklıdır. Bunun yanı sıra, kininojeni de hidrolize ederek bradikinin oluşturur ve kan basıncını düşürür (15).

Bazı yılan zehirlerinin oluşturduğu fibrin, trombinin oluşturduğu fibrine çok benzer. *Cerastes vipera* zehirinden izole edilen *serastobin* bu grupta yer alır. Serastobin, 348 amino asit kalıntısına sahip olup molekül ağırlığı 38.000'dir. Faktör X'un etkisi serastobin tarafından azaltılır. Enzimin antitrombin III'ün etkinliğini de azalttığı tespit edilmiştir. Enzim, fibrin monomerlerinin alfa ve beta zincirlerini yüksek derecede hidroliz eder fakat hidrolize, alfa zinciri oldukça dirençlidir. Serastobin'in oluşturduğu fibrinin parçalanması güç olduğu için, vücutun herhangi bir bölgesinde tromboza sebep olabilir (6).

**III- Venombin B:** Trombin benzeri enzimlerin üçüncü sınıfı fibrinojenden, fibrinopeptid B açığa çıkarı enzimleri içerir ve *A. contortrix contortrix* zehirinden izole edilen bu enzim *venzim* olarak adlandırılır. Enzim molekül ağırlığı 64.000 olan bir serin proteinazdır. Antılımiş enzim; trombosit kümelenmesine ve faktör XIII'ün etkinleşmesine sebep olmaz. Bu enzim küçük arjinin ester substratlarını hidrolize eder (14).

## 5.2. Pıhtılaşma önleyici etki

**5.2.1. Protein C etkinleştiricileri:** Etkinleştirilmiş protein C, pıhtılaşma faktörlerinden faktör VIIIa ve faktör Va'nın etkisini proteolitik olarak zayıflatıp ve fizyolojik rol oynayan vitamin K bağımlı serin proteazlardır. Böylece kanamayı durdurucu sürecin düzenlenmesine yardımcı olur. Trombin, damar duvarı üzerindeki fibrinojen dönüştürücü etkisini kaybeder ve damar endoteline bağlı bulunan trombomodulin ile etkileşerek protein C etkinleştiricisi oluşur. İkinci bir

vitamin K bağımlı protein, protein S'dir ve protein C'nin yardımcı faktörü olarak görev yapar.

*Russell's viper* zehirlerinin protein C'yi etkinleştirme yeteneği zayıftır. Oysa, *Agistrodon contortrix contortrix* zehiri güçlü protein C etkinleştiricisi içerir. Trombomodilin ve trombinde bağımsız olarak etkiler. Bu etkinleştiricilerin molekül ağırlığı 39.000-40.000 olup ısiya dayanıklıdır. Bundan dolayı protein C'nin tesbitinde ayıraç olarak kullanılır (14).

**5.2.2. Pihtlaşma önleyici etkinliği olan fosfolipazlar:** Fosfolipazlar, yılan zehirlerinde aynı anda pek çok işe görev alır. Bazıları trombositleri kümelenir; bazıları trombositlerin dış yüzündeki fosfatidilkolin gibi trombosit fosfolipidlerinin etkisini engeller ve pihtlaşmayı geciktirir. Bu fosfolipazların pihtlaşıcı etkisi de vardır.

Pihtlaşma önleyici fosfolipaz içeren zehirler *Naja nigricollis* (*Vipera berus*), *Avrupa adder* ve *Tropical rattlesnake* (*Crotalus durissus terrificus*) de bulunur (9).

**5.2.3. Antitromboplastik bileşikler:** Bu zehir bileşiklerinin; kalsiyum, faktör Xa, faktör V ve trombosit fosfolipid matrixi ile protrombinin etkileşimiini önleyerek etkidiği görülmüştür. Bu şekilde etki gösteren yılan zehiri; *Dein-agistrodon acutus* ve *Trimeresurus gramineus*'dır. *Australopus superbus*, *Pseudechis australis* ve *Acanthophis antarcticus*'u içine alan Avustralya Elapidleri tamamıyla benzer mekanizmayla güçlü pihtlaşma önleyici etki oluşturur (9).

**5.2.4. Fibrinojen parçalanma ürünleri:** Yılan zehiri fibrinojen parçalanma ürünleri trombine bağlanır; fibrin oluşumunu önler ve trombosit kümelenmesine engel olur. Pihtlaşıcı etkisi ise çok yavaşır yada hiç yoktur. Bu yüzden antikoagulant olarak bilinirler (9).

**5.2.5. Fibrin eritici proteazlar:** Bu enzimler; *Rattlesnake* ve *Caperhead*'ları içine alan Kuzey ve Güney Amerikan yılanlarının pek çoğundan, Elapidlerden, Kobra ve Avrupa Viperlerinden izole edilmiştir.

Fibrin eritici proteazlar, metalloproteazlar ve serin proteazlar olmak üzere iki grupta incelenir. Yılan zehirlerinden izole edilen ve bu özelliklerini gösteren toksinlerin bir kısmının pihtlaşma önleyici etkisi vardır.

**i-Fibrin eritici metalloproteinler:** Metalloproteinaz ve disintegrin prekürsörlerinin yapısı gözden geçirildiğinde 4 bölümden oluşan tesbit edilmiştir.

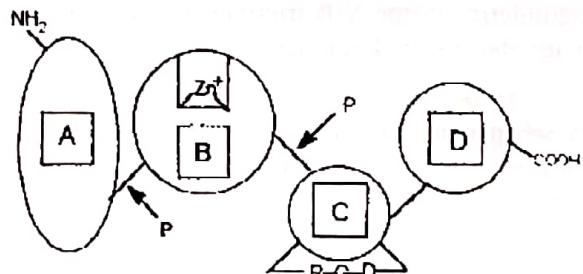
**Bölüm A:** Molekül ağırlığı 24.000 olup 210 amino asit kalıntısı içerir. Bu kısım kuvvetli asidik özellik gösterir.

**Bölüm B:** Molekül ağırlığı 23.000-24.000'dir ve 200-204 amino asit kalıntısı içerir. Metalloproteinaz etkinliği için metal bağlayıcı yer ve katalitik bölgesi vardır.

**Bölüm C:** Molekül ağırlığı 95.000 olup 85 amino asit kalıntısı içerir. 485-487 arasında yer alan amino asitler *arjinin-glisin-serin*'dir. Bu kısım integrinlerle birleşir ve trombositlerin kümelenmesini engeller.

**Bölüm D:** Molekül ağırlığı 14.000 olup 120 amino asit kalıntısı içerir. Bu bölge sistein yönünden zengindir ve diğer bölgelerdeki zincir dizilişlerine benzerlik göstermez. Bölüm D'nin enzimatik ve biyolojik etkiliğe katkıda bulunup bulunmadığı bilinmemektedir.

R-G-D : Arjinin- Glisin- Serin (12)



**Şekil 2.** Metalloproteinaz ve disintegrin prekürsörlerinin yapısı.

Krotalid ve Viperid zehirlerinden izole edilen metalloproteinazların molekül ağırlıkları

15.000-100.000 arasındadır ve molekül ağırlıklarına göre 4 gruba ayrılır.

**a. Küçük metalloproteinazlar:** Molekül ağırlığı 22.000-27.000 arasındadır. Prekürsör protein'in bölüm B yapısını gösterir. Bu proteinlerin metal bağlayıcı bölgesi ve enzimatik olarak etkin yerleri vardır. *Trimeresurus mucrosquamatus* zehiri; *hemorajik faktör a* ve *b* olmak üzere iki proteinaz içerir. Hemorajik faktör a; 15.000 molekül ağırlığında asidik, faktör b ise 27.000 molekül ağırlığında bazik protein-

dir. Faktör a'daki 211-300 arasındaki asidik kalıntılar, bazik kalıntılarından fazladır.

b. Ara grupta yer alan (Küçük ve orta metalloproteinazlar arasında) **metalloproteinazlar**: Bu enzimler *bölüm B* ve *bölüm C* yapısı gösterirler. *A. acutus*'dan **fibrinojenaz** (molekül ağırlığı: 31.000) ve *Bitis orientalis*'den, **proteinaz** (molekül ağırlığı: 30.000) izole edilmiştir.

c. Orta metalloproteinazlar: Molekül ağırlıkları 46.000-70.000 arasındadır. *T. flavoviridae*'den izole edilen, **HRIB** bu grupta yer alır. Bu proteinazlar *bölüm B,C* ve *D*'yi içerir.

d. Büyüük metalloproteinazlar: *Bölüm A, B, C* ve *D*'den oluşur. Molekül ağırlıkları 71.000'dir. Zincir dizilişleri tesbit edilememiştir (11).

**Metalloproteinler**; fibrin(ojen)az etkinliği gösterir ve fibrinojenlerin alfa ve beta zincirini parçalarlar. Fakat alfa zinciri üzerindeki etkinliği daha güçlündür. Fibrinojeni parçalamaları sebebiyle pıhtılaşma engelleyici etkinlik gösterirler. Alfa fibrinojenazlardan bazıları, trombosit kümelenmesini inhibe eder. Etkisi, fibrinojen yıkımılanma ürünlerinin birikmesi nedeniyedir. *A. rhodostoma* ve *T. mucrosquamatus* zehirleri bu grupta yer alır (11).

Hemorajik etkinlikten sorumlu olan *C. atrox*'dan izole edilen **atroksaz** ve *A. contortrix* *contortrix*'den izole edilen **fibrolaz**; fibrinin ve fibrinojen'in alfa zincirini; beta zincirinden daha hızlı parçalar. *Naja nigricollis*'den izole edilen fibrinojenaz yalnızca fibrin ve fibrinojenin alfa zincir ya da alfa polimerini parçalar. *Vipera lebetina*'dan izole edilen fibrinolitik enzim plazminojeni aktive etmeyen Aalfa, Bbeta sırın(ogen)az'dır. Bunlar arasında; *C. atrox* zehirinin fibrinolitik etkinlik gösterdiği tesbit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda, fibrinolitik etkinlik gösteren kısmın molekül ağırlığının 21.500-60.000 arasında olduğu anlaşılmıştır. Zehirden molekül ağırlıkları sırasıyla 20.000, 31.000, 24.000 ve 46.000 olan **proteaz I, II, III, IV** olarak adlandırılan dört proteaz tesbit edilmiştir. Proteaz II ve III; plazmadaki fibrinojen seviyesini düşürür. Hemorajik toksinlerden molekül ağırlığı 24.000 ve 60.000 olan **Ht-b** ve **Ht-g**; fibrinojenin Aalfa ve Bbeta zincirlerini hidrolize ederken, üçüncü toksin **HT-f** ise gama zincirini hidrolize eder (22).

*Cerastas cerastas* zehirinden elde edilen **serastaz F-4**, 22.500 molekül ağırlığında alt ünitesi olmayan tek zincirli polipeptiddir. Bu zincirin %28'ini aspartik asit kalıntıları ve %7'sini bazik amino asitler oluşturur. Kanamaya sebep olan kısım izoelektrik noktası 5.2 olan asidik bir proteindir. Enzim hem fibrinojeni hem de fibrini hidrolize eder.

Optimum ısı 55 °C'dir; öldürücü ve kanamaya sebep olan etkinliği oldukça zayıftır (5).

ii- **Serin proteinazlar**: Bu grupta yer alan zehir proteinazları, fibrinojen ve fibrinin beta zincirini parçalar. Bunlar, arjinin esteraz etkinliği gösterir. Bu enzimlerin molekül ağırlıkları 23.000-35.000 arasındadır. Serin proteinaz olmalarına rağmen; fibrinojenden, fibrinopeptid A ve fibrinopeptid B açığa çıkarılan trombin benzeri yılan zehiri serin proteinazları ile benzerlikleri yoktur.

### 5.3. Koagulant- antikoagulant etki

Malayan çingiraklı yılanı (*Agistrodon rhodostoma*) hem koagulant hem de antikoagulant zehirlere örnektir. Koagulant etkisi, fibrinojeni fibrine dönüştürmesiyle ilgilidir. Fakat bu zehirin oluşturduğu pihti, doğal fibrin pihtısından farklıdır ve mikropihtılardan oluşur. Bu pihti hızla plazmadan uzaklaştırılır ve birbirini takip eden şiddetli fibrinolitik reaksiyonlarla eritilir veya RES tarafından uzaklaştırılır. Sonuçta kan pıhtılaşmazken, fibrinojenin de tekrar sentezlenme süresi uzar. Bu açıdan zehir antikoagulant olarak da tanımlanabilir (1).

### 5.4. Trombositler üzerine etkisi

Yılan zehirlerinin trombositler üzerine etkisi iki yönlüdür. Bazıları trombositleri kümelenirken bazıları da trombositlerin kümelenmesini önler. Bazı zehirler de (*Krotalit*) ise her iki faktör de birarada bulunur ve zehirden ayrı ayrı izole edilebilir.

#### 5.4.1. Trombositleri kümelenen bileşikler

**Trombositler üzerine direkt etkisi olan enzimatik bileşikler**: Trombositler üzerine direkt etkisi olan enzimler; **serin proteinaz**, **krotalositin** ve **trombositin**'dır. *Timber rattlesnake* zehirinden izole edilen krotalositin, molekül ağırlığı 55.000 olan tek zincirli polipeptiddir. Trombositin; *Kuzey Amerikan Pit Viper*, *B. atrox*'dan izole edilmiştir ve molekül ağırlığı 36.000 olan bir glikoproteindir. Trombositinin, trombosit kümelenici ajan olan **trombosit adenozin difosfatı** (ADP) salınımını teşvik ettiği görülmüştür. Krotalositin, yalnızca ADP salımını teşvik etmez aynı zamanda tromboksan A<sub>2</sub> ve diğer trombosit agonistlerinin oluşumunda da görev alır.

Fosfolipaz A<sub>2</sub>, trombosit kümelenmesini teşvik eden, zehir enzimlerinin ayrı bir grubunu oluşturur. Genelde, bu maddeler trombosit membran fosfolipidlerini ayırır sonuçta araşidonik asit ve tromboksan A<sub>2</sub> oluşur.

**Trombositler üzerine direkt etkisi olan enzimatik olmayan bileşikler**: Bu grupta bulunan

bileşikler, farklı yılan zehirlerinden izole edilen *lektinler*'dir. Lektinler, trombositler üzerinde yer alan fibrinojen reseptörleri (trombosit glikoprotein IIb/IIIa)'inde konformasyonel değişikliklere sebep olarak reseptörlere fibrinojenin bağlanması kolaylaştırır; bağlanmayı takiben de trombositlerde kümeleşmeye şüklenir.

Koagulant ve enzimatik olmayan zehir trombosit kümeleştirici maddelerin diğer bir grubu; *Kuzey Amerikan rattlesnake*, *C. durissus terrificus*'dan izole edilen *convulksin*'dır. Bu protein iki alt ünitesi olan yüksek molekül ağırlıklı glikoprotein kompleksidir. En güçlü trombosit kümeleştirici ajanlardan biridir (14).

**Plazma yardımcı faktörlerine gereksinim duyarak trombosit kümeleşmesine sebep olan bileşikler:** Plazma von Willebrant Faktör (vWF), trombosit glukoprotein Ib (integrin)'ye bağlanmada ve damar çeperinin tahribatı sonucu oluşan kanamalarda anahtar rol oynar. vWF; endotel hücreler ve megakaryositler tarafından sentezlenir ve kana serbestlenir. Molekül ağırlığı 275.000'dir ve 2050 amino asit kalıntısından oluşmaktadır. GPIb'ye bağlanan bu faktör normal koşullarda oluşmaz. *Ristosetin* ve *yılan zehir Botrosetini* varlığında şüklenir. Son zamanlarda gerilime bağlı olarak da oluştuğu tespit edilmiştir. Koroner arterlerin daralmasının temelinde, stres bağımlı vWF'ün, GPIb ile birleşmesi ve trombositleri kümeleştirmesi yatmaktadır (18).

*Botrosetin*, *Botrops* türünün birkaç yılan zehirinden izole edilmiştir ve trombosit kümeleştirici etkisini vWF aracılığıyla gösterir. vWF'ün kümeleştirici etkinliği şöyledir: İlk önce trombositler üzerinde bulunan matriks bileşiklerine bağlanır. vWF, genellikle matriks bileşiklerinden tip III kollajeni tercih eder. Oysa, tip I, IV, V, VI kollajen, fibronektin, laminin, elastin ya da proteoglikonlara belirgin bir şekilde bağlanmaz. vWF, matriks bileşenleriyle etkileşikten sonra GPIb'ye bağlanır. Bunun sonucu olarak kümeleştirici etkinlik gösterir (16).

Botrosetin, iki adımda trombosit kümeleşmesini teşvik eden 26.5 kilodalton ağırlığında disülfit bağlarla bağlı heterodinamik bir proteindir. Botrosetin, ilk adımda, aktif kompleks oluşturmak için vWF'e bağlanır. İkinci adımda, bu etkin kompleks vWF reseptörü olan *integrin GPIb*'ye bağlanır. Madde, bu reaksiyonda bir köprü olarak hizmet eder ve reaksiyon trombosit kümeleşmesiyle sonuçlanır. GPIb'ye bağlanan proteinler diğer yılan zehirinden de izole edilmiştir ve yapı olarak botrosetin'e benzerlik gösterir (18).

#### 5.4.2. Trombosit kümeleşmesini engelleyen bileşikler

Trombosit kümeleşmesini engelleyen yılan zehirleri etki mekanizmalarına göre beş grupta ele alınmıştır.

**Birinci grup:** fibrinojen alfa zincirinin yapısını bozan Kuzey-doğu Asya zehirinde bulunan *alfa fibrinojenazları* içine alır. Bu enzimler, ADP bağımlı trombosit kümeleşmesini inhibe eder.

**İkinci grup:** fosfolipaz A<sub>2</sub>'ler bu grupta yer alır. Bazi fosfolipazlar iki yönlü etki oluşturur. Kısa süreli inkübasyon ya da düşük enzim yoğunluğunda kümeleştirici etki; ya da yüksek yoğunluklarda ya da uzun süreli inkübasyondan sonra kümeleşmeyi engelleyici etkinlik; bu etkinlik muhtemelen araşidonik asit metabolitlerinin oluşturduğu parçalanmış ürünler sebebiyedir.

**Üçüncü grup:** trombosit kümelestiren ADP'nin parçalanmasına sebep olan 5' nukleotidazları içine alır.

**Dördüncü grup:** bu grupta disintegrinler yer almır (*fibrinojen reseptör antagonistleri*).

**Fibrinojen reseptör antagonistleri:** Yılan zehirlerinde bulunan trombosit kümeleşmesini önleyen en ilginç grup *fibrinojen reseptör antagonist (disintegrin)*'leridir. Bu ilginç moleküllerin yapısı ve fonksiyonu son zamanlarda keşfedilmiştir. Disintegrin, hücre yüzeyinde bulunan ve *integrin* adı verilen reseptörlere bağlanan disülfit bağlı yönünden zengin polipeptidlerdir (7).

Enzimatik etkinlikleri yoktur ve integrinlere bağlanarak, onların etkinliklerini engellerler. Disintegrinler, Krotalid ve Viperid yılan zehirlerinden izole edilmiştir. Disintegrinler 3 alt grupta ele alınmıştır:

a. 47-51 amino asit kalıntısı ve 4 disülfit bağlı bulunduran kısa zincirli disintegrinler,

b. 68-75 amino asit kalıntısı ve 6 disülfit bağlı bulunduran orta zincirli disintegrinler,

c. 83-84 amino asit kalıntısı ve 7 disülfit bağlı bulunduran uzun zincirli disintegrinler.

*Echis carinatus* zehirinden, *ekistatin* ve *T. gramineus* zehirinden, *trigamin*'ın amino asit dizilişleri tespit edilmiştir. Her iki inhibitör de *arjinin-glisin-aspartik asit* içerir ve fibrinojen ile glikoprotein IIb/IIIa arasındaki etkileşimi engeller (11).

*Kontortrostatin* molekül ağırlığı 13.500 olup tek disülfit bağlı içerir. Fibrinojen reseptörlerine bağlanarak (*integrin GPIIb/IIIa*) trombosit kümeleşmesini engeller. *Crotalus viridis* yılan zehirinden güçlü trombosit kümeleşme inhibitörü izole edilmiştir. Bu

inhibitör, *krotraviridin* olarak adlandırılmıştır. Molekül ağırlığı 9200 olan tek zincirli polipeptiddir. Krotraviridin, glikoprotein IIb-IIIa reseptörlerine özel olarak etkiyip, buraya bağlanarak fibrinojenin etkinliğini ve sonuçta trombosit kümelenmesini engelleyen güçlü bir trombosit kümelenme inhibitörüdür (13).

**Beşinci grup ise;** yılan zehirlerinde, GPIb'ye bağlanarak, vWF'ün bağlanması engelleyen proteinleri içine alır. Bu proteinlerin özelliği, GPIb (vWF reseptörü)'ye bağlanması ve vWF'ün bağlanması engellemesidir. Bu proteinler aşağıdaki tabloda verilmiştir (8).

**Tablo 5:** Yılan zehirlerinde bulunan vWF reseptör (GPIb) blokörleri

Proteinler	CHH-B	Ekitsetin	J. GPIb-BP	Flavosetin-A	Tokarasetin	Agkisetin
Yılan	Crotalus horridus horridus	Echis carinatus	Bothrops jararaca	Trimeresurus flavoviridis	Trimeresurus tokarensis	Agistrodon acutus
<b>Molekül ağırlığı</b>						
İndirgenmemiş durumda	25.000	26.000	30.000	149.000	29.000	26.000
İndirgenmiş durumda						
Alfa	15.000	16.000	17.000	17.000	16.000	15.000
Beta	12.000	14.000	13.000	14.000	15.000	14.000
Direkt trombosit kümelenmesi	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır

(8)

**6. Hemorajik proteinazlar:** Hemorajik etkinlige, kapiller hücre duvarını çevreleyen basal membran proteinlerinin yapısını bozan zehir metalloproteinazları sebep olur. Bu etki ile kapillar bütünlük bozulur ve sonuçta yerel olarak kanama şekillenir. Brezilya yılanı *Bothrops jaraca* zehiri, trombositlerin kümelenmesini engelleyerek kanamaya sebep olur (19).

**7. Plazma serin proteinaz inhibitörlerinin etkinliğini engelleyen bileşikler:** İnsan serumu; *Kolubrit*, *Krotalid*, *Viperid* zehirleri ile in vitro inkübasyondan sonra kemotripsin ve tripsinin etkinliğini önleyici etkisini kaybettiği görülmüştür. Bu, konakçı kanındaki proteinaz inhibitör etkinliğin zehirlenmeyi takiben değiştiğini veya maskelendirdiğini göstermektedir. Aksine *Elapid* ve *Hidrofıd* zehirlerinin plazma proteinaz inhibitörleri üzerinde hiçbir etkisi yoktur. Zehir enzimleri; alfa 1 proteinazın inhibisyonu ve antitrombin III'ün etkinsizleştirilmesinden sorumludur. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, plazma proteinaz inhibitörlerinin pek çoğunu

zehiri etkinsizleştirici enzimler olduğunu göstermektedir (7).

#### 8. Zehirlerde bulunan protein olmayan bileşikler

Yılan zehirleri yüksek düzeyde; çinko, bakır, magnezyum ve diğer iz elementleri içerir. Metallerin bazıları hemoglobinlere ve nörotoksinlere bağlanır fakat polipeptid zehir bileşiklerinin öldürücü etkinliği inorganik bileşiklerin varlığına bağlı değildir. Elapid zehirlerinde çinko düzeyi oldukça yüksektir. Çinko, adenozin monofosfataz ve pirofosfatazlar üzerinde inhibitör etkiye sahiptir. Çinkonun bu enzimler üzerinde inhibitör etkisi, zehirin salgı bezleri üzerindeki tahribatını engeller. Yılan zehirlerinde bulunan diğer bileşikler; karbonhidrat, lipit, organik asitler, biyojenik aminler ve riboflavindir.Çoğu yılan zehirlerinde bulunan bu bileşiklerin hiçbir etkinliği yoktur (1)

#### KAYNAKLAR

- Anthony TT. Overview of snake venom chemistry. Adv Exp Med Biol 1996; 391: 37-65.
- Aronson DL Comparison of the actions of thrombin and the thrombin-like venom enzymes ancrod and batroxobin. Thromb. Haemost 1976; 31(1): 9-13.

3. Ascenzi P, Bertolini A, Bolognesi M et al. Primary specificity of anrod, the coagulating serine proteinase from the malayan pit viper (*Agkistrodon rhodostoma*) venom. *Biochim Biophys Acta* 1986; 871(2): 225-228.
4. Bell RW. Desfibrinogenating enzymes. *Drugs* 1997; 54(3): 18-31.
1. 5. Douth E and El-Asmar ME. Isolation and characterisation of an anticoagulant proteinase, cerastase F-4, from Cerastase cerastase (Egyptian Sand Viper) venom. *Thromb Res* 1986; 42(1): 55-62.
5. Farid TM, Tu AT and El-Asmar MF. Characterisation of cerastobin, a thrombin-like enzym from the venom of *Cerastes vipera* ( Sahara sand viper ). *Biochem* 1989; 28(1): 371-377.
6. Francis S and Markland JR. Inventory of  $\alpha$ - and  $\beta$ -fibrinogenases from snake venoms. *Thromb Haemost* 1991; 65(4): 438-443.
7. Fujimura Y, Kawasaki T and Titani K. Snake venom proteins modulating the interaction between von Willebrand factor and platelet glycoprotein Ib. *Thromb Haemost* 1996; 76(5): 633-639.
8. Hutton RA and Warrell DA. Action of snake venom components on the haemostatic system. *Blood Review* 1993; 7: 176-189.
9. Inoue S, Shimada A, Okhura N. et all. Specificity of two types of phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors from the plasma of venomous snakes. *Biochem Mol Biol Int* 1997; 41(3): 529-537.
10. Kini RM and Evans HJ. Structural domeins in venom proteins. *TOXIA* 1992; 30(3): 265-293.
11. Kostiza T, Dahinden CA, Rihs S. et al. Nerve growth factor the venom of the Chinese cobra *Naja naja atra*: purification and description of non-neuronal activities. *TOXIA* 1995; 33(10): 1249-1261.
12. Liu CZ, Peng HC and Huang TF. Crotaviridin, a potent platelet aggregation inhibitor purified from the venom of the snake *Crotalus viridis*. *TOXIA* 1995; 33(10): 1289-1298.
13. Markland FS. Snake venoms. *Drugs* 1997; 54(3): 1-10.
14. Matsui T, Sakurai Y, Fujimura Y. et al . Purification and amino acid squence of halystase from snake venom of *Agistrodon halys blomhoffii*, a serine protease that cleaves specifically fibrinogen and kininogen. *Prog. Nucleic Acid Res Mol Biol* 1998; 59: 307-364.
15. Matsui T, Kunishima S, Hamaka J. et al. Interaction of von Willebrand factor with the extracellular matrix and glyocalicin under static conditions. *J Biochem (Tocyo)* 1997; 121(2): 376-381.
16. Mizoguchi, Y and Osler A.G.. Effect of cobra venom factor on the response of wistar-furth rats to the Gross-virus-induced (C58NT)D lymphoma. *Int Arch Allergy Immunol* 1979; 58(3): 302-312.
17. Rosing , J. and Tans, G. Structural and functional properties of snake venom protrombin activators. *TOXIA* 1992; 30 ( 12 ): 1515-1527.
18. Sano-Martins, I.S. Platelet aggregation in patients bitten by the Brazilian snake *Bothrops jararaca*. *Thromb Res* 1997; 87(2): 183-195.
19. Server AC, HerrupK, Shooter EM. et al. Comparison of the nerve growth factor proteins from cobra venom (*Naja naja*) and mouse submaxillary gland. *Biochem* 1976; 15(1): 35-39.
20. Siigur E, Neuman T, Jarve V. et al. Isolation and characterization of nerve growth factor from *Vipira lebetina* snake venom. *Comp Biochem Physiol* 1985; 81(1): 211-215.
21. Todd WW and Anthony T. Purification and biochemical characterisation of atroxase, a nonhemorrhagic fibrinolytic protease from Western Diamondback Rattlesnake venom. *Biochem* 1988; 27: 4769-4777.
22. Vogt W. Factors in cobra venoms affecting the complement system. *TOXIA* 1982; 20(1): 299-303.
23. Walter M, Nyman D, Krajnc V. et al. The activation of plazma factor XIII with the snake venom enzymes anrod and batroxobin marajoensis. *Thromb Haemost* 1977; 38(2): 438-446.
24. Zhang, S.Y and Yan, X.W. The evaluation of thrombolytic effect of snake venom antitrombus enzyme in treatment of acute myocardial infarction CHHNA 1994; 33(4): 244-247.