

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

**FIZIOLOŠKO DJELOVANJE I BIOKEMIJSKE
KARAKTERISTIKE ZMIJSKOG OTROVA**

**PHYSIOLOGICAL ACTION AND BIOCHEMICAL
COMPONENTS OF SNAKE VENOM**

SEMINARSKI RAD

Ana Krivokuća
Preddiplomski studij Znanosti o okolišu
(Undergraduate study Environmental sciences)
Mentor: Doc.dr.sc. Zoran Tadić

Zagreb, 2012.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	2
2. OTKRIVANJE ZMIJSKOG OTROVA.....	3
2.1. Što su toksini?.....	5
2.2. Klinički aspekti trovanja	
2.2.1. Ugrizi elapida.....	6
2.2.2. Ugrizi viperida.....	6
2.2.3. Ugrizi atraktaspidida.....	7
2.2.4. Ugrizi colubrida.....	7
3. TOKSIČNE I NETOKSIČNE KOMPONENTE.....	7
3.2. Toksične komponente.....	8
3.3. Netoksične komponente.....	9
4. NEUTRALIZACIJA DJELOVANJA TOKSINA.....	9
5. ZAKLJUČAK.....	10
6. LITERATURA.....	11
7. SAŽETAK.....	12
8. SUMMARY.....	13

1. UVOD

Zmije! Ta živa bića a oduvijek ljudima tjeraju strah u kosti. Uz njih se vežu mitovi i vjerovanja čiji je uzrok njihova duga prisutnost na planetu Zemlji. Uopćenito je mišljenje i stavljeno je znak jednakosti između u pojmovima zmija i otrov. To mišljenje naravno nije ispravno jer nisu sve zmije otrovne. U relativno nedavnoj prošlosti herpetologija doživljava svoj procvat, a time i istraživanja koja se provode na zmijama, što je uvelike pridonijelo sistematici na temelju znanstveno dokazanih činjenica.

Zmije spadaju u koljeno Chordata, potkoljeno Vertebrata, razred Reptilia, red Squamata i podred Ophidia. Podred se dijeli na još mnogo skupina no nama najzanimljivije su superporodice Henophidia¹ i Colubroidea². Superporodica Colubroidea dijeli se u četiri velike porodice: Elapidae, Viperidae, Atractaspididae i Colubridae. Ima ih sveukupno oko 2 300, s tim da je oko 600 jedinki otrovno, a ugrizi njih 250 mogu uzrokovati teške komplikacije kod ljudi. Podjela u četiri velike porodice izvedena je iz oblika njihove denticije (relativno stare podjele, koja se nerijetko koristi i danas). Elapidae obuhvaćaju sve prednježljebozubice, zmije relativno kratkih, uralih zubi na prednjoj strani gornje čeljusti, u koje spada oko 280-300 vrsta. Postoje i umjetne podjele unutar porodice zbog njihovih različitih prilagodbi, a najčešća je na arborealne i terestričke Elapidae (guje).

U porodicu Viperidae (ljutice) spada oko 230 vrsta i spadaju u kategoriju cjevozubica (Solenoglypha). Zubi su, za razliku od elapida, pomično odnosi smješteni na pomičnoj kosti, s prednje strane gornje čeljusti. Pri napadu mogu biti pomaknuti u skoro okomit položaj na kosti lubanje, dok su inače u zatvorenim ustima u vodoravnom položaju. Također imaju i karakterističan izgled glave s proširenim stražnjim dijelom. Zmije ove porodice rasprostranjene su u svim područjima osim u Australiji, Papua Novoj Gvineji i susjednim područjima. (Menez, 2004.)

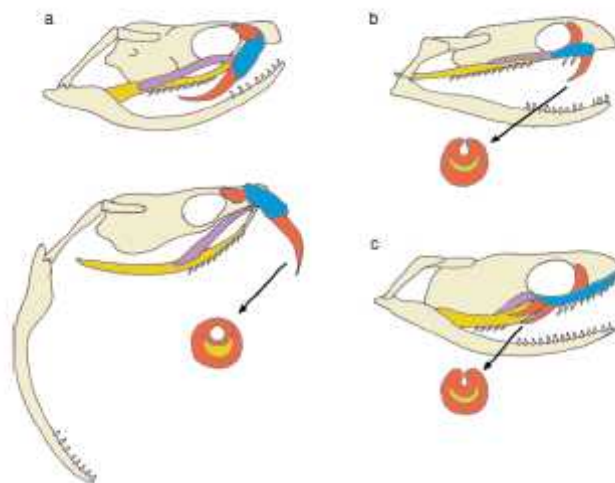
Atractaspididae sada čine posebnu porodicu, no nije oduvijek bilo tako. Često su bile svrstavane u porodicu Viperidae iz razloga što posjeduju zubnu aparaturu cjevozubica i izrazito su otrovne. I danas njihova sistematika djeluje zbunjujuće zbog rasprava o broju vrsta i rodova, no čine zasebnu porodicu. Izrazito su tamne i žive u uskim podzemnim kanalima iz čega je proizašla njihova specifična prilagodba. Naime, da bi ulovili plijen u uskim kanalima

¹ Henophidia - taksonomska kategorija koja obuhvaća najveće svjetske zmije poput pitona i boa koje imaju ostatke kukovlja, a vrhunac razvoja imali su prije 65-23.5 milijuna godina (Menez, 2004.).

² Colubroidea – taksonomska kategorija koja obuhvaća sve otrovne i neotrovne zmije bez ostataka kukovlja uz razvijenost sofisticiranih prilagodbi. Razvijaju se od prije 53-35 milijuna godina do danas. (Menez, 2004.).

moгу ugrišti postrance i okrenuti i glavu u natrag, te im zubi mogu izaći i kroz gotovo zatvorena usta. Rasprostranjene su paralelno sa svojim staništima na prostorima središnje i južne Afrike, na Bliskom Istoku, u Sinaju, Jordanu i južnom dijelu Izraela.

Colubridae su daleko najrasprostranjenija porodica s oko 1700 vrsta u čak 290 rodova. Ova porodica obuhvaća i otrovne i neotrovne zmije, a dvije trećine svih posjeduju Duvernoyevu žlijezdu koja služi u lučenju toksina. Također žlijezda koju posjeduju kolubride (guževi) razlikuje se od onih u elapida i viperida. Zmije porodice Colubridae su uglavnom stražnježljebozubice, te zbog toga nisu osobito opasne za ljude, jer moraju jako zagristi i po nekoliko žvakati da bi otrov mogao prodrijeti u tijelo. Izuzetak su zmije koje mogu jako otvoriti eljusti te tako omogućiti ugriz stražnjim zubima kao npr. boomslang (*Dispholidus typus*) koja može eljusti otvoriti za 170°, te određeni broj vrsta koji ne posjeduje nikakvu denticiju.



Slika 1. Dentacija zmijske otrovnice : a) Viperidae (solenoglypha), b) Elapidae (proteroglypha), c) Colubridae (opisthoglypha)
 (Izvor: Ménez, 2004)

2. OTKRIĆE ZMIJSKOG OTROVA

Prva saznanja o zmijskom otrovu pojavljuju se još prije tri stoljeća. Vjerovalo se da ugriz otrovnice emitira zle duhove i da su ti duhovi toliko „hladni“ da uzrokuju koagulaciju krvi i blokiranje cirkulacije. Takvo vjerovanje zapravo je oprečno samom korijenu latinske riječi *venenum*, koja je označavala izlučenu tekućinu otrobnog cvijeta. Sve je

oduvijek obavijeno magijom i mistikom, te se tako i vjerovalo da otrovi opijaju, zavode. Neki pozitivno, a neki negativno. U pozitivnom svjetlu pristupa *venes-num* zna i „ljubavni filter“ .

udna povezanost ne eg tako ubojitog i rije i ljubav. Možda e upravo znanost tu odigrati klju nu ulogu analizom komponenata zmijskog otrova, za njegovo iskorištavanja u medicinske svrhe. Tada e mnogi povu i znak jednakosti izme u rije i otrov i ljubav.

Tek 1670-te godine talijanski znanstvenik Francesco Redi usudio se napraviti novi korak. Bio je istinski eksperimentalist i u skladu s time skupljao je žuti „sok“ sa zubi otrovnica (Slika 2.) i nanosio ih na rane životinja, koje su mahom umirale. Zaključio je da je za sve odgovoran žuti „sok“ – otrov i time ustanovio po etak znanstvenog pristupa prou avanju zmijskog otrova. Po etna pitanja bila su: „Kako otrov djeluje?“ i „Odakle taj otrov dolazi?“ S vremenom znanstvenici su uo ili povezanost izme u djelovanja prirodnih otrova i onih zmijskih. Na temelju gra e prirodnih otrova, otkrivala se gra a, ali i funkcija zmijskih otrova.



Slika 2. Otrovnica na zubima egртуše *Crotalus horridus*

(Izvor: Ménez, 2004)

Shva eno je da sastav zmijskog otrova varira te da njegov sastav odre uje koje e posljedice imati na djelovanje razli itih fizioloških sustava. Jedna od posebnosti zmiya je i ta da kako proizvode otrov, isti nije štetan za njih same.

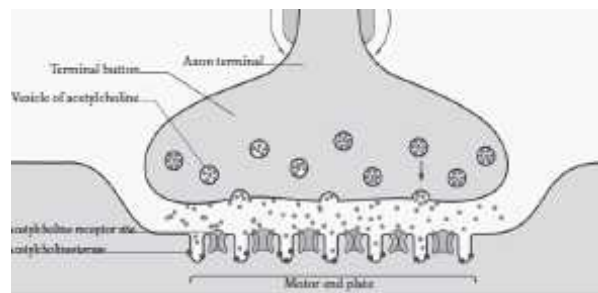
Priroda zmijskog otrova znanstvenim metodama odre ena je u 19. stolje u. Nakon brojnih rasprava ustanovljeno je da je otrov tvar proteinske gra e, a ne alkaloidne kako su predlagali neki znanstvenici. Tokom 19. stolje a proteini i dobivaju svoje ime od gr ke rije i *protein* što zna i prvi, primarni. A ime su smislili švedski i njema ki znanstvenici Berzelius i Mulder. Godine 1956. dogodila se još jedna prekretnica. Elbert Peterson i njegovi suradnici predstavili su kromatografsku³ metodu utemeljenu na ionskoj izmjeni, kojom su mogli

³ Kromatografija – obuhva a niz metoda koje se temelje na prolasku teku e faze kroz krutu fazu koja sadži željenu tvar za ispitivanje, a o svojstvima ispitivane tvari ovisi koliko dugo ce ostati u stacionarnoj fazi.

odvajati proteine na temelju njihovog ionskog naboja. Skoro istovremeno dolazi do uspostavljanja metode gel filtracije, te je bilo moguće proteine odvajati na temelju različite molekularne veličine. Nedugo nakon toga prvi toksini su izolirani i identificirani.

2.1. Što su toksini?

Kao i riječ otrov i riječ toksin vuče svoje korijene iz Grčke. Toxikon – grčka riječ za otrov nanesen na strjelicu. Djelovanje toksina često se ispituje na miševima. No kako se toksini razlikuju svojim sastavom, razlikuju se i u tome na koju vrstu djeluju, koje je mjesto njihovog djelovanja, koja je doza potrebna za potpuno djelovanje itd. Također, toksini izrazito opasni za jednu vrstu mogu biti bezopasni za drugu. Svojstva toksina jednako tako mogu biti različita s obzirom na preferirani tip prehrane (različiti toksini kod zmija koje se hrane sisavcima, od onih koje se hrane npr. pticama). Najčešća mjesta djelovanja toksina su neuromuskularne sinapse (Slika 3.). Zmijski toksini slični kurareu i nikotinu sprječavaju prijenos signala između osjetilnih i motoričkih živaca, djeluju i na acetilkolinске receptore, uzrokujući paralizu. To su neurotoksični otrovi, poput onih koje možemo naći i kod kobri.



Slika 3. Prikaz neuromuskularne sinapse s acetilkolinom
(Izvor: Fry, 2005.)

Za razliku od prirodnih otrova kurareu i nikotina, kod ovakvih zmijskih otrova blokada acetilkolinških receptora je dugotrajna i nepovratna. Struktura samih toksina je bitna, jer sadrže enzime i proteine bez enzimskih aktivnosti. Stoga toksini koji imaju slično djelovanje bitno su sličnog sastava i sličnog načina namatanja aminokiselinskih lanaca. (Menez, 2004.)

2.3. Klinički aspekti trovanja zmijskim otrovom

2.3.1. Ugrizi elapida (guja)

Najčešće i su ugrizi terestričnih elapida (kobre, mambe, kraitovi, koraljne zmije). Najčešći i simptomi ovakvih ugriza je progresivna paraliza kao posljedica neurotoksičnosti. Mišići koji su najviše inervirani prvi pokazuju simptome (npr. nekontrolirano zatvaranje kapaka (tzv. ptoza) i zamudni vid). Ostali uobičajeni pokazatelji trovanja su povraćanje, glavobolja i obilno slinjenje. Ovo dolazi do ukočenosti ekstremiteta i paralize dijafragme što dovodi do gušenja. Ukoliko pacijent uspije brzo doći u bolnicu, može ga se održavati na životu pomoću respiratora. Afričke kobre pljuvačice i azijske kobre u svom otrovu posjeduju velike količine citotoksina koji uzrokuju i raspadanje membrana stanica uz dodatak djelovanju neurotoksina. Ugrizi australskih elapida najviše pridonose raznolikosti kliničkih aspekata trovanja. Otrovnost taipana može uzrokovati lokalno otjecanje, nekrozu tkiva, grčeve, oštećenje mišića, otkazivanje bubrega i tešku ireverzibilnu paralizu.

Ugrizi morskih zmija jako su rijetki, no njihovi otrovi djeluju i na mišićni i na živčani sustav. Ugriz se u vodi teško može osjetiti i bez oticanja je, no kroz nekoliko sati može se pojaviti bol u mišićima, grčevi, ukočenost, glavobolja, žestota, obilno znojenje, osjećaj hladnoće te progresivna paraliza.

2.3.2. Ugrizi viperida (ljutica)

Ugrizi ljutica karakteristični su po tome što dolazi do djelovanja otrova već na samom mjestu ugriza. Prvo dolazi do oticanja koje se širi i kroz cijeli ugrizeni ud (dio tijela). Nekroza tkiva oko mjesta ugriza može se pojaviti kroz nekoliko sati ili dana i imati teške posljedice za rad ugrizenog dijela tijela. Iznimke su kada se na mjestu ugriza ne pokažu nikakvi znakovi trovanja, a opet može doći do smrtnog ishoda kroz par dana. Ova je pojava šoka već oko 10 minuta nakon ugriza, popratne pojave su krvarenje iz mjesta ugriza, ali i u cijelom tijelu, pojava ugrušaka, nagli pad tlaka, već spomenuta nekroza tkiva te moguće otkazivanje bubrega.

Ugrizi atraktaspidida

Ove zmiје, sli ne ljuticama, imaju i sli no djelovanje otrova. Prvo se javlja lokalno oticanje, nekroza tkiva i bol. Ovisno o ja ini ugriza i simptomi mogu biti druga iji. Ako se radi o teškom ugrizu ubrzo dolazi do mu nine i povra anja, respiratornih poteško a, hipertenzije i ubrzanog rada srca i ponekad smrti. Najve i udio otrova atraktaspidida ine jaki toksini izrazitog kardiovaskularnog djelovanja.

2.3.3. Ugrizi colubrida (guževa)

Svakako jedan od najboljih primjera otrovnih colubrida je afri ki boomslang (Slika 4.). Ugriz ove vrste ili njezinih ro aka može uzrokovati oticanje i krvarenje. Źrtve povraaju i osjeaju jaku bol u trbuhu. Otrov esto po inje djelovati punom snagom tek nakon 24 sata. Onemogu uje zgrušavanje krvi te time uzrokuje obilno krvarenje i otkazivanje rada bubrega.



Slika 4. *Dispholidus typus* - boomslang – stražnježljebozubica

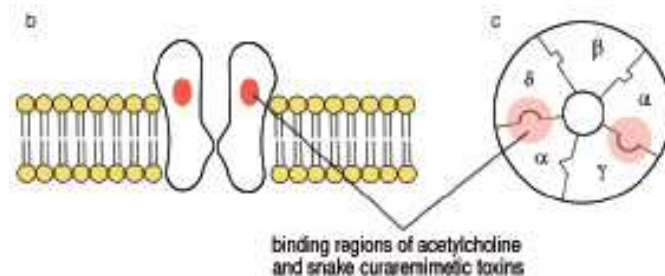
3. TOKSINE I NETOKSINE KOMPONENTE

Proteini prisutni u zmijskom otrovu ne razlikuju se evolucijski od ostalih proteina. Njihova struktura jednostavno je prilagođena bržem pronalaženju ciljanog odredišta za vezanje u domaćinu. Još uvijek nije zapravo poznato koji su to točno mehanizmi koji ubrzavaju i povećavaju broj mutacija u određenim dijelovima gena za kodiranje proteina

prisutnih u otrovu. Čini se da se i ovdje radi o ubrzanjoj metodi pokušaja i pogreške, te one varijante koje se pokažu uspješnima ostaju odmah zadržane. Neka naga anja temelje se na pretpostavci da se ve ina tih proteina razvila iz jednog ribonukleaznog pretka.

3.1. Toksi ne komponente

Djelovanje zmijskih toksina možemo usporediti sa djelovanjem ranije poznatih toksina poput kurarea i nikotina. Kod zmija možemo razlikovati dva razreda toksina sli njih kurareu. Toksini dugih lanaca imaju prednost pred onima kratkih lanaca, jer se mogu vezati za miši ne, ali i za receptore živ anih stanica (γ -receptori), dok se kratki lanci mogu vezati samo za miši ne receptore. Reidualni ostatci nekih toksina poput erabutoksina i -kobratoksina postoje u svim toksinima sli nima kurareu. Nemaju svi toksini isti princip vezanja bez obzira na sli an sastav. Neki toksini se vežu specijalno na jedno mjesto (npr. erabutoksin), dok se neki sa druga ijom strukturnom raspodjelom aminokiselina mogu vezati na više mjesta (trodijelni -kobratoksin⁴). Još jedan od trodijelnih toksina važnih u vezanju na acetilkolinesterazu je fascikulin, sli nog djelovanja kao erabutoksin. Oba toksina vežu se za acetilkolinске receptore sprje avaju i time vezanje acetilkolina na receptor (Slika 5.)



Slika 5. Longitudinalni i transverzalni presjek nikotinskog acetilkolinškog receptora u membrani

(Izvor: Ménez, 2004)

Neki od naj eš ih toksina su i 3FTx alfa neurotoksin koji uzrokuje hidrolizu kolina, ADAM koji uzrokuje nekrozu tkiva, BNP koji izaziva nesvjesticu, CRISP koji uzrokuje paralizu perifernih glatkih miši a, faktor V u kombinaciji sa faktorom X kod taipana i sme ih zmija uzrokuju pretvaranje protrombina u trombin, crotamin uzrokuje mionekrozu, cystatin inhibira obrambene tjelesne enzime i još mnogi drugi sa sli nim djelovanjima. (Fry, 2005.)

⁴ -kobratoksin ujedno spada i u toksine dugih lanaca što pridonosi njegovoj konformnosti.

Sam ovaj širok spektar djelovanja toksina govori nam o tome koliko su se evolucijski prilagodili i međusobno isprepleli svoja djelovanja. Princip favoriziranja pojedinih mutacija i dan danas nije jasan, no zna se da su svi ti toksini i dalje u stalnoj mjeni.

3.2. Netoksi ne komponente

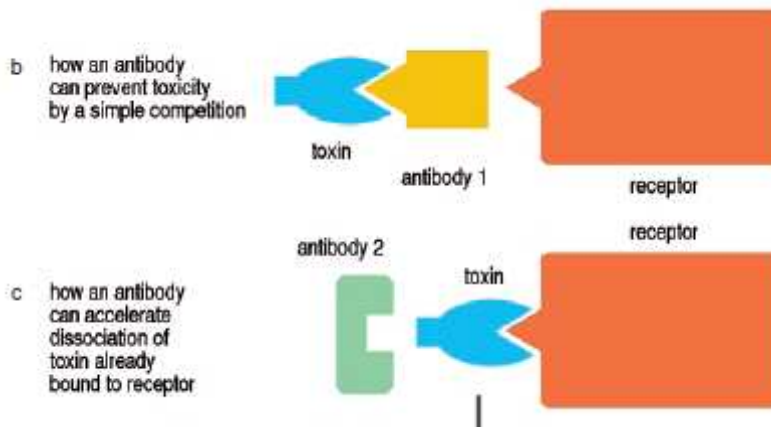
Oko 90% sastava zmijskog otrova su proteini i ostalih 10 % anorganskih tvari. Oko 26 enzima pronađeno je u zmijskom otrovu i svi su proteini od 150 do 1500 aminokiselina dugi. Prisutnost tih neletalnih proteina dovela je znanstvenike do zaključka da njihova prisutnost pridonosi razgradnji i probavi plijena. Vezivna tkiva sadrže proteoglikane (koji se sastoje od ponavljajućih disaharidnih jedinica poput hijalouronata). Kao odgovor na to skoro svi zmijski otrovi sadrže hijalouronidazu za razgradnju tih tkiva. Za lakšu razgradnju lipida posjeduju fosfolipazu A₂. Skoro svi otrovi sadrže i jake nukleaze koje razaraju DNA i RNA. Metaloproteaze su specifične po tome što za svoju aktivnost trebaju prisutnost određenog metala, a različitih su funkcija. Kolagenaza razgrađuje kolagen, elastaza je probavni enzim i mnogi drugi enzimi povezani s koagulacijom i cirkulacijom krvi. Jedan od najstabilijih enzima je i alfa-aminooksidaza koja uzrokuje razgradnju aminokiselina, a u međudjelovanju s FAD⁵, koji je koenzim, može prepoznati i promijeniti gotovo sve aminokiseline. Zmijski otrov može sadržavati i neuobičajene enzime poput NGF-a (faktor rasta živanih stanica) čija prisutnost do danas nije objašnjena. Uz mnoge enzime otrov sadrži i nešto lipida, šećera, flavina, nukleozida, aminokiselina, kao i pozitivno nabijene metale potrebne za funkcije metaloproteaza (natrij, kalij, kalcij, magnezij, cink i ponekad bakar, mangan i željezo). (*Menez, 2004.*)

NEUTRALIZACIJA DJELOVANJA TOKSINA

Dva su vrlo važna čimbenika prisutna u životinja otpornih na zmijski otrov. To su antitijela koja proizvodi sam organizam i imunološki faktori prisutni u plazmi otpornih životinja. Cilj navedenih čimbenika prije čiti je dolazak toksina do željenog receptora. Sam pojednostavljen princip djelovanja temelji se na tome da se toksini ne mogu istovremeno vezati i za receptore i za prisutna antitijela. Tako prisutnost antitijela zapravo ograničava

⁵ FAD – flavin adenin dinukleotid, također odgovoran i za žućkastu boju otrova.

koli inu toksina koji se mogu vezati za druga receptorska mjesta (Slika 6). Kod toksina sli nog djelovanja poput kurarea najviše se dostiglo u istraživanju. Ukoliko do e do nastanka kompleksa toksin-receptor on može biti stabilan i do nekoliko sati. Dodavanjem antitijela kompleks se raspada vrlo brzo, brže nego u odsutnosti antitijela, što nam je pokazatelj da se ne radi samo o neutralizaciji. Antitijelo uzrokuje pucanje veze toksina s receptorom i njegovim uklanjanjem, a još jedna mogu a varijanta je da antitijelo mijenja prirodu veze izme u toksina i receptora. Druga varijanta je uobi ajena u me udjelovanju ostalih proteina.



Slika 6. b) kompeticija sli nog receptorskog mjesta i antitijela, antitijelo sprje ava vezanje toksina na receptor, c) antitijelo ima strukturni dio koji odgovara toksinu, veže se za njega i uzrokuje promjenu konfiguracije veze toksin-receptor i njeno kidanje

(Izvor: Ménez, 2004)

4. ZAKLJU AK

Strah od zmiya uobi ajena je pojava širom svijeta. Mali pomaci koji se rade u upoznavanju ljudi sa pravim problemima proizašli su iz ustrajnosti znanstvenika koji pokušavaju što više upoznati ta tajnovita bi a. Zmije su sofisticirane životinje, prilago ene gotovo za sve životne uvjete na svijetu.

Napretkom tehnologije otkrilo se puno toga o sastavu i strukturi samih otrova koje posjeduju. Kako se i znanost razvija, shva a se da protuotrovi dobiveni konvencionalnim tehnikama nisu toliko u inkoviti te da se treba prona i novi proces njihove proizvodnje.

Saznavanje odgovora na brojna pitanja koja smo do sada postavljali za sobom povla i nova, još kompliciranija pitanja. Prema tome mogu zaklju iti da je herpetologija tek u po etnom zamahu i da vrhunac tek slijedi. Kako teoretski, tako i u praksi!

5. LITERATURA

1. Fry, B.G. (2005): From genome to „venome“ : Molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins, *Genome Research* 2005, **15**:403-420,
2. Mackessy, S. (2010): Venoms and Toxins of Reptiles, CRC Press, Boca Raton
3. Ménez, A. (2004): The Subtle Beasts, Taylor & Francis, London
4. Roger and Janet Knapp (1997.) : Snake bites
<http://www.rogerknapp.com/medical/snakebite.htm>, preuzimano 05.07.2012.
5. Online Encyclopedia http://encyclopedia.jrank.org/SIV_SOU/SNAKES.html ,preuzimano 09.07.2012.

6. SAŽETAK

U ovom radu opisala sam pregled otkrića otrova, njegovih svojstava i strukture, kroz povijest pa do danas. Pošto govoriti, odnosno pisati, o toksinima nije lako, morali smo proučiti i osnovnu podjelu zmija. Podjela prema dentaciji najjednostavnija je i općenito prihvaćena. Prema njoj razlikujemo tri skupine: prednježljebozubice (Elapide), stražnježljebozubice (Colubride) i cjevozubice (Viperide i Atractaspidide). Prema dentaciji možemo ih podijeliti i na to koju „vrstu“ otrova posjeduju i kako ju ubrizgavaju. „Vrsta“ je pod navodnicima, jer zapravo niti jedna vrsta otrova nije u potpunosti ista. Zmije poput egртуša sa velikim udjelom hemotoksičnih komponenti u otrovu često zadrže i nešto neurotoksičnih komponenti. Isto vrijedi i za zmije poput taipana kod kojih prevladavaju neurotoksične komponente.

Kada je prvi problem bio uspješno riješen, definiranje proteina i njihova uloga, moglo se krenuti na detaljnije istraživanje samih toksina. Utvrđeno je da je 90% građevine toksina upravo proteinska te da za njihove analize mogu primijeniti sada utvrđene tehnike za analizu proteina. Prvenstveno se koristila kromatografija. Jedne od već ih bile su kromatografija ionskom izmjenom i gel filtracija (kromatografija na stupcu) koje su odvajale proteine na temelju različitog ionskog naboja ili određene molekulske mase.

8. SUMMARY

This work contains overview of history of discovery, structure and properties of snake venoms. Because writing about snake toxins is not an easy task, we needed to make some kind of classification of snakes themselves. The most common classification is based on their dentition. According to this classification there are three groups of snakes : front-fanged (proteroglyphous - Elapids), rear-fanged (opisthoglyphous - Colubrids) and tubular-fanged (solenoglyphous – Vipers and atractaspids). Because of their dentition, we can differ which “kind” of poison snakes posses and how they inject it. “Kind” has quotation marks because no poison is completely pure. Snakes like rattlesnakes with big percentage of cytotoxic compounds in their venom always have some neurotoxic compounds. The same holds true for snakes like taipans, with big percentage of neurotoxic compounds, but also some cytotoxic components.

When the first problem was solved, i.e. definition of proteins and their function, it was possible to move on to the research of toxins. It was discovered that 90% of snake toxin is made of proteins. The most often used method in this research was chromatography, specially ion exchange chromatography and gel filtration in which proteins can be divided on the basis of their ionic charge or molecular weight.