اولین کنگره منطقه ای جانوران سمی ، زهرآگین و سموم جانوری
The First Regional Congress on Venomous Animals and Toxin
Nov 22-24 , Razi Vaccine and Serum Research Institute , Karaj , Iran
۱ تا ۳ آذر ماه سال ۱۳۹۰ - موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی - کرج - ایران

تشخیص و ارزیابی خصوصیات ضد انعقادی سم مار جعفری ایرانی *Iranian Echis Carinatus* بر روی موش‌های آزمایشگاهی

حسین سلمانی‌زاده[۱]، مهدی بابایی[۱]، حسین ذوالفقاریان[۲]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.
۲- موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی حصارک، کرج، ایران.

چکیده

سم مار جعفری ایرانی دارای ضدانعقادهای موثر بر سیستم هموستاز خون می‌باشد که شکل‌گیری لخته را به تأخیر می‌اندازند که این عمل با مهار فعالیت فاکتورها و عوامل انعقادی و یا فعال‌سازی فاکتورهای ضدانعقادی صورت می‌گیرد. با انجام کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون بوسیله‌ی سفادکس G-75و کروماتوگرافی تعویض یونی بوسیله‌ی DEAE-cellulose (DE-52) از 50mg سم خالص ساب فراکسیون‌های F2A و F2B و F3A و F3B بعنوان عوامل ضدانعقادی سم مار جعفری ایرانی IEC جداسازی و به موش‌های سوئیسی نر نژاد NIH تزریق شدند. خونگیری قبل و بعد از تزریق این ساب فراکسیون‌ها انجام و با تست PT خصوصیات ضدانعقادی و توکسیسیتی آن‌ها بررسی شد. با بررسی نتایج و خواص ضدانعقادی پس از تزریق ساب فراکسیون‌های F2A و F2B و F3A و F3B و انجام تست PT قبل و بعد از تزریق مشاهده شد که زمان انعقاد پس از تزریق ساب فراکسیون‌ها بالاتر از زمان انعقاد نرمال و زمان انعقاد بعد از تزریق سم خالص می‌باشد که این فرآیند خاصیت ضد انعقادی این ساب فراکسیون‌ها را نشان می‌دهد. زمان انعقاد با تخریب و مهار فاکتورهای انعقادی و یا فعال‌کردن فاکتورهای ضدانعقادی موجود در سیستم خون به تاخیر می‌افتد و میزان اکتیویتی آبشار انعقادی را به شدت کاهش می‌دهند و سم مار جعفری ایرانی حتی می‌تواند منجر به مهار کامل انعقاد خون و خونریزی شود($Pvalue<0.05$). بیماری انسداد شریان قلب، سکته و دیگر بیماری‌های مغزی و قلبی- عروقی علت عمده مرگ و میر در سرتاسردنیا هستند. و لذا تولید و جایگزینی داروهای طبیعی به جای داروهای شیمیایی چون وارفارین امری مهم و مسلم به نظر می‌رسد و لذا ما در این پژوهش خصوصیات و ویژگی‌های ضدانعقادی سم مار جعفری ایرانی را بعنوان یکی از مارهای مهم و بومی ایران که سم آن دارای خصوصیات انعقادی و ضدانعقادی است مورد بررسی قرار دادیم.

مقدمه

سم مارها مایعی سرشار از پروتئین‌ها و پپتیدهای فعال به‌لحاظ دارویی است که بعنوان سلاح تهاجمی در بی‌حرکت کردن، کشتن و هضم طعمه مفیداند. برخی از این توکسین‌ها انواع فعالیت‌های آنزیماتیک و برخی دیگر پروتئین‌های بدون فعالیت آنزیماتیک هستند. فعالیت ضدانعقادی عوامل مختلف در سم مارهای مختلف گزارش شده‌است و پروتئین‌های مسئول در برخی موارد خالص سازی شده‌اند. عمل ضدانعقادی پروتئین‌های موجود در سم مارها دارای این فعالیت‌ها می‌باشند: ۱- فعال‌سازی پروتئین C ۲- مهار فاکتورهای انعقادی IX و X بوسیله‌ی پروتئینی از سم که با هر دو فاکتور و یا یکی از از این دو فاکتور انعقادی باند می‌شود ۳- یک مهارکننده‌ی ترومبین ٤- فسفولیپیدهای درگیر در شکل-گیری کمپلکس‌های مهم برای فعال‌کردن مسیرانعقادی را تخریب می‌کنند. فعال‌کننده‌ی پروتئین C: پروتئین C یک زیموژن دو زنجیره‌ای وابسته به ویتامین K است که بوسیله‌ی ترومبین بر روی سطح اندوتلیال در حضور ترومبومودولین فعال می‌شود(Suzuki, 1995). پروتئین C فعال‌شده فاکتورهای V_a و VIII_a را تخریب می‌کند و یک فعال‌کننده پلاسمینوژن نوع بافتی را آزاد می‌کند و بنابراین فعالیت ضدانعقادی دارد. فعال‌کننده‌های پروتئین C به‌عنوان عوامل تشخیصی در برآورد و تخمین پروتئین C استفاده شده‌اند و زمان انعقاد را در محیط In vivo به تأخیر می‌اندازند و شکل‌گیری Thrombus را از بین می-برند. مهارکننده‌ی فاکتور IX/X: یک مهارکننده‌ی فاکتور X است که از سم hundred-pace جداسازی شده‌است. این پروتئین یک گلیکوپروتئین اسیدی با وزن ملکولی تقریبا 26.6KDa است و شامل ۲ زنجیره‌ی پپتیدی تقریبا 10-12KDa است. این پروتئین فعالیت آنزیماتیک قابل شناسایی ندارد و در حضور Ca^{2+} به فاکتور Xa باند می‌شود و از درگیری آن در فعال‌سازی کمپلکس پروترومبین جلوگیری می‌کند(Ouyang and Teng, 1972). مهارکننده‌ی ترومبین: یک مهار کننده‌ی ترومبینی منحصر به فرد از سم Bothrops jararaca بوسیله‌ی Zingali و همکارانش در سال ۱۹۹۳ جداسازی شده‌است که این تنها گزارش برای این نوع مهارکننده‌ی سم مار می‌باشد. فسفولیپازهای A_2: کمپلکس پروترومبیناز متشکل از فاکتورهای Va و Xa و فسفولیپید و یون‌های کلسیم است. به نظر می‌رسد که فسفولیپازها باعث مهار شکل‌گیری این کمپلکس بوسیله‌ی تخریب فسفولیپیدهای درگیر در این کمپلکس می‌شود و بنابراین اثر ضدانعقادی دارند. فسفولیپازهایی از برخی سم مارها جداسازی شده‌اند و دارای یکسری اثرات دارویی از جمله اثر بر روی انعقاد خون هستند(Ouyang و همکاران ۱۹۹۲)(٦، ٥، ٤، ٣، ٢، ١). در این پژوهش ما بر روی جداسازی و تزریق فاکتورهای ضدانعقادی سم مار جعفری ایرانی بررسی انجام داده و به طور کلی فراکسیون‌های ضدانعقادی سم مار جعفری ایرانی را جداسازی و به موش تزریق و اثرات ضدانعقادی آن را بررسی کردیم.

روش تحقیق

۱- مقدار50mg سم لیوفیلیزه از بخش جانوران سمی موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم-سازی رازی حصارک کرج تهیه و برای این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت.

۲- تعداد ۱۸ سر موش سوئیسی نر نژاد NIH با وزنی بین ۲۰ تا ٤٠ گرم از بخش پرورش حیوانات آزمایشگاهی موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی حصارک کرج تهیه و مورد استفاده قرار گرفت.

۳- جداسازی سم خالص مار جعفری ایرانی (Iranian Echis carinatus) بوسیله کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون: جدا سازی با استفاده از ستون سفادکس G-75 و روش Farid et al انجام گرفت. تمام مراحل استخراج در ٤+ درجه سانتیگراد و با استفاده از جمع کننده اتوماتیک (Fraction collector LKB Model) انجام گرفت.

٤- جداسازی فراکسیون‌های حاصل از ژل فیلتراسیون بوسیله کروماتوگرافی تعویض یونی: از پیک‌های استخراج شده بوسیله ژل فیلتراسیون فراکسیون‌هایی را که خواص ضدانعقادی و مهار یا تخریب سیستم انعقاد خون و همچنین تخریب فیبرین را داشتند برای جداسازی و تفکیک بیشتر به روی ستون DEAE-cellulose (DE-52) برده شد. جداسازی به وسیله روش Markus Berger et al (bothrojaractivase) (٥) صورت گرفت. تمام مراحل استخراج در ٤+ درجه سانتی گراد و با استفاده از دستگاه جمع کننده اتوماتیک (Fraction collector) انجام پذیرفت.

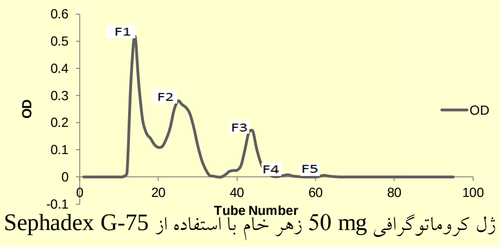
٥- تزریق سم خالص و فراکسیون‌ها: سم خالص و فراکسیون‌های مورد نظر که بعنوان فراکسیون‌های ضدانعقادی جداسازی شدند به موش‌های سوئیسی نر نژاد NIH تزریق شدند و نتایج قبل و بعد از تزریق ثبت شدند.

٦- تست PT (Prothrombin Time): روش مورد استفاده این تست برای این پژوهش به این صورت است که: ١- آوردن بطری و ظرف محلول تست PT به ٣٧ درجه. ٢- اضافه کردن 50µl پلاسما به یک لوله‌ی تست. ٣- انکوبه کردن پلاسما در ٣٧ درجه برای مدت زمان ٢ دقیقه ٤- اضافه کردن 100µl محلول تست PTو هم زمان، زمان استارت زده می-شود. ٥- زمان انعقاد و میزان فعالیت و INR از روی جدول مربوط به کیت مورد نظر تعیین می‌شود. میزان نرمال این تست ١٢ الی ١٤ ثانیه است. در این تست فراکسیون‌های جداسازی شده از طریق دو کروماتوگرافی انجام گرفته به جای محلول PT مورد استفاده قرار گرفت.

٧- تست PTT و FT.

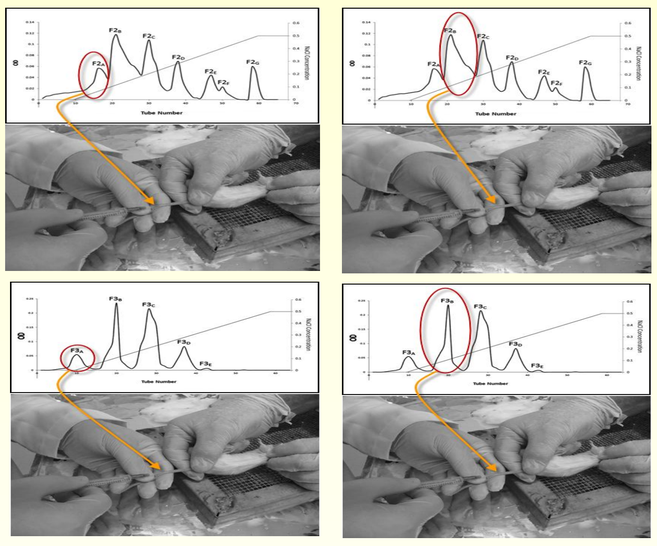
نتایج و بحث

50mg سم خالص لیوفیلیزه شده با 4 سی سی آب به صورت محلول در آمده و بوسیله سانتری‌فوژ با سرعت 14000rpmسانتری‌فوژ شد و بعد از جداسازی ماده سفید رنگ موکوسی ته‌نشین شده که لیپید، کربوهیدرات و....می‌باشد، محلول باقی‌مانده که حاوی پروتئین‌های مورد نظر ما می‌باشد به روی ستون کرماتوگرافی Sephadex G-75 ژل فیلتراسیون برده شد. جداسازی با استفاده از روش Farid et al انجام گرفته و تمام مراحل استخراج در ٤+ درجه سانتیگراد و با استفاده از جمع کننده اتوماتیک (Fraction collector LKB Model) انجام گرفت. با استفاده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون، 5 پیک (فراکسیون) بدست آمد که آنها را به ترتیب F_1 تا F_5 نامگذاری کردیم. با انجام تست PT بر روی پلاسما و ثبت نتایج و مقایسه آن با نتایج نرمال تست PT، طبق نمودار زیر پیک F_2 و F_3 بعنوان پیک‌ها و فراکسیون‌های ضدانعقادی شناسایی شدند. پیک های F_2 تا F_5به ترتیب دارای پروتئین‌هایی با وزن مولکولی پایین‌تری نسبت به پیک F_1 هستند.



ژل کروماتوگرافی 50 mg زهر خام با استفاده از Sephadex G-75

ابتدا تست PT با استفاده از فراکسیون F_2 و F_3 به جای محلول PT بر روی پلاسمای انسان انجام گرفته و با توجه به ثبت نتایج نرمال و این نتایج و مقایسه آن‌ها با هم، این دو فراکسیون بعنوان فراکسیون‌های ضدانعقادی سم مار جعفری ایرانی شناخته شده و برای جداسازی و تفکیک بیشتر به ساب فراکسیون، به روی ستون کروماتوگرافی تعویض یونی DEAE-cellulose (DE-52) برده شد. در این کروماتوگرافی جداسازی به وسیله روش Markus Berger et al (bothrojaractivase) صورت گرفت که تمام مراحل استخراج در ٤+ درجه سانتی گراد و با استفاده از دستگاه جمع کننده اتوماتیک (Fraction collector) انجام پذیرفت که نمودار زیر جداسازی را بر اساس شیب غلظتی نمک در این ستون و نحوه ی تزریق آن ها به موش های نر نژاد NIH را نشان میدهد.



ساب فراکسیون های حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی و تزریق intravenous آن ها به موش های نر نژاد NIH

قبل از تزریق این ساب فراکسیون‌ها ابتدا خونگیری از موش‌ها انجام گرفت و نتایج نرمال تست PT و PTT و FT برای این موش‌ها بدست آمد و این نتایج با نتایج تست PT بعد از تزریق سم خالص و ساب فراکسیون‌های مورد نظر با غلظتی نزدیک به LD50 سم مار جعفری ایرانی مقایسه و تفسیر این نتایج صورت گرفت. تزریق سم خالص و هرکدام از ساب فراکسیون‌های F2A و F2B و F3A و F3B به ۳ سر موش سوئیسی نر نژاد NIH صورت گرفت و ۳ سر موش نیز بعنوان شاهد در نظر گرفته شدند. نتایج تست PT قبل و بعد از تزریق و محاسبه Pvalue در جداول زیر برای تمامی ساب فراکسیون‌ها بطور کامل آورده شده‌است.

موش‌های شاهد	شماره	PT نرمال	PTT نرمال	FT نرمال
	۱	12.4s	40s	22s
	۲	13.4s	38.4s	19.7s
	۳	14s	44.2s	23.1s
میانگین		13.26s	40.8s	21.6s

سم خالص با غلظتی نزدیک به غلظت LD50	شماره	PT نرمال	PT بعد از تزریق
	۱	13.9s	10s
	۲	14.1s	9.8s
	۳	12.9s	8.9s
میانگین		13.6s	9.5s
		P-Value<0.05	P-Value<0.05

تزریق	شماره	PT نرمال	PT بعد از تزریق
فراکسیون F2A با غلظتی نزدیک به غلظت LD50	۱	14s	50s
	۲	12.9s	54s
	۳	13.4s	67s
میانگین		13.4s	57s
		P-Value<0.05	P-Value<0.05

تزریق	شماره	PT نرمال	PT بعد از تزریق
فراکسیون F2B با غلظتی نزدیک به غلظت LD50	۱	12.6s	66s
	۲	13.9s	67s
	۳	14.2s	52s
میانگین		13.5s	61.6s
		P-Value<0.05	

تزریق	شماره	PT نرمال	PT بعد از تزریق
فراکسیون F3A با غلظتی نزدیک به غلظت LD50	۱	11.9s	170s
	۲	12.3s	114s
	۳	13.6s	80s
میانگین		12.6s	121.3s
		P-Value<0.05	P-Value<0.05

تزریق	شماره	PT نرمال	PT بعد از تزریق
فراکسیون F3B با غلظتی نزدیک به غلظت LD50	۱	12.5s	120s
	۲	13.9s	118s
	۳	14.6s	More than 5min
میانگین		13.6s	.....
		P-Value<0.05	

نتیجه گیری

با مشاهده‌ی نتایج بدست آمده در مورد ساب فراکسیون‌های F2A و F2B می-توان اینگونه نتیجه‌گیری کرد که با مقایسه PT نرمال و PT سم خالص با PT مربوط به این دو ساب فراکسیون می‌توان بیان کرد به دلیل اینکه PT بعد از تزریق این دو ساب فراکسیون به موش بالاتر از PT نرمال و همچنین PT سم خالص می‌باشد بنابراین این دو ساب فراکسیون دارای خاصیت ضدانعقادی بوده و میزان اکتیویتی آبشار انعقادی را به شدت کاهش داده و بنابراین می‌توانند منجر به خونریزی شوند. همچنین با مقایسه نتایج مربوط به دو ساب فراکسیون F3A و F3B نیز می‌توان همین مطلب را عنوان کرد با این تفاوت که این دو ساب فراکسیون ضدانعقادی‌تر و میزان اکتیویتی آبشار انعقادی را با شدت بیشتری کاهش می‌دهند و منجر به خونریزی شدیدتر می‌شوند. از طرف دیگر با مقایسه نتایج PT بعد از تزریق با PTT نرمال می‌توان بیان کرد که تا حدودی اکتیویتی مسیر داخلی انعقاد نیز کاهش پیدا می‌کند. با مقایسه PT بعد از تزریق با FT نرمال در مورد هر ٤ ساب فراکسیون نیز می‌توان استنباط کرد که فیبرینوژن نیز به شدت تخریب شده و فیبرین شکل نمی‌گیرد و یا خیلی ضعیف و کم شکل می‌گیرد. بنابراین از سم مار جعفری ایرانی برای کشف روشهای جدی در درمان بیماریهای قلبی و سرطان می-توان استفاده کرد. می‌توان در آینده‌ای نزدیک با جداسازی و خالص سازی این پروتئین‌ها یا آنزیم‌های ضدانعقادی از آن‌ها به جای داروهای شیمیایی چون وارفارین استفاده کرد. همچنین می‌توان با مسدود کردن گیرنده‌های یافت شده روی سطح پلاکت‌ها توسط این سم هم با لخته شدن نامنظم خون مقابله کرد و هم از انتشار سرطان‌های خاص در سرتاسر بدن جلوگیری نمود. درک اعمال و تغییرات و اصلاحات در واکنش‌های شیمیایی مهمی که در این زمینه تاثیرگذار هستند، می‌تواند جان بسیاری از انسانها را از مرگ نجات دهد.

مراجع

(1) Sajevic T, Leonardi A, Krizaj I. Haemostatically active proteins in snake venoms. Toxicon 2011 Apr;57(5):627-45.
(2) Manjunatha Kini R., Serine Proteases Affecting Blood Coagulation and Fibrinolysis from Snake Venoms. Pathophysiol Haemost Thromb 2005;34:200–204
(3) Manjunatha KINI R. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. Biochem. J, 2006 397, pp. 377–387.
(4) Braud S, Le Bonniec BF, Bon C, Wisner A. The stratagem utilized by the plasminogen activator from the snake Trimeresurus stejnegeri to escape serpins. Biochemistry 2002 Jul 2;41(26):8478-84.
(5) Markus Berger, Antonio F.M. Pinto, Jorge A. Guimaraes_Laboratorio de Bioquimica Farmacologica, Centro de, 2008, Purification and functional characterization of bothrojaractivase, a Prothrombin-activating metalloproteinase isolated from Bothrops jararaca snake venom, Toxicon 51; 488–501.
(6) Ghorbanpur .M, Zare Mirakabadi .A, Zokaee .F, Zolfagharian .H, 2010, Identification and partial purification of an anticoagulant factor from the venom of the Iranian snake *Agkistrodon halys* , J venom anim toxin incl trop dis, V 16, n 1; 96-106.
(7) Boffa m. C, Bofaa G. A, 1976, A phospholipase A2 with anticoagulant activity II, Inhibition of the phospholipid activity in coagulation, Biochem Biophys Acta 429; 839-852.
(8) Verheij H. M, Boffa M. C, Rothen C, Bryckert M. C, Verger R, De Haas G. H, 1980, Correlation of enzymatic activity and anticoagulant properties of phospholipase A2, Eur. J. Biochem 112; 25-32.