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

اثرات *in vivo* پروتئین های انعقادی سم مار جعفری ایرانی *Iranian Echis Carinatus* بر روی هموستاز خون

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

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

چکیده

سم مار جعفری ایرانی (Iranian Echis carinatus) حاوی آنزیم‌ها و پروتئین‌های موثر بر روی سیستم هموستاز خون می‌باشد. با استفاده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون (سفادکس G-75) و تعویض یونی(DEAE-cellulose (DE-52)) ساب فراکسیون‌های F1A و F1B از سم خالص مارجعفری ایرانی جداسازی و به موش‌های سوئیسی نر نژاد NIH از طریق intravenous(i.v.) تزریق شد. خونگیری قبل از تزریق انجام و نتایج نرمال تست PT (Prothrombin Time) و تست FT(Fibrinogen Time) وتست PTT(Partial Thromboplastin Time) ثبت شد. پس از تزریق سم خالص و ساب فراکسیون‌های F1A و F1B با غلظت یکسان، خونگیری انجام و مقایسه نتایج تست PT قبل و بعد از تزریق نشان داد که زمان انعقاد خون پس از تزریق این ساب فراکسیون‌ها بسیار پایین‌تر از زمان انعقاد طبیعی خون و زمان انعقاد پس از تزریق سم خالص می‌باشد که این نتیجه خاصیت انعقادی این دو ساب فراکسیون را نشان می‌دهد و لذا این دو ساب فراکسیون میزان اکتیویتی آبشار انعقادی را به شدت افزایش داده و منجر به انعقاد سریع خون می‌شوند(P-Value< 0.005). با مقایسه نتایج تست PT بعد از تزریق با PTT نرمال می توان بیان کرد میزان اکتیویتی مسیر داخلی انعقاد نیز به شدت افزایش یافته و همچنین با مقایسه PT بعد از تزریق با FT نرمال نیز فعال شدن شدید آبشار انعقادی و تولید فیبرین را می توان استنباط کرد و باز هم خصوصیت انعقادی شدید این دو ساب فراکسیون را نشان می دهد. لذا ویژگی سم مار جعفری ایرانی (Iranian Echis carinatus)درغلظت کم بعد از گزش خاصیت انعقادی شدید آن می باشد که از این خاصیت انعقادی می توان در موارد درمانی استفاده کرد.

مقدمه

سم مارهای Viperidae منبع غنی از پروتئین‌ها و پپتیدهای موثر بر سیستم هموستاتیک‌اند یعنی دارای فعالیت علیه انواع فاکتورهای درگیر در انعقاد و فیبرینولیز هستند. به عبارت دیگر این پروتئین‌ها می‌توانند به فاکتورهای انعقادی، ضدانعقادی و فیبرینولیتیک طبقه‌بندی شوند. این پروتئین‌ها دارای ویژگی زیادی برای هدف ملکولی‌شان، مقاوم به مهارکننده‌های فیزیولوژیکی و پایدار در محیط In vitro و In vivo هستند. در طبقه‌بندی کلی بر اساس تشابه توالی، آنزیم‌ها شامل خانواده‌ی سرین پروتئینازها، متالوپروتئینازها، فسفولیپازهای A_2، L- آمینواسید اکسیدازها، نوکلئازها، نوکلئوتیدازها و پروتئین‌های غیرآنزیمی شامل لکتین‌های نوع C، دیس اینتگرین‌ها، توکسین‌های Three finger می‌باشند(۱،۲،۳). این ترکیب‌ها بر فاکتورهای مختلف انعقاد خون به طور انتخابی تاثیر می‌گذارند و امکان شناخت خصوصیات عناصر ساختاری درگیر در هدف‌های ملکولی را فراهم می‌کنند و لذا پروتئین‌های سم مار مدل‌های فوق العاده‌ای برای مطالعات ارتباط ساختار- عملکرد محسوب می‌شوند. فاکتورهای پیش‌انعقادی یک زیموژن فاکتور انعقادی ویژه را در آبشار انعقادی فعال کرده و شکل گیری لخته را تسریع می‌کنند که مهمترین فاکتورها و عوامل انعقادی سم مار عبارتند از: ۱- فعال کننده فاکتورVII که تاکنون پروتئینی از سم مار که به طور ویژه فقط فاکتور VIIرا فعال کنند شناخته نشده‌است. oscutarin یک فعال کننده پروترومبینی گروه c از سم Oxyuranus scutellatus است که فاکتور VII را فعال می‌کند. آنالیز ژل الکتروفورز محصولات تخریب نشان داد که فعال‌سازی در یک نقطه مشابه به نقطه شکست طبیعی رخ می‌دهد.(۱،۲،۳،٤). ۲- فعال کننده فاکتور X، سم Viperidae و Crotalidae و Elapidaeشامل یک تنوع فاکتورهای فعال کننده‌ی فاکتورX هستند. ۳- فعال کننده‌های پروترومبین، برخی مارها دارای فعال کننده‌های پروترومبین در سم خود هستند که برمبنای خصوصیات ساختمانی، مشخصات عملکردی و احتیاجات کوفاکتوری خود به ٤ گروه تقسیم می‌شوند. فعال کننده‌های پروترومبینی گروه A و B متالوپروتئیناز هستند و پروترومبین را به میوزوترومبین تبدیل می‌کنند و در مقابل، فعال کننده‌های پروترومبینی گروه C و D سرین‌پروتئیناز و پروترومبین را به ترومبین بالغ تبدیل می‌کنند(۱،۲،۳،٤). ٤- فعال‌کننده‌ی فاکتور IX و آنزیم‌های منعقد کننده‌ی فیبرینوژن نیز از دیگر عوامل انعقادی برخی سم مارها هستند. در این پژوهش ما خصوصیات انعقادی سم مار جعفری ایرانی (Iranian Echis carinatus) را با تزریق به موش مورد بحث و بررسی قرار دادیم.

در این تیره ۱۰ جنس شناسایی شده‌اند که در اروپا، آسیا و افریقا دیده می‌شوند، جنس‌های متعددی از این تیره در ایران وجود دارند که یکی از آن‌ها جنس Echis است. پراکندگی این جنس که ۲ گونه در آن تشخیص داده شده، در شمال و شرق افریقا، جنوب و جنوب غربی آسیاست. که خصوصیات انعقادی سم گونه‌ی Echis Carinatus در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت.

روش تحقیق

۱- مقدار50mg سم لیوفیلیزه از بخش جانوران سمی موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی 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 ٤۰ 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 روش Farid et al بر روی ستون سفادکس G-75 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 انعقادی و توکسوسیتی قوی بر روی آبشار انعقادی داشتند را برای جداسازی و تفکیک بیشتر به روی ستون DEAE-cellulose(DE-52) برده شد. جداسازی به وسیله روش Markus Berger et al (bothrojaractivase) صورت گرفت. تمام مراحل استخراج در ٤+ درجه سانتی گراد و با استفاده از دستگاه جمع کننده اتوماتیک (Fraction collector) انجام پذیرفت.

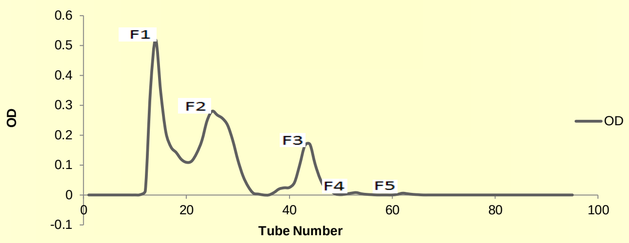
٥- تزریق سم خالص و فراکسیون‌ها: سم خالص و فراکسیون‌های مورد نظر که بعنوان فراکسیون‌های انعقادی جداسازی شدند به موش‌های سوئیسی نر نژاد NIH تزریق شدند.

٦- تست PT (Prothrombin Time): روش مورد استفاده این تست برای این پژوهش به این صورت است که: ۱- آوردن بطری و ظرف محلول تست PT به ۳۷ درجه. ۲- اضافه کردن 50µl پلاسما به یک لوله‌ی تست. ۳- انکوبه کردن پلاسما در ۳۷ درجه برای مدت زمان ۲ دقیقه ٤- اضافه کردن 100µl محلول تست PTو هم زمان، زمان استارت زده می‌شود. ٥- زمان انعقاد و میزان فعالیت و INR از روی جدول مربوط به کیت مورد نظر تعیین می‌شود. میزان نرمال این تست ۱۲ الی ۱٤ ثانیه است. در این تست فراکسیون‌های جداسازی شده از طریق دو کروماتوگرافی انجام گرفته به جای محلول PT مورد استفاده قرار گرفت.

۷- تست PTT و FT.

نتایج و بحث

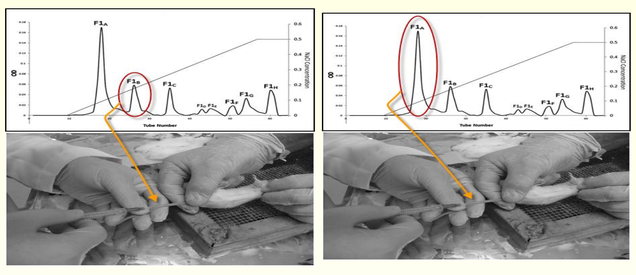
50mgسم خالص لیوفیلیزه شده با 4 سی سی آب به صورت محلول در آمده و بوسیله سانتری‌فوژ با سرعت 14000rpm سانتری‌فوژ شد و بعد از جداسازی ماده سفید رنگ موکوسی ته‌نشین شده که لیپید، کربوهیدرات و....می‌باشد. محلول باقی‌مانده که حاوی پروتئین‌های مورد نظر ما می‌باشد به روی ستون کرماتوگرافی Sephadex G-75 ژل فیلتراسیون برده شد. جداسازی با استفاده از روش Farid et al انجام گردید. 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. طبق نمودار زیر پیک اول بزرگترین پیک و حاوی بیشترین میزان پروتئین می باشد. این پیک دارای پروتئین هایی با وزن مولکولی بالا است. پیک های F_2 تا F_5 به ترتیب دارای پروتئین هایی با وزن مولکولی پایین تری 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 F1 به جای محلول PT بر روی پلاسمای خون انسان انجام گرفت و بعد از اینکه مشخص شد این فراکسیون دارای خاصیت انعقادی است در ادامه برای جداسازی و تفکیک بیشتر این فراکسیون به روی ستون کروماتوگرافی تعویض یونی (DE-52) DEAE-cellulose برده شد. جداسازی به وسیله روش Markus Berger et al (bothrojaractivase) و تمام مراحل استخراج در ٤+ درجه سانتی گراد و با استفاده از دستگاه جمع کننده اتوماتیک (Fraction collector) انجام پذیرفت.

با توجه به اینکه ساب فراکسیون‌های F1A و F1B دارای پیک بلندتر و تیزتری می‌باشند و محتوای پروتئینی آن‌ها بیشتر می‌باشد برای تزریق به موش‌های سوئیسی نر نژاد NIH مورد استفاده قرار گرفتند. قبل از تزریق این ساب فراکسیون‌ها ابتدا خونگیری از موش‌ها انجام گرفت و نتایج نرمال تست PTT و PTT و FT بدست آمد. در ادامه تزریق سم خالص با غلظتی نزدیک به LD50 سم مار جعفری ایرانی به ۳ سر موش صورت گرفت و نتایج PT مربوط به آن ثبت شد. تزریق ساب فراکسیون F1A و F1B نیز با غلظتی نزدیک به غلظت LD50 هرکدام به ٦ سر موش انجام گرفت و برای ثبت مشاهدات و میزان توکسیسیتی سم خالص و ساب فراکسیون‌ها ۳ سر موش نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. نمودار کرواتوگرافی تعویض یونی و نحوه تزریق ساب فراکسیون ها و تایج تست های نرمال و پس از تزریق در زیر آمده است.



تفکیک فراکسیون F_1 توسط کروماتوگرافی تعویض یونی و
نحوه تزریق ساب فراکسیون F1A و F1B از طریق intravenous

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 یا 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	تزریق	شماره	PT نرمال	PT بعد از تزریق
فراکسیون F1A با غلظتی نزدیک به غلظت LD50	۱	11s	6s	فراکسیون F1B با غلظتی نزدیک به غلظت LD50	۱	11.2s	4s
	۲	13.6s	5s		۲	12.6s	3.3s
	۳	12.2s	7s		۳	11.8s	4s
	٤	14.1s	8s		٤	14.1s	4s
	٥	13.9s	9s		٥	13.3s	5s
	٦	12s	6s		٦	13s	3s
میانگین		12.8s	6.8s	میانگین		12.6s	3.8s
		P-Value<0.05				P-Value<0.05	

نتیجه گیری

با مقایسه نتایج PT نرمال با PT بعد از تزریق سم خالص و دو ساب فراکسیون مورد نظر می‌توان نتیجه گرفت که دو ساب فراکسیون F1A و F1Bعوامل انعقادی سم مار جعفری ایرانی می‌باشند. که این مطلب را می توان اینگونه نتیجه گرفت که زمان انعقاد بعد از تزریق این دو ساب فراکسیون بسیار پایین تر از زمان انعقاد طبیعی و زمان انعقاد بعد از تزریق سم خالص می باشد و لذا این دو ساب فراکسیون انقادی می باشند. از طرف دیگر با قرار دادن سه موش به عنوان شاهد میزان توکسیسیتی این دو ساب فراکسیون را نیز مشاهده نمودیم که در علایم حیاتی آن ها قابل مشاهده بود. با مقایسه PT بعد از تزریق با PTT نرمال می توان استنباط کرد که مسیر داخلی انعقاد نیز به شدت فعال شده است. با مقایسه PT بعد از تزریق با FT نرمال نیز می توان نتیجه گرفت که سیستم انعقاد که در نهاییت منجر به تشکیل فیبرین می شود به شدت فعال شده و فیبرینوژن تجزیه شده و فیبرین شکل گرفته است. بنابراین سم مار جعفری ایرانی دارای خصوصیات انعقادی می باشد که ما جداسازی و تزریق آن را انجام دادیم و بنابراین ویژگی انعقادی این سم را بررسی کردیم. موستازیس سیستمی است که به‌شدت دقیق و ماهرانه تنظیم شده است. کنترل دقیق و جامع انعقاد خون برای زندگی حیوانات مانند انسان‌ها ضروری است. مارهای سمی انبار پروتئین‌های نمویافته‌اند که فرآیندهای موجود در این سیستم را در شکار خود تحت تاثیر قرار داده و از کار می‌اندازند. برخی از این مولکول‌های موجود در سم مار می‌توانند برای سلامتی انسان مفید و سودمند باشند. با توجه به این مطالب می‌توان از سم مار جعفری ایرانی که به عنوان یک مار بسیار مفید و سودمند در مناطق زیادی از ایران وجود دارد در موارد پزشکی استفاده کرد که ما در این پژوهش اینگونه ثابت کردیم که این سم حاوی عوامل انعقادی بسیار قوی می‌باشد که می‌تواند منجر به انعقاد در زمانی کمتر از زمان نرمال شود که ساب فراکسیون‌های F1A و F1B بعنوان این عوامل انعقادی جداسازی و تزریق و نتایج مربوطه ثبت گردید که این خاصیت انعقادی بستگی به میزان و غلظت سم تزریق شده توسط مار نیز دارد.

مراجع

(1) Sajevic T, Leonardi A, Krizaj I. Haemostatically active proteins in snake venoms. Toxicon 2011 Apr; 57(5): pp. 627-45.
(2) Pradeep Kumar K, Basheer M. Snake bite: Biochemical changes in blood after envenomation by viper and cobra . J Me d A l l i e d S c i 2011; 1 (1): pp. 3 6 -41.
(3) Manjunatha Kini R. Serine Proteases Affecting Blood Coagulation and Fibrinolysis from Snake Venoms. Pathophysiol Haemost Thromb 2005; 34: pp. 200-204.
(4) Manjunatha Kini R. The intriguing world of Prothrombin activators from snake venom. Toxicon 45 (2005), pp. 1133–1145.
(6) Howesa J, Wilkinsonb M, Theakston R, Laing G. The purification and partial characterization of two novel metalloproteinase from the venom of the West African carpet viper, Echis ocellatus. Toxicon 42, 2003, pp. 21–27.
(5) Sundell I, Ranby M, Zuzel M, Robinson K, Theakston R. In vitro procoagulant and anticoagulant properties of Naja naja naja venom. Toxicon 42 (2003) 239–247.
(6) 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): pp. 8478-84.
(7) Markland F. Snake and venoms and the hemostatic system. Toxicon 1998, Vol. 36, No. 12, pp. 1749-1800.
(8) Hofmann H, Bon C. Blood Coagulation Induced by the Venom of Bothrops atrox. 1. Identification, Purification, and Properties of a Prothrombin Activator. Biochemistry 1987, VOL. 26, NO. 3. pp. 772-780.
(9) Chester A, Crawford G. In vitro coagulant properties of venoms from Australian snakes. Toxicon 1982, Vol . 20, No. 2, pp. 501-504.
(10) Franza B, Aronson D. Detection and measurement of low levels of Prothrombin, use of a procoagulant from Echis carinatus venom. Thrombosis research 1976, Vol. 8, pp. 329-336.