خون
دوره ۱۰ شماره ۲ تابستان ۹۲ (۱۸۱-۱۷۳)

مقاله پژوهشی

اثر آنزیم فعال‌کننده پروترومبین جدا شده از سم مار جعفری ایرانی بر روی هموستاز خون

مهدی بابایی[۱]، حسین ذوالفقاریان[۲]، حسین سلمانی‌زاده[۱]، عباس زارع میرک آبادی[۳]، حافظه علیزاده[۱]

چکیده

سابقه و هدف

زهر مار جعفری(*Echis carinatus*) مخلوط پیچیده‌ای از مواد سمی است. این زهر شامل متالوپروتئازهایی است، که فعال‌کننده قوی پروترومبین هستند. این ترکیبات بر سیستم انعقاد خون اثر دارند و باعث ایجاد لخته خون می‌شوند. در این مطالعه، مکانیسم اثر سم مار جعفری ایرانی روی پروتئین‌های پلاسمای انسان (پروترومبین یا فیبرینوژن) و اثر انعقادی آن مورد بررسی قرار گرفت. هدف از این مطالعه، بررسی خاصیت انعقادی مار جعفری ایرانی و اثرات آن در انعقاد خون و خالص‌سازی عامل مؤثر در انعقاد بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، زهر خام از گونه مار جعفری ایرانی انتخاب شد. فعال‌کننده پروترومبین از زهر خام این مار با ترکیبی از روش‌های کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون، تعویض یونی و HPLC فاز معکوس، خالص شد. نمونه خون از ۲۰ فرد سالم گرفته شد و برای آزمایش‌های PT و FT مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها

سم خام مار جعفری ایرانی باعث تسریع انعقاد خون شد به طوری که در غلظت زهر ۱ mg/mL ، لخته در ۸/۶ ± ۰/۶۴ ثانیه در مقایسه با پلاسمای شاهد(۱۳/۴ ± ۰/۵۹ ثانیه) تشکیل شد.

نتیجه گیری

زهر مار جعفری ایرانی شامل فاکتورهای انعقادی است. به نظر می‌رسد فراکسیون تخلیص شده از مار جعفری ایرانی شبیه به پروتئین انعقادی باشد، که قادر به تسریع انعقاد خون انسان در شرایط آزمایشگاهی است.

کلمات کلیدی: انعقاد خون، فعال‌کننده پروترومبین(سم مار جعفری)، سم

تاریخ دریافت : ۹۰/۱۰/۲۰
تاریخ پذیرش : ۹۱/ ۱/۳۰

۱- کارشناس ارشد بیوشیمی ـ دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات ـ باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان ـ تهران ـ ایران
۲- مؤلف مسؤول: PhD بیوشیمی بالینی ـ استادیار مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی ـ کرج ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۴۸-۳۱۹۷۵
۳- PhD بیوشیمی ـ مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی ـ بخش جانوران سمی ـ کرج ـ ایران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

سم مار جعفری، مخلوطی از پروتئین‌هاست که آبشار انعقادی خون را تحت تاثیر قرار داده و موجب عرق کردن طاقت‌فرسا و خونریزی شدید می‌شود. از جمله این پروتئین‌ها، پروترومبین است که فعال‌سازی پروترومبین برای بلوغ و تبدیل به ترومبین به وسیله فعالیت کمپلکس پروتئولیتیک پروترومبیناز رخ می‌دهد و شامل یک فاکتور سرین پروتئیناز Xa و کوفاکتورهای فاکتور V و یون‌های Ca^{+2} و فسفولیپیدها است. تعدادی از فعال‌کننده‌های پروترومبین به صورت خارجی در سم مار یافت شده‌اند. سم مار جعفری باعث انعقاد خون می‌شود. بیش از ۵۰ ماده مختلف در انعقاد خون مؤثرند. هدف پایانی انعقاد این است که آنزیم ترومبین به وجود آید. این آنزیم است که در پایان فیبرینوژن را به فیبرین تبدیل می‌کند. رشته‌های فیبرین پس از اتصال به یکدیگر، شبکه‌ای در محل آسیب دیده ایجاد می‌کنند(۱).

بعضی از این مواد که فاکتور انعقادی نام دارند، موجب پیشبرد انعقاد می‌شوند، در حالی که بعضی دیگر با نام فاکتور ضد انعقادی، موجب توقف فرآیند انعقاد می‌شوند. منعقد شدن یا نشدن خون به درجه تعادل این دو گروه ماده بستگی دارد. در حالت طبیعی، مواد ضد انعقادی برتری داشته و خون منعقد نمی‌شود، اما هنگامی که رگی پاره شود مواد انعقادی در ناحیه آسیب دیده فعال شده، بر مواد ضد انعقادی غلبه می‌کنند و در نتیجه یک لخته خون تشکیل می‌گردد. از نظر بالینی سم‌های منعقدکننده خون اگر به مقدار زیاد و به تدریج و آهسته وارد جریان خون شوند، خاصیت انعقاد خون را از بین می‌برند یعنی خون را دفیبرینه نموده باعث عدم انعقاد خون می‌گردند. اگر مقدار این سم زیاد باشد و به سرعت وارد جریان خون گردد باعث انعقاد خون در عروق شده و سرانجام مرگ فرا می‌رسد(۳، ۲).

سالانه گزارش‌های زیادی از مارگزیدگی منتشر می‌شود. به همین علت نیز شناسایی و بررسی عوامل موجود در سم مار از اهمیت بسیار زیادی برخوردار بوده و مورد توجه دانشمندان می‌باشد. آنزیم‌های فعال کننده پروترومبین(شبیه به اکارین) به عنوان یک ابزار مهم در آزمایشگاه‌ها برای آنالیز خون بیمارانی که دچار بیماری کبدی شده‌اند، مورد استفاده قرار می‌گیرند. ارزش این آنزیم در این است که بر خلاف فاکتور Xa می‌تواند مستقلاً بدون نیاز به هیچ کوفاکتوری حتی بدون نیاز به فاکتور V بر روی پروترومبین کربوکسیله شده و یا کربوکسیله نشده عمل نماید. بنابراین حتی اگر در فاکتور V اختلالی وجود داشته باشد، می‌توان با این آنزیم میزان موجودی پروترومبین را در خون بیماران اندازه‌گیری نمود. این فعال کننده‌ها به ۴ گروه بر مبنای نیازمندی و احتیاج به کوفاکتورهایشان طبقه‌بندی شده‌اند. فعال‌کننده‌های پروترومبین گروه A و B متالوپروتئیناز هستند، در حالی که فعال‌کننده‌های پروترومبین گروه C و D سرین پروتئیناز می‌باشند. فعال‌کننده‌های پروترومبین گروه C به فاکتور موجود در پستانداران یعنی Xa فاکتور کمپلکس V شباهت دارند در حالی که فعال‌کننده‌های گروه D به لحاظ ساختمانی و عملکردی مشابه فاکتور Xa اند(۸-۴).

امروزه روش‌های مختلفی برای تشخیص و جداسازی آنزیم‌های سم مار به کار گرفته می‌شود که از جمله معمول‌ترین و پرکاربردترین آن‌ها روش کروماتوگرافی و الکتروفورز است(۱۴-۹). این بررسی امکان تشریح و توصیف یک سری جزییات پیرامون اطلاعات موجود درباره فعال‌کننده‌های پروترومبین که بر روی هموستاز خون مؤثرند و سؤالاتی را که بی‌پاسخ مانده‌اند، به طور برجسته فراهم می‌کند.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، سم مار جعفری لیوفیلیزه شده از بخش جانوران سمی مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. سفادکس G-75 ، DEAE- سفاروز و ستون HPLC C-18 فاز معکوس از فارماسیا(سوئد) خریداری شد. کلسیم کلراید، کیت PT و FT (محصولی از دیاگنوستیک - آمریکا) از شرکت اهورا طب روز تهیه گردید.

نمونه خون:

نمونه خون از ۲۰ فرد سالم، جوان و از هر دو جنس

Archive of SID
www.SID.ir

(بدون هیچ سابقه بیماری خونی) گرفته شد. نمونه خونی این افراد به مدت ۱۵ دقیقه و در ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد، پلاسمای به دست آمده جدا شد و برای آزمایش‌های PT و FT مورد استفاده قرار گرفت.

ارزیابی زمان پروترومبین (PT):

۱۰۰ لاندا از پلاسمای سیتراته(با نسبت ۱/۹) را به لوله اضافه کرده و ۲ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمودیم. سپس ۲۰۰ لاندا ترومبوپلاستین(ویال حاوی ترومبوپلاستین و کلسیم) را به لوله محتوی پلاسما اضافه کرده و به محض دیدن لخته، زمان را متوقف کردیم. زمان نرمال برای این آزمایش ۱۴-۱۲ ثانیه می‌باشد(۱۷-۱۵).

ارزیابی زمان فیبرینوژن(FT):

نمونه شامل ۱/۸ میلی‌لیتر خون بر روی ۰/۲ تری سدیم سیترات ۰/۱۰۹ مولار (۳/۲٪) بود. خون را به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ کردیم و پلاسما را به یک لوله پلاستیکی منتقل نمودیم. ۰/۱ میلی‌لیتر از پلاسما را برداشته و ۰/۹ میلی‌لیتر از بافر رقیق‌کننده را به آن اضافه کرده و مخلوط نمودیم(رقت ۱:۱۰ از پلاسما). ۰/۲ میلی‌لیتر از پلاسمای رقیق شده را به یک لوله شیشه‌ای منتقل کرده و برای مدت ۲ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از گذشت ۲ دقیقه از انکوباسیون، مقدار ۰/۱ میلی لیتر از معرف حاوی ترومبین را به پلاسمای رقیق شده اضافه کرده و هم زمان با دیدن اولین علایم تشکیل لخته، زمان را یادداشت کردیم(۲۱-۱۸).

اندازه‌گیری میزان پروتئین زهر خام مار جعفری:

مقدار پروتئین موجود در محلول زهر خام، با استفاده از BSA (Bovin Serum Albumin) به روش پروتئین سنجی لوری تعیین شد(۲۲).

اندازه‌گیری فعالیت انعقادی زهر خام:

از ۱۰ میلی‌گرم زهر مار جعفری، غلظت ۱ mg/mL تهیه گردید. این غلظت برای بررسی خاصیت انعقادی سم مار جعفری، مورد آزمایش PT قرار گرفت.

جداسازی و خالص‌سازی عامل فعال‌کننده پروترومبین:

خالص‌سازی عامل فعال‌کننده پروترومبین با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی انجام گرفت. جهت جداسازی فاکتور انعقادی، ۵۰ میلی‌گرم زهر خام مار جعفری در ۴ میلی‌لیتر بافر آمونیوم استات(۲۰ میلی‌مولار با pH= ۶/۸) حل شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. ناخالصی‌های سم با استفاده از میکروفیلتر ۰/۴۵ حذف گردید. پس از تعادل ستون، محلول پروتئینی حاصل به ستون(۳ cm × ۲۰۰) سفادکس G-75 تزریق شد. ستون ژل کروماتوگرافی با بافر آمونیوم استات با pH= ۶/۸ به تعادل رسید و با همین بافر بعد از تزریق نمونه شسته شد. جذب هر فراکسیون در طول موج ۲۸۰ به دست آمد و پیک‌های مربوط به آن رسم شد. تمامی فراکسیون ها ۲۴ ساعت مقابل ۱۰ حجم آب مقطر دیالیز شدند و در ۴ درجه سانتی‌گراد تغلیظ گردیدند. پس از تغلیظ، حجم پیک‌ها به دقت اندازه‌گیری شد. آزمایش PT برای ۵ پیک(فراکسیون) با غلظت مشابه، انجام گرفت. در مرحله بعد فراکسیون انعقادی در ۴ درجه‌سانتی‌گراد در مقابل بافر تریس–HCl ۰/۰۵ میلی‌مولار(pH= ۸/۲) دیالیز گردید. این فراکسیون به ستون(۲۵ cm × ۱/۵)کروماتوگرافی تعویض یونی DEAE ـ سفاروز، وارد شد و ستون با بافر تریس –HCl ۰/۰۵ میلی‌مولار(pH= ۸/۲) به تعادل رسید. ستون را با گرادیانی از غلظت نمک از صفر تا ۰/۵ میلی‌مولار شستشو دادیم. ساب فراکسیونی که فعالیت انعقادی از خود نشان داد، دیالیز شد و بعد از دیالیز به ستون C-18 HPLC فاز معکوس تزریق گردید. ستون با محلول A (آب،۰/۱٪ تری فلورواستیک اسید) به تعادل رسید و با گرادیان غلظتی از محلول B (استونیتریل، ۰/۱٪ تری فلورواستیک اسید) از صفر تا ۱۰۰٪ با سرعت جریان ۰/۳ میلی لیتر در دقیقه، طی ۵۵ دقیقه شستشو داده شد(۲۴، ۲۳). در نهایت پیک‌ها در ۲۸۰ نانومتر مشاهده شدند و فراکسیون دارای فعالیت انعقادی تشخیص داده شد.

انحراف معیار(SD) و p-value در مورد داده‌های آزمایش‌های انجام شده با استفاده از نرم‌افزار mini tab انجام گرفت، فرض H0 رد و H1 تایید شد و $p\leq$ ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

Archive of SID
www.SID.ir

یافته‌ها

با توجه به زمان انعقاد پلاسمای نرمال(فاقد زهر)، مشخص شد که زهر خام مار جعفری پلاسما را سریعاً لخته می‌کند، بنابراین این زهر ویژگی انعقادی (procoagulant) دارد. با اضافه کردن سم با غلظت ۱ mg/mL ، لخته به سرعت تشکیل شد. بدین ترتیب وجود عامل انعقادی در زهر مار جعفری اثبات گردید.

جدول ۱: آزمایش PT برای غلظت ۱ mg/mL سم مار جعفری ایرانی

غلظت زهر	میانگین PT(s) *	توضیحات
۱ (mg/mL)	۸/۶ ± ۰/۶۴	لخته کاملاً تشکیل می‌شود.
Normal PT (بدون وجود زهر)	۱۳/۴ ± ۰/۵۹	لخته کاملاً تشکیل می‌شود.

* n= ۴ ، p value < ۰/۰۵

در مرحله بعد آزمایش PT و FT نرمال برای ۶ نمونه خون انجام گرفت و نتایج مدت زمان میانگین آن برای آزمایش PT = ۱۲/۸ s (p< ۰/۰۰۱) و FT = ۱۳/۷ s (p< ۰/۰۱) به دست آمد.

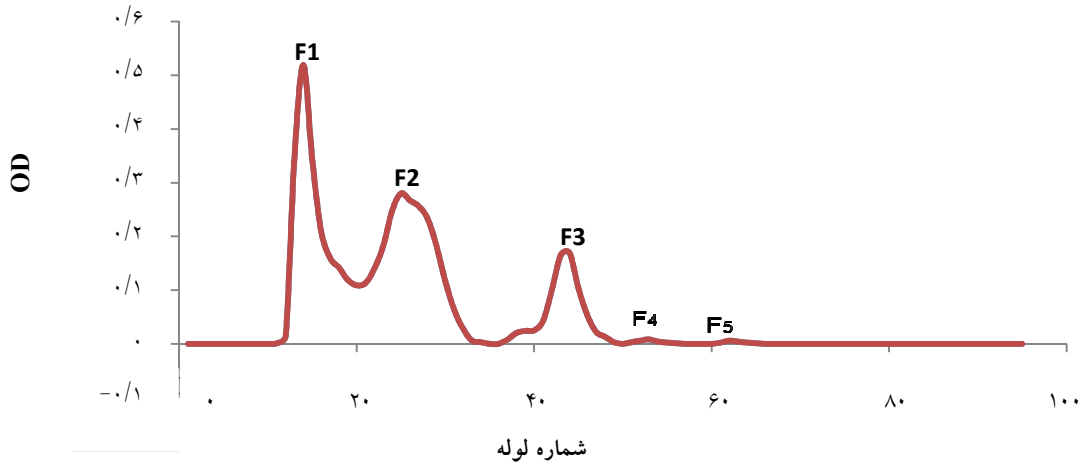
آزمایش PT را با غلظت ۱ mg/mL بر روی پلاسمای خون ۶ نمونه انجام دادیم. نتایج میانگین مدت زمان آزمایش PT در این حالت ۹/۲ ثانیه(p< ۰/۰۰۵) به دست آمد.

جداسازی سم اکیس کارناتوس به وسیله کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون:

با استفاده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون، ۵ پیک (فراکسیون) به دست آمد که آن‌ها را به ترتیب F_1 تا F_5 نام‌گذاری کردیم. طبق نمودار ۱، فراکسیون‌های F_1 تا F_5 شامل پروتئین‌هایی است که به ترتیب از وزن مولکولی بالا به پایین از ستون ژل کروماتوگرافی خارج می‌شوند. فراکسیونF_1 بزرگترین و حاوی بیشترین میزان پروتئین بود.

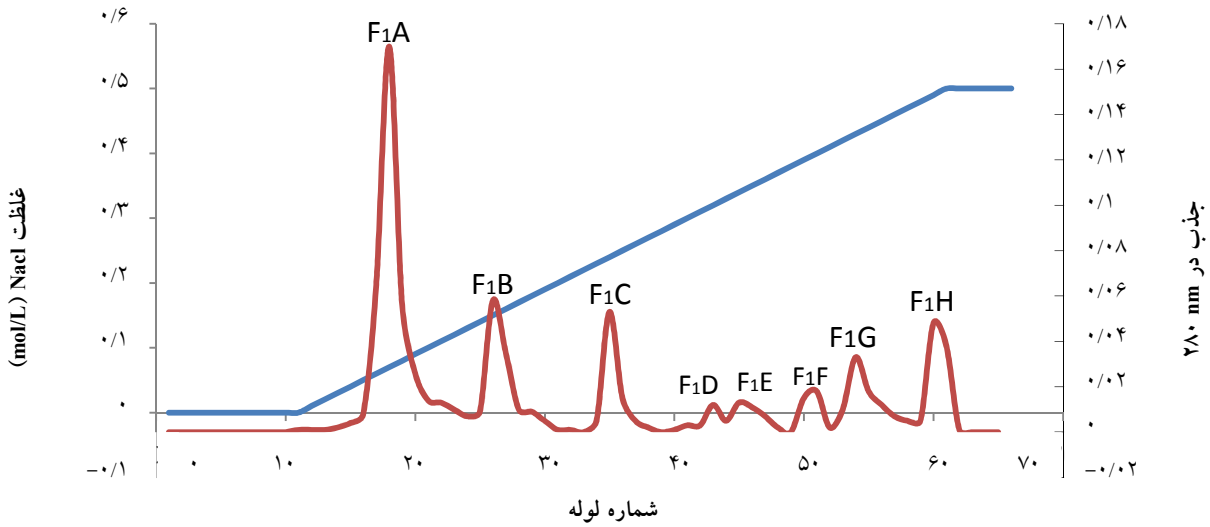
بررسی فعالیت انعقادی فراکسیون‌های به دست آمده از ژل کروماتوگرافی:

با انجام آزمایش PT بر روی فراکسیون‌های F_1-F_5، فراکسیون انعقادی مشخص شد. فراکسیون F_1 خاصیت انعقادی بیشتری نسبت به سایر فراکسیون‌ها داشت. زمان تشکیل لخته با وجود فراکسیون F_1 در پلاسما ۱۸/۳۴ ثانیه (p< ۰/۰۲ و SD= ± ۱/۱۶) بود. این زمان برای فراکسیون F_2 در حدود ۳۵/۵ ثانیه (p < ۰/۰۴ و SD = ±۲/۴۱) و برای سایر فراکسیون‌ها بیشتر از ۵ دقیقه به دست آمد.

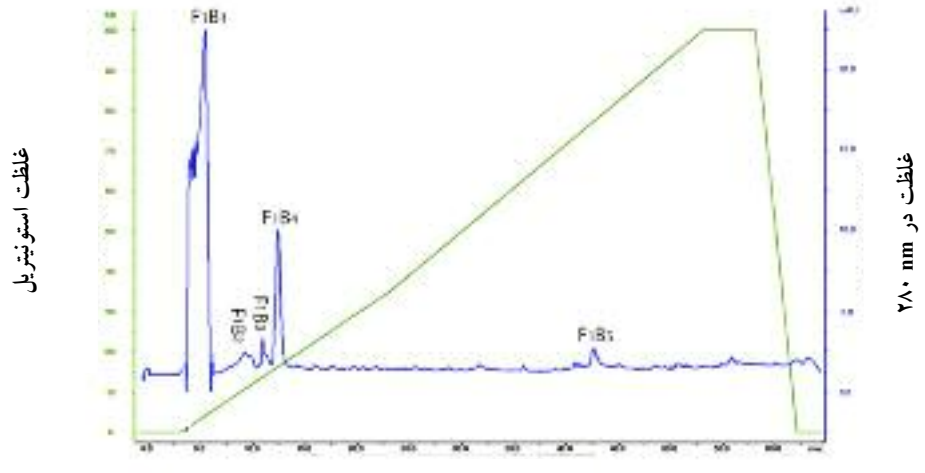


نمودار ۱: ژل کروماتوگرافی ۵۰ mg زهر خام با استفاده از سفادکس G-۷۵

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار ۲: جذب تفکیک فراکسیون F1 توسط کروماتوگرافی تبادل یونی



نمودار ۳: جداسازی ساب فراکسیون F_1B به وسیله HPLC

جداسازی ساب فراکسیون‌های F_1 حاصل از ژل فیلتراسیون به وسیله کروماتوگرافی تعویض یونی:

فراکسیون F_1 که خاصیت انعقادی داشت، برای جداسازی بیشتر بر روی ستون(DE-52) DEAE– سفاروز برده شد. از کروماتوگرافی تعویض یونی F1 ، ۸ فراکسیون F_1A تا F_1H به دست آمد(نمودار ۲).

بررسی خواص انعقادی ساب فراکسیون‌های F_1:

خاصیت انعقادی ساب فراکسیون‌های F_1 با انجام آزمایش PT بررسی شد(جدول ۲).

طبق جدول ۲، ساب فراکسیون‌های F_1A و F_1B بیشترین خاصیت انعقادی را دارند، به طوری که حتی F_1B زمان انعقاد پایین‌تری نسبت به سم خام داشت.

جداسازی ساب فراکسیون F_1B به وسیله کروماتوگرافی HPLC:

با استفاده از HPLC ، ۵ پیک به دست آمد، که فراکسیون‌های F_1B_1 تا F_1B_5 نامیده شدند(نمودار ۳).

www.SID.ir

پیک‌های به دست آمده در این مرحله مجزا بودند و فراکسیون اول، بیشینه مقدار جذب را داشت. این فراکسیون‌ها با استفاده از آزمایش PT، ارزیابی شدند.

جدول ۲: زمان فعالیت انعقادی ساب فراکسیون‌های F_1

نمونه	متوسط *PT
Fraction F_1 A	۱۴ s
Fraction F_1 B	۸ s
Fraction F_1 C	۷۰ s
Fraction F_1 D	۵۲ s
Fraction F_1 E	۹۰ s
Fraction F_1 F	۵۶ s
Fraction F_1 G	بیشتر از ۵ دقیقه
Fraction F_1 H	۹۵ s

* n= ۴ ، p-value < ۰/۰۵

بررسی فعالیت انعقادی فراکسیون‌های F_1B:

با استفاده از آزمایش PT بر روی فراکسیون‌های F_1B_1 تا F_1B_5 مشخص شد، فراکسیون چهارم(یعنی فراکسیون F_1B_4) خاصیت انعقادی دارد. با اضافه کردن این فراکسیون به پلاسما، لخته در ۳ ثانیه تشکیل شد(p< ۰/۰۵)، به طوری که زمان انعقاد پلاسما با اضافه کردن این فراکسیون به ۳ ثانیه کاهش یافت. در نتیجه فراکسیون F_1B_4 را می‌توان فراکسیون انعقادی در نظر گرفت.

بحث

این تحقیق روشی مؤثر و تکرارپذیر را جهت جداسازی فاکتورهای انعقادی و ضد انعقادی موجود در زهر مار جعفری ایران ارایه می‌دهد. زهر مارهای خانواده ویپریده از جمله مار جعفری، منبع غنی از ترکیبات جدیدی است که کاربردهایی در پزشکی و بیوشیمی دارد(۲۶). به نظر می‌رسد که سم مار جعفری ایران، در انعقاد خون تاثیر داشته باشد، که ممکن است باعث برخی اختلالات هموستاتیک در قربانیان شود.

با توجه به مزیت‌های آزمایش‌های انعقادی به خصوص آزمایش PT (زمان کمتر پاسخ‌دهی و مدل‌سازی بهتر شرایط *in vivo*)، نشان داده شد که زهر مار جعفری در حالت کلی، خاصیت انعقادی زیادی دارد.

از اعداد به دست آمده از آزمایش‌های انجام گرفته بر روی ۶ نفر می‌توان نتیجه گرفت که همه افراد مورد آزمایش سالم بودند چون زمان به دست آمده برای هر یک از آن‌ها در محدوده طبیعی زمان آزمایش‌های PT ، ۱۴–۱۰ ثانیه و FT ، ۱۵–۵ ثانیه بود.

برای بررسی خاصیت انعقادی سم مار جعفری، آزمایش PT را در حضور غلظت ۱ mg/mL بر روی پلاسمای خون ۶ نمونه انجام دادیم. نتایج میانگین مدت زمان آزمایش PT در این حالت باز هم نمایانگر خاصیت انعقادی زهر خام مار جعفری ایرانی بود(ثانیه ۹/۲ =PT). بدین ترتیب وجود عامل انعقادی در زهر مار جعفری اثبات شده و این زهر جهت جداسازی عامل انعقادی انتخاب شد.

با بررسی نتایج بالا، در می‌یابیم که سم مار جعفری باعث تسریع انعقاد خون می‌شود، زیرا در هنگام اضافه کردن سم مار جعفری به پلاسما، زمان آزمایش PT آن نسبت به حالت طبیعی آزمایش PT کاهش می‌یابد. محدوده نرمال برای مقادیر فیبرینوژن در پلاسمای انسان معمولاً بین ۴۰۰–۲۰۰ mg/dL می‌باشد. در مواردی که سطح فیبرینوژن در پلاسما از حداقل محدوده نرمال پایین‌تر رفته باشد، می‌توان یکی از حالت‌های فیبرینولیز، مارگزیدگی، DIC و سایر حالاتی که در آن‌ها مقدار فیبرینوژن خون کاهش می‌یابد را در نظر گرفت. طبق داده‌های به دست آمده در هر یک از این آزمایش‌ها، می‌توان نتیجه گرفت که در صورت مار گزیدگی و یا با وجود غلظت‌های سم، مقداری فیبرینوژن تخریب شده و در نتیجه فیبرینولیز اتفاق می‌افتد(۳۰–۲۵). فراکسیون‌های به دست آمده از ژل کروماتوگرافی، دارای خواص متفاوتی هستند(نمودار ۱). این تفاوت عمل در فراکسیون‌های F_1 تا F_5 به دلیل وجود آنزیم‌های متفاوت در این فراکسیون‌هاست. به طوری که در فراکسیون F_1 ، آنزیم‌های انعقادی(فعال‌کننده پروترومبین نظیر اکارین) وجود دارد و فراکسیون‌های دیگر می‌تواند شامل آنزیم‌های ضد انعقادی(نظیر PLA2) و پروتئین‌های دیگر باشد.

در سال ۱۹۹۶، دیسوک و همکارانش با ترکیبی از روش‌های ژل کروماتوگرافی و کروماتوگرافی تعویض

Archive of SID
www.SID.ir

یونی، موفق به خالص‌سازی آنـزیم CA-1 در محـدوده kD ۶۲ از زهر مار جعفری شدند. مراحل انجام تحقیق تا حدود زیادی با کار تحقیقاتی ما مطابقت داشت(۱۳).

در اثر مار گزیدگی و یـا تزریـق سـم مـار جعفـری بـه پلاسما، زمان انعقاد خون پایین می‌آید. این حالت در مـورد فراکسیون F_1 به طور واضح صدق نکرد، با توجه به این که فعالیت انعقادی، کاهش در زمان انعقاد در مقایسه با نمونـه کنترل می‌باشد. همان طوری که مشخص اسـت فراکسـیون F_1 خاصیت انعقادی بیشتری دارد، به طوری کـه فراکسـیون F_1 زمان انعقـاد پـایین‌تـری نسـبت بـه فراکسـیون F_2 و F_3 داشت. از طرفی دیگر ساب فراکسـیون بـه دسـت آمـده از کروماتوگرافی تعویض یونی(F_1B)، به سرعت زمـان انعقـاد را کاهش می‌دهد و لخته ایجاد می‌کند. ایـن کـاهش مـدت زمـان آزمـایش PT ، در سـاب فراکسـیون F_1B_4 حاصـل از HPLC نیز مشاهده شد.

با انجام آزمایش PT بر روی فراکسـیون‌هـای حاصـل از HPLC ، مشخص می‌شود که هر چـه پـروتئین مـورد نظـر خالص‌تر باشد، تاثیر آن در انعقاد خون شدیدتر می‌شود.

زهر مار ایرانی(Agkistrodon halys) توسط قربان‌پـور و همکـارانش مـورد بررسـی قـرار گرفـت(۲۳). توسـط ژل فیلتراسیون، زهر خام به پنج پیک تقسـیم شـد(AH_1-AH_5). همه فراکسیون‌ها برای انعقاد مورد آزمایش قـرار گرفتنـد و فراکسیون AH_1 برای انعقاد مثبت بود. خالص‌سـازی بیشـتر توسط کروماتوگرافی تبادل یونی انجام شد.

در این مرحله نیز فراکسیون AH_{14} فعالیت انعقادی نشان داد. خالص‌سازی نهایی توسط HPLC انجام شد کـه AH_{143} با وزن مولکولی kD ۳۰ ، فعالیت پروتئولیتیکی انعقاد نشان داد. این تحقیق تا حـدود زیـادی بـا کـار تحقیقـاتی انجـام گرفته و نتایج به دست آمده برای انعقـاد مطابقـت داشـت. آنزیم CA-1، فعال کننده پروترومبین است کـه از سـم مـار جعفری توسـط دیسـوک و همکـارانش جداسـازی شـد و باعث تسریع انعقاد خون گردید. عمل این آنـزیم شـبیه بـه آنزیم استخراجی ما می‌باشد(۱۳).

نتیجه‌گیری

در ایـن بررسـی زهـر مـار جعفـری بـه دلیـل وجـود فعالیت‌های انعقادی انتخاب شد و با توجـه بـه روش‌هـای کروماتوگرافی، پـروتئین‌هـای مختلـف موجـود در آن خـالص‌سـازی و جداسـازی گردیـد. در نهایـت عامـل فعال‌کننده پروترومبین، پروتئینی کـه باعـث تسـریع انعقـاد خون می‌شود، خالص‌سازی شد. عمل این پروتئین تا حدود زیادی شبیه به اکارین است، که می‌تـوان از ایـن آنـزیم در اعمال جراحی و برای آنالیز خون بیمارانی که دچار بیماری کبدی شده‌اند، استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

از کارکنان محترم مؤسسه رازی به ویژه بخش سروتراپی و جانوران سـمی کمـال تشـکر را دارم. از آقـای مهنـدس عسکری و خانم دکتر خامه چیان به خاطر راهنمایی‌هایشان سپاسگزارم.

References:

1- Gharehbaghian a, Arman L, Teimouri Naghadeh H, Vafaiyan V. [Haemostasis: Physiology, Pathology, Diagnostics]. 1st ed. Tehran: Tohfe Publication; 2004. p. 13-38; 59-68; 83-5.
2- Zare A, Teimourzadeh Sh. Venomous Snakes of Iran. Tehran: Teimourzadeh Publications; 2008. p. 74-9. [Farsi]
3- Amozgari Z. Isolation of Vipera lebatina venom fractions: survey of its enzymatic and toxic activities. Tehran: Razi Vaccine & Serum Research Institute; 1990. p. 6-28, 52-71. [Farsi]
4- Silva MB, Schattner M, Ramos CR, Junqueira-de-Azevedo IL, Guarnieri MC, Lazzari MA, *et al*. A prothrombin activator from Bothrops erythromelas (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. Biochem J 2003; 369(Pt 1): 129-39.
5- Howesa JM, Kamigutib AS, Theakstona RD, Wilkinson MC, Laing GD. Effects of three novel metalloproteinases from the venom of the West African saw-scaled viper, Echis ocellatus on blood coagulation and platelets. Biochim Biophys Acta 2005; 1724(1-2): 194-202.
6- Pradeep Kumar KM, Basheer MP. Snake bite: Biochemical changes in blood after envenomation by viper and cobra. J Med Allied Sci 2011; 1(1): 36-41.
7- Braud S, Bon C, Wisner A. Snake venom proteins acting on hemostasis. Biochimie. 2000; 82(9-10): 851-9.
8- Kini RM. The intriguing world of prothrombin activators from snake venom. Toxicon 2005; 45(8): 1133-45.
9- Samel M, Vija H, Rönnholm G, Siigur J, Kalkkinen N,

Archive of SID
www.SID.ir

Siigur E. Isolation and characterization of an apoptotic and platelet aggregation inhibiting L-amino acid oxidase from Vipera berus berus (common viper) venom. Biochim Biophys Acta 2006; 1764(4): 707-14.
10- Oyama E, Takahashi H. Purification and characterization of a thrombin like enzyme, elegaxobin II, With lys-bradykinin releasing activity from the venom of Trimeresurus elegans (Sakishima-Habu). Toxicon 2003; 41(5): 559-68.
11- Sant' Ana CD, Ticli FK, Oliveira LL, Giglio JR, Rechia CG, Fuly AL, *et al*. BjussuSP-I: a new thrombin-like enzyme isolated from Bothrops jararacussu snake venom. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 2008; 151(3): 443-54.
12- Yamada D, Sekiya F, Morita T. Isolation and characterization of carinactivase, a novel prothrombin activator in *Echis carinatus* venom with a unique catalytic mechanism. J Biol Chem 1996; 271(9): 5200-7.
13- Vilca-Quispe A, Ponce-Soto LA, Winck FV, Marangoni S. Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake Bothrops marajoensis. Toxicon 2010 ; 55(4): 745-53.
14- Rizzo F, Papasouliotis K, Crawford E, Dodkin S, Cue S. Measurement of prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT) on canine citrated plasma samples following different storage conditions. Res Vet Sci 2008; 85(1): 166-70.
15- Ghorbanpur M, Zare Mirakabadi A, Zokaee F, Zolfagarrian H. Identification and partial purification of an anticoagulant factor from the venom of the Iranian snake Agkistrodon halys. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis 2010; 16(1): 96-106.
16- Pilsczek FH, Rifkin WD, Walerstein S. Overuse of prothrombin and partial thromboplastin coagulation tests in medical inpatients. Heart Lung 2005; 34(6): 402-5.
17- Clauss A. Rapid physiological coagulation method in determination of fibrinogen. Acta Haematol 1957; 17(4): 237-46. [Article in German]
18- Koepke JA. The partial thromboplastin time in the CAP survey program. Am J Clin Pathol 1975; 63 (6 SUPPL): 990-4.
19- Grannis GF. Plasma fibrinogen: determination, normal values, physiopathologic shifts, and fluctuations. Clin Chem 1970; 16(6): 486-94.
20- Exner T, Burridge J, Power P, Rickard KA. An evaluation of currently available methods for plasma fibrinogen. Am J Clin Pathol 1979; 71(5): 521-7.
21- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193(1): 265-75.
22- Ghorbanpur M, Zare Mirakabadi A, Zokaee F, Zolfagarrian H, Rabiei H. Purification and partial characterization of a coagulant serine protease from the venom of the Iranian snake Agkistrodon halys. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis 2009; 15(3): 411-23.
23- Berger M, Pinto AF, Guimarães JA. Purification and functional characterization of bothrojaractivase, a prothrombin-activating metalloproteinase isolated from Bothrops jararaca snake venom. Toxicon 2008; 51(4): 488-501.
24- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227(5259): 680-5.
25- Joseph JS, Chung MC, Jeyaseelan K, Kini RM. Amino acid sequence of trocarin, a prothrombin activator from Tropidechis carinatus venom: its structural similarity to coagulation factor Xa. Blood 1999; 94(2): 621-31.
26- Healy JEJ. Hematologic Disordrs, Common medical diagnosis. Philadelphia: W.B. Saunders company; 1990. p. 106-7.
27- Brozovic M. Acquierd coagulation disorders. In: Bloom AL. Haemostasis and Thrombosis. London: Churchill Livingstone; 1994. p. 411-26.
28- Wallach JB. Interpretation of Diagnostic Tests: A Synopsis of Laboratory Medicine. Canada: Little Brown & Co; 1992. p. 362-8.
29- Bithell TC. Acquiered coagulation disorders. In: Lee GR. Wintrobe's clinical hematology. Philadelphia: LEA and Fibiger; 1993. p. 1473-502.
30- Chernechy CC, Berger BJ. Laboratory tests and diagnostic procedures. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 1997. p. 514-6.

Archive of SID

www.SID.ir

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2013; 10(2):173-181

Original Article

Effect of a protrombin activator isolated from Iranian *Echis carinatus* venom on hemostasis

Babaie M.[1], Zolfagharian H.[2], Salmanizadeh H.[1], Zare Mirakabadi A.[2], Alizadeh H.[1]

[1]Young Researches and Elites Club, Science and Research Branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Department of Venomous Animals and Antivenom Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

Archive of SID

Abstract

Background and Objectives

Echis carinatus venom is a complex mixture of toxins. This venom contains metalloproteinases which convert prothrombin to meizothrombin. The prothrombin activator leads to the formation of small blood clots inside the blood vessels throughout the body. To understand the effect mechanism of Iranian *Echis carinatus* venom, in this study we investigated the effect of EV on human plasma proteins (prothrombin and fibrinogen) and on blood coagulation. The aim was the purification and characterization of procoagulant factor from the Iranian *Echis Carinatus* venom and the evaluation of the procoagulant activity on human plasma.

Materials and Methods

Crude venom from the Iranian snake species E. carinatus was selected. The prothrombin activator was purified from the crude venom of *Echis carinatus* by combination of the procedures by gel filtration, ion-exchange chromatography, and reverse phase HPLC. Electrophoresis on 12.5% polyacrylamide gel was performed.

Results

The Iranian E. carinatus venom was able to coagulate human plasma very rapidly. The coagulation time was reduced from 13.4 seconds (SD= ±0.59) to 8.6 seconds (SD= ±0.64) when human plasma was treated with crude venom (concentraion of venom was 1 mg/ml).

Conclusions

The venom of Iranian *Echis carinatus* contains procoagulant factors. It seems the fraction F1B4 isolated from IEc to be like coagulation proteins which coagulate human plasma very rapidly *in vitro*.

Key words: Blood Coagulation, Prothrombin activator (*Echis carinatus venom*), Venom

Received: 10 Jan 2012
Accepted:18 Apr 2012

Correspondence: Zolfagharian H., PhD of Clinical Biochemistry. Assistant Professor of Razi Vaccine and Serum Research Institute.
P.O.Box: 31975-148, Karaj, Iran. Tel: (+98261) 4580038; Fax: (+98261) 34502859
E-mail: *h.zolfagharian@rvsri.ir*

www.SID.ir