خصوصیات بیوشیمیایی زهرخام گرزه مار ایرانی Macrovipera lebetina

فرشاد صمیمی مطلق[۱]، کامران پوشنگ باقری[۲]، حنانه زرین نهاد[۳]، مهدی بهدانی[۴]، علی مرادی[۵]، دلاور شهباززاده[۶*]

۱.کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی ، پردیس بین الملل، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول های درمانی، انستیتو پاستور، تهران
۲. دکترای تخصصی باکتری شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول های درمانی، انستیتو پاستور، تهران
۳. کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول های درمانی، انستیتو پاستور، تهران
۴. دکترای تخصصی بیوتکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول های درمانی، انستیتو پاستور، تهران
۵. دکترای تخصصی بیوشیمی پایه، گروه بیوشیمی ، پردیس بین الملل، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد
۶. دکترای تخصصی بیوشیمی پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول های درمانی، انستیتو پاستور، تهران

* نشانی برای مکاتبه: مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول های درمانی، انستیتو پاستور، تهران، ایران.
تلفکس: ۶۶۴۸۰۷۸۰ ، کدپستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱ ، shahbazzadeh@pasteur.ac.ir

دریافت مقاله: فروردین نود و سه پذیرش برای چاپ: خرداد نود و سه

چکیده

سابقه و هدف: *افعی گرزه مار جز خانواده ویپریده بوده و یکی از سمی ترین مارهای فلات ایران می باشد. زهر این افعی سبب عوارض کشنده سیستمیک می شود. تقریبا تمامی عمل کرد زهر مارهای خانواده افعی در نتیجه ترکیب عملکرد پروتئین های متعددی اعم از پروتئین های دارای خاصیت آنزیمی و یا غیر آنزیمی می باشد. هدف از این مطالعه تعیین الگوی پروتئینی و بررسی خواص بیوشیمیایی زهر خام گرزه مارایرانی بود.*

روش کار: *بعد از نمونه برداری از مارهای منطقه خراسان زهر گیری انجام شد و پس از آماده سازی زهر تعیین غلظت به روش برادفورد انجام گردید. سپس الگوی پروتئینی با الکتروفورز پروتئین به روش SDS-PAGE تعیین شد. برای تعیین خواص بیوشیمیایی زهر تست های LD50 ، فعالیت همولیتیک، فعالیت پروتئازی، فعالیت فسفولیپازی، فعالیت درمونکروتیک و تست های انعقادی مسیر خارجی (PT) و مسیر داخلی (PTT) انعقاد خون انجام شد.*

یافته ها: *طیف وزن مولکولی پروتئین های مشاهده شده در الکتروفورز از رنج ۱۱تا ۱۳۵ کیلودالتون بر روی ژل SDS برآورد گردید. LD50زهر برابر با ۴۷µg/mouse برآورد گردید. ۵۰ درصد فعالیت همولیتیک (HD50) در مقدار ۱۴۲/۸۵ میکروگرم از زهر مشاهده شد. مقادیر مختلف زهر از ۳۱/۲۵ الی۵۰۰ میکروگرم فعالیت پروتئولیتیک و ۳۱/۲۵ الی ۰/۲۴ میکروگرم فعالیت فسفولیپازی از خود نشان داد. حداقل فعالیت درمونکروتیک در دوز ۱۰ میکروگرم از زهر مشاهده و ثبت گردید. کم ترین مقداری از زهر که در تست PT و PTT باعث انعقاد پلاسما در کم ترین زمان ثبت شده گردید برای هر دو تست ۱۵/۶۲۵ میکروگرم بود .*

نتیجه گیری: *در این تحقیق فعالیت های همولیتیک، فسفولیپاز، پروتئولیتیک، درمونکروتیک، انعقادی در زهر گرزه مار ایرانی مشاهده گردید و میزان فعالیت بر اساس مقدارسنجی بدست آمد. این تحقیق نشان می دهد که اثر سمی زهر گرزه مار بیشتر مربوط به خواص آنزیمی زهر می باشد. این تحقیق با جداسازی و خالص سازی پروتئین های آنزیمی زهر گرزه مار و شناسایی فراکشن های مربوطه تکمیل خواهد شد.*

واژگان کلیدی: *زهر، گرزه مار، خصوصیات بیوشیمیایی*

مقدمه

مارهای زهری عموما در مناطق گرم و خشک از قبیل خاورمیانه و کشورهایی مانند ایران پراکنده هستند(۱). توزیع جغرافیایی این مار ها در سطح کشور نشان می دهد موارد گزش بیش تر مربوط به گروه افعی‌ها شامل مار شاخ دار، مار جعفری و گرزه مار می باشد(۲). افعی گرزه مار متعلق به خانواده ویپریده بوده و در شمال آفریقا و منطقه خاورمیانه از جمله ایران تا قسمت کشمیر پراکندگی جغرافیایی دارد(۳). گرزه مار ایرانی یکی از سمی ترین مارهای فلات ایران و فراوان ترین گونه های مار در ایران بوده(۴) و گزیدگی ناشی از گزش این مار با عوارض متنوعی از قبیل نکروز پوست و عضله در محل گزش، ادم، اختلالات انعقادی، خون ریزی خود به خودی هم راه می باشد(۵،۶). زهر مارهای خانواده ویپریده موجب تغییرات اساسی در سیستم گردش خون شده و اثرات کشنده سیستمیک ایجاد می نمایند(۷). یکی از مشخصات بارز گزیدگی با مارهای خانواده ویپریده خون ریزی می باشد که از جمله علل اصلی آن تأثیر پروتئازهایی با منشا متالوآنزیم بر جدار عروق می باشد(۸). عوارض مختلف زیادی شامل عوارض میوتوکسیک، همولیتیک، ادم و ضد انعقادی به ایزوفرم های مختلف آنزیم فسفولیپاز A2 زهر خانواده افعی نسبت داده شده است(۹). تفاوت بسیاری بین محتویات زهر مارها در گونه های مختلف و در گونه های یک سان در مناطق مختلف جغرافیایی وجود داشته و بین تنوعات جغرافیایی و عوارض بالینی ناشی از مارگزیدگی ارتباطاتی وجود دارد(۱۰). با وجود این که این افعی یکی از فراوان ترین گونه های مار در ایران می باشد اما تاکنون بررسی خواص بیوشیمیایی آن به صورت کامل انجام نشده است. از آن جایی که شناخت الگوی پروتئینی و خواص بیوشیمیایی زهر خام می تواند یک ابزار کمک کننده برای شناخت کامل از خواص بیوشیمیایی زهر باشد تحقیق در مورد این فاکتورها ضروری به نظر می رسد.

روش کار

مواد مصرفی از نوع Analytical grade بوده و شامل مارکر پروتئینی (Gene ON-Germany) ، کازئین (Sigma) ، لسیتین (Sigma) ، آلبومین سرم گاوی (Sigma) ، کوماسی بریلیانت بلو-G (Merck) 250، تراپتون X-100 (Merck)، محلول ترومبوپلاستین جهت تست PTو پودر لیوفیلیزه aPTT (Fisher) بود. تمام آزمایشات به صورت Duplicateانجام گردید.

افعی گرزه (Macrovipera lebetina) در فصل بهار از استان خراسان رضوی منطقه کلات نادر جمع آوری شد و به انستیتو پاستورایران منتقل گردی. نشانه های این افعی مطابق با نشانه های ذکر شده در منابع مارشناختی ایران بود(۶). پس از طی مدت یک الی دو ماه زهر این افعی در سرپنتاریوم انستیتو پاستور سم گیری شد و به صورت لیوفیلیزه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داری گردید. زهر با آب مقطر هموژن شد و با سانتریوفوژ در دور RPM ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه استخراج گردید.

تعیین غلظت پروتئین زهر به روش برادفورد انجام گردید(۱۱). محلول برادفورد با استفاده از رنگ کوماسی بلو G-250 تهیه و از پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA) به عنوان استاندارد برای تهیه منحنی استاندارد استفاده شد. جذب نوری نمونه ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه Spectrophotometr CT-5000 قرائت شد. سپس با استفاده از منحنی استاندارد زهر تعیین غلظت گردید.

الکتروفورز پروتئین زهر خام (SDS-PAGE) به روش لاملی و هم کاران انجام شد(۱۲). از آکریل آمید ۱۲ درصد جهت انجام آزمایش استفاده گردید. بعد از انجام الکتروفورز به مدت ۴ ساعت، نمونه ها به مدت ۳ ساعت بوسیله محلول رنگ آمیزی (کوماسی بریلیانت بلو R-250 رنگ آمیزی شدند. نتیجه آزمایش با سیستم مستند سازی ژل (Gel Documentation, BioRad - USA) عکس برداری و ثبت گردید.

تعیین میزان کشندگی ۵۰ درصد زهر خام به روش Spearman-Karber انجام شد(۱۳). موش ها به شش گروه تقسیم شدند. هر گروه شامل چهار موش بود. مقادیر مختلف از زهر با ضریب غلظت ۱/۲۵ شامل ۸۸، ۷۰، ۵۶، ۴۵ و۳۶ میکروگرم به همراه آب مقطر و ۰/۰۱ BSA به صورت داخل صفاقی به میزان ۲۰۰ میکرو لیتر به موش ماده نژاد ۶ Swissتا ۸ هفته با وزن ۲۵-۲۰(±۵) گرم تزریق شد و بعد از ۲۴ ساعت مرده یا زنده بودن موشها بررسی گردید. در گروه کنترل از آب مقطر و ۰/۰۱ BSA استفاده شد. جهت ثبت نتایج نیز از فرمول Spearman-Karberاستفاده گردید.

تست همولیتیک زهر خام بر اساس پروتکل شهباززاده و هم کاران انجام شد(۱۴). خون کامل تازه با ضد انعقاد هپارین از داوطلب سالم تهیه گردید. پلاسما و بافی کوت بوسیله سانتریوفوژ با دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط جدا شدند و گلبول های قرمز ۳ بار با نرمال سالین (pH=7/4) شسته شدند. جهت تهیه سوسپانسیون ۲ درصد گلبول های قرمز، این گلبول ها با نرمال سالین رقیق شدند. برای ایجاد مقادیر۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲۵، ۷/۸۱۲۵ و ۳/۹۰۶۲۵ میکروگرم، زهر به صورت سریالی در میکروپلیت ۹۶ خانه با نرمال سالین رقیق شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر گلبول های قرمز ۲ درصد به هر چاهک اضافه گردید. بعد از انکوباسیون به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰ rpm سانتریوفوژ شدند و جذب مایع روئی در ۵۴۰ نانومتر قرائت شد. جهت کنترل منفی از نرمال سالین و از تراپتونX-100 در نمونه های کنترل مثبت استفاده گردید. درصد همولیز با فرمول زیر محاسبه شد .

× (جذب نوری کنترل منفی− جذب نوری کنترل مثبت) / (جذب نوری کنترل منفی- جذب نوری نمونه)= درصد همولیز ۱۰۰

تعیین فعالیت فسفولیپازی زهر خام به روش رنگ سنجی انجام شد(۱۵). جهت ساختن محلول تست فسفولیپاز از لسیتین، فنل رد، تراپتون X-100، CaCl2، NaCl و آب طبق رفرانس استفاده گردید. بعد از ساختن محلول، با استفاده از سود ۲ میلی مولار رنگ محلول به رنگ قرمز مایل به نارنجی تبدیل شد. جهت انجام آزمایش مقادیر سریالی از زهر شامل ۳۱/۲۵، ۷/۸۱،۱۵/۶۲، ۳/۹۰، ۱/۹۵ ، ۰/۹۷ ، ۰/۴۸ ، ۰/۲۴ ، و ۰/۱۲ میکروگرم تهیه گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا به هر چاهک اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵دقیقه انکوباسیون انجام شد. از اسید کلریدریک یک نرمال به عنوان کنترل صحت واکنش مثبت اسیدی و از سود یک نرمال به عنوان کنترل صحت واکنش قلیایی و نرمال سالین به عنوان کنترل منفی استفاده شد. برای تعیین شدت فعالیت فسفولیپازی دانسیته اپتیک در طول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت گردید.

فعالیت پروتئازی زهر خام بر طبق روش شهباززاده و هم کاران انجام شد(۱۶). یک میلی لیتر از کازئین ۰/۵ درصد با ۴۰۰ میکرولیتر از محلول تست شامل مقادیر ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲۵، ۷/۸۱۲۵ و ۳/۹۰۶۲۵ میکروگرم از زهر در حضور کلسیم کلراید ۰/۰۰۸ مولار در pH=7/5 به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. بعد از انجام انکوباسیون ۵۰ میکرولیتر تری کلرواستیک اسید ۵ درصد برای متوقف کردن واکنش به محلول ها اضافه شد. پپتیدهای هیدرولیز شده موجود در مایع روئی بوسیله روش برادفورد در طول موج ۵۹۵ نانومتر تعیین غلظت شدند.

توانایی ایجاد نکروز ناشی از زهر خام در خرگوش نیوزلندی به روش شهباززاده و هم کاران مطالعه شد(۱۷). مقادیر مختلف از زهر گرزه مار شامل ۳۲۰، ۱۶۰، ۸۰، ۴۰، ۲۰، و ۱۰ میکروگرم، به میزان ۱۰۰میکرولیتر به صورت داخل جلدی (Intra Dermal)به خرگوش نیوزلندی تزریق شد. فواصل بین تزریق ۵ سانتی متر بود. پس از ۲۴ ساعت از تزریق زهر، میزان نکروز با کولیس اندازه گیری شد. در این تست از نرمال سالین به عنوان شاهد استفاده شد.

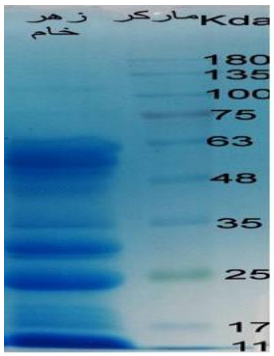
اثر زهر بر راه خارجی و داخلی آبشار انعقادی به ترتیب با تست های PT و PTTارزیابی شد(۱۸).

برای ارزیابی زمان پروترومبین از پلاسمای سیتراته انسان نرمال استفاده شد. مقادیر مختلف تهیه شده از زهر شامل ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۷/۸۱۲۵،۱۵/۶۲۵ و۳/۹۰۶۲۵ میکروگرم، به ۲۰۰ میکرولیتر از محلول ترومبوپلاستین اضافه شد. انکوباسیون به مدت ۵ دقیقه در۳۷ درجه سانتی گراد با استفاده از بن ماری انجام شد. سپس ۱۰۰میکرولیتر پلاسمای سیتراته به لوله ها اضافه شده و هم زمان کورنومتر روشن گردید و به محض دیدن لخته زمان ثبت شد. زمان کنترل نرمال برای این آزمایش ۱۱تا ۱۳ ثانیه بود .

برای ارزیابی زمان ترومبوپلاستین جزئی مقادیر مختلف تهیه شده از زهر شامل ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲۵، ۷/۸۱۲۵ و۳/۹۰۶۲۵ میکروگرم به ۱۰۰ میکرولیتر محلول aPTT اضافه شد. انکوباسیون به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد با استفاده از بن ماری انجام گردید. بعد از انجام انکوباسیون ۱۰۰میکرولیتر پلاسمای سیتراته به داخل لوله ها اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر ۰/۱ Cacl2 مولار که از قبل به دمای ۳۷ درجه سانتی گراد رسیده بود، هم زمان با زدن کرنومتر، به لوله ها اضافه گردید. پس از مشاهده لخته در پلاسما، زمان انعقاد ثبت گردید.

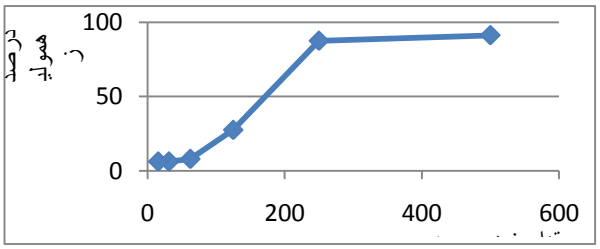
یافته ها

چهارده باند پروتئینی بعد از الکتروفورز مشاهده گردید. طیف وزن مولکولی مشاهده شده از گستره ۱۱تا ۱۳۵ کیلودالتون بر روی ژل SDS برآورد گردید(شکل ۱).



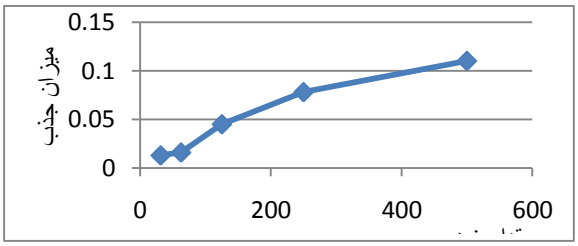
شکل ۱. الگوی پروتئینی زهر خام گرزه مار ایرانی به روش SDS-PAGE با ژل پلی آکریل آمید ۱۲درصد. نمونه ها از چپ به راست: ۱. زهر خام گرزه مار ایرانی ۲. مارکر پروتئینی

میزان کشندگی ۵۰ درصد زهر خام گرزه مار ۴۷µg/mouse بدست آمد. ۵۰۰ میکرو گرم از زهر خام سبب ایجاد ۹۱/۲۵ درصد همولیز بر روی گلبول های قرمز ۲ درصد شسته شده انسان نرمال گردید. مقداری از زهر که سبب ۵۰ درصد همولیز گردیده بود به عنوان HD50 در نظر گرفته شده و معادل با ۱۴۲/۸۵ میکروگرم محاسبه گردید(نمودار ۱).



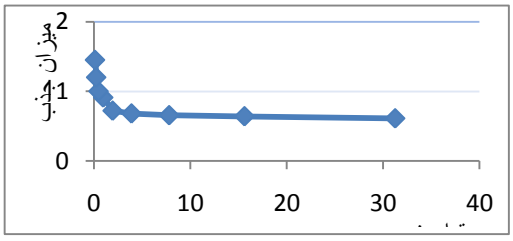
نمودار۱. فعالیت همولیتیک زهر خام گرزه مار ایرانی بر روی گلبول های قرمز۲ درصد شسته شده انسان.

زهر گرزه مار دارای فعالیت پروتئولیتیک در کازئین ۰/۵ درصد بود. معیار مشاهده فعالیت، تغییر میزان جذب (OD) بود. با کم شدن میزان زهر خام، جذب نوری از ۰/۱۱ به ۰/۰۱۳ کاهش یافت. فعالیت پروتئولیتیک از مقدار ۵۰۰ الی ۳۱/۲۵ میکروگرم از زهر خام مشاهده شد. معیار مشاهده فعالیت تغییر میزان جذب (OD) نسبت به OD اولیه (OD کازئین) بود(نمودار ۲).



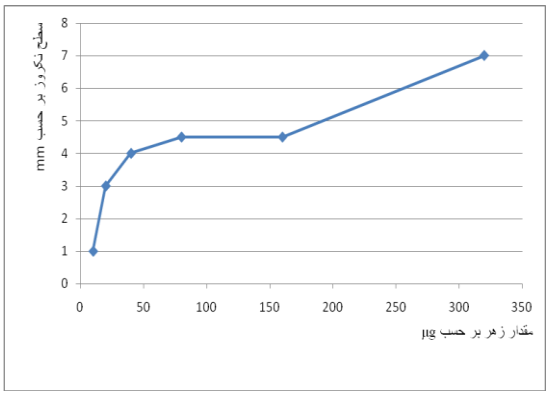
نمودار۲. فعالیت پروتئولیتیک زهر خام گرزه مار ایرانی بر کازئین ۰/۵ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد.

زهر خام گرزه مار ایرانی دارای فعالیت فسفولیپازی بر روی لسیتین بود. فعالیت فسفولیپازی از مقدار ۳۱/۲۵ الی ۰/۲۴ میکروگرم از زهر خام مشاهده شد. کم ترین میزانی از زهر که دارای فعالیت فسفولیپازی A2 بود ۰/۲۴ میکروگرم بود(نمودار ۳).



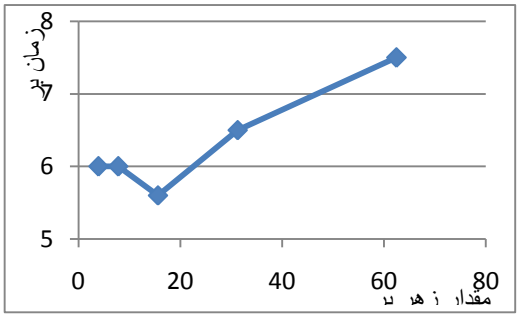
نمودار۳. فعالیت فسفولیپازی زهر خام گرزه مار ایرانی.

اثر نکروتیک وابسته به دوز ناشی از زهر خام در پوست خرگوش مشاهده شد. میزان نکروز در زمان ۴۸ ساعت بعد از تزریق در مقایسه با نمونه شاهد مشاهده گردید و با کولیس اندازه گیری شد. در نمونه شاهد هیچ گونه نکروز و التهابی مشاهده نشد. کم ترین مقدار از زهر خام که سبب ایجاد نکروز گردید، ۱۰ میکروگرم بود که توانست یک میلی متر نکروز در پوست خرگوش ایجاد کند(نمودار ۴) .



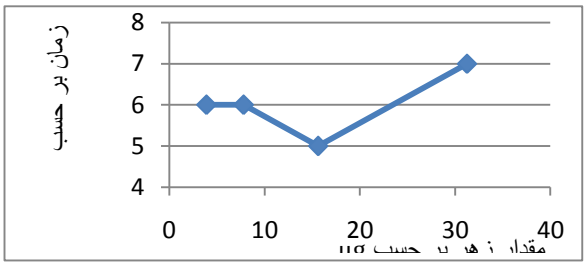
نمودار۴. اثر درمونکروتیک زهر خام گرزه مار ایرانی به صورت وابسته به دوز در مدت ۴۸ ساعت در پوست خرگوش.

با توجه به زمان انعقاد پلاسمای نرمال (فاقد زهر) مشخص گردید که زهر خام گرزه مار در مقادیر پایین سریعا سبب لخته شدن پلاسما می شود. زهر خام گرزه مار ایرانی در مقدار ۱۵/۶۲۵ میکروگرم توانست زمان انعقاد پلاسما را در مقایسه با زمان نرمال (۱۳-۱۱) به ۵/۶ ثانیه کاهش دهد که نشان دهنده فعالیت شدید انعقادی این زهر در دوز های پایین می باشد. در دوز های بالاتر فعالیت انعقادی مشاهده نشد(نمودار۵).



نمودار۵. فعالیت انعقادی زهر خام گرزه مار ایرانی بر فاکتورهای آبشار خارجی انعقاد.

با توجه به زمان انعقاد پلاسمای نرمال (فاقد زهر) مشخص گردید که زهر خام گرزه مار در مقادیر پایین سریعا سبب لخته شدن پلاسما می شود. کمترین مقدار از زهر که توانست زمان انعقاد خون را به پایین ترین میزان (۵ ثانیه) کاهش دهد ۱۵/۶۲۵ میکروگرم بود(نمودار۶).



نمودار۶. فعالیت انعقادی زهر خام گرزه مار ایرانی بر فاکتورهای آبشار داخلی انعقاد.

بحث

مارگزیدگی می تواند سبب عوارض موضعی و سیستمیک و یا منجر به مرگ افراد شود(۱۹). زهر مارها ترکیب پیچیده ای از پروتئین ها و پلی پپتیدهای فعال فارماکولوژیک بوده(۲۰) و اکثر پروتئین‌های موجود در زهر مارهای خانواده افعی دارای خواص آنزیمی می باشند(۲۱). در حال حاضر درمان روتین مارگزیدگی با استفاده از پادزهر بوده که می تواند همراه با عوارض خفیف تا شدید باشد(۷). اما شناخت خصوصیات بیوشیمیایی زهر می تواند راه گشای ایده های جدید درمان مارگزیدگی باشد. با شناخت مولکول های آنزیمی موجود در زهر بستری برای تولید مهارکننده های آنزیمی فراهم می گردد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد زهر خام گرزه مار ایرانی ۱۴باند پروتئینی از طیف وزن مولکولی ۱۱تا ۱۳۵ کیلودالتون را بر روی ژل SDS نشان می دهد در حالی که در مطالعه Tonismagi و هم کاران بر روی وایپرا لبتینای آسیای مرکزی ۱۸باند پروتئینی از طیف وزن مولکولی ۵ تا ۱۰۰ کیلودالتون بر روی ژل SDS مشاهده شده بود(۲۲). این اختلاف می تواند به دلیل نحوه تکامل مارها در مناطق جغرافیایی مختلف باشد(۱۰).

زهر خام در مقدار ۴۷µg/mouse بر روی موش Siwss اثر کشندگی ۵۰ درصد داشت در حالی که در مطالعه Nalbantsoy و هم کاران بر روی موش Swissوایپرا لبتینا لبتینا قبرس در۵۸/۷ mg/kg میزان کشندگی ۵۰ درصد از خود نشان داد(۲۳). این نشان دهنده میزان کشندگی بالاتر افعی لبتینای ایرانی بود.

مقدار ۵۰۰ میکرو گرم زهر خام ۹۱/۲۵ درصد فعالیت همولیتیک از خود نشان داد. مقداری از زهر که سبب همولیز۵۰ درصد گردید (HD50) ۱۴۲/۸۵ میکروگرم برآورد شد. در مطالعه stripja و هم کاران مشاهده شد که مقدار ۴۰۰ میکرو گرم از زهر وایپرا لبتینا سبب بیش ترین میزان شکنندگی در گلبول های قرمز شده و سبب تغییر مورفولوژی اریتروسیت ها می شود(۲۴). Gocmen و هم کاران اثر همولیتیک زهر وایپرا لبتینا منطقه قبرس را بر روی گلبول های قرمز انسان گزارش کردند. این مقایسه نشان می دهد که زهر گرزه مار منطقه ترکیه فاقد اثر همولیتیک بوده است در حالی که گونه ایرانی و قبرسی دارای خواص همولیتیک بودند.

فعالیت پروتئولیتیک از مقدار ۳۱/۲۵ الی۵۰۰ میکروگرم از زهر خام مشاهده شد. در مطالعه ای Tonismagi و هم کاران بر روی وایپرا لبتینا آسیای مرکزی وجود مقادیر زیادی آنزیم های پروتئاز در زهر این افعی گزارش گردید(۲۲). این نتیجه تایید کننده وجود فعالیت پروتئولیتیک در زهر وایپرا لبتینا می باشد. نتایج این مطالعه تحقیق Tonismagi و هم کاران را تأیید می کند.

کم ترین مقداری از زهر که در آن فعالیت فسفولیپازی A2 مشاهده گردید ۰/۲۴ میکروگرم بود. Ownby و هم کاران وجود گروه II فسفولیپازهای A2 را در زهر مارهای خانواده افعی گزارش کردند(۲۵). در مطالعه ای که توسط Bozkurtو هم کاران انجام شده بود نشان داند زهر مارهای خانواده ویپریده حاوی مقادیر زیادی آنزیم فسفولیپاز A2 بوده که بسیار توکسیک می باشد(۲۶). در این مطالعه نیز فعالیت فسفولیپاز A2 در زهر خام مشاهده گردید که با نتایج Bozkurt تطابق دارد.

زهر خام سبب ایجاد نکروز و التهاب بر روی پوست خرگوش گردید Gutler .و هم کاران اثرات نکروتیک زهر وایپرا لبتینا را به آنزیم فسفولیپاز A2 نسبت دادند(۲۷). Gocmen و هم کاران نشان دادند توکسین زهر مارها می تواند سبب ادم، انقباض عروق و نکروز بافتی به دلیل تخریب سلولی مستقیم و آسیب عروقی اطراف محل گزش شود(۲۸). این نتایج نشان دهنده وجود اثر نکروتیک زهر وایپرا لبتینای ایرانی می باشد و از لحاظ این خصوصیت مشابه سایر گرزه مار ها می باشد.

وجود عامل انعقادی در زهر خام مشاهده شد. کم ترین میزان ثبت شده زمان انعقاد در تست PT ۵/۶ و در تست PTT ۵ ثانیه بود که در دوزهای پایین رخ داد. در هر دو تست غلظت های بالا مانع انعقاد پلاسما گردید. در هر دو راه داخلی و خارجی مقدار ۱۵/۶۲۵ میکروگرم سبب انعقاد سریع خون شد، اما اثر آن بر راه داخلی سریع تر بود. با توجه به نتایج بدست آمده زهر خام گرزه مار ایرانی در هر دو مسیر داخلی و خارجی انعقاد خون تاثیر گذاشت. اما اثر زهر خام در مسیر داخلی (PTT) قوی تر بود. یعنی در زمان کم تری باعث انعقاد شد. بدین ترتیب وجود عامل انعقادی در زهر گرزه مار مشاهده گردید.

در مطالعه ای که Fox و هم کاران در سال ۲۰۰۵ انجام دادند، مشخص شد که زهرهایی که بوسیله مارهای خانواده ویپریده تولید می شوند حاوی پروتئین هایی هستند که باعث اختلال در آبشارهای انعقادی گردیده و فرد مارگزیده معمولا با علایم اختلالات انعقادی، نکروز موضعی بافت ها و کاهش فیبرینوژن در خون هم راه است(۲۹). Shoorijeh و هم کاران در سال ۱۳۸۸در مطالعه ای که زهر افعی گرزه مار به صورت عضلانی به سگ تزریق شده بود نشان دادند که زهر این مار علاوه بر ایجاد نشانه های بالینی بیش تر اثرات موضعی نشان داده و تاثیرات آن بر روی خون بیشتر به صورت ایجاد اختلال در سیستم انعقادی وایجاد همولیز در دوزهای بالا می باشد و تزریق سم با دوز بالا می تواند با مرگ و میر هم راه باشد. هم چنین نشان دادند فاکتور ضد انعقاد موجود در زهر وایپرا لبتینا در دوزهای بالا اثر خود را نشان می دهد(۳۰). Gocmen و هم کاران نشان دادند که زهر مارها احتمالا نشان دهنده هر دو فعالیت آنتی کواگولانت و پروکواگولانت بوده که منجر به ترومبوز هم زمان با اختلالات خونریزی و انعقاد درون عروقی منتشر می شوند(۲۸).

اما به نظر محققین این پروژه فاکتور ضد انعقادی در زهر خام وجود نداشته و دلیل عدم مشاهده انعقاد در دوز های بالا، عدم بالانس تعداد مولکول های عامل انعقادی با پروتئین های مسیر انعقادی باشد. شاهد این موضوع می تواند پدیده Prozone در تست ELIZA و یا در بیماری حصبه و تب مالت باشد. در این موارد به دلیل تعداد زیاد مولکول های آنتی بادی در خون تشخیص بیماری ممکن نبوده و باید سرم بیمار رقیق شده تا آزمایش مثبت گردد. در نتیجه اثر ضد انعقادی می تواند مربوط به تعداد بالای فاکتورهای انعقادی باشد.

در این تحقیق فعالیت های همولیتیک، پروتئولیتیک، فسفولیپاز، درمونکروتیک و انعقادی در زهر گرزه مار ایرانی مشاهده گردید و میزان فعالیت بر اساس مقدارسنجی بدست آمد. دیدگاه این تحقیق شناسایی خواص بیوشیمیایی زهر گرزه مار بوده و در آینده می توان با توجه به شناسایی بیشتر خواص آنزیمی فراکشن های خالص، داروهای مهارکننده آنزیمی را جهت درمان مارگزیدگی پیشنهاد کرد.

نتیجه گیری

این تحقیق نشان می دهد که اثر سمی زهر گرزه مار بیش تر مربوط به خواص آنزیمی زهر می باشد. این تحقیق با جداسازی و خالص سازی پروتئین های آنزیمی زهر گرزه مار و شناسایی فراکشن های مربوطه تکمیل خواهد شد.

تشکر و قدردانی

این مقاله با حمایت انیستیتو پاستور ایران و دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد شعبه بین الملل انجام گردید.

REFERENCES

1. Ismail M, Memish ZA. Venomous snakes of Saudi Arabia and the Middle East: a keynote for travellers. Int J Antimicrob Agents 2003; 21(2): 164-69.

2. Gene JA, Roy A, Rojas G, Gutierrez J, Cerdas L. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. Toxicon 1989; 27(8): 841-48.

3. Johnson CA. Management of snakebite. Am Fam Physician 1991; 44(1): 174-80.

4. Fatehi -Hassanabad Z, Fatehi M. Characterisation of some pharmacological effects of the venom from Vipera lebetina. Toxicon 2004;43:385-91

5. Maity G, Mandal S, Chatterjee A, Bhattacharya D. Purification and characterization of a low molecular weight multifunctional cytotoxic phospholipase A2 from Russell's viper venom. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2006; 845(2):232-43

6. Latifi M. Iranians venom . Tehran . Department of Environmental publications; 1985.

7. DU XY, Sim DS, Lee WH, Zhang Y. Blood cells as Targets of snake Toxins. Blood cells, molecules and diseases 2006; 36(3): 414-21.

8. Reid HA. Symptomatology, pathology, and treatment of land snake bite in India and Southeast Asia. In: Bucherl W, Buckley E, Deulofeu V, et al, editors. Venomous Animals and Their Venoms. 1st ed. New York: Academic Press; 1968. p. 611-642.

9. Nevalainen TJ, Peuravuori HJ, Quinn RJ, Liewellyn LE, Benzie JA, Fenner PJ, et al. phosholipase A2 in Cnidaria. CBP 2004; 139(4):731-35.

10. Marsh N, Williams V. Practical applications of snake venom toxin in haemostasis. Toxicon 2005;45(8):1171-81.

11. Bradford M M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72(1-2):248-54.

12. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 277: 680-85.

13. Salmanizadeh H, Babaie M, Zolfagharian H. In vivo evaluation of homeostatic effects of Echis carinatus snake venom in Iran. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis 2013; 19:3.

14. Shahbazzadeh D, Abdollahi T, Pooshang Bagheri K, Hosseini-Nejad Chafi M, Sasani F, Torkashvand F, Khalili G, Vaziri B. "Purification of Haemolytic/Necrotic Protein from the Venom of Deathful Hemiscorpius Lepturus Scorpion in Khuzestan Province". Iranian Journal of Infectious Diseases 2012; 55: 31-37 [in persian]

15. Ghafari S M, Jamili Sh, Pooshang Bagheri K, Mirabzadeh Ardakani E, Fatemi M R, Shahbazzadeh F, et al. The first report on some toxic effects of green scat Scatophagus argus an Iranian Persian Gulf venomous fish. Toxicon 2013; 66:82-87.

16.Araujo A L, Radvanyi F. Determination of phospholipase A2 activity by a colorimetric assay using a pH indicator. Toxicon 1987; 25(11):1181-88.

17. Borchani L, Sassi A, Shahbazzadeh D, Strub J M, Tounsi-Guetteti H, Boubaker M S, et al. Heminecrolysin, the first hemolytic dermonecrotic toxin purified from scorpion venom. Toxicon 2011;7(58):130-39.

18. Theakston R D G, Reid H A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venom. Bull World Health Organ 1983;61:949-56.

19. Mehdizadeh Kashani T, Vatanpour H , Zolfagharian H, Hooshdar Tehrani H, Hossein Heydari M, Kobarfard F. Partial Fractionation of Venoms from Two Iranian Vipers, Echis carinatus and Cerastes persicus Fieldi and Evaluation of Their Antiplatelet Activity. Iranian J of Pharmaceutical Research 2012; 11 (4): 1183-89.

20. Juckett G, Hancox J G. Venomous snakebites in the United States: management review and update. Am Fam Phys 2002;65(7):1367-74.

21. Kochva E. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. Toxicon 1987; 25:65-106.

22. Tonismagi K, Samela M, Trummala K, Ronnholm G, Siigura J,Kalkkinen N. L-Amino acid oxidase from Vipera lebetina venom: Isolation, characterization, effects on platelets and bacteria. Toxicon 2006;48: 227-37.

23. Nalbantsoy A, Karabay-Yavasoglu N U, Sayım F, Deliloglu-Gurhan I, Gocmen B, Arıkan H, et al. Determination of in vivo toxicity and in vitro cytotoxicity of venom
from the Cypriot blunt-nosed viper Macrovipera lebetina lebetina and antivenom production. J of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases 2012;18(2):208-16.

24. Sitprija V, Kasantikul V, Maneesri S, Tejachokviwat M, Napathorn S. Effects of Russell's viper venom on human erythrocytes in vitro. J Nat Toxins 1998; 7(1):73-85.

25. Ownby C L. Structure, function and biophysical aspects of the myotoxins from snake venoms. Toxicol. Toxin Rev1998;17: 213-38.

26. Bozkurt M, Kulahci Y, Zor F, Kapi E. The Management of Pit Viper Envenomation of the Hand. American Association for Hand Surgery 2008; 3:324-31.

27. Gutlerrez J M, Rajas G, lomouk B, Gene J A, Cerdas L. Effect of myotoxic phospholipase A2 isolated from Bothrops asper venom on eskletal muscle,
sarcoplasmic reticulum. Toxicon 1987; 25(11): 1244- 48.

28. Gocmen B, Arikan H, Ozbel Y, Mermer A, Cicek K. Clinical, physiological and serological observations of a human following a venomous bite by Macrovipera lebetina lebetina (Reptilia: Serpentes). Acta Parasitol Turcica 2006; 30(2): 158-62.

29. Fox J W, Serrano S M. Snake toxins and hemostasis. Toxicon 2005;45(8): 951-1181.

30. Jafari Shoorijeh S, Taghi pour A N. clinical symptoms and change in blood parameters following the intramascular injection of snake venom vipera lebetina to dog. phisiology and pharmacology 2006; 9(2). [in persian]