

# خون

فصلنامه پژوهشی

دوره ۱۰ شماره ۲ تابستان ۹۲ (۱۴۱-۱۷۳)

مقاله پژوهشی

## اثر آنزیم فعال کننده پروتومبین جدا شده از سم مار جعفری ایرانی بر روی هموستاز خون

مهدي بابايجي<sup>۱</sup>، حسين ذوالفقاريان<sup>۱</sup>، حسين سلماني زاده<sup>۱</sup>، عباس زارع ميرك آبادي<sup>۲</sup>، حافظه عليزاده<sup>۱</sup>

### چکیده سابقه و هدف

زهر مار جعفری (*Echis carinatus*) مخلوط پیچیده‌ای از مواد سمی است. این زهر شامل متالوپروتئازهایی است، که فعال کننده قوی پروتومبین 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 (پروتومبین 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. فعال کننده پروتومبین 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  $1 \text{ mg/mL}$ ، لخته در  $8/6 \pm 0/64$  ثانیه در مقایسه با پلاسمای شاهد ( $0/59 \pm 0/43$  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، فعال کننده پروتومبین (سم مار جعفری)، سم

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۲۰

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱/۳۰

۱- کارشناس ارشد بیوشیمی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات - باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان - تهران - ایران

۲- مؤلف مسؤول: PhD بیوشیمی بالینی - استادیار مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی - کرج - ایران - صندوق پستی: ۳۱۹۷۵-۱۴۸

۳- PhD بیوشیمی - مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی - بخش جانوران سمی - کرج - ایران

۴۷۶

آنالیز خون بیمارانی که دچار بیماری کبدی شده‌اند، مورد استفاده قرار می‌گیرند. ارزش این آنریم در این است که برخلاف فاکتور Xa می‌تواند مستقلًا بدون نیاز به هیچ کوفاکتوری حتی بدون نیاز به فاکتور V بر روی پروتروموبین کربوکسیله شده و یا کربوکسیله نشده عمل نماید. بنابراین حتی اگر در فاکتور V اختلالی وجود داشته باشد، می‌توان با این آنریم میزان موجودی پروتروموبین را در خون بیماران اندازه‌گیری نمود. این فعال‌کننده‌ها به ۴ گروه بر مبنای نیازمندی و احتیاج به کوفاکتورهایشان طبقه‌بندی شده‌اند. فعال‌کننده‌های پروتروموبین گروه A و B متالوپروتئیناز هستند، در حالی که فعال‌کننده‌های پروتروموبین گروه C و D سرین پروتئیناز می‌باشند. فعال‌کننده‌های پروتروموبین 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(۸-۱۴).

امروزه روش‌های مختلفی برای تشخیص و جداسازی آنریم‌های سم مار به کار گرفته می‌شود که از جمله معمول‌ترین و پرکاربردترین آنها روش کروماتوگرافی و الکتروفورز است(۹-۱۴). این بررسی امکان تشریح و توصیف یک سری جزییات پیرامون اطلاعات موجود درباره فعال‌کننده‌های پروتروموبین 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 ۲۰-۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. سفادکس G-75، DEAE-Sephadex، 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

سم مار جعفری، محلولی از پروتئین‌های است که آبشار انعقادی خون را تحت تاثیر قرار داده و موجب عرق کردن طاقت‌فرسا و خونریزی شدید می‌شود. از جمله این پروتئین‌ها، پروتروموبین است که فعال‌سازی پروتروموبین برای بلوغ و تبدیل به ترومیبین به وسیله فعالیت کمپلکس پروتئولیتیک پروتروموبیناز رخ می‌دهد و شامل یک فاکتور سرین پروتئیناز Xa و کوفاکتورهای فاکتور V و یون‌های  $\text{Ca}^{+2}$  و فسفولیپیدها است. تعدادی از فعال‌کننده‌های پروتروموبین 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 آنریم ترومیبین به وجود آید. این آنریم 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 دفیرینه 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(۲،۳).

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. آنریم‌های فعال‌کننده پروتروموبین(شیشه به اکارین) به عنوان یک ابزار مهم در آزمایشگاه‌ها برای

جدا سازی و خالص سازی عامل فعال کننده پروتومبین: خالص سازی عامل فعال کننده پروتومبین با استفاده از روش های کروماتوگرافی انجام گرفت. جهت جدا سازی فاکتور انعقادی، ۵۰ میلی گرم زهر خام مار جعفری در ۴ میلی لیتر بافر آمونیوم استات (۲۰ میلی مولار با  $\text{pH} = 6/8$ ) حل شد و به مدت ۱۵ دقیقه در  $14000 \text{ rpm}$  سانتریفوژ گردید. ناخالصی های سم با استفاده از میکروفیلتر ۰/۴۵ حذف گردید. پس از تعادل ستون، محلول پروتئینی حاصل به ستون  $3 \text{ cm} \times 200$  سفادکس G-75 تزریق شد. ستون ژل کروماتوگرافی با بافر آمونیوم استات با  $\text{pH} = 6/8$  به تعادل رسید و با همین بافر بعد از تزریق نمونه شسته شد. جذب هر فراکسیون در طول موج ۲۸۰ به دست آمد و پیک های مربوط به آن رسم شد. تمامی فراکسیون ها ۲۴ ساعت مقابل ۱۰ حجم آب مقطر دیالیز شدند و در ۴ درجه سانتی گراد تغليظ گردیدند. پس از تغليظ، حجم پیک ها به دقت اندازه گیری شد. آزمایش PT برای ۵ پیک (فراکسیون) با غلظت مشابه، انجام گرفت. در مرحله بعد فراکسیون انعقادی در ۴ درجه سانتی گراد در مقابل بافر تریس-HCl ۰/۰۵ میلی مولار ( $\text{pH} = 8/2$ ) دیالیز گردید. این فراکسیون به ستون ( $1/5 \text{ cm} \times 25 \text{ cm}$ ) کروماتوگرافی تعویض یونی DEAE-سفاروز، وارد شد و ستون با بافر تریس-۰/۰۵ HCl معیار مولار ( $\text{pH} = 8/2$ ) به تعادل رسید. ستون را با گرادیانی از غلظت نمک از صفر تا ۰/۵ میلی مولار شستشو دادیم. ساب فراکسیونی که فعالیت انعقادی از خود نشان داد، دیالیز شد و بعد از دیالیز به ستون HPLC C-18 فاز معکوس تزریق گردید. ستون با محلول A (آب، ۱/۰٪ تری فلورواتیک اسید) به تعادل رسید و با گرادیان غلظتی از محلول B (استونیتریل، ۱/۰٪ تری فلورواتیک اسید) از صفر تا ۱۰۰٪ با سرعت جريان ۰/۳ میلی لیتر در دقیقه، طی ۵۵ دقیقه شستشو داده شد (۲۳، ۲۴). در نهايیت پیک ها در ۲۸۰ نانومتر مشاهده شدند و فراکسیون دارای فعالیت انعقادی تشخيص داده شد.

انحراف معیار (SD) و  $p$ -value در مورد داده های آزمایش های انجام شده با استفاده از نرم افزار mini tab انجام گرفت، فرض  $H_0$  رد و  $H_1$  تایید شد و  $p \leq 0/05$  معنادار در نظر گرفته شد.

(بدون هیچ سابقه بیماری خونی) گرفته شد. نمونه خونی این افراد به مدت ۱۵ دقیقه و در  $3000 \text{ rpm}$  سانتریفوژ شد، پلاسمای به دست آمده جدا شد و برای آزمایش های PT و FT مورد استفاده قرار گرفت.

ارزیابی زمان پروتومبین (PT):

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

ارزیابی زمان فیبرینوژن (FT):

نمونه شامل ۱/۸ میلی لیتر خون بر روی ۰/۲ تری سدیم سیترات ۰/۱۰۹ مولار ( $\text{pH} = ۳/۲$ ) بود. خون را به مدت ۱۵ دقیقه در  $3000 \text{ rpm}$  سانتریفوژ کردیم و پلاسمای را به یک لوله پلاستیکی منتقل نمودیم. ۰/۱ میلی لیتر از پلاسمای را برداشت و ۰/۹ میلی لیتر از بافر رقیق کننده را به آن اضافه کرده و مخلوط نمودیم (رقت ۱:۱۰ از پلاسمای ۰/۲ میلی لیتر از پلاسمای رقیق شده را به یک لوله شیشه ای منتقل کرده و برای مدت ۲ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد 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 عالیم تشکیل لخته، زمان را یادداشت کردیم (۲۱-۱۸).

اندازه گیری میزان پروتئین زهر خام مار جعفری:

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

اندازه گیری فعالیت انعقادی زهر خام:

از ۱۰ میلی گرم زهر مار جعفری، غلظت  $1 \text{ mg/mL}$  تهیه گردید. این غلظت برای بررسی خاصیت انعقادی سم مار جعفری، مورد آزمایش PT قرار گرفت.

خون ۶ نمونه انجام دادیم. نتایج میانگین مدت زمان آزمایش PT در این حالت  $9/2 \pm 0/005$  ثانیه ( $p < 0/005$ ) به دست آمد.

جداسازی سم اکیس کاربیناتوس 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. فراکسیون  $F_1$  بزرگترین و حاوی بیشترین میزان پروتئین بود.

بررسی فعالیت انعقادی فراکسیون‌هایی 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 پلاسمای  $18/34$  ثانیه ( $SD = \pm 1/16$  و  $p < 0/02$ ) بود. این زمان برای فراکسیون  $F_2$  در حدود  $35/5$  ثانیه ( $SD = \pm 2/41$  و  $p < 0/04$ ) و برای سایر فراکسیون‌ها بیشتر از ۵ دقیقه به دست آمد.

### یافته‌ها

با توجه به زمان انعقاد پلاسمای نرمال (فاقد زهر)، مشخص شد که زهر خام مار جعفری پلاسمای را سریعاً لخته می‌کند، بنابراین این زهر ویژگی انعقادی (procoagulant) دارد. با اضافه کردن سم با غلظت  $1 \text{ mg/mL}$ ، لخته به سرعت تشکیل شد. بدین ترتیب وجود عامل انعقادی در زهر مار جعفری اثبات گردید.

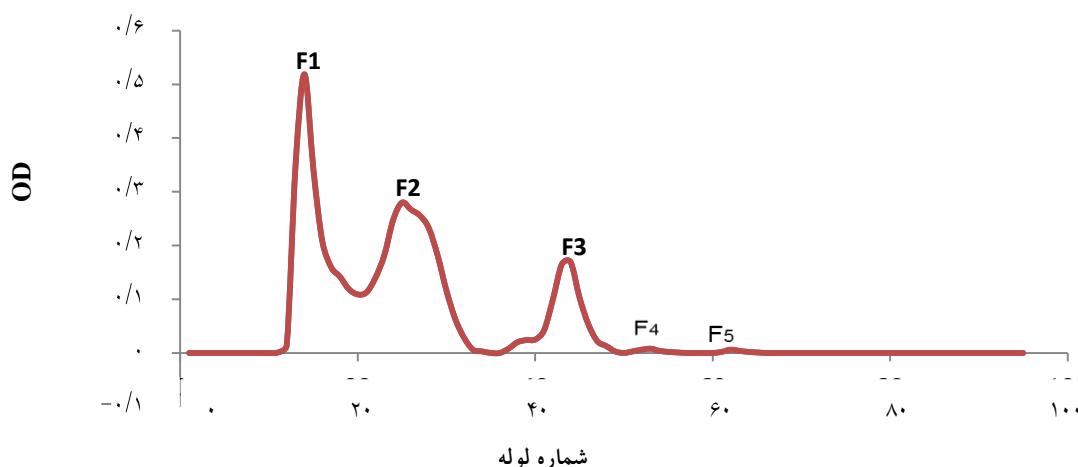
جدول ۱: آزمایش PT برای غلظت  $1 \text{ mg/mL}$  سم مار جعفری ایرانی

غلظت زهر	* میانگین (PT(s)	توضیحات
$1 \text{ (mg/mL)}$	$8/6 \pm 0/64$	لخته کاملاً تشکیل می‌شود.
Normal PT (بدون وجود زهر)	$13/4 \pm 0/59$	لخته کاملاً تشکیل می‌شود.

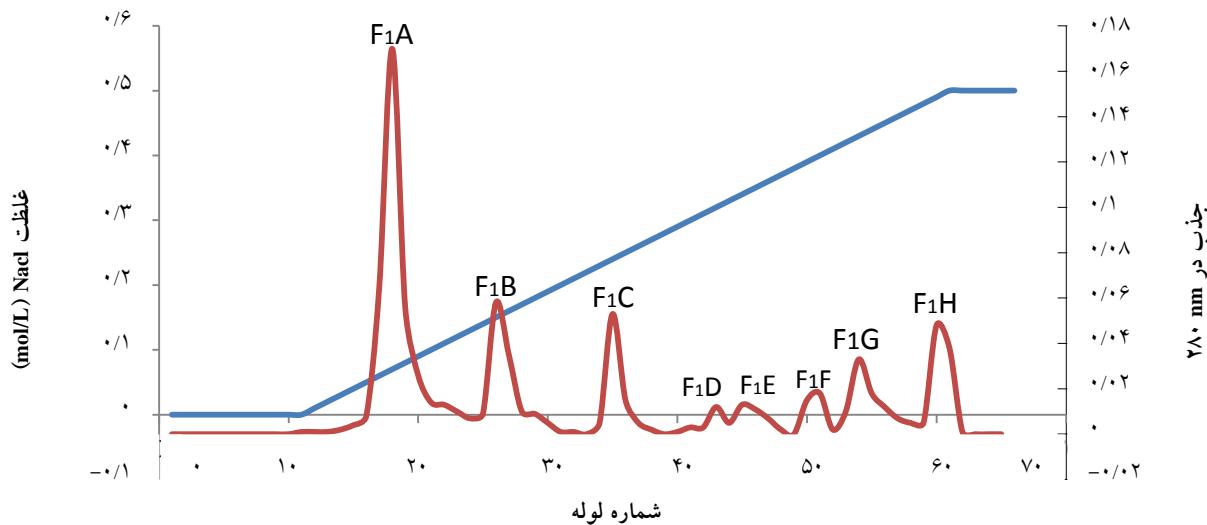
$n = 4$ ،  $p \text{ value} < 0/05^*$

در مرحله بعد آزمایش PT و FT نرمال برای ۶ نمونه خون انجام گرفت و نتایج مدت زمان میانگین آن برای آزمایش  $PT = 12/8 \text{ s}$  ( $p < 0/001$ ) و  $FT = 13/7 \text{ s}$  ( $p < 0/01$ ) به دست آمد.

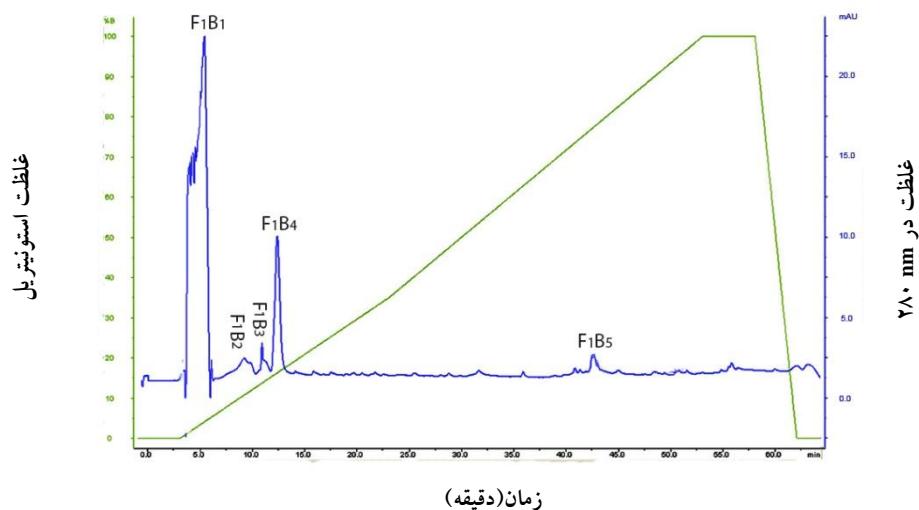
آزمایش PT را با غلظت  $1 \text{ mg/mL}$  بر روی پلاسمای



نمودار ۱: ژل کروماتوگرافی  $50 \text{ mg}$  زهر خام با استفاده از سفادکس G-75



نمودار ۲: جذب تفکیک فراکسیون F1 توسط کروماتوگرافی تبادل یونی



نمودار ۳: جداسازی ساب فراکسیون F1B به وسیله HPLC

آزمایش PT بررسی شد(جدول ۲).

طبق جدول ۲، ساب فراکسیون‌های F1A و F1B بیشترین خاصیت انعقادی را دارند، به طوری که حتی F1B زمان انعقاد پایین‌تری نسبت به سم خام داشت.

جداسازی ساب فراکسیون F1B به وسیله کروماتوگرافی : HPLC

با استفاده از HPLC ، ۵ پیک به دست آمد، که فراکسیون‌های F1B<sub>1</sub> تا F1B<sub>5</sub> نامیده شدند(نمودار ۳).

جاداسازی ساب فراکسیون‌های F1 حاصل از ژل فیلتراسیون به وسیله کروماتوگرافی تعویض یونی: فراکسیون F1 که خاصیت انعقادی داشت، برای جداسازی بیشتر بر روی ستون(DE-52)-سفاروز برد شد. از کروماتوگرافی تعویض یونی F1، ۸ فراکسیون F1A تا F1H به دست آمد(نمودار ۲).

بررسی خواص انعقادی ساب فراکسیون‌های F1: خاصیت انعقادی ساب فراکسیون‌های F1 با انجام

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، ۱۰–۱۴ ثانیه و FT، ۵–۱۵ 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 (ثانية  $9/2$ ). 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  $200\text{--}400$  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 تخرب شده و در نتیجه فیبرینولیز اتفاق می‌افتد ( $25\text{--}30$ )<sup>۲۵</sup>. 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 نظری اکارین) وجود دارد و فراکسیون‌های دیگر می‌توانند شامل آنزیم‌های ضد انعقادی (نظری PLA2) و پروتئین‌های دیگر باشد.

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

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 (عنی فراکسیون  $F_1B_4$ ) خاصیت انعقادی دارد. با اضافه کردن این فراکسیون به پلاسما، لخته در ۳ ثانیه تشکیل شد ( $p < 0/05$ ، 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 ( $26$ ). 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 *in vivo*، نشان داده شد که زهر مار جعفری در

داد. خالص‌سازی نهایی توسط HPLC انجام شد که AH<sub>143</sub> با وزن مولکولی kD ۳۰، فعالیت پروتئولیتیکی انعقاد نشان داد. این تحقیق تا حدود زیادی با کار تحقیقاتی انجام گرفته و نتایج به دست آمده برای انعقاد مطابقت داشت. آنزیم CA-1، فعال کننده پروترومبین است که از سم مار جعفری توسط دیسوک و همکارانش جداسازی شد و باعث تسریع انعقاد خون گردید. عمل این آنزیم شبیه به آنزیم استخراجی ما می‌باشد(۱۳).

### نتیجه‌گیری

در این بررسی زهر مار جعفری به دلیل وجود فعالیت‌های انعقادی انتخاب شد و با توجه به روش‌های کروماتوگرافی، پروتئین‌های مختلف موجود در آن خالص‌سازی و جداسازی گردید. در نهایت عامل فعال کننده پروترومبین، پروتئینی که باعث تسریع انعقاد خون می‌شود، خالص‌سازی شد. عمل این پروتئین تا حدود زیادی شبیه به اکارین است، که می‌توان از این آنزیم 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 سروترایپی و جانوران سمی کمال تشکر را دارم. از آقای مهندس عسکری و خانم دکتر خامه چیان به خاطر راهنمایی‌هایشان سپاسگزارم.

یونی، موفق به خالص‌سازی آنزیم CA-1 در محدوده 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 یا تزریق سم مار جعفری به پلاسمما، زمان انعقاد خون پایین می‌آید. این حالت در مورد فراکسیون F<sub>1</sub> به طور واضح صدق نکرد، با توجه به این که فعالیت انعقادی، کاهش در زمان انعقاد در مقایسه با نمونه کنترل می‌باشد. همان طوری که مشخص است فراکسیون F<sub>1</sub> خاصیت انعقادی بیشتری دارد، به طوری که فراکسیون F<sub>1</sub> زمان انعقاد پایین‌تری نسبت به فراکسیون F<sub>2</sub> و F<sub>3</sub> داشت. از طرفی دیگر سب فراکسیون به دست آمده از کروماتوگرافی تعویض یونی (F<sub>1</sub>B)، به سرعت زمان انعقاد را کاهش می‌دهد و لخته ایجاد می‌کند. این کاهش مدت زمان آزمایش PT، در سب فراکسیون F<sub>1</sub>B<sub>4</sub> حاصل از HPLC نیز مشاهده شد.

با انجام آزمایش PT بر روی فراکسیون‌های حاصل از HPLC، مشخص می‌شود که هر چه پروتئین مورد نظر خالص‌تر باشد، تاثیر آن در انعقاد خون شدیدتر می‌شود.

زهر مار ابرانی (Agiistrodon halys) توسط قربان‌پور و همکارانش مورد بررسی قرار گرفت(۲۳). توسط ژل فیلتراسیون، زهر خام به پنج پیک تقسیم شد(AH<sub>1</sub>-AH<sub>5</sub>). همه فراکسیون‌ها برای انعقاد مورد آزمایش قرار گرفتند و فراکسیون AH<sub>1</sub> برای انعقاد مثبت بود. خالص‌سازی بیشتر توسط کروماتوگرافی تبادل یونی انجام شد.

در این مرحله نیز فراکسیون AH<sub>14</sub> فعالیت انعقادی نشان

### References:

- Gharebaghian a, Arman L, Teimouri Naghadeh H, Vafaiyan V. [Haemostasis: Physiology, Pathology, Diagnostics]. 1<sup>st</sup> ed. Tehran: Tohfe Publication; 2004. p. 13-38; 59-68; 83-5.
- Zare A, Teimourzadeh Sh. Venomous Snakes of Iran. Tehran: Teimourzadeh Publications; 2008. p. 74-9. [Farsi]
- 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]
- Silva MB, Schattner M, Ramos CR, Junqueira-de-Azevedo IL, Guarneri 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.
- Howesa JM, Kamigutib AS, Theakston 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.
- 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.
- Braud S, Bon C, Wisner A. Snake venom proteins acting on hemostasis. Biochimie. 2000; 82(9-10): 851-9.
- Kini RM. The intriguing world of prothrombin activators from snake venom. Toxicol 2005; 45(8): 1133-45.
- Samel M, Vija H, Rönnholm G, Siigur J, Kalkkinen N,

- 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, Zokae F, Zolfagharrian H. Identification and partial purification of an anticoagulant factor from the venom of the Iranian snake *Agiistrodon 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, Zokae F, Zolfagharrian H, Rabiee H. Purification and partial characterization of a coagulant serine protease from the venom of the Iranian snake *Agiistrodon 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 Disorders, Common medical diagnosis. Philadelphia: W.B. Saunders company; 1990. p. 106-7.
- 27- Brozovic M. Acquired 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. Acquired 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. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 1997. p. 514-6.

**Original Article**

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

**Babaie M.<sup>1</sup>, Zolfagharian H.<sup>2</sup>, Salmanizadeh H.<sup>1</sup>, Zare Mirakabadi A.<sup>2</sup>, Alizadeh H.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Young Researches and Elites Club, Science and Research Branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Department of Venomous Animals and Antivenom Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

### **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 ( $SD = \pm 0.59$ ) to 8.6 seconds ( $SD = \pm 0.64$ ) when human plasma was treated with crude venom (concentration 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