فصلنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال شانزدهم، شماره ۳، صفحه ۲۲۴ - ۲۱۵ (پاییز ۱۳۹۲)

بررسی خنثی کنندگی آنتی‌ونوم انستیتو رازی بر خصوصیات بیولوژیک مار ویپرا لبتینای ایرانی

رامین سیدیان[۱*]، سیدمهدی حسینی[۱]، نیلوفر سیدیان[۲]، سمیه غریبی[۱]، نجمه سپاهی[۱]، سحر ناصری‌نژاد[۱]، ثریا قدرتی[۱]، مهرزاد بحتویی[۳]، حمیدرضا علیزاده اطاقور[۴]، عباس زارع میرک‌آبادی[۵]

[۱] مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج‌فارس، پژوهشکده زیست پزشکی خلیج‌فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر
[۲] گروه بهداشت عمومی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۳] بخش داخلی، بیمارستان فاطمه زهرا، بوشهر
[۴] بخش جراحی، بیمارستان فاطمه زهرا، بوشهر
[۵] بخش جانوران سمی و تولید پاد زهر، مؤسسه تحقیقاتی و سرم سازی رازی، کرج

(دریافت مقاله: ۹۱/۳/۳۰- پذیرش مقاله: ۹۱/۶/۱۵)

چکیده

زمینه: عوامل هموتوکسیک و نوروتوکسیک موجود در ونوم مار می‌تواند سبب نکروز و از بین رفتن بافت گردد. مارگزیدگی در نقاط روستایی ایران در تمامی استان‌ها شایع بوده و می‌تواند باعث ادم، نکروز بافت و تغییرات خونی (در صورت وجود عامل هموتوکسیک) گردد. قدرت ونوم گرزه مار (ویپرا لبتینا) ایرانی در ایجاد تأثیرات موضعی هموراژیک و ادماتوز در رت و نیز پروکواگولانت به‌همراه توان خنثی نمودن موارد فوق به کمک آنتی‌ونوم پلی والانت آماده شده انستیتورازی به دو صورت انکوباسیون با ونوم قبل از تزریق و نیز در مطالعات خارج از بدن مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها: دوزهای افزاینده ونوم ویپرا لبتینا (۲، ۵ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به‌صورت زیر پوستی به سطح پشتی گروه‌های سه‌گانه رت جهت اندازه‌گیری میزان متوسط دوز هموراژیک زده شد. در آزمایش دیگر جهت تعیین قدرت ادماتوژنیک مقادیر متفاوت ونوم (۱۰ تا ۱۵۰میکروگرم) به‌صورت زیر پوستی (۱۰۰ میکرولیتر) به پای راست گروه‌های سه گانه رت زده شد و جهت کنترل از مقدار مساوی نرمال سالین در پای چپ استفاده گردید. جهت تعیین زمان انعقاد مقادیر مختلف از ونوم حل شده در ۵۰ میکرولیتر از نرمال سالین به ۲۰۰ میکرولیتر از پلاسمای انسانی اضافه شده و زمان انعقاد اندازه‌گیری شد. آنتی ونوم انستیتو رازی در کلیه آزمایشات فوق جهت خنثی‌سازی به‌کار برده شد.

یافته‌ها: در بررسی حداقل دوز هموراژیک، پروکواگولانت و میزانی که می‌توانست ادم را در کف پای رت به‌میزان ۳۰ درصد افزایش دهد مقادیر ۸/۵، ۱/۱ و۷۰ میکروگرم مشاهده گردید که بیانگر تأثیرات بالینی متفاوت این ونوم بود. با انکوباسیون ونوم و آنتی‌ونوم (۳۰ و۲۰۰ میکرولیتر) قبل از تزریق، تأثیرات هموراژیک و پروکواگولانت از بین رفت و ویژگی‌های ادماتوزنیز با دوزهای افزایش یابنده آنتی‌ونوم کم اثر شد. تزریق داخل پریتونئال آنتی‌ونوم نقش مؤثری در کاهش عوارض هموراژیک و ادماتوز در رت نداشت. تزریق دوزهای بالاتر ونوم به‌صورت داخل عضلانی با تأثیرات میونکروتیک همراهی داشت.

نتیجه‌گیری: بررسی کنونی، نشان دهنده قدرت آنتی‌ونوم انستیتو رازی در خنثی نمودن تأثیرات هموراژیک و ادماتوز در محیط داخلی بدن و نیز لخته‌کنندگی در محیط آزمایشگاه بود. با توجه به وجود آنزیم‌های متعدد در ونوم مار ویپرا لبتینا لزوم انجام آزمایش‌های دیگر جهت بررسی آن‌ها به‌منظور تخلیص و جداسازی و نیز ارزیابی قدرت خنثی‌کنندگی آنتی‌ونوم انستیتو رازی الزامی است.

واژگان کلیدی: ونوم، ویپرا لبتینا، آنتی‌ونوم انستیتو رازی، ایران

* بوشهر، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دریایی خلیج‌فارس، گروه فارماکولوژی و توکسیکولوژی
E-mail:r.seyedian@bpums.ac.ir

مقدمه

مارها برخلاف باورهای افسانه‌ای و نادرست که آن‌ها را به‌عنوان موجوداتی سمی و مرگ‌آور معرفی می‌کند، در کنار انسان‌ها زندگی کرده و تنها نزدیک به ۱۵ درصد از۳۰۰۰ گونه مار شناخته شده در جهان برای انسان خطرناک می‌باشد. به‌عنوان نمونه در کشور هندوستان ۵۲ گونه زهردار و خطرناک وجود دارد (۱ و ۲).

مارهای سمی متعلق به چهار خانواده الاپیده، ویپریده، هیدروفیده و آتراکتاسپیدیده می‌باشند که عموماً در مناطق خشک و گرم از قبیل خاورمیانه و کشورهایی مانند ایران پراکنده هستند (۳).

در ایالات متحده آمریکا سالیانه ۸۰۰۰ مورد گزش با مارهای سمی رخ می‌دهد که منجر به مرگ ۱۰ تا ۱۵ نفر می‌گردد (۴ و ۵). اما متأسفانه آمار دقیقی از موارد گزش و یا تلفات گزیدگی در ایران موجود نیست. تزریق پادزهر علاوه بر درمان‌های علامتی از دیرباز جهت مارگزیدگان به‌کار برده شده و در این راستا سازمان بهداشت جهانی، ارزیابی و استاندارد کردن آنتی‌ونوم‌های موجود در کشورهای مختلف را به‌عنوان یک هدف برگزیده است (۶). ونوم مارها همچون کژدم‌ها حاوی نوروتوکسین و میوتوکسین و سایر آنزیم‌ها می‌باشد (۷). از میان مارهای سمی ایران می‌توان به ویپرا لبتینا با نام محلی گرزه مار اشاره کرد که با عوارض متنوع از قبیل اختلالات انعقادی، خون‌ریزی خود به خودی، ادم، میونکروز و غیره همراه می‌باشد (۹ و ۸). در کشور ایران مصدومین مارگزیده به همراه درمان‌های شایع از تزریق سرم ضد مار پلی‌والان انستیتو رازی جهت از بین بردن عوارض و درمان سود می‌برند که قدرت شناسایی و خنثی سازی آن در مقابله با گزش مارهای بومی ایران با توجه به ماهیت این آنتی‌ونوم کمتر بررسی شده است.

هدف از این مطالعه، بررسی و مقایسه قدرت زهر مار ویپرا لبتینا جهت ایجاد ادم، خون‌ریزی زیر پوستی، نکروز عضلانی و در آخر قدرت کواگولانت آن می‌باشد. در مرحله دیگری از بررسی قدرت خنثی کنندگی آنتی‌ونوم انستیتو رازی در از بین بردن تأثیرات فوق با تزریق آن همراه با ونوم بررسی خواهد شد.

مواد و روش‌ها

ونوم و حیوانات آزمایشگاهی

ونوم لیوفیلیزه مار ویپرا لبتینا صید شده در مناطق مختلف ایران از بخش جانوران سمی انستیتو رازی کرج تهیه و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. قبل از استفاده ونوم در نرمال سالین با غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر حل شد. آنتی‌ونوم پلی‌والان ضد مار انستیتو رازی با حجم ۱۰ میلی‌لیتر که از تصفیه و تغلیظ پلاسمای اسب تهیه شده و زهر شش نوع از مارهای بومی و خطرناک ایران (Pseudocerastes persicus, Agkistrodon halys, Vipera albicornuta, Echis carinatus, Vipera lebetina, Naja naja Oxiana) را خنثی می‌کند از همان مکان تهیه گردید. تمامی رت‌های مورد آزمایش نر و از نژاد ویستار با وزن ۵۰±۲۵۰ گرم بودند. کلیه حیوانات در قفس‌های استاندارد در خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی بوشهر نگهداری شدند.

مشخص نمودن محتوای پروتئینی

درصد پروتئینی ونوم مار ویپرا لبتینا با روش رنگ سنجی براد فورد (۱۰) تعیین و برابر ۱/۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود.

تعیین فعالیت هموراژیک

فعالیت هموراژیک موضعی ونوم با روش کوندوو همکاران به‌دست آمد (۱۱). ابتدا رت‌ها به گروه‌های سه تایی تقسیم شدند. به رت‌های یک گروه نرمال سالین به‌صورت زیر پوستی به‌میزان صد میکرولیتر پس از بیهوشی خفیف با اتر در ناحیه پشتی حیوان که قبلاً تراشیده شده بود به‌عنوان کنترل منفی تزریق شد. سپس دوزهای مختلف از ونوم لیوفیلیزه شده (۲/۵ تا ۵۰ میکروگرم) از مار فوق درصد میکرولیتر نرمال سالین حل شد و به سایر گروه‌ها تزریق گردید. ۲۴ ساعت بعد رت‌ها با تزریق کتامین در ناحیه پریتونئال قربانی شده و سطح داخلی پوست آن‌ها از جهت ایجاد محدوده خون‌ریزی در دو جهت که بیشترین میزان را ایجاد کردند در بین دو لام شیشه‌ای در حالتی که پوست کشیده نشده بود بازبینی شد. دو محور که بیشترین میزان خون‌ریزی در آن‌ها دیده شده بود به کمک خط‌کش و کولیس اندازه‌گیری شد و میانگین حسابی آن‌ها در مورد هر رت محاسبه گردید. دوز متوسط خون‌ریزی دهنده برابر میزانی از ونوم بود که می‌توانست خون‌ریزی برابر یک سانتی‌متر ایجاد کند.

تعیین فعالیت ادماتوز ونوم

این پارامتر از روش لمونت[1] با اندکی تغییرات به‌دست آمد (۱۲ و ۱۳). دوزهای مختلف از ونوم حل شده در صد میکرولیتر از نرمال سالین در پای راست گروه‌هایی شامل سه رت پس از بیهوشی خفیف با اتر در منطقه کف پا تزریق شده و در پای چپ همان حجم از نرمال سالین به‌عنوان کنترل تزریق گردید. بعد از ۲۴ ساعت رت‌ها با داروی بیهوشی کشته شده و هر دو پا از محل قوزک با قیچی قطع گردیده و با ترازوی دیجیتال EK-3000 وزن شدند. حداقل دوز ادماتوز برابر میزانی بود که می‌توانست به‌اندازه ۳۰ درصد اختلاف در وزن دو پا ایجاد کند.

تعیین فعالیت پروکواگولانت ونوم

حداقل دوز پروکواگولانت برابر میزانی (وزن خشک ونوم با واحد میلی‌گرم) قرار گردید که می‌توانست خون انسانی سیتراته را در مدت زمان ۶۰ ثانیه لخته نماید (۶). ابتدا پلاسمای تازه انسانی که توسط سیترات سدیم سه درصد تهیه شده بود و آزمون‌های انعقادی آن نیز نرمال بودند (PT=۱۲ و PTT=۳۵) از سازمان انتقال خون تهیه گردید. سپس غلظت‌های متفاوت از ونوم (یک دهم و ۰۱/ و ۰۰۱/ و ۰۰۰۱/ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در نرمال سالین تهیه شده و میزان ۵۰ میکرولیتر از آن‌ها را پس از به حجم رساندن به ۲۰۰ میکرولیتر از خون سیتراته سه درصد در نمونه‌های سه تایی اضافه گردید و سپس زمان لازم برای لخته شدن در دمای ۳۷°C به کمک کرونومتر محاسبه شد. در کلیه آزمایش‌ها پلاسمای سیتراته به‌همراه فسفات بافر سالین به‌عنوان کنترل کنار گذاشته شد.

خنثی‌سازی فعالیت هموراژیک و ادماتوز سم‌های مزبور با آنتی‌ونوم انستیتو رازی

در این بررسی ابتدا مقادیر مختلف از آنتی‌ونوم را با دوز ثابت ونوم در دمای ۳۷°C به‌مدت زمان سی دقیقه انکوبه کرده سپس میزان صد میکرولیتر از محلول به‌صورت زیر پوستی تزریق گردید. ۲۴ ساعت بعد موش‌ها به کمک تزریق با دوز بالای کتامین قربانی شده و میزان خون‌ریزی در سطح داخلی پوست در دو محور اندازه‌گیری شد. در آزمایشی جداگانه همراه با تلقیح زیر پوستی ونوم، دوزهای متفاوت آنتی‌ونوم به‌صورت داخل پریتوئن تزریق گردید. جهت بررسی

[1] Lomonte

قابلیت خنثی کنندگی آنتی‌ونوم بر روند ادماتوز دوز ثابت ونوم با مقادیر متفاوت آنتی‌ونوم در دمای اتاق به‌مدت زمان سی دقیقه انکوبه شده و سپس صد میکرولیتر در پای راست گروه‌های سه گانه رت تزریق شد. تزریق آنتی ونوم به تنهایی و نرمال سالین به‌عنوان کنترل منفی صورت پذیرفت. در این آزمایش تغییر میزان ادم ارزیابی شد.

خنثی‌سازی فعالیت پروکواگولانت ویپرا لبتینا

خنثی‌سازی فعالیت پروکواگولانت با استفاده از روش لانگ (Laing) و همکاران با تغییرات انجام شد (۱۴). مقدار محاسبه شده قبلی از ونوم (۱/۱ میکروگرم) با میزان‌های متفاوت از آنتی‌ونوم (۵۰ تا ۲۵۰ میکرولیتر) پس از به حجم رساندن با فسفات بافر سالین به‌مدت زمان ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر پلاسمای سیتراته و کلرید کلسیم به آن اضافه شد. زمان لخته شدن به‌کمک کرونومتر در نمونه‌های سه‌تایی اندازه‌گیری گردید. در نمونه‌های کنترل، پلاسما با ونوم و آنتی‌ونوم انستیتو رازی و یا نرمال سالین به تنهایی مخلوط شدند. خنثی سازی به‌میزانی از آنتی‌بادی گفته شد که در آن زمان لخته شدن در مقایسه با کمترین میزان دوز لخته کننده سه برابر شد (۱۵).

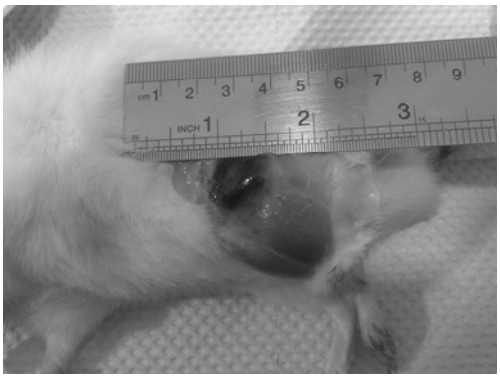
اصول کاربرد آمارزیستی

در بررسی آماری و کشیدن نمودارها از نرم‌افزار EXCEL و SPSS (USA،Il،Chicago،SPSS Inc) ویرایش ۱۱/۵ استفاده شده است و داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف معیار ارایه شده‌اند. در بررسی گروه‌های دوتایی از t-test و چند تایی از ANOVA به همراه tuckey استفاده شده است. ($P<۰/۰۵$).

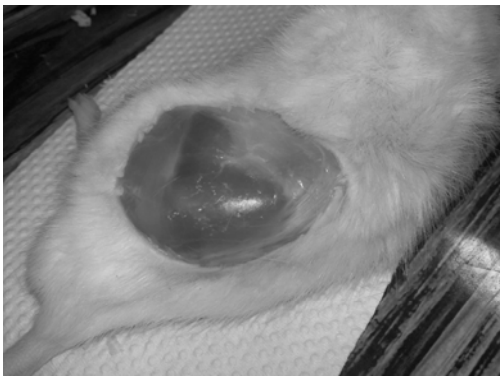
یافته‌ها

میزان خون‌ریزی ایجاد شده به‌دنبال تزریق و خنثی‌سازی آن به‌کمک آنتی ونوم انستیتورازی

بیست و چهار ساعت پس از تزریق زیر پوستی ونوم ویپرا لبتینا به رت با خون‌ریزی قابل ملاحظه نسبت به کنترل (تزریق نرمال سالین) روبرو بودیم (شکل الف در مقابل ب).



شکل الف) تأثیر هموراژیک تزریق زیرپوستی ونوم ویپرا لبتینا به رت



شکل ب) تأثیر تزریق زیرپوستی نرمال سالین به‌عنوان کنترل منفی در رت

سه برابر دوز هموراژیک ونوم با مقادیر مختلف آنتی‌ونوم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت زمان ۳۰ دقیقه انکوبه شده و میزان خون‌ریزی ماکروسکوپی بعد از گذشت بیست و چهار ساعت با قربانی کردن حیوان به کمک اتر به‌دست آمد. با قرار دادن میزان متوسط خون‌ریزی نسبت به دوز

تزریق شده مقدار ۸/۵ میکروگرم به‌عنوان متوسط دوز خون‌ریزی دهنده مشخص شد (جدول ۱). در این آزمایش نکروز واضح ماکروسکوپیک با تغییر رنگ ارغوانی محل تزریق داخل عضلانی نمونه‌های وزنی متفاوت ونوم (۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰) در تزریقات به گروه‌های سه‌گانه رت دیده شد.

دوزهای افزاینده از آنتی‌ونوم (۵۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر) به‌صورت اینتراپریتونئال پس از تزریق زیر پوستی ونوم به گروه‌های سه گانه رت تزریق شد ولی در هیچ‌کدام از آن‌ها خون‌ریزی زیر پوستی به‌طور کامل از بین نرفت.

میزان ادم کف پایی ایجاد شده و خنثی‌سازی آن به‌کمک آنتی ونوم انستیتو رازی

بیست و چهار ساعت پس از تزریق مقادیر مختلف ونوم در مقابل نرمال سالین در پای مقابل گروه‌های سه گانه رت با ادم قابل ملاحظه در کف پا روبرو شدیم (نمودار ۱). در آزمایشی جداگانه حداقل دوز ایجاد کننده ادم (۷۰ میکروگرم) را با مقادیر مختلف آنتی‌ونوم (۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر) مجاور کرده و میزان ۱۰۰ میکرولیتر پس از سی دقیقه انکوباسیون به گروه‌های سه‌گانه رت تزریق شد. در آزمایشی دیگر از تزریق مقدار برابر آنتی‌ونوم استفاده گردید. ترکیب نمودن آنتی‌ونوم و ونوم تا حدود قابل ملاحظه‌ای از ادم کاست (۷۸ به ۳۸ درصد).

نمودار ۱) متوسط تغییرات ادماتوز ایجاد شده در گروه‌های سه تایی رت با تزریق مقادیر متفاوت ونوم ویپرا لبتینا

قدرت کواگولانت ونوم و خنثی شدن آن توسط آنتی‌ونوم انستیتو رازی

با توجه به انجام آزمایش ۵۲/۴ میکروگرم از پودر لیوفیلیزه ونوم ویپرا لبتینا توانست خون انسانی سیتراته را در مدت زمان ۶۰ ثانیه لخته نماید. در بررسی انجام شده با آنتی‌ونوم انستیتو رازی با مخلوط کردن و انکوبه نمودن در دمای ۳۷ درجه، میزان۲۰۰ میکرولیتر از آنتی‌ونوم انستیتو رازی توانست زمان لخته شدن را سه برابر کند (جدول ۱).

جدول ۱) مقادیر حداقل دوز هموراژیک، کواگولانت و ادماتوز مار ویپرالبتینا به‌همراه میزان خنثی‌کننده آنتی‌ونوم انستیتو رازی

ونوم	حداقل دوز خون‌ریزی دهنده (میکروگرم)	حداقل دوز پروکواگولانت (میکروگرم)	دوز ادماتوژنیک (میکروگرم)	دوز خنثی کننده آنتی‌ونوم (میکرولیتر)	
				خون‌ریزی دهنده	پروکواگولانت
گرزه مار	۸/۵	۱/۱	۷۰	۳۰	۲۰۰

بحث

ونوم موجود در مارهای سمی در یک برآورد کلی به دو دسته نوروتوکسیک (آسیب‌رسانی و یا نابودی بافت عصبی) و هموتوکسیک (آسیب‌رسانی به بافت‌ها

و خون) تقسیم‌بندی می‌شوند. افراد مار گزیده با علایمی از قبیل درد و تورم در محل گزش، وجود فنگ (جای دندان‌های مار) در آن محل، کواگولوپاتی‌های خفیف و یا شدید، نارسایی کلیه و در آخر شوک روبرو می‌شوند (۱۵).

امروزه بی‌حرکت کردن عضو مار گزیده و نیز بستن قسمت بالای عضو با فشار کم به نحوی که مانع از رسیدن خون شریانی به آن موضع و در نتیجه افزایش نکروز نشود تا رسیدن خدمات اورژانس پیشنهاد می‌گردد. استفاده از آنتی‌ونین اسبی مدت زمان مدیدی است که جهت درمان ۷۵ درصد از گزش‌های خطرناک در آمریکا مورد استفاده قرار می‌گیرد و این امر با توجه به زمان کم رسیدن بیمار به بیمارستان (کمتر از دو ساعت) در درمان نقش مؤثری به عهده دارد (۱۸-۱۶).

مار ماکروویپرا لبتینا متعلق به خانواده ویپریده بوده و در شمال آفریقا و منطقه خاورمیانه از جمله ایران تا قسمت کشمیر پراکندگی جغرافیایی دارد. این مار در ایران به نام گرزه مار خوانده شده و یکی از بزرگترین مارهای سمی موجود در اکثر مناطق کوهستانی، و علف‌زاری ایران است که دارای سری صاف، مثلثی و جدا از گردن بوده نیز در دمای بالای ۴۵ درجه سلسیوس در پناه درختان خود را مخفی می‌کند (۱۹).

یکی از مشخصات بارز گزیدگی با مارهای گروه ویپرینه خون‌ریزی می‌باشد که از جمله علل اصلی آن تأثیر پروتئازهایی با منشا متالوآنزیم بر جدار عروق است (۲۰). میزان متوسط دوز خونریزی دهنده در آزمایشات این بررسی بر روی رت در مورد گونه ایرانی برابر ۸/۵ میکروگرم بود که در مقایسه با مار جعفری[2] موجود در ایران قدرت بیشتری را از خود نشان می‌داد (۸/۵ میکروگرم در مقابل ۱۴ و ۴۶/۵) (۶).

اکثریت عوامل مؤثر بر خواص هموراژیک زهر مار دارای وزن مولکولی بالای۲۰ کیلو دالتون هستند که از توان تولید آنتی‌بادی بالایی در اسب برخوردار می‌باشند. برای ارزیابی تأثیرات خنثی کنندگی آنتی‌ونوم انستیتو رازی به‌عنوان درمان شایع مار گزیدگی در کشورمان مقادیر متفاوت از این پادزهر را با ونوم مخلوط شد و بعد از انکوباسیون و تزریق نشان داده شد که ۳۰ میکرولیتر می‌تواند به‌صورت کامل مانع از خون‌ریزی زیر پوستی پس از ۲۴ ساعت از تزریق حداقل دوز هموراژیک گردد.

بر این اساس می‌توان آنتی‌ونوم انستیتو رازی را به‌عنوان یک آنتی‌ونوم با قدرت نسبتاً خوب جهت خنثی نمودن قابلیت هموراژیک بر اساس مخلوط کردن آن با ونوم دانست. نکته قابل توجه آن است که خون‌ریزی زیر پوستی در ناحیه مار گزیدگی پدیده‌ای است که به سرعت رخ داده و در بعضی از گونه‌ها حتی پس از ۳۰ دقیقه رخ می‌دهد و با توجه به میزان جذب داخل خونی محدود به‌دنبال تزریق داخل پریتوئن دوزهای افزاینده آنتی‌ونوم همزمان با تزریق در آزمایش ما نمی‌توان به‌صورت کامل مانع از ایجاد خون‌ریزی گردید. گوتیرز (Gutiérrez) و همکاران در مورد خنثی‌سازی سم (Terciopolo) Bothrops Asper به‌کمک آنتی‌ونوم موجود در کشور کستاریکا به این نتیجه رسیدند که تأثیر خنثی‌سازی ونوم و آنتی‌ونوم قبل از تزریق بر خاصیت همولیتیک و ادماتوز بسیار بیشتر از تزریق وریدی همزمان آن است (۲۳ و ۲۴).

علت این امر را می‌توان در سرعت بالای انتشار ونوم دانست که حتی با تزریق همزمان وریدی نمی‌توان به‌صورت کامل این امر را خنثی نمود. در بررسیکنونی تزریق آنتی‌ونوم به‌صورت پریتونئال صورت پذیرفت و

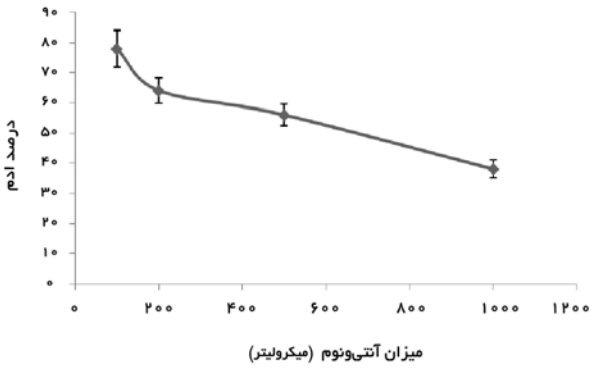
[2] Echis carinatus

نتوانست حتی با دوز ۲۰۰ میکرولیتر به‌صورت کامل جلوی خون‌ریزی زیر پوستی را بگیرد که یکی از علل اصلی آن می‌تواند میزان جذب داخل خون کم آن باشد. به هر حال نیاز به انجام بررسی با تزریقات وریدی جهت نشان دادن قدرت خنثی‌کنندگی و یا مجاور کردن با ید رادیواکتیو جهت بررسی توزیع بافتی و به‌دست آوردن فاکتورهای کینتیک ونوم و آنتی‌ونوم احساس می‌شود.

در این بررسی جهت تعیین حداقل دوز پروکواگولانت در مورد این مار میزان ۱/۱ میکروگرم از ونوم موجود در ۵۰ میکرولیتر قادر بود پلاسمای سیتراته را در عرض ۶۰ ثانیه لخته نماید. در مقایسه با سایر مارها از قبیل B.schlegelli مار ویپرا لبتینا از قدرت بالایی برخوردار است و از جمله مارهایی که قابلیت رقابت در این زمینه را با کفچه مار دارند مار جعفری ایرانی می‌باشد (۶) (۲/۲ میلی‌گرم در لیتر در مقابل ۲ میلی‌گرم در لیتر). در هنگام انکوباسیون دو برابر دوز کواگولانت ونوم با مقادیر متفاوت حجمی آنتی‌ونوم میزان ۲۰۰ میکرولیتر توانست مدت زمان انعقاد را سه برابر افزون کند و به‌عنوان دوز خنثی کننده محسوب شد.

با توجه به آن که اختلال انعقادی منتشر یکی از اتفاقات شایع به‌دنبال مارگزیدگی در حیوانات و انسان است ونوم گرزه مار بر خلاف مار قهوه‌ای[3] با انکوباسیون به‌مدت زمان نیم ساعت قابلیت پروکواگولانت خود را تا حدود زیادی از دست داد و این بیانگر کارآیی خوب آنتی‌ونوم انستیتو رازی در خنثی نمودن این خاصیت می‌باشد (۲۴).

در بررسی ما حداقل دوز ادماتوز ونوم که می‌توانست افزایش وزن ۳۰ درصد در کف پا ایجاد کند برابر ۷۰ میکروگرم بود و جهت کنترل از تزریق ۱۰۰ میکرولیتر نرمال سالین استفاده شد. انکوباسیون ونوم با مقادیر متفاوت آنتی‌ونوم توانست ادم ایجاد شده را تا حد کمی بکاهد. ادم پدیده پیچیده‌ای است که به عوامل و مدیاتورهای مختلفی همچون آزاد شدن هیستامین و سروتونین از ماست سل‌ها به‌وسیله کینین‌ها و متابولیت‌های لیپواکسی ژناز ارتباط دارد (۲۵). در مورد ونوم ویپرا لبتینا قدرت آنتی‌ونوم انستیتو رازی در خنثی نمودن تأثیر ادماتوز نشان داده شده است (نمودار ۲) و با انکوباسیون ۱۰۰۰ میکرولیتر درصد ادم به ۳۸ درصد کاهش پیدا کرد. این امر در مورد سایر گونه‌های مار نیز مشابه بوده و مثلاً در یک مطالعه در مورد Bothrops asper در هنگام انکوبه کردن ونوم و آنتی‌ونوم با اعدادی مشابه روبرو می‌شویم (۲۶).



نمودار ۲) تأثیرات انکوباسیون ونوم ویپرالبتینا و آنتی‌ونوم انستیتو رازی به‌مدت زمان نیم ساعت قبل از تزریق بر میزان ادم کف پایی در گروه‌های سه گانه رت

نکته مهم و اساسی آن بود که با تزریق مقادیر یکسان آنتی‌بادی یک ساعت بعد در میزان ادم به‌وجود آمده تغییر آماری معنی‌داری مشاهده نشد که می‌تواند مربوط به مشخصات فارماکوکینتیک سم و نیز سرعت اثربخشی آن در ایجاد پدیده ادم باشد. این امر لزوم بررسی و تزریق هر چه سریع‌تر آنتی‌ونوم را یادآور می‌کند (۲۷).

[3] P.textilis

سپاس و قدردانی

این پژوهش در خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی بوشهر و با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی آن دانشگاه انجام گرفته است.

References:

1.Meenatchisundaram S, Parameswari G, Michael A, et al. Neutralization of the pharmacological effects of Cobra and Krait venoms by chicken egg yolk antibodies. Toxicon 2008; 52: 221-7.
2.Bawaskar HS. Snake venoms and antivenoms: critical supply issues. J Assoc Physicians India 2004; 52: 11-3.
3.Ismail M, Memish ZA. Venomous snakes of Saudi Arabia and the Middle East: a keynote for travellers. Int J Antimicrob Agents 2003; 21: 164-9.
4.Parrish HM. Incidence of treated snakebites in the United States. Public Health Rep 1966; 81: 269-76.
5.Hutton RA, Warrell DA. Action of snake venom components on the haemostatic system. Blood Rev 1993; 7: 176-89.
6.Theakston RD, Reid HA. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. Bull World Health Organ 1983; 61: 949-56.
7.Farahmandzad A, Sarvari R, Ebrahimi F, et al. Differential comparison on protein components of the venoms obtained from two species of the Iranian endemic scorpions, Buthidae family. ISMJ 2012; 15: 85-92.
8.Mohapatra BN, Nayak K, Rath RN. Coagulation disorder following viper bite in Orissa. J Indian Med Assoc 1992; 90: 12-4.
9.Melo PA, do Nascimento MC, Mors WB, et al. Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by Eclipta prostrata (Asteraceae) extracts and constituents. Toxicon 1994; 32: 595-603.
10.Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. In: Walker JM, editor. The protein protocols handbook. 2nd ed. NJ: Humana Press; 2002: p. 15-21.
11.Kondo H, Kondo S, Ikezawa H, et al. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. Jpn J Med Sci Biol 1960; 13: 43-52.
12.Lomonte B, Tarkowski A, Hanson LA. Host response to Bothrops asper snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. Inflammation 1993; 17: 93-105.
13.Chandrashekara KT, Nagaraju S, Nandini SU, et al. Neutralization of local and systemic toxicity of Daboia russelii venom by Morus alba plant leaf extract. Phytother Res 2009; 23: 1082-7.
14.Laing GD, Theakston RD, Leite RP, et al. Comparison of the potency of three Brazilian Bothrops antivenoms using in vivo rodent and in vitro assays. Toxicon 1992; 30: 1219-25.
15.Gené JA, Roy A, Rojas G, et al. 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: 841-8.
16.Juckett G, Hancox JG. Venomous snakebites in the United States: management review and update. Am Fam Physician 2002; 65: 1367-74.
17.Dart RC, McNally J. Efficacy, safety, and use of snake antivenoms in the United States. Ann Emerg Med 2001; 37: 181-8.
18.Beebe DK. Adnormal Vaginal bleeding. In: Rakel R, editor. Saunders manual of medical practice. 1st ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1996.
19.Johnson CA. Management of snakebite. Am Fam Physician 1991; 44: 174-80.
20.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. 611-42.
21.Bjarnason JB, Fox JW. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. Pharmacol Ther 1994; 62: 325-72.
22.Tu AT. Venoms: chemistry and molecular biology. 1st ed. Michigan: John Wiley & Sons Inc; 1977: p. 325-327
23.Gutiérrez JM, Chaves F, Bolaños R, et al. Neutralizacion of local effects of Bothrops asper venom by polyvalent antivenin. Toxicon 1981; 19: 493-500.
24.Gutiérrez JM, Gené JA, Rojas G, et al. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. Toxicon 1985; 23: 887-93.

25.Masci PP, Whitaker AN, De Jersey J. Purification and characterization of a prothrombin activator from the venom of the Australian brown snake, Pseudonaja textilis textilis. Biochem Int 1988; 17: 825-35.
26.de Faria L, Antunes E, Bon C, et al. Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by Bothrops lanceolatus (Fer de lance) venom. Toxicon 2001; 39: 825-30.
27.Rucavado A, Lomonte B. Neutralization of myonecrosis, hemorrhage, and edema induced by Bothrops asper snake venom by homologous and heterologous pre-existing antibodies in mice. Toxicon 1996; 34: 567-77.
28.Chaves F, Barboza M, Gutiérrez JM. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake Bothrops asper (terciopelo) in mice. Toxicon 1995; 33: 31-9.

ISMJ 2013; 16(3): 215-24

Original Article

Neutralization effects of Iranian *Vipera lebetina* biological properties by Razi institute antivenom

R. Seyedian [1*], SM. Hosseini [1], N.Seyyedian [2], S. Gharibi [1], N. Sepahy [1], S. Naserinejad [1], S. Ghodrati [1], M. Bahtouee [3], HR. Alizadeh Otaghvar [4], A. Zare Mirak Abadi [5]

[1]*The Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, The Persian Gulf Biomedical Research Center, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, IRAN*
[2]*Department of Public Health, School of Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, IRAN*
[3]*Department of Internal Diseases, Fatemeh Zahra Hospital, Bushehr, IRAN*
[4]*Department of Surgery, Fatemeh Zahra Hospital, Bushehr, IRAN*
[5]*Department of Venomous Animals and Antivenom Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, IRAN*

(Received 18 Jun, 2012 Accepted 5 Sep, 2012)

Abstract

Background: The hemotoxic and neurotoxic factors of snake venoms is the main responsible for necrosis and tissue sloughing. Envenomations are common in rural areas in all provinces of Iran caused by snake species which causes local swelling, ecchymosis and alterations in blood profile in case of hemotoxic venom. In this study some in vivo and in vitro properties (Hemorrhagic, edematogenic and coagualant) of Iranian Vipera lebetina venom in addition to neutralizing capacity of pepsin derived Razi Institute polyvalent antivenin were assayed.

Material and Methods: Escalating doses of *Vipera lebetina* venom dissolved in Normal saline (2.5-50 µg/ml) were injected (100µl) subcutaneously to dorsal area of rats (n=3) to investigate mean hemorrhagic amount after 24 hours.Groups of three mice were injected subcutaneously in the right foodpad with various amounts of venom (10-150µg).The left foodpad received the same amount (100µl) ofnormal saline alone (negative control) to evaluate the edematogenic property of this venom. To determine the coagulant activity, various amounts of venom dissolved in normal saline (50µl) were added to human plasma (200µl) and coagulation time was measured. Razi Institute antivenom was used for neutralization of all three measured biological parameters.

Results: Mean hemorrhagic, procoagulant and edematous amounts (increasing 30% in hind paw edema) were 8.5, 1.1 and 70 microgram, respectively. Preincubation with polyvalent antibody (30 and 200 microliter) decreased hemorrhagic and procoagulant activity. Edematogenic property of this venom decreased significantly by incubation with antivenom (78% to 38% by incubation with 1000 microliter of polyvalent antivenom). Intra peritoneal injection of this remedy following envenomation had no effect in relieving symptoms. Myonecrotic effects were seen by intramuscular injection of *Vipera lebetina* venom in rats.

Conclusion: Our study shows that Iranian antivenom could neutralize some in vivo and in vitro hazardous effects of envenomation by this snake like hemorrhagic, edematogenic and procoagulant properties that paves the way for separation and purification of multiple enzymes present in this venom to investigate the neutralizing capacity from Razi Institute polyvalent antivenom.

Keywords: venom, Vipera lebetina, Razi institute antivenom, Iran

*****Address for correspondence*: The Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, The Persian Gulf Biomedical Research Center, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, IRAN; E-mail: r.seyedian@bpums.ac.ir

Website: http://bpums.ac.ir
Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir