



توکسینولوژی مارهای دریایی، یک مطالعه مروری نظام مند

غلامحسین محبی^{۱*}، رامین سیدیان^۱، ایرج نبی پور^۱

^۱ مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

چکیده

(دریافت مقاله: ۹۵/۵/۶ - پذیرش مقاله: ۹۵/۶/۳)

زمینه: مارهای دریایی متعلق به خانواده هیدروفیده، عمدتاً در آب‌های گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان از جمله آب‌های خلیج فارس یافت می‌شوند. زهر بسیار کشنده آنها، قوی‌تر از مارهای با منشأ زمینی بوده و شامل مخلوط‌های پیچیده‌ای از مواد فعال زیستی آلی و غیر آلی نظیر آنزیم و پروتئین‌های غیرآنزیمی هستند. مطالعات محدودی روی ونوم و توکسین‌های مارهای دریایی وجود دارد. لذا هدف از این مطالعه سیستماتیک، بررسی ابعاد توکسینولوژی مارهای دریایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: به منظور بررسی توکسین‌های مارهای دریایی، در تاریخ ۲۰۱۶/۸/۱۰ در وبگاه "pubmed"، واژگان "هیدروفیس شیتوس توکسین، هیدروفیس سیانوسینکتوس توکسین، هیدروفیس لاپموندس توکسین، هیدروفیس اسپیراليس توکسین، لاپمیس کورتوس توکسین"، به صورت مجزا، جستجو گردیدند که به ترتیب ۳۲، ۹، ۲ و ۴ نتیجه در بر داشتند. جستجوی واژه "هیدروفیس گراسیلیس توکسین"، نتیجه‌ای در بر نداشت. جستجو برای اصطلاح "Hydrophis gracilis" در مطالعه به دست آمد. اولین مربوط به مشخصات فیلوژنتیک مارهای دریایی و دومین نیز که دارای ارتباط با موضوع بود، با نتایج جستجوهای دیگر مشترک بود. برخی از مقالات در جستجوهای مختلف، مشترک بودند. از این میان، مطالعاتی که دارای ارتباط مستقیم به موضوع بودند، انتخاب و مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: توکسین‌های اصلی جدا شده از زهر مارهای دریایی مختلف شامل توکسین سه انگشتی (3FTx) (ایزوفرم‌های نوروتوکسین کوتاه زنجیر: AAL54893، AAL54892، ABN54806؛ و بلند زنجیر: AAL54894، AAL54895، P68416، ABN54805)، پلامیتوکسین (P62388)، فسفولیپاز A2 (هر دو PLA2 بازی و اسیدی)، دو آنزیم فسفولیپاز A2 (H1 و H2)، پروتئین ترش‌خونی غنی از سیستمین (CRISP)، متالوپروتئیناز زهر مار (SVMP)، L-آمینواسید اکسیداز (LAAO)، ۵-نوکلئوتیداز، هیدروفیتوکسین‌های A، B و C، هیدروفیس اوراتوس A، هیدروفیس لاپموندس A، فاکتور رشد پلاکتی (PDGF) و α -نوروتوکسین‌های rSN311، rSN316 و rSN285 بودند. هر توکسین و خانواده پروتئینی، طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های فارماکولوژیکی را ارائه می‌دهند. برخی از این نوروتوکسین‌ها به گیرنده‌های استیل کولینی اتصالات عصبی - عضلانی پیوند می‌یابند. این توکسین‌ها، فعالیت‌های پروتئیناز (ژلاتینازی و کازئینازی) از خود نشان داده و / یا سبب القای میونکروزیس و تغییرات بیوشیمیایی و هیستوپاتولوژیکی می‌گردند.

نتیجه‌گیری: تنوع بسیار کمی در ترکیب ونوم در گونه‌های مشابه و متفاوت مارهای دریایی وجود دارد. مطالعه ما نشان می‌دهد یک پروفایل ونوم نسبتاً ساده با میل به سمت ترکیبات مهلک قابل ملاحظه‌ای از نوروتوکسین‌ها و PLA2s و مقدار کمتری از توکسین‌هایی چون CRISP، SVMP و LAAO وجود دارد.

واژگان کلیدی: مار دریایی، ونوم، توکسین، خلیج فارس

* بوشهر، مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

Email: mohebbihsn@yahoo.com

* این پروژه با حمایت‌های کرسی پژوهشی پزشکی دریایی، (مصوب صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور) معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری به انجام رسید.

مقدمه

مارها در گذشته به عنوان قدرتی ماورای طبیعت مورد پرستش بوده‌اند. تقدیس مار را "افیلاتری" می‌نامند. هنوز، هندو مذهب بنگال، "مانازا"، مظهر مارها را مقدس می‌شمارند. در ادبیات مذهبی هندی‌ها "سشا"، مار بزرگ هفت سر مراقب و سایبانی برای خدای "ویشنو" است. پیکره "شیوا" خدای مخرب هندوها را مارها احاطه نموده‌اند و او حلقه‌ای از مار بر سر دارد. در پالمیر، چشمه مقدسی هست به نام "اوفه آ"، محافظ این چشمه را یک مار ماده می‌دانند و معتقدند هنگامی که مار خشمگین شود، مانع جریان آب می‌گردد. یونانی‌های قدیم و روم باستان، اعتقاد داشته‌اند که قهرمانان افسانه‌ای سرزمین کهن ایشان، قدرت خود را از این جانور مورد احترام و ستایش، کسب می‌کرده‌اند. در ادبیات مذهبی یونان آمده است که در زمان جنگ بین کشور ایران و یونان، مار معبد "اسکلیپوس"، غذای خود را نخورد، مردم یونان آن را نشانه‌ای از این گرفتند که خدایان یونان، مقابل حمله ایرانی‌ها آنها را حفظ نخواهند نمود و در نتیجه شهرها را تخلیه کردند (۱).

خزندگان مهره‌دارانی با بیش از ۷۰۰۰ گونه و قدمت بیش از ۱۶۰ میلیون سال هستند که امروزه چهارگروه از آنها باقی مانده‌اند که شامل ۱- کروکودیلیا (Crocodylia): کروکودیل‌ها، تمساح‌ها و کایمن‌ها ۲- اسفندونتیا (Sphenodontia): سوسماران دارای چشم سوم، مثل توآتارا، ۳- تستودین‌ها (Testudines): لاک پشتان دریایی، خشکی- آبی و خشکی‌زی مطلق و ۴- اسکواماتا (Squamata): سوسماران، مارها و کرم سوسمارها می‌باشند (۲ و ۳). مارها احتمالاً در کرتاسه دور، با قدمتی بین ۱۲۰۰-۱۰۰ میلیون سال پیش، به وجود آمده‌اند (۴).

آنها از رده سوسماریان (Sauropsid)، زیررده دوکوان (Diapsida)، فرو رده پولک سوسمارشکلان (Lepidosauromorpha)، بالاراسته پولک‌سوسماران (Lepidosauria)، راسته پولک‌داران (Squamata)، زیرراسته ماران (Serpentes) هستند (۵).

مارها خزندگانی فلس‌دار و مهره‌دار هستند که تقریباً حدود ۱۰ درصد از ۳۵۰۰ گونه آنها در سراسر جهان، به طور بالقوه برای انسان خطرناک هستند (۶). آنها موجوداتی مرموز هستند که اغلب مردم از آنها وحشت دارند.

این مطالعه، شامل ویژگی‌های عمومی مارها، مشتمل بر اطلاعات عمومی در زمینه انواع مارها، طبقه‌بندی و خصوصیات آنها بر اساس الگوهای مختلف، با محوریت مارهای دریایی و به ویژه مارهای دریایی خلیج فارس، همراه با خصوصیات آناتومی، دستگاه زهری و پراکندگی جغرافیایی آنها و همچنین در یک قسمت اختصاصی که هدف اصلی این مطالعه می‌باشد، به بررسی توکسینولوژی مارهای دریایی و به ویژه مارهای دریایی خلیج فارس، در یک مطالعه مروری نظام‌مند پرداخته می‌شود.

طبقه‌بندی مارها از نظر سمیت‌زایی

مارها از نظر وجود سمیت، به انواع غیرسمی، نیمه سمی و سمی طبقه‌بندی می‌شوند (شکل ۱) (۷).

الف- مارهای غیرسمی (Aglypha)

مارهای غیرسمی دارای دندان‌های ساده بوده که راهی به غده سمی نداشته و شکل پولک‌های سر آنها با بدن کاملاً متفاوت است. پولک‌های سطح شکم صاف و بزرگ‌تر از پولک‌های ناحیه پشتی هستند. مردمک آنها اغلب گرد و دم آنها معمولاً گرد و دراز بوده و در حرکت سریع‌تر

ج- مارهای سمی (Proteroglyphous)

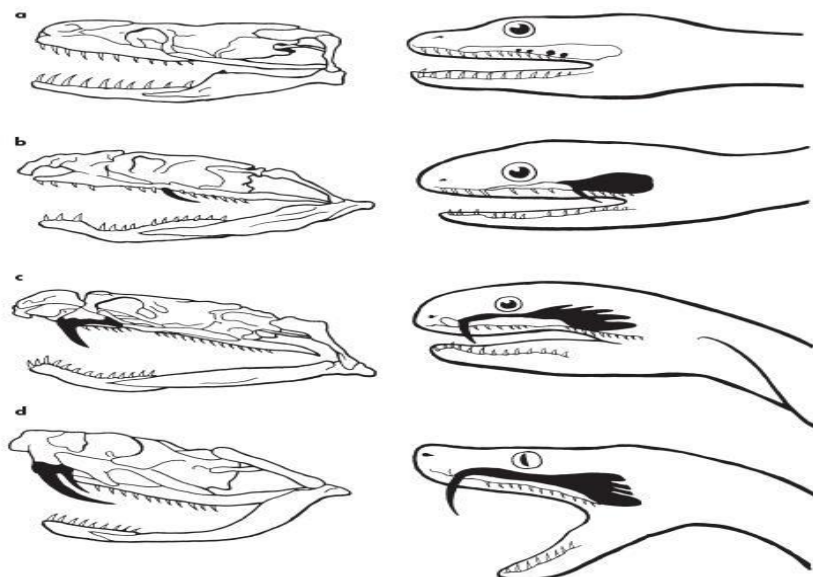
مارهای سمی، دارای سر مثلثی شکل و پهن تر از گردن می باشند. یک حفره (Facial pit) بین چشم ها و بینی آنها وجود دارد که گیرنده حرارت و ارتعاش می باشد، مردمک آنها عمودی و یا بیضی بوده و در فک فوقانی دارای ۲ عدد دندان زهری (نیش یا فنگ) غیرمتحرک و بعضاً متحرک می باشند (۸ و ۹).

پولک های انتهایی مارهای سمی یک ردیف در عرض بدن ولی در انواع غیر سمی دو ردیف هستند. مارهای سمی در فک فوقانی دارای دو عدد نیش غیرمتحرک هستند، البته در بعضی از آنها متحرک هستند. طول بدن مارهای سمی به دو متر می رسد و بعضی از آنها ۲۴ سال عمر می کنند. محل گزش مارهای سمی به صورت یک تا سه سوراخ می باشد، ولی محل گزش های غیر متحرک مارهای غیر سمی به شکل دو ردیف سوراخ هلالی مشخص می شود.

هستند. از جمله این مارها را می توان خانواده تیفلوئیده (نظیر مار کرمی شکل)، لیتوتیفلوئیده (مار خاکی)، خانواده بوئیده یا بوآ (انواع کورمارها)، خانواده کلوبریده (مار آبی و کوتوله مارها) را نام برد (۸).

ب- مارهای نیمه سمی (Opisthoglypha)

مارهای نیمه سمی ظاهری کم و بیش شبیه مارهای سمی دارند و یکی از وجوه تمایز آنها وجود دندان نیش خلفی شیاردار است که به غده سمی مار متصل است. مردمک چشم آنها ممکن است عمودی یا گرد باشد. از جمله این مارهای تاربوئیس چون سوسن مار، بویگا چون آلوسر، مالپولون چون طلحه مار و طلحه مار و پساموفیس چون تیرمار را می توان نام برد (۴ و ۸).



شکل ۱) انواع دستگاه زهری و دندان های نیش (فنگ) در مارها: a: آگلیفوس (Aglyphous)، b: اپیستوگلیفوس (Opisthoglyphous)، c: پروتروگلیفوس (Proteroglyphous)، d: سولنوگلیفوس (Solenoglyphous).

طبقه‌بندی مارهای سمی

بطور سیستماتیک، مارهای سمی عموماً در ۵ خانواده الایده (Elapidae)، وپیریده (Viperidae)، کلوبریده (Colubridae)، کروتالیده (Crotalidae) و هیدروفیده (Hydrophiidae) طبقه‌بندی می‌شوند (جدول ۱) (۴).

همه اعضای خانواده الایده (کفچه‌ماران) سمی هستند، اگر چه همه آنها برای انسان خطرناک نیستند (۴). مارهای این خانواده که تخم‌گذار هستند و در تمام دنیا به‌جز اروپا یافت می‌شوند شامل انواعی چون مارهای کبرا، کفچه مار، مارهای مرجانی هستند که سستی، خواب آلودگی، فلج گلو و اصولاً عوارض عصبی و خونریزی از علایم مهم شایع گزش با آنها به شمار می‌آیند. مارهای این خانواده تخم‌گذار هستند.

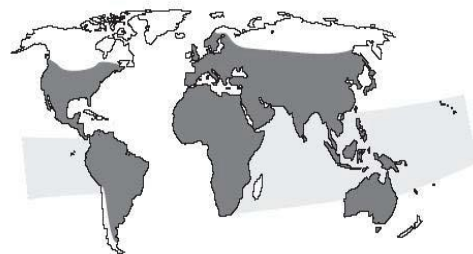
خانواده وپیریده (Viperidae) یا افعی‌ها که در تمام دنیا به‌جز آمریکا یافت می‌شوند شامل ده گونه خطرناک می‌باشند. این مارها که زنده‌زا هستند هنگام گزش بدون نیاز به گاز گرفتن، با فرو بردن نیش، زهر خود را وارد بدن قربانی می‌نمایند. پس از گزش، ابتدا هموگلوبینوری و سپس در اکثر آنها عدم انعقاد خون به‌وجود می‌آید. تورم، خونریزی موضعی، بروز دانه‌های قرمز رنگ در یکی دو ساعت اولیه، تعریق، سرگیجه، سیاهی رفتن چشم‌ها، لرز، کرختی اندام‌ها، نیستاگموس، تاکی پنه، تاکی کاردی، آنوری، کما، تشنج و آریتمی از تظاهرات گزش با آنها می‌باشند (۸).

خانواده کلوبریده (Colubridae) یا قمچه‌ماران شامل بومسلنگ (boomslang) و مارهای پرنده می‌باشند (۸). این خانواده از بزرگ‌ترین خانواده‌ها بوده و در تمام نقاط جهان (به جز برای استرالیا) یافت می‌شوند. اغلب مارها در این خانواده بی‌ضرر هستند اما برخی‌ها سمی هستند. برخی از کلوبریده‌ها بسیار سمی و خطرناک هستند. واضح‌ترین این مثال بومسلنگ *Dispholidus typus* آفریقای جنوبی می‌باشد (۴). برخی خانواده کروتالیده (Crotalidae)، افعی‌های منفذدار (pit viper)، را از زیر خانواده گرزه‌ماران در نظر می‌گیرند. آنها در تمام جهات شبیه به خانواده گرزه‌ماران هستند، به جز این‌دارای حفره حرارتی حساس، واقع در طرفین سر، بین سوراخ بینی و چشم دارا می‌باشند. حفره سنجش حرارتی اجازه می‌دهد که جانورانی که تنها دمای ۲/۱ درجه سانتی‌گراد بالاتر از دمای محیط داشته باشند را از فاصله ۲۴-۱۲ متری تشخیص دهند. این مرکز برای شکار طعمه خونگرم در شب استفاده می‌شود. خانواده کروتالیده معمولاً مارهای دنیای جدید هستند (۴). این خانواده، شامل مارهای زنگی، دهان کتانی و سرمسی هستند. نیش این مارها دراز و لولایی شکل بوده و هنگام بسته شدن دهان به طرف عقب، خم می‌شود. اعضاء این خانواده سر خود را همیشه به طرف جلو نگه داشته و ناگهان به قربانی خود حمله‌ور می‌شوند (۸).

جدول ۱) طبقه‌بندی مارهای سمی در ۵ خانواده الایده (Elapidae)، وپیریده (Viperidae)، کلوبریده (Colubridae)، کروتالیده (Crotalidae) و هیدروفیده (Hydrophiidae)، مثال‌ها و پراکندگی جغرافیایی آنها

خانواده	مثال‌ها	پراکندگی
الایده	کراپت‌ها، کبراها، مامباها، مارهای مرجانی	آمریکا، آفریقا، آسیا، استرالیا
ویپیریده	افعی‌ها	اروپا، آفریقا، آسیا، آمریکا
کروتالیده	مارهای زنگی	آمریکا و قسمت‌هایی از جنوب آسیا
کلوبریده	مارهای درختی	همه دنیا بجز: استرالیا، نیوزلند، ماداگاسکار، ایرلند، گرینلند، قطب جنوب و جزایر قناری
هیدروفیده	مارهای دریایی	سواحل آسیا و استرالیا، اقیانوس آرام تا کرانه دریاهای آمریکای مرکزی و جنوبی

شکل (۲)، توزیع جهانی مارهای سمی. و مارهای دریایی را نشان می‌دهد.



شکل (۲) توزیع جهانی مارهای سمی. بخش خاکستری روشن نشان دهنده محدوده تقریبی مکان مارهای دریایی است مناطق سفید سرزمین‌هایی است که تخمین زده می‌شود عاری از مارهای سمی باشد (۱۰).

مارهای خانواده هیدروفیده (Hydrophis)

مارهای دریایی گروه هیدروفیس (Hydrophis) با اجداد مشترک خود، حدود ۵-۸ میلیون سال قدمت دارند. آنها از نظر اکومورفولوژیکی دارای تنوع بسیار زیادی می‌باشند (۱۱). خانواده دریاماران که شامل مارهای دریایی می‌باشند، توسط برخی به عنوان یک زیر خانواده از خانواده کفچه‌ماران تلقی می‌گردند. در شکل کلی، مارهای دریایی به الپیده‌ها مشابهت دارند، جز آنکه در آنها ویژگی‌های خاصی طراحی شده است که به آنها اجازه زندگی در محیط‌های دریایی را می‌دهد (۴). با وجود فقدان یک چارچوب فیلوژنتیک و موانع زیاد در ارزیابی این گونه‌ها، آنها را بین ۱۰-۱۶ جنس، طبقه‌بندی نموده‌اند (۱۲ و ۱۳).

مار دریایی، خزنده‌ای با تنفس ششی است که با محیط آبی، با وجود دم پارویی مانند توسعه یافته‌اش، سازش پیدا کرده است. مارهای دریایی ساکن مناطقی از اقیانوس آرام، هند و دریای سرخ هستند و تا مساحت ۱۱۳ مایلی در آن سرزمین دیده می‌شوند (۱۴).

این مارها از خلیج فارس تا جنوب ژاپن و در سواحل دریاهای هند و استرالیا و سواحل جنوبی اقیانوس کبیر پیدا می‌شوند. نوعی از مار دریایی بنام پلامیس پلاتوروس (*Plamis Platurus*)، انتشار و پراکندگی وسیع‌تری دارد. این مار را می‌توان تا صدها کیلومتر دورتر از سواحل پیدا کرد. در حالی که سایر انواع مارهای دریایی در آبهای کم عمق و نزدیک ساحل به زندگی خود ادامه می‌دهند. مارهای دریایی در آبهای کم عمق و نزدیک ساحل زندگی خود می‌کنند. مارهای دریایی از ماهی‌ها تغذیه می‌کنند. سر این مارها عموماً کوچک و دارای بدنی استوانه‌ای شکل و کشیده و دمی پهن می‌باشند. تمام مارهای دریایی سمی و زنده‌زا هستند. حداکثر طول مار دریایی را تا ۲۵۷ سانتی‌متر گزارش کرده‌اند (۹ و ۱۴).

بیشتر نواحی خطرناک برای شناکردن، دهانه رودخانه‌هاست چون در آن نواحی، تعداد مارهای دریایی بیشتر و آب هم گل آلود است. مارهای دریایی، از مارهای واقعی و بندبند هستند. آنها معمولاً کنج‌کاو بوده و اغلب به طرف غواص‌ها جذب می‌شوند. ولی به جز در فصل جفت‌گیری، معمولاً مهاجم نیستند (۱۴).

طبقه‌بندی مارهای دریایی بر اساس الگوی تغذیه‌ای

مارهای دریایی شامل ۸۷ گونه هستند. آنها بر اساس الگوی تغذیه‌ای به دو گروه عمده تغذیه کننده‌های کفرو و گونه‌های شناور تقسیم می‌شوند.

تغذیه کننده‌های کفرو

تغذیه کننده‌های کفرو تا ژرفای بیش از ۱۰۰ متر در آب فرو می‌روند. جنس لاتیکاودا (*Laticauda*) یا مارهای نواری از نمونه‌های بارز این تیپ است. آنها

مانند و پهن هستند که هیچ مار خشکی‌زی، این نوع دم را ندارد (۱۵).

مارهای دریایی خلیج فارس

خانواده مارهای دریایی دارای پنج گونه سمی هستند که در ایران فقط در خلیج فارس صید و یا شناسایی شده اند (۸).

مار دریایی پوزه‌دار (*Enhydrina schistose*)

مارهای دریایی پوزه‌دار (Beaked sea Snake) یا منقار عقابی (hook-nosed)، از جنس انهیدرینا (*Enhydrina*)، در میان مارهای دریایی بچه‌زا، مشخص‌ترین بوده و به طور گسترده‌ای توزیع شده اند. آنها از مارهای دریایی دیگر، توسط پوزه بلند و باریک خود، متمایز می‌گردند (۱۳). طبقه‌بندی علمی مارهای دریایی پوزه‌دار در جدول (۲)، آورده شده است.

جدول (۲) طبقه‌بندی علمی مارهای دریایی پوزه‌دار (*Enhydrina schistose*)

مار دریایی پوزه‌دار			
فرمانرو	آنیمالیا	زیر راسته	سرپتیس
شاخه	کروдата	خانواده	الایپده
زیر شاخه	ورتراتا	زیرخانواده	هیدروفینائه
رده	رپتیلیا	جنس	انهیدرینا
راسته	اسکواماتا	گونه	<i>E. schistosa</i>

در مار بالغ، این خطوط کمی نامشخص و در بعضی نمونه‌ها بدن به رنگ خاکستری متمایل به سیاه و یکنواخت می‌باشد. سطح جانبی و شکمی آنها به رنگ روشن دیده می‌شود. حداکثر طول آنها ۱۳۰ سانتی‌متر و دم ۱۹ سانتی‌متر است (۹).

مار دریایی پوزه‌دار (شکل ۳)، در سواحل دریاها از خلیج فارس تا سریلانکا، آسیای جنوب شرقی، استرالیا و گینه نو دیده شده است (۱۳ و ۱۶). این گونه در درجه اول ساکن مناطق ساحلی بوده و به مقدار فراوان

به سواحل و آب‌های نسبتاً کم ژرفا محدود شده‌اند و محل پرورش و تخم‌گذاری آنها اغلب در سواحل، در درون غارها یا شکاف‌ها است و می‌توانند برای مدت طولانی در خارج از آب زندگی کنند.

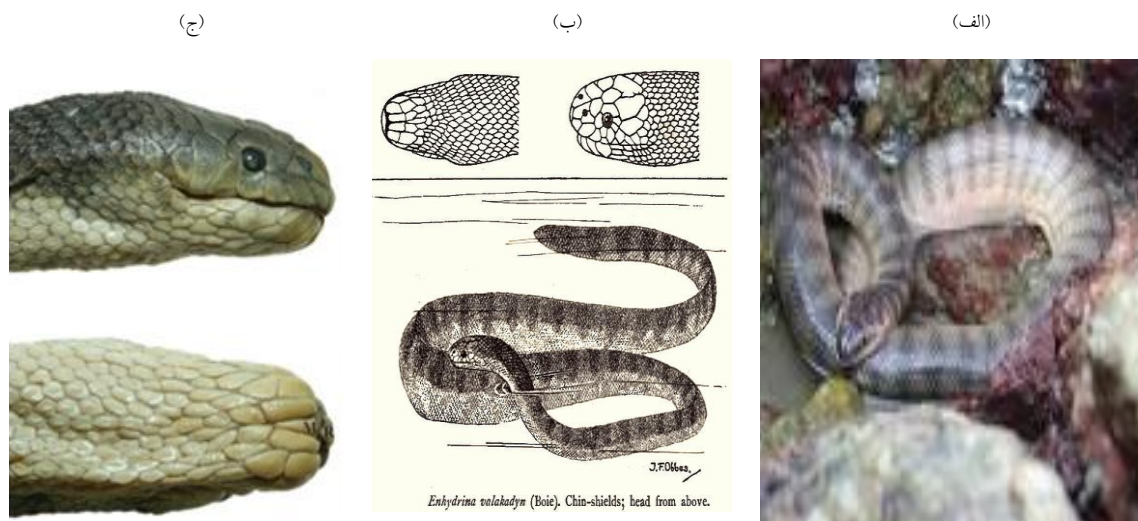
گونه‌های شناور (پلاژیک)

گروه دوم، گونه‌های شناور (پلاژیک) هستند که نمونه آن مار دریایی شکم بزرگ زرد (*Pelamis platurus*) است. این مارها در سطح، تغذیه می‌کنند. جفت‌گیری در دریا انجام می‌شود و مارها در آب، زنده هستند و چنانچه به ساحل یا خشکی پرتاب شوند می‌میرند. برای این مارها، گرمای زیاد کشنده است و برای گریز از گرما، به آب‌های خنک ژرفا پناه می‌برند. ولی در فصل باران و روزهای ابری، روی سطح دیده می‌شوند. مارهای خشکی‌زی نیز ممکن است وارد آب شوند و گاهی افتراق دشوار می‌شود. هر چند که مارهای دریایی، دارای دم پارو

از مشخصه آنها، ارتفاع پولک رستال بیش از پهنای آن است، پولک پیشانی کوچک (طویل و کوتاه‌تر از پولک آهیانه)، دارای یک پولک جلو چشمی و یک یا دو پولک عقب چشمی، معمولاً دارای یک پولک گیجگاهی، پولک‌های چین کوچک یا نامشخص، پولک‌های سطح پشتی دارای برآمدگی و کمی تیغه دار و در ۵۰ تا ۷۰ ردیف، پولک‌های سطح شکمی ۲۳۰ تا ۳۱۴ عدد می‌باشند. سطح پشتی آنها زیتونی یا خاکستری با خطوط عرضی سیاه رنگ بوده که معمولاً

در مصب‌ها و تالاب‌ها دیده می‌شود و در آنجا خطرات قابل توجهی برای ماهیگیرانی که به تورها

دست می‌زنند ایجاد می‌نمایند (۱۰).



شکل ۳) مار دریایی پوزه‌دار (Beaked sea Snake) (الف). شکل‌های شماتیک (ب) و تصویر سر و پوزه این مار دریایی (ج).

مار دریایی حلقه‌دار (*Hydrophis cyanocinctus*)

مار دریایی حلقه‌دار (Annulated Sea Snake)، دارای یک سر متوسط، بدن کشیده، پهنای پولک رستral بیش از ارتفاع آن، پولک بینی کوتاه‌تر از پولک پیشانی، طول پولک پیشانی بیش از عرض آن و کوتاه‌تر از پولک آهیانه می‌باشد. این مار دارای یک پولک جلو چشمی و یک یا دو پولک عقب چشمی هستند. لب بالای آنها دارای ۷ تا ۸ پولک، دو پولک گیجگاهی، دو پولک چین قدامی برابر و به هم متصل و دو پولک چین خلفی جدا از هم است. پولک‌های سطح پشتی آنها برجسته یا کمی تیغه دار و در ۳۹ تا ۴۵ ردیف، به علاوه ۲۸۱ تا ۳۸۵ پولک سطح شکمی می‌باشند. بدن آنها معمولاً به رنگ سبز زیتونی با خطوط عرضی زیتونی تیره، سیاه و گاهی زرد یا قهوه‌ای هستند. این خطوط در قسمت گردن پهن‌تر و در سطح زیرین بدن حلقه‌ای و در سطح پشتی با

خطوط طولی سیاه رنگ و گاهی در قسمت گردن منقطع و به شکل خال دیده می‌شوند (۹ و ۱۷). همچنین، طول آنها به حدود ۲۷۵ سانتی‌متر می‌رسد (شکل ۴) (۱۷).

این مارها در اقیانوس هند (از خلیج فارس، پاکستان، هند، سریلانکا، بنگلادش، میانمار، تایلند، مالزی، فیلیپین: دریای ویسایان، پانای، و غیره) و آب‌های دریاهای اطراف کره، ژاپن، جزایر سلیمان، دریای چین جنوبی (از جمله هاینان)، شرق دریای چین (از جمله تایوان)، مناطق ساحلی شاندونگ و لیائونینگ (چین) و سواحل ایرانی خلیج فارس، عمان، امارات متحده عربی، در شرق از طریق آسیای جنوبی تا گینه نو. یافت گردیده‌اند (شکل ۴) (۱۸).

طبقه‌بندی علمی این مارها در جدول (۳)، آورده شده است.



شکل ۴) مار دریایی حلقه‌دار (*Hydrophis cyanocinctus*) و پراکندگی جغرافیایی آنها (۱۷).

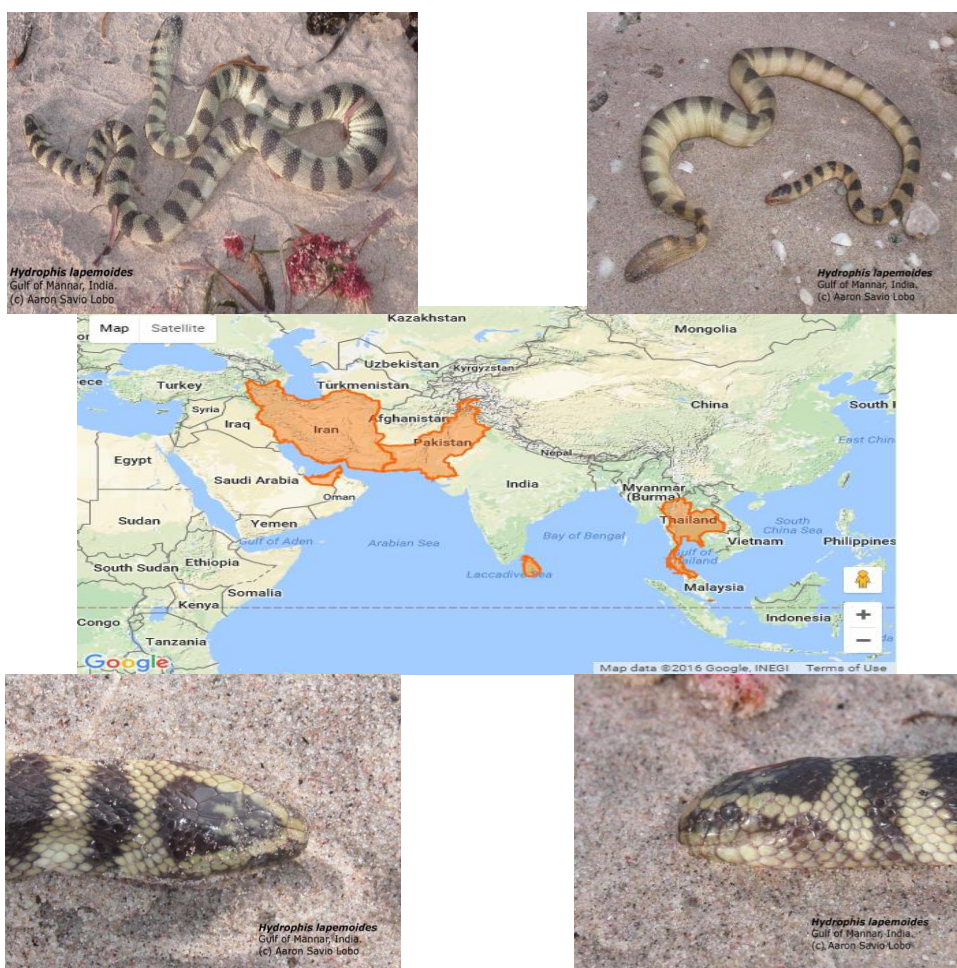
مار دریایی خلیج فارس (*Hydrophis lapemoides*)
 مارهای دریایی خلیج فارس
 (Persian Gulf Sea Snake)، در ضخیم‌ترین ناحیه
 بدن خود، دارای پولک‌های سطح پستی کم و بیش
 شش گوش با به شکل مربع می‌باشند که غالباً پولک‌ها
 به صورت برجسته یا پهلوی هم قرار می‌گیرند. در فک

جدول ۳) طبقه‌بندی علمی مار دریایی حلقه‌دار
 (*Hydrophis cyanocinctus*)

مار دریایی حلقه‌دار			
فرمانرو	آنیمالیا	زیر راسته	سرپنتنس
شاخه	کروماتا	خانواده	الایده
زیر شاخه	ورتراتا	زیرخانواده	هیدروفینانه
رده	رپتیلیا	جنس	هیدروفیس
راسته	اسکواماتا	گونه	<i>H. cyanocinctus</i>

بالایی پشت فنگ‌ها تعداد ۸ تا ۱۳ دندان، یک پولک جلو چشمی، دو یا سه پولک عقب چشمی، دو یا سه پولک گیجگاهی خلفی قرار دارند. لب بالایی با ۷ یا ۸ پولک (سومین و چهارمین یا سومین و چهارمین و پنجمین پولک لب بالا متصل به چشم) و لب پائین دارای ۸ پولک هستند. پولک‌های سطح پشتی در ناحیه گردن کمی برجسته یا تیغ‌دار و در قسمت خلفی بدن به شکل چند ضلعی و پهلوه هم قرار دارند. مرکز هر پولک برجسته بوده و پولک‌های پشتی ۴۰ تا ۵۱ عدد

و پولک‌های سطح شکمی از ۳۰۰ تا ۴۰۴ عدد می‌رسند (۹ و ۱۹). بدن آنها به رنگ خاکستری کم رنگ و در سطوح جانبی و شکمی متمایل به سفید روشن می‌باشند. گاهی رنگ بدن زرد روشن متمایل به سفید دیده می‌شوند. به علاوه، بدن دارای ۳۳ تا ۴۵ عدد باند تاریک بوده که در سطح پشتی پهن‌تر و در سطح جانبی باریک به نظر می‌رسند. گاهی رنگ بدن در بالغین، سبز تیره و در نوزادان سیاه‌رنگ هستند (۹ و ۲۰).



شکل ۵) مار دریایی خلیج فارس (*Hydrophis lapemoides*) و پراکنندگی جغرافیایی آنها.

منابع: <http://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Hydrophis&species=lapemoides> و

<http://www.iucnredlist.org/details/176741/0>

مار دریایی زرد (*Hydrophis spiralis*)

مار دریایی زرد، دارای سری تقریباً کوچک و بدن کمی کشیده می‌باشند (شکل ۶). پهنای پولک رسترال در آنها، بیش از ارتفاع آن، طول پولک پیشانی بیش از عرض آن و پولک پیشانی کوتاه‌تر از پولک آهیانه می‌باشد. آنها یک پولک جلو چشمی و یک پولک عقب چشمی، یک پولک گیجگاهی، لب بالا با ۶ تا ۷ پولک، دو جفت پولک چین متصل به هم، پولک‌های سطح پشتی ۲۹ تا ۳۹ ردیف، پولک‌های سطح شکمی نسبتاً بزرگ و ۲۸۲ تا ۳۷۳ عدد دارا می‌باشد. در نوزادان پولک‌های سطح پشتی به هم پیوسته، صاف یا (فاقد تیغه) و در مارهای بالغ قسمت میانی پولک برجسته، بدن در سطح پشتی زیتونی و در سطح شکمی زرد رنگ، همراه با حلقه‌های سیاه رنگ و ممتد در سطح شکمی، سطح پشتی با چند سری خال سیاه در فواصل حلقه‌ها، سطح بالای سر سیاه با شکل نعل اسبی زرد رنگ و ممتد تا قسمت پولک‌های جلو پیشانی و انتهای دم سیاه دیده می‌شوند. حداکثر طول آنها ۱۸۰ سانتی‌متر و دم نیز ۱۴ سانتی‌متر می‌باشد (۹).

ناحیه دم آنها دارای ۶ تا ۷ خط بوده و سر به رنگ زیتونی تیره با خط زرد هلالی شکل بین نوک سوراخ‌های بینی که در نوزادان مشخص و در بالغین نامشخص یا فاقد آن هستند. ناحیه گلوی آنها به رنگ سفید کدر دیده می‌شوند. حداکثر طول آنها به ۹۶ سانتی‌متر می‌رسد (۲۱). مار دریایی خلیج فارس، در آب‌های گرم کم عمق نزدیک ساحل، در میان صخره‌ها، شن‌ها و علف‌های دریایی به چشم می‌خورند. همان‌گونه که از نام آنها پیداست در خلیج فارس یافت می‌شوند. وجود آنها همچنین در سواحل سریلانکا، هند، سنگاپور، تایلند و جزایر مالزیایی پنانگ نیز به ثبت رسیده‌اند (شکل ۵) (۲۲ و ۲۳). حضور آنها در اعماق پایین‌تر از ۳۰ متر، با محدودیت توأم است. طبقه‌بندی علمی این مارها در جدول (۴) آورده شده است.

جدول (۴) طبقه‌بندی علمی مار دریایی خلیج فارس
(*Hydrophis lapemoides*) (Gray, 1849)

مار دریایی خلیج فارس			
فرمانرو	آنیمالیا	زیر راسته	سرپتس
شاخه	کروداتا	خانواده	الایده
زیر شاخه	ورتراتا	زیرخانواده	هیدروفینائه
رده	رپتیلیا	جنس	هیدروفیس
راسته	اسکواماتا	گونه	<i>H. lapemoides</i>



شکل ۶) مار دریایی زرد (*Hydrophis spiralis*). منبع: <http://www.irandeserts.com/content>

مار دریایی سر کوچک (*Hydrophis gracilis*)

سر این مار دریایی (Graceful Small Headed)

(Seasnake) بسیار کوچک، باریک و سطح فوقانی آن محذب می‌باشد (شکل ۷).



شکل ۷) مار دریایی سر کوچک (*Hydrophis gracilis*) (تصاویر بالا و پایین) و پراکنندگی جغرافیایی آنها (تصویر وسط). منبع:

<http://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Hydrophis&species=gracilis>

مار دریایی شاو (*Lapemis curtus*)

مارهای دریایی شاو (Shaw's Sea Snake)، دارای بدن و پوزه کوتاه و ناحیه سر پهنی می‌باشند (شکل ۸). آنها تعداد ۱۴۰ تا ۲۱۹ پولک سطح شکمی کوچک و مشخص دارند و در نرها در قسمت قدامی بدن، دارای برجستگی هستند. در فک بالایی آنها به فاصله‌ای از فنگ‌ها دارای ۳ تا ۵ دندان وجود دارد. پولک‌های جلو چشمی و عقب چشمی منفرد، دو پولک گیجگاهی قدامی و سه یا چهار پولک گیجگاهی خلفی، چند پولک آهیانه نامنظم منقسم از مشخصات آنهاست. لب بالایی آنها دارای شش یا هفت پولک (چهارمین پولک آن به چشم متصل) و لب پائینی دارای نه پولک می‌باشند. پولک‌های چین قدامی، کوچک و از هم مجزا ولی فاقد پولک‌های چین خلفی هستند. سطوح جانبی بهم فشرده و پولک‌های سطح پشتی ۳۳ تا ۴۳ عدد بوده که به شکل صاف یا مرکز هر پولک به خصوص در ردیف‌های تحتانی، برجسته به نظر می‌رسند. سطح بالایی بدن آنها به رنگ زرد، زیتونی یا خاکستری و سطح زیرین آنها سفید رنگ و دارای ۴۵ تا ۵۵ خال باریک عرضی به رنگ خاکستری تیره یا سیاه هستند که در سطوح جانبی خال‌ها باریک‌تر می‌شود. در نوزادان، ناحیه سر سیاه رنگ و در بالغین به رنگ زیتونی خاکستری با علائم یا بدون علائم هلالی شکل دیده می‌شوند. حداکثر طول آنها ۸۵ سانتی‌متر و دم به ۸ سانتی‌متر می‌رسد (۹).

آنها در مناطق خلیج فارس (عمان، امارات متحده عربی و ایران)، اقیانوس هند (پاکستان، سری‌لانکا، هند و کرالا)، ویتنام، شمال دریای چین شمالی تا سواحل فوجیان و شان‌دونگ شاخه تایوان، ساحل شمالی استرالیا (تریتوری شمالی، کوئینسلند، غرب استرالیا)،

بدن آن کشیده و در قسمت قدامی آن استوانه‌ای شکل، گردن نامشخص، پولک‌های سر بزرگ و سوراخ بینی به سمت بالا متمایل است. پولک‌های بینی بهم متصل، پولک رسترال بزرگ و ارتفاع آن کمی بیش از پهنای آن است. پولک پیشانی از سومین پولک لب بالا مجزا، پولک‌های جلو چشمی، عقب چشمی و گیجگاهی منفرد و لب بالایی دارای ۵ یا ۶ پولک (سومین و چهارمین پولک آن به چشم متصل) هستند. دومین پولک لب بالایی به پولک جلو پیشانی متصل و لب پایین دارای ۶ تا ۷ پولک می‌باشند. چین قدامی و چین خلفی کوتاه و برابر، ناحیه گردن استوانه‌ای شکل، پوزه و سطوح جانبی بهم فشرده‌اند. پولک‌های سطح پشتی در ناحیه گردن ۱۷ تا ۱۹ ردیف و در ضخیم‌ترین قسمت بدن ۳۰ تا ۳۶ ردیف به طور طولی و چند ضلعی قرار دارند. پولک‌های سطح شکمی ۲۲۰ تا ۲۸۶ ردیف در قسمت قدامی بدن منفرد و در قسمت خلفی منقسم هستند. پولک‌های سطح پشتی در قسمت قدام بدن صاف، بلند و کمی برجسته و در قسمت خلفی بدن چند ضلعی و پهلوی هم قرار دارند و هر پولک دارای مرکزی برجسته است. قسمت قدامی بدن شامل تمام ناحیه سر و گلو به رنگ سیاه یا زیتونی تیره و در دو طرف گردن با خال‌های سفید یا زرد رنگ پریده یا با خال‌های عرضی روشن دیده می‌شوند. قسمت خلفی بدن زرد متمایل به سبز با خال‌های سفید یا خاکستری، گاهی سطح پشتی خاکستری یکنواخت و سطح جانبی و شکمی روشن دیده می‌شوند. نوزادان آنها دارای رنگی تیره با خال‌های روشن می‌باشند. حداکثر طول آنها ۱۰۲ سانتی‌متر و دم آنها ۹ سانتی‌متر بوده است (۹). آنها در خلیج فارس، سواحل هندوستان، چین، هنگ‌کنگ و احتمالاً سواحل استرالیا پراکنده‌اند (شکل ۷).

فیلیپین (پانای)، اقیانوس آرام (میانمار، تایلند، اندونزی، چین، ژاپن، گینه نو) و مالزی پراکنده شده‌اند



شکل ۸) مار دریایی شاو (*Lapemis curtus*) (تصویر بالا) و پراکندگی جغرافیایی آنها (تصویر پایین).

منبع: <http://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Hydrophis&species=curtus>

مواد و روش‌ها

این مطالعه که شامل دو بخش واضح، بخش اول: عمومی مشتمل بر اطلاعات عمومی در زمینه انواع مارها، طبقه‌بندی و خصوصیات آنها بر اساس الگوهای مختلف، با محوریت مارهای دریایی و به‌ویژه مارهای دریایی خلیج فارس، همراه با خصوصیات آناتومی، دستگاه زهری و پراکندگی جغرافیایی آنها می‌باشد که برای این منظور با جستجو در موتور جستجوی گوگل (google)، از منابع مقالات لاتین، وبگاه‌های

از دیگر نام‌های این مارهای دریایی را می‌توان هیدروفیس هاردویکی (*Hydrophis hardwickii*) (Gray، ۱۸۳۴)، هیدروس کورتوس شاو (۱۸۰۲)، هیپسیرینا هاردویکی (*Hydrus curtus* Shaw، ۱۸۳۴)، هیپسیرینا هاردویکی (*Hypsirhina hardwickii* Gray، ۱۸۳۴) و لاپمیس هاردویکی (*Lapemis hardwickii*، ۱۸۳۴)، Gray اشاره نمود.

"Hydrophis gracilis toxin" نتیجه‌ای در بر نداشت که با جستجوی تنها واژه "Hydrophis gracilis"، دو مطالعه که اولی در خصوص مشخصات فیلوژنیک مارهای دریایی و دومین نیز که دارای ارتباط با موضوع بود، با نتایج جستجوهای دیگر مشترک بود. برخی از مقالات در جستجوهای مختلف، مشترک بودند. از این میان، مطالعاتی که دارای ارتباط مستقیم به موضوع بودند، انتخاب و مورد بررسی قرار گرفتند.

بحث

زهر مار، یک منبع غنی و متنوع از پروتئین فعال دارویی و اجزای پپتیدی هستند (۲۴). برخی از این اجزاء، آنزیم و برخی نیز پروتئین‌های غیر آنزیمی یا پلی‌پپتیدی هستند. بسیاری از آنها همچون سلاح‌های تهاجمی، برای صید شکار به کار برده می‌شوند. تزریق زهر به طعمه، منجر به بی‌حرکتی، مرگ و پس از آن کمک به هضم غذا می‌گردد (۲۵). زهر، همچنین ممکن است برای مقاصد دفاعی، برای حفظ جانور از شکارچیان، استفاده شود (۲۶). مارهای دریایی در آب شور زندگی می‌کنند و زهر آنها ممکن است از مارهای زمینی متفاوت باشد. به دلیل مشکلات در به دست آوردن زهر مار دریایی، اطلاعات، در مورد مارها دریایی کاملاً ناقص است (۲۷).

توکسین‌های زهر مار دریایی پوزه‌دار (*Hydrophis schistosus*)

توکسین‌های سه انگشتی (3FTx)، فسفولیپاز A2، کریسپ (CRISP)، متالوپروتئاز زهر مار (SVMP) و L- آمینو اسید اکسیداز (LAAO) در سال ۲۰۱۵، پروتئوم زهر مار دریایی پوزه‌دار *Hydrophis schistosus* صید شده در آب‌های مالزی، با استفاده از HPLC فاز معکوس، SDS-PAGE و

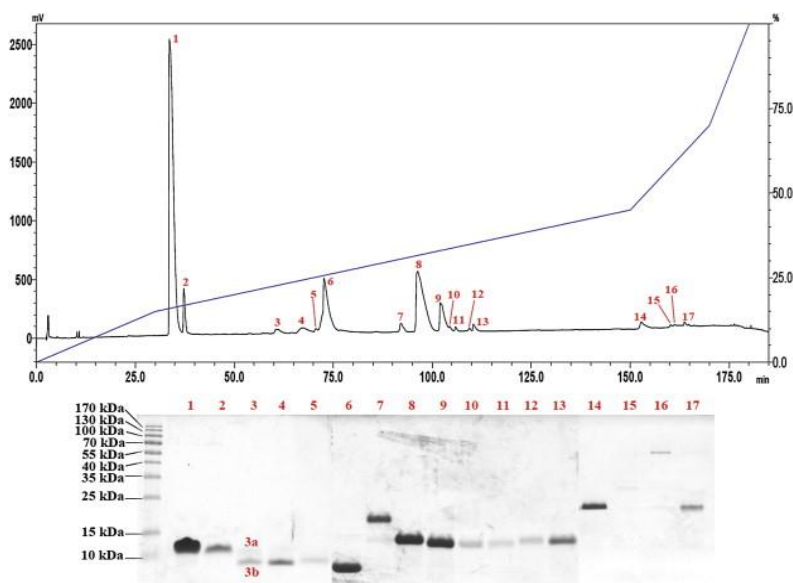
اختصاصی نظیر reptile-database و iucnredlist (به ویژه جهت تصاویر و پراکندگی جغرافیایی آنها) و همچنین کتب فارسی معتبر و محدود موجود، استفاده گردید. در بخش اختصاصی، به منظور بررسی توکسین‌های مارهای دریایی، در تاریخ ۲۰۱۶/۸/۱۰ در وبگاه "pubmed"، واژگان هیدروفیس شیسستوس توکسین "*Hydrophis schistosus toxin*" هیدروفیس سیانوسینکتوس توکسین "*Hydrophis cyanocinctus toxin*" هیدروفیس لاپموییدس توکسین "*Hydrophis lapemoides toxin*" هیدروفیس اسپیرالیس توکسین "*Hydrophis spiralis toxin*"، لاپمیس کورتوس توکسین "*Lapemis curtus toxin*" و همچنین واژه هیدروفیس گراسیلیس توکسین "*Hydrophis gracilis toxin*" به صورت مجزا، جستجو گردیدند و متن مقالات آن، از نظر ارتباط با موضوع و انتخاب مقالات مورد نظر، مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها

جستجوی واژگان هیدروفیس شیسستوس توکسین "*Hydrophis schistosus toxin*" هیدروفیس سیانوسینکتوس توکسین "*Hydrophis cyanocinctus toxin*" هیدروفیس لاپموییدس توکسین "*Hydrophis lapemoides toxin*" هیدروفیس اسپیرالیس توکسین "*Hydrophis spiralis toxin*" و همچنین، لاپمیس کورتوس توکسین "*toxin Lapemis curtus*" به ترتیب ۳۲، ۹، ۲، ۴ و ۴ نتیجه در بر داشتند. جستجوی واژه هیدروفیس گراسیلیس توکسین

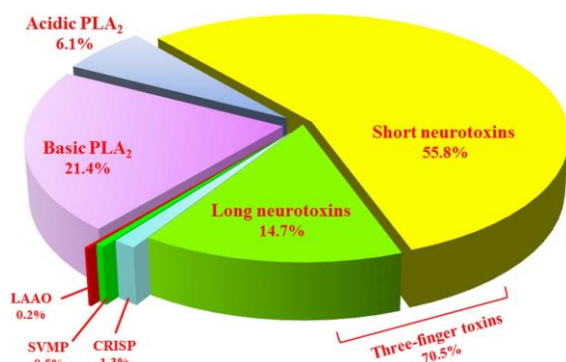
کروماتوگرافی مایع طیف سنجی جرمی
(high-resolution liquid chromatography-
tandem mass Spectrometry)، توسط تان (Tan) و
همکاران مورد بررسی قرار گرفت (۲۸).

آنالیز HPLC فاز معکوس، از زهر این مار دریایی، ۱۷
پیک را به همراه داشت. جرم‌های ملکولی آن، توسط
SDS-PAGE با ژل ۱۵ درصد، ارزیابی گردیدند
(شکل ۹).



شکل ۹) HPLC فاز معکوس با ستون C_{18} ، از ۲ میلی گرم زهر *Hydrophis schistosus*، در ۲۱۵ نانومتر (پانل بالای صفحه) و SDS-سپس PAGE ۱۵ درصد ژل پس جمع آوری فراکشن‌های زهر (پانل پایین).

ایزوفرم بازی (۲۱/۴ درصد) و سه اسیدی (۶/۱ درصد)
تشکیل یافته بودند. پروتئین‌های جزئی شامل یک
کریسپ (۱/۳ درصد)، دو متالوپروتئاز زهر مار (۰/۵
درصد) و یک LAAO (۰/۲ درصد) بودند (۲۸).



شکل ۱۰) توکسین‌های سه انگشتی (3FTx)، فسفولیپاز A2، کریسپ
(CRISP)، متالوپروتئاز زهر مار (SVMP) و L-آمینو اسید اکسیداز
(LAAO) مربوط به زهر مار دریایی پوزه‌دار
Hydrophis schistosus و سهم هر کدام در زهر.

پروتئین‌های مشاهده شده در باندهای SDS-PAGE، نیز
با استفاده از طیف سنجی جرمی با وضوح بالا شناسایی
گردیدند. این یافته‌ها حضور ۱۸ پروتئین ونوم را نشان
داد. این پروتئین‌ها متعلق به پنج خانواده توکسین‌ها،
شامل توکسین سه انگشتی (3FTx)، پروتئین ترش‌خی غنی
(toxin)، فسفولیپاز A2 (PLA2)، پروتئین ترش‌خی غنی
از سیستمین یا کریسپ (CRISP)، cysteine-rich secretory protein
متالوپروتئاز زهر مار (SVMP) و L-آمینو اسید اکسیداز (LAAO)،
بودند (شکل ۱۰) (۲۸).

توکسین سه انگشتی، حدود ۷۰/۵ درصد از کل پروتئین
زهر را تشکیل داده بود که آن هم خود شامل سه
نوروتوکسین کوتاه (۵۵/۸ درصد) و چهار نوروتوکسین
بلند (۱۴/۷ درصد) بود. خانواده PLA2 از چهار

جدول (۵)، دوز متوسط کشنده (LD₅₀) توکسین‌های عمده موجود در زهر *Hydrophis schistosus* تجویز شده از راه‌های داخل وریدی و زیرجلدی و بررسی مرگ و میر آنها تا ۴۸ ساعت پس از تزریق را نشان می‌دهد.

جدول (۵) دوز متوسط کشنده (LD₅₀) توکسین‌های عمده زهر *Hydrophis schistosus* تجویز شده از مسیرهای داخل وریدی و زیرجلدی (۴۸ ساعت از تزریق) (میکروگرم بر گرم)

فراکشن	توکسین	LD ₅₀ تزریق وریدی	LD ₅₀ تزریق زیرجلدی
۱F	نروتوکسین کوتاه	۰/۰۷	۰/۰۷
۲F	نروتوکسین کوتاه	۰/۰۹	۰/۰۹
۶F	نروتوکسین بلند	۰/۱۸	۰/۲۸
۸F	فسفولیپاز A2 بازی	۰/۰۸	۰/۶۳
۹F	فسفولیپاز A2 اسیدی	کمتر از ۱/۲۰	کمتر از ۱/۲۰

می‌شود) و مار دریایی شاو (*Lapemis curtus*) مالزی و سپس مقایسه آن با زهر کالوسلازما رودوستوما (*Calloselasma rhodostoma*) و ناجا کاوتیا (*Naja kaouthia*) و بررسی اثر بالقوه خنثی‌سازی آنتی‌ونوم‌های ضد مار کبری در برابر زهر مارهای دریایی *H. schistosus* و *H. curtus* مالزیایی پرداختند. نتایج مطالعه آنها نشان داد که هر چهار مار دریایی دارای قدرت مرگ‌آوری بسیار قوی در موش‌ها ایجاد نمودند (جدول ۶) (۳۳).

جدول ۶) مقایسه دوز مهلک میانی (LD₅₀) به دست آمده از راه‌های تجویز مختلف در موش، مربوط به چهار مار دریایی

LD 50 s.c.	LD 50 i.m.	LD 50 i.v.	ونوم (میکروگرم بر گرم)
۰/۰۹	۰/۱۰	۰/۰۷	<i>Hydrophis schistosus</i> مالزیایی
۰/۱۸	۰/۱۸	۰/۱۱	<i>Hydrophis curtus</i> مالزیایی
-	-	۰/۱۰	<i>Laticauda laticaudata</i>
-	-	۰/۲۲	<i>Laticauda semifasciata</i>

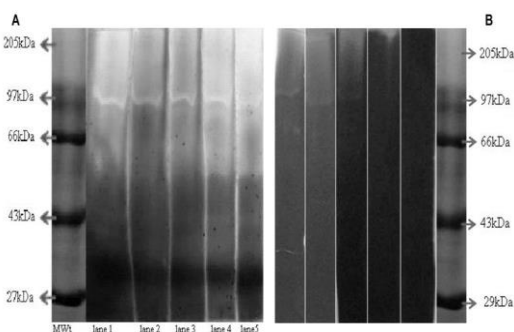
فعالیت‌های ژلاتینازی و کازئینازی زهر *E. schistosus*

داموتران (Damotharan) و همکاران، در سال ۲۰۱۵ (۳۴)، به جداسازی و شناسایی پروتئین زهر فعال بیولوژیکی و بیوشیمیایی از مار دریایی

گزارش پروتئوم ونوم مار دریایی شکم زرد *P. platura* توسط لومونت (Lomonte) و همکاران در سال ۲۰۱۴، مبنی بر پیچیدگی بیشتر پروتئوم گزارش شده نسبت به این مطالعه بود. زهر *P. platura* دارای مقدار بیشتر کریسپ (۹/۱ درصد) در مقایسه با مقدار آن در مطالعه تان و همکاران (۱/۳ درصد) بود. علاوه بر این، مقداری ۵- نوکلئوتیداز (5'-nucleotidase) و همچنین برخی پروتئین‌های غیرتوکسینی (۲/۱-۰/۸ درصد) و ناشناس در پروتئوم زهر *P. platura* وجود داشتند که در زهر *H. schistosus* شناسایی نشد (۲۹). در آنالیز این ونوم، هیچ ترکیب سیتوتوکسیک یا کاردیوتوکسیکی در پروتئوم زهر دیده نشد. عدم مشاهده کلون سیتوتوکسین در زهر غده مربوط به دیگر مارهای دریایی چون *Aipysurus eydouxii* نیز صدق می‌کند (۳۰-۳۲).

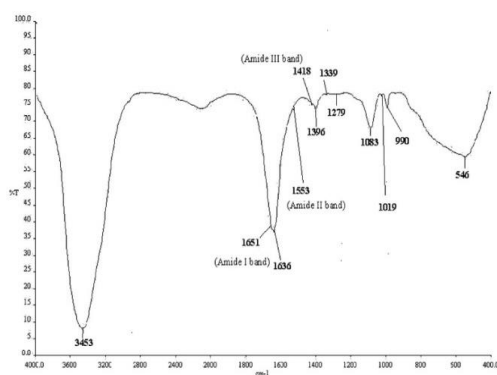
قدرت سمیت ونوم‌های چند مار دریایی مالزیایی تان و همکاران (۳۳)، به بررسی برخی خصوصیات ونوم‌های مار دریایی پوزه‌دار (*Hydrophis schistosus*) که در مالزی، به نام مار دریایی نوک نهنگی شناخته

پروتئین زهر خالص سازی شده، با یک LC50 برابر ۲/۰ میکروگرم بر میلی لیتر، فعالیت های آنزیمی و هیدرولیز ژلاتین (در pH بهینه ۵-۹) و کازئین را از خود نشان داد. (شکل ۱۳).



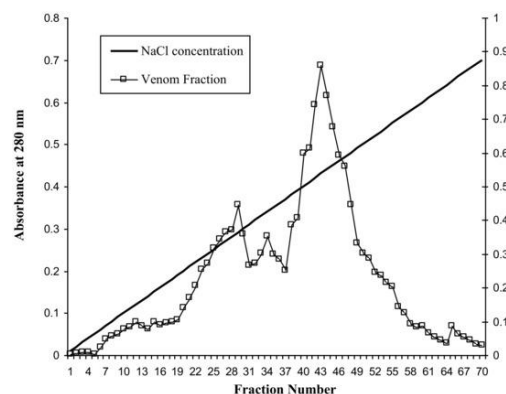
شکل ۱۳) فعالیت های ژلاتینولیتیک (A) و کازئینولیتیک (B) زهر *E. schistose*.

به نقل از نویسندگان این مطالعه، این بخش کم وزن مولکولی پروتئین زهر می تواند بالقوه در خدمت جنبه های بیولوژیکی و دارویی، قرار گیرد. شکل (۱۴) طیف FT-IR زهر خالص سازی شده و وجود سه باند آمیدی را در طیف مربوطه، نشان می دهد (۳۴).



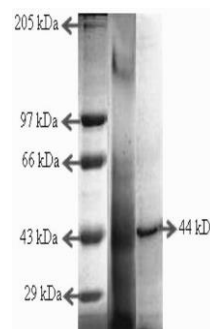
شکل ۱۴) طیف FT-IR زهر خالص سازی شده *E. schistose*.

Enhydrina schistose پرداختند. خالص سازی زهر *E. schistosa* در ستون DEAE- سلولز در تعادل با بافر فسفات ۰/۰۱ مولار انجام پذیرفت و جذب فراکشن های زهر خام جمع آوری شده و غلظت پروتئین آنها در طول موج ۲۸۰ نانومتر به دست آمد. بلندترین پیک خالص سازی شده توسط کروماتوگرافی تبادل یونی، مربوط به فراکشن های ۳۹-۴۹ بود (شکل ۱۱) (۳۴).



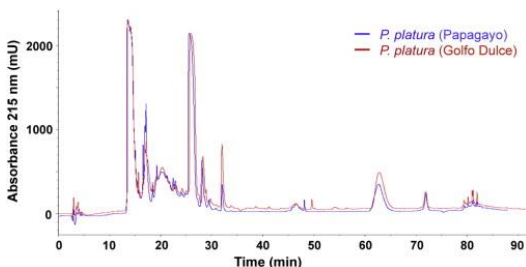
شکل ۱۱) خالص سازی زهر *E. schistosa* در ستون DEAE- سلولز. زهر خام در ستون (۱۶×۱/۵ سانتی متری) در تعادل با بافر فسفات ۰/۰۱ M (pH: ۶/۴) و یک گرادیان خطی از ۰/۵-۰/۰ مولار NaCl در بافر مشابه (حجم کل ۳۰۰ میلی لیتر) استفاده شد. چهار میلی لیتر به میزان مساوی جمع آوری شدند. خطوط کامل و شکسته، به ترتیب جذب مربوط به این فراکشن ها و پروتئین را در طول موج ۲۸۰ نانومتر نشان می دهد.

در مرحله نهایی خالص سازی، در هشتاد درصد خلوص، یک تک باند پروتئینی در حدود ۴۴ کیلو دالتون، تحت شرایط کاهشی بر روی ژل SDS- پلی آکریل آمید، مشاهده شد (شکل ۱۲).



شکل ۱۲) آنالیز SDS-PAGE زهر *E. schistosa* (لاین ۱: نشانگر وزن مولکولی؛ لاین ۲: زهر خام؛ و لاین ۳: زهر خالص).

جمعیت، تفاوت قابل توجهی در بیان پروتئین زهر، دیده نشد (۲۹)،

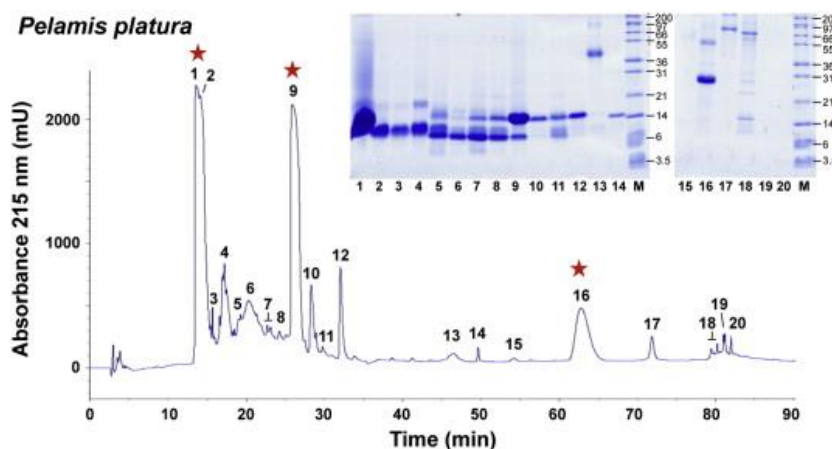


شکل ۱۵) مقایسه کروماتوگرام‌های مربوط به ونوم‌های پروتئینی نمونه‌های جمع‌آوری شده مار دریایی شکم‌زرد (*Pelamis platyura*)، در دو منطقه کاستاریکا (خلیج پاپاگایو و خلیج دولک)، با HPLC فاز معکوس در یک ستون C₁₈

به علاوه، فراکشن‌های زهر، توسط SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت و پروتئین‌های هضم تریپسینی شده، توسط nESI-MS/MS یا MALDI-TOF-TOF مشخص گردیدند (شکل ۱۶) (۲۹).

پلامیتوکسین و دیگر اجزاء اصلی زهر مار دریایی شکم‌زرد (*P. platyura*)

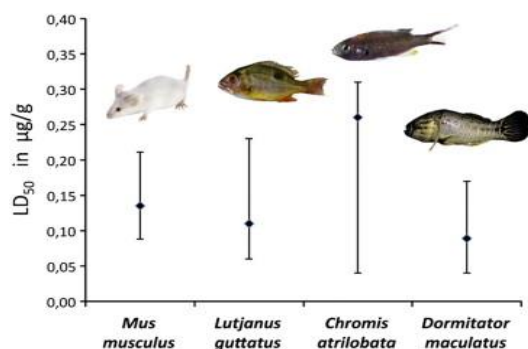
مار دریایی شکم‌زرد (*Pelamis platyura*)، از نظر جغرافیایی دارای توزیع گسترده‌ای است. با وجود اینکه دارای یک ونوم بسیار کشنده است، آنالیز پروتئوم ترکیب توکسین آن تا قبل از مطالعه لومونت و همکاران در دسترس نبوده است. در مطالعه لومونت و همکاران در سال ۲۰۱۴ (۲۹)، ونوم‌های نمونه‌های جمع‌آوری شده مار دریایی شکم‌زرد (*Pelamis platyura*)، در دو منطقه کاستاریکا (خلیج پاپاگایو و خلیج دولک) با شکل و رنگ متمایز، از نظر کروماتوگرافی مورد مقایسه و بررسی قرار گرفته شدند. آنالیز RP-HPLC پروفایل زهر پروتئین هر دو جانور، با وجود فنوتیپ رنگ متفاوت دارای شباهت زیادی بودند. همان‌طور که در شکل (۱۵) نشان داده شده است، مقایسه پروفایل RP-HPLC فنوتیپ خود را حفظ نموده و تغییر الگوی رنگ متمایز بین این دو



شکل ۱۶) پروفایل شویی پروتئین ونوم مار دریایی شکم‌زرد *Pelamis platyura* (خلیج Dulce) به روش HPLC فاز معکوس بر روی یک ستون C₁₈ (۲۵×۴/۶ میلی‌متر) شستشو با یک گرادیان استونیتریل حاوی ۰/۱ درصد تری‌فلوروآستیک اسید. فراکشن‌های زهر روش SDS-PAGE در ژل ۱۲ درصد و رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو R-۲۵۰ مورد بررسی قرار گرفت (بالای شکل). نشانگر وزن مولکولی (M)، در سمت راست. پروتئین‌های هضم تریپسینی شده، توسط nESI-MS/MS یا MALDI-TOF-TOF مشخص شد. سه پیک زهر، با فراوان‌ترین مقدار، با ستاره نشان داده شده است.

مشخصات کروماتوگرافی زهر *Platura Pelamis* نسبتاً ساده به نظر می‌رسد (شکل ۱۷) و شباهت زیادی به زهر الایده‌های زمینی مانند کبرا برای آفریقایی (۳۵) و برخی مار مرجانی نظیر میکروروس آلتروستریس (*Micurus altirostris*) و میکروروس کورالینس (*M. corallines*) (۳۶) و میکروروس میپارتیتوس (*Micurus mipartitus*) (۳۷) و یا الایده دریایی هیدروفیس (*Hydrophis cyanocinctus*) (۳۸) دارد.

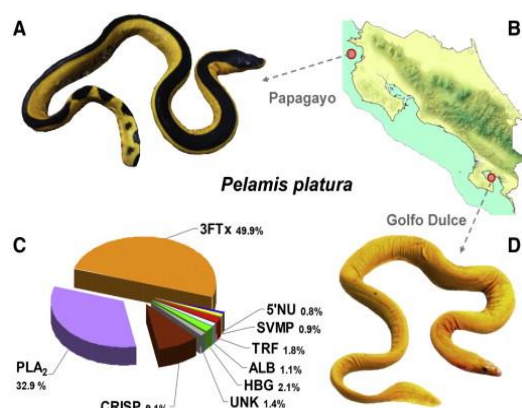
از نظر قدرت مرگ‌آوری، با وجودی که پلامیتوکسین، در موش، بسیار مهلک بود، هیچ‌کدام از فراکشن‌های PLA2 و CRISP موجب مرگ نگردیدند. آنزیم PLA2 پس از تزریق عضلانی به سرعت موجب افزایش فعالیت کراتین کیناز پلازما و فعالیت میوتوکسیک آن گردید. فعالیت میوتوکسیک PLA2 در آنها متفاوت از مکانیزم عمل PLA2 و پیریدها است. دوزهای کشنده میانی (LD50) زهر خام برای *P. platyura* در موش و در سه گونه ماهی، تفاوت معنی‌داری نداشتند (شکل ۱۸) (۲۹).



شکل ۱۸: دوزهای کشنده میانی (LD50) زهر خام برای *P. platyura* در موش و در سه گونه ماهی.

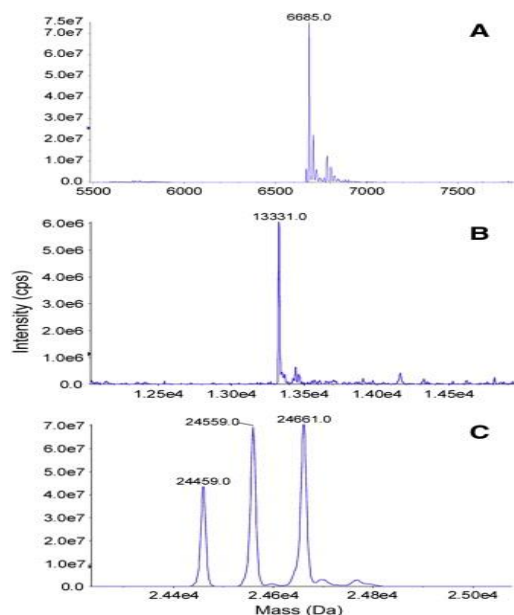
جرم‌های مولکولی متوسط سه جزء اصلی زهر مار دریایی شکم زرد (A: پیک‌های ۱-۲، 3FTx؛ B: پیک ۹،

همچون روند مشاهده شده در زهر دیگر مارهای دریایی، *P. platyura*، نسبتاً ساده بوده و از پروتئین‌های توکسین سه انگشتی (3FTx)، فسفولیپاز A2 (PLA2)، پروتئین ترش‌خی غنی از سیستئین (کریسپ)، ۵'-نوکلئوتیداز و خانواده متالوپروتئیناز تشکیل شده بود. سه گروه اول مذکور به ترتیب، دارای مقادیر ۴۹/۹، ۳۲/۹، ۹/۱ درصد از پروتئین زهر کل بودند. فراوان‌ترین جزء آنها (~۲۶ درصد) مربوط به پلامیتوکسین ((pelamitoxin (P62388)، یک 3FTx کوتاه زنجیر و یک PLA2 بازی (~۲۰ درصد) و یک گروه از سه ایزوفرم کریسپ (~۹ درصد) بودند (شکل ۱۷). پلامیتوکسین با اتصال به گیرنده‌های استیل کولینی نیکوتینی عضله (nAChR) و جلوگیری از اتصال استیل کولین به گیرنده، موجب اختلال در انتقال عصبی-عضلانی می‌گردد (۲۹).



شکل ۱۷: دو واژک رنگ *Pelamis platyura* (A، C) از ریشه‌های جغرافیایی مختلف در کاستاریکا (خلیج پاپاگایو و خلیج دولک) (B)، تفاوت چندانی در پروفایل پروتئین زهر دیده نمی‌شود. فراوانی نسبی پروتئین زهر به عنوان درصدی از کل محتوای پروتئین در (C) نشان داده شده است. 3FTx: توکسین‌های سه انگشتی، PLA2: آنزیم فسفولیپاز A2؛ CRISP: پروتئین ترش‌خی غنی از سیستئین؛ ۵'-NU: ۵'-نوکلئوتیداز؛ SVMP: متالوپروتئینازهای زهر مار؛ TRF: ترانسفرین؛ ALB: آلبومین؛ HBG: هموگلوبین؛ UNK: ناشناخته.

PLA2؛ C: پیک ۱۶، CRISP) با تزریق مستقیم به nESI-MS به دست آمدند (شکل ۱۹) (۲۹).



شکل ۱۹) جرم‌های مولکولی متوسط از سه جزء اصلی زهر مار دریایی شکم‌زرد (A: پیک‌های ۲-۱، 3FTx؛ B: پیک ۹، PLA2؛ C: پیک ۱۶، CRISP)، با تزریق مستقیم به nESI-MS در یک نرم‌افزار (ABSciex) QTrap3200 به دست آمدند.

میوپاتی و رابدومیولیز ناشی از تلقیح زهر *E. schistosa*

مارهای دریایی ساکن آب‌های گرمسیری اقیانوس هند و اقیانوس آرام، بسیار سمی هستند. گونه‌های مار دریایی *Enhydrina schistosa* در آب‌های ساحلی، تالاب‌ها، دهانه رودخانه و مصب خلیج فارس از طریق سریلانکا و تا جنوب شرقی آسیا زندگی می‌کنند. این مار به عنوان یکی از مهاجم‌ترین مارهای دریایی در سریلانکا است که ماهیگیران و مردم را در معرض خطر قرار می‌دهد. در سه مورد گزارش مختلف به ثبت رسیده توسط کولاراتنه (Kularatne) و همکاران در سال ۲۰۱۴ (۳۹)، سه قربانی با درجات مختلفی از شدت تلقیح زهر *E. schistosa* به دو بیمارستان در ساحل غرب سریلانکا مراجعه نمودند. اولین بیمار، یک ماهیگیر ۲۶ ساله بود که درد عضلانی شدید با سطح کراتین کیناز بسیار بالا (CK) بود. بیمار دوم یک ماهیگیر ۳۲ ساله با میوگلوبینوری، سطح CK بالا و هایپرکالمی داشت. هر دو بیمار بهبود یافته، در ثبت الکترومیوگرافی خود ویژگی‌های میوپاتی را نشان دادند (شکل ۲۰) (۳۹).

شکل (۲۱)، الکترومیوگرافی (EMG) فرد میوپاتیک مذکور را نشان می‌دهد.

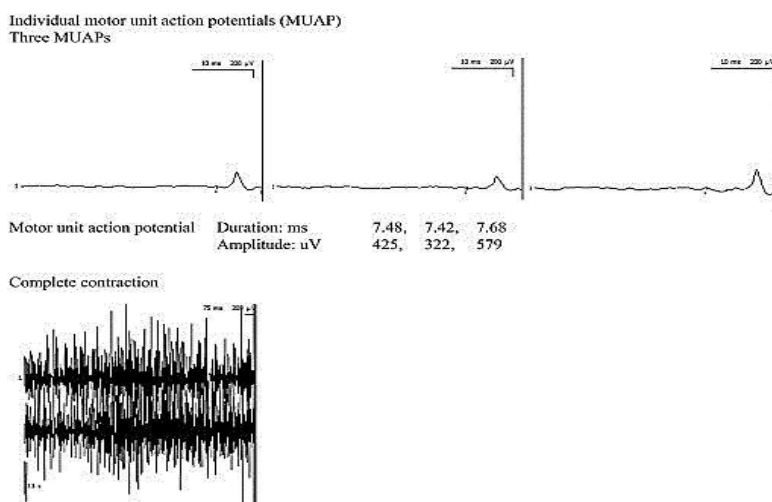
(ب)



(الف)



شکل ۲۰) الف: فک باز در قربانی ناشی از تلقیح زهر *E. schistosa* با خصوصیات میوپاتیک ب: ادرار قرمز تیره ناشی از شدت تلقیح زهر *E. schistosa* در ماهیگیر ۳۲ ساله سریلانکایی.



شکل (۲۱) ثبت الکترومیوگرافی نشان دهنده MUAPs کوتاه مدت دامنه کم با الگوی اولیه کامل سازگار با اختلال میوپاتیک، ناشی از شدت تلقیح زهر *E. schistose*

بیمار سوم، یک مرد ۴۱ ساله بود که توسط یک مار دریایی در دهانه رودخانه گام مورد گزش قرار گرفت. درد شدید عضلانی، هفت ساعت پس از گزش و پس از آن رابدومیولیز شدید دیده شد و قربانی پس از سه روز، به علت ضایعه‌های قلبی درگذشت. این مشاهدات، مؤید این است که *E. schistosa*، یک مار دریایی کشنده بوده و گزش با آن موجب رابدومیولیز شدید می‌گردد (۳۹). در یک مطالعه، دو پروتئین به وجود آورنده میوگلوبینوریا در موش، از زهر مار الایده استرالیایی *Pseudechis colletti* مورد شناسایی قرار گرفتند که از نظر ترکیب‌های اسید آمینه، شباهت بسیار زیادی با آنزیم‌های فسفولیپاز A و با عمل مشابه به ونوم مار دریایی پوزه‌دار (*Enhydrina schistosa*) از خود نشان دادند (۴۰).

زهرهای نروتوکسیک چند مار دریایی و پاسخ‌های انقباضی آنها به استیل کولین
چتی (Chetty) و همکاران در ۲۰۰۴ (۴۱)، نروتوکسیستی زهر چند مار دریایی انهیدرینا شیتوس (*Enhydrina schistose*) لاپمیس کورتوس

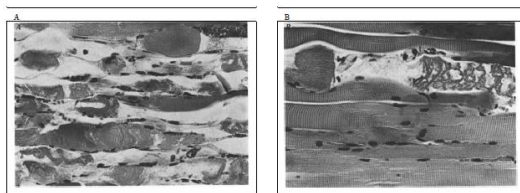
(*Lapemis curtus*)، لاتیکودا کلورینا (*Laticauda colubrina*)، آپیسوروس لایویس (*Aipysurus laevis*)، آپیسوروس فوسکوس (*Aipysurus fuscus*) و آپیسوروس فولیوسکواماتوس (*Aipysurus foliosquamatus*) را در محدوده‌های جغرافیایی ویا و مالزی مورد بررسی قرار دادند. زهر مار ببری زمینی نوتکیس اسکوتاتوس (*Notechis scutatus*) نیز به عنوان مرجع در نظر گرفته شد. زهر تمام این مارها در دوزهای ۱ و ۳ میکروگرم بر میلی‌گرم، موجب مهار انقباض غیرمستقیم عضله بیونتر سرویسیس (*biventer cervicis*) جوجه گردیدند. بدین منظور، مدت زمان ایجاد نود درصد مهار طول توئیچینگ عضله محاسبه گردیدند. زهر همه مارهای دریایی، در غلظت یک میکروگرم/ میلی‌لیتر، به طور قابل توجهی قوی‌تر از زهر *N. scutatus* بودند. پاسخ‌های انقباضی به استیل کولین و کارباکول (CCh) و نه به KCL اگزورژن، به طور قابل توجهی توسط ونوم همه مارهای دریایی و همچنین *N. scutatus* مهار گردیدند (شکل ۲۲).

این داده‌ها، فعالیت عصبی پس سیناپسی قوی زهر مار دریایی را تأیید می‌نماید. در واقع، این توکسین‌ها، حتی بر روی اتصالات عصبی عضلانی اسکلتی، بسیار قوی‌تر از مارهای زمینی هستند.

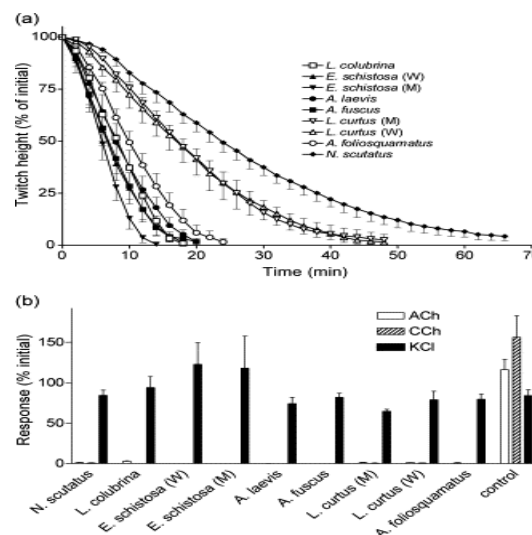
سمیت‌های عصبی و عضلانی زهر مار دریایی پوزه‌دار (*Enhydrina schistosa*)

فعالیت‌های فسفولپازی A2 زهر مار دریایی پوزه‌دار (*Enhydrina schistosa*) به صورت داخل وریدی و یا داخل عضلانی به موش و اثرات آن بر پاسخ‌های انقباضی و انتقالات عصبی-عضلانی در عضله سولئوس (عضله کند انقباضی) و لونگوس اکستانسور انگشتان (e.d.l: عضله تند انقباضی)، خصوصیات مورفولوژیکی عضلات و نیز هیستوشیمی آنزیم، توسط بروک (Brook) و همکاران، مورد مطالعه قرار گرفتند (۴۲).

تلقیح زهر، یک کاهش سریع و غیر قابل برگشت در پتانسیل استراحت غشاء فیبرهای عضلانی عضلات سولئوس و با تأثیر بسیار کمتری بر e.d.l، پس از پاسخ به تحریک مستقیم یا غیرمستقیم به وجود آوردند. رهاسازی خود به خودی و برانگیختگی قابل ملاحظه ناقل، تقریباً در تمام پایانه صفحات (end-plates)، دیده شدند. هیچ کاهش آشکاری در حساسیت غشاء پس سیناپسی مشاهده نگردید. بیشتر فیبرهای عضلانی عضلات سولئوس و حدود ۵۰ درصد از e.d.l، نکروزه شدند (شکل ۲۳).



شکل ۲۳) تصویر بخش‌هایی از سولئوس (A) و e.d.l (B) در ۲۴ ساعت پس از تزریق i.v. فسفولپاز A2 در سولئوس همه فیبرها نکروزه شده‌اند در e.d.l فقط یک فیبر نکروزه دیده می‌شود.



شکل ۲۲) اثر ونوم‌ها (۳ میکروگرم بر لیتر) روی (a); تویچ‌های واسطه‌ای غیرمستقیم در نمونه‌های عصب-عضله بیونتر سرویسس (biventer cervicis) جوجه و (b): پاسخ‌ها به استیل کولین (ACh)، کارباکول (CCh) و پتاسیم کلرید (KCl). مهار قابل توجه پاسخ‌های انقباضی به استیل کولین و کارباکول (و نه به پتاسیم کلرید اگزوزن)، به‌طور متوسط ونوم همه مارهای دریایی و مار *N. scutatus*.

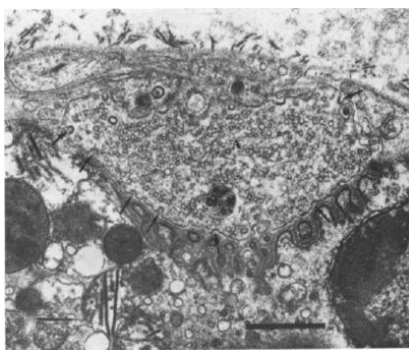
در غلظت‌های یک میلی‌مولار و ۲۰ میکرومولار، به ترتیب پاسخ قابل توجهی به مهار استیل کولین و کارباکول (CCh) نشان دادند که نشان دهنده حضور پس سیناپسی توکسین‌ها بود (جدول ۷) (۴۱).

جدول ۷) مقادیر T_{90} (دقیقه) ونوم‌های مارهای دریایی.

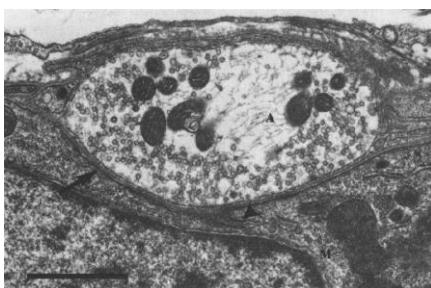
اختلاف‌ها نسبت به مقدار مار زمینی *N. scutatus* مقایسه

گردیده است ($P < 0.05$)

زهر مار		غلظت (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
۱	۳	
<i>E. schistosa</i> (مالزی)	۳۱/۲	۱۰/۵
<i>A. fuscus</i>	۳۳/۱	۱۳
<i>E. schistosa</i> (ویپا)	۳۹/۹	۱۳/۱
<i>L. colubrina</i>	۴۴/۵	۱۴/۶
<i>A. laevis</i>	۴۴	۱۵/۵
<i>A. foliosquamatus</i>	۲۷/۵	۱۸
<i>L. curtus</i> (ویپا)	۶۴/۹	۳۳/۵
<i>L. curtus</i> (مالزی)	۴۵/۴	۳۶/۵
<i>N. scutatus</i>	۱۴۴/۳	۵۳/۲



شکل ۲۵) تصویر یک پایانه آکسونی توسط میکروگراف الکترون (A) در سولئوس ۳ ساعت پس از تزریق i.v. فسفولیپاز A2، تعدادی آثار امگا شکل در غشای آکسولما دیده می‌شوند. فیبر عضله به شدت بهم‌ریخته است.

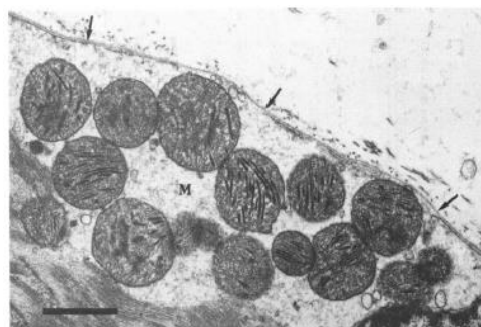


شکل ۲۶) اتصالات عصبی عضلانی در سولئوس یک ماه پس از تزریق داخل عضلانی فسفولیپاز A2. پایانه آکسونی (A) نرمال و فیبر عضله (M) ترمیم یافته بود. غشای پس سیناپسی (فلش) غیر معمولی بود و فقط یک تک چین‌های کوتاه دیده شدند. (نوک پیکان).

فسفولیپازهای اسیدی زهر مار دریایی (*Enhydrina schistosa*)

دو آنزیم فسفولیپاز اسیدی از زهر مار دریایی (*Enhydrina schistosa*) با استفاده از ژل‌های کروماتوگرافی در سفادکس G-۷۵ و تبادل یونی Bio-Rex 70 و سپس تکرار با کروماتوگرافی تبادل یونی DEAE- سفادکس A-25، خالص‌سازی شده و دو ترکیب همگن به دست آمده با الکتروفورز ژل پلی‌آکرلامید و کروماتوگرافی تبادل یونی نشان داده شدند. مشخص گردید که آنزیم باید برای دو موقعیت لستین زرده تخم مرغ، اختصاصی باشد. وزن مولکولی هر دو آنزیم تعیین شده توسط کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و الکتروفورز ژل SDS- پلی‌آکرلامید،

همچنین، هیستوشیمی فیبرهای نوع ۱ و A ۲ تحت تأثیر قرار گرفتند. مشاهدات میکروسکوپی الکترونی نشان داد که در فاز حاد (تا ۲۴ ساعت)، ضایعات پلاسمالمایی و بهم ریختگی شدید ساختار داخلی فیبرهای عضلانی وجود دارد (شکل ۲۴).



شکل ۲۴) میکروگراف الکترون فیبرهای عضله سولئوس ۱۵-۳۰ دقیقه پس از تزریق i.v. فسفولیپاز A2. فیبر عضله (M) به شدت بهم‌ریخته است و میتوکندری آن ملتهب و نرم و همچنین ضایعات پلاسمالمایی (فلش) دیده می‌شوند.

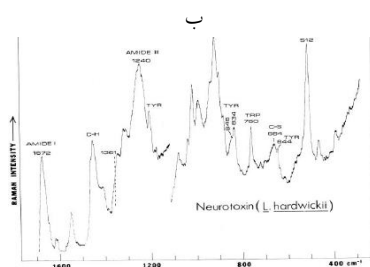
در مقابل، پایانه‌های عصبی موتور چون آکسون‌های میلین‌دار در اعصاب عضلانی دست نخورده باقی مانده بودند. یک افزایش گذرا در تعداد پروفایل‌های امگا شکل در آکسولما و وزیکول پوشش داده شده در پایانه‌های عصبی در طی ۱-۳ ساعت دیده شد، اما پس از ۲۴ ساعت، پایانه‌های عصبی موتور، به صورت طبیعی، ظاهر شدند. چین‌های پس سیناپسی در پایانه‌های عصبی موتور، در عضله بازسازی شده، از نظر عمق و تعداد، کاهش قابل توجهی نشان دادند (شکل ۲۵).

در بسیاری از اتصالات عصبی عضلانی مورد مطالعه، در طول یک تا چهار ماه پس از دژنراسیون عضلانی ناشی از PLA2 موضعی، چین‌های پس سیناپسی غشای سارکولمایی از نظر تعداد و عمق در مقابل پایانه‌های طبیعی، کاهش یافته بودند (شکل ۲۶).

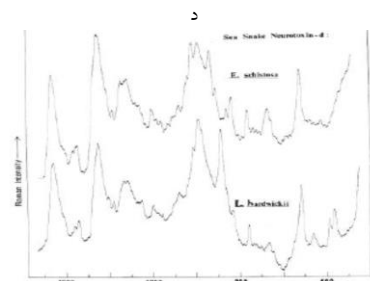
انهیدروتوکسین a، مشابه به مقادیر گزارش شده پیشین، مربوط به توکسین‌های انهیدرا (Enhydrina) می‌باشد (۴۴).

نوروتوکسین‌های زهر مارهای دریایی *Enhydrina schistosa* و *Lapemis hardwickii*

ونوم‌های خانواده هیدروفیده حاوی نوروتوکسین‌های قوی هستند که در اتصالات عصب-عضله، با گیرنده استیل کولین پیوند برقرار می‌کنند. توکسین عمده زهر مارهای دریایی *Lapemis hardwickii* و *Enhydrina schistosa* قبلاً جداسازی و گزارش گردیده بود. این توکسین‌های خالص، توسط طیف سنجی رامان لیزر، جهت روشن شدن ارتباط ساختاری و عملکردی نوروتوکسین، مورد مطالعه قرار گرفتند. طیف‌های مربوط به پودر، محلول آبی، و مشتقات دوتریومی هر توکسین به دست آمدند (شکل ۲۷) (۴۵).



طیف رامان نوروتوکسین خالص جدا شده از زهر پودری *Lapemis hardwickii*



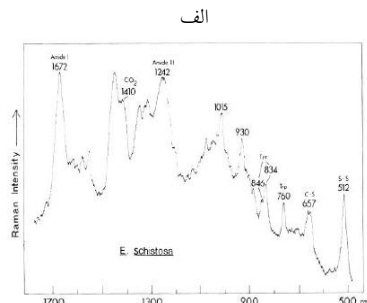
طیف رامان توکسین‌ها پس از تغییر دوتریوم (نمونه پودری در DzO صد درصد.

حدود ۱۴۰۰۰ بود. داده‌های ترکیب آمینواسیدی، نشان دهنده محتوای بالایی از اسپارٹیک اسید، گلوسین و آلانین در هر دو آنزیم بود (۴۳).

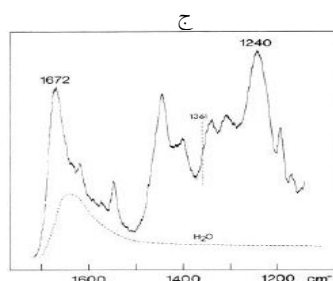
انهیدروتوکسین‌های (enhydrottoxins) ونوم مار *Enhydrina schistosa* دریایی

گوید و گایتوند (Gawade & Gaitonde)، سه ترکیب نوروتوکسیک، معروف به انیدروتوکسین‌های A، B و C را از ونوم مار دریایی *Enhydrina schistosa* جداسازی نمودند (۴۴). دوز میانی مهلک داخل وریدی آنها (LD50 i.v)، در موش به ترتیب ۰/۰۴۲، ۰/۰۴۵ و ۰/۰۵۲ میلی‌گرم/کیلوگرم بود.

هر سه توکسین، به صورت برگشت‌ناپذیر، موجب مهار انتقال عصبی-عضلانی شدند. لغو پاسخ به استیل کولین، نشان دهنده یک جایگاه عمل پس‌سیناپسی این توکسین‌ها است. وزن مولکولی و ترکیب اسید آمینه



طیف رامان نوروتوکسین خالص جدا شده از زهر پودری *Enhydrina schistosa*



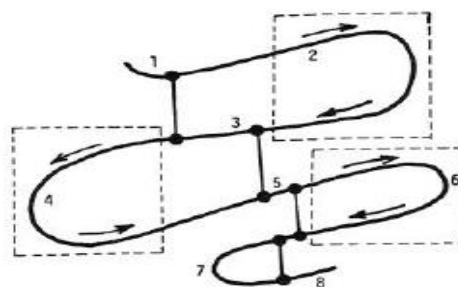
طیف رامان نوروتوکسین خالص جدا شده از زهر *Lapemis hardwickii* در محلول آبی در pH 7

شکل ۲۷) طیف رامان نوروتوکسین خالص جدا شده از زهرهای پودری الف: *Enhydrina schistosa* ب: *Lapemis hardwickii* ج: طیف رامان

نوروتوکسین خالص جدا شده از زهر *Lapemis hardwickii* در محلول آبی در pH 7 د: طیف رامان توکسین‌ها پس از تغییر دوتریوم (نمونه پودری در

DzO صد درصد.

به نظر می‌رسد که ترکیب ساختاری پپتید این نوروئوکسین‌ها، به صورت "پیکربندی بتا غیرموازی"، به صورت باندهای آمیدی مجزای I و III، به ترتیب در طول موج‌های ۱۶۷۲ و ۱۲۴۰ (cm^{-1})، ظاهر گردند (شکل ۲۸).



شکل ۲۸) ساختار دو بعدی نوروئوکسین تپ یک، نشان دهنده یک پیکربندی غیرموازی پپتید.

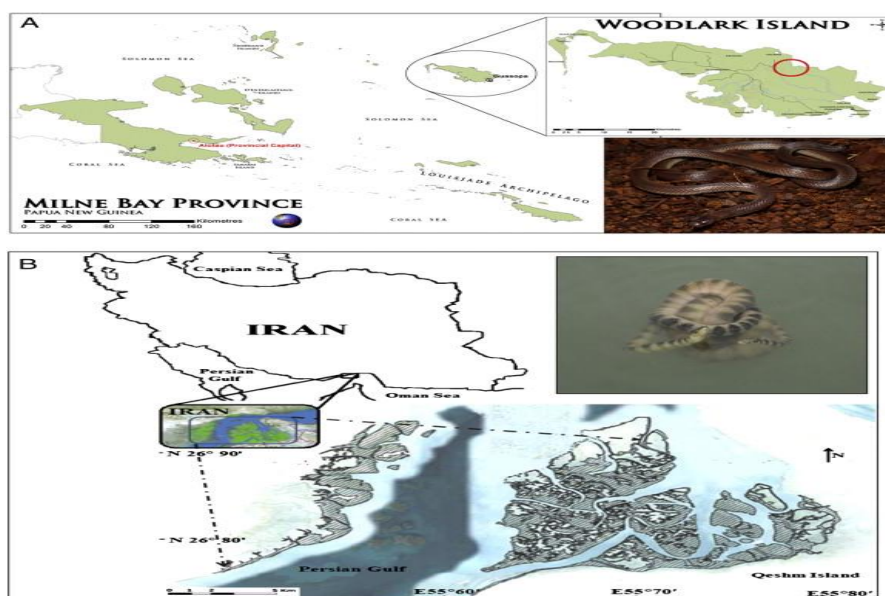
هیچ نشانه‌ای از ساختار مارپیچی آلفا در نوروئوکسین، در باندهای آمیدی I و III مشاهده نگردید. پیک‌ها به دلیل یک باقی مانده تیروزین در (cm^{-1}) ۶۴۴، ۸۳۴ و ۸۴۶ ظاهر شدند. نسبت‌های شدت توکسین زهر *L. hardwickii*، در این طول موج‌ها به ترتیب ۰/۹۲، ۱/۰، ۰/۸۴ بودند. این مانده تیروزین است که در برخی از فعل و انفعالات درون مولکولی غیر معمول درگیر بوده و به راحتی برای مولکول‌های آب، در دسترس نیست. همین نتیجه، برای توکسین *Enhydrina schistosa* به دست آمد. واقعیت این است که تنها ۵۰ درصد از مولکول تیروزین اصلاح شده توسط نیتراسیون، در توافق کامل با نتیجه لیزر رامان می‌باشد. فقدان یک خط رامان تیز در cm^{-1} ۱۳۶۱، ممکن است نشان دهنده بقایای تنها تریپتوفان، در معرض قرار گرفته باشد.

یک پیک دی سولفیدی نسبتاً متقارن در ۵۱۲ (cm^{-1})، نشان دهنده یکسان بودن رابطه هندسی

C-C-S-S-C-C تقریباً برای هر چهار پیوند دی سولفید در مولکول است. در طیف رامان لیزر و آنالیز اسید آمینه عدم وجود فنیل آلانین، به دلیل فقدان پیک آن مشخص گردید. آمینواسیدهای موجود در زهرها شامل لیزین، هیستیدین، آرژنین، اسپارتیک اسید، ترئونین، سرین، گلوتامیک اسید، پرولین، گلیسین، آلانین، والین، متیونین، ایزولوسین، لوسین، تیروزین، نیمه سیستین و تریپتوفان، ولی با مقادیر متفاوت در برخی از آمینواسیدها بودند (۴۵).

زهر مارهای دریایی *Hydrophis cyanocinctus* خلیج فارس

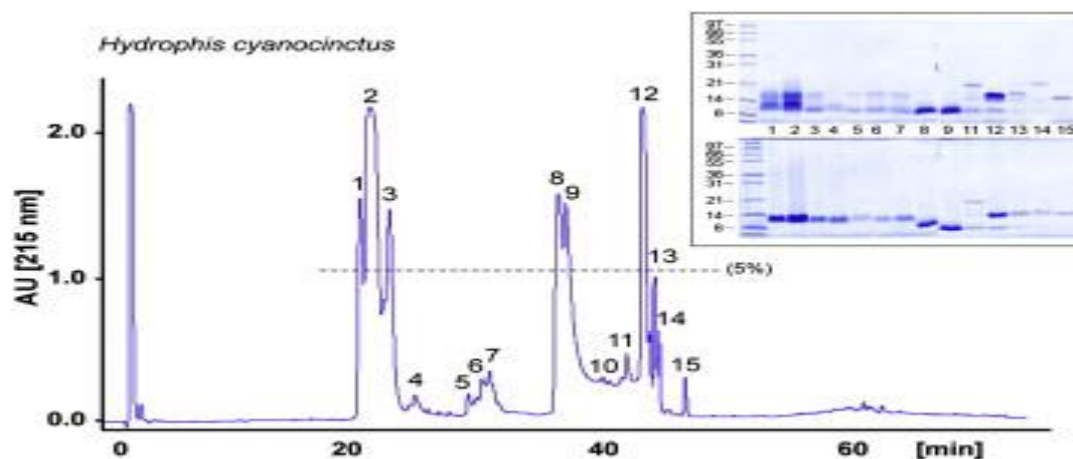
کالوت (Calvete) و همکاران در سال ۲۰۱۲ به بررسی توکسینولوژی مار زمینی *Toxicocalamus longissimus* و مارهای دریایی *Hydrophis cyanocinctus* پرداختند (۳۸). مار زمینی *Toxicocalamus longissimus* در جزیره وودلارک (Woodlark) (دایره قرمز)، در شمال مجمع الجزایر لوئیسایاد، در نوک شرقی خلیج میلن (Milne)، استان پاپوآ گینه نو و مارهای دریایی *Hydrophis cyanocinctus* از منطقه حفاظت شده دریایی حرا در شمال خلیج فارس جمع‌آوری شدند. مارهای دریایی مار حلقه‌دار، *H. cyanocinctus*، در واقع از تورهای ماهیگیری صیادان میگوی محلی در طول ماه اکتبر تا دسامبر سال ۲۰۱۰ در منطقه حفاظت شده دریایی ایران جمع‌آوری شده بودند و زهر نیش آنها با استفاده از نوک پیت، آسپیره و سپس آزاد شدند (شکل ۲۹). زهر مخلوط، در نیتروژن مایع ذخیره و پس از لیوفیلیزه شدن تا زمان آنالیز در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بودند.



شکل ۲۹) الف) مار زمینی *Toxicocalamus longissimus* در جزیره وودلارک (Woodlark) (دایره قرمز)، در شمال مجمع‌الجزایر لونیسیاد، در نوک شرقی خلیج میلن (Milne)، استان پاپوا گینه نو و (ب) مارهای دریایی *Hydrophis cyanocinctus* از منطقه حفاظت شده دریایی حرا در شمال خلیج فارس جمع‌آوری شدند.

جمع‌آوری و تحت شرایط کاهشی، جهت آنالیز SDS-PAGE استفاده گردیدند (شکل ۳۰).

هفده پروتئین (پنج PLA2 نوع I و دوازده 3FTx)، در ۱۵ فراکشن زهر *H. cyanocinctus* از هم جدا شدند. همچنین فراکشن‌ها، به صورت دستی



شکل ۳۰) پروتئوم ۲ میلی‌گرم زهر خام *Hydrophis cyanocinctus* بر روی یک ستون C₁₈ فراکشن‌ها به صورت دستی جمع‌آوری و توسط SDS-PAGE تحت شرایط کاهشی جهت تعیین جرم ملکولی استفاده شدند. همچنین، فراکشن‌های HPLC توسط ESI-MS مورد آنالیز قرار گرفتند.

مولکول PLA2)، یک فراوانی نسبی بیش از ۵ درصد را دارا بودند. همان طور که از فراوانی نوروتوکسین انتظار می‌رود، LD50 زهر *H. cyanocinctus*، برای موش، نسبتاً کم و در تزریق‌های داخل وریدی و داخل صفاقی به ترتیب ۰/۱۳۲ و ۰/۱۷۲ میکروگرم/ گرم بودند. چنین توکسیسیتی بالا (LD50 بین ۰/۰۴ تا کمتر از ۱ میکروگرم/ گرم)، از خصوصیات زهرهای نوروتوکسیک پس‌سیناپسی مارهای دریایی است (۳۱، ۴۱، ۴۹-۴۶). سرعت عمل نوروتوکسین‌های پس‌سیناپسی، ممکن است تحت فشار انتخابی برای بی‌حرکت نمودن سریع و کشتن سریع طعمه در حال حرکت در یک محیط آبی به وجود آمده باشد.

پروتئین‌های α -نوروتوکسین rSN311، rSN316 و rSN285 مار دریایی *Hydrophis cyanocinctus* Daudin

سه ژن مختلف، به نام‌های sn311، sn285 و sn316 توسط تعیین توالی تصادفی بزرگ مقیاس کتابخانه cDNA کیفیت بالای مربوط به غدد ونوم از مار دریایی *Hydrophis cyanocinctus* Daudin، توسط پنگ (Peng) و همکاران در سال ۲۰۰۳ کشف گردیدند (۵۰). آنالیز توالی نشان داد که این سه ژن، سه زنجیره مختلف کوتاه آلفا نوروتوکسین از ۸۱ اسید آمینه، مشتمل بر یک پپتید سیگنال ۲۱ اسید آمینه‌ای و سپس یک پپتید بالغ ۶۰ اسید آمینه‌ای را کدگذاری می‌کند. مقایسه اسید آمینه‌ها نشان داد که پپتیدهای بالغ sn311 و sn316 بسیار همسان بوده و تنها در موقعیت ۴۶، محل Lys46 و Ser46، دارای اختلاف هستند. پپتید بالغ sn285 فاقد اسیدهای آمینه حفاظت شده در زنجیره کوتاه آلفا نوروتوکسین‌ها، Asp31 و Arg33 می‌باشند.

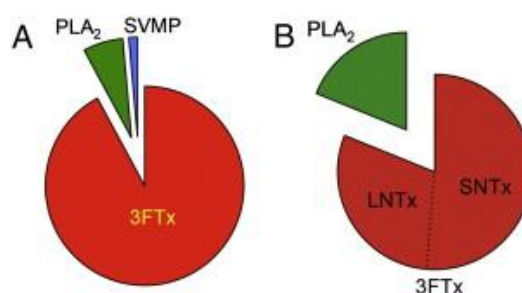
توکسین‌های سه انگشتی و پروتئین PLA2 نوع I، به ترتیب، ۸۱ و ۱۹ درصد از پروتئوم زهر را تشکیل می‌دادند. توکسین‌های سه انگشتی، با توجه به تشابه توالی N ترمینال و جرم مولکولی، به نوروتوکسین‌های کوتاه زنجیر و بلند زنجیر طبقه‌بندی شدند (جدول ۸ و شکل ۳۱).

جدول ۸) درصد از خانواده‌های مختلف توکسینی در زهر

H. cyanocinctus و *T. longissimus*

خانواده پروتئین	پروتئین‌های زهری تام (%)	
	Hc	Tl
توکسین سه انگشتی	۸۱/۱	۹۲/۱
نوروتوکسینهای کوتاه زنجیر	۵۱/۱	-
نوروتوکسینهای بلند زنجیر	۲۹/۴	-
فسفولیپاز A2 نوع-I	۱۸/۹	۶/۵
متالوپروتئیناز ونوم مار	-	۱/۴

پروتئوم زهرهای تام گونه‌های مارهای زمینی و دریایی در شکل (۳۱)، مورد مقایسه قرار گرفته‌اند.



شکل ۳۱) مقایسه پروتئوم زهر تام گونه‌های مارهای زمینی و دریایی. نسبت پروتئین‌ها از خانواده مختلف توکسین در زهر *T. longissimus* (پانل A) و *Hydrophis cyanocinctus* (پانل B). 3FTx، توکسین سه انگشتی. SNTx: نوروتوکسین کوتاه؛ LNTx: نوروتوکسین بلند؛ SVMP، متالوپروتئیناز ونوم مار؛ PLA2: فسفولیپاز A2 نوع-I.

سادگی پروتئوم ونوم *H. cyanocinctus*، حاکی این واقعیت است که تنها ۶ جزء زهر (سه نوروتوکسین با زنجیره کوتاه، دو نوروتوکسین با زنجیره بلند، و یک

کمی بالاتر از دو مورد دیگر بود. مقادیر LD50 مربوط به α -نوروتوکسین، قابل مقایسه با مطالعات قبلی بود (۵۱).

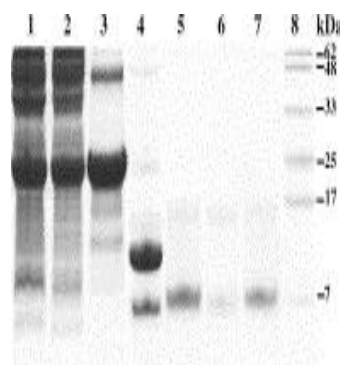
مطالعات بر روی اثرات این پروتئین‌های نوترکیب روی انتقال عصبی-عضلانی نشان داد که همه آنها می‌توانند تولید مهار سریع انتقال عصبی-عضلانی گردند. این نوروتوکسین‌های پس‌یناپسی، می‌توانند انتقال عصبی را توسط اتصال به گیرنده‌های نیکوتینیک استیل کولینی (nAChRs) مهار نمایند. اتصال به گیرنده‌ها موجب بازشدن کانال‌های یونی نمی‌گردند، بنابراین انقباض عضله را نمی‌توان در طول فرایند مهار، مشاهده نمود. سه پروتئین خالص rSN311، rSN316 و rSN285 موجب مهار سریع انتقال عصبی-عضلانی در عرض یک ساعت گردیدند.

فسفولیپاز A2 (PLA2-H1) زهر مار دریایی *Hydrophis cyanocinctus*

علی و همکاران (۲۰۰۰)، توانایی یک فسفولیپاز A2 توکسیک (PLA2-H1) جدا شده از زهر مار دریایی *Hydrophis cyanocinctus* را برای توانایی القای میونکروزیس و تغییرات هیستوپاتولوژیک در موش و موش صحرایی را مورد مطالعه قرار دادند (۵۲).

آنزیم PLA2-H1 خالص شده، بسیار سمی بوده و LD50 داخل صفاقی آن در موش‌ای صحرایی و سوری به ترتیب برابر ۰/۰۴۵ و ۰/۰۳۶ میلی‌گرم/کیلوگرم بود. خالص سازی، منجر به افزایش بیش از ۱۸ برابری در سمیت زهر خام LD50 داخل صفاقی برابر ۰/۸۰۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، در رت و ۰/۷۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در موش) گردید. القای میونکروزیس، با رهاسازی کراتین کیناز (CK) از ایلاف عضلات آسیب دیده، نشان داده شد. میونکروز شدید PLA2-H1 با تغییراتی چون، نکروز و ظهور

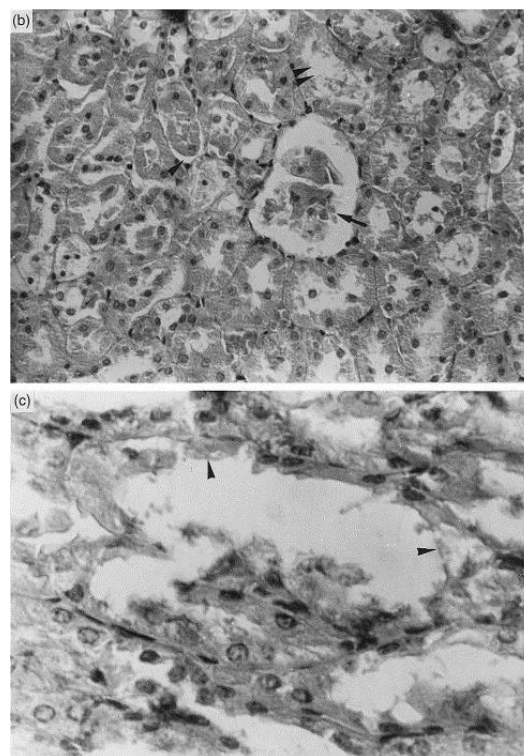
توالی کدگذاری سه نوروتوکسین، به یک وکتور بیانی فیوژن تیوردوکسین (pTRX) کلون و به عنوان پروتئین‌های نوترکیب محلول در *E. coli* بیان شدند. پس از خالص سازی بیشتر با استفاده از یک ستون CM سفاروز و سپس یک ستون سفادکس G-50، حدود ۱۰ میلی‌گرم/لیتر از این پروتئین‌های نوترکیب با خلوص بالای ۹۵ درصد به دست آمدند. سه پروتئین خالص شده به عنوان rSN316، rSN311 و rSN285 در نظر گرفته شدند (شکل ۳۲) (۵۰).



شکل ۳۲) آنالیز SDS-PAGE / تریس / تریسین rSN316، rSN311 و rSN285. لاین ۱: پروتئین تام pETTRXSN285-؛ لاین ۲: پروتئین‌های محلول تام از BL21 (DE3)؛ لاین ۳: پروتئین فیوژن pETTRX-rSN285-؛ لاین ۴: محصولات پروتئین ترکیبی-TRX؛ rSN285 هضم شده توسط پروتئاز 3C؛ لاین ۵: نوروتوکسین خالص نوترکیب زنجیره کوتاه rSN285؛ لاین ۶: نوروتوکسین خالص نوترکیب زنجیره کوتاه rSN311؛ لاین ۷: نوروتوکسین خالص نوترکیب زنجیره کوتاه rSN316؛ لاین ۸: نشانگر پروتئین

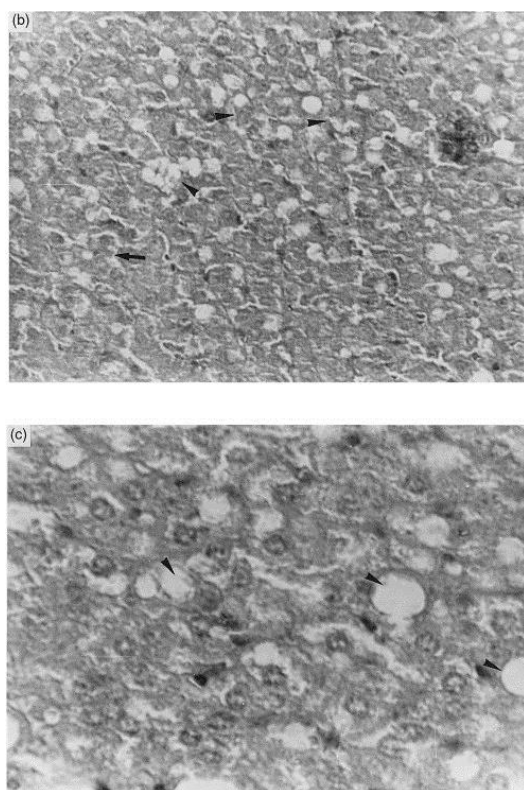
این سه پروتئین نوترکیب، به ترتیب با وزن مولکولی ۶/۹۶۳، ۶/۹۲۰ و ۶/۷۵۶ کیلودالتون، شبیه به توالی اسید آمینه پیش‌بینی شده طراحی گردیدند. مقادیر LD50 آنها به ترتیب ۰/۰۸۲۷، ۰/۰۹۵ و ۰/۰۶۴۷ میلی‌گرم/کیلوگرم برای موش بود. سه α -نوروتوکسین نوترکیب، سمیت کشندگی مشابهی (LD50)، برای موش داشتند، اما سمیت rSN285

ادم با ارتشاح سلولی، واکوئله شدن و دژنراسیون سلول‌های عضلانی با ضایعات دلتا و ادم شدید بین سلولی، بدون میوگلوبینوری در حیوانات، عجین شده بود. بررسی میکروسکوپ نوری بخش‌های کلیه، یک نکروز توبولی کانونی، دیسکواماسیون کامل پوشش اپیتلیال و دژنراسیون اپیتلیال توبول‌ها را نشان داد (شکل ۳۳).



شکل ۳۳ (A) میکروگراف نوری کلیه در گروه کنترل با دریافت ۱۰۰ میکرولیتر از محلول نرمال سالین (i.p.). بخش توبول‌های کلیوی نرمال با اپیتلیال سالم دست نخورده (سر فلش). (B) فوتومیکروگراف گروه آزمون پس از دریافت ۶/۰ میکروگرم PLA₂-H1 (i.p.). نکروز توبولی کانونی (سر فلش)، دیسکواماسیون کامل پوشش اپیتلیال (فلش‌ها) و انحطاط اپیتلیال توبول‌ها (سرهای دو پیکانی)، (C) فوتومیکروگراف از گروه آزمون با دریافت ۶/۰ میکروگرم PLA₂-H1 (i.p.) که نشان دهنده دژنراسیون مشخص اپیتلیال شده توبول‌ها (سر پیکان).

کبدی متراکم و پس از ۴۸ ساعت، واکوئله شدن چربی پارانشیم در یک الگوی کلی را نشان داد (شکل ۳۴).



شکل ۳۴ (A) میکروگراف نوری کبد در گروه کنترل با دریافت ۱۰۰ میکرولیتر از محلول نرمال سالین (i.p.). بخش سلول‌های کبدی نرمال (پیکان) و پارانشیم یکنواخت، (B) فوتومیکروگراف گروه آزمون پس از دریافت ۶/۰ میکروگرم PLA₂-H1 (i.p.) و تشریح بعد از ۲۴ ساعت. انفیلتراسیون چربی در پارانشیم (نوک پیکان) و سلول‌های کبدی متراکم (فلش). (C) فوتومیکروگراف گروه آزمون پس از دریافت ۶/۰ میکروگرم PLA₂-H1 (i.p.) و تشریح بعد از ۲۴ ساعت. واکوئله شدن چربی پارانشیم (نوک پیکان).

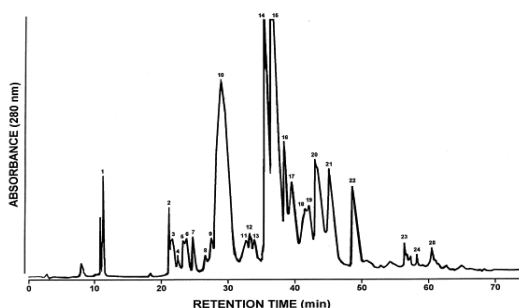
همچنین در بخش‌های ریه، اتساع برونش و انفیلتراسیون مشخص از سلول‌های التهابی در آلوئول مشاهده شدند (شکل ۳۵) (۵۲).

میکروگراف نوری از بخش‌های کبد ۲۴ ساعت پس از تزریق، انفیلتراسیون چربی در پارانشیم و سلول‌های

فسفولیپازهای A2 (H2 و H1) زهر مار دریایی

Hydrophis cyanocinctus

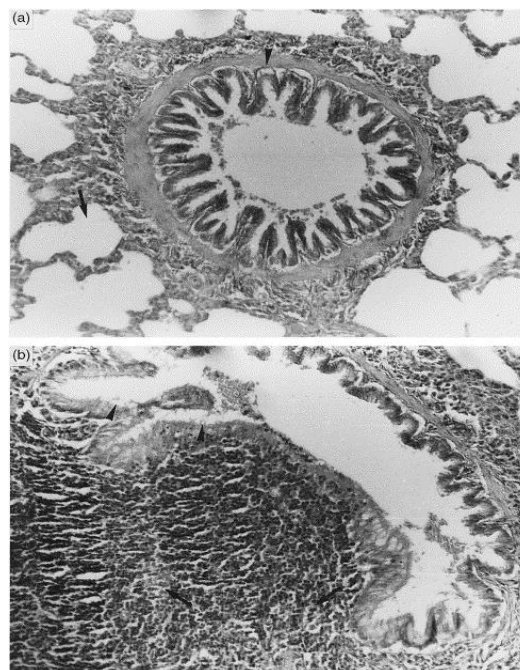
دو آنزیم فسفولیپاز A2 (H2 و H1) از زهر مار دریایی *Hydrophis cyanocinctus* با استفاده از RP-HPLC بر روی یک ستون C18 نوکلئوسیل، جداسازی شدند (۵۳). جداسازی اجزای مختلف پروتئین و پپتید زهر خام این مار دریایی، منجر به جداسازی بیش از ۲۵ فراکشن گردید (شکل ۳۶).



شکل ۳۶ جداسازی اجزای مختلف پروتئین و پپتید زهر خام زهر مار دریایی *Hydrophis cyanocinctus* با استفاده از RP-HPLC بر روی یک ستون C18 نوکلئوسیل، در طول موج ۲۸۰ نانومتر.

طیف‌سنجی جرمی در خلوص و برآورد جرم مولکولی هر فراکشن، فقط یک ترکیب را در بسیاری از فراکشن‌ها نشان داد. پیک‌های ۱۴ و ۱۶ که بالاترین فعالیت فسفولیپازی A2 نشان می‌دادند را به ترتیب، H1 و H2 نامیدند. فعالیت‌های کاتالیتیکی این فسفولیپازهای خالص، به ترتیب حدود ۱۹ و ۱۳ درصد از کل فعالیت فسفولیپازهای زهر بود.

جرم مولکولی هر دو PLA2، توسط MALDI MS مورد آنالیز قرار گرفت. یون مولکول‌های پروتونه $[MH^+]$ در m/z ۱۳۵۸۹/۱ و ۱۳۲۴۸/۲ دالتون، به ترتیب نشان‌دهنده وزن مولکولی ۱۳۵۸۸/۱ و ۱۳۲۴۷/۲ دالتون برای PLA2 H1 و PLA2 H2 هستند (شکل ۳۷a). پیک ۲۲ (شکل ۳۷b) که دارای فعالیت فسفولیپاز



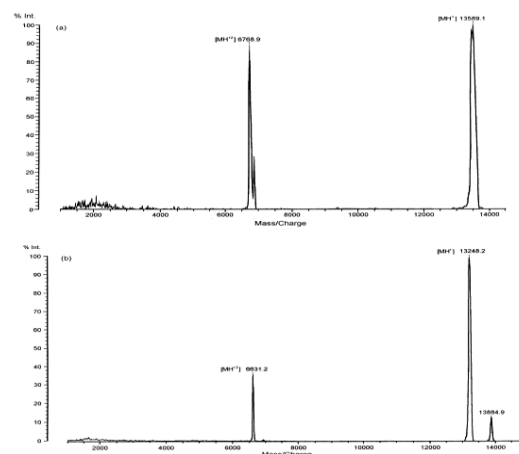
شکل ۳۵ (A) میکروگراف نوری ریه در گروه کنترل با دریافت ۱۰۰ میکرولیتر از محلول نرمال سالین (i.p.). بخش برونش نرمال (نوک پیکان) و آلونول دست نخورده (فلش) را نشان می‌دهد. (B) فوتومیکروگراف گروه آزمون پس از دریافت ۶/۰ میکروگرم PLA2-H1 (i.p.) و تشریح بعد از ۴۸ ساعت. برونش متسع (نوک پیکان) و انفیلتراسیون مشخص سلول‌های التهابی در آلونول (فلش‌ها).

در کل، آنزیم PLA2-H1 موجب القای میوتوکسیستیتی متوسط در عضلات و تغییرات هیستوپاتولوژیک خفیف در اندام‌های حیاتی، بدون وجود میوگلوبینوری گردیده بود. پس از تزریق PLA2-H1 i.p. به حیوانات آزمایشگاهی، کاهش تحرک در عرض چند ساعت و فلج کامل پس از ۱۰-۱۲ ساعت در موش صحرایی و ۵-۶ ساعت در موش ظاهر شد. بررسی ماکروسکوپی اندام‌های هر دو موش، تورم ریه، کبد و کلیه‌ها را نشان داد. تغییرات در کلیه‌های آسیب دیده کمی بالاتر از گروه شاهد بود. کبد به خصوص در حیواناتی که تا ۴۰ ساعت زنده مانده بودند، کمی متورم و دارای تغییر رنگ شده بود (۵۲).

حضور بیش از یک ایزوآنزیم PLA2 در زهر مار دریایی *H. cyanocinctus*، گویای تنوع ساختاری و عملکردی در این کلاس از پروتئین‌ها می‌باشد.

معمولاً چندین گونه PLA2 در یک منبع زهر نظیر X، b، TFLV PL-Ia در مار هوبو، تایپوکسین آلفا، بتا و گاما از *Oxyuranus scutellatus* در ناچا موسامبیکا CM-I-III یا DEI-III (*Naja mossambica*) در ناچا ملانولوکا (*Naja melanoleuca*) وجود دارد. این ایزوآنزیم‌ها، خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و فارماکولوژیکی بسیار گسترده‌ای دارند (۵۴ و ۵۵). مقایسه خواص بیولوژیکی مختلف زهر خام مار دریایی *Hydrophis cyanocinctus* با فسفولیپازهای A2 خالص در جدول (۹)، دیده می‌شود.

A2 کمی بود دارای جرم مولکولی مشابه H1 و H2 و برابر (MH+=۱۳۷۴۲/۸ Da) بود.

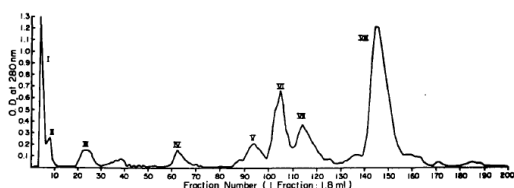


شکل ۳۷) طیف MALDI MS فسفولیپازهای A2 خالص H1 (a) و H2 (b) زهر مار دریایی *Hydrophis cyanocinctus* جمع‌آوری شده از فრაکشن‌های خالص RP-HPLC.

جدول ۹) خصوصیات بیولوژیکی مختلف زهرهای خام و تخلیص شده فسفولیپازهای A2 (H1 و H2) مار

دریایی *Hydrophis cyanocinctus*

خصوصیات	و نوم نام	PLA ₂ -H1	PLA ₂ -H2
فعالیت ویژه PLA ₂ (μmol/min/mg)	۱۶۲±۱۰/۵۰۳	۴۵۷/۷۵	۲۴۰±۵/۱۰
LD50 (i.p. mg/kg, b.w.)	۰/۸۰۵±۰/۱۲۰	۰/۰۴۵±۰/۰۰۹	-
فعالیت همولیتیک (مستقیم)	-	-	-
فعالیت همولیتیک (غیرمستقیم)	۰/۸۷۲±۰/۰۰۹	۰/۶±۰/۰۳۳	۰/۴۸±۰/۰۲۱
مینیمم دوز القاء کننده ادم (MED) در موش (μg/paw)	۴/۶۱±۰/۰۸۶	۰/۰۴۶±۰/۰۰۲	۰/۰۶۲±۰/۰۰۳
نسبت ادم (در دوزهای ۰/۰۴۶، ۰/۰۶۲ و ۰/۰۸۶ میکروگرم)	۱۲۳±۱۰/۱۷۰	۱۸۰/۷۵±۸/۰۴۱	۱۴۰/۶۰±۱۰/۱۰۴
فعالیت همولیتیک	-	-	-

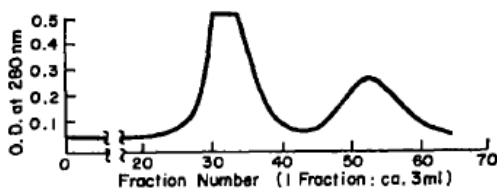


شکل ۳۸) جداسازی زهر خام مار دریایی *Hydrophis cyanocinctus* را توسط کروماتوگرافی ستونی کربوکسی متیل سلولز با گرادیان سدیم کلرید.

هیدروفیتوکسین a (Hydrophitoxin a) 206

لیو (Liu) و همکاران در سال ۱۹۷۳ اجزاء سمی زهر خام مار دریایی *Hydrophis cyanocinctus* را توسط کروماتوگرافی ستونی کربوکسی متیل سلولز، جداسازی نمودند. در ابتدا، هشت پیک اصلی از این کروماتوگرافی جداسازی شد (شکل ۳۸) (۵۶).

b (hydrophitoxin b) نام گذاشتند (۵۹). آنها دو فراکشن VI و VII جمع‌آوری شده در جداسازی کروماتوگرافی مطالعه پیشین را، مورد بررسی قرار دادند. هیدروفیتوکسین b (hydrophitoxin b) خالص از جزء VI، توسط ستون کروماتوگرافی با کربوکسی متیل سلولز (CM-52)، با استفاده از یک گرادیان خطی بافر آمونیوم استات در PH۶/۵ به دست آمد و از جزء VII جدا گردید. آنها هیدروفیتوکسین b را از پیک اول به دست آوردند (شکل ۴۰).



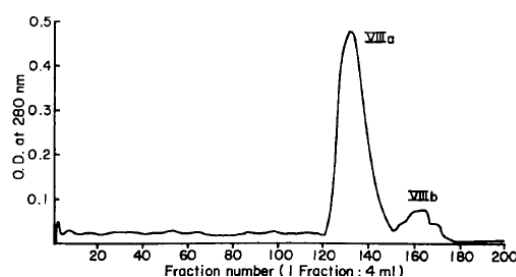
شکل ۴۰) خالص‌سازی بیشتر توکسین از زهر مار دریایی *cyanocinctus* *Hydrophis* با کروماتوگرافی ستونی کربوکسی متیل سلولز با گرادیان آمونیوم استات و به دست آمدن هیدروفیتوکسین b از پیک اول.

همچنین، ترکیب پیک دوم (شکل ۴۰) مربوط به فراکشن VII از کروماتوگرافی اصلی که دارای مقدار کمی هم برای انجام مطالعات بود هیدروفیتوکسین c (hydrophitoxin c) نامیده شد.

نوروتوکسین‌های هیدروفیس اوراتوس a و هیدروفیس لاپمویید a

ترکیبات نوروتوکسیک اصلی، به نام‌های هیدروفیس اوراتوس a و هیدروفیس لاپمویید a، به ترتیب از ونوم مارهای دریایی *Hydrophis ornatus* به دست آمده از فیلیپین و خلیج مک کلوتر (McCluer) و مار دریایی *Hydrophis lapemoides* فیلیپینی جداسازی شده‌اند (۶۰).

مطالعات سمیت اولیه مربوط به هر یک از هشت فراکشن انجام و مشخص گردید که فراکشن‌های VI، VII و VIII دارای بیشترین فعالیت نوروتوکسیسیته هستند. فراکشن VIII که دارای بیشترین ماده سمی بود پس از لیوفیلیزاسیون مجدد، توسط سفادکس G-15 خالص‌سازی گردید که خود شامل دو پیک، یکی عمده و دیگری یک پیک کوچک‌تر بود (شکل ۳۹).



شکل ۳۹) خالص‌سازی بیشتر ترکیبات سمی اصلی از فراکشن VIII زهر مار دریایی *Hydrophis cyanocinctus* با کروماتوگرافی ستونی کربوکسی متیل سلولز با گرادیان آمونیوم استات.

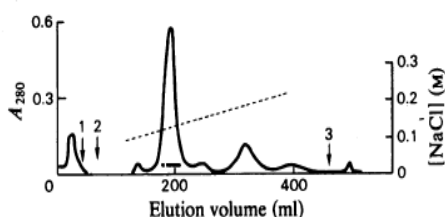
فراوان‌ترین جزء که هیدروفیتوکسین a (Hydrophitoxin a) نام گرفت، برای ترکیب اسید آمینه مورد مطالعه قرار گرفت که شامل ۱۹ اسیدهای آمینه (از جمله آسپاراژین و گلوتامین و بدون فنیل آلانین) بود. هیدروفیتوکسین a از نظر اندازه مولکولی و مشابهت ساختار، همانند سایر مارهای دریایی و زمینی که قبلاً گزارش شده اند، می‌باشد (۵۷ و ۵۸)، که بیشترین مشابهت را با *Lapemis hardwickii* دارا می‌باشد (۵۷).

هیدروفیتوکسین b (hydrophitoxin b)

لیو و همکاران، ۱۹۷۳، فراوان‌ترین توکسین، از سه جزء توکسیک جداسازی شده از زهر مار دریایی *Hydrophis cyanocinctus* را هیدروفیتوکسین a (hydrophitoxin a) و دومین را هیدروفیتوکسین

ستون سفادکس G-۵۰ خالص سازی گردید. این توکسین که ۴۲ درصد از کل پروتئین و ۷۰ درصد سمیت زهر خام را داشت، هیدروفیس اورانتوس a (*Hydrophis ornatus*) نام گرفت.

(ب)



شکل ۴۱) کروماتوگرافی ستونی CM- سلولز از ونوم خام مار دریایی *Hydrophis ornatus* خلیج مک کلونر (الف). کروماتوگرافی ستونی CM- سلولز (CM-52) از ونوم خام مار دریایی *Hydrophis ornatus* فیلیپینی (ب).

مقدار LD50 این توکسین در تزریق عضلانی به موش سوری برابر ۰/۰۹ میکروگرم/ گرم وزن بدن بود. هر توکسین از ۶۰ باقی مانده اسید آمینه تشکیل شده بود. ترکیب توکسین مارهای دریایی *Hydrophis ornatus* خلیج مک کلونر و فیلیپین با مار *Astrotia stokesii* دارای مشابهت بودند.

اثرات بیوشیمیایی و مورفولوژیکی زهر مارهای دریایی،

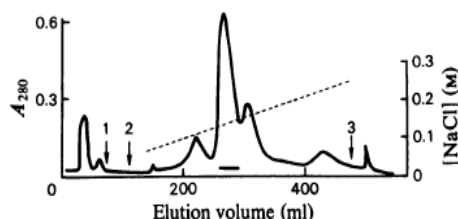
H. Cyanocinctus *Hydrophis spiralis*

Lapemis curtus و *H. Lapemoides*

سطوح سرمی برخی آنزیم ها و ترکیبات شیمیایی از قبیل کراتین فسفوکیناز (CPK)، لاکتات دهیدروژناز (LDH)، آلفا- گلوتامیل ترانس پپتیداز (GGT)، گلوتامات اگزالواستات ترانس آمیناز (GOT)، گلوتامات-پیروات ترانس آمیناز (GPT)، آلکالین فسفاتاز (ALP) و ۳- آمیلاز (AMY) و همچنین ترکیبات شیمیایی سرم شامل گلوکز، کراتینین، بیلی روبین تام و مستقیم، آلبومین، نیتروژن اوره خون، کلسترول، تری گلیسرید، چربی کل و پروتئین تام، پس از تلقیح آزمایشگاهی زهر چند جانور دریایی از

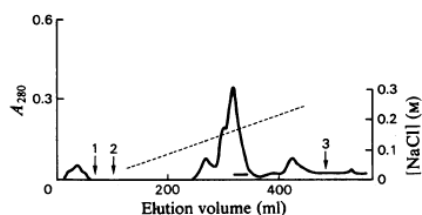
ونوم های خام مارهای دریایی *Hydrophis ornatus* خلیج مک کلونر توسط یک CM- سلولز خالص سازی گردید (شکل الف-۴۱). یک فراکشن با فعالیت کشندگی زیاد در موش پس از جمع آوری و لیوفیلیزاسیون، با یک

(الف)



تخلیص ونوم خام مار دریایی *Hydrophis ornatus* فیلیپینی نیز به همین منوال صورت گرفت. هر چند که خالص سازی فراکشن با یک دیسک- ژل الکتروفورز انجام گردید. این توکسین که ۵۸ درصد از پروتئین از کل زهر خام را داشت تحت عنوان هیدروفیس اورانتوس a فیلیپینی (*Hydrophis ornatus*) شناخته شد (شکل ۴۱-ب).

ونوم خام ماردریایی *Hydrophis lapemoides* همچون مورد مار دریایی خلیج مک کلونر خالص سازی گردید. این توکسین که ۴۴ درصد از پروتئین از کل زهر خام را دارا بود به عنوان هیدروفیس لاپموئید a (*Hydrophis lapemoides*) شناخته شد (شکل ۴۲).



شکل ۴۲) کروماتوگرافی ستونی CM- سلولز (CM-52) از ونوم خام مار دریایی *Hydrophis lapemoides*

برخی آثار گزش با مار دریایی زرد

Hydrophis spiralis

در یک مورد نادر از گزش با مار دریایی زرد *Hydrophis spiralis* در سریلانکا، برخی از تظاهرات غیرمعمول در بیمار، نظیر وقوع درد در محل گزش، بزرگ شدن گره‌های لنفاوی منطقه‌ای و میالژی شدید، عضله حساس به لمس و علائم عصبی، مشاهده گردید. جای نیش در محل گزش گزارش گردید. این اولین مورد گزش، با مار دریایی در سریلانکا بود (۶۴).

توکسین مار دریایی *Hydrophis gracilis*

در جستجوی pubmed در مورد توکسین مار دریایی *Hydrophis gracilis*، تنها دو مطالعه که اولی در خصوص مشخصات فیلوژنیک مارهای دریایی (۶۵) است و دومین، مربوط به مطالعه عالم و همکاران (۶۳)، در خصوص اثرات بیوشیمیایی چند زهر مار دریایی که در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار گرفت، به چشم می‌خورد.

زهر مار دریایی (*Lapemis curtus*)

در مطالعه کارتیکیان (Karthikeyan) و همکاران در سال ۲۰۰۸، فعالیت ضد توموری زهر مار دریایی (*Lapemis curtus*) در برابر کارسینومای سرطان آسیت‌های ارلیش (EAC)، در موش سوئیسی نژاد آلبینو و نیز کشت سلولی تومور HeLa و Hep2 مورد بررسی قرار گرفت (۶۶).

قبل از آن، در مطالعه جداگانه‌ای، مار دریایی *L. curtus* از سواحل کالپاکام کوروماندل هند جمع‌آوری و زهر آن از مار زنده، به صورت دستی با فشار، گرفته شد و بلافاصله پس از لیوفیلیزه، در -4°C ذخیره گردید (۶۷). مطابق مطالعه پیشین کارتیکیان (Karthikeyan) و همکاران در سال

جمله چهار مار دریایی *Hydrophis spiralis*

H. Cyanocinctus، *H. Lapemoides* و

Lapemis curtus مورد بررسی قرار گرفتند (۶۱).

مقادیر LD₅₀ i.v زهر خام این مارهای دریایی به ترتیب، ۰/۴۰، ۰/۶۰، ۰/۷۰ و ۲/۹ میلی‌گرم/کیلوگرم بود. موش‌های دریافت کننده دوز یک دوم LD₅₀ پس از ۲۰ ساعت، دارای شرایط بحرانی بودند اما گروه دریافت کننده یک سوم LD₅₀ تا ۴۸ ساعت زنده ماندند. زهر مار دریایی، *Hydrophis spiralis* به‌عنوان قوی‌ترین زهر (LD₅₀ برابر ۰/۴ میلی‌گرم/کیلوگرم)، افزایش قابل توجهی در سطوح آنزیم‌های سرمی در مقایسه با دیگر زهرها ایجاد کرده بود. غلظت اجزای شیمیایی سرم گلوکز، بیلی‌روبین، نیترژن اوره خون نیز به طور قابل توجهی بالا بود. پروتئین، آلبومین، چربی کل، کلسترول و تری‌گلیسرید پس از تزریق وریدی زهر، کاهش پیدا کرده بود.

همچنین تغییرات مورفولوژیکی قابل ملاحظه‌ای در کبد، طحال، کیسه صفرا، ریه‌ها و قلب، در زهر فیزالیا و مارهای دریایی دیده شد. حیوانات دریافت کننده زهر مار دریایی، دارای کبدی با سطحی خشن و رنگ قهوه‌ای مایل به قرمز و لکه‌های سیاه و سفید مایل به قهوه‌ای نامنظم، طحال قهوه‌ای تیره بودند و در چند مورد نیز لکه‌های قرمز یا قهوه‌ای بر روی قلب مشاهده شدند. تغییرات رنگ ریه از رنگ مایل به رنگ صورتی روشن به سفید متمایل به زرد با رگه‌های قرمز مشخص، دیده شد.

نه تنها گزارش اثرات قوی نفروتوکسیک، هپاتوتوکسیک و کاردیوتوکسیک زهر مارهای دریایی در منابع موجود است بلکه در برخی موارد، در صورت عدم درمان مناسب و به موقع، فلج و مرگ نیز دیده شده‌اند (۶۲ و ۶۳).

ترکیبات ضد سرطانی زهر مارها، در مطالعات پیشین نیز مورد مطالعه قرار گرفته بودند (۷۱ و ۷۲)، مباحث مربوط به فعالیت‌های ضد توموری زهر مارها، حتی در طب سنتی نیز مطرح بوده است (۷۳-۷۵)

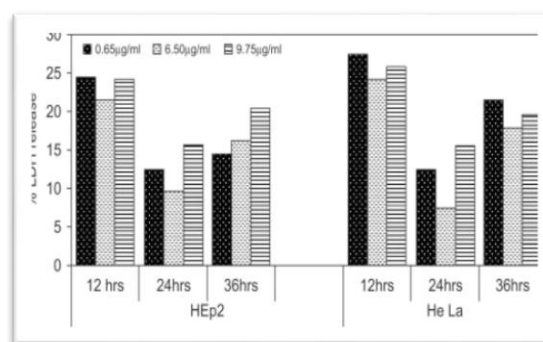
توکسین‌های دو مار دریایی *Lapemis curtus* و *Acalyptophis peronei*

ترکیب زهر مار به طور گسترده‌ای در میان گونه‌های نزدیک و جنس‌های مشابه، بر اساس متغیرهای زیست محیطی، متفاوت است. در مارهای زمینی، این قبیل تنوع‌ها ممکن است به دلیل رژیم غذایی مارها باشد. مارهای زمینی، گونه‌های مختلف حشرات، مارمولک‌ها، قورباغه‌ها و وزغ‌ها، پرندگان و جوندگان را شکار می‌کنند، در حالی که مارهای دریایی معمولاً یک کلاس مهره‌داران یعنی ماهیها را مورد هدف قرار می‌دهند. از این رو، بررسی تکامل توکسین‌ها در زهر مار دریایی نسبت به مارهای زمینی جالب به نظر می‌رسد. در مطالعه پاهاری (Pahari) و همکاران (۲۰۰۷)، به بررسی بیان ژن‌های توکسین دو مار دریایی *Lapemis curtus* و *Acalyptophis peronei* پرداخته شد (۳۰). مطالعه آنها نشان داد که تفاوت‌های بسیار کمی در توکسین سه انگشتی (3FTx) و همچنین آنزیم فسفولیپاز A2، به عنوان دو ترکیب اصلی زهر *Lapemis curtus* و *Acalyptophis peronei* وجود دارد.

شکل (۴۴)، توزیع کلون‌ها و فراوانی توکسین‌ها در هر دو زهر مارهای *L. curtus* و *A. peronei* را نشان می‌دهد.

۲۰۰۷)، مقدار LD50 زهر خام، ۰/۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم (mg kg^{-1}) بود (۶۸).

در این مطالعه، غلظت‌های مختلف زهر، جهت تعیین اثر بالقوه ضد سرطانی، در مدل *in vivo* با استفاده از روش انتخابی ابوسینا و همکاران (۶۹)، مورد بررسی قرار گرفت. معیار قابل اعتماد برای ارزیابی پتانسیل هر عامل ضد سرطان، طولانی گشتن زنده مانی حیوانات آزمایشگاهی است. کاهش حجم تومور و تعداد سلول‌های تومور زنده، در آزمون‌ها می‌تواند به عنوان شاخص مهم در کاهش بار تومور و افزایش طول عمر موش در نظر گرفته شود (۷۰).



شکل (۴۳) سمیت سلولی زهر *Lapemis curtus* روی خطوط سلولی HEP2 و HeLa. نتایج (هر کدام شش بار تکرار) گروه درمان با گروه درمان نشده بر اساس $\text{mean} \pm \text{SD}$ مقایسه شدند ($n=6$)

با توجه به مشاهدات در مطالعه آنها، زهر *L. curtus* دارای اثرات ضد پرولیفراتیو بالقوه‌ای روی مدل تومور حیوانی و رده‌های سلولی سرطانی بود. در میان دوزهای مختلف مورد آزمون، ۶/۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر در ۲۴ ساعت، به طور مؤثری مانع از تکثیر سلول‌های سرطانی شده بود. تزریق *i.p* همان دوز بر روی موش، به طور قابل توجهی موجب کاهش رشد تومور و افزایش طول عمر آن، تا ۱/۲۵، ۲۰ درصد گردید (شکل ۴۳).

یک فاکتور رشد تک‌قلو (AY742212) را نشان داد که یک خصوصیت مشابه قابل توجهی با فاکتور رشد مشتق از پلاکت (PDGF) داشت. هر چند که فاکتورهای رشدی چون NGF (۷۸) و VEGF (۷۹) در برخی از ونوم‌ها شناسایی شده‌اند، ولی حضور پروتئین شبه PDGF، اولین گزارش در غده زهری است.

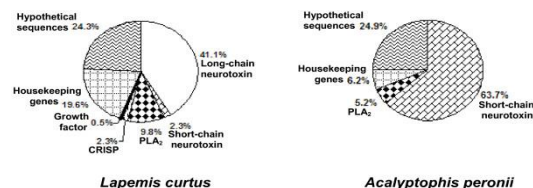
اثرات گاز گرفتگی توسط مار دریایی

زهری که مار دریایی وارد می‌کند ۳ تا ۱۳ برابر قوی تر از زهر مار کبری است. در اثر گاز گرفتن، ممکن است از یک تا ۳۳ سوراخ مشاهده شود. دندان ممکن است در زخم باقی بماند. سم نورو توکسین، یک پروتئین بدون آنزیم است که به گرما مقاوم است. بنابراین مصدومی که توسط مار دریایی گزیده شده است را نباید مثل مصدومی که توسط ماهی زهرآگین گزیده گردیده در آب داغ قرار داد.

به دلیل داشتن آرواره کوچک، اغلب گزیدگی‌ها منجر به وارد کردن زهر نمی‌شود. گزیده شدن توسط مار دریایی، درد کمتری به وجود می‌آورد و معمولاً دوره نهفته‌ای از ۱۳ دقیقه تا چند ساعت قبل از گسترش نشانه‌های عمومی چون درد و سختی ماهیچه، احساس زبری زبان، تهوع، استفراغ، دشواری در صحبت کردن و بلع، ناتوانی و دیسترس تنفسی، ادرار خاکستری رنگ ناشی از میوگلوبینوریا (که ممکن است باعث از کار افتادگی کلیه شود)، وجود دارد (۱۴).

راه‌های پیشگیری

لباس‌های غواصی، به خصوص دستکش‌ها ممکن است که بدن را در برابر گزیده شدن محافظت کنند و باید هنگام غواصی در آب‌هایی که مارهای دریایی فراوان‌اند استفاده شوند. در محل‌های با احتمال وجود



شکل ۴۴ فراوانی توکسین‌ها در زهر *Lapemis curtus* و *Acalyptophis peronii*

تا به امروز، سه ایزوفرم زنجیره بلند توکسین سه انگشتی، (AAL54893، AAL54892، ABN54806) و چهار ایزوفرم زنجیره کوتاه از این توکسین‌ها (ABN54805، AAL54894، AAL54895، P68416) از زهر *L. curtus* گزارش گردیده است (۷۶).

همچنین در این مطالعه، کلون‌های cDNA کدکننده هر دو ایزوفرم زنجیره بلند، (AAL54893، AAL54892) از 3FTx با ۴۱ درصد فراوانی یافت شدند (شکل ۴۴)، که نسبت بین ایزوفرم‌های AAL54893 و AAL54892 برابر ۱۰:۱ بود. همچنین کلون‌های cDNA کدکننده 3FTx زنجیره کوتاه، با دو درصد فراوانی (AAL54894) یافت گردید.

تاکنون، سه ایزوفرم PLA₂ از مار دریایی *L. curtus* یعنی AAL55555، AAL55556 و AAL54920 گزارش شده است (۷۷).

در مطالعه پاهاری، یک ایزوفرم به طور کامل شناسایی شده AAL55555، نیز با فراوانی تقریبی ۱۰ درصد یافت گردید. توالی‌های بخشی از دو ایزوفرم (Q8UW11 و Q8UW25) از توکسین CRISP غدد زهری *L. curtus* گزارش شده است. کتابخانه cDNA مربوط به مطالعه پاهاری حاوی حدود ۲ درصد کلون کدگذاری برای ایزوفرم Q8UW25 توکسین CRISP، بدون هر گونه تنوع در سطح نوکلئوتیدی بود (شکل ۴۴). کتابخانه cDNA، حضور

مار دریایی، از کفش استفاده گردد. در هنگام ماهیگیری، به مارهای دریایی دست زده نشود. گزیده شدن دست ماهیگیران هنگامی اتفاق می‌افتد که سعی می‌کنند مارهای دریایی را از تور جدا نمایند.

امداد و درمان اولیه

باید مصدوم را بی‌حرکت نگه داشت و از استفاده از رگ بند اجتناب و از فشار مستقیم با استفاده از بانداژ متراکم استفاده نمود و آنرا با استفاده از آتل‌ها یا بانداژهای کشی در موقعیت خود ثابت کرد. این روش از گسترش نوروتوکسین جلوگیری می‌کند.

می‌توان از روش برش و مکش استفاده نمود. تمام مصدومان گزیده شده توسط مارهای دریایی را بدون توجه به علائم رایج، باید به سرعت به بخش مراقبت‌های ویژه پزشکی انتقال داد. باید اطمینان حاصل نمود که بیمار به طور مناسب تنفس می‌کند و آماده احیاء دهان به دهان یا احیاء قلبی و ریوی (در صورت لزوم) می‌باشد.

زهر، یک پروتئین مقاوم در برابر گرما است که انتقال عصبی - عضلانی را مسدود می‌کند. اغلب، میونکروزیس ناشی از میوگلوبینوریا و خرابی کلیوی، دیده می‌شوند. هیپوتانسیون هم ممکن است وجود داشته باشد. امکان ایست قلبی ناشی از فلج ماهیچه‌ای وجود دارد. انتوباسیون و تهویه مکانیکی ممکن است لازم باشد. عملکرد کلیه باید با دقت مورد بررسی قرار بگیرد چون ممکن است که دیالیز پریتونال یا همودیالیز لازم باشد. ادرار قلیایی با تزریق درون رگی مناسب، دفع میوگلوبین را بالا می‌برد. عملکرد کلیه را باید بررسی نمود.

علائم حیاتی باید به دقت بررسی شوند. حمایت قلبی-عروقی و تزریق مایع درون رگی، علاوه بر اکسیژن رسانی، ممکن است لازم باشد. به دلیل احتمال از کار افتادگی علائم حیاتی، تمام مصدومان که توسط مار دریایی گزیده می‌شوند باید حداقل ۱۳ ساعت تحت مراقبت‌های شدید باشند. اگر علائم مسمومیت، در عرض یک ساعت اتفاق افتاد، درمان سریع، با پادزهر میسر می‌شود. اگر بیمار دچار مسمومیت شدید باشد، درمان توسط پادزهر (استرالیا، ملبورن، آزمایشگاه سرم کامانولر)، حتی پس از یک تأخیر قابل ملاحظه نیز مفید است. در صورت عدم وجود پادزهر مخصوص، می‌توان پادزهر مار خشکی زی (مار ببری یا کرایت الایده) را جانشین کرد. در صورت استفاده پادزهر، پزشک باید برای مقابله با شوک آنافیلاکسی آماده باشد. تجویز تتانوس، باید به طور مناسب مد نظر قرار گیرد (۱۴).

نتیجه‌گیری

تنوع بسیار کمی در ترکیب ونوم در گونه‌های مشابه و متفاوت مارهای دریایی وجود دارد. مطالعه ما نشان می‌دهد یک پروفایل ونوم نسبتاً ساده با میل به سمت ترکیبات مهلک قابل ملاحظه‌ای از نوروتوکسین‌ها و PLA2s و مقدار کمتری از توکسین‌هایی چون SVMP، CRISP و LAAO وجود دارد.

تضاد منافع

هیچ گونه تضاد منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1. Iranian snakes. Young elites scientific site. (Accessed August 10, 2016, at

[http://www.njavan.com/forum/showthread.php?102259-specific topic of snakes/page10.](http://www.njavan.com/forum/showthread.php?102259-specific+topic+of+snakes/page10.))

2. Gibbons JW, Scott DE, Ryan TJ, et al. The global decline of reptiles, deJa vu amphibians. *BioSci* 2000; 50(8): 653-6.
3. Subrata T, Abdulhadi AA, Hasibur R, et al. DNA barcoding: Tool for assessing species identification in Reptilia. *JEZS* 2016; 4(1): 332-7.
4. Harris JB. Phospholipases in snake venoms and their effects on nerve and muscle. *Pharmacol Ther* 1985; 31(1-2): 79-102.
5. Squamata-UCL. Squamata - lizards and snakes. (Accessed August 10, 2016, at <http://www.ucl.ac.uk/museums-static/obl4he/vertebratediversity/squamata.html>.)
6. Dehghani R, Mehrpour O, Shahi MP, et al. Epidemiology of venomous and semi-venomous snakebites (Ophidia: Viperidae, Colubridae) in the Kashan city of the Isfahan province in Central Iran. *J Res Med Sci* 2014; 19(1): 33-40.
7. Weinstein SA, Warrell DA, White J, et al. Venomous Bites from Non-Venomous Snakes: A Critical Analysis of Risk and Management of Colubrid Snake Bites. Burlington: Elsevier, 2011, 30-135.
8. Pajoumand A, Shariat Tarabghani A. Diagnosis and treatment of poisonin. Tehran: Chehr Publication, 1998, 96-130. (Persian)
9. Latifi M. The Snakes of Iran. 3rd ed. Tehran: Environment Protection organization, 2000, 27-92. (Persian)
10. Valenta J. Venomous Snakes: Envenoming, Therapy. New York: Nova Science Publishers, 2010, 27-49.
11. Rasmussen AR, Murphy JC, Ompi M, et al. Marine reptiles. *PLoS One* 2011; 6(11): e27373.
12. Kharin VE. Review of Sea Snakes of the genus *Hydrophis* sensu stricto (Serpentes: Hydrophiidae). *Russ J Marine Biol* 2004; 30(6): 387-94.
13. Kanishka DBU, Anslem de S, Bryan GF, et al. Molecular evidence that the deadliest sea snake *Enhydrina schistosa* (Elapidae: Hydrophiinae) consists of two convergent species. *Mol Phylogenet Evol* 2013; 66(1): 262-9.
14. Nobakht M. A Glance on medical principles, in exposure with dangerous animal of Persian Gulf, and providing some strategies relief and rescue of victims. (Accessed August 10, 2016, at http://health.ajaums.ac.ir/_health/documents.)
15. Nabipour I. The venomous animals of the Persian Gulf. Bushehr: Bushehr University of Medical Sciences Press, 2012, 98-108. (Persian)
16. Heatwole H. Sea Snakes. Sydney: University of New South Wales Press, 1999, 148.
17. Reptiledatabase. *Hydrophis cyanocinctus*. (Accessed August 10, 2016, at [http://reptiledatabase.reptarium.cz/species?genus=Hydrophis&species=cyanocinctus&search_param=\(\(genus%3D'I'\)\)](http://reptiledatabase.reptarium.cz/species?genus=Hydrophis&species=cyanocinctus&search_param=((genus%3D'I'))).)
18. Rasmussen A, Sanders K, Lobo A. *Hydrophis cyanocinctus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010. (Accessed August 10, 2016, at <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-4.RLTS.T176726A7291386.en>.)
19. Rasmussen AR. A preliminary study on sea snakes (Hydrophiidae) from Phuket Harbor, Phuket Island, Thailand. *Nat Hist Bull Siam Soc* 1989; 37(2): 209-25.
20. Rasmussen AR. Sea Snakes. In: Carpenter KE, Niem VH (Eds) *FAO species identification guide for fishery purposes. The living marine resources of the Western Central Pacific*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 2001, 6.
21. Baldwin R, Gardner AS. Marine reptiles. In the emirates: a natural history. Hellyer P, Aspinall S, editors. London, Trident Press, 2005, 242-51.
22. Soorae PS, Das HS, Al Mazrouei H. Records of sea snakes (subfamily Hydrophiinae) from the coastal waters of the Abu Dhabi Emirate, United Arab Emirates. *Zoology in the Middle East* 2006; 39(1): 109-10.
23. Craig J. Venter Institute. (Accessed August, 10, 2016, at <http://www.jcvi.org/reptiles/search.php>.)
24. Low BW. Handbook of experimental pharmacology: Snake Venoms. In: Lee CY, editors. Chap. 6, Vol. 52. Berlin: Springer-Verlag, 1979, 213-5.
25. Dufton MJ. Kill and cure: the promising future for venom research. *Endeavour* 1993; 17(3): 138-40.

- 26.Kardong KV. Snake toxins and venom: an evolutionary perspective. *Herpetologica* 1996; 52(1): 36-46.
- 27.Mariam K, Tu AT. Extremely low nerve growth factor (NGF) activity of sea snake (Hydrophiidae) venoms. *J Nat Toxins* 2002; 11(4): 393-8.
- 28.Tan CH, Tan KY, Lim SE, et al. Venomics of the beaked sea snake, *Hydrophis schistosus*: A minimalist toxin arsenal and its cross-neutralization by heterologous antivenoms. *J Proteomics* 2015; 126: 121-30.
- 29.Lomonte B, Pla D, Sasa M, et al. Two color morphs of the pelagic yellow-bellied sea snake, *Pelamis platura*, from different locations of Costa Rica: snake venomics, toxicity, and neutralization by antivenom. *J Proteomics* 2014; 103: 137-52.
- 30.Pahari S, Bickford D, Fry BG, et al. Expression pattern of three-finger toxin and phospholipase A₂ genes in the venom glands of two sea snakes, *Lapemis curtus* and *Acalytophis peronii*: comparison of evolution of these toxins in land snakes, sea kraits and sea snakes. *BMC Evol Biol* 2007; 27: 175.
- 31.Tan T, Xiang X, Qu H, et al. The study on venom proteins of *Lapemis hardwickii* by cDNA phage display. *Toxicol Lett* 2011; 206(3): 252-7.
- 32.Li M, Fry BG, Kini RM. Eggs-only-diet: its implications for the toxin profile changes and ecology of the marbled sea snake (*Aipysurus eydouxii*). *J Mol Evol* 2005; 6(1): 81-9.
- 33.Tan CH, Tan NH, Tan KY, et al. Antivenom cross-neutralization of the venoms of *Hydrophis schistosus* and *Hydrophis curtus*, two common sea snakes in Malaysian waters. *Toxins (Basel)* 2015; 7(2): 572-81.
- 34.Damotharan P, Veeruraj A, Arumugam M, et al. Isolation and characterization of biologically active venom protein from sea snake *Enhydrina schistosa*. *J Biochem Mol Toxicol* 2015; 29(3): 140-7.
- 35.Petras D, Sanz L, Segura A, et al. Snake venomics of African spitting cobras: toxin composition and assessment of congeneric cross-reactivity of the Pan-African EchiTAb-Plus-ICP antivenom by antivenomics and neutralization approaches. *J Proteome Res* 2011; 10(3): 1266-80.
- 36.Corrêa-Netto C, Junqueira-de-azevedo I, Silva D, et al. Snake venomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, *Micurus altirostris* and *M. corallines*. *J Proteomics* 2011; 74(9): 1795-809.
- 37.Rey-Suárez P, Núñez V, Gutiérrez JM, et al. Proteomic and biological characterization of the venom of the retdail coral snake, *Micurus mipartitus* (Elapidae), from Colombia and Costa Rica. *J Proteomics* 2011; 75(2): 655-67.
- 38.Calvete JJ, Ghezellou P, Paiva O, et al. Snake venomics of two poorly known Hydrophiinae: comparative proteomics of the venoms of terrestrial *Toxicocalamus longissimus* and marine *Hydrophis cyanocinctus*. *J Proteomics* 2012; 75(13): 4091-101.
- 39.Kularatne SA, Hettiarachchi R, Dalpathadu J, et al. *Enhydrina schistose* (Elapidae: Hydrophiinae) the most dangerous sea snake in Sri Lanka: three case studies of severe envenoming. *Toxicon* 2014; 77: 78-86.
- 40.Mebs D, Samejima Y. Myotoxic phospholipases A from snake venom, *Pseudechis colletti*, producing myoglobinuria in mice. *Experientia* 1980; 36(7): 868-9.
- 41.Chetty N, Du A, Hodgson WC, et al. The in vitro neuromuscular activity of Indo-Pacific sea-snake venoms: efficacy of two commercially available antivenoms. *Toxicon* 2004; 44(2): 193-200.
- 42.Brook GA, Torres LF, Gopalakrishnakone P, et al. Effects of phospholipase of *Enhydrina schistose* venom on nerve, motor end-plate and muscle of the mouse. *Q J Exp Physiol* 1987; 72(4): 571-91.
- 43.Tan NH. Acidic phospholipases A2 from the venom of common sea snake *Enhydrina schistosa*. *Biochim Biophys Acta* 1982; 717(3): 503-8.
- 44.Gawade SP, Gaitonde BB. Isolation and characterisation of toxic components from the venom of the common Indian sea snake (*Enhydrina schistosa*). *Toxicon* 1982; 20(4): 797-801.
- 45.Yu NT, Lin TS, Tu AT. Laser Raman scattering of neurotoxins isolated from the

- venoms of sea snakes *Lapemis hardwickii* and *Enhydrina schistosa*. J Biol Chem 1975; 250(5): 1782-5.
46. Mackessy SP, Tu AT. Biology of the sea snakes and biochemistry of their venoms. In: Tu AT, editor. Toxin-related Diseases: Poisons Originating from Plants, Animals and Spoilage. New Delhi: Oxford & IBH Publishing Co, 1993, 305-51.
47. Tamiya N, Yagi T. Studies on sea snake venoms. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 2011; 87: 41-52.
48. Calvete JJ, Juárez P, Sanz L. Snake venomomics. Strategy and applications. J Mass Spectrom 2007; 42(11): 1405-14.
49. White J. Clinical toxicology of snakebite in Australia and New Guinea. In: Meier J, White J, editors. Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons. Boca Raton: CRC Press, 1995, 595-617.
50. Peng LS, Zhong XF, Huang YS, et al. Molecular cloning, expression and characterization of three short chain alpha-neurotoxins from the venom of sea snake *Hydrophiinae Hydrophis cyanocinctus* Daudin. Toxicon 2003; 42(7): 753-61.
51. Atassi MZ. Postsynaptic-neurotoxin-acetylcholine receptor interaction and the binding sites on the two molecules. In: Tu AT, editors. Handbook of Natural Toxins: Reptile Venoms and Toxins. New York: Marcel Dekker, 1995, 53-83.
52. Ali SA, Alam JM, Abbasi A, et al. Sea snake *Hydrophis cyanocinctus* venom. II. Histopathological changes, induced by a myotoxic phospholipase A₂ (PLA₂-H1). Toxicon 2000; 38(5): 687-705.
53. Ali SA, Alam JM, Stoeva S, et al. Sea snake *Hydrophis cyanocinctus* venom. I. Purification, characterization and N-terminal sequence of two phospholipases A₂. Toxicon 1999; 37(11): 1505-20.
54. Vishwanath BS, Kini RM, Gowda TV. Characterization of three edema-inducing phospho-lipase A₂ enzymes from habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom and their interaction with the alkaloid aristolochic acid. Toxicon 1987; 25(5): 501-15.
55. Davidson FF, Dennis EA. Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A₂ from snake venom to human secreted forms. J Mol Evol 1990; 31(3): 228-38.
56. Liu CS, Huber GS, Lin CS, et al. Fractionation of toxins from *Hydrophis cyanocinctus* venom and determination of amino acid composition and end groups of hydrophitoxin a. Toxicon 1973; 11(1): 73-9.
57. Tu AT, Hoxo BS. Purification and chemical studies of a toxin from the venom of *Lapemia hardwickii* (Hardwick's sea snake). J Biol Chem 1971; 246(9): 2772-9.
58. Yang CC, Chance CC, Hayashi K, et al. Amino acid composition and end group analysis of cobrotoxin. Toxicon 1969; 7(1): 43-7.
59. Liu CS, Blackwell RQ. Hydrophitoxin b from *Hydrophis cyanocinctus* venom. Toxicon 1974; 12(5): 543-6.
60. Tamiya N, Maeda N, Cogger HG. Neurotoxins from the venoms of the sea snakes *Hydrophis ornatus* and *Hydrophis lapemoides*. Biochem J 1983; 213(1): 31-8.
61. Alam JM, Qasim R. Changes in serum components induced by venoms of marine animals. Pak J Pharm Sci 1993; 6(1): 81-7.
62. Reid HA. Myoglobinuria and sea- snake bite poisoning. Brit Med J 1961; 1(5235): 1284-9.
63. Marsden AT, Reid HA. Pathology of sea-snake poisoning. Br Med J 1961; 1(5235): 1290-3.
64. Amarasekera N, Jayawardena A, Ariyaratnam A, et al. Bites of a sea snake (*Hydrophis spiralis*): a case report from Sri Lanka. J Trop Med Hyg 1994; 97(4): 195-8.
65. Sanders KL, Lee MS, Mumpuni Bertozzi T, et al. Multilocus phylogeny and recent rapid radiation of the viviparous sea snakes (Elapidae: *Hydrophiinae*). Mol Phylogenet Evol 2013; 66(3): 575-91.
66. Karthikeyan R, Karthigayan S, Sri Balasubashini M, et al. Inhibition of Hep2 and HeLa cell proliferation in vitro and EAC tumor growth in vivo by *Lapemiscurtus* (Shaw 1802) venom. Toxicon 2008; 51(1): 157-61.

67. Ali SA, Alam JM, Stoeva S, et al. Sea snake *Hydrophis cyanocinctus* and N-terminal sequence of two phospholipases A2. *Toxicon* 1999; 37(11): 1505-20.
68. Karthikeyan R, Karthigayan S, Sri Balasubashni M, et al. Histopathological changes induced in mice after intramuscular injection of venom from spin-bellied sea snake, *Lapemis curtus* (Shaw, 1802). *J Pharmacol Toxicol* 2007; 2(4): 307-18.
69. Abu-Sinna G, Esmat AY, Al-Zahaby AA, et al. Fractionation and characterization of *Cerastes cerastes* snake venom and the antitumor action of its lethal and non-lethal fractions. *Toxicon* 2003; 42(2): 207-15.
70. Hogland HC. Hematological complications of cancer chemotherapy. *Semin Oncol* 1982; 9(1): 95-102.
71. Yang RS, Tang CH, Chuang WJ, et al. Inhibition of tumor formation by snake venom disintegrin. *Toxicon* 2005; 45(5): 661-9.
72. Mora R, Valverde B, Díaz C, et al. A Lys49 phospholipase A2 homologue from *Bothrops asper* snake venom induces proliferation, apoptosis and necrosis in a lymphoblastoid cell line. *Toxicon* 2005; 45(5): 651-60.
73. Sun P, Ren XD, Zhang HW, et al. Serum from rabbit orally administered cobra venom inhibits growth of implanted hepatocellular carcinoma cells in mice. *World J Gastroenterol* 2003; 9(11): 2441-4.
74. Araya C, Lomonte B. Antitumor effects of cationic synthetic peptides derived from Lys49 phospholipase A2 homologues of snake venoms. *Cell Biol Int* 2007; 31(3): 263-8.
75. Zhou Q, Sherwin RP, Parrish C, et al. Contortrostatin, a dimeric disintegrin from *Agkistrodon contortrix*, inhibits breast cancer progression. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 61(3): 249-60.
76. Zhong XF, Peng LS, Wu WY, et al. Identification and functional characterization of three postsynaptic short-chain neurotoxins from *Hydrophiinae*, *Lapemis hardwickii* gray. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 2001; 33(4): 457-62.
77. Yang WL, Wei JW, Zhong XF, et al. Diversity of PLA(2) genes from sea snake *Lapemis hardwickii* gray venom. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 2001; 33(3): 345-50.
78. Bailey GS, Banks BE, Pearce FL, et al. A comparative study of nerve growth factors from snake venoms. *Comp Biochem Physiol B* 1975; 51(4): 429-38.
79. Tokunaga Y, Yamazaki Y, Morita T. Specific distribution of VEGFF in *Viperinae* snake venoms: isolation and characterization of a VGEF-F from the venom of *Daboia russelli siamensis*. *Arch Biochem Biophys* 2005; 439(2): 241-7.

Review Systematic Article

The toxinology of sea snakes: A systematic review

GH. Mohebbi^{1*}, R. Seyedian¹, I. Nabipour¹,

¹ The Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, The Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

(Received 27 Jul, 2016 Accepted 24 Aug, 2016)

Abstract

Background: Sea snakes belong to Hydrophiidae family mainly are found in tropical and subtropical waters of the world including the Persian Gulf. Their highly lethal venoms are more potent than snakes with terrestrial origin and contain complex mixtures of organic and inorganic bioactive substances, such as enzyme, and non-enzymatic proteins. There were limited studies on the venoms and toxins of sea snake; hence, the aim of this systematic review was to investigate the toxinological dimensions of sea snakes.

Materials and Methods: In order to investigate of the toxins of sea snakes, the "Hydrophis schistosus toxin", "Hydrophis cyanocinctus toxin", "Hydrophis lapemoides toxin", "Hydrophis spiralis toxin", and "Lapemis curtus toxin" terms were searched separately, in "PubMed database", in 10/08/2016 which obtained 32, 9, 2, 2 and 4 papers, respectively. The "Hydrophis gracilis toxin" term had no any results. For the "Hydrophis gracilis" term, two studies were obtained. The first one related to the sea snakes phylogenetic characteristics and the second one shared with other search results and well-connected with the issue. Some papers were similar in different searches. Of these, those studies were selected that had direct relevance to the subject.

Results: The main isolated toxins from different sea snakes venoms included three-finger toxin (3FTx (short chain neurotoxins isoforms: AAL54893, AAL54892, ABN54806; long chain neurotoxins isoforms: AAL54894, AAL54895, P68416, ABN54805), pelamitoxin (P62388), phospholipase A₂ (both the basic and acidic PLA₂), two phospholipases A₂ (PLA₂-H1 and H2), cysteine-rich secretory protein (CRISP), snake venom Zn²⁺-metalloproteinase (SVMP), L-amino acid oxidase (LAAO), 5'-nucleotidase, Hydrophitoxins a, b and c, Hydrophis ornatus a, Hydrophis lapemoides a, PDGF and α - neurotoxins of rSN311, rSN316 and rSN285. Each toxin and protein family presents a wide range of pharmacological activities. Some of these neurotoxins were linked to acetylcholine receptors in the neuromuscular junctions. These toxins showed protease (gelatinase and caseinase) activities, and/or they produce the myonecrosis and biochemical and histopathological changes.

Conclusion: There is scant variability in the venom composition in the same and different species of sea snakes. Our study revealed that there is a rather simple venom profile with an affinity towards a lethal mixture of high abundance of neurotoxins and PLA₂s, and lower amounts of toxins such as CRISP, SVMP and LAAO.

Key words: sea snake, venom, toxin, Persian Gulf

©Iran South Med J. All rights reserved.

Cite this article as: Mohebbi GH, Seyedian R, Nabipour I. The toxinology of sea snakes: A systematic review. Iran South Med J 2016; 19(4): 662-703

Copyright © 2016 Mohebbi, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

*Address for correspondence: The Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, The Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran. Email: mohebbihns@yahoo.com

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