

DELOVANJE ELEKTROFORETSKIH FRAKCIJA OTROVA V. AMMODYTES NA KOAGULACIJU KRVI IN VITRO

G. A. ŠESTAKOV, I. I. DEJANOV i I. S. TADŽER

Institut za patološku fiziologiju, Medicinski fakultet, Skopje

(Priljeno 1. VI. 1959.)

Prikazano je elektroforetsko razdvajanje na niskoj temperaturi (+2°C) otrova vipera ammodytes i odnos pojedinih elektroforetskih frakcija prema koagulaciji krvi.

Davno je već poznata osobina većeg broja zmijskih otrova da utiču na koagulaciju krvi (1). Delovanje zmijskih otrova na koagulaciju krvi predmet je posebnih ispitivanja i danas (2-11). Nađeno je da se neki zmijski otrovi ponašaju slično kao tkivni tromboplastin, dok drugi imaju trombinsko delovanje; izrazito antikoagulantno delovanje nekih zmijskih otrova osobito je naglašeno (1, 3).

Zmijski otrovi korišćeni su u terapiji i dijagnostici hemoragičnih sindroma. Osobito je proučavana u tom smislu primena otrova vipera Russelli, pomoću koga je izvršena identifikacija dvaju različitih tipova faktora u kompleksu VII faktora koagulacije (12). Otrov vipera Russelli ima delovanje slično kao tromboplastin i zavisi od koncentracije protrombina, proakcelarina i Stuart-ovog faktora (faktor VII-bis), no ne zavisi od koncentracije samog VII faktora-prokonvertina.

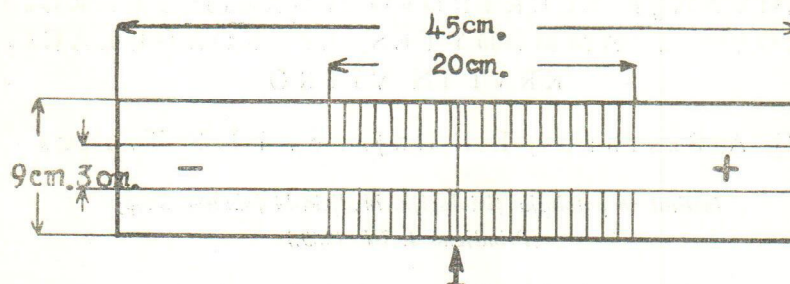
Kod nas se već više godina ispituju biohemijska i imunološka svojstva otrova poskoka (16-20).

Delovanje otrova poskoka-vipera ammodytes na koagulaciju krvi već se istraživalo (4, 13-15), ali nedovoljno. Zato smo ispitali delovanje elektroforetskih frakcija ovog otrova na istu u smislu navedenih osobina otrova vipera Russelli.

MATERIJAL I METODE

Otrov je dobiven iz Serovakcinalnog zavoda u Zagrebu.* Čuvan je uvek na -10°C .

Elektroforeza se izvodila na niskoj temperaturi ($+2$) u vlažnoj komori; napon 8–10 V/cm, jačina struje 0,4 mA/cm, veronalni pufer, pH 8,6, jonska jakost 0,05, trajanje 17 sati; trake – Whatman papir № 1 (dimenzije i aplikacija – sl. 1). Srednji segment trake bojen je acetat-



Sl. 1. A mesto aplikacije

nom metodom sa brom fenol blau (21), sečen na male trake širine 3 mm, koje su eluirane sa 0,01 N NaOH i eluati su čitani na spektrofotometru Unicam na 590 m M; ostala dva segmenta trake su uzimani za ispitivanje koagulacionog efekta otrova; segmenti su sečeni na male trake širine od 1 cm, eluirane u 0,85% NaCl (1 cm oba segmenta eluiran je u 0,8 ccm).

Koagulacione probe:

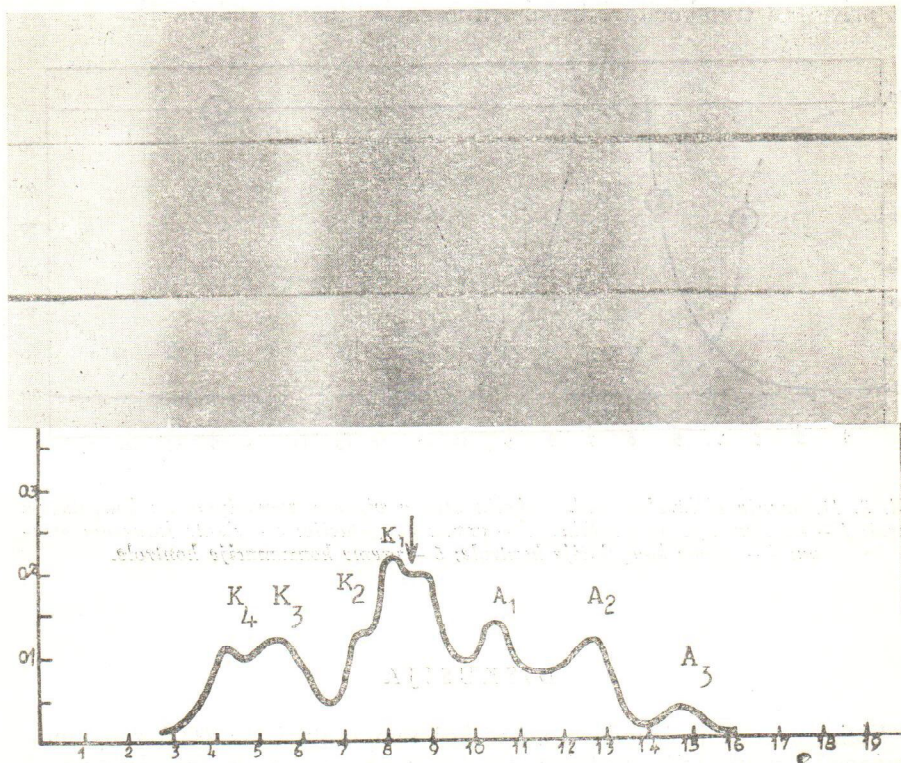
- Vreme koagulacije celokupne krvi po Lec-White (22);
- Konsumacija protrombina po Quick-u (23);
- Vreme rekalcifikacije plazme po Howell-u (24);
- Supstrate plazme bez protrombina, prokonvertina, spremljene su po metodi Koller-a (25), supstratna plazma bez proakcelarina po Wolf-u (26);
- Trombocitni substituent pripremljen je po metodi Bell-a i Alton-a (27);
- Generacija tromboplastina po Hicks-Pitney-u (28);
- Christmas-ov faktor pripremljen je po metodi Aggeler-a i sar. (29);
- Tromboplastin iz čovečjeg mozga, po standardnoj metodi (30).

* Na ovom mestu najiskrenije zahvaljujemo drugovima iz Serovakcinalnog zavoda u Zagrebu za isporuku otrova.

REZULTATI

Prikazani rezultati su srednje vrednosti iz deset određivanja.

1. Elektroferezom je dobiveno osam frakcija – četiri katodne, tri anodne i jedna na mestu aplikacije (sl. 2).



Sl. 2. Elektrofogram otrova *viperæ ammodytes*.
Katodne frakcije - $K_{1, 2, 3, 4}$; anodne frakcije - $A_{1, 2, 3}$.

2. Eluati elektroforetskih frakcija otrova imaju dvostruko dejstvo na koagulaciju celokupne krvi i konsumaciju protrombina; katodne frakcije imaju inhibitorni uticaj, dok anodne imaju obrnuti efekat (sl. 3).

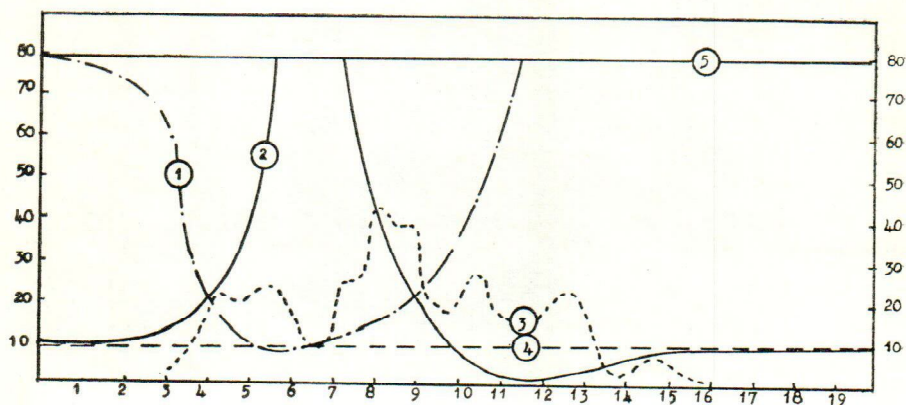
3. Delovanje eluata elektroforetskih frakcija otrova na vreme rekalcifikacije plazme ima isti karakter kao ono na koagulaciju celokupne krvi i konsumaciju protrombina (sl. 4).

4. Tromboplastična moć eluata je lokalizovana između frakcije A_1 i A_2 . Tromboplastična aktivnost eluata zavisi od koncentracije II, V i VII faktora koagulacije (sl. 5).

5. Katodne frakcije imaju inhibitorni uticaj na tromboplastinsku generaciju, dok anodne imaju obrnuti efekat (sl. 6).

6. Katodne frakcije inhibišu delovanje tkivnog tromboplastina (moždani tromboplastin), dok anodne imaju sinergistično delovanje sa njim (sl. 7).

Koagulantni princip otrova vipera ammodytes ima snažno delovanje u prisustvu trombocita i trombocitnog substituenta (tabela 1).



Sl. 3. Delovanje elektroforetskih frakcija otrova viperae ammodytes na koagulaciju krvi; 1 - konzumacija protrombina; 2 - vreme koagulacije; 3 - elektroforegram otrova; 4 - vreme koagulacije kontrole; 5 - vreme konzumacije kontrole.

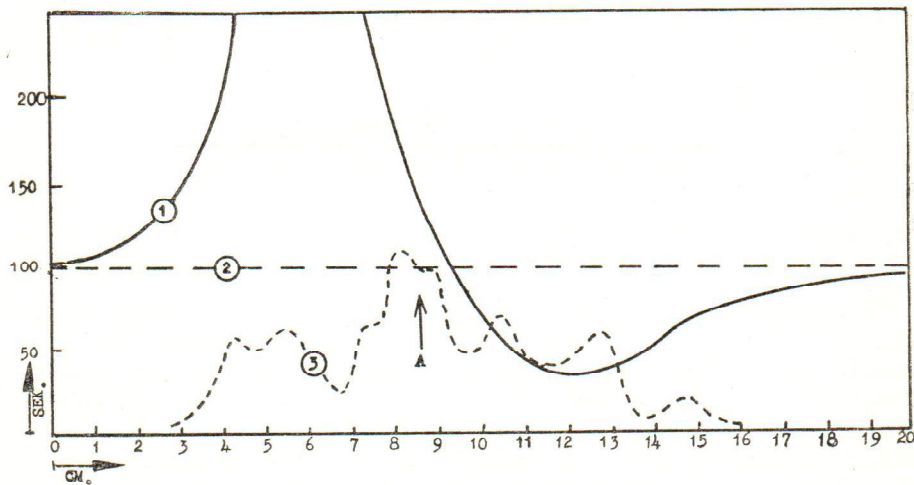
DISKUSIJA

Elektroforeza je izvođena na niskoj temperaturi (+ 2° C) zbog mogućnosti denaturacije proteina. Dobivano je uvek osam frakcija; drugi autori našli su manji broj frakcija (15, 17).

Delovanje otrova vipera ammodytes na koagulaciju krvi in vitro je dvojako: katodne frakcije imaju antikoagulantnu aktivnost dok anodne frakcije imaju koagulantno delovanje. Priroda ove aktivnosti nije sasvim poznata. Za puni efekat koagulantne aktivnosti neophodno je prisustvo protrombina, proakcelarina i kompleksa VII faktora (prokonvertin i Stuart-ov faktor), što ide u prilog činjenici da je koagulantni princip sličan tromboplastinu (sl. 5). Zavisnost koagulantne aktivnosti od koncentracije kompleksa VII faktora nije posebno precizirana u odnosu na prokonvertin i Stuart-ov faktor. Poznato je međutim da je za delovanje koagulantnog principa otrova vipera Russelli neophodno samo prisustvo Stuart-ovog faktora. Koncentracija prokonvertina ne utiče na njegovo delovanje (2, 12, 30, 31).

Koagulantno delovanje celokupnog otrova vipera ammodytes potencira se u prisustvu hemoliziranih eritrocita, lecitina i trombocita (4). Macfarlane i sar. su 1938 g. (30) našli da otrov vipera Russellia nema koagulacioni efekat ukoliko se centrifugiranjem na velikom broju obrtaja, filtracijom ili ekstrakcijom sa lipoidnim rastvaračima plazma oslobodi lipoida i trombocita. Mogli smo da potvrdimo da i delovanje koagulantne frakcije otrova vipera ammodytes također zavisi od prisustva lipoida i trombocita. Aktivnost koagulantne frakcije se snažno pojačava dodatkom opranih svežih trombocita i trombocitnog substituenta po Bell-u i Alton-u (tabela 1). Tvrdi se, da je fosfatidil etanolamin lipoidni faktor koji potencira delovanje koagulantnog principa vipera Russellia (32). Dokazuje se prethodna reakcija otrova sa jednim termolabilnim faktorom seruma a posle nje sa lipoidnim faktorom (9).

Postoji sinergizam u delovanju tkivnog, moždanog tromboplastina i koagulantnog principa otrova vipera ammodytes (sl. 7); ovaj sinergizam je nađen i za koagulantni princip otrova vipera Russellia, kao i međusobno između pojedinih tkivnih tromboplastina, iz različitih organa (39).

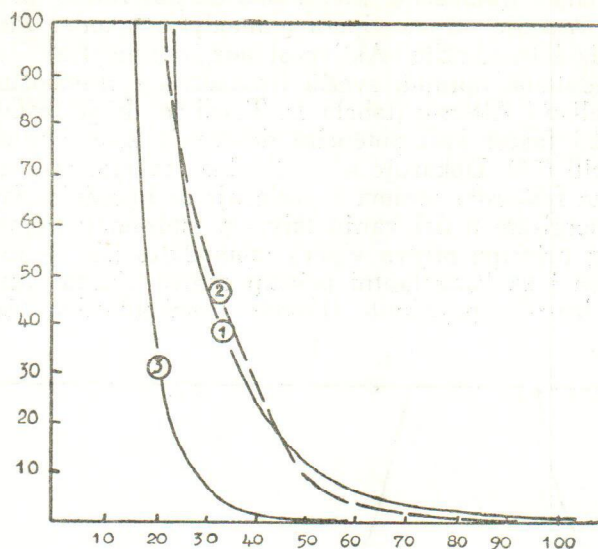


Sl. 4. Delovanje elektroforetskih frakcija otrova viperae ammodytes na koagulaciju plazme; 1 - vreme rekalcifikacije plazme sa pojedinim frakcijama; 2 - vreme rekalcifikacije plazme sa fiziološkim rastvorom; 3 - elektroforegram otrova.

Prava priroda samog koagulantnog principa zmijskih otrova još nije određena. Već su 1939 Leathes i Mellanby pretpostavljali da je ona slična tromboplastinu, koji utiče na fiziološku koagulaciju krvi (30); koagulantni princip otrova, prema ovoj pretpostavci, stvara kompleks sa lipoidnim faktorom u plazmi, koji bi po strukturi bio sličan tromboplastinu. Nije poznato da li je delovanje tromboplastinu sličnih sup-

stanci u zmijskim otrovima isto kao i delovanje moždanog tromboplastina. Poznato je da trombin vrši drugačije konverziju fibrinogena nego zmijski otrov sa trombinskim delovanjem (11).

Iznošena je pretpostavka da je proteolitička aktivnost zmijskih otrova odgovorna za koagulacionu aktivnost (14).



Sl. 5. Zavisnost trombolitične moći otrova od koncentracije faktora; 1 - faktor II; 2 - faktor U; 3 - faktor VII.

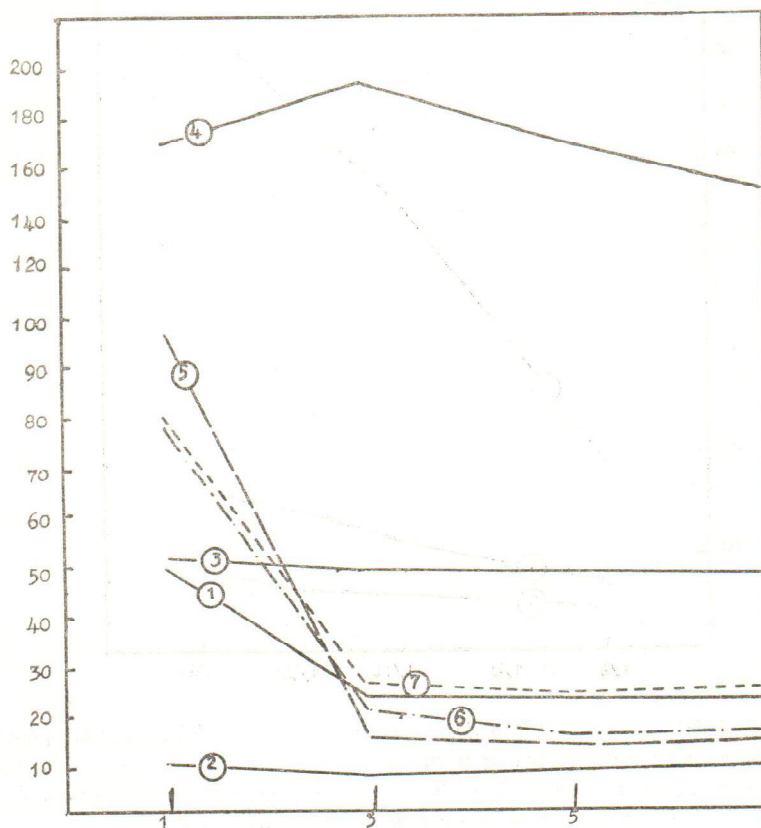
Koagulantni princip otrova vipera ammodytes nije sposoban da u odsustvu lipoidnog faktora zameni trombocite u tromboplastinskoj generaciji (sl. 6), međutim u njegovom prisustvu ponaša se kao moćan akcelerator tromboplastinske generacije i ima delovanje punog tromboplastina.

Antikoagulantno delovanje zmijskih otrova davno je već utvrđeno, ali mehanizam toga delovanja nije poznat. Antitrombinsko delovanje koje ističu neki autori (33), drugi ne potvrđuju (8). Oslobođanje supstance sličnih heparinu iz protrombina, takođe nije potvrđeno (34). Smatra se da se antikoagulantni princip nalazi u samom otrovu (8).

Svakako je interesantno da je već Morawitz pre 1905 god. (1) našao da otrov kobre nema inhibitorni efekat na već stvoreni trombin, već da on deluje na proces koagulacije pre stvaranja trombina, da se delovanje otrova ukida dodatkom tromboplastina, tkivnih sokova, trombina, dilucijom, neutralizacijom ili dodavanjem kalcijum hlorida; antikoagulaciono delovanje otrova je prema njemu antitrombolitično.

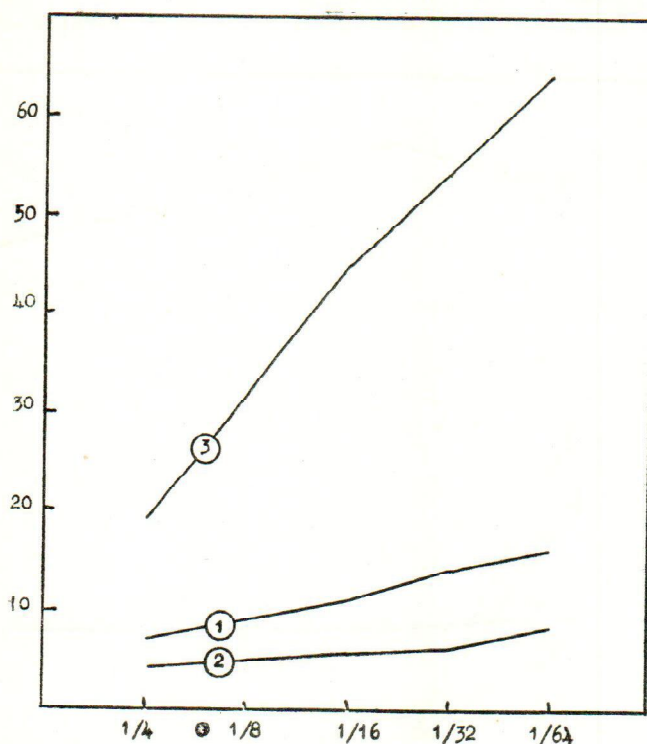
1956 god. O'Brien je našao da plazma i serum normalne osobe neutrališu inhibitorni efekt kobrinog otrova na reakciju trombin-fibrinogen, dok plazma i serum bolesnika sa Christmas-ovom bolešću nemaju tu sposobnost (5). Isti autor je pokazao da Christmas-ov faktor inhibira delovanje heparina (35), da je ta njegova aktivnost manja od trombocitne a veća od one beta-lipoproteina (36).

Antikoagulantno delovanje elektroforetskih frakcija otrova vipera ammodytes veoma je snažno. Antitromboplastična aktivnost antikoagulantnog principa ogleda se u snažnoj inhibiciji tromboplastične ge-



Sl. 6. Uticaj elektroforetskih frakcija otrova na tromboplastinsku generaciju: 1 - kontrola; 2 - eluat koagulantne frakcije sa trombocitnim substituentom; 3 - eluat kongulantne frakcije bez trombocitnog substituenta; 4 - eluat antikoagulantne frakcije; 5 - eluat antikoagulantne frakcije + Christmas-ov faktor; 6 - eluat antikoagulantne frakcije + suspenzija opranih trombocita; 7 - substratna plazma u testu tromboplastinske generacije zamenjena je sa substratnom plazmom sastavljenom iz jednog dela normalne plazme i jednog dela eluata antikoagulantne frakcije.

neracije, produženju vremena koagulacije, rekalcifikaciji i usporenju konsumacije protrombina. Ona se neutrališe dodatkom opranih trombocita i izolovanog Christmas-ovog faktora. Verovatno antikoagulantni princip onemogućava delovanje trombocita i Christmas-ovog faktora, te se njegovo delovanje ukida dodatkom većih količina trombocita ili Christmas-ovog faktora (sl. 6). Antikoagulantni princip ne deluje na već stvoreni krvni tromboplastin (Sl. 6 – krivulja 7).



Sl. 7. Sinergističko i antagonističko delovanje između eluata elektroforetskih frakcija otrova *Vipera ammodytes* i tkivnog tromboplastina; 1 – različna razređenja tromboplastina sa fiziološkim rastvorom; 2 – ista razređenja sa eluatom koagulantne frakcije; 3 – ista razređenja sa eluatom antikoagulantne frakcije.

Tkivni tromboplastin također gubi od svoje aktivnosti u prisustvu antikoagulantnog principa (sl. 7). Delovanje antikoagulantnog principa se neutrališe dodatkom trombocita ili Christmas-ovog faktora. Može li to da znači, da je antikoagulantni princip po mehanizmu svog delovanja sličan heparinu, s obzirom na nalaze O'Brien-a (35, 36) pokazaće dalja ispitivanja.

Utvrđeno je već davno prisustvo hijaluroidaze u zmijskim otrovima (37). U katodnim elektroforetskim frakcijama otrova vipera ammodytes također je ovaj enzim dokazan (15). U novije vreme nađeno je da ovaj enzim ima inhibitorni uticaj na tromboplastinsku generaciju plazme bez trombocita ili trombocitnih supstituenata. Međutim, ovaj inhibitorni uticaj se neutrališe u prisustvu trombocita ili trombocitnih supstituenata (38). Antikoagulantni princip vipera ammodytes deluje samo u prisustvu trombocitnih supstituenata. Suspenzije opranih trombocita ukidaju njegovo delovanje. Ovo pokazuje da je antikoagulantni princip zmijskih otrova sastavljen verovatno iz više bioloških aktivnih činilaca.

ZAKLJUČAK

Prikazano je elektroforetsko razdvajanje na niskoj temperaturi (+ 20°C) otrova vipera ammodytes i odnos pojedinih elektroforetskih frakcija prema koagulaciji krvi. Postoji koagulantna i antikoagulantna aktivnost.

Delovanje koagulantnog principa otrova zavisno je od koncentracije protrombina, proakcelarina i kompleksa VII faktora. Trombociti i trombocitni supstituent snažno potenciraju delovanje koagulantnog principa.

Antikoagulantni princip ima antitromboplastično delovanje, koje se neutralizira u prisustvu trombocita i Christmas-ovog faktora.

Literatura

1. Morawitz, P.: Die Chemie der Blutgerinnung, Ergebnisse der Physiologie 4 (1905) 307-423 edit. Bergmann, J. F., prevod - The Chemistry of Blood Coagulation, Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Ill., USA, 1958.
2. Rapaport, S. I., Aas, K. and Owen, P. A.: Blood, IX (1954) 12.
3. Didisheim, P. and Lewis, J. H.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 93 (1956) 1.
4. Zürn, H.: Folia Haemat., 74 (1957) 4.
5. O'Brien, J. R.: Brit. J. Haemat., 2 (1956) 430.
6. de Uriès, A. and Gitter, S.: Brit. J. Haemat., 3 (1957) 379.
7. Hall, G. H.: Clin. Path., 9 (1956) 237.
8. Bowers, E. F. and Hall, G. H.: Brit. J. Haemat., 2 (1958) 220.
9. Peden, J. C. and Peacock, A. C.: J. Lab. Clin. Med., 52 (1958) 1.
10. Plagnol, H. et Martin, P.: Ann. Inst. Pasteur, 92 (1957) 4.
11. Blombäck, B.: Acta Physiol. Scand., 43/suppl. 148, 1958.
12. Hougie, C., Barrow, E. and Graham, J. B.: J. clin. Invest., 36 (1957) 485.
13. Dyckerhoff, H. und Marx, R.: Biochem. Z., 313 (1942) 107.
14. Eagle, H.: Medicine, 16 (1937) 95.
15. Kaiser, E. und Michl, H.: Die Biochemie der tierischen Gifte, Wien. Franz Deuticke, 1958.

16. Kratochvil, J. and Ajduković, Dj.: *Croatica chem. acta*, 30 (1958).
17. Muić, N. i Piantanida, M.: *Radovi Jugoslav. akad. znanosti i umjetnosti*, 298 (1953) 207; *Bull. inter. acad. yougoslave sci. et beaux-arts. Classe sci. math. et nat. N. S.* 9 (1953) 159; *Arch. Bioch. and Biophys.*, 46 (1953) 110 *J. Immunol.* 73 (1954) 115; *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, 299 (1955) 6.
18. Muić, N. and Meniga, A.: *Arhiv kem.*, 27 (1955) 131.
19. Muić, N.: *Bull. sci. Conseil acad. R. F. P. Yougoslavie*, 2 (1956) 105.
20. Muić, N. and Ajduković, Dj.: *Arhiv hig. rada*, 8 (1957) 89.
21. Block, R. J., Durrum, E. L., Zweig, G.: *Manual of paper chromatography and paper electrophoresis*, Second edition, Academic Press Inc., Publishers, New York, 1958.
22. Lee, R. J. and White, P. D.: *Amer. J. Med. Sci.*, 145 (1913) 495.
23. Quick, A. J.: *Hemorrhagic Diseases*, Philadelphia, Lea & Febiger (1957).
24. Nikolić, B.: *Današnje shvatanje koagulacije krvi i njenih poremećaja*, Beograd-Zagreb, Med. Knjiga (1955).
25. Koller, F., Loeliger, A., Duckert, F.: *Rev. d'Hématol.*, 156 (1952).
26. Wolf, P.: *J. Clin. Path.*, 6 (1953) 34.
27. Bell, W. N. and Alton, H. G.: *Nature (Lond.)*, 174 (1954) 880.
28. Hicks, N. D. and Pitney, W. R.: *Brit. J. Haemat.*, 3 (1957) 227.
29. White, S. G., Aggeler, P. M. and Glendening, M. B.: *Blood*, VIII (1953) 101.
30. Biggs, R. and Macfarlane, R. G.: *Human Blood Coagulation and Its Disorders*, Oxford, Blackwell (1957).
31. Deutsch, E.: *Blutgerinnungsfaktoren*, Wien, Franz Deuticke (1955).
32. Poole, J. C. F.: *Brit. Med. Bull.*, 14 (1958) 3.
33. Grasset, E. and Schwartz, D. E.: *Ann. Inst. Pasteur*, 88 (1955) 271.
34. Wenckert, A. and Nilsson, I. M.: *Scand. J. clin. Lab. Invest.*, suppl. 15 (1955).
35. O'Brien, J. R.: *Nature (Lond.)*, 181 (1958) 1801.
36. O'Brien, J. R.: *Lancet*, 21. Feb. (1959).
37. Duran-Reynals, F.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 38 (1938) 763.
38. Djerassi, J., Klein, E., Farber, S.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 97 (1958) 2.
39. Georgatsos, J. G., Hussey, U. C., Quick, J. A.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 97 (1958) 3.

Summary

EFFECT OF ELECTROPHORETIC FRACTIONS OF VIPERAMMODYTES VENOM ON COAGULATION IN VITRO

Coagulation studies on saline eluates of bands cut from a paper strip on which viperammodytes venom was electrophoresed at low temperature (2° C) show coagulant and anticoagulant principles. The coagulant substance migrates toward the anode, the anticoagulant fraction migrates on the opposite site towards the cathode.

The clot-promoting eluate of the venom depends in his activity on the concentration of prothrombin, proaccelerin and the factor VII complex. An obvious enhancement in the activity of the coagulant substance could be demonstrated in the presence of platelets and platelets substituent cephalin.

The anticoagulant fraction show antithromboplastin-like activity, which was inactivated by platelets and the Christmas-factor.

*Institute of Pathophysiology,
Medical Faculty, Skopje*

*Received for publication
June 1, 1959*