

การแยกส่วนประกอบของพิษงูเขียวหางไหม้และงูกะปะที่มีผลต่อกลไกการห้ามเลือด

นายอานูภาพ เลชะกุล



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาอายุรศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2531

ISBN 974-569-213-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

014440

117404721

ISOLATION AND PARTIAL PURIFICATION OF
HEMATOTOXIC PRINCIPLES OF CROTALID VENOMS
(GREEN PIT VIPER AND MALAYAN PIT VIPER)

Mister Arnuparp Lekhakula

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Internal Medicine

Graduate School

Chulalongkorn University

1988

ISBN 974-569-213-1

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University

Thesis Title Isolation and Partial Purification of Hematotoxic Principles of Crotalid Venoms (Green Pit Viper and Malayan Pit Viper)
By Mr. Arnuparp Lekhakula
Department Internal Medicine
Thesis Advisor Assistant Professor Seubsan Mahasandana, M.D.
Co-advisor Associate Professor Tada Seublinvong, M.D., M.Sc.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

Thavorn Vajrabhaya Dean of Graduate School
(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee:

S. Israsena Chairman
(Associate Professor Sachaphan Israsena, M.D.)
S. Mahasandana Thesis Advisor
(Assistant Professor Seubsan Mahasandana, M.D.)
Tada Seublinvong Co-advisor
(Associate Professor Tada Seublinvong, M.D., M.Sc.)
Chulee Mitrakul Member
(Professor Chulee Mitrakul, M.D., D.Sc.)



อาณัติภาพ เลขช่กุล :: การแยกส่วนประกอบของพิษงูเขียวหางไหม้และงูกะปะที่มีผลต่อกลไกการห้ามเลือด (ISOLATION AND PARTIAL PURIFICATION OF HEMATOTOXIC PRINCIPLES OF CROTALID VENOMS (GREEN PIT VIPER AND MALAYAN PIT VIPER)) อ.ที่ปรึกษา : ศศ.นพ.สืบสันต์ มหาสันทนะ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.พญ. ธาดา สืบหลินวงศ์, 84 หน้า.

เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่า พิษงูเขียวหางไหม้และงูกะปะก่อให้เกิดความผิดปกติในระยะต่างๆ ของกลไกการห้ามเลือด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกส่วนประกอบจากพิษของงูทั้งสองโดย DEAE-cellulose column chromatography แล้วนำมาศึกษาผลที่มีต่อการแข็งตัวของเลือด, fibrinolysis, ผลต่อ platelet และ hemorrhagic activity

ผลการศึกษาพบว่าพิษของงูเขียวหางไหม้ (Trimeresurus popeorum) และ งูกะปะ (Calloselasma rhodostoma) มีฤทธิ์คล้าย thrombin นอกจากนี้ยังมี fibrinolytic และ hemorrhagic activity ด้วย ทั้งนี้ความรุนแรงจะขึ้นอยู่กับปริมาณของพิษ แต่จากรายงานนี้ไม่พบว่าพิษของงูทั้งสองมีผลทำให้เกิดหรือยับยั้งการเกิดการรวมกลุ่มของ platelet ดังที่ได้เคยมีผู้ศึกษาไว้ พิษของงูเขียวหางไหม้จะมี thrombin-like และ fibrinolytic activity น้อยกว่าพิษของงูกะปะหลายเท่า แต่มีฤทธิ์ของ hemorrhagic activity สูงกว่า

โดย DEAE-cellulose chromatography สามารถแยกพิษของงูเขียวหางไหม้และงูกะปะ ออกได้เป็น 9 และ 7 ส่วนตามลำดับ โดยที่แต่ละส่วนจะมีฤทธิ์แตกต่างกันไป ได้ศึกษาแต่ละส่วนประกอบของพิษงูเขียวหางไหม้ พบว่าส่วนที่ II, V และ VI มีผลทาง thrombin-like activity ส่วนที่ I และ V มีฤทธิ์ทาง fibrinolysis ส่วนที่ I, III, VII และ VIII มีผลทาง hemorrhagic activity โดยที่ส่วนที่ V จะมีฤทธิ์ thrombin-like และ fibrinolytic activity สูงสุด ในขณะที่ส่วนที่ I มีฤทธิ์ hemorrhagic activity สูงกว่าส่วนอื่น สำหรับพิษของงูกะปะนั้น ส่วนที่ I, II, III, IV, V และ VI มี coagulant action โดยส่วนที่ IV จะมีฤทธิ์แรงที่สุด ในขณะที่พบ fibrinolytic และ hemorrhagic action สูงในส่วนที่ I

จากการศึกษาแต่ละส่วนประกอบด้วย 15% polyacrylamide gel electrophoresis อาจพอมองเห็นว่า ส่วนที่เป็น fibrinolytic และ hemorrhagic principle นั้นมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า ส่วนที่เป็น coagulant enzymes แต่ทั้งนี้ เนื่องจากส่วนประกอบที่ได้เป็นเพียง partial purified fraction จึงคงต้องมีการศึกษากันต่อไป

ภาควิชา อักษรศาสตร์
สาขาวิชา โลหิตวิทยา
ปีการศึกษา ๒๕๓๑

ลายมือชื่อนิติ Dyuan Kunit
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Dr. S. S. S.

ARNUPARP LEKHAKULA : ISOLATION AND PARTIAL PURIFICATION OF HEMATO-
TOXIC PRINCIPLES OF CROTALID VENOMS (GREEN PIT VIPER AND MALAYAN PIT
VIPER). THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. SEUBSAN MAHASANDANA,
CO-ADVISOR : ASSO. PROF. TADA SEUBLINVONG, Ed.D. 84 pp.

The hemostatic disorders following envenomization by crotalid snakes were well recognized. The objectives of this study were to isolate and identify the principles involving in those disturbances, focusing on coagulant action, fibrinolytic activity, effect on platelets and hemorrhagic components from common Thai crotalid venoms, Green pit viper (Trimeresurus popeorum) and Malayan pit viper (Calloselasma rhodostoma) by DEAE-cellulose column chromatography.

Both of them had the concentration-related powerful coagulant action, thrombin-like; fibrinolytic and hemorrhagic activities, but no platelet aggregating or aggregation inhibition effects were found in this report. Thrombin and fibrinolytic activities of T. popeorum venom were much less potent than of C. rhodostoma venom, but stronger hemorrhagic activity.

On chromatographic studies, T. popeorum and C. rhodostoma venoms were separated into nine and seven partial purified fractions, respectively. The different activities took place in the different venom fractions. Of T. popeorum venom, the clotting actions distributed in fractions II, V and VI, fibrinolytic activities in fractions I and V, hemorrhagic principles in fractions I, III, VII, VIII; whereas fraction V had the strongest coagulant and fibrinolytic activities, and fraction I for hemorrhagic component. Of C. rhodostoma venom, the clotting activities were found in fraction I, II, III, IV, V and VI, and fraction IV was the most powerful one; while the fibrinolytic and hemorrhagic principles were concentrated in fraction I.

On 15% polyacrylamide gel electrophoresis, the fibrinolytic and hemorrhagic partitions seemed to have lower molecular weight than the coagulant enzymes.

This was only preliminary study in this field, the venom fractions obtained were partially purified. Further steps in separation and identification of purified components should be proceeded.

ภาควิชา INTERNAL MEDICINE
สาขาวิชา HEMATOLOGY
ปีการศึกษา 2530

ลายมือชื่อนิสิต A. Lekhakula
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Seubsan Mahasandana

ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express my sincere gratitude to my advisor, Assistant Professor Seubsan Mahasandana, and co-advisor, Associate Professor Tada Seublinvong for their kindness, valuable advices, guidance and encouragement during the course of this thesis.

I also wish to thank Associate Professor Supawat Chutivongse of Science Division, Thai National Red Cross Society, who not only support the snake venoms using in this study, but also help in lyophilization of the venom fractions.

Special appreciation is also respectfully submitted to Associate Professor Kanit Buranasiri, Head of Department of Biochemistry; Associate Professor Puedsri Wattananukul, Head of the Division of Hematology; Professor Srichitra Bunnag, Head of the Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Medicine; and Professor Chulee Mitrakul, Head of the Division of Hematology, and Head of the Department of Pediatrics, Chulalongkorn University, for their permission to use the laboratory facilities, equipments and chemicals.

Thanks are also extended to Dr. Naulthip Kamolvarin, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine,

Chulalongkorn University, for her kindness, helpful and valid suggestions in gel electrophoresis techniques.

I am grateful to the staff and personnels in the Division of Hematology, Department of Medicine for their kind assistance in the laboratory; and the staff of the Division of Medical Illustration for their valuable aids in photographic works, and the typists in the Department of Medicine for the preparation of this manuscripts.

Finally, I must faithfully submit my indebtedness to my family for their heartfelt support, encouragement, understanding, especially to my parent for my powerful life and intelligence.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENT


	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENT.....	vi
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xii
ABBREVIATIONS.....	xv
CHAPTER	
I. INTRODUCTION.....	1
Rationale and objective.....	1
Significances.....	2
II. REVIEW OF LITERATURES.....	4
Crotalid Venoms and Hemostasis.....	5
Green Pit Viper Venom.....	6
Malayan Pit Viper Venom.....	8
III. METHODOLOGY.....	13
3.1 Materials.....	13
3.1.1 Snake Venom.....	13
3.1.2 Fibrinogen.....	13
3.1.3 Thrombin.....	13
3.2 Methods.....	14
3.2.1 DEAE-Cellulose Column Chromatography..	14
3.2.2 Determination of Protein.....	15
3.2.3 SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis.....	15
3.2.4 Thrombin Time.....	16

	Page
3.2.5 Fibrinolytic Activity.....	17
3.2.6 Preparation of Plate-Rich Plasma.....	17
3.2.7 Platelet Aggregation Test.....	19
3.2.8 Direct Platelet Aggregation.....	20
3.2.9 Platelet Aggregation Inhibition Test..	20
3.2.10 Assay of Hemorrhagic Activity.....	20
IV. RESULTS.....	23
CRUDE VENOMS.....	23
Thrombin Activity.....	23
Fibrinolytic Activity.....	29
Direct Platelet Aggregation Activity.....	29
Platelet Aggregation Inhibition.....	34
Hemorrhagic Activity.....	34
ISOLATION AND FRACTIONATION OF VENOMS.....	41
Thrombin-like Activities.....	41
Fibrinolytic Activities.....	48
Hemorrhagic Activities.....	48
SDS-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS OF VENOMS.....	54
T. <u>popeorum</u> Venom and its Fractions.....	54
C. <u>rhodostoma</u> Venom and its Fractions.....	59
V. DISCUSSION AND CONCLUSION.....	60
REFERENCES.....	69
APPENDIX.....	80
APPENDIX I.....	81
APPENDIX II.....	83
BIOGRAPHY.....	84

LIST OF TABLES

Table	Page
1 Thrombin activities of <u>T. popeorum</u> and <u>C. rhodostoma</u> venoms on fibrinogen solution.....	24
2 Clotting activities of <u>T. popeorum</u> and <u>C. rhodostoma</u> venoms on normal pool plasma.....	25
3 Thrombin activities of bovine thrombin on fibrinogen solution and normal pool plasma.....	26
4 Fibrinolytic activity of <u>T. popeorum</u> venom on fibrin plate.....	30
5 Fibrinolytic activity of <u>C. rhodostoma</u> venom on fibrin plate.....	31
6 Hemorrhagic activities of <u>T. popeorum</u> and <u>C. rhodostoma</u> crude venom on rabbit skin.....	39
7 Thrombin activities of <u>T. popeorum</u> venom fractions II, V, VI on fibrinogen solution.....	44
8 8.1 Thrombin activities of <u>C. rhodostoma</u> venom fractions I, II, III on fibrinogen solution.....	46
8.2 Thrombin activities of <u>C. rhodostoma</u> venom fractions IV, V, VI on fibrinogen solution.....	47
9 Fibrinolytic activities of <u>T. popeorum</u> venom fractions I, V on fibrin plate.....	50
10 Fibrinolytic activities of <u>C. rhodostoma</u> venom fraction I on fibrin plate.....	52

Table	Page
11 Distribution of hematotoxic principles in T. <u>popeorum</u> venom fractions.....	67
12 Distribution of hematotoxic principles in C. <u>rhodostoma</u> venom fractions.....	68



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1 Fibrinolytic activity by fibrin lysis plate.....	18
2 Architecture of the study.....	22
3 Thrombin activities of <u>T. popeorum</u> and C. <u>rhodostoma</u> venom on fibrinogen solution, compared with bovine thrombin.....	27
4 Coagulant activities of <u>T. popeorum</u> and C. <u>rhodostoma</u> venom on normal pool plasma, compared with bovine thrombin.....	28
5 Fibrinolytic activities of <u>T. popeorum</u> and C. <u>rhodostoma</u> crude venom.....	32
6 Platelet aggregation curves induced by various inducers.....	33
7 Effect of <u>T. popeorum</u> venom on human platelet aggregation.....	35
8 Inhibitory effects of <u>T. popeorum</u> venom on human platelet aggregation	36
9 (A) Effect of C. <u>rhodostoma</u> venom on human platelet aggregation.....	37
(B) Inhibitory effects of C. <u>rhodostoma</u> venom on human platelet aggregation.....	37
10 Venom-produced hemorrhage observed from visceral side of rabbit skin.....	38
11 Dose-response curve of hemorrhage induced by <u>T. popeorum</u> and C. <u>rhodostoma</u> venom.....	40

Figure	Page
12 DEAE-cellulose (DE 52) column chromatography of <u>T. popeorum</u> venom.....	42
13 DEAE-cellulose (DE 52) column chromatography of <u>C. rhodostoma</u> venom.....	43
14 Thrombin activities of <u>T. popeorum</u> crude venom and venom fractions, compared with bovine thrombin.....	45
15 Thrombin activities of <u>C. rhodostoma</u> crude venom and venom fractions, compared with bovine thrombin.....	49
16 Fibrinolytic activities of <u>T. popeorum</u> crude venom and its fractions.....	51
17 Fibrinolytic activity of <u>C. rhodostoma</u> crude venom and its fraction.....	52
18 Hemorrhagic activities of venom fractions of <u>T. popeorum</u> on rabbit skin.....	55
19 Hemorrhagic activities of venom fractions of <u>C. rhodostoma</u> on rabbit skin	56
20 SDS-Polyacrylamide gel (15%) electrophoresis at pH 8.3 of <u>T. popeorum</u> crude venom and some venom fractions.....	57
21 SDS-Polyacrylamide gel (15%) electrophoresis at pH 8.3 of <u>C. rhodostoma</u> crude venom and some venom fractions.....	58

22	Polyacrylamide-gel electrophoresis at pH 8.6 of the coagulant enzyme, venom peak 6, and the hemorrhagic and caseinolytic fractions of <i>C. rhodostoma</i> venom.....	66
----	--	----



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

α	=	alpha
ADP	=	Adenosine diphosphate
β	=	beta
cm	=	centrimetre
<u>C. rhodostoma</u>	=	<u>Calloselasma rhodostoma</u>
DEAE	=	Diethylaminoethyl
$^{\circ}\text{C}$	=	degree celcius
EACA	=	Epsilon-aminocaproic acid
EDTA	=	Ethylenediaminetetra-acetic acid
ed.	=	editor
et al	=	et alii
Fig.	=	Figure
g	=	gramme
GPVV	=	Green pit viper venom
h	=	hour
HCl	=	hydrochloric acid
kg	=	kilogramme
l	=	litre
M	=	molar
mA	=	milliampere
mg	=	milligramme
ml	=	millilitre
mM	=	millimolar
μg	=	microgramme
μl	=	microlitre
μM	=	micromolar

min	=	minute
MHD	=	Minimum Hemorrhagic Dose
MPVV	=	Malayan pit viper venom
N	=	Normal
NaCl	=	sodium chloride
NIH	=	National Institute of Health
NSS	=	Normal saline solution
NH ₄ OAC	=	Ammonium acetate
PAGE	=	Polyacrylamide gel electrophoresis
PRP	=	Platelet-rich plasma
PPP	=	Platelet-poor plasma
rpm	=	revolution per minute
rev	=	revolution
R _f	=	Relative mobility ratio
spp.	=	species
sec	=	second
sq mm	=	square millimetre
SDS	=	Sodium dodecyl sulphate
T. <u>albolabris</u>	=	<u>Trimeresurus albolabris</u>
T. <u>erythrurus</u>	=	<u>Trimeresurus erythrurus</u>
T. <u>popeorum</u>	=	<u>Trimeresurus popeorum</u>
TAME	=	p-Toluene sulfonyl-L-arginine methyl ester
TEMED	=	N, N, N', N'-tetramethylethylene-diamine
TEAE	=	Triethylaminoethyl
V	=	volt