UPPSALA
UNIVERSITET

Struktur, funktion och medicinska tillämpningar av giftet hos den indiska kobran (*Naja naja*)

Johannes Van den Weghe

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2013
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Struktur, funktion och medicinska tillämpningar av giftet hos den indiska kobran (*Naja naja*)

Johannes Van den Weghe

Sammandrag

Den indiska kobran (*Naja naja*) står för cirka 5000-10 000 dödsfall i Indien varje år. Giftet består av neurotoxiner, cytotoxiner, metalloproteas, hyaluronidas, fosfolipas A_2 och andra enzymatiskt aktiva ämnen. Fosfolipas A_2 har såväl en koagulatorisk som en antikoagulatorisk verkan, vilket gör att de bildas färre fullt fungerande blodkoagler och de som nybildas är defekta. Hyaluronidas brukar ofta kallas "spridningsfaktor" på grund av dess förmåga att bryta ned hyaluronsyra vilket gör att giftet kan diffundera fritt genom den extracellulära matrisen. Metalloproteas är en stor grupp stor grupp med metallberoende enzymer. I giftet har metalloproteas en antikoagulatorisk effekt.

Toxiner såsom neurotoxiner och cytotoxiner är de centrala beståndsdelarna i den indiska kobrans gift. Alla toxinerna hos den indiska kobran består av 60-72 aminosyror och uppvisar en likartad aminosyrasammansättning. De olika toxiner som finns hos den indiska kobran är cytotoxiska vid namn I, II och IIa. De neurotoxiska toxinerna har delas upp i två grupper och har namnen långa neurotoxiner A,B, C och D och korta neurotoxiner I och II.

Disintegrin och NN-32 är proteiner som har visat sig ha anti-cancerogena egenskaper. Disintegrin har en cytotoxisk verkan genom initiering av apoptos hos bröstcancer-, lungcancer- och levercancerceller. NN-32 har visat sig kunna aktivera apoptos hos Yohsida sarkom-, ascites hepatom- och leukemiceller. Apoptos initieras genom att NN-32 förhindrar att cancercellerna kan passera genom cellcykeln. En studie pekar även på att NN-32 kan vara selektiv genom att vara mer toxisk mot cancerceller än mot andra celler.

Inledning

Ormen har under mänsklighetens historia beundrats, fruktats och inte utan orsak. Man beräknar att ungefär 125 000 dör varje år på grund av ormbett, där Asien står för majoriteten av alla dödsfall med cirka 100 000 dödsfall per år (Chippaux 1998). I södra Asien har man myntat begreppet "Big 4"(det stora fyra) där man refererar till de fyra arter som står för flest dödsfall i Indien: russells huggorm (*Daboia russeli),* indisk kobra (*Naja naja*), sandrasselhuggorm (*Echis carinatus)* och vanlig krait *(Bungarus caeruleus)* (Simpson & Norris 2007).

Alla asiatiska kobror har tills nyligen ansetts vara underarter till den indiska kobran (fig.1). Men studier som har gjorts har visat på en skillnad mellan de olika arterna med avseende på deras toxiner (Wüster 1996). Den indiska kobran tillhör familjen Elapidae och den återfinns i västra Asien och den indiska subkontinenten (Kularatne et al. 2009).

I Indien dör cirka 5000-10 000 människor per år som följd av bett från den indiska kobran. Man tror att det är närmare 5000 än 10 000 då många oförklarliga dödsfall skylls på ormar (Chippaux 1998).

Med så många dödsfall började man att studera mer och mer vilka komponenter som finns i ormars gift. Man ville veta vilka effekter som dessa komponenter har, för att kunna utveckla motgift. Då man har studerat giftet har man upptäckt att giftet kan ha medicinska tillämpningar. Hos den indiska kobran finns det många olika komponenter med farmakoligiska effekter, till exempel antikoagulatoriska och anti-cancerogena egenskaper. Genom att isolera proteiner från den indiska kobrans gift har man i studier visat att delar av giftet kan inducera apoptos hos Yohsida sarkom-, ascites hepatom- och leukemiceller (Takechi et al. 1972 , Das et al. 2013).

Figur 1: *En ung indisk kobra med den typiska nackskölden utvecklad. Av: Gopal Venkatesan 2009*

Syftet med detta arbete är att besvara följande frågor: Vad består giftet av? Hur ser verkningsmekanismerna ut? Finns det några medicinska tillämpningar av den indiska kobrans gift och i så fall vilka?

Den indiska kobrans gift

Giftet hos den indiska kobran består av neurotoxiner, cytotoxiner och även andra typer av proteiner. De proteiner som inte är toxiner finns som fria proteiner i giftvätskan (Charles et al. 1981). De olika ämnena som kommer att tas upp i det här arbetet är fosfolipas A_2, hyaluronidas och metalloproteas (SVMP). Toxiner som har en neurologisk påverkan kallas neurotoxiner och toxiner som har en toxisk verkan mot celler kallas cytotoxiner.

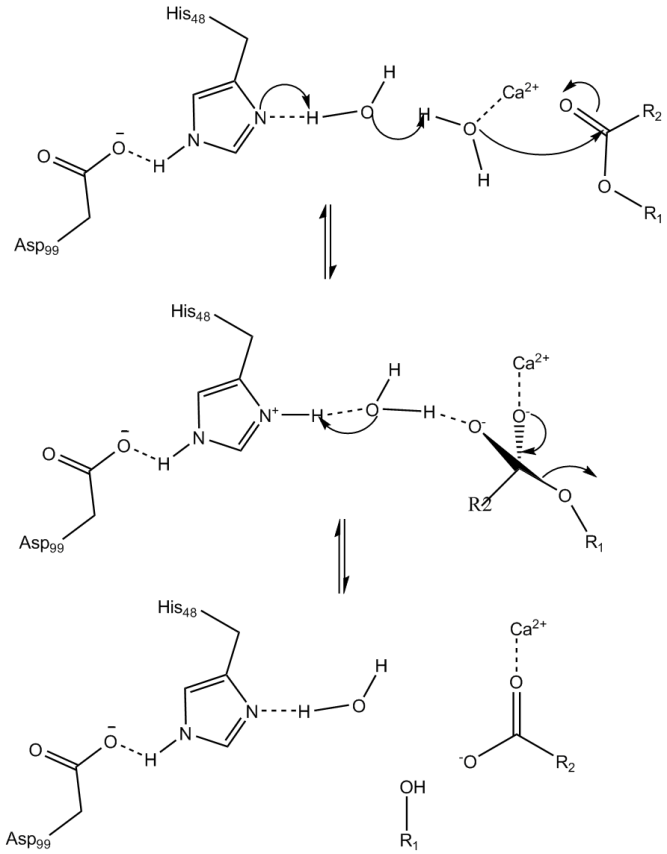
Neurotoxinerna är de huvudsakliga toxinerna hos den indiska kobran med mest potent verkan. I den indiska kobrans gift finns flera olika typer av neurotoxiner. De olika neurotoxiska gifter som finns hos den indiska kobran klassificeras i två olika grupper; långa neurotoxiner A, B, C och D och korta neurotoxiner I och II. Skillnaden mellan de olika grupperna har att göra med längden på aminosyrasekvensen i toxinerna (Ohta et al. 1981).

Ett fosfolipas A_2 har identifierats hos en population av den indiska kobran och detta protein har en ännu mer potent neurotoxisk verkan än de neurotoxiner som den indiska kobran har (Mukherjee & Maity 2002, Shashidharamurthy & Kemparaju 2006). Fosfolipas A_2 ingår i neurotoxin, cytotoxin och även som fria proteiner i giftvätskan hos den indiska kobran. Det finns flera olika typer av fosfolipas A_2 i kobrans gift. Fosfolipas A_2 hydrolyserar fosfolipider. Hos människor interagerar enzymet med röda blodkropparnas plasmamembran där det har en

koagulatorisk verkan (Bicher et al. 1965). I ormens gift finns det även substanser som inte ingår i någon av cyto- eller neurotoxinerna. Metalloproteas och fosfolipas A_2 har båda en antikoagulatorisk effekt. Hyaluronidas kallas även "spridningsfaktor" och används huvudsakligen för att sprida giftet från bettet till närmaste kapillär.

Fosforlipas A_2

Fosforlipas A_2 ingår i olika delar av ormens gift, i både toxinerna och i ormens gift som fria proteiner i giftvätskan. Fosfolipas A_2 initierar en rad olika effekter såsom nedbrytning av ormens byte genom att orsaka lysering av celler och det har en antikoagulatorisk effekt genom att störa blodplättsaggregering och aktivera protrombinas. Giftet förmedlar både en koagulatorisk och en antikoagulatorisk verkan, men dess huvudsakliga uppgift är att katalysera hydrolys av fettsyror (fig.2) (Basavarajappa et al. 1993).



Figur 2: *Katalyseringen av hydrolys genom Ca^{2+} polarisering av 2-sn karbonylsyregruppen. Av: Ron Jones 2011.*

Fosfolipas A_2 stimulerar aktivering av protrombinas som är en essentiell del av kaskadprocessen som leder till en koagulation av blodet. När en blodkoagel bildas sker en aggregering av blodplättar för att forma blodkoageln. Genom en ännu okänd mekanism interagerar fosfolipas A_2 i synergi med andra komplex i giftet med blodplättarna som leder till en sämre elasticitet hos blodplättarna vilket orsakar en sämre kontraktionsförmåga. Till skillnad från vanliga blodkoagler är blodkoagler skapade genom interaktion med giftet defekta på grund av den försämring som sker av kontraktionsförmågan hos blodplättarna (Sundell et al. 2003). Den antikoagulatoriska effekten som fosfolipas A_2 orsakar genom bildning av defekta blodkoagler leder till ischaemi. Ischaemi innebär att syresatt blod inte når sin destination eller i för liten mängd (Sundell et al. 2003).

En hypotes är att ischaemi uppstår på grund av att de defekta blodkoaglerna förhindrar syresatt blod från att nå fram till cellerna vilket leder till skador på kapillärerna. Skadornas omfattning begränsas därför att fosfolipaset endast har en lokal verkan. Som följd av ischaemi uppstår nekros. (Sundell et al. 2003).

Hyaluronidas

Hyaluronidas är en glykosidas som bryter ner hyaluronsyra. Hyaluronidas återfinns i giftvätskan hos nästan alla ormarter i världen (Girish & Kemparaju 2006). Hyaluronsyra består av sura upprepade disackarider och har en relativt hög molekylvikt på 70,4 kDa.

Hyaluronsyra har ett flertal olika funktioner: Den bidrar till viskoelastisitet (deformation som både är elastisk och visköst) i olika typer av vävnader, medverkar vid regleringen av vattenbalansen, osmotiskt tryck i vävnader och återfinns även i ledvätska där den har en smörjade funktion (El-Safory et al. 2010).

Enzymets funktion i ormgiftet är att den används som en så kallad "spridningsfaktor", vilket innebär att enzymet hjälper spridning av giftet från bettet till närmaste kapillär. Detta görs genom nedbrytning av hyaluronsyra, som leder till att ormens gift kan diffundera genom den extracellulära matrixen (Girish et al. 2004).

En studie utfördes 2006 för att avgöra hur stor inverkan hyaluronidas har på överlevnadstid hos möss efter injektion av gift från den indiska kobran. I studien injicerades en grupp av möss enbart med gift från den indiska kobran medan en annan grupp av möss förutom giftet även injicerades med en substans som inhiberar hyaluronidas. Resultatet från studien visade att överlevnadstiden hos de individer som endast injiceras med giftet var betydligt kortare (ca 49 minuter) än överlevnadstiden hos de individer som dessutom injicerats med den substans som verkar inhiberande på hyaluronidas (ca 71 minuter) (Girish & Kemparaju 2006).

Man har även upptäckt en isoform av enzymet med samma funktion och till synes samma verkningsmekanism som den ursprungliga. Både formerna bidrar till lokal vävnadsskada vid ormens bett när nedbrytning av hyaluronsyra sker (Girish & Kemparaju 2005).

Metalloproteas (NN-PF_3)

Metalloproteas är en grupp enzymer som använder proteinbundna metalljoner och vattenmolekyler som aktivatorer. Metalloproteas är en viktig grupp enzymer som finns i alla levande organismer (Auld 2013). Metalloproteas som återfinns hos ormars gift brukar anges SVMP (snake venom metalloprotease)(Guan et al. 2010).

Hos den indiska kobran ingår metalloproteas i ormens gift, där man har identifierat tre olika metalloproteaskomplex (NN-$PF_{1,2}$ och $_3$) varav en av dessa (NN-PF_3) är enzymatiskt aktiv. NN-PF_3 har en relativt låg molekylvikt på 68 kDa. NN-PF_3 använder sig av kalciumjoner (Ca^{2+}) och zinkjoner (Zn^{2+}) som aktivatorer (Jagadeesha et al. 2002). Jonerna används för sina specifika egenskaper till exempel zinkjonerna kan stabilisera peptiden (Graham et al. 2005). Metalloproteas har observerats ha en antikoagulatorisk effekt (Jagadeesha et al. 2002).

Fibrinogen är ett glykoprotein som syntetiseras i levern och finns i blodet i höga koncentrationer. Fibrinogen består av tre olika peptidkedjor α, β och γ. Fibrinogen aktiveras av trombin som klyver små peptider av fibrinogen och bildar fibrin. Därefter bildas en nätliknande struktur som fångar upp blodplättar och aggregerar dem. NN-PF_3 attackerar C-terminalen hos α- och β-kedjor hos fibrinogen och klyver dessa kedjor. α-kedjan klyvs snabbare än β-kedjan och nedbrytning av dessa kedjor gör att bildning av fibrin från fibrinogen går saktare. Då NN-PF_3 klyver fibrinogenkedjorna finns mindre fibrinogen tillgängligt för polymerisering vilket leder till att mindre fibrin kan bildas. När mindre fibrin bildas på grund av nedbrytningen av fibrinogen tar koagulationsprocessen längre tid vilket ger

ökad blödning. NN-PF_3 verkar inte påverka trombin som i sin tur aktiverar fibrinogen (Kumar et al. 2009).

In vitro-experiment utförda 2002 gjordes för att bestämma effekten hos NN-PF_3 i blodplasma hos människor. Blodplasma från ett antal individer samlades in. Plasma från varje individ delades upp i två prover. Till det ena provet sattes NN- PF_3 men inte till det andra. Vid höga doser (4µg) såg man en markant skillnad mellan den försöksgruppen och kontroll. Testet visade att koagulering av blodplasman tog 244 ± 5 sekunder hos försöksgruppen och 95 ± 4 sekunder hos kontrollgruppen. Detta försök påvisar NN-PF_3s antikoagulatoriska effekt (Jagadeesha et al. 2002).

Neurotoxiner

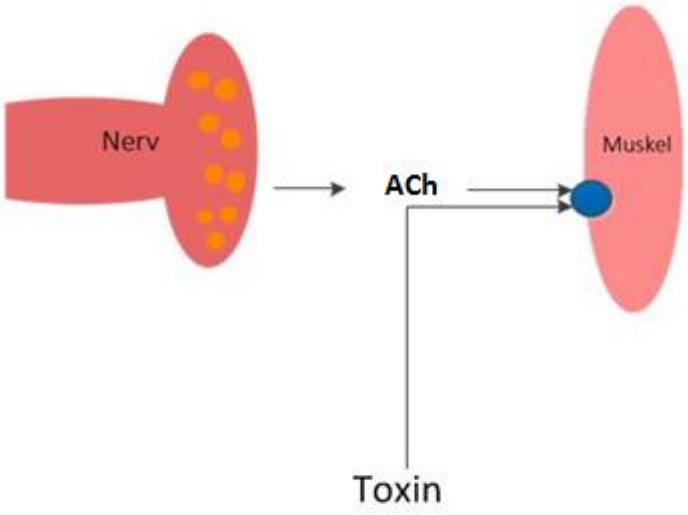
Skillnader mellan neurotoxinerna

Långa neurotoxiner är cirka 70-74 aminosyror långa och är korslänkade med fem disulfidbryggor. Korta neurotoxiner är cirka 60-62 aminosyror i längd och korslänkade med fyra disulfidbryggor (Ohta et al. 1981). De långa neurotoxinerna som finns hos den indiska kobran liknar varandra, med endast några få skillnader i aminosyrasekvensen. De mest toxiska neurotoxinerna som finns i den indiska kobrans gift är toxin A och B (Charles et al. 1981). Skillnaden mellan toxin A och toxin B är en enda aminosyra som är utbytt i peptidkedjan, en leucin mot en isoleucin. Förutom detta är de identiska. Neurotoxin C består av 71 aminosyror i en peptidkedja som är korslänkad med fem disulfidbryggor, några olika fria aminosyragrupper, fem guanidinogrupper och karboxylgrupper (Karlsson et al. 1972). Neurotoxin D är 71 aminosyror lång. LD50-värdet för neurotoxin D är ungefär dubbelt så högt som det för neurotoxinerna A och B. Detta anses bero på att den 35:te aminosyran i neurotoxin Ds peptidkedjan – lysin – är negativt laddad. Hos de flesta andra neurotoxiner är denna aminosyra positivt laddad. Att lysinet är positivt laddat vid denna specifika plats i peptidkedjan kan vara viktigt för en hög toxicitet hos toxinet (Ohta et al. 1981).

Neurotoxinernas verkningsmekanism och effekt

Neurotoxiner i giftet orsakar en curareliknande effekt på den som blir biten. Musklerna slappnar av och bytesdjuret eller människan dör som följd av andningsuppehåll (Charles et al. 1982). Trots att neurotoxinerna har en curareliknande effekt så misslyckades curareantagonister som K^+, Ca^{2+} och succinylkolin att motverka giftets neurotoxiska effekt (Charles et al. 1982). Curare är ett gift som ingår i alkaloidfamiljen och har en muskelavslappnande effekt. Neurotoxinernas effekter på människor inkluderar symptom såsom; dåsighet, huvudvärk, förvirring, medvetslöshet, konvulsioner och förlamning. Förlamning kan ske i stort sett var som helst i kroppen t.ex. extremiteter, nacke, muskler ansvariga för ögonrörelser och muskler ansvariga för andning. Fall där andningen störs blir snabbt livshotande och det är en vanlig orsak till att personer som blir bitna avlider (Britt & Burkhart 1997).

Det huvudsakliga målet för den indiska kobrans neurotoxiner är blockering av nikotinreceptorer (NACHr) och därmed förhindra en bindning mellan receptorn och acetylkolin (fig.3). När acetylkolin binder till NACHr öppnas jonkanaler i cellmembranet som släpper ut K^+ och in Ca^{2+} genom kanalen. Detta leder i sin tur till att nervimpulsen transporteras vidare till t.ex. en skelettmuskel som då svarar med en kontraktion.



Figur 3: *Acetylkolin och neurotoxin konkurerar om att binda till NACHr vid en motorändplatta. Bilden är självproducerad efter Dake 2009.*

När receptorn är blockerad öppnas inga jonkanaler och nervimpulsen transporteras inte fram till muskeln. När inga signaler når muskeln upphör den att kontrahera och muskeln blir avslappnad. Neurotoxinets affinitet till receptorn är hög. Tester där man har använt Krebs buffert för att "tvätta" muskelcellerna som blivit utsatta för neurotoxinet så har inte ens upprepade försök lett till att depolarisation återupptagits på grund av att toxinets starka bindning till NACHr. Neurotoxinet har ingen påverkan på frisläppning av acetylkolin utan konkurrerar endast med signalsubstansens bindning till receptorn (Charles et al. 1982).

Fosfolipas A_2 med neurotoxisk verkan

Ett neurotoxiskt fosfolipas A_2 finns i den indiska kobrans gift. Detta fosfolipas skiljer sig mellan olika populationer av indiska kobror. Hos den östra populationen i Indien finns det en typ av fosfolipas A_2 som inte har noterats hos någon av de andra populationerna. Namnet på detta "nya" fosfolipas A_2 är NN-X-PLA^2. Detta lokala fosfolipas har ett LD_{50} värde på 0,098 mg/kg hos möss, vilket är den lägsta LD_{50} dosen som noterats inom arten. Tester där man gav möss (n=6) dubbla LD_{50} dosen, blev resultatet att mössen fick fullt utvecklade neurologiska symptom som bakbensförlamning, andningsnöd och konvulsioner inom 30-35 minuter. Döden hos mössen inträffade efter 58 ± 5 minuter. Detta innebär att fosfolipaset har en neurologisk verkan och att det är potent (Shashidharamurthy & Kemparaju 2006).

Cytotoxiner

Hos den indiska kobran finns det två olika typer av cytotoxiner; cytotoxin I, cytotoxin II och det finns även en analog av cytotoxin II vid namn cytotoxin IIa (Kaneda & Hayashi 1983).

Cytotoxiner hos den indiska kobran är 60-62 aminosyror långa och är placerade i en enda peptidkedja. Cytotoxin II består av 60 aminosyror korslänkade med disulfidbryggor, med en

låg molekylvikt på cirka 7 kDa. Cytotoxin II är likt cytotoxin I och liknar neurotoxin A till en viss del då den har nästan samma aminosyrasekvens förutom på platserna 12,13och 21-27 i peptidkedjan (Takechi et al. 1972).

Cytotoxinernas verkningsmekanism och effekt
Den exakta verkningsmekanismen för den indiska kobrans cytotoxiner är ännu inte helt kartlagd. Specifika peptider isolerade från cytotoxin har undersökts och verkningsmekanism har upptäckts, men inte verkningsmekanismen för toxinerna i sin helhet. Cytotoxiner från den indiska kobran har en rad olika effekt i kroppen hos den som blir biten; nekros, apoptos och lysering av röda blodkroppar (Ponnappa et al. 2008).

Fosfolipas A_2 med cytotoxisk verkan
De finns syrarika fosfolipas A_2 som är cytotoxiska hos den indiska kobran. Genom fraktionering har man identifierat en rad olika proteiner som har fått namnen; NN-I-PLA, NN-I_2-PLA och NN-I_3-PLA, men endast NN-I_2-PLA har fosfolipasaktivitet. NN-I_2-PLA fraktionerades vidare och man identifierade fem olika fosfolipasaktiva komponenter, namngivna NN-I_{2a}-PLA till NN-I_{2e}-PLA. De fosfolipaser som liknade varandra var NN-I_c-PLA, NN-I_d-PLA och NN-I_e-PLA. Dessa tre sura fosfolipaser har förmodligen inte någon större cytotoxisk effekt i sig självt, men man vet inte om dessa fosfolipaser kan samverkan med andra delar av giftet. När man gett möss de tre fosfolipaserna var de inte dödliga, inte ens när en stor dos på 10 mg kg^{-1} administrerades till mössen. Den enda effekten som observerades hos mössen var att de fick ödem (ansamling av vätska) i tassarna. Basiska fosfolipaser anses generellt vara mer toxiska än de sura, som är av betydelse vid nedbrytningen av ormens byte (Rudrammaji & Gowda 1998).

Medicinska tillämpningar av giftet

Identifiering av beståndsdelarna i kobragiftet har gjort att man effektivt har kunna börja undersöka om giftet har medicinska tillämpningar. Man har sett att olika isolerade peptider från cytotoxinerna från den indiska kobran har toxiska effekter på cancerceller. Specifikt på Yohsida sarkom, ascites hepatomceller när man gjort undersökningar på möss och på leukemi (U937) i *in vitro*-studier hos människoceller. Man har även gjort *in vitro*-studier med cytotoxin IIa där man såg toxicitet mot ett flertal cancertyper; bröstcancer (MCF-7), lungcancer (A549) och levercancer (HepG2) (Takechi et al. 1972, Das et al. 2013, Thangam et al. 2012).

Studerade cancertyper

I studier där man undersökt den toxiska verkan av den indiska kobrans gift har man kommit fram till att isolerade peptider och proteiner från kobrans cytotoxiner har en anti-cancerogen effekt. I studierna har man använt sig av specifika modellcellinjer för den cancertyp man vill studera.

Yohsida sarkom
Yohsida sarkom är en cancer av typen sarkom som studeras hos råttor. Yohsida sarkomstudier används som typexempel för att undersöka hur tumörer bildas och används för att ge ökad förståelse för tumörbildning hos människor (SARCOMA 1964).

Ehrlich ascites karcinom
Ehrlich karcinom är en typ av cancer finns hos möss och är en typ av bröstcancer. Denna specifika cancer används ofta i djurförsök då den enkelt kan transplanteras till försöksdjuret. Ehrlich karcinom är en tumör som antingen växer som en solid tumör eller som ascites. Ascites är ett tillstånd som innebär att bukhålan fylls med vätska. Ascites kan ha olika orsaker, en av dem är cancer, så kallad malign ascites.

Leukemi (U937)
Leukemi är ett samlingsnamn för en rad olika typer av cancersjukdomar, generellt sett är leukemi en cancertyp som angriper blodet, de vita blodkropparna och benmärgen. U937 är en specifik typ av leukemi som kallas histiocytisk lymfom. Karaktäristiskt för histiocytisk lymfom är stora tumörer som liknar histiocyter i utseende men är lymfom. Histiocyter är en del av immunförsvaret. Leukemi som grupp står för cirka 255 000 dödfall per år i världen.

Bröstcancer (MCF-7)
Bröstcancer är en cancertyp som angriper bröstkörtelvävnad och bröstcancer orsakar cirka 450 000 dödsfall per år i världen. MCF-7 är en modellcellinje som har använts till en stor del inom bröstcancerforskning.

Lungcancer (A549)
Lungcancer är en cancertyp som angriper lungvävnad. Lungcancer är den vanligaste typen av cancer och den cancertyp som står för flest dödsfall, cirka 1,38 miljoner per år i världen. A549 är en modellcellinje som tillhör adenokarcinom vilket är den vanligaste typen av lungcancer. Adenokarcinom är cancer som kommer från epitelceller som finns i körtlar.

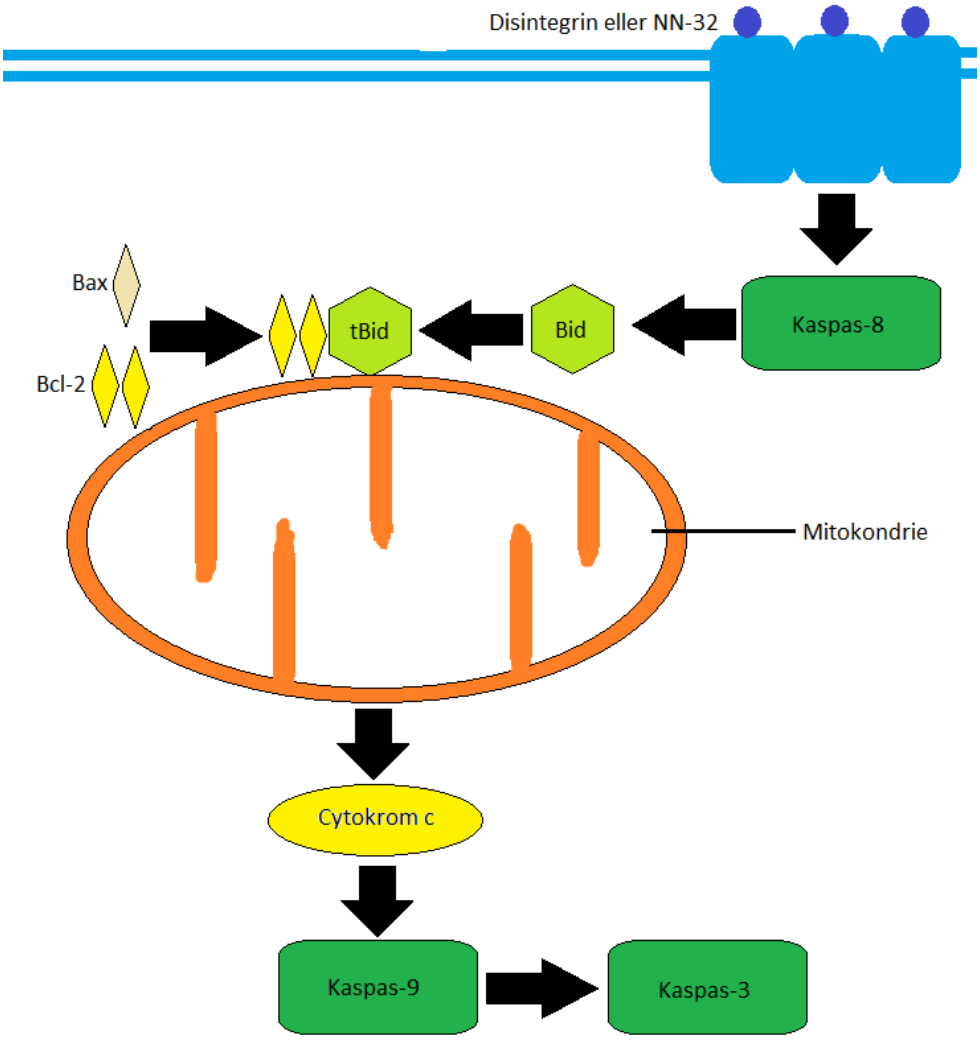
Levercancer (HepG2)
Hepatom en cancerform i gruppen karcinom. Hepatom angriper levern och är en utav de vanligaste typerna av cancer som angriper levern. Hepatom uppstår vanligast som en effekt av en annan leversjukdom som hepatit B, C och levercirros (skrumplever) och står för cirka 600 000 dödsfall per år i världen. HepG2 är ett karcinom bildas i epitelceller.

NN-32
NN-32 är ett protein och en antioxidant isolerat från den indiska kobrans gift. NN-32 är en polypeptid med en låg molekylvikt på 6,7 kDa. N-terminalens aminosyrasekvens hos NN-32 är liknande den aminosyrasekvensen hos andra toxiner från andra ormarter (Das et al. 2011). N-terminalens aminosyrasekvens är identisk med den från tre andra kobraarter och en huggormsart (Gomes et al. 2007). NN-32 har cytotoxiska egenskaper där den minsta dödliga dosen hos möss är 4 mg/kg (Das et al. 2011).

NN-32 har i studier visat sig inducerar apoptos i cancerceller (fig.5). När apoptosis sker så uppregleras proapototiska Bax, samtidigt som Bcl2 nedregleras (Das et al. 2011). Detta gör att kvoten Bax/Bcl2 är det som avgör hur mottaglig en cell är för apoptos (Gupta et al. 2010).

För att förstå hur NN-32 fungerar har studier utförts på möss som blivit infekterade med Ehrlichs ascites karcinom (EAC). Försöksgruppen som fick en behandling av NN-32 (10 mg/kg/dag) överlevde längre än kontrollgruppen. Överlevnadstiden var 29 ± 0,9 dagar för kontrollgruppen, medan den var cirka 64 ± 2 % längre hos behandlingsgruppen. Hos försöksgruppen observerade man ett reducerat antal cancerceller med upptill 90,3 ± 0,9 % jämfört med kontrollgruppen. NN-32 påverkar den s.k. inre apoptosvägen, genom att uppreglera Bax och nedreglera Bcl2 vilket leder till en förändrad kvot Bax/Bcl2 (Das et al. 2011). Detta gör att apoptoskaskaden fortsätter, vilket gör att aktivt kaspas-9 bildas från prokaspas-9. Sedan längre ned i kaskaden till kaspas-3, som båda är viktiga delar i apoptosen (Debnath et al. 2010).

En annan studie har gjorts på humana leukemiceller (U937). NN-32 har samma effekt som hos EAC där NN-32 inducerar apoptos. Hos leukemiceller har NN-32 även andra effekter. NN-32 påvisade egenskaper som tyder på att peptiden kan hämma delar av cellcykeln. När cellcykeln avstannar initieras apoptos (Das et al. 2013). I studier med proteinet NN-32 har man observerat att proteinet inte förorsakar lysis av erytrocyter från get, makrofager från möss eller av lymfocyter från människa. Detta kan tyda på att NN-32 är selektiv mot cancerceller i sin cytotoxisitet. Mekanismen bakom detta är ännu inte känd (Das et al. 2011).



Figur 5. *Proapoptotisk signal når cellreceptor som sedan startar apoptoskaskaden. Bid (BH3 interacting-domain death agonist), Bax (Bcl-2-associated X protein) och Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) Bilden är självproducerad efter Galluzzi et al. 2009.*

Disintegrin
Disintegrin är en grupp peptider med storleken 49-84 aminosyror. Man har sett att disintegrin kan ha en cytotoxisk påverkan på bröstcancer (MCF-7), lungcancer (A549) och levercancer (HepG2). Disintegrin isolerat från den indiska kobrans cytotoxiner kan påverka cellcykeln hos de ovannämnda cancertyperna. I studier har man sett att andelen celler i G_0,G_1 och S-faserna ökar medan de minskar för andelen celler i G_2 och M-faserna. Detta indikerar att disintegrin inhiberar G_0, G_1 och S-faserna medan den inte inhiberar G2 och M-faserna i cellcykeln. Apoptos har även observerats hos cancerceller som utsatts för disintegrin. Det är möjligt att disintegrin initierar apoptos på ett liknande eller till och med samma sätt som proteinet NN-32 (Thangam et al. 2012).

Diskussion
Att naturligt förekommande gifter kan användas inom medicin är inget nytt. Mycket av forskningen på ormgift har börjat för att kunna framställa motgift, ökad förståelse för hur ormgift är uppbyggda och hur giftet kan ge tillämpningar inom medicin.

I det här arbetet har flera olika toxiner, proteaser, och andra komponenter som ingår i giftet presenterats. I den indiska kobrans komplexa gift ingår ett stort antal olika proteiner och peptider vars aminosyrasekvens är avgörande för såväl verkningsmekanism som toxicitet. Det är bland annat visat för en av de långa neurotoxinerna som har ett negativt lysin där många andra neurotoxiner har ett positivt lysin och att detta verkar vara avgörande för dess något mindre toxicitet. Toxiner inom kobrafamiljen har en liknande aminosyrasekvens trots det är dessa små skillnader anledningen till mycket olika effekter och toxicitet. Då kobror har ett antal olika toxiner, som till exempel visats hos den indiska kobran som har både ett antal olika cytotoxiska och neurotoxiska. Denna skillnad i uppsättning toxiner bör vara en anledning till den skilda dödligheten hos olika arter (Ohta et al. 1981). De liknande aminosyrasekvenser som finns mellan olika toxiner är en anledning till fortsatta studier, då ökad förståelse för ett specifikt toxin hos en art, mycket väl kan ge ökad förståelse för ett toxin hos en annan art.

De båda icke-toxin komponenterna metalloproteas och fosfolipas A_2 har koagulatoriska och antikoagulatoriska egenskaper. Metalloproteas och fosfolipas är två stora grupper enzymer, dessa grupper utför viktiga funktioner. Fortsatta studier av verkningsmekanismer och effekter kan vara nödvändiga. Fosfolipas A_2 har klara negativa effekter genom dess initiering av bildning av defekta blodkoagler (Sundell et al. 2003). Detta gör att fosfolipas A_2 kanske är något mindre lämpad för medicinska tillämpningar. Metalloproteas skulle eventuellt kunna användas för att bekämpa blodproppar, men fler studier skulle självklart behövas för att utvärdera huruvida detta är möjligt.

Med hyaluronidas är det svårt att tänka sig allt för många medicinska tillämpningar. Det är förstås viktigt att fortsätta studera för att bättre kunna utforma motgift. Man skulle kunna tänka sig att anti-hyaluronidas skulle kunna administreras tillsammans med motgift för att minska spridning av giftet. Många som blir bitna i fattigare länder kan ha svårt att få sjukvård i tid. Till exempel i en studie på Sri lanka där man sammanställde statistik från sjukhus över

personer bitna av den indiska kobra, upptäckte man att många har cirka 45 minuters restid till närmaste sjukhus (Kularatne et al. 2009). Anti-hyaluronidas skulle förmodligen behöva ges mycket kort efter det att bettet ägt rum, för att kunna få en signifikant effekt. Men det är ändå en intressant tanke att man skulle kunna ge anti-hyaluronidas tillsammans med motgift. Om personen får sjukvård snabbt eller att anti-hyaluronidas skulle kunna vara mer tillgängligt lokalt och på så vis öka överlevnadsgraden innan den bitna personen har fått lämplig sjukvård.

De finns uppenbara skäl till att fortsätta studera delar av den indiska kobrans gift som till exempel disintegrin och NN-32. Då de har visat sig ha anti-cancerogena egenskaper. De olika cancertyper som har studerats har varit både hos möss och hos människoceller *in vitro.* Disintegrin har anti-cancerogena egenskaper mot modellcellinjerna bröstcancer (MCF-7), lungcancer (A549) och levercancer (HepG2). Då verkningsmekanismerna för disintegrin och NN-32 uppenbarligen har stora likheter är det svårt att säga om det är någon större skillnad mellan de två. De skulle vara bra med fler studier som reder ut vilka fler skillnader som finns. NN-32 har anti-cancerogena egenskaper mot yohsida sarkom, ascites hepatomceller och på leukemi (U937). NN-32s mest intressanta egenskap enligt mig är att den möjligtvis är selektiv i sin cytotoxisitet, vilket innebär att den är mer toxisk mot cancerceller än mot andra celler som testats. Fortsatta studier bör fokusera på att utvärdera om det faktiskt är så och i så fall hur ser verkningsmekanismen ut? (Thangam et al. 2012, Das et al. 2013, Das et al. 2011, Takechi et al. 1972).

Slutsats

Jag tror att de finns bra skäl att fortsätta studera giftet från den indiska kobran, inte bara för att behandla bett, men också för de potentiella medicinska tillämpningar som kan finns hos giftet. Metalloproteas, disintegrin och NN-32 har troligen fler tillämpningar annat än en ökad förståelse för att behandla bett. Både disintegrin och NN-32 kan nog användas i framtiden för att bekämpa cancer hos människor.

Tack

Jag skulle vilja tacka min handledare Jan Örberg för tips och råd. Jag skulle även vilja tacka mina medstudenter Anna Runsö, Hannes Gröntoft och Ella Franzèn för ihärdig och uppmuntrande kommentering.

Referenslista

Auld DS. 2013. Metalloproteases. In: Encyclopedia of Biological Chemistry. Editors-in-Chief: William J. Lennarz & M. Daniel Lane, editors. Academic Press, Waltham pp. 86–89. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123786302000189 (Accessed April 17, 2013).

Bicher HI, Klibansky C, Shiloah J, Gitter S, De Vries A. 1965. Isolation of three different neurotoxins from indian cobra (< i> Naja naja</i>) venom and the relation of their action to phospholipase a. Biochemical Pharmacology. 14: 1779–1782. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006295265902686 (Accessed April 11, 2013).

Britt A, Burkhart K. 1997. Naja naja cobra bite. The American Journal of Emergency Medicine. 15: 529–531. doi: 10.1016/S0735-6757(97)90202-3.

Charles AK, Gangal SV, Deshpande SS, Joshi AP. 1982. Effects on muscle of a toxin from indian cobra (< i> Naja naja naja</i>) venom. Toxicon. 20: 1019–1035. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0041010182901040 (Accessed April 11, 2013).

Charles AK, Gangal SV, Joshi AP. 1981. Biochemical characterization of a toxin from indian cobra (Naja naja naja) venom. Toxicon. 19: 295–303. doi: 10.1016/0041-0101(81)90033-7.

Chippaux JP. 1998. Snake-bites: appraisal of the global situation. Bulletin of the World Health Organization. 76: 515–524. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2305789/ (Accessed April 12, 2013).

Das T et al. 2011. Cytotoxic and antioxidant property of a purified fraction (NN-32) of Indian Naja naja venom on Ehrlich ascites carcinoma in BALB/c mice. Toxicon. 57: 1065–1072. doi: 10.1016/j.toxicon.2011.04.012.

Das T et al. 2013. Inhibition of leukemic U937 cell growth by induction of apoptosis, cell cycle arrest and suppression of VEGF, MMP-2 and MMP-9 activities by cytotoxin protein NN-32 purified from Indian spectacled cobra (Naja naja) venom. Toxicon. 65: 1–4. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.01.004.

Debnath A et al. 2010. A lethal cardiotoxic–cytotoxic protein from the Indian monocellate cobra (Naja kaouthia) venom. Toxicon. 56: 569–579. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.05.016.

El-Safory NS, Fazary AE, Lee C-K. 2010. Hyaluronidases, a group of glycosidases: Current and future perspectives. Carbohydrate Polymers. 81: 165–181. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.02.047.

Girish KS, Kemparaju K. 2005. A Low Molecular Weight Isoform of Hyaluronidase: Purification from Indian Cobra (Naja naja) Venom and Partial Characterization. Biochemistry (Moscow). 70: 708–712. doi: 10.1007/s10541-005-0172-6.

Girish KS, Kemparaju K. 2006. Inhibition of Naja naja venom hyaluronidase: Role in the management of poisonous bite. Life Sciences. 78: 1433–1440. doi: 10.1016/j.lfs.2005.07.015.

Girish KS, Shashidharamurthy R, Nagaraju S, Gowda TV, Kemparaju K. 2004. Isolation and characterization of hyaluronidase a ‘spreading factor’ from Indian cobra (Naja naja) venom. Biochimie. 86: 193–202. doi: 10.1016/j.biochi.2004.02.004.

Gomes Antony et al. 2007. A heat stable protein toxin (drCT-I) from the Indian Viper (Daboia russelli russelli) venom having antiproliferative, cytotoxic and apoptotic activities. Toxicon. 49: 46–56. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.09.009.

Graham SC, Bond CS, Freeman HC, Guss JM. 2005. Structural and Functional Implications of Metal Ion Selection in Aminopeptidase P, a Metalloprotease with a Dinuclear Metal Center†. Biochemistry. 44: 13820–13836. doi: 10.1021/bi0512849.

Guan H-H et al. 2010. Structures of two elapid snake venom metalloproteases with distinct activities highlight the disulfide patterns in the D domain of ADAMalysin family proteins. Journal of Structural Biology. 169: 294–303. doi: 10.1016/j.jsb.2009.11.009.

Gupta SD, Gomes Antony, Debnath A, Saha A, Gomes Aparna. 2010. Apoptosis induction in human leukemic cells by a novel protein Bengalin, isolated from Indian black scorpion venom: Through mitochondrial pathway and inhibition of heat shock proteins. Chemico-Biological Interactions. 183: 293–303. doi: 10.1016/j.cbi.2009.11.006.

Jagadeesha DK, Shashidhara murthy R, Girish KS, Kemparaju K. 2002. A non-toxic anticoagulant metalloprotease: purification and characterization from Indian cobra (Naja naja naja) venom. Toxicon. 40: 667–675. doi: 10.1016/S0041-0101(01)00216-1.

Kaneda N, Hayashi K. 1983. Separation of cardiotoxins (cytotoxins) from the venoms of Naja naja and Naja naja atra by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A. 281: 389–392. doi: 10.1016/S0021-9673(01)87906-1.

Karlsson E, Eaker D, Ponterius G. 1972. Modification of amino groups in Naja naja neurotoxins and the preparation of radioactive derivatives. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure. 257: 235–248. doi: 10.1016/0005-2795(72)90275-9.

Kularatne SAM, Budagoda BDSS, Gawarammana IB, Kularatne WKS. 2009. Epidemiology, clinical profile and management issues of cobra (Naja naja) bites in Sri Lanka: first authenticated case series. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 103: 924–930. doi: 10.1016/j.trstmh.2009.04.002.

Kumar MS, Devaraj VR, Vishwanath BS, Kemparaju K. 2009. Anti-coagulant activity of a metalloprotease: further characterization from the Indian cobra (Naja naja) venom. Journal of Thrombosis and Thrombolysis. 29: 340–348. doi: 10.1007/s11239-009-0379-2.

Mukherjee AK, Maity CR. 2002. Biochemical composition, lethality and pathophysiology of venom from two cobras—< i> Naja naja</i> and< i> N. kaouthia</i>. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 131: 125–132. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096495901004730 (Accessed April 11, 2013).

Ohta M, Sasaki T, Hayashi K. 1981. The amino acid sequence of toxin D isolated from the venom of indian cobra (< i> Naja naja</i>). Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure. 671: 123–128. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0005279581901252 (Accessed April 20, 2013).

Ponnappa KC, Saviour P, Ramachandra NB, Kini RM, Gowda TV. 2008. INN-toxin, a highly lethal peptide from the venom of Indian cobra (Naja naja) venom—Isolation, characterization and pharmacological actions. Peptides. 29: 1893–1900. doi: 10.1016/j.peptides.2008.07.020.

Rudrammaji LMS, Gowda TV. 1998. Purification and characterization of three acidic, cytotoxic phospholipases A2 from Indian cobra (Naja naja naja) venom. Toxicon. 36: 921–932. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010197000974 (Accessed April 21, 2013).

SARCOMA GFOY. 1964. Yahiro Irako*:(The Medical Institute of Sasaki Foundation). Gann: the Japanese journal of cancer research. 55: 129–139.

Shashidharamurthy R, Kemparaju K. 2006. A neurotoxic phospholipase A2 variant: Isolation and characterization from eastern regional Indian cobra (Naja naja) venom. Toxicon. 47: 727–733. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.01.011.

Simpson ID, Norris RL. 2007. Snakes of Medical Importance in India: Is the Concept of the 'Big 4' Still Relevant and Useful? Wilderness & Environmental Medicine. 18: 2–9. doi: 10.1580/06-WEME-CO-023R1.1.

Sundell IB, Rånby M, Zuzel M, Robinson KA, Theakston RDG. 2003. In vitro procoagulant and anticoagulant properties of Naja naja naja venom. Toxicon. 42: 239–247. doi: 10.1016/S0041-0101(03)00137-5.

Takechi M, Hayashi K, Sasaki T. 1972. The Amino Acid Sequence of Cytotoxin II from the Venom of the Indian Cobra (Naja naja). Molecular Pharmacology. 8: 446–451. http://molpharm.aspetjournals.org/content/8/4/446 (Accessed April 11, 2013).

Thangam R et al. 2012. A novel disintegrin protein from Naja naja venom induces cytotoxicity and apoptosis in human cancer cell lines in vitro. Process Biochemistry. 47: 1243–1249. doi: 10.1016/j.procbio.2012.04.020.

Wüster W. 1996. Taxonomic changes and toxinology: Systematic revisions of the asiatic cobras (Naja naja species complex). Toxicon. 34: 399–406. doi: 10.1016/0041-0101(95)00139-5.