

فعالیت آنزیم فسفولیپاز A₂ و هیالورونیداز در زهر عقرب مزوپوتوس اپیوس

منیزه کدخدایی الیادرانی^{۱*}، زهره آموزگاری^۲، حسین حنفی^۳

خلاصه

سابقه و هدف: عقرب مزوپوتوس اپیوس متعلق به خانواده بوتیده می‌باشد. این عقرب یکی از فراوانترین عقرب‌ها در ناحیه خوزستان است و مسؤول حدود ۴۵٪ عقرب‌زدگی‌ها در این ناحیه است. زهر عقرب‌ها از نوروتوكسین‌هایی تشکیل شده که کاتالهای یونی سلول‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند. با توجه به اهمیت مطالعه روی عقرب‌ها در این ناحیه جغایایی و اینکه کار زیادی در ارتباط با فعالیت آنزیم‌ها در زهر عقرب مزوپوتوس اپیوس انجام نشده بود بر آن شدید تا فرآکسیون‌های زهر عقرب مزوپوتوس اپیوس را توسط کرومتوگرافی ژل فیلتراسیون جدا نموده و فعالیت آنزیم‌های فسفولیپاز A₂ و هیالورونیداز را در فرآکسیون‌های جدا شده بررسی نماییم.

مواد و روش‌ها: یک گرم زهر خام در ۱۰ میلی‌لیتر آب حل گردید و در ۱۸۰۰۰ ریخته ساتریفوژ گردید. محلول رویی که حاوی پروتئین بود در ستون کرومتوگرافی ژل فیلتراسیون حاوی سفادکس G50 در تعادل با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولاو PH 4.7 با سرعت ۳۰ میلی‌لیتر در ساعت به کار برد شد. محلول خروجی در حجم‌های ۳ میلی‌لیتر جمع‌آوری شد. جذب نوری به طور مداوم در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. سپس مقدار پروتئین، فعالیت آنزیم فسفولیپاز A₂ و هیالورونیداز در تمام فرآکسیون‌های جدا شده اندازه‌گیری شد.

نتایج: یک گرم زهر خام حاوی ۸۱۶ میلی‌گرم پروتئین بود. فعالیت آنزیم در زهر خام، فرآکسیون I و به مقدار جزیی در فرآکسیون II مشاهده شد و به ترتیب دارای ۵۳/۱۲، ۷۷/۳، ۲/۴۳٪ فعالیت همولیزی می‌باشد. فعالیت مخصوص آنزیم به ترتیب ۵۹۰/۳۲، ۱۰۹۰ و ۳۰/۳۷ می‌باشد. فعالیت هیالورونیداز در زهر خام و تنها در فرآکسیون اول مشاهده شد. فعالیت مخصوص آنزیم هیالورونیداز در زهر خام ۷۴۰ TRU/mg و در فرآکسیون I حاصل از کرومتوگرافی ۴۵۷۴/۵ TRU/mg به دست آمد و درجه خلوص آنزیم ۶/۱۸ تعیین شد.

نتیجه‌گیری: زهر عقرب مزوپوتوس اپیوس دارای هر دو فعالیت فسفولیپازی و هیالورونیدازی می‌باشد که با استفاده از کرومتوگرافی ژل فیلتراسیون در فرآکسیون اول جدا می‌شود.

واژگان کلیدی: زهر خام، کرومتوگرافی، مزوپوتوس اپیوس، فسفولیپاز A₂، هیالورونیداز

۱- استادیار گروه بیوشمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اهواز.

۲- مری گروه بیوشمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اهواز.

۳- کارشناس ارشد گروه بیوشمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اهواز.

* نویسنده مسؤول: منیزه کدخدایی الیادرانی

آدرس: دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، گروه بیوشمی و مرکز تحقیقات هموگلوبینوپاتی‌ها.

پست الکترونیک: Kadkhodaeim@yahoo.com

تلفن: ۰۹۱۶ ۱۱۳ ۳۶۳۸

دورنويس: ۰۶۱۱ ۳۳۶ ۱۵۴۴

تاریخ دریافت: ۸۵/۰۴/۱۹

تاریخ پذیرش نهایی: ۸۵/۱۰/۰۵

اليگوپتیدها، نوکلوتیدها، اسیدهای آمینه و ترکیبات آلی دیگر و نیز از آنزیم‌هایی همچون فسفولیپاز، هیالورونیداز و مولکول‌هایی با وزن مولکولی نسبتاً پایین مثل سروتونین، هیستامین، مهارکننده‌های پروتئاز، آزادکننده‌های هیستامین تشکیل شده است [۱، ۲، ۳]. برخلاف زهر مارها و عنکبوت‌ها به طور کلی زهر بسیاری از عقرب‌ها یا فاقد آنزیم هستند و یا دارای مقادیر کم فعالیت‌های

مقدمه

عقرب مزوپوتوس اپیوس اپیوس متعلق به عقرب‌های خانواده بوتیده می‌باشد و از فراوانترین عقرب‌های بومی موجود در خوزستان است که مسؤول ۴۵٪ عقرب‌زدگی‌ها می‌باشد [۱]. زهر عقرب یک ترکیب محلول در آب، آنتی‌ژنیک و PH آن خشی تا قلیایی است. زهر عقرب‌ها به طور کلی از موکوس،

حاوی پیتیدها و پروتئین‌های محلول می‌باشد و موکوپروتئین‌ها به صورت رسوب جدا می‌شوند. محلول رویی که حاوی ۸۱۶ میلی‌گرم پروتئین بود وارد ستونی از سفادکس G-50 به ابعاد ۲۰×۱۰۰×۲ سانتی‌متر) در تعادل با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مolar (PH=۴/۷) گردید و بعد از اینکه نمونه جذب ستون شد ستون با سرعت جريان ۳۰ میلی‌لیتر در ساعت با همين بافر شستشو داده شد، سپس محلول خروجی در حجم‌های ۳ میلی‌لیتر در هر لوله به وسیله دستگاه جمع‌کننده اتوماتیک^۱ جمع‌آوري شد. جذب نمونه‌ها بالاگصلة در طول موج ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (UV/VIS) قرائت شد و منحنی جذب بر حسب حجم بافر خروجی رسم گردید. سپس فراکسيون‌های مختلف در ظروف جداگانه جمع‌آوري شدند. هر يك از فراکسيون‌ها با استفاده از كيسه‌های دیالیز با ۱۲۰۰ Cut off به مدت ۲۴ ساعت در مقابل آب مقطر دیالیز شدند و بعد تغليظ گردیدند. مقدار پروتئين نمونه‌ها بر اساس روش Lowry اندازه‌گيری گردید [۹]. اندازه‌گيری فعالیت فسفولیپاز A₂ (همولیپتیک غیر مستقیم) بر اساس روش Ouyang و Shiau انجام شد [۱۰] و درصد همولیز بر طبق روش Smith و Gul به دست آمد [۱۱]. اساس اين روش به اين صورت است که فسفولیپاز A₂ در حضور يك منبع خارجي لستين باعث همولیز گلوبول‌های قرمز می‌شود که اين همولیز غیر مستقیم گويند. درصد همولیز به مقدار لیزولیستین و مقدار لیزولیستین به مقدار فسفولیپاز A₂ بستگی دارد. به تعداد نمونه‌ها لوله سانتریفوژ در نظر گرفته شد و يك لوله نيز به عنوان شاهد تعیین گردید. در هر كدام ۰/۵ میلی‌لیتر سوسپانسيون٪ ۱۰ گلوبول‌های قرمز در بافر فسفات ۰/۲ مولار با PH=۷/۲ و ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰ مولار با PH=۷/۲ ریخته شد. سپس به لوله شاهد ۱/۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی و به لوله‌های دیگر به ترتیب ۱/۰ میلی‌لیتر از هر نمونه حاوی مقدار معین پروتئین افزوده شد. به همه لوله‌ها ۰/۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسيون ۰/۰۱ مولار لستین در سالین افزوده و فوراً لوله‌ها در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ دقیقه انکوبه شدند. بعد از گذشت این مدت با گذاشتن لوله‌ها در بیخ، واکنش متوقف شد. سپس لوله‌ها در +۴ درجه سانتی گراد در ۳۰۰۰.gx به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. جذب محلول‌های رویی در ۵۵۰ نانومتر در مقابل شاهد به وسیله اسپکتروفوتومتر قرائت گردید. برای اندازه‌گيری درصد همولیز، ابتدا همولیز کل گلوبول قرمز تعیین می‌شود. به اين ترتیب که در يك لوله سانتریفوژ به عنوان لوله Total (کل همولیز) حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر سوسپانسيون ۱۰٪ گلوبول‌های قرمز در بافر

Heterometrus scaber آنزیم‌های اسیدوفسفاتاز، ریبونوکلئاز، ۵-نوکلئوتیداز، هیالورونیداز، استیل‌کولین استراز و فسفولیپاز A، یافت شده‌اند. ۵-هیدروکسی تریپتامین، پروتئین‌های مهارکننده پروتئاز، آنزیبوتانسیناز و سوکسینات دهیدروژناز نیز در زهر عقرب‌های Mesobuthus tamulus، Centruroides exilicuada و Heterometrus fulvipes فسفولیپاز A₂ EC 3.1.1.4 (PLA₂) یک خانواده بزرگی از آنزیم‌های درون سلولی و ترشحی هستند که همگی پیوند استری گلیسروفسفولیپیدها را در موقعیت Sn-2 هیدرولیز می‌کنند [۶]. هیالورونیدازها آنزیم‌هایی هستند که بر روی هیالورونیک اسید عمل می‌کنند. هیالورونیک اسید پلی‌ساقاریدی با وزن مولکولی بالا است که از واحدهای دی‌ساقاریدی متناوب β -گلوکورونیک اسید و N-استیل گلوکز آمن تشکیل شده است که به طور متناوب توسط پیوندهای گلیکوزیدی (۱-۳) β و (۱-۴) β به هم متصل می‌شوند [۷]. برای اينکه مکانیسم‌های بیوشیمیابی و پاتوفیزیولوژیکی تاثیر آنزیم‌های موجود در زهر عقرب‌ها مشخص شوند باید اين آنزیم‌ها شناسایی گردد و اثرات هر يك به طور جداگانه مورد مطالعه قرار گیرد. در اين تحقیق با توجه به اينکه روی آنزیم‌های زهر عقرب مزوپوتوس اپیوس اپیوس مطالعه‌ای صورت نگرفته بود بر آن شدیدم تا فعالیت‌های آنزیمی هیالورونیداز و فسفولیپاز A₂ را در زهر خام و فراکسيون‌های جدا شده از آن توسط کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون بررسی نماییم.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر يك مطالعه توصیفی است و هر آزمایش سه بار تکرار شده و نتایج نشان داده شده میانگین سه بار آزمایش می‌باشند. زهر خام لیوفیلیزه عقرب مزوپوتوس اپیوس اپیوس از موسسه رازی اهواز خردباری شد این زهر به روش تحریک الکتریکی تهیه شده بود. سفادکس G50 از شرکت Pharmacia هیالورونیک اسید، لستین، فولین سیوکالتو، استات آمونیوم و آلبومین سرم گاوى از شرکت Sigma، فسفات مونوسدیک، فسفات دی سدیک از شرکت Merck خردباری گردید.

جداسازی فراکسيون‌های زهر: تمام مراحل جداسازی در +۴ درجه سانتی گراد و طبق روش Angelina انجام گردید [۸]. يك گرم از زهر خام لیوفیلیزه در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید سپس محلول حاصل به مدت ۱۲ دقیقه و در دور ۱۸۰۰۰.gx در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد و قسمت محلول (محلول رویی) از قسمت نام محلول جدا گردید. قسمت رویی

میلی لیتر از محلول ۰/۴ میلی گرم در میلی لیتر هیالورونیک اسید اضافه گردید. این لوله‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۵-۶ دقیقه انکوبه شدند. یک لوله شاهد نیز حاوی ۱ میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار (PH=۵/۳) حاوی کلرید سدیم ۰/۱۵ مولار انکوبه گردید. سپس ۰/۵ میلی لیتر از نمونه‌های رقیق شده به لوله‌های مشخص شده به عنوان نمونه اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. بعد از این مدت ۹ میلی لیتر معرف آلبومین به هر لوله اضافه شده و در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردیدند. پس از آن جذب هر یک از لوله‌ها در برابر لوله شاهد در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت گردید. سپس از روی منحنی استاندارد مقدار هیالورونیک اسید باقی مانده بعد از تعزیزه شدن توسط آنزیم به دست می‌آید و مقدار هیالورونیک اسید تعزیزه شده طبق رابطه زیر به دست آمد.

$$\text{میلی گرم هیالورونیک اسید تعزیزه شده} = \frac{\text{فعالیت مخصوص}}{\text{میلی گرم بروتین در واکنش}} \times ۰/۲\text{mg}$$

میلی گرم هیالورونیک اسید باقیمانده، سپس فعالیت مخصوص (specific activity) آنزیم توسط رابطه زیر محاسبه شد.

$$\text{فعالیت مخصوص} = \frac{\text{میلی گرم هیالورونیک اسید تعزیزه شده} \times ۳}{\text{میلی گرم بروتین در واکنش}}$$

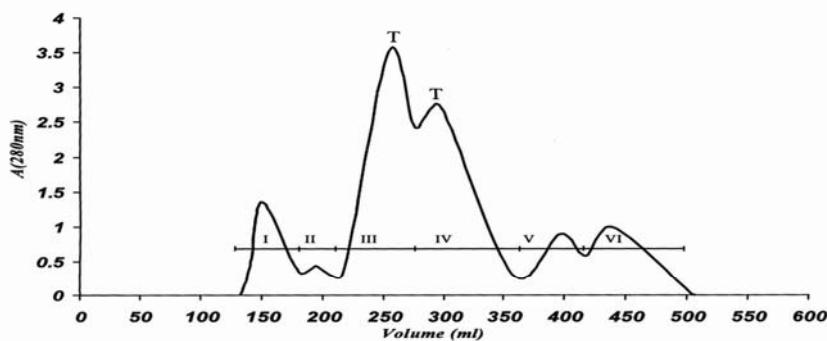
نتایج

نتیجه حاصل از ژل فیلتراسیون زهر خام بر روی ستون سفادکس G-50 در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. توسط کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون، از زهر خام مزوبوتونس اپیوس اپیوس ۶ فراکسیون مجزا شد که به ترتیب I, II, III, IV, V, VI نام گذاری شدند. سنجش پروتئین در زهر خام و تمام فراکسیون‌های حاصل از کروماتوگرافی در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. نتایج مربوط به فعالیت آنزیم فسفولیپاز A₂ در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. درصد همولیز نشان‌دهنده فعالیت آنزیم فسفولیپاز A₂ می‌باشد. این فعالیت در زهر خام، در فراکسیون I و به میزان خیلی کمتر در فراکسیون II وجود داشت. سایر فراکسیون‌ها قادر فعالیت فسفولیپاز A₂ بودند.

فسفات ۰/۲ مولار همراه با ۰/۵ میلی لیتر آب قطر کاملاً لیز شد. سپس به آن ۰/۱ میلی لیتر سرم فیزیولوژی و ۰/۰ میلی لیتر سوپانسیون لیستین ۰/۰۱ مولار در سالین افزوده و در ۳۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه ساتریفوژ شد (رسوبی دیده نشد) جذب محلول لیز شده در ۵۵۰ نانومتر در مقابل شاهد حاوی ۲/۵ میلی لیتر آب قطر، ۰/۰ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار، ۰/۱ میلی لیتر سرم فیزیولوژی و ۰/۲ میلی لیتر سوپانسیون لیستین قرائت گردید. (برای یکسان شدن شرایط آزمایش لوله شاهد هم در ۳۰۰۰g ساتریفوژ شد). OD لوله total به عنوان همولیز کل محاسبه گردید و درصد همولیز از فرمول زیر محاسبه گردید. از آنجایی که درصد همولیز بستگی به غلظت هر نمونه دارد برای اینکه مقایسه درستی از این فعالیت در لوله‌های مختلف شود درصد همولیز بر میلی گرم پروتئین در هر لوله تقسیم می‌شود.

$$\text{درصد همولیز} = \frac{\text{ODTest}}{\text{ODTotal}} \times 100$$

هیالورونیداز بر اساس روش Tolksdorf و همکارانش انجام شد [۱۲]. در این روش از توانایی هیالورونیک اسید در ایجاد کدورت با محلول اسیدی آلبومین، جهت اندازه‌گیری مقدار هیالورونیک اسید استفاده می‌شود. میزان کدورت با مقدار فعالیت آنزیم هیالورونیداز متناسب است. فعالیت آنزیم هیالورونیداز با واحد TRU (Turbidity Reducing Unit) بیان می‌شود و عبارت است از مقدار آنزیمی که باعث کاهش کدورت تحت شرایط مشابه با یک واحد استاندارد بین‌المللی شود از زهر خام و فراکسیون‌های مورد آزمایش محلول استوک یک میلی گرم در یک میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار تهیه گردید و قبل از انجام آزمایش در همان بافر رقیق شد (برای ترکیبات خام پیشنهاد می‌شود که غلظت‌های ۰/۰۱-۰/۰۵ میلی گرم در میلی لیتر تهیه گردد). برای رسم منحنی استاندارد یک سری لوله آماده گردید. تمام لوله‌ها در حمام آب جوش به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند، سپس تا حد دمای اتاق خنک شدند. ۹ میلی لیتر معرف آلبومین به هر یک از لوله‌ها اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه به حال خود گذاشته شدند پس از این مدت جذب هر یک از لوله‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت گردید و منحنی استاندارد بر حسب مقدار جذب نور در ۵۴۰ نانومتر در برابر میلی گرم هیالورونیک اسید رسم گردید. در یک سری لوله به تعداد نمونه‌های مورد آزمایش ۰/۵



نمودار ۱- نتیجه حاصل از ژل فیلتراسیون ۸۱۶ میلی گرم پروتئین زهر خام بر روی ستون سفادکس G-50 به ابعاد (۲/۷×۱۰۰ سانتیمتر) در تعادل با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی مولار (PH=۴/۷) و سرعت جریان ۳۰ میلی لیتر در ساعت

جدول ۱- نتایج سنجش پروتئین و بازده فراکسیون‌های حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون زهر خام

فراکسیون	توatal پروتئین (mg)	بازده (%)
محلول زهر خام	۸۱۶	۱۰۰
*PI	۱۳۲	۱۶/۱۸
PII	۲۳/۳	۲/۸۵
PIII	۳۱۴/۴	۳۸/۵۳
P IV	۲۴۲/۷	۲۹/۷۴
P IV	۵۰/۶	۷/۲
P VI	۵۲	۶/۳۷
بازده کل	۹۹/۸۷	

P = فراکسیون*

جدول ۲- درصد همولیز در نمونه‌های مختلف (زهر خام و فراکسیون‌های آن)

نمونه	مقدار پروتئین (mg)	درصد همولیز *	فعالیت مخصوص	فاکتور اندازه‌گیری
زهر خام	۰/۰۹	۵۳/۱۳	۵۹۰/۳۳	
*PI	۰/۰۷	۷۷/۳۰	۱۰۹۰	
PII	۰/۰۸	۲/۴۳	۳۰/۳۷	
PIII	۰/۰۵	۰	۰	
PIV	۰/۰۵	۰	۰	
PV	۰/۰۷	۰	۰	
PVI	۰/۰۷	۰	۰	

T= Toxic

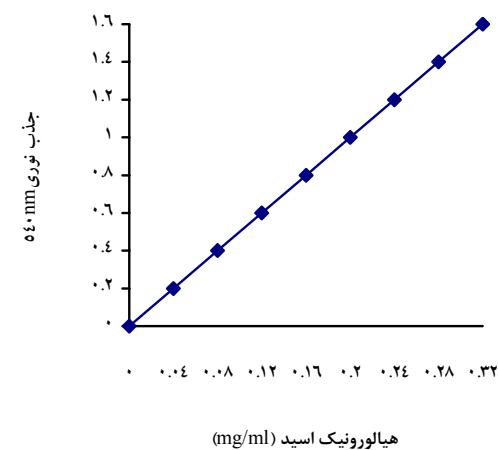
* درصد همولیز نشان‌دهنده فعالیت فسفولیپاز A₂ (همولیتیک غیر مستقیم) می‌باشد.

P = فراکسیون**

کلی اندازه‌گیری فعالیت آنزیم هیالورونیداز در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. قابلیت مخصوص این آنزیم در زهر خام استاندارد را نشان می‌دهد. میزان هیالورونیک اسید (منحنی TRU/mg ۷۴۰ و در فراکسیون I ۴۵۷۴/۵) در بقیه فراکسیون‌ها فعالیت آنزیمی هیالورونیداز مشاهده نگردید.

نمودار شماره ۲ منحنی تغییرات جذب نوری بر حسب دورت ایجاد شده در مقادیر مختلف هیالورونیک اسید (منحنی استاندارد) را نشان می‌دهد. میزان هیالورونیک اسید باقی مانده در لوله‌های آزمایش از روی منحنی محاسبه شد و فعالیت مخصوص آنزیم هیالورونیداز در نمونه‌های مورد آزمایش به دست آمد. نتایج

توسط *Heterometrus fulvipes* و همکارانش [۱۴]. فسفولیپین یک نوع آنزیم فسفولیپاز A_2 هترودیمری است که در سال ۱۹۹۹ Conde و همکارانش از زهر عقرب *imperator* جداسازی و شناسایی کردند و ساختمان اولیه و ویژگی‌های عملکردی آن را تعیین کردند [۱۵]. در مرحله ۢل فیلتراسیون آنزیم‌ها به دلیل داشتن وزن مولکولی بالاتر نسبت به توکسین‌ها قبل از آنها از ستون کروماتوگرافی خارج می‌گردند، در نتیجه پیک I حاوی پلیپپتیدها و بروتین‌هایی با وزن مولکولی بالا خواهد بود. انواع آنزیم‌های موجود در سوم حیوانات در روندهای مختلف پاتولوژیکی و روندهای توکسیک شرکت دارند [۱۶]. تا کنون فسفولیپازهای پیدا شده در مهره‌دارانی همچون پستانداران و مارها متعلق به گروه‌های I و II فسفولیپازها می‌باشند در حالی که گروه III فسفولیپازها عمدتاً در زهر غیر مهره‌دارانی همچون عقرب‌ها و زنبور عسل پیدا شده‌اند [۱۷، ۱۸]. با استفاده از فسفولیپاز شناسایی شده‌اند. این رسانه‌های انتخابی از رسانه‌های فسفولیپاز شناسایی شده‌اند. این رسانه‌های انتخابی از فسفولیپازهای سوم مارها و پستانداران دارند [۱۶]. با توجه به اینکه تا کنون آنزیم‌های فسفولیپاز A_2 و هیالورونیداز در زهر عقرب مزوپوتوس اپیوس اپیوس مطالعه نشده بود در این تحقیق فعالیت آنزیمی فسفولیپاز A_2 به روش همولیتیک غیرمستقیم در زهر خام و فراکسیون‌های جدا شده آن اندازه‌گیری گردید. درصد همولیز نشان‌دهنده فعالیت فسفولیپاز A_2 می‌باشد. فعالیت آنزیمی فسفولیپاز A_2 در زهر مزوپوتوس اپیوس اپیوس، پیک I و به مقدار بسیار جزیی در پیک II وجود داشت. مازکریم فعالیت آن در پیک I مشاهده شد، به طوری که ۷۰ میکروگرم از آن $77/30\%$ همولیز ایجاد می‌کند. فعالیت مخصوص این آنزیم در فراکسیون یک 10^9 محاسبه شد. هیالورونیدازها دارای عملکردهای بیولوژیکی از محدوده ایجاد انواع بیماری‌های عغونی مختلف از طریق تعزیز هیالورونیک اسید انسانی تا دخالت در روندهای باروری پستانداران هستند. هیالورونیداز اسید از موکوپلی ساکاریدهایی است که به عنوان ماده زمینه‌ای یا نگهدارنده در عناصر ساختمانی نسوج از قبیل الاستین و کلاژن یافت می‌شوند. Morey و همکارانش در سال ۲۰۰۶ یک نوع آنزیم هیالورونیداز از زهر عقرب *plamneus gravimanus* (عقرب سیاه هندی) جداسازی کردند فعالیت مخصوص این آنزیم در زهر خام در حدود 250 TRU/mg و فعالیت آن در فراکسیون



نمودار ۲- تغییرات جذب نوری بر حسب کدورت ایجاد شده در مقادیر مختلف سوبسترات هیالورونیداز اسید (نمودار استاندارد)

جدول ۳- نتایج مربوط به فعالیت آنزیم هیالورونیداز

نمونه	فاکتور اندازه‌گیری			
	تواتل	مقدار کل	نمودار	آنکتور
	فعالیت مخصوص (%)	فعالیت آنزیم (mg)		
	(TRU/mg)	(mg)	(TRU)	
زهر خام	۷۴۰	۶۰۳۸۴۰	۸۱۶	
PI	۴۵۷۴/۵	۶۰۳۸۴۳	۱۳۲	
PII	.	.	۲۳/۳	
PIII	.	.	۳۱۴/۴	
PIV	.	.	۲۴۳/۷	
PV	.	.	۵۰/۶	
PVI	.	.	۵۲	

بحث

زهر عقرب مزوپوتوس اپیوس اپیوس که در این تحقیق مورد مطالعه قرار گرفته است یکی از شش نوع عقربی است که در ایران دارای اهمیت بالینی بوده و جهت تهیه سرم پلی‌والان ضد عقرب‌زدگی در موسسه سرم‌سازی رازی مورد استفاده قرار می‌گیرد. فعالیت‌های آنزیمی مختلفی از جمله فسفولیپاز A_2 ، هیالورونیداز،^۵ نوکلتوتیداز در زهر عقرب‌ها وجود دارد. البته مقدار فعالیت‌های آنزیمی و نوع آنها نسبت به زهر مارها کمتر است. به نظر می‌رسد که آنزیم هیالورونیداز تنها آنزیمی است که به مقدار قابل توجهی در زهر عقرب‌های خانواده بوتیده وجود دارد. اگرچه در بعضی از گونه‌ها مانند *Buthus tamulus* فعالیت فسفودی استرازی نیز در حد قابل توجهی است [۱۳]. در سال ۱۹۹۰ یک نوع آنزیم فسفولیپاز A_2 از زهر عقرب

به زهر خام ۶/۱۸ برابر شده است. این آنزیم تنها در فراکسیون I دیده شد. همانطور که در نمودار ۱ نشان داده شده در تحقیق قبلی مشخص شده بود که فراکسیون‌های ۳ و ۴ برای موش توکسیک بودند در حالی که در این تحقیق مشاهده شد که فعالیت جداسازی آنها از طریق فسفولیپازی و یا هیالورونیدازی ندارند و اثر سمی آنها از طریق مکانیسم‌های دیگر می‌باشد. در پایان می‌توان گفت توانایی جداسازی آنزیم‌ها از زهر عقرب می‌تواند راهنمایی برای خالص‌سازی هر کدام از آنزیم‌ها و بررسی اثرات مختلف بیوشیمیایی و پاتوفیزیولوژیکی آنها باشد.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق فعالیت آنزیم هیالورونیداز و فسفولیپاز A₂ در زهر عقرب مزوپیتوس اپیوس مشاهده گردید، توانایی جداسازی آنزیم‌ها از زهر عقرب می‌تواند راهنمایی برای تخلیص آنزیم‌ها و بررسی اثرات مختلف بیوشیمیایی و پاتوفیزیولوژیکی آنها باشد.

تشکر و قدر دانی

این تحقیق بخشی از طرح مصوب شماره ۱۶۲ دانشگاه علوم پزشکی اهواز می‌باشد. از معاونت محترم پژوهشی که پشتیبانی مالی این طرح را عهده‌دار بوده‌اند تشکر می‌شود.

حاوی آنزیم جدا شده از زهر خام ۶۴۱۱/۷ TRU/mg تعیین گردید [۲۲]. Pessini و همکارانش در سال ۲۰۰۱ یک نوع آنزیم هیالورونیداز از زهر عقرب *Tityus serrulatus* با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی با ژل CM-cellulose جداسازی کردند. فعالیت مخصوص این آنزیم در زهر خام در حدود ۸۴۵ TRU/mg و فعالیت آن در فراکسیون حاوی آنزیم جدا شده از زهر خام ۱۹۹۰ TRU/mg بود [۲۳]. در تحقیق حاضر در مقایسه با مطالعه انجام شده توسط Ressimi و همکاران آنزیم هیالورونیداز با درجه خلوص بیشتری به دست آمده است. در سال ۱۹۳۶، Durar-Reynals نظریه فاکتورهای پخش‌کننده را برای توضیح مکانیسم ورود سموم حیوانات به درون بدن انسان را بیان کردند. هیالورونیداز موجود در زهر یک فاکتور انتشاردهنده است. این آنزیم انتشار توکسین به درون بافت‌های بدن قربانی را از طریق تجزیه گلکوز آمینوگلیکان‌ها در بافت‌های همبند تسهیل می‌کند، بنابراین مسمومیت سیستمیک را منجر می‌شوند [۲۴]. در این پروژه فعالیت آنزیمی هیالورونیداز در زهر خام و فراکسیون‌های به دست آمده در مرحله ژل فیلتراسیون سنجیده شده و مشخص گردید که این آنزیم در زهر عقرب مزوپیتوس اپیوس اپیوس موجود است. فعالیت مخصوص آنزیم هیالورونیداز در زهر خام ۷۴۰ TRU/mg و در پیک I حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون ۴۵۷۴/۵ TRU/mg می‌باشد که میزان فعالیت آن نسبت

References:

- [1] ARACHNODATA's current projects. The medical and social significance of scorpionism in the southern provinces of Iran. Academy of Natural Sciences.WWW.Arachnodata.ch/publicate.htm 1997; www.Arachnodata.Ch/Publicate.htm
- [2] Gwee MC. Nirthanan S. Khoo HE. Gopalakrishnakone P. Kini RM. Cheah LS. Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002; 9: 795-801
- [3] Tu AT. Scorpion Venoms. In venoms: Chemistry and Molecular Biology, A. T. Tu. *John and Sons* 1977; 459-483.
- [4] Gwee MC. Gopalakrishnakone P. cheah LS. wong, PTH. Gong, Jp. Kini, RM. Studies on venom from the Black scorpion *Heterometrus longimanus* and some other scorpion species. *J Toxicol Tox Rev* 1996; 15: 37-57.
- [5] Possani LD. Becerril B. Delepierre M. Tytgat J. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *Eur J Biochem* 1999; 264: 287-300.
- [6] Dennis EA. The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 1-2.
- [7] Pattanaargson S. Roboz J. Determination of hyaluronidase activity in venoms using capillary electrophoresis.. *Toxicon* 1996; 34: 1107-1117.
- [8] Angelina N. Ramirez Georgina B. Gurrola Brian M. Martin Lourival D. Possani. Isolation of several toxins from the venom of the scorpion *centruroides limpidus tecomanus* Hoffmann. *Toxin* 1988; 26: 773-783.
- [9] Lowry OH. Rosebrough NJ. Furr AL. Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- [10] Ouyang C. Shiao SY. Relationship between pharmacological actions and enzymatic activities of the venom of *Trimeresurus gramineus*. *Toxicon* 1970; 8: 183-191.
- [11] Gul G. Smith AD. Haemolysis of washed human red cells by combined action of Nagja-naja phospholopspase A₂ and albumin. *Bio chem Biophys Acta* 1984 288: 237-240.

- [12] Tolksdorf S. McCready M. McCullagh D. Schwenk E. The turbidimetric assay of hyaluronidase. *Lab Clin Med* 1949; 34: 74.
- [13] Tu AT. Scorpion Venoms. In venoms: Chemistry and Molecular Biology. *A. T. Tu. John and Sons New York* 1977; 459-483.
- [14] Ramanaiah M. Parthasarathy RR. Venkaiah B. Purification and properties of phospholipase A2 from the venom of scorpion, (*Heterometrus fulvipes*). *Biochem Int* 1990; 20: 931-940.
- [15] Conde R. Zamudio FZ. Becerril B. Possani LD. Phospholipin, a novel heterodimeric phospholipase A2 from *Pandinus imperator* scorpion venom. *FEBS Lett* 1999; 460: 447-450.
- [16] Lambeau, G. Lazdunski M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2. *Trends pharmacol Sci* 1999; 20: 162-170.
- [17] Cond R. Zamudio FZ. Becerril B. Posan LD. Phospholipin, a novel heterodimeric phospholipase A2 from *Pandinus imperator* scorpion venom. *FEBS Lett* 1999; 460: 447-450.
- [18] Lotan A. Fishman L. Loya Y. Zlotkin E. Delivery of a nematocyst toxin. *Nature* 1995; 375: 456.
- [19] Ohara O. Ishizaki J. Arita H. Structure and function of phospholipase A2 receptor. *Lipid Res* 1995; 34: 117-138.
- [20] Cupillard L. Mulherkar R. Gomez N. Kadam S. Valentin E. Lazdunski, M. et al. Both group IB and group IIA secreted phospholipases A2 are natural ligands of the mouse 180-kDa M-type receptor. *J Biol Chem* 1999; 274: 7043-7051.
- [21] Condrea E. Hemolytic effects of snake venoms. In: Lee CY. Ed. Snake venoms Berlim: Springer: 1979. pp. 448-79.
- [22] Morey SS. Kiran KM. Gadag JR. Purification and properties of hyaluronidase from *Palamneus gravimanus* (Indian black scorpion) venom. *Toxicon* 2006; 47: 188-195.
- [23] Pessini AC. Takao TT. Cavalheiro EC. Vichnewski W. Sampaio SV. Giglio JR. et al. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon* 2001; 39: 1495-1504.
- [24] Nirthanan S. Joseph JS. Gopalakrishnakone P. Khoo HE. Cheah LS. Gwee MC. Biochemical and pharmacological characterization of the venom of the black scorpion *Heterometrus spinifer*. *Biochem Pharmacol* 2002; 63: 49-55.