فعالیت آنزیم فسفولیپاز A_2 و هیالورونیداز در زهر عقرب مزوبوتوس اپیوس اپیوس

منیژه کدخدایی الیادرانی [*1]، زهره آموزگاری [2]، حسین حنیفی [3]

خلاصه

سابقه و هدف: عقرب مزوبوتوس اپیوس متعلق به خانواده بوتیده می‌باشد. این عقرب یکی از فراوان‌ترین عقرب‌ها در ناحیه خوزستان است و مسوول حدود ٤٥٪ عقرب‌زدگی‌ها در این ناحیه است. زهر عقرب‌ها از نوروتوکسین‌هایی تشکیل شده که کانال‌های یونی سلول‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند. با توجه به اهمیت مطالعه روی عقرب‌ها در این ناحیه جغرافیایی و اینکه کار زیادی در ارتباط با فعالیت آنزیم‌ها در زهر عقرب مزوبوتوس اپیوس اپیوس انجام نشده بود بر آن شدیم تا فراکسیون‌های زهر عقرب مزوبوتوس اپیوس را توسط کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون جدا نموده و فعالیت آنزیم‌های فسفولیپاز A_2 و هیالورونیداز را در فراکسیون‌های جدا شده بررسی نماییم.

مواد و روش‌ها: یک گرم زهر خام در ١٠ میلی‌لیتر آب حل گردید و در ١٨٠٠٠xg به مدت ١٢ دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول رویی که حاوی پروتئین بود در ستون کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون حاوی سفادکس G50 در تعادل با بافر استات آمونیوم ٢٠ میلی‌مولار PH 4.7 با سرعت ٣٠ میلی‌لیتر در ساعت به کار برده شد. محلول خروجی در حجم‌های ٣ میلی‌لیتر جمع‌آوری شد. جذب نوری به طور مداوم در طول موج ٢٨٠ نانومتر اندازه‌گیری گردید. سپس مقدار پروتئین، فعالیت آنزیم فسفولیپاز A_2 و هیالورونیداز در تمام فراکسیون‌های جدا شده اندازه‌گیری شد.

نتایج: یک گرم زهر خام حاوی ٨١٦ میلی‌گرم پروتئین بود. فعالیت آنزیم در زهر خام، فراکسیون I و به مقدار جزیی در فراکسیون II مشاهده شد و به ترتیب دارای ٥٣/١٢، ٧٦/٣ و ٢/٤٣٪ فعالیت همولیزی می‌باشند. فعالیت مخصوص آنزیم به ترتیب ٥٩٠/٣٢، ١٠٩٠ و ٣٠/٣٧ می‌باشد. فعالیت هیالورونیداز در زهر خام و تنها در فراکسیون اول مشاهده شد. فعالیت مخصوص آنزیم هیالورونیداز در زهر خام ٧٤٠TRU/mg و در فراکسیون I حاصل از کروماتوگرافی ٤٥٧٤/٥ TRU/mg به دست آمد و درجه خلوص آنزیم ٦/١٨ تعیین شد.

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

واژگان کلیدی: زهر خام، کروماتوگرافی، مزوبوتوس اپیوس، فسفولیپاز A_2، هیالورونیداز

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

٢- مربی گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اهواز.

٣- کارشناس ارشد گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اهواز.

* **نویسنده مسوول:** منیژه کدخدایی الیادرانی

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

پست الکترونیک: Kadkhodaeim@yahoo.com

تلفن: ٠٩١٦ ١١٣ ٣٦٣٨ **دورنویس:** ٠٦١١ ٣٣٦١٥٤٤

تاریخ دریافت: ٨٥/٤/١٩ **تاریخ پذیرش نهایی:** ٨٥/١٠/٥

مقدمه

عقرب مزوبوتوس اپیوس اپیوس متعلق به عقرب‌های خانواده بوتیده می‌باشد و از فراوان‌ترین عقرب‌های بومی موجود در خوزستان است که مسوول ٤٥٪ عقرب‌زدگی‌ها می‌باشد [١]. زهر عقرب یک ترکیب محلول در آب، آنتی‌ژنیک و PH آن خنثی تا قلیایی است. زهر عقرب‌ها به طور کلی از موکوس، الیگوپپتیدها، نوکلئوتیدها، اسیدهای آمینه و ترکیبات آلی دیگر و نیز از آنزیم‌هایی همچون فسفولیپاز، هیالورونیداز و مولکول‌هایی با وزن مولکولی نسبتا پایین مثل سروتونین، هیستامین، مهارکننده‌های پروتئاز، آزادکننده‌های هیستامین تشکیل شده است [٢، ٣]. بر خلاف زهر مارها و عنکبوت‌ها به طور کلی زهر بسیاری از عقرب‌ها یا فاقد آنزیم هستند و یا دارای مقادیر کم فعالیت‌های

آنزیمی می‌باشند به عنوان مثال در زهر عقرب Heterometrus scaber آنزیم‌های اسیدفسفاتاز، ریبونوکلئاز، 5- نوکلئوتیداز، هیالورونیداز، استیل‌کولین استراز و فسفولیپاز A، یافت شده‌اند. 5- هیدروکسی تریپتامین، پروتئین‌های مهارکننده پروتئاز، آنژیوتانسیناز وسوکسنیات دهیدروژناز نیز در زهر عقرب‌های Mesobuthus tamulus, Centruroides exilicuada و Heterometrus fulvipes یافت شده‌اند [٤، ٥]. آنزیم‌های فسفولیپاز A_2 (PLA_2 EC 3.1.1.4) یک خانواده بزرگی از آنزیم‌های درون سلولی و ترشحی هستند که همگی پیوند استری گلیسروفسفولیپیدها را در موقعیت Sn-2 هیدرولیز می‌کنند [٦]. هیالورونیدازها آنزیم‌هایی هستند که بر روی هیالورونیک اسید عمل می‌کنند. هیالورونیک اسید پلی‌ساکاریدی با وزن مولکولی بالا است که از واحدهای دی‌ساکاریدی متناوب β-گلوکورونیک اسید و N- استیل گلوکز آمین تشکیل شده است که به طور متناوب توسط پیوندهای گلیکوزیدی (٣-١) β و (٤-١) β به هم متصل می‌شوند [٧]. برای اینکه مکانیسم‌های بیوشیمیایی و پاتوفیزیولوژیکی تاثیر آنزیم‌های موجود در زهر عقرب‌ها مشخص شوند باید این آنزیم‌ها شناسایی گردند و اثرات هر یک به طور جداگانه مورد مطالعه قرار گیرد. در این تحقیق با توجه به اینکه روی آنزیم‌های زهر عقرب مزوبوتوس اپیوس اپیوس مطالعه‌ای صورت نگرفته بود بر آن شدیم تا فعالیت‌های آنزیمی هیالورونیداز و فسفولیپاز A_2 را در زهر خام و فراکسیون‌های جدا شده از آن توسط کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون بررسی نماییم.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر یک مطالعه توصیفی است و هر آزمایش سه بار تکرار شده و نتایج نشان داده شده میانگین سه بار آزمایش می‌باشند. زهر خام لیوفیلیزه عقرب مزوبوتوس اپیوس اپیوس از موسسه رازی اهواز خریداری 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 گاوی از شرکت Sigma، فسفات مونوسدیک، فسفات دی سدیک از شرکت Merck خریداری گردید.

جداسازی فراکسیون‌های زهر: تمام مراحل جداسازی در ٤+ درجه سانتی‌گراد و طبق روش Angelina انجام گردید [٨]. یک گرم از زهر خام لیوفیلیزه در ١٠ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید سپس محلول حاصل به مدت ١٢ دقیقه و در دور ١٨٠٠٠gx در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد و قسمت محلول (محلول رویی) از قسمت نامحلول جدا گردید. قسمت رویی حاوی پپتیدها و پروتیین‌های محلول می‌باشد و موکوپروتئین‌ها به صورت رسوب جدا می‌شوند. محلول رویی که حاوی ٨١٦ میلی‌گرم پروتئین بود وارد ستونی از سفادکس G-50 به ابعاد (١٠٠×٢/٧ سانتی‌متر) در تعادل با بافراستات آمونیوم ٢٠ میلی‌مولار (PH=٤/٧) گردید و بعد از اینکه نمونه جذب ستون شد ستون با سرعت جریان ٣٠ میلی‌لیتر در ساعت با همین بافر شستشو داده شد، سپس محلول خروجی در حجم‌های ٣ میلی‌لیتر در هر لوله به وسیله دستگاه جمع‌کننده اتوماتیک[1] جمع‌آوری شد. جذب نمونه‌ها بلافاصله در طول موج ٢٨٠ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UV/VIS) قرائت شد و منحنی جذب بر حسب حجم بافر خروجی رسم گردید. سپس فراکسیون‌های مختلف در ظروف جداگانه جمع‌آوری شدند. هر یک از فراکسیون‌ها با استفاده از کیسه‌های دیالیز با Cut off<1200 به مدت ٢٤ ساعت در مقابل آب مقطر دیالیز شدند و بعد تغلیظ گردیدند. مقدار پروتیین نمونه‌ها بر اساس روش Lowry اندازه‌گیری گردید [٩]. اندازه‌گیری فعالیت فسفولیپاز A_2 (همولیتیک غیر مستقیم) بر اساس روش Ouyang و Shiau انجام شد [١٠] و درصد همولیز بر طبق روش Smith و Gul به دست آمد [١١]. اساس این روش به این صورت است که فسفولیپاز A_2 در حضور یک منبع خارجی لستین باعث همولیز گلبول‌های قرمز می‌شود که این همولیز را همولیز غیر مستقیم گویند. درصد همولیز به مقدار لیزولیستین و مقدار لیزولیستین به مقدار فسفولیپاز A_2 بستگی دارد. به تعداد نمونه‌ها لوله سانتریفوژ در نظر گرفته شد و یک لوله نیز به عنوان شاهد تعیین گردید. در هر کدام ٠/٥ میلی‌لیتر سوسپانسیون ١٠٪ گلبول‌های قرمز در بافر فسفات ٠/٢ مولار با PH=٧/٢ و ٢/٥ میلی‌لیتر بافر فسفات ٠/٢ مولار با PH=٧/٢ ریخته شد. سپس به لوله شاهد ٠/١ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی و به لوله‌های دیگر به ترتیب ٠/١ میلی‌لیتر از هر نمونه حاوی مقدار معینی پروتئین افزوده شد. به همه لوله‌ها ٠/٢ میلی‌لیتر سوسپانسیون ٠/٠١ مولار لسیتین در سالین افزوده و فورا لوله‌ها در حمام آب گرم ٣٧ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٠ دقیقه انکوبه شدند. بعد از گذشت این مدت با گذاشتن لوله‌ها در یخ، واکنش متوقف شد. سپس لوله‌ها در ٤+ درجه سانتی‌گراد در ٣٠٠٠xg به مدت ١٥ دقیقه سانتریفوژ شدند. جذب محلول‌های رویی در ٥٥٠ نانومتر در مقابل شاهد به وسیله اسپکتروفتومتر قرائت گردید. برای اندازه‌گیری درصد همولیز، ابتدا همولیز کل گلبول قرمز تعیین می‌شود. به این ترتیب که در یک لوله سانتریفوژ به عنوان لوله Total (کل همولیز) حاوی ٠/٥ میلی‌لیتر سوسپانسیون ١٠٪ گلبول‌های قرمز در بافر

1- fraction collector

فسفات ٠/٢ مولار همراه با ٢/٥ میلی‌لیتر آب مقطر کاملا لیز شد. سپس به آن ٠/١ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی و ٠/٢ میلی‌لیتر سوسپانسیون لیستین ٠/٠١ مولار در سالین افزوده و در ٣٠٠٠g به مدت ١٥ دقیقه سانتریفوژ شد (رسوبی دیده نشد) جذب محلول لیز شده در ٥٥٠ نانومتر در مقابل شاهد حاوی ٢/٥ میلی‌لیتر آب مقطر، ٠/٥ میلی‌لیتر بافر فسفات ٠/٢ مولار، ٠/١ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی و ٠/٢ میلی‌لیتر سوسپانسیون لیستین قرائت گردید. (برای یکسان شدن شرایط آزمایش لوله شاهد هم در ٣٠٠٠g سانتریفوژ شد). OD لوله total به عنوان همولیز کل محسوب 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 میلی‌گرم پروتئین در هر لوله تقسیم می‌شود.

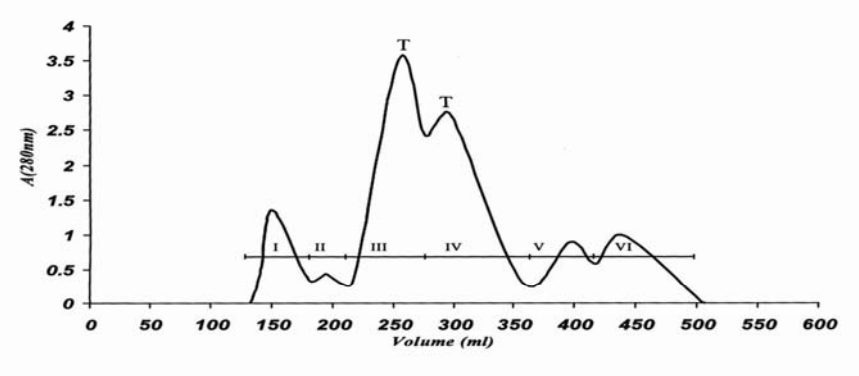
درصد همولیز= $\frac{\text{ODTest}}{\text{ODTotal}} \times 100$ اندازه‌گیری فعالیت هیالورونیداز بر اساس روش Tolksdorf و همکارانش انجام شد [١٢]. در این روش از توانایی هیالورونیک اسید در ایجاد کدورت با محلول اسیدی آلبومین، جهت اندازه‌گیری مقدار هیالورونیک اسید استفاده می‌شود. میزان کدورت با مقدار فعالیت 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 میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ٠/١ مولار تهیه گردید و قبل از انجام آزمایش در همان بافر رقیق شد (برای ترکیبات خام پیشنهاد می‌شود که غلظت‌های ٠/٠٥-٠/٠١ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه گردد). برای رسم منحنی استاندارد یک سری لوله آماده گردید. تمام لوله‌ها در حمام آب جوش به مدت ٥ دقیقه قرار داده شدند، سپس تا حد دمای اتاق خنک شدند. ٩ میلی‌لیتر معرف آلبومین به هر یک از لوله‌ها اضافه کرده و به مدت ١٠ دقیقه به حال خود گذاشته شدند پس از این مدت جذب هر یک از لوله‌ها در طول موج ٥٤٠ نانومتر قرائت گردید و منحنی استاندارد بر حسب مقدار جذب نور در ٥٤٠ نانومتر در برابر میلی‌گرم هیالورونیک اسید رسم گردید. در یک سری لوله به تعداد نمونه‌های مورد آزمایش ٠/٥ میلی‌لیتر از محلول ٠/٤ میلی‌گرم در میلی‌لیتر هیالورونیک اسید اضافه گردید. این لوله‌ها در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد به مدت ٥ـ٤ دقیقه انکوبه شدند. یک لوله شاهد نیز حاوی ١ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ٠/١ مولار (PH=٥/٣) حاوی کلرید سدیم ٠/١٥ مولار انکوبه گردید. سپس ٠/٥ میلی‌لیتر از نمونه‌های رقیق شده به لوله‌های مشخص شده به عنوان نمونه اضافه شد و به مدت ١٠ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. بعد از این مدت ٩ میلی‌لیتر معرف آلبومین به هر لوله اضافه شده و در دمای اتاق به مدت ١٠ دقیقه انکوبه گردیدند. پس از آن جذب هر یک از لوله‌ها در برابر لوله شاهد در طول موج ٥٤٠ نانومتر قرائت گردید. سپس از روی منحنی استاندارد مقدار هیالورونیک اسید باقی مانده بعد از تجزیه شدن توسط آنزیم به دست می‌آید و مقدار هیالورونیک اسید تجزیه شده طبق رابطه زیر به دست آمد.

میلی‌گرم هیالورنیک اسید تجزیه شده = ٠/٢mg − میلی‌گرم هیالورونیک اسید باقیمانده، سپس فعالیت مخصوص (specific activity) آنزیم توسط رابطه زیر محاسبه شد.

$$\text{فعالیت مخصوص} = \frac{\text{TRU}}{\text{mg}} = \frac{\text{میلی‌گرم هیالورنیک اسید تجزیه شده} \times 3}{\text{میلی‌گرم پروتئین در واکنش}}$$

نتایج

نتیجه حاصل از ژل فیلتراسیون زهر خام بر روی ستون سفادکس G-50 در نمودار شماره ١ نشان داده شده است. توسط کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون، از زهر خام مزوبوتوس اپیوس ٦ فراکسیون مجزا شد که به ترتیب I، II، III، IV، V، VI نام‌گذاری شدند. سنجش پروتئین در زهر خام و تمام فراکسیون‌های حاصل از کروماتوگرافی در جدول شماره ١ نشان داده شده است. نتایج مربوط به فعالیت آنزیم فسفولیپاز A_2 در جدول شماره ٢ نشان داده شده است. درصد همولیز نشان‌دهنده فعالیت آنزیم فسفولیپاز A_2 می‌باشد. این فعالیت در زهر خام، در فراکسیون I و به میزان خیلی کمتر در فراکسیون II وجود داشت. سایر فراکسیون‌ها فاقد فعالیت فسفولیپاز A_2 بودند.



نمودار ۱- نتیجه حاصل از ژل فیلتراسیون ۸۱٦ میلی‌گرم پروتئین زهر خام بر روی ستون سفادکس G-50 به ابعاد (۱۰۰×۲/۷ سانتیمتر) در تعادل با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی‌مولار (PH=٤/۷) و سرعت جریان ۳۰ میلی‌لیتر در ساعت

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

فراکسیون	توتال پروتئین (mg)	بازده (٪)
محلول زهر خام	۸۱٦	۱۰۰
*PI	۱۳۲	۱٦/۱۸
PII	۲۳/۳	۲/۸۵
PIII	۳۱٤/٤	۳۸/۵۳
P IV	۲٤۲/۷	۲۹/۷٤
P IV	۵۰/٦	٦/۲
P VI	۵۲	٦/۳۷
بازده کل		۹۹/۸۷

* فراکسیون= P

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

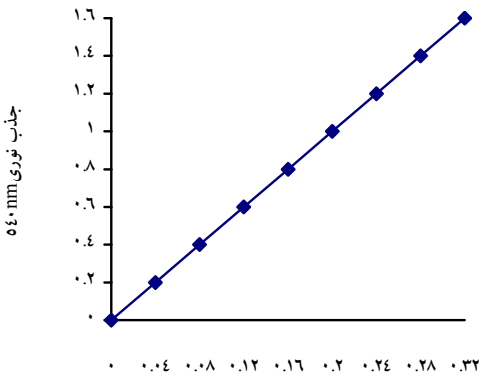
نمونه	فاکتور اندازه‌گیری		
	مقدار پروتئین (mg)	درصد همولیز *	فعالیت مخصوص
زهر خام	۰/۰۹	۵۳/۱۳	۵۹۰/۳۳
**PI	۰/۰۷	۷٦/۳۰	۱۰۹۰
PII	۰/۰۸	۲/٤۳	۳۰/۳۷
PIII	۰/۰۵	۰	۰
PIV	۰/۰۵	۰	۰
PV	۰/۰۷	۰	۰
PVI	۰/۰۷	۰	۰

T= Toxic

* درصد همولیز نشان‌دهنده فعالیت فسفولیپاز A_2 (همولیتیک غیر مستقیم) می‌باشد.

**فراکسیون=P

نمودار شماره ۲ منحنی تغییرات جذب نوری بر حسب کدورت 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 کلی اندازه‌گیری فعالیت آنزیم هیالورونیداز در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. فعالیت مخصوص این آنزیم در زهر خام ۷٤۰ TRU/mg و در فراکسیون I، ٤۵۷٤/۵ TRU/mg می‌باشد و در بقیه فراکسیون‌ها فعالیت آنزیمی هیالورونیداز مشاهده نگردید.



نمودار ٢- تغییرات جذب نوری برحسب کدورت ایجاد شده در مقادیر مختلف سوبسترای هیالورونیک اسید (نمودار استاندارد)

جدول ٣- نتایج مربوط به فعالیت آنزیم هیالورونیداز

نمونه	فاکتور اندازه‌گیری			
	مقدار کل پروتئین (mg)	توتال فعالیت آنزیم (TRU)	فعالیت مخصوص (TRU/mg)	بازده (٪)
زهر خام	٨١٦	٦٠٣٨٤٠	٧٤٠	١٠٠
PI	١٣٢	٦٠٣٨٤٣	٤٥٧٤/٥	٩٩/٩٩
PII	٢٣/٣	٠	٠	٠
PIII	٣١٤/٤	٠	٠	٠
PIV	٢٤٣/٧	٠	٠	٠
PV	٥٠/٦	٠	٠	٠
PVI	٥٢	٠	٠	٠

بحث

زهر عقرب مزوبوتوس 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، '5- نوکلئوتیداز در زهر عقرب‌ها وجود دارد. البته مقدار فعالیت‌های آنزیمی و تنوع 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 [١٣]. در سال ١٩٩٠ یک نوع آنزیم فسفولیپاز A_2 از زهر عقرب Heterometrus fulvipes توسط Ramanaiah و همکارانش جداسازی گردید وزن مولکولی این آنزیم ١٦ کیلو دالتون بود [١٤]. فسفولیپین یک نوع آنزیم فسفولیپاز A_2 هترودیمری است که در سال ١٩٩٩ Conde و همکارانش از زهر عقرب Pandinus imperator جداسازی و شناسایی کردند و ساختمان اولیه و ویژگی‌های عملکردی آن را تعیین کردند [١٥]. در مرحله ژل 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 پروتئین‌هایی با وزن مولکولی بالا خواهند بود. انواع آنزیم‌های موجود در سموم حیوانات در روندهای مختلف پاتولوژیکی و روندهای توکسیک شرکت دارند [١٦]. 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 عمدتا در زهر غیر مهره‌دارانی همچون عقرب‌ها و زنبور عسل پیدا شده‌اند [١٧، ١٨]. با استفاده از فسفولیپازهای زهر به عنوان لیگاند، انواع متفاوتی از رسپتورهای فسفولیپاز شناسایی شده‌اند. این رسپتورها احتمالا در سمیت فسفولیپازهای زهر دخالت دارند [١٩،٢٠]. فسفولیپازهای عموم حیوانات بی‌مهره پروتئین‌های غنی از پیوندهای دی‌سولفیدی هستند اما ساختمان اولیه مجزایی از فسفولیپازهای سموم مارها و پستانداران دارند [١٦]. با توجه به اینکه تا کنون آنزیم‌های فسفولیپاز A_2 و هیالورونیداز در زهر عقرب مزوبوتوس 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. [٢١]. درصد همولیز نشان‌دهنده فعالیت فسفولیپاز A_2 می‌باشد. فعالیت آنزیمی فسفولیپاز A_2 در زهر مزوبوتوس اپیوس اپیوس، پیک I و به مقدار بسیار جزیی در پیک II وجود داشت. ماکزیمم فعالیت آن در پیک I مشاهده شد، به طوری که ٧٠ میکروگرم از آن ٧٦/٣٠٪ همولیز ایجاد می‌کند. فعالیت مخصوص این آنزیم در فراکسیون یک ١٠٩٠ محاسبه شد. هیالورونیدازها دارای عملکردهای بیولوژیکی از محدوده ایجاد انواع بیماری‌های عفونی مختلف از طریق تجزیه هیالورونیک اسید انسانی تا دخالت در روندهای باروری پستانداران هستند. هیالورونیک 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 ٢٠٠٦ یک نوع آنزیم هیالورونیداز از زهر عقرب plamneus gravimanus (عقرب سیاه هندی) جداسازی کردند فعالیت مخصوص این آنزیم در زهر خام در حدود ٢٥٠TRU/mg و فعالیت آن در فراکسیون

حاوی آنزیم جدا شده از زهر خام TRU/mg ٦٤١١/٧ 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 ٨٤٥TRU/mg و فعالیت آن در فراکسیون حاوی آنزیم جدا شده از زهر خام TRU/mg ۱۹۹۰۰ بود [۲۳]. در تحقیق حاضر در مقایسه با مطالعه انجام شده توسط Ressini و همکاران آنزیم هیالورونیداز با درجه خلوص بیشتری به دست آمده است. در سال ۱۹۳٦، 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 گلیکوز آمینوگلیکان‌ها در بافت‌های همبند تسهیل می‌کند، بنابراین مسمومیت سیستمیک را منجر می‌شوند [٢٤]. 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 مزوبوتوس اپیوس اپیوس موجود است. فعالیت مخصوص آنزیم هیالورونیداز در زهر خام ٧٤٠TRU/mg و در پیک I حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون TRU/mg ٤٥٧٤/٥ می‌باشد که میزان فعالیت آن نسبت به زهر خام ٦/١٨ 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 ٤ برای موش توکسیک بودند در حالی که در این تحقیق مشاهده شد که فعالیت 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 A_2 در زهر عقرب مزوبوتوس اپیوس مشاهده گردید، توانایی جداسازی آنزیم‌ها از زهر عقرب می‌تواند راهنمایی برای تخلیص آنزیم ها و بررسی اثرات مختلف بیوشیمایی و پاتولوفیزیولوژیکی آنها باشد.

تشکر و قدر دانی

این تحقیق بخشی از طرح مصوب شماره ١٦٢ دانشگاه علوم پزشکی اهواز می‌باشد. از معاونت محترم پژوهشی که پشتیبانی مالی این طرح را عهده‌دار بوده‌اند تشکر می‌شود.

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 A_2 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. Isolatron of several toxins from the venom of the scorpion centruroiedes limipidus 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. Shiau 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 phospholospase A_2 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 scp6pion 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 scprpion 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.