جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

(مقاله پژوهشی)

اندازه گیری فعالیت آنزیم فسفولیپاز A_2 در زهر خام و فراکسیونهای جدا شده از زهر افعی لبتینای ایران

مهرنوش شانکی باورصاد[*1]، زهره آموزگاری[**]، مژگان نور بهبهانی[***]

چکیده

زمینه و هدف: زهر مارها کمپلکس پیچیده ای از پروتئین هایی با فعالیت های بیولوژیکی مختلف می باشند. افعی لبتینا یکی از مارهای سمی در ایران است. در این مطالعه با بررسی روی زهر خام افعی لبتینا، به بررسی وجود آنزیم فسفولیپاز A_2 پرداخته شد.

روش بررسی: صد میلی گرم زهر خام افعی لبتینا (P I-P V) با استفاده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون روی سفادکس G-100 که با بافراستات آمونیوم ۲۰ میلی مولار (pH = ۴/۶) به تعادل رسیده بود به ۵ فراکسیون مجزا شد. غلظت پروتئین زهر خام و فراکسیون های آن با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد تعیین شد. فعالیت فسفولیپاز A_2 با استفاده از سوسپانسیون زرده تخم مرغ به عنوان سوبسترا تعیین گردید.

یافته ها: حدود ۸۹ درصد از زهر خام لیوفیلیزه این افعی، پروتئین بود. زهر خام به پنج فراکسیون مجزا شد که بر طبق خارج شدن از ستون، Peak I تا Peak V (P I-P V) نامگذاری شدند. فعالیت مخصوص در زهر خام، PeakI ، PeakII و PeakIII به ترتیب $۲/۲۵ \frac{U}{mg}$ ، $۰/۰۷۸ \frac{U}{mg}$، $۲/۷۶ \frac{U}{mg}$ و $۱/۰۴ \frac{U}{mg}$ بدست آمد.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که آنزیم فسفولیپاز A_2 در زهر خام دارای فعالیت بالایی می باشد. در بین پیکها، پیک II دارای بیشترین فعالیت بود در صورتیکه فعالیت قابل توجهی در پیک I مشاهده نشد. *م ع پ ۱۳۸۸؛ ۸ (۳): ۳۶۰-۳۵۵*

کلید واژگان: فسفولیپاز A_2 ، زهر، افعی لبتینا، ایران

*دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
** مربی گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
***کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
۱- نویسنده مسوول: Email: shanaki_m@ yahoo.com

دریافت مقاله ۱۳۸۷/۱۲/۱۹ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۸/٤/۲٤ اعلام قبولی: ۱۳۸۸/٤/۳۰

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

زهر مارها مخلوط پیچیده ای از مولکول های سمی و آنزیم های مختلف می باشند. فعالیت های بیولوژیکی اجزاء مختلف زهرها به طور همزمان اثرات سمی و کشنده ای را روی سیستم های خونی، قلبی-عروقی، تنفسی و عصبی ایجاد می کنند (۱). مارهای سمی به ۵ خانواده تقسیم بندی می شوند: کروتالیده، ویپریده، الاپیده، هیدروفیده و آتراکتاسپیدیده (۲).

افعی لبتینا(Vipera Lebetina) که در ایران به افعی یا گرزه مار معروف می باشد، در خانواده ویپریده جای دارد. این مار به رنگ های متفاوت و بیشتر به رنگ خاکستری روشن یا تیره یا نقره ای متمایل به سیاه، ساده و یکنواخت یا با خال های متفاوت قرمز آجری یا زرد زیتونی همراه با خال های کوچک تیره دیده می شود (۱).

یکی از آنزیم های مهم موجود در زهر مارها آنزیم فسفولیپاز A_2 می باشد. فسفولیپاز A_2 یک آنزیم استرولیتیک بخصوص می باشد که پیوند استری را در موقعیت sn-۲ گلیسرو فسفولیپیدها هیدرولیز می کند و مشتقات لیزو لسیتین و اسید چرب را بوجود می آورد (۳ و ۴) .

فسفولیپاز گرفته شده از زهر مارها، اثرات مختلفی از جمله نوروتوکسیسیتی، میوتوکسیسیتی، تجمع یا عدم تجمع پلاکتی، ادم، همولیز، ضد انعقاد و کاهش فشار خون را دارا می باشند (۵). هدف از این بررسی، اندازه گیری فعالیت آنزیم فسفولیپاز A_2 در زهر خام و فراکسیون های جدا شده از آن بود تا در تحقیقات آینده اثرات مختلف این آنزیم بررسی شود.

روش بررسی

این پژوهش از نوع تجربی بود.

مواد مصرفی از نوع Analytical grade شامل سفادکس G-۱۰۰ ساخت شرکت فارماسیا، سولفات مس متبلور(CUSO4, 5H2O)، معرف فولین سیو کالتو، تارتارات مضاعف سدیم و پتاسیم، کربنات سدیم، سود، استات آمونیم و آلبومین سرم گاوی خریداری شده از شرکت سیگما بودند. زهر افعی لبتینا به صورت لیوفیلیزه اهدایی مؤسسه تحقیقاتی رازی بود.

جدا سازی فراکسیون های زهر خام: ابتدا جدا سازی فراکسیون های زهر خام روی ستون سفادکس G -۱۰۰ و با استفاده از روش فرید و همکارانش انجام شد (۶). ۱۰۰ میلی گرم زهر خام در ۱ میلی لیتر بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی مولار (pH =۴/۶) حل شد. محلول حاصل در rpm ۲۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول رویی روی ستون سفادکس G -۱۰۰ با قطر ۲ سانتی متر و طول ۱ متر برده شد. این ستون قبلاً با بافر استات آمونیوم ۲۰ میلی مولار (pH =۶/۸) به تعادل رسیده بود. بعد از جذب نمونه، ستون با همین بافر شستشو داده شد. فراکسیون ها با سرعت جریان ۱۵ میلی لیتر در ساعت توسط دستگاه جمع کننده اتوماتیک مدل LKB جمع آوری شدند. سپس جذب نمونه ها در ۲۸۰ نانومتر بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر Perkin Elmer مدل Lambda۲ ساخت کشور آلمان قرائت و منحنی جذب رسم گردید. سپس پیک های مختلف دیالیز و لیوفیلیزه شدند.

اندازه گیری پروتئین: پروتئین نمونه ها با استفاده از روش لوری اندازه گیری شد(۷). به طور خلاصه یک سری لوله به طور دو تایی برای هر نمونه به اضافه یک شاهد حاوی ۱ میلی لیتر آب مقطر انتخاب شدند. مقدار مناسبی از ۰/۱ میلی لیتر تا ۱ میلی لیتر محلول استاندارد پروتئین (آلبومین سرم گاوی ۲۰ میلی گرم در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر) در لوله های مخصوص به خود ریخته و حجم هر لوله با آب مقطر به ۱ میلی لیتر رسانده شد. زهر خام و سایر فراکسیون ها هم با رقت های معین جداگانه با آب مقطر به ۱ میلی لیتر رسانده شدند. ۵ میلی لیتر از مخلوط معرف ها (۱میلی لیترمحلول

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

سولفات مس ۱ درصد در آب مقطر +۱ میلی لیتر محلول تارتارات مضاعف سدیم و پتاسیم ۲ در صد در آب مقطر + ۹۸ میلی لیتر کربنات سدیم انیدر۲ درصد در سود نیم نرمال) به هر لوله اضافه، سپس ۰/۵ میلی لیتر معرف فولین سیو کالتو (۲ بار رقیق شده) به هر کدام از لوله ها افزوده شد. پس از مدت زمان ۳۰ دقیقه جذب نمونه ها در ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Perkin Elmer مدل Lambda ۲ (ساخت کشور آلمان) قرائت گردید. پس از رسم منحنی استاندارد مقدار پروتیئن نمونه ها تعیین گردید.

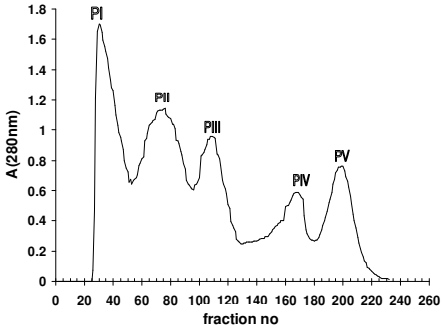
آزمایش های آنزیمی: برای اندازه گیری فعالیت آنزیم فسفولیپاز A_2 در زهر خام و فراکسیون های جدا شده از آن از روش مارینتی و همکاران استفاده شد(۸) . برای تهیه سوسپانسیون ذخیره، یک زرده تخم مرغ در سرم فیزیولوژی حل شد و حجم نهایی به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. از سوسپانسیون زرده تخم مرغ در سرم فیزیولوژی به عنوان منبع لسیتین استفاده شد. سوسپانسیون کار با تهیه رقت ۱۰ از سوسپانسیون ذخیره بدست آمد. برای اندازه گیری فعالیت فسفولیپاز A_2 به این صورت عمل شد که ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون کار با ۴/۹ میلی لیتر سرم فیزیولوژی مخلوط و در دمای $41^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. سپس به آن ۰/۱ میلی لیتر از نمونه (زهر خام و فراکسیون ها) اضافه شد و بلافاصله مخلوط گردید. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری جذب نمونه ها در ۹۲۵ نانومتر قرائت شد. اختلاف جذب بین ۵ و ۱۵ دقیقه (جذب در ۱۰ دقیقه) به عنوان مقدار نسبی فعالیت آنزیم در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتیجه کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون ۱۰۰ میلی گرم زهر خام افعی لبتینای ایران حاوی ۸۹ میلی گرم پروتئین، در شکل ۱ نشان داده شده است. طبق این روش پروتئین های زهر خام بر اساس وزن مولکولی به ۵ فراکسیون مشخص، مجزا شدند که به ترتیب خارج شدن از ستون به صورت Peak I (PI) , Peak II (PII) ، Peak III (PIII) ، Peak IV (PIV) و Peak V (PV) نامگذاری شدند.

نتایج کلی سنجش پروتئین در جدول ۱ نشان داده شده است. به طور کلی ۱۰۰ میلی گرم زهر خام حاوی ۸۹ میلی گرم پروتئین بود که بعد از بردن روی ستون مقدار ۵۲/۶ میلی گرم پروتئین(۵۹ درصد) استخراج شد.همان طور که مشاهده می شود بیشترین مقدار در Peak I و Peak II قرار داشته است.

نتایج اندازه گیری فعالیت آنزیم فسفولیپاز A_2 در زهر خام و فراکسیون های آن در جدول ۲ نشان داده شده است. همان طورکه در این جدول مشاهده می شود، فعالیت مخصوص این آنزیم در زهر خام ۲/۲۵ $\frac{U}{mg}$ می باشد. بعد از جدا سازی، فعالیت آنزیم در پیک های I ، II و III مشاهده شد. فعالیت مخصوص آن در PI ، ۰/۰۷۸ $\frac{U}{mg}$، در PII، ۲/۷۶ $\frac{U}{mg}$ و در PIII، ۱/۰۴ $\frac{U}{mg}$ بوده است.



شکل ۱: کروماتوگرافی زهر خام افعی لبتینای ایران روی ستون سفادکس G-100

جدول۱: نتایج تعیین مقدارپروتئین در زهرخام و پیک های آن

فاکتور اندازه گیری شده	حجم نمونه (میلی لیتر)	پروتئین (میلی گرم/میلی لیتر)	پروتئین توتال (میلی گرم)	بازده(درصد)
زهرخام	۱	۸۹	۸۹	۱۰۰
Peak I	۸	۲/۵٦	۲۰/٤۸	۲۳
Peak II	۹	۱/٦۸	۱۵/۳	۱۷/۲
Peak III	۱۰/۵	۰/۹٦	۱۰/۰۸	۱۱/۳۳
Peak IV	۱۳	۰/۲۳	۲/۹۹	۳/۳٦
Peak V	۱۱	۰/۳٤	۳/۷٤	٤/۲

جدول ۲: نتایج اندازه کیری فعالیت آنزیم فسفولیپاز A_2 در زهر خام و پیک های آن

فاکتور اندازه گیری شده	پروتئین توتال (میلی گرم)	فعالیت (Total unit)	فعالیت مخصوص (U/mg)	بازده (درصد)
زهرخام	۸۹	۲۰۰	۲/۲۵	۱۰۰
Peak I	۲۰/٤۸	۱/٦	۰/۰۷۸	۰/۸
Peak II	۱۵/۳	٤۲/۳	۲/۷٦	۲۱/۱۵
Peak III	۱۰/۰۸	۱۰/۵	۱/۰٤	۵/۲۵
Peak IV	۲/۹۹	–	–	–
Peak V	–	–	–	–

بحث

اثرات مختلف فراوانی همچون اثرات همولیتیک، میوتوکسیک، ضد انعقاد و ادم برای ایزوفرم های مختلف آنزیم فسفولیپاز A_2 گزارش شده است (۹). گزارشاتی مبنی بر اثر سیتوتوکسیک آنزیم فسفولیپاز A_2 از زهر افعی *Daboia russelli russelli* در غرب هندوستان(۱۰) و همچنین اثرات ضد انعقاد و میوتوکسیک آنزیم فسفولیپاز A_2 از مار کلمبیایی *crotalus durissus cumanensis* نیز گزارش شده است (۱۱). همچنین دانیل و همکارانش خاصیت ضد التهاب و همولیتیک آنزیم فسفولیپاز A_2 را در زهر مار *Bothrops jararacussu* گزارش دادند (۱۲).

نتایج جداسازی فراکسیون های زهر افعی لبتینای ایران روی سفادکس G -۱۰۰ نشان می دهد که ژل فیلتراسیون یک ابزار مفید برای جداسازی فراکسیون های این زهر می باشد. این مطالعه نشان داد که زهر افعی لبتینای ایران می تواند سریعاً باعث هیدرولیز فسفولیپیدهای موجود در لیپوپروتئین های زرده تخم مرغ گردد.

به دلیل عملکرد آنزیم فسفولیپاز A_2 روی فسفولیپیدها، لیزولسیتین آزاد می شود. لیزولسیتین آزاد شده می تواند باعث شفافیت سوسپانسیون زرده تخم مرغ شود (۸). همین یافته قبلاً در مورد لیپوپروتئین های سرم نیز مشاهده شده است (۹). اثر آنزیم فسفولیپاز A_2

برلسیتین و آزاد سازی لیزولسیتین که منجر بـه لیـز غـشاء گلبول قرمزمی شود، اثرات همولیتیک این آنزیم را توجیـه می کند (۱۲).

نتیجه گیری

ایـن بررسـی مـی توانـد بـه عنـوان روشـی بـرای جداسازی و تخلیص آنزیم فسفولیپاز A_2 و بررسی اثرات مختلف بیوشیمیایی و بیولوژیکی آن باشد کـه ایـن مـسأله منوط به کارهای تحقیقاتی آینده می باشد.

منابع

1- Ohsaka A. Hemorrhagic,necrotizing and edema-forming effects of snake venom. In: Chen YL (ed). Handbook of Experimental Pharmacology. New York: Springer; 1979:480-546.

2- Dokmetjian JC, Del Canto S,Vinzon S, Bonino MB. Biochemical characterization of the Micrurus pyrrhocryptus venom. Toxicon 2009;53:375-82.

3- Zouari-Kessentini R, LuisJ, Karray A, Kallech-Ziri O, Srairi-Abid N, et al. Two purified characterized phospholipase A_2 from Cerastes venom that inhibit cancerous cell adhesion and migration. Toxicon 2009;53:444-53.

4- Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A_2 enzymes: classification and characterization. Biochim Biophys Acta 2000;1488:1-19.

5- Kini RM. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A_2 enzymes. Toxicon 2003;42:827-40.

6- Farid TM, Tu AT. Characterization of cerastobin, a thrombin-Like enzyme from the venom of Cerastes vipera (Sahara sand viper). Biochemistry 1989;28(1):371-7.

7- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem1951;193(1):265-75.

8- Marinetti GV. The action of phospholipase A_2 on lipoproteins. Biochem Biophys Acta 1965;98:554-6.

9- Nevalainen TJ, Peuravuori HJ, Quinn RJ, Liewellyn LE, Benzie JA, Fenner PJ, et al. phosholipase A_2 in Cnidaria. CBP 2004; 139:731-5.

10- Maity G, Mandal S, Chatterjee A, Bhattacharyya D. Purification and characterization of a low molecular weight multifunctional cytotoxic phospholipase A_2 from Russell's viper venom. Chromb 2006;12:1-12.

11- Pereanez JA, Nunez V, Huancahuire-Vega S, Ponce-Soto LS. Biochemical and biological characterization of a PLA_2 from crotoxin complex of Crotalus durissus cumanensis. Toxicon 2009;53:534-42.

12- Ketelhut DFJ, Mello MH, Veronese ELG, Esmeraldino LE, Murakami MT, Arni RK, et al. Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A_2 isoforms from Bothrops jararacussu snake venom. Biochemie 2003; 58:983-91.

Phospholipase A_2 activity in crude venom and fractions separated from Iranian *Vipera Lebetina* venom

Shanaki bavarsad M*, Amoozgari Z, Noorbehbahani M

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine,Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Abstract

Background and Objective: Snake venoms are complex mixtures containing many different biologically active proteins and peptides. *Vipera lebetina* is one of the most poisonous snakes in Iran. The aim of the present study was to test the existence of phospholipaseA_2 activity in the crude venom of the snake.

Materials and Methods: One hundred mg of the crude venom of *Vipera lebetina* was resolved into five fractions using gel filtration chromatography on sephadex G-100, equilibrated with 20mM ammonium acetate buffer pH 6.8. Protein concentration of crude venom and fractions was assayed by Bovin serum albumin as a standard. Phospholipase A_2 (PLA_2) activity was determined using suspension of egg yolk as substrate.

Results: The preliminary results showed that the 89% of lyophilized venom was protein. Crude venom produced five fractions. These fractions were labeled as peak I to peak V (PI-P V), in order of their elution. Specific activity in crude venom, peak I, peak II and peak III were 2.25, 0.078, 2.76 and 1.04 U/mg.

Conclusion: High PLA_2 activity was detected in crude venom, which was more prominent in peak II and was not considerable in peak I of the fractions.

Keywords: Venom, *Vipera lebetina*, Iran, Phospholipase A_2

Received: 9/Mar/2009 **Revised: 15/Jul/2009** **Accepted: 21/Jul/2009**

*Corresponding author email: shanaki_m@yahoo.com