✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۵۸، بهار ۱۳۸۱

اندازه گیری فعالیت فسفولیپاز A_2 در زهر مارهای ایران

● **مهدی امینیان**، کارشناس ارشد مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
● **محمود طوفانی**، کارشناس ارشد مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
● **ابوالفضل اکبری**، عضو هیات علمی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
● **سید محمد طباطبائی**، کارشناس ارشد مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

تاریخ دریافت: اسفندماه ۱۳۷۹ تاریخ پذیرش: دیماه ۱۳۸۱

چکیده:
آنزیم فسفولیپاز A_2 در زهر بسیاری از مارهای سمی از جمله در زهر مارهای تیره الاپید، کروتالیده، ویپریده و مارهای دریائی وجود دارد. این آنزیم با هیدرولیز فسفولیپیدهای غشاء سلولی باعث شکسته شدن گلبولهای قرمز میشود. هدف از این مطالعه دستیابی به یک روش سریع و مطمئن برای اندازه گیری فعالیت این آنزیم و نیز استفاده از آن در جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم فسفولیپاز A_2 موجود در زهر مارهای ایران بوده است. روش کار به این ترتیب است که غلظت مشخصی از زهر هر گونه را با سوسپانسیون زرده تخم مرغ مخلوط و آنکوبه کرده، سپس توسط اسپکتروفتومتر مدل Shimadzu(Japan) UV-160A در طول موج ۹۲۵ نانومتر در مقابل محلولی از سدیم کلراید (NaCL) به‌عنوان شاهد قرائت نموده، و از اختلاف جذب نوری بین شاهد و نمونه مقدار فعالیت آنزیم محاسبه می‌شود. نتایج حاصل از ارزیابی فعالیت آنزیم فسفولیپاز A_2 در زهر مارهای تیره الاپیده (کبری)، تیره ویپریده (افعی گرزه، افعی زنجانی، افعی شاخدار و جعفری) به روش فوق به‌ترتیب مقادیر ۵۲۷، ۴۳۸، ۷۱۵، ۷۵۰، ۷۳۰، ۴۷۰، واحد بر میلی گرم زهر (U/mg) را نشان داد، که در نتیجه بیشترین فعالیت مربوط به زهر افعی شاخدار و کمترین فعالیت مربوط به افعی گرزه می‌باشد.
کلمات کلیدی: فسفولیپاز، زهر، مار، ایران

Pajouhesh & Sazandegi, No 58 PP: 23-25

Determination of phospholipase A_2 activity in the venom of iranian snakes

By: Toofani, M, Tabatabaei S.M, Aminian.M. Akbari. A. Razi Research. Institute. Karaj. Iran.

Phospholipas A_2 (ph A_2) which is present in the venom of many snakes eg. elapids, viperids, crotalids, seasnakes and even cloubrids,hydrolyses phospholipids in cell membrane and consequently lyses the red blood cells. the aim of this study is to find a rapid, sensitive and useful method to determine the activity of this enzyme in venom. The procedure is to take o.1 ml of each venom (stock conc. 100 mg / ml) and add it to suspension of egg yolk. after the incubation, the suspension was read in a spectrophotometer model U V - 160 A shimadzu (Japan) at 925 nm against Nacl as blank. The difference between blank absorbance and venom absorbance was calculated as enzyme activity. The results of above experiments showed the following activites, *Naja naja oxiana* 525, *Vipera lebetina* 438, *Vipera albicornuta* 712, *Pseudocerastes persicus* 750, *Echis carinatus* 730, *Aghistrodon halys* 470 (U/mg).Our results showed the highest activity was belong to *P. persicus* and the lowest belong to *V. lebetina*, the comparison of the enzyme activity in Iranian venoms with foreign venoms showed higher activity for Iranian venoms.
Keywords: Phospholipase. Snake, Venom, Iran.

مقدمه

زهر مار کمپلکس پیچیده‌ای است که حاوی عناصر سمی و آنزیم‌های مختلف می‌باشد (۲،۱). فعالیتهای بیولوژیکی اجزاء مختلف سموم به‌طور همزمان اثرات سمی و کشنده‌ای را روی سیستمهای خونی، قلبی، عروقی و عصبی ایجاد می‌کنند.

مطالعات گسترده‌ای بوسیله برخی از محققین روی زهر مار در نقاط مختلف جهان صورت گرفته است، در این راستا اجزای تشکیل دهنده زهر خام با استفاده از روشهای بیوشیمیائی جداسازی و خواص آنزیمی و سمی آنها مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته و مشخص شده که اعمال پاتوفیزیولوژیکی زهر مربوط به آنزیمهای موجود در آن می‌باشد (۶). از آنزیمهائی که در زهر اغلب مارها وجود دارد فسفولیپازها هستند که در متابولیسم لیپیدها مؤثر می‌باشند.از میان آنها فسفولیپازها A_2 که فسفاتیداز A، لسیتیناز و همولیزین (لیز کننده گلبولهای قرمز) نیز نامیده میشود و فسفولیپیدها را هیدرولیز می‌کند، بیشتر مطالعه شده است (۱۱).فسفولیپاز A_2 در زهر بیش از بیست گونه مار از جمله در زهر مارهای خانواده الاپیده، کروتالیده، ویپریده و مارهای دریائی وجود دارد(۱۵). فسفولیپیدها از ترکیبات مهم غشاء سلولی محسوب می‌شوند و هیدرولیز آنها توسط آنزیم فسفولیپاز A_2 باعث شکسته شدن گلبولهای قرمز شده و از طرفی به‌عنوان یک توکسین فعال پیش سیناپسی عمل می‌کند که مانع آزاد شدن استیل کولین شده و در نتیجه باعث فلج شدن ماهیچه‌های صاف می‌گردد (۴، ۱۰). همچنین با اثر بر روی فسفولیپیدهای شبکه سارکوپلاسمی ماهیچه‌های ارادی و با مهار فعالیت آنزیم Ca-ATPase باعث اختلال در عملکرد ماهیچه‌ها میشود (۹). سوبسترای طبیعی این آنزیم فسفاتیدیل کولین (لسیتین) می‌باشد ولی هیدرولیز می‌تواند در سوبسترای آزاد یعنی زرده تخم مرغ هم انجام گیرد. این آنزیم لسیتین را به لیزولسیتین تبدیل میکند و همین امر موجب شفاف شدن رنگ زرده تخم مرغ میشود، چون لیزولسیتین در سوسپانسیون زرده تخم مرغ حل میشود(۱۳). سعی بر این بوده که با بررسی فعالیت آنزیم فسولیپاز A_2 در زهر مارهای ایران زمینه برای جداسازی و خالص نمودن این آنزیم فراهم شده و نیز امکان دست یابی به یک روش مطمئن برای اندازه‌گیری فعالیت فسفولیپاز A_2 در جهت شناسائی خواص بیولوژیکی زهر مارها فراهم شود.

مواد و روشها

برای انجام آزمایش مربوط به فعالیت آنزیم فسفولیپاز A_2 از روش Marinetti (۱۳). با بعضی تغیرات استفاده شده (۶). به‌این صورت که از حل کردن یک زرده تخم مرغ در سدیم کلراید ۰/۹ ٪ و رساندن حجم محلول به ۱۰۰ میلی لیتر برای تهیه سوسپانسیون زرده تخم مرغ ذخیره استفاده میکنیم این محلول در طول موج ۹۲۵ نانومتر جذبی برابر ۱/۲ دارد. برای تهیه محلول کار، یک میلی لیتر از این محلول را به حجم ۱۰ میلی لیتر میرسانیم، به ۰/۱ میلی لیتر از زهر هر کدام از مارها با غلظت ۱۰۰ ماکروگرم در میلی لیتر ۲ میلی لیتر سوسپانسیون زرده تخم مرغ اضافه کرده (در لوله شاهد فقط ۲ میلی لیتر سوسپانسیون زرده تخم مرغ می‌ریزیم) و به‌مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار میدهیم پس از این مدت به هر نمونه ۳ میلی لیتر محلول سرم فیزیولوژی ایزوتونیک سد شده اضافه میکنیم تا واکنش متوقف گردد. سپس لوله‌ها را در طول موج ۹۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Shimadzu (Japan) UV- 160 A قرائت میکنیم (قبلاً دستگاه را با محلول سدیم کلراید ۰/۹٪ صفر کرده‌ایم) اختلاف جذب لوله شاهد با نمونه‌ها عبارتست از مقادیر فسفولیپاز A_2 زهرها. هر ۱٪ اختلاف جذب مربوط به یک واحد در هر میلی گرم میباشد.

(بر حسب واحد U در میلی گرم) فسفولیپاز A_2= ۱۰۰۰ (جذب نمونه - جذب شاهد).

هر واحد (U) عبارت است از مقادیری از آنزیم که بتواند ۱٪ کاهش در جذب سوسپانسیون زرده تخم مرغ بوجود آورد. بعبارت دیگر واحد فعالیت آنزیم عبارت است از مقدار آنزیم مؤثر در آزاد کردن یک میکرومول اسید چرب در دقیقه.

مشاهدات و نتایج

برای اندازه‌گیری فعالیت فسفولیپاز A_2، زهر شش گونه از مارهای سمی ایران مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن براساس U/mg در جدول شماره -۱ آمده است:

با توجه به جدول مشاهده میشود که فعالیت آنزیم در زهر افعی طرح شاخ دار *(P. persicus)* بیشتر و در زهر افعی گرزه *(V.lebetina)* کمتر از سایر مارها بوده است. اگر به نمونه ء حاوی سوسپانسیون زرده تخم مرغ و زهر مار، سوسپانسیون گلبولهای قرمز انسان اضافه شود، گلبولهای قرمز همولیز میشوند. از این خاصیت برای اثبات وجود لیزولسیتین در محلول سوسپانسیون میتوان استفاده نمود.(۵، ۱۴). آزمایشها نشان داد که بهترین غلظت برای زهر، ۱۰۰ ماکروگرم در میلی لیتر میباشد و نیز در غلظت‌های بالای نمک و محلولهای قلیائی، لیپوپروتئین‌های زرده تخم مرغ بیشتر حل میشوند. افزایش pH با استفاده از تریس بافر و یا فسفات بافر (۰/۱M) و یا افزایش غلظت سدیم کلراید، باعث شفاف‌تر شدن سوسپانسیون زرده تخم مرغ می‌شود (۱۳). حرارت دادن تا حدود ۹۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه آنزیم را غیر فعال نموده و نیز فرمالدئید از(۰/۶ - ۰/۰۶) در صد باعث غیر فعال شدن آنزیم میشود(۱۳).

بحث

بررسی اخیر نشان داد که فسفولیپاز A_2 زهر مار، فسفولیپیدهای زرده تخم مرغ را به‌سرعت هیدرولیز میکند و اگر به محصول هیدرولیز (لیزولسیتین) سوسپانسیونی از گلبولهای قرمز شسته شده در بافر سدیم کلراید اضافه شود این گلبولهای قرمز شکسته و لیز می‌شوند (۵). در حالیکه مشاهده شده فسفولیپاز A_2 نمی‌نواند به فسفولیپیدهای گلبولهای قرمز شسته شده حمله نماید (در غیاب لیزولسیتین) زیرا در اثر شستشو، لیپوپروتئینها شسته شده و فقط فسفولیپیدها باقی می‌مانند و فسفولیپیدهای غشاء گلبولهای قرمز در دسترس فسفولیپاز A_2 نیستند. این نشان میدهد که اسیدهای چرب آزاد فسفولیپیدها مستقیماً در داخل ملکول لیپوپروتئینها هستند، ولی گروههای فسفریل کولین در خارج ملکول و در دسترس فسفولیپاز C هستند. برای بررسی و اندازه‌گیری فعالیت فسفولیپاز A_2 در زهر مار، از چند روش استفاده میشود، یکی از آنها روش کالریمتری است (۳). (۱۹۸۷). Aravaio, Radvanyi, F که بر اساس تغیرات pH محیط، در نتیجه آزاد شدن اسیدهای چرب حاصل از هیدرولیز فسفولیپیدها ایجاد می‌شود. در این جا از فنل‌رد به‌عنوان معرف رنگی برای تغیرات pH استفاده شده، بدین صورت که لسیتین خالص همراه با کلسیم کلراید و سدیم کلراید در سدیم کلات یا ترایتون X-100 حل شده و جریانی از نیتروژن از روی آن عبور داده میشود، سپس حجم معینی از زهر مار با غلظتهای مشخص که حاوی آنزیم فسفولیپاز A_2 میباشد اضافه شده بعد از ۱۵ دقیقه در طول موج ۵۵۸ نانومتر قرائت می‌شود و با یک نمونه کنترل (بدون فسفولیپاز) مقایسه می‌شود. کاهش تغیرات شدت جذب بین کنترل و نمونه در دقیقه در ماکروگرم فسفولیپاز به‌عنوان فعالیت آنزیم فسفولیپاز A_2 گزارش می‌شود.

در این روش، چون تغیرات جزئی pH باعث تغیر رنگ و در نتیجه تغیر طول موج میشود لذا در محاسبات ایجاد خطا میکند. از طرفی تهیه معرفهای سدیم کلات و ترایتون X-100 نسبت به روش انجام شده در بخش جانوران سمی مقرون به صرفه نمیباشد.

روش دیگر روش تیتریمتری می‌باشد، Dole, و Kockolaty (۷، ۸ و ۱۲). که در آن از زرده تخم مرغ در باقر تریس pH=۷ به‌عنوان سوبسترا استفاده شده و پس از افزودن زهر مار با غلظت‌های معین و مشخص به‌مدت ۳۰ دقیقه در اتو ۳۷ درجه، محلول حاوی ایزو پروپانل، هپتان و آمونیم سولفات به املسیون حاوی زهر مار اضافه می‌شود. در اینجا فسفولیپاز زهر روی لسیتین زرده تخم مرغ اثر کرده تولید اسید چرب آزاد می‌کند. اسیدهای چرب آزاد شده در مجاورت معرف رنگی تیمول بلو توسط NaOH/۰۰۲N تیتر شده و از روی میکرومول‌های اسید چرب آزاد شده در دقیقه در میلی‌گرم فسفولیپاز مقدار فعالیت آنزیم مشخص می‌شود. هر واحد آنزیم می‌تواند یک میکرومول اسید چرب را در دقیقه از لسیتین آزاد نماید (در pH=۸/۹ و۲۵ درجه سانتیگراد). در این روش دقت عمل به‌خاطر تهیه محلولهای استاندارد تیتراسیون، کمتر شده و از طرفی NaOH ($O.OO_2N$) مورد مصرف در تیتراسیون باید قبلاً بوسیله عبور بخار ازت از سطح آن سترون شود و pH محیط ثابت باشد. در نتیجه زمان آزمایش طولانی‌تر و معرفهای نسبتاً زیادی مصرف می‌شود.

روشی که در بخش جانوران سمی و تهیه سم و سرم مؤسسه رازی مورد استفاده قرار گرفت، روش Marinetti

(میزان فعالیت آنزیم فسفولیپاز A_2 درزهر مارهای ایران)

نام علمی مارهای مورد بررسی	بار اول	باردوم	میانگین
Naja. naja oxiana	524	530	527
Vipera Lebetina	416	461	438
Agkistrodon halys	475	465	470
Vipera albicornuta	736	694	715
Pesudocerastes persicus	783	719	750
Echis carinatus	734	728	730

(۱۳) با بعضی تغیرات و با استفاده از خاصیت بی‌رنگ شدن زرده تخم مرغ در بافر سدیم کلراید در مجاورت زهر بوده است (در قسمت مواد و روشها شرح داده شده است) که این روش بنا بهٔ دلایل فوق هم از نظر مواد مصرفی و هم از نظر سرعت عمل و کارائی نسبت به دو روش فوق الذکر مقرون به صرفه و مناسب‌تر می‌باشد.

همانطوریکه از جدول ۱ بر می‌آید اندازه‌گیری فعالیت فسفولیپاز A_2 در زهر شش نوع از مارهای ایران در دو نوبت انجام شد که نتایج نشان میدهد در انجام این آزمایش اشتباه محسوسی رخ نداده است بنابراین در این بررسی، از محاسبات آماری نظیر، انحراف معیار، حدود اطمینان و... استفاده نشده است و آزمایش دوم جهت تائید صحت آزمایش اول انجام شده و فقط بین نتایج نوبت اول و دوم میانگین گرفته شده است.

منابع مورد استفاده

۱- فرزان پی. رضا - مارشناخت. تهران، انتشارات مرکز نشر دانشگاهی (۱۳۶۴). صفحه ۲۲۲-۲۱۸

۲- لطیفی. محمود - مارهای ایران. تهران، انتشارات سازمان محیط زیست (۱۳۶۴). صفحه ۵۱-۴۶

3- Albetiza, A. & Radvanvi., 1987, Determination of phospholipase A_2 activity by a colorimetric assay using a pH indicator. Toxicon vol. 25, no. 11, pp.1181-1188.

4- Covacevich, J.,Davi,p.and Pearn, J.,1987, Toxic plants & animals,374-381.

5- Condrea, E. and Devries,A., 1964, Hemolysis and splitting of human erythrocyte phospholipids by snake venoms. Biochim.Biophys.Acta,84,60-73.

6- Dimitrov, G. D. and Kankonkar. R.C.,1968, Fractionation of *Vipera russeli* venom by gelfiltration. Toxicon, 5,213-221.

7- Dole, V.p., 1956, A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose.J. Clin Invest. 35,150-154.

8- Dole, V. P. and Meinertz, H., 1960, Microdetermination of long-chain acids in plasma and tissues. J. Biol. Chem., 235,2595.

9- Gutierrez, J. M. and Colegue., 1987, Effect of myotoxic phospholipase A_2 isolated from *Bothrops asper* venom on skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Toxicon, Vol. 25,No.11, pp. 1244-1248.

10- Harris, J. B. 1981, Phospholipase A_2 activity of notexin and its role in muscle damage. Toxicon, 19, No. 3, 419-430.

11- Iwanaga, S. and Susuki, T. 1979, Enzymes in snake venom; Handbooks of experimental pharmacology (Ed. By Leechen yuat) Springer Verlag. Berlin Heidelberg, 52,61.

12- Kocholaty, W., A., 1966, Rapid and simpel phospholipase assay. Toxicon,4,1-5.

13- Marinetti, G. V., 1965, The action of phospholipase A_2 on lipoproteins. Biochem. Biophys. Acta, 98, 554-565.

14- Ouyang, C. and YN-Shiau, S.,1970, Relationship between pharmacological actions and enzymatic activities of the venom of *Trimeresurus gramineus*. Toxicon 8,183-191.

15- Russell,M.D.,and Findlay, E., 1983, Snake venom poisoning 172-176.