(مقالهٔ پژوهشی)

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم هیالورونیداز در زهر افعی لبتینای ایران

زهره آموزگاری[1*]، سمانه ابیض[2]، مژگان نوربهبهانی[3]، اسماء محمدی[2]

۱-کارشناس‌ارشد بیوشیمی.
۲-دانشجوی کارشناسی‌ارشد بیوشیمی بالینی.
۳-کارشناس آزمایشگاه.

۱و۲-گروه بیوشیمی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران.
۳-گروه آزمایشگاه، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران.

* نویسندهٔ مسؤول:
زهره آموزگاری؛ گروه بیوشیمی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران.
تلفن: ۰۰۹۸۹۱۶۳۱۱۸۶۳۵
Email: zamoozgari277@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: زهر مارها حاوی مخلوطی از پروتئین‌های آنزیمی و غیرآنزیمی و ترکیبات آلی کوچک می‌باشد. مطالعات ما روی زهر افعی لبتینای ایرانی مشخص نمود که این زهر منبع غنی از پروتئین‌ها و لیپیدها می‌باشد. افعی لبتینا یکی از مارهایی است که در قسمت-هایی از جنوب شرقی اروپا، جنوب شرقی آسیا و شمال غربی آفریقا یافت می‌شود.
هیالورونیداز یک فاکتور ثابت در زهر مارهاست و به عنوان یک فاکتور انتشار شناخته شده که انتشار توکسین‌های سیستمیکی را که به گردش خون آسیب می‌رسانند، تسهیل می‌کند. در این مقاله فعالیت آنزیم هیالورونیداز را در زهر افعی لبتینای ایران گزارش می‌دهیم.

وش بررسی: فعالیت هیالورونیداز روی هیالورونیک اسید به روش توربیدومتری آزمایش شد. فعالیت کاهش توربیدیتی به صورت درصد هیالورونات هیدرولیز شده در مقایسه با جذب لولهٔ آزمایش بدون آنزیم به عنوان صد درصد توربیدیتی محاسبه شد. از هیالورونیداز بیضهٔ گاوی به عنوان استاندارد استفاده شد.
یافته‌ها: pH و درجهٔ حرارت اپتیمم برای حداکثر فعالیت به ترتیب ۶ و ۳۷ درجهٔ سانتی-گراد بود.
نتیجه‌گیری: نتیجهٔ کلی این مطالعه این بود که زهر افعی لبتینای ایران دارای مقدار قابل ملاحظه‌ای فعالیت هیالورونیداز بود.

کلید واژگان: افعی لبتینای ایران، هیالورونیداز.

دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۶/۱۸ دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده: ۱۳۹۵/۱/۲۹ اعلام قبولی: ۱۳۹۵/۱/۳۰

مقدمه

زهر مارها کمپلکسی از آنزیم‌های مختلف، توکسین‌ها، پپتیدهای غیرآنزیمی و ترکیبات آلی کوچک مثل سیترات، نوکلئوزیدها و استیل کولین می‌باشد (۱).

تنوعات بسیار زیادی بین محتویات زهر مارها در گونه‌های مختلف، در افراد یک گونه و مناطق مختلف جغرافیایی وجود دارد.

گزیدگی توسط مارها باعث تظاهرات بالینی وسیعی که شامل: نوروتوکسیسیتی، میوتوکسیسیتی، کاردیوتوکسیسیتی، انعقادی، ضدانعقادی، هموراژیک، همولیتیک و ادم می‌باشد. این تظاهرات بین مارهای مختلف جغرافیایی متنوع می‌باشد. یکی از آنزیم‌های موجود در زهر مارها هیالورونیداز می‌باشد. این آنزیم پیوندهای گلیکوزیدی β(۱→۴) و β(۱→۳) بین واحدهای N-استیل هگزوزامین و گلوکورونات را در هیالورونیک اسید می‌شکند (۲، ۳).

آنزیم هیالورونیداز در آسیب موضعی بافت‌ها و التهاب از طریق تخریب هیالورونات بافت پیوندی و کلاژن عروق خونی نقش دارد (۲). وجود این آنزیم در زهر مارها به طور عمده به عنوان فاکتور انتشار زهر شناخته شده است، زیرا این آنزیم قابلیت نفوذ غشای بافتی را افزایش داده و سبب کاهش ویسکوزیته زهر وارد شده به بدن و بنابراین تسهیل انتشار زهر می‌شود (۳).

مهار این آنزیم نه تنها آسیب‌های بافتی سطحی را به حداقل می‌رساند، بلکه باعث تأخیر در انتشار توکسین‌های کشنده می‌شود، از این رو در مورد معالجهٔ مار گزیدگی مهم است. هدف از این مطالعه بررسی وجود این آنزیم در افعی لبتینای ایران (گرزه ماز) و اندازه‌گیری فعالیت آن می‌باشد که در تحقیقات بعدی اقدام به تخلیص و بررسی اثرات مهارکننده‌های آن پرداخته شود تا شاید راهی برای جلوگیری از انتشار زهر در بدن بعد از گزیدگی باشد.

روش بررسی

زهر افعی لبتینای ایران به صورت لیوفلیزهٔ اهدایی مؤسسه رازی بود.

مواد مصرفی شامل: هیالورونیک اسید، هیالورونیداز، استات الومینیم ساخت شرکت Sigma، هگزا دسیل تری-متیل امونیوم برمید، فسفات منوسدیک، فسفات دی سدیک، کلرید کلسیم، تریس، سولفات مس متبلور (SH20 و Cuso4)، تارتارات مضاعف سدیم و پتاسیم، کربنات سدیم، سود، آلبومین سرم گاوی ساخت شرکت مرک، معرف فولین سیوکالتو از ترکیبات تنگستات سدیم، مولیبیدات سدیم، اسید فسفریک غلیظ، اسید کلریدریک غلیظ و برم که ساخت شرکت مرک بودند، ساخته شد.

مقدار پروتئین نمونه‌ها بر اساس روش لوری (۴) تعیین گردید. یک سری لوله به صورت دوتایی برای هر نمونه به اضافه یک شاهد حاوی ۱ میلی‌لیتر آب مقطر انتخاب شدند. مقدار مناسبی از ۰/۱ تا ۱ میلی‌لیتر محلول استاندارد پروتئین (سرم آلبومین گاوی، ۲۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) را در لوله‌های مخصوص به خود ریخته و حجم هر لوله با آب مقطر به ۱ میلی‌لیتر رسانده شد. زهر خام هم در رقت‌های معین، جداگانه با آب مقطر به ۱ میلی-لیتر رسانده شد. ۵ میلی‌لیتر از مخلوط معرف‌ها (۱ میلی‌لیتر محلول سولفات مس ۱ درصد در آب مقطر + ۹۸ میلی‌لیتر کربنات‌سدیم انیدرید ۲ درصد در سود نیم نرمال) به هر کدام از لوله‌ها اضافه شد. پس از مدت زمان ۳۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در ۵۴۰ نانومتر قرائت گردید. پس از رسم منحنی استاندارد مقدار پروتئین نمونه‌ها تعیین شد.

فعالیت هیالورونیداز بر طبق روش پکریتایاکامه (Pukrittayakame) و همکاران (۵) با برخی تغییرات انجام شد. در یک سری لولهٔ آزمایش مقادیر مختلف زهر خام از ۲۰۰ تا ۴۰۰ میکرولیتر ریخته و سپس حجم هر لوله

با بافر استات حاوی استات سدیم- اسید استیک ۰/۲ مولار با pH برابر ۶ حاوی Nacl ۰/۱۵ مولار به ۴۰۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس به هر لوله ۱۰۰ میکرولیتر هیالورونیک اسید (mg/ml ۰/۵ در بافر استات) افزوده شد (حجم نهایی هر لوله ۰/۵ میلی‌لیتر بود). یک لولهٔ آزمایش حاوی همهٔ مواد آزمایش به جز زهر خام در همین شرایط گذاشته شد که بعداً نمونه‌ها با آن سنجیده شدند (این لوله به عنوان صد در درصد کدورت در نظر گرفته شد.). همهٔ لوله‌های آزمایش به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد اینکوبه شدند و سپس واکنش با افزودن ۱ میلی‌لیتر ستیل‌تری متیل امونیوم برمید (۲/۵ درصد w/v در سود ۲ درصد) متوقف شد. به عنوان نمونه کنترل از هیالورونیداز گاوی در همین شرایط استفاده شد. فعالیت هیالورونیداز به صورت درصد هیالورونات هیدرولیز شده در مقایسه با جذب لولهٔ آزمایش بدون زهر (آنزیم) به عنوان صد درصد توربیدیتی محاسبه شد.

$$\text{میزان هیالورونات باقی مانده} = \frac{OD \text{ نمونه حاوی زهر}}{OD \text{ نمونه فاقد زهر}} \times ۱۰۰$$

میزان هیالورونات هیدرولیز شده= میزان هیالورونات باقی مانده −۱۰۰

اثر درجهٔ حرارت روی فعالیت هیالورونیداز:

فعالیت هیالورونیداز زهر افعی لبتینا در درجهٔ حرارت‌های مختلف (°C ۸۰-۰) به مدت ۳۰ دقیقه آزمایش شد.

اثر pH بر روی فعالیت هیالورونیداز:

برای تعیین pH اپتیمم فعالیت هیالورونیداز بافرهای ۰/۲ مولار استات سدیم با PH برابر ۴ تا ۶ و بافر تریس_ Hcl با pH برابر ۸ تا ۹ حاوی Nacl، ۳۰۰ میلی مولار استفاده شد.

یافته‌ها

هر میلی‌گرم پودر لیوفیلیزهٔ زهر افعی لبتینای ایران حاوی ۰/۸۹ میلی‌گرم پروتئین می‌باشد. فعالیت هیالورونیداز از زهر خام روی هیالورونیک اسید انجام شد که نتایج در جدول ۱ و منحنی ۱ مشخص شده است.

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود زهر خام حاوی فعالیت هیالورونیداز می‌باشد که با افزایش غلظت پروتئین زهر این فعالیت افزایش می‌یابد، ولی از غلظت ۲۰۰ میکروگرم به بعد میزان فعالیت در محدوده‌ای ثابت می‌شود.

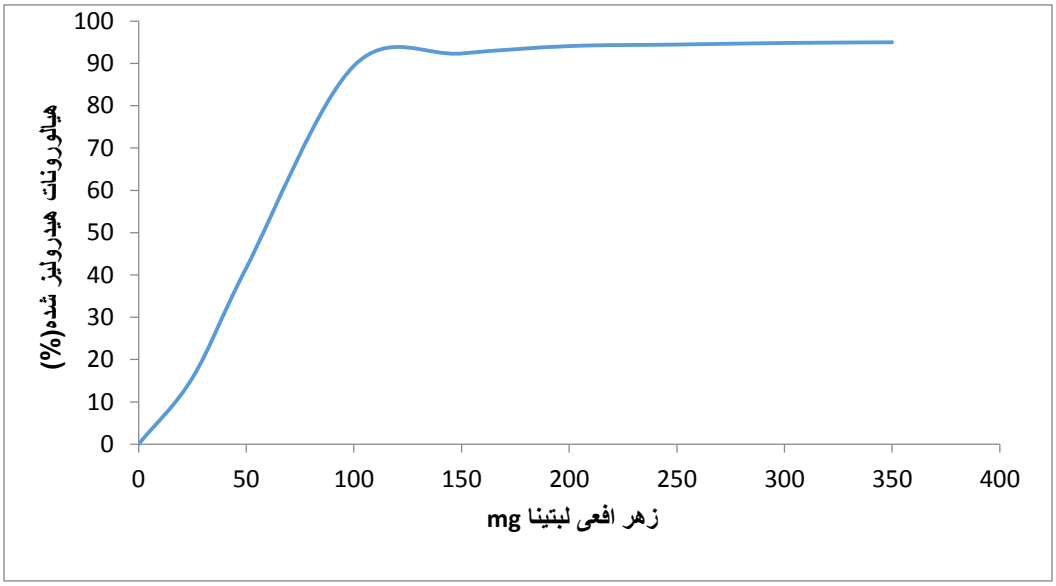
اثر pH بر روی فعالیت هیالورونیداز در منحنی ۲ نشان داده شده است، همان‌طور که از روی منحنی مشاهده می‌شود، ماکزیمم فعالیت در pH برابر۶ می‌باشد.

اثر درجهٔ حرارت بر روی فعالیت هیالورونیداز در منحنی ۳ نشان داده شده است. ماکزیمم فعالیت در حرارت ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد مشاهده می‌شود.

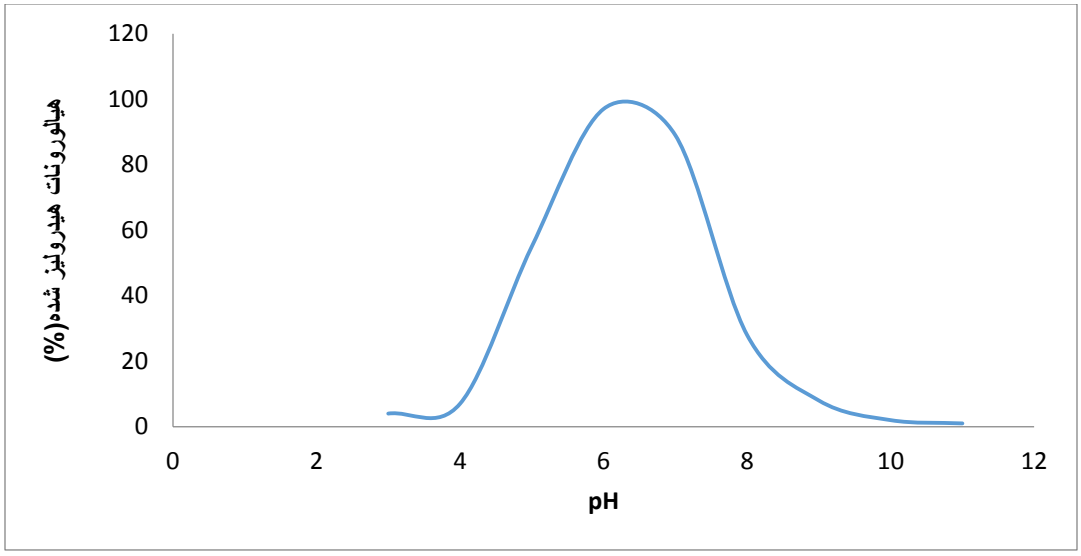
جدول۱: نتایج فعالیت هیالورونیداز زهر خام افعی لبتینای ایران

زهر خام (میکرو گرم)	میزان پروتئین (میکرو گرم)	فعالیت هیالورونیداز(٪)
۲۵	۲۲/۵	15/68 ±1/3
۵۰	۴۴/۵	41/66 ±1/74 89/44 ±3/6
۱۰۰	۸۹	92/36 ± 4
۱۵۰	۱۳۳/۵	94/1 ±4/3 94/46 ±4/02
۲۰۰	۱۷۸	94/84 ±4.35
۲۵۰	۲۲۲/۵	95 ±4/6 95 ± 4/65
۳۰۰	۲۶۷	
۳۵۰	۳۱۱/۵	
۴۰۰	۳۵۶	

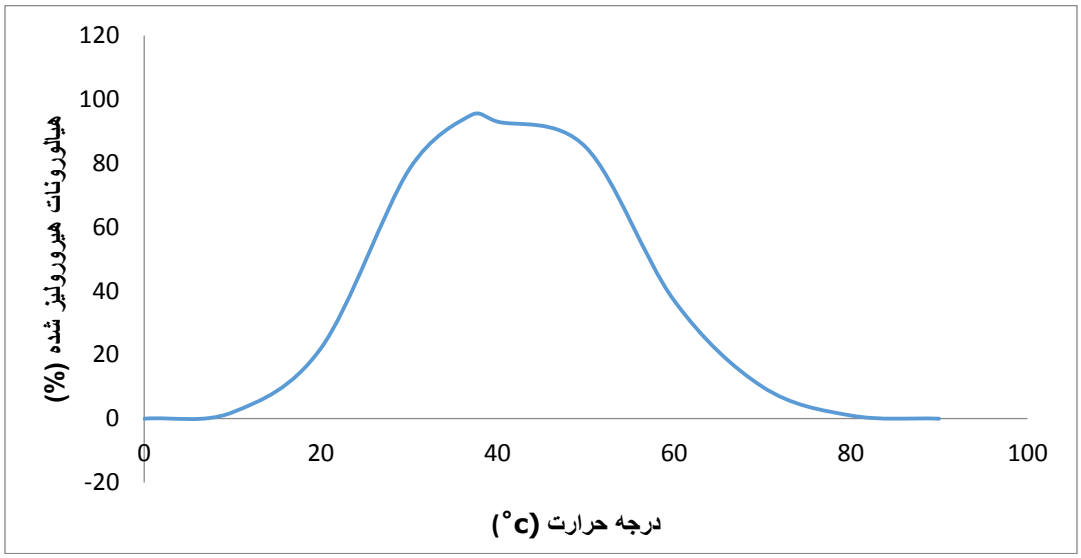
- فعالیت هیالورونیداز برابر با درصد هیالورونات هیدرولیز شده می‌باشد.
- اطلاعات جدول بر اساس میانگین ± انحراف معیار (mean± S.D) بیان شده‌اند که n =۳ می‌باشد.



منحنی ۱: نتایج فعالیت هیالورونیداز غلظت‌های مختلف زهر خام افعی لبتینای ایران



منحنی۲: بررسی فعالیت هیالورونیداز زهر افعی لبتینا در **pH**های مختلف



منحنی۳: بررسی فعالیت هیالورونیداز زهر افعی لبتینا در درجهٔ حرارت‌های مختلف

بحث

زهر مارها حاوی آنزیم‌ها و توکسین‌های مختلف می‌باشد. یکی از آنزیم‌های موجود در زهر مارها هیالورونیداز می‌باشد. این آنزیم تقریباً در زهر همهٔ مارها مشاهده می‌شود (۶–۸). آنزیم هیالورونیداز خود سمی نیست، اما به دلیل تجزیهٔ هیالورونات در زهر سبب انتشار و جذب عناصر سمی با وزن مولکولی بالا می‌شود (۱۱–۱۲). طبق تحقیقات انجام شده، وزن مولکولی هیالورونیداز از ۱۱۰۰۰۰–۷۰۰۰ متنوع است. برای مثال هیالورونیدازی که از زهر افعی روسلی گزارش شده است، دارای وزن مولکولی ۱۴۰۰۰ می‌باشد. این مسأله این احتمال را می‌رساند که این آنزیم به صورت پلی‌مورفیسم باشد (۹).

این مطالعه وجود آنزیم هیالورونیداز را در زهر افعی لبتینای ایران مشخص می‌کند. همان‌طورکه نتایج نشان می‌دهند این آنزیم با فعالیت بالایی در زهر این افعی وجود دارد به نحوی که مقدار ۴۰۰ میکروگرم از این زهر می‌تواند ۹۵ درصد هیالورونات به کار برده شده را هیدرولیز کند، یعنی از ۵۰ میکروگرم هیالورونات به کار برده شده در حدود ۴۷/۵ میکروگرم را هیدرولیز می‌کند. نکته جالب توجه این است که زهری که در این مطالعه به کار برده شده به مدت ۲۰ سال به صورت لیوفیلیزه ذخیره شده بود. یعنی فعالیت آنزیم هیالورونیداز بعد از ۲۰ سال حفظ شده است. فعالیت این آنزیم با افزایش غلظت زهر افزایش می‌یابد ولی از غلظت ۲۵۰ میکروگرم به بعد فعالیت تقریباً ثابت و در حدود ۹۵ درصد هیدرولیز می‌باشد.

مطالعات نشان می‌دهد که فعالیت بعضی از هیالورونیدازها به‌طور قابل ملاحظه‌ای در حرارت‌های مختلف حفظ می‌شود ولی بعضی از آنها در دمای بالاتر از ۴۰ $^{\circ}C$ به سرعت فعالیت خود را از دست می‌دهند (۱۰).

فعالیت بعضی از آنها در حدود ۶۰$^{\circ}C$ از دست می‌رود(۱۱). در این مطالعه مشخص شد که فعالیت هیالورونیداز در زهر افعی لبتینای ایران بیشترین فعالیت را در ۳۷$^{\circ}C$ دارد و با افزایش درجهٔ حرارت به تدریج فعالیت خود را از دست می‌دهد، اما در حرارت ۵۰$^{\circ}C$ فعالیت به ۸۵ درصد و در ۶۰$^{\circ}C$ به ۳۷ درصد می‌رسد. همچنین این مطالعه مشخص می‌کند که PH اپتیمم برای فعالیت این آنزیم ۶ می‌باشد و در PHهای پایین‌تر و بالاتر از ۶ این آنزیم فعالیت خود را از دست می‌دهد.

نتیجه‌گیری نهایی این مطالعه یعنی وجود آنزیم هیالورونیداز را در زهر افعی لبتینای ایران را با فعالیت بالا، راهی را برای تحقیقات آینده برای تخلیص و بررسی‌های کینیتیکی و فارماکولوژیکی این آنزیم فراهم می‌کند.

قدردانی

نویسندگان این مقاله از مؤسسهٔ سرم‌سازی رازی حصارک کرج برای اهدای زهر افعی لبتینا و از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز برای تأمین بودجهٔ طرح تحقیقاتی که این مقاله منتج آن است و از گروه بیوشیمی دانشکدهٔ پزشکی دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز برای فراهم نمودن امکانات این تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

1-Girish K, Shashidharamurthy R, Nagaraju S, Gowda TV, Kemparaju K. Isolation and characterization of hyaluronidase a "spreading factor" from Indian cobra (Naja naja) venom. *Biochimie* 2004;86(3):193-202.
2-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(10):1495-504.
3-Morey SS, Kiran K, Gadag J. Purification and properties of hyaluronidase from Palamneus gravimanus (Indian black scorpion) venom. *Toxicon* 2006;47(2):188-95.
4-Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J biol Chem* 1951;193(1):265-75.
5-Pukrittayakamee S, Warrell DA, Desakorn V, McMichael AJ, White NJ, Bunnag D. The hyaluronidase activities of some Southeast Asian snake venoms. *Toxicon* 1988;26(7):629-37.
6-El-Safory NS, Fazary AE, Lee C-K. Hyaluronidases, a group of glycosidases: Current and future perspectives. *Carbohydrate Polymers* 2010;81(2):165-81.
7-Girish K, Kemparaju K. Inhibition of Naja naja venom hyaluronidase: role in the management of poisonous bite. *Life sciences* 2006;78(13):1433-40.
8-Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *European journal of cell biology* 2006;85(8):699-715.
9-Zhong D, Meng Q, Li J, Wang Y, Zhang X, Wang S, et al. A hyaluronidase from the snake venom of Agkistrodon blomhoffii ussurensis of Changbai mountain: isolation and characterization. *International Journal of Biology* 2010;2(2):p171.
10-Janardhan P, Rosenblum D, Strichartz RS. Numerical experiments in Fourier asymptotics of Cantor measures and wavelets. *Experimental Mathematics* 1992;1(4):249-73.
11-Harrison RA, Ibison F, Wilbraham D, Wagstaff SC. Identification of cDNAs encoding viper venom hyaluronidases: cross-generic sequence conservation of full-length and unusually short variant transcripts. *Gene* 2007;392(1):22-33.

Measurement of Hyaluronidase Enzyme Activity in Venom of Iranian Vipera Lebetina

Zohreh Amozegari[1*], Samaneh Abyaz[2], Mozhgan Nour Behbahani[3], Asma Mohammadi[2]

1-Msc in Biochemistry.
*2-*MSC Student of *Biochemistry Graduate.*
3-Expert Laboratory.

1,2-Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
3-Department of Laboratory, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

**Corresponding author:*
Zohreh Amozegari; Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
Tel: +989163118635
Email: zamoozgari277@yahoo.com

Abstract

Background and Objective: Snake venoms comprise complex mixtures of enzymatic and non-enzymatic proteins and small organic compounds. Hyaluronidase is a constant factor in the venom of the snake and is known as a spreading factor. This factor facilitate spread of toxins that harm into the blood circulation system.
In this paper, we describe the determination of hyaluronidase activity in Iranian *Vipera lebetina* venom.

Subjects and Methods: Hyaluronidase activity was assayed turbidometrically on hyaluronic acid. Turbidity reducing activity was expressed as a percentage of the hydrolysed hyaluronate, taking the absorbance of a tube as 100% in which no enzyme was added. Bovin testis hyaluronidase was used as standard.

Results: The optima PH and temperature for hyaluronidase maximum activity was 6 and 37 °C respectively.

Conclusion: In conclusion the Iranian *Vipera lebetina* venom possessed considerable hyaluronidase activity.

Key word: *Vipera lebetina*, Venom, Hyaluronidase.

►*Please cite this paper as:*
Amozegari Z, Abyaz S, Nour Behbahani M, Mohammadi A. Measurement of Hyaluronidase Enzyme Activity in Venom of Iranian Vipera Lebetina. Jundishapur Sci Med J 2016;15(3):363-370.

Received: Sep 9, 2015 **Revised: Apr 17, 2016** **Accepted: Apr 18, 2016**