تحقیقی

دارای رتبه علمی-پژوهشی
ازکمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

اثر α-لیپوئیک اسید روی فعالیت همولیتیک زهرخام افعی لبتینای ایران

زهره آموزگاری
مربی بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، ایران
سمانه صالحی پور باورصاد
دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، ایران
مژگان نوربهبهانی
کارشناس آزمایشگاه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، ایران

نویسنده مسئول: زهره آموزگاری
پست الکترونیک: Zamoozgari277@yahoo.com
تلفن : ۰۹۱۶۳۱۱۸۶۳۵
آدرس: دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز ،اهواز ، ایران

دریافت: ۹۳/۲/۲۱
ویرایش پایانی: ۹۳/٤/۱۳
پذیرش: ۹۳/٤/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: *زهر مارها مخلوطی از عناصر سمی و آنزیم ها می باشند. زهر مارها دارای عواملی هستند که قادر به لیز غشا های سلولی و زیر سلولی می باشند، بنابراین قادر به همولیز گلبول های قرمز حیوانات مختلف از جمله انسان می باشند. دو نوع فعالیت همولیتیک، مستقیم و غیر مستقیم در زهر مار ها وجود دارد. فسفولیپاز A2 به عنوان ماده مسئول لیز غیرمستقیم شناخته شده است. هدف از این مطالعه بررسی اثر α-لیپوئیک اسید روی فعالیت همولیتیکی زهر افعی لبتینای ایران می باشد.*

روش بررسی: *غلظت پروتئین زهر خام افعی لبتینا با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد تعیین شد. فعالیت همولیتیک مستقیم زهر با استفاده از گلبول های قرمز انسان (RBC) و فعالیت همولیتیک غیر مستقیم روی RBC در حضور زرده ی تخم مرغ انجام شد. سپس α-لیپوئیک اسید با غلظت های متفاوت در بافر تریس – HCL ۱۰۰ میلی مولار به کار برده شد و اثر آن روی همولیز گلبول های قرمز مورد بررسی قرار گرفت.*

یافته ها: *فعالیت همولیتیک مستقیم زهر روی RBC انسان مشاهده نشد اما فعالیت همولیتیک غیرمستقیم وجود داشت به طوری که این فعالیت با افزودن غلظت های مختلف α-لیپوئیک اسید افزایش یافت. درصد همولیزغیرمستقیم درحضور α-لیپوئیک اسید ۶۰ میکرومولار تا ۶۰ درصد افزایش یافت.*

نتیجه گیری : *α-لیپوئیک اسید نه تنها فاقد اثرات مهارکنندگی روی فعالیت همولیتیک زهر افعی لبتینای ایران بود بلکه اثرات مثبت روی این فعالیت داشت.*

واژه های کلیدی: *زهرافعی لبتینای ایران، همولیتیک مستقیم، همولیتیک غیرمستقیم، α - لیپوئیک اسید، فسفولیپاز A2*

آدرس مقاله
آموزگاری ز، صالحی پور باورصاد س، نوربهبهانی م" اثر α-لیپوئیک اسید روی فعالیت همولیتیک زهرخام افعی لبتینای ایران"
مجله علوم آزمایشگاهی، فروردین و اردیبهشت۹۴، دوره نهم (شماره ۱): ۷۰-۷۵

مقدمه

زهر مارها کمپلکسی از عناصر توکسیک و آنزیم های مختلف می باشند. به طور کلی مار های سمی متعلق به چهار خانواده ویپریده (افعی ها)، الاپیده (مار های کبری)، کروتالیده و هیدروفیده (مارهای دریایی) می باشند. ویپرا لبتینا (Vipera lebetina) که در ایران به گُرزه مار معروف می باشد در خانواده ویپریده جای دارد و در نقاط مختلف ایران وجود دارد. زهر مارها حاوی عواملی هستند که قادر به لیز غشا های سلولی و زیر سلولی می باشند، بنابراین قادر به همولیز گلبول های قرمز حیوانات مختلف از جمله انسان می باشند. همولیزی که به وسیله ی زهر مارها صورت می گیرد به دو صورت مستقیم و غیر مستقیم می باشد. همولیز مستقیم توسط بعضی از زهرها بدون دخالت ترکیب دیگری صورت می گیرد. همولیز غیر مستقیم در حضور لسیتین یا یک منبعی از لسیتین صورت می گیرد که این همولیز به واسطه هیدرولیز لسیتین به لیزولسیتین و اسیدهای چرب توسط آنزیم فسفولیپاز A2 زهر مار و متعاقب آن لیز گلبول های قرمز خون به وسیله ی این محصولات می باشد(۱). فسفولیپاز A2 (EC : 3.1.1.4) متعلق به یک خانواده ی بزرگ از آنزیم هایی می باشد که پیوند استری را درموقعیت Sn-۲ فسفوگلیسرید ها هیدرولیز می کند و مشتقات لیزوفسفولیپید و اسید چرب را به وجود می آورد که هر دو محصول می توانند باعث اثرات فارماکولوژیک متعدد شوند (۳،۲). فسفولیپازهایی که از منابع مختلف استخراج نموده اند به سه دسته فسفولیپاز A2 ترشحی (sPLA2)، فسفولیپاز A2 سیتوزولیک (cPLA2) و فسفولیپاز A2 غیروابسته به کلسیم (iPLA2) تقسیم می شوند که همه ی آن ها بر اساس اطلاعات ساختمانی و خصوصیات ملکولی به ۱۱ گروه تقسیم می شوند. این آنزیم دارای اثرات مختلف از قبیل نروتوکسیک، کاردیوتوکسیک، میوتوکسیک، همولیتیک، ضد انعقادی، ضدپلاکت ها، ایجاد کننده ادم و آسیب بافتی می باشند (۵،۴). از طرفی برخی از تحقیقات مشخص نموده اند که α-لیپوئیک اسید(۱و۲ دی تیولان ۳ پنتانوئیک اسید)که یک کوفاکتور مهم در کمپلکس های آنزیمی α-کتواسید ها می باشد یک آنتی اکسیدان قوی و مؤثر در مقابل رادیکال های آزاد محلول در آب و محلول در چربی می باشد. α-لیپوئیک اسید به عنوان یک ضد التهاب عمل می کند که مکانیسم ملکولی آن هنوز شناخته نشده است. همچنین تحقیقات نشان می دهند که α-لیپوئیک اسید مهارکننده ی برخی از فسفولیپازهای A2 می باشد که می تواند برخی از اثرات آنها را مهارکند(۶). هدف از این مطالعه پاسخ به این سؤال است که با توجه به این که مسئول همولیتیک غیرمستقیم در زهر افعی لبتینای ایران فسفولیپاز A2 می باشد و از طرفی چون α-لیپوئیک اسید مهارکننده ی این آنزیم می باشد آیا در حضور α-لیپوئیک اسید اثرات همولیتیک این زهر کاهش می یابد؟

روش بررسی

زهر افعی لبتینای ایران به صورت لیوفیلیزه اهدایی مؤسسه تحقیقاتی رازی بود، α-لیپوئیک اسید ساخت شرکت Sigma، فسفات منوسودیک، فسفات دی سودیک، کلرید کلسیم، تریس، سولفات مس متبلور (Cuso4, 5 H2O)، تارتارات مضاعف سدیم و پتاسیم، کربنات سدیم، سود، آلبومین سرم گاوی ساخت شرکت مرک بودند. معرف فولین سیوکالتو از ترکیب تنگستات سدیم، مولیبدات سدیم، اسید فسفریک غلیظ، اسیدکلریدریک غلیظ و برم که ساخت شرکت مرک بودند در آزمایشگاه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور ساخته شد. مقدار پروتئین نمونه ها بر اساس روش لوری(۷)تعیین گردید. همولیتیک مستقیم بر اساس روش Gutierrez et al (۸) با بعضی از تغییرات انجام شد. در سه لوله سانتریفوژ ، ۲/۷ میلی لیتر سوسپانسیون گلبول های قرمز۲ درصد در سرم فیزیولوژی حاوی کلرید کلسیم ۲ میلی مولار با PH برابر ۷/۲ ریخته شد و سپس به هر لوله ۰/۱ میلی لیتر زهرخام حاوی مقدار پروتئین به ترتیب ۰/۰۱۲، ۰/۰۲۳ و ۰/۰۴۷ میلی گرم ریخته شد. در یک لوله سانتریفوژ دیگر به عنوان شاهد، ۲/۷ میلی لیتر سوسپانسیون گلبول قرمز و ۰/۱ میلی لیتر سرم فیزیولوژی ریخته شد. نمونه ها به همراه شاهد به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون لوله ها در ۳۰۰۰g سانتریفوژ شدند و سپس جذب محلول رویی در ۵۴۰ نانومتر قرائت گردید (نمونه ها به

صورت سه تایی گذاشته شدند). همولیتیک غیرمستقیم (فعالیت فسفولیپاز A2) بر طبق روش Gul and Smith (۵) با بعضی تغییرات انجام شد. ابتدا سه لوله سانتریفوژ و یک لوله شاهد انتخاب شدند. در هر لوله ۰/۵ میلی لیتر سوسپانسیون گلبول های قرمز در بافر فسفات ۱۰ درصد، ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار با PH=۷/۲ ریخته شد. سپس به لوله شاهد ۰/۱ میلی لیتر سرم فیزیولوژی و به لوله های آزمایش ، ۰/۱ میلی لیتر زهر خام با مقدار پروتئین به ترتیب۰/۰۱۲ ، ۰/۰۲۳ و ۰/۰۴۷ میلی گرم ریخته شد. به همه لوله ها ۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون زرده ی تخم مرغ در سرم فیزیولوژی به عنوان منبع لسیتین اضافه شد. لوله ها در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ دقیقه انکوبه شدند. با گذاشتن لوله ها در یخ واکنش متوقف شد. سپس لوله ها در ۴ درجه سانتی گراد در ۳۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. جذب محلول های رویی در ۵۵۰ نانومتر در مقابل شاهد قرائت گردید (نمونه ها به صورت سه تایی آزمایش شدند). برای اندازه گیری درصد همولیز در یک لوله ی سانتریفیوژ به عنوان لوله ی توتال همولیز (کل همولیز) ۰/۵میلی لیتر سوسپانسیون گلبول های قرمز در بافر فسفات ۰/۲ مولار همراه با ۲/۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی و ۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون زرده ی تخم مرغ در سرم فیزیولوژی افزوده و در ۳۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و جذب محلول لیز شده در ۵۵۰ نانومتر در مقابل شاهدی حاوی ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر ، ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات ، ۰/۱ میلی لیتر سرم فیزیولوژی و۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون زرده ی تخم مرغ قرائت گردید(برای یکسان شدن شرایط آزمایش لوله شاهد هم در ۳۰۰۰g سانتریفوژ شد) و درصد همولیز از معادله زیر محاسبه گردید :

$$\text{درصد همولیز} = \frac{\text{OD test}}{\text{OD total hemolysis}} \times 100$$

و از آنجایی که درصد همولیز بستگی به غلظت پروتئین هر نمونه دارد برای این که مقایسه ی درستی از فعالیت داشته باشیم درصد همولیز بر میلی گرم پروتئین مورد استفاده در هر لوله تقسیم شد.

جدول ۱-نتایج فعالیت همولیتیک غیرمستقیم زهر خام روی گلبول های قرمز انسان

زهر خام (شماره لوله)	غلظت پروتئین(mg)	درصد همولیز (٪)	درصدهمولیز / پروتئین mg
T1	(۰/۰۱۲)	(۲/۹±۰/٤)*	(۲٤۱/۷)
T2	(۰/۰۲۳)	(۸/٦± ۰/۹۵)	(۳۷۳/۹)
T3	(۰/۰٤۷)	(۲۲/٤±۱/٦۳)	(٤۷٦/٦)

*اطلاعات جدول بر اساس میانگین ±انحراف معیار (Means ± S.D) بیان شده اند که۳ =n می باشد.

فعالیت همولیتک غیر مستقیم بر اساس درصد همولیز بیان شده اند.

جدول۲-اثر α-لیپوئیک اسید با غلظت های مختلف روی همولیز گلبول های قرمز انسان توسط زهر خام افعی لبتینای ایران

درصد همولیز	غلظتα-لیپوئیک اسید (میکرومولار)	غلظت پروتئین زهر خام
*(۲۲/٤±۱/٦۳)	۰	(۰/۰٤۷)
(۵۱/۳±۱/۷٤)	۳	(۰/۰٤۷)
(۵۲/۷±۱/٤۸)	۷	(۰/۰٤۷)
(۵٤±۱/۱۵)	۱۵	(۰/۰٤۷)
(۵٦/۷±۱/۰۲)	۳۰	(۰/۰٤۷)
(٦۰±۱/٦۳)	٦۰	(۰/۰٤۷)
-	٦۰	۰

*اطلاعات جدول بر اساس میانگین ±انحراف معیار (Means ± S.D) بیان شده اند که۳ =n می باشد.

α-لیپوئیک اسید در غلظت های مختلف به کار برده شد که در تمام لوله ها غلظت پروتئین زهر خام ثابت بود. با افزایش غلظت α-لیپوئیک اسید درصد همولیز افزایش می یابد به طوریکه در غلظت ۶۰ میکروگرم درصد همولیز به ۶۰ درصد می رسد. در یک لوله (لوله آخر در جدول) ۶۰میکروگرم α-لیپوئیک اسید به تنهایی به کار برده شد که در این لوله هیچ گونه فعالیت همولیتیکی مشاهده نشد. در صورتی که α-لیپوئیک اسید با همین غلظت در حضور زهر فعالیت همولیز را تقریباً ۳ برابر می کند (از ۲۲/۴ درصد به ۶۰ درصد می رساند).

بحث

این مطالعه نشان داد که زهر افعی لبتینای ایران با غلظت های مختلف نمی تواند باعث همولیز مستقیم گلبول های قرمز انسان شود. اما همان طوری که در زهر سایر مارهای خانواده ویپریده فاکتور غیرمستقیم همولیز وجود دارد در زهر افعی لبتینای ایران هم فعالیت همولیز غیرمستقیم وجود داشت. مطالعات نشان می دهد فسفولیپاز A2 موجود در این زهر مسئول این فعالیت همولیتیک می باشد. همان طوری که مطالعات نشان می دهد فسفولیپاز A2 دارای اثرات مختلف از قبیل نروتوکسیک، کاردیوتوکسیک، همولیتیک، ضدانعقادی و ... می باشد. از طرفی برخی از تحقیقات نشان داده اند که α-لیپوئیک اسید مهارکننده ی فسفولیپاز A2 می باشد(۶). همین مسأله باعث شد که اثر α- لیپوئیک اسید روی همولیز غیر مستقیم گلبول های قرمز که توسط زهر افعی لبتینای ایران صورت می گیرد، بررسی شود. در این مطالعه یک بار گلبول های قرمز در شرایط مختلف؛ در حضور زهر، غیاب زهر، زهر به همراه α- لیپوئیک اسید در غلظت های مختلف و α-لیپوئیک اسید به تنهایی (بدون زهر) بررسی شد . گلبول های قرمز در حضور α- لیپوئیک اسید به تنهایی هیچگونه همولیزی را نشان ندادند اما در حضور زهر خام درصد همولیز را در حدود ۲۲/۴ درصد نشان دادند. در حضور زهر به همراه α-لیپوئیک اسید با غلظت ۶۰µg درصد همولیز از ۲۲/۴ درصد به ۶۰ درصد رسید که حتی بعد از چندین بار تکرار باز همین نتیجه گرفته شد. با افزایش غلظت α- لیپوئیک اسید درصد همولیز بیشتر شد که این مسأله برای ما دور از انتظار بود زیرا اکثر منابع گزارش داده اند که α- لیپوئیک اسید یک مهارکننده ی قوی فسفولیپاز A2 می باشد(۶). این نتیجه می تواند دلایل مختلفی داشته باشد. همان طوریکه تحقیقات نشان می دهد فسفولیپاز A2 خانواده ی بزرگی از یک آنزیم می باشد که به شکل های مختلف وجود دارد که همان طوریکه در مقدمه ذکر شد آن ها را به سه دسته ترشحی، سیتوزولیک و غیروابسته به کلسیم تقسیم می کنند که باز این سه دسته را بر اساس اطلاعات ساختمانی و خصوصیات ملکولی به ۱۱ گروه تقسیم می کنند (۵،۴). پس می توان پیشنهاد نمود که ممکن است α- لیپوئیک اسید، فسفولیپاز A2 موجود در زهر افعی لبتنیا را مهار نکند ولی برای اینکه، این مسئله روشن شود، باید فسفولیپاز A2 را از زهرخام خالص نمود و اثرات α- لیپوئیک اسید را روی آنزیم خالص بررسی نمود که این منوط به تحقیقات بعدی می باشد. دلیل دوم این است که آزمایش های ما روی زهر خام این مار بود، پس می توان احتمال داد که در حضور α- لیپوئیک اسید عوامل دیگری در زهر فعال شوند که بتوانند باعث لیز گلبول های قرمز شوند که این مسأله هم منوط به بررسی های بیشتری می باشد.

نتیجه گیری

α- لیپوئیک اسید نه تنها فاقد اثرات مهارکنندگی روی فعالیت همولیتیک زهر افعی لبتینای ایران بود، بلکه اثرات مثبت روی این فعالیت دارد که چگونگی این اثرات منوط به تحقیقات بیشتری است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مؤسسه تحقیقاتی سرم سازی رازی حصارک کرج برای اهدای زهر افعی لبتینا و از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز برای تامین بودجه طرح تحقیقاتی و از گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز برای فراهم نمودن امکانات این تحقیق تشکر و قدردانی می نمایند.

References

1. Kornalik F. *The influence of snake venomes on blood coagulation*. Pharmacol Ther. 1985; 29(3): 353-405.

2. Kini RM. *Excitement : structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes*.Toxicon. 2003; 42(8): 827-842.

3. Tamara S, Adrijana L, Igor K. *Haemostatically active proteins in snake venoms*. Toxicon. 2011; 57(5): 627-64.

4. Duncan RE, Sarkadi-nagy E, Jaworski K, Ahmadian M, Sul HS. *Identification and functional characterization of adipose-specific Phospholipase A2 (AdPLA*). J Biol Chem. 2008; 283(37): 25428-25436.

5. Schaloske RH, Dennis EA. *The Phospholipase A2 superfamily and its group numbering system*. Biochem, Biophys. Acta. 2006; 1761(11): 1246-1259.

6. Noormohamad J, Mysore AS, Bannikuppe SV. *Alpha-lipoic acid: an inhibitor of secretory phospholipase A2 with anti-inflammatory activity.* Life sciences. 2006; 80(2): 146-153.

7. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall Rj. *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biolchem.1951; 193(1): 265-75.

8. Gutierrez JM, Ownby CL, Odell GV. *Isolation of a myotoxin from Bothrops venom.partial characterization, and actionon skeletal muscle*. Toxin. 1984; 22(1): 115-120.

9. Gul S, Smith AD. *Haemolysis of washed human red cells by combined action of Naja-naja Phospholipase A2 and albumin*. Biochem Biophys Act. 1984; 288(1): 237-240.

10. Marsh N, Williams V. *Practical applications of snake venom toxins in haemostasis*. Toxicon. 2005; 45(8): 1171-81.

11. Sggarwal SK, Yip K, Prasad Sk. *Snake venom for acute myocardial infarction: Natural serendipity or an abstruction to Treatment.* International journal cardiology. 2007; 119(2): e53-e55.

12. Iwanage S, Suzuki T. *Enzymes in snake venom .In: snake venoms*; Hanbook of experimental Pharmacology (Ed.By chen YL). Springer, Veraly, Newyork, NY. 1979: 61-159.

13. Mion G, Olive F, Hernandez E, Martin Ym, Vieillefosse AS. *Action of snake venoms on blood coagulation:diagnosis of hemorrhagic syndromes.* Bull Soc Pathol Exot. 2002; 95(3): 132-138.

14. Atanasov VN, Dancheva D, Mitewa M, Petrova S. *Hemolytic and anticoagulant study of the neurotoxin vipoxin and its components basic phosphplipase A2 and an acidic inhibitor*. Biochemistry (Mosc). 2009; 74(3): 276-80.

Effect of α-lipoic Acid on Hemolytic Activity of Iranian Vipera Lebetina Venom

Amoozgari, Z. (MSc)
MSc of Biochemistry, Faculty of Medicine, Ahvaz jundishapure University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Salehi pour bavarsad, S. (BSc)
MSc Student of Biochemistry, Faculty of Medicine, Ahvaz jundishapure University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Noorbehbahani, M. (BSc)
BSc of medical Science, Faculty of Medicine, Ahvaz jundishapure University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Corresponding Author:
Amoozgari, Z.

Email:
Zamoozgari277@yahoo.com

Received: 11 May 2014
Revised: 4 Jul 2014
Accepted: 8 Jul 2014

Abstract

Background and Objective: Snake venom is a complex of several toxic elements and enzymes. It has the agents with the ability to destroy cellular and subcellular membrane and to bring about hemolysis of red blood cells (RBC). Two types of direct and indirect hemolytic activity are known in snake venom in that phospholipase A2 is responsible for the indirect lysis. The aim of this study was to investigate the effect of α-lipoic acid on hemolytic activity of Iranian Vipera Lebetina venom.

Material and Methods: Protein concentration of the crude venom of Vipera Lebetina was determined using bovine serum albumin as a standard. Direct hemolytic activity of venom was determined by using the Human RBC and Indirect hemolytic activity was assayed on RBC in the presence of egg yolk. Then, α-lipoic acid with different concentrations in 100 mM Tris-HCL buffer was applied and its effect on hemolysis of RBC was studied.

Results: direct hemolytic activity on RBC was not observed while its indirect activity was detected to be increased proportional to different concentration of α-lipoic acid. The range of indirect hemolysis was increased up to 60% by 60μm α-lipoic acid.

Conclusion: Not only has α-lipoic acid no inhibitory effects on the hemolytic activity of Iranian Vipera Lebetina venom but also has the positive effects on it.

Keywords: Iranian Vipera Lebetina Venom, Direct Hemolytic, Indirect Hemolytic, α-Lipoic Acid, Phospholipase A2

This paper should be cited as: Amoozgari Z, Salehi pour bavarsad S, Noorbehbahani M. [Effect of α-lipoic Acid on Hemolytic Activity of Iranian Vipera Lebetina Venom]. mljgoums. 2015; 9(1): 70-75[Article in Persian]