انجمن بیوشیمی فیزیک ایران
ISOBC
دانشگاه هرمزگان
University of Hormozgan

هجدهمین همایش ملی و سومین همایش بین المللی بیوشیمی فیزیک ایران
18th National and 3rd International Conference of Iranian Biophysical chemistry

۶-۵ دی ماه ۱۴۰۳، دانشگاه هرمزگان
25-26 Des, 2024, University of Hormozgan

بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی دو فرکشن استخراجی از سم عقرب در شرایط برون‌تنی

زهرا ستایش‌مهر[1*]

۱-گروه زیست شناسی-دانشکده علوم-دانشگاه زابل-زابل-ایران، پست الکترونیکی: setayeshmehr@uoz.ac.ir

چکیده

به دلیل عدم بروز علائم جانبی، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های استخراجی از منابع طبیعی توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است. مطالعه حاضر به منظور بررسی فعالیت دو فرکشن استخراجی از سم عقرب *Hemiscorpius lepturus* (F2 و F4) انجام شد. بدین‌منظور، دو فرکشن در معرض ارزیابی‌های مختلف آنتی اکسیدان برون‌تنی از قبیل ۱،۱-دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل (DPPH)، ۲،۲-آزینو-بیس (۳-اتیل بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید) ($ABTS^{\cdot+}$)، و رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل قرار گرفتند. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت، قدرت حذف رادیکال‌ها توسط هر دو فرکشن افزایش داشت و اختلاف چندانی میان توانایی حذف رادیکال توسط دو فرکشن و کنترل مثبت وجود نداشت. مقادیر IC50 دو فرکشن F2 و F4، به ترتیب، جهت حذف رادیکال DPPH، برابر با ۱۷/۴۹ µg/ml و ۱۵/۱۰، جهت حذف رادیکال ABTS، ۲۰/۹۰ µg/ml و ۲۰/۴۳ و جهت حذف رادیکال هیدروکسیل ۲۶/۶۹ µg/ml و ۲۵/۷۵ گزارش شدند. به طور کلی، نتایج مطالعه حاضر نشان داد، می‌توان دو فرکشن F2 و F4 استخراجی از سم عقرب *H. lepturus* را به عنوان عوامل آنتی‌اکسیدانی جدید معرفی کرد که می‌توانند تحت بررسی‌های بیشتر قرار بگیرند.

واژه‌های کلیدی: فرکشن، سم عقرب، *Hemiscorpius lepturus*، آنتی‌اکسیدان، برون‌تنی

۱- مقدمه

اهمیت اکسیداسیون برای بدن به میزان زیادی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است. متابولیسم اکسیداتیو برای حیات سلول‌ها ضروری است. اثرات جانبی اکسیداسیون وابسته به تولید رادیکال‌های آزاد و سایر گونه‌های اکسیژن فعال است که منجر به تغییرات اکسیداتیو می‌شوند. زمانی‌که این رادیکال‌های آزاد به میزان زیادی تولید می‌شوند، فعالیت آنزیم‌های حفاظتی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز دچار اختلال شده و در نهایت منجر به اثرات تخریبی یا مرگ سلولی می‌شوند که با اکسیداسیون چربی‌های غشا، پروتئین‌های سلولی، DNA و آنزیم‌ها صورت می‌گیرد. مجموعه این اتفاقات سبب از بین رفتن فرآیندهای سلولی می‌شود (۱).

گونه‌های اکسیژن فعال (ROS: Reactive Oxygen Species)، محصولات جانبی متابولیک در متابولیسم هوازی هستند که شامل آنیون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل می‌باشند. استرس اکسیداتیو ایجاد شده به دلیل عدم تعادل گونه‌های اکسیژن فعال و آنتی اکسیدان‌ها می‌باشد. در این شرایط گونه‌های اکسیژن فعال می‌توانند به مولکول‌های بزرگ مانند چربی‌ها و پروتئین‌ها حمله کرده و منجر به اختلالات متعددی مانند افزایش فشار خون، بیماری‌های قلبی، سرطان، دیابت ملیتوس، بیماری‌های سیستم عصبی و التهابی با آسیب شدیدی به بافت‌ها بشوند. اصولا" اکسیداسیون بر روی اسیدهای چرب غیراشباع توسط یک جریان مرتبط با رادیکال‌های آزاد رخ می‌دهد. رادیکال‌ها با اکسیژن مولکولی واکنش داده و رادیکال‌های لیپید پراکسی را شکل می‌دهند، این نوع رادیکال‌ها هیدروژنی را از اسیدهای چرب غیر اشباع مجاور دریافت کرده و یک هیدروپراکسی و رادیکال لیپیدی جدیدی را تولید می‌کنند ، این مراحل به طور زنجیروار ادامه می‌یابد. اکسیداسیون پروتئین‌ها در صنایع غذایی توسط اکسیداسیون لیپیدی تحت تاثیر قرار می‌گیرند، چرا که محصولات اکسیداسیون لیپیدی با پروتئین‌ها واکنش داده و سبب اکسیداسیون پروتئین‌ها می‌گردند (۲).

بنابراین، جایگزینی آنتی اکسیدان‌های مصنوعی با ترکیبات طبیعی مانند پپتیدهای فعال زیستی مورد توجه محققان قرار گرفته است. پپتیدهای فعال زیستی قطعات پروتئینی کوچکی با عملکردهای بیولوژیکی مختلف از جمله فعالیت های ضد فشار خون، تعدیل کننده سیستم ایمنی، آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد ترومبوتیک و ضد سرطان هستند (۳و۴). با توجه به اهمیت آنتی اکسیدان‌های طبیعی، هدف از مطالعه حاضر بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی دو فرکشن F2 و F4 استخراجی از سم عقرب *Hemiscorpius lepturus* است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- کروماتوگرافی

جهت خالص سازی پپتیدهای موجود در سم عقرب *Hemiscorpius lepturus*، از کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) دارای ستون C-18 استفاده شد. پس از عبور سم از ستون، در نهایت طول موج ۲۱۴ nm جهت اندازه گیری میزان جذب پیک‌ها استفاده گردید. دو پیک شماره ۲ و ۴ جمع آوری و برای مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گرفت (۵).

۲-۲- ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی

۲-۲-۱- سنجش میزان فعالیت فرکشن‌ها در حذف رادیکال DPPH

روش گوسر و گولسین (۲۰۱۱) جهت بررسی فعالیت حذف رادیکال DPPH مورد استفاده قرار گرفت (۶). در ابتدا، محلول فرکشن با غلظت‌های مختلف (µg/ml ۳۵-۵) ساخته شد. سپس ۰/۱ ml محلول فرکشن به ۰/۴ ml محلول DPPH اضافه شد.

مخلوط تهیه شده، در مکانی تاریک برای مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. برای نمونه کنترل، از آب مقطر استفاده شد. درصد فعالیت حذف رادیکال DPPH با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

میزان فعالیت حذف رادیکال (٪) = (Acontrol – Asample) / Acontrol × 100

در این رابطه؛ Acontrol، میزان جذب محلول کنترل و Asample، میزان جذب محلول نمونه است.

۲-۲-۲- سنجش میزان فعالیت فرکشن‌ها در حذف رادیکال‌های کاتیونی ABTS

بررسی میزان فعالیت فرکشن در حذف رادیکال کاتیونی ABTS براساس روش تیرونی و آنون (۲۰۱۰) انجام شد (۷). به طور خلاصه، پس از انکوباسیون محلول رادیکالی ABTS در اتاق تاریک به مدت ۱۶ ساعت، محلول مورد نظر ABTS تا رسیدن به جذب ۰/۷۰ ±۰/۰۲ در طول موج ۷۳۴ nm و تولید محلول ABTS۰/۵۱۴ mM، با آب مقطر رقیق شد. پس از آن ۱ ml محلول رادیکالی ABTS با ۱۰۰µl محلول فرکشن مخلوط و متعاقبا" میزان جذب در طول موج ۷۳۴ نانومتر بعد از گذشت ۰ و ۲۰ دقیقه از شروع واکنش اندازه‌گیری شد. از گلوتاتیون به عنوان استاندارد و از ۱۰۰ µl آب مقطر به عنوان محلول شاهد استفاده گردید. درصد فعالیت حذف رادیکال ABTS با استفاده از معادله زیر اندازه گیری شد:

میزان فعالیت حذف رادیکال کاتیونی ABTS(%) = [(Abs0 – Abst) – (Abc0 – Abct) / Abc0] × 100

در این رابطه؛ Abs0 و Abst، به ترتیب، میزان جذب محلول شاهد در زمان‌های ۰ و ۲۰ دقیقه می‌باشند. Abc0 و Abct، به ترتیب، میزان جذب محلول فرکشن در زمان‌های ۰ و ۲۰ دقیقه می‌باشند.

۲-۲-۳- سنجش میزان فعالیت فرکشن در حذف رادیکال هیدروکسیل

روش لی و همکاران (۲۰۰۸) برای سنجش میزان حذف رادیکال هیدروکسیل استفاده شد (۸). در ابتدا، محلولی شامل ۰/۱ml از محلول EDTA ۱۵mM، ۷۰µl از محلول ۰/۲ M بافر فسفات سدیم (pH =۷/۴) و ۰/۱ml از محلول سولفات آهن ۵mM تهیه شد. سپس به مخلوط تهیه شده، ۱۰۰µl محلول فرکشن و ۱۴۰µl H_2O_2 اضافه شدند. مخلوط حاصل در دمای ۳۷°C برای مدت زمان یک ساعت انکوبه گردید. در نهایت، جذب در طول موج ۵۳۶nm اندازه گیری شد. میزان فعالیت پپتید در حذف رادیکال هیدروکسیل با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید:

میزان فعالیت حذف رادیکال هیدروکسیل (%) = [(As –A0) – (Ac – A0)] × 100

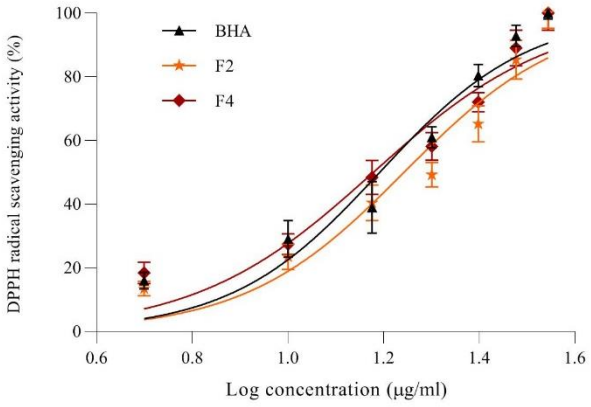
در این رابطه؛ As، A0 و Ac، به ترتیب، میزان جذب نمونه پپتیدی، کنترل منفی (آب مقطر) و محلول کنترل در غیاب H_2O_2 هستند.

۲-۲-۴- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل های آماری توسط نرم افزار GraphPad Prism 9 انجام شد. تفاوت بین گروه ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA یک طرفه) و سپس Tukey برای مقایسات چندگانه استفاده گردید. سطح معنی داری آماری ۰/۰۵ تعیین گردید.

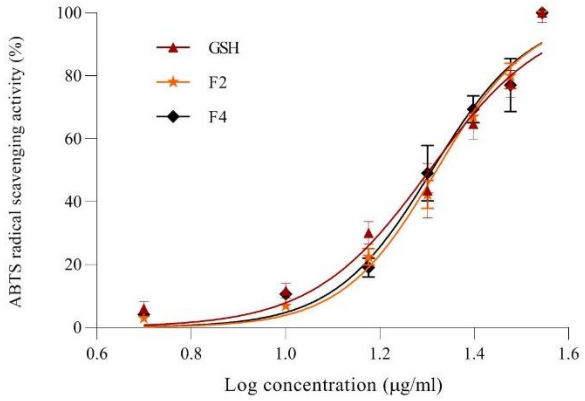
۳- نتایج

نتایج نشان داد که درصد فعالیت F2 و F4، در حذف رادیکال DPPH همراه با افزایش غلظت، بطور معناداری افزایش یافت ($p<0.05$) میزان فعالیت حذف F2 و F4 در غلظت µg/ml ۳۵، به ترتیب، به ۶۴/۹۳ درصد و ۶۵/۲۶ درصد رسید. مقادیر IC50 برای F2 (۱۷/۴۹ µg/ml) و F4 (۱۵/۱۰ µg/ml) بدست آمدند (شکل ۱).



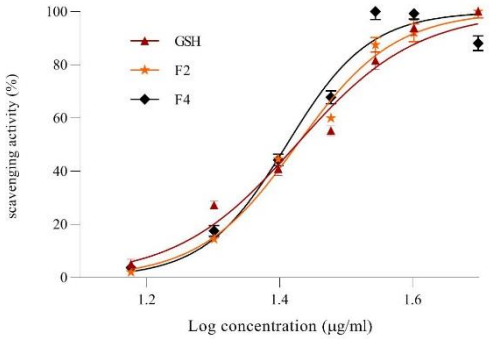
شکل ۱. مهار رادیکال DPPH نمونه فرکشن و هیدروکسی آنیزول بوتیله (BHA) به عنوان کنترل مثبت. فعالیت آنتی اکسیدانی توسط سه آزمایش مستقل مورد ارزیابی قرار گرفت.

شکل ۲، میزان درصد فعالیت دو پپتید در حذف رادیکال ABTS را نشان می‌دهد. میزان حذف رادیکال در بالاترین غلظت مورد استفاده (µg/ml ۳۵)، ۵۸/۵۵ درصد برای F2 و ۶۱/۱۸ درصد برای F4 بود. فعالیت حذف رادیکال برای F2، F4 و گلوتاتیون (به عنوان کنترل مثبت) در غلظت نهایی µg/ml ۳۵، به ترتیب ، ۵۸/۵۵ درصد، ۶۱/۱۸ درصد و ۶۷/۷ درصد بودند، از این رو در مقایسه با پپتید F2، درصد فعالیت حذف رادیکال F4 بیشتر بود (شکل ۲).



نمودار ۲. مهار رادیکال ABTS نمونه فرکشن و گلوتاتیون (GSH) به عنوان کنترل مثبت. فعالیت آنتی اکسیدانی توسط سه آزمایش مستقل مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج نشان داد که افزایش غلظت فرکشن از ۱۵ به ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به طور معنی‌داری ($p<0.05$)، سبب افزایش درصد حذف رادیکال هیدروکسیل شد. مقادیر IC50 در حذف رادیکال هیدروکسیل، برای F2 (۲۶/۷ µg/ml) و F4 (۲۵/۷۵ µg/ml) بدست آمدند (شکل ۳).



شکل ۳. مهار رادیکال هیدروکسیل نمونه فرکشن و گلوتاتیون (GSH) به عنوان کنترل مثبت. فعالیت آنتی اکسیدانی توسط سه آزمایش مستقل مورد ارزیابی قرار گرفت.

۴- بحث

پپتیدهای آنتی اکسیدانی استخراجی از منابع گوناگون، توانایی‌های متنوعی در مهار رادیکال های آزاد از خود نشان داده اند. فعالیت آنتی اکسیدانی یک پپتید به اندازه مولکولی و خواص شیمیایی آن مانند آبگریزی و بقایای آمینواسیدهایش بستگی دارد (۹). خواص آنتی اکسیدانی دو فرکشن استخراجی از سم عقرب *H. lepturus* با استفاده از سنجش های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج ما نشان داد که فرکشن‌های استخراجی از سم دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی قوی برای از بین بردن رادیکال های آزاد DPPH، $ABTS^{\cdot+}$ و هیدروکسیل است. در تمام موارد، فعالیت های آنتی اکسیدانی دو فرکشن، اثرات وابسته به دوز را نشان داد. دو فرکشن F2 و F4 توانستند رادیکال‌های DPPH را به ترتیب با مقادیر IC50 برابر با ۱۷/۴۹ µg/ml و ۱۵/۱۰ µg/ml از بین ببرند. لیو و همکاران (۲۰۱۵)، اثرات آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزات مشتق شده از پروتئین Mactra veneriformis را مورد بررسی قرار دادند. نتایجشان نشان داد که باقی‌مانده‌های اسیدآمینه گلوتامات، گلایسین، آسپارتات، لیزین و آرژنین توانایی شلاته‌کنندگی فلز یا خاصیت دهنده هیدروژن/الکترون را داشتند. از این‌رو، پپتیدهای آنتی‌اکسیدان مذکور، قادر به خاتمه واکنش‌های زنجیره‌وار رادیکالی بودند (۱۰).

در روش مهار رادیکال کاتیونی ABTS، مقادیر IC50 فرکشن‌های دو و چهار، به ترتیب، ۲۰/۹۰ µg/ml و ۲۰/۴۳ µg/ml بود که اختلافی با مقدار IC50 گلوتاتیون (۲۰/۲۰ µg/ml)، به عنوان کنترل مثبت نداشت. فعالیت مهاری فرکشن‌ها در حذف رادیکال‌های DPPH، نسبت به رادیکال کاتیونی ABTS بیشتر بود.

۵- نتیجه‌گیری

وجود اسیدآمینه گلاسین در توالی پپتیدی، می‌تواند بیانگر خاصیت آنتی‌اکسیدانی باشد. همچنین تحقیقات نشان داده است که باقی‌مانده‌های اسیدهای‌آمینه لوسین، تیروزین، هیستیدین و متیونین نقش مهمی در فعالیت‌های حذف رادیکال پپتیدهای آنتی‌اکسیدان داشتند (۱۱). از این رو، فعالیت آنتی اکسیدانی فرکشن‌ها می‌تواند به علت توالی آمینواسیدی آن‌ها باشد.

مراجع

[1] Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. Clin Biochem; 32(8): 595-603, 1999.

[2] Viljanen K, Kivikari R, Heinonen M. Protein-lipid interactions during liposome oxidation with added anthocyanin and other phenolic compounds. J Agric Food Chem; 52(5): 1104-1111, 2004.

[3] Torres-Fuentes C, Alaiz M, Vioque J. Affinity purification and characterisation of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. Food Chem; 129(2): 485-490, 2011.

[4] Borawska J, Darewicz M, Pliszka M, Vegarud GE. Antioxidant properties of salmon (*Salmo salar* L.) protein fraction hydrolysates revealed following their *ex vivo* digestion and in vitro hydrolysis. J Sci Food Agric; 96(8): 2764-2772, 2016.

[5] Setayesh-Mehr Z, Asoodeh A. Biochemical characterization of HL-7 and HL-10 peptides identified from scorpion venom of *Hemiscorpius lepturus* . Int J Pept Res Ther; 24: 421–430, 2018.

[6] Göçer H, Gülçin I. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): correlation of structure and antioxidant properties. Int J Food Sci Nutr; 62: 821-825, 2011.

[7] Tironi VA, Añón MC. Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: Effect of proteolysis. Food Res Int; 43: 315-322, 2010.

[8] Li YH, Jiang B, Zhang T, Mu WM, Liu J. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). Food Chem; 106: 444-450, 2008.

[9] Carrasco-Castilla J, Hernández-Álvarez AJ, Jiménez-Martínez C, Jacinto-Hernández C, Alaiz M, Girón-Calle J, Vioque J, Dávila-Ortiz G. Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates. Food Chem; 135(3): 1789-1795, 2012.

[10] Liu R, Wang L, Zheng W, Wu H. *In vivo* antioxidant effects of hydrolysate derived from waste proteins of *Mactra veneriformis*. J Aquat Food Prod Technol; 24: 143-152, 2015.

[11] Grimble G.K. The significance of peptides in clinical nutrition. Annu Rev Nutr; 14: 419-447, 1994.

انجمن بیوشیمی فیزیک ایران
ISOBC
دانشگاه هرمزگان
University of Hormozgan

18th National and 3rd International Conference of Iranian Biophysical chemistry

هجدهمین همایش ملی و سومین همایش بین المللی بیوشیمی فیزیک ایران

25-26 Des, 2024, University of Hormozgan

۶-۵ دی ماه ۱۴۰۳، دانشگاه هرمزگان

Antioxidant activity of *Hemiscorpius lepturus* venom fractions: evaluation of radical scavenging potential

Zahra Setayesh-Mehr[1*]

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran, Email: setayeshmehr@uoz.ac.ir

Abstract

Given the lack of side effects, antioxidants extracted from natural sources have attracted considerable attention from researchers. The present study aimed to evaluate the activity of two fractions, F2 and F4, isolated from *Hemiscorpius lepturus* venom. For this purpose, the two isolated were evaluated for their antioxidant activity using various assays, including 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ($ABTS^{+}$), and hydroxyl free radicals. The results showed that as the concentration increased, both fractions demonstrated enhanced radical scavenging ability. Additionally, there was no significant difference in the radical scavenging effectiveness between the two fractions and the positive control. The IC50 values for the two fractions were as follows: for DPPH radical scavenging, 17.49 µg/mL for F2 and 15.10 µg/mL for F4; for ABTS radical scavenging, 20.90 µg/mL for F2 and 20.43 µg/mL for F4; and for hydroxyl radical scavenging, 26.69 µg/mL for F2 and 25.75 µg/mL for F4. In general, the results of the present study showed that the two isolated fractions, F2 and F4, could be promising new antioxidant agents warranting further investigations.

Keywords: Fraction, Scorpion venom, *Hemiscorpius lepturus*, Antioxidant, *In vitro*