علت عدم نیاز به یون Mg^{2+} در آنزیم فسفاتیدات فسفوهیدرولاز غشایی نسبت به فرم سیتوزولی آن در کبد موش صحرایی

دکتر اسفندیار حیدریان*، دکتر بهرام حقیقی[۲].

۱) گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

۲) گروه بیوشیمی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

تاریخ دریافت: ۸۵/۷/۱۰ تاریخ پذیرش: ۸۵/۹/۲

چکیده

مقدمه: آنزیم فسفاتیدات فسفوهیدرولاز (PAP) تبدیل اسید فسفاتیدیک به دی‌آسیل گلیسرول و فسفات را کاتالیز می‌کند. این آنزیم در کبد موش صحرایی دارای دو فرم می‌باشد. یک فرم سیتوزولی (PAP_1) در متابولیسم گلیسرولیپیدها نقش داشته و برای فعالیت نیازمند یون Mg^{2+} می‌باشد. فرم دیگر آن(PAP_2) غشایی است که در Signal transduction دخیل است و جهت فعالیت خود نیازی به یون Mg^{2+} ندارد. PAP_2 دارای دو ایزوفرم PAP_{2a} و PAP_{2b} می‌باشد. اطلاعات محدودی پیرامون خواص آنزیمولوژیکی، مکانیسم عمل PAP_2 و علت عدم نیاز آن به Mg^{2+} نسبت به PAP_1 وجود دارد. در تحقیقات انجام گرفته بر روی این آنزیم همواره خصوصیات سوبسترای متفاوت آن از نظر دور مانده است. به همین دلیل اهداف این تحقیق برروی فعالیت آنزیم و چگونگی پاسخ‌های آن به برخی از عوامل از جمله Mg^{2+}، علت عدم نیازمندی آن به Mg^{2+} و تاثیر ساختارشکن‌های اوره و گوانیدین هیدروکلراید بر فعالیت آنزیم از دیدگاه سوبسترای آن می‌باشد.

مواد و روشها: آنزیم غشایی PAP_{2b} طی چندین مرحله کروماتوگرافی از کبد موش صحرایی تخلیص گردید. تمایل آنزیم PAP_{2b} در مصرف فرم‌های L_a(Lamellar) و H_{II}(Hexagonal) سوبسترای فسفاتیدات در حضور غلظت‌های مختلف تریتون X-100 بررسی شد. تاثیر زمان و اثر ساختارشکن‌های مذکور بر روند تبدیل فرم L_a به H_{II} فسفاتیدات بررسی شد. مقدار فرم L_a به روش هضم فسفولیپیدی در حضور ساختارشکن ها و غلظت‌های مختلف یون Mg^{2+} بررسی شد.

یافته‌های پژوهش: PAP_{2b} فرم L_a سوبسترا را مصرف می‌کند. ساختار شکن‌های اوره و گوانیدین هیدروکلراید با ابقاء فرم L_a باعث افزایش فعالیت آنزیم گردیدند. نتایج حاصل از هضم فسفولیپیدی نیز حاکی از ابقاء فرم L_a فسفاتیدات در حضور ساختارشکن‌های مذکور بود. روند تبدیل فرم L_a بهH_{II} در محیط فاقد تریتون X-۱۰۰ نسبت به محیط حاوی تریتون X -۱۰۰ سریعتر صورت گرفت.

نتیجه‌گیری نهایی: PAP_{2b} فرم L_a فسفاتیدات را مصرف می‌کند و لذا هر عاملی که باعث تسهیل روند تبدیل فرم L_a به H_{II} گردد باعث کاهش فعالیت آنزیم می‌گردد و برعکس، عواملی مثل ساختارشکن‌های اوره و گوانیدین هیدروکلراید بعلت ابقاء فرم L_a باعث افزایش فعالیت آنزیم می‌گردند. چون یون Mg^{2+} باعث تسهیل ایجاد فرم H_{II} سوبسترا می شود و آنزیم نیاز به فرم L_a سوبسترا دارد لذا می‌توان نتیجه گرفت که نه تنها آنزیم نیازی به یون Mg^{2+} ندارد بلکه توسط آن مهار می‌گردد.

واژه‌های کلیدی : فسفاتیدات فسفوهیدرولاز غشایی ، اسید فسفاتیدیک ، L_a فسفاتیدات ، H_{II} فسفاتیدات

* **نویسنده مسئول:** گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

E-mail: heidarian46@yahoo.com

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-10]

مقدمه

آنزیم فسفاتیدات فسفوهیدرولاز[1](PAP, C 3.1.3.4) تبدیل اسید فسفاتیدیک به دی‌آسیل‌گلیسرول و فسفات معدنی (P_i) را کاتالیز می‌کند (۱). دی آسیل گلیسرول حاصل از این واکنش بعنوان پیش ساز در سنتز تری گلیسرید و سایر فسفولیپیدهای مرکب مثل فسفاتیدیل کولین و فسفاتیدیل اتانول آمین مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱ و۲). این آنزیم در کبد موش صحرایی دارای دو ایزوفرم می‌باشد، یک فرم در سیتوزول و میکروزوم‌ها وجود دارد و به آن PAP_1 گفته می‌شود. این فرم جهت فعالیت کاتابولیکی خود نیاز به یون Mg^{2+} دارد و بوسیله N– اتیل مالیمید (NEM) مهار می‌شود و در متابولیسم گلیسرولیپیدها و فسفولیپیدها دخیل است (۳ و۴). فرم دیگر که در غشاء سیتوپلاسمی جای گرفته و به آن PAP_2 گفته می‌شود، در Signal transduction نقش دارد و توسط N– اتیل مالیمید مهار نمی‌شود (۳ و ۵) و در غلظت‌های بالاتر از ۵mM از یون Mg^{2+} مهار می‌شود (۶ و۷). متعاقباً اثبات شده که PAP_2 در کبد موش صحرایی دارای دو ایزوفرم PAP_{2a} و PAP_{2b} می‌باشد که از لحاظ مقدار تقریباً ۳۰٪ PAP_{2a} و مابقی را PAP_{2b} تشکیل می‌دهد (۵ و۷). تحقیقات محدودی بر روی ایزوفرم‌های PAP_{2a} و PAP_{2b} صورت گرفته است. به علت اینکه PAP_{2a} تاکنون به صورت یک پروتئین همگن تخلیص نشده است، تحقیقات قابل ملاحظه‌ای برروی آن انجام نگرفته است (۷). تحقیقات انجام گرفته برروی PAP_{2b} حاکی از اثرات مهاری یونهای Ca^{2+}، Mn^{2+}، Zn^{2+}، آمین‌های آمفی فیلیک مثل پروپرانولول، کلرپرومازین، اسفنگوزین و دی‌پرامین می‌باشد (۷). در خصوص مکانیسم و یا چگونگی اثرات مهاری کاتیونهای مذکور هیچگونه تحقیقاتی صورت نگرفته است (۷). همچنین مشخص شده است که PAP_{2b} جهت فعالیت نیازی به فسفولیپیدها ندارد و توسط دی آسیل گلیسرول مهار می‌شود (۷).

تاکنون تحقیقاتی در خصوص علت عدم نیازمندی PAP_2 به یون Mg^{2+} صورت نگرفته است. از طرف دیگر در تحقیقات انجام گرفته برروی این آنزیم همواره خصوصیات سوبسترای متفاوت آن از نظر دور مانده است. لذا هدف از این پژوهش بررسی فعالیت آنزیم و چگونگی پاسخ‌هایش به برخی از عوامل از جمله کاتیون Mg^{2+} و ساختارشکن‌های اوره و گوانیدین هیدروکلراید از دیدگاه سوبسترای آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده عبارت بودند از: اسید فسفاتیدیک (ملح دی سدیم)، دی‌تیوترایتول (DTT)، N-اتیل مالیمید (NEM)، لوپیتین، مهارکننده Soyabean tripsin، بنزآمیدین، هیدروکسیل آپاتیت، پپستاتین، هپارین سفارز، n- اکتیل گلوکوزید، سفاکریل S_{300} (Sigma,USA)، $EDTA^2$، $EGTA^3$، گلیسرول و سرم آلبومین گاوی (Merck,Germany).

الف) تخلیص آنزیم: PAP_{2b} از غشاء سلولهای کبدی موش صحرایی بر اساس روش Fleming و همکارانش تخلیص گردید و فقط مرحله هیدروکسیل آپاتیت به روش Batch wise انجام گرفت (۷). تعداد موشهای صحرایی ۱۴عدد و در محدوده ۲۰۰ تا ۲۵۰gr بودند.

ب) سنجش فعالیت آنزیم: طبق روشی که قبلاً شرح داده شده است در بافر سنجش اندازه‌گیری گردید (۸).

ج) جداسازی و تشخیص فازهای مختلف تشکیل شده توسط اسید فسفاتیدیک امولسیونه: اسید فسفاتیدیک در آب به صورت ساختارهای تجمعی (Aggregated) دیده می‌شود که می‌تواند از نوع L_a (Lammelar) یا H_{II} (Hexagonal) باشد، نظر به اینکه خواص این دو ساختار با هم متفاوت است، امکان جداسازی و تشخیص آنها توسط روشهای فیزیکوشیمیایی ممکن است، به این طریق که این دو فاز توسط سانتریفوژ در دمای $4^{\circ}C$ به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۵۰۰g به راحتی جدا می‌شوند و رسوب امولسیونه که ته‌نشین می‌گردد به دقت جدا شده و با استفاده از محلول سودان سیاه B (۰/۷ گرم در۱۰۰ میلی‌لیتر پروپیلن گلیکول) وجود فسفاتیدات آزمایش می‌گردد تا بطور کلی صحت فاز H_{II} در آن اثبات گردد. محلول رویی به دست آمده نیز

1.Phosphatidate phosphohydrolase
2. Ethylene diamine tetra acetic acid
3. Ethylene bis (Oxyethylene nitrilo) tetra acetic acid

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-10]

به عنوان سوبسترای امولسیونه فاز L_a در نظر گرفته می‌شود (۹).

د) بررسی رابطه زمان و تغییر فاز L_a به H_{II} فسفاتیدات در بافر سنجش فعالیت آنزیم: جهت بررسی تغییر فاز L_a به H_{II} در امولسیون اسید فسفاتیدیک در بافر سنجش فعالیت آنزیم، پس از ایجاد غلظت ۰/۳۵ mM از اسید فسفاتیدیک در بافر سنجش، تغییر جذب نوری در طول موج ۳۵۶nm برای تشکیل H_{II} در فواصل زمانی یک دقیقه قرائت و نتیجه به صورت نمودار زمان در مقابل جذب نوری رسم گردید (۹و۱۰).

ه) بررسی تمایل آنزیم PAP_{2b} در مصرف فرم‌های L_a و H_{II} فسفاتیدات: جهت تهیه فرم H_{II} سوبسترا هشت لوله آزمایش تمیز انتخاب و غلظت ۰/۳۵mM از سوبسترا در محیط سنجش فاقد تریتون X-100 و فاقد آنزیم ایجاد گردید و برای تبدیل فرم L_a سوبسترا به فرم H_{II} (Phase transition) در محیط ایجاد غلظت ۱۰۰mM یون Ca^{2+} گردید و به مدت ده دقیقه انکوبه شدند (۱۰). سپس رسوب H_{II} مطابق بند ج جدا گردید و با ۱۰ ml آب دوبار تقطیر بخوبی شسته شد و در حین شستشو با استفاده از یک میله شیشه ای رسوب کاملاً خرد شده و دوباره سانتریفوژ گردید و این عمل حداقل ۵ بار با آب دوبار تقطیر تکرار گردید. درآخرین مرحله رسوب ها در بافر سنجشی که به ترتیب محتوی غلظت های۰، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی مولار تریتون X-100 بود حل شدند (۱۰). سپس هشت لوله دیگر که همگی دارای غلظت ۰/۳۵mM فسفاتیدات به فرم L_a در بافرسنجش محتوی ۰، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی‌مولار تریتون X-100 بودند، ایجاد و سپس به کلیه لوله ها آنزیم اضافه و فعالیت آنها اندازه گیری شد و نتایج به صورت منحنی فعالیت در مقابل غلظت‌های مختلف تریتون X-100 برای فرم‌های L_a و H_{II} رسم گردید.

و) بررسی اثر ساختارشکن های اوره و گوانیدین هیدروکلراید برفعالیت PAP_{2b} غشایی: غلظت های مختلف ۱۰،۲۰،۴۰،۵۰،۸۰، ۷، ۵، ۲، ۱، ۰ میلی‌مولار از ساختارشکن های اوره و گوانیدین هیدروکلرید به طور مجزا در محیط سنجش فعالیت آنزیم ایجاد و فعالیت آنزیم اندازه گیری و نتایج به صورت فعالیت در مقابل غلظت ساختارشکن رسم گردید.

ز) بررسی اثر ساختارشکن های اوره و گوانیدین هیدروکلراید در امولسیون اسید فسفاتیدیک برروند تبدیل فرم L_a به H_{II}: جهت بررسی تغییر پیشرونده فاز از فرم L_a به H_{II} بطور مجزا غلظت های ۰، ۰/۱، ۰/۴، ۱، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۵۰ میلی مولار از ساختارشکن اوره و غلظت های ۰، ۱، ۲، ۵، ۷/۵، ۱۰ و ۱۵ میلی مولار گوانیدین هیدروکلراید در امولسیون اسید فسفاتیدیک در بافر سنجش فعالیت ایجاد گردید و تغییر جذب نوری در طول موج ۳۵۶ nm در فواصل زمانی یک دقیقه‌ای خوانده شد (۱۰) و نتایج به صورت نمودارهای زمان در مقابل جذب نوری رسم گردید.

ح) بررسی اثر غلظت های مختلف یون Mg^{2+} بر روند تبدیل سوبسترای L_a به H_{II} در محیط سنجش فعالیت و محیط سنجش فاقد تریتون X-100 : دو دسته هفت عددی لوله آزمایش تمیز، یک دسته به عنوان شاهد و دسته دیگر به عنوان تست انتخاب گردید. در سری شاهد، محیط سنجش فعالیت آنزیم حاوی ۰/۳۵mM فسفاتیدات و غلظت های ۰، ۰/۲، ۰/۴، ۱، ۲، ۴ و ۱۰ میلی مولار از $MgCl_2$ بود. در سری تست نیز، محیط سنجش فعالیت آنزیم فاقد تریتون X-100 و غلظت‌های ۰، ۰/۲، ۰/۴، ۱، ۲، ۴، ۱۰ میلی مولار از $MgCl_2$ و ۰/۳۵mM از فسفاتیدات ایجاد گردید. سپس همه لوله ها به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند. متعاقباً همه لوله ها در دور ۱۵۰۰g در $4^{\circ}c$ سانتریفوژ و سوپرناتانت محتوی فاز L_a از رسوب که محتوی فاز H_{II} بود جدا گردید و لوله های محتوی فاز L_a مورد هضم فسفولیپیدی قرار گرفتند (۱۰و۱۱). نتایج به صورت درصد مقدار فرم L_a در مقابل غلظت $MgCl_2$ در محیط سنجش حاوی تریتون X-100 و فاقد آن رسم گردید.

یافته های پژوهش

نمودار شماره ۱ رابطه زمان و تغییرات جذب نوری در ۳۵۶nm برای روند تبدیل فرم L_a به فرم H_{II} امولسیون اسید فسفاتیدیک در محیط سنجش فعالیت آنزیم مشاهده می شود. این نمودار نشان می‌دهد که با گذشت زمان میزان جذب نوری به دلیل تشکیل ذرات H_{II} از فرم L_a افزایش می یابد ولی از دقیقه هشتم به بعد تشکیل ذرات H_{II} در محیط کاهش می یابد.

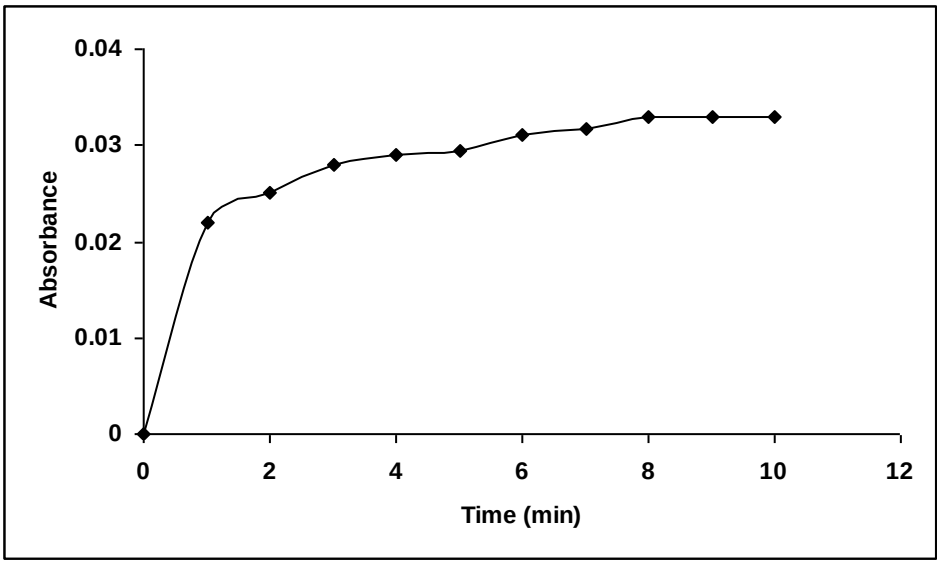
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-10]

نمـــودار شمـاره ۲ تمایـل آنـزیم PAP_{2b} را در مصـرف فرم های L_a و H_{II} فسفاتیدات نشان می‌دهد. این نمودار نشان می دهد که آنـزیم PAP_{2b} تمـایلی بـه مصـرف سوبسـترای فسفاتیدات به فرم H_{II} حتی در حضور تریتون X-100 نـدارد و تمایل به مصرف فرم L_a سوبسترا دارد و ایـن تمـــایـــل در حضـــور تریتـون X-100 در غلظـــت ۴mM تـا ۲/۵ برابـر بیشتـــر، تحریک می شود. درنمودار شماره۳ و۴ به ترتیـب اثـر ساختارشکن هـــای اوره و گوانیدین هیدروکلراید بر روند تبدیل L_a بـهH_{II} فسفـــاتیدات دیـده مـی شـود، همـــانطور کـه در نمودارها مشاهده می شود با افزایش غلظت ساختار شکن ها در محیط سنجش از شدت جذب نوری کاسته می شود که به دلیل جلوگیری از تشکیل ذرات H_{II} در محیـــط می باشد.

نمودار شماره ۵ اثر غلظـت هـای مختلـف اوره و گوانیـدین هیدروکلراید بر فعالیـت PAP_{2b} غشـایی را نشـان مـی دهـد. مطابق ایـن نمـودار، حضـور ساختارشـکن‌هـای مـذکور باعـث افزایش فعـــالیت آنزیم می‌گردند، بطـــوریکه غلظت هـــای ۱۰ میلی مولار اوره و ۲۰ میلی‌مولار از گوانیـدین هیدروکلرایـد بیشترین اثر در محیط سنجش فعالیت نسبت به شاهد را ایجـاد می‌کنند.

در نمودار شماره ۶ درصد باقیمانده فرم L_a به روش هضـم فسفـــولیپیدی پـس از جـــداسازی فـاز L_a از H_{II} در حضـور غلظـت هـای مـذکور از ساختـــارشکن‌هـای اوره و گوانیـدین هیدروکلراید مشاهده می شود. همانطور کـه شـکل نشـان مـی دهد با افـــزایش غلظت ساختارشکن های مـذکور درصـد ابقـاء فرم L_a در محیط افزایش می یابد.

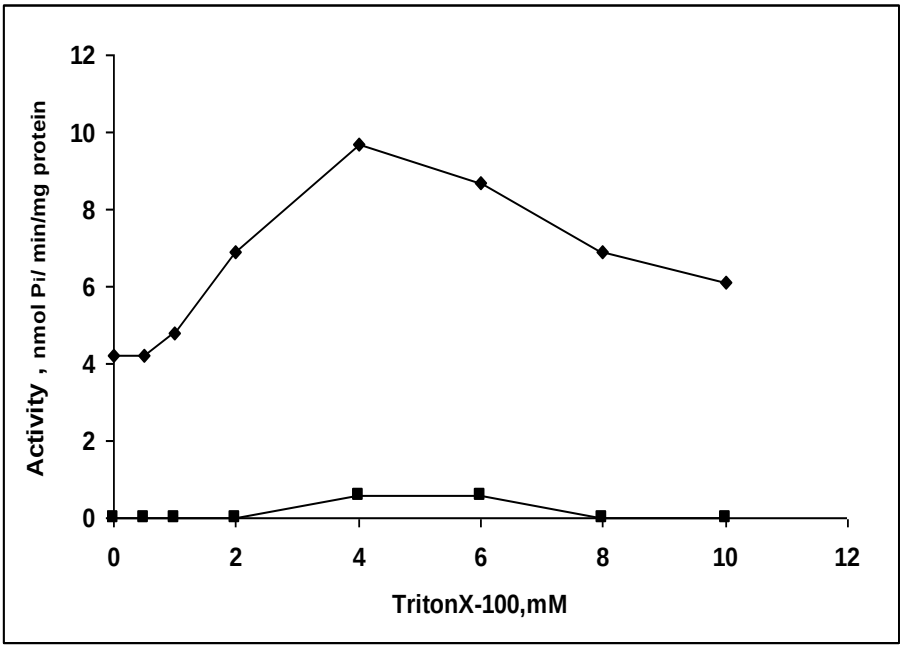
نمودار شماره ۷ درصد ابقاء سوبسترا بـه فـرم L_a در حضـور غلظـت هـای مختلـف Mg^{2+} را در بـافر سـنجش فعـــالیت محتـوی و فـــاقد تریتون X-100 نشـــان می دهد. این شکل نشان می دهد که افـزایش غلظـت یـون Mg^{2+} باعـث القـاء تشکیل فاز H_{II} و کاهش فاز L_a می گردد ولی این وضعیت در محیط سنجشی کـه فاقـــد تریتـــون X-100 اسـت، بیشـتر می‌باشد.



نمودار ۱: تغییرات جذب نوری در مقابل زمان برای امولسیون اسید فسفاتیدیک.

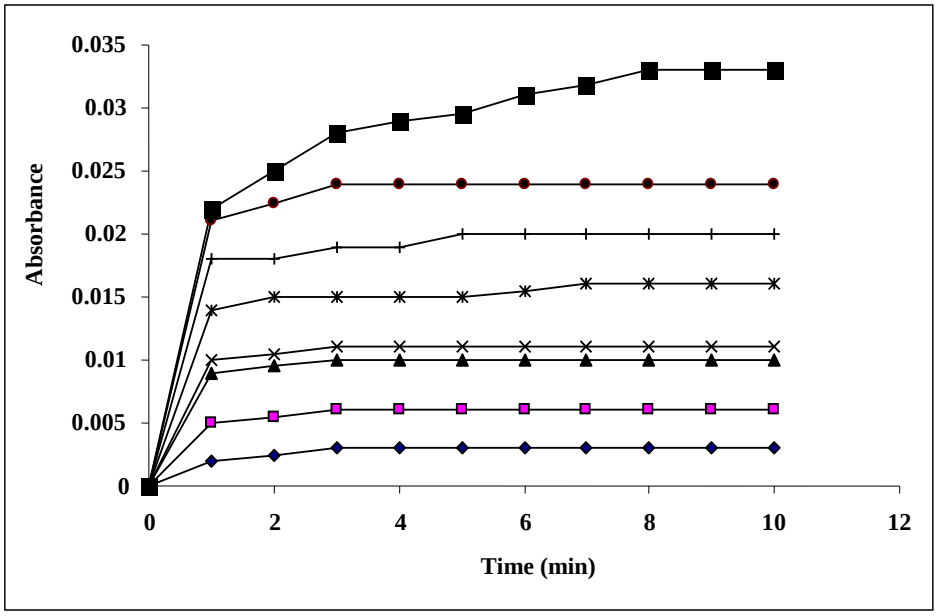
غلظت اسید فسفاتیدیک ۰/۳۵ میلی‌مولار در بافر سنجش فعالیت آنزیم و طول موج ۳۵۶nm بود.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-10]



نمودار ۲: تمایل آنزیم PAP_{2b} در مصـــــرف فرم های L_a و H_{II} سوبستـــرا.

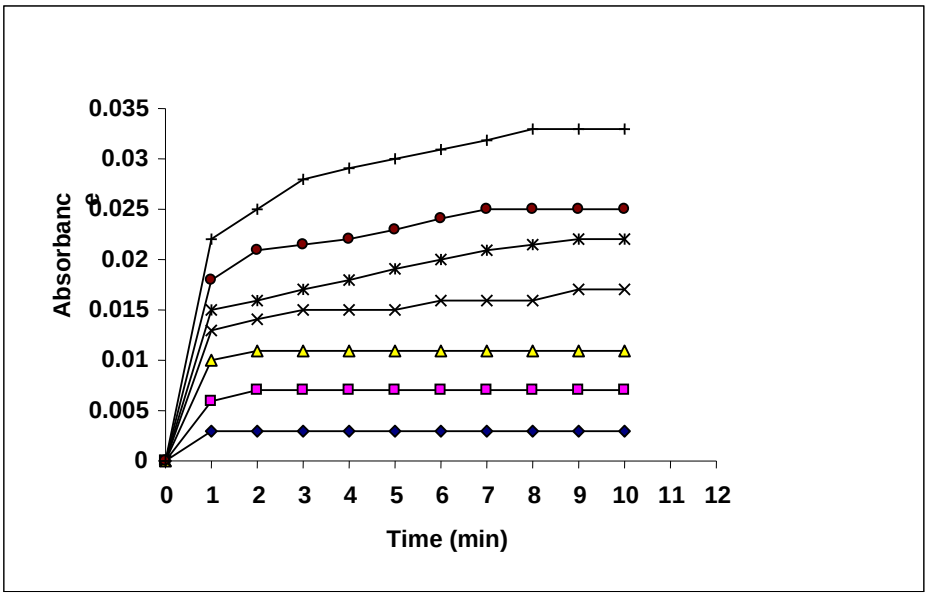
فعـالیت PAP_{2b}(۰/۵g μ) در بافر سنجش فعالیت محتوی سوبسترا به فـرم هـای L_a (♦) و H_{II} (■) در حضـور غلظـت هـای مختلف تریتون X-100 اندازه گیری گردید.



نمودار ۳ : اثر ساختارشکن اوره بر تغییر فاز از L_a به H_{II} در امولسیون اسید فسفاتیدیک.

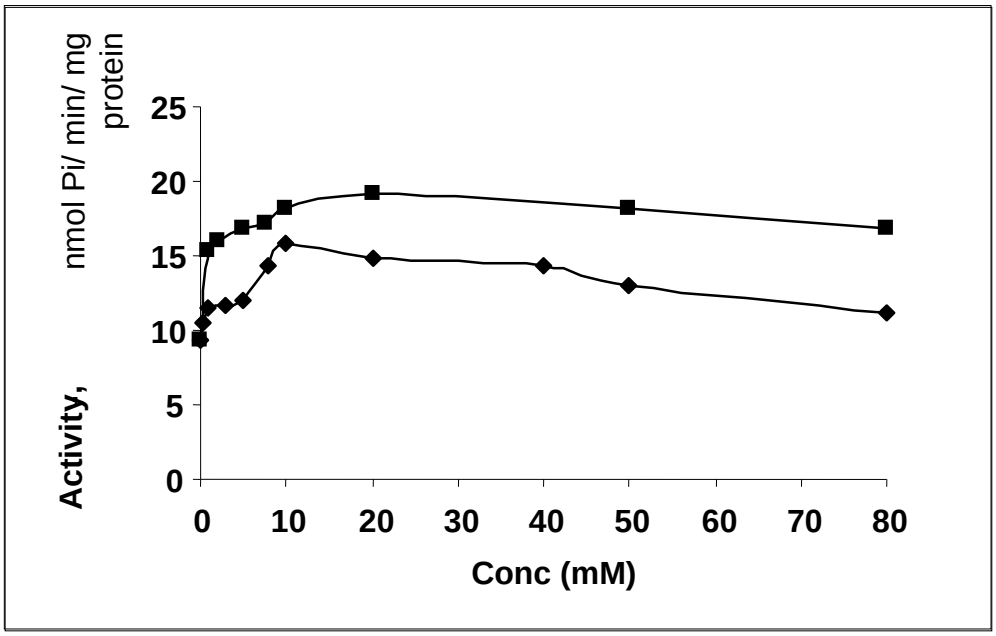
تغییـرات جـذب نـوری امولسیـون اسیـد فسفـاتیدیک ۰/۳۵ میلی مـولار در بافـر سنجش فعالیت در مجـاورت غلظـت هـای ۰ (■)، ۰/۱ (●)، ۰/۴ (+)، ۱(*)، ۱۰(×)، ۲۰(▲)، ۴۰ (■) و ۵۰ (♦) میلی مولار اوره اندازه گیری شد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-10]



نمودار ۴: اثر ساختارشکن گوانیدین هیدروکلراید بر تغییر فاز از L_a به H_{II} در امولسیون اسید فسفاتیدیک

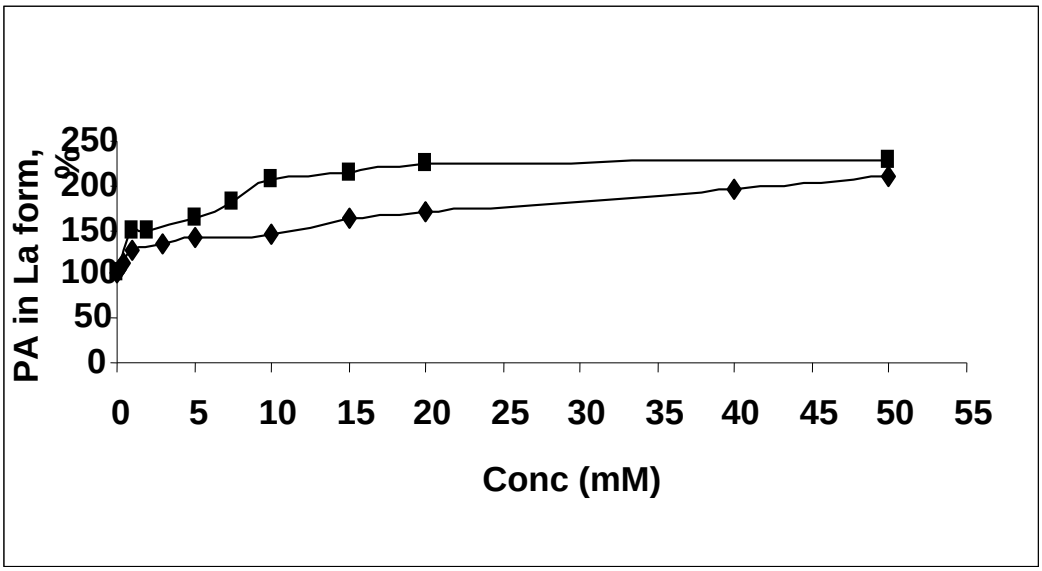
تغییرات جذب نوری امولسیون اسید فسفاتیدیک ۰/۳۵ میلی مولار در بافر فعالیت در مجاورت غلظت های ۰(+)، ۱ (●)، ۲ (*)، ۵ (×)، ۷/۵ (Δ)، ۱۰ (■) و ۱۵ (♦) میلی مولار هیدروکلراید گوانیدین اندازه گیری شد.



نمودار ۵ : اثر اوره و گوانیدین هیدروکلراید بر فعالیت PAP_{2b}

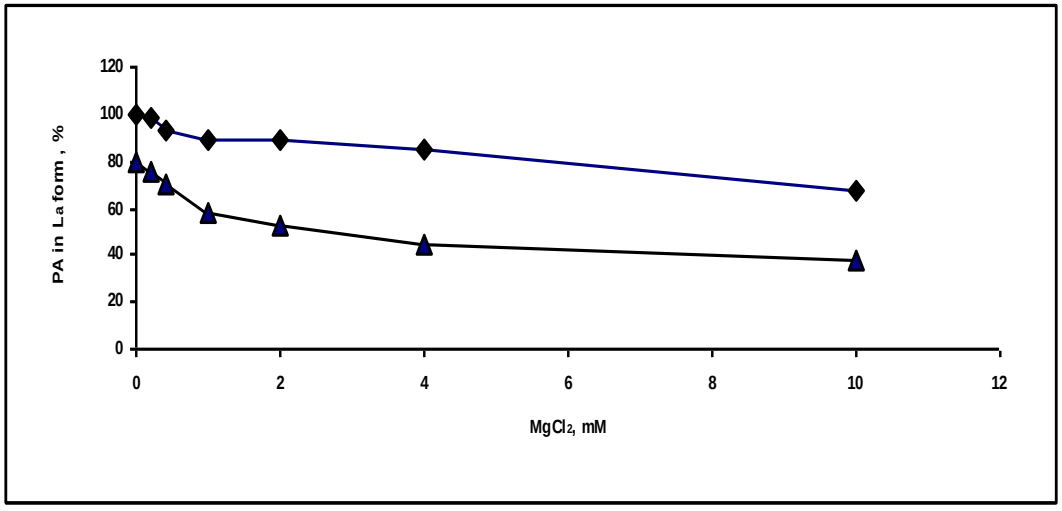
فعالیت آنزیم PAP_{2b} ($0/5g\,\mu$) در بافر سنجش فعالیت در حضورغلظت‌های مختلف از اوره (♦) وگوانیدین هیدروکلرید (■) به طور جداگانه اندازه گیری شد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-10]



نمودار ۶: مقدار اسید فسفاتیدیک موجود به شکل La پس از تعادل امولسیون اسید فسفاتیدیک با غلظت‌های مختلف اوره و گوانیدین هیدروکلراید

اسید فسفاتیدیک باقیمانده به شکل La پس از افزودن غلظت‌های مختلف اوره (♦) و گوانیدین هیدروکلرید (■) به امولسیون اسید فسفاتیدیک ۰/۳۵mM در بافر سنجش فعالیت از رسوب H_{II} جداسازی گردید و P_i آزاد شده از آن در اثر هضم اسیدی توسط اسید پرکلریک ۷۰٪ اندازه گیری شد.



نمودار ۷ : اثر غلظت های مختلف Mg^{2+} بر اسید فسفاتیدیک موجود به شکل La در حضور و غیاب تریتون X-100 در بافر سنجش

اسید فسفاتیدیک باقیمانده به شکل La در بافر سنجش محتوی تریتون X-100 (♦) و فاقد تریتون X-100 (▲) در غلظت های مختلف Mg^{2+} از رسوب H_{II} جداسازی گردید و P_i آزاد شده از آن در اثر هضم اسیدی توسط اسید پرکلریک ۷۰٪ اندازه‌گیری شد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-10]

بحث و نتیجه گیری

برخی از فسفولیپازها برای فعالیت خود نیاز به یونهای دوظرفیتی دارند، فعالیت PAP_1 نیز بوسیله Mg^{2+} تحریک می شود درحالیکه PAP_2 غیر وابسته به Mg^{2+} است (۱۲). نتایج حاصل از بررسی اثرات یونهای دو ظرفیتی مثل Ca^{2+}، Mg^{2+}، Zn^{2+} بر روی PAP_{2b} حاکی از اثر مهاری آنها بر فعالیت PAP_{2b} می باشد (۵ و ۶). ولی در تحقیقات مذکور اشاره ای به نوع مهار یا مکانیسم احتمالی آن نشده است. در نمودار شماره ۲ مشاهده می شود که آنزیم PAP_{2b} فرم L_a سوبسترا را مصرف می کند و لذا هر عاملی که باعث تسهیل و تشدید روند تبدیل فرم L_a به H_{II} فسفاتیدات گردد، با خارج کردن فرم L_a سوبسترای موردنیاز آنزیم باعث کاهش فعالیت آنزیم می‌گردد. از طرف دیگر اثرات یونهای دوظرفیتی در پلی مورفیسم فسفولیپیدهای باردار پیچیده است و بین آنها تفاوت وجود دارد (۱۳و۱۴). معمولاً چنین یونهایی از لحاظ استوکیومتری تمایل اتصال به گروه سری فسفو لیپید دارند و این تمایل حتی در غلظت های اندک یونها نیز وجود دارد، بدلیل اینکه ثابت های اتصال آنها بسیار بزرگ است (۱۳و۱۴) و باعث القاء فاز H_{II} فسفاتیدات می گردند (۱۷– ۱۵) که مورد مصرف آنزیم قرار نمی‌گیرد. در رابطه با اسید فسفاتیدیک اثبات گردیده که بعلت داشتن بار منفی در ناحیه سری تمایل به اتصال به کاتیونها دارد و در حضور مقادیر اندک کایتونها فاز H_{II} در آن القاء می‌گردد (۱۸). علاوه بر موارد مذکور اثبات شده که قدرت اتصال کاتیونهای مختلف به اسید فسفاتیدیک درجات مختلفی دارد که رابطه مستقیمی با قدرت ایجاد ذرات H_{II} دارد (۱۴). لذا با توجه به مطالب مذکور می‌توان استدلال کرد چون PAP_{2b} فرم L_a سوبسترا را مصرف می کند بنابراین نیازی به یون Mg^{2+} که یک عامل القاءکننده فرم H_{II} می باشد را ندارد. در رابطه با علت نیازمندی PAP_1 به یون Mg^{2+} جهت فعالیت حقیقی و همکارانش اثبات کردند که آنزیم PAP_1 فرم حد واسطی از فسفاتیدات که در طی روند تبدیل فرم L_a به H_{II} ایجاد می گردد، را مصرف می کند (۱۰) و به همین دلیل نیازمند یون Mg^{2+} یا برخی از یونها در غلظت های پایین می باشد، تا باعث القاء و تبدیل فرم L_a به H_{II} و در کنار آن تشکیل فرم حد واسط موردنیاز آنزیم PAP_1 شود(۱۰).

در نمودار شماره ۱ روند تغییرات فاز L_a به H_{II} سوبسترا در محیط سنجش فعالیت آنزیم دیده می شود که پس از گذشت هشت دقیقه روند تبدیل فرم L_a به H_{II} تقریباً ثابت و متوقف می گردد. بهرحال در روند تبدیل فرم L_a به H_{II} عوامل بسیار متعددی دخالت دارند. از جمله این عوامل می توان نوع اسیدهای چرب، طول زنجیره آنها، اشباع یا غیراشباع بودن در اسید فسفاتیدیک را نام برد (۶) که همگی قادرند فعالیت PAP_2 را تحت تاثیر قرار دهند. از عوامل دیگر که قادرند برروی روند تبدیل فرم L_a به H_{II} فسفاتیدات موثر باشد، مواد حل شده در بافر سنجش مورد استفاده است که اثر آنها بستگی به غلظت و مکان آنها دارد و با تغییر خواص محلول اثر خود را اعمال می کنند (۱۹). از جمله این مواد می توان ساختارشکن گوانیدین هیدروکلراید و اوره را نام برد که سبب پایدارسازی فاز تیغه ای L_a می شود (۱۹). در نمودار های شماره ۳ و ۴ اثرات ساختارشکن های مذکور بر روند تبدیل فاز L_a به H_{II} مشاهده می شود و نتیجه گرفته می شود که حضور این ترکیبات در محیط سنجش از روند تبدیل فرم L_a به H_{II} ممانعت می کنند.

در نمودار ۵ اثرساختارشکن های مذکور در غلظت‌های مختلف بر فعالیت آنزیم مشاهده می شود. در این شکل مشاهده می شود که متناسب با افزایش غلظت ساختارشکن های مذکور در محیط سنجش، فعالیت آنزیم نیز افزایش می یابد که خود تایید دیگری بر مصرف فرم L_a توسط آنزیم و عدم نیاز آن به یون Mg^{2+} است. در نمودار شماره ۶ نتایج حاصل از هضم فسفولیپیدی اثرات ساختارشکن های مذکور در روند تبدیل فرم L_a به H_{II} مشاهده می شود و از این نمودار نتیجه گرفته می شود که وجود این ساختار شکن ها مانع از تشکیل ذرات H_{II} فسفاتیدات و باعث حفظ و ابقاء فرم L_a در محیط و در نتیجه در حضور آنها فعالیت آنزیم نیز افزایش می یابد. بنابراین نتایج حاصل از این آزمایشات تاییدی دیگر برای آنزیم PAP_2 جهت مصرف فرم L_a فسفاتیدات می باشد و با توجه به اینکه یون Mg^{2+} باعث القاء فرم H_{II} سوبسترا می شود (۱۰) می توان استنتاج کرد که این یون اثری مهاری بر فعالیت آنزیم دارد و نیازی به آن ندارد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-10]

در نمودار شماره ۷ درصد باقیمانده فرم L_a سوبستـــرا در حضـــور Mg^{2+} در محیط سنجش حاوی و فاقـــد تریتـون X-100 مشاهده می شود. از این شکل استنبـاط می شـــود که در

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-10]

محیط سنجش فاقد تریتون X – 100 روند تبدیل فرم L_a به H_{II} تشدید می‌گردد. احتمالاً میسل های تریتون X-100 و یا سایر دترجنت ها زمینه قرار گرفتن سوبسترای فسفاتیدات در این غشاء های مصنوعی را مهیا کرده و با ایجاد تغییر شکل فیزیکی در فسفاتیدات امکان روند تبدیل فرم L_a به H_{II} سوبسترا را از طریق ایجاد رقت سطحی و ممانعت از تشکیل کمپلکس های تجمعی کاهش داده و نهاتیاً باعث ابقاء فرم L_a سوبسترا در محیط می گردد.

References

1. Smith SW, Weiss SB, Kennedy EP. Enzymatic dephosphorylation of phosphatidic acid. J Biol Chem 1957, 228: 915 - 22.

2. Brindley DN. Intracellular translocation of phosphatidate phosphohydrolase and its possible role in the control of glycerolipid synthesis. Prog Lipid Res 1984, 115-33.

3. Jamal Z, Martin A, Munoz AG, et al. Plasma membrane fractions from rat liver contain a phosphatidate phosphohydrolase distinct from that in the endoplasmic reticulum and cytosol; J Biol Chem 1991, 266: 2988- 96.

4. Martin A, Comez- Munoz A, Jamal Z, et al. Charactrization and assay of PAP; Methods Enzymol 1991, 197: 553-63.

5. Waggoner DW, Martin A, Dewald J, et al. Purification and characterization of a novel plasma membrane phosphatidate phosphohydrolase from rat liver; J Biol Chem 1995, 270: 19422- 19429.

6. Kanoh H, Imai SI, Yamada K, et al. Purification and properties of phosphatidic acid phosphatase from procine thymus membrane; J Biol Chem 1992, 267: 25309- 25314.

7. Fleming IN, Yeaman SJ. Purification and characterization of N- ethylmaleimide-insensitve phosphatidic acid phosphohydrolase (PAP_2) from rat liver; Biochem J 1995, 308: 983- 989

۸. حیدریان، اسفندیار. تشخیص لیزین اساسی در فعالیت کاتالیتیکی آنزیم فسفاتیدات فسفوهیدرولاز غشایی کبد موش صحرایی. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دوره سیزدهم، شماره اول، بهار ۱۳۸۴، ص ۵۰–۵۸.

9. Seddon JM. Structure of the inverted hexagonal (H_{II}) phase, and nonlamellar phase transition of lipids; Biochim Biophys Acta 1990, 1031: 1- 69

10. Haghighi B, Yari M, Tori S. The relationship between cation induced substrate configuration and enzymatic activity of phosphatidate phosphohydrolase from human liver; Iranian Biomed J 2000, 4: 13 – 19

11. Comfurius P, Zwaal RFA. The enzymatic synthesis of phosphatidylserine and purification by CM- cellulose column chromatography; Biochim Biophys Acta 1977, 488: 36- 42.

12. Butterwith SC, Hopewell R, Brindley DN. Partial purification and characterization of the phosphatidate phosphohyrolase of rat liver; Biochem J 1984, 220: 828- 833.

13. Farren SB, Hope MJ, Cullis PR. Polymorphic phase preference of phosphatidic: A ^{31}p and ^{2}H NMR study; Biochem Biophys Res Commun 1983, 111: 675- 682.

14. Papahadjopoulos D, Vail WJ, Pangborn WA, et al. Studies on membrane fusion. II) Induction of fusion in pure phospholipids membranes by calcium ions and other divalent metals; Biochim Biophys Acta 1976, 448: 265- 283.

15. Hope MJ, Cullis PR. Effects of divalent cations and pH on phosphatidylserine model membranes. A ^{31} P NMR study; Biochem Biophys Res Commun 1980, 92: 846- 852.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-10]

16. Jacobson K, Papahadjopoulos D. Phase transition and phase separation in phospholipids membrane induced by changes in temperature, pH and concentration of bivalent cations; Biochemistry 1975, 14: 153- 161

17. Hauser H, Friner E, Darke A. Crystalline anhydrous Ca–phosphatidylserine bilayer; Biochem Biophys Res Commun 1977, 76: 276- 274.

18. Ito T, Ohnishi SI. Ca^{2+}- induced lateral phase separations in phosphatidic acid phosphatidylcholine membranes; Biochim Biophys Acta 1974, 325: 29- 37.

19. Marsh D, Watts A, Smith ICP. Dynamic structure and phase behavior of dimyristoylphosphatidylethanolamine bilayers studied by deuterium nuclear magnetic resonance; Biochemistry 1983, 22: 3023 – 3026.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-10]