سینیتیک اثر برخی داروهای پایین آورنده فشار خون بر فعالیت آنزیم پراکسیداز

فروغ پوریوسف صومعه سرایی[۱]، ریحانه سریری*[۲]، محمود رضا آقامعالی[۳]، رضا حاجی حسینی[۴]

۱و ۴- دانشگاه پیام نور، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، تهران، ایران، صندوق پستی: ۴۶۹۷-۱۹۳۹۵

۲*و ۳- دانشگاه گیلان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، رشت، ایران، صندوق پستی: ۱۴۸۴

sariri@guilan.ac.ir

چکیده

آنزیم پراکسیداز (EC 1.11.1.7) جزء پروتئین‌های هم‌دار می‌باشد که وظیفه اصلی آن‌ها اکسیداسیون سوبستراهای مختلف با استفاده از پراکسید هیدروژن می‌باشد. به دلیل نقش این آنزیم در حذف رادیکال‌های آزاد و بالا بودن قدرت کاتالیتیکی کاربرد وسیعی در صنعت پزشکی و عرصه بیوشیمی دارد. هدف از این تحقیق، بررسی اثر برخی داروهای فشار خون موجود که توسط متخصص به بیماران تجویز می‌شوند و از طریق مکانسیم‌های مختلف عمل می‌کنند روی آنزیم پراکسیداز می‌باشد. در عمل، ابتدا فعالیت آنزیم پراکسیداز در حضور غلظت‌های مختلف داروهای مورد نظر، آتنولول، لوزارتان و کاپتوپریل، بررسی و درصد فعالیت آنزیم مشخص گردید. نتایج نشان دادند که آتنونول به عنوان فعال کننده پراکسیداز عمل می‌کند، در حالی که لوزارتان و کاپتوپریل نقش باز دارنده را برای این آنزیم دارند. سپس با تغییر دادن غلظت یکی از سوبستراها در حضور غلظت IC_{50} این ترکیبات فعالیت آنزیم اندازه‌گیری و مقادیر K_m و V_{max} آن‌ها محاسبه شد. از طرفی، میزان برگشت‌پذیری واکنش نیز با استفاده از روش دیالیز بررسی و اثبات گردید. نتایج این بخش نشان دادند که مهار و یا فعال شدن آنزیم پراکسیداز توسط هر سه داروی فوق از نوع برگشت‌پذیر است.

کلمات کلیدی: پراکسیداز، فشار خون، فعال‌کننده آنزیم، مهارکننده آنزیم.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species, ROS) مولکول‌هایی با عمر کوتاه می‌باشند که از احیاء اکسیژن مولکولی ایجاد شده‌اند. سیستم‌های مختلف آنزیمی موجود در سیستم قلبی عروقی با استفاده از سوبسترای مناسب، موجب ایجاد و یا از بین بردن موثر گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند. بنابراین، افزایش فعالیت آنزیم‌های اکسیدانت و یا کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت زمینه را برای افزایش خطر استرس‌های اکسیداتیو فراهم می‌کنند. در شرایط نرمال فیزیولوژیکی تولید و از بین رفتن رادیکال‌های آزاد به گونه‌ای بسیار ظریف و دقیق در جدار رگ‌ها کنترل می‌شوند. در مقابل، برخی شرایط فیزیولوژیکی مانند دیابت، افزایش کلسترول و فشار خون بالا، که زمینه بیماری‌های قلبی عروقی را فراهم می‌کنند، همه با استرس اکسیداتیو و تولید رادیکال‌های آزاد همراه‌اند. مطالعات زیاد نشان داده‌اند که این نوع استرس دلیل اصلی آترواسکلروز و در نتیجه فشار خون بالا است (۴، ۱۲و ۱۳). فشار خون عارضه خطرناک و گاه تهدیدکننده زندگی است که به دلایل مختلف از جمله بیماری خشک شدن رگ‌ها ایجاد می‌شود و گاه تا انتهای عمر بیمار با او همراه است. داروهای فشار خون از طریق مکانیسم‌های مختلف افزایش فشار خون سرخرگی را کنترل می‌کنند و استفاده از آن‌ها در اغلب بیماران مبتلا به این عارضه ضروری است. از طرفی، در تجویز این نوع داروها مانند همه داروهای دیگر (۵ و۱۱) باید عوارض جانبی مورد نظر قرار گیرد.

شایع‌ترین مکانیسم ایجاد اثرات جانبی داروها، اثرات ناخواسته آن‌ها روی برخی آنزیم‌ها است. تحقیقات گسترده در مورد اثر جانبی بسیاری از داروها نشان داده‌اند که برخی از آن‌ها از طریق منع آنزیمی موجب بروز عوارض ناخواسته و گاه بسیار مهم و خطرناک می‌شوند. داروها می‌توانند، مانند بسیاری از ترکیبات شیمیایی دیگر، به عنوان بازدارنده یا فعال کننده آنزیم‌ها عمل کنند. عمل منع و یا فعال شدن آنزیمی، اگر چه در برخی صنایع مطلوب (۳) و مورد استفاده است، ولی در داروسازی و طراحی داروها باید با دقت تحت نظارت و کنترل باشد.

پراکسیدازها با شماره کمیته آنزیمی EC1.11.1.7 تعداد زیادی از آنزیم‌ها را شامل می‌شوند که همه آن‌ها با استفاده از هیدروژن پراکسید عمل دهیدروژناسیون دسته وسیعی سوبستراها را کاتالیز می‌کنند. تحقیقات پیشین گروه تحقیقاتی ما اثر دسته‌های مختلف مواد آلی و معدنی روی فعالیت آنزیم پراکسیداز (۹ و ۱۰) و سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت (۲و۸) در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفته‌اند. در مورد اثر جانبی داروها و به خصوص روی فعالیت آنزیم ها منابع کمتری وجود دارند (۷). در تحقیق حاضر، اثر سه نوع داروی ضد فشار خون، آتنولول، لوزارتان و کاپتوپریل، بر روی آنزیم پراکسیداز در آزمایشگاه بررسی و پارامترهای سینیتیکی اندازه‌گیری شده‌اند.

مواد و روش‌ها

آنزیم پراکسیداز ترب کوهی HRP، آمینو آنتی پیرین، فنل، هیدروژن پر اکسید منو و دی فسفات هیدروژن پتاسیم فسفات از شرکت مرک خریداری و به همان صورت مورد استفاده قرار گرفتند. داروهای فشار خون (آتنولول – لوزارتان – کاپتوپریل) تولید شرکت داروسازی سبحان رشت بودند. معرف‌های شیمیائی، آکریل آمید، آمونیم پرسولفات، کوماسی بلو

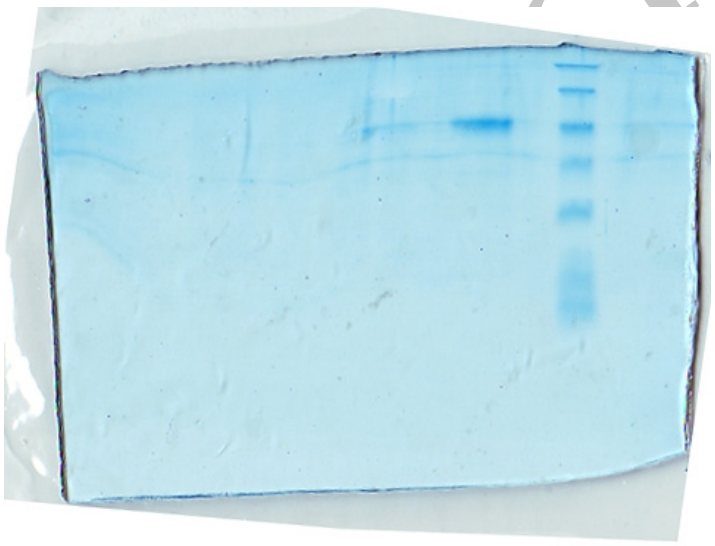
Archive of SID

www.SID.ir

و حلال‌های الکتروفورز پلی آکریل آمید همه از تولیدات شرکت شیمیایی مرک بودند.

بررسی خلوص آنزیم توسط الکتروفورز

در تمامی مطالعات سینتیکی باید آنزیم مورد استفاده خالص باشد، زیرا در صورت وجود ناخالصی نمی‌توان نتایج بدست آمده را صرفاً به ماده مورد مطالعه نسبت داد و ناخالصی موجود نیز می‌تواند به عنوان مهارکننده یا فعال کننده در این نتایج موثر باشند. برای بررسی خلوص آنزیم از روش سدیم دودسیل سولفات پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز استفاده گردید. ژل پائینی با غلظت ۳/۵ و پائینی غلظت ۲/۵ تهیه شدند و رنگ‌آمیزی با استفاده از کوماسی برلیانت بلو انجام گرفت. شکل ۱ ژل حاصل از آنزیم و مارکر وزن مولکولی را نشان می‌دهد. وجود یک باند منفرد و واضح و بدون باندهای ضعیف مداخل نشان‌دهنده خلوص آنزیم است.



شکل ۱: الکتروفورگرام پراکسیداز رنگ آمیزی شده با کوماسی بریلیانت بلو. ستون اول سمت راست مارکر وزن ملکولی پروتئین و ستون دوم پراکسیداز خالص است.

روش اندازه‌گیری فعالیت آنزیم

سوبستراهای آنزیم، محلول پراکسید هیدروژن ۰/۰۰۱۷M و ۴-آمینو آنتی پیرین ۰/۰۰۲۵ M با نسبت یک به یک (۴۷۵ میکرولیتر از هر کدام) مخلوط شده و سپس ۵۰ میکرولیتر محلول آنزیم به محتویات سل نمونه افزوده شد. پس از بهم زدن، سرعت واکنش آنزیمی به صورت تغییرات جذب در مقابل زمان (ΔA/min) در طول موج ۵۱۰ نانومتر ثبت گردید.

جهت تعیین فعالیت آنزیمی، تغییرات جذب علیه زمان (ΔA/min یا OD) به عدد ثابت ۶/۵۸ تقسیم گردید.

$$\text{فعالیت آنزیم } A = \frac{OD(\Delta A/\min)}{۶/۵۸}$$

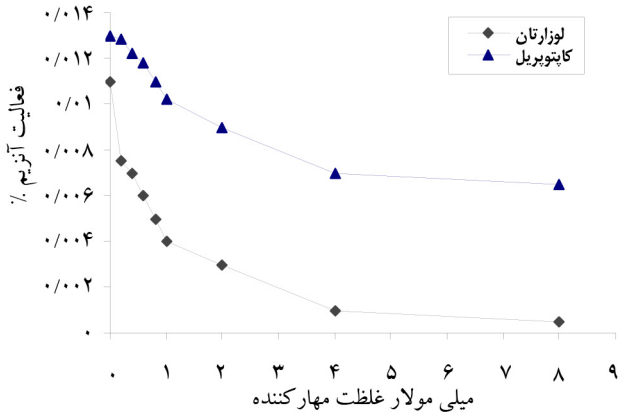
www.SID.ir

درصد فعالیت نسبی آنزیمی

ابتدا محلول استوک لوزارتان، کاپتوپریل و آتنونول در بافرفسفات ۰/۲M (pH=۷/۲) تهیه و با استفاده از آن غلظت‌های ۰/۱ تا ۸ میکرومولار داروها تهیه شد. فعالیت بیولوژیکی آنزیم در حضور هر یک از غلظت‌ها اندازه‌گیری شد. برای محاسبه فعالیت نسبی آنزیم از فرمول زیر استفاده شد که در آن V_i سرعت آنزیمی در حضور هر یک از داروهای مورد نظر و V_0 سرعت اولیه آنزیم بدون حضور ترکیبات فوق است.

$$\text{درصد فعالیت نسبی} = \frac{V_i}{V_o} \times ۱۰۰$$

نتایج نشان دادند که دو داروی لوزارتان و کاپتوپریل به عنوان بازدارنده عمل کرده و سرعت واکنش آنزیم را کاهش دادند، در حالی که آتنونول نقش فعال کننده داشت و سرعت واکنش آنزیمی را افزایش داد. به عنوان نمونه، نمودار ۱ فعالیت آنزیم پراکسیداز در حضور کاپتوپریل و لوزارتان را نشان می‌دهد.



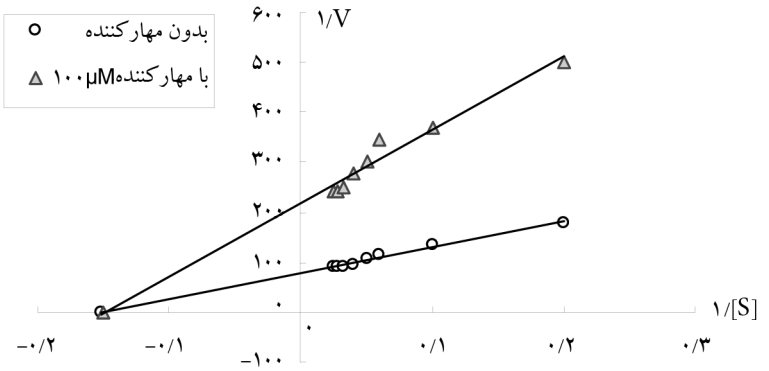
نمودار ۱: اثر بازدارندگی کاپتوپریل و لوزارتان روی فعالیت آنزیم پراکسیداز در آزمایشگاه.

تعیین پارامترهای سینتیکی

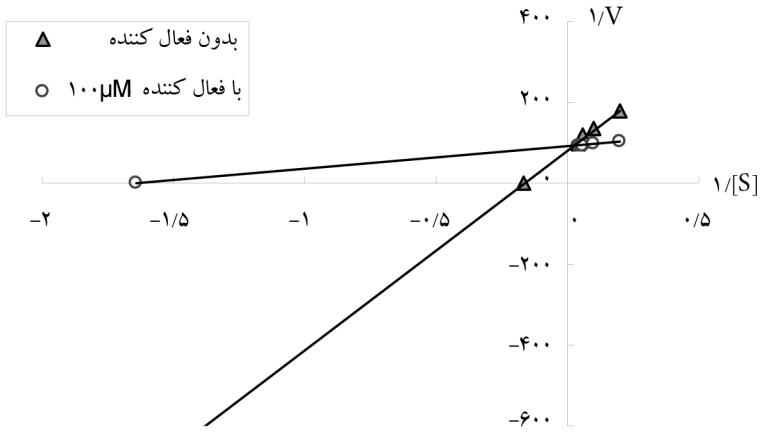
برای اندازه‌گیری پارامترهای سینتیکی آنزیم، فعالیت آن در غلظت‌های مختلف سوبسترا در حضور و عدم حضور ترکیبات مورد مطالعه اندازه‌گیری شد. برای این منظور از غلظت‌های مختلف ۴- آمینوآنتی پیرین (۵-۴۰ mm) استفاده گردید. فعالیت آنزیم در غلظت‌های مختلف سوبسترا محاسبه و با استفاده از نرم‌افزار EXCEL پارامترهای ثابت مکالیس منتن K_m و حداکثر سرعت آنزیم V_{max} محاسبه شدند (نمودارهای ۲، ۳ و ۴).

Archive of SID

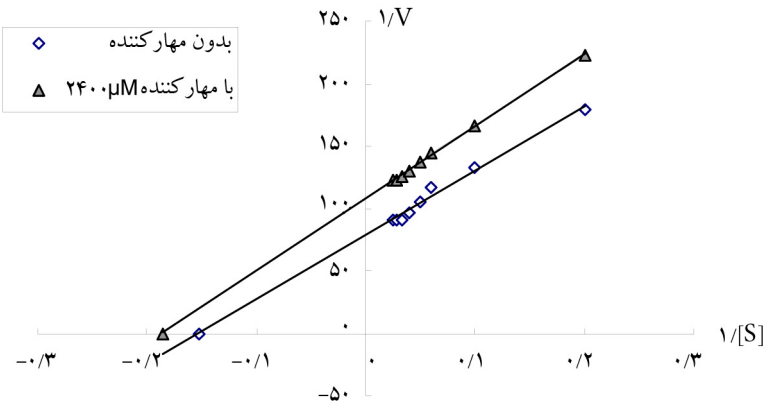
www.SID.ir



نمودار ۲: نمودار لاینویور برک آنزیم پراکسیداز در حضور کاپتوپریل ۱۰۰ میکرومولار (IC_{50})



نمودار ۳: نمودار لاینویور برک آنزیم پراکسیداز در حضور آتنونول ۱۰۰ میکرومولار (IC_{50})



نمودار ۴: منحنی لاینویور- برک واکنش آنزیمی در حضور ۲۴۰۰ میکرومولار (IC_{50}) لوزارتان.

www.SID.ir

بحث

منبع اصلی ROS در سلول‌های عروقی توسط NAD(P)H اکسیداز شکل می‌گیرد. زیر واحدهای این آنزیم پس از انتقال الکترون به O_2، رادیکال‌های سوپراکسید تولید می‌کنند که مهم‌ترین گونه فعال اکسیژن است. از جمله آنزیم‌های اکسیدانت دیگر می‌توان به گزانتین اکسیداز و میلو پراکسیداز اشاره کرد. آنزیم اول در اکسیداسیون گزانتین و هیپوگزانتین در طول متابولیسم پورین، تولید سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن می‌کند و میلو پراکسیداز نیز در تولید اسید هیپوکلوروز نقش دارد. در مقابل، آنزیم‌های آنتی اکسیدانت مانند سوپراکسید دیسموتاز سیستم دفاعی در مقابل سوپراکسید در سلول‌های عروقی می‌باشند که موجب جذب و از بین بردن ROS می‌شوند. گلوتاتیون پراکسیداز نیز به طور موثر پراکسید هیدروژن و پراکسید لیپیدی را به آب و الکل های لیپیدی کاهش می‌دهد. پراکسیداز یکی از آنزیم آنتی اکسیدانت درون سلولی است که در پراکسی زوهای سلولی و سیتوزولی جای دارد و واکنش پراکسید هیدروژن را به آب و O_2 کاتالیز می‌کند. آنژیوتانسین II محرکی برای تولید ROS در سلول‌های عروقی می‌باشد که این عمل را از طریق افزایش فعالیت آنزیم NAD(P)H اکسیداز انجام می‌دهد (۱۲و۱۳).

گروهی از داروهای ضد فشار خون نظیر بازدارندگان آنزیم مبدل آنژیوتانسین II و انتاگونیست‌های گیرنده AT_1 به عنوان آنتی اکسیدانت غیر مستقیم عمل کرده و مانع از عمل آنژیوتانسین II می‌شوند و در نتیجه فعالیت آنزیم NAD(P)H اکسیداز کاسته می‌شود (۱۲و۱۵).

با توجه به مطالعات انجام شده و اهمیت آنزیم پراکسیداز چه در صنعت و چه در پزشکی، در این تحقیق اثر سه داروی ضد فشار خون (آتنولول، لوزارتان، کاپتوپریل) روی این آنزیم بررسی شد.

نتایج حاصل نشان دادند که آتنولول باعث افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز می‌شود. این در حالی است که لوزارتان و کاپتوپریل باعث کاهش فعالیت شدند. قدرت مهارکنندگی در دو ترکیب اخیر یکسان نبوده لوزارتان با غلظت ۲۴ میلی‌مولار و کاپتوپریل با غلظتی برابر با ۱ میلی‌مولار موجب کاهش فعالیت آنزیم تا حدود ٪۵۰ نسبت به حالت بدون مهار کننده شدند (IC_{50}). باید توجه داشت که قدرت مهارکنندگی کاپتوپریل به مراتب بیشتر از لوزارتان است تا جایی که در غلظت‌های بالاتر این ترکیبات فعالیت آنزیم را به صفر نزدیک می‌گرداند. در مقابل، آتنولول در غلظت ۴ میلی‌مولار باعث افزایش ۱/۵ برابری فعالیت آنزیم شده است.

برای بدست آوردن پارامترهای سینیتیکی V_{max} و K_m آنزیم، نمودارهای لاینور برک برای هر یک از ترکیبات رسم و از طریق آن مقادیر دقیق V_{max}، K_m مربوطه تعیین گردید (جدول۱). به طوری که ملاحظه می‌شود، حضور کاپتوپریل کاهش V_{max} آنزیم و ثبات تقریبی K_m مشاهده گردید که نشان‌دهنده مکانیسم مهار از طریق غیر رقابتی می‌باشد. بنابراین، می‌توان ادعا نمود که کاپتوپریل به جایگاهی غیر از جایگاه فعال اتصال یافته است به طوری که پس از اتصال جایگاه فعال آنزیم را دستخوش تغییر می‌کند و بدین صورت عمل مهار آنزیمی را انجام می‌دهد. جایگاه مذکور جایگاه اثر کننده نامیده می‌شود (۶).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱ : مقایسه پارامترهای سینتیکی اثر کننده‌ها در غلظت IC_{50} آن‌ها

نام اثر کننده	$K_m(mol)$	$V_{\max}(mol/\min)$
---	۶/۵۷۸	$۱/۲۷\times۱۰^{-۲}$
کاپتوپریل	۶/۶۶۶	$۴/۵\times۱۰^{-۳}$
لوزارتان	۵/۴۰۵	$۹/۲\times۱۰^{-۳}$
آتنولول	۰/۶۰۹	۱۱×۱۰^{-۳}

جدول ۱ هم چنین نشان می‌دهد که در حضور لوزارتان، کاهش V_{max} و کاهش نسبی K_m ایجاد گردیده‌اند. این نوع رفتار سینیتیکی موید مهار از نوع مختلط می‌باشند (۱۴) و از آنجا که دو نمودار لاینوربرک در پایین محور x ها همدیگر را قطع نموده‌اند، می‌توان ادعا کرد که مهار مختلط از نوع غیر رقابتی – نارقابتی باشد (Noncompetitive – uncompetitive Inhibition) (نمودار۴).

اما در مورد آتنولول، که یک ترکیب فعال کننده است، نمودار منحنی لاینویوربرک نشان‌دهنده ثابت بودن V_{max} و کاهش شدید K_m می‌باشد که این رفتار موجب افزایش تقریبی فعالیت آنزیم می‌گردد. از آنجایی که این دارو سبب کاهش قابل ملاحظه K_m شده است پس در حضور آن تمایل آنزیم به سوبسترا افزایش می‌یابد. در نتیجه می‌توان گفت که مکانیسم فعال شدن آنزیم پراکسیداز در حضور آتنولول همانند مهار کننده‌های مختلط می‌باشد. به این ترتیب، آتنولول را می‌توان به عنوان یک فعال کننده غیر ضروری دسته‌بندی نمود (۱). به این معنی که آنزیم در غیاب این فعال کننده نیز قادر به فعالیت طبیعی خود بوده و بنابراین، وجود این نوع فعال کننده‌ها برای فعال‌سازی آنزیم الزامی نیست.

با توجه به ساختمان شیمیایی سه داروی فوق و ساختار جایگاه فعال آنزیم (جدول ۲)، منطقی به نظر می‌رسد هیچکدام از داروهای فوق از طریق جایگاه فعال آنزیم اثر نکنند. اگر چه وجود حلقه‌های آروماتیک در لوزارتان و آتنولول پیش‌بینی برای شباهت به سوبسترا دارد ولی اندازه مولکول و وجود گروه‌های آمینی مختلف ایجاد بارهای منفی می‌کند که با توجه به اسیدهای آمینه هیستیدین و آرژنین ورود آن را به جایگاه غیر ممکن می‌کند.

از آنجائی که آنزیم‌های اکسیده کننده، شامل آنزیم پراکسیداز، عامل جذب رادیکال‌های آزاد بوده و در نتیجه در تعادل فشارخون نقش دارند، بنابراین داروهایی نظیر کاپتوپریل و لوزارتان که از طریق مهار این آنزیم عمل می‌کنند ممکن است اثرات جانبی ایجاد نمایند. در مقابل داروی آتنولول اثر فعال کنندگی جزیی داشتند و بنابراین پیش بینی می‌شود نه تنها اثر جانبی در مکانیسم جذب رادیکال آزاد ندارد بلکه به این عمل آنزیم تا حدی کمک خواهد کرد.

Archive of SID

www.SID.ir

سپاسگزاری

بدینوسیله از کلیه کسانی که در اجرای این تحقیق ما را یاری نمودند تشکر می نمائیم.

منابع

۱. شعبانی میانکوشکی، ف.، ۱۳۸۸. بررسی اثر فعال کننده‌ها بر فعالیت آنزیم تیروزیناز، دانشکده علوم پایه گیلان، پایان نامه کارشناسی ارشد.

2. Doehner, W.; Schoene, N.; Rauchhaus, M.; Leyva-Leon, F.; Pavitt, D.V.; Reaveley, D.A.; Schuler, G.; Coats, A.J.; Anker, S.D. and Hambrecht, R., 2002. Effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol on endothelial function and peripheral blood flow in hyperuricemic patients with chronic heart failure: results from 2 placebo- controlled studies. Circulation 105: 2619-2624.
3. Homaei, A.; Sajedi, R.H.; Seifzadeh, S.; Sariri, R. and Stevanato, R., 2009. Cystein enhances activity and staibility of immobilized papain. Amino Acids, Published online 29th. May 2009.
4. Kalinowski, L.; Dobrucki, L.W.; Azczepanska-Konkel, M.; Jankowski, M.; Martyniec, L.; Angielski, S. and Malinski, T., 2003. Third-generation beta-blockers stimulate nitric oxide release from endothelial cells through ATP efflux: a novel mechanism for antihypertensive action. Circulation 107:2747-2752.
5. Katzung Berthram, G., 2004. Basic & Clinical Pharmacology, 9th. Ed, MC.Graw Hill Company, London.
6. Palmer, T., 1991. Understanding Enzymes, 3 rd .ed, Ellis Horwood, U.K.
7. Sariri, R. and Laiali, E., The inhibitory effect of alcohols on alkaline phosphatase activity. International Journal of Chemical Science 3 (1): 16-22.
8. Sariri, R.; Mahmodian, R.; Khaje, Kh., 2006. Inhibition of tyrosinase activity on dopamine hydrochlorid by thiol compounds. Asian Journal of Chemistry, 18 (1), 8-14.
9. Sariri, R.; Sajedi, R. H. and Jafarian, V., 2006. Inhibition of horseradish peroxidase by thiol type inhibitors: Mercaptoethanol and mercaptoacteic acid. Journal of Molecular Liquids 128: 175-177.
10. Sariri, R.; Sajedi, R.H.; Jafarian, V. and Khaje, Kh., 2006. Inhibition of horseradish peroxidase by thiol type inhibitors. Journal of Molecular Liquids. 123: 20-23.
11. Wassmann, S.; Wassmann, K. and Nickeing, G., 2004. Modulation of Oxidant and Antioxidant Enzymes Expression and Function in Vascular Cells. Hypertention 44:381-386.
12. Warnhltz, A.; Nickenig, G.; Schulz, E.; MacHarzina, R.; Brasen, J.H.; Skatchkov, M.; Heitzer, T.; Stasch, J.P.; Griendling, K.K.; Harrison, D.G.; Bohm, M.; Meinertz, T. and Munzel, T., 1999. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the rennin-anginotensin system. Circulation 99: 2027-2033.
13. Wang, T.J.; Ausiello, J.C. and Stafford, R.S., 1999. Tends in Antihypertensive Drug Aduertising. Crculation 99: 2055-2057.
14. Wassmann, S.; Hilgers, S.; Laifs, U.; Bohm, M. and Nickenig, G., 2002. Anginotensin II type I receptor antagonism improves hypercholesterolemia-associated endothelial dysfunction. Arterioscler Thromb Vasc Biol 22: 1208-1212.
15. Zalba, G.; Beaumont, F.J.; San Jose G.; Fortune, M.A.; Etayo, J.C. and Diez, J., 2000. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rat. Hypertention 35: 1055-1061.

Archive of SID

www.SID.ir