

فعالیت کاتالیتیک DNA در یک واکنش انتقال الکترون و نقش مهارى فلزات نیکل (II) و سرب (II) در این واکنش

بیژن فرزامی^۱، رمضان صادقی، سیده زهرا بطحانی، فخرالدین تقدسی نژاد، محمود قاضی خوانساری

چکیده مقاله

مقدمه. نیکل و سرب فلزاتی هستند که با مکانیسم‌های متفاوتی بر سیستم‌های بیولوژیکی اثر می‌گذارند. در این تحقیق مشاهده شد که DNA در یک واکنش انتقال الکترون به صورت یک آنزیم عمل می‌کند. در این واکنش دی‌کلروفلورسین غیر فلورسانت (LDCF) در حضور پراکسیدها و هماتین به دی‌کلروفلورسین فلورسانت (DCF) تبدیل می‌شود.

روشها. در این مطالعه از روش فلوریمتری استفاده شد. اثر pH بر واکنش، مورد بررسی قرار گرفت و بیشترین نشر DCF در بافر تریس ۰/۰۵ مولار با pH برابر ۸/۴ به دست آمد.

نتایج. DNA و کارنوزین واکنش تبدیل LDCF به DCF را کاتالیز می‌کنند و نحوه عمل آنها تشدید انتقال الکترون است. کارنوزین در ارتباط با عمل کاتالیز کنندگی DNA نقش یک کوفاکتور را دارد. در این واکنش نیکل (II) و سرب (II) مهار کننده‌های قوی هستند و این نتیجه‌گیری با اندازه‌گیری پارامترهای کینتیکی در حضور و در غیاب لیگاندهای مذکور تأیید شد. بحث. DNA دو رشته‌ای دارای خواص الکتریکی است و در تبدیل دی‌کلروفلورسین غیرفلورسنت به نوع فلورسنت به صورت یک کاتالیزور عمل می‌کند. کارنوزین یک دی‌پپتید درونزاد است که برای آن نقش‌هایی از جمله خواص ضد اکسیدکنندگی و حذف کنندگی رادیکال‌های آزاد شناخته شده است. این دی‌پپتید نقش مهمی در پیشرفت واکنش انتقال الکترون دارد. در ضمن نیکل (II) و سرب (II) مهار کننده‌های واکنش محسوب می‌گردند. این فلزات به عنوان گیرنده الکترون، سبب مهار واکنش انتقال الکترون می‌شوند. این پدیده ممکن است با خواص سرطان‌زایی آنها مرتبط باشد.

● واژه‌های کلیدی. دی‌کلروفلورسین فعال (LDCF)، دی‌کلروفلورسین فلورسانت (DNA)، DNA، کارنوزین، نیکل (II) و سرب (II)

مقدمه

دی استیل دی‌کلروفلورسین (LDADCF) در محیط قلیائی هیدرولیز می‌شود و به ترکیب فعالی دی-کلروفلورسین (LDCF) تبدیل می‌گردد. این ترکیب در مجاورت اکسید کننده‌ها با از دست دادن یک الکترون اکسید شده و در نهایت به دی‌کلروفلورسین فلورسنت (DCF) تبدیل می‌شود. از این واکنش در موارد مختلفی برای اندازه‌گیری مقادیر بسیار جزئی ترکیباتی مثل هیدروپراکسیدها از جمله هیدروپراکسیدهای لیپیدی (۱، ۲)، اندازه‌گیری آب اکسیژنه در فرآیند سلولی و همچنین در سیستم آنزیمی گلوکز اکسیداز

استفاده شده است (۳). این روش برای اندازه‌گیری انفجار اکسیداتیو نوتروفیل‌ها نیز به کار گرفته شده است (۴).

ماهیت واکنش تبدیل LDCF به DCF در حضور اکسید کننده‌هایی مثل H_2O_2 ، نقل و انتقالات الکترونی است (۲). از طرفی DNA دو رشته‌ای به صورت یک ریسمان هادی الکترون شناخته شده است. به طوری که در دو سر آن اختلاف پتانسیل وجود (۵). مطالعات قبلی نشان داده که کارنوزین به عنوان یک دی‌پپتید درونزا نقش ضد اکسید کنندگی و حذف کنندگی رادیکال‌های آزاد را دارد (۶، ۷).

در مطالعه حاضر اثر DNA و کارنوزین بر واکنش مزبور مورد بررسی قرار گرفت، تا مشخص گردد که وجود DNA در واکنش انتقال الکترون دارای چه نوع تأثیری است و کارنوزین نیز چه اثری بر آن دارد. از آنجا که برخی فلزات دو ظرفیتی به DNA متصل شده و بارهای منفی گروه‌های فسفات آن را خنثی می‌کنند، پس مطالعه اثر این فلزات در واکنش فوق نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد و به درک صحیح و دقیق مکانیسم کمک خواهد کرد. سؤال اصلی این مطالعه، بررسی نقش DNA در یک واکنش انتقال الکترون (تبدیل LDCF به DCF فلورسنت) در حضور ترکیباتی مثل کارنوزین و کاتیون‌های فلزی دو ظرفیتی می‌باشد.

روشها

مواد. دی استیل - آنزیم دی‌کلروفلورسین (LDADCF) و کارنوزین از شرکت سیگما تهیه شد. هماتین، آب اکسیژنه و نمک‌های فلزی از شرکت Merck تهیه شد. DNA براساس روش ارائه شده قبلی، از تیموس گوساله استخراج و خالص‌سازی شد (۸). سایر مواد مورد نیاز نیز همگی از شرکت‌های معتبر تهیه و از خلوص بسیار بالا برخوردار بود.

این تحقیق با استفاده از روش فلوریمتری و با دستگاه اسپکتروفلوریمتر Shimadzu مدل RF-۵۰۰۰ انجام شد. در این روش سرعت اکسید شدن دی‌کلروفلورسین در مجاورت پراکسید هیدروژن و هماتین (به عنوان تسهیل کننده) و تبدیل آن به ترکیب فلورسنت دی‌کلروفلورسین در حضور مواد مختلفی از جمله DNA تیموس گوساله، کارنوزین و نمک یون‌های فلزی سرب (II) و نیکل (II) مورد بررسی قرار گرفت.

آزمایش‌های طیف نور سنجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر

۱ - گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران.

با فر تریس به حجم ۵۰ میلی لیتر رسید و به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده و زیر شیر آب سرد شد (محلول ب).

در ویال های ۴ میلی لیتری، ۲/۵ میلی لیتر محلول «ب» با حجم مناسبی از محلول «الف» و H₂O₂ با نسبت یک به یک مخلوط گردید. در نهایت DNA، کارنوزین یا یون های فلزی نیز به محلول فوق اضافه شد. سپس نمونه ها در حرارت ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس نمونه ها زیر شیر آب سرد شده و فلورسانس نسبی آنها اندازه گیری شد. طول موج تحریکی و نشری به ترتیب ۴۹۶ و ۵۲۱/۶ نانومتر تعیین شد.

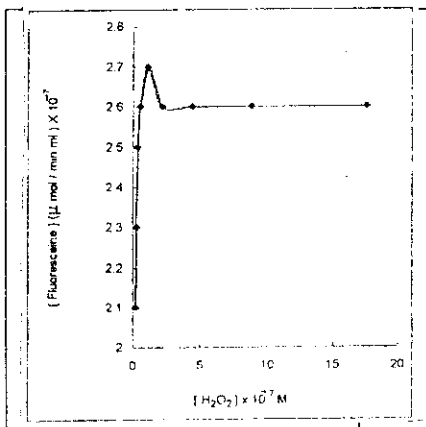
نتایج

در این مطالعه ابتدا اثر غلظت LDCF در حضور غلظت ثابتی از هماتین و آب اکسیژنه بر تولید DCF فلورسانت، بررسی شد. همان طور که در نمودار ۱ ملاحظه می شود، با افزایش غلظت LDCF تولید محصول دارای نشر

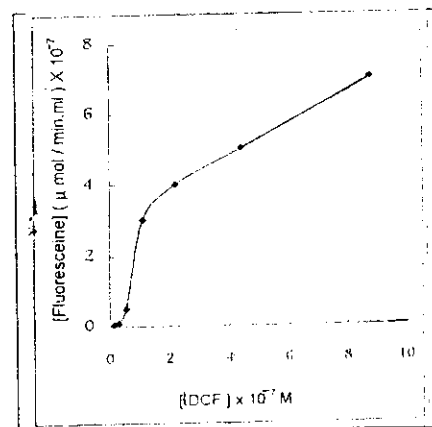
Shimadzu مدل ۱۳۰۱، جهت تعیین غلظت محلول های DNA و آب اکسیژنه به ترتیب در طول موجهای ۲۶۰ و ۲۴۰ نانومتر با احتساب ظرائب جذب $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ و $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ انجام شد.

تهیه محلول ها. ابتدا محلول ذخیره یک میلی مولار LDADCF در اتانول مطلق تهیه و در یخچال نگهداری شد. در روز آزمایش یک حجم از محلول فوق با چهار حجم سود ۰/۱۰ نرمال مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد تا در اثر هیدرولیز، فعال گردد. سپس به مقدار کافی بافر تریس ۰/۰۵ مولار با pI برابر ۸/۴ به آن اضافه شد تا حجم نهایی به ۱۰ میلی لیتر برسد (محلول الف).

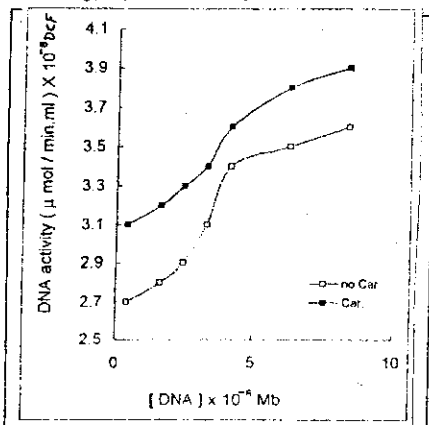
محلول هماتین ذخیره با غلظت یک میلی گرم در ۵ میلی لیتر سود ۰/۲ نرمال تهیه شد. سپس با مقدار کافی از بافر تریس به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسید و در حجمهای ۶/۵ میلی لیتری در فریزر نگهداری شد. برای هر بار آزمایش، یکی از نمونه های فوق از فریزر خارج و پس از ذوب شدن با



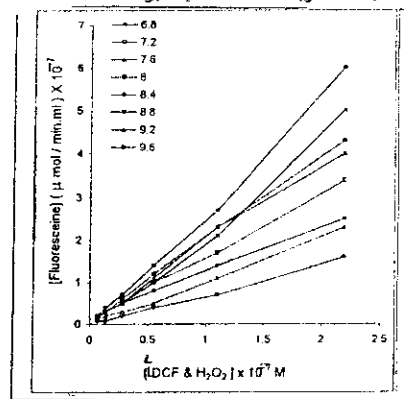
نمودار ۱. اثر افزایش غلظت آب اکسیژنه بر واکنش DCF غلظت LDCF در هر نمونه 1×10^{-7} مولار بود. غلظت آب اکسیژنه از 0.22×10^{-7} تا 17×10^{-7} مولار متغیر بود. دما 50°C و زمان انکوبه شدن ۵۰ دقیقه بود.



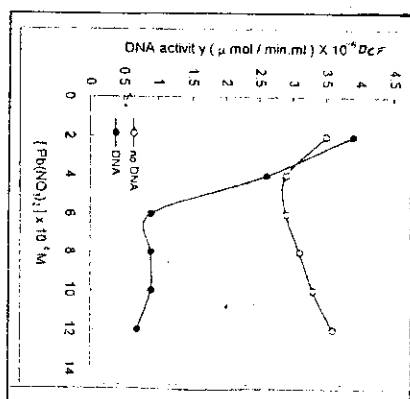
نمودار ۲. اثر افزایش غلظت دی کلرو فلورسین (LDCF) بر واکنش DCF در حضور غلظت ثابتی از آب اکسیژنه. غلظت LDCF از 0.14×10^{-7} تا 8×10^{-7} مولار متغیر بود. غلظت آب اکسیژنه 1×10^{-7} مولار در هر نمونه بود. دما 50°C و زمان انکوبه شدن ۵۰ دقیقه بود.



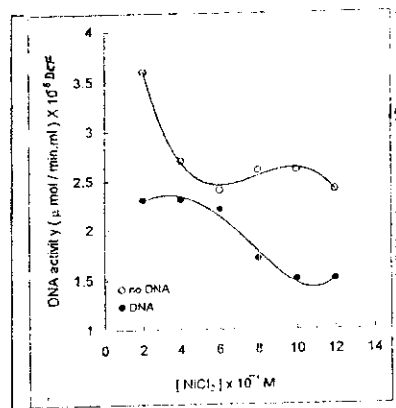
نمودار ۳. اثر افزایش غلظت DNA بر واکنش DCF در غیاب کارنوزین (○) و در حضور 1×10^{-7} مولار از آن (●). غلظت LDCF و آب اکسیژنه در نمونه ها 1×10^{-7} مولار بود. غلظت DNA در هر دو گروه نمونه از 0.42×10^{-6} تا 8×10^{-6} مولار باز متغیر بود. یک گروه از نمونه ها فاقد کارنوزین و در گروه دیگر غلظت ثابتی برابر 1×10^{-7} مولار از آن وجود داشت. دما 50°C و زمان انکوبه شدن ۵۰ دقیقه بود.



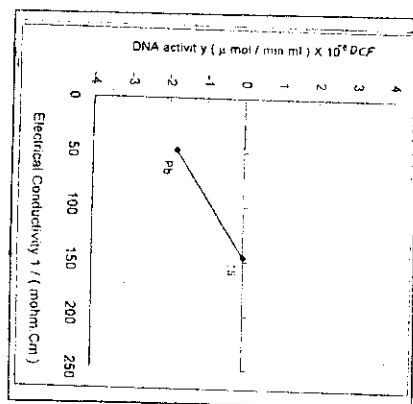
نمودار ۴. اثر افزایش pH محیط بر واکنش DCF غلظت LDCF و آب اکسیژنه در هر نمونه مساوی و از 0.07×10^{-7} تا 2.2×10^{-7} مولار متغیر بود. pH محیط واکنش نیز از ۶/۸ تا ۹/۶ متغیر بود.



نمودار ۶. اثر افزایش غلظت نیترات سرب (II) بر واکنش DCF در غیاب DNA (○) و در حضور $8/4 \times 10^{-6}$ مولار باز از آن (●). غلظت LDCF و آب اکسیژنه در نمونه‌ها $1/1 \times 10^{-7}$ مولار بود. غلظت نیترات سرب (II) در هر دو گروه نمونه از 2×10^{-4} تا 12×10^{-4} مولار متغیر بود. یک گروه از نمونه‌ها فاقد DNA و در گروه دیگر غلظت ثابتی برابر $8/4 \times 10^{-6}$ مولار از آن وجود داشت. دما 50°C و زمان انکوبه شدن ۵۰ دقیقه بود.



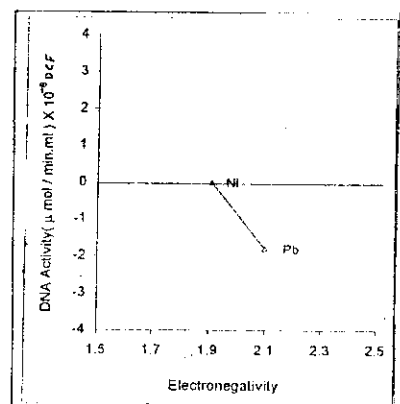
نمودار ۵. اثر افزایش غلظت کلرید نیکل (II) بر واکنش DCF در غیاب DNA (○) و در حضور $8/4 \times 10^{-6}$ مولار باز از آن (●). غلظت LDCF و آب اکسیژنه در نمونه‌ها $1/1 \times 10^{-7}$ مولار بود. غلظت نیکل (II) در هر دو گروه نمونه از 2×10^{-4} تا 12×10^{-4} مولار متغیر بود. یک گروه از نمونه‌ها فاقد DNA و در گروه دیگر غلظت ثابتی برابر $8/4 \times 10^{-6}$ مولار از آن وجود داشت. دما 50°C و زمان انکوبه شدن ۵۰ دقیقه بود.



نمودار ۸. ارتباط بین هدایت الکتریکی یون‌های فلزی سرب (II) و نیکل (II) و اثر آن روی فعالیت DNA (واکنش DCF).

LDCF به DCF مورد بررسی قرار گرفت. نمودار ۴ (منحنی نشاندار با مربع توخالی) نشان می‌دهد که میزان نشر و به عبارتی، تولید DCF در خصوص DNA افزایش یافته است. اثر کارنوزین بر واکنش نیز در حضور DNA مورد بررسی قرار گرفت. همان طور که منحنی ترسیم شده با مربع‌های توپر در نمودار ۴ نشان می‌دهد، حضور این ترکیب نیز موجب افزایش تولید محصول شده است. بررسی‌ها نشان داد، که کارنوزین به تنهایی نیز واکنش را تسریع می‌کند ولی نه به اندازه‌ای که در حضور DNA این اثر را دارد (داده‌ها نشان داده نشده است).

اثر نیکل (II) و سرب (II) نیز به صورت نمک‌های محلول (به ترتیب کلرید و نیترات)، بر واکنش فوق در حضور و غیاب DNA مورد بررسی قرار گرفت. نمودارهای ۵ و ۶ نشان می‌دهد که با افزایش غلظت هر یک از دو نمک فلزی، ابتدا نشر کاهش می‌یابد و سپس به مقدار ثابتی می‌رسد که حاکی از اشباع جایگاه توسط یون مربوط است.



نمودار ۷. ارتباط بین الکترونگاتیوی یون‌های فلزی سرب (II) و نیکل (II) و اثر آن روی فعالیت DNA (واکنش DCF).

افزایش یافته ولی بعد از غلظت خاصی ($1/1 \times 10^{-7}$ مولار)، شیب منحنی کاهش یافته است. تغییر شیب به دلیل محدود بودن غلظت‌های هماتین و آب اکسیژنه در نمونه است.

در مرحله بعد، اثر غلظت آب اکسیژنه بر واکنش مورد بررسی قرار گرفت. نمودار ۲ نشان می‌دهد که بهترین غلظت آب اکسیژنه در واکنش فوق، $1/1 \times 10^{-7}$ مولار است.

به منظور بررسی اثر pH بر واکنش، بافرهای تریس با غلظت یکسان ولی در محدوده pH بین ۶/۸ تا ۹/۶ تهیه و تمام مراحل واکنش در هر یک از این بافرها انجام شد. نتایج این بررسی در نمودار ۳ نشان داده شده است. همان طوری که ملاحظه می‌شود در pH برابر ۸/۴ بیشترین میزان نشر فلورسانس وجود دارد. پس در ادامه مطالعات این pH برای کار انتخاب شد.

همان طور که در مقدمه ذکر شد، از آنجا که DNA یک ماکرومولکول دارای اهمیت الکتریکی است، اثر غلظت‌های مختلف آن بر واکنش تبدیل

بحث

دارد و قادر است الکترون‌ها را به DNA دو رشته‌ای هادی، برساند.

نمودارهای ۵ و ۶ نشان می‌دهند که نیکل و سرب تولید DNA را کاهش می‌دهند ولی این اثر مهارتی در حضور DNA بیشتر از حالت قبل است. براساس نتایج به دست آمده، اثر مهارتی سرب به مراتب قوی‌تر از نیکل است. علت اصلی این اثرات مهارتی را می‌توان به وجود اربیتال‌های خالی در ساختار اتمی دو فلز مربوط دانست. به طوری که این دو فلز به عنوان مخزن دریافت الکترون عمل کرده، قادرند واکنش انتقال الکترون را که توسط DNA کاتالیز شده است، مهار نمایند. همچنین اثرات شدیدتر سرب نسبت به نیکل در مهار واکنش، مربوط به الکترون‌گاتیویته بیشتر سرب نسبت به نیکل است که این ارتباط نمودار ۷ نشان داده شده است. از طرفی قابلیت هدایت (Conductivity) سرب کمتر از نیکل است. یعنی الکترون‌ها را بیشتر به تله می‌اندازد و از تحرک آنها جلوگیری می‌کند. نمودار ۸ مبین این نکته است که سرب با هدایت الکتریکی کمتر، اثر مهارتی بیشتری بر واکنش انتقال الکترون توسط DNA اعمال می‌کند.

در حقیقت، شاید بتوان اثرات سرطان‌زایی این فلزات را به همین خواص ساختاری آنها مرتبط دانست. یعنی این فلزات قابلیت مهار حرکت الکترون‌ها در DNA دو رشته‌ای را دارند و از این طریق اثرات سمی خود را اعمال می‌نمایند. مشابه این پدیده در DNA دو رشته‌ای، وقتی که دو ریشه گوانین در کنار هم قرار گرفته باشند، نیز مشاهده شده است (۱۰، ۱۱).

با توجه به اهمیت مکانیزم‌های فوق، مطالعات بیشتری در ارتباط با فعالیت‌های کاتالیتیک DNA و اثرات لیگاند‌های مختلف فلزی و غیرفلزی بر واکنش‌های مشابه، در رابطه با نقش‌های بیولوژیکی DNA، ضروری به نظر می‌رسد.

با توجه به داده‌های فوق، مکانیزمی می‌توان ارائه داد که براساس آن، DNA دو رشته‌ای به عنوان کاتالیزور در واکنش تبدیل دی‌کلروفلورسین (LDCF) به دی‌کلروفلورسین (DCF) عمل می‌کند و سرعت واکنش را از $1.18 \times 10^{-3} \mu\text{M}/\text{min.ml}$ به $1.7 \times 10^{-3} \mu\text{M}/\text{min.ml}$ افزایش می‌دهد. در این واکنش، کارنوزین نقش کوفاکتور را به عهده دارد و نیکل و سرب با داشتن اربیتال‌های خالی و جذب الکترون‌ها، مهار کننده‌های آن محسوب می‌گردند. اثرات سرب بر مهار واکنش، به دلیل الکترون‌گاتیویته بیشتر و هدایت الکتریکی کمتر، بیش از نیکل است.

همان طور که ذکر شد برای اولین بار در سال ۱۹۶۵ از واکنش تبدیل LDCF به DCF دارای نشر فلورسانس برای اندازه‌گیری مقادیر کم آب اکسیژنه، در حضور پراکسیداز استفاده شد (۲). این روش در سال ۱۹۸۲ پس از انجام تغییراتی بهینه شد و به این ترتیب توانستند هیدروپراکسیدهای زیادی از جمله هیدروپراکسید کلسترول و هیدروپراکسید لیپید را اندازه‌گیری نمایند (۱). در این بهینه سازی از همانین به جای پراکسیداز به عنوان تسهیل کننده واکنش استفاده شد و نسبت ۱:۱ برای آب اکسیژنه: LDCF به عنوان مناسبترین غلظت، انتخاب شد. آزمایش‌های فوق در بافر فسفات با pH برابر ۷/۲ انجام شده بود (۱، ۲).

مطالعات قبلی هیدروکسیله شدن ازت -۷ گوانین در ساختار DNA توسط آب اکسیژنه را نشان داده بود (۹). به منظور بررسی مکانیزم این واکنش و اثبات حضور یکی از حد واسط‌های رادیکال آزاد یا سوپراکسید، استفاده از سوپراکسید دیسموتاز هیچگونه موفقیتی در پی نداشت. همچنین نشان داده شده بود که هیدروکسیله شدن گوانین در حضور کارنوزین و نیکل تشدید می‌گردد (۹).

با توجه به موارد فوق، مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر DNA در حضور کارنوزین بر واکنش اکسید شدن LDCF و تولید DCF دارای نشر انجام شد. همان طور که از نمودارهای ۱ و ۲ بر می‌آید، نسبت استوکیومتری یک به یک بین LDCF و H_2O_2 در واکنش برقرار می‌باشد. هر چند که غلظت بهینه به دست آمده در این آزمایش با مطالعات قبلی متفاوت است (۱، ۲). بهترین pH برای انجام واکنش نیز pH برابر ۸/۴ در بافر تریس بدست آمد که با شرایط مطالعات قبلی که pH برابر ۷/۲ در بافر فسفات بود (۱، ۲)، متفاوت است و افزایش نشر بیشتری در شرایط فعلی مشاهده می‌گردد. همچنین با توجه به نمودار ۴، می‌توان نتیجه گرفت که در واکنش فوق DNA نقش کاتالیزوری دارد و در حضور آن سرعت واکنش افزایش می‌یابد. شکل نمودار نیز سیگموئیدی به نظر می‌رسد، که این امر حاکی از متعادل بودن واکنش در حضور این کاتالیزور است. با توجه به شناختی که از ساختار و خواص کارنوزین در دست است و از آنجائی که در حضور این ترکیب سرعت واکنش به مراتب از غیاب آن بیشتر است، بنابراین می‌توان ادعا کرد که کارنوزین نیز به عنوان کوفاکتور در مکانیزم فوق دخالت

مراجع

- 1- Cathcart R, Shwiers E, Ames BN. Detection of Picomole levels of hydro peroxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Anal Biochem* 1963; 134: 111-116.
- 2- Keston AS, Brandt R. The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Anal Biochem* 1969; 11: 1-5.
- 3- Black M, Brandt RB. Spectrofluorometric analysis of hydrogen peroxide. *Anal Biochem* 1974; 58: 246-254.
- 4- Bass DA, Parce W, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M. Flow Cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol* 1983; 130: 1910-1917.

- 5- Ben C. Live Wire. *New Scientist* 1998; 243: 12-5.
- 6- Hipkiss AR. Carnosine, a protective anti-aging peptide. *Int J Biochem* 1995; 30: 863-868.
- 7- Quinn P, Boldyrev AA, Formazuyk VE. Carnosine: its properties, functions and potential therapeutic applications. *Mol Aspects Med* 1992: 379.
- 8- Bathaie SZ, Moosavi-Movahedi AA, Saboury AA. Energetic and binding properties of DNA upon interaction with dodecyl trimethylammonium bromide. *Nucl Acids Res* 1999; 27: 1001-1005.
- 9- Datta AK, Shi X, Kasprzak KS. Effect of carnosine, homocarnosine and anserine on hydroxylation of the guanine moiety in 2 - deoxyguanosine, DNA and nucleohistone with hydrogen peroxide in the presence of Ni. *Carcinogenesis* 1993; 14: 417-422.
- 10- Thomas J. Damage Control. *New Scientist* 7 Feb, 1998.
- 11- Hall DB. Oxidation DNA damage through long range electron transfer. *Nature* 1996; 382: 731.