

اثر آلکیل بنزن سولفونات بر فعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دامیناز مغز موش آزمایشگاهی

دکتر دردی قوجق*؛ دکتر سید علی محمد قاضی میر سعید**؛ محمد آهنجان***

چکیده:

سابقه و هدف: آلکیل بنزن سولفونات که به عنوان ماده فعال سطحی به محیط زیست افزوده می شود، در صورت افزایش مقدار آن در محیط زیست به عنوان یک سم بیولوژیکی محیط زیست را آلوده می نماید. آلکیل بنزن سولفونات عموماً به عنوان ماده فعال سطحی به مقدار زیاد به رودخانه ها و دریاچه ها افزوده می شود. به دلیل عدم هضم بیولوژیکی آلکیل بنزن سولفونات در طبیعت، این ترکیب شیمیایی می تواند خصوصیات سمیت بیولوژیکی از خود نشان دهد. مکانیسم سمیت بیولوژیکی آلکیل بنزن سولفونات هنوز مشخص نشده است. از طرفی آنزیم آدنوزین منوفسفات دامیناز، آنزیمی است که نقش بسیار مهمی در تحریک مسیر گلیکولیز و در کنترل شارژ انرژی دارد. این آنزیم در تعادل انرژی و در بررسی شرایط حیات موجودات زنده نقش مارکر و شاخص دارد؛ بنابراین ممکن است در شناخت مکانیسم سمیت بیولوژیک آلکیل بنزن سولفونات مفید باشد.

مواد و روش ها: این مطالعه از نوع تجربی است و در این پژوهش اثر آلکیل بنزن سولفونات بر فعالیت آدنوزین منوفسفات دامیناز در مغز موش آزمایشگاهی در لوله آزمایش مطالعه شد. در گروه آزمایش به تعداد ۳۰ نمونه در حضور آلکیل بنزن سولفونات در غلظت های ۱۰ تا ۵۰ میکرومول در لیتر فعالیت آنزیم اندازه گیری شد. در گروه شاهد به تعداد ۳۰ نمونه در عدم حضور آلکیل بنزن سولفونات فعالیت آنزیم اندازه گیری شد. برای اندازه گیری فعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دامیناز در گروه شاهد و گروه آزمایش از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد.

یافته ها: نتایج حاصل نشان دادند که فعالیت این آنزیم در گروه شاهد برابر با $18/52 \pm 92/80$ نانومول در دقیقه در گرم پروتئین و در گروه آزمایش برابر با $2/45 \pm 18/31$ نانومول در دقیقه در گرم پروتئین مغز موش آزمایشگاهی بود.

بحث: یافته های ما نشان داد که آلکیل بنزن سولفونات از طریق واکنش با جایگاه فعال آنزیمی آدنوزین منوفسفات دامیناز مغز موش آزمایشگاهی نقش مهاری خود را نشان می دهد. مهار آنزیم آدنوزین منوفسفات دامیناز توسط آلکیل بنزن سولفونات ممکن است یک راهنمایی مناسب برای درک مکانیسم سمیت آلکیل بنزن سولفونات و آلودگی محیط زیست با ماهیت هیدروفوبیک باشد.

کلیدواژه ها: آلکیل بنزن سولفونات، آدنوزین منوفسفات دامیناز، آلوده کننده محیط زیست.

* دانشیار و مدیر گروه بخش بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل.

** استادیار بخش داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل.

*** مربی بخش میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، گروه بیوشیمی - بیوفیزیک، تلفن: ۰۱۱۱-۲۲۳۴۶۸۶

* **عهده دار مکاتبات:** بابل، خیابان گنج افروز، دانشگاه علوم پزشکی بابل، گروه بیوشیمی - بیوفیزیک، تلفن: ۰۱۱۱-۲۲۳۴۶۸۶

مقدمه:

مشابه آن را در محیط زیست، با ماهیت عمل هیدروفوبیکی مشخص کنیم.

مواد و روش ها:

• **مواد شیمیایی:** آلکیل بنزن سولفونات، ایمیدازول - کلر، پتاسیم، منیزیم، سترات، گوانوزین تری فسفات، آدنوزین تری فسفات، آلفاکتوگلو تارات و گلو تانات دهیدروژناز از نمایندگی شرکت های سیگما، مرک و شرکت های مواد شیمیایی تهیه شد. سایر مواد شیمیایی و محلول های استفاده شده در حد آزمایشگاهی خالص بود و در تمام مراحل آزمایش از آب مقطر دوبار تقطیر و عاری از یون استفاده شد.

• **حیوان آزمایشگاهی و بافت مغز:** تعداد ۶۰ سر موش آزمایشگاهی (RAT) با وزن متوسط $224/5 \pm 45/8$ گرم در شرایط استاندارد نگهداری و پرورش داده شدند. موش های آزمایشگاهی از طریق قطع نخاعی کشته شدند و در مدت زمان کمتر از دو دقیقه از جمجمه سر، مغز بیرون آورده شد و در ظرف یخ قرار داده شد و توزین گردید. برای حذف چربی از روش قوجق وصفی (۹) استفاده شد؛ به طوری که بافت مغز در بافر فسفات سدیم ۰/۵ مولار توسط هموژنایزر به مدت ۵ دقیقه هموژنه شد. سپس هموژنه حاصل در دور ۳۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و محلول رویی برداشته شد و تا انجام مراحل بعدی آزمایش در فریزر در دمای -20°C درجه سانتی گراد ذخیره گردید.

• **استخراج آنزیم آدنوزین دآمیناز از مغز موش** آزمایشگاهی: که در دو مرحله صورت پذیرفت:

آدنوزین منوفسفات دآمیناز (EC 3.5.4.6) آنزیمی است که در تحریک مسیر گلیکولیز و در کنترل شارژ انرژی آدنیلات اهمیت دارد (۲۱). این آنزیم همچنین در تبدیل نوکلئوتیدهای آدنین، اینوزین و گوانین نقش مهمی دارد (۳ و ۴). به دلیل این خصوصیات، این آنزیم در مطالعات آنزیم شناسی و شیمی - فیزیک از نظر تنظیم متابولیسم سلولی بسیار با اهمیت است. فعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمیناز که یک آنزیم آلوستریک می باشد، بر اثر عوامل متعددی تحت تأثیر قرار می گیرد، محققان گزارش داده اند که ترکیبات آلی از طریق کاهش افنیتی سوسترای این آنزیم سبب کاهش فعالیت آن می گردند (۷-۵). محققان احتمال می دهند اتصال مهارکنندگان به آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمیناز ممکن است به خصوصیات هیدروفوبیسیته ترکیبات بستگی داشته باشد. آلکیل بنزن سولفونات که به عنوان مواد فعال سطحی استفاده می شود، در طبیعت خصوصیات سمیت بیولوژیک از خود نشان می دهد و آلوده کننده محیط محسوب می شود (۸). به رغم استفاده بسیار زیاد از آلکیل بنزن سولفونات، مکانیسم سمیت بیولوژیک این ترکیب آلی مشخص نشده است. هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر آلکیل بنزن سولفونات بر فعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمیناز است. در این مطالعه ما تأثیرات آلکیل بنزن سولفونات را در فعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمیناز مغز موش آزمایشگاهی بررسی کردیم تا بدین طریق بتوانیم مکانیسم سمیت بیولوژیک آلکیل بنزن سولفونات و سایر آلوده کننده های

میلی مول آدنوزین تری فسفات و ۵۰ میکرو لیتر از محلول آنزیمی در حجم نهایی ۲ میلی لیتر به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. فعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دامیناز با استفاده از روش Yoshino و همکارانش (۷) در طول موج ۳۴۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر مدل سیسیل C.E.1020 اندازه گیری شد.

یافته‌ها:

در این پژوهش روش دو مرحله‌ای برای استخراج آنزیم آدنوزین منوفسفات دامیناز از مغز موش آزمایشگاهی استفاده شد. در نمودار ۱، نمونه کروماتوگرام استخراج آنزیم توسط کروماتوگرافی ستونی نشان داده شده است، همانگونه که در این نمودار نشان داده شده است، آنزیم به DEAE سلولز متصل می‌شود و جداسازی آن در حجم ۱۰ میلی لیتری که حداکثر جذب نوری را دارد، شروع شده است. هر یک از نقاط در نمودار، حاصل ۶ بار آزمایش است و مقادیر بر حسب Mean±SE ارائه شده است. در نمودار ۲ منحنی استاندارد اندازه گیری فعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دامیناز مغز موش آزمایشگاهی نشان داده شده است. تا غلظت ۰/۸ میکرومول در لیتر غلظت سوپسترا نمودار به صورت خطی است؛ بنابراین تا غلظت ۰/۸ میکرومول در لیتر سوپسترا از این نمودار برای اندازه گیری فعالیت آنزیم می‌توان استفاده کرد.

میزان فعالیت آنزیم در گروه شاهد (بدون حضور آلکیل بنزن سولفونات) برابر ۹۲/۸۵±۸/۵۲ و در گروه

۱- روش افنیتی کروماتوگرافی: در هر آزمایش ۵ میلی لیتر از هموزنه بافت مغز موش آزمایشگاهی به ستون کروماتوگرافی حاوی ژل انتقال داده شد. افنیتی کروماتوگرافی با استفاده از روش Kelly و Weyden انجام شد (۱۰). نمونه‌های با حجم ۰/۵ میلی لیتر از ستون جمع‌آوری شد. از روش الکتروفورز برای جداسازی و شناسایی استفاده شد.

۲- روش انجام الکتروفورز: در هر سری آزمایش مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول تهیه شده از افنیتی کروماتوگرافی برای روش الکتروفورز استفاده گردید. ژل الکتروفورز افقی (به ابعاد ۰/۵ میلی متر در ۱۰ × ۵ سانتی متر) با استفاده از ژل تفکیک کننده حاوی ۱۰ درصد آکریل آمید در حضور سدیم دودوسیول سولفات (SDS) ۰/۵٪ و در PH= ۷/۲۵ (۴ میلی لیتر آب مقطر، ۳/۳ میلی لیتر ژل آکریل آمید ۳۰ درصد، ۱/۳ میلی لیتر تریس ۱/۵ مولار و PH=۸/۲۵ و ۰/۱ میلی لیتر SDS ۱۰٪، ۰/۱ میلی لیتر آمونوم پر سولفات ۱۰ درصد ۰/۰۰۲ میلی لیتر تمد (Themd) انجام شد. ژل استکینگ با آکریل آمید ۰/۵٪ (۱/۴ میلی لیتر آب مقطر، ۰/۳۳ میلی لیتر آکریل آمید ۳۰٪، ۰/۲۵ میلی لیتر تریس ۱/۵ مولار با PH=۷/۳۵، ۰/۰۲ میلی لیتر SDS و ۰/۰۲ میلی لیتر آمونوم پر سولفات ۱۰٪ و ۰/۰۰۲ میلی لیتر تمد) استفاده شد. مدت زمان الکتروفورز ۵ ساعت بود.

• اندازه گیری فعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دامیناز: محلول واکنش حاوی ۱۵۰ میلی مول بافر ایمیدازول - کلر با PH=۷/۲۵، ۱۵۰ میلی مول پتاسیم، ۵ میلی مول منیزیم، ۱ میلی مول سیترات و ۰/۵ میلی مول گوانوزین تری فسفات و ۵

آزمایش (در حضور آلکیل بنزن سولفونات) برابر
۱۸/۳۱±۲/۴۵ نانومول در دقیقه در گرم پروتئین مغز

نمودار ۱- منحنی جذب نوری آنزیم آدنوزین منوفسفات دامیناز در طول موج ۲۸۰ نانومتر با استفاده از کروماتوگرافی ستونی.

نمودار ۲- منحنی استاندارد اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دامیناز مغز موش آزمایشگاهی (میزان جذب نوری سوبسترا در طول موج ۳۴۰ نانومتر).

موش آزمایشگاهی بود. همانگونه که ملاحظه می‌شود آلکیل بنزن سولفونات بر این آنزیم نقش مهاری دارد و سبب کاهش فعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دامیناز می‌گردد.

منحنی میکالیس-منتون آنزیم آدنوزین منوفسفات دامیناز در حضور آلکیل بنزن سولفونات و در عدم حضور آلکیل بنزن سولفونات نشان داده شده است؛ همانطور که در این نمودار نشان داده شده است. در حضور آلکیل- بنزن سولفونات فعالیت آنزیم آدنوزین

منوفسفات دامیناز کاهش یافته است (نمودار ۳).
 است و مقادیر بر حسب $Mean \pm SE$ ارائه شده است.
 هریک از نقاط در این نمودار حاصل ۶ بار آزمایش

نمودار ۳- منحنی میکالیس- منتون آنزیم آدنوزین منوفسفات دامیناز در حضور آلکیل بنزن سولفونات (منحنی پایین) و در عدم حضور آلکیل بنزن سولفونات (منحنی بالا) (فعالیت آنزیم بر حسب $nmol/min/g$ می باشد).

جمله آنزیم‌های فسفوفروکتوکیناز و پیرووات کیناز و از طریق افزایش آمونیوم عمل می‌کند. بنابراین، ممکن است آلکیل بنزن سولفونات سمیت بیولوژیک خود را از طریق مهار فعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دامیناز نشان دهد، به طوری که سرانجام تولید انرژی در سلول مختل گردد (۴).

آلکیل بنزن سولفونات به مقدار زیاد به عنوان ماده فعال سطحی در محیط زیست استفاده می‌گردد و به رودخانه‌ها و دریاچه‌ها افزوده می‌شود. به دلیل هضم کم و یا عدم هضم بیولوژیکی این ترکیب به عنوان آلوده کننده محیط زیست محسوب می‌شود و سمیت بیولوژیکی از خود نشان می‌دهد (۸). اگرچه کنتیک واکنش آلکیل بنزن سولفونات با آنزیم آدنوزین منوفسفات به خوبی مشخص نشده است، اما معین شده

بحث:
 یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان می‌دهند که فعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دامیناز مغز موش آزمایشگاهی در حضور آلکیل بنزن سولفونات با غلظت ۵۰ میکرومول در لیتر به میزان ۷۸ درصد کاهش می‌یابد و این یافته‌ها با گزارش سایر محققان از جمله Hwang و Yoshino که کاهش فعالیت این آنزیم را با این دسته از ترکیبات تا ۶۰ درصد گزارش داده‌اند، منطبق و قابل مقایسه است (۳ و ۸).

آنزیم آدنوزین منوفسفات دامیناز به عنوان سیستم کنترل کننده مسیر گلیکولیز در متابولیسم کربوهیدرات‌ها می‌باشد و از طریق فعال نمودن آنزیم‌های کلیدی این مسیر در متابولیسم سلولی از

هیدروفوبیکی باشد. با توجه به یافته‌های مایک توضیح ممکن برای مکانیسم مهار آلکیل بنزن سولفونات بر فعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دامیناز احتمال دارد تغییر فرم مولکولی آنزیم در حضور بخش هیدروفوبیکی آلکیل بنزن سولفونات باشد که به بخش فعال آنزیم متصل می‌شود و بخش کاتالیتیکی آنزیم را جدا می‌کند و سرانجام سبب تغییر فرم ساختمانی آنزیمی شود و منجر به مهار آنزیمی می‌گردد.

نتیجه اینکه واکنش‌های هیدروفوبیکی آلکیل بنزن سولفونات با آنزیم آدنوزین منوفسفات دامیناز مغز موش آزمایشگاهی ممکن است دلیل مهار فعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دامیناز باشد. آنالیز این واکنش‌ها در آینده و در مطالعات بعدی راهنمای خوبی برای درک واکنش‌های پیچیده بین آنزیم‌ها، لیگاندها و ترکیبات آلوده‌کننده محیط خواهد بود.

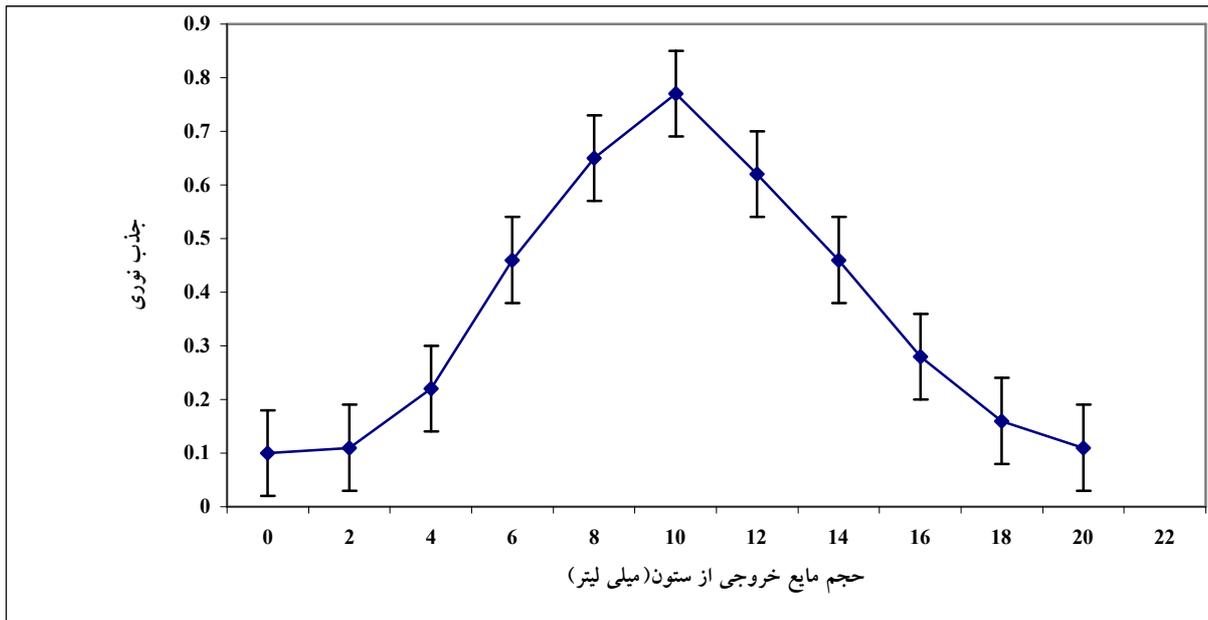
که قدرت مهار آلکیل بنزن سولفونات بر آدنوزین منوفسفات دامیناز به مقدار زیاد به هیدروفوبیسیته لیگاند بستگی دارد و نشان‌دهنده واکنش غیرقطبی این ترکیب آلی با ساختمان مولکول این آنزیم است. یافته‌های ما در بررسی منحنی میکالیس-متون در حضور و عدم حضور آلکیل بنزن سولفونات نشان‌داد که آلکیل بنزن سولفونات با جایگاه فعال آنزیمی واکنش دارد و با گزارش سایر محققان از جمله Yoshino, Mayagima و همکارانش که قدرت مهار این ترکیب را بر این آنزیم وابسته به خصوصیات هیدروفوبیسیته لیگاند می‌دانند، قابل مقایسه و منطبق است (۷ و ۴).

مهار آنزیم آدنوزین منوفسفات دامیناز توسط آلکیل بنزن سولفونات ممکن است یک راهنمایی مناسب برای درک مکانیسم سمیت آلکیل بنزن سولفونات و آلودگی محیط زیست با ماهیت

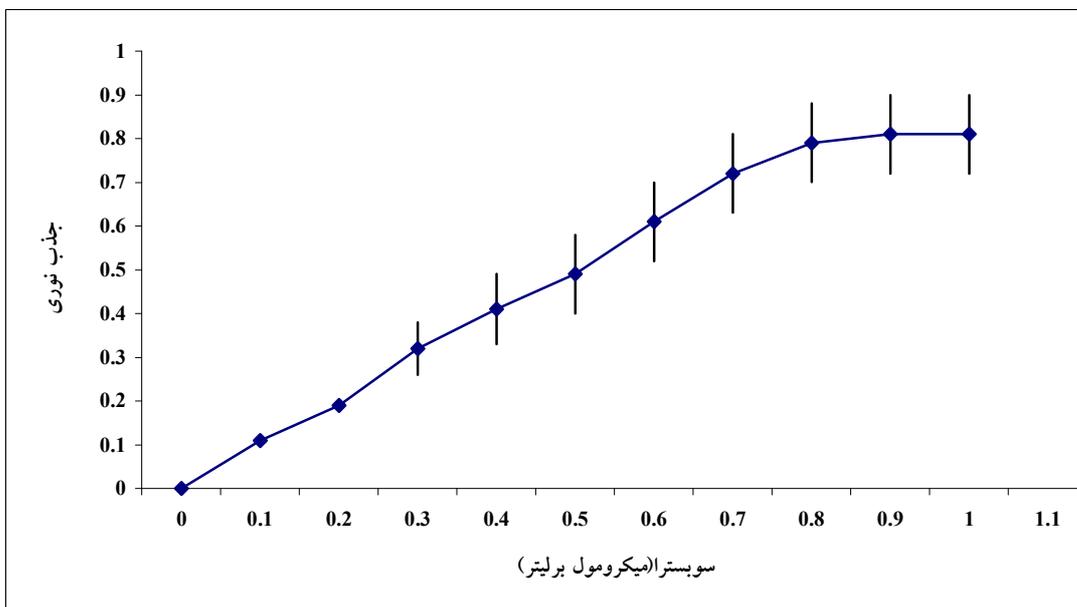
References:

1. Sims BM, Zizelman DK, Profit AA, Prestwich GD, Sabina RL, Theibert AB. Regulation of AMP deaminase by phoinositides. *J Biol Chem* 1999; 274(36): 25701-25707.
2. Hisatome I, Morisaki T, Kamma H, Sugama T, Morisaki H, Ohtahara A, Holmes EW. Control of AMP deaminase 1 binding to myosin heavy chain. *Am J Physiol* 1998; 275(3 Pt 1):C870-881.
3. Yoshino M and Kawamura Y. Inhibition of chicken erythrocyte AMP deaminase by tetraiodofluorescein compounds. *Bioch Biophys Acta* 1976; 526: 640-643.
4. Yoshino M, Murakami K. AMP deaminase reaction as a control system of the adenylate energy charge in yeast. Activation of phosphofructokinase and pyruvate kinase by the AMP deaminase-ammonia system. *J Biol Chem* 1985; 257:2822-2827.
5. Zielke CL, Suelter CH. Purine, purine nucleoside and purine nucleotide aminohydrolase. In: Boyer PD (Editor). *The Enzymes*. vol 4. 3rd ed. New York: Academic press, 1984, P.47-51.

6. Yoshino M, Murakami K. AMP deaminase reaction as a control system of glycolysis in yeast. Role of ammonium ion in the interaction of phosphofructokinase and pyruvate kinase activity with the adenylate energy charge. *J Biol Chem* 1985; 260:4729-4734.
7. Yoshino M, Miyajima E, Tsushima K. Kinetics of the interactions of AMP deaminase with fatty acids. *J Biol Chem* 1979; 254:1521-1526.
8. Hwang DF, Chen MY, Yoshida T, Jeng SS. Toxic effects of Linear alkylbenzene sulfonate on the tiger prawn *penaeus monodon*. *Ecotoxicol Environ Saf* 1993; 26:285-289.
9. Qujeq D and Safari YH. The effect of methamphetamine on histamine level and histidine decarboxylase activity in the mouse brain. *Pharmacology Reviews and Communications* 2001; 11(4):313-317.
10. Weyden MB and Kelley WN. Human adenosine deaminase . *J Biolog Chem* 1976; 251(18):5448-5456.

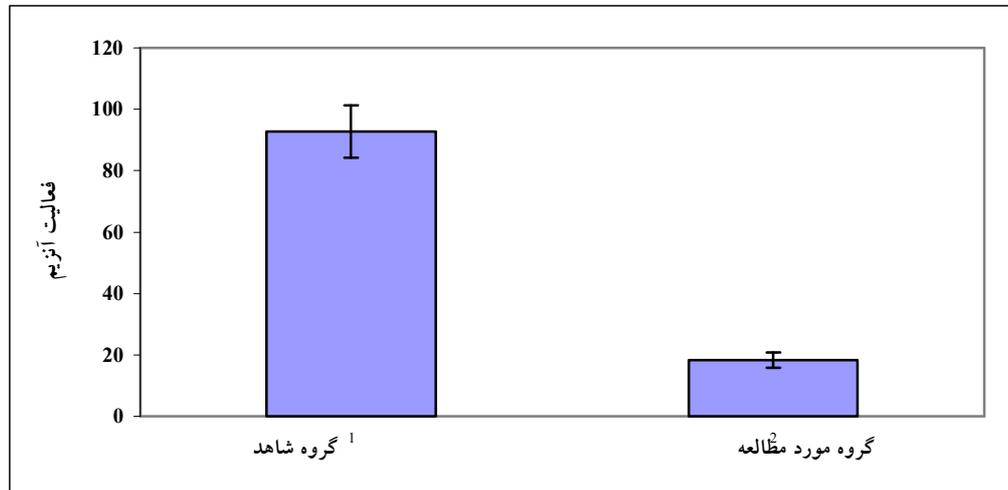


نمودار ۱- منحنی جذب نوری آنزیم آدنوزین منوفسفات دامیناز در طول موج ۲۸۰ نانومتر با استفاده از کروماتوگرافی ستونی.



نمودار ۲- منحنی استاندارد اندازه گیری فعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دامیناز مغز موش آزمایشگاهی (میزان جذب نوری سوپترا

در طول موج ۳۴۰ نانومتر)

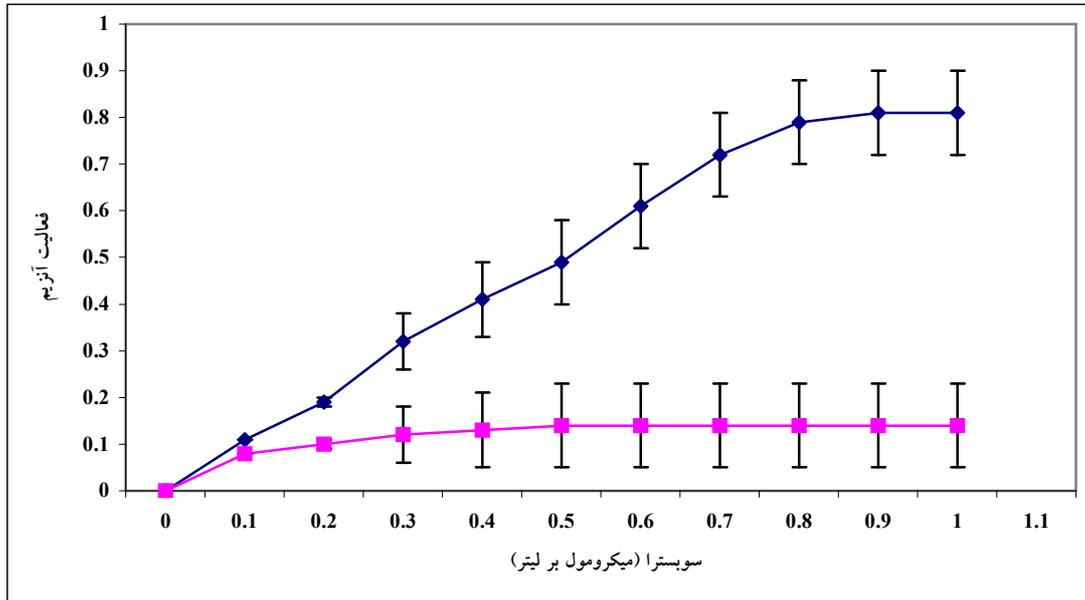


نمودار ۳- فعالیت آنزیم در گروه شاهد (بدون حضور آلکیل بنزن سولفونات) و در گروه آزمایش (در حضور آلکیل بنزن سولفونات

). هر یک از ستون‌ها حاصل ۶ بار آزمایش است و مقادیر بر حسب $(Mean \pm SE)$ ارائه شده است.

نمودار ۴- منحنی میکالیس- منتون آنزیم آدنوزین منوفسفات دامیناز در حضور آلکیل بنزن سولفونات (منحنی پایین) و در عدم حضور

آلکیل بنزن سولفونات (منحنی بالا). هر یک از نقاط، حاصل ۶ بار آزمایش است و مقادیر بر حسب $Mean \pm SE$ ارائه شده است.



نمودار ۴- منحنی میکالیس- منتون آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمیناز در حضور آلکیل بنزن سولفونات (منحنی پایین) و در عدم حضور آلکیل بنزن سولفونات (منحنی بالا). هریک از نقاط، حاصل ۶ بار آزمایش است و مقادیر بر حسب $Mean \pm SE$ ارائه شده است.