تغییرات فعالیت بیولوژیکی آنزیمهای بزاقی در سیگاریها

عاطفه قدیمی[۱]، ریحانه سریری[۲*]، حسن آریاپور[۳]، علی عرفانی[۴] و فهیمه نصرت آبادی[۵]

[۱] سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات سنندج، گروه زیست شناسی

[۲] رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

[۳] گرگان، دانشگاه گلستان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

[۴] رشت، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، گروه داخلی

[۵] تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۱۷

چکیده

دود سیگار حاوی دهها ماده شیمیایی پیچیده است که می تواند ایجاد و تشدید کننده برخی بیماریهای موضعی و داخلی شود. بزاق به عنوان یک مایع بیولوژیکی غیر تهاجمی که زودتر از سایر مایعات بدن در مقابل دود سیگار قرار می گیرد تغییرات عمده را نشان خواهد داد که در بسیاری موارد ردیابی این تغییرات می تواند در تشخیص و پیشگیری مشکلات بعدی مفید واقع شود. در این تحقیق اثر استفاده از سیگار روی آنزیمهای آنتی اکسیدانت بزاقی بررسی گردید. با توجه به اهمیت آنزیمهای پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در حفظ و نگهداری حفره دهانی و دستگاه گوارش از صدمات محیطی و داخلی و این نکته که بزاق انسان تا به حال کمتر مورد توجه پژوهشگران بوده است و جمع آوری آن غیر تهاجمی است، تحقیق حاضر طراحی گردید. در بخش عملی این پژوهش، بزاق غیر تحریکی ۲۵ نفر سیگاری و ۲۵ نفر شاهد غیر سیگاری، همه مرد و ۲۰ تا ۲۵ سال، در لوله های استریل جمع آوری و بعد از سانتریفیوژ کردن تا انجام آزمایشها در فریزر نگهداری شد. سپس فعالیت آنزیمهای بزاقی پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز با استفاده از سوبسترای هر آنزیم در بافر مشخص و شرایط ویژه تعیین گردید. نتایج نشان دادند که در افراد سیگاری، علاوه بر حجم و (pH) بزاق، فعالیت بیولوژیکی آنزیمهای آنتی اکسیدانت بزاقی بین ۲۵ تا۳۰ درصد نسبت به گروه شاهد کاهش دارند.

واژه های کلیدی: سیگار، سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز، سیستم آننی اکسیدانتی بزاق.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۳۲۲۰۰۶۶-۰۱۳۱، پست الکترونیکی: sariri@guilan.ac.ir

مقدمه

استفاده از سیگار موجب می شود تعداد زیادی مواد شیمیایی سمی از طریق حفره دهانی به سیستم بیولوژیکی بدن وارد شوند. این ترکیبات خطرناک ممکن است در دهان ایجاد مشکلات لثه، پوسیدگی دندان و بیماریهای دیگر بافت دهانی شوند (۲۷). به علاوه، برخی بیماریهای مهم انسان از قبیل مشکلات قلبی عروقی و تنفسی نیز ممکن است به دلیل سیگار کشیدن ایجاد و یا تشدید شوند. تحقیقات نشان داده اند که دود سیگار حاوی بیش از ۴۰۰۰ نوع مواد شیمیایی است که حداقل یک دهم آنها در دسته کارسینوژن ها طبقه بندی شده اند (۳۴). بر اساس تحقیقات Peterson و همکاران (۲۰۱۰) دود سیگار همچنین حاوی ترکیبات اکسیدانت قوی مانند رادیکالهای اکسیژن، ازت و آلدئیدهای فرار است (۲۴). ترکیبات اکسید کننده می توانند آسیبهای جدی به مولکولهای حیاتی

Archive of SID
www.SID.ir

مانند پروتئینها و آنزیمها وارد کرده و مشکلات فیزیولوژیکی مختلف را سبب شوند. گونه های فعال اکسیژن (ROS) و نیتروژن (RNS) در اثر متابولیسم طبیعی سلولی به وجود می آیند. گونه های ROS و RNS می توانند مفید و یا مضر باشند و به این ترتیب نقش دو جانبه ای در سیستمهای زنده ایفاء می کنند . اثرات مفید ROS در غلظتهای پائین نامتوسط رخ می دهد به عنوان مثال دفاع در برابر عوامل عفونی و همچنین عملکرد تعدادی از تقسیمهای سیگنالینگ سلولی به عنوان عملکرد فیزیولوژیکی ROS شناخته شده‌اند. مثال دیگری از اثرهای مفید ROS در غلظت پایین تا متوسط، القای واکنش متوژنیک است. این در حالی است که تولید بالای ROS /RNA در سیستمهای بیولوژیکی و همچنین نقص و کمبود در آنتی اکسیدانتهای آنزیمی و غیر آنزیمی اثرات مضر رادیکال آزاد و خطرات بیولوژیکی همانند استرس اکسیداتیو و نیتروزاتیو را ایجاد می کند (۳۸ و ۳۹). بسیاری واکنشهای آنزیمی می تواند منبع تولید رادیکال آزاد باشند، به عنوان مثال می توان از واکنشهای زنجیرۀ تنفسی، فاگوسیتوز و سنتز پروستا گلاندین نام برد. آنتی اکسیدانتها با جمع آوری رادیکال و یا جلوگیری از تشکیل آنها، از سلولهای بدن محافظت می کنند . ترکیبات آنتی اکسیدانت الکترون اضافی دارند که می توانند در اختیار رادیکال آزاد قرار دهند با این کار رادیکال آزاد دیگر برای جفت کردن الکترونها به قسمتهای حیاتی حمله نمی کند (۳۸) . ترکیبات آنتی اکسیدانت نقش مهمی در حفظ سلامتی ایفاء می کنند. آنتی اکسیدانتهایی از قبیل آسکوربیک اسید، فنولیک اسید، پلی فنلها و فلاونوئیدها از طریق جمع آوری رادیکالهای پر اکسید و هیدروپراکسید می توانند از آسیب اکسیداتیو که منجر به بیماریهای پر خطر می شود، جلوگیری کنند . نتایج برخی تحقیقات پیشنهاد می کند که آنتی اکسیدانتها از خطر بیماریهای قلبی و سرطان می کاهند (۳۳ و ۴۲). بزاق اولین مایع بیولوژیکی است که با مواد خارجی مثل غذا، نوشیدنیها یا ترکیبات فرار موجود در محیط مواجهه شده و واکنش می دهد و در نتیجه نقش مهم در سلامت حفره دهانی دارد (۶). از آنجا که جمع آوری بزاق از طریق روشهای غیر تهاجمی انجام شده و نیاز به تخصص ویژه ای ندارد، بنابراین می تواند به عنوان یک مایع بیولوژیکی ارزشمند برای بررسی برخی تغییرات بیوشیمیایی مورد توجه قرار گیرد. بزاق دارای مکانیسمهای دفاعی مختلف است که باعث حمله به باکتری، ویروس و قارچها شده و در برابر حملۀ مکانیکی و یا شیمیایی نیز نقش محافظتی دارد. Nagler و همکاران (۲۰۰۲) ثابت کردند بزاق توانایی آنتی اکسیدانتی داشته و می تواند گونه های رادیکال اکسیژن مثل سوپر اکسید (O_2^-) را غیرفعال کند. رادیکالهای آزاد قوی ممکن است باعث تغییرات مختلف روی موکوس دهانی و ایجاد عفونتهای متعدد و حتی سرطان شوند (۲۲). خاصیت ضد سرطان بزاق به طور ویژه در پیشگیری از پیشرفت سرطان دهان در تحقیقات زیادی مورد بررسی قرار گرفته است (۴ و ۲۱) . سیستم آنتی اکسیدانتی بزاق شامل مولکولهای غیر آنزیمی و آنزیمهاست آنتی اکسیدانتهای بزاقی شامل سه گروه می باشند: آنتی اکسیدانتهای خارج سلولی مثل اوریک اسید، آنتی اکسیدانتهای سلولی مثل آسکوربیک اسید و آنتی اکسیدانتهای آنزیمی مثل سوپر اکسید دیسموتاز، پراکسیداز و کاتالاز. از مهم ترین آنتی اکسیدانتهای بزاقی می توان اسید اوریک و آنزیم پراکسیداز را نام برد که هر دو محلول در آب هستند. آنتی اکسیدانتهای محلول در لیپید توسط لیپو پروتئینها حمل می شوند که غلظتشان در بزاق خیلی کم است در واقع کمتر از ۱۰ درصد ظرفیت آنتی اکسیدانتی بزاق را ایجاد می کنند (۱۴ و ۲۲). در این تحقیق فعالیت سه آنزیمهای آنتی اکسیدانت، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز، در بزاق افراد سیگاری با دسته ای شاهد مقایسه شد. آنزیمهای پراکسیداز بزاقی دو نوع می باشند، ولی از آنجایی که از نظر خواص آنتی اکسیدانتی تفاوتی بین فعالیت دو فرم پراکسیداز نیست، در

Archive of SID
www.SID.ir

این تحقیق فعالیت کل پراکسیداز بزاقی بدون توجه به نوع آنها بررسی گردید.

مواد و روشها

نمونه برداری: داوطلبها شامل دو دسته ۲۵ نفری مرد ۲۰-۲۵ سال بودند.گروه مورد آزمایش افرادی بودند که همه آنها **از** حدود ۳-۵ سال قبل سیگاری شده بودند و روزانه ۱۰-۱۲ عدد سیگار از نوع مشابه استفاده می کردند. گروه شاهد از میان افراد سالم با سن و شرایط مشابه ولی غیر سیگاری انتخاب شدند. نمونه های بزاق غیر تحریکی که طی ۳ دقیقه ترشح شده بودند به حجم حدود ۱۰-۲۰ میلی لیتر در لوله های موئین استریل جمع آوری، علامت گذاری و تا هنگام آزمایش در ۷۰- درجه نگهداری شدند.

برای هر سنجش آنزیمی، سپس نمونه‌های بزاقی به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور/دقیقه سانتریفیوژ شدند و از مایع رویی زلال برای آزمایش مربوطه استفاده شد.

محاسبه سرعت جریان بزاق غیر تحریکی: سرعت جریان (Flow Rate) با تقسیم حجم بزاق غیر تحریکی جمع آوری شده (میلی لیتر) به زمان لازم برای جمع شدن آن حجم (دقیقه) به دست آمد.

اندازه گیری (pH) نمونه های بزاق: مقدار pH نمونه های بزاقی، بعد از عمل سانتریفیوز و رقیق نمودن آنها توسط آب مقطر (به میزان ۵۰ درصد)، با استفاده از دستگاه pH متر، که توسط بافرهایی با pH مشخص کنترل شده بود، اندازه گیری گردید.

تعیین فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD): فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، با استفاده از روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد (۳۷). در عمل، مخلوط مورد آزمایش متشکل از ۰/۵ میلی لیتر محلول واکنش (EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، بافرفسفات ۵۰ میلی‌مولار، نیتروبلوتترازولوم (NBT) ۷۵ میکرومولار و ریبوفلاوین ۰/۲۱ میلی‌مولار) با یک میلی لیتر بزاق مخلوط گردید. کووت‌های حاوی محلول واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در حالی که به آرامی به هم زده می‌شدند، در معرض پرتو فلورسانس (۲ عدد لامپ ۲۰ وات فلورسانس) قرار گرفتند و سپس جذب نمونه‌ها و کنترلها در طول موج ۵۶۰ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد. در نهایت، با استفاده از فرمول زیر مقدار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بزاقی تعیین گردید (۳۵).

$$\frac{\text{جذب بلانک} - \text{جذب نمونه مورد آزمایش}}{\text{جذب بلانک}} \times ۱۰۰$$

هر واحد فعالیت SOD عبارت است از مقداری از آنزیم که برای ۵۰ درصد مهار احیای فتوشیمیایی NBT تحت شرایط سنجش لازم باشد (۱).

سنجش فعالیت پراکسیداز(POD): برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز از سوبسترای ۴-آمینوآنتی پیرین در حضور پراکسید هیدروژن استفاده شد و فعالیت آنزیم در دمای اطاق در بافر مشخص اندازه‌گیری گردید. نمونه حاوی ۴۸۰ میکرولیتر ۴-آمینو آنتی پیرین + ۴۸۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن + ۴۰ میکرولیتر بزاق بود. لوله بلانک (شاهد) نیز حاوی ۴۸۰ میکرولیتر ۴-آمینو آنتی پیرین + ۴۸۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن + ۴۰ میکرولیتر بافر فسفات با pH مساوی ۷/۰ بود. نمونه‌های استاندارد بعد از رسیدن به دمای مورد نظر به سوبسترا اضافه شدند و پیشرفت واکنش آنزیمی با استفاده از اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۱۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت و تغییرات جذب بر زمان ثبت شد. در نهایت، داده‌های به دست آمده را بر عدد ۶/۵۸ تقسیم کرده فعالیت پراکسیداز محاسبه گردید (۱۰) .

فعالیت آنزیم کاتالاز(CAT) : برای اندازه‌گیری فعالیت کاتالاز، بافرفسفات ۵۰ میلی مولار (pH = 7) با ۱۰ میلی-مولار پراکسید هیدروژن ترکیب شده و سپس دو کووت از جنس کوارتز انتخاب شدند. در کووت بلانک ۵۰۰ میکرو-لیتر از ترکیب بافرفسفات و پراکسید هیدروژن و در کووت

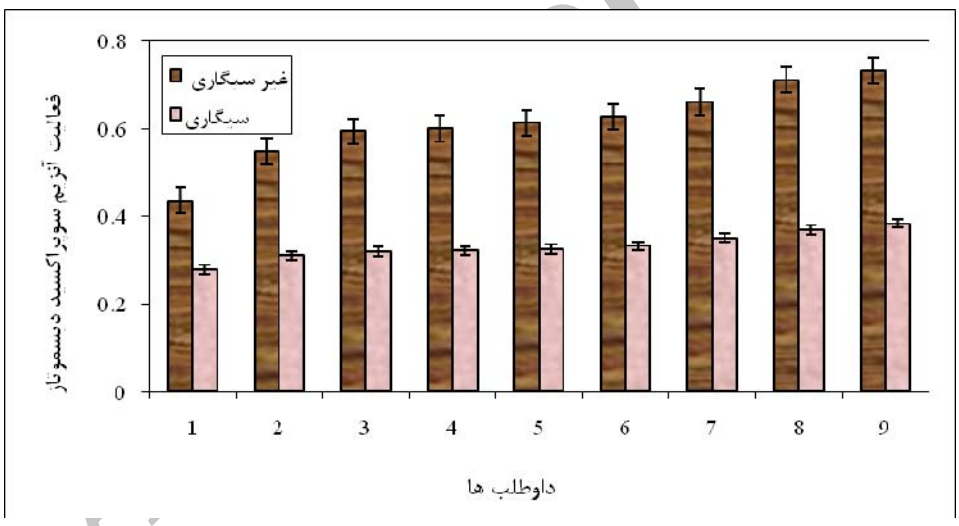
Archive of SID
www.SID.ir

دیگر ۴۶۰ میکرولیتر از ترکیب بافرفسفات و پراکسید هیدروژن و ۴۰ میکرولیتر از بزاق اضافه شده و با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر به صورت کاینتیک در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه و به فاصله‌های ۱۰ ثانیه‌ای ثبت گردید و در نهایت اعداد به دست آمده بر عدد ۳۹/۴ تقسیم شد و فعالیت آنزیم کاتالاز محاسبه گردید (۴۰) .

مطالعات آماری: همه آزمایشهای سنجش آنزیمی با حداقل ۳ تکرار انجام شد و سپس آنالیزهای آماری مربوطه با استفاده از آزمون دانکن در SPSS صورت گرفت و نمودارهای تغییرات مربوطه در برنامه Excel رسم شد.

جدول ۱- تغییرات سرعت جریان بزاق در اثر استفاده از سیگار. اعداد داده شده میانگین حجم جمع آوری شده از هر داوطلب میانگین ± انحراف استاندارد (SD) می باشند.

فاکتور بزاقی	سیگاری (متوسط ± SD)	غیرسیگاری (متوسط± SD)	مقدار *P
سرعت جریان (ml/min)	۱/۱۸ ± ۰/۳۱	۵/۰۵ ± ۰/۹	≤ ۰/۰۰۱
مقدار pH	۵/۹ ± ۰/۲۳	۷ ± ۰/۱۲	≤ ۰/۰۰۱
سوپراکسید دیسموتاز (U/ml)	۰/۳۱۷ ± ۰/۰۳	۰/۵۸۲ ± ۰/۰۸	≤ ۰/۰۰۱
فعالیت پراکسیداز (mU/ml)	۰/۰۱۴ ± ۰/۰۰۹	۰/۰۲۸ ± ۰/۰۰۸	≤ ۰/۰۰۱
فعالیت کاتالاز (U/ml)	۰/۰۱۶ ± ۰/۰۰۷	۰/۰۴۷ ± ۰/۰۱۳	≤ ۰/۰۰۱



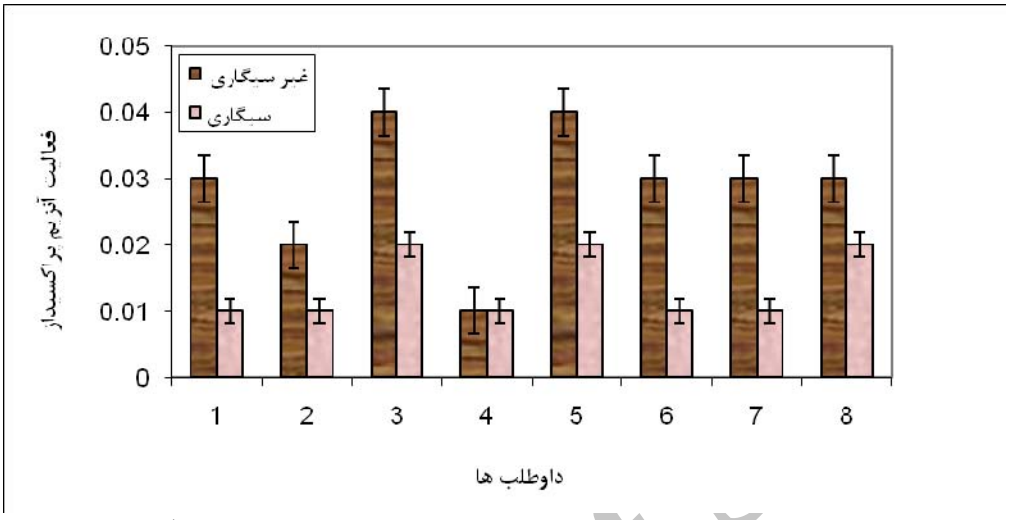
شکل ۱- مقایسه فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در بزاق افراد سیگاری در مقایسه با داوطلبهای سالم. اعداد استفاده شده میانگین آزمایشهای مربوط به مجموع آزمودنیها هستند.

نتایج

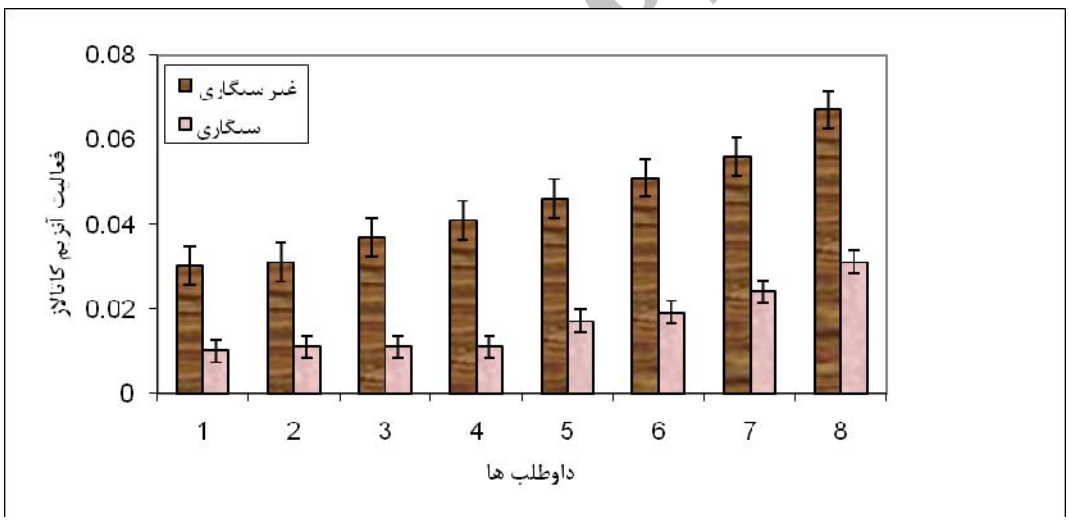
این پژوهش با هدف بررسی اثر دود سیگار بر تغییرات آنتی اکسیدانتهای بزاقی مردان انجام گردید. از آنجایی که حجم بزاق و pH آن می توانند از عوامل مهم اثر گذار روی فعالیت آنتی اکسیدانتی بزاق داشته باشد، تغییرات آنها نیز مورد بررسی قرار گرفتند. سرعت جریان بزاق با اندازه گیری حجم جمع آوری شده در زمان معین و سپس تبدیل به میلی لیتر/دقیقه تعیین شد. نتایج نشان دادند که کاهش حجم بزاق در افراد سیگاری نسبت به گروه شاهد غیر سیگاری، تفاوت معنی داری دارند (جدول ۱). تغییرات pH در افراد سیگاری به طور متوسط ۳۰ درصد کاهش

www.SID.ir

نشان می دهند. با توجه به داده های این جدول که همه اعداد میانگین همه داوطلبهاست، فعالیت هر سه آنزیم آنتی اکسیدانتی مورد مطالعه نیز کاهش یافتند.



شکل ۲- مقایسه فعالیت پراکسیداز در بزاق افراد سیگاری در مقایسه با داوطلب های سالم. اعداد استفاده شده میانگین آزمایش های مربوط به مجموع آزمودنی ها هستند.



شکل ۳- مقایسه فعالیت کاتالاز در بزاق افراد سیگاری در مقایسه با داوطلب های سالم. اعداد استفاده شده میانگین آزمایش های مربوط به مجموع آزمودنی ها هستند.

تغییرات فعالیت سوپراکسید دیسموتاز : بررسی فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز برای ۲۵ نفر افراد سیگاری و ۲۵ نفر افراد غیر سیگاری که در رده سنی مشابه بودند صورت گرفت. هر اندازه گیری حداقل ۲ بار تکرار شد و میانگین تغییرات فعالیت SOD در سیگاریها و غیر سیگاریها به ترتیب ۰/۳۱۷ واحد/میلی لیتر و ۰/۵۸۲ واحد/میلی لیتر بودند (شکل ۱). با توجه به نتایج مذکور، ملاحظه می شود که فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در

www.SID.ir

مبتلایان به سیگار با میزان قابل توجهی یعنی در حدود ۵۴ درصد کاهش یافته است. لازم به توضیح است که، برای احتراز از پیچیدگی و شلوغ شدن شکلها، نمونه هایی از هر گروه آزمایشی به صورت تصادفی برای رسم نمودارها استفاده شدند.

نتایج مربوط به فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) : بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز نیز در دو گروه سیگاری و غیر سیگاری هر کدام متشکل از ۲۵ نفرصورت گرفت و هر آزمایش آنزیمی با ۲ تا ۳ بار تکرار انجام شد. نتایج نشان دادند که میانگین تغییرات مربوطه به فعالیت آنزیم POD در سیگاریها و غیرسیگاریها به ترتیب ۰/۰۱۴۱ و ۰/۰۲۸۱ (U/ml) می باشد (شکل ۲). این اعداد نشان دهنده کاهش فعالیت پراکسیداز به میزان ۵۰ درصد در افراد سیگاری است. در این مورد نیز نمونه هایی از هر گروه آزمایشی به صورت تصادفی برای رسم نمودارها استفاده شدند.

نتایج بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) : برای این آنزیم نیز اندازه گیریها در دو گروه سیگاری و غیر سیگاری صورت پذیرفت. میانگین تغییرات مربوط به فعالیت آنزیم CAT در سیگاریها و غیرسیگاریها به ترتیب ۰/۰۱۶۴ و ۰/۰۴۷۱ (U/ml) می باشد(شکل ۳). با توجه به نتایج به دست آمده، ملاحظه می شود که میانگین فعالیت آنزیم در گروه شاهد حدود ۳۴ درصد میانگین فعالیت آن در افراد سیگاری است.

بحث

گونه های اکسیژن فعال یا رادیکالهای آزاد اکسیژن (ROS) از متابولیسمهای طبیعی سلول به وجود می آیند (۱۳و۱۹). مقداری از اکسیژن تنفسی کاملاً به آب کاهش نیافته و به این ترتیب رادیکالهای آزاد ایجاد می شوند (۳۲ و ۴۱). برخی از رادیکالهای آزاد اکسیژن شامل هیدروکسیل(OH)، نیتریک اکسید (NO)، سوپر اکسید (O_2^-)، هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و پراکسی نیتریت (ONOO) می باشند (۲۹و۴۱). علی رغم اینکه هیدروژن پراکسید رادیکال آزاد نیست، ولی از نظر بیولوژیکی اکسیدان مهمی است چون توانایی تولید رادیکال هیدروکسیل را دارد که یک رادیکال قوی می باشد (۳۶). بنابراین، بار کم موجب می شود که (H_2O_2) بتواند با تراوش از میتوکندری به غشای هیدروفوبیک نفوذ کند (۱۵).

افزایش گونه های فعال اکسیژن می تواند خطر آسیب اکسیداتیو برای پروتئین، لیپید و حتی DNA ایجاد کند (۸). آسیب اکسیداتیو غشاء سبب می شود سیالیت آن افزایش یابد و گیرنده های پیوند شده به غشاء و آنزیمها غیر فعال گردد. در مورد اثر رادیکال آزاد به DNA هنوز اطلاعات کامل و قطعی وجود ندارند و بررسی برای بیان این آسیب ادامه دارد. زمانی که سلول باDNA آسیب دیده تقسیم می شود متابولیسم و تکثیر آن بی نظم شده و جهش اتفاق می افتد که فاکتور مهمی در سرطان زایی است (۸). بر اساس نتایج تحقیقات بالینی، مصرف سیگار و به طور کلی استعمال دخانیات ارتباط مستقیم با انواع سرطان مانند سرطان ریه و دستگاه تنفس و همچنین موجب آسیب DNA می شود (۱۱ و ۴۵). از طرفی، ترک سیگار می تواند پیشرفت سرطان را کم نموده و در تسریع روند بهبودی اثر گذار باشد (۹).

احتمالا مواد شیمیایی موجود در دود به دلیل ایجاد تغییرات در DNA می تواند منجر به ایجاد سرطان شود ولی جزئیات مکانیسم مربوط هنوز ناشناخته است. در سالهای اخیر جهشهای وابسته به سیگار در ژن سرکوبگر تومور مربوط به (P_{53}) مورد بررسی قرار گرفته است (۲۵ و۴۴). این پروتئین در تنظیم تکثیر سلولی و ترمیم DNA آسیب دیده نقش دارد. موتاسیون در این ژن منجربه تجمع DNA آسیب دیده در سلول می گردد که عامل مهمی در پیشرفت سرطان است (۴۴).

Archive of SID

www.SID.ir

یک پک سیگار می تواند ۱۰۱۴ رادیکال آزاد در فاز قطران و ۱۰۱۵ رادیکال در فاز گازی ایجاد کند. در یک بررسی تحقیقاتی ادعا شده است که دود سیگار می تواند قدرت آنتی اکسیدانتی بزاق را تغییر دهد و کارآیی سیستم دفاعی آنتی اکسیدانت بزاق با افزایش سن کمتر می شود (۲). بررسیهای ارتباط سن با مقدار بزاق نشان داده اند که با افزایش سن سرعت جریان و حجم بزاق غیر تحریکی به صورت معنی دار کاهش می یابد (۲۶). از طرفی، هرچقدر میزان جریان بیشتر باشد قدرت پاکسازی و توانایی بافری بزاق بالاتر و احتمال حمله میکروبی کمتر می شود (۴۳).

از آنجایی که مطالعات آنزیمی روی بزاق کمتر انجام شده اند و از طرفی با توجه به اهمیت آنزیمهای آنتی اکسیدانت شامل پراکسیداز ، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز، در تحقیق حاضر به بررسی صدمات ناشی از حمله اکسیداتیو دود سیگار به فعالیت این آنزیمها در بزاق پرداخته شده است.

دود سیگار شامل رادیکالهای آزاد و مواد شیمیایی مضر است که باعث آسیب سلولی می گردد. مهم ترین این مواد عبارتند از نیکوتین، آمونیاک، آکرولین، فنول، استالدهید، بنزوپیرین، نیتروژن اکسید، کربن مونو اکسید، پولونیوم، رادیوم و توریم (۱۶ و۲۹). در میان این ترکیبات، نیکوتین اصلی ترین و فراوان ترین است و به دلیل پایداری زیاد می تواند زنجیره تنفسی میتوکندری را مختل و به افزایش تولید آنیونهای سوپراکسید و هیدروژن پراکسید منجر شود (۳۰ و ۳۶).

Bogdanska و همکاران (۲۰۰۳) پیشنهاد کردند که فعالیت آنتی اکسیدانتی و قدرت محافظتی در اریتروسیت افراد سیگاری بیشتر از غیرسیگاریهاست. بررسیهای آنها نشان داد که فعالیتCAT در ارتیرویست افراد سیگاری بیشتر است که این یافته با نتایج تحقیق حاضر مغایرت دارد (۵). از طرفی، مشابه نتایج این تحقیق، کاهش معنی دار فعالیت کاتالاز و در مردان سیگاری در مقایسه با غیر سیگاری نیز در برخی تحقیقات گزارش شده اند (۱۲).

تحقیق در مورد دو آنزیم آنتی اکسیدانت مهم بزاقی، گلوتاتیون پراکسید از و کاتالاز، نشان داده است که فعالیت هر دو آنزیم در اریتروسیت افراد سیگاری تفاوت معنی داری با افراد سالم ندارد (۵). این نتیجه نیز در مغایرت با یافته های تحقیق حاضراست که نشان دهنده کاهش فعالیت هر دو آنزیم مورد بحث در افراد سیگاری در مقایسه با گروه شاهد می باشد. در هر حال، باید توجه داشت که فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدانت از یک مکانیسم آبشاری پیروی می کند. به این معنی که کاهش فعالیت یک آنزیم موجب افزایش مواد اکسید کننده و گونه های فعال اکسیژن و ازت می شود که این امر خود موجب می شود فعالیت سایر آنزیمهای آنتی اکسیدانت افزایش یابد.

بر اساس تحقیقات کتابخانه ای، در میزان فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدانت تغییرات مثبت و یا منفی مشاهده شد که برخی نتایج تحقیق حاضر را تأیید و گاهی نیز مخالف این یافته ها دارند. به عنوان مثال، مطالعه روی موشهای آزمایشگاهی که در معرض دود سیگار قرار گرفته بودند نشان داده است که رادیکالهای آزاد باعث کاهش فعالیت آنزیمهای سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز شده و در نتیجه منجر به تجمع (H_2O_2) و هیدروپراکسیداسیون لیپیدها می شود (۳).

مشابه با یافته های تحقیق حاضر، کاهش میانگین فعالیت SOD در بزاق سیگاریها نسبت به گروه کنترل گزارش شده است (۲۰). تحقیق مذکور، همچنین بیان نموده است که میانگین فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در بزاق افراد به شدت سیگاری نسبت به کسانی که کمتر سیگار می کشند پایین تر است (۲۰). از طرفی، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در سرم و نوتروفیل سیگاریها نیز کاهش را نشان داده است. این نتایج علاوه بر تأیید یافته های این تحقیق،

Archive of SID
www.SID.ir

ارتباط بین آنزیمهای بزاق، سرم و نوتروفیل ها را اثبات می نماید.

رادیکالهای کوینون – سمی کوینون، ایجاد شده در دود سیگار، می توانند اکسیژن مولکولی را به رادیکال سوپراکسید تبدیل کنند به طوری که تولید بالای این رادیکال، موجب کاهش شدید فعالیت آنزیم گردد. بنابراین، کاهش فعالیت SOD در بزاق افراد سیگاری ناشی از غیر فعال شدن اکسیدانها در فاز دود است (۳).

Klein (۲۰۰۳) اثرات دود سیگار روی فعالیت آنزیم پراکسیداز در بزاق انسان را به صورت *in vivo* بررسی کرد. او و همکارانش ثابت کردند که قرار گرفتن در معرض دود سیگار می تواند تا حدود ۷۰ درصد از فعالیت این آنزیم را کاهش دهد (۱۸). تحقیق مذکور هم چنین نشان داد که کم شدن فعالیت آنزیم تحت کنترل فاز گازی دود سیگار اتفاق می افتد و این نتایج با یافته های تحقیق حاضر همسو است.

Rezinck و همکاران (۲۰۰۳) طی یک سری مطالعات *in vivo* و *in vitro* نشان دادند که، حتی بعد از استعمال یک نخ سیگار، افت سریع فعالیت پراکسیداز دهانی هم در افراد سیگاری و هم غیرسیگاریها اتفاق می افتد (۲۸).

هیدروژن سیانید (HCN) ماده شیمیایی مهمی است که در کاهش فعالیت پراکسیداز دهانی با دود سیگار همکاری می کند. این ترکیب در کبد به یون تیوسیانات (SCN^-) تبدیل شده و توسط غده بناگوش از پلاسما جمع شده و به حفره دهانی ترشح می شود. غلظت آن در بزاق افراد سالم حدود ۱/۵-۰/۳ میلی مولار است در حالی که مقدار مورد نظر در مبتلایان به سیگار تا حد ۴-۱/۴ میلی مولار نیز می رسد که این محدوده تغییرات به تعداد سیگار مصرفی در روز بستگی دارد (۷ و ۳۱).

تحقیقات نشان داده اند که ۲ تا۳ درصد سرطانهای جهان، از نوع دهانی هستند. از طرفی، مطالعات آماری و جمعیتی نشان داده اند که خطر ریسک سرطان دهان در سیگاریها بالاتر از غیرسیگاریهاست (۱۷ و ۲۳). در میان بیماریهای دهانی، پوسیدگی دندان معمول ترین بیماری بشر است که علی رغم جنس، طبقه اجتماعی، نژاد و سن بر تمام افراد اثر می گذارد و فاکتورهای مهمی مثل بهداشت دهان و بزاق برآن مؤثرند (۷).

استفاده از سیگار و افزایش تعداد دفعات مصرف آن می تواند یون تیوسیانات را در بزاق افزایش دهد. سیستم های بافری مربوط به تیوسیانات موجود در بزاق برای پیشگیری از پوسیدگی دندانها و شروع صحیح هضم و حفظ عملکرد آنزیمهای بزاقی اهمیت زیاد دارند. سیستم بافری تیوسیانات ($HOSCN/OSCN^-$) در بازداری از متابولیسم باکتریایی در pH پایین اهمیت بیولوژیکی زیاد دارد (۲۸). به طوری که در جدول ۱ ملاحظه می شود تغییرات pH بزاق در افراد سیگاری نسبت به داوطلبهای سالم مبنی بر این است که عمل بافری بزاق تحت اثر سیگار ضعیف شده و موجب تغییر (pH) بزاقی گردیده است. احتمال می رود که سیستم ($HOSCN/OSCN^-$) با کاهش متابولیسم کربوهیدرات و محصولات اسیدی باکتریها آن را از پوسیدگی اولیه محافظت می کند. باکتریهای فاسد کننده دندان، علاوه بر محصولات اسیدی، مقادیر قابل توجه پراکسید هیدروژن ایجاد می کنند. ایجاد (H_2O_2) موجب کاتالیز عمل پراکسیداسیون (SCN^-) می شود. بنابراین، یکی از عملکردهای مهم پیشنهادی در مورد پراکسیداز بزاقی کنترل باکتریهای دهانی است که باعث ایجاد جرم دندان و پوسیدگی می شوند. به عبارت دیگر می توان گفت بزاق غیر تحریکی اثر محافظتی مهمی بر علیه پوسیدگی دندان دارد (۲۳ و۲۶). کاهش مقدار pH در افراد سیگاری در مقایسه با گروه کنترل (حدود ۳۰ درصد) ممکن است به دلیل ترکیبات شیمیایی موجود در دود سیگار باشد که با سیستمهای بافری بزاق ترکیب و نسبت تشکیل دهنده های آنها را تغییر می دهد. انحلال ترکیبات معدنی مینای دندان در pH های کمتر از ۶/۵ نه تنها استحکام دندانها و لثه ها

Archive of SID

www.SID.ir

را کاهش می دهد بلکه فعالیت آنزیمهای بزاقی، را از طریق تغییر ماهیت ساختمان پروتئینی آنها، به شدت تحت اثر قرار می دهد. به این ترتیب، دندانهای نا سالم، لثه های خونریزی دهنده و بوی زننده دهان و دندان در افراد سیگاری قابل توجیه می شود (۲۶ و ۲۸).

در نهایت، یافته های این تحقیق تأکید می کند که سیگار نه تنها یک عادت آزار دهنده برای خود فرد و اطرافیان ایشان است، بلکه علاوه بر همه مضرات سلامتی که تا به حال گزارش شده اند، آسیب جدی روی فعالیتهای مفید بیولوژیکی بزاق و سلامت حفره دهانی دارد.

تقدیر و تشکر

حمایت مالی این تحقیق توسط دانشگاه گیلان انجام شده است که بدین وسیله مراتب قدردانی و سپاس از دانشگاه گیلان به عمل می آید.

منابع

۱. طاهری محمد، ۱۳۹۰، فعالیت آنتی اکسیدانتی و آنتی تیروزینازی چای، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه گیلان.

2. Abdolsamadi, H. R., Goodarzi, M. T., Mortazavi, H., Robati, M., Ahmadi-motemayel, F., 2011, Comparison of salivary antioxidants in healthy smoking and non-smoking men, Chang Gung Med. J, 34: 607-611.
3. Anbarasi, K., Vani, G., Balakrishna, K., Shyamala devi, C. S., 2006. Effect of *bacoside A* on brain antioxidant status in cigarette smoke exposed rats, Life Sciences, 78: 1378-1384.
4. Bello, I. O., Soini, Y., Salo, T., 2010. Prognostic evaluation of oral tongue cancer: Means, markers and perspectives (I), Oral Oncology, 46: 630-635.
5. Bogdanska, J., Korneti, P., Todorova, B., 2003. Erythrocyte superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in healthy male subjects in Republic of Macedonia, Bratisl Lek Listy. 104: 108-114.
6. Brosky, M. E., 2007. The role of saliva in oral health: Strategies for prevention and managment of xerostomia, J Support Oncol, 5: 215-225.
7. Carlsson, J., 1987, Effects of variations in pH and hypothiocyanite concentrations on *S.mutans* glucose metabolism Biochem J Oral Pathol, 16: 412-416.
8. Chen, C. L., Chi, C. W, Lin, T. Y., 2002, Hydroxyl radical formation and oxidative DNA damage induced by areca quid *in vivo*. J Toxical Environ Health, 63: 327-336.
9. Cooley, M. E., Sarna, L., Kotlerman, J., Lukanich, J. M., Jaklitsch, M., Green, S. B., Bueno, R., 2009, Smoking cessation is challenging even for patients recovering from lung cancer surgery with curative intent. Lung Cancer. 66: 218-225.
10. Damirchi, A., Sariri, R., Kiani, M., Jafarian, V., 2010, Response of salivary peroxidase to exercise intensity. European Journal f Applied Physiology. 108: 1233-1237.
11. Fang, X., Netzer, M., Baumgartner, C., Bai, C., Wang, X., 2012, Genetic network and gene set enrichment analysis to identify biomarkers related to cigarette smoking and lung cancer, Cancer Treatment Reviews, In Press, Corrected Proof, Available online.
12. Firoozri, M., Mehrabi, H., Ehsani, A., Najafi,M., Ghaffari, M., 2007, Activities of anti-oxidative enzymes, catalase and glutathione reductase in red blood cells of patients with coronary artery disease, Asian Journal of Biochemistry, 2: 437-440.
13. Free Natural Health E book. http://www.remedies4.com/.
14. Ginsburg, I., Koren, E., Shalish, M. J. Kanner, J., Kohen, R., 2012, Saliva increases the availability of lipophilic polyphenols as antioxidants and enhances their retention in the oral cavity, Archives of Oral Biology, In Press, Corrected Proof, Available online.
15. Han, D., E., Williams, E., Cadenas, E., 2001, Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. Biochem, J 353:411-416.
16. Hemalatha, A., Venkatesan, A., Bobby, Z., Selvaraj, N., Sathiyapriya, V, 2006, Antioxidant response to oxidative stress induced by smoking, Indian J Physiol Pharmacol 50: 416-420.
17. Huang, R. Y., Chen, G. G., 2011, Cigarette smoking, cyclooxygenase-2 pathway and cancer

Archive of SID
www.SID.ir

Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Reviews on Cancer, 1815: 158-169.
18. Klein, I., Nagler, R. M., Toffler, R., Vliet, A. V., Reznick, A. Z., 2003, Effect of cigarette smoke on oral peroxidase activity in human saliva: Role of hydrogen cyanide, Free Radical Biology and Medicine, 35: 1448-1452.
19. Kumar, S. 2011, Free radicals and antioxidants: Human and food system. Advances in Applied Science Research, 2: 129-135.
20. Mahapatra, K. S., Das, S., Dey, K. S., Roy, S., 2008, Smoking induced oxidative stress in serum and neutrophil of the university students, Al Ameen Journal Medical Sciences, 1: 20-31.
21. Mognetti, B., Di Carlo, F., Berta, G. N., 2006, Animal models in oral cancer, Research Oral Oncology, 42: 448-460.
22. Nagler, R. M., Klein, I., Zarzhevsky, N., Drigues, N., Reznick, A. Z., 2002, Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva Free, Radical Biology and Medicine, 32: 268-277.
23. Pendyala, G., Thomas, B., Kumari, S., 2008, The challenge of antioxidants to free radicals in periodontitis, Journal of Indian Society of Periodontology, 12: 24-27.
24. Peterson, L. A., Urban, A. M., Hecht, S. S., 2010, Carcinogenic Effects of Cigarette Smoke on the Respiratory Tract, Comprehensive Toxicology (Second Edition), 8: 351-377.
25. Phillips, D. H., Hewer, A., Scholefield, J. H, Skinner, P., 2004, Smoking-related DNA adducts in anal epithelium, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 560: 167-172.
26. Preethi, B., Pyati, A., Dodawad, R., 2010, Evaluation of flow rate, pH, buffering capacity, calcium, total protein and total antioxidant levels of saliva in caries free and caries active children-An *in vivo* study, Biomedical Research, 21: 289-294.
27. Rezaei, A., Sariri, R., 2011, Periodontal Status, Salivary Enzymes and Flow Rate in Passive Smokers, Pharmacologyonline, 3: 462-476.
28. Reznick, Z. A., Klein, I., Eiserich, P. J., Cross, E. C., Nagler, M. R., 2003, Inhibition of oral peroxidase activity by cigarette smoke: *In vivo* and *in vitro* studies Free Radical Biology and Medicine 34: 377-384.
29. Roemer, E., Stabbert, R., Rustemeier, K., Veltel, D. J., Meisgen, T. J, Reininghaus, W., Carchman, R. A., Gaworski, C. L., Podraza, K. F., 2004, Chemical composition, cytotoxicity and mutagenicity of smoke from US commercial and reference cigarettes smoked under two sets of machine smoking conditions Toxicology, 195: 31-52.
30. Rustemeier, K., Stabbert, R., Haussmann, H. J., Roemer, E., Carmines, E. L., 2002, Evaluation of the potential effects of ingredients added to cigarettes. Part 2: Chemical composition of mainstream smoke Food and Chemical Toxicology, 40: 93-104.
31. Sariri, R., Varasteh, A., Erfani, A., Rezaei, A., Heidari, Z., 2010, Inhibition of salivary peroxidase by cigarette smoke, Health, 2: 347-351.
32. Sarma, A. D, Mallick, A. R., Ghosh, A. K., 2010, Free radicals and their role in different clinical conditions: An overview. International Journal of Pharma Sciences and Research, 1:185-192.
33. Skolimowski, J. J., Cieślińska, B., Żak, M., Osiecka, R., Błaszczyk, A., 2010, Modulation of ethoxyquin genotoxicity by free radical scavengers and DNA damage repair in human lymphocytes, Toxicology Letters, 193: 194-199.
34. Smith, C. J., Perfetti, T. A., Garg, R., Hansch, C., 2003, ARC carcinogens reported in cigarette mainstream smoke and their calculated log P values, Food and Chemical Toxicology, 41:807-817.
35. SOD activity, Catalog No. ADI -900-15, Enzo® Life Sciences.
36. Sohal, S. R., 1997, Mitochondria generate superoxide anion radicals and hydrogen peroxide, The FASEB Journal, 11: 33-36.
37. Superoxide dismutase kit, Catalog number: 5700-100-k, Reagent kit for the analysis of superoxide dismutase in cell extracts.
38. Svend, J., Jensen, K., 2003, Oxidative stress and free radicals Journal of Molecular Structure: Theochem 666: 387-392.
39. Ulus, A. T., Aksoyek, A., Ozkan, M., Katircioglu, S. F., Basu, S., 2003, Cardiopulmonary bypass as a cause of free radical-induced oxidative stress and enhanced blood-borne isoprostanes in humans, Free Radical Biology and Medicine 34: 911-917.
40. Urbanska, A., 2007, Location and variability of catalase activity within aphids Electronic Journal of Agricultural Universities 10: 2-19.
41. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, T. D. M., Mazur, M., Telser, J., 2007, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 39: 44-84.
42. Wallace, S. S., 2002, Biological consequences of free radical-damaged DNA bases Free Radical Biology and Medicine 33: 1-14.

Archive of SID

www.SID.ir

43. Wu, P. K., Ke, J. Y., Chung, C. Y. C. L., Chen, H. T. L., Chou, M. Y., Wong, A. K., Hu, C. F., Lee, Y. C., 2008, Relationship between unstimulated salivary flow rate and saliva composition of healthy children in Taiwan Chang Gung Med J 31: 281-286.
44. Yu, H. P., Zhang, X. Y., Wang, X. L., Shi, L. Y., Li, .Y. Y., Li, F., Su, Y. H., Wang, Y. J., Lu, B., Sun, X., Lu, W. H., Xu,S. Q., 2004, DNA repair gene XRCC1 polymorphisms, smoking, and esophageal cancer risk, Cancer Detection and Prevention, 28: 194-199.
45. Yun, Y. H., Jung, K. W., Bae, J. M., Lee, J. S., Shin, S. A., Park, S. M., Yoo, T., Huh, B. Y., 2005, Cigarette smoking and cancer incidence risk in adult men,. National Health Insurance Corporation Study Cancer Detection and Prevention, 29: 15-24.

Variations in biological activity of salivary enzymes of smokers

Ghadimi A.[1], Sariri R.[2], Aryapour H.[3], Erfani A.[4] and Nosratabadi F.[5]

[1] Biology Dept., Science and Research Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, I.R. of Iran

[2] Biology Dept., University of Guilan, Rasht, I.R. of Iran

3 Biology Dept., Faculty of Science, Golestan University, Gorgan, I.R. of Iran

[4] Internal Medicine Dept., Guilan University of Medical Science, Rasht, I.R. of Iran

[4] Biochemistry Dept., Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Cigarette smoke contains a considerable number of dangerous chemicals which are toxic to all parts of human body, especially to oral cavity. Human saliva is the first line of defense that encounters these toxic agents. Therefore, saliva could be thought as a non-invasive research tool to monitor alternations in biochemistry of body fluids due to toxic chemicals. The aim of this research was to investigate the effect of cigarette smoke on activity of enzymatic antioxidants of saliva including peroxidase and superoxide dismutase. In practical section, a group of 20-25 years old smoker men entered the study and their salivary antioxidants were compared with a similar group of non-smokers. Un-stimulated saliva was collected in sterile tubes and kept frozen at -70°C after being centrifuged. The activity of peroxidase and superoxide dismutase was the measured using their specific substrates under assay conditions. The results showed that, within experimental errors, the activity of peroxidase was decreased significantly in the smoker group ($P \leq 0.001$) as compared to non-smokers. Super oxide dismutase was also less active in the saliva of smokers. It is suggested that toxic chemicals in cigarette smoke could have acted as inhibitors of mentioned enzymes in saliva of smokers. A significant decrease in saliva flow rate and pH was also observed among smokers with respect to non-smokers. Calling the important contributing role of antioxidant enzymes in the defense system of saliva opens a novel new insight into smoking habit.

Key words: Un-stimulated saliva, salivary enzymes, superoxide dismutase, smokers.

Archive of SID

www.SID.ir