فصلنامه پژوهش در علوم، مهندسی و فناوری
دوره ۸، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱
صفحات ۱۷۸-۱۸۷
ISSN: 2476-5082
www.uctjournals.com

اثر برخی داروهای فشار خون بر روی فعالیت آنزیم پراکسیداز

مهرداد نوبخت وکیلی
کارشناس ارشد، گروه علوم پایه، رشته بیوشیمی، دانشگاه کردستان، ایران vakilimehrdad777@gmail.com

چکیده
آنزیم پراکسیداز با شماره کمیته EC 1.11.1.7 جزء پروتیین های هم دار می باشد که وظیفه اصلی آنها اکسیداسیون سوبستراهای مختلف با استفاده از پراکسید هیدروژن می باشد. به دلیل نقش این آنزیم در حذف رادیکالهای آزاد و بالا بودن قدرت کاتالیتیکی کاربرد وسیعی در صنعت پزشکی و عرصه بیوشیمی دارد.ازطرفی، استفاده از داروهای پائین آورنده برای بیمارانی که دچار این عارضه هستند امری ضروری و غیر قابل چشم پوشی است. در هر حال، مانند بسیاری داروهای دیگر، مصرف آنها ممکن است عوارض جانبی داشته باشد که برخی از این اثرات هنوز ناشناخته اند. هدف از این تحقیق، بررسی اثر برخی داروهای فشار خون موجود که توسط متخصص به بیماران تجویز می شوند و از طریق مکانسیم های مختلف عمل می کنند روی آنزیم پراکسیداز می باشد. در عمل، ابتدا فعالیت آنزیم پراکسیداز در حضور غلظت های مختلف داروهای مورد نظر، آتنولول، لوزارتان و کاپتوپریل، بررسی و درصد فعالیت آنزیم مشخص گردید. نتایج نشان دادند که این اثرات که در برخی موارد به صورت کاهش و در برخی افزایش فعالیت پراکسیداز بروز نمودند. سپس با تغییر دادن غلظت یکی از سوبستراها در حضور غلظت IC50 این ترکیبات فعالیت آنزیم اندازه گیری و مقادیر Km وVmax آنها محاسبه شد. از طرفی، میزان برگشت پذیری 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 برگشت پذیر است.

واژه‌های کلیدی: پراکسیداز، مهارکننده‌های آنزیم، فعال‌کننده‌های آنزیم، فشارخون

۱- مقدمه

وقتی صحبت از موجودات زنده می شود، واکنش های بیوشیمیایی مطرح می گردند که به واسطه آنها فرآیندهای مختلف سلولی به انجام می رسند. اختلال در این واکنش ها منجر به اختلال در فعالیت سلولی و بروز ناهنجاری ها و بیماری های مختلف می گردد. یک واکنش انرژی زا لزوما به سرعت پیشرفت نمی نماید. مسیر تبدیل واکنشگر ها به محصولات تقریبا همیشه مواجه با یک سد انرژی به نام سد فعالسازی می باشد که می بایست برای انجام هر واکنش بر آن فائق آمد. شکستن پیوندهای موجود و ایجاد پیوندهای جدید، عموما نیاز به تغییر شکل پیوندهای موجود و ایجاد یک حالت انتقالی با انرژی آزاد بیش از واکنش گر یا محصول، دارد بلندترین نقطه در این شکل واکنش، حالت زودگذر را نشان می دهد (۱).

در واقع هر واکنش شیمیایی سلول تنها به دلیل وجود آنزیم ها با سرعت قابل اندازه گیری به انجام می رسند. آنزیم ها بیو کاتا لیستهایی هستند که همانند تمامی کاتالیستهای دیگر بدون مصرف شدن ، منجر به افزایش شدید سرعت واکنش های شیمیایی اختصاص می گردند. آنزیم ها سد انرژی بین واکنش گر و محصول راکاهش می دهند. اندازه گیری فعالیت آنزیم ها در پلاسما، گلبول قرمز با نمونه های بافتی در تشخیص بعضی از بیماری ها دارای اهمیت است. بسیاری از داروها اثر خود را از طریق انجام واکنش با آنزیم ها اعمال می نمایند. آنزیم ها ابزار عملی مهمی در پزشکی و در صنعت شیمی می باشند (۲).

پراکسیدازها

پراکسیدازها محدوده وسیعی از آنزیم ها شامل آنزیمهای اختصاصی نظیر NAD پراکسیداز و آنزیم های غیر اختصاصی از منابع مختلف می باشند شماره کمیته آنزیمی این دسته از آنزیم ها EC1.11.1.7 می باشند. عدد اول (۱) نام کلاس (اکسید و ردوکتازها) آنزیم را مشخص می کند. عده دوم (۱۱) مربوط به زیر کلاس است نخستین بار اسکو نبین در سال ۱۸۵۵ به این دسته از پروتئین ها پی برد و نام پراکسیداز را لینو سیر در سال ۱۸۹۸ بر آنها نهاد. پراکسیداز دهیدروژناسیون تعداد زیادی از مواد نظیر فنل ها ، گوایاکل و پیر و کالل را کاتالیز می کند. جزء چند مورد استثناء آنزیم های دارای شماره 1.11.1.7 همگی هموپروتئین هستند. این آنزیمها تقریبا در همه جای طبیعت حضور دارند و اعمال فیزیولوژیک متنوعی را انجام می دهند واکنش طبیعی که پراکسیداز ها آن را کاتالیز می کنند شامل انتقال هیدروژن یا الکترون از یک دهنده به H_2O_2 است. اما مثال هایی از این آنزیم ها می توان یافت که مشابه اکسیدان ها و مونو اکسیژناز ها عمل می کنند (۳).

در واکنش های کلاسیک پراکسیداز ، ویژگی برای دهنده هیدروژن کم بوده اما نسبت به پراکسید بالاست. بنابر این مشخص است که بجز تنها ترکیب دارای گروه OH-0 نظیر – استیل ، – متیل می توانند بعنوان سوبسترای گیرنده هیدروژن عمل کنند. ثابت سرعت برای H202 در میان گیرنده های هیدروژن چندین برابر سایرین است و این در حالی است که میان دهنده های هیدروژن تفاوت بسیار زیاد نیست. پراکسیدازهای هم دار در جانوران، گیاهان عالی نظیر انجیر، ترب کوهی، تنباکو و در مخمرها، جلبکها و باکتریها وجود دارند. در پستانداران این آنزیم ها در لوکوسیتها ، شیر ، جگر، طحال ورحم، غدد بزاقی، دیواره لوله گوارش، شش ها و ... وجود دارد .جایگاه درون سلولی آنها سیتوپلاسم، میتوکندری، میکروزومها و احتمالا لیزوزمهاست (۴).

نامگذاری و طبقه بندی پراکسیداز

در این دسته آنزیم ها پر اکسیداز ترب ، پراکسیداز جو، پراکسیداز گوجه فرنگی، پراکسیداز Arabidopsis . پراکسیداز Prostaglandin Hsynthase, Cinereus Coprinrs قرار می گیرند. عدد ۱۱نشان دهنده یک الکترون دهنده اختصاصی باید باشد. اما در مورد پراکسیدازها مولکول های دهنده الکترون مختلف هستند و مولکولی خاص را شامل نمی شود (۵). علاوه بر هم پراکسیداز ها ، اعداد (۱،۱۱،۱) NADH پراکسیداز (۱، ۱،۱،۱۱)NADPH پراکسیداز (۱،۱۱،۱،۲). گلوتاتیون پراکسیداز (۱،۱۱،۱،۲) که آنزیم های کاملا متفاوت هستند را نیز تحت پوشش قرار می دهد. پراکسیداز ها به روش های متفاوت نامگذاری می شوند که می توان به نامگذاری بر اساس منبع آنزیمی ژن کد کننده پروتئین و طبقه بندی، IUB ،Welinder اشاره نمود (۶).

نامگذاری پراکسیداز ها بر اساس منبع در برخی مواقع پراکسیدازها بر حسب منبع نامگذاری می کنند. بعنوان نمونه می توان پراکسیداز Horseradish را نام برد. گاهی اوقات نیز بر اساس نوع سوبسترا آنها را نامگذاری می کنند. بعنوان مثال می توان به منگنز پراکسیداز اشاره کرد (۷).

نامگذاری بر اساس ژن کد کننده در حال حاضر با پیشرفت بیولوژی مولکولی ژن کد کننده اکثر پروتئین ها در حال شناسایی است. در مورد پراکسیدازها نیز در صورت مشخص بودن ژن می توان از نام ژن استفاده کرد مثلا برای نامیدن cytochrome p450 از سه حرف CYP استفاده نمود (۸).

طبقه بندی Welinder Welinder در سال ۱۹۹۲ پراکسیداز ها را بر اساس خواص ساختمان شان به دو خانواده بزرگ پراکسیداز های گیاهی و جانوری تقسیم کرد که در این تقسیم بندی پراکسیداز های گیاهی به سه دسته و پراکسیداز های جانوری به دو دسته تقسیم می شوند (۹).

سوبسترای پراکسیداز آنزیم پراکسیداز دارای سوبستراهای متنوعی است که تا کنون بیش از یکصد و هفتاد نوع سوبسترا برای این آنزیم گزارش شده است. از جمله آنها می توان به پیرو گالل – هیدرو کوییتون – گوایاکل و ... اشاره کرد (۱۰).

کاربردهای صنعتی و پزشکی پراکسیداز

بطور کلی آنزیمها چه در صنعت و چه در زمینه پزشکی موارد استفاده وسیعی دارند. که از این موارد می توان به تخمین قندها، اندازه گیری کلسترول خون و تخمین میزان اسید اوریک، اسید استیک یا اسید چرب، اسید لاکتیک، اسید پیر و یک، بیو ترانسفورماسیون لیگنین، ترکیبات فنلی ساخت کاغذ، حفاظت از چوب و واکنش های پلیمریزاسیون در شیمی برای تولید پلی فنل ها ، پلی آنیلین و ونیل پلیمر و در ایمونولوژی در ELISA بیوسنسورها، دستواره DNA و وسترن بلات اشاره کرد. در ادامه به برخی از واکنش هایی که طی آن برخی از مواد نامبرده تعیین می شود اشاره می شود:

آنزیم های یافت شده در پلاسما دو نوعند: یکسری آنهایی هستند که به طور طبیعی در پلاسما حضور دارند و دارای نقش عملکردی می باشند و سری دیگر آنزیم هایی هستند که از بافت ها به داخل پلاسما آزاد می شوند. البته این آنزیم ها نیز می توانند بطور طبیعی در سطح بسیار پایین در پلاسما حضور داشته باشند ولی هیچ نقش عملکردی در پلاسما ندارند. ولی برای اهداف تشخیصی مهم ترین هستند. آنزیم ها در آنالیزهای بالینی برای اهداف غربالگری استفاده می شوند به عنوان مثال سنجش کلسترول و تری اسیل گلیسرون می توان در مقادیر کم در پلاسما انجام شود. کلسترول اکسیداز برای تعیین کلسترول بکار می رود آنزیم ها در طول یک دو لایه با فاکتورها و معرف های لازم بی حرکت می شوند و وقتی که احیاء می شوند بر کروموفور تبدیل می شوند. در مورد کلسترول اکسید از H_20 یک محصول واکنش اکسیداسیون است و پراکسید تشکیل شده یک ماده رنگی را با واسطه آنزیمی دیگری که یک پراکسیداز است به محصول رنگی تبدیل می کند (۱۱).

از کاربردهای دیگر می توان استفاده از پراکسیداز در روش الایزا اشاره کرد. شیمی بالینی مدرن ترکیبی از شیمی و ایمنولوژی آنزیم می باشد. آنتی بادی اختصاصی یک انتی ژن پروتئینی با یک آنزیم معرف مثل پراکسیداز ترب کوهی جفت می شوند تا یک سنجش بسیار اختصاصی و حساس را ایجاد کند. بعد از اتصال آنتی بادی جفت شده با پراکسیداز به آنتی ژن پراکسیداز برای تولید یک محصول رنگی استفاده می شود که این محصول قابل اندازه گیری است و غلظش متناسب با مقدار آنتی ژن در یک نمونه است. بخاطر طبیعت کاتالیتیک آنزیم سیستم سیگنال را بسیار تقویت می کند به این سنجش نام اختصاری الایزا (ELISA) داده شده است. اغلب در الایزا مثلا برای آزمایش حضور آنتی ژن های پروتئینی پوشش ویروس نقص ایمنی انسانی HIV از پراکسیداز ترب کوهی به عنوان یک معرف استفاده می شود. بخاطر طبیعت کاتالیتیک گروه منتقل کننده که یک آنزیم پراکسیداز است، سنجش پیام را تقویت می کند. چنین سنجش های آنزیمی تقویت کننده ای اجازه می اندازه گیری بسیار جزئی آنتی ژن ها را می دهد (۱۲).

سنتیک واکنش های آنزیم های چند سوبسترایی بسیاری از مشخصات سنتیک آنزیم ها به طور منطقی از مفاهیمی که در سنتیک سایر واکنش های شیمیایی بدون حضور کاتالیزورها وجود دارد بدست می آید. در بسیاری از واکنش های آنزیمی دو و گاهی بیش از دو مولکول سوبسترا مختلف به آنزیم متصل شده و در واکنش شرکت می نمایند (۱۳).

– ضرورت مطالعه مهارکننده ها در واکنش های آنزیمی: بیشتر دانش پایه، درباره مسیر های متابولیک با استفاده از مهار کننده های آنزیمی خاصی بدست آمده است. ترکیبات دارویی در حال حاضر به عنوان مهار کننده آنزیمی های خاص طراحی می شود و بسیاری از ترکیبات طبیعی هم مهار کننده هستند. در تولید داروهای سنتزی باید دقت فراوانی بر نحوه اثر و مکانیسم دارو و عوارض جانبی احتمالی آن شود زیرا ممکن است داروی طراحی شده اثر مورد نظر را بر روی سایت مورد نظر داشته باشد اما از سوی دیگر بر روی سایر آنزیم ها و بافت ها اثر مخرب داشته باشد بهمین دلیل طراحی مهار کننده یا فعال کننده آنزیمی از مباحث مهم بیو شیمی دارویی می باشد. از نمونه های داروهای ساخته شده که روی آنزیم اثر دارد. آلوپورنیول است که در درمان نقرس کاربرد دارد. بیماری از ساخته شدن بیش از حد اسید اوریک است که یک مشتق پورینی محسوب می شود، ناشی میشود. آخرین مرحله متابولیسم پورین توسط گزانتین اکسید از کاتالیز می شود. آلوپور نیول یک آنالوگ ساختاری گزانتین و یک مهار کننده آنزیمی می باشد (۱۴).

– مهار آنزیمی : مهار کننده ها ترکیباتی هستند که باعث کاهش سرعت واکنش های آنزیمی شوند. گرچه برخی روی سوبسترا و کوفاکتور اثر می گذارند. مهارکننده ها خود به دو دسته برگشت پذیر و برگشت ناپذیر تقسیم می شوند.

مهار کننده های برگشت ناپذیر

انواعی از مهار کننده ها هستند که به یک گروه عامل ضروری برای فعالیت آنزیم متصل و یا آن را از بین می برند و یا سبب ایجاد یک ترکیب پایدار غیر کووالان با آنزیم می شوند. تشکیل یک اتصال کووالان بین یک مهار کننده برگشت ناپذیر و آنزیم معمول می باشد. پنی سیلین آنزیم ترانس پپتیداز transpeptidase را که در سنتز دیواره سلولی باکتریایی نقش دارد به طور برگشت ناپذیر غیر فعال می کند. یونهای فلزات سنگین (Hg^{2+}, Ag^{+}) و عوامل اکسید کننده باعث کاهش فعالیت آنزیمی شوند این ترکیبات اسید آمینه های موجود در آنزیم را که نقش مهم در روند کاتالیز دارند دچار تغییر شیمیایی میکنند که به راحتی قابل برگشت نمی‌باشند. در مثال دیگر، آسپرین (استیل سالیسیلات) آنزیم کاتالیز کننده اولین مرحله سنتز پروستاگلاندین ها را که در ایجاد درد موثر اند مهار می کنند که از نوع مهار برگشت ناپذیر می باشد.

الکتروفورز

با توجه به اینکه در مطالعات سنتیکی خالص بودن نمونه اهمیت زیادی دارد، انجام عمل الکتروفورز برای اطمینان از خالص بودن آنزیم اجتناب ناپذیر می باشد. الکتروفورز ژل پلی اکریلامید PAGE در این نوع از الکتروفورز از بستر ژل پلی اکریلامید استفاده شده است که این ژل به کاهش انتشار مولکول ها کمک می کند و سبب می شود تا اجزاء جداشده در نواحی مجزایی قرار بگیرند و بین آنها تفکیک بالایی وجود داشته باشد. از برتری های این ژل می توان به یکنواختی و آسان تهیه شدن آن اشاره کرد (۱۵).

در PAGE اثر غربال مولکولی با اندازه بار مولکول فاکتور اصلی در جداسازی است. همچنین در الکتروفورز عبور هر ذره از ژل بستگی به اندازه نسبی ذره و منافذ ژل دارد . اندازه منافذ ژل را می توان با تغییر در صد مونومر و یا مولکول پیوند دهنده عرضی تغییر دارد مطالعات نشان داده که طی PAGE تحرک مولکولها تحت تأثیر فاکتورهای متعددی است که روی طول متوسط زنجیره پلی اکریلامید موثرند. کاربرد جالب اکریلامیدژل الکتروفورز جدا شدن مولکولهای حلقوی از خطی است . یافتن غلظتی از ژل که فقط به مولکول های خطی اجازه نفوذ به ژل را بدهد امکان پذیر است (جرم مولی مشخص است). مشاهده DNA دو رشته ای با افزودن رنگ فلورسانس اتیدیوم بروماید بسیار آسان تر است. این نوع رنگ می توانند DNA و RNA و پروتئین ها را مشخص نمایند بطوری که هر کدام را به یک رنگ متفاوت در می آورند. بطور کلی از لحاظ تغییر ماهیت دادن مخلوط پروتئین برای جداسازی الکتروفورز به دو دسته تقسیم می شود:

الف) Naturing PAGE : پروتئین ها بدون تخریب ساختار تحت عمل الکتروفورز قرار می گیرند.

ب) DenaturingPAGE : در این روش ابتدا پروتئین ها را تغییر ساختار داده و سپس الکتروفورز روی آنها انجام می شود که رایج ترین آنهاSDS – PAGE می باشد.

آماده سازی آنزیم

استوک اولیه آنزیم برای سنجش بسیار غلیظ می باشد . برای رسیدن به جذب مورد نظر ابتدا دستگاه اسپکتروفتومتر با استفاده از دو سو بستر ای ساخته شده با حجمهای مساوی 495ML (نمونه شاهد) صفر می کنیم سپس در سال نمونه 475ML از سوبسترای اول و 475ML سوبسترای دوم می ریزیم و در یک میکرو تیوپ مقداری از آنزیم و همراه با بافر فسفات مخلوط کرده و از آنزیم رقیق شده به میزان 50uL بر داشته و سرعت واکنش آنزیمی را بصورت جذب علیه زمان در طول موج ۵۱۰nm بدست می آوریم بهترین فعالیت آنزیم در محدوده جذب ۰/۰۹-۰/۰۴ می باشد. تغییرات جذب متناسب با مصرف سوبسترا و تولید محصول رنگی می باشد (۱۶).

آماده سازی نمونه برای الکتروفورز

در یک ظرف کوچک درب دار مثل میکروتیوپ، یک حجم بافر نمونه ساخته شده را به چهار نمونه پروتئینی اضافه می کنیم. میکروتیوپ ها را به مدت ۵ دقیقه در ظرف آب جوش قرار می دهیم. برای حصول اطمینان از عدم ورود آب به داخل میکروتیوپ ها، از پارافین استفاده می شود. سپس با استفاده از سرنگ هامیلتون ۱۰ تا ۳۰ میکرولیتر از هر نمونه را به دقت در چاهک ها می ریزیم. وجود گلیسرول یا ساکارز در بافر نمونه باعث سنگین شدن نمونه و قرار گرفتن در ته چاهک می گردد.

رنگ آمیزی با کوماسی بلو رنگ آمیزی کوماسی بلو رایج ترین نوع رنگ آمیزی ژل می باشد.

۱- محلول رنگ آمیزی : ۰/۲۵ گرم کو ماسی بلو ۲۵۰ – R رادر ۱۲۵ میلی لیتر متانول حل می کنیم. سپس۲۵ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال و ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه می کنیم.

۲- محلول رنگبر: به ۲۰۰ میلی لیتر متانول، ۱۰۰ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال و ۷۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه می کنیم.

روش کار: ژل را به مدت دو تا چهار ساعت در محلول رنگ تهیه شده بر روی shaker قرار می دهیم. پس از طی شدن زمان لازم، تخلیه رنگ و شستشوی ژل با آب مقطر انجام می گیرد. محلول رنگبر را به ظرف محتوی ژل اضافه می کنیم. با گذشت زمان و تیره شدن رنگبر آن را با رنگبر تازه تعویض می نماییم. این کار را آن قدر تکرار می کنیم تا رنگبری بطور کامل انجام گیرد و باندهای روی ژل کاملا هویدا گردند. باندهای ایده آل باندی است که همه قسمتهایش بطور یکنواخت رنگی شده است (۱۷).

تعیین غلظت پروتئین

– روش Brad ford روش براد فورد مناسب ترین روش در تعیین غلظت پروتئین ها می باشد. اتصال رنگ کوماسی برلیانت بلو به پروتئین در محیط اسیدی، تغییر طول موج جذب حداکثر (max۸) رنگ از ۵۶۵ نانومتر به ۵۹۰ نانومتر را موجب می شود. به این ترتیب جذب در ۵۹۰ نانومتر رابطه مستقیم با غلظت پروتئین دارد. شکل پروتونه کوماسی بلو به رنگ خرمایی و شکل غیر پروتونی آن آبی است. زمانی که پروتئین ها در یک محلول اسیدی به کوماسی بلو متصل می شوند. بارهای مثبت شان پروتونه شدن را متوقف نموده و منجر به تشکیل رنگ آبی خواهد شد. برتری روش برادفورد به روش لوری عدم تاثیر پذیری آن از ساکارز، بافر، عوامل احیا کننده و شلاته کننده ها است. از طرفی از یک معرف استفاده می شود. لذا سرعت عمل آن بیشتر است. باید توجه داشت که رنگ برای مدت زمان کم قبل از رسوب کمپلکس رنگ – پروتئین، پایدار است. محدودیت دیگر این است که پروتئین ها با وزن مولکولی کمتر از ۳۰۰۰ دالتون را نمی توان اندازه گیری نمود که این محدودیت خود می تواند مزیتی نسبت به روش لوری محسوب شود. چون در عصاره خام به علت وجود اسیدهای آمینه و پپتیدهای کوچک خطاهایی در سنجش پروتئین بوجود می آید که با استفاده از روش براد فورد از آنها جلوگیری می شود (۱۸).

روش کار Bradford پس از حل نمودن ۱۰۰ میلی گرم پودر کوماسی برلیانت بلو ۲۵۰–G در ۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ مقدار ۱۰۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۸۵٪ به آن اضافه می کنیم. سپس محلول حاصل با آب مقطر به حجم ۱ لیتر می رسانیم و با

کاغذ صافی صاف می کنیم. این محلول را تا حدود ۶ ماه در دمای ۴۰ قابل نگهداری است. برای ساختن پروتئین استاندارد از آلبومین سرم گاوی (BSA) استفاده می شود. ۱۰ میلی گرم BSA را با آب مقطر به حجم نهایی ۱ میلی لیتر می رسانیم. یک میلی لیتر از آن را با اضافه کردن ۹ میلی لیتر آب ده بار رقیق کرده و غلظت پروتئین بهmg/ml ۱می رسانیم.

روش کار

برای ادامه کار به بافر۷,۲ = PH با مولاریته 0/2M به حجم ۵/۱ لیتر برای هر ماده نیاز داریم. سوبسترا ها را در حجم ۲۵ میلی لیتر درست می کنیم. در یکی از کیسه های دیالیز که از قبل آماده شده بود، نمونه آنزیمی مورد نظر بدون ترکیب ریخته و در کیسه دیگر نمونه آنزیمی با همان غلظت أما در حضور IC50 ترکیب مورد نظر می ریزیم. بعد از بستن کیسه ها آنها را داخل ارلن حاوی بافر فسفات به مدت ۶ ساعت در دمای ۴۰ روی استریر قرار می دهیم. هر ۲ ساعت یکبار بافر فسفات داخل ارلن را عوض می کنیم. در پایان در حضور سوبستراها فعالیت نمونه دیالیز شده را با دستگاه اسپکتروفتومتر می خوانیم.

بحث و نتیجه گیری

تکنیک الکتروفورز

همانطور که قبلا ذکر شد، اطمینان خاطر از خالص بودن آنزیم در تحقیقات سینتیکی اهمیت بسیاری دارد زیرا وجود ناخالصی ممکن است بر فعالیت آنزیم اثر داشته و باعث خطا در نتایج نهایی گردد. از این رو قبل از شروع کار، الکتروفورز-SDS PAGE بکار گرفته شد. با توجه به تک باند بودن نمونه می توان از خلوص آنزیم اطمینان پیدا کرد.

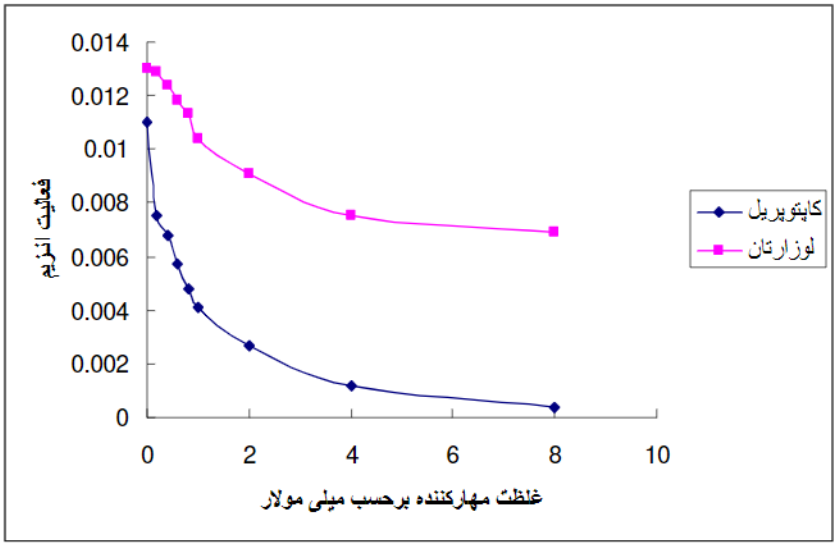
عوارض جانبی دارو از دیر باز دغدغه خاطر داروسازان و بیوشیمیست ها بوده و می باشد. اینکه داروی ساخته شده روی سایت مورد نظر درست عمل کند تنها کافی نیست. ممکن است دارو اثر مورد نظر را داشته باشد ولی از سوی دیگر تاثیر منفی بر دیگر ارگان های بدن داشته باشد. از این رو مطالعه برای عوارض جانبی داروها در کنار تولید آنها دارای اهمیت می باشد . در این تحقیق سعی شده اثر برخی داروهای ضد فشار خون را بر روی آنزیم پراکسیداز مورد بررسی قرار بگیرد. شرایط پاتولوژیکی که برای رویدادهای قلبی – عروقی مانند فشار بالا مطرح می شوند با فشار اکسیداتیو در ارتباط می باشند . چند آنزیم ترشح شده در بافت عروقی تولید و تجزیه انواع اکسیژن واکنش پذیر را بر عهده داشته و افزایش فعالیت آنزیم های اکسیدان کننده و یا کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان کننده ممکن است باعث بر هم زدن تعادل در فشار اکسیداتیو شود.اکسیژن واکنش پذیر (ROS) شامل مولکول های بیو اکتیو با عمر کوتاه بوده که از کاهش اکسیژن مولکولی (۰) حاصل می شوند. در شرایط فیزیولوژیکی نرمال شکل گیری و عرضه ROS در دیواره عروقی متعادل میباشد.

منبع اصلی ROS در سلول های عروقی توسط NADPH اکسیداز شکل می گیرد . زیر واحدهای این آنزیم پس از انتقال الکترون به ۰۲، رادیکال های سوپر اکسید تولید می کنند. از جمله آنزیم های اکسیدان کننده دیگر می توان به گزانتین اکسیداز و میلو پراکسیداز اشاره کرد. آنزیم اول در اکسیداسیون گزانتین و هیپو گزانتین در طول متابولیسم پورین ، تولید سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن می کند و میلو پر اکسیداز نیز در تولید اسید هیپو کلوروز نقش دارد. از منابع دیگر ROS بجز سلول های عروقی می توان به زنجیره انتقال الکترون میتوکندری یا ایزوزیمهای سیتوکروم ۴۵۰ p و ... اشاره کرد که منجر به توسعه بار رادیکال اکسیژن عروقی می شوند. در مقابل آنزیم های آنتی اکسیدان کننده نیز وارد عمل می شوند . سوپر اکسید دیسموتاز سیستم دفاعی در مقابل سوپر اکسید در سلول های عروقی می باشد . گلوتاتیون پر اکسیداز نیز به طور موثر پر اکسید هیدروژن و پر اکسید لیپیدی را به آب و الکل های لیپیدی کاهش می دهد. کاتالاز آنزیم آنتی اکسیدان کننده درون سلولی است که در پراکسی زوهای سلولی و سیتوزولی جای دارد و واکنش پر اکسید هیدروژن را به آب و O کاتالیز می کند . آنژیوتانسین II محرکی برای تولید ROS در سلول های عروقی می باشد. یکی از اعمال مهم در این زمینه فعال سازی NADPH اکسیداز است . آنژیوتانسین ال فعالیت این آنزیم را زیاد می کند . در مطالعات قبلی نشان داده شد که گروهی از داروهای ضد فشار خون نظیر باز دارندگان آنزیم مبدل آنژیوتانسین II و انتاگونیستهای گیرنده AT به عنوان آنتی اکسیدان کننده غیر مستقیم عمل کرده و مانع از عمل آنژیوتانسین II شده و در نتیجه عمل فعال سازی NADPH اکسیداز کمتر صورت می گیرد . داروهای

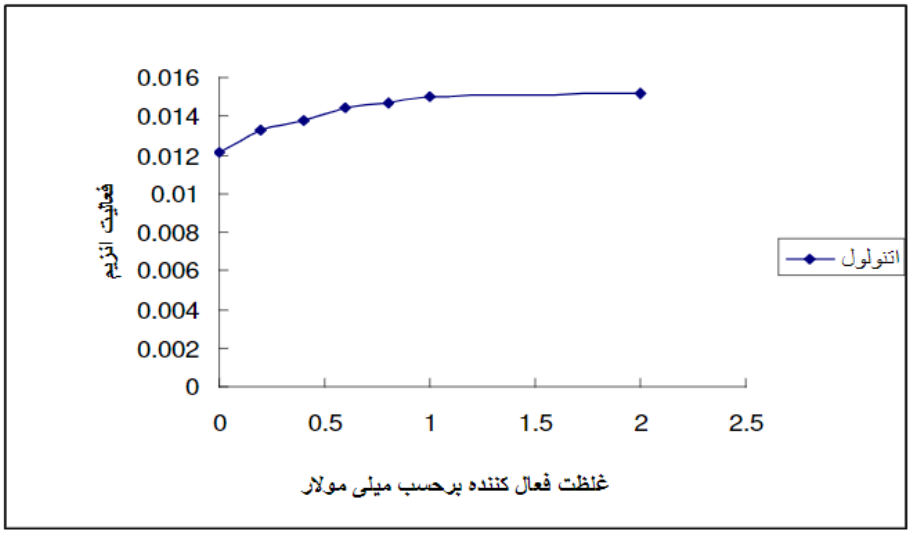
دیگر نظیر تبابلاکر و آنتاگونیست های کانال کلسیم نیز ویژگی های آنتی اکسیداتیو را از خود نشان داده اند . نسل سوم بتابلاکرها مانند کارودیلول ممکن است ترشح NO را در EC و در نتیجه محتوای گلوتاتیون عروقی را افزایش داده و مانع از تشکیل ROS می شود.

در بررسی دیگری که روی موش انجام شد. افزایش اثر سه داروی ضد فشار خون (کاپتوپریل ، هیدرولایزین و ترازوسین) بر آنزیمهای دیگر آنتی اکسیدان مورد مطالعه قرار گرفته شد . هر سه دارو افزایش چشمگیری برای سوپر اکسید دسموتاز C میوکاردیاتی (بالای۱۳۳ فعالیت) و کاهش فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز (در حدود ۵۹٪) را از خود نشان دادند. کاپتوپریل همچنین فعالیت سوپر اکسیداز دیسموتاز Mn را نیز افزایش داد و هیدرولایزین و تراز وسین فعالیت کاتالاز را کاهش دادند. هر سه دارو باعث کاهش چشمگیری در مقادیر پر اکسیداسیون لیپید میوکاریادتی شدند. 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، که نتایج آن در ادامه مورد بحث قرار می گیرد : با توجه به ژل الکتروفورز انجام شده و ایجاد تک باند ظاهر شده می توان ادعا کرد که آنزیم مورد استفاده خالص و عاری از هر گونه آلودگی می باشد. در گام بعدی فعالیت آنزیم پراکسیداز در غلظت ثابت سوبسترا و در کنار غلظتهای مختلف ترکیبات مورد مطالعه بررسی شد که داده ها نشان از متفاوت بودن اثر این سه دارو بر روی فعالیت آنزیم دارد. تا جایی که آتنولول باعث تشکیل بیشتر ماده رنگی (کروموژن) و بنابر این افزایش فعالیت آنزیم را در پی دارد. این در حالی است که لوزارتان و کاپتوپریل باعث کاهش فعالیت شدند.

شکل ۱ و ۲ قدرت مهار کنندگی در این دو ترکیب اخیر یکسان نبوده لوزارتان با غلظت ۲۶ میلی مولار و کاپتوپریل با غلظتی برابر با ۱ میلی مولار موجب کاهش فعالیت آنزیم تا حدود ۵۰ در حالت بدون مهار کننده شدند.



شکل۱- فعالیت آنزیم پراکسیداز در حضور کاپتوبریل و لوزارتان

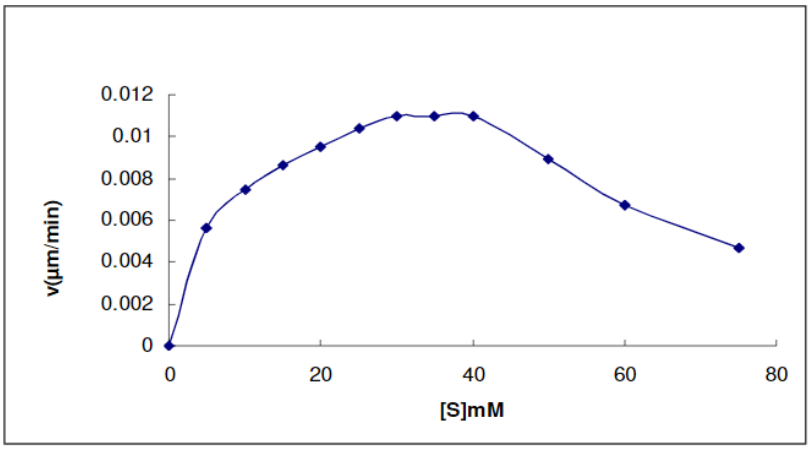


شکل۲- فعالیت آنزیم پراکسیداز در حضور آتنولول

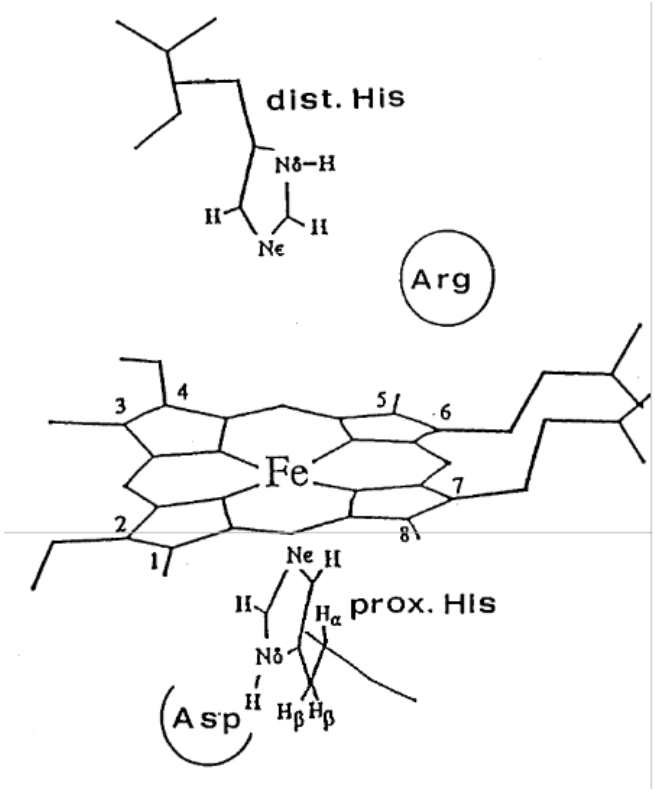
أین أعداد موید این است که کاپتوپریل قدرت مهار کنندگی بیشتری نسبت به لوزارتان داشته تا جایی که در غلظتهای بالاتر این ترکیبات فعالیت آنزیم را به صفر نزدیک می گرداند.

برای بدست آوردن پارامتر های سینیتیکی V_{max},K_m

آنزیم ، در حضور غلظت ICs0 ترکیبات غلظت یکی از سوبستر ا(AAP۴) تغییر داده شد. از پایین به بالا در غلظت های مختلف سوبسترا در ابتدا منحنی با یک افزایش نسبی مواجه گردید تا جایی که نمودار به یک خط مستقیم و سپس با کاهش فعالیت آنزیمی روبرو شد. این کاهش به دلیل مهار آنزیم توسط خود سوبسترا بوده (substrate inhibition) یعنی سوبسترا خود به عنوان مهار کننده وارد عمل شده و حالت مهار سوبسترایی را ایجاد کرده است (شکل ۳-۱۵) از آنجایی که مقدار Km آنزیمی را نمی توان از منحنی مکائیلیس – منتن به دلیل خطی نبودن منحنی بدست آورد ، منحنی لاینور برک برای این منظور رسم شد و از طریق آن مقدار دقیق V_{max},K_m مربوطه را بدست آمد.



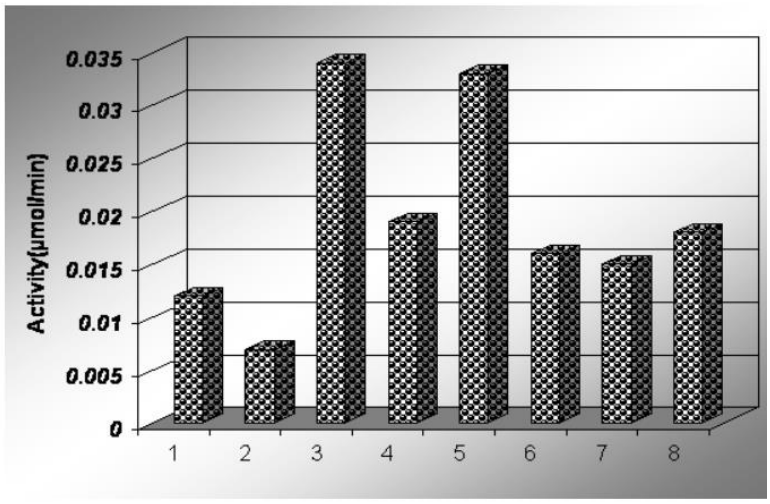
شکل۳- منحنی مکائیلیس- منتن آنزیم پراکسیداز در حالت مهار سوبسترایی



شکل۴- ساختار شیمیایی داروهای مورد مطالعه و جایگاه فعال آنزیم

با توجه به ساختمان شیمیایی سه داروی فوق (شکل ۴) و ساختار جایگاه فعال آنزیم منطقی به نظر می رسد هیچکدام از داروهای فوق از طریق جایگاه فعال آنزیم اثر نکند . اگر چه وجود حلقه های آروماتیک در لوزارتان و آتنولول پیش بینی برای شباهت به سوبسترا دارد ولی اندازه مولکول و وجود گروه های آمینی مختلف ایجاد بارهای منفی می کند که با توجه به اسیدهای آمینه هیستیدین و آرژنین ورود آن را به جایگاه غیر ممکن می کند. از آنجائی که آنزیم های اکسیده کننده مانند آنزیم پراکسیداز عامل جذب رادیکالهای آزاد و در نتیجه در متعادل ساختن فشار خون نقش دارند بنابر این داروهایی نظیر کاپتوپریل و لوزارتان که از طریق مهار این آنزیم عمل می کنند ممکن است اثرات جانبی ایجاد نمایند.

در مقابل داروی آتنولول اثر فعال کنندگی جزیی داشتند و بنابراین پیش بینی می شود نه تنها اثر جانبی در مکانیسم جذب رادیکال آزاد ندارد بلکه به این عمل آنزیم تا حدی کمک خواهد کرد . شاید با این نوع اتصال موجبات اتصال کار آمدتر سوبسترا به جایگاه فعال آنزیم را فراهم می کند. در مرحله بعدی برای بررسی نوع اتصال ایجاد شده از لحاظ برگشت پذیر بودن یا غیر قابل برگشت بودن از روش استفاده شد. با توجه به نتایج بدست آمده و مقایسه آن در دیاگرام (شکل ۵) می توان تفسیر زیر را انجام داد. ستون اول نشانگر فعالیت آنزیم بدون حضور ترکیبات قبل از دیالیز می باشد که فعالیتی برابر با ۰/۰۱۲ میکرو مول بر دقیقه را دار است. اما بعد از حضور ترکیبات قبل از دیالیز فعالیت آنزیمی تا حدود ۵۰ کاهش می یابد.



شکل۵- دیاگرام آنالیز آنزیم پراکسیداز در حضور غلظت ترکیبات مورد مطالعه

ستون شماره ۲) در ستون های بعدی فعالیت آنزیم در حضور ترکیبات و بدون حضور آنها بعد از دیالیز آورده شده است مقایسه آنها با ستون اول و دوم بیانگر این است که مهار یا فعال کنندگی از نوع برگشت پذیر بوده و در اثر دیالیز ترکیبات از ساختار آنزیم جدا شده و آنزیم می تواند فعالیت اولیه خود را از سر گیرد. تفاوتهای جزیی در این میان به خطاهای مرتبط در طول آزمایش بر می گردد.

منابع

1. Bradford .M.M ,2016, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principale of Protein-dye binding., Anal biochem,72.248-254
2. Montgomery. B ,20018, Does paracetamol cause hypertension? B M J 336, (7654):1190-1
3. Manton , Anthea,Hopkins ,et al. ,2019 ,Human Biology and Health ,Englewood Cliffs,New Jersey,USA ,Prentice Hall
   Guyton & Hall, Text book of Medical Physiology ,7 th.Ed ,Elsevier, Saunders ,p220
4. G. Katzung. Brthram ,2014, Basic & Clinical Pharmacology ,9 th. Ed, MC. Graw Hill company
5. Wang.t .J ,Ausiello J.C ,Stafford RS ,1999 ,Trends in Antihypertensive Drug Aduertising ,1985-4996,Circulation,99,2055-2057
   Wassmann .S ,Wassmann .K ,Nickeing . G ,2014, Modulation of Oxidant and
6. Antioxidant Enzymes Expression and Function in Vascular Cells, Hypertention,44:381-386
7. Seshiah. P N, Weber. DC, Rocic. P, Valppu. L, Taniyama. Y, Griendlingk. K ,2012, Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity, Upstream mediators, Circ Res, 91:406-413
8. Wassmann. S, Laufs. U, Bäumer. A T., Müller. K, et al. ,2001, Inhibition of Geranyl geranylation reduses angiotension II-mediated free radical production in vascular smooth muscle ,59:646-654

9. Drummond. GR, Cia.H,Davis.ME, Ramasamy. S, Harrison. DG ,2020, Transcriptional and posttranscriptional regulation of endotehelial nitric oxide synthase expression, by hydrogen peroxide, Circ Res ,86:347-354
10. Meilhac. C, Zhou.M, Santanam.N, Parthasarathy.S,2000, Lipid peroxides induce expression of catalase in cultured vascular cells, J Lipid Res.41:1205-1213
11. Zalba.G,Beaumont,FJ, San Jose .G,Fortune.MA,Etayo .JC ,Diez.J , 2000 ,Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rat , Hypertention,35: 1055-1061
Warnholtz. A, Nickeing. G, Schulz.E, MacHarzina. R, Brazen. JH, Skatchkov.
12. M, Heitzer.T, Stasch.JP, Griengling. KK, Harrison. DG, Böhm.M, Meinertz.T, Munzel. T ,1999, Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the rennin-angiotensin system, Circulation.99:2027
13. Wassmann. S, Hilgers. s, Laufs. U, Böhm.M, Nickeing. G ,2002, Angiotension II type 1 receptor antagonism improves hypercholesterolemia- associated endothelial dysfunction, Arterioscler Thromb Vasc Boil, 22:1208-1212
14. Diep. QN, Amiri. F, Touyz .RM, Cohn .JS, Endemann.D, Neves .MF, Schiffrin. EL,2002, PPARalpha activator effects on Angiotension II- induced vascular oxidative stress and inflammation, Hypertention, 40:866-871
15. Wagner. AH, Schroetor. MR, Hecker. M ,2011, 17 beta-estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells, FASEB. J ,15:2121-2130
Kalinowski .L, Dobrucki.LW, Szczepanska-Konkel. M, Jankowski.
16. M, Martyniec. L, Angielski. S, Malinski. T., 2013, Third-generation beta-blockers stimulate nitric oxide release from endothelial cells through ATP efflux: a novel mechanism for antihypertensive action. Circulation.; 107: 2747— 2752.
17. Berkels. R, Egink. G, Marsen. TA, Bartels. H, Roesen. R, Klaus. W ,2011, Nifedipine increases endothelial nitric oxide bioavailability by antioxidative mechanisms. Hypertension.; 37: 240— 245.
Spiekermann. S, Landmesser. U, Dikalov.S, Bredt .M, Gamez. G, Tatge. H
18. Reepschlager N, Hornig B, Drexier H, Harrison DG. ,2003, Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. Circulation.; 107: 1383—1389.