بررسی اثرات جانبی آسپیرین بر ساختار و عملکرد آنزیم کاتالاز کبدی

بهاره کوهشکن [۱](M.Sc)، عادله دیوسالار [*۱](Ph.D)، مریم سعیدی‌فر [۲](Ph.D)، علی‌اکبر صبوری [۳](Ph.D)

۱- *دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست سلولی و مولکولی*

۲- *پژوهشگاه فناوری نانو و مواد پیشرفته، مرکز تحقیقات مواد و انرژی*

۳- *دانشگاه تهران، مرکز تحقیقات بیوشیمی-بیوفیزیک*

چکیده

سابقه و هدف: کاتالاز آنزیمی است که تجزیه‌ی H_2O_2 به آب و اکسیژن مولکولی را کاتالیز می‌کند. از سوی دیگر آسپیرین داروی بسیار مهمی است که توسط بسیاری از بیماران و در سطح جهانی استفاده می‌شود. اهمیت این آنزیم در دفاع آنتی‌اکسیدان بدن و ارتباط این آنزیم کبدی با بیماری‌هایی از قبیل دیابت موجب شد تا در این مطالعه تاثیر آسپیرین را که محل متابولیزه شدن آن مانند تمامی داروها در کبد می‌باشد بر عمل‌کرد و ساختار آنزیم کاتالاز کبدی مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها: به کمک تکنیک‌های طیف سنجی مرئی- ماوراء بنفش و فلوئورسانس در دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد تغییرات در ساختار و عمل‌کرد کاتالاز مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: با استفاده از مطالعات کینتیکی و با توجه به نمودار و معادله‌ی میکائیلیس-منتن مقدار K_m آنزیم ۴۰ میلی‌مولار اندازه‌گیری شد. نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان داد که آسپیرین باعث ایجاد تغییر در فعالیت آنزیم نمی‌شود. هر چند افزودن آسپیرین باعث کاهش تدریجی در شدت نشر فلوئورسانس کاتالاز شد. علاوه بر آن با افزایش دما مقدار ثابت اتصال دارو به آنزیم کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: کاهش مشاهده شده در نشر فلوئورسانس ذاتی کاتالاز در این مطالعه تحت تاثیر غلظت‌های افزایشی آسپیرین نشان داد که این دارو با باز کردن ساختار سه بعدی کاتالاز به عنوان یک خاموش‌کننده عمل می‌کند. هر چند که باز شدن ساختار آنزیم منجر به مهار فعالیت آن نشد.

واژه‌های کلیدی: کاتالاز، پراکسید هیدروژن، آسپیرین، فلوئورسانس

مقدمه

کاتالاز (EC 1.11.1.6) آنزیمی است که تجزیه‌ی پراکسید هیدروژن (H_2O_2) را به آب و اکسیژن مولکولی کاتالیز می‌کند [۱]. این آنزیم تقریباً در تمام موجودات زنده یافت می‌شود. کاتالاز تنظیم‌کننده‌ی اصلی متابولیسم پراکسید هیدروژن است [۲]. ارگانیسم‌های هوازی به طور قابل توجهی از بازده انرژی بالای به دست آمده در طی تبدیل کنترل شده‌ی O_2 به آب بهره می‌برند. در عین حال، حد واسط‌های واکنشگر فعال محصولات فرعی سمی و ناخواسته‌ای هستند که در طی متابولیسم هوازی تولید می‌شوند [۳]. H_2O_2 یک مولکول کوچک به شدت فعالی است که به عنوان یک محصول جانبی در متابولیسم انرژی تولید می‌شود. غلظت‌های پایین این ماده در سلول‌های ماهیچه‌ای سیگنالینگ انسولین را تسهیل می‌کند، اما مقادیر زیاد از حد آن باعث ایجاد آسیب‌های به شدت مخرب در پروتئین‌ها، DNA و RNA می‌شود [۴]. کاتالاز از طریق حذف کردن بیش از نیمی از H_2O_2 های تولید شده در

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۶۱۷۰۸۲۳ نمابر: ۰۹۱۲۶۱۷۰۸۲۳ Email: divsalar@khu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۸/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۳/۲۰

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-04-20]

اریتروسیت‌های انسان طبیعی از هموگلوبین حفاظت می‌کند. با توجه به این‌که اریتروسیت‌ها در معرض غلظت‌های بالای اکسیژن هستند، نقش اساسی کاتالاز در سم‌زدایی H_2O_2 چشم‌گیر خواهد بود [۳]. در بافت‌های انسانی، بیش‌ترین فعالیت آنزیم در کبد، اریتروسیت‌ها و کلیه‌ها شناخته شده است. این فعالیت در بافت هم‌بند، پانکراس و سرم بسیار پایین‌تر است. کاتالاز عمدتاً در پراکسیزوم‌ها، میتوکندری‌ها و سیتوپلاسم اریتروسیت‌ها قرار دارد [۲]. ژن کاتالاز انسان در بازوی کوتاه کروموزوم شماره‌ی ۱۳ قرار گرفته است. مهم‌ترین مهارکننده‌ی این آنزیم ۳-آمینو ۱, ۲, ۴- تریازول است، اما مهارکننده‌های دیگری مانند سیانید و آزید را نیز دارا می‌باشد [۵].

کاتالاز کبد گاو (BLC)، مانند تمام کاتالازها یک آنزیم اولیگومر آنتی‌اکسیدان، با وزن مولکولی تقریبی ۲۴۰۰۰۰ دالتون است. این آنزیم مانند کاتالاز انسانی دارای ۴ زیرواحد یکسان است، که به صورت ۴ وجهی آرایش یافته‌اند. هر زیرواحد شامل یک زنجیر پلی‌پپتیدی منفرد، همراه با یک گروه پروستتیک- فریک پروتوپوفیرین IX (گروه هِم) و NADPHدراکتیوسایت است. زیرواحدها به طور آشکاری به طور مستقل از یک‌دیگر عمل می‌کنند [۶-۱۰].

آسپیرین یا استیل سالیسیلیک اسید داروئی است که اغلب به عنوان مسکن برای دردهای خفیف و داروی ضد تب و ضد التهاب از آن استفاده می‌شود. این دارو اولین بار در سال ۱۸۹۷ توسط شیمیدان آلمانی فیلیکس هافمن خالص‌سازی شد [۱۲،۱۱].

این دارو یکی از پر مصرف‌ترین داروها با مصرف سالانه‌ی ۴۰۰۰۰ تن می‌باشد [۱۳]. با توجه به این‌که کاتالاز یک آنزیم کبدی است و محل متابولیزه شدن این دارو نیز در کبد می‌باشد. از طرفی کبد اولین عضوی است که از طریق ورید باب تمام موادی را که از راه روده جذب می‌شود دریافت می‌کند. لذا اثر سمی اکثر داروها روی کبد زودتر از بقیه اعضا نمایان می‌شود. بنابراین بررسی تغییرات در فعالیت کاتالاز کبد می‌تواند به عنوان پارامتر مناسب در ارزیابی تاثیرات جانبی انواع داروها بر بدن باشد [۱۴]. لذا در این مطالعه اثرات جانبی داروی آسپیرین روی فعالیت و ساختار پروتئین کاتالاز مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

مطالعات کینتیکی آنزیم

فعالیت آنزیم با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومترمرئی ماوراءبنفش مدل شیمادزو (Shimadzu) اندازه‌گیری شد که بر اساس کاهش جذب سوبسترای H_2O_2 در طول موج ۲۴۰ نانومتر عمل می‌کند [۱۵]. بدین ترتیب که هر ۵ ثانیه یک‌بار میزان جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر (ماکزیمم جذب پراکسید هیدروژن) به مدت ۶۰ ثانیه ثبت شد. به منظور به‌دست آوردن مقدار K_m آنزیم (غلظتی از سوبسترا که در آن سرعت آنزیم نصف سرعت ماکزیمم است) در غیاب دارو مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ mM (۷/۰ pH) و غلظت‌های مختلف پراکسید هیدروژن (از ۱۰ تا ۹۰ میلی‌مولار) و غلظت ثابت آنزیم ($۰/۵۶\times۱۰^{-۳}$ mg/ml) است. سپس به منظور بررسی تاثیر داروی آسپیرین بر فعالیت کاتالیتیکی آنزیم، مقدار فعالیت آنزیم در حضور غلظت‌های متفاوت دارو اندازه‌گیری شد.

مطالعات فلوئورسانس. به منظور بررسی تغییرات در ساختار سه بعدی آنزیم تحت تأثیر غلظت‌های مختلف آسپیرین و در دو دمای ۳۷ و ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد مطالعات فلوئورسانس آنزیم به کمک دستگاه فلوئورسانس Cary انجام گرفت. اساس این روش اندازه‌گیری شدت نشر فلوئورسانس ذاتی تریپتوفان‌های موجود در پروتئین (کاتالاز) می‌باشد. بدین منظور طیف نشری آنزیم طبیعی (بدون حضور دارو) و آنزیم در حضور غلظت‌های ذکر شده‌ی دارو در طول موج تحریکی ۲۹۰ نانومتر بررسی شد.

نتایج

فعالیت کاتالیتیکی کاتالاز کبد گاو. به منظور سنجش فعالیت کاتالاز کبد گاو از روش اسپکتروفتومتری ماوراء بنفش- مرئی (UV-Visible) استفاده شد. در این روش از طریق ثبت تغییرات جذب سوبسترا (پراکسید هیدروژن) در واحد زمان، میزان فعالیت (Activity) آنزیم اندازه‌گیری می‌شود. در این مطالعه با استفاده از غلظت‌های مختلف پراکسید هیدروژن فعالیت آنزیم محاسبه گردید. نمودار سرعت آنزیم در برابر غلظت پراکسید هیدروژن به عنوان سوبسترای آنزیم در دمای محیط و هم‌چنین نمودار لاینویوربرک در شکل ۱ (الف و ب) نشان داده شده است که بیانگر وابسته به غلظت بودن مقدار سرعت واکنش آنزیمی می‌باشد. به منظور تعیین مقدار دقیق پارامتر کینتیکی K_m کاتالاز از طول از مبداء نمودار لاینویور-برک (معادله ۱)، مقدار K_m برابر با ۴۰ mM و مقدار V_{max} برابر با ۸/۸ $\frac{mM}{s}$ اندازه‌گیری شد.

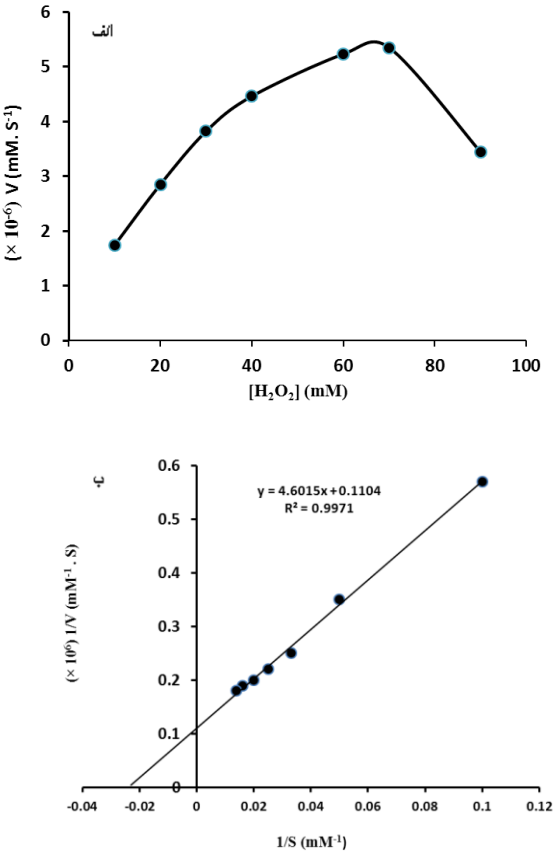
معادله‌ی (۱) $\frac{1}{V}=\frac{K_m}{V_{max}}\times\frac{1}{[S]}+\frac{1}{V_{max}}$

با توجه به نمودار و معادله میکائیلیس- منتن ($V/V_{max}=\frac{[S]}{K_m+[S]}$) در غلظت ۷۰ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن، ماکزیمم فعالیت از کاتالاز مشاهده شد و بعد از آن

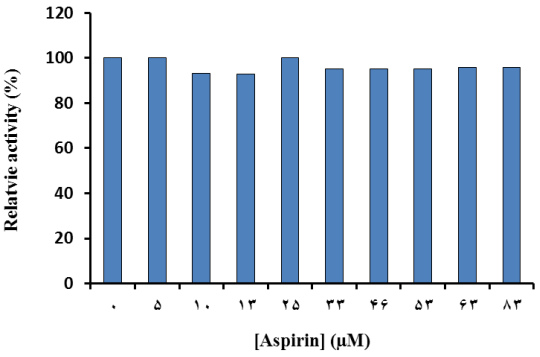
[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-04-20]

روند کاهشی در فعالیت آنزیم دیده شد این روند کاهشی توجیه‌کننده پدیده مهار آنزیم توسط سوبسترا است.

پس از یافتن نقطه اشباع آنزیم، یعنی غلظت ۷۰ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن، در این غلظت از سوبسترا، اثر غلظت‌های مختلف داروی آسپیرین بر فعالیت BLC بررسی شد که نتایج آن در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج حاصله نشان می‌دهند که در حضور غلظت‌های ذکر شده‌ی دارو تغییر محسوس و معنی‌داری در فعالیت آنزیم مشاهده نمی‌شود.



شکل ۱. الف) نمودار میکائیلیس – منتن آنزیم کاتالاز کبد گاو در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد ب) نمودار لاینویوربرک برای آنزیم کاتالاز کبد گاو در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد.



شکل ۲. درصد فعالیت نسبی کاتالاز تحت تاثیر غلظت‌های مختلف آسپیرین در دمای محیط

مطالعات فلوئورسانس. تکنیک فلوئورسانس روشی بسیار قوی و رایج جهت بررسی تغییرات در ساختار سوم پروتئین‌ها در اثر اتصال یک لیگاند می‌باشد. به دلیل وجود اسید آمینه‌ی تریپتوفان (Trp) در توالی آمینو اسیدی یک پروتئین، تابش طول موج تحریکی ۲۹۰ نانومتر باعث می‌شود تا این اسید آمینه تهییج شود و انرژی حاصل از این پرتو را به صورت نوری در محدوده‌ی ۳۰۰–۵۰۰ نانومتر منتشر کند که به آن نور نشری می‌گویند. تغییر در حالت پایه‌ی نشر پروتئین نشان‌دهنده‌ی تغییر در کنفورماسیون آن می‌باشد [۱۶].

به منظور بررسی تاثیر داروی آسپیرین بر ساختار سه بعدی آنزیم کاتالاز و خصوصیات اتصالی آن در دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به کمک این تکنیک بررسی شده است. نشر فلوئورسانس کاتالاز در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلف آسپیرین در دامنه‌ی طول موج ۲۹۵–۵۰۰ نانومتردر در دماهای ۲۵ و ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است. این مطالعه نشان می‌دهد که اضافه کردن آسپیرین به محلول پروتئینی باعث ایجاد کمپلکس جدیدی می‌شود که همراه با یک جابه‌جایی به سمت راست (Shift)، نشر آن افزایش می‌یابد. بررسی بیش‌تر نشان داد که داروی آسپیرین نیز در این محدوده‌ی طول موج دارای نشر می‌باشد (شکل ۵). لذا پس از تفریق نشر ماکزیمم دارو از نشر ماکزیمم کاتالاز در طول موج‌های معین، نمودار نشر ماکزیمم در برابر غلظت دارو رسم شده که یک نمودار کاهشی وابسته به غلظت است (شکل ۶) که بیانگر آن است که نشر فلوئورسانس ذاتی کاتالاز با افزودن غلظت‌های مختلف آسپیرین کاهش می‌یابد و بنابراین دارو به عنوان یک خاموش‌کننده (quencher) عمل می‌نماید. کم شدن نشر کاتالاز بیانگر باز شدن ساختار سه بعدی آن و قرارگیری تریپتوفان‌ها در سطح آنزیم می‌باشد.

بررسی پارامترهای اتصالی آسپیرین روی کاتالاز. به منظور تعیین پارامترهای اتصال آسپیرین به کاتالاز می‌توان از معادله‌ی لگاریتمی (۲) استفاده کرد که در تعیین پارامترهای اتصالی لیگاند به ماکرومولکول معمولاً از آن استفاده می‌شود.

$$\log\frac{[F0-F]}{F} = \log K + n \log [Q] \qquad \text{معادله‌ی (۲)}$$

در معادله‌ی فوق F_0 بیانگر شدت نشر فلوئورسانس پروتئین در غیاب دارو، F شدت نشر فلوئورسانس پروتئین در حضور غلظت‌های مختلف دارو، K ثابت اتصال، [Q] غلظت خاموش‌کننده (آسپیرین) و n تعداد مولکول‌های لیگاند (آسپیرین) متصل شده بر روی کاتالاز را نشان می‌دهد. با استفاده از رسم نمودار $\log\frac{[F0-F]}{F}$ در برابر log [Q] می‌توان

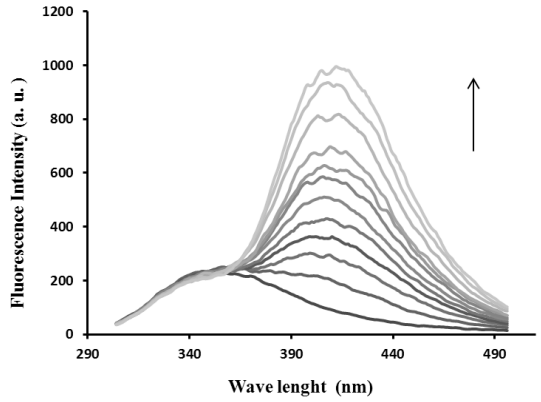
[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-04-20]

مقادیر ثابت اتصال (K_A) و تعداد آسپیرین‌های متصل شده روی کاتالاز (n) را محاسبه نمود. شکل ۷ نمودارهای مربوطه را در دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نشان می‌دهد. هم‌چنین خلاصه نتایج اتصال در جدول ۱ نشان داده شده است.

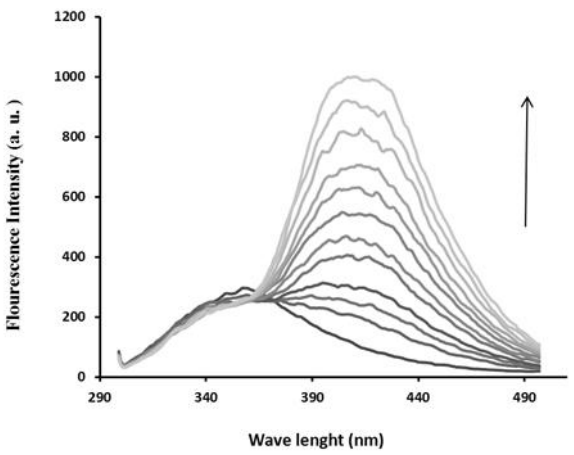
جدول ۱ . پارامتر های ترمودینامیکی و اتصالی آسپیرین به کاتالاز در دماهای مختلف

Temperature (^{0}C)	n	K_A (M^{-1})
25	1.42	84.4
37	1	8.1

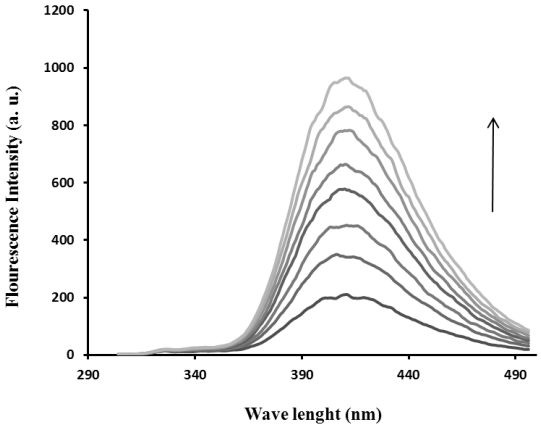
همان‌طور که اطلاعات مندرج در جدول فوق نشان می‌دهند با افزایش دما تعداد مولکول‌های آسپیرین متصل شده به پروتئین و هم‌چنین مقدار K_A یا تمایل برای ایجاد کمپلکس کاهش می‌یابد.



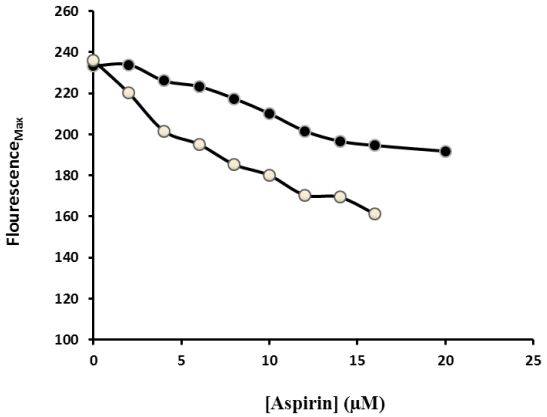
شکل۳. شدت نشر فلوئورسانس کاتالاز کبد گاو درغیاب و در حضور غلظت های مختلف آسپیرین (از پایین به بالا ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۲۰، ۲۴ و ۲۸میکرو مولار) در دمای۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد.



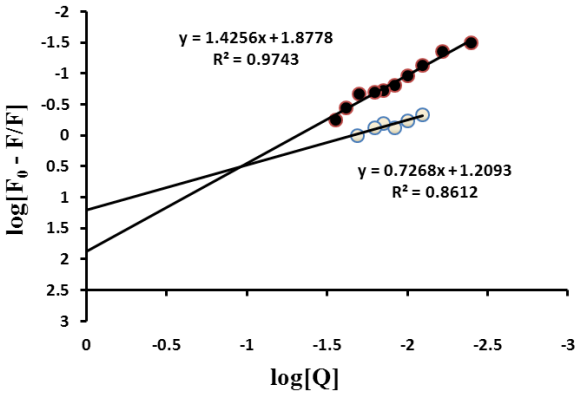
شکل ۴. شدت نشر فلوئورسانس کاتالاز کبد گاو درغیاب و در حضورغلظت های مختلف آسپیرین (از پایین به بالا ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۲۰و ۲۴ میکرو مولار) در دمای ۳۷ درجه ی سانتیگراد.



شکل ۵ . شدت نشر فلوئورسانس غلظت‌های مختلف آسپیرین (از پایین به بالا (از پایین به بالا ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴و۱۶میکرو مولار) در دمای ۲۵ درجه ی سانتیگراد.



شکل ۶. تغییرات در نشر ماکزیمم فلوئورسانس کاتالاز کبد گاو در حضور غلظت های مختلف آسپیرین (۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶ ، ۲۰ و ۲۴میکرومولار) در دماهای (●) ۲۵ و (○) ۳۷ درجه ی سانتیگراد (پس از تفریق از نشر ماکزیمم آسپیرین تنها).



شکل ۷. نمودار خطی log[F0 - F/F] در مقابل log[Q] در دماهای ۲۵ (●) و ۳۷ (○) درجه ی سانتیگراد بر اساس معادله (۲).

بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق نتایج حاصل از مطالعات طیف سنجی کاهش شدت نشر فلوئورسانس ذاتی کاتالاز را در اثر افزودن

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-04-20]

آسپیرین نشان داد. بنابراین آسپیرین به عنوان خاموش‌کننده برای کاتالاز عمل می‌کند. کاهش در نشر یک پروتئین به دنبال افزودن لیگاند نشان‌دهنده‌ی این است که کروموفور (تریپتوفان) از محیط هیدروفوب درون پروتئین در سطح قرار می‌گیرد و این مطلب بیانگر باز شدن ساختار سه بعدی آنزیم می‌باشد [۱۷]. هم‌چنین تعداد جایگاه‌های اتصال آسپیرین بر روی کاتالاز و تمایل کاتالاز و آسپیرین برای تشکیل کمپلکس با افزایش دما از ۲۵ به ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کاهش یافت. اما فعالیت آنزیم دچار تغییر نشد.

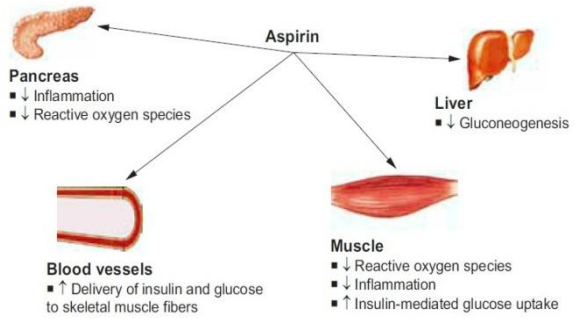
مطالعات مشابهی بر روی برهم کنش بین سالیسیلیک اسید و کاتالاز در گیاهان صورت گرفته است. سالیسیلیک اسید به گروهی از فنول‌های گیاهی تعلق دارد که به طور گسترده‌ای در گیاهان توزیع شده‌اند و به عنوان یک ماده‌ی شبه هورمون در نظر گرفته می‌شود که نقش مهمی را در تنظیم رشد و نمو گیاه به عهده دارد [۱۸]. اطلاعات به‌دست آمده در مورد تاثیر سالیسیلیک اسید بر روی فعالیت کاتالاز مبهم می‌باشند. در مطالعه‌ای سانچز– کاسا ۶۶ درصد مهار کاتالاز را گزارش کرده‌اند، در صورتی که هیچ مهاری توسط دات و همکاران مشاهده نگردید. در مطالعه‌ی دیگری سالیسیلیک اسید ۱ میلی‌مولار باعث مهار جزئی (۹درصد) کاتالاز شد. البته گفته شده که این اثرات متناقض به ایزوزیم‌های مختلف پروتئین نیز بستگی دارد. در واقع ایزوزیم‌های مختلف کاتالاز حساسیت متفاوتی را نسبت سالیسیلیک اسید دارا می‌باشند. هم‌چنین میزان مهار شدن کاتالازهای گیاهی به میزان بلوغ گیاه نیز وابسته است. به‌طوری‌که در عصاره‌ی برگ‌های جوان‌تر درصد مهار کاتالاز توسط سالیسیلیک اسید بیش‌تر از برگ‌های پیر می‌باشد [۱۹]. در فرضیه‌ای که توسط دورنر و کلسیگ مطرح شده است پیشنهاد می‌شود که سالیسیلیک اسید فعالیت کاتالاز را از طریق عمل کردن به عنوان یک دهنده‌ی الکترون برای واکنش آهسته‌ی پراکسیداتیو کاتالاز مهار می‌کند. در غلظت‌های پایین پراکسید هیدروژن سالیسیلیک اسید فعالیت کاتالاز را مهار می‌کند، در حالی‌که در سطوح آسیب‌رسان پراکسید هیدروژن (غلظت‌های بالا) سالیسیلیک اسید می‌تواند از غیر فعال شدن کاتالاز جلوگیری نماید و این کار را از طریق احیاء ترکیب II و باز گرداندن آن به فرم فعال آنزیم انجام می‌دهد [۲۰]. ترکیب II، یک فرم غیرفعال کاتالاز می‌باشد که در اثر قرارگیری آنزیم در برابر تولید پیوسته‌ی H2O2 و در نتیجه‌ی احیاء تک الکترونی ترکیب I (فرم دیگری از آنزیم که فعال می‌باشد) ایجاد می‌شود. NADPH به عنوان یک منبع الکترونی به منظور پیشگیری از تشکیل ترکیب II و یا تبدیل این فرم غیرفعال به حالت FeIII اولیه (فری کاتالاز) عمل می‌کند [۷].

با توجه به این‌که آسپیرین مشتق استیله شده‌ی سالیسیلیک اسید می‌باشد و غلظت پراکسید هیدروژن استفاده شده در این مطالعه نیز غلظت بالایی (۷۰ میلی‌مولار) بوده است می‌توان علت عدم مهار فعالیت آنزیم توسط آسپیرین را با فرضیه‌ی مطرح شده برای سالیسیلیک اسید توجیه نمود. از آن‌جایی‌که عمل‌کرد صحیح هر پروتئین به ساختار طبیعی آن وابسته است، باز شدن ساختار سه بعدی آنزیم در صورتی‌که غلظت پراکسید هیدروژن طبیعی باشد ممکن است فعالیت آنزیم را دچار اختلال سازد. با در نظر گرفتن مکان استراتژیک و حیاتی کاتالاز در میتوکندری که مکان اصلی تولید رادیکال‌های آزاد است و با در نظر گرفتن این‌که آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان دیگر مانند گلوتاتیون پراکسیداز تجزیه‌کننده‌ی کارآمدی برای پراکسید هیدروژن نیستند این اختلال در ساختار و احتمالاً در فعالیت کاتالاز می‌تواند اثرات مخربی را برای بدن به دنبال داشته باشد [۲۱].

اهمیت کاتالاز به عنوان یکی از اصلی‌ترین آنزیم‌ها در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان بدن به منظور مقابله با آثار مخرب استرس اکسیداتیو قابل توجه است که در این راستا ارتباط این آنزیم با بیماری‌های ایجاد شده توسط رادیکال‌های آزاد از جمله دیابت، انواع سرطان‌ها، آلزایمر، ویتیلیگو (Vitiligo)، بیماری‌های کاردیوواسکولار و بیماری‌های نورودژنراتیو و ... مطرح می‌باشد. نقص در آنزیم کاتالاز باعث افزایش در غلظت H_2O_2 هم‌راه با اثرات سمی آن به ویژه در سلول‌های بتای پانکراس که به اکسیداسیون حساس هستند و میزان کاتالاز کمی دارند، می‌شود [۱]. عوارض میکرو و ماکروواسکولار بیماری دیابت، اصلی‌ترین علت نارسایی کلیه، کوری و قطع عضوهایی است که منجر به مرگ و میر در افراد مبتلا به دیابت می‌شود. تخمین زده شده که تعداد بزرگ‌سالانی که تحت تاثیر این بیماری هستند از ۱۳۵ میلیون نفر در سال ۱۹۹۵ به ۳۰۰ میلیون نفر در سال ۲۰۲۵ رشد خواهد کرد [۲۲]. به همین علت آسپیرین‌تراپی در این بیماران برای جلوگیری از خطرات قلبی و عروقی تجویز می‌شود. آسپیرین از فعالیت (مونواکسیژناز۱) COX-1 جلوگیری می‌کند و بنابراین سبب کاهش مقدار فعالیت پلاکت‌ها و جلوگیری از تنگی عروق می‌شود. هم‌چنین آسپیرین (سالیسیلات‌ها) قادر است تا ترشح انسولین به واسطه‌ی گلوکز را تشدید کند و تحمل گلوکز را در بیماران مبتلا به دیابت نوع دوم بهبود بخشد. توانایی آسپیرین برای کاهش گلوکزاوری و کاهش گلوکز خون در یک بیمار دیابتی که با دوز بالای آسپیرین

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-04-20]

برای بهبود روماتیسم حاد تیمار شده، مورد اثبات قرار گرفته بود (شکل ۸) [۲۳–۲۵].



شکل ۸. مکانیسم هایی که توسط آن‌ها آسپیرین متابولیسم گلوکز را بهبود می‌بخشد. آسپیرین ارگان‌های متعددی را برای بهبود متابولیسم گلوکز تحت تاثیر قرار می دهد (۲۴).

با توجه به ارتباط کاتالاز و بیماری دیابت و مصرف آسپیرین در این افراد می‌توان پیشنهاد کرد که استفاده‌ی گسترده از آسپیرین در بیماران دیابتی که ممکن است با سطوح کاهش یافته‌ی کاتالاز خون نیز مواجه باشند می‌تواند از طریق تغییر در ساختار آنزیم برای این افراد آثار مخربی را بر جا گذارد. با توجه به این‌که آسپیرین در کبد متابولیزه می‌شود و این ارگان اصلی‌ترین مکان کاتالاز است این مسئله اهمیت بیش‌تری پیدا می‌کند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله مراتب قدردانی و تشکر خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه خوارزمی به دلیل حمایت مالی از این پژوهش اعلام می‌داریم.

منابع

[1] Díaz A, Muñoz-Clares RA, Rangel P, Valdés VJ, andHansberg W. Functional and structural analysis of catalase xidized by singlet oxygen. Biochimie 2005; 87: 205–214.

[2] Goth L, Nagy T. Acatalasemia and diabetes mellitus. Arch Biochem Biophys 2012; 525: 195-200.

[3] Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. J MolBiol 2000; 296: 295-309.

[4] Veal E, Day A. Hydrogen peroxide as a signaling molecule. Antioxid Redox Signal 2011; 15: 147-151.

[5] Goth L, Nagy T. Inherited catalase deficiency: Is it benign or a factor in various age related disorders?. Mutat Res 2013; 753: 147-154.

[6] Reid TJ 3rd, Murthy MR, Sicignano A, Tanaka N, Musick WD, Rossmann MG. Structure and heme environment of beef liver catalase at 2.5 A resolution. Proc Natl Acad Sci U S A 1981; 78: 4767-4771.

[7] Fita I, Rossmann MG. The NADPH binding site on beef liver catalase. Proc Natl Acad Sci U S A 1985; 82: 1604-1608.

[8] Fita I, Silva AM, Murthy MR, Rossmann MG. The refined structure of beef liver catalase at 2.5 A resolution. ActaCryst 1986; 42: 497-515.

[9] Yousefi R, Saboury AA, Ghadermarzi M, Moosavi-Movahedi AA. Effects of cysteine on the inactivation of bovine liver catalase. Bull Korean Chem Soc 2000; 21: 567-570.

[10] Hashemnia S, Moosavi-Movahedi AA, Ghourchian H, Ahmad F, Hakimelahi GH, Saboury AA. Diminishing of aggregation for bovine liver catalase through acidic residues modification. Int J Biol Macromol 2006; 40: 47-53.

[11] Sneader W. The discovery of aspirin A reappraisal. BMJ 2000; 321: 1591-1594.

[12] Bathaie S Z, Nikfarjam L, Rahmanpour R, Moosavi-Movahedi AA. Spectroscopic studies of the interaction of aspirin and its important metabolite, salicylate ion, with DNA, A•T and G•C rich sequences. Spectrochim Acta A Mole Biomol Spectrosc 2010; 77: 1077-1083.

[13] Macdonald S. Aspirin use to be banned in under 16 year olds. BMJ 2002; 325: 988.

[14] Iwatsubo T, Hirota N, Ooie T, Suzuki H, Shimada N, Chiba K, et al. Prediction of in vivo drug metabolism in the human liver from in vitro metabolism data. Pharmacol Ther 1997;73: 147-171.

[15] Yang B, Hao F, Li J, Chen D, Liu R. Binding of chrysoidine to catalase: Spectroscopy, isothermal titration calorimetry and molecular docking studies. J Photochem Photobiol B 2013; 128: 35-42.

[16] Hu Y, Da L. Insights into the selective binding and toxic mechanism of microcystin to catalase. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 2014; 121: 230-237.

[17] Vivian JT, Callis PR. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. Biophys J 2001; 80: 2093-2109.

[18] Raskin I. Role of salicylic acid in plants. Annual Rev Plant Biol 1992; 431: 439-463.

[19] Horvath E, Janda T, Szalai G, Paldi E. In vitro salicylic acid inhibition of catalase activity in maize: differences between the isozymes and a possible role in the induction of chilling tolerance. Plant Science 2002: 163: 1129-1135.

[20] Durner J, Klessig DF. Salicylic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalases. J Biol Chem 1996; 271: 28492-28501.

[21] Lopez-Torres M, Perez-Campo R, Rojas C, Cadenas S, Barja G. Simultaneous induction of SOD, glutathione reductase, GSH, and ascorbate in liver and kidney correlates with survival during aging. Free Radic Biol Med 1993; 15: 133-142.

[22] Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. Toxicol Appl Pharmacol 2006; 212: 167-178.

[23] De Berardis G, Sacco M, Strippoli GF, Pellegrini F, Graziano G, Tognoni G, Nicolucci A. Aspirin for primary prevention of cardiovascular events in people with diabetes: meta-analysis of randomize controlled trials. BMJ 2009; 339: 1-8.

[24] Nobles-James C, James EA, Sowers JR. Prevention of cardiovascular complications of diabetes mellitus by aspirin. Cardiovasc Drug Rev 2004; 22: 215-226.

[25] Reid J, MacDougall AI, Andrews MM. Aspirin and diabetes mellitus. Br Med J 1957; 25: 1071-1074.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-04-20]

Side effects of aspirin on the structure and function of liver catalase

Bahareh Koohshekan (M.Sc)[1], Adeleh Divsalar (Ph.D)[*1], Maryam Saeidifar (Ph.D)[2], Ali Akbar Saboury (Ph.D)[3]

1 – Dept. of Cell and Molecular Biology, School of Biology, Kharazmi University, Tehran, Iran

2 - Nanotechnology and Advanced Materials Department, Materials and Energy Research Center, Karaj, Iran

3 - Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran, Iran

(Received: 19 Nov 2013; Accepted: 10 Jun 2014)

Introduction: Catalase is an enzyme that catalyzes the breakdown of H2O2 into the oxygen and water molecules. On the other hand, aspirin is an important drug, which is used by many patients globally. Because of importance of catalase in antioxidant defense system and the connection between this enzyme and some diseases such as diabetes, in this study, we have investigated the effects of aspirin, which is metabolized in the liver like other drugs, on the structure and function of liver catalase.

Materials and Methods: Using different spectroscopic (UV-Visible and Fluorescence) techniques at two temperatures of 25 and 37 ^{0} C we have investigated the changes in the structure and function of catalase.

***Results*:** By using kinetics studies obtained from spectroscopic methods as well as the Michaelis–Menten plot, the Km value was measured 40 mM. Kinetic results indicated that aspirin did not change the function of BLC. However, addition of aspirin caused a gradual reduction in the fluorescence emission intensity of catalase. Also, the values of binding constants of drug on the enzyme decreased by increasing the temperature.

Conclusion: The results of the fluorescence studies showed a decrease in fluorescence emission spectra of catalase, affected by addition of aspirin. Aspirin acts as a quencher with unfolding the three- dimensional structure of catalase, but this unfolding did not inhibit the catalase activity.

Keywords: Catalase, Hydrogen peroxide, Aspirin, Fluorescence

*Corresponding author. Fax: +98 +98 9126170823; Tel +98 9126170823

divsalar@khu.ac.ir

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-04-20]

How to cite this article:

Koohshekan B, Divsalar A, Saeidifar M, Saboury A. Side effects of aspirin on the structure and function of liver catalase . koomesh. 2014; 16 (1) :97-102

URL http://koomeshjournal.semums.ac.ir/browse.php?a_code=A-10-2208-1&slc_lang=en&sid=1