

اثر دوزهای درمانی متفاوت ایبوپروفن بر فعالیت آنزیم آدنوزین دآمیناز در دماهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک

شیوا کلانتری^۱ (Ph.D)، مصطفی رضایی طویرانی^{۲*} (Ph.D)، سهیلا خداکریم^۳ (Ph.D)

۱ - دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پیراپزشکی، گروه علوم پایه

۲ - دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پیراپزشکی، مرکز تحقیقات پروتئومیکس بالینی

۳ - دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پیراپزشکی، گروه آمار حیاتی

چکیده

سابقه و هدف: آدنوزین دآمیناز (Adenosine deaminase, ADA) یک آنزیم کاتابولیک پورین می باشد که آدنوزین و ۲' - داکسی آدنوزین را به طور برگشتناپذیر دآمین می کند. ADA در رشد سیستم ایمنی دخالت داشته در فرایند التهاب نیز درگیر است. در این پژوهش اثر تقویت کنندگی سه دوز متفاوت ایبوپروفن به عنوان یکی از داروهای ضد التهاب بر فعالیت این آنزیم در دماهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک بررسی شده است.

مواد و روش ها: فعالیت آدنوزین دآمیناز در دو دمای ۳۷ و ۴۲ درجه در حضور و عدم حضور دارو از طریق اسپکترومتری در طول موج ۲۶۵ nm سنجش شد.

یافته ها: دوز بالا و پایین ایبوپروفن در دمای ۳۷ درجه اثر فعال کنندگی بر آنزیم داشته، حساسیت آنزیم به اثر سوپسترا را تعدیل می کند. هم چنین از یک طرف اثر ضد التهابی آدنوزین با کاهش غلظت آن را کاهش داده و از طرف دیگر بر سیستم ایمنی اثر مثبتی را اعمال می کند. دمای ۴۲ درجه اثر تقویت فعالیت آنزیم توسط ایبوپروفن را کاهش داده و ایبوپروفن در این دما اثر دما بر وابستگی فعالیت آنزیم به سوپسترایش را نیز تعدیل می کند. اثرات ایبوپروفن بر سیستم ایمنی و ضد التهاب بودن آدنوزین در ۴۲ درجه کم تر است.

نتیجه گیری: ایبوپروفن یک فعال کننده قطعی برای آدنوزین دآمیناز بوده در نتیجه برای شرایط نقص ایمنی می تواند مفید باشد. این دارو با توجه به فقدان فعال کننده تاکنون برای این آنزیم اهمیت دارد. ایبوپروفن اثر ضد التهابی آدنوزین را کم رنگ می کند. آزمایشات *in vivo* در مطالعات بعدی مورد نیاز است.

واژه های کلیدی: آدنوزین دآمیناز، ایبوپروفن، فعال کننده، التهاب، فعال سازی آنزیم

مقدمه

آدنوزین دآمیناز یا آدنوزین آمینویدرولاز EC (ADA 3.5.4.4) یک آنزیم کاتابولیک پورین می باشد که آدنوزین و ۲' - داکسی آدنوزین را به ترتیب به اینوزین و ۲' - داکسی اینوزین دآمین می کند و این تبدیل را به صورت برگشتناپذیر انجام می دهد [۱]. آدنوزین دآمیناز تقریباً به طور وسیعی در تمام بافت ها توزیع شده است. بیشترین

فعالیت آنزیم در تیموس و بافت های لنفوئیدی دیده می شود (۸۰۰ IU/mg) و کم ترین فعالیت نیز در اریتروسیت ها گزارش شده است (۱ IU/mg) [۲]. به دلیل اهمیت این آنزیم در پروسه های مهمی مانند کاتابولیسم پورین ها [۳]، تکثیر T cell ها و تقویت سیستم ایمنی [۵،۴] و درگیر بودن در پروسه التهابی از طریق سوپسترای معروف خود یعنی آدنوزین و بعضی بیماری های التهابی مانند بیماری های التهابی پانکراس

[۶] و روده [۷]، از گذشته تا کنون مورد توجه دانشمندان زیادی بوده و در زمینه‌های گوناگون از قبیل تخلیص و تعیین خصوصیات فعالیتی و ساختاری در موجودات مختلف مثل گاو [۸]، ماهی [۹]، باکتری [۱۰] و هم‌چنین فعالیت آن در بافت‌های مختلف بدن [۱۱]، اثر لیگاندهای گوناگونی مثل کافئین [۱۲]، آسپرین و دیکلوفناک [۱۳]، داروهای پورینی [۱۴]، سورفکتانت و نمک [۱۵] مورد مطالعه قرار گرفته است. مطالعات بسیاری نیز در مورد نقش این آنزیم در بیماری‌های مختلف و برخی بدخیمی‌ها تاکنون به انجام رسیده است [۱۶-۲۱]. لازم به ذکر است اولین و مهم‌ترین بیماری که نقص فعالیت ADA در آن مشاهده شد بیماری نقص حاد سیستم ایمنی (SCID) بود که یک بیماری ارثی است و ایمنی به دلیل نقص سلول‌های T و B دچار اختلال می‌شود [۴]. لازم به ذکر است که در مطالعات ذکر شده همه لیگاندها نقش مهارتی بر فعالیت آنزیم داشته و تاکنون فعال‌کننده‌ای برای آن گزارش نشده است.

آدنوزین به عنوان سوبسترای این آنزیم، یک متابولیت قابل جبران در تمام سلول‌هاست که حضور آن در مسیرهای کلیدی مثل سنتز بازهای پورینرژیک اسیدهای نوکلئیک، متابولیسم اسیدهای آمینه و تعدیل وضعیت متابولیک سلول مشخص شده است [۲۲]. آدنوزین در مکانیسم‌های ضد التهابی و تنظیم‌کنندگی عصبی (Neuromodulatory) نیز دخالت دارد [۲۳]. در واقع آدنوزین دامیناز نقش خود را از طریق تنظیم غلظت سوبسترایش، که در مسیرهای مختلف دخالت دارد ایفا می‌کند. از آن‌جا که آدنوزین به عنوان یک تنظیم‌کننده اندوژن ایمنی ذاتی عمل کرده و از میزان در برابر آسیب بافتی ناشی از التهاب محافظت می‌کند [۲۴]، پاسخ به این پرسش که عمل‌کرد آنزیم تنظیم‌کننده آن (ADA) در حضور داروهای ضد التهابی از قبیل ایوپروفن به چه صورت است و این‌که آیا این قبیل داروها در جهت افزایش اثر آدنوزین عمل می‌کنند یا خیر، جالب توجه است. از سوی دیگر تغییر فعالیت ADA در چندین نوع سرطان قبلاً گزارش شده است [۱۶-۲۱] که در بسیاری از موارد کاهش فعالیت این آنزیم مشاهده می‌شود،

بنابراین با توجه به گزارش نشدن هیچ دارو یا لیگاندی به عنوان تقویت‌کننده فعالیت این آنزیم تاکنون علی‌رغم گزارشات زیاد در مورد وجود مهارکننده‌های مختلف [۱۲، ۱۳، ۲۵]. جای خالی یک فعال‌کننده برای آن که لیگاندی قابل دسترس و شناخته شده باشد بسیار محسوس است. بنابراین به نظر می‌رسد که ایوپروفن، چه از نظر ضد التهاب بودن، در دسترس بودن و ارزان بودن کاندید مناسبی برای بررسی در این زمینه باشد. هم‌چنین بررسی کینتیک آنزیم در حضور این لیگاند نیز خود، دارای ارزش علمی است. به دلیل اهمیت آنزیم، چگونگی شرایط آن در حالت فیزیولوژیک و مقایسه با شرایط افزایش دما در حالت تب علاوه بر چگونگی اثر دارو بر آن حائز اهمیت است.

هدف از این مطالعه آزمون کردن اثر ایوپروفن به عنوان یک داروی رایج ضد التهاب بر فعالیت ADA به عنوان یک آنزیم درگیر در پروسه التهاب از طریق تنظیم غلظت آدنوزین و یافتن مکانیسم احتمالی دیگری برای اثر ضد التهابی ایوپروفن علاوه بر مکانیسم‌های اثبات شده کنونی [۲۶] از طریق نوع اثر آن بر این آنزیم بوده است. مقایسه فعالیت آنزیم در حضور دارو و چگونگی آن در شرایط تب نیز مد نظر بود. در این پژوهش اثر ایوپروفن بر فعالیت ADA در شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک به صورت *in vitro* مورد بررسی قرار گرفت و از سوی دیگر اثر فعال‌سازی آن بر آنزیم در بعضی شرایط خاص (شرایط خاص از نظر دما و غلظت سوبسترا) گزارش شد.

مواد و روش‌ها

تهیه آنزیم. آنزیم آدنوزین دامیناز روده گاوی، ایوپروفن و آدنوزین از شرکت سیگما خریداری شد.

سنجش فعالیت آنزیمی. سنجش آنزیمی بر طبق روش Kaplan [۲۷] در طول موج ۲۶۵ nm و بر اساس کاهش جذب آدنوزین در این طول موج در مدت زمان یک دقیقه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ۶۰۱ Spectronic صورت گرفت. سنجش آنزیمی در ۱۰ غلظت از سوبسترا (آدنوزین)

در دو دمای ۳۷ درجه و ۴۲ درجه در حضور دوزهای مختلف ایوپروفن با سه بار تکرار در هر غلظت آدنوزین انجام شد. غلظت‌هایی از ایوپروفن که در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند معادل غلظت‌های سرمی ماکزیم این دارو در دوزهای بالا، متوسط و پایین می‌باشد که عبارتند از: ۵۰، ۱۰۰ و ۲۵۰ $\mu\text{g/ml}$. غلظت‌های به کار رفته از دارو با اضافه کردن مقادیر مناسب آنزیم (۹۴ Unit/ml)، سوبسترا و بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار با pH ۷/۵ به حجم نهایی ۱ میلی‌لیتر رسانده شد و فعالیت آنزیم در مدت زمان یک دقیقه به دست آورده شد. نمودار میکائیلیس-منتن (نمودار فعالیت آنزیم در غلظت‌های مختلف سوبسترا) در هر دو دما و با حضور دوزهای دارو ترسیم شد.

به منظور بررسی دقیق‌تر اثر دارو بر فعالیت آنزیم در شرایط ذکر شده، تغییرات فعالیت آنزیم به صورت درصد محاسبه شد و نمودار آن ترسیم گردید (نمودار درصد تغییرات فعالیت بر علیه غلظت سوبسترا). لازم به ذکر است که محاسبه درصد فعالیت به صورت زیر می‌باشد:

$$[(A-B)/B] \times 100$$

به طوری که A معادل فعالیت آنزیم در یک غلظت خاص از سوبسترا در حضور دارو، B معادل فعالیت آنزیم در همان غلظت سوبسترا و در عدم حضور دارو است.

آنالیز آماری. آنالیزهای آماری که شامل تست آنالیز واریانس سه طرفه (three way-ANOVA) برای مشخص کردن معنی‌داری اثرات دارو، دما و غلظت‌های مختلف سوبسترا بر آنزیم بود با استفاده از نرم‌افزار SPSS (V.۱۶) به انجام رسید. برای مقایسه اثرات چندگانه دوزها و دماها نیز از تست Dunnet با نرم‌افزار نام برده استفاده شد. در کلیه آزمون‌ها، معنی‌داری، سطح ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

اثر دوزهای مختلف ایوپروفن در دمای فیزیولوژیک. آنزیم در حضور ۳ غلظت مختلف از ایوپروفن (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰) در بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار، pH ۷/۵ در

غلظت‌های مختلف سوبسترا در دو دمای ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد مورد سنجش قرار گرفت.

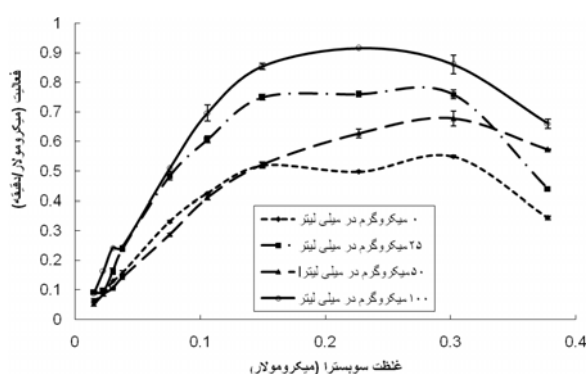
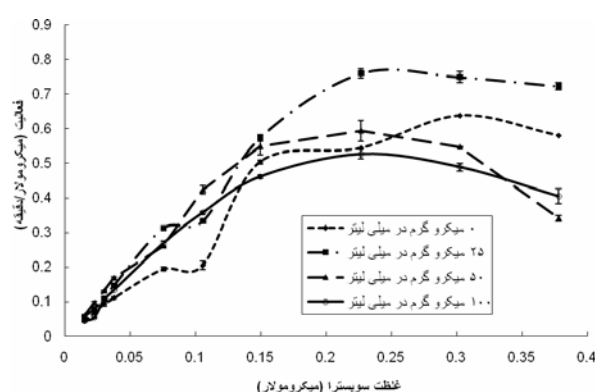
منحنی میکائیلیس-منتن (فعالیت آنزیم بر علیه غلظت‌های مختلف آدنوزین) در دمای ۳۷ درجه شکل ۱ آورده شده است. بر اساس این شکل و نتایجی که از آنالیزهای آماری به دست آمد، تمام دوزهای داروی به کار رفته اثرات معنی‌داری ($P < 0/0001$) بر فعالیت آنزیم داشته‌اند. اثر دما نیز بر فعالیت معنی‌دار بوده است ($P < 0/0001$). البته بین متغیرها (دما، مقادیر سوبسترا و دوزهای مختلف ایوپروفن) نیز اثرات متقابل دیده شد ($P < 0/0001$) که در بخش بعدی مورد تفسیر قرار می‌گیرند. همان‌طور که در شکل ۱ مشخص است ایوپروفن با دوز ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ بیش‌ترین اثر را در جهت فعال‌کنندگی آنزیم دارد. به منظور درک بهتر از اثرات دارو، درصد تغییرات فعالیت آنزیم در هر دوز ایوپروفن و در غلظت‌های متفاوت سوبسترا در شکل ۲، آورده شد. دوزهای ۱۰۰ و ۲۵۰ $\mu\text{g/ml}$ به کار رفته در جهت تقویت‌کنندگی قطعی فعالیت آنزیم بوده است. آزمون Dunnet نیز معنی‌داری اثرات دوزهای ایوپروفن را نسبت به فعالیت آنزیم بدون دارو در این دما اثبات کرد ($P < 0/05$).

اثر دوزهای مختلف ایوپروفن در دمای پاتولوژیک. شکل ۳، نمودار میکائیلیس-منتن فعالیت آنزیم در حضور دوزهای مختلف ایوپروفن در دمای ۴۲ درجه را نشان می‌دهد. تعدیل اثر فعال‌کنندگی دارو بر آنزیم به خوبی مشهود است. بیش‌ترین تغییر مربوط به دوز ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ نسبت به دماست. شکل ۴ نیز تغییرات فعالیت در حضور دارو را به صورت درصد نمایش می‌دهد. بر اساس این شکل، در دمای پاتولوژیک بیش‌ترین اثر به دوز ۵۰ $\mu\text{g/ml}$ شیف‌ت پیدا کرده، و همچنین اثرات دوزهای مختلف دارو بسته به غلظت سوبسترا متفاوت می‌شود.

آزمون Dunnet نیز معنی‌داری اثرات دوزهای ایوپروفن را نسبت به فعالیت آنزیم بدون دارو در این دما اثبات کرد ($P < 0/05$). جزئیات این آزمون در جدول ۱ آورده شده است. اما لازم به ذکر است که درجه معنی‌داری آن نسبت به دمای ۳۷ درجه بیش‌تر بود.

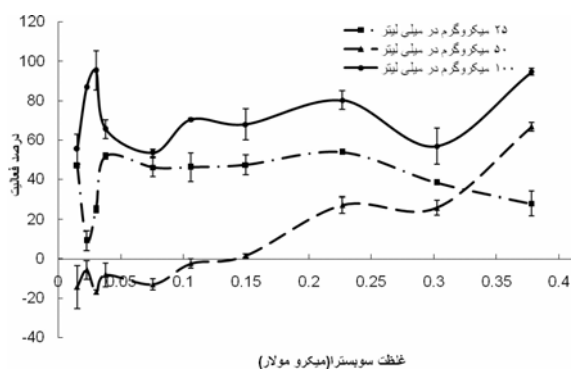
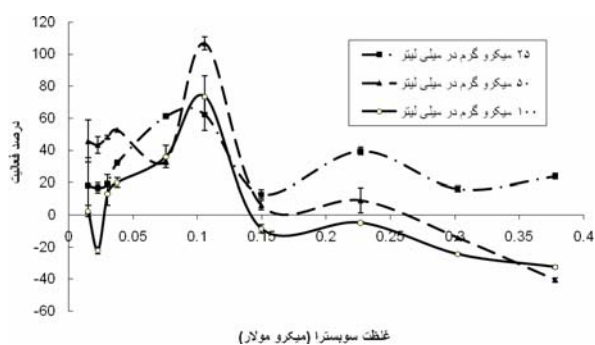
جدول ۱. اثر دوزهای مختلف ایبوپروفن در دمای پاتولوژیک بر فعالیت آنزیم آدنوزین دامیناز

	(I) ibuprophen	(J) ibuprophen	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Dunnet	۲۰ micro g/ml	۰	۰/۱۲۴۶۵	۰/۰۲۳۹۱	۰/۰۰۰	۰/۰۷۲۲۲	
	۵۰ micro g/ml	۰	۰/۰۷۵۰۹	۰/۰۲۶۲۲۵	۰/۰۰۰	۰/۰۲۳۰۰	
	۱۰۰ micro g/ml	۰	۰/۰۷۳۴۳	۰/۰۲۶۲۲۵	۰/۰۰۰	۰/۰۲۱۳۵	



شکل ۳. فعالیت آنزیم بر علیه غلظتهای مختلف سوپسترا در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد در بافر تریس mM ۵۰، pH ۵/۷ و در حضور ۳ غلظت ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ ایبوپروفن.

شکل ۴. فعالیت آنزیم بر علیه غلظتهای مختلف سوپسترا در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در بافر تریس mM ۵۰، pH ۷/۵ و در حضور ۳ غلظت ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ ایبوپروفن.



شکل ۵. تغییرات درصد فعالیت آنزیم بر علیه غلظتهای مختلف سوپسترا در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد در بافر تریس mM ۵۰، pH ۷/۵ و در حضور ۳ غلظت ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ ایبوپروفن.

شکل ۶. تغییرات درصد فعالیت آنزیم بر علیه غلظتهای مختلف سوپسترا در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در بافر تریس mM ۵۰، pH ۷/۵ و در حضور ۳ غلظت ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ ایبوپروفن.

مقایسه اثرات دماها بر فعالیت آنزیم با دوزهای مختلف دارو. با مقایسه فعالیت آنزیم خالص در دو دما، مشخص شد که فعالیت آنزیم تحت تأثیر دما و سوبسترا هر دو قرار دارد. تا یک غلظت بحرانی (۱۵/۰ میکرو مولار) از آدنوزین فعالیت در دمای ۳۷ درجه غالب است و از این غلظت به بعد فعالیت در دمای ۴۲ درجه غلبه می‌یابد.

فعالیت آنزیم در دمای ۳۷ در دوزهای ۲۵ $\mu\text{g/ml}$ و ۱۰۰ و هم‌چنین در دوز ۵۰ $\mu\text{g/ml}$ اما فقط در دوزهای بالای سوبسترا غالب است.

بحث و نتیجه‌گیری

به طور کلی آزمایشات نشان‌دهنده تقویت فعالیت آنزیم توسط ایوپروفن در دمای ۳۷ درجه بود. میزان فعال‌کنندگی دارو با افزایش دما کاهش پیدا کرده، که می‌توان آن را ناشی از تغییر ساختار آنزیم در دمای ۴۲ نسبت به دمای ۳۷ درجه دانست. چرا که فعالیت آنزیم خالص، در دو دما تفاوت نشان می‌داد که خود بیانگر تفاوت فعالیت و در نتیجه تفاوت ساختار آنزیم در دو دما می‌باشد. بنابراین با درگیر بودن آدنوزین در پروسه‌های التهابی و کاهش غلظت بافتی یا سرمی آن توسط ADA می‌توان پیشنهاد کرد که ایوپروفن اثر ضد التهابی آدنوزین را سرکوب کرده و خود، از طریق همان مکانیسم مهار پروستاگلاندین‌ها التهاب را کنترل می‌کند.

در منحنی مربوط به آنزیم خالص در شکل ۱، نوساناتی مشاهده می‌شود که با توجه به کوچک بودن انحراف معیارها می‌توان از واقعی بودن آن‌ها اطمینان داشت. به نظر می‌رسد که تغییر غلظت آدنوزین مسئول چنین رفتاری باشد و نقش تنظیمی سوبسترا بر آنزیم را بیان می‌کند (مطالعاتی دقیق‌تر در این مورد در مقاله دیگری در حال بررسی است). حضور دارو در دوزهای (بالا و متوسط) آن حساسیت آنزیم به تنظیم با سوبسترای خود را از بین می‌برد چرا که چنین نوساناتی در حضور دارو حذف شده‌اند. در شکل ۲، اثر فعال‌کنندگی دوز بالا (۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$) و پایین (۲۵ $\mu\text{g/ml}$) دارو که در بیش‌ترین حالت به بیش از ۹۰ درصد توسط دوز بالای ایوپروفن در

محدوده غلظتی سوبسترا در سرم (۰/۰۲۹ میکرومولار) [۲۸] می‌رسد به خوبی آشکار است. اما آنزیم در حضور دوز متوسط ایوپروفن که غلظت ماکزیم سرمی ۵۰ $\mu\text{g/ml}$ را ایجاد می‌کند در غلظت‌های بالای سوبسترا متفاوت از غلظت‌های پایین سوبسترا رفتار می‌کند اما هنوز در غلظت بالای سوبسترا اثر فعال‌کنندگی دارد ولی به مراتب کم‌تر از دوزهای دیگر.

با توجه به اثر فعال‌کنندگی ایوپروفن در دمای فیزیولوژیک که حاصل آن کاهش غلظت آدنوزین به عنوان یک ماده ضد التهاب است، این مطلب تأیید می‌شود که ایوپروفن به عنوان یک داروی ضد التهاب اثر ضد التهابی خود را از طریق مکانیسم دیگری که همان مهار روند سنتز پروستاگلاندین‌هاست اعمال می‌کند. در این میان چنین پیشنهاد می‌شود که ایوپروفن دارای یک نقش دوگانه در پروسه التهاب است از یک طرف با مهار پروستاگلاندین‌ها التهاب را کم می‌کند و از طرف دیگر با کاهش غلظت آدنوزین به عنوان یک ماده ضد التهاب زمینه را برای ایجاد التهاب فراهم می‌کند. به طور کلی می‌توان گفت که اثر تحریکی ایوپروفن بر آنزیم که منجر به افزایش التهاب می‌شود بخشی از فعالیت ضد التهابی دارو را می‌کاهد پس پیشنهاد می‌شود که در شرایطی که ایوپروفن برای کاهش التهاب تجویز می‌شود بهتر است مهارکننده‌های آدنوزین دامیناز نیز توأم با آن مصرف شود تا اثر ضد التهابی دارو افزایش یابد. هم‌چنین لازم به ذکر است که علی‌رغم وجود مهارکننده‌های فراوان، تاکنون فعال‌کننده‌ای برای آن گزارش نشده است.

از طرفی تقویت فعالیت ADA در حضور ایوپروفن در دمای ۳۷ درجه اثر مثبتی بر سیستم ایمنی نیز دارد به لحاظ نقش ADA در بهبود عمل‌کرد این سیستم. بنابراین در شرایط نقص سیستم ایمنی مثل SCID، ایوپروفن می‌تواند مثر ثمر واقع شود. اما در شرایط تب، چگونگی فعالیت آنزیم خالص و هم‌چنین کیفیت و میزان اثر دارو بر آنزیم متفاوت می‌شد. در این دما نوسانات ایجاد شده توسط اثرات تنظیمی سوبسترا بیش‌تر آشکار بود و ایوپروفن این نوسانات را تعدیل می‌کرد

تغییرات دما حساس بوده و فعالیتش به اثرات تنظیمی آدنوزین روی آن وابسته است، اما ایوپروفن آنزیم را به چنین شرایطی مقاوم می‌کند.

لازم به ذکر است که این نتایج در شرایط *in vitro* به دست آمده و باید این نتایج در مطالعات *in vivo* نیز مورد تأیید قرار گیرد. همچنین امکان تداخلات دارویی بین ایوپروفن و داروهای دیگری که در چنین شرایطی تجویز می‌شوند وجود دارد که خود، نیازمند مطالعات بیش‌تر در زمینه می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بر گرفته از پایان نامه شیوا کلانتری در مقطع کارشناسی ارشد بیوشیمی می‌باشد. همچنین از دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشگاه الزهرا (س) و مرکز تحقیقات پروتئومیکس بالینی به جهت حمایت از انجام این تحقیق سپاسگزاری می‌شود.

منابع

- [1] Herrera C, Casado V, Ciruela F, Schofield P, Mallol J, Lluís C, Franco R. Adenosine A2B receptors behave as an alternative anchoring protein for cell surface adenosine deaminase in lymphocytes and cultured cells. *Mol Pharmacol* 2001; 59: 127-134.
- [2] Hershfield MS, Mitchell BS. Immunodeficiency disease caused by adenosine deaminase deficiency and purine nucleoside phosphorylase deficiency, the metabolic and molecular bases of inherited disease. 7th ed. New York: NY; McGraw-Hill. 1995. p.1725-1768.
- [3] Mills GC, Schmalstieg FC, Trimmer KB, Goldman AS, Goldblum RM. Purine metabolism in adenosine deaminase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 2867-2871.
- [4] Cristalli G, Costanzi S, Lambertucci C, Lupidi G, Vittori S, Volpini R, Camaioni E. Adenosine deaminase: Functional implications and different classes of inhibitors. *Med Res Rev* 2001; 21: 105-128.
- [5] Harutyunyan H, Sargisova Y, Andreasyan N, Hairapetyan H. Adenosine deaminase isoenzymes expression in human blood cells. *FEBS J* 2005; 272: D3-016P.
- [6] Ibiş M, Köklü S, Yılmaz FM, Başar O, Yılmaz G, Yüksel O, et al. Serum adenosine deaminase levels in pancreatic diseases. *Pancreatol* 2007; 7: 526-530.
- [7] Antonioli L, Fornai M, Colucci R, Ghisu N, Da Settimo F, Natale G, et al. Inhibition of adenosine deaminase attenuates inflammation in experimental colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 322: 435-442.
- [8] Lupidi G, Falasca M, Marmocchi F, Venardi G, Cristalli G, Riva F. Adenosine deaminase from bovine brain: purification and partial characterization. *Biochem Int* 1992; 26: 1053-1063.
- [9] Rosemberg DB, Rico EP, Senger MR, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD, Souza DO. Kinetic characterization of adenosine deaminase activity in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2008; 151: 96-101.

به خصوص دوز $100 \mu\text{g/ml}$ که ظاهری کاملاً میکائیلیسی به نمودار می‌داد (شکل ۳). افزایش این نوسانات در دمای 42°C درجه نشان‌دهنده حساسیت بیش‌تر آنزیم به سوبسترای خود در این دماست. آنچه در شکل ۳ و ۴ مشخص است تغییرات اثر دارو بر فعالیت آنزیم نسبت به دمای فیزیولوژیک است. از شدت فعال‌کنندگی دارو در دوز $100 \mu\text{g/ml}$ کاسته شده و حداکثر آن به نقطه 0.1 میکرومولار به میزان 60% درصد فعال‌کنندگی محدود شده است. در این غلظت آدنوزین دوز $50 \mu\text{g/ml}$ نیز بیش‌ترین تأثیر خود را بر آنزیم داشت (100% درصد). اثر این دوزها در سایر غلظت‌های آدنوزین یک اثر مهاري خفیف بود. دوز پایین دارو در شرایط تب نیز اثر فعال‌کنندگی متوسط خود را حفظ کرده بود.

با توجه به آنالیزهای آماری، در دمای 42°C نیز معنی‌داری ($P < 0.001$) اثر متقابل غلظت سوبسترا و دوزهای ایوپروفن را می‌توان به عدم وجود یک اثر یکسان و ثابت توسط ایوپروفن در غلظت‌های مختلف سوبسترا نسبت داد. با توجه به چگونگی اثر دما بر آنزیم می‌توان گفت که دمای فیزیولوژیک به نفع افزایش فعالیت آنزیم در حضور ایوپروفن در دوز بالا و پایین بوده ولی ساختار آنزیم در حضور دوز متوسط ایوپروفن در برابر اثر دما مقاوم بوده است (مگر در غلظت‌های بالای سوبسترا که فعالیت در دمای فیزیولوژیک غالب است). اثر متقابل دما و دوز ایوپروفن در آنالیزهای آماری معنی‌دار بود.

به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که ایوپروفن به عنوان یک فعال‌کننده قطعی آنزیم در دمای طبیعی بدن برای تقویت سیستم ایمنی در موارد نقص این سیستم مفید بوده ولی در شرایط تب اثر چندانی بر آنزیم نخواهد داشت (به جز اثر تقویت‌کننده جزئی دوز پایین آن) مگر در بافت‌های خاصی که غلظت آدنوزین در آن‌ها معادل 0.1 میکرومولار باشد. همچنین اثر ضد التهابی آدنوزین توسط ایوپروفن با کاهش غلظت این نوروترانسمیتر (در شرایط فیزیولوژیک) کم‌رنگ شده و مکانیسم اثر ضد التهابی ایوپروفن که قوی‌تر از اثر ضد التهابی آدنوزین است بار دیگر تأیید شد. آدنوزین دامیناز به

- [19] Durak I, Cetin R, Canbolat O, Cetin D, Yurtaslan Z, Unal A. Adenosine deaminase, 5V-nucleotidase, guanase and cytidine deaminase activities in gastric tissues from patients with gastric cancer. *Cancer Lett* 1994; 84: 199-202.
- [20] Walia M, Mahajan M, Singh K. Serum adenosine deaminase, 5V-nucleotidase and alkaline phosphatase in breast cancer patients. *Indian J Med Res* 1995; 101: 247-249.
- [21] Parola AH, Porat N, Caiolfa VR, Gill D, Kiesow LA, Weisman M, et al. Membrane lipid – protein interactions modify the regulatory role of adenosine-deaminase complexing protein: a phase fluorometry study of a malignancy marker. *Int Soc Opt Eng* 1990; 1204: 830-842.
- [22] Boroweic A, Lechward K, Tkacz-Stachowska K, Sktadanowski AC. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidase. *Acta Biochim Pol* 2006; 53: 269-278.
- [23] Cronstein BN. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J Appl Physiol* 1994; 76: 5-13.
- [24] Desrosiers MD, Cembrola KM, Fakir MJ, Stephens LA, Jama FM, Shameli A, et al. Adenosine deamination sustains dendritic cell activation in inflammation. *J Immunol* 2007; 179: 1884-1892.
- [25] Antonini I, Cristalli G, Franchetti P, Grifantini M, Martelli S, Lupidi G, Riva F. Adenosine deaminase inhibitors. Synthesis of deaza analogs of erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine. *J Med Chem* 1984; 27: 274-278.
- [26] Orme ML. Plasma concentrations and therapeutic effects of anti-inflammatory and anti-rheumatoid drugs. *pharmacol Ther* 1982; 16: 167-180.
- [27] Kaplan NO. Specific adenosine deaminase from intestinal. *Meth Enzymol* 1955; 2: 473-480.
- [28] Sato T, Ui M. A sensitive radioimmunoassay for adenosine. In: Daly JW, Kuroda Y, Phillis JW, Shimizu H, Ui M, editors. *Physiology and Pharmacology of Adenosine Derivatives*. New York: Raven Press; 1983.p.1-11.
- [10] Sgarrella F, Mura U, Catalani R, Pitti A, Ipata PL. Preliminary characterization of adenosine deaminase from *Bacillus cereus*. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1982; 58: 1145-1151.
- [11] Ataei G, Zonoozi F, Divsalar A, Moosavi-Movahedi AA, Saboury AA, Safarian S, Habibi M. Comparative kinetic and thermodynamic studies on intestinal and spleen adenosine deaminase. *Pejuhandeh* 2005; 10: 44. (Persian).
- [12] Saboury AA, Divsalar A, Ataie G, Amanlour M, Moosavi-Movahedi AA, Hakimelahi GH. Inhibition study of adenosine deaminase by caffeine using spectroscopy and isothermal titration calorimetry. *Acta Biochim Pol* 2003; 50: 849-855.
- [13] Ajloo D, Saboury AA, Haghi-Asli N, Ataei-Jafari G, Moosavi-Movahedi AA, Ahmadi M, et al. Kinetic, thermodynamic and statistical studies on the inhibition of adenosine deaminase by aspirin and diclofenac. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2007; 22: 395-406.
- [14] Ataie G, Bagheri S, Divsalar A, Saboury AA, Safarian S, Namaki S, Moosavi-Movahedi AA. A kinetic comparison on the inhibition of adenosine deaminase by purine drugs. *Iranian J Pharm Res* 2007; 6: 43-50. (Persian).
- [15] Ajloo D, Taghizadeh E, Saboury AA, Bazyari E, Mahnam K. Effects of surfactant, salt and solvent on the structure and activity of adenosine deaminase: Molecular dynamic and spectrophotometric studies. *Int J Biol Macromol* 2008; 43: 151-158.
- [16] Porat N, Gill D, Parola AH. Adenosine deaminase in cell transformation: biophysical manifestation of membrane dynamics. *J Biol Chem* 1988; 263: 14608-14611.
- [17] Trotta PP, Balis ME. Characterization of adenosine deaminase from normal colon and colon tumors: evidence for tumor specific variants. *Biochemistry* 1978; 17: 270-278.
- [18] Balis ME. Adenosine deaminase and malignant cells. *Ann N Y Acad Sci* 1985; 451: 142-149.

Effects of different therapeutical doses of ibuprofen on the adenosine deaminase activity at physiologic and pathologic temperatures

Shiva Kalantari (Ph.D)¹, Mostafa Rezaei-Tavirani (Ph.D)^{*2}, Soheila Khodakarim (Ph.D)³

1 – Dept. of Proteomics, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medicine, Tehran, Iran

2 – Research Center of Clinical Proteomics, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medicine, Tehran, Iran

3 – Dept. of Biostatistics, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medicine, Tehran, Iran

(Received: 5 Oct 2010 Accepted: 3 Apr 2011)

Introduction: Adenosine deaminase (ADA) is a purine catabolic enzyme that removes amino group of adenosine or 2' deoxyadenosine irreversibly. ADA enhances immune system and also intervenes the inflammation process. In this study, the effect of ibuprofen as an anti-inflammatory drug has been studied on the ADA activity in the physiologic and pathologic temperatures.

Materials and Methods: ADA was assessed in the presence of 3 different doses of ibuprofen at 37°C and 42°C via spectrometry in 265 nm.

Results: Ibuprofen at high and low doses had an activation effect on the ADA activity at 37°C and moderated the sensitivity of enzyme activity to its substrate. It also decreased the anti-inflammatory effect of adenosine via decrease of its concentration and had a positive effect on immune system as well. The activation of the enzyme by Ibuprofen was decreased at 42°C and also Ibuprofen moderated the effect of temperature on dependency of enzyme activity to its substrate. Ibuprofen effects on immune system and anti-inflammatory effects of adenosine decreased at 42°C.

Conclusion: Ibuprofen is a putative activator for adenosine deaminase and administration of this drug could be useful for immune deficiency. Since there is no activator for ADA so far, this drug is important. Ibuprofen decreases anti-inflammatory effect of adenosine. In-vivo studies would be needed.

Key words: Adenosine deaminase, Ibuprofen, Activator, Inflammation, Enzyme Activation

* Corresponding author: Fax: +98 9181410426; Tel: +98 9181410426
rezaei.tavirani@ibb.ut.ac.ir