

بررسی اثرات جانبی آسپیرین بر ساختار و عملکرد آنزیم کاتالاز کبدی

بهاره کوهشکن^۱ (M.Sc)، عادلہ دیوسالار^{۱*} (Ph.D)، مریم سعیدی فر^۲ (Ph.D)، علی اکبر 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 تجزیه ی H_2O_2 به آب و اکسیژن مولکولی را کاتالیز می کند. از سوی دیگر آسپیرین داروی بسیار مهمی است که توسط بسیاری از بیماران و در سطح جهانی استفاده می شود. اهمیت این آنزیم در دفاع آنتی اکسیدان بدن و ارتباط این آنزیم کبدی با بیماری هایی از قبیل دیابت موجب شد تا در این مطالعه تاثیر آسپیرین را که محل متابولیزه شدن آن مانند تمامی داروها در کبد می باشد بر عمل کرد و ساختار آنزیم کاتالاز کبدی مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش ها: به کمک تکنیک های طیف سنجی مرئی - ماوراء بنفش و فلورئورسانس در دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی گراد تغییرات در ساختار و عمل کرد کاتالاز مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: با استفاده از مطالعات کینتیکی و با توجه به نمودار و معادله ی میکائیلیس-منستن مقدار K_m آنزیم ۴۰ میلی مولار اندازه گیری شد. نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که آسپیرین باعث ایجاد تغییر در فعالیت آنزیم نمی شود. هر چند افزودن آسپیرین باعث کاهش تدریجی در شدت نشر فلورئورسانس کاتالاز شد. علاوه بر آن با افزایش دما مقدار ثابت اتصال دارو به آنزیم کاهش یافت.

نتیجه گیری: کاهش مشاهده شده در نشر فلورئورسانس ذاتی کاتالاز در این مطالعه تحت تاثیر غلظت های افزایشی آسپیرین نشان داد که این دارو با باز کردن ساختار سه بعدی کاتالاز به عنوان یک خاموش کننده عمل می کند. هر چند که باز شدن ساختار آنزیم منجر به مهار فعالیت آن نشد.

واژه های کلیدی: کاتالاز، پراکسید هیدروژن، آسپیرین، فلورئورسانس

مقدمه

کاتالاز (EC 1.11.1.6) آنزیمی است که تجزیه ی پراکسید هیدروژن (H_2O_2) را به آب و اکسیژن مولکولی کاتالیز می کند [۱]. این آنزیم تقریباً در تمام موجودات زنده یافت می شود. کاتالاز تنظیم کننده ی اصلی متابولیسم پراکسید هیدروژن است [۲]. ارگانیسم های هوازی به طور قابل توجهی از بازده انرژی بالای به دست آمده در طی تبدیل کنترل شده ی O_2 به آب بهره می برند. در عین حال، حد واسطه های واکنشگر فعال

محصولات فرعی سمی و ناخواسته ای هستند که در طی متابولیسم هوازی تولید می شوند [۳]. H_2O_2 یک مولکول کوچک به شدت فعالی است که به عنوان یک محصول جانبی در متابولیسم انرژی تولید می شود. غلظت های پایین این ماده در سلول های ماهیچه ای سیگنالینگ انسولین را تسهیل می کند، اما مقادیر زیاد از حد آن باعث ایجاد آسیب های به شدت مخرب در پروتئین ها، DNA و RNA می شود [۴]. کاتالاز از طریق حذف کردن بیش از نیمی از H_2O_2 های تولید شده در

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 (pH ۷/۰) و غلظت‌های مختلف پراکسید هیدروژن (از ۱۰ تا ۹۰ میلی‌مولار) و غلظت ثابت آنزیم ($10^{-3} \times 0.56 \text{ mg/ml}$) است. سپس به منظور بررسی تاثیر داروی آسپیرین بر فعالیت کاتالیتیکی آنزیم، مقدار فعالیت آنزیم در حضور غلظت‌های متفاوت دارو اندازه‌گیری شد.

مطالعات فلئورسانس. به منظور بررسی تغییرات در ساختار سه بعدی آنزیم تحت تاثیر غلظت‌های مختلف آسپیرین و در دو دمای ۳۷ و ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد مطالعات فلئورسانس آنزیم به کمک دستگاه فلئورسانس Cary انجام گرفت. اساس این روش اندازه‌گیری شدت نشر فلئورسانس 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 اسپکتروفوتومتری 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 لاینیویربرک 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 لاینیویربرک - برک (معادله ۱)، مقدار K_m برابر با ۴۰ mM و مقدار V_{max} برابر با $8/8 \frac{mM}{s}$ 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 میکائلیس - 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

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 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 هم) و NADPH در اکتیوسایت است. زیرواحدها به طور آشکاری به طور مستقل از یک‌دیگر عمل می‌کنند [۶-۱۰].

آسپیرین یا استیل سالیسیلیک اسید دارویی 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 [۱۱، ۱۲].

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 متابولیسم 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 اسپکتروفوتومتر مرئی ماوراءبنفش مدل شیمادزو (Shimadzu) اندازه‌گیری شد که

مطالعات فلئوئورسانس. تکنیک فلئوئورسانس 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 اتصال آن در دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به کمک این تکنیک بررسی شده است. نشر فلئوئورسانس کاتالاز در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلف آسپیرین در دامنه‌ی طول موج ۲۹۵-۵۰۰ نانومتر 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 ماکزیم دارو از نشر ماکزیم کاتالاز در طول موج‌های معین، نمودار نشر ماکزیم در برابر غلظت دارو رسم شده که یک نمودار کاهشی وابسته به غلظت است (شکل ۶) که بیانگر آن است که نشر فلئوئورسانس 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.

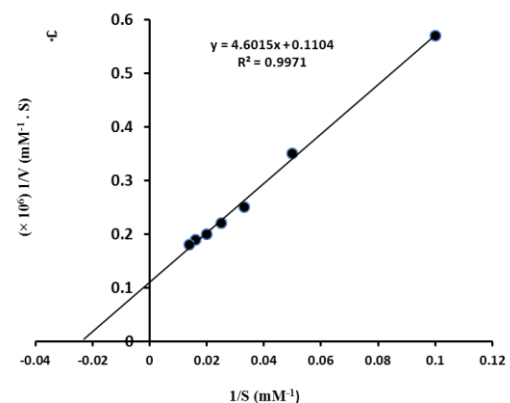
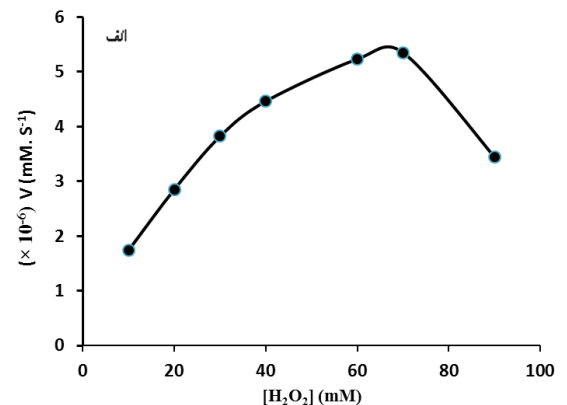
بررسی پارامترهای اتصال آسپیرین روی کاتالاز. به منظور تعیین پارامترهای اتصال آسپیرین به کاتالاز می‌توان از معادله‌ی لگاریتمی (۲) استفاده کرد که در تعیین پارامترهای اتصال لیگاند به ماکرومولکول معمولاً از آن استفاده می‌شود.

$$\log \frac{[F_0-F]}{F} = \log K + n \log [Q] \quad (2)$$

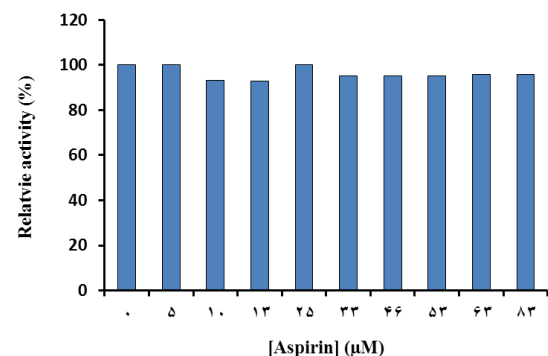
در معادله‌ی فوق F_0 بیانگر شدت نشر فلئوئورسانس پروتئین در غیاب دارو، F شدت نشر فلئوئورسانس پروتئین در حضور غلظت‌های مختلف دارو، K ثابت اتصال، $[Q]$ غلظت خاموش‌کننده (آسپیرین) و n تعداد مولکول‌های لیگاند (آسپیرین) متصل شده بر روی کاتالاز را نشان می‌دهد. با استفاده از رسم نمودار $\log \frac{[F_0-F]}{F}$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

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

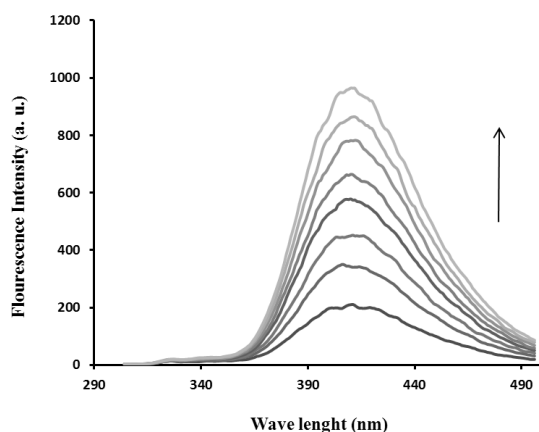
پس از یافتن نقطه اشباع آنزیم، یعنی غلظت ۷۰ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن، در این غلظت از سوبسترا، اثر غلظت‌های مختلف داروی آسپیرین بر فعالیت BLC بررسی شد که نتایج آن در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج حاصله نشان می‌دهند که در حضور غلظت‌های ذکر شده‌ی دارو تغییر محسوس و معنی‌داری در فعالیت آنزیم مشاهده نمی‌شود.



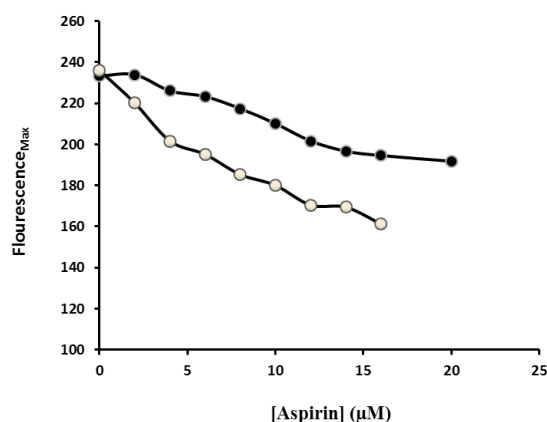
شکل ۱. الف) نمودار میکائیلیس - منتن آنزیم کاتالاز کبد گاو در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد ب) نمودار لاینیوبرک برای آنزیم کاتالاز کبد گاو در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد.



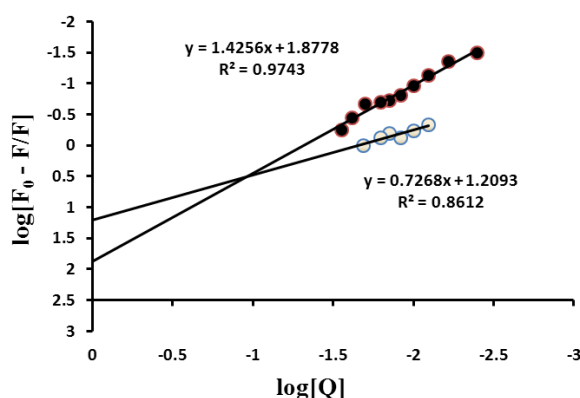
شکل ۲. درصد فعالیت نسبی کاتالاز تحت تاثیر غلظت‌های مختلف آسپیرین در دمای محیط



شکل ۵. شدت نشر فلوئورسانس غلظت‌های مختلف آسپیرین (از پایین به بالا (از پایین به بالا ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴ و ۱۶ میکرو مولار) در دمای ۲۵ درجه ی سانتیگراد.



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



شکل ۷. نمودار خطی $\log[F_0 - F/F]$ در مقابل $\log[Q]$ در دماهای ۲۵ (●) و ۳۷ (○) درجه ی سانتیگراد بر اساس معادله (۲).

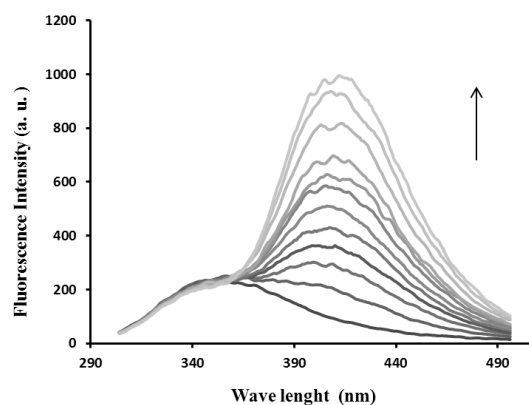
مقادیر ثابت اتصال (K_A) و تعداد آسپیرین‌های متصل شده روی کاتالاز (n) را محاسبه نمود. شکل ۷ نمودارهای مربوطه را در دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه ی سانتی‌گراد نشان می‌دهد. همچنین خلاصه نتایج اتصال در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. پارامترهای ترمودینامیکی و اتصال آسپیرین به کاتالاز در

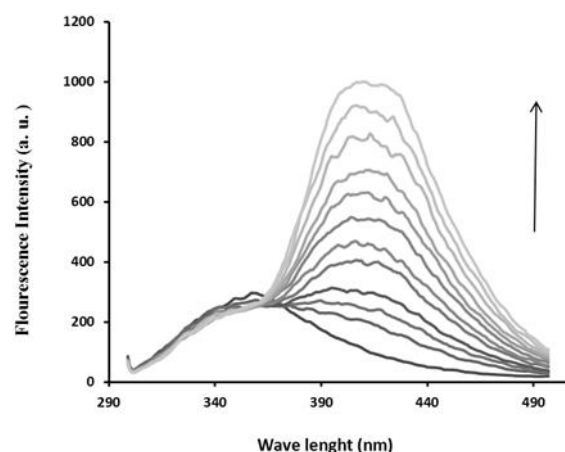
دماهای مختلف

Temperature (°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.



شکل ۸. شدت نشر فلوئورسانس کاتالاز کبد گاو در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلف آسپیرین (از پایین به بالا ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۲۰، ۲۴ و ۲۸ میکرو مولار) در دمای ۲۵ درجه ی سانتی‌گراد.



شکل ۹. شدت نشر فلوئورسانس کاتالاز کبد گاو در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلف آسپیرین (از پایین به بالا ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۲۰ و ۲۴ میکرو مولار) در دمای ۳۷ درجه ی سانتیگراد.

بحث و نتیجه‌گیری

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

II و یا تبدیل این فرم غیرفعال به حالت FeIII اولیه (فری کاتالاز) عمل می‌کند [۷].

با توجه به این‌که آسپیرین مشتق استیل‌شده‌ی 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 گلوکاتایون 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 عضوایی 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 (مونواکسیژناز ۱) 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 گلوکزآوری و کاهش گلوکز خون در یک بیمار دیابتی که با دوز بالای آسپیرین

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 مطالعه‌ی سانچز-کاسا ۶۶ درصد مهار کاتالاز را گزارش کرده‌اند، در صورتی‌که هیچ مهاری توسط دات و همکاران مشاهده نگردید. در مطالعه‌ی دیگری سالیسیلیک اسید ۱ میلی‌مولار باعث مهار جزئی (۹ درصد) 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 H_2O_2 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

[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 Å 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 Å resolution. *Acta Cryst* 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.

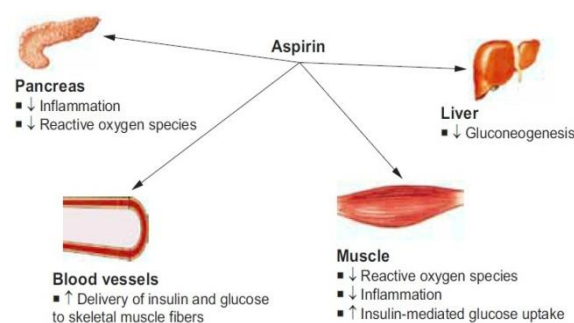
[22] Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 212: 167-178.

[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.

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 می‌دهد (۲۴).

با توجه به ارتباط کاتالاز و بیماری دیابت و مصرف آسپیرین در این افراد می‌توان پیشنهاد کرد که استفاده گسترده از آسپیرین در بیماران دیابتی که ممکن است با سطوح کاهش یافته 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, and Hansberg W. Functional and structural analysis of catalase oxidized 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 Mol Biol* 2000; 296: 295-309.
- [4] Veal E, Day A. Hydrogen peroxide as a signaling molecule. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15: 147-151.

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 °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 K_m 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

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