

مطالعه سینتیکی مهار پراکسیداز به وسیله برخی محرک‌های گزانتینی

طیبه رحمتی دروازی^{1*}، ریحانه سریری²

1- کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

2- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

* نویسنده مسئول: tr.darvazi@yahoo.com

پذیرش: 1400/9/28

دریافت: 1400/2/25

چکیده

گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) با غلظت‌های کم در تنظیم مسیرهای درون‌سلولی چون بیان ژن نقش مهمی دارند در حالی که غلظت‌های بالای آنها، با ایجاد استرس اکسیداتیو و آسیب به ماکرومولکول‌های حیاتی در پاتوژن‌های بسیاری از بیماری‌های مهم مؤثر هستند. هر سلول برای خنثی کردن مقادیر بالای ROSها از یک سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی استفاده می‌کند. پراکسیداز به‌عنوان یک آنزیم آنتی‌اکسیدانی مهم، اکسیداسیون سوبستراهای مختلف را با استفاده از هیدروژن پراکسید (که یک گونه فعال اکسیژنی است) کاتالیز می‌کند. از آنجایی که کافئین و تیوبرومین روزانه به‌طور گسترده استفاده می‌شوند و غلظت مصرفی آنها بر فعالیت بسیاری از آنزیم‌ها تأثیر دارد، به‌این ترتیب در پژوهش حاضر اثر مهارتی این متیل‌گزانتین‌ها بر فعالیت پراکسیداز بررسی شده است. فعالیت پراکسیداز به روش کینتیک به‌وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج 510 نانومتر به مدت 3 دقیقه، از راه دنبال کردن جذب محصول رنگی ناشی از اکسایش 4-آمینوآنتی‌پیرین در حضور و عدم حضور کافئین و تیوبرومین اندازه‌گیری می‌شود. در این مطالعه مشاهده شد که هر دو ترکیب بر فعالیت پراکسیداز اثری مهارتی دارند و مقادیر IC_{50} برای تیوبرومین و کافئین به ترتیب 0/50 و 0/60 میلی‌مولار تعیین شد. علاوه بر این، مقادیر K_m و V_{max} نارقابته بودن سازوکار مهار برای هر دو مهارکننده را تأیید می‌کند. همچنین مقدار K_i برای تیوبرومین و کافئین به ترتیب 0/03 و 0/08 میلی‌مولار تعیین شد. در نتیجه، تیوبرومین در مقایسه با کافئین به دلیل داشتن مقادیر کمتر IC_{50} و K_i ، دارای قدرت مهار بالاتر و تمایل اتصال بیشتری به کمپلکس آنزیم - سوبسترا است. بنابراین چنین استنباط می‌شود که تیوبرومین اثر مهارتی قوی‌تری بر فعالیت پراکسیداز دارد.

کلید واژگان: پراکسیداز، تیوبرومین، کافئین، گونه‌های فعال اکسیژن، محرک گزانتینی.

1- مقدمه

پراکسیداز به عنوان یک آنزیم آنتی اکسیدانی مهم، با استفاده از هیدروژن پراکسید به عنوان پذیرنده الکترون، واکنش های اکسیداسیون سوبستراهای مختلف ارگانیک و غیرارگانیک را کاتالیز می کند. این آنزیم که یک نوع پروتئین هم دار می باشد همانند تمام هم پراکسیدازها یک چرخه کاتالیتیک عمومی با سه مرحله احیای متوالی دارد. در اولین مرحله، آنزیم با یک مولکول هیدروژن پراکسید در طی یک فرایند اکسیداسیون - احیای دو الکترونی واکنش می دهد. در نتیجه در اثر احیاشدن هیدروژن پراکسید، آب تولید می شود و در این زمان خود آنزیم به شکل اکسید در می آید که با عنوان ترکیب I نام گذاری می شود. این ترکیب یک مرکز اکسی فریل ($O = Fe(IV)$) و یک رادیکال آلی کاتیونی دارد که روی هم یا یک ریشه تریپتوفان قرار دارد. در مرحله بعد رادیکال کاتیونی ترکیب I، یک مولکول سوبسترا را اکسید کرده و خود دستخوش احیای تک الکترونی می شود و ترکیب II با مرکز اکسی فریل را تشکیل می دهد. در نهایت، ترکیب II از راه اکسیداسیون تک الکترونی دومین سوبسترا به حالت پایه فریک احیا می شود که این مرحله از واکنش، تعیین کننده سرعت واکنش می باشد [1؛ 2].

هیدروژن پراکسید (H_2O_2) یکی از اعضای مهم گونه های فعال اکسیژنی (ROS) می باشد. ROSها یک گروه از رادیکال های آزاد هستند که به عنوان یونها یا مولکول هایی فعال در طی متابولیسم طبیعی سلول از اکسیژن مولکولی مشتق شده اند [2؛ 3]. از رایج ترین گونه های فعال اکسیژنی می توان به آنیون سوپراکسید ($O_2^{\bullet-}$)، رادیکال هیدروکسیل (OH^\bullet) و هیدروژن پراکسید (H_2O_2) اشاره کرد [4]. ROS ها قادر هستند یک تناقض عملکردی را به نمایش بگذارند؛ یعنی هم می توانند تأثیرات مفید و سودمندی را بر سیستم های زنده اعمال کنند و هم قابلیت آسیب رساندن به آنها را دارند.

غلظت های پایین یا متوسط گونه های فعال اکسیژنی در پاسخ به آسیب های سلولی از جمله دفاع در برابر عوامل عفونی یک نقش اساسی داشته و این توانایی را دارند که به عنوان یک عامل تأثیرگذار در عملکرد برخی از سیستم های پیام رسان سلولی مثل بیان ژن و آپوپتوز نقش ایفا کنند و یک ابزار کمکی مهم برای تنظیم تکثیر و تمایز سلولی باشند [5؛ 6]. علاوه بر این، استرس اکسیداتیو و استرس نیتروژاتیو از آثار مخربی است که رادیکال های آزاد می توانند بر بدن تحمیل کنند. همچنین قادر هستند در پاتوژن بسیاری از بیماری های قلبی - عروقی مؤثر باشند که این آثار مضر در غلظت های بالای ROS مشاهده می شود. تماس طولانی با رادیکال های آزاد حتی اگر مقدار آن پایین باشد، ممکن است باعث آسیب به مولکول های مهم بیولوژیکی از جمله پروتئین، کربوهیدرات و DNA شود که می تواند به ایجاد بیماری های خطرناکی چون انواع سرطانها منجر شود [7-9]. با توجه به عملکرد ROSها می توان چنین عنوان کرد، مولکول اکسیژن با وجود ضرورت مطلق که برای حیات هوایی دارد، در شرایط ویژه ای می تواند برای بدن، مضر هم باشد. به این پدیده مهم در اصطلاح پارادوکس اکسیژنی گفته می شود. بنابراین می توان بیان داشت که اختلال در عملکرد آنزیم پراکسیداز، ممکن است به گونه ای شرایط را برای تجمع ROSها و بروز برخی ناهنجاری ها در بدن فراهم کند [10].

از سوی دیگر امروزه نوشیدنی های رایجی چون چای، قهوه و نوشابه های گازدار که روزانه به وسیله مردم در سراسر جهان مصرف می شوند، حاوی مقادیر زیادی از آلکالوئیدهای گزانتینی مثل تئوبرومین (7 و 3 دی متیل گزانتین) و کافئین (7 و 3، 1 تری متیل گزانتین) هستند. این ترکیبها، آلکالوئید پورین های مشتق شده از گزانتین هستند که به طور گسترده ای در گونه های مختلف گیاهی توزیع شده اند و به مقدار زیادی در برگ چای، دانه های

قهوه و کاکائو دیده می‌شوند [11]. این آلکالوئید گزانتین‌ها، قادر هستند از سد خونی - مغزی عبور کنند و باعث تحریک سیستم عصبی مرکزی و محیطی شوند، به همین دلیل با عنوان محرک‌های روان‌گردان خفیف شناخته شده‌اند. از آثار اصلی این محرک‌ها می‌توان به افزایش هوشیاری، سرعت فکر، تمرکز، اعتماد به نفس، سرخوشی و افزایش یا کاهش اشتها اشاره کرد. کافئین به‌عنوان پرکاربردترین داروی روان‌گردان در بین انسان‌ها، ساختاری مشابه با متابولیت‌های خود از جمله تئوفیلین و تئوبرومین دارد. این ترکیب‌های طبیعی گزانتینی خاصیتی محرک داشته و به گروه محرک‌های طبیعی از خانواده بزرگ ترکیب‌های روان‌گردان تعلق دارند که به‌طور معمول به‌عنوان مواد تشکیل‌دهنده بسیاری از داروها استفاده می‌شوند [12].

تئوبرومین به‌عنوان ترکیبی ارزشمند قدمتی طولانی در کاربردهای بالینی دارد. یکی از کاربردهای درمانی مهم تئوبرومین، استفاده از آن به‌عنوان دارویی مفید برای درمان سرفه مزمن است، زیرا ثابت شده که مصرف غلظت مناسبی از این ترکیب از فعال‌سازی نامناسب عصب واگ (که یکی از ویژگی‌های اصلی سرفه مداوم است) جلوگیری می‌کند [13]. تئوبرومین همانند سایر آلکالوئید پورین‌های گزانتینی از جمله کافئین و تئوفیلین به‌عنوان یک محرک ملایم سیستم عصبی مرکزی (CNS) عمل می‌کند. با وجود اینکه، اثر محرک تئوبرومین در مقایسه با کافئین و تئوفیلین، کمتر بوده ولی نیمه عمر بیشتری در بدن دارد، بنابراین می‌تواند آثار طولانی‌تری بر بدن داشته باشد [14-16]. علاوه‌براین، تئوبرومین خصوصیت آنتی‌اکسیدانی نیز دارد، به عبارتی این توانایی را دارد که تولید رادیکال‌های هیدروکسیل را کاهش دهد [17]. این ترکیب به دلیل قابلیت خود در گشادکردن عروق خونی و ادرارآوردن، در مواردی مثل نارسایی قلبی که منجر به تجمع مایعات در بدن می‌شود و همچنین برای درمان

فشار خون نیز استفاده می‌شود [18]. مصرف تئوبرومین، HDL کلسترول و آپولیپوپروتئین A-1 را در خون انسان افزایش می‌دهد و نیز با تخریب C/EBP از راه سرکوب سیگنالینگ AR1، قادر است تمایز سلول‌های چربی را مهار کند [19]. تئوبرومین به‌عنوان یک ماده گیاهی قدرتمند از راه تبدیل چربی سفید به قهوه‌ای و فعال‌سازی سلول‌های چربی قهوه‌ای، توانایی کاهش چاقی ناشی از رژیم غذایی را دارد. افزون‌براین، اثر ضدچاقی تئوبرومین به یک مسیر تنظیمی وابسته به فسفودی‌استراز مرتبط است که تئوبرومین از راه میانکشی با آن، فعالیت PDE4D را در بافت‌های چربی مهار می‌کند [20؛ 21]. تئوبرومین با وجود آثار مفیدی که بر بدن دارد، برخی مواقع به دلیل داشتن خاصیت پرواکسیدانی می‌تواند باعث شکست اکسیداتیو DNA، در حضور یون‌های فلزی شود و همچنین اگر بیش از حد نرمال مصرف شود، می‌تواند باعث بی‌اشتهایی، تحریک معده، حالت تهوع و استفراغ باشد [15؛ 17].

کافئین با توجه به مقدار مصرف می‌تواند اثرهای مثبت و منفی بر بدن داشته باشد. زمانی که کافئین در سطح معمول و مناسب مصرف شود، این قابلیت را دارد که به‌عنوان یک عامل ضدافسردگی عمل کرده و عملکرد مغز را افزایش دهد. علاوه‌براین، می‌تواند برای درمان برخی از بیماری‌ها مانند پارکینسون، آلزایمر و سایر اختلال‌های سیستم عصبی مرکزی استفاده شود [22]. کاهش فعالیت سیستم دوپامینرژیک و تخریب سلول‌های عصبی دوپامینرژیک از دلایل اصلی افسردگی و بیماری پارکینسون است. از طرف دیگر، کافئین با مسدودکردن گیرنده‌های آدنوزین A₁ و A₂ و اختلال در عملکرد آنها، از سلول‌های عصبی دوپامینرژیک محافظت می‌کند. بنابراین، خواص ضدافسردگی کافئین و همچنین تأثیر مثبت آن بر بیماری پارکینسون با میانکشی آن با سیستم‌های دوپامینرژیک ارتباط دارد. علاوه‌براین،

سنجش فعالیت آنزیم آماده شد. همچنین در طی واکنش آنزیمی برای خواندن جذب، از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Visible از شرکت فارماسیا² مدل 3000 Ultrospec استفاده شد.

2-2 سنجش فعالیت پراکسیداز در عدم حضور محرک‌های گزانتینی

برای سنجش فعالیت سینتیکی آنزیم پراکسیداز از روش سزار و همکارانش با اندکی تغییر استفاده شد [26]. بنابراین محلولی حاوی 340 میکرولیتر فنل 0/17 مولار، 1/7 میکرولیتر هیدروژن پراکسید 1/7 میلی مولار، به همراه 4-آمینوآنتی پیرین 2/5 میلی مولار با غلظت متغیر (1، 2، 3، 5، 10، 15، 20، 30، 50، 100 میکرومولار) و بافر پتاسیم فسفات 0/2 مولار (pH=7.2) تهیه شد و در نهایت یک میکرولیتر از آنزیم پراکسیداز به محلول اضافه شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز نیز به روش کینتیک با استفاده از دستگاه اسپکتروسکوپی جذبی سنجش شد. در این سنجش آنزیمی جذب یک محصول رنگی کینونیمین، حاصل از اکسایش 4-آمینوآنتی پیرین در حضور همزمان فنل و هیدروژن پراکسید در دمای 25 درجه سانتیگراد، طول موج 510 نانومتر، به مدت 3 دقیقه دنبال شد [27]. در نهایت با توجه به اطلاعات به دست آمده، منحنی میکائیلیس - منتن و لاینویور - برک رسم شده و به دنبال آن ثابت‌های سینتیکی K_m و V_{max} در نبودن هر یک از مهارکننده‌ها محاسبه شد. گفتنی است که هر مرحله از آزمایش، سه مرتبه پیاپی تکرار شد.

3-2 سنجش فعالیت پراکسیداز در حضور محرک‌های گزانتینی

در این آزمایش برای تعیین تأثیر ترکیب‌های ذکر شده بر فعالیت آنزیم پراکسیداز، غلظت هیدروژن پراکسید، فنل و

مسدود شدن این گیرنده‌ها به وسیله کافئین، یک ویژگی حایز اهمیت دیگری نیز به آن می‌بخشد و آن ضد درد بودن است، بنابراین می‌تواند به عنوان دارو، جایگزین مناسبی برای مواد مخدر باشد [23؛ 24]. اثرهای آنتی‌اکسیدانی آن نیز از راه مهار پراکسیداسیون لیپیدی غشا (که امری مخالف با عملکرد گونه‌های فعال اکسیژنی است) محقق می‌شود و در مواردی عمل پاکسازی بدن از ROSها را بر عهده دارد. اما در مقابل، استفاده از غلظت بالای کافئین، اثرهای مضر بر بدن دارد و قادر به افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و استرس اکسیداتیو می‌باشد [25].

با توجه به مطالب بیان شده در بالا، محرک‌های طبیعی کافئین و تتوبرومین، از اجزای اساسی تشکیل دهنده نوشیدنی‌هایی چون چای، قهوه و نوشابه‌های گازدار محسوب می‌شوند. بر اساس مطالعه‌های پیشین نشان داده شده است که این ترکیب‌های گزانتینی با توجه به مقدار مصرف خود قادر هستند بر قسمت‌های مختلف بدن حتی آنزیم‌ها، آثار مفید یا مضر را داشته باشند. از طرفی آنزیم پراکسیداز در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی بدن نقشی مهم و ضروری دارد. بنابراین در پژوهش حاضر، اثر احتمالی این محرک‌های طبیعی بر فعالیت آنزیم حیاتی پراکسیداز بررسی شد.

2- روش پژوهش

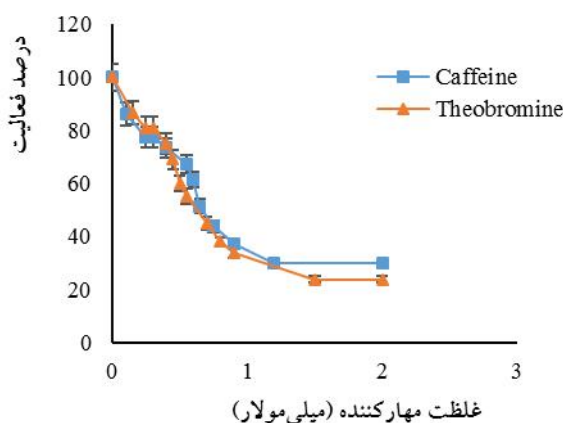
1-2 مواد شیمیایی

موادی که در این پژوهش استفاده شد، عبارتند از آنزیم پراکسیداز از گونه *Arthromyces ramosus* کافئین، تتوبرومین و 4-آمینوآنتی پیرین که از شرکت سیگما¹ تهیه شدند. هیدروژن پراکسید 30 درصد از صنایع شیمیایی دکتر مجللی و فنل از شرکت مرک خریداری شد. بافر پتاسیم فسفات نیز به طور تازه در محیط آزمایشگاه برای

تا 100 میکرومولار) و غلظت ثابت هریک از مهارکننده‌ها اندازه‌گیری شد که به تبعیت از آن، نمودارهای میکائیلیس - منتن و لاینویور - برک رسم شد. همچنین برای به‌دست‌آوردن مقدار ثابت مهاري (K_i)، در حضور هریک از مهارکننده‌ها، نمودار ثانویه ($1/k_m$ در برابر $[I]$) رسم شد. در نهایت برای تعیین جزئی یا کامل بودن مهار، نمودار دیکسون ($1/V$ در برابر $[I]$)، ترسیم شد.

3- نتایج

فعالیت پراکسیداز در غلظت‌های مختلف هریک از مهارکننده‌ها سنجش شد. براساس نتایج به‌دست‌آمده، مشاهده شد که فعالیت آنزیم پراکسیداز در حضور غلظت‌های مختلف کافئین و تئوبرومین به‌طور چشمگیری کاهش پیدا کرده است. همچنین با افزایش غلظت هریک از این دو ترکیب، کاهش بیشتری در فعالیت آنزیم مشاهده شده است (شکل 1).



شکل 1 فعالیت پراکسیداز در حضور غلظت‌های 2- 0/15 میلی‌مولار تئوبرومین و غلظت‌های 2- 0/1 میلی‌مولار کافئین در 25 درجه سانتیگراد، فنل 0/17 مولار، هیدروژن پراکسید 1/7 میلی‌مولار، 4-آمینوآنتی‌پیرین 2/5 میلی‌مولار، بافر 0/2 مولار و $pH=7.2$

نمودار همواره ثابت است. از این رو، پارامترهای سینتیکی K_m و V_{max} ، با توجه به نمودارهای لاینویور - برک در حضور و عدم حضور هریک از مهارکننده‌ها محاسبه و براساس نتایج کسب‌شده مشاهده شد که مقادیر K_m و

4-آمینوآنتی‌پیرین (غلظت اشباع سویسترا معادل 100 میکرومولار) در تمام سنجش‌ها ثابت و غلظت مهارکننده، متغیر در نظر گرفته شد. برای تئوبرومین از غلظت‌های 0/15 الی 2 میلی‌مولار و برای کافئین نیز از غلظت‌های 0/1 الی 2 میلی‌مولار استفاده شد. همان‌گونه که در بالا بیان شد، هر مرحله از آزمایش سه مرتبه تکرار شد و براساس نتایج به‌دست‌آمده مشاهده شد که فعالیت آنزیم پراکسیداز در حضور هریک از دو مهارکننده کاهش پیدا کرده است. در نهایت با توجه به اطلاعات کسب‌شده، نمودارهای مهاري و دز- پاسخ برای هریک از دو مهارکننده رسم شد.

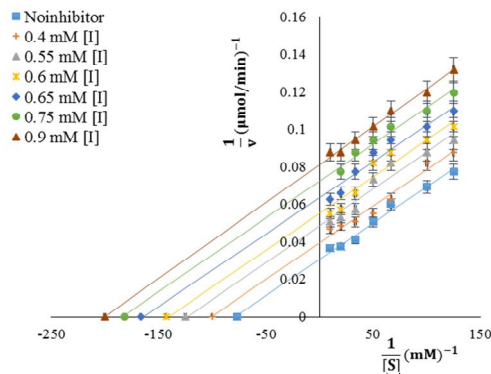
2-4 محاسبه‌های سینتیکی

مقادیر IC_{50} برای هریک از دو مهارکننده (با توجه به نمودار دز- پاسخ) محاسبه شد. همچنین برای تعیین سازوکار مهار و مقادیر پارامترهای سینتیکی K_m و V_{max} ، فعالیت آنزیمی در حضور غلظت‌های مختلف سویسترا (1)

3-1 تعیین پارامترهای سینتیکی K_m ، V_{max}

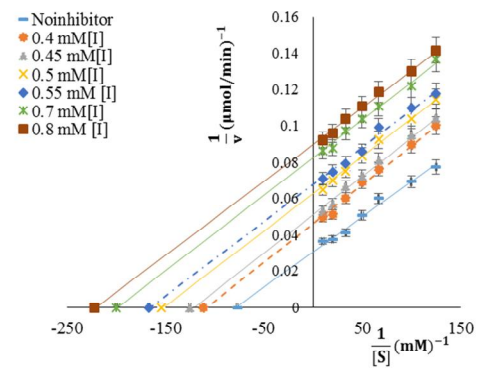
براساس نمودارهای لاینویور - برک (شکل‌های 2 و 3)، با زیاد شدن غلظت مهارکننده، محل تقاطع با محور Y ($1/V_{max}$) و محور X ($-1/K_m$) متغیر بوده، اما شیب

می‌دهد. نمودار هانس - ولف و ثابت‌های سینتیکی حاصل از آن در این مقاله ذکر نشده است. براساس اطلاعات پیشین ما می‌دانیم نمودار لاینویور - برک برای مهار جزئی و کامل به صورت خطی می‌باشد. بنابراین برای تشخیص نوع مهار مناسب نیست و یکی از بهترین راه‌های تشخیص مهار جزئی از مهار کامل، نمودار دیکسون است [28]. از این رو، نمودار دیکسون در حضور غلظت‌های مختلف تنوبرومین و کافئین ترسیم شد (شکل‌های 4 و 5).



شکل 3 نمودار لاینویور-برک در حضور و عدم حضور غلظت‌های 0/4-0/9 میلی‌مولار کافئین در 25 درجه سانتیگراد، فنل 0/17 مولار، هیدروژن پراکسید 1/7 میلی‌مولار، 4-آمینوآنتی‌پیرین 2/5 میلی‌مولار، بافر 0/2 مولار و pH=7.2

V_{max} با افزایش غلظت مهارکننده کاهش پیدا می‌کنند. مقادیر به‌دست‌آمده برای پارامترهای سینتیکی در جدول 1 ذکر و با هم مقایسه شده است. دقت و درستی مقادیر K_m و V_{max} محاسبه‌شده، از راه ترسیم نمودار هانس - ولف در حضور و عدم حضور غلظت IC_{50} هریک از مهارکننده‌ها تعیین شد و مقادیر K_m و V_{max} برای هر دو مهارکننده تخمین زده شد. در نهایت مشاهده شد که مقادیر K_m و V_{max} به‌دست‌آمده از طریق هانس - ولف و لاینویور - برک، معادل هم بوده و به‌طور دقیق یکدیگر را تأیید می‌کنند. این امر بالابودن دقت آزمایش را نشان

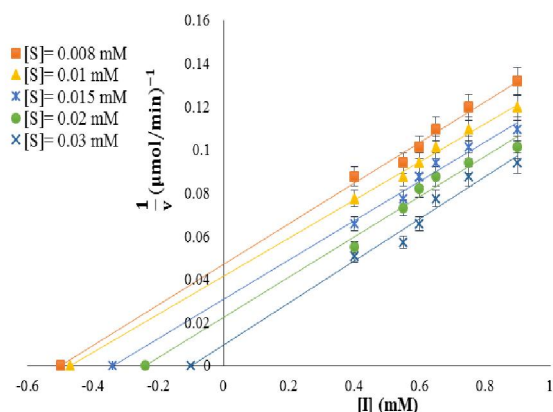


شکل 2 نمودار لاینویور-برک در حضور و عدم حضور غلظت‌های 0/4-0/8 میلی‌مولار تنوبرومین در 25 درجه سانتیگراد، فنل 0/17 مولار، هیدروژن پراکسید 1/7 میلی‌مولار، 4-آمینوآنتی‌پیرین 2/5 میلی‌مولار، بافر 0/2 مولار و pH=7.2

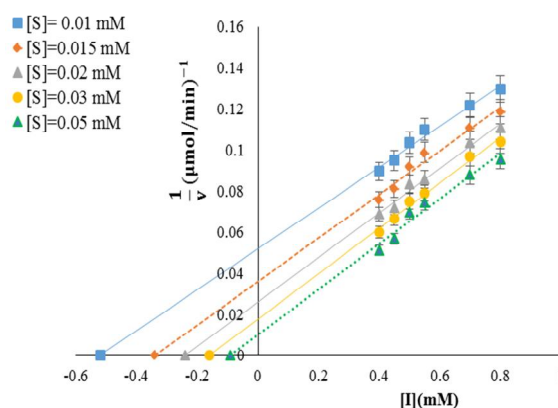
جدول 1 مقایسه مقادیر K_m و V_{max} به‌دست‌آمده از نمودار لاینویوربرک در حضور غلظت‌های مختلف کافئین و

تنوبرومین

کافئین (mM)	0	0/4	0/55	0/6	0/65	0/75	0/9
K_m (mM)	0/013	0/010	0/008	0/007	0/006	0/0055	0/005
V_{max} (μmol/min)	31/948	25/188	20/964	18/726	16/155	13/908	12/239
تنوبرومین (mM)	0	0/4	0/45	0/5	0/55	0/7	0/8
K_m (mM)	0/013	0/009	0/008	0/0065	0/006	0/005	0/0045
V_{max} (μmol/min)	31/948	22/321	20/202	16/313	15/083	12/303	11/299



شکل 5 نمودار دیکسون در حضور و عدم حضور مهارکننده کافئین در 25 درجه سانتیگراد، فنل 0/17 مولار، هیدروژن پراکسید 1/7 میلی مولار، 4-آمینوآنتی پیرین 2/5 میلی مولار، بافر 0/2 مولار و pH=7.2

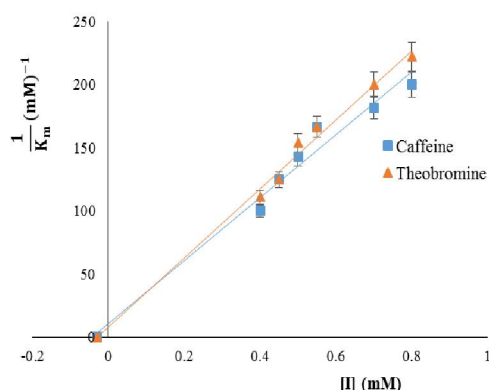


شکل 4 نمودار دیکسون در حضور و عدم حضور مهارکننده تتوبرومین در 25 درجه سانتیگراد، فنل 0/17 مولار، هیدروژن پراکسید 1/7 میلی مولار، 4-آمینوآنتی پیرین 2/5 میلی مولار، بافر 0/2 مولار و pH=7.2

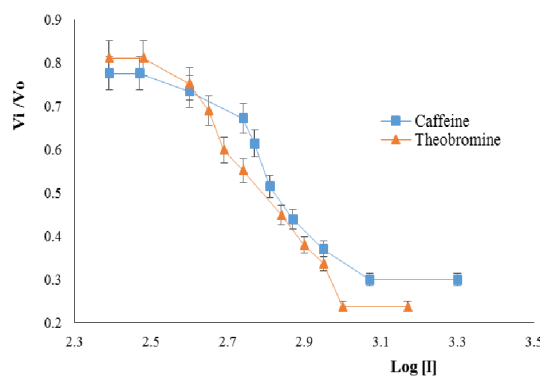
2-3 تعیین مقادیر K_i و IC_{50}

مقادیر IC_{50} برای هر دو مهارکننده با توجه به نمودار اثر مهاری (شکل 1) و نمودار در - پاسخ (شکل 6) تعیین شد که برای کافئین 0/60 میلی مولار و برای تتوبرومین 0/50 میلی مولار می باشد. همچنین ثابت مهاری (K_i) برای هر یک از مهارکننده ها از روی نمودار ثانویه (شکل 7) تعیین شد و مقدار K_i برای کافئین و تتوبرومین به ترتیب

0/03 و 0/08 میلی مولار به دست آمد. ثابت مهاری (K_i) نشان دهنده میزان تمایل آنزیم به مهارکننده می باشد. بنابراین اگر مقدار آن برای مهارکننده ای کمتر باشد، تمایل مهارکننده برای اتصال به آنزیم بیشتر بوده و با قدرت بیشتری به آنزیم متصل می شود [29]. مقادیر K_i و IC_{50} برای هر یک از دو مهارکننده در جدول 2 ذکر شده است.

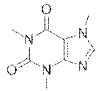
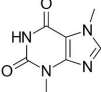


شکل 7 منحنی ثانویه در حضور مهارکننده کافئین و تتوبرومین در 25 درجه سانتیگراد، فنل 0/17 مولار، هیدروژن پراکسید 1/7 میلی مولار، 4-آمینو آنتی پیرین 2/5 میلی مولار، بافر 0/2 مولار و pH=7.2



شکل 6 منحنی دز- پاسخ آنزیم پراکسیداز در حضور غلظت های مختلف کافئین و تتوبرومین در 25 درجه سانتیگراد، فنل 0/17 مولار، هیدروژن پراکسید 1/7 میلی مولار، 4-آمینو آنتی پیرین 2/5 میلی مولار، بافر 0/2 مولار و pH=7.2

جدول 2 مقایسه مقادیر IC_{50} و K_i کافئین و تئوبرومین

مهارکننده	ساختار شیمیایی	IC_{50} (mM)	K_i (mM)
کافئین		0/60	0/08
تئوبرومین		0/50	0/03

4- بحث

امروزه قهوه، چای و نوشابه‌های گازدار که به‌عنوان نوشیدنی‌های رایج، روزانه به‌وسیله افراد استفاده می‌شوند، حاوی مقادیر بالایی از مشتقات گزانتینی از جمله تئوبرومین و کافئین هستند. همچنین این ترکیب‌ها براساس غلظت مصرفی قادر هستند اثرهای سودمند یا مخربی را بر قسمت‌های مختلف بدن از جمله آنزیم‌ها داشته باشند [11].

در مطالعه حاضر با توجه به نتایج به‌دست‌آمده مشاهده شد که تئوبرومین و کافئین اثر مهارتی بر آنزیم داشته و فعالیت آن را به‌طور چشمگیری کاهش می‌دهند. پارامترهای سینتیکی K_m و V_{max} برای هر دو ترکیب که از نمودار لاینیویر - برک (شکل‌های 2 و 3) به دست آمده است، با زیاد شدن غلظت مهارکننده روندی کاهشی داشته و نشان‌دهنده این است که هر دو مهارکننده با پیروی از یک الگوی مهارتی نارقابتی، فعالیت آنزیم را کاهش می‌دهند، زیرا هر یک از ترکیب‌های مذکور فقط به کمپلکس پراکسیداز - 4-آمینو آنتی‌پیرین (آنزیم - سوبسترا)، یعنی به جایگاهی متفاوت از جایگاه فعال پراکسیداز اتصال پیدا می‌کنند. در نتیجه در حضور هر یک از این ترکیب‌های گزانتینی، سوبسترای 4-آمینو آنتی‌پیرین این قابلیت را دارد که بعد از اتصال به پراکسیداز، ساختار آنزیم را به گونه‌ای تغییر دهد تا جایگاه موردنظر برای اتصال مهارکننده را در دسترس آن قرار دهد. به این ترتیب، میل ترکیبی پراکسیداز به تئوبرومین یا کافئین افزایش پیدا

کرده و مقدار K_m کاهش پیدا می‌کند. در نهایت یک کمپلکس سه‌تایی مرده و بی حاصل شامل پراکسیداز، 4-آمینو آنتی‌پیرین و ترکیب گزانتینی موردنظر شکل گرفته و واکنش آنزیمی مهار می‌شود که این امر کاهش مقدار V_{max} را توجیه می‌کند.

براساس مقادیر K_i و IC_{50} محاسبه‌شده از راه نمودار دز- پاسخ (شکل 6) و نمودار ثانویه (شکل 7) مشاهده شد که تئوبرومین نسبت به کافئین مقادیر IC_{50} و K_i کمتری دارد. از طرفی با توجه به تعریف ثابت مهارتی (K_i)، این پارامتر نشان‌دهنده میزان تمایل آنزیم به مهارکننده بوده و مقدار عددی آن همواره با قدرت اتصال مهارکننده به آنزیم ارتباطی معکوس دارد [30؛ 31]. همچنین IC_{50} ، نشانگر قدرت مهارتی مهارکننده می‌باشد و به‌عنوان غلظتی از مهارکننده که در آن غلظت، فعالیت آنزیم به اندازه نصف کاهش پیدا کرده است، تعریف می‌شود که هرچه قدر مقدار IC_{50} یک ترکیب، کمتر باشد، گویای قدرت مهارتی بیشتر آن است [30]. بنابراین می‌توان چنین استنباط کرد که تئوبرومین به دلیل داشتن مقادیر کمتر K_i و IC_{50} نسبت به کافئین، تمایل اتصال بیشتر به کمپلکس آنزیم - سوبسترا و در نهایت قدرت مهار بالاتری دارد.

برای توجیه قدرت مهارتی بیشتر تئوبرومین، با توجه به ساختار شیمیایی این مهارکننده‌ها می‌توان چنین پیشنهاد داد که بیشتر بودن قدرت مهارتی تئوبرومین در مقایسه با کافئین به گروه‌های حجیم در جایگاه‌های N_1 ، N_3 و

داشته و سازوکار مهار برای هر سه مهارکننده از نوع رقابتی است. علاوه براین، با توجه به مقادیر K_i این ترکیب‌ها، تئوفیلین بیشترین قدرت اتصال به آنزیم را از خود نشان می‌دهد، درحالی‌که تئوبرومین در جایگاه دوم قرار گرفته و کمترین قدرت اتصال نیز مربوط به کافئین است [35].

از مطالعات مشابه دیگری که در این زمینه انجام شده است، بررسی اثر آلکالوئیدهای گزانتینین چون کافئین، تئوفیلین و بنتوکسی‌فیلین بر فعالیت آلکالین فسفاتاز می‌باشد و نتایج حاصل شده از این آزمایش نشان می‌دهد که همه این ترکیب‌ها بر فعالیت آنزیم، اثری کاهشی داشته و آن را به‌طور نارقابتی مهار می‌کنند و مشاهده شد که تئوفیلین اثر کاهشی بیشتری نسبت به بقیه دارد [36]. در پژوهشی دیگر، تأثیر کافئین بر آنزیم‌های ترانسفراز از جمله GPT، GGT و GOT بررسی شده است که در این مطالعه مشاهده شد کافئین با وجود اینکه برای آنزیم‌های GOT و GPT به‌عنوان فعال‌کننده عمل می‌کند و فعالیت آنها را افزایش می‌دهد، آنزیم GGT را با سازوکار غیررقابتی مهار می‌کند [37]. در سال 2019، پژوهشگران در مطالعه‌ای اثر مهار تئوبرومین و متیل‌گزانتین‌های مرتبط را بر آمین‌اکسیداز اولیه بررسی کردند. براساس نتایج به‌دست‌آمده، سازوکار مهار برای همه متیل‌گزانتین‌ها از نوع غیررقابتی تشخیص داده شد و کم‌تر بودن قابل توجه مقدار K_i برای تئوبرومین نسبت به متیل‌گزانتین‌های دیگر، اثباتی برای قدرت مهار بیشتر آن بود [16]. همچنین در طی پژوهشی، تأثیر کافئین بر مونوآمین‌اکسیداز بررسی شد و در این آزمایش مشاهده شد که کافئین فعالیت آنزیم را با الگوی رقابتی کاهش داده و آن را مهار می‌کند [38].

5- نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، با توجه به نتایج به‌دست‌آمده به نظر می‌رسد که مصرف محرک‌های گزانتینی مثل کافئین و

N_7 مرتبط می‌باشد، زیرا اتم‌های N_3 و N_7 پورین‌ها یک نقش ضروری برای تشخیص مهارکننده به‌وسیله آنزیم و تمایل اتصال به آن دارند. با این وجود به‌طور کامل آشکار و واضح است که متیله شدن گزانتین در موقعیت‌های 3 و 7 برای مهار، لازم و ضروری است [16]. از طرفی اتم‌های C_6 ، N_7 و C_8 باز پورینی به‌طور ویژه برای شناسایی به‌وسیله آنزیم مهم هستند و میان‌کنش شدیدی با آنزیم دارند که این موضوع به نوبه خود نشان‌دهنده اهمیت جایگاه N_7 پورین‌ها می‌باشد [32]. در مورد کافئین نیز پیشنهاد می‌شود که این ترکیب با سه گروه متیل در موقعیت‌های N_1 ، N_3 و N_7 ، احتمالاً به دلیل بیشتر بودن تعداد گروه‌ها و ممانعت فضایی به‌عنوان یک مهارکننده ضعیف‌تر عمل می‌کند. از این رو می‌توان تفاوت در قدرت مهار را به ساختار کلی هر مهارکننده نسبت داد.

از طرفی، در این مطالعه برای تعیین نوع مهار از نمودار دیکسون به‌عنوان روشی بسیار کارآمد استفاده شد. براساس توضیحاتی که پیش تر بیان شد، نمودار دیکسون فقط در زمانی که مهار کامل باشد، از الگوی خطی تبعیت می‌کند و در صورت جزئی بودن مهار به‌صورت هذلولی است [29؛ 33]. بنابراین، براساس نتایج کسب‌شده به دلیل خطی بودن نمودار دیکسون در حضور هریک از مهارکننده‌ها، کامل بودن نوع مهار تأیید می‌شود.

نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش، با یافته‌های گروهی از پژوهشگران که تأثیر کافئین را بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کبد موش، بررسی کردند، شباهت دارد. براساس مشاهده‌های این پژوهشگران، کافئین اثری مهار بر آنزیم کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز دارد و فعالیت آنها را به‌طور چشمگیری کاهش می‌دهد [34]. در مطالعه دیگری، تأثیر متیل‌گزانتین‌هایی مثل کافئین، تئوبرومین و تئوفیلین بر فعالیت گزانتین اکسیداز شش، قلب، کبد و شیر موش بررسی شده است که نشان می‌دهد هریک از این ترکیب‌ها بر فعالیت آنزیم گزانتین اکسیداز اثر مهار

cancer therapy: the bright side of the moon. *Experimental & Molecular Medicine*. 52,192-203.

[7] Gammella, E., Recalcati, S., and Cairo, G. (2016) Dual role of ROS as signal and stress agents: iron tips the balance in favor of toxic effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 16, 1-9.

[8] Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., and Abete, P. (2018) Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*. 13, 757-772.

[9] Srinivas, U. S., Tan, B. W., Vellayappan, B. A., and Jeyasekharan, A. D. (2019) ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biology*. 25,1-32.

[10] Davies, K. J. (2000) An overview of oxidative stress. *IUBMB Life*. 50, 241-244.

[11] Fredholm, B.B. (2010) *Methylxanthines*. Springer Science & Business Media, 554 pp.

[12] Monteiro, J. P., Alves, M. G., Oliveira, P. F., Silva, B.M. (2016) Structure-bioactivity relationships of methylxanthines: trying to make sense of all the promises and the drawbacks. *Molecules*. 21,974-1006.

[13] Morice, A. H., McGarvey, L., Pavord, I. D., Higgins, B., Chung, K. F., and Birring, S. S. (2017) Theobromine for the treatment of persistent cough: a randomised, multicentre, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Journal of Thoracic Disease*. 9, 1864-1872.

[14] Mitchell, E., Slettenaar, M., Vd Meer, N., Transler, C., Jans, L., Quadt, F., and Berry, M. (2011) Differential contributions of theobromine and caffeine on mood, psychomotor performance and blood pressure. *Physiology & Behavior*. 104, 816-822.

[15] Baggott, M. J., Childs, E., Hart, A. B., de Bruin, E., Palmer, A. A., Wilkinson, J. E., and de Wit, H. (2013) Psychopharmacology of theobromine in healthy volunteers. *Psychopharmacology*. 228, 109-118.

[16] Shanahan, P., O'Sullivan, J., Tipton, K. F., Kinsella, G. K., Ryan, B.J., and Henehan, G. T. (2019) Theobromine and related methylxanthines as inhibitors of Primary

تئوبرومین در غلظت‌های بالاتر از حد نرمال می‌تواند فعالیت بسیاری از آنزیم‌های ضروری از جمله پراکسیداز را مهار کند. علاوه بر این، اختلال در عملکرد آنزیم مهم و حیاتی پراکسیداز ممکن است سازوکار دفاعی آنتی‌اکسیدانی را تحت تأثیر قرار داده و شرایط مناسب برای بروز ناهنجاری‌هایی چون استرس اکسیداتیو و در نهایت سرطان را فراهم کند. در نتیجه، با توجه به مقادیر IC_{50} و K_i به دست آمده برای هریک از مهارکننده‌ها، چنین نتیجه‌گیری می‌شود که تئوبرومین در مقایسه با کافئین به دلیل داشتن مقادیر کمتر IC_{50} و K_i ، احتمالاً اثر منفی بیشتری بر عملکرد پراکسیداز دارد. بنابراین، تئوبرومین نسبت به کافئین مهارکننده قوی‌تری بوده و فعالیت پراکسیداز را به مقدار بیشتری تحت تأثیر قرار می‌دهد.

منابع

[1] Conesa, A., Punt, P. J., and vanden Hondel, C. A. (2002) Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *Journal of Biotechnology*. 93,143-158.

[2] Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological Interactions*. 160, 1-40.

[3] Pisoschi, A. M., and Pop, A. (2015) The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 97,55-74.

[4] Schieber, M., and Chandel, N.S. (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*. 24, 453- 462.

[5] Agidigbi, T.S., and Kim, C. (2019) Reactive oxygen species in osteoclast differentiation and possible pharmaceutical targets of ROS-mediated osteoclast diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 20, 3576-3592.

[6] Perillo, B., Di Donato, M., Pezone, A., Di Zazzo, E., Giovannelli, P., Galasso, G., Castoria, G., and Migliaccio, A. (2020) ROS in

- of caffeine: effect on the activities of hepatic antioxidant enzymes of Ehrlich ascites tumor-bearing mice. *Indian Journal of Experimental Biology*. 41, 283-289.
- [26] Ferreira, L. C., Cataneo, A. C., Remaeh, L. M. R., Corniani, N., de Fátima Fumis, T., de Souza, Y. A., Scavroni, J., and Soares, B. J. A. (2010) Nitric oxide reduces oxidative stress generated by lactofen in soybean plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 97, 47-54.
- [27] Sariri, R., Sajedi, R., and Jafarian, V. (2006) Inhibition of horseradish peroxidase activity by thiol type inhibitors. *Journal of Molecular Liquids*. 123, 20-23.
- [28] Cornish-Bowden, A. (2013) *Fundamentals of enzyme kinetics*. John Wiley & Sons, 516 pp.
- [29] Copeland, R. A. (2000) *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. John Wiley & Sons, 411 pp.
- [30] Bisswanger, H. (2017) *Enzyme kinetics: principles and methods*. John Wiley & Sons, 316 pp.
- [31] Cook, P. F., and Cleland, W. W. (2007) *Enzyme kinetics and mechanism*. Garland Science, 403 pp.
- [32] Ataei, G., Bagheri, S., Divsalar, A., Sabouri, A., Safarian, S., Namaki, S., and Mousavi, M.A.A. (2007) A kinetic comparison on the inhibition of adenosine deaminase by purine drug. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 6, 43-50.
- [33] Yoshino, M., and Murakami, K. (2009) A graphical method for determining inhibition constants. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 24, 1288-1290.
- [34] Sung, J. H., Chang, C. C., and Chang, Y. S. (2004) The effect of caffeine on the antioxidative activities of mouse liver. *The Korean Journal of Food And Nutrition*. 17, 442-449.
- [35] Bae, J., Park, P. S., Chun, B. Y., Choi, B. Y., Kim, M. K., Shin, M. H., Lee, Y. H., Shin, D. H., and Kim, S. K. (2015) The effect of coffee, tea, and caffeine consumption on serum uric acid and the risk of hyperuricemia in Amine Oxidase. *Journal of Food Biochemistry*. 43, 1-7.
- [17] Azam, S., Hadi, N., Khan, N. U., and Hadi, S. M. (2003) Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Medical science monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 9, 325-330.
- [18] Cova, I., Leta, V., Mariani, C., Pantoni, L., and Pomati, S. (2019) Exploring cocoa properties: is theobromine a cognitive modulator? *Psychopharmacology*. 236, 561-572.
- [19] Neufingerl, N., Zebregs, Y. E., Schuring, E. A., and Trautwein, E. A. (2013) Effect of cocoa and theobromine consumption on serum HDL-cholesterol concentrations: a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 97, 1201-1209
- [20] Mitani, T., Watanabe, S., Yoshioka, Y., Katayama, S., Nakamura, S., and Ashida, H. (2017) Theobromine suppresses adipogenesis through enhancement of CCAAT-enhancer-binding protein β degradation by adenosine receptor A1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 1864, 2438-2448.
- [21] Jang, M. H., Mukherjee, S., Choi, M. J., Kang, N. H., Pham, H. G., and Yun, J. W. (2020) Theobromine alleviates diet-induced obesity in mice via phosphodiesterase-4 inhibition. *European Journal of Nutrition*. 59, 3503-3516.
- [22] Lara, D.R. (2010) Caffeine, mental health, and psychiatric disorders. *Journal of Alzheimer's Disease*. 20, 239-248.
- [23] Higdon, J.V., and Frei, B. (2006) Coffee and health: a review of recent human research. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 46, 101-123.
- [24] Rivera-Oliver, M., and Díaz-Ríos, M. (2014) Using caffeine and other adenosine receptor antagonists and agonists as therapeutic tools against neurodegenerative diseases: a review. *Life Sciences*. 101, 1-9.
- [25] Mukhopadhyay, S., Mondal, A., and Poddar, M. K. (2003) Chronic administration

[37] Al-Qaisi, Z. H. J., Abbass, S. A. R., and Abdullah, A. H. (2011) Effect of Caffeine on Some Transferase Enzymes Activities. *International Journal of Chemistry*. 3, 140-148.

[38] Petzer, A., Pienaar, A., and Petzer, J. P., (2013) The interactions of caffeine with monoamine oxidase. *Life Sciences*. 93, 283-287.

Korean multi-rural communities Cohort. *Rheumatology International*. 35, 327-336.

[36] Glogowski, J., Danforth, D.R., and Cierszko, A. (2002) Inhibition of alkaline phosphatase activity of boar semen by pentoxifylline, caffeine, and theophylline. *Journal of andrology*. 23, 783-792.

A kinetic study of peroxidase inhibition by some xanthine stimulants

Tayyebeh Rahmati Darvazi^{1*}, Reyhaneh Sariri²

1 -MSc Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

2 -Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

Postal Code 4193833697

*Corresponding author: tr.darvazi@yahoo.com

Received: 2021/5/15

Accepted: 2021/12/19

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) at low concentrations effectively regulates intracellular pathways such as gene expression. Whereas their high concentrations are involved in the pathogenesis of many diseases by causing oxidative stress and damaging vital macromolecules. Each cell is equipped with an antioxidant defense system to neutralize high levels of ROS. Peroxidase, as an essential antioxidant enzyme, catalyzes the oxidation of various substrates using hydrogen peroxide which is a reactive oxygen species. Since, the caffeine and theobromine are widely consumed daily in the world, and their concentrations affect the activity of many enzymes. Therefore, in the present study, the inhibitory effect of these methylxanthines on peroxidase activity has been examined. The peroxidase activity is measured by a spectrophotometer at 510 nm for 3 minutes with following absorption due to the oxidation of 4-aminoantipyrine in the presence and absence of caffeine and theobromine. In this study, it was observed that both compounds had an inhibitory effect on peroxidase activity. The values of IC_{50} for theobromine and caffeine were obtained as 0.5 and 0.6 mmol, respectively. Moreover, the values of K_m and V_{max} showed that both inhibitors acted by an un-competitive mechanism of inhibition. Also, K_i values for theobromine and caffeine were calculated 0.03 and 0.08 mM, respectively. The values of K_i and IC_{50} for theobromine was lower than those of caffeine indicating that theobromine has a higher inhibition strength and binding affinity to the enzyme-substrate complex. Therefore, it can be concluded that theobromine has a stronger inhibitory effect on peroxidase activity.

Keywords: Peroxidase, Caffeine, Xanthine stimulant, Theobromine, ROS