مطالعه سینتیکی مهار پراکسیداز به‌وسیله برخی محرک‌های گزانتینی

طیبه رحمتی دروازی[1*]، ریحانه سریری[2]

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

دریافت: 1400/2/25 **پذیرش: 1400/9/28**

چکیده

گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) با غلظت‌های کم در تنظیم مسیرهای درون‌سلولی چون بیان ژن نقش مهمی دارند درحالی‌که غلظت‌های بالای آنها، با ایجاد استرس اکسیداتیو و آسیب به ماکرومولکول‌های حیاتی در پاتوژنز بسیاری از بیماری‌های مهم مؤثر هستند. هر سلول برای خنثی‌کردن 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 آن‌جایی‌که کافئین و تئوبرومین روزانه به‌طور گسترده استفاده می‌شوند و غلظت مصرفی آنها بر فعالیت بسیاری از آنزیم‌ها تأثیر دارد، به‌این‌ترتیب در پژوهش حاضر اثر مهاری 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 دنبال‌کردن جذب محصول رنگی ناشی از اکسایش 4-آمینوآنتی‌پیرین در حضور و عدم حضور کافئین و تئوبرومین اندازه‌گیری می‌شود. در این مطالعه مشاهده شد که هر دو ترکیب بر فعالیت پراکسیداز اثری مهاری دارند و مقادیر IC_{50} برای تئوبرومین و کافئین به‌ترتیب 0/50 و 0/60 میلی‌مولار تعیین شد. علاوه بر این، مقادیر K_m و V_{max}، نارقابتی‌بودن سازوکار مهار برای هر دو مهارکننده را تأیید می‌کند. همچنین مقدار K_i برای تئوبرومین و کافئین به‌ترتیب 0/03 و 0/08 میلی‌مولار تعیین شد. درنتیجه، تئوبرومین 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 تئوبرومین اثر مهاری قوی‌تری بر فعالیت پراکسیداز دارد.

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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-11]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.11.6]

1- مقدمه

پراکسیداز به‌عنوان یک آنزیم آنتی‌اکسیدانی مهم، با استفاده از هیدروژن پراکسید به‌عنوان پذیرنده الکترون، واکنش‌های اکسیداسیون سوبستراهای مختلف ارگانیک و غیرارگانیک را کاتالیز می‌کند. این آنزیم که یک نوع پروتئن هم‌دار می‌باشد همانند تمام هم‌پراکسیدازها 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 دوالکترونی واکنش می‌دهد. درنتیجه در اثر احیاشدن هیدروژن پراکسید، آب تولید می‌شود و در این زمان خود آنزیم به شکل اکسید در می‌آید که با عنوان ترکیب I نامگذاری می‌شود. 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 تک‌الکترونی می‌شود و ترکیب II با مرکز اکسی فریل را تشکیل می‌دهد. درنهایت، ترکیب II از راه اکسیداسیون تک‌الکترونی دومین سوبسترا به حالت پایه فریک احیا می‌شود که این مرحله از واکنش، تعیین‌کننده سرعت واکنش می‌باشد [1؛ 2].

هیدروژن پراکسید (H_2O_2) یکی از اعضای مهم گونه‌های فعال اکسیژنی (ROS) می‌باشد. ROSها یک گروه از رادیکال‌های آزاد هستند که به‌عنوان یون‌ها یا مولکول‌هایی فعال در طی متابولیسم طبیعی سلول از اکسیژن مولکولی مشتق شده‌اند [2؛ 3]. از رایج‌ترین گونه‌های فعال اکسیژنی می‌توان به آنیون سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$)، رادیکال هیدروکسیل ($OH^{\cdot}$) و هیدروژن پراکسید (H_2O_2) اشاره کرد [4]. ROS ها قادر هستند یک تناقض عملکردی را به نمایش بگذارند؛ یعنی هم می‌توانند تأثیرات مفید و سودمندی را بر سیستم‌های زنده اعمال کنند و هم قابلیت آسیب‌رساندن به آنها را دارند. غلظت‌های پایین یا متوسط گونه‌های فعال اکسیژنی در پاسخ به آسیب‌های سلولی از جمله دفاع در برابر عوامل عفونی یک نقش اساسی داشته و این توانایی را دارند که به‌عنوان یک عامل تأثیرگذار در عملکرد برخی از سیستم‌های پیام‌رسان 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 نیتروزاتیو از آثار مخربی است که رادیکال‌های آزاد می‌توانند بر بدن تحمیل کنند. همچنین قادر هستند در پاتوژنز بسیاری از بیماری‌های قلبی - عروقی مؤثر باشند که این آثار مضر در غلظت‌های بالای ROS مشاهده می‌شود. تماس طولانی با رادیکال‌های آزاد حتی اگر مقدار آن پایین باشد، ممکن است باعث آسیب به مولکول‌های مهم بیولوژیکی از جمله پروتئین، کربوهیدرات و DNA شود که می‌تواند به ایجاد بیماری‌های خطرناکی چون انواع سرطان‌ها منجر شود [7-9]. با توجه به عملکرد ROSها می‌توان چنین عنوان کرد، مولکول اکسیژن با وجود ضرورت مطلقی که برای حیات هوازی دارد، در شرایط ویژه‌ای می‌تواند برای بدن، مضر هم باشد. به این پدیده مهم در اصطلاح پارادوکس اکسیژنی گفته می‌شود. بنابراین می‌توان بیان داشت که اختلال در عملکرد آنزیم پراکسیداز، ممکن است به گونه‌ای شرایط را برای تجمع ROSها و بروز برخی ناهنجاری‌ها در بدن فراهم کند [10].

از سویی دیگر امروزه نوشیدنی‌های رایجی چون چای، قهوه و نوشابه‌های گازدار که روزانه به‌وسیله مردم در سراسر جهان مصرف می‌شوند، حاوی مقادیر زیادی از آلکالوئیدهای گزانتینی مثل تئوبرومین (7 و 3 دی‌متیل گزانتین) و کافئین (7 و 3، 1 تری‌متیل گزانتین) هستند. این ترکیب‌ها، آلکالوئید پورین‌های مشتق‌شده از گزانتین هستند که به‌طور گسترده‌ای در گونه‌های مختلف گیاهی توزیع شده‌اند و به مقدار زیادی در برگ چای، دانه‌های

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-11]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.11.6]

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، اعتمادبه‌نفس، 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 سایرآلکالوئید 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 ادرارآوربودن، 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 میانکش 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. زمانی‌که 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 A_1 و A_2 و اختلال در عملکرد آنها، از سلول‌های عصبی دوپامینرژیک محافظت می‌کند. بنابراین، خواص ضدافسردگی کافئین و همچنین تأثیر مثبت آن بر بیماری پارکینسون با میانکنش آن با سیستم‌های دوپامینرژیک ارتباط دارد. علاوه‌براین،

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-11]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.11.6]

مسدودشدن این گیرنده‌ها به‌وسیله کافئین، یک ویژگی حایز اهمیت دیگری نیز به آن می‌بخشد و آن ضد دردبودن است، بنابراین می‌تواند به‌عنوان 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 مضری بر بدن دارد و قادر به افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و استرس اکسیداتیو می‌باشد [25].

با توجه به مطالب بیان‌شده در بالا، محرک‌های طبیعی کافئین و تئوبرومین، از اجزای اساسی تشکیل‌دهنده نوشیدنی‌هایی چون چای، قهوه و نوشابه‌های گازدار محسوب می‌شوند. براساس 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 مضری 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

2-1 مواد شیمیایی

موادی که در این پژوهش استفاده شد، عبارتند از آنزیم پراکسیداز از گونه *Arthromyces ramosus*، کافئین، تئوبرومین و 4-آمینوآنتی‌پیرین که از شرکت سیگما[1] تهیه شدند. هیدروژن پراکسید30 درصد از صنایع شیمیایی دکتر مجللی و فنل از شرکت مرک خریداری شد. بافر پتاسیم فسفات نیز به‌طور تازه در محیط آزمایشگاه برای سنجش فعالیت آنزیم آماده شد. همچنین در طی واکنش آنزیمی برای خواندن جذب، از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Visible از شرکت فارماسیا[2] 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 میلی‌مولار، به همراه 4-آمینوآنتی‌پیرین 2/5 میلی‌مولار با غلظت متغیر (1، 2، 3، 5، 8، 10، 15، 20، 30، 50، 100 میکرومولار) و بافرپتاسیم فسفات 0/2مولار (pH=7.2) تهیه شد و درنهایت 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-آمینوآنتی‌پیرین در حضور همزمان فنل و هیدروژن پراکسید در دمای 25 درجه سانتیگراد، طول موج 510 نانومتر، به مدت 3 دقیقه دنبال شد [27]. درنهایت با توجه به اطلاعات به‌دست‌آمده، منحنی میکائیلیس - منتن و لاینویور - برک رسم شده و به دنبال آن ثابت‌های سینتیکی K_m و V_{max} در نبودن هریک از مهارکننده‌ها محاسبه شد. گفتنی است که هر مرحله از آزمایش، سه مرتبه پیاپی تکرار شد.

2-3 سنجش فعالیت پراکسیداز در حضور محرک‌های گزانتینی

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

1 . Sigma

2 . Pharmacia

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-11]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.11.6]

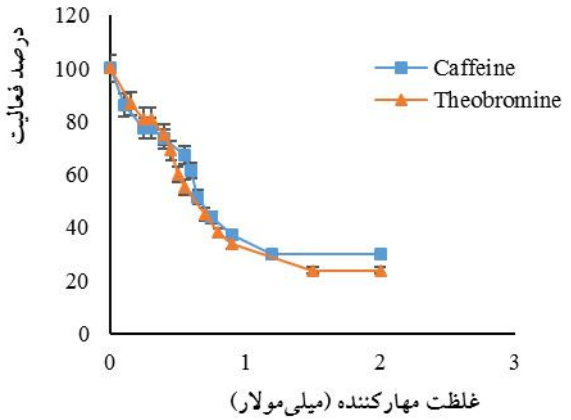
4-آمینوآنتی‌پیرین (غلظت اشباع سوبسترا معادل 100میکرومولار) در تمام سنجش‌ها ثابت و غلظت مهارکننده، متغیر در نظرگرفته شد. برای تئوبرومین از غلظت‌های 0/15 الی 2 میلی‌مولار و برای کافئین نیز از غلظت‌های 0/1 الی 2 میلی‌مولار استفاده شد. همان‌گونه که در بالا بیان شد، هر مرحله از آزمایش سه مرتبه تکرار شد و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

4-2 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 سوبسترا (1 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 مهاری (K_i)، در حضور هریک از مهارکننده‌ها، نمودار ثانویه (1/km در برابر [I]) رسم شد. درنهایت 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- 15/ 0میلی‌مولار 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

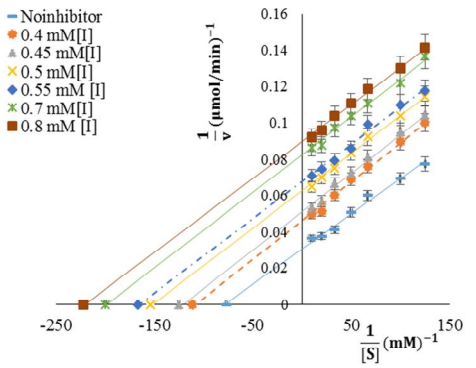
1-3 تعیین پارامترهای سینتیکی K_m، V_{max}

براساس نمودارهای لاینویور - برک (شکل‌های 2 و 3)، با زیادشدن غلظت مهارکننده، محل تقاطع با محور Y ($1/V_{max}$) و محور X ($-1/K_m$) متغیر بوده، اما شیب نمودار همواره ثابت است. ازاین 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

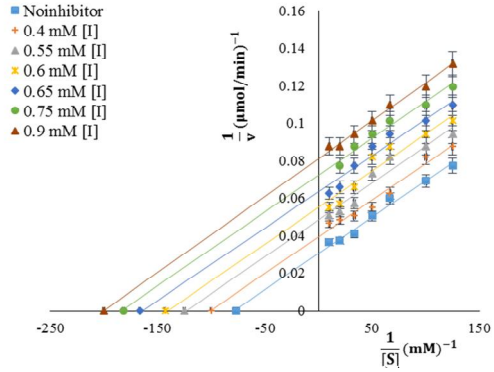
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-11]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.11.6]

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. درنهایت 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 می‌دهد. نمودار هانس - ولف و ثابت‌های سینتیکی حاصل از آن در این مقاله ذکرنشده است. براساس اطلاعات پیشین ما می‌دانیم نمودار لاینویور - برک برای مهار جزئی و کامل به‌صورت خطی می‌باشد. بنابراین برای تشخیص نوع مهار مناسب نیست و یکی از بهترین راه‌های تشخیص مهار جزئی از مهار کامل، نمودار دیکسون است [28]. ازاین‌رو، نمودار دیکسون در حضور غلظت‌های مختلف تئوبرومین و کافئین ترسیم شد (شکل‌های 4 و5).



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



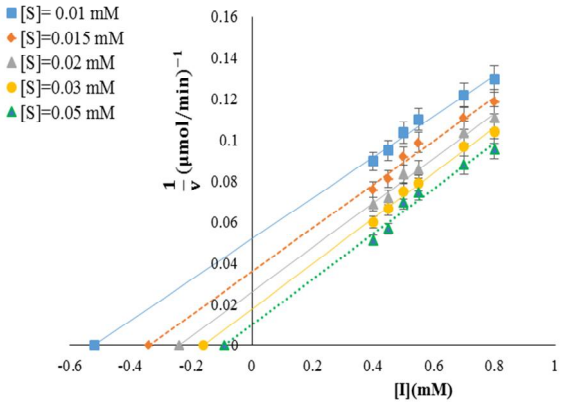
شکل 3 نمودار لاینویور- برک در حضور و عدم حضور غلظت‌های 0/9-0/4 میلی‌مولار کافئین در 25 درجه سانتیگراد، فنل 0/17 مولار، هیدروژن پراکسید 1/7 میلی‌مولار، 4-آمینوآنتی‌پیرین 2/5 میلی‌مولار، بافر 0/2 مولار و pH=7.2

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

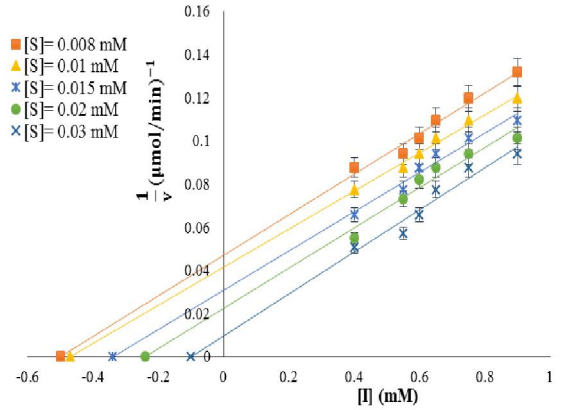
کافئین(mM)	0	0/4	0/55	0/6	0/65	0/75	0/9
K_m (mM)	0/013	0/010	0/008	0/007	0/006	0/0055	0/005
V_{max} (µmol/min)	31/948	25/188	20/964	18/726	16/155	13/908	12/239
تئوبرومین(mM)	0	0/4	0/45	0/5	0/55	0/7	0/8
K_m (mM)	0/013	0/009	0/008	0/0065	0/006	0/005	0/0045
V_{max} (µmol/min)	31/948	22/321	20/202	16/313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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-11]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.11.6]



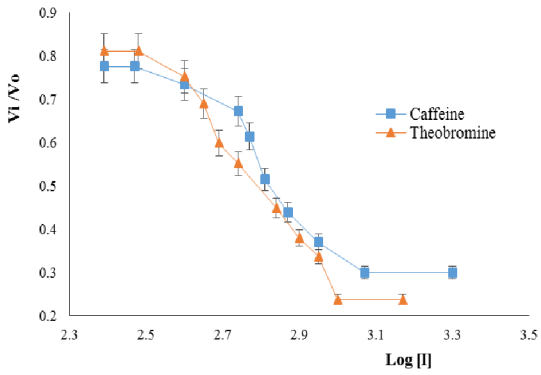
شکل 4 نمودار دیکسون در حضور و عدم حضور مهارکننده تئوبرومین در 25 درجه سانتیگراد، فنل 0/17 مولار، هیدروژن پراکسید 1/7 میلی‌مولار، 4-آمینوآنتی‌پیرین 2/5 میلی‌مولار، بافر 0/2 مولار و pH=7.2



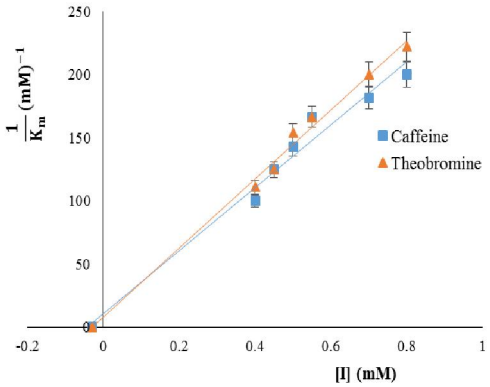
شکل 5 نمودار دیکسون در حضور و عدم حضور مهارکننده کافئین در 25 درجه سانتیگراد، فنل 0/17 مولار، هیدروژن پراکسید 1/7 میلی‌مولار، 4-آمینوآنتی‌پیرین 2/5 میلی‌مولار، بافر 0/2 مولار و pH=7.2

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 میلی‌مولار و برای تئوبرومین 0/50 میلی‌مولار می‌باشد. همچنین ثابت مهاری (K_i) برای هریک از مهارکننده‌ها از روی نمودار ثانویه (شکل 7) تعیین شد و مقدار K_i برای کافئین و تئوبرومین به‌ترتیب 0/08 و 0/03 میلی‌مولار به دست آمد. ثابت مهاری (K_i) نشان‌دهنده میزان تمایل آنزیم به مهارکننده می‌باشد. بنابراین اگر مقدار آن برای مهارکننده‌ای کمتر باشد، تمایل مهارکننده برای اتصال به آنزیم بیشتر بوده و با قدرت بیشتری به آنزیم متصل می‌شود [29]. مقادیر K_i و IC_{50} برای هریک از دو مهارکننده در جدول 2 ذکر شده است.



شکل 6 منحنی دز- پاسخ آنزیم پراکسیداز در حضور غلظت‌های مختلف کافئین و تئوبرومین در 25 درجه سانتیگراد، فنل 0/17 مولار، هیدروژن پراکسید 1/7 میلی‌مولار، 4-آمینو آنتی‌پیرین 2/5 میلی‌مولار، بافر 0/2 مولار و pH=7.2

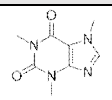
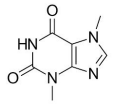


شکل 7 منحنی ثانویه در حضور مهارکننده کافئین و تئوبرومین در 25 درجه سانتیگراد، فنل 0/17 مولار، هیدروژن پراکسید 1/7 میلی‌مولار، 4-آمینو آنتی‌پیرین 2/5 میلی‌مولار، بافر 0/2 مولار و pH=7.2

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-11]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.11.6]

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 مهاری 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 لاینویور - برک (شکل‌های 2 و3) به دست آمده است، با زیادشدن غلظت مهارکننده روندی کاهشی داشته و نشان‌دهنده این است که هر دو مهارکننده با پیروی از یک الگوی مهاری نارقابتی، فعالیت آنزیم را کاهش می‌دهند، زیرا هریک از ترکیب‌های مذکور فقط به کمپلکس پراکسیداز - 4-آمینو آنتی‌پیرین (آنزیم - سوبسترا)، یعنی به جایگاهی متفاوت از جایگاه فعال پراکسیداز اتصال پیدا می‌کنند. درنتیجه در حضور هریک از این ترکیب‌های گزانتینی، سوبسترای 4-آمینو آنتی‌پیرین این قابلیت را دارد که بعد از اتصال به پراکسیداز، ساختار آنزیم را به‌گونه‌ای تغییر دهد تا جایگاه موردنظر برای اتصال مهارکننده را در دسترس آن قرار دهد. به‌این‌ترتیب، میل ترکیبی پراکسیداز به تئوبرومین یا کافئین افزایش پیدا کرده و مقدار K_m کاهش پیدا می‌کند. درنهایت یک کمپلکس سه‌تایی مرده و بی حاصل شامل پراکسیداز، 4-آمینوآنتی‌پیرین 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 مهاری (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 مهاری 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 مهاری بیشتر آن است [30]. بنابراین می توان 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 درنهایت قدرت مهار بالاتری دارد.

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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-11]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.11.6]

N_7مرتبط 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 متیله‌شدن گزانتین در موقعیت‌های 3 و7 برای مهار، لازم و ضروری است [16]. از طرفی اتم‌های C_6، N_7 و C_8 باز پورینی به‌طورِ 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 وN_7، احتمالاً به دلیل بیشتربودن تعداد گروه‌ها و ممانعت فضایی به‌عنوان یک مهارکننده ضعیف‌تر عمل می‌کند. ازاین‌رو 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 می کند و در صورت جزئی‌بودن مهار به‌صورت هذلولی است [29، 33]. بنابراین، براساس نتایج کسب‌شده به دلیل خطی‌بودن نمودار دیکسون در حضور هریک از مهارکننده‌ها، کامل‌بودن نوع مهار تأیید می‌شود.

نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش، با یافته های گروهی از پژوهشگران که تأثیر کافئین را بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کبد موش، بررسی کردند، شباهت دارد. براساس مشاهده‌های این پژوهشگران، کافئین اثری مهاری بر آنزیم کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز دارد و فعالیت آنها را به طور 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 مهاری 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 اثرآلکالوئیدهای گزانتینی چون کافئین، تئوفیلین و پنتوکسی‌فیلین بر فعالیت آلکالین فسفاتاز می‌باشد و نتایج حاصل‌شده 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 ترانسفرازی از جمله GPT، GGT وGOT بررسی شده است که در این مطالعه مشاهده شد کافئین با وجود اینکه برای آنزیم‌های GOT وGPT 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 مهاری تئوبرومین و متیل‌گزانتین‌های مرتبط را بر آمین‌اکسیداز اولیه بررسی کردند. براساس نتایج به‌دست‌آمده، سازوکار مهاری برای همه متیل‌گزانتین‌ها از نوع غیررقابتی تشخیص داده شد و کمتربودن قابل توجه مقدار K_i برای تئوبرومین نسبت به متیل‌گزانتین‌های دیگر، اثباتی برای قدرت مهاری 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 الگویی 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 گزانتیتی مثل کافئین و

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-11]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.11.6]

تئوبرومین در غلظت‌های بالاتر از حد نرمال می‌تواند فعالیت بسیاری از آنزیم‌های ضروری از جمله پراکسیداز را مهار کند. علاوه‌براین، اختلال در عملکرد آنزیم مهم و حیاتی پراکسیداز ممکن است سازوکار دفاعی آنتی‌اکسیدانی را تحت تأثیر قرارداده و شرایط مناسب برای بروز ناهنجاری‌هایی چون استرس اکسیداتیو و درنهایت سرطان را فراهم کند. درنتیجه، با توجه به مقادیر IC_{50} و K_i به‌دست‌آمده 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., abd 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 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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-11]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.11.6]

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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-11]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.11.6]

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

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

[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.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-11]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.11.6]

Biotechnology-Tarbiat Modares University

A kinetic study of peroxidase inhibition by some xanthine stimulants

Tayyebeh Rahmati Darvazi[1*], Reyhaneh Sariri[2]

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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-02-11]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.11.6]