Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 17:00 +0330 on Saturday November 18th 2017

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2014; 17(83): 40-49

The effects of oxali-palladium on the function and structure of liver catalase

Gholamian A[1], Divsalar A[1*], Eslami Moghadam M[2], Saiedifar M[3], Sabory AA[4]

1. Department of Cell and Molecular Biology, School of Biology, Kharazmi University, Tehran, Iran
2. Chemistry and Chemistry Engineering Research Center, Tehran, Iran
3. Nanotechnology, Material, and Energy Research Center, Karaj, Iran
4. Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 24 Nov 2013, Accepted: 26 Feb 2014

Abstract

Background: Catalase is a basic antioxidant enzyme that exits in human organs, mainly in the liver. The liver as a main tissue in the body that plays a substantial role in the catabolism and detoxification of drugs is a target of toxic and carcinogenic effects of many drugs. In the present study, the side effects of an anti-cancer compound of oxali-palladium on the function and structure of liver catalase were investigated.

Methods: In this experimental study, changes in the enzyme activity were studied by conversion in substrate (hydrogen peroxide) absorption at wavelength of 240 nm, using UV-visible spectroscopy in the absence and presence of different concentrations of oxali-palladium at room temperature. Furthermore, the effect of oxali-palladium on the tertiary structure of catalase was investigated using fluorescence spectroscopy via studying the changes in the intrinsic enzyme emission in the absence and presence of different concentrations of oxali-palladiumat at both room and physiologic temperatures.

Results: Kinetics data showed that the Km value of bovine liver catalase was 26.8 mM. Moreover, in the presence of different concentrations of oxali-palladium, the enzyme activity showed a gradual decrease in a dose-dependent manner ($p<0.001$). Fluorescence data presented changes in the tertiary structure of the enzyme by quenching fluorescence emission, that indicated alteration in protein chromophore environment.

Conclusion: It could be concluded that inhibition of catalase enzyme by anticancer drug of oxali-palladium increases the content of reactive oxygen species. Increase in reactive oxygen species values is one of the chief mechanisms of different anticancer drugs.

Keywords: Cancer, Catalase, Fluorescence, Kinetics, Oxali-palladium

*Corresponding author:
Address: Department of Cellular and Molecular Biology, School of Biology, Kharazmi University, Karaj, Iran
E-mail: divsalar@khu.ac.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 17:00 +0330 on Saturday November 18th 2017

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال 17، شماره 2 (شماره پیاپی 83)، اردیبهشت 1393، 49-40

اثر اگزالی پالادیوم بر فعالیت و ساختار کاتالاز کبد

اعظم غلامیان[1]، عادله دیوسالار*[2]، محبوبه اسلامی مقدم[3]، مریم سعیدی فر[4]، علی اکبر صبوری[5]

1. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
2. استادیار، گروه زیست شناسی سلولی ومولکولی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
3. استادیار، پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی ایران، تهران، ایران
4. استادیار، پژوهشگاه فناوری نانو و مواد پیشرفته مرکز تحقیقات مواد و انرژی، کرج، ایران
5. استاد، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 92/9/3 تاریخ پذیرش: 92/12/7

چکیده

زمینه و هدف: کاتالاز یکی از اصلی‌ترین آنزیم‌های آنتی اکسیدانت است که در بافت‌های انسانی به مقدار زیادی در کبد وجود دارد. کبد بافت اصلی در بدن است که در کاتابولیسم و سم زدایی داروها نقش دارد و هدف اثرات توکسیک و کارسینوژنیک بسیاری از داروها است. در این مطالعه اثرات جانبی ترکیب ضد سرطانی اگزالی پالادیوم بر عملکرد و ساختار آنزیم حیاتی کاتالاز کبدی بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، تغییرات در فعالیت آنزیم به واسطه تغییر جذب سوبسترا(هیدروژن پراکسید) در طول موج240 نانومتر با استفاده از اسپکتروسکوپی مرئی – ماوراء بنفش در غیاب و حضور غلظت‌های مختلف اگزالی پالادیوم در دمای اتاق مطالعه شد. هم‌چنین اثر اگزالی پالادیوم بر ساختار سه بعدی کاتالاز از طریق اسپکتروسکوپی فلوئورسانس توسط مطالعه تغییر در نشر ذاتی آنزیم در غیاب و حضور غلظت‌های مختلف اگزالی پالادیوم در دو دمای محیط و فیزیولوژیک بررسی شد.

یافته‌ها: داده‌های سینتیکی نشان داد که مقدار K_m کاتالاز کبد گاو برابر با 26/8 میلی‌مولار به دست آمد. هم‌چنین در حضور غلظت‌های مختلف اگزالی پالادیوم، فعالیت آنزیم کاهش تدریجی در مسیر وابسته به دوز را نشان داد($p<0/001$). داده‌های فلوئورسانس تغییر در ساختار سه بعدی آنزیم از طریق خاموشی نشر فلورئورسانس را نشان داد که تغییر در محیط کروموفور در پروتئین را ثابت می‌کند.

نتیجه‌گیری: از نتایج این مطالعه می‌توان دریافت که مهار آنزیم کاتالاز توسط داروی ضد سرطان اگزالی پالادیوم مقدار گونه‌های اکسیژن فعال را افزایش می‌دهد. افزایش گونه‌های فعال اکسیژن یکی از مکانیسم‌های داروهای ضدسرطان مختلف است.

واژگان کلیدی: سرطان، کاتالاز، فلورئورسانس، سینتیک، اگزالی- پالادیوم

***نویسنده مسئول:** کرج، حصارک، میدان دانشگاه، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی

Email: divsalar@khu.ac.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 17:00 +0330 on Saturday November 18th 2017

مقدمه

سلول‌های بدن به طور معمول در طی متابولیسم خود، رادیکال‌های آزاد تولید می‌کنند. هنگامی که عدم تعادل بین سرعت تشکیل رادیکال آزاد و سم زدایی آن رخ دهد اصطلاح استرس اکسیداتیو به کار برده می‌شود. پاتوفیزیولوژی بسیاری از بیماری‌ها مانند سرطان، تصلب شرائین، آماس مفصلی، بیماری‌های التهابی، پیری و غیره در ارتباط و وابسته به استرس اکسیداتیو است(1).

آنزیم‌های آنتی اکسیدانت بخشی از مکانیسم‌های دفاعی فیزیولوژیکی در سلول‌های پستانداران علیه غلظت‌های بالای رادیکال‌های آزاد اکسیژن(ROS - Reactive oxygen species) است. یکی از این آنزیم‌ها کاتالاز است که به مقدار زیاد در کبد و کلیه حضور دارد. کاتالاز هیدروژن پراکسید را به آب و اکسیژن تبدیل می‌کند(2).

تغییر در فعالیت کاتالاز تحت اثر بیماری‌ها، مصرف داروها و مواد غذایی اتفاق می‌افتد. مطالعات نشان داده‌اند که یکی از بیماری‌هایی که باعث تغییر فعالیت کاتالاز می‌شود، سرطان است. مطالعات زیادی که در ارتباط این بیماری و فعالیت کاتالاز صورت گرفته، نشان می‌دهد فعالیت کاتالاز کبد و اریتروسیت به طور چشم‌گیر به ویژه در مراحل نهایی بیماری کاهش می‌یابد(3). هم‌چنین مشخص شده که انواع داروهای مورد استفاده در مراحل درمان سرطان به ویژه انواع داروهای شیمی درمانی باعث کاهش فعالیت کاتالاز می‌شود(4).

کمپلکس‌های فلزی در درمان بسیاری از بیماری‌ها شامل سرطان، آنمی، آماس مفاصل، التهاب مزمن، عفونت باکتریایی و بیماری‌های گوارشی کاربرد دارند. داروهای پلاتینی نقش کلیدی را بین عوامل ضد سرطان بر پایه فلز بازی می‌کنند و اولین نسل این داروها سیس پلاتین بود و بعد آن به ترتیب کربوپلاتین و اگزالی پلاتین به بازارعرضه شدند(5). داروهای پلاتینی دارای عوارض جانبی فراوانی بودند. برای حل مشکل فوق، کمپلکس‌های پالادیوم توسط گروه‌های زیادی از محققان در سراسر جهان سنتز و آزمایش می‌شوند تا با اثرات جانبی کمتر جایگزین کمپلکس‌های معمول پلاتین گردند(6). داروهای پالادیومی، همانند سایر داروهای پلاتینی اثراتشان را به واسطه مهار سنتز و رونویسی DNA، بر سلول می‌گذارند و از طریق متوقف کردن همانندسازی و رونویسی سلول را به سمت آپوپتوز هدایت می‌کنند(7).

ازآن جایی که کاتالاز یکی از اصلی‌ترین آنزیم‌های کبد است و به مقدار فراوانی در پراکسی زوم سلول‌های کبدی وجود دارد(2) هم‌چنین کبد عضوی است که می‌بایست سموم داروها را خنثی کند و 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. بنابر این بررسی تغییرات در فعالیت کاتالاز کبد می‌تواند به عنوان پارامتر مناسب در ارزیابی تاثیر انواع داروهای شیمی درمانی بر بدن باشد(8). بدین منظور، در مطالعه حاضر، تاثیر یک داروی اگزالی پالادیوم(که در درمان سرطان روه، تخمدان و پروستات استفاده می‌شود)(9) بر فعالیت و ساختار سه بعدی آنزیم کاتالازکبدی بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها

از کاتالاز کبد گاو(bovine liver - BLC catalase) با درجه خلوص بالای 99 درصد خریداری شده از شرکت سیگما به علت شباهت ساختاری بالا با کاتالاز کبد انسان استفاده شد. نمک‌های فسفات مونو و دی سدیک و سوبسترای پراکسید هیدروژن از شرکت مرک خریداری شده‌اند.

مطالعات سینتیکی آنزیم کاتالاز

در این مطالعه تجربی، فعالیت BLC در دمای 25 درجه سانتی‌گراد به روش سینتیکی اندازه‌گیری شد. در این روش از اسپکتروفتومتر مدل Cary استفاده شد. بدین ترتیب که هر 5 ثانیه یک بار میزان جذب در طول موج 240 نانومتر(ماکسیمم جذب هیدروژن پراکسید) به مدت 60 ثانیه

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 17:00 +0330 on Saturday November 18th 2017

قرائت و نتایج ذخیره شد. به منظور به دست آوردن مقدار K_m آنزیم(غلظتی از سوبسترا که در آن سرعت آنزیم نصف سرعت ماکسیمم است) در غیاب دارو مخلوط واکنش شامل بافر فسفات 50 میلی‌مولار(pH=7)و غلظت‌های مختلف هیدروژن پراکسید(از 10 تا 90 میلی‌مولار) و غلظت ثابت آنزیم(56×10^{-5} میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) می‌باشد. سپس به منظور بررسی تاثیر داروی اگزالی پالادیوم بر فعالیت کاتالیتیکی آنزیم، مقدار فعالیت آنزیم در حضور غلظت‌های متفاوت اگزالی پالادیوم اندازه‌گیری شد. به منظور به دست آوردن پارامترهای سینتیکی از فرمول لاینویور-برک(معادله 1) استفاده شد.

معادله (1) $1/V_0 = K_m/V_{max}[S]+ 1/V_{max}$

در معادله فوق V_0 برابر با سرعت آنزیم در هر غلظتی از سوبسترا، V_{max} سرعت بیشینه آنزیم و [S] غلظت سوبسترا می‌باشد.

مطالعات فلوئورسانس

اندازه گیری نشر فلوئورسانس آنزیم به کمک دستگاه طیف سنج مدل Cary توسط روش زیر انجام گرفت:

در این آزمایش، به کووت‌های مخصوص با حجم 500 میکرولیتری، 497 میکرولیتربافر فسفات سدیم 50 میلی‌مولار و 3 میکرولیتر کاتالاز(که با توجه به غلظت استوک آنزیم، غلظت 0/2 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست می‌آید) اضافه شد. سپس مقدارهای متفاوت از محلول استوک 2 میلی‌مولار اگزالی پالادیوم اضافه شد. در هر بار اضافه کردن اگزالی- پالادیوم لوله آزمایش حاوی نمونه به مدت 3 دقیقه انکوبه شد. طول موج تحریکی 290 نانومتر و محدوده طول موج بین 295 تا 500 نانومتر قرار داده شد و آزمایش در غلظت‌های مختلف اگزالی- پالادیم و در دو دمای 25 و 37 درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. به منظور به دست آوردن پارامترهای اتصال اگزالی – پالادیوم به کاتالاز از معادله(2) که به معادله باندینگ معروف است، استفاده شد.

معادله (2) $\log F_0\text{-}F /F =\log K_a + n \log [Q]$

در معادله فوق F_0 و F به ترتیب بیان‌گر نشر فلورسانس آنزیم در غیاب و در حضور اگزالی پالادیوم، K_a ثابت اتصال برای ایجاد کمپلکس BLC-Pd و [Q] غلظت خاموش کننده(اگزالی پالادیوم) را نشان می‌دهد.

کلیه داده‌های مربوط به سینتیک با استفاده از نرم افزار SPSS آنالیز شده و جهت سنجش تفاوت‌ها از آزمون مربع کای استفاده شد. یافته‌ها به صورت میانگین±انحراف استاندارد مقایسه شده‌اند.

نمودارهای بخش سینتیک و فلوئورسانس با استفاده از برنامه Excel رسم شده است. تمام آزمایشات مربوط به سینتیک 6 بار تکرار شدند، لذا نتایج ارائه شده در شکل‌ها همان میانگین تکرار آزمایشات است. آزمایشات فلوئورسانس 3 بار تکرار شدند.

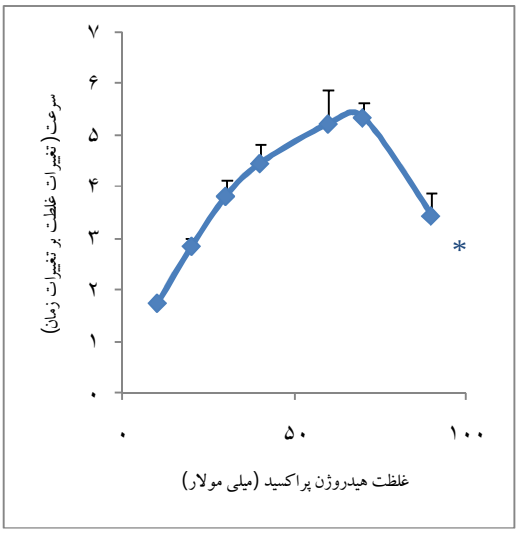
یافته‌ها

مطالعات سینتیکی

با رسم نمودار جذب در برابر زمان در غلظت‌های مختلف سوبسترای هیدروژن پراکسید، سرعت یا فعالیت آنزیم محاسبه می‌شود. سپس نمودار میکائیلیس – منتن که بیان‌گر تغییرات سرعت آنزیم در برابر غلظت هیدروژن پراکسید به عنوان سوبسترای آنزیم در دمای محیط(نمودار 1) رسم شده است. نمودار بیانگر وابسته به غلظت بودن مقدار سرعت واکنش آنزیمی می‌باشد. به منظور تعیین مقدار دقیق پارامتر سینتیکی K_m کاتالاز از طول از مبداء نمودار لاینویور- برک(معادله 1)، مقدار K_m برابر با 26/8 میلی‌مولارتعیین شد.

معادله (1) $1/V_0 = K_m/V_{max}[S]+ 1/V_{max}$

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 17:00 +0330 on Saturday November 18th 2017

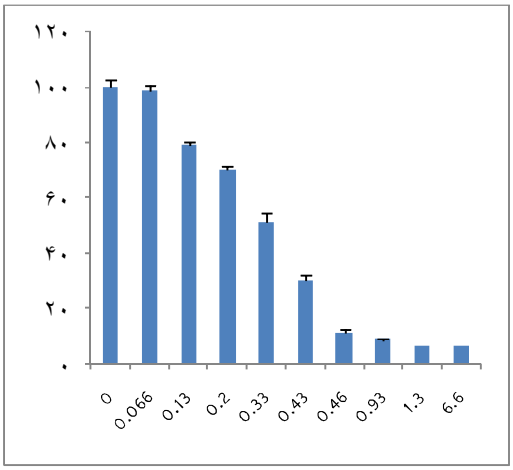


نمودار 1. نمودار میکائیلیس -منتون(سرعت آنزیم در برابر غلظت سوبسترای هیدروژن پراکسید)آنزیم کاتالاز(با غلظت (56×10^{-5} میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در دمای 25 درجه سانتی‌گراد، بافر فسفات50 میلی‌مولار pH 7.* نشانگر اختلاف معنی داری بین غلظت های مختلف هیدروژن پراکسید در مقایسه با غلظت اولیه(10 میلی‌مولار) است (p<0/001). اختلاف معنی داری بین غلظت 10 و 90 میلی‌مولار هیدروژن پراکسید وجود ندارد(p>0/005). هم‌چنین داده ها بر اساس میانگین ± انحراف استاندارد مقایسه شده‌اند.

با توجه به نمودار 1، در غلظت 70 میلی‌مولار هیدروژن پراکسید، ماکسیمم فعالیت کاتالاز مشاهده شد و بعد از آن روند کاهشی در فعالیت آنزیم دیده شد. این روند کاهشی توجیه کننده پدیده مهار آنزیم توسط سوبسترا است که در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است(10). مطالعات نشان داده‌اند که هیدروژن پراکسید در غلظت‌های بالا باعث مهار آنزیم از طریق تشکیل ترکیب II (فرم غیر فعال کاتالاز) می‌شود. بسیاری از مهارکننده‌های کاتالاز مانند آسکوربیک اسید نیز از طریق تشکیل ترکیب II باعث مهار آنزیم می‌شود. هم‌چنین دهنده‌های تک الکترونی اندوژنوس و اگزوژنوس نیز باعث تشکیل ترکیب II آنزیم می‌شود(10).

E-Fe(V)-O (فرم اکسی آنزیم) + ترکیب I + donor electron → E-Fe(IV)II ترکیب→etc

پس از یافتن غلظت بهینه سوبسترای آنزیم(یعنی غلظت 70 میلی‌مولار هیدروژن پراکسید)، در این غلظت از سوبسترا، اثر غلظت‌های مختلف اگزالی پالادیوم بر فعالیت BLC بررسی شد که نتایج آن در نمودار 2 نشان داده شده است. همان طور که در نمودار مشهود است با افزایش غلظت اگزالی پالادیوم سرعت آنزیم به طور معنی داری کاهش می‌یابد به طوری که در غلظت 6/6 میکرومولاراز دارو، فعالیت آنزیم تقریبا به صفر رسید(p<0/001).



نمودار 2. نمودار درصد فعالیت کاتالاز در مقابل غلظت‌های مختلف اگزالی پالادیوم. همان طور که مشاهده می‌شود اگزالی پالادیوم باعث کاهش محسوس فعالیت کاتالاز می‌شود به طوری که در غلظت 6/6 میکرومولار تقریبا فعالیت کاتالاز را به صفر می‌رساند.* نشانگر اختلاف معنی داری بین غلظت‌های مختلف اگزالی پالادیوم در مقایسه با کنترل(غلظت صفر اگزالی پالادیوم) می‌باشد(p<0/001). در موردمقایسه غلظت 0/066 میکرومولار اگزالی پالادیوم با کنترل اختلاف معنی داری وجود ندارد (p>0/05). هم‌چنین داده‌ها بر اساس میانگین ± انحراف استانداردمقایسه شده‌اند.

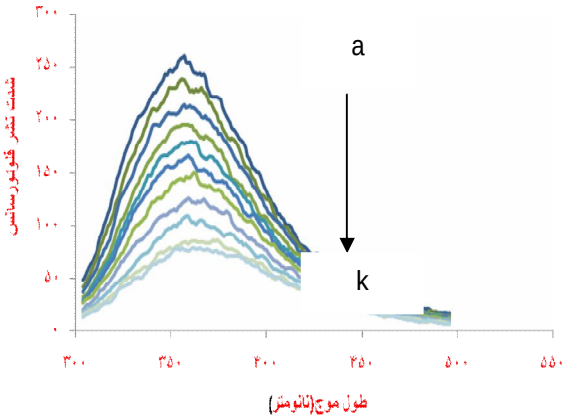
در مطالعه انجام گرفته جهت بررسی معنی داری فعالیت کاتالاز بین غلظت‌های مختلف سوبسترا و غلظت اولیه(10 میلی‌مولار) آن، مطالعه آزمون مربع کای انجام گردید و رابطه معنی داری بین آنها دیده شد(p<0/001).

هم‌چنین جهت بررسی معنی داری فعالیت کاتالاز بین غلظت‌های مختلف داروی اگزالی پالادیوم و غلظت صفر آن مطالعه آزمون مربع کای انجام گردید و رابطه معنی‌داری بین آنها مشاهده شد(p<0/001).

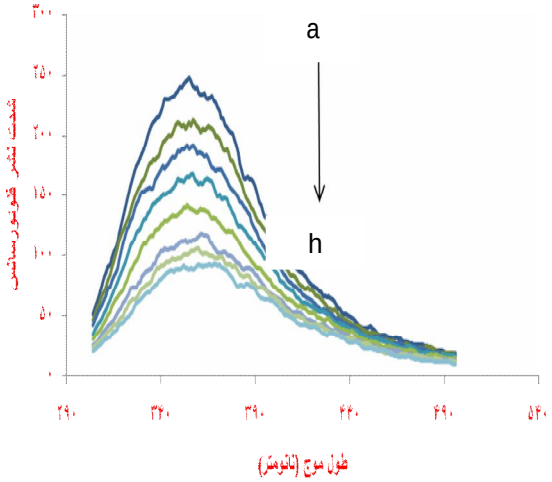
Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 17:00 +0330 on Saturday November 18th 2017

مطالعات ساختاری آنزیم

تغییرات در نشر فلوئورسانس ذاتی کاتالاز به ترتیب در دو دمای 25 و 37 درجه سانتی‌گراد در نمودارهای 3 و 4 نشان داده شده است. همان طور که مشهود است با افزایش غلظت اگزالی پالادیوم میزان نشر ماکزیمم آنزیم کاهش می‌یابد. هم‌چنین در غلظت‌های بالای اگزالی پالادیوم شیفت کوچکی به سمت راست در طول موج ماکزیمم نشر کاتالاز دیده می‌شود که می‌تواند دلیل از دست رفتن محیط هیدروفوبی که ترتیپتوفان در آن قرار دارد، باشد. با افزایش دما از 25 به 37 درجه سانتی‌گراد، اولا میزان نشر آنزیم بدون حضور کمپلکس پالادیوم کاهش یافته، هم‌چنین در دمای 37 درجه سانتی‌گراد، میزان نشر در غلظت‌های کمتری از پالادیوم به میزان اشباع خود نزدیک می‌شود. درواقع افزایش دما موجب افزایش سرعت رسیدن به حالت اشباعی از طریق کاهش در غلظت اگزالی پالادیوم می‌شود.



نمودار 3. طیف نشری کاتالاز کبد گاو در غیاب(a) و در حضور غلظت‌های (b) 12، (c) 48، (d) 80، (e) 112، (f) 152، (g) 200 ، (h)308، (i) 440، (j) 620و(k) 720 میکرومولار اگزالی پالادیوم در دمای 25 درجه سانتی‌گراد بافر فسفات50 میلی‌مولار pH 7. همان طور که در شکل مشهود است با افزایش غلظت اگزالی پالادیوم(از غلظت b تا k) شدت نشر فلوئورسانس کاتالاز کاهش می‌یابد و در غلظت 720 میکرومولار اگزالی- پالادیوم، نشر به اشباع خود می‌رسد.



نمودار 4. طیف نشری کاتالاز کبد گاو در غیاب (a) و در حضور غلظت‌های (b) 12، (c) 48، (d) 104، (e) 212، (f) 380، (g) 480 و (h) 630 میکرومولار اگزالی پالادیوم در دمای 37 درجه سانتی‌گراد بافر فسفات50 میلی‌مولار pH7. همان طور که در شکل مشهود است با افزایش غلظت اگزالی پالادیوم شدت نشر فلوئورسانس کاتالاز کاهش می‌یابد و نشر کاتالاز در غلظت630 میکرومولار اگزالی- پالادیوم به اشباع می‌رسد. این غلظت اشباعی کمتر از غلظت اشباعی در دمای 25 درجه سانتی‌گراد است.

با توجه به این که با افزایش غلظت اگزالی پالادیوم میزان نشر فلوئورسانس کاتالاز کاهش یافته پس می‌توان گفت که این دارو باعث تغییر در محیط اطراف کروموفورهای کاتالاز شده است.

نتایج مطالعات فلورسانس تغییرات در ساختار سه بعدی آنزیم را نشان می‌دهد که با نتایج سینتیکی که بیان‌گر مهار آنزیم توسط اگزالی پالادیوم بوده هم‌خوانی دارد. لذا در این بخش از مطالعه برآن شدیم تا پارامترهای ترمودینامیکی اتصال اگزالی پالادیوم به آنزیم را محاسبه نماییم.

برای پیدا کردن پارامترهای اتصال لیگاند به ماکروملکول با کمک پدیده خاموشی نشر فلورسانس می‌توان از معاله (2) استفاده کرد:

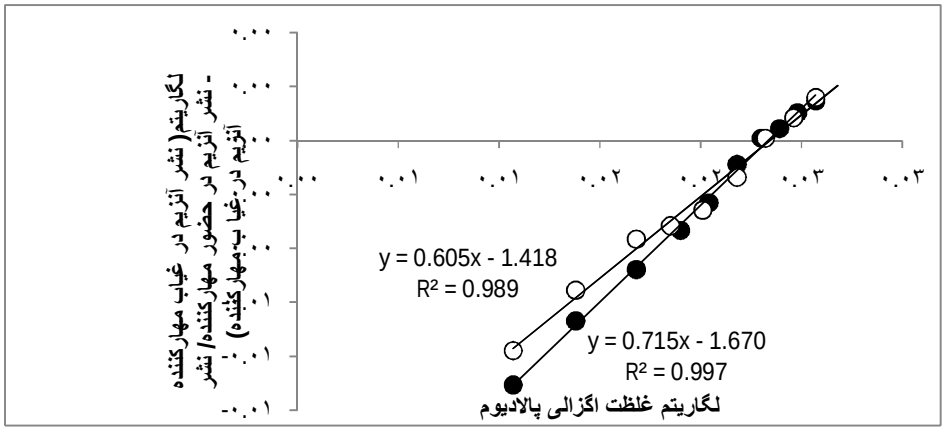
معادله (2) $\log F_0\text{-}F/F = \log K_a + n \log [Q]$

در معادله فوق F_0 و F به ترتیب بیانگر نشر فلورسانس آنزیم در غیاب و در حضور اگزالی پالادیوم، K_a

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 17:00 +0330 on Saturday November 18th 2017

ثابت اتصال برای ایجاد کمپلکس BLC-Pd و [Q] غلظت خاموش کننده(اگزالی پالادیوم) را نشان می‌دهد. سپس با استفاده از نمودار $\log F_0\text{-}F / F$ در برابر $\log [Q]$ می‌توان مقادیر ثابت اتصال(Ka) و تعداد اگزالی پالادیوم‌های متصل شده به کاتالاز(n) را محاسبه کرد(نمودار 5).

با آنالیز نتایج حاصل از نمودار 5، میزان K_a در دمای 25 و 37 درجه سانتی‌گراد به ترتیب برابر با $3/81\times10^4$ و $2/1\times10^4$ میلی مولار به دست آمد. با افزایش دما از 25 به 37 درجه سانتی‌گراد، مقادیر Ka کاهش یافته یا به عبارت دیگر تمایل پروتئین برای ایجاد کمپلکس با اگزالی پالادیوم یا برای اتصال به آن کاهش یافته است. هم‌چنین تعداد جایگاه اتصالی کاتالاز برای اگزالی پالادیوم در دو دمای 25 و 37درجه سانتی‌گراد تقریبا برابر با یک به دست آمد که بیانگر وجود یک جایگاه اتصال برای اتصال اگزالی پالادیم روی کاتالاز کبدی می‌باشد. وجود ضرایب وابستگی(R^2) بالا، حاکی از وجود توافق بسیار خوب بین داده‌های به دست آمده و معادله(2) در محدوده غلظت‌های مورد استفاده است.



نمودار 5. نمودار خطی لگاریتم(نشر آنزیم(کاتالاز) در غیاب مهار کننده – نشر آنزیم در حضور مهارکننده(اگزالی پالادیوم) / نشر آنزیم در غیاب مهارکننده) در مقابل لگاریتم غلظت اگزالی پالادیوم در دماهای 25 (o) و 37(.) درجه‌ی سانتی‌گراد بر اساس معادله(2). شیب این نمودار نشان دهنده تعداد اگزالی پالادیوم متصل به کاتالاز و عرض از مبدا آن، Ka یا ثابت پیوندی اگزالی – پالادیوم به کاتالاز است.

بحث

مطالعات مربوط به کاتالاز کبد برای فهم بهتر فرآیند سرطان اهمیت دارد. این آنزیم به طور گسترده‌ای در سرطان بررسی شده است زیرا کاهش آن به عنوان یکی از ویژگی‌های مختص بافت‌های توموری مطرح شده است. اهمیت کاتالاز برای حیات انسان به واسطه بیماری‌هایی که در ارتباط با موتاسیون ژن کاتالاز است، ثابت شده است. از جمله این بیماری‌ها انواع سرطان‌ها هستند. مطالعات گسترده‌ای نشان داده زنانی که به علت موتاسیون در ژن کاتالاز، فعالیت کاتالاز کمتری دارند، مستعدتر برای بروز سرطان سینه هستند. مطالعات نشان داده‌اند که رابطه‌ای پیچیده در کاهش فعالیت کاتالاز و بروز سرطان وجود دارد(9). با وجود ارتباط محسوس بین فعالیت کاتالاز و خطر ابتلا به سرطان، در طی بیماری سرطان نیز فعالیت کاتالاز کبد به طور چشم‌گیری کاهش پیدا می‌کند. مشخص شده که کاتالاز در سطح mRNA، پروتئین و فعالیت در انواع سلول‌های سرطانی کاهش می‌یابد(3). به عنوان مثال در سرطان سینه، هیپرمتیلاسیون در پروموتور ژن کاتالاز باعث کاهش بیان ژن کاتالاز شده(9) و هم‌چنین افزایش رادیکال‌های آزاد مثل سوپراکسید(مهار کننده کاتالاز) و هیدروژن پراکسید(در غلظت‌های بالا باعث مهار کاتالاز شده) در سرطان اثر مهاری خود را بر کاتالاز اعمال می‌کنند. بنابر این بررسی فعالیت کاتالاز در طی شیمی

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 17:00 +0330 on Saturday November 18th 2017

درمانی‌ها می‌تواند در درمان موثرتر سرطان کارا باشد(11، 12).

تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در طی دوره شیمی درمانی بسیار حائز اهمیت است زیرا این آنزیم‌ها متاستاز و پیشرفت سرطان را با سم زدایی لیگاندهایشان تغییر می‌دهند. به عنوان مثال در مکان متاستاز کاهش فعالیت کاتالاز و افزایش هیدروژن پراکسید دیده شده است. کاتالاز یکی از اصلی‌ترین آنزیم‌های آنتی اکسیدانت کبد می‌باشد که کمبود و نقص آن باعث افزایش استرس‌های اکسیداتیو و در نتیجه افزایش خسارات ناشی از آن به ماکروملکول‌های سلول می‌شود و فعالیت آن وابسته به مصرف انواع ترکیبات است. داروهای هیپولیپودیمیک باعث افزایش بیان ژن کاتالاز و افزایش فعالیت کاتالاز کبد می‌شود(13). هم‌چنین داروهای ضد سرطانی حاوی کینون باعث کاهش فعالیت کاتالاز می‌شوند(14) که این تغییر در عملکرد کاتالاز یا از طریق تغییر در بیان ژن کاتالاز یا از طریق تغییر فعالیت آن می‌باشد(15).

مطالعات سینتیکی و ساختاری کاتالاز در حضور اگزالی- پالادیوم، مهار این آنزیم توسط اگزالی- پالادیوم را تثبیت کرد. در غلظت 6/6 میکرومولاراگزالی پالادیوم، فعالیت کاتالاز تقریبا صفر می‌شود. این کاهش عملکرد کاتالاز می‌تواند باعث افزایش غلظت هیدروژن پراکسید در فرد سرطانی شود و هیدروژن پراکسید در غلظت بالا باعث مهار سوپراکسید دیسموتاز(یکی دیگر از آنزیم‌های آنتی اکسیدانت) شده و در نتیجه سوپراکسید افزایش می‌یابد(16). افزایش این دو رادیکال آزاد باعث افزایش خسارات اکسیداتیو بیشتر به بافت‌های فرد بیمار خواهد شد. هم‌چنین افزایش رادیکال‌های آزاد باعث پیشرفت تومورو متاستاز آن به بافت‌های سالم می‌شود. در واقع مهم‌ترین آسیبی که با افزایش ROS در فرد سرطانی ایجاد می‌شود پیشرفت تومورو متاستاز آن به بافت‌های سالم است. زیرا هیدروژن پراکسید سطح بیان مولکول‌هایی که در فرآیند متاستاز نقش دارند را افزایش می‌دهند(17).

از طرفی افزایش هیدروژن پراکسید به واسطه کاهش فعالیت کاتالاز توسط اگزالی- پالادیوم می‌تواند باعث افزایش گلیکولیز هوازی و اتوفاژیب شود. فعال سازی اتوفاژی و گلیکولیز در فرد سرطانی توسط غلظت بالای ROS، مواد مغذی(پیروات، لاکتات، کتون‌ها، گلوتامین) را برای رشد سلول‌های سرطانی فراهم می‌کند و سلول‌های سرطانی را از آپوپتوز حفظ می‌کند(3). علاوه بر کاهش فعالیت کاتالاز در طی مصرف اگزالی پالادیوم، سرطان نیز به تنهایی یکی از عوامل کاهش دهنده فعالیت کاتالاز است. بنابر این مصرف داروی ضد سرطانی مانند اگزالی پالادیوم توسط فرد مبتلا به سرطان باعث کاهش چندین برابری فعالیت این آنزیم آنتی اکسیدانت قوی می‌شود و بنابر این عوارض جانبی فراوانی را بر فرد سرطانی ایجاد می‌کند.

اثر کاهشی فعالیت کاتالاز توسط اگزالی پالادیوم نه تنها به عنوان عارضه جانبی این دارو شناخته می‌شود بلکه به عنوان مکانیسم برای عملکرد ضد توموری آن شناخته می‌شود. دو مکانیسم اصلی برای عملکرد داروهای ضد سرطان وجود دارد. اولین مکانیسم انهدام سلول توموری به واسطه اثر برسنتز و رونویسی DNA است که داروهای پلاتینی و پالادیومی این تاثیر را به واسطه مسدود کردن مسیر همانند سازی و رونویسی DNA دارند. دومین مکانیسم داروهای ضد سرطان برای انهدام سلول‌های توموری افزایش رادیکال‌های آزاد می‌باشد(18). افزایش رادیکال‌های آزاد یا از طریق افزایش تولید آن در بدن یا از طریق کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت است که مورد دوم یعنی کاهش فعالیت آنزیم حیاتی کاتالاز در این بررسی به اثبات رسید. بنابر این، هدف قرار دادن آنزیم‌های آنتی اکسیدانت توسط داروهای ضد سرطان به عنوان مکانیسم عملکرد آنها مطرح می‌شود.

نتیجه گیری

به طور کلی نتایج مطالعه اخیر، اثرات اگزالی- پالادیوم بر فعالیت و ساختار سه بعدی آنزیم آنتی اکسیدانت کاتالاز کبدی را نشان می‌دهد. نتایج به طور واضح نشان

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 17:00 +0330 on Saturday November 18th 2017

دادند که اگزالی- پالادیوم در غلظت‌های کم نیز باعث مهار محسوس فعالیت کاتالاز کبد می‌شود و علاوه بر آن باعث تغییرات محسوس در ساختار سه بعدی آنزیم می‌شود که بیان‌گر آن است که یکی از اهداف مهم داروهای ضد سرطان در بدن آنزیم‌های آنتی اکسیدانت مانند کاتالاز می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج ازپایان نامه کارشناسی ارشد با عنوان مطالعه سینتیکی و ساختاری آنزیم کاتالاز کبد گاو در حضور اگزالی - پالادیوم می‌باشد و بدین وسیله مراتب قدردانی و تشکر خود را ازمعاونت پژوهشی دانشگاه خوارزمی به دلیل حمایت مالی از این پژوهش اعلام می‌داریم.

منابع

1. Mason RP. Redox cycling of radical anion metabolites of toxic chemicals and drugs and the Marcus theory of electron transfer. Environmental health perspectives. 1990; 87: 237-42.
2. Góth L, Nagy T. Acatalasemia and diabetes mellitus. Archives of biochemistry and biophysics. 2012;55(2):195-200.
3. Kampschmidt RF. Mechanism of liver catalase depression in tumor-bearing animals: a review. Cancer research. 1965; 25(1 Part 1):34-45.
4. Sazuka Y, Tanizawa H, Takino Y. Effect of adriamycin on the activities of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in tissues of mice. Cancer Science. 1989;80(1):89-94.
5. Lebwohl D, Canetta R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. European Journal of Cancer. 1998;34(10):1522-34.
6. Alberto ME, Cosentino C, Russo N. Hydrolysis mechanism of anticancer Pd (II) complexes with coumarin derivatives: a theoretical investigation. Structural Chemistry. 2012; 23(3):831-9.
7. Divsalar A, Saboury A, Yousefi R, Moosavi-Movahedi A, Mansoori-Torshizi H. Spectroscopic and cytotoxic studies of the novel designed palladium (II) complexes: β-Lactoglobulin and K562 as the targets. International journal of biological macromolecules. 2007; 40(4): 381-6.
8. Klingelhoeffer C, Kämmerer U, Koospal M, Mühling B, Schneider M, Kapp M, et al. Natural resistance to ascorbic acid induced oxidative stress is mainly mediated by catalase activity in human cancer cells and catalase-silencing sensitizes to oxidative stress. BMC complementary and alternative medicine. 2012; 12(1):12-61.
9. Abu-Surrah AS, Al-Sa'doni HH, Abdalla MY. Palladium-based chemotherapeutic agents: Routes toward complexes with good antitumor activity. Cancer therapy. 2008;6:1-10.
10. Yousefi R, Saboury A, Ghadermarzi M, Moosavi-Movahedi A. Effects of Cysteine on the Inactivation of Bovine Liver Catalase. Bulletin-korean chemical society. 2000; 21(6): 567-70.
11. Shimizu N, Kobayashi K, Hayashi K. The reaction of superoxide radical with catalase. Mechanism of the inhibition of catalase by superoxide radical. Journal of Biological Chemistry. 1984;259(7):4414-8.
12. Quick SK, Shields PG, Nie J, Platek ME, McCann SE, Hutson AD, et al. Effect modification by catalase genotype suggests a role for oxidative stress in the association of hormone replacement therapy with postmenopausal breast cancer risk. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention. 2008; 17(5):1082-7.
13. Iritani N, Ikeda Y. Activation of catalase and other enzymes by corn oil intake. The Journal of nutrition. 1982; 112(12):2235-9.
14. Mimnaugh EG, Trush MA, Ginsburg E, Gram TE. Differential effects of anthracycline drugs on rat heart and liver microsomal reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent lipid peroxidation. Cancer research. 1982; 42(9): 3574-82.
15. Duthie S, Grant M. The role of reductive and oxidative metabolism in the toxicity of mitoxantrone, adriamycin and menadione in

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 17:00 +0330 on Saturday November 18th 2017

human liver derived Hep G2 hepatoma cells. British journal of cancer. 1989;60(4):566-71.
16. Hyoudou K, Nishikawa M, Kobayashi Y, Kuramoto Y, Yamashita F, Hashida M. Inhibition of adhesion and proliferation of peritoneally disseminated tumor cells by pegylated catalase. Clinical & experimental metastasis. 2006;23(5-6): 269-78.
17. Yoshikawa T, Kokura S, Tainaka K, Naito Y, Kondo M. A novel cancer therapy based on oxygen radicals. Cancer research. 1995; 55(8): 1617-20.
18. Sotgia F, Martinez-Outschoorn UE, Lisanti MP. Mitochondrial oxidative stress drives tumor progression and metastasis: should we use antioxidants as a key component of cancer treatment and prevention? BMC medicine. 2011; 9(1):62.