اثر آلومینیم بر آنزیم گلوکز ٦- فسفات دهیدروژناز اریتروسیت انسان

دکتر بهرام حقیقی* داریوش ایلغاری** دکتر مجید سیرتی‌ثابت*** مهدی سهمانی**

The effect of aluminum on human erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase

B.Haghighi D.Ilghari M.Sirati Sabet M.Sahmani

Abstract

Background: Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD), the first enzyme in initiating the pentose phosphate shunt, is an important component in generation of NADPH. Although innumerable studies have been performed on human erythrocyte G6PD, however, the effect of trace elements on the enzyme activity requires further investigations.

Objective: To study the effect of aluminum on human erythrocyte G6PD.

Methods: In this experimental research, following the purification of G6PD using chromatographic methods, the effect of different concentrations of Al^{3+} (up to 100 micro-molar) on G6PD activity was studied. The enzyme activity was measured at different concentrations of glucose 6-phosphate and $NADP^+$ to determine the type of inhibitory action.

Findings: Aluminum at the concentration of 100 μM showed a considerable inhibitory effect on G6PD activity (60%). The type of inhibitory action, depending on the use of glucose-6-phosphate or $NADP^+$, was competitive and noncompetitive, respectively.

Conclusion: Aluminum exerts an inhibitory action on human erythrocyte G6PD activity.

Keywords: Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase, Aluminum, Polycythemia

چکیده

زمینه : آنزیم گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز (G6PD) اولین آنزیم در مسیر متابولیسمی پنتوزفسفات است که در تولید NADPH نقش مهمی دارد. مطالعه های زیادی روی آنزیم G6PD اریتروسیت انسان انجام شده است. با این وجود اثر عناصر کم مقدار روی این آنزیم به بررسی بیش‌تری احتیاج دارد.

هدف : مطالعه به منظور تعیین اثر آلومینیم (III) بر آنزیم گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز اریتروسیت انسان انجام شد.

مواد و روش‌ها : در این مطالعه تجربی آنزیم G6PD با استفاده از روش کروماتوگرافی خالص شد. سپس اثر Al^{3+} تا غلظت ۱۰۰ میکرومولار بر فعالیت آنزیم بررسی شد. جهت تعیین نوع مهارشوندگی، فعالیت آنزیم در غلظت‌های مختلف گلوکز ۶- فسفات و $NADP^+$ اندازه‌گیری گردید.

یافته ها : آلومینیم (III) با غلظت ۱۰۰ میکرومولار حدود ۶۰ درصد آنزیم را مهار نمود. مهارشوندگی نسبت به گلوکز ۶ فسفات و $NADP^+$ به ترتیب از نوع رقابتی و غیررقابتی بود.

نتیجه گیری : آنزیم گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز اریتروسیت انسان توسط آلومینیم (III) مهار می شود.

کلیدواژه ها : گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز، آلومینیم، پلی سیتمی

* استاد بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

** کارشناس ارشد بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

*** استادیار بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

آدرس مکاتبه : دانشگاه علوم پزشکی قزوین، دانشکده پزشکی، بخش بیوشیمی، تلفن ۳۳۳۰۵۳۴

Email : Ilghari-D@Yahoo.com

*** مقدمه :**

آلومینیم فراوان‌ترین فلز در پوسته زمین است.[۱] این فلز به طور عمده از سه طریق گوارشی، پوستی و ریوی جذب می‌شود.[۲] در افراد طبیعی بیش از ۹۵ درصد آلومینیم دریافت شده توسط مدفوع و یک تا دو درصد مقدار جذب شده نیز از طریق ادرار دفع می‌شود.[۲] اگرچه آلومینیم جذب شده به صورت مؤثری از طریق سیستم‌های دفعی بدن دفع می‌شود اما اگر فردی برای مدت طولانی در معرض آن قرار گیرد این فلز تجمع می‌یابد.[۳]

تاکنون اثر مهاری آلومینیم بر چندین آنزیم از جمله پمپ سدیم- پتاسیم، استیل کولین استراز، فرواکسیداز، گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز (G6PD) استخراج شده از مخمر و ایزوآنزیم‌های نوع اول و دوم آنزیم G6PD که از مغز انسان وخوک استخراج شده اند ثابت شده است.[۴و۵و۶و۷و۸] بررسی‌های انجام شده در زمینه اثر مهاری آلومینیم (III) بر آنزیم G6PD مخمر نشان داده است که اتصال این فلز به آنزیم باعث کاهش ساختارهای مارپیچ آلفا و صفحه‌های چین‌دار بتا می‌شود و در عوض میزان ساختار پیچش نامنظم را افزایش می‌دهد. بنابراین احتمال داده شد که غیرفعال شدن آنزیم G6PD توسط آلومینیم (III) به واسطه تغییر شکل فضایی آن است.[۴] بررسی‌های بعدی در این زمینه نشان داد که آلومینیم به واسطه یک واکنش درجه اول کاذب آنزیم G6PD را مهار می کند. این اثر مهاری با زمان اثر، غلظت آلومینیم و PH محیط واکنش ارتباط دارد به صورتی که با زمان اثر و غلظت آلومینیم نسبت مستقیم و با PH محیط رابطه عکس دارد.[۵و۷]

آنزیم گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز (EC.1.1.1.49) اولین آنزیم راه متابولیکی هگزوز منوفسفات است. یکی از محصول‌های این مسیر متابولیکی مولکول NADPH است که در بسیاری از اعمال حیاتی بدن انسان نقش دارد. تاکنون اهمیت این آنزیم در ارتباط با کم‌خونی همولیتیک، ساخت اسیدهای چرب و ترکیبات استروئیدی و سرطان‌ها مشخص شده است.[۹و۱۰و۱۱] آنزیم G6PD اریتروسیت‌های انسان در سطح وسیعی از نظر ژنتیکی، بالینی و همچنین کاربرد متابولیکی بررسی شده است. اما تاکنون اثر فلزهای سمی روی آنزیم G6PD اریتروسیت‌های انسان مورد بررسی قرار نگرفته است.[۱۲و۱۳و۱۴و۱۵] با توجه به این موضوع این مطالعه با هدف تعیین اثر مهاری آلومینیم (III) بر آنزیم گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز اریتروسیت‌های انسان در آزمایشگاه انجام شد.

*** مواد و روش ها :**

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۰ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شد. در این مطالعه از نمک سدیم گلوکز ۶- فسفات، نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید فسفات ($NADP^+$)، دی اتیل آمینو اتیل سلولز، فسفوسلولز، بتامرکاپتواتانل، اسید اتیلن دی آمین ترا استیک، کلرید آلومینیم با درجه خلوص بالا و آلبومین سرم گاوی محصول شرکت سیگما استفاده شد. سایر مواد مصرف شده نیز از نوع خالص و محصول شرکت سیگما بودند. برای تخلیص آنزیم از اریتروسیت‌های انسان، ده واحد packed cells از سازمان انتقال خون تهیه شد.

برای اندازه گیری مقدار پروتئین از روش لوری، جهت تخلیص آنزیم از روش اصلاح شده Deflora با استفاده از ژل‌های دی اتیل آمینو اتیل سلولز و فسفوسلولز و برای سنجش فعالیت آنزیم G6PD از طیف‌سنجی استفاده شد.[۱۶و۱۷و۱۸] هر آزمایش سه بار انجام و میانگین نتایج به دست آمده در محاسبه‌ها و رسم نمودارها استفاده شد.

برای رسم منحنی لینوور-برگ، فعالیت آنزیم در غلظت‌های مختلف گلوکز۶ فسفات (G6P) و غلظت اشباع $NADP^+$ در غیاب آلومینیم (III) و غلظت‌های ۶۰ و ۸۰ میکرومولار Al^{3+} اندازه‌گیری شد. مشابه این

آزمایش‌ها در غلظت‌های مختلف $NADP^+$ و غلظت اشباع G6P انجام شد. آزمایش‌ها در PH برابر ۷/۴ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و زمان انکوباسیون ۵ دقیقه انجام شد. مقدار ثابت واکنش مهارکنندگی (K_i) با استفاده از نمودار slope-replote محاسبه شد.

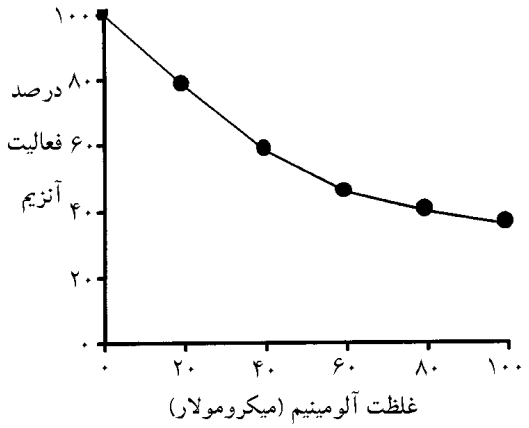
جهت بررسی وابستگی اثر مهار آلومینیم (III) به زمان انکوباسیون و PH، فعالیت آنزیم G6PD در غلظت ۶۰ میکرومولار Al^{3+} در زمان‌های انکوباسیون ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ دقیقه در PH برابر ۷/۴، ۸/۴ و ۹ بررسی شد.

*** یافته ها :**

در مراحل خالص سازی آنزیم G6PD بعد از استفاده از ژل های دی اتیل آمینو اتیل سلولز و فسفوسلولز به ترتیب فعالیت آنزیمی ۰/۲۹ و ۱/۴ واحد بین اللملی بر میلی گرم در پایان هر مرحله به دست آمد. میزان بازده آنزیم G6PD بعد از مراحل خالص سازی ۲۱ درصد و درجه خلوص آن ۱۲۷۳ برابر شد.

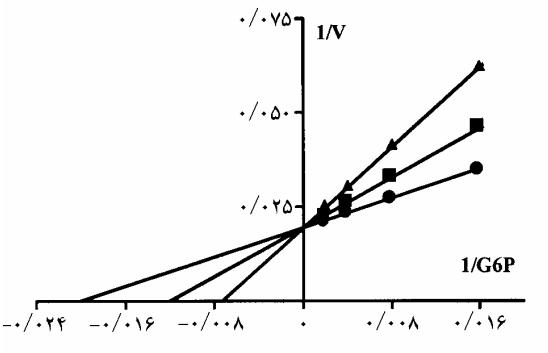
فعالیت آنزیم در غیاب آلومینیم (III) ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد. با افزایش تدریجی غلظت آلومینیم (III) فعالیت آنزیم کاهش یافت. میزان مهار فعالیت آنزیم در غلظت ۱۰۰ میکرومولار آلومینیم (III) در PH برابر ۷/۴ حدود ۶۰ درصد بود (نمودار شماره ۱).

نمودار ۱- اثر غلظت‌های مختلف آلومینیم (III) بر فعالیت آنزیم G6PD اریتروسیت‌های انسان



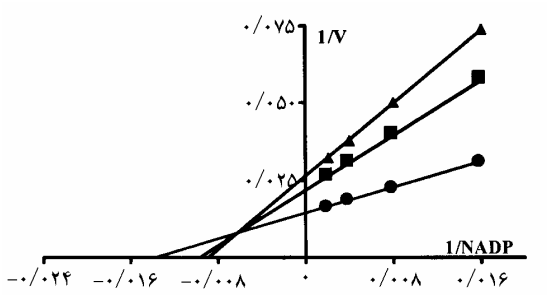
با استفاده از نمودار لینوور-برگ اثر مهارکنندگی آلومینیم بر فعالیت آنزیم G6PD در حضور گلوکز۶- فسفات (G6P) بررسی شد که سرعت حداکثر واکنش آنزیمی (V_m) تغییر نکرد، اما ثابت میکائیلیس- منتن (K_m) ظاهری آنزیم افزایش یافت (نمودار شماره ۲).

نمودار ۲- منحنی لینوور- برگ فعالیت آنزیمG6PD با غلظت‌های مختلف گلوکز۶- فسفات (G6P) و غلظت اشباع $NADP^+$ در حضور غلظت ۶۰ (■) ، ۸۰ (▲) میکرومولار آلومینیم و عدم حضور آلومینیم (●)



بررسی اثر مهارکنندگی آلومینیم (III) روی فعالیت آنزیم G6PD در حضور $NADP^+$ نشان داد که آلومینیم (III) سبب کاهش سرعت حداکثر واکنش آنزیمی (V_m) می شود (نمودار شماره ۳).

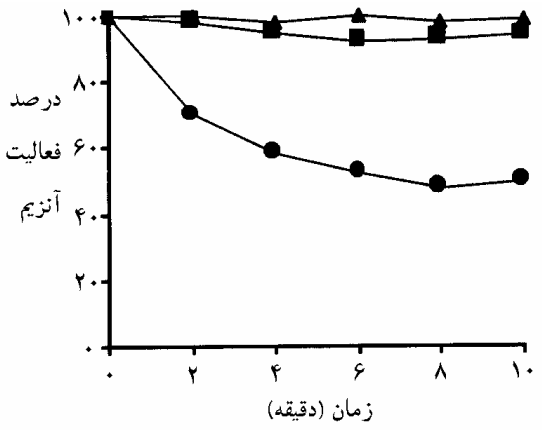
نمودار ۳- منحنی لینوور- برگ فعالیت آنزیمG6PD با غلظت‌های مختلف $NADP^+$ و غلظت اشباع گلوکز ۶- فسفات (G6P) در حضور غلظت ۶۰ (■) ، ۸۰ (▲) میکرومولار آلومینیم و عدم حضور آلومینیم (●)



با توجه به اطلاعات نمودار لینوور- برگ مهار آنزیم G6PD توسط آلومینیم (III) در حضور گلوکز۶- فسفات مقدار ثابت واکنش مهارکنندگی (K_i) آلومینیم در این شرایط با استفاده از نمودار slope-replote برابر ۳۹/۳ میکرومولار به دست آمد.

همزمان با افزایش زمان انکوباسیون و کاهش PH اثر مهارکنندگی آلومینیم بیش‌تر شد (نمودار شماره ۴).

نمودار ۴- وابستگی اثر مهار آلومینیم به PH و زمان در غلظت ۶۰ میکرومولار آلومینیم و در PH برابر ۹ (▲)، ۸/۴ (■) و ۷/۴ (●)



* بحث و نتیجه گیری :

این مطالعه نشان داد آلومینیم (III) بر روی فعالیت آنزیم G6PD اریتروسیت‌های انسان اثر مهاری دارد. تاکنون اثر مهاری آلومینیم (III) بر آنزیم G6PD مخمر، مغز انسان، خوک و موش صحرایی و مغز استخوان موش صحرایی مورد مطالعه قرار گرفته است.[۴و۵و۱۹و۲۰] آلومینیم (III) بر روی آنزیم‌های اشاره شده نیز اثر مهاری دارد. با توجه به این که اثر مهاری آلومینیم (III) روی آنزیم G6PD در حضور گلوکز۶- فسفات سبب افزایش K_m ظاهری آنزیم شد اما تأثیری روی سرعت حداکثر واکنش آنزیمی (V_m) نداشت به نظر می رسد که مهارکنندگی از نوع رقابتی است. از طرفی اثر مهاری آلومینیم (III) روی آنزیم G6PD در حضور $NADP^+$ سبب کاهش سرعت حداکثر واکنش آنزیمی (V_m) شد، لذا این اثر مهاری آلومینیم (III) از نوع غیر رقابتی است.

برخی محققین اعتقاد دارند که آلومینیم فقط به شکل یونیزه Al^{3+} و غیر کمپلکس دارای اثر سمی است.[۲۱] در این تحقیق نیز مشاهده شد که اثر مهارکنندگی آلومینیم روی فعالیت آنزیم G6PD با افزایش زمان انکوباسیون و کاهش PH محیط افزایش می یابد. با توجه به این که افزایش اسیدیته محیط (کاهش PH) سبب کاهش نسبت $Al(OH)_4^-$ به Al^{3+} می شود، می‌توان اظهار نمود که آلومینیم به صورت Al^{3+} دارای اثر مهاری بیش‌تری روی فعالیت آنزیم G6PD است.[۲۲]

مسمومیت با آلومینیم به خصوص در بیماران دیالیزی و بیماری‌های مزمن کلیوی گزارش شده است. این مشاهده به علت مصرف آلومینیم به عنوان شلات کننده فسفات روده ای و همچنین به علت وجود آلومینیم در مایع دیالیز و استفاده آن توسط بیماران دیالیزی به هنگام همودیالیز است.[۲۳] بدین جهت برخی از اختلال‌های ناشی از همودیالیز از جمله کم خونی هیپوکرومیک و میکروسیتیک را به مسمومیت با آلومینیم نسبت داده اند.[۲۴] با توجه به مطالعه‌های قبلی انجام شده در این زمینه و نیز بررسی صورت گرفته در این مطالعه می توان ارتباط مسمومیت با آلومینیم و کم خونی را در بیماران اشاره شده توجیه نمود.

در مطالعه‌های قبلی مشاهده شده است که آلومینیم به دلیل شباهت ساختمانی با آهن (III) می تواند به مولکول ترانسفرین متصل شود و جایگزین آهن شود لذا پس از ورود به داخل سلول سبب کاهش ساخت حلقه هم (heme) می‌شود.[۲۵و۲۶] آلومینیم همچنین آنزیم فرواکسیداز را مهار می کند که پیامد آن کاهش آزادسازی آهن از ذخایر آهن- فریتین است.[۲۷] مطالعه حاضر نیز نشان داد که آلومینیم سبب مهار آنزیم G6PD اریتروسیت‌های انسان می شود. با توجه به اثرات اشاره شده آلومینیم می‌توان به ارتباط بین مسمومیت با

آلومینیم و کم خونی هیپوکرومیک و میکروسیتیک پی برد. این اثرات آلومینیم احتمال ایجاد یک کم‌خونی شدید را مطرح می‌کند، اما در عمل چنین اتفاقی نمی‌افتد. شاید علت آن PH محیط واکنش و وجود شلاتورهای طبیعی آلومینیم از جمله سیترات و ATP در خون و گلبول‌های قرمز باشد. این مواد با شلات کردن آلومینیم امکان اتصال آن به بیومولکول‌ها از جمله ترانسفرین و سرولوپلاسمین راکاهش می‌دهند و از شدت کم خونی می‌کاهند.[۵] در این زمینه باید مطالعه های بیش‌تری به خصوص در مورد اثر این مواد روی مهار آنزیم G6PD اریتروسیت‌های انسان توسط آلومینیم انجام شود.

* مراجع :

1. Hem J D. Geochemistry and aqueous chemistry of aluminum. Kidney Int 1986; 29 (18): S3-S9

2. Moshtaghie A A. Aluminum toxicity: a review in related to biology and medicine. Clin Chem 1986; 32: 1797-806

3. Rocker R, Blotcky A J, Heffler J A. Evidence of aluminum absorption from the gastrointestinal tract and bone deposition by aluminum carbon ingestion with normal renal function. J Lab Clin Med 1977; 90: 810-5

4. Cho S W, Joshi J G.Inactivation of baker's yeast G6PD by aluminum. Biochemistry 1989; 28 (8): 3613-8

5. Cho S W, Joshi J G. Inactivation of G6PD isoenzymes from human and pig brain by aluminum. J Nerochem 1989; 53 (2): 616-20

6. Huber C Y, Frieden E. The inhibition of ferrioxidase by trivalent and other metal ions. J Biol Chem 1970; 245: 3979-84

7. Lai J C K et al. The effect of cadmium, manganese, and aluminum on sodium-potassium activated and magnesium ATPase activity and choline uptake in rat brain-synaptosomes. Biochem Pharmacol 1980; 29: 141-6

8. Marquis J K, Lerrick A J. Noncompetitive inhibition by aluminum, cadmium of acetylcholine esterase from E electricum. Biochem Pharmacol 1982; 31: 1437-40

9. Hilf R, Bartly J C, Abraham S. Multiplied molecular forms G6PD in normal, preneoplastic mammary tissue of mice. Cancer Res 1975; 35: 2109-16

10. Wakil S J. The mechanism of fatty acid synthesis. Am J Clin Nutr 1960; 98: 630

11. Yoshida A. Hemolytic anemia and G6PD deficiency. Science 1973; 179: 532-7

12. Ozmen I, Ciftci M, Kufrevioglu OI, Gundogdu M, Effects of some antibiotics on enzyme activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. Pharmacol Res 2000 Jan; 41(1): 109-13

13. Ciftci M et al. Effects of metamizol and magnesium sulfate on enzyme activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase from human erythrocyte in vitro and rat erythrocyte in vivo. Clin Biochem 2001 Jun; 34(4): 297-302

14. Ciftci M et al.Some drug effects on the activity of erythrocyte hexokinase and glucose 6-phosphate dehydrogenase enzymes in vitro and in vivo. Pol J Pharmacol 2002 Nov-Dec; 54(6): 673-9

15. Sayit A et al. Invitro effects of some anesthetic drugs on enzymatic activity of human red blood cell glucose 6-phosphate dehydrogenase. Pol J Pharmacol 2002; 54 : 67–71

16. Lowry O H et al. Protein measurement. J Biol Chem 1951; 193: 265-75

17. Deflora A, Morelli A. An improved procedure for rapid isolation of G6PD from human erythrocytes. Arch Biochem Biophys 1975; 169 (1): 362-3

18. Julian G R, Reithel F J. G6PD from bovine mammary gland. Methods Enzymol 1975; 183-214
19. Cho S W, Joshi J G. Effect of long term feeding of aluminum chloride on hexokinase and G6PD on brain. Toxicology 1988; 48: 61-96
20. Zaman K, Miszta H. The effect of Al(III) upon the activity of selected bone marrow enzymes in rat felid. Haematol Int Mag Klin Marphol Blut Forsch 1990; 117 (3): 447-51
21. Macdonal T et al. Aluminum ion in human body. Science 1987; 236: 138-86
22. Martin R B. The chemistry of aluminum a related to biology and medicine. Clin Chem 1986; 32: 1798-806
23. Kerr D N S, Ward M K. The history of aluminum related disease. In: Taylor A, (ed). Aluminum and other trace element in renal disease. London, Bailliere Tindall, 1986, 1-14
24. Kaiser L, Schwartz K A. Aluminum induced anemia. Am J Kidney Dis 1982; 6: 348-52
25. Moshtaghie A A, Skillen A W. Comparative binding studies of aluminum and iron to serum transferring. J Iran Academic Sci 1990; 3: 280-5
26. Moshtaghie A A, Skillen A W. Study of relationship between aluminum toxicity and heme synthesis. Iran J Med Sci 1990; 15: 46-52
27. Pon N C. Comparative biochemistry. NewYork, Academic Press, 1985, 1-92