اثر آلکیل بنزن سولفونات بر فعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمیناز مغز موش آزمایشگاهی

دکتر دردی قوجق* ؛ دکتر سید علی محمد قاضی میر سعید ** ؛ محمد آهنجان***

چکیده :

سابقه و هدف: *آلکیل بنزن سولفونات که به‌عنوان ماده فعال سطحی به‌محیط زیست افزوده می‌شود، در صورت افزایش مقدارآن درمحیط زیست به‌عنوان یک سم بیولوژیکی محیط زیست را آلوده‌می‌نماید.آلکیل بنزن سولفونات عموماً به‌عنوان ماده فعال سطحی به‌مقدار زیاد به رودخانه‌ها ودریاچه‌ها افزوده می‌شود. به‌دلیل عدم هضم بیولوژیکی آلکیل بنزن سولفونات در طبیعت ،این ترکیب شیمیایی می‌تواند خصوصیات سمیت بیولوژیکی از خود نشان دهد.مکانیسم سمیت بیولوژیکی آلکیل بنزن سولفونات هنوز مشخص نشده است . از طرفی آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمیناز ،آنزیمی است که نقش بسیار مهمی در تحریک مسیر گلیکولیز ودر کنترل شارژ انرژی دارد.این آنزیم در تعادل انرژی ودر بررسی شرایط حیات موجودات زنده نقش مارکر وشاخص دارد؛ بنابراین ممکن است در شناخت مکانیسم سمیت بیولوژیک آلکیل بنزن سولفونات مفیدباشد.*

مواد و روش‌ها: *این مطالعه از نوع تجربی است ودر این پژوهش اثر آلکیل بنزن سولفونات بر فعالیت آدنوزین منوفسفات دآمیناز در مغز موش آزمایشگاهی در لوله آزمایش مطالعه شد. در گروه آزمایش به تعداد ۳۰ نمونه درحضور آلکیل بنزن سولفونات در غلظت‌های ۱۰ تا ۵۰ میکرومول در لیتر فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شد. در گروه شاهد به تعداد ۳۰ نمونه درعدم حضور آلکیل بنزن سولفونات فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمیناز در گروه شاهد و گروه آزمایش از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد.*

یافته‌ها: *نتایج حاصل نشان دادند که فعالیت این آنزیم در گروه شاهد برابر با۸/۵۲ ± ۹۲/۸۵ نانومول در دقیقه در گرم پروتئین ودر گروه آزمایش برابر با۲/۴۵ ± ۱۸/۳۱نانومول در دقیقه در گرم پروتئین‌مغز موش آزمایشگاهی بود.*

بحث: *یافته‌های ما نشان‌داد که آلکیل بنزن سولفونات از طریق واکنش با جایگاه فعال آنزیمی آدنوزین منوفسات دآمیناز مغز موش آزمایشگاهی نقش مهاری خود را نشان می‌دهد. مهارآنزیم آدنوزین منوفسفات دآمیناز توسط آلکیل بنزن سولفونات ممکن است یک راهنمایی مناسب برای درک مکانیسم سمیت آلکیل بنزن سولفونات وآلودگی محیط زیست با ماهیت هیدروفوبیکی باشد.*

کلیدواژه‌ها: *آلکیل بنزن سولفونات ،آدنوزین منوفسفات دآمیناز،آلوده‌کننده محیط زیست.*

---

* دانشیارومدیرگروه بخش بیوشیمی وبیوفیزیک ، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی بابل.

** استادیار بخش داخلی ، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی بابل.

*** مربی بخش میکروب‌شناسی،دانشکده پزشکی ،دانشگاه علوم پزشکی مازندران.

* **عهده‌دار مکاتبات:** بابل، خیابان گنج افروز، دانشگاه علوم پزشکی بابل، گروه بیوشیمی- بیوفیزیک، تلفن: ۲۲۳۴۶۸۶-۰۱۱۱

مقدمه:

آدنوزین منوفسفات دآمیناز (EC 3.5.4.6)آنزیمی است که درتحریک مسیر گلیکولیز ودر کنترل شارژ انرژی آدنیلات اهمیت دارد (۱و۲). این آنزیم همچنین در تبدیل نوکلئوتیدهای آدنین ،اینوزین وگوانین‌نقش‌مهمی‌دارد(۳و۴).به‌دلیل‌این خصوصیات، این آنزیم در مطالعات آنزیم‌شناسی وشیمی- فیزیک از نظر تنظیم متابولیسم سلولی بسیار با اهمیت‌است. فعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمیناز که‌یک آنزیم آلوستریک می‌باشد، براثر عوامل متعددی تحت تأثیر قرار می‌گیرد، محققان گزارش داده‌اند که ترکیبات آلی از طریق کاهش افنیتی سوبسترای این آنزیم سبب کاهش فعالیت آن می‌گردند(۷-۵). محققان احتمال می‌دهند اتصال مهارگنندگان به‌آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمینازممکن‌است به‌خصوصیات هیدروفوبیسیتی ترکیبات‌بستگی‌داشته‌باشد .آلکیل‌بنزن سولفونات‌که‌به‌عنوان‌موادفعال‌سطحی استفاده‌می‌شود، درطبیعت خصوصیات سمیت بیولوژیک از خود نشان می‌دهد و آلوده‌کننده محیط محسوب می‌شود (۸). به‌رغم استفاده بسیار زیاد از آلکیل بنزن سولفونات، مکانیسم سمیت بیولوژیک این ترکیب آلی مشخص نشده است. هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر آلکیل بنزن سولفونات برفعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمیناز است. در این مطالعه ما تأثیرات آلکیل بنزن سولفونات را در فعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمیناز مغز موش آزمایشگاهی بررسی کردیم تا بدین‌طریق بتوانیم مکانیسم سمیت بیولوژیک آلکیل‌بنزن‌سولفونات‌وسایر آلوده‌کننده‌های مشابه‌آن‌را درمحیط‌زیست،باماهیت‌عمل هیدروفوبیکی مشخص کنیم.

مواد وروش‌ها:

- **موادشیمیایی:** آلکیل‌بنزن‌سولفونات،ایمیدازول -کلر، پتاسیم، منیزیم، سیترات، گوانوزین‌تری‌فسفات، آدنوزین تری‌فسفات، آلفاکتوگلوتارات وگلوتامات دهیدروژناز از نمایندگی شرکت‌های سیگما ،مرک و شرکت‌های موادشیمیایی تهیه‌شد.سایر مواد شیمیایی ومحلول‌های استفاده‌شده درحدآزمایشگاهی خالص بود و درتمام مراحل‌آزمایش از آب‌مقطر دوبار تقطیر وعاری از یون استفاده شد.
- **حیوان آزمایشگاهی وبافت مغز:** تعداد ۶۰سر موش آزمایشگاهی(RAT) باوزن‌متوسط ۲۲۴/۵±۴۵/۸ گرم در شرایط استاندارد نگهداری و پرورش‌داده‌شدند. موش‌های آزمایشگاهی ازطریق قطع نخاعی کشته‌شدند و در مدت‌زمان کمتراز دو دقیقه از جمجه‌سر، مغز بیرون آورده‌شد و در ظرف یخ قرار داده شد و توزین گردید .برای حذف چربیبا از روش قوجق وصفری (۹) استفاده شد؛ به‌طوری‌که بافت مغز در بافر فسفات سدیم ۰/۵ مولار توسط هموژنایزر به مدت ۵ دقیقه هموژنه شد. سپس هموژنه حاصل در دور ۳۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردیدو محلول رویی برداشته شد وتاانجام مراحل بعدی آزمایش درفریزر در دمای ۲۰- درجه‌سانتی‌گراد ذخیره گردید.
- **استخراج آنزیم‌آدنوزین‌دآمیناز ازمغزموش آزمایشگاهی:** که‌در دومرحله صورت‌پذیرفت:

۱- روش افنیتی کروماتوگرافی : در هر آزمایش ۵ میلی لیتر از هموژنه بافت مغز موش آزمایشگاهی به‌ستون کروماتوگرافی حاوی‌ژل انتقال داده‌شد.افنیتی کروماتوگرافی با استفاده ازروش Weyden و Kelly انجام شد(۱۰). نمونه‌های با حجم ۰/۵ میلی‌لیتر از ستون جمع‌آوری‌شد. از روش الکتروفورز برای جداسازی وشناسایی استفاده شد.

۲- روش انجام الکتروفورز: درهر سری‌آزمایش مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول تهیه‌شده از افنیتی کروماتوگرافی برای روش الکتروفورز استفاده گردید. ژل الکتروفورز افقی (به ابعاد ۰/۵ میلی‌متر در ۱۰ * ۵ سانتی‌متر)با استفاده از ژل تفکیک‌کننده حاوی ۱۰ درصد آکریل آمید در حضورسدیم دودوسیل سولفات (SDS) ۵٪ ودر PH= ۷/۲۵ (۴ میلی‌لیتر آب‌مقطر ، ۳/۳ میلی لیتر ژل آکریل آمید ۳۰ درصد ،۱/۳ میلی‌لیتر تریس ۱/۵ مولار و PH=۸/۲۵ و ۰/۱ میلی لیتر SDS ۱۰٪، ۰/۱ میلی‌لیتر آمونیوم پرسولفات ۱۰ درصد ۰/۰۰۲ میلی‌لیتر تمد (Themd) انجام شد. ژل استکینگ با آکریل آمید ۵٪ (۱/۴ میلی لیتر آب مقطر ،۰/۳۳ میلی لیترآکریل آمید ۳۰٪ ، ۰/۲۵ میلی‌لیتر تریس ۱/۵ مولاربا۷/۳۵=PH ،۰/۰۲ میلی‌لیتر SDS و۰/۰۲ میلی لیتر آمونیم پرسولفات ۱۰٪ و۰/۰۰۲ میلی‌لیتر تمد)استفاده‌شد. مدت‌زمان‌الکتروفورز ۵ ساعت بود.

- **اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمیناز:** محلول واکنش حاوی ۱۵۰ میلی‌مول بافر ایمیدازول –کلر با PH=۷/۲۵،۱۵۰ میلی‌مول پتاسیم، ۵میلی‌مول منیزیم ،۱میلی‌مول سیترات و۰/۵ میلی‌مول گوانوزین تری‌فسفات و۵ میلی‌مول آدنوزین تری‌فسفات و۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی در حجم نهایی ۲ میلی‌لیتر به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه‌شد. فعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمیناز بااستفاده ازروش Yoshino و همکارانش(۷) در طول موج ۳۴۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر مدل سیسیلC.E.1020 اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها:

در این پژوهش روش دومرحله‌ای برای استخراج آنزیم‌آدنوزین‌منوفسفات‌دآمینازازمغزموش‌آزمایشگاهی استفاده‌شد. درنمودار ۱، نمونه کروماتوگرام استخراج آنزیم توسط‌کروماتوگرافی ستونی نشان‌داده‌شده‌است، همانگونه که در این نمودار نشان‌داده‌شده‌است، آنزیم به DEAE سلولز متصل‌می‌شود و جداسازی آن در حجم ۱۰ میلی‌لیتری که حداکثر جذب نوری را دارد، شروع‌شده‌است. هریک ازنقاط درنمودار، حاصل ۶بار آزمایش است و مقادیر بر حسب Mean±SE ارائه شده است. در نمودار۲ منحنی استاندارد اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمیناز مغز موش آزمایشگاهی‌نشان‌داده‌شده‌است.تاغلظت۰/۸میکرومول در لیتر غلظت سوبسترا نمودار به‌صورت خطی است؛ بنابراین تا غلظت ۰/۸ میکرومول در لیتر سوبسترا از این نمودار برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم می‌توان استفاده‌کرد.

میزان فعالیت آنزیم در گروه شاهد (بدون حضور آلکیل بنزن سولفونات) برابر ۸/۵۲±۹۲/۸۵ و درگروه آزمایش (درحضور آلکیل بنزن سولفونات) برابر ۲/۴۵±۱۸/۳۱ نانومول در دقیقه در گرم پروتئین مغز

نمودار ۱- منحنی جذب نوری آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمینازدر طول موج ۲۸۰ نانومتربا استفاده از کروماتوگرافی ستونی.

نمودار ۲- منحنی استاندارد اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمینازمغزموش آزمایشگاهی (میزان جذب نوری سوبسترا در طول موج ۳۴۰ نانومتر).

موش آزمایشگاهی بود. همانگونه که ملاحظه می‌شود آلکیل بنزن سولفونات بر این آنزیم نقش مهاری دارد و سبب کاهش فعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمیناز می‌گردد.

منحنی میکالیس-منتون آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمیناز در حضور آلکیل بنزن سولفونات و در عدم حضور آلکیل بنزن سولفونات نشان داده شده است؛ همانطورکه در این نمودار نشان داده شده است. در حضور آلکیل- بنزن‌سولفونات فعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمیناز کاهش یافته است (نمودار ۳).

هریک از نقاط در این نمودار حاصل ۶بار آزمایش است و مقادیر بر حسب Mean±SE ارائه شده است.

نمودار ۳- منحنی میکالیس- منتون آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمیناز در حضور آلکیل بنزن سولفونات (منحنی پایین) و درعدم حضور آلکیل بنزن سولفونات(منحنی بالا)(فعالیت آنزیم برحسب nmol/min/g می‌باشد).

بحث:

یافته‌های حاصل ازاین پژوهش نشان می‌دهند که فعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمیناز مغز موش آزمایشگاهی در حضور آلکیل بنزن سولفونات با غلظت ۵۰ میکرومول در لیتر به میزان ۷۸ درصد کاهش می‌یابد و این یافته‌ها با گزارش سایر محققان از جمله Hwang و Yoshino که کاهش فعالیت این آنزیم را با این دسته از ترکیبات تا ۶۰ درصد گزارش داده‌اند، منطبق و قابل مقایسه است(۳و۸).

آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمیناز به‌عنوان سیستم کنترل‌کننده مسیر گلیکولیز در متابولیسم کربوهیدرات‌ها می‌باشد و ازطریق فعال‌نمودن آنزیم‌های کلیدی این مسیر در متابولیسم سلولی از جمله آنزیم‌های فسفوفروکتوکیناز و پیرووات کیناز و ازطریق افزایش آمونیوم عمل‌می‌کند. بنابراین، ممکن است آلکیل بنزن سولفونات سمیت بیولوژیک خود را از طریق مهار فعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمیناز نشان دهد، به‌طوری‌که سرانجام تولید انرژی در سلول مختل‌گردد(۴).

آلکیل بنزن سولفونات به مقدار زیاد به‌عنوان ماده فعال سطحی درمحیط زیست استفاده می‌گردد و به رودخانه‌ها ودریاچه‌ها افزوده می‌شود.به‌دلیل هضم کم و یا عدم هضم بیولوژیکی این ترکیب به‌عنوان آلوده‌کننده محیط زیست محسوب می‌شود و سمیت بیولوژیکی از خود نشان می‌دهد (۸). اگرچه کنتیک واکنش آلکیل بنزن سولفونات باآنزیم آدنوزین منوفسفات به‌خوبی مشخص‌نشده است ،اما معین‌شده که قدرت مهاری آلکیل بنزن سولفونات بر آدنوزین منوفسفات دآمیناز به‌مقدار زیاد به هیدروفوبیسیتی لیگاند بستگی دارد و نشان‌دهنده واکنش غیرقطبی این‌ترکیب آلی با ساختمان مولکول این آنزیم است.

یافته‌های ما در بررسی منحنی میکالیس-منتون در حضور وعدم حضور آلکیل بنزن سولفونات نشان‌داد که آلکیل بنزن سولفونات با جایگاه فعال آنزیمی واکنش داردو با گزارش سایر محققان از جمله Yoshino،Mayagima و همکارانش که قدرت مهاری این ترکیب را بر این آنزیم وابسته به‌خصوصیات هیدروفوبیسیتی لیگاند می‌دانند، قابل‌مقایسه ومنطبق است(۴و۷).

مهارآنزیم آدنوزین منوفسفات‌دآمیناز توسط آلکیل بنزن سولفونات ممکن است یک راهنمایی مناسب برای درک مکانیسم سمیت آلکیل بنزن سولفونات و آلودگی محیط زیست با ماهیت هیدروفوبیکی باشد. باتوجه به یافته‌های مایک‌توضیح ممکن برای مکانیسم مهاری آلکیل بنزن سولفونات برفعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمیناز احتمال دارد تغییر فرم مولکولی آنزیم در حضور بخش هیدروفوبیکی آلکیل بنزن سولفونات باشد که به‌بخش فعال آنزیم متصل می‌شود و بخش کاتالیتیکی آنزیم را جدا می‌کند و سرانجام سبب تغییر فرم ساختمانی آنزیمی شود و منجر به مهار آنزیمی می‌گردد.

نتیجه اینکه واکنش‌های هیدروفوبیکی آلکیل بنزن سولفونات با آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمیناز مغز موش آزمایشگاهی ممکن‌است دلیل مهار فعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمینازباشد. آنالیز این واکنش‌ها در آینده ودر مطالعات بعدی راهنمای خوبی برای درک واکنش‌های پیچیده بین آنزیم‌ها، لیگاندها وترکیبات آلوده‌کننده محیط خواهد بود.

References:

1. Sims BM, Zizelman DK, Profit AA, Prestwich GD, Sabina RL, Theibert AB. Regulation of AMP deaminase by phoinositides. J Biol Chem 1999; 274(36): 25701-25707.
2. Hisatome I, Morisaki T, Kamma H, Sugama T, Morisaki H, Ohtahara A, Holmes EW. Control of AMP deaminase 1 binding to mysoine heavy chain. Am J Physiol 1998; 275(3 Pt 1):C870-881.
3. Yoshino M and Kawamura Y. Inhibition of chicken erythrocyte AMP deaminase by tetraiodofluorescein compounds. Bioch Biophy Acta 1976; 526: 640-643.
4. Yoshino M, Murakami K. AMP deaminase reaction as a control system of the adenylate energy charge in yeast.Activation of phosphofructokinase and pyruvate kinase by the AMP deaminase-ammonia system. J Biol Chem 1985; 257:2822-2827.
5. Zielke CL, Suelter CH. Purine ,purine nucleoside and purine nucleotide aminohydrolase. In: Boyer PD (Editor). The Enzymes. vol 4. 3rd ed. New York: Academic press, 1984, P.47-51.

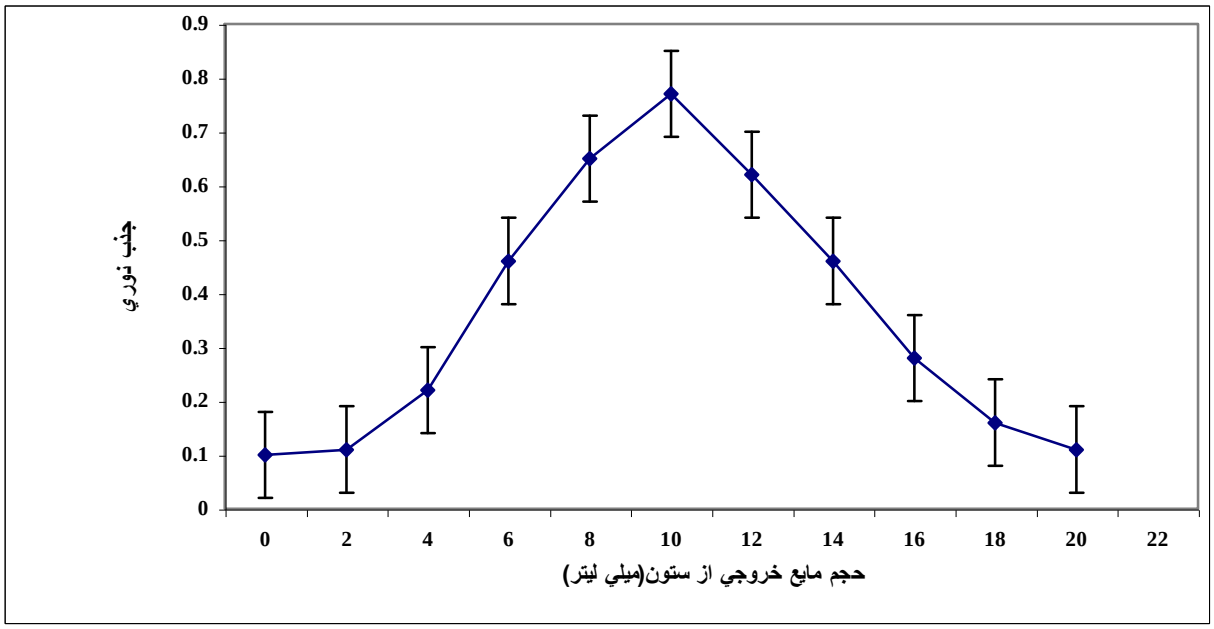
6. Yoshino M, Murakami K. AMP deaminase raction as a control system of glycolysis in yeast. Role of ammonium ion in the interaction of phosphofructokinase and pyruvate kinase activity with the adenylate energy charge. J Biol Chem 1985; 260:4729-4734.

7. Yoshino M, Miyajima E, Tsushima K. Kinetics of the interactions of AMP deaminase with fatty acids. J Biol Chem 1979; 254:1521-1526.

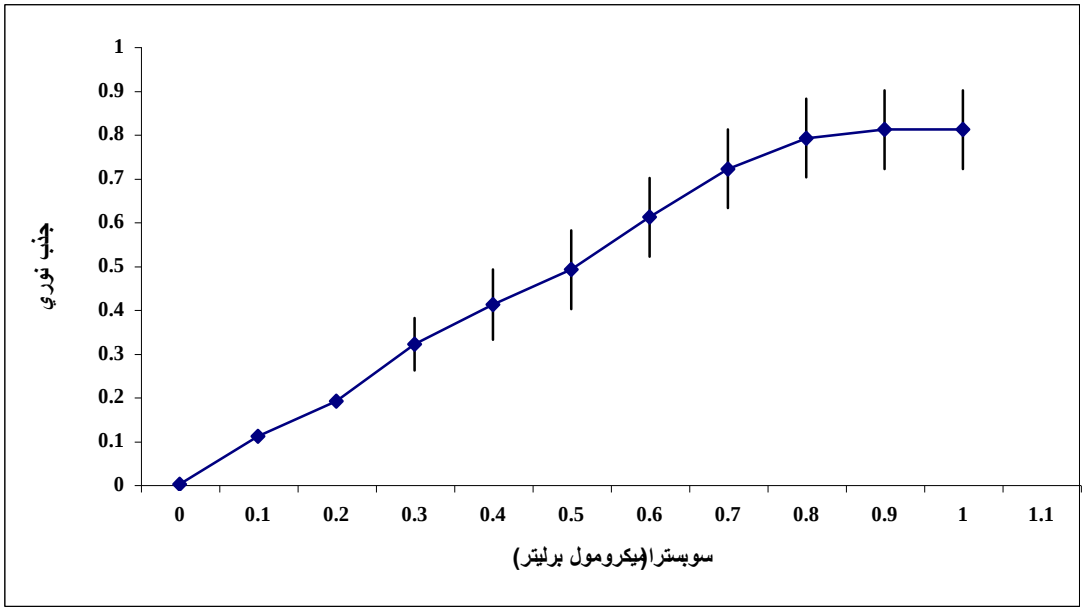
8. Hwang DF, Chen MY, Yoshida T, Jeng SS. Toxic effects of Linear alkylbenzene sulfonate on the tiger prawn penaeus monodon. Ecotoxicol Environ Saf 1993; 26:285-289.

9. Qujeq D and Safari YH. The effect of methamphetamine on histamine level and histidine decarboxylase activity in the mouse brain. Pharmacology Reviews and Communications 2001; 11(4):313-317.

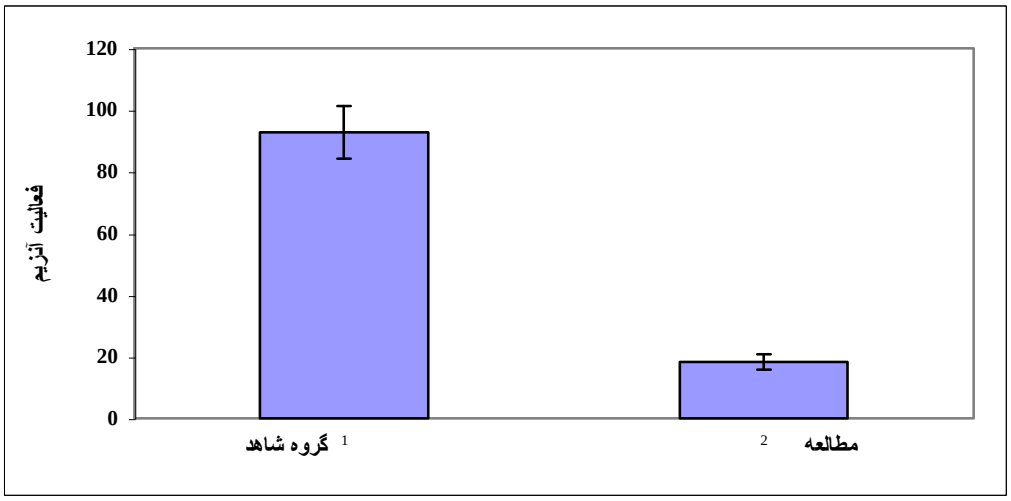
10. Weyden MB and Kelley WN. Human adenosine deaminase . J Biolog Chem 1976; 251(18):5448-5456.



نمودار ۱- منحنی جذب نوری آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمینازدر طول موج ۲۸۰ نانومتربا استفاده از کروماتوگرافی ستونی.

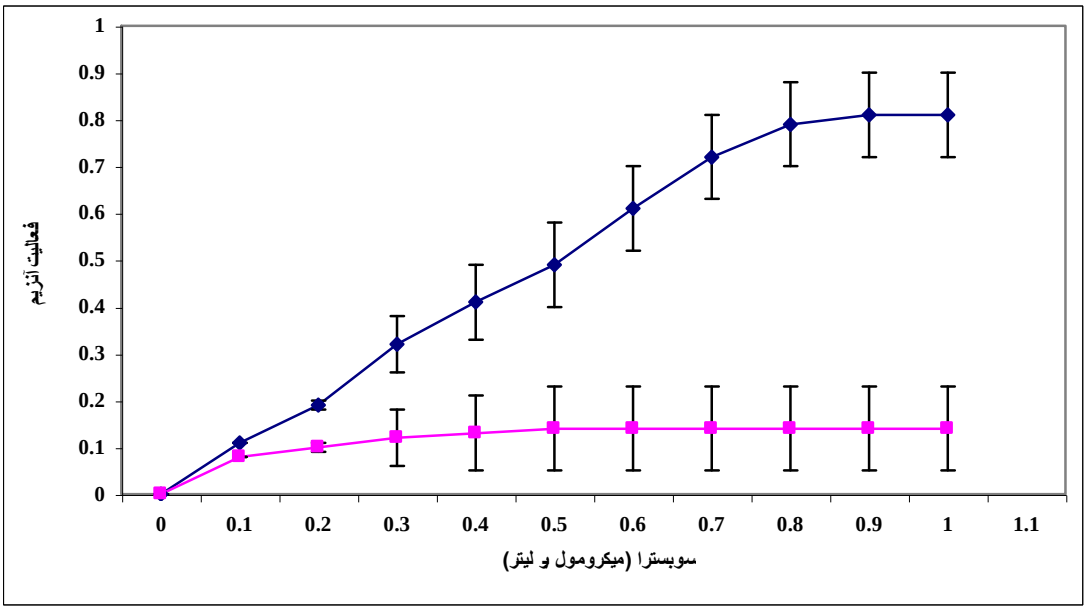


نمودار ۲- منحنی استاندارد اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمینازمغزموش آزمایشگاهی (میزان جذب نوری سوبسترا در طول موج ۳۴۰ نانومتر)



نمودار ۳- فعالیت آنزیم درگروه شاهد (بدون حضور آلکیل بنزن سولفونات)ودرگروه آزمایش (در حضور آلکیل بنزن سولفونات).هر یک از ستون‌ها حاصل ۶ بار آزمایش است ومقادیر بر حسب (Mean ±SE) ارائه شده است.

نمودار ۴- منحنی میکالیس- منتون آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمیناز در حضور آلکیل بنزن سولفونات (منحنی پایین) و درعدم حضور آلکیل بنزن سولفونات(منحنی بالا). هریک از نقاط، حاصل ۶ بار آزمایش است و مقادیر بر حسب Mean ±SE ارائه شده است.



نمودار۴- منحنی میکالیس- منتون آنزیم آدنوزین منوفسفات دآمیناز در حضور آلکیل بنزن سولفونات (منحنی پایین) و درعدم حضور آلکیل بنزن سولفونات(منحنی بالا). هریک از نقاط، حاصل ۶ بار آزمایش است و مقادیر بر حسب Mean ±SE ارائه شده است.