مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هفتم، شماره بیست و هفتم- تابستان ۱۳۹۶

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

ارزیابی اثرمهارکنندگی فلز روی بر فعالیت اکسیداتیوآنزیم پراکسیداز با طیف سنجی جذبی و داکینگ مولکولی

نجمه هادی زاده شیرازی[1*]، امیرهمایون کیهان[2]، شراره سجادی[1]

۱. گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران
۲. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله ، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به اثرهای وابسته به غلظت فلز روی هدف از این تحقیق ارزیابی اثر مهارکنندگی فلز روی بر فعالیت اکسیداتیوآنزیم پراکسیداز به عنوان یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های تنفسی سلول است.

مواد و روش‌ها: به منظور استخراج پارامترهای سینتیکی منحنی فعالیت پراکسیداز در غلظت‌های مختلف روی بر علیه زمان رسم شده و مکانیزم مهارکنندگی با کمک رسم منحنی‌های لینور- برگ و داکینگ مولکولی بررسی شده است.

یافته‌ها: فلز روی در غلظت‌های مختلف، زمان تأخیر واکنش اکسیداسیون را افزایش داده و آنزیم را با IC_{50} ۳۷۰ میکرو مولارو به صورت برگشت پذیر مهار می‌کند. الگوی گراف‌های لینوور-برگ برای مکانیزم اثر فلز روی بر فعالیت HRP با مکانیزم غیر رقابتی منطبق است. بر اساس مطالعه‌های داکینگ مولکولی و طیف سنجی جذبی آنزیم، یون روی مستقیم به جایگاه فعال متصل نشده در نتیجه میان‌کنش آنزیم و روی، انعطاف‌پذیری گروه هم کاهش یافته و یون آهن از آن حذف نشده است.

نتیجه‌گیری: یون روی دارای اثرهای مهارکنندگی وابسته به غلظت بر پراکسیداز بوده و با تأثیر بر گروه پروستتیک آنزیم فعالیت آن را با مکانیزم غیر رقابتی به شدت کاهش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: فلز روی، مهارکنندگی، تنفس سلولی،آنزیم پراکسیداز

مقدمه

بسیاری از واکنش‌های بیوشیمیایی وابسته به حضور فلز روی هستند که از آن جمله می‌توان به تنظیم مقدار دی اکسید کربن خون و هضم پروتئین‌های درون سلولی اشاره کرد (۵).
حدودا ۱۰٪ از پروتئین‌های انسانی پتانسیل اتصال به روی را داشته که در میان آنها بسیاری ازآنزیم‌ها، پروتئین‌های فعال در سیستم ایمنی، پروتئین‌های دخیل در تقسیم سلول و همانند سازی DNA دیده می‌شود (۱۶، ۳).
علی رغم نقش حیاتی روی در سیستم‌های بیولوژیک، فرایندهای هموستاتیک، تنظیم‌های فراوانی را در غلظت روی موجود در بافت‌ها و سلول‌ها اعمال می‌کنند (۳). اگرچه یون روی از دیدگاه علم شیمی در جدول تناوبی با دو عنصر سمی جیوه و کادمیوم هم گروه است اما به طور مستقیم در واکنش-های اکسیداسیون و احیاء سلول شرکت نکرده و جزء فلزات غیر سمی و بی خطر برای سلول‌ها به شمار می‌آید. با این‌حال مطالعه‌های اخیر نشان داده‌اند که یون آزاد روی (Zn^{2+}) قادر به از بین بردن نورون‌ها، سلول‌های گلیا و سلول‌های خونی است (۲،۲۱،۱۱). هم‌چنین مقادیر زیاد این فلز می‌تواند در فعالیت پروتئین‌هایی مانندآنزیم‌های کبدی (۳) و لنفوسیت‌ها (۱۶) اختلال ایجاد کند. بر اساس مطالعه‌هایی که توسط ترانگ و همکارانش و نیز واتژن و همکاران صورت گرفته است وجود سطوح بالای یون روی می‌تواند در بسیاری از سلول‌ها آغازگر آپوپتوز و مرگ سلولی باشد (۳۳ ،۳۰). به نظر می‌رسد که این پدیده به دلیل تأثیر یون روی بر فرایندهای انرژی‌زای سلول و مهار آنها است (۳۰، ۷).

نویسنده مسئول :
گروه زیست شناسی، دانشگاه ازاد اسلامی واحد رودهن
پست الکترونیکی: nhadizade@riau.ac.ir
تاریخ دریافت: ۶/۱۲/۱۳۹۵
تاریخ پذیرش: ۲۹/۱/۱۳۹۶

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.27.4.6]

آنزیم‌های فراوانی در مسیر تنفس سلولی دخالت می‌کنند که یکی از مهم‌ترین آن‌ها آنزیم پراکسیداز است.آنزیم‌های پراکسیداز گروه بزرگی از پروتئین آهن دار هستند که در نقل و انتقال‌های الکترونی از غشاءهای بیولوژیک واکنش‌های اکسیداتیو شرکت می‌کنند (۳۱). این آنزیم‌ها با استفاده از پراکسید هیدروژن بسیاری از سوبستراهای آلی و غیر آلی را اکسید کرده و از این رو در حذف انواع عوامل اکسید کننده و رادیکال‌های آزاد دخالت و نیز پراکسید هیدروژن اضافی تولید شده در شرایط استرس دارند. مطالعه‌های نشان داده‌اند که فعالیت و پایداری این آنزیم‌ها به شدت به شرایط محیطی و به‌ویژه غلظت یون‌های موجود در محیط حساس اند (۱۸ ، ۱۴). اگرچه پراکسیدازها فعالیت خود را در حضور بسیاری از فلزات حفظ می‌کنند اما گزارش‌هایی نیز مبنی بر مهار آن‌ها توسط یون‌های فلزی وجود دارد (۲۰، ۱۷). پراکسیدازها از انواع آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز هستند. گروه پروستتیک این آنزیم‌ها گروه هم بوده که دارای حلقه‌های پروتوپورفیرین و یون آهن III است. پراکسیدازها به فراوانی در موجودات مختلف اعم از باکتری‌ها، گیاهان و جانوران دیده شده و در میان آن‌ها گونه‌های گیاهی این آنزیم از نظر تحقیق‌های بیولوژیکی و کاربردهای صنعتی از بقیه پرکاربردترند چرا که قابلیت دسترسی بهتری داشته و واکنش آنزیمی قابل کنترل-تری نسبت به سایرین دارند (۱۸). از جمله آنزیم‌های پراکسیداز گیاهی که به فراوانی در مطالعه‌های بیوشیمی بالینی و ایمونواسی آنزیمی مورد استفاده قرار می گیرد آنزیم پراکسیداز ترب‌کوهی است (۳۶، ۲۴). پراکسیداز ترب‌کوهی پروتئینی با ۳۰۸ اسید آمینه بوده و در ساختار آن علاوه بر فلز آهن دو یون کلسیم نیز دیده می‌شود.

با توجه به اهمیت آنزیم‌های پراکسیداز در تنفس سلولی به نظر می‌رسد که یکی از آنزیم‌های هدف در مسمومیت با یون روی پراکسیدازها باشند. بر همین اساس در این تحقیق با هدف درک تغییرهای ساختار و عملکرد آنزیم پراکسیداز در نتیجه افزایش غلظت یون روی، تأثیر غلظت‌های مختلف کلرید روی بر فعالیت کاتالیتیک و نیز ساختار آنزیم پراکسیداز ترب-کوهی (HRP[1]) ارزیابی و ارتباط میان غلظت‌های گوناگون روی با پارامترهای سینتیکی و ساختاری مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار

مواد

پودر لیوفیلیزه آنزیم پراکسیداز ترب‌کوهی (EC.1.11.1.7)، پیروگالول، فسفات پتاسیم و کلرید روی از شرکت سیگما خریداری شده است. HRP با غلظت ۳ mg/ml در بافر فسفات پتاسیم (۶ pH) حل شده و برای مطالعه‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفته است. با توجه به هم دار بودن آنزیم برای تعیین درجه خلوص آنزیم از اندازه گیری Rz استفاده شده است. برای این منظور نسبت جذب در طول موج ۴۰۳ نانومتر (جذب ماکزیمم هم) به جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر (جذب پروتئین) بررسی شده است (۱۵). مقدار پارامتر Rz برای محلول آنزیمی فوق بیش‌تر از ۳ بوده است که به معنی خلوص قابل قبول آنزیم می‌باشد.

سنجش فعالیت آنزیم

فعالیت آنزیم با استفاده از روش Mackova اندازه‌گیری شده است(۱۹). محلول سنجش فعالیت آنزیم دارای ٪۰/۰۲۷(حجمی/حجمی) پراکسید هیدروژن ، بافر فسفات پتاسیم ۱۴ میلی مولار و پیروگالول (٪۰/۵وزنی/حجمی) به عنوان سوبسترا بوده که در نتیجه فعالیت آنزیم پراکسیداز به ترکیب رنگی پورپوروگالین[2] تبدیل می‌شود که در ۴۲۰ نانومتر جذب دارد. برای شروع واکنش ۲میکرولیتر محلول آنزیمی به ۳ میلی‌لیتر محلول سنجش فعالیت آنزیم اضافه شده و تغییرهای جذب نور در ۴۲۰ نانومتر به عنوان شاخصی از فعالیت آنزیم در نظر گرفته شده است. یک واحد فعالیت پراکسیداز مقدار آنزیمی است که بتواند ۱میکروگرم پیروگالول را به پورپوروگالین در هر دقیقه تبدیل کند (۲۸). منحنی فعالیت کاتالیتیک آنزیم نسبت به زمان[3] در حضور و عدم حضور یون روی با غظت‌های ۰ تا ۷۰۰ میکرومولار با استفاده از تکنیک اسپکتروسکوپی جذبی ثبت شده است. زمان تأخیر[4] (τ) و سرعت فاز ایستا[5] (κ) واکنش به ترتیب از محل برخورد منحنی با محور xها و برون‌یابی منحنی در ناحیه خطی محاسبه شده است (۴). مکانیزم مهارکنندگی یون روی با استفاده از منحنی لینوور-برگ ارزیابی شده است (۶).

[1]Horseradish peroxidase

[2]Purpurogallin
[3]Progrress curve
[4]Lag time
[5]Steady state rate

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.27.4.6]

مطالعه‌های ساختاری

برای پایش تغییرهای ساختاری ناشی از میان‌کنش فلز روی با HRP، طیف جذبی نمونه ها در طول موج‌های ۷۰۰-۳۰۰ نانومتر و با استفاده از اسپکتروفوتومتر جذبی شیماتزو تهیه شده است. طیف‌ها با استفاده از یک کووت کوارتز ۱ سانتی-متری و در دمای اتاق به‌دست آمده اند. برای هر نمونه غلظت نهایی HRP ثابت و به میزان ۰/۱ میلی گرم بر میلی‌لیتر حفظ شده و غلظت فلز روی بین ۰ تا ۷۰۰ میکرومولار متغیر بوده است.

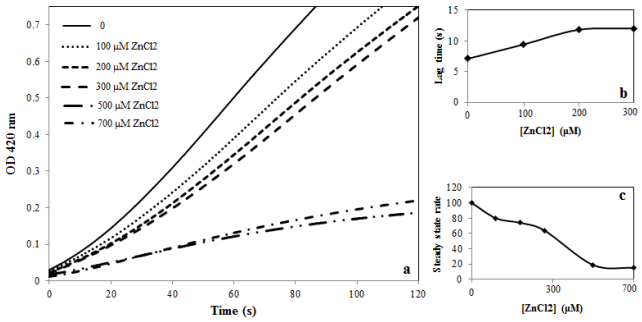
مطالعه‌های داکینگ مولکولی

مدل‌سازی مولکولی فرایند مهارکنندگی روی، با دریافت اطلاعات ساختار کریستالی آنزیم پراکسیداز ترب‌کوهی (PDB ID: 1HCH) از بانک اطلاعاتی پروتئین (Protein Data Bank (PDB)) آغاز شده است. پس از بررسی ساختار پروتئین، برای آماده سازی فایل‌های ورودی، با کمک نرم افزار Auto Dock Tools (version 4.2) اتم‌های هیدروژن قطبی به ساختار اضافه و مولکول‌های آب از آن حذف شده‌اند. بارهای جزئی با روش Gasteriger محاسبه شده است. مدل‌سازی و مطالعه داکینگ مولکولی با نرم افزار AutoDock4 انجام شده است (۳۴). پارامترهای grid box با کمک AutoGrid4 و با ابعاد ۵۶×۷۲×۷۴ نقطه ساخته شده است تا اسیدهای آمینه پروگزیمال به گروه هم(His 170, Asp 247, Phe 221 و Glu64) و دیستال(Phe 41, His42, Arg38 و Asn70) را کمابیش پوشش دهد. در نهایت از الگوریتم ژنتیک لامارکین برای شبیه سازی استفاده شده و محاسبات در ۱۵۰ دور انجام شده است. پس از انجام مدل‌سازی با کمک آنالیز انرژی اتصال، مدل اتصالی با کم‌ترین انرژی آزاد اتصال به عنوان بهترین مدل انتخاب شده است. داده‌های خروجی داکینگ با نرم افزار گرافیکی PyMol تصویرسازی شده و به نمایش گذاشته شده است (۳۴).

نتایج

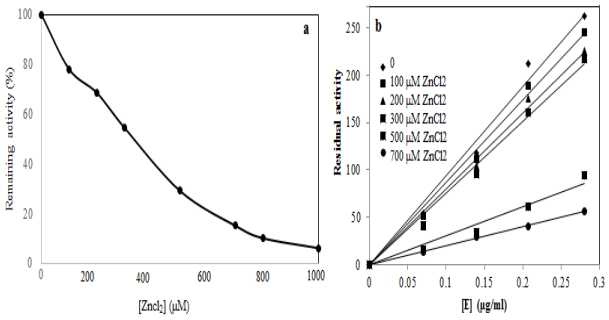
مطالعه‌های سینتیکی

تغییرهای جذب ناشی از تولید پوپوروگالین در ۴۲۰ نانومتر بر علیه زمان رسم شده و به این ترتیب منحنی سینتیکی آنزیم تهیه و در شکل ۱a آورده شده است. آنالیز این منحنی نشان دهنده آن است که اکسیداسیون پیروگالول به‌خودی‌خود دارای حدود ۷ ثانیه زمان تأخیر است که یون روی این زمان را افزایش داده و به بیش از ۱۲ ثانیه می‌رساند (شکل ۱b). منحنی فعالیت پس از طی زمان تأخیر، خطی شده و به فاز ایستا می‌رسد. در این فاز میزان تولید پورپوروگالین نسبت به زمان ثابت است. سرعت فاز ایستا با افزایش غلظت روی از ۳۰۰ میکرومولار به آرامی کاهش می‌یابد (شکل۱c). این درحالی است که شیب ناحیه خطی برای غلظت‌های بالاتر از ۳۰۰ میکرومولار به شدت کاهش یافته و در نتیجه مقدار کم-تری محصول در واحد زمان تولید می‌شود.



شکل۱. a) منحنی سینتیکی فعالیت آنزیم پراکسیداز ترب‌کوهی. b) زمان تأخیر فعالیت آنزیم c) منحنی تغییرهای سرعت فاز ایستا در غلظت‌های ۰ تا ۷۰۰ میکرومولار کلرید روی.

مکانیزم و سینتیک مهارکنندگی روی با استفاده از گراف‌های لینوور-برگ مطالعه و بررسی شده است. نتایج نشان می‌دهند که فعالیت اکسیداسیون آنزیم در حضور روی با IC_{50} ۳۷۰ میکرومولار کاهش یافته است (شکل۲a). برگشت‌پذیری فرایند مهارکنندگی توسط رسم منحنی غلظت آنزیم بر علیه فعالیت آن در حضور غلظت‌های مختلف روی مطالعه شده است. (شکل۲b). این منحنی دارای دسته‌ای از خطوط صاف است که همگی از مبدأ می‌گذرند. در این گراف افزایش غلظت یون روی منجر به کاهش شیب خطوط شده است.

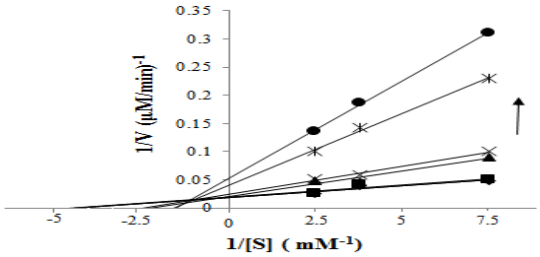


شکل۲. a) منحنی تغییرهای سرعت فعالیت آنزیم پراکسیداز ترب‌کوهی در حضور۰ تا ۱۰۰۰ میکرومولار کلرید روی. b) گراف تغییرهای غلظت آنزیم پراکسیداز ترب‌کوهی بر فعالیت آنزیم و در حضور غلظت‌های مختلف کلرید روی.

نوع مهارکنندگی فلز روی بر فعالیت آنزیم HRP در شکل۳ آورده شده است. آنالیز شکل ۳ بیانگر آن است که اکسیداسیون پیروگالول توسط HRP از مدل‌های سینتیکی میکائیلیس-منتون تبعیت می‌کند. گراف‌های لینوور- برگ

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.27.4.6]

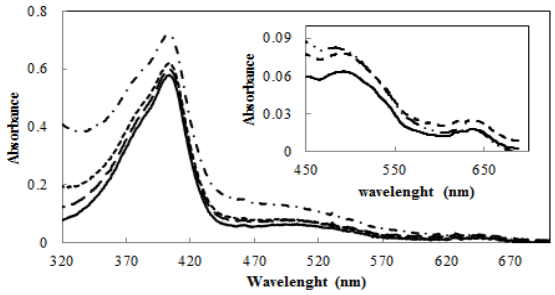
فعالیت آنزیم بر علیه غلظت سوبسترا از یک‌سری خطوط با شیب‌های متفاوت تشکیل شده است که یکدیگر را در بالای محور xها (معکوس غلظت سوبسترا) قطع می‌کنند. مقدار k_m با افزایش غلظت روی افزایش یافته است درحالی که مقدار v_{max}کاهش داشته است.



شکل ۳. گراف لینوور-برگآنزیم پراکسیداز ترب‌کوهی در حضور غلظت‌های مختلف کلرید روی

مطالعه‌های ساختاری

متالوآنزیم‌های پورفیرین‌دار در محدوده ماوراءبنفش نزدیک و مرئی باند جذبی دارند که ناشی از جذب نور توسط گروه هم و حلقه‌های پوفیرینی آن‌ها است. شکل ۴ طیف جذبی HRP را در حضور و عدم حضور فلز روی نشان می‌دهد. همان‌طور که در این تصویر دیده می شود، طیف جذبی در فقدان یون روی دارای یک پیک قوی (باند سورت) در طول موج ۴۰۳ نانومتر و دو پیک ضعیف‌تر (باندهایQ) در محدوده طول موجی ۵۰۰ تا ۶۵۰ نانومتر است.



شکل۴. طیف جذبی آنزیم پراکسیداز ترب‌کوهی در حضور غلظت‌های ۰ (خط پیوسته)، ۱۰۰ (خط چین)، ۳۰۰ (نقطه چین) و ۵۰۰ میکرومولار (خط-نقطه) کلرید روی. غلظت ۷۰۰ میکرومولار به دلیل احتمال وجود اگریگاسیون آورده نشده است.

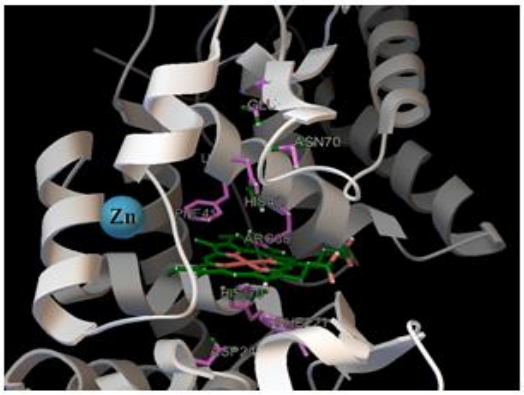
بررسی طیف جذبی گویای آن است که میزان جذب برای باند سورت با افزایش غلظت روی تا ۵۰۰ میکرومولار افزایش پیدا می‌کند. این نتیجه برای باندهای Q نیز به میزان کم‌تری صادق است اما در غلظت‌های بالاتر روی، باند سورت در قله پهن‌تر شده و به الگوی طیف جذبی برای اگریگاسیون شبیه می‌شود. هم‌چنین نسبت شدت α/β و α به سورت برای تمام غلظت‌های فلز روی با افزایش ملایم روبرو است. باند الفا همواره به میزان بیش‌تری نسبت به باند بتا افزایش یافته است.

جدول۱. نسبت تغییرهای جذب در باندهای جذبی Q و سورت برای آنزیم پراکسیداز ترب‌کوهی در حضور کلرید روی.

$[ZnCl_2](\mu M)$	۰	۱۰۰	۳۰۰	۵۰۰
α/β intensity	۳/۸	۳/۹	٤/۱	٤/۲
α/Soret intensity	۰/۱۱	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۱۷

مطالعه‌های داکینگ مولکولی

بر اساس آنالیز خوشه‌ای[۶] مدل‌های خروجی داکینگ، بهترین انرژی آزاد اتصال($\Delta G_{binding}$) برای کمپلکس روی-HRP ۰/۱۹- کیلوکالری بر مول بوده است. از این پارامتر برای آنالیز مدل‌های خروجی داکینگ استفاده شده است. بر این اساس نقاط اتصال احتمالی روی مشخص شده و اتصال با پایین‌ترین انرژی در شکل ۵ آورده شده است. برای RMSD کم‌تر از ۱۰ انگستروم، مدلی با انرژی آزاد قابل قبول دیده نشده است.



شکل۵. مدل انتخابی در مدل‌سازی مولکولی برای محل قرارگیری یون روی در اطراف جایگاه فعال و گروه هم. این مدل توسط نرم افزار AutoDock4 محاسبه و توسط نرم افزار PYMol به نمایش گذاشته شده است.

بحث

در مقایسه با بسیاری از فلزات مانند کادمیوم، فلز روی جزء عناصر بی خطر برای بافت‌های زنده به شمار رفته و تنها در دوزهای مصرفی بالا خاصیت سمی دارد. سیستم‌های تنظیمی بدن در بسیاری از موانع مانع از دریافت و جذب دوزهای بالای روی می‌شود. با این‌حال همواره این فلز می‌تواند در دوزهای سمی از طرق مختلف مانند دارو و مواد آرایشی به بدن وارد

[۶] Cluster analysis

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.27.4.6]

شود (۳۵، ۹،۲۲،۲۵). فلز روی برخلاف یون آهن پروتئین‌ها و واکنش‌های اختصاصی نداشته و به صورت مستقیم و غیر مستقیم در بسیاری از واکنش‌های بیوشیمیایی دخالت دارد. از این رو مسمومیت با این فلز می‌تواند بسیاری از فرایندهای حیاتی سلول را درگیر کند. مطالعه‌های نشان داده‌اند که مسیرهای ردوکس و تنفس سلولی و مرگ سلولی از جمله فرایندهایی است که فلز روی در آنها دخالت دارد (۳۳، ۳۰). مکانیزم دقیق دخالت این فلز در این مسیرها مشخص نیست اما بسیاری از محققان بر این باورند که اثرهای مهارکنندگی و یا فعال‌کنندگی این پدیده‌های سلولی به طور کامل وابسته به غلظت یون روی موجود در بافت و سلول است به این معنی که روی می‌تواند فرایند مرگ سلولی و اپوپتوز را با کنترل نفوذپذیری میتوکندری تسریع و یا با تأخیر مواجه کند (۱۰، ۷). به‌علاوه افزایش غلظت روی منجر به افزایش غلظت اکسیژن رادیکالی، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های آزاد موجود در سلول می‌شود (۳۲). در شرایط عادی،آنزیم‌های پراکسیداز مانند HRPبا فعالیت اکسیداسیونی خود رادیکال-های آزاد را از محیط حذف می‌کند. از این رو به نظر می‌رسد که افزایش غلظت روی بر فعالیت این آنزیم ها مؤثر باشد. از دیدگاه بیوشمیایی گروه فریک HRP با کمک پراکسید هیدروژن سوبسترا را اکسید می‌کند. مسیر واکنش دارای دو کمپلکس حدواسط I و II است که سرعت تشکیل و شکستن آنها تأثیر بسزایی بر سرعت و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز دارد (۲۹). نتایج این مطالعه نشان دهنده افزایش زمان تأخیر در واکنش اکسیداسیون در منحنی سینتیکی آنزیم است. به-طورکلی در مسیرهای بیوشیمیایی که دارای چندین حدواسط اند حدواسط پایدارتر و یا با سرعت تشکیل کم‌تر مسئول ایجاد زمان تأخیر است (۱). از طرف دیگر آنزیم پس از طی زمان تأخیر وارد فاز ایستا می‌شود که در نتیجه میان‌کنش با فلز روی سرعت این فاز به صورت قابل توجهی کاهش پیدا می-کند. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که تغییر فعالیت آنزیم به طور قوی به تغییر ساختار گروه هم به عنوان گروه پروستتیک آن‌ها بستگی دارد (۲۷،۲۸). برای بررسی نقش احتمالی گروه هم در میان‌کنش فلز روی با HRP، تغییرهای ساختاری گروه هم با استفاده از اسپکتروفوتومتر جذبی در محدوده ۷۰۰-۳۰۰ نانومتر مورد مطالعه قرار گرفته است. ناحیه آهن‌دار و حلقه-های پورفیرینی گروه هم در این محدوده طول موج دارای دو پیک جذبی به ترتیب سورت و Q هستند. به‌علاوه باند Q خود از دو باند α (۵۰۱ نانومتر) و β (۶۳۳ نانومتر) تشکیل شده است (۱۲، ۱۱). مقایسه طیف جذبی آنزیم در حضور و عدم حضور یون روی نشان می‌دهد که الگوی اصلی طیف جذبی بدون تغییر بوده و هیچ‌کدام از پیک‌ها از آن حذف نشده‌اند . این نتیجه به این معنی است که گروه هم تغییر ساختاری اساسی نداشته و یون آهن نیز از آن حذف نشده است. با این حال افزایش جذب برای میان‌کنش آنزیم با روی در تمام غلظت‌ها دیده می‌شود. گرچه مقدار این افزایش جذب برای غلظت‌های ۱۰۰ تا ۳۰۰ میکرومولار کم‌تر و برای غلظت‌های بالاتر بیش‌تر است. بررسی دقیق‌تر باند سورت نشان می‌دهد قله این پیک برای غلظت ۷۰۰ میکرومولار پهن‌تر شده که به احتمال نشانه‌ای از وجود و تشکیل ساختارهای پروتئینی اگریگه در محلول مورد بررسی است. باندهای Q در متالوپورفیرین‌ها به تغییر شرایط پورفیرین حساس‌اند و نسبت شدت α/β و αبه سورت گویای انتقال‌های الکترونی و پایداری پیوندها در کمپلکس فلزی است (۲۰، ۱۳ ، ۸). نسبت‌های α/βو α به سورت با افزایش غلظت روی افزایش یافته که بیانگر افزایش پایداری کمپلکس فلزی پورفیرین در نتیجه افزایش غلظت یون روی است (جدول۱). این نتایج با نتایج حاصل از مطالعه فلزات نیکل و کادمیوم بر گروه نیز همخوانی دارد (۲۰، ۱۷). به این ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که وجود فلز روی در غلظت‌های ۱۰۰ تا ۵۰۰ میکرومولار قدرت پیوندهای موجود در هم و در نتیجه پایداری کمپلکس‌های حدواسط را افزایش داده و آن‌ها را پایدار می‌کند.

درک بهتر از تغییرهای ساختاری گروه هم در میان‌کنش با فلز روی با کمک مدل‌سازی مولکولی میسر شده است. نتایج داکینگ نشان می‌دهند که انرژی آزاد اتصال برای RMSD کم‌تر از ۱۰ انگستروم زیاد است به این معنی که جایگاه اتصال یون روی از محوطه جایگاه فعال دور است. به بیان ساده‌تر یون روی مستقیم با اتم آهن موجود در جایگاه فعال میان-کنش نداده و تأثیر آن غیر مستقیم است. با توجه به نتایج فوق یون روی در محلی بیرون از جایگاه فعال متصل می‌شود و از این رو نمی‌تواند با سوبسترا رقابت کند و مکانیزم مهار کنندگی باید غیر رقابتی یا نارقابتی باشد. ارزیابی این نتیجه-گیری با کمک تعیین مکانیزم مهارکنندگی صورت گرفته است. آنالیز گراف‌های لینوور-برگ نشان می‌دهد که فلز روی در یک فرایند وابسته به غلظت و برگشت پذیر آنزیم HRP را مهار می‌کند. فلزاتی مانند نیکل، کبالت و مس نیز مهارکنندگی برگشت پذیر دارند (۲۶، ۲۰). گراف‌های لینوور-برگ شکل ۳ نشان می‌دهد که فلز روی فعالیت اکسیداتیو آنزیم را با مکانیزم غیر رقابتی یا non-competetive مهار می-کند. در این حالت جایگاه اتصال مهارکننده در محلی دور از

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-23]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.27.4.6]

جایگاه فعال بوده و مهارکننده به صورت غیر مستقیم بر فعالیت آنزیم موثر است. به این ترتیب صحت نتایج حاصل از مطالعه‌های ساختاری و مدل‌سازی مولکولی تأئید می‌شود.

نتیجه‌گیری

میان‌کنش فلز روی و آنزیم پراکسیداز از این جهت که روی یکی از فلزات مهم بافت‌های زنده و آنزیم پراکسیداز از جمله آنزیم‌های اکسیداسیون و احیاء سلولی است اهمیت فراوانی دارد. بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، غلظت بالای فلز روی بر آنزیم پراکسیداز اثر مهارکنندگی برگشت پذیر داشته و فعالیت آن را به صورت قابل توجهی و با مکانیزم غیر رقابتی کاهش می‌دهد. غیر رقابتی بودن مهارکنندگی روی با مطالعه و شبیه‌سازی داکینگ مولکولی تأئید شده است. بر اساس نتایج داکینگ مولکولی محل اتصال فلز روی در جایگاهی غیر از جایگاه فعال است به این معنی که فلز روی در اتصال به جایگاه اتصال خود با سوبسترا رقابت نمی‌کند. بررسی نتایج مطالعه‌های ساختاری گروه هم نشان می‌دهد که گروه پروستتیک آنزیم HRP در میان‌کنش با فلز روی ساختار خود را حفظ کرده و در نتیجه این میان‌کنش فلز آهن از جایگاه خود خارج نشده است. با این‌حال میزان انتقال الکترون و در نتیجه پایداری کمپلکس فلزی گروه پروستتیک افزایش پیدا می‌کند. با توجه به دخالت این گروه در تشکیل و شکستن حدواسطهای واکنش آنزیمی، پراکسیداز قدرت عملکرد و فعالیت خود را در حضور فلز روی از دست داده و مهار می-شود.

پر واضح است که از توانایی مهار فعالیت اکسیداتیو آنزیم پراکسیداز توسط فلز روی می‌توان در طراحی داروهای ضد سرطان و مختل کردن فرایندهای تنفس سلولی سلول‌های توموری استفاده کرد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن برای حمایت مالی در اجرای این تحقق کمال تشکر و قدردانی را دارند.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-23]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.27.4.6]

منابع

1. Bisswanger H. Enzyme assays. PerspectivesinSci;2014(1): 41–55
2. Bitanihirwe BK, Cunningham MG. Zinc: The brain's dark horse. Synapse. 2009; 63: 1029.
3. Cai L, Li XK, Song Y, Charian MG. Essentiality, toxicology and chelation therapy of zinc and copper. Curr Med Chem. 2005; (12): 2753–2763.
4. Chen QX. Enzymology and Research Technology. First ed. Xiamen University. Xiamen 2010; p: 100-115.
5. Classen HG, Gröber U, Löw D, Schmidt J, Stracke H. Zinc deficiency: Symptoms, causes, diagnosis and therapy. Med Monatsschr Pharm; 2011 (34): 87-95.
6. Copeland RA. Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism and data analysis. Wiely-VCH Inc.2000; p 231-34.
7. Curtin J.F. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. J Immunol Methods ;2002(265): 49-72.
8.Dayer M R, Moosavi-Movahedi A K, Dayer M S (2010) Band Assignment in Hemoglobin Porphyrin Ring Spectrum: Using Four-Orbital Model of Gouterman. Prot Peptide Lett. 17:473-479.
9. Das M, Das R. Need of education and awareness towards zinc supplementation: A review. Int. J. Nutrition Met; 2012 (4): 45-50.
10. Feng P, Li T, Guan Z, Franklin RB, Costello LC. The involvement of Bax in zinc-induced mitochondrial apoptogenesis in malignant prostate cells. Mol Cancer ;2008 (7):25-30.
11. Frederickson CJ, Koh JY, Bush AI. The neurobiology of zinc in health and disease. Nature Neur ;2005 (6): 449–462.
12. GiovannettiR(2012) The use of spectrophotometry UV-Vis for the study of porphyrins. macro to nanopectroscopy, Jamal Uddin (Ed.), ISBN: 978-953-51-0664-7, InTech.
13. Gouterman MG. Study of the Effects of Substitution on the Absorption Spectra of Porphin, J Chem Phys;1959 (30) :1139-1161.
14. Hamid H, Rehman KU. Potential applications of peroxidases, Food Chem ;2009 (115):1177–1186.
15. Hassani L, Ranjbar B, Khajeh K, Naderi-Manesh H, Naderi-Manesh M, Sadeghi M, Horseradish peroxidase thermostabilization: The combinatorial effects of the surface modification and the polyols. Enz Microb Technol ;2006 (38):118-25.
16. Honscheid A, Rink L, Haase H. T-lymphocytes: a target for stimulatory and inhibitory effects of zinc ions. Endocr Metab Immune Disord ;2009 (9): 132-144.
17. Keyhani J. Heterogenous inhibition of horseradish peroxidase activity by cadmium. Biochem Biophys Acta ;2004 (1621): 140-148
18. Lopez GR, Pinto DC. Silva Horseradish peroxidase (HRP) as a tool in green chemistry. RSC Adv ;2014(4): 37244-37265.
19. Mackova M, Ferr EN, Demnerov K, Macek T. Quantitative chemiluminescent detectionof plant peroxidase using a commercial kit originality designed for blothing assays. Chem Listy ;2012(95) :130-132.
20. Mahmoudi A, Nazari K, Mohammadian N, Moosavi-movahedi AK. Effect of Mn^{2+}, Co^{2+},Ni^{2+}, and Cu^{2+}on horseradish peroxidase activation, inhibition, and denaturation studies. Appl Biochem Biotech ;2003(104): 81-94.
21. Mandar A A, Elias A. Redox Regulation of Intracellular Zinc: Molecular Signaling in the Life and Death of Neurons. Antioxidants & Redox Signaling;2011 (15): 2249-2263.
22. Maret W, Sandstead HH. Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. J Trace Elements Med Biol; 2006 (20): 3–18
23. Patel N, Seward HE, Svensson A, Gurman SJ, Thomson AJ, Raven EL. Exploiting the conformational flexibility of leg hemoglobin:a framework for examination of heme protein axial ligation. Arch Biochem Biophys ;2003 (418):197-204.
24. Prasad AS. Zinc: an overview. Nutrition ;1995 (11): 93-99

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-23]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.27.4.6]

25. Preeti T B, Satya R M, Mohsina H. Nutritional Aspects of Essential Trace Elements in Oral Health and Disease: An Extensive Review, Scientifica; 2016:12 pages.
26. Prushan MJ, Addison AW, Butcher RJ, Thompson LK. Copper(II) complexes of tetradentate thioether-oxime ligands. Inorganica Chimica Acta ;2005 (358): 3449-3456.
27. Thongsook T, Barrett DM. Heat Inactivation and Reactivation of Broccoli Peroxidase, J Agric Food Chem ;2005 (53): 3215-3222.
28. Thomas L, Poulos L. Thirty years of heme peroxidase structural biology, Arch Biochem Biophys ;2010 (500): 3–12.
29. Toledo JC, Audi R, Ogusucu R, Monteiro G, Eduardo G. Horseradish peroxidase compound I as a tool to investigate reactive protein-cysteineresidues: from quantification to kinetics. Free Radical Biol Med ;2011 (50): 1032–1038.
30. Truong-Tran AQ, Carter J, Ruffin RE, Zalewski PD. The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death. Biometals ;2001 (14):315-330.
31- Vlasits J, Jakopitsch Ch, Bernroitner M, Zamocky M, Furtmüller P G. Heme peroxidases, mechanisms of catalase activity of heme peroxidases. Arch Biochem Biophys ;2010 (500):74–81.
32. Valko M, Morris H, Cronin MTD. Metals, Toxicity and Oxidative stress. Curr Med Chem ;2005 (12):1161-66.
33. Watjen W, Haase H, Biagioli M, Beyersmann D. Induction of apoptosis in mammalian cells by cadmium and zinc. Environ Health Perspect ;2002 (110):865-867.
34. Wang YJ, Zhang GW, Yan JK, Gong D. Inhibitory effect of morin on tyrosinase: insights from spectroscopic and molecular docking studies. Food Chem ;2014 (163): 226–233.
35. Whitney EN, Rolfes SR. Understanding Nutrition. 10th ,ed, 2010;p: 447-450.
36. Zitka O J, Ryvolova M, Hubalek J, Eckschlager T, Adam V. From Amino Acids to Proteins as Targets for Metal-based Drugs, Cur. Drug Met; 2012 (13): 306-320

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-23]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.27.4.6]