

بررسی اثرات جانبی داروی دفراسیروکس بر ساختار و عملکرد آنزیم کاتالاز کبدی گاو در شرایط *In vitro*

مریم مرادی^۱، عادل دیوسالار^{۱*}، مریم سعیدی فر^۲، علی اکبر صبوری^۲، محمد طهماسب^۱

۱- گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

۲- پژوهشگاه فناوری نانو و مواد پیشرفته مرکز تحقیقات مواد و انرژی، تهران، ایران.

۳- مرکز تحقیقات بیوشیمی بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۱/۲۹

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۱۰/۰۱

چکیده

زمینه و هدف: امروزه کلاتورهای خوراکی از جمله داروی دفراسیروکس برای درمان بار اضافی آهن ناشی از انتقال خون مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به نقش حائز اهمیت کبد در سم زدایی و متابولیسم کردن داروها و اهمیت کاتالاز به عنوان آنزیم کلیدی در سم زدایی بدن، در این مطالعه به بررسی اثر داروی دفراسیروکس به عنوان عامل کلاته کننده آهن بر روی ساختار و سینتیک آنزیم کاتالاز کبد گاوی پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی تغییرات فعالیت آنزیم در حضور و عدم حضور غلظت‌های مختلف داروی دفراسیروکس با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر (مرئی- ماوراء بنفش) اندازه‌گیری شد. همچنین تغییر در ساختمان سه بعدی و عملکردی آنزیم با استفاده از تغییرات در نشر ذاتی آنزیم با مطالعات طیف سنجی فلورئورسانس بررسی گردید. داده‌ها در نرم افزار Excel تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج: نتایج مطالعات سینتیکی آنزیم نشان می‌دهد که غلظت‌های افزایشی دارو منجر به کاهش فعالیت آنزیم و در نتیجه مهار واکنش آنزیمی کاتالاز گردید. همچنین در حضور دارو، شدت نشر ذاتی آنزیم کاهش یافته و در محیط سه بعدی اطراف کروموفورهای آنزیم تغییرات فاحشی رخ داد. داروی دفراسیروکس دارای ۲ جایگاه اتصال روی آنزیم کاتالاز کبدی در دو دمای محیط و فیزیولوژیک است.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعات فوق نشان می‌دهد که داروی دفراسیروکس به عنوان یک کلاتور، از طریق اتصال به آهن موجود در جایگاه فعال آنزیم کاتالاز، موجب مهار فعالیت آنزیم شده و امکان دارد از این طریق منجر به نارسایی و عوارض جانبی در کبد شود.

کلمات کلیدی: دفراسیروکس، کاتالاز، سینتیک، ساختار، فلورئورسانس

مقدمه

بازوی کوتاه کروموزوم ۱۳ قرار گرفته است و شامل ۱۱۳ گژون و ۴۳۰۷۶ نوکلئوتید است (۲). پیدایش کاتالاز با تشکیل اتمسفر حاوی اکسیژن در اطراف زمین همزمان بود. بنابراین، ارگانیسم‌ها مجبور به خنثی سازی محصولات جانبی رادیکال‌های اکسیژن شدند. کاتالاز حدود یک میلیون مولکول پراکسید هیدروژن (H_2O_2) را در یک ثانیه تجزیه می‌کند و سلول‌ها را در مقابل اثرات سمی H_2O_2 محافظت نموده و با تجزیه‌ی نیمی از H_2O_2 متعلق به هموگلوبین از آن حفاظت می‌کند (۳). آنزیم کاتالاز، با تخریب پراکسید هیدروژن، آنتی اکسیدانی قوی محسوب می‌شود که به

کاتالاز آنزیمی الیگومر و آنتی اکسیدانت با وزن مولکولی ۲۴۰ کیلودالتون و $EC\ 1,11,1,6$ است. این آنزیم یک تترامر است که هر زیر واحد آن از زنجیره‌ی پلی پپتیدی با گروه پروستاتیک فریک پروتوپورفیرین IX تشکیل شده است (۱). هر زیر واحد کاتالاز دارای ۵۲۷ رزیدو و یک Fe^{3+} است. کاتالاز در پانکراس، سرم و بافت‌های اتصال به مقدار خیلی کم وجود دارد. در پراکسی زوم، میتوکندری کبد، کلیه و سیتوپلاسم سلول‌های قرمز خون (RBC) دارای بیشترین فعالیت است. ژن انسانی کاتالاز بر روی

* نویسنده مسئول: عادل دیوسالار، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران. تلفن: ۰۲۶۳۴۵۷۹۶۰۰ Email:divsalar@khu.ac.ir



استخلاف شده، است. سه دندان دارد و دو مولکول از آن با یک مولکول آهن کمپلکس کامل تشکیل می‌دهند (۱۲). DFX یک کلاتور خوراکی درون سلولی است که تمایل زیادی برای اتصال به آهن دارد و به شکل قرص ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم مورد استفاده قرار می‌گیرد. از جمله عوارض جانبی دفراسیروکس می‌توان به مشکلات پوستی (راش، نقص پیگمانتاسیون، وازکولیت، لکوسیتوکلستسی)، کاتاراکت، کاهش شنوایی، درد فوق شکمی، تهوع، اسهال، خونریزی گوارشی، سندرم فانکونی، نارسائی کلیوی حاد، نارسائی کبدی، افزایش کراتینین، پروتئین اوری، درد حلق و حنجره و تب اشاره نمود (۱۱). این دارو به علت اندازه‌ی کوچک، نیمه عمر بالا و کارایی بالای آن در زدودن بار اضافی آهن کبدی نسبت به کلاتور دفروکسامین دارای مزیت است (۱۳). همچنین دفراسیروکس به صورت قرص و یک بار در روز مصرف می‌شود، در حالی که دفروکسامین به شکل تزریق زیر جلدی هر ۱۲-۸ ساعت یک بار مورد استفاده قرار می‌گیرد و این موجب جایگزینی دفراسیروکس با دفروکسامین شده است (۱۴).

نتایج مطالعات قبلی نشان می‌دهد ویتامین C و کاتکول باعث مهار فعالیت و تغییر ساختار آنزیم کاتالازکبد گاوی (BLC) می‌شوند. همچنین گزارش‌ها حاکی از این است که آمینوتریازول به عنوان یک کلاتور آهن فعالیت کاتالاز ماهی قرمز را به میزان ۸۳ درصد کاهش می‌دهد (۱، ۱۵ و ۱۶). با نظر به مطالعات قبلی و با توجه به این که متابولیسم داروها و سم زدایی آن‌ها در کبد انجام می‌گیرد در این مقاله تأثیر داروی دفراسیروکس به عنوان کلاتور آهن (III) بر روی ساختار و فعالیت BLC حاوی آهن (III) در جایگاه فعال، بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

آنزیم کاتالاز کبد گاوی با درجه خلوص بالای ۹۹ درصد از شرکت سیگما، پراکسید هیدروژن، نمک‌های مونی و دی سدیک فسفات و سود از شرکت مرک خریداری شده‌اند. همچنین داروی خالص دفراسیروکس در دانشکده داروسازی دانشگاه تهران سنتز شده است.

مطالعات سینتیکی آنزیم کاتالاز کبد گاو در حضور داروی دفراسیروکس

همراه دیگر آنتی اکسیدان‌های آنزیمی (نظیر پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتازها) و غیر آنزیمی (نظیر آسکوربات، توکوفرول و گلوتاتیون) می‌تواند سلول‌ها را از اثرات زیانبار گونه‌های فعال اکسیژن محافظت نماید (۴). در یوکاریوت‌ها کاتالاز در تعدیل و تنظیم فرآیند پیری نیز دخالت داشته به طوری که موتاسیون در آنزیم کاتالاز سیتوزولی الگانس (Caenorahbtidis elegans) سبب کاهش طول عمر ارگانیزم می‌شود. بالعکس، بیان بیش از حد کاتالاز در میتوکندری‌های موش سبب افزایش طول عمر ارگانیزم تا ۲۰ درصد، کاهش از بین رفتن میتوکندری‌ها، به تأخیر انداختن بیماری قلبی و آب مروارید می‌شود (۵ و ۶). علاوه بر کاربرد کاتالاز در صنعت، از این آنزیم در پزشکی به‌ویژه در دندانپزشکی استفاده می‌شود (۷). این آنزیم یک فاکتور مهم در جلوگیری از آپوپتوز، جهش زایی و تحریک تومورهاست و کمبود آن منجر به بیماری‌هایی چون: دیابت، آلزایمر، تومورها، ویتیلیگو، آکاتالازی و بیماری‌های مجاری ادراری می‌شود. جهش در کاتالاز سیتوزولی منجر به کوتاهی عمر می‌شود و این نشانگر نقش کاتالاز و مولکول اکسیژن در تعدیل فرآیند پیری در یوکاریوت‌ها است (۳). کاهش کاتالاز در بیماری آلزایمر منجر به افزایش H_2O_2 و در نتیجه تشکیل پلاک‌های پروتئینی و گره‌های نوروفیبریلاری می‌شود (۸). در بیماران تالاسمیک کاهش کاتالاز و آنتی اکسیدان‌ها باعث افزایش پراکسید هیدروژن شده و از این طریق منجر به پراکسیداسیون لیپیدی در گلبول‌های قرمز بیماران مبتلا به بتاتالاسمی E و بتاتالاسمی می‌شود (۹). همچنین استفاده از رژیم غذایی فاقد سلنیوم و ویتامین E منجر به کاهش فعالیت کاتالاز و تجمع H_2O_2 می‌شود که آسیب کلیوی را در پی دارد. طبق مطالعات صورت گرفته، فعالیت کاهش یافته‌ی کاتالاز در بیماران دیابتی منجر به افزایش مقادیر بالای گونه‌های فعال اکسیژن و آسیب مجاری ادراری می‌شود (۱۰).

جهت کلاته سازی بار اضافی آهن ناشی از انتقال مکرر خون در بیماران تالاسمیک بالای ۲ سال از داروی دفراسیروکس (Deferasirox) استفاده می‌شود. دفراسیروکس با DFX نشان داده می‌شود. نام تجاری آن ایکس جید (Exjade) است. در نوامبر ۲۰۰۵ در آمریکا توسط سازمان غذا و داروی ایالات متحده (FDA) تأیید شد (۱۱). این دارو متعلق به دسته‌ی داروئی کلاته کننده‌ها و گروه یک بیس هیدروکسی فنیل تری آزول دارای N

سنجش فعالیت آنزیم

فعالیت آنزیم با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر (مرئی-ماوراءبنفش) مدل carry اندازه‌گیری شد که براساس کاهش جذب سوپسترای H_2O_2 در طول موج ۲۴۰ نانومتر عمل می‌کند و با تبدیل H_2O_2 به آب و اکسیژن مولکولی از طریق جذب مولی محاسبه می‌شود (۱۷). سنجش‌ها در کووت‌هایی با حجم ۳ میلی لیتر و طول عبور نور یک سانتیمتر انجام گرفت. تغییر در جذب ماکزیمم سوپسترای H_2O_2 (با غلظت‌های متفاوت ۰ تا ۹۰ میکرومولار) با گذشت زمان ۶۰ ثانیه هر ۲ ثانیه یک بار خوانده شد و بر اساس شیب نمودار تغییرات کاهشی جذب سوپسترا در طول موج ۲۴۰ نانومتر در مقابل زمان، مقدار سرعت اولیه آنزیم محاسبه گردید.

لازم به ذکر است که جهت تعیین غلظت سوپسترا به کمک ضریب خاموشی پراکسید هیدروژن در ۲۴۰ نانومتر در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار که برابر با $39200 M^{-1}cm^{-1}$ بود، از تکنیک اسپکتوفوتومتر (مرئی-ماوراءبنفش) مدل carry استفاده گردید.

همچنین به منظور بررسی اثرات داروی دفراسیروکس بر عملکرد کاتالاز، تغییرات در فعالیت آنزیم در غیاب و حضور غلظت‌های مختلف (۰ تا ۱۳ میکرومولار) از داروی دفراسیروکس و درحضور غلظت ثابت ۷۰ میکرومولار سوپسترا در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی گراد در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH ۷ سنجیده شد. لازم به ذکر است که در هر بار سنجش فعالیت آنزیم در حضور هر یک از غلظت‌های دارو، تغییرات در فعالیت آنزیم حاصل از برهم کنش داروی دفراسیروکس پس از سه دقیقه انکوباسیون بررسی شد و نتایج ارائه شده در نمودارها حاصل حداقل ۳ بار تکرار هر آزمایش می‌باشند.

مطالعات ساختاری آنزیم

مطالعات طیف سنجی فلورسانس ذاتی آنزیم

مطالعات فلورسانس آنزیم به کمک دستگاه فلورسانس مدل Carry، از طریق مطالعه تغییرات در نشر ماکزیمم کاتالاز در طول موج تحریکی ۲۸۰ نانومتر در حضور غلظت‌های مختلف دارو (۰ تا ۲۴۰ میکرومولار) در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار در دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد بررسی گردید. بدین منظور طیف

نشری آنزیم طبیعی (۰/۸۳ میکرو مولار) در غیاب و حضور غلظت‌های ذکرشده‌ی دارو با استفاده از طیف سنجی فلورسانس در محدوده‌ی طول موج نشری ۵۰۰-۳۰۰ نانومتر جمع آوری و ثبت گردید (۱۸).

مطالعات اتصال دارو به کاتالاز

با توجه به توانایی داروی دفراسیروکس در خاموشی نشر فلورسانس ذاتی آنزیم؛ لذا در این مطالعه با استفاده از نتایج فلورسانس ذاتی، مقادیر ثابت اتصال (K) و تعداد جایگاه‌های اتصال (n) دارو روی آنزیم کاتالاز محاسبه گردید. جهت محاسبه‌ی ثابت اتصال و تعداد جایگاه‌های اتصال داروی موجود بر روی کاتالاز از معادله‌ی (۲) استفاده شد (۲۰).

$$\log [F_0 - F/F] = \log K + n \log [Q] \quad (2)$$

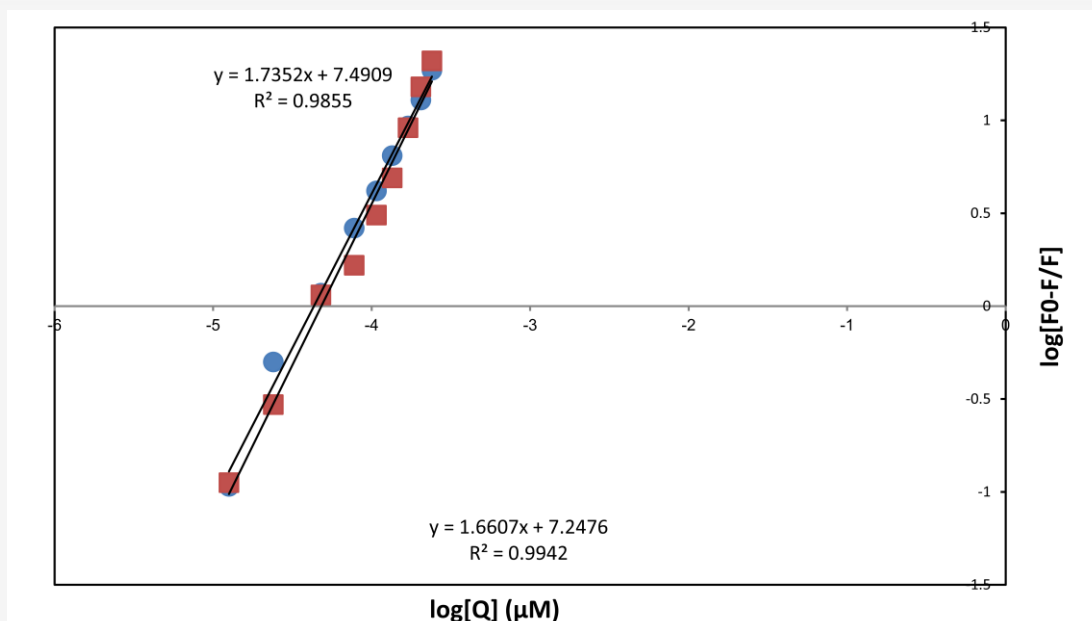
در معادله فوق پارامترهای F ، F_0 ، K و n به ترتیب بیانگر شدت نشر فلورسانس در حضور و غیاب داروی دفراسیروکس، ثابت اتصال و تعداد جایگاه اتصال می‌باشند.

در این مطالعه تعداد جایگاه‌های اتصال و ثابت اتصال دارو بر روی کاتالاز در دماهای ۲۵ و ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد با استفاده از شیب و عرض از مبدا نمودار $\log [F_0 - F/F]$ در مقابل $\log [Q]$ محاسبه گردید (نمودار ۱).

نتایج

مطالعات تغییرات در فعالیت آنزیم

نتایج مطالعات سینتیکی با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتری مرئی-ماوراء بنفش نشان داد که افزایش مقدار غلظت‌های مختلف سوپسترا منجر به افزایش فعالیت آنزیم شد. سرعت واکنش آنزیمی با کمک محاسبه شیب خط مماس بر منحنی تغییرات جذب سوپسترا علیه زمان در طول موج ۲۴۰ نانومتر به دست آمد. با تقسیم نمودن شیب خط بدست آمده بر ضریب خاموشی پراکسید هیدروژن ($39200 M^{-1}cm^{-1}$)، سرعت (فعالیت) آنزیم محاسبه گردید (معادله‌ی ۱). با استفاده از نمودار میکائیلیس-منتن مشاهده شد که درغلظت ۷۰ میکرو مولار از سوپسترا، آنزیم حداکثر فعالیت را از خود نشان می‌دهد (شکل ۱). در حالی که با افزودن غلظت‌های مختلف دارو به محیط عمل آنزیم در حضور غلظت اپتیمم سوپسترا (۷۰ میکرو مولار)، کاهش فاحشی در فعالیت آنزیم مشاهده شد که وابسته به غلظت دارو



نمودار ۱: نمودار خطی $\log[F_0 - F/F]$ در مقابل $\log[Q]$ در دماهای ۲۵ (●) و ۳۷ (■) درجه‌ی سانتی گراد بر اساس معادله‌ی (۲).

کنفورماسیونی، اجتماع زیر واحدها یا اتصال سوبسترا است. به منظور بررسی اثر داروی دفراسیروکس بر ساختار سوم آنزیم کاتالاز از مطالعات فلئورسانس ذاتی آنزیم استفاده شد. نتایج حاصل از فلئورسانس ذاتی کاتالاز نشان می‌دهد که اضافه کردن داروی دفراسیروکس به کاتالاز، در هر دو دما موجب کاهش فاحشی در شدت نشر فلئورسانس ذاتی آنزیم و یا خاموشی نشر فلئورسانس ذاتی آن می‌شود که بیانگر تغییرات در ساختار سه بعدی آن می‌باشد. مطالعات فلئورسانس خاموشی کاتالاز با غلظت ۰/۸۳ میکرو مولار پروتئین در حضور غلظت‌های مختلف افزایشی از داروی دفراسیروکس در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار در دو دمای ۲۵ (نمودار ۳ الف) و ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد (نمودار ۳ ب) بررسی شده است. طیف آنزیم کاتالاز با تهییج در طول موج ۲۹۰ نانومتر و نشر در محدوده‌ی ۳۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر بعد از سه دقیقه انکوباسیون با غلظت‌های مختلف دارو ثبت شده است. با توجه به نمودار ۴ می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت‌های دارو در دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد از شدت نشر کاسته شده و فرآیند خاموشی نشر فلورسانس مشاهده می‌گردد.

مطالعات اتصال دارو به کاتالاز

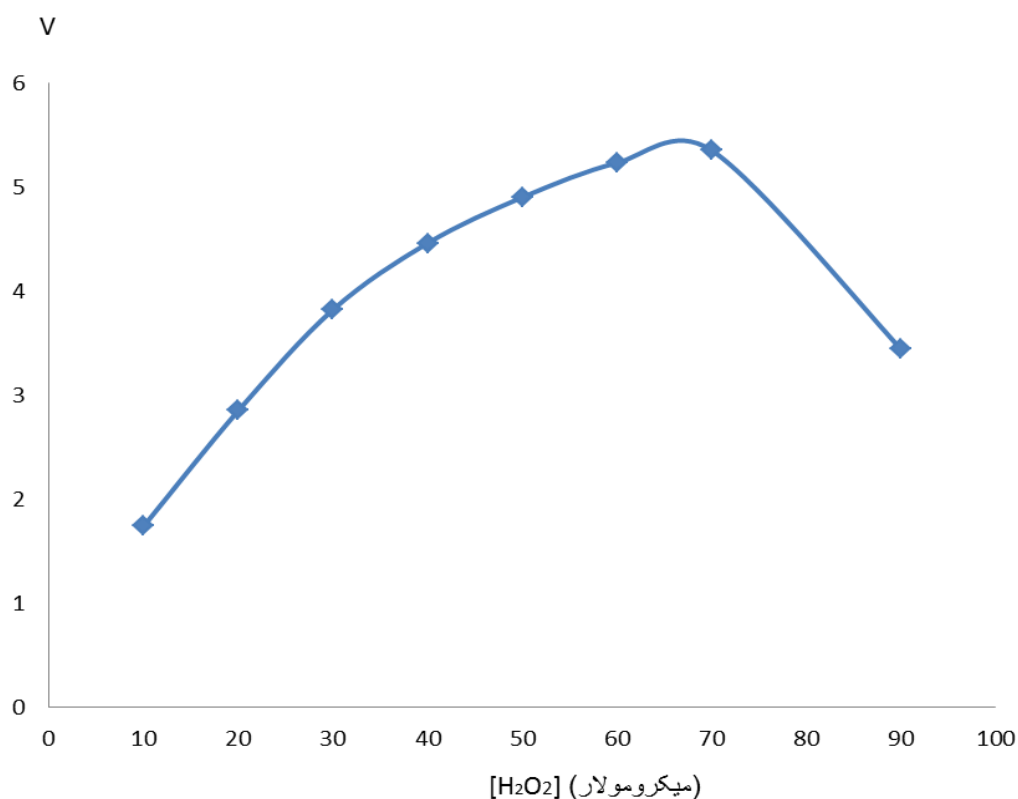
بوده و بیانگر مهار فعالیت آنزیم توسط داروی دفراسیروکس است (شکل ۲).

(معادله‌ی ۱) $\frac{Abs}{dt} = \frac{\epsilon c}{dt} = V_i \quad \frac{V_i}{\epsilon} = V$
در معادله فوق Abs ، ϵ ، C ، V_i و V به ترتیب بیانگر جذب، ضریب خاموشی، غلظت سوبسترا، سرعت اولیه و سرعت واکنش آنزیمی هستند.

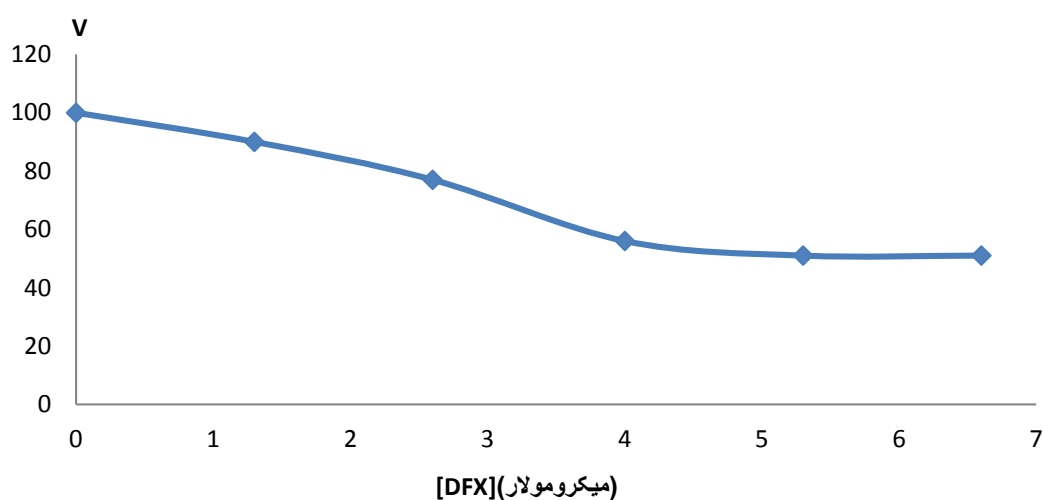
مطالعه‌ی بررسی تغییرات در ساختمان سه بعدی

پروتئین

فلئورسانس تکنیک مناسبی برای مطالعه‌ی ساختار، دینامیک و خصوصیات اتصال مولکول‌های پروتئینی موجود در محلول است. پروتئین‌ها به دلیل حضور اسید آمینه‌هایی همچون تیروزین، تریپتوفان و فنیل آلانین خاصیت فلئورسانس از خود نشان می‌دهند. آنزیم کاتالاز کبد گاوی نیز به عنوان پروتئینی که دارای باقی مانده‌های تریپتوفان است، خاصیت فلئورسانس ذاتی از خود نشان می‌دهد (۱۹). مطالعات نشان داده‌اند که در اثر اتصال لیگندهای مختلف با پروتئین‌ها طیف فلئورسانس تریپتوفان تغییر می‌یابد که این امر یک پاسخ معمول به تغییرات



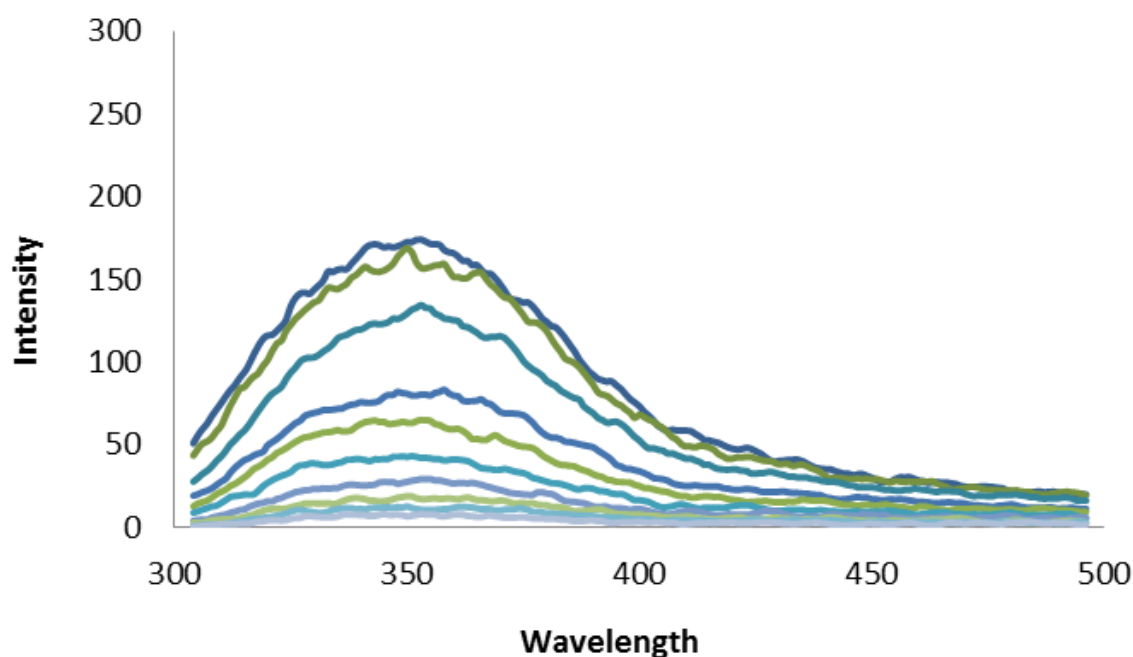
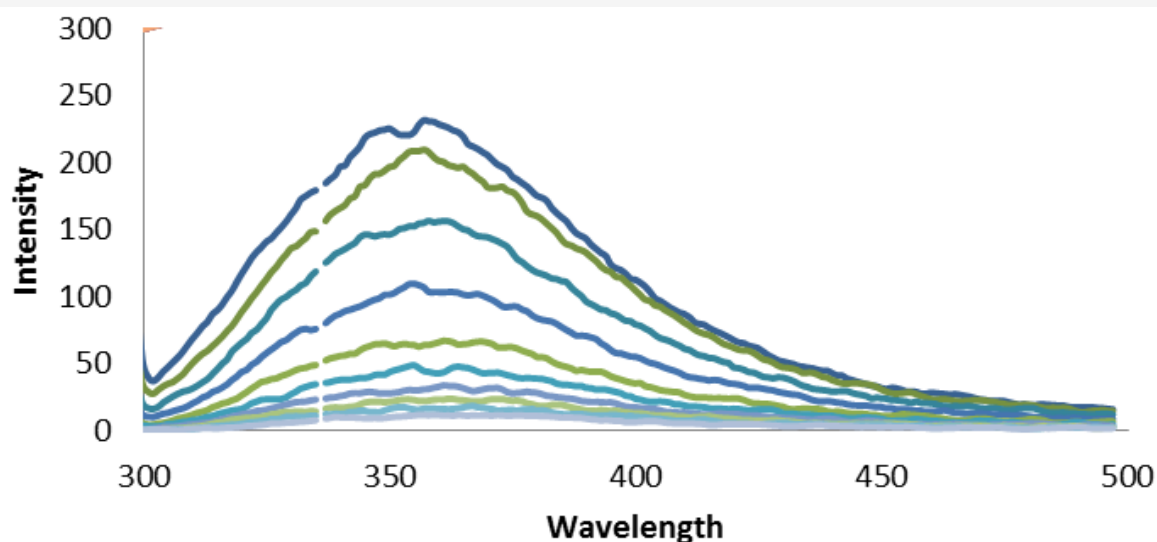
نمودار ۲: فعالیت آنزیم کاتالاز کبدی با غلظت ۲/۳ نانو مولار در حضور غلظت‌های مختلف سوبسترا (۹۰-۱۰) میکرو مولار.



نمودار ۳: درصد فعالیت آنزیم کاتالاز کبدی با غلظت ۲/۳ نانو مولار در حضور و عدم حضور غلظت‌های مختلف دارو در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار دمای ۲۵ درجه‌ی سانتیگراد



آنالیز نمودارهای مربوط به نمودار ۱ نشان می‌دهند که در هر دو دما، دو جایگاه اتصالی برای دارو روی آنزیم کاتالاز وجود دارد و با افزایش دما نیز تغییری در تعداد جایگاه‌های اتصال ایجاد نمی‌شود. ثابت اتصال دارو به آنزیم در دماهای ۲۵ و ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد



نمودار ۴: طیف فلئورسانس ذاتی آنزیم کاتالاز (۰/۸۳ میکرو مولار) در حضور و غیاب غلظت‌های مختلف دفراسیروکس ۰، ۷/۹۶، ۲۳/۷، ۴۶/۸۷، ۱۰۶/۰۶، ۱۳۴/۳۲، ۱۶۸/۴۹، ۲۰۱/۴۳ و ۲۳۹/۴۳ میکرو مولار (از بالا به پایین) در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار و دمای ۲۵ (الف) و ۳۷ (ب) درجه‌ی سانتی گراد.

به ترتیب 3×10^7 و $1/7 \times 10^7$ می باشد که بیانگر آن است که با افزایش دمای واکنش تمایل اتصال کاهش می یابد که نشانگر واکنش های گرمازا است.

بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق به مطالعه ی برهم کنش کاتالاز با یکی از داروهای مهم کلاته کننده ی آهن- داروی دفراسیروکس- پرداخته شد. دفراسیروکس داروی سنتزی است و در بیماران تالاسمیک به صورت خوراکی استفاده می شود. این دارو تمایل بالایی به آهن (III) دارد و آن را از پروتئین های موجود در دستگاه گوارشی انسان جدا می کند. مطالعات کشت میوسیت ها نشان داد که دفراسیروکس سریعاً وارد میوسیت ها می شود و به گونه های آهن آزاد درون سلولی متصل شده و محصولات رادیکال آزاد را کاهش می دهد (۲۱). این دارو پس از ورود به سلول ها آهن را درون سلول های اندام هایی چون کبد و قلب کلاته می کند. سپس این کمپلکس، DFX-Fe، دوباره وارد جریان عمومی خون می شود و نهایتاً در کبد توسط سلول های کبدی هیپاتوسیت ها جذب می شود. کمپلکس DFX-Fe از هیپاتوسیت ها به صفا آزاد می شود و بیش از ۸۰٪ آن از طریق صفا دفع می شود. DFX توسط UDP گلوکورونیل ترانسفراز A1، با تشکیل گلوکورونید، یک متابولیت اصلی، در هیپاتوسیت ها متابولیزه می شود (۲۲). گزارشات حاکی از کارکرد غیر عادی آنزیم های کبدی در حضور داروی دفراسیروکس است (۲۳).

کبد به عنوان عضو مهم بدن در سم زدایی مواد و داروها، دارایی آنزیم های حائز اهمیتی مثل کاتالاز است. آکاتالازمی (فقدان کاتالاز) آسیب بافت کلیوی را تشدید می کند و کلیه ها را در اثر تغییرات اپیتلیال به مزانشیم و نیز فیبروز کلیوی پیشرفته حساس می کند (۲۲). لازم به ذکر است که افزایش پراکسید هیدروژن ناشی از آکاتالازمی منجر به بیماری دیابت می شود (۲).

لذا با توجه به اهمیت کاتالاز به عنوان یک آنتی اکسیدان حاوی آهن در جایگاه فعال آن، بررسی اثر کلاتورها بر روی این آنزیم از اهمیت ویژه ای برخوردار است. تاکنون اثر برخی مواد بر روی فعالیت و ساختار آنزیم کاتالاز بررسی شده است. طبق تحقیقی که لوشچاک (Lushchak) و همکاران در سال ۲۰۰۵ بر روی مهار کاتالاز توسط آمینوتریازول انجام دادند، غلظت های

بالای آمینو تریازول ($1-5$ mg/gww) باعث کاهش ۸۳ درصدی فعالیت آنزیم کاتالاز می شود (۱۶). همچنین مگور (Magwere) در سال ۱۹۹۷ تأثیر کلروکوئین (Chloroquin) را بر کاهش فعالیت کاتالاز کبد موش به اثبات رساند (۲۴). یوسفی و صوری (Yousefi & Saboury) در سال ۲۰۰۰ نیز کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز کبد گاوی را در حضور ویتامین C گزارش کردند. طبق گزارش آن ها ویتامین C با دادن الکترون به فرم فعال آنزیم آن را به فرم غیر فعال تبدیل کرده و موجب کاهش فعالیت و مهار آن می شود (۱). بر اساس جستجوهای انجام شده تحقیقات بسیار اندکی در مورد سینتیک آنزیم کاتالاز صورت گرفته است و در تحقیقات ثبت شده به مکانیسم و چگونگی مهار آنزیم توسط ماده- ی مورد نظر پرداخته نشده است. جینگ جین (Jing Jin) و همکاران در سال ۲۰۰۸ تغییر ساختار کاتالاز کبد گاوی را در حضور غلظت های مختلف ویتامین C بررسی کردند. طبق تحقیقات آن ها با افزایش غلظت ویتامین C طیف نشر آنزیم کاهش یافت و این به علت تغییر هیدروفوبیسیته ی محیط اطراف تریپتوفان آنزیم بود (۱۸). نتایج مطالعات سینتیکی آنزیم در حضور دارو نشان داد که دفراسیروکس قادر به مهار فعالیت آنزیم کاتالاز کبدی است. میزان مهار وابسته به غلظت دارو بوده و همراه با افزایش غلظت دارو میزان مهار فعالیت آنزیم نیز افزایش می یابد (نمودار ۳). فلئورسانس ذاتی پروتئین ها اطلاعاتی در مورد ساختار و دینامیک آن ها به ما می دهد. تغییرات کنفورماسیونی پروتئین، اتصال سوبسترا یا دناتوراسیون منجر به تغییر طیف نشری تریپتوفان می شود (۲۱). جهت بررسی اثر کلاتوری دفراسیروکس بر روی ساختار سوم کاتالاز کبدی گاوی از روش طیف سنجی فلئورسانس تریپتوفان ذاتی کاتالاز استفاده شد. فلئورسانس کاتالاز به محیط اطراف رزیدوی تریپتوفان حساس است. هریک از زیر واحدهای کاتالاز حاوی ۶ رزیدوی تریپتوفان در موقعیت های ۱۱، ۱۴۳، ۱۸۲، ۱۸۵، ۲۷۷ و ۳۰۳ می باشد. تریپتوفان در موقعیت های نام برده به ترتیب در تشکیل $\alpha 1$ ، $\beta 4$ ، $\alpha 5$ ، $\alpha 5$ و $\beta 7$ و انتخاب پراکسید هیدروژن نقش دارد (۲۵). طبق نتایج حاصل از این تحقیق شدت نشر ذاتی فلئورسانس کاتالاز در حضور دارو کاهش می یابد که این بیانگر کاهش هیدروفوبیسیته ی اطراف رزیدوی تریپتوفان است. بنابراین، می توان نتیجه گرفت که اندرکنش دفراسیروکس با کاتالاز منجر



همچنین تعیین دقیق رزیدوهای که تحت تأثیر دارو قرار می‌گیرند نیاز به تحقیقات بیشتر است.

یافته‌های مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که دفراسیروکس به عنوان داروی کلاته‌کننده‌ی آهن با تأثیر بر روی آهن موجود در جایگاه فعال آنزیم کاتالاز منجر به تغییر در ساختار سوم آن و کاهش میزان نشر ذاتی آن می‌شود و همچنین فعالیت آنزیم را کاهش می‌دهد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که دفراسیروکس با تأثیر منفی بر روی فعالیت و ساختار کاتالاز منجر به عوارض جانبی در کبد از جمله نارسایی کبدی می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله مراتب قدردانی و تشکر خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه خوارزمی به دلیل حمایت مالی از این پژوهش اعلام می‌داریم.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را اعلام نکرده‌اند.

به تغییرات کنفورماسیونی کاتالاز می‌شود و این بیانگر بازشدگی بخشی از پروتئین در حضور غلظت‌های بالای دارو می‌باشد. همچنین با استفاده از تکنیک خاموشی نشر فلورسانس، پارامترهای اتصال دارو به پروتئین محاسبه شده‌اند.

با استناد به اثر مهاري آمینوتریازول و کلروکوئین به عنوان کلاتورهای آهن بر روی فعالیت آنزیم کاتالاز، نتایج حاصل از تحقیقات ما در تطابق با کارهای قبلی بوده و خاصیت مهارکنندگی دفراسیروکس را به عنوان یک داروی کلاته‌کننده‌ی آهن، بر روی فعالیت کاتالاز کبد گاو تأیید کرد. همچنین تحقیقات ما اثر این دارو را بر روی تغییر ساختار سه بعدی آنزیم کاتالاز نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد دارو با تأثیر بر آهن (III) موجود در جایگاه فعال آنزیم موجب این تغییرات می‌شود. در این تحقیق اثر دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد بر ساختار آنزیم بررسی شد و تفاوت فاحشی بین نتایج حاصل از دو دما مشاهده نشد. جهت بررسی مکانیسم تأثیر دارو بر آنزیم و

References

1. Yousefi A, Sboury AA, Ghadermarzi M, Moosavi-Movahedi AA. Effect of cysteine on the inactivation of bovine liver catalase. Bull Korean Chem Soc. 2000;21(6):567-570.
2. Góth L, Nagy T. Acatlasemia and diabetes mellitus. Arch Biochem Biophys. 2012;525(2):195-200.
3. Díaz A, Loewen PC, Fita I, Carpena X. Thirty years of heme catalases structural biology. Arch Biochem Biophys. 2012;525(2):102-110.
4. Blokhina O, Virolanien E, Fagerstedt KV. Antioxidants, Oxidative damage and oxygen deprivation stress. Annals of Botany. 2003; 91(2): 179-194.
5. Putnam CD, Arvia AS, Bourne Y, Tainer JA. Active and inhibited human catalase structures: Ligand and NADPH binding catalytic mechanism. J Mol Biol. 2000; 296(1): 295-309.
6. Taub J, Lau JF, Ma C, Hahn JH, Hoque R, Rothblatt J, Chalfie M. Acytosolic catalase is needed to extend adult lifespan in C. elegans daf-C and clk-1 mutants. Nature. 1999; 399(6732): 162-166.
7. Alacam A, Tulunoglu O, Oygur T, Bilici S. Effects of topical Catalase application on dental pulp tissue: a histopathological evaluation. J. Dent. 2000; 28(5): 333-339.
8. Maynard CJ, Bush AI, Masters CL, Cappai R, Li QX. Metals and amyloid-b in alzheimer's disease. Int. J. Exp. Pathol. 2005; 86(3): 147-159.
9. Chakraborty D, Bhattacharyya M. Antioxidant defense status of red blood cells of patients with β -thalassemia and E β -thalassemia. Clin Chim Acta. 2001;325(1-2):123-129.
10. Haugen E, Nath KA. The Involvement of Oxidative Stress in the Progression of Renal Injury. Blood Purif. 1999;17(2-3):58-65.
11. Lindsey WT, Olin BR. Deferasirox for Transfusion-Related Iron Overload: A Clinical Review. Clinical Ther. 2007;29(10):2154-2166.
12. Sharma RN, Pancholi SS. Oral Iron chelators: a new avenue for the management of thalassemia major. J C P R. 2010; 01:1-7.



13. Kayyali R, Pannala AS, Khodr H, Hider RC. Comparative Radical Scavenging Ability of Bidentate Iron(III) Chelators. *Biochem Pharmacol.* 1998;55(8):1327-32.
14. Cappellini D M. Long-term efficacy and safety of deferasirox. *Blood Rev.* 2008; Suppl 2: S35-41.
15. BukowskaB, Kowalska S. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. *Toxicol Lett.* 2004;152(1):73-84.
16. Bagnyukova TV, Vasyukiv OY, Storey KB, Lushchak VI. Catalase inhibition by amino triazole induces oxidative stress in goldfish brain. *Brain Res.* 2005;1052(2):180-186.
17. Nakamura K, Watanabe M, Sasaki Y, Ikeda T. Purification and characterization of liver catalase in acatalasemic beagle dog: comparison with normal dog liver catalase. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000; 32(1): 89-98.
18. Li D, Ji B, Jin J. Spectrophotometric studies on the binding of Vitamin C to lysozyme and bovine liver catalase. *Journal of Luminescence.* 2008;128(9):1399-1406.
19. Divsalar A, Khodabakhshian S, Saboury AA, Mansuri-Torshizi H, Evini M. Probing of the Interaction Between Human Serum Albumin and A New Synthesized Pd(II) Complex Using Spectroscopic Methods. *J. Sciences.* 2013; 24(2): 105-111.
20. Garabagiu S. A spectroscopic study on the interaction between gold nanoparticles and Hemoglobin. *Mater Res Bull.* 2011;46(12):2474-2477.
21. Moosavi-Movahedi AA, Mousavy SJ, Babaahmadi A, Divsalar A, Saboury A, Riazi H, et al. The Effects of Deferiprone and Deferasirox on the Structure and Function of β -Thalassemia Hemoglobin. *JBSD.* 2009;27(3):319-330.
22. Nirogi R, Ajjala DR, Kandikere V, Aleti R, Srikakolapu S, Vurimindi H. Dried blood spot analysis of an iron chelator – Deferasirox and its potential application to therapeutic drug monitoring. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012; 907:65-73.
23. Galanello R, Piga A, Forni GL, Bertrand Y, Foschini ML, Bordone E, et al. Phase II clinical evaluation of deferasirox, a once daily oral chelating agent in pediatric patients with beta-thalassemia major. *Haematologica.* 2006; 91(10): 1343-1351.
24. Magwere T, Naik YS, Hasler JA. Effects of Chloroquine Treatment on Antioxidant Enzymes in Rat Liver and Kidney. *Free Radical Bio Med.* 1997;22(1-2):321-327.
25. Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA. Active and Inhibited Human Catalase Structures: Ligand and NADPH Binding and Catalytic Mechanism. *J Mol Biol.* 2000;296(1):295-309.



Original Article

In vitro Studying of Deferasirox Side effects on the Structure and the Function of Bovine Liver Catalase

Moradi M¹, Divsalar A^{1*}, Saeidifar M², Saboury A A³, Tahmaseb M¹

1- Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.

2- Nanotechnology Research Institute, Material and Energy Research Center, Karaj, Iran.

3- Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran, Iran.

Received: 22 Dec 2013

Accepted: 18 Apr 2014

Abstract

Background & Objective: Oral chelators such as deferasirox are used to treat iron overload caused by blood transfusion. Considering the significant role of liver in detoxification and drug metabolism as well as the importance of catalase as a key enzyme in detoxification, this study was performed to evaluate the effect of deferasirox, which is an iron chelator on the structure and the synthesis of the bovine liver catalase.

Materials & Methods: In this experimental study, the alterations in catalase activity were measured in the absence and the presence of different concentrations of deferasirox by using spectrophotometer (UV-Visible). Moreover, we used fluorescence spectroscopic methods for investigating the changes in three dimensional structure of enzyme and its function based on the changes in intrinsic emission. The data were analyzed by Excel software.

Results: Analyzing the synthesis of the enzyme showed that increased drug concentrations lead to decrease in the enzyme activity and consequently inhibition of catalase enzymatic reaction. In addition, fluorescence data represented the significant decreasing in intrinsic emission of enzyme in the presence of drug, which indicates that significant changes have been done at three dimensional environments around the enzyme chromophores. Analyzing the fluorescence quenching data at different room and physiologic temperatures was represented two binding sites for deferasirox on liver catalase enzyme.

Conclusion: Above results suggest that deferasirox, as a chelator drug, can bind to the catalase active site then leading to functional changes of enzyme by inactivation of it, which results in side effects of this drug in liver and liver failure.

Key words: Deferasirox, Catalase, Kinetic, Structure, Fluorescence

*Corresponding author: Adeleh Divsalar, Department of Cell & Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.

Email: divsalar@khu.ac.ir

Tel: +982634579600