Determination of the Inhibitory Mechanism of Eugenyl Adamantate on 15-Lipoxygenase

Davoodnejad M[1], Alimardani M[1], Sadeghian H[1]

Abstract

Introduction: Lipoxygenases are non-hem iron-containing proteins responsible for the peroxidation of the unsaturated lipids in animals and plants. The critical role of the enzymes in creating inflammations, sensitivities and some of the cancers has been demonstrated in mammalians. An investigation of the mechanism details of these category of enzymes and the metabolism of their peroxide products as well as the synthesis of appropriates inhibitors is of great importance for the mentioned enzymes. In this article, the inhibitory mechanisms of eugenyl adamantate which is a new synthetic potent inhibitor of lipoxygenase is studied.

Methods: The lipoxygenase activity of soybean 15-lipoxygenase in the presence of eugenyl adamantate was assayed by using two spectrophotometric methods: the formation of conjugated dien in 235 nm and DMAB-MBTH peroxide in 592 nm.

Results: The experiments show that the mentioned compound decreases the lipoxygenase activity in two concentration ranges of 80-120 nM and 5-13 µM. The kinetic studies show the mixed inhibitory mechanism including the competitive and non-competitive for this compound.

Conclusion: The kinetic studies show the mixed inhibitory mechanism of the compound.

Keywords: 15-Lipoxygenase, Inhibitors, Peroxide formation, DMAB, MBTH

دریافت مقاله:۶ بهمن ۱۳۹۰ تایید مقاله:۲ اردیبهشت ۱۳۹۱

بررسی مکانیسم مهاری ترکیب اوژنیل آدامانتات نسبت به آنزیم ۱۵- لیپواکسیژناز

مهدیه داوود نژاد[۱]، ملیحه علیمردان[۱]، حمید صادقیان[۱]

هدف: آنزیمهای لیپواکسیژناز از دسته پروتئین های آهن دار غیر همی هستند که مسئول پراکسیداسیون اسید های چرب غیر اشباع در گیاهان و حیوانات می باشند. اهمیت فعالیت این آنزیمها در بدن پستانداران و نقش آنها در ایجاد حساسیت ها، التهابها و حتی تشکیل برخی از سرطانها به اثبات رسیده است. از این رو مطالعه در مورد جزئیات مکانیسمی این دسته از آنزیمها و متابولیسم محصولات پراکسیدی آنها و همچنین سنتز مهار کننده های مناسب برای آنزیمهای مذکور بسیار حائز اهمیت می باشد. دراین مقاله مکانیسم بازدارندگی یکی از مهارکننده های قوی آنزیم لیپواکسیژناز موسوم به اوژنیل آدامانتات که به تازگی سنتز و مطالعه شده بود مورد بررسی واقع شده است.

روش بررسی: در این بررسی فعالیت لیپواکسیژنازی آنزیم ۱۵- لیپواکسیژناز سویا در حضور مهارکننده اوژنیل آدامانتات به دو روش اسپکتروفوتومتری تشکیل دی ان مزدوج در طول موج ۲۳۵ نانومتر و روش تشکیل پراکسید با معرف های DMAB و MBTH در طول موج ۵۹۲ نانومتر بررسی شد.

یافته ها: در نتیجه آزمایشات انجام شده مشخص شد که مهارکننده مذکور در دو دامنه غلظتی فعالیت آنزیم را پایین می آورد و دو IC_{50} در محدوده ۸۰ تا ۱۲۰ نانومولار و ۵ تا ۱۳ میکرومولار برای آن تعیین گردید.

بحث و نتیجه گیری: در نتیجه آزمایشات انجام شده مشخص شدکه مهارکننده مذکور در دو دامنه غلظتی فعالیت آنزیم را پایین می آورد و دو IC_{50} در محدوده ۸۰ تا ۱۲۰ نانومولار و ۵ تا ۱۳ میکرومولار برای آن تعیین گردید. بررسی های سنیتیکی یک مکانیسم مهاری مختلط از رقابتی و غیر رقابتی را برای این ترکیب نشان داد.

کلمات کلیدی: ۱۵- لیپواکسیژناز، مهارکننده، تشکیل پراکسید، DMAB، MBTH

نویسنده مسئول: دکتر حمید صادقیان، sadeghianh@mums.ac.ir

آدرس:ابتدای فلسطین- دانشکده علوم پیراپزشکی مشهد، تلفن:۱۳-۷۶۱۰۱۱۱

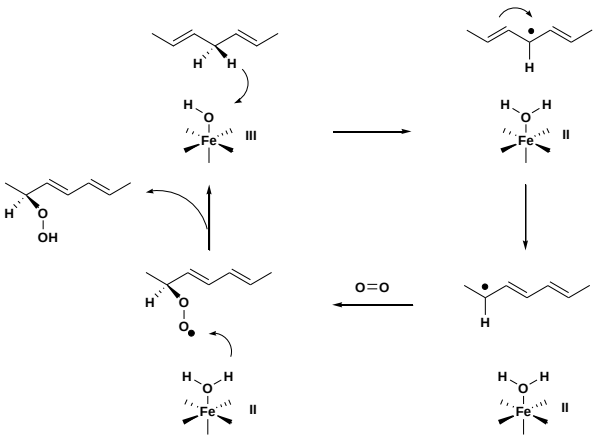
۱- گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده علوم پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

مقدمه

تمایل به مطالعه بر روی استرهای مشتق شده از اوژنول (مشتقات استری اوژنول) به عنوان بازدارنده‌های لیپواکسیژناز از کار اخیری منشاء می گیرد که در آن بازدارندگی این ترکیبات برای آنزیم ۱۵- لیپواکسیژناز گزارش شده است (۱).

لیپواکسیژنازهای پستانداران آنزیم‌های غیرهمی دارای آهن هستند که مسئول اکسایش اسیدها و استرهای چرب غیر اشباع به مشتقات هیدروپراکسی می‌باشند (شکل ۱).

آنزیم‌های مذکور از دسته غیرهمگنی از آنزیم‌ها هستند که به طور وسیعی در گیاهان و حیوانات یافت شده و بر اساس موقعیتی که در آن یک سابستریت کلیدی مانند آراشیدونیک اسید و یا سایر اسید های چرب غیر اشباع ۱و ۴ اکسید می‌شود، نام‌گذاری می گردند.



شکل۱: چرخه آنزیمی پراکسیداسیون اسید های چرب غیر اشباع

امروزه در میان لیپواکسیژنازهای انسانی ۵- لیپواکسیژناز (5-LO) به خوبی به عنوان هدفی مناسب برای کاهش تولید لوکوترین‌ها (به ویژه در عارضه آسم) شناخته و تثبیت شده است (۲).

بر اساس نتایج حاصل از تحقیقات اخیر، ۱۵- لیپواکسیژناز به عنوان هدفی جالب توجه برای درمان تداخلی برخی از بیماری‌ها معرفی شده است (۳).

همچنین 15-LO در روند پیشروی سرطان‌های خاصی تاثیر گذار است (۴). در سال‌های اخیر یافته‌هایی مبنی بر تاثیر بازدارندگی فعالیت آنزیم 15-LO در معالجه بیماری‌های قلبی- عروقی کشف شده است. هرچند این مورد به تحقیقات بیشتری نیاز دارد. مطالعات سعی و خطا نقش اساسی 15-LOرا در atherogenesis نشان می-دهد. آنزیم مذکور در هنگام عارضه آترواسکلروزیز به میزان قابل توجهی در ماکروفاژها بیان می‌شود (۶،۵).

تحقیقات نشان داده است که محصولات آنی حاصل از اکسایش آراشیدونیک اسید و لینولئیک اسید توسط -15 LO می‌توانند به عنوان عوامل پیش التهاب و پیش درد مطرح باشند (۷).

سه مسیراساسی به منظور مهار فعالیت LO شناخته شده است (۸) که عبارتند از:

۱) بازدارنده‌های کاهشی یا آنتی اکسیدان‌ها که در چرخه کاهشی 15-LO تداخل ایجاد می‌نمایند.

۲) عوامل کمپلکس دهنده با آهن

۳) بازدارنده‌های رقابتی غیر کاهشی که با آراشیدونیک اسید و یا سایر اسید های چرب غیر اشباعی ۱ و ۴ به منظور اتصال به جایگاه فعال آنزیم رقابت می‌نمایند.

اوژنول (۴-آلیل -۲-متوکسی فنول) به طور طبیعی در تعدادی از گیاهان از جمله ریحان، دارچین و پوست گردو یافت می‌شود و همچنین مهمترین جز در اسانس گل میخک است. این ترکیب به طور گسترده‌ای به شکل ترکیبی با خمیر اکسید روی در دندانپزشکی به کار برده - می‌شود (۹).

به علاوه اوژنول عاملی معطر و طعم دهنده در محصولات آرایشی و غذایی است. اوژنول خواص دارویی زیادی نیز دارد از جمله می‌توان به خواص آنتی اسپاسم، تب بر، ضد-التهاب و آنتی باکتریال آن اشاره نمود. اخیرا گزارش شده است که اوژنول توسط مکانیسمی غیررقابتی مانع از فعالیت آنزیم 5-LO می‌شود (۱).

در این گزارش تحقیقاتی، مکانیسم مهاری یکی از استرهای اوژنول موسوم به اوژنیل آدمانتات که بیشترین اثر مهاری را بر روی ۱۵- لیپواکسیژناز نشان داده بود، تعیین نموده ایم.

روش بررسی

۱,۱ مواد و دستگاهها

اندازه گیری های اسپکتروفوتومتری توسط اسپکتروفوتومتر Spekol 1500 انجام شد. ترسیم منحنی ها و تحلیل آماری آنها توسط نرم افزار Prism 3.0 صورت گرفت. ترکیب اوژنیل آدامانتات مطابق با دستورالعمل سنتزی ارائه شده در مقالات منتشره گذشته از مواد اولیه اوژنول و آدامانتان کربوکسیلیک اسید ساخته شد. آنزیم ۱۵- لیپو اکسیژناز سویا از کمپانی Fluka و سایر مواد مربوط به آنالیز آنزیم از کمپانی Aldrich تهیه شد.

۱,۲ بررسی فعالیت آنزیمی

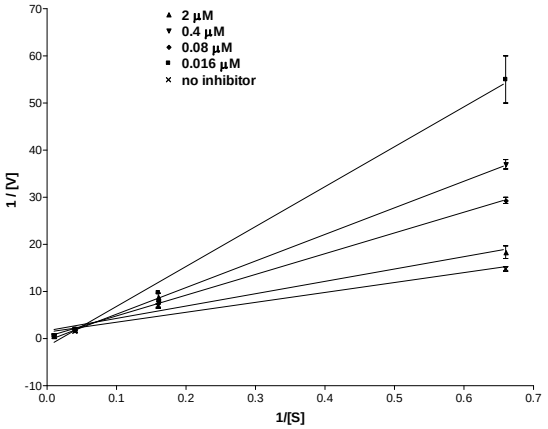
اندازه گیری فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز با دو روش تشکیل پیوند دوگانه مزدوج (conjugated dien formation) و تشکیل پراکسید (peroxide formation) انجام شد (۱۴). در روش اول به لوله های حاوی نمونه های تست، کنترل و شاهد که حاوی آنزیم (فعالیت ۰/۰۶ تا ۰/۰۷ جذب در هر دقیقه) و غلظت های مختلف بازدارنده (۵۰ تا ۰/۰۰۵ میکرومولار) در ۲/۴ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH 7.0) بودند، پس از هم دما شدن در دمای ۱-۲ درجه سانتیگراد، لینولئیک اسید با غلظت نهایی ۱۰۰ میکرومولار اضافه شد و سپس با افزایش دما به ۲۰ درجه سانتیگراد واکنش آغاز شده و بعد از سپری شدن ۵ دقیقه با قرار دادن لوله ها در حمام آب جوش (۴ دقیقه) واکنش آنزیمی متوقف شد. در مرحله بعد پس از سرد شدن لوله ها، جذب محلول آنها در طول موج ۲۳۵ نانومتر قرائت شد.

در روش دوم به لوله های سرد شده روش اول، مقدار ۲۵۰ میکرولیتر معرف DMAB (۳۰۰ میکرومولار) و پس از ۵ دقیقه ۲۵۰ میکرولیتر معرف MBTH (۱۰ میکرو مولار) حاوی هموگلوبین (۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) اضافه شده و بعد از ۱۰ دقیقه جذب محلول لوله ها در طول موج ۵۹۲ نانومتر قرائت گردید. در آزمایش های مذکور نمونه تست در هر غلظت سه بار تکرار شد.

یافته ها

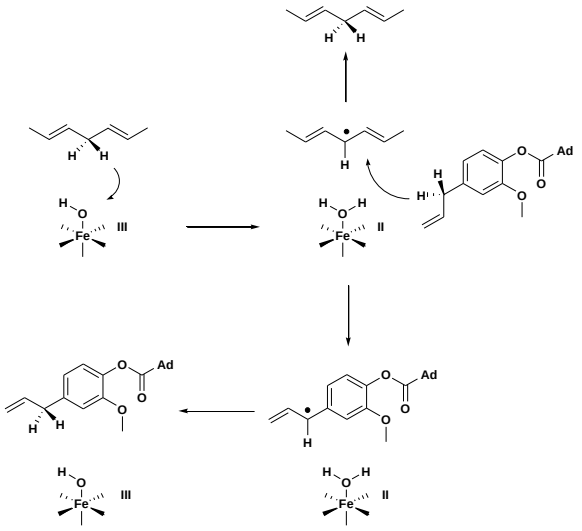
در کار تحقیقاتی گذشته، مشاهده کردیم که برخی از استرهای اوژنول قدرت مهاری بالاتری را نسبت به اوژنول نشان می دهند. در تحقیق صورت گرفته، IC_{50} بدست آمده برای اوژنول ۳۴ میکرومولار شد و این در حالی بود که در مورد برخی از استرهای اوژنول عدد مذکور به پایین تر از ۳ میکرومولار رسید و برای ترکیب اوژنیل آدامانتات رقم ۱۷ نانومولار ثبت شد (۱). درتحقیق انجام شده توسط Naiduو همکارانش (۱۰)، اثبات شده بود که اوژنول با مکانیسم غیر رقابتی آنزیم لیپواکسیژناز را مهار می کند و به احتمال زیاد با ویژگی احیا کنندگی گروه هیدروکسی فنولی خود، فعالیت هیدروپراکسیداسیونی آنزیم را کاهش می دهد. در تحقیق بعدی نتایج آزمایشگاهی نشان داد که اوژنول قدرت احیا کنندگی بالاتری نسبت به استر اوژنیل بنزوات دارد ولی ظرفیت شکار رادیکالی استر مذکور به اندازه اوژنول می باشد (۱۱). در تحقیقات متعدد دیگری که در دو دهه اخیر انجام گرفته بود خصلت شکار رادیکالی سیستم های آلیل بنزنی تایید شده بود (۱۲). در این فرآیند هیدروژن متیلنی آلیل بنزن توسط عامل رادیکالی کنده شده و رادیکال آلیل بنزن ایجاد می گردد و محصول ایجاد شده یا با یک واکنشگر ثانویه مثل اکسیژن واکنش داده و اکسید می شود و یا با انجام نوآرایی درون مولکولی به ایندن تبدیل می گردد (۱۳). با انجام بررسی های بیشتر در مورد استرهای اوژنول، هیچ محصول جدیدی بعد از فرآیند مهار کنندگی آنزیم جدا نشد. به عبارتی استرهای اوژنول در هنگام مهار آنزیم خود، دچار اکسیداسیون یا نوآرایی نشده اند. در بررسی دیگری مکانیسم مهار کنندگی اوژنیل آدمانتات را تعیین کردیم. آزمایشات مکانیسم مختلطی از غیررقابتی (uncompetitive) و رقابتی (competitive) را برای ترکیب مذکور نشان داد (شکل ۲).

همان طور که می دانیم در یک مهار غیررقابتی، ساختمان حد واسط بصورت کمپلکسی از مهار کننده، سابستریت و آنزیم می باشد. این موضوع و سایر یافته ها اثبات می کند که مهارکننده های مذکور در هنگام قرار گرفتن اسید چرب در بخش فعال آنزیم و از دست دادن هیدروژن رادیکالی، با قرار گرفتن در موضع واکنش و با دادن هیدروژن اتمی به رادیکال



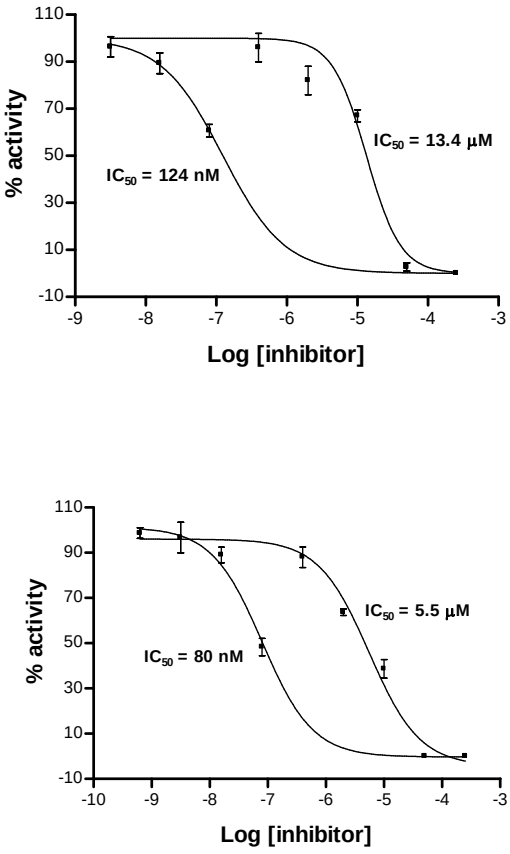
شکل۲: منحنی های مهار آنزیم ۱۵- لیپواکسیژناز سویا توسط ترکیب اوژنیل آدامانتات

اسید چرب، موجب توقف فرآیند هیدرو پراکسیداسیونی آن می شوند. در مرحله بعد رادیکال آلیل بنزنی ایجاد شده هیدروژن اتمی را با اکسایش آهن دریافت می کند (شکل ۳). با توجه به منحنی های مهارکنندگی بدست آمده، به احتمال زیاد در غلظت های پایین مهار کننده، مکانیسم غیررقابتی غالب است و در غلظت های بالاتر مکانیسم رقابتی حاکم می گردد.



شکل۳: مکانیسم پیشنهادی مهار فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز توسط ترکیب اوژنیل آدامانتات (Ad = Adamantan).

با ترسیم منحنی فعالیت آنزیم برحسب غلظت مهار کننده اوژنیل آدمانتات، مشاهده شد که در غلظت های حدود ۸۰ نانومولار فعالیت آنزیم به کمتر از ۵۰ درصد رسید ولی با افزایش غلظت مهار کننده فعالیت لیپواکسیژنازی افزایش یافته و دوباره در غلظت های بالاتر از ۲ میکرومولار به پایین تر از ۵۰ درصد نزول نمود. بر این اساس دو IC_{50} برای ترکیب مذکور بدست آمد که مقادیر آنها در روش اندازه گیری بر اساس تشکیل دی ان مزدوج (conjugated dien formation) ۸۰ نانومولار و ۵/۵ میکرومولار و در روش تشکیل پراکسید (peroxide formation) ۱۲۴ نانومولار و ۱۳/۴ میکرومولار بود (شکل ۴).



شکل ۴: منحنی های فعالیت بر حسب غلظت مهار کننده اوژنیل آدامانتات که با دو روش تشکیل پیوند دوگانه مزدوج (منحنی پایین) و تشکیل پراکسید (منحنی بالا) بدست آمده است.

بحث و نتیجه گیری

در مجموع این گونه برداشت می شود که ترکیب اوژنیل آدامانتات و ترکیبات همرده آن می توانند بدون تغییرات ساختمانی، آنزیم لیپواکسیژناز را با یک مکانیسم شکار رادیکالی (غیر رقابتی) و همچنین بصورت رقابتی (در غلظت های بالا) مهار نمایند. به احتمال زیاد با افزایش غلظت مهار کننده ساختمان بخش فعال آنزیم دچار تغییرات فضایی می شود، بطوری که احتمال قرار گرفتن همزمان مولکولهای اسید چرب و مهار کننده در حفره غیرممکن شده و در نتیجه نسبت غلظت های مهارکننده و اسید چرب تعیین کننده میزان جایگیری آنها در بخش فعال آنزیم و در نهایت تولید محصول پراکسیدی می گردد.

منابع

1. Sadeghian H, Seyedi SM, Saberi MR, Arghiani Z, Riazi M. Design and synthesis of eugenol derivatives, as potent 15-lipoxygenase inhibitors. Bioorg Med Chem 2008; 16: 890-901.
2. Larsen JS, Acosta EP. Leukotriene-receptor antagonists and 5-lipoxygenase inhibitors in asthma. Ann Pharmacother 1993; 27: 898-903.
3. Schewe T. 15-lipoxygenase-1: a prooxidant enzyme. Biol Chem 2002; 383: 365-374.
4. Kelavkar U, Glasgow W, Eling TE. The Effect of 15-Lipoxygenase-1 Expression on Cancer Cells, Curr Urol Rep 2002; 3: 207-214.
5. Cyrus T, Witztum JL, Rader DJ, Tangirala R, Fazio S, Linton MF, et al. Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice. J Clin Invest 1999; 1597-1604.
6. Harats D, Shaish A, George J, Mulkins M, Kurihara H, Levkovitz H, et al. Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. Arteriosler Thromb Vasc Biol 2000; 20: 2100-2105.
7. Sultana C, Shen Y, Rattan V, Kalra VJ. Lipoxygenase metabolites induced expression of adhesion molecules and transendothelial migration of monocyte-like HL-60 cells is linked to protein kinase C activation. J Cell Phys 1996; 167: 467-487.
8. Charlier C, Michaux C. Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) As a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs. Eur J Med Chem 2003; 38: 645-659.
9. Markowitz K, Moynihan M, Liv M, Kim S. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol: A clinically oriented review. Oral Surg Oral Pathol 1992; 73: 729-737.
10. Raghavenra H, Diwakr BT, Lokesh BR, Naidu KA. Eugenol - The active principle from cloves inhibits 5-lipoxygenase activity and leukotriene-C4 in human PMNL cells. Prostaglandins, Leukot Essent Fatty Acids 2006; 74: 23-27.
11. Horchani H, Salem NB, Zarai Z, Sayari A, Gargouri Y, Chaâbouni M. Enzymatic synthesis of eugenol benzoate by immobilized Staphylococcus aureus lipase: Optimization using response surface methodology and determination of antioxidant activity. Bioresour Technol 101; 2010: 2809-2817.
12. Debrunner PG, Dexter AF, Schulz CE, Xia Y, Hager LP. Mossbauer and electron paramagnetic resonance studies of chloroperoxidase following mechanism-based inactivation with allylbenzene. Proc Natl Acad Sci 1996; 93: 12791-12798.
13. Burrington JD, Grasseli RK, Kartisek CT, Indene production from aromatic olefins. US Patent 1983 (4,374,293).
14. Anthon GE, Barrett DM, Colorimetric Method for the Determination of Lipoxygenase Activity, J Agric Food Chem 2001; 49: 32-37.