

اثر آلومینیم بر آنزیم گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز اریتروسیت انسان

دکتر بهرام حقیقی* داریوش ایلغاری** دکتر مجید سیرتی ثابت*** 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 micromolar) 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 بیش تری احتیاج دارد.

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

مواد و روش ها: 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 غلظت های مختلف گلوکز ۶- فسفات و $NADP^+$ اندازه گیری 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

*** 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 و خوک 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 ماریچ 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 می‌کند. 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.^(۷و۸)

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 :**

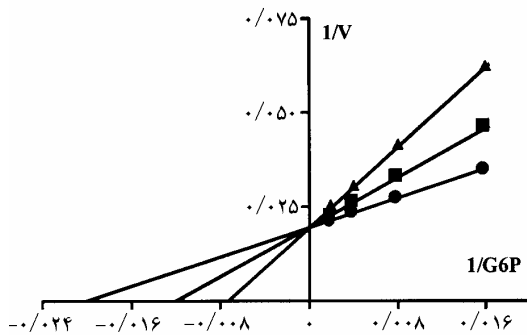
این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۰ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شد. در این مطالعه از نمک سدیم گلوکز ۶- فسفات، نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید فسفات (NADP⁺)، دی اتیل آمینو اتیل سلولز، فسفوسلولز، بتامرکاپتواتانل، اسید اتیلن دی آمین تترا استیک، کلرید آلومینیم با درجه خلوص بالا و آلومین سرم گاوی محصول شرکت 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 لینیور-برگ، فعالیت آنزیم در غلظت‌های مختلف گلوکز ۶ فسفات (G6P) و غلظت اشباع NADP⁺ در غیاب آلومینیم (III) و غلظت‌های ۶۰ و ۸۰ میکرومولار Al³⁺ اندازه‌گیری شد. مشابه این

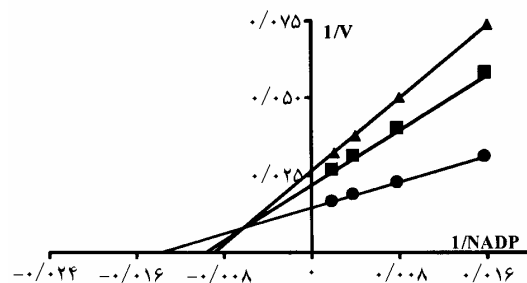
با استفاده از نمودار لاینور-برگ اثر مهارکنندگی آلومینیم بر فعالیت آنزیم G6PD در حضور گلوکز ۶- فسفات (G6P) بررسی شد که سرعت حداکثر واکنش آنزیمی (V_m) تغییر نکرد، اما ثابت میکائیلیس-منتن (K_m) ظاهری آنزیم افزایش یافت (نمودار شماره ۲).

نمودار ۲- منحنی لاینور-برگ فعالیت آنزیم G6PD با غلظت‌های مختلف گلوکز ۶- 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) می‌شود (نمودار شماره ۳).

نمودار ۳- منحنی لاینور-برگ فعالیت آنزیم G6PD با غلظت‌های مختلف $NADP^+$ و غلظت اشباع گلوکز ۶- فسفات (G6P) در حضور غلظت ۶۰ (■)، ۸۰ (▲) میکرومولار آلومینیم و عدم حضور آلومینیم (●)



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.

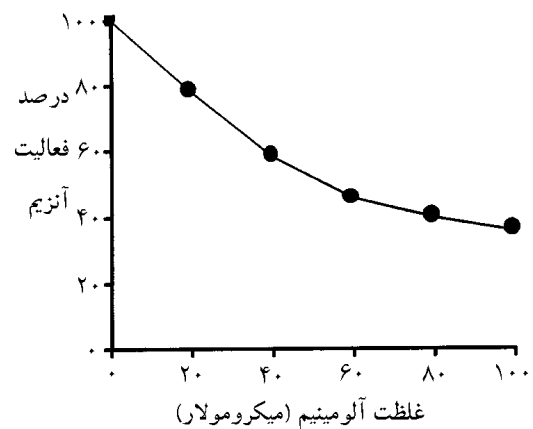
جهت بررسی وابستگی اثر مهار آلومینیم (III) به زمان انکوباسیون و PH، فعالیت آنزیم G6PD در غلظت ۶۰ میکرومولار Al^{3+} در زمان‌های انکوباسیون ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ دقیقه در PH برابر ۷/۴، ۸/۴ و ۹ بررسی شد.

* یافته‌ها :

در مراحل خالص سازی آنزیم G6PD بعد از استفاده از ژل‌های دی اتیل آمینو اتیل سلولز و فسفوسلولز به ترتیب فعالیت آنزیمی ۰/۲۹ و ۱/۴ واحد بین‌المللی بر میلی‌گرم 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



حضور NADP^+ سبب کاهش سرعت حداکثر واکنش آنزیمی (V_m) شد، لذا این اثر مهارگری 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، می توان اظهار نمود که آلومینیم به صورت Al^{3+} دارای اثر مهارگری بیش تری روی فعالیت آنزیم G6PD است.^(۲۲)

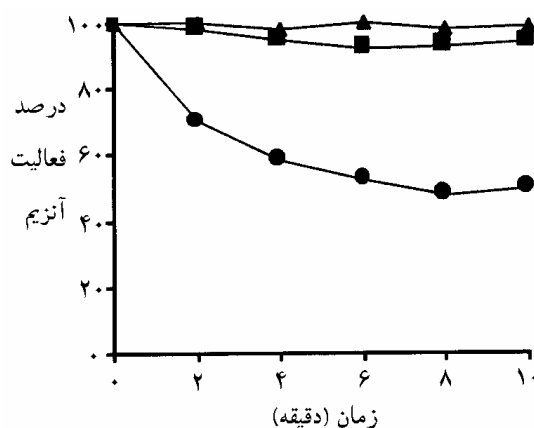
مسمومیت با آلومینیم به خصوص در بیماران دیالیزی و بیماری های مزمن کلیوی گزارش شده است. این مشاهده به علت مصرف آلومینیم به عنوان شلات کننده فسفات روده ای و همچنین به علت وجود آلومینیم در مایع دیالیز و استفاده آن توسط بیماران دیالیزی به هنگام همودیالیز است.^(۲۳) بدین جهت برخی از اختلال های ناشی از همودیالیز از جمله کم خونی هیپوکرومیک و میکروسیتیک را به مسمومیت با آلومینیم نسبت داده اند.^(۲۴) با توجه به مطالعه های 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 مطالعه های 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) می شود.^(۲۵،۲۶) 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 اریتروسیت های انسان می شود. با توجه به اثرات اشاره شده آلومینیم می توان به ارتباط بین مسمومیت با

با توجه به اطلاعات نمودار لینوور- برگ مهار آنزیم G6PD توسط آلومینیم (III) در حضور گلوکز ۶- فسفات مقدار ثابت واکنش مهارکنندگی (K_i) آلومینیم در این شرایط با استفاده از نمودار slope-replote برابر $3/39$ میکرومولار به دست آمد.

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

نمودار ۴- وابستگی اثر مهار آلومینیم به PH و زمان در غلظت 60 میکرومولار آلومینیم و در PH برابر $7/4$ (●) و $8/4$ (■) و 9 (▲)



* بحث و نتیجه گیری :

این مطالعه نشان داد آلومینیم (III) بر روی فعالیت آنزیم G6PD اریتروسیت های انسان اثر مهارگری دارد. تاکنون اثر مهارگری آلومینیم (III) بر آنزیم G6PD مخمر، مغز انسان، خوک و موش صحرائی و مغز استخوان موش صحرائی مورد مطالعه قرار گرفته است.^(۲۸،۲۹،۳۰) آلومینیم (III) بر روی آنزیم های اشاره شده نیز اثر مهارگری دارد. با توجه به این که اثر مهارگری آلومینیم (III) روی آنزیم G6PD در حضور گلوکز ۶- 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 مهارگری آلومینیم (III) روی آنزیم G6PD

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. In vitro 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

آلومینیم و کم خونی هیپوکرومیک و میکروسیتیک پی برد. این اثرات آلومینیم احتمال ایجاد یک کم خونی شدید را مطرح می کند، اما در عمل چنین اتفاقی نمی افتد. شاید علت آن PH محیط واکنش و وجود شلاتورهای طبیعی آلومینیم از جمله سیترات و ATP در خون و گلبول های قرمز باشد. این مواد با شلات کردن آلومینیم امکان اتصال آن به بیومولکول ها از جمله ترانسفرین و سرولوپلاسمین را کاهش می دهند و از شدت کم خونی می کاهند.^(۵) در این زمینه باید مطالعه های بیش تری به خصوص در مورد اثر این مواد روی مهار آنزیم G6PD اریتروسیت های 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 Neurochem* 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-

- 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 transferrin. *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*. New York, Academic Press, 1985, 1-92
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