Research Article

Nova Biologica Reperta 8(4): 279-288 (2022)

Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115

https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.8.4.279

مقاله پژوهشی

یافته‌های نوین در علوم زیستی

جلد ۸، شماره ۴، صفحات ۲۷۹ الی ۲۸۸ (۱۴۰۰)

انتشارات دانشگاه خوارزمی

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-29]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.4.3.8]

[DOI: 10.52547/nbr.8.4.279]

مطالعه سینتیکی آنزیم پراکسیداز در حضور آلکالوئیدهای پورینی

طیبه رحمتی دروازی و ریحانه سریری

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

مسئول مکاتبات: طیبه رحمتی دروازی، armrah@guilan.ac.ir

چکیده. آنزیم پراکسیداز واکنش‌های اکسیداسیونی پیش‌ماده‌های مختلف را با استفاده از هیدروژن پراکسید که یک گونه فعال اکسیژنی است، تسریع می‌کند. گونه‌های فعال اکسیژن در غلظت‌های کم، به عنوان پیام‌رسان در تنظیم مسیرهای درون سلولی عمل می‌کنند و در غلظت‌های زیاد، با ایجاد استرس اکسیداتیو قابلیت غلبه بر سیستم ایمنی را دارند. از طرفی، نوشیدنی‌هایی مثل قهوه، چای و نوشابه‌های گازدار که به مقدار فراوان در رژیم غذایی روزانه افراد وجود دارند، حاوی مقادیر زیادی از آلکالوئید گزانتین‌ها از جمله تئوفیلین و تئوبرومین هستند. از این‌رو، تأثیر تئوفیلین و تئوبرومین بر فعالیت پراکسیداز بررسی شده است. فعالیت پراکسیداز به روش کینتیک توسط اسپکتروفتومتر از طریق دنبال‌کردن جذب محصول رنگی ناشی از اکسایش ۴-آمینوآنتی پیرین در طول موج ۵۱۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه، در حضور و فقدان تئوفیلین و تئوبرومین اندازه‌گیری می‌شود. در این مطالعه نشان داده شد که هر دو ترکیب فعالیت آنزیم پراکسیداز را مهار می‌کنند و مقادیر IC_{50} برای تئوبرومین و تئوفیلین به ترتیب ۰/۵۰ و ۰/۵۵ میلی‌مولار است. از طرفی مقادیر ثابت‌های K_m و V_{max} هر یک از مهارکننده‌ها، نارقابتی بودن مکانیسم مهار را نشان می‌دهد. همچنین مقدار K_i، برای تئوبرومین و تئوفیلین به ترتیب ۰/۰۳ و ۰/۰۴۵ میلی‌مولار تعیین شد. درنتیجه، تئوبرومین در مقایسه با تئوفیلین، به دلیل داشتن مقادیر کمتر IC_{50} و K_i، دارای قدرت مهار بالاتر و تمایل اتصال بیشتری به کمپلکس آنزیم - پیش‌ماده است. بنابراین، نتیجه‌گیری می‌شود که تئوبرومین اثر مهاری قوی‌تری بر فعالیت پراکسیداز دارد.

واژه‌های کلیدی. آنتی‌اکسیدان، تئوبرومین، تئوفیلین، رادیکال آزاد، مهارکننده

Kinetic study of peroxidase enzyme in the presence of purine alkaloids

Tayyebeh Rahmati Darvazi & Reyhaneh Sariri

Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran

Correspondent author: Tayyebeh Rahmati Darvazi, armrah@guilan.ac.ir

Abstract. Peroxidase catalyzes different oxidation of substrates using hydrogen peroxide, a reactive oxygen specie (ROS). ROS, at low concentrations, act as messenger to regulate intracellular signaling, whereas, at high concentrations, they can overcome the immune system by creating oxidative stress. Some common beverages such as coffee, tea and soft drinks contain high levels of xanthine alkaloids including theophylline and theobromine. In this study, the effect of theophylline and theobromine on peroxidase activity was kinetically studied by measuring the absorption of 4-aminoantipyrine, oxidized in the presence and absence of theophylline and theobromine at 510 nm for 3 minutes. The results showed that theobromine and theophylline acted as inhibitors with IC_{50} of 0.50 and 0.55 mM, respectively. K_m and V_{max} values showed that both compounds are non-competitive inhibitors. The values of K_i were calculated as 0.03 and 0.045 mM for theobromine and theophylline, respectively. Lower values of K_i and IC_{50} for theobromine compared to theophylline indicates that theobromine has a higher inhibition strength and binding tendency to the enzyme-substrate complex. Hence, it is concluded that theobromine has a stronger inhibitory effect on POD activity.

Key words. antioxidant, free radical, inhibitor, theobromine, theophylline

Received 10.04.2021/ Revised 05.07.2021/ Accepted 25.08.2021/ Published 20.01.2022

دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۱/اصلاح: ۱۴۰۰/۰۴/۱۴/پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۰۳/انتشار: ۱۴۰۰/۱۰/۳۰

مقدمه

آنزیم آنتی‌اکسیدانی پراکسیداز یک پروتئین هم‌دار است، که واکنش‌های اکسیداسیونی پیش‌ماده‌های مختلف آلی و غیرآلی را با استفاده از هیدروژن پراکسید، به عنوان پذیرنده الکترون، تسریع می‌کند. تمام هم‌پراکسیدازها دارای یک چرخه کاتالیتیک عمومی با سه مرحله احیای متوالی هستند (Valko et al., 2006). در ابتدا آنزیم با یک مولکول هیدروژن پراکسید، در طی یک فرآیند اکسیداسیون - احیای دو الکترونی واکنش می‌دهد. در نتیجه هیدروژن پراکسید، احیاء شده و آب تولید می‌گردد و از طرفی آنزیم به شکل اکسید در می‌آید، که به آن ترکیب I گفته می‌شود. این ترکیب شامل یک مرکز اکسی فریل ($O = Fe(IV)$) و یک رادیکال آلی کاتیونی، واقع بر روی هم یا یک ریشه تریپتوفان است. در مرحله دوم، رادیکال کاتیونی ترکیب I دستخوش احیای تک الکترونی شده و یک مولکول سوبسترا را اکسید می‌کند، بنابراین ترکیب II با مرکز اکسی فریل شکل می‌گیرد. در آخرین مرحله، ترکیب II با اکسیداسیون تک الکترونی دومین سوبسترا، به حالت پایه فریک احیاء می‌شود که این مرحله تعیین کننده سرعت واکنش است (Conesa et al., 2002).

هیدروژن پراکسید (Hydrogen peroxide) به گروهی از رادیکال‌های آزاد به نام گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species) تعلق دارد. رادیکال‌های آزاد، مولکول‌های فعال یا یون‌هایی هستند که در طی متابولیسم طبیعی سلول از اکسیژن مولکولی مشتق شده‌اند (Pisoschi & Pop, 2015; Valko et al., 2006). ROS ها در غلظت‌های پایین یا متوسط دارای یک نقش فیزیولوژیک در پاسخ به آسیب‌های سلولی از جمله دفاع در برابر عوامل عفونی هستند. همچنین در عملکرد تعدادی از سیستم‌های پیام‌رسان سلولی مثل آپوپتوز و بیان ژن نقش دارند و به تنظیم تکثیر و تمایز سلولی کمک می‌کنند (Agidigbi & Kim, 2019; Perillo et al., 2020). از اثرات مضر رادیکال‌های آزاد می‌توان به استرس اکسیداتیو و نیتروزاتیو اشاره کرد که در غلظت‌های بالای گونه‌های فعال اکسیژنی مشاهده می‌شوند. تماس طولانی با رادیکال‌های آزاد حتی در یک مقدار کم، ممکن است باعث آسیب به مولکول‌های مهم بیولوژیکی و جهش DNA شود، درنتیجه می‌تواند منجر به بیماری‌های مهمی از جمله انواع سرطان‌ها شود (Liguori et al., 2018; Gammella et al., 2016; Srinivas et al., 2019). بنابراین با وجود اینکه مولکول اکسیژن برای حیات هوازی کاملاً ضروری است، تحت شرایط ویژه‌ای می‌تواند سمی هم باشد که به این پدیده اصطلاحاً پارادوکس اکسیژنی (Oxygen Paradox) گفته می‌شود. از این‌رو، اختلال در عملکرد آنزیم پراکسیداز ممکن است، منجر به تجمع ROS ها و بروز برخی ناهنجاری‌ها در بدن گردد (Davies et al., 2017).

از طرفی در جوامع امروزی، نوشیدنی‌های رایجی مانند قهوه، چای و نوشابه‌های گازدار که روزانه توسط افراد مصرف می‌شوند، حاوی مقادیر بالایی از متیل گزانتین‌ها از جمله تئوبرومین (۳ و۷ دی متیل گزانتین) و تئوفیلین (۱ و۳ دی متیل گزانتین) با فرمول شیمیایی یکسان ($C_7H_8N_4O_2$) هستند. این ترکیبات، آلکالوئید پورین‌های مشتق شده از گزانتین هستند که از توزیع گسترده‌ای در گیاهان برخوردارند و به مقدار زیادی در برگ چای، دانه‌های قهوه و کاکائو یافت می‌شوند (Fredholm, 2010). این ترکیبات طبیعی قادر هستند، از سد خونی - مغزی عبور کرده و سیستم عصبی مرکزی و محیطی را تحریک کنند. بنابراین آلکالوئید گزانتین‌ها به عنوان محرک‌های روان‌گردان خفیف شناخته شده و معمولاً از اجزای تشکیل دهنده بسیاری از داروها محسوب می‌شوند (Monteiro et al., 2016).

در چندین دهه اخیر، تئوفیلین جهت مصارف بالینی استفاده می‌شود و در غلظت‌های مناسب درمانی، دارای اثرات ضدالتهابی و ایمنی‌کننده است. شواهد زیادی مبنی بر اینکه تئوفیلین، برای درمان بیماری‌های ریوی انسدادی و آسم شدید یک عامل سودمند است، وجود دارد (Barnes, 2013; Dubuis et al., 2014; Hosseini et al., 2021). التهاب اصلی‌ترین ناهنجاری در بیماران آسمی است و تئوفیلین به دلیل خاصیت ضدالتهابی، از جابه‌جایی فاکتور هسته‌ای تقویت‌کننده زنجیره سبک کاپای سلول‌های B فعال شده (Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells or NF-kB) که مسئول رونویسی ژن‌های التهابی است، جلوگیری می‌کند. درنتیجه بیان این ژن‌ها را در آسم کاهش می‌دهد (Zhong et al., 2017; Lawrence, 2009). این ترکیب گزانتینی بر سلول‌های ایمنی نیز تأثیر می‌گذارد، به این ترتیب که وقتی سلول‌های تک هسته‌ای پریفرال خون و ماکروفاژهای ریوی، در معرض غلظت‌های مناسب تئوفیلین قرار می‌گیرند، سوپراکسیدهای کمتری ترشح می‌کنند. همچنین تئوفیلین خوراکی، فعالیت باکتریایی و رهاسازی هیدروژن پراکسید (H_2O_2) از ماکروفاژهای حفره دار را کاهش می‌دهد، در نتیجه با این کار بر ایمنی بدن افزوده و به پاکسازی بدن از ROS ها کمک می‌کند (Barnes, 2003, 2004; Fricker & Gibson, 2017). علاوه بر تأثیرات مفید

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-29]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.4.3.8]
[DOI: 10.52547/nbr.8.4.279]

تئوفیلین بر بدن، مصرف بیش از حد آن می‌تواند منجر به بی‌خوابی، ناراحتی‌های دستگاه گوارش، افت فشار خون، استفراغ، حالت تهوع شدید، آریتمی قلبی و تشنج شود (Zhong et al., 2017).

تئوبرومین نیز همانند تئوفیلین قدمتی طولانی در مصارف بالینی دارد، به عنوان مثال تئوبرومین در غلظت مصرفی مناسب از فعال‌سازی نامناسب عصب واگ که یکی از ویژگی‌های اصلی سرفه مداوم است، جلوگیری می‌کند. بنابراین، می توان از آن به عنوان دارویی مفید برای درمان سرفه مزمن استفاده نمود (Morice et al., 2017). همچنین تئوبرومین دارای دو خصوصیت آنتی‌اکسیدانی و پرواکسیدانی بوده و همانند سایر آلکالوئید پورین‌های‌گزانتینی مانند کافئین و تئوفیلین به عنوان یک محرک بسیار ملایم سیستم عصبی مرکزی (Central Nervous System or CNS) عمل می‌کند. اثر محرک تئوبرومین کمتر از تئوفیلین و کافئین است، اما نیمه عمر بیشتری در بدن دارد. از این‌رو می‌تواند اثرات طولانی‌تری بر بدن داشته باشد (Baggott et al., 2013; Mitchell et al., 2011; Shanahan et al., 2019). این ترکیب به دلیل ادرارآور بودن و توانایی‌اش در گشاد کردن عروق خونی، در مواردی مثل نارسایی قلبی که منجر به تجمع مایعات در بدن می‌شود و همچنین برای درمان فشار خون مورد استفاده قرار می‌گیرد (Cova et al., 2019).

مصرف تئوبرومین باعث افزایش آپولیپوپروتئین A-1 (APO A1) و HDL کلسترول در خون انسان می‌شود. آپولیپوپروتئین A-1، پروتئین اصلی HDL است که باعث ورود کلسترول از سلول‌ها به HDL می‌گردد و در صورت کمبود یا ناقص بودن این پروتئین، HDL نمی‌تواند عمل اصلی خود، یعنی انتقال کلسترول از سلول‌ها به کبد را انجام دهد. درنتیجه APO A1 خطر گرفتگی رگ‌های کرونر قلبی را کاهش داده و در مقابل آن اثری محافظت کننده دارد. همچنین، این ترکیب گزانتینی به طور انتخابی با گیرنده آدنوزین A1 (AR1) ارتباط برقرار کرده و از طریق مهار پیام رسان AR1 باعث تخریب C/EBP (CCAAT-Enhancer-Binding Protein) می‌شود، در نتیجه تمایز سلول‌های چربی را مهار می‌کند. C/EBP، خانواده‌ای چند عضوی از فاکتورهای رونویسی است، که بیان ژن‌های خاصی چون ژن‌های درگیر در متابولیسم را تقویت می‌کند (Neufingerl et al., 2013). تئوبرومین به عنوان یک ماده طبیعی قدرتمند، با قهوه‌ای شدن چربی سفید و فعال‌سازی سلول‌های چربی قهوه‌ای، چاقی ناشی از رژیم غذایی را کاهش می‌دهد. علاوه براین، اثر ضد چاقی آن به یک مسیر تنظیمی وابسته به فسفودی‌استراز مرتبط است که تئوبرومین به طور فعال از طریق تعامل با PDE4D (یک ایزوفرم از فسفودی استراز ۴) فعالیت آن را در بافت‌های چربی و سلول‌های تقویت کننده انرژی مهار می‌کند (Jang et al., 2020; Mitani et al., 2017). با وجود اثرات مفیدی که تئوبرومین بر بدن دارد، استفاده بیش از حد آن می‌تواند منجر به بی‌اشتهایی، تحریک معده، حالت تهوع و استفراغ شود (Baggott et al., 2013).

باتوجه به مطالب ذکرشده، آلکالوئید گزانتین‌های مهمی چون تئوفیلین و تئوبرومین، جزء اساسی تشکیل دهنده نوشیدنی‌های رایجی مثل قهوه، چای و نوشابه‌های گازدار هستند. طبق مطالعات پیشین، این ترکیبات پورینی با توجه به غلظت‌های مصرفی، قابلیت تأثیر مفید و مضر بر قسمت‌های مختلف بدن از جمله آنزیم‌ها را دارند. از طرفی پراکسیداز یکی از اجزای مهم سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی است. بنابراین در پژوهش حاضر، اثر احتمالی ترکیبات متیله گزانتینی مذکور بر فعالیت طبیعی آنزیم پراکسیداز بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

مواد مورد استفاده در این پژوهش عبارتند از آنزیم پراکسیداز از گونه *Arthromyces ramosus*، تئوفیلین، تئوبرومین و ۴-آمینوآنتی‌پیرین که از شرکت Sigma خریداری شدند. فنل از شرکت مرک و هیدروژن پراکسید ۳۰ درصد از صنایع شیمیایی دکتر مجللی تهیه شد. بافر پتاسیم فسفات جهت سنجش فعالیت آنزیم در محیط آزمایشگاه آماده شد. از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Visible از شرکت Pharmacia مدل Ultrospec ۳۰۰۰ جهت خواندن جذب واکنش آنزیمی استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز

برای سنجش فعالیت سینتیکی آنزیم پراکسیداز، از روش مورد استفاده توسط محققین پیشین با کمی اصلاحات، استفاده گردید (Ferreira et al., 2010). بنابراین محلولی حاوی ۳۴۰ میکرولیتر فنل ۰/۱۷ مولار، ۱/۷ میکرولیتر هیدروژن پراکسید ۱/۷ میلی‌مولار، به همراه ۴-آمینوآنتی‌پیرین ۲/۵ میلی‌مولار با غلظت متغیر (۱، ۲، ۳، ۵، ۸، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۵۰، ۱۰۰ میکرومولار) و بافر پتاسیم فسفات ۰/۲ مولار (pH=7.2) تهیه شد و در نهایت یک میکرولیتر از آنزیم پراکسیداز به محلول اضافه گردید. فعالیت آنزیم پراکسیداز به روش کینتیک با استفاده از دستگاه اسپکتروسکوپی جذبی مورد سنجش قرارگرفت. در این سنجش آنزیمی جذب محصول رنگی کینونیمین،

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-29]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.4.3.8]
[DOI: 10.52547/nbr.8.4.279]

حاصل ازاکسایش ۴-آمینوآنتی‌پیرین در حضور همزمان فنل و هیدروژن پراکسید، در طول موج ۵۱۰ نانومتر و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، به مدت ۳ دقیقه اندازه‌گیری شد (Sariri et al., 2006). در نهایت با توجه به اطلاعات به‌دست آمده، منحنی میکائیلیس - منتن و لاینویور - برک رسم شد و به موازات آن ثابت‌های سینتیکی K_m و V_{max} در فقدان هر یک از مهارکننده‌ها محاسبه گردید. شایان ذکراست، که هر مرحله از آزمایش سه مرتبه تکرار شده است.

بررسی مهار آنزیمی

در این آزمایش، جهت تعیین تأثیر ترکیبات ذکر شده بر فعالیت آنزیم پراکسیداز، غلظت فنل، هیدروژن پراکسید و ۴-آمینوآنتی‌پیرین (غلظت اشباع سوبسترا معادل ۱۰۰میکرومولار) در تمام سنجش‌ها ثابت و غلظت مهارکننده متغیر در نظر گرفته شد. برای تئوبرومین از غلظت‌های ۰/۱۵ الی ۲ میلی‌مولار استفاده شد و در مورد تئوفیلین نیز غلظت‌های ۰/۱۵الی ۱/۵ میلی‌مولار مورد استفاده قرارگرفت. همان‌گونه که پیش‌تر بیان شد، هر مرحله از آزمایش سه مرتبه تکرار گردید و براساس نتایج به‌دست آمده، مشاهده شد که فعالیت آنزیم پراکسیداز در حضور هر یک از دو مهارکننده کاهش یافته است. در نهایت با توجه به اطلاعات کسب شده، نمودارهای مهاری و غلظت - پاسخ برای هر یک از دو مهارکننده رسم گردید.

محاسبات سینتیکی

با توجه به نمودار غلظت - پاسخ، مقادیر IC_{50} برای هر یک از دو مهارکننده محاسبه شد. از طرفی برای تعیین الگوی مهار و مقادیر پارامترهای سینتیکی K_m و V_{max}، فعالیت آنزیمی در حضور غلظت‌های مختلف سوبسترا (۱ الی ۱۰۰ میکرومولار) و غلظت ثابت هر یک از مهارکننده‌ها سنجش شد. سپس، نمودارهای میکائیلیس - منتن و لاینویور - برک ترسیم گردید. همچنین برای تخمین زدن مقدار ثابت مهاری (K_i)، در حضور هر یک از مهارکننده‌ها، نمودار ثانویه رسم شد. در نهایت، برای تعیین جزئی یا کامل بودن مهار، نمودار دیکسون، رسم گردید.

نتایج

فعالیت پراکسیداز

فعالیت پراکسیداز در غلظت‌های مختلف هر یک از مهارکننده‌ها اندازه‌گیری شد. براساس نتایج به‌دست آمده، با افزایش غلظت هر یک از این ترکیبات، کاهش بیشتری در فعالیت آنزیم مشاهده گردید (شکل ۱).

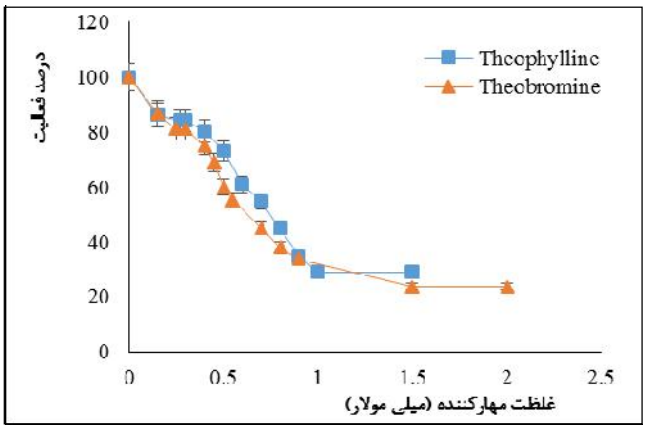
تعیین پارامترهای سینتیکی K_m، V_{max}

براساس نمودارهای لاینویور - برک (شکل‌های ۲، ۳)، با زیاد شدن غلظت مهارکننده شیب نمودار همواره ثابت بوده، اما محل تقاطع با محور Y ($1/V_{max}$) و محور X ($-1/K_m$) متغیر است. بنابراین باتوجه به آن، پارامترهای سینتیکی K_m و V_{max}، در حضور و فقدان هر یک از مهارکننده‌ها محاسبه گردید و مشاهده شد که مقادیر K_m و V_{max} با افزایش غلظت مهارکننده کاهش می‌یابند. مقادیر به‌دست آمده برای پارامترهای سینتیکی در جدول ۱ باهم مقایسه شده است. جهت تعیین دقت و درستی مقادیر K_m و V_{max} محاسبه شده توسط لاینویور - برک، نمودار هانس- ولف در حضور و فقدان غلظت IC_{50} هر یک از مهارکننده‌ها ترسیم شد و مقادیر K_m (ثابت میکائیلیس - منتن نام دارد و به‌عنوان غلظتی از سوبسترا که درآن غلظت، سرعت واکنش به اندازه نصف سرعت حداکثر است، تعریف می‌شود. همچنین، تمایل اتصال آنزیم به مهارکننده را نشان می‌دهد) و V_{max} (سرعت حداکثر واکنش است که در غلظت اشباع سوبسترا مشاهده می‌شود) برای هر دو مهارکننده به‌دست آمد (Cornish-Bowden, 2013). در نهایت مشاهده شد که مقادیر K_m و V_{max} به‌دست آمده از طریق نمودار هانس - ولف و لاینویور - برک، معادل هم بوده و دقیقاً یکدیگر را تأیید می‌کنند که این نتیجه، بالا بودن دقت آزمایش را نشان می‌دهد. نمودار هانس - ولف و ثابت‌های سینتیکی حاصل از آن در این مقاله ذکرنشده است. طبق اطلاعات پیشین، نمودار لاینویور - برک برای تشخیص مهار جزئی و کامل از یکدیگر مناسب نیست، زیرا این نمودار برای هر دو مورد به صورت خطی است. از این‌رو یکی از بهترین راه‌های تشخیص مهار جزئی از مهار کامل، نمودار دیکسون (1/V در برابر [I]) است (Copeland, 2000). بنابراین، نمودار دیکسون در حضور غلظت‌های مختلفی از تئوبرومین و تئوفیلین رسم شده است (شکل‌های ۴، ۵).

تعیین مقادیر K_i و IC_{50}

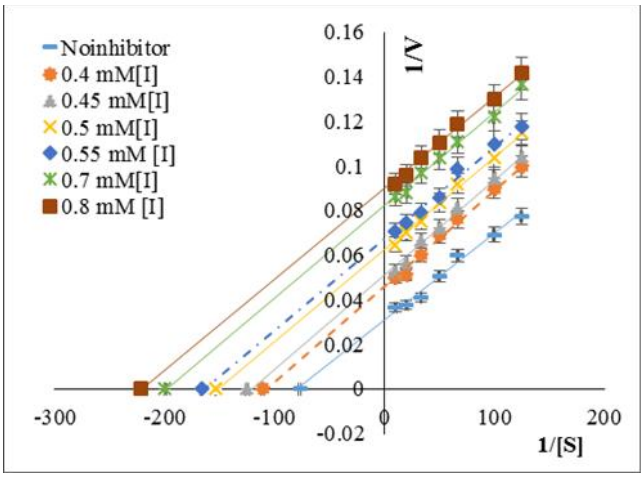
با توجه به نمودار اثر مهاری (شکل ۱) و نمودار غلظت - پاسخ (شکل ۶)، مقادیر IC_{50} برای تئوبرومین ۰/۵ میلی‌مولار و برای تئوفیلین ۰/۵۵ میلی‌مولار تخمین زده شد. همچنین ثابت مهاری (K_i)، از روی نمودار ثانویه (شکل ۷) برای هر یک از مهارکننده‌ها تعیین شد، که مقدار K_i برای تئوبرومین و تئوفیلین به ترتیب ۰/۰۳ و ۰/۰۴۵ میلی‌مولار به‌دست آمد. ثابت مهاری (K_i)، میزان تمایل آنزیم به مهارکننده را نشان می‌دهد. بنابراین اگر مقدار آن برای مهارکننده‌ای کمتر باشد، تمایل مهارکننده برای اتصال به آنزیم بیشتر بوده و با قدرت بیشتری به آنزیم متصل می‌شود (Purich, 2010). مقادیر IC_{50} و K_i برای هر دو مهارکننده در جدول ۲ بیان شده است.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-29]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.4.3.8]
[DOI: 10.52547/nbr.8.4.279]



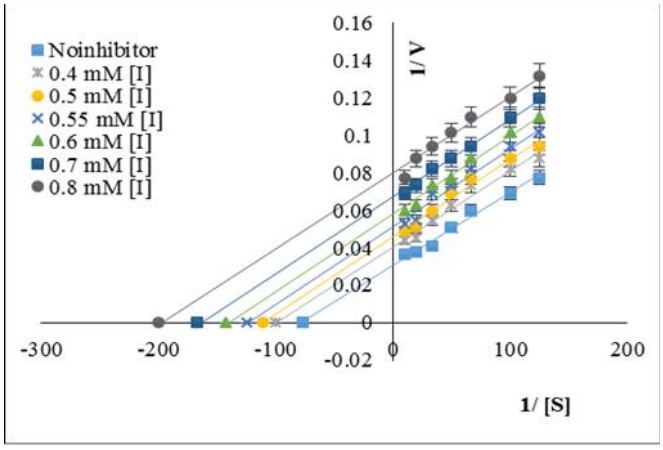
شکل ۱- فعالیت پراکسیداز در غلظت‌های مختلف تئوبرومین و تئوفیلین.

Figure 1. Peroxidase activity in the different concentrations of theobromine and theophylline.



شکل ۲- نمودار لاینویور - برک در حضور و فقدان تئوبرومین.

Figure 2. Lineweaver-Burk plot in the presence and absence of theobromine.



شکل ۳- نمودار لاینویور - برک در حضور و فقدان تئوفیلین.

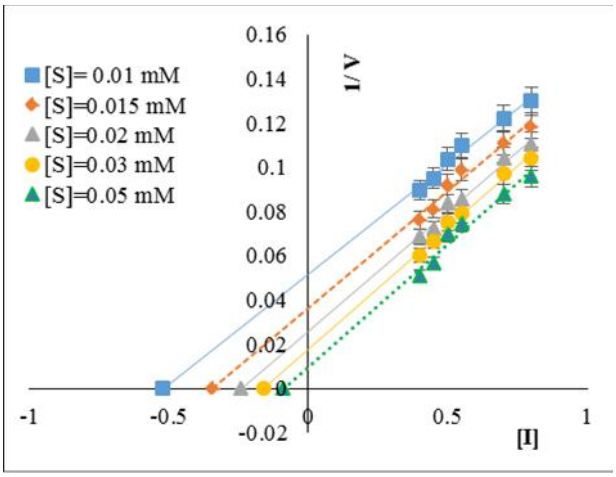
Figure 3. Lineweaver-Burk plot in the presence and absence of theophylline.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-29]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.4.3.8]
[DOI: 10.52547/nbr.8.4.279]

جدول ۱- مقایسه مقادیر K_m و V_{max} به‌دست آمده، از نمودار لاینویور - برک در غلظت‌های مختلف تئوفیلین و تئوبرومین.

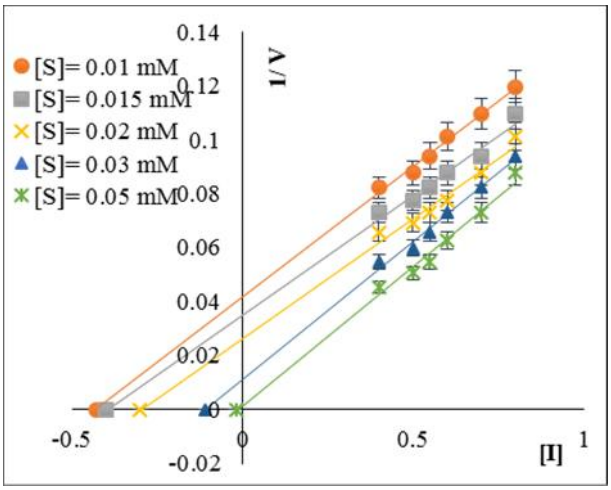
Table 1. Comparison of the K_m and V_{max} values, from Lineweaver-Burk plots in the different concentrations of theophylline and theobromine.

0.8	0.7	0.6	0.55	0.5	0.4	0	**Theophylline(mM)**
0.005	0.006	0.007	0.008	0.009	0.010	0.013	**K_m (mM)**
12.886	15.267	17.857	19.801	21.834	24.509	31.948	**V_{max} (µmol/min)**
0.8	0.7	0.55	0.5	0.45	0.4	0	**Theobromine(mM)**
0.0045	0.005	0.006	0.0065	0.008	0.009	0.013	**K_m (mM)**
11.299	12.303	15.083	16.313	20.202	22.321	31.948	**V_{max} (µmol/min)**



شکل ۴- نمودار دیکسون در حضور و فقدان تئوبرومین.

Figure 4. Dixon plots in the presence and absence of theobromine.



شکل ۵- نموداردیکسون در حضور و فقدان تئوفیلین.

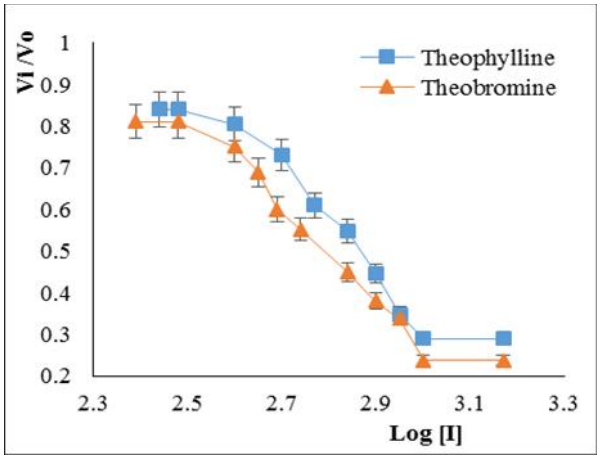
Figure 5. Dixon Plots in the presence and absence of theophylline.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-29]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.4.3.8]
[DOI: 10.52547/nbr.8.4.279]

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-29]

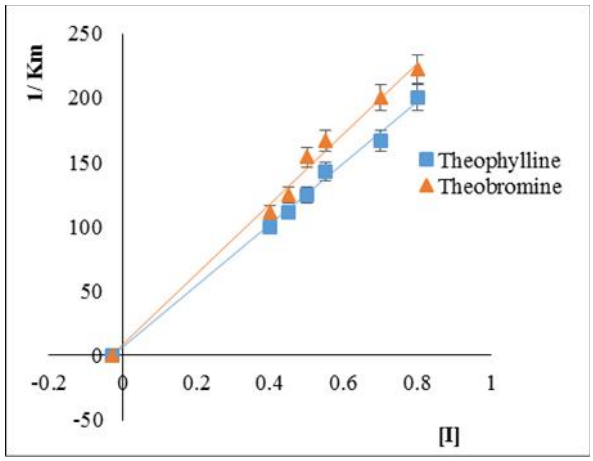
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.4.3.8]

[DOI: 10.52547/nbr.8.4.279]



شکل ۶- نمودار غلظت - پاسخ پراکسیداز در حضور تئوفیلین و تئوبرومین.

Figure 6. The Dose-Response plot of peroxidase in presence of theophylline and theobromine.

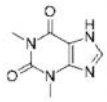
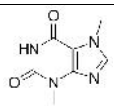


شکل ۷- نمودار ثانویه پراکسیداز در حضور تئوفیلین و تئوبرومین.

Figure 7. The Secondary Plot of Peroxidase in Presence of theophylline and theobromine.

جدول۲- مقایسه مقادیر IC_{50} و K_i تئوفیلین و تئوبرومین.

Table 2. Comparison of the IC_{50} and K_i values calculated for theophylline and theobromine.

Inhibitor	Chemical structure	IC_{50} (mM)	K_i (mM)
Theophylline		0.55	0.045
Theobromine		0.5	0.03

بحث

غلظت مصرفی متیل‌گزانتین‌هایی همچون تئوفیلین و تئوبرومین که روزانه به طور گسترده مصرف می‌شوند، در مهار فعالیت آنزیمی حائز اهمیت هستند (Martínez-Pinilla et al., 2015; Wikiera et al., 2012). در این مطالعه، براساس پارامترهای سینتیکی K_m و V_{max} محاسبه شده از طریق نمودار لاینویور - برک برای هر یک از مهارکننده‌ها (شکل‌های ۲، ۳) و تغییرات کاهشی مقادیر K_m و V_{max}، متناسب با افزایش غلظت مهارکننده (جدول ۱) می‌توان چنین عنوان نمود که تئوبرومین و تئوفیلین با تبعیت از یک مکانیسم مهاری نارقابتی، فعالیت آنزیم را به طور محسوسی کاهش می‌دهند. زیرا هر یک از ترکیبات ذکر شده قادر هستند، فقط به کمپلکس پراکسیداز - ۴-آمینوآنتی‌پیرین (آنزیم -

پیش‌ماده) و بـه جایگـاهی متفـاوت از جایگـاه فعـال پراکسـیداز متصـل شـوند. در نتیجـه در حضـور هـر یـک از ایـن ترکیبـات گزانتینی، ۴-آمینوآنتی‌پیرین به‌عنوان پیش‌ماده اصـلی قادراسـت بعد از اتصال به پراکسیداز، ساختار آنزیم را به‌گونه‌ای تغییر دهـد که جایگاه اتصـالی مهارکننـده در دسـترس آن قرارگیـرد. بـدین ترتیب میل ترکیبی پراکسیداز به تئوفیلین یا تئوبرومین افـزایش یافته و مقدار K_m کاهش می‌یابد. درنهایـت یـک کمـپلکس سـه تایی مرده و بی‌حاصـل شـامل پراکسـیداز، ۴-آمینـوآنتی‌پیرین و ترکیب گزانتینی موردنظر شکل گرفتـه و واکـنش آنزیمـی مهـار می‌گردد، که این امر علت کاهش V_{max} است.

از طرفی، براساس مقادیر K_i تعیین شده از طریق نمودار ثانویه (شـکل ۷)، کـه مقـدار K_i بـرای تئـوبرومین کمتـر از تئـوفیلین تخمین زده شده است. همچنین، با توجه به تعریف ثابـت مهـاری (K_i)، که میزان تمایل آنـزیم بـه مهارکننـده را نشـان می‌دهـد و مقدار عددی آن همواره بـا قـدرت اتصـال مهارکننـده بـه آنـزیم ارتبـاطی معکـوس دارد (Bisswanger, 2017; Cook & Cleland, 2007). چنین به نظـر می‌رسـد کـه تمایـل و قـدرت اتصـال تئـوبرومین بـه کمـپلکس آنـزیم – پیش‌مـاده بیشـتر از تئوفیلین است. علاوه‌براین، ازآنجا که مقدار IC_{50} به‌دست آمده از طریـق نمـودار غلظـت - پاسـخ (شـکل ۶) بـرای تئـوبرومین در مقایسه با تئوفیلین کمتر است، می‌توان چنین استنباط نمود کـه تئوبرومین احتمالاً در مقایسه بـا تئـوفیلین دارای قـدرت مهـاری بیشتری است. زیرا IC_{50}، به عنوان غلظتـی از مهارکننـده کـه در آن غلظت، فعالیت آنزیم به اندازه نصف کاهش یافته است، تعریف می‌شود و همواره بین مقـدار IC_{50} و قـدرت مهـاری مهارکننـده رابطه‌ای عکس برقرار است (Bisswanger, 2017).

جهت توجیه توانایی بالای تئوبرومین برای اتصال به کمـپلکس آنزیم - پیش‌ماده و قدرت مهاری بیشتر آن، با توجـه بـه سـاختار شیمیایی این مهارکننده‌ها، می‌توان چنین پیشنهاد داد که بیشتر بودن قدرت مهاری تئـوبرومین در مقایسـه بـا تئـوفیلین، ممکـن است به گروه‌هـای حجـیم در جایگاه‌هـای N_1، N_3 و N_7 مـرتبط باشد. زیرا اتم‌های N_3 و N_7 پورین‌ها دارای یـک نقـش ضـروری، جهت تشخیص مهارکننده توسـط آنـزیم و تمایـل اتصـال بـه آن هستند. بااین‌وجود، کاملاً آشکار است که متیلاسیون گـزانتین در موقعیت‌های ۳ و ۷ بـرای مهـار لازم و ضـروری اسـت. از طرفـی اتم‌های C_6-N_7-C_8 باز پورینی به طور ویژه برای شناسایی توسط آنزیم مهم هستند، که به شدت با آنـزیم تعامـل دارنـد. بنـابراین، جایگزینی یـک گـروه متیـل در جایگـاه N_7 پورین‌هـا از اهمیـت بیشتری برخوردار اسـت (Ataei et al., 2007; Shanahan et al., 2019). ازایـن‌رو، می‌تـوان تفـاوت در قـدرت مهـاری را بـه ساختار کلی هر مهارکننده نسبت داد.

از طرفی، در پژوهش حاضر بـرای تعیـین نـوع مهـار از نمـودار دیکسون بـه عنـوان روشـی بسـیار ارزشـمند اسـتفاده گردیـد و براساس نتایج به‌دست آمده نوع مهار از نوع کامـل تشـخیص داده شد، زیرا نمودار دیکسون در حضور هر یـک از دو مهارکننـده بـه صورت خطی است. طبق توضیحاتی که پیش‌تر گفته شد، نمـودار دیکسون فقط در زمانی کـه مهـار کامـل باشـد از الگـوی خطـی تبعیت می‌کند و در صورت جزئی بودن مهار، به صـورت هـذلولی است (Copeland, 2000; Yoshino & Murakami, 2009).

نتایج به‌دست آمده از این تحقیق، با یافته‌های گروهـی از محققـان که تأثیرکافئین را بـر آنزیم‌هـای آنتی‌اکسـیدانی کبـد مـوش، مـورد بررسی قراردادند، مشابهت دارد. این پژوهشگران مشاهده کردنـد، کـه کافئین بر آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسـموتاز اثـری مهـاری دارد و فعالیت آن‌ها را به طور قابل توجهی کاهش می‌دهـد (Sung et al., 2004). در مطالعـه دیگـری، اثـر آلکالوئیـدهای گزانتینـی مثـل تئوبرومین، تئوفیلین و کافئین بر فعالیت گزانتین اکسیداز شیر، کبـد، شش و قلب موش بررسی شده است،که نشـان می‌دهـد هـر کـدام از این ترکیب‌ها بر فعالیت آنزیم گزانتین اکسیداز اثـر مهـاری داشـته و مکانیسـم مهـار بـرای هـر سـه مهارکننـده از نـوع رقـابتی اسـت. علاوه‌براین، با توجه به مقادیر K_i این ترکیبـات، تئـوفیلین بیشـترین قدرت اتصال به آنزیم را از خود نشان می‌دهد، درحالی که تئـوبرومین در جایگاه دوم قرار گرفته و کمتـرین قـدرت اتصـال نیـز مربـوط بـه کافئین است (Bae et al., 2015).

از مطالعات مشابه دیگری که در این زمینه انجـام شـده اسـت، بررسـی تـأثیر متیل‌گزانتین‌هـایی چـون کـافئین، تئـوفیلین و پنتوکسی‌فیلین بر فعالیت آلکالین‌فسفاتاز است. نتایج حاصل شده از این تحقیق، حاکی از آن است که هر سـه ترکیـب بـر فعالیـت آنزیم، اثری کاهشی داشته و آن را به طور نارقابتی مهار می‌کننـد که تئـوفیلین در مقایسـه بـا سـایر متیل‌گزانتین‌هـا اثـر کاهشـی بیشـتری دارد (Glogowski et al., 2002). همچنـین در تحقیقی دیگر، تأثیر کافئین بـر آنزیم‌هـای ترانسـفرازی از جملـه گاماگلوتامیل ترانسفراز (GGT)، گلوتامات پیـروات ترانس‌آمینـاز (GPT) و گلوتامـات اگزالوسـتات ترانس‌آمینـاز (GOT) بررسـی شده است. این مطالعه نشـان می‌دهـد کـه کـافئین باوجوداینکـه برای آنزیم‌های گلوتامـات اگزالوسـتات ترانس‌آمینـاز و گلوتامـات پیروات ترانس‌آمیناز به عنوان فعال‌کننده عمل می‌کند و فعالیـت آن‌ها را افزایش می‌دهـد، آنـزیم گامـا گلوتامیـل ترانسـفراز را بـا مکانیسـم غیررقـابتی مهـار می‌کنـد (Al-Qaisi et al., 2011). تأثیر کافئین بر مونوآمین‌اکسیداز توسط گروهی دیگر از محققین

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-29]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.4.3.8]
[DOI: 10.52547/nbr.8.4.279]

مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده کردند که کافئین با مکانیسمی از نوع رقابتی فعالیت آنزیم را کاهش داده و آن را مهار می‌کند (Petzer et al., 2013). در سال ۲۰۱۹ محققین، اثر مهاری تئوبرومین و متیل‌گزانتین‌های مرتبط را بر روی آمین‌اکسیداز اولیه بررسی کردند. طبق نتایج به‌دست آمده، الگوی مهاری برای همه متیل‌گزانتین‌ها از نوع غیررقابتی تشخیص داده شد. همچنین، مقدار K_i محاسبه شده برای تئوبرومین به طور قابل توجهی پایین‌تر از متیل‌گزانتین‌های دیگر به‌دست آمد، که این امر قدرت مهاری بیشتر تئوبرومین را اثبات کرده است (Shanahan et al., 2019).

نتیجه گیری

براساس نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر، به نظر می‌رسد که آلکالوئید پورین‌های گیاهی مثل تئوفیلین و تئوبرومین در صورت مصرف در غلظت‌های بالاتر از حد مجاز، قادر هستند فعالیت بسیاری از آنزیم‌های اساسی از جمله پراکسیداز را مهار کنند. علاوه‌براین، اختلال در عملکرد آنزیم حیاتی پراکسیداز به نوبه خود می‌تواند بدن را برای بروز ناهنجاری‌هایی چون استرس اکسیداتیو و در نهایت سرطان مستعدتر سازد. درنتیجه، با توجه به مقادیر IC_{50} و K_i به‌دست آمده برای هر یک از دو مهارکننده، چنین استنباط می‌شود که تئوبرومین در مقایسه با تئوفیلین، به دلیل داشتن مقادیر IC_{50} و K_i کمتر، احتمالاً اثر منفی قوی‌تری بر فعالیت پراکسیداز دارد. بنابراین تئوبرومین نسبت به تئوفیلین مهارکننده قوی‌تری بوده و فعالیت پراکسیداز را به مقدار بیشتری کاهش می‌دهد.

سپاسگزاری

نگارندگان مقاله از مساعدت دانشگاه گیلان در انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

REFERENCES

Agidigbi, T.S. & Kim, C. 2019. Reactive oxygen species in osteoclast differentiation and possible pharmaceutical targets of ROS-mediated osteoclast diseases. International Journal of Molecular Sciences 20: 3576-3592.

Al-Qaisi, Z.H.J., Abbass, S.A.R. & Abdullah, A.H. 2011. Effect of caffeine on some transferase enzymes activities. International Journal of Chemistry 3: 140-148.

Ataei, G., Bagheri, S., Divsalar, A., Sabouri, A., Safarian, S., Namaki, S. & Mousavi, M.A.A. 2007. A kinetic comparison on the inhibition of adenosine deaminase by purine drug. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 6: 43-50. (In Persian).

Bae, J., Park, P.S., Chun, B.Y., Choi, B.Y., Kim, M.K., Shin, M.H., Lee, Y.H., Shin, D.H. & Kim, S.K. 2015. The effect of coffee, tea, and caffeine consumption on serum uric acid and the risk of hyperuricemia in Korean multi-rural communities Cohort. Rheumatology International 35: 327-336.

Baggott, M.J., Childs, E., Hart, A.B., de Bruin, E., Palmer, A.A., Wilkinson, J.E. & de Wit, H. 2013. Psychopharmacology of theobromine in healthy volunteers. Psychopharmacology 228: 109-118.

Barnes, P.J. 2003. Theophylline: new perspectives for an old drug. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 167: 813-818.

Barnes, P.J. 2004. Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease 1: 59-70.

Barnes, P.J. 2013. Theophylline. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 188: 901-906.

Bisswanger, H. 2017. Enzyme kinetics: principles and methods. John Wiley & Sons, 316 pp.

Conesa, A., Punt, P.J. & van den Hondel, C.A. 2002. Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. Journal of Biotechnology 93: 143-158.

Cook, P.F. & Cleland, W.W. 2007. Enzyme kinetics and mechanism: Garland Science, 403 pp.

Copeland, R.A. 2000. Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis. John Wiley & Sons, 411 pp.

Cornish-Bowden, A. 2013. Fundamentals of enzyme kinetics. John Wiley & Sons, 516 pp.

Cova, I., Leta, V., Mariani, C., Pantoni, L. & Pomati, S. 2019. Exploring cocoa properties: is theobromine a cognitive modulator? Psychopharmacology 236: 561-572.

Davies, J.M., Cillard, J., Friguet, B., Cadenas, E., Cadet, J., Cayce, R., Fishmann, A., Liao, D., Bulteau, A.L. & Derbré, F. 2017. The Oxygen Paradox, the French Paradox, and age-related diseases. GeroScience 39: 499-550.

Dubuis, E., Wortley, M.A., Grace, M.S., Maher, S.A., Adcock, J.J., Birrell, M.A. & Belvisi, M.G. 2014. Theophylline inhibits the cough reflex through a novel mechanism of action. Journal of Allergy and Clinical Immunology 133: 1588-1598.

Ferreira, L.C., Cataneo, A.C., Remaeh, L.M.R., Corniani, N., de Fátima Fumis, T., de Souza, Y.A., Scavroni, J. & Soares, B.J.A. 2010. Nitric oxide reduces oxidative stress generated by lactofen in soybean plants. Pesticide Biochemistry and Physiology 97: 47-54.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-29]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.4.3.8]
[DOI: 10.52547/nbr.8.4.279]

Fredholm, B.B. 2010. Methylxanthines. Springer Science & Business Media, 554 pp.

Fricker, M. & Gibson, P.G. 2017. Macrophage dysfunction in the pathogenesis and treatment of asthma. European Respiratory Journal 50: 1-16.

Gammella, E., Recalcati, S. & Cairo, G. 2016. Dual role of ROS as signal and stress agents: iron tips the balance in favor of toxic effects. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 16: 1-9.

Glogowski, J., Danforth, D.R. & Ciereszko, A. 2002. Inhibition of alkaline phosphatase activity of boar semen by pentoxifylline, caffeine, and theophylline. Journal of Andrology 23: 783-792.

Hosseini, S.M., Ajmal, M. & Shetty, R. 2021. Symptomatic supraventricular tachycardia resistant to adenosine therapy in a patient with chronic theophylline use. Case Reports in Cardiology 21: 1-4.

Jang, M.H., Mukherjee, S., Choi, M.J., Kang, N.H., Pham, H.G. & Yun, J.W. 2020. Theobromine alleviates diet-induced obesity in mice via phosphodiesterase-4 inhibition. European Journal of Nutrition 59: 3503-3516.

Lawrence, T. 2009. The nuclear factor NF-κB pathway in inflammation. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 1: 1-10.

Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D. & Abete, P. 2018. Oxidative stress, aging, and diseases. Clinical Interventions in Aging 13: 757–772.

Martínez-Pinilla, E., Oñatibia-Astibia, A. & Franco, R. 2015. The relevance of theobromine for the beneficial effects of cocoa consumption. Frontiers in Pharmacology 30: 1-6.

Mitani, T., Watanabe, S., Yoshioka, Y., Katayama, S., Nakamura, S. & Ashida, H. 2017. Theobromine suppresses adipogenesis through enhancement of CCAAT-enhancer-binding protein β degradation by adenosine receptor A1. Biochimicaet Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research 1864: 2438-2448.

Mitchell, E., Slettenaar, M., Vd Meer, N., Transler, C., Jans, L., Quadt, F. & Berry, M. 2011. Differential contributions of theobromine and caffeine on mood, psychomotor performance and blood pressure. Physiology and Behavior 104: 816-822.

Monteiro, J.P., Alves, M.G., Oliveira, P.F. & Silva, B.M. 2016. Structure-bioactivity relationships of methylxanthines: trying to make sense of all the promises and the drawbacks. Molecules 21: 974-1006.

Morice, A.H., McGarvey, L., Pavord, I.D., Higgins, B., Chung, K.F. & Birring, S.S. 2017. Theobromine for the treatment of persistent cough: a randomised, multicentre, double-blind, placebo-controlled clinical trial. Journal of Thoracic Disease 9: 1864-1872.

Neufingerl, N., Zebregs, Y.E., Schuring, E.A. & Trautwein, E.A. 2013. Effect of cocoa and theobromine consumption on serum HDL-cholesterol concentrations: a randomized controlled trial. The American Journal of Clinical Nutrition 97: 1201-1209.

Perillo, B., Di Donato, M., Pezone, A., Di Zazzo, E., Giovannelli, P., Galasso, G., Castoria, G. & Migliaccio, A. 2020. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. Experimental & Molecular Medicine 52: 192-203.

Petzer, A., Pienaar, A. & Petzer, J.P. 2013. The interactions of caffeine with monoamine oxidase. Life Sciences 93: 283-287.

Pisoschi, A.M. & Pop, A. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. European Journal of Medicinal Chemistry 97: 55-74.

Purich, D.L. 2010. Enzyme kinetics: catalysis and control: a reference of theory and best-practice methods. Elsevier, 915 pp.

Sariri, R., Sajedi, R. & Jafarian, V. 2006. Inhibition of horseradish peroxidase activity by thiol type inhibitors. Journal of Molecular Liquids 123: 20-23. (In Persian).

Shanahan, P., O'Sullivan, J., Tipton, K.F, Kinsella, G.K., Ryan, B.J. & Henehan, G.T. 2019. Theobromine and related methylxanthines as inhibitors of Primary Amine Oxidase. Journal of Food Biochemistry 43: 1-7.

Srinivas, U.S., Tan, B.W., Vellayappan, B.A. & Jeyasekharan, A.D. 2019. ROS and the DNA damage response in cancer. Redox Biology 25: 1-32.

Sung, J.H., Chang, C.C. & Chang, Y.S. 2004. The effect of caffeine on the antioxidative activities of mouse liver. The Korean Journal of Food and Nutrition 17: 442-449.

Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological Interactions 160: 1-40.

Wikiera, A., Mika, M. & Zyla, K. 2012. Methylxanthine drugs are human pancreatic lipase inhibitors. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences 62: 1-40.

Yoshino, M. & Murakami, K. 2009. A graphical method for determining inhibition constants. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry 24: 1288-1290.

Zhong, J., Tang, N., Asadzadeh, B. & Yan, W. 2017. Measurement and correlation of solubility of theobromine, theophylline, and caffeine in water and organic solvents at various temperatures. Journal of Chemical & Engineering Data 62: 2570-2577.

*****

How to cite this article:

Rahmati Darvazi, T. & Sariri, R. 2022. Kinetic study of peroxidase enzyme in the presence of purine alkaloids. Nova Biologica Reperta 8: 279-288. (In Persian).

رحمتی دروازی، ط. و سریری، ر. ۱۴۰۰. مطالعه سینتیکی آنزیم پراکسیداز در حضور آلکالوئیدهای پورینی. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۸: ۲۸۸-۲۷۹.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-29]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.4.3.8]

[DOI: 10.52547/nbr.8.4.279]