

# تأثیر استرس اکسیداتیو حاصل از مصرف سیگار بر فعالیت آنزیم‌های گلیکولیزی

## هگزوکیناز و پیرووات کیناز در اریتروسیت‌های افراد سیگاری

### چکیده

زمینه و هدف: دو آنزیم هگزوکیناز و پیرووات کیناز از آنزیم‌های کلیدی و تنظیم کننده مسیر گلیکولیز در اریتروسیت‌ها می‌باشند. براساس مطالعات متعدد، مشخص شده است که مصرف سیگار سبب ایجاد رادیکال‌های آزاد و فرآیند استرس اکسیداتیو شده و می‌تواند باعث آسیب ماکرومولکول‌های موجود در بدن از جمله پروتئین‌ها و آنزیم‌ها شود. هدف از انجام این مطالعه، بررسی آسیب‌پذیری آنزیم‌های کلیدی مسیر گلیکولیزی اریتروسیت‌ها (هگزوکیناز و پیرووات کیناز) در افراد سیگاری بوده است.

فرشته بهمنی I

\*دکتر عبدالوهاب احسانی زنوز II

دکتر محسن فیروزرأی III

روش بررسی: در این مطالعه ۶۵ فرد سیگاری و ۶۵ فرد غیرسیگاری که از لحاظ سن و جنس مشابه افراد سیگاری بودند، مورد بررسی قرار گرفتند و میزان فعالیت‌های تام آنزیم‌های هگزوکیناز و پیرووات کیناز آنها و همچنین میزان آنتی‌اکسیدان‌های تام پلاسما در این افراد، اندازه‌گیری و مقایسه شد.

یافته‌ها: براساس نتایج بدست آمده، مقدار فعالیت آنزیم هگزوکیناز و مقدار آنتی‌اکسیدان‌های تام پلاسما در افراد سیگاری، کمتر از افراد غیرسیگاری بود، ولی میزان فعالیت آنزیم پیرووات کیناز در دو گروه سیگاری و غیرسیگاری تفاوت معنی‌داری نداشت. بین میزان فعالیت آنزیم‌های هگزوکیناز و پیرووات کیناز با میزان آنتی‌اکسیدان‌های تام پلاسما، همبستگی مثبت معنی‌دار وجود داشت. بین میزان فعالیت آنزیم هگزوکیناز و همچنین مقدار آنتی‌اکسیدان‌های تام پلاسما با مدت زمان مصرف سیگار و تعداد نخ سیگار مصرف شده در روز، همبستگی منفی معنی‌دار دیده شده ولی هیچ‌گونه رابطه معنی‌داری بین میزان فعالیت آنزیم پیرووات کیناز با مدت زمان مصرف سیگار یا تعداد نخ سیگار مصرف شده در روز مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج بدست آمده، مشخص شد که در افراد سیگاری به دلیل مصرف سیگار، استرس اکسیداتیو ایجاد شده است و رادیکال‌های آزاد تولید شده باعث آسیب ساختار و کاهش فعالیت آنزیم هگزوکیناز در اریتروسیت‌های این افراد شده‌اند. به نظر می‌رسد آنزیم پیرووات کیناز دارای ساختار مقاوم‌تری نسبت به آنزیم هگزوکیناز بوده، به همین دلیل فعالیت آن در افراد سیگاری با افراد غیرسیگاری، تفاوت معنی‌دار ندارد.

کلیدواژه‌ها: ۱- هگزوکیناز ۲- پیرووات کیناز ۳- آنتی‌اکسیدان‌های تام ۴- استرس اکسیداتیو

تاریخ دریافت: ۸۴/۵/۱۶، تاریخ پذیرش: ۸۴/۹/۲۲

### مقدمه

دارای چهار ایزوآنزیم متفاوت است که آنها را با حروف A تا D و یا I تا IV مشخص می‌کنند و مبنای این نامگذاری، براساس ترتیب خروج از ستون کروماتوگرافی و یا افزایش حرکت الکتروفورتیکی آنها می‌باشد.<sup>(۱)</sup> این ایزوآنزیم‌ها دارای توزیع بافتی متفاوت

آنزیم هگزوکیناز (HK; EC 2.7.1.1; D-hexose 6-phosphotransferase) اولین واکنش در مسیر گلیکولیز را کاتالیز می‌کند. در طی این واکنش، فسفریلاسیون گلوکز با استفاده از ATP (Adenosine triphosphate) انجام شده و گلوکز ۶- فسفات تولید می‌شود. در پستانداران، هگزوکیناز

(I) دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی.

(II) استادیار گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران (\*مؤلف مسؤول).

(III) دانشیار گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران.

جهت انجام این مطالعه، NaCl (کلرید سدیم)، KCl (کلرید پتاسیم)، MgCl<sub>2</sub> (کلرید منیزیوم)، Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (فسفات دی‌سدیک)، NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (فسفات مونوسدیک)، EDTA (Ethylenediamine tetra-acetic acid)، DTT (dithiothreitol)، TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine)، گلوکز، تریس، اسید استیک، استات سدیم و سولفات آهن II از شرکت Merck و HEPES (Hydroxyethylpiperazine ethanesulphonic acid)، ATP، بتامرکاپتواتانول، سرم آلبومین گاوی و کلرید آهن III از شرکت Sigma و NADP<sup>+</sup> (Nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate)، NADH (Nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate)، PEP (Phosphoenol pyruvate)، G6PD (Glucose-6-Phosphate dehydrogenase) و LDH (Lactate dehydrogenase) از شرکت Roche خریداری شدند.

### روش بررسی

در این تحقیق که به روش مطالعه مقایسه‌ای (comparative study) انجام شد، ۱۳۰ فرد مورد مطالعه قرار گرفتند. ۶۵ فرد در گروه مورد (سیگاری) و ۶۵ فرد نیز در گروه شاهد (غیرسیگاری) قرار گرفتند. همگی این افراد، مذکر بوده و از سلامت کامل جسمانی برخوردار بودند و تنها تفاوت دو گروه، در مصرف سیگار بود، به نحوی که افرادی که حداقل روزانه ۱۰ نخ سیگار مصرف می‌کردند، در گروه مورد و افرادی که سیگار مصرف نمی‌کردند، در گروه شاهد قرار گرفتند. افراد گروه شاهد طوری انتخاب شدند که از لحاظ سنی مشابه گروه مورد باشند.

برای جمع‌آوری نمونه‌ها، نمونه خون صبحگاهی در شرایط ناشتا با ضد انعقاد EDTA گرفته شد و بلافاصله در ظرف حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. خون، سانتریفوژ شده و پلاسما برای اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان‌های تام، جدا گردید و به فریزر، با دمای ۸۵- درجه سانتی‌گراد منتقل شد. از باقیمانده خون نیز برای جدا کردن اریتروسیت‌ها استفاده شد.

برای جداسازی اریتروسیت‌ها از کاغذ Whatman شماره

هستند، بطوری که هگزوکیناز I بیش‌تر در مغز و اریتروسیت‌ها، هگزوکیناز II در ماهیچه و بافت چربی، هگزوکیناز III در کبد و کلیه و هگزوکیناز IV در سلولهای بتا پانکراس و هیپاتوسیت‌های کبد یافت می‌شوند.<sup>(۲)</sup>

آنزیم پیرووات کیناز (EC 2.7.1.40; PK2-O-Pyruvate phosphotransferase) آخرین واکنش در مسیر گلیکولیز را کاتالیز می‌کند. در طی این واکنش انتقال گروه فسفریل از فسفواپنول پیرووات به ADP (Adenosine diphosphate) انجام شده و پیرووات و ATP تولید می‌شوند. در پستانداران چهار ایزوآنزیم از پیرووات کیناز وجود دارد. این ایزوآنزیم‌ها را براساس نوع بافتی که در آن به میزان بیش‌تری وجود دارند، نامگذاری کرده‌اند، که شامل ایزوآنزیم‌های L (Liver)، R (Red blood cell)، M<sub>1</sub> و M<sub>2</sub> (Muscle) می‌باشند.<sup>(۳)</sup> این ایزوآنزیم‌ها از لحاظ خواص سینتیک، الکتروفوریک و ایمونولوژیک با یکدیگر تفاوت دارند و به نظر می‌رسد که متعلق به دو گروه مجزا هستند و هر گروه تحت کنترل یک ژن خاص قرار دارد. دو ایزوآنزیم L و R از ژن PK<sub>LR</sub> و با استفاده از پروموتورهای جداگانه تولید می‌شوند<sup>(۴)</sup>، در حالی که دو ایزوآنزیم M<sub>1</sub> و M<sub>2</sub> از ژن PK<sub>M</sub> و به کمک فرآیند alternative splicing ایجاد می‌شوند.<sup>(۵)</sup>

مصرف سیگار، همواره به عنوان یکی از عوامل ایجاد کننده فرآیند استرس اکسیداتیو مورد توجه قرار گرفته است. در اثر مصرف سیگار، رادیکال‌های آزاد متعددی در بدن تولید می‌شوند، که می‌توانند سبب آسیب ماکرومولکول‌های حیاتی بدن از جمله پروتئین‌ها شوند. آنزیم‌ها نیز به دلیل ساختار پروتئینی که دارند، نسبت به رادیکال‌های آزاد حساس هستند، بطوری که ساختار و بالتبع فعالیت آنها می‌تواند تحت تأثیر این مولکول‌ها قرار گیرد.<sup>(۱)</sup>

با توجه به نقش کلیدی آنزیم‌های هگزوکیناز و پیرووات کیناز در متابولیسم گلوکز و تولید ATP در اریتروسیت‌ها، در این مطالعه، تأثیر استرس اکسیداتیو حاصل از مصرف سیگار بر میزان فعالیت این دو آنزیم مورد بررسی قرار گرفته است که این کار برای اولین بار انجام شد.

برون سنجش و درون سنجش برای این آزمایش، به ترتیب ۵/۱٪ و ۳/۲٪ بود.

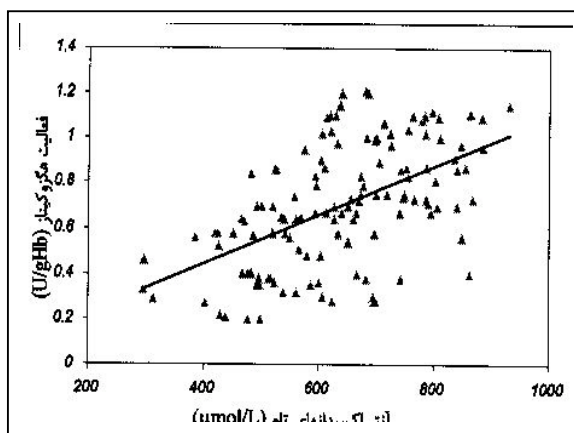
اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پیرووات کیناز به روش سنجش جفت شده با آنزیم لاکتات دهیدروژناز انجام شد.<sup>(۷)</sup> در این روش آنزیم پیرووات کیناز سبب انتقال گروه فسفریل از فسفوااینول پیرووات به ADP شده، که با تولید ATP و پیرووات همراه است. محصول واکنش فوق(پیرووات) به عنوان سوبسترای آنزیم لاکتات دهیدروژناز، مصرف شده که واکنش اخیر با مصرف NADH همراه است. میزان ANDH مصرف شده با اسپکتروفتومتر UV دو پرتویی Cecil مدل ۹۰۰۰ و در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیم عبارت است از فعالیت مقدار آنزیمی که در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در زمان ۱ دقیقه، یک میکرومول از NADH (معادل یک میکرومول از PEP) را مصرف کند. فعالیت ویژه آنزیم به صورت واحد بر گرم هموگلوبین (IU/gHb) بیان گردید. ضریب تغییرات برون سنجش و درون سنجش برای این آزمایش، به ترتیب ۳/۶٪ و ۲/۴٪ بود.

اندازه‌گیری مقدار آنتی‌اکسیدان‌های تام پلاسما به روش Benzie و همکارانش انجام شد.<sup>(۱۱)</sup> در این روش توانایی پلاسما در احیای یون فریک یا FRAP (Ferric reducing ability of plasma) اندازه‌گیری می‌شود. با این روش می‌توان مقدار هر ترکیب آنتی‌اکسیدان را که دارای خاصیت احیاءکنندگی باشد، تعیین کرد. برای انجام دادن این آزمایش، پس از تهیه محلول واکنشگر که شامل 2,4,6-tripyridyl-triazine، کلرید آهن و بافر استات بود، دمای محلول را به ۳۷ درجه سانتی‌گراد رسانده، سپس به ۹۰۰ میکرولیتر از این محلول، ۳۰ میکرولیتر پلاسما اضافه گردید و جذب بلافاصله و طی ۸ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. تفاوت میان مقدار جذب نهایی و جذب اولیه ( $\Delta A_{0.92nm}$ ) برای هر نمونه محاسبه شد و با استفاده از منحنی استاندارد، مقدار آن تعیین گردید. ترسیم منحنی استاندارد با استفاده از سولفات آهن صورت گرفت. نتیجه آزمایش به صورت میکرومول در لیتر گزارش گردید که در حقیقت مقدار  $Fe^{2+}$

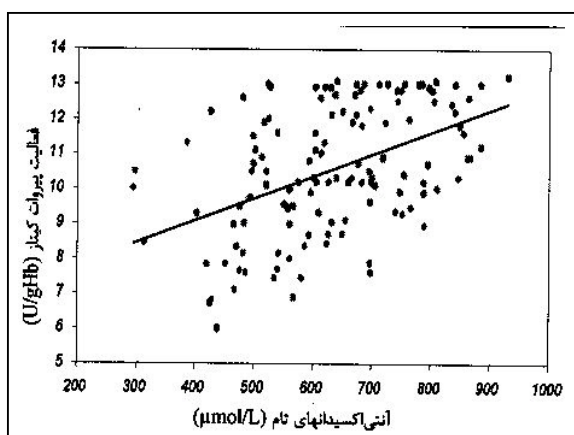
۲ استفاده شد.<sup>(۷)</sup> هر حجم از خون با پنج حجم از بافر (Buffered Saline-Glucose)BSG ( $NaH_2PO_4$ ,  $Na_2HPO_4$ )، NaCl و گلوکز با  $PH=7/4$  مخلوط شد. خون رقیق شده از کاغذ دولای Whatman که با بافر BSG مرطوب شده بود، عبور داده شد. این عمل با تعویض صافی برای بار دوم تکرار شد. نمونه خون صاف شده، دو بار با بافر BSG و بار سوم با محلول ایزوتونیک NaCl شستشو داده شد. در مرحله آخر پس از اینکه نمونه، سانتریفوژ و محلول رویی برداشته شد، با مخلوط کردن یک حجم از اریتروسیت‌های حاصل (Packed red cells) با یک حجم از محلول ایزوتونیک NaCl، سوسپانسیون ۵۰٪ از اریتروسیت‌ها تهیه شد.

برای تهیه همولیزات، از محلول پایدارکننده (Stabilizing solution) شامل بتا مرکاپتواتانول و EDTA با  $PH=7$  استفاده شد.<sup>(۸)</sup> هر حجم از سوسپانسیون ۵۰٪ از اریتروسیت‌ها با ۵ حجم از این محلول، مخلوط شد. همولیزاتی که به این طریق تهیه گردید، همولیزات ۱:۲۰ بوده که برای اندازه‌گیری فعالیت تمامی آنزیم‌های گلیکولیزی اریتروسیت‌ها مناسب می‌باشد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم هگزوکیناز به روش سنجش جفت شده (Coupled assay) با آنزیم گلوکز ۶-فسفات دهیدروژناز انجام شد.<sup>(۹، ۱۰)</sup> در این روش، آنزیم هگزوکیناز سبب تبدیل گلوکز به گلوکز ۶-فسفات می‌شود. محصول واکنش فوق(گلوکز ۶-فسفات) به عنوان سوبسترای آنزیم گلوکز ۶-فسفات دهیدروژناز، مصرف شده که واکنش اخیر با تولید Reduced from of Nicotinamide-(NADPH) همراه است. مقدار NADPH تولید شده با اسپکتروفتومتر UV دو پرتویی Cecil مدل ۹۰۰۰ و در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیم عبارت است از فعالیت مقدار آنزیمی که در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در زمان ۱ دقیقه، یک میکرومول از NADPH (معادل یک میکرومول از گلوکز ۶-فسفات) را تولید کند. فعالیت ویژه آنزیم به صورت واحد بر گرم هموگلوبین (IU/gHb) بیان گردید. ضریب تغییرات



نمودار شماره ۱- همبستگی میان میزان آنتی‌اکسیدان‌های تام پلاسما و میزان فعالیت آنزیم هگزوکیناز ( $r=0/546$  و  $P<0/001$ )



نمودار شماره ۲- همبستگی میان میزان آنتی‌اکسیدان‌های تام پلاسما و میزان فعالیت آنزیم پیرووات کیناز ( $r=0/474$  و  $P<0/001$ )

تولید شده می‌باشد. ضریب تغییرات برون سنجش و درون سنجش برای این آزمایش، به ترتیب ۲/۵٪ و ۱/۱٪ بود.

داده‌ها با نرم‌افزار SPSS (Version 11.5) پردازش شدند. بررسی‌های مقایسه‌ای، از طریق Independent-Samples T Test و همبستگی داده‌ها، با استفاده از Pearson Correlation مورد بررسی قرار گرفت. تمام داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شدند و اختلاف میان داده‌ها، زمانی معنی‌دار تلقی گردید که  $P<0/05$  بود. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel (Microsoft office XP) رسم شدند.

#### یافته‌ها

در جدول شماره ۱ نتایج مربوط به فاکتورهای بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده در دو گروه سیگاری و غیرسیگاری و مقدار P آنها نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، مقدار آنتی‌اکسیدان‌های تام پلاسما در افراد سیگاری، به میزان قابل توجهی کمتر از افراد غیرسیگاری است ( $P<0/001$ ). میزان فعالیت آنزیم هگزوکیناز در گروه سیگاری کاهش چشمگیری نسبت به گروه غیرسیگاری نشان می‌دهد ( $P<0/001$ ). اما در رابطه با فعالیت آنزیم پیرووات کیناز، اختلاف معنی‌داری بین دو گروه مشاهده نشد.

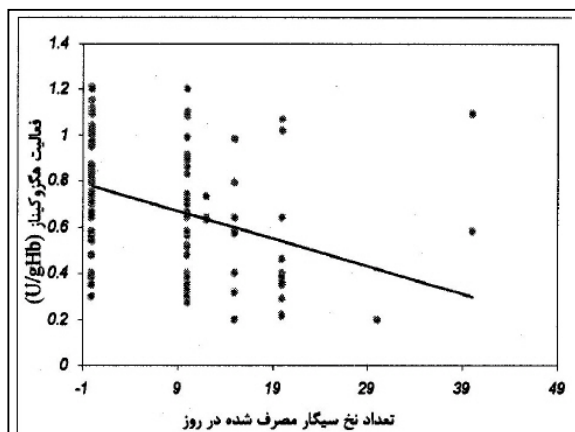
جدول شماره ۱- نتایج مربوط به فاکتورهای بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده در افراد سیگاری و افراد غیرسیگاری

| مقدار P  | افراد غیرسیگاری     | افراد سیگاری        |  |
|----------|---------------------|---------------------|--|
| $<0/001$ | $681/97 \pm 117/47$ | $582/56 \pm 137/59$ | آنتی‌اکسیدان‌های تام ( $\mu\text{mol/L}$ ) |
| $<0/001$ | $0/81 \pm 0/22$     | $0/58 \pm 0/26$     | فعالیت هگزوکیناز (IU/gHb)                  |
| NS       | $10/74 \pm 1/78$    | $10/28 \pm 1/88$    | فعالیت پیرووات کیناز (IU/gHb)              |

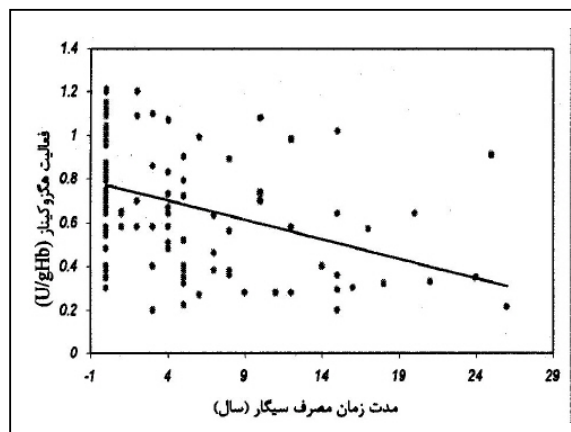
NS: اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد.

بین میزان فعالیت آنزیم هگزوکیناز و مقدار آنتی‌اکسیدان‌های تام پلاسما با مدت زمان مصرف سیگار، همبستگی منفی معنی‌دار مشاهده شد (به ترتیب  $r=-0/410$ ،  $r=-0/280$  و  $P<0/001$ ) (نمودارهای شماره ۳ و ۴).

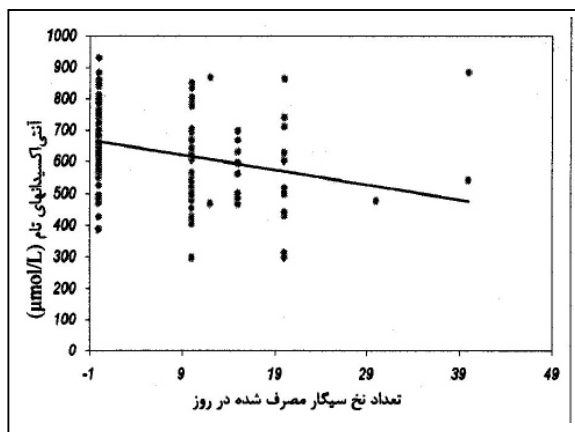
بین فعالیت آنزیم‌های هگزوکیناز، پیرووات کیناز و مقدار آنتی‌اکسیدان‌های تام پلاسما همبستگی مثبت معنی‌دار وجود داشت (به ترتیب  $r=0/546$ ،  $r=0/474$  و  $P<0/001$ ) (نمودارهای شماره ۱ و ۲).



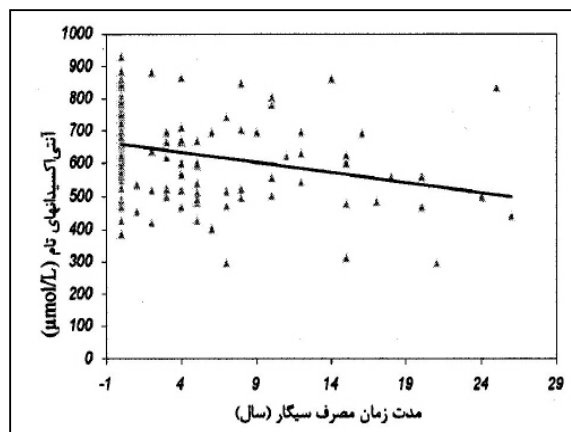
نمودار شماره ۵- همبستگی میان تعداد نخ سیگار مصرف شده در روز و میزان فعالیت آنزیم هگزوکیناز ( $r = -0.372$ ) و ( $P < 0.001$ )



نمودار شماره ۳- همبستگی میان مدت زمان مصرف سیگار و میزان فعالیت آنزیم هگزوکیناز ( $r = -0.410$ ) و ( $P < 0.001$ )



نمودار شماره ۶- همبستگی میان تعداد نخ سیگار مصرف شده در روز و میزان آنتی‌اکسیدان‌های تام پلاسما ( $r = -0.292$ ) و ( $P < 0.001$ )



نمودار شماره ۴- همبستگی میان مدت زمان مصرف سیگار و میزان آنتی‌اکسیدان‌های تام پلاسما ( $r = -0.280$ ) و ( $P < 0.001$ )

#### بحث

از اندازه‌گیری میزان آنتی‌اکسیدان‌های تام پلاسما، به عنوان شاخصی در تعیین استرس اکسیداتیو استفاده می‌شود. در افراد سیگاری به دلیل مصرف سیگار، میزان رادیکال‌های آزاد در بدن افزایش می‌یابد. بدن نیز برای مقابله با این ترکیبات مضر از آنتی‌اکسیدان‌ها استفاده می‌کند. در طی خنثی‌سازی و حذف رادیکال‌های آزاد، آنتی‌اکسیدان‌ها مصرف شده و مقدارشان کاهش می‌یابد. بنابراین در این

همچنین بین میزان فعالیت آنزیم هگزوکیناز و مقدار آنتی‌اکسیدان‌های تام پلاسما با تعداد نخ سیگار مصرف شده در روز نیز همبستگی منفی معنی‌دار مشاهده شد (به ترتیب  $r = -0.372$ ،  $r = -0.292$  و  $P < 0.001$ ) (نمودارهای شماره ۵ و ۶).

هیچ رابطه معنی‌داری بین فعالیت آنزیم پیرووات کیناز با مدت زمان مصرف سیگار و تعداد نخ سیگار مصرف شده در روز وجود نداشت.

این مولکول‌ها می‌شوند، بنابراین مقدار آنتی‌اکسیدان‌ها کاهش خواهد یافت.

فعالیت آنزیم هگزوکیناز در افراد سیگاری کاهش چشمگیری داشت. به نظر می‌رسد رادیکال‌های آزاد تولید شده به ساختار و فعالیت آنزیم هگزوکیناز صدمه رسانده‌اند، که این آسیب به صورت کاهش در میزان فعالیت آنزیم هگزوکیناز در گروه سیگاری نمایان شده است.

همچنین بین فعالیت آنزیم هگزوکیناز با مدت زمان مصرف سیگار و تعداد نخ سیگار مصرف شده در روز، همبستگی منفی معنی‌داری مشاهده شد. در این مورد نیز با افزایش مدت زمان مصرف سیگار و تعداد نخ سیگار مصرف شده در روز، میزان رادیکال‌های آزاد تولید شده و بالتبع آسیب ناشی از این مولکول‌ها افزایش می‌یابد.

میزان فعالیت آنزیم پیرووات کیناز در دو گروه با هم تفاوت معنی‌داری نداشت. همچنین هیچ ارتباط معنی‌داری بین فعالیت آنزیم پیرووات کیناز با مدت زمان مصرف سیگار و تعداد نخ سیگار مصرف شده در روز دیده نشد. به نظر می‌رسد آنزیم پیرووات کیناز دارای ساختمان مقاوم‌تری نسبت به آنزیم هگزوکیناز بوده، بطوری که استرس اکسیداتیو حاصل از مصرف سیگار بر روی فعالیت این آنزیم تأثیری ندارد.

#### نتیجه‌گیری

مقایسه مقادیر مربوط به آنتی‌اکسیدان‌های تام پلاسما در دو گروه سیگاری و غیرسیگاری نشان می‌دهد که مقدار این مواد در پلاسماهای افراد سیگاری به میزان چشمگیری کمتر از افراد غیرسیگاری است و در این افراد، استرس اکسیداتیو ایجاد شده است و چون فعالیت آنزیم هگزوکیناز موجود در (Red blood cell) RBC این افراد نیز کاهش یافته، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که استرس اکسیداتیو حاصل از مصرف سیگار به داخل سلول نیز منتقل شده است. با توجه به اینکه RBC فاقد هسته بوده و قدرت جایگزینی پروتئین‌های قدیمی (پروتئین‌های آسیب دیده) را با پروتئین‌های جدید ندارد؛ لذا این کاهش، جبران ناپذیر بوده و با گذشت زمان، سبب ناتوانی RBC شده و اصلی‌ترین

افراد کاهش مقدار آنتی‌اکسیدان‌ها، دلیلی برای وقوع پدیده استرس اکسیداتیو می‌باشد.<sup>(۱۲ و ۱۳)</sup> در این مطالعه مشخص شد که مقدار آنتی‌اکسیدان‌های تام در پلاسماهای افراد سیگاری به میزان قابل توجهی کمتر از افراد غیرسیگاری است، که نشان دهنده وقوع استرس اکسیداتیو در اثر مصرف سیگار در این افراد می‌باشد.

اریتروسیت‌ها در طی بلوغ، هسته و بسیاری از اندامک‌های خود را از دست می‌دهند و به دلیل از دست دادن هسته قادر به سنتز پروتئین جدید نیستند؛ لذا در طی زندگی ۱۲۰ روزه خود متکی به آنزیم‌های گلیکولیزی هستند که از ابتدا داشته‌اند.<sup>(۷)</sup> آنزیم‌های موجود در اریتروسیت همانند سایر پروتئین‌های آن دارای ساختارهای حساس هستند و برای اینکه بتوانند به طور مناسب فعالیت کنند، لازم است که ساختار خود را حفظ کنند. هر عاملی که به نحوی سبب آسیب ساختار آنزیمی شود، فعالیت آنزیم را نیز دچار اختلال خواهد کرد و به نظر می‌رسد به دلیل فقدان هسته و قدرت سنتز پروتئین، این آسیب جبران ناپذیر خواهد بود. رادیکال‌های آزاد که در اثر مصرف سیگار تولید می‌شوند، می‌توانند به ساختار و فعالیت آنزیم‌ها صدمه برسانند. در مقابل، ترکیبات آنتی‌اکسیدان با حذف رادیکال‌های آزاد به حفظ ساختار و فعالیت آنزیم‌ها، در مقابل این ترکیبات مضر کمک می‌کنند.<sup>(۱۴)</sup> بنابراین به نظر می‌رسد که بین میزان فعالیت آنزیم‌ها و میزان آنتی‌اکسیدان‌ها ارتباط وجود داشته باشد. در این مطالعه مشخص شد که بین فعالیت آنزیم‌های هگزوکیناز و پیرووات کیناز و میزان آنتی‌اکسیدان‌های تام پلاسما، همبستگی مثبت معنی‌دار وجود دارد که موضوع اخیر را تأیید می‌کند.

بین میزان آنتی‌اکسیدان‌ها با مدت زمان مصرف سیگار و تعداد نخ سیگار مصرف شده در روز، همبستگی منفی معنی‌دار دیده شد. این امر کاملاً منطقی به نظر می‌رسد. زیرا هر چه مدت زمان مصرف سیگار و یا تعداد نخ سیگار مصرف شده بیشتر شود، رادیکال‌های آزاد بیش‌تری تولید شده و مقدار بیش‌تری از آنتی‌اکسیدان‌ها صرف خنثی‌سازی

relationship to cell death. American Journal of Haematology 1980; 8: 31-42.

8- Beutler E, Blume KG, Kaplan JC, Lohr GW, Ramot B, Valentine WN. International committee for standardization in haematology: recommended methods for red-cell enzyme analysis. British Journal of Haematology 1977; 35: 331-40.

9- Ehsani Zonouz A, Golestani A, Nemat-Gorgani M. Interaction of hexokinase with the outer mitochondrial membrane and a hydrophobic matrix. Molecular and Cellular Biochemistry 2001; 223: 81-7.

10- Arora KK, Pedersen PL. Glucose utilization by tumor cells: the enzyme hexokinase autophosphorylates both its N- and C-terminal halves. Archives of Biochemistry and Biophysics 1993; 304(2): 515-8.

11- Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. Analytical Biochemistry 1996; 239: 70-6.

12- Sobczak A, Golka D, Szoltysek-Boldys I. The effects of tobacco smoke on plasma alpha-and gamma-tocopherol levels in passive and active cigarette smokers. Toxicology Letters 2004; 151: 429-37.

13- Elsayod NM, Bendich A. Dietary antioxidants: potential effects on oxidative products in cigarette smoke. Nutrition Research 2001; 21: 551-67.

14- Cotgreave IA, Gerdes RF. Recent trends in glutathione biochemistry-glutathione protein interactions: A molecular link between oxidative stress and cell proliferation? Biochemical and Biophysical Research Communications 1998; 242: 1-9.

مسیر تولید ATP در این سلولها (گلیکولیز) را مختلف می‌سازد.

چنانچه افراد سیگاری قادر به ترک سیگار و یا کاهش تعداد نخ سیگار مصرف شده نباشند، می‌توان با گنجاندن مقدار آنتی‌اکسیدان‌های بیش‌تر در رژیم غذایی‌شان از اثرات مخرب و اکسیداتیو رادیکال‌های آزاد حاصل از مصرف سیگار بر RBC جلوگیری کرد.

#### تقدیر و تشکر

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران در گروه دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی انجام گردیده است، که بدین وسیله نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین آن مراکز ابراز می‌دارند.

#### فهرست منابع

1- Rijkssen G, Schoop IBI, Staal GEJ. Properties of human erythrocyte hexokinase related to cell age. Clinical Chemical Acta 1977; 80: 193-202.

2- Kanno H. Hexokinase: gene structure and mutations. Bailliere's Clinical Haematology 2000; 13(1): 83-8.

3- Wooll JO, Friesen RHE, White MA, Watowich SJ, Fox RO, Ching Lee J, et al. Structural and functional linkages between subunit interfaces in mammalian pyruvate kinase. Journal of Molecular Biology 2001; 312: 525-40.

4- Noguchi R, Yamada K, Inove H, Matsuda T, Tanaka T. The L- and R-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from a single gene by use a different promoters. The Journal of Biological Chemistry 1987; 262(29): 14366-71.

5- Noguchi T, Inove H, Tanaka T. The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing. The Journal of Biological Chemistry 1986; 261(29): 13807-12.

6- Deaton CM, Marlin DJ. Exercise-associated oxidative stress. Clinical Techniques in Equine Practice 2003; 2(3): 278-91.

7- Seaman C, Wyss S, Piomelli S. The decline in energetic metabolism with aging of the erythrocyte and its

## *The Effect of Oxidative Stress Induced by Cigarette Smoking on the Activities of Hexokinase and Pyruvate Kinase Glycolytic Enzymes in Erythrocytes of Smokers*

F. Bahmani, MSc<sup>I</sup>      \*A.V. Ehsani Zonouz, Ph.D.<sup>II</sup>      M. Firoozrai, Ph.D.<sup>III</sup>

### *Abstract*

**Background & Aim:** Hexokinase and pyruvate kinase are two regulatory enzymes of glycolytic pathway in erythrocytes. Increasing evidence suggests that cigarette smoking which produces free radicals and oxidative stress can cause damage to body macromolecules such as proteins and enzymes. The aim of the present study was to investigate the susceptibility of key enzymes of erythrocytes glycolytic pathway (hexokinase and pyruvate kinase) in smokers.

**Patients & Methods:** Sixty-five smokers and 65 age and sex-matched healthy non-smokers were enrolled in the study. The total activities of hexokinase and pyruvate kinase and total plasma antioxidants were measured and then compared in both smokers and non-smokers.

**Results:** Results showed that hexokinase activity and total plasma antioxidants were significantly lower in smokers than non-smokers, but the activity of pyruvate kinase did not differ significantly from values obtained in non-smokers. The activities of hexokinase and pyruvate kinase were positively correlated with the total plasma antioxidants. The activity of hexokinase and total plasma antioxidant were negatively correlated with duration and also with cigarette number smoking per day, but there was not any significant correlation between activity of pyruvate kinase and duration and also cigarette number smoking per day.

**Conclusion:** It seems that smokers undergo an important oxidative stress due to cigarette smoking. Also, free radicals produced in this process can damage the structure of hexokinase and then reduce hexokinase activity in erythrocytes of smokers. It seems that pyruvate kinase has more stability than hexokinase, and its activity does not differ significantly in smokers from non-smokers.

**Key Words:** 1) Hexokinase    2) Pyruvate Kinase    3) Total Plasma Antioxidants

4) Oxidative Stress

*I) MSc Student of Biochemistry. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.*

*II) Assistant Professor of Biochemistry Department. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran. (\*Corresponding Author)*

*III) Associate Professor of Biochemistry Department. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.*