

بررسی عملکرد IRFI005 در حذف رادیکال های آزاد داخل و خارج سلول

منوچهر قوجائی^{۱*}، ابوالفضل برزگر^۲، رضا اسدزاده^۳

(۱) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بناب

(۲) گروه زیست شناسی، مرکز تحقیقات علوم پایه، دانشگاه تبریز

(۳) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اورمیه

تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۱۸

تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۷

چکیده

مقدمه: آنتی اکسیدان ها مولکول هایی هستند که مانع عمل رادیکال های آزاد شده و ویتامین E یکی از مهم ترین ترکیبات آنتی اکسیدانی محسوب می شود. این ویتامین در آب نامحلول است و همین مسئله کاربرد آن در محیط های قطبی را محدود می سازد. در حال حاضر بررسی های زیادی برای استفاده از آنالوگ های محلول در آب این ترکیب انجام می پذیرد. در این مطالعه به منظور بررسی خواص مورد انتظار ویتامین E در محیط های قطبی از IRFI005 که آنالوگ قطبی و صناعی ویتامین E می باشد استفاده شد.

مواد و روش ها: بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی برون سلولی IRFI005 به روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۳۰ nm و با استفاده از رادیکال آزاد Galvinoxyl در غلظت های مولی ۱:۴ و ۱:۲ (IRFI005:Galvinoxyl) مورد بررسی قرار گرفت. اثر درون سلولی $5 \mu\text{M}$ از IRFI005 نیز به روش DCF و با استفاده از پروپ رنگی DCFH_2 DA و کیومن هیدرو پروکساید بررسی شد.

یافته های پژوهش: IRFI005 در خارج و داخل سلول باعث مهار فعالیت اکسیدانی می شود. رادیکال Galvinoxyl در نسبت ۱:۲ دارای جذب نوری (OD) پایین تری می باشد و کاملاً از محیط حذف شده است. هر مولکول IRFI005 قادر به حذف دو مولکول رادیکال آزاد می باشد. در داخل سلول نیز IRFI005 باعث سرکوب اثر کیومن هیدرو پروکساید و مهار افزایش شدت فلورسانس می شود.

بحث و نتیجه گیری: یافته ها نشان می دهد که در محیط قطبی، IRFI005 یک آنتی اکسیدان بسیار قوی، وابسته به دوز و فعال است که به خوبی باعث مهار مولکول اکسیدان در داخل و خارج سلول می گردد.

واژه های کلیدی: رادیکال آزاد، آنتی اکسیدان، ویتامین E، IRFI005

*نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بناب

مقدمه

در آب نامحلول می باشد، (۱۳). این ویژگی باعث می شود که در محیط های قطبی مثل آب میان بافتی، خون و سیتوزول نقش چندانی نداشته باشد. امروزه تلاش های بسیار زیادی در جهت استفاده از آنالوگ های صناعی محلول در آب این ترکیب صورت می پذیرد و ما نیز در همین راستا از آنالوگ IRFI005 استفاده کردیم که مطالعات بسیار کمی بر روی آن صورت پذیرفته است، (۴)(نمودار شماره ۱). فرمول شیمیایی IRFI005 نشان می دهد که این مولکول یک ترکیب قطبی است و در اثر داستیلاسیون مولکول (IRFI0016) Raxofelast به وجود می آید. در بسیاری از مطالعات داروشناسی فعالیت آنتی اکسیدانی IRFI0016 به اثبات رسیده است، (۴). هدف این مطالعه نشان دادن خواص آنتی اکسیدانی IRFI005 در محیط های قطبی درون و برون سلولی است.

مواد و روش ها

این مطالعه از نوع مطالعات بنیادی-کاربردی می باشد و برای انجام آن، کیومن هیدرو پراکساید (CHP: cumene hydro peroxide)، محیط کشت (DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)، آنتی بیوتیک های مختلف از جمله پنی سیلین، استرپتومایسین و تریپسین و رادیکال آزاد 2,6-di-tert-butyl-alpha-(3,5-ditert-butyl-4-oxo-2,5-cyclohexadien-1-ylidene)-p-tolyloxy (Galvinoxyl) از شرکت Sigma آمریکا خریداری شد. پروپ رنگی (DCFH₂-DA) 2',7'-dichlor-odihydrofluorescein diacetate برای مطالعه اکسیدانت داخل سلولی از Molecular Probes Inc (Eugene) تهیه شد. هیدرات دی سدیم فسفات و اسیدفسفریک از شرکت Merk آلمان خریداری گردید. فلاسک کشت سلول، پلیت های چند حفره ای و لوله های سانتریفوژ از شرکت Falcon دانمارک و سرم جنین گاوی (FBS) از شرکت GIBCO (Grand Island, NY) تهیه شدند. برای تهیه بافرها و دیگر نمونه ها از آب دیونیزه حاصل از دستگاه شرکت MicroMed-TKA استفاده گردید. مولکول های IRFI005 از ایتالیا و به صورت پودر تهیه شد و به منظور نگهداری در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد، محلول استوک از IRFI005 در حلال DMSO (برای ممانعت از تشکیل بلور یخ) تهیه و برای مطالعات از آن استفاده شد. (۱۵)

رادیکال های آزاد به طور پیوسته در داخل سلول به عنوان محصولات جانبی واکنش های متابولیک تولید می گردند. قرار گرفتن در معرض پرتوها نیز به عنوان یک منبع برون زاد می تواند باعث تشکیل رادیکال های آزاد گردد، (۱). رادیکال های آزاد ترکیبات دارای الکترون جفت نشده هستند، (۲)، که توانایی آسیب زدن به بسیاری از مولکول های زیستی مثل نوکلئیک اسیدها، پروتئین ها و لیپیدها را دارا می باشند و باعث ایجاد نقص در ساختار و عملکرد این مولکول ها می گردند، (۳-۵). به همین علت یکی از عوامل اصلی پدیده پیری و بیش از ۱۰۰ نوع بیماری مختلف می باشند، (۶). موجودات زنده جهت مقابله و خنثی نمودن اثر این گونه مواد واکنشگر، دارای ساز و کارهای مختلفی از جمله سیستم های دفاعی آنتی اکسیدانی می باشند که از آن ها می توان به پروتئین ها و آنزیم هایی مانند کاتالاز، پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز، (۷)، و مولکول های کوچکی مثل کومارین ها، (۸)، فلاوونوئیدها، (۹)، و ویتامین ها، (۱۰، ۱۱)، اشاره کرد. کاهش دسترسی زیستی به آنتی اکسیدان ها می تواند منجر به آسیب های بافتی القاء شده توسط گونه های فعال اکسیژن (ROS) شود، (۱۰). ویتامین E به عنوان یک مولکول آنتی اکسیدان، به وسیله ممانعت از تشکیل ROS، سلول ها را از آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو محافظت می نماید، (۱۱). در واقع این ویتامین، ROS را به محصولات بی ضرر تبدیل می کند، (۱۲). ویتامین E در سال ۱۹۲۲ به عنوان ترکیب محلول در چربی ضروری برای تولید مثل موش شناخته شد. در سال ۱۹۵۰ نیز شوارتز آن را به عنوان فاکتور ۲ معرفی کرد و در فهرست سیستم های آنتی اکسیدان سلولی قرار داد، (۱۳). امروزه ثابت شده است که ویتامین E از پراکسیداسیون لیپید و رادیکال های مشتق شده از دیگر واکنش های اکسیداتیو ممانعت به عمل می آورد، (۱۴). با توجه به ساختمان مولکول ویتامین E، آن را می توان به دو بخش تقسیم کرد، (نمودار شماره ۱) یک بخش آن دارای سیستم آروماتیک حمل کننده عامل هیدروکسیل است که مسئول ویژگی های آنتی اکسیدانی ویتامین می باشد و به هسته کرومان معروف است. بخش دیگر آن از زنجیره های هیدروکربنی اشباع (توکوفرول) و یا غیراشباع (توکوتری انول) تشکیل شده است که در حالایت آن در چربی ها ایفای نقش می کنند، (۱). فرم فعال ویتامین E آلفا توکوفرول نام دارد. ویتامین E به دلیل داشتن دم هیدروفوب طولانی شدیداً غیرقطبی است و به همین دلیل

رادیکال Galvinoxyl در طول زمان مورد مطالعه، با استفاده از اسپکتروسکوپی جذبی (Perkin-Elmer Lambda EZ 201, Roma, Italia) و در طول موج ۴۳۰ nm بررسی شد.

بررسی اثرات آنتی اکسیدانی داخل سلولی IRFI005: برای مطالعه اثر آنتی اکسیدانی داخل سلولی IRFI005 از روش DCF استفاده شد، (۱۵،۱۶،۲۶). پروب رنگی DCFH₂-DA مورد استفاده در این روش که یک ماده هیدروفیلک است به طور معمول برای بررسی توانایی مولکول آنتی اکسیدان در جلوگیری از انتشار نور فلورسانس به کار گرفته می شود، (۲۰،۲۶،۲۷). در این بررسی ابتدا سلول های کشت داده شده به مدت نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در معرض DCFH₂-DA با غلظت ۱۰ μM قرار گرفتند. این مولکول به راحتی از غشاء سلولی عبور می کند ولی فاقد خاصیت فلورسانس می باشد، (۲۶). در داخل سلول گروه استات آن توسط آنزیم استراز برداشته شده و به DCFH₂ تبدیل می گردد، (۲۶). مولکول DCFH₂ در حضور رادیکال های آزاد و مخصوصاً ROS به راحتی اکسیده شده و تبدیل به DCF می شود که شدیداً فلورسانس می باشد، (۴،۲۶). پس از رقیق سازی CHP در DMSO با نسبت ۱ به ۱۰۰، این عامل به عنوان جزء ایجاد کننده رادیکال استفاده شد، (۲۲،۲۸). CHP یکی از عوامل اکسید کننده است که به عنوان منبع واسطه های فعال اکسیژن در داخل سلول مورد استفاده قرار می گیرد، (۲۸). بعد از تیمار، سلول ها دو بار با بافر PBS (phosphate-buffered saline) دارای دمای ۳۷ درجه سانتی گراد شستشو و در دور ۱۲۰۰ RPM به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردیدند و مجدداً در حضور ۵ μM از IRFI005 قرار گرفتند. ارزیابی نمونه ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفلورسانس (Hitachi F-2700, Japan) در طول موج تحریک ۴۹۸ nm و نشر ۵۳۰ nm صورت پذیرفت. افزایش ROS داخل سلولی منجر به اکسید شدن DCFH₂ می شود و در صورت حضور مولکول های IRFI005 که دارای اثرات ضد اکسیدانی باشد این خاصیت قابل ارزیابی است.

یافته های پژوهش

نتایج طیف سنجی بر اساس رادیکال آزاد Galvinoxyl در نمودار شماره ۲ نشانگر میزان احیای Galvinoxyl با غلظت های مختلف IRFI005 در طول موج ۴۳۰ nm می باشد. بعد از ۲ دقیقه نسبت های مولی مختلف از IRFI005 بر روی رادیکال Galvinoxyl

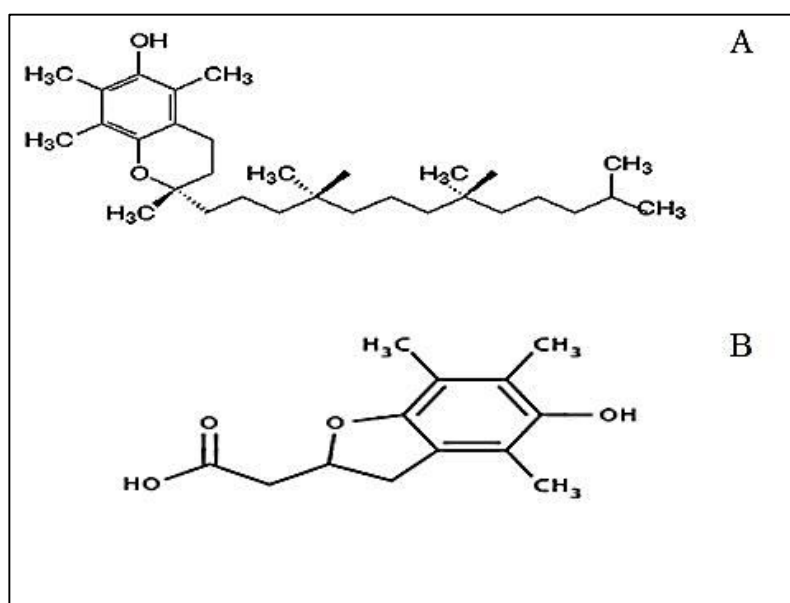
آماده سازی کشت های سلولی: برای انجام این بررسی از سلول های عضلات اسکلتی موش (L6) که از American Type Culture Collection (CRL1458; Rockville, MD) تهیه شده بودند استفاده شد. سلول های L6 قبلاً برای سنجش ROS داخل سلولی، به عنوان یک مدل آزمایشگاهی، مورد استفاده قرار گرفته اند، (۱۶،۱۷). سلول ها در فلاسک های متوسط با سطح ۷۲ cm² و با استفاده از محیط کشت DMEM، ۲ mmol/L مکمل های گلوتامین، ۱۰۰ U/ml پنی سیلین، ۱۰۰ mg/ml استرپتومایسین و سرم جنین گاوی (vol/vol) ۱۰ درصد در محیط دارای ۵ درصد دی اکسید کربن و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند. پس از گذشت ۵ روز، رشد سلول ها باعث پوشش کامل سطح کشت فلاکس ها شد، به طوری که هر فلاسک با سطح ۷۲ cm² حاوی تعداد ۶×۱۰^۶ سلول بود و از طریق پاساژ مداوم به عنوان سلول های میوبلاست نگهداری شدند.

بررسی اثر آنتی اکسیدانی خارج سلولی IRFI005: توانایی ترکیب آنتی اکسیدان برای حذف رادیکال های آزاد توسط دو فاکتور بررسی می شود: ۱) سرعت حذف رادیکال های آزاد و ۲) تعداد رادیکال هایی که هر مولکول آنتی اکسیدان می تواند حذف کند، (۱۸-۲۰). این دو پارامتر را می توان به وسیله رادیکال های آزاد استاندارد برای مطالعات آنتی اکسیدانی مثل 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) و Galvinoxyl اندازه گیری کرد، (۱۸-۲۰)، و برای انجام این کار می توان از یک دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده نمود، (۲۰). بررسی اثرات آنتی اکسیدانی خارج سلولی IRFI005 بر اساس روش استفاده شده توسط سایر محققین انجام پذیرفت که اثر آنتی اکسیدانی یک ترکیب خاص را بر روی این رادیکال های آزاد استاندارد مطالعه کرده بودند، (۲۱-۲۳). در این بخش، حداقل غلظت لازم از IRFI005 برای از بین بردن و زدودن کامل رادیکال های Galvinoxyl در مدت زمان ۱۰ دقیقه مورد مطالعه قرار گرفت. برای این کار ۱ ml از محلول Galvinoxyl دارای غلظت ۱۰ μM با حداکثر ۱۰ μL از محلول IRFI005 مخلوط گردید تا غلظت های ۱:۲ و ۱:۴ (Galvinoxyl : IRFI005) تهیه گردد. غلظت های مختلف تهیه شده، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بر روی ۲ ml بافر تریس (۲۰ mM، PH=۷/۴) اضافه شد و PH با استفاده از HCL با غلظت ۰/۱ mM و NaOH دارای غلظت ۰/۱ mM بر روی عدد ۶/۸ تنظیم گردید، (۱،۲۴،۲۵). تغییرات طیفی شدت ماکزیمم جذب

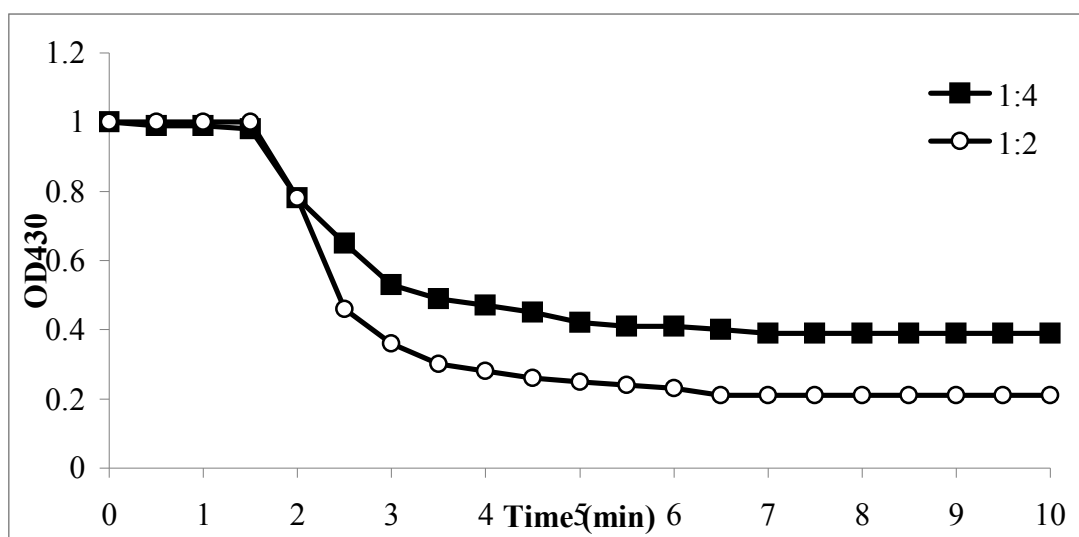
۲ شدت فلورسانس تقریباً ثابت است ولی افزودن CHP در دقیقه ۲ باعث افزایش سریع شدت فلورسانس شد که همین افزایش نشان دهنده به وجود آمدن سریع گونه های فعال اکسیژن به وسیله CHP می باشد. در این بخش به دلیل تیمار سلول ها در دقیقه ۵ با غلظت $5 \mu\text{M}$ از IRFI005، IRFI005 باعث سرکوب اثر CHP می شود که در نهایت جلوگیری از افزایش شدت فلورسانس DCF را به دنبال دارد. (نمودار شماره ۳) ایجاد شکستگی در نمودار شدت فلورسانس DCF با اضافه کردن IRFI005 بیانگر توانایی نفوذ IRFI005 به داخل سلول می باشد.

اضافه می شود. غلظت $1:4$ دارای OD افزایش یافته ای در مقایسه با غلظت $1:2$ می باشد که نشانگر ناکافی بودن توان یک مولکول IRFI005 برای زدودن ۴ مولکول رادیکال آزاد می باشد، در حالی که در غلظت مولی $1:2$ هر دو رادیکال کاملاً از محیط زدوده می شود و این امر باعث کاهش OD می گردد. این یافته بیانگر این امر است که هر مولکول IRFI005 قادر به حذف دو مولکول رادیکال آزاد Galvinoxyl از محیط می باشد.

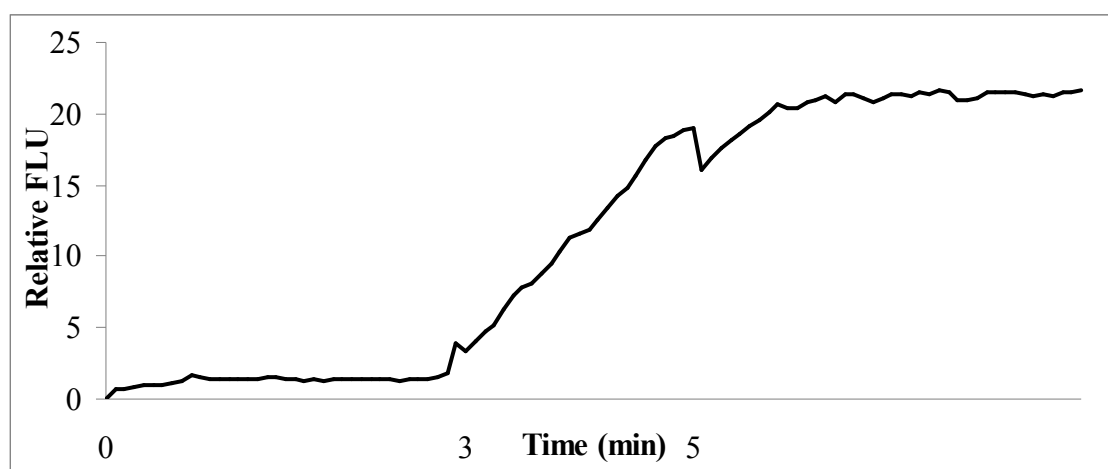
برای مطالعه میزان فعالیت آنتی اکسیدانی داخل سلولی IRFI005 از کشت سلولی میوبلاست استفاده شد. تا دقیقه



نمودار شماره ۱. A) مولکول ویتامین E: دارای دم هیدروکربنی بلند و بخش آروماتیک کرومان در قسمت سر، (۱). B) مولکول IRFI005: دارای گروه هیدروکسیل در زنجیره جانبی کوتاه خود و بخش آروماتیک کرومان در قسمت سر. (۴)



نمودار شماره ۲. مقایسه توان حذف رادیکال آزاد Galvinoxyl توسط IRFI005 در غلظت های مختلف: حضور غلظت های مختلف IRFI005 Galvinoxyl باعث احیاء و از بین رفتن رادیکال مذکور می گردد. غلظت ۱:۴ دارای OD افزایش یافته ای در مقایسه با غلظت ۱:۲ می باشد که نشانگر ناکافی بودن یک مولکول IRFI005 برای زدودن ۴ مولکول رادیکال آزاد می باشد، در حالی که در غلظت مولی ۱:۲ هر دو رادیکال کاملاً از محیط زدوده می شود و این امر باعث کاهش بیشتر OD در مقایسه با غلظت ۱:۴ می گردد.



نمودار شماره ۳. اثرات ضد اکسیدانی داخل سلولی IRFI005: افزودن CHP بعد از ۲ دقیقه افزایش سریع شدت فلورسانس را در پی داشت. این افزایش شدت فلورسانس نشانگر تشکیل گونه های فعال اکسیژن توسط CHP می باشد. در ادامه افزودن ۵ μM از IRFI005 (در دقیقه ۵) منجر به مهار اثر CHP شده و از افزایش شدت فلورسانس DCF جلوگیری می کند. ایجاد شکستگی در نمودار شدت فلورسانس DCF با اضافه کردن IRFI005 بیانگر توانایی نفوذ IRFI005 به داخل سلول می باشد و افزایش مشاهده شده بعد از دقیقه ۵ بیانگر مدت زمانی است که طول می کشد تا IRFI005 مولکول اکسیدان را به طور کامل مهار کند و بعد از آن، اثر آنتی اکسیدانی IRFI005 با ثابت کردن شدت فلورسانس مشهود می باشد.

بحث و نتیجه گیری

ویتامین E یک مولکول آنتی اکسیدان محلول در چربی است که بیشترین غلظت آن در غشاهای سلولی و به ویژه غشاهای میتوکندری و میکروزوم ها مشاهده می شود، (۴،۱۴). مولکول IRFI005 یکی از آنالوگ های صناعی ویتامین E بوده که به دلیل قطبی بودن در محیط قطبی مثل آب محلول می باشد و می تواند در محیط های آبی خواص آنتی اکسیدانی خوبی داشته باشد، (۴) (نمودار شماره ۱). در PH فیزیولوژیک گروه هیدروکسل موجود در موقعیت ۲ زنجیره جانبی این ترکیب موجب حلالیت آن در محیط های آبی می گردد، (۴)

رادیکال های آزاد Galvinoxyl در ۴۳۰ nm دارای ماکزیمم جذب می باشند، (۲۰). نتایج حاصل از مطالعات طیف سنجی جذبی برای Galvinoxyl نشان می دهد احیاء مولکول های رادیکال آزاد Galvinoxyl به مولکول های پایدار خنثی باعث از بین رفتن شدت جذب آن ها در طول موج ۴۳۰ nm می شود. (نمودار شماره ۲) تغییرات مذکور نشان دهنده به وجود آمدن مولکول های جدید و پایدار از رادیکال آزاد در حضور IRFI005 می باشد. این داده ها هم چنین گویای این واقعیت است که در غلظت های مختلف IRFI005، رادیکال آزاد سریعاً احیاء می شود و در غلظت مولی ۱:۲ رادیکال آزاد کاملاً از بین می رود. یافته های یک بررسی دیگر نیز از وابسته به دوز بودن میزان فعالیت این ترکیب حکایت می کند، به طوری که با افزایش غلظت IRFI005 میزان فلورسانس DCF نیز رو به کاهش می گذارد، (۴). یافته های مطالعه حاضر دلالت بر توانایی و پتانسیل بالای IRFI005 برای حذف رادیکال های آزاد فعال در مدت زمان کم (در حدود ۵ دقیقه) و غلظت کمتر رادیکال آزاد در حضور یک غلظت ثابت از این آنالوگ صناعی ویتامین E دارد به طوری که در نسبت ۱:۲ شدت جذب Galvinoxyl در مقایسه با نسبت ۱:۴ کاهش نشان می دهد. (نمودار شماره ۲) لذا به احتمال می توان پیش بینی کرد که IRFI005 می تواند یک آنتی اکسیدان مناسب برای بافت ها و سلول ها باشد بدین معنی که با به کار بردن یک نسبت معین برای حذف دو نسبت از رادیکال، در مدت زمان اندک عمل آنتی اکسیدانی خود را اعمال می کند. در طی یک بررسی بر روی توانایی IRFI005 مشخص شد که این مولکول فعالیت احیاء کنندگی بسیار خوبی برای سوپر اکسید را داراست. هم چنین آن ها نشان دادند که این مولکول توانایی جاروب رادیکال های ارگانیک

مثل بی پریدینیوم و آنتراسایکلین را به خوبی دار می باشد. (۴)

مطالعه اثرات آنتی اکسیدانی داخل سلولی نیز نشان می دهد که CHP یک ترکیب اکسیدانت بسیار قوی است و اثر آن برای افزایش ROS داخل سلولی آبی می باشد، زیرا افزودن CHP در دقیقه ۲ باعث افزایش سریع شدت فلورسانس شد. (نمودار شماره ۳) CHP یکی از عوامل اکسیدکننده است که به عنوان منبع واسطه های فعال اکسیژن در داخل سلول مورد استفاده قرار می گیرد، (۲۵). مولکول DCFH₂ در حضور رادیکال های آزاد و مخصوصاً ROS به راحتی اکسیده شده و تبدیل به DCF می شود که شدیداً فلورسانس می باشد و همین افزایش شدت فلورسانس در اثر افزوده شدن CHP در نمودار شماره ۳ دیده می شود که بیانگر تولید ROS می باشد، (۴،۲۶). این شکل هم چنین نشان می دهد که در غلظت ۵ μM، اثرات آنتی اکسیدانی داخل سلولی IRFI005 به قدری است که کاملاً اثرات اکسیدانی CHP مهار شده است. این یافته ها بیانگر این مطلب می باشد که مولکول IRFI005 در محیط داخل سلول به طور کامل فعال و اکتیو است و باعث مهار اثرات CHP می شود. در آزمون DCF، شدت فلورسانس با شدت CHP داخل سلول متناسب است. در این آزمون افزودن CHP بعد از ۲ دقیقه باعث افزایش آبی شدت فلورسانس شد ولی در ادامه، افزودن ۵ μM از IRFI005 (در دقیقه ۵) منجر به مهار اثر CHP شده و از افزایش شدت فلورسانس DCF جلوگیری کرد.

در طی یک مطالعه، ۱ μM از IRFI005 باعث شد که تولید اشکال فعال تیو باریتورات در سلول های اپیتلیال برونش ها تا میزان ۶۵ درصد و در ماکروفاژهای ریوی تا ۶۲ درصد کاهش پیدا کند، (۲۹). در یک بررسی نیز مشخص شد که غلظت ۵-۵۰۰ μM از IRFI005 میزان شدت فلورسانس DCF را در سلول های لنفوئید انسانی K-562 کاهش و حتی متوقف ساخت و نقش محافظتی داخل سلولی را برای آن پیشنهاد نمود. (۴)

به طور کلی آنتی اکسیدان ها، رادیکال های آزاد را با دو مکانیسم اصلی غیرفعال می کنند، (۲۰،۳۰). اولین مکانیسم، روش وابسته به انتقال هیدروژن نامیده می شود که در آن ماده آنتی اکسیدان با انتقال اتم هیدروژن به رادیکال آزاد باعث غیرفعال شدن آن در محیط می شود. مکانیسم دوم، روش وابسته به انتقال تک الکترون می باشد که در آن ماده آنتی اکسیدان با انتقال تک الکترون به

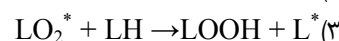
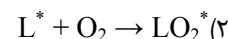
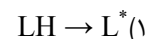
هیدروکسیل موجود در بخش آروماتیک مسئول فعالیت آنتی اکسیدانی می باشد که همین بخش در ترکیب IRFI005 نیز حفظ شده است، (۱،۴). این متابولیت Raxofelast در بدن به عنوان مانع پراکسیداسیون لیپیدها و جاروب کننده گونه های فعال اکسیژن شناخته می شود. گروه هیدروکسیل آن با دادن یک هیدروژن به مولکول رادیکال آزاد باعث احیاء آن می گردد، (۱،۴،۱۲). سرعت واکنش IRFI005 با رادیکال پروکسیل برابر $10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ می باشد، در حالی که سرعت واکنش ویتامین E برابر $10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ است، (۳۵). این امر می تواند به آنتالپی تفکیک پیوند O-H (BDE: Bond Dissociation Enthalpy) مربوط باشد، به طوری که پیوند ضعیف بین O-H در یک مولکول آنتی اکسیدان (BDE پایین تر) باعث افزایش سرعت واکنش با یک مولکول رادیکال آزاد خواهد شد، (۳۱). با توجه به این گفته ها به احتمال بتوان بیان نمود که BDE مولکول IRFI005 باید پایین تر از BDE مولکول ویتامین E با BDE برابر با ۷۷ Kcal/mol باشد، (۳۰)، تا از سرعتی بالاتر نسبت به ویتامین E برای واکنش با مولکول رادیکال آزاد برخوردار باشد.

نتایج به دست آمده نشان می دهند که ترکیب IRFI005، به خوبی باعث مهار رادیکال های آزاد در داخل و خارج سلول شده و در محیط های قطبی یک آنتی اکسیدان بسیار قوی و فعال می باشد که به راحتی از غشای سلول عبور می کند و فعالیت آن وابسته به دوز است.

سپاسگزاری

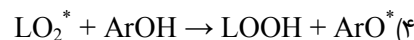
در پایان از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بناب در جهت تامین هزینه این مطالعه کمال تشکر و قدرانی را داریم.

رادیکال آزاد، وظیفه خود را انجام می دهد. تشکیل رادیکال آزاد، باعث به وجود آمدن یک سری واکنش ها به نام واکنش های زنجیره ای رادیکال می شود که این واکنش ها در زیر نشان داده شده اند و به ترتیب شامل یک واکنش آغازگر، یک واکنش توسعه ای و یک واکنش خاتمه می باشد، (۳۱):



به وجود آمدن رادیکال آزاد (L^*) آغازگر این زنجیره می باشد که از اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع (LH) حاصل می شود. (واکنش ۱) این واکنش آغازگر، بسیار کند می باشد و به دلیل وجود عواملی مثل حرارت و پرتوها ایجاد می شود ولی در عوض واکنش ۲ خیلی سریع است، در حالی که واکنش ۳ نیز خیلی کند می باشد و در آن رادیکال آزاد پروکسیل (LO_2^*) در ترکیب با یک اسید چرب غیر اشباع به هیدروپروکسیل پایدار (LOOH) و یک رادیکال آزاد تبدیل می شود. (۳۲،۳۳)

مولکول آنتی اکسیدان (ArOH) طی واکنش با رادیکال آزاد پروکسیل (واکنش ۴) اجازه واکنش به رادیکال پروکسیل و اسید چرب غیر اشباع را نمی دهد و از این طریق باعث شکسته شدن و خاتمه این واکنش های زنجیره ای شده و رادیکال فروکسیل پایدار (ArO^*) را به وجود می آورد، (۳۲):



رادیکال فروکسیل نیز با رادیکال های پروکسیل دیگر واکنش می دهد تا محصولات غیرفعال مثل کینون را به وجود آورد، (۳۱،۳۴). در مولکول ویتامین E، گروه

References

1. Rezk BM, Haenen GRMM, van der Vijgh WJF, Bast A. The extraordinary antioxidant activity of vitamin E phosphate. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004; 1683: 16-21.
2. Sano T, Umeda F, Hashimoto T, Nawata H, Utsumi H. Oxidative stress measurement by in vivo electron spin resonance spectroscopy in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 1998; 41: 1355-60.
3. Heliövaara M, Knekt P, Aho K. Serum antioxidant and risk of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1994; 53: 51-3.
4. Campo GM, Ceccarelli S, Squadrito F,

- Altavilla D, Dorigotti L, Caputi AP. Raxofelast (IRFI 016): A New Hydrophilic Vitamin E-Like Antioxidant Agent. *Cardiovas Drug Rev* 1997; 15:157-73.
5. Niki E, Noguchi N, Tsuchihashi H, Gotoh N. Interaction among vitamin C, vitamin E, and β -carotene. *Am J Clin Nutr* 1995; 62: 1322S-6S.
6. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7915-22.

- 7.Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994; 74: 139-62.
- 8.Morabito G, Trombetta D, Brajendra KS, Ashok KP, Virinder SP, Naccari C, et al. Antioxidant properties of 4-methylcoumarins in in vitro cell-free systems, *Biochimie* 2010; 92: 1101-7.
- 9.Villano D, Fernandez-Pachon MS, Moya ML, Troncoso AM, Garcia-Parrilla MC. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* 2007; 71: 230-5.
- 10.Chen X, Rhian MT, Jeong BP, Ernesto LS. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension* 2001; 38:606-11.
- 11.Yue D, Yan L, Luo H, Xu X, Jin X. Effect of Vitamin E supplementation on semen quality and the testicular cell membranal and mitochondrial antioxidant abilities in Aohan fine-wool sheep. *Anim Reprod Sci* 2010; 118: 217-22.
- 12.Aryaeian N, Djalali M, Shahram F, Jazayeri S, Chamari M, Nazari SA. Beta-carotene, vitamin E, MDA, glutathione reductase and arylesterase activity levels in patients with active rheumatoid arthritis. *Iran J Publ Health* 2011; 40:102-9.
- 13.Brigelius-Flohe´ R, Traber MG. Vitamin E: function and metabolism. *J Fed Am Soc Exp Biol* 1999; 13:1145-55.
- 14.Ghayour-Mobarhan M, Sahebkar AH, Starkey B, Livingstone C, Wang T, Lamb D, et al. An investigation of the relationship between serum vitamin E status and coronary risk factors in dyslipidaemic patients. *Iranian. J Bas Med Sci* 2008; 10: 206-15.
- 15.Barzegar A. Proton-coupled electron-transfer mechanism for the radical scavenging activity of cardiovascular drug dipyr-idamole. *PLoS ONE* 2012; 7:e39660.
- 16.Riboulet-Chavey A, Pierron A, Durand I, Murdaca J, Giudicelli J, Obberghen EV. Methylglyoxal impairs the insulin signaling pathways independently of the formation of intracellular reactive oxygen species. *Diabetes* 2006; 55: 1289-99.
- 17.Pedersen JZ, Oliveira C, Incerpi S, Kumar V, Fiore AM. Antioxidant activity of 4-methylcoumarins. *J Pharm Pharmacol* 2007; 59: 1721-8.
- 18.Shi H, Noguchi N, Niki E. Galvinoxyl method for standardizing electron andpro-ton donation activity. *Method Enzymol* 2001; 335: 157-66.
- 19.Butkovic V, Klasinc L, Bors W. Kinetic study of flavonoid reactions with stable radicals. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 2816-20.
- 20.Niki E. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Rad Biol Med* 2010; 49: 503-15.
- 21.Von Gadow A, Joubert E, Hansmann C. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of Rooibos tea (*Aspalathuslinearis*), α -tocopherol, BHT, and BHA. *J Agric Food Chem* 1997; 45: 632-8.
- 22.Barzegar A, Pedersen JZ, Incerpi S, Moosavi-Movahedi AA, Saso L, The mechanism of antioxidant activity of IRFI005 as a synthetic hydrophilic analogue of vitamin E. *Biochimie* 2011; 93: 1880-8.
- 23.Hatano T, Kagawa H, Yasuhara T, Okuda T. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astirngency and radical scavenging effects. *Chem Pharm Bull* 1988; 36: 2090-7.
- 24.Clark JB, Greenbaum AL, Slater TF. Effects of Tetrazolium Salts on Oxidative Phosphorylation in Rat-Liver Mitochondria. *Biochem.J.* 1965; 94: 651-654.
- 25.Altavilla D, Deodato B, Campo GM, Arlotta M, Miano M, Squadrito G, et al. IRFI 042, a novel dual vitamin E-like antioxidant, inhibits activation ofnuclear factor-kB and reduces the inflammatory response in myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovascular Research* 2000; 47: 515–528.
- 26.Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using micro plate reader, *Free Radic. Biol. Med.* 1999; 27: 612-616.
- 27.Adom KK, Liu RH. Rapid peroxy radical scavenging capacity (PSC) assay for assessing both hydrophilic and lipophilic antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 6572-6580.
- 28.Ayala A, Parrado J, Bougria M, Machado A. Effect of oxidative stress,produced by cumene hydro peroxide, on the various steps of proteinsynthesis, *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 23105–23110.
- 29.Mattoli S, Mezzetti M, Allegra L, Braga PC. Dihydro-hydroxy-trimethyl-benzofura-

nylacetic acid inhibits lipid peroxidation and lysosomal enzyme release in bronchial epithelial cells and macrophages. *Ital J Chem Dis* 1991;45:78-80.

30. Wright JS, Johnson ER, Di Labio GA. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* 2001; 123:1173-1183.

31. Szymusiak H, Zieliński R. Bond dissociation enthalpy of phenolic antioxidants. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2003; 12(53): 129-135.

32. Wolf G. The Discovery of the Antioxidant Function of Vitamin E: the Contribution of Henry A. Mattill. *American Soc-*

iety for Nutritional Sciences. J. Nutr. 2005; 135: 363-366.

33. Cummings MJ, Mattill HA. The auto-oxidation of fats with reference to their destructive effect on vitamin E. *J. Nutr.* 1931; 3: 421-432.

34. Liebler DC. The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. *Crit. Rev. Toxicol.* 1993; 23, 147-169.

35. Iuliano L, Pedersen JZ, Camastra C, Bello V, Ceccarelli S, Violi F. Protection of low density lipoprotein oxidation by the antioxidant agent IRFI005, a new synthetic hydrophilic vitamin E analogue. *Free Radic. Biol. Med.* 1999; 26:858-868.

Evaluating the function of IRFI005 on removing intra and extracellular free radicals

Ghojaie M^{1*}, Barzegar A², Asadzadeh R³

(Received: December 9, 2013)

Accepted: February 26, 2014)

Abstract

Introduction: Antioxidants are molecules that inhibit the action of free radicals and vitamin E is one of the most important antioxidant compounds. This vitamin is insoluble in water and this feature limits its application in polar media. At present, many studies are performing to find water-soluble analogues of this compound. In this study, a polar and synthetic analogue of vitamin E (IRFI005) was used to survey expected properties of vitamin E in polar media.

Materials & Methods: Evaluation of extracellular antioxidant activity of IRFI005 was performed spectrophotometrically at 430 nm and using the galvinoxyl free radical with molar concentrations, 1:2 and 1:4 of IRFI005: Galvinoxyl. Intra-cellular antioxidant an effect of 5 μ M of IRFI005 was also studied using the DCFH₂-DA colored probe and Cumene hydroperoxide method.

Findings: IRFI005 inhibited oxidant activity in the inside and outside media under study. Galvinoxyl had lower optical density (OD) at the ratio 1:2 and was completely removed from the media. Each IRFI005 molecule was able to remove two free radical molecules. It also suppressed Cumene hydroperoxide effect inside the cells and inhibited the increase of fluorescence intensity.

Discussion & Conclusion: The findings suggest that IRFI005 is a powerful, dose-dependent and active antioxidant in polar media and could inhibit oxidant molecules in the inside and outside of cells.

Keywords: Free radicals, antioxidant, vitamin E, IRFI005

1. Dept of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Bonab, Iran

2. Dept of Biology, Basic Sciences Research Center, Tabriz University, Tabriz, Iran

3. Dept of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Uremia, Iran

* (Corresponding author)