بررسی اثر MTBE (ماده افزودنی به بنزین) به‌عنوان یک آلاینده محیطی بر فعالیت، ساختار و پایداری حرارتی کربنیک انیدراز II انسانی

مهسا پوربابادی[1]، علی خطیبی*[2]، رضا خدارحمی[3]

1- کارشناسی ارشد رشته بیوفیزیک، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران.

2- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران.

3- استاد، گروه فارماکوگنوزی و بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

*نویسنده مسئول: khatibi@alzahra.ac.ir

دریافت: 1400/6/8 پذیرش: 1400/10/14

چکیده

MTBE[1] یکی از افزودنی‌های بنزین که به‌منظور افزایش اکتان و کاهش تولید گازهای گلخانه‌ای استفاده می‌شود، MTBE می‌تواند از راه‌های مختلف مانند استنشاق، خوراکی و تماس پوستی وارد جریان خون انسان شود. همچنین کربنیک انیدراز انسانی یکی از متالوآنزیم‌هاست که تقریباً در تمام موجودات زنده یافت می‌شود و مورد مطالعات گسترده‌ای قرار گرفته و بیماری‌های متعددی با کربنیک انیدراز در ارتباط هستند. در این مطالعه اثر مجاورت MTBE با آنزیم کربنیک انیدراز II انسانی بر فعالیت آنزیم با روش‌های طیف‌سنجی مرئی- فرابنفش بررسی شد و تغییرات Tm آنزیم در غلظت‌های مختلف از MTBE گزارش شده است. همچنین تغییرات ساختاری آنزیم در حضور MTBE با طیف‌سنجی فلورسنس ذاتی نیز بررسی شد. نتایج نشان می‌دهد فعالیت آنزیم در مجاورت MTBE با سازوکار مختلط خطی مهار شده است. نتایج مربوط به طیف‌سنجی فلورسنس ذاتی آنزیم تغییرات ساختار در حضور MTBE را نشان می‌دهد. همچنین در پی اتصال MTBE به آنزیم، پایداری حرارتی آنزیم کاهش پیداکرده و نسبت به تغییرات دما حساس شده است.

کلید واژگان: کربنیک انیدراز، طیف‌سنجی، سینتیک آنزیمی، MTBE.

۱ Methyl tertiary-butyl ether

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.8.3]

1- مقدمه

کربنیک انیدراز انسانی [1] یکی از متالوآنزیم‌هایی است که تقریباً در تمام موجودات زنده یافت می‌شود و مورد مطالعات گسترده‌ای بوده است. این آنزیم واکنش هیدراسیون برگشت‌پذیر دی‌اکسید کربن به بیکربنات را کاتالیز می‌کند [1].

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$

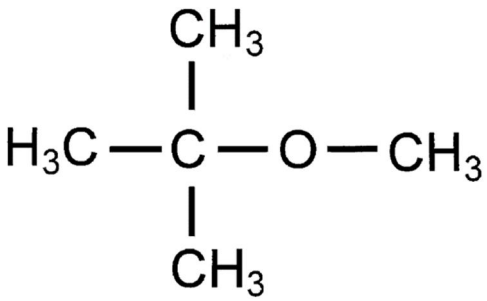
از آن‌جایی‌که دی‌اکسید کربن، بیکربنات و پروتون، نقش‌های بسیار مهمی در موجودات یوکاریوت و پروکاریوت دارند و به نسبت بسیار زیاد در بافت‌ها و سلول‌های مختلف این موجودات حضور دارند، وجود کربونیک انیدراز در تعادل این مولکول‌ها و یون‌ها ضروری می‌باشد. این آنزیم در فرایندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک نقش حیاتی دارد، از جمله: حفظ تعادل اسید و باز در خون، انتقال دی‌اکسید کربن به خارج از بافت‌ها، نقش در واکنش‌های بیوسنتزی (تولید ادرار، لیپوژنز، گلوکونئوژنز)، دفع الکترولیت‌ها، بازجذب استخوانی، کلسیفیکاسیون، تولید مایع مغزی- نخاعی، تولید مایع زلالیه و همچنین در تثبیت دی‌اکسید کربن در دیاتوم‌ها نیز نقش دارد [2].

نقص در آنزیم کربنیک انیدراز انسانی با بیماری‌های زیادی در ارتباط است، ازجمله سرطان، صرع، گلوکوم، اختلال‌های عصبی، چاقی، پوکی استخوان، زخم معده و دوازدهه [1].

کربنیک انیدراز در شش گروه با کدگذاری متمایز ژنی تقسیم‌بندی می‌شود: آلفا (α)، بتا (β)، گاما (γ)، دلتا (δ)، زِتا (ζ)و اِتا (η). جزئیات سینتیک و کریستالوگرافی اشعه ایکس به ما درک عمیقی از ساختار و عملکرد این خانواده‌های آنزیمی می‌دهد. این آنزیم‌ها از نظر تاخوردگی با یکدیگر متفاوت هستند ولی در همه آنها جایگاه فعال برای فعالیت کاتالیتیک خود نیازمند فلز روی است [3].

ماده MTBE[2] معمول‌ترین افزودنی برای افزایش عدد اکتان بنزین است و از واکنش شیمیایی بین متانول و ایزوبوتن تولید می‌شود. MTBE به شدت تحت تأثیر دما و pH محیط است. افزایش دما زمان انجام واکنش باعث تخریب چشمگیر MTBE می‌شود، همچنین تغییرات pH خارج از محدوده (11-2/5) سرعت برهم‌کنش MTBE را کاهش می‌دهد. این ماده حلالیت بالایی دارد و اغلب در آب‌های سطحی و زیرزمینی قابل تشخیص است [4]. استفاده از MTBE در بنزین باعث کاهش نشر گاز آلاینده منواکسید کربن از اگزوز اتومبیل می‌شود، اما در کنار این اثر مثبت زیست‌محیطی، MTBE می‌تواند آثار منفی زیادی برای سلامت انسان و محیط‌زیست به‌خصوص در زمینه آلودگی منابع آب ایجاد کند [5].

انتشار محیطی MTBE ممکن است منجر به ورود آن به جریان خون از راه استنشاق، نوشیدن آب آلوده و تعامل آن با مولکول‌های زیستی از جمله پروتئین‌ها شود [6]. ساختار شیمیایی ترکیب MTBE در شکل 1 نمایش داده شده است [7].



شکل 1- ساختار شیمیایی MTBE

MTBE خصوصیات مهمی دارد که آن را از سایر آلاینده‌ها متمایز می‌کند از جمله حد آستانه بسیار پایین بو

1 Human Carbonic Anhydrase

۲ Methyl tertiary-butyl ether

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.8.3]

و مزه دارد، به این معنا که در مقادیر پایین بو و مزه هم می‌تواند قابل توجه باشد. قابلیت حل‌شدن سریع در آب را دارد. این ویژگی می‌تواند باعث نفوذ و پراکندگی آن در خاک شود [4].

استفاده گسترده از MTBE به‌عنوان افزودنی برای افزایش کیفیت بنزین منجر به افزایش آلودگی زیست‌محیطی این ماده در دهه‌های گذشته شده است. تاکنون بررسی‌های زیادی از تأثیر MTBE بر سلامت انسان و آلودگی‌های آب‌وهوا انجام شده است. قرارگرفتن در معرض MTBE ممکن است باعث سردرد، استفراغ، اسهال، تب، سرفه، دردهای عضلانی، خواب‌آلودگی، اختلال در تمرکز، سرگیجه، ناراحتی‌های چشمی و پوستی شود، درحالی‌که سازوکارهای سلولی و مولکولی عملکرد آن ناشناخته است. تأثیرات این ماده بر بدن انسان به دو دسته سرطانی و غیرسرطانی تقسیم می‌شود. در مورد تأثیرات سرطانی، مطالعات آزمایشگاهی در یک دوره 104 روزه بر موش‌های صحرایی انجام شد که مبتلاشدن این موش‌ها به سرطان خون در اثر مصرف 1000 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن را نشان می‌دهد [5]. از تأثیرات غیرسرطانی می‌توان به سرگیجه، سردرد، حالت تهوع و عوارض بر ژنتیک و تولیدمثل اشاره کرد. یکی از بررسی‌های جدید مربوط به تأثیر MTBE بر هموگلوبین افراد دیابتی و غیردیابتی است. نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که به‌طورکلی MTBE باعث افزایش سرعت تجمع هموگلوبین شده و فعالیت آنتی چاپرونی دارد. در افراد دیابتی اثرهای شدیدتری از جمله تولید گونه‌های فعال رادیکال اکسیژن و تخریب گروه هِم مشاهده می‌شد. در بررسی مدل‌سازی مولکولی[1] مشخص شد جایگاه اتصال MTBE در هموگلوبین در نزدیکی جایگاه گروه هِم قرار گرفته است [6].

در بررسی دیگر، نقش سیتوکروم p450 در متابولیسم MTBE در کبد انسان مورد پژوهش بوده است که MTBE فعالیت آنزیم‌های سیتوکروم p450 را به‌طور چشمگیری مهار می‌کند[5]. تاکنون بررسی از اثر MTBE بر آنزیم کربنیک انیدراز انسانی گزارش نشده است. ازاین‌رو با توجه به اهمیت آنزیم کربنیک انیدراز انسانیII بررسی عملکرد این آنزیم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این پژوهش اثر میان‌کنش MTBE بر فعالیت آنزیم کربنیک انیدراز انسانی بررسی شده است.

2- مواد و روش‌ها

مواد و دستگاه‌های استفاده‌شده در این مطالعه شامل آنزیم کربنیک انیدراز II تخلیص‌شده از نمونه خون انسانی به روش نیمن[2][8]، استونیتریل و متانول و تریس (مرک – آلمان)، پارانیتروفنیل استات[3] به‌عنوان سوبسترای آنزیم کربنیک انیدراز (سیگما)، MTBE[4] تهیه‌شده از شرکت پتروشیمی بندر ماهشهر B.I.P.C، اسپکتروفتومتر مرئی-فرابنفش (Shimadzu-0013 – ژاپن)، اسپکتروفوتومتر فلورسنس (Carry 100 bio –استرالیا) و دستگاه pH متر (Beckman – سوئیس) می‌باشد.

2-1 خالص‌سازی آنزیم

خالص‌سازی پروتئین‌ها، مرحله‌ای ضروری برای بررسی ساختار و درک اعمال آنها است. روش‌های متعددی برای جداسازی پروتئین‌ها وجود دارد که با به‌کارگیری آنها می‌توان پروتئین‌ها را با موفقیت تخلیص نمود. متداول‌ترین روشی که امروزه برای تخلیص استفاده

۱ Molecular Docking

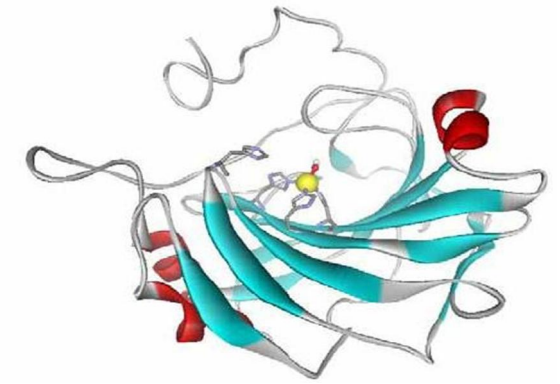
۲ Nyman
۳ p-Nitrophenylacetate (p-NPA)
۴ Methyl tertiary-butyl ether

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]
[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.8.3]

می‌شود، استفاده از کروماتوگرافی است [9]. در روش نیمن، کربنیک انیدراز II انسانی با استفاده از ستون کروماتوگرافی تعویض آنیونی DEAE-سفارز از اریتروسیت انسانی خالص می‌شود.

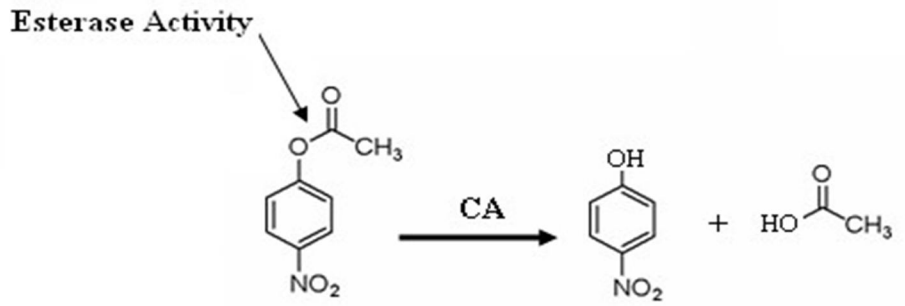
2-2 سنجش فعالیت آنزیمی

پارانیتروفنیل استات (p-NPA) از طریق حمله هسته‌دوستی آب (یون هیدروکسید) به اتم مرکزی آن (کربونیل CO) هیدرولیز می‌شود؛ اما زمانی‌که کربنیک انیدراز در محیط حضور داشته باشد، به این دلیل که حاوی باز قوی‌تری (یون هیدروکسید کئوردینه شده با فلز روی) است، این هیدرولیز با سرعت بسیار بیشتری انجام می‌شود. از بین ایزوزیم‌های کربنیک انیدراز انسانی، کربنیک انیدراز II فعالیت استراتژی بالاتری برای هیدرولیز پارانیتروفنیل استات دارد [10]. نمایش روبانی کربنیک انیدراز II انسانی در شکل 2 نشان داده شده است [11].



شکل 2 نمایش روبانی کربنیک انیدراز II انسانی و جایگاه فلز روی در آن. فلز روی در جایگاه فعال به حلقه‌های ایمیدازول سه اسید آمینه هیستیدین و یک مولکول آب متصل شده است.

پارانیتروفنیل استات پودری با رنگ بژ و با وزن مولکولی 181/14 g/mol است. فرمول مولکولی آن $C_8H_7NO_4$ و نقطه ذوبی معادل $^{\circ}C$ 79-76 دارد. یکی از واکنش‌هایی که به‌وسیله آنزیم کربنیک انیدراز II انسانی کاتالیز می‌شود، استفاده از پارانیتروفنیل استات به‌عنوان سوبسترا و تبدیل آن به دو محصول پارانیتروفنول و استات است. پارانیتروفنول محصولی زردرنگ است که در 400 نانومتر جذب دارد. این روش سنجش فعالیت به‌وسیله پوکر و استون پایه‌گذاری شده است[12] (شکل 3) .



شکل 3 واکنش استراتژی آنزیم کربنیک انیدراز

برای سنجش فعالیت نمونه‌های آنزیمی، از حالت کینتیک دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی- فرابنفش استفاده شد. در این آزمایش به‌منظور محاسبه سرعت واکنش استرازی آنزیم از غلظت 0/05 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آنزیم و غلظت‌های مختلف سوبسترای پارانیتروفنیل استات (2 تا 6 میلی‌مولار) در بافر تریس 50 میلی‌مولار

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.8.3]

و در سل با ضخامت 1 سانتیمتر استفاده شد. استوک سوبسترا با حل‌کردن پودر پارانیتروفنیل استات در حلال استونیتریل تهیه گردید. هر اندازه‌گیری سینتیکی حداقل سه بار تکرار شد.

3-2 اثر MTBE بر غیرطبیعی‌شدن حرارتی آنزیم

پایداری حرارتی آنزیم‌ها و پروتئین‌ها در صنایع غذایی و دارویی بسیار مورد توجه است [13]. برای مطالعه غیرطبیعی شدن حرارتی آنزیم، از دستگاه اسپکتروفوتومتر مرئی- فرابنفش و سیرکولاتور حرارتی استفاده شد. بین دمای 35 درجه سانتیگراد تا 75 درجه سانتیگراد تغییرات جذب نمونه در طول‌موج 280 نانومتر به‌وسیله دستگاه ثبت شد. در این آزمایش همانند آزمایش قبلی از غلظت 0/05 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آنزیم و درحضور و عدم حضور غلظت‌های مختلف MTBE (30 و 40 ماکرومولار) در بافر تریس 50 میلی‌مولار و در سل با ضخامت 1 سانتی‌متر استفاده شد.

4-2 اندازه‌گیری‌های فلورسنس ذاتی آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف MTBE

فلورسنس ذاتی پروتئین‌ها وابسته به اسیدهای آمینه آروماتیک (به‌خصوص اسیدآمینه تریپتوفان) می‌باشد. آنزیم کربنیک انیدرازII در ساختار خود 7 اسیدآمینه تریپتوفان دارد [14]. برای انجام اندازه‌گیری تغییرات فلورسنس ذاتی آنزیم از طول موج تهیج 280 نانومتر برای برانگیختگی زیرواحدهای تریپتوفان و اجتناب از برانگیختگی باقیمانده‌های تیروزین [15] استفاده شد و طیف نشری در محدوده 300 تا 600 نانومتر ثبت شد. تمامی این آزمایش‌ها در دمای $25^{\circ}C$ و در بافر تریس 50 میلی‌مولار با pH برابر 7/4 انجام شده است و پهنای شکاف‌های تهییج و نشر دستگاه به‌ترتیب 5 و 10 نانومتر انتخاب شد.

ضخامت کووت استفاده‌شده در همه سنجش‌ها 1 سانتی‌متر و غلظت آنزیم استفاده‌شده در این آزمایش 0/05 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. روش آزمایش به این صورت بود که برای اندازه‌گیری نشر نمونه‌های مختلف آنزیمی، نشر سل بلانک حاوی تمامی مواد موجود در نمونه‌های مختلف آنزیمی بجز آنزیم، صفر گردید و سپس نشر نمونه‌های مختلف آنزیمی ثبت شد.

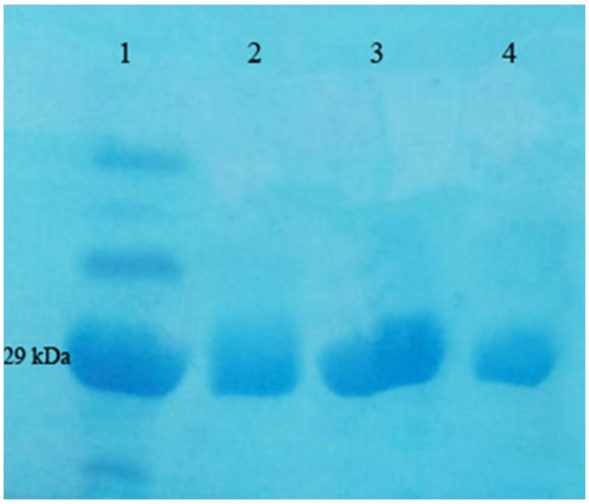
3- نتایج

1-3 تخلیص آنزیم و ارزیابی کیفی فرآیند

کربنیک انیدراز II انسانی با استفاده از ستون کروماتوگرافی تعویض آنیونی DEAE- سفارز از اریتروسیت انسانی خالص شد که نتایج SDS-PAGE نمونه‌های خالص‌شده بعد از ستون کروماتوگرافی در شکل 4 به نمایش گذاشته شده است. این شکل نشان‌دهنده تخلیص خوب آنزیم است.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.8.3]



شکل4 SDS-PAGE نمونه‌های خالص‌شده آنزیم کربنیک انیدراز II انسانی به‌وسیله ستون کروماتوگرافی تعویض آنیونی DEAE-سفارز. 1 نمونه ناخالص قبل از ستون، 2، 3 و 4 سه غلظت متفاوت از نمونه خالص بعد از ستون. همان‌طور که در تصویر مشاهده می‌شود، تک‌باندبودن الکتروفورگرام SDS-PAGE نمونه‌های 2، 3 و 4 نشان‌دهنده خلوص نمونه است.

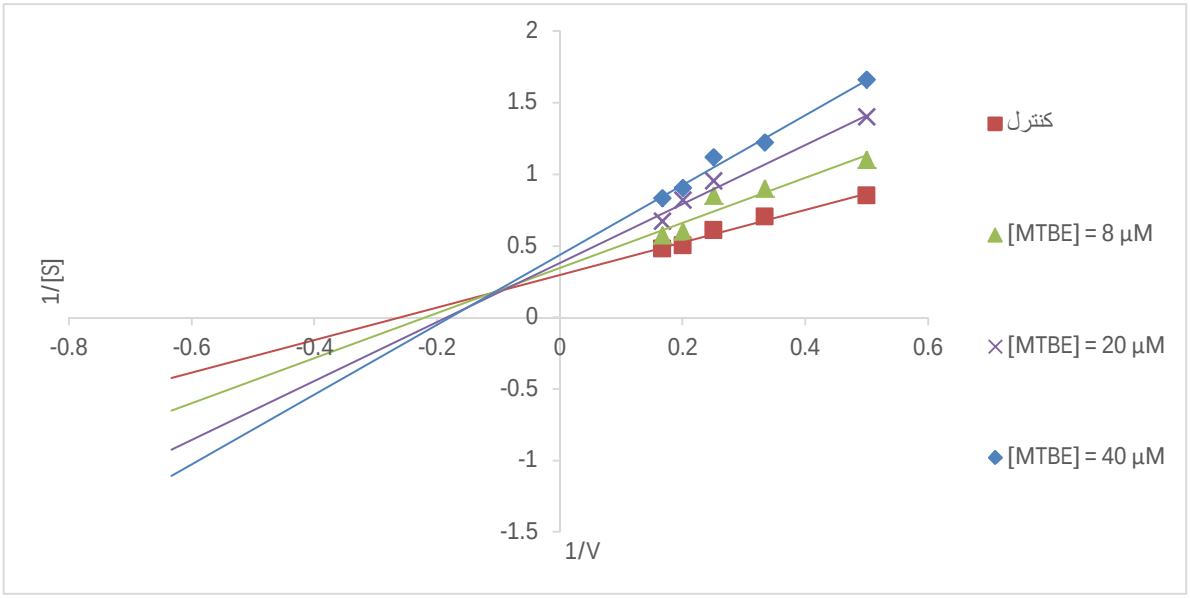
2-3 فعالیت استرازی آنزیم

فعالیت استرازی آنزیم در دمای 25 درجه سانتیگراد در عدم حضور MTBE و حضور غلظت‌های مختلف MTBE (8، 20، 40 میکرومولار) و غلظت‌های متفاوت پارانیتروفنیل استات (2، 3، 4، 5، 6 میکرومولار) اندازه‌گیری شد. نتایج ما نشان می‌دهد V_{max} آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف MTBE کاهش پیدا کرده است و همچنین مقدار K_m در حضور غلظت‌های مختلف افزایش پیدا کرده است. این افزایش K_m به این معناست که ساختار آنزیم به‌گونه‌ای تغییر پیداکرده که سوبسترا نتوانسته است به‌خوبی در اختیار جایگاه فعال آنزیم قرار بگیرد. بنابراین می‌توان گفت در حضور MTBE تمایل آنزیم به سوبسترا کاهش پیدا کرده است. تغییرات V_{max} و K_m نشان‌دهنده مهار آنزیم با سازوکار مختلط خطی است [16]. سپس با استفاده از نمودار لاینویور – برک و معادله خط آن فعالیت استرازی نمونه‌های مختلف آنزیمی محاسبه شد. نتایج در شکل‌های 5 و 6 و جدول 1 نمایش داده شده است.

شکل 5 نمودار لاینویور- برک مربوط به فعالیت آنزیم را نشان می‌دهد، در این نمودار از رسم تغییرات $1/V_0$ در مقابل $1/S$ خط راستی به دست می‌آید که عرض از مبدأ آن $1/V_{max}$ و شیب نمودار K_m/V_{max} را مشخص می‌کند. همچنین در جدول 1 مقادیر K_m و V_{max} آنزیم آورده شده است. در شکل 6 به‌خوبی تغییرات K_m و V_{max} آنزیم قابل مشاهده است.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]

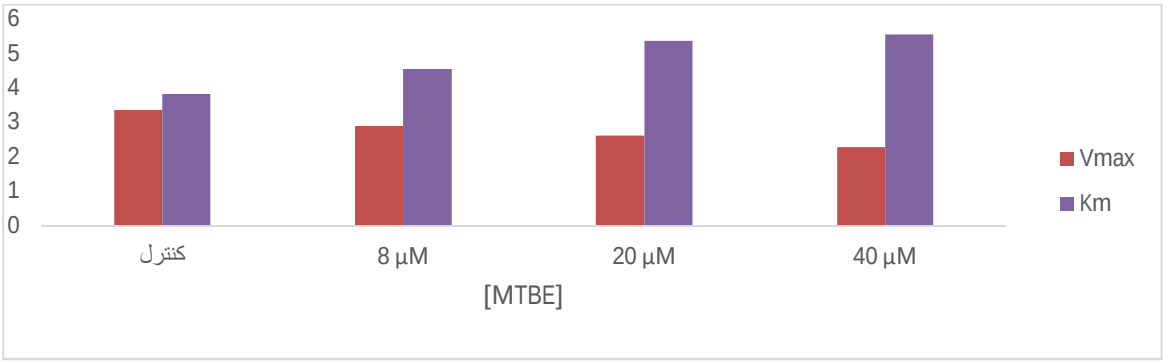
[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.8.3]



شکل 5 نمودار لاینویور-برک کربنیک انیدرازII در عدم حضور و حضور MTBE، غلظت‌های مختلف از MTBE (8 ، 20، 40 میکرومولار) در بافر تریس- سولفات 50 میلی مولار با pH=7/75 (غلظت آنزیم 0/05 mg/mL)

جدول 1 مقادیر K_m و V_{max} آنزیم کربنیک انیدراز II انسانی در عدم حضور MTBE و حضور غلظت‌های مختلف MTBE

	[MTBE] = 0 (کنترل)	**[MTBE] = 8 µM**	**[MTBE] = 20 µM**	**[MTBE] =µ40 M**
V_{max}(U/ min/mg protein)	3/35	2/9	2/6	**2/3**
K_m (mM)	3/8	4/5	5/4	**5/6**



شکل 6 نمودار تغییرات مقادیر V_{max} و K_m آنزیم در عدم حضور و حضور MTBE، غلظت‌های مختلف از MTBE (8، 20، 40 میکرومولار) در بافر تریس-سولفات 50 میلی مولار با pH=7/75 (غلظت آنزیم 0/05 mg/mL)

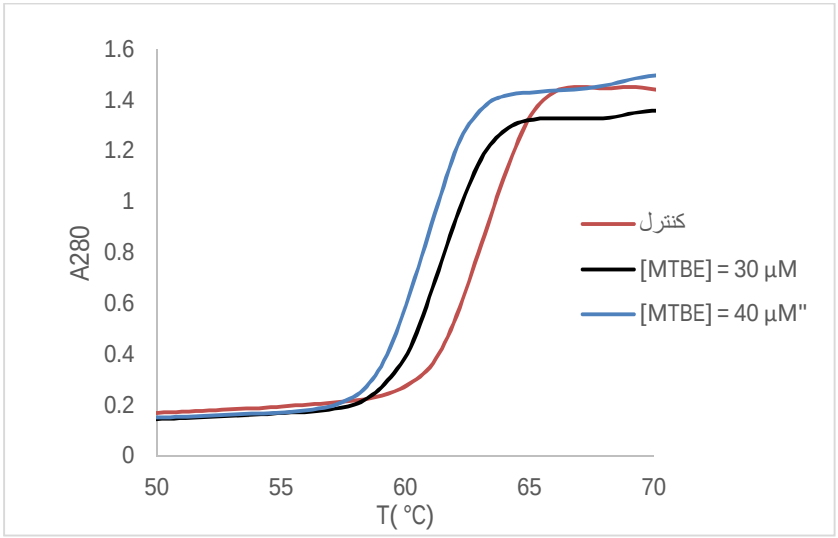
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.8.3]

3-3 اثر MTBE بر غیرطبیعی شدن حرارتی آنزیم

نمودار غیرطبیعی شدن آنزیم کربنیک انیدراز II در محدوده دمایی 50 تا 70 درجه سانتیگراد رسم شده است و نتایج نشان می‌دهد ساختار آنزیم در حضور MTBE به‌گونه‌ای تغییر پیدا کرده است که نسبت به حالت طبیعی خود پیوندهای ضعیف‌تری دارد بنابراین در دمایی کمتر از حالت طبیعی ساختار آنزیم واسرشته می‌شود، به عبارتی آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف MTBE نسبت به غیرطبیعی شدن حرارتی حساس‌تر شده است. در شکل 7 نمودار غیرطبیعی شدن آنزیم کربنیک انیدراز به‌صورت تابعی از دما نشان داده شده است.

دمای ذوب آنزیم کربنیک انیدراز در حالت طبیعی حدود 63 درجه سانتیگراد است و در حضور MTBE در غلظت 40 میکرومولار به 60 درجه سانتیگراد رسیده است. این کاهش دمای ذوب نشان می‌دهد ساختار در حضور MTBE نسبت به عدم حضور MTBE از استحکام کمتری برخوردار است.



شکل 7 اثر MTBE بر غیرطبیعی‌شدن حرارتی آنزیم در عدم حضور و حضور غلظت‌های مختلف از MTBE (30، 40 میکرومولار) و محدوده دمایی 50 تا 70 درجه سانتیگراد در بافر تریس- سولفات 50 میلی‌مولار با pH = 7/75 (غلظت آنزیم 0/05 mg/mL)

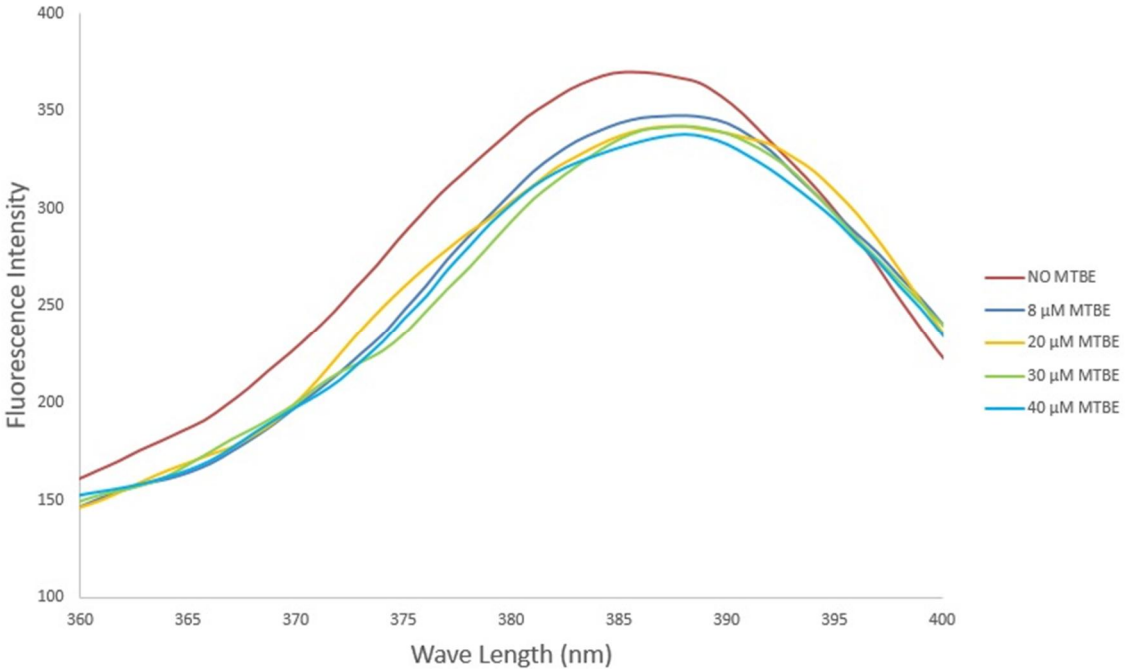
4-3 اندازه‌گیری‌های فلورسنس ذاتی آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف MTBE

طیف نشری فلورسنس ذاتی آنزیم کربنیک انیدراز II انسانی در غیاب و حضور غلظت‌های 8، 20، 30، 40 میکرومولار MTBE در شکل 8 نشان داده شده است. در همه آزمایش‌ها طول موج تهییج 280 نانومتر بوده است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، شدت فلورسنس ذاتی آنزیم درحضور غلظت‌های مختلف MTBE نسبت به حالت کنترل کاهش پیدا می‌کند. این کاهش شدت نشر نشان می‌دهد محل اتصال MTBE در نزدیکی و یا در موقعیت تریپتوفان‌های سطحی آنزیم قرار دارد. بیشینه طیف نشری کربنیک انیدراز II در حضور MTBE از nm 385 به 389 nm جابه‌جا شده است.

جابه‌جایی و افت پیک‌های فلورسنس ذاتی آنزیم در مجاورت MTBE نسبت به حالت کنترل می‌تواند نتیجه بازشدن ساختار سوم آنزیم و در معرض قرارگرفتن اسیدآمینه‌های تریپتوفان در حلال و درنهایت خاموشی نشر آنها شده است.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.8.3]



شکل 8 تغییرات شدت فلورسنس ذاتی آنزیم در عدم حضور و حضور MTBE، غلظت‌های مختلف از MTBE (8، 20، 30، 40 میکرومولار) در بافر تریس- سولفات 50 میلی‌مولار با pH= 7/75 (غلظت آنزیم 0/05 mg/mL)

4- بحث

کربنیک انیدراز انسانی یکی از متالوآنزیم‌ها است که تقریباً در تمام موجودات زنده یافت می‌شود و مورد مطالعات گسترده‌ای بوده است. این آنزیم واکنش هیدراسیون برگشت‌پذیر دی‌اکسید کربن به بیکربنات را کاتالیز می‌کند. از آن‌جایی‌که دی‌اکسید کربن، بیکربنات و پروتون، نقش‌های بسیار مهمی در موجودات یوکاریوت و پروکاریوت دارند و به نسبت بسیار زیاد در بافت‌ها و سلول‌های مختلف این موجودات حضور دارند، وجود کربنیک انیدراز در تعادل این مولکول‌ها و یون‌ها ضروری می‌باشد. این آنزیم در فرایندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک نقش حیاتی دارد، از جمله حفظ تعادل اسید و باز در خون، انتقال دی‌اکسید کربن به خارج از بافت‌ها، نقش در واکنش‌های بیوسنتزی (تولید ادرار، لیپوژنز، گلوکونئوژنز).

نقص در عملکرد این آنزیم در ابتلا به بیماری‌های بسیاری مؤثر است و انواع مهارکننده‌ای این آنزیم نقش مهمی در درمان بیماری‌ها دارند. مهارکننده‌های کربنیک انیدراز سال‌هاست به‌عنوان داروهای دیورتیک و ضد گلوکوم استفاده بالینی دارند. به‌تازگی مطالعات گسترده‌ای که بر مهارکننده‌های این آنزیم انجام شده است، علاوه بر نقش آنها به‌عنوان داروهای دیورتیک و ضد گلوکوم، قابلیت درمان صرع، چاقی، سرطان و... را خواهند داشت. مشکل اصلی تولید این داروها، وجود ایزوزیم‌های زیاد کربنیک انیدراز و حضور آنها در بافت‌ها و ارگان‌های مختلف می‌باشد. این مهارکننده‌ها ممکن است تمایل بیشتری به مهار یک ایزوزیم خاص داشته باشند [2-17].

یافتن مهارکننده‌های این آنزیم می‌تواند به‌عنوان یک راه درمانی مؤثر بررسی شود. ازجمله ایندیاپامین که از داروهای سولفانامیدی است، این دارو در درمان بیماری‌های مختلف ازجمله دیابت نوع2، چاقی، عوارض مربوط به بیماری‌های متابولیک و ... کاربرد دارد. همچنین به‌عنوان داروی ضد فشارخون استفاده می‌شود و به‌طور قابل توجه باعث کاهش

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.8.3]

عوارض بیماری‌های قلب و عروق و کاهش مرگ‌ومیر در مطالعات کلینیکی می‌شود [18].

اما همان‌طور که مهار این آنزیم در برخی بیماری می‌تواند مؤثر باشد، مهارشدن آن در شرایط طبیعی می‌تواند نتایج مخربی بر سلامتی انسان داشته باشد. همچنین تأثیر هریک از این مهارکننده‌ها روی ایزوزیم‌های مختلف کربونیک انیدراز متفاوت است و در هریک از بافت‌های بدن انواع خاصی از ایزوزیم‌های آنزیم حضور دارند، به همین علت استفاده از این داروهای مهارکننده کربنیک انیدراز عوارض ناخواسته‌ای به همراه خواهد داشت. از آن‌جایی‌که از MTBE به‌طور گسترده در تولید بنزین استفاده می‌شود و قرارگرفتن در معرض آن آثار جبران‌ناپذیری بر سلامتی افراد دارد. درنتیجه تغییرات آنزیم کربنیک انیدراز انسانی در حضور MTBE بسیار مورد توجه است.

نتایج به دست‌آمده از نشان دهنده مهار آنزیم در حضور غلظت‌های متفاوت MTBE است، افزایش مقدار K_m همزمان با کاهش سرعت فعالیت آنزیم نشان از مهار آنزیم به‌صورت مختلط دارد. آنزیم در حضور MTBE دچار تغییرات ساختاری شده است و این تغییرات ساختار منجر به کاهش تمایل آنزیم به سوبسترای خود شده است. نتایج ما نشان می‌دهد MTBE یک مهارکننده با سازوکار مختلط خطی برای کربنیک انیدراز II است و می‌تواند در عملکرد مؤثر و مفید این آنزیم اختلال ایجاد کند و فعالیت آن را کاهش دهد. کاهش دمای ذوب نشان می‌دهد ساختار در حضور MTBE نسبت به عدم حضور MTBE از استحکام کمتری برخوردار است و آنزیم در حضور MTBE ناپایدارتر شده است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از نشر فلورسنس ذاتی، ساختار آنزیم در مجاورت MTBE باز شده و ساختار سوم پروتئین از بین رفته است. درواقع با این تغییر ساختار پروتئین اسید آمینه‌های آروماتیکی که در درون پروتئین قرار داشته به سطح آمده و در معرض حلال قطبی قرار گرفته است، بنابراین در برخورد با مولکول‌های حلال انرژی خود را از دست داده و نشر آن کاهش پیدا کرده و به سمت طول موج‌های بلندتر حرکت کرده است.

حضور MTBE در طبیعت به‌عنوان آلاینده و عملکرد ناشناخته این ماده در بدن سلامتی انسان را به خطر می‌اندازد. به دلیل هزینه بالا برای حذف این ماده از آب‌های زیرزمینی، استفاده کمتر بهترین گزینه است. در کشورهای اروپایی استفاده از MTBE به حداقل ممکن رسیده است. امید داریم با کاهش مصرف MTBE در تولید بنزین در کشور ما نیز حضور این آلاینده در طبیعت به صفر نزدیک شود.

منابع

[1] Supuran, C. T., & Scozzafava, A. (2000). Carbonic anhydrase inhibitors and their therapeutic potential. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 10(5), 575-600.

[2] Supuran, C. T. (2010). Carbonic anhydrase inhibitors. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 20(12), 3467-3474.

[3] Supuran, C. T. (2016). Structure and function of carbonic anhydrases. Biochemical Journal, 473(14), 2023-2032.

[4] Huang, K. C., Couttenye, R. A., & Hoag, G. E. (2002). Kinetics of heat-assisted persulfate oxidation of methyl tert-butyl ether (MTBE). Chemosphere, 49(4), 413-420.

[5] Hong, J. Y., Wang, Y. Y., Mohr, S. N., Bondoc, F. Y., & Deng, C. (2001). Human cytochrome P450 isozymes in metabolism and health effects of gasoline ethers. Research report (Health Effects Institute), (102), 7-27.

[6] Najdegerami, I. H., Maghami, P., Sheikh-Hasani, V., Hosseinzadeh, G., Sheibani, N., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2017). Antichaperone activity and heme degradation effect of methyl tert-butyl ether (MTBE) on normal and diabetic hemoglobins. Journal of Molecular Recognition, 30(5), e2596.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.8.3]

[7] Davis, J. M., & Farland, W. H. (2001). The paradoxes of MTBE. Toxicological Sciences, 61(2), 211-217.

[8] Nyman, P. O. (1961). Purification and properties of carbonic anhydrase from human erythrocytes. Biochimica et biophysica acta, 52(1), 1-12.

[9] Walls, D., McGrath, R., & Loughran, S. T. (2011). A Digest of Protein Purification. In Protein Chromatography (pp. 3-23).

[10] Innocenti, A., Scozzafava, A., Parkkila, S., Puccetti, L., De Simone, G., & Supuran, C. T. (2008). Investigations of the esterase, phosphatase, and sulfatase activities of the cytosolic mammalian carbonic anhydrase isoforms I, II, and XIII with 4-nitrophenyl esters as substrates. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 18(7), 2267-2271.

[11] Tashian, R. E. (1992). Genetics of the mammalian carbonic anhydrases. Advances in genetics. 1992 ,Elsevier. P. 321-356., 30, 35 .

[12] Smith, K. S., & Ferry, J. G. (2000). Prokaryotic carbonic anhydrases. FEMS microbiology reviews, 24(4), 335-366.

[13] Khatibi, A., Ma'mani, L., Khodarahmi, R., Shafiee, A., Maghami, P., Ahmad, F., … & Moosavi-Movahedi, A. A. (2015). Enhancement of thermal reversibility and stability of human carbonic anhydrase II by mesoporous nanoparticles. International journal of biological macromolecules, 75, 67-72.

[14] Freskgaard, P. O., Maartensson, L. G., Jonasson, P., Jonsson, B. H., & Carlsson, U. (1994). Assignment of the contribution of the tryptophan residues to the circular dichroism spectrum of human carbonic anhydrase II. Biochemistry, 33(47), 14281-14288.

[15] Gharib, R., Khatibi, A., Khodarahmi, R., Haidari, M., & Husseinzadeh, S. (2020). Study of glycation process of human carbonic anhydrase II as well as investigation concerning inhibitory influence of 3-beta-hydroxybutyrate on it. International journal of biological macromolecules, 149, 443-449.

[16] Segel ,I.H. (1993). Enzyme kinetics. John Wiley & Sons, New York, Chapter 3-4

[17] Supuran, C. T. (2008). Diuretics: from classical carbonic anhydrase inhibitors to novel applications of the sulfonamides. Current pharmaceutical design, 14(7), 641-648.

[18] Temperini, C., Cecchi, A., Scozzafava, A., & Supuran, C. T. (2009). Carbonic anhydrase inhibitors. Comparison of chlorthalidone, indapamide, trichloromethiazide, and furosemide X-ray crystal structures in adducts with isozyme II, when several water molecules make the difference. Bioorganic & medicinal chemistry, 17(3), 1214-1221.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.8.3]

Biotechnology-Tarbiat Modares University

Investigation of the effect of MTBE as an environmental pollutant on the structure structure and thermal stability of human carbonic anhydrase II

Mahsa Pourbabadi[1], Ali Khatibi[2*], Reza Khodarahmi[3]

1- M.Sc., Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
3- Professor, Department of Pharmacognosy and Biotechnology, Faculty of Pharmacy, University of Medical Sciences, Kermanshah, Kermanshah, Iran.

*corresponding author: khatibi@alzahra.ac.ir
Received: 2021/8/30 Accepted: 2022/1/4

Abstract

Methyl tertiary-butyl ether (MTBE) One of the gasoline additives used to increase octane and reduce greenhouse gas emissions, MTBE can enter the human blood flow through different ways including inhalation, oral and skin contact. Human carbonic anhydrase is one of the metalloenzymes that is found in almost all living organisms and has been extensively studied and many diseases are associated with carbonic anhydrase. In this study, the effect of MTBE proximity with human carbonic anhydrase II enzyme on enzyme activity was investigated by visible-ultraviolet spectroscopy and changes in enzyme Tm at different concentrations of MTBE were reported. In addition, the structural changes of the enzyme in the presence of MTBE were examined by intrinsic fluorescence spectroscopy. The results show that the enzyme activity in the presence of MTBE is inhibited by liner-complex mechanism. The results of intrinsic fluorescence spectroscopy of the enzyme show changes in the structure of the enzyme in the presence of MTBE. Also, following the binding of MTBE to the enzyme, the thermal stability of the enzyme is reduced and it becomes sensitive to temperature changes.

Keywords: Carbonic anhydrase, Spectroscopy, Enzymatic kinetics, MTBE

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.2.8.3]