

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

مهسا پوربابادی¹، علی خطیبی^{2*}، رضا خدارحمی³

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

2- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، 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

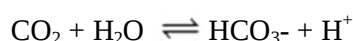
MTBE¹ یکی از افزودنی های بنزین که به منظور افزایش اکتان و کاهش تولید گازهای گلخانه ای استفاده می شود، MTBE می تواند از راه های مختلف مانند استنشاق، خوراکی و تماس پوستی وارد جریان خون انسان شود. همچنین کربنیک انیدراز انسانی یکی از متالوآنزیم هاست که تقریباً در تمام موجودات زنده یافت می شود و مورد مطالعات گسترده ای قرار گرفته و بیماری های متعددی با کربنیک انیدراز در ارتباط هستند. در این مطالعه اثر مجاورت MTBE با آنزیم کربنیک انیدراز II انسانی بر فعالیت آنزیم با روش های طیف سنجی مرئی - فرابنفش بررسی شد و تغییرات Tm آنزیم در غلظت های مختلف از MTBE گزارش شده است. همچنین تغییرات ساختاری آنزیم در حضور MTBE با طیف سنجی فلورسنس ذاتی نیز بررسی شد. نتایج نشان می دهد فعالیت آنزیم در مجاورت MTBE با سازوکار مختلط خطی مهار شده است. نتایج مربوط به طیف سنجی فلورسنس ذاتی آنزیم تغییرات ساختار در حضور MTBE را نشان می دهد. همچنین در پی اتصال MTBE به آنزیم، پایداری حرارتی آنزیم کاهش پیدا کرده و نسبت به تغییرات دما حساس شده است.

کلید واژگان: کربنیک انیدراز، طیف سنجی، سینتیک آنزیمی، MTBE.

¹ Methyl tertiary-butyl ether

1- مقدمه

کربنیک انیدراز انسانی¹ یکی از متالوآنزیم‌هایی است که تقریباً در تمام موجودات زنده یافت می‌شود و مورد مطالعات گسترده‌ای بوده است. این آنزیم واکنش هیدراسیون برگشت پذیر دی‌اکسید کربن به بیکربنات را کاتالیز می‌کند [1].



از آنجایی که 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، گلوکونوژنز)، دفع الکترولیت‌ها، بازجذب استخوانی، کلسیفیکاسیون، تولید مایع مغزی- نخاعی، تولید مایع زلالیه و همچنین در تثبیت دی‌اکسید کربن در دیاتوم‌ها نیز نقش دارد [2].

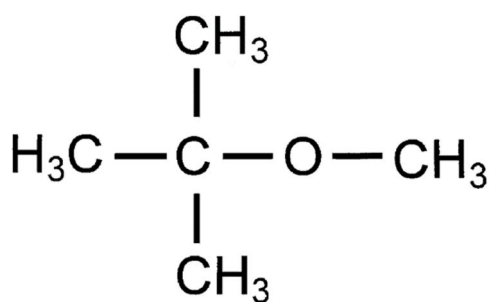
نقص در آنزیم کربنیک انیدراز انسانی با بیماری‌های زیادی در ارتباط است، از جمله سرطان، صرع، گلوکوم، اختلال‌های عصبی، چاقی، پوکی استخوان، زخم معده و دوازدهه [1].

کربنیک انیدراز در شش گروه با کدگذاری متمایز ژنی تقسیم‌بندی می‌شود: آلفا (α)، بتا (β)، گاما (γ)، دلتا (δ)، زتا (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 MTBE² 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 (2/5-11) 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 زیست محیطی، 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

² Methyl tertiary-butyl ether

1 Human Carbonic Anhydrase

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

استفاده گسترده از MTBE به عنوان افزودنی برای افزایش کیفیت بنزین منجر به افزایش آلودگی زیست محیطی این ماده در دهه‌های گذشته شده است. تاکنون بررسی‌های زیادی از تأثیر MTBE بر سلامت انسان و آلودگی‌های آب و هوا 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 مبتلا شدن این موش‌ها به سرطان خون در اثر مصرف 1000 میلی گرم 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 به طور کلی MTBE باعث افزایش سرعت تجمع هموگلوبین شده و فعالیت آنتی چابرونی دارد. در افراد دیابتی اثرهای شدیدتری از جمله تولید گونه‌های فعال رادیکال اکسیژن و تخریب گروه هم مشاهده می‌شد. در بررسی مدل سازی مولکولی¹ مشخص شد جایگاه اتصال

MTBE در هموگلوبین در نزدیکی جایگاه گروه هم قرار گرفته است [6].

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

2- مواد و روش‌ها

مواد و دستگاه‌های استفاده شده در این مطالعه شامل آنزیم کربنیک انیدراز II تخلیص شده از نمونه خون انسانی به روش نیمن² [8]، استونیتریل و متانول و تریس (مرک - آلمان)، پارانیتروفنیل استات³ به عنوان سوسترای آنزیم کربنیک انیدراز (سیگما)، MTBE⁴ تهیه شده از شرکت پتروشیمی بندر ماهشهر B.I.P.C، اسپکتروفوتومتر مرئی - فرابنفش (Shimadzu-0013 - ژاپن)، اسپکتروفوتومتر فلورسنس (Carry 100 bio - استرالیا) و دستگاه pH متر (Beckman - سوئیس) می‌باشد.

2-1 خالص سازی آنزیم

خالص سازی پروتئین‌ها، مرحله‌ای ضروری برای بررسی ساختار و درک اعمال آنها است. روش‌های متعددی برای جداسازی پروتئین‌ها وجود دارد که با به کارگیری آنها می‌توان پروتئین‌ها را با موفقیت تخلیص نمود. متداول ترین روشی که امروزه برای تخلیص استفاده

² Nyman

³ p-Nitrophenylacetate (p-NPA)

⁴ Methyl tertiary-butyl ether

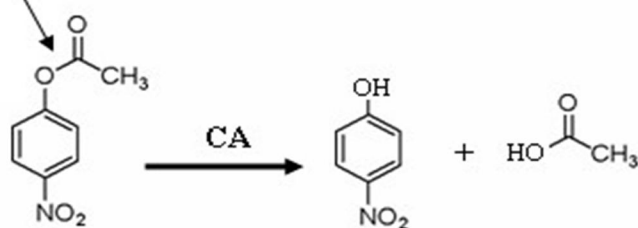
¹ Molecular Docking



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 $76-79^\circ C$ دارد. یکی از واکنش‌هایی که به وسیله آنزیم کربنیک انیدراز II انسانی کاتالیز می‌شود، استفاده از پارانیتروفنیل استات به عنوان 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 به وسیله پوکر و استون پایه گذاری شده است [12] (شکل 3).

Esterase Activity



شکل 3 واکنش استراتژی آنزیم کربنیک انیدراز

استرازی آنزیم از غلظت 0/05 میلی گرم بر میلی لیتر آنزیم و غلظت‌های مختلف سوبسترای پارانیتروفنیل استات (2 تا 6 میلی مولار) در بافر تریس 50 میلی مولار

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 هسته دوستی آب (یون هیدروکسید) به اتم مرکزی آن (کربونیل CO) هیدرولیز می‌شود؛ اما زمانی که کربنیک انیدراز در محیط حضور داشته باشد، به این دلیل که حاوی باز قوی تری (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].

برای سنجش فعالیت نمونه‌های آنزیمی، از حالت کینتیک دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی - فرابنفش استفاده شد. در این آزمایش به منظور محاسبه سرعت واکنش

و در سل با ضخامت 1 سانتیمتر استفاده شد. استوک سوپسترا با حل کردن پودر پارانیتروفنیل استات در حلال استونیتریل تهیه گردید. هر اندازه گیری سینتیکی حداقل سه بار تکرار شد.

3-2 اثر MTBE بر غیرطبیعی شدن 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 طول موج 280 نانومتر به وسیله دستگاه ثبت شد. در این آزمایش همانند آزمایش قبلی از غلظت 0/05 میلی گرم بر میلی لیتر آنزیم و در حضور و عدم حضور غلظت‌های مختلف MTBE (30 و 40 ماکرومولار) در بافر تریس 50 میلی مولار و در سل با ضخامت 1 سانتی متر استفاده شد.

4-2 اندازه گیری‌های فلورسنس ذاتی آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف MTBE

فلورسنس ذاتی پروتئین‌ها وابسته به اسیدهای آمینه آروماتیک (به خصوص اسید آمینه تریپتوفان) می باشد. آنزیم کربنیک انیدراز II در ساختار خود 7 اسید آمینه تریپتوفان دارد [14]. برای انجام اندازه گیری تغییرات

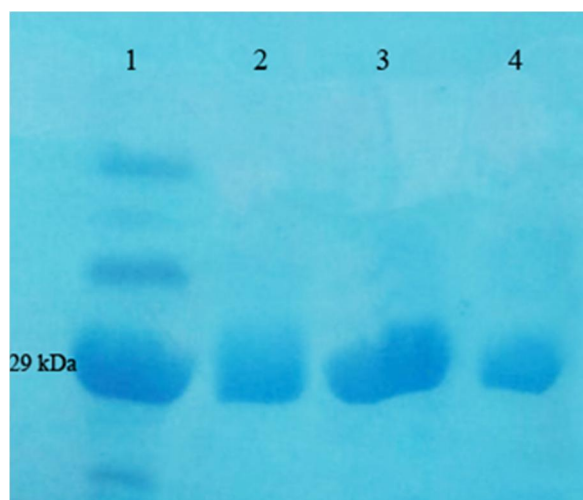
فلورسنس ذاتی آنزیم از طول موج تهیج 280 نانومتر برای برانگیختگی زیرواحدهای تریپتوفان و اجتناب از برانگیختگی باقیمانده‌های تیروزین [15] استفاده شد و طیف نشری در محدوده 300 تا 600 نانومتر ثبت شد. تمامی این آزمایش‌ها در دمای 25°C و در بافر تریس 50 میلی مولار با pH برابر 7/4 انجام شده است و پهنای شکاف‌های تهیج و نشر دستگاه به ترتیب 5 و 10 نانومتر انتخاب شد.

ضخامت کووت استفاده شده در همه سنجش‌ها 1 سانتی متر و غلظت آنزیم استفاده شده در این آزمایش 0/05 میلی گرم بر میلی لیتر بود. روش آزمایش به این صورت بود که برای اندازه گیری 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 خالص شده بعد از ستون کروماتوگرافی در شکل 4 به نمایش گذاشته شده است. این شکل نشان دهنده تخلیص خوب آنزیم است.



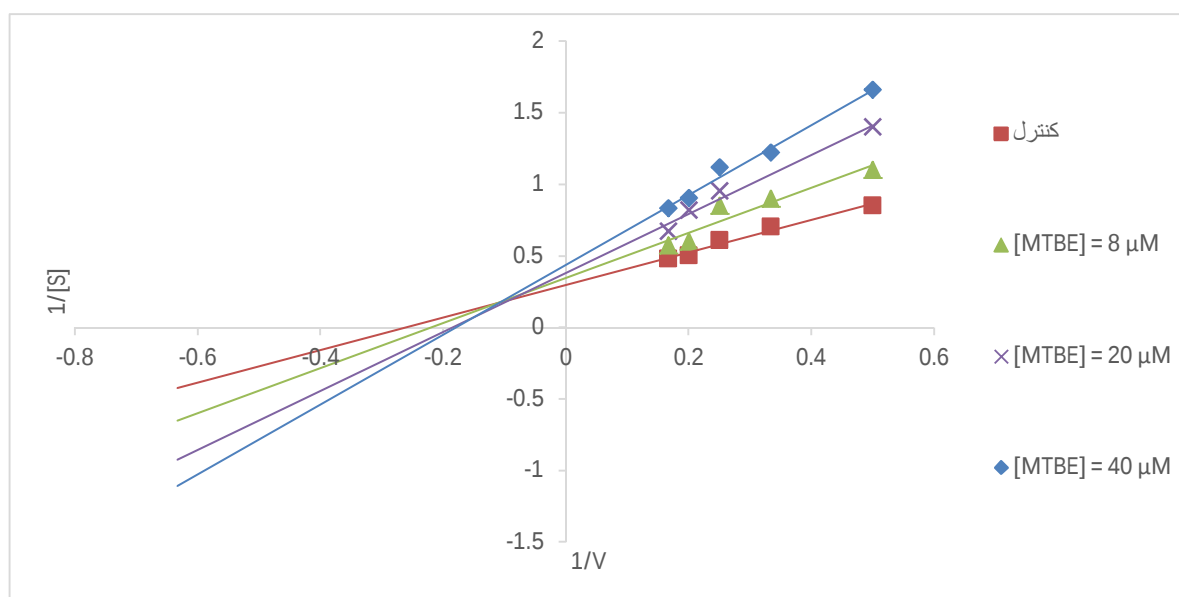
شکل 4 SDS-PAGE نمونه‌های خالص‌شده آنزیم کربنیک انیدراز II انسانی به وسیله ستون کروماتوگرافی تعویض آنیونی DEAE-سفارز. 1 نمونه ناخالص قبل از ستون، 2، 3 و 4 سه غلظت متفاوت از نمونه خالص بعد از ستون. همان‌طور که در تصویر مشاهده می‌شود، تک‌باندبودن الکتروفورگرام SDS-PAGE نمونه‌های 2، 3 و 4 نشان‌دهنده خلوص 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 به گونه‌ای تغییر پیدا کرده که سوبسترا نتوانسته است به خوبی 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 لاینیور-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.

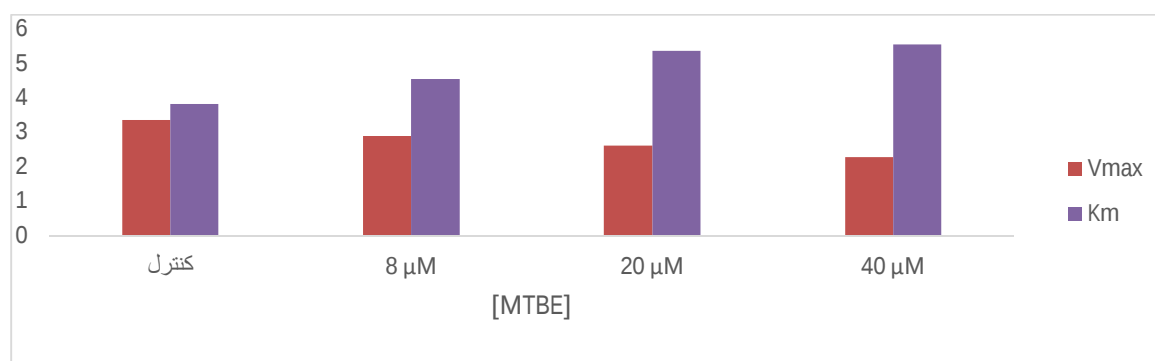
شکل 5 نمودار لاینیور-برک مربوط به فعالیت آنزیم را نشان می‌دهد، در این نمودار از رسم تغییرات $1/V_0$ در مقابل $1/S$ خط راستی به دست می‌آید که عرض از مبدأ آن $1/V_{max}$ و شیب نمودار K_m/V_{max} را مشخص می‌کند. همچنین در جدول 1 مقادیر K_m و V_{max} آنزیم آورده شده است. در شکل 6 به خوبی تغییرات K_m و V_{max}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



شکل 5 نمودار لاینویور-برک کربنیک انیدراز II 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 V_{max} و K_m آنزیم کربنیک انیدراز II انسانی در عدم حضور MTBE و حضور غلظت‌های مختلف MTBE

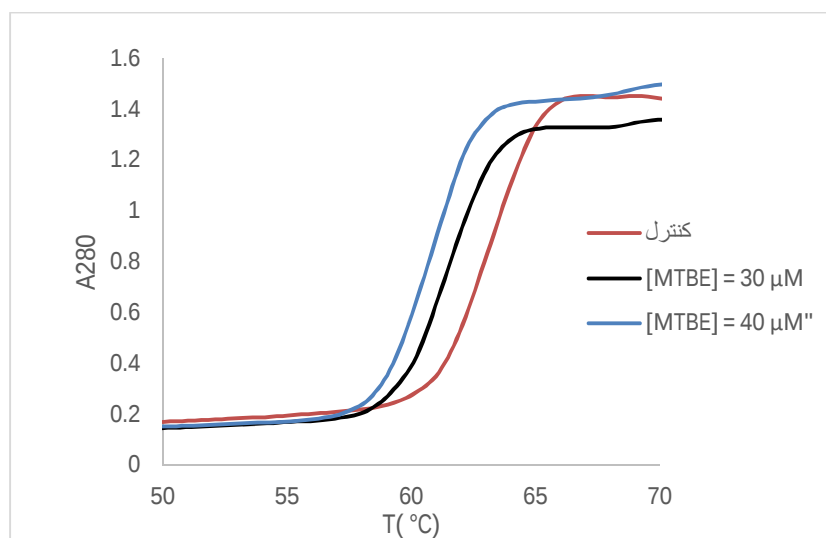
	[MTBE] = 0 (کنترل)	[MTBE] = 8 μ M	[MTBE] = 20 μ M	[MTBE] = 40 μ M
V_{max} (U/ min/mg protein)	3/35	2/9	2/6	2/3
K_m (mM)	3/8	4/5	5/4	5/6



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)

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 به گونه‌ای 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



شکل 7 اثر MTBE بر غیرطبیعی شدن 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)

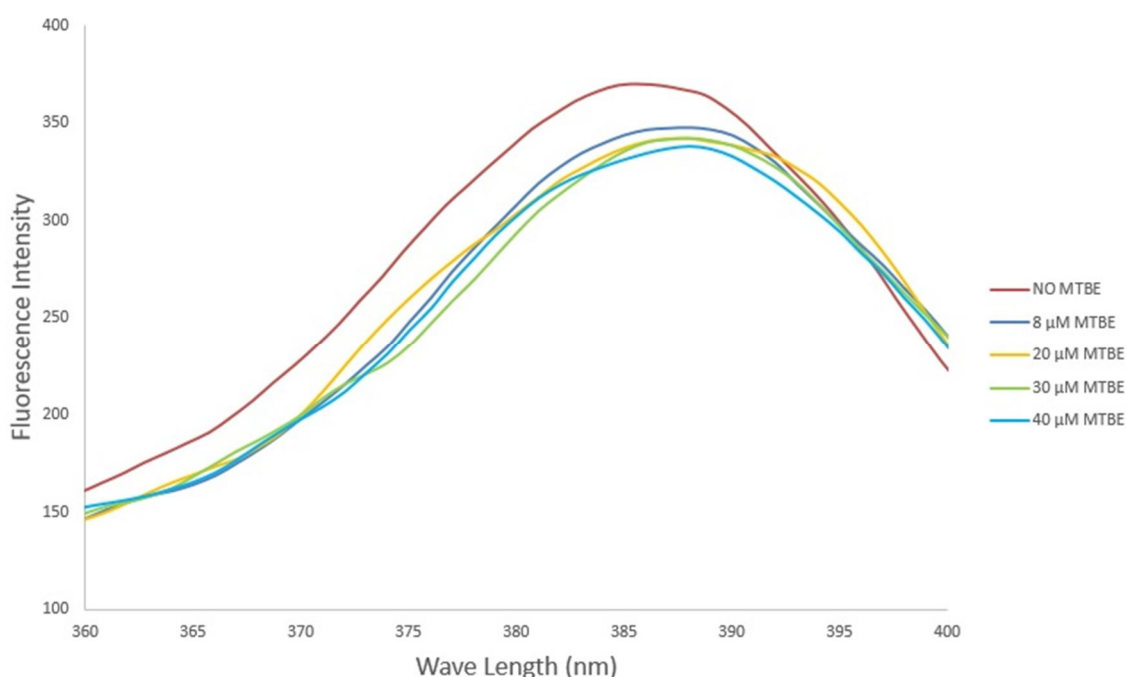
نشان می‌دهد محل اتصال MTBE در نزدیکی و یا در موقعیت تریپتوفان‌های سطحی آنزیم قرار دارد. بیشینه طیف نشری کربنیک انیدراز II در حضور MTBE از 385 nm به 389 nm جابه‌جا شده است.

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

3-4 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 تهیج 280 نانومتر بوده است، همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، شدت فلورسنس ذاتی آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف MTBE نسبت به حالت کنترل کاهش پیدا می‌کند. این کاهش شدت نشر



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 میلی مولار 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 آنجایی که 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، گلوکونئوزنز).

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 ایندپامین که از داروهای سولفانامیدی است، این دارو در درمان بیماری‌های مختلف ازجمله دیابت نوع 2، چاقی، عوارض مربوط به بیماری‌های متابولیک و... کاربرد دارد. همچنین به‌عنوان داروی ضد فشارخون استفاده می‌شود و به‌طور قابل توجه باعث کاهش

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، در نتیجه 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.

- 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., & Husseinazadeh, 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, J.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.
- [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

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

Mahsa Pourbabadi¹, Ali Khatibi^{2*}, Reza Khodarahmi³

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 T_m 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