

مطالعه‌ی فرآیند گلیکته شدن آنزیم کربنیک انیدراز II انسانی و بررسی تأثیر روزه داری بر فعالیت آنزیم، با استفاده از روش‌های طیف سنجی

راضیه قریب^۱، علی خطیبی^{۱*}

چکیده

مقدمه: گلیکته شدن، اتصال غیرآنزیمی بین گروه کربونیل قندها با گروه‌های آمین پروتئین‌ها است که این فرآیند منجر به ایجاد تغییرات ساختاری و عملکردی در پروتئین‌ها می‌گردد. محصولات نهایی فرآیند گلیکته شدن پیشرفته (Advanced glycation end-product, AGEs) آخرین مرحله در این فرآیند است که ماهیتی به شدت اکسیدکننده و طبیعتی بسیار تخریبی دارد و عوارض زیادی را برای بیماران دیابتی ایجاد می‌کند.

روش‌ها: در این تحقیق اثر ۳-بتا-هیدروکسی بوتیرات یا به عبارتی تأثیر روزه‌داری بر فرآیند گلیکته شدن آنزیم کربنیک انیدراز II انسانی در شرایط فیزیولوژیکی (دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و pH معادل ۷/۴) با استفاده از روش‌های مختلف طیف سنجی فرابنفش-مرئی (UV-Vis)، فلورسانس و دو رنگ‌نمایی چرخشی (CD) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور نمونه‌های مختلف آنزیم کربنیک انیدراز II انسانی کنترل (بدون گلوکز و ۳-بتا-هیدروکسی بوتیرات)، آنزیم در حضور گلوکز تنها، آنزیم در حضور ۳-بتا-هیدروکسی بوتیرات تنها و آنزیم در حضور گلوکز و ۳-بتا-هیدروکسی بوتیرات به مدت ۳۵ روز تیمار گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان می‌دهد که ۳-بتا-هیدروکسی بوتیرات، که در زمان روزه‌داری به مقدار بسیار زیاد در بدن افزایش می‌یابد، به‌عنوان مهارکننده‌ی فرآیند گلیکته شدن عمل کرده و منجر به کاهش عوارض اتصال قند به آنزیم می‌گردد و از تشکیل AGEs جلوگیری می‌کند و مانع تغییر فعالیت سینتیکی آنزیم می‌شود.

نتیجه‌گیری: روزه‌داری می‌تواند با افزایش چشمگیر در میزان تولید ۳-بتا-هیدروکسی بوتیرات به‌عنوان یک مهارکننده‌ی فرآیند گلیکیشن، نقش مهمی را در حفظ سلامت بدن و رفع عوارض بسیاری از بیماری‌ها از جمله دیابت ایفا کند.

واژگان کلیدی: کربنیک انیدراز II انسانی، گلوکز، ۳-بتا-هیدروکسی بوتیرات، گلیکیشن، روزه‌دار

۱- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

***نشان‌ی:** تهران، خیابان ده ونک، میدان شیخ بهایی، دانشگاه الزهراء (س)، دانشکده‌ی علوم زیستی، کدپستی: ۱۹۹۳۸۹۳۹۷۳، تلفن: ۰۲۱۸۵۶۹۳۰۱۳،

نمبر: ۰۲۱۸۸۰۵۸۹۱۲، پست الکترونیک: khatibi@alzahra.ac.ir

آزمایشات در دمای 25°C و در بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار با pH برابر ۷/۴ انجام شده است. و پهنای شکاف‌های تهییج و نشر دستگاه به ترتیب ۵ و ۱۰ نانومتر انتخاب شدند.

اندازه‌گیری فلوروسانس ذاتی

جهت انجام اندازه‌گیری تغییرات فلوروسانس آنزیم‌های انکوبه و آنزیم تازه از دستگاه Carry 100 Bio و از طول موج تهییج ۲۸۰ نانومتر برای برانگیختگی باقیمانده‌های تریپتوفان و اجتناب از برانگیختگی باقیمانده‌های تیروزین [۲۵] و ثبت طیف نشی در محدوده‌ی ۳۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر استفاده شد. غلظت آنزیم مورد استفاده در این آزمایش ۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود و پهنای شکاف تهییج و نشر به ترتیب ۵ و ۱۰ نانومتر انتخاب شدند.

اندازه‌گیری فلوروسانس AGE

اندازه‌گیری فلوروسانس محصولات گلیکته شده در طول موج های ۳۲۲، ۳۷۵ و ۳۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه Carry 100 Bio صورت گرفت. این طول موج‌ها برای تشکیل AGE هستند. تمام نمونه‌ها با غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آنزیم در بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار با pH، ۷/۴ تهیه شدند.

اندازه‌گیری فلوروسانس خارجی (ANS)

برای اندازه‌گیری فلوروسانس خارجی نمونه‌های آنزیمی از دستگاه Carry 100 Bio استفاده شد. استوک ANS با غلظت ۱۰ میلی‌مولار در بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷/۴ و در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتیگراد برای بررسی نشر خارجی پروتئین استفاده شد. طول موج تحریک برای فلوروسانس ANS در ۳۸۰ نانومتر تنظیم شد و طیف‌های نشی از ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر ثبت شد و پهنای شکاف تهییج و نشر به ترتیب در ۵ و ۱۰ نانومتر تنظیم شد.

انیدراز در این شرایط ممکن است تأثیر به‌سزایی در درمان ناهنجاری‌های متابولیکی داشته باشد.

روش‌ها

تخلیص و انکوباسیون

آنزیم کربنیک انیدراز II انسانی در طی ۳ مرحله به روش نیمین از گلبول‌های قرمز خون تخلیص شد [۲۲] و نتیجه‌ی تخلیص با استفاده از کروماتوگرافی تعویض آنیونی تأیید گردید و غلظت نهایی آنزیم با قانون بیر-لامبرت تعیین شد [۲۳]. انکوباسیون آنزیم کربنیک انیدراز II انسانی با غلظت‌های ۲۰ میکرومولار آنزیم و گلوکز ۴۰ میلی‌مولار، در حضور و غیاب ۳-بتا هیدروکسی بوتیرات با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر فسفات سدیم ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) ۵۰ میلی‌مولار و در شرایط استریل و فیزیولوژیکی (تاریک، دمای 37°C درجه‌ی سانتی‌گراد و pH معادل ۷/۴) در ویال‌های درپوش دار ۱/۵ میلی‌لیتری به مدت ۳۵ روز انجام گرفت.

بررسی فعالیت سینتیکی آنزیم

یکی از واکنش‌هایی که توسط 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 زرد رنگ است که در ۴۰۰ نانومتر جذب دارد. این روش سنجش فعالیت توسط پوکر و استون پایه‌گذاری شده است [۲۴]. در این آزمایش به‌منظور محاسبه‌ی سرعت واکنش استرازی آنزیم از غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آنزیم و غلظت‌های مختلف سوبسترای پارانیتروفنیل استات ۲ تا ۶ میلی‌مولار در بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار و در سل با ضخامت ۱ سانتیمتر و از مد کیتیک دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی-فرابنفش استفاده شد.

اندازه‌گیری‌های فلوروسانس

جهت اندازه‌گیری‌های فلوروسانس آنزیم کربنیک انیدراز II انسانی از دستگاه Carry 100 Bio استفاده شد. کلیه‌ی این

که در $[\theta]_{\lambda}$ بیضی واری مشاهده شده در یک طول موج مدنظر برحسب (milidegree)، M_0 متوسط وزن هر آمینوآسید برحسب دالتون، C غلظت پروتئین بر حسب mg/ml و L مسیر عبور نور برحسب cm است. تحلیل نتایج به‌دست آمده از این بررسی با نرم‌افزار Cdnن موجود در سایت <http://bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdnن> صورت پذیرفت.

یافته‌ها

تخلیص آنزیم و ارزیابی کمی و کیفی فرایند

کربنیک انیدراز II انسانی همان‌طور گفته شد، با استفاده از ستون کروماتوگرافی تعویض آنیونی DEAE- سفارز از اریتروسیت انسانی خالص شد که نتایج SDS-PAGE نمونه‌های ناخالص قبل از ستون و خالص شده بعد از ستون کروماتوگرافی در شکل ۱ به نمایش گذاشته شده است. این شکل به وضوح نشان دهنده‌ی درصد بالای خلوص آنزیم است.

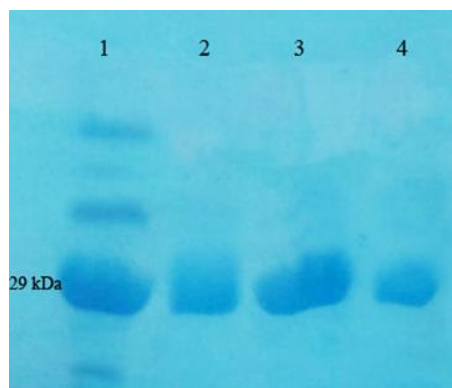
طیف سنجی فلورئورسانس هم‌زمان^۱

طیف سنجی فلورئورسانس هم‌زمان به‌منظور بررسی تغییر قطبیت محیط اطراف رزیدوهای تایروزین و تریپتوفان در نمونه‌های مختلف آنزیمی با غلظت نهایی 0.05 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آنزیم در بافر فسفات سدیم 50 میلی‌مولار با pH ، 7.4 و در دمای اتاق انجام گرفت. برای این منظور، تغییرات طیف نشی در دلتا لامبدهای 15 و 60 نانومتر مورد استفاده قرار گرفت و طیف نشی در بازه‌ی 220 تا 600 نانومتر ثبت شد.

مطالعه‌ی دو رنگ نمایی دورانی^۲ (CD)

مطالعه‌ی تغییرات ساختار دوم آنزیم با غلظت 0.4 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر فسفات سدیم 50 میلی‌مولار بافر فسفات سدیم و pH معادل 7.4 در محدوده‌ی far-UV با استفاده از دستگاه J-810 با طول مسیر نور 0.1 سانتیمتر در دمای 25 درجه‌ی سانتیگراد انجام شد. نتایج به‌دست آمده از CD با کاربرد مطالعه‌ی زیر به بیضی وار مولار $[\theta]_{\lambda}$ برحسب $(deg\cdot cm^2\cdot mol^{-1})$ تبدیل شد.

$$[\theta]_{\lambda} = \frac{[\theta]_{\lambda} M_0}{10CL}$$



شکل ۱- SDS-PAGE نمونه‌های خالص شده آنزیم کربنیک انیدراز II انسانی به‌وسیله ستون کروماتوگرافی تعویض آنیونی

DEAE- سفارز. ۱: نمونه‌ی ناخالص قبل از ستون، ۲، ۳ و ۴: سه غلظت متفاوت از نمونه‌ی خالص بعد از ستون. همان‌طور که در تصویر مشاهده می‌شود تک باند بودن الکتروفورگرام SDS-PAGE نمونه‌های ۲، ۳ و ۴: نشان دهنده‌ی خلوص نمونه است

سنجش فعالیت آنزیمی

با توجه به گزارشات انجام گرفته بر روی اثر فرآیند گلیکیشن بر فعالیت سیتیکی آنزیم کربنیک انیدراز، سرعت فعالیت استرازی آنزیم در دمای 25 درجه‌ی سانتی‌گراد در حضور غلظت

های مختلف از سوبسترای p-NPA ($6-2$ میلی‌مولار) اندازه گیری شد و سپس با استفاده از نمودار لاینیور-برک و معادله ی خط آن فعالیت استرازی نمونه‌های مختلف آنزیمی محاسبه شد. در این نمودار از رسم تغییرات $1/V_0$ در مقابل $1/S$ خط

² Circular Dichroism

¹ Synchronous fluorescence spectroscopy

فعالیت آنزیم گلاایک شده در روز ۳۵ام، یعنی زمانی که AGEs تشکیل می‌شود نسبت به تمام نمونه‌های دیگر کاهش یافته و تقریباً برابر صفر است. همچنین نتایج ما در مورد K_m نشان می‌دهد (جدول ۱) که مقدار K_m در آنزیم گلاایک شده نسبت به نمونه‌های دیگر تفاوت معناداری دارد و مقدار آن افزایش یافته است ($P < 0.001$) که این افزایش مقدار K_m نشان دهنده‌ی کاهش تمایل آنزیم گلاایک به سوبسترا است که می‌تواند به دلیل از بین رفتن ساختار جایگاه فعال آنزیم باشد. این درحالی که مقدار K_m در بین نمونه‌های دیگر نسبت به هم تفاوت معناداری را نشان نمی‌دهد ($P > 0.09$).

راستی به دست می‌آید که عرض از مبدا آن $1/V_{max}$ و شیب نمودار K_m/V_{max} را مشخص می‌کند. بررسی‌های ما نتایج جالبی را از فعالیت آنزیم کربنیک انیدراز ۲ انسانی گلاایک شده نشان می‌دهد (جدول ۱). سرعت فعالیت آنزیم گلاایک شده (HCA+Glc) در روز ۲۱ام نسبت به آنزیم تازه (HCA 0D) و آنزیم کنترل (HCA 21D)، افزایش چشمگیری داشته است و تفاوت معناداری را نسبت به دیگر نمونه‌ها نشان می‌دهد ($P < 0.001$). این درحالی است که بین نمونه‌های HCA 21D، HCA+BHB و HCA+Glc+BHB تفاوت معناداری مشاهده نشده است ($P > 0.005$) و سرعت فعالیت این نمونه‌ها نسبت به آنزیم تازه و آنزیم گلاایک شده کاهش یافته است. سرعت

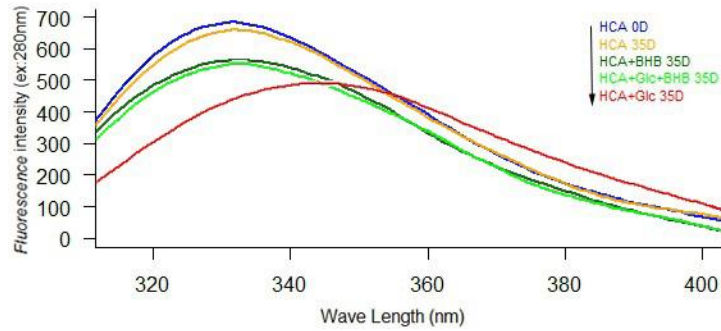
جدول ۱- مقادیر V_{max} و K_m آنزیم کربنیک انیدراز II انسانی در نمونه‌ی تازه (HCA 0D)، کنترل (HCA 35D) و تغییر یافته (HCA+Glc، HCA+Glc+BHB و HCA+BHB)

	HCA 0 D (native)	HCA 21 D (control)	HCA + BHB 21 D	HCA + Glc 21 D	HCA +Glc + BHB 21 D
V_{max}	0.4 ± 1.6	0.0 ± 0.2	0.1 ± 0.6	0.9 ± 3.6	0.0 ± 0.6
K_m	2.5 ± 5.5	2.1 ± 4.9	1.3 ± 5.0	6.4 ± 24.7	0.3 ± 4.6

اعداد به شکل میانگین \pm انحراف استاندارد بیان شده‌اند.

فلوئورسانس نمونه‌ی آنزیم کربنیک انیدراز همراه با گلوکز (HCA+Glc) در قیاس با نمونه‌های دیگر یک red shift مشاهده شد. بیشترین کاهش نشر و red shift بیانگر آن است که Glc بیشترین اثر را در آشفتگی محیط اطراف اسید آمینه‌های تریپتوفان به دلیل ایجاد تغییر در قطبیت محلول برعهده دارد. یعنی Glc باعث باز شدن ساختار سوم آنزیم و در نتیجه در معرض قرار گرفتن اسید آمینه‌های تریپتوفان در حلال و نهایتاً خاموشی نشر آنها شده است. رخداد این پدیده به معنای از دست رفتن ساختار سوم و واسرشتگی ساختار HCA است. همچنین نتایج به دست آمده در این آزمایش نشان می‌دهد که BHB اثر Glc بر روی HCA را کاهش داده و در نتیجه ساختار HCA (HCA+Glc+BHB) کمتر باز شده و شدت نشر در مقایسه با نمونه HCA+Glc کمتر کاهش می‌یابد.

نتایج مربوط به فلوئورسانس ذاتی نمونه‌های مختلف HCA II طیف فلوئورسانس ذاتی نمونه‌ی تازه (HCA 0D)، کنترل (HCA 35D) و HCA با Glc، BHB، HCA+BHB در شکل ۲ نشان داده شده است. در همه‌ی آزمایشات طول موج تهییج ۲۹۰ نانومتر بود. نتایج ساختار سوم HCA از طریق نشر ذاتی، تفاوت معنی‌داری را بین شدت نشر نمونه‌ی HCA+Glc 35D در مقایسه با نمونه‌های دیگر نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که نشر ذاتی نمونه‌ی آنزیمی تیمار شده با گلوکز (HCA+Glc) بعد از ۳۵ روز بیشترین کاهش نشر را در میان همه‌ی نمونه‌ها دارد. طیف نشر فلوئورسانس مابقی نمونه‌ها به ترتیب HCA+BHB، HCA+Glc+BHB، کنترل HCA و HCA تازه در بالای HCA+Glc قرار داشت. همچنین در طیف نشر



شکل ۲- تغییرات شدت فلئورسانس ذاتی

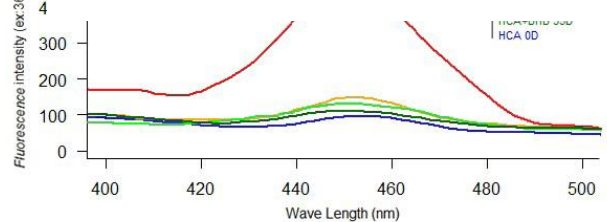
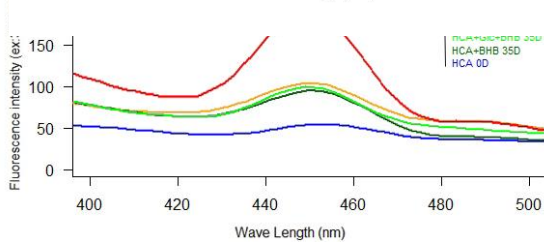
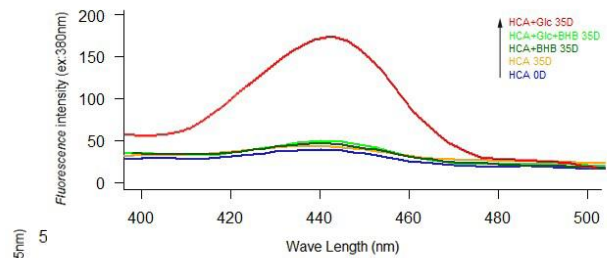
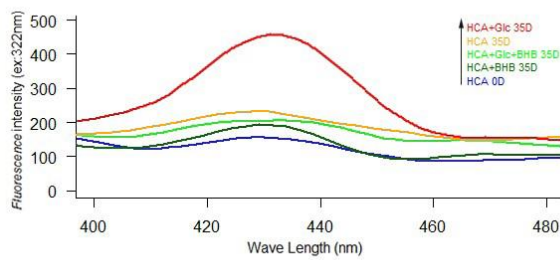
در نمونه‌های تازه (HCA 0D)، کنترل (HCA 35D) و تغییر شکل یافته (HCA+BHB 35D, HCA+Glc 35D, HCA+Glc+BHB 35D) آنزیم کربنیک انیدراز ۲ انسانی پس از تیمار ۳۵ روزه در ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد و در بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار و PH برابر ۷/۴

AGE در تحقیقات پیشین استفاده شده بودند [۲۶-۲۹]. همان طور که در شکل دیده می‌شود نشر فلئورسانس HCA انکوبه شده با گلوکز افزایش چشمگیری در مقایسه با نمونه‌های دیگر دارد. شایان ذکر است که براساس تحقیقات گذشته (۲۷-۳۰)، طول موج‌های ۳۲۲، ۳۶۵ و ۳۸۰ به ترتیب به برخی محصولات شناخته شده AGE، آرژپیریمیدین (Argpyrimidine)، و سپرلین (Vesperliline) و کراس لین (Crossline) مربوط است

نتایج مربوط به فلئورسانس محصولات نهایی گلیکته

(AGEs) در نمونه‌های مختلف HCA II

شکل ۳ طیف فلئورسانس نمونه‌ی HCA کنترل (HCA 35D) و HCA تغییر یافته (HCA+BHB, HCA+BHB+Glc) و HCA+Glc را پس از ۳۵ روز انکوبه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد با طول موج‌های تحریک ۳۲۲، ۳۶۵، ۳۷۵ و ۳۸۰ نانومتر و ثبت طیف در بازه ۳۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر نشان می‌دهد. تمام طول موج‌های مذکور برای ردیابی محصولات شناخته شده



شکل ۳- طیف نشر فلئورسانس AGEs

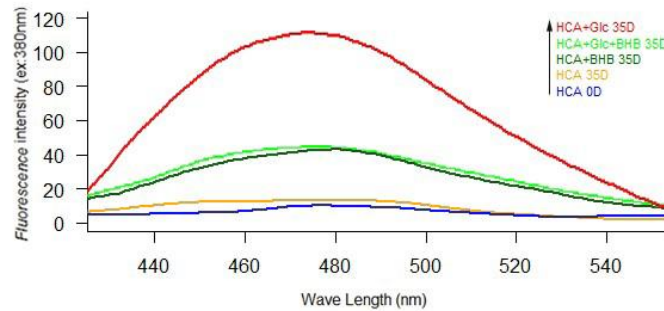
HCA 0D, HCA 35D, HCA+Glc, HCA+Glc+BHB, HCA+BHB) در طول موج تحریکی ۳۲۲، ۳۶۵، ۳۷۵ و ۳۸۰ پس از تیمار ۳۵ روزه با بافر فسفات سدیم ۵۰ mM و PH برابر ۷/۴. فلش، ترتیب افزایش شدت نشر فلئورسانس را نشان می‌دهد.

نتایج مربوط به طیف سنجی فلئورسانس در حضور پروب HCA+Glc+BHB 35D, HCA+Glc) و طول موج تحریکی ۳۸۰ نانومتر و ثبت طیف نشری در محدوده‌ی ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر را نشان می‌دهد.

نتایج مربوط به طیف سنجی فلئورسانس در حضور پروب

ANS^۳ در نمونه‌های مختلف HCA II

شکل ۴ نشر خارجی HCA تازه (HCA 0D)، HCA کنترل (HCA 35D) و HCA تغییر یافته (HCA+BHB 35D)



شکل ۴- نشر فلئورسانس کمپلکس HCA-ANS

در نمونه‌های HCA 0D, HCA 35D, HCA+Glc, HCA+Glc+BHB و HCA+BHB در طول موج تحریکی ۳۸۰ nm پس از تیمار ۳۵ روزه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد و بافر فسفات سدیم ۵۰ mM و pH برابر ۷/۴

موج تهیجی و طول موج نشری ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$) منعکس کننده طیف‌های کروموفورهای با ماهیت متفاوت است. در مورد پروتئین‌ها هنگامی که $\Delta\lambda$ برابر ۱۵ نانومتر باشد، طیف حاصل موید باقیمانده‌های تایروزین در پروتئین است و هنگامی که این اختلاف برابر ۶۰ نانومتر باشد طیف حاصل موید باقیمانده‌های تریپتوفان است [۳۰]. آنچه در شکل ۵ مشاهده می‌شود، طیف فلئورسانس هم‌زمان رزیدوهای تریپتوفان ($\Delta\lambda = 60\text{nm}$) و تایروزین ($\Delta\lambda = 15\text{nm}$) در نمونه‌های مختلف آنزیمی (HCA 0D, HCA 35D, HCA+BHB, HCA+Glc+BHB and HCA+Glc) است. مطالعه تغییرات HCA در حضور و غیاب گلوکز و همچنین در حضور و غیاب BHB با استفاده از این روش، اطلاعات زیادی را در رابطه با قطبیت محیط اطراف رزیدوهای آروماتیک در نمونه‌های مختلف آنزیمی فراهم می‌کند. همان‌طور که مشاهده می‌کنید، فلئورسانس باقیمانده‌های تایروزین ضعیف است و موقعیت طول موج حداکثری نشر هنگامی که $\Delta\lambda = 15\text{nm}$ است، تغییر نمی‌کند. درحالی‌که فلئورسانس باقیمانده‌های تریپتوفان قوی است و طول موج

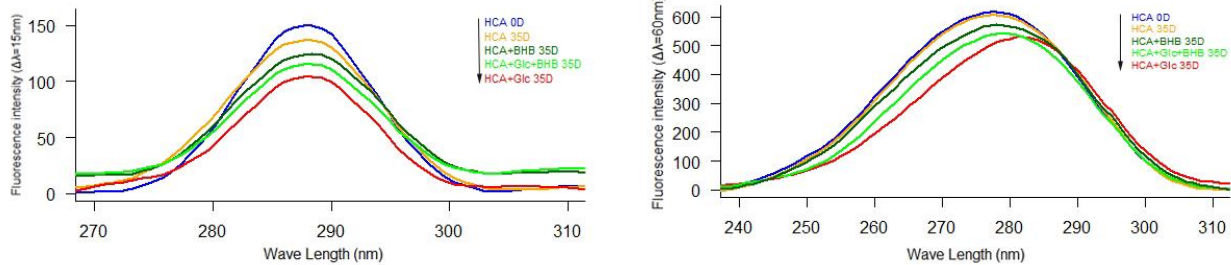
نتایج ما نشان می‌دهد HCA تیمار شده با گلوکز دارای بیشترین نشر فلئورسانس خارجی است و نشر نمونه‌های آنزیمی HCA+BHB, HCA+Glc+BHB, HCA 35D و HCA 0D به ترتیب در پایین آن قرار می‌گیرد. این رفتار، حاکی از آن است که اتصال گلوکز با HCA منجر به باز شدن ساختار سوم آنزیم شده و در نتیجه نواحی آبگریز آن بیشتر در معرض حلال قرار می‌گیرد. بنابراین با اتصال پروب ANS به این نواحی آبگریز، شدت نشر ANS افزایش می‌یابد. همچنین نتایج ما نشان می‌دهد که در حضور ۳-بتا‌هیدروکسی بوتیرات اتصال گلوکز به HCA کاهش و نشر خارجی کمتر افزایش می‌یابد. که با نتایج حاصل از نشر ذاتی HCA همخوانی دارد.

نتایج حاصل از طیف سنجی فلئورسانس هم‌زمان

از جمله کاربردهای روش طیف سنجی فلئورسانس هم‌زمان می‌توان به بررسی تغییرات آرایش فضایی پروتئین‌ها و نیز تعیین پروتئین‌ها، DNA یا ویتامین‌ها در غلظت‌های بسیار اندک اشاره کرد. تغییر دادن اختلاف طول موج، $\Delta\lambda$ یا مقدار D، بین طول

³ Anilino-1-naphthalene sulfonic acid

حداکثری نشر آن هنگامی که $\Delta\lambda=60\text{nm}$ است در نمونه HCA انکوبه شده با گلوکز به سمت طول موج‌های بلندتر جابجایی دارد.



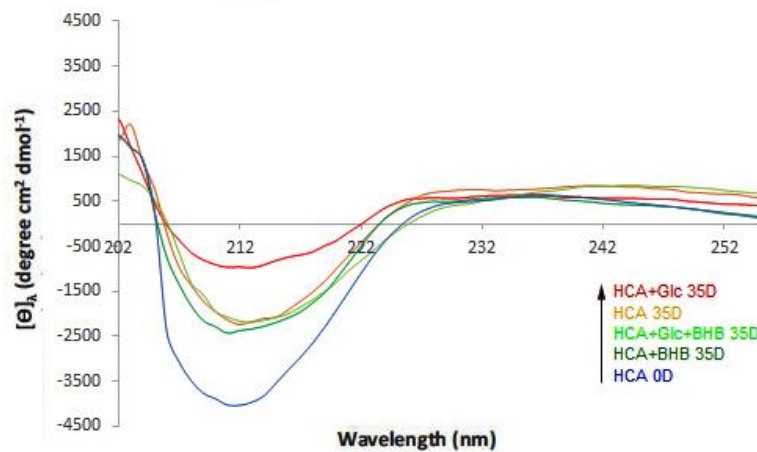
شکل ۵- طیف فلورسانس همزمان

HCA تازه (HCA 0D)، HCA کنترل (HCA 35D) و HCA تغییر یافته (HCA+Glc 35D، HCA+BHB 35D و HCA+Glc+BHB 35D) در $\Delta\lambda=60\text{nm}$ و $\Delta\lambda=15\text{nm}$

بیشترین بیضی واری مولار در نمونه HCA تازه (HCA 0D) و کمترین بیضی واری مولار در نمونه‌ی HCA+Glc 35D مشاهده شد.

نتایج حاصل از مطالعات دورنگ نمای دورانی

شکل ۶ تغییرات بیضی واری در نمونه‌های مورد بررسی پس از گذشت ۳۵ روز را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌کنید



شکل ۶- طیف‌های CD

نمونه تازه (HCA 0D)، کنترل (HCA 35D) و تغییر یافته (HCA+Glc، HCA+BHB، HCA+Glc+BHB) آنزیم در ناحیه‌ی فرابنفش دور پس از تیمار ۳۵ روزه در بافر فسفات سدیم ۵۰ mM در دمای ۳۷ °C و PH برابر ۷/۴

(35D) بوده است. به گونه‌ای که بیشترین افزایش بیضی واری مولار در طیف CD مربوط به HCA تازه (HCA 0D) و بیشترین کاهش در HCA تیمار شده با گلوکز مشاهده شد و نمونه‌های دیگر

نتایج CD در شکل ۶ و جدول ۲ نشان دهنده‌ی تغییرات معنادار ساختار دوم HCA در طول مدت ۳۵ روز در HCA تیمار شده با گلوکز نسبت به HCA تازه (HCA 0D) و HCA کنترل (HCA)

تیمار شده با گلوکز و ۳- بتا هیدروکسی بوتیرات (HCA+Glc+BHB 35D) از تأثیرات نامطلوب گلوکز به دلیل حضور ۳- بتاهیدروکسی بوتیرات در امان مانده است.

HCA 35D، HCA+BHB 35D، HCA+Glc+BHB 35D و HCA 35D به ترتیب کاهش بیضی واری در بین آنها قرار می‌گیرند. با توجه به جدول ۲ می‌توان بیان کرد که گلوکز ساختارهای ماریچج آلفا را کاهش داده و باعث افزایش صفحات بتا و ساختارهای نامنظم و تصادفی در HCA شده است. همچنین می‌توان بیان داشت HCA

جدول ۲- درصد عناصر ساختار دوم آنزیم کربنیک انیدراز ۲ انسانی در نمونه‌ی تازه (HCA 0D)، کنترل (HCA 35D) و تغییر یافته (HCA+Glc، HCA+Glc+BHB و HCA+BHB)

Samples	α -Helix	Antiparallel	Parallel	β -Turn	Random-coil
HCA 0D	۰/۵ ± ۱۵/۸	۵/۹ ± ۱۹/۱	۱/۱ ± ۱۶/۱	۰/۳ ± ۲۱/۱	۲/۶ ± ۴۸/۱
HCA 35D	۰/۹ ± ۱۴/۱	۵/۶ ± ۲۰/۳	۱/۵ ± ۱۶/۶	۰/۴ ± ۲۱/۵	۲/۳ ± ۵۱/۲
HCA + Glc + BHB	۰/۴ ± ۱۳/۹	۶/۸ ± ۲۱/۰	۱/۴ ± ۱۷/۷	۰/۳ ± ۲۱/۷	۲/۲ ± ۵۱/۳
HCA + BHB	۰/۶ ± ۱۴/۰	۶/۵ ± ۲۰/۷	۱/۴ ± ۱۷/۶	۰/۴ ± ۲۱/۶	۲/۲ ± ۵۱/۱
HCA + Glc	۱/۱ ± ۱۳/۰	۶/۰ ± ۲۱/۶	۱/۸ ± ۱۸/۶	۰/۵ ± ۲۲/۰	۲/۷ ± ۵۳/۰

اعداد به شکل میانگین ± انحراف استاندارد بیان شده‌اند.

بحث

یعنی زمانی که AGEs مشاهده شده است، سرعت فعالیت آنزیم تقریباً برابر صفر است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت، با توجه به اینکه گلاسیکیشن آنزیم در کدام مرحله باشد، سرعت فعالیت آنزیم می‌تواند افزایش یا کاهش یابد. که این با نتایج به دست آمده از مطالعات گذشته در مورد افزایش و کاهش فعالیت استرازی هم‌خوانی دارد. از طرفی مقدار K_m افزایش یافته است (جدول ۱). یعنی میزان تمایل آنزیم به سوبسترا در نمونه‌ی آنزیمی همراه با گلوکز نسبت به تمامی نمونه‌های دیگر کاهش چشمگیری داشته است. در واقع می‌توان بیان داشت که سرعت فعالیت استرازی (V_{max}) و مقدار K_m در نمونه‌ی آنزیمی همراه با گلوکز نسبت به نمونه‌های دیگر افزایش یافته است. همچنین نتایج ما نشان می‌دهد که ۳- بتا-هیدروکسی بوتیرات عوارض ناشی از گلوکز را در نمونه‌ی آنزیمی همراه با ۳- بتاهیدروکسی بوتیرات و گلوکز (HCA+Glc+BHB 35D) از بین می‌برد و در نتیجه مقدار K_m و V_{max} آن در مقایسه با نمونه کنترل تغییری پیدا نکرده است. با توجه به نتایج به دست آمده از نشر فلورسانس ذاتی (شکل ۲) و خارجی (شکل ۴) نمونه‌های مختلف آنزیمی می‌توان بیان کرد که ساختار آنزیم در نمونه

از آنجایی که اختلال و یا نقص در عملکرد یا میزان این آنزیم از عوامل دخیل در ایجاد یک سری ناهنجاری‌ها از قبیل گلوکوما، چاقی، دیابت، سرطان، استئوپروز و... محسوب می‌شود، از این رو بررسی سازکارهای مولکولی محرک و بازدارنده‌ی این آنزیم نقش به‌سزایی در کنترل این بیماری‌ها خواهد داشت. بررسی فعالیت سینتیکی این آنزیم در بیماران دیابتی در گذشته نشان داده است که فعالیت استرازی این آنزیم در بیماران دیابتی نسبت به افراد سالم افزایش چشمگیری داشته است [۳۱]. این درحالی است که مطالعات دیگر بیان کننده کاهش فعالیت این آنزیم در بیماران دیابتی هستند [۳۲] و در بیشتر مطالعات انجام گرفته همواره سعی بر این بوده تا با داروهای مختلف همچون داروهای سولفانامیدی، فعالیت این آنزیم را به‌منظور کاهش عوارض ناشی از آن در بیماران دیابتی کاهش دهند [۳۳-۳۵]. این درحالی است که بررسی‌های ما نشان می‌دهد (جدول ۱) سرعت فعالیت آنزیم گلاسیک شده در روز ۲۱م به‌طور چشمگیری بالاتر از نمونه‌ی کنترل (HCA 35D) و تازه (HCA 0D) است و در روز ۳۵م

موقعیت طول موج حداکثری نشر هنگامی که $\Delta\lambda=15\text{nm}$ است، تغییر نمی‌کند. در حالی که فلئورسانس باقیمانده‌های تریپتوفان قوی است و طول موج حداکثری نشر آن هنگامی که $\Delta\lambda=60\text{nm}$ است در نمونه‌ی HCA انکوبه شده با گلوکز به سمت طول موج های بلندتر جابجایی دارد. این موضوع نشان می‌دهد که بر اثر اتصال گلوکز به HCA، ریزمحیط اطراف تریپتوفان‌ها بسیار متأثر شده است. یعنی بخش‌های آبریز در آنزیم در معرض قرار گرفته و ساختار آن بازتر شده است به گونه‌ای که قطبیت اطراف تریپتوفان افزایش و آبریزی کاهش می‌یابد. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود BHB (HCA+Glc+BHB) تأثیر ناشی از گلوکز را از بین می‌برد.

همچنین نتایج مربوط به اندازه‌گیری تغییرات ناحیه فرابنفش دور (CD) نشان می‌دهد (شکل ۶) که در نمونه‌ی آنزیمی همراه با گلوکز نسبت به نمونه‌های دیگر به‌طور قابل توجهی، از میزان ساختار مارپیچ α کاسته شده و بر صفحات β و ساختارهای نامنظم و تصادفی افزوده شده است. در صورتی که این تغییرات در نمونه آنزیمی همراه با گلوکز و ۳-بتا-هیدروکسی بوتیرات (HCA+Glc+BHB 35D) در مقایسه با نمونه کنترل (HCA 35D) مشاهده نشده است. بنابراین گلیکته شدن آنزیم با تأثیر بر شبکه‌ی منظم پیوند هیدروژنی موجود در ساختار دوم و کاهش محتوای آن، موجب ناپایداری ساختار دوم پروتئین می‌گردد.

نتیجه‌گیری

امروزه بسیاری از تجمع‌های غیرطبیعی زیستی و بیوشیمیایی مرتبط با بسیاری از بیماری‌ها نظیر دیابت و عوارض ناشی از پیری مثل سفت شدن رگ‌ها و مفصل‌ها، تنگ شدن رگ‌ها، آب مروارید چشم، آلزایمر و پارکینسون را به گلیکته شدن پروتئین‌ها نسبت می‌دهند. محصولات حاصل از این فرآیند مانند محصولات شیف باز، آمادوری و گلایکو توکسین‌های AGE همگی ماهیتی به شدت اکسیدکننده و طبیعی بسیار تخریبی دارند که می‌توانند تغییرات پاتومورفولوژیکی را در پروتئین‌های مختلف به‌ویژه آنزیم کربنیک انیدراز II انسانی به‌عنوان یک هدف خاص ایجاد کنند. بنابراین بررسی سازکارهای مولکولی مهار

آنزیمی همراه با گلوکز (HCA+Glc) پس از تیمار ۳۵ روزه، باز شده و ساختار سوم پروتئین از بین رفته است. در واقع با باز شدن پروتئین اسیدآمین‌های آروماتیکی که در درون پروتئین قرار داشته به سطح آمده و در معرض حلال قطبی قرار گرفته است، بنابراین در برخورد با مولکول‌های حلال انرژي خود را از دست داده و نشرش کاهش یافته و به سمت طول موج‌های بلندتر حرکت کرده است. این نتایج با گزارشات قبلی که نشان می‌دهد، گلیکته شدن باعث باز شدن ساختار پروتئین می‌شود، همخوانی دارد [۲۶، ۳۶]. همچنین نشر خارجی آنزیم در حضور ANS نیز مبین باز شدن ساختار آنزیم است. ANS ترکیبی است که میل بسیار بالایی برای اتصال به نواحی آبریز دارد. بنابراین در حلال قطبی نشر بسیاری ضعیفی از خود نشان می‌دهد [۳۷] و به محض اتصال به نواحی آبریز مانند حفره‌های درونی پروتئین‌ها، نشر فلئورسانس آن به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد. افزایش چشمگیر شدت نشر کمپلکس HCA-ANS در نمونه‌ی آنزیمی همراه با گلوکز به معنای باز شدن ساختار آنزیم و قرارگیری حفره‌های آبریز آن در معرض حلال است. این درحالی است که نشر ANS در نمونه‌ی آنزیمی همراه با ۳-بتا-هیدروکسی بوتیرات و گلوکز (HCA+Glc+BHB) به‌طور واضحی پایین‌تر از آنزیم گلیکته (HCA+Glc) بوده است. بنابراین با توجه به نتایج حاصل از نشر ذاتی و نشر خارجی، می‌توان بیان کرد که در حضور ۳-بتا-هیدروکسی بوتیرات فرآیند گلیکته شدن، کاهش یافته و در نتیجه‌ی آن، ساختار پروتئین کمتر باز شده و شدت نشر ذاتی کاهش کمتری نسبت به نمونه‌ی همراه با گلوکز یافته است و همچنین شدت نشر ANS نیز کمتر افزایش یافته است. AGE‌ها محصولات نهایی فرآیند گلیکته شدن پروتئین‌ها هستند، شکل ۳ میزان تولید AGE را نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که بیشترین شدت نشر فلئورسانس محصولات نهایی گلیکته شدن در نمونه آنزیمی همراه با گلوکز مشاهده می‌شود و در حضور ۳-بتا-هیدروکسی بوتیرات تولید محصول AGE کاهش یافته است و یا به‌عبارتی محصولات AGE دیده نشده است. شکل ۵ نتایج مربوط به طیف سنجی فلئورسانس هم‌زمان را نشان می‌دهد. پر واضح است حرکت فلئورسانس باقیمانده‌های تیروزین ضعیف است و

و داروسازی در کمک به بیماران دیابتی و سالخورده‌گی مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر حاصل بخشی از پایانامه در مقطع کارشناسی ارشد است که با حمایت دانشگاه الزهرا (س) اجرا شد.

فرآیند گلیکاسیون شدن پروتئین‌ها بسیار حائز اهمیت است. در این تحقیق، اثر کتون بادی ۳-بتا- هیدروکسی بوتیرات بر فرآیند گلیکاسیون شدن آنزیم کربنیک انیدراز ۲ انسانی و به عبارتی تأثیر روزه داری بر سلامتی انسان با روش‌های مختلف طیف سنجی مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که ۳-بتا- هیدروکسی بوتیرات می‌تواند به‌عنوان یک مهارکننده برای گلیکیشن عمل کند و در نتیجه مانع تغییرات ساختاری و عملکردی در پروتئین‌ها شود. نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند در حوزه‌ی پزشکی

مآخذ

- Duda DM, and McKenna R. *Carbonic Anhydrases (α -Class)*. Handbook of Metalloproteins, 2006 .
- Supuran CT. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature reviews Drug discovery* 2008. 7(2): 168-181.
- Mahon BP, et al. Activity and anion inhibition studies of the α -carbonic anhydrase from *Thiomicrospira crunogena* XCL-2 Gammaproteobacterium. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2015. 25(21): 4937-4940.
- Pinard MA, Mahon B, and McKenna R. Probing the surface of human carbonic anhydrase for clues towards the design of isoform specific inhibitors. *BioMed research international* 2015.
- Venters RA, et al. Characterizing the use of perdeuteration in NMR studies of large proteins: ^{13}C , ^{15}N and ^1H assignments of human carbonic anhydrase II. *Journal of molecular biology* 1996; 264 (5): 1101-1116.
- Khalifah RG. The carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase I. Stop-flow kinetic studies on the native human isoenzymes B and C. *Journal of Biological Chemistry* 1971; 246 (8): 2561-2573.
- Miranda HV and Outeiro TF. The sour side of neurodegenerative disorders: the effects of protein glycation. *The Journal of pathology* 2010; 221(1): 13-25.
- Sattarahmady N, et al. Formation of the molten globule-like state during prolonged glycation of human serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2007; 1770(6): 933-942.
- Stefani M. Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 2004; 1739(1): 5-25.
- Voziyan PA, et al. Modification of Proteins In Vitro by Physiological Levels of Glucose Pyridoxamine Inhibits Conversion of Amadori Intermediate to Advanced Glycation End-Products Through Binding of Redox Metal Ions. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278(47): 46616-46624.
- Singh VP, et al. Advanced glycation end products and diabetic complications. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology* 2014; 18(1): 1-14.
- Adlouni A, et al. Beneficial effect on serum apo AI, apo B and Lp AI levels of Ramadan fasting. *Clinica chimica acta* 1998; 271(2): 179-189.
- Anson RM, et al, Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003; 100(10): 6216-6220.
- Longo VD, and Mattson MP. Fasting: molecular mechanisms and clinical applications. *Cell metabolism* 2014; 19(2): 181-192 .
- Laffel L. Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews* 1999; 15(6): 412-426.
- Sabokdast M, et al. Protection by beta-Hydroxybutyric acid against insulin glycation, lipid peroxidation and microglial cell apoptosis. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 2015; 23(1): 42.
- Kojić-Prodić B. and Molčanov K. The Nature of Hydrogen Bond: New Insights Into Old Theories. *Acta Chimica Slovenica* 2008; 55(4).
- Charville H, et al. The Uncatalyzed Direct Amide Formation Reaction—Mechanism Studies and the Key Role of Carboxylic Acid H-Bonding. *European Journal of Organic Chemistry* 2011; 2011(30): 5981-5990.
- Nyman PO. Purification and properties of carbonic anhydrase from human erythrocytes. *Biochimica et biophysica acta* 1961; 52(1): 1-12.
- Swinehart DF. The beer-lambert law. *Journal of chemical education* 1962; 39(7): 333.
- Pocker Y. and Stone J. The catalytic versatility of erythrocyte carbonic anhydrase. III. Kinetic studies of

- the enzyme-catalyzed hydrolysis of p-nitrophenyl acetate. *Biochemistry* 1967; 6(3): 668-678.
22. Labieniec M, and Gabryelak T. Interactions of tannic acid and its derivatives (ellagic and gallic acid) with calf thymus DNA and bovine serum albumin using spectroscopic method. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2006; 82(1): 72-78.
 23. Taghavi F, et al. Potassium sorbate as an AGE activator for human serum albumin in the presence and absence of glucose. *International journal of biological macromolecules* 2013; 62: 146-154.
 24. Boušová I, et al. Glycation of aspartate aminotransferase by methylglyoxal, effect of hydroxycitric and uric acid. *Molecular and cellular biochemistry* 2009; 331(2-1): 215.
 25. Nakamura K, Nakazawa Y, and Ienaga K. Acid-stable fluorescent advanced glycation end products: vesperlysines A, B, and C are formed as crosslinked products in the Maillard reaction between lysine or proteins with glucose. *Biochemical and biophysical research communications* 1997; 232(1): 227-230.
 26. Bohlooli M, et al. Acetoacetate promotes the formation of fluorescent advanced glycation end products (AGEs). *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 2016; 34(12): 2658-2666.
 27. Wang L, et al. Determination of proteins at nanogram levels by synchronous fluorescence scan technique with a novel composite nanoparticle as a fluorescence probe. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2004; 60(11): 2469-2473.
 28. Özdemir H, Küfrevioğlu Öİ, and Cetinkaya R. Effects of glycation on erythrocyte carbonic anhydrase-I and II in patients with diabetes mellitus. *Turkish Journal of Medical Sciences* 2000; 30(2): 135-142.
 29. Ghosh C, et al. Targeting erythrocyte carbonic anhydrase and 18 O-isotope of breath CO₂ for sorting out type 1 and type 2 diabetes. *Scientific reports* 2016; 6: 35836.
 30. Mehrabi M, Ghobadi S, and Khodarahmi R. Spectroscopic study on the interaction of celecoxib with human carbonic anhydrase II: Thermodynamic characterization of the binding process. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2009; 97(3): 161-168.
 31. Ranjbar S, et al. Spectroscopic characterization of furosemide binding to human carbonic anhydrase II. *International journal of biological macromolecules* 2012; 50(4): 910-917.
 32. Alaei L, et al. Mechanistic investigation of sulfonamide ligands as human carbonic anhydrase II inhibitors. *International journal of biological macromolecules* 2018; 120: 1198-1207.
 33. Sattarahmady N, Moosavi-Movahedi A, and Habibi-Rezaei M. A biophysical comparison of human serum albumin to be glycosylated in vivo and in vitro. *Journal of Medical Biochemistry*, 2011; 30(1): 5-10.
 34. Syakhovich VE, et al. 1, 8-Anilino-naphthalene sulfonate binds to central cavity of human hemoglobin. *Biochemical and biophysical research communications* 2004; 317(3): 761-767.

Study of Glycation Process of Human Carbonic Anhydrase II and Investigation of Effect of Fasting On Enzyme Activity by Using Spectroscopic Methods

Raziyeh Gharib¹, Ali Khatibi^{1*}

1. Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

ABSTRACT

Background: Glycation is the non-enzymatic reaction between the carbonyl groups in sugar and free amino groups in proteins. this reaction leads to changes in structure and functions of proteins. Advanced glycation end products (AGEs) is the final stage in this process, which is highly oxidizing and destructive nature, causing many diabetic complications.

Methods: In the present investigation, the effect of fasting upon the glycation process of human Carbonic anhydrase II under physiological conditions (37 °C and pH 7.4) was studied recruiting various techniques including Ultraviolet–visible spectroscopy, fluorescence spectroscopy and CD Spectroscopy. To address this question, different samples of control carbonic anhydrase (without glucose and 3-beta-hydroxybutyrate), carbonic anhydrase with glucose, carbonic anhydrase in the presence of only 3-beta-hydroxybutyrate (BHB) and carbonic anhydrase along with glucose and 3-beta-hydroxybutyrate were incubated for 35 days under physiological conditions.

Results: The results indicate that 3-beta-hydroxybutyrate, which is greatly increased in the body during fasting, functions as an inhibitor of the glycation process and decreases the impacts of glucose binding to the protein and prevents the formation of AGEs and preserve enzyme activity.

Conclusion: Fasting can play an important role in maintaining the health of the body and eliminating the complications of the disease, with a significant increase in the production of 3-beta-hydroxybutyrate as an inhibitor of the glycation process.

Keywords: Human carbonic anhydrase II, Glucose, 3-beta-hydroxybutyrate, Glycation, Fasting

* Alzahra University, North Sheikh Bahae St., Deh-e Vanak, Tehran, Iran. Tel: +9885693013, Fax: +9888058912, Email: khatibi@alzahra.ac.ir.

