بررسی تغییرات ساختاری و عملکردی لیزوزیم سفیده تخم مرغ در حضور آلاینده شیمیایی بنزن با روش‌های طیف سنجی

معصومه ولی پور[۱] و پروانه مقامی[۲*]

[۱] ایران، تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

[۲] ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۷/۸/۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۵

چکیده

بنزن یکی از آلاینده‌های مهم در هوا و ترکیبی شیمیایی از گروه هیدروکربن‌های عطری است که در صنعت کاربرد زیادی دارد. مواجهه با بنزن منجر به عوارض زیستی شدیدی بخصوص سرطان می‌گردد. بطوری که موارد بی‌شماری از مرگ و میر ناشی از اثرات بنزن در نشریات پزشکی و صنعتی آورده شده است. بمنظور بررسی مکانیسم مولکولی بنزن در این مطالعه، برهم‌کنش بنزن با آنزیم لیزوزیم، بعنوان یک آنتی بیوتیک طبیعی که نقش مهمی در ایمنی غیر اختصاصی در بدن دارد، مورد بررسی قرار گرفته است. تغییر در ساختار و عملکرد پروتئین‌ها می‌تواند منجر به پیامدهای متعددی در پدیده‌های زیستی در سطح سلول شود. مطالعه تغییرات ساختاری ناشی از بر هم‌کنش بنزن و لیزوزیم سفیده تخم مرغ با بکارگیری روش‌های طیف سنجی نشان داده است که ساختار سه بعدی پروتئین در حضور غلظت‌های مختلف بنزن تغییر می‌کند. همچنین فلورسانس خارجی لیزوزیم در حضور بنزن بطور چشمگیری افزایش یافت. نتایج آزمایش کمی لومینسانس بیانگر افزایش تولید رادیکال‌های فعال آزاد همگام با افزایش غلظت بنزن بود. بنابر این اثرات تخریبی ایجاد شده در ساختار لیزوزیم ناشی از تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن در حضور بنزن است. با توجه به ارتباط ساختار و عملکرد در پروتئین‌ها می‌توان نتیجه گرفت که بنزن با تغییر ساختار پروتئین نقش مهمی در تغییر عملکرد آن دارد. با سنجش فعالیت آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف بنزن کاهش عملکرد لیزوزیم تأیید گردید.

واژه های کلیدی: بنزن، کمی لومینسانس، طیف سنجی، رادیکال‌های آزاد

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۲۲۳۸۹۸۶۰ ، پست الکترونیکی: maghami@srbiau.ac.ir

مقدمه

لیزوزیم از زمان کشف تا به امروز به عنوان یک پروتئین مدل، نقش مهمی در مطالعات زیست شناسی مدرن از قبیل کریستالوگرافی پروتئین‌ها، آنزیم شناسی، ایمنی شناسی و تاخوردگی پروتئین‌ها داشته است (۳). لیزوزیم سفیده تخم مرغ پروتئینی با ۱۲۹ باقیمانده آمینو اسیدی و وزن مولکولی ۱۴/۳۰۷ کیلو دالتون است. این باقیمانده‌ها بوسیله ۴ پیوند دی- سولفیدی در موقعیت سیستئین ۶ و۱۲۷، سیستئین ۳۰ و ۱۱۵، سیستئین ۶۴ و ۸۰ و سیستئین ۷۶ و۹۴ با یکدیگر اتصال متقابل دارند (۱۹). لیزوزیم ۶ آمینو اسید تریپتوفان، ۳ آمینو اسید تیروزین و ۳ آمینو اسید فنیل آلانین دارد (۲۷). ساختار آن تقریباً بیضی شکل است که لیزوزیم را به دو دمین تقسیم کرده است. دمین اول از یک مارپیچ آلفا و دمین دوم از سه رشته بتای موازی که تشکیل یک صفحه بتا می‌دهند، تشکیل شده است (۲۶). لیزوزیم که در گروه آنزیم‌های مورآمیداز (Muramidase) قرار دارد، دارای فراوانی بالایی است و غالباً در تمام ترشحات،

مایعات و بافت‌های بدن موجودات زنده یافت می‌شود (۱۷). نقش بارز لیزوزیم عملکرد ضد میکروبی آن است. همچنین لیزوزیم بعنوان یک آنتی بیوتیک طبیعی عمل کرده و به تشخیص بسیاری از بیماری‌ها کمک می‌کند. مطالعات نشان داده است که لیزوزیم بعنوان یک ناقل واسط در فعالیت ضد توموری دخالت دارد. همچنین تحقیقات دیگر حاکی از آن است که لیزوزیم سفیده تخم مرغ می‌تواند در برابر بیماری‌های باکتریایی، ویروسی یا التهابی نقش محافظتی داشته باشد (۲۰). از میان آمینو اسیدهای موجود در ساختار لیزوزیم، تریپتوفان ۱۰۸، آسپارتیک اسید ۷۵ و گلوتامیک اسید ۳۵ و ۵۱ نقش کاتالیزگری دارند (۴).

مولکول بنزن یک ماده شیمیایی صنعتی با ۶ اتم کربن و ۶ اتم هیدروژن، دارای آرایش حلقوی و متعلق به خانواده هیدروکربن‌ها است. این ماده به حالت مایع بی رنگ، خوشبو و فرار است و به سوخت خودروها اضافه می‌شود (۳۴). چگالی آن، ۸۷ گرم بر سانتیمتر مکعب، نقطه جوش آن، ۸۰/۱ درجه سانتی گراد و جرم مولی آن، ۷۸/۱۱ گرم بر مول است. بنزن بمقدار جزئی در آب و براحتی در الکل، کلروفرم، دی‌اتیل اتر، استون و تترا کلراید کربن حل می‌شود (۱۸). فعالیت‌های صنعتی مهم‌ترین منبع انتشار بنزن در محیط زیست هستند. در این صنایع بنزن بعنوان ماده خام و یا حلال استفاده می‌گردد. سوخت خودروها و یا گاز خروجی از اگزوز وسایل نقلیه، تبخیر بنزن در پمپ بنزین‌ها و سوخت نفت و گاز غلظت بنزن را در هوا افزایش می‌دهد. همچنین استفاده از دخانیات و دود ناشی از سوختن تنباکو عامل انتشار بنزن در محیط‌های بسته است (۳۲). بنزن موجود در بنزین به دو صورت تبخیر مستقیم و یا خروجی از اگزوز باعث انتشار بنزن می‌شود. افزایش مقدار بنزن در بنزین با بنزن خروجی از اگزوز رابطه مستقیم دارد. آلایندگی مستقیم و غیر مستقیم ناشی از بنزن بیش از حد استاندارد (۱ درصد حجمی) می‌تواند اثرات مخربی بر سلامتی داشته باشد (۲۵). وقتی انسان در معرض غلظت بالای بنزن در هوا قرار می‌گیرد، ۵۰ درصد بنزنی که از طریق تنفس وارد بدن می‌شود، از طریق بازدم دفع می شود و نیمی دیگر از طریق جداره شش‌ها وارد جریان خون می‌شود (۱۴). امروزه بنزن بدلیل استفاده زیاد در صنایع جزء ۲۰ محصول شیمیایی عمده جهان بحساب می‌آید. بنزن برای تولید استایرن، ساخت پلاستیک، نایلون و لاستیک، فیبرهای مصنوعی، رزین‌های مختلف، رنگ، دارو، حشره کش‌ها، چسب، حلال، مواد منفجره، جوهر، براق کننده‌ها و روان کننده‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۶). مطالعات نشان داده است که بنزن دارای اثرات نامطلوب بر سیستم‌های زنده است. اثرات بنزن به نحوه جذب آن به بدن و میزان قرارگیری در معرض بنزن بستگی دارد (۲۳). تماس بنزن با پوست منجر به سوزش و گاهی ایجاد راش‌های پوستی می‌شود. افزایش زمان تماس ناراحتی پوستی ایجاد می‌کند که ناشی از کاهش آب بدن و از بین رفتن چربی موجود در سلول‌های پوستی است. جذب بنزن از طریق استنشاق ضمن تحریک مخاط ریه و سوزش آن، می‌تواند عوارض سیستمیک ایجاد کند (۲۴). تماس کوتاه مدت انسان با بنزن باعث سر درد، چشم درد، سوزش پوست، گیجی، بی خوابی و تحریک دستگاه تنفس می‌شود و در دراز مدت باعث کاهش تعداد سلول‌های قرمز خون و کم خونی آپلازی، سمیت ماده وراثتی، آسیب به ماکرومولکول‌ها، سمیت اسپرم‌ها و سرطان زایی می‌شود. بطور کلی مسمومیت حاصل از بنزن در اثر استنشاق بخارهای بنزن موجود در هوا اتفاق می‌افتد. نیمه عمر بنزن در خون ۸ دقیقه است که زمان خوبی برای ورود بنزن به کبد و انجام متابولیسم است. در انسان و حیوان هدف اصلی بنزن مغز استخوان است (۳۳). شایع ترین گروه افراد در معرض خطر بنزن کارگران پمپ بنزین هستند. افراد سیگاری و افرادی که با سیگاری‌ها زندگی می‌کنند و همچنین افرادی که در نزدیکی کارخانجات صنعتی و شیمیایی زندگی می‌کنند در گروه بعدی افراد در معرض خطر قرار دارند (۱۰).

با توجه به شیوع آلاینده ها و کاربرد شایع بنزن در حوزه های مختلف زندگی و آشکار شدن سمیت بنزن و پتانسیل سرطان زایی آن، هدف ما در این مطالعه بررسی اثرات بنزن در سطح مولکولی است. تغییرات ساختاری و عملکردی ماکرومولکول‌های زیستی بویژه پروتئین‌ها جایگاه برجسته ای در مطالعات مولکولی دارد. لیزوزیم سفیده تخم مرغ یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های مدل در مطالعات زیستی است و تاکنون تحقیقی مبنی بر اثرات مولکولی بنزن بر تغییرات ساختاری و عملکردی این آنزیم انجام نشده است. از اینرو لیزوزیم گزینه مناسبی برای این تحقیق بود. تعیین اثرات مولکولی بنزن بر پروتئین‌های مختلف این امکان را فراهم می‌کند تا بتوان در آینده راهکارهای مناسبی جهت خنثی کردن آثار زیان بار بنزن ارائه داد.

مواد و روشها

مواد: لیزوزیم سفیده تخم مرغ، لومینول، سوبسترای *میکروکوکوس لیزو دیکتیوس* (*Micrococcus lyzodeikticus*)، پتاسیم دی سولفات و ۱- آنیلینونفتالن ۸- سولفانات (ANS) از شرکت سیگما، بنزن، هیدروژن پراکسید ، کلریدریک اسید و سدیم هیدروکسید از شرکت مرک خریداری شدند. در تمامی آزمایش‌ها از آب دو بار تقطیر استفاده شد.

طیف سنجی فرابنفش – مرئی (UV-Vis)

الف) تعیین غلظت پروتئین: بمنظور تعیین غلظت لیزوزیم و بررسی تغییرات ساختمانی لیزوزیم در حضور غلظت‌های مختلف بنزن از دستگاه طیف سنج فرابنفش- مرئی (Varian، استرالیا) استفاده شد. غلظت لیزوزیم در طول موج ۲۸۰ نانومتر با بهره گیری از قانون بیر لامبرت ۰/۲ میلی گرم در میلی لیتر محاسبه شد. محلول پروتئینی در بافر فسفات (پتاسیم دی فسفات و پتاسیم مونو فسفات) ۲۰ میلی مولار و pH برابر ۷ در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد تهیه شد. تغییرات جذب لیزوزیم در حضور غلظت‌های مختلف بنزن (۱۸ تا ۱۲۶ میکرومولار) اندازه گیری شد. لازم به ذکر است که کوت‌های مورد استفاده بطور کامل با پارافیلم پوشیده شدند تا جلوی خروج بنزن گرفته شود. بمنظور بررسی تغییرات لیزوزیم، بنزن در غلظت‌های مختلف به محلول پروتئینی اضافه شد.

ب) سنجش فعالیت آنزیمی: سنجش فعالیت آنزیمی لیزوزیم به روش کدورت سنجی و بوسیله دستگاه طیف سنجی فرابنفش – مرئی انجام شد. برای سنجش لیزوزیم از باکتری *میکروکوکوس لیزودیکتیکوس* بعنوان سوبسترا استفاده شد. به این منظور کاهش میزان جذب در سلول‌های *میکروکوکوس لیزودیکتیکوس* بمدت ۱۰ دقیقه در طول موج ۴۵۰ نانومتر و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد ثبت شد. یک واحد فعالیت آنزیم معادل مقدار لیزوزیمی است که در طول موج ۴۵۰ نانومتر و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، کاهش جذبی معادل ۰/۰۰۱ در دقیقه در سوبسترا ایجاد می کند. آنزیم با غلظت ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر در بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH برابر ۷ در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد تهیه شد و سوبسترا بصورت محلول غلیظ ۲۰ میکرومولار در آب دوبار تقطیر تهیه گردید.

طیف سنجی فلورسانس در حضور ANS : تغییرات ساختار سوم لیزوزیم در حضور غلظت‌های مختلف بنزن با استفاده از دستگاه طیف سنج فلورسانس (Cary Eclipse; Varian) مورد مطالعه قرار گرفت. نمونه‌ها در طول موج ۳۵۰ نانومتر برانگیخته شدند و طیف نشری در بازه ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر ثبت شد. غلظت لیزوزیم ۰/۲ میلی گرم در میلی لیتر و غلظت ANS در نمونه‌ها ۱۰ میکرومولار بود. نشر نمونه‌های محتوی بافر- ANS، پروتئین- ANS و بنزن- ANS بعنوان کنترل اندازه گیری شد. پهنای باند تهییج و نشر بترتیب ۵ و ۱۰ در نظر گرفته شد.

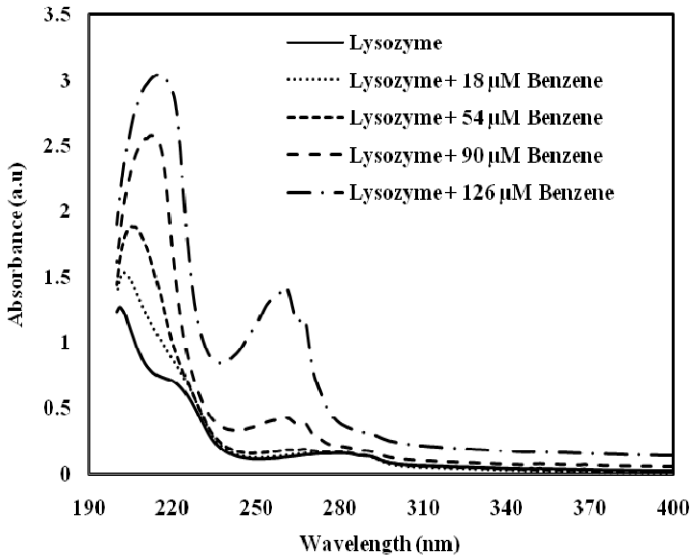
طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (ATR- FTIR= Attenuated total reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy**):** روش ATR-FTIR روشی دقیق

و مناسب برای بررسی ساختار دوم پروتئین در محلول است. جهت تعیین تغییرات ساختار دوم لیزوزیم در حضور غلظت‌های مختلف بنزن از دستگاه طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (مدل Nexus) استفاده شد. شاخص ترین طیف در شناسایی ساختمان دوم پروتئین‌ها در محیط آبی، باند آمید I است. عدد موج این باند در محدوده ۱۶۰۰ تا ۱۶۹۹ بر سانتی متر ظاهر می‌شود.

طیف سنجی کمی لومینسانس (Chemiluminescence): بمنظور اندازه گیری میزان گونه‌های اکسیژن فعال ایجاد شده در محلول‌های مورد آزمایش از دستگاه کمی لومینسانس (Synergy H4 Hybrid Reader) استفاده شد. در مطالعات کمی لومینسانس محلول لومینول، لیزوزیم و لیگاند در بافر کربنات (سدیم کربنات و سدیم بی کربنات) ۱۰۰ میلی مولار pH برابر ۹حل شدند. داده‌های کمی لومینسانس بعد از اضافه کردن کاتالیزگر نمک طلا ۰/۰۲ درصد به نمونه‌ها، در طول موج ۴۲۵ نانومتر جمع آوری شدند. در تمام مراحل کار شدت کمی لومینسانس ایجاد شده از میان‌کنش لیزوزیم و لومینول و همچنین لیگاند و لومینول از نتایج کم شده است.

نتایج

تغییرات جذب پروتئین: شکل ۱ مربوط به تغییرات جذب لیزوزیم با افزودن بنزن در طول موج ۲۸۰ نانومتر است. همان طور که نشان داده شده است با افزایش غلظت بنزن از ۱۸ تا ۱۲۶ میکرومولار بتدریج میزان جذب لیزوزیم افزایش می‌یابد.

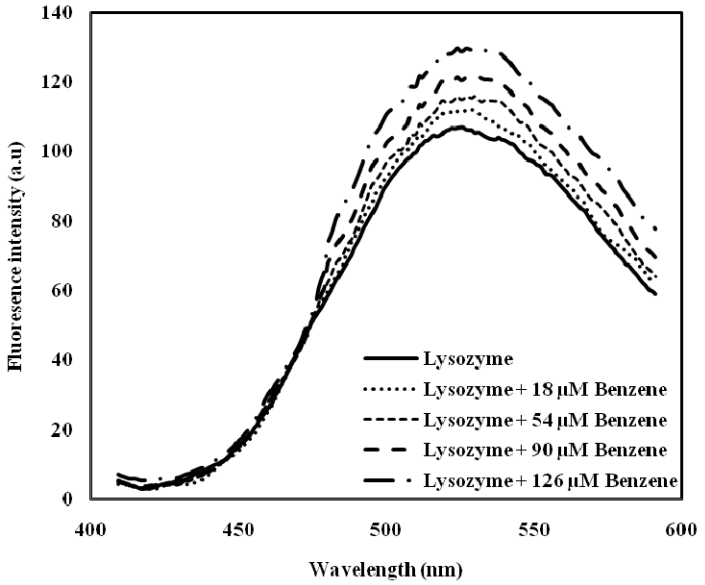


شکل ۱- نمودار جذب لیزوزیم در حضور غلظت‌های مختلف بنزن. نمونه‌ها در بافر فسفات ۲۰ میلی مولار، pH برابر ۷ و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد تهیه شدند.

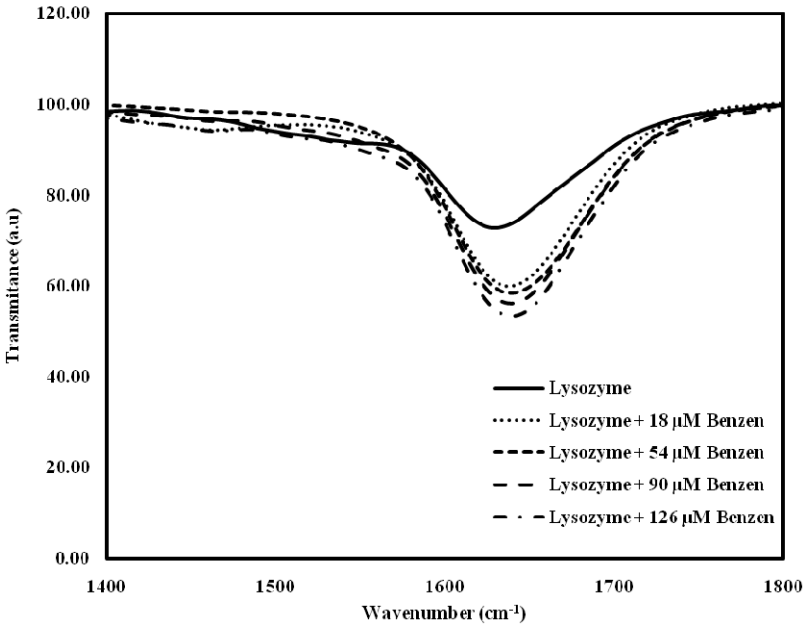
تغییرات نشر پروتئین: شکل ۲ تغییرات نشر پروتئین را در حضور غلظت‌های مختلف بنزن نشان می‌دهد. همان طور که نمودار نشان می‌دهد در حضور بنزن نشر فلورسانس افزایش یافته است و با افزایش غلظت بنزن میزان نشر بیشتر می‌شود.

تغییرات در طیف‌های مادون قرمز تبدیل فوریه: شکل ۳ طیف‌های بدست آمده از بررسی تغییرات ساختار دوم پروتئین با استفاده از دستگاه طیف سنج مادون قرمز تبدیل فوریه را نشان می‌دهد. طیف‌های پیوند آمید I لیزوزیم در محدوده عدد موج ۱۶۰۰ تا ۱۶۹۹ بر سانتی متر جابجا شده اند. همچنین شدت پیوند در حضور غلظت‌های مختلف بنزن کاهش یافته است که این امر حاکی از تغییر در

ساختار دوم پروتئین است.

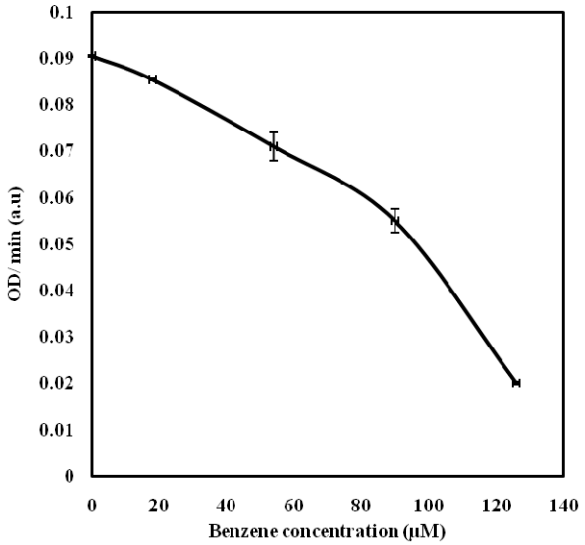


شکل ۲- نمودار نشر لیزوزیم در حضور ANS و با افزودن غلظت‌های مختلف بنزن. نمونه‌ها در بافر فسفات ۲۰ میلی مولار، pH برابر ۷ و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد تهیه شدند.



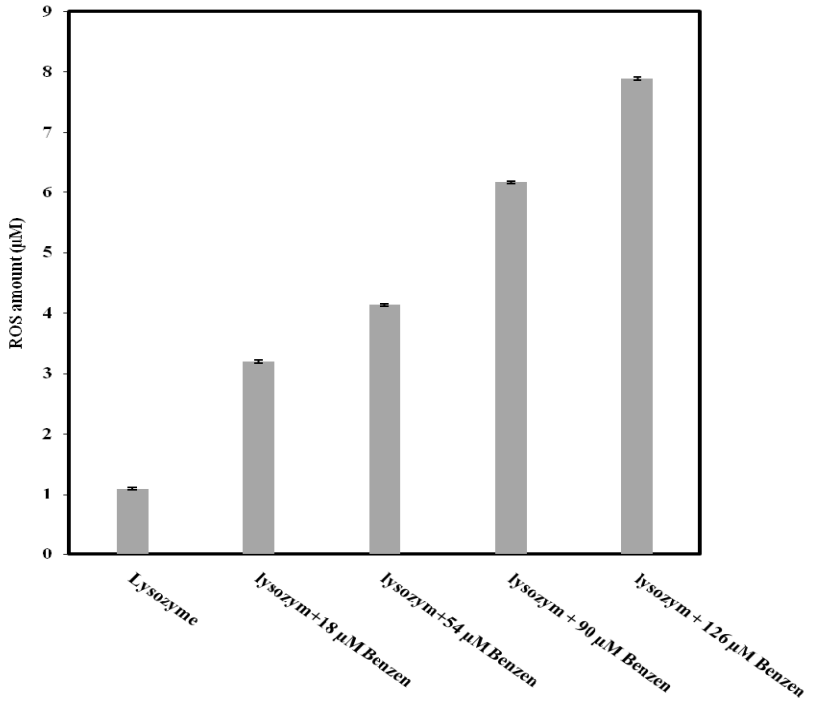
شکل ۳- طیف FTIR لیزوزیم در حضور غلظت‌های مختلف بنزن. نمونه‌ها در بافر فسفات ۲۰ میلی مولار، pH برابر ۷ و دمای ۲۵ درجه سانتی – گراد تهیه شدند.

اندازه گیری فعالیت آنزیمی: نمودار مربوط به تغییرات فعالیت آنزیمی لیزوزیم در غیاب و حضور غلظت‌های مختلف بنزن در شکل ۴ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت بنزن میزان فعالیت آنزیم بتدریج در طول زمان کاهش می‌یابد.



شکل ۴- طیف مربوط به فعالیت آنزیمی لیزوزیم در غیاب و حضور غلظت‌های مختلف بنزن. آنزیم با غلظت ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر در بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH برابر ۷ در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد تهیه شد. جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری شد.

تولید گونه‌های فعال اکسیژن: شکل ۵ نمودار مربوط به تولید گونه‌های فعال اکسیژن در حضور بنزن است. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت بنزن میزان گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌یابد.



شکل ۵- نمودار مربوط به تولید گونه‌های فعال اکسیژن در حضور غلظت‌های مختلف بنزن. نمونه‌ها در در بافر کربنات ۱۰۰ میلی مولار با pH برابر ۹ حل شدند و داده‌ها در طول موج ۴۲۵ نانومتر جمع آوری شدند.

بحث و نتیجه گیری

برخی مواد واکنش دهنده با پروتئین می‌توانند منجر به تغییرات ساختاری پروتئین شده و عملکرد زیستی آن‌ها را تحت تأثیر قرار دهند (۲). بررسی برهم‌کنش مولکولی بین

پروتئین و لیگاند یک فرایند اساسی جهت تشخیص و درمان برخی بیماری‌ها است. بنابراین تغییرات ساختار و عملکرد پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ در حضور غلظت‌های مختلف بنزن با روش‌های طیف سنجی نقش مهمی در ارزیابی اثرات زیستی آن در سطح مولکولی دارد.

نتایج بدست آمده در شکل ۱ بیانگر افزایش میزان جذب لیزوزیم در حضور غلظت‌های مختلف بنزن است. اگرچه در غلظت‌های ابتدایی بنزن (۱۸ و ۵۴ میکرومولار) تغییر محسوسی در طول موج ۲۸۰ نانومتر رخ نمی‌دهد اما در غلظت‌های ۹۰ و ۱۲۶ میکرومولار بدلیل باز شدن و یا غیر طبیعی شدن ساختار لیزوزیم در حضور بنزن، افزایش جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر وجابجایی به سمت طول موج های کوتاه (شیفت آبی) ملاحظه می‌گردد.

نمودار فلورسانس در شکل ۲ حاکی از آن است که میزان نشر فلورسانس لیزوزیم بتدریج با افزایش غلظت بنزن در حضور ANS بیشتر می‌شود. ANS ترکیبی است که میزان نشر فلورسانس آن با انتقال به محیط غیرقطبی افزایش می‌یابد (۱) و یک جابه جایی در قله نمودار به سمت طول موج‌های کوتاه دیده می‌شود. علاوه بر این جابجایی طول موج به سمت طول موج‌های قرمز نشان دهنده کاهش قدرت اتصال است. بنابر این افزایش شدت طیف فلورسانس توأم با یک جابجایی جزئی به سمت طول موج‌های بلند نشان‌دهنده تورم ساختار پروتئین و اتصال تعداد بیشتری از ملکول‌های ANS به سطوح آبگریز پروتئین بوده و در عین حال بطور میانگین قدرت اتصال کم شده است (۱۱، ۱۳ و ۳۰). با توجه به افزایش میزان نشر لیزوزیم و جابجایی ایجاد شده در نمودار می‌توان نتیجه گرفت که بنزن منجر به تغییرات ساختاری لیزوزیم شده و در پی آن بخش‌های آبگریز پروتئین در معرض حلال قرار گرفته است. مطالعه ای در مورد نحوه اتصال بنزن با پروتئین لیزوزیم T4 انجام شده است که نشان می‌دهد بنزن با تغییر در ساختار دو یا چند مارپیچ آلفا در انتهای کربوکسیلی لیزوزیم، اتصال آن را به این پروتئین تسهیل می‌کند (۲۱).

بمنظور بررسی بیشتر اثر بنزن بر تغییرات ساختاری لیزوزیم، از طیف سنج مادون قرمز فوریه استفاده شد. همان طور که در شکل ۳ آورده شده است عدد موج مربوط به پیوند آمید I که مختص ساختار دوم پروتئین است در حضور غلظت‌های مختلف بنزن جابجا شده است و شدت این پیوند بطور مشخص و چشمگیر کاهش یافته است. این جابجایی و تغییر در شدت پیوند آمید I بیانگر تغییر در ساختمان دوم لیزوزیم است (۵ و ۹). نتایج بدست آمده در شکل‌های ۲ و ۳ بخوبی تغییرات ساختاری لیزوزیم در حضور بنزن را تأیید می‌کنند.

با توجه به تغییر ساختار لیزوزیم در حضور غلظت‌های مختلف بنزن و اثبات این موضوع با بکارگیری ابزار دقیق طیف سنجی، بررسی عملکرد این پروتئین در حضور بنزن ضروری بنظر رسید. زیرا همواره ارتباط تنگاتنگی میان ساختار و عملکرد پروتئین‌ها و بطور کلی ماکرومولکول‌ها وجود دارد. بدین منظور فعالیت آنزیمی لیزوزیم با روش کدورت سنجی بوسیله دستگاه طیف سنجی فرابنفش – مرئی سنجش شد. همان طور که در شکل ۴ نشان داده شده است با افزایش غلظت بنزن فعالیت لیزوزیم کاهش یافته است. بنابر این می‌توان بیان کرد که بنزن با تخریب ساختار لیزوزیم، عملکرد آن را نیز مختل می‌کند.

بمنظور دستیابی به مکانیسم اثر بنزن بر روی لیزوزیم میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن اندازه گیری شد. شکل ۵ افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن را در حضور غلظت‌های مختلف بنزن نشان می‌دهد. رادیکال‌های آزاد حاوی یک یا چند الکترون جفت نشده هستند. این حالت فعالیت شیمیایی یک اتم یا مولکول را تغییر داده و آن را فعال تر می‌سازد. در بدن سیستم‌های خاصی برای مقابله با آسیب حاصل از رادیکال‌های آزاد بوجود آمده است که به نام سیستم‌های دفاع آنتی اکسیدانی معروف هستند.

زمانی که عدم تعادل در میزان تولید رادیکال‌های آزاد و سیستم دفاع آنتی اکسیدانی پیش آید، این حالت را تنش اکسیداتیو گویند. افزایش جذب بنزن باعث کاهش آنتی اکسیدان‌های بدن و بالا رفتن تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود (۲۲). پروتئین‌ها و دیگر مولکول‌های زیستی در حضور مقادیر بالای گونه‌های فعال اکسیژن آسیب می‌بینند (۳۱). تجمع گونه‌های فعال اکسیژن می‌تواند منجر به اکسید شدن ماکرومولکول‌ها از قبیل پروتئین‌ها شود. سطوح بالای گونه‌های فعال اکسیژن در بیماری‌های مختلف مانند آلزایمر، پارکینسون و دیابت آشکار شده است (۸-۶ و ۱۲ و ۳۱). برهم‌کنش پروتئین‌ها با گونه‌های فعال اکسیژن در دو گروه تغییرات برگشت پذیر و تغییرات برگشت ناپذیر تقسیم بندی می‌شود. تغییرات برگشت ناپذیر ناشی از اکسید شدن آمینو اسیدهایی مانند آرژنین، هیستیدین، پرولین، ترئونین و تیروزین است (۲۸ و ۲۹) که در لیزوزیم هم مشاهده می‌شود. بنابر این اکسید شدن لیزوزیم در حضور بنزن که تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌کند، می‌تواند از نوع برگشت ناپذیر باشد. این تغییرات ساختاری ناشی از اکسید شدن می‌تواند منجر به تغییرات پیکربندی لیزوزیم و در نتیجه نقص عملکردی آن شود. علاوه بر این آمینو اسید آرژنین در جایگاه فعال لیزوزیم قرار دارد که اکسید شدن برگشت ناپذیر این آمینو اسید می‌تواند در تغییر عملکرد لیزوزیم بطور مستقیم اثر گذارد (۱۵).

نتیجه گیری نهایی

بنزن بعنوان یک آلاینده زیست محیطی با تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌تواند منجر به تغییرات ساختاری پروتئین شود. با توجه به ارتباط تنگاتنگ ساختار و عملکرد در پروتئین‌ها و نتایج بدست آمده از این تحقیق می‌توان اذعان داشت که بنزن با تغییر ساختار پروتئین موجبات اختلال عملکردی لیزوزیم را فراهم کرده است که خود ناشی از تولید گونه‌های فعال اکسیژن است. گونه‌های فعال اکسیژن این تغییرات را از طریق اکسید کردن آمینو اسیدهای پروتئین اعمال می‌کنند. بنابر این با توجه به حضور مداوم بنزن در محیط زیست انسان‌ها و جذب آن توسط خون لازم است تمهیدات مناسبی جهت کاهش اثرات تخریبی آن در نظر گرفت.

منابع

۱- ریاحی مدوار، ع.، قاسمی نسب، ع. ر.، (۱۳۹۶) مطالعه میان‌کنش نانوذره اکسید مس با آلبومین سرم انسانی با استفاده از تکنیک فلورسانس، مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، ۳۰، ص ۵۵۷-۵۴۵.

۲- شارقی، ب.، شهدادنژاد، ک.، محمدی.، (۱۳۹۴) مطالعه پایداری ساختاری آنزیم پپسین در حضور نانوذرات اکسیدروی و اکسیدآهن، ، مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، ۲۸، ص ۳۵۱-۳۴۴.

3- Abergel, Ch., Monchois, V., Byrne, D., Chenivesse, S., 2007, Structure and evolution of the lvy protein family, unexpected lysozyme inhibitors in gram –negative bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 104: 6394-6399.

4- Adcock, S. A., McCammon, J. A., 2006, Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins, *Chem. Rev.* 106: 1589-1615.

5- Barth, A., 2007, Infrared spectroscopy of proteins, *Biophys. Biochem. Acta.*, 1767: 1073-1101.

6- Berlett, B. S., Stadtman, E. R., 1997, Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress, *J. Biol. Chem.*, 272: 20313-20316.

7- Cabiscol, E., Tamarit, J. Ros, J., 2000, Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species, *Int. Microbiol.*, 3: 3-8.

8- Cai, Z., Yan, L. J., 2013, Protein oxidative modifications: beneficial roles in disease and health, *J. Biochem. Pharmacol. Res.*, 1: 15-26.

9- Calabrò1, E., Magazù1, S., 2014, Unfolding-Induced in haemoglobin by exposure to electromagnetic fields: A FTIR spectroscopy study, *Orient. J. Chem.*, 30: 31-35.

10- Carere, A., Andreoli, C., Galati, R., Leopardi, P., Marcon, F., Rosati, M. V., Rossi, S., Tomei, F., Verdina, A., Zijno, A., Crebelli, R., 2002, Biomonitoring of exposure to urban air pollutants: analysis of sister chromatid exchanges and DNA lesions in peripheral lymphocytes of traffic policemen, *Mutat. Res.*, 518: 215-224.

11- Gasymov, O. K., Glasgow, B. J., 2007, ANS fluorescence: potential to augment the identification of the external binding sites of proteins, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1774, 403-411.

12- Gerber, R., Tahiri-Alaoui, A., Hore, P. J., James, W., 2007, Oligomerization of the human prion protein proceeds via a molten globule intermediate, *J. Biol. Chem.*, 282: 6300-6307.

13- Hawe, A., Sutter, M., Jiskoot, W., 2008, Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization, *Phrm. Res.*, 25, 1487-1499.

14- Johnson, E. S., Langrad, S., Lin, Y. A., 2007, Critique of benzene exposure in the 6 general population, *Sci. Total Environ.*, 374:183-198.

15- Kumagai, I., Sunada, F., Takeda, S., Miura, K., 1992, Redesign of the substrate-binding site of hen egg white lysozyme based on the molecular evolution of C-type lysozymes, J. Biol. Chem. 267: 4608-4612.

16- Lawryk, N. J., Lioy, P. J., Weisel, C. P., 1995, Exposure to volatile organic compounds in the passenger compartment of automobiles during periods of normal and malfunctioning operation, *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.*, 5: 511-531.

17- Liburdi, K., Benucci, I., Esti, M., 2014, Lysozyme in wine: an overview of current and future applications, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 13: 1062-1073.

18- Lide, D. R., 2005, CRC Hand Book of Chemistry and Physics, CRC Press.

19- Ma, B., Zhang, F., Wang, X. Zhu, X., 2017, Investigating the inhibitory effects of zinc ions on amyloid fibril formation of hen egg-white lysozyme, *Int. J. Biol. Macromol.*, 98: 717-722.

20- Mateus, L., Costa, L., Silva, Y. J., Pereira, C., Alemedida, A., 2014, Effect of lysozyme addition on the activity of phages against Vibrio Parahaemolyticus, *Aquaculture*, 432: 125-129.

21- Mondal, J., Ahalawat, N., Pandit, S., Kay, L. E., Vallurupalli, P., 2018, Atomic resolution mechanism of ligand binding to a solvent inaccessible cavity in T4 lysozyme, *PLOS Comput. Biol.*, 14: 1-20.

22- Moro, A. M., Charão, M. F., Brucker, N., Durgante, J., Baierle, M., Bubols, G., Goethel, G., Fracasso, R., Nascimento, S., Bulcão, R., Gauer, B., Barth, A., Bochi, G., Moresco, R., Gioda, A., Salvador, M., Farsky, S., Garcia, S. C., 2013, Genotoxicity and oxidative stress in gasoline station attendants, *Mutat. Res.*, 754, 63-70.

23- Navasumrit, P., Arayasiri, M., Hiang, O. M., Leechawengwongs, M., Promvijit, J., Choonvisase, S., nakngam, N., Mahidol, C., Ruchirawat, M., 2008, Potential health effects of exposure to carcinogenic compound in incense smoke in temple workers, *Chem. Biol. Interact.*, 173: 19-31.

24- Navasumrit, P., Choonvisase, S., Intarasunanont, P., Arayasiri, M., Lauhareungpanya, N., Parnlob, V., Settachan, D., Ruchirawat, M., 2005, Environmental and occupational exposure to benzene in Thailand, *Chem. Biol. Interact.*, 153-154: 75-83.

25- Ozkaynak, H., Palma, T., Touma, J. S., Thurman, J., 2008, Modeling population exposure to outdoor sources of hazardous air pollutants, *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.*, 18: 45-58.

26- Pellegrino, L., Tirelli, A., 2000, A sensitive HPLC method to detect hen's egg white lysozyme in milk and dairy products, *Int. Dairy J.*, 10: 435- 442.

27- Peters, C.W., Kruse, U., Pollwein, R., Grzeschik, K.H., Sippel. A.E., 1989, The human lysozyme gene. Sequence organization and chromosomal localization, *Eur. J. Biochem.*, 182: 507-516.

28- Stadtman, E. R., 2006, Protein oxidation and aging, *Free Radic. Res.*, 40: 1250-1258.

29- Stadtman, E. R., Levine, R. L., 2003, Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins, *Amino Acids*, 25: 207-218.

30- Themistou, E., Singh, I., Shang, C., Balu-lyer, A. V., Alexandridis, P., Neelamegham, S., 2009, Application of fluorescence spectroscopy to quantify shear-induced protein conformation change, *Biophys. J.*, 97: 2567-2576.

31- Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., Mahajan, R. T., 2009, Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options, *Curr. Neuropharmacol.*, 7: 65-74.

32- Wallace, L. A., 1989, Major sources of benzene exposure, *Environ. Health Perspect.*, 82: 165-169.

33- Wiliams, R., Panko, J.M., Brown, J. L., Paustenbach, D. J., 2008, Occupational exposures associated whit petroleum derived products containing trace levels of benzene, *J. Occup. Environ Hyg.*, 5: 565-574.

34- Yardley-Jones, A., Anderson, D., Parke, D. V., 1991, The toxicity of benzene and its metabolism and molecular pathology in human risk assessment, *Br. J. Ind. Med*., 48: 437-444.

Investigation of hen egg white lysozyme structure and function alterations in the presence of Benzene as a chemical pollutant by spectroscopic methods

Valipour M.[1] and Maghami P.[2]

[1] Dept. of Biology, Faculty of Science, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, I.R. of Iran

[2] Dept. of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Benzene is one of the major pollutants in the air and a chemical compound of the aromatic hydrocarbon group, which is widely used in the industry. Exposure to benzene can lead to biologic damages, especially cancer, as it has been reported in many studies of benzene mortality. In this study, we examined the interaction between benzene and lysozyme enzyme which plays a major role in non-specific immunity in the body and also is a natural antibiotic. Structural changes resulting from the interaction of benzene and egg white lysozyme by spectroscopic methods showed that the protein 3D structure changed in the presence of different concentrations of benzene. Changes in the protein function will induce multiple consequences in the biological phenomena at the cellular levels. Lysozyme extrinsic fluorescence was also indicated a significant increase in the presence of benzene. The results of the chemiluminescence method suggested that, with increasing benzene concentration, the production of free radicals was increased. Therefore, the destructive effect of benzene on the lysozyme structure is due to the production of reactive oxygen radicals. Because of the relationship between structure and function in proteins, benzene plays a major role in its function by changing the protein structure. By measuring the activity of enzyme in the presence of different concentrations of benzene, the lysozyme function was reduced.

Key words: Benzene, Chemiluminescence, Spectroscopy, Reactive oxygen radicals