بررسی اثر MTBE (متیل ترشیاری بوتیل اتر) روی ساختار هموگلوبین خون موش نر نژاد ویستار

مرسده تشکری[۱]، اکرم عیدی[۱*]

چکیده

مطالعه تأثیر آلاینده‌های زیستی با مولکول‌های پروتئینی از سال‌های گذشته مورد توجه بوده است. از جمله آلاینده‌هایی که اخیراً مورد توجه محققان علوم زیستی قرار گرفته استMTBE (متیل ترشیاری بوتیل اتر) می‌باشد. این ماده سبب افزایش کارایی بنزین می‌گردد. MTBE می‌تواند در طبیعت حضور داشته و به جریان خون وارد شود.با توجه به شباهت ساختاری هموگلوبین انسان و موش در این مطالعه تاثیر MTBE بر روی هموگلوبین موش به شکل invivo مورد بررسی قرار گرفته است. ۳ غلظت از MTBE (۲۰۰، ٤۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) به موش‌های تحت تیمار به صورت خوراکی منتقل شد. مطالعات اسپکتروسکوپی UV در منطقه ۲۸۰ نانومتر حاکی از فشردگی و پیچیده‌تر شدن بیشتر هموگلوبین‌های موش‌های تحت تیمار با MTBE نسبت به نمونه نرمال است. مطالعات اسپکتروسکوپی CD جهت بررسی ساختار دوم هموگلوبین تحت تاثیر MTBE انجام گردید. مطالعه حاضر تغییرات قابل ملاحظه ای در ساختار دوم را اثبات نمی کند. با توجه به بررسی‌های انجام شده میتوان فشردگی بیشتر ساختار هموگلوبین در حضور غلظت‌های مختلف MTBE را عنوان کرد.

واژگان کلیدی: *اسپکتروسکوپی UV، متیل ترشیاری بوتیل اتر، هموگلوبین، طیف‌سنجی CD*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۳/۲

مقدمه

MTBE (متیل ترشیاری بوتیل اتر) با فرمول شیمیایی $C_5H_{12}O$ یکی از ترکیبات آلی فرار و ماده اکسیژنه‌ی سوخت است که اضافه کردن این ماده به بنزین باعث کاهش مونوکسیدکربن و ازون اتمسفری شده و مشکل دود را تا حدودی رفع می‌نماید (۷). انحلال پذیری بالای این ماده و همچنین نفوذ آن به خاک و آب‌های زیر زمینی، جهانیان را با مخاطرات زیست محیطی و بهداشتی جدیدی مواجه ساخت (۳-۲). تحقیقات نشان می‌دهد این ماده می‌تواند از طریق استنشاق و پوست و از طریق خوراکی وارد بدن شود(۲). از آنجائیکه هموگلوبین ازجمله ماکرومولکول‌های حیاتی مهم بدن بوده و در انتقال گازهـای تنفسی نقش بسزایی دارد بررسی تاثیر MTBE بر روی این مولکول اهمیت ویژه‌ای می یابد. بررسی‌های in vitro پیرامون تاثیر MTBE بر روی هموگلوبین انسانی نشان می‌دهد که این ماده به واسرشته شدن مولکول هموگلوبین و در نتیجه کاهش پایداری حرارتی آن کمک می‌کند(۱۰). همچنین ساختار سوم مولکول هموگلوبین انسانی با حضور غلظت‌های بالای MTBE تغییر محسوسی می‌یابد. علاوه بر این در حضور MTBE کاهش تمایل اکسیژن به هموگلوبین مشاهده می‌شود (١٤). از آنجاییکه بررسی بر اثرات MTBE بر ساختار هموگلوبین در شرایط in vivo صورت نگرفته است لذا در تحقیق حاضر سعی شده است تغییرات ساختاری مولکول هموگلوبین در حضور غلظت‌های مختلف MTBE در موش صحرایی نژاد ویستار vivo بررسی گردد.

مواد و روش‌کار

در مطالعه تجربی حاضر موش‌های بالغ نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۵۰ گرم از انستیتو پاستور ایران خریداری گردیده و تحت شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفتند. آب و غذا بصورت آزاد در دسترس حیوانات قرار گرفت. حیوانات به چهار گروه به صورت تصادفی تقسیم شدند:

۱- حیوانات کنترل که آب مقطر را بصورت گاواژ دریافت نمودند.

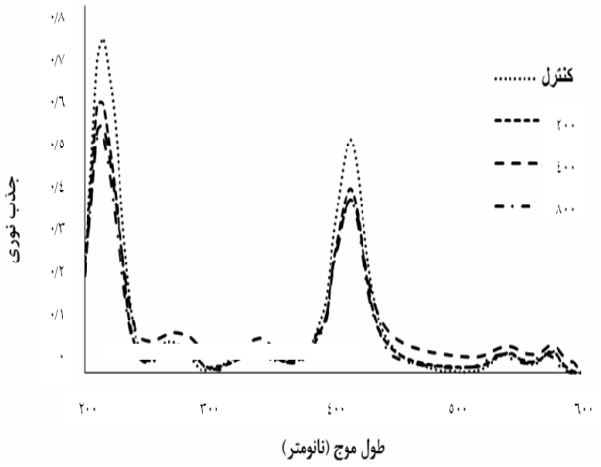
گروه‌های ٤ و ۳ و ۲ - حیوانات تجربی که MTBE را در دوزهای ۲۰۰ و ٤۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن بصورت گاواژ دریافت نمودند.

*۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علـوم پایـه، واحـد علـوم و تحقیقـات، دانشـگاه آزاد اسـلامی، تهـران، ایـران
(akram_eidi@yahoo.com)

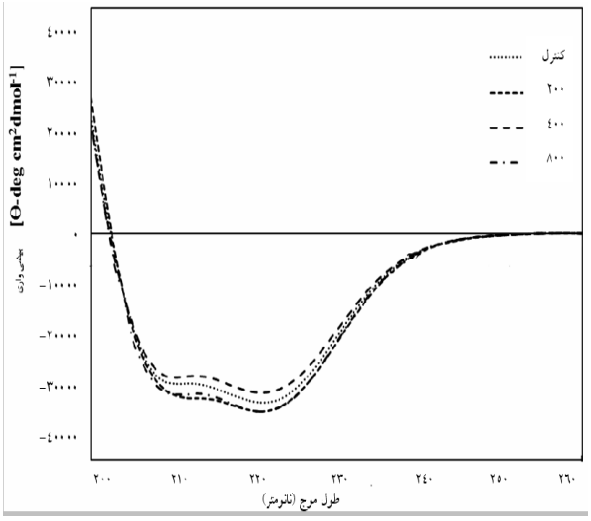
مدت تیمار ۳۰ روز و حجم تیمار ۰/۵ میلی‌لیتر بود. در پایان مدت تیمارحیوانات بیهوش گردیده و خون از قلب حیوان جمع‌آوری گردید. جهت استخراج هموگلوبین (٤)، خون مورد نیاز از قلب نمونه موش نرمال و موش‌های تحت تیمار تهیه شد. استخراج هموگلوبین پس از شستشوهای اولیه با استفاده از سدیم کلراید ۰/۹٪ و بافر فسفات پتاسیم ۲۰۰ میلی‌مولار شروع و با لیز گلبول‌های قرمز توسط آب سرد و رسوب هموگلوبین با آمونیم سولفات ادامه یافت. پس از خالص سازی هموگلوبین تعیین غلظت نمونه‌های بدست آمده توسط روش Bradford (۸-۹) انجام گردید. طیف جذبی نمونه‌ها با توجه به غلظت‌های به دست آمـده در محدوده ٦۰۰-۲۰۰ نانومتر و در دمای 25^{0C} با یکدیگر مقایسه شد (نمودار ۱). جهت مقایسه تغییرات ساختار دوم هموگلوبین‌های نرمال و تحت تیمار غلظت‌های مختلف MTBE از تکنیک دو رنگ نمایی دورانی یا Circular Dichroism (CD) استفاده شد. در این روش ابتدا غلظت ۰/۲ میلی‌گرم از هر یک از نمونه‌ها تهیه شده وسپس طیف آنها بین طول موج‌های ۱۹۰ تا ۲٦۰ نانومتر (ناحیه Far UV) تهیه شد. طیف‌های حاصله توسط نرم‌افزار cdnn آنالیز و درصدهای ساختاری بدست آمده با یکدیگر مقایسه شد.

نتایج

از آنجا که مطالعات in vitro تغییرات ساختاری هموگلوبین را به خوبی نشان می‌دهد (۵). در این تحقیق سعی شده جهت تایید این اثرات در محیط داخلی بدن بررسی‌ها بشکل in vivo ادامه یابد. بررسی مقایسه طیف جذبی در گروه‌های مختلف نشانگر کاهش جذب هموگلوبین در طول موج ٤۱۰ نانومتر بوده که نشانه تخریب ساختار هم در هموگلوبین‌های تیمار شده در هر سه غلظت از MTBE می‌باشد (نمودار ۱). همچنین کاهش میزان جذب در ۲۸۰ نانومتر حاکی از پیچیده و فشرده شدن بیشتر ساختار پروتئینی در هموگلوبین‌های تیمار شده توسط MTBE نسبت به نمونه نرمال می‌باشد. همچنین بررسی ساختار دوم توسط اسپکتروسکوپی دورنگ نمایی دورانی (CD) و در منطقه فرا بنفش دور (بین ۱۹۰ تا ۲٦۰ نانومتر) تغییر ساختاری قابل ملاحظه‌ای در نمونه‌های تیمار شده نشان نمی‌دهد (نمودار ۲) و لذا می‌توان آن را به پایداری ساختار دوم در مقابل MTBE مرتبط دانست (جدول ۱).



نمودار ۱- مقایسه طیف جذبی هموگلوبین در گروه‌های موش‌های صحرایی نر کنترل و تیمار شده با MTBE در دوزهای ۲۰۰، ٤۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن موش می‌باشد.



نمودار۲ - مقایسه ساختار دوم هموگلوبین در گروه‌های موش‌های صحرایی نر کنترل و تیمار شده با MTBE در دوزهای ۲۰۰، ٤۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن موش می‌باشد.

جدول ۱- درصد ساختارهای دوم در نمونه هموگلوبین در گروه‌های موش‌های صحرایی نر کنترل و تیمار شده با MTBE در دوزهای ۲۰۰، ٤۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن موش می‌باشد.

	کنترل	۲۰۰	٤۰۰	۸۰۰
Helix	۸۲/٦	۸٤/۱۷	۸۱/۱۷	۸٤/۷۸
Antiparallel	/۲۸٦	/۱۹	/۳۸	/۱۹
Parallel	۱/٤۳	۱/۳۳	۱/٦٤	۱/۳٦
Beta-Turn	۸	۷/٦۲	۸/٦۱	۷/٦٥
Rnd Coil	۷/٦۹	٦/۷٦	۸/۲	٦/۰۲
Total	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

بحث

MTBE در طول تمام مراحل چرخه سوخت بنزین از جمله تبخیر از ایستگاه سوخت‌گیری بنزین وسایل نقلیه، نشت از مخازن ذخیره‌سازی و خطوط لوله، آزاد شدن از انبارهای پالایشگاه‌ها و یا به صورت تصادفی، وارد محیط زیست می‌شود. بنابراین MTBE می‌تواند پس از نشر وارد آب، هوا و خاک شود (۱).

از آنجا که سهم زیادی از MTBE از طریق استنشاق جذب بدن میگردد و بدین وسیله به محیط داخلی بدن که جزء اصلی آن خون است وارد می‌شود بررسی تاثیرMTBE بر روی گلبول‌های قرمز و پروتئین اصلی تشکیل دهنده آن هموگلوبین اهمیت خاصی می‌یابد. عملکرد زیستی مولکول هموگلوبین در انسان حمل اکسیژن و دی اکسید کربن است که در طی تکامل به دلیل نیاز به مقادیر بالای اکسیژن تغییرات ساختاری بیشتری پیدا کرده تا حمل گازهای تنفسی با ظرفیت بیشتری انجام پذیرد. ساختمان کروی هموگلوبین از نظر فیزیولوژیک مهم بوده و شامل چهار زنجیره گلوبین می‌باشد ($\alpha_2\beta_2$) که به هر یک از رشته‌ها یک گروه پروستتیک هِم متصل می‌باشد و در مرکز هر گروه هِم یک Fe^{+2} قرار گرفته است. بر هم کنش‌های اسیدهای آمینه با مولکول هِم به طور عمده غیر قطبی بوده و سبب پایداری گروه هِم و محیط آبگریز محدوده هِم می‌شود. این بررسی نشان می دهد نمونه تیمار شده فوق در برابر دما ناپایدارتر از نمونه نرمال می‌باشد در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که نمونه‌های هموگلوبین تحت تیمار با MTBE ساختار پیچیده‌تری را نشان می‌دهند با وجود اینکه ساختار دوم تغییر محسوسی نشان نمی‌دهد(۱۵).

بررسی‌های اولیه پیرامون تاثیر MTBE بر روی هموگلوبین در محیط in vitro و بر روی هموگلوبین انسانی انجام گرفت (۱۰) . همچنین Prah و همکارانش تماس دهانی انسان با MTBE در مقایسه با سایر مسیر های تماس با این ماده را سبب افزایش سرعت متابولیسم این ماده در بدن می‌دانند(۱۱). Dekantبا تاثیر SDS بر روی هموگلوبین به مهار اکسیداسیون هموگلوبین توسط این ماده پی برد(۵). Salehi و همکاران نیز در تحقیقات خود دریافتند فعالیت پراکسیدازی هموگلوبین در شرایط اکسیداتیو در حضور چنین آلاینده‌هایی افزایش می‌یابد(۱۳). در این سری از تحقیقات به منظور بررسی تغییرات ساختاری هموگلوبین ابتدا میان کنش MTBE با هموگلوبین توسط دستگاه طیف سنج ماورا بنفش ـ مرئی بررسی شد. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد طیف هموگلوبین در ناحیه ٤۱۰ نانومتر در حضور MTBE کاهش نشان می‌دهد و بنابراین ساختار سوم هموگلوبین با افزودن ماده فوق تغییر می‌کند. در بررسی ساختار دوم توسط طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی پروتئین در حضور غلظت‌های مختلف MTBE کاهش عناصر ساختار دوم هموگلوبین مشاهده شد. نتایج این سری از تحقیقات نشان می‌دهد هموگلوبین در حالت طبیعی دارای درصد بالایی از مارپیچ آلفا است اما با افزودن MTBE از محتوای مارپیچ آلفا کاسته شده و بر محتوای پیچه نامنظم افزوده شده است به‌عبارتیMTBE ساختار پروتئین را تا حد زیادی تغییر داده است(۸).

علاوه بر مطالعات طیف سنجی جذبی و دورنگ نمایی دورانی تغییرات ساختاری هموگلوبین در حضور MTBE با فلورسانس در حضور نشانگر ANS انسان از افزایش شدت فلورسانس در حضور این ماده را داشته و در نهایت تغییرات ساختاری را

مورد تأیید قرار داده و در دست قرار گرفتن بخش‌های آبگریز در برابر حلال را نشان می‌دهد(۳).

در تحقیق پیش رو به تأثیرMTBE بر هموگلوبین موش پرداخته شده و تغییرات ساختار مولکول هموگلوبین در غلظت‌های مختلف MTBE مورد مقایسه قرار گرفته شده است. از آنجا که بررسی میزان شباهت ساختاری هموگلوبین موش و انسان می‌تواند منجر به اعتبار بیشتریافته‌های بدست آمده گردد، اولین قدم آنالیز توالی اسیدهای آمینه و نوکلئوتیدهای این دو هموگلوبین (انسانی و موش) می‌باشد.

بنابراین براساس نتایج تحقیق حاضر می توان احتمال داد که نمونه‌های هموگلوبین تحت تیمار با MTBE ساختار پیچیده‌تری را نشان می‌دهد با وجود اینکه ساختار دوم تغییر محسوسی نشان نمی‌دهد در حالی که مطالعات قبلی تغییرات بیشتری در محتوای ساختار دوم از جمله تبدیل ساختارهای آلفا به پیچه‌های نامنظم را نشان می‌دهد.

فهرست منابع

1. Ahmed, F.E. (2001): Toxicology and human health effects following exposure to oxygenated or reformulated gasoline. Toxicol. Lett. 123(2):89-113.
2. Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2002): Hemoglobin transports oxygen efficiently by binding oxygen cooperatively. In: Biochemistry, 5th edition (Freeman, W.H.): p.122-129.
3. Borghoff, S., Ring, C., Banton, M., Leavens, T. (2016): Physiologically based pharmacokinetic model for ethyl tertiary-butyl ether and tertiary-butyl alcohol in rats: Contribution of binding to α2u–globulin in male rats and high-exposure nonlinear kinetics to toxicity and cancer outcomes. J. Appl. Toxicol.37(5):621-640.
4. Chen, X., Chen, Sh., Liu, J., Wang, J., (2008): Isolation of hemoglobin from human bloodusing solid phase extraction with lanthanum (III) modified zeolite. Microchim. Acta. 165(1):217-225.
5. Dekant, W., Bernauer, U., Rosner, E., Amberg, A. (2001): Biotransformation of MTBE, ETBE, and TAME after inhalation or ingestion in rats and humans. Res. Report (Health Effects Institute). 102:29-71.
6. Ernst, O., Zor, T. (2010): Linearization of the bradford protein assay. J. Vis. Exp. 38. 1918.
7. Huang, X., Wang, Y., Xing, Z., Du, K. (2016): Emission factors of air pollutants from CNG-gasoline bi-fuel vehicles: Part II. CO, HC and NOx. Sci. Total Environ. 565:698-705.
8. Kang, J.W., Hoffmann M.R. (1998): Kinetics and mechanism of the sonolytic destruction of methyl tert-butyl ether by ultrasonic irradiation in the presence of ozone. Environ. Sci. Technol. 32(20):3194-3199.
9. Nikpay, A., Nikpay, M., Kazemian, H. (2006): Removal of methyl tertiary butyl ether (MTBE) vapour from contaminated air streams using different bacterial culture in biotrickling filters. J. Environ. Health Sci. Eng. 3(2):117-122.
10. 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. J. Mol. Recognit. 30(5):1-17.
11. Prah, J.D., Goldstein, G.M., Devlin, R., Otto, D., Ashley, D., House, D., Cohen, K.L., Gerrity, T. (1994): Sensory, symptomatic, inflammatory, and ocular responses to and the metabolism of methyl tertiary butyl ether in a controlled human exposure experiment. Inhal. Toxicol. 6(6):521-538.
12. Schifter, I., Dfaz, L., Avalos, S., Vera, M., Barrera, A., López-Salinas, E. (2011): Effect of methyl tertiary butyl ether concentrations on exhaust emissions from gasoline used in the metropolitan area of Mexico City. J. Air Waste Manag. Assoc. 1:2162-2906.
13. Salehi, N., Moosavi-Movahedi, A.A., Fotouhi, L., Yousefinejad, S., Shourian, M., Hosseinzadeh, R., Sheibani, N., Habibi-Rezaei, M. (2014): Heme degradation upon production of endogenous hydrogen peroxide via interaction of hemoglobin with

Photobiol. B 133:11-17.

14. Valipour, M., Maghami, P., Habibi-Rezaei, M., Sadeghpour, M., AliKhademian, M., Mosavi, K., Ahmad, F., Moosavi-Movahedi, A.A. (2017): Counteraction of the deleterious effects of reactive oxygen species on hemoglobin structure and function by ellagic acid. J. Lumin.182:1-7.
15. Yuan, Y., Wang, W.H., Sun, H.F., Du, H.F., Xu, L.H., Liu, Y.F., Ding, X.F., Fu, D.P., Liu, K.X. (2007): Adduction of DNA with MTBE and TBA in mice studied by accelerator mass spectrometry. Environ. Toxicol. 22(6):630-635.
16. Zor, T., Selinger, Z. (1996): Linearization of the bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies. Anal. Biochem. 236(2):302-308.

sodium dodecyl sulfate. J. Photochem.