

تاثیر آلاینده نیتрат سرب بر ساختار آنزیم کاتالاز کبد گاوی

رومینا گل افشان^۱، سارا خاوری نژاد^۲، آزاده حکمت^{۳*}

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۳- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*ایمیل نویسنده مسئول : hekmat@ut.ac.ir

تاریخ دریافت : ۹۹/۰۴/۲۴ تاریخ پذیرش : ۹۹/۰۵/۰۸

چکیده

کاتالاز آنزیمی است که تبدیل هیدروژن پراکسید را به آب و اکسیژن مولکولی کاتالیز می‌کند. اهمیت این آنزیم در دفاع آنتی اکسیدانی بدن است. از جمله سمی‌ترین و مهم‌ترین فلزات سنگین سرب است. سمیت سرب به عنوان یکی از مشکلات اساسی در جهان است و به عنوان یک عامل سمی در سیستم‌های مختلف بدن و به ویژه کودکان اثر مخرب دارد. در این پژوهش تاثیر نیترات سرب بر ساختار آنزیم کاتالاز کبد گاو (BLC) با استفاده از الکتروفورز SDS-PAGE و روش‌های طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش، فلورسانس و مادون قرمز (FT-IR) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج الکتروفورز نشان داد باند آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف نیترات سرب تغییر نمی‌یابد. نتایج طیف‌سنجی‌های مرئی-فرابنفش، فلورسانس و FT-IR نشان داد یک جایگاه اتصال برای نیترات سرب در آنزیم وجود دارد و همچنین در حضور نمک نیترات سرب تغییراتی در ساختار سوم آنزیم ایجاد می‌گردد. این تغییر در ساختار آنزیم کاتالاز که شباهت بسیاری با کاتالاز انسانی دارد خود زمینه‌ساز بروز بیماری در بدن است. بنابراین باید در صنایع و دیگر فعالیت‌ها به دقت مورد مصرف قرار گیرد.

کلمات کلیدی

"آنزیم کاتالاز کبد گاو"، "نمک نیترات سرب (Pb(NO₃)₂)"، "UV-Vis"، "فلورسانس"، "FT-IR"

Structural alterations induce by Lead(II) nitrate pollutant in Bovine Liver Catalase

Romina golafshan¹, Sarah Khavarinejad², Azadeh Hekmat^{3*}

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Department of Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Karaj, Iran

3*. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Email Address : hekmat@ut.ac.ir

Abstract

Catalase is an enzyme that catalyses the decomposition of Hydrogen peroxide into the water and molecular oxygen. This enzyme is important in the body's antioxidant defence. Lead is one of the most toxic and most important heavy metals. Lead poisoning is a public health problem in many areas of the world. Lead is a cumulative toxicant that affects multiple body systems and is particularly harmful to young children. In this study the effects of Lead(II) nitrate (Pb(NO₃)₂) on the structure of bovine liver catalase (BLC) were investigated by means of different spectroscopic (UV-Visible, FT-IR, and Fluorescence) techniques and SDS-PAGE electrophoresis. The SDS-PAGE electrophoresis results showed that the enzyme band did not change in different concentrations of Pb(NO₃)₂. The UV-Visible and FT-IR, fluorescence spectroscopy results showed that there is one binding site for Pb(NO₃)₂ and also some structural changes in enzyme happened after addition of Pb(NO₃)₂. Since BLC has efficient similarities with human catalase, this structural changes could initiate harmful disease and should be used more carefully in industrial and other activities.

Keywords

"Bovine Liver Catalase", "Lead(II) nitrate (Pb(NO₃)₂)", "UV-Vis", "Fluorescence", "FTIR"

۱- مقدمه

فلزات سنگین به صورت طبیعی و در غلظت‌های کم در خاک و سنگ‌ها وجود دارند، اما عواملی همچون گسترش صنایع، ترافیک، سوزاندن سوخت‌های فسیلی و کشاورزی سبب افزایش و انتشار آن‌ها در محیط زیست شده است. اغلب فلزات سنگین حتی در غلظت‌های کم نیز سمی هستند و زندگی انسان و موجودات زنده را تهدید می‌کنند (Wu et al. 2018). فلزات سنگین با ورود به بدن انسان می‌توانند در بافت‌ها تجمع یابند و بر روی سیستم عصبی و گردش خون تأثیر گذارند. فلزات سنگین در بدن متابولیزه نمی‌شوند و قابلیت تجمع در بافت‌هایی مانند استخوان‌ها، عضلات، و مفاصل را دارند که این امر موجب بروز بیماری‌های مختلفی در بدن می‌گردد (Muchuweti et al. 2006). آلودگی محیط زیست به فلزات سنگین هر ساله رو به افزایش است و در صورت عدم توجه کافی به این امر قطعاً به بروز خطرات جدی برای سلامت انسان، جانوران و گیاهان منجر خواهد شد. (Yi, Yang, and Zhang 2011) سرب (Lead) یکی از عناصر شیمیایی فلزی با علامت اختصاری Pb و عدد اتمی ۸۲ است که در طبیعت به شکل کانی به نام گالن (سیستم تبلور کوپیک یا مکعبی) یافت می‌گردد. سرب سنگین‌ترین عنصر پایدار، انعطاف پذیر، چکش‌خوار، براق و دارای رنگ سفید مایل به آبی رنگ است که از خاصیت هدایت الکتریکی پایینی برخوردار است. از سرب در سازه‌های ساختمانی، ساچمه و گلوله استفاده می‌شود و همچنین بخشی از آلیاژهای لچیم و آلیاژهای گدازپذیر است. این فلز به شدت در برابر پوسیدگی مقاومت می‌کند و از آن برای نگهداری مایعات فرسایش‌گر (مثل اسید سولفوریک) استفاده می‌شود. فعالیت‌های انسانی منشأ اصلی ورود سرب به محیط زیست است. سرب بیش از هر عنصر دیگری محیط زیست را آلوده می‌کند. (Assi et al. 2016) مطالعات نشان داده است که آلودگی سرب موجب ایجاد سمیت در کلیه و سیستم اندوکرین می‌گردد. همچنین غلظت بالای سرب موجب ایجاد عقمی می‌گردد. مطالعات نشان داده است که سرب می‌تواند بر سیستم گردش خون، سیستم عصبی و سیستم بنیادی خونساز اثر بگذارد (Assi et al. 2016). اغلب مطالعات نشان می‌دهد که سرب از طریق تولید گونه فعال اکسیژن (ROS) مانند هیدروژن پراکسید موجب القای پراکسیداسیون لیپیدی می‌گردد. مطالعات *in vivo* همچنین نشان داده است که سرب فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مانند سوپراکسید دسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوکوز ۶-فسفات دهیدروژناز (G6PD) و گلوکاتایون پراکسیداز (GPx) را در انسان و جانوران تغییر می‌دهد. به عبارت دیگر تزریق و تنفس سرب به مدت طولانی موجب کاهش چشمگیر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در کبد و کلیه می‌گردد (Moneim, Dkhal, and Al-Quraishy 2011; Assi et al. 2016). بر این آنزیم‌ها پیچیده است زیرا سرب به صورت رقابتی می‌تواند مانع جذب یا جانشینی عناصر زیستی در جایگاه فعال آنزیم‌ها گردد و یا به گروه‌های SH پروتئین متصل می‌شود (Lakshmi, Sudhakar, and Aparna 2013). آنزیم‌ها نوعی از کاتالیست‌های (catalyst) زیستی هستند که سرعت واکنش‌های شیمیایی را در موجود زنده تنظیم می‌کنند. اکثر آنزیم‌ها ساختار پروتئینی دارند. اگرچه گروهی از نوکلئیک اسیدها به نام ریبوزوم‌ها هم قادر به انجام فعالیت کاتالیزی هستند. کاتالاز یا هیدروژن پراکسید اکسیدودوکناز (EC

number: 1.11.1.6) آنزیمی الیگومر و آنتی اکسیدانت با وزن مولکولی ۲۴۰ کیلودالتون می‌باشد که متعلق به گروه بزرگ پروتئین‌های دارای هم است (Díaz et al. 2005; Alfonso Prieto, Vidossich, and Rovira 2012). این آنزیم یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی اکسیدانی است که هیدروژن پراکسید (H_2O_2) را در یک واکنش دو مرحله‌ای به آب و اکسیژن تجزیه می‌کند. در مرحله اول، مولکول پراکسید هیدروژن، اکسایش هم (Heme) را انجام می‌دهد و آن را به گونه اکسی فریل تبدیل می‌کند، در این شرایط یک اکسی والان الکترون از آهن و یک اکسی والان الکترون نیز از حلقه پورفیرین جدا می‌شود که نتیجه آن تشکیل یک رادیکال کاتیون پورفیرین است. در نتیجه اتم آهن توسط اکسیژن هیدروژن پراکسید، اکسید شده و ترکیب $I (O=Fe(IV)-E)$ را ایجاد می‌کند. در مرحله دوم، دومین هیدروژن پراکسید به عنوان احیاکننده ترکیب I عمل کرده و آنزیم اولیه را همراه با آب و اکسیژن مولکولی تولید می‌کند (Díaz et al. 2005; Alfonso Prieto, Vidossich, and Rovira 2012). آنزیم با فعالیت خود، سلول‌ها را از اثرات سمی هیدروژن پراکسید محافظت می‌کند. بیشترین فعالیت این آنزیم در کبد، اریتروسیت‌ها و کلیه است و کمترین فعالیت را در بافت پیوندی دارد. کاتالاز عمدتاً در پراکسی‌زوم قرار دارد. به طوری که گاهی از کاتالاز به عنوان مهم‌ترین پروتئین پراکسی‌زوم یاد می‌شود. (Díaz et al. 2012) آنزیم کاتالاز کبد گاوی (Bovine liver catalase) یا به اختصار BLC از خانواده کاتالازها می‌باشد که به عنوان یک مدل آنزیم آنتی اکسیدانی در اکثر مطالعات جهت بررسی میان‌کنش ترکیبات مختلف و لیگاند‌های کوچک به عنوان آنزیم الگو استفاده می‌شود (Alfonso Prieto, Vidossich, and Rovira 2012). کریستالوگرافی این آنزیم (PDB ID: 1TGU) نشان می‌دهد که BLC دارای ساختار هموترامر است که هر زیر واحد آن از زنجیرهای پلی پپتیدی با گروه پروستتیک فریک پروتوپورفیرین IX تشکیل شده است. هر زیر واحد شامل ۵۰۶ رزیدو، وزن مولکولی تقریباً ۶۰ کیلودالتن و یک آهن (Fe) سه ظرفیتی است. قسمت هم در وسط هر مونومر مدفون شده است که حدود ۲۳ آنگستروم از مرکز تترامر فاصله دارد. هر زیر واحد کاتالاز دارای یک گروه NADPH نیز می‌باشد که بر روی سطح آنزیم قرار می‌گیرد. مولکول NADPH برای فعالیت کاتالازی آنزیم BLC لازم نمی‌باشد و مطالعات پیشین نشان داده است که این مولکول مانع از غیرفعال شدن آنزیم توسط هیدروژن پراکسید می‌شود (Khataee et al. 2020). تاکنون تأثیر برخی فلزات و ترکیبات مانند مس، سیپرمترین (cypermethrin) (Liu et al. 2008) و اکسید گرافن (Wei and Ge 2013) بر فعالیت و ساختار BLC بررسی شده است. جایگاه آنزیم کاتالاز در کبد به عنوان مهم‌ترین ارگان بدن جهت متابولیسم و سمیت‌زدایی از ترکیبات، داروها و مواد مصرفی آن را به عنوان یکی از آنزیم‌های شاخص جهت سنجش عوارض جانبی یا سمیت ترکیبات در بدن تبدیل کرده است. مطالعات انطباق ساختاری و توالی کاتالاز انسانی و کاتالاز کبد گاوی نشان داده است که بین دو گونه آنزیمی ۹۱ درصد شباهت وجود دارد. همچنین مطالعه توالی جایگاه فعال آنزیم در هر دو ساختار مشخص کرده است که اسید آمینه‌های متصل شده به ساختار گروه هم در جایگاه فعال و اسید آمینه‌های درگیر در تقویت بار جایگاه فعال

شد. غلظت نمونه BLC ۴ میکرومولار تعیین شد. ابتدا طیف مرئی-فرابنفش نمونه BLC مورد بررسی قرار گرفت. سپس جذب نور مرئی-فرابنفش نمونه BLC پس از افزودن غلظت‌های مختلف نمک نیتрат سرب (10^{-6} ، 10^{-5} ، 10^{-4} ، 10^{-3} ، 10^{-2} ، 10^{-1} مولار) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ثبت گردید.

• مطالعات طیف‌سنجی نشر فلورسانس (Fluorescence Spectrophotometer)

اندازه‌گیری شدت نشر فلورسانس ذاتی، به منظور مطالعه تاثیر $Pb(NO_3)_2$ در غلظت‌های مختلف بر ساختار BLC مورد بررسی قرار گرفت. نشر فلورسانس با استفاده از اسپکتروفلورومتر فلورسانس مدل هیتاچی MPF-7 ساخت آمریکا بررسی شد. جهت کنترل دما در طی هر آزمایش، از حمام مدل Protherms NTB-211 استفاده شد. طول موج تحریک و نشر در تمام طول آزمایش‌ها به ترتیب ۲۸۰ و ۳۳۵ نانومتر تنظیم شد. ابتدا جذب مرئی-فرابنفش BLC مورد بررسی قرار گرفت. سپس جذب نور مرئی-فرابنفش نمونه BLC پس از افزودن غلظت‌های مختلف $Pb(NO_3)_2$ (10^{-6} ، 10^{-5} ، 10^{-4} ، 10^{-3} ، 10^{-2} ، 10^{-1} مولار) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ثبت گردید. ضخامت کووت‌های کوارتز در آزمایش‌ها ۱ سانتی‌متر و پهنای شکاف مورد استفاده در تحریک و نشر به ترتیب ۵ و ۵ سانتی‌متر تنظیم گردید.

• مطالعات طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (Fourier-transform Infrared Spectroscopy, FT-IR)

طیف مادون قرمز BLC در محدوده 500 تا 2100 cm^{-1} تیمار شده با غلظت‌های مختلف $Pb(NO_3)_2$ (10^{-6} ، 10^{-5} ، 10^{-4} ، 10^{-3} ، 10^{-2} ، 10^{-1} مولار) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با استفاده از طیف‌سنجی مادون قرمز Brocker model equare 55 ساخت آلمان ثبت گردید.

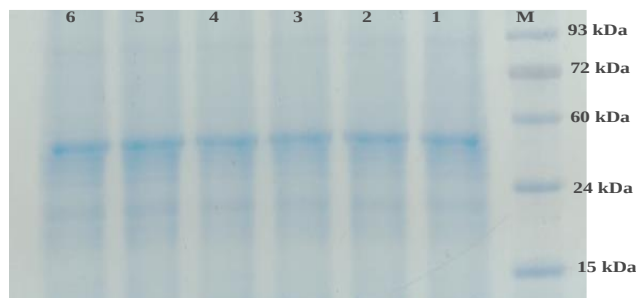
• آنالیز آماری داده‌ها

نتایج میانگین ۳ آزمایش مستقل $\pm$ SD می‌باشد.

۳- نتایج

• الگوی الکتروفورزی آنزیم BLC در حضور سرب

نتایج الگوی الکتروفورزی آنزیم BLC در حضور غلظت‌های مختلف نیترات سرب (10^{-6} ، 10^{-5} ، 10^{-4} ، 10^{-3} ، 10^{-2} ، 10^{-1} مولار) در شکل ۱ نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده می‌گردد در حضور غلظت‌های مختلف نیترات سرب، تفاوتی در اندازه و یا موقعیت باندهای حاصله مشاهده نمی‌گردد.



شکل ۱- تصویر ژل الکتروفورز SDS-PAGE آنزیم BLC به تنهایی (۱) و تیمار شده با غلظت‌های مختلف از نیترات سرب (۲ تا ۶). غلظت آنزیم ۴ میکرومولار و غلظت نیترات سرب در ستون ۲ تا ۶ به ترتیب 10^{-6} ، 10^{-5} ، 10^{-4} ، 10^{-3} ، 10^{-2} ، 10^{-1} مولار بود.

در بین هر دو گونه آنزیم شباهت ۱۰۰ درصدی با هم دارند (Yekta et al. 2017; Khataee et al. 2020). نیترات سرب یا سرب نیترات ($Pb(NO_3)_2$) یک بلور بی رنگ یا پودر سفید و یک اکسید کننده قوی و پایدار است و برخلاف بیشتر نمک‌های سرب، در آب حل می‌شود. کاربرد اصلی این ماده از قرون وسطی، با نام plumbum dulce، ماده خام برای تولید رنگدانه‌ها بوده است و از قرن بیستم، به عنوان یک پایدارساز (ثبیت کننده) در نایلون و پلی‌استرها و روکش‌دار کردن کاغذهای فوتوترموگرافیک به کار می‌رود. سمیت سرب به عنوان یکی از مشکلات اساسی در جهان است و به عنوان یک عامل سمی در سیستم‌های مختلف بدن و به ویژه کودکان اثر مخرب دارد. لذا در این مطالعه تغییرات ایجاد شده در ساختار کاتالاز کبد گاوی، به عنوان یک شاخص مهم جهت بررسی سمیت ایجاد شده توسط آلودگی‌ها، توسط $Pb(NO_3)_2$ پرداخته شد.

۲- مواد و روش‌ها

• مواد

آنزیم خالص کاتالاز کبد گاوی (لیوفیلیزه، به صورت پودر) و نیترات سرب ($Pb(NO_3)_2$) از شرکت سیگما تهیه شد. دی پتاسیم فسفات (K_2HPO_4) و مونو پتاسیم فسفات (KH_2PO_4) از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند. تمام آزمایش‌ها در بافر پتاسیم فسفات ۰/۱ مولار pH ۷ انجام پذیرفت و آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند. جهت آماده‌سازی نمونه‌ها در ابتدا ۴ میلی‌گرم از آنزیم کاتالاز کبد گاو در ۴ میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات گرم با pH ۷ ریخته شد و به طور مداوم دمای محلول کنترل شد. پس از حل شدن کامل آنزیم در بافر، رنگ محلول به صورت زرد مایل به سبز دیده شد.

• مواد مطالعات الکتروفورز به روش SDS-PAGE

به منظور مطالعه میزان تغییر ساختار آنزیم، ابتدا ۴ میکرومولار آنزیم با 10^{-6} ، 10^{-5} ، 10^{-4} ، 10^{-3} ، 10^{-2} ، 10^{-1} مولار نمک نیترات سرب تیمار شد. به منظور الکتروفورز پروتئین‌ها به روش-SDS PAGE از ژل ۱۱ درصد (ژل بالا) و ۴ درصد (ژل پایین)، SDS 10 درصد و محلول استوک اکریل آمید ۳۰ استفاده شد. ابتدا بافر الکتروده به تانک الکتروفورز منتقل شد و سپس به ترتیب ژل‌های پایین و بالا به داخل محفظه شیشه‌ای دستگاه الکتروفورز تزریق شدند. پیش از اضافه کردن ژل‌های بالا و پایین به هر یک از آنها ۵۰ میکرولیتر آمونیوم پرسولفات ۱۰ درصد و ۵ میکرولیتر TEMED اضافه شد. پس از انعقاد ژل، شانه داخل آن را برداشته و ۱۵ میکرولیتر از هر یک از نمونه‌های پروتئینی حاوی ۱۵ میکرولیتر بافر نمونه و ۷ میکرولیتر مارکر به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد. عمل الکتروفورز با ولتاژ ثابت ۶۰ ولت و جریان ۱۵ میلی‌آمپر به مدت حدود ۲ ساعت انجام شد. پس از اتمام زمان الکتروفورز، ژل با استفاده از رنگ کوماسی بلو R ۲۵۰ رنگ‌آمیزی شد و سپس در محلول رنگ قرار داده شد تا باندها مشخص شوند.

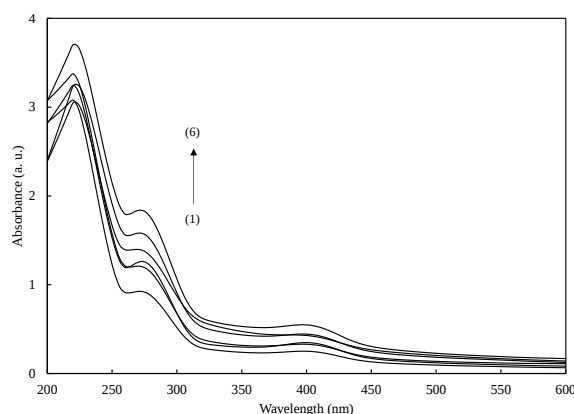
• مطالعات طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش (Ultraviolet-visible Spectrophotometer)

جهت بررسی تغییر در ساختار BLC در حضور $Pb(NO_3)_2$ از طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش PG Instruments Ltd ساخت انگلیس استفاده شد. طیف‌سنجی با کووت کوارتز با طول مسیر عبور نور ۱ سانتی متر و در محدوده طول موج ۲۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر انجام

• نتایج طیف‌های مرئی-فرابنفش آنزیم BLC در حضور

نیترات سرب

نتایج طیف‌های مرئی-فرابنفش آنزیم BLC در حضور غلظت‌های مختلف نیترات سرب در نمودار ۱ نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده می‌گردد سه بیشینه جذب برای آنزیم BLC در ۲۳۰، ۲۷۷ و ۴۰۴ نانومتر وجود دارد که به ترتیب مربوط به جذب مرئی-فرابنفش توسط پیوند پپتیدی، اسیدهای آمینه آروماتیک (Hekmat et al. 2020; Hekmat et al. 2017) و گروه هیم (پیک سورت) می‌باشد (Khataee et al. 2020). همانگونه که مشاهده می‌گردد با افزایش غلظت نمک نیترات سرب، افزایش شدت جذب به همراه جابجایی به طول موج‌های بلندتر (red shifted) اندک در طول موج‌های بیشینه مشاهده می‌گردد.



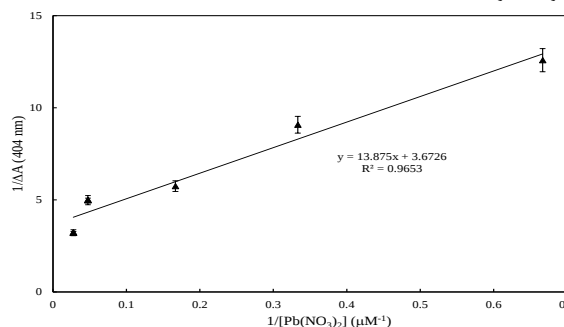
نمودار ۱- طیف جذبی نور مرئی-فرابنفش آنزیم BLC (۴ میکرومولار) در حضور غلظت‌های مختلف نیترات سرب. غلظت نیترات سرب در ستون ۲ تا ۶ به ترتیب 1×10^{-6} ، 3×10^{-6} ، 6×10^{-6} ، 21×10^{-6} ، 36×10^{-6} مولار بود.

• محاسبه ثابت اتصال با استفاده از رابطه Benesi-Hildebrand

با استفاده از رابطه Benesi-Hildebrand (رابطه ۱) (Hekmat et al. 2020) ثابت تشکیل کمپلکس (K_a) بین BLC و نیترات سرب محاسبه گردید.

$$\text{رابطه ۱} \quad \frac{1}{\Delta A} = \left(\frac{1}{K_a \Delta A_{\infty}} \right) \times \frac{1}{[S]} + \left(\frac{1}{\Delta A_{\infty}} \right)$$

در این رابطه ΔA تغییرات جذب در ۴۰۴ نانومتر در عدم حضور و حضور نیترات سرب است. ΔA_{∞} بیشینه تغییرات جذب و $[S]$ بیانگر غلظت نیترات سرب می‌باشد. با توجه به نمودار ۲ مقدار ثابت اتصال K_a برابر با $1.04 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ بدست آمد. این ثابت اتصال بیانگر اتصال BLC و نیترات سرب است.



نمودار ۲- نمودار Benesi-Hildebrand برای تعیین مقدار ثابت اتصال نیترات سرب به BLC. آزمایش سه بار تکرار پذیرفت.

• نتایج طیف‌های نشر فلورسانس آنزیم BLC در حضور

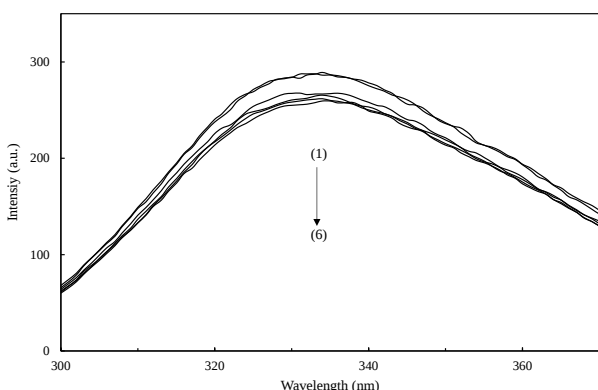
نیترات سرب

نتایج طیف‌های نشر فلورسانس آنزیم BLC در حضور غلظت‌های مختلف نیترات سرب در نمودار ۳ نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده می‌گردد با افزایش غلظت نیترات سرب طیف نشر فلورسانس BLC کاهش می‌یابد که نشانگر ایجاد کمپلکس بین BLC و نیترات سرب و در نتیجه ایجاد خاموشی (Quenching) در نشر فلورسانس است.

• محاسبه ثابت اتصال با استفاده از رابطه استرن-ولمر در مرحله بعد برای پیدا کردن پارامترها و مکانیسم دخیل در پدیده خاموشی از رابطه استرن - ولمر استفاده گردید (رابطه ۲).

$$\text{رابطه ۲} \quad \frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q]$$

در معادله فوق F_0 و F به ترتیب بیانگر نشر فلورسانس BLC در غیاب و حضور نیترات سرب است. K_{SV} ثابت استرن-ولمر و $[Q]$ غلظت کل خاموش کننده (نیترات سرب) می‌باشد. همچنین k_q و τ_0 به ترتیب بیانگر ثابت خاموشی بیومولکولی و نیمه عمر فلوروفور در حالت تهیجی (excited state) می‌باشد که برای تریپتوفان تقریباً 10^{-10} ثانیه است (Hekmat et al. 2020).



نمودار ۳- طیف نشر فلورسانس آنزیم BLC (۴ میکرومولار) در حضور غلظت‌های مختلف نیترات سرب. غلظت نیترات سرب در ستون ۲ تا ۶ به ترتیب 1×10^{-6} ، 3×10^{-6} ، 6×10^{-6} ، 21×10^{-6} ، 36×10^{-6} مولار بود.

نمودار ۴ بیانگر نمودار استرن-ولمر یا میزان F_0/F در مقابل غلظت خاموش کننده در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد است. مقدار K_{SV} و k_q در جدول ۱ نشان داده شده است. پارامترهای اتصال و ترمودینامیک در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با استفاده از رابطه مدیفای شده استرن ولمر (رابطه ۳) تعیین شدند (Hekmat et al. 2020) (جدول ۱ و نمودار ۴).

$$\text{رابطه ۳} \quad \log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_a + n \log [Q]$$

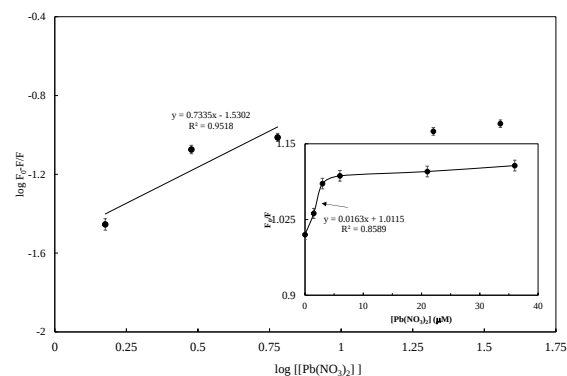
در معادله فوق F_0 و F به ترتیب بیانگر نشر فلورسانس BLC در غیاب و در حضور نیترات سرب است. K_a ثابت اتصال برای ایجاد کمپلکس، n تعداد لیگاند اتصال و $[Q]$ غلظت کل خاموش کننده را نشان می‌دهد (Hekmat et al. 2020). با استفاده از رابطه ۴

زیست است. قرارگیری افراد در معرض سرب چه در محیط زیست و چه در مواجهه شغلی در بسیاری از کشورها مشکلات جدی ایجاد کرده است. تحقیقات نشان داده است که سرب، فراوانترین عنصر غیر ضروری در حیوانات و انسان است و با طیف گسترده‌ای از اختلالات فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و رفتاری مرتبط است (Eleroğlu et al. 2011; Sharma et al. 2011). بسیاری از فلزات سنگین از جمله سرب، موجب تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و در نتیجه، افزایش پراکسیداسیون لیپیدها در غشاهای می‌شوند. گونه‌های اکسیژن واکنش پذیر، محصول همراه واکنش‌های تخریب کننده در بسیاری از بافت‌ها هستند که با آسیب رساندن به اجزای سلولی، متابولیسم منظم را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Ahamed and Siddiqui 2007; Sharma et al. 2011). کل تولید جهانی سرب در حدود ۳ میلیون تن در سال است. قسمت عمده سربی که به صورت فلزی به کار می‌رود قابل بازیافت است اما اکثر سربی که به صورت ترکیبی استفاده می‌شود معمولاً به محیط زیست راه پیدا می‌کند. قسمتی از سرب از راه صنایع شیشه‌سازی وارد محیط زیست می‌شود. کبد به عنوان عضو مهم بدن در سم‌زدایی مواد و داروها نقش اساسی دارد و آنزیم کاتالاز یکی از آنزیم‌های حائز اهمیت در سم‌زدایی کبد است. گزارش شده است که کاتالاز مسئول سم‌زدایی مقادیر قابل توجهی پراکسید هیدروژن است که در طی واکنش‌های مختلف بیوشیمیایی و متابولیک ایجاد می‌شود (Ahamed and Siddiqui 2007). آکاتالازی (فقدان کاتالاز) آسیب بافت کبدی و کلیوی را تشدید می‌کند و موجب تغییرات اپیتلیال در مزانشیم کلیه و پیشرفت به سمت فیروز کلیوی پیشرفته می‌شود (Nirogi et al. 2012). مطالعه برهمکنش ترکیبات مختلف از جمله دارو یا فلزات سنگین با پروتئین‌های مختلف یکی از مباحث مهم و مورد توجه برای بسیاری از محققین خصوصاً محققین علم داروشناسی یا سم شناسی است، زیرا بسیاری از فلزات سنگین و یا داروها می‌توانند به پروتئین‌های خاصی در درون سلول‌ها متصل شده و موجب تغییر در عملکرد و یا حتی ساختار پروتئین شوند و در نتیجه اثرات زیانباری را برای سلول به همراه داشته باشند (Yang et al. 2006). در شرایط آزمایشگاهی می‌توان با روش‌های متعددی برهمکنش فلز سنگین و یا دارو را با یک ترکیب پروتئینی مانند آنزیم مورد بررسی قرار داد. از جمله این روش‌ها می‌توان به روش‌های اسپکتروسکوپی مانند طیف‌سنجی UV-Vis و طیف سنجی فلورسانس اشاره نمود (Keyhani et al. 2005; Tayefi-Nasrabadi et al. 2006). در این پژوهش آنزیم کاتالاز کبد گاو در معرض غلظت‌های مختلف نمک نیترات سرب (10^{-6} ، 10^{-5} ، 10^{-6} ، 10^{-7} ، 10^{-8} ، 10^{-9} مولار) قرار گرفت و در ابتدا برای بررسی اتصال نمک سرب به پروتئین کاتالاز از روش الکتروفورز SDS-PAGE استفاده شد. ساختار کریستالوگرافی این آنزیم، نشان می‌دهد که BLC دارای ساختار هموترامر است که هر زیر واحد آن از زنجیرهای پلی پپتیدی با گروه پروستتیک فریک پروتوپورفیرین IX تشکیل شده است. هر زیر واحد آنزیم BLC شامل ۵۰۶ رزیدو، وزن مولکولی تقریباً ۶۰ کیلودالتن و یک آهن (Fe) سه ظرفیتی است [۱]. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نمک نیترات سرب تفاوت محسوسی در الگوی الکتروفورتیک مشاهده نمی‌شود. با توجه به الگوی الکتروفورتیک بدست آمده وزن مولکولی زیرواحدهای آنزیم در تمام غلظت‌های نیترات سرب تقریباً ۶۰ کیلودالتن است.

می‌توان مقادیر انرژی آزاد گیبس (ΔG°) اتصال نیترات سرب به BLC محاسبه شد (Hekmat et al. 2020).

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad \text{رابطه ۴}$$

در رابطه فوق R ثابت عمومی گازها و T دمای مطلق می‌باشد. مقدار ΔG° در جدول ۱ آورده شده است. از آنجایی که مطابق این جدول، مقدار انرژی آزاد گیبس اتصال منفی است بیانگر خودبخودی بودن فرایند اتصال نیترات سرب به BLC می‌باشد.



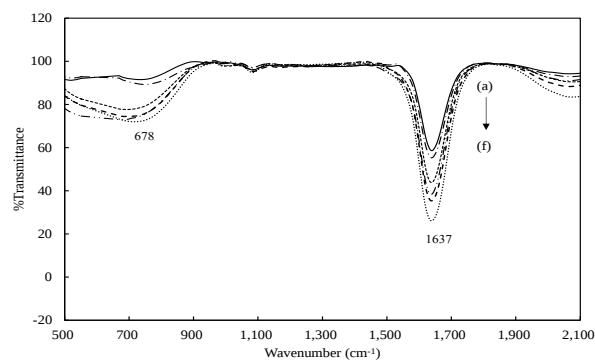
نمودار ۴- نمودار معادله مدیفای شده استرن ولمر آنزیم BLC (۴) میکرومولار) در حضور غلظت‌های مختلف نیترات سرب. نمودار الحاقی مربوط به معادله کلاسیک استرن-ولمر می‌باشد.

جدول ۱- پارامترهای ترمودینامیکی و اتصال نیترات سرب به BLC در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

K_{sv} ($M^{-1} s^{-1}$)	k_q (M^{-1})	n	K_a (M^{-1})	ΔG° (kJ/mol)
$1/63 \times 10^4$	$8/15 \times 10^{11}$	$0/73$	$2/9 \times 10^4$	$-26/5$

• مطالعات طیف‌سنجی FT-IR

نتایج طیف‌های FT-IR آنزیم BLC در حضور غلظت‌های مختلف نیترات سرب در نمودار ۵ نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده می‌گردد با افزایش غلظت نیترات سرب طیف FT-IR آنزیم تغییر می‌یابد که نشانگر ایجاد تغییرات در ساختار BLC می‌باشد.



نمودار ۵- طیف نشر فلورسانس آنزیم BLC (۴ میکرومولار) در حضور غلظت‌های مختلف نیترات سرب. غلظت نیترات سرب در ستون ۲ تا ۶ به ترتیب 10^{-6} ، 10^{-5} ، 10^{-6} ، 10^{-7} ، 10^{-8} ، 10^{-9} مولار بود.

۳- بحث

سرب به عنوان خطرناک‌ترین فلز سنگین آلاینده محیط زیست، بر روی فعالیت‌های متابولیکی و فیزیولوژیکی موجودات زنده تأثیر می‌گذارد و به دلیل نقش سرب در صنعت مدرن، این فلز سنگین در محیط زیست پراکنده می‌شود. فعالیت‌های انسانی منشا اصلی ورود سرب به محیط

دفراسیروکس، شدت نشر ذاتی BLC کاهش یافته است و نتیجه گرفتند که در اطراف کروموفورهای آنزیم تغییرات شاخص رخ داده است. Koohshekan و همکاران (Koohshekan et al. 2014) نشان دادند کاهش نشر فلورسانس ذاتی آنزیم BLC تحت تاثیر غلظت‌های افزایشی آسپرین تایید کننده ی این مسئله است که این دارو با باز کردن ساختار سه بعدی آنزیم کاتالاز به عنوان یک خاموش کننده عمل می‌کند [۲۶]. Li و همکاران تغییر ساختار BLC را در حضور غلظت‌های مختلف ویتامین C بررسی کردند. طبق تحقیقات آنها با افزایش غلظت ویتامین C، طیف نشر BLC کاهش یافت و این امر به علت تغییر هیدروفوبیسیته (آبگریزی) محیط اطراف تریپتوفان آنزیم بود (Li et al. 2008). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت در حضور غلظت‌های مختلف نیترات سرب خاموشی در نشر فلورسانس آنزیم کاتالاز رخ می‌دهد که به علت ایجاد کمپلکس بین نیترات سرب و آنزیم، تغییر میکرومحیط اطراف تریپتوفان‌های آنزیم و تغییر در میزان آب‌گریزی اطراف فلوروفورهای تریپتوفان می‌باشد. با آنالیز تغییرات در نشر فلورسانس می‌توان اطلاعاتی درباره تاثیر برخورد مولکول تحریک شده با محیط اطراف بدست آورد. برخی مقالات پدیده خاموشی در نشر فلورسانس را به دو دسته بزرگ خاموشی دینامیک و خاموشی استاتیک تقسیم‌بندی می‌کنند. اساس تقسیم‌بندی فوق، چگونگی رابطه بین شدت نشر فلورسانس و غلظت خاموش کننده می‌باشد که آیا کاملاً با معادله استرن-ولمر همخوانی دارد (خاموشی دینامیک) یا ندارد (خاموشی استاتیک). (Amani et al. 2011; Hekmat et al. 2012; Pashah et al. 2019). جهت یافتن پارامترها و مکانیسم دخیل در پدیده خاموشی از معادله استرن-ولمر استفاده شد. نمودار $\frac{F_0}{F}$ بر علیه غلظت نیترات سرب، در غلظت کم به صورت خطی بدست آمد که بیانگر ایجاد خاموشی از نوع استاتیک (تشکیل کمپلکس) یا مخلوط دینامیک-استاتیک است. اما در غلظت‌های بالا غیرخطی و شیب به سمت کاهش نشان داد که معرف وجود دو گونه نشر کننده در سیستم است که فقط گونه در بخش خطی قابل دسترس خاموش کننده است (Qin et al. 2014). در مرحله بعد مقدار k_q محاسبه شد. که مقدار بدست آمده (جدول ۱) بیشتر از مقدار محدودکننده $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ است (Huang et al. 2015). بنابراین خاموشی نشر فلورسانس BLC در حضور نیترات سرب از نوع استاتیک (از طریق ایجاد کمپلکس حالت پایه) است. در مرحله بعد پارامترهای اتصال با استفاده از رابطه مدیفای شده استرن-ولمر تعیین شد و مقادیر n و ثابت اتصال نیترات سرب بدست آمد. ثابت اتصال بین BLC و نیترات سرب $10^4 \times 2/67 \text{ M}^{-1}$ بدست آمد. این مقدار به عدد بدست آمده از طریق رابطه Benesi-Hildebrand بسیار نزدیک است و تایید کننده محاسبات از طریق دو رابطه می‌باشد. بر طبق رابطه مدیفای شده استرن-ولمر تعداد اتصال نیترات سرب به BLC به صورت ۱:۱ است. بر طبق جدول ۱ مقدار ΔG° اتصال برای نیترات سرب منفی بدست آمد که بیانگر خودبخودی بودن فرایند اتصال می‌باشد (Pashah et al. 2019). جهت مطالعه تغییرات ساختار دوم آنزیم کاتالاز در حضور نیترات سرب از طیف‌سنجی FT-IR استفاده شد. BLC دارای ۳ باند آمیدی I, II, III و (III) است. امید I در محدوده عدد موج $1600-1700 \text{ cm}^{-1}$ که معمولاً به علت ارتعاشات کششی C=O ایجاد می‌شود، به تغییرات ساختاری آنزیم بسیار حساس است و معمولاً جهت بررسی تغییرات ساختاری ایجاد شده در پروتئین‌ها به کار می‌رود. امید II در محدوده

طیف‌سنجی جذب الکترونی یکی از ضروری‌ترین روش‌ها جهت بررسی برهمکنش بین پروتئین‌ها و مولکول‌های کوچک است. همانگونه که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود BLC دارای سه جذب بیشینه (λ_{max}) شاخص در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۷۷ و ۴۰۴ نانومتر می‌باشد که این بیشینه جذب بر طبق گزارشات پیشین مربوط به جذب مرئی-فرابنفش توسط پیوند پپتیدی، اسیدهای آمینه آروماتیک [۱۴، ۱۵] و گروه هیم (پیک سورت) می‌باشد [۱۰]. همانگونه که مشاهده می‌گردد با افزایش غلظت نمک نیترات سرب، افزایش شدت جذب (هایپرکرومیک) به همراه جابجایی به طول موج‌های بلندتر (red shifted) اندک در هر سه طول موج‌های بیشینه مشاهده می‌گردد. این افزایش جذب در طول موج‌های ۲۳۰ و ۲۸۰ نانومتر بسیار شاخص و در طول موج ۴۰۴ نانومتر اندک است. Moradi و همکاران [۲۶] مشاهده کردند در حضور داروی دفراسیروکس، میزان جذب BLC در طول موج ۲۸۰ نانومتر افزایش یافته است و نتیجه گرفتند که در اطراف اسیدهای آمینه آروماتیک به ویژه تریپتوفان آنزیم تغییرات شاخص رخ داده است. Khataee و همکاران (Khataee et al. 2020) مشاهده کردند که با افزایش غلظت Lawsone میزان جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر تغییر شاخص و در طول موج ۴۰۴ نانومتر تغییر اندکی کرده است و این گونه نتیجه گرفتند که Lawsone باعث تغییر در محیط اطراف تریپتوفان می‌گردد و گروه هیم آنزیم کاتالاز می‌گردد. Sun و همکاران (Sun et al. 2014) پس از افزودن N-استیل-L-سیستئین کوانتوم دات (N-Acetyl-L-cysteine-Capped CdTe Quantum Dots) نشان دادند که اتصال ترکیب به آنزیم BLC موجب افزایش جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر می‌گردد که بیانگر تغییر در ساختار آنزیم است. بنابراین می‌توان اینگونه نتیجه گرفت که در حضور نیترات سرب، آنزیم کاتالاز تغییر ساختار می‌دهد. این تغییر موجب در دسترس حلال قرار گرفتن گروه‌های هیدروفوب در داخل آنزیم می‌شود (Hekmat et al. 2019). در مرحله بعد با استفاده از رابطه Benesi-Hildebrand ثابت تشکیل کمپلکس (K_a) بین BLC و نیترات سرب محاسبه گردید و مقدار آن $10^4 \times 2/67 \text{ M}^{-1}$ بدست آمد. طیف‌سنجی فلورسانس یک تکنیک بسیار قوی برای مطالعه ساختار و خصوصیات ماکرومولکول‌های موجود در محلول می‌باشد، لذا در این مطالعه با کمک تکنیک طیف‌سنجی فلورسانس مطالعه اتصال نمک نیترات سرب به آنزیم BLC انجام شد. پروتئین‌ها به دلیل حضور آمینواسیدهای تریپتوفان، تیروزین و فنیل‌آلانین (فلوروفور) دارای نشر فلورسانس ذاتی هستند. آنزیم کاتالاز کبد گاوی چهار زیرواحد و هر زیرواحد شامل ۲۰ اسید آمینه تیروزین و ۶ اسید آمینه تریپتوفان است (Moradi et al. 2015). از آنجاکه فلورسانس اسید آمینه فنیل آلانین بسیار کم و فلورسانس تیروزین نیز تقریباً هنگامیکه این اسید آمینه یونیزه می‌شود و یا نزدیک یک گروه آمینو یا کربوکسیل تریپتوفان است خاموش می‌شود، پس باقی مانده‌های تریپتوفان حساس به لیگاندی است که متصل می‌شود. بنابراین شدت نشر فلورستان تریپتوفان (در مجموع ۲۴ باقی مانده تریپتوفان) در طول موج برانگیختگی ۲۸۰ نانومتر نشر فلورسانس در حضور غلظت‌های مختلف نیترات سرب مورد بررسی قرار گرفت. با افزایش غلظت نیترات سرب، طیف نشر فلورسانس BLC کاهش یافت که نشانگر ایجاد خاموشی (Quenching) در نشر فلورسانس است. Moradi و همکاران (Moradi et al. 2015) مشاهده کردند در حضور داروی

crispus مطالعه کردند و نشان دادند تغییرات در ساختار آنزیم از نتایج تجمع ROS ناشی از سرب است. کاتالاز به عنوان آنزیمی در سیستم دفاعی بدن به منظور مقابله با آثار مخرب استرس اکسیداتیو بسیار حائز اهمیت است. ارتباط این آنزیم با بیماری‌های ایجاد شده توسط رادیکال‌های آزاد مانند انواع سرطان‌ها، آلزایمر، دیابت، بیماری‌های عصبی و همچنین بیماری‌های عروقی بسیار مهم می‌باشد. نقص در ساختار و عملکرد آنزیم کاتالاز موجب افزایش غلظت پراکسید هیدروژن می‌گردد و این اثرات در سلول‌های بتای پانکراس که به استرس اکسیداتیو حساس هستند و میزان کاتالاز در آنها کم است می‌شود. مطالعات انطباق ساختاری و توالی کاتالاز انسانی و کاتالاز کبد گاوی نشان داده است که بین دو گونه آنزیمی ۹۱ درصد شباهت وجود دارد. همچنین مطالعه توالی جایگاه فعال آنزیم در هر دو ساختار مشخص کرده است که اسید آمینه‌های متصل شده به ساختار گروه هیم در جایگاه فعال و اسید آمینه‌های درگیر در تقویت بار جایگاه فعال در بین هر دو گونه آنزیم شباهت ۱۰۰ درصدی با هم دارند (Khataee et al. 2017; Yekta et al. 2020). بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده از این پژوهش نیترات سرب می‌تواند ساختار این آنزیم را دستخوش تغییر کند که خود زمینه‌ساز بروز بیماری‌های جدی است. بنابراین ایجاد تمهیداتی جهت کاهش آلودگی‌های سرب به ویژه در مناطق شهری بسیار مهم است.

۴- نتیجه‌گیری

به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که نمک نیترات سرب دارای یک جایگاه اتصال بر روی آنزیم کاتالاز می‌باشد و می‌تواند با اتصال به آنزیم کاتالاز موجب تغییر در ساختار فضایی آنزیم کاتالاز شود و این تغییر ساختار آنزیم کاتالاز احتمالاً موجب تغییر در عملکرد آنزیم خواهد شد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از مسئولین مجتمع آزمایشگاهی رازی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات که در پیشبرد این پژوهش یاری رساندند تشکر می‌گردد.

عدد موج $1600-1500 \text{ cm}^{-1}$ و در نتیجه ارتعاشات کششی C-N به همراه خمش‌های N-H است که با ایجاد کمپلکس آنزیم-لیگاند مرتبط است (Khataee et al. 2020). همانگونه که نمودار ۵ نشان می‌دهد غلظت‌های افزایشی نیترات سرب منجر به ایجاد تغییرات در شدت طیف‌های FT-IR آنزیم کاتالاز می‌گردد. به طور کلی در پروتئین‌ها باند آمید مشاهده شده آمیخته‌ای از ساختارهای هلیکس آلفا، صفحات بتا (β -sheet)، کوئل تصادفی و پیچش‌ها است. تغییر در شدت جذب در عدد موج آمید I (1637 cm^{-1}) در حضور غلظت‌های مختلف نیترات سرب بیانگر تغییر در ساختار دوم آنزیم است. در مقالات وجود پیک تیز در این عدد موج به وجود ساختارهای کاتالاز مربوط دانسته شده است (Çetinus et al. 2009). آنزیم کاتالاز گاوی شامل ساختار دوم صفحات بتا است. از آنجا که محدوده عدد موج $1645-1620 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ساختارهای دوم صفحات بتا است، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که نیترات سرب موجب تغییر در صفحات بتا آنزیم شده است (Khataee et al. 2020). پیک‌های قابل مشاهده در عدد موج کمتر از 900 cm^{-1} به عوامل مختلفی چون ارتعاش خمشی گروه‌های C-N، ارتعاش خمشی حلقه‌های آروماتیک و ارتعاش کششی اکسید فلزات سنگین مانند Pb-O مربوط است. بنابراین این پیک‌ها نشانگر اتصال سرب به آنزیم است (Prasad et al. 2017).

Kasperczyk و همکاران (Kasperczyk et al. 2004) به بررسی فعالیت دو آنزیم سوپراکسید دسموتاز و کاتالاز در پلاسما خون و اریتروست ۱۷۲ نفر از کارگران صنعت سرب و مس پرداختند. این افراد به دو گروه تقسیم شدند. دسته ی اول با غلظت متوسط سرب $35 \mu\text{l/dl}$ و دسته ی دوم با غلظت بیش از $35 \mu\text{l/dl}$ مواجه شدند. نتایج نشان داد که هیچ تغییر معنی داری در فعالیت آنزیم کاتالاز در پلاسما خون و اریتروست رخ نداده است اما فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز بصورت معنی دار افزایش یافته است. Sardar و همکاران (Sardar et al. 2007) نشان دادند آنزیم کاتالاز در میکروب‌های خاکزی با افزایش غلظت فلزات سنگین از جمله سرب مهار می‌شود. نتایج این تحقیق نشان داد که کمترین فعالیت آنزیم کاتالاز در میکروب‌های خاکزی زمانی مشاهده می‌شود که این آنزیم در مواجهه با ترکیبی از کادمیوم و سرب قرار گیرد. Hu و همکاران (Hu et al. 2007) اثر سرب را بر ساختار آنزیم کاتالاز را در گیاه Potamogeton

منابع

- Ahamed, M., and Siddiqui, M. 2007. Low Level Lead Exposure and Oxidative Stress: Current Opinions, Clinica chimica acta, Vol. 383, P. 57-64.
- Amani, N., Reza Saberi, M., and Khan Chamani, J. 2011. Investigation by Fluorescence Spectroscopy, Resonance Rayleigh Scattering and Zeta Potential Approaches of the Separate and Simultaneous Binding Effect of Paclitaxel and Estradiol with Human Serum Albumin, Protein and peptide letters, Vol. 18, P. 935-951.
- Çetinus, Ş. A., Şahin, E., and Saraydin, D. 2009. Preparation of Cu (Ii) Adsorbed Chitosan Beads for Catalase Immobilization, Food Chemistry, Vol. 114, P. 962-969.
- Eleroğlu, H., Yalçın, H., and Yıldırım, A. 2011. Dietary Effects of Ca-Zeolite Supplementation on Some Blood and Tibial Bone Characteristics of Broilers, South African Journal of Animal Science, Vol. 41, P. 319-330.
- Hekmat, A., Bromand Gohar, R., and Larijani, K. 2019. Interaction of Saponins Extracted from Tribulus Terrestris with Human Serum Albumin, Journal of Herbal Drugs, Vol. 10, P. 37-46.
- Hekmat, A., Hajebrahimi, Z., and Motamedzade, A. 2017. Structural Changes of Human Serum Albumin (Hsa) in Simulated Microgravity, Protein and peptide letters, Vol. 24, P. 1030-1039.
- Hekmat, A., Saboury, A. A., and Divsalar, A. 2012. The Effects of Silver Nanoparticles and

- Doxorubicin Combination on DNA Structure and Its Antiproliferative Effect against T47d and Mcf7 Cell Lines, *Journal of biomedical nanotechnology*, Vol. 8, P. 968-982.
- Hekmat, A., Salavati, F., and Tackallou, S. H. 2020. The Effects of Paclitaxel in the Combination of Diamond Nanoparticles on the Structure of Human Serum Albumin (HSA) and Their Antiproliferative Role on Mda-Mb-231cells, *The Protein Journal*, Vol. 39, P. 268-283.
 - Hu, J., Shi, G., Xu, Q., Wang, X., Yuan, Q., and Du, K. 2007. Effects of Pb²⁺ on the Active Oxygen-Scavenging Enzyme Activities and Ultrastructure in *Potamogeton Crispus* Leaves, *Russian Journal of Plant Physiology*, Vol. 54, P. 414-419.
 - Huang, S., Qiu, H., Lu, S., Zhu, F., and Xiao, Q. 2015. Study on the Molecular Interaction of Graphene Quantum Dots with Human Serum Albumin: Combined Spectroscopic and Electrochemical Approaches, *J Hazard Mater*, Vol. 285, P. 18-26.
 - Kasperczyk, S., Birkner, E., Kasperczyk, A., and Zalejska-Fiolka, J. 2004. Activity of Superoxide Dismutase and Catalase in People Protractedly Exposed to Lead Compounds, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, Vol. 11, P. 291-296.
 - Keyhani, J., Keyhani, E., Zarchipour, S., Tayefi-Nasrabadi, H., and Einollahi, N. 2005. Stepwise Binding of Nickel to Horseradish Peroxidase and Inhibition of the Enzymatic Activity, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, Vol. 1722, P. 312-323.
 - Khataee, S., Dehghan, G., Rashtbari, S., Dastmalchi, S., and Iranshahi, M. 2020. Noncompetitive Inhibition of Bovine Liver Catalase by Lawsone: Kinetics, Binding Mechanism and in Silico Modeling Approaches, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. Vol.19, P. 383-397.
 - Koohshekan, B., Divsalar, A., Saeidifar, M., and Saboury, A. A. 2014. Side Effects of Aspirin on the Structure and Function of Liver Catalase, *Koomesh*, Vol. 16:1, P. 97-102.
 - Li, D., Ji, B., and Jin, J. 2008. Spectrophotometric Studies on the Binding of Vitamin C to Lysozyme and Bovine Liver Catalase, *Journal of luminescence*, Vol. 128, P. 1399-1406.
 - Moradi, M., Divsalar, A., Saboury, A., Ghalandari, B., and Harifi, A. 2015. Inhibitory Effects of Deferasirox on the Structure and Function of Bovine Liver Catalase: A Spectroscopic and Theoretical Study, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, Vol.33, pp. 2255-2266.
 - Nirogi, R., Ajjala, D. R., Kandikere, V., Aleti, R., Srikakolapu, S., and Vurimindi, H. 2012. Dried Blood Spot Analysis of an Iron Chelator-Deferasirox and Its Potential Application to Therapeutic Drug Monitoring, *Journal of Chromatography B*, Vol. 907, P. 65-73.
 - Pashah, Z., Hekmat, A., and Hesami Tackallou, S. 2019. Structural Effects of Diamond Nanoparticles and Paclitaxel Combination on Calf Thymus DNA, Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Vol. 38, P. 249-278.
 - Prasad, K. H., Vinoth, S., Jena, P., Venkateswarlu, M., and Satyanarayana, N. 2017. Structural Characterization and Impedance Studies of Pbo Nanofibers Synthesized by Electrospinning Technique, *Materials Chemistry and Physics*, Vol. 194, P. 188-197.
 - Qin, L., Ji, C., He, L., Li, X., Kang, S., and Mu, J. 2014. Interactions between Quantum Dots and Dopamine Coupled Via a Peptide Bridge, *RSC advances*, Vol. 4, P. 2143-2150.
 - Sardar, K., Qing, C., Hesham, A. E.-L., Yue, X., and He, J.-z. 2007. Soil Enzymatic Activities and Microbial Community Structure with Different Application Rates of Cd and Pb, *Journal of Environmental Sciences*, Vol. 19, P. 834-840.
 - Sharma, S., Sharma, V., and Paliwal, R. 2011. Lead Toxicity, Oxidative Damage and Health Implications. A Review, *International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research*, Vol. 2, P. 215-221.
 - Sun, H., Yang, B., Cui, E., and Liu, R. 2014. Spectroscopic Investigations on the Effect of N-Acetyl-L-Cysteine-Capped Cdte Quantum Dots on Catalase, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Vol. 132, P. 692-699.
 - Tayefi-Nasrabadi, H., Keyhani, E., and Keyhani, J. 2006. Conformational Changes and Activity Alterations Induced by Nickel Ion in Horseradish Peroxidase, *Biochimie*, Vol. 88, P. 1183-1197.
 - Yang, X.-X., Hu, Z.-P., Chan, S. Y., and Zhou, S.-F. 2006. "Monitoring Drug-Protein Interaction," *Clinica Chimica Acta*, Vol. 365, P. 9-29.
 - Yekta, R., Dehghan, G., Rashtbari, S., Sheibani, N., and Moosavi-Movahedi, A. A. 2017. Activation of Catalase by Pioglitazone: Multiple Spectroscopic Methods Combined with Molecular Docking Studies, *Journal of Molecular Recognition*, Vol. 30, P. e2648.