مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال دهم، شماره دوم، پیاپی سی و هشتم، پاییز ۱۴۰۰ (۳۸-۳۱)

مقاله پژوهشی:

بررسی اثر مایع یونی غیر ایمیدازولی تری‌اتیل‌آمونیوم مالئات بر آنزیم اوریکاز

شهرزاد فولادی[1*]، رضا حاجی حسینی[2]، مسعود ترکزاده ماهانی[3]، هوشنگ حمیدیان[4]
۱. دکتری، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۲. استاد، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۳. دانشیار، گروه بیو تکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران
٤. دانشیار، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۵- تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/۷/۲۵)

چکیده
اوریکاز آنزیمی تترامر و کروی از گروه اکسیدوردوکتازها و فاقد کوفاکتوراست. تاکنون تحقیقات زیادی در مورد این آنزیم به‌دلیل کاربردهای آن در علم پزشکی به‌عنوان یک عامل درمانی و تشخیصی انجام شده است. اوریکاز تخریب اسید اوریک و تولید آلانتوئین را کاتالیز می‌کند. قسمتی از کیت تشخیصی که برای سنجش غلظت اسید اوریک در خون استفاده می‌شود، اوریکاز است. در این تحقیق، تأثیر مایع یونی غیر ایمیدازولی تری‌اتیل‌آمونیوم مالئات بر عملکرد آنزیم اوریکاز بررسی شد. مایعات یونی نمک‌هایی با خواص مهمی مانند پایداری حرارتی زیاد، قدرت حلالیت زیاد و قطبیت زیاد هستند. برخی ازمایعات یونی به‌عنوان تثبیت‌کننده برای ذخیره طولانی مدت پروتئین‌ها استفاده می‌شوند و ماندگاری پروتئین‌هایی مانند پروتئین‌های درمانی یا صنعتی را افزایش می‌دهند. در این مطالعه، آنزیم را با غلظت‌های مختلف مایع یونی تری‌اتیل‌آمونیوم مالئات تیمار کردیم. درصد حجمی این مایع یونی ۱٪، ۲٪، ۵٪، ۱۰٪ و ۱۵٪ می‌باشد. نتایج نشان می دهد که تری‌اتیل‌آمونیوم مالئات تأثیر وابسته به غلظت بر فعالیت آنزیم اوریکاز دارد. استفاده از مایع یونی تری‌اتیل‌آمونیوم مالئات با غلظت ۵ درصد باعث افزایش فعالیت کاتالیزوری آنزیم در مقایسه با آنزیم تیمارنشده می‌شود. همچنین دما و pH بهینه برای فعالیت آنزیم به‌واسطه تیمار با مایع یونی مذکور تغییر می‌کند. بروز تغییرات در میانکنش‌های داخل ساختاری آنزیم از جمله تغییر در پیوندهای هیدروژنی، الکترواستاتیک و فعل و انفعالات واندروالس و در نتیجه تغییرات ساختاری آنزیم باعث افزایش فعالیت اوریکاز و بهبود کارایی کاتالیزوری و همچنین تغییر دما و pH بهینه آنزیم می‌شود. درضمن با توجه به نتایج، اوریکاز تیمارشده در pHهای قلیایی فعالیت بیشتری نسبت به اوریکازآزاد دارد و در برابر pHهای قلیایی مقاومت نشان می‌دهد و هیچ‌گونه کاهش فعالیت که ناشی از به‌هم‌ریختگی ساختار آنزیم و دناتوراسیون است نشان نمی دهد. این نتیجه برای استفاده از تری‌اتیل‌آمونیوم مالئات درزمینه هایی که باید یوریکاز در pH های قلیایی استفاده شود کاربردی است.

واژه‌های کلیدی: اوریکاز، تأثیر، مایع یونی.

Evaluation of the Effect of Non-Imidazolium Based Ionic Liquid Triethylammonium Maleate on Uricase Enzyme

Shahrzad Fouladi[1*], Reza Hajihosseini[2], Masoud Torkzadeh-Mahani[3], Hooshang Hamidian[4]
1. Ph.D., Department of Biochemistry, Faculty of Science, Payam Noor University, Tehran, Iran
2. Professor , Department of Biochemistry, Faculty of Science, Payam Noor University, Tehran, Iran
3. Associate Professor, Department of Biotechnology, Institute of Science, High Technology and Environmental Sciences,Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran
4. Associate Professor, Department of chemistry, Faculty of Science, Payam Noor University, Tehran, Iran

(Received: Mar. 5, 2021 - Accepted: Oct. 17, 2021)

Abstract
Urate oxidase or uricase (UOX) (EC 1.7.3.3) is an globular tetramer oxidoreductase enzyme which lacks cofactor. Much research on this enzyme has been done so far due to its biomedical applications as a therapeutic and diagnostic agent. Urate oxidase catalyzes uric acid degradation and produces allantoin. An imbalance in the excretion of uric acid causes the hyperuricemia. Part of a clinically important diagnostic kit used to measure the concentration of uric acid in the blood is the enzyme uricase. In this research, efforts are made to investigate the effect of triethylammonium maleate (TEAM) ionic liquid on the function of urate oxidase (UOX). Ionic liquids are salts with important properties like high thermal stability, high solvating capacity and high polarity. These salts have been considered in biochemical and biomedical fields. They can also be utilized as a stabilizer for long-term protein storage and they can extend the shelf life of some proteins such as therapeutic or industrial proteins. In this study, we treated the enzyme in different concentrations of triethylammonium maleate ionic liquid. The volume percentages of TEAM in the solvent phase are 1%, 2%, 5%, 10% and 15%. The results indicate that TEAM has a concentration-dependent effect on the activity of UOX enzyme. The use of 5% TEAM ionic liquid increased the enzymatic activity in comparison to untreated enzyme. We concluded that this ionic liquid was able to alter the structure of the uricase in a way that increased the activity and improve its catalytic efficiency of uricase.

Keywords: Effect, Ionic liquid, uricase.

*نویسنده مسئول: شهرزاد فولادی Email: shahrzadfld@gmail.com

مقدمه

آنزیم یوریکاز تترامری کروی با جرم مولکولی تقریبی ۱۳۰ کیلو دالتون است، جرم مونومرهای این آنزیم تترامر تقریباً ۳۲ کیلودالتون است. این آنزیم از آنزیم‌های گروه آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز محسوب می‌شود (Colloc'h *et al*., 1997; Liu & Guo, 2001; Middleton *et al*., 2002; Caves *et al*., 2013; Imani & Shahmohamadnejad, 2017; Shikha *et al*., 2017). تاکنون تحقیقات بی‌شماری در مورد این آنزیم به دلیل کاربردهایی که به‌عنوان یک عامل درمانی و تشخیصی در پزشکی دارد، انجام گرفته است. آنزیم یوریکاز باعث کاتالیز تخریب‌شدن اسید اوریک و تولید آلانتوئین می‌شود. این آنزیم بیش از ۳۰ سال سابقه استفاده درمانی در علم پزشکی را دارد (Schumacher and Chen, 2006; Sherman, Saifer *et al*., 2008; Moore, Gunn *et al*., 2014). کاهش دفع اسید اوریک باعث ایجاد بلورهای مونوسدیم اورات می‌شود (Imani & Shahmohamadnejad, 2017). آنزیم یوریکاز حاصل از *Aspergillus flavus* به‌طور عمده برای درمان هایپراوریسمی استفاده می‌گردد (Pui *et al*., 2001; Pui *et al*., 2001; Pession *et al*., 2008; Alakel *et al*., 2017). بخشی از کیت تشخیصی برای اندازه‌گیری غلظت اسید اوریک در خون آنزیم یوریکاز است (Liao *et al*., 2006; Lohrasbi-Nejad *et al*., 2016; Li *et al*., 2017). تحقیقات زیادی با هدف ثابت نگه‌داشتن آنزیم یوریکاز با هدف ایجاد حس‌گر زیستی انجام شده است (Huang *et al*., 2004; Zhao *et al*., 2009; 2010; Bayramoğlu *et al*., Chen *et al*., 2011). در این مطالعه، اثر مایع یونی تری‌اتیل‌آمونیوم مالئات بر آنزیم یوریکاز بررسی شد. این دسته از نمک‌ها در دمای اتاق به شکل مایع هستند (Jaeger & Pfaendtner, 2016). مایعات یونی در زمینه‌های بیوشیمی و پزشکی نیز قابل توجه هستند، خواص آنها باعث شده است که آنها به‌عنوان یک کلاس از حلال‌های سبز در نظر گرفته شوند. علاوه بر این، آنها حلال‌های غیرآبی هستند که می‌توانند به‌عنوان یک تثبیت‌کننده برای ذخیره طولانی مدت بعضی از پروتئین‌ها مورد استفاده قرار گیرند (van Rantwijk *et al*., 2006; Kumari *et al*., 2014). این دسته از مواد ماندگاری پروتئین‌های مهمی مانند پروتئین‌های درمانی یا صنعتی را افزایش می‌دهند. محققان اخیراً علاقمند به یافتن مایعات یونی هستند که باعث افزایش پایداری، حلالیت و فعالیت آنزیم‌ها می‌شوند (van Rantwijk *et al*., 2006). تاکنون، بر روی بسیاری از مایعات یونی با این اهداف کار شده است، برخی از آنها با متوقف‌کردن تجمع ساختارهای آنزیمی، پایداری برخی از آنزیم‌ها را افزایش می‌دهند، اما برخی از مایعات یونی باعث دناتوراسیون ساختار برخی از آنزیم‌ها می‌شوند. بنابراین، مطالعه تعامل بین آنزیم و مایعات یونی برای مشخص شدن تأثیرات مایعات یونی بر ساختار آنزیم بسیار مهم است. با اتصال مولکول‌های مایع یونی به ساختار آنزیم، نیروهای بین مولکولی دستخوش تغییراتی می‌شوند که باعث پایداری و یا ناپایداری آنزیم می‌شوند (Kumari *et al*., 2014). گزارش شده است که مایعات یونی مختلف برهمکنش‌های متفاوتی بر پروتئین‌های مختلف دارند که نتیجه این برهمکنش‌ها ایجاد تغییراتی درساختار پروتئین‌هایی مانند آنزیم‌ها می‌شود (Bihari *et al*., 2010; Constatinescu *et al*., 2010; Vasantha *et al*., 2012). مکانیسم دقیق واکنش بین مولکول‌های مایعات یونی و آنزیم‌های مختلف هنوز مشخص نیست زیرا تأثیر قطبیت، غلظت، آبگریزی و طبیعت یونی مایعات یونی بر پایداری و فعالیت آنزیم‌های مختلف، متفاوت است (Arrhenius, 1889; Galani & Apenten, 1997; Marin *et al*., 2003; Lou & Zong, 2006; Zaboli & Raissi, 2017; Hashemzadeh & Raissi, 2018). بنابراین، برای

بررسی تأثیر مایعات یونی متفاوت بر پایداری و فعالیت آنزیمی خاص، باید مطالعات اختصاصی روی آنزیم مورد نظرمان انجام شود.

مواد و روش‌ها

اسید اوریک و اسید بوریک با گرید آنالیتیکال از شرکت سیگما–الدریچ (Sigma-Aldrich) تهیه شد. تری‌اتانول‌آمین، اسیدمالئیک، گلیسین، پتاسیم‌دی هیدروژن فسفات، تریس هیدروکلراید، استات سدیم و سایر مواد شیمیایی دارای گرید آنالیتیکال از شرکت مرک (Merck) تهیه شدند.

سنتز مایع یونی تری‌اتیل‌آمونیوم مالئات

سنتز تری‌اتیل‌آمونیوم مالئات (TEAM) به شرح زیر انجام شد: ۱۰ گرم (۰/۰۶۷ مول) تری‌اتانول‌آمین (TEA) و ۷/۷۷۷ گرم (۰/۰۶۷ مول) اسید مالئک توزین شد. یک گرم از اسید مالئک وزن شده به ارلن مایر حاوی تری‌اتانول‌آمین توزین شده اضافه شد. ارلن را بر روی یک هیتربا قابلیت کنترل دما و مجهز به همزن در دمای ۸۰ درجه قرار داده و محتویات آن با دور ۱۵۰۰ rpm بر روی هیتر با همزن مغناطیسی هم زده شد. پس از مشاهده تغییر رنگ، ۱ گرم اسید (از کل مقدار لازم برای سنتز یعنی ۷/۷۷۷ گرم) به داخل فلاسک اضافه شد. کل مقدار اسید (۷/۷۷۷ گرم، ۰/۰۶۷ میلی‌مول) در مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق به ارلن مایر اضافه شد. پس از اتمام واکنش، از TLC برای اثبات خلوص محصول (تری‌اتیل‌آمونیوم مالئات) استفاده شد. با توجه به نتیجه کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) ماده خالص بود. این ماده یک مایع بسیار غلیظ و چسبناک زرد رنگ بود. نتایج طیف FTIR نیز خلوص محصول را تأیید کرد.

سنجش فعالیت یوریکاز تیمارنشده ویوریکاز تیمارشده با تری‌اتیل‌آمونیوم مالئات

فعالیت آنزیم یوریکازدر تبدیل اسیداوریک به آلانتوئین، در pH بهینه و دمای بهینه فعالیت یوریکاز (pH برابر ۹ و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد) با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (طول موج ۲۹۳ نانومتر). فعالیت آنزیم با مخلوط‌کردن یوریکاز (۱۰ میکرولیتر) در بافر اسید بوریک (۷۱۰ میکرولیتر با pH برابر ۹) و محلول اسید اوریک (۷ میکرولیتر، با pH برابر ۹) مورد سنجش قرار گرفت. یک واحد یوریکاز در هر دقیقه یک میکرومول اسید اوریک را به آلانتوئین در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و pH برابر ۹ اکسید می‌کند. در این تحقیق، یوریکاز با غلظت‌های مختلف مایع یونی تری‌اتیل‌آمونیوم مالئات (۱٪، ۲٪، ۵٪، ۱۰٪ و ۱۵٪) تیمار شد. فعالیت آنزیم تیمارشده در زمان‌های مختلف (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه) اندازه‌گیری شد. غلظت بهینه مایع یونی دراین مرحله تعیین شد.

فعالیت یوریکاز با معادله زیر اندازه‌گیری شد:

$$\text{Enzyme (units/ml)} = \frac{(\Delta A293nm/minTest - \Delta A293nm/minBlank)\ (df)}{(12.3)\ V}$$

df و V به ترتیب فاکتور رقت انزیم و حجم انزیم (میلی‌لیتر) هستند و ۱۲/۳ضریب جذب مولی یا ضریب خاموشی اسید اوریک درطول موج ۲۹۳ نانومتر است.

تعیین دمای بهینه برای فعالیت انزیم

فعالیت یوریکاز آزاد (تیمارنشده) ویوریکازتیمارشده با غلظت بهینه مایع یونی در دماهای مختلف اندازه‌گیری شد. در این آزمایش، محلول سوبسترا که متشکل از بافر اسید بوریک و اسید اوریک است، به مدت ۵ دقیقه درون سل در دماهای مختلف با استفاده از دستگاه Single cell peltier accessory انکوبه شد، پس از سپری‌دن این زمان و انجام گرفتن انکوباسیون در دمای مورد نظر، ۱۰ میکرولیتر آنزیم یوریکازبه محتویات سل اضافه شد و کاهش جذب که نشانه فعالیت انزیم است، در طول موج ۲۹۳ نانومتر اندازه‌گیری شد.

تعیین pH بهینه برای فعالیت انزیم

برای اندازه‌گیری pH بهینه، ابتدا بافر میکس (متشکل

از تریس هیدروکلراید به غلظت ۵۰ میلی‌مولار، گلیسین به غلظت ۵۰ میلی‌مولار، پتاسیم دی هیدروژن فسفات به غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار، استات سدیم به غلظت ۵۰ میلی‌مولار) تهیه شد . در این تست میزان فعالیت آنزیم آزاد و آنزیم تیمارشده با غلظت بهینه از تری‌اتیل‌آمونیوم مالئات در pHهای متفاوت در طول موج ۲۹۳ اندازه‌گیری شد، با این تفاوت که زمان صفرکردن اسپکتروفتومتر به جای بافر اسید بوریک از بافر میکس با pHهای مختلف استفاده شد.

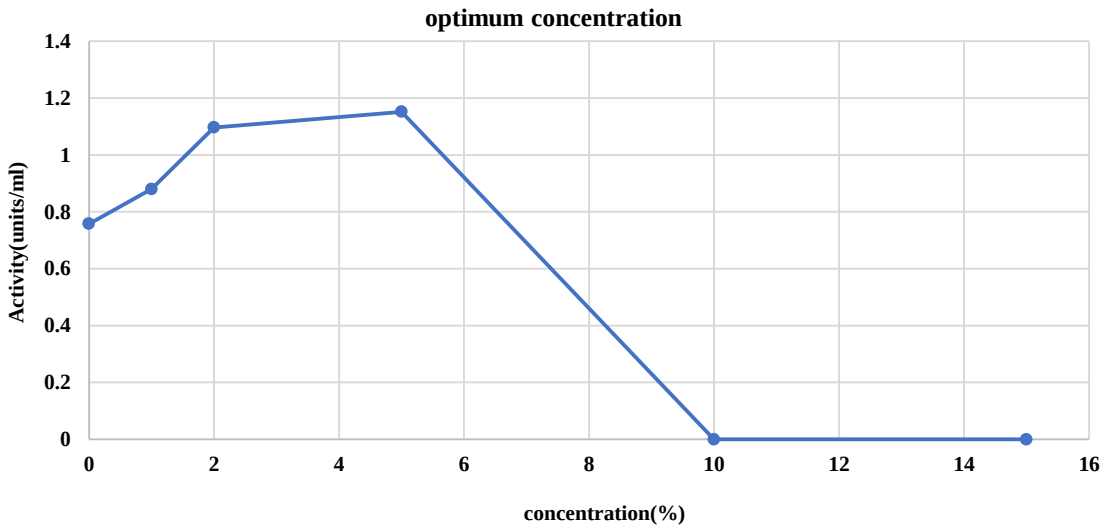
نتایج

غلظت بهینه تری‌اتیل‌آمونیوم مالئات

فعالیت آنزیم یوریکازدر تبدیل اسید اوریک به آلانتوئین، درpH بهینه و دمای بهینه فعالیت آنزیم (pH برابر ۹ و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد) در زمان‌های مختلف (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه) با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۹۳ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس فعالیت آنزیم تیمارشده با غلظت‌های مختلف تری‌اتیل‌آمونیوم مالئات (۱٪، ۲٪، ۵٪، ۱۰٪ و ۱۵٪) در زمان‌های مختلف (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه) اندازه‌گیری شد. در این مرحله غلظت بهینه مایع یونی درافزایش فعالیت کاتالیتیکی آنزیم ۵٪ تعیین شد. با توجه به نتایج، مایع یونی تری‌اتیل‌آمونیوم مالئات تأثیر وابسته به غلظت بر فعالیت یوریکاز دارد. افزودن تری‌اتیل‌آمونیوم مالئات با غلظت ۵٪ باعث بهبود کارایی کاتالیتیکی آنزیم می‌شود (شکل ۱). این افزایش فعالیت آنزیم می‌تواند به‌دلیل تغییرات ساختاری ایجادشده ناشی از افزودن مایع یونی به آنزیم باشد.

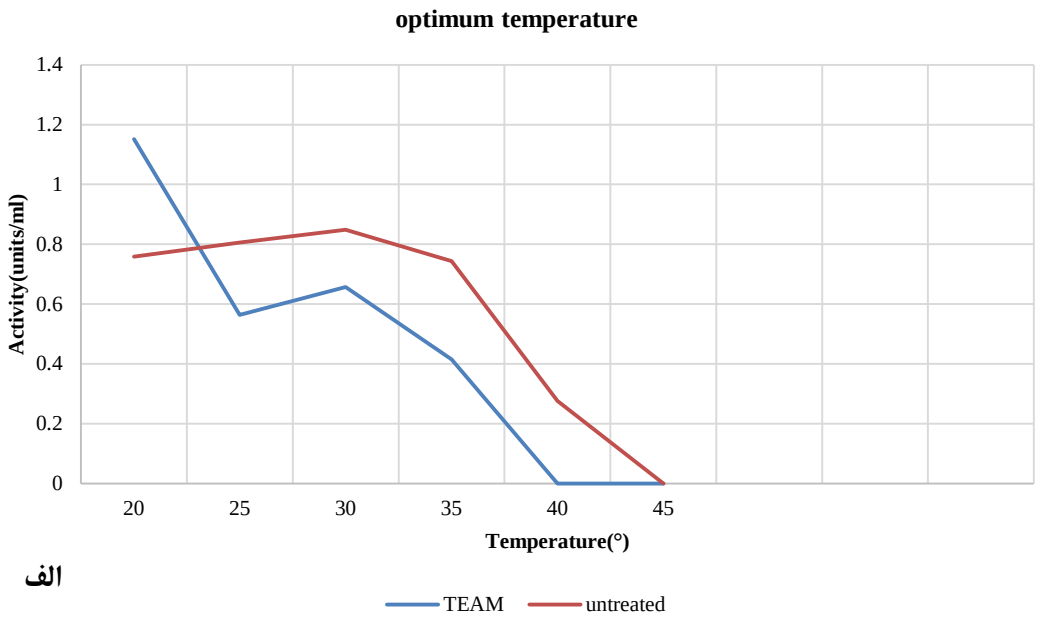
دما و pH بهینه برای فعالیت آنزیم تیمارشده با مایع یونی

فعالیت یوریکاز آزاد (تیمارنشده) ویوریکاز تیمارشده با غلظت بهینه تری‌اتیل‌آمونیوم مالئات (۵٪) در دماهای مختلف اندازه‌گیری شد. در این آزمایش، محلول سوبسترا به مدت ۵ دقیقه درون سل در دماهای مختلف با استفاده از دستگاه Single cell peltier accessory انکوبه شد، پس ازانجام گرفتن انکوباسیون در دمای مورد نظر، ۱۰ میکرولیتر آنزیم به محتویات سل اضافه شد و کاهش جذب که نشانه فعالیت آنزیم است، در طول موج ۲۹۳ نانومتر اندازه‌گیری شد. حداکثر فعالیت یوریکاز آزاد و یوریکاز تیمارشده با مایع یونی به‌ترتیب ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۲۰ درجه سانتی‌گراد تعیین شد (شکل ۲– الف).

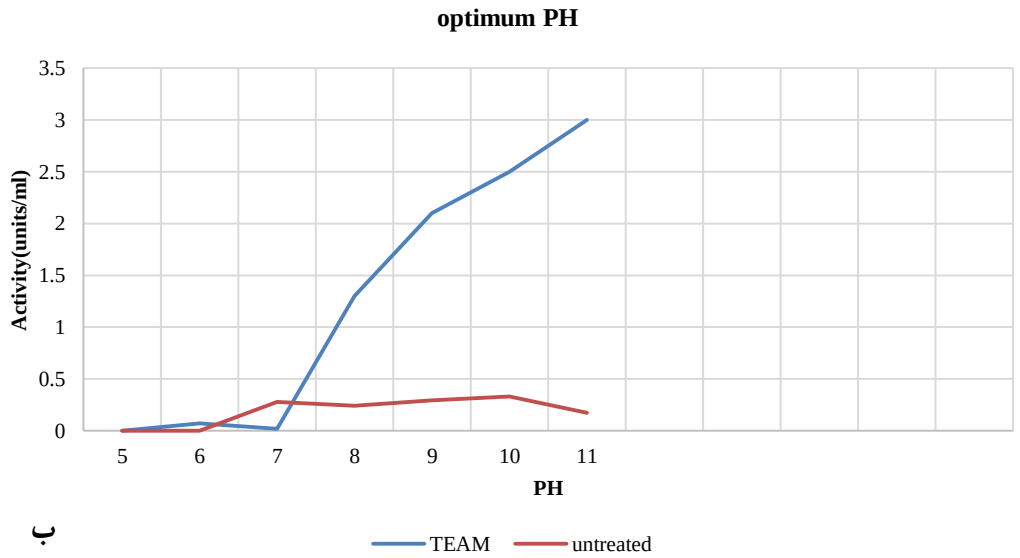


شکل ۱. اثر غلظت‌های مختلف مایع یونی تری‌اتیل‌آمونیوم مالئات بر فعالیت آنزیم یوریکاز

برای اندازه‌گیری pH بهینه برای فعالیت آنزیم، میزان فعالیت آنزیم آزاد و آنزیم تیمارشده با غلظت بهینه از تری‌اتیل‌آمونیوم مالئات در pHهای متفاوت در طول موج ۲۹۳ نانومتراندازه‌گیری شد، با این تفاوت که زمان صفرکردن اسپکتروفتومتر به جای بافر اسید بوریک از بافر میکس با pHهای مختلف استفاده شد. با توجه به نتایج، pH بهینه یوریکاز آزاد و یوریکاز تیمارشده با غلظت بهینه تری‌اتیل‌آمونیوم مالئات (۵٪) به ترتیب ۹ و ۱۱ تعیین شد (شکل ۲-ب). این نتایج نشان می‌دهد که افزودن تری‌اتیل‌آمونیوم مالئات بر دمای بهینه و pH بهینه برای فعالیت یوریکاز تأثیر دارد. این تأثیر در آنزیم تیمارشده می‌تواند به‌دلیل بروز تغییراتی درساختار یوریکاز ناشی از افزودن تری‌اتیل‌آمونیوم مالئات باشد.



الف



ب

شکل ۲. الف) اثر دماهای مختلف بر فعالیت یوریکاز آزاد و تیمارشده با تری‌اتیل‌آمونیوم مالئات با غلظت (۵٪)
ب) اثر pHهای مختلف بر فعالیت یوریکاز آزاد و تیمارشده با تری‌اتیل‌آمونیوم مالئات با غلظت (۵٪)

بحث و نتیجه‌گیری

اوریکاز آنزیمی تترامر، کروی و فاقد کوفاکتور است. تحقیقات زیادی در مورد این آنزیم به‌دلیل کاربردهایش در علم پزشکی به‌عنوان یک عامل درمانی و تشخیصی انجام شده است. اوریکاز تخریب اسید اوریک را کاتالیز می‌کند. در این تحقیق، تأثیر مایع یونی غیر ایمیدازولی تری‌اتیل‌آمونیوم مالئات بر عملکرد آنزیم اوریکاز بررسی شد. مایعات یونی نمک‌هایی با خواص مهمی مانند پایداری حرارتی زیاد، قدرت حلالیت زیاد و قطبیت زیاد هستند. برخی ازمایعات یونی برای ذخیره طولانی‌مدت پروتئین‌ها به‌عنوان تثبیت‌کننده کاربرد دارند .در این تحقیق، آنزیم اوریکاز با غلظت‌های مختلف مایع یونی تری‌اتیل‌آمونیوم مالئات تیمار شد. درصد حجمی این مایع یونی ۱٪، ۲٪، ۵٪، ۱۰٪ و ۱۵٪ بود. بر اساس نتایج تری‌اتیل‌آمونیوم مالئات تأثیر وابسته به غلظت بر فعالیت آنزیم اوریکاز دارد. استفاده از مایع یونی تری‌اتیل‌آمونیوم مالئات با غلظت ۵٪ باعث افزایش فعالیت کاتالیزوری آنزیم می‌شود و نقش جلوگیری‌کننده از دناتوراسیون و از هم‌پاشیدگی ساختمان آنزیم و در نتیجه نقش پایدارکننده ساختمان آنزیم را ایفا می‌کند در حدی که نه تنها فعالیت آنزیم را حفظ می‌کند بلکه باعث افزایش فعالیت آنزیم در مقایسه با فعالیت آنزیم تیمارنشده می‌شود. همچنین دما و pH بهینه برای فعالیت آنزیم به‌واسطه تیمار با مایع یونی مذکور تغییر می‌کند. بروز تغییرات در میان‌کنش‌های داخل ساختاری آنزیم از جمله تغییر در پیوندهای هیدروژنی، الکترواستاتیک و فعل و انفعالات واندروالس و در نتیجه تغییرات ساختاری آنزیم باعث افزایش فعالیت و پایداری اوریکاز و بهبود کارایی کاتالیزوری و همچنین تغییر دما و pH بهینه آنزیم شده است. در ضمن با توجه به نتایج، اوریکاز تیمارشده در pHهای قلیایی فعالیت کاتالیزوری بیشتری نسبت به اوریکاز آزاد دارد، بنابراین ساختمان آنزیم در برابرp های قلیایی دچار دناتوراسیون نمی‌شود و کاملاً مقاومت نشان می‌دهد و پایدار است و هیچ‌گونه کاهش فعالیت که ناشی از به‌هم‌ریختگی ساختار آنزیم و دناتوراسیون است بروز نمی‌کند. به‌عبارت دیگر تری‌اتیل‌آمونیوم مالئات در pHهای قلیایی که فعالیت آنزیم آزاد در حال کاهش است باعث افزایش چشم‌گیر فعالیت اوریکاز می‌شود. این نتیجه برای استفاده ازتری‌اتیل‌آمونیوم مالئات در زمینه‌هایی که باید اوریکازدر pHهای قلیایی استفاده شود کاربردی است.

REFERENCES

Alakel, N.; *et al*. (2017). Prevention and treatment of tumor lysis syndrome, and the efficacy and role of rasburicase. OncoTargets and therapy 10: 597.

Bayramoğlu, G.; *et al*. (2011). Reversible immobilization of uricase on conductive polyaniline brushes grafted on polyacrylonitrile film. Bioprocess and biosystems engineering; 34(2): 127-134.

Bihari, M.; *et al*. (2010). "Dissolution and dissolved state of cytochrome c in a neat, hydrophilic ionic liquid." Biomacromolecules; 11(11): 2944-2948.

Caves, M.S.; *et al*. (2013). Thermal inactivation of uricase (urate oxidase): mechanism and effects of additives. Biochemistry; 52(3): 497-507.

Chen, D.; *et al*. (2010). Low-Potential Detection of Endogenous and Physiological Uric Acid at Uricase-Thionine-Single-Walled Carbon Nanotube Modified Electrodes. Analytical chemistry; 82(6): 2448-2455.

Colloc'h, N.; *et al*. (1997). Crystal structure of the protein drug urate oxidase-inhibitor complex at 2.05 Å resolution. Nature structural biology; 4(11): 947-952.

Constatinescu, D.; *et al*. (2010). Patterns of protein unfolding and protein aggregation in ionic liquids. Physical Chemistry Chemical Physics; 12(8): 1756-1763.

Galani, D.; Apenten, R. K. O. (1997). The

comparative heat stability of bovine β-lactoglobulin in buffer and complex media. Journal of the Science of Food and Agriculture; 74(1): 89-98.

Hashemzadeh, H.; Raissi, H. (2018). Covalent organic framework as smart and high efficient carrier for anticancer drug delivery: a DFT calculations and molecular dynamics simulation study. Journal of Physics D: Applied Physics; 51(34): 345401.

Huang, S.-H.; *et al*. (2004). Detection of serum uric acid using the optical polymeric enzyme biochip system. Biosensors and Bioelectronics; 19(12): 1627-1633.

Imani, M.; Shahmohamadnejad, S. (2017). Recombinant production of Aspergillus Flavus uricase and investigation of its thermal stability in the presence of raffinose and lactose. 3Biotech;7(3): 1-9.

Jaeger, V.W.; Pfaendtner, J. (2016). Destabilization of human serum albumin by ionic liquids studied using enhanced molecular dynamics simulations. The Journal of Physical Chemistry B; 120(47): 12079-12087.

Kumari, M.; *et al*. (2014). Probing HSA-ionic liquid interactions by spectroscopic and molecular docking methods. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology; 138: 27-35.

Li, W.; *et al*. (2017). Directed evolution to improve the catalytic efficiency of urate oxidase from Bacillus subtilis. PloSone; 12(5): e0177877.

Liao, F.; *et al*. (2006). Evaluation of a kinetic uricase method for serum uric acid assay by predicting background absorbance of uricase reaction solution with an integrated method. Journal of Zhejiang University Science B; 7(6): 497-502.

Liu, L.; Guo, Q.-X. (2001). Isokinetic relationship, isoequilibrium relationship, and enthalpy-entropy compensation. Chemical Reviews; 101(3): 673-696.

Lohrasbi-Nejad, A.; *et al*. (2016). Hydrophobin-1 promotes thermostability of firefly luciferase. The FEBS Journal; 283(13): 2494-2507.

Lou, W.Y.; Zong, M.H. (2006). Efficient kinetic resolution of (R, S)-1-trimethylsilylethanol via lipase-mediated enantioselective acylation in ionic liquids. Chirality: The Pharmacological, Biological, and Chemical Consequences of Molecular Asymmetry; 18(10): 814-821.

Marin, E.; *et al*. (2003). Effect of heat treatment on bovine lactoperoxidase activity in skim milk: kinetic and thermodynamic analysis. Journal of Food Science; 68(1): 89-93.

Middleton, J.K.; *et al*. (2002). Thermostability of reovirus disassembly intermediates (ISVPs) correlates with genetic, biochemical, and thermodynamic properties of major surface protein μ1. Journal of virology; 76(3): 1051-1061.

Moore, J.B.; *et al*. (2014). The role of dietary sugars and de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. Nutrients; 6(12): 5679-5703.

Pession, A.; *et al*. (2008). Pitfalls, prevention, and treatment of hyperuricemia during tumor lysis syndrome in the era of rasburicase (recombinant urate oxidase). Biologics: targets & therapy; 2(1): 129.

Pui, C.-H.; *et al*. (2001). Recombinant urate oxidase for the prophylaxis or treatment of hyperuricemia in patients with leukemia or lymphoma. Journal of clinical oncology; 19(3): 697-704.

Pui, C.; *et al*. (2001). Recombinant urate oxidase (rasburicase) in the prevention and treatment of malignancy-associated hyperuricemia in pediatric and adult patients: results of a compassionate-use trial. Leukemia; 15(10): 1505-1509.

Schumacher, H.R.; Chen, L.X. (2006). Newer therapeutic approaches: gout. Rheumatic Disease Clinics; 32(1): 235-244.

Sherman, M.R.; *et al*. (2008). PEG-uricase in the management of treatment-

resistant gout and hyperuricemia. Advanced drug delivery reviews; 60(1): 59-68.

Shikha, S.; *et al*. (2017). Facile fabrication of lipase to amine functionalized gold nanoparticles to enhance stability and activity. RSC advances; 7(68): 42845-42855.

van Rantwijk, F.; *et al*. (2006). Structure and activity of Candida antarctica lipase B in ionic liquids. Green Chemistry; 8(3): 282-286.

Vasantha, T.; *et al*. (2012). Structural basis for the enhanced stability of protein model compounds and peptide backbone unit in ammonium ionic liquids. The Journal of Physical Chemistry B; 116(39): 11968-11978.

Zaboli, M.; Raissi, H. (2017). The influence of nicotine on pioglitazone encapsulation into carbon nanotube: the investigation of molecular dynamic and density functional theory. Journal of Biomolecular structure and dynamics; 35(3): 520-534.

Zhao, C.; *et al*. (2009). Highly sensitive and selective uric acid biosensor based on direct electron transfer of hemoglobin-encapsulated chitosan-modified glassy carbon electrode. Analytical Sciences; 25(8): 1013-1017.