مطالعه الکتروشیمیایی اتصال ماده فعال سطحی هگزا دسیل پیریدینیوم برماید (*HPB*) به آلبومین سرم انسانی

دکتر مصطفی رضایی طاویرانی[۱]*، دکتر سید محمد مهدوی[۲]، دکتر اسفندیار حیدریان[۱]، دکتر نادر علیزاده مطلق[۳]، دکتر محمد آقا محمدی[۳]، دکتر بیژن رنجبر[۳]، مهرناز مصطفوی[۲]، دکتر سید حسن مقدم‌نیا[۴]، رضا محمدی ارانی[۳]، دکتر مجید رضایی طاویرانی[۱]

۱) دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

۲) موسسه خدمات پژوهشی و صنعتی عصر نوین

۳) دانشکده علوم، دانشگاه تربیت مدرس

۴) دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۰/۲ **تاریخ پذیرش: : ۸۵/۱۲/۵**

چکیده

مقدمه: آلبومین سرم انسانی (*HSA*)، پروتئینی تک زنجیره است که نقش عمده‌ای در حفظ فشار اسمزی پلاسما ایفا می‌کند. سطح این پروتئین پوشیده از تعدادی بار الکتریکی منفی خنثی نشده می‌باشد و نقش مهمی در حمل اسیدهای چرب، بسیاری از کاتیون‌ها، داروها و هورمون‌ها در خون ایفا می کند. در این بررسی اتصال ماده فعال سطحی هگزادسیل پیریدینیوم به آلبومین سرم انسانی مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها : آلبومین سرم انسانی از شرکت سیگما تهیه و بقیه مواد با درجه خلوص بالا از شرکت مرک تهیه شده و با استفاده از بافر فسفات در *pH*=۷ از طریق طیف‌سنجی *CD* در ناحیه دور *UV* و نیز پتانسیومتری در دماهای ۳۷^oC و ۴۲ ^oC خواص ساختاری و عملکردی *HSA* مطالعه گردید.

یافته‌های پژوهش: طیف‌های *CD* ناحیه دور در دماهای ۳۷ ^oC و ۴۲ ^oC تهیه گردیدند که اختلاف قابل ملاحظه‌ای با هم دیگر دارند، نمودارهای ایزوترم پیوندی در دماهای ۳۷ ^oC و ۴۲ ^oC و نیز نمودارهای اسکادچارد در همین دماها ترسیم شدند.

نتیجه‌گیری نهایی : افزایش ۵ درجه سانتیگراد دما از ۳۷ ^oC به ۴۲ ^oC طیف *CD* مربوط به *HSA* را تغییر می‌دهد و یا به عبارتی ساختار دوم پروتئینی را دچار تغییر مـی‌نماید. بنابر همین یافته انجام آزمایش اتصال *HPB* در ۳۷ ^oC و ۴۲ ^oC انجام گردید که یافته‌ها نشان دادند که عملکرد *HSA* (تمایل به اتصال لیگاند) نیز در اثر تغییر دما ، تغییر کرده و تمایل *HSA* برای اتصال کاتیون‌ها کاهش یافته است. نمودارهای اسکادچارد ترسیم شده نیز این یافته‌ها را تأیید کرد . می‌توان چنین نتیجه گرفت که در دمای ۴۲ ^oC نسبت به دمای ۳۷ ^oC تمایل *HSA* به کاتیون‌ها کاهش می‌یابد و در نتیجه از تعداد ذرات موجود در خون کاسته می‌شود و سرانجام فشار اسمزی خون کاسته **می‌شود**. کاهش فشار اسمزی خون در ۴۲ ^oC سبب خروج آب خون از بدن و کاهش توأم دمای بدن می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آلبومین سرم انسانی، هگزادسیل پیریدینیوم برماید، دما

نویسنده مسئول: دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

E-mail: Tavirany@yahoo.com

مقدمه

سرم آلبومین انسان یک پروتئین تک رشته‌ای غیرگلیکوزیله با ۵۸۵ اسید آمینه می‌باشد که در کبد سنتز و ساختار نهایی به شکل قلب به خود میگیرد که محتوی ٦٧٪ ساختار α هلیکس و فاقد صفحات β می‌باشد (۲،۱). ۱۰٪ اسیدهای آمینه ساختمان آلبومین از لیزین تشکیل شده است (۳). آلبومین از سه دمین (*Domain*) مشابه(*I* تا *III*) تشکیل شده و هر دمین نیز دارای دو زیر دمین *A* و *B* می‌باشد، که حاوی اجزاء ساختمانی مشابه هستند (٥،٤). سرم آلبومین به یک خانواده چند ژنی تعلق دارد که شامل α*fetoprotein* و *Vitamin D-binding protein* می‌باشد و تاکنون بیش از ٦٠ ایزوفرم ساختمانی متفاوت آن شناسایی شده است (٧،٦). سرم آلبومین با غلظتی در حدود ۴۵*mg/ml* (۰/٦٧*mM*) بعنوان پروتئین اصلی سرم محسوب می‌شود و در سیستم گردش خون دارای نیمه عمری در حدود ۲۰ روز می‌باشد (۹،۸). اعمال اصلی آلبومین تنظیم فشار اسمزی خون، انتقال اسیدهای چرب، ترکیبات لیپوفیلیک، بیلی روبین و مس در نظر گرفته می‌شود (۱۱،۱۰). علاوه بر این آلبومین سرم به تغییر *pH* خون حساس می‌باشد و بعنوان یک بافر در تنظیم *pH* خون ایفای نقش می‌کند (۱۲). در آلبومین سرم انسانی برای پیوند شدن غیرکووالانسی مولکولهای کوچک و یونها حداقل شش ناحیه وجود دارد و آلبومین دارای توانایی تغییر ساختار در حضور و عدم حضور لیگاند می‌باشد و در اثرپیوند شدن لیگاند می‌تواند تغییر ساختار بدهد (۱۳). ضروری بودن آلبومین برای بقاء انسان و سایر پستانداران مورد سئوال است، چونکه افراد و موشهای فاقد آلبومین۱ طبیعی نیز مشاهده شده است که در آنها غلظت سایر پروتئین‌های سرم جهت حفظ فشار اسمزی و انتقال مولکولهای لیپوفیلیک افزایش یافته است (۸).

مواد و روش‌ها

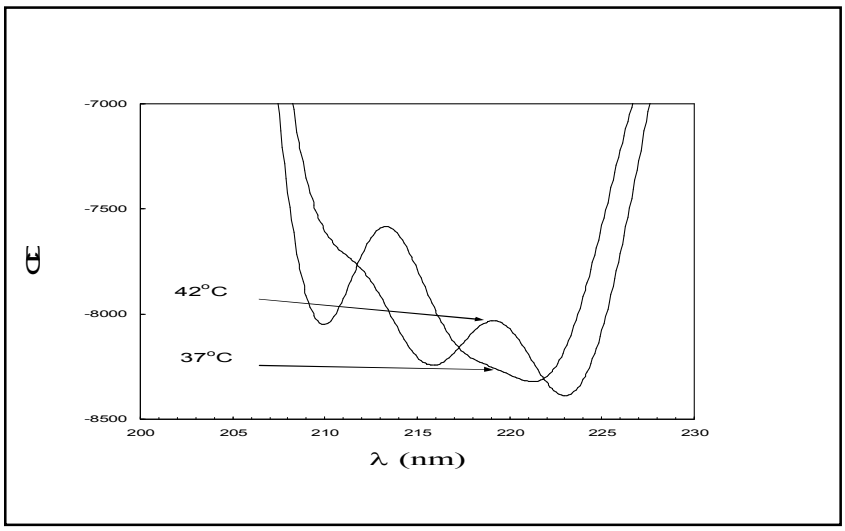
آلبومین سرم انسانی از شرکت سیگما ۲ خریداری گردید. کلیه نمک‌ها و معرف‌های شیمیایی با درجه خلوص بالا (آنالیتیکی) از شرکت مرک۳ تهیه شدند. از بافر فسفات*pH*=۷با۱۰*mM* در کلیه آزمایشات استفاده گردید. محلول *mg /ml* ۰/۲ از آلبومین تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. طیف‌های*CD*۳ با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر*CD* (مدل *Jasco*) در ناحیه *UV* دور در دماهای ^oC ۳۷ و ^oC ٤٢ رسم گردیدند.

ایزوترم‌های پیوندی*HPB*۵ به *HSA* در دماهای ^oC ۳۷ و ^oC ٤٢ با استفاده از روش پتانسیومتری و به کمک پتانسیومتر(مدل *Fluke – USA*) تعیین گردیدند. نمودارهای اسکادچارد با استفاده از رابطه اسکادچارد و با استفاده از یافته‌های پتانسیومتری در دماهای ^oC ۳۷ و ^oC ٤٢ترسیم شدند.

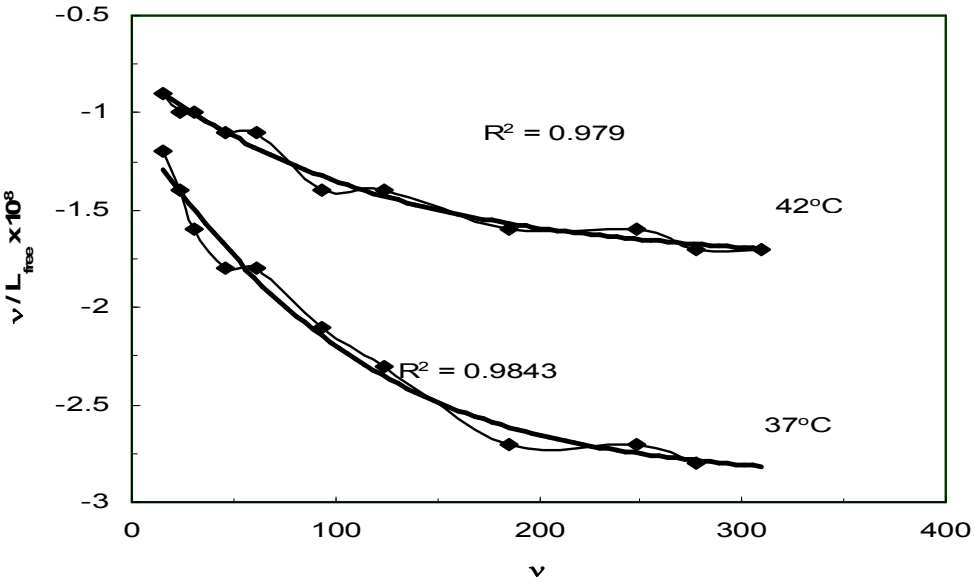
یافته‌های پژوهش

طیف‌های *CD* ناحیه دور *UV* آلبومین سرم انسانی در دماهای ^oC ۳۷ و ^oC ٤٢ در شکل شماره ۱ ترسیم شده‌اند. شکل‌های شماره ۲ و ۳ به ترتیب نمودارهای ایزوترم پیوندی و اسکادچارد را برای اتصال *HPB* به آلبومین سرم انسانی در دماهای^oC ۳۷ و ^oC ٤٢ نشان می‌دهند.۱

1. Analbuminemic
2. Sigma
3. Merck
4. Circular Dichorism
5. Hexadesyl Pridinium bromide

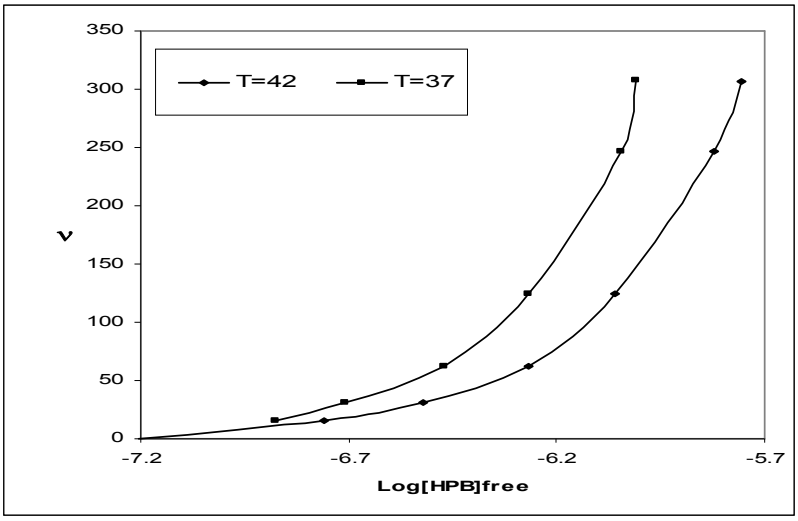


شکل شماره۱-طیف‌های ***CD*** ناحیه دور ***UV*** آلبومین سرم انسانی در دماهای ***°C*** ۳۷ و ***°C*** ۴۲(***λ*** ; طول موج).



شکل شماره ۲- نمودارهای ایزوترم پیوندی ***HPB*** به آلبومین سرم انسانی در دماهای***°C*** ۳۷ و ***°C*** ۴۲

(***ν*** ; تعداد مول لیگاند که به یک مول پروتئین متصل میشود، ***L free*** ; لیگاند آزاد)



شکل شماره۳- نمودارهای اسکادچارد اتصال *HPB* به آلبومین سرم انسانی در دماهای ^oC ۳۷ و ^oC ۴۲
(*v* ; تعداد مول لیگاند که به یک مول پروتئین متصل میشود)

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به شکل شماره ۱ طیف *CD* آلبومین در ^oC ۳۷ با طیف این پروتئین در^oC۴۲ یکسان نمی‌باشد. بررسی ساختار دوم پروتئین‌ها از طریق دستگاه *CD* در ناحیه *UV* دور یک روش متداول بیوفیزیکی می‌باشد (۱۴).

جابجا شدن طیف *CD* در ناحیه دور *UV* به سمت بالا نشان دهنده کاهش ساختارهای دوم پروتئین است (۱۵). بنابراین به نظر می‌رسد که افزایش دما از ^oC ۳۷ به^oC ۴۲ باعث کاهش ساختارهای دوم آلبومین سرم انسانی می‌شود، که این تغییرات ساختاری ممکن است خواص فیزیکی و شیمیایی پروتئین و نیز نتیجه عملکرد فیزیولوژیک آن را تحت تأثیر قرار دهد. به منظور بررسی اثر افزایش دما به میزان ^oC ۵ از ^oC ۳۷ به ^oC ۴۲ و به منظور پیامدهای تغییر ساختار دوم آلبومین سرم انسانی (آشکار شده از نتایج *CD*)،

اتصال ماده فعال *HPB* که یک ماده دوگانه دوست ماده فعال *HPB* که یک ماده دوگانه دوست کاتیونی است به عنوان لیگاند با آلبومین سرم انسانی در دو دمای ذکر شده مطالعه شد. این بررسی می‌تواند در خصوص تأثیرپذیری خواص فیزیکی و شیمیایی آلبومین از تغییرات ساختار اطلاعات مناسبی را در اختیار محققین قرار دهد. با توجه به شکل شماره ۲ ملاحظه می‌شود که ایزوترم پیوندی اتصال *HPB* به آلبومین سرم انسانی در دمای^oC ۴۲ در سمت راست نمودار بدست آمده در دمای^oC ۳۷ واقع شده است. به عبارتی دیگر، این مقایسه نشان می‌دهد که افزایش دمای اعمال شده خواص فیزیکی شیمیایی آلبومین را تحت تأثیر قرار داده است و بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تغییر دما از^oC ۳۷ به^oC ۴۲ علاوه بر القاء تغییرات ساختاری در آلبومین سبب تغییر خواص فیزیکی شیمیایی آن نیز می‌شود. جابجا شدن ایزوترم پیوندی در اثر افزایش دما به سمت راست نشاندهنده کاهش تمایل آلبومین سرم انسانی به لیگاند مورد استفاده (که یک ماده فعال کاتیونی می‌باشد) است. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که تعدادی بار الکتریکی منفی خنثی نشده در سطح آلبومین واقع شده‌اند که سبب منفی شدن سطح این پروتئین می‌شوند(۱۶).

کاهش تمایل آلبومین به کاتیون مورد استفاده می‌تواند ناشی از دو مورد باشد؛

۱- کاهش بارهای سطحی منفی پروتئین، که این امر می‌تواند به دو روش اتفاق بیفتد:

۱-۱- به علت تغییرات ساختاری، حجم و در نتیجه سطح آلبومین تغییر کند که در آن صورت چگالی بار سطحی آن تغییر می‌کند. با توجه به کاهش ساختارهای دوم پروتئین ممکن است حجم آلبومین افزایش یابد که در آن صورت سطح آن افزایش و در نتیجه چگالی بار منفی در سطح پروتئین کاهش می‌یابد و متعاقب آن از تمایل پروتئین برای کاتیون کاسته می‌شود.

۱-۲- متعاقب تغییرات ساختاری؛ الف- تعدادی بار مثبت به سطح بیایند و یا اینکه ب- از تعداد بارهای منفی در سطح کاسته شود، که در هر دو مورد الف و ب تمایل ماکرومولکول برای اتصال کاتیون به کار گرفته شده کاهش می‌یابد.

۲- افزایش دما بصورت ذاتی پیوند *HPB* و آلبومین را تضعیف کند. با توجه به تحقیقات انجام شده (۱۷) نشان داده شده است که افزایش دما از ^{o}C ۲۵ تا ^{o}C ۳۷ و نیز از ^{o}C ٤۰ تا ^{o}C ٦۰ تأثیر چندان زیادی بر ساختار آلبومین ندارد، گرچه در این بررسی‌ها افزایش دما ^{o}C ۱۲ تا ^{o}C ۱۵ بوده است. بنابراین احتمالاً فرض موجود در بند ۲ چندان قابل قبول نمی‌باشد.

نمودارهای اسکادچارد اتصال *HPB* به آلبومین در شکل ۳ اختلاف بارزی را نشان می‌دهند که خود تأییدی بر اختلاف در خواص فیزیکی شیمیایی آلبومین در دو دمای ^{o}C ۳۷ و ^{o}C ٤۲ می باشد.

نمودار اسکادچارد می‌تواند نشان‌دهنده خواص تعاونی اتصال لیگاند- ماکرومولکول و نیز انواع دسته جایگاههای اتصال باشد (۱۵). یافته‌های به کار رفته در ترسیم نمودارهای اسکادچارد در دو دمای موردنظر در معادله اسکادچارد قرار داده شد که نتایج به دست آمده به شرح ذیل می‌باشد.

ملاحظه می‌گردد که حل معادله اسکادچارد برای یک نوع دسته جایگاهی به طور مناسبی رفتار یافته‌های آزمایش را تأیید می کند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که افزایش دما از ^{o}C ۳۷ به ^{o}C ٤۲ نوع جایگاه‌های اتصال را تغییر نداده است، بلکه تعداد و یا تمایل جایگاه‌های موجود بر سطح پروتئین را تغییر داده است که این نتیجه‌گیری می‌تواند تأیید کننده موارد ۱-۱ و ۲-۱ موجود در بند ۱ باشد.

افزایش دما از ^{o}C ۳۷ تا ^{o}C ٤۲ گرچه از نظر مقدار ($5^{o}C$) در مقایسه با بررسی‌های دیگر (از ^{o}C ۲۵ تا ^{o}C ۳۷ و از ^{o}C ٤۵ تا ^{o}C ٦۰) قابل ملاحظه نیست اما تغییرات قابل ملاحظه‌ای هم در ساختار و هم در خواص فیزیکی شیمیایی آلبومین سرم انسانی ایجاد می‌کند. این تغییرات در جهت کاهش تمایل آلبومین سرم انسانی به کاتیون می‌تواند در حالت‌های پاتولوژیکی (تب) سبب کاهش فشار انکوتیک خون شود. زیرا کاتیون‌های اطراف آلبومین ۵۰٪ از فشار انکوتیک خون را تأمین می‌کند. لازم به ذکر است که کاهش فشار انکوتیک خون می‌تواند منجر به دفع آب بیشتر از بدن شود که این مکانیسم می‌تواند در کاهش دمای بدن در شرایط تب مؤثر باشد.

References:

1.Minchioti L,Kragh-Hansen U, Nielsen H, et al. Structural characterization, stability and fatty acid binding properties of two French genetic variant of human serum albumin; *Biochem Biophys Acta 1999, 1431: 223-31.*

2. Kragh- Hansen U, Donaldson Dandjenson PH. The glycan structure of albumin red hill, a glycosylated variant of human serum albumin. *Biochem Biophys Acta 2001, 1550: 20-6.*

3.Mcpherson JD, Shilton BH, Walton DJ. Role of fructose in glycation and cross linking of proteins. *Biochemistry 1988, 27: 1901-7.*

4.Curry S, Mandelkow H, Brick P, et al; Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals on asymmetric distribution of binding sites. *Nat Struct Biol 1998, 5: 827-35.*

5. Sugio S, Kashima A, Mochizuli S, et al. Crystal structure of human serum albumin at 2.50 resolution. *Protei Eng 1999, 12: 439-46.*

6. Foster JF. In the plasma protein 1st ed. 1960, PP. 179-239.

7. Minchiotti L, Campagnoli M, Rossi A, et al. A nucleotide insertion and frame shift cause albumin kenitra, an extended and O-glycosylated mutant of human serum albumin with two additional disulfide bridges. *Eur J Biochem 2001, 268: 344-52.*

8. Baker ME. Albumin's role in steroid hormone action and the origins of vertebrates: is albumin an essential protein. *FEBS Letters 1998, 439: 9-12.*

9. Waldmann TA. In albumin structure, function and uses (V.M. Rosenoer, M. Oratz and M.A. Rothschild, eds), *1977, PP: 255-273.*

10. Peters T. All about albumin. Biochemistry, Genetics and Medical Applications. *Academic Press, San Diego, CA, 1996, PP. 1- 166.*

11. Peters T. Serum albumin. Adu Protin Chem 1985, 37: 161-245.

12. Figge. J, Rossing TH, Fencl V. The role of serum proteins acid- base equilibria. *J Lab Clin Med 1991, 117: 453-67.*

13. Kragh- Hansen U. Molecular aspects of ligands binding to serum albumin . *Pharmacol Rev 1981, 33: 17-53.*

١٤. مقدم نیا سید حسن، رضایی طاویرانی مصطفی، رنجبر بیژن و همکاران. حد واسط جدید در ساختار آلبومین سرم انسانی در اثر ایجاد تب. فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی. ١٣٨٣، شماره ٣، صفحات ١١٨-١١٣.

١٥. رضایی طاویرانی مصطفی، یوسفی رضا، رنجبر بیژن و همکاران. بیوفیزیک. چاپ سوم، انتشارات سنجش تکمیلی. ١٣٨٥، فصل ششم.

١٦. مهدوی سید محمد، مصطفوی مهرناز، رضایی طاویرانی مصطفی و همکاران. تأثیر تب بر آلبومین سرم انسانی در تأمین فشار اسمزی خون ، مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام. ١٣٨٤، دوره سیزدهم، شماره سوم، صفحات ٣٥-٢٧.

17. Rezaei-Tavirani M, Moghaddamnia SH, Ranjbar B, et al.Conformational Study of Human Serum Albumin in Pre-denaturation Temperatures by Differential Scanning Calorimetry, Circular Dichroism and UV Spectroscopy. J Biochem Mol Biol 2006, 530-6.