مطالعه ساختار و پایداری آلبومین سرم انسانی در حضور DTAB

پادینا واثقی مغوان[1*]، نایبعلی احمدی[1]، مینو شاهانی[1]، ایاد بهادری منفرد[2]، منیره عزیزی[3]

۱) مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

۲) گروه بهداشت و پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

۳) گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ دریافت: ۹۲/۵/۱٤ تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۲۱

چکیده

مقدمه: آلبومین سرم انسانی با ساختار منحصر به فرد خود به عنوان یک مولکول حامل در پلاسما، می تواند به طیف وسیعی از مواد اتصال یابد و در نتیجه نقش های متنوعی را ایفا کند. هر گونه تغییر غیر طبیعی در ساختار و عملکرد آلبومین، می تواند عواقب ناخوشایندی در پی داشته باشد. در این تحقیق اتصال لیگاندهایی چون دترجنت‌ها(DTAB) و قندها(گلوکز) در دماهای ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی گراد بر روی آلبومین بررسی شد.

مواد و روش ها: بافر تریس آلبومین با pH نزدیک به pH بدن تهیه گردید و به منظور دناتوراسیون آن از اسیدکلریدریک استفاده شد. تکنیک مورد استفاده جهت مطالعات دناتوراسیون در این تحقیق طیف سنجی UV بود.

یافته های پژوهش: نتایج نشان داد که با افزایش غلظت DTAB، ماکزیمم جذب پروتئین، کاهش یافته، غلظت ۴۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر قند، سبب تغییرات قابل ملاحضه ای در جذب آلبومین سرم انسانی شده و احتمالاً ساختار و عملکرد مولکول تحت تاثیر قرار می گیرد.

بحث و نتیجه گیری: گلوکز علاوه بر تاثیرات زیانباری که دارد می تواند عملکرد بسیاری از مولکول ها را در خون تغییر دهد. به عنوان مثال، در سطوح هورمونی، انتقال داروها، عناصر و یون های حیاتی و مورد نیاز بدن، می تواند تاثیرات شگرف و مهمی داشته باشد.

واژه های کلیدی: آلبومین سرم انسانی، کاتیون DTAB، گلوکز، دناتوراسیون دمایی، طیف سنجی UV

* نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

Email: padinavm@gmail.com

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-16]

مقدمه

آلبومین سرم انسانی، یکی از مهم ترین اجـزاء پـروتئین های پلاسما می باشد، تک رشته ای و غیر گلیکوزیله بوده و دارای ۵۸۵ اسید آمینه اسـت. در کبـد سـنتز شـده و نهایتـاً ساختار قلبی شکل به خود می‌گیرد،(۱). غلظت این پـروتئین در خون در حدود 7×10^{-4} M می باشـد،(۲). ایـن پـروتئین حامل قند، هورمون ها، داروها، اسیدهای چـرب، اسـیدهای آمینه و تعدادی از کاتیون ها در سیستم گـردش خـون مـی باشد. هم چنین در جداسازی رادیکال هـای آزاد اکـسیژن و متابولیت های سمی مانند بیلـی روبـین نقـش دارد. تنظـیم فشار اسمزی خون یکی از عملکرد های اصلی آلبومین سرم انسانی می باشد،(۳). علاوه بر این آلبومین سرم انـسانی بـه تغییر pH خون حساس می باشد و به عنـوان یـک بـافر در تنظیم pH خون ایفای نقش می کند،(۴). از نظـر محتـوای ساختمانی دارای ۶۷ درصد ساختار α هلیکس بـوده و فاقـد صفحات β می باشد،(۵). این پروتئین از سـه دمـین مـشابه تشکیل شده است. حداقل ۶ ناحیه در آلبومین سـرم انـسانی برای پیوند شدن غیر کووالانسی مولکـول هـای کوچـک و یون ها وجود دارد. آلبومین دارای توانـایی تغییـر سـاختار در حضور و عدم حضور لیگاند می باشد. هر ناحیه از آلبومین در ضمن پیوند شدن لیگاندها می تواند تغییر سـاختار دهـد،(۶). گلوکز نیز یکی از موادی است که به وسـیله آلبـومین سـرم انسانی در خون حمل می شود. بر اسـاس معیـار تشخیـصی انجمن دیابت آمریکا قندخون ناشتای بالای ۱۱۰ میلی گرم بر دسی لیتر در دو بار متوالی دیابت تلقی می شود. در غیاب انسولین و یا در صورت مقاومت به انسولین غلظت قنـدخون افزایش می یابد و تمـامی عـوارض دیابـت بـه علـت تـأثیر قندخون بر روی عروق بافت های مختلـف اسـت،(۷). از آن جا که حامل قندخون آلبومین سرم انسانی می باشد اهمیـت مطالعه تاثیرات قندخون بر ساختار پروتئین در کنـار عوامـل دیگری چون تغییرات دمایی، و یا حضور لیگانـدهای دیگـر آشکار می شود.

مواد و روش ها

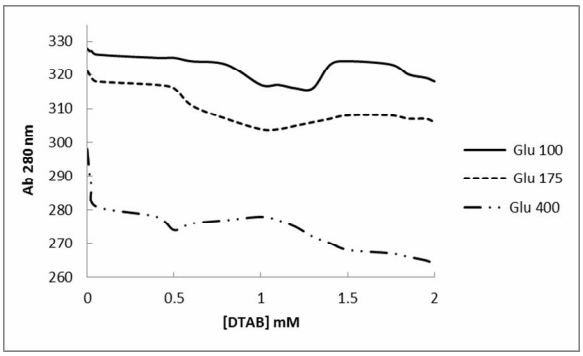
به منظور تهیه بافری با pH نزدیک به pH بدن، gr ۷۵/۳ پودر بافر تریس به cc ۴۰۰ آب مقطر اضافه گردید(pH10) سپس با اضافه کردن تدریجی HCl به محلول، pH تا ۵/۷ کاهش داده شد، و پس از آن cc ۱۰۰ آب مقطر به محلول اضافه گردید تا به این ترتیب حجم نهایی به cc۵۰۰ برسد. آلبومین سرم انسانی(HSA, A-1887, Lot. No. 1449319, fatty acid free) از شرکت سیگما آمریکا خریداری شد و پس از آماده سازی بیشتر مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از این آلبومین و محلول بافر، نمونه ای با غلظت $Mgml^{-1}$ ۰/۷ برای آزمایشات با غلظتM^{-4} ۱۰ تهیه گردید. کاتیون DTAB که غلظت های مختلف(۰ و ۰,۵ و ۱/۵ و ۲ میلی مولار) تهیه گردید. ۰/۵ گرم گلوکز با آب مقطر به حجم ml ۲ رسانده شد، جهت برداشت غلظت های متفاوت گلوکز(۱۰۰، ۱۷۵ و ۴۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر) حجم های مختلفی از این نمونه به محلول آلبومین انکوبه شده با DTAB اضافه گردید. از آن جا که هدف استفاده از روش اسپکتروفتومتری UV-Visible، به دست آوردن طیف جذبی آلبومین است از خاصیت اسیدآمینه های آروماتیک آلبومین در جذب فوتون هایی با طول موج nm ۲۸۰ استفاده گردید. در این مرحله، بعد از پنج دقیقه انکوباسیون DTAB و گلوکز با آلبومین، با استفاده از این دستگاه، فوتون هایی با طول موج های nm ۳۰۰-۲۵۰ به نمونه داده شد و جذب ماکزیمم اندازه گیری شد. با استفاده از این روش غلظت های DTAB و گلوکز با HSA مورد بررسی قرار گرفت و در دمای ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی گراد سه بار تکرار گردید.

یافته‌های پژوهش

طیف های UV آلبومین سرم انسانی انکوبه شده با کاتیون DTAB و غلظت های مختلف قند، در دماهای ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی گراد به ترتیب در شکل های شماره ۱ و ۲ ترسیم شده اند.

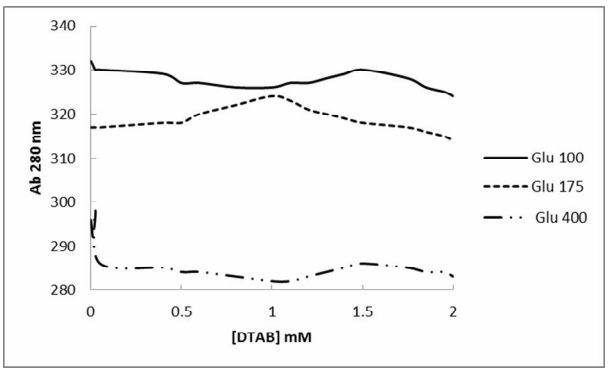
شکل شماره ۱، ماکزیمم جذب آلبومین سرم انسانی، انکوبه شده با کاتیون DTAB در حضور غلظت های مختلف قند در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد می باشد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-16]



شکل شماره ۱. جذب طول موج ۲۸۰ نانومتر آلبومین سرم انسانی در حضور غلظت های مختلف گلوکز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به عنوان تابعی از غلظت DTAB در بافر فسفات نیم میلی مولار و pH=7

هم چنین شکل شماره ۲، ماکزیمم جذب آلبومین سرم انسانی، انکوبه شده با کاتیون DTAB در حضور غلظت های مختلف قند در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد می باشد.



شکل شماره ۲. جذب طول موج ۲۸۰ نانومتر آلبومین سرم انسانی در حضور غلظت های مختلف گلوکز در دمای ٤٢ درجه سانتی گراد به عنوان تابعی از غلظت DTAB در بافر فسفات نیم میلی مولار و pH=7

بحث و نتیجه‌گیری

همان طور که مشاهده می شود در دو غلظت ۱۷۵ و ۱۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر قند، جذب بیشینه در غلظت ۰/۵ میلی مولار از DTAB رخ داده است و این در حالی است که در غلظت قند ۴۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر جذب بیشینه در غلظت ۱ میلی مولار از DTAB حاصل شده است. با افزایش غلظت DTAB، ماکزیمم جذب پروتئین، کاهش یافته است. با توجه به شکل ماکزیمم جذب در غلظت ۰/۵ میلی مولار DTAB و شرایط نرمال قندخون ۱۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر و شروع هایپرگلایسمی با غلظت قند ۱۷۵ میلی گرم بر دسی لیتر، به ترتیب ۳۲۵ و ۳۱۶ نانومتر می باشد و این در حالی است که ماکزیمم جذب در غلظت ۱ میلی مولار DTAB و شرایط دیابت با غلظت قند ۴۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر، تا ۲۷۸ نانومتر کاهش محسوسی نشان می دهد. هم چنین با افزایش غلظت قند، تمایل پروتئین به کاتیون DTAB بیشتر شده است. در شکل شماره ۲ همان طور که مشاهده می شود پروتئین در غلظت ۴۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر قند، ماکزیمم جذب را در غلظت بیشتری از DTAB حاصل می کند. به طوری که ماکزیمم جذب پروتئین در غلظت ۱۷۵ میلی گرم بر دسی لیتر قند در غلظت ۱ میلی مولار DTAB و در غلظت ۴۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر قند، در غلظت ۱/۵ میلی مولار DTAB دیده می شود. از طرفی با توجه به شکل شماره ۲ در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد نیز مانند دمای فیزیولوژیک، با افزایش غلظت DTAB، ماکزیزمم جذب پروتئین کاهش یافته است؛ زیرا ماکزیمم جذب غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر قند، در۳۳۰ نانومتر بوده و این رقم در غلظت ۴۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر قند به ۲۸۶ نانومتر نزول پیدا کرده است. هم چنین همانند شکل شماره ۱ با افزایش غلظت قند، تمایل پروتئین

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-16]

به کاتیون DTAB بیشتر شده است. با افزایش غلظت قندخون، ماکزیمم جذب غلظت ۱۷۵ میلی گرم بر دسی لیتر قند، در غلظت ۱ میلی مولار DTAB حاصل شده و با افزایش غلظت قندخون به ۴۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر ماکزیمم جذب در غلظت ۱/۵ میلی مولار از DTAB دیده می شود. با توجه به این که در هر دو دمای ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد تمایل پروتئین به کاتیون با افزایش غلطت قندخون افزایش یافته است می توان گفت اگر کاتیون DTAB را به لحاظ داشتن یک بار مثبت به Na^+ تشبیه کنیم، می توان گفت در افراد مبتلا به دیابت مصرف نمک طعام از حساسیت بیشتری برخوردار است، چرا که آلبومین تمایل بیشتری به نمک پیدا کرده و این موضوع شخص را مستعد ابتلا به فشارخون و متعاقباً بیماری های قلبی- عروقی خواهد کرد. بیش از ۵۰ درصد مبتلایان به دیابت نوع ۲ به بیماری فشارخون مبتلا هستند،(۸). در مبتلایان به دیابت نوع یک، این درصد، در ابتدا و در سنین پایین به مراتب کمتر است و تدریجاً با افزایش سن، بیشتر می شود،(۹). فشارخون بالا، دیابت را تشدید و دیابت، فشارخون را بدتر می کند و تنها راه کنترل این دو، درمان توأمان و هم زمان آن هاست. هر چه فشارخون بیمار دیابتی، بهتر کنترل شود، خطر بروز سکته های قلبی و مغزی، ضایعات چشمی و کلیوی و عروقی و اعصاب محیطی در او کمتر می شود و برعکس. لذا توجه به این مسئله از اهمیت فراوانی برخوردار است،(۱۰). با توجه به اطلاعات حاصل از شکل های ۱ و ۲ قند با غلظت ۴۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر می توان گفت جایگاه های فعال آلبومین سرم انسانی فرد مبتلا به دیابت که دچار تب شده است، تمایل به کاتیون دارد. در نتیجه می توان گفت این افراد بیشتر در معرض ابتلا به فشارخون و عوارض ناشی از آن قرار دارند. هم چنین با توجه به نتایج منتشر شده در مجله دیابت و لیپید، ماکزیمم جذب آلبومین گلایکه شده با غلظت بالای قند در مقایسه با ماکزیمم جذب آلبومین انکوبه شده با DTAB و قند به غلظت ۴۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر نشان می دهد پایداری پروتئین در حالتی که تنها با غلظت بالای قند انکوبه شده است، بیشتر از زمانی است که کاتیون نیز به آن ها می پیوندد. این موضوع نشان می دهد که آلبومین فرد دیابتی ای که از نمک کمتری در رژیم غذایی خود استفاده می کند، در وضعیت پایدارتری قرار دارد نسبت به فردی که رژیم غذایی پر نمکی دارد. این مهم باعث می شود افرادی با رژیم غذایی کنترل شده و مبتلا به دیابت کمتر در معرض بروز بیماری های جانبی مانند فشارخون، بیماری های قلبی و عروقی، نارسایی های کلیوی و بیماری های اتوایمیون مانند پسوریاز، آرتریت روماتوئید، ام اس و اسپوندیلیت آنکلیلوزان شوند؛ چرا که هافلر و همکاران دریافتند نمک در ایجاد بیماری های خودایمنی مانند «دیابت نوع یک» نقش دارد،(۱۱). این پژوهش نشان می دهد که غلظت ۴۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر قند سبب تغییرات قابل ملاحضه ای در جذب آلبومین سرم انسانی شده است و احتمالاً ساختار و عملکرد مولکول تحت تاثیر قرار می گیرد. آن گونه که از نتایج حاصله بر می آید، گلوکز علاوه بر تاثیرات زیانباری که دارد می تواند عملکرد بسیاری از مولکول ها را در خون تغییر دهد. به عنوان مثال این مهم در سطوح هورمونی، انتقال داروها، عناصر و یون های حیاتی و مورد نیاز بدن، می تواند تاثیرات شگرف و مهمی داشته باشد.

References

1- Rezaei-Tavirani M, Mahdavi SM, Heidarian E.Electrochemical study of attaching the active substance HPB to human serum albumin. J Ilam Uni Med Sci 2006; 4:38-43. (Persian)

2- Fasano M, Curry S, Terreno E, Galliano M, Fanali G, Narciso P, et al. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin, IUBMB Life 2005; 57:787-96.

3- Curry S. Lessons from the crystallographic analysis of small molecule binding to human serum albumin. Drug Metab Pharmacokinet 2009; 24:342-57.

4- Peters Jr T. All about albumin: biochemistry, genetics and medical applications. Academic Press:San Diego and London; 1996.

5- Curry S. Beyond expansion: structural studies on the transport roles of human serum albumin. Vox Sang 2002; 83:315-9.

6- Lockridge O, Xue W, Gaydess A, Grigoryan H, Ding SJ, Schopfer LM, et al. Pseudo-esterase activity of human albumin: slow turnover on tyrosine 411 and stable acetylation of 82 residues including 59 lysines. J Biol Chem 2008;283:22582-90.

7- Maraschin Jde F. Classification of diabetes. Adv Exp Med Biol 2012; 771:12-9.

8- The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pre--

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-16]

ssure. National Heart, Lung and Blood Institute; 2003.
9- Sicras AM. Clinical and economic characteristics associated with type 2 diabetes. Rev Clin ESP 2013; 17:164-9.
10- Sowers R, Epstein M. Diabetes Mellitus and Associated Hypertension, Vascular Disease, and Nephropathy. Am Heart Assoc J 1995; 26: 869-79.
11- Muller N, Hafler A. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. Nature 2013; 21:965-71.

Evaluating Human Serum Albumin Structure and Stability in the Presence of DTAB

Vaseghimaghvan P[1], Ahmadi N[1], Shahani M[1], BahadoriMonfared E[2], Azizi M[3]*

Recived: 5August, 2013 Accepted: 12November, 2013

Abstract

Introduction: Human serum albumin with its singular structure acts as a carrier molecule that can attach to a variety of substances. Any structural or functional changes in albumin are accompanied with undesirable outcomes. In the present research, attachment of some ligands such as detergents (DTAB) and sugars (glucose) to albumin were evaluated at temperatures 27°C and 42°C.

Materials & Methods: Tris-buffer solusion for albumin with a pH close to the pH of body was prepared. To denature albumin, hydrochloric acid was used. UV specterophotometric technique was applied to evaluate denaturation process.

Findings: With increment of DTAB concentration the maximum optical absorption of albumin decreased. Glucose concentration at 400mg/dl level caused a profound change in the optical absorption of albumin that might affect the structure of the molecule.

Discussion & Conclusion: Glucose elevateon has deleterious effects and deteriorates the function of many molecules in blood. The effects may exert on hormones, drug transportation, necessary ions and elements

Keywords: Human serum albumin, DTAB cation, glucose, thermal denaturation, UV spectrophotometry

1.Proteomic Research Center, Faculty of Paramedicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2.Dept of Health and Social Medicine, Faculty of Paramedicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3.Dept of Anatomy, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
**Corresponding author*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-16]