

مطالعه الکتروشیمیایی اتصال ماده فعال سطحی هگزا دسیل پیریدینیوم بر مایند (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^۴، دکتر بیژن رنجبر^۳، مهرناز مصطفوی^۲، دکتر سید حسن مقدم‌نیا^۱، 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 پذیرش: ۸۶/۴/۵

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۰/۲

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 می‌کند. در این بررسی اتصال ماده فعال سطحی هگزا دسیل 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 °C و ۴۲ °C خواص ساختاری و عملکردی HSA مطالعه گردید.

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

نتیجه‌گیری نهایی: افزایش ۵ درجه سانتیگراد دما از ۳۷ °C به ۴۲ °C طیف CD مربوط به HSA را تغییر می‌دهد و یا به عبارتی ساختار دوم پروتئینی را دچار تغییر می‌نماید. بنابر همین یافته انجام آزمایش اتصال HPB در ۳۷°C و ۴۲°C 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°C نسبت به دمای ۳۷ °C 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 °C سبب خروج آب خون از بدن و کاهش توأم دمای بدن می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آلبومین سرم انسانی، هگزا دسیل پیریدینیوم بر مایند، دما

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 ۶۷٪ ساختار α هلیکس و فاقد صفحات β می‌باشد (۲۰). 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 (۵ و ۴). سرم آلبومین به یک خانواده چند ژنی تعلق دارد که شامل Vitamin D-binding protein و α fetoprotein می‌باشد و تاکنون بیش از ۶۰ ایزوفرم ساختمانی متفاوت آن شناسایی شده است (۷ و ۶). سرم آلبومین با غلظتی در حدود ۴۵mg/ml (۰/۶۷mM) بعنوان پروتئین اصلی سرم محسوب می‌شود و در سیستم گردش خون دارای نیمه عمری در حدود ۲۰ روز می‌باشد (۹ و ۸). اعمال اصلی آلبومین تنظیم فشار اسمزی خون، انتقال اسیدهای چرب، ترکیبات لیپوفیلیک، بیلی روبین و مس در نظر گرفته می‌شود (۱۰ و ۱۱). 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 اثر پیوند شدن لیگاند می‌تواند تغییر ساختار بدهد (۱۳). ضروری بودن آلبومین برای بقاء انسان و سایر پستانداران مورد سؤال است، چونکه افراد و موشهای فاقد آلبومین^۱ 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 مرک^۳ تهیه شدند. از بافر فسفات ۱۰mM با pH=۷ در کلیه آزمایشات استفاده گردید. محلول ۰/۲ mg/ml از آلبومین تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. طیف‌های CD^۴ با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر CD (مدل Jasco) در ناحیه UV دور در دماهای ۳۷°C و ۴۲°C رسم گردیدند. ایزوترم‌های پیوندی HPB^۵ به HSA در دماهای ۳۷°C و ۴۲°C 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 ۳۷°C و ۴۲°C ترسیم شدند.

یافته‌های پژوهش

طیف‌های CD ناحیه دور UV آلبومین سرم انسانی در دماهای ۳۷°C و ۴۲°C 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 ۳۷°C و ۴۲°C نشان می‌دهند.^۱

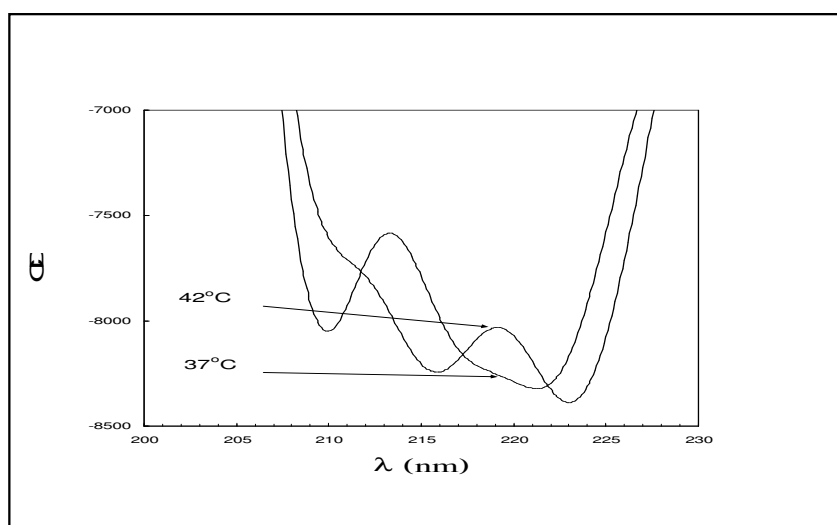
1. Analbuminemic

2. Sigma

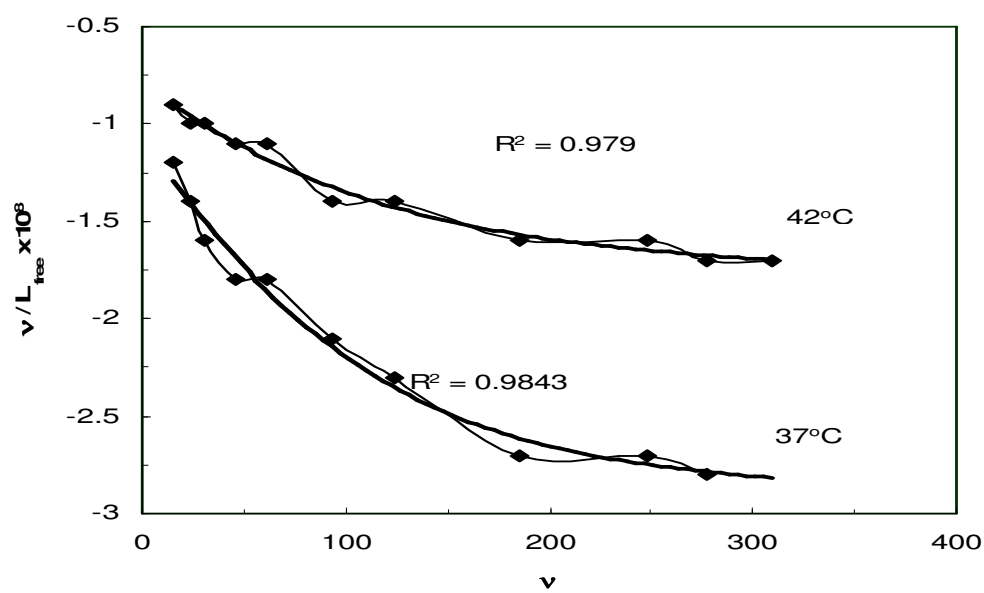
3. Merck

4. Circular Dichorism

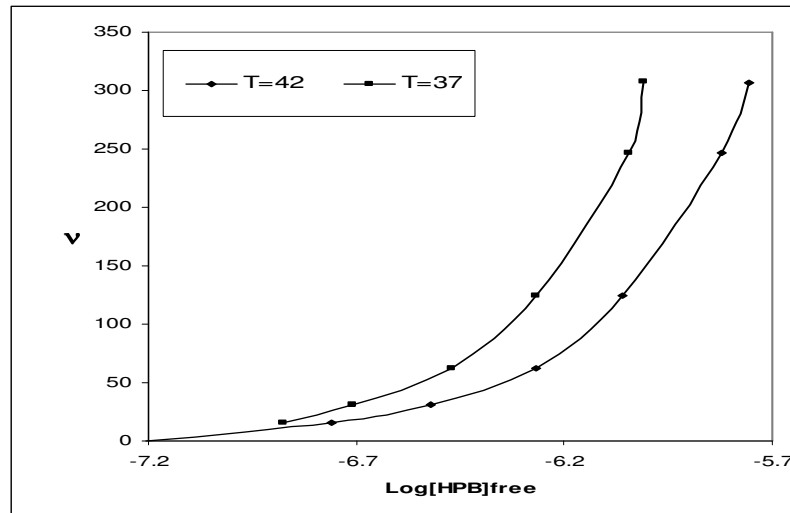
5. Hexadesyl Pridinium bromide



شکل شماره ۱- طیف‌های CD ناحیه دور UV آلبومین سرم انسانی در دماهای 37°C و 42°C (λ) ; طول موج).



شکل شماره ۲- نمودارهای ایزوترم پیوندی HPB به آلبومین سرم انسانی در دماهای 37°C و 42°C (v ; تعداد مول لیگاند که به یک مول پروتئین متصل میشود، L_{free} ; لیگاند آزاد)



شکل شماره ۳- نمودارهای اسکادچارد اتصال HPB به آلبومین سرم انسانی در دماهای 37°C و 42°C (ν ; تعداد مول لیگاند که به یک مول پروتئین متصل میشود)

بحث و نتیجه گیری

با توجه به شکل شماره ۱ طیف CD آلبومین در 37°C با طیف این پروتئین در 42°C یکسان نمی باشد. بررسی ساختار دوم پروتئین ها از طریق دستگاه CD در ناحیه UV دور یک روش متداول بیوفیزیکی می باشد (۱۴).

جابجا شدن طیف CD در ناحیه دور UV به سمت بالا نشان دهنده کاهش ساختارهای دوم پروتئین است (۱۵). بنابراین به نظر می رسد که افزایش دما از 37°C به 42°C باعث کاهش ساختارهای دوم آلبومین سرم انسانی می شود، 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 5°C از 37°C به 42°C 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 می تواند 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 می شود که ایزوترم پیوندی اتصال HPB به آلبومین سرم انسانی در دمای 42°C در سمت راست نمودار بدست آمده در دمای 37°C واقع شده است. به عبارتی دیگر، این مقایسه نشان می دهد که افزایش دمای اعمال شده خواص فیزیکی شیمیایی آلبومین را تحت تأثیر قرار داده است و بنابراین می توان نتیجه گرفت که تغییر دما از 37°C به 42°C علاوه بر القاء تغییرات ساختاری در آلبومین سبب تغییر خواص فیزیکی شیمیایی آن نیز می شود. جابجا شدن ایزوترم پیوندی در اثر افزایش دما به سمت راست نشان دهنده کاهش تمایل آلبومین سرم انسانی به لیگاند مورد استفاده (که یک ماده فعال کاتیونی می باشد) است. مطالعات انجام شده نشان می دهد که تعدادی بار الکتریکی منفی خنثی نشده در سطح آلبومین واقع شده اند که سبب منفی شدن سطح این پروتئین می شوند (۱۶).

کاهش تمایل آلبومین به کاتیون مورد استفاده می تواند 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 25°C تا 37°C و نیز از 40°C تا 60°C تأثیر چندانی بر ساختار آلبومین ندارد، گرچه در این بررسی‌ها افزایش دما 12°C تا 15°C 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 37°C و 42°C می‌باشد.

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 می‌کند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که افزایش دما از 37°C به 42°C 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 37°C تا 42°C گرچه از نظر مقدار (5°C) در مقایسه با بررسی‌های دیگر (از 25°C تا 37°C و از 45°C تا 60°C) 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. Minchiotti 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; *Biochim 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. *Biochim 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. *Protein 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. *Adv Protein Chem* 1985, 37: 161-245.
12. Figge. J, Rossing TH, Fencel 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.
۱۴. 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. ۱۳۸۳، شماره ۳، صفحات ۱۱۸-۱۱۳.
۱۵. رضایی طاویرانی مصطفی، یوسفی رضا، رنجبر بیژن و همکاران. بیوفیزیک. چاپ سوم، انتشارات سنجش تکمیلی. ۱۳۸۵، فصل ششم.
۱۶. 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. ۱۳۸۴، دوره سیزدهم، شماره سوم، صفحات ۳۵-۲۷.
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.

Electrochemical study of Activated HpB binding to Human Serum Albumin

Rezaei- tavrani M^{3*}., Mahdavi S²., Heydarian E¹., Alizadeh- Motlagh N³., Aghamohammadi M³., et al.

1) Faculty of Medicine, Medical Sciences University of Ilam.

2) Asrenouin Research and Industrial Services Institute.

3) Faculty of Medicine, Tarbiat Modarres University.

Abstract

Introduction: Human serum Albumin (HSA) is a single strand protein that plays a major role in the maintenance of plasma oncotic pressure. Surface of this protein is covered with unneutralized negative charges and has an important role in the transfer of some drugs, fatty acids, cations and hormones in the blood.

was purchased **Materials & Methods:** HAS (Hexadesyl pridium bromide) from Sigma company and the other reagents were recieved from Merck Co. Using Phosphate buffer in pH=7 for all experiments through CD-spectrophotometer (model Jasco) secondary structure changes in the protein were observed. The ligand binding of HSA- HPB interaction was studied by fluke potentiaometer. HSA concentration in all experiments was 0.2 mg/ml.

Results: HSA CD spectra in the far – UV region were obtained at 37⁰C and 42⁰C. The binding isotherms and also scatchard curves for HAS-HPB interaction at 37⁰C and 42⁰C were drawn and discussed.

Conclusion: Rising temperature from 37⁰C up to 42⁰C proved a considerable effect on the structural aspects of HSA. HSA- HPB interaction depends on the temperature so the affinity of HSA for HPB binding reduces as temperature increases to 42⁰C from 37⁰C. Therefore, the amounts of negative charges on the surface of HSA at the 42⁰C are less than those at 37⁰C and leads to the decrement of blood oncotic pressure. This effect expresses the considerable effect of HSA on the moderation of fever on the body.

* * *

Key words: Human Serum Albumin, Hexadesyl Pridinium bromide, tempreture.