

ترمودینامیک اثر سرب روی آلبومین سرم خون انسان

* غلامرضا حبیبی
 ** دکتر علی اکبر صبوری
 *** دکتر علی اکبر موسوی موحدی

کلمات کلیدی:

اثر سمیت سرب، آلبومین خون انسان، گرمای بحرانی، ترمودینامیک.

چکیده:

سرب یکی از آلاینده‌های مهم جامعه صنعتی امروز است. آثار سمی سرب بر روی اجزای مختلف بدن از جمله آنزیم‌های مسیر بیوستنز هموگلوبین و سیستم عصبی، به‌طور بسیار گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته است. در این پژوهش، از نظر ترمودینامیکی، آثار ناپایدار کنندگی سرب روی آلبومین سرم انسان (HSA) با روش‌های تجربی مختلفی مورد مطالعه قرار گرفته است. دیالیز تعادلی، غیر طبیعی کردن حرارتی و تیتراسیون اسپکتروفوتومتری در $\text{pH}=3/2$ و دماهای مختلف استفاده شد و تعداد کل جایگاه‌های پیوندی، ثابت تعادل و اندازه تعاونی پیوند سرب روی HSA، در دو دمای 27°C و 37°C تعیین گردید. فرآیند پیوند، گرماگیر است. از این‌رو، گرما باعث افزایش اثر سمیت سرب می‌شود. بعلاوه، نقطه ذوب پروتئین، به عنوان یک پارامتر پایداری ترمودینامیکی، با افزایش غلظت سرب محیط، افزایش می‌یابد.

* - فوق لیسانس بیوشیمی مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران.

** - استادیار مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران.

*** - استاد مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران.

مقدمه:

آلبومین سرم انسانی یکی از پروتئینهای مهم پلاسماست. این پروتئین انتقال دهنده هورمونها، داروها، اسیدهای چرب. اسیدهای آمینه و تعداد زیادی از کاتیونهای فلزی در سیستم گردش خون است. آلبومین در مقایسه با اکثر پروتئینها، تعداد سیستئینهای آن بالا بوده، در تنظیم فشار اسمزی کلوئیدی و pH خون سهم بسزائی دارد [۱]. وزن مولکولی آن ۶۶،۵۰۰ دالتون و شامل ۵۸۴ اسید آمینه است. اسیدهای آمینه به طریقی قرار گرفته اند که نواحی سه گانه تقریباً مشابه ساختمانی را به وجود آورده است [۲-۳]. نظر به اهمیتی که این پروتئین در بدن تمام پستانداران دارد، مطالعات و تحقیقات بسیاری را به خود اختصاص داده است. در این رابطه مقالات متنوعی چاپ و منتشر گردیده که از جمله می توان به رفتارهای ساختمانی که در برابر pHهای مختلف از خود نشان می دهد [۴-۱۰] و نیز اثر متقابل لیگاندهای مختلف مثل داروها، مواد فعال سطحی، اسیدهای چرب و فلزات مختلف اشاره کرد. در مطالعات نوع اخیر اطلاعات وسیعی در خصوص ماهیت و ویژگی فرآیندهای اتصال و نیز تعداد و محل جایگاههای پیوندی روی آلبومین، به دست آمده است [۱۱-۱۸]. داروهای زیادی در سیستم گردش خون به این پروتئین پیوند می گردد و در ارگانسیم جابجایی شود از جمله می توان به سورامین، بنزود یا زپین، وارفرین، آسپرین و دیژری توکسین اشاره کرد [۱۹-۲۳].

آنچه در این پژوهش مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته، اثر متقابل یون سرب (II) (که آثار مخرب محیط زیستی دارد) با HSA از نظر ترمودینامیکی است. در این راستا، مقادیر پارامترهای مختلف ترمودینامیکی مربوط به رفتار ساختمانی پروتئین در برابر سرب، و اطلاعات ساختمانی قابل توجهی حاصل گردید.

۱ - مواد و روشها

سرم آلبومین انسانی (HSA) از شرکت سیگما، کیسه های دیالیز از شرکت SIC، نیترات سرب از شرکت میرک ورز آنیلین هیدروکلراید از شرکت BDH تهیه گردید. سایر مواد شیمیایی به کار رفته در درجه بالایی از خلوص قرار داشته و تمام محلولها به وسیله آب دوبار تقطیر تهیه شد. محلول گلاسیسین با غلظت ۵۰

میلی مولار با $pH=3/2$ به عنوان بافر استفاده گردید. انحلال نیترات سرب در pH فیزیولوژیک بسیار ناچیز بوده به طوری که تحقیق حاضر در آن امکان ناپذیر می نمود.

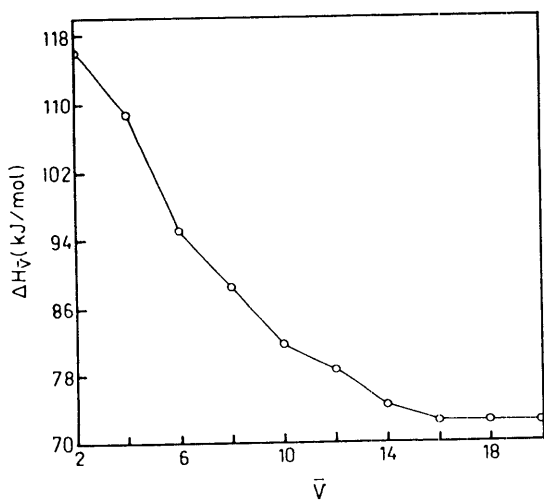
کیسه های دیالیز نیمه تراوا سه بار و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه در محلول بیکربنات سدیم و محلول EDTA (اتیلن دی آمین تترااستیک اسید) جوشانده شد. آنگاه چندین بار با آب مقطر شستشو گردید و سپس در محلول آبی ۲۰ درصد اتانول نگهداری گردید. حجمهای ۲ میلی لیتری از محلول یک میلی گرم در میلی لیتر از HSA در داخل کیسه های دیالیز ریخته سپس علیه حجمهای دو میلی لیتری محلول نیترات سرب با یک محدوده وسیع غلظتی به مدت ۹۶ ساعت در دو دمای ثابت ۲۷ و ۳۷ درجه سانتیگراد دیالیز گردید. میزان یونهای پیوند نشده سرب (II) به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی یونیکام مدل ۹۱۹ در طول موج ۲۱۷ نانومتر تعیین گردید. با در دست داشتن مقادیر اولیه سرب، میزان یونهای سرب پیوند شده به ازای یک ملکول پروتئین محاسبه گردید.

در مطالعه غیر طبیعی شدن حرارتی پروتئین، از دستگاه اسپکتروفتومتر شیمادزو مدل ۳۱۰۰ استفاده گردید. از بافر ایمیدازول ۰/۰۵M با $pH=7/43$ ، در دمای اطاق استفاده گردید. غلظت محلول پروتئین، ۰/۰۵% W/V، انتخاب شد و تغییرات جذب پروتئین در طول موج ۲۷۸ نانومتر در اثر اعمال حرارت، دنبال گردید. در دفعات بعدی، غلظتهای معینی از سرب (II) به محلول پروتئین اضافه شد و تغییرات جذب حاصله مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله بعدی، تغییرات جذب پروتئین در اثر افزایش تدریجی سرب (II) در دو دمای ثابت $27^{\circ}C$ و $37^{\circ}C$ و pH برابر ۳/۲ بافر گلاسیسین تحقیق گردید.

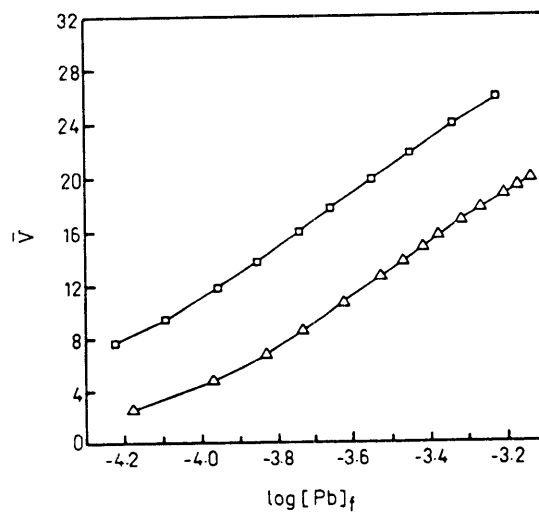
۲ - بحث و نتایج

شکل (۱)، منحنیهای ایزوترم پیوندی را در مورد برهم کنش سرب با HSA در دو دمای $27^{\circ}C$ و $37^{\circ}C$ نشان می دهد. در نمایش داده های پیوندی از پارامتر با نشان $\bar{\nu}$ استفاده می شود که عبارت است از: تعداد متوسط مولکول لیگاند پیوند شده (در اینجا Pb^{2+}) به یک ماکرومولکول پروتئین. از این رو $\bar{\nu}$ به صورت:

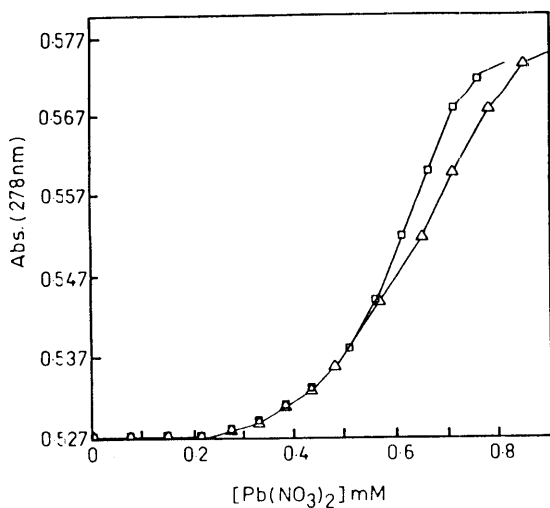
$$\bar{\nu} = \frac{[Pb^{2+}]_b}{[HSA]_t} = \frac{[Pb^{2+}]_t - [Pb^{2+}]_f}{[HSA]_t} \quad (1)$$



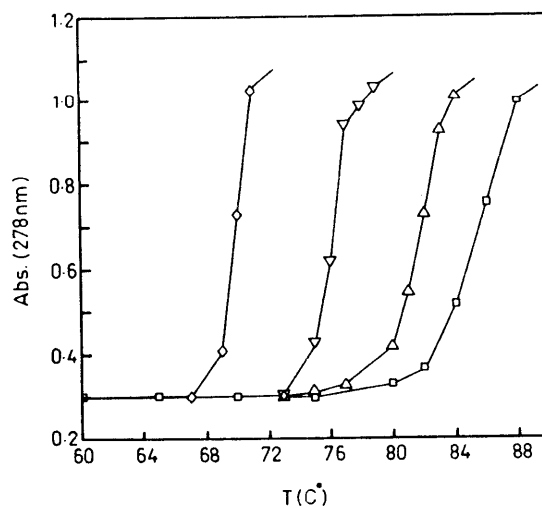
شکل ۲ - نمودارهای تغییرات $\Delta H_{\bar{v}}$ پیوند در مقابل \bar{v} . حاصل تأثیر متقابل HSA به غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر با نیترات سرب در بافر گلايسين pH=3.2



شکل ۱ - نمودارهای ایزوترم پیوند بر هم کنش HSA به غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر با نیترات سرب (II) در بافر گلايسين ۵۰ میلی مولار و pH=3.2 در دو دمای ۲۷°C (D) و ۳۷°C (□).



شکل ۴ - نمودار تغییرات جذب محلول HSA علیه افزایش تدریجی نیترات (II) در بافر گلايسين با pH=3.2 در دو دمای ۲۷°C (D) و ۳۷°C (□). گلايسين



شکل ۳ - نمودارهای تغییرات جذب HSA علیه تغییرات درجه حرارت با حضور نیترات سرب ۰/۰۲۵ میلی مولار (D)، ۰/۰۵ میلی مولار (V)، ۰/۱ میلی مولار (◇) و عدم حضور سرب (□) در بافر pH=3.2

با تعیین پتانسیل پیوندی وایمن، π از مساحت سطوح مختلف زیر منحنیهای ایزوترم پیوندی در \bar{v} های متفاوت، براساس معادله [۲۶-۲۷].

$$\pi_{\bar{v}} = RT \int_0^{\bar{v}} \bar{v} d \ln [Pb^{2+}]_f \quad (3)$$

و استفاده آن در معادله جونز [۲۸-۲۹].

$$\pi_{\bar{v}} = RT \ln (1 + K_{app} [Pb^{2+}]_f^{\bar{v}}) \quad (4)$$

یک ثابت تعادل ظاهری، K_{app} ، به ازای هر \bar{v} خاص به دست می آید. R ثابت گازها و T دمای مطلق (مقیاس کلوین) است. با تعیین مقدار K_{app} در مقادیر مختلف \bar{v} در دو دمای مختلف T_1 و T_2 ، به ترتیب $K_{app,1}$ و $K_{app,2}$ ، براساس معادله وانت هوف [۳۰-۳۱].

$$\ln \frac{K_{app,2}}{K_{app,1}} = - \frac{\Delta H_b}{R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) \quad (5)$$

می توان آنتالپی پیوند (ΔH_b) را در هر مقدار \bar{v} تعیین نمود. مقدار $\Delta H_{\bar{v}} = \frac{\Delta H_b}{\bar{v}}$ گرمای مربوط به پیوند یک مول سرب به یک مول HSA خواهد بود. این محاسبات انجام شده، نتیجه آن به صورت، $\Delta H_{\bar{v}}$ در مقابل \bar{v} در شکل (۲) نشان داده شده است. قابل توجه است که فرآیند پیوند همواره گرما گیر است. یعنی گرما سبب پیشرفت فرآیند پیوند سرب روی پروتئین می شود. به عبارت دیگر، گرما یک عامل کمکی در اثر سمیت سرب روی پروتئین HSA محسوب می شود.

از آنجا که pH ایزوالکتریک HSA برابر ۴/۷ است، انتظار می رود که افزایش pH از مقدار ۳/۲ که این آزمایشها در آن انجام شده است، به pH فیزیولوژیک، یعنی ۷/۴، سبب افزایش اثر مسمومیتی سرب شود. زیرا، افزایش pH تعداد بارهای منفی سطح پروتئین را افزایش می دهد و بستر بهتری برای یونهای مثبتی همچون کاتیونهای سرب، فراهم می سازد.

شکل (۳) روند غیر طبیعی شدن پروتئین HSA را در مقابل تغییرات درجه حرارت محیط در حضور سرب با غلظت‌های

محاسبه می شود که در آن، $[HSA]_i$ غلظت کلی پروتئین و $[Pb^{2+}]_b$ غلظت لیگاند پیوند شده می باشد. غلظت لیگاند پیوند شده، حاصل تفریق غلظت آزاد لیگاند، $[Pb^{2+}]_f$ ، از غلظت کلی لیگاند $[Pb^{2+}]_i$ ، می باشد. منحنیهای ایزوترم پیوندی نشان می دهند که مقدار پیوند سرب به HSA در دماهای بالاتر بیشتر است. بعلاوه، عدم تغییر ناگهانی در شیب منحنیهای ایزوترم پیوندی در هر دما حکایت از تأثیر متقابل یکساخت در مجموعه‌ای از پیوندهای مشابه می نماید.

برای تعیین ماکزیمم تعداد جایگاههای پیوندی سرب روی هر ماکرومولکول پروتئین (پارامتر g)، ثابت تعادلی (K) و میزان تعادلی پیوندی جایگاههای اتصال (ضریب هیل، n) می باید داده‌های تجربی شکل (۱) در معادله هیل [۲۴].

$$\bar{v} = \frac{g (K[Pb^{2+}]_f)^n}{1 + (K[Pb^{2+}]_f)^n} \quad (2)$$

جایگزین شود. به این ترتیب، پارامترهای ترمودینامیکی مجهول (n ، K ، g) که در واقع مشخص کننده روند پیوند لیگاند سرب روی پروتئین است، حاصل می شود. برای جایگزینی داده‌های تجربی، \bar{v} و $[Pb^{2+}]_f$ در معادله (۲) از روش کمترین مربعات غیر خطی و نرم افزارهای کامپیوتری موجود در این زمینه [۲۵] استفاده شده است. نتایج حاصل از این جایگزینی در جدول (۱) آورده شده است. این نتایج نشان می دهد که افزایش دما، نه تنها تعداد جایگاههای پیوندی را افزایش می دهد، بلکه ثابت تعادل و در نتیجه تمایل پیوند سرب به HSA را نیز افزایش می دهد. از این رو، سرب در دماهای بالاتر، اثر تخریبی بیشتری بر ساختمان این پروتئین می تواند داشته باشد. ضریب هیل در هر دو دما نزدیک به یک است. این بدین معنی است که در روند پیوند شدن سرب در سطح ماکرومولکولهای HSA، جایگاههای پیوندی مستقل از هم عمل نموده بین آنها برهم کنش وجود ندارد.

جدول ۱ - پارامترهای ترمودینامیکی به دست آمده از معادله هیل پس از جایگزین کردن نتایج حاصل از دیالیز تعادلی

$t^{\circ}C$	g	K/M^{-1}	n
1.27	26	3280	10
37	37	4432	0.99

- scrum albumin. J. Mol. Biol. 122, 543-558.
- 4 - Fernsdorff, H., Watson, M. T., Kauzmann, W. 1953. Protein denaturation. J. Am. Chem. Soc. 75, 5167-5174.
- 5 - Gutfreund, H., Sturtevant, J. M. 1953. Analysis of osmotic pressure measurement of solutions of bovine serum proteins. J. Am. Chem. Soc. 75, 5447-5448.
- 6 - Kauzmann, W., Simpson, R. B. 1953. Study of protein denaturation by optical rotatory power. J. Am. Chem. Soc. 75, 5154-5157.
- 7 - Tanford, C. 1955. Electrochemistry in biology and medicine. pp 248-250, Wiley, New York.
- 8 - Tanford, C., Buzzell, J.G., Rands, D.S. 1955. viscosity of dilution aqueous Solutions of bovine serum albumin and ribonuclease. J. Am. Chem. Soc. 77, 6421-6428.
- 9 - Yang, J.T., Foster, J. F. 1954. Mode of interaction of surface activations with ovalbumin and bovine plasma albumin. J. Am. Chem. Soc. 76, 1588-1595.
- 10 - Carter, D.C., Ho, J.X. 1994. Structure of serum albumin. Adv. Protein Chem: 45, 153-203.
- 11 - Ozeki, Y., Kurono, Y. 1994. Effects of drug binding on the sterase activity of human serum albumin: inhibition modes and binding sites of anionic drugs. Chem. Pharm. Bull. 28, 535-540.
- 12 - Moosavi - Movahedi, A.A., Bordbar, A.K., Taleshi, A.A., Naderimanesh, H. M., Ghadam, p. 1996. Mechanism of denaturation of bovine serum albumin by dodecyl trimethyl ammonium bromide. Int. J. Biochem. Cell Biol. 28 (9), 991-998.
- 13 - Scatchard, G., Scheinberg, I. H., Armstrong, S. H. 1950. The combination of human serum albumin With chloride ion. J. Am. chem. Soc. 72, 535-540.

مختلف، نشان می‌دهد. تغییر در مقدار جذب نور، در طول موج منطبق بر ماکزیمم جذب پروتئین $\lambda_{max} = 278\text{nm}$ معیار خوبی از پیشرفت فرآیند غیر طبیعی شدن پروتئین است. نمودار تغییرات جذب در مقابل دما در غیاب و یا حضور هر غلظتی از سرب، یک سیگموئید است. دمایی که در حوالی آن بیشترین تغییرات جذب پروتئین آشکار می‌شود، نقطه میانی انتقال مشهور به دمای ذوب پروتئین بوده و با T_m نشان داده می‌شود. این مقدار، در غیاب سرب 85.5°C است. افزایش غلظت سرب سبب کاهش T_m شده است که این به مفهوم اثر ناهنجار سرب روی ساختمان مقاوم ماکرومولکولهای پروتئین HSA است.

شکل (۴) نمودار تغییرات جذب پروتئین در طول 278nm را به دلیل افزایش غلظت سرب محیط، در دو دمای ثابت 27°C و 37°C ، نشان می‌دهد. سیگموئیدی بودن این نمودارها از تخریب ساختمان طبیعی ماکرومولکولهای حیاتی HSA به صورت جهشی و تعاونی، حول یک غلظت بحرانی، غلظت در نقطه میانی انتقال با نشان $[Pb^{2+}]_{1/2}$ ، حکایت می‌کند. غلظت بحرانی در دمای 27°C برابر 0.65mM و در دمای 37°C برابر 0.60mM است.

وجود سرب در محیط موجب می‌شود که پروتئین آلبومین سرم خون انسان تا حدودی غیر طبیعی شود. اثر ناهنجاری سرب روی این پروتئین با افزایش دما بیشتر می‌شود. از این رو، مسمومیت ناشی از سرب، به عنوان یک غیر طبیعی کننده پروتئینی، بویژه در دماهای بالاتر باید جدی گرفته شود.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران به خاطر کمکهای مالی در پیشبرد این پژوهش علمی تشکر و قدردانی می‌کنیم.

منابع:

- 1 - Figge, J., Rossing, T. H., Fend V. J. 1991. The role of serum proteins in acid - base equilibria. Lab. Clin Med. 117, 453-467.
- 2 - Brown, J. R. 1977. Albumin structure function and uses. pp 27-51, Pergamon, Oxford.
- 3 - McLachlan, A. D., Walker, J. E. 1977. Evolution of

- 23 - Wilting, J., Giesen, F., Perrin, J. H. 1980. The effect of albumin conformation on the binding of warfarin to human serum albumin. *J. Biol. Chem.* 225, 3032-3037.
- 24 - Hill, A. V. 1910. Relative velocities of diffusion in aqueous solutions of rubidium and cesium chlorides. *J. Physiol. (London)* 40, 4-7.
- 25 - James, M. L., Smith, G.M., Wolford, J.C. 1985. *Applied numerical methods for digital computer.* 3rd edition., Harper and Row Publisher, New York.
- 26 - Wyman, J. 1965. The binding potential, a neglected linkage concept. *J. Mol. Biol.* 11, 631-644,
- 27 - Moosavi-Movahedi, A. A., Housaindokht, M. R. 1990. Thermodynamic studies of the interaction of sodium n-dodecyl sulphate with histone H2B. *Physiol. Chem. & medical NMR* 22, 19-26.
- 28 - Jones, M.N., Manley, P. 1981. Relationship between proton and surfactant binding to lysozyme in aqueous solution. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1, 77, 827-835.
- 29 - Moosavi-Movahedi, A.A., Jones, M.N., Pilcher, G. 1989. Thermodynamics of the interaction of sodium n-dodecyl sulphate with *Aspergillus niger* catalase in high ionic strength aqueous solutions. *Int. J. Biol. Macromol.* 11, 26-28.
- 30 - Barrow, G. M. 1988. *Physical Chemistry.* 5th. edition, McGraw-Hill, New York.
- 31 - Moosavi-Movahedi, A.A. 1996. *Physical Chemistry of biological macromolecule.* Vol. 1, University of Tehran Press, Tehran.
- 14 - Pauling, L. 1940. *The nature of the Chemical bond.* 2nd. edition, pp 243-245, Cornew U. P., Ithaca.
- 15 - Coryell, C. D. 1954. *Chemical specificity in biological interactions.* pp 90-95, Academic Press, New York.
- 16 - Sen, D.N., Mizushima, S. 1955. Infrared complexes (I) nature of chelation bonding in bis (glycino) - Cu (II) monohydrate and bis (glycino) - Ni (II) dihydrate. *J. Am. Chem. Soc.* 77, 211-212.
- 17 - Klothoff, I. M., Stricks, W. 1955. Determination of the molecular weight of serum albumin by its effect on the diffusion current of methyl orange. *J. Am. Chem. Soc.* 77, 1996-1999.
- 18 - Tanaka, N., Klothoff, I.M., Stricks, W. 1955. Determination of disulfide groups in cystine, oxidized glutathione of protein. *J. Am. Chem. Soc.* 77, 2000-2006.
- 19 - Muller, W.E., Wollert, U. 1976. spectroscopic studies on the complex formation of seramine with bovine and human serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta* 427, 465-480.
- 20 - Goodman, L.S., Gilman, A. 1970. *The Pharmacological basis of Thera Peutics.* 4th. edition, pp 1144, Macmillan Co, New York.
- 21 - Muler, W.E., Wollert, U. 1973. Interaction of benzodiazepines with human serum albumin circular dichroism studies. *Nounyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac.* 278, 301-312.
- 22 - Muler, W.E., Wollert, U. 1974. Influence of pH on the benzodiazepine-human serum albumin complex *Nounyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac.* 283, 67-69.