

بررسی القا و مهار تجمع آمیلوئیدی آلبومین سرم انسانی

مریم چینی ساز^۱، آزاده ابراهیم حبیبی^{۲*}، عطیه قاسمی^۳، باقر لاریجانی^۲

چکیده

مقدمه: در بیماری دیابت، آلبومین سرم انسانی تمایل بالایی در اتصال به قند و گلاایک شدن (Glycation) از خود نشان داده است. گلاایک شدن آلبومین سرم انسانی، زمینه را برای تشکیل اشکال تجمعی فراهم می‌کند. با توجه به عمومیت پدیده تجمع و تشکیل آمیلوئید و دخالت این گونه اشکال تجمعی در بیماری‌های مرتبط با پروتئین‌ها، مطالعه بر روی پروتئین‌های مدل و بدست آوردن اطلاعات بیشتر در مورد چگونگی این پدیده‌ها، می‌تواند در مقابله با اشکال تجمعی راهگشا باشد. تحقیقات مربوط به تاثیر ترکیبات شیمیایی کوچک بر فیبریلایسیون پروتئین‌ها نیز می‌تواند در راستای طراحی و بهینه سازی این مولکول‌ها به عنوان دارو، در درمان بیماری‌های آمیلوئیدی کمک کننده باشد.

روش‌ها: القای تغییرات ساختاری آلبومین سرم انسانی انکوبه شده در بافر گلیسین با pH پایین و در حضور حلال آلی اتانول به مدت ۲۴ ساعت انجام گرفت. ایجاد آمیلوئید به کمک روش‌های اسپکتروسکوپی جذب کنگورد، نشر فلورسانس تیوفلاوین تی، دو رنگنمایی حلقوی (CD) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) بررسی شد. در عین حال، از دو ترکیب به نام سیلیبینین و یدی پامید در جهت بررسی تاثیر آنها در فرایند فیبریلایسیون استفاده شد.

یافته‌ها: آلبومین سرم انسانی در شرایط اسیدی قادر به تشکیل ساختار فیبریلار آمیلوئیدی است و هر دو ترکیب مذکور قادر به کاهش فیبریلایسیون در این پروتئین بودند.

نتیجه‌گیری: در این تحقیق نشان داده شد که آلبومین سرم انسانی بدون گلاایک شدن، استعداد ایجاد اشکال تجمعی را دارد. جهت مهار این پدیده، سیلیبینین نسبت به یدی پامید دارای تاثیر بیشتری بود و می‌تواند به عنوان داروی بالقوه در مهار آمیلوئید مطرح باشد.

واژگان کلیدی: آلبومین، فیبریل، آمیلوئید، تجمع پروتئین

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

۲- مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران

* **نشانی:** تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران، کد پستی ۱۴۱۱۴۱۳۱۳۷ تلفن: ۸۸۲۲۰۰۳۷، نمابر: ۸۸۲۲۰۰۵۲، پست الکترونیک: aehabibi@sina.tums.ac.ir

مقدمه

زمانی که شرایط طبیعی به حالت غیرطبیعی تبدیل می‌شود، خیلی از پروتئین‌ها تمایل شدیدی به ایجاد تجمعات با ساختار منظم فیبریلار آمیلوئیدی دارند. پیشنهاد این است که این تمایل یکی از خصوصیات ذاتی ساختارهای پلی‌پپتید است. این فیبریل‌های آمیلوئیدی تجمعات پلی‌پپتیدی با یک مرکز سازماندهی شده توسط رشته‌های بتا هستند که عمود بر محور اصلی فیبریل قرار گرفته‌اند. این چنین ساختارهایی نقش کلیدی را در بیماری‌های تحلیل برنده سیستم ایمنی مانند آلزایمر، پارکینسون و همچنین در ایجاد اختلالات در نقل و انتقال اطلاعات ژنتیکی و ارتباطات سیناپسی مرتبط با حافظه، بر عهده دارند [۱-۳]. بیشتر از ۲۵ بیماری مرتبط با اینگونه اشکال تجمعی شناخته شده است. به دلیل نقش روشن انسولین در دیابت، تحقیق‌های زیادی بر روی اشکال تجمعی انسولین انجام شده است ولی باید در نظر گرفت که پروتئین‌های دیگر نیز وجود دارند که ممکن است وقتی در معرض شرایط غیرعادی خون افراد دیابتی [۴] قرار بگیرند دچار تغییر ساختار شوند. یکی از این پروتئین‌های در معرض قرار گرفته، آلبومین سرم انسانی است که در اثر گلائیکه شدن می‌تواند تشکیل ساختارهای تجمعی دهد. در این تحقیق، بررسی امکان تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی آلبومین در شرایط اسیدی و بدون قرار گرفتن در معرض ترکیبات کربوهیدراتی مورد نظر بود.

ناپایداری مکانیکال و ترمودینامیک محلول‌های پروتئینی و به دنبال آن تجمعات پروتئین در تحقیقات پزشکی، داروسازی و بیوتکنولوژی نیز یک موضوع اصلی و مهم می‌باشد. این موضوع برای طراحی دارو یا ارزیابی صحیح تاریخ مصرف فرمولاسیون‌های دارویی، محصولات غذایی و برای توسعه و بهبود مقاومت مواد نگهدارنده بسیار ضروری است [۵].

تجمعات آمیلوئیدی اغلب به دنبال باز شدن جزئی ساختار پروتئینی و پایدار ماندن این شکل پروتئین تشکیل می‌شوند. پروتئین‌های طبیعی می‌توانند بعد از تشکیل الیگومرها، تجمعات خطی و مورفولوژی آمیلوئیدی داشته باشند. به طور کلی جزئیات ساختاری پروتئین و خصوصیات حلال،

نقش اساسی را در تعیین پایداری و فهم فرایند تجمع پروتئین بر عهده دارند [۶]. می‌توان گفت که اساس تشکیل این ساختارهای حیاتی، جوانه‌زایی تعدادی از پیش‌سازهای خاص و رشد و طولیل شدن این هسته اصلی است. این هسته‌زایی در نهایت ساختار رشته‌ای، بلند و بدون شاخه را باعث می‌شوند. البته به شکل روشن نمی‌توان این مسیرها را تعریف کرد ولی می‌توان از این اطلاعات در جهت درمان بیماری‌های حاصل از سمیت این ساختارها بهره برد [۷،۸].

آلبومین سرم انسانی از سال ۱۸۳۹ به عنوان جزء اصلی خون شناخته شده است. این پروتئین توسط سلول‌های کبدی ساخته می‌شود و نیمه عمر آن در بدن ۱۹ روز است [۹]. از بین گروه‌های مختلف پروتئین‌های پلاسما مانند فیبرینوژن، آلبومین و گلوبولین، آلبومین دارای بالاترین غلظت جرمی است و حدود ۶۰٪ پروتئین‌های سرم را تشکیل می‌دهد. وزن مولکولی آن ۶۷ KD و نقطه ایزوالکتریک آن ۴/۸ می‌باشد و در آب به خوبی محلول است. آلبومین سرم در انتقال، توزیع و متابولیسم اسیدهای چرب و بسیاری از داروها دخالت دارد [۱۰].

سمیت آمیلوئیدها به دو شکل نمود می‌یابد: یک حالت شامل اثرات نفوذی هسته‌های آمیلوئیدی می‌باشد که منجر به ناپایداری غشای سلول می‌شود [۱۱-۱۳] و حالت دوم شامل اثرات غیر مستقیم تجمعات پروتئین روی سازوکار عملکرد سلولی می‌شود، از جمله افزایش تشکیل انواع اکسیژن و نیتروژن فعال، غیر نرمال شدن سیستم کاهش و احیای سلول، کاهش عملکرد پروتئین بعد از تجمع و فسفریلاسیون بالای پروتئین آمیلوئیدوزنیک [۱۴].

به همین ترتیب، راه‌های مقابله با بیماری‌های آمیلوئیدی معمولاً کاهش تولید پروتئین و افزایش پاکسازی پروتئین‌های تجمع یافته یا با پیچش اشتباه و افزایش پایداری حالت طبیعی در پروتئین‌های آمیلوئیدوزنیک و مهار سیستم فرایند اتصال به هم اجزای پروتئینی و تجمع است.

مولکول‌های آروماتیک کوچک مثل کنگورد و تیوفلاوین تی مانع تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی می‌شوند. در چند سال اخیر انبوهی از گزارش‌ها ارائه شده، مبنی بر اینکه

آماده‌سازی محلول پروتئینی

معادل ۳mg/ml پروتئین آلبومین سرم انسانی در بافر گلايسين ۵۰ میلی‌مولار با $\text{pH} = ۷/۵$ و اتانول ۶۰٪ حل شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد.

اندازه‌گیری نشر فلورسانس تیوفلاوین تی

بررسی‌های فلورسانس با استفاده از ابزار اسپکترو فلورومتر کری اکلپس واریان^۱ انجام شد. برای تشخیص ساختارهای فیبریلار آمیلوئیدی توسط آلبومین سرم انسانی، ۱۰ میکرولیتر از نمونه (۲mg/ml) با ۹۰۰ میکرولیتر از محلول ۱۳ میکرومولار ThT (محلول ۲/۵ میلی‌مولار ThT در ۱۰ میلی‌مولار سدیم فسفات، ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl، $\text{pH} = ۷$ ، فیلتر شده مخلوط شده و برای ۵ دقیقه انکوبه شد. در طول موج ۲۸۰ نانومتر، برانگیختگی انجام گرفت و نشر فلورسانس از ۲۸۵ تا ۴۰۰ نانومتر در نمونه پروتئین انکوبه شده، بررسی شد. پس از برانگیختگی در طول موج ۴۴۰ نانومتر، تیوفلاوین تی نشر ضعیفی را با حداکثر شدت در ۴۹۰ نانومتر نشان می‌دهد [۱۹].

جذب نوری کنگورد

۷ میلی‌گرم کنگورد در ۱ میلی‌لیتر بافر که شامل ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl و ۵ میلی‌مولار فسفات سدیم ($\text{pH} = ۷/۴$) حل شده و با فیلتر سرنگی با منافذ $۰/۲ \mu\text{m}$ فیلتر شد. ۵ میکرولیتر از نمونه انکوبه شده به ۳۰۰ میکرولیتر محلول کنگورد اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. طیف جذبی (در طول موج ۴۰۰-۶۰۰) توسط اسپکتروفوتومتر Shimadzu UV-visible (کیوتو-ژاپن) اندازه‌گیری شد [۲۰].

طیف دورنگ نمایی دورانی^۲

طیف‌های دو رنگ نمایی دورانی پروتئین در محدوده فرابنفش دور (۱۹۰nm - ۶۰۰) با استفاده از ابزار اسپکتروپلاریومتر AVIV 215 به دست آمدند. برای

مولکول‌های کوچک مانع از تشکیل فیبریل آمیلوئید می‌شوند [۱۷-۱۵].

با توجه به اهمیت بسیار زیاد این پروتئین در زمینه‌های مختلف تحقیقاتی، در این مطالعه القای ساختار آمیلوئیدی در آلبومین سرم انسانی بررسی شد. البته قابل ذکر است که باید شرایط به کار گرفته شده را به عنوان شرایط مساعد کننده تشکیل آمیلوئید در نظر گرفت؛ طبیعی است که pH پایین و دمای بالای به کار گرفته شده در بدن اتفاق نمی‌افتد و پدیده‌ای که در شرایط آزمایشگاهی مطالعه شده است تشکیل مدلی از آمیلوئید آلبومین است که امکان ایجاد آن در معرض حلال آلی (اتانل)، شرایط اسیدی و دمای بالا مشخص شده است. همچنین از دو ترکیب سیلیسین و یدی پامید برای چگونگی تاثیر بر روی مسیر فرایند آمیلوئیدوز استفاده شد و نتایج هر دو تحقیق با کمک اسپکتروسکوپی جذب کنگورد، نشر فلورسانس تیوفلاوین تی، دو رنگنمایی حلقوی (CD) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) بررسی شد.

روش‌ها

آلبومین سرم انسانی، تیوفلاوین تی، کنگورد، سیلیسین و یدی پامید از شرکت سیگما (St. Louis, Mo) تهیه شد. محلول آلی اتانول ۹۶٪ از شرکت مرک (Merck-Germany-Darmstadt) تهیه گردید.

تعیین غلظت پروتئین

در روش براد فورد با معرف براد فورد غلظت پروتئین بر اساس غلظت‌های مشخص آلبومین سرم گاوی (سیگما) اندازه‌گیری شد [۱۸]. در این روش با استفاده از جذب غلظت‌های مختلف آلبومین سرم گاوی در دامنه ۰/۱-۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، منحنی استاندارد رسم گردید و بر اساس منحنی استاندارد، غلظت پروتئین در نمونه‌ها اندازه‌گیری شد.

1- Cary Eclipse VARIAN

2- Circular Dichroism (CD)

کردن پروتئین عادی تغییر قابل ملاحظه‌ای در الگوی طیف جذبی کنگورد موجب نمی‌شود ولی پس از اضافه کردن پروتئین انکوبه شده در شرایط ذکر شده در بالا، افزایش شدت نشر و به خصوص شیفت قابل ملاحظه به سمت طول موج‌های بلندتر مشاهده می‌شود. در این شرایط افزایش جذب به حدود ۵۰۸ نانومتر می‌رسد که نشانگر ساختارهای فیبریلار آمیلوئیدی تشکیل شده توسط آلبومین سرم انسانی است.

طیف دورنگ نمایی دورانی

شکل ۳ طیف دورنگ نمایی دور آلبومین سرم انسانی به همراه اتانول ۶۰٪ در بافر ۵۰ میلی‌مولار گلايسین با $pH = 1/5$ ، ۲۴ ساعت پس از قرار دادن در دمای ۵۷ درجه در محدوده فرابنفش دور در نمودارهای زیر نشان داده شده است. در نمودار شاهد پیک منفی وسیع و عمیق پس از ۲۴ ساعت در طیف حدود ۲۲۰ نانومتر هستیم، این نوع پیک موید حضور ساختارهای بتا می‌باشد و احتمال حضور تجمعات آمیلوئیدی آلبومین سرم انسانی را تشدید می‌کند.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره

شکل ۴ تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره نمونه آلبومین سرم انسانی انکوبه شده به مدت ۲۴ ساعت در شرایط آمیلوئیدی را نشان می‌دهد. ساختارهای فیبریلار آمیلوئیدی که عمدتاً مستقیم و فاقد شاخه هستند در تصویر قابل مشاهده هستند.

مهار القای آمیلوئید

مهار تجمع آمیلوئیدی در آلبومین سرم انسانی در

$pH = 1/5$ و دمای ۵۷ درجه در حضور سیلیسین

داده‌های زیادی نشان می‌دهد که ترکیبات پلی فنولیک در مهار روند فیبریلایسیون پروتئینی دخالت دارند. برای بررسی اثر ترکیبات پلی فنولیک بر روی فرایند تجمع، غلظت ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ میکرومولار سیلیسین در شرایط انکوباسیون بر روی پروتئین مذکور تاثیر داده شد.

اندازه‌گیری طیف CD در محدوده فرابنفش دور از غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پروتئین و سل با ضخامت ۰/۱ سانتی‌متر استفاده شد [۲۱].

تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره^۱

جهت مشاهده مستقیم ساختار فیبریلاری نمونه پروتئینی، روی گریدهای پوشیده از کربن (۴۰۰)، ۱۰-۵ میکرولیتر از نمونه پروتئینی قرار داده می‌شود. پس از ۴۵ ثانیه، گریدها را با آب دو بار تقطیر شسته و سپس با اورانیل استات ۲ درصد رنگ‌آمیزی انجام شده و پس از ۵-۲ دقیقه، نمونه جهت بررسی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی انتقالی آماده می‌باشد [۲۲].

یافته‌ها

القای آمیلوئید

نشر فلئورسانس تیوفلاوین T

شکل ۱ طیف نشر فلئورسانس محلول ۶۵ میکرومولار تیوفلاوین T را پیش و پس از اضافه کردن پروتئین آلبومین سرم انسانی انکوبه شده در شرایط فوق به مدت ۲۴ ساعت نشان می‌دهد. پس از برانگیختگی در طول موج ۴۵۰ نانومتر، تیوفلاوین T نشر ضعیفی را با حداکثر شدت در ۴۸۵ نانومتر در شرایط انکوبه نشده، نشان می‌دهد. تغییر قابل ملاحظه‌ای در شدت یا الگوی طیف نشری تیوفلاوین T قبل از اضافه کردن پروتئین انکوبه شده در شرایط آمیلوئیدی ایجاد نمی‌شود ولی پس از اضافه کردن پروتئین انکوبه شده در شرایط فوق، افزایش شدید شدت نشر مشاهده می‌شود.

جذب نوری کنگورد

شکل ۲ طیف جذب نوری کنگورد را در حضور و عدم حضور پروتئین عادی یا انکوبه شده در شرایط آمیلوئیدی به مدت ۲۴ ساعت نشان می‌دهد. بیشترین طیف جذبی کنگورد در طول موج ۴۹۰-۴۸۶ نانومتر است. اضافه

نمودار طیف کنگورد می‌توان مشاهده کرد. اما حضور یدی پامید موجب شدت جذب می‌گردد، که این اثر متناسب با غلظت است.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره

از میان غلظت‌های مختلف سیلیسین و یدی پامید، آن غلظت‌هایی برای تاثیر بر فرایند فیبریلایون آلبومین سرم انسانی انتخاب شدند که طیف کنگورد آنها کمترین جذب و شیفت به سمت راست را داشت (شکل ۷، ۸).

از تصاویر میکروسکوپ الکترونی مشخص است که هم سیلیسین و هم یدی پامید بر روی فرایند فیبریلایون پروتئین مذکور تاثیر داشتند، و باعث مهار تشکیل فیبریل آمیلوئیدی شدند. اما داده‌ها نشان می‌دهند که اشکال حد واسط مسیر فیبریلایون از اشکال انتهایی دارای اثرات سمی‌تری هستند. به همین جهت اثر واقعی این اشکال حد واسط بدست آمده نیاز به بررسی بیشتری دارد.

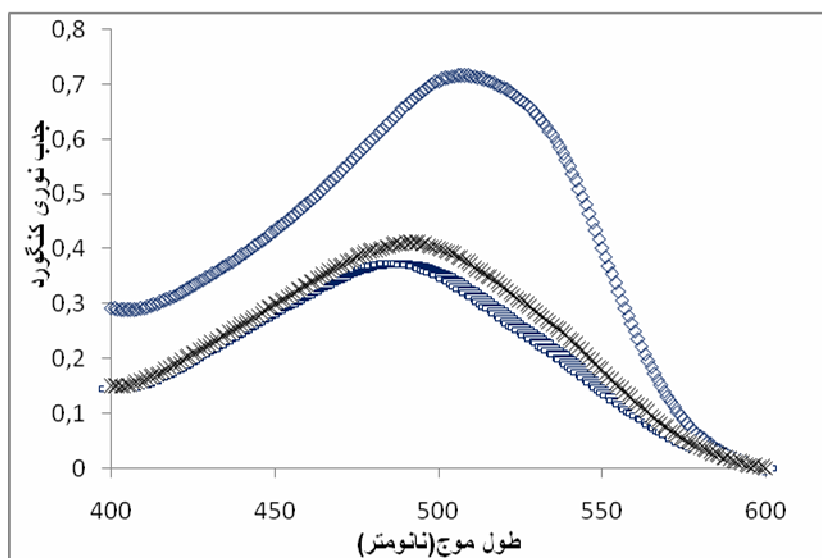
شکل ۵ طیف جذب نوری کنگورد، تاثیر غلظت‌های مختلف سیلیسین به پروتئین در دمای ۵۷ درجه و $pH=1/5$ به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون را نشان می‌دهد. در عدم حضور سیلیسین افزایش شدت نشر و شیفت به سمت قرمز را در نمودار طیف کنگورد می‌توان مشاهده کرد. اما حضور سیلیسین موجب کاهش شیفت و شدت جذب می‌گردد، که این اثر متناسب با غلظت است.

مهار تجمع آمیلوئیدی در آلبومین سرم انسانی در $pH=1/5$

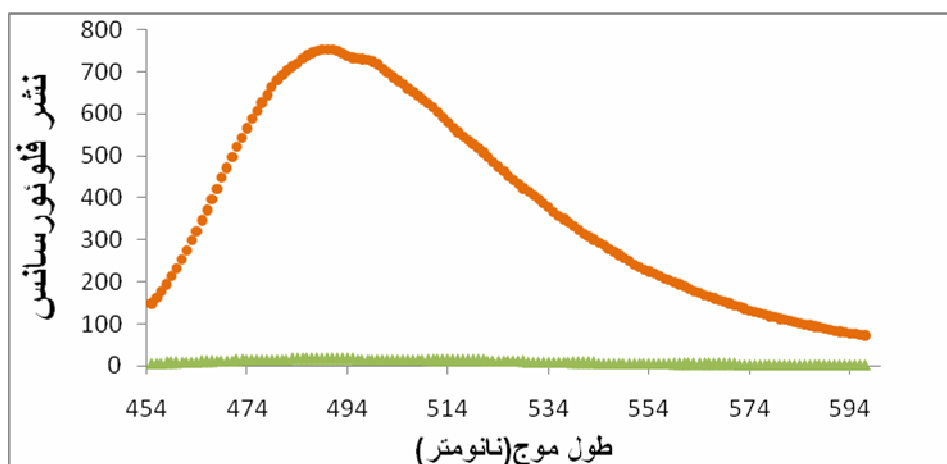
و دمای ۵۷ درجه در حضور یدی پامید

غلظت ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ میکرومولار یدی پامید بر آلبومین سرم انسانی در شرایط انکوباسیون تاثیر داده شد.

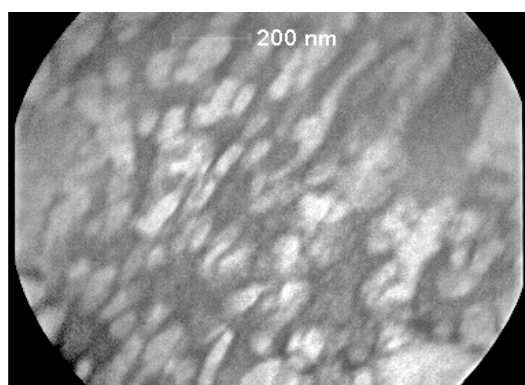
شکل ۶ طیف جذب نوری کنگورد، تاثیر غلظت‌های مختلف یدی پامید به پروتئین در دمای ۵۷ درجه و $pH=1/5$ به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون را نشان می‌دهد. در عدم حضور یدی پامید افزایش شدت جذب را در



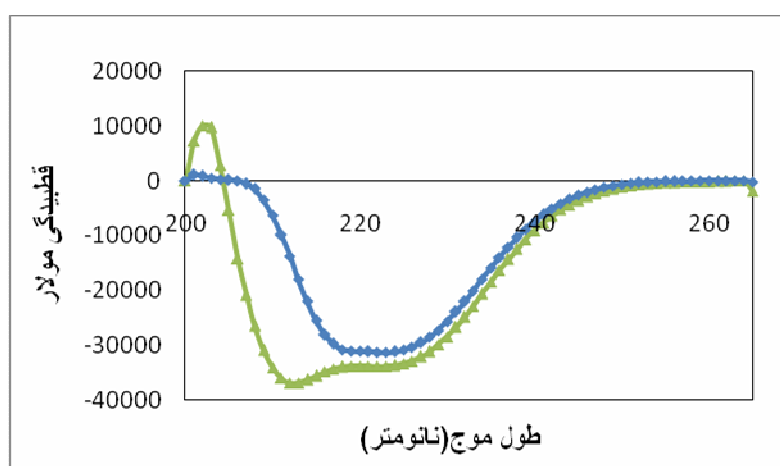
شکل ۱- طیف نشر فلورسانس تیوفلاوین T پیش (●) و پس (▲) از اضافه کردن نمونه آلبومین سرم انسانی که به مدت ۲۴ ساعت در $pH=1/5$ و دمای ۵۷ درجه سانتی گراد با غلظت ۳ میلی گرم در میلی لیتر و اتانول ۶۰٪ انکوبه شده بود.



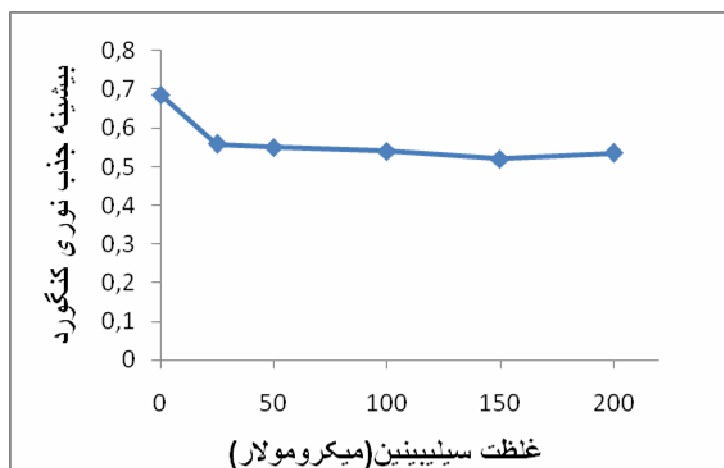
شکل ۲- طیف جذبی کنگورد (□)، پس از اضافه کردن آلبومین سرم انسانی انکوبه شده به مدت ۲۴ ساعت در $\text{pH}=1/5$ و دمای ۵۷ درجه سانتی گراد (+) و در مجاورت آلبومین سرم انسانی انکوبه نشده (□).



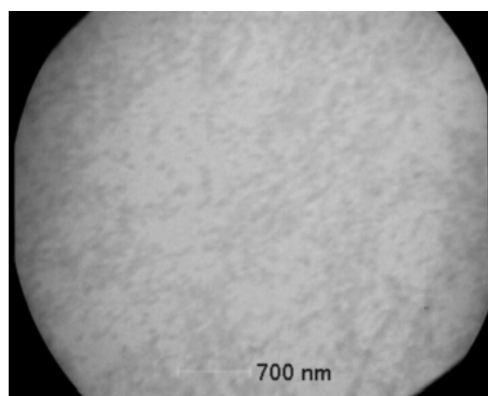
شکل ۳- طیف دورنگ نمایی دورانی آلبومین سرم انسانی در $\text{pH}=1/5$ قبل (▲) و بعد از انکوباسیون (◆) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵۷ درجه. واحد قطبیدگی مولار (الپتیسیتیته مولار) $\text{degree. cm}^2. \text{dmol}^{-1}$ است.



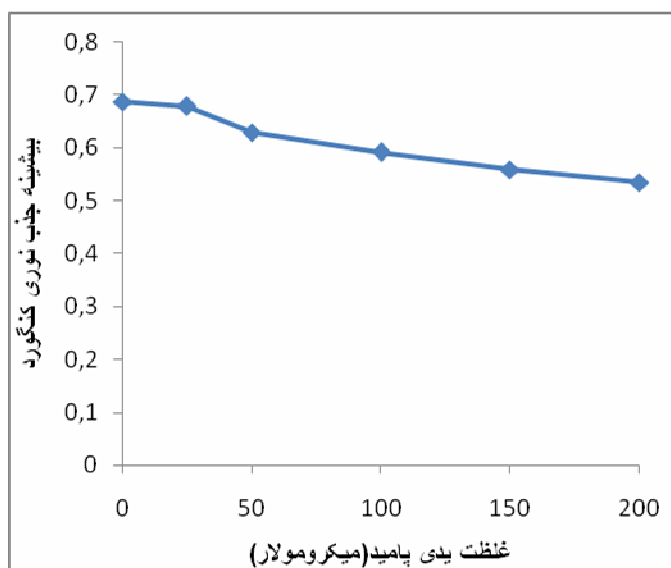
شکل ۴- تصویر میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM) آلبومین سرم انسانی انکوبه شده به مدت ۲۴ ساعت در $\text{pH}=1/5$ و دمای ۵۷ درجه سانتی گراد.



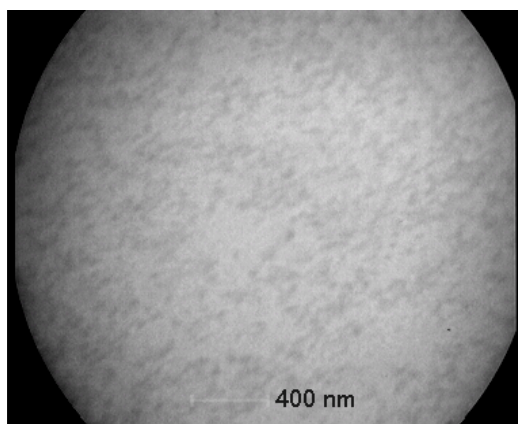
شکل ۵- تغییرات طیف جذبی کنگو رد به تنهایی (□) و در حضور آلبومین سرم انسانی انکوبه شده (+) به مدت ۲۴ ساعت در pH=۱/۵ و دمای ۵۷ درجه، طیف جذبی آلبومین سرم انسانی انکوبه شده در مجاورت ۲۵ (Δ)، ۵۰ (■)، ۱۰۰ (◆)، ۱۵۰ (▲) و ۲۰۰ (●) میکرو مولار سیلیبینین.



شکل ۶- تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره از نمونه آلبومین سرم انسانی انکوبه شده در حضور غلظت ۲۰۰ میکرومولار سیلیبینین افزوده شده بعد از ۲۴ ساعت در pH=۱/۵ و دمای ۵۷ درجه سانتی گراد.



شکل ۷- تغییرات طیف جذبی کنگورد به تنهایی (Δ) و در حضور آلبومین سرم انسانی انکوبه شده (○) به مدت ۲۴ ساعت در pH=۱/۵ و دمای ۵۷ درجه، طیف جذبی آلبومین سرم انسانی انکوبه شده در مجاورت ۲۵ (▲)، ۵۰ (×)، ۱۰۰ (◆)، ۱۵۰ (+) و ۲۰۰ (●) میکرو مولار یدی پامید.



شکل ۸- تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره از نمونه آلبومین سرم انسانی انکوبه شده در حضور غلظت ۲۰۰ میکرومولار یدی پامید افزوده شده بعد از ۲۴ ساعت در $\text{pH}=1/5$ و دمای ۵۷ درجه.

بحث

همانطور که بیان شد، پروتئین‌ها می‌توانند شرایط نامساعد شامل دمای بالا، pH پایین و حضور حلال آلی، تشکیل ساختارهای فیبریلار آمیلوئیدی بدهند. در شرایط *in vivo* افزایش بیان پروتئین، جهش‌ها و استرس‌های اکسیداتیو می‌توانند باعث تغییرات کونفورماسیون پروتئین شوند، همچنین مهار تجزیه پروتئینی وابسته به پروتئوزوم، تخریب ویزیکول‌های دوپامینرژیک، تشکیل انواع اکسیژن‌های فعال تولید خودشان را افزایش داده که باعث تخریب عملکرد میتوکندری می‌شود. همه این فاکتورها در افزایش مقدار بیان پروتئینی و یا تسهیل تشکیل پرتوفیریل و الیگو مریزاسیون آن موثرند [۵].

بین افزایش ساختار β و تجمع مولکول‌های آلبومین سرم انسانی در اثر افزایش حرارت رابطه مستقیمی وجود دارد. میزان تجمع مولکول‌های آلبومین سرم انسانی با افزایش حرارت و غلظت افزایش می‌یابد. علاوه بر حرارت، افزایش غلظت آلبومین سرم انسانی به ناپایداری مولکول مذکور کمک می‌کند. معمولاً اکثر پروتئین‌ها در حلال‌هایی که پیوند هیدروژنی تشکیل می‌دهند، حل می‌گردند. معمولاً هرچه قدرت حلال در تشکیل پیوند هیدروژنی ضعیف‌تر باشند، پیوندهای هیدروژنی درون مولکول قویتر شده و پروتئین ساختار منظم‌تری دارد [۲۳].

اکثر حلال‌های قابل حل در آب قابلیت دناتوره کردن پروتئین را دارا هستند. در غلظت‌های کم الکل‌های آلیفاتیک (۲۰-۵۰٪) به علت اتصال اجزای آب گریز حلال

با دنباله‌های آبگریز در معرض قرار گرفته پروتئین، امکان تخریب ساختار پروتئین افزایش می‌یابد. تخریب ساختار پروتئین توسط حلال‌های آلی به مقدار زیاد به غلظت و دما وابسته است. غلظت‌های کم الکل‌ها مثل اتانول و متانول، در دمای صفر درجه می‌تواند ساختار پروتئین را پایدار کند، در صورتی که در دمای بالاتر پروتئین به حالت واسرشته در می‌آید. در غلظت‌های بالای الکل و حلال‌های آلی، پروتئین‌ها رسوب می‌کنند که وجود ساختار پایدارتر پیشنهاد شده است و داده‌های CD نشان می‌دهد این ساختمان به سمت ایجاد ساختار با افزایش مقدار آلفا هلیکس می‌رود [۲۴]. آزمایش‌هایی که در مورد پایداری پروتئین‌ها در کنار الکل‌های آلیفاتیک صورت گرفته، نشان می‌دهد که در محیط آب-الکل، دمای ذوب (TM)، آنتالپی واسرشته شدن کاهش و تراکم مابین مولکول‌های پروتئینی افزایش می‌یابد [۲۵، ۲۶].

در این مطالعه نشان داده شد که افزودن اتانول ۱۰ درصد حجمی / حجمی به پروتئین فوق با غلظت ۳mg/ml در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در بافری با $\text{pH}=1/5$ ، می‌تواند تشکیل ساختارهای تجمعی دهد. افزایش مولکول‌های الکل و ایجاد تجمعاتی از آنها باعث می‌شود که قسمت‌های غیر قطبی وسیع مولکول پروتئین در معرض مولکول‌های حلال قرار بگیرد و پیوندهای درون مولکولی کمتر می‌شود. در نتیجه تغییرات مستعد کننده ساختاری در پروتئین، توانایی تشکیل فیبریل را فراهم می‌کند. عقیده بر این است که شرایط اسیدی باعث دناتوراسیون پروتئین

شده و در مرحله بعد مولکول الکل باعث تحریک تاخوردگی مجدد و تشکیل ساختارهای بتا می‌شود در واقع الکل باعث القای هرچه بیشتر ساختار فیبریلار در پروتئین می‌شود.

مجموعه گلوکز، کم آبی و تجمع اسید در خون موسوم به کتواسیدوز است که یک عامل تهدید کننده حیات به شمار آمده و بایستی فوراً درمان گردد [۲۷]. احتمال دارد که وجود pH پایین خون در افراد دیابتی بتواند زمینه را برای ایجاد تغییرات ساختاری فراهم کند، اگرچه میزان اسیدی شدن خون افراد دیابتی به اندازه‌ای نیست که در این تحقیق به کار رفته است. قابل توجه است که این ساختارها در حضور حلال آلی (اتانل) بهتر و سریعتر تشکیل می‌شوند و این نکته نشان دهنده یکی از آثار مخرب حضور چنین ترکیباتی در بدن است.

اکثر پروتئین‌های موجود در پلاک‌های تصلب شرایین در شرایط *in vivo* می‌توانند تشکیل فیبریل آمیلوئید را بدهند از جمله آپولیپوپروتئین‌ها، بتا-آمیلوئید و آلفا-آنتی تریپسین. به علاوه اکسیداسیون و اصلاحات آنزیمی لیپوپروتئین‌ها با دانسته کم باعث بازسازی ساختاری مجدد و بدست آوردن خصوصیات شبه آمیلوئیدی می‌شود. مانند گلیکته شدن آلبومین سرم انسانی در دیابت که باعث تحریک تشکیل آمیلوئید در این پروتئین می‌شود. تجمعات آمیلوئیدی که در بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی دخالت دارند، به میزان فراوانی در پلاک‌های تصلب شرایین وجود دارند که نشان دهنده نقش مهم این تجمعات در روند گسترش زخم‌های تصلب شرایین است. همچنین وجود تجمعات پروتئینی در آتروما، نشانه نقش فعال کننده ساختارهای شبه آمیلوئیدی در فعالسازی مسیر سیگنالی ماکروفاژها و ایجاد نشانه‌های پروترومبیک و التهاب می‌باشد. تحقیقات نشان داده که تجمعات آمیلوئیدی باعث تسهیل تصلب شرایین در موش می‌شوند [۲۸]. با توجه به استعداد آلبومین سرم انسانی به تشکیل فیبریل آمیلوئید، می‌توان این فرض را مطرح کرد که این مولکول نیز در گردش خون ناکارآمد و سخت شدن شریان‌ها دخیل باشد. البته جهت تایید این فرض نیاز به بررسی‌های بیشتر وجود دارد.

در مورد اثر مهارری در ترکیب سیلیسین و یدی پامید می‌توان گفت که مسطح بودن حلقه‌های آروماتیک به خاطر هندسه خاص فضایی آنها، می‌تواند برهمکنش‌های انرژی‌تیکی را فراهم بکند که جهت‌دهی و سمت و سوی مناسبی را برای تشکیل ساختارهای کوچک و منظم فیبریل آمیلوئید فراهم می‌کند، همچنین گفته شده که برهمکنش‌های آمیلوئید باعث پایداری ساختارهای آنتی پارالل بتا می‌شود [۲۹]. معمولاً ترکیبات غنی از حلقه‌های آروماتیک و ترکیبات مولکولار کوچک پلی فنولیک، مانع از مرگ سلولی در محیط کشت ناشی از اثرات سمی آمیلوئیدوژنیک می‌شوند و بعضی از این ترکیبات در شرایط *in vitro* مانع از تشکیل فیبریل آمیلوئیدی می‌شوند. چندین سازوکار برای نقش موثر پلی فنول‌ها در جلوگیری از تجمع پروتئینی بیان شده است مثلاً بعضی از پلی فنول‌ها مانند رزوراترول^۱ دارای خصوصیت بارز جاروب‌گر رادیکال آزاد در انواع مختلف سلول‌ها هستند [۳۰]. گزارش شده که سایر پلی فنول‌ها به عنوان آنتی اکسیدان بر علیه اکسید نیتریک که باعث افزایش سمیت می‌شوند، عمل می‌کنند و در کنار این، در سازوکارهای سیگنالی درون سلولی که اثر محافظت از سیستم عصبی را دارند، شرکت می‌کنند [۳۱].

معمولاً مهارکننده‌های پلی فنولی حداقل ۲ حلقه فنولیک با ۲ تا ۶ اتم اتصالی دارند که برای اتصال غیر کووالانی با ساختار بتا مورد نیاز است و معمولاً طویل سازی فیبریل آمیلوئیدی یا اتصال الیگومرها را مهار می‌کند ولی در مرحله هسته‌زایی دخالتی ندارد و با مونومرهای آمیلوئیدوژنیک برهمکنش نمی‌دهد، بلکه برهمکنش‌های آنها با ساختارهای آمیلوئیدوژنیک است. این اتصالات و برهمکنش‌ها به کونفورماسیون وابسته هستند و به ترادف پروتئینی بستگی ندارند. پیشنهاد شده که پروتئین‌هایی که دارای تریپتوفان و فنیل آلانین فراوان هستند ساختار آمیلوئیدوژنیک دارند، چون این رزیدوهای آروماتیک به جهت ساختار فضایی که دارند، جهت‌دهی اجزای پروتئینی را راحت‌تر می‌کنند و به دلیل تمایل برهمکنش پلی فنول‌ها به این رزیدوها، پیشنهاد شده که این ترکیبات می‌توانند مهار کننده‌های خوبی باشند [۳۲]. تحقیقات مربوط به تاثیر

عنوان پروتئین مدل در جهت آزمودن داروهای بالقوه ضد آمیلوئیدی استفاده کرد. قابل توجه است که جهت مشخص شدن نقش دقیق‌تر شرایط به کار گرفته شده (محیط اسیدی، دمای بالا و اتانل) و امکان تعمیم دادن این فاکتورهای مستعد کننده ایجاد آمیلوئید به محیط واقعی بدن، نیاز به مطالعات دیگر می‌باشد.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر با حمایت مالی مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است.

ترکیبات پلی فنولی بر فیبربلاسیون پروتئین‌ها می‌تواند کمک بزرگی در راستای طراحی و بهینه‌سازی مولکول‌های کوچک به عنوان دارو برای درمان بیماری‌های مرتبط با آمیلوئیدوزیز باشد. از میان ترکیبات مختلف دارای حلقه‌های آروماتیکی که در این راستا بر روی هر دو پروتئینی مذکور استفاده شد، سیلیبینین و یدی پامید در غلظت‌های بالا بیشتر از ترکیبات دیگر در مهار مسیر فیبریلوژنز هر دو پروتئین موثر بودند.

به طور خلاصه مطالعه حاضر امکان ایجاد شدن اشکال آمیلوئیدی پروتئین آلبومین را در شرایط اسیدی و در مجاورت حلال آلی (اتانل) نشان داده است؛ علاوه بر اینکه می‌توان این نتیجه را تا حدودی به شرایط واقعی بدن تعمیم داد، می‌توان از شکل آمیلوئیدی بدست آمده به

مأخذ

- Dobson, CM. The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2001; 356:133-145.
- Eanes ED, and Glenner GG. X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J Histochemistry and Cytochemistry* 1968; 16: 673-677.
- Ehud G. Inhibition of Amyloid Fibril Formation by Polyphenols: Structural Similarity and Aromatic Interactions as a Common Inhibition Mechanism. *Chemical Biology and Drug Design* 2006; 67: 27-37.
- Eledrisi MS, Alshanti MS, Shah MF, Brolosy B, Jaha N. Overview of the diagnosis and management of diabetic ketoacidosis. *American Journal of Medical Science* 2006; 331 (5): 243-51.
- Lashuel HA, Lansbury JRPT. Are amyloid disease caused by protein aggregates that mimic bacterial pore-forming toxin? *Quaternary Reviews of Biophysics* 2006; 39:167-201.
- Chiti F, Dobson CM. Amyloid formation by globular proteins under native conditions. *Nature Chemical Biology* 2009; 5: 15-22.
- Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual Review of Biochemistry* 2006; 75: 333-366.
- Chiti F, Webster P, Taddei N, Clark A, Stefani M, Ramponi G, and Dobson CM. Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007; 96: 3590-3594.
- Gorinstein S, Caspi A, Rosen A, Goshev I, Zemser M, et al. Structure characterization of human serum aprotin in solution and dry state. *Journal of Peptide Research* 2002; 59:71-78.
- Lin SY, Wei YS, Li MJ, and Wang SL. Effect of ethanol or/and captopril on the secondary structure of human serum albumin before and after protein binding. *European Journal of Pharmacy and Biopharmacy* 2004; 57:457-464.
- Arispe N. Architecture of the Alzheimer's A beta P ion channel pore. *Journal of Membrane Biology* 2004; 197:33-48.
- Azriel R, Gazit E. Analysis of the minimal amyloid-forming fragment of the islet amyloid polypeptide. An experimental support for the key role of the phenylalanine residue in amyloid formation. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276:34156-34161.
- Platt GW, McParland VJ, Kalverda AP, Homans SW, Radford SE. Dynamics in the unfolded state of beta2-microglobulin studied by NMR. *Journal of Molecular Biology* 2005; 346:279-294.
- Conte A, Pellegrini S, Tagliazucchi D. Synergistic protection of PC12 cells from beta-amyloid toxicity by resveratrol and catechin. *Brain Research Bulletin* 2003; 62:29-38.
- Lee VM. Amyloid binding ligands as Alzheimer's disease therapies. *Neurobiology of Aging* 2002; 23:1039-1042.
- Lorenzo A, Yankner BA. Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo red. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1994; 91:12243-12247.
- Poli G, Ponti W, Carcassola G, Cecilian F, Colombo L, Dall'Ara P, Gervasoni M, Giannino ML, Martino PA, Pollera C, Villa S, Salmona M. In vitro evaluation of the anti-prionic activity of newly synthesized Congo red derivatives. *Arzneimittelforschung* 2003; 53: 875-888.

18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72: 248-254.
19. Nilsson MR. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods* 2004; 34: 151-160.
20. Klunk WE, Pettegrew JW & Abraham DJ. Quantitative evaluation of Congo red binding to amyloidlike proteins with a beta-pleated sheet conformation. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1989; 37: 1273-1281.
21. Norma G. Using circular dicroirsm spectra to estimate protein secondary structure Nature Protocols, (2007) 1; 2876-2890.
22. Morshedi D., Rezaei-Ghaleh N., Ebrahim-Habibi A, Ahmadian S, Nemat-Gorgani M. Inhibition of amyloid fibrillation of lysozyme by indole derivatives-possible mechanism of action. *FEBS Journal* 2007; 274: 6415-6425.
23. Vetri V, Librizzi F, Leone M, and Militello V. Thermal aggregation of bovine serum albumin at different pH: comparison with human serum albumin. *European Biophysical Journal* 2007; 36: 717-725.
24. Taboada P, Barbosa S, Castro E, Gutie'rrrez-Pichel M, and Mosquera V. Effect of solvation on the structure conformation of human serum albumin in aqueous-alcohol mixed solvents. *Chemical Physics* 2007; 340:59-68.
25. Lin SY, Wei YS, Li MJ, and Wang SL. Effect of ethanol or/and captopril on the secondary structure of human serum albumin before and after protein binding. *European Journal of Pharmacy and Biopharmacy* 2004; 57:457-464.
26. Ahmed N. Advanced glycation endproducts role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin PR* 2005; 67: 3-21.
27. Howlett GJ, Moore KJ. Untangling the role of amyloid in atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology* 2006; 17: 541-7.
28. Zhu M, Rajmani S, Kaylor J, Han S, Zhou F, & Fink AL. The flavonoid baicalein inhibits fibrillation of alpha-synuclein and disaggregates existing fibrils. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 26846-26857.
29. Tartaglia GG, Cavalli A, Pellarin R, Caflisch A. The role of aromaticity, exposed surface, and dipole moment in determining protein aggregation rates. *Protein Science* 2004; 13: 1939-1941.
30. Gazit E. A possible role for p-stacking in self-assembly of amyloid fibrils. *FASEB Journal* 2002; 16:77-83.
31. Burley SK, Petsko GA. Aromatic-aromatic interaction: a mechanism of protein structure stabilization. *Science* 1985; 229:23-28.