

## Investigation of the Human Serum Albumin(HSA) Protein Structure Change Caused by Remained Diazinon Toxin on the Food Materials

Shahrzad Hadichegeni<sup>1\*</sup>, Bahram Goliaei<sup>2</sup>, Mehrdad Hashemi<sup>3</sup>

1- Department of Biophysics, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

2- Department of Biophysics, Institute of Biochemistry and Biophysics (IBB), Tehran University, Tehran, Iran

3- Department of Medical Genetics, Islamic Azad University, Tehran Branch of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 3 March 2015, Accepted: 10 May 2015

### Abstract

**Background:** Human serum albumin (HSA) is a soluble blood protein which can bind to small molecules (such as drugs and toxins) and transfer them within the blood circulation.

**Materials and Methods:** UV-Vis spectroscopy and FT-IR methods were used to characterize the binding properties of HSA with diazinon(the toxin of organophosphate) and to investigate the changes of protein secondary structure, respectively, in molecular level under physiological condition in two times of first and thirty five days.

**Results:** The binding constant ( $K_{\text{Diazinon-HSA}} = 3.367 \times 10^{+4} M^{-1}$ ) was have been calculated based UV-Vis spectroscopy data. In FT-IR method, the proportion of decrease in percentage of  $\alpha$ -Helix on the first day was 53.97% to 51.88%, other secondary structures increased, such as Turns from 8.49% to 10.21%,  $\beta$ -Sheet from 13.94% to 14.81%,  $\beta$ -anti from 8.2% to %8.25 and r-coils from 15.4% to % 17.24. These changes for  $\alpha$ -Helixes, Turns,  $\beta$ -Sheet,  $\beta$ - anti and random r-coils after thirty five days were 56.7% to 47.11%, 25.3% to 29.75%, 6.93% to 10.94%, 2% to 2.83% and 9.08% to 10.86%, respectively.

**Conclusion:** Since the content of protein secondary structure relates closely with its biological activity, therefore, a decrease in  $\alpha$ -helix and increase in  $\beta$ -sheet structure in the presence of diazinon at high concentration means the decrease of HSA biological activity. Our results suggest that diazinon has a relatively good binding with HSA and it could cause considerable changes in various secondary structures and likely is indicative of a unfolding of protein especially for the samples in thirty five days.

**Keywords:** Diazinon, FT-IR, Human serum albumin, UV-Vis spectroscopy

\*Corresponding Author:

Address: Department of Biophysics, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.  
Email: sharzadhadi@yahoo.com

## بررسی تغییر ساختار پروتئین آلبومین سرم انسانی در اثر باقی ماندن سم دیازینون روی مواد غذایی

شهرزاد هادی چگنی<sup>۱\*</sup>، بهرام گلیایی<sup>۲</sup>، مهرداد هاشمی<sup>۳</sup>

۱- کارشناسی ارشد، گروه بیوفیزیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران، تهران، ایران

۲- پروفیسور، گروه بیوفیزیک، مرکز بیوفیزیک و بیوشیمی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۲۰

### چکیده

**زمینه و هدف:** آلبومین سرم انسانی (HSA) یک پروتئین محلول در خون است که می‌تواند به مولکول‌های کوچک (نظیر سم‌ها و داروها) متصل شده و آن‌ها را به جریان گردش خون منتقل کند.

**مواد و روش‌ها:** طیف سنجی فرابنفش - مرئی برای مشخص کردن ویژگی‌های پیوند آلبومین سرم انسانی با دیازینون (سم ارگانوفسفره) و روش طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR) برای بررسی تغییرات ساختار دوم پروتئین در سطح مولکولی و تحت شرایط فیزیولوژی، در روز اول و سی و پنجم استفاده شدند.

**یافته‌ها:** مقدار ثابت پیوندی اتصال ( $K_{\text{Diazinon-HSA}} = 3/367 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) براساس داده‌های طیف سنجی فرابنفش - مرئی به دست آمد. در FT-IR، کاهش ساختار  $\alpha$ -Helix برای روز اول از ۵۳/۹۷ درصد بود. به ۵۱/۸۸ درصد سایر ساختارها نظیر Turns،  $\beta$ -Sheet،  $\beta$ -anti و r-coils به ترتیب از ۸/۴۹ درصد به ۱۰/۲۱ درصد، ۱۳/۹۴ درصد به ۱۴/۸۱ درصد، ۸/۲ درصد به ۸/۲۵ درصد و ۱۵/۴ درصد به ۱۷/۲۴ درصد افزایش یافتند. برای روز سی و پنجم، ساختارهای Turns،  $\alpha$ -Helix،  $\beta$ -Sheet،  $\beta$ -anti و r-coils به ترتیب از ۵۶/۷ درصد به ۴۷/۱۱ درصد، ۲۵/۳ درصد به ۲۹/۷۵ درصد، ۶/۹۳ درصد به ۱۰/۹۴ درصد، ۲ درصد به ۲/۸۳ درصد و ۹/۰۸ درصد به ۱۰/۸۶ درصد تغییر کردند.

**نتیجه گیری:** از آنجایی که محتوای ساختار دوم پروتئین ارتباط نزدیکی با فعالیت بیولوژیکی آن دارد، بنابراین کاهش ساختار  $\alpha$ -Helix و افزایش  $\beta$ -sheet در غلظت‌های بالای دیازینون به معنی کاهش فعالیت بیولوژیکی HSA است. نتایج ما بیان می‌کنند که دیازینون پیوند نسبتاً خوبی با HSA دارد و تغییرات قابل توجهی در ساختارهای متنوع دوم ایجاد می‌کند که احتمالاً سبب واسرشتگی پروتئین به خصوص نمونه‌های روز سی و پنجم می‌شود.

**واژگان کلیدی:** دیازینون، FT-IR، آلبومین سرم انسانی، طیف سنجی فرابنفش - مرئی

\* نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران، گروه بیوفیزیک

## مقدمه

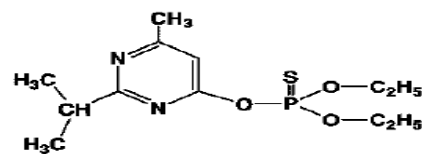
بسیاری از مواد و سم‌زدایی ضروری است (۸) و از نظر ساختاری سه دومین IA، IB، IIA در ناحیه سر دارد و بخش دم که کشیده تر و شل تر است دارای سه زیر دومین IIB، IIA، IIB است. هم‌چنین دو دسته جایگاه I و II دارد؛ جایگاه I که شامل دومین I و بخشی از دومین II است می‌تواند به لیگاندهای مختلف متصل شود (۹). لیگاندها نقش به‌سزایی در تغییرات ساختار فضایی مولکول آلبومین دارند که با اتصال به جایگاه‌های مختلف آلبومین منتقل می‌شوند و این تغییرات همراه با تغییرات ساختار دوم پروتئین روی می‌دهند (۱۰، ۱۱).

بر اساس اعلام مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی، هر ماده غذایی کشت شده دارای مرز بیشینه مانده (MRL) آفت کش یعنی بالاترین غلظت مانده یک ماده شیمیایی است که بر طبق قانون می‌تواند در یک ماده غذایی وجود داشته باشد تا آن ماده غذایی مورد قبول یا مجاز شناخته شود که به طور معمول برحسب میلی‌گرم بر کیلوگرم قسمت در میلیون بیان می‌شود. مرز بیشینه برخی محصولات که با دیازنیون سم پاشی شده‌اند به صورت ذیل گزارش شده است: برنج (۱/۱ قسمت در میلیون)، خرما (۵/۰ قسمت در میلیون)، مرکبات (۷/۰ قسمت در میلیون)، شوید، کرفس و رازیانه (۵ قسمت در میلیون) از این رو، طبق تحقیقات و پژوهش‌های حاضر و در راستای کاربردی نمودن این پژوهش، اثر سم دیازنیون بر اساس مقدار واقعی باقیمانده آن روی محصولات کشاورزی به همراه آلبومین سرم انسانی و چگونگی تغییرات ساختار آن در غلظت ثابت پروتئین و غلظت‌های متفاوت این سم برای روز اول و حدوداً بیش از یک ماه باقی ماندن آن در بدن تحت شرایط فیزیولوژی شبیه‌سازی شده بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، محلول پروتئین آلبومین سرم انسانی از شرکت سیگما با ۲۰ درصد وزن حجمی به مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و وزن مولکولی ۶۶۵۰۰ دالتون خریداری شد. جهت انجام

امروزه، تجمع سموم در غذا، آب، خاک و هوا از مهم‌ترین موضوعات در زمینه سلامت انسان و محیط زیست است. تجمع سموم در بدن با تماس مستقیم یا غیر مستقیم سموم از طریق غذا، تنفس یا جذب از راه پوست اتفاق می‌افتد. از طرفی، طیف وسیعی از این مسمومیت‌های حاد از طریق آفت‌کش‌ها، به ویژه ترکیبات ارگانو فسفره ایجاد می‌شود (۱). دیازنیون یکی از پرکاربردترین حشره‌کش‌های ارگانو فسفره با فرمول شیمیایی  $C_{12}H_{21}N_2O_3PS$  است. مکانیسم اصلی این سم، مهار آنزیم استیل کولین استراز می‌باشد که در نهایت سبب آسیب به اعصاب مرکزی و محیطی می‌شود. این ترکیبات از طریق فسفریلاسیون اسید آمینه سرین در جایگاه فعال آنزیم کولین استراز موجب غیر فعال شدن این آنزیم و عدم هیدرولیز استیل کولین شده و با تجمع آن در سیناپس‌های سیستم عصبی مرکزی و محیطی موجب تحریک بیش از حد سیناپس‌های کولینرژیک نیکوتینی و موسکارینی می‌شوند (۲). مطالعات بیان می‌کنند که سموم ارگانو فسفره تا دو ماه پس از برداشت محصول در نمونه‌ها قابل شناسایی هستند (۳). با این وجود، این سموم در اکثر پژوهش‌ها بلافاصله پس از برداشت محصول اندازه‌گیری می‌شوند (۴). این حشره‌کش‌ها از طریق پوست، سیستم گوارش و مسیر هوایی (تبخیر) جذب شده و عمدتاً از راه کلیه دفع می‌شوند (۵).



شکل ۱. ساختار دیازنیون

از طرفی یکی از پروتئین‌های مهم تشکیل دهنده پلاسمای خون آلبومین سرم انسانی است که در انتقال، توزیع و متابولیسم بیشتر لیگاندهای آگروژن و اندوژن دخالت دارد. غلظت پروتئین آلبومین خارج سلولی در پلاسمای انسانی بیشتر از ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۰/۶ میلی‌مولار) است (۶، ۷). حضور آلبومین جهت سوخت و ساز

درصد از طریق حلال استونیتریل به غلظت ۹ میلی مولار یا ۲۷۳۹ قسمت در میلیون یا رقیق شد. سپس، مطابق جدول ۱ یازده غلظت اصلی از آن تهیه شد. (منظور از D در جدول، سم دیازینون است).

آزمایش‌ها براساس شبیه سازی محیط فیزیولوژی بدن، استوک پروتئین آلبومین سرم انسانی با غلظت ۳۰ میلی گرم بر میلی لیتر یا ۴۰ میلی مولار از طریق بافر فسفات ۵۰ میلی مولار، رقیق شد. پودر سم دیازینون نیز با درجه خلوص ۹۶

جدول ۱. مقدار یازده غلظت دیازینون جهت انجام آزمایش‌ها

شماره سم دیازینون	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11
برحسب قسمت در میلیون میلی مولار	۰/۱	۰/۵	۱	۱/۵	۲	۲/۵	۳	۳/۵	۴	۴/۵	۵
	۰/۰۰۰۳۲۸	۰/۰۰۱۶۴	۰/۰۰۳۲۸	۰/۰۰۴۹۲	۰/۰۰۶۵۷	۰/۰۰۸۲۱	۰/۰۰۹۸۵	۰/۰۱۱۵	۰/۰۱۳۴	۰/۰۱۴۷	۰/۰۱۶۴

ltd) با دو سل از جنس کوارتز به طول یک سانتی متر کشیده شدند. طیف اصلی در محدوده ۲۵۰ تا ۲۹۰ نانومتر مد نظر است. ولی با افزایش طول موج به ۲۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر، امکان بررسی سایر طیف‌ها نیز فراهم شد. از آن جایی که غلظت محلول‌های تهیه شده بالا بود، کلیه محلول‌ها قبل از طیف‌گیری رقیق شدند.

این نسبت جهت طیف‌گیری پروتئین آزاد به ۰/۲ میلی گرم بر میلی لیتر می‌رسد که معادل ۶ میکرو لیتر (۱۰<sup>-۶</sup> × ۲/۵ مولار) از محلول استوک اولیه آلبومین سرم انسانی برداشته می‌شود و با بافر فسفات سالین به حجم یک میلی لیتر می‌رسند. از سایر محلول‌های کمپلکس (پروتئین-دیازینون) نیز به همان نسبت ۶ میکرو لیتر از محلول اولیه با بافر فسفات در pH = ۷/۴ رقیق شده، سپس طیف‌گیری انجام می‌گیرد.

#### طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR):

در طیف‌گیری FT-IR از دستگاه Thermo Nicolet استفاده شد و برای انجام مراحل تجربی بخش FT-IR، روش خشک کردن محلول روی قرص به کار گرفته شد (۱۲، ۱۳). محدوده طیف‌ها نیز در ناحیه ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ نانومتر در نظر گرفته شد. تعداد اسکن‌ها بین ۱۰۰ تا ۵۰۰ اسکن (مینیمم ۱۰۰ اسکن) بود و قدرت تفکیک R=۴ مناسب در نظر گرفته شد. برای بهینه سازی آزمون، طیف‌گیری پس از گذشت مدت زمان مشخص و با ثابت بودن غلظت پروتئین انجام گرفت. در این پژوهش شناسایی

جهت نگهداری محلول‌های کمپلکس پروتئین آلبومین سرم انسانی با سم دیازینون به خصوص نمونه‌های روز یک، از دو پودر EDTA با غلظت یک میلی مولار به مقدار ۰/۳۱۲۴۸ گرم و پودر سدیم آزاید (NaN<sub>3</sub>) یک دهم میلی مولار به مقدار ۰/۰۰۵۴۶ گرم استفاده شد و از طریق بافر فسفات به صورت محلول تهیه شد و مورد استفاده قرار گرفت. pH تمامی محلول‌ها ۷/۴ بود و آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شدند. نمونه‌های گروه اول همان روز مورد آزمایش قرار گرفتند و نمونه‌های گروه دوم به مدت سی و پنج روز تحت دمای ۳۷ درجه به دور از نور انکوبه شدند. اثر سم دیازینون پس از گذشت این دوره بر پروتئین آلبومین سرم انسانی بررسی شد و یافته‌ها از نظر تغییرات ساختاری تحلیل شدند.

#### مواد و روش‌ها

در این پژوهش، از دو روش مطالعه بیوفیزیکی طیف سنجی مرئی-فرابنفش (UV-Vis) و طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR) استفاده شد.

#### طیف سنجی مرئی-فرابنفش

نمودارهای گزارش شده در این بررسی از طریق دستگاه طیف سنج فرابنفش - مرئی دو پرتوئی مارک (T90 + UV/Vis Spectromert PG Instruments)

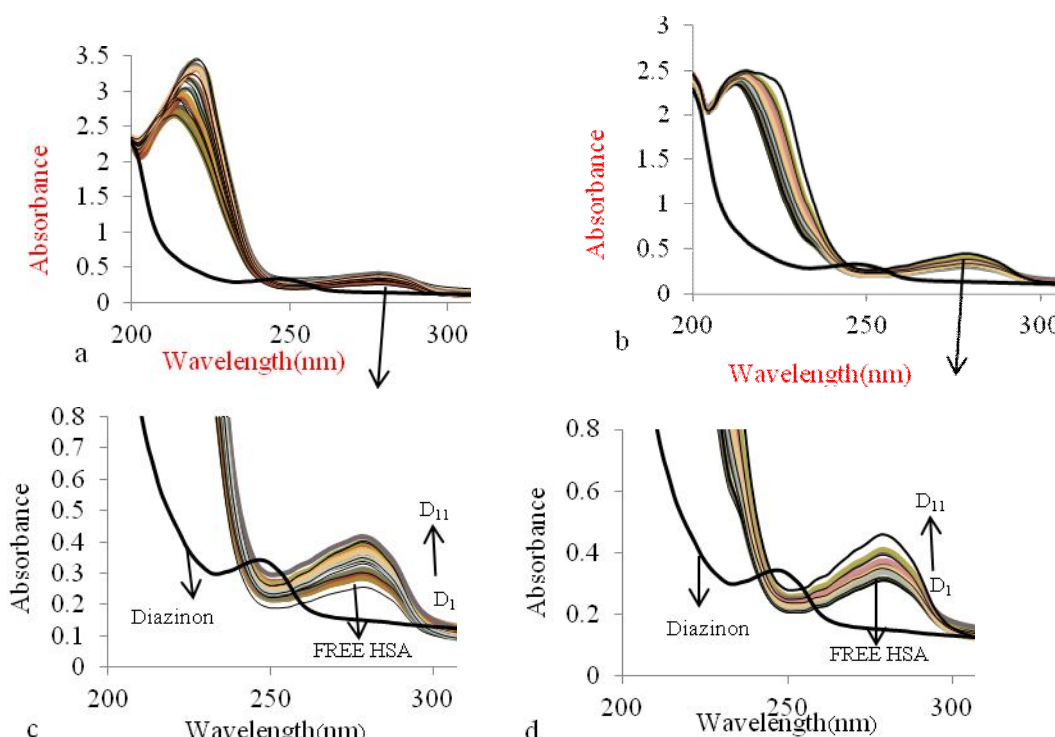
و ارتعاشات کششی C-N (۱۸ تا ۴۰ درصد) می‌باشد (۱۴)، (۱۵). در این تحقیق، ناحیه آمید I مد نظر است.

### یافته ها

#### طیف سنجی فرابنفش - مرئی میزان جذب

نور پروتئین از طریق ریشه تریپتوفان ۲۱۴-Trp تعیین می‌گردد. آلبومین سرم انسانی تنها یک تریپتوفان در مولکول پروتئین خود دارد، به همین جهت خاصیت جذب نوری در آن کمتر از سایر پروتئین‌ها می‌باشد. پیک جذب آلبومین سرم انسانی به طور معمول در طیف ۲۷۸/۵ تا ۲۷۹ نانومتر مشاهده می‌شود. شکل ۲ نمودارهای اسکن پروتئین آلبومین سرم انسانی با لیگاند (سم دیازینون) را برای نمونه‌های روز اول و سی و پنجم، نشان می‌دهد.

فرمول شیمیایی ماده حاصل ملاک عمل نیست، چرا که انجام آن مستلزم آزمایش‌های تکمیلی نظیر NMR می‌باشد و هدف اصلی، توجه به ساختمان دوم پروتئین آلبومین سرم انسانی و تغییرات حاصل از نظر درصد کنفورماسیون ساختار دوم می‌باشد. از این رو، ناحیه دو باند طیفی آمید I و II مهم‌ترین طیف‌های به دست آمده از FT-IR هستند که به ترتیب باند آمید I (در ناحیه  $1700-1600 \text{ cm}^{-1}$ ) عمدتاً مربوط به ارتعاشات کششی C=O (۷۰ تا ۸۵ درصد) و به طور مستقیم وابسته به شکل ساختار اصلی و تشکیل پیوند هیدروژنی می‌باشد و باند آمید II (در ناحیه  $1580 \text{ cm}^{-1}$ ) ناشی از ارتعاشات خمشی N-H (۴۰ تا ۶۰ درصد)



شکل ۲. نمودار اسکن UV-Vis (لیگاند دیازینون با پروتئین آلبومین سرم انسانی) در غلظت‌های سه بار تکرار از D1 تا D11 (۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ قسمت در میلیون)، و بافر PBS با pH=۷/۴ برای روز یک (c) و روز سی و پنج (d)، بزرگ‌نمایی طول موج ۲۸۰ نانومتر به دو شکل روز یک (a) و روز سی و پنج (b) در طول موج ۲۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر

$A_0$  و جذب کمپلکس‌های مختلف در حضور لیگاند دیازینون A یعنی  $A_{D1}$  را محاسبه کنیم و نمودار آن را مطابق شکل ۳ رسم کنیم. در نمودار، محور افقی X نماینده عکس

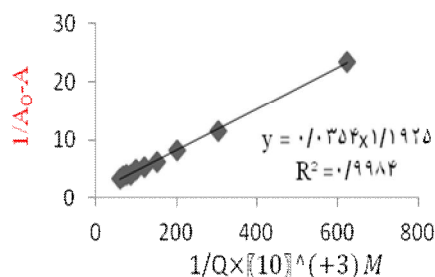
برای به دست آوردن ثابت پیوندی یا مقدار عددی میزان اتصال لیگاند به پروتئین لازم است تفاوت مقادیر مقدار جذب پروتئین بدون حضور لیگاند دیازینون

### نتایج FT-IR:

هدف اصلی ما در این روش، بررسی اثر سم دیازینون به عنوان یک ماده شیمیایی بر ساختارهای دوم آلبومین سرم انسانی به خصوص در باز شدن تا خوردگی  $\alpha$ -Helix کنفورماسیون اصلی آلبومین سرم انسانی است. برای جمع آوری اطلاعات ساختاری پروتئین، روش انطباق منحنی مد نظر است. انواع ساختارهای دوم شرکت کننده در پروتئین به کمک نرم افزار Jasco Omnic شناسایی شده و تغییرات ایجاد شده در هر یک از ساختارها، پس از اینترکشن سم دیازینون با پروتئین آلبومین سرم انسانی، با استفاده از طیف‌های جذبی FT-IR مورد بررسی قرار می‌گیرد. لازم به ذکر است که ناحیه آمید I  $1700\text{cm}^{-1}$  - $1600$  بیشتر مورد توجه است. جداول ۲ و ۳ درصد تغییرات ساختارهای دوم پروتئین آزاد را بعد از اینترکشن با دیازینون و پس از تحلیل داده‌ها به ترتیب برای نمونه‌های روز اول و روز سی و پنجم نشان می‌دهد.

مقادیر غلظت اولیه لیگاندها (Q) بر حسب میلی مولار و محور عمودی Y نمایش عکس تفاوت جذب  $A_0 = -A$  در حضور و عدم حضور لیگاند دیازینون می‌باشد. از تقسیم عرض از مبدا نمودار به شیب نمودار مقدار ثابت تشکیل یا ثابت پیوندی ( $K_a$ ) به دست می‌آید.

$$(K_a = 3/367 \times 10^4 \text{ M}^{-1})$$



شکل ۳. نمودار نقاط  $A - 1/A_0$  (محور عمودی) و  $1/[Q]$  (محور افقی) برای آلبومین سرم انسانی با غلظت‌های متفاوت دیازینون در  $\text{pH}=7/4$

جدول ۲. درصد ساختار دوم پروتئین آلبومین سرم انسانی در حضور دیازینون برای نمونه‌های روز یک، طیف حاصل از FT-IR

نوع ساختار	ناحیه	HAS آزاد	کمپلکس HSA +D <sub>1</sub>	کمپلکس HSA +D <sub>3</sub>	کمپلکس HSA +D <sub>5</sub>	کمپلکس HSA +D <sub>6</sub>	کمپلکس HSA +D <sub>7</sub>
$\alpha$ -helix	۱۶۵۰-۱۶۶۵	%۵۷/۹۷	%۵۳/۶۳	%۵۳/۵۲	%۵۳/۰۴	%۵۲/۶۳	%۵۱/۹۲
$\beta$ -sheet	۱۶۱۴-۱۶۳۷	%۱۳/۹۴	%۱۵/۶۳	%۱۲/۲۱	%۱۳/۷۹	%۱۵/۶۳	%۱۲/۵۱
r-coil	۱۶۳۸-۱۶۴۹	%۱۵/۴	%۱۴/۰۵	%۱۵/۸۷	%۱۵/۹۷	%۱۴/۰۵	%۱۵/۷
Turn	۱۶۶۵-۱۶۸۳	%۷/۹۵	%۱۰/۳۵	%۸/۵۷	%۸/۵	%۱۰/۳۵	%۱۱/۷۴
$\beta$ -anti	۱۶۸۴-۱۶۹۵	%۸/۲	%۷/۵	%۹/۸۳	%۸/۷۵	%۷/۵	%۸/۲

ادامه جدول ۲

نوع ساختار	ناحیه	کمپلکس HSA +D <sub>8</sub>	کمپلکس HSA +D <sub>11</sub>
$\alpha$ -helix	۱۶۵۰-۱۶۶۵	%۵۱/۵۴	%۴۶/۹۲
$\beta$ -sheet	۱۶۱۴-۱۶۳۷	%۱۶/۶۷	%۱۷/۲۴
r-coil	۱۶۳۸-۱۶۴۹	%۱۴/۶۶	%۱۵/۰۲
Turn	۱۶۶۵-۱۶۸۳	%۹/۴۷	%۱۲/۵۳
$\beta$ -anti	۱۶۸۴-۱۶۹۵	%۷/۷	%۸/۳

۱۰/۲۱ درصد، ۱۳/۹۴ درصد به ۱۴/۸۱ درصد، ۸/۲ درصد به ۸/۲۵ درصد و ۱۵/۴ درصد به ۱۷/۲۴ درصد افزایش یافتند.

نسبت درصد کاهش ساختار  $\alpha$ -Helix برای روز یک از ۵۳/۹۷ درصد به ۵۱/۸۸ درصد بود. سایر ساختارها نظیر Turn،  $\beta$ -Sheet،  $\beta$ -anti و r-coil نیز به ترتیب از ۸/۴۹ درصد به

جدول ۳. درصد ساختار دوم پروتئین HSA در حضور دیازینون برای نمونه های روز سی و پنج، طیف حاصل از FT-IR

نوع ساختار	ناحیه	HAS آزاد	کمپلکس HSA +D <sub>1</sub>	کمپلکس HSA +D <sub>2</sub>	کمپلکس HSA +D <sub>3</sub>	کمپلکس HSA +D <sub>4</sub>	کمپلکس HSA +D <sub>5</sub>
$\alpha$ -helix	۱۶۵۰-۱۶۶۵	%۵۶/۷	%۵۶/۰۷	%۵۴/۱۸	%۵۴/۲۴	%۵۴/۰۵	%۵۰/۱۶
$\beta$ -sheet	۱۶۱۴-۱۶۳۷	%۶/۹۳	%۸/۴۹	%۹/۰۷	%۶/۶۴	%۵/۷۳	%۹/۰۹
r-coil	۱۶۳۸-۱۶۴۹	%۹/۰۸	%۴/۲۹	%۵/۷۴	%۱۵/۷۷	%۱۵/۶۸	%۱۳/۱۴
Turn	۱۶۶۵-۱۶۸۳	%۲۵/۳	%۳۷/۹	%۲۸/۸۵	%۲۰/۹۳	%۲۲/۲۷	%۲۳/۴۷
$\beta$ -anti	۱۶۸۴-۱۶۹۵	%۲	%۳/۲۸	%۲/۱۵	%۲/۴۱	%۲/۳۷	%۴/۱۳

نوع ساختار	کمپلکس HSA+D <sub>6</sub>	کمپلکس HSA+D <sub>7</sub>	کمپلکس HSA+D <sub>8</sub>	کمپلکس HSA+D <sub>9</sub>	کمپلکس HSA+D <sub>10</sub>	کمپلکس HSA+D <sub>11</sub>
$\alpha$ -helix	%۴۹/۰۸	%۴۷/۵۸	%۴۳/۵۵	%۴۳/۴۳	%۳۸/۹۵	%۲۶/۹۵
$\beta$ -sheet	%۸/۴۱	%۷/۳۳	%۵/۱۱	%۴/۳۲	%۳۹/۶۳	%۹/۶
r-coil	%۱۲/۵۸	%۶/۲۹	%۴/۸۵	%۱۱/۳	%۱۳/۹۳	%۶/۸۱
Turn	%۲۸/۴۷	%۵۳/۱۴	%۴۳/۷۶	%۳۷/۸۳	%۷/۴۹	%۵۲/۱۲
$\beta$ -anti	%۱/۵	%۳/۶۶	%۳/۷۵	%۳/۱۲	%۲	%۴/۵۲

همان طور که در جدول ۴ مشاهده می شود، اختلاف تغییرات ساختاری پروتئین برای نمونه های روز سی و پنج بیشتر است.

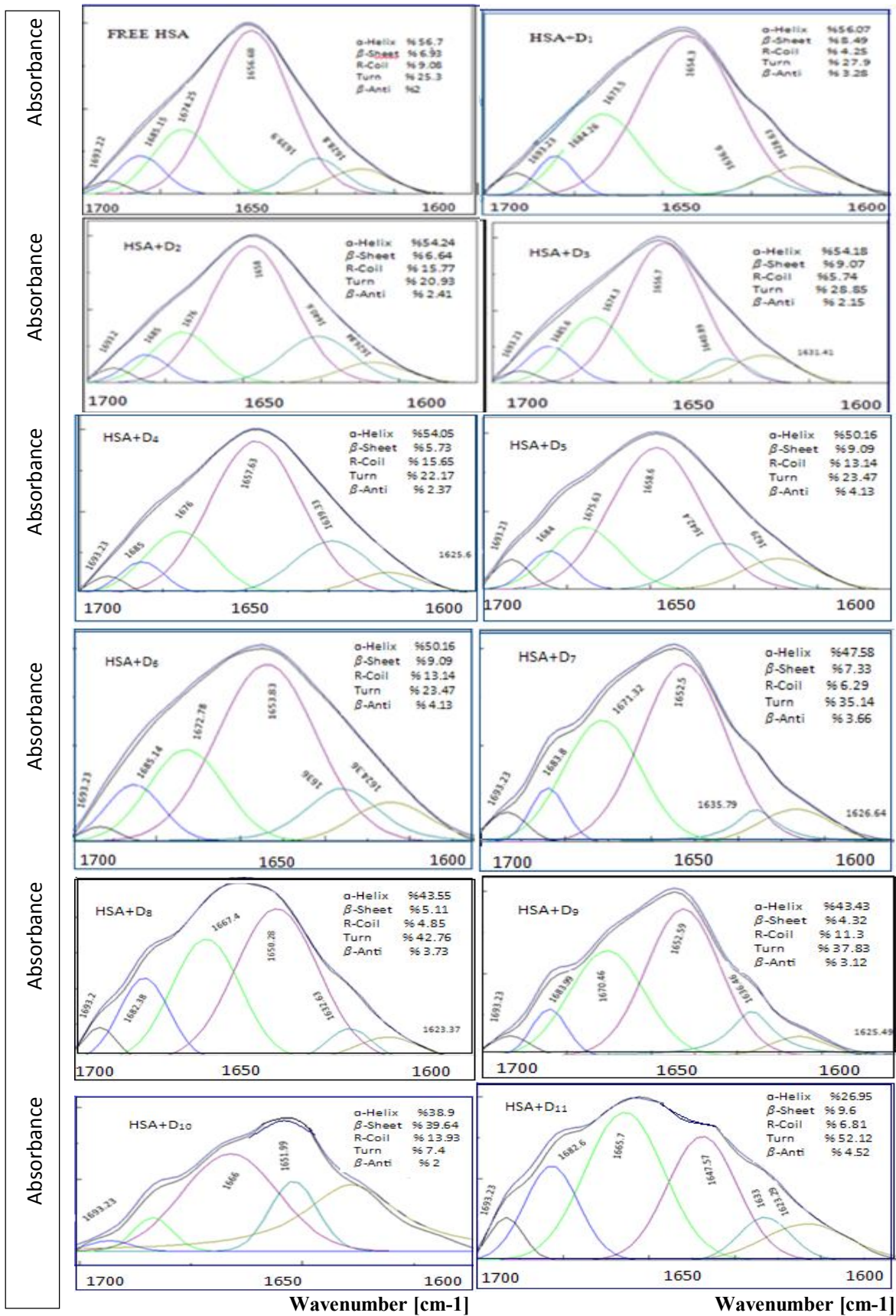
جدول ۴. مقایسه درصد مجموع ساختارهای دوم تغییر یافته کل نمونه های روز یک با پروتئین آزاد

نوع ساختار دوم	HSA آزاد	کمپلکس دیازینون+HSA	اختلاف درصد ساختار تغییر یافته کمپلکس نسبت به پروتئین آزاد
$\alpha$ -helix	%۵۳/۹۷	%۵۱/۸۸	%۲/۰۹
$\beta$ -sheet	%۱۳/۹۴	%۱۴/۸۱	%۰/۸۷
r-coil	%۱۵/۴	%۱۷/۲۴	%۱/۸۴
Turn	%۸/۴۹	%۱۰/۲۱	%۱/۷۲
$\beta$ -anti	%۸/۲	%۸/۲۵	%۰/۰۵

جدول ۵. مقایسه درصد مجموع ساختارهای دوم تغییر یافته کل نمونه های روز سی و پنج با پروتئین آزاد

نوع ساختار دوم	HSA آزاد	کمپلکس دیازینون+HSA	اختلاف درصد ساختار تغییر یافته کمپلکس نسبت به پروتئین آزاد
$\alpha$ -helix	%۵۶/۷	%۴۷/۱۱	%۹/۵۹
$\beta$ -sheet	%۶/۹۳	%۱۰/۹۴	%۴/۰۱
r-coil	%۹/۰۸	%۱۰/۸۶	%۱/۷۸
Turn	%۲۵/۳	%۲۹/۷۵	%۴۵/۴۵
$\beta$ -anti	%۲	%۲/۸۳	%۰/۸۳

درصد ساختار  $\alpha$ -Helix برای روز سی و پنج از ۵۶/۷ درصد به ۴۷/۱۱ درصد کاهش داشت، سایر ساختارها نیز نظیر Turn از ۲۵/۳ درصد به ۲۹/۷۵ درصد،  $\beta$ -Sheet از ۶/۹۳ درصد به ۱۰/۹۴ درصد،  $\beta$ -anti از ۲ درصد به ۲/۸۳ درصد و r-coil از ۹/۰۸ درصد به ۱۰/۸۶ درصد افزایش نشان دادند. تغییرات نواحی کنفورماسیون پروتئین نمونه های روز سی و پنج بیشتر بوده است. این نواحی پروتئین ساختار دوم خود را به وضوح از دست داده اند. شکل ۴ نواحی کنفورماسیون پروتئین آزاد و نواحی کنفورماسیون تغییر یافته پروتئین در حضور سم دیازینون را برای تمامی غلظت های مورد آزمایش سم دیازینون (۱۱ غلظت) در روز سی و پنج نشان می دهد. در جداول ۴ و ۵ نیز مقایسه ای کلی بین میانگین تغییرات هر ساختار دوم پروتئین تمامی کمپلکس ها در غلظت های جواب گرفته با پروتئین آزاد برای نمونه های روز اول و سی و پنجم صورت گرفته است تا در یک نگاه کلی اختلاف درصد تغییر ساختارها مشخص شود.



شکل ۴. نمودارهای نواحی کنفورماسیون ساختارهای دوم پروتئین آزاد و کمپلکس (پروتئین + سم دیازینون) (برای تمامی یازده کمپلکس روز سی و پنج)

شکل ۴. نواحی کنفورماسیون پروتئین آزاد و تغییر یافته در روز سی و پنج



## بحث

غیراشباع داخل سلول می‌شود (۱۷). مشابه همین پژوهش در سال ۲۰۱۱ نیز اثر سم تیاکلورپرید بر پروتئین آلبومین سرم انسانی توسط محققان بررسی شد و تغییر ساختار دوم پروتئین تأیید گشت (۱۹). این مطالعه هم‌چنین نشان داده که قرار گرفتن در معرض حشره کش‌هایی نظیر دیازینون موجب بروز مشکلات بیشتری در آلبومین سرم انسانی در بلند مدت می‌شود.

از طرفی، تجزیه و تحلیل ساختاری لیگاندهای متصل به آلبومین سرم انسانی می‌تواند ما را در طراحی منطقی این پروتئین با تکیه بر تغییر در قابلیت اتصال لیگاندها از جمله اصلاح ساختاری ترکیبات و یا ویرایش اسیدهای آمینه جهت تنظیم و هدایت آن‌ها یاری دهد (۲۰، ۲۱).

بر اساس پژوهش حاضر، اثر نامطلوب سم دیازینون حتی در مقدار مجاز باقیمانده آن در مواد غذایی با غلظت‌های اندک هم به خوبی مشهود است و این هشدار برای مقادیر مشاهده شده به مراتب بیشتر از حد مجاز استاندارد باقیمانده سم است که چشم پوشی از آن به معنی پذیرفتن مرگ خاموش انسان هاست.

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان از زحمات اساتید ارجمند جناب آقای دکتر محمد تقی زاده و دکتر فرشته تقوی که درایت علمی ایشان منجر به نتیجه مطلوب این پژوهش شد و هم‌چنین از زحمات کلیه افراد شاغل در مرکز تحقیقات کشاورزی استان تهران و لرستان که با در اختیار گذاشتن اطلاعات لازم ما را در انجام این پژوهش یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌نمایند.

## منابع

1. Ibrahim NA, El-Gamal BA. Effect of diazinon, an organophosphate insecticide, on plasma lipid constituents in experimental animals. *BMB Reports*. 2003;36(5):499-504.
2. Shadnia S, Azizi E, Hosseini R, Khoei S, Fouladdel S, Pajoumand A, et al. Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in

ثابت پیوندی به دست آمده ( $K_D = 3.367 \times 10^{-4} M^{-1}$ ) حاکی از برهم کنش نسبتاً خوب آلبومین سرم انسانی با سم دیازینون است. از طرفی افزایش جذب در طیف سنجی فرابنفش - مرئی حاکی از تغییر ساختار فضایی و ناپایداری پروتئین به خصوص برای نمونه‌های روزی و پنج است. براساس مقایسه‌ی تغییر کنفورماسیون پروتئین آزاد در برهم کنش با لیگاند دیازینون برای روز اول و سی و پنجم در تکنیک FT-IR، مشخص شد که تغییرات روند منظمی را دنبال کرده است، در هر دو روز، بالاترین نسبت تغییر مربوط به ساختار  $\alpha$ -Helix می‌باشد که از محتوای ساختارهای مارپیچ آلفا در آلبومین سرم انسانی کاسته شده و بر عکس به محتوای ساختارهای صفحات بتا و ساختارهای نامنظم آن افزوده می‌شود. از آنجایی که محتوای ساختار دوم پروتئین رابطه نزدیکی با فعالیت بیولوژیکی آن دارد، از این رو کاهش میزان ساختارهای مارپیچ آلفای آلبومین سرم انسانی به معنی کاهش فعالیت بیولوژیکی آلبومین سرم انسانی بعد از برهم کنش با دیازینون است. تغییرات احتمالی نمونه‌های مورد آزمایش در روز سی و پنج بیشتر بوده است. در هر دو روش طیف سنجی فرابنفش - مرئی و طیف سنجی FT-IR، شکل و ساختار پروتئین با افزایش غلظت سم دیازینون تغییر کرده است.

هر چند بدن انسان با سیستم‌های دفاعی هم‌چون فرایند سم‌زدایی از طریق آنزیم‌های مختلف تجهیز شده است، ولی مواجهه طولانی با این ترکیبات منجر به بیماری‌زایی و ایجاد سرطان می‌شود (۱۶، ۱۷). مطالعاتی که وستر و همکاران در سال ۱۹۹۳ بر روی انسان انجام دادند، جذب پوستی سم دیازینون را ۳۴ درصد دوز مصرفی اعلام نمودند (۱۸). گارفیت در تحقیقات مربوط به حیوانات اظهار کرد که دیازینون با تولید رادیکال آزاد موجب تغییرات ساختمانی در پروتئین‌های سلول و هم‌چنین پراکسیداسیون چربی‌های

- organophosphorus insecticide formulators. *Human & experimental toxicology*. 2005;24(9):439-45.
3. Luty S, Latuszynska J, Halliop J, Tochman A, Obuchowska D, Przylepa E, et al. Toxicity of dermally absorbed dichlorvos in rats. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 1998;5:57-64.
  4. Gupta RC. *Toxicology of organophosphate & carbamate compounds*: Academic Press; 2011.
  5. Zama D, Meraihi Z, Boubekri N, Amrani A, Tebibel S, Baali N. Assessment of the changes in some diagnostics enzymes and other parameters in wistar albinorats treated with pesticides during gestation. *Sciences & Technologie C*. 2005(23):51-6.
  6. Peters Jr T. *All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications*: Academic press; 1995.
  7. Sugio S, Kashima A, Mochizuki S, Noda M, Kobayashi K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein engineering*. 1999;12(6):439-46.
  8. Vannoy CH, Leblanc RM. Effects of DHLA-capped CdSe/ZnS quantum dots on the fibrillation of human serum albumin. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2010;114(33):10881-8.
  9. Rinco O, Brenton J, Douglas A, Maxwell A, Henderson M, Indrelie K, et al. The effect of porphyrin structure on binding to human serum albumin by fluorescence spectroscopy. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2009;208(2):91-6.
  10. Wang Y-Q, Zhang H-M, Zhou Q-H. Studies on the interaction of caffeine with bovine hemoglobin. *European journal of medicinal chemistry*. 2009;44(5):2100-5.
  11. Hein KL, Kragh-Hansen U, Morth JP, Jeppesen MD, Otzen D, Møller JV, et al. Crystallographic analysis reveals a unique lidocaine binding site on human serum albumin. *Journal of structural biology*. 2010;171(3):353-60.
  12. Takallu SH, Tavirani MR, Kalantari S, Bakhtiarvand MA, Mahdavi SM. Co-amoxiclav effects on the structural and binding properties of human serum albumin. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*. 2010;9(3):251-2.
  13. Pavia D, Lampman G, Kriz G, Vyvyan J. *Introduction to spectroscopy*: Cengage Learning; 2008.
  14. Warren G. FTIR Analysis of Protein Structure. *Biochemistry*. 1992; 31: 4673-80.
  15. Pelton JT, McLean LR. Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. *Analytical biochemistry*. 2000;277(2):167-76.
  16. Hariri AT, Moallem SA, Mahmoudi M, Hosseinzadeh H. The effect of crocin and safranal, constituents of saffron, against subacute effect of diazinon on hematological and genotoxicity indices in rats. *Phytomedicine*. 2011;18(6):499-504.
  17. Garfitt S, Jones K, Mason H, Cocker J. Exposure to the organophosphate diazinon: data from a human volunteer study with oral and dermal doses. *Toxicology letters*. 2002;134(1):105-13.
  18. Wester RC, Hui X, Hartway T, Maibach HI, Bell K, Schell MJ, et al. In vivo percutaneous absorption of boric acid, borax, and disodium octaborate tetrahydrate in humans compared to in vitro absorption in human skin from infinite and finite doses. *Toxicological Sciences*. 1998;45(1):42-51.
  19. Wang C, Chu Q, Chen C, Bo Z. Investigation of the mechanism of binding of thiacloprid to human serum albumin using spectroscopic techniques and molecular modeling methods. *Journal of Spectroscopy*. 2011; 25(2): 113-22.
  20. Yang F, Zhang Y, Liang H. Interactive association of drugs binding to human serum albumin. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(3):3580-95.
  21. Liang H, Yang F, Lee N, Wu X. HSA-based anti-inflammatory therapy: a new and improved approach. *Future medicinal chemistry*. 2014; 6(2): 119-21.