مجله دیابت و لیپید ایران. پاییز و زمستان ۱۳۸۱؛ دوره ۲ (شماره ۱): ۲۵-۳۰

مقاله پژوهشی

بررسی ترکیبات گلیکوزیله نهایی آلبومین سرم (AGE) در افراد دیابتی به روش ایزوالکتریک فوکوسینگ (IEF) و فلورسانس جهت ارزیابی پیشرفت بیماری دیابت

منوچهر نخجوانی: مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران، بیمارستان ولی‌عصر (عج)
بیژن فرزامی*: گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
تقی گل محمدی: گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
اکبر جعفرنژاد: کارشناس ارشد، گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

مقدمه: گلیکوزیلاسیون غیرآنزیمی پروتئنها در دیابت می‌تواند آثار مخربی بر ساختمان و کارکرد پروتئینها داشته باشد. برپایه مطالعات in vitro و in vivo، گلیکوزیلاسیون غیرآنزیمی پروتئینها و ترکیبات گلیکوزیله نهایی آنها در ایجاد عوارض ماکروواسکولار مانند آترواسکلروز و نیز آثار میکروواسکولار از قبیل رتینوپاتی و نفروپاتی، اهمیت دارد.

روشها: برخی ویژگیهای بیوشیمیایی و فیزیکی آلبومین گلیکوزیله مانند تحرک الکتروفورتیک، فلورسانس و pH ایزوالکتریک در تشکیل وابسته به زمان ترکیبات گلیکوزیله نهایی مورد بررسی قرار گرفت. همچنین برای نخستین بار از روش ایزوالکتریک فوکوسینگ برای بررسی گلیکوزیلاسیون آلبومین سرم افراد دیابتی و مقایسه آن با افراد سالم استفاده شد.

یافته‌ها: تحرک الکتروفورتیک آلبومین گلیکوزیله پس از ۱۰ هفته انکوباسیون با گلوکز نسبت به آلبومین طبیعی ۲۱/۳٪ افزایش نشان داد. pH ایزوالکتریک آلبومین از ۴/۶ در روز اول به ۴/۱ در هفته هفتم کاهش یافت. افزایش تحرک الکتروفورتیک همراه با کاهش در pH ایزوالکتریک در هفته اول مشاهده گردید. این تغییرات به خوبی با تغییرات مشاهده شده در فلورسانس همبستگی داشت. محتوای گلوکز نمونه‌های آلبومین نگهداری شده تا هفته اول انکوباسیون کاهش یافت اما پس از هفته دوم به تدریج افزایش نشان می‌داد. اندازه‌گیریهای فلورسانس نیز با این روند تغییرات، همخوانی داشت. در بررسی با روش ایزوالکتریک فوکوسینگ، اختلاف معنی‌داری بین آلبومین سرم افراد دیابتی و آلبومین سرم افراد طبیعی مشاهده شد ($p = ۰/۰۰$).

نتیجه‌گیری: افزایش تحرک الکتروفورتیک پس از هفته اول همراه با کاهش همزمان در pH ایزوالکتریک نشان‌دهنده آن است که تشکیل ترکیبات گلیکوزیله نهایی پس از هفته اول آغاز می‌شود. کاهش غلظت گلوکز طی هفته اول و افزایش متعاقب آن پس از هفته دوم را می‌توان به تشکیل و هیدرولیز ترکیبات گلیکوزیله نهایی نسبت داد. شاید بتوان از این روش برای شناسایی وضعیت پایدار دیابت یا درجه پیشرفت آن استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: ترکیبات گلیکوزیله نهایی (AGE)، آلبومین گلیکوزیله، دیابت قندی، ایزوالکتریک فوکوسینگ (IEF)، فلورسانس

* نشانی: گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، صندوق پستی ۵۳۹۹-۱۴۱۵۵؛
تلفن/ نمابر: ۶۹۵۹۷۴۵؛ پست الکترونیک: bfarzami@neda.net

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2026-05-06]

مقدمه

دیابت قندی نقص متابولیکی با مشخصه بارز افزایش مزمن گلوکز خون است که موجب اختلال در متابولیسم مواد سه‌گانه (کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و پروتئین‌ها) می‌گردد. افزایش مزمن قند خون عامل اصلی عوارض ثانویه دیابت است. با وجود این گزارشهای متعددی وجود دارد که نقش گلیکوزیلاسیون غیرآنزیمی پروتئین‌ها را در پاتوفیزیولوژی دیابت نشان می‌دهد(۱). در گلیکوزیلاسیون غیرآنزیمی پروتئین‌هایی که واجد گروههای آمین آزاد نظیر گروه اپسیلون آمین لیزین هستند، در pH فیزیولوژیک به‌صورت غیرآنزیمی با گروههای کتونی یا آلوییدی قندهای احیاکننده واکنش داده ترکیبات ناپایدار آلدامین را تشکیل می‌دهند. این محصولات طی چند ساعت در اثر بازآرایی (rearrangement) بیشتر به محصولات پایداری به نام ترکیبات آمادوری (Amadori) تبدیل می‌شوند(۲). ترکیبات آمادوری طی دو واکنش متوالی دهیدراتاسیون و قطعه قطعه شدن به ترکیبات آلفا ـ دی‌کربونیل تبدیل می‌گردند. این ترکیبات نسبت به قندهای اولیه برای واکنش با پروتئین‌ها فعال‌تر هستند، لذا با ایجاد پیوند عرضی بین پروتئین‌ها ترکیبات ناهمگونی به نام ترکیبات گلیکوزیله نهایی (AGE[1]) پدید می‌آورند (۳). انباشت این ترکیبات که به‌طور برگشت‌ناپذیر تشکیل می‌شوند به القای آسیبهایی در بدن منجر می‌گردد(۳). یکی از پروتئین‌های مهم بدن که متحمل فرایند گلیکوزیلاسیون غیرآنزیمی می‌شود آلبومین سرم است. آلبومین حدود ۶۰٪ پروتئین‌های پلاسما را تشکیل می‌دهد و حاوی نقش‌های مهمی از جمله حفظ فشار اونکوتیک و انتقال بیومولکولهای درون‌زاد (آندوژن) و برون‌زاد (اگزوژن) است(۴). بررسی‌ها نشان داده‌اند که در سرم افراد دیابتی غلظت آلبومین گلیکوزیله و ترکیبات AGE افزایش می‌یابد(۵) و ویژگیهای فیزیکی – شیمیایی این پروتئین‌ها از جمله پیوند آن به بیومولکولها دستخوش تغییر می‌گردد(۶). در این مطالعه، برخی از پارامترهای بیوشیمیایی آلبومین گلیکوزیله نظیر حرکت الکتروفورتیک، تغییرات گسیل (emission) فلورسانس و pH ایزوالکتریک را در محیط in vitro مورد بررسی قرار داده‌ایم. با اطلاعات به‌دست آمده از مطالعات in vitro، تغییرات آلبومین سرم افراد دیابتی و سالم با روش ایزوالکتریک فوکوسینگ مورد بررسی قرار گرفت.

با توجه به افزایش بی‌رویه جمعیت کشور و روند افزایش شهر نشینی در چند سال آینده توجه و برنامه‌ریزی برای تشخیص پیشرفت دیابت جهت پیگیری و درمان این بیماری از اولویتهای مهم کشوری است؛ لذا انجام پژوهشهایی مانند مطالعه حاضر جهت برنامه‌ریزی در استفاده از روشهایی که بتوانند وضعیت پایدار بیماری دیابت را ارزیابی و آثار مداخلات درمانی را در جلوگیری از پیشرفت آن شناسایی نمایند، از اهمیت خاصی برخوردار است.

روشها

۱- روش گلیکوزیلاسیون آلبومین سرم انسانی (HSA[2]) در شرایط in vitro (۷)

آلبومین سرم ۲۰٪ از فرآورده‌های سازمان انتقال خون ایران تهیه گردید. گلوکز (شرکت سیگما) به غلظت ۰/۵ مولار در محلول HSA با غلظت ۵۰ mg/ml تهیه شد. سپس مقدار ۰/۰۲٪ (W/V) سدیم‌آزید و ۰/۰۱٪ جنتامایسین به بافر اضافه گردید. همزمان با تهیه محلول فوق، مخلوط کنترل حاوی تمام اجزای مخلوط HSA به‌جز گلوکز تهیه شد و محلول در تاریکی و دمای ۳۷ $^{\circ}$c نگهداری شد. از این محلولها در فواصل زمانی معین، حجم ۲ میلی‌لیتر برداشت نموده و در ۷۰ $^{\circ}$c- قرار دادیم. در پایان زمان انکوباسیون تمامی نمونه‌ها برای آزمایشهای مربوط مورد استفاده قرار گرفت.

۲- الکتروفوروز ژل‌پلی‌آکریل‌آمید

PAGE[3] به روش Davis (۸) و در سیستم بافری‌تریس ـ گلیسین انجام گردید. pH بافر متراکم کننده ۶/۷ و pH بافر جدا کننده در ۸/۹ = pH تنظیم گردید. جریان ۵۰ میلی‌آمپر در مدت سه ساعت برقرار شد و در حرارت ۱۵ $^{\circ}$c+ الکتروفورز انجام گردید.

[1] Advanced glycated end-products

[2] Human serum albumin

[3] Polyacrylamide gel electrophoresis

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2026-05-06]

۳- ایزوالکتریک فوکوسینگ

برای این منظور از ژل‌های آماده با دامنه pH ۳/۵ – ۹/۵ استفاده شد (شرکت فارماسیا). ژل‌ها در تانک الکتروفورز افقی نصب شدند و جریان الکتریکی به صورت ذیل برقرار شد.

۱۵ دقیقه، ۲۰۰ ولت؛ ۳۰ دقیقه، ۳۰۰ ولت؛ ۳۰ دقیقه، ۴۰۰ ولت؛ ۲۴ ساعت، ۵۰۰ ولت؛ یک ساعت، ۷۵۰ ولت.

۴- اسپکتروفلوئورومتری

اهمیت به‌کارگیری این روش در حساسیت آن است. به‌طوری‌که مقادیر کم در حد نانوگرم را نیز می‌توان از این طریق شناسایی و اندازه‌گیری کرد. با این روش ترکیبات AGE را در طول موج برانگیختگی λ exc = ۳۷۰ nm و طول موج تابش λ emiss = ۴۴۰ nm می‌توان اندازه‌گیری نمود(۷).

۵- اندازه‌گیری گلوکز

این اندازه‌گیری از طریق سنجش آنزیمی با آنزیم گلوکز اکسیداز انجام گرفت (شرکت زیست‌شیمی)

یافته‌ها

۱- الکتروفورز PAGE

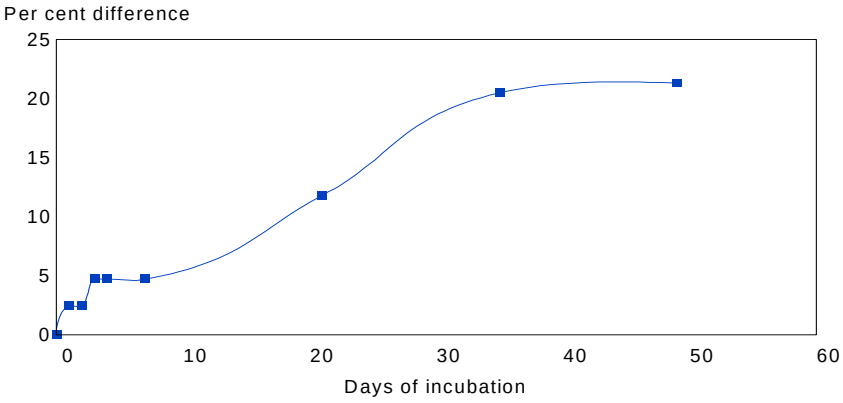
در الکتروفورز، نمونه‌های آلبومین سرم حاوی قند با نمونه‌های شاهد مقایسه گردید. باندهای نمونه‌های آلبومین گلیکوزیله نسبت به نمونه‌های آلبومین پهن‌تر و روشن‌تر بودند و تحرک بیشتری نیز از خود نشان دادند. مهاجرت نسبی آلبومین گلیکوزیله نسبت به آلبومین از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{مهاجرت نسبی} = \frac{\text{میزان حرکت آلبومین گلیکوزیله}}{\text{میزان حرکت آلبومین غیرگلیکوزیله}} \times ۱۰۰$$

شکل ۱ درصد نسبی تغییرات مهاجرات، آلبومین گلیکوزیله به آلبومین سرم در مدت هفت هفته انکوباسیون آلبومین با گلوکز

۲- فلورسانس

از آنجا که محصولات AGE به‌علت ساختمانهای ایجاد شده خود دارای خواص فلورسانس می‌باشند. گسیل فلورسانس نمونه‌های قندی و شاهد در طول موج ۴۴۰ نانومتر قرائت گردید که مقادیر اختلاف آن با شاهد در شکل ۲ نمایش داده شده است. با توجه به نتایج به‌دست آمده از تعیین مقدار گلوکز آزاد در نمونه‌های گلیکوزیله ملاحظه می‌شود که نمونه‌ها از روز چهارم به بعد کاهش معنی‌داری را پیدا کرده‌اند که این کاهش تا هفته سوم ادامه دارد و سپس افزایش یافته به حد اولیه خود می‌رسد.



شکل ۱ـ درصد نسبی تغییرات مهاجرت، آلبومین گلیکوزیله به آلبومین سرم در مدت هفت هفته انکوباسیون آلبومین با گلوکز.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2026-05-06]

۳- ایزوالکتریک فوکوسینگ

در ایزوالکتریک فوکوسینگ (IEF[1]) محدوده پیدایش باند آلبومین در هفته اول در pH ایزوالکتریک آلبومین معادل ۴/۶ بود که در طی سه مرحله اندازه‌گیری شد. در هفته‌های سوم، پنجم و هفتم به‌تدریج کاهش معنی‌داری در pHi ایجاد گردید و مقدار نهایی آن در هفته هفتم به ۴/۱ رسید (شکل۳).

۴- ایزوالکتریک فوکوسینگ نمونه‌های آلبومین سرم افراد دیابتی و سالم

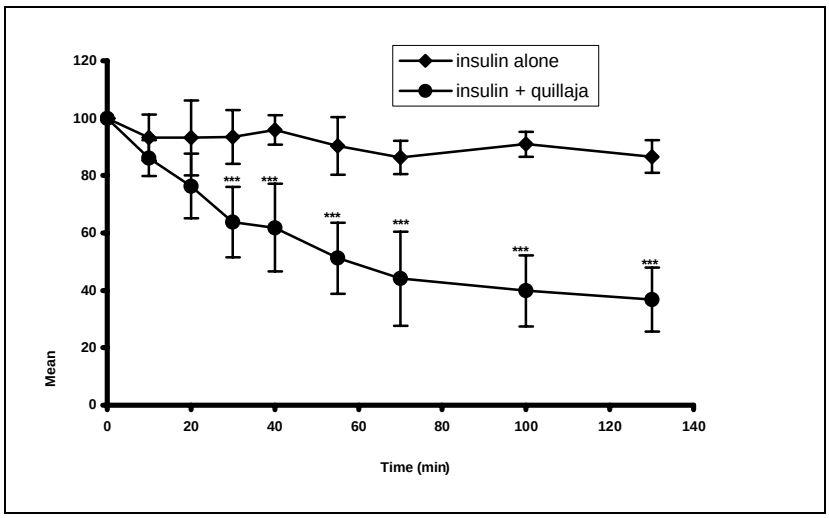
در مرحله بعد ۱۶ نمونه سرم دیابتی شامل ۸ نمونه دیابتی با قند خون کنترل شده با مشخصات دیابت نوع ۲ با مدت ابتلا به بیماری حدود ۱۰ سال که تحت درمان با انسولین بوده‌اند و گلوکز ناشتای آنها ۲۰۰-۲۵۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر بود و ۸ نمونه سرم دیابتی با قند خون کنترل‌نشده با HbA_{1c}>۱۰ انتخاب شدند. تعداد ۱۶ نمونه سرم سالم نیز به‌عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج حاصل از IEF سرم‌های دیابتی و سالم نشان داد که pH ایزوالکتریک آلبومین در افراد دیابتی در مقایسه با افراد سالم کاهش معنی‌داری ($p = 0.000$) نشان می‌دهد (شکل ۴).

بحث

بررسی ترکیبات گلیکوزیله نهایی (AGE) در بیماران دیابتی از آن جهت حائز اهمیت است که این ترکیبات کمپلکس‌های پروتئینی گلیکوزیله متفاوتی ایجاد می‌کنند که به‌نظر می‌رسد در ایجاد عوارض دیررس بیماری دیابت از قبیل آنژیوپاتی- رتینوپاتی، میوپاتی و کاتاراکت دخالت داشته باشند. شناسایی و بررسی این ترکیبات و کمپلکس‌های پروتئینی گلیکوزیله را می‌توان معیاری برای ارزیابی پیشرفت بیماری دیابت قرار داد. همچنین شناسایی مواد و روشهایی که قادر به جلوگیری از تشکیل مواد فوق باشند می‌تواند در جلوگیری از پیدایش عوارض دیابت به‌کار گرفته شود. در این بررسی برای نخستین‌بار با استفاده از روش ایزوالکتریک فوکوسینگ و فلورسانس، برخی از ویژگیهای ترکیبات گلیکوزیله نهایی مشخص گردید. نتایج حاصل از الکتروفورز AGE و ایزوالکتریک فوکوسینگ نشان داد که در نتیجه ایجاد ترکیبات AGE، آلبومین سرم دیابتی در زمانهای انکوباسیون طولانی‌تر، افزایش حرکت الکتروفورتیکی بیشتری نسبت به آلبومین سرم طبیعی دارد. (شکل۱). کاهش pH ایزوالکتریک نیز در این مدت (هفت هفته) ایجاد گردید (شکل۳). بدین ترتیب به‌نظر می‌رسد که در اثر گلیکوزیلاسیون، بارهای مثبت لیزین در آلبومین که هدف اصلی ترکیب قند در واکنشهای گلیکوزیلاسیون می‌باشد، کاهش می‌یابند و در pH مورد نظر نسبت کلی بارهای منفی افزایش می‌یابد. نتایج حاصل از فلئوریمتری نشان می‌دهد که تشکیل فراورده‌های AGE بعد از روز چهارم آغاز می‌شود (شکل۲) و در هفته دوم به حداکثر مقدار خود می‌رسد ولی بعد از هفته دوم کاهش فلورسانس که مبین کاهش ترکیبات AGE است تا هفته پنجم ادامه می‌یابد. اندازه‌گیری قند در نمونه‌های مورد آزمایش نشان می‌دهد که در این مدت مصرف قند جهت ایجاد ترکیبات گلیکوزیله افزایش دارد (شکل۲) (این تغییرات با کمیات منفی در مقایسه با مقدار قند موجود در زمان صفر نشان داده شده است). در هفته پنجم مقدار قند به حد طبیعی خود برمی‌گردد. در مطالعات ایزوالکتریک فوکوسینگ که بر روی سرم افراد دیابتی انجام گرفت مشخص گردید که PHi مربوط به آلبومین در سرم افراد دیابتی کاهش قابل‌توجهی نشان داده است (شکل۴). در این خصوص می‌توان از میزان pH ایزوالکتریک آلبومین سرم افراد دیابتی در مقایسه با سرم افراد سالم همراه با الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌های سرم به روش ایزوالکتریک فوکوسینگ در شناسایی درجه پیشرفت بیماری دیابت به‌عنوان معیاری ثابت استفاده کرد..

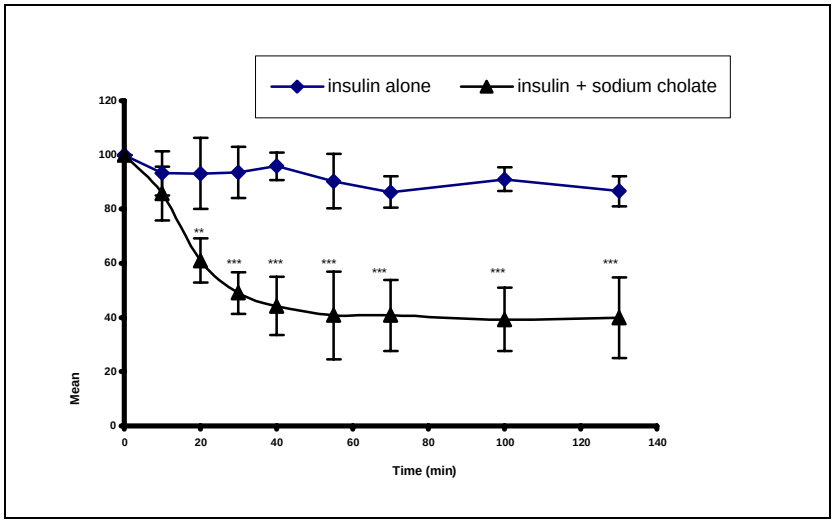
[1] Isoelectric focusing

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2026-05-06]

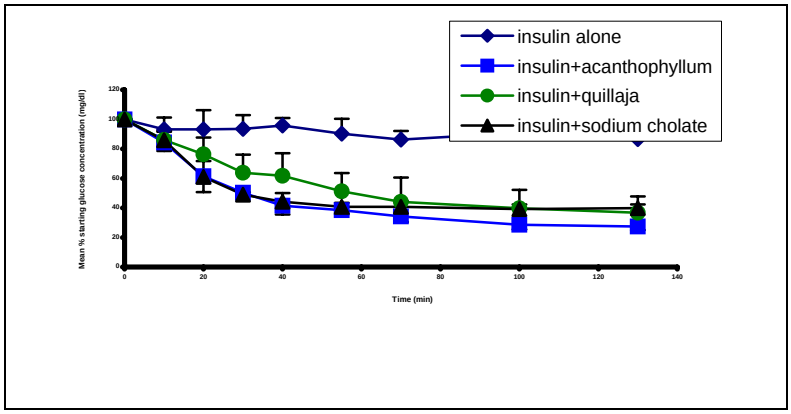


شکل ۲- تغییرات نسبی فلورسانس ترکیبات AGE در مدت ۷۰ روز انکوباسیون استریل با قند

کمیات منفی مربوط به کاهش مقدار قند اضافه شده نسبت به زمان صفر است



شکل ۳- تغییرات همزمان افزایش تحرک الکتروفورتیک آلبومین در طی ۴۹ روز انکوباسیون استریل با گلوکز با تغییرات pH ایزوالکتریک در ایزوالکتریک فوکوسینگ



شکل ۴- مقایسه نمونه‌های سرم دیابتیک با سرم افراد سالم در ایزوالکتریک فوکوسینگ

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2026-05-06]

مآخذ

1. Friedman EA. Advanced glycosylated end products and hyperglycemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care* 1999; 22: 65.
2. Brownlee M. Glycation and diabetic complications. *Diabetes* 1994; 43: 836–41.
3. Yim MB, Cheolju L. Creation of catalytic sites for free radical generation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2001; 928: 48-53.
4. Peters T Jr. Serum albumin. *Advance in Protein Chemistry* 1985; 37: 161-245.
5. Dolhofer R, Wieland OH. Glycosylation of serum albumin: elevated glycosyl – albumin in diabetic patients. *FEBS Letters* 1979; 103: 282–6.
6. Shaklai N, Garlick RL, Bunn HF. Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function. *Journal of Biological Chemistry* 1984; 259: 3812–7.
7. Wu JT, Tu MC, Zhung P. Advanced glycation end product (AGE): characterization of the products from the reaction between D-glucose and serum albumin. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 1996; 10: 21–34.
8. LKB Laboratory Manual. *Vertical Electrophoresis*; 2001.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2026-05-06]