

مطالعه برهمکنش نیکوتین‌آمید با آلبومین سرم انسانی با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی و شبیه‌سازی داکینگ مولکولی

گلناز پرویزی فرد^۱، لاله سلوکی^۲، مصطفی زکریازاده^۳، حسین حقایی^۴ و سمیه سلطانی^۵

گروه شیمی تجزیه، دانشکده شیمی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران؛ مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران؛ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران؛ گروه تغذیه، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران؛ گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
مسئول مکاتبات: سمیه سلطانی، soltanis@tbzmed.ac.ir

چکیده آلبومین سرم انسانی یکی از مهمترین پروتئین‌های خون است که توانایی اتصال به گستره زیادی از ترکیبات و داروهای مختلف را دارا است. از این رو آگاهی از چگونگی پیوند دارو با آلبومین برای درک بهتر خصوصیات فارماکوکینتیک و فارماکودینامیک دارو حائز اهمیت است. برهمکنش دارو با آلبومین بر روی توزیع، دفع و برهمکنش دارو با بافت‌های هدف اثرگذار است. نیکوتین‌آمید یک مکمل دارویی ایمن و ارزان است که برای پیشگیری و درمان کمبود ویتامین ب_۳ مصرف می‌شود. در این پژوهش برای مطالعه مکانیسم برهمکنش مولکولی نیکوتین‌آمید با آلبومین سرم انسانی از روش‌های اسپکتروسکوپی و داکینگ مولکولی استفاده شده است. تاثیر دما، pH های اسیدی/بازی و حضور یون‌های فلزی، اوره و گلوکز روی برهمکنش نیکوتین‌آمید و آلبومین سرم انسانی بررسی شده است. مطالعات اسپکتروسکوپی نشان دادند که برهمکنش نیکوتین‌آمید با آلبومین سرم انسانی عمدتاً تحت کنترل نیروهای آب‌گریز بوده و واکنش به صورت خودبه‌خودی است. تعداد جایگاه اتصال و ثابت اتصال به ترتیب برابر با ۱ و 4×10^4 (لیتر/مول) است که در حضور گلوکز افزایش می‌یابد. حضور یون‌های فلزی و pH قلیایی ثابت اتصال نیکوتین‌آمید به آلبومین را کاهش می‌دهد. نتایج حاصل نشانگر این است که نیکوتین‌آمید تمایل دارد به نواحی مشابهی که مولکول‌هایی با دنباله اسیدی به آنها می‌چسبند، متصل شود. در تفسیر مکانیسم برهمکنش و نیز حضور نیکوتین‌آمید در پدیده‌های مختلف فیزیولوژیکی بدن انسان نتایج می‌تواند مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: اسپکتروسکوپی، برهمکنش دارو-پروتئین، پروتئین حامل، شبیه‌سازی مولکولی، ویتامین ب_۳

Study of interaction between nicotinamide and human serum albumin using spectroscopic techniques and molecular docking simulation

Golnaz Parvizi Fard¹, Lale Solouki², Mostafa Zakariazadeh³, Hossein Haghaei⁴ & Somaieh Soltani⁵

¹Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Tabriz, Tabriz, Iran; ²Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran; ³Department of Biology, Faculty of Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran; ⁴Department of Nutrition, Faculty of Nutrition and Food Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran; ⁵Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Correspondent author: Somaieh Soltani, soltanis@tbzmed.ac.ir

Abstract. Human serum albumin is one of the most important blood proteins that has the ability to bind a wide range of compounds and different drugs. Hence, knowing how drugs bind to albumin is crucial to understand their pharmacokinetics and pharmacodynamic properties. The binding of drugs to protein affects the drug's excretion, distribution and interaction in the target tissues. Nicotinamide (NA) is a safe and inexpensive medical supplement that used to prevent and treat vitamin B₃ deficiency. In this research, the molecular mechanism of the interaction between nicotinamide and human serum albumin was studied by the utilization of spectroscopic and molecular docking methods. The effects of temperature, acidic/basic pHs, metal ions, urea, and glucose on the interaction between nicotinamide and

human serum albumin were also investigated. The spectroscopic studies indicated that the interaction between nicotinamide and human serum albumin is mainly controlled by hydrophobic forces and the interaction is spontaneous. The number of binding site and binding constant is 1 and 4.6×10^4 (L/mol), respectively, which were increased in the presence of glucose. The presence of metallic ions and basic pH decreased the binding constant of nicotinamide to albumin. The obtained results indicated that nicotinamide tend to binds to the similar sites wherever the molecules with acidic moieties bind. The results could be helpful to interpret the mechanisms of actions of nicotinamide in the various physiological phenomena in the human body.

Key words. carrier protein, drug-protein interaction, molecular simulation, spectroscopy, vitamin B3

مقدمه

آب هستند که نقش مهمی در متابولیسم سلولی و هموستاز فیزیولوژیکی دارند (Kennedy, Fratoni & Brandi, 2015; Maqbool et al., 2018; 2016). نیکوتین‌آمید یا نیاسین‌آمید (NA)، فرم آمیدی ویتامین ب^۳ (نیکوتینیک‌اسید یا نیاسین) است (شکل ۱). این ویتامین دارای حلقه پیریدینی است و در بدن می‌تواند از اسیدآمین‌ه تریپتوفان سنتز شود (Williams & Ramsden, 2005; Li et al., 2020).

نیاسین‌آمید یک ترکیب اصلی در مسیرهای متابولیکی بوده و در ساختمان کوانزیم‌های نیکوتین‌آمید آدنین دی نوکلئوتید (NAD^+) و نیکوتین‌آمید آدنین دی نوکلئوتید فسفات ($NADP$) قرار دارد (Fukuwatari & Shibata, 2007). نیاسین‌آمید از زیست‌فراهمی مناسبی برخوردار بوده و نقش مهمی در کاهش التهاب، فعالیت ضد میکروبی، حفاظت پوستی و ضد خارش پوستی را دارد. نیاسین‌آمید از ویژگی‌های فیزیوشیمیایی مناسبی برخوردار است. در سیستم‌های متابولیکی پیچیده در داخل سلول‌ها، NA در کنترل بیان مولکولهای دخیل در سیگنالینگ سلولی به‌واسطه مسیر NF κ B از طریق مهار آنزیم داخل‌هسته‌ای poly (PARP-1) (polymerase-1) (ADP-ribose) اعمال می‌کند (Wohlrab & Kreft, 2014; Collins et al., 1991). نیاسین‌آمید می‌تواند میزان بیان MHC-II و سنتز IL-1 α , TNF- α , IL-1 β و اکسید نیتریک را کاهش دهد (Otsuka et al., 1991; Fujimura et al., 1997; Andrade et al., 1997). نیاسین‌آمید و مشتق n-متیل نیکوتین‌آمید با تاثیر بر متابولیسم اکسید نیتریک و سنتز پروستاگلاندین‌ها نقش مهمی در نفوذپذیری عروق دارند (Pietrzak et al., 2009). علاوه بر این موارد، NA در درمان‌های موضعی بخاطر بی‌خطر بودن به کار گرفته می‌شود. نیاسین‌آمید همچنین در جراحی پلاستیک و لوازم آرایشی و بهداشتی نیز مورد مصرف قرار می‌گیرد. به‌طور کلی نیاسین‌آمید به‌ساخت پروتئین کلژن پوست کمک کرده و با حفظ رطوبت باعث افزایش نرمی و کاهش اندازه منافذ باز پوست می‌شود، همچنین باعث کاهش التهاب و مهار تولید واسطه‌های التهابی شده و در موارد زیادی از مرگ سلولی جلوگیری می‌کند. تحقیقات نشان داده است که محلولی با غلظت

آلبومین سرم انسانی (Human Serum Albumin (HSA))، پروتئینی است که نقل و انتقال طیف متنوعی از متابولیت‌ها و داروها را برعهده دارد. برهمکنش داروها با HSA، روی خواص فارماکوکینتیک و فارماکودینامیک آنها تاثیر دارد (Fanali et al., 2017; Poureshghi et al., 2012; al., 2012). اتصال سست دارو به آلبومین باعث می‌شود تا مقدار بیشتری از دارو به صورت غیرکمپلکس (متصل نشده به آلبومین) یا آزاد وجود داشته باشد، درحالی‌که اتصال محکم دارو به آلبومین سبب افزایش غلظت دارو به شکل کمپلکس در خون شده و در نتیجه باعث پائین‌تر بودن دوز مؤثر آن می‌شود (Mamizadeh & Razzaghi-Asl, 2018). لذا مطالعه مکانیسم مولکولی برهمکنش ترکیبات دارویی و غیر دارویی با HSA، اطلاعات ارزشمندی در اختیار محققین قرار می‌دهد. HSA به شکل یک زنجیره پلی‌پپتیدی غیرگلیکته است (Nakajou et al., 2003) که حاوی ۵۸۵ عدد اسیدآمین و ۱۷ عدد پیوند دی سولفیدی است. ساختار HSA از سه دومین همولوگ (I, II و III) تشکیل شده است. ساختار ثانویه دومین‌ها متشکل از مارپیچ آلفا بوده که هر دومین، دو زیردومین A و B را دارد (Alhumaydhi et al., 2021; Kharazian et al., 2021). محل اتصال اغلب لیگاندها و داروها از طریق حفره‌های آب‌گریز در زیردومین‌های IIA (Sudlow site I) و IIIA (Sudlow site II) هستند (Sudlow et al., 1976). جایگاه اتصال I به ترکیبات حجیم حاوی گروه‌های هتروسیکل مثل وارفارین و جایگاه اتصال II به ترکیبات دارای گروه‌های آروماتیک مثل ایبوپروفن تمایل اتصال بیشتری دارند (Francis et al., 2020; Zhao et al., 2020). HSA خاصیت فلوروسانس ذاتی دارد که منشا عمده آن اسیدآمین‌ه تریپتوفان ۲۱۴ است که در جایگاه اتصال I قرار دارد (Yadav et al., 2014). ویتامین‌ها ترکیبات آلی هستند که به‌دلیل حضور در ساختار آنزیم‌ها باعث تسهیل در متابولیسم اسیدآمین‌ه‌ها، چربی‌ها و کربوهیدرات‌ها می‌شوند و در نهایت رشد و نمو و ترمیم سلول‌های بدن را میسر می‌سازند (Yang et al., 2014). ویتامین‌های گروه B دسته‌ای از ویتامین‌های محلول در

۵ درصد نیاسین امید می‌تواند در روشن‌تر شدن لک‌های تیره و کاهش آثار پیری در سطح پوست بسیار مفید واقع شود (Snaird et al., 2019). شناخت مکانیسم برهمکنش دارو-HSA اطلاعات ارزشمندی برای مطالعاتی که در زمینه طراحی ترکیبات دارویی با ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی و فارماکولوژیکی بهتر، تصحیح فرمولاسیون و تعیین دوز بهینه دارو انجام می‌شود را فراهم می‌آورد (Rolfe, 2014). روش‌های زیادی جهت مطالعه برهمکنش داروها و لیگاندها با HSA وجود دارد که می‌توان به روش‌های کالریمتری، اسپکتروسکوپی، کروماتوگرافی (Kotani et al., 2016)، اولترافیلتراسیون (Harding et al., 2015) و مدلینگ مولکولی اشاره نمود (Xu et al., 2008; Rampogu & Rampogu Lemuel, 2016). پیش‌تر برهمکنش داروهای دیلتیازم (Farsad et al., 2021)، فینگولیمود (Gholizadeh et al., 2021)، لاموتریژین (Safarnejad et al., 2016) و رزوواستاتین (Afkham et al., 2022) با HSA به‌وسیله روش‌های اسپکتروسکوپی و داکینگ مولکولی بررسی شده است. در این پژوهش، برهمکنش NA با HSA به‌وسیله اسپکتروسکوپی ماورای بنفش-مرئی (UV-Vis)، فلوروسانس، طیفسنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR)، دورنگ‌نمایی دورانی (CD) و شبیه‌سازی داکینگ مولکولی مطالعه می‌شود. هدف از این پژوهش، بررسی سایت‌های احتمالی اتصال NA به HSA، مقایسه مکانیسم و قدرت اتصال و نیز خصوصیات ترمودینامیکی اتصال است. با توجه به تأثیر یون‌های فلزی، اوره و گلوکز روی برهمکنش دارو-HSA، اثر حضور یون‌های فلزی آهن، سدیم، منیزیم، نیکل، مس، روی و همچنین تأثیر حضور اوره و گلوکز بر روی برهمکنش HSA-NA بررسی شده است.

روش‌های دستگاهی

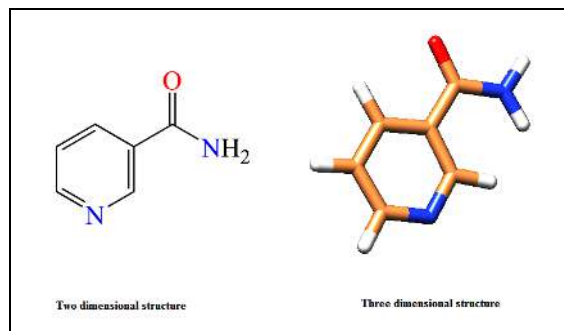
طیف‌های جذبی توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر Shimadzu-UV ۱۸۰۰ (ساخت ژاپن) با پرتو دوگانه با سل (cell) کوارتز ۱ سانتی‌متری ثبت شدند. طیف‌های فلوروسانس به‌وسیله دستگاه BioTek® Instruments Cytation™۵ (ساخت آمریکا) اندازه‌گیری شد. طیف‌های مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) توسط طیفسنج BRUKER TENSOR ۲۷ (ساخت آلمان) در دامنه ۴۰۰۰-۶۰۰ سانتی‌متر ثبت شدند. ثبت طیف دو رنگ‌نمایی دورانی (CD) در ناحیه فرابنفش دور (Far-UV) در طول موج ۱۹۵-۲۶۰ نانومتر که مطابق با جذب پیوندهای پپتیدی است با دستگاه اسپکتروپلاریومتر مدل JASCO J-۸۱۰ (ساخت ژاپن) انجام شده است. لازم به‌ذکر است که آزمایش‌های انجام یافته برای همه آزمایش‌ها به‌غیر از مطالعات ترمودینامیک در دامای آزمایشگاه انجام گرفته است.

شبیه‌سازی اتصال (داکینگ) مولکولی

چگونگی برهمکنش NA با جایگاه‌های اتصال HSA با استفاده از شبیه‌سازی داکینگ مولکولی و با نرم افزار AutoDockVina انجام گرفت (Trott & Olson, 2010; Barzegar et al., 2017). انرژی آزاد اتصال (ΔG) و نیروهای غیرکووالانسی مؤثر در برهمکنش و اسیدآمین‌های برهمکنش دهنده بررسی شدند. ساختار NA با استفاده از نسخه ۸ نرم‌افزار HyperChem ترسیم و سپس بهینه‌سازی انرژی با استفاده از روش‌های مکانیک مولکولی و نیمه تجربی انجام شد (Soltani et al., 2007; Zakariazadeh et al., 2015; Tatardar et al., 2015). ساختار کریستالوگرافی HSA از پروتئین دیتا بانک (RCSB) با کد ۴Z۶۹ و حد تفکیک ۲.۱۹ آنگستروم انتخاب شد. بارهای الکتریکی لیگاند و پروتئین تنظیم

مواد و روش‌ها

HSA (فاقد اسید چرب، خلوص > ۹۹ درصد، شماره کاتالوگ A۳۷۸۲) از شرکت سیگما، متانول (شماره کاتالوگ، ۱۰۶۰۱۲)، نمک سدیم هیدروکسید (شماره کاتالوگ، ۱۰۶۴۶۲) و دی‌هیدروژن فسفات پتاسیم (KH_2PO_4) (شماره کاتالوگ، ۱۰۴۸۷۳) از شرکت مرک و پودر NA، از شرکت دارویی سبحان تهیه شدند. محلول استوک HSA با غلظت $10^{-5} \times 7/5$ مولار (محلول ۰/۵ درصد وزنی-حجمی) در بافر فسفات ۲۵ میلی مولار (pH ۷/۴) تهیه شد. غلظت نهایی آلبومین سرم انسانی در نمونه‌های مورد نظر برابر با $10^{-6} \times 7/5$ مولار (۰/۵ درصد وزنی-حجمی) می‌باشد. محلول‌های کار NA ($10^{-6} \times 1-9$ مولار) از رقیق‌سازی محلول استوک تهیه شدند (Ciepluch et al.,



شکل ۱- ساختارهای دو بعدی و سه بعدی نیکوتین آمید.

Figure 1. Two- and three-dimensional structures of nicotinamide.

NA در طول موج ۲۷۸ نانومتر شدت جذب بسیار کمتری نسبت به HSA دارد. شدت جذب HSA در طول موج ۲۷۸ نانومتر با افزایش غلظت NA افزایش یافته است.

مطالعات تیتراسیون خاموش سازی فلوروسانس

شکل ۳ طیف نشری فلوروسانس HSA را در حضور غلظت-های فزاینده NA نشان می‌دهد. مطابق این شکل، HSA در طول موج ۳۴۳ نانومتر بیشترین مقدار نشر را دارد که با افزایش غلظت NA به تدریج و به صورت منظم کاهش پیدا می‌کند. همچنین، طول موج بیشینه نشر حدود ۴ نانومتر به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر جابجا شده است (جابجایی آبی). شدت طیف نشر فلوروسانس پروتئین در اثر مزدوج‌شدگی با لیگاند می‌تواند کاهش یابد. کاهش شدت فلوروسانس، یا خاموش‌سازی می‌تواند به‌خاطر برخورد لیگاند (خاموش‌کننده) با اسیدآمینه فلوروفور یا تشکیل کمپلکس باشد که به‌ترتیب خاموش‌سازی دینامیک و استاتیک نامیده می‌شوند (Gholizadeh et al, 2021). مکانیسم خاموش‌سازی نشر فلوروسانس HSA در برهمکنش با NA توسط معادله استرن-وولمر (Stern-Volmer) (معادله ۱) مورد مطالعه قرار گرفت.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q] \quad (\text{معادله ۱})$$

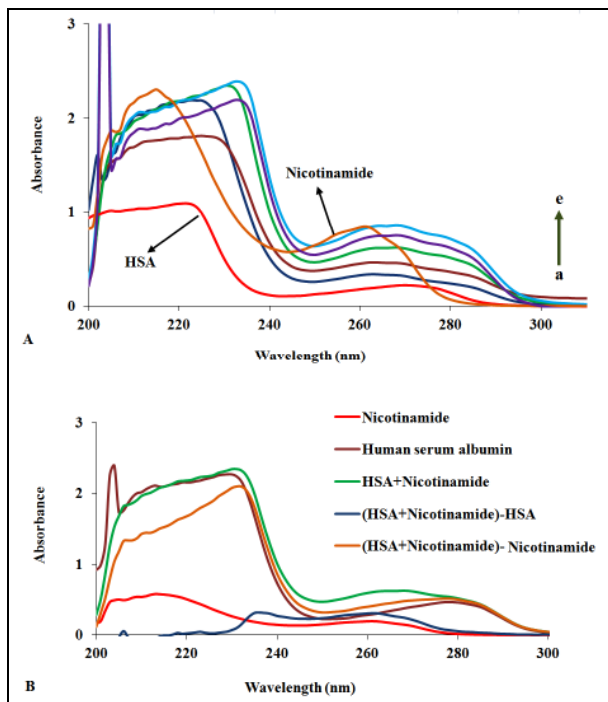
F_0 و F به‌ترتیب، شدت نشر فلوروسانس HSA در حضور و غیاب خاموش‌کننده (NA) است، $[Q]$ غلظت خاموش‌کننده، K_{sv} ثابت خاموش‌سازی استرن-وولمر است که نشانگر حدّ دسترسی اسیدآمینه فلوروفور تریپتوفان به خاموش‌کننده است، K_q ثابت سرعت فرایند خاموش‌سازی و حدّ نفوذ خاموش‌ساز در محیط را نشان می‌دهد و τ_0 نیمه عمر فلوروسانس بیومولکول در غیاب خاموش‌کننده است که معمولاً برای HSA برابر با 10^{-8} بر ثانیه است (Jayabharathi et al., 2011). از رسم نمودار $\frac{F_0}{F}$ برابر $[Q]$ خطی به‌دست می‌آید که شیب آن برابر با K_{sv} است و K_q را می‌توان از (معادله ۲) به‌دست آورد.

شدند (Safarnejad et al., 2016; Poureshghi et al., 2017). سپس، مرکز گرید باکس با توجه به‌فرارگیری ساختار لیگاندهای کریستالیزه که مختص هر جایگاه اتصال در ساختار آلبومین هستند، انتخاب شدند. اندازه گرید باکس مورد استفاده $23/25 \times 23/25 \times 23/25 \text{ \AA}^3$ و فاصله بین نقاط شبکه ۱ آنگستروم است. برهمکنش NA در ۶ جایگاه اتصال آلبومین به‌صورت مستقل با تعداد ۲۰ بار اجرا انجام گرفته است. برای معتبرسازی عملیات شبیه‌سازی اتصال مولکولی، قبل از اجرای فرایند شبیه‌سازی اتصال مولکولی HSA با NA از ساختار کریستالیزه دیکلوفناک استفاده شد که در آن دیکلوفناک در همان جایگاه اصلی خودش دوباره شبیه‌سازی اتصال مولکولی شده و انحراف جذر میانگین مربعات بین ساختار کریستالیزه با کانفورمر حاصل از شبیه‌سازی اتصال مولکولی محاسبه گردید. شایان ذکر است که پژوهش حاضر یک مطالعه غیرانسانی و آزمایشگاهی بوده و با استفاده از آلبومین سنتزی انجام شده است. محلول‌های لازم بر اساس پروتکل‌های استاندارد در آزمایشگاه تهیه شده و داده‌های مورد نیاز با استفاده از دستگاه‌های اسپکتروسکوپی قید شده در بخش دستگاهوری استخراج و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته‌اند.

نتایج

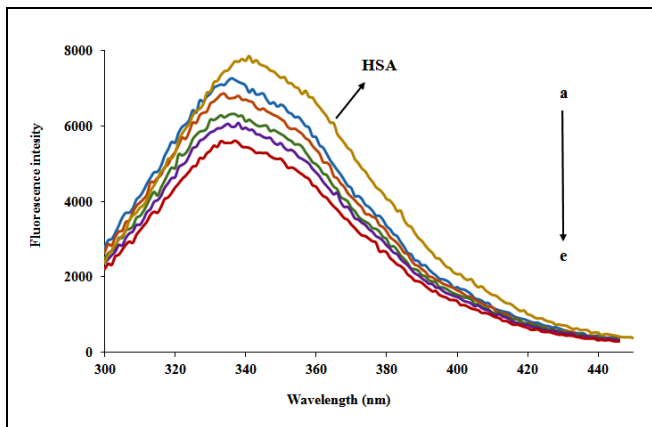
اسپکتروسکوپی جذبی

در طیف جذبی فرابنفش HSA، دو ناحیه بیشینه جذب نوری در طول موج‌های ۲۱۰ و ۲۷۸ نانومتر مشاهده می‌شوند. پیک جذبی در حدود ۲۱۰ نانومتر مربوط به ساختار دوم پروتئین (مارپیچ آلفا) و در ناحیه ۲۷۸ نانومتر مربوط به انتقال $\pi \rightarrow \pi^*$ گروه‌های آروماتیک اسیدآمینه‌های تریپتوفان، تیروزین و فنیل‌آلانین است (Yaseen et al., 2018). طیف جذبی HSA، NA و برهمکنش آن‌ها و نیز طیف‌های تفاضلی ثبت شده است (شکل ۲ A و B). همانگونه که در این شکل مشاهده می‌شود،



شکل ۲- (A)، طیف جذبی NA-HSA (غلظت HSA ۷/۵ میکرومولار و NA ۱-۹ e → a میکرومولار). (B)، طیف‌های جذبی HSA، NA، کمپلکس NA-HSA و تفاضلی.

Figure 2. (A) Absorption spectrum of HSA-NA (HSA concentration 7.5 μM and NA a → e 1-9 μM). (B) Absorption spectra of HSA, NA, HSA-NA complex and subtracted.



شکل ۳- طیف نشر برهمکنش NA-HSA (a تا e) غلظت از کم تا زیاد می‌شود.

Figure 3. Emission spectrum of HSA-NA low to the high concentration (a → e).

مکانیسم خاموش‌سازی دینامیک و استاتیک وابستگی متفاوتی به دما دارند، در خاموش‌سازی دینامیک بین لیگاند و پروتئین کمپلکسی تشکیل نمی‌شود و خاموش‌سازی تنها با برخورد لیگاند به پروتئین اتفاق می‌افتد که با افزایش دما مقدار برخوردها و در نتیجه K_{SV} به تدریج افزایش می‌یابد. درحالی‌که در خاموش‌سازی استاتیک یک کمپلکس غیر فلئورسانس بین لیگاند و پروتئین

$$K_{q1} = \frac{K_{SV}}{a_0} = \frac{K_{SV}}{10^{-5}} \quad (\text{معادله ۲})$$

نمودار $\frac{F_0}{F}$ برابر [Q] در دمای ۲۹۸ کلون با غلظت‌های افزایشنده NA نموداری خطی است (شکل ۴ A) که مقدار محاسبه شده K_{SV} برابر $4/74 \times 10^4$ (لیتر/مول) است. اثر دما بر خاموش‌سازی با مطالعه مقادیر K_{SV} در دماهای مختلف (۲۹۸، ۳۰۵، ۳۱۰، ۳۱۵ کلون) با استفاده از طیف نشری برهمکنش بررسی شد.

است (Haghaei et al., 2020; Afkham et al., 2022,) (Farsad et al., 2021).

مطالعه برهمکنش NA-HSA در pH اسیدی، بازی و خنثی
 برهمکنش NA-HSA در pHهای اسیدی، خنثی و بازی (۵/۵، ۷/۴، ۸) مطالعه شد و مقادیر پارامترهای K_b ، n و K_{sv} در جدول ۴ آورده شده است. در pH بازی، مقادیر K_b و n نسبت به pH خنثی و اسیدی کاهش یافته است که می‌تواند به دلیل تغییر در یونیزاسیون پروتئین، دارو یا هر دو باشد. افزایش pH باعث کاهش یونیزه شدن گروه‌های ایمیدازول و آمینو HSA می‌شود که منجر به افزایش بار خالص منفی در HSA می‌شود (Safarnejad et al., 2016). در pH بازی، یونیزاسیون نیتروژن حلقه پیریدینی NA (pK_a ۳/۳) در مقایسه با pH اسیدی کاهش بیشتری داشته و با توجه به خاصیت رزونانسی پیوند آمیدی، گروه کربونیل می‌تواند به گروه هیدروکسیلی تبدیل شده و بار منفی بگیرد. تغییرات در نسبت یونیزاسیون و سهم بارهای خالص NA و HSA، همچنین دافعه بین گروه‌های دارای بار منفی احتمالاً باعث کاهش در میزان برهمکنش می‌شود.

تأثیر یون‌های فلزی، گلوکز و اوره در برهمکنش NA-HSA
 مقادیر K_b ، n و K_{sv} برهمکنش NA-HSA در حضور یون‌های فلزی مختلف، گلوکز و اوره استخراج شده و در جدول ۴ آورده شده‌اند. با توجه به این جدول، مشاهده می‌شود که در حضور یون‌های مطالعه شده، مقادیر K_b و K_{sv} کاهش می‌یابد. HSA پروتئینی غیرگلیک که می‌تواند بر اثر فرایندهای آنزیمی و غیر آنزیمی گلیک شود (Szkudlarek et al., 2016; Qais et al, 2021). ایجاد پیوند کووالانسی و غیر کووالانسی بین واحد قندی و ریشه‌های آمینو اسیدی HSA، می‌تواند موجب تغییرات ساختمانی شده و بر فعالیت‌های فیزیولوژیکی HSA مانند توانایی اتصال و حمل داروها تأثیر بگذارد (Awasthi & Saraswathi, 2016). به غیر از گلوکز، اوره از ترکیبات مهمی است که بر ساختار و عملکرد HSA اثر می‌گذارد. حضور گلوکز و اوره به‌طور قابل ملاحظه‌ای باعث افزایش مقدار ثابت اتصال و اثر همکاری مثبت در برهمکنش NA-HSA می‌شوند (جدول ۴).

انتقال انرژی رزونانس فورستر (FRET) Förster resonance (energy transfer)

انتقال انرژی بین NA و HSA، بر اساس FRET مطالعه شد (Amézqueta et al., 2021). FRET زمانی اتفاق می‌افتد که طیف نشری مولکول دهنده (فلوروفور) به‌وسیله یک مولکول گیرنده (دارو) خاموش شده و طیف‌ها با همدیگر همپوشانی داشته باشند. (Karami et al., 2018). برای مطالعه این پدیده بازده انتقال انرژی با استفاده از معادله ۶ محاسبه شد.

در حالت پایه تشکیل می‌شود که با افزایش دما، کمپلکس تشکیل شده ناپایدار شده و مقدار K_{sv} کاهش می‌یابد. در جدول ۱ ثوابت محاسبه شده با استفاده از معادله ۱ نشان داده شده‌اند. K_{sv} با افزایش دما افزایش یافته که نشان‌دهنده مکانیسم خاموش‌سازی دینامیک در محدوده غلظت مطالعه شده است. علاوه بر مقادیر K_{sv} ، در تعیین مکانیسم خاموش‌سازی، از K_q نیز می‌توان بهره گرفت. حداکثر مقدار K_q در سیستم‌های زیستی در خاموش‌سازی دینامیک یا برخورد نفوذی برابر با 2×10^{10} لیتر/مول است که این مقدار در مکانیسم استاتیک بدون محدودیت است. با توجه به اینکه نمودار استرن-وولمر در شکل ۴ A به‌صورت خطی است برای مطالعه امکان دخالت مکانیسم استاتیک علاوه بر دینامیک در خاموش‌سازی، مقدار K_q نیز محاسبه شد که در دمای ۲۹۸ کلوین مقدار $4/74 \times 10^{12}$ لیتر/مول به‌دست آمد.

محاسبه ثوابت اتصال و تعداد جایگاه‌های اتصال

ثابت اتصال (K_b) و تعداد جایگاه‌های اتصال (n) از برازش داده‌های حاصل از تیتراسیون خاموش‌سازی به معادله هیل (معادله ۳) به‌دست آمد (Gholizadeh et al, 2021). از رسم نمودار $\log \frac{F_0-F}{F}$ در مقابل $\log [Q]$ می‌توان ثابت اتصال و تعداد جایگاه‌های اتصال را محاسبه کرد (Huang et al., 2015). جدول ۲ ثوابت اتصال و شکل B نمودار Hill را نشان می‌دهد.

$$\log \frac{F_0-F}{F} = \log K_b + n \log [Q] \quad (\text{معادله ۳})$$

در دمای ۲۹۸ کلوین مقدار n و K_b به‌ترتیب برابر $0/99$ و $10^5 \times 0/46$ لیتر/مول است.

مطالعه نیروهای بین‌مولکولی مؤثر در برهمکنش

پارامترهای ترمودینامیکی با استفاده از معادله وانت هوف (معادله ۴) محاسبه می‌شوند (Afkham et al., 2022).

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (\text{معادله ۴})$$

از نمودار $\ln K_b$ در مقابل $\frac{1}{T}$ می‌توان مقادیر تغییرات آنتالپی (ΔH) و تغییرات آنتروپی (ΔS) را محاسبه کرد. R ثابت عمومی گازها ($8/314$ ژول/مول کلوین) است. مقدار انرژی آزاد اتصال گیبس (ΔG) با استفاده از معادله گیبس-هلمهولتز ($Gibbs-Helmholtz$) (معادله ۵) محاسبه می‌شود.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{معادله ۵})$$

طبق جدول ۳، مقادیر ΔH و ΔS برابر $95/9$ (کیلو ژول/مول) و $409/2$ (ژول/مول در کلوین) است. بنابراین می‌توان گفت نیروهای دخیل در برهمکنش NA-HSA از نوع آب‌گریز است (Haghaei et al., 2020). همچنین مقدار ΔG در دمای ۲۹۸ کلوین برابر با $-26/2$ (کیلو ژول/مول) و واکنش خودبه‌خودی

نانومتر و در حضور غلظت‌های ۱ و ۹ میکرومولار NA مطالعه شد (شکل ۶). درصد محتوای ساختار دوم شامل مارپیچ آلفا، صفحات بتای موازی و ناموازی، دور بتا (β -Turn) و پیچ‌ها تصادفی محاسبه شده با نرم‌افزار CDNN۲.۱ در جدول ۶ وارد شده است. با افزایش غلظت NA درصد مارپیچ آلفا کاهش و درصد ساختار صفحات بتا (موازی و ناموازی) و دیگر ساختارهای دوم افزایش یافته است. نتایج حاصل، نشان‌دهنده تغییر ساختار دوم آلبومین در اثر برهمکنش با NA است.

مطالعه مکانیسم برهمکنش HSA-NA با استفاده از شبیه سازی اتصال (داکینگ) مولکولی

مقادیر ΔG محاسبه شده با استفاده از مطالعات شبیه‌سازی اتصال مولکولی در جدول ۷ ارائه شده است. بر اساس نتایج برهمکنش با جایگاه‌های IA, IB و IIIA برای NA مطلوب‌تر است. NA با جایگاه وارفارین (IIA)، اتصال قوی‌تری در مقایسه با جایگاه ایبوپروفن (IIIA) دارد. شکل ۷ تصویر برهمکنش NA با ۶ جایگاه اتصال HSA را نمایش می‌دهد. با توجه به ساختار NA که دارای اتم نیتروژن در حلقه پیریدین و گروه‌های عاملی کتونی و آمینی است، انتظار تشکیل پیوند هیدروژنی بین اتم‌های نیتروژن و اکسیژن NA و اسیدآمینه‌های قطبی و باردار HSA وجود دارد که لیست پیوندهای هیدروژنی مشاهده شده در جدول ۷ وارد شده است. اعتبارسنجی روش شبیه‌سازی اتصال مولکولی (داکینگ مولکولی) با استفاده از شبیه‌سازی اتصال مولکولی ساختار دیکلوفناک کریستال در جایگاه خود صورت گرفته است و شاخص RMSD بین ساختار کریستالیزه و کانفورمر حاصل از شبیه‌سازی اتصال مولکولی محاسبه شده است. نتایج نشان دادند که پارامترهای به‌کار برده شده در شبیه‌سازی اتصال مولکولی، توانایی بازتولید کانفورماسیون دیکلوفناک کو-کریستال را دارا است و این پارامترها از دقت مناسبی در طی عملیات شبیه‌سازی و پیش‌بینی برخوردارند (Ravindranath et al., 2015). در شکل ۷ B ساختار کریستالیزه و کانفورمر داک شده دیکلوفناک نشان داده شده است که هم‌ترازی قابل‌قبول ساختار کریستالیزه با داک شده مشهود است. در شکل‌های ۷ C-E و ۷ F-H پیوند هیدروژنی و انواع برهمکنش‌های غیرکووالانسی NA و HSA به‌صورت دوبعدی و سه‌بعدی نمایش داده شده است. حلقه هتروسیکل پیریدین در برهمکنش پای-پای استکینگ (π - π stacking) با اسیدآمینه‌های دارای حلقه آروماتیک Phe۷۰ و Tyr۱۶۱ مشارکت می‌کند. توانایی NA در تشکیل پیوند هیدروژنی نسبت به برهمکنش‌های هیدروفوبی کمتر است.

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^2}{R_0^2 + F_0^2} \quad (\text{معادله ۶})$$

F_0 و F به ترتیب شدت نشر فلئورسانس HSA در حضور و عدم حضور NA هستند. r_0 فاصله بین مولکول‌های دهنده و گیرنده، و R_0 فاصله بحرانی فورستر است که در آن بازده انتقال انرژی ۵۰ درصد است. R_0 با استفاده از معادله ۷ به دست می‌آید.

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 \eta^4 n^{-4} \Phi_f \quad (\text{معادله ۷})$$

K^2 فاکتور جهت‌گیری دوقطبی - دوقطبی مولکول‌های دهنده و گیرنده، N ضریب انکسار محیط، Φ میانگین بازده کوانتومی مولکول دهنده در عدم حضور مولکول گیرنده، J همپوشانی طیفی بین طیف نشری مولکول‌های دهنده با طیف جذبی مولکول‌های گیرنده است که برای یک جهت‌یابی تصادفی این مقادیر با $K^2=2/3$ ، $N=1/33$ ، $\Phi=0/15$ برابر هستند (Karami et al., 2019).

مقدار J از طریق معادله ۸ محاسبه می‌شود:

$$J = \frac{\sum F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4}{\sum F(\lambda) \varepsilon(\lambda)} \quad (\text{معادله ۸})$$

$F(\lambda)$ و $\varepsilon(\lambda)$ به ترتیب نشان‌دهنده شدت فلئورسانس مولکول دهنده (Trp۲۱۴) بدون حضور مولکول گیرنده در طول موج λ و ضریب جذب مولی مولکول گیرنده در طول موج λ است. شکل ۵ A، همپوشانی بین طیف نشری HSA با طیف جذب NA را نشان می‌دهد. نتایج محاسبه معادله‌های ۸-۶ در جدول ۵ وارد شده است.

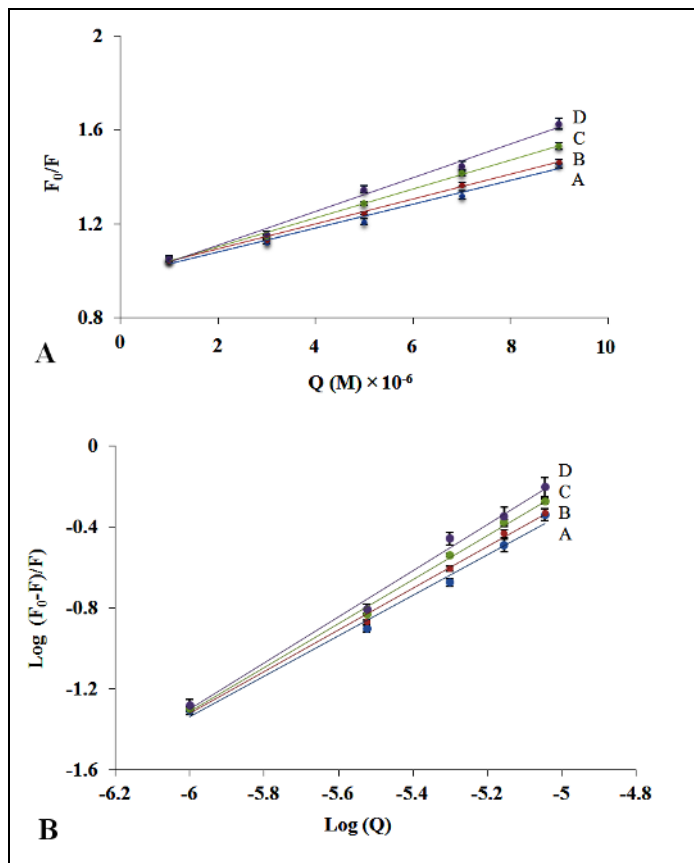
مطالعه کانفورماسیون HSA در حضور NA با استفاده از CD و FTIR-ATR

طیف‌های FTIR-ATR برای NA، HSA و کمپلکس NA-HSA در شکل ۵ B نشان داده شده است. مطابق این شکل، دو پیک در اعداد موجی 1650 cm^{-1} و 1547 cm^{-1} دیده می‌شوند که به ترتیب مربوط به گروه‌های آمید I و آمید II در ساختار HSA هستند. برهمکنش منجر به جابجایی پیک جذبی برای آمید I به 1630 cm^{-1} و برای آمید II به 1518 cm^{-1} شده است. تغییر مکان اعداد موجی پیک آمید I شامل ۸۰ درصد ارتعاشات کششی C=O است که متصل به N-H است و برای پیک آمید II شامل ۶۰ درصد از ارتعاشات خمشی N-H و ۴۰ درصد از ارتعاشات کششی C-N هستند که با ساختار دوم پروتئین ارتباط دارند. طیف‌های دو رنگ نمای دورانی (CD) برای مطالعه ساختار دوم و تاخوردگی پروتئین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Greenfield, N. J. 2006). طیف CD برای HSA دارای دو کمینه جذب در طول موج‌های حدود ۲۰۸ و ۲۲۲ نانومتر است که نشان‌دهنده انتقال الکترونی $n \rightarrow \pi^*$ پیوند پپتیدی بوده که مرتبط با محتوای مارپیچ آلفا HSA است (Sengupta et al., 2018). طیف‌های CD مربوط به HSA در ناحیه ۲۶۰-۱۹۵

جدول ۱- مقادیر K_q و K_{sv} برهمکنش NA-HSA.

Table 1. The K_{sv} and K_q values of HSA-NA interaction.

T(K)	K_q ($10^{12} M^{-1} s^{-1}$)	K_{sv} ($10^4 M^{-1}$)	R^2
298	4/74	4/74	0/98
305	5/12	5/12	0/99
310	5/84	5/84	0/99
315	6/67	6/67	0/98



شکل ۴- نمودارهای (A) استرن-ولمر، (B) و هیل در دماهای (A) ۲۹۸، (B) ۳۰۵، (C) ۳۱۰ و (D) ۳۱۵ کلوین.

Figure 4. The Stern-Volmer (A) and Hill (B) plots at 298(A), 305(B), 310(C) and 315(D) Kelvin.

جدول ۲- مقادیر K_b و n برهمکنش NA-HSA.

Table 2. The K_b and n values of HSA-NA interaction.

T(K)	n	K_b ($10^5 M^{-1}$)	R^2
298	0/99	0/46	0/98
305	1/03	0/74	0/99
310	1/09	1/69	0/98
315	1/14	3/56	0/99

جدول ۳- پارامترهای ترمودینامیکی محاسبه شده برهمکنش NA-HSA.

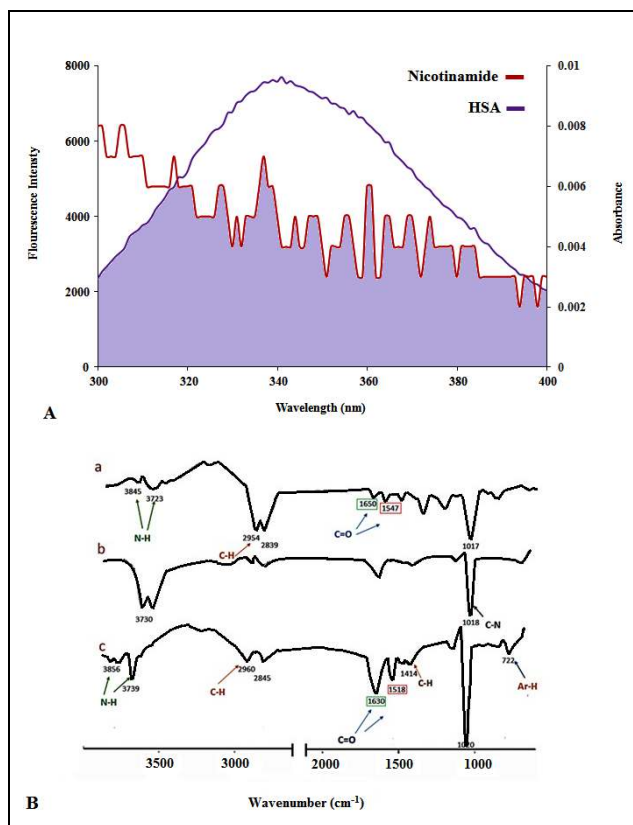
Table 3. Calculated thermodynamic values of HSA-NA interaction.

T(K)	(ΔH) (KJ.mol ⁻¹)	(ΔS) (J.mol ⁻¹ K ⁻¹)	(ΔG) (KJ.mol ⁻¹)	R ²
298	95/9	409/2	-26/2	0/96
305	95/9	409/2	-29/1	0/96
310	95/9	409/2	-31/1	0/96
315	95/9	409/2	-33/2	0/96

جدول ۴- تأثیر pH، یون‌های فلزی، گلوکز و اوره بر مقادیر K_b، n و K_{sv} در برهمکنش NA-HSA.

Table 4. The effect of pH, metal ions, glucose, and urea in K_b, n, and K_{sv} of HSA-NA interaction.

pH / ion / molecule	K _{sv} (10 ⁻⁴ M ⁻¹)	K _b (10 ⁻⁵ M ⁻¹)	N
5/5	3/74	1/170	1/09
7/4	4/74	0/460	0/99
8/0	2/89	0/290	1/00
Fe	0/60	0/003	0/76
Mn	1/56	0/105	0/97
Na	1/87	0/001	0/59
Zn	2/26	0/243	1/00
Cu	2/22	0/003	0/63
Ni	2/25	0/009	0/93
Glucose	2/19	10/010	1/33
Urea	3/08	12/450	1/47



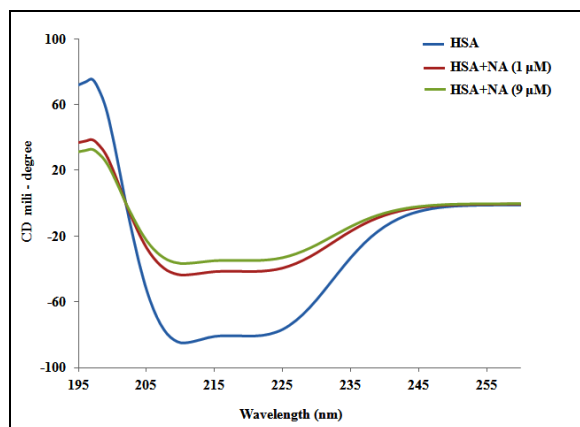
شکل ۵- (A) همپوشانی بین طیف‌های نشری و جذبی، (B) طیف‌های FTIR برای نمودارهای HSA (a)، NA (b)، کمپلکس NA-HSA (c) با نسبت مولی ۱:۱.

Figure 5. (A) The overlapped of emission and absorption spectra. (B) FTIR spectrum for HSA (a), NA (b), HSA-NA complex (c) plots with 1:1 molar ration.

جدول ۵- مقادیر پارمترهای انتقال انرژی FRET.

Table 5. The values of inter molecular energy transfer parameters.

Complex	$J(\times 10^{-15} \text{ cm}^3 \text{ L mol}^{-1})$	E(j)	$R_0(\text{nm})$	$r_0(\text{nm})$
NA-HSA	7/75	0/135	1/60	2/18



شکل ۶- طیف‌های CD پروتئین HSA (۷/۵ میکرومولار) و در حضور غلظت‌های ۱ و ۹ میکرومولار NA.

Figure 6. The CD spectra of HSA (7.5 micromolar) and in the presence of 1 and 9 micromolar of NA.

جدول ۶- مقادیر درصد کمی ساختار دوم HSA در غیاب و حضور NA.

Table 6. Quantified percentage values of HSA secondary structure in the absent and presence of NA.

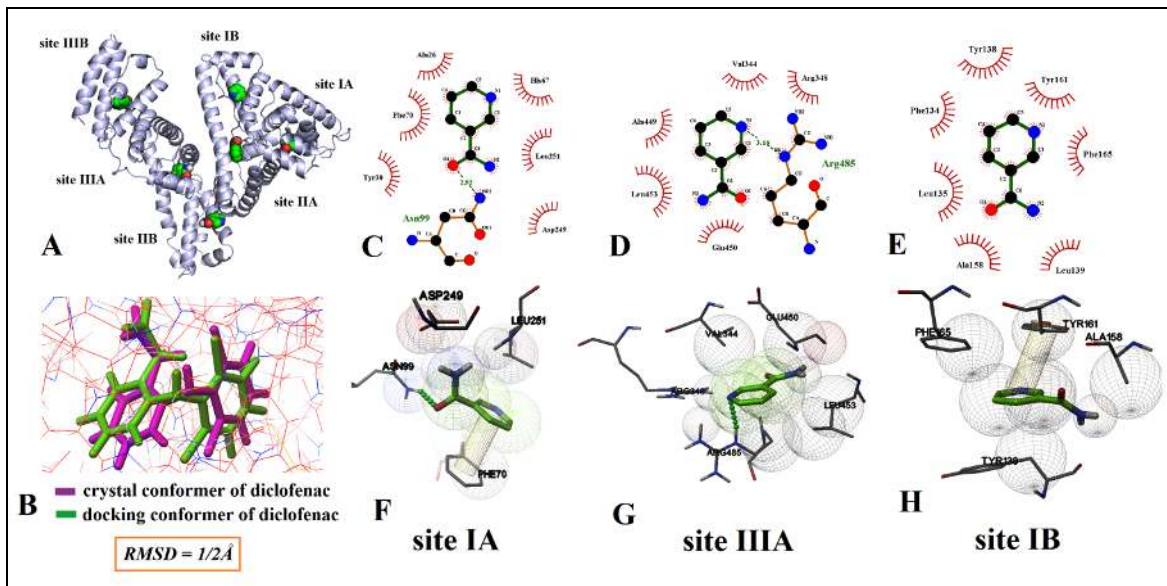
Secondary Structure of protein	HSA (%)	HSA + NA (1μM) (%)	HSA + NA (9μM) (%)
α-Helix	50/40	28/40	25/60
β-sheet (parallel)	3/70	12/00	14/10
β-sheet (anti-parallel)	5/30	10/00	10/90
β-Turn	14/00	17/70	18/30
Random Coil	22/00	35/70	38/00

HSA و NA است که مؤید وجود برهمکنش است (Nusrat et al., 2016). جابجایی آبی که در نشر فلورسانس HSA مشاهده شده است، می‌تواند نشان‌دهنده برهمکنش HSA با NA باشد. (Huang et al., 2015). معمولاً مقدار K_{sv} در برهمکنش داروها با HSA در محدوده 10^3-10^5 لیتر/مول است (Zhang et al., 2020). تعیین نوع مکانیسم خاموش سازی در این مطالعه با توجه به مطالعات قبلی برهمکنش ترکیبات مختلف با انواع پروتئین آلبومین نشان داده شده است، هنگامی که مقدار K_{sv} با افزایش دما افزایشی است که حاکی از مکانیسم خاموش سازی دینامیک است ولی در عین حال مقدار K_q از بیشینه مقدار برهمکنش‌های دینامیک ($K_q < 10^{10}$ لیتر/مول) بیشتر است، احتمال خاموش سازی استاتیک و تشکیل کمپلکس نیز وجود داشته و سهم آن در برهمکنش نسبت به دینامیک می‌تواند بیشتر هم باشد (Al-Shabib et al., 2020; Alvarado et al., 2021).

احتمال برهمکنش واندروالسی به خاطر اندازه و حجم کوچک NA ضعیف است. حلقه آروماتیکی NA بیشتر باعث تشکیل برهمکنش‌های هیدروفوبی شده و در بعضی موارد سبب تشکیل برهمکنش $\pi-\pi$ می‌شود. نتایج بررسی ترمودینامیکی برهمکنش در شرایط آزمایشگاهی نیز مؤید تمایل NA به برهمکنش هیدروفوبی با HSA است.

بحث

مکانیسم مولکولی برهمکنش NA و HSA با استفاده از تلفیق مطالعات اسپکتروسکوپی و داکینگ مولکولی مطالعه شد. با توجه به نتایج اسپکتروسکوپی جذبی، افزایش جذب HSA با افزایش غلظت NA نشان‌دهنده مزدوج شدگی HSA-NA است (Nusrat et al., 2016). همچنین طیف‌های تفاضلی نشان‌دهنده تغییرات قابل توجه در فرم طیف‌ها و همچنین عدم انطباق آن‌ها با طیف‌های خالص



شکل ۷- (A)، ساختار سه‌بعدی HSA و برهمکنش NA در جایگاه‌های اتصال. (B)، هم‌ترازی ساختار کریستالیزه با کانفورمر داک شده دیکلوفناک. نمایش دوبعدی (C-E) برهمکنش NA-HSA به‌وسیله نرم‌افزار لیگ پلات و نمایش سه‌بعدی (F-H) در ۳ جایگاه اتصال.

Figure 7. (A), Three-dimensional structure of HSA and interaction of NA at binding sites. (B), superimposition of crystal and docked conformers of diclofenac. (C-E), two-dimensional representation of HSA-NA interaction by LigPlot software and three dimensional (F-H) representation at three binding sites.

جدول ۷- مقادیر ΔG ، اسیدآمین‌های شرکت‌کننده در پیوند هیدروژنی و برهمکنش پای - پای بین HSA و NA.

Table 7. The values of ΔG , amino acids participate in H bonds and π - π interaction between HSA and NA.

Binding Site	ΔG (Kcal/mol)	Hydrogen bonding	π - π interaction
IA	-6/1	Asn99	Phe70
IIA	-4/6	Cys246-Tyr148	---
IIIA	-5/5	Arg485-Arg348-Tyr411	Trp214-Tyr411
IB	-6/1	Leu135	Phe165-Tyr168-Tyr138
IIB	-5/1	Asp324	---
IIIB	-5/3	Ser579-Lys525	Phe551

تعداد جایگاه اتصال (n)، نشان‌دهنده تأثیر لیگاند متصل‌شده بر سهولت اتصال لیگاند بعدی است (Farsad et al., 2021). مقادیر n بیشتر از ۱، مساوی ۱ و کمتر از ۱، به ترتیب نشانگر تسهیل اتصال لیگاند بعدی، عدم تأثیر و کاهش اتصال است. اتصال NA اثر محسوسی بر اتصال NA بعدی را ندارد زیرا مقدار عددی تعداد جایگاه اتصال در حدود یک برای دماهای مختلف است (Farsad et al., 2021). در مطالعه انتقال انرژی رزونانس فورستر بر اساس نتایج، فاصله محاسبه شده بین مولکول گیرنده (NA) و مولکول دهنده (HSA) کوچک‌تر از ۷ نانومتر و در رابطه $r_0 > 0.5R_0 > 1/\delta R_0$ صدق می‌کند که حاکی از انتقال انرژی بین HSA و NA است (Steinhardt et al., 1971; Safarnejad et al., 2016). در مقایسه یافته‌های این مطالعه با نتایج برهمکنش NA با BSA (Xu et al., 2008) نشان

بنابراین با این تفاسیر می‌توان بیان نمود که در برهمکنش NA-HSA هر دو نوع مکانیسم خاموش‌سازی می‌توانند دخیل باشند. با توجه به شکل ۲ B که طیف‌های جذبی گونه‌های خالص و تفاضل آنها با طیف ناشی از برهمکنش آنها را نشان داده است و در آن طیف‌های تفاضلی با طیف‌های HSA و NA خالص همپوشانی ندارند، احتمال تشکیل کمپلکس وجود دارد. همچنین مقدار K_b برای برهمکنش ترکیبات دارویی و شبه دارویی با HSA نیز در محدوده 10^3 - 10^5 لیتر/مول گزارش شده است. در برهمکنش NA و HSA با افزایش دما مقدار ثابت اتصال (K_b) افزایش می‌یابد. با توجه به مقدار ثابت اتصال در دمای معمول ($4/6 \times 10^4$ لیتر/مول)، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که برهمکنش قابل توجهی بین NA و HSA وجود دارد (Safarnejad et al., 2016; Poureshghi et al., 2017; Dubey et al., 2020).

مشاهده شده در این ناحیه در حضور NA نشان داد که ساختار دوم HSA بخصوص محتوای مارپیچ آلفا دچار تغییر می‌شود. این نتیجه منطبق با نتایج طیف‌های CD است که کاهش محتوای ساختار دوم مارپیچ آلفا در حضور NA را نشان می‌دهد. بدلیل تغییرات کانفورماسیون HSA که در اثر برهمکنش با لیگاندها اتفاق می‌افتد، حفرات هیدروفوبیکی HSA در معرض محیط هیدروفوبی قرار می‌گیرند و شرایط اولیه ریزمحیط اطراف اسیدآمینه‌های آروماتیک HSA تغییر می‌یابد که در نهایت باعث تغییر فرم شکل طیف HSA در حضور NA می‌شود (Thakur et al., 2021). با توجه به نتایج حاصل از مطالعات داکینگ مولکولی مشاهده شد که NA تمایل کمی برای تشکیل پیوند هیدروژنی داشته و حلقه آروماتیک آن موجب تسهیل برهمکنش‌های هیدروفوبی می‌شود که این نتایج با در نظر گرفتن ماهیت هیدروفوبی جایگاه‌های اتصال HSA مخصوصاً در جایگاه اتصال IIIA، مطابقت دارد (Kharazian et al., 2021). همچنین تأثیر نیروهای هیدروفوبی بر روی برهمکنش در مقادیر مثبت تغییرات آنتالپی و آنتروپی منعکس شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده از این مطالعه می‌توان گفت NA برهمکنش مطلوبی با HSA در جایگاه‌های اتصال مطلوب سایر داروها دارد.

نتیجه‌گیری

به‌دلیل اهمیت برهمکنش داروها با HSA در مطالعات فارماکوکینتیکی و فارماکودینامیکی و نیز تأثیرات فارماکولوژیکی داروها در درمان و پیشگیری از بیماری‌ها، مکانیسم مولکولی برهمکنش NA با HSA مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج پژوهش حاضر نشان‌دهنده برهمکنش مؤثر بین NA با HSA است. ثابت‌های مختلف برهمکنش مانند ثابت خاموش‌سازی و اتصال و نیز پارامترهای ترمودینامیکی محاسبه شده است و اثرات یون‌های فلزی و مولکول‌های گلوکز و اوره به‌همراه تغییرات pH و دما بر پارامترهای قیدشده مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند. آنالیز انواع طیف‌ها نشان دهنده اتصال NA به HSA است. یون‌های فلزی سبب کاهش ثابت اتصال شده و در نتیجه موجب کاهش زمان ذخیره دارو در خون می‌شوند، اما اثرات گلوکز و اوره در برهمکنش برعکس اثر یون‌ها است. اصلی‌ترین نیروی غیرکووالانسی مؤثر در برهمکنش، نیروی آب‌گریز است که این نتایج توسط مطالعات شبیه‌سازی داکینگ مولکولی نیز تأیید گردید. با توجه به برهمکنش مطلوب NA با جایگاه اتصال داروها در HSA، در صورت وجود برهمکنش رقابتی، تنظیم دوز داروها در زمان مصرف NA به‌عنوان مکمل دارویی باید مورد توجه قرار

می‌دهد که K_{sv} با افزایش دما در هر دو مطالعه افزایش یافته و مقدار n در دماهای مختلف حدود ۱ است. تغییرات آنتالپی و آنتروپی مثبت و واکنش خودبه‌خودی است. در هر دو پژوهش احتمال انتقال انرژی FRET کمتر از ۷ نانومتر گزارش شده است، بنابراین احتمال انتقال انرژی غیرتشنشعی بسیار زیاد است. با توجه به مطالعات انجام گرفته، اگرچه ترکیب آمینواسیدی HSA و BSA بسیار شبیه هم‌دیگر هستند، ولی در میزان اتصال و تشکیل کانفورماسیون کمپلکس، به‌طور قابل ملاحظه‌ای از هم‌دیگر متفاوتند (Steinhardt et al., 1971; Farsad et al., 2021). این تفاوت تاحدی مربوط به وجود دو عدد اسیدآمینه تریپتوفان در BSA در مقایسه با HSA (با یک عدد اسیدآمینه تریپتوفان) است که سبب تسهیل در آنالیز نتایج HSA بخصوص داده‌های فلورسانس می‌شود (Safarnejad et al., 2016). در pH بازی، تغییرات بار NA، HSA و دافعه بین بارهای همسان منفی زیاد بوده که باعث کاهش K_b شده، درحالی‌که مقدار آن در pH اسیدی حدود ۴ برابر است. در pH خنثی مقدار ثابت اتصال نسبت به pH اسیدی کمتر شده است. در حضور یون‌های فلزی، معمولاً توانایی اتصال دارو به HSA افزایش یا کاهش می‌یابد (Ding et al., 2010; Byadagi et al., 2017). حاضر، حضور یون‌های فلزی باعث کاهش K_b و n شدند که احتمالاً به‌دلیل اثر رقابتی بین یون‌های فلزی و NA در اتصال به HSA، تغییر کانفورماسیون جایگاه‌های اتصال در حضور یون‌ها و یا رقابت واکنش‌های شلاتاسیون با برهمکنش NA و HSA شده است. با توجه به امکان گلیک‌شدگی غیرآنزیمی، ساختار HSA و عملکرد آن می‌تواند تحت تأثیر گلوکز قرار گیرد. به‌طوری‌که گلیک‌شدن باعث تغییر ساختار دوم آلبومین از مارپیچ آلفا به صفحات بتا و تانخورده شده و در نهایت به‌دلیل اثر تعاونی مثبت و تسهیل اتصال NA، موجب افزایش K_b و n می‌شود. در نارسایی شدید کلیوی سطح اوره سرم بشدت افزایش یافته که می‌تواند بر ساختار HSA اثر بگذارد (Otagiri & Chuang, 2009). اوره می‌تواند ساختار HSA را طی دو مرحله حدواسط و دنا‌توره به کانفورماسیون تانخورده تبدیل کند (Rehman et al., 2014). تأثیر اوره در برهمکنش NA با HSA مشابه گلوکز است. در حضور گلوکز و اوره، NA با نواحی بیشتری از HSA برهمکنش دارد. اوره، HSA را به کانفورماسیون تانخورده تبدیل کرده و تمایل اتصال NA به نواحی بیشتری از HSA از جمله دومین III را امکان‌پذیر می‌سازد (Gull et al., 2007). با توجه به اینکه طیف FTIR-ATR در محدوده 1650 cm^{-1} الی 1660 cm^{-1} مرتبط با ساختار دوم مارپیچ آلفا در پروتئین‌ها و البته HSA است (Gao et al., 2010; Usoltsev et al., 2019) تغییرات

REFERENCES

- Afkham, S., Hanaee, J., Zakariazadeh, M., Fathi, F., Shafiee, S. & Soltani, S. 2020. Molecular mechanism and thermodynamic study of Rosuvastatin interaction with human serum albumin using a surface plasmon resonance method combined with a multi-spectroscopic, and molecular modeling approach. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 168: 1-10.
- Al-Shabib, N.A., Khan, J.M., Malik, A., Rehman, M.T., AlAjmi, M.F., Husain, F.M., Ahmed, M.Z. & Alamery, S.F. 2020. Molecular interactions of food additive dye quinoline yellow (Qy) with alpha-lactalbumin: Spectroscopic and computational studies. *Journal of Molecular Liquids* 311: 1-8.
- Alhumaydhi, F.A., Aljasir, M.A., Aljohani, A.S., Alsagaby, S.A., Alwashmi, A.S., Shahwan, M., Hassan, M.I., Islam, A. & Shamsi, A. 2021. Probing the interaction of memantine, an important Alzheimer's drug, with human serum albumin: In silico and In vitro approach. *Journal of Molecular Liquids* 340: 116888.
- Alvarado, Y.J., Vera-Parra, E., Mendez, A., Romero, F., Gonzalez-Paz, L.A., Moncayo, L.S., Restrepo, J., Rodríguez-Lugo, P., Paz, J.L. & Vera-Villalobos, J. 2021. Conformational change of ovalbumin induced by surface cavity binding of N-Phthaloyl gamma-aminobutyric acid derivative: a study theoretical and experimental. *Biointerface Research in Applied Chemistry* 11: 9566-9586.
- Amézqueta, S., Beltrán, J.L., Bolioli, A.M., Campos-Vicens, L., Luque, F.J. & Ràfols, C. 2021. Evaluation of the interactions between Human Serum Albumin (HSA) and Non-Steroidal Anti-Inflammatory (NSAIDs) drugs by multiwavelength molecular fluorescence, structural and computational analysis. *Pharmaceuticals* 14: 214.
- Andrade, J., Ramirez, R., Conde, M., Sobrino, F. & Bedoya, F.J. 1997. Nicotinamide inhibits inducible nitric oxide synthase enzyme activity in macrophages by allowing nitric oxide to inhibit its own formation. *Life Sciences* 61: 1843-1850.
- Awasthi, S. & Saraswathi, N.T. 2016. Non-enzymatic glycation mediated structure-function changes in proteins: case of serum albumin. *RSC Advances* 6: 90739-90753.
- Barzegar, A., Naghizadeh, E., Zakariazadeh, M. & Azamat, J. 2017. Molecular dynamics simulation study of the HIV-1 protease inhibit ion using fullerene and new fullerene derivatives of carbon nanostructures. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 17: 633-647.
- Byadagi, K., Meti, M., Nandibewoor, S. & Chimatadar, S. 2017. Investigation of binding behaviour of procainamide hydrochloride with human serum albumin using synchronous, 3D fluorescence and circular dichroism. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 7: 103-109.
- Bryzewska, M. 2012. Photo-physical and structural interactions between viologen phosphorus-based dendrimers and human serum albumin. *Journal of Luminescence* 132: 1553-1563.
- گردد. علاوه بر این تغییرات عدیده میزان برهمکنش NA با HSA در حضور گلوکز، اوره و pH اسیدی که ممکن است در برخی شرایط پاتولوژیکی شاهد چنین تغییراتی باشیم باید مورد توجه ویژه قرار گیرد. در کنار موارد بیان شده اطلاعات حاصل می‌تواند در طراحی داروها و ترکیبات با ویژگی‌های مشابه مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

از دانشگاه علوم پزشکی تبریز به جهت حمایت مالی از این پژوهش تحت گرنت‌های شماره ۵۲/۸۷۵۰ و ۶۰۱۴۲ صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد. همچنین کد اخلاق طرح برای مطالعات غیرانسانی و آزمایشگاهی IR.TBZMED.VCR.REC.۱۳۹۸.۰۲۰ است.

- Ciepluch, K., Katir, N., Kadib, A.El., Weber, M., Caminade, A.M., Bousmina, M., Majoral, J.P. & Collins, T. M., Caimi, R., Lynch, P.R., Sheffield, J., Mitra, A., Stueber, K. & Smith, Y.R. 1991. The effects of nicotinamide and hyperbaric oxygen on skin flap survival. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery* 25: 5-7.
- Ding, F., Liu, W., Zhang, L., Yin, B. & Sun, Y. 2010. Sulfometuron-methyl binding to human serum albumin: Evidence that sulfometuron-methyl binds at the Sudlow's site I. *Journal of Molecular Structure* 968: 59-66.
- Dubey, S., Madana, S.K., Kallubai, M., Sarkar, A. & Subramanyam, R. 2020. Unraveling the stability of plasma proteins upon interaction of synthesized uridine products: biophysical and molecular dynamics approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 38: 1927-1937.
- Fanali, G., Masi, A.Di., Trezza, V., Marino, M., Fasano, M. & Ascenzi, P. 2012. Human serum albumin: from bench to bedside. *Molecular Aspects of Medicine* 33: 209-290.
- Farsad, S.A., Haghaei, H., Shaban, M., Zakariazadeh, M. & Soltani, S. 2021. Investigations of the molecular mechanism of diltiazem binding to human serum albumin in the presence of metal ions, glucose and urea. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*: 1-12.
- Francis, J.A., Shalauddin, M., Ridzwan, N.F., Mohamad, S.B., Basirun, W.J. & Tayyab, S. 2020. Interaction mechanism of an antimalarial drug, sulfadoxine with human serum albumin. *Spectroscopy Letters* 53: 391-405.
- Fratoni, V. & Brandi, M.L. 2015. B vitamins, homocysteine and bone health. *Nutrients* 74: 2176-2192.
- Fukuwatari, T. & Shibata, K. 2007. Effect of nicotinamide administration on the tryptophan-nicotinamide pathway in humans. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 77: 255-262.
- Fujimura, M., Tominaga, T. & Yoshimoto, T. 1997. Nicotinamide inhibits inducible nitric oxide synthase mRNA in primary rat glial cells. *Neuroscience Letters* 228: 107-110.
- Gao, W., Li, N., Chen, Y., Xu, Y., Lin, Y., Yin, Y. & Hu, Z. 2010. Study of interaction between syringin and human serum albumin by multi-spectroscopic method and atomic force microscopy. *Journal of Molecular Structure* 983: 133-140.
- Gholizadeh, S., Haghaei, H., Karami, H., Zakariazadeh, M., Shokri, J. & Soltani, S. 2021. Mode of binding, kinetic and thermodynamic properties of a lipid like drug (Fingolimod) interaction with human serum albumin. *BioImpacts*. In press.
- Greenfield, N.J. 2006. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols* 1: 2876-2890.
- Gull, N., Sen, P., Kabir-ud-Din. & Khan, R.H. 2007. Effect of physiological concentration of urea on the conformation of human serum albumin. *The Journal of Biochemistry* 141: 261-268.
- Haghaei, H., Hosseini, S.R.A., Soltani, S., Fathi, F., Mokhtari, F., Karima, S. & Rashidi, M.R. 2020. Kinetic and thermodynamic study of beta-Boswellic acid interaction with Tau protein investigated by surface plasmon resonance and molecular modeling methods. *BioImpacts* 10: 17-25.
- Harding, S.E., Gillis, R.B., Almutairi, F., Erten, T., Kök, M.Ş. & Adams, G.G. 2015. Recent advances in the analysis of macromolecular interactions using the matrix-free method of sedimentation in the analytical ultracentrifuge. *Biology* 4: 237-250.
- Hou, H.N., Qi, Z.D., Yang, Y.W.Ou., Liao, F.L., Zhang, Y. & Liu, Y. 2008. Studies on interaction between Vitamin B12 and human serum albumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 47: 134-139.
- Huang, S., Qiu, H., Lu, S., Zhu, F. & Xiao, Q. 2015. Study on the molecular interaction of graphene quantum dots with human serum albumin: combined spectroscopic and electrochemical approaches. *Journal of Hazardous Materials* 285: 18-26.
- Jayabharathi, J., Thanikachalam, V., Jayamoorthy, K. & Perumal, M.V. 2011. A physicochemical study of excited state intramolecular proton transfer process: luminescent chemosensor by spectroscopic investigation supported by ab initio calculations. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 79: 6-16.
- Karami, K., Rahimi, M., Zakariazadeh, Mostafa., Buyukgungor, Orhan. & Amirghofran, Z. 2018. New phosphorous ylide palladacyclic: Synthesis, characterization, X-Ray crystal structure, biomolecular interaction studies, molecular docking and in vitro cytotoxicity evaluations. *Journal of Organometallic Chemistry* 878: 60-76.
- Karami, K., Rahimi, M., Zakariazadeh, Mostafa., Buyukgungor, Orhan., Momtazi-borojeni, A.A. & Esmaeili, S.A. 2019. A novel silver (I) complex of α -keto phosphorus ylid: Synthesis, characterization, crystal structure, biomolecular interaction studies, molecular docking and in vitro cytotoxic evaluation. *Journal of Molecular Structure* 1177: 430-443.
- Kennedy, D.O. 2016. B vitamins and the brain: mechanisms, dose and efficacy—a review. *Nutrients* 8: 68.
- Kharazian, B., Ahmad, A. & Mabudi, A. 2021. A molecular dynamics study on the binding of gemcitabine to human serum albumin. *Journal of Molecular Liquids* 337: 116496.
- Kotani, A., Watanabe, M., Yamamoto, K., Kusu, F. & Hakamata, H. 2016. Determination of eicosapentaenoic, docosahexaenoic, and arachidonic acids in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytical Sciences* 32: 1011-1014.
- Li, X., Ou, X., Wang, B., Rong, H., Wang, B., Chang, C., Shi, B., Yu, L. & Lu, M. 2020. Rich polymorphism in nicotinamide revealed by melt crystallization and crystal structure prediction. *Communications Chemistry* 3: 1-8.
- Mamizadeh, R. & Razzaghi-Asl, N. 2018. Molecular modeling of drug-albumin interactions: A case study on antifungal agents. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences* 18: 173-190.
- Maqbool, M.A., Aslam, M., Akbar, W. & Iqbal, Z.

2018. Biological importance of vitamins for human health: A review. *Journal of Agriculture and Basic Science* 2: 50-58.
- Nakajou, K., Watanabe, H., Kragh-Hansen, U., Maruyama, T. & Otagiri, M.** 2003. The effect of glycation on the structure, function and biological fate of human serum albumin as revealed by recombinant mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1623: 88-97.
- Nusrat, S., Siddiqi, M.K., Zaman, M., Zaidi, N., Ajmal, M.R., Alam, P., Qadeer, A., Abdelhameed, A.S. & Khan, R.H.** 2016. A comprehensive spectroscopic and computational investigation to probe the interaction of antineoplastic drug nordihydroguaiaretic acid with serum albumins. *PLoS One* 11: 1-20.
- Otagiri, M. & Chuang, V.T.G.** 2009. Pharmaceutically important pre-and posttranslational modifications on human serum albumin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 32: 527-534.
- Otsuka, A., Hanafusa, T., Miyagawa, J., Kono, N. & Tarui, S.** 1991. Nicotinamide and 3-aminobenzamide reduce interferon-gamma-induced class II MHC (HLA-DR and -DP) molecule expression on cultured human endothelial cells and fibroblasts. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 13: 263-280.
- Pietrzak, L., Mogielnicki, A. & Buczek, W.** 2009. Nicotinamide and its metabolite N-methylnicotinamide increase skin vascular permeability in rats. *Clinical and Experimental Dermatology* 34: 380-384.
- Poureshghi, F., Ghandforoushan, P., Safarnejad, A. & Soltani, S.** 2017. Interaction of an antiepileptic drug, lamotrigine with human serum albumin (HSA): Application of spectroscopic techniques and molecular modeling methods. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 166: 187-192.
- Qais, F.A., Sarwar, T., Ahmad, I., Khan, R.A., Shahzad, S.A. & Husain, F.M.** 2021. Glyburide inhibits non-enzymatic glycation of HSA: An approach for the management of AGEs associated diabetic complications. *International Journal of Biological Macromolecules* 169: 143-152.
- Rampogu, S. & Lemuel, M.R.** 2016. Network based approach in the establishment of the relationship between type 2 diabetes mellitus and its complications at the molecular level coupled with molecular docking mechanism. *BioMed Research International* 2016: 1-6.
- Ravindranath, P.A., Forli, S., Goodsell, D.S., Olson, A.J. & Sanner, M.F.** 2015. AutoDockFR: advances in protein-ligand docking with explicitly specified binding site flexibility. *PLoS Computational Biology* 11: 1-28.
- Rehman, M.T., Shamsi, H. & Khan, A.U.** 2014. Insight into the binding mechanism of imipenem to human serum albumin by spectroscopic and computational approaches. *Molecular Pharmaceutics* 11: 1785-1797.
- Rolfe, H.M.** 2014. A review of nicotinamide: treatment of skin diseases and potential side effects. *Journal of Cosmetic Dermatology* 13: 324-328.
- Safarnejad, A., Shaghghi, M., Dehghan, G. & Soltani, S.** 2016. Binding of carvedilol to serum albumins investigated by multi-spectroscopic and molecular modeling methods. *Journal of Luminescence* 176: 149-158.
- Sengupta, P., Sardar, P.S., Roy, P., Dasgupta, S. & Bose, A.** 2018. Investigation on the interaction of Rutin with serum albumins: Insights from spectroscopic and molecular docking techniques. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 183: 101-110.
- Snaird, V.A., Damian, D.L. & Halliday, G.M.** 2019. Nicotinamide for photoprotection and skin cancer chemoprevention: A review of efficacy and safety. *Experimental Dermatology* 28: 15-22.
- Soltani, S., Babaei, H., Asadpour-Zeynali, K. & Jouyban, A.** 2007. Modeling vasorelaxant activity of some drugs/drug candidates using artificial neural networks. *Journal of Pharmacology and Toxicology* 2: 411-426.
- Steinhardt, J., Krijn, J. & Leidy, J.G.** 1971. Differences between bovine and human serum albumins. Binding isotherms, optical rotatory dispersion, viscosity, hydrogen ion titration, and fluorescence effects. *Biochemistry* 10: 4005-4015.
- Sudlow, G., Birkett, D. & Wade, D.** 1976. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Molecular Pharmacology* 12: 1052-1061.
- Szkudlarek, A., Sulowska, A., Maciążek-Jurczyk, M., Chudzik, M. & Równicka-Zubik, J.** 2016. Effects of non-enzymatic glycation in human serum albumin. Spectroscopic analysis. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 152: 645-653.
- Taghipour, P., Zakariazadeh, M., Sharifi, M., Dolatabadi, J.E.N. & Barzegar, A.** 2018. Bovine serum albumin binding study to erlotinib using surface plasmon resonance and molecular docking methods. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 183: 11-15.
- Tatardar, S., Jouyban, A., Soltani, S. & Zakariazadeh, M.** 2015. QSAR analysis of cyclooxygenase inhibitors selectivity index (COX1/COX2): Application of SVM-RBF and MLR methods. *Pharmaceutical Sciences* 21: 86-93.
- Thakur, A., Patwa, J., Pant, S., Sharma, A. & Flora, S.J.S.** 2021. Interaction study of monoisoamyl dimercaptosuccinic acid with bovine serum albumin using biophysical and molecular docking approaches. *Scientific Reports* 11: 4068.
- Trott, O. & Olson, A.** 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry* 31: 455-461.
- Ustolsev, D., Sitnikova, V., Kajava, A. & Uspenskaya, M.** 2019. Systematic FTIR spectroscopy study of the secondary structure changes in human serum albumin under various denaturation conditions. *Biomolecules* 9: 1-17.
- Williams, A. & Ramsden, D.** 2005. Nicotinamide homeostasis: a xenobiotic pathway that is key to

- development and degenerative diseases. *Medical Hypotheses* 65: 353-362.
- Wohlrab, J. & Kreft, D.** 2014. Niacinamide – mechanisms of action and its topical use in dermatology. *Skin Pharmacology and Physiology* 27: 311-315.
- Xu, H., Liu, Q. & Wen, Y.** 2008. Spectroscopic studies on the interaction between nicotinamide and bovine serum albumin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 71: 984-988.
- Yadav, R., Sengupta, B. & Sen, P.** 2014. Conformational fluctuation dynamics of domain I of human serum albumin in the course of chemically and thermally induced unfolding using fluorescence correlation spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B* 118: 5428-5438.
- Yang, F., Zhang, Y. & Liang, H.** 2014. Interactive association of drugs binding to human serum albumin. *International Journal of Molecular Sciences* 15: 3580-3595.
- Yaseen, Z., Aswal, V., Zhou, X. & Haider, S.** 2018. Morphological changes in human serum albumin in the presence of cationic amphiphilic drugs. *New Journal of Chemistry* 42: 2270-2277.
- Yu, J., Liu, J.Y., Xiong, W.M., Zhang, X.Y. & Zheng, Y.** 2019. Binding interaction of sodium benzoate food additive with bovine serum albumin: multi-spectroscopy and molecular docking studies. *BMC Chemistry* 13: 1-8.
- Zakariazadeh, M., Barzegar, A., Soltani, S. & Aryapour, H.** 2015. Developing 2D-QSAR models for naphthyridine derivatives against HIV-1 integrase activity. *Medicinal Chemistry Research* 24: 2485-2504.
- Zhang, J., Gao, X., Huang, J. & Wang, H.** 2020. Probing the interaction between human serum albumin and 9-hydroxyphenanthrene: a spectroscopic and molecular docking study. *ACS Omega* 5: 16833-16840.
- Zhao, T., Liu, Z., Niu, J., Lv, B., Xiao, Y. & Li, Y.** 2020. Investigation of the interaction mechanism between salbutamol and human serum albumin by multispectroscopic and molecular docking. *BioMed Research International* 2020: 1-8.

How to cite this article:

Parvizi Fard, G., Solouki, L., Zakariazadeh, M., Haghaci, H. & Soltani, S. 2022. Study of nicotinamide interaction with human serum albumin using spectroscopic techniques and molecular docking simulation. *Nova Biologica Reperta* 9: 153-168. (In Persian).

پرویزی فرد، گ.، سلوکی، ل.، زکریازاده، م.، حقایقی، ح. و سلطانی، س. ۱۴۰۱. مطالعه برهمکنش نیکوتین‌آمید با آلبومین سرم انسانی با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی و شبیه‌سازی داکینگ مولکولی. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۹: ۱۶۸-۱۵۳.