

مطالعات اسپکتروفتومتری مرئی فرابنفش اثر سم تترااتیل پیروفسفات به عنوان یک آلاینده زیست محیطی بر ساختار و پایداری هموگلوبین انسانی

خلاصه

مقدمه: نرخ روبه رشد جمعیت جهان و نیاز روزافزون به مواد غذایی، استفاده بی‌رویه از مواد شیمیایی و سموم آفت‌کش در صنعت کشاورزی را در پی داشته است و این موضوع موجب آلودگی های زیست محیطی در آب، خاک، هوا و در پی آن بروز مسمومیت‌های حاد و مزمن در انسان و سایر جانداران گردیده است. طیف وسیعی از این مسمومیت‌ها از طریق آفت‌کش‌های ارگانوفسفره ایجاد می‌شود لذا، تحقیق در زمینه فهم سازوکار اثر سموم با رویکرد کاهش بیماری‌ها و عوارض حاد و مزمن ناشی از استفاده سموم و مواد شیمیایی از اهمیت به‌سزایی برخوردار است.

روش بررسی: اثر تترااتیل پیروفسفات به‌عنوان یک سم ارگانوفسفره بر ساختار و پایداری هموگلوبین انسان بالغ و همچنین اثرات همولیزی این سم با استفاده از تکنیک‌های طیف‌سنجی نوری ماوراء بنفش مرئی نرمال و دمایی و تبدیل فوریه مادون قرمز (ATR/FTIR) با روش‌های تیتراسیون با سم و نیز آنکوباسیون در زمان‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج با نمونه شاهد مقایسه گردید.

یافته‌ها: میزان پتانسیل همولیزی سم بر روی سلول‌های قرمز خونی در مقایسه با نمونه‌های کنترل منفی و مثبت بررسی شد که نشانگر افزایش فعالیت همولیزی سم تترااتیل پیروفسفات با افزایش غلظت سم بر روی سلول‌های قرمز خون می‌باشد. بر اثر برهمکنش تترااتیل پیروفسفات با پروتئین هموگلوبین در بخش گلوبین و مرکز هم، تغییراتی القا می‌گردد و این پروتئین در اعمال شرایط حرارتی در حضور سم رفتار دوگانه‌ای را از خود نشان می‌دهد. بر اساس داده‌های طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز نیز ساختار دوم هموگلوبین در برهمکنش با این سم دچار تغییرات نگردیده است.

نتیجه‌گیری: این ترکیب در غلظت‌های بسیار پایین توانایی لیز سلول‌های قرمز خون و همچنین القای تغییرات در سطح پروتئین هموگلوبین و نفوذ به پاکت هیدروفوب را دارا است، همچنین در شرایط حرارتی این توانایی را دارد که ساختار پروتئین را فشرده‌تر نماید. تترااتیل پیروفسفات پتانسیل تغییر ساختار دوم هموگلوبین را ندارد.

واژه‌های کلیدی: هموگلوبین، سم تترااتیل پیروفسفات، طیف‌سنجی نوری، همولیز

آیدا درودیان^۱
خاطره خرسندی^۲
پروانه مقامی^۱
رضا حسین‌زاده^۳

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲. گروه پژوهشی فنودینامیک، مرکز تحقیقات لیزر پزشکی، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳. گروه پژوهشی لیزر پزشکی، مرکز تحقیقات لیزر پزشکی، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

نویسنده مسئول: پروانه مقامی، تلفن: ۰۲۱۴۴۸۶۵۲۲۳
پست الکترونیک: maghami@srbiau.ac.ir

نویسنده مسئول: رضا حسین‌زاده، تلفن: ۰۲۱۶۶۴۹۰۷۶۴
پست الکترونیک: r.hoseinzadeh@ut.ac.ir

مقدمه

در مورد اثرات دو حشره کش کلروپایریفوس (از گروه سموم ارگانوفسفره) و سایپرترین بر دو پروتئین خون، هموگلوبین گاوی و سرم آلبومین گاوی انجام دادند که نتایج نشان‌دهنده اتصال ضعیف‌تر این سموم به هموگلوبین نسبت به سرم آلبومین می‌باشد، همچنین اتصال این سموم به پروتئین‌های خونی می‌تواند بر روی روند توزیع دفع و متابولیسم آن‌ها اثر گذار باشد [۱۰]. Yan-Quing Wan و همکاران نیز در سال ۲۰۰۷ اثر علف‌کش پاراکوات بر هموگلوبین را مورد مطالعه قرار دادند که نتایج حاکی از واکنش گروه هم با آنیون سوپراکسید بر اساس کاهش باند سورت می‌باشد. گروه‌های هم دچار تغییرات ساختاری شدند و حتی به وسیله آنیون سوپر اکسید ایجاد شده به واسطه حضور سم تخریب شدند. نتایج بیانگر وجود یک دسته جایگاه اتصال سم بر روی هموگلوبین می‌باشد و بر همکنش‌های آب‌گریز و نیروهای الکترواستاتیک نقش‌های عمده را در پایداری کمپلکس سم-پروتئین ایفا می‌کنند [۱۱]. در سال ۲۰۱۰، Fei Ding و همکاران گزارشی مبنی بر برهمکنش حشره کش ایمیداکلوپراید (از گروه نئونیکوتینوئیدها) با هموگلوبین انسانی توسط دستگاه‌های فلورسانس، دورنگ‌نمایی حلقوی، اسپکتروسکوپی مرئی فرابنفش، فلورسانس هم-زمان و سه‌بعدی منتشر نمودند. نتایج حاکی از خاموشی فلورسانس ذاتی هموگلوبین از طریق مکانیسم خاموشی ایستا بود و همچنین روشن شد برهمکنش‌های آب‌گریز و پیوندهای هیدروژنی نیروهای بین مولکولی غالب در پایدار کردن این کمپلکس (سم-هموگلوبین) هستند. آزمایش‌های رقابتی (با ANS) نیز نشان داد که نواحی هیدروفوب عمده‌ترین جایگاه برای اتصال سم به هموگلوبین می‌باشند. نتایج طیف‌سنجی‌های دورنگ‌نمایی حلقوی و فلورسانس هم‌زمان و سه‌بعدی نیز نشانگر این بود که ساختار دوم هموگلوبین و پایداری فیزیولوژیک آن توسط سم تغییر یافته است [۱۲]. تاکنون، گزارش‌های بالینی متعددی در مورد مسمومیت با تترااتیل‌پیروفسففات گزارش شده است، به‌طور مثال در سم‌پاشی مزارع توسط تترااتیل‌پیروفسففات در یکی از ایالت‌های آمریکا، این سم منجر به مسمومیت تنفسی در فاصله ۱۵ مایلی مکان سم‌پاشی و اختلالات گوارشی ۱۵ رأس دام و مرگ دو دام شده بود [۱۳]. در سال ۱۹۴۹ نیز گزارشی مبنی بر بروز علائم سیستمیک ناشی از مسمومیت با سموم ارگانوفسفره را در کارگری که در معرض تماس پوستی با محلول ۲۰ درصد از تترااتیل‌پیروفسففات قرار داشته و از میوه شسته‌نشده آغشته به این سم نیز استفاده کرده‌بوده‌است، منتشر شد [۱۴]. گزارش دیگر مربوط به کارگرانی است که به‌طور مداوم در تماس با این سم بوده‌اند که با وجود استفاده از لباس و ماسک‌های پوشاننده، به‌علت تماس لباس کار عرق کرده آن‌ها با محلول سم، به‌مرور زمان سم از طریق پوستی جذب و منجر به بروز علائم سیستمیک مسمومیت با سموم ارگانوفسفره به‌علت مهار آنزیم استیل‌کولین‌استراز شده بود [۱۵]. از آنجا که تاکنون پژوهشی مبنی بر اثرهای مولکولی تترااتیل‌پیروفسففات بر ساختار پروتئین هموگلوبین انسانی صورت نگرفته است، لذا تحقیق حاضر به بررسی اثرات این سم بر

همگام با افزایش جمعیت جهان نیاز به مواد شیمیایی نیز رو به افزایش است. به‌همین دلیل امکانات تولید و فناوری مواد شیمیایی چه در کشورهای پیشرفته و چه در ممالک روبه‌توسعه در حال گسترش می‌باشد. امروزه، مقادیر قابل توجهی از ترکیبات مختلف در سطح جهان تولید، مصرف و نگهداری می‌شود که علیرغم منافع کلان اقتصادی، همواره کاربرد آن‌ها توأم با خطرات احتمالی بهداشتی و زیست‌محیطی بوده است. استفاده بیش‌ازحد از سموم کشاورزی برای تولید محصولات بیشتر در حالی در مزارع و باغ‌های کشاورزی گسترش یافته که بقایای سموم در محصولات کشاورزی باعث بروز بیماری‌های نوظهور و مسمومیت‌های خطرناک شده است [۱]. از آنجا که طیف وسیعی از این مسمومیت‌های حاد از طریق آفت‌کش‌ها به‌ویژه ترکیبات ارگانوفسفره ایجاد می‌شود، لذا تحقیق در زمینه درک مکانیسم اثر با رویکرد کاهش بیماری‌ها و عوارض حاد و مزمن ناشی از استفاده سموم و مواد شیمیایی حائز اهمیت است و دانشمندان بسیاری در این زمینه به تحقیق و مطالعه می‌پردازند [۲]. تترا اتیل‌پیروفسففات یک استر ارگانوفسفره بسیار سمی و اولین ترکیب از گروه ارگانوفسفره می‌باشد که به‌خصوصیت آنتی‌کولین‌استرازی آن پی برده‌شده است [۳]. این ترکیب که به‌عنوان آفت‌کش و کنه‌کش در کشاورزی کاربرد دارد، ترکیبی سمی است که در صورت مسمومیت، خطرات زیادی را برای انسان و جانوران در پی دارد و همچنین در دوزهای بالا مهلک می‌باشد به‌طوری که مقدار دوز کشنده آن از طریق خوراکی برای انسان mg/Kg ۱/۴۲۹ و کمترین دوز کشنده (LD LO) آن از طریق خوراکی برای موش صحرایی mg/Kg ۰/۵ و برای خوکچه هندی mg/Kg ۲/۳ و برای موش mg/Kg ۳ گزارش شده است [۴-۷]. مکانیسم عمل این سم مهار آنزیم استیل‌کولین‌استراز از طریق فسفریلاسیون اسید آمینه سرین در جایگاه فعال آنزیم می‌باشد که این کار مانع از هیدرولیز نوروترانسمیتر استیل‌کولین می‌شود و نهایتاً منجر به مختل شدن سیستم عصبی آفت می‌گردد [۸]. مهم‌ترین پروتئین موجود در خون انسان هموگلوبین می‌باشد که در انتقال اکسیژن از ریه به بافت‌ها و دی‌اکسیدکربن از بافت به ریه‌ها نقش دارد. هموگلوبین را می‌توان به‌موتور حیات تعبیر کرد. ساختار آن شامل بخش پروتئینی گلوبین و بخش غیر پروتئینی پورفیرینی موسوم به "هم" است که از یک اتم آهن در مرکز چهار حلقه پروتوپورفیرین (IX) تشکیل شده است. هموگلوبین بالغین (HbA) از دو زیرواحد آلفا و دو زیرواحد بتا تشکیل گردیده‌است که هرکدام دارای یک گروه هم هستند. اتم آهن در مرکز هم دارای شش اتصال می‌باشد که اتصال ششم محل اتصال اکسیژن و لیگاند‌های مختلف می‌باشد. اتصال لیگاند‌های مختلف به هموگلوبین می‌تواند بر روند حمل اکسیژن توسط این پروتئین تأثیر بگذارد یا ساختار آن را تغییر دهد [۹]. تاکنون مطالعات فراوانی در مورد برهمکنش هموگلوبین با لیگاند‌های مختلف از جمله سموم صورت گرفته است، از جمله تحقیقی که در سال ۲۰۰۶ Yong Cui و همکاران

نانومتر به روش تیتراسیون و آنکوباسیونی استفاده گردید زمان آنکوباسیون یک، دو و سه ساعت در نظر گرفته شد. غلظت هموگلوبین مورد استفاده ۱ میلی مولار بوده است.

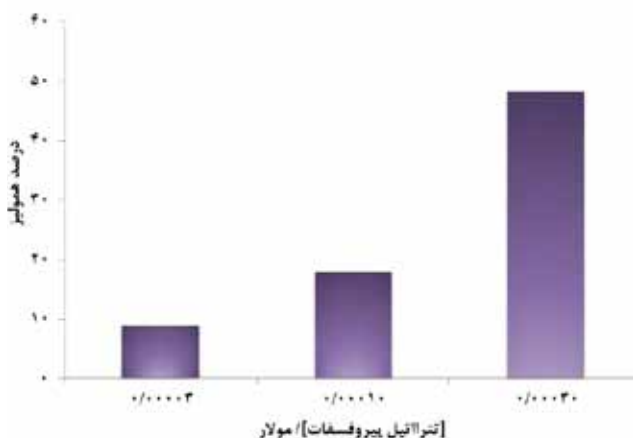
بررسی ساختار دوم هموگلوبین بر اثر برهمکنش با سم: جهت بررسی تغییرات ساختار دوم پروتئین در دو ناحیه آمید I و آمید II از طیف مادون قرمز استفاده گردید. به دلیل مایع بودن هموگلوبین و کاهش اثرات آب در طیف مادون قرمز، از طیف ATR/FTIR استفاده گردید.

مطالعات پایداری و اثر سم بر دنا تورا سیون دمایی پروتئین: برای مطالعه دنا تورا سیون و تغییرات پایداری حرارتی، محلول هموگلوبین به تنهایی و به همراه غلظت‌های مشخص از سم به کووت دستگاه که دارای قابلیت کنترل دمایی است، انتقال و سپس تغییرات جذب در طول موج ۲۸۵ نانومتر در بازه دمایی ۲۵ تا ۹۰ درجه سانتی گراد ثبت گردید.

یافته‌ها

پتانسیل همولیزی تترااتیل پیروفسفات

شکل شماره ۱، اثر همولیزی غلظت‌های مختلف سم تترااتیل پیروفسفات را بر روی سلول‌های قرمز خون نرمال انسان سالم نشان می‌دهد. نتایج بیانگر پتانسیل بالای سم در تخریب دیواره سلول‌های قرمز خون و به عبارتی لیز کردن سلول‌های قرمز خونی می‌باشد. اثر همولیتیکی سم قابل توجه است به طوری که با افزایش غلظت سم به میزان ده برابر همولیز به میزان ۵ برابر را افزایش می‌یابد.



شکل ۱: نمودار درصد همولیز سلول‌های خون در اثر غلظت‌های مختلف از تترااتیل پیروفسفات

تغییرات ساختاری و عملکردی هموگلوبین بر اثر برهم‌کنش با سم

شکل ۲، تغییرات طیف جذبی هموگلوبین در ناحیه ۳۴۰-۲۲۰ نانومتر را در حضور غلظت‌های مختلف سم تترااتیل پیروفسفات به روش تیتراسیون را نشان می‌دهد. این ناحیه طیفی هموگلوبین به ناحیه

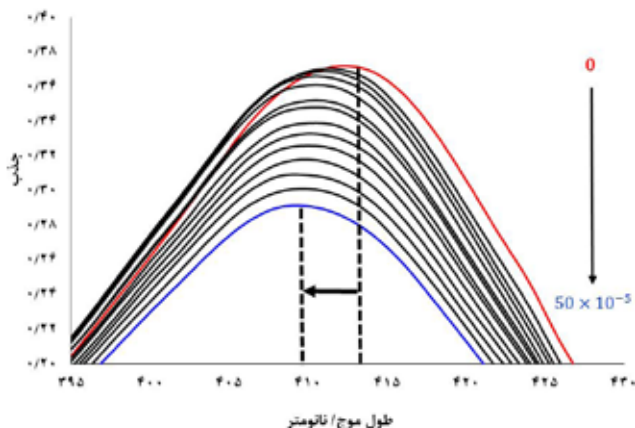
ساختار و عملکرد هموگلوبین انسانی با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی می‌پردازد.

روش بررسی

پروتئین هموگلوبین انسانی طبق روش A.Riggs از افراد سالم و غیر سیگاری به طور اختصار به این ترتیب جداسازی شد که خون تازه هپارینه شده با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و محتوای پلاسمایی آن جداسازی گشت، سپس گلبول‌های قرمز خون سه مرتبه با محلول نمکی ایزوتونیک شستشو داده شد و به دنبال آن سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه انجام داده شد. اجزای تشکیل دهنده غشای سلولی نیز به وسیله سانتریفیوژ ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه خارج شدند و در نهایت محلول هموگلوبین حاصل ۳ مرتبه با محلول بافر فسفات pH=۷ برای مدت ۲۴ ساعت دیالیز شده سپس توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین غلظت گردید [۱۶]. تترااتیل پیروفسفات از شرکت سیگما خریداری شد. بافر مورد استفاده در تمامی آزمایش‌ها بافر فسفات با pH=۷ بود و تمامی محلول‌ها به صورت تازه و با استفاده از آب دوبار تقطیر تهیه شدند و مورد استفاده قرار گرفتند. دستگاه‌های طیف‌سنج ماوراء بنفش مرئی دوشعاعی (Varian، استرالیا)، دستگاه ATR/FTIR مدل Nexus ساخت شرکت Thermo Fisher Scientific، دستگاه اسپکتروفتومتر ماوراء بنفش مرئی مجهز به سیستم کنترل دمایی و سیستم تعوض سل ساخت شرکت Varian کشور استرالیا برای مطالعات پایداری دستگاه سانتریفیوژ دور بالا Hitachi مجهز به یخچال، ساخت کشور ژاپن جهت جداسازی هموگلوبین و آزمایشات همولیز استفاده گردیدند. تمامی دستگاه‌ها بر اساس استانداردهای بین‌المللی و توسط شرکت‌های فروشنده کالیبره گردید و قبل از آزمون‌ها، کارکرد دستگاه‌ها بررسی گردید. کلیه آزمایش‌ها نیز با سه بار تکرار انجام شد و صحت و دقت داده‌ها با استفاده از آزمون آماری T-test مورد ارزیابی قرار گرفت.

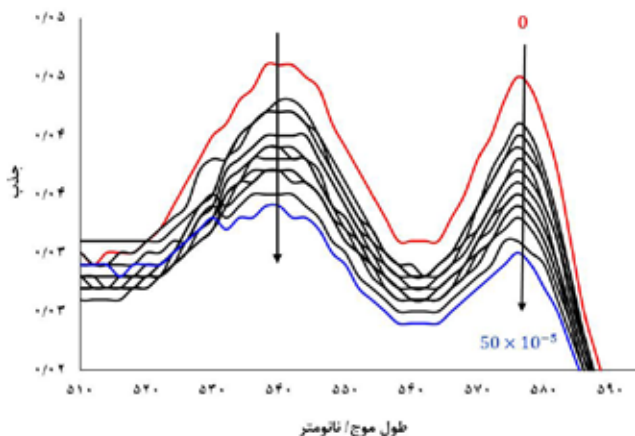
بررسی اثر همولیزی غلظت‌های مختلف سم: سلول‌های قرمز خون جدا شده به درون ویال‌های ۲ میلی لیتری منتقل گردید و سم با غلظت‌های مختلف به آن‌ها افزوده شد. گروه کنترل منفی (۰ درصد) بدون اضافه کردن هیچگونه آنالیتی و گروه کنترل مثبت (۱۰۰ درصد) با اضافه کردن تریتون X-۱۰ تهیه شدند. ویال‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در حمام آب آنکوبه گردید سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۶۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. لایه بالایی برای تعیین غلظت هموگلوبین لیز شده در طول موج ۵۴۰ نانومتر مورد استفاده قرار گرفت [۱۷].

بررسی تغییرات ساختاری هموگلوبین: برای بررسی این تغییرات در پیک‌های گلوبین و سورت و همچنین تغییرات عملکردی در باند Q تحت تأثیر سم از دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی-فرابنفش، در طول موج ۸۰۰-۲۰۰



شکل ۳: طیف جذبی هموگلوبین در حضور تترااتیل‌پیروفسفات در ناحیه باند سورت در تیتراسیون هموگلوبین با سم. غلظت هموگلوبین ۰/۰۰۱ مولار و غلظت تترااتیل‌پیروفسفات به ترتیب از بالا به پایین افزایش می‌یابد (۵-۵۰×۱۰-۵ مولار)

هموگلوبین است و وجود تغییرات طیفی در این ناحیه طول موج نشان دهنده تغییر در فعالیت هموگلوبین می‌باشد. شکل ۴ نشان می‌دهد که در روش تیتراسیونی، کاهش در جذب هموگلوبین روندی وابسته به غلظت سم دارد. نتایج حاصل از روش آنکوباسیونی نیز روندی مشابه روش تیتراسیونی داشته است و در آنکوباسیون تغییری در روند تغییرات مشاهده نگردید (نتایج حاصل از آنکوباسیون در این مقاله آورده نشده است).

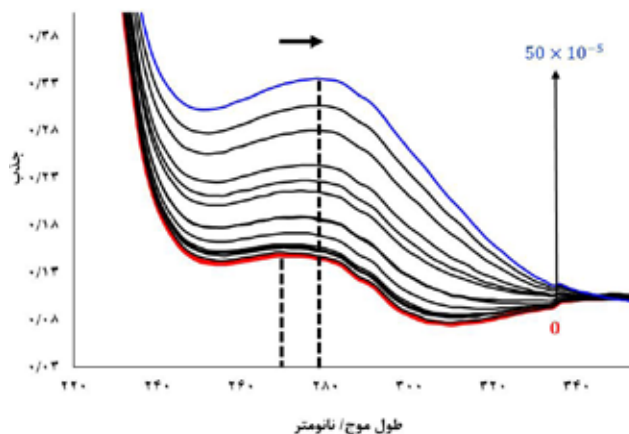


شکل ۴: طیف جذبی هموگلوبین در حضور تترااتیل‌پیروفسفات در ناحیه باند Q در تیتراسیون هموگلوبین با سم غلظت هموگلوبین ۰/۰۰۱ مولار و غلظت تترااتیل‌پیروفسفات به ترتیب از بالا به پایین افزایش می‌یابد (۵-۵۰×۱۰-۵ مولار)

بررسی روند تغییرات جذب در ۵۷۶ و ۵۴۲ نانومتر

شکل ۵ نمودار تغییرات طیف جذبی در برابر تغییرات غلظت سم را در دو طول موج ۵۷۶ و ۵۴۲ نانومتر نشان می‌دهد. اثر سم بر جذب در هر دو پیک ۵۷۶ نانومتر و ۵۴۲ نانومتر کاهشی است. این نمودار نشان دهنده این است که اثرات سم تنها به ساختار منتهی نمی‌شود و اثرات عملکردی

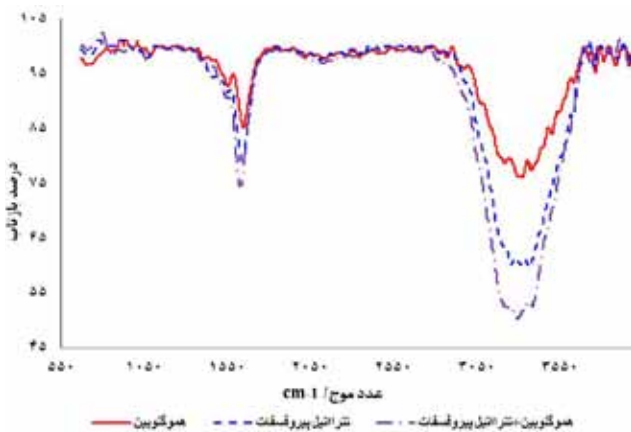
طیفی گلوبین معروف است و نشان‌دهنده تغییرات طیفی مرتبط با بخش گلوبینی آن می‌باشد. تغییرات این ناحیه در حضور غلظت‌های مختلف از تترااتیل‌پیروفسفات نشان‌دهنده آن است که با افزایش غلظت سم، شدت جذب هموگلوبین در طول موج ۲۸۰ نانومتر (ناحیه گلوبین) روند افزایشی وابسته به غلظت سم داشته است و طول موج بیشینه در این ناحیه ۵ نانومتر به سمت راست جابه‌جا گردیده است بدین معنی که محیط اطراف کروموفور غیرقطبی‌تر شده است و آبگریزی در سطح پروتئین بیشتر شده است. نتایج حاصل از روش آنکوباسیونی نیز روندی مشابه روش تیتراسیونی را نشان می‌دهند و در آنکوباسیون به مدت دو ساعت تغییری در روند تغییرات مشاهده نگردید (نتایج حاصل از آنکوباسیون در این مقاله آورده نشده است).



شکل ۲: طیف جذبی هموگلوبین در حضور تترااتیل‌پیروفسفات در ناحیه گلوبینی در تیتراسیون هموگلوبین با سم. غلظت هموگلوبین ۰/۰۰۱ مولار و غلظت تترااتیل‌پیروفسفات به ترتیب از پایین به بالا افزایش می‌یابد (۵-۵۰×۱۰-۵ مولار)

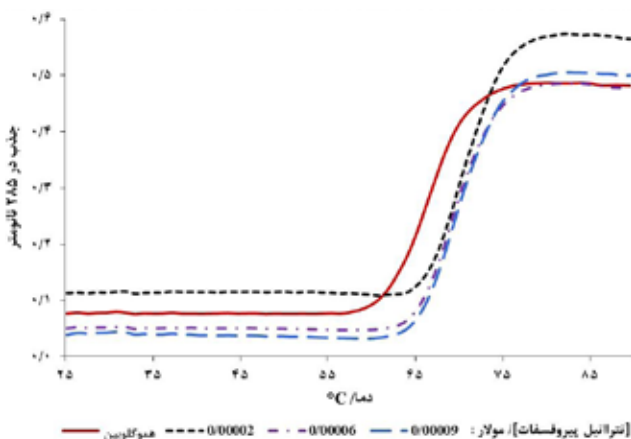
ناحیه شاخص دوم در طیف جذبی هموگلوبین در محدوده طول موج‌های ۳۸۰-۴۳۰ نانومتر وجود دارد (شکل ۳). تغییرات جذبی این ناحیه از طیف هموگلوبین مربوط به ساختار غیر پروتئینی گروه هم است و مربوط به پاکت هیدروفوب می‌باشد. در این ناحیه، در طول موج ۴۱۲ نانومتر (پیک سورت) جذب هموگلوبین در روندی وابسته به غلظت سم کاهش یافته است و طول موج بیشینه حدود ۵ نانومتر به سمت چپ جابه‌جا گردیده است که نشان‌دهنده نفوذ سم به پاکت هیدروفوب و قطبی‌تر شدن محیط اطراف هم می‌باشد. نتایج حاصل از روش آنکوباسیونی روندی مشابه روش تیتراسیونی داشته است و در آنکوباسیون تغییری در روند تغییرات مشاهده نگردید (نتایج حاصل از آنکوباسیون در این مقاله آورده نشده است).

ناحیه سوم طیف جذبی هموگلوبین مربوط به باند Q است و مرتبط با ساختارهای مختلف هموگلوبین در فرآیندهای اتصال به مولکول اکسیژن می‌باشد. این ناحیه از طیف هموگلوبین نشان‌دهنده گونه‌های مختلف



شکل ۶: طیف ATR/FTIR تترااتیل پیروفسفات به تنهایی، هموگلوبین و ترکیب تترااتیل پیروفسفات و هموگلوبین

اسیدهای آمینه به عنوان شاخص برای تعیین تغییرات در ساختار پروتئین‌ها استفاده می‌شوند. حداکثر جذب این اسیدهای آمینه در حدود ۲۸۰ نانومتر می‌باشد در نتیجه تغییرات طیفی در این طول موج بیانگر تغییر در محیط اطراف کروموفور می‌باشد و با در نظر گرفتن این تغییرات می‌توان به مطالعات پایداری و دناتوراسیون حرارتی هموگلوبین در حضور سم پرداخت [۲۰]. جدول ۱ مقادیر نقاط ذوب هموگلوبین (T_m) را در غیاب سم و در حضور غلظت‌های مختلف تترااتیل-پیروفسفات نشان می‌دهد. همان‌طور که در جدول ۱ دیده می‌شود، نقطه ذوب پروتئین هموگلوبین

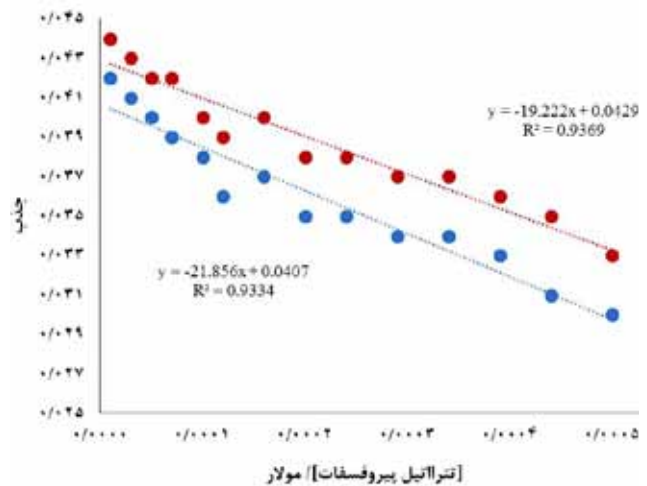


شکل ۷: منحنی دناتوراسیون حرارتی هموگلوبین در حضور غلظت‌های مختلف از تترااتیل پیروفسفات. غلظت هموگلوبین ۰/۰۰۱ مولار می‌باشد

جدول ۱: مقادیر نقطه ذوب منحنی دمایی هموگلوبین در حضور غلظت‌های مختلف از سم

غلظت تترااتیل پیروفسفات / مولار	۰	۰/۰۰۰۰۶	۰/۰۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰۹
T _m	۶۷	۷۱	۶۹	۷۰

نیز بر روی هموگلوبین دارد. نتایج حاصل از روش آنکوباسیونی نیز نشانگر روندی مشابه روش تیتراسیونی داشته است و در آنکوباسیون تغییری در روند تغییرات مشاهده نگردید (نتایج حاصل از آنکوباسیون در این مقاله آورده نشده است).



شکل ۵: نمودار جذب برابر غلظت در دو طول موج ۵۷۶ نانومتر (دایره‌های آبی توپر) و ۵۴۲ نانومتر (دایره‌های قرمز توپر) در تیتراسیون هموگلوبین با سم غلظت هموگلوبین ۰/۰۰۱ مولار و غلظت تترااتیل پیروفسفات (۵×۱۰^{-۵} مولار) می‌باشد

مطالعات طیف‌سنجی تبدیل فوریه بر روی پروتئین

از تکنیک ATR/FTIR^۱ برای مطالعه ساختار دوم پروتئین استفاده شد [۱۸]. شکل ۶، طیف تبدیل فوریه ناحیه مادون قرمز هموگلوبین را در حضور و غیاب سم تترااتیل پیروفسفات نشان می‌دهد. این طیف شامل یک پیک پر شدت در ناحیه آمید (I) که در محدوده ۱۶۵۴ cm⁻¹ قرار دارد و مربوط به محتوای ساختار مارپیچ آلفا است که ناشی از ارتعاشات CO کششی و N-H خمشی می‌باشد. یک پیک دیگر با شدت کم نیز مربوط به ادغام ارتعاشات N-H خمشی و C-N کششی می‌باشد. با افزایش غلظت تترااتیل پیروفسفات در عدم موج پیک‌های آمید (I) و آمید (II) تغییر مشاهده نشد که نشان‌دهنده عدم تغییر ساختار دوم هموگلوبین در اثر برهمکنش با سم می‌باشد [۱۹].

مطالعات دناتوراسیون دمایی هموگلوبین در غیاب و حضور سم

شکل ۷ نمودار تغییرات جذب در ۲۸۰ نانومتر در غلظت‌های مشخصی از سم در محدوده دمایی ۲۵-۹۰ درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد. این نمودار معروف به نمودار پایداری حرارتی پروتئین می‌باشد. به علت حضور حداقل یکی از سه اسید-آمینة آروماتیک تریپتوفان، فنیل آلانین و تیروزین به عنوان کروموفورهای طیف‌سنجی در ساختار پروتئین‌های مختلف، این

۱. Attenuated Total Reflectance / Fourier Transform InfraRed Spectroscopy

با افزایش غلظت سم اندکی افزایش می‌یابد.

بحث و نتیجه‌گیری

اتصال بیشتر مولکول‌های سم پایداری پروتئین را کاهش می‌دهد. افزایش وابسته به غلظت نقطه ذوب پروتئین نیز شاهدهی بر این مدعا می‌باشد. نتایج تحقیق حاضر اثرهای برهمکنش تتراتیل‌پیروفسفات با پروتئین مهم بدن را از دیدگاه مولکولی بیان کرده در صورتی که نتایج بررسی‌های قبلی پژوهشگران پیرامون اثرهای بالینی و مسمومیت‌های پوستی و تنفسی ایجاد شده توسط این سم بوده است و تاکنون تحقیقی در مورد بررسی اثرهای بالینی این سم بر روی فاکتورهای خونی انسان صورت نگرفته است لذا، برای مقایسه نتایج بالینی و مولکولی لازم است پژوهش‌های بیشتری صورت گیرد. براساس نتایج، با توجه به اینکه این ترکیب توانایی تخریب سلول‌های قرمز خون را دارا است، این امکان وجود دارد افرادی که به‌طور مداوم در تماس با این سم هستند، با عارضه کم‌خونی مواجه گردند، لذا توصیه می‌شود که سطح سلول‌های قرمز خون این افراد توسط تست‌های بالینی معتبر سنجیده شود و در صورت لزوم درمان‌های بالینی مناسب توسط پزشک متخصص اتخاذ گردد. این ترکیب ارگانوفسفره همچنین عملکرد حمل اکسیژن توسط هموگلوبین را مختل می‌کند و باعث کاهش آن می‌شود، بنابراین می‌توان پیشنهاد نمود کشاورزان و کارگرانی که با این سم در تماس هستند از حضور یافتن در شرایطی که کمبود اکسیژن را تشدید می‌کنند مانند در معرض دود سیگار یا هوای آلوده قرار گرفتن اجتناب نمایند. این مطالعه اطلاعات مهمی را در مورد برهمکنش مهم ترین پروتئین بدن یعنی هموگلوبین با حشره‌کش‌های ارگانوفسفره فراهم آورده است که می‌تواند راهنمای مناسبی برای بررسی‌های سم‌شناسی در آینده باشد. لازم به ذکر است که در انجام این تحقیق محدودیت‌هایی چون دسترسی به دستگاه‌های فلوسایتمتری برای اندازه‌گیری میزان گونه‌های فعال اکسیژن، دورنگ‌نمایی حلقوی برای بررسی‌های بیشتر بر روی ساختار دوم و روش‌های الکتروشیمیایی برای بررسی اکسیژن‌خواهی هموگلوبین وجود دارد و نتایج حاصل از آزمایش‌ها با این دستگاه‌ها به قطعیت نتایج حاضر کمک شایانی خواهد نمود.

با توجه به پرکاربرد بودن سموم ارگانوفسفره در کشاورزی و میزان بالای مسمومیت با این سموم به‌نظر می‌رسد یکی از معضلات عمده عصر حاضر عدم آگاهی در مورد مکانیسم اثر این سموم بر بدن باشد. از آنجا که تتراتیل‌پیروفسفات ترکیبی ارگانوفسفره و بسیار مهلک برای انسان و جانوران می‌باشد و پروتئین هموگلوبین انسانی نیز نقش حیاتی انتقال اکسیژن و دی‌اکسیدکربن در بدن را برعهده دارد، لذا تحقیق حاضر به بررسی اثرات این سم بر ساختار و عملکرد هموگلوبین انسانی از دیدگاه مولکولی می‌پردازد. با توجه به نتایج آزمایش همولیز، تتراتیل‌پیروفسفات پتانسیل قابل توجهی در لیز سلول‌های قرمز را دارا است. این ترکیب همچنین از نظر الکتروشیمیایی دارای دو بخش غیر قطبی (دنباله‌های اتیل) و بخش قطبی (گروه‌های فسفات و اکسیژن‌های استری) می‌باشد و همین عامل نیز باعث می‌شود تا بسته به قطبی یا غیر قطبی بودن محیط برهمکنش رفتار دوگانه‌ای را القاء کند. از طرفی طیف جذبی هموگلوبین شامل سه ناحیه گلوبین در ۲۸۰ نانومتر، سورت در ۴۱۰ نانومتر و باند Q در ۵۵۰-۵۶۰ نانومتر می‌باشد [۲۱]. تغییرات جذب در ۲۸۰ و ۴۱۰ نانومتر ناشی از تغییرات ساختاری هموگلوبین در برهمکنش با تتراتیل‌پیروفسفات می‌باشد. جابه‌جایی ۸ نانومتری طول موج به سمت طول موج‌های بلندتر^۲ در ناحیه گلوبین که در سطح پروتئین قرار دارد، نشان‌دهنده برهمکنش سم از بخش غیرقطبی خود با سطح گلوبین و در نتیجه غیر قطبی تر شدن (آبگریزی) این بخش می‌باشد. ناحیه سورت، مربوط به گروه هم می‌باشد لذا، جابه‌جایی طول موج به اندازه ۴ نانومتر به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر^۳ در این ناحیه ناشی از قطبی تر شدن این محیط در نتیجه برهمکنش سم از بخش‌های قطبی خود و در نتیجه نفوذ سم به پاکت هیدروفوب می‌باشد. کاهش جذب هموگلوبین در دو طول موج ۵۴۲ نانومتر و ۵۷۶ نانومتر نیز نشان‌دهنده کاهش فعالیت اکسیژن‌گیری هموگلوبین بر اثر برهمکنش با غلظت‌های مختلف از سم می‌باشد. در بررسی ساختار دوم توسط طیف سنجی تبدیل فوریه نشان داده شد که تغییری در ساختار دوم هموگلوبین بر اثر برهمکنش با سم القاء نشده است. همچنین در مطالعات پایداری حرارتی مشاهده شد که خاصیت آبدوستی این سم باعث حفظ آب اطراف پروتئین می‌شود و در نتیجه نفوذ آن به قسمت آبگریز درون پروتئین امکان‌پذیر نمی‌باشد. در حقیقت ساختار پروتئین فشرده‌تر می‌شود. به عبارتی دیگر خاصیت آبدوستی این سم به حفظ آب اطراف پروتئین و در نتیجه حفظ ساختار آن کمک می‌نماید. همچنین با کاهش بار سطحی و افزایش غلظت سطحی سم میزان نیروهای آبگریز افزایش می‌یابد و باعث ایجاد جایگاه‌های پیوندی جدیدی برای مولکول‌های سم می‌گردد که با

۲. Redshift

۳. BlueShift

References:

1. Sato H, Ito Y, Ueyama J, Kano Y, Arakawa T, Gotoh M, Kamijima M, Kondo t, Sugiura Y, Saito I, Shibata E, Kamijima M. Effects of Paraoxonase 1 gene polymorphisms on organophosphate metabolism in Japanese pest control workers. *Journal of occupational health*. 2016; 58(1): 56-65.
2. Ismael MA, Sherif MM, El-Dabah FH, Mohamed YS. Cases with Toxicity of Anticholinesterase Enzyme and factors affecting outcome. *Journal of Pharmacology and Toxicology*. 2013; 8(3): 90-7.
3. Roberts Stephen M., Phillip L W, Robert C J. *Principles of Toxicology. Environmental and Industrial Applications*. John Wiley & Sons, 2015.
4. Wayland JH. *Clinical handbook on economic poisons; emergency information for treating poisoning*. Us Dept. of Health, 1963.
5. Edson EF *Applied toxicology of pesticides*. Pharmaceut J, 1960.
6. Frawley JP, Hagan EC, Fitzhugh OG. A comparative pharmacological and toxicological study of organic phosphate Anticholinesterase compounds. *J Pharmacol Exp Ther*. 1952; 105: 156-65.
7. Kamimura H, Matsumoto A, Miyazaki Y, Yamamoto I. Studies on nicotinoids as an insecticide. Part IV. Relation of structure to toxicity of pyridylmethyamines. *Agri Biol Chem*. 1963; 27: 684-8.
8. Colovic MB, Krstic DZ, Lazarevic-Pasti TD, Bondzic AM, Vasic VM. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current neuropharmacology*. 2013; 11: 315-35.
9. Perutz MF. Hemoglobin structure and respiratory transport. *Scientific American*. 1987; 239: 92.
10. Cui Y, Guo J, Xu B, Chen Z. Binding of chlorpyrifos and cypermethrin to blood proteins. *Pesticide biochemistry and physiology*, 2006; 85: 110-14.
11. Wang YQ, Zhang HM, Zhang GC, Liu S, Zhou XQH, Fei ZH, Liu ZT. Studies of the interaction between paraquat and bovine hemoglobin. *IJBM*. 2007; 41: 243-50.
12. Ding F, Han BY, Liu W, Zhang L, Sun Y. Interaction of imidacloprid with hemoglobin by fluorescence and circular dichroism. *Journal of fluorescence*. 2010; 20: 753-62.
13. Quinby GE, Doornink GM. Tetraethyl pyrophosphate poisoning following airplane dusting. *JAMA*, 1965; 191: 1-6.
14. Faust J. Poisoning due to tetraethylpyrophosphate. *J Am Med Assoc*. 1949; 141: 192-3.
15. Reeder DH, Whittier. Organic phosphate insecticide poisoning. *J Occup Med*. 1961; 3: 129-30.
16. Riggs A. Preparation of blood hemoglobins of vertebrates. *Methods in enzymology*. 1981; 76: 5-29.
17. Ali I, Naseem I. Hemolysis of human red blood cells by combination of riboflavin and aminophylline. *Life sciences*. 2002; 70: 2013-22.
18. Pace CN. Measuring and increasing protein stability. *Trends in biotechnology*. 1990; 8: 93-8.
19. Wang Y, Boysen RI, Wood BR, Kansiz M, McNaughton D, Hearn MT. Determination of the secondary structure of proteins in different environments by FTIR ATR spectroscopy and PLS regression. *Biopolymers*. 2008; 89: 895-905.
20. Calabrò E, Magazù S. Unfolding-Induced in hemoglobin by exposure to electromagnetic fields: a FTIR spectroscopy study. *Oriental Journal of chemistry*. 2014; 30: 131-5.
21. Zijlstra Wg, Buursma A. Spectrophotometry of hemoglobin: absorption spectra of bovine oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1997; 118: 743-9.