لیزر در پزشکی؛ ۱۳۹۶، دورهٔ ۱۴، شمارهٔ ۳، صفحات: ۱۶-۱۰ .

مقاله پژوهشی

مطالعات اسپکتروفتومتری مرئی فرابنفش اثر سم تترااتیل پیروفسفات به‌عنوان یک آلایندهٔ زیست‌محیطی بر ساختار و پایداری هموگلوبین انسانی

آیدا درودیان [۱]
خاطره خرسندی [۲]
پروانه مقامی [۱]
رضا حسین‌زاده [۳]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲. گروه پژوهشی فتودینامیک، مرکز تحقیقات لیزر پزشکی، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳. گروه پژوهشی لیزرپزشکی، مرکز تحقیقات لیزر پزشکی، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

نویسندهٔ مسئول: پروانه مقامی، تلفن: ۰۲۱۴۴۸۶۵۳۲۳
پست الکترونیک: maghami@srbiau.ac.ir

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

خلاصه

مقدمه: نرخ روبه‌رشد جمعیت جهان و نیاز روزافزون به مواد غذایی، استفادهٔ بی‌رویه از مواد شیمیایی و سموم آفت‌کش در صنعت کشاورزی را درپی داشته است و این موضوع موجب آلودگی های زیست‌محیطی 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 ازطریق آفت‌کش‌های ارگانوفسفره ایجاد می‌شود لذا، تحقیق در زمینهٔ فهم سازوکار اثرسموم با رویکرد کاهش بیماری‌ها و عوارض حاد و مزمن ناشی‌از استفادهٔ سموم و مواد شیمیایی از اهمیت به‌سزایی برخوردار است.

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

یافته‌ها: میزان پتانسیل همولیزی سم برروی سلول‌های قرمز خونی درمقایسه با نمونه‌های کنترل منفی و مثبت بررسی شد که نشانگر افزایش فعالیت همولیزی سم تترااتیل‌پیرو فسفات با افزایش غلظت سم برروی سلول‌های قرمز خون می‌باشد. براثر برهمکنش تترااتیل‌پیروفسفات با پروتئین هموگلوبین در بخش گلوبین و مرکز هِم، تغییراتی القا می‌گردد و این پروتئین در اعمال شرایط حرارتی درحضور سم رفتار دوگانه‌ای را از خود نشان می‌دهد. براساس داده‌های طیف‌سنجی تبدیل فوریهٔ 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. تترا اتیل‌پیروفسفات پتانسیل تغییر ساختار دوم هموگلوبین را ندارد.

واژه‌های کلیدی: هموگلوبین، سم تترااتیل‌پیروفسفات، طیف‌سنجی نوری، همولیز

[Downloaded from icml.ir on 2025-11-04]

مقدمه

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. استفادهٔ بیش‌ازحد از سموم کشاورزی برای تولید محصولات بیشتر درحالی در مزارع و باغ‌های کشاورزی گسترش یافته که بقایای سموم در محصولات کشاورزی باعث بروز بیماری‌های نوظهور و مسمومیت‌های خطرناک شده است[۱]. ازآنجاکه طیف وسیعی از این مسمومیت‌های حاد ازطریق آفت‌کش‌ها به‌ویژه ترکیبات ارگانوفسفره ایجاد می‌شود، لذا تحقیق در زمینهٔ درک مکانیسم اثر با رویکرد کاهش بیماری‌ها و عوارض حاد و مزمن ناشی از استفادهٔ سموم و مواد شیمیایی حائز اهمیت است و دانشمندان بسیاری در این زمینه به تحقیق و مطالعه می‌پردازند[۲]. تترا اتیل‌پیروفسفات یک استر ارگانوفسفرهٔ بسیار سمی و اولین ترکیب از گروه ارگانوفسفره می‌باشد که به خاصیت آنتی‌کولین‌استرازی آن پی برده‌شده است[۳]. این ترکیب که به‌عنوان آفت‌کش و کنه‌کش در کشاورزی کاربرد دارد، ترکیبی سمی است که درصورت مسمومیت، خطرات زیادی را برای انسان و جانوران درپی دارد و همچنین در دوزهای بالا مهلک می‌باشد به‌طوری‌که مقدار دوز کشندهٔ آن ازطریق خوراکی برای انسان mg/Kg ۱/۴۲۹ و کمترین دوز کشندهٔ (LD Lo) آن ازطریق خوراکی برای موش صحرایی mg/Kg ۰/۵ و برای خوکچهٔ هندی mg/Kg ۲/۳ و برای موش mg/Kg ۳ گزارش شده است[۷-۴]. مکانیسم عمل این سم مهار آنزیم استیل‌کولین‌استراز ازطریق فسفریلاسیون اسید آمینهٔ سرین در جایگاه فعال آنزیم می‌باشد که این کار مانع از هیدرولیز نوروترانسمیتر استیل کولین می‌شود و نهایتاً منجر به مختل شدن سیستم عصبی آفت می گردد[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 به موتور حیات تعبیر کرد. ساختار آن شامل بخش پروتئینی گلوبین و بخش غیر پروتئینی پورفیرینی موسوم به "هِم" است که از یک اتم آهن در مرکز چهار حلقهٔ پروتوپورفیرین (IX) تشکیل شده است. هموگلوبین بالغین (HbA) از دو زیرواحد آلفا و دو زیرواحد بتا تشکیل گردیده‌است که هرکدام دارای یک گروه هِم هستند. اتم آهن در مرکز هِم 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 درمورد برهمکنش هموگلوبین با لیگاندهای مختلف ازجمله سموم صورت گرفته است، ازجمله تحقیقی که در سال ۲۰۰۶ Yong Cui و همکاران درمورد اثرات دو حشره‌کش کلروپایریفوس (از گروه سموم ارگانوفسفره) و سایپرمترین بر دو پروتئین خون، هموگلوبین گاوی و سرم آلبومین گاوی انجام دادند که نتایج نشان‌دهندهٔ اتصال ضعیف‌تر این سموم به هموگلوبین نسبت‌به سرم آلبومین می‌باشد، همچنین اتصال این سموم به پروتئین‌های خونی می‌تواند برروی 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 حاکی‌از واکنش گروه هم با آنیون سوپراکسید براساس کاهش باند سورت می‌باشد. گروه‌های هِم دچار تغییرات ساختاری شدند و حتی به‌وسیلهٔ آنیون سوپر اکسید ایجادشده به‌واسطهٔ حضور سم تخریب شدند. نتایج بیانگر وجود یک دسته جایگاه اتصال سم برروی هموگلوبین می‌باشد و برهمکنش‌های آب‌گریز و نیروهای الکترواستاتیک نقش‌های عمده را در پایداری کمپلکس سم‌پروتئین ایفا می‌کنند[۱۱]. در سال ۲۰۱۰، Fei Ding و همکاران گزارشی مبنی‌بر برهمکنش حشره‌کش ایمیداکلوپراید (از گروه نئونیکوتنوئیدها) با هموگلوبین انسانی توسط دستگاه‌های فلورسانس، دورنگ‌نمایی حلقوی، اسپکتروسکوپی مرئی‌فرابنفش، فلورسانس هم-زمان و سه‌بعدی منتشر نمودند. نتایج حاکی‌از خاموشی فلورسانس ذاتی هموگلوبین ازطریق مکانیسم خاموشی ایستا بود و همچنین روشن شد برهمکنش‌های آب‌گریز و پیوندهای هیدروژنی نیروهای بین مولکولی غالب در پایدار کردن این کمپلکس (سم‌هموگلوبین) هستند. آزمایش‌های رقابتی (با ANS) نیز نشان داد که نواحی هیدروفوب عمده‌ترین جایگاه برای اتصال سم به هموگلوبین می‌باشند. نتایج طیف‌سنجی‌های دورنگ نمایی 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 درمورد مسمومیت با تترااتیل‌پیروفسفات گزارش شده است، به‌طور مثال در سم‌پاشی مزارع توسط تترااتیل‌پیروفسفات در یکی از ایالت‌های آمریکا، این سم منجر به مسمومیت تنفسی در فاصلهٔ ۱۵ مایلی مکان سم‌پاشی و اختلالات گوارشی ۱۵ رأس دام و مرگ دو دام شده بود[۱۳]. در سال ۱۹۴۹ نیز گزارشی مبنی‌بر بروز علایم سیستمیک ناشی‌از مسمومیت با سموم ارگانوفسفره را در کارگری که درمعرض تماس پوستی با محلول ۲۰ درصد از تترااتیل‌پیروفسفات قرار داشته و از میوهٔ شسته‌نشدهٔ 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 باوجود استفاده‌از لباس و ماسک‌های پوشاننده، به‌علت تماس لباس کار عرق کردهٔ آن‌ها با محلول سم، به‌مرور زمان سم ازطریق پوستی جذب و منجر به بروز علایم سیستمیک مسمومیت با سموم ارگانوفسفره به‌علت مهار آنزیم استیل‌کولین‌استراز شده‌بود[۱۵]. ازآنجاکه تاکنون پژوهشی مبنی‌بر اثرهای مولکولی تترااتیل‌پیروفسفات بر ساختار پروتئین هموگلوبین انسانی صورت نگرفته است، لذا تحقیق حاضر به بررسی اثرات این سم بر

[Downloaded from icml.ir on 2025-11-04]

ســاختار و عملکرد هموگلوبین انسانی بااستفاده از روش‌های طیف‌سنجی می‌پردازد.

روش بررسی

پروتئین هموگلوبین انســانی طبق روش A.Riggs از افراد سالم و غیر سیگاری به‌طور اختصار به این ترتیب جداسازی شد که خون تازهٔ هپارینه شــده با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و محتوای پلاسمایی آن جداســازی گشت، ســپس گلبول‌های قرمز خون سه مرتبه با محلول نمکی ایزوتونیک شستشــو داده‌شــد و به‌دنبال آن ســانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه انجام داده شد. اجزای تشکیل‌دهندهٔ غشای سلولی نیز به‌وســیلهٔ ســانتریفیوژ ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه خارج شدند و درنهایت محلــول هموگلوبین حاصل ۳ مرتبه با محلول بافر فســفات pH=۷ برای مدت ۲۴ ساعت دیالیز شده سپس توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر تعیین غلظت گردید[۱۶]. تترااتیل‌پیروفســفات از شرکت سیگما خریداری شد. بافر مورد استفاده در تمامی آزمایش‌ها بافر فسفات با pH=۷ بود و تمامی محلول‌ها به‌صورت تازه و با استفاده از آب دوبار تقطیر تهیه شدند و مورد استفاده قرار گرفتند. دستگاه‌های طیف‌سنج ماوراء بنفش مرئی دوشعاعی (Varian، اســترالیا)، دســتگاه ATR/FTIR مــدل Nexusســاخت شــرکت Thermo Fisher Scientific، دســتگاه اســپکتروفوتومتر ماوراء بنفش مرئی مجهز به سیســتم کنترل دمایی و سیستم تعوض سل ساخت شرکت Varian کشور اســترالیا برای مطالعات پایداری دستگاه ســانتریفیوژدور بالا Hitachi مجهز به یخچال، ساخت کشور ژاپن جهت جداســازی هموگلوبیــن و آزمایشــات همولیز اســتفاده گردیدند. تمامی دستگاه‌ها براساس استانداردهای بین‌المللی و توسط شرکت‌های فروشنده کالیبره گردید و قبل‌از آزمون‌ها، کارکرد دســتگاه‌ها بررســی گردید. کلیهٔ آزمایش‌ها نیز با ســه‌بار تکرار انجام شد و صحت و دقت داده‌ها با استفاده از آزمون آماری T-test مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررســی اثر همولیزی غلظت‌های مختلف ســم: ســلول‌های قرمز خون جداشــده به درون ویال‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل گردید و ســم با غلظت هــای مختلف به آن‌ها افزوده شــد. گروه کنترل منفــی (۰ درصد) بدون اضافه کردن هیچگونه آنالیتی و گروه کنترل مثبت (۱۰۰ درصد) با اضافه کردن تریتون x-۱۰۰ تهیه شــدند. ویال‌ها به‌مــدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ ســانتی‌گراد در حمام آب انکوبه گردید سپس به‌مدت ۵ دقیقه با ســرعت ۱۶۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. لایهٔ بالایی برای تعیین غلظت هموگلوبین لیز شــده در طول‌موج ۵۴۰ نانومتر مورد اســتفاده قرار گرفت[۱۷].

بررسی تغییرات ساختاری هموگلوبین: برای بررسی این تغییرات در پیک های گلوبین و سورت و همچنین تغییرات عملکردی در باند Q تحت تأثیر سم از دستگاه اســپکتروفتومتر مرئی-فرابنفش، در طول‌موج ۸۰۰-۲۰۰ نانومتر به روش تیتراسیونی و انکوباسیونی استفاده گردید زمان انکوباسیون یک، دو و ســه ساعت درنظر گرفته شد. غلظت هموگلوبین مورد استفاده ۱ میلی‌مولار بوده است.

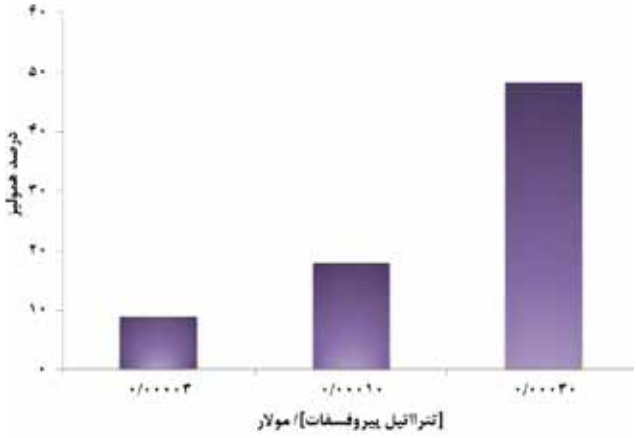
بررســی ســاختار دوم هموگلوبین براثر برهمکنش با سم: جهت بررسی تغییــرات ســاختار دوم پروتئین در دو ناحیهٔ آمیــد I و آمید II از طیف مادون قرمز استفاده گردید. به‌دلیل مایع بودن هموگلوبین و کاهش اثرات آب در طیف مادون قرمز، از طیف ATR/FTIR استفاده گردید.

مطالعات پایداری و اثر سم بر دناتوراسیون دمایی پروتئین: برای مطالعهٔ دناتوراســیون و تغییرات پایداری حرارتی، محلول هموگلوبین به‌تنهایی و به‌همراه غلظت‌های مشــخص از سم به کووت دســتگاه که دارای قابلیت کنترل دمایی اســت، انتقال و ســپس تغییرات جــذب در طول‌موج ۲۸۵ نانومتر در بازهٔ دمایی ۲۵ تا ۹۰ درجهٔ سانتی‌گراد ثبت گردید.

یافته‌ها

پتانسیل همولیزی تترااتیل‌پیروفسفات

شکل شمارهٔ ۱، اثر همولیزی غلظت‌های مختلف سم تترااتیل‌پیروفسفات را برروی ســلول‌های قرمز خون نرمال انسان ســالم نشان می‌دهد. نتایج بیانگر پتانســیل بالای ســم در تخریب دیوارهٔ ســلول‌های قرمز خون و به عبارتی لیز کردن سلول‌های قرمز خونی می‌باشد. اثر همولیتیکی سم قابل توجه اســت به‌طوری‌که با افزایش غلظت سم به میزان ده‌برابر همولیز به میزان ۵ برابر را افزایش می‌یابد.



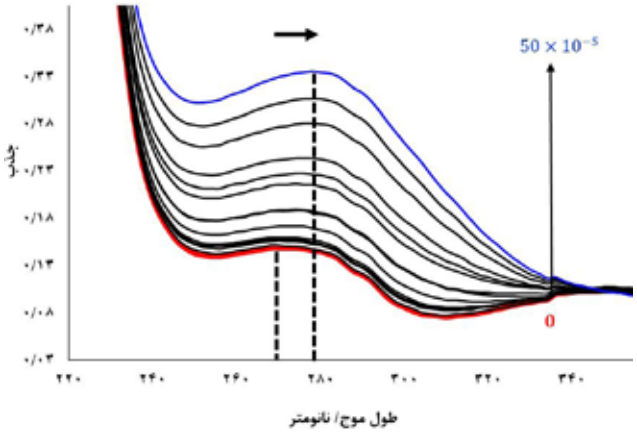
شکل۱: نمودار درصد همولیز سلول‌های خون دراثر غلظت‌های مختلف از تترااتیل‌پیروفسفات

تغییرات ساختاری و عملکردی هموگلوبین براثر برهم‌کنش با سم

شــکل۲، تغییرات طیف جذبی هموگلوبین در ناحیهٔ ۳۴۰-۲۲۰ نانومتر را در حضــور غلظت‌هــای مختلــف ســم تترااتیل-پیروفســفات به‌روش تیتراســیونی را نشــان می‌دهد. ایــن ناحیهٔ طیفی هموگلوبیــن به ناحیهٔ

[Downloaded from icml.ir on 2025-11-04]

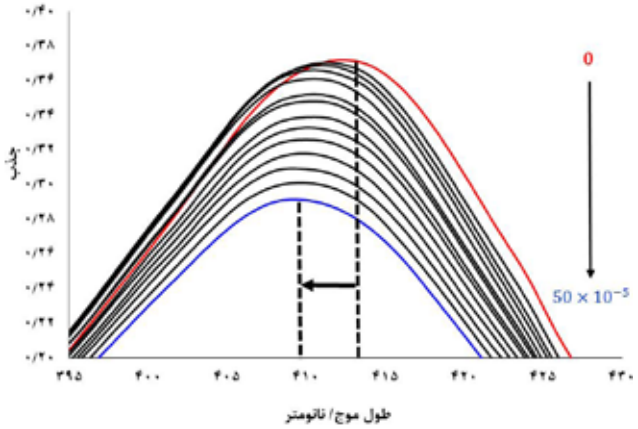
طیفی گلوبین معروف است و نشان‌دهندهٔ تغییرات طیفی مرتبط با بخش گلوبینی آن می‌باشد. تغییرات این ناحیه درحضور غلظت‌های مختلف از تترااتیل‌پیروفسفات نشان‌دهندهٔ آن است که با افزایش غلظت سم، شدت جذب هموگلوبین در طول‌موج ۲۸۰ نانومتر (ناحیهٔ گلوبین) روند افزایشی وابسته به غلظت سم داشته است و طول‌موج بیشینه در این ناحیه ۵ نانومتر به‌سمت راست جابه-جا گردیده است بدین‌معنی که محیط اطراف کروموفور غیرقطبی‌تر شده است و آبگریزی در سطح پروتئین بیشتر شده است. نتایج حاصل‌از روش انکوباسیونی نیز روندی مشابه روش تیتراسیونی را نشان می‌دهند و در انکوباسیون به‌مدت دو ساعت تغییری در روند تغییرات مشاهده نگردید (نتایج حاصل از انکوباسیون در این مقاله آورده نشده است).



شکل۲: طیف جذبی هموگلوبین در حضور تترااتیل‌پیروفسفات در ناحیهٔ گلوبینی در تیتراسیون هموگلوبین با سم. غلظت هموگلوبین ۰/۰۰۱ مولار و غلظت تترااتیل‌پیروفسفات به‌ترتیب از پایین به بالا افزایش می‌یابد (۵-۱۰×۵۰-۰ مولار)

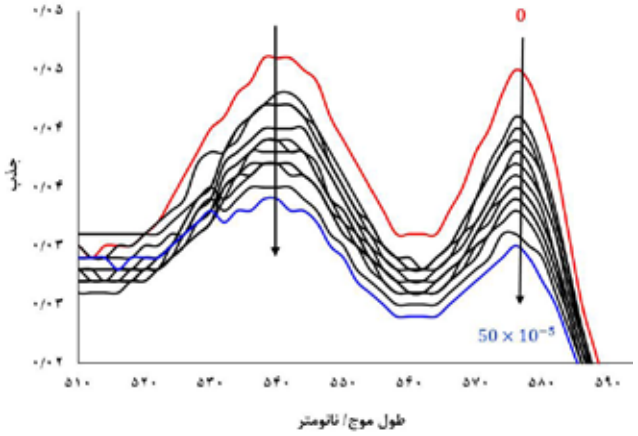
ناحیهٔ شاخص دوم در طیف جذبی هموگلوبین در محدودهٔ طول‌موج‌های ۴۳۰-۳۸۰ نانومتر وجود دارد (شکل۳). تغییرات جذبی این ناحیه از طیف هموگلوبین مربوط به ساختار غیر پروتئینی گروه هِم است و مربوط به پاکت هیدروفوب می‌باشد. در این ناحیه، در طول‌موج ۴۱۲ نانومتر (پیک سورت) جذب هموگلوبین در روندی وابسته به غلظت سم کاهش یافته است و طول‌موج بیشینه حدود ۵ نانومتر به سمت چپ جابه‌جا گردیده است که نشان‌دهندهٔ نفوذ سم به پاکت هیدروفوب و قطبی‌تر شدن محیط اطراف هِم می‌باشد. نتایج حاصل‌از روش انکوباسیونی روندی مشابه روش تیتراسیونی داشته است و در انکوباسیون تغییری در روند تغییرات مشاهده نگردید (نتایج حاصل از انکوباسیون در این مقاله آورده نشده است).

ناحیهٔ 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 نشان‌دهندهٔ گونه‌های مختلف



شکل۳: طیف جذبی هموگلوبین در حضور تترااتیل‌پیروفسفات در ناحیهٔ باند سورت در تیتراسیون هموگلوبین با سم. غلظت هموگلوبین ۰/۰۰۱ مولار و غلظت تترااتیل‌پیروفسفات به‌ترتیب از بالا به پایین افزایش می‌یابد (۵-۱۰×۵۰-۰ مولار)

هموگلوبین است و وجود تغییرات طیفی در این ناحیهٔ طول‌موج نشان دهندهٔ 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 انکوباسیونی نیز روندی مشابه روش تیتراسیونی داشته است و در انکوباسیون تغییری در روند تغییرات مشاهده نگردید (نتایج حاصل از انکوباسیون در این مقاله آورده نشده است).



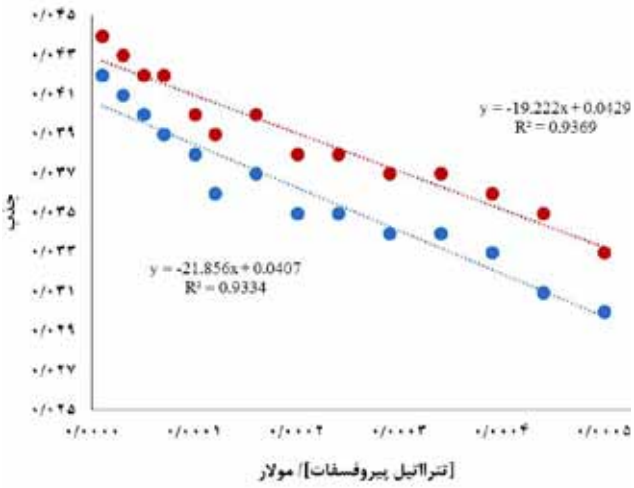
شکل۴: طیف جذبی هموگلوبین در حضور تترااتیل‌پیروفسفات در ناحیهٔ باند Q در تیتراسیون هموگلوبین با سم غلظت هموگلوبین ۰/۰۰۱ مولار و غلظت تترااتیل‌پیروفسفات به‌ترتیب از بالا به پایین افزایش می‌یابد (۵-۱۰×۵۰-۰ مولار)

بررسی روند تغییرات جذب در ۵۴۲ و ۵۷۶ نانومتر

شکل۵ نمودار تغییرات طیف جذبی در برابر تغییرات غلظت سم را در دو طول‌موج ۵۷۶ و ۵۴۲ نانومتر نشان می‌دهد. اثر سم بر جذب در هر دو پیک ۵۷۶ نانومتر و ۵۴۲ نانومتر کاهشی است. این نمودار نشان‌دهندهٔ این است که اثرات سم تنها به ساختار منتهی نمی‌شود و اثرات عملکردی

[Downloaded from icml.ir on 2025-11-04]

نیز برروی هموگلوبین دارد. نتایج حاصل‌از روش انکوباسیونی نیز نشانگر روندی مشابه روش تیتراسیونی داشته است و در انکوباسیون تغییری در روند تغییرات مشاهده نگردید (نتایج حاصل از انکوباسیون در این مقاله آورده نشده است).



شکل۵: نمودار جذب برابر غلظت در دو طول‌موج 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 (۵-۱۰×۵۰-۰ مولار) می باشد

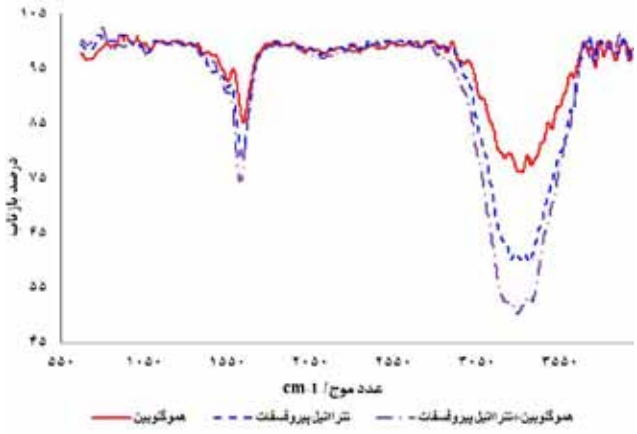
مطالعات طیف‌سنجی تبدیل فوریه برروی پروتئین

از تکنیک ATR/FTIR[1] برای مطالعهٔ ساختار دوم پروتئین استفاده شد[۱۸]. شکل ۶، طیف تبدیل فوریهٔ ناحیهٔ مادون قرمز هموگلوبین را در حضور و غیاب سم تترااتیل‌پیروفسفات نشان می‌دهد. این طیف شامل یک پیک پر شدت در ناحیهٔ آمید (I) که در محدودهٔ $1654\ cm^{-1}$ قرار دارد و مربوط به محتوای ساختار مارپیچ آلفا است که ناشی‌از 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 تترااتیل‌پیروفسفات در عددموج پیک‌های آمید (I) و آمید (II) تغییر مشاهده نشد که نشان‌دهندهٔ عدم تغییر ساختار دوم هموگلوبین در اثر برهمکنش با سم می‌باشد[۱۹].

مطالعات دناتوراسیون دمایی هموگلوبین در غیاب و حضور سم

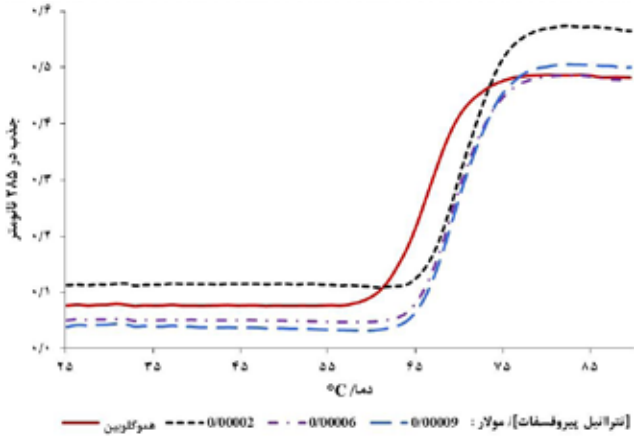
شکل۷ نمودار تغییرات جذب در ۲۸۰ نانومتر در غلظت‌های مشخصی از سم در محدودهٔ دمایی ۹۰-۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد را نشان می‌دهد. این نمودار معروف به نمودار پایداری حرارتی پروتئین می‌باشد. به‌علت حضور حداقل یکی از سه اسید-آمینهٔ آروماتیک تریپتوفان، فنیل‌آلانین و تیروزین به‌عنوان کروموفورهای طیف‌سنجی در ساختار پروتئین‌های مختلف، این

۱. Attenuated Total Reflectance / Fourier Transform InfraRed Spectroscopy



شکل۶: طیف ATR/FTIR تترااتیل‌پیروفسفات به‌تنهایی، هموگلوبین و ترکیب تترااتیل پیروفسفات و هموگلوبین

اسیدهای آمینه به‌عنوان شاخص برای تعیین تغییرات در ساختار پروتئین‌ها استفاده می‌شوند. حداکثر جذب این اسیدهای آمینه در حدود ۲۸۰ نانومتر می‌باشد درنتیجه تغییرات طیفی در این طول‌موج بیانگر تغییر در محیط اطراف کروموفور می‌باشد و با درنظر گرفتن این تغییرات می‌توان به مطالعات پایداری و دناتوراسیون حرارتی هموگلوبین در حضور سم پرداخت[۲۰]. جدول ۱ مقادیر نقاط ذوب هموگلوبین (Tm) را در غیاب سم و درحضور غلظت‌های مختلف تترااتیل-پیروفسفات نشان می‌دهد. همان‌طورکه در جدول ۱ دیده می‌شود، نقطهٔ ذوب پروتئین هموگلوبین



شکل۷: منحنی دناتوراسیون حرارتی هموگلوبین درحضور غلظت‌های مختلف از تترااتیل پیروفسفات. غلظت هموگلوبین ۰/۰۰۱ مولار می‌باشد

جدول۱: مقادیر نقطهٔ ذوب منحنی دمایی هموگلوبین درحضور غلظت‌های مختلف از سم

[تترااتیل پیروفسفات]/ مولار	۰	۰/۰۰۰۰۶	۰/۰۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰۹
T_m	۶۷	۷۱	۶۹	۷۰

[Downloaded from icml.ir on 2025-11-04]

با افزایش غلظت سم اندکی افزایش می‌یابد.

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به پرکاربرد بودن سموم ارگانوفسفره در کشاورزی و میزان بالای مسمومیت با این سموم به‌نظر می‌رسد یکی از معضلات عمدهٔ عصر حاضر عدم آگاهی درمورد مکانیسم اثر این سموم بر بدن باشد. ازآنجاکه تترااتیل پیروفسفات ترکیبی ارگانوفسفره و بسیار مهلک برای انسان و جانوران می باشد و پروتئین هموگلوبین انسانی نیز نقش حیاتی انتقال اکسیژن و دی اکسیدکربن در بدن را برعهده دارد، لذا تحقیق حاضر به بررسی اثرات این سم بر ساختار و عملکرد هموگلوبین انسانی از دیدگاه مولکولی می پردازد. باتوجه به نتایج آزمایش همولیز، تتراتیل‌پیروفسفات پتانسیل قابل توجهی در لیز سلول‌های قرمز را دارا است. این ترکیب همچنین ازنظر 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. ازطرفی طیف جذبی هموگلوبین شامل سه ناحیهٔ گلوبین در ۲۸۰ نانومتر، سورت در ۴۱۰ نانومتر و باند Q در ۵۵۰-۵۶۰ نانومتر می‌باشد[۲۱]. تغییرات جذب در ۲۸۰ و ۴۱۰ نانومتر ناشی‌از تغییرات ساختاری هموگلوبین در برهمکنش با تترااتیل‌پیروفسفات می باشد. جابه‌جایی ۸ نانومتری طول‌موج به‌سمت طول‌موج‌های بلندتر[۲] در ناحیهٔ گلوبین که در سطح پروتئین قرار دارد، نشان‌دهندهٔ برهمکنش سم از بخش غیرقطبی خود با سطح گلوبین و درنتیجه غیر قطبی‌تر شدن (آبگریزی) این بخش می‌باشد. ناحیهٔ سورت، مربوط به گروه هم می‌باشد لذا، جابه‌جایی طول‌موج به اندازهٔ ۴ نانومتر به سمت طول‌موج‌های کوتاه‌تر[۳]در این ناحیه ناشی‌از قطبی‌تر شدن این محیط درنتیجهٔ برهمکنش سم از بخش‌های قطبی خود و درنتیجه نفوذ سم به پاکت هیدروفوب می‌باشد. کاهش جذب هموگلوبین در دو طول‌موج ۵۴۲ نانومتر و ۵۷۶ نانومتر نیز نشان‌دهندهٔ کاهش فعالیت اکسیژن‌گیری هموگلوبین براثر برهمکنش با غلظت‌های مختلف از سم می‌باشد. در بررسی ساختار دوم توسط طیف سنجی تبدیل فوریه نشان‌داده‌شد که تغییری در ساختار دوم هموگلوبین براثر برهمکنش با سم القاء نشده‌است. همچنین در مطالعات پایداری حرارتی مشاهده شد که خاصیت آبدوستی این سم باعث حفظ آب اطراف پروتئین می‌شود و درنتیجه نفوذ آن به قسمت آبگریز درون پروتئین امکان‌پذیر نمی‌باشد. درحقیقت 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 اتصال بیشتر مولکول‌های سم پایداری پروتئین را کاهش می‌دهد. افزایش وابسته به غلظت نقطهٔ ذوب پروتئین نیز شاهدی بر این مدعا می‌باشد. نتایج تحقیق حاضر اثرهای برهمکنش تترااتیل‌پیروفسفات با پروتئین مهم بدن را از دیدگاه مولکولی بیان کرده درصورتی‌که نتایج بررسی های قبلی پژوهشگران پیرامون اثرهای بالینی و مسمومیت‌های پوستی و تنفسی ایجاد شده توسط این سم بوده است و تاکنون تحقیقی درمورد بررسی اثرهای بالینی این سم برروی فاکتورهای خونی انسان صورت نگرفته است لذا، برای مقایسهٔ 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 افرادی‌که به‌طور مداوم در تماس با این سم هستند، با عارضهٔ کم‌خونی مواجه گردند، لذا توصیه می‌شود که سطح سلول‌های قرمز خون این افراد توسط تست‌های بالینی معتبر سنجیده شود و درصورت 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 حضوریافتن 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 درمورد 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 فلوسایتومتری 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 حاصل‌از آزمایش‌ها با این دستگاه‌ها به قطعیت نتایج حاضر کمک شایانی خواهد نمود.

۲. Redshift
۳. BlueShift

[Downloaded from icml.ir on 2025-11-04]

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 Äanticholinesterase 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 pyridylmethylamines. 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 X QH, 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 tetraeyhylpyrophosphate. 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 heamoglobin by exposure to electromagnetic fields: a FTIR spectroscopy study. Oriental Journal of chemistry. 2014; 30: 131-5.

21. Zijlstra Wg, Buursma A. Spectrophotometey of hemoglobin: absorption spectra of bovine oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin. Comparative Biochemistry and Physiology. 1997; 118: 743-9.

[Downloaded from icml.ir on 2025-11-04]