فصلنامه علمی - پژوهشی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۳ ، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۹

بررسی تغییرات ساختار و تجمع‌پذیری هموگلوبین انسان در حضور سم کارتاپ

مهدیه عمادی[۱]، پروانه مقامی*[۲]، خاطره خرسندی[۳]، رضا حسین زاده*[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۵/۵

چکیده

هدف این تحقیق بررسی اثر سم کارتاپ بر ساختار و عملکرد هموگلوبین برای تعیین مکانیسم مولکولی اثر سم می باشد. در این پژوهش، اثرکارتاپ بر ساختار و تجمع‌پذیری هموگلوبین انسانی با روش‌های طیف‌سنجی جذب فرابنفش مرئی، حرارتی، فلورسانس و تبدیل فوریه در دو حالت تیتراسیونی و انکوباسیونی و در غلظت های متفاوت، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج طیف‌سنجی فرابنفش مرئی نشان داد که با افزودن غلظت‌های مختلف از سم، تغییرات جذب مشاهده می‌گردد. آنالیز مقادیر اکسی-داکسی و مت‌هموگلوبین در حضور مقادیر مختلفی از سم کارتاپ، نشان دهنده‌ی کاهش گونه‌های فعال هموگلوبین در حضور سم بود. همچنین تجمع‌پذیری و همولیز گلبول قرمز با اضافه نمودن غلظت سم افزایش نشان داد. در طیف سنجی فلورسانس تخریب جزئی هِم رخ داد و در مادون قرمزتغییر ساختار دوم هموگلوبین مشاهده نشد.

واژه های کلیدی: ***آفت‌ُکش، سلول های قرمز، طیف سنجی، هِم، همولیز.***

مقدمه

امروزه یکی از مسائل مورد توجه در محیط‌زیست و آلودگی منابع آب و خاک، استفاده‌روزافزون و بی‌رویه از آفت‌کش‌ها و سموم دفع آفات در حفاظت از محصولات زراعی و کشاورزی می‌باشد. آفت‌کش‌های شیمیایی شامل سموم کلره، ارگانو فسفره، کاربامات‌ها و .. می‌باشند که برای کنترل جمعیت آفاتی چون حشرات، علف‌های هرز، عوامل بیماری زا و امثال آن تولید و استفاده می‌شوند. از آنجا که همه آفت‌کش‌ها با نسبت هایی متفاوت و بسته به مکانیسم و نحوه‌ی اثر خود برروی ارگانیسم‌ها، اندام‌ها و فرایندهای حیاتی اثرات مضر و سمی می‌گذارند، تماس مستقیم و غیرمستقیم انسان با آفت‌کش‌ها می تواند باعث بروز بیماری و مرگ گردد، به‌علاوه خساراتی را به سایر موجودات زنده مانند گیاهان نیز وارد می‌نمایند. لذا رعایت اصول بهداشتی و پیشگیری می‌تواند جانداران را در برابر خطرات این سموم محافظت کند. (Ali *et al*., 2014; Dehghani., 1385; Talebi Jahromi., 1385).

۱-کارشناسی ارشد بیوفیزیک ،گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲- استادیار بیوفیزیک ،گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
*(نویسنده مسئول: maghami@srbiau.ac.ir)
۳- استادیار بیوشیمی ،گروه پژوهشی فتودینامیک، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی، پژوهشکده یارا، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴- استادیار بیوفیزیک ،گروه پژوهشی لیزر پزشکی، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی، پژوهشکده یارا، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
*(نویسنده مسئول: r.hoseinzadeh@ut.ac.ir)

کاربامات‌ها در دسته‌حشره‌کش‌ها به‌طور کلی شامل چندین گروه از مواد با خصوصیات شیمیایی و سم شناسی متفاوت و مجزا هستند که دارای سمیت بالادر پستانداران هستند و اندام هدف اصلی آن‌ها مغز، کبد، عضلات اسکلتی، و قلب می‌باشند (Sraylv.,1376). کارتاپ‌هیدروکلراید از گروه سموم کارباماتی، ماده‌ای جامد، کریستالی بی‌رنگ، کمی رطوبت‌پسند، با بوی ملایم می‌باشد و با نام تجاری پادان (Padan) برای مبارزه با آفاتی چون کرم ساقه‌خوار نواری برنج و سایر حشرات جونده و مکنده بکار می‌رود. مکانیسم اثر این سم، انسداد انتقال کولینرژیک در سیستم عصبی مرکزی حشرات است و به‌عنوان یک مسدودکننده‌ی عصبی عضلانی در نظر گرفته می‌شود. حشره‌کش کارتاپ با فرمول شیمیایی (S,S′-(2dimethylaminotrimethylene) bis(thiocarbamate) hydrochloride، با اکسیداسیون سم طبیعی nereistoxin (NTX) تشکیل[۴- (دی متیل) -۱،۲- دیتیولان] می‌دهد. متوسط دوز کشنده‌ی LD_{50} (lethal dose) سم کارتاپ برای پستانداران ۳۴۵-۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و متوسط غلظت کشنده یا LC_{50} (lethal concentration) برای ماهی ها ۱/۶ میلی‌گرم بر لیتر است. این سم برای پرندگان و ماهی‌ها و دیگر موجودات آبزی سمیت بالایی دارد (Motevalian.,1380; Aldridge& Magos., 1978).

در پژوهش‌های صورت گرفته در این زمینه، برهمکنش حشره‌کش تیاکلوپراید TL (Thiacloprid) با هموگلوبین گاوی BHB (Bovine Hemoglobin) تحت شرایط فیزیولوژیکی با استفاده از طیف‌سنجی فلورسانس، طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی CD(Circular Dichroism Spectroscopy) و مدل‌سازی مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تعامل بین TL و BHB یک روند استاتیک می باشد به‌طوری‌که شدت فلورسانس BHB به طور منظم با افزایش تدریجی غلظت تیاکلوپراید کاهش یافت و همچنین کمپلکس TL–BHb میتواند به پیوند هیدروژنی و تعاملات آبگریز منجر گردد(Chen *et al*., 2010) . همچنین طی پژوهشی بررسی تاثیرسموم ارگانوکلره آندوسولفان و ارگانوفسفره‌دیازینون بر پارامترهای خونی و سرمی ماهی کپور گزارش شده است که نتایج آن نشان داد آندوسولفان و دیازینون سبب کاهش تعداد گلبول‌های قرمز، کاهش غلظت هموگلوبین و کاهش درصد هماتوکریت خون در ماهی کپور شدند (Mahdaviasl., 1390). مطالعات مختلف برای بررسی تاثیر سم کارتاپ هیدروکلراید به صورت موردی روی تحریک پوست، سوزش چشم، اثرات تنفسی، تولیدمثل، تراریختگی‌ژنی، بازدارندگی‌آنزیمی و جهش‌زایی و نیز آزمایشات بالینی کوتاه‌مدت و درازمدت برروی موش، خرگوش و سایر پستانداران انجام گردیده است؛ نتایج مطالعات موردی نشان دهنده‌ی اثر مثبت این سم بر اختلالات باروری در نسل اول(والدی)، مسدود شدن فعالیت‌های عصبی و عضلانی در برخی گونه‌های جانوری و سوزش‌چشم و تنگی‌نفس به صورت خفیف و موقتی بود و نتایج حاصل از مطالعات بالینی شامل افزایش نیتروژن و اوره خون، کاهش درصد حجمی گلبول‌های قرمز خون و کاهش فعالیت کولین‌استراز بوده است(inchem., 1978) . علاوه بر این، چندین گزارش از مسمومیت کارتاپ در انسان در ژاپن و هند وجود دارد و علائم آن همراه با استفراغ، تشنج، دردشکم، تنگی‌نفس، ترشح بزاق، اسپاسم و میدریازیس (گشادشدن مردمک) گزارش شده است (Kumar *et al*., 2013; Raza *et al*., 2013) . هموگلوبین یک پروتئین تترامر کروی محلول است و از دو زنجیره یکسان آلفا با ۱۴۱ اسیدآمینه و دو زیرواحد بتا

با ۱۴۶ اسیدآمینه تشکیل شده است. هموگلوبین دارای بخش غیرپروتئینی موسوم به هِم(heme) است که به آن گروه پروستتیک مولکول هموگلوبین می‌گویند. هِم عبارتست از یک حلقهٔ پورفیرینی که یک اتم آهن دوظرفیتی در مرکز آن قرار گرفته است. ماهیت تترامری هموگلوبین برای عملکرد بیولوژیکی آن بسیار مهم است که انتقال اکسیژن به ارگان‌های تنفسی، تنظیم pH خون و درگیری در بسیاری از بیماری‌های بالینی ازآن جمله است. از این رو اتصال آفت‌کش‌ها به هموگلوبین اهمیت زیادی دارد (Perutz& Lehmann.,1968; Abbasi-Tejarag *et al*., 2014).

با در نظر گرفتن اهمیت پروتئین هموگلوبین و نیز اثرات مضر سموم بر سلامت انسان و به‌ویژه بر فاکتورهای خونی و نیز از آنجا که تاکنون پژوهشی درخصوص اثرات مولکولی سم کارتاپ با این پروتئین انجام نشده است، تحقیق حاضر به بررسی تغییرات ساختاری و عملکردی هموگلوبین به عنوان پروتئینی که نقش مهمی در انتقال اکسیژن دارد، در حضور غلظت‌های مختلف سم کارتاپ و با تکنیک‌های مختلف طیف‌سنجی می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد مورد استفاده

سم کارتاپ هیدروکلراید گرانوله با خلوص ۹۸ درصد از شرکت سیگما (آمریکا) خریداری شد. در این مطالعه هموگلوبین از خون فرد سالم و غیر سیگاری طبق پروتکلAusten Riggs ا ستخراج گردید. روش جدا سازی هموگلوبین به این ترتیب می‌باشد که خون تازه هپارینه شده با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و محتوای پلاسمایی آن جداسازی می‌شود، سپس گلبول‌های قرمز خون سه مرتبه با محلول نمکی ایزوتونیک شستشو داده و به‌دنبال آن سانتریفیوژ باسرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه انجام می‌شود. اجزای تشکیل‌دهنده‌ی غشای سلولی نیز بوسیله‌ی سانتریفیوژ ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه خارج شدند و در نهایت محلول هموگلوبین حاصل سه مرتبه با محلول بافر فسفات pH=۷ برای مدت ۲۴ ساعت دیالیز شد(Riggs., 1981). برای تهیه‌ی محلول‌ها از بافر فسفات با pH= ۷ استفاده شد و تمامی محلول‌ها در روز آزمایش تهیه گردیدند.

مطالعات همولیزی روی گلبول قرمز خون

همولیز سلول‌های قرمز خون با کمک شستشو توسط محلول بافر سالین‌ایزوتونیک (NaCl ۰/۹در صد) و همچنین دستگاه سانتریفیوژ دور بالای مجهز به سیستم برودتی Hitachi ساخت کشور ژاپن صورت گرفت. دو نمونه به‌عنوان شاهد صفر درصد و ۱۰۰ درصد نیز آماده شد به‌طوری که در نمونه صفر درصد با استفاده از آب به‌جای آنالیت و نمونه ۱۰۰ درصد لیز سلولی با ا ستفاده از تریتون۱۰۰ – X تهیه گردید. سپس نمونه برای مدت ۴۵ دقیقه در حمام آبی و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد تیمار شد و پس از سانتریفیوژ در ۱۶۰۰ دور بر دقیقه، فاز فوقانی هموگلوبین جدا گردید و برای اندازه‌گیری در طول

موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه طیف‌سنجی فرابنفش مرئی مورد بررسی قرار گرفت (Ariaeenejad *et al*., 2014; Hosseinzadeh& Moosavi Movahedi., 2016; Maghami *et al*., 2014).

مطالعات طیف‌سنجی فرابنفش مرئی

برای بررسی تغییرات ساختاری از طیف فرابنفش مرئی تهیه شده از محلول هموگلوبین با غلظت یک میلی‌مولار به همراه غلظت های مشخص از سم به روش تیتراسیونی و انکوباسیونی در فواصل زمانی یک، دو و سه ساعت در ناحیه طول موج ۸۰۰-۲۰۰ نانومتر انجام گرفت تو سط د ستگاه طیف سنجی مرئی- فرابنفش کری(carry) ساخت کشور ا ستراليا ا ستفاده شد، طیف‌سنجی تغییرات طیفی به‌دست آمده برای آنالیز مورد بررسی قرار گرفتند. کلیه‌ی آزمایشات نیز با سه بار تکرار انجام گرفته است.

مطالعات تجمع‌پذیری پروتئین

برر سی تجمع‌پذیری هموگلوبین در حضور سم کارتاپ با د ستگاه طیف سنجی حرارتی مدل Ultrascan XE ساخت کشور آمریکا انجام شد. برای بررسی تجمع‌پذیری پروتئین در حضور سم، تغییرات جذب هموگلوبین به‌تنهایی و در حضور غلظت‌های مختلف از سم کارتاپ در طول موج ۳۶۵ نانومتر در دمای ۶۰ درجه‌ی سلسیوس در طول مدت ۸۰۰ ثانیه ثبت گردید.

مطالعات طیف‌سنجی فلورسانس

برای انجام آزمون‌های طیف‌سنجی فلورسانس نرمال، طیف‌ها در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی گراد و غلظت یک میلی مولار به همراه غلظت‌های مشخص از سم به دو روش تیتراسیونی و انکوباسیونی در دو طول موج تهییج و نشر ۳۲۱ و ۴۶۰ نانومتر توسط دستگاه طیف‌سنج فلورسانس کری‌اکلیپس ساخت شرکت وریان کشور استرالیا ثبت گردیدند.

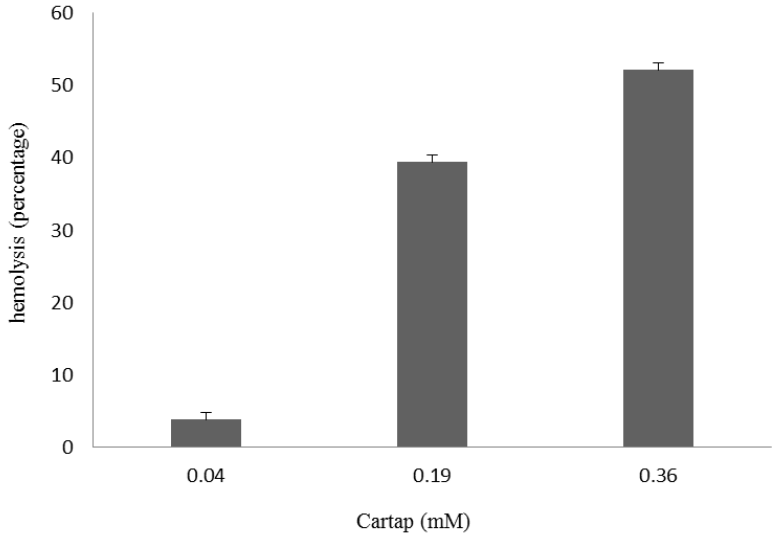
مطالعات طیف‌سنجی ATR -FTIR

FTIR (Fourier Transform InfraRed Spectroscopy) – ATR (Attenuated Total Reflection) یا طیف سنجی مادون قرمز بر اساس جذب تابش و بررسی جهش‌های ارتعاشی مولکول‌ها و یون‌های چند اتمی برای تعیین ساختار و اندازه‌گیری گونه‌های شیمیایی و شناسایی ترکیبات آلی به‌کار می‌رود. برای بررسی تغییرات ساختار دوم هموگلوبین انسانی در اثر برهمکنش با کارتاپ‌هیدروکلراید از دستگاه مدل Thermo Nicolet NEXUS 670 ساخت کشور آمریکا در ناحیه‌ی عدد موج ۱۶۰۰-۱۷۰۰ cm^{-1}(آمید I) و ۱۵۴۰ cm^{-1}(آمید II) استفاده گردید. برای انجام کار پنج محلول ATR شامل سم خالص، هموگلوبین خالص، و سه محلول ترکیبی از سم با مقادیر نصف، برابر و دو برابر غلظت هموگلوبین تهیه گردید.

نتایج و بحث

بررسی یافته‌های حاصل از اثر همولیزی سم

همولیز در واقع تخریب یا لیز غشای گلبول‌های قرمز و آزاد شدن هموگلوبین به پلاسمای خون است که سبب قرمز شدن پلاسما می‌شود. همولیز ممکن است تحت تاثیر عوامل مختلفی مانند فشار اسمزی، برخی مواد شیمیایی و یا سموم انجام شود. مطالعه‌ی اثرات همولیتیک آنالیت‌های مختلف بر روی گلبول‌های قرمز یکی از مطالعات مهم در خصوص مواد مختلف است. نتایج بدست آمده از اثر همولیز کارتاپ نشان دهنده‌ی افزایش لیز گلبول قرمز متناسب با افزایش غلظت سم می‌باشد به‌گونه‌ای که با افزایش ۱۰ برابری غلظت سم کارتاپ درصد همولیز نیز تقریبا ۱۰ برابر شده است.(شکل۱)



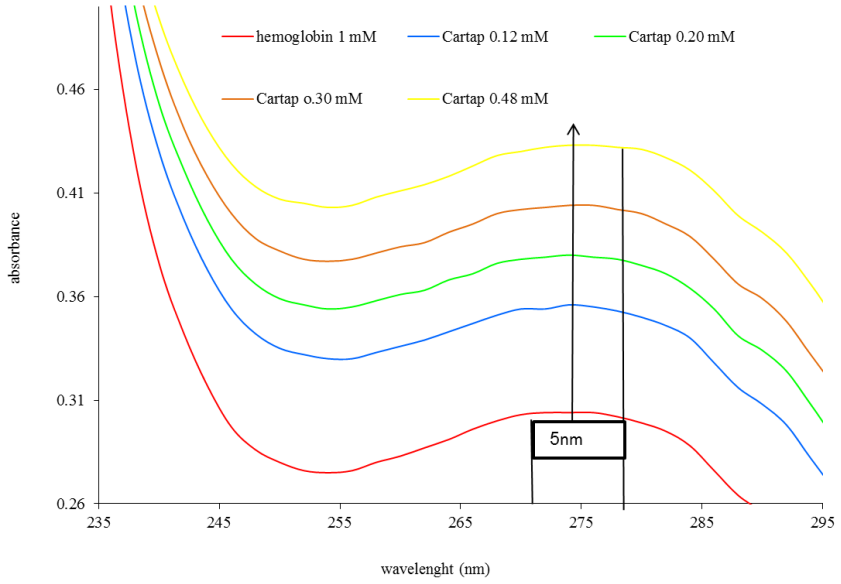
شکل ۱:نمودار اثر همولیزی سم کارتاپ در غلظت‌های مختلف برروی سلول‌های قرمز خون انسان بالغ سالم

بررسی یافته‌های حاصل از طیف‌سنجی فرابنفش مرئی

طیف جذبی هموگلوبین در ناحیه ۸۰۰-۲۰۰ شامل سه منطقه‌ی جذب به ترتیب در ۲۸۵ نانومتر مربوط به گلوبین (جذب تریپتوفان و تیروزین)، ۴۱۵ نانومتر مربوط به سورت یا ناحیه B (کمپلکس پورفیرینی آهن) و ۶۰۰-۵۰۰ مربوط به پیک Q (حالات اکسی و داکسی و مت‌هموگلوبین) می‌باشد. طیف‌سنجی در حضور غلظت‌های مختلف سم کارتاپ و هموگلوبین در دوحالت تیتراسیونی و انکوباسیونی در سه ساعت با فواص زمانی مشخص انجام گردید و در این مقاله حالت انکوباسیونی با کسب نتیجه بهتر در هر ساعت آورده شده است.

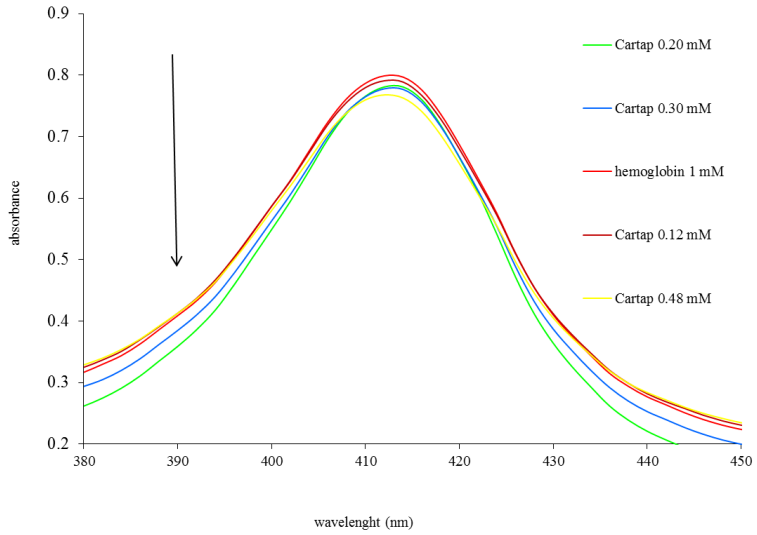
شکل(۲) حالت تیتراسیونی مربوط به ناحیه طیفی گلوبین را نشان می‌دهد. اضافه کردن غلظت‌های مختلف سم کارتاپ به هموگلوبین در حالت تیتراسیونی باعث افزایش جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر و جابجایی باتوکرومیک

(Bathochromic Shift) (انتقال‌قرمز و یا Red Shift) می‌شـــود در نتیجه پیک جذب به‌ســـمت طول موج‌های بلندتر با انرژی و فرکانس‌های کمتر می‌رود، (تغییر حداکثر طول موج جذب در حدود پنج نانومتر از طول موج نانومتر ۲۷۳به ۲۷۸ نانومتر) و افزایش جذب در همین طول موج را به‌همراه دارد.



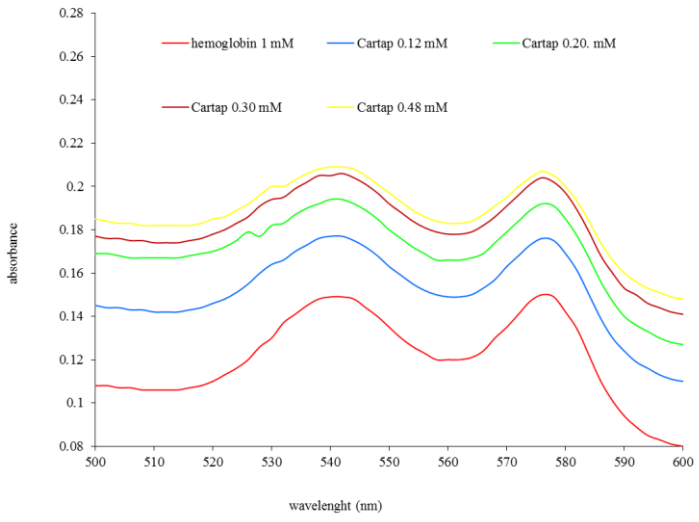
شکل۲:اثر افزایش غلظت سم کارتاپ بر هموگلوبین در ناحیه طیفی گلوبین.

شکل(۳) حالت تیترا سیونی مربوط به ناحیه طیفی سورت را نـ شان می‌دهد. در حالت تیترا سیونی کاهش جذب در طول موج ۴۱۵ نانومتر دیده می‌شود و در حالت انکوباسیون نیز همان روند مشاهده می‌گردد ولی می‌توان نتیجه گرفت که تاثیر ســـم بر پروتئین در زمان طولانی‌تر، باعث نفوذ آن به کمپلکس هِم یا آهن می‌شـــود و می‌تواند تاثیرات مخرب‌تری اعمال کند. (نتایج انکوباسیون در این بخش نیامده است.)



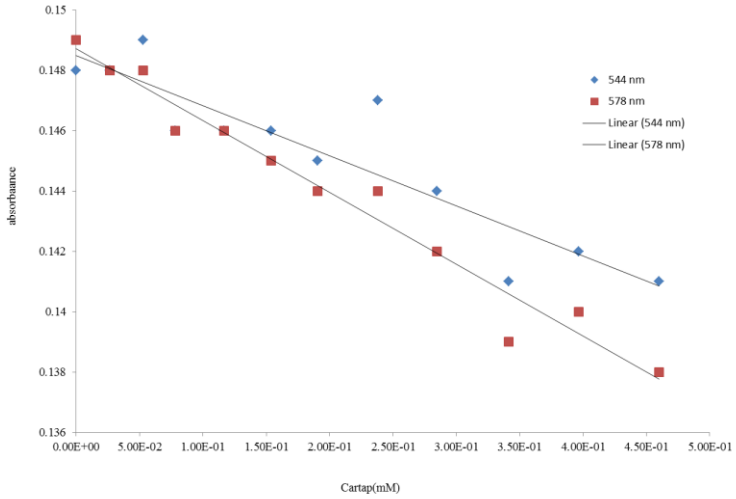
شکل۳: تغییرات طیفی ناحیه سورت هموگلوبین با افزایش غلظت سم کارتاپ.

شکل(۴) حالت تیتراسیونی مربوط به ناحیه‌ی طیفی باند Q را نشان می‌دهد. این ناحیه بازه میان ۵۰۰-۶۰۰ نانومتر، با دو پیک مجزا دیده می‌شـود که در حال تیتراسـیونی جذب آن کاهش یافته اسـت. همچنین می‌توان کاهش گونه‌های فعال هموگلوبین(اکسی و داکسی) و افزایش گونه‌های غیرفعال(مت‌هموگلوبین) را نیز پیش‌بینی نمود که در اینجا رقابت میان سم و گونه‌ها در اکسیژن‌گیری رخ می‌دهد.

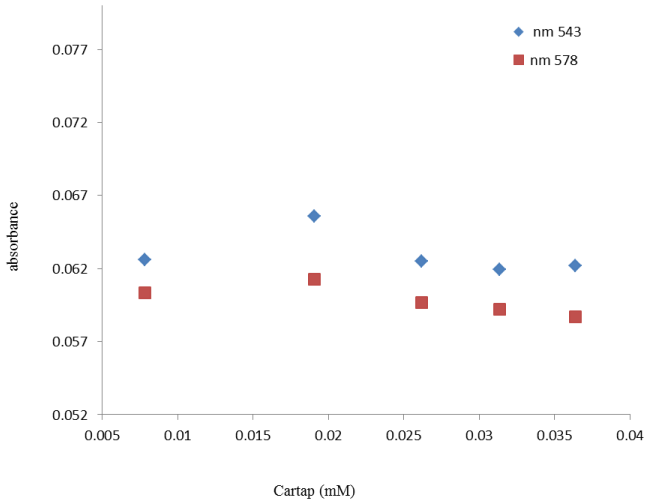


شکل۴: تغییرات باند Q هموگلوبین با افزایش غلظت سم کارتاپ.

شکل(۵) و شکل(۶) تغییرات طیفی در طول‌موج‌های ۵۴۴ و ۵۷۸ نانومتر در دوحالت تیتراسیونی و انکوباسیونی پس از ساعت دوم را نشان می‌دهد که در این دو حالت با افزایش غلظت سم کارتاپ کاهش جذب در تیتراسیون به طور قابل ملاحظه‌ای مشاهده می‌گردد. در انکوباسیون ساعت دوم روند جذب تقریبا مشابه تیتراسیون است با این تفاوت که ابتدا بصورت افزایشی و بعد کاهشی می‌باشد. این نشانه تاثیر سم بر عملکرد هموگلوبین است. در واقع این تغییرات در دو طول موج معین ادامه بررسی روند گونه‌های فعال و غیرفعال در ناحیه طیفی Q است و بررسی‌های بیشتر برای میزان تغییرات نیز در این پژوهش صورت گرفته است.



شکل ۵: نمودار تغییرات جذب با افزایش غلظت سم کارتاپ در طول‌موج‌های ۵۴۴ و ۵۷۸ نانومتر(باند Q) در حالت تیتراسیونی. غلظت هموگلوبین ۱ میلی مولار است.



شکل ۶: نمودار تغییرات جذب با افزایش غلظت سم کارتاپ در طول‌موج‌های ۵۴۴ و ۵۷۸ نانومتر(باند Q) در انکوباسیون ساعت دوم. غلظت هموگلوبین ۱ میلی مولار است.

بررسی گونه‌های مختلف هموگلوبین

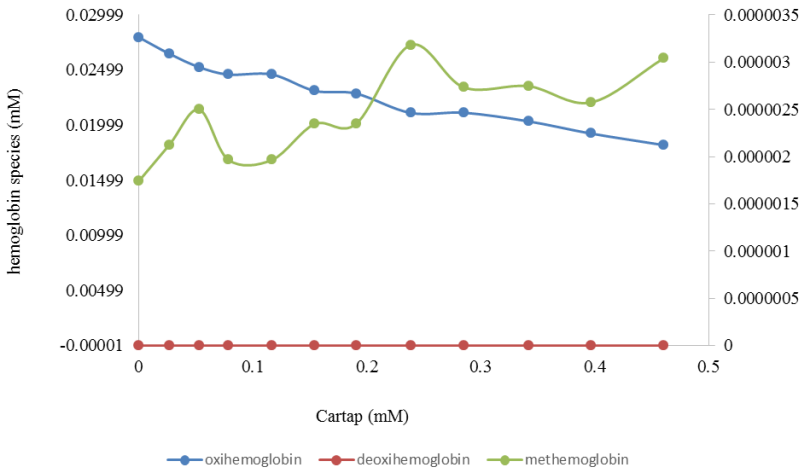
با توجه به شکل(۷) که برای بررسی گونه‌های فعال(اکسی) و غیرفعال(داکسی و مت‌هموگلوبین) در حالت تیتراسیونی رسم گردیده است، مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت سم کارتاپ، غلظت اکسی هموگلوبین کاهش و غلظت مت‌هموگلوبین افزایش می‌یابد. حالت اکسی کمتر اما بازهم غالب است. بنابراین نتایج نشان دهنده احتمال ایجاد تخریب هِم می‌باشد.

از طرفی با مد نظرقرار دادن تغییرات پیک‌های Qband می‌توان در طول‌موج‌های ۶۰۰-۵۰۰ گونه‌های فعال هموگلوبین توسط معادله بنش (Bensch) را مورد محاسبه قرار داد(Benesch et al., 1973) :

اکسی هموگلوبین $[(1.4747\ A_{576}-0.6820\ A_{560}-0.5329\ A_{540})*10^{\wedge-4}]=$

داکسی هموگلوبین $[(1.4749\ A_{560}-0.2141\ A_{576}-1.1042\ A_{540})*10^{\wedge-4}]=$

متهموگلوبین $[(4.5852\ A_{540}-0.8375\ A_{560}-3.7919\ A_{576})*10^{\wedge-4}]=$

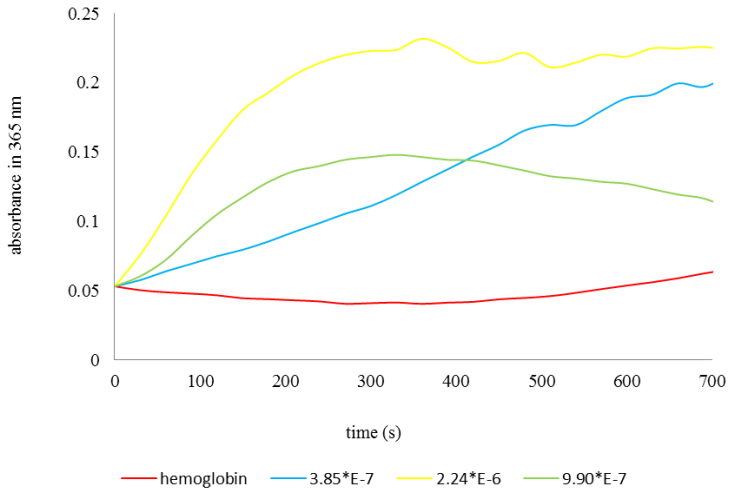


شکل ۷:نمودار گونه‌های فعال و غیر فعال هموگلوبین در تیتراسیون هموگلوبین با سم.

بررسی یافته‌های حاصل از تجمع‌پذیری پروتئین

در فرایند تجمع‌پذیری (aggregation) پاکت‌های هیدروفوب در معرض قرار می‌گیرد و پروتئین‌ها به‌هم متصل می‌شوند و این اتصال یا برهمکنش برگشت پذیر نیست. غلظت‌های مختلف سم کارتاپ بر تجمع پذیری هموگلوبین نیز با طیف‌سنجی مرئی دمایی مورد بررسی قرار گرفت و نمودار نشان داد که با افزایش غلظت سم میزان تجمع‌پذیری پروتئین افزایش می‌یابد و زمان تاخیر در شروع تجمع‌پذیری در زمان‌های کوتاه‌تر رخ می‌دهد که نشان از سمیت بالای کارتاپ هیدروکلراید بر پروتئین هموگلوبین است. بنابراین وابستگی رابطه میان سم و هموگلوبین به‌خوبی دیده می‌شود. باید این نکته را در نظر گرفت که میزان

تجمع‌پذیری این سم وابسته به غلظت سم و مدت مجاورت با سم نیز می‌باشد. بعد از مدت زمانی معین و در طول موج مشخص تجمعات پروتئینی به حالت ثابت می‌رسد(شکل۸).

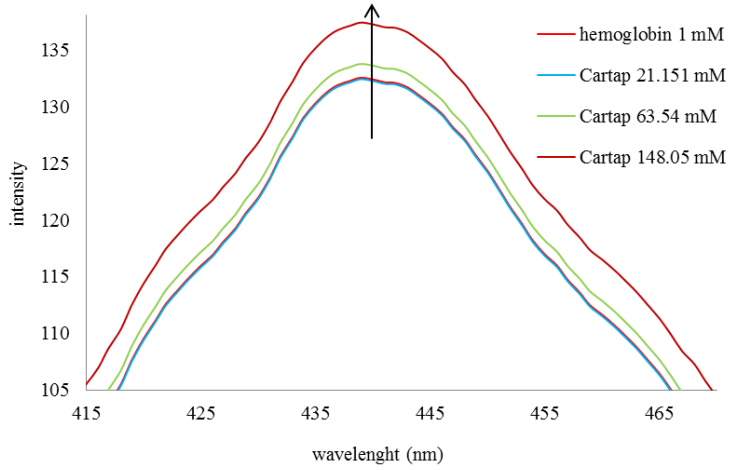


شکل۸ :اثرکینتیکی سم در طول موج ۳۶۵ نانومتر و در مدت ۸۰۰ ثانیه نشان دهنده‌ی ایجاد تجمعات پروتئینی هموگلوبین در حضور سم کارتاپ با افزایش غلظت است.

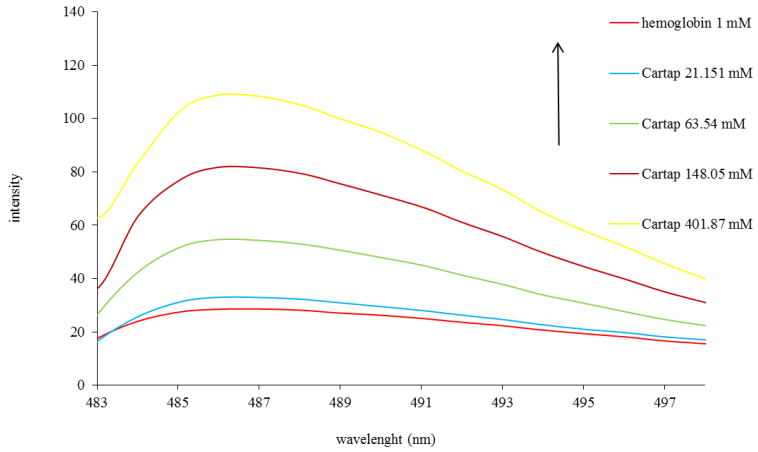
بررسی یافته‌های حاصل از طیف‌سنجی فلورسانس

به‌منظور پیگیری ترکیبات حاصل از تخریب هِم، دو طیف فلورسانس برای بررسی برهم‌کنش سم با هموگلوبین مورد بررسی قرار گرفتند. طیف اول با حداکثر طول موج تهییج در ۳۲۱ نانومتر با نشر در محدوده ۴۵۰-۳۳۰ نانومتر و طیف دوم با حداکثر تهییج در ۴۶۰ نانومتر با نشر در محدوده۵۵۰-۴۶۰ نشان داده شده است.

شکل(۹) و(۱۰) نشان می‌دهد که فلورسانس در دو حالت تیتراسیونی و انکوباسیون در نواحی تهییج افزایش می‌یابد. با این وجود با گذشت زمان بیشتر، تغییری در افزایش تخریب هِم دیده نمی‌شود بلکه پس از آن به صورت خطی در می‌آید و سپس به پایین ترین حد خود می‌رسد. (نتایج انکوباسیون در این بخش نیامده است.)



شکل ۹: طیف نشر فلوئورسانس هموگلوبین در حضور غلظت‌های مختلف از کارتاپ. طول موج تهییج ۳۲۱ نانومتر.



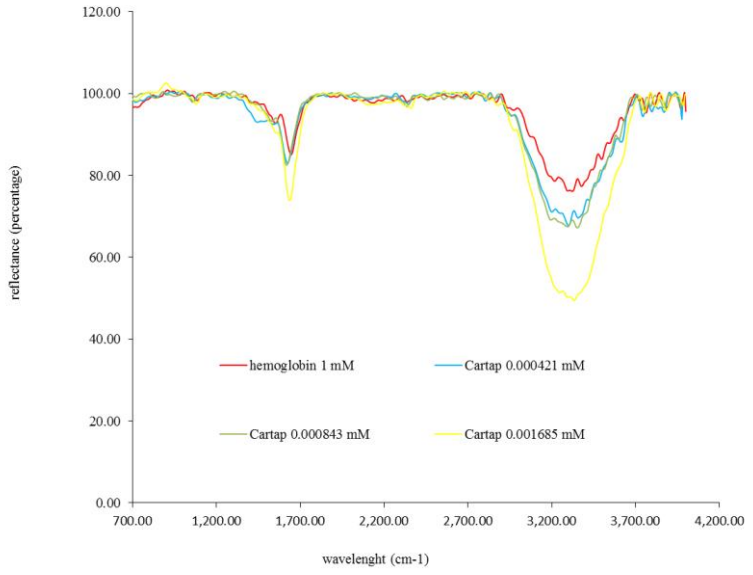
شکل ۱۰: طیف نشر فلوئورسانس هموگلوبین در حضور غلظت‌های مختلف از کارتاپ. طول موج تهییج ۴۶۰ نانومتر.

بررسی یافته‌های حاصل از طیف‌سنجی ATR -FTIR

فرکانس تشعشع الکترومغناطیس در ناحیه مادون قرمز (IR) مطابق با فرکانس ارتعاش طبیعی اتم‌های یک پیوند است و پس از جذب امواج مادون قرمز در یک مولکول، باعث ایجاد یک سری حرکات ارتعاشی در آن می‌شود که اساس و مبنای طیف‌سنجی مادون قرمز را تشکیل می‌دهد. ساده‌ترین نوع حرکات ارتعاشی در یک مولکول، حرکات خمشی و کششی است. ساختمان دوم پروتئین هموگلوبین انسانی و تغییرات حاصل از نظر درصد کنفورماسیون مورد بررسی قرار گرفت. از این رو، ناحیه دو باند طیفی آمید I و II مهم ترین طیف‌های به دست آمده هستند. که به ترتیب باند آمید I (در ناحیه ۱۶۰۰-۱۷۰۰ cm^{-1}) عمدتاً مربوط به ارتعاشات کششی (C=O) و به طور مستقیم وابسته به شکل ساختار اصلی و تشکیل پیوند هیدروژنی می‌باشد و

باند آمید II (در ناحیه ۱۵۸۰-۱۵۱۰ cm^{-1}) ناشی از ارتعاشات خمشی (N-H) و ارتعاشات کششی (C-N) می‌باشد (Hadichegeni *et al*., 2015; Goldberg& Chaffotte., 2005)

شکل(۱۱)، طیف ATR-FTIR هموگلوبین به تنهایی در غیاب سم، کارتاپ هیدروکلراید خالص و ترکیب هموگلوبین و محلول کارتاپ با غلظت‌های مختلف را نشان می‌دهد. در این نمودار در ناحیه‌ی آمید I و II جابجایی مشاهده نشد بنابراین تغییر محسوسی در ساختار دوم هموگلوبین بر اثر برهمکنش با کارتاپ ایجاد نشده است.



شکل ۱۱: طیف ATR به‌دست آمده از هموگلوبین به تنهایی و در حضور سم کارتاپ

نتیجه‌گیری

یکی از عواملی که امروزه در تخریب محیط‌زیست نقش زیاد دارد، استفاده بی‌رویه از کودها و سموم شیمیایی در تولیدات کشاورزی است که نه تنها به محیط‌زیست بلکه بر صنایع مختلف آسیب جدی وارد کرده است و سلامت انسان‌ها و حیات جانوران نیز از آثار سوء آن در امان نیستند. در مورد اثرات سموم و فلزات سنگین و دیگر عوامل مسمومیت‌زا به صورت حاد و به خصوص مزمن (بیشتر در مدل‌های حیوانی) مطالعات فراوانی شده است، لذا همچنان به آزمایشات مختلف برای اندازه‌گیری تغییر پارامترهای خونی ناشی از این سموم، نیاز می‌باشد (Talebi Jahromi.,1385) . در این تحقیق برای بررسی اثرات بیولوژیکی سم کارتاپ در سطح مولکولی با استفاده از روش‌های مختلف طیف‌سنجی اثرات غلظت‌های مختلف این سم روی هموگلوبین (پروتئین مهم خون که نقش مهمی در اکسیژن‌رسانی دارد) مورد بررسی قرار گرفت. کاربارل در برنامه‌های بهداشت عمومی، دامپزشکی و کشاورزی برای مبارزه با آفات گوناگون به طور گسترده به کار رفته است. در مسمومیت با کاربامات‌ها نیز استیل‌کولین در بدن

انباشته می‌شود و عملکرد عصب پاراسمپاتیک، افزایش می‌یابد. کندی‌نبض، اسهال، استفراغ، انقباضات ماهیچه‌ای، افزایش ترشحات بدن و... از عوارض ناشی از مسمویت با کاربامات‌هاست(Risher et al,.1987) . نتایج بررسی‌های همولیزی نشان دهنده‌ی توانایی بالای این سم برای لیز سلول‌های قرمز و در معرض قرارگیری هموگلوبین با سم می‌باشد. طیف فرابنفش مرئی در روش تیتراسیونی و انکوباسیونی نشان دهنده‌ی تغییرات آشکار در جذب هموگلوبین در برهمکنش با کارتاپ هیدروکلراید در نواحی گلوبین و باند سورت می باشد که نشان دهنده‌ی تغییرات ساختاری القا شده توسط سم می باشد. جابجایی ۵ نانومتر طیف جذبی در طول موج ۲۸۰ نانومتر به سمت طول موج های بلندتر در ناحیه‌ی گلوبین(red shift) نشان دهنده‌ی درگیری سطح پروتئین در برهمکنش با سم و همچنین جابجایی طیف جذبی در طول موج ۴۱۵ نانومتر به سمت طول‌موج‌های کوتاه تر در ناحیه‌ی سورت (blue shift) نشانگر نفوذ سم به پاکت هیدروفوب می‌باشد(Hosseinzadeh& Moosavi Movahedi., 2016) . تغییرات جذب باند Q (گونه‌های فعال و غیرفعال هموگلوبین) نیز بیانگر این نکته است که سم کارتاپ علاوه بر اثرات ساختاری، اثرات عملکردی نیز بر روی هموگلوبین دارد. بررسی تغییرات جذب در طول‌موج‌های ۵۴۴ و ۵۷۸ نانومتر نیز نشان دهنده‌ی کاهش فعالیت هموگلوبین بر اثر برهمکنش با سم می باشد. همچنین نتایج حاصل از بررسی گونه‌های هموگلوبین نشان می دهد که اکسی هموگلوبین کاهش و داکسی هموگلوبین و مت‌هموگلوبین افزایش یافته است. حالت فعال هموگلوبین (اکسی) کم شده و وقتی سم اضافه می‌شود، رقابت با جایگاه اکسیژن‌گیری در هموگلوبین اتفاق می‌افتد. از طرفی، نتایج میزان تجمع‌پذیری هموگلوبین در حضور سم کارتاپ هیدروکلراید نشان دهنده‌ی ایجاد تجمعات پروتئینی و القای تغییرات ساختاری و عملکردی بر هموگلوبین می‌باشد. در نتیجه می‌توان گفت که افزایش غلظت سم کارتاپ بر هر دو مورد یعنی اثر همولیزی و تجمع پذیری مثبت می‌باشد و اهمیت این مقاله آشکار کردن مکانیسم اثر برهمکنش این سم با هموگلوبین بوده است. همچنین یافته‌های ما از بررسی فلورسانس و برهمکنش هموگلوبین با کارتاپ در شرایط آزمایشگاهی نشان می‌دهد که تخریب محصولات هِم ابزار مهمی برای تشخیص و شناسایی سطوح تخریب هموگلوبین تحت شرایط خاص مانند در معرض قرار گرفتن با سموم یا استرس اکسیداتیو می‌باشد که خود توضیحی بر مسیرهای واکنشی مسئول تخریب هِم و نیز سنجش حساسی برای هموگلوبین و سلول‌های قرمز تحت شرایط پاتولوژیکی در بدن است(Nagababu & Moses Rifkind., 1998). نتایج بدست آمده از بررسی‌های طیف‌سنجی تبدیل فوریه نشان‌دهنده این است که جابجایی در نواحی آمید I و آمید II مشاهده نشد، لذا ساختار دوم پروتئین بر اثر برهمکنش با سم تغییر محسوسی نکرده است.(Hadichegeni *et al*., 2015) با توجه به اینکه سم کارتاپ هیدروکلراید به دلیل وجود مزارع برنج و زمین‌های کشاورزی در کشور ایران کاربردهای وسیعی دارد برای جلوگیری از اثرات مضر سم، تعیین مکانیسم اثر آن بر پروتئین حائز اهمیت می‌باشد.

سپاسگزاری

در پایان از همکاری سرکار خانم آیدا درودیان برای همکاری در انجام این تحقیق قدردانی می‌شود.

منابع

Abbasi-Tejarag, KH, Divsalar, A, Saboury, A.A, et.al. (2014) In vitro study of oxali-palladium effect on human hemoglobin. Journal of Shahrekord Uuniversity of Medical Sciences. Oct, Nov; 16(4): 110-119.

Aldridge, w.n and Magos, l. (1978) Carbamates, Thiocarbamates, dithiocarbamats. Health Criteria (Exposure/Effect Relationships). Surrey: Medical Research Council Toxicology Unit Carshalton.

Ali, M, Ghiasi, F, Badakhshan, H. (2014) Acute effects of combined herbicides (2,4 dichlorophenoxyacetic acid) and (2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid) on blood factors and ALT and AST liver enzymes in Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Iranian Journal of Health and Environment. 7 (1):95-104.

Ariaeenejad, Sh, Moosavi-Movahedi, A.A and Kavousi, K, (2014) The Species and Heme Pocket Properties of Sturgeon Hemoglobins Upon Interaction with N-dodecyl Trimethylammonium Bromide. Protein & Peptide Letters, 21.

Benesch, R.E., Benesch, R., and Yung, S. (1973). Equations for the spectrophotometric analysis of hemoglobin mixtures. Analytical biochemistry, 55(9), 245-248.

Chen, C-Y.Zhao and B.Wang, Z-W. (2010) Interaction of thiacloprid with bovine hemoglobin using spectroscopic and molecular modeling methods. Spectroscopy 24: 559–566.

Dehghani, R. (1385) Environmental Toxicology. Kashan University of Medical Sciences.

Goldberg, M and Chaffotte, A. (2005) Undistorted structural analysis of soluble proteins by attenuated total reflectance infrared spectroscopy. Protein Science, 14:2781–2792.

Hadichegeni, Sh, Goliaei, B and Hashemi, M. (2015) Investigation of the Human Serum Albumin (HSA) Protein Structure Change Caused by Remained Diazinon Toxin on the Food Materials. Journal of Arak University of Medical Sciences; 18(100): 92-101.

Hosseinzadeh, R and Moosavi Movahedi, A. A. (2016) Human hemoglobin structural and functional alterations and heme degradation upon interaction with benzene: A spectroscopic study. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 157: 41-9.

Inchem, (1978) CARTAP. JMPR. http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v078pr06.htm

Kumar, A. Singh, A and Sibia, R.(2013) a rare case of Cartap poisoning. Journal of Punjab Academy of Forensic Medicine & Toxicology. 13(2): 88-89.

Maghami, p,Valipour, m. et al. (2014) Formation of heme degradadation products during the interaction of human hemoglobin with Methyl Teritiary Butyl Ether (MTBE). Molecular biology research communications. 3(1):53.

Mahdavi asl, R. (1390) Effects of sub-lethal concentrations of endosulfan (organochlorine) and diazinon (organophosphate) pesticides on hematological and serum biochemical parameters in common carp (Cyprinus carpio). Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources Faculty of Animal Science and Fisheries. Master's thesis, 1-20.

Motevalian, S.A.(1380) Pesticides and their use, Iran University of Medical Sciences and Health Services.

Nagababu, E and Moses Rifkind, J. (1998) formation of fluorescent Heme degradation Products during the oxidation of hemoglobin by hydrogen peroxide. Biochemical and biophysical research communications; 247: 592-596.

Perutz, M.F and Lehmann, H. (1968) Molecular pathology of human hemoglobin.Nature; 219(157):902–909.

Raza, A.N.Aslam., M.Noreen, Z et.al. (2013) spectrophotometric determination of cartap hydrochloride in commercial samples of pesticides by iron (III) complexation. International Journal of Current Pharmaceutical Research, 5(3): 54-58.

Riggs, A. (1981) Preparation of blood hemoglobins of vertebrates. Methods Enzymol. 76: 5-29.

Risher, J.F., Mink, F.L and Stara, J.F.(1987)The toxicologic effects of the Carbamate insecticide aldicarb in mammals: a review. Environmental health perspectives; 72: 267–81.

Srivastava, R. and Foundation. Saxena, R. C. (1376) Toxicology insects. Translated by Mohammad Hassan Sraylv. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan.

Talebi Jahromi, Kh. (1385) pesticides Studies, Tehran University Press, second edition, 492.

The Study of structural and aggregation changes of human Hemoglobin in the presence of Cartap

M. Emadi[1], P. Maghami [2*], kh. Khorsandi [3] , R. Hosseinzadeh [4*]

Received:2019.3.16
Accepted:2020.7.26

Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of Cartap hydrochloride on the structure and function of Hemoglobin to determine the molecular mechanism of toxicity of toxin. In this research, the effect of Cartap on the structure and aggregation of human hemoglobin was investigated by UV-visible spectroscopy, thermal spectroscopy, florescent spectroscopy and Attenuated Total Reflection Fourier Transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy in both titration and incubation conditions and with different concentrations of toxic. Based on UV-visible spectroscopy results, revealed that absorption spectra were changed by adding different concentrations of toxin. Analysis of the levels of oxy-deoxy and Met -hemoglobin in presence of various concentration of Cartap showed a decrease in active hemoglobin species. Moreover, the aggregation and hemolysis of red blood cells increased in presence of Cartap. In Florescent spectroscopy minor degradation of Heme happened and second structure of hemoglobin has not been altered in presence of toxin.

Keywords: Heme, Hemolysis, Pesticide, Red cells, Spectrophotometry.

1- MSC of Biophysics, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Assistant Professor of Biophysics, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
*(Corresponding author: maghami@srbiau.ac.ir)
3- Assistant Professor of Biochemistry, Department of Photodynamic, Medical laser research center, YARA institute, ACECR, Tehran,Iran
4- Assistant Professor of Biophysics, Department of Medical laser, Medical laser research center, YARA institute, ACECR, Tehran,Iran
*(Corresponding author: r.hoseinzadeh@ut.ac.ir)