Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2012; 14(59): 10-18

Structural and spectroscopic changes of human hemoglobin during iron-mediated oxidative stress

Ansarihadipour H(Ph.D)[1*], Ziafatikafi H(GP)[2]

1- Department of Biochemistry, Nutrition and Genetics and Molecular and Medical Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
2- Student Reseach committee, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Received: 24 Jan 2011, Accepted: 1 March 2011

Abstract

Background: Biochemical studies have shown that iron produces reactive oxygen species via Haber-Weiss and Fenton reactions. The goal of this study is to examine the role of iron in oxidation of human hemoglobin and its structural changes in erythrocytes.

Materials and Methods: In this experimental study, blood samples from healthy subjects were incubated aerobically with the iron containing metal catalyzed oxidation (MCO) system in the presence of 0.036, 0.7, 0.14, 0.28, 0.57, 1.14, 2.28, 4.55, 9.09, and 18.18 micromole of iron. Structural changes in Hb were followed by spectrophotometric analysis from 300 to 650 nm. In addition, carbonyl assay was performed for estimation of protein oxidation in globin chains.

Results: Based on the results, oxy-Hb decreased up to 68% in iron-treated erythrocytes. Decrease in the absorbance ratio (A577, A542 wavelength) indicated the conversion of oxy-Hb to met-Hb. Also, met-Hb concentration was 4.7 fold of hemichrome. After 24 hours of incubation, oxyHb concentration decreased up to 50% and metHb concentration increased up to 85%. Moreover, increase in iron concentration resulted in significant carbonyl formation in hemoglobin.

Conclusion: These findings indicate that Hb oxidation instead of its oxygenation leads to anemia and hypoxia. The findings of this study may be directly applicable to oxidation states during hemolytic diseases and iron treatment.

Keywords: Erythrocyte, Human hemoglobin, Oxidative stress, Spectroscopic, Absorption

*Corresponding author:
Address: Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
Email: hadyansary@yahoo.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۱۴، شماره۶ (شماره پیاپی ۵۹)، بهمن و اسفند ۱۳۹۰، ۱۸-۱۰

تغییرات ساختاری و طیف جذبی هموگلوبین انسان در طی استرس اکسیداتیو ایجاد شده توسط آهن

هادی انصاری هادی پور[1*]، حسن ضیافتی کافی[2]

۱- استادیار، گروه بیوشیمی، تغذیه و ژنتیک و مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۲- دانشجوی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۱/۴ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: تحقیقات بیوشیمیائی نشان داده است که آهن از طریق فرآیندهای هابر-ویز و فنتون، باعث ایجاد گونه‌های اکسیژن فعال می‌شود. هدف از تحقیق حاضر، بررسی نقش آهن در اکسیداسیون هموگلوبین انسان و تغییرات ساختاری این پروتئین در گلبول‌های قرمز است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه از نوع تجربی است. گلبول‌های قرمز افراد سالم، در شرایط هوازی در محیط کشت حاوی سیستم اکسیداسیون فلزی و در حضور غلظت‌های ۰/۰۳۶، ۰/۷، ۰/۱۴، ۰/۲۸، ۰/۵۷، ۱/۱۴، ۲/۲۷، ۴/۵۵، ۹/۰۹ و ۱۸/۱۸ میکرومولار یون آهن قرار داده شد. برای مطالعه تغییرات ساختاری، طیف جذبی هموگلوبین در محدوده طول موج‌های ۳۰۰ تا ۶۵۰ نانومتر بررسی گردید. هم‌چنین اندازه‌گیری گروه‌های کربنیل به منظور سنجش اکسیداسیون پروتئین در زنجیره‌های گلوبین انجام شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج این تحقیق، غلظت اکسی هموگلوبین به میزان ۶۸ درصد کاهش یافته بود. کاهش در نسبت جذب نوری در طول موج‌های۵۴۲ و ۵۷۷ نشان دهنده تبدیل اکسی هموگلوبین به مت هموگلوبین بود. هم‌چنین، غلظت مت هموگلوبین، ۴/۷ برابر همی کروم بود. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، غلظت اکسی هموگلوبین به میزان ۵۰ درصد تقلیل و میزان مت هموگلوبین به میزان ۸۵ درصد افزایش یافت. افزایش غلظت آهن نیز موجب افزایش معنی‌داری در میزان گروه‌های کربنیل در هموگلوبین گردید.

نتیجه گیری: این نتایج نشان می‌دهد که اکسیداسیون هموگلوبین به جای اکسیژناسیون آن، منجر به کم خونی و هیپوکسی می‌شود. یافته‌های این تحقیق ممکن است در ارزیابی وضعیت اکسیداسیون در مبتلایان به کم خونی و افراد تحت درمان با آهن مفید واقع گردد.

واژگان کلیدی: اریتروسیت، استرس اکسیداتیو، طیف جذبی، هموگلوبین انسان

***نویسنده مسئول:** اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، گروه بیوشیمی، تغذیه و ژنتیک

Email: hadyansary@yahoo.com

مقدمه

متابولیسم هوازی دارای مزایای فراوانی است. اکسیژن برای تنفس سلولی و تولید انرژی ضروری است. هم‌چنین بیوترانسفورماسیون ترکیبات گزنوبیوتیک عمدتا از طریق واکنش‌های اکسیداسیون انجام می‌شود. ولی در طی این فرایندها گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive oxygen Species-ROS) نظیر پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال هیدروکسیل $^{\bullet}$(OH) و آنیون سوپر اکسید $(O_2)^{\bullet-}$ نیز ایجاد می‌شود. چنانچه سیستم‌های دفاع آنتی اکسیدان، کارآیی لازم را نداشته باشند، مقادیر زیادی از گونه‌های اکسیژن فعال در بدن تجمع می‌یابد و استرس اکسیداتیو رخ می‌دهد که منجر به تغییر ساختار بیومولکول‌هایی نظیر چربی‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود. تحقیقات قبلی نشان داده است که تولید رادیکال‌های سوپر اکسید در طی چرخه احیائی منادیون و فیلوکینون موجب پراکسیداسیون لیپیدها در غشای گلبول‌های قرمز، تشکیل گروه‌های کربنیل و لیپید پراکسیداسیون در پلاسما می‌شود(۴-۱). گلبول قرمز مدل مناسبی برای بررسی اثرات رادیکال‌های آزاد اکسیژن است. زیرا این سلول‌ها سرشار از هموگلوبین، اکسیژن و یون آهن هستند. انعطاف‌پذیری و تغییر شکل جایگاه حلقه هم (Heme pocket)، ورود آب و آنیون‌ها را به این جایگاه امکان‌پذیر می‌سازد. واکنش این ترکیبات با حلقه هم، منجر به رهایش یک رادیکال آنیون سوپراکسید و تشکیل متهموگلوبین(met-Hb) می‌شود(۵). متهموگلوبین در حضور یون‌های آهن و از طریق واکنش‌های هابر-ویز و فنتون، قادر به تشکیل رادیکال‌های هیدروکسیل است که در نهایت منجر به استرس اکسیداتیو می‌شود(۶، ۷).

کم خونی فقر آهن یکی از بیماری‌های شایع در ایران است و نمک‌های سولفات، فومارات و گلوکونات آهن برای این مبتلایان و هم‌چنین کودکان، دختران، زنان باردار، افراد مسن، ورزش‌کاران و افراد با رژیم گیاه‌خواری تجویز می‌شود. عوارض جانبی مصرف آهن شامل حالت تهوع، استفراغ، دردهای شکمی و یبوست است. مطالعات قبلی ما نشان داده است که یون‌های آهن در شرایط آزمایشگاهی موجب اکسیداسیون پروتئین‌های سیتواسکلتون در گلبول‌های قرمز می‌شود(۸). با توجه به این که در مولکول هموگلوبین به خوبی می‌توان رابطه بین ساختار و عملکرد را بررسی نمود، در تحقیق حاضر برای مطالعه اثرات اکسیداتیو آهن، این مولکول انتخاب شده است. بدین منظور در شرایط آزمایشگاهی، یون آهن با غلظت‌های ۰/۳۶ تا ۱۸/۱۸ میکرومول به محیط کشت حاوی گلبول‌های قرمز افزوده شد و در فواصل زمانی ۴ تا ۲۴ ساعت، هموگلوبین از گلبول‌های قرمز جدا سازی و تخلیص شد. سپس طیف جذبی فرم‌های مختلف آن با روش اسپکتروفتومتری بررسی گردید. هم‌چنین به منظور بررسی میزان اکسیداسیون در ساختار پروتئینی هموگلوبین، گروه‌های کربنیل در زنجیره‌های گلوبین اندازه‌گیری شد. از این رو این مطالعه با هدف بررسی نقش آهن در اکسیداسیون هموگلوبین انسان در تغییرات ساختاری این پروتئین در گلبول‌های قرمز طراحی شده است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی است. کلیه مواد مورد استفاده در این تحقیق از شرکت مرک آلمان خریداری گردید. برای آنالیز طیفی از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Biochrom WPA Biowave II UV/Visible، ساخت انگلستان) استفاده شد. پس از انتخاب افراد به صورت تصادفی، خون‌گیری از ورید با سرنگ انجام شد. با توجه به این که اثرات اکسیداتیو یون آهن در گلبول‌های قرمز طبیعی مد نظر بود، کلیه نمونه‌ها از افراد سالمی که دارو مصرف نمی‌کنند و دچار بیماری‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو نیستند، تهیه گردید. هم‌چنین کلیه نمونه‌های خون مشکوک به همولیز، از مطالعه خارج شدند. با توجه به این که تحقیق در شرایط آزمایشگاهی در ۱۰ غلظت متفاوت از یون آهن شامل ۰/۰۳۶، ۰/۷، ۰/۱۴، ۰/۲۸، ۰/۵۷، ۱/۱۴، ۲/۲۷، ۴/۵۵، ۹/۰۹ و ۱۸/۱۸ میکرومولار مد نظر بود و در کلیه موارد وجود نمونه‌های شاهد ضروری بود، بنابراین حجم نمونه ۸۰

مورد در نظر گرفته شد که باید به تفکیک، تحت انکوباسیون با آهن و مطالعات بیوشیمیائی قرار می‌گرفتند. جدا سازی گلبول‌های قرمز با استفاده از سانتریفوژ (۵ دقیقه با نیروی g×۱۸۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) و شستشوی گلبول‌های قرمز ۳ بار با بافر فسفات ایزوتونیک (pH=۷/۴) انجام شد. پس از هر بار شستشو، سانتریفوژ انجام و محلول رویی با دقت برداشته شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از گلبول‌های قرمز در شرایط هوازی در محیط کشت حاوی سیستم اکسیداسیون فلزی (Metal Catalyzed Oxidation System-MCO) حاوی غلظت‌های ۰/۰۳۶، ۰/۷، ۰/۱۴، ۰/۲۸، ۰/۵۷، ۱/۱۴، ۲/۲۷، ۴/۵۵، ۹/۰۹ و ۱۸/۱۸ میکرومولار یون آهن قرار داده شد. در نمونه‌های شاهد، یون آهن از محیط کشت حذف شد. در فواصل زمانی ۴ تا ۲۴ ساعت، محیط‌های کشت سانتریفوژ و گلبول‌های قرمز پس از جدا سازی، با بافر فسفات شستشو شد. با استفاده از بافر فسفات هیپوتونیک سرد، گلبول‌های قرمز لیز و سپس در کلیه نمونه‌ها، غلظت هموگلوبین در حد یک گرم در دسی‌لیتر تنظیم شد. برای اندازه‌گیری غلظت هموگلوبین از روش سیان متهموگلوبین استفاده شد(۹). در این روش از سیانید پتاسیم استفاده می‌شود که موجب اکسیداسیون یون فرو به فریک می‌شود. ۷۰۰ میکرولیتر از نمونه‌ها به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد منتقل گردید تا در مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گیرد. برای بررسی رفتار هموگلوبین و تغییر در کنفورماسیون آن، جذب نوری نمونه‌ها در محدوده طول موج‌های ۲۰۰ تا ۶۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. با توجه به این که فرم‌های اکسید شده هموگلوبین در طول موج‌های ۵۶۰، ۵۷۷ و ۶۳۰ نانومتر حداکثر جذب نوری را نشان می‌دهند، از معادلات زیر برای محاسبه غلظت اکسی هموگلوبین، متهموگلوبین و همی کروم استفاده شد:

$$\text{Oxy-Hb}=119A_{577}-39A_{630}-89A_{560}$$
$$\text{Met-Hb}=28A_{577}+307A_{630}-55A_{560}$$
$$\text{Hemichrome}=-133A_{577}-114A_{630}+233A_{560}$$

در این معادلات A_{577} ، A_{630} و A_{560} به ترتیب مبین جذب نوری محلول در طول موج‌های ۵۷۷، ۶۳۰ و ۵۶۰ نانومتر است. هم‌چنین برای مطالعه بر هم کنش حلقه‌های هم با یکدیگر (Hem-hem interaction) و بر هم کنش پروتئین گلوبین با حلقه هم (Globin-hem interaction)، جذب نوری محلول‌ها به ترتیب در طول موج‌های ۴۲۰ و ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای سنجش کربنیل در هموگلوبین از روش پیشنهادی اوانس استفاده شد(۱۰). در این تحقیق از معرف ۲و۴ دی نیتروفنیل هیدرازین (Dinitrophenylhydrazine-DNPH) استفاده شد که پس از واکنش با گروه‌های کربنیل موجب تشکیل ۲و۴ دی نیتروفنیل هیدرازون (2,4-dinitrophenylhydrazone) می‌شود:

$$\text{Protein}-C=O \xrightarrow{H_2N-NH-2,4-DNP} \text{Protein}=N-NH-2,4-DNP+H_2O$$

حداکثر جذب نوری این مشتقات در طول موج ۳۸۰ نانومتر است که با روش اسپکتروفتومتری قابل بررسی می‌باشد. پس از اندازه‌گیری جذب نوری محلول نهایی و شاهد مربوطه (حاوی پروتئین مورد مطالعه در اسید کلریدریک ۲ مولار) طبق روابط زیر غلظت گروه‌های کربنیل بر حسب نانومول در هر میلی‌گرم از پروتئین نمونه به دست می‌آید:

$$C=\frac{\text{Abs}(355-390\,\text{nm})}{2.2\times10^4/10^6}$$

$$\text{Carbonyl concentration in nmol/ml} = \Delta A(355-390\,\text{nm})\times 45.45$$

$$\Delta A(355-390)=A(355-390)\,of\ DNPH\ solution-A(355-390\,nm)\,of\ HCl\ solution$$

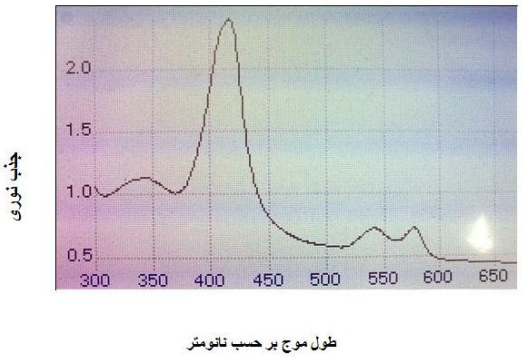
Carbonyl concentration (nmol)= nmol of carbonyl per mg of protein

جهت تجزیه و تحلیل آماری از شاخص‌های میانگین و انحراف معیار و آزمون‌های تی مستقل و آنالیز

کد ۵-۶۶-۸۸ اجرا و در تمام مراحل تحقیق اصول بیانیه هلسینکی مورد توجه قرار گرفت.

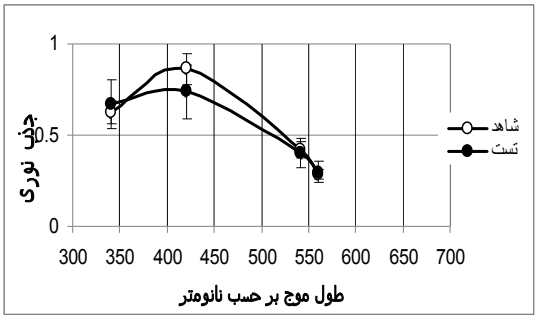
یافته ها

شکل۱، طیف جذبی مولکول هموگلوبین طبیعی را در محدوده طول موج‌های ۳۰۰ تا ۶۵۰ نانومتر نشان می‌دهد. این نمودار در طول موج ۳۴۰ نانومتر، برهم کنش پروتئین گلوبین و حلقه هم و در طول موج ۴۲۰ نانومتر، برهم کنش حلقه‌های هم را به صورت باند سورت (Soret band) نشان می‌دهد(شکل ۱). هم‌چنین جذب نوری در ۵۶۰ نانومتر مربوط به همی کروم و در ۵۴۲ و ۵۷۷ نانومتر مربوط به تشکیل اکسی هموگلوبین است.



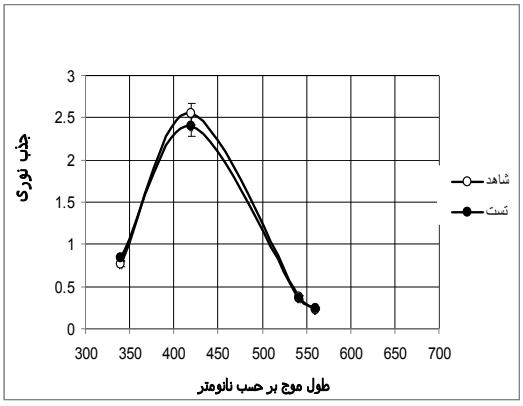
شکل۱. طیف جذبی مولکول هموگلوبین طبیعی در محدوده طول موج ۳۰۰ تا ۶۵۰ نانومتر. غلظت هموگلوبین با بافر فسفات در حد یک گرم در دسی لیتر تنظیم شده است.

شکل۲، جذب نوری مولکول‌های هموگلوبین را در گلبول‌های قرمز شاهد و تست، در محدوده طول موج ۳۴۰ تا ۵۶۰ نانومتر نشان می‌دهد. در باند سورت، کاهش قابل ملاحظه جذب نوری ($p<0/05$) در نمونه‌های تست (۰/۰۹۶±۰/۷۴) نسبت به شاهد (۰/۱۱±۰/۸۶۴)، نشان می‌دهد که در حضور یون‌های آهن، بر هم کنش حلقه‌های هم تضعیف شده است(شکل ۲).



شکل۲ . طیف جذبی مولکولهای هموگلوبین در محدوده طول موج ۳۴۰ تا ۵۶۰ نانومتر. انکوباسیون گلبول‌های قرمز در نمونه‌های شاهد و تحت استرس اکسیداتیو با یون آهن به مدت ۴ ساعت در شرایط آزمایشگاهی انجام شده است.

در شکل۳ تغییرات مشابهی پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون گلبول‌های قرمز در محیط کشت حاوی آهن با غلظت‌های ۰/۰۳۶ تا ۱۸/۰۱۸ میکرومول مشاهده می‌شود(شکل ۳).



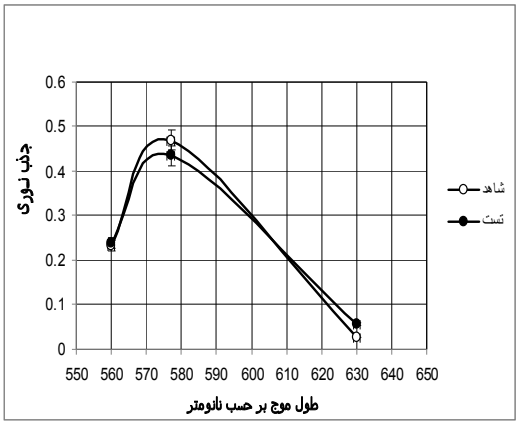
شکل۳ . طیف جذبی مولکول های هموگلوبین در محدوده طول موج ۳۴۰ تا ۵۶۰ نانومتر.
در نمونه‌های شاهد و تحت استرس اکسیداتیو با یون آهن، انکوباسیون گلبول‌های قرمز در محیط کشت به مدت ۲۴ ساعت انجام شده است. بدلیل بالا بودن جذب نوری محلول ها در طول موج ۴۱۷ نانومتر، کلیه محلول ها به میزان ۵ بار با بافر فسفات رقیق شده و سپس نتایج نهایی در ۵ ضرب شده است.

شکل۴، طیف جذبی هموگلوبین در گلبول‌های قرمز شاهد و تست را در محدوده طول موج ۵۶۰ تا ۶۳۰ نانومتر نشان می‌دهد. جذب نوری هموگلوبین در طول موج ۶۳۰ نانومتر، در نمونه‌های تست ۰/۰۱۶±۰/۱۲ است که در مقایسه با گروه شاهد(۰/۰۰۶±۰/۱۱)، نشان‌دهنده افزایش

معنی‌داری($p<۰/۰۵$) در غلظت متهموگلوبین است(شکل ۴).

شکل۴ . طیف جذبی مولکول های هموگلوبین در محدوده طول موج ۵۶۰ تا ۶۳۰ نانومتر

همان طوری که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون گلبول‌های قرمز در محیط کشت حاوی آهن، افزایش مشابهی در غلظت متهموگلوبین در گلبول‌های قرمز ایجاد می‌گردد(شکل ۵).



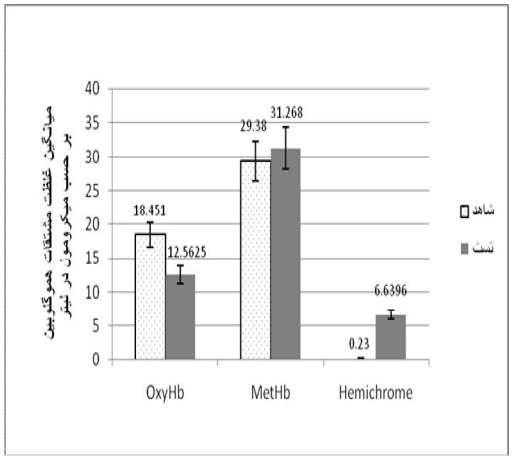
شکل۵ . طیف جذبی مولکول های هموگلوبین در محدوده طول موج ۵۶۰ تا ۶۳۰ نانومتر

جدول۱، میانگین و انحراف معیار برای مقادیر جذب نوری هموگلوبین را در طول موج‌های مختلف نشان می‌دهد. کاهش قابل ملاحظه($p<۰/۰۵$) در جذب نوری هموگلوبین در طول موج‌های ۵۴۲ و ۵۷۷ نانومتر، نشان می‌دهد که در حضور آهن غلظت اکسی هموگلوبین در گلبول‌های قرمز کاهش معنی‌داری دارد. هم‌چنین کاهش نسبت جذب نوری در طول موج‌های ۵۷۷ و ۵۴۲ نانومتر (A_{577}/A_{542})، مبین تبدیل اکسی هموگلوبین به متهموگلوبین است. در گلبول‌های قرمز شاهد، این نسبت معادل ۰/۹۷±۰/۲۱ بود که پس از ۴ ساعت انکوباسیون با آهن به ۰/۹۳±۰/۲۲ رسید که کاهش معنی‌داری است($p<۰/۰۵$)(جدول۱).

جدول ۱. میانگین و انحراف معیار برای مقادیر جذب نوری هموگلوبین در طول موجهای مختلف

طول موج بر حسب نانومتر	گروه شاهد	گروه تست
۳۴۰	۰/۶۲۸±۰/۰۴	۰/۶۷±۰/۱۳
۴۲۰ (Soret band)	۰/۸۶۴±۰/۱۱	۰/۷۴±۰/۰۹۶
۵۴۲	۰/۴۱۹±۰/۰۱	۰/۳۹۸±۰/۰۵۲
۵۶۰	۰/۲۸۶±۰/۰۲۱	۰/۲۹۹±۰/۰۲۳
۵۷۷	۰/۴۱±۰/۰۰۵	۰/۳۷±۰/۰۴
۶۳۰	۰/۱۱±۰/۰۰۶	۰/۱۲±۰/۰۱۶
A_{577}/A_{542}	۰/۹۷±۰/۲۱	۰/۹۳±۰/۲۲

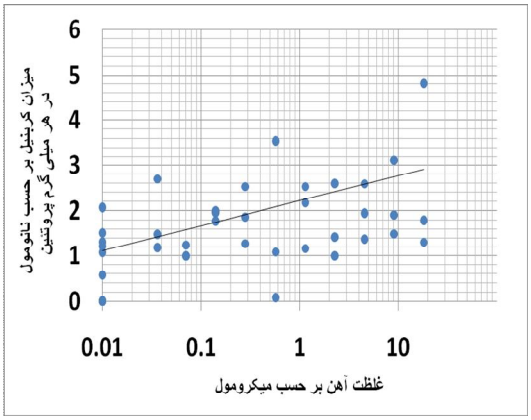
شکل۶، مقادیر میانگین و انحراف معیار را برای غلظت مشتقات هموگلوبین در نمونه‌های شاهد و تحت استرس اکسیداتیو نشان می‌دهد. در حضور آهن، میزان اکسی هموگلوبین کاهش و غلظت همی کروم افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد($p<۰/۰۵$)(شکل ۶).



شکل۶ . میانگین و انحراف معیار برای غلظت مشتقات هموگلوبین

شکل۷، میزان گروه‌های کرینیل را در ساختار پروتئین گلوبین نشان می‌دهد. همگام با افزایش غلظت یون آهن در محیط کشت از ۰/۰۳۶ به ۱۸/۱۸ میکرومول، غلظت گروه‌های کربنیل از ۱/۱±۰/۵ نانومول در هر

میلی‌گرم پروتئین به ۲/۹±۲ نانو مول در هر میلی‌گرم پروتئین رسیده است که از نظر آماری افزایش معنی‌داری است($p<۰/۰۵$)(شکل ۷).



شکل۷ . میزان گروه‌های کربنیل در هموگلوبین نمونه‌های شاهد و تحت استرس اکسیداتیو

بحث

با توجه به معیارهای سازمان بهداشت جهانی و طبق برآوردهای انجام شده، در حدود ۱۴۹ میلیون نفر در منطقه مدیترانه شرقی مبتلا به کمبود آهن هستند(۱۱). کم خونی فقر آهن از بیماری‌های شایع در ایران است. روش مرسوم برای درمان این بیماری، تزریق یا مصرف خوراکی نمک‌های آهن است. در حالی که آهن از طریق فرآیندهای هابر–ویز و فنتون، قادر به تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن است که باعث اکسیداسیون بیومولکول‌ها و آسیب اکسیداتیو به بافت‌های بدن می‌شود. مطالعات استفانسون و همکاران نشان داده است که تزریق داخل وریدی فرم‌های داروئی آهن، موجب افزایش پارامترهای استرس اکسیداتیو در پلاسمای خون می‌شود(۱۲). بر اساس تحقیقات سوارنالاتا و همکاران، فرم‌های تزریقی آهن موجب افزایش قابل توجه مالونیل دی آلدئید در خون بیماران همودیالیزی می‌گردد(۱۳). این ترکیب محصول اکسیداسیون چربی‌های پلاسما است و در شرایط استرس اکسیداتیو در خون ظاهر می‌شود. هم‌چنین تحقیقات ایشان نشان داده است که مصرف ان استیل سیستئین در این بیماران باعث کاهش اثرات اکسیدکنندگی آهن می‌شود. طبق نتایج مطالعات برسجن و همکاران، فریتین موجب صدمه به DNA و آپوپتوز در هپاتوسیت‌ها می‌شود و افزودن ترولوکس به محیط کشت موجب جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از اثرات اکسیداتیو آهن می‌گردد(۴). استرس اکسیداتیو در گلبول‌های قرمز منجر به تغییر کنفورماسیون در هموگلوبین و کاهش میل ترکیبی آن با اکسیژن می‌شود. هم‌چنین پس از مصرف آهن، دناتوراسیون زنجیره‌های بتاگلوبین و افزایش غلظت آهن در سیتوزول سلول و کاهش میزان هموگلوبین طبیعی گزارش شده است(۱۴). اکسیداسیون هموگلوبین باعث تشکیل متهموگلوبین می‌شود و اگر ساختار گلوبین ناپایدار گردد، متهموگلوبین به همی کروم تبدیل می‌شود که در تشکیل اجسام هینز (Heinz bodies) نقش دارد. کاهش غلظت اکسی هموگلوبین همراه با افزایش متهموگلوبین، منجر به اختلال در انتقال اکسیژن و کاهش میل ترکیبی هموگلوبین با اکسیژن می‌گردد(۱۵). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داده است که یون آهن باعث تغییرات ساختاری در هموگلوبین انسان می‌شود. بر اساس مطالعات اسپکتروفتومتریک، یون آهن موجب تبدیل هموگلوبین به متهموگلوبین و همی کروم می‌شود، به طوری که افزایش غلظت همی کروم ارتباط معنی‌داری با افزایش غلظت آهن دارد(شکل ۶). در این تحقیق از روش‌های آنالیز طیفی و سنجش گروه‌های کربنیل برای بررسی تغییرات ساختاری در هموگلوبین استفاده شد. بدین منظور جذب نوری مولکول‌های هموگلوبین در محدوده طول موج‌های ۳۰۰ تا ۶۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. پس از انکوباسیون گلبول‌های قرمز در محیط کشت حاوی آهن، مشخص شد که کاهش جذب نوری در باند سورت و کاهش نسبت A_{577}/A_{542} به طور معنی‌داری متناسب با افزایش جذب نوری در ۶۳۰ نانومتر است. این تغییرات مبین تبدیل اکسی هموگلوبین به متهموگلوبین می‌باشد. البته میزان تشکیل متهموگلوبین وابسته و متناسب با برهم کنش حلقه‌های هم است که در طول موج ۵۷۷ نانومتر مشاهده می‌شود. هم‌چنین آسیب وارد شده توسط رادیکال‌های اکسیژن و پراکسید هیدروژن به ساختار پروتئینی گلوبین در

هموگلوبین، در ارتباط با شکستن حلقه پورفیرین و کاهش هم است(۱۶). میزان جذب نوری در ۳۴۰ نانومتر نیز مربوط به اتصال غیرکووالان بین هیستیدین گلوبین و آهن هم است. هم‌چنین سنجش گروه‌های کربنیل نشان داد که با افزایش غلظت یون آهن، میزان اکسیداسیون هموگلوبین تسریع می‌گردد که در نهایت می‌تواند باعث تغییرات ساختاری در هموگلوبین و کاهش میل ترکیبی آن با اکسیژن شود. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که طیف جذبی هموگلوبین، یک معیار دقیق و حساس برای بررسی تغییرات ساختاری در این پروتئین است. هم‌چنین در این تحقیق رابطه مستقیمی بین غلظت یون آهن و میزان گروه‌های کربنیل در هموگلوبین مشاهده شد.

نتیجه گیری

وجود دوزهای بالای آهن در پلاسما، زمینه تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن را فراهم می‌کند. در این شرایط هموگلوبین موجود در گلبول‌های قرمز به جای اکسیژناسیون، متحمل اتواکسیداسیون می‌شود. ادامه این فرآیند موجب تشکیل متهموگلوبین و همی کروم و در نتیجه کاهش ظرفیت انتقال اکسیژن و هیپوکسی می‌شود. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که آنالیز طیفی و سنجش کربنیل در گلبول‌های قرمز، روش دقیق و مناسبی برای پی‌گیری وضعیت متابولیک در مبتلایان به کم خونی و افراد تحت درمان با آهن است. با توجه به این که طیف جذبی هموگلوبین و میزان گروه‌های کربنیل به عنوان شاخص‌های معتبری برای بررسی اکسیداسیون پروتئین‌ها مورد تأیید اکثر محققین است و تجهیزات مورد استفاده در این گونه تحقیقات، در اکثر آزمایشگاه‌های تشخیصی وجود دارد، پیشنهاد می‌شود که مطالعات بیشتری در این زمینه انجام شود و ارزش بالینی این تکنیک‌ها در تشخیص بیماری‌ها، مسمومیت با فلزات، استرس اکسیداتیو و کم‌خونی مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت معاونت پژوهشی و کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، در گروه بیوشیمی، تغذیه و ژنتیک و مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی انجام شده است. بدینوسیله از مساعدت مسئولین محترم در اجرای این طرح تحقیقاتی، قدردانی می‌شود.

منابع

1. Ansari Hadipour H, Allameh A, Kazemnejad A. Relationship between antioxidant power of plasma with lipid peroxide formation in plasma and liver damages caused by overdose of vitamin k1 in adult and weanling rats. Acta Medica Iranica. 2003;41(4):207-13.
2. Ansarihadipour H, Allameh A. Comparative effects of vitamin K1 on the total antioxidant capacity in adult and weanling rats using 'ferric reducing ability of plasma' (FRAP assay). EUROTOX 2001; 13-16 September; Istanbul, Turkey2001.
3. Ansarihadipour H, Allameh A. Relationship between lipid peroxide formation and antioxidant capacity in erythrocytes taken from adult and suckling rats treated with phylloquinone. 15th IFCC-FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine; June 1-5; Barcelona,Spain2003.
4. Bresgen N, Jaksch H, Lacher H, Ohlenschläger I, Uchida K, Eckl PM. Iron-mediated oxidative stress plays an essential role in ferritin-induced cell death. Free Radic Biol Med. 2010;48(10):1347-57.
5. Signorini C, Ferrali M, Ciccoli L, Sugherini L, Magnani A, Comporti M. Iron release, membrane protein oxidation and erythrocyte ageing. FEBS Lett. 1995;362(2):165-70.
6. McCord JM. Iron, free radicals, and oxidative injury. Semin Hematol. 1998;35(1):5-12.
7. Saltman P. Oxidative stress: a radical view. Semin Hematol. 1989;26(4):249-56.
8. Ansarihadipour H. Metal-catalyzed oxidation of human erythrocyte membrane in vitro. 31st FEBS Congress; 24-29 June; Istanbul, Turkey2006.

9. Drabkin DL. The standardization of hemoglobin measurement. Am J Med Sci. 1949;217(6):710.
10. Evans P, Lyras L, Halliwell B. Measurement of protein carbonyls in human brain tissue. Methods Enzymol. 1999;300:145-56.
11. Wu AC, Lesperance L, Bernstein H. Screening for iron deficiency. Pediatr Rev. 2002;23(5):171-8.
12. Stefánsson BV, Haraldsson B, Nilsson U. Acute Oxidative Stress following Intravenous Iron Injection in Patients on Chronic Hemodialysis: A Comparison of Iron-Sucrose and Iron-Dextran. Nephron Clinical Practice. 2010;118(3):c250-c7.
13. Swarnalatha G, Ram R, Neela P, Naidu MU, Dakshina Murty KV. Oxidative stress in hemodialysis patients receiving intravenous iron therapy and the role of N-acetylcysteine in preventing oxidative stress. Saudi J Kidney Dis Transpl. 2010;21(5):852-8.
14. Vives Corrons JL, Miguel-García A, Pujades MA, Miguel-Sosa A, Cambiazzo S, Linares M, et al. Increased susceptibility of microcytic red blood cells to in vitro oxidative stress. Eur J Haematol. 1995;55(5):327-31.
15. Kuypers FA, Schott MA, Scott MD. Phospholipid composition and organization in model beta-thalassemic erythrocytes. Am J Hematol. 1996;51(1):45-54.
16. Stepuro II, Chaikovskaya NA, Vodoevich VP, Vinogradov VV. Reduction of methemoglobin and ferricytochrome c by glycosylated amino acids and albumin. Biochemistry (Mosc). 1997;62(9):967-72.