Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol. 23, No. 1, Spring 2023, Pages 82-90

Hemoglobin Removal by Zinc Sulfate to Assay Level and Activity of Red Blood Cell Caspase 3 Using ELISA and Colorimetric Methods

Karimzadeh Shushbolagh N, Mansour Kiaie S, Hamidi Nokhostin K*

Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
**** Corresponding author.*** Tel: +984531505189, Fax: +984531514702, E-mail: K_hamidi@uma.ac.ir

Received: Apr 19, 2023 Accepted: Jun 9, 2023

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

[DOR: 20.1001.1.22287280.1402.23.1.7.9]

[DOI: 10.61186/jarums.23.1.82]

ABSTRACT

Background & objectives: Zinc sulfate binds to the R group of some amino acids, such as histidine and cysteine, resulting in protein precipitation. In an ELISA and colorimetric experiments, we determined the optimal concentration of zinc sulfate to precipitate hemoglobin, which in turn affects the level and activity of Caspase 3 in red blood cells.

Methods: Osmotic stress was induced on red blood cells under hypertonic and hypotonic conditions. An isotonic condition was used as a control without osmotic stress. The cells were incubated at 37^{o}C for 15 min and 24 hrs. Different concentrations of zinc sulfate were set up experimentally, stepwise after the lysis of RBC samples with ultrasound waves and removal of cell membranes by centrifugation. Zinc sulfate was allowed to bind to hemoglobin at different time intervals at room temperature. Afterward, hemoglobin was precipitated at various time intervals through centrifugation. The supernatants were then measured by ELISA and colorimetric methods for Caspase 3 level and activity.

Results: The optimal conditions were found to be 6 mM zinc sulfate, 10 min incubation at room temperature to bind zinc sulfate to hemoglobin, and 30 min centrifugation at 3000 rpm to precipitate hemoglobin.

Conclusion: This study showed that zinc sulfate with a concentration of 6 mM precipitates and removes hemoglobin without affecting the level or activity of Caspase 3.

Keywords: Zinc Sulfate; Hemoglobin; Caspase 3

استفاده از سولفات روی به منظور حذف هموگلوبین در اندازه‌گیری میزان و فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ گلبول‌های قرمز به روش‌های الایزا و کالریمتری

*نسیم کریم زاده شوشبلاغ، سپیده منصور کیائی، کمال الدین حمیدی نخستین**

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۵۳۱۵۰۵۱۸۹ فاکس: ۰۴۵۳۱۵۱۴۷۰۲ پست الکترونیک: K_hamidi@uma.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: سولفات روی بدلیل ایجاد پیوند کوئوردینانس با گروه‌های Rبرخی اسیدهای آمینه مانند هیستیدین و سیستئین موجب رسوب پروتئین‌ها می‌گردد. هدف از این مطالعه یافتن غلظت مناسب از سولفات روی برای رسوب هموگلوبین هست که دراندازه‌گیری میزان و فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ داخل گلبول‌های قرمز با روش‌های به ترتیب الایزا و کالریمتری ایجاد تداخل می‌نماید.

روش کار: در این مطالعه، تنش‌های اسمزی هیپرتونیک و هیپوتونیک بر روی گلبول‌های قرمز اعمال گردید. علاوه بر این، محیط غیر تنشی ایزوتونیک به عنوان کنترل بکار گرفته شد. سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در بازه‌های زمانی ۱۵ دقیقه و ۲٤ ساعت قرار داده شدند. بعد از لیز این سلول‌ها بوسیله دستگاه اولترا سونیک هوموژنایزور و متعاقب آن حذف غشاهای گلبول‌های قرمز با کمک سانتریفوژ شرایط مطلوب هم از نظر غلظت سولفات روی و نیز مدت زمان دادن فرصت برای اتصال سولفات روی به هموگلوبین و مدت زمان مناسب برای سانتریفوژ بصورت تجربی و پلکانی انجام گردید و بعد از هموگلوبین‌زدایی میزان و فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ در نمونه‌ها اندازه‌گیری گردید.

یافته‌ها: غلظت مناسب سولفات روی ۶ میلی‌مول، مدت زمان مطلوب اتصال سولفات روی به هموگلوبین ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه و نیز مدت زمان سانتریفوژ ۳۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه بدست آمد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که سولفات روی با غلظت ۶ میلی مول قادر هست که بدون تاثیر بر روی میزان و فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ موجب رسوب و حذف هموگلوبین شود.

واژه های کلیدی: سولفات روی، هموگلوبین، کاسپاز ۳

دریافت: ۱٤۰۲/۱/۳۰ **پذیرش:** ۱٤۰۲/۳/۱۹

مقدمه

سولفات روی ($ZnSO_4,\ 7H_2O$) به عنوان ماده‌ای جهت تهیه پلاسمای عاری از پروتئین جهت انجام آزمایش گزیلوز در کتاب‌های بیوشیمی تا چند دهه قبل کاربرد داشت [۱]. روی (Zinc) موجود در این ترکیب قادر است به پروتئین متصل شده و عمدتا کمپلکس‌های کوئوردینانس با گروه ایمیدازول اسیدآمینه هیستیدین و گروه تیول سیستئین برقرار کند [۲]. از این رو موجب رسوب پروتئین‌ها و تهیه مایع رویی عاری از پروتئین می‌شود.

در مورد تحقیقاتی که بر روی آنزیم‌ها، بیومولکول‌های موجود در درون گلبول قرمز انجام

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]
[DOR: 20.1001.1.22287280.1402.23.1.7.9]
[DOI: 10.61186/jarums.23.1.82]

می‌گردد نظیر آنزیم‌های MAPK[1]، کاسپاز، سوپر اکسید دیسموتاز و ترانس کتولاز یا سنجش برخی بیومولکول‌ها مانند گلوتاتیون، TOS[2]، TAC[3] و حتی داروهایی مانند تاکرولیموس نیاز به لیز گلبول‌های قرمز و آزاد شدن محتوای آن جهت سنجش مواد مذکور است که در مورد سنجش برخی از مواد مذکور، هموگلوبین آزاد شده موجب تداخل می‌گردد.

با توجه به اینکه ۳۳ درصد از حجم گلبول قرمز را هموگلوبین اشغال می‌کند و در هر گلبول قرمز حدود ۳۰۰ میلیون مولکول هموگلوبین وجود دارد [۳] از این رو مایع حاصل از لیز گلبول‌های قرمز یعنی همولیزیت[4] علاوه بر آنالیت‌های مذکور دارای مقدار متنابهی از هموگلوبین است که این مولکول بنابر چند دلیل زیر در سنجش برخی از مواد مذکور تداخل ایجاد می‌کند.

۱- بدلیل ایجاد رنگ اضافی هموگلوبین در روش‌های رنگ سنجی یا کالریمتری در برخی طول موج‌ها، جذب نوری اضافی در اندازه‌گیری غلظت بیومولکول-ها و فعالیت آنزیم‌ها خطا تولید می‌کند.

۲- در روش‌های ایمونواسی با تولید ممانعت فضایی در اتصال آنتی‌ژن و آنتی‌بادی ایجاد اختلال نموده و موجب خاموشی یا Quenching می‌گردد.

۳- فعالیت پراکسیداز این ماده با عملکرد آنزیم لیپو اکسیناز بافتی تداخل حاصل می‌کند[٤].

٤- علاوه بر این در زمانی که هدف سنجش موادی مانند پتاسیم، منیزیم و یا آنزیم‌هایی مانند LDH[5] و AST[6] و ALT[7] در سرم باشد، وارد شدن هموگلوبین به داخل سرم به دلیل همولیز گلبول‌های قرمز و بالتبع اضافه شدن مواد مذکور به درون سرم موجب ایجاد خطا و گزارش بیشتر از مقدار واقعی آنها خواهد گردید.

در تحقیق حاضر، بعد از قرارگیری گلبول‌های قرمز در محیط‌های با اسمولالیته مختلف به مدت ۱۵ دقیقه و ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، بدلیل خارج‌نمودن آنزیم کاسپاز ۳ از درون گلبول‌های قرمز با روش اولترا سونیک هوموژنایزور و تهیه همولیزیت، مایعی حاصل گردید که علاوه بر حضور آنزیم کاسپاز ۳ محتوی مقدار متنابهی مولکول هموگلوبین بود که بنابر دلایلی که در بالا اشاره گردید هم در روش اندازه‌گیری میزان کاسپاز ۳ با روش ایمونواسی الایزا با واحد ng/ml و هم سنجش فعالیت این آنزیم با روش کالریمتری با واحد nmol/min/l به ترتیب در طول موج‌های ٤۵۰ و ٤۰۵ نانومتر ایجاد تداخل می‌نمود.

از این رو برای رفع این چالش تحقیقاتی به صورت ابتکاری و تجربی از سولفات روی استفاده گردید و غلظت مطلوبی از آن بدست آورده شد که بتواند با هموگلوبین‌زدایی از محیط واکنش بر روی میزان و فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ هم تاثیر نگذارد.

روش کار

در این طرح تحقیقاتی با کد اخلاقی IR.UMA.REC.1401.86، تنش‌های اسمزی هیپرتونیک و هیپوتونیک و محیط غیر تنشی ایزوتونیک بعنوان کنترل به کمک غلظت‌های مختلف کلرور سدیم در بازه‌های زمانی ۱۵ دقیقه و ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بر روی گلبول‌های قرمز اعمال گردید. با استفاده از دستگاه اولتراسونیک هوموژنایزور Dr.Hielscher بر روی یخ، نمونه‌ها لیز گردیده و از آن‌ها همولیزیت تهیه گردید.

به دلیل رنگ قرمز گلبول‌های لیز شده در نمونه‌ها امکان خوانش جذب نوری توسط دستگاه میکرو پلیت ریدر BioTek وجود نداشت. به همین دلیل برای رسوب دادن هموگلوبین در نمونه‌های همولیزیت،

[1] Mitogen Activated Protein Kinase
[2] Total Oxidant Status
[3] Total Antioxidant Capacity
[4] Hemolysate
[5] Lactate Dehydrogenase
[6] Aspartate Transaminase
[7] Alanine Transaminase

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]
[DOR: 20.1001.1.22287280.1402.23.1.7.9]
[DOI: 10.61186/jarums.23.1.82]

ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه همولیزیت را در سانتریفوژ ۲۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده تا غشاءها (استروماها) گلبو ل‌های قرمز کاملا ته نشین شوند و مایع رویی شفاف گردد.

در ابتدا یک میلی‌لیتر از نمونه همولیزیت سانتریفوژ شده با ۵۰۰ میکرولیتر از محلول سولفات روی ۰/۵میلی‌مول مخلوط شده و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه و با دور۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. به دلیل هموگلوبین‌زدایی ناقص نمونه شفاف رویی کاملاً جدا نگردید، از این رو با افزایش غلظت سولفات روی از ۰/۵میلی‌مول به بالا و با افزودن مدت زمان اتصال سولفات روی به هموگلوبین از ۵ دقیقه به بالا و افزایش مدت زمان سانتریفوژ از دقیقه ۱۰ به بالا به صورت پلکانی و طی آزمایش‌های متعدد به شرایط مطلوب هم از نظر غلظت سولفات روی و نیز مدت زمان فرصت برای اتصال سولفات روی به هموگلوبین و مدت زمان مناسب برای سانتریفوژ دسترسی پیدا نمودیم.

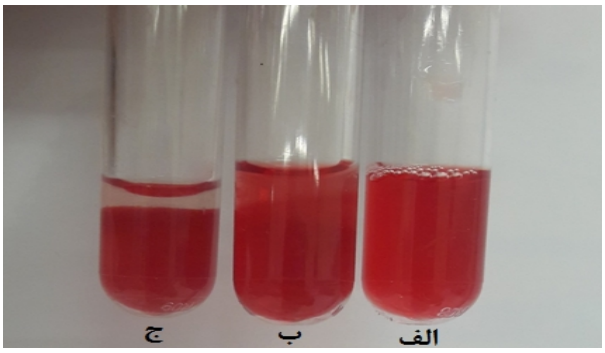
شرایط مساعد بدست آمده شامل غلظت ۶ میلی‌مول سولفات روی و مدت زمان ۱۰ دقیقه دمای آزمایشگاه برای اتصال سولفات روی به هموگلوبین و مدت زمان ۳۰ دقیقه سانتریفوژ در ۳۰۰۰ دور در دقیقه بود. سپس مایع رویی نمونه‌های هموگلوبین جدا شده و برای انجام آزمایش‌های ذیل استفاده گردید.

۱- اندازه‌گیری میزان کاسپاز ۳ به روش ایمونواسی و با تکنیک الایزا با استفاده از کیت شرکت Bioassay Technology Laboratory مطابق روش انجام کیت و استفاده از چاهک‌های پوشیده با آنتی‌بادی مونوکلونال کاسپاز ۳ و خوانش نتیجه در طول موج ۴۵۰ نانومتر به کمک دستگاه میکرو پلیت ریدر [۵].

۲- سنجش فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ به روش کالریمتری با استفاده از کیت ساخت شرکت Kiazyst در این کیت آنزیم موجود در نمونه در معرض سوبسترای کالریمتریک قرار گرفته و سپس این آنزیم سوبسترای متصل به کروموژن را شکسته و تولید رنگ زرد می‌کند که در طول موج ۴۰۵ نانومتر جذب نوری دارد[۶].نرم افزار SPSS و تست آنالیز واریانس دو طرفه جهت تحلیل داده‌ها بکار گرفته شد.

یافته‌ها

شکل ۱ نتایج تاثیر سولفات روی ۶ میلی‌مول بر روی رسوب هموگلوبین به ترتیب قبل از اضافه شدن به همولیزیت سانتریفوژ شده، ۱۰ دقیقه و ۳۰ دقیقه بعد را نشان می‌دهد. همان‌گونه که در تصویر مشاهده می‌شود بعد از ۱۰ دقیقه سانتریفوژ هموگلوبین‌زدایی از همولیزیت به صورت ناقص و نسبی ولی بعد از ۳۰ دقیقه سانتریفوژ بطور کامل انجام می‌گردد.



شکل ۱. تصویر رسوب هموگلوبین. الف) همولیزیت سانتریفوژشده. ب) همولیزیت به همراه رسوب‌دهنده سولفات روی ۶ میلی مول بعد از ۱۰ دقیقه سانتریفوژ. ج) همولیزیت به همراه سولفات ۶ میلی مول بعد از ۳۰ دقیقه سانتریفوژ

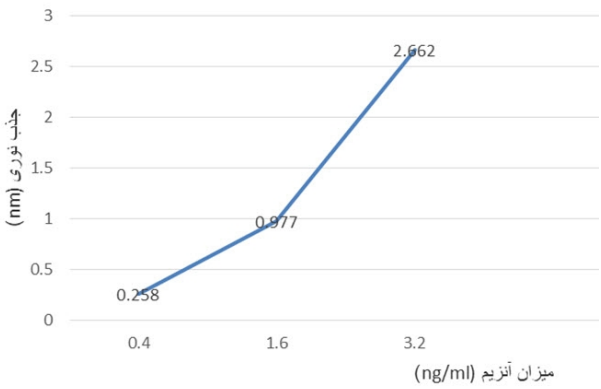
[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]
[DOR: 20.1001.1.22287280.1402.23.1.7.9]
[DOI: 10.61186/jarums.23.1.82]

نتایج انجام آزمایش میـزان کاسـپاز ۳ در گلبـول‌هـای قرمز تحت تنش اسمزی و محیط کنترل غیر تنشی بـه روش الایزا با خوانش در ٤٥٠ نانومتر توسـط دسـتگاه میکروپلیت ریدر و میـزان آنـزیم کاسـپاز ۳ محاسـبه شده از روی منحنی استاندارد در جـدول ۱ و شـکل ۲ ارائه می‌گردد.

جدول ۱. جدول مربوط به جذب‌های نوری استانداردها و نمونه‌ها و میزان آنزیم کاسپاز ۳ محاسبه شده در آن‌ها از روی منحنی استاندارد

ردیف	نمونه ها	جذب نوری			میانگین میزان کاسپاز۳ (ng/ml)
		تکرار ۱	تکرار ۲	تکرار ۳	
۱	استاندارد B	۰/۲۶۸	۰/۲٤۷	۰/۲۵۹	۰/٤
۲	استاندارد C	۰/۹۸۸	۰/۹۶۵	۰/۹۷۷	۱/۶
۳	استاندارد D	۲/۷۸	۲/۵۶	۲/۶۵	۳/۲
٤	مایع رویی حاصل از افزودن $ZnSO_4$ به همولیزیـت ایزوتونیـک بعـد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در°۳۷	۱/۱۰۳	۱/۰۹۰	۱/۰۸۱	۱/۶۸
۵	مایع رویی حاصل از اقزودن $ZnSO_4$ به همولیزیـت ایزوتونیـک بعـد از ۲٤ ساعت انکوباسیون در°۳۷	۰/۹۷۹	۰/۹۵۵	۰/۹۶۷	۱/۶
۶	مایع رویی حاصل از اقزودن $ZnSO_4$ به همولیزیت هیپرتونیـک بعـد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در°۳۷	۱/۲٤٤	۱/۲۵۰	۱/۲۶٤	۲/۱۶
۷	مایع رویی حاصل از اقزودن $ZnSO_4$ همولیزیت به هیپرتونیـک بعـد از ۲٤ ساعت انکوباسیون در°۳۷	۱/۰۲۳	۱/۰۰۶	۱/۰۱۳	۱/۶٤
۸	مایع رویی حاصل از اقزودن $ZnSO_4$ به همولیزیت هیپوتونیـک بعـد از ۱۵دقیقه انکوباسیون در°۳۷	۰/۹۳۲	۰/۹۱۶	۰/۹۲۱	۱/۵
۹	مایع رویی حاصل از اقزودن $ZnSO_4$ به همولیزیت هیپوتونیـک بعـد از ۲٤ ساعت انکوباسیون در °۳۷	۱/۰۱۹	۱/۰۱۳	۱/۰۰۳	۱/۵٤

نتایج انجام فعالیت کاسپاز ۳ در گلبول‌های قرمز تحت تـنش اسـمزی و محـیط کنتـرل غیـر تنشـی بـه روش کالریمتری و خوانده شده توسط دسـتگاه میکروپلیـت ریدر در طول مـوج ٤۰۵ نـانومتر در جـدول ۲ ارائـه شده است. اعداد مربوط به جذب را در نمودار جذب نـوری- میـزان وارد کـرده و میـزان میکرومـول هـر نمونه را از فرمول به دست آمده از منحنـی محاسـبه گردیده است (شکل ۳).

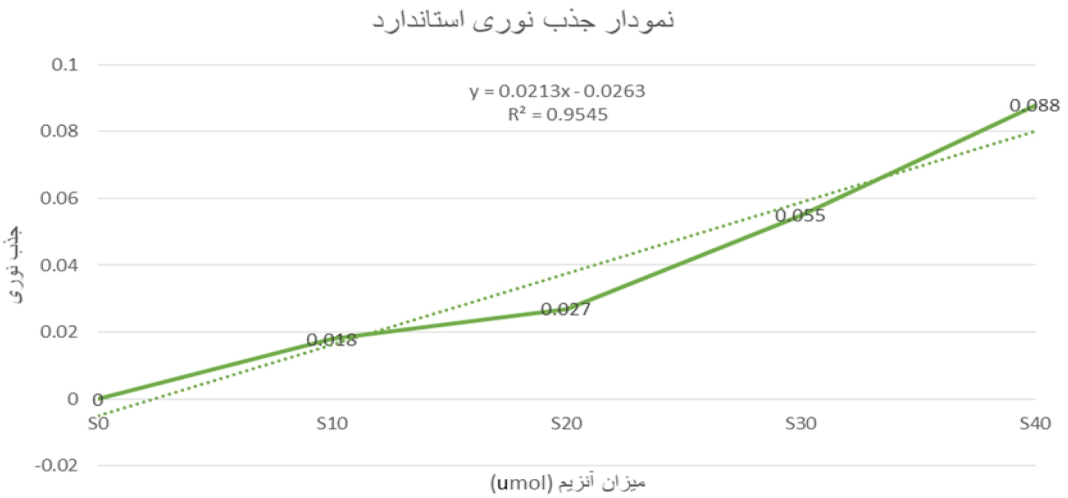


شکل ۲. نمودار استاندارد کاسپاز ۳

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]
[DOR: 20.1001.1.22287280.1402.23.1.7.9]
[DOI: 10.61186/jarums.23.1.82]

جدول ۲. نتایج حاصل از جذب‌های نوری استانداردها و نمونه‌ها پس از کسر از جذب چاهک استاندارد صفر و میزان آنزیم کاسپاز ۳ محاسبه شده در آن‌ها از روی منحنی

ردیف	نمونه ها	جذب نوری آنزیم کاسپاز۳			
		تکرار۱	تکرار ۲	تکرار ۳	میانگین میزان کاسپاز ۳ (µmol)
۱	استانداردصفر	۰	_	_	۰
۲	استاندارد ده	۰/۰۱۸	_	_	۱۰
۳	استاندارد بیست	۰/۰۲۷	_	_	۲۰
٤	استاندارد سی	۰/۰۵۵	_	_	۳۰
۵	استاندارد چهل	۰/۰۸۸	_	_	٤۰
۶	مایع رویی حاصل از افزایش $ZnSO_4$ به همولیزیت ایزوتونیک بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در C ۳۷°	۰/۰٤۹	۰/۰۵۱	۰/۰۵٤	۲۹
۷	مایع رویی حاصل از افزایش $ZnSO_4$ به همولیزیت ایزوتونیک بعد از ۲٤ ساعت انکوباسیون در C ۳۷°	۰/۰۱۹	۰/۰۲۱	۰/۰۲۳	۲۳
۸	مایع رویی حاصل از افزایش $ZnSO_4$ به همولیزیت هیپرتونیک بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در C ۳۷°	۰/۰۳٤	۰/۰۳۲	۰/۰۳۹	۲۳
۹	مایع رویی حاصل از افزایش $ZnSO_4$ به همولیزیت هیپرتونیک بعد از ۲٤ ساعت انکوباسیون در C ۳۷°	۰/۰۲۲	۰/۰۲۵	۰/۰۲۷	۱۶
۱۰	مایع رویی حاصل از افزایش $ZnSO_4$ به همولیزیت هیپوتونیک بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در C ۳۷°	۰/۰۶۹	۰/۰۷۱	۰/۰۷۵	۳۵
۱۱	مایع رویی حاصل از افزایش$ZnSO_4$ به همولیزیت هیپوتونیک بعد از ۲٤ ساعت انکوباسیون در C ۳۷°	۰/۰۵۸	۰/۰۶۱	۰/۰۶۲	۲۳



شکل ۳. نمودار استاندارد محاسبه میزان آنزیم کاسپاز ۳

پس از به دست آوردن میکرومول نمونه‌ها با استفاده از منحنی، فعالیت آنزیم‌های کاسپاز با استفاده از فرمول مقابل به دست آمد:

$$\text{Caspase Activity} = \frac{M \times 105.5}{T \times 50} \times \text{ضریب رقت نمونه}$$

M: µmol from standard curve plot
T: Incubated time for each sample in minutes

ضریب رقت نمونه = ۲

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]
[DOR: 20.1001.1.22287280.1402.23.1.7.9]
[DOI: 10.61186/jarums.23.1.82]

در انتها جواب نهایی برای تبدیل داده از حالت اعشاری به عدد صحیح در ۱۰۰۰ ضرب می‌شد تا واحد فعالیت با nmol/min/l بیان شود. نتایج در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳ . مقادیر فعالیت کاسپاز ۳ به دست آمده از فرمول

ردیف	نمونه ها	فعالیت کاسپاز			
		تکرار۱	تکرار ۲	تکرار ۳	میانگین فعالیت کاسپاز۳ (nmol/min/l)
۱	مایع رویی حاصل از افزایش $ZnSO_4$ به همولیزیت ایزوتونیک بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در C °۳۷	۹۱٤	۹۸٤	۱۰۱۹	۹۷۲
۲	مایع رویی حاصل از افزایش $ZnSO_4$ به همولیزیت ایزوتونیک بعد از ۲٤ ساعت انکوباسیون در C °۳۷	۳۵۱	۳۸۶	٤۲۲	۳۸۶
۳	مایع رویی حاصل از افزایش $ZnSO_4$ به همولیزیت هیپرتونیک بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در C °۳۷	۶۳۳	۵۹۷	۷۳۸	۶۵۶
٤	مایع رویی حاصل از افزایش $ZnSO_4$ به همولیزیت هیپرتونیک بعد از ۲٤ ساعت انکوباسیون در C °۳۷	۱۰۱۹	۱۰۹۰	۱۱۲۵	۱۰۷۸
۵	مایع رویی حاصل از افزایش $ZnSO_4$ به همولیزیت هیپوتونیک بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در C °۳۷	۱۱۹۵	۱۲۳۰	۱۲۶۶	۱۲۳۰
۶	مایع رویی حاصل از افزایش $ZnSO_4$ به همولیزیت هیپوتونیک بعد از ۲٤ ساعت انکوباسیون در C °۳۷	٤۲۲	٤۵۷	۷۰۳	۵۲۷

بحث

ساختمان هموگلوبین طبیعی دارای دو زنجیره آلفا و بتا است. زنجیره آلفا دارای ۱٤۱ و زنجیره بتا ۱٤۶ ریشه یا اسید آمینه می‌باشد (پیوست ۱) [۷]. زنجیره آالفا دارای ۱۰ ریشه هیستیدین و یک ریشه سیستئین بوده در حالی‌که زنجیره بتا حاوی ۹ ریشه هیستیدین و دو ریشه سیستئین می‌باشد (پیوست ۲) بنابراین کل یک مولکول هموگلوبین دارای ۳۸ ریشه هیستیدین و شش ریشه سیستئین خواهند بود که تعدادی از آن‌ها در سطح مولکول هموگلوبین قرار گرفته‌اند. بنابراین حدود ۱۰ درصد از ریشه‌های مولکول هموگلوبین قادر به واکنش با روی هستند که این اتصال داتیو یا کوئوردینانس که استحکام لازم را دارد بتدریج موجب جدا شدن و رسوب هموگلوبین و پیدایش مایع رویی شفاف می‌گردد.

مطالعه نتایج میزان و فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ در این طرح تحقیقاتی نشان دهنده حضور معنی‌دار این آنزیم با دو روش سنجش ایمونواسی و کالریمتری است. به عبارت دیگر، داده‌های عددی حاصل از روش ایمونواسی الایزا نشان می‌دهد که بعد از رسوب هموگلوبین توسط سولفات روی ۶ میلی‌مول، آنزیم کاسپاز ۳ در مایع رویی حضور داشته و توانسته به آنتی‌بادی مونوکلونال کاسپاز ۳ دیواره چاهک الایزا متصل گردیده و بین آنتی‌کاسپاز ۳ اضافه شده و متصل به دیواره چاهک ساندویچ گردیده و متعاقباً استرپتاویدین HRP[1] به این مجموعه افزوده شده و آنزیم پراکسیداز مربوطه بر روی کروموژن اضافه‌شده تاثیر گذاشته و موجب تولید رنگ و تغییر آن به رنگ زرد بعد از افزودن محلول متوقف‌کننده گردیده است به طوری‌که امکان خوانش آن را در طول موج ٤۵۰ نانومتر توسط میکروپلیت ریدر فراهم کرده است. از طرف دیگر، در روش اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ به‌روش کالریمتری، بعد از رسوب هموگلوبین بواسطه

[1] Horse Raddish Peroxidase

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]
[DOR: 20.1001.1.22287280.1402.23.1.7.9]
[DOI: 10.61186/jarums.23.1.82]

سولفات روی ۶ میلی‌مول، آنزیم کاسپاز ۳ باقیمانده در مایع رویی توانسته است بر روی سوبسترای پپتید Ac-DEVD-pNA اثر کرده و با بریدن pNA در محل اتصال به اسیدآسپارتیک موجب آزاد شدن آن گردیده بطوری‌که این نیتروانیلین در طول موج ۴۰۵ نانومتر جذب نوری آن قابل اندازه‌گیری باشد.

از آنجایی که طول موج جذب ماکزیمم (λ_m) حلقه هم (Heme) موجود در انواع هموگلوبین بین ۴۰۵ تا ۴۱۵ بوده که می‌تواند در محدوده خوانش میزان و فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ در طول موج‌های به ترتیب ۴۵۰ و ۴۰۵ تداخل ایجاد کرده و حتی هموگلوبین در روش الایزا ممانعت‌هایی را در اتصالات ایمونولوژیک کاسپاز ۳ و آنتی‌کاسپاز ۳ ایجاد نماید از این‌رو زدودن و حذف آن توسط سولفات روی با غلظت متناسب اجتناب ناپذیر است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مقاله و تحلیل‌های آماری موجود در منابع ۵ و ۶ که مرتبط با این مقاله هستند مبین این موضوع است که مقدار ۶ میلی‌مول سولفات روی، هموگلوبین را رسوب داده و از رسوب آنزیم کاسپاز ۳ جلوگیری به عمل نمی‌آورد و آنزیم فعالیت خود را نشان می‌دهد. با توجه به ساختمان اول و توالی امینواسیدهای کاسپاز ۳، درصد پایین اسید امینه هیستیدین ۳ عدد و سیستئین ۲ عدد، این شانس را می‌دهد که این آنزیم حتی‌الامکان در مایع رویی باقیمانده و رسوب ننموده و حضور سولفات روی مانعی در فعالیت آنزیمی آن ایجاد نکند.

در آزمایشگاه تشخیص پزشکی حضور هموگلوبین در نمونه سرم بدلیل لیز گلبول‌های قرمز در زمان نمونه‌گیری از کودکان و بیماران بد رگ و یا به دلیل تخلیه نامناسب نمونه خون گرفته شده به داخل لوله در اندازه‌گیری برخی آنالیت‌ها تداخل ایجاد می‌کند. همولیز بسته به مقدار هموگلوبین آزاد شده در سرم بسته به ماده مورد سنجش مانند آنزیم‌های AST، ALT، آلکالن فسفاتاز ،کلسیم، فسفر، بیلی روبین توتال و مستقیم، تری گلیسرید، کلسترول، HDL[1]-کلسترول داشته و بسته به نوع آزمایش هموگلوبین به عنوان عامل مداخله‌گر از ۵۰ تا ۵۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر می‌تواند روی صحت پاسخ به دست آمده اثر گذاشته و از عوامل ایجاد خطا محسوب شود[2]. از این رو پیشنهاد می‌شود به صورت اختصاصی برای هر آزمایش تاثیر رسوب هموگلوبین به کمک سولفات روی بررسی و با احتساب ضریب رقت ناشی از اضافه شدن این ماده بر روی سرم حاوی همولیز و بشرطی که این ماده با آنالیت مذکور واکنش ندهد مقدار صحیح ماده مورد اندازه‌گیری بدست آید. بدیهی است در جاییکه گرفتن مجدد نمونه جدید بدلیل شرایط خاص عروقی بیمار یا عدم دسترسی مجدد به بیمار بخاطر بعد مسافت می‌تواند کار ساز باشد.

[1] High Density Lipoprotein
[2] Pars Azmoon Cooperation Analytes Assay Leaflets

References

1- Sonnenwirth AC, Jarett L. Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis: 8th ed. Missouri: The C.V.Mosby Company, 1980: Volume one, Chapter 24: 530-531.
2- Namuswe F, Berg JM. Secondary interactions involving zinc-bound ligands: roles in structural stabilization and macromolecular interactions. J Inorg Biochem. 2012 Jun; 111:146-9.
3- Rawn JD. Biochemistry.1st ed. North Carolina: Neil Patterson Publication, 1989. Chapter 6: 121.
4- Hover CG, Kulkarni AP. A simple and efficient method for hemoglobin removal from mammalian tissue cytosol by zinc sulfate and its application to the study of lipoxygenase. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2000 Feb; 62(2):97-105.

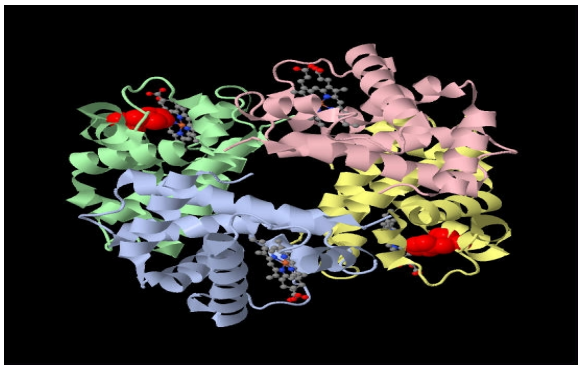
[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]
[DOR: 20.1001.1.22287280.1402.23.1.7.9]
[DOI: 10.61186/jarums.23.1.82]

5- Karimzadeh N. Studies on MAPK enzyme activity, apoptosis and total antioxidant capacity in blood anuclear cells (RBC) under osmotic stress [dissertation]. University of Mohaghegh Ardabili; 1400. (Full text in Persian)
6- Mansurkiaie S. Studies on caspase enzyme activity in blood anuclear cells (RBC) under osmotic stress [dissertation]. University of Mohaghegh Ardabili;1401. [Full text in Persian]
7- Marengo-Rowe AJ. Structure-function relations of human hemoglobins. Proc (Bayl Univ Med Cent). 2006;19(3):239-45.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

[DOR: 20.1001.1.22287280.1402.23.1.7.9]
[DOI: 10.61186/jarums.23.1.82]

پیوست ها



پیوست ۱. ساختمان هموگلوبین طبیعی انسان [۷]

- **Translation (141 aa):**

VLSPADKTNVKAAWGKVGA**H**AGEYGAEALERMFLSFPTTKTYFP**H**FDLS**H**GSAQVKG**H**GK
KVADALTNAVA**H**VDDMPNALSALSDL**H**A**H**KLRVDPVNFKLLS**HC**LLVTLAA**H**LPAEFTPA
V**H**ASLDKFLASVSTVLTSKYR

Hemoglobin sub unit alpha

- **Translation (146 aa):**

V**H**LTPEEKSAVTALWGKVNVDEVGGEALGRLLVVYPWTQRFFESFGDLSTPDAVMGNPKV
KA**H**GKKVLGAFSDGLA**H**LDNLKGTFATLSEL**HC**DKL**H**VDPENFRLLGNVLV**C**VLA**HH**FGK
EFTPPVQAAYQKVVAGVANALA**H**KY**H**

Hemoglobin sub unit beta

پیوست ۲. توالی اسیدآمینه ای زنجیره های آلفا و بتای هموگلوبین طبیعی انسان بر گرفته از PDB