دانشگاه فرهنگیان
فصل‌نامه پویش در آموزش علوم پایه
دوره ۷، شماره ۲۳، تابستان ۱۴۰۰

Farhangian University
Quarterly Journal of Education in Basic Sciences
Volum7, Issue23, summer2021

طیف‌های جذبی و فلوئورسانس هموگلوبین انسانی در حلال‌های دی‌متیل‌سولفوکسید و دی‌متیل‌آمین

بهروز جلیلیان[۱]، محمد صادق ذاکرحمیدی[۲]، رضا خردمند[۳]

دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۱۷ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۳۰

چکیده

در این پژوهش طیف‌های جذبی و فلوئورسانس هموگلوبین انسانی در حلال‌های دی‌متیل‌سولفوکسید و دی‌متیل‌آمین با غلظت 1×10^{-5} مولار بعد از آماده‌سازی و نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد برای مدت ۲۴ ساعت، با استفاده از طیف سنجی مرئی - فرابنفش و فلوئورسانس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج طیف جذبی و فلوئورسانس نشان می‌دهد گذار الکترونی و تغییر در ماهیت اولیه هموگلوبین به دلیل حلال است.

کلیدواژه‌ها: جذب، حلال، خطیت، فلوئورسانس، هموگلوبین.

مقدمه

خون کامل انسان شامل حدود ۵۵ درصد پلاسما (۹۰ درصد آب، ۱۰ درصد پروتئین‌ها) و ۴۵ درصد سلول‌ها (۹۹ درصد گلبول‌های قرمز خون، ۱درصد گلبول‌های سفید خون و ترومبوسیت‌ها) است. یک گلبول قرمز خون یک شکل مقعرالطرفین مسطح خاص با قطر ۷ تا ۸ میکرون و ضخامت ۲ میکرون دارد. سلول‌های قرمز خون دارای حجم متوسط ۹۰ میکرومتر مکعب و حاوی ۳۰ pg هموگلوبین است که امکان انتقال اکسیژن را فراهم می‌کند. در شرایط فیزیولوژیکی، غلظت سلول در خون حدود $5\times10^{12}\ L^{-1}$ است. با این حال، تنها تعداد کمی از مطالعات نظری و تجربی در مورد خواص نوری خون منجر به نتایج معقول شده است، زیرا خواص اپتیکی خون به طور عمده به پارامترهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مانند هماتوکریت،

---

۱ . استادیار دانشگاه فنی و حرفه‌ای باهنر ، شیراز، ایران. نویسنده مسؤول، bjalilian٤٤٥@gmail.com
۲ . عضو هیات علمی پژوهشکده فیزیک کاربردی و ستاره‌شناسی، دانشگاه تبریز، ایران.
۳. عضو هیات علمی پژوهشکده فیزیک کاربردی و ستاره‌شناسی، دانشگاه تبریز، ایران.

جریان، اسمولاریسم، همولایز و اشباع اکسیژن بستگی دارد (روگان و دیگران، ۱۹۹۹). در این میان مولکول‌های هموگلوبین، که درون سلول‌های قرمز قرار دارند،۹۷ ٪ اکسیژن در خون را حمل می‌کنند در حالی که۳ ٪ دیگر در پلاسما حل می‌شود. هر مولکول هموگلوبین از چهار گروه هم (اتم آهن در مرکز ساختارش، که دارای ویژگی‌های پارامغناطیسی است) و پروتئین گلوبین تشکیل شده است. هموگلوبین دارای یک نقش اساسی در انتقال و تحویل اکسیژن از ریه‌ها به بافت‌ها (اکسی‌هموگلوبین)، و حمل دی‌اکسیدکربن از بافت (دی‌اکسی‌هموگلوبین) به ریه‌ها است. مقدار هموگلوبین خون میزان اکسیژن قابل حمل به دیگر سلول‌ها را در سلول‌های قرمز خون تعیین می‌کند. دامنه نرمال برای غلظت هموگلوبین (که براساس سن و جنسیت تغییر می‌کند) ۱۴ تا ۲۰ گرم در دسی‌لیتر در کودکان، ۱۳ تا ۱۸ گرم در دسی‌لیتر در مردان بالغ و ۱۲ تا ۱۶ گرم در دسی‌لیتر در خانم‌های بالغ است. مولکول‌های هموگلوبین در سلول‌های قرمز خون تقریباً باعث همه جذب نور که توسط خون صورت می‌گیرد هستند (ویکتوروویچ، ۲۰۰۷).

روش‌شناسی پژوهش

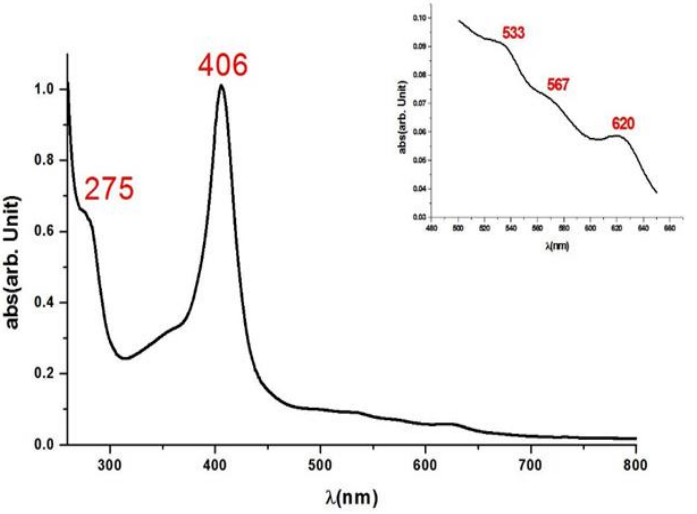
برای بررسی تاثیر این نوع حلال‌ها بر هموگلوبین انسانی این نوع محیط بیولوژیک با حلال‌های مختلف با غلظت ۱×۱۰^{-۵} مولار محلول‌سازی شدند. در مرحله اول بعد از آماده‌سازی، نمونه‌ها را به مدت ۲۴ ساعت در دمای $۴^{\circ}c$ در یخچال نگهداری شدند. بعد از این مدت با استفاده از دستگاه‌های Uv-vis و فلورئومتر ویژگی‌های خطی هموگلوبین در حلال‌های مختلف اندازه‌گیری شد.

یافته‌های پژوهش

۱- طیف‌های جذبی

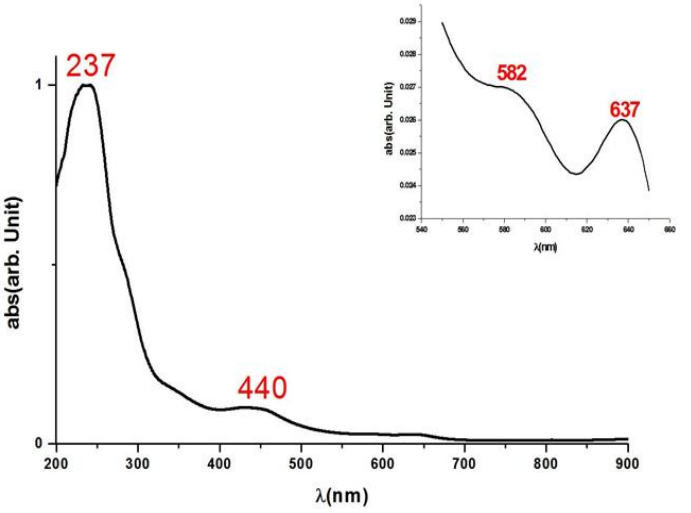
طیف‌سنجی UV-vis شامل طیف‌سنجی جذب و بازتابی در ناحیه طیفی UV-vis است. مولکول‌هایی که دارای الکترون‌های π یا الکترون‌های غیرپیوندی (الکترون‌های n) می‌باشند می‌توانند انرژی نور ماوراء بنفش یا نور مرئی را جذب کنند و به اربیتال‌های مولکولی غیرپیوندی بالاتر برانگیخته شوند. به طور کلی، طیف‌سنجی UV-vis برای تعیین غلظت عناصر در یک محلول بر اساس قانون بیر- لامبرت استفاده می‌شود (شیخ‌بهائی و دیگران، ۱۹۸۹). همانطور که از شکل ۱ قابل مشاهده است، طیف‌های جذبی هموگلوبین انسانی در دی‌متیل‌سولفوکسید دارای طول موج‌های جذبی مختلفی می‌باشند. طول موج جذب در ناحیه ۲۷۵ نانومتری مربوط به تریپتوفان، تیروزین و فنیل‌آلانین و طول موج جذب در ناحیه ۴۰۶ نانومتری

مربوط به سورت باند پورفیرین-هم و طول موج‌های جذب ضعیف در ناحیه ۵۳۳، ۵۶۷ و ۶۲۰ نانومتری مربوط به باند Q می‌باشند. از آنجایی که هم متعلق به گروهی از مجموعه‌های پورفیرین است، طیف جذبی یک مجموعه پورفیرین معمولی از یک گذار قوی به دومین حالت برانگیخته (S_0 به S_2) در حدود ۴۰۰ نانومتر (سورت باند) و یک گذار ضعیف به اولین حالت برانگیخته (S_0 به S_1) در حدود ۵۰۰ تا ۶۵۰ نانومتر (باند Q) تشکیل می شود. جذب‌های سورت باند و باند Q هر دو از گذار $\pi - \pi^*$ بوجود می‌آیند (دینا و دیگران، ۲۰۱۰).



نمودار ۱ . طیف جذبی هموگلوبین انسانی در دی‌متیل‌سولفوکسید.

همانطور که شکل ۲ به طور واضح نشان می‌دهد، هموگلوبین انسانی در دی‌متیل‌آمین دارای چهار طیف جذبی است که طول موج جذب در ناحیه ۲۳۷ نانومتری نشانه ساختار مارپیچ α می‌باشد و طول موج جذب در ۴۴۰ نانومتری متعلق به پورفیرین و طول موج‌های ۵۸۲ و ۶۳۷ مربوط به باند Q می‌باشد (می‌ژانگ، ۲۰۰۹).

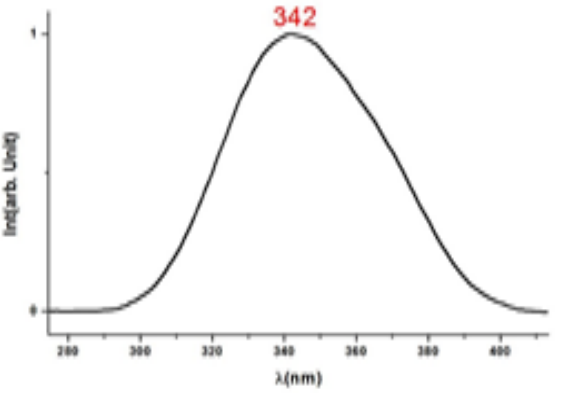


نمودار ۲ . طیف جذبی هموگلوبین انسانی در دی‌متیل‌آمین.

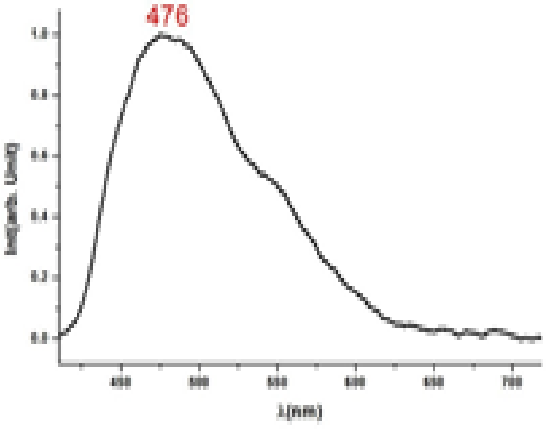
۲-طیف‌های فلوئورسانس

وجود یک فلوئورسانس ضعیف در بخشی از پروتئین هموگلوبین انسانی به وضوح ثابت شده است. این انتشار ذاتی برای بررسی پدیده‌هایی مانند انتقال انرژی تریپتوفان - هم و گذارهای ساختاری R-T در هموگلوبین مورد استفاده قرار گرفته است. با این حال، جنبه‌های دینامیکی فلوئورسانس تریپتوفان ممکن است اطلاعاتی در مورد حرکت زنجیره‌ای محیط فلوروفور را فراهم کند (آلبانی، ۱۹۸۵). برای مدت زمان طولانی، هموگلوبین به صورت یک کروموفور غیرفلورسنت در نظر گرفته شد چون اعتقاد بر این بود که واپاشی غیرتابشی در واهلش حالت تحریکی غالب است. اخیراً، انتشار فلوئورسانس قوی از هموگلوبین با تحریک دوفوتونی با طول موج کوتاه کشف شده است (دینا و دیگران، ۲۰۱۰). در واقع طیف‌سنجی فلوئورسانس یک ابزار ضروری برای مطالعه برهمکنش‌های لیگاند پروتئین است به صورتی که به ما کمک می‌کند تا اطلاعات مربوط به تغییرات ساختاری پروتئین ، میزان در معرض قرارگرفتن فلوروفور با محیط حلال و میزان تحرک موضعی آن در مدت برهمکنش آن با هر گونه لیگاند خارجی پیش‌بینی کنیم (موحد، ۲۰۱۷). به علت اینکه طول موج‌های جذبی هموگلوبین انسانی در دی‌متیل‌سولفوکسید به ترتیب ۲۷۵، ۴۰۶، ۵۳۳، ۵۶۷ و ۶۲۰ نانومتر می‌باشد، بنابراین طول موج‌های تحریکی برای هموگلوبین انسانی ۲۷۰، ۳۸۵، ۴۹۰، ۵۶۰ و ۵۹۰ نانومتر در نظر گرفته شد و با توجه به این طول موج‌ها و همانطور که از شکل‌های۳،۴،۵، ۶ و ۷ به طور واضح دیده می‌شود، طول موج گسیلی برای هموگلوبین انسانی ۳۴۲، ۴۷۶، ۵۴۷، ۶۵۲، ۶۶۰

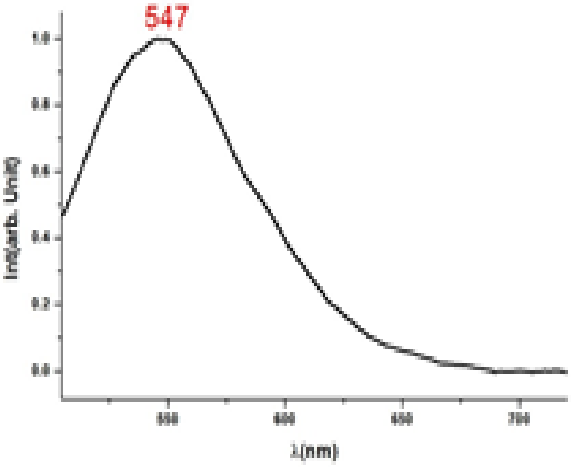
نانومتر است. بنابراین فلوئورسانس ذاتی هموگلوبین به دلیل بخش‌های تریپتوفان و تیروزین در زنجیره پلیپپتیدی است. در واقع فلوئورسانس ذاتی هموگلوبین اساساً به دلیل باقی‌مانده β-Trp۳۷ در فصل مشترک $\alpha_1 \beta_2$ است و نشان‌دهنده گذار از شکل آرام (R) به (T) کشیده است (آنیربان، ۲۰۱۶).



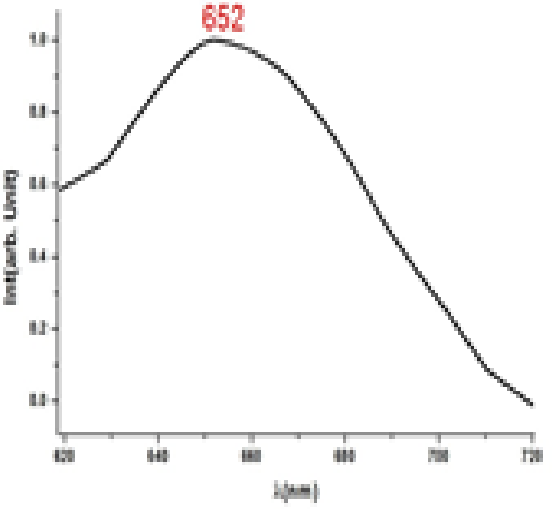
نمودار ۳ . طیف فلوئورسانس هموگلوبین انسانی در دی‌متیل‌سولفوکسید با طول موج تحریکی ۲۷۰ نانومتری.



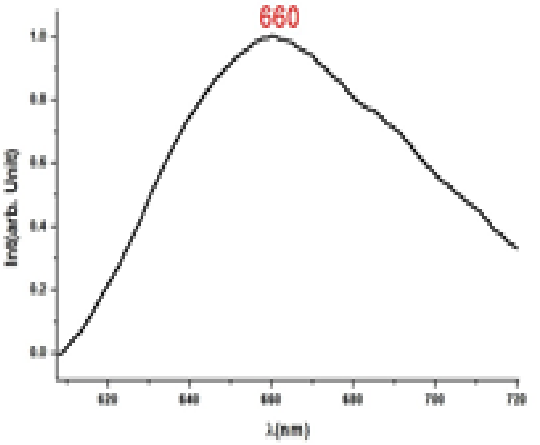
نمودار٤ . طیف فلوئورسانس هموگلوبین انسانی در دی‌متیل‌سولفوکسید با طول موج تحریکی ۳۸۵ نانومتری.



نمودار۵ . طیف فلوئورسانس هموگلوبین انسانی در دی‌متیل‌سولفوکسید با طول موج تحریکی ۴۹۰ نانومتری.

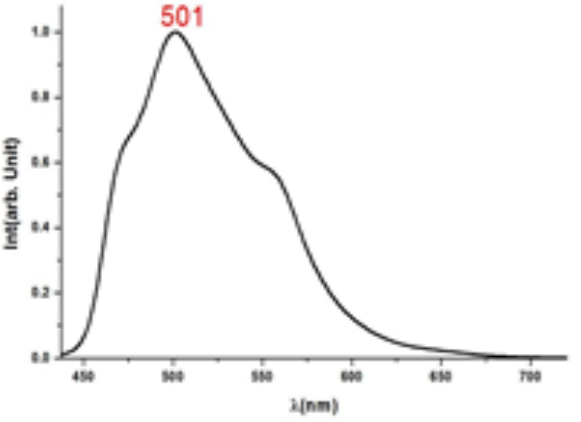


نمودار۶ . طیف فلوئورسانس هموگلوبین انسانی در دی‌متیل‌سولفوکسید با طول موج تحریکی ۵۶۰ نانومتری.

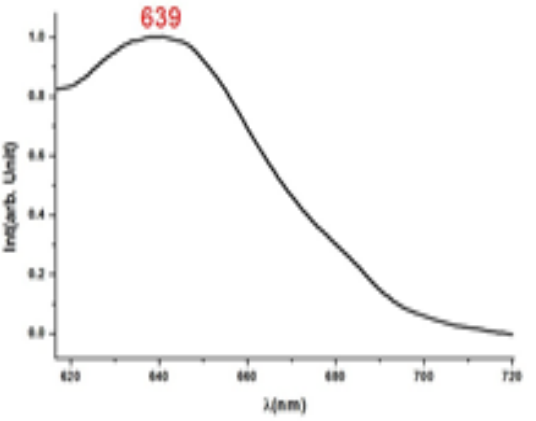


نمودار۷. طیف فلوئورسانس هموگلوبین انسانی در دی‌متیل‌سولفوکسید با طول موج تحریکی ۵۹۰ نانومتری.

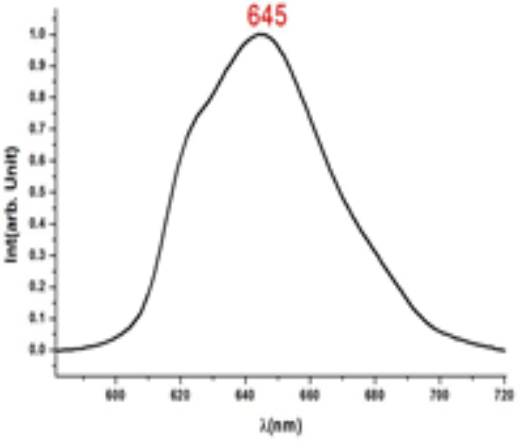
همچنین با توجه به اینکه هموگلوبین انسانی در دی‌متیل‌آمین دارای طول موج‌های جذبی ۲۳۷، ۴۴۰، ۵۸۲ و ۶۳۷ نانومتر است، بنابراین طول موج تحریکی برای هموگلوبین انسانی ۴۲۰، ۵۷۰ و ۶۲۰ در نظر گرفته شده که با توجه به این طول موج‌های تحریکی و همانطور که از شکل‌های۸،۹ و ۱۰ به طور واضح دیده می‌شود، طول موج گسیلی برای هموگلوبین انسانی ۵۰۱، ۶۳۹ و ۶۴۵ نانومتر می‌باشد که همانطور در بالا ذکر شد، این طول موج‌های گسیلی نشانه‌ای از فلوئورسانس پورفیرین (باند Q) هستند.



نمودار۸. طیف فلوئورسانس هموگلوبین انسانی در دی‌متیل‌آمین با طول موج تحریکی ٤٢٠ نانومتری.



نمودار۹ . طیف فلوئورسانس هموگلوبین انسانی در دی‌متیل‌آمین با طول موج تحریکی ۵۷۰ نانومتری.



نمودار۱۰. طیف فلوئورسانس هموگلوبین انسانی در دی‌متیل‌آمین با طول موج تحریکی ٦٢٠ نانومتری.

بحث و نتیجه‌گیری

از نمودارهای دو حلال می‌توان به این نتیجه رسید که طیف‌های جذبی Uv-vis تغییرات ساختاری پروتئین‌ها را منعکس می‌کند و علاوه بر این، شکل و موقعیت پیک پروتئین می‌تواند تغییرات مهم ساختاری

مانند بازشدگی و ماهیت عوض‌شدن را نشان‌دهند. همچنین شدت فلوئورسانس و محل پیک فلوئورسانس منعکس‌کننده محیط کوچک گروه کروموفور پروتئین است.

منابع

Roggan, A. et al., (۱۹۹۹), ' optical properties of circulating human blood in the wavelength range ٤۰۰–۲٥۰۰ nm', *journal of biomedical optics* ٤(۱), ۳٦–٤٦.

Viktorovich, V. (۲۰۰۷),*'Tissue optics : light scattering methods and instruments for medical diagnosis'*, SPIE P.O. Box ۱۰ Bellingham, Washington ۹۸۲۲۷-۰۰۱۰ USA, ISBN-۱۳: ۹۷۸-۰-۸۱۹٤-٦٤۳۳-۰

Sheik-Bahae, M. et al. (۱۹۸۹), 'High sensitivity single beam n_v measurements', *Optics Letters*, Vol. ۱٤, pp. ۹٥٥-۹٥۷.

Dhinaa, A. et al, (۲۰۱۰), 'Z-Scan technique: To measure the total protein and albumin in blood, *Biomedical Science and Engineering'*, ۳, ۲۸٥-۲۹۰ doi:۱۰,٤۲۳٦/jbise.۲۰۱۰,۳۳۰۳۸, ۲۰۱۰

Mei Zhang, H. (۲۰۰۹), ' A fluorimetric study of the interaction of C.I. Solvent Red ۲٤ with haemoglobin ', *Dyes and Pigments* ۸۲ ۱٥٦–۱٦۳, doi:۱۰,۱۰۱٦/j.dyepig.۲۰۰۸,۱۲,۰۰۸.

Albani, J. (۱۹۸٥), ' A fluorescence decay time study of tryptophan in isolated hemoglobin subunits ', *Elsevrer Science Publishers B. V. (Biomedical Division)*, FEBS ۲۳۷٦, Volume ۱۸۲.

Mohd, A. (۲۰۱۷),' In vitro evaluation of the non-covalent interactions of hemoglobin with distinctively modified gemini surfactants: Effect of structural variation ', *Colloids and Surfaces* A ٥۲۷, ۱٤٥–۱٥۷, doi: ۱۰,۱۰۱٦/j.colsurfa.۲۰۱۷,۰٥,۰۲۱.

Anirban, B. et al. (۲۰۱٦), ' A biophysical investigation on the binding of

proflavine with human hemoglobin: Insights from spectroscopy, thermodynamics and AFM studies ', *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* ۱٦٥ ٤۲–٥۰, doi: ۱۰,۱۰۱٦/j.jphotobiol.۲۰۱٦,۱۰,۰۱۰