



**Structural and functional properties of the
hemoglobin components from the Caspian Sea
Acipenser persicus and *Acipenser stellatus***

| | |
|---------------|---|
| Item Type | thesis |
| Authors | Ariaeenejad, Shohreh |
| Publisher | Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Marine Biology |
| Download date | 11/12/2023 14:15:35 |
| Link to Item | http://hdl.handle.net/1834/34338 |

اللَّهُمَّ
الْحَمْدُ لَكَ
الْحَمْدُ لَكَ
الْحَمْدُ لَكَ



معاونت پژوهش و فناوری

به نام خدا نشور اخلاق پژوهش

بیایید از خداوند سبحان و اعتقاد به این که عالم محضر خداست و همواره ناظر بر اعمال انسان و به منظور پاس داشت مقام بلند دانش و پژوهش و نظریه اهمیت جایگاه دانشگاه در اعتلای فرهنگ و تمدن بشری، مادیانجویان و اعضاء هیات علمی و احداثی دانشگاه آزاد اسلامی متعهد می گردیم اصول زیر را در انجام فعالیت های پژوهشی مد نظر قرار داده و از آن تخطی نکنیم:

- ۱- اصل برانست: التزام به برانست جویی از حرکت ز رفتار غیر حرفه ای و اعلام موضع نسبت به کسانی که حوزه علم و پژوهش را به شبه های غیر علمی می آلاینند.
- ۲- اصل رعایت انصاف و امانت: تعهد به اجتناب از حرکت جانب داری غیر علمی و حفاظت از اموال، تجهیزات و منابع در اختیار.
- ۳- اصل ترویج: تعهد به رواج دانش و اشاعه نتایج تحقیقات و انتقال آن به بهکاران علمی و دانشجویان به غیر از مواردی که منع قانونی دارد.
- ۴- اصل احترام: تعهد به رعایت حریم ها و حرمت ها در انجام تحقیقات و رعایت جانب تعد و خودداری از حرکت حرمت شکنی.
- ۵- اصل رعایت حقوق: التزام به رعایت کامل حقوق پژوهشگران و پژوهیدگان (انسان، حیوان و نبات) و سایر صاحبان حق.
- ۶- اصل رازداری: تعهد به صیانت از اسرار و اطلاعات محرمانه افراد، سازمان ها و کشورهای دیگر و نهاد های مرتبط با تحقیق.
- ۷- اصل حقیقت جویی: تلاش در راستای پی جویی حقیقت و وفاداری به آن و دوری از حرکت پنهان سازی حقیقت.
- ۸- اصل مالکیت مادی و معنوی: تعهد به رعایت کامل حقوق مادی و معنوی دانشگاه و کلیه بهکاران پژوهش.
- ۹- اصل منافع ملی: تعهد به رعایت مصالح ملی و در نظر داشتن پیشبرد و توسعه کشور در کلیه مراحل پژوهش.



دانشگاه آزاد اسلامی

واحد علوم و تحقیقات

تعهد نامه اصالت رساله یا پایان نامه تحصیلی

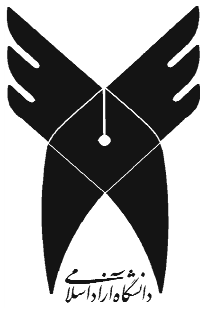
اینجانب **شهره آریائی نژاد** دانش آموخته مقطع کارشناسی ارشد ناپیوسته / دکترای حرفه ای / دکترای تخصصی در رشته **یولوژی دریاکه** در تاریخ ۱۳۹۰/۱۱/۱۸ از رساله خود تحت عنوان **"بررسی ساختار و عملکرد مایان خاویاری قره برون *Acipenser persicus* و اردن برون *Acipenser stellatus* دریای خزر"**

با کسب نمره ۲۰ و درجه عالی دفاع نموده ام بدینوسیله متعهد می شوم:

- ۱- این رساله حاصل تحقیق و پژوهش انجام شده توسط اینجانب بوده و در مواردی که از دستاوردهای علمی و پژوهشی دیگران (اعم از پایان نامه ، کتاب ، مقاله و.....) استفاده نموده ام، مطابق ضوابط و رویه موجود ، نام منبع مورد استفاده و سایر مشخصات آن را در فهرست مربوطه ذکر و درج کرده ام.
- ۲- این رساله قبلاً برای دریافت هیچ مدرک تحصیلی (هم سطح ، پایین تر یا بالاتر) در سایر دانشگاه ها و موسسات آموزش عالی ارائه نشده است.
- ۳- چنانچه بعد فراغت از تحصیل، قصد استفاده و هرگونه بهره برداری اعم از چاپ کتاب ، ثبت اختراع و.... از این رساله داشته باشم، از حوزه معاونت پژوهشی واحد مجوزهای مربوطه را اخذ نمایم.
- ۴- چنانچه در هر مقطع زمانی خلاف موارد فوق ثابت شود، عواقب ناشی از آن را می پذیرم و واحد دانشگاهی مجاز است با اینجانب مطابق ضوابط و مقررات رفتار نموده و در صورت ابطال مدرک تحصیلی ام هیچگونه ادعایی نخواهم داشت.

نام و نام خانوادگی: **شهره آریائی نژاد**

تاریخ و امضاء:



دانشگاه آزاد اسلامی

واحد علوم و تحقیقات

دانشکده علوم و فنون دریایی، گروه بیولوژی دریا

رساله دکتری رشته بیولوژی دریا (Ph.D)

عنوان

بررسی ساختار و عملکرد هموگلوبین ماهیان خاویاری

قره برون *Acipenser persicus* و ازون برون *Acipenser stellatus*

دریای خزر

استادان راهنما

دکتر علی اکبر موسوی موحدی

دکتر شهلا جمیلی

استادان مشاور

دکتر مهران حبیبی رضایی

دکتر محمد رضا فاطمی

نگارش

شهره آریائی نژاد

زمستان ۱۳۹۰

بعد از سپاس از خداوند متعال که همه هستی مرهون لطف و رحمت اوست با سپاس از پدر و مادر عزیزم که وجودم برایشان همه رنج بود و وجودشان برایم همه مهر، توانشان رفت تا به توانایی برسم و مویشان سپیدی گرفت تا روی سپید بمانم. آنان که فروغ نگاهشان، گرمی کلامشان و روشنی رویشان سرمایه جاودان زندگی من است. در برابر وجود گرامیتان زانوی ادب بر زمین می نهیم و بادل مالامال از عشق و محبت بر دستانتان بوسه می زنم.

مراتب صمیمانه ترین سپاس ها و قدردانی های خود را تقدیم می نمایم به: استاد ارجمند و بزرگوارم جناب آقای دکتر موسوی موحدی، که شخصیت متینشان همواره الگوی زندگیم خواهد ماند و در به ثمر رسیدن این رساله همچون یآوری صمیمی گام به گام مرا در مشکلات و تنگنایهای مربوط به این تحقیق یاری نمودند و از هیچ لطفی فروگذار نکردند و همواره ضمن برخورداری از راهنمایی های ارزشمند و کمک های بی دریغشان، مرهون لطف و محبت فراوان ایشان بوده ام.

و همچنین از استاد عزیزم سرکار خانم دکتر جمیلی که در طول مدت تحصیل در دکتری از کلاسهایشان حداکثر بهره برداری را نمودم در تمام مدت انجام پروژه همچون دوستی صمیمی مرا در مشکلات و تنگنایهای مربوط به آن و تهیه نمونه ماهیان مورد مطالعه، یافتن منابع، مقالات و استفاده از کتب مورد نیاز برای تحقیق یاری نمودند.

همچنین از استاد ارجمندم جناب آقای دکتر حبیبی رضایی که در همه حال از هیچگونه کمک و مساعدت دریغ ننمودند و امکانات آزمایشگاهی خود را بی دریغ در اختیار اینجانب قرار دادند، و هرگاه در زمینه های مربوط به رساله راهنمایی خواستم، ایشان را در حل مشکل خود بسی دلسوز، با سعه صدر، و مهربان یافتم.

همچنین از راهنمایی های استاد گرامیم جناب آقای دکتر فاطمی، استاد مشاور پروژه، که در طول مدت تحصیل در دکتری از کلاسها و درسهایشان حداکثر بهره برداری را نمودم و مرا در حل مشکلات این دوره یاری نمودند، تشکر و سپاسگزاری می کنم.

با تشکر از اساتید محترمی که داوری این رساله را بر عهده دارند و مطمئناً ارائه نقطه نظراتشان موجبات پربار شدن این رساله را فراهم خواهد نمود.

از تمامی اساتید بزرگوارم در طول دوران تحصیل، جناب آقای دکتر ماشین چیان، سرکار خانم دکتر مصطفوی و کلیه بزرگوارانی که توفیق شاگردی آنها را داشتم، سپاسگزاری می کنم و برای همه آنها آرزوی توفیق و سلامتی دارم.

از دوستان و همکاران بسیار خوبم در آزمایشگاه بیوشیمی فیزیک مرکز تحقیقات بیوشیمی بیوفیزیک دانشگاه تهران و در آزمایشگاه بیوتکنولوژی پروتئین دانشگاه تهران به ویژه خانم ها موسوی موحدی، سلامی، فریور، نباتی و فردوسی و آقایان اکبری، امیری سپاسگزارم و توفیق و شادکامی تمامی این عزیزان را از خداوند بزرگ آرزومندم. در خاتمه انجام این تحقیق، بدون زحمات و بردباری بی دریغ پدر و مادر مهربانم مخصوصاً در مراقبت از فرزندم و محبت های خواهر و برادر عزیزم، دلسوزی و محبت های بی حد و مرز همسر عزیزم که در تمام مراحل تحصیل پشتیبان و یاور من بوده، ممکن نبود. و با تشکر از کلیه عزیزانی که در انجام این رساله مرا همراهی کردند.

شهره آریائی نژاد، دی ماه ۱۳۹۰

تقدیم به همسر گرامیم

یگانه شریک زندگیم، همگام در مسیر آموختن، که دریای مهر است و ایمان

و تقدیم به

گل زیبای باغ زندگیم که با وجودش عشق و عظمت بی کران خدا را به تمام معنا
تجربه کردم

فرزند دلبندم ارشک

فهرست مطالب

| عنوان | شماره صفحه |
|---|------------|
| فصل اول: کلیات تحقیق..... | ۲ |
| ۱-۱ مقدمه | ۳ |
| ۲-۱ تاسماهیان (ماهیان خاویاری) | ۴ |
| ۱-۲-۱ معرفی سیستماتیک و بیولوژیک تاسماهیان | ۴ |
| ۲-۲-۱ مشخصات کلی جنس تاسماهی (<i>Acipenser</i>) | ۵ |
| ۱-۲-۲-۱ قره برون (تاسماهی ایرانی) (<i>Acipenser persicus</i>) | ۶ |
| ۲-۲-۲-۱ ازون برون (<i>Acipenser stellatus</i>) | ۹ |
| ۳-۲-۱ خصوصیات محیطی و جغرافیائی دریای خزر | ۱۱ |
| ۳-۱ خون ماهیان | ۱۲ |
| ۴-۱ هموگلوبین | ۱۳ |
| ۱-۴-۱ هموگلوبین ماهی ها | ۱۴ |
| ۲-۴-۱ ساختار هموگلوبین در ماهی ها | ۱۶ |
| ۱-۲-۴-۱ ساختمان اول زنجیره های گلوبین | ۱۶ |
| ۲-۲-۴-۱ ساختمان دوم زنجیره های گلوبین | ۱۸ |
| ۳-۲-۴-۱ ساختمان سوم و چهارم زنجیره های گلوبین | ۱۹ |
| ۳-۴-۱ ارتباط ساختار و عملکرد هموگلوبین در ماهی ها | ۲۱ |
| ۴-۴-۱ تنظیم آلوستریکی | ۲۳ |
| ۵-۴-۱ میل ترکیبی اکسیژن با هموگلوبین ماهی | ۲۶ |
| ۱-۵-۴-۱ اثر غلظت دی اکسید کربن و pH | ۲۶ |
| ۲-۵-۴-۱ اثر دما | ۲۷ |
| ۳-۵-۴-۱ اثر فسفات آلی | ۲۷ |
| ۵-۱ کموتریکس | ۲۸ |

| | |
|----|--|
| ۳۲ | ۶-۱ اهداف پژوهش حاضر |
| ۳۴ | فصل دوم:..... |
| ۳۴ | مروری بر ادبیات تحقیق و پیشینه تحقیق |
| ۳۵ | ۱-۲ مروری بر تحقیقات انجام شده در رابطه با هموگلوبین ماهی |
| ۳۵ | ۱-۱-۲ مروری بر مطالعات انجام شده در جهان |
| ۴۰ | فصل سوم: روش اجرای تحقیق |
| ۴۱ | ۱-۳ مواد |
| ۴۲ | ۲-۳ روشها |
| ۴۲ | ۱-۲-۳ تهیه نمونه خون و استخراج هموگلوبین |
| ۴۳ | ۲-۲-۳ روش تهیه کیسه دیالیز |
| ۴۳ | ۳-۲-۲ مطالعات الکتروفورز |
| ۴۳ | ۱-۳-۲-۳ الکتروفورز ژل SDS |
| ۴۶ | ۲-۳-۲-۳ الکتروفورز طبیعی |
| ۴۷ | ۳-۳-۲-۳ الکتروفورز کانونی |
| ۴۸ | ۴-۲-۳ مطالعات کروماتوگرافی به روش تعویض یونی |
| ۵۰ | ۵-۲-۳ مطالعات طیف سنجی مرئی-فرابنفش |
| ۵۰ | ۶-۲-۳ طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی (CD) |
| ۵۱ | ۷-۲-۳ مطالعات طیف سنجی فلورسانس |
| ۵۱ | ۸-۲-۳ روش اندازه گیری درصد اشباع هموگلوبین |
| ۵۳ | ۹-۲-۳ مطالعات کالریمتری روبشی افتراقی |
| ۵۴ | ۱۰-۲-۳ روش اندازه گیری تجمع پروتئین ها |
| ۵۵ | ۱۱-۲-۳ تیتراسیون هموگلوبین با دو دسیل تری متیل آمونیوم برماید (DTAB) |
| ۵۵ | ۱۲-۲-۳ روش اندازه گیری غلظت گونه های Met, Deoxy, Oxy هموگلوبین |
| ۵۶ | ۱۳-۲-۳ تحلیل های کمومتریکس |
| ۶۱ | فصل چهارم: تجزیه و تحلیل داده ها |
| ۶۲ | ۱-۴ مقدمه |

| | | |
|-------|--|----|
| ۱-۴ | مشخصات ساختاری و عملکردی هموگلوبین گونه های ماهیان خاویاری مورد مطالعه | ۶۲ |
| ۱-۱-۴ | استخراج و خالص سازی هموگلوبین ها و ارائه روش هایی برای اثبات تخلیص | |
| ۶۲ | هموگلوبین غالب | |
| ۱-۴-۲ | تعیین غلظت هموگلوبین ها | ۶۸ |
| ۱-۴-۳ | مطالعات فلورسانس انجام شده بر روی هموگلوبین ها | ۶۹ |
| ۱-۴-۴ | مطالعات دورنگ نمایی دورانی بر روی هموگلوبین ها | ۷۰ |
| ۱-۴-۵ | روش اندازه گیری منحنی اشباع هموگلوبین ها با استفاده از دی تیونیت | ۷۱ |
| ۲-۴ | مطالعه مقایسه ای فرایند واسرشته شدن هموگلوبین های مورد مطالعه به وسیله دو دسیل تری متیل آمونیوم بروماید بر اساس تحلیل های کموتریکس | ۷۲ |
| ۱-۲-۴ | مطالعات کالریمتری روبشی افتراقی (DSC) | ۷۳ |
| ۲-۲-۴ | مطالعات تجمع هموگلوبین ها | ۷۴ |
| ۳-۲-۴ | مطالعات کموتریکس | ۷۵ |
| ۳-۴ | تاثیر دو دسیل تری متیل آمونیوم بروماید (DTAB) بر گونه های هموگلوبین ماهی ازون | |
| ۷۷ | برون و ماهی قره برون دریای خزر | |
| ۱-۳-۴ | بررسی اثر DTAB بر هموگلوبین های قره برون و ازون برون بوسیله طیف سنجی | |
| ۷۸ | مرئی - فرابنفش | |
| ۲-۳-۴ | بررسی اثر DTAB بر هموگلوبین های ماهی قره برون و ماهی ازون برون بوسیله | |
| ۸۳ | طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی | |
| ۸۵ | فصل پنجم: نتیجه گیری و پیشنهادات | |
| ۹۲ | فهرست منابع | |
| ۱۰۲ | چکیده انگلیسی | |
| ۱۰۳ | طرح روی جلد به زبان انگلیسی | |

فهرست شکل ها و جدول ها

- شکل ۱-۱ ساختار فروپروتوپورفیرین IX (هم b) جزء آهن فرو $[Fe^{2+}]$ گروه هم. ۱۸.....
- شکل ۲-۱ ساختار یک ماریچ آلفا..... ۱۹.....
- شکل ۳-۱ ساختار چهارم هموگلوبین ماهی قزل آلاي رنگين کمان *Oncorhynchus mykiss* با چهار زنجيره گلوبين، ۲ زنجيره آلفا و ۲ زنجيره بتا که هر زنجيره یک هم دارند. ۲۰.....
- شکل ۴-۱ یک ديمر هموگلوبين لامپري در حالت دی اُکسي که در آن زنجيره ی آلفا به همراه هم مشاهده می گردد. ۲۱.....
- شکل ۵-۱ فرآيند دوطرفه ی اتصال اکسيژن به هموگلوبين و جدا شدن از آن ۲۵.....
- شکل ۶-۱ ارتباط کمومتریکس با ديگر شاخه های علوم ۲۹.....
- شکل ۷-۱ تقسيم بندي روش های مختلف کمومتریکس ۳۰.....
- شکل ۱-۴ کروماتوگرام حاصل از خالص سازی هموگلوبين های ماهی قره برون..... ۶۴.....
- شکل ۲-۴ کروماتوگرام حاصل از خالص سازی هموگلوبين های ماهی ازون برون..... ۶۵.....
- شکل ۳-۴ الکتروفورز SDS-PAGE بر روی هموگلوبين ها. ۶۶.....
- شکل ۴-۴ الکتروفورز Native -PAGE بر روی هموگلوبين ها..... ۶۷.....
- شکل ۶-۴ طيف بدست آمده از دستگاه طيف سنج مرئی- فرابنفش برای سه نمونه هموگلوبين انسان، ماهی ازون برون و ماهی قره برون در شرايط استاندارد و دمای $25^{\circ}C$ ۶۸.....
- شکل ۷-۴ نمودار طيف فلورسانس ذاتی هموگلوبين غالب ماهی ازون برون، قره برون و انسان. ۶۹.....
- شکل ۸-۴ نمودار طيف فلورسانس اتصال ANS به هموگلوبين غالب ماهی ازون برون، قره برون و انسان.. ۷۰.....
- شکل ۹-۴ نمودار طيف CD مربوط به هموگلوبين ها..... ۷۱.....
- شکل ۱۰-۳ شکل منحنی تغييرات تمايل هموگلوبين ها به اکسيژن ۷۲.....
- شکل ۱۱-۳ ترموگرام DSC واسرشتگی حرارتی هموگلوبين ها را نشان می دهد. ۷۴.....
- شکل ۱۲-۳ اندازه گیری تجمع هموگلوبين ۷۴.....
- شکل ۱۳-۳ پروفایل طيف هموگلوبين ماهی قره برون..... ۷۵.....
- شکل ۱۴-۳ پروفایل طيف هموگلوبين ماهی ازون برون..... ۷۶.....
- شکل ۱۵-۳ پروفایل غلظتی هموگلوبين ماهی قره برون ۷۷.....
- شکل ۱۶-۳ پروفایل غلظتی هموگلوبين ماهی ازون برون ۷۷.....

- شکل ۳-۱۷ طیف حاصل از طیف سنجی مرئی-فرابنفش که از تیتراسیون DTAB بر هموگلوبین ماهی قره برون بدست آمده است. ۷۹
- شکل ۳-۱۸ طیف حاصل از طیف سنجی مرئی-فرابنفش که از تیتراسیون DTAB بر هموگلوبین ماهی ازون برون بدست آمده است. ۸۰
- شکل ۳-۱۹ تاثیر تیتراسیون DTAB بر روی هموگلوبین ماهی قره برون و تغییرات درصد گونه های هموگلوبین این ماهیان. ۸۲
- شکل ۳-۲۰ طیف های CD که در اثر تیتراسیون هموگلوبین ماهی ازون برون با DTAB بدست آمده است. ۸۳
- شکل ۳-۲۱ طیف های CD که در اثر تیتراسیون هموگلوبین ماهی قره برون برون با DTAB بدست آمده است. ۸۴
- شکل ۵-۱ ارتباط افزایش عمق و تاثیر آن بر میزان فشار جزئی اکسیژن و نیتروژن. ۸۶
- شکل ۵-۱ میانگین تغییرات فصلی دما، شوری و pH با افزایش عمق در ناحیه جنوبی دریای خزر ۸۹

چکیده

تنوع هموگلوبین که به عنوان یک شاخص مهم در ماهی ها، این جانوران را قادر می سازد تا خود را با شرایط مختلف و متغیر محیطی سازگار کنند. در پژوهش جاری خواص ساختاری و عملکردی هموگلوبین دو گونه از ماهیان خانواده ی تاسماهیان *Acipenser stellatus* و *Acipenser persicus* ساکن در بخش جنوبی دریای خزر مورد مطالعه قرار گرفته است. پس از جدا سازی و خالص سازی هموگلوبین خون این ماهیان، با استفاده از روش های الکتروفورز ژل SDS، الکتروفورز طبیعی، و الکتروفورز کانونی تنوع هموگلوبین در این ماهیان را تأیید شد. با استفاده از کروماتوگرافی به روش تعویض یونی روی ستون CM-cellulose یک هموگلوبین غالب خالص سازی گردید و صحت خلوص توسط روش های الکتروفورز کانونی و الکتروفورز ژل SDS تأیید گردید. مطالعات طیفی با استفاده از طیفسنجی فلورسانس برای مقایسه آبگریزی سطح هموگلوبین ها و بوسیله دورنگ نمائی دورانی (CD) برای مقایسه ای زیر ساختارهای مارپیچ آلفا از ساختمان دوم زنجیره های گلوبین صورت گرفت. همچنین از طیفسنجی مرئی-فرابنفش (UV-Vis) برای اندازه گیری تمایل هموگلوبین ها به اکسیژن در حضور سدیم دیتیونیت استفاده شد. همچنین هموگلوبین های غالب خالص سازی شده برای آزمایشات بیشتری مورد استفاده قرار گرفتند. در این راستا رفتار هموگلوبین ها در فرآیند واسرشته شدن بوسیله تیتراسیون با دو دسیل تری متیل آمونیوم برماید (DTAB) توسط طیفسنجی مرئی _ فرابنفش و دورنگ نمائی دورانی و همچنین مطالعه بر روی گونه های مختلف این هموگلوبین ها و مقایسه درصد اکسی، دی اکسی و مت انجام گرفت. همچنین روند واسرشته شدن گرمائی هموگلوبین ها با استفاده از روش کالریمتری روبشی افتراقی (DSC) و نیز روند تجمع پروتئین در حضور دی تیو تری تول (DTT) بوسیله ی طیفسنجی مرئی_فرابنفش مورد بررسی قرار گرفت مجموعه ی نتایج حاصل از آزمایشات و تحلیل های فوق، در این رساله موید این فرضیه بود که می توان ارتباطی معنی دار بین توانائی ورود ماهی به اعماق بیشتر، فشار جزئی اکسیژن در اعماق مختلف و تفات های ساختاری هموگلوبین ها از نظر فشردگی ساختار، تمایل به اکسیژن و پایداری آنها برقرار نمود.

واژگان کلیدی:

ماهیان خاویاری (تاسماهیان)، آبگریزی، مارپیچ آلفا، تمایل به اکسیژن، کمومتریکس

فصل اول:

کلیات تحقیق

۱-۱ مقدمه

ماهیان خاویاری که از با ارزش ترین ماهیان تجاری جهان می باشند، بیشتر از ۳۱۰ میلیون سال است که با سازگاری با محل زیست شان توانسته اند نسل خود را حفظ نمایند و امروزه به عنوان فسیل های زنده شناخته می شوند. در گذشته این ماهیان در نیمکره شمالی زمین پراکندگی بیشتری داشتند ولی به علت از بین رفتن زیستگاه و تغییرات اکولوژیک محیط زیست، صید بی رویه و غیره امروزه محدود به دریاچه خزر، آزوف، اورال و دریای سیاه می باشند. هر چند بطور محدود و پراکنده در اروپا و آمریکا نیز گونه هایی از آنها یافت می شود. در این میان دریاچه خزر و مخصوصا سواحل جنوبی آن، به لحاظ موقعیت ممتاز خود زیستگاه اصلی تاسماهیان بشمار می رود، به طوریکه ۹۰ درصد صید جهانی ماهیان خاویاری در این دریا صورت می گیرد. نظر به اهمیت جایگاه این ماهیان برای کشورمان، مطالعات جامع بر روی ساختار و عملکرد هموگلوبین دو گونه از با ارزش ترین این ماهیان، یعنی قره برون و اوزون برون به عنوان موضوع این رساله انتخاب شده است. در این فصل ابتدا به معرفی تاسماهیان (ماهیان خاویاری) و ویژگی های بیولوژیک و سیستماتیک آنها پرداخته خواهد شد. این اطلاعات در مورد گونه های مورد مطالعه در این رساله با جزئیات بیشتری عرضه خواهند گردید. همچنین خصوصیات محیطی و جغرافیائی دریای خزر به عنوان زیستگاه اصلی این ماهیان معرفی می گردد. پس از آن اطلاعاتی در مورد ویژگی های خون ماهیان و هموگلوبین و نقش آن به صورت عام و هموگلوبین ماهیان به صورت خاص عرضه می گردد. همچنین ضمن بررسی ساختار اول تا چهارم پروتئین گلوبین در ماهیان، ارتباط بین ساختار و عملکرد هموگلوبین در این جانوران مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

تنظیمات آلوستریکی و میل ترکیبی اکسیژن با هموگلوبین ماهی ها و اثر غلظت دی اکسید کربن و pH، دما، و فسفات های آلی بر این میل ترکیب توضیح داده خواهند شد.

انجام مروری کلی بر مطالعات و تحقیقات انجام شده در حوزه بررسی خواص و عملکرد هموگلوبین ماهی ها و چندگانگی هموگلوبین در این موجودات، با رویکردی بیو فیزیکی _ بیوشیمیائی، بخش بعدی این فصل را تشکیل می دهد. در پایان مقدمه ای بر علم کمومتریکس، به عنوان یکی از ابزارهای مطالعه ی قدرتمند مورد استفاده در این رساله عرضه خواهد گردید.

۱-۲- تاسماهیان (ماهیان خاویاری)

۱-۲-۱ معرفی سیستماتیک و بیولوژیک تاسماهیان

خانواده تاسماهیان (*Acipenseridae* – Sturgeons) از سلسله جانوران (*Animalia*)، شاخه مهره داران (*Chordata*)، رده ماهیان باله شعاعی (*Actinopterygii*)، راسته تاسماهی شکلان (*Acipenseriformes*) می باشند. افراد این خانواده دارای نوعی علایم ساده و بعضی خصایص قدیمی در ساختار تشریحی خود هستند. این خانواده با شبه تاسماهیان (*polyodontidae*) و یک خانواده فسیلی از بین رفته (*chondrosteidae*) متعلق به راسته ی تاسماهی سانان *Acipenseriformes* هستند. این راسته به علاوه ی تعداد زیادی راسته های فسیلی در فوق راسته ماهیان غضروفی - استخوانی (*chondrostei*) قرار دارند که دارای باله دمی با شکافی عمیق اند که بخش بالایی این باله درازتر و کشیده تر از بخش پایینی آن است. خانواده ماهیان خاویاری دارای چهار جنس به شرح زیر می باشند (کیوان، ۱۳۸۱، وثوقی و مستجیر، ۱۳۷۵):

- جنس فیل ماهی *Huso*: دارای پوزه ی گرد، سبیلک های پهن و دهان هلالی شکل بزرگ و سوراخ اسپیراکولوم می باشد.
 - جنس تاسماهی *Acipenser*: دارای پوزه ی معمولاً گرد، سبیلک های کم عرض و دهان نسبتاً کوچک و سوراخ اسپیراکولوم می باشد.
 - جنس پاروپوزه *Scaphirhynchus*: دارای پوزه پهن با حاشیه تیز، ساقه دمی بلند و دارای صفحات استخوانی می باشد. این جنس یا فاقد سوراخ اسپیراکولوم می باشد یا در صورت وجود رشد کمی کرده است.
 - جنس پاروپوزه نما *Pseudoscaphirhynchus*: دارای پوزه پهن با حاشیه تیز، ساقه دمی کوتاه و کاملاً پوشیده شده از صفحات استخوانی می باشند. این جنس نیز یا فاقد سوراخ اسپیراکولوم می باشد و یا در صورت وجود رشد کمی کرده است.
- این ماهیان دارای گانوییدهای^۱ غضروفی بوده و در مقایسه با ماهیان رده های بالاتر دارای اختصاصات ساختمانی ساده همراه با ریخت ظاهری قدیمی هستند. تحقیقات نشان داده است که اسکلت آنها بیشتر شامل سلول های استخوانی است و سلول های غضروفی نسبت کمتری را دارا هستند. بنابراین رده آنها را ماهیان استخوانی غضروفی نامیده و در دسته ماهیان استخوانی قرار می گیرند (وثوقی و مستجیر، ۱۳۷۳). گواه این امر مجموعه و اسکلت غضروفی آنها است (کیوان، ۱۳۸۱).

^۱ Ganoid

بخشی از این ماهیان در آبهای شور دریا زندگی می کنند ولی جهت تخم ریزی و زاد و ولد وارد آب شیرین رودخانه ها می شوند و بخشی دیگر در آب شیرین رودخانه ها و مصب ها به سر می برند. از این خانواده دو جنس فیل ماهی *Huso* و تاسماهی *Acipenser* در آب های دریاچه خزر یافت می شود و واجد اسپیراکولوم و آبشش کاذب هستند. در جنس فیل ماهی غشاء های آبششی بهم چسبیده و در عقب ایجاد یک چین یا تاخوردگی آزاد می کنند. پوزه در آنها کوتاه با مقطع گرد است. دهان خیلی بزرگ و هلالی شکل و سیل ها از پهلو مسطح هستند (کیوان، ۱۳۸۱).

۱-۲-۲ مشخصات کلی جنس تاسماهی (*Acipenser*)

بدن این ماهیان کشیده، دراز، دوکی شکل و پوشیده از ۵ ردیف طولی از پلاک های استخوانی است که یک ردیف آنها پشتی، دو ردیف پهلوئی و دو ردیف دیگر شکمی هستند. در بین این ردیف ها معمولا دانه های کوچک و بزرگ و برجستگیهای استخوانی پوستی نامنظم دیگری مشاهده می شود (Probst and Cooper, 1955). پوزه این ماهیان کشیده، مخروطی و یا کم و بیش پارویی است. ستون مهره ها غضروفی استخوانی است که در انتهای بدن وارد شاخه بالایی دم می شود (Bemis and Kynard, 2002, Birstein, 1993, Carr et al., 1996, Vladykov, 1955). سرافراز و اکبریان، ۱۳۸۴). باله پشتی در بخش عقبی بدن قرار دارد. اولین شعاع باله سینه ای سخت و نوک تیز است. سر پوشیده از پلاک های استخوانی با منشا پوستی است. دهان استوانه ای، زیرین و در عرض سر قرار دارد و در بالغین بدون دندان که به شکل خرطومی با قابلیت جهش به طرف جلو در داخل حفره در زیر سر است. در زیر پوزه این ماهیان چهار عدد زائده به نام سیل به طور عرضی در جلوی دهان قرار دارد. در هر طرف سر یک سوراخ بینی مقدم بر چشم همان طرف وجود دارد. این ماهیان فاقد غشاء زیر حلق و شعاعهای این غشاء^۲ هستند (سرافراز و اکبریان، ۱۳۸۴، کیوان، ۱۳۸۱). باله دمی هتروسرکال (ناجوردم)^۳ است و گاهی هم فلس های لوزی شکل گانویید روی آنها دیده می شود (Bemis and Kynard, 2002). در هر طرف سر یک شکاف آبششی وجود دارد که سرپوش آبششی آن را پوشانده است. این ماهی ها اسکلتی غضروفی استخوانی دارند اما ساختمان جمجمه آنها اختصاصا غضروفی است. مخروط سرخرگی در این ماهیان دیده می شود. کیسه شنا در آنها ساده و با روده ارتباط دارد (Bemis and Kynard, 2002, Birstein, 1993, Carr et al., 1996, Vladykov, 1955).

^۲ Branchiostegal rays

^۳ Heterocercal Caudal

در ماهیان متعلق به این جنس غشاء زیر چانه به شکاف بین کمان های آبششی چسبیده و چین خوردگی غشایی آزاد بین آنها دیده نمی شود.

شکاف دهان متوسط بوده و به طور عرضی در زیر سر قرار گرفته است. در این ماهی ها سیبک ها تقریباً استوانه ای اند و مقطع گرد دارند.

در جنس تاسماهیان غشاء های آبششی بین خود به هم متصل هستند. بیشتر تاسماهیان مهاجر به رودخانه یا آنادروموس^۴ می باشند که بیشتر در نیمکره شمالی پراکنده شده اند (v.i.kozlov, 1376). عموماً این ماهیان بیشترین تراکم را در مناطق فلات قاره دریاچه خزر دارند و در رودخانه ولگا، تجن، گرگان رود، اورال و کورا دیده می شوند (اصلان پرویز، ۱۳۷۲).

صید آنها با دام گوشگیر با چشمه ۱۰^{cm} مخصوص ازون برون و چشمه ۱۵^{cm} مخصوص سایر تاسماهیان صورت می گیرد. عرض رودخانه در دو یا سه ردیف با دام مسدود و دو سر دام با چوب در دو طرف رودخانه بسته شده و قسمت بالایی دام با کرف در سطح آب قرار گرفته و پایین آن با سرب در کف رودخانه قرار می گیرد.

فیل ماهی، قره برون، ازون برون، تاس ماهی روسی (چالباش)، ماهی شیب ۵ گونه تاسماهیان آب های دریاچه خزر هستند، که به شرح کامل دو گونه ازون برون و قره برون که ماهیان مورد مطالعه در این رساله هستند، بسنده می کنیم.

۱-۲-۲-۱ قره برون (تاسماهی ایرانی) (*Acipenser persicus*)

سیاه بینی - دراکول - تیریج - تاس ماهی ایرانی - سگ ماهی - ماهی خاویار - سترا از اسامی این ماهی است که در کشور های حاشیه خزر به کار می رود. در روسیه پرسیدسکی، در ترکمنستان نیارا، در آذربایجان نرسی و در قزاقستان پارسی بکرسی نامیده می شود. این ماهی در زبان انگلیسی Persian Sturgeon خوانده می شود. همانطور که از ظاهر کلمه persicus هم پیداست این ماهی بطور عمده در خزر جنوبی و به ویژه سواحل ایران یافت می شود و *Acipenser persicus* نامیده شده است (Kottelat and Freyhof, 2007). سرافراز و اکبریان، ۱۳۸۴).

استروژن ایرانی بدنی سیلندری شکل، باریک و کشیده و به نسبت سری باریک و طویل دارد. پوزه تقریباً ضخیم بوده و حالتی افتاده به خود گرفته است. باله های سینه ای ماهی نسبتاً کوچک و تنها دارای یک شعاع سخت هستند. معمولاً بین صفحات استخوانی پشتی - جانبی و گاهی بین صفحات استخوانی جانبی -

⁴ Anadromous

شکمی این ماهی ۱ تا ۴ ردیف پلاک استخوانی دیده می شود که بطور طولی آرایش یافته اند. تعداد شعاع های باله پشتی و باله شکمی به ترتیب ۳۰-۴۹ و ۱۸-۳۲ عدد گزارش داده شده است. تعداد خارهای آبششی این ماهی ۱۵-۳۶ و شمار صفحات استخوانی پشتی ۷-۱۹ عدد، جانبی ۲۳-۵۰ عدد و شکمی ۷-۱۳ عدد بدست آمده است. ماده ها در مقایسه با نرها ی هم سن طول و وزن بیشتری دارند. سطح پشتی بدن این ماهی معمولا خاکستری - آبی و در مواردی آبی تیره است که در طرفین آبی براق، با درخششی فلز مانند دیده می شود. سر در مقایسه با پشت کم رنگ تر بوده و صفحات استخوانی نیز به نسبت زمینه ای که در آن قرار گرفته اند کم رنگ تر دیده می شوند. این صفحات در بالغین زرد کم رنگند و در نمونه های جوان رنگی بین طلایی و مسی دارند. شکم در بیشتر موارد سفید خالص است و گاهی متمایل به زرد هم دیده شده است. متوسط طول این ماهی در حدود ۲۲۸ سانتی متر بوده و در مواردی تا ۲۵۰ سانتی متر هم گزارش شده است. وزن این ماهی نیز ممکن است تا ۷۰ کیلوگرم افزایش یابد (Vecsei and Artyukhin, 2001). این گونه خاویاری بطور عمده در دریای خزر پراکنش یافته است. البته مهاجرت هایی هم به بخش های شمالی و به ویژه قسمت جنوبی رود کورا در آذربایجان و رودهای ایران در این ماهی دیده شده است. به علاوه گزارش هایی در دست است که ورود قره برون به کورا، ولگا و اورال و به نسبت کمتر سایر رودها همچون اترک، سولاک و سامور را تأیید می کند. ماهی خاویاری ایرانی علاوه بر دریای خزر در بخش های شرقی دریای سیاه نیز دیده شده است. قره برون در آب های شمالی ایران از رود آستارا در غرب گرفته تا رود گرگان در شرق دیده شده است. نمونه هایی نیز در سفید رود، شلمان، گلشن، تالار، لنگرود، چاف، یوسف آباد، ده کاه، پل رود، سرخ رود، فریدون کنار، تجن، نکا، پالارود، بابل رود، که همگی در مناطق شمالی ایران قرار دارند مشاهده شده است (Armantrout, 1980). این گونه عمدتاً در بخش های جنوبی دریای خزر یافت می شود و در شرقش بیشتر است و در منطقه سواحل غربی خزر میانی دیده می شود زیرا این گونه آب گرمتر را ترجیح می دهد. پراکنش آنها بطور عمده در منطقه فلات قاره و در اعماق ۵۰ متری می باشد (اصلان پرویز، ۱۳۷۲). این گونه جانوری بر بستر های تشکیل یافته از گل ولای دریا که در مواردی با ماسه مخلوط شده اند و در محدوده دمایی ۴/۱ تا ۲۸/۰ درجه سانتیگراد و شوری ۸/۵۹ تا ۱۴/۲ ‰ یافت می شود (Vecsei and Artyukhin, 2001). قره برون در مقایسه با سایر استروژن ها در مقابل نوسانات شوری مقاومت کمتری از خود نشان می دهد و به همین دلیل آب خزر از نظر این جانور ارجحیت دارد. ضمن اینکه گونه ی مورد بحث در مقابل سطوح اکسیژن پایین بسیار حساس است (Legeza, 1972). این ماهی برای تخم ریزی رودخانه های خروشان را ترجیح می دهد و برای این منظور گاهی فاصله های زیادی را در مهاجرت خود به مناطق مناسب زاد آوردی طی می کند.

متوسط سرعت حرکت این جانور به هنگام مهاجرت به رود کورا ۲۲/۶ کیلومتر در روز گزارش شده است. این ماهی در بیشتر موارد اندکی پس از تخم ریزی به دریا باز می گردد و در مواردی ممکن است یکسال یا بیشتر در آب شیرین باقی بماند، با این وجود نهایتاً به دریا باز می گردد. لاروهای حاصل از تخم های شکفته شده^۵ نیز بلافاصله به سمت پایین دست رودخانه حرکت می کنند. میانگین طول یک ماده و نر پانزده ساله به ترتیب ۱۲۳ و ۱۲۲ سانتی متر است. اغلب ماهیان (۸۲ درصد نمونه ها) بین ۱۴ تا ۳۲ سال بوده است. سن بلوغ نیز در نرها بین ۸ تا ۱۵ سالگی و در ماده ها بین ۱۲ تا ۱۸ سالگی متغیر است (Markarova et al., 1991) و طول عمر بیشینه در این ماهیان ۴۸ سال عنوان شده است. رژیم غذایی این ماهی را نرم تنان، سخت پوستان از جمله گونه ای از خرچنگ ها به نام *Rhithropanopeus harrisii*، کرم ها، شیرونومیدها، ماهیان کوچکی همچون گاوماهیان (از خانواده *Gobiidae*) و شاه ماهیان کوچکی چون گونه هایی از جنس *Clupeonella* تشکیل می دهند. ماهی بخش عمده ای از غذای استروژن های جوان ساکن آب دریا را تشکیل می دهد.

نمونه های بالغ ایرانی عمدتاً ماهی و به ویژه گاوماهی و پس از آن سخت پوستان دوکفه ای همچون *Abra ovate* و *Cerastoderma umbonatum* را برای تغذیه ترجیح می دهند (Babushkin and Borzenko, 1951). تخم ها به رنگ خاکستری-قهوه ای بوده و قطر آنها بین ۳/۲ تا ۳/۸ میلیمتر محاسبه شده است. تخم ریزی هنگامی صورت می گیرد که آب دمایی حدود ۱۵ تا ۲۵ درجه سانتی گراد داشته باشد. تخم ریزی در مناطق شنی سنگریزه ای و رسی و در مواردی بسترهایی که از بقایای جانوران آبی (shell beds) حاصل آمده در عمق ۲ تا ۲۰ متری آب جاییکه جریانی در حدود ۱ تا ۱/۷ متر بر ثانیه دارد صورت می گیرد. سفید رود مهم ترین منطقه تخم ریزی این ماهی در ایران به حساب می آید (اصلان پرویز، ۱۳۷۲). با این وجود تخم ریزی در بخش قابل ملاحظه ای از رودخانه های خزر جنوبی و حد فاصل ماه های آوریل تا ژوئن (فروردین تا اواسط تیر) و پس از وقفه ای یکماهه در اوت و سپتامبر (شهریور) انجام می گیرد. دلیل این وقفه تابستانی را می توان دمای بالای آب در حدود ۲۶ تا ۳۰ درجه سانتی گراد عنوان کرد. با گذشت ۸۲ تا ۸۷ ساعت از زمان لقاح جنین های درون تخم به مرحله شکفتگی می رسند و ۶ روز پس از شکفتگی کیسه زرده جذب شده و نهایتاً ۷ تا ۸ روز پس از آن بچه ماهیانی که قادرند شنا کنند پدیدار می شوند (کیوان، ۱۳۸۱).

⁵ hatch

۱-۲-۲-ازون برون (*Acipenser stellatus*)

اسامی رایج در ایران به نام های ازون برون (پوزه دراز) دراکول، تیریچ، سوروگا، سگ ماهی و ماهی خاویاری شناخته می شود. در زبان روسی سوروگا، در قزاقستان شوکر، در ترکمنستان تیرنا، و در آذربایجان ازون برون و در زبان انگلیسی استروژن ستاره ای نامیده می شود. کلمه *stellatus* ریشه لاتین داشته و به معنای پوشیده با ستارگان است. از آنجا که بدن ازون برون از صفحات ستاره ای شکل پوشیده شده است این ماهی به این نام خوانده می شود.

این گونه با پوزه دراز و شمشیر مانند و نوک برجسته ای که دارند از سایر گونه ها متمایز می شود (سرافراز و اکبریان، ۱۳۸۴). بدن دوک مانند و کشیده، لب پایین در وسط چاکدار، و سبیلک ها کوتاهند و حالت ریشریش ندارند و به دهان نزدیکترند تا به نوک پوزه. باله پشتی شکافدار است و باله ی مخرجی دارای لبه ضخیم و همچنین کمی برجسته است. تعداد شعاع های باله پشتی ۳۸-۵۴ شعاع های باله مخرجی ۲۰-۴۰ عدد شمارش شده است. تعداد صفحات استخوانی پشتی ۹-۱۶ صفحات جانبی ۲۶-۴۳ صفحات شکمی ۹-۱۴ تعداد خارهای آبششی ۲۴-۲۹ عدد گزارش شده است. همچنین بین ردیف های اصلی صفحات استخوانی ستاره ای شکل کوچکی دیده می شود. رنگ پشت طوسی _ خاکستری یا قهوه ای دارچینی است. اما در بعضی از نمونه ها پشت سیاه رنگ و با نزدیک شدن به سمت شکم به سفید متمایل می شود. پهلوی ها سفید مایل به زرد است و در تعدادی از ماهی های کوچک صفحات از سایر قسمت های بدن روشن تر بوده و بنابراین کاملاً متمایزند. به طور کلی ماهیان دریایی تیره تر از انواع رودخانه ای هستند. حداکثر طول و وزن ممکن برای این ماهی به ترتیب ۲۲۰ سانتی متر و ۸۰ کیلوگرم عنوان شده است. البته نمونه های صید شده در ایران عموماً ۱۳۰-۱۴۰ سانتی متر طول و ۹-۱۰ کیلو گرم وزن داشته اند. این گونه در دریای آدریاتیک ، اژه، سیاه، خزر و حوزه ی آبریز آنها یافت می شود. با این وجود بزرگترین جمعیت این گونه در دریای خزر ساکن است. این ماهی از رود آستارا در غرب تا گرگان رود در شرق ایران پراکنده است. این نمونه را در سفید رود ، گلشن، چاف ، یوسف آباد، چونه چنان، ده کاه، سرخ رود، تجن و نکارود رصد کرده اند. همچنین مطالعات اخیر حضور ازون برون را در قره سو، بابل رود، هراز، سفید رود، خلیج گرگان، همچنین جنوب شرقی و جنوب غربی و بخش میانی خزر جنوبی بعلاوه تالاب انزلی نشان می دهد. این گونه مانند دیگر ماهیان خاویاری فرم تیپیک بستری^۶ آب های ساحلی و زمین های پست رودخانه ای است (Shorygin, 1952). اما برخلاف سایر گونه ها به میزان بسیار زیادی از لایه های پایینی و بالایی آب استفاده می کند. در طول روز در لایه های بالایی بیشتر دیده شده و شب ها بستر دریا را ترجیح می دهند. پراکنش ازون برون به میزان زیادی به عمق آب ، شرایط بستر و به خصوص پراکندگی

^۶ Benthic

حیوانی که به عنوان طعمه مورد استفاده قرار می گیرد دارد. این ماهی به تعداد زیادی در سواحل شرقی خزر جنوبی دیده شده و در تابستان از بخش جنوبی به آب های شمالی مهاجرت می کند و در اواخر زمستان بویژه در اوایل بهار به سمت سواحل ایران حرکت می کند (Kottelat and Freyhof, 2007). این گونه جانوری در تمام نقاط فلات قاره دریا دیده می شود و عمده ترین اعماق بیش از ۱۵۰-۳۰۰ متری وارد نمی گردد (اصلان پرویز، ۱۳۷۲). این ماهی اکثراً روی بستر شنی پوشیده از صدف تغذیه می کند. بطور کلی محدوده دمایی برای زندگی این ماهی در فصول مختلف بین ۴ تا ۲۹/۵ درجه متغیر است. در ضمن شوری آب نیز بین ۰/۱ تا ۱۴/۶ درصد می باشد. در میان گونه های استروژن این گونه به دلیل فرم فیزیکی خاصی که دارد شناگر خوبی محسوب می شود به طوری که سرعت آب پیمایی آن در رود ولگا تا ۱۱۰ کیلومتر در روز گزارش شده است.

سن بلوغ برای نرها رود کورا ۱۱ تا ۱۳ سال و برای ماده ها ۱۴ تا ۱۷ سال ثبت شده است و جوان ترین نمونه ۸ سال سن داشته است. ماده ها عمر طولانی تری دارند و تا ۴۱ سال عمر می کنند. مانند دیگر ماهیان خاویاری وقفه های تولید مثلی در ازون برون هر ۳ تا ۴ سال است. رژیم غذایی این گونه به ویژگی های بیولوژیکی ماهی و خصوصیات ویژه آب محل زندگی آن بستگی دارد (Shorygin, 1952). ماهی جوان از سخت پوستان و مسن ترها از لاروهای شیرونومید و نمونه های بالغ از ماهی تغذیه می کنند.

ماهیان بالغ در درجه اول از گاوماهیان، کیلکا، صدف *Abra ovate* و *Cerastoderma umbonatum* به عنوان غذای دوم استفاده می کنند. رژیم غذایی این گونه در رودخانه (رودهای ایران) را گامارید^۷ ها، لارو شیرونومید، کرم ها و Mysid ها تشکیل می دهند (Kashentseva, 2001, v.i.kozlov, 1376). ماهی های مولد تغذیه نمی کنند یا بسیار کم تغذیه کرده و هنگام تولید مثل از چربی بدن خود استفاده می کنند. بنابر این باید بلافاصله پس از تولید مثل به بسترهای غذایی دریا برگردند و به همین دلیل در این هنگام روزانه بین ۷۰-۸۰ کیلومتر آب پیمایی می کنند.

ازون برون ماهی مهاجری است که مسافت های زیادی را در دریا برای تغذیه و زمستان گذرانی طی می کند و همچنین برای تولید مثل به رودخانه ها وارد می شود. این ماهیان در خزر برای تخم ریزی به ولگا، اورال، ترک، سولاک، کورا، سفید رود مهاجرت می کند. بلوغ جنسی در ازون برون زودتر از سایر گونه های استروژن اتفاق افتاده و دوره بین تولید مثلی برای نرها کوتاهتر از ماده هاست. ازون برون در مورد نوسانات سطح آب و سرعت جریانات به شدت حساس است و حتی تغییرات بسیار ناچیز در شرایط آب آزادسازی تخم ها را متوقف می کند و موجب می شود ماهی به سمت نقاط عمیق تر رودخانه که شرایط پایدارتری دارد حرکت کند.

⁷ Gammarus

بنابراین تخم ریزی تحت شرایط ثابت هیدرولوژیکی (نوسانات روزانه سطح آب حدود ۰/۵ - ۰/۲ متر) صورت می گیرد. اوج مهاجرت در آبهای ایران در ماه آوریل (فروردین) و در رود کورا هنگام پاییز سپتامبر و اکتبر (شهریور و مهر) مشاهده می شود. مهاجرت پاییزه نسبت به مهاجرت بهار از اهمیت کمتری برخوردار است. در رود کورا مهاجرت بهار با دمای ۱۰ درجه سانتی گراد آغاز شده و در ۱۸ درجه به اوج خود می رسد و البته با گرم شدن آب در تابستان متوقف شده و دوباره در پاییز با سرد شدن آب از سر گرفته می شود.

تخم ریزی در کف رودخانه که دارای آب سریع با جریان آب ۰/۷ تا ۱/۸ متر بر ثانیه می باشد و در مناطق سنگلاخی همراه با قطعات به جا مانده از صدف جانوران و ماسه های زمخت یا بستر با گل سفت و شنهای دانه درشت انجام می شود. تخم ها شکلی کروی یا بیضوی داشته و قطری حدود ۳/۲ میلیمتر دارند و رنگشان خاکستری مایل به قهوه ای است. انکوباسیون در دمای ۲۰ تا ۲۸ درجه سانتی گراد ۴۴ تا ۸۰ ساعت به طول می انجامد. ماهی های جوان معمولاً پس از ۳ تا ۴ ماه و در بعضی جمعیت ها بلافاصله پس از خارج شدن از تخم راهی دریا می شوند. گوشت این ماهی بسیار لذیذ است و خاویار مرغوبی از آن بدست می آید.

۱-۲-۳ خصوصیات محیطی و جغرافیائی دریای خزر

دریاچه خزر، بزرگ ترین دریاچه جهان که در اصطلاح آن را دریا می نامند. دریای خزر با جهتی شمالی - جنوبی حول طول جغرافیایی ۵۰ درجه شرقی امتداد یافته است که پایین ترین حد جنوبی آن در عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۳۳ دقیقه شمالی، و بالاترین حد شمالی آن در عرض جغرافیایی ۴۷ درجه و ۷ دقیقه شمالی قرار دارد. به این ترتیب بین شمالی ترین و جنوبی ترین نقطه ی آن حدود ۱۰ درجه اختلاف عرض جغرافیایی می باشد. عمق این دریاچه در ناحیه شمالی به طور متوسط کمتر از ۱۰ متر، در بخش میانی بین ۱۸۰ تا ۷۸۸ متر و در بخش جنوبی که آب های ساحلی ایران را تشکیل می دهد به ۹۶۰ تا ۱۰۰۰ متر می رسد. تا عمق ۱۰۲۵ متری نیز در ناحیه جنوبی این دریاچه گزارش شده است. در سواحل ایرانی دریای خزر ۳۵۰ رشته رودخانه وجود دارد. مهمترین آنها که دارای اهمیت شیلاتی هستند، عبارتند از رودخانه های سفیدرود، حویق، لیمیر، تنکابن، شلمانرود، تجن، خواجه نفس (گرگانرود)، شیررود. در این میان نقش رودخانه سفیدرود با طول ۷۸۰ کیلومتر برای این منطقه هم از نظر صید و محل زاد و ولد طبیعی انواع ماهیان اقتصادی، و هم از نظر کشاورزی حایز اهمیت است. جنس رسوبات حوضه جنوبی دریای خزر گل و لای آهکی، رسی و کربناتها حاوی صدف دوکفه ایها و شکم پایان می باشد.

۱-۳ خون ماهیان

خون ماهی مانند مهره داران دیگر و بسیاری از بی مهرگان از گلبول های خونی تشکیل شده است که در پلاسما به صورت معلق هستند و در سراسر بافت های بدن گردش می کنند. اجزای سلولی خون، گلبول های قرمز یا اریتروسیت ها^۸ و گلبول های سفید یا لوکوسیت ها^۹ هستند. گلبول های قرمز ماهیان مانند سایر مهره داران غیر پستاندار، هسته دار و معمولاً بیضی شکل و فقط در تعداد محدودی از گونه ها تقریباً کروی دیده می شود و فراوان ترین سلول ها در خون ماهی هستند. این سلول ها حاوی هموگلوبین هستند و وظیفه اصلی آنها حمل اکسیژن از آبشش به بافت هاست (Tocidlowski *et al.*, 1997). تنها مهره دارانی که فاقد هموگلوبین و گلبول قرمز می باشند لاروهای مارماهیان و معدودی دیگر از ماهی های قطب جنوب از خانواده *Chaenichthyidae* می باشند. در لامپری گلبول قرمز کروی و حدود ۹ میکرون قطر دارد. ماهیان الاسموبرانش در مقایسه با ماهیان استخوانی گلبول های قرمز بزرگتری دارند ولی در ماهیان شش دار اندازه گلبول های قرمز از سایر ماهیان بزرگتر است. معمولاً ارتباط معکوسی بین اندازه و تعداد گلبول های قرمز وجود دارد. در اکثر ماهیان استخوانی تعداد گلبول های قرمز در حدود ۲ میلیون عدد در هر میلی متر مکعب متغیر است. هماتوکریت درصدی از حجم کل خون است که شامل گلبول های قرمز می باشد. تعداد گلبول قرمز و در نتیجه میزان هماتوکریت و غلظت هموگلوبین، بر حسب فصل، دما، وضعیت غذایی ماهی متفاوت است. گلبول های سفید نسبت به گلبول های قرمز از فراوانی کمتری برخوردارند و معمولاً تعداد آنها از ۱۵۰۰۰۰ عدد در هر میلی متر مکعب خون کمتر است (Junqueira and Carneiro, 1991). گلبول های سفید چهار نوع هستند که شامل گرانولوسیت ها^{۱۰}، ترومبوسیت ها^{۱۱}، لنفوسیت ها^{۱۲}، مونوسیت ها^{۱۳} می باشند که هر کدام نقش ویژه ای در حیات ماهی بر عهده دارند. تولید سلول های خونی در ماهیان از سلول های بنیادی^{۱۴} هموسیتوپلاست^{۱۵} که شکل تمایز نیافته سلول های خونی می باشد به وجود می آیند. این سلول ها از اندام های گوناگونی نشأت می گیرند و معمولاً بعد از اینکه وارد جریان خون شدند بالغ می شوند.

⁸ erythrocytes

⁹ Leucocytes

¹⁰ Granulocytes

¹¹ Thrombocytes

¹² lymphocytes

¹³ Monocytes

¹⁴ Stem cells

¹⁵ Hemocytoblast

در قزل آلاهی رنگین کمان *oncorhynchus mykiss* اولین گلوبین های جنینی که بیان می شوند در روز ۶ و ۷ جنینی از توده اولیه سلولی که زیر طناب پشتی^{۱۶} قرار دارد به وجود می آیند در حالی که گلوبین های بالغ از سلولهای گلبول قرمز خون در کبد و کلیه منشأ می گیرند (Maruyama et al., 2004).

در هاگ فیش ها محل اصلی خونسازی پوشش مزودرمی است که دور روده را احاطه کرده است (Jordan and Speidel, 1930) در لامپری های بالغ سلول های خونی در بافت چربی قسمت پشتی طناب عصبی ساخته می شوند (Percy and Potter, 1976).

ماهیان الاسموبرانش سلول های خونی را از اندام لایدیک واقع در مری و اندام اپی گونال و طحال تولید می کنند. گلبول های قرمز در بیشتر ماهیان در کلیه و طحال تولید می شود. گلبول های سفید در بسیاری از ماهیان استخوانی در کلیه تولید می شود اما در الاسموبرانش ها، لایدیک این وظیفه را بر عهده دارد. در ماهیان دیگر بافت های مشابه در محل های مختلف از جمله روده، حذقه چشم، پرده های منتر، و قاعده جمجمه قرار دارند. معمولاً حجم خون ماهیان نسبت به مهره داران دیگر کمتر و در ماهیان استخوانی حدوداً بین ۲ تا ۴ میلی لیتر به ازای ۱۰۰ گرم می رسد (ستاری، ۱۳۸۱). در لامپری ها حجم خون بیشتر است و به ۵-۸ میلی لیتر به ازای ۱۰۰ گرم و هاگ فیش ها حتی از این مقدار هم بیشتر است و به ۱۷ میلی لیتر به ازای ۱۰۰ گرم می رسد. در ماهیان الاسموبرانش حجم خون بین ۶ تا ۸ میلی لیتر به ازای ۱۰۰ گرم گزارش شده است. ماهیان استخوانی عالی تر دارای دستگاه عروقی کامل تری هستند. به همین خاطر به خون کمتری برای انتقال اکسیژن و مواد دیگر نیاز دارند.

خون مواد مختلف از جمله یون های غیر آلی و تعدادی از ترکیبات آلی مانند هورمون ها، ویتامین ها و پروتئین های مختلف پلاسما را منتقل می کند. این پروتئین ها شامل دو نوع آلفا گلوبین، دو نوع بتا گلوبین و گاما گلوبین و همچنین آلبومین، ترانسفرین، گلیکوپروتئین ها و پروتئین های دیگر است. این ترکیبات در ایجاد پاسخهای ایمنی معین، ایجاد حالت بافری در مقابل تغییرات pH و حفظ فشار اسمزی نقش دارند (ستاری، ۱۳۸۱).

۴-۱ هموگلوبین

گلبول قرمز مهره داران حاوی هموگلوبین است که یک رنگدانه تنفسی است که بطور گسترده قدرت اتصال اکسیژن به خون را افزایش می دهد و این ترکیب به ترتیب در فرم های مونومریک، دیمریک، و تترامریک از یک، دو، و چهار گلوبین تشکیل شده است که هریک از آنها پروتئینی فاقد رنگ و در برگیرنده ی ماده ای

¹⁶ Notochord

به نام هم می باشد. توانایی متابولیسم هوایی در بدن جانوران توسط هموگلوبین ایجاد می شود. هموگلوبین، اکسیژن حل شده را حمل و ورود آن را به بافت ها تسهیل می کند و به عنوان پذیرنده ی الکترون در واکنش های اکسیداسیون و احیا در بدن موجودات ایفای نقش می کند (Giardina et al., 2004). این پروتئین از دو جنبه ی ساختار و عملکرد مورد مطالعه قرار گرفته است. عملکرد هموگلوبین با توجه به برآورده کردن نیاز های متابولیسم جانور با توجه به تغییرات شرایط محیط زیست آنها بسیار حائز اهمیت می باشد (Riggs, 1976).

۱-۴-۱ هموگلوبین ماهی ها

در بین مهره داران، ماهی ها بیشترین تطابق را با شرایط در رده بندی تکاملی ایجاد کرده اند و این ویژگی مهم سبب شده که آنها با تغییرات شرایط محیط زیست مثل دما، فشار، شوری، و میزان اکسیژن تطبیق پذیری بیشتری نسبت به سایر موجودات داشته باشند و از نظر تنوع^{۱۷} هموگلوبین بیشترین تنوع نسبت به سایر موجودات در ماهیان دیده می شود (Giardina et al., 2004).

بسیاری از ماهی های آمازون زمانی که با کمبود اکسیژن آب روبرو می شوند قدرت گرفتن اکسیژن را به طور مستقیم از هوا دارند که تغییرات آناتومیک در آنها باعث به وجود آمدن این توانایی شده است. این تغییرات شامل تغییرات در آبشش، دهان، معده، روده و عروق کیسه ی شنا [۲۷ و ۲۶] می باشد.

گونه هایی که توانایی این تغییرات در آناتومی خود را نداشته اند مجبورند این نیاز خود در مقابل کمبود اکسیژن را از طریق تغییرات رفتاری و متابولیسم برطرف کنند [۲۸ و ۲۶]. بیشتر این تنظیمات شامل تعداد تنفس و میزان حجم گاز تهویه شده، ضربان قلب و افزایش تعداد گلبول قرمز و هماتوکریت و غلظت هموگلوبین، تغییرات غلظت فسفات آلی و حضور هموگلوبین های مشابه با خواص عملکردی متفاوت و کاهش متابولیسم است [۲۶]. ماهی ها برای حفظ بقاء مجبور هستند با تغییر شرایط محیط، تغییرات میزان اکسیژن را تحمل کنند و آناتومی، فیزیولوژی و تغییرات بیوشیمیایی داخل بدن آنها به این تطابق با تغییرات محیطی کمک می کند. هموگلوبین ماهی ها در انطباق با این شرایط اهمیت ویژه ای دارند (Landini et al., 2002).

به نظر می رسد که این انطباق ارتباط مستقیمی با ساختار هموگلوبین و تمایل لیگاند در گروه پروستتیک هم دارد. هموگلوبین اکسیژن را به صورت ترکیب با آهن فرّوی "هم" انتقال می دهد. این ترکیب قابل برگشت است و انجام آن بستگی به فشار نسبی اکسیژن دارد. برای مثال در کوسه پورت جاکسون^{۱۸} در دمای

¹⁷ Multiplicity

¹⁸ *Heterodontus portjacksoni*

۲۰ درجه سانتی گراد ۹۳٪ از اکسیژنی که توسط خون حمل می شود، به طور قابل برگشت با هموگلوبین ترکیب می شود، در حالی که ۷٪ به طور فیزیکی در پلاسما در حالت اشباع حل می شود (Grigg, 1974). تنها تعداد محدودی از ماهیان فاقد هموگلوبین هستند. برای مثال ماهیان چان ایکتی اید^{۱۹} قطب جنوب و نوزادان لپتوسفالوس^{۲۰} مار ماهیان، خون بی رنگ دارند.

عملکرد هموگلوبین با توجه به میزان سوخت و ساز بدن جاندار و تغییرات زیست محیطی تغییر می کند (Riggs, 1976). در محیط های سردتر، پلاسما افزایش می یابد. در ماهی ترماتوموس برناچی ای^{۲۱} در دمای ۱/۵- درجه سانتی گراد میزان پلاسما به ۱۲٪ می رسد. در واقع، ماهیان یخی کروکودیلی قطب جنوب (خانواده چان ایکتیده) به هیچ عنوان هموگلوبین را در خون خود حمل نمی کنند. ماهیان یخی زنده می مانند زیرا نیاز اکسیژنی سوخت و سازی آنها خیلی پایین است و در عوض میزان اکسیژن محلول محیطی در آبهای دائم سرد قطب جنوب زیاد و مقادیر کافی از ماهیان کوچک و سخت پوستان برای تغذیه وجود دارد (Hemmingsen and Douglas, 1970).

خون ماهی ها اغلب دارای چند هموگلوبین می باشد (Fourie and Van Vuren, 1976,) Fyhn and Sullivan, 1974, Giles and Vanstone, 1976, Houston and Cyr, 1974, (Houston et al., 1976, Ronald and Tsuyuki, 1971). منشأ اصلی این چندگانگی هموگلوبین^{۲۲}، رونویسی زنجیره های هموگلوبین مختلف در جایگاه بیان ژن گلوبین می باشد که در طی تکامل اتفاق افتاده و سبب می شود خواص عملکردی هموگلوبین در پاسخ به واکنشهای محیطی متفاوت گردد. همانند آنچه که در اثر روت و بوهر مشاهده می گردد (de Almeida-Val et al., 1992).

تحقیقات وسیعی در زمینه سازگاری بیوشیمیایی ماهی ها با محیط در مقالات گزارش شده است. بر اساس این تحقیقات ماهی ها از نظر ژنوتیپی^{۲۳} قابیت انعطاف پذیری بالایی دارند. به عنوان مثال آنها قادر هستند که از یک ژن با توجه به تغییرات محیط زیستشان بیان های متفاوتی داشته باشند. این توانایی آنها در به وجود آوردن فرم دو رگه^{۲۴} از آنها به وضوح دیده می شود مثل گونه *Tambacu* که از جنس *pacu* و جنس ماده *Tambaqui* به وجود آمده و از نظر ژنتیکی ویژگی های مشابه به اجداد خود دارد (de Almeida-Val et al., 1992). تکامل در هموگلوبین مهره داران در تحقیقات اهمیت ویژه ای داشته است ولی به علت اینکه در مهره داران عالی دمای فیزیولوژی بدن ثابت می باشد نیاز به سیستم های

¹⁹ Chaenichthyid

²⁰ Leptocephalus

²¹ *Trematomus bernachii*

²² Hemoglobin multiplicity

²³ Genotypic

²⁴ Hybrid

چند هموگلوبینی که در اثر تکامل حاصل گشته از بین رفته است و در ماهیان به سبب وجود این نیاز این اهمیت باقی مانده است.

تکامل هموگلوبین مهره داران در طول زمان دستخوش محدودیت های بسیاری بوده است. تبدیل یک ژن واحد به ژن های عامل بیان زنجیره های آلفا و بتا، تقریباً در ۴۵۰ میلیون سال پیش اتفاق افتاده است. در طول این مدت مدید، تغییرات محیطی شگرفی رخ داده اند. تکامل هموگلوبین در طی این مدت در جهت سازگاری فیزیولوژیکی همگام با تغییرات زیست محیطی بوده است (Brittain, 2005).

۱-۴-۲ ساختار هموگلوبین در ماهی ها

هموگلوبین یک پروتئین گلوبولار^{۲۵}، دارای ساختار چهارم که از زنجیره های پلی پپتیدی تشکیل شده است، می باشد. این زنجیره ها گلوبین نام دارند و هر کدام دارای یک گروه پروستتیک^{۲۶} به نام هم می باشد که در تمام ماهی ها مشخصات یکسانی دارند. به عبارت دیگر گلوبین ها از گونه ای به گونه ای دیگر و حتی در بین همخانواده ها متفاوت هستند. قابل توجه است که گلوبین ها در تمام موجودات زنده ساختار چهارم متنوعی دارند و به غیر از حمل و نقل و ذخیره سازی اکسیژن عملکردهای متفاوتی را به شکل سیتوگلوبین و نوروگلوبین نشان می دهند (Fago et al., 2004, Weber and Fago, 2004). در مهره داران مولکول هموگلوبین از چهار زنجیره گلوبین تشکیل شده است که ایجاد یک تترامر پایدار می کند.

بیشتر ماهی ها مانند پستانداران دارای هموگلوبین تترامر هستند با این تفاوت که ممکن است زنجیره ها دو بدو مشابه و یا هر چهار زنجیره ی پلی پپتید متفاوت باشند (Edelstein et al., 1976, Gillen and Riggs, 1973, Powers, 1980, Ronald and Tsuyuki, 1971, Weber et al., 1976).

۱-۴-۲-۱ ساختمان اول زنجیره های گلوبین

پروتئین ها پلیمر هایی خطی از اسید های آمینه هستند. البته همین زنجیره خطی که ساختمان اول^{۲۷} پروتئین نامیده می شود، در واقع اجزاء تشکیل دهنده ساختار سه بعدی پروتئین را مشخص می کند. بیست نوع اسید آمینه در تشکیل پروتئین ها شرکت دارند.

²⁵ Globular

²⁶ Prosthetic

²⁷ Primary structure

ساختمان اول یکی از عوامل تعیین کننده ی نحوه ی تا شدن پروتئین در فضای سه بعدی است. براونیتز^{۲۸}، کونینگزبرگ^{۲۹} و هیل^{۳۰} ساختار اول گلوبین توالی اسید های آمینه هموگلوبین را به روش اِدمن تعیین کردند. زنجیره های گلوبینی به صورت کووالان و از طریق هیستیدین نزدیک^{۳۱} به اتم آهن هم متصل هستند. هیستیدین نزدیک دارای دو نقش بسیار مهم است:

۱. پایدار کردن هم و کاهش احتمال تفکیک و جدا شدن هم از گلوبین.
۲. تاثیر بر واکنش پذیری و فعالیت آهن هم از طریق تغییر در کشش پیوند خود با هم که به نوبه ی خود مبنای خواص آلوستری هموگلوبین است (White, 1977).

گروه پروستتیک هموگلوبین (هم) از یک ساختار حلقوی تترا پیرولی آهن دار ساخته شده است. این چهار پیرول از طریق پیوند متنی^{۳۲} به همدیگر متصل شده اند. هر حلقه شامل ۴ گروه متیل، ۲ گروه وینیل و ۲ استخلاف پروپیونیک اسید است و به همین جهت متعلق به طبقه فروپروتوپورفیرین IX (هم b) است. مطابق شکل ۱-۱، اتم آهن در گروه هم به طور طبیعی به یکی از دو فرم فرو (Fe^{2+}) و یا فریک (Fe^{3+}) وجود دارد، و دارای هندسه کئوردیناسیون هشت وجهی^{۳۳} و شش جایگاه بالقوه برای اتصال می باشد. نیتروژن های پیرول، چهار جایگاه اتصال را پر می کنند، در حالی که یکی از جایگاه های محوری به وسیله زنجیره جانبی هیستیدین نزدیک اشغال می شود که در همه هموگلوبین های شناخته شده موجود و حفظ شده است (Dickerson *et al.*, 1961). در نهایت ششمین جایگاه، محل اتصال لیگاندها است که به پاکت دور هم معروف می باشد. خواص الکتروستاتیک و حجمی این پاکت، ویژگی و تمایل این جایگاه به لیگاند را تنظیم می کند. اصطلاح پنج کئوردینه^{۳۴} مربوط به حالتی است که ششمین جایگاه خالی باشد و در صورت اتصال لیگاند، اصطلاح شش کئوردینه^{۳۵} به کار می رود.

²⁸ Bravenitz

²⁹ Konigzberg

³⁰ Hill

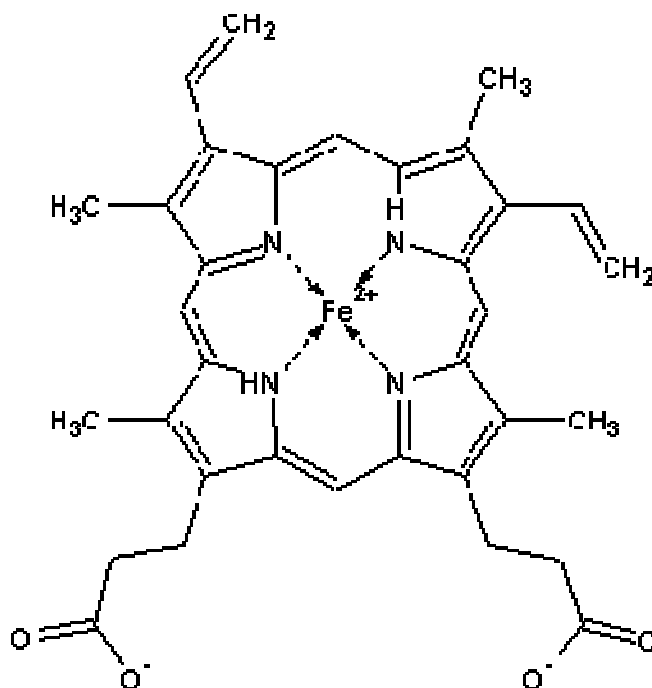
³¹ Proximal histidine

³² Methen bonds

³³ Hexacoordinate

³⁴ Pentacoordinate

³⁵ Hexacoordinate



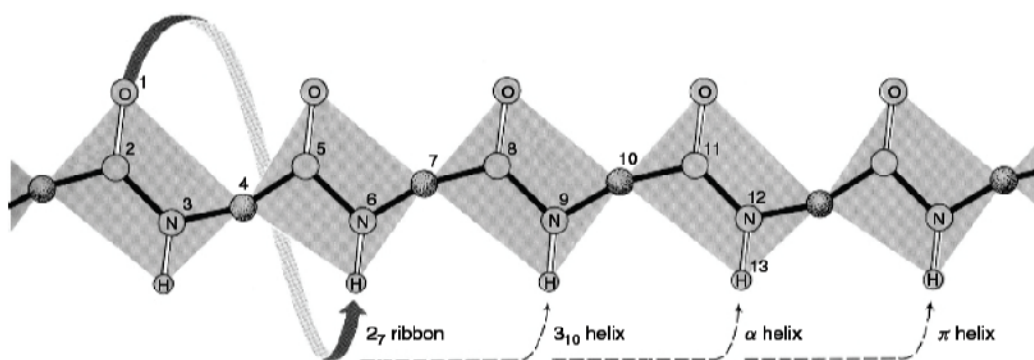
شکل ۱-۱ ساختار فروپروتوپورفیرین IX (هم b) جزء آهن فرو $[Fe^{2+}]$ گروه هم از طریق چهار پیوند کئوردینانسی محکم به اتم های نیتروژن متصل شده است.

۱-۲-۲-۲ ساختمان دوم زنجیره های گلوین

پائولینگ^{۳۶} و کوری^{۳۷} مفهوم ساختمان دوم پروتئین را برای نخستین بار مطرح نمودند (Pauling *et al.*, 1951). آنها مدل های پلی پپتیدی مختلفی را آزمودند تا راهی برای رسیدن به کنفرماسیونی که از راه تفرق اشعه X در آلفا کراتین مشاهده کرده بودند، پیدا کنند. زنجیره های پلی پپتیدی با تا خوردن به فرم های مارپیچ آلفا و یا صفحات چین خورده بتا، پایدار می شوند. مارپیچ آلفا یکی از ساختارهای دوم رایج در پروتئین هاست. شکل ۱-۲ ساختار یک مارپیچ آلفا را نشان می دهد.

³⁶ Pauling

³⁷ Corey



شکل ۲-۱ ساختار یک مارپیچ آلفا

مارپیچ آلفا یک مارپیچ راستگرد است که ساختار آن هر $5/4$ آنگستروم یکبار تکرار می‌شود. در هر دو مارپیچ آلفا، $3/6$ اسید آمینه وجود دارد. یعنی هر $1/5$ آنگستروم یک اسید آمینه در طول مارپیچ آلفا قرار می‌گیرد. هر گروه کربوکسیل و آمین در مارپیچ آلفا با اسید آمینه ای با فاصله چهار تا از خود، دارای باند هیدروژنی می‌باشد و این الگو در سراسر مارپیچ، غیر از چهار اسید آمینه در دو انتهای آن تکرار شده است. زیر واحدهای گلوبین فقط دارای ساختمان مارپیچ آلفای راست گرد می‌باشند. در حالت طبیعی، وقتی هموگلوبین دارای چهار زیر واحد است، دارای $75-80$ درصد مارپیچ آلفا است و بنابر این گلوبین یک پروتئین با ساختار دوم آل-آلفا^{۳۸} می‌باشد. اعتقاد بر این است که وجود درصد بالای ساختار منظم مارپیچ آلفا در هموگلوبین عامل اصلی پایداری^{۳۹} زیاد این پروتئین است. این مارپیچ ها به نحوی اطراف هم مستقر می‌شوند که از قرارگیری هم در معرض آب اضافی ممانعت کنند و همچنین پاکت مناسبی برای اتصال به اکسیژن فراهم کنند (Liong et al., 2001).

۱-۴-۲-۳ ساختمان سوم و چهارم زنجیره های گلوبین

ساختار سوم به روابط فضائی^{۴۰} اسیدهای آمینه و ساختمان چهارم به نحوه قرارگیری زیرواحدها در کنار هم اشاره دارد. این ساختار نظم سراسری^{۴۱} قرارگیری عناصر ساختارهای دوم در کنار یکدیگر در فضای سه بعدی را بیان می‌کند. در واقع نحوه چینش و زاویه عناصر ساختار نوع دوم در کنار یکدیگر در یک فضای ۳

³⁸ All α

³⁹ Stability

⁴⁰ Steric

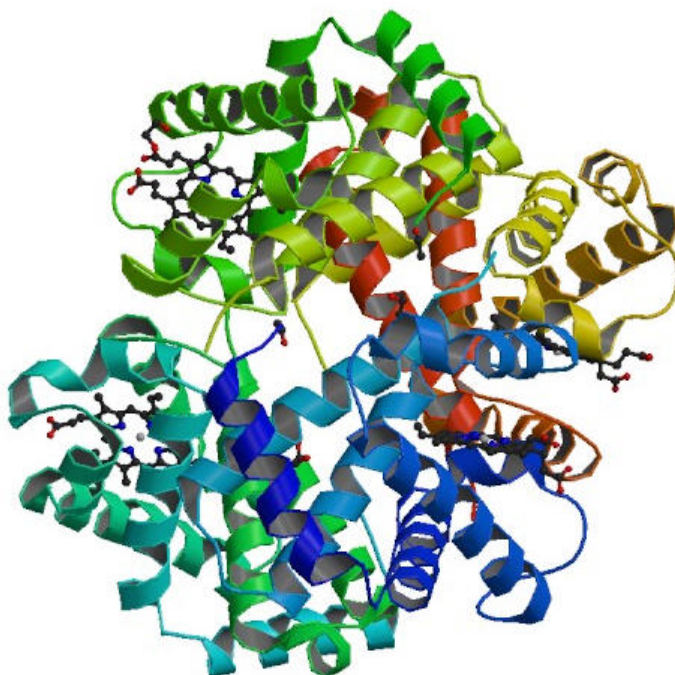
⁴¹ - Global

بعدی، ساختار نوع سوم پروتئین و توپولوژی پروتئین را تعیین می کند. به منظور درک بهتر از عملکرد یک پروتئین، شناخت ساختار سه بعدی آن ضرورت دارد.

ساختار چهارم بیشتر پروتئین ها از پیوند زنجیره های پلی پپتیدی مشابه و یا متفاوت ساخته شده اند و اتصال بین زنجیرها توسط پیوندهای ضعیف تری برقرار می گردد. این ساختارترتیب قرارگرفتن زیر واحدهای یک پروتئین را شرح می دهد و نقش مهمی در توضیح چگونگی شرکت پروتئین در واکنش های شیمیایی دارد.

ساختار سوم و چهارم هموگلوبین توسط کریستالوگرافی با اشعه ایکس معلوم می شوند (Perutz *et al.*, 1997). البته امروزه این کار تا حدودی با روش های بیوانفورماتیکی نیز قابل انجام است. نحوه ی قرارگیری اسیدهای آمینه در ساختار سه بعدی هموگلوبین اینگونه است که اسیدهای آمینه ی سطح خارجی در ساختار زیرواحدها عمدتاً آبدوست و قطبی هستند تا حلالیت هموگلوبین در آب افزایش یابد و در مقابل بخش داخلی زیرواحدها، تقریباً از اسیدهای آمینه ی غیر قطبی و آبگریز تشکیل شده است.

شکل ۱-۳ ساختمان چهارم هموگلوبین ماهی قزل آلا ی رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* و نحوه ی دربرگیری هم توسط زنجیره های گلوبین را نمایش می دهد.



شکل ۱-۳ ساختار چهارم هموگلوبین ماهی قزل آلا ی رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* با چهار زنجیره گلوبین، ۲ زنجیره آلفا و ۲ زنجیره بتا که هر زنجیره یک هم دارند.

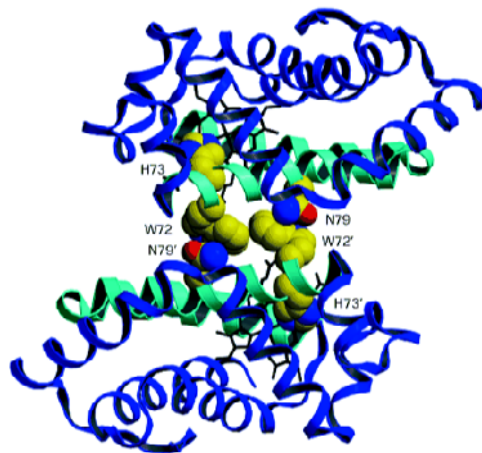
۱-۴-۳ ارتباط ساختار و عملکرد هموگلوبین در ماهی ها

در هموگلوبین هر زنجیره گلوبین شامل یک گروه هم است که سبب اتصال اکسیژن O_2 به صورت برگشت پذیر به آن می شود:



عملکرد اصلی هموگلوبین حمل و نقل اکسیژن از اندام تبادل گاز به بافتهای بدن می باشد. هموگلوبین در مجاورت اکسیژن زیاد تبدیل به اکسی هموگلوبین می گردد و واکنش بالا به سمت راست جریان می یابد و در مجاورت اکسیژن کم، اکسیژن دوباره آزاد می شود و جهت جریان واکنش به سمت چپ پیش می رود. قدرت پیوند با اکسیژن در هموگلوبین بسیار قوی است اما در صورت نیاز آن اکسیژن را آزاد می کند و این عملکرد به شدت وابسته به فشار جزئی گاز اکسیژن دارد (Perutz, 1978).

این برگشت پذیری پیوند با اکسیژن را گروه هم به واسطه ی اتم آهن به شکل Fe^{+2} میسر می کند. ساختار هموگلوبین اکثر ماهی ها به شکل تترامریک می باشد ولی بعضی از گونه ها مثل لامپری و هگ فیش ها (ماهی های فاقد آرواره) در حالت منومریک اکسیژن می گیرند و زمانی که اکسیژن از دست می دهد به صورت دimer (شکل ۴-۱) و یا تترامر هستند (Qiu et al., 2000).



شکل ۴-۱ یک دimer هموگلوبین لامپری در حالت دی اُکسی که در آن زنجیره ی آلفا به همراه هم مشاهده می گردد.

در گونه *Myxine glutinosa* (hagfish) سه هموگلوبین مونومر در حالت باند شده با اکسیژن وجود دارد (Iler et al., 2003). هموگلوبین های مونومریک شامل مولکول های پلی پپتیدی تک واحدی به نام هم هستند که هر کدام جرم مولکولی حدود ۱۷۰۰ دالتون دارند. هموگلوبین تترامریک مشخصه تمام ماهیان رده های بالاتر است. این نوع هموگلوبین عموماً از چهار زنجیر اسید های آمینه (دو زنجیر آلفا و دو زنجیر بتا) تشکیل شده است که بسیار شبیه پستانداران می باشد و دارای جرم مولکولی تقریبی ۶۵۰۰۰ دالتون هستند.

انواع متنوعی از هموگلوبین تترامریک وجود دارد و ممکن است چندین نوع مختلف در یک ماهی یافت شود. وجود آمیخته ای از چند نوع هموگلوبین در یک ماهی نشان دهنده تلاش آن ماهی برای سازگاری با محیط های مختلف یا روش های زندگی متفاوت است. هموگلوبین های گوناگون از ویژگی های تطابقی گونه های ماهیان مهاجر هستند که دگرگونی های محیطی قابل توجهی را تجربه می کنند. با آنالیزهای مولکولی که بر روی هموگلوبین انجام گرفته است گام بزرگی برای درک مفاهیم معاصر در زیست شناسی به ویژه شناخت ساختار چهارم از طریق کریستالوگرافی، ارتباط ساختار و عملکرد، اتصال لیگاند، فعل و انفعالات آلوستریک، و غیره صورت گرفته است (Berenbrink, 2006, Perutz, 1983). هموگلوبین به علت نقشی که در تنفس ایفا می کند، تاکنون بسیار مورد مطالعه قرار گرفته است. تحقیقات بسیاری در خانواده آزاد ماهیان از نظر تنوع هموگلوبین انجام گرفته است. از گونه هایی از این خانواده که تا کنون بر روی تنوع هموگلوبین آنها مطالعه شده است می توان به *rainbow trout*, *cutthroat trout*, *Salmo clarki*, *blueback salmon*, *salmon chinook*, *chum salmon*, *pink salmon*, *brook trout*, *Salmo clark* اشاره کرد. تحقیقات مختلف نشان داده است که این ماهیان بر حسب جنس و گونه بین ۲ تا ۲۰ نوع هموگلوبین می توانند داشته باشند (Braman, 2002, Braman et al., 1977,)

(Braman et al., 1980, Buhler, 1963, Fago et al., 2001, Frey et al., 1998, Southard et al., 1986). بررسی های انجام شده بر روی هموگلوبین های گونه *Labeo capensis* از *mudfish* که می تواند در شرایط هایپوکسی مقاومت کند نشان می دهد که این گونه دارای ۴ نوع هموگلوبین است (Frey et al., 1998). در خانواده کپور ماهیان، در گونه های *Abramis brama* و *Abramis ballerus* و *Abramis sapa* دو نوع هموگلوبین شناسایی شده است (Arefjev and Karnauchov, 1989). در مطالعات انجام شده توسط M. E. Clementi و همکارانش در سال ۲۰۰۱ بر روی گونه ی *Acipenser naccarii* از خانواده ی تاسماهیان دو نوع هموگلوبین شناسایی شده است (Clementi et al., 2001,) (Clementii et al., 1999).

اگر چه مطالعات وسیعی بر روی ساختار هموگلوبین ماهی ها انجام گرفته است ولی در پایگاه اطلاعاتی پروتئین (PDB^{۴۳}) که اطلاعات دقیق ساختار اول تا چهارم پروتئین ها موجود می باشد، فقط ده هموگلوبین ماهی ثبت گردیده است (Aranda Iv et al., 2009, Chong et al., 1999, Naoi et al., 2001, Vergara et al., 2009, Vergara et al., 2009). جدول ۱-۱ برخی مشخصات هموگلوبین های این ماهیان را نمایش می دهد.

جدول ۱-۱ مشخصات ده نمونه ی موجود از هموگلوبین ماهیان ثبت شده در PDB

| ردیف | جنس و گونه | خانواده | جرم مولکولی (دالتون) |
|------|---|---------------|----------------------|
| ۱ | <i>Trematomus Newnesi</i> (Mazzarella et al., 2006) | ototheniidae | ۶۶۴۲۸/۱۸ |
| ۲ | <i>Trematomus bernacchii</i> (Merlino et al., 2009) | Nototheniidae | ۶۶۱۳۹/۷۲ |
| ۳ | <i>Pagothenia bernacchii</i> (Camardella et al., 1992) | Nototheniidae | ۶۶۱۳۹/۷۲ |
| ۴ | Yellow Perch(<i>Perca flavescens</i>) (Aranda Iv et al., 2009) | Percidae | ۶۵۸۸۷ /۵۹ |
| ۵ | Trout IV(<i>Oncorhynchus mykiss</i>) (Aranda Iv et al., 2009) | Salmonidae | ۶۶۵۵۶/۵۳ |
| ۶ | <i>Leiostomus xanthurus</i> (Mylvaganam et al., 1996) | Sciaenidae | ۶۶۵۸۰/۵۸ |
| ۷ | <i>Brycon cephalus</i> | Characidae | ۶۶۲۵۹/۵۹ |
| ۸ | <i>Mustelus griseus</i> (Naoi et al., 2001) | Triakidae | ۶۲۷۱۹/ ۵۹ |
| ۹ | <i>Isurus oxyrinchus</i> | Lamnidae | ۶۲۷۱۹/۵۹ |
| ۱۰ | <i>Dasyatis akajei</i> (Chong et al., 1999) | Dasyatidae | ۶۶۸۲۰ |

این در حالی است که در مرکز ملی اطلاعات زیست فناوری آمریکا (NCBI^{۴۴}) در رابطه با ساختار اول و توالی اسیدهای آمینه اطلاعات مربوط به ۸۰۰ هموگلوبین ماهی ذکر گردیده است.

۱-۴-۴ تنظیم آلوستریکی

مطالعه ی ساختار چهارم هموگلوبین نشان می دهد که بین زیرواحدهای هموگلوبین امکان تعامل وجود دارد. این تعامل منجر به ظهور خواص جدیدی تحت عنوان خواص آلوستریک^{۴۵} می گردد. اگر اتصال لیگاند به پروتئین موجب تغییر ویژگی های اتصال جاییگاه دیگر در همان پروتئین گردد، در این صورت

⁴³ Protein Data Bank

⁴⁴ National Center for Biotechnology Information

⁴⁵ Allostery

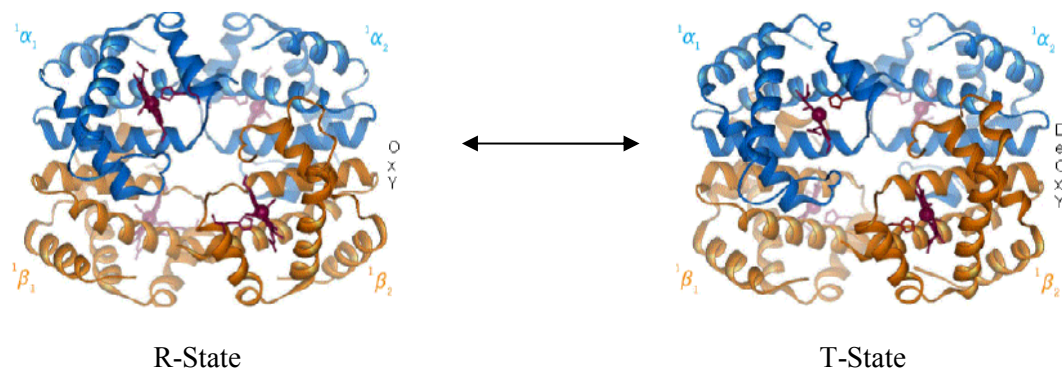
یک تنظیم آلوستریکی صورت گرفته است. اتصال تعاونی^{۴۶} یک لیگاند به یک پروتئین چند زیر واحدی، مانند اتصال اکسیژن به هموگلوبین، حالتی از اتصال آلوستریکی می باشد. اتصال یک لیگاند بر روی تمایل اتصال جایگاه های باقیمانده اثر می گذارد. در تنظیم آلوستریکی دو نوع برهمکنش دیده می شود که هموتروپیک و هتروتروپیک نام دارند. برهمکنش هموتروپیک زمانی روی می دهد که دو مولکول لیگاند یکسان بوده و به جایگاه های متفاوتی بر روی پلی پپتید یکسان یا به جایگاه های یکسانی بر روی زیر واحد های متفاوت پیوند یابند. برهمکنش های هتروتروپیک زمانی اتفاق می افتد که مولکول های لیگاند متفاوت بوده و به جایگاه های متفاوتی نیز اتصال می یابند. اگر اتصال یک لیگاند در یک جایگاه سبب افزایش تمایل جایگاه دیگر نسبت به لیگاند شود حالت تعاونی مثبت پدید آمده است و اگر باعث کاهش این تمایل شود تعاونی منفی به وجود می آید. پیوند دو یا چند مولکول لیگاند به پروتئین یکسان (با در نظر گرفتن اتصال هر یک به صورت مجزا) عملکردی مرتبط با اتصال تک تک لیگاندها است. این موضوع بدین معنی است که اتصال یک لیگاند به پروتئین، هر اثری که بر روی پیوند لیگاند بعدی خواهد داشت، لیگاند دیگر هم باید همان اثر را بر روی تمایل پروتئین نسبت به لیگاند اول داشته باشد. آثار آلوستریکی در پروتئین ها معمولاً با دو الگوی ترتیبی^{۴۷} و تجمعی^{۴۸} بیان می شوند. در الگوی ترتیبی پیوند یک لیگاند بر روی یک جایگاه در پروتئین سبب القای تغییر آرایش فضایی در مولکول پروتئین می شود، به نحوی که این تغییر توسط مولکول به جایگاه های دیگر اتصال لیگاند منتقل می شود. این وضعیت تمایل جایگاه ها را در اتصال به لیگاند تغییر می دهد. چنین آثاری می تواند موجب افزایش یا کاهش تمایل جایگاه های دیگر برای اتصال به لیگاند شود. در الگوی تجمعی تمایل ساختار چهارم نسبت به لیگاندهای گوناگون متفاوت است. ساختار چهارمی که در غیاب لیگاندها حالت غالب دارد معمولاً تمایل کمی برای لیگاند دارد. این وضعیت را Tenese نامیده و با T نشان می دهند. ساختار متقابل این وضعیت Relax نامیده می شود و تمایل بالایی نسبت به لیگاند دارد (حالت R). به دلیل تفاوت حالات ذکر شده در تمایلشان نسبت به اتصال لیگاند، اتصال هر لیگاندی تعادل در وضعیت T و R را به سمتی هدایت می کند که تمایل بیشتری برای اتصال به لیگاند دارا است (موسوی موحدی ۱۳۸۳).

شکل ۱-۵ نحوه ی اتصال اکسیژن به هموگلوبین (حالت R) و آزاد سازی آن (حالت T) را نمایش می دهد.

⁴⁶ Cooperative

⁴⁷ Sequential

⁴⁸ Concerted model



شکل ۵-۱ فرآیند دوطرفه ی اتصال اکسیژن به هموگلوبین و جدا شدن از آن

هموگلوبین پستانداران پروتئین نوع آلوستریک است. زیرا واحد های α و β به صورت تترامر های همولوگ هستند ($\alpha_2\beta_2$). این مولکول تترامر می تواند به چهار مولکول اکسیژن متصل شود. پیوند مولکول اکسیژن به صورت تعاونی هموتروپیک مثبت است. بررسی های انجام شده با اشعه X دو بنای فضایی^{۴۹} اصلی، شامل حالت R و حالت T را برای هموگلوبین نمایان کرده است. وضعیت اول مربوط به حالت اکسیژن دار و وضعیت دوم مربوط به حالت بدون اکسیژن است. در هر دو حالت اکسیژن به هموگلوبین اتصال می یابد ولی تمایل حالت R برای اتصال به اکسیژن به طور قابل ملاحظه ای بیشتر می باشد. در صورت عدم اتصال اکسیژن، این حالت پایدارترین فرم هموگلوبین است. به دلیل اینکه ساختار سوم پروتئین از تغییرات جزئی ساختاری صورت گرفته در گروه هم پس از پیوند با اکسیژن جلوگیری می کند، تمایل حالت T برای اتصال به اکسیژن کم است. هر چه حالت T پایدارتر باشد، ممانعت های ذکر شده بیشتر و تمایل اتصال به اکسیژن نیز به همان نسبت کاهش می یابد. ممانعت های ذکر شده در ساختار R دیده نمی شود، از این رو تمایل این حالت برای اتصال به اکسیژن افزایش می یابد. اتصال اولین اکسیژن مولکولی به هموگلوبین می تواند سبب تغییر ساختار در مولکول هموگلوبین و در نتیجه افزایش تمایل اتصال مولکول های اکسیژن بعدی شود. اتصال اولین اکسیژن مولکولی به هموگلوبین اتصال ضعیف می باشد، زیرا به زیر واحدی در حالت T متصل می شود. با اتصال اکسیژن به زیر واحد اول شکل T به شکل R تغییر یافته و اتصال مولکول بعدی تسهیل می گردد و به این ترتیب افینیته اکسیژن افزایش پیدا کند، به این واکنش هموتروپیک آلوستریک^{۵۰} گویند (Tsuneshige et al., 2002).

⁴⁹ Conformation

⁵⁰ Homotropic allosteric

۱-۴-۵ میل ترکیبی اکسیژن با هموگلوبین ماهی

اصطلاح میل ترکیبی اکسیژن با توجه به منحنی تفکیکی اکسیژن-هموگلوبین در خون تفسیر می شود. قابلیت ترکیب هموگلوبین برای اینکه نصف ظرفیت آن با اکسیژن اشباع گردد یا فشاری که لازم است تا ۵۰٪ هموگلوبین توسط اکسیژن اشباع شود، را ارزش نیمه اشباع یا P_{50} نامیده اند. ارزش نیمه اشباع یا P_{50} انعکاس دهنده میل ترکیبی هموگلوبین با اکسیژن است. میزان اتصال اکسیژن به هموگلوبین افینیته اکسیژن نامیده می شود.

تطابق میل ترکیبی هموگلوبین با اکسیژن، برای بهینه سازی انتقال گاز به مکان های بافتی مصرف کننده اکسیژن تکامل یافته است. عوامل متعددی می تواند بر روی میل ترکیبی اکسیژن خون تاثیر بگذارد. از مهمترین آنها می توان به تأثیرات محیط زیست و ضروریات فیزیولوژیکی بدن جانداران، pH و میزان دی اکسید کربن متصل به هموگلوبین، تأثیر فسفاتهای آلی مخصوصاً 2,3-BPG، IPP، ATP و GTP و درجه حرارت آب وابسته است (Souza and Bonilla-Rodriguez, 2007).

۱-۴-۵-۱ اثر غلظت دی اکسید کربن و pH

اثر این دو با هم ارتباط متقابل دارد و از نظر فیزیولوژیک، مهم ترین عواملی هستند که بر روند میل ترکیبی اکسیژن خون اثر می گذارند. کاهش میل ترکیبی با افزایش دی اکسید کربن مطابق اثر بور^{۵۱}، سبب جدا شدن اکسیژن از هموگلوبین و افزایش فشار پلاسما و تسهیل انتشار آن در بافت ها می شود. کاهش میل ترکیبی با کاهش pH قوی تر و به نام اثر روت^{۵۲} موسوم است.

مهمترین نتیجه آن در ماهی ها انتقال اکسیژن به داخل کیسه شنا توسط خون می باشد. از اختصاصات ویژه اثر روت این است که زمانی که pH خون اسیدی شود حتی با وجود فشار اکسیژن زیاد هم اشباع نمی گردد. در ماهی کپور *Cyprinus carpio* هنگامی که pH آب بین ۵/۵ تا ۸ باشد، اکسیژن افینیته بشدت کاهش می یابد و در pH ۵/۵ بیشترین کاهش مشاهده می گردد (Noble et al., 1970). با افزایش میزان دی اکسید کربن اکسیژن افینیته در ماهی کپور بشدت کاهش می یابد اما در زیر pH ۸/۳ تأثیر فسفات های آلی در کاهش افینیته بسیار بیشتر می باشد (Weber and Lykkeboe, 1978). در ماهی *Salmo gairdneri* با افزایش غلظت دی اکسید کربن میزان pH خون کاهش می یابد و در نتیجه اکسیژن افینیته کاهش می یابد (Boutilier et al., 1986).

⁵¹ Bohr

⁵² Root

۱-۴-۵ اثر دما

با افزایش دما اتصال بین هموگلوبین با اکسیژن سست و میل ترکیبی آنها کاهش می یابد. در نتیجه هموگلوبین در حرارت بالا اکسیژن بیشتری آزاد می کند. این موضوع اهمیت فیزیکی ویژه ای دارد زیرا معمولاً ازدیاد درجه حرارت بدن توام با افزایش میزان متابولیسم بدن می باشد. تحقیقات بر روی اثر تغییرات دمایی بر میزان اکسیژن افینیته هموگلوبین دو ماهی *Symenchelis parasitica* و *Thermarces cerberus* که شرایط دمایی محیط زیست آنها با هم متفاوت می باشند نشان داده که میزان حساسیت اکسیژن افینیته به دما در هر گونه آزمایشی ها به دمای محیط زیست آن وابسته می باشد (Weber et al., 2003).

۱-۴-۵ اثر فسفات آلی

اولین بار در سال ۱۹۶۷ اثر فسفات های آلی بر روی هموگلوبین انسان بررسی شد (Benesch and Benesch, 1967). در ماهی ها اثر فسفات آلی برای اتصال برگشت پذیر هموگلوبین ماهی با اکسیژن حائز اهمیت است. گیلن^{۵۳} و ریگس^{۵۴} در سال ۱۹۷۱ نشان دادند که غلظت های فسفات آلی در طبیعت می تواند میل ترکیبی هموگلوبین با اکسیژن را تحت تاثیر قرار دهد (Gillen and Riggs, 1971). آنها دریافتند که افزودن آدنوزین تری فسفات ATP در ماهی *Cichlasoma cyanoguttatum* میل ترکیبی اکسیژن را کم می کند (Gillen and Riggs, 1973a). مطالعات انجام شده بر روی هموگلوبین ماهی *Anguilla rostrata* نشان داد که فسفات های آلی تمایل اکسیژن هموگلوبین را در این ماهی کاهش می دهد و اثر GTP از ATP بیشتر می باشد (Kaloustian and Poluhowich, 1976). ماهی آمازون Amazonian fish در محیط هایی که از نظر میزان اکسیژن فقیر هستند، برای جبران کمبود اکسیژن مقدار ATP و GTP را کاهش می دهد (Val, 2000, Val et al., 1992). وبر^{۵۵} در سال ۱۹۸۲ نشان داد که در شرایط کمبود اکسیژن در خون بسیاری از ماهی ها میزان فسفات های آلی کاهش می یابد (Jensen and Weber, 1982). کاهش فسفات های آلی در شرایطی که دمای محیط زیست ماهی افزایش می یابد هم به وضوح مشاهده می گردد.

⁵³ Gillen

⁵⁴ Riggs

⁵⁵ Weber

۱-۵ کمومتریکس

کمومتریکس^{۵۶} یک شاخه ی مهم علمی می باشد که کاربردهای فراوانی در زمینه های مختلف علوم یافته است. این حوزه ی علمی دارای شاخه های مختلفی مانند بهینه سازی، انتخاب و طراحی آزمایش، کالبراسیون چند متغیره، ارتباط کمی ساختار-فعالیت، و روش های شناسائی الگو^{۵۷} و طبقه بندی^{۵۸} می باشد. با توجه به اهمیت مسائل زیستی، کاربرد کمومتری در این شاخه از علوم نیز افزایش چشمگیری داشته است. ایده های کمومتری به طور مجزا در علوم مختلف ارزش افزوده ی علمی چشمگیری ایجاد نموده اند. از ابتدای دهه ی هشتاد میلادی پیشرفت علوم مختلف مانند زیست شناسی، علوم کامپیوتر، و شیمی حجم بسیار زیادی از اطلاعات در مدت زمانی کوتاه تولید می گردد. به منظور به دست آوردن بهترین نتایج از داده ها و همچنین استخراج اطلاعات مفید از آزمایش ها به یک سری از روش های خاص مورد نیاز می باشد. همین نیاز موجب توسعه ی علم کمومتریکس شد که شامل ترکیبی از ریاضیات، روش های آماری، و علوم کامپیوتری می باشد.

گروه های تحقیقاتی مختلف با اهداف متفاوت علاقه مند به استفاده از روش های کمومتریکس هستند. همانند هر مفهوم فراگیر دیگر، تعریفی جامع و فراگیر در مورد کمومتریکس که مورد اجماع همگان باشد وجود ندارد و هر گروه با توجه به زمینه ی تحقیقاتی خود تعریفی خاص از کمومتریکس ارائه می دهد. با این وجود برخی از تعاریف ارائه شده تعاریفی جامع تر به نظر می رسند.

انجمن بین المللی کمومتریکس^{۵۹} این علم را به صورت زیر تعریف می نماید (Wise et al):

"کمومتریکس علمی است که به بررسی اندازه گیری های انجام شده در یک سیستم شیمیائی و ارتباط آن با حالت سیستم مورد بررسی می پردازد که در آن روش های آماری، ریاضیات و کامپیوتر استفاده می شود. علاوه بر این تعریف افراد معتبر مانند ماسارت^{۶۰} (Massart, 1988) یا ولد^{۶۱} (Wold, 1978) نیز تعاریفی ارائه کرده اند. ماسارت کمومتریکس را اینگونه تعریف نموده است که کمومتریکس روشی ریاضی، آماری، و یا ترسیمی در محدوده علم شیمی می باشد که هدف آن گسترش روش هایی برای به دست آوردن حداکثر اطلاعات شیمیائی از سیستم مورد نظر می باشد. کمومتریکس در زمینه های مختلف و

⁵⁶ - Chemometrics

⁵⁷ - Pattern recognition

⁵⁸ - Classification

⁵⁹ - International chemometrics society

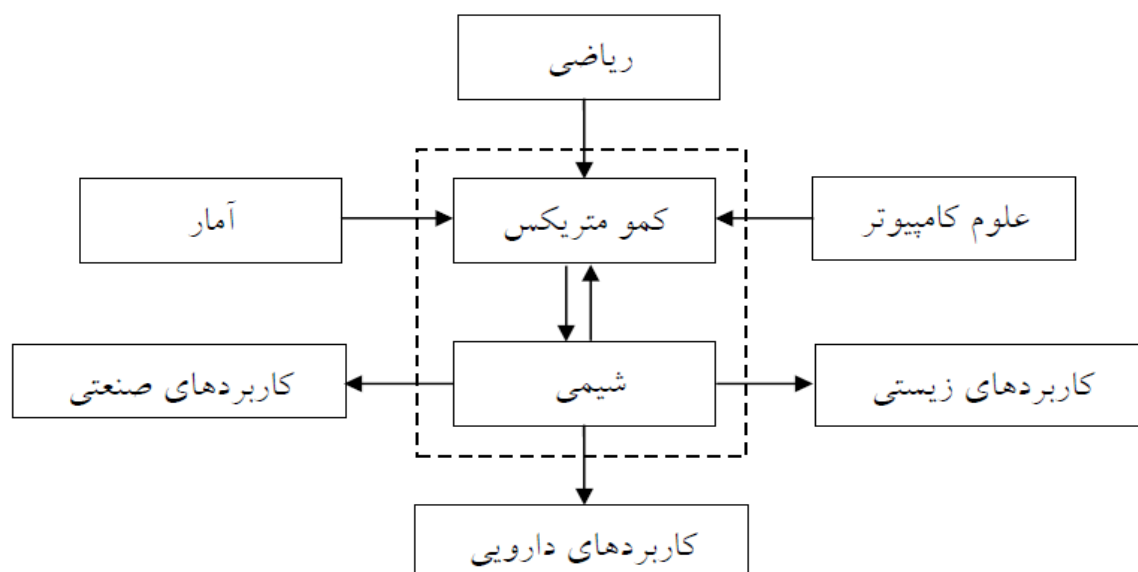
⁶⁰ - Massart

⁶¹ - Wold

گسترده ای همچون آنالیز داده ها، کالبراسیون، کنترل کیفیت، طراحی آزمایش^{۶۲}، و بررسی های ساختار-فعالیت^{۶۳} ترکیبات مختلف شیمیائی کاربرد فراوان دارد.

قابلیت های متفاوت کمومتریکس موجب شده است که گروه های مختلف استفاده های متفاوتی از این علم داشته باشند. بررسی تحقیقات انجام شده توسط گروه های پژوهشی مختلف نشان می دهد که رشته هایی شامل گستره ای از زیست شناسی، بیوشیمی و بیوفیزیک، شیمی آلی، شیمی فیزیک، شیمی تجزیه، شیمی خاک^{۶۴}، علوم جنائی^{۶۵}، نظارت و کنترل محیط زیست^{۶۶}، و برخی رشته های مهندسی مانند مهندسی شیمی نیز به استفاده از کمومتریکس علاقه نشان می دهند.

امروزه حجم عظیم داده های تولید شده به وسیله ی دستگاه های پیشرفته استفاده از روش های محاسباتی کمومتریکس برای تحلیل داده ها را الزام آور نموده است. این الزام موجب توسعه ی روش های موثری از این علم شده است. ارتباط بین کمومتریکس و شاخه های مختلف علوم در شکل ۱-۶ نمایش داده شده است.



شکل ۱-۶ ارتباط کمومتریکس با دیگر شاخه های علوم

⁶² - Experimental design

⁶³ - Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR)

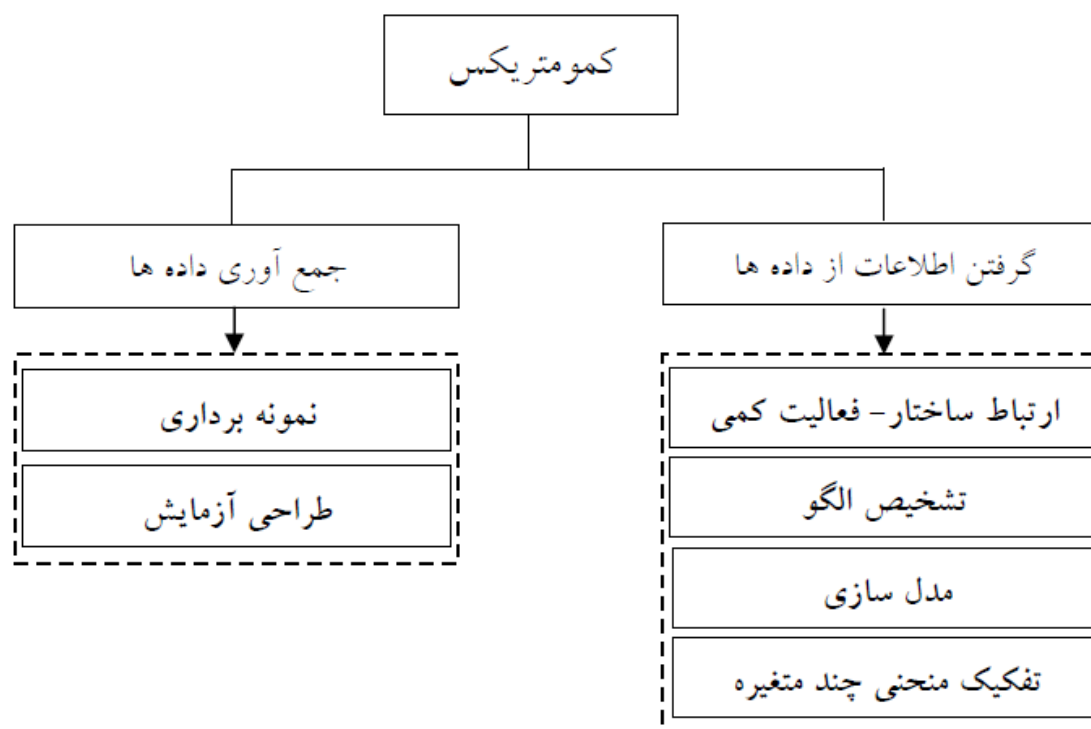
⁶⁴ - Geo-chemistry

⁶⁵ - Forensic science

⁶⁶ - Environmental monitoring and control

این شکل نشان دهنده ی ارتباط شیمی و کمومتریکس با یکدیگر می باشد. درواقع این دو علم موجب گسترش مرزهای یکدیگر می گردند. درواقع اغلب روش های کمومتریکس توسط گروه های تحقیقاتی شیمی تجزیه توسعه داده شده اند.

باید به این نکته توجه داشت که برای توسعه ی عمیق کمومتریکس آشنائی با علوم کامپیوتر و برنامه نویسی ضروری می باشد. شکل فوق نشان می دهد که این علم نه تنها موجب توسعه ی روش های تجزیه ای شده است، بلکه در روش هایی که به نوعی وابسته به شیمی تجزیه هستند نیز تحولی شگرف ایجاد نموده است. کاربردهای صنعتی، زیستی، طراحی دارو^{۶۷} و غیره بخشی از کاربردهای کمومتریکس هستند. روش های کمومتریکس را می توان به دو گروه کلی تقسیم نمود. این تقسیم بندی در شکل ۷-۱ نشان داده شده است.



شکل ۷-۱ تقسیم بندی روش های مختلف کمومتریکس

همانطور که در این شکل نشان داده شده است، یک سری از روش ها مربوط به طریقه ی انجام آزمایش می شوند. این روش ها شامل نمونه برداری^{۶۸} و طراحی آزمایش هستند. در این روش ها سعی بر این است که آزمایش به چه صورت انجام پذیرد تا بیشترین داده های مفید را تولید نماید.

⁶⁷ - Drug design

⁶⁸ - Sampling

سایر روش ها پس از جمع آوری داده ها کاربرد دارند. در این روش ها سعی بر این است که حداکثر اطلاعات مفید از داده ها استخراج گردد. این روش ها شامل رابطه ی ساختار-فعالیت کمی، تشخیص الگو، مدل سازی، و تفکیک منحنی چند متغیره می باشد^{۶۹}. بیشتر افرادی که علاقه مند به استفاده از کمومتریکس هستند زمینه قوی در کامپیوتر و ریاضی ندارند و هدف اصلی آنها آنالیز داده ها می باشد. برخی گروه های تحقیقاتی دیگر روش ها و الگوریتم های جدید را توسعه می دهند که پیشرفت اصلی کمومتریکس بر عهده ی این گروه ها می باشد.

از میان روش های مختلف توسعه داده شده برای کمومتری، در پژوهش جاری روش تفکیک منحنی چند متغیره برای تحلیل نتایج آزمایش ها مورد استفاده قرار گرفته است. در این روش، هدف به دست آوردن پیک های خالص از پیک همپوشانی شده، تشخیص مزاحمت ها و به دست آوردن حداکثر اطلاعات کمی و کیفی است. در مواردی که از روش های تجزیه ای برای آنالیز مخلوط های پیچیده استفاده می شود، می توان با استفاده از تکنیک تفکیک منحنی چند متغیره اطلاعات را به خوبی تفسیر نمود. این روش ها شامل روش های بی نیاز از مدل مانند تفکیک منحنی بر اساس خود مدل سازی^{۷۰}، و نیز روش های بر اساس مدل مانند سیمپلکس^{۷۱}، و روش های گرادیانی مانند نیوتن-گوس^{۷۲} می باشد.

روش تفکیک منحنی چند متغیره بر اساس حداقل مربعات متناوب (MCR-ALS^{۷۳}) روشی پرکاربرد و کارآمد در کمومتریکس محسوب می شود که برای تفکیک اجزاء مختلف یک مخلوط متشکل از اجزاء ناشناخته و تفکیک نشده مورد استفاده قرار می گیرد (Jaumot *et al.*, 2005).

چنین ترکیباتی ممکن است از نوع واکنش های شیمیایی، فرایندهای صنعتی، جداسازی به وسیله ی شستشو در ستون کروماتوگرافی و غیره باشند که توسط پاسخ های مختلف چند متغیره مانند اندازه گیری های طیف سنجی^{۷۴}، سیگنال های الکتروشیمیایی^{۷۵}، و پروفایل ترکیب^{۷۶} (مانند پروفایل غلظت^{۷۷} و پروفایل طیف^{۷۸}) تحت نظارت قرار دارند.

تا کنون نرم افزارهای مختلفی برای استفاده از MCR-ALS توسعه یافته اند. در این رساله از نرم افزار توسعه یافته توسط J. Jaumot و همکاران در محیط MATLAB استفاده شده است (Jaumot *et al.*,)

^{۶۹} - Multivariate Curve Resolution (MCR)

^{۷۰} - Self modeling

^{۷۱} - Simplex

^{۷۲} - Newton-gauss

^{۷۳} - Alternating Least Square

^{۷۴} - Spectroscopic

^{۷۵} - Electrochemical Signals

^{۷۶} - Composition profile

^{۷۷} - Concentration profile

^{۷۸} - Spectra profile

2005). به عنوان مثالی دیگر می توان به جعبه ابزار PLS^{79} (پیاده سازی شده در MATLAB) از شرکت آمریکائی Eigenvector (نسخه ی ۳/۵ به بعد) اشاره کرد که در آن توابع مناسب برای آنالیز های MCR-ALS از طریق واسط کاربر گرافیکی⁸⁰ در دسترس می باشند (Wise et al., 2004). نرم افزار مجانی GUIPRO ابزار دیگری برای تفکیک منحنی می باشد که از طریق اینترنت در دسترس می باشد. تفاوت های موجود بین روش های فوق عمدتا در پیاده سازی محدودیت ها و در روش بازنمایی و تحلیل داده ها می باشد.

۱-۶ اهداف پژوهش حاضر

نقش اصلی هموگلوبین در همه جانوران و از جمله ماهیان انتقال اکسیژن از شش ها به بافت ها و انتقال دی اکسید کربن از بافت ها به شش هاست. اما مساله ای که ماهیان را از جانوران خشکی متمایز می کند آن است که معمولا ماهیان بر حسب زمان و مکان در معرض مقادیر مختلفی از اکسیژن، دما و شوری متغیر قرار می گیرند و برای مقابله با این مشکل استراتژی های آناتومیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی پیچیده ای برای تطابق با محیط دارند. عملکرد هموگلوبین با توجه به نیاز های متابولیکی و با تغییراتی که در محیط اطراف ماهی به طور ثابت (مثل تغییر فصل) و یا به صورت ناگهانی و تحت استرس های محیطی رخ می دهد قابلیت انعطاف بالایی دارد. ویژگی مشترک در تمام ماهیان، تنوع تعداد هموگلوبین است که به عنوان نشانه ای از تنوع فیلوژنتیکی و تطبیق پذیری مولکولی پذیرفته می شود و عاملی برای تطابق ماهی با شرایط محیطی به شمار می آید.

به طور کلی در تاکنون پژوهش هایی در زمینه هموگلوبین خون ماهیان انجام گرفته است که در قسمت های پیشین به آن اشاره شده است. تا پیش از انجام این رساله، مطالعه ای جامع در زمینه تنوع و ساختار هموگلوبین خون ماهیان خاویاری ایران انجام نگرفته است. بدین لحاظ مطالعه ساختار و عملکرد هموگلوبین *Acipenser stellatus* و *Acipenser persicus* که از خانواده تاس ماهیان و دو گونه خاویاری ایران می باشند، با توجه به عمق زیستگاه آنها و در نظر گرفتن مهاجرت این ماهیان بین آب شور و شیرین، و توانایی انطباق در بدست آوردن اکسیژن حائز اهمیت می باشد.

لازم به ذکر است که موضوع مورد مطالعه در این رساله متمایز از مطالعه فاکتورهای خونی و اندازه گیری های هماتوکریت می باشد که در آن اندازه گیری حجم کلی آلبومین، غلظت هموگلوبین، شمارش اریتروسیت ها و لکوسیت ها و مقایسه ی میزان این فاکتور ها با توجه به رشد و نمو ماهی در مراحل

⁷⁹ - PLS (Partial Least Squares) toolbox

⁸⁰ - Graphical User Interface

مختلف صورت می گیرد. از این جنبه، خلاء فقدان پژوهشی جامع در این زمینه ی مطالعه ی خواص ساختاری و عملکردی هموگلوبین این ماهیان کاملاً محسوس می باشد و تحقیق حاضر گامی در جهت رفع این خلاء می باشد. نکته دیگر آنکه با توجه به اینکه ماهیان انتخاب شده از خانواده تاس ماهیان، و از ماهیان ارزشمند خاویاری ایران می باشند این موضوع اهمیت ویژه ای می یابد.

همواره مطالعات مقایسه ای جایگاه ویژه ای در پیشرفت علوم مختلف داشته است. رویکرد مقایسه ای به کارگرفته شده در این رساله، امکان برقراری ارتباطی منطقی بین تفاوت خواص ساختاری و عملکردی هموگلوبین های مورد مطالعه با ویژگی های شرایط محیطی ماهیان مورد مطالعه را ایجاد نموده است. همچنین چنین رویکردی باعث می گردد تا این رساله آغازی مناسب برای پیگیری و پیشبرد یک خط مطالعاتی گسترده گردد که حقایقی شگفت آور در زمینه ی چگونگی تطابق آبزیان با شرایط زیست محیطی شان را روشن نماید.

فصل دوم:

مروری بر ادبیات تحقیق و پیشینه تحقیق

۲-۱ مروری بر تحقیقات انجام شده در رابطه با هموگلوبین ماهی

تا کنون تحقیقات بسیار متنوعی در مورد هموگلوبین به صورت عام و هموگلوبین ماهی ها به صورت خاص انجام شده است. در این بخش به صورت خلاصه به مرور اهم تحقیقات انجام شده در مورد خالص سازی و تفکیک هموگلوبین ها، تنوع هموگلوبینی در گونه های مختلف، و تعیین خواص ساختاری و عملکردی و ارتباط آنها با یکدیگر در هموگلوبین ماهی ها می پردازیم.

در این راستا عناوین تحقیقات مرتبط که در طی مطالعات مروری انجام شده جمع آوری شده اند را می توان در چهاربند به شرح زیر طبقه بندی نمود.

۱. مطالعات مربوط به استخراج، جداسازی، و خالص سازی هموگلوبین های ماهیان مختلف.
۲. مطالعات مربوط به سنجش میزان تمایل هموگلوبین به اکسیژن^{۸۱} و بررسی تغییرات آن با فاکتورهای محیطی مانند تغییرات pH و دما بر روی هموگلوبین های خالص سازی شده از خون ماهی و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی مثل وزن مولکولی^{۸۲}، نقطه ایزوالکتریک، N-terminal زنجیره گلوبین بر روی هموگلوبین.
۳. مطالعات مربوط به شناسائی نوع زنجیره های تشکیل دهنده گلوبین و اجزاء تشکیل دهنده آن.
۴. مطالعات مربوط به تعیین توالی اسیدهای آمینه در زنجیره های گلوبینی مربوط به هموگلوبین ماهی ها و انجام مطالعات ساختاری و محاسباتی مانند پیشگویی ساختار های دوم و سوم و مطالعات وابسته به آن.

در ادامه به ذکر اهم این مطالعات به ترتیب زمانی می پردازیم.

۲-۱-۱ مروری بر مطالعات انجام شده در جهان

McCutcheon و همکارانش در سال ۱۹۴۷ میزان اکسیژن افینیته هموگلوبین را در چند گونه ماهی الاسموبرانس مطالعه نمودند (McCutcheon, 1947). در سال ۱۹۵۸ مشخص شد که گونه ی *Petromyzon planeri* بالغ دارای دو نوع هموگلوبین می باشد (Adinolfi and Chieffi, 1958). در همان سال Manwell و همکارانش گزارش کردند که هموگلوبین هگ فیش کالیفرنیا

⁸¹ Oxygen affinity

⁸² Molecular weight

Poliostrongylus stouti افینته ی اکسیژن بالایی دارد و اثر بوهر در آن دیده نمی شود (Manwell, 1958).

گروه تحت نظارت Buhler and Shanks در سال ۱۹۵۹ عملکرد هموگلوبین ۱۴ گونه از ماهیان دریایی و آب شیرین را مورد مطالعه قرار دادند (Buhler and Shanks, 1959).

Allison و همکارانش در سال ۱۹۶۰ ضمن تعیین هموگلوبین غالب^{۸۳} در *Lampetra fluviatilis* دو نوع هموگلوبین را در این گونه تشخیص دادند (Allison and Humphrey, 1960).

Riggs و همکارانش در سال ۱۹۷۰ اثر فسفات های آلی را بر روی ماهی استخوانی *Cichlasoma cyanoguttatum* و میزان اکسیژن افینته بررسی کردند (Gillen and Riggs, 1971). در سال ۱۹۷۲ بر روی ساختار و عملکرد ماهی *Cyprinus carpio* تحقیق کرد. در سال ۲۰۰۳ اثر روت و میزان اکسیژن افینته را بر روی هموگلوبین ماهی squirrelfish مطالعه کرد (Pennelly et al., 1978).

گروه مطالعاتی Morris و همکاران در سال ۱۹۸۰ نشان دادند که چهارنوع هموگلوبین در خون ماهی *Thunnus thynnus* وجود دارد و با استفاده از ستون کروماتوگرافی DEAE آنها را جداسازی کردند. تغییرات صورت بندی^{۸۴} در این هموگلوبین ها در شرایط pH پایین در مطالعه ی آنان مورد بررسی قرار گرفته است (Morris et al., 1981).

D'Avino و همکاران در سال ۱۹۸۸ و در مطالعه ای گسترده بر روی ساختار مولکولی و خواص پیوند اکسیژن با هموگلوبین ۱۸ گونه از ماهی قطبی (قطب جنوب) از ۵ خانواده ی مختلف تحقیق کرد و توانست ۱۱ گونه هموگلوبین تخلیص کند (D'Avino and di Prisco, 1989, Di Prisco et al., 1988).

در سال ۱۹۸۹ مطالعه ای جامع بر روی خالص سازی و عملکرد هموگلوبین ماهی قطبی *Notothenia coriiceps* انجام گردید (D'Avino and di Prisco, 1989).

اثر فسفات های آلی بر حمل اکسیژن توسط هموگلوبین دو ماهی *carp, trout* با کاهش pH در سال ۱۹۹۰ مورد مطالعه قرار گرفت (Pelster and Weber, 1990). در همان سال Luis Val و همکاران قدرت انطباق ماهی *Pterygoplichthys multiradiatus* تحت تاثیر اثر بوهر و نیز ارتباط میزان فسفات های آلی در داخل گلبول قرمز با شرایط کمبود اکسیژن را مورد مطالعه قرار دادند (Val et al., 1990).

⁸³ Dominant

⁸⁴ Conformation

در همان سال Affonso گزارش کرده است که میل ترکیبی هموگلوبین با اکسیژن و با تغییرات فصلی در گونه *Hoplosternum littorale* ارتباط دارد (Affonso, 1990).

دو سال بعد Glomski و همکاران نشان دادند که ارتباطی معنی دار بین جنس، سن، فصل، و محیط زیست با غلظت هموگلوبین در ماهیان وجود دارد (Glomski et al., 1992).

در سال ۱۹۹۴ Clementi (Clementi et al., 1994) با بررسی مقدار اکسیژن افینیته هموگلوبین جنس و گونه ی *Acipenser naccarii* تاسماهی ایتالیایی به این نتیجه رسیدند که بر طرف کردن نیاز اکسیژن در این جانور نه تنها به هموگلوبین بلکه به ارتباط بین ساختار و عملکرد هموگلوبین همراه با فیزیولوژی بدن موجود بر می گردد.

در مطالعه ای که در سال ۱۹۹۶ انجام گرفت ارتباط مابین کاهش غلظت تری فسفات نوکلئوتید در بسیاری از گونه های ماهی ها با شرایط هیپوکسی (فقر اکسیژن) مورد بررسی قرار گرفت (Weber, 1996).

رویکرد تکاملی به هموگلوبین و ساختار و عملکرد آن برای نخستین بار در سال ۱۹۹۷ و در رابطه با تکامل مولکولی هموگلوبین ماهی قطبی *Notothenioidei* توسط Stam و همکاران مورد توجه قرار گرفت (Stam et al., 1997). وی همچنین در سال ۱۹۹۸ بر روی روند تکامل توالی اسید های آمینه هموگلوبین ماهیان استخوانی تحقیق نمود (Stam et al., 1998).

فرآیند کریستالوگرافی ساختار هموگلوبین ماهی *Trematomus newnesi* در سال ۱۹۹۹ و در هنگام مطالعه ی اثر روت صورت گرفت (Mazzarella et al., 1999).

در همان سال مطالعاتی جامع بر روی ارتباط خواص هموگلوبین ماهی *Tambaqui* (*colossoma macropomum*) که از گونه های استخوانی مهاجر آب شیرین است با قدرت تحمل زیاد این ماهی در برابر تغییرات pH، مقادیر O_2 محلول در آب و تغییرات پارامترهای فیزیوشیمیایی که در طول روز یا با تغییر فصل روی می دهند، انجام گرفت (Marcon and Wilhelm Filho, 1999).

در برخی از گونه های ماهیان، کاهش pH خون سبب می شود که هموگلوبین تمام اکسیژن های متصل به خود را آزاد نکند و مقداری از این اکسیژن ها متصل به هموگلوبین باقی بماند. چگونگی جبران این کمبود اکسیژن توسط تنوع هموگلوبین ها با تمایل مختلف به اکسیژن موضوع مطالعاتی بوده است که در سال های ۱۹۹۷ و ۲۰۰۴ انجام شده است (Fago et al., 1997, Verde et al., 2004).

تحقیقات مختلفی در زمینه ی تشخیص و اثبات چندگانگی هموگلوبین در خانواده ی آزادماهیان به طور خاص (Binotti et al., 1971, Braman et al., 1977) و سایر ماهی ها با استفاده از الکتروفورز صورت گرفته است (Buhler and Shanks, 1959, Powers, 1974, Ramsey, 1959, Yamanaka et al., 1965).

این واقعیت که میزان هموگلوبین های مختلف در ماهی ها متناظر با تنظیم میزان اتصال اکسیژن با هموگلوبین در سازش با عوامل مختلف در محیط زیست آنها مثل دما می باشد توسط Fago و در سال ۲۰۰۱ روشن گردید (Fago et al., 2001).

Clementi و همکارانش در سال ۲۰۰۱ بر روی جنس و گونه *Acipenser naccarii* تاسماهی ایتالیایی، تحقیقات جامعی را در زمینه ی خالص سازی هموگلوبین ها (Clementi et al., 1999)، اندازه گیری میزان اکسیژن افینته دو هموگلوبین خالص شده و بررسی تأثیر تغییرات یونی، دمایی و فسفات های آلی بر روی میزان اکسیژن افینته انجام دادند. آنها همچنین به روش ادمن توالی پروتئین های خالص سازی شده را مشخص نمودند. همچنین در این تحقیق آنها نشان دادند که با افزایش GTP میزان اکسیژن افینته کاهش می یابد (Clementi et al., 2001a).

آنها در ادامه، تحقیقات خود را بر روی زنجیره های آلفا و بتا گلوبین متمرکز کردند و این نتیجه حاصل شد که دو هموگلوبین خالص شده دارای دو زنجیره ی آلفا و دو زنجیره ی بتای متفاوت دارند. از نظر درصد اسید آمینه ی هیستیدین، زنجیره ی بتای هموگلوبین این ماهی مشابه زنجیره ی بتای انسان و بقیه ماهیان استخوانی می باشد ولی زنجیره ی آلفای آن مشابه ساختار دهان گردان مثل لامپری و گلوبین دو کفه ای ها می باشد (Clementi et al., 2001b). در سال ۲۰۰۲ چندگانگی هموگلوبین ماهی *Anarhichas minor* توسط Verde و گروه تحقیقاتی اش مورد بررسی قرار گرفت و سه نوع هموگلوبین در خون این ماهی جداسازی و تخلیص شد. اثر بوهر و روت نیز بر روی هموگلوبین های خالص سازی شده مورد مطالعه واقع شد (Verde et al., 2002). وی در سال ۲۰۰۳ بر روی نحوه انتقال اکسیژن در ماهیان قطبی تحقیق کرد و مقاله ای در رابطه با تکامل ماهی قطبی و تحلیل های فیلوژنتیکی بر روی آن نوشت (Verde and di Prisco, 2003, Verde et al., 2003) و در سال ۲۰۰۴ بر روی ساختار و عملکرد هموگلوبین ماهی قطبی مطالعه کرد (Verde and di Prisco, 2004).

تحقیقی جامع در سال ۲۰۰۴ بر روی هموگلوبین ماهی *Pagothenia bernacchii* و ساختار اول و توالی اسید های آمینه در آن و نیز کریستالوگرافی مشتق کربن مونوکسید هموگلوبین آن صورت گرفت (Camardella et al., 1992).

انطباق عملکرد هموگلوبین و تکامل ژن بیان کننده گلوبین در ماهی *Notothenioid* در سال ۲۰۰۶ مورد مطالعه قرار گرفت (di Prisco et al., 2007). همچنین در همین سال Murad و همکاران علت کاهش حمل اکسیژن توسط هموگلوبین را با افزایش دما و کاهش غلظت اکسیژن محیط در ماهی *Carassius auratus* (gold fish) بررسی کردند (Murad et al., 1990).

برای توضیح منشاء اصلی تنوع هموگلوبین در ماهی ها دو فرضیه وجود دارد که اولی تئوری انتخاب پذیری و دومی تئوری بی طرفی نامیده می شود که چند تایی بودن هموگلوبین را در جهش های طبیعی توضیح می دهد (Andersen *et al.*, 2009, Kimura, 1989).

در بسیاری از مطالعات جدید، یافتن ژن های بیان کننده ی هموگلوبین و نقش آن در پدیده ی چند هموگلوبینی، و نیز تعیین توالی این ژن ها موضوع تحقیق می باشند (Awenius *et al.*, 2001, Cocca *et al.*, 2000, Cocca *et al.*, 1997, Okamoto *et al.*, 2001, Yoshizaki *et al.*, 1991). بررسی نحوه ی انطباق ماهی با تغییرات شرایط محیطی در اثر گرمایش زمین و نقش هموگلوبین در آن (di Prisco *et al.*, 2007, Verde *et al.*, 2006) از دیگر مطالعات این حوزه است. بررسی موقعیت فیلوژنی هموگلوبین ها از لحاظ تکاملی و عملکردی از طریق مقایسه ی ژن های بیان کننده ی هموگلوبین (Roesner *et al.*, 2005) و نیز تفسیر عملکرد های مختلف هموگلوبین از طریق بیان ژن (Nikinmaa and Rees, 2005) از دیگر موضوعات پژوهشی مورد مطالعه می باشند.

فصل سوم:

روش اجرای تحقیق

مواد ۱-۳

(۱) سدیم در هیدروژن فسفات، فرمول: $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ، $MW = 156/01 \text{ gr.mol}^{-1}$

(۲) دی سدیم هیدروژن فسفات، فرمول: $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ ، $MW = 141/96 \text{ gr.mol}^{-1}$

(۳) آنیلو-۸-نفتالن سولفونیک اسید (ANS)، فرمول: $C_{16}H_{13}SNO_3$ ، $gr.mol^{-1}$ ، $MW = 300$

(۴) سدیم دی تیونیت، فرمول: $Na_2S_2O_4$ ، $MW = 174/11 \text{ gr.mol}^{-1}$

(۵) اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA)، فرمول: $C_{10}H_{16}N_2O_8$ ، $gr.mol^{-1}$ ، $MW = 292/2$

(۶) تریس اسیدی، فرمول: $C_4H_{11}N O_3.HCl$ ، $MW = 157/56 \text{ gr.mol}^{-1}$

(۷) سدیم آزید، فرمول: NaN_3 ، $MW = 65/01 \text{ gr.mol}^{-1}$

(۸) کلرید سدیم، فرمول: $NaCl$ ، $MW = 58/44 \text{ gr.mol}^{-1}$

(۹) تریس بازی، فرمول: $C_{14}H_{11}NO_3$ ، $MW = 121/11 \text{ gr.mol}^{-1}$

(۱۰) آکریل آمید، فرمول: $CH_2CHCONH_2$ ، $MW = 71/08 \text{ gr.mol}^{-1}$

(۱۱) متیلن نیس آکریل آمید، فرمول: $C_7H_{10}N_2O_2$ ، $MW = 154/17 \text{ gr.mol}^{-1}$

(۱۲) سدیم دو دسیل سولفات (SDS)، فرمول: $C_{12}H_{25}NaO_4S$ ، $gr.mol^{-1}$ ، $MW = 288/38$

(۱۳) آمونیوم پر سولفات (APS)، فرمول: $(NH_4)_2S_2O_8$ ، $MW = 288/2 \text{ gr.mol}^{-1}$

(۱۴) TEMED (N,N,N',N'-tetramethylenediamine)، فرمول: $C_6H_{16}N_2$ ، $MW = 116/21 \text{ gr.mol}^{-1}$

(۱۵) گلیسین، فرمول: H_2NCH_2COOH ، $MW = 75/07 \text{ gr.mol}^{-1}$

(۱۶) برموفنل بلو، فرمول: $C_{19}H_{10}Br_4O_2S$ ، $MW = 669/98 \text{ gr.mol}^{-1}$

(۱۷) گلیسرول، فرمول: $C_3H_8O_3$ ، $MW = 92/10 \text{ gr.mol}^{-1}$

(۱۸) کوماسی بلو، فرمول: $C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$ ، $MW = 854/03 \text{ gr.mol}^{-1}$

(۱۹) متانول، فرمول: CH_3OH ، $MW = 32 \text{ gr.mol}^{-1}$

(۲۰) اتانول، فرمول: C_2H_5OH ، $MW = 46 \text{ gr.mol}^{-1}$

(۲۱) اسید استیک، فرمول: CH_3COOH ، $MW = 60 \text{ gr.mol}^{-1}$

(۲۲) هیدروکسید سدیم، فرمول: $NaOH$ ، $MW = 40 \text{ gr.mol}^{-1}$

(۲۳) هیدروکلریک اسید، فرمول: HCl ، $MW = 36/46 \text{ gr.mol}^{-1}$

(۲۴) سدیم دو دسیل سولفات (SDS)، فرمول: $NaC_{12}H_{25}SO_4$ ، 38 gr.mol^{-1}

$$MW = 288$$

(۲۵) دو دسیل تری متیل آمونیوم برماید (DTAB)، فرمول: $CH_3C_{11}H_{22}NC_3H_9Br$ ،

$$MW = 308 / 34 \text{ gr.mol}^{-1}$$

(۲۶) اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA)، فرمول: $C_{10}H_{16}N_2O_8$ ،

$$MW = 292 / 24 \text{ gr.mol}^{-1}$$

(۲۷) دی تیوتری تول (DTT)، فرمول: $C_4H_{10}O_2S_2$ ، $154 / 25 \text{ gr.mol}^{-1}$

(۲۸) آکریل آمید، فرمول: C_3H_5NO ، $71 / 0.77 \text{ gr.mol}^{-1}$

۲-۳ روشها

۱-۲-۳ تهیه نمونه خون و استخراج هموگلوبین

با هماهنگی های لازم از طرف مرکز تحقیقات شیلات تهران با اداره شیلات استان گیلان، و مراجعه به **مزرعه** پرورش ماهیان خاویاری قرون در بخش مرکزی تالش عملیات خون گیری از ماهیان پرورشی دریایی مورد نظر انجام گرفت. شرایط آب محیط زیست ماهیان خاویاری در این مرکز، در دمای ۱۳-۱۴ درجه سانتی گراد و درجه شوری ۹ ppm گزارش شد. به لحاظ شرایط سنی عمل خونگیری از ساقه دم ماهیان نابالغ سه ساله انجام گرفت. سپس نمونه های خون در ظروف مخصوص که آغشته به هپارین ریخته شده و توسط کلمن یخ به آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیوفیزیک و بیوشیمی دانشگاه تهران IBB منتقل گردید.

برای استخراج هموگلوبین از خون، ۹ ml از خون ماهی آغشته به هپارین را بمدت ۱۵ دقیقه با ۳۰۰۰ دور سانتریفوژ می کنیم. در این مرحله سرم خون در فاز رویی قرار می گرفت که با سر ریز کردن مایع رویی از نمونه خارج گردید. مرحله بعد با افزایش ۱۰ حجم محلول سالین ۰/۹٪ (کلرید سدیم) به نمونه حاصله و انجام سانتریفوژ به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰ RPM انجام پذیرفت و سپس مایع رویی خارج گردید. به رسوب حاصل ۵ حجم بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH ۷/۴ اضافه و بعد از انجام سانتریفوژ بمدت ۱۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ RPM مایع رویی خارج گردید. در ادامه بمنظور لیز کردن گلبول های قرمز به اندازه ۹ برابر حجم رسوب آب دو بار تقطیر سرد افزوده شد. سپس بمدت ۱۰ دقیقه با ۱۸۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. مایع رویی حاوی هموگلوبین و رسوب حاصله جداده سلول ها می باشد.

محلول بالایی را جدا و سپس نمک سولفات آمونیوم ۲۰٪ اضافه نموده و ۱۵ دقیقه در حالت ایستا قرار داده و سپس سانتریفوژ با دور ۱۴۰۰۰ RPM در دمای ۲ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت انجام می گیرد. محلول بالایی حاوی هموگلوبین می باشد که بمنظور جداسازی 2,3-DPG از روش Benesch و همکاران (Benesch et al., 1973) استفاده گردید. بر اساس این روش فرایند دیالیز سه بار با استفاده از

بافر فسفات ۵۰ mM با pH ۷/۴ بمدت ۱۲ الی ۲۴ ساعت انجام گرفت. سپس محلول هموگلوبین حاصل را به اندازه مصرف روزانه در ویال ها تقسیم می نماییم. غلظت هموگلوبین با روش اسپکتروفتومتری با استفاده از ضریب جذب مولی $13/5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ بر پایه مونومر در طول موج ۵۴۱ nm برای اکسی هموگلوبین اندازه گیری شد (Laterreur and English, 2007, Romeo et al., 2003).

۳-۲-۲ روش تهیه کیسه دیالیز

کیسه های دیالیز^۱ (cut off ۱۲۴۰۰ Da) به اندازه ده سانتی متری بریده شد و در سه نوبت و هر نوبت به مدت ۱۵ دقیقه در محلول بی کربنات سدیم ۵ درصد جوشانده شد. پس از آبکشی، کیسه ها در سه نوبت و هر نوبت به مدت ۱۵ دقیقه در یک لیتر محلول EDTA با غلظت ۵ میلی مولار جوشانده شد و پس از آبکشی مجدد با آب مقطر تا زمان مصرف در اتانول ۵۰ درصد و در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

۳-۲-۲ مطالعات الکتروفورز

مهاجرت ذرات باردار تحت اثر یک میدان الکتریکی را الکتروفورز گویند. ذرات شیمیایی با بار الکتریکی در یک سیستم الکتروفورز، بر حسب نوع بار، به سمت کاتد یا آنود حرکت می کنند. در این فرایند خصوصیات فیزیکوشیمیایی مولکول ها مانند میزان بار، اندازه، شکل و شرایط محیط اطراف آنها از قبیل نوع و غلظت محیط نگهدارنده، جنس، قدرت یونی و pH بافر، درجه حرارت و مولفه های میدان الکتریکی (شدت جریان، ولتاژ و زمان الکتروفورز) موثر هستند. بسیاری از مولکول های زیستی مهم نظیر اسیدهای آمینه، پپتیدها، پروتئین ها، نوکلئوتیدها و اسیدهای نوکلئیک دارای گروه های قابل یونیزه شدن هستند، بنابراین در هر pH ای در محلول می توانند دارای بار مثبت، منفی و یا خنثی باشند. الکتروفورز امروزه در رشته های بیولوژی، بیوشیمی، شیمی پروتئین، داروشناسی، تشخیص طبی، بیولوژی مولکولی و ژنتیک کاربرد دارد.

۳-۲-۳ الکتروفورز ژل SDS^۲

پس از استخراج و جداسازی هموگلوبین ها از خون، به منظور تعیین درصد خلوص آنها از الکتروفورز SDS-PAGE استفاده شد. تفکیک باندهای پروتئینی بر روی ژل الکتروفورز سدیم دو دسیل سولفات پلی آکریل آمید بر اساس جرم مولکولی پروتئین ها و نتیجه اثر غربال کنندگی ژل پلی آکریل آمید است. این روش به طور معمول برای بررسی مراحل خالص سازی، محاسبه مقدار نسبی و تعیین جرم مولکولی

^۱ Dialysis tubing cellulose membrane

^۲ Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAG)

پروتئین ها و پپتید ها بکار می رود. با توجه به اندازه ی منافذ ژل، حرکت پروتئین های کوچکتر با مزاحمت کمتر و حرکت پروتئین های بزرگتر با مزاحمت بیشتری همراه است. مسافت طی شده توسط پروتئین ها در پایان الکتروفورز با وزن مولکولی آنها تناسب دارد. این موضوع اساس تعیین وزن مولکولی در روش SDS-PAGE می باشد (Kim et al., 2005). تفکیک پروتئین ها در این روش ناشی از ویژگی مناسب ژل پلی اکریل آمید در غربال پروتئین ها با اندازه مولکولی متفاوت است. بر اساس وزن مولکولی مجموعه پروتئینی مورد مطالعه درصد ژل مورد استفاده متفاوت است. در ژل با غلظت ۵، ۱۰، ۱۵ درصد به ترتیب می توان پروتئین هایی در محدوده ۲۰-۳۰۰، ۱۵-۲۰۰ و یا ۱۰۰-۱۲۰ کیلو دالتون را از هم تفکیک کرد. در انجام این آزمایش روش Laemmli با اندکی تغییر بکار گرفته شد (Bollag and Edelstein, 1991). در این روش ژل شامل دو قسمت جدا کننده و متراکم کننده می باشد. قسمت متراکم کننده اساسا برای تغلیظ نمونه و جدا سازی بهتر باند ها است. ابتدا شیشه الکتروفورز با دقت شسته و محلول ژل جدا کننده^۳ طبق دستور، آماده و در بین شیشه ها ریخته شد. مقداری الکل ۷۰ درصد برای صاف شدن ژل به ارتفاع یک سانتی متر بر روی آن ریخته می شود. بعد از کامل شدن پلیمریزاسیون ژل جدا کننده، محلول ژل متراکم کننده^۴ که روش تهیه آن در زیر آمده است بر روی آن ریخته شد. در همین لحظه شانه ژل به گونه ای که حباب در زیر آن تشکیل نشود، برای ایجاد چاهک بر روی ژل قرار می گیرد. نقش بیس آکریل آمید ایجاد پیوند متقاطع و شبکه ای در ژل می باشد. محلول هموگلوبینی که برای آزمایش الکتروفورز تهیه شد، دارای غلظت ۱ mg/ml بود. پس از آماده سازی ژل و خارج کردن شانه، ژل را داخل بافر تانک قرار داده و سپس نمونه های آماده شده با استفاده از بافر نمونه و طبق دستور زیر، داخل چاهک ها ریخته شد. در مرحله ی بعد دستگاه به میدان الکتریکی متصل گردید. در پایان رنگ آمیزی ژل به وسیله محلول رنگی که با کوماسی بلو تهیه شده بود، انجام گرفت.

مواد مورد نیاز برای تهیه ژل جدا کننده (۱۵٪)

- استوک آکریل آمید ۳۰٪ ۵/۸۳ میلی لیتر
- بیس آکریل آمید ۱٪ ۰/۷۳ میلی لیتر
- بافر تریس (۱/۵ مولار با pH ۸/۷) ۲/۵ میلی لیتر
- SDS ۱۰٪ ۰/۱ میلی لیتر
- آب دوبار تقطیر ۰/۸ میلی لیتر
- آمونیوم پر سولفات ۱۰٪ (APS) ۳۳ میکرولیتر

³ Separating gel

⁴ Stacking gel

مواد مورد نیاز برای تهیه ژل متراکم کننده (۰.۴٪)

- استوک آکریل آمید ۳۰٪ ۰/۷۵ میلی لیتر
- بافر تریس (۰/۵ مولار با pH ۷/۸) ۲/۵ میلی لیتر
- SDS ۱۰٪ ۰/۱ میلی لیتر
- آب دوبار تقطیر ۲ میلی لیتر
- آمونیوم پر سولفات ۱۰٪ (APS) ۳۳ میکرولیتر
- TEMED ۳۳ میکرولیتر

در ادامه این روش محلول پروتئینی به نسبت ۲:۱ با بافر نمونه ترکیب شد.

مواد مورد نیاز برای تهیه بافر نمونه

- تریس اسیدی (۱ مولار با pH ۷/۸) ۲/۴ میلی لیتر
- SDS ۱۰٪ ۳ میلی لیتر
- گلیسرول ۳ میلی لیتر
- برموفنل بلو ۰/۱٪ ۶ میلی گرم

مواد فوق به حجم ۴۰ میلی لیتر رسانده می شود (pH ۶/۸).

نمونه به مدت ۳ دقیقه در آب جوش حرارت داده شود و در نهایت داخل چاهک ریخته شد. بعد از ریختن بافر به درون مخزن دستگاه با برقراری جریان الکتریکی، در ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت و به مدت یک ساعت انجام گرفت.

مواد مورد نیاز برای تهیه بافر مخزن الکتروفورز

- SDS ۱ گرم
- تریس بازی ۳ گرم
- گلیسین ۱۴/۴ گرم

مواد فوق در حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر آماده می گردد. (pH ۸/۳)

بعد از اتمام الکتروفورز، ژل آکريل آميد به مدت ۲۰ دقيقه در محلول تثبيت کننده (اسيد استيك ۱۲٪ + متانول ۵۰٪) و سپس به مدت يك ساعت در محلول رنگ قرار داده شد.

مواد مورد نیاز برای تهیه محلول رنگ

- کوماسی بلو
- اسیداستیک
- آب مقطر
- متانول
- ۰/۲۵ گرم
- ۲۵ میلی گرم
- ۱۰۰ میلی لیتر
- ۱۲۵ میلی لیتر

برای مشاهده باند ها، ژل به مدت ۳ ساعت در محلول رنگ بر گذاشته شد. بعد از چند بار تعویض محلول رنگ بر باند ها بر روی ژل ظاهر می شود.

مواد مورد نیاز برای تهیه محلول رنگ بر

- اسیداستیک
- آب دو بار تقطیر
- متانول
- ۱۰ میلی گرم
- ۵۰ میلی لیتر
- ۴۰ میلی لیتر

۲-۳-۲-۳ الکتروفورز طبیعی^۵

در این روش الکتروفورز پروتئین ها، بر اساس خواص ذاتی و بر اساس اندازه، شکل، و بار طبیعی از هم جدا می شوند. در این روش حرکت پروتئین ها هم بر اساس بار و هم بر اساس وزن می باشد. به منظور مطالعه میزان تغییر ساختار پروتئین ابتدا محلول هموگلوبین را با غلظت ۱ mg/ml آماده کردیم. روش انجام آزمایش همانند روش الکتروفورز SDS-PAGE با استفاده از ژل پلی آکريل آميد ۱۵٪ صورت گرفت و مراحل انجام آزمایش کاملاً مشابه الکتروفورز SDS-PAGE تنظیم گردید. با این تفاوت که در ژل طبیعی بجای استفاده از هر گونه مواد واسرشته کننده با همان نسبت از آب دو بار تقطیر استفاده گردید (Bollag and Edelstein, 1991).

⁵ Native gel electrophoresis

۳-۲-۳ الکتروفورز کانونی^۶

برای تأیید خلوص هموگلوبین های بدست آمده از طریق ستون کروماتوگرافی CM- سلولز ، از روش دقیق و حساس الکتروفورز کانونی استفاده شد. به طور کلی پروتئین ها مولکول های چند یونی هستند که بار خالص آنها وابسته به pH محیط اطراف است. در این روش پروتئین ها بر اساس pH ایزوالکتریک خود جدا می شوند. این روش از درجه تفکیک بالایی برخوردار است. با توجه به تأثیر pH محیط در میزان یونیزه شدن گروه های اسیدی و بازی، هر پروتئین دارای یک نقطه ایزوالکتریک (pI) منحصر به خود است. نقطه ایزوالکتریک نقطه ای از pH است که در آن تعداد بارهای مثبت و منفی موجود در ساختمان پروتئین با هم برابر و بار خالص مولکول صفر است. اگر پروتئین در pH پایین تر از pI خود قرار گیرد، بار مثبت پیدا می کند.

پروتئین در این حالت به عنوان کاتیون (یون مثبت) عمل می نماید و در میدان الکتریکی به طرف کاتد (قطب منفی) حرکت می کند. در حالتی که پروتئین در pH بالاتر از pI خود قرار گیرد، بار منفی پیدا می کند و به عنوان آنیون (یون منفی) به طرف آند (قطب مثبت) می رود. pI پروتئین ها کاملاً متنوع می باشد. جداسازی در این روش با اعمال اختلاف پتانسیل در عرض ژلی که شامل گرادیان pH است انجام می شود. در این آزمایش پروتئین را بر روی نوارهایی با شیب تثبیت شده pH^8 که در محدوده pH ۳ تا ۱۰ با اندازه نوار ۱۸ سانتی متر بود، مورد مقایسه قرار گرفت. برای این منظور نوار های مذکور با محدوده pH از ۳ تا ۱۰ بر روی محلول آبدهی^۹ حاوی پروتئین قرار داده شد (میزان پروتئین و محلول آبدهی ۳۱۵ μl بود) و بمنظور جلوگیری از تبخیر محلول و کریستاله شدن اوره، روی محافظ ژل که بطرف بالا قرار دارد به مقدار لازم (حدود ۱ میلی لیتر) روغن معدنی^{۱۰} ریخته شد.

غلظت پروتئین بین ۵۰ تا ۸۰ میکروگرم تنظیم شد. ژل را بمدت ۱۶ ساعت بدون اعمال ولتاژ^{۱۱} در محفظه مشخص دستگاه Bio Rad نگهداری و سپس با استفاده از یک کاغذ صافی روغن معدنی موجود بر روی نوار ها گرفته شد و بر روی فتیله الکترودی^{۱۲} واقع بر روی الکترودهای دستگاه قرار داده شد به گونه ای قرار گرفت که ژل به سمت پایین قرار داشته باشد. سپس برنامه کانونی^{۱۳} بر روی ژل ها اعمال گردید. در پایان نیز نوارها توسط محلول رنگ آمیزی حاوی کوماسی بلو رنگ آمیزی شدند.

⁶ IsoElectric Focusing (IEF)

⁷ Isoelectric point

⁸ Immobilized pH Gradient (IPG)

⁹ Rehydration solution

¹⁰ Mineral oil

¹¹ Passive rehydration

¹² Electrode wick

¹³ Focusing

مواد مورد نیاز برای تهیه محلول آبدهی

| | | |
|---|-------------------|---------------|
| • | اوره | ۹/۶۱ گرم |
| • | Ampholine (۲۰٪) | ۲۰۰ ماکرولیتر |
| • | CHAPS | ۰/۸ گرم |
| • | DTT | ۰/۱۵۴ گرم |
| • | آب دی یونیزه | ۲۰ ماکرولیتر |
| • | برموفنول بلو (۱٪) | ۴ ماکرولیتر |

دستور العمل برنامه کانونی

| شیب دار ^{۱۴} | ساعت- ولتاژ | زمان | ولتاژ | |
|-----------------------|-------------|----------|-------|---------|
| خطی ^{۱۵} | ----- | ۲۰ دقیقه | ۲۵۰ | قدم اول |
| خطی | ----- | ۲/۵ ساعت | ۱۰۰۰۰ | قدم دوم |
| تندی | ۴۰۰۰۰ | ----- | ۱۰۰۰۰ | قدم سوم |
| | ۵۰۰۰۰ | ۷ ساعت | | مجموع |

۳-۲-۴ مطالعات کروماتوگرافی به روش تعویض یونی^{۱۶}

کروماتوگرافی به روش تعویض یونی یکی از تکنیک های مهم در جداسازی و تخلیص پروتئین ها محسوب می شود. در این روش اختلاف توزیع بارها بر روی سطح پروتئین بسیار مهم می باشد. اساس کروماتوگرافی تعویض یونی رقابت میان یون ها برای اتصال به گروه های باردار شده (با بار مخالف) بر روی یک تعویض کننده ی یونی است. تعویض کننده ی یونی از پلیمر های خنثی نظیر پلی استایرن یا سلولز ساخته شده اند که بارهای مثبت یا منفی از طریق پیوند کووالان به آن متصل گشته اند. بر هم کنش میان پروتئین و یک تعویض کننده ی یونی نه تنها به بار خالص و قدرت یونی بستگی دارد بلکه به توزیع بار سطحی پروتئین، pH، طبیعت یون های ویژه در حلال، افزودنی هایی نظیر حلال های آلی و خواص

¹⁴ Ramp

¹⁵ Linear

¹⁶ Ion-exchange chromatography

تعویض کننده ی یونی نیز وابسته است. بطور کلی در این روش پروتئین ها در شرایطی که حداکثر اتصال به سطح رزین ایجاد شود، وارد ستون می شوند و سپس بمنظور جداسازی، آنها را با تغییر شرایط یونی محیط بصورت انتخابی از ستون شسته و جدا می کنند.

بنابر این برای اتصال پروتئین ها بر روی یک تعویض کننده کاتیونی مانند CM- سلولز، قدرت یونی پایین و pH معادل ۵ شرایط ایده آلی محسوب می شود. در کروماتوگرافی تعویض آنیونی، مانند DEAE- سلولز، قدرت یونی پایین و pH حدود ۸ شرایط مناسب محسوب می شود.

با افزایش و کاهش قدرت یونی و یا pH و یا ترکیبی از هر دو، پروتئین ها یکی پس از دیگری از ستون شسته می شوند و از بستر جدا شده و خارج می گردند. در این روش کروماتوگرافی ما یک سطح تعویض کننده یونی داریم که باردار است و هر چه میزان این بار بیشتر باشد، بار خالص سطح پروتئین که مخالف این بار می باشد به آن محکومتر اتصال می یابد. همچنین هر چه pH محلول نسبت به pH ایزوالکتریک پروتئین فاصله بیشتری داشته باشد پروتئین به بستر (تعویض کننده یونی) محکم تر متصل می شود.

در این تحقیق برای جداسازی هموگلوبین های دو گونه مورد مطالعه از کروماتوگرافی تعویض یونی استفاده شد. از یک تعویض کننده کاتیونی بنام CM- سلولز به عنوان بستر ستون کروماتوگرافی و از تغییرات pH به عنوان روش اصلی در جداسازی استفاده گردید. CM- سلولز استفاده شده در بستر ستون از شرکت sigma خریداری شده بود.

این بستر با استفاده از پروتوکل آماده سازی مخصوص این ماده که در آدرس الکترونیکی شرکت sigma موجود بود، آماده گردید و در یک ستون کروماتوگرافی با طول ۲۰ سانتی متر و قطر ۱ سانتی متر مورد استفاده قرار گرفت.

۱۰ ml از نمونه های هموگلوبین استخراج شده از خون، از فریزر ۷۰- خارج شد و پس از دیالیز با بافر فسفات ۱۰ mM با pH ۵/۵ (pH پایین تر از نقطه ایزوالکتریک هموگلوبین است) بمدت ۱۲ ساعت، بر روی ستون کروماتوگرافی قرار می گرفت. عمل شستشو با بافر فسفات ۱۰ mM و از pH ۶ و با حجم ۳ برابر ظرفیت ستون^{۱۷} آغاز شد و با روندی افزایشی با حد فاصل ۰/۲ تا pH ۸/۵ که کل هموگلوبین ها از ستون خارج می شد، ادامه می یافت. خروجی ستون در ویال های ۲ ml جمع آوری گردید. سپس با استفاده از دستگاه طیف سنجی مرئی- فرابنفش جذب تک تک ویال ها اندازه گیری شد و کروماتوگرام مربوط به هر نمونه رسم گردید.

¹⁷ Bed volume

۳-۲-۵ مطالعات طیف سنجی مرئی-فرابنفش^{۱۸}

مطالعات طیف سنجی مرئی-فرابنفش به منظور بررسی تغییرات در طیف جذبی هموگلوبین استفاده شد. دستگاه طیف سنج نوری شیمادزو^{۱۹} مدل UV ۳۱۰۰ مجهز به کامپیوتر جهت امور طیف سنجی مورد استفاده قرار گرفت. این دستگاه بصورت دو پرتوی^{۲۰} که قابلیت تفاضل دارد کار می کند. یعنی دارای دو سل می باشد که در یکی بافر و در دیگری نمونه قرار می گیرد و تفاوت طیفی آنها آشکار می شود. محدوده روبش^{۲۱} طیف بین طول موج های ۲۰۰ nm تا ۸۰۰ nm تنظیم گردید. وضعیت صفر دستگاه در ابتدا توسط بافر فسفات ۱۰ mM با pH ۷/۳ فراهم شد. یعنی دو سل دستگاه از بافر پر شد و خط پایه^{۲۲} بدست آمد و سپس در سل نمونه، نمونه های مربوط به دو هموگلوبین خالص شده قرار می گرفت. همچنین بمنظور تعیین غلظت (c) هموگلوبین از رابطه بیر لامبرت $A = \epsilon cd$ استفاده شد که در آن A جذب در طول موج ۵۴۱ nm، ϵ ضریب جذب مولی برای اکسی هموگلوبین در همان طول موج ۵۴۱ نانومتر برابر ۱۳/۵ بر میلی مولار بر سانتی متر بود (که این ضرایب جذب به ازای یک واحد هم محاسبه شده است). d طول مسیر عبور نور که معادل ۱ سانتی متر در نظر گرفته می شود.

۳-۲-۶ طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی (CD)^{۲۳}

دورنگ نمایی دورانی یک روش فیزیکی بسیار حساس برای مطالعه ساختار و بررسی تغییرات ساختاری مولکول های زیستی است که برهمکنش متفاوت برخی ماکرومولکول ها را با نور قطبیده دایره ای چپ گرد و راست گرد اندازه گیری می کند.

طیف دورنگ نمایی دورانی محدوده فرابنفش دور برای بررسی تغییرات ساختار دوم و طیف دورنگ نمایی دورانی محدوده فرابنفش نزدیک، مربوط به سهم زنجیره های جانبی آروماتیک و پیوند های دی سولفیدی در ساختار سوم پروتئین است (Li et al., 2000, Sugita et al., 1971).

طیف دورنگ نمایی دورانی در ناحیه ماوراء بنفش دور (محدوده روبش طیف بین ۱۹۰ و ۲۶۰ نانومتر)، با استفاده از دستگاه اسپکتروپلاریمتر Jasco مدل J-810 با استفاده از کووت کوارتز با قطر ۱ mm در دمای ۲۵°C بدست آمد. غلظت پروتئین حدود ۰/۲۳ mg/ml در حضور بافر فسفات ۱۰ mM با pH ۷/۳ تنظیم گردید. ساختار دوم پروتئین با استفاده از نرم افزار CDNN version 2.1 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

¹⁸ UV-Visible spectroscopy

¹⁹ Shimadzu

²⁰ Double beam

²¹ Scan

²² Base line

²³ Circular dichroism

۳-۲-۷ مطالعات طیف سنجی فلورسانس^{۲۴}

این طیف سنجی اطلاعاتی درباره آرایش فضایی، جایگاه پیوندی، برهمکنش حلال، فواصل بین مولکولی در اختیار ما می گذارد. در این تحقیق بمنظور بررسی آبرگریزی سطحی هموگلوبین ها از تغییرات میزان شدت فلورسانس استفاده شد. پرتو فلورسانس پرتو نشری فرابنفش و یا مرئی است که نسبت به پرتوی جذب طول موج بلندتر و انرژی کمتری دارد. دو نوع مطالعه فلورسنت برای ماکرومولکول ها انجام می شود. بعضی از ماکرومولکول ها دارای فلورسنت ذاتی و بعضی دیگر فاقد آن هستند لذا باید فلورسنت خارجی به آنها اضافه و پس از آن ساختار های پروتئینی مورد مطالعه قرار گیرد. پروتئین ها در صورت دارا بودن اسیدهای آمینه تریپتوفان، تیروزین، فنیل آلانین دارای فلورسنت ذاتی هستند. فلورسنت هر کدام از این اسیدهای آمینه در طول موج خاصی ظاهر می شود. اسید آمینه تریپتوفان عامل اصلی فلورسنت ذاتی پروتئین هاست. طیف نشری پروتئین ها با استفاده از دستگاه طیف نورسنج فلورسانس Varian مدل Carry Ecips با طول موج ثابت بر انگیزختگی ۲۸۵ nm در محدوده ۲۹۰-۴۰۰ nm و با فواصل طول موجی ۰/۹ نانومتر ثبت شده است. محلول پروتئین با غلظت حدود ۲/۳۴ mg/ml در حضور بافر فسفات ۱۰ mM با pH ۷/۳ تهیه و اندازه گیری شدت فلورسانس آن در دمای ۲۵°C انجام پذیرفت. محفظه های کوارتزی استفاده شده حجمی معادل ۴۰۰ µl و طول مسیری معادل ۰/۵ cm را در جهت عبور نور داشته اند. سرعت روبش طول موج توسط تکفام ساز نشری بکار رفته ۱۲۰ nm/min و نیز قطر دریچه نشری - تهییجی ۱۰ nm بوده است. محلول های پروتئینی دارای غلظتی در حدود ۲/۳۴ mg/ml و در بافر فسفات ۱۰ mM، pH ۷/۳ تهیه شدند. جهت به حداقل رساندن اثر نورهای پراکنده شده^{۲۵} از فیلتر های خاص بر سر راه فوتون های نشری استفاده شده است تا فوتون های با طول موج کمتر از ۲۹۰ nm را جذب نمایند. وجود پاکت های آب گریز در دسترس در هموگلوبین با استفاده از 1-Anilinonaphthalene-8-sulfonate (ANS) بررسی شد. ANS یک ردیاب نشرزا است که دارای طیف نشری مشخص و ویژه ای بر اساس میزان آبرگریز بودن محیط اطراف می باشد. طیف نشری کمپلکس ANS - هموگلوبین در ۲۵°C بین طول موج های ۳۶۶-۶۵۰ nm و طول موج برانگیزختگی ۳۵۵ nm با همان شرایط دستگاهی قبل ثبت شده است. قبل از ثبت طیف نشری زمان انکوباسیونی حدود ده دقیقه برای نفوذ ANS در پاکت های آبرگریز موجود در ساختار پروتئین به آن داده شد.

۳-۲-۸ روش اندازه گیری درصد اشباع هموگلوبین

میل ترکیبی اکسیژن با هموگلوبین بر اساس اختلاف در خصوصیات طیف جذبی دو رنگیزه اکسی هموگلوبین و دیاکسی هموگلوبین با استفاده از روش Tietz اندازه گیری شد

²⁴ Spectrofluorimeter

²⁵ Scattered lights

(Tietz and Andresen, 1986). سدیم دی تیونیت ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) یک عامل کاهنده قوی است که اکسی هموگلوبین را به دی اکسی هموگلوبین تبدیل می کند (Salhany, 2008, Stevens *et al.*, 2005, Weiland *et al.*, 2004). درصد اشباع هموگلوبین از اکسیژن که با نشان داده می شود و به صورت زیر تعریف می گردد:

$$S_{O_2} (\%) = 100 \times (\text{ظرفیت اتصال اکسیژن/میزان اکسیژن متصل به هموگلوبین}) \quad \text{معادله (۱-۲)}$$

ظرفیت اتصال عبارتست از کل غلظت اکسیژن هنگام اشباع کامل هموگلوبین. درصد اشباع به روش اسپکتروفتومتری با استفاده از فرمول زیر محاسبه می شود:

$$S_{O_2} (\%) = K_4 \left(\frac{A_{577}}{A_{548}} \right) - K_5 \quad \text{معادله (۲-۲)}$$

روش تعیین ضرایب K_4 و K_5

غلظت مناسب هموگلوبین حدود $2/34 \text{ mg/ml}$ در محلول بافر فسفات 10 mM با $\text{pH } 7/3$ تهیه گردید. $800 \mu\text{l}$ از محلول هموگلوبین که برای مدت کافی جهت اشباع از اکسیژن در تماس با هوا بوده و به حالت تعادل رسیده است را انتخاب و در دمای 25°C جذب آن را در طول موج 584 nm نانومتر با استفاده از دستگاه طیف سنج نوری شیمادزو مدل $UV 3100$ مجهز به کامپیوتر ا قرائت نموده و آن را $A_{548(0)}$ نامیدیم. همچنین پس از قرائت جذب در 577 nm نانومتر آن را $A_{577(0)}$ نامیدیم. مقدار $100 \mu\text{l}$ از محلول 3 mg/ml دی تیونیت سدیم در بافر فسفات با غلظت 10 mM با $\text{pH } 7/3$ (برای تهیه محلول ابتدا بافر فسفات را به مدت کافی بدون گاز 26 می کنیم) را به این نمونه اضافه نموده تا کاملاً به شکل داکسی تبدیل شود. جذب نمونه حاصل را در 548 nm و 577 nm قرائت نموده و آنها به ترتیب $A_{548(r)}$ و $A_{577(r)}$ نامگذاری شد. با استفاده از اعداد بدست آمده نسبت های R_0 و R_r به ترتیب زیر محاسبه شد:

$$R_0 = \frac{A_{548(0)}}{A_{577(0)}} \quad \text{معادله (۳-۲)}$$

$$R_r = \frac{A_{548(r)}}{A_{577(r)}} \quad \text{معادله (۴-۲)}$$

سپس با استفاده از روابط زیر ضرایب مورد نظر را محاسبه می کنیم:

$$K_4 = \frac{100}{(R_o - R_r)} \quad \text{معادله (۲-۵)}$$

$$K_5 = \frac{100R_r}{(R_o - R_r)} \quad \text{معادله (۲-۶)}$$

تیتراسیون محلول هموگلوبین با محلول سدیم دی تیونیت

مجدداً ۸۰۰ μl از محلول هموگلوبین با غلظت ۲/۳۴ mg/ml در بافر فسفات ۱۰ mM با pH ۷/۳ که برای مدت کافی جهت اشباع از اکسیژن در تماس با هوا قرار گرفت و به حالت تعادل رسیده بود، آماده شد. این محلول درون کووت دستگاه ریخته و در دمای ۲۵°C جذب آن را در طول موج های ۵۴۸ nm و ۵۷۷ nm قرائت شد. سپس این محلول را با اضافه کردن هر بار ۵ μl از محلول سدیم دی تیونیت مورد تیتراسیون قرار گرفت. تیتراسیون به شکلی انجام می شد که پس از هر بار افزایش محلول سدیم دی تیونیت، محلول هموگلوبین به آرامی مخلوط و سپس جذب آن در طول موج های ۵۴۸ nm و ۵۷۷ nm قرائت گردید. تیتراسیون تا برداشت کامل اکسیژن از هموگلوبین ادامه یافت. با داشتن ضرایب فوق می توان با وارد کردن جذب نمونه در ۵۴۸ nm و ۵۷۷ nm درصد اشباع هموگلوبین را اندازه گیری کرد. در پایان، تغییرات درصد اشباع نسبت به غلظت سدیم دی تیونیت رسم کرده و منحنی اشباع هموگلوبین بدست آمد. ۵۰ [SDT] آن غلظتی از [SDT] است که در آن غلظت حدود ۵۰٪ از هموگلوبین اشباع شده است معادل نقطه ی ۵۰ P در منحنی تفکیک اکسیژن در هموگلوبین می باشد (Nelson and Cox). در این روش از غلظت سدیم دی تیونیت مصرفی به جای فشار جزئی اکسیژن استفاده شده است.

۳-۲-۹ مطالعات کالریمتری روبشی افتراقی^{۲۷}

ترمودینامیک غیر طبیعی شدن پروتئین پایه و اساس درک پایداری پروتئین است. یکی از روش های سنجش در این زمینه استفاده از کالریمتری روبشی افتراقی (DSC) می باشد که بر پایه اندازه گیری انرژی مورد نیاز برای افزایش حرارت یک محلول پروتئینی نسبت به حالتی که پروتئینی در محلول وجود ندارد استوار شده است. در این روش، پارامتر اندازه گیری شده، ظرفیت گرمایی ویژه محلول پروتئین در فشار ثابت C_p است. مفهوم C_p میزان گرمای جذب شده توسط یک پروتئین برای تبدیل شکل طبیعی آن به

²⁷ Differential Scanning Calorimetry (DSC)

شکل باز شده می باشد. فرم باز شده نسبت به حالت طبیعی دارای ظرفیت گرمایی بیشتری است. اختلاف ظرفیت گرمایی این دو حالت ΔC_p گویای ظرفیت گرمایی شکل باز شده و اگر چه خصوصیات ترمودینامیکی پروتئین ها بسیار متفاوتند، ویژگی های ترمودینامیکی پروتئین های کوچک دارای شباهت های هستند که بدین ترتیب می توان مجموعه ای از قوانین عمومی را در این ارتباط ذکر کرد. ΔC_p گویای هیدروفوبیسیته در پروتئین هاست، از این رو هر چه ΔC_p پروتئین ها بیشتر باشد هایدروفوبیسیته ی پروتئین بیشتر می گردد (موحدی *et al.*, 1383).

در این آزمایش از دستگاه کالریمتری روبشی افتراقی با مدل Calorimetry Sciences Corporation , CSC 6100 N-DSC II استفاده شد. محدوده دمایی بکار رفته در این آزمایش $^{\circ}\text{C}$ ۲۰-۸۰ در نظر گرفته شد. در این آزمایش غلظت هموگلوبین در تمام نمونه ها برابر با $2/34 \text{ mg/ml}$ در بافر فسفات 10 mM با $\text{pH } 7/3$ و سرعت افزایش دمایی دستگاه 2°C/min تنظیم شد. دمای ماگزیمم پیک به عنوان T_m در نظر گرفته و گزارش شد.

۳-۲-۱۰ روش اندازه گیری تجمع پروتئین ها^{۲۸}

روش کدورت سنجی، روشی قدیمی است که برای اندازه گیری تجمع پروتئین ها استفاده می شود. اساس این روش بر پایه اندازه گیری دانسیته نوری در ناحیه مرئی- فرا بنفش نزدیک می باشد که در این ناحیه پروتئین ها جذب کمی دارند. دی تیو تراتیول (DTT^{29}) پل های دی سولفید موجود در هموگلوبین را می شکند و با سیستئین پیوند می دهد. بنابر این دی تیو تراتیول برای بازشدگی ساختار هموگلوبین استفاده می شود و پیوندهایی که سبب تاخوردگی پروتئین می شوند و به این ترتیب عاملی برای تجمع هموگلوبین محسوب می گردد. در این روش محلول هموگلوبین ها با غظت $2/34 \text{ mg/ml}$ در بافر فسفات 10 mM با $\text{pH } 7/3$ تهیه و جذب آنها در 360 nm اندازه گیری شد. در این آزمایش دما به روی 50°C درجه سانتی گراد ثابت، و غلظت دی تیو تراتیول مورد استفاده برابر با $6/523 \text{ mM}$ در نظر گرفته شد. ابتدا در سل نمونه $985 \mu\text{l}$ از نمونه هموگلوبین ریخته و به آن $15 \mu\text{l}$ از دی تیو تراتیول اضافه شد. در سل شاهد نیز $1 \mu\text{l}$ بافر فسفات با غلظت 10 mM و $\text{pH } 7/3$ به همراه $15 \mu\text{l}$ از دی تیو تراتیول اضافه شد. با استفاده از دستگاه طیف سنجی مرئی- فرابنفش به مدت 60 دقیقه و به فاصله هر 2 دقیقه یکبار جذب نور در 360 nm ثبت و پس از اتمام آزمایش نمودار A_{360} را بر حسب زمان رسم شد.

²⁸ Aggregation

²⁹ Dithiotreitol

۳-۲-۱ تیتراسیون هموگلوبین با دو دسیل تری متیل آمونیوم برماید (DTAB^{۳۰}) و ثبت طیف ها با استفاده از دستگاه طیف سنجی مرئی - فرابنفش و دستگاه دورنگ نمایی دورانی

دو دسیل تری متیل آمونیوم برماید ماده فعال سطحی کاتیونی است که اغلب پروتئین ها را ناپایدار می کند. تاثیر این ماده بر روی هموگلوبین سبب می شود که درصد آلفا هلیکس کاهش یابد و همچنین باند سور^{۳۱} گروه هم کاهش می یابد. همچنین این ماده سبب اکسایش هموگلوبین از حالت اکسی به مت می گردد (Nakaya et al., 1971). در این آزمایش تیتراسیون دو دسیل تری متیل آمونیوم برماید بر روی محلول هموگلوبین دو ماهی، به عنوان ماده فعال سطحی کاتیونی انجام گرفت. دو دسیل تری متیل آمونیوم برماید سبب فرایند باز شدگی^{۳۲} هموگلوبین ها می شود، که در این آزمایش تاثیر این فرایند بر روی هموگلوبین دوماهی مورد نظر، با هم مقایسه گردید. در این آزمایش غلظت هموگلوبین ها در حدود ۱/۲۳ mg/ml در حضور بافر فسفات ۱۰mM با pH ۷/۳ تنظیم و غلظت دو دسیل تری متیل آمونیوم برماید برابر با ۳/۰۸۳mg/ml در نظر گرفته شد. در هر نقطه از تیتراسیون ۲۵ μl دو دسیل تری متیل آمونیوم برماید به ۸۰۰μl محلول هموگلوبین اضافه و طیف این محلول ها در هر مرحله با استفاده از دستگاه طیف سنجی مرئی - فرابنفش و طیف دورنگ نمایی دورانی ثبت گردید.

۳-۲-۲ روش اندازه گیری غلظت گونه های Oxy، Deoxy، Met هموگلوبین

برای اندازه گیری غلظت گونه های هموگلوبین در محلول از معادله بنش^{۳۳} و همکارانش استفاده شد. در این آزمایش محلول هموگلوبین ها با غلظتی در حدود ۱/۲۳ mg/ml در بافر فسفات ۱۰ mM با pH ۷/۳ تهیه و میزان جذب نوری در سه طول موج ۵۴۰ nm و ۵۶۰ nm و ۵۷۶ nm مشخص شد.

$$[\text{Oxy Hb}] = (1.4747 A_{576} - 0.6820 A_{560} - 0.5329 A_{540}) \times 10^{-4} \text{ (mol heme)} \quad \text{معادله (۷-۲)}$$

$$[\text{Deoxy Hb}] = (1.4749 A_{560} - 0.2141 A_{576} - 1.1042 A_{540}) \times 10^{-4} \text{ (mol heme)} \quad \text{معادله (۸-۲)}$$

$$[\text{Met Hb}] = (4.5852 A_{540} - 0.8375 A_{560} - 3.7919 A_{576}) \times 10^{-4} \text{ (mol heme)} \quad \text{معادله (۹-۲)}$$

در آزمایش تیتراسیون هموگلوبین ها با دو دسیل تری متیل آمونیوم برماید غلظت عامل دناتور کننده برابر با ۳/۰۸۳mg/ml بود که در هر نقطه از تیتراسیون ۲۵μl از آن به ۸۰۰μl محلول هموگلوبین اضافه شد.

³⁰ n-dodecyl trimethylammonium bromide

³¹ Soret bond

³² unfolding

³³ Benesch

طیف این محلول ها با استفاده از دستگاه طیف سنجی مرئی- فرابنفش ثبت و درصد Deoxy, Oxy و Met در هر مرحله تیتراسیون با استفاده معادله بنش تعیین می شد.

۳-۲-۱۳ تحلیل های کمومتری کس

همانطور که در بخش مقدمه ذکر گردید، از میان روش های مختلف توسعه داده شده برای کمومتری، در پژوهش جاری روش تفکیک منحنی چند متغیره برای تحلیل نتایج آزمایش ها مورد استفاده قرار گرفته است. روش تفکیک منحنی چند متغیره بر اساس حداقل مربعات متناوب (MCR-ALS) روشی پرکاربرد و کارآمد در کمومتری کس محسوب می شود که برای تفکیک اجزاء مختلف یک مخلوط متشکل از اجزاء ناشناخته و تفکیک نشده مورد استفاده قرار می گیرد و توانایی استفاده و پردازش هم زمان از چندین ماتریس داده (اطلاعات تحلیل فاکتور^{۳۴}) (Tauler, 1995, 2001, Tauler et al., 1995) و اطلاعات نقصان رتبه^{۳۵} (Amrhein et al., 1996, Saurina et al., 1998) و نیز به کارگیری موثر محدودیت^{۳۶} هایی چون غیر منفی بودن^{۳۷} و بستار^{۳۸} برای محدود کردن دامنه ی جواب های ممکن باعث شده است تا این روش به عنوان روشی موثر مورد استفاده ی محققین قرار گیرد.

اگرچه توصیف کامل این الگوریتم در مراجع (Amrhein et al., 1996, De Juan and Tauler, 1995, 2001, Tauler et al., 1995, Saurina et al., 1998, Tauler, 2003) آمده است، در اینجا در حد نیاز به تشریح عملکرد الگوریتم پرداخته می شود. یکی از مزایای تفکیک ریاضی اجزاء تشکیل دهنده، همچنان که در الگوریتم MCR-ALS انجام می شود، آن است که استفاده از آن نیازی به (تقریباً) هیچ دانش پیشینی^{۳۹} در مورد سیستم شیمیائی تحت مطالعه ندارد.

بدون از دست دادن جامعیت و برای درک ساده تر و تطابق با آنچه که در این رساله انجام شده است فرض شده است که الگوریتم بر روی مجموعه داده های مستخرج از اندازه گیری های طیف سنجی انجام می گیرد. این در حالی است که این الگوریتم یک ابزار تحلیل فاکتور^{۴۰} عام منظوره می باشد که برای تحلیل انواع دیگری از داده های دستگاهی ماتریسی که قابل تجزیه^{۴۱} به یک مدل دوخطی^{۴۲} باشند نیز کاربرد دارد (Berbel et al., 2003).

از نقطه نظر ریاضی، روش های تفکیک منحنی چند متغیره مبتنی بر یک مدل دوخطی تجزیه مشابه آنچه که در معادله ی (۱۰) آمده است می باشد:

³⁴ Factor analysis

³⁵ Rank deficiencies

³⁶ Constraint

³⁷ Non-negativity

³⁸ Closure

³⁹ A priori knowledge

⁴⁰ Factor Analysis

⁴¹ Decompose

⁴² Bilinear

$$D_{NR \times NC} = C_{NR \times N} S_{N \times NC}^T + E_{NR \times NC} \quad \text{معادله (۲-۱۰)}$$

در معادله ی فوق، زیر نویس ها نشاندهنده ی ابعاد ماتریس ها می باشند. NR (تعداد سطرها) برابر تعداد طیف ها می باشد. NC (تعداد ستون ها) برابر تعداد طول موج ها است، و N تعداد اجزاء در نظر گرفته شده در محلول می باشد (تعداد گونه های مختلفی که در سیگنال نقش ایفاء می کنند). در این رساله، D یک ماتریس سطری است که از اطلاعات طیف های UV-vis ساخته شده است. NR سطر از ماتریس D توصیف می کند که نقش N جزئی که محلول متشکل از آنها می باشد در طول فرآیند و در ماتریس پروفایل غلظت ($C_{NR \times N}$) چگونه تغییر می کند. NC ستون از ماتریس D توصیف می کنند که پاسخ های این N جزء چگونه در ماتریس $S_{NC \times N}$ (ماتریس پروفایل های طیف خالص^{۴۳}) تغییر می کنند. E ماتریس داده ی مانده ای^{۴۴} آشکار نشده توسط CS^T می باشد (Tauler, 2001). حال مساله ای که باید توسط الگوریتم MCR حل شود را می توان به صورت قدم های زیر تشریح نمود:

۱. تعیین تعداد اجزاء (گونه های) تشکیل دهنده ی محلول (N).
۲. یافتن پروفایل های غلظت مربوط به هر یک از این گونه ها و تشکیل ماتریس C .
۳. یافتن پاسخ طیفی خالص یا همان پروفایل های گونه های مورد اشاره و تشکیل ماتریس S .

با توجه به اولین قدم، روش تجزیه ی مقدار تکین ($SVD^{۴۵}$) می تواند برای ارزیابی تعداد اجزاء سیستم (N) به کار رود. ایده ی اصلی اغلب روش هایی که برای حل معادله ی (۲-۱۰) توسعه یافته اند آن است که تعداد اجزاء سیستم به اندازه ی المان های مستقل خطی ماتریس D می باشد. این عدد رتبه^{۴۶} ی ماتریس D نامیده می شود. در SVD بردارها و مقادیر ویژه^{۴۷} ی ماتریس اولیه ی داده ها (D) تعیین می گردند. رتبه ی شیمیائی^{۴۸} یک سیستم را به صورت تعداد مقادیر ویژه ی سیستم که بالاتر از مقادیر ویژه ی نسبت داده شده به نویز قرار می گیرند تعریف می کنند. همچنین ترسیم بردارهای ویژه می تواند برای تخمین تعداد صحیح اجزاء سیستم مورد استفاده قرار گیرد. SVD از نقطه نظرهای متفاوتی حائز اهمیت است. نخست آنکه می توان آن را به چشم روشی برای تبدیل متغیرهای همبسته^{۴۹} به مجموعه ای از متغیرهای ناهمبسته نگریست که می تواند روابط فی مابین اقلام داده ای را بهتر نمایان سازد. دوم آنکه

^{۴۳} Pure spectral profiles

^{۴۴} Residual

^{۴۵} Singular Value Decomposition

^{۴۶} Rank

^{۴۷} Eigenvectors and Eigenvalues

^{۴۸} Chemical rank

^{۴۹} Correlated variables

SVD روشی برای شناسایی و مرتب سازی ابعادی که داده ها در طول آنها بیشترین تغییرات را دارند، ارائه می نماید. از این منظر SVD می تواند به عنوان ابزاری برای یافتن بهترین تخمین داده های اصلی از روی داده های در دسترس با ابعاد پائین تر مورد استفاده قرار گیرد. بنابراین از SVD می توان برای کاهش بعد فضای ویژگی و حذف ابعاد کم اهمیت (در کاربرد ما ابعادی که در واقع مربوط به نویز هستند و نه اجزاء اصلی موجود در سیستم مورد آزمایش) استفاده نمود. برای اطلاعات بیشتر در این زمینه و نحوه ی عملکرد SVD مطالعه ی مرجع (Baker, 2005) توصیه می گردد.

با در نظر گرفتن قدم های ۲ و ۳ (ذکر شده در بالا) واضح است که بدون اطلاعات بیشتر، درجات آزادی چرخشی^{۵۰} و مقیاسی^{۵۱} موجود در معادله ی (۲-۱۰) باعث می گردند که پاسخ های متعددی (در حالت کلی بی نهایت پاسخ) برای این معادله وجود داشته باشند که فقط یکی از آنها منطبق بر واقعیت حاکم بر سیستم می باشد (Lawton and Sylvestre, 1971). برای محدود کردن تعداد پاسخ ها باید محدودیت^{۵۲} های منطقی و منطبق بر طبیعت واکنش را بر ماتریس های پروفایل غلظت (C) و پروفایل طیف (S) اعمال نمود. مهم ترین این محدودیت ها به شرح زیر می باشند:

نا منفی بودن^{۵۳}: همواره پروفایل غلظت همه ی اجزاء باید مثبت باشد. این محدودیت در شرایطی که از طیف سنجی UV-vis استفاده می شود (مانند آزمایشهای انجام شده در این رساله) باید به پروفایل های طیف نیز تعمیم یابد. زیرا همواره جذب مقادیر مثبت دارد.

تک قله ای بودن^{۵۴}: به معنای آن است که پروفایل های غلظت و/یا طیف همواره باید به صورت تک پیک (فقط دارای یک نقطه ی بیشینه) باشند. در اکثر مواقع (همانند آنچه در این رساله انجام شده است) این قید فقط به پروفایل غلظت اعمال می گردد.

بسته بودن^{۵۵}: این محدودیت زمانی اعمال می گردد که مجموع غلظت همه ی اجزاء با گذر زمان ثابت باشد. این محدودیت در این رساله نیز اعمال گردیده است.

گزینشگری^{۵۶} و رتبه ی محلی^{۵۷}: این دو محدودیت بسیار مفید و قوی هستند و در اغلب موارد می توانند تعداد پاسخ های محتمل را به شدت کاهش دهند و حتی فقط یک پاسخ مورد قبول ایجاد نمایند که این بسیار مطلوب می باشد (Tauler *et al.*, 1995). این محدودیت ها به این واقعیت اشاره می کنند که ممکن است در بعضی نواحی از ماتریس D یک گونه ی خاص وجود داشته باشد و سایر گونه ها وجود نداشته باشند. به عنوان مثال در سیستم های مبتنی بر واکنش (مانند تاثیر دادن DTAB بر محلول

⁵⁰ Rotational freedom

⁵¹ Scale freedom

⁵² Constraint

⁵³ Nonnegativity

⁵⁴ Unimodality

⁵⁵ Closure

⁵⁶ Selectivity

⁵⁷ Local rank

هموگلوبین خالص سازی شده در این رساله) بسیار اتفاق می افتد که در نقطه ی شروع یا پایان آزمایش یک گونه ی خاص (مانند حالت واسرشته^{۵۸} ی پروتئین در شروع آزمایشات تاثیر DTAB و یا حالت طبیعی پروتئین در انتهای آن) وجود نداشته باشد. همچنین در مورد سیگنال های طیف سنجی یک گونه ی خاص می تواند در یک محدوده ی طیفی جذب نداشته باشد. در این حالات استفاده از اطلاعات فوق بسیار مفید واقع خواهد شد.

تحت قیود ذکر شده در بالا و با به کارگیری روشی مناسب می توان انتظار داشت که پاسخی یکتا^{۵۹} برای C و S به دست آید. الگوریتم مورد استفاده ی ما در این رساله برای تعیین ماتریس های پروفایل غلظت و پروفایل طیف، همانطور که پیشتر ذکر گردید، MCR-ALS می باشد. جزئیات کامل الگوریتم در (Diaz-Cruz *et al.*, 1999) و نحوه ی پیاده سازی آن در MATLAB در (Tauler *et al.*, 1995) به شکل کامل ذکر گردیده است. با توجه به معادله ی (۱۰) محاسبه ی ماتریس های C و S در یک رویه ی بهینه سازی تکراری^{۶۰} به گونه ای انجام می گیرد که در نهایت CS^T با کمترین مقدار خطای باقی مانده^{۶۱} (E)، ماتریس D را به وجود آورد. این کار بر اساس معادلات زیر صورت می پذیرد:

$$C = TS^+ \quad \text{معادله (۱۱-۲)}$$

$$S = C^+T \quad \text{معادله (۱۲-۲)}$$

بالانویس '+' بالای هر ماتریس نماد شبه معکوس^{۶۲} ماتریس مورد نظر می باشد. برای آنکه الگوریتم بهینه سازی حداقل مربعات متناوب (ALS) اجرا شود، لازم است تا یک تخمین اولیه برای یکی از ماتریس های پروفایل غلظت و یا پروفایل طیف برای هر جزء ایجاد گردد. هرچه این تخمین اولیه، تخمین بهتری باشد (به مقدار واقعی نزدیکتر باشد) الگوریتم با سرعت بیشتری به یک راه حل خوب همگرا می شود و احتمال گیرکردن در یک کمینه ی محلی^{۶۳} کاهش می یابد. روش های بسیاری برای انجام چنین تخمینی پیشنهاد شده اند. الگوریتم های سیمپلیسما^{۶۴} (SIMPLISMA) (Windig and Guilment, 1991) و آنالیز فاکتوری تکاملی^{۶۵} (EFA) (Maeder, 1987) به ترتیب روش های شناسخته شده ای برای تخمین ماتریس های پروفایل طیف S و پروفایل غلظت C می باشند.

در این رساله از روش سیمپلیسما برای تخمین اولیه ی S بهره گرفته شده است. محدودیت های نامنفی بودن، تک قله ای بودن، بسته بودن، و گزینشگری در هر تکرار از الگوریتم اعمال می گردند. کد

⁵⁸ Denatured state

⁵⁹ Unique

⁶⁰ Iterative optimization procedure

⁶¹ Minimal residual error

⁶² Pseudo inverse

⁶³ Local minima

⁶⁴ Simple-to-use interactive self-modeling mixture Analysis (SIMPLISMA)

⁶⁵ Evolving Factor Analysis

MATLAB مربوط به الگوریتم MCR-ALS از صفحه ی وب مندرج در (Tauler et al., 1993) متعلق به Tauler و همکاران گرفته شده است.

فصل چهارم:

تجزیه و تحلیل داده ها

در راستای اهداف تعیین شده برای این پایان نامه آزمایشهای متعددی طراحی و انجام گرفته است که نتایج حاصل از آنها در قالب ۳ بخش آماده گردیده اند. نتایج عرضه شده در این بخش ها به صورت تفصیلی در این فصل تشریح گردیده اند. در بخش اول، نتایج حاصل از مقایسه ی مشخصات بیوشیمیائی هموگلوبین در ماهیان مورد مطالعه منعکس شده است. در بخش دوم، نتایج حاصل از مقایسه ی فرآیند واسرشته شدن هموگلوبین ها به وسیله دو دسیل تری متیل آمونیوم بروماید (DTAB) بر اساس تحلیل های کمومتریکس تشریح شده اند و صحت این نتایج با مطالعات DSC مورد بررسی قرار گرفته است. در بخش آخر، اثر DTAB بر روی گونه های اُکسی، دی اُکسی، و مت هموگلوبین بررسی گردیده است و ارتباط میان میزان فشردگی^۱ و تاخوردگی پروتئین با شرایط زیستی ماهیان مورد مطالعه با رویکرد مقایسه ی پایداری هریک از هموگلوبین ها مشخص گردیده است.

۴-۱-۱ مشخصات ساختاری و عملکردی هموگلوبین گونه های ماهیان خاویاری مورد مطالعه

تنوع هموگلوبین در ماهیان به همراه اختلاف های فیزیولوژیکی بدن آنها سبب می شود آنها در محدوده ی وسیعی از تغییرات شرایط محیطی بتوانند به حیات خود ادامه دهند. پس از جداسازی هموگلوبین از خون ماهیان قره برون و ازون برون و اثبات وجود پدیده ی چند هموگلوبینی در آنها خالص سازی هموگلوبین ماهیان خاویاری با استفاده از روش های مختلف مانند الکتروفورز، کروماتوگرافی تعویض یونی صورت گرفت. در هر کدام از این دو گونه یک هموگلوبین غالب وجود داشت. با استفاده از نتایج حاصله از طیف سنجی فلورسانس و طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی و منحنی تغییرات تمایل هموگلوبین به اکسیژن بر روی هموگلوبین انسان و هموگلوبین غالب دو گونه ماهی مورد مطالعه، ارتباط منطقی بین تمایل هموگلوبین به اکسیژن و فشار جزئی اکسیژن در دو عمق مختلف دریا بدست آمد.

۴-۱-۱-۱ استخراج و خالص سازی هموگلوبین ها و ارائه روش هایی برای اثبات تخلیص

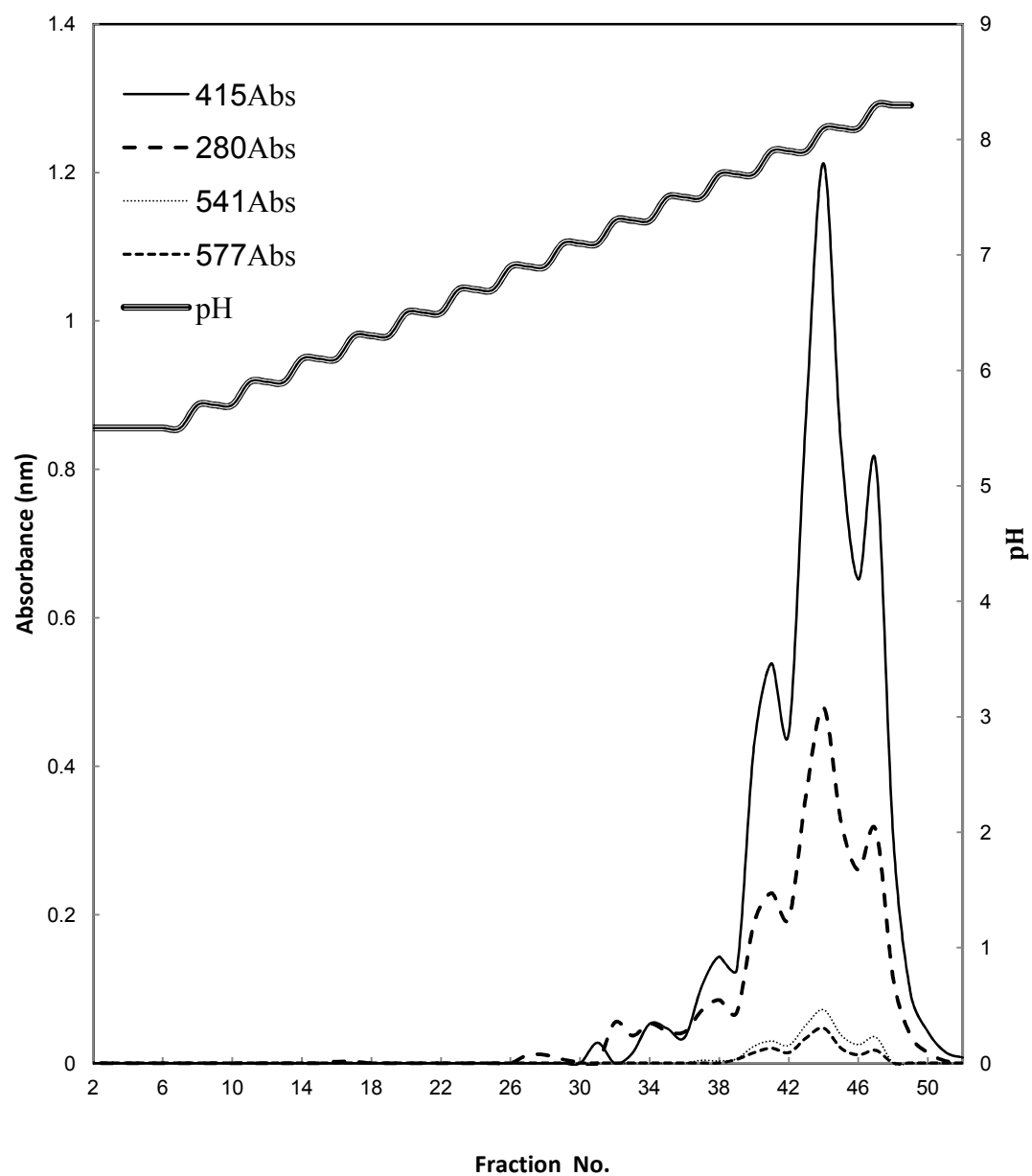
هموگلوبین غالب

از خون دو ماهی قره برون و ازون برون و انسان، هموگلوبین با روشی که در فصل دوم به تفصیل شرح داده شد، هموگلوبین استخراج گردید. هموگلوبین ها دو ماهی مورد مطالعه با استفاده از روش کروماتوگرافی تعویض یونی و با استفاده از ستون کروماتوگرافی CM- سلولز پس از شستشو با بافر فسفات ۱۰ mM در محدوده ی pH از ۵/۵ تا ۸/۵، خالص سازی شدند. با توجه به شکل ۳-۱ و ۳-۲

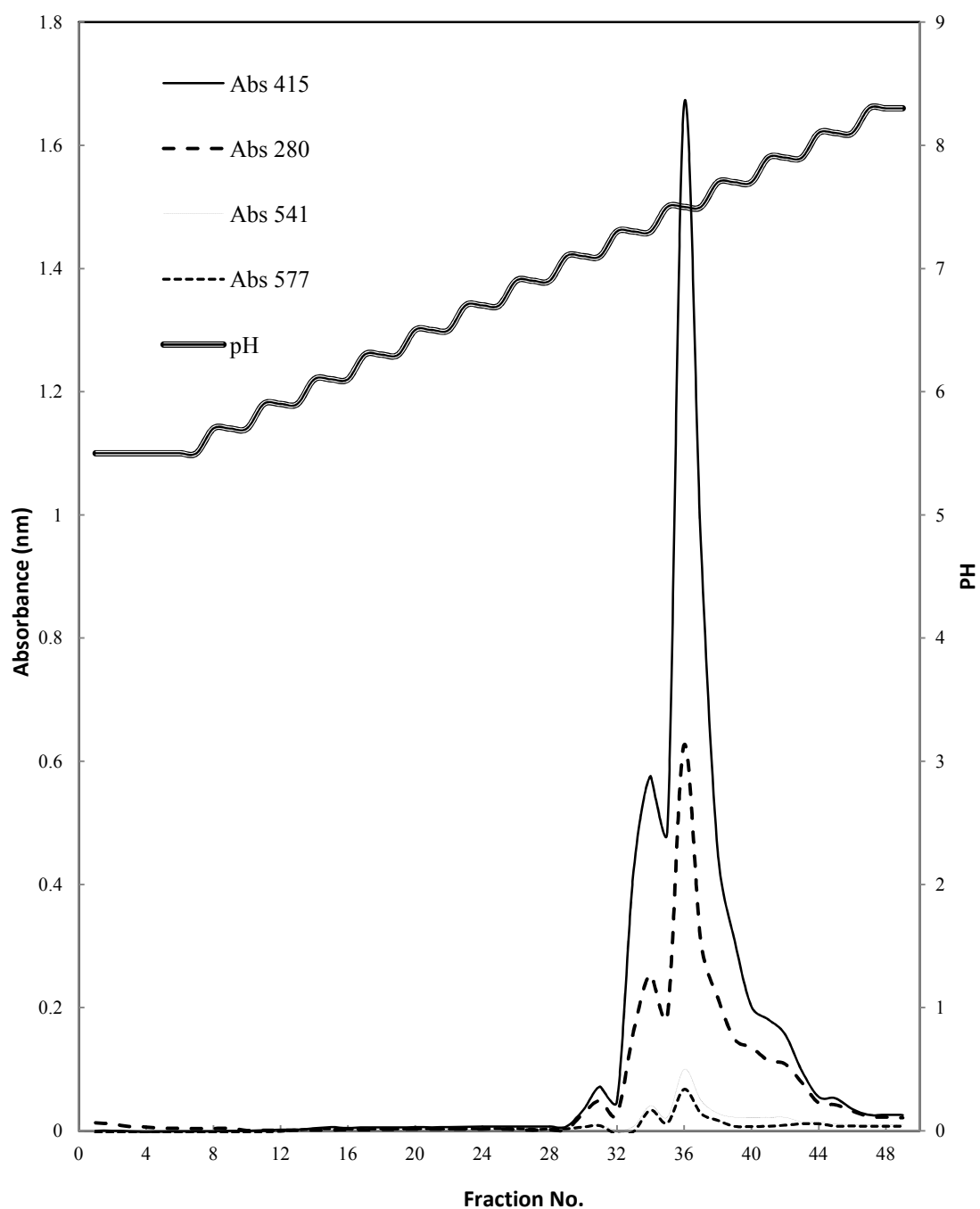
^۱ Compactness

که نشان دهنده ی کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی برای هموگلوبین های دو ماهی می باشند، این نتیجه بدست آمد که در خون هر دو ماهی سه نوع هموگلوبین وجود دارد که یکی از آنها در دو گونه ی مورد مطالعه غالب می باشد. هموگلوبین ها در ماهی ازون برون در pH های ۷/۱ ، ۷/۳ ، ۷/۵ و در ماهی قره برون در در pH های ۷/۷ ، ۸ ، ۸/۳ از ستون کروماتوگرافی CM- سلولز تخلیص گردید. در ماهی قره برون هموگلوبین غالب در pH ۸ در حالی که در ماهی ازون برون هموگلوبین غالب در pH ۷/۳ از ستون کروماتوگرافی جدا می شد.

در طی فرایند تخلیص هموگلوبین ها دمای ستون کروماتوگرافی ۴ درجه سانتی گراد تنظیم گردید. در طول ثبت جذب نوری هموگلوبین به وسیله دستگاه طیف سنجی مرئی- فرابنفش دمای آزمایشگاه °C ۲۵ و شرایط استاندارد آزمایش محیا بود. با فرض اینکه هموگلوبین غالب بیشترین نقش را در تنفس ایفا می کند، بقیه مراحل آزمایش بر روی هموگلوبین غالب در هر جنس و گونه انجام شد.



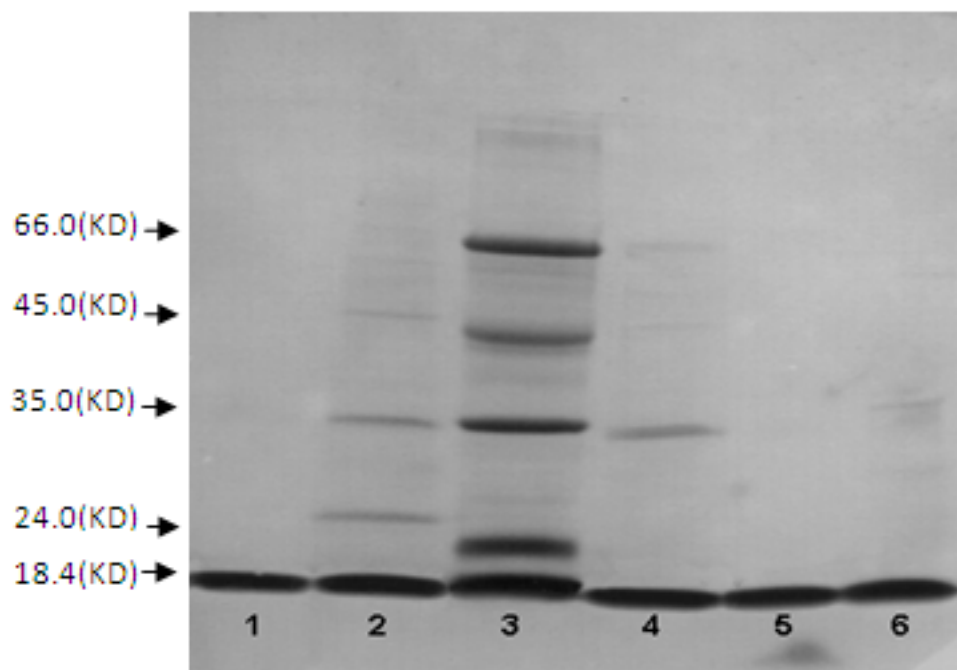
شکل ۴-۱ کروماتوگرام حاصل از خالص سازی هموگلوبین های ماهی قره برون



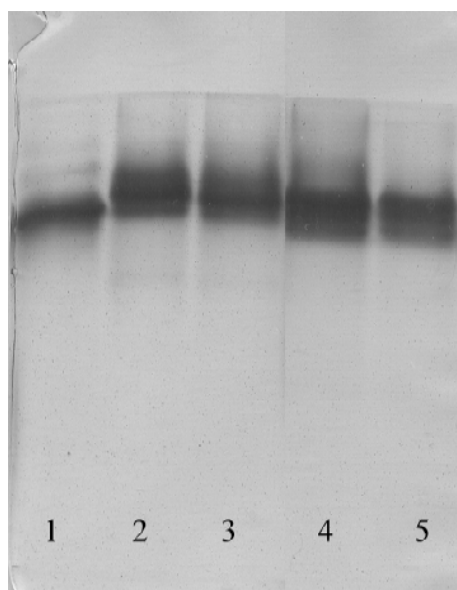
شکل ۴-۲ کروماتوگرام حاصل از خالص سازی هموگلوبین های ماهی ازون برون

برای تأیید خلوص هموگلوبین های بدست آمده توسط فرآیند فوق، از روش های الکتروفورز (Native-PAGE و SDS-PAGE) و روش ایزوالکتریک فوکوسینگ استفاده شد. در روش الکتروفورز کانونی، نقطه ایزوالکتریک هموگلوبین غالب در هر دو گونه تخمین زده شد. با این فرض که

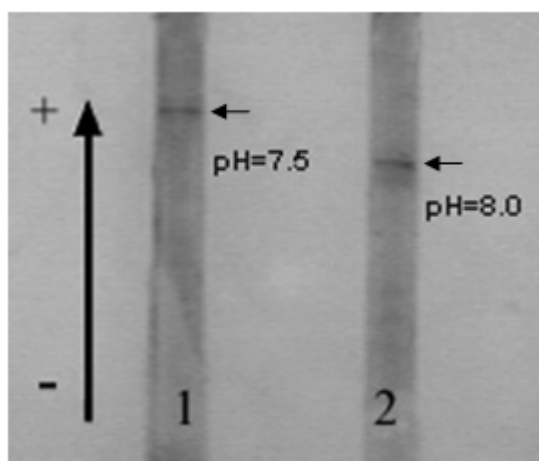
هموگلوبین غالب نقش اصلی را در تنفس ایفا می کند، ادامه ی تحقیق بر روی هموگلوبین غالب در هر گونه انجام گرفت. شکل ۳-۳ الکتروفورز SDS-PAGE را برای دو نمونه هموگلوبین دو ماهی قبل از عملیات تخلیص و بعد از تخلیص برای هموگلوبین های خالص و در شکل ۳-۴ همان نمونه ها را با الکتروفورز Native-PAGE نشان داده شده است. همچنین در شکل ۳-۵ نقطه ایزوالکتریک دو هموگلوبین غالب برای دو نمونه ماهی مشخص شده است.



شکل ۳-۴ الکتروفورز SDS-PAGE بر روی هموگلوبین ها. هموگلوبین های استخراج شده از خون قبل از عملیات خالص سازی: (۲) ماهی ازون برون، (۳) مارکر، (۴) ماهی قره برون، (۶) انسان. هموگلوبین خالص سازی شده توسط ستون کروماتوگرافی در دو ماهی: (۱) ماهی ازون برون (۵) ماهی قره برون



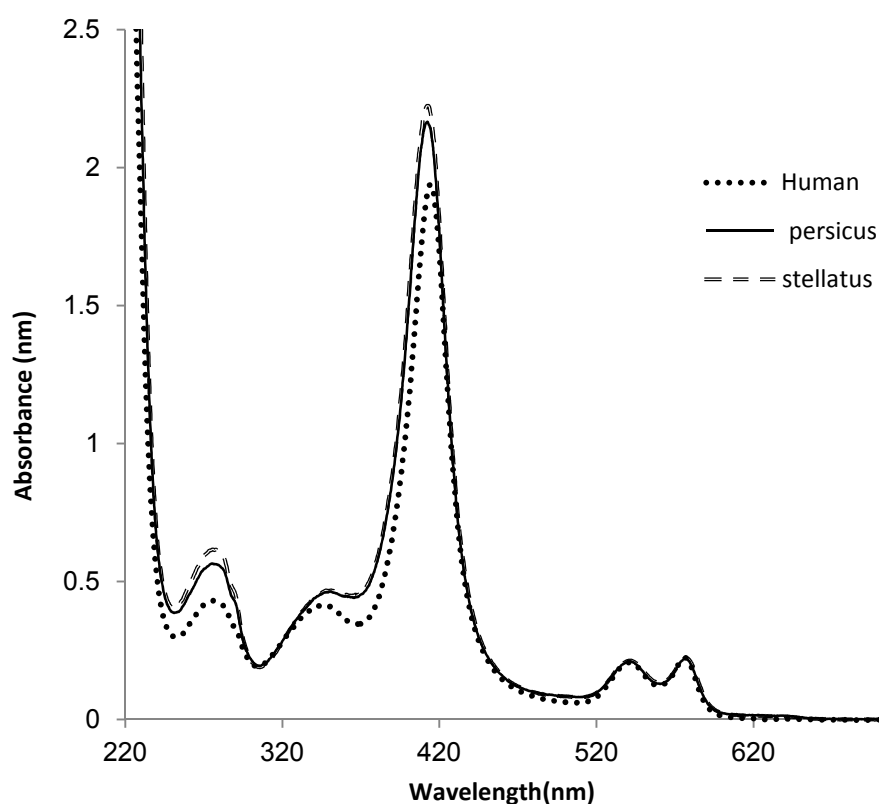
شکل ۴-۴ الکتروفورز Native-PAGE بر روی هموگلوبین ها. هموگلوبین های استخراج شده از خون قبل از عملیات خالص سازی: (۱) انسان (۲) ماهی ازون برون، (۴) ماهی قره برون. هموگلوبین خالص سازی شده توسط ستون کروماتوگرافی در دو ماهی: (۳) ماهی ازون برون (۵) ماهی قره برون



شکل ۴-۵ تأیید خلوص هموگلوبین دو ماهی پس از عملیات کروماتوگرافی به وسیله روش الکتروفورز کانونی با استفاده از نوارهایی با شیب تثبیت شده pH (۱۰-۳) و تعیین نقطه ایزوالکتریک pI در آنها. (۱) ازون برون (۲) قره برون

۴-۱-۲ تعیین غلظت هموگلوبین ها

پس از اینکه سه نمونه هموگلوبین از خون تازه و با استفاده از یک پروتوکل استخراج شدند، یکسان سازی غلظت سه نمونه هموگلوبین نخستین قدم برای شروع آزمایش هایی خواهد بود که برای مطالعه ی ساختاری هموگلوبین ها لازم می باشند. بدین منظور با استفاده از معادله بنش^۲ و همکاران درصد اکسی هموگلوبین، دی اکسی هموگلوبین و مت هموگلوبین محاسبه شد. طیف حاصل از دستگاه طیف سنج مرئی-فرابنفش شکل ۳-۶ نشان دهنده هم غلظت بودن هموگلوبین انسان و ماهی های قره برون و ازون برون می باشد.

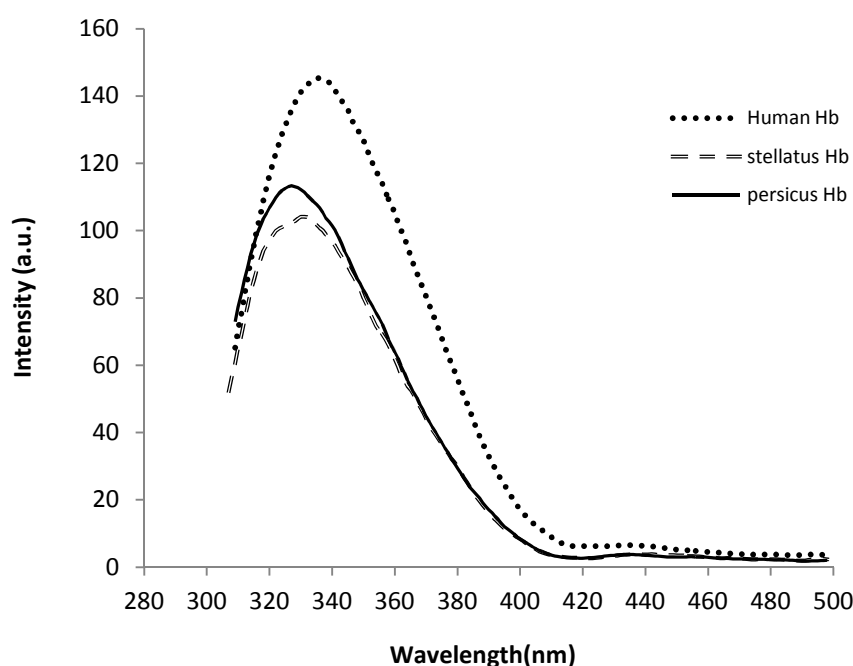


شکل ۴-۶ طیف بدست آمده از دستگاه طیف سنج مرئی-فرابنفش برای سه نمونه هموگلوبین انسان، ماهی ازون برون و ماهی قره برون در شرایط استاندارد و دمای ۲۵ °C

² Benesch

۳-۱-۴ مطالعات فلورسانس انجام شده بر روی هموگلوبین ها

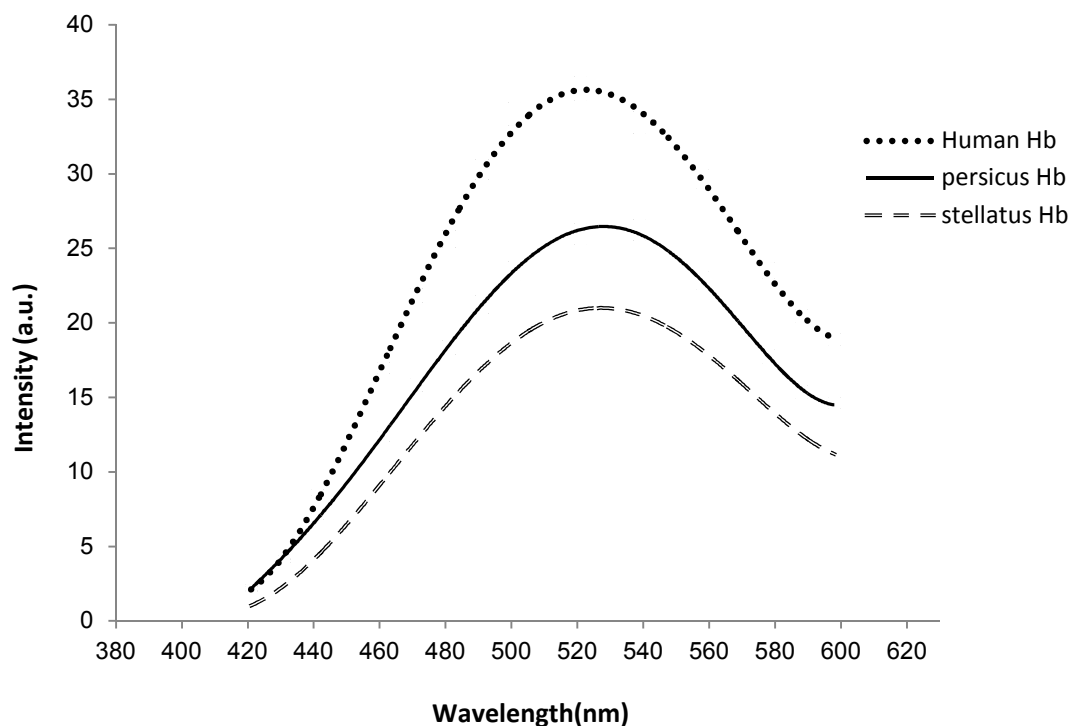
در این تحقیق به منظور بررسی خواص آبریزی سطحی^۳ هموگلوبین ها، از فلورسانس استفاده گردید. به این ترتیب که هر چه میزان شدت فلورسانس بیشتر باشد، هموگلوبین از آبریزی بیشتری برخوردار است. ابتدا طیف فلورسنت ذاتی شکل ۳-۷ و سپس طیف نثری کمپلکس ANS-هموگلوبین مطابق شکل ۳-۸ در 25°C بین طول موج های ۳۶۶-۶۵۰ nm و طول موج برانگیختگی ۳۵۵ nm ثبت شد. اتصال ANS به وصله های^۴ آشکار شده آبریز در سطح پروتئین با افزایش قابل ملاحظه ای در فلورسانس آن همراه می شود (De and Girigoswami, 2006). شدت فلورسانس در هموگلوبین انسان بیشتر از هموگلوبین دو ماهی می باشد. این نتیجه بیان می کند که سطح هموگلوبین انسان از دو ماهی آبریزتر می باشد و همچنین مطابق نمودار، سطح هموگلوبین ماهی قره برون آبریزتر از ماهی ازون برون است.



شکل ۴-۷ نمودار طیف فلورسانس ذاتی هموگلوبین غالب ماهی ازون برون، قره برون و انسان. در این شکل، غلظت هموگلوبین ها در حدود $2/34 \text{ mg/ml}$ در حضور بافر فسفات 10 mM با $\text{pH } 7/3$ و در شرایط استاندارد و دمای 25°C در نظر گرفته شده است.

³ Hydrophobicity

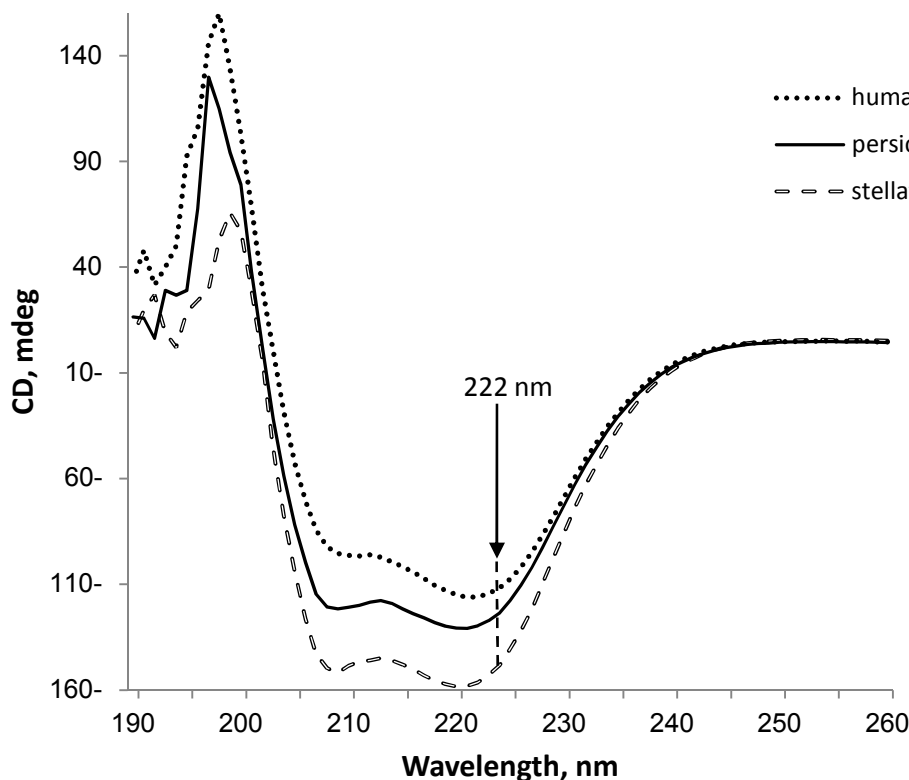
⁴ Patches



شکل ۴-۸ نمودار طیف فلورسانس اتصال ANS به هموگلوبین غالب ماهی ازون برون، قره برون و انسان. در این شکل، غلظت هموگلوبین ها در حدود ۲/۳۴ mg/ml در حضور بافر فسفات ۱۰ mM با pH ۷/۳ و در شرایط استاندارد و دمای ۲۵°C در نظر گرفته شده است.

۴-۱-۴ مطالعات دورنگ نمایی دورانی بر روی هموگلوبین ها

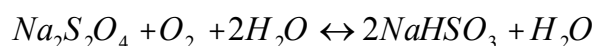
مقایسه طیف CD مربوط به هموگلوبین انسان و هموگلوبین دو ماهی نشان می دهد که در ساختار دوم هموگلوبین ها میزان مارپیچ آلفا در دو ماهی بیشتر از انسان می باشد و همچنین میزان مارپیچ آلفا در ماهی ازون برون بیشتر از ماهی قره برون است. در شکل ۳-۹ تفاوت طیف CD در ۲۲۲ nm برای انسان و ماهی قره برون ۱۳/۶۴ mdeg و این اختلاف برای دو ماهی ازون برون و قره برون mdeg ۲۶/۷۸ می باشد. با مقایسه درصد مارپیچ آلفا و با توجه به طیف CD، مشاهده می شود که میزان مارپیچ آلفا در ماهی قره برون نسبت به انسان ۱٪ بیشتر و در ماهی ازون برون نسبت به قره برون ۲٪ بیشتر می باشد.



شکل ۴-۹ نمودار طیف CD مربوط به هموگلوبین ها. غلظت هموگلوبین ها در حدود ۰/۲۳ mg/ml در حضور بافر فسفات ۱۰ mM با pH ۷/۳ و در شرایط استاندارد و دمای ۲۵ °C می شود:

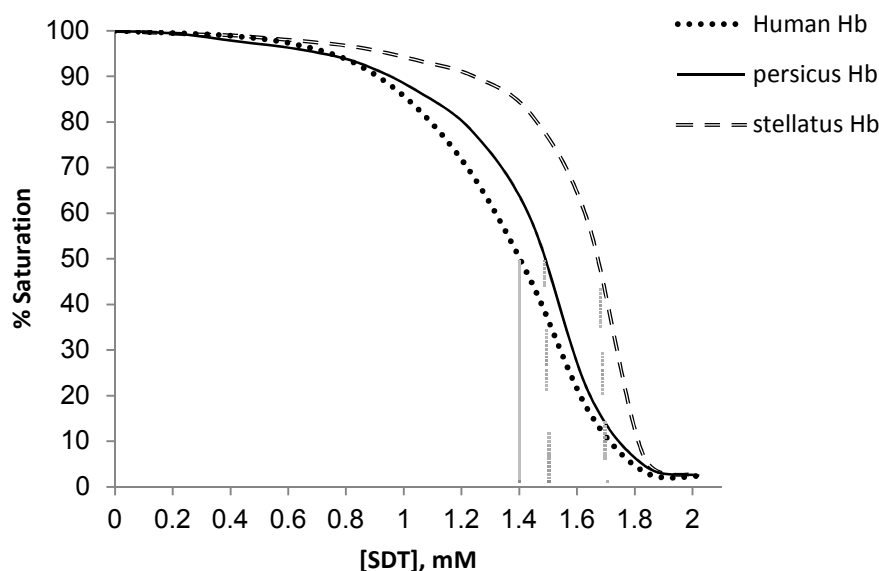
۴-۱-۵ روش اندازه گیری منحنی اشباع هموگلوبین ها با استفاده از دی تیونیت

دی تیونیت سدیم ($Na_2S_2O_4$) می تواند به سرعت با اکسیژن مولکولی و با نسبت یک به یک ترکیب می شود:



دی تیونیت سدیم با اکسیژن متصل به هموگلوبین و همچنین با اکسیژن محلول واکنش می دهد. لذا در عمل باید تمام نمونه ها در شرایط یکسانی قرار داده شوند تا میزان اکسیژن محلول آنها یکسان گردد. در این روش برای رسم منحنی تفکیک اکسیژن به جای فشار جزئی اکسیژن از غلظت دی تیونیت سدیم مصرفی استفاده می شود. از روی این منحنی مقدار دقیق $[SDT]_{50}$ که پارامتر مشابه P_{50} است استخراج می شود. در شکل ۴-۱۰ نمودار منحنی تغییرات تمایل هموگلوبین ها به اکسیژن مشاهده می شود. با

مقایسه نمودار حاصله تمایل هموگلوبین ماهی ازون برون به اکسیژن بیشتر از هموگلوبین ماهی قره برون، و هموگلوبین ماهی قره برون بیشتر از هموگلوبین انسان می باشد. علت اصلی اختلاف تمایل هموگلوبین به اکسیژن در سه نمونه هموگلوبین مربوط به تفاوت خواص آگریزی سطح هموگلوبین ها می باشد. در این محاسبه نشان داده می شود که تمایل هموگلوبین انسان به اکسیژن نسبت به دو ماهی کمتر است و هموگلوبین ماهی قره برون که توانایی رفتن به عمق کمتر را دارد، در مقایسه با ماهی ازون برون اکسیژن افینته کمتری دارد. به نظر می رسد توانایی رفتن به عمق بیشتر با تمایل هموگلوبین به اکسیژن ارتباط دارد که برای بیان این نظریه نیاز به نتایج سایر آزمایش هایی که برای تعیین ساختار هموگلوبین استفاده شده اند.



شکل ۴-۱۰ شکل منحنی تغییرات تمایل هموگلوبین ها به اکسیژن در دمای 25°C . میزان $[\text{SDT}]_{50}$ برای هموگلوبین انسان، ماهی قره برون و ماهی ازون برون به ترتیب برابر $1/40\text{ mM}$ ، $1/50\text{ mM}$ و $1/67\text{ mM}$ می باشد.

۲-۴ مطالعه مقایسه ای فرایند واسرشته شدن هموگلوبین های مورد مطالعه به وسیله دو دسیل تری متیل آمونیوم بروماید بر اساس تحلیل های کموتریکس

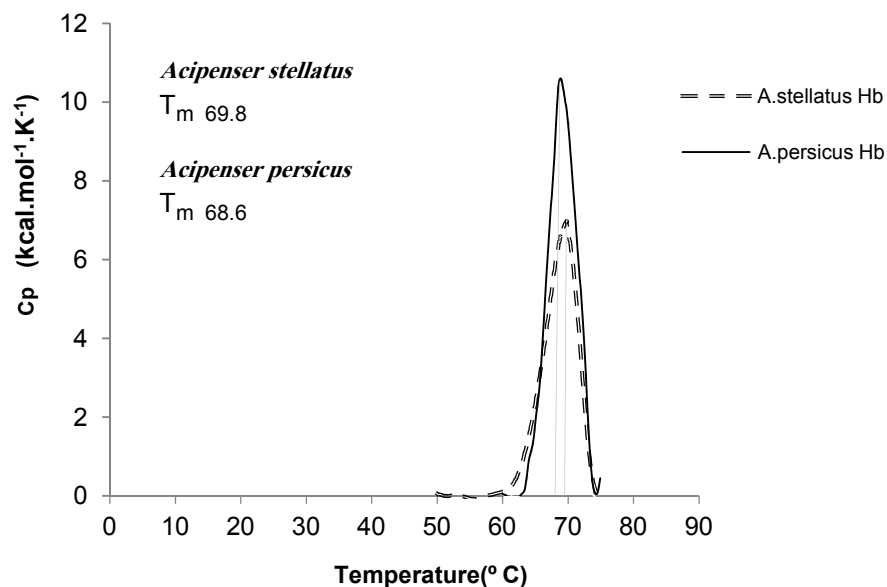
تنوع هموگلوبین در ماهی ها سبب شده است که آنها بتوانند در شرایط مختلف اکولوژیکی به حیات خود ادامه دهند و قدرت انطباق آنها با محیط اطرافشان افزایش یابد. در این تحقیق هموگلوبین دو گونه

از ماهیان خاویاری دریای خزر مورد مطالعه قرار گرفته است. بعد از جداسازی هموگلوبین از خون و خالص سازی هموگلوبین ها به وسیله کروماتوگرافی تعویض یونی با ستون CM- سلولز، هموگلوبین غالب در هر گونه پس از تأیید صحت خلوص با روش های مختلف الکتروفورز و روش الکتروفورز کانونی، مورد مطالعه قرار گرفت. در این تحقیق رفتار دو هموگلوبین تحت فرایند واسرشته شدن به وسیله دو دسیل تری متیل آمونیوم برمایید بررسی گردید. خصوصیت واسرشته شدن حرارتی هموگلوبین ها به وسیله کالریمتری روبشی افتراقی و خصوصیت تجمعی هموگلوبین ها به وسیله دستگاه طیف سنجی مرئی- فرابنفش و دی تیو تراتیول ۲۰ mM و ثبت جذب در ۳۶۰nm انجام شد. نتایج کالریمتری روبشی افتراقی و تجمعی بر روی هموگلوبین ها نشان داد که T_m در ماهی ازون برون بیشتر از ماهی قره برون می باشد و هموگلوبین ماهی قره برون بیشتر از ماهی ازون برون تجمع می یابد. مطالعات کمومتری اثر تیتراسیون DTAB به عنوان سورفاکتانت کاتیونی بر روی هموگلوبین غالب در دو گونه به وسیله ی طیف سنجی مرئی- فرابنفش بررسی شد. تکنیک کمومتری با قدرت تفکیک بالا، برای مشخص کردن تعداد اجزاء و کسر مولی هموگلوبین در طی فرایند واسرشته شدن به وسیله DTAB مورد استفاده قرار گرفته است. تحلیل مراحل واسرشتگی هموگلوبین دو ماهی با روش های کمومتریکس نشان داد که سه جزء مولکولی طبیعی (N)، حدواسط (I) و واسرشته (D) در سیستم دیده می شود. با رسم نمودار کسر مولی اجزاء بر حسب غلظت DTAB مصرفی و محاسبه سطح زیر نمودار مشاهده گردید که سطح زیر نمودار در منحنی مربوط به هموگلوبین ازون برون بیشتر از هموگلوبین قره برون می باشد. با استفاده از این نتایج که از مطالعات کمومتریکس حاصل شده است، ارتباط عمق و پایداری هموگلوبین ها نمایان گردیده است.

۴-۲-۱ مطالعات کالریمتری روبشی افتراقی (DSC)

شکل ۳-۱۱ واسرشته شدن حرارتی دو هموگلوبین، ظرفیت گرمایی C_p اندازه گیری شده و T_m را در هر هموگلوبین نشان می دهد. در این نمودار نشان داده شده است که گرمای لازم برای بازشدگی^۵ دو هموگلوبین با هم متفاوت است. هموگلوبین ماهی ازون برون برای باز شدگی گرمای بیشتری نسبت به هموگلوبین ماهی قره برون لازم دارد.

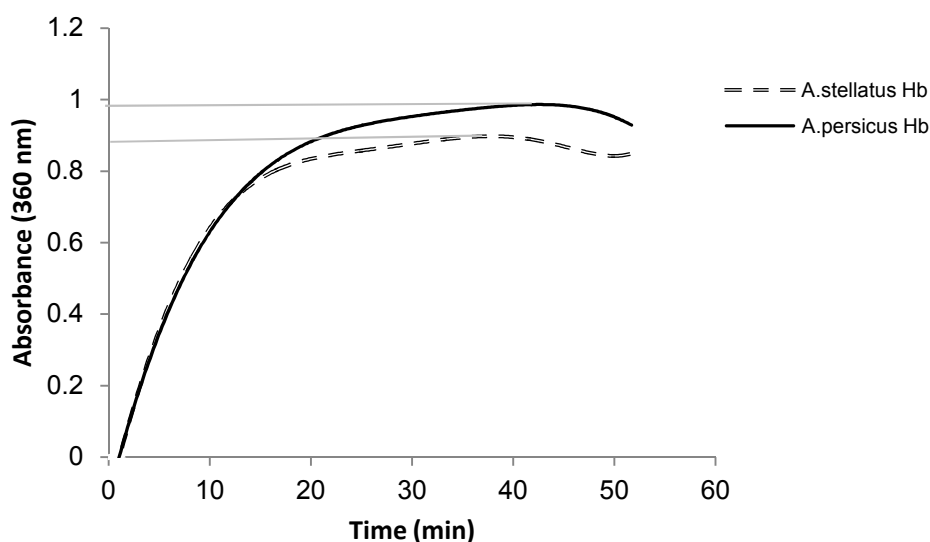
⁵ Unfolding



شکل ۴-۱۱ ترموگرام DSC واسرشتگی حرارتی هموگلوبین ها را نشان می دهد.

۴-۲-۲ مطالعات تجمع هموگلوبین ها

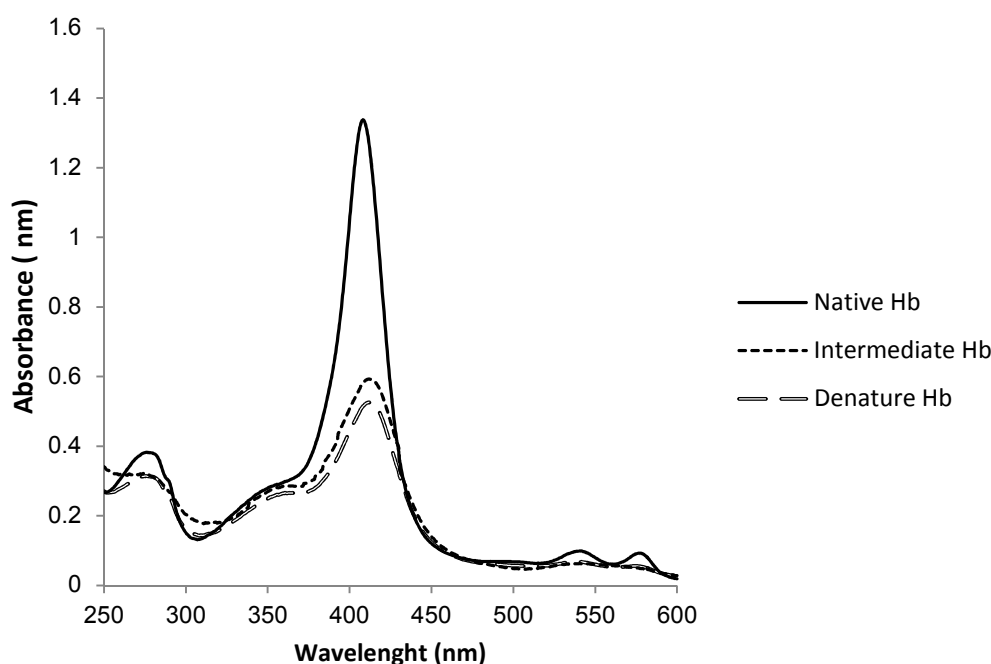
با توجه به شکل ۴-۱۲ نشان داده شده است که تجمع در هموگلوبین قره برون از هموگلوبین ازون برون بیشتر می باشد. این نمایانگر این نکته می باشد که پایداری هموگلوبین قره برون از هموگلوبین ازون برون کمتر می باشد.



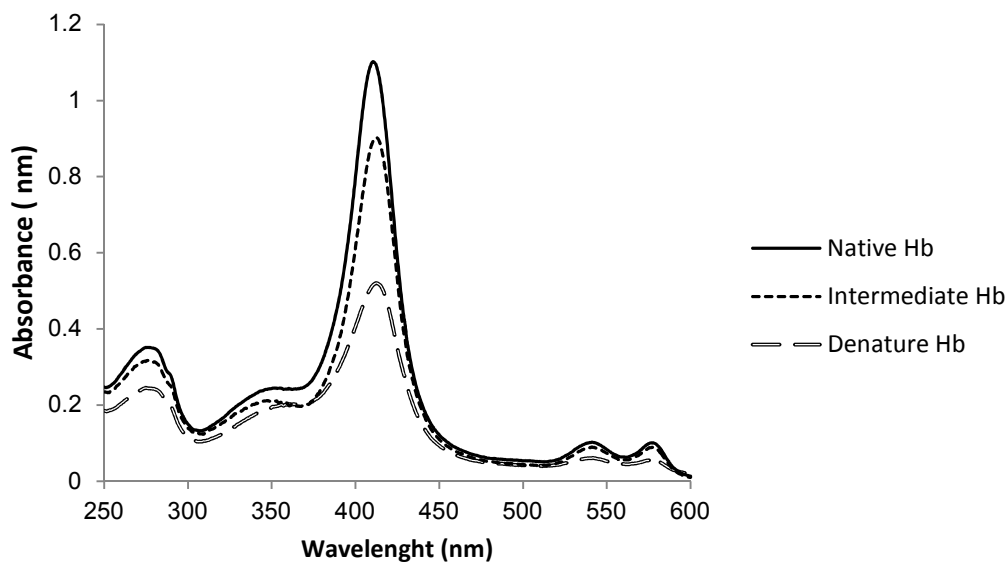
شکل ۴-۱۲ اندازه گیری تجمع هموگلوبین بوسیله ثبت جذب ۳۶۰ nm در اثر افزایش DTT ، mM
۶/۵۲۳ به محلول هموگلوبین با غلظت ۲/۳۴ mg/ml در بافر فسفات ۱۰ mM با pH ۷/۳

۳-۲-۴ مطالعات کمومتریکی

طیف های بدست آمده از طیف سنجی مرئی-فرابنفش به عنوان اطلاعات ورودی برای تحلیل های کمومتری و رسم نمودار کسر مولی هموگلوبین در طی فرایند بازشدگی با افزایش غلظت DTAB به کار گرفته شده است. برای ثبت اطلاعات مربوط به طیف سنجی مرئی-فرابنفش، غلظت دو هموگلوبین $1/3 \text{ mg/ml}$ در بافر فسفات 10 mM با $\text{pH} = 7/3$ و طیف ها در محدوده $250-600 \text{ nm}$ در نظر گرفته شده اند. با استفاده از روش تجزیه ای مقدار تکین (SVD) برای هر هموگلوبین سه جزء شناسایی شد که با بررسی روی این سه جزء مشخص شد که آنها با هم تفاوت های واضحی دارند و فرایند باز شدگی هموگلوبین ها به صورت یکسان انجام نگرفته است. برای شناسایی اجزاء هموگلوبین های مورد مطالعه که در طی فرایند بازشدگی هموگلوبین توسط DTAB شکل گرفته اند، از روش MCR-ALS استفاده شده است. شکل های ۴-۱۳ و ۴-۱۴ نیمرخ طیف تفکیک شده ی این سه جزء حاصل را نشان می دهند.

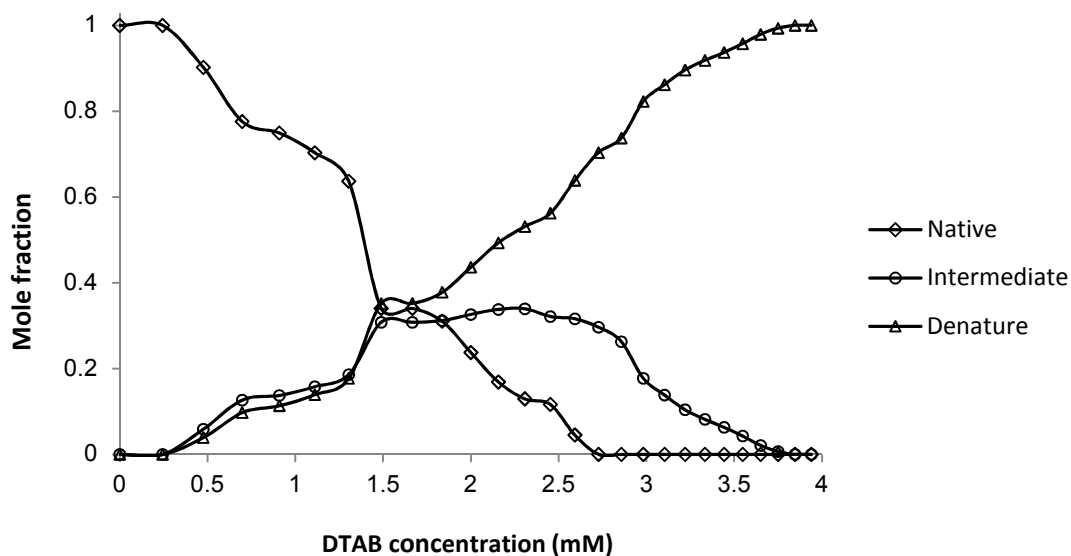


شکل ۴-۱۳ پروفایل طیف هموگلوبین ماهی قره برون

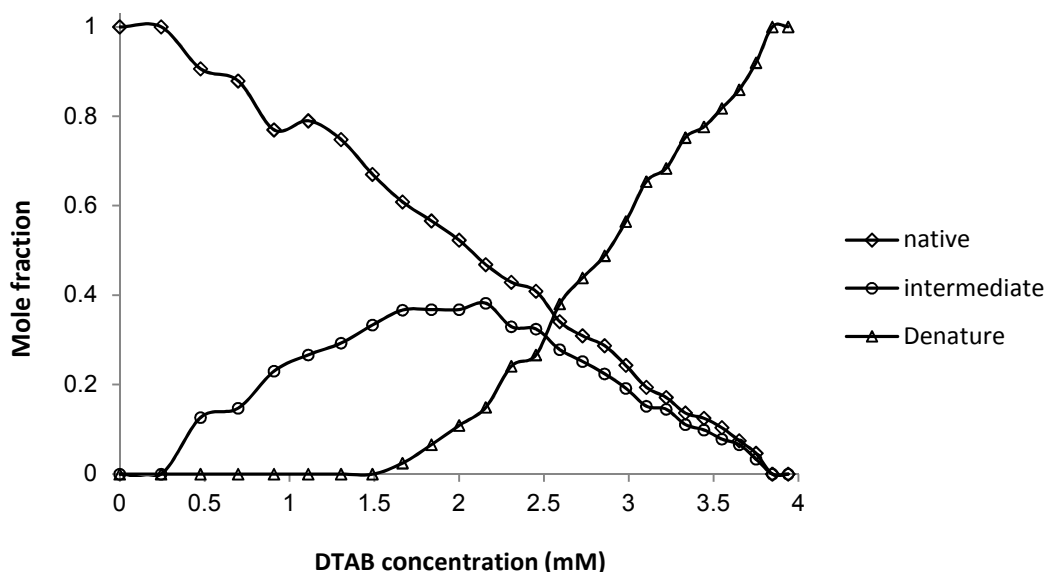


شکل ۴-۱۴ پروفایل طیف هموگلوبین ماهی ازون برون

در نهایت با استفاده از الگوریتم MCR-ALS نتیجه نهایی تحلیلی های کمومتری و دو شکل ۳-۱۵ و ۳-۱۶ برای ماهی قره برون و ازون برون بدست آمد و نشان داده شد که سطح زیر نمودار حد واسط در ماهی ازون برون ۱۹٪ از ماهی قره برون بیشتر است. این نشان دهنده این موضوع می باشد که هر چه سطح زیر نمودار کسر مولی بر حسب غلظت بیشتر باشد تجمع پروتئین در آن کمتر است.



شکل ۴-۱۵ پروفایل غلظتی هموگلوبین ماهی قره برون



شکل ۴-۱۶ پروفایل غلظتی هموگلوبین ماهی ازون برون

۳-۴ تاثیر دو دسیل تری متیل آمونیوم بروماید (DTAB) بر گونه های هموگلوبین ماهی ازون

برون و ماهی قره برون دریای خزر

تنوع هموگلوبین در ماهی ها به علت انطباق زیاد آنها در شرایط اکولوژیکی مختلفی است که در محیط زیست آنها وجود دارد. در این تحقیق هموگلوبین دو گونه از ماهیان خاویاری دریای خزر مورد مطالعه قرار می گیرد. بعد از جداسازی هموگلوبین از خون و خالص سازی هموگلوبین ها به وسیله کروماتوگرافی تعویض یونی با ستون CM- سلولز، هموگلوبین غالب در هر گونه پس از تأیید صحت خلوص با روش های مختلف الکتروفورز و روش الکتروفورز کانونی، مورد مطالعه قرار گرفت.

در این تحقیق مقایسه ای بین گونه های هموگلوبین در اثر تیتراسیون دو دسیل تری متیل آمونیوم بروماید بر روی هموگلوبین غالب دو گونه ماهی با استفاده از طیف سنجی مرئی-فرابنفش، طیف سنجی دورنگ نمایی و کالریمتری روبشی افتراقی انجام گرفت. در طیف سنجی مرئی-فرابنفش جذب طیف ها در ناحیه بین ۵۰۰-۶۰۰ nm برای نمایش اختلاف در گونه های هموگلوبین ها در اثر افزایش DTAB مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که غلظت گونه های اکسی هموگلوبین و مت هموگلوبین کاهش می یابد و غلظت دی اکسی هموگلوبین افزایش می یابد. در طیف سنجی دورنگ نمایی با افزایش DTAB نشان داده شد که سرعت واسرشته شدن و میزان کاهش ماریچ آلفا برای دو هموگلوبین دو گونه یکسان تغییر نمی یابد. برای تأیید میزان سرعت واسرشته شدن و استقامت دو هموگلوبین از DSC استفاده شد.

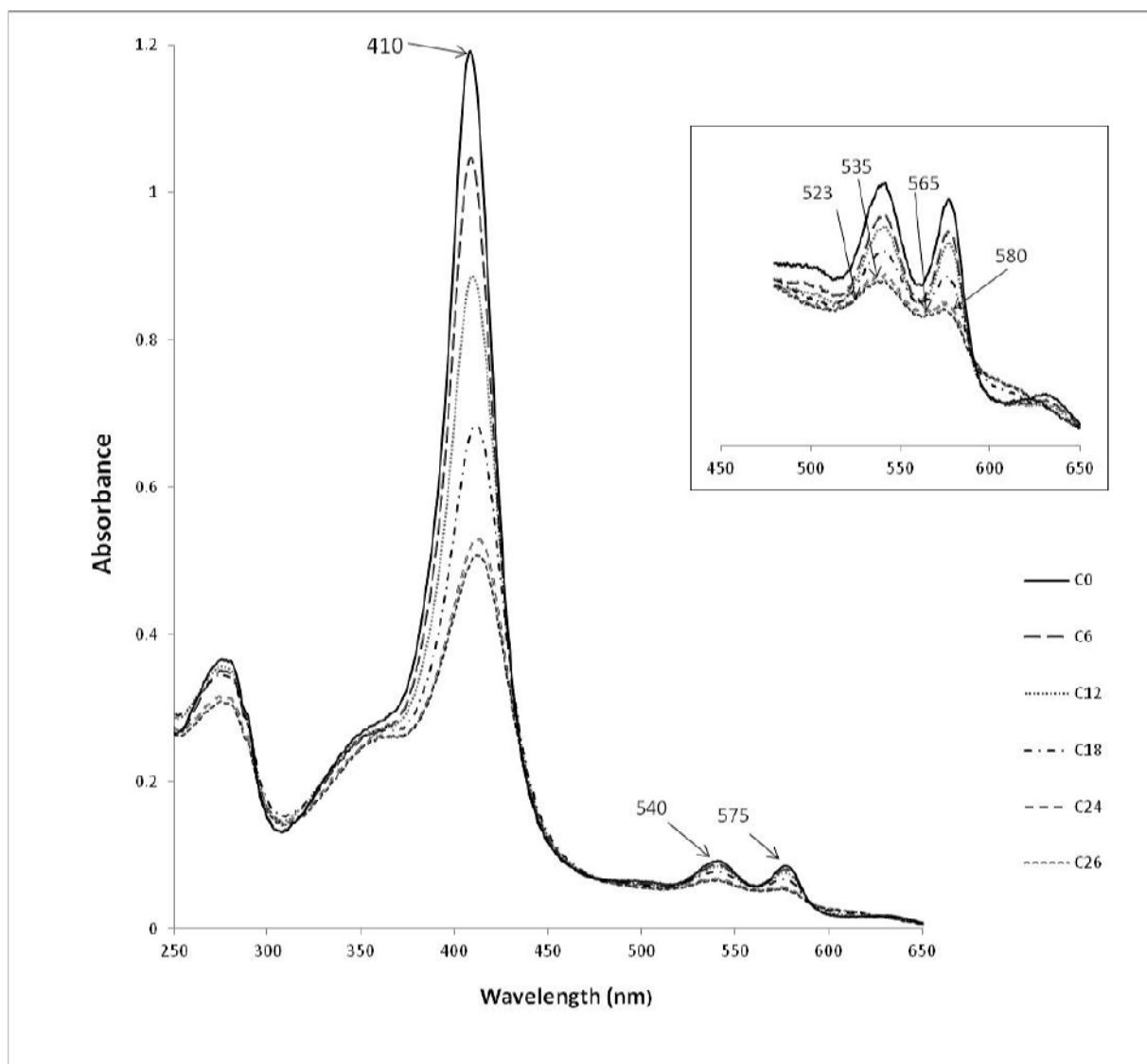
نتایج نشان داد که در اثر افزایش DTAB ساختار هموگلوبین ماهی ازون برون در مقایسه با قره برون تاخوردگی محکم تر و فشردگی بیشتری دارد. با استفاده از این نتایج می توان این فرضیه را بیان کرد که بین میزان عمق و فشردگی ساختار هموگلوبین ارتباط وجود دارد.

۱-۳-۴ بررسی اثر DTAB بر هموگلوبین های قره برون و ازون برون بوسیله طیف سنجی مرئی -

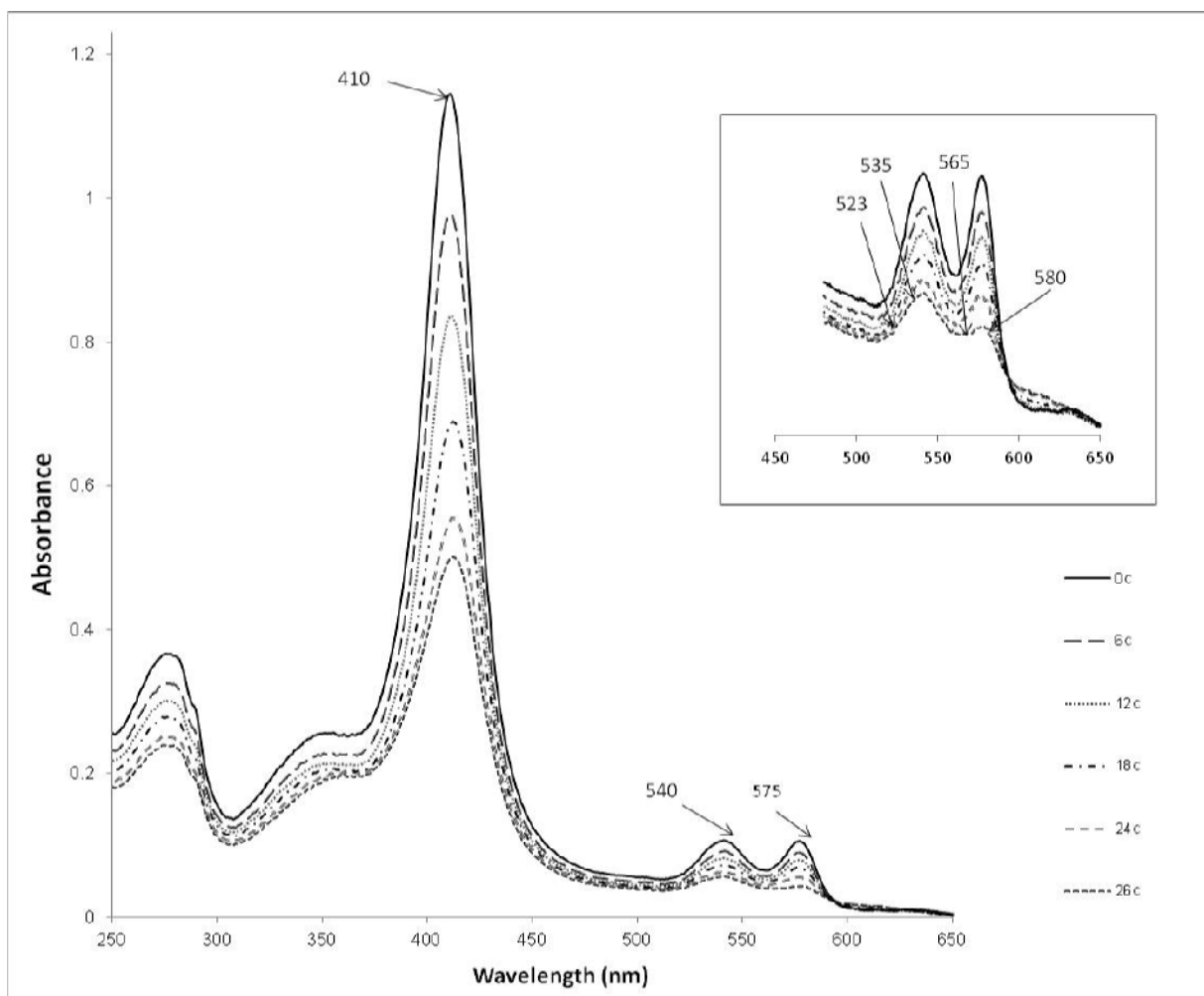
فرابنفش

طیف سنجی مرئی - فرابنفش یک ابزار دقیق برای مطالعه حالت صورتبندی هموگلوبین^۶ می باشد. طیف سنجی مرئی - فرابنفش در شکل ۴-۱۷ برای هموگلوبین ماهی ازون برون و شکل ۴-۱۸ برای هموگلوبین ماهی قره برون نشان دهنده مراحل بازشدگی هموگلوبین در اثر تیتراسیون DTAB می باشد. غلظت دو هموگلوبین در این آزمایش ۱/۳ mg/ml در بافر فسفات ۱۰mM با pH ۷/۳ می باشد.

^۶ Conformational status



شکل ۴-۱۷ طیف حاصل از طیف سنجی مرئی-فرا بنفش که از تیتراسیون DTAB بر هموگلوبین ماهی قره برون بدست آمده است.



شکل ۴-۱۸ شکل طیف حاصل از طیف سنجی مرئی-فرابنفش که از تیتراسیون DTAB بر هموگلوبین ماهی ازون برون بدست آمده است.

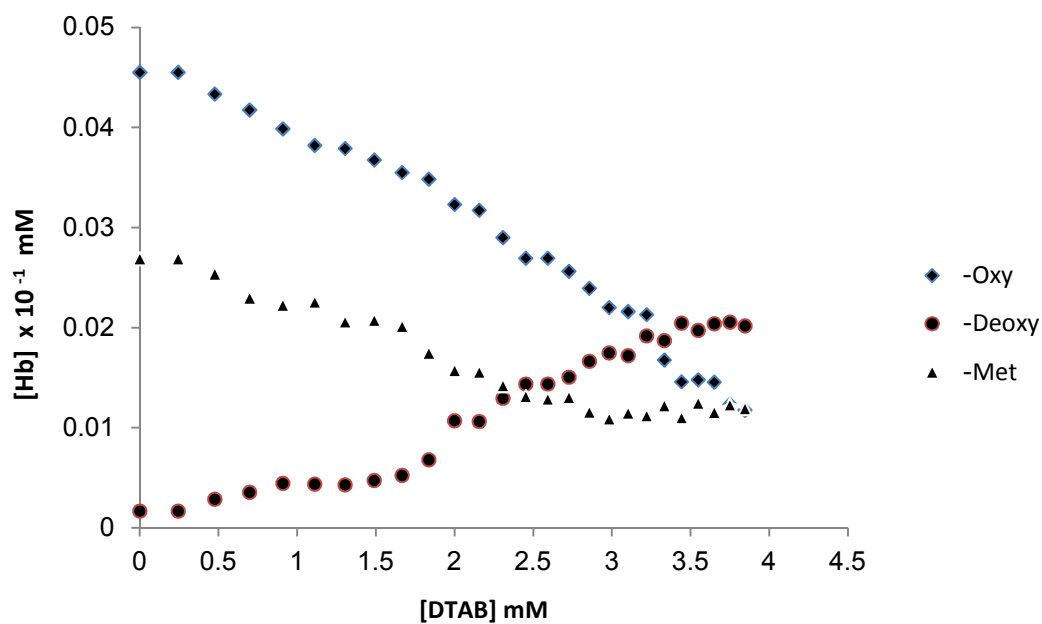
جذب اکسی هموگلوبین در اطراف 414 nm (جذب ماکزیمم) نشان دهنده حالت اسپین اتم آهن می باشد که بستگی به حالت صورتبندی پروتئین دارد. ضریب جذب DTAB در محدوده $400-650 \text{ nm}$ قابل صرف نظر است. محدوده $400-410 \text{ nm}$ مربوط به باند سورِت در هموگلوبین می باشد و دو باند Q که در محدوده $525-600 \text{ nm}$ نشان دهنده ی ۴ ارییتال مدل Gouterman می باشد (Dayer *et al*). در این تحقیق با افزایش میزان DTAB مطابق شکل ۴-۱۲ و ۴-۱۳ برای هر دو هموگلوبین ماهی ها ماکزیمم جذب در طیف مرئی- فرابنفش که مربوط به باند سورِت، کاهش می یابد و به سمت طول موج های بیشتر تغییر مکان می یابد. این نشان می دهد که تبدیل متالوپورفرین (مثل هموگلوبین) به پورفرین آزاد سبب تغییر مکان هم در باند سورِت و هم در باند Q به طول موج بالاتر می گردد (Reza Dayer *et al*). همانطور که در شکل نشان داده شده تغییر مکان باند سورِت به سمت طول موج بالاتر در ماهی

قره برون بیشتر از ماهی ازون برون می باشد. این مقدار در ماهی قره برون ۴ nm و در ماهی ازون برون ۱/۵ nm می باشد.

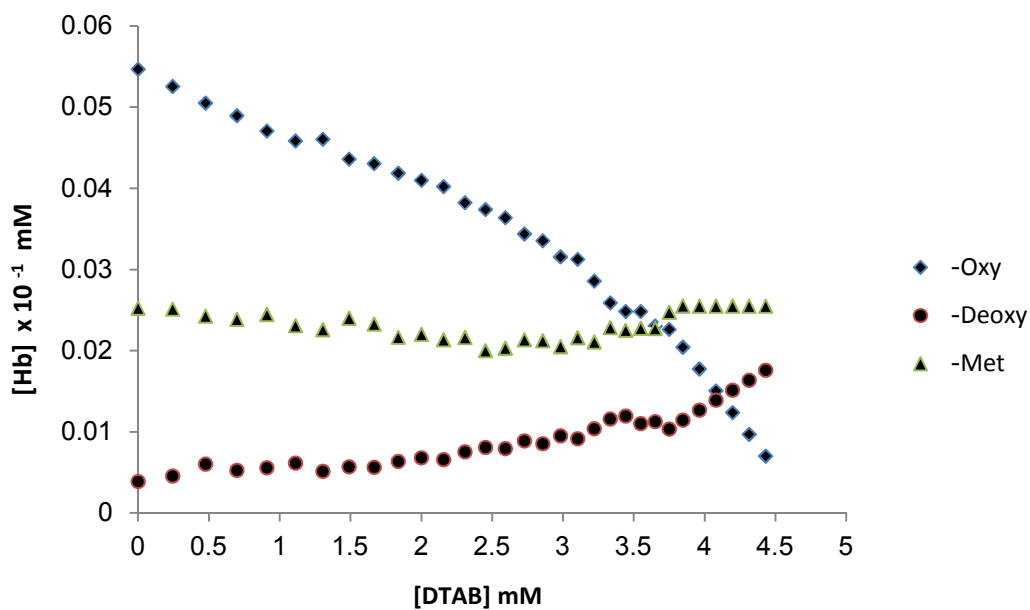
این تغییر مکان باند سورِت مربوط به واسرشته شدن هموگلوبین ها می باشد که در آن پیوند اتم آهن هم و لیگاند محوری یا بشدت تخریب شده و یا کاملاً شکسته شده است (O'Keeffe *et al.*, 1978). در طیف اکسی هموگلوبین در ناحیه ۶۵۰-۵۰۰ nm، قله ۵۴۰ nm پیک β و قله ۵۷۵ nm پیک α نامیده می شود (Gersonde *et al.*, 1970).

با افزایش DTAB ملاحظه می گردد که کاهش جذب پیک α نسبت به پیک β بیشتر است و همچنین اکسایش اکسی هموگلوبین از پیک β شروع می شود و بعد به پیک α می رسد (Lecomte *et al.*, 1981, Tomoda *et al.*, 2004).

این کاهش جذب در طول موج ۵۴۰ nm و ۵۸۱ nm نشان دهنده تبدیل اکسی هموگلوبین به همی کروم می باشد (Ajloo *et al.*, 2002a, Robinson *et al.*, 2003). نتایج در شکل ۳-۱۹ و ۳-۲۰ نشان می دهد که غلظت DTAB در ماهی قره برون در لحظه تقاطع حالت اکسی هموگلوبین و دی اکسی هموگلوبین برابر ۳/۵ mM و در ماهی ازون برون این غلظت برابر ۴/۱ mM می باشد. به این سبب هموگلوبین ماهی ازون برون پایدارتر است و برای واسرشته شدن نیاز به غلظت بیشتری از DTAB دارد. نمودار کالریمتری روبشی افتراقی (DSC) در شکل ۳-۱۱ هم این موضوع را تأیید می کند. همچنین هر چه نقطه تلاقی اکسی هموگلوبین و دی اکسی هموگلوبین دیرتر اتفاق بیفتد، ساختار هموگلوبین فشرده تر است (Reza Dayer *et al.*). به این ترتیب ساختار هموگلوبین ازون برون نسبت به قره برون فشرده تر می باشد. این نتیجه بوسیله آزمایش تیتراسیون هموگلوبین ها با DTAB با طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی و مقایسه میزان ماریچ آلفا در هر دو هموگلوبین نیز تأیید شد.



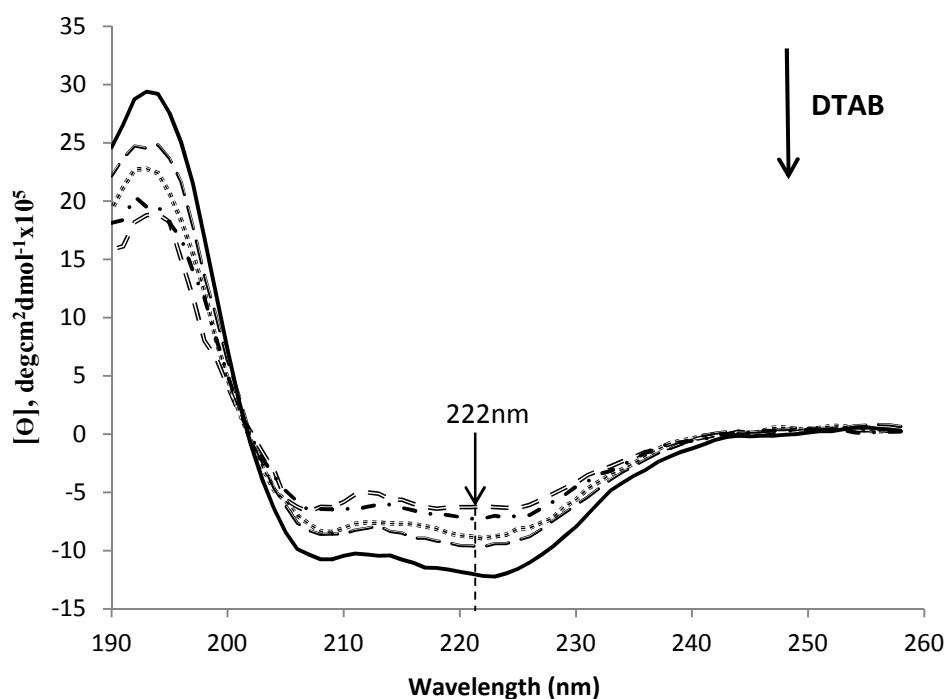
شکل ۴-۱۹ تاثیر تیتراسیون DTAB بر روی هموگلوبین ماهی قره برون و تغییرات درصد گونه های هموگلوبین این ماهی



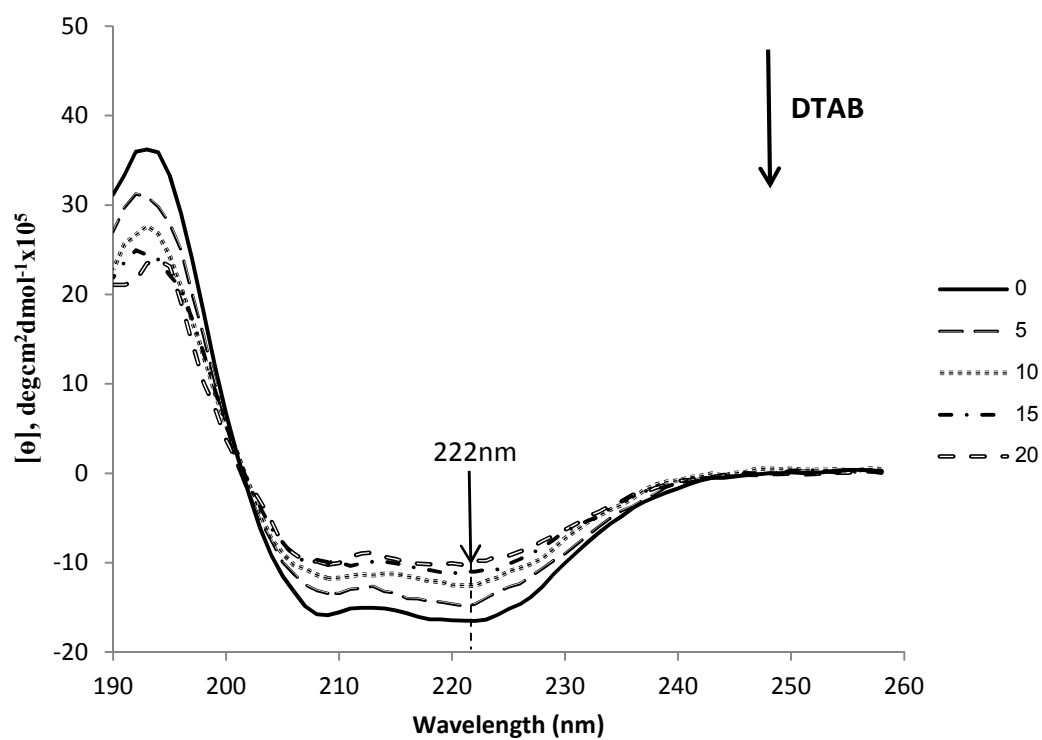
شکل ۴-۲۰ تاثیر تیتراسیون DTAB بر روی هموگلوبین ماهی ازون برون و تغییرات درصد گونه های هموگلوبین این ماهی

۴-۳-۲ بررسی اثر DTAB بر هموگلوبین های ماهی قره برون و ماهی ازون برون بوسیله طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی

در شکل ۴-۱۴ تغییرات ساختار دوم دو هموگلوبین در اثر افزایش DTAB نشان داده شده است. غلظت هموگلوبین در هر دو نمونه 0.23 mg/ml در بافر فسفات 10 mM با $\text{pH } 7.3$ می باشد. میزان مارپیچ آلفا در 222 nm قبل و بعد از واسرشته شدن بوسیله DTAB در هموگلوبین ماهی ازون برون بیشتر از هموگلوبین ماهی قره برون می باشد. این آزمایش نشان می دهد، میزان فشردگی هموگلوبین ماهی ازون برون بیشتر از هموگلوبین ماهی قره برون می باشد و این نکته هم در شروع آزمایش (بدون حضور DTAB) و هم پس از کامل شدن تیتراسیون قابل مشاهده بود. همچنین تغییرات میزان فشردگی و پایداری هموگلوبین در یک جهت رخ می دهد و با افزایش DTAB به هموگلوبین ها پایداری و میزان فشردگی هر دو کاسته می شود. در اولین طیف CD که سیستم فاقد DTAB می باشد، اختلاف مقدار مارپیچ آلفا بین هموگلوبین ازون برون و قره برون 4.3588 mdeg می باشد و پس از 20 تیتراژ DTAB این اختلاف در دو گونه به 3.393 mdeg می رسد که نشان دهنده کاهش میزان مارپیچ آلفا پس از اتمام تیتراسیون به وسیله DTAB می باشد.



شکل ۴-۲۰ طیف های CD که در اثر تیتراسیون هموگلوبین ماهی ازون برون با DTAB بدست آمده است.



شکل ۴-۲۱ طیف های CD که در اثر تیتراسیون هموگلوبین ماهی قره برون برون با DTAB بدست آمده است.

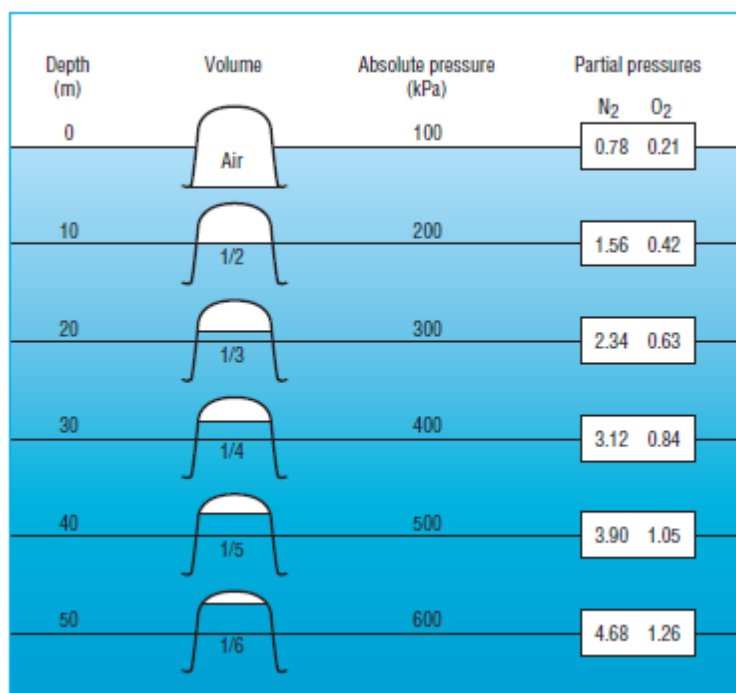
فصل پنجم:

نتیجه گیری و پیشنهادات

همانطور که فشار اکسیژن از سطح زمین به ارتفاعات کاهش می یابد، در دریاها و اقیانوس ها با افزایش عمق مقدار فشار جزئی اکسیژن موجود در آبها افزایش می یابد. با در نظر گرفتن این واقعیت، طرح این پرسش که چگونه موجودات موجود در هر تراز از نظر ارتفاع یا عمق نیاز اکسیژن خود را برای ادامه حیات تأمین می کنند حائز اهمیت می باشد.

در ارتفاعات میزان اکسیژن کم می شود و نشان داده شده که میزان آزاد سازی اکسیژن در هموگلوبین با افزایش ارتفاع زیاد می شود و مقدار تمایل هموگلوبین به اکسیژن کاهش می یابد. نتیجه این تحقیق در مقایسه ای که بر روی هموگلوبین پرندگان و انسان انجام گرفته، بیان شده است (Ajlou *et al.*, 2002b). فشار جزئی اکسیژن در اعماق مختلف متفاوت می باشد (Wilmschurst, 1998). افزایش عمق آب به معنی افزایش در میزان فشار کلی و در نهایت فشار جزئی اکسیژن می باشد.

با افزایش هر ۱۰ متر در عمق فشار به میزان ۱۰۰ کیلوپاسکال افزایش می یابد



شکل ۵-۱ ارتباط افزایش عمق و تأثیر آن بر میزان فشار جزئی اکسیژن و نیتروژن بر گرفته از مرجع (Wilmschurst, 1998)

با توجه به این موضوع که ساختار و عملکرد هموگلوبین در حمل و نقل اکسیژن بسیار مهم می باشد، مطمئناً هموگلوبین ماهیان در اعماق مختلف ساختارهای متفاوتی را دارا می باشند. در ضمن تمایل هموگلوبین به اکسیژن ماهی ها به عوامل دیگری چون شوری، pH، دما، و مانند آن نیز وابسته می باشد.

در این تحقیق با توجه به این که شرایط اکولوژیک محیط زیست این ماهیان یکسان می باشد و از نظر فیزیولوژی هم این دو ماهی مشابه هستند، توانایی حرکت به اعماق مختلف می تواند وجه تمایز آنها باشد.

با توجه به اینکه ماهیان مورد مطالعه جایگاه ویژه ای در نگرش تاریخی به طبقه بندی و تکامل ماهیان دارند مطالعه ی هموگلوبین آنها از این وجه نیز حائز اهمیت می باشد (Bemis *et al.*, 2002). از نظر تکاملی به تاسماهیان فسیل زنده می گویند و قدمت آنها به دوره تریاس و کرتاسه بر می گردد (Jensen *et al.*, 1998). علت اینکه هنوز این ماهیان در جهان یافت می شوند، اینگونه تفسیر می شود که آنها محدوده وسیعی از تغییرات اکولوژیکی را تحمل می کنند و به علت سایز بزرگ آنها شکارچیان طبیعی برای آنها کم می باشند. همچنین آنها بستر خوار می باشند و مقدار کافی غذا در دسترس آنها وجود دارد (Gardiner, 1984, Krieger and Fuerst, 2002). در این رساله هموگلوبین انسان به عنوان مرجعی برای هموگلوبین در سطح تراز دریا و دو ماهی قره برون و ازون برون که توانایی حرکت در اعماق ۵۰ و ۱۵۰ متری را دارند (اصلان پرویز، ۱۳۷۲) و از نظر شرایط زیست محیطی و فیزیولوژی یکسان هستند، به عنوان مرجعی برای بیان اختلاف عمق در نظر گرفته شدند. در بخش نتایج نشان داده شد که تمایل هموگلوبین به اکسیژن در ماهی ازون برون از ماهی قره برون، و ماهی قره برون از انسان بیشتر می باشد. با نتایج فلورسانس تأیید گردید که از لحاظ آبگریزی سطح هموگلوبین، آبگریزی هموگلوبین انسان از ماهی قره برون، و ماهی قره برون از ماهی ازون برون بیشتر می باشد. تحقیقات پیشین نشان داده است که روند تغییرات ظرفیت گرمایی (C_p) در پروتئین ها با میزان آبگریزی سطح رابطه ی خطی دارد (Baldwin, 1986, Moosavi-Movahedi *et al.*, 2003). این موضوع در این تحقیق نیز کاملاً تأیید گردید. به نظر می رسد که ساختار هموگلوبین با توجه به شرایط محیط زیست و میزان فشار جزئی اکسیژن و مقدار تمایل ی مورد نیاز توسط طبیعت بهینه شده است. این در حالی است که در مهره دارانی که دارای تنوع هموگلوبینی کمتری می باشند، مانند انسان، تغییر در شرایط طبیعی زندگی می تواند منجر به بروز بیماری های خطرناکی مانند بیماری های گریبان گیر غواصانی که به اعماق زیاد می روند^۷ (Layon and Modell, 2009) شود. مستقل از این واقعیت که هوا از ۲۱٪ اکسیژن، ۷۸٪ نیتروژن، و ۱٪ سایر گازها تشکیل یافته است، مطابق قانون دالتون^۸، فشار جزئی نسبی اکسیژن در هر ارتفاعی ۲۱٪ کل فشار را تشکیل می دهد (Wilmshurst, 1998). در کنار تاثیرات انکارناپذیر ویژگی های فیزیولوژیکی، ساختار هموگلوبین نقشی حیاتی در تطابق موجود با شرایط محیطی دارد. در خصوص بیماری های مرتبط با اعماق زیاد در غواصی، تاثیر افزایش فشار جزئی اکسیژن

⁷ Oxygen toxicity

⁸ Dalton's law

قابل توجه است. با افزایش عمق و افزایش فشار جزئی مطلق^۹ اکسیژن، مقدار اکسیژن در محلول و در بدن افزایش می یابد و به پیگمنت های حامل اکسیژن متصل می گردد. بنابر این در یک فشار جزئی مشخص اکسیژن، هموگلوبین در خون سرخرگی به شکل مجازی با اکسیژن اشباع می گردد و پس از آن افزایش فشار جزئی اکسیژن، تاثیر کمی بر افزایش مقدار اکسیژن پیوند یافته با هموگلوبین دارد (Wilmshurst, 1998). در آزمایشات انجام شده در این رساله، نتایج نشان دادند که تمایل هموگلوبین به اکسیژن با افزایش عمق و در نتیجه افزایش فشار جزئی اکسیژن، افزایش می یابد. در مطالعات انجام گرفته بر روی ارتباط عمق و فشار جزئی اکسیژن نشان داده شده است که با افزایش عمق فشار جزئی اکسیژن افزایش می یابد (Wilmshurst, 1998). پس فشار جزئی اکسیژن در عمقی که ماهی ازون برون توانایی عزیمت با آنجا را دارد بیشتر از ماهی قره برون و بیشتر از سطح زمین برای انسان می باشد. جدول ۴-۱ ارتباط کاملی از نتایج گرفته شده را بیان می کند.

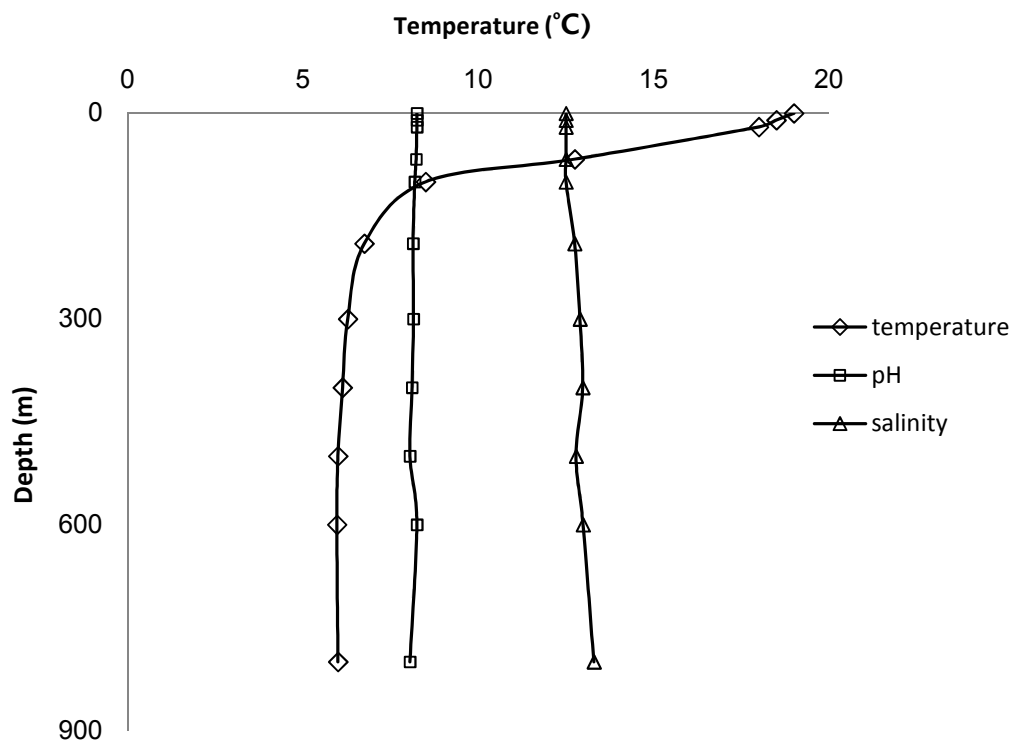
جدول ۴-۱ ارتباط بین میانگین عمق محیط زیست و اختلاف ساختار و عملکرد هموگلوبین ماهی ازون برون و قره برون و انسان.

| <div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);"> اکسیژن افینیته میزان ماریچ آلفا فشار جزئی اکسیژن </div> <div style="background-color: #333; color: white; padding: 5px; margin: 0 10px; text-align: center;"> Increase ↓ </div> </div> | گونه | میزان عمق آبها از سطح تراز دریا (m) | ظرفیت گرمایی C_p (kcal.mol ⁻¹ .K ⁻¹) | <div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);"> آبگریزی سطح هموگلوبین </div> <div style="background-color: #333; color: white; padding: 5px; margin: 0 10px; text-align: center;"> Increase ↑ </div> </div> |
|---|----------------------------|---|--|--|
| | Human | ۰ | ۱۷.۹۷۳ | |
| | <i>Acipenser persicus</i> | -۵۰ | ۹.۹۹۷ | |
| | <i>Acipenser stellatus</i> | -۱۵۰ | ۶.۴۵۷ | |

در ادامه تحقیق بالا بر روی پایداری حرارتی هموگلوبین دو گونه ماهی مورد مطالعه تحقیق شد. این تحقیقات منجر به کامل تر شدن فرضیه مطالعات قبل گردید. پایداری حرارتی هموگلوبین پستانداران، پرندگان و خزندگان بهم نزدیک می باشد و در مقایسه با هموگلوبین دوزیستان و ماهی ها مقاوم تر هستند (Tondo *et al.*, 1980). این واقعیت می تواند با اعماق مختلف محیط زیست جانور و دمای آب مرتبط باشد. بیشتر ماهیان خاویاری آنادروموس و بستر خوار هستند و بین آب دریا و رودخانه مهاجرت می کنند. ماهیان خاویاری دریای خزر از دریا به رودخانه های اطراف مهاجرت می کنند و در این حرکت تغییرات شوری بین ۱۴/۲۰ - ۸/۵۹ درصد و محدوده دمایی بین ۴ تا ۲۹ درجه سانتی گراد را تحمل می کنند. مطابق شکل ۵-۱ میانگین تغییرات فصلی شوری و pH با افزایش عمق در آبهای

^۹ Partial absolute pressure

دریای خزر ناچیز می باشد و تغییرات دما نمایش داده شده است. این شکل طبق آخرین اطلاعات بدست آمده در غالب طرح از مرکز تحقیقات شیلات تهران بدست آمده است.



شکل ۵-۱ میانگین تغییرات فصلی دما، شوری و pH با افزایش عمق در ناحیه جنوبی دریای خزر

با در نظر گرفتن این واقعیت که ماهی ازون برون به علت داشتن توانایی حرکت به اعماق بیشتر می تواند محدوده بیشتری از تغییرات دمایی و فشار جزئی اکسیژن را نسبت به ماهی قره برون تحمل کند، هموگلوبین ماهی ازون برون نسبت به قره برون باید پایداری حرارتی بیشتری داشته باشد. نتایج آزمایش های انجام شده به وسیله دستگاه DSC انجام گرفت، نشان داد که هموگلوبین ماهی ازون برون نسبت به ماهی قره برون پایداری دمایی بیشتری دارد. اندازه گیری های انجام شده برای تجمع هموگلوبین ها در این تحقیق مشخص کرد که هموگلوبین ماهی قره برون بیشتر از ماهی ازون برون تجمع می یابد. این نتایج با تحلیل های کموتری که با استفاده از طیف های بدست آمده از دستگاه طیف سنجی مرئی-فرابنفش در تیتراسیون هموگلوبین ها با DTAB انجام گرفت، تأیید گردید. در نتایج بدست آمده از تحلیل های کموتری سطح زیر حدودا در نمودار کسر مولی و غلظت DTAB نشان دهنده معیاری از تجمع پروتئین می باشد و با آن نسبت عکس دارد. محاسبه این دو سطح در نمودار بدست آمده، این سطح در حد واسط ماهی ازون برون ۱۹ درصد بیشتر از ماهی قره

برون می باشد که تأییدی برای آزمایش های انجام شده در راستای اندازه گیری تجمع هموگلوبین می باشد.

با توجه به این موضوع که مقایسه هموگلوبین های دو ماهی ازون برون و قره برون با استفاده از دستگاه های طیف سنجی مرئی-فرابنفش، دورنگ نمایی دورانی، فلورسانس، مطالعات کالریمتری روبشی افتراقی (DSC) و تحلیل های کمومتری انجام گرفت ارتباطی بین محیط زیست ماهی های مورد مطالعه و تأثیر عمق بر روی ساختار و عملکرد دو هموگلوبین ارائه شد و یک فرضیه نیز در این رابطه بیان گردید.

با تأمل بیشتر بر روی این تحقیق، تغییرات گونه های هموگلوبین مورد بررسی قرار گرفت. اساس این تحقیق واسرشته کردن دو هموگلوبین به وسیله DTAB و در این روند مقایسه گونه های هموگلوبین و نتایج حاصل از آن مورد بررسی قرار گرفت. در این تیتراسیون در هر طیف مرئی - فرابنفش حاصل از افزودن DTAB به هموگلوبین، درصد اکسی، دی اکسی، مت هموگلوبین به وسیله معادله بنش محاسبه شد. با رسم نمودار تغییرات درصد هر یک از این گونه های هموگلوبین نسبت به غلظت DTAB در محلول مشاهده شد که صورتبندی گونه اکسی در هموگلوبین ازون برون پایدارتر از صورتبندی هموگلوبین قره برون می باشد و همچنین میزان تمایل هموگلوبین به اکسیژن در هموگلوبین ازون برون از هموگلوبین قره برون بیشتر است (Ariaeenejad *et al.*). این حقیقت با نتایج بدست آمده از DSC، مقدار ظرفیت گرمایی Cp که با آگریزی سطح پروتئین رابطه خطی دارد کاملاً تطبیق پذیر است (Baldwin, 1986, Moosavi-Movahedi *et al.*, 2003). همچنین نقطه تلاقی اکسی هموگلوبین و دی اکسی هموگلوبین نشان می دهد که هر چه این نقطه در غلظت بالاتری از DTAB باشد، آن هموگلوبین پایدارتر است.

در ادامه تحقیق در تیتراسیون در هر طیف دورنگ نمایی دورانی حاصل از افزودن DTAB به هموگلوبین، این نتیجه حاصل شد که میزان ماریپیچ آلفا در هموگلوبین ماهی ازون برون بیشتر از ماهی قره برون می باشد و این موضوع نشان می دهند که میزان فشردگی در هموگلوبین ازون برون بیشتر از هموگلوبین قره برون می باشد.

نتیجه کلی:

با استفاده از نتایج این سه تحقیق که در سه مرحله انجام گرفت می توان فرضیه ارائه شده در رابطه با انطباق دو ماهی مورد مطالعه با محیط زیست آنها در برآورده کردن نیاز خود به گرفتن اکسیژن را اینگونه بیان کرد که ماهی ازون برون توانایی رفتن به اعماق بیشتر را نسبت به ماهی قره برون دارد، و طبق نتایج این رساله مشاهده می شود که هر چه هموگلوبین در عمق بیشتری بتواند باشد میزان فشردگی، پایداری و پایداری حرارتی، تمایل هموگلوبین به اکسیژن، میزان درصد ماریپیچ آلفا در آن بیشتر و برعکس میزان

آبگریزی سطح هموگلوبین کمتر می باشد. به عبارت دیگر با افزایش عمق آب میزان فشردگی، پایداری و پایداری حرارتی، تمایل هموگلوبین به اکسیژن، میزان درصد ماریچ آلفا در هموگلوبین افزایش یافته و آبگریزی سطح پروتئین کاهش می یابد.

فهرست منابع

- اصلان پرویز، حسن. (۱۳۷۲). پراکنش ماه ر دریای یان خاویاری د خزر. ناشر: موسسه تحقیقات و آموزش شیلات ایران
- سرافراز، ژاله و اکبریان، محمد علی. (۱۳۸۴). مروری بر بیولوژی ماهیان خاویاری خزر: انتشارات نقش مهر.
- ستاری، مسعود. (۱۳۸۱). ماهی شناسی ۱: نشر حق شناس.
- کیوان، امین. (۱۳۸۱). مقدمه ای بر بیوتکنولوژی پرورش ماهیان خاویاری (در استخر ها، حوضچه ها، قفسها و آبگیر انتشارات دانشگاه آزاد لاهیجان.
- موسوی موحدی، علی اکبر. خان چمنی، جمشید و تقوی، امیر حسین. (۱۳۸۳). پروتئین ساختار و عملکرد: انتشارات دانشگاه تهران.
- وثوقی، غلام حسین و مستجیر، بهزاد. (۱۳۷۳). ماهیان آب شیرین: انتشارات دانشگاه تهران.
- وثوقی، غلام حسین و مستجیر، بهزاد. (۱۳۷۵). ماهیان آب شیرین: انتشارات دانشگاه تهران.

- Adinolfi, M., and G. Chieffi. 1958.** Larval and aoult haemoglobins of the cyclostome petromyzon planeri. *Nature* **182**:730.
- Affonso, E. G. 1990.** Estudo sazonal de caracter-ísticas respirat³rias do sangue de Hoplosternum littorale (Siluriformes, Callichthyidae) da ilha da Marchantaria, Amazonas, Masterâ€™s thesis]: INPA/FAU, Manaus.
- Ajloo, D., A. A. Moosavi-Movahedi, G. H. Hakimelahi, A. A. Saboury, and H. Gharibi. 2002a.** The effect of dodecyl trimethylammonium bromide on the formation of methemoglobins and hemichrome. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **26**:185-196.
- Ajloo, D., A. A. Moosavi-Movahedi, M. Sadeghi, and H. Gharibi. 2002b.** Comparative structural and functional studies of avian and mammalian hemoglobins. *Acta Biochimica Polonica-English Edition*.49: 459-470-
- Allison, A. C., and J. H. Humphrey. 1960.** A theoretical and experimental analysis of double diffusion precipitin reactions in gels, and its application to characterization of antigens. *Immunology* **3**:95.
- Amrhein, M., B. Srinivasan, D. Bonvin, and M. M. Schumacher. 1996.** On the rank deficiency and rank augmentation of the spectral measurement matrix. *Chemometrics and intelligent laboratory systems* **33**:17-33.
- Andersen O. F. Wetten, M. C. De Rosa, C. Andre, C. Carelli Alinovi, M. Colafranceschi, O. Brix, and A. Colosimo. 2009.** Haemoglobin polymorphisms affect the oxygen-binding properties in Atlantic cod populations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **276**:833.
- Aranda Iv, R., H. Cai, C. E. Worley, E. J. Levin, R. Li, J. S. Olson, G. N. Phillips Jr, and M. P. Richards. 2009.** Structural analysis of fish versus mammalian hemoglobins: effect of the heme pocket environment on autooxidation and hemin loss. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **75**:217-230.
- Arefjev, V. A., and G. I. Karnauchov. 1989.** Species-specificity of electrophoretic patterns of haemoglobin and uniformity of karyotypes in fishes, Genus Abramis (Pisces: Cyprinidae). *Biochemical Systematics and Ecology* **17**:479-488.
- Ariaeenejad, S., M. Habibi-Rezaei, S. Jamili, M. R. Fatemi, N. Poursasan, F. Ahmad, N. Sheibani, K. Kavousi, and A. A. Moosavi-Movahedi.** Biochemical Characterization

of Hemoglobins from Caspian Sea Sturgeons (*Acipenser persicus* and *Acipenser stellatus*). *Cell Biochemistry and Biophysics*:1-9.

Armantrout, N. B. 1980. The freshwater fishes of Iran.

Awenius, C., T. Hankeln, and T. Burmester. 2001. Neuroglobins from the zebrafish *Danio rerio* and the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Biochemical and biophysical research communications* **287**:418-421.

Babushkin, N. Y., and M. P. Borzenko. 1951. The Sturgeons of the Caspian. *Pishchepromizdat, Moscow*.

Baker, K. 2005. Singular Value Decomposition Tutorial. 2005. Available at [www.ling.ohio-state.edu/~kbaker/...ISingular Value Decomposition Tutorial .pdf](http://www.ling.ohio-state.edu/~kbaker/...ISingularValueDecompositionTutorial.pdf).

Baldwin, R. L. 1986. Temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**:8069.

Bemis, W., E. Findeis, and L. Grande. 2002. An overview of Acipenseriformes. *Sturgeon Biodiversity and Conservation*:25-71.

Bemis, W., and B. Kynard. 2002. Sturgeon rivers: an introduction to acipenseriform biogeography and life history. *Sturgeon Biodiversity and Conservation*:167-183.

Benesch, R., and R. E. Benesch. 1967. The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. *Biochemical and biophysical research communications* **26**:162.

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

Berbel, F., E. Kapoya, M. Esteban, and R. Tauler. 2003. Multivariate resolution of coeluted peaks in hyphenated liquid chromatography Linear sweep voltammetry . *Electroanalysis* **15**:499-508.

Berenbrink, M. 2006. Evolution of vertebrate haemoglobins: Histidine side chains, specific buffer value and Bohr effect. *Respiratory physiology & neurobiology* **154**:165-184.

Binotti, I., S. Giovenco, B. Giardina, E. Antonini, M. Brunori, and J. Wyman. 1971. Studies on the functional properties of fish hemoglobins:: II. The oxygen equilibrium of the isolated hemoglobin components from trout blood. *Archives of biochemistry and biophysics* **142**:274-280.

Birstein, V. J. 1993. Sturgeons and paddlefishes: threatened fishes in need of conservation. *Conservation Biology* **7**:773-787.

Bollag, D. M., and S. J. Edelstein. 1991a. Gel electrophoresis under denaturing conditions. P.^Pp. 95-123 Wiley-Liss: New York.

Bollag, D. M., and S. J. Edelstein. 1991b. Immunoblotting. *Protein Methods*:181-211.

Boutilier, R. G., G. K. Iwama, and D. J. Randall. 1986. The promotion of catecholamine release in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, by acute acidosis: interactions between red cell pH and haemoglobin oxygen-carrying capacity. *Journal of experimental biology* **123**:145.

Braman, J. C. 2002. Yellowstone Lake cutthroat trout hemoglobin polymorphism. *Yellowstone Lake: Hotbed of Chaos or Reservoir of Resilience*:8-10.

Braman, J. C., C. B. Stalnaker, T. M. Farley, and G. T. Klar. 1977. Starch gel electrophoresis of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, and cutthroat trout, *Salmo clarkii*, hemoglobins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **56**:435-437.

Braman, J. C., C. B. Stalnaker, G. T. Klar, and T. M. Farley. 1980. Hemoglobin polymorphism in adult cutthroat trout, *Salmo clarkii*. *Journal of Experimental Zoology* **211**:411-413.

- Brittain, T. 2005.** Root effect hemoglobins. *Journal of inorganic biochemistry* **99**:120-129.
- Buhler, D. R. 1963.** Studies on fish hemoglobins. *Journal of Biological Chemistry* **238**:1665-1674.
- Buhler, D. R., and W. E. Shanks. 1959.** Multiple hemoglobins in fishes. *Science* **129**:899.
- Camardella, L., C. Caruso, R. D'Avino, G. di Prisco, B. Rutigliano, M. TamburriniGiulio, and M. F. Perutz. 1992.** Haemoglobin of the Antarctic fish *Pagothenia bernacchii** 1:: Amino acid sequence, oxygen equilibria and crystal structure of its carbonmonoxy derivative. *Journal of Molecular Biology* **224**:449-460.
- Carr, S. H., F. Tatman, and F. A. Chapman. 1996.** Observations on the natural history of the Gulf of Mexico sturgeon (*Acipenser oxyrinchus de sotoi* Vladykov 1955) in the Suwannee River, southeastern United States. *Ecology of Freshwater Fish* **5**:169-174.
- Chong, K. T., G. Miyazaki, H. Morimoto, Y. Oda, and S. Y. Park. 1999.** Structures of the deoxy and CO forms of haemoglobin from *Dasyatis akajei*, a cartilaginous fish. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **55**:1291-1300.
- Clementi, M. E., S. G. Condo, M. Castagnola, and B. Giardina. 1994.** Hemoglobin function under extreme life conditions. *European Journal of Biochemistry* **223**:309-317.
- Clementi, M. E., M. C. De Rosa, C. Bertonati, C. Capo, E. Cataldi, R. Petruzzelli, and B. Giardina. 2001a.** Functional and structural properties of the hemoglobin components from Italian sturgeon (*Acipenser naccarii*). *Fish Physiology and Biochemistry* **24**:191-200.
- Clementi, M. E., M. C. De Rosa, C. Bertonati, C. Capo, E. Cataldi, R. Petruzzelli, and B. Giardina. 2001b.** The hemoglobins of the "Fossil Fish" *Acipenser naccarii*: functional properties and their structural basis. *Hemoglobin* **25**:447-451.
- Clementi, M. E., M. C. De Rosa, C. Bertonati, C. Capo, E. Cataldi, R. Petruzzelli, and B. Giardina. 2001c.** The hemoglobins of the fossil fish *Acipenser naccarii*: Functional properties and their structural basis. *Hemoglobin* **25**:447-451.
- Clementi, M. E., E. Cataldi, C. Capo, R. Petruzzelli, E. Tellones, and B. Giardina. 1999.** Purification and characterization of the hemoglobin components of Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*) blood. *Journal of Applied Ichthyology* **15**:78-80.
- Cocca, E., H. W. Detrich III, S. K. Parker, and G. Prisco. 2000.** A cluster of four globin genes from the Antarctic fish *Notothenia coriiceps*. *Journal of fish biology* **57**:33-50.
- Cocca, E., M. Ratnayake-Lecamwasam, S. K. Parker, L. Camardella, M. Ciaramella, G. di Prisco, and H. W. Detrich. 1997.** Do the hemoglobinless icefishes have globin genes? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **118**:1027-1030.
- D'Avino, R., and G. di Prisco. 1989.** Hemoglobin from the Antarctic fish *Notothenia coriiceps neglecta*. *European Journal of Biochemistry* **179**:699-705.
- Dayer, M. R., A. A. Moosavi-Movahedi, and M. S. Dayer.** Band Assignment in Hemoglobin Porphyrin Ring Spectrum: Using Four-Orbital Model of Gouterman. *Protein and Peptide Letters* **17**:473-479.
- de Almeida-Val, V. M. F., M. N. P. da Silva, M. C. de Magalhaes Caraciolo, L. S. B. de Mesquita, I. P. Farias, and A. L. Val. 1992.** LDH isozymes in amazon fish--III. Distribution patterns and functional properties in Serrasalminidae (Teleostei: Ostariophysi). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **103**:119-125.
- De Juan, A., and R. Tauler. 2003.** Chemometrics applied to unravel multicomponent processes and mixtures: Revisiting latest trends in multivariate resolution. *Analytica Chimica Acta* **500**:195-210.

- De, S., and A. Girigoswami. 2006.** A fluorimetric and circular dichroism study of hemoglobin-effect of pH and anionic amphiphiles. *Journal of colloid and interface science* **296**:324-331.
- di Prisco, G., J. T. Eastman, D. Giordano, E. Parisi, and C. Verde. 2007.** Biogeography and adaptation of Notothenioid fish: hemoglobin function and globin-gene evolution. *Gene* **398**:143-155.
- Di Prisco, G., B. Giardina, R. D'Avino, S. G. Cond, A. Bellelli, and M. Brunori. 1988.** Antarctic fish hemoglobin: an outline of the molecular structure and oxygen binding properties--II. Oxygen binding properties. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **90**:585-59.
- Diaz-Cruz, M. S., J. Mendieta, R. Tauler, and M. Esteban. 1999.** Multivariate curve resolution of cyclic voltammetric data: Application to the study of the cadmium-binding properties of glutathione. *Analytical Chemistry* **71**:4629-4636.
- Dickerson, R. E., J. C. Kendrew, and B. E. Strandberg. 1961.** The crystal structure of myoglobin: Phase determination to a resolution of 2 Å by the method of isomorphous replacement. *Acta Crystallographica* **14**:1188-1195.
- Edelstein, S. J., B. McEwen, and Q. H. Gibson. 1976.** Subunit dissociation in fish hemoglobins. *Journal of Biological Chemistry* **251**:7632.
- Fago, A., E. Bendixen, H. Malte, and R. E. Weber. 1997.** The anodic hemoglobin of *Anguilla anguilla*. *Journal of Biological Chemistry* **272**:15628.
- Fago, A., E. Forest, and R. E. Weber. 2001.** Hemoglobin and subunit multiplicity in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hemoglobin system. *Fish Physiology and Biochemistry* **24**:335-342.
- Fago, A., C. Hundahl, H. Malte, and R. E. Weber. 2004.** Functional properties of neuroglobin and cytoglobin. Insights into the ancestral physiological roles of globins. *IUBMB life* **56**:689-696.
- Fourie, F. R., and J. H. J. Van Vuren. 1976.** A seasonal study on the hemoglobins of carp (*Cyprinus carpio*) and yellowfish (*Barbus holubi*) in South Africa. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **55**:523-525.
- Frey, B. J., R. E. Weber, W. J. van Aardt, and A. Fago. 1998.** The haemoglobin system of the mudfish, *Labeo capensis*: adaptations to temperature and hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **120**:735-742.
- Fyhn, U. E. H., and B. Sullivan. 1974.** Hemoglobin polymorphism in fishes. I. Complex phenotypic patterns in the toadfish, *Opsanus tau*. *Biochemical Genetics* **11**:373-385.
- Gardiner, B. G. 1984.** Sturgeons as living fossils. Springer-Verlag, New York.
- Gersonde, K., H. Sick, and A. Wollmer. 1970.** Nachweis von Konformationsisomeren im Hämoglobin (III) von *Chironomus th. thummi* mit Hilfe der Elektronen-Spin-Resonanz. *European Journal of Biochemistry* **15**:237-244.
- Giardina, B., D. Mosca, and M. C. De Rosa. 2004.** The Bohr effect of haemoglobin in vertebrates: an example of molecular adaptation to different physiological requirements. *Acta physiologica scandinavica* **182**:229-244.
- Giles, M. A., and W. E. Vanstone. 1976.** Ontogenetic variation in the multiple hemoglobins of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and effect of environmental factors on their expression. *Journal of the Fisheries Board of Canada* **33**:1144-1149.
- Gillen, R. G., and A. Riggs. 1971.** The hemoglobins of a fresh-water teleost, *Cichlasoma cyanoguttatum* (Baird and Girard)-I. The effects of phosphorylated organic compounds upon the oxygen equilibria. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **38**:585-595.

- Gillen, R. G., and A. Riggs. 1973a.** The hemoglobins of a fresh-water teleost, *Cichlasoma cyanoguttatum* (Baird and Girard). II. Subunit structure and oxygen equilibria of the isolated components. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 154:348-354.
- Gillen, R. G., and A. Riggs. 1973b.** Structure and function of the isolated hemoglobins of the American eel, *Anguilla rostrata*. *Journal of Biological Chemistry* 248:1961.
- Glomski, C. A., J. Tamburlin, and M. Chainani. 1992.** The phylogenetic odyssey of the erythrocyte. III. Fish, the lower vertebrate experience. *Histology and histopathology* 7:501.
- Grigg, G. C. 1974.** Respiratory function of blood in fishes. *Chemical zoology* 8:331-368.
- Hemmingsen, E. A., and E. L. Douglas. 1970.** Respiratory characteristics of the hemoglobin-free fish *Chaenocephalus aceratus*. *Comparative biochemistry and physiology* 33:733-744.
- Houston, A. H., and D. Cyr. 1974.** Thermoacclimatory variation in the haemoglobin systems of goldfish (*Carassius auratus*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of experimental biology* 61:455.
- Houston, A. H., K. M. Mearow, and J. S. Smeda. 1976.** Further observations upon the hemoglobin systems of thermally-acclimated freshwater teleosts: Pumpkinseed (*Lepomis gibbosus*), white sucker (*Catostomus commersoni*), carp (*Cyprinus carpio*), goldfish (*Carassius auratus*) and carp-goldfish hybrids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 54:267-273.
- Jaumot, J., R. Gargallo, A. de Juan, and R. Tauler. 2005.** A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB. *Chemometrics and intelligent laboratory systems* 76:101-110.
- Jensen, F. B., A. Fago, and R. E. Weber. 1998.** 1 Hemoglobin Structure and Function. *Fish physiology* 17:1-40.
- Jensen, F. B., and R. E. Weber. 1982.** Respiratory properties of tench blood and hemoglobin. Adaptation to hypoxic-hypercapnic water. *Mol. Physiol* 2:235-250.
- Jordan, H. E., and C. C. Speidel. 1930.** Blood formation in cyclostomes. *American Journal of Anatomy* 46:3.391-55
- Junqueira, L. C., and J. Carneiro. 1991.** *Biologia Molecular e Celular*. pp. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Kaloustian, K. V., and J. J. Poluhowich. 1976.** The role of organic phosphates in modulating the oxygenation behavior of eel hemoglobin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 53:245-248.
- Kashentseva, L. N. 2001.** The state of feeding of stellate sturgeon population in the Caspian Sea. *Status of Commercial Species Stocks in the Caspian Sea and their Management*:171-181.
- Kim, D. H., J. H. Kim, J. H. Seo, J. W. Lee, S. Y. Lim, H. J. Lee, and M. W. Byun. 2005.** Polymerization of SDS-PAGE gel by gamma irradiation and its use for characterization by electrophoresis of a protein. *Radiation Physics and Chemistry* 74:395-398.
- Kimura, M. 1989.** The neutral theory of molecular evolution and the world view of the neutralists. *Genome* 31:24-31.
- Kottelat, M., and J. Freyhof. 2007.** *Handbook of European freshwater fishes*. Publications Kottelat Cornol Switzerland.
- Krieger, J., and P. A. Fuerst. 2002.** Evidence for a slowed rate of molecular evolution in the order Acipenseriformes. *Molecular biology and evolution* 19:891.
- Landini, G. F., A. R. Schwantes, and M. L. B. Schwantes. 2002.** *Astyanax scabripinnis* (Pisces: Characidae) hemoglobins :structure and function. *Brazilian Journal of Biology* 62:595-599.

- Laterreur, J., and A. M. English. 2007.** Hemoglobin S-nitrosation on oxygenation of nitrite/deoxyhemoglobin incubations is attenuated by methemoglobin. *Journal of inorganic biochemistry* **101**:1835-1827.
- Lawton, W. H., and E. A. Sylvestre. 1971.** Self modeling curve resolution. *Technometrics* **6**:17-633.
- Layon, A. J., and J. H. Modell. 2009.** Drowning: update 2009. *Anesthesiology* **110**:1390.
- Lecomte, J. T. J., D. A. Vuletich, B. C. Vu, S. A. Kuriakose, N. L. Scott, and C. J. Falzone. 2004.** Structural properties of cyanobacterial hemoglobins: the unusual heme-protein cross-link of *Synechocystis* sp. PCC 6803 Hb and *Synechococcus* sp. PCC 7002 Hb. *Micron* **35**:71-72.
- Legeza, M. I. 1972.** The role of abiotic factors in the distribution of sturgeons (Pisces, Acipenseridae) in the Caspian Sea. *Jour. Ichthyology (USSR)* **1**.
- Li, R., Y. Nagai, and M. Nagai. 2000.** Changes of tyrosine and tryptophan residues in human hemoglobin by oxygen binding: near-and far-UV circular dichroism of isolated chains and recombined hemoglobin. *Journal of inorganic biochemistry* **82**:93-101.
- Liong, E. C., Y. Dou, E. E. Scott, J. S. Olson, and G. N. Phillips. 2001.** Waterproofing the heme pocket. *Journal of Biological Chemistry* **276**:9093.
- Maeder, M. 1987.** Evolving factor analysis for the resolution of overlapping chromatographic peaks. *Analytical chemistry* **59**:527-530.
- Manwell, C. 1958.** On the evolution of hemoglobin. Respiratory properties of the hemoglobin of the California hagfish, *Polistotrema stouti*. *The Biological Bulletin* **115**:227-238.
- Marcon, J. L., and D. Wilhelm Filho. 1999.** Antioxidant processes of the wild tambaqui, *Colossoma macropomum* (Osteichthyes, Serrasalminae) from the Amazon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **123**:257-263.
- Markarova, I. A., A. P. Alekperov, and T. S. Zarbalina. 1991.** Present status of the spawning run of sheap sturgeon, *Acipenser nudiiventris*, in the Kura River. *Journal of Ichthyology/Voprosy Ikhtiologii* **31**:17-22.
- Maruyama, K., S. Yasumasu, K. Naruse, H. Mitani, A. Shima, and I. Iuchi. 2004.** Genomic organization and developmental expression of globin genes in the teleost *Oryzias latipes*. *Gene* **335**:89-100.
- Massart, D. L. 1988.** *Chemometrics: a textbook*. Elsevier Science.
- Mazzarella, L., G. Bonomi, M. C. Lubrano, A. Merlino, A. Riccio, A. Vergara, L. Vitagliano, C. Verde, and G. di Prisco. 2006.** Minimal structural requirements for Root effect: crystal structure of the cathodic hemoglobin isolated from the Antarctic fish *Trematomus newnesi*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **62**:316-321.
- Mazzarella, L., R. D'Avino, G. di Prisco, C. Savino, L. Vitagliano, P. C. E. Moody, and A. Zagari. 1999.** Crystal structure of *Trematomus newnesi* haemoglobin re-opens the root effect question1. *Journal of Molecular Biology* **287**:897-906.
- McCutcheon, F. H. 1947.** Specific oxygen affinity of hemoglobin in elasmobranchs and turtles. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **29**:333-344.
- Merlino, A., L. Vitagliano, B. D. Howes, C. Verde, G. di Prisco, G. Smulevich, F. Sica, and A. Vergara. 2009.** Combined crystallographic and spectroscopic analysis of *Trematomus bernacchii* hemoglobin highlights analogies and differences in the peculiar oxidation pathway of Antarctic fish hemoglobins. *Biopolymers* **91**:1117-1125.
- Moosavi-Movahedi, A. A., J. Chamani, Y. Goto, and G. H. Hakimelahi. 2003.** Formation of the molten globule-like state of cytochrome c induced by n-alkyl sulfates at low concentrations. *Journal of biochemistry* **133**:93.

- Morris, R. J., W. S. Neckameyer, and Q. H. Gibson. 1981.** Multiple T state conformations in a fish hemoglobin. Carbon monoxide binding to hemoglobin of *Thunnus thynnus*. *Journal of Biological Chemistry* **256**:4598.
- Murad, A., A. H. Houston, and L. Samson. 1990.** Haematological response to reduced oxygen-carrying capacity, increased temperature and hypoxia in goldfish, *Carassius auratus* L. *Journal of fish biology* **36**:289-305.
- Mylvaganam, S. E., C. Bonaventura, J. Bonaventura, and E. D. Getzoff. 1996.** Structural basis for the Root effect in haemoglobin. *Nature Structural & Molecular Biology* **3**:275-283.
- Müller, G., A. Fago, and R. E. Weber. 2003.** Water regulates oxygen binding in hagfish (*Myxine glutinosa*) hemoglobin. *Journal of experimental biology* **206**:1389.
- Nakaya, K., K. Yamada, M. Onozawa, and Y. Nakamura. 1971.** Interaction of cetylpyridinium chloride with oxymyoglobin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure* **251**:7-13.
- Naoi, Y., K. T. Chong, K. Yoshimatsu, G. Miyazaki, J. R. H. Tame, S. Y. Park, S. Adachi, and H. Morimoto. 2001.** The functional similarity and structural diversity of human and cartilaginous fish hemoglobins. *Journal of Molecular Biology* **307**:259-270.
- Nelson, D. L., and M. M. Cox.** Lehninger Principles of Biochemistry (2005). Pp. New York: Worth Publishers.
- Nikinmaa, M., and B. B. Rees. 2005.** Oxygen-dependent gene expression in fishes. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **288**:R1079-R1090.
- Noble, R. W., L. J. Parkhurst, and Q. H. Gibson. 1970.** The effect of pH on the reactions of oxygen and carbon monoxide with the hemoglobin of the carp, *Cyprinus carpio*. *Journal of Biological Chemistry* **245**:6628-6633.
- O'Keeffe, D. H., R. E. Ebel, and J. A. Peterson. 1978.** Studies of the oxygen binding site of cytochrome P-450. Nitric oxide as a spin-label probe. *The Journal of biological chemistry* **253**:3509.
- Okamoto, K., M. Sakai, and M. Miyata. 2001.** Molecular cloning and sequence analysis of [alpha]- and [beta]-globin cDNAs from yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **130**:207-216.
- Pauling, L., R. B. Corey, and H. R. Branson. 1951.** The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **37**:205-211.
- Pelster, B., and R. O. Y. E. Weber. 1990.** Influence of organic phosphates on the Root effect of multiple fish haemoglobins. *Journal of experimental biology* **149**:425.
- Pennelly, R. R., A. Riggs, and R. W. Noble. 1978.** The kinetics and equilibria of squirrel-fish hemoglobin: A root effect hemoglobin complicated by large subunit heterogeneity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure* **533**:120-129.
- Percy, L. R., and I. C. Potter. 1976.** Blood cell formation in the river lamprey, *Lampetra fluviatilis*. *Journal of Zoology* **178**:319-340.
- Perutz, M. F. 1978.** Hemoglobin structure and respiratory transport. *Scientific American* **239**:92.
- Perutz, M. F. 1983.** Species adaptation in a protein molecule. *Molecular Biology and Evolution* **1**:1-28.
- Perutz, M. F., H. Muirhead, J. M. Cox, and L. C. G. Goaman. 1997.** Three-dimensional Fourier Synthesis of Horse Ox/haemoglobin at 2.8 Å Resolution: The Atomic Model. *Science is not a quiet life: unravelling the atomic mechanism of haemoglobin* **4**:270.

- Powers, D. A. 1974.** Structure, function, and molecular ecology of fish hemoglobins. *Annals of the New York Academy of Sciences* **241**:472-490.
- Powers, D. A. 1980.** Molecular ecology of teleost fish hemoglobins: strategies for adapting to changing environments. *American Zoologist*:139-162.
- Probst, R. T., and E. L. Cooper. 1955.** Age, growth, and production of the lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) in the Lake Winnebago region, Wisconsin. *Transactions of the American Fisheries Society* **84**:207-227.
- Qiu, Y., D. H. Maillett, J. Knapp, J. S. Olson, and A. F. Riggs. 2000.** Lamprey Hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry* **275**:13517.
- Ramsey, L. H. 1959.** Analysis of gas in biological fluids by gas chromatography. *Science* **129**:900.
- Reza Dayer, M., A. Akbar Moosavi-Movahedi, M. Saaïd Dayer, and S. Jafar Mousavy.** Comparison of Human and Shirbot (*Cyprinidae*: *Barbus grypus*) Hemoglobin: A Structure-Function Prospective. *Protein and Peptide Letters* **18**:1072-1077.
- Riggs, A. 1976.** Factors in the evolution of hemoglobin function. pp. 2115.
- Robinson, V. L., B. B. Smith, and A. Arnone. 2003.** A pH-dependent aquomet-to-hemichrome transition in crystalline horse methemoglobin. *Biochemistry* **42**:10113-10125.
- Roesner, A., C. Fuchs, T. Hankeln, and T. Burmester. 2005.** A globin gene of ancient evolutionary origin in lower vertebrates: evidence for two distinct globin families in animals. *Molecular Biology and Evolution* **22**:12-20.
- Romeo, A. A., J. A. Capobianco, and M. Ann. 2003.** Superoxide dismutase targets NO from GSNO to Cys²⁹³ of oxyhemoglobin in concentrated but not dilute solutions of the protein. *Journal of the American Chemical Society* **125**:14370-14378.
- Ronald, A. P., and H. Tsuyuki. 1971.** The subunit structures and the molecular basis of the multiple hemoglobins of two species of trout, *Salmo gairdneri* and *S. clarki clarki*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **39**:195-198, IN191-IN192, 199-202.
- Salhany, J. M. 2008.** Kinetics of Reaction of Nitrite with Deoxy Hemoglobin after Rapid Deoxygenation or Predeoxygenation by Dithionite Measured in Solution and Bound to the Cytoplasmic Domain of Band 3. *Biochemistry* **47**:6059-6072.
- Saurina, J., S. Hern, R. Tauler, and A. Izquierdo. 1998.** Multivariate resolution of rank-deficient spectrophotometric data from first-order kinetic decomposition reactions. *Journal of Chemometrics* **12**:183-203.
- Shorygin, A. A. 1952.** Pitanie i pishchevye vzaimootnosheniya ryb Kaspiiskogo morya (Feeding and Food Relations of Caspian Sea Fish). Pishchepromizdat.
- Southard, J. N., C. R. Berry Jr, and T. M. Farley. 1986.** Multiple hemoglobins of the cutthroat trout, *Salmo clarki*. *Journal of Experimental Zoology* **239**:7-16.
- Souza, P. C., and G. O. Bonilla-Rodriguez. 2007.** Fish hemoglobins. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **40**:769-778.
- Stam, W. T., J. J. Beintema, R. D'Avino, M. Tamburrini, E. Cocca, and G. di Prisco. 1998.** Evolutionary studies on teleost hemoglobin sequences. *Fishes of Antarctica. A biological overview. Springer, Milano*:355-359.
- Stam, W. T., J. J. Beintema, R. D'Avino, M. Tamburrini, and G. di Prisco. 1997.** Molecular evolution of hemoglobins of Antarctic fishes (*Notothenoidei*). *Journal of molecular evolution* **45**:437-445.
- Stevens, J., T. Uchida, O. Daltrop, and S. Ferguson. 2005.** Covalent cofactor attachment to proteins: cytochrome c biogenesis. *Biochemical Society Transactions* **33**:792-795.
- Sugita, Y., M. Nagai, and Y. Yoneyama. 1971.** Circular dichroism of hemoglobin in relation to the structure surrounding the heme. *Journal of Biological Chemistry* **246**:383.

- Tauler, R. 1995.** Multivariate curve resolution applied to second order data. *Chemometrics and intelligent laboratory systems* **30**:133-146.
- Tauler, R. 2001.** Calculation of maximum and minimum band boundaries of feasible solutions for species profiles obtained by multivariate curve resolution. *Journal of chemometrics* **15**:627-646.
- Tauler, R., A. Izquierdo-Ridorsa, and E. Casassas. 1993.** Simultaneous analysis of several spectroscopic titrations with self-modelling curve resolution. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **18**:293-300.
- Tauler, R., A. Smilde, and B. Kowalski. 1995.** Selectivity, local rank, three-way data analysis and ambiguity in multivariate curve resolution. *Journal of Chemometrics* **9**:31-58.
- Tietz, N. W., and B. D. Andresen. 1986.** Textbook of clinical chemistry.
- Tocidlowski, M. E., G. A. Lewbart, and M. K. Stoskopf. 1997.** Hematologic study of red pacu (*Colossoma brachypomum*). *Veterinary Clinical Pathology* **26**: 119-125.
- Tomoda, A., Y. Yoneyama, and A. Tsuji. 1981.** Changes in intermediate haemoglobins during autoxidation of haemoglobin. *Biochemical Journal* **195**:485.
- Tondo, C. V., H. M. Mendez, and E. Reischl. 1980.** Thermostability of hemoglobins in homeothermic and non-homeothermic vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **66**:151-154.
- Tsuneshige, A., S. I. Park, and T. Yonetani. 2002.** Heterotropic effectors control the hemoglobin function by interacting with its T and R states--a new view on the principle of allostery. *Biophysical chemistry* **98**:49-63.
- Val, A. L. 2000.** Organic phosphates in the red blood cells of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology* **125**:417-435.
- Val, A. L., E. G. Affonso, R. H. de Salvo Souza, V. M. F. de Almeida-Val, and M. A. F. de Moura. 1992.** Inositol pentaphosphate in the erythrocytes of an Amazonian fish, the pirarucu) *Arapaima gigas*). *Canadian Journal of Zoology* **70**:852-855.
- Val, A. L., V. M. Fonseca de Almeida-Val, and E. Gusmão Affonso. 1990.** Adaptive features of Amazon fishes: hemoglobins, hematology, intraerythrocytic phosphates and whole blood Bohr effect of *Pterygoplichthys multiradiatus* (Siluriformes). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **97**:435-440.
- Vecsei, P., and E. Artyukhin. 2001.** Threatened fishes of the world: *Acipenser persicus* Borodin, 1897 (Acipenseridae). *Environmental biology of fishes* **61**:160-160.
- Verde, C., V. Carratore, A. Riccio, M. Tamburrini, E. Parisi, and G. di Prisco. 2002.** The functionally distinct hemoglobins of the Arctic spotted wolffish *Anarhichas minor*. *Journal of Biological Chemistry* **277**:36312-36.32.
- Verde, C., and G. di Prisco. 2003.** The oxygen transport system of polar fish: the evolution of hemoglobin. *Ocean Polar Res* **25**:617-623.
- Verde, C., and G. di Prisco. 2004.** Structure/function and phylogeny of hemoglobins of polar fishes. *Micron* **35**:77-80.
- Verde, C., B. D. Howes, M. C. De Rosa, L. Raiola, G. Smulevich, R. Williams, B. Giardina, E. Parisi, and G. Di Prisco. 2004.** Structure and function of the Gondwanian hemoglobin of *Pseudaphritis urvillii*, a primitive notothenioid fish of temperate latitudes. *Protein science* **13**:2766-2781.
- Verde, C., E. Parisi, and G. di Prisco. 2006.** The evolution of thermal adaptation in polar fish. *Gene* **385**:137-145.
- Verde, C., E. Parisi, and G. Prisco. 2003.** The evolution of polar fish hemoglobin: a phylogenetic analysis of the ancestral amino acid residues linked to the Root effect. *Journal of molecular evolution* **57**:258-267.
- Vergara, A., M. Franzese, A. Merlino, G. Bonomi, C. Verde, D. Giordano, G. Di Prisco, H. C. Lee, J. Peisach, and L. Mazzarella. 2009.** Correlation between

hemichrome stability and the Root effect in tetrameric hemoglobins. *Biophysical journal* **97**:866-874.

Vergara, A., L. Vitagliano, A. Merlino, F. Sica, K. Marino, C. Verde, G. di Prisco, and L. Mazzarella. An order-disorder transition plays a role in switching off the Root effect in fish hemoglobins. *Journal of Biological Chemistry* **285**:32568-32575.

Vladykov, V. D. 1955. A comparison of Atlantic sea sturgeon with a new subspecies from the Gulf of Mexico (*Acipenser oxyrinchus desotoi*). *Journal of the Fisheries Board of Canada* **12**:754-761.

Weber, R. E. 1996. Hemoglobin adaptations in Amazonian and temperate fish with special reference to hypoxia, allosteric effectors and functional heterogeneity. *Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon*. AL Val, VMF Almeida-Val, and DJ Randall (eds.), INPA, Manaus:75-90.

Weber, R. E., and A. Fago. 2004. Functional adaptation and its molecular basis in vertebrate hemoglobins, neuroglobins and cytoglobins. *Respiratory physiology & neurobiology* **144**:141-159.

Weber, R. E., S. Hourdez, F. Knowles, and F. Lallier. 2003. Hemoglobin function in deep-sea and hydrothermal-vent endemic fish: *Symenichelis parasitica* (Anguillidae) and *Thermarces cerberus* (Zoaridae). *Journal of experimental biology* **206**:2693.

Weber, R. E., and G. Lykkeboe. 1978. Respiratory adaptations in carp blood influences of hypoxia, red cell organic phosphates, divalent cations and CO₂ on hemoglobin-oxygen affinity. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* **128**:127-137.

Weber, R. E., B. Sullivan, J. Bonaventura, and C. Bonaventura. 1976. The hemoglobin system of the primitive fish, *Amia calva*: isolation and functional characterization of the individual hemoglobin components. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure* **434**:18-31.

Weiland, T. R., S. Kundu, J. T. Trent III, J. A. Hoy, and M. S. Hargrove. 2004. Bis-histidyl hexacoordination in hemoglobins facilitates heme reduction kinetics. *J. Am. Chem. Soc* **126**:11930-11935.

White, J. M. 1977. Haemoglobin structure and function: Its relevance to biochemistry and medicine. *Molecular Aspects of Medicine* **1**:129-185.

Wilmshurst, P. 1998. Diving and oxygen. *BMJ* **317**:996-999.

Windig, W., and J. Guilment. 1991. Interactive self-modeling mixture analysis. *Analytical chemistry* **63**:1425-1432.

Wise, B. M., N. B. Gallagher, R. Bro, J. M. Shaver, W. Windig, and R. S. Koch. 2004. PLS Toolbox 3.5 for use with MATLAB, 2004. URL <http://software.eigenvector.com/>. Software, Eigenvector Research, Inc.

Wise, B. M., P. Wiegand, M. A. Nemeth, A. J. Owens, N. B. Gallagher, R. E. Shaffer, and D. Duewer. International Chemometrics Society.

Wold, S. 1978. Cross-validatory estimation of the number of components in factor and principal components models. *Technometrics*.397-405.

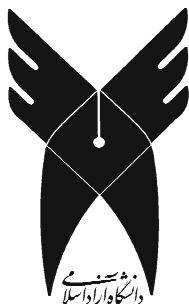
Yamanaka, H., K. Yamaguchi, and F. Matsuura. 1965. Starch gel electrophoresis of fish hemoglobins. II. Electrophoretic patterns of hemoglobin of various fishes. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* **31**:833-839.

Yoshizaki, G., T. Oshiro, and F. Takashima. 1991. Introduction of carp α -globin gene into rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi* **57**:819-824.

Abstract

Hemoglobin (Hb) variability is a commonly used index of phylogenetic differentiation and molecular adaptation in fish. In the current study, the structural and functional characteristics of Hbs from two Sturgeon species of the Southern Caspian Sea Basin were investigated. After extraction and separation of hemoglobin from whole blood, the polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), native-PAGE and isoelectric focusing (IEF) were used to confirm Hb variability in these fishes. Ion-exchange on CM-cellulose chromatography was used for purification of the dominant Hbs from these fishes. The accuracy of the methods was confirmed by IEF and SDS-PAGE. Spectral studies using fluorescence spectrophotometry, circular dichroism spectropolarimetry (CD) analysis and UV-vis spectrophotometry. Oxygen affinities of these Hbs were compared using Hb-oxygen dissociation curves. Also, the dominant Hbs from these blood fishes were utilized for further experiments. The behavior of Hbs during the denaturation process by n-dodecyl trimethylammonium bromide (DTAB) is investigated by UV-vis spectrophotometer and circular dichroism spectropolarimetry. The thermal denaturation properties of the Hbs were investigated by differential scanning calorimetry (DSC) and Hbs aggregation performed chemically in the presence of dithiotreitol (DTT) by UV-vis spectrophotometer and chemometric study. The results demonstrate a significant relationship between stability of fish hemoglobins and the ability of fish for entering to deeper depths. The UV-Vis absorption spectra identified species of hemoglobin and showed the concentration of oxyHb and metHb decreases and deoxyHb increases upon interaction with DTAB. Besides the UV-vis spectrophotometry, the interaction of DTAB with hemoglobins has been studied using circular dichroism spectropolarimetry analysis. This experiment was utilized to measure the unfolding mechanism and compared alpha-helix secondary structure under different conditions for Hbs. The results reveal that the *Acipenser stellatus* Hb in comparison with *Acipenser persicus* Hb has more stability and more structural compactness. Besides, the results confirm the hypothesis that there is a meaningful relation between average habitat depth, partial oxygen pressure, oxygen affinity, structural compactness of Hb, and its stability.

Keywords: Sturgeon hemoglobins -Oxygen affinity- hydrophobicity-
alpha-helix- chemometry



**Islamic Azad University (IAU)
Science and Research Branch**

**Department of Marine Biology
Faculty of Marine Science and Technology
Ph.D. thesis**

Subject:

**Structural and Functional Properties of the Hemoglobin
Components from the Caspian Sea
Acipenser persicus and *Acipenser stellatus***

Thesis Advisors:

Dr.A.A.Moosavi-Movahedi Ph.D.

Dr.Sh. Jamili Ph.D.

Consulting Advisors:

Dr.M. Habibi Rezaee Ph.D.

Dr.M. Fatemi Ph.D.

By

Shohreh Ariaeenejad

Winter 2012

