

مطالعه بیوفیزیکی اثر سن بر پروتئین‌های اسکلت غشای اریتروسیت و هموگلوبین در موش‌های صحرایی بالغ

هاجر فیلسوفیان^۱، محمدرضا رئوفی^۲، بیژن رنجبر^{*}

(۱) گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
(۲) گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده:

افزایش سن با تغییراتی در عملکرد بافت‌ها و سلول‌ها از جمله غشای سلولی ارتباط دارد. اریتروسیت‌ها یکی از مناسب‌ترین مدل‌های زیستی برای مطالعه اثر افزایش سن بر روی رفتار سلولی می‌باشند، زیرا برخلاف سلول‌های دیگر هسته و دیگر اندامک‌های سلولی ندارند و تغییرات آن‌ها با تغییر در جذب نور ماورای بنفش و مرئی (UV-Visible) همراه است. همچنین از دیدگاه بیوفیزیکی، خصوصیات پروتئین‌های اسکلت غشای اریتروسیت‌ها و هموگلوبین موجود در سیتوپلاسم آن‌ها که دارای قابلیت تغییر شکل‌پذیری می‌باشند، از اهمیت قابل توجهی برخوردارند. با افزایش سن میزان تراکم و چسبندگی اریتروسیت‌ها افزایش یافته و قابلیت تغییر شکل‌پذیری آن‌ها کاهش می‌یابد. همچنین با افزایش سن تمایل هموگلوبین به اکسیژن بیشتر شده و رهایش اکسیژن به بافت‌ها به دشواری صورت می‌گیرد. لذا در این گزارش به بررسی اثر سن بر روی تغییرات ساختاری و ترمودینامیکی پروتئین‌های اسکلت غشای اریتروسیت‌ها و هموگلوبین در موش‌های صحرایی بالغ با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی دورنگ نمایایی دورانی (CD)، مادون قرمز (FTIR)، ماورا بنفش و مرئی (UV-Visible) و کالریمتر روبشی تفاضلی (DSC) پرداخته شده است. نتایج نشان داد که افزایش سن در موش‌های صحرایی بالغ، منجر به فشردگی ساختار پروتئین‌های اسکلت غشای اریتروسیت‌ها می‌شود. بدین ترتیب انعطاف‌پذیری اریتروسیت‌ها کاهش می‌یابد. همچنین فشردگی و سختی ساختار هموگلوبین افزایش می‌یابد، بطوری که اتصال آهن به اکسیژن با شدت بیشتری همراه و رهایش اکسیژن به بافت‌ها کمتر می‌شود.

کلمات کلیدی: سن، پروتئین‌های اسکلت غشای اریتروسیت، قابلیت تغییر شکل اریتروسیت، دورنگ نمایایی دورانی (CD)، کالریمتر روبشی تفاضلی (DSC)

* نویسنده مسئول:

دکتر بیژن رنجبر، طبقه اول، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، بزرگراه جلال آل احمد، پل نصر، تهران، ایران، پست الکترونیک: ranjbarb@modares.ac.ir

مقدمه:

با گذشت زمان و با افزایش سن در موجودات زنده تغییراتی رخ می‌دهد که منجر به اختلالات عملکردی، افزایش میزان آسیب و در نهایت مرگ می‌شود. این تغییرات یک پدیده بیولوژیکی است که با تغییرات بیوشیمیایی و عملکردی سلول‌ها و بافت‌ها ارتباط دارد [۱]. از طرفی دیگر می‌توان گفت پیامدهای حاصل از افزایش سن نتیجه میان‌کنش بین مشخصه‌های ژنتیکی، تغذیه و سبک زندگی فرد است که با تغییرات مورفولوژی، فیزیولوژی و مولکولی، شامل تغییر در غشای سلول‌ها و اندامک‌های سلولی همراه می‌باشد. از میان انواع سلول‌ها، اریتروسیت (RBC)^۱ مدل بسیار خوبی برای مطالعه ترکیب و رفتار غشای بیولوژیکی است، زیرا که تجزیه (لیز)^۲ شدن اریتروسیت‌ها از طریق تغییر در جذب آن‌ها قابل بررسی می‌باشد [۲]. تعداد گلبول‌های قرمز خون حدود $10^{13} \times 2/3$ است که یک چهارم تعداد کل سلول‌های بدن انسان را شامل می‌شود. شکل اریتروسیت‌ها با عملکردشان متناسب است، بطوری که از منظره‌ی بالای سلول، کروی و از جانب، دوسوکاو (مقعرالطرفین)^۳ می‌باشند. وجه تمایز اریتروسیت‌ها با دیگر سلول‌های بدن در این است که آن‌ها حاوی هسته و نیز دیگر اندامک‌های سلولی نیستند [۳، ۴]. از آنجا که اریتروسیت‌ها در ویسکوزیته^۴ و جریان خون نقش تعیین کننده‌ای دارند، ویژگی‌های بیوفیزیکی آن‌ها مانند متراکم شدن سلول‌ها و قابلیت تغییرشکل‌پذیری‌شان در رفتارهای سلولی و جریان خون از اهمیت قابل توجهی برخوردار است [۵]. قابلیت تغییر شکل اریتروسیت‌ها نقش مهمی در عملکرد آن‌ها دارد و عوامل مختلفی همچون شکل هندسی اریتروسیت‌ها، میزان ویسکوزیته سیتوپلاسم و ساختار کورتکس غشای آن‌ها در تعیین آن دخالت دارد. میزان ویسکوزیته سیتوپلاسم اریتروسیت‌ها به غلظت هموگلوبین بستگی دارد. همچنین پروتئین‌های اسکلت غشای اریتروسیت از جمله پروتئین اسپکترین^۵

انکیرین^۶ و پروتئین ۴/۱^۷، در قابلیت تغییر شکل اریتروسیت‌ها نقش مهمی را ایفا می‌کنند [۶-۹]. اریتروسیت‌ها با داشتن قابلیت تغییر شکل می‌توانند با قطری برابر ۷ میلی‌متر براحتی از میان مویرگ‌ها و شریان‌های کوچک با قطر ۳ میلی‌متر عبور کنند [۱۰]. با افزایش سن تغییراتی در میزان هماتوکریت، غلظت هموگلوبین، نیمه عمر اریتروسیت‌ها و ترکیب غشای آن‌ها ایجاد می‌شود. بطوری که افزایش تراکم اریتروسیت‌ها و غلظت هموگلوبین منجر به تخریب غشا و پروتئین‌های سرتاسری غشا می‌گردد که خصوصیت ویسکوالاستیسیته^۸ آن را کاهش می‌دهد [۱۱]. متعاقب این تغییرات، قابلیت تغییر شکل در اریتروسیت‌ها کاهش یافته و میزان ویسکوزیته داخل سلول افزایش می‌یابد. همچنین با افزایش سن، شکل سلول اریتروسیت از دوسوکاو به شکل بیضی تغییر کرده و شاخص کشیدگی و افزایش طول بحرانی کاهش می‌یابد. اگرچه با افزایش اندازه اریتروسیت‌ها قابلیت تغییر شکل در آن‌ها افزایش می‌یابد، اما در اینجا با افزایش سن، اندازه سلول کاهش یافته و در نتیجه قابلیت تغییرشکل‌پذیری آن نیز کاهش می‌یابد [۱۱-۱۶]. بطور کلی پدیده کاهش تغییر شکل اریتروسیت‌ها با افزایش سن، در انسان و مدل‌های حیوانی گزارش شده است [۱۱]. با توجه به مطالب مذکور در این گزارش تغییرات ساختاری و ترمودینامیکی اثر سن بر روی پروتئین‌های اسکلت غشای اریتروسیت و هموگلوبین توسط تکنیک‌های دورنگ نمایی دورانی (CD)^۹، ماورای بنفش و مرئی، تبدیل فوری مادون قرمز (FTIR)^{۱۰} و کالریمتر روبشی تفاضلی (DSC)^{۱۱} در موش‌های صحرایی بالغ بررسی می‌گردد.

مواد و روش‌ها:

حیوانات آزمایشگاهی و خونگیری از آن‌ها

در این گزارش، ۴۸ راس موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار^{۱۲} با وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم از مرکز انسیتو پاستور

^۶ Ankyrin^۷ Protein 4.1^۸ Viscoelasticity^۹ Circular Dichroism^{۱۰} Fourier Transform Infrared^{۱۱} Differential Scanning Calorimetry^{۱۲} Wistar^۱ Erythrocyte or Red Blood Cell (RBC)^۲ Lysis^۳ Biconcave^۴ Viscosity^۵ Spectrin

الکتروفورز غشای اریتروسیت‌ها و هموگلوبین

بعد از انجام تخلیص غشای اریتروسیت، برای تایید حضور آن از تکنیک الکتروفورز عمودی با شیب غلظت ژل پلی‌اکریل آمید (۵ تا ۱۵ درصد) و برای پروتئین هموگلوبین نیز از الکتروفورز با ژل پلی‌اکریل آمید متداول (۱۲/۵ درصد) استفاده شد. همچنین برای استفاده از شاخص وزنی، استاندارد رنگ‌آمیزی شده با وزن‌های مولکولی ۱۷ تا ۲۴۵ کیلو دالتون تهیه شد. در نهایت برای رنگ‌آمیزی ژل‌ها از کوماسی بلو^۲ (G-250) استفاده گردید [۱۷].

سنجش غلظت مجموع پروتئین‌های غشای اریتروسیت و هموگلوبین

پس از مراحل تخلیص غشای اریتروسیت‌ها و هموگلوبین، غلظت نمونه‌ها توسط روش بردفورد^۳ اندازه‌گیری شد [۱۸]. بدین منظور پس از رسم منحنی استاندارد و خواندن جذب نمونه‌های رقیق شده، غلظت آن‌ها به همراه رنگ کوماسی بلو در طول موج ۵۹۵ نانومتر، تعیین گردید.

مطالعات طیف سنجی UV-Visible^۴

طیف جذبی مجموع پروتئین‌های اسکلت غشای اریتروسیت‌ها و هموگلوبین رقیق شده برای چهار گروه موش صحرایی بالغ در زمان‌های اولیه، و نیز پس از دو، چهار و شش هفته در بافر فسفات $\text{pH}=7/4$ با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر توسط دستگاه UV-Visible Agilent مدل Cary-100 در طول موج بین ۳۰۰-۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

مطالعات ساختاری با استفاده از تکنیک دورنگ نمایی دورانی

مطالعات ساختار دوم مجموع پروتئین‌های اسکلت غشای اریتروسیت‌ها و هموگلوبین رقیق شده در بافر فسفات ۰/۲ مولار با $\text{pH}=7/4$ و در غلظت ۰/۲ میلی گرم بر میلی لیتر و همچنین مطالعات ساختار سوم هموگلوبین در بافر فسفات ۰/۲ مولار با $\text{pH}=7/4$ و در غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر برای چهار گروه موش صحرایی بالغ

خریداری و در خانه حیوانات دانشگاه تربیت مدرس تهران در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت نور، ۱۲ ساعت تاریکی) نگهداری شد. حیوانات در ۴ گروه با وزن‌های مختلف تقسیم شدند. به شکلی که گروه اول با پایین‌ترین وزن بعنوان کنترل در زمان اولیه و نیز گروه‌های دوم، سوم و چهارم به ترتیب پس از دو هفته، چهار هفته و شش هفته مورد آزمایش قرار گرفتند. پس از اعمال بیهوشی، حدود ۷ میلی لیتر خون از هر یک از حیوانات گرفته شد. به منظور ممانعت از انعقاد خون، نمونه‌های خون در لوله‌های حاوی سدیم سیترات ۳/۲٪ جمع‌آوری شدند.

جداسازی اریتروسیت‌ها

برای جداسازی اریتروسیت‌ها از خون، نمونه‌های جمع‌آوری شده به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردیدند. سپس رسوب باقی مانده با بافر سالین فسفات $\text{pH}=7/4$ در سانتریفوژ به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد دو تا سه بار شستشو داده شد.

تخلیص شبغ غشای^۱ اریتروسیت

برای انجام این آزمایش، سوسپانسیون اریتروسیت‌ها با بافر فسفات ۰/۲ مولار و $\text{pH}=7/4$ در سانتریفوژ به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس جهت لیز شدن اریتروسیت‌ها، به رسوب باقی مانده آب سرد دوبار تقطیر اضافه شد و برای تخلیص شبغ غشای اریتروسیت‌ها ۴ مرتبه به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد.

تخلیص هموگلوبین از اریتروسیت

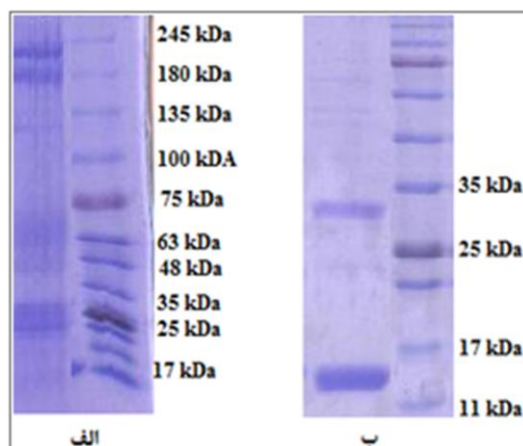
بمنظور تخلیص هموگلوبین از اریتروسیت، پس از آن که اریتروسیت‌ها توسط آب سرد دو بار تقطیر لیز شدند، نمونه‌های مورد نظر در سانتریفوژ به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۵۰۰۰ در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. سپس محلول رویی حاوی هموگلوبین با آمونیوم سولفات ۲۰ درصد مخلوط گردید و به مدت ۱ ساعت با دور ۱۴۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. در نهایت محلول حاوی هموگلوبین در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد علیه بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با $\text{pH}=7/4$ دیالیز گردید.

^۲ Coomassie Brilliant Blue

^۳ Bradford

^۴ Ultra Violet-Visible

^۱ Ghost membrane



شکل ۱ - نتایج الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید (الف) از سمت چپ به ترتیب پروتئین‌های اسکلت غشای اریتروسیت و شاخص‌های وزنی نشان داده شده است. (ب) از سمت چپ به ترتیب زیر واحدهای هموگلوبین و شاخص‌های وزنی نشان داده شده است.

در این دستگاه، جایگاه مربوط به نمونه با پروتئین و جایگاه مربوط به شاهد با بافر فسفات $\text{pH}=7/4$ پر شد؛ بشکلی که در هنگام پر شدن جایگاه‌ها، از ایجاد حباب هوا جلوگیری گردید. در این آزمایش، برای پروتئین‌های اسکلت غشای اریتروسیت‌ها از غلظت $0/6$ میلی گرم بر میلی لیتر و برای هموگلوبین از غلظت $0/4$ میلی گرم بر میلی لیتر استفاده شد. همچنین اسکن ترموگرام^۳ نمونه در دمای $20-80$ درجه سانتی گراد با سرعت گرمادهی ۱ درجه کلون بر دقیقه انجام گرفت [۲۰-۲۲].

نتایج:

نتیجه تخلیص غشای اریتروسیت و هموگلوبین با استفاده از تکنیک الکتروفورز عمودی ژل پلی آکریل آمید بررسی شد. در شکل ۱ باندهای مربوط به پروتئین‌های اسکلت غشای اریتروسیت و هموگلوبین نشان داده شده است.

نتایج حاصل از طیف سنجی ماورای بنفش و مرئی

نتایج طیف‌های ماورای بنفش و مرئی اریتروسیت و هموگلوبین مربوط به چهار گروه موش صحرایی بالغ در شکل ۲ نشان داده شده است. شکل مذکور مربوط به نمودار جذب اریتروسیت‌ها در موش‌های صحرایی بالغ در زمان اولیه (کنترل) و پس از دو، چهار و شش هفته می‌باشد. شدت جذب نمونه‌ها پس از گذشت دو هفته نسبت به کنترل به شکل چشمگیری کاهش یافت.

در زمان‌های اولیه و نیز پس از دو، چهار و شش هفته توسط تکنیک دورنگ نمایی دورانی با استفاده از دستگاه اسپکتروپلاریومتر^۱ JASCO مدل J-715 در دو ناحیه طول موجی $190-250$ و $250-350$ نانومتر انجام شد. آنالیز و پردازش طیف‌ها توسط نرم افزار اختصاصی دستگاه با استفاده از روش تبدیل فوری^۲ انجام گرفت تا اختلالات طیف‌ها بدون تغییر در شکل آن‌ها از بین رود [۱۹].

مطالعات طیف سنجی دورنگ نمایی مادون قرمز

جهت انجام مطالعات تکمیلی، طیف مادون قرمز مجموع پروتئین‌های اسکلت غشای اریتروسیت‌ها و نیز پروتئین هموگلوبین رقیق شده در بافر فسفات $\text{pH}=7/4$ با غلظت $0/5$ میلی گرم بر میلی لیتر در چهار گروه موش صحرایی بالغ در زمان‌های اولیه، پس از دو، چهار و شش هفته، توسط دستگاه FTIR Nicolet (مدل IR-100) علیه عدد موجی بین $4000-900 \text{ cm}^{-1}$ اندازه گیری شد [۷].

مطالعات ترمودینامیکی با استفاده از تکنیک

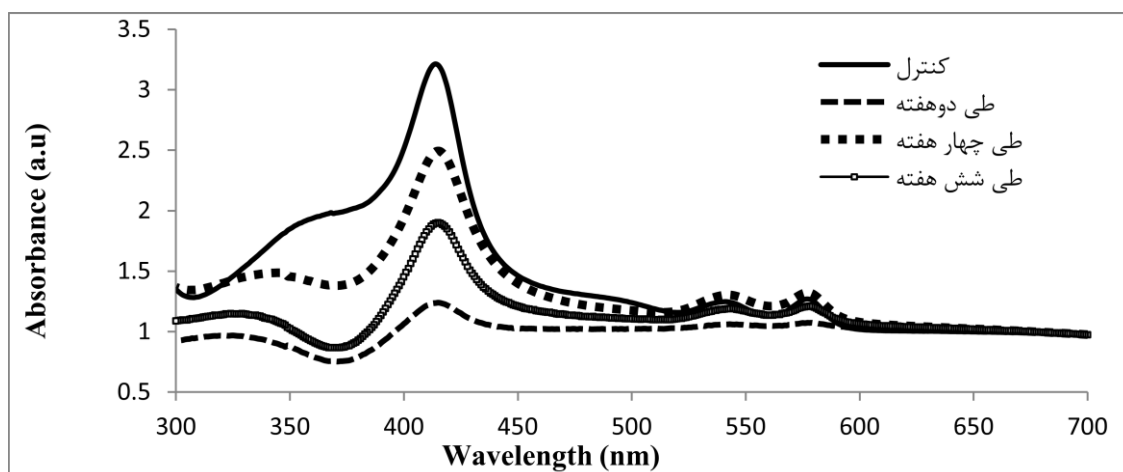
کالریتر روبشی تفاضلی

بررسی ترمودینامیکی پروتئین‌های اسکلت غشای اریتروسیت‌ها و همچنین هموگلوبین در چهار گروه مورد نظر از موش‌های صحرایی با استفاده از دستگاه TA instrument مدل Nano DSC III انجام گرفت.

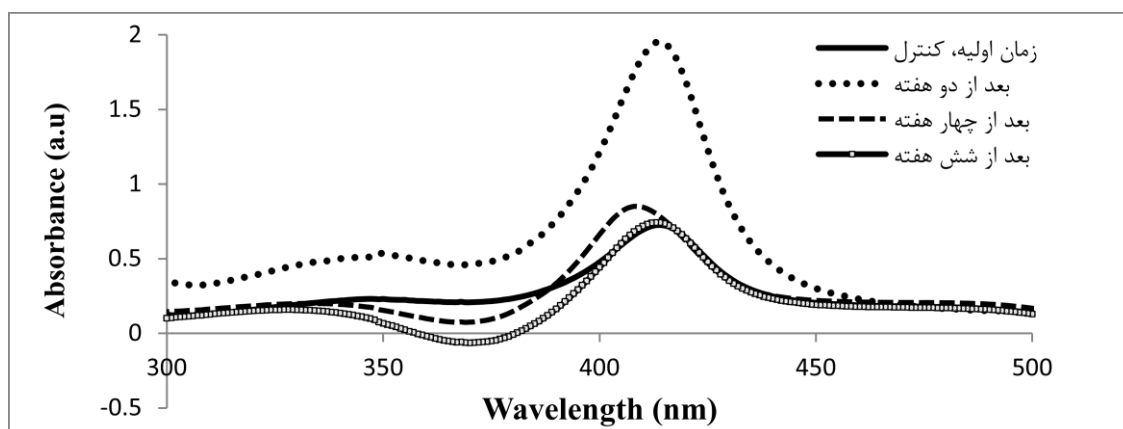
^۱ Spectropolarimeter

^۲ Fourier transform

^۳ Thermography scan



شکل ۲ - طیف جذبی اریتروسیت موش های صحرایی در زمان اولیه و پس از گذشت ۲، ۴ و ۶ هفته



شکل ۳ - نمودار طیف جذبی هموگلوبین موش های صحرایی بالغ در زمان اولیه و پس از گذشت ۲، ۴ و ۶ هفته

طیف‌های پروتئین‌های $\alpha+\beta$ بود و فشردگی ساختار دوم پس از دو هفته اندکی کاهش و پس از چهار هفته افزایش نسبتاً خوبی را نشان داد. همچنین شکل ۵ طیف دورنگ نمایی دورانی هموگلوبین را در ناحیه دور نشان می‌دهد و حاکی از کاهش فشردگی ساختار دوم بعد از دو هفته و افزایش ساختار پس از چهار و شش هفته است.

نتایج بررسی موضعی ساختار سوم حاصل از طیف‌های دورنگ نمایی دورانی

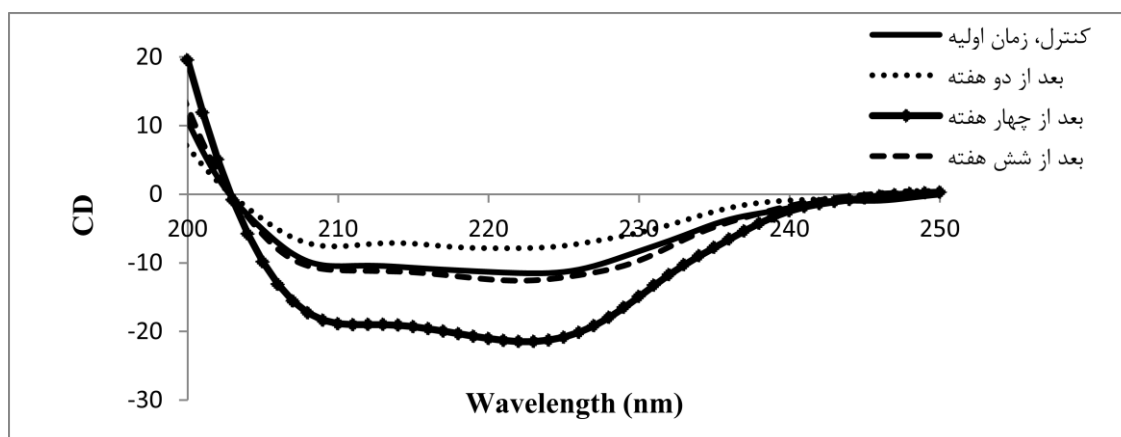
جهت مطالعه تغییرات موضعی ساختار سوم هموگلوبین در چهار گروه مذکور، از تکنیک Near-UV-CD استفاده گردید که نتایج آن در شکل ۶ نشان داده شده است. همانطور که در این شکل مشاهده میشود، تغییرات ساختار اطراف فنیل‌آلانین در طول موج ۲۶۰ نانومتر

بطور کلی می‌توان گفت میزان جذب اریتروسیت‌ها با گذشت زمان روند کاهشی داشت.

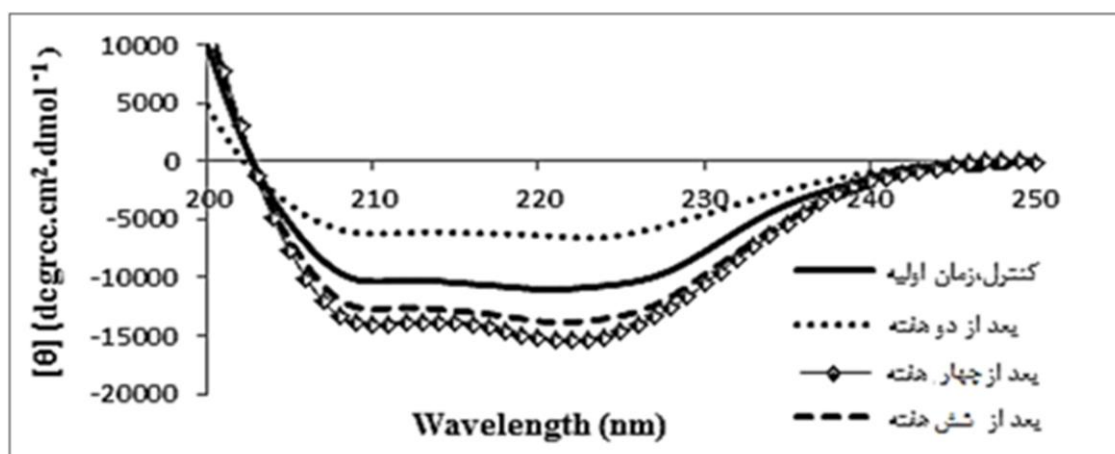
همچنین شکل ۳ نمودار جذب هموگلوبین در چهار گروه مذکور را نشان می‌دهد. میزان جذب هموگلوبین پس از دو هفته در مقایسه با کنترل بشدت افزایش یافت، اما با توجه به شکل، در مقدار جذب هموگلوبین پس از چهار و شش هفته نسبت به کنترل تغییر قابل توجهی دیده نشد.

نتایج بررسی ساختار دوم حاصل از طیف‌های دورنگ نمایی دورانی

اشکال ۴ و ۵ طیف‌های دورنگ نمایی دورانی مربوط به ساختار دوم مجموع پروتئین‌های اریتروسیت و هموگلوبین در چهار گروه موش صحرایی بالغ را نشان می‌دهند. نتایج مربوط به بررسی تغییر ساختار دوم مجموع پروتئین‌های اریتروسیت در شکل ۴ نشان‌دهنده



شکل ۴ - نمودار طیف دورنگ نمایی دورانی مربوط به اریتروسیت موش‌های صحرایی بالغ در زمان اولیه و پس از گذشت ۲، ۴ و ۶ هفته



شکل ۵ - نمودار بیضی واری دورنگ نمایی دورانی مربوط به هموگلوبین موش‌های صحرایی بالغ در زمان اولیه و پس از گذشت ۲، ۴ و ۶ هفته

باند در گروه چهارم در مقایسه با گروه‌های دیگر افزایش یافته است. همچنین با توجه به شکل ۸ افزایش قابل ملاحظه‌ای در باند مربوط به ارتعاشات کششی NH پروتئین‌های اریتروسیت موش‌های صحرایی بالغ گروه دوم مشاهده شد.

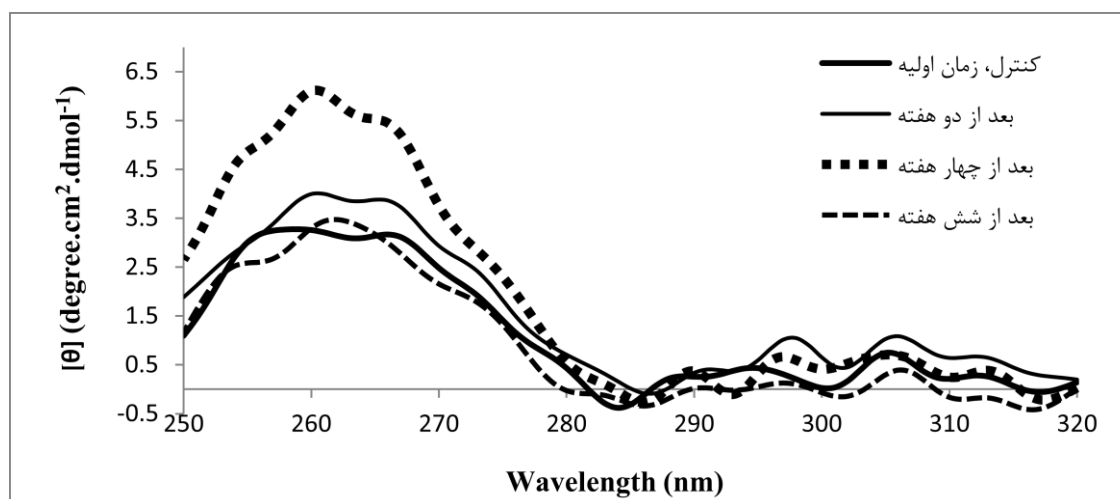
نتایج آنالیزهای ترمودینامیکی با تکنیک کالریمتر روبشی تفاضلی

اشکال ۹-۱۲ ترموگرام‌های کالریمتر روبشی تفاضلی مربوط به پروتئین‌های اسکلت غشای اریتروسیت در بافر فسفات ۲۰ میلی‌مولار با $\text{pH}=7.4$ را نشان می‌دهد. همانطور که ملاحظه می‌شود، دو پیک انتقال فاز پروتئین‌های اسکلت غشا (a و b) به روشنی قابل مشاهده

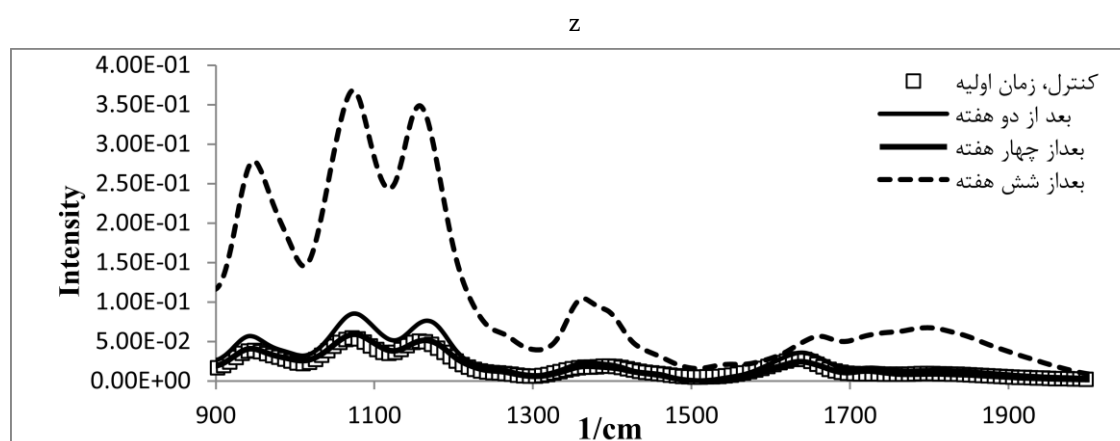
دیده شد که نشان دهنده افزایش سختی ساختار در آن ناحیه پس از چهار هفته می‌باشد و در زمان‌های دیگر تغییر قابل ملاحظه‌ای دیده نشد.

نتایج طیف سنجی مادون قرمز

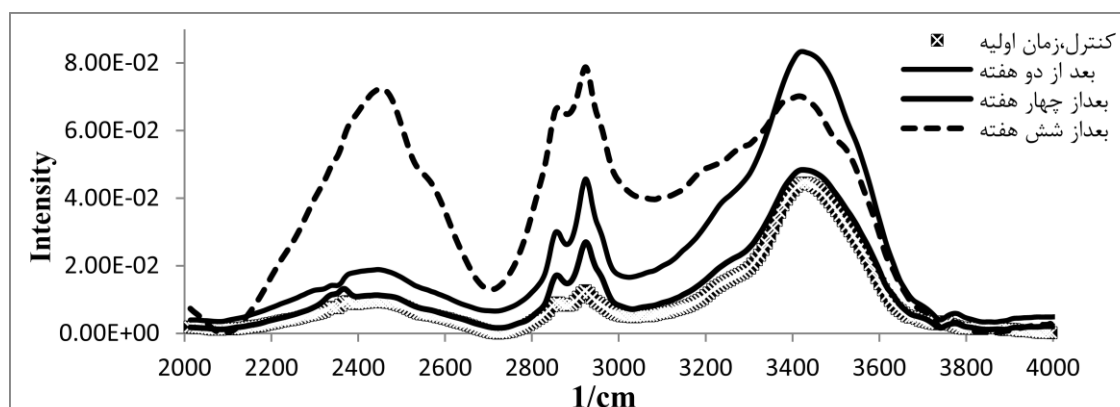
نتایج طیف‌های مادون قرمز مربوط به اریتروسیت چهار گروه موش صحرایی بالغ در اشکال ۷ و ۸ نشان داده شده است. همان گونه که ملاحظه می‌شود طیف مادون قرمز، باندهای اختصاصی مختلفی از جمله برای ساختار دوم مارپیچ آلفا در $1645-1660\text{ cm}^{-1}$ ، ساختار دوم صفحات بتا در $1530-1686\text{ cm}^{-1}$ ، باند مخصوص فسفولیپیدها برای C=O در 1748 cm^{-1} و ارتعاشات C-C در 978 cm^{-1} را نشان می‌دهد. با توجه به شکل ۷، میزان شدت



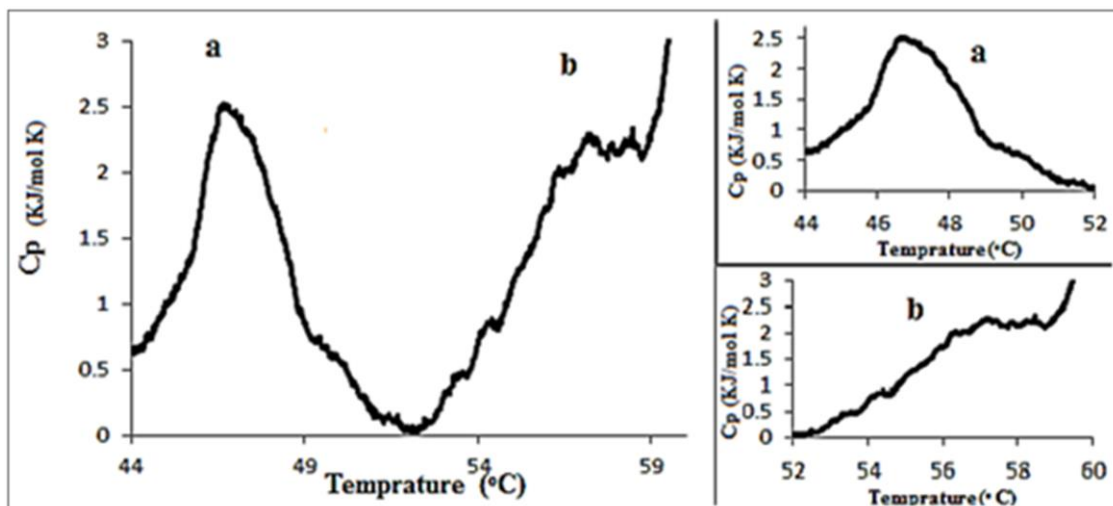
شکل ۶ - نمودار بیضی واری دورنگ نمایی دورانی در ناحیه Near-UV مربوط به هموگلوبین موش های صحرایی بالغ در زمان اولیه و پس از گذشت ۲، ۴ و ۶ هفته



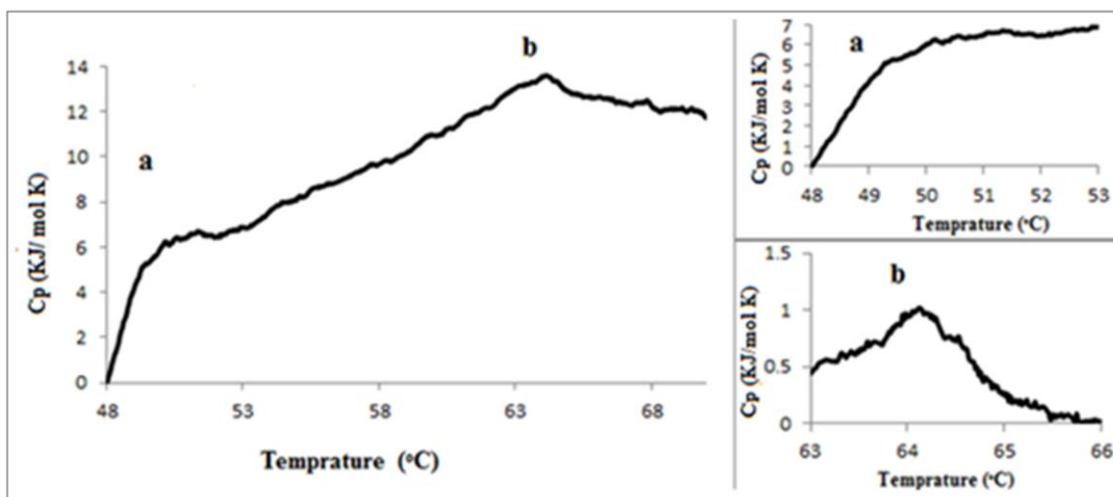
شکل ۷ - نمودار طیف مادون قرمز اریتروسیت موش های صحرایی بالغ در زمان اولیه و پس از گذشت ۲، ۴ و ۶ هفته



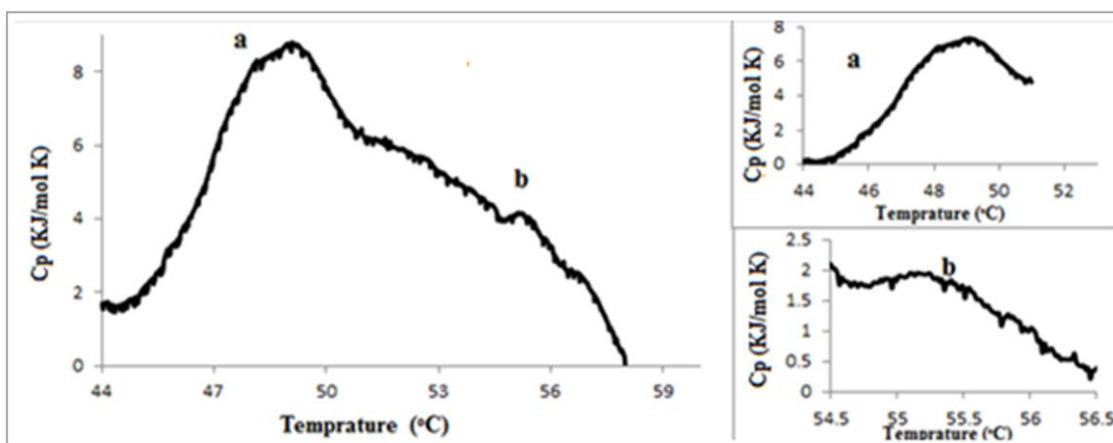
شکل ۸ - نمودار طیف مادون قرمز اریتروسیت موش های صحرایی بالغ در زمان اولیه و پس از گذشت ۲، ۴ و ۶ هفته



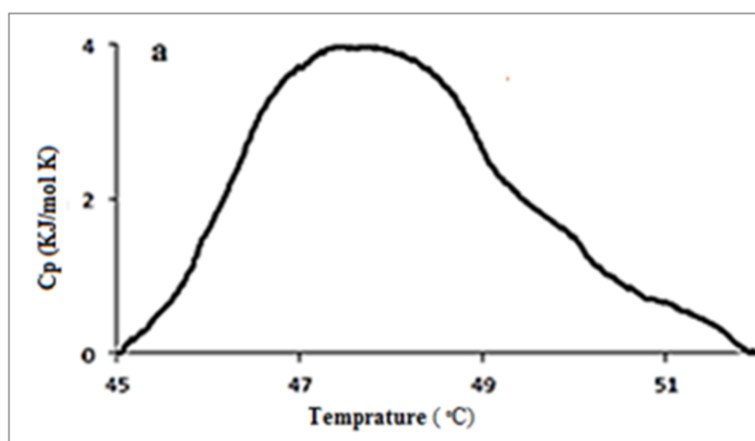
شکل ۹ - ترموگرام DSC مربوط به پروتئین‌های اسکلت غشای اریتروسیت برای موش صحرایی بالغ در زمان اولیه



شکل ۱۰ - ترموگرام DSC مربوط به پروتئین‌های اسکلت غشای اریتروسیت برای موش صحرایی بالغ پس از ۲ هفته



شکل ۱۱ - ترموگرام DSC مربوط به پروتئین‌های اسکلت غشای اریتروسیت برای موش صحرایی بالغ پس از ۴ هفته



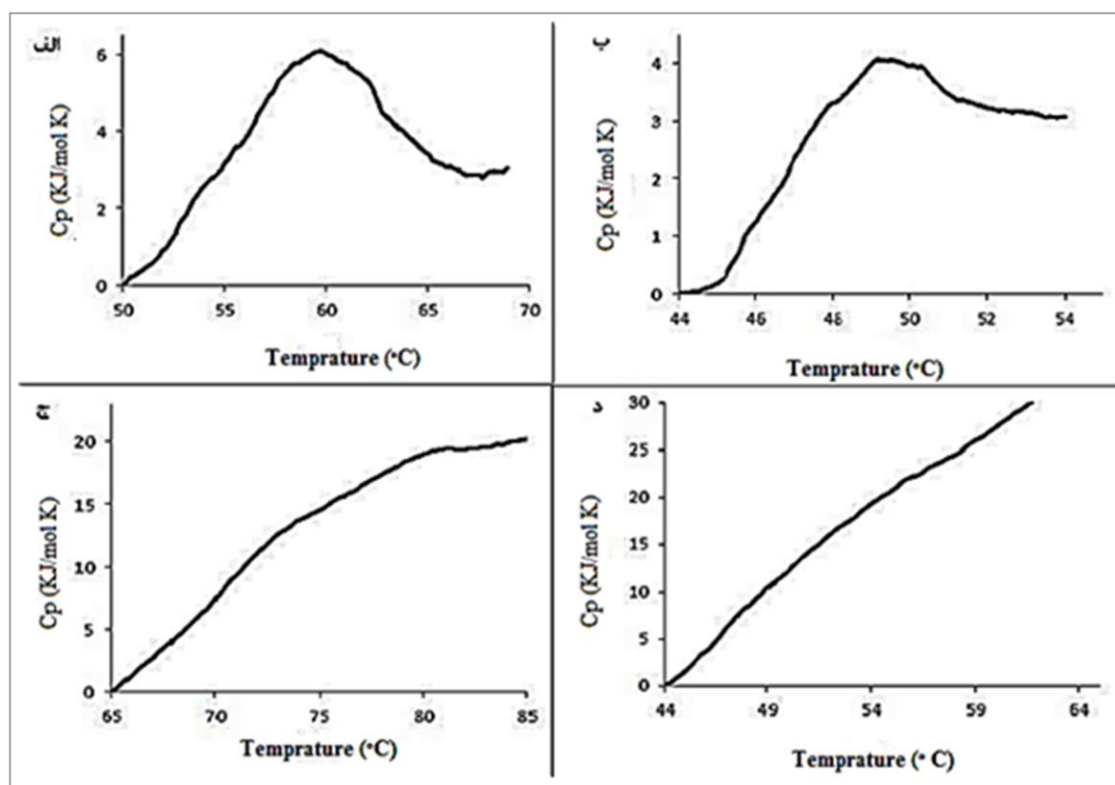
شکل ۱۲ - ترموگرام DSC مربوط به پروتئین‌های اسکلت غشای اریتروسیت برای موش صحرایی بالغ پس از ۶ هفته

می‌باشد که a نمایانگر اسپکتروم و b نمایانگر باند ۳ می‌باشند. این نتایج بیانگر افزایش دمای ذوب واسرشتگی پروتئین اسپکتروم پس از گذشت ۴،۲ و ۶ هفته در موش‌های صحرایی بالغ می‌باشد. بدین ترتیب با افزایش سن نمونه‌ها دمای ذوب پروتئین‌های اسکلت غشای اریتروسیت‌ها افزایش یافته‌است. همچنین شکل ۱۳ نتایج مربوط به منحنی انتقال فاز هموگلوبین را نشان می‌دهد. همان‌طور که در این شکل مشاهده می‌شود دمای ذوب هموگلوبین نمونه‌ها بعد از چهار هفته نسبت به زمان اولیه افزایش و پس از دو هفته و شش هفته کاهش یافته‌است.

بحث:

این گزارش به بررسی بیوفیزیکی اثر سن بر روی پروتئین‌های اسکلت غشای اریتروسیت و هموگلوبین در موش‌های صحرایی بالغ پرداخته‌است. با توجه به گزارشات پیشین، با افزایش سن، تغییرات عملکردی و بیوشیمیایی در سلول‌ها و بافت‌ها ایجاد می‌شود. همچنین با گذشت زمان و افزایش سن، اریتروسیت نیز در زمینه‌های عملکردی و متابولیکی تغییر می‌کند که با تغییر در هماتوکریت، هموگلوبین و ترکیبات غشای اریتروسیت‌ها ارتباط دارد. بنابراین می‌توان گفت که ساختار سلول‌ها و ترکیبات غشای سلول مطابق با شرایط محیطی تغییر می‌نماید [۱،۲،۱۱]. در این گزارش با رویکرد بیوفیزیکی، این تغییرات بررسی شده‌اند. بدین ترتیب که نتایج بدست آمده از تکنیک دورنگ‌نمایی دورانی نشان داد که بیضی‌واری اریتروسیت موش‌های صحرایی پس از دو

هفته نسبت به زمان اولیه کاهش یافته‌است. بدین ترتیب می‌توان به کاهش فشردگی مجموع پروتئین‌های اریتروسیت‌ها پس از گذشت دو هفته در مقایسه با زمان اولیه پی برد. همچنین در مقایسه با زمان اولیه، بیضی‌واری اریتروسیت موش‌های صحرایی بالغ پس از چهار هفته افزایش پیدا کرد که این حاکی از افزایش فشردگی مجموع پروتئین‌های اریتروسیت‌ها پس از چهار هفته، در مقایسه با زمان اولیه، است. بطور کلی با افزایش سن، فشردگی در مجموع پروتئین‌های اریتروسیت در موش‌های صحرایی بالغ افزایش می‌یابد. به عبارت دیگر با افزایش سن، پروتئین‌های غشای اریتروسیت‌ها در کنار همدیگر فشرده می‌شوند. همچنین با توجه به نتایج طیف‌های جذبی ماورای بنفش و مرئی، کاهش قابل ملاحظه‌ای در میزان جذب اریتروسیت موش صحرایی بالغ پس از گذشت دو هفته نسبت به زمان اولیه مشاهده می‌شود. اگرچه پس از چهار هفته مجدداً میزان جذب افزایش می‌یابد، اما بطور کلی با افزایش سن روند کاهش جذب اریتروسیت‌ها مشاهده می‌گردد. با توجه به اینکه طول موج ۴۱۵ نانومتر مربوط به جذب آهن است، می‌توان چنین گفت که با افزایش سن تغییراتی در ساختار اریتروسیت‌ها بوجود آمده که منجر به کاهش دسترسی آهن شده‌است. بر طبق گزارشات قبلی با افزایش سن، تراکم اریتروسیت‌ها افزایش می‌یابد. همچنین، جریان خون نیز با مقدار تراکم اریتروسیت‌ها ارتباط دارد. بنابراین با افزایش سن میزان جریان خون تغییر کرده و چسبندگی اریتروسیت‌ها افزایش می‌یابد



شکل ۱۳ - ترموگرام های DSC مربوط به پروتئین هموگلوبین برای موش صحرایی بالغ (الف) (زمان اولیه، ب) پس از ۲ هفته (ج) پس از ۴ هفته، (د) پس از ۶ هفته

می‌شوند و تراکم سلولی افزایش و قابلیت تغییر شکل پذیری اریتروسیت‌ها کاهش می‌یابد. قابلیت تغییر شکل پذیری اریتروسیت‌ها نقش مهمی در عملکرد آن‌ها دارد. همچنین عوامل مختلفی مانند شکل هندسی اریتروسیت‌ها، میزان ویسکوزیته سیتوپلاسم و ساختار کورتکس غشای اریتروسیت‌ها، تعیین کننده این ویژگی می‌باشند. ساختار کورتکس غشای اریتروسیت‌ها (شامل پروتئین‌های اسکلت غشا) نقش مهمی در قابلیت تغییر پذیری اریتروسیت‌ها بعهده دارد. پروتئین‌های اسکلت غشای اریتروسیت‌ها شامل آلفا و بتا اسپکتین، اکتین^۲، انکرین و پروتئین ۴/۱ می‌باشد. با توجه به گزارشات پیشین، پروتئین‌های اسکلت غشای اریتروسیت بر اساس الگوی الکتروفورزی^۳ از یکدیگر شناسایی شده و مطابق با جایگاهشان در هر باند نامگذاری می‌گردند [۲۴،۲۳]. به‌عنوان مثال پروتئین سرتاسری غشا که انتقال دهنده یون‌های منفی از غشای اریتروسیت

[۱۶،۱۵]. با توجه به مطالب مذکور می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش سن، ساختار مجموع پروتئین‌های اریتروسیت‌ها فشرده‌تر می‌شود، بگونه‌ای که سطح دسترسی آهن موجود در سیتوپلاسم اریتروسیت‌ها کاهش می‌یابد. از نقطه نظر دیگر، ترکیبات غشای اریتروسیت‌ها با افزایش سن تغییر می‌نمایند. از جمله این تغییرات افزایش نیروی واندروالس^۱ بین زنجیره‌های جانبی فسفولیپیدهای غشا است که سبب پایداری غشای اریتروسیت‌ها می‌گردد [۲]. نتایج طیف مادون قرمز اریتروسیت‌ها نشان می‌دهد که با افزایش سن و با گذشت ۶ هفته شدت طیف در فرکانس‌های مربوط به فسفولیپیدها و اسیدهای چرب غشای اریتروسیت‌ها بطور قابل توجهی افزایش یافته است که مطابق با گزارشات قبلی می‌باشد. بر این اساس می‌توان گفت با افزایش سن میزان اتصالات بین فسفولیپیدهای غشا افزایش یافته و متعاقب آن پروتئین‌های غشا در کنار همدیگر فشرده

² Actin

³ Electrophoresis

¹ Van der Waals force

می‌باشد، در باند سوم الگوی الکتروفورز قرار می‌گیرد و به همین دلیل به آن پروتئین باند ۳ می‌گویند [۲۶،۲۵].

مهمترین پروتئین در اسکلت غشای اریتروسیت‌ها پروتئین هترو دایمر اسپکتین با دو زیر واحد آلفا و بتا است که در باندهای اول و دوم الگوی الکتروفورز به ترتیب با وزن‌های ۲۴۵ و ۲۴۰ کیلو دالتون قرار می‌گیرند [۲۸،۲۷].

براساس ساختار چینش پروتئین‌های اسکلت غشای اریتروسیت‌ها، اسپکتین به‌طور غیر کوالان به اکتین متصل شده که این اتصال از طریق پروتئین ۴/۱ تقویت می‌شود. از جهت دیگر اسپکتین از طریق پروتئین آنکرین با پروتئین باند ۳ که پروتئین سرتاسری غشا است برهمکنش دارد [۲۹،۹].

همچنین گزارشات پیشین نشان می‌دهد که با افزایش سن، بار سطحی اریتروسیت‌ها کاهش می‌یابد که این منجر به اکسید شدن پروتئین‌های غشا می‌شود. بر این اساس باند ۳ به‌عنوان پروتئین سرتاسری غشا تجزیه شده و متعاقب آن پروتئین‌های آنکرین، پروتئین باند ۴/۱ و اسپکتین‌ها که در ارتباط با پروتئین باند ۳ می‌باشند نیز دچار تغییر می‌گردند [۱۳،۱].

نتایج بدست آمده از ترموگرام کالریمتری روبشی تفاضلی مربوط به پروتئین‌های اسکلت غشا بیانگر آن است که با افزایش سن، دمای ذوب و اسرشتگی پروتئین‌های اسکلت غشا از جمله اسپکتین‌ها افزایش و باند ۳ کاهش می‌یابد. بویژه آن که با افزایش سن در موش‌های صحرایی پس از ۶ هفته، انتقال فاز مربوط به پروتئین باند ۳ آشکار نمی‌شود که این با مطالعات پیشین مطابقت دارد. بنابراین با افزایش سن موش‌های صحرایی بالغ، اتصالات میان فسفولیپیدهای غشا و فشردگی در مجموعه پروتئین‌های غشا افزایش یافته است. علاوه بر این پروتئین‌های اسکلت غشا پایدارتر شده‌اند. بدین ترتیب بنظر می‌رسد که با افزایش سن موش‌های صحرایی بالغ، لیپیدها و پروتئین‌های غشای اریتروسیت‌ها با تاثیر بر روی همدیگر موجب کاهش انعطاف‌پذیری در ساختار اریتروسیت می‌شوند؛ بویژه پس از گذشت ۴ هفته (در اواسط سن بلوغ موش‌های صحرایی) که تغییرات ساختاری و ترمودینامیکی قابل ملاحظه‌ای مشاهده می‌گردد. بنابراین پس از گذشت ۴ هفته نسبت به زمان‌های دیگر، فشردگی مجموع پروتئین‌های غشا و میزان اتصالات لیپیدها بطور

قابل توجهی افزایش می‌یابند. همچنین از دیدگاه ترمودینامیکی در ترموگرام کالریمتری روبشی تفاضلی پروتئین‌های اسکلت غشا در موش‌های صحرایی بالغ پس از گذشت ۴ هفته، آنتالپی^۱ دومین پیک انتقال فاز مربوط به واسرشتگی پروتئین باند ۳ بشدت کاهش می‌یابد، بطوری که پس از ۶ هفته دیگر دومین پیک مشاهده نمی‌گردد.

یکی دیگر از عواملی که در قابلیت تغییر شکل‌پذیری اریتروسیت‌ها دخالت دارد میزان ویسکوزیته سیتوپلاسم اریتروسیت‌ها می‌باشد که با غلظت هموگلوبین در سیتوپلاسم مرتبط است. سیتوپلاسم اریتروسیت‌ها غنی از هموگلوبینی است که یک سوم حجم کل سلول قرمز خون را دربرمی‌گیرد. مولکول هموگلوبین بعنوان هتروتترامر^۲ شامل دو زیرواحد^۳ آلفا و دو زیرواحد بتا می‌باشد که هر زیرواحد از ۱۴۱ تا ۱۴۶ اسیدآمینه تشکیل شده است. بیشتر اسیدآمینه‌ها در مولکول هموگلوبین تمایل به تشکیل ساختار مارپیچ آلفا دارند. بنابراین هر زیرواحد به شکل قطعات ساختاری مارپیچ آلفا سازمان یافته است که این قطعات با ساختارهای غیر مارپیچ به همدیگر متصل شده‌اند. اندازه زیرواحدها مشابه همدیگر و معادل ۱۶ کیلو دالتون می‌باشد [۳۱،۳۰].

نتایج تغییر ساختار دوم و سوم هموگلوبین موش‌های صحرایی بالغ پس از دو، چهار و شش هفته در مقایسه با زمان اولیه توسط تکنیک دورنگ نمایی دورانی بررسی شد. اگرچه پس از گذشت دو هفته میزان فشردگی هموگلوبین نسبت به زمان اولیه کاهش دارد اما بطور کلی با افزایش سن، ساختار دوم هموگلوبین فشرده‌تر می‌گردد. همچنین با افزایش سن ساختار سوم هموگلوبین موش‌های صحرایی در ناحیه مربوط به اسیدآمینه فنیل‌آلانین بطور قابل توجهی تغییر می‌کند، بطوری که پس از چهار هفته نسبت به زمان اولیه، سختی ساختار سوم هموگلوبین در ناحیه اطراف اسیدآمینه فنیل‌آلانین بشدت افزایش یافته است. علاوه بر این در مقایسه با زمان اولیه، نتایج طیف‌های جذبی ماورای بنفش و مرئی افزایش قابل توجهی را در میزان جذب

¹ Enthalpy

² Heterotetramer

³ Subunit

آهن پس از دو هفته نشان می‌دهند. اما در هفته‌های چهارم و ششم، نسبت به زمان اولیه، افزایش چندانی مشاهده نمی‌گردد. گزارشات نشان می‌دهد که اسیدآمینه هیستیدین در زنجیره آلفا و بتا هموگلوبین به گروه پروستتیک آهن (هم) متصل شده است، بطوری که در زنجیره آلفا اسیدآمینه هیستیدین ۸۷ و در زنجیره بتا اسیدآمینه هیستیدین ۹۲ با گروه آهن برهم‌کنش می‌دهند. همچنین اسیدآمینه‌های اطراف گروه آهن مانند فنیل‌آلانین ۴۳، لوسین ۸۳ و تیروزین ۱۴۰ بطور مستقیم به آن متصل می‌شوند [۳۲]. بنابراین می‌توان گفت با کاهش فشردگی در ساختار دوم هموگلوبین موش‌های صحرایی بالغ پس از دو هفته، نسبت به زمان اولیه، میزان دسترسی آهن افزایش یافته است. همچنین در موش‌های صحرایی بالغ پس از گذشت چهار هفته، میزان فشردگی در ساختار دوم هموگلوبین و نیز ساختار سوم هموگلوبین در اطراف اسیدآمینه فنیل‌آلانین افزایش و دسترسی آهن مجدداً کاهش می‌یابد. در منحنی ترموگرام کالریمتری روبشی تفاضلی دمای ذوب هموگلوبین نمونه‌ها با افزایش سن به جز در چهار هفته نسبت به زمان اولیه، کاهش یافته است. بنابراین در مجموع می‌توان چنین گفت که تغییرات ساختاری بگونه‌ای است که پیوندهای هیدروژنی و واندروالسی در هموگلوبین در نواحی انرژی‌ک^۱ کاهش می‌یابند که این بیانگر کاهش پایداری در پروتئین هموگلوبین است. بطور کلی ساختار هموگلوبین به دو شکل اکسی و دی‌اکسی می‌باشد. در ساختار اکسی هموگلوبین گروه هم به همراه اسیدآمینه هیستیدین که به آن متصل است به صفحه پورفیرین نزدیک شده و ساختار فشرده‌ای تشکیل می‌دهد. همچنین در شکل دی‌اکسی هموگلوبین، گروه هم به همراه اسیدآمینه هیستیدین که به آن متصل است از صفحه پورفیرین دور شده و ساختار گنبدی تشکیل می‌دهد. بر اساس نمودار سیگموئیدی اشباع هموگلوبین با اکسیژن، تمایل بیشتر مولکول هموگلوبین به اکسیژن بدان معنی است که میزان اتصال Fe^{2+} به اکسیژن قوی‌تر بوده و رهایش اکسیژن به بافت‌های بدن کمتر صورت می‌گیرد. بنابراین زمانی که فشار اکسیژن زیاد باشد

ساختار هموگلوبین، به شکل اکسی هموگلوبین است و تمایل آن به اکسیژن کمتر و رهایش اکسیژن به بافت‌ها بیشتر است. در مقابل وقتی که فشار اکسیژن کم باشد هموگلوبین به شکل دی‌اکسی هموگلوبین و فشرده است و اتصال آن به اکسیژن بیشتر و رهایش اکسیژن به بافت‌ها کمتر می‌شود [۳۳-۳۵]. بر طبق گزارشات، با گذشت زمان و افزایش سن میزان تمایل مولکول هموگلوبین به اکسیژن بیشتر می‌شود [۳۶، ۳۷]. بنابراین با افزایش سن موش‌های صحرایی بالغ تغییرات ساختاری و ترمودینامیکی قابل توجهی در مولکول هموگلوبین مشاهده می‌شود. ساختار مولکول هموگلوبین با افزایش سن موش‌های صحرایی بالغ بویژه در اواسط سن بلوغ و پس از گذشت ۴ هفته، فشرده‌تر و سخت‌تر می‌شود که منجر به اتصالات قوی‌تر با اکسیژن می‌گردد و رهایش اکسیژن به بافت‌ها را دشوار می‌نماید.

نتیجه‌گیری:

نتایج بررسی‌های ساختاری و ترمودینامیکی مربوط به پروتئین‌های اسکلت غشای اریتروسیت نشان داد که با افزایش سن موش‌های صحرایی بالغ، اتصالات میان فسفولیپیدهای غشا و فشردگی در مجموعه پروتئین‌های غشا افزایش یافته است. علاوه بر این پروتئین‌های اسکلت غشا پایدارتر شده‌اند. بدین ترتیب بنظر می‌رسد لیپیدها و پروتئین‌های غشا با تأثیر بر روی همدیگر موجب کاهش انعطاف پذیری در ساختار اریتروسیت می‌شوند.

با توجه به نتایج بدست آمده، با افزایش سن موش‌های صحرایی بالغ، بویژه پس از دو و چهار هفته نسبت به زمان اولیه، ویژگی‌های ساختاری و ترمودینامیکی هموگلوبین تغییر کرده است. به عبارت دیگر با گذشت چهار هفته ساختار هموگلوبین فشرده‌تر، سخت‌تر و پایدارتر شده است.

تشکر و قدردانی:

در پایان از مساعدت همه جانبه دانشگاه تربیت مدرس و نیز کارشناس آزمایشگاه بیوفیزیک، سرکار خانم ندافی که در پیشبرد روند تحقیقات اینجانب همکاری لازم را مبذول فرمودند کمال تشکر را دارم.

¹ Energetic

Informatics. 2003;3(1):90-93.

- 13) Bosman GJ, Werre JM, Willekens FL, Novotný VM. Erythrocyte ageing in vivo and in vitro: structural aspects and implications for transfusion. *Transfusion Medicine*. 2008;18(6):335-347.
- 14) Pfaffert C, Nash GB, Meiselman HJ. Red blood cell deformation in shear flow, Effects of internal and external phase viscosity and of in vivo aging. *Biophysical Journal*. 1985;47(5):695-704.
- 15) Tuğral E, Yalçın Ö, Başkurt OK. Effect of donor age on the deformability and aggregability of density-separated red blood cells. *Turkish Journal of Hematology*. 2002;19(2):303-308.
- 16) Mel'nikov AA, Vikulov AD. Age-related erythrocyte structure and rheological blood properties in athletes. *Human Physiology*. 2002;28(2):214-218.
- 17) Mordacq JC, Ellington RW. Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) of blood proteins. In: Goldman, Corey A, editors. *Tested Studies for Laboratory Teaching*. 15th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE); June 8-12, 1993; University of Toronto, Ontario, Canada. New Haven, Connecticut: Association for Biology Lab; 1994. P. 15-44.
- 18) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72:248-254.
- 19) Ranjbar B, Gill P. Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses- a review. *Chemical Biology & Drug Design*. 2009;74(2):101-120.
- 20) Gill P, Tohidi Moghadam T, Ranjbar B. Differential scanning calorimetry techniques applications in biology and nanoscience. *Journal of Biomolecular Techniques*. 2010;21(4):167-193.
- 21) Shnyrov VL, Orlov SN, Zhadan GG, Pokudin NI. Thermal inactivation of membrane proteins, volume-dependent Na⁺, K⁺-cotransport, and protein kinase C activator-induced changes of the shape of human and rat erythrocytes. *Biomedica Biochimica Acta*. 1990;49(6):445- 453.
- 22) Akoev VR, Matveev AV, Belyaeva TV, Kim YA. The effect of oxidative stress on structural transitions of human erythrocyte ghost membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998;1371(2):284-294.
- 23) Barker RN. Electrophoretic analysis of erythrocyte membrane proteins and glycoproteins from different species.

منابع:

- 1) Purushotham S, Muthaiya B, Dayalan H, Chinnakannu P. Age associated changes in erythrocyte membrane surface charge: Modulatory role of grape seed proanthocyanidins. *Experimental Gerontology*. 2005;40(10):820-828.
- 2) Penha-Silva N, Firmino CB, de Freitas Reis FG, et al. Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2007;128(7-8):444-449.
- 3) McLaren CE, Brittenham GM, Hasselblad V. Statistical and graphical evaluation of erythrocyte volume distributions. *American Journal of Physiology*. 1987;252(4Pt2):H857-66.
- 4) Uzoigwe C. The human erythrocyte has developed the biconcave disc shape to optimise the flow properties of the blood in the large vessels. *Medical Hypotheses*. 2006; 67(5):1159-1163.
- 5) Alizadehrad D, Imai Y, Nakaaki K, Ishikawa T, Yamaguchi T. Quantification of red blood cell deformation at high-hematocrit blood flow in microvessels. *Journal of Biomechanics*. 2012;5(15):2684-2689.
- 6) Muravyov AV, Tikhomirova IA. Role molecular signaling pathways in changes of red blood cell deformability. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2013;53(1-2):45-59.
- 7) Kunitsyn VG, Panin LE. Mechanism of erythrocyte deformation under the action of stress hormones. *International Journal of Biophysics*. 2013;3(1):1-14.
- 8) Sonmez M, Ince HY, Yalcin O. The effect of alcohols on red blood cell mechanical properties and membrane fluidity depends on their molecular size. *PLoS ONE*. 2013;8(9):e76579.
- 9) Ziparo E, Zani BM, Filippini A, Stefanini M, Marchesi VT. Proteins of the membrane skeleton in rat Sertoli cells. *Journal of Cell Science*. 1986;86:145-154.
- 10) Lekka M, Fornal M, Pyka-Fościan G, et al. Erythrocyte stiffness probed using atomic force microscope. *Biorheology*. 2005;42(4):307-317.
- 11) Bransky A, Korin N, Nemirovski Y, Dinnar U. Correlation between erythrocytes deformability and size: A study using a microchannel based cell analyzer. *Microvascular Research*. 2007;73(1):7-13.
- 12) Hashimoto S, mochizuki S, Morita Y. Effect of aging on deformability of erythrocytes in shear flow. *Systemics, Cybernetics and*

- [dissertation]. [Munich]: Technical University of Munich; 2006. 114 p.
- 36) Edwards MJ, Rigas DA. Electrolyte-labile increase of oxygen affinity during in vivo aging of hemoglobin. *The Journal of Clinical Investigation*. 1967;46(10):1579-1588.
 - 37) Benesch R, Benesch RE, Yu CI. Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by human hemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1968; 59(2):526-532.
 - Comparative Haematology International. 1991;1(3):155-160.
 - 24) Matei H, Frentescu L, Benga G. Comparative studies of the protein composition of red blood cell membranes from eight mammalian species. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2000;4(4):270-276.
 - 25) Galtieri A, Tellone E, Romano L, et al. Band-3 protein function in human erythrocytes: effect of oxygenation-deoxygenation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2002;1564(1): 214-218.
 - 26) Sabban E, Marchesi V, Adesnik M, Sabatini DD. Erythrocyte membrane protein band 3: its biosynthesis and incorporation into membranes. *The Journal of Cell Biology*. 1981;91(3 Pt 1):637-646.
 - 27) Zhang R, Zhang C, Zhao Q, Li D. Spectrin: Structure, function and disease. *Life Sciences*. 2013;56(12):1076-1085.
 - 28) Speicher DW, Davis G, Marchesi VT. Structure of human erythrocyte spectrin. II. The sequence of the alpha-I domain. *The Journal of Biological Chemistry*. 1983; 258(24):14938-14947.
 - 29) Machnicka B, Grochowalska R, Bogusławska DM, Sikorski AF, Lecomte MC. Spectrin-based skeleton as an actor in cell signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2012;69(2):191-201.
 - 30) Sugita Y, Nagai M, Yoneyama Y. Circular dichroism of hemoglobin in relation to the structure surrounding the heme. *The Journal of Biological Chemistry*. 1971;246:383-388.
 - 31) Dayer MR, Moosavi-Movahedi AA, Norouzi P, Safarian S. Inhibition of human hemoglobin autoxidation by sodium n-dodecyl sulphate. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2002;35(4):364-370.
 - 32) Liddington R, Derewenda Z, Dodson E, Hubbard R, Dodson G. High resolution crystal structures and comparisons of T-state deoxyhaemoglobin and two liganded T-state haemoglobins: T (alpha-oxy) haemoglobin and T (met) haemoglobin. *Journal of Molecular Biology*. 1992;228(2):551-579.
 - 33) Sawicki CA, Gibson QH. GIBSON, Quaternary conformational changes in human hemoglobin studied by laser photolysis of carboxyhemoglobin. *The Journal of Biological Chemistry*. 1976;251(6):1533-1542.
 - 34) Bruno S, Bonaccio M, Bettati S, et al. High and low oxygen affinity conformations of T state hemoglobin. *Protein Science*. 2001;10(11):2401-2407.
 - 35) Croci, S. Conformational changes in hemoglobin triggered by changing the iron charge, high and low affinity hemoglobin.

Biophysical Study of the Effect of Age on Erythrocyte Membrane Skeleton Proteins and Hemoglobin in Mature Rats

Hajar Filsoofian¹, Mohammad Reza Raoufy², Bijan Ranjbar^{1*}

- 1) Department of biophysics, Faculty of biological sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2) Department of physiology, Faculty of medical sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Abstract:

The aging process is related to some functional changes of the tissues and cells, including cell membrane. Erythrocytes, are among the most suitable biological models to study the effect of aging on cell function, as they have no nuclei and other organelles. Moreover, any alterations of erythrocytes are accompanied by changes in absorbance detection in UV-visible emission. Also, the biophysical properties of the erythrocyte membrane skeleton proteins and hemoglobin, play important roles in deformability of erythrocytes. Furthermore, the erythrocytes' deformability and aggregation declines and increases respectively, during aging process. Also hemoglobin affinity to oxygen increases and oxygen release to the tissues decreases in aging process. Therefore in this report the effect of age on structural and thermodynamical changes of erythrocyte membrane skeleton proteins and hemoglobin in mature rats are studied by different spectroscopy methods like circular dichroism (CD), FTIR, UV-Visible and differential scanning calorimetry (DSC). The results showed that aging of the rats' erythrocytes leads to the compactness of erythrocytes membrane skeletal proteins structure. Thus, the reduction in erythrocytes flexibility and increment in the compactness and rigidity of the hemoglobin structure occur. Accordingly, these changes result in more severe iron binding to oxygen and decrease in oxygen delivery to the tissues.

Keywords: Age, erythrocyte membrane skeleton proteins, erythrocytes deformability, circular dichroism (CD), differential scanning calorimetry (DSC)

* Corresponding Author:

Bijan Ranjbar, PhD. Department of biophysics, Faculty of biological sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. Email: ranjbarb@modares.ac.ir