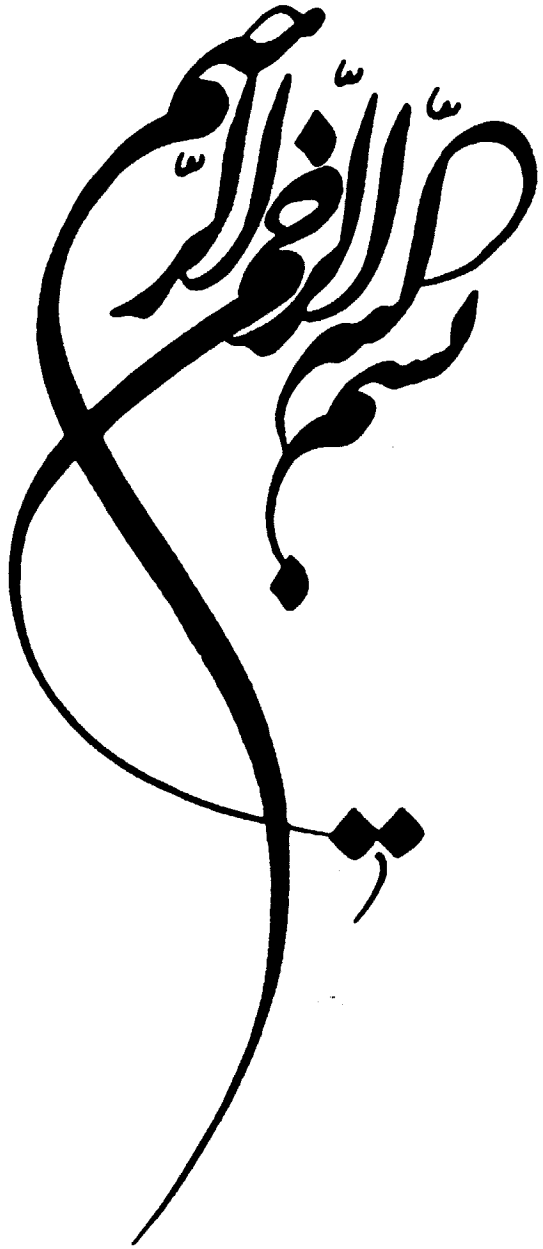


۳۹۵۲۱

۱۳۸۰/۱۱/۲۴
مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
مرکز مدارک

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم پایه

**پایان نامه دوره کارشناسی ارشد بیوفیزیک**

# *مطالعه بیوفیزیکی اندرکنش حاملهای دارویی لیپوزوم و دندروزوم با لیزوزیم با روشهای دورنگ نمایی دورانی و گرماسنجی تیتراسیونی هم دما*

**نگارش:**

**لیلا بهادری طولابی**

016318

**استاد راهنما:**

**دکتر بیژن رنجبر**

**اساتید مشاور:**

**دکتر حسین نادری منش**

**دکتر محمد نبی سربلوکی**

**پاییز ۱۳۸۰**

۳۹۵۲۱

# تأییدیه اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد

اعضای هیئت داوران نسخهٔ نهایی پایان نامه خانم/ آقای لیلا بهادری‌طولابی

تحت عنوان: **مطالعه بیوفیزیکی اندرکنش حامل‌های دارویی لیپوزوم و دندروزوم با لیزوزیم با روش‌های دو رنگ‌نمایی دورانی و گرماسنجی تیتراسیونی همرما**

را از نظر فرم و محتوات بررسی نموده و آنرا برای اخذ درجه کارشناسی‌ارشد مورد تایید قرار دادند.

| اعضای هیأت داوران | نام و نام خانوادگی | رتبهٔ علمی | امضاء |
|---|---|---|---|
| ۱- استاد راهنما | آقای دکتر بیژن رنجبر | استادیار | |
| ۲- استاد مشاور | آقای دکتر حسین نادری‌منش | دانشیار | |
| ۳- استاد مشاور | آقای دکتر محمدنبی سربلوکی | استاد | |
| ۴- استاد ناظر | آقای دکتر علی‌اکبر صبوری | دانشیار | |
| ۵- استاد ناظر | آقای دکتر منوچهر میرشاهی | استادیار | |
| ۶- نماینده تحصیلات تکمیلی | آقای دکتر منوچهر میرشاهی | استادیار | |

بسمه تعالی

# آیین‌نامهٔ چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرّس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرّس، مبیّن بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

مادّهٔ ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اطلاع دهد.

مادّهٔ ۲ در صفحهٔ سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

*«کتاب حاضر، حاصل پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد/رسالهٔ دکتری نگارنده در رشتهٔ* بیوتکنولوژی *است که در سال* ۱۳۸۰ *در دانشکدهٔ* علوم پایه *دانشگاه تربیت مدرّس به راهنمایی سرکار خانم/جناب آقای دکتر* بهروز نجفی *، مشاورهٔ سرکار خانم/جناب آقای دکتر* حسین هادی منش *و مشاورهٔ سرکار خانم/جناب آقای دکتر* محمدرضا سرلک *از آن دفاع شده است.»*

مادّهٔ ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

مادّهٔ ۴ در صورت عدم رعایت مادّهٔ ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ‌شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرّس، تأدیه کند.

مادّهٔ ۵ دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در مادّهٔ ۴ را از محلّ توقیف کتابهای عرضه‌شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

مادّهٔ ۶ اینجانب لیلا هادی طولای دانشجوی رشته بیوتکنولوژی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام‌خانوادگی: لیلا هادی طولای

تاریخ و امضا: ۸۰/۱۱/۱

تقدیم به:

**مادر فداکارم ،**

**خواهران و برادران مهربانم ،**

**دوست و همراه خوبم لیلا**

## تشکر و قدردانی :

سپاس آنکه جان را فکرت آموخت .

از استاد گرامی جناب آقای دکتر بیژن رنجبر به خاطر قبول راهنمایی این پایان نامه و همراهی های صمیمانه و بی دریغ ایشان کمال تشکر و امتنان را دارم.

از استاد ارجمند جناب آقای دکتر حسین نادری منش به خاطر مشاوره و حضور موثر و فعال ایشان در دانشکده علوم پایه نهایت سپاسگزاری را دارم.

از استاد محترم جناب آقای دکتر محمد نبی سر بلوکی به خاطر مشاوره این پایان نامه و در اختیار گذاشتن بی دریغ امکانات آزمایشگاه شیمی فیزیک ماکرومولکولها صمیمانه قدردانی می نمایم.

زحمات اساتید محترم گروه زیست شناسی و کارشناس متعهد ومحترم آزمایشگاهای بیوشیمی و بیوفیزیک سر کار خانم زهرا فضل زرندی را ارج می نهم .

از دوستان و همراهان خوب و عزیزم خانم لیلا خاکی ، آقایان فرامرز مهرنژاد، مجید تقدیر، سید کیوان فربد، سید شهریار عرب و مجید عرفانی مقدم به پاس دوستی و محبتهای بی دریغ شان صمیمانه ممنون و قدردانم.

از همه دوستان ارزشمندم در آزمایشگاههای بیوفیزیک ، بیو ترمودینامیک ، مدل سازی ، بیوشیمی ، ان.ام.آر، ژنتیک و گیاهی تربیت مدرس ونیز دوستان خوبم در آزمایشگاه شیمی فیزیک ماکرومولکولها و آزمایشگاه مولکولهای حیاتی دانشگاه تهران به ویژه همکار محترم آقای نوید مقرب سپاسگزارم.

## چکیده :

در این تحقیق اندرکنش لیزوزیم با سطح دو نوع لیپوزوم (ایمن گریز و معمولی )و دندروزوم توسط دورنگ نمایی دورانی (CD) و گرما سنجی تیتراسیونی هم دما (ITC) مورد مطالعه قراز گرفت.

مطالعات گرما سنجی تیتراسیونی هم دما نشان می دهند که بین غلظت لیزوزیم آزاد و درجه اتصال لیزوزیم به سطح هر دو نوع لیپوزوم و دندروزوم یک رابطه غیر خطی وجود دارد.

نتایجITC نشان می دهد که جذب لیزوزیم بر سطح هر دو نوع لیپوزوم از الگوی جذب سطحی لانگ موير تبعیت می کند اما جذب آن بر سطح دندروزوم با این الگو سازگار نیست.

از طرف دیگر آزمایشات CD در نسبت های مختلف لیزوزیم به لیپوزوم نشان می دهند که اثر انواع لیپوزوم بر لیزوزیم مستقل از نوع لیپوزوم و وابسته به نسبت لیزوزیم به لیپوزوم است که این نتیجه با نتایج ITC نیز مطابقت دارد.



**واژگان کلیدی** : لیزوزیم ، لیپوزوم ساده ، لیپوزوم ایمن گریز ، دندروزوم ، دورنگ نمایی دورانی (CD) ، گرما سنجی هم دمای تیتراسیونی( ITC)

مقدمه پیشگفتار ۶

۱ -پیشگفتار ۷

۲ -لیپوزومها ۹

۲-۱ -انواع لیپوزوم ۱۰

۲-۱-۱ -لیپوزومهای معمولی Conventional Liposomes ۱۰

۲-۱ -۲ -لیپوزومهای طولانی گردش Long circulating Liposomes ۱۱

۲-۱-۳ -ایمونولیپوزومهاImmunoliposemes ۱۳

۲-۱-۴ -لیپوزومهای کاتیونیCationic Liposomes ۱۳

۲-۲.لیپوزمها بعنوان حاملین دارویی ۱۴

۲-۲-۱ - هدف یابیDirection ۱۴

۲-۲-۲ -ماندگاری Duration ۱۵

۲-۲-۳ -حفاظت Protection ۱۵

۲-۲-۴ -درونی شدن Internalization ۱۵

۲-۲-۵ -تقویت Amplification ۱۵

۲-۳ -موانع فناوری دارویی لیپوزومها ۱۶

۲-۳-۲ -خواص شیمی فیزیکی ۱۶

۲-۳-۳ -بارگیری ۱۶

۲-۳-۴ -نیمه عمر ۱۷

۲-۳-۵ -مقیاس بالا ۱۷

۲-۳-۶ -اطلاعات مربوط به بی خطر بودن ۱۷

۲-۴ -اندرکنش لیپوزوم - پروتئین ۱۸

۳ -لیزوزیم ۲۰

**۳ -۱ -ساختمان سوم لیزوزیم سفیده تخم مرغ** ۲۱

۳-۲ -مکانیسم عمل لیزوزیم ۲۳

**۴ -دورنگ نمایی دورانی *(CD)*** ۲۵

**۴-۱ -پدیده CD** ۲۵

**۴-۲ -کاربردهای CDدر زیست شناسی** ۲۷

۴-۲-۱ -مطالعه ساختمان دوم پروتئینها ۲۷

۴-۲-۲ -مطالعه ساختمان سوم پروتئینها ۲۹

۴-۲-۳ -مطالعه کره مذاب ۳۱

**۵ -استفاده از گرماسنجی تیتراسیونی در بررسی اندرکنش لیپوزوم-پروتئین** ۳۲

۵-۱ -دو روش گرماسنجی برای بررسی اندرکنش لیپید و پروتئین ۳۲

۵-۱-۱ -اندازه‌گیری انتالپی واکنش $\Delta H$ ۳۳

۵-۱-۲ -سنجش هم دمای پیوندی (Binding Isotherm) ۳۴

۵-۲ -هم دمای پیوندی پپتید ولیپید ۳۵

۵-۲-۱ -پپتیدهای بدون بار ۳۵

۵-۲-۲ -پپتیدهای باردار ۳۶

۵-۲-۳ -تجزیه وتحلیل هم دمای پیوندی ۳۶

**۲ -دستگاههای مورد استفاده** ۴۰

**۳ -روش جداسازی فسفاتیدیل کولین از زرده تخم مرغ** ۴۱

**۴ - کروماتوگرافی لایه نازک** ۴۱

**۵ -روشهای تهیه لیپوزوم** ۴۲

۵-۱ -تهیه لیپوزوم به روش لایه نازک ۴۲

۵-۲ -تهیه لیپوزوم به روش تبخیرفاز معکوس ۴۳

۳-۵ -تعیین حجم محصور شده و قطر لیپوزوم به روش کروماتوگرافی ۴۳

**۶ - تهیه دندروزوم ۴۴**

**۷ -تعیین مقدار لیزوزیم متصل شده به سطح لیپوزوم به کمک روشهای رنگ‌سنجی ۴۴**

۷-۱ - روش لوری ۴۵

۷-۲ -روش برادفورد ۴۵

۷-۳ -روش مارک ول ۴۵

۷-۴ -روش اسید تانیک ۴۶

**۸ -دورنگ نمایی دورانی *(CD)* ۴۶**

۸-۱ -روش آماده سازی نمونه ها ۴۶

۸-۲ -طیف گیری دو رنگ نمایی دورانی ۴۶

**۹ -گرماسنجی تیتراسیونی هم دما ۴۷**

**فصل سوم ۴۸**

**نتایج و بحث ۴۸**

**۱ -نتایج جداسازی فسفاتیدیل‌کولین از زردهٔ تخم مرغ ۴۹**

**۲ -نتایج محاسبهٔ حجم محصور شده و قطر لیپوزومها به روش کروماتوگرافی ۵۰**

**۳ -تعیین مقدار لیزوزیم متصل به سطح لیپوزوم به کمک روشهای رنگ سنجی ۵۱**

**۴ -نتایج بررسی اندرکنش لیزوزیم با انواع لیپوزم و دندروزوم به کمک دو رنگ نمایی دورانی ۵۲**

۴-۱ -نتایج واسرشت سازی حرارتی لیزوزیم و بررسی آن به کمک CD ۵۲

۴-۲ -نتایج بررسی اندرکنش لیزوزیم با انواع لیپوزوم و دندروزوم به کمک دو رنگ نمایی دورانی ۵۴

۴-۲-۱ -لیپوزوم معمولی ۵۴

۴-۲-۲ -لیپوزومهای ایمن گریز ۶۷

۴-۲-۳ -دندروزومها ۷۸

**۵ -نتایج گرماسنجی تیتراسیونی هم دما و سنجش هم دمای پیوندی ۸۸**

**منابع ۱۰۳**

# فصل اول

## مقدمه

# ۱- پیشگفتار

آدمی از آغاز خلقت با کنجکاوی محیط اطراف خود را کشف کرده و با الهام از آنچه دریافته، دست به خلق و آفرینش زده است و بدین گونه از زندگی لذت برده و مشکلات خود را حل نموده است.

یکی از با سابقه‌ترین مسایلی که بشر با آن روبرو بوده است، پیداکردن علل بیماریها و یا راهی برای درمان و تسکین آنها بوده و هست که در هر زمان به کمک دانش و امکانات خود به این مهم پرداخته است.

امروزه پیشرفتهای چشمگیر در مهندسی پروتئینها و فناوری DNA نوترکیبی، طراحی و تولید انواع داروهای جدید را به میزان انبوه امکان پذیر نموده است [۱]، اما صنایع داروسازی با مسایل جدیدی روبرو شده اند. پپتیدها اگرچه کاربردهای دارویی بسیار ارزنده‌ای دارند اما نسبت به تغییرات محیط بسیار حساس می‌باشند و بسرعت فعالیت و اثر دارویی خود را از دست میدهند، از اینرو باید در شرایط ویژه‌ای نگهداری و حمل شوند. از طرف دیگر صنایع داروسازی در جستجوی تولید داروهایی با بیشترین تاثیرگذاری و کمترین میزان مصرف و نیز دوره اثر بخشی طولانی میباشند، بنابراین باید حامل‌هایی برای تحویل و حمل دارو طراحی میشدند که اهداف بالا را تامین کنند.

از مهمترین این حامل‌ها می‌توان لیپوزومها و اخیراً دندریمرها (Dendrimers) را نام برد. لیپوزومها حدود ٤٠ سال پیش توسط بنگهام ساخته شدند [۳ و ۲]. اما در دو دهه اخیر رشد سریع خود را آغاز نموده‌اند و این رشد سریع آنها بعلت فرمولبندی آنها به منظور حمل داروها یا آنتی‌ژنها صورت گرفته است. رشد و بهبود لیپوزومها با مشکلات زیادی مواجه بوده و هست و این مشکلات بدو دلیل عمدهٔ، دانش اندک در زمینه چگونگی تحویل داروها توسط لیپوزوم به بدن و نیز عدم شناخت کافی از عواملی که پایداری لیپوزومها را تحت تاثیر قرار میدهد،می باشد. به دلایل قبلی بایستی مشکلات داروسازی و فناوری مربوط به لیپوزومها را نیز افزود [٤].

لیپوزومها از بسیاری جهات بر سایر حاملین دارویی برتری دارند، از جمله این مزایا میتوان غیرایمنی‌زا بودن، طبیعی و غیرسمی بودن، قابلیت تجزیه‌پذیری توسط بدن، تحویل تدریجی دارو، هدف گیری دارو به

بافت خاص و حفاظت دارو را نام برد [٦ و ٥ و ٤]. داشتن چنین مزایایی محققین را برآن میدارد که نسبت به بهبود لیپوزومها اقدام و مشکلات آن را حل نمایند. بنظر میرسد بدون تیم‌های تحقیق بین رشته‌ای بهبود و رشد لیپوزومها به راحتی امکانپذیرنباشد و لیپوزوم‌ها باید از زوایای مختلف مورد بررسی واقع گردند[٤].

در همین راستا برآن شدیم که به مطالعه بیوفیزیکی اندرکنش پلی‌پپتیدها با دو نوع لیپوزوم و نیز دندروزوم بپردازیم و این اندرکنشها با یکدیگر مقایسه کنیم.در این تحقیق اندرکنش لیزوزوم بعنوان یک پروتئین مدل با سطح لیپوزوم ساده و لیپوزوم پوششدار (ایمن گریز Stealth) و نیز دندروزوم F1 به کمک روشهای دو رنگ نمایی دورانی (Circular Dichroism) و گرماسنجی تیتراسیونی هم دما (Isothermal Titration Calorimetry) مطالعه شد. با استفاده از طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی تاثیر این حاملها بر ساختار دوم و سوم پروتئین مطالعه و مقایسه شد. علاوه براین با مطالعه واسرشت سازی حرارتی لیزوزیم در حضور و عدم حضور این حاملها، دمای ذوب (Tm) لیزوزیم محاسبه و مقایسه گردید.اما در مطالعات گرماسنجی تیتراسیونی همدما اندرکنش لیزوزیم و این حاملها بصورت کمی مطالعه و همچنین قدرت و چگونگی اتصال لیزوزیم برسطح این حاملها مورد بحث و بررسی واقع شد.

# ۲- لیپوزومها

برای اولین بار بنگهام[1] و همکارانش در اوایل دهه ۱۹٦۰ میلادی متوجه شدند که مولکولهای غشاء مانند فسفولیپیدها در آب بصورت وزیکولهای چند جداره‌ای در می‌آیند که هر جداره، غشایی دولایه‌ای از مولکولهای فسفولیپید است [۷ و ۲ و ۳]. این ساختمانهای خاص که توسط بنگهام معرفی شده بودند در سال ۱۹٦۷ توسط AL. Lehninger و همکارانش به احترام بنگهام، بنگوزوم (Bangosome) نامیده شدند، سپس G. weismann و G. sessa در سال ۱۹٦۸ نام لیپوزوم را برای آنها بکار بردند که از آن پس به این نام خوانده می‌شوند [۹ و۸].

لیپوزومها کره‌های لیپیدی بسیار کوچکی هستند که حاوی یک بخش آبی در مرکز میباشند و از طریق خود تجمعی ذرات کلوئیدی تشکیل میشوند، این اتفاق می‌تواند بطور طبیعی یا مصنوعی رخ دهد. در ابتدا لیپوزومها بعنوان الگویی برای مطالعه غشاهای زیستی مورد تحقیق واقع میشدند و به کمک آنها شیمی فیزیک غشاء، اتصال لیگاندها به غشاء ،اندرکنش لیپید - پروتئین را مطالعه میکردند [۳ و ۱٤ و ۱۳ و ۱۲ و ۱۱ و ۱۰]. در دهه ۱۹۷۰ کاربردهای عملی متعددی برای لیپوزومها خصوصاً در ز مینه تحویل دارو پیدا کردند[۱۷ و ۱٦ و ۱۵].

امروزه لیپوزومها مدل و ابزار و واکنشگرهای بسیار مفیدی در رشته‌های مختلف علمی هستند که شامل فیزیک نظری و ریاضی (توپولوژی سطوح دوبعدی شناور در یک محیط پیوسته سه بعدی)، بیوفیزیک (مطالعه خصوصیات غشاء سلولی و کانالهای غشایی)، شیمی (تبدیل انرژی و فتوسنتز، کاتالیز)، بیوشیمی (عملکرد پروتئینهای غشایی)، زیست شناسی (ترشح، عملکرد سلولی، تحویل مواد ژنتیکی، انتقال علائم و اطلاعات بین سلولها)، علوم مربوط به کلوئیدها (پایداری و ترمودینامیک سیستمهای متناهی) در عرصه

---

[1]- Alec Bangham