بسم الله الرحمن الرحیم

وزارت علوم تحقیقات و فناوری
دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)
دانشکده علوم پایه – گروه شیمی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد شیمی فیزیک

موضوع:

ترمودینامیک برهمکنش نانوسولفونامیدها با آلبومین سرم انسانی

اساتید راهنما:

دکتر غلامرضا رضایی بهبهانی
دکتر علی اکبر صبوری

استاد مشاور:

دکتر عادله دیوسالار

نگارش:

مجتبی اسلام‌دوست

آذر ماه ۱۳۹۰

به

اسطوره‌ی پاکی و ایستادگی،

مظهر مهر و فداکاری:

پدرم

و

وزش شور و معنا

فوران مهر و معصومیت:

مادرم

سپاس‌گذاری

به مصداق " من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق" بسی شایسته است از اساتید فرهیخته و فرزانه جناب آقای دکتر غلامرضا رضایی و جناب آقای پروفسور علی اکبر صبوری که با کرامتی چون خورشید، سرزمین دل را روشنی بخشیدند و گلشن‌سرای علم و دانش را با راهنمایی‌های کارساز و سازنده بارور ساختند تقدیر و تشکر نمایم.

سپاس بیکران از استاد مشاور محترم

سرکار خانم دکتر عادله دیوسالار که در طی این مدت از همراهی صمیمانه و مساعدت ایشان بهره‌مند گشتم.

از خانواده عزیزم که همانند گذشته این‌بار نیز با حمایت‌های بی‌دریغ خود مرا یاری رسانند از صمیم قلب تشکر می‌نمایم و برایشان آرزوی سلامت و سعادت دارم.

چکیده‌ی فارسی

آلبومین سرم انسان (HSA)، فراوانترین پروتئین موجود در پلاسما و حمل کننده بسیاری از داروها از جمله سولفونامیدها برای اهداف دارویی مختلف است. پارامترهای ترمودینامکی برهمکنش HSA با لیگاندهای N- فنیل بنزن سولفونیل هیدرازید و نانو N- فنیل بنزن سولفونیل هیدرازید در محلول بافر تریس (۳۰ mM) با $pH = ۷$، در دمای ۳۰۰ K به‌وسیله دستگاه کالریمتری تیتراسیونی هم‌دما به دست آمده است. با آنالیز گرماهای به‌دست آمده از این برهمکنش و استفاده از تئوری انحلال، پارامتر-هایی مانند تعداد جایگاه‌های اتصال، ثابت تفکیک، آنتالپی اتصال مولی و پارامترهای ترمودینامیکی دیگر به‌دست آمد. آنالیز داده‌ها وجود دو دسته جایگاه برای HSA در این برهمکنش را نشان می‌دهد. آنتالپی برهمکنش آلبومین سرم انسانی (HSA) با N- فنیل بنزن سولفونیل هیدرازید و نانو N- فنیل بنزن سولفونیل هیدرازید به‌ترتیب برابر $-۲۴/۶۳ \text{ kJ mol}^{-1}$ و $-۳۶/۹۰ \text{ kJ mol}^{-1}$ برای دسته جایگاه اول و $-۱۲/۴۵ \text{ kJ mol}^{-1}$ و $-۳۹/۲۰ \text{ kJ mol}^{-1}$ برای دسته جایگاه دوم به‌دست آمد، که نشان‌دهنده غالب بودن نیروهای الکترواستاتیک بر هیدروفوبیک در این برهمکنش می‌باشد. مقادیر K_a به دست-آمده در این برهمکنش برای لیگاندهای فوق، به‌ترتیب $۲/۱\times۱۰^{۵} \text{ L mol}^{-1}$ و $۳/۶۳\times۱۰^{۶} \text{ L mol}^{-1}$ برای دسته جایگاه اول و $۳/۸۶\times۱۰^{۵} \text{ L mol}^{-1}$ و $۵/۲۸\times۱۰^{۵} \text{ L mol}^{-1}$ برای دسته جایگاه دوم می باشد، که می‌توان نتیجه گرفت در فرم نانو تمایل به برهمکنش بیشتر می‌باشد.

کلید واژگان: کالریمتری تیتراسیونی هم‌دما، سولفونامید، آلبومین سرم انسان، جایگاه‌های اتصال.

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و پیشینه تحقیق

۱-۱ کالریمتری ۱

۱-۱-۱ کالریمتری پیمایشی افتراقی ۳

۱-۱-۲ کالریمتری تیتراسیونی هم‌دما ۵

۱-۲ پروتئین ها ۶

۱-۲-۱ پیوند پپتیدی ۷

۱-۲-۲ اسیدهای آمینه ۹

۱-۲-۳ انواع اسیدهای آمینه ۱۱

۱-۲-۴ ساختار پروتئین‌ها ۱۲

۱-۲-۵ طبقه بندی پروتئین‌ها ۱۷

۱-۲-۶ دگرگونی پروتئین‌ها ۲۰

۱-۲-۷ پیوند پروتئین‌ها ۲۱

۱-۲-۸ انواع پیوندهای ضعیف ۲۲

۱-۲-۹ پیوندهای ضعیف مهم ۲۳

۱-۳ آلبومین سرم ۲۴

۱-۳-۱ آلبومین سرم انسانی ۲۴

۱-۳-۲ باز شدگی و غیر طبیعی شدن مولکول آلبومین ۲۹

۱-۳-۳ منابع آلبومین ۳۰

۱-۳-۴ توالی آمینواسیدها ۳۰

۱-۳-۵ برهمکنش با لیگاندها ۳۱

۱-۳-۶ جایگاه I ۳۳

۱-۳-۷ جایگاه II ۳۵

۱-۳-۸ جایگاه‌های اضافی ۳۶

۱-۳-۹ سیستئین ۳۴ ۳۷

۱-۳-۱۰ الزامات ساختاری برای برهمکنش دارو با مکان II روی آلبومین سرم انسان ۳۸

۱-۳-۱۱ کاربردهای درمانی ۳۹

۱-۳-۱۲ مفهوم گیرنده و علت مطالعه برهمکنش‌های آلبومین ۳۹

۱-۴ سولفونامیدها ۴۰

۱-۴-۱ شیمی سولفونامیدها ۴۰

۱-۴-۲ پارامترهای فارماکوکینتیک ۴۱

۱-۴-۳ روش‌های دفع سولفونامیدها ۴۳

۱-۴-۴ نانوسولفونامیدها ۴۳

۱-۵ برهمکنش داروهای مختلف با آلبومین سرم انسان ۴۴

۱-۵-۱ برهمکنش آلبومین سرم انسان با کمپلکس ضد سرطان تازه سنتز شده پالادیم II ۴۴

۱-۵-۲ برهمکنش ۲ و ´۲ - بی پیریدین گلیسناتو پالادیم II کلرید با آلبومین سرم انسانی ۴۶

۱-۵-۳ برهمکنش آلبومین سرم انسان و تیگافور ۴۸

۱-۵-۴ برهمکنش تئوفیلین با آلبومین سرم انسان ۴۹

۱-۵-۵ برهمکنش دکسامتازون با آلبومین سرم انسان ۵۱

۱-۶ بررسی پیوند لیگاند به ماکرومولکول ۵۳

۱-۶-۱ اتصال لیگاند به بیش از یک مجموعه جایگاه یکسان و مستقل ۵۳

۱-۶-۲ پیوند رقابتی دو لیگاند روی مجموعه‌ای از جایگاه‌های پیوندی یکسان و مستقل ۵۴

۱-۶-۳ پیوند لیگاند به مجموعه‌ای از جایگاه‌های پیوندی یکسان و غیرمستقل (کنش‌گر) ۵۵

۱-۷ استفاده از روش کالریمتری در تئوری انحلال ۵۶

۱-۸ هدف از پایان نامه ۵۹

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱ مواد مورد استفاده ۶۰

۲-۱-۱ روش تهیه سولفونامیدها ۶۰

۲-۲ دستگاه مورد استفاده ۶۱

۲-۲-۱ دستگاهوری کالریمتری تیتراسیونی هم‌دما ۶۱

۲-۳ کاربردهای سیستم کالریمتری تیتراسیونی هم‌دما ۶۴

۲-۴ طریقه انجام آزمایش در دستگاه کالریمتری تیتراسیونی هم‌دما ۶۵

فصل سوم: بحث و نتیجه‌گیری

۳-۱ بررسی اثرات ضدمیکروبی و ضد قارچی، به‌روش دیسک دیفوزیون ۶۶
۳-۱-۱ آماده سازی مواد مورد نیاز ۶۶
۳-۱-۲ روش انجام آزمایش ۶۷
۳-۲ نتایج اولیه ۶۹
۳-۳ محاسبه پارامترهای ترمودینامیکی اتصال نانو N – فنیل بنزن سولفونیل هیدرازید با آلبومین سرم انسان ۷۰
۳-۴ محاسبه پارامترهای ترمودینامیکی اتصال N – فنیل بنزن سولفونیل هیدرازید با آلبومین سرم انسان ۷۳
۳-۵ بررسی داده‌های میکروکالریمتری با استفاده از تئوری انحلال در برهمکنش نانو N– بنزن سولفونیل هیدرازید با آلبومین سرم انسان ۷۶
۳-۶ بررسی داده‌های میکروکالریمتری با استفاده از تئوری انحلال در برهمکنش N– فنیل بنزن سولفونیل هیدرازید با آلبومین سرم انسان ۷۹
۳-۷ مقایسه پارامترهای ترمودینامیکی برهمکنش نانوسولفونامید و برخی داروهای دیگر با HSA ۸۴
۳-۷-۱ مقایسه با برهمکنش کمپلکس ضدسرطان پالادیم II آلبومین ۸۵
۳-۷-۲ مقایسه با برهمکنش تئوفیلین- آلبومین ۸۶
۳-۷-۳ مقایسه با برهمکنش دکستامتازون – آلبومین ۸۶
۳-۷-۴ مقایسه با برهمکنش تیگافور – آلبومین ۸۷
۳-۸ نتیجه‌گیری کلی ۸۸
۳-۹ پیشنهادات ۸۹
مراجع ۹۰
پیوست ۹۵

فهرست اشکال

فصل اول

شکل ۱-۱- Power – Compensation DSC ۴

شکل ۱-۲- Heat – Flux DSC ۴

شکل ۱-۳- نمایی از یک زنجیر پپتیدی ۶

شکل ۱-۴- پیوند پپتیدی و نحوه‌ی ایجاد آن ۷

شکل ۱-۵- ابعاد یک پیوند پپتیدی ۸

شکل ۱-۶- ساختمان کلی اسیدهای آمینه ۹

شکل ۱-۷- اسید آمینه آلانین (A)، اسید آمینه والین (B) و اسید آمینه فنیل آلانین (C) ۱۰

شکل ۱-۸- اسید آمینه بتا-آلانین (A)، اسید آمینه گاما- آمینو بوتیریک اسید (B) ۱۰

شکل ۱-۹- ساختار اول پروتئین‌ها ۱۳

شکل ۱-۱۰- صفحات یک زنجیر پپتیدی ۱۳

شکل ۱-۱۱- ساختار دوم پروتئین‌ها، ساختمان مارپیچی (a) و ساختمان چین‌دار (b) ۱۴

شکل۱-۱۲- ساختار سوم پروتئین‌ها ۱۵

شکل ۱-۱۳- ساختار چهارم پروتئین‌ها ۱۶

شکل ۱-۱۴- ساختارهای پروتئین ۱۶

شکل ۱-۱۵- شکل سه بعدی پروتئین‌ها ۱۹

شکل ۱-۱۶- دگرگونی پروتئین‌ها ۲۱

شکل ۱-۱۷- پیوند هیدروژنی ۲۲

شکل ۱-۱۸- مدل Ribbon از سه دمین HSA. دمین I (A)، دمین II (B) و دمین III (C) ۲۵

شکل ۱-۱۹- تقسیم HSA به دمین‌های (I تا III) و زیر دمین (A و B) ۲۶

شکل ۱-۲۰- ساختار HSA ۲۷

شکل ۱-۲۱- شکل کلاسیک آلبومین ۲۷

شکل ۱-۲۲- توالی آمینواسیدهای آلبومین سرم انسانی ۳۰

شکل ۱-۲۳- برهمکنش از انانتیومر (+)-R وارفارین با rHSA کمپلکس شده با شش مولکول (Myr) ۳۴

شکل ۱-۲۴- rHSA کمپلکس شده با دو مولکول پروپوفول (PR) ۳۶

شکل ۱-۲۵- rHSA کمپلکس شده با سه مولکول هالوتان (HAL) ۳۷

شکل ۱-۲۶- ساختار شیمیایی سولفونامید (A) و پارا آمینو بنزوئیک اسید (B) ۴۱

شکل ۱-۲۷- ساختار شیمیایی ۲و ۲ بی پیریدین بوتیل دی تیوکربناتو پالادیم II ۴۴

شکل ۱-۲۸- برهمکنش هم‌دما از ۲و ۲- بی پیریدین گلیسناتو پالادیم II کلرید با آلبومین سرم انسانی ۴۸

شکل ۱-۲۹- ساختار شیمیایی تئوفیلین ۵۰

شکل ۱-۳۰- ساختار شیمیایی دکسامتازون ۵۲

شکل ۱-۳۱- نمودار اسکاچارد: (a) سیستم‌های غیرمتعاون، (b) سیستم‌های متعاون و (c) سیستم-های ضدمتعاون ۵۶

فصل دوم

شکل ۲-۱- ساختار شیمیایی N– فنیل بنزن سولفونیل هیدرازید ۶۰

شکل ۲-۲: دیاگرام سلول‌ها و سرنگ ITC ۶۲

شکل ۲-۳- نمونه‌ای از ترموگرام کالریمتری تیتراسیونی هم‌دما ۶۴

فصل سوم

شکل ۳-۱- هاله تشکیل شده در اطراف دیسک حاوی مواد ضدمیکروبی ۶۷

شکل ۳-۲- نمودار خطی $M\frac{\Delta q}{q_{max}}$ در برابر $L\frac{\Delta q}{q}$ در µJ ۴۰۰۰- =q_{max} برای نانو سولفونامید ۷۱

شکل ۳-۳- نمودار خطی $M\frac{\Delta q}{q_{max}}$ در برابر $L\frac{\Delta q}{q}$ در µJ ۱۷۰۰۰- =q_{max} برای نانوسولفونامید ۷۲

شکل ۳-۴- نمودار خطی $M\frac{\Delta q}{q_{max}}$ در برابر $L\frac{\Delta q}{q}$ در µJ ۲۶۷۰- =q_{max} برای سولفونامید ۷۴

شکل ۳-۵- نمودار خطی $M\frac{\Delta q}{q_{max}}$ در برابر $L\frac{\Delta q}{q}$ در µJ ۱۷۰۰۰- =q_{max} برای سولفونامید ۷۵

شکل ۳-۶- مقایسه مقادیر تجربی و محاسباتی در برهمکنش آلبومین و نانوسولفونامید با استفاده از معادله‌ی (۱-۹) ۷۸

شکل ۳-۷- مقایسه مقادیر تجربی و محاسباتی در برهمکنش آلبومین و سولفونامید با استفاده از معادله‌ی (۱-۹) ۸۰

شکل ۳-۸- مقایسه مقادیر تجربی و محاسباتی در برهمکنش آلبومین و سولفونامید با استفاده از معادله‌ی (۱-۹) ۸۱

فهرست جداول

فصل اول

جدول ۱-۱- تعداد و نوع آمینواسیدهای آلبومین سرم انسان و گاو ۲۴

جدول ۱-۲- برهمکنش تمایل بالا لیگاند برای جایگاه I و II از HSA ۳۲

جدول ۱-۳-تقسیم‌بندی سولفونامیدها به سه گروه بر حسب نیمه عمر ۴۱

جدول۱-۴- تقسیم‌بندی پروتئین‌ها بر حسب وزن مولکولی و درصد پیوند با پروتئین پلاسما ۴۲

جدول۱-۵- پارامترهای به‌دست آمده در واکنش HSA و Butpd ۴۵

جدول ۱-۶- پارامترهای ترمودینامیکی در واکنش Butpd + HAS ۴۶

جدول ۱-۷- پارامترهای برهمکنش لیگاند با HSA به کمک معادله Hill و برنامه کامپیوتری ۴۷

جدول ۱-۸- پارامترهای ترمودینامیکی برهمکنش داروی ضدتومور و HSA ۴۹

جدول ۱-۹- پارامترهای ترمودینامیکی برهمکنش تئوفیلین و HSA ۵۱

جدول ۱-۱۰- پارامترهای ترمودینامیکی برهمکنش دکسامتازون و HSA ۵۲

فصل سوم

جدول ۳-۱- انواع میکروارگانیسم‌های مورد استفاده ۶۶

جدول ۳-۲- فعالیت ضد باکتریایی سولفونامیدها ۶۸

جدول ۳-۳- فعالیت ضد قارچی از سولفونامیدها ۶۸

جدول ۳-۴- نتایج به‌دست آمده برای برهم کنش آلبومین سرم انسان با سولفونامید ۸۲

جدول ۳-۵- نتایج به‌دست آمده برای برهم کنش آلبومین سرم انسان با نانو سولفونامید ۸۳

جدول ۳-۶- مقایسه NPBSH و NNPBSH با Butpd ۸۵

جدول ۳-۷- مقایسه NPBSH و NNPBSH با تئوفیلین ۸۶

جدول ۳-۸- مقایسه NPBSH و NNPBSH با دکستامتازون ۸۷

جدول ۳-۹- مقایسه NPBSH و NNPBSH با تیگافور ۸۷

فصل اول

مقدمه و

پیشینه تحقیق

۱-۱ کالریمتری

بیوشیمی فیزیک زمینه‌ایی از دانش است که می‌توان آن را ترکیبی از شیمی، زیست شناسی، فیزیک و حتی گاهی پزشکی دانست. به‌همین دلیل شاید ارائه تعریفی دقیق از آن آسان نباشد. به‌طور کلی، هرچه در زیست شناسی و پزشکی که بر پایه قوانین و اصول شیمیایی یا فیزیکی استوار و قابل توجیه باشد بیوشیمی فیزیک است. دانشمندان متخصص شیمی فیزیک معتقدند بیوشیمی فیزیک استفاده از اصول و قوانین شیمی فیزیکی برای توجیه و تفسیر پدیده‌های زیستی است، اما زیست شناسان می - گویند این دانش تفسیر شیمی فیزیکی خواص بیومولکول‌ها و فرایندهای زیستی است.

کاربرد شیمی فیزیک در علوم زیستی یک منبع عالی برای افرادی می‌باشد که حرفه مرتبط با علوم بیوشیمی و سلامت دارند. این علم هم‌چنین برای دانشجویانی که نیاز به یک فهم پایه از ترمودینامیک، سنتیک و هیدرودینامیک از ماکرومولکولها دارند و نیازمند به‌دست آوردن بینشی به- منظور کشف ساختار و واکنش‌های شیمیایی مولکول‌ها می‌باشند کاربرد دارد.

ترمودینامیک و سینتیک شیمیایی ، تعیین ساختار ماکرومولکول‌ها و برهمکنش لیگاندها با ماکرو- مولکول‌ها از مواردی هستند که این علم قادر به پاسخ‌گویی آنها می‌باشد [۱]. روش‌های آزمایشگاهی مورد استفاده در بیوشیمی فیزیک را به دو دسته روش‌های اصلی و جدید می‌توان طبقه‌بندی کرد.

روش‌های اصلی که قدیمی‌تر هستند، هیچ‌کدام منسوخ نشده و هم‌چنان کاربرد دارند و عمدتاً روش‌هایی هستند که به نور و واکنش آن با ماده می‌پردازند و با استفاده از آن درباره بیومولکول‌ها اطلاعات به‌دست می‌آورند; مانند چرخش نوری، پراکنش نوری، کریستالوگرافی پرتوایکس و انواع طیف سنجی. اما از روش‌های جدید می‌توان به تکنیک‌های Single – Biomolecule ومیکروسکوپی فلئورسانس[1] را نام برد. البته روش‌های تئوری، پای ثابت بیوشیمی فیزیک است.

هدف اصلی بیوشیمی درک کامل تمام فرایندهای سیستم‌های مرتبط با سلول‌های زنده در سطح مولکولی می‌باشد [۲]، لذا با توجه به‌اینکه بسیاری از بیماری‌ها به دلیل اختلالات مولکولی می‌باشد می‌توان از بیوشیمی برای تشخیص این بیماری‌ها استفاده کرد، هم‌چنین به‌کمک مطالعات بیوشیمی- فیزیک می‌توان با بررسی میزان و نوع داروی مرتبط به بیماری به درمان بیماران کمک کرد.

یکی از مسائل اساسی که بیوشیمی فیزیک‌دانان با آن روبرو بوده و هستند تفسیر ترمودینامیکی پیوند شدن مولکول‌های کوچک (لیگاند)، به ماکرومولکول‌ها[2]می باشد. در واقع عمل بیولوژیکی بسیاری از پلیمرهای زیستی به پیوند شدن مولکول‌های کوچک و یا یون‌ها مرتبط می‌باشد، به‌همین دلیل مساله

[1]- Fluorescence
[2]- Macromolecules

اتصال لیگاند به ماکرومولکول را به عنوان قلب بیولوژی مولکولی نامیده‌اند. اغلب اعمال زیستی ناشی از برهمکنش مولکول‌های کوچکی نظیر متابولیت‌ها و تنظیم کننده‌ها با ناحیه خاصی از ماکرومولکول می‌باشند. درواقع بسیاری از از اعمال کنترلی در بدن به واسطه همین پدیده اتفاق می‌افتد. لذا درک کامل این پدیده از نظر ترمودینامیکی می‌تواند ما را در فهم دقیق‌تر پدیده‌های زیستی یاری دهد. برای درک این پدیده به اطلاعاتی درباره پیوند شدن لیگاندها[1] به ماکرومولکول‌ها نیازمندیم. در این گونه مطالعات باید به سوالاتی نظیر ماکزیمم تعداد لیگاندی که می‌تواند به هر ماکرومولکول اتصال یابد، ثابت اتصال و ... پاسخ داد. این موضوع قطعا کمک شایانی به زیست شناسان و کلیه افراد وابسته به این رشته از جمله طراحان دارو خواهد بود.

برهمکنش میان لیگاند و ماکرومولکول‌ها، از نوع برهمکنش‌های فیزیکی می‌باشد. لیگاندها شامل سوبستراهای آنزیمی، کاتیون‌های فلزی، آنیون‌های چرب، مواد فعال سطحی و غیره هستند. یک ماکرومولکول ممکن است یک یا چند جایگاه پیوندی و یا چندین دسته جایگاه پیوندی داشته باشد. جایگاه‌های پیوندی ممکن است یکسان یا غیر یکسان، مستقل یا وابسته باشند. روش‌های گوناگونی برای بررسی اتصال لیگاند به ماکرومولکول استفاده می‌شود، یکی از این روش‌ها روش‌های کالریمتری[2] می‌باشد.

- کالریمتری با توجه به حساسیت، استعداد و توانی که در آن وجود دارد یک منبع مهم برای به دست آوردن اطلاعات ترمودینامیکی می‌باشد. کالریمتری یک روش عمومی کاربردی برای به‌دست آوردن جواب در تمام فرایندهای بیولوژیکی[3]، فیزیکی و شیمیایی می‌باشد که با تغییرات گرما همراهی می شود. با تحلیل داده‌های حاصل از کالریمتری می‌توان اطلاعاتی درمورد تعداد مجموعه جایگاه‌ها، تعداد جایگاه‌های پیوندی در هر مجموعه و قدرت و ماهیت پیوند به‌دست آورد. بنابراین کالریمتری یکی از قویترین ابزارها برای توسعه دانش ما در بسیاری از علوم و تکنولوژی‌ها می‌باشد [۳].

این روش می‌تواند اطلاعات اساسی در رابطه با علم ترمودینامیک، ساختار و عملکرد پروتئین‌ها، اسید نوکلئوئیک‌ها، لیپیدها، داروها و دیگر بیوماکرومولکول‌ها بدهد.

دو روش کالریمتری پیمایش افتراقی[4] (DSC) وکالریمتری تیتراسیونی هم‌دما[5] (ITC) به‌عنوان تکنیک‌های کالریمتری حساس برای به‌دست آوردن اطلاعات ترمودینامیکی مورد استفاده قرار می-

[1]- Ligands
[2]- Calorimetry
[3]- Biological
[4]- Differential scanning calorimetry
[5]- Isothermal titration calorimetry

گیرند. مطالعات اخیر کاربردهای زیادی از کالریمتری تیتراسیونی هم‌دما و کالریمتری افتراقی هم‌دما را برای مطالعه واکنش‌های پروتئین – لیگاند گزارش نموده‌اند.

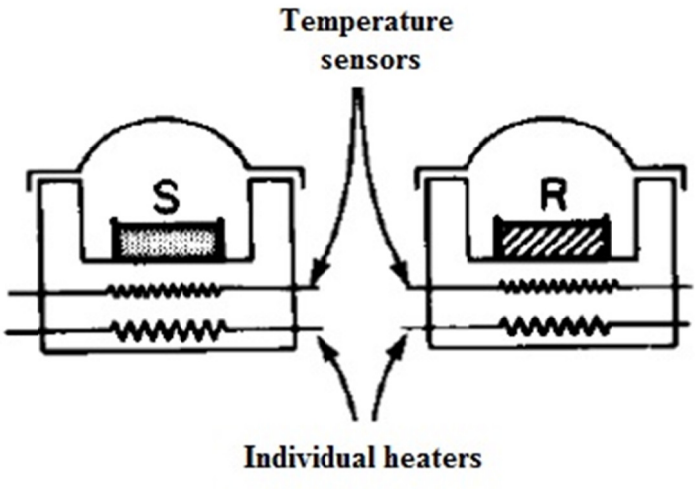
۱-۱ ۱-کالریمتری پیمایشی افتراقی

این روش برای محاسبه میزان گرمایی که نمونه می‌گیرد یا آزاد می‌کند، عمل می‌کند. کالریمتری پیمایشی افتراقی تکنیکی برای اندازه‌گیری انرژی مورد نیاز برای به‌وجود آوردن یک اختلاف دمایی نزدیک به صفر بین یک ماده نمونه و یک مرجع، وقتی دو نمونه در شرایط دمایی یکسان در محیط - هایی با درجه کنترل شده سرما و گرما هستند می‌باشد. در دستگاه کالریمتر پیمایش افتراقی در اطراف نمونه مجرای عبور آب یا نیتروژن مایع جهت سرد کردن نمونه و هم‌چنین گرم کن‌هایی جهت گرم کردن نمونه وجود دارد. دستگاه به‌طور خودکار دمای نمونه ها را یکسان نگه داشته و میزان انرژی لازم برای انجام این‌کار را محاسبه می‌کند.

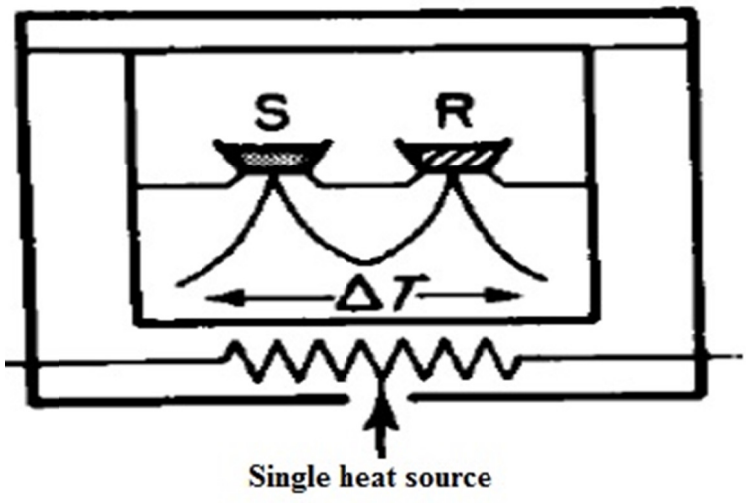
دو نوع از سیستم‌های کالریمتری پیمایشی افتراقی متداول هستند.

- ۱- در کالریمتر پیمایش افتراقی با عنوان Power – Compensation DSC، دمای نمونه و مرجع به طور مستقل با استفاده از دو حمام مشابه کنترل می‌گردد. دمای نمونه و مرجع به‌وسیله استفاده از تغییرات گرمای ورودی به هر دو حمام یکسان می‌گردد. انرژی مورد نیاز برای این کار به عنوان تغییرات ظرفیت گرمایی یا آنتالپی از نمونه مرتبط با مرجع اندازه گرفته می‌شود (شکل ۱-۱).
- ۲- در کالریمتر پیمایش افتراقی با عنوان Heat – Flux DSC، نمونه و مرجع توسط یک مسیر جریان گرمایی با مقاومت کم به‌هم متصل می‌باشند. مجموعه در یک حمام منفرد[1] قرار داده شده است. آنتالپی یا تغییرات ظرفیت گرمایی در نمونه به‌دلیل تفاوت در دمای مرتبط با مرجع می‌باشد (شکل ۱-۲) [۴].

[1]- Single furnace



شکل ۱ ۱-Power – Compensation DSC



شکل ۱ ۲- Heat – Flux DSC

DSC یکی از پرکاربردترین تکنیک‌های گرماسنجی می‌باشد این ابزار قادر به تعیین شماری از پارامترهای ترمودینامیکی مرتبط با فرایندهای فیزیکی و شیمیایی در فاز متراکم می‌باشد. دمای انتقال فاز مانند نقطه ذوب، شروع انجماد، شروع تبلور مجدد، دمای تبخیر و آنتالپی از انتقال فاز، دیاگرام فاز، تغییرات فاز پلیمر ترموپلاستیک، دمای شیشه، گرمای مخصوص و مطالعات سنتیک اندازه‌گیری خلوص می‌توانند به وسیله کالریمتر پیمایش افتراقی مورد بررسی قرار گیرند. کالریمتری پیمایشی افتراقی اغلب برای مطالعه ظرفیت گرمایی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۵].

۱-۲ کالریمتری تیتراسیونی هم‌دما

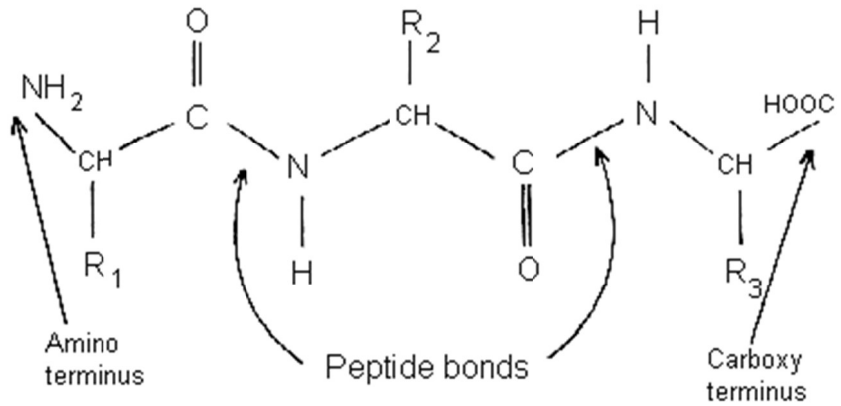
به‌وسیله کالریمتری تیتراسیونی همدما انرژی از واکنش‌های بیوشیمیایی و واکنش‌های بین مولکولی در دمای ثابت به‌دست می‌آید. روش کالریمتری تیتراسیونی هم‌دما به‌طور مستقیم گرمای جمع‌آوری شده از واکنش یا برهمکنش شیمیایی (پدیده‌های پیوند لیگاند، برهمکنش‌های آنزیم سوبسترا و برهمکنش‌های میان اجزاء و کمپلکس‌های چندمولکولی) در دمای ثابت را با استفاده از شبکه بازخورد سلولی بین دوسلول، یکی سلول نمونه و سلول مرجع را اندازه می‌گیرد. کالریمتر از یک سل نمونه و یک سل مرجع ساخته شده است که به‌ترتیب حاوی پروتئین و بافر می‌باشند. این‌ها در محیط آدیاباتیک استوانه ای نصب شده اند و با محیط بیرون از طریق لوله مدخل باریک تماس پیدا می‌کنند. آزمایش از تیتر کردن یک واکنش‌گر به محلول نمونه حاوی واکنشگرهای دیگر که برای واکنش لازم است تشکیل گردیده است. تیتر کردن از طریق تزریق[1]، با استفاده از یک سرنگ مخصوص به ظرف تیتراسیون انجام می‌گردد. بعد از هر افزایش گرمای آزاد شده یا جذب شده به‌عنوان نتیجه واکنش به‌وسیله دستگاه ثبت می‌شود. دستگاه مقدار گرمایی را که برای جبران اختلاف دما بین سلول نمونه و مرجع نیاز می‌باشد را اندازه می‌گیرد [۷ ۶].

آنالیز ترمودینامیکی از اثر گرمایی مشاهده شده به ما امکان تعیین ویژگی‌های کمی از فرایندهای انرژی زا که به برهمکنش واکنش وابسته است را می‌دهد. ITC به‌طور همزمان همه‌ی پارامترهای پیوندی (K، g، ΔH، ΔS) را در یک آزمایش واحد تعیین می‌کند. کالریمتری تیتراسیونی هم‌دما، اطلاعات ارزشمندی در مورد برهمکنش لیگاند–بیوماکرومولکول، پروتئین‌های مصنوعی، مهارکننده های آنزیم[2]، زمان ماندگاری و پایداری مواد را می‌دهد [۷].

[1]- Injection
[2]- Inhibitors enzyme

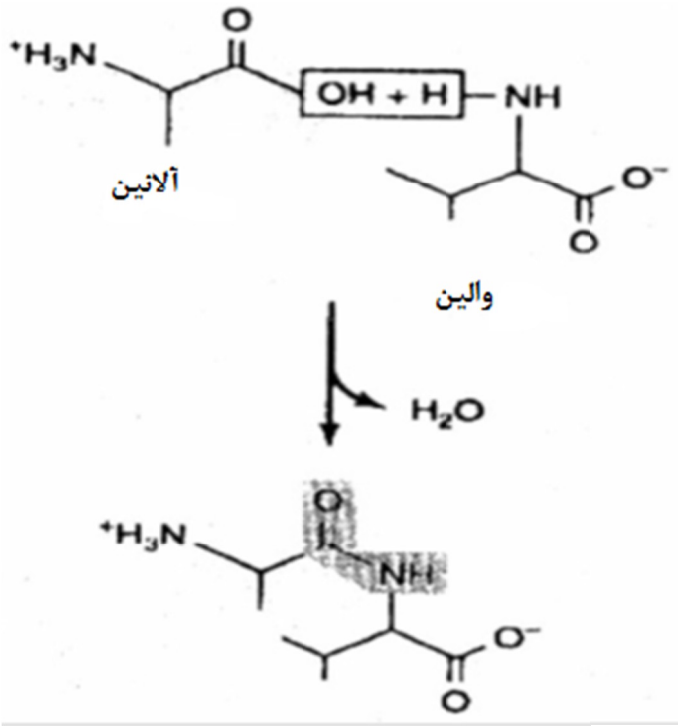
۱ ۲ پروتئین‌ها

پروتئین‌ها از تعداد زیادی اسیدهای آمینه ساخته شده‌اند، این اسیدهای آمینه توسط پیوندهای پپتیدی به یکدیگر اتصال یافته و زنجیر طویلی را ایجاد کرده‌اند (شکل ۱-۳). با توجه به‌اینکه در جانداران انواع و اقسام پروتئین‌های مختلف وجود دارد، تعجب آور است که در سنتز زنجیرهای پلی‌پپتیدی، تنها ۲۰ نوع اسید آمینه مختلف شرکت می‌جوید. ولی باید توجه داشت اگر یک زنجیر پلی‌پپتیدی را که دارای ۵۰ اسید آمینه است در نظر بگیریم تنها با تغییر ترتیب قرار گرفتن این اسیدهای آمینه می توان سنتز ($۲۰^{۵۰}$) زنجیر پلی پپتیدی مختلف را پیش بینی کرد [۸].



شکل ۱ ۳ نمایی از یک زنجیر پپتیدی

پیوند پپتیدی از ترکیب عامل کربوکسیل یک اسید آمینه و عامل آمین اسید آمینه دیگر با ازدست دادن یک مولکول آب به‌وجود می‌آید (شکل ۱-۴):



شکل ۱-۴ - پیوند پپتیدی و نحوه‌ی ایجاد آن

جسمی که از ترکیب دو اسید آمینه به‌وجود آمده یک دی‌پپتید است. در صورتی که تعداد اسید آمینه را زیاد کنیم با سه اسید آمینه یک تری‌پپتید و با چهار اسید آمینه یک تتراپپتید و غیره به‌دست می‌آید. هنگامی که تعداد اسیدهای آمینه زیاد باشند پپتیدی که به‌دست می‌آید پلی‌پپتید نامیده می‌شود. معمولا پلی‌پپتیدی را که وزن مولکولی آن از ۵۰۰۰ دالتن بیشتر باشد پروتئین می‌نامند [۹].

۱-۲-۱ پیوند پپتیدی

با مطالعاتی که پالینگ[1] و همکارانش بوسیله پرتو X انجام دادند توانستند ساختمان دقیق پیوند پپتیدی را معین نمایند. این دانشمندان به این نتیجه رسیدند که فاصله بین NH– و CO– در یک پیوند پپتیدی کوتاه‌تر از پیوند منفردی است که بین C و N (C-N) وجود دارد. فاصله‌ی کوتاه پیوند پپتیدی که در حدود ۱/۳۲ آنگستروم (?) است به این پیوند خاصیت پیوندهای دوگانه را می‌دهد به‌طوری که این پیوند نمی‌تواند به آسانی به دور خود چرخش کند.

[1]- Pauling