بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده شیمی

بررسی اسپکتروسکوپی و مدل‌سازی مولکولی برهمکنش ونکومایسین با DNA

پایان نامه کارشناسی ارشد شیمی تجزیه

آرمان خالدی

استاد راهنما :

پروفسور تقی خیامیان

۱۳۹۳

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده شیمی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته شیمی تجزیه آقای آرمان خالدی

تحت عنوان :

بررسی اسپکتروسکوپی و مدل‌سازی مولکولی برهمکنش ونکومایسین با DNA

در تاریخ ۱۳۹۳/۷/٦ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

۱- استاد راهنمای پایان نامه — دکتر تقی خیامیان

۲- استاد داور — دکتر محمدتقی جعفری

۳- استاد داور — دکتر محمد سراجی

سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده — دکتر علیرضا نجفی

کلیه‌ی حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه متعلق به دانشگاه صنعتی اصفهان است.

تقدیر و تشکر

حمد و سپاس یکتای بی همتا را که لطفش بر ما عیان است، ادای شکرش را هیچ زبان و دریای فضلش را هیچ کران نیست و اگر در این وادی هستیم همه محبت اوست. الهی ای مهربانتر از ما به ما، از تو می خواهم همه کسانی را که حتی ذره ای در این امر مرا یاری نموده اند، در سایه لطف و محبت بی کرانت، سلامت، شادکام و موفق بداری.

با تشکر و سپاس فراوان از استاد گرانقدرم جناب آقای پروفسور تقی خیامیان، که در طول تحصیل و نگارش این مجموعه، با راهنمایی های عالمانه و بجایشان، سکاندار شایسته ای در هدایت این پایان نامه بوده اند. همچنین از سرکار خانم دکتر ابراهیمی که همواره از راهنمایی هایشان بهره بردم و مراصمیمانه یاری کرده اند نهایت تشکر و سپاس را دارم. در پایان از اساتید محترم و بزرگوار، آقای دکتر جعفری و آقای دکتر سراجی که زحمت داوری این پایان نامه را بر عهده داشتند، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

تقدیم به :

پدر بزرگوارم

و

مادر مهربانم

کسانی که صبر، حمایت و عاطفه شان سختی راه را بر من هموار کرد. آنان که دوستشان دارم و سلامتی شان را از خداوند منان خواستارم.

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

فهرست مطالب ..... هشت
فهرست شکل‌ها ..... ده
چکیده ..... یازده

فصل اول: مقدمه

۱-۱ مقدمه ۱
۱-۲ بیوانفورماتیک ۲
۱-۳ آنتی‌بیوتیک ۲
۱-۳-۱ اطلاعات اولیه ۳
۱-۳-۲ تاریخچه ۳
۱-۳-۳ مکانیسم عملکرد آنتی‌بیوتیک‌ها ۳
الف) وقفه در سنتز سلولی ۴
ب) اثر بر روی غشاء سیتوپلاسمی ۴
ج) وقفه در سنتز پروتئین داخل باکتری ۴
۱-۴ ونکومایسین ۴
۱-۴-۱ مکانیسم اثر ۴
۱-۴-۲ موارد مصرف ۵
۱-۴-۳ متابولیسم دارو ۵
۱-۴-۴ عوارض جانبی ۵
۱-۴-۵ شرایط نگهداری ۶
۱-۵ DNA ۶
۱-۵-۱ نقش DNA در سلول‌ها ۷
۱-۵-۲ ویژگی‌های DNA ۸
۱-۵-۳ بازهای آلی DNA ۱۰
۱-۵-۴ DNA به‌عنوان هدف درمانی ۱۰
۱-۵-۵ برهمکنش‌های لیگاند با DNA ۱۱
الف) اتصال خارجی ۱۱
ب) اتصال از طریق شیار DNA ۱۱
ج) اتصال از طریق اینترکلیشن ۱۱
۱-۶ تکنیک‌های مورد استفاده برای مطالعه برهمکنش‌های دارو با DNA ۱۱
۱-۷ داکینگ مولکولی ۱۶
۱-۷-۱ انواع داکینگ مولکولی ۱۶
۱-۷-۲ کاربردهای داکینگ مولکولی ۱۶
۱-۷-۳ نرم‌افزارهای داکینگ مولکولی ۱۷
الف) نرم‌افزار آرگوس لب ۱۷

ب) نرم‌افزار اتو داک ۱۷
ج) نرم‌افزار اتو داک وینا ۱۸
۱-۸ شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (MD) ۱۸
۱-۹ مروری بر کارهای انجام شده مرتبط با این پروژه در سال‌های اخیر ۱۹
۱-۱۰ هدف از انجام این پروژه ۲۰

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱ مشخصات مواد، روش‌ها و دستگاه‌های مورد استفاده ۲۱
۲-۱-۱ مواد و حلال‌ها ۲۱
۲-۱-۲ دستگاه‌ها ۲۲
۲-۲ تهیه محلول‌های مورد نیاز ۲۲
۲-۳ تکنیک UV-Vis ۲۲
۲-۴ تکنیک فلوئورسانس ۲۲
۲-۵ مطالعات ویسکومتری ۲۳
۲-۶ تعیین نسبت استوکیومتری ونکومایسین و DNA ۲۳
۲-۷ مدل‌سازی مولکولی ۲۳
۲-۸ شبیه‌سازی دینامیک مولکولی ۲۴
۲-۸-۱ محاسبه *RMSD* ۲۴
۲-۸-۲ محاسبه شعاع چرخش (R_g) ۲۴

فصل سوم: بحث و نتایج

۳-۱ بررسی اسپکتروسکوپی و مدل‌سازی مولکولی برهمکنش ونکومایسین با DNA ۲۶
۳-۲ انواع نیروهای ممکن در برهمکنش بین ونکومایسین با DNA ۲۶
۳-۳ تکنیک UV- Vis ۲۷
۳-۴ تکنیک فلوئورسانس ۲۹
۳-۵ اتصال رقابتی بین اتیدیوم بروماید (EB) و ونکومایسین با FS-DNA ۳۲
۳-۶ تکنیک ویسکومتری ۳۳
۳-۷ روش منحنی جاب ۳۴
۳-۸ داکینگ مولکولی ۳۵
۳-۹ بررسی برهمکنش ونکومایسین با DNA ۳۶
۳-۱۰ شبیه‌سازی دینامیک مولکولی بر روی کمپلکس ونکومایسین-DNA ۳۷
۳-۱۰-۱ محاسبه *RMSD* ۳۹
۳-۱۰-۲ محاسبه R_g ۴۰
۳-۱۱ مقایسه نتایج حاصل از داکینگ مولکولی ونکومایسین با DNA قبل و بعد از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی ۴۰
۳-۱۲ نتیجه‌گیری ۴۲

پیشنهادات و آینده نگری ۴۴
منابع و مراجع ۴۵

فهرست شکل‌ها

عنوان | صفحه

شکل۱-۱ : ساختار ونکومایسین هیدروکلراید. ۵
شکل۱-۲ : ساختار DNA و بازهای موجود درآن. ۷
شکل۱-۳ : حالت‌های مختلف DNA از راست به چپ Z، B و A. ۸
شکل۱-۴ : تصویری از مارپیچ دوگانه DNA، ساختار بازها و موقعیت شیارهای اصلی و فرعی. ۹
شکل۱-۵ : ساختار شیمیایی دو رشته DNA ۱۰
شکل۳-۱ : طیف جذبی ونکومایسین در بافر تریس با pH=۷/۴ و غلظت $۱/۰۰\times۱۰^{-۴}$ M ۲۷
شکل۳-۲ : طیف جذبی ونکومایسین در غیاب (بالاترین پیک) و حضور مقادیر مختلف از FS-DNA .
غلظت ونکومایسین ثابت و برابر با $۸/۹\times۱۰^{-۵}$ M و غلظت FS-DNA در محدوده $۲/۱۱\times۱۰^{-۴}$ M – ۰ متغیر است ۲۸
شکل۳-۳ : نمودار $(\varepsilon_a-\varepsilon_f)/[DNA]$ بر حسب غلظت DNA ۲۹
شکل۳-۴ : طیف فلوئورسانس ونکومایسین در بافر تریس با pH = ۷/۴ و غلظت $۱/۰۰\times۱۰^{-۴}$ M ۳۰
شکل۳-۵ : طیف فلوئورسانس ونکومایسین در غیاب (پایین‌ترین طیف) و در حضور مقادیر متفاوت از FS-DNA .
غلظت ونکومایسین ثابت و برابر با $۱/۸\times۱۰^{-۴}$ M و غلظت FS-DNA در محدوده $۷/۳۴\times۱۰^{-۷}$ M– ۰ متغیر است ۳۱
شکل۳-۶ : نمودار نسبت شدت فلوئورسانس(F_0/F) بر حسب غلظت DNA ۳۲
شکل۳-۷ : طیف فلوئورسانس اتیدیوم بروماید-DNA در غیاب (بالاترین پیک) و حضور غلظت‌های µM ۰/۲۶، ۰/۵۲،
۰/۷۸، ۱ از ونکومایسین. غلظت DNA، µM ۲۲ و غلظت اتیدیوم بروماید، µM ۲/۲ میباشد ۳۳
شکل۳-۸ : تاثیر افزایش مقادیر مختلف از ونکومایسین بر نسبت ویسکوزیته FS-DNA در pH = ۷/۴ و دمای
۲۸ درجه سانتی‌گراد. ۳۴
شکل۳-۹ : منحنی جاب کمپلکس ونکومایسین-DNA در بافر تریس با pH =۷/۴ . ..... ۳۵
شکل۳-۱۰ : شماتیک داکینگ ونکومایسین با FS-DNA . هیدروژن‌های دارو با بازهای تیمین و سیتوزین پیوند
هیدروژنی برقرار کرده است. ۳۶
شکل۳-۱۱ : شماتیک دو بعدی از جزئیات برهمکنش ونکومایسین با FS-DNA ۳۷
شکل۳-۱۲ : سیستم مورد مطالعه در جعبه آب ۳۸
شکل۳-۱۳ : نمایش تغییرات *RMSD* کمپلکس FS-DNA با دارو در طول زمان شبیه‌سازی. ۳۹
شکل۳-۱۴ : نمایش تغییرات R_g کمپلکس FS-DNA با دارو در طول زمان شبیه‌سازی. ۴۰
شکل۳-۱۵ : شماتیک برهمکنش ونکومایسین با FS-DNA بعد از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی. ۴۱
شکل۳-۱۶ : شماتیک دوبعدی برهمکنش ونکومایسین با DNA بعد از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی. ۴۲

چکیده

در این پایان‌نامه به مطالعه تجربی و تئوری بررسی برهمکنش داروی ونکومایسین با DNA پرداخته شد. ونکومایسین یک آنتی‌بیوتیک گلیکوپپتیدی است که با اثر بر روی ساخت دیواره سلولی، برای درمان عفونت‌های باکتریایی گرم مثبت استفاده می‌شود. تغییرات طیف حاصل از روش‌های اسپکتروسکوپی جذب و فلوئورسانس، نمایانگر برهمکنش ونکومایسین با DNA می‌باشد. ثابت اتصال پیوندی(K_b) با استفاده از تکنیک جذب $۰٫۱۶۱(\pm ۰٫۰۶۴)\times ۱۰^{۵}\ M^{-۱}$ و ثابت تقویت دینامیکی(K_D)، با استفاده از روش فلوئورسانس $۷٫۲(\pm ۰٫۳)\times ۱۰^{۵}\ M^{-۱}$ به‌دست آمد. نسبت استوکیومتری اتصال کمپلکس ونکومایسین با DNA، با روش تجزیه تغییر مداوم (منحنی جاب) بررسی شد که نسبت ۱:۱ به‌دست آمد. از روش‌های محاسباتی و مدل‌سازی هم برای بررسی سایت‌های اتصال دارو و DNA، استفاده شد و مقدار ثابت اتصال بین دارو و DNA، برابر $۵٫۲۶\times ۱۰^{۵}\ M^{-۱}$ به‌دست آمد. نتایج حاصل از محاسبات تجربی و تئوری تطابق خوبی را نشان می‌دهد. مطالعه نوع برهمکنش با استفاده از تکنیک فلوئورسانس، ویسکومتری و داکینگ مولکولی انجام شد که هر سه روش، نحوه برهمکنش اینترکلیشن را نشان دادند. شبیه-سازی دینامیک مولکولی بر روی کمپلکس ونکومایسین-DNA انجام شد و نتایج حاصل نشان دادکه برهمکنش‌های هیدروفوبیک حذف و تعداد پیوندهای هیدروژنی نسبت به حالت قبل از شبیه‌سازی کاهش پیدا کرد. در پایان، سایت اتصال و نوع برهمکنش داروی ونکومایسین با DNA قبل و بعد از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی مقایسه شد.

کلمات کلیدی: داکینگ مولکولی، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، DNA، ونکومایسین

فصل اول

مقدمه

۱-۱ مقدمه

درحال حاضر DNA هدف بسیاری از داروهای مورد استفاده در بخش‌ها و آزمایش‌های بالینی است. مطالعه و بررسی DNA، برای تنظیم عملکرد سلول، تنظیم رونویسی (بیان ژن و سنتز پروتئین) و یا تداخل در تکثیر سلولی امری ضروری است. لیگاندهای کوچک با اتصال به DNA سبب تغییر شکل ظاهری و یا اختلال در عملکرد DNA می‌شوند. این لیگاندهای کوچک یا داروها، اگر باعث تغییر شکل یا توقف عملکرد DNA موجود در سلول‌ها شوند برای درمان یا کنترل یک بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱]. مطالعه برهمکنش دارو با DNA، نه‌تنها برای درک مکانیسم اثر متقابل، بلکه برای طراحی داروهای جدید، مهم و حیاتی می‌باشد. با درک بهتر مکانیسم اثر متقابل، طراحی داروهای جدید برای هدف قرار دادن DNA و غربال‌گری آنها در شرایط آزمایشگاهی امکان‌پذیر خواهد بود [۲].

۱-۲ بیوانفورماتیک

واژه بیوانفورماتیک نخستین بار در سال ۱۹۷۰ توسط پائولین هاجوگ[1] مطرح شد که به مطالعه سیستم‌های زنده توسط روش‌های محاسباتی اشاره دارد و در برگیرنده مطالعات بیوفیزیک و بیوشیمی می‌باشد [۳]. بیوانفورماتیک علم نوینی است که در آن با استفاده از کامپیوتر، نرم افزارهای کامپیوتری و بانک‌های اطلاعاتی به مطالعه مسائل بیولوژیکی به‌خصوص در زمینه‌های سلولی و مولکولی پرداخته می‌شود. در این علم با به‌کارگیری کامپیوتر سعی بر آن است تا تحقیقات وسیع‌تری در خصوص پروتئین‌ها و ژن‌ها به‌عمل آید. علم بیوانفورماتیک می‌تواند ابزاری در جهت توسعه تکنولوژی مهندسی رونویسی از روی ژنتیک و مهندسی پروتئین باشد. برخی از محققین امروزی، فصل جدیدی در حوزه علم بیوانفورماتیک معرفی می‌کنند که نام آن را زیست‌سیستم نهاده‌اند. زیست‌سیستم یا دستگاه زیستی، دست یافته جدیدی است که برای پاسخ‌گویی به مباحث پیچیده زیستی توسط محققان به‌کار می‌رود [٤]. امروزه توالی ژنوم بسیاری از موجودات ساده مانند باکتری‌ها تا موجودات بسیار پیشرفته مانند یوکاریوت‌های پیچیده شناسایی شده است. پروژه شناسایی ژنوم انسان که از سال ۱۹۹۰ آغاز شد در بهار ۲۰۰۳ پایان یافت و به این ترتیب اطلاعات کامل مربوط به توالی کروموزوم‌های انسانی به دست آمد. این حجم وسیع اطلاعات به دست آمده برای دانشمندان بسیار مفید است. این اطلاعات می‌تواند برای کشف و شناسایی پدیده‌های ناشناخته، رفع اثرات نابه‌هنجار ژنتیکی و پیش‌گویی برخی پدیده‌ها استفاده شود. با این وجود استفاده از این حجم وسیع اطلاعات پردازش نشده نمی‌تواند چندان مفید باشد. در این زمان با پیشرفت چشم‌گیر تکنولوژی اطلاعات و کاربرد آن در زمینه‌های مختلف، به نظر رسید که ترکیب دو علم زیست‌شناسی و ریاضیات می‌تواند راه‌گشا باشد. به این ترتیب، حدود اوایل سال ۱۹۷۵ بود که رشته بیوانفورماتیک با هدف استفاده از تکنیک‌های مدیریت سیستم‌های «داده» در مطالعات بیولوژیک شکل گرفت. با پیشرفت بیوانفورماتیک دخالت سایر رشته‌ها در پیشبرد کار، امری اجتناب ناپذیر بود. حجم بالای اطلاعات و پردازش آنها وجود کامپیوترهای پیشرفته‌تر را می‌طلبید. تحلیل داده‌ها و نتیجه‌گیری منطقی از آنها حضور علم آمار را در این رشته رقم زد. به این ترتیب علم بیوانفورماتیک به‌عنوان یک تخصص میان‌رشته‌ای با ادغام زیست شناسی، ریاضیات (به‌ویژه آمار)، علوم کامپیوتر و تکنولوژی اطلاعات ایجاد شد. علم بیوانفورماتیک به سرعت در حال رشد است و کاربردهای فراوانی پیدا کرده است [۷-۵].

۱-۳ آنتی‌بیوتیک[2]

آنتی‌بیوتیک به طورکلی فرآورده یا ماده‌ای است که از یک میکروارگانیسم[3] تولید یا ازآن گرفته می‌شود و میکروارگانیسم‌های دیگر را از بین می‌برد یا مانع عمل آنها می‌شود. انواع مختلف آنتی‌بیوتیک‌ها از لحاظ خصوصیات شیمیایی، فیزیکی، داروشناسی، طیف ضدمیکروبی و مکانیسم عمل با هم متفاوت هستند [۸]. آنتی-بیوتیک‌های با طیف گسترده، آنهایی هستند که در مقابل انواع مختلف میکروارگانسیم‌ها فعال می‌باشند مانند؛ تتراسایکلین که در مقابل بسیاری از باکتری‌های گرم منفی، موثر است. آنتی‌بیوتیک‌های با طیف محدود، آنهایی هستند که فقط در مقابل یک میکروارگانیسم یا طیف بسیار محدودی از میکروارگانیسم‌ها فعال می باشند مانند؛

[1] Paulien Hogeweg
[2] Antibiotic
[3] Micro organism

ونکومایسین[1] که عمدتاً در مقابل کوکسی[2]های گرم مثبت مانند استافیلوکوکوس[3]ها وانتروکوکوس[4]ها مورد استفاده قرار می‌گیرند [۹].

۱-۳-۱ اطلاعات اولیه

آنتی‌بیوتیک‌ها مواد شیمیایی هستند که از دو راه طبیعی و ساختگی به دست می‌آیند. آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی از میکروارگانیسم‌هایی مانند قارچ‌ها و باکتری‌ها گرفته می‌شوند. امروزه با پیشرفت شیمی پزشکی بیشتر آنتی‌بیوتیک‌ها، حاصل تغییرات مولکولی بر روی آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی هستند. آنتی‌بیوتیک‌ها به دو گروه عمده آنتی‌بیوتیک‌های باکتریوسید، که باعث کشتن سلول بیماری‌زا می‌شوند و باکتریواستاتیک، که باعث توقف رشد و ثابت ماندن تعداد سلول‌های بیماری‌زا هستند، طبقه بندی می‌شوند.

۱-۳-۲ تاریخچه

مدت‌ها قبل از کشف پنی‌سیلین بشر آموخته بود که بطور تجربی بعضی مواد خام را به عنوان عامل ضدمیکروب مورد استفاده قرار دهد. ۵۰۰ تا ۶۰۰ سال قبل از میلاد چینی‌ها، شیره کپک زده لوبیای شور را برای درمان عفونت‌ها بکار می‌بردند. اصطلاح آنتی‌بیوز[5] اولین بار در سال ۱۸۸۹ به وسیله ویلمن[6] برای توجیه ماهیت رقابتی جوامع بیولوژیک که درآن فقط قوی‌ترین و اصلح‌ترین زنده می‌ماند، به‌کار برده شد و چند سال بعد این اصطلاح برای آنتاگونیسم[7] میکروارگانیسم‌ها نیز مورد استفاده قرار گرفت. کشف اولین ماده آنتی‌بیوتیک به سال ۱۹۲۸ توسط فلمینگ[8] صورت گرفت، او به طور اتفاقی متوجه اثرضدباکتریایی ماده مترشحه توسط قارچ پنی‌سیلیوم نوتاتوم[9] شد [۱۰]. هاوارد فلوری[10] این ماده را تخلیص کرد و با تجویز آن موفق به درمان عفونت‌ها شد. پس از این یافته، دانشمندان مواد طبیعی دیگری را هم به عنوان آنتی‌بیوتیک به دست آوردند که شامل تتراسایکلین، استرپتومایسین و سفالوسپورین‌ها می‌شد. پس از شناسایی ساختار این مواد توسط شیمیدان‌ها، با ایجاد تغییرات در آنها انواع صنعتی آنتی‌بیوتیک‌ها تولید شدند. درنهایت انواع جدید کاملاً صنعتی آنتی‌بیوتیک‌ها با اثر بخشی بیشتر و ثبات شیمیایی بیشتر نیز تولید گردیدند [۱۱].

۱-۳-۳ مکانیسم عملکرد آنتی‌بیوتیک‌ها

آنتی‌بیوتیک‌ها بر اساس سه مکانیسم زیر باکتری‌ها را نابود می‌کنند [۹]:

---

[1] Vancomycin
[2] Cocci
[3] Staphylococcus
[4] Enterococcus
[5] Antibiosis
[6] Vilman
[7] Antagonism
[8] Fleming
[9] Penicillium Notatum
[10] Howard Florey

الف) وقفه در سنتز سلولی

برخی آنتی بیوتیک‌ها از یک طرف باعث وقفه عمل آنزیم ترانس پپتیداز[1] می‌شوند که این آنزیم در سنتز پپتیدوگلیکان[2] دیواره سلولی نقش مهمی دارد و از طرف دیگر ساختمان شیمیایی هسته این داروها به یکی از مواد تشکیل دهنده دیواره سلولی شبیه است. بنابراین در جریان بیوسنتز، در دیواره مذکور، دارو می‌نشیند و باعث می‌شود که موکوپپتیدهای دیواره باکتری ساخته نشوند و یا معیوب ساخته شوند. در نتیجه ضعف ساختمانی دیواره، باکتری به علت فشار زیاد داخلی متلاشی می‌شود واز بین می‌رود.

ب) اثر بر روی غشاء سیتوپلاسمی

آنتی‌بیوتیک‌هایی که در این گروه قرار می‌گیرند پس از عبور از دیواره سلولی وارد پرده سیتوپلاسمی می‌گردند که یک سر آنها در چربی و سر دیگرشان در پروتئین حل شده و در نتیجه بین سه لایه سیتوپلاسمی شکاف می‌اندازند که منجر به مرگ باکتری می‌گردند.

ج) وقفه در سنتز پروتئین داخل باکتری

وقفه و اختلال در سنتز پروتئین با روش‌های متفاوتی صورت می‌پذیرد، نظیر ممانعت از تقسیم DNA یا همانندسازی، ممانعت از سنتز RNA و ممانعت از سنتز زنجیره پلی‌پپتیدی که در آن آنتی‌بیوتیک‌های مختلف هر یک از روش‌های مذکور، جدا از یکدیگر عمل می‌کنند.

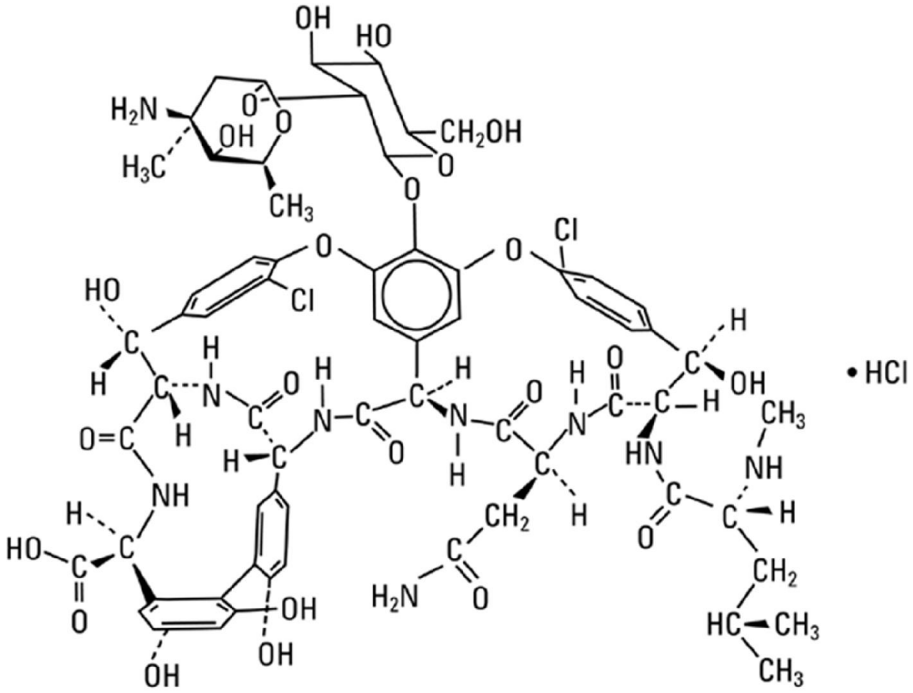
۱-۴ ونکومایسین

ونکومایسین یک آنتی‌بیوتیک گلیکوپپتیدی است که برای اولین بار در سال ۱۹۵۶ توسط الی لیلی[3] برای درمان عفونت‌های باکتریایی گرم مثبت توصیف و معرفی شد. گلیکوپپتید، پپتیدهای حاوی نیمه کربوهیدراتی هستند که به صورت کووالان به زنجیره‌های جانبی از باقی مانده‌های آمینواسیدی که پپتید را تشکیل می‌دهند، متصل می‌شوند. آنتی‌بیوتیک‌های گلیکوپپتیدی دسته‌ای از ترکیبات هستند که نقش مهمی را در درمان عفونت‌های باکتریایی ایفا می‌کنند [۱۲].

۱-۴-۱ مکانیسم اثر

ونکومایسین بر باکتری‌های گرم مثبت هوازی و بی‌هوازی مؤثر است. این آنتی‌بیوتیک با اثر بر روی ساخت دیواره سلولی، بر روی اغلب باکتری‌ها اثر باکتریسید دارد [۱۳].

[1] Transpeptidase
[2] Peptidoglycan
[3] Eli Lilly



شکل۱-۱ : ساختار ونکومایسین هیدروکلراید [۱۲].

ساختار شیمیایی ونکومایسین در شکل ۱-۱ نشان داده شده است. وزن مولکولی ونکومایسین برابر $MW = ۱۴۸۵٫۷ \ gmole^{-۱}$ است. با توجه به شکل، ونکومایسین دارای دو گروه قندی نیز می‌باشد.

۱-۴-۲ موارد مصرف

ونکومایسین در موارد محدودی ازجمله پیشگیری و درمان آندوکاردیت[1] و سایر عفونت‌های جدی ناشی از کوکسی‌های گرم مثبت (مانند استافیلوکوکوس مقاوم به پنی‌سیلین‌ها) مصرف می‌شود [۱٤].

۱-۴-۳ متابولیسم دارو

ونکومایسین پس از تزریق به‌طور گسترده در بافت‌ها و مایعات بدن منتشر می‌شود. از آنجا که اثر دارو نسبتاً طولانی مدت است، می‌توان آن را هر ۱۲ ساعت مصرف نمود. نیمه عمر دارو در بزرگسالان ٤-۱۱ ساعت است که در بعضی موارد خاص ممکن است به ٦-۱۰ روز برسد. دفع دارو عمدتاً کلیوی است [۱۵].

۱-۴-۴ عوارض جانبی

عوارضی از قبیل مسمومیت گوشی، اختلال‌های خونی شامل کاهش نوتروفیل‌های خون و به ندرت آگرانولوسیتوز، کاهش پلاکت‌های خونی، تهوع، لرز، ائوزینوفیلی، واکنش‌های آنافیلاکسی، التهاب ورید، افت فشار

[1] Endocarditis

خون، خس خس کردن، اختلال در تنفس، کهیر، خارش، برافروختگی بالاتنه، درد و اسپاسم عضلات و همچنین مسمومیت کلیوی شامل نارسایی کلیه و نفریت بین سلولی، با مصرف این دارو گزارش شده است [١٦].

١-۴-۵ شرایط نگهداری

محلول رقیق شده اولیه را تا رقیق شدن مجدد با محلول تزریقی می‌توان به مدت ٢٤ ساعت در دمای اتاق (کمتر از ٣٠ درجه سانتیگراد) و ٩٦ ساعت در یخچال (٢-٨ درجه سانتیگراد) نگهداری کرد [١٧].

جدول١-١ : اطلاعات شیمیایی و فارماکوکینتیکی ونکومایسین [١٧].

موارد	مشخصات
نام تجاری	Vancomycin
فرمول مولکولی	$C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}.HCl$
وزن مولکولی	1485.7 $gmol^{-1}$
روش مصرف	تزریقی
متابولیسم	دفع بدون تغییر
دفع	کلیوی

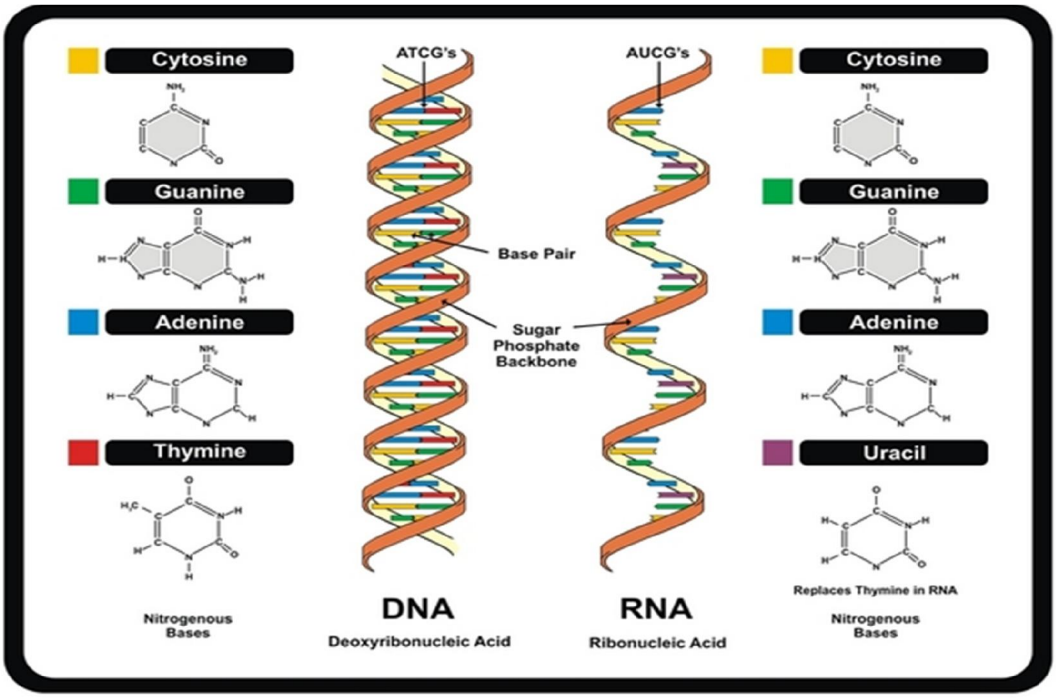
خلاصه‌ای از اطلاعات شیمیایی و فارماکوکینتیکی داروی ونکومایسین در جدول ١-١ نشان داده شده است.

DNA ١-۵

دی.ان.ای (DNA)، مخفف عبارت دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید[1]، نوعی اسیدنوکلئیک حاوی دستورالعمل‌های ژنتیکی است که برای کارکرد و توسعه بیولوژیکی موجودات زنده مورد استفاده قرار می‌گیرد. نقش اصلی مولکول DNA ذخیره‌سازی طولانی مدت اطلاعات ژنتیکی است. در سال ١٨٦٩ فردریک میشر[2] ماده‌ای را کشف کرد که بعدها DNA نام گرفت [١٨]. در سال ١٩٣٠ کاسل[3] و لوین[4] دریافتند که اسیدنوکلئوتیدی که میشر کشف کرده بود، در واقع دی‌اکسی ریبونوکلئیک اسید است. به‌طور کلی هر نوکلئیک از سه جزء، یک مونوساکارید پنج کربنی (پنتوزدی‌اکسی ریبوز)، یک گروه فسفات و یکی از چهار باز آلی نیتروژن‌دار حلقوی آدنین (A)[5]، گوانین (G)[6]، تیمین (T)[7] و سیتوزین (C)[8] تشکیل شده است که در شرایط طبیعی دارای بار منفی هستند. از این چهار باز آلی، دو باز آدنین و گوانین از بازهای پورینی (دو حلقه ای) و دو باز سیتوزین و تیمین پریمیدینی (تک حلقه ای) هستند [١٩]. در سال ١٩٥٠ اروین چارگاف[9] نشان داد که با وجود آرایش متنوع از بازهای موجود در ساختار DNA ، همواره

[1] Deoxyribonucleic acid
[2] Fredrick Misher
[3] Kossel
[4] Levene
[5] Adenine
[6] Guanine
[7] Thymine
[8] Cytosine
[9] Ervin Chargaff

نسبت باز آدنین به باز تیمین و همین‌طور نسبت باز سیتوزین به باز گوانین باهم برابر است. در سال ۱۹۵۳ واتسون[1] و کریک[2] ساختار سه بعدی رشته‌های DNA که توسط ویلکینز[3] و فرانکلین[4] تهیه شده بود را با استفاده از مطالعات پراش پرتو-X ارائه دادند [۱۹،۲۰]. در مدل آنها DNA یک مارپیچ دو رشته‌ای است که رشته‌های آن به دور یک محور مرکزی و معمولا به صورت راست‌گرد پیچ می‌خورند.



شکل ۱-۲ : ساختار DNA و بازهای موجود درآن [۱۸].

هنگام تشکیل مارپیچ رشته‌ها به صورت موازی مقابل هم قرار می‌گیرند [۲۱]. ساختار DNA و بازهای موجود درآن در شکل ۱-۲ نشان داده شده است.

۱-۵-۱ نقش DNA در سلول‌ها

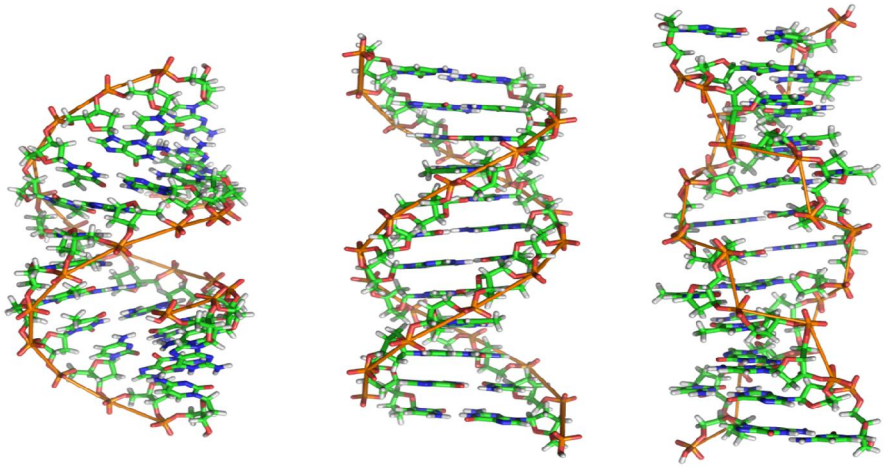
پیام‌های ژنتیکی موجود در مولکول DNA در نهایت برای مواردی چون ساخت پروتئین، خود DNA یا تنظیم استفاده از اطلاعات ژنتیکی موجود در ژن، مورد استفاده قرار می‌گیرند. از لحاظ شیمیایی DNA از دو رشته طولانی پلیمری با واحدهای ساختاری از جنس نوکلئوتید تشکیل شده است که شامل ستون‌هایی از گروه قند و فسفات هستند. اتصال نوکلئوتیدها به هم در زنجیره توسط گروه‌های هیدروکسیل کربن ′۳ و ′۵ ریبوزصورت می‌گیرد. به این اتصال فسفودی استر می‌گویند، که در نهایت اسکلت DNA ساخته می‌شود. این دو رشته DNA با هم موازی هستند [۲۲]. مولکول‌های قند از طریق چهار نوع باز آلی به یکدیگر متصل می‌باشند. توالی این چهار باز آلی باعث

[1] Watson
[2] Crick
[3] Wilkins
[4] Frankline

رمزگذاری رشته ژنتیکی می‌شود که این رمزها برای ساخت اسید آمینه که واحدهای سازنده پروتئین می‌باشند مورد استفاده قرار می‌گیرد. این رمز ژنتیکی توسط مولکول RNA در مرحله برگردان خوانده می‌شود و برای ساخت اسید آمینه مورد استفاده قرار می‌گیرد. DNA در داخل سلول به شکل سازه‌هایی به نام کروموزوم می‌باشد. دو نسخه از هر کروموزوم در زمان تقسیم سلول ساخته می‌شود. فرایند تکثیر به دو نسخه را نسخه برداری DNA می‌نامند. کروموزوم در یوکاریوت‌ها (جانوران، گیاهان، قارچ‌ها، آغازیان) در بخشی به نام هسته سلول قرار می‌گیرد در حالی که در پروکاریوت‌ها (باکتری و آرکی‌ها) در سیتوپلاسم سلول قرار دارد و جایگاه مشخصی ندارد. در داخل کروموزوم پروتئین‌های کروماتینی (کروماتین واحد سازنده DNA می‌باشد) مانند هیستون وجود دارد که وظیفه فشرده‌سازی DNA و تنظیم بیان ژن را بر عهده دارند. هیستون‌ها تحت تاثیر عوامل گوناگون از جمله استیلاسیون هیستونی بسته یا باز می‌شوند و بدین ترتیب رونویسی از ژن‌های ناحیه مربوط به آنها متوقف یا آغاز می‌شود [۲۳].

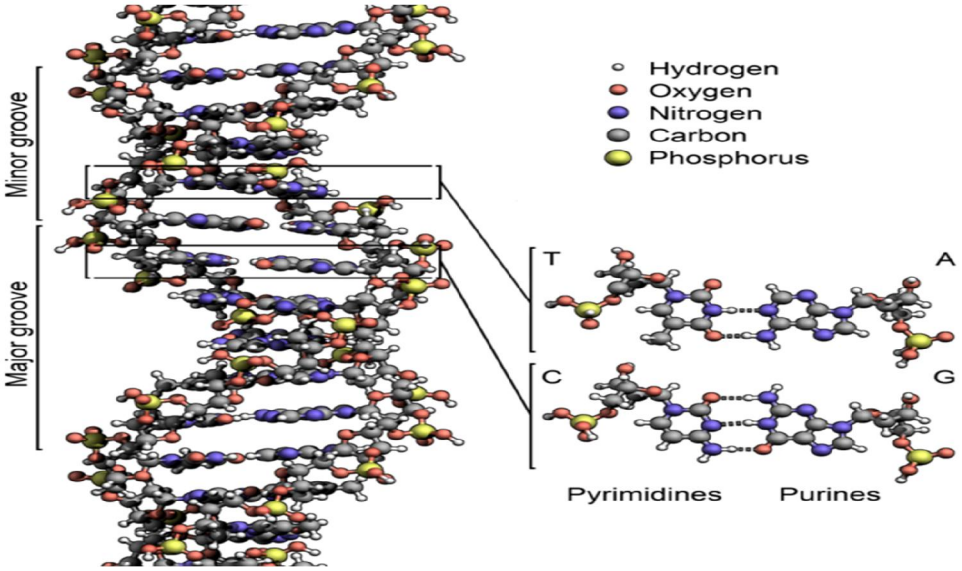
۱-۵-۲ ویژگی‌های DNA

DNA پلیمری از رشته‌های تکرار شونده شامل واحدهای سازنده‌ای از جنس نوکلئوتید می‌باشد. طول رشته زنجیرهای DNA، ۲۲ تا ۲۶ آنگستروم (۲٫۲ تا ۲٫۶ نانومتر) و عرض آن ۳/۳ آنگستروم (۰٫۳۳ نانومتر) می باشد [۲٤]. اگرچه هر واحد تکرارشونده DNA بسیار کوچک است ولی رشته پلیمری DNA ممکن است از میلیون‌ها نوکلئوتید تشکیل شده باشد. برای مثال بزرگ‌ترین کروموزوم انسان، کروموزوم شماره یک دارای ۲۲۰ میلیون باز آلی مکمل است [۲۵]. دو رشته سازنده DNA ساختار درهم پیچیده‌ای مانند مارپیچ دارند. یک باز آلی پیوند داده شده به قند، نوکلئوزید نامیده می‌شود و اگر نوکلئوزید از طریق باز خود به گروه فسفات متصل شود نوکلئوتید تشکیل می‌شود. اگر چندین نوکلئوتید با یکدیگر پیوند داده شده باشند به طور مثال در DNA به آن پلی‌نوکلئوتید گفته می‌شود. رشته‌های DNA از واحدهای متشکل از قند و گروه فسفات می باشد که به طور متناوب و تکراری در طول رشته قرار گرفته‌اند [۲٦]. قند مورد استفاده در DNA دئوکسی‌ریبوز که نوعی پنتوز (قند پنج کربنی) است تشکیل شده است. قندها توسط گروه‌های فسفری به یکدیگر پیوند داده شده‌اند. DNA می‌تواند در شرایط متفاوت به یکی از حالت‌های موجود در شکل ۱-۳ دیده شود. حالت B حالت عادی داخل سلول است [۲۷].



شکل ۱-۳ : حالت‌های مختلف DNA از راست به چپ Z، B و A [۲۷].

مارپیچ دوتایی[1] DNA در آرایش‌های متفاوت A، B و Z دیده می‌شود که آرایش B معمول‌ترین آرایش می‌باشد. این آرایش از دو رشته موازی DNA تشکیل شده است که چرخش آن در راستای محور عمود یک مارپیچ دوتایی راست‌گرد به وجود می‌آورد. چرخش مارپیچ[2] حدود ۳۶ درجه است و ۱۰ جفت باز برای هر مارپیچ پیچیده می‌شود. برآمدگی[3] هر مارپیچ، ۳٫۴ آنگستروم و ارتفاع آن حدود ۳۴ آنگستروم است. همان‌طور که در شکل ۱-۴ دیده می‌شود، در این آرایش دو نوع شیار[4] ذاتی در طول مارپیچ قابل تشخیص است. هر دو این شیارها عمیق هستند اما یکی از آنها شیار اصلی[5] با عرض بیشتر(۲۲آنگستروم) و دیگری شیار فرعی[6] با عرض کمتر(۱۲آنگستروم) می‌باشند [۲۸]. نوع دیگر آرایش معمول مارپیچ دوتایی DNA، آرایش A است. در این آرایش نیز مارپیچ DNA به صورت راست‌گرد می‌باشد. اما در مقایسه با آرایش B، این آرایش انبوه و فشرده‌تر در راستای محور چرخش است. جفت بازها با زاویه بزرگی در راستای محور مارپیچ شیب‌دار هستند که یک حفره استوانه‌ای با قطر تقریباً ۶ آنگستروم در مرکز مارپیچ به وجود می‌آورند. شیار اصلی در این آرایش کم عرض و عمیق است در حالی که شیار فرعی پهن و سطحی می‌باشد. این آرایش در مارپیچ دوتایی ریبونوکلئیک اسید[7] (RNA) دیده می‌شود. نوع سوم آرایش Z است که این آرایش به طور مثال در توالی متناوب بازهای پورین-پیریمیدین یافت می‌شود [۲۹]. Z-DNA در مقایسه با A-DNA طویل‌تر است و همچنین دارای یک چرخش چپ‌گرد می‌باشد. شیار اصلی صاف یا محدب[8] و شیار فرعی عمیق و کم عرض است [۲۶].

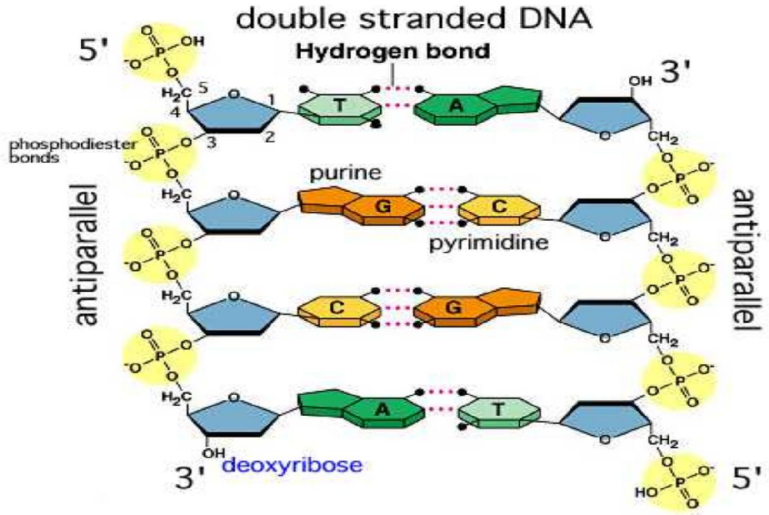


شکل۱-۴ : تصویری از مارپیچ دوگانه DNA، ساختار بازها و موقعیت شیارهای اصلی و فرعی [۲۷].

[1] Double helix
[2] Helical
[3] Rise
[4] Groove
[5] Major groove
[6] Minor groove
[7] Ribonucleic acid
[8] Convex

۱-۵-۳ بازهای آلی DNA

نوکلئوتید هر رشته از طریق بازهای آلی در هر دو رشته به یکدیگر متصل می‌شوند. این اتصال بین دو باز آلی نوکلئوتیدهای دو طرف رشته می‌باشد. به این بازهای آلی متصل به هم باز مکمل گفته می‌شود.



شکل ۱-۵ : ساختار شیمیایی دو رشته DNA [۲۷].

همان‌گونه که در شکل ۱-٤ مشاهده می‌شود، بازهای آلی به چهار شکل آدنین، تیمین، سیتوزین و باز گوانین وجود دارند که از این میان باز آدنین مکمل تیمین، و باز گوانین مکمل سیتوزین است. این توالی رشته‌ای، غیر قطبی و نامحلول در آب می‌باشد. پیوند بازهای مکمل با یکدیگر از طریق پیوند بین هیدروژن یک باز با مولکول نیتروژن یا اکسیژن باز مکمل حاصل می‌شود، این پیوند از نوع کووالانسی قوی نیست و در نتیجه به راحتی شکسته می‌شود و قابل جایگزینی است. به همین سبب زنجیره دو رشته‌ای DNA را به زیپ لباس تشبیه کرده‌اند که به راحتی در اثر فشار یا گرمای بالا از یکدیگر جدا می‌شوند [۳۰]. پیوند هیدروژنی بین دو باز مکمل آدنین-تیمین با گوانین-سیتوزین متفاوت می‌باشد. در گوانین-سیتوزین سه پیوند هیدروژنی وجود دارد در حالیکه در آدنین-تیمین دو پیوند هیدروژنی وجود دارد. در نتیجه میزان تعداد بازهای مکمل گوانین-سیتوزین تعیین‌کننده استحکام DNA می‌باشد به‌طوری‌که هرچه مقدار آن بیشتر باشد DNA مستحکم‌تر است [۳۱].

۱-۵-۴ DNA به‌عنوان هدف درمانی

با توجه به اینکه عامل اصلی بیماری‌های گوناگون از قبیل سرطان‌ها، DNA می‌باشد هدف قرار دادن DNA در درمان بیماری‌ها حائز اهمیت است. روش‌های درمانی مختلف برای هدف قرار دادن DNA وجود دارد که یکی از آنها اتصال دارو به DNA و مهار آنزیم‌هایی است که از DNA به‌عنوان سوبسترا استفاده می‌کنند. دلایل اصلی و منطقی برای هدف قرار دادن DNA در درمان سرطان‌ها بر سه اصل استوار است که عبارتند از: شکسته شدن DNA در سلول‌های سرطانی، تفاوت چرخه زندگی DNA در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های سالم و آسیب دیدگی