

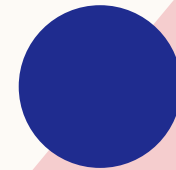


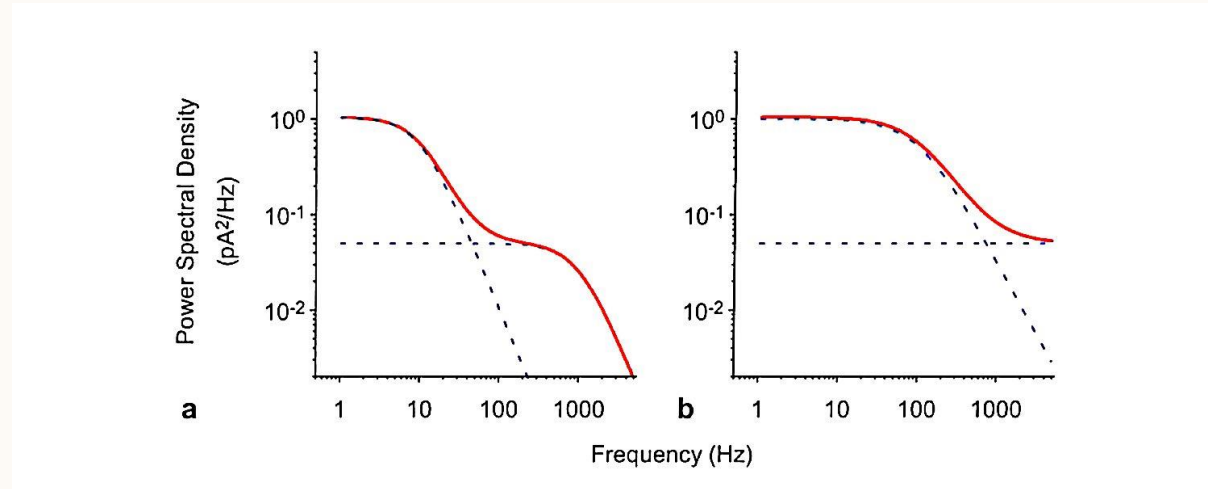


ارائه کلاسی در خصوص تکنولوژی پچ کلمپ

الکتروفیزیولوژی

سحر زارع





چگالی طیفی از نوع لورنتس (الف) با ترکیب دو مولفه با فرکانس های گوشه ای 10 و 1000 هرتز، از نوع انتشار (ب) با فرکانس گوشه ای 100 هرتز و نویز سفید مقایسه شده است. در صورت وجود تعداد نامحدودی از حالت های باز و بسته، یک طیف انتشار بدست می آید: نوسانات ناشی از گیتینگ کانال های پتاسیم را می توان با یک طیف انتشار که بر روی یک پس زمینه مستقل از فرکانس قرار گرفته است، توصیف کرد.

$$S_D = \frac{S_0}{1 + (f/f_c)^2}.$$

تجزیه و تحلیل حرکات گذرای بار (جریان های گیتینگ)

انتقال یون ها از عرض غشا توسط یک حامل یا بازو بسته شدن یک کانال، همواره با تغییرات شکل ساختاری پروتئین ناقل همراه است.

اگر این تغییرات با جابجایی های باردرداخل پروتئین جفت شده باشند، نرخ باید به پتانسیل غشا وابسته باشد. درمورد کانالی که دارای

یک حالت باز و یک حالت بسته است، توزیع بین این دو حالت را می توان با معادله فرمی محاسبه کرد.

نکته: اگر جابجایی ساختاری پروتئین با حرکت بار همراه باشد، پتانسیل غشا که نیرو محرکه این بار است مستقیماً بر سرعت بازو بسته شدن اثر می گذارد.

در این فرمول: نشان می دهیم که چگونه با تغییر پتانسیل، کانال بصورت نمایی بین حالت بازو بسته جابجا می شود

Z: بار معادل که جابجا می شود.

F: ثابت فارادی

V: پتانسیل غشا

ΔG : اختلاف انرژی بین حالات باز و بسته در پتانسیل صفر

RT: انرژی حرارتی

$$q = \frac{1}{1 + e^{-zEF/(RT)}} ,$$

الکتروفیزیولوژی خودکار

کانال های یونی و ناقل های الکتروژنیک در فرایند های فیزیولوژیکی و پاتوفیزیولوژیکی متعددی نقش دارند، بنابراین جزئی از اهداف مهم درمانی محسوب می شوند. که این ویژگی باعث شده برای درک اختلالات عملکردی فیزیولوژیک و همچنین برای جستجو و توسعه داروهایی که با عملکرد کانال یا ناقل در تعامل هستند بسیار مورد توجه قرار گیرند.

اگرچه روش های غیر الکتروفیزیولوژیکی برای سنجش یا بررسی عملکرد رسانایی های غشایی توسعه یافته اند، اما درک واقعی از عملکرد دارو بر روی کانال یونی همچنان مستلزم استفاده از روش های الکتروفیزیولوژیکی مانند گیره ی ولتاژ دو الکترودی یا گیره ی پچ نیاز دارد. زیرا تنها این تکنیک ها امکان کنترل پتانسیل غشا را فراهم می کند. متأسفانه، روش های الکتروفیزیولوژیکی کلاسیک از نظر فنی چالش برانگیز هستند، به پرسنل آموزش دیده نیاز دارند و نتایج را با توان بسیار کم تولید می کنند.

این در واقع این مشکل جدی در مواجهه با ترکیبات شیمیایی است که باید در ابتدای توسعه ی دارو برای یافتن ترکیبات پیشرواسکن شوند. از این روماشین های اتوماسیون تکنیک پچ کلمپ توسعه یافتند.

پچ کلمپ خودکار

روش پچ کلمپ خودکار در اواخر دهه 1970 توسط دانشمندان آلمانی نهر و ساکمن توسعه داده شد که در سال 1991 بخاطر اختراع خود جایزه نوبل پزشکی را دریافت کردند.

کمی پس از انتشار اولین مقالات مربوط به این روش، اولین تقویت کننده های پچ کلمپ بصورت تجاری در دسترس قرار گرفتند. این روش بسیار محبوب شد و تقریباً هر آزمایشگاه الکتروفیزیولوژی به یک دستگاه پچ کلمپ مجهز گردید. همراه با پیشرفت در زیست شناسی مولکولی و سلولی و ایجاد سیستم میان پستانداران، الکتروفیزیولوژی بیش از پیش به گلوگاهی برای غربالگری کانال های یونی جهش یافته در تحقیقات پایه و پاتوفیزیولوژیک برای غربالگری دارو در صنعت دارو سازی تبدیل شد. در نهایت، مشکل تکنیک پچ_کلمپ با توان عملیاتی بسیار پایین، هزینه بالا به ازای هر نقطه داده و نیاز به پرسنل ماهر، با توسعه ی سیستم های رباتیک حل شد که امکان خودکار سازی اکثر مراحل وقت گیر و از نظر فنی دشواری بستن دستی پچ را فراهم کرد. (همچنین به بخش 3.6 مراجعه کنید)

هنگام انجام پچینگ دستی، آزمایش با آماده سازی پیپت پچ (کشیدن پیپت، سیقل دادن حرارتی نوک، پر کردن پیپت و قرار دادن آن در نگهدارنده پیپت)، یافتن سلول مناسب زیر میکروسکوپ، حرکت دادن نوک پیپت (با فشار مثبت داخلی) نزدیک به سلول، لمس غشای سلولی و اعمال فشار منفی تا گیگا اهم تشکیل شود.

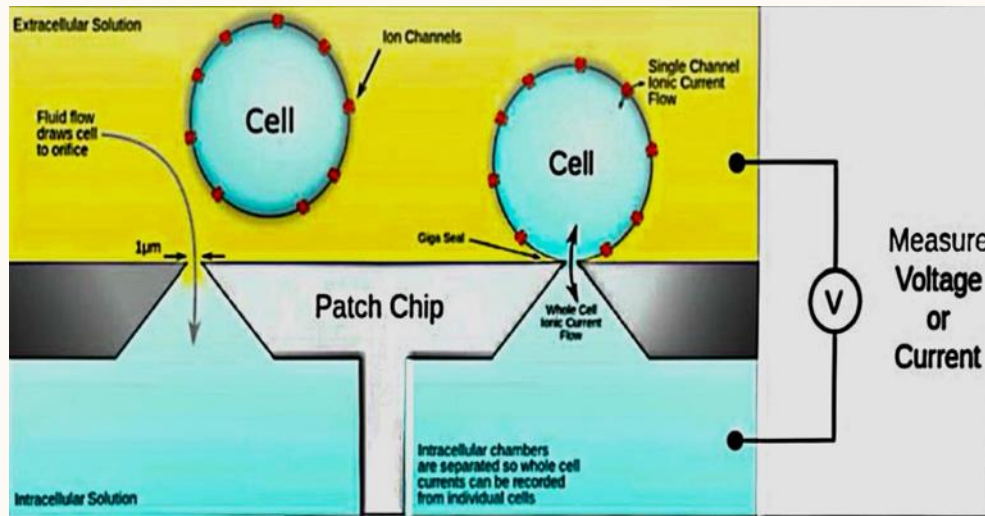
سپس باید پیکربندی مناسب یا پیکربندی کل سلول، از داخل به خارج یا از خارج به خارج ایجاد شود، تا کانال یونی یا ناقل تحت تاثیر دارو ها یا تعدیل کننده ها مشخص شود.

بیشتر سیستم های رباتیک موجود در بازار، مراحل دستی ذکر شده در بخش قبل را با استفاده از زیرلایه های تراشه ای تخت که حاوی یک یا چند دهانه به اندازه 1 تا 2 میکرومتر هستند، را خودکار سازی می کنند.

این دهانه ها پپیت های پچ کلاسیک را شبیه سازی می کنند و سلول ها بطور خودکار توسط سیستم های میکروسیال یا ربات های پپیت به درون چاهک ها منتقل می شوند.

فرایند های جذب سلول ها، تشکیل آب بندی . برقراری ضب حالت کل سلول توسط سیستم های فشار با کنترل بازخورد انجام می گیرند.

تعویض محلول نیز یا از طریق ریختن متوالی محلولها در چاهک و یا با استفاده از کانال های میکروسیال ادغام شده در صفحه تراشه ای چند چاهکی صورت می گیرد.



شماتیک یک تراشه تخت شامل سلولی قبل از نزدیک شدن به دهانه تراشه و پس از برقراری پیکربندی کل سلول را نشان می دهد.

این رویکرد تخت دو مزیت اصلی نسبت به پچ کلمپ دستی دارد: خودکارسازی، موازی سازی و سهولت در استفاده با سیستم های جدید موجود در بازار، اکنون امکان ثبت داده از حداکثر 768 سلول بصورت همزمان وجود دارد که این امر، نیاز صنعت داروسازی به استفاده از تکنیک استاندارد طلایی پچ کلمپ را در مراحل اولیه توسعه دارو برآورده می کند.

پیام های کلیدی

بسته به نوع سلول، نسخه‌های مختلفی از روش‌های «ولتاژ کلمپ» مورد استفاده قرار می‌گیرند.

الف) نسخه‌های مختلف برای فیبرهای سلولی (مانند فیبرهای عصبی و عضلانی).

ب) نسخه‌های مختلف برای سلول‌های کروی‌تر (با قطر سلولی بین ۱۰۰ میکرومتر تا ۱ میلی‌متر).

نوسانات جریان را می‌توان برای استخراج ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیک تک-پروتئین تحلیل کرد،

از جابه‌جایی‌های گذرا بار الکتریکی را می‌توان برای کسب اطلاعات درباره گیتینگ (باز و بسته شدن)

کانال و واکنش‌های جزئی سیستم‌های حامل تحلیل کرد:

الف) ظرفیت الکتریکی مؤثر بارهای جابه‌جا شده.

ب) تعداد پروتئین‌هایی که در تولید سیگنال نقش دارند.

الف) رسانایی تک-کانال.

ب) نرخ ترابران.

ج) تعداد پروتئین‌هایی که در تولید سیگنال نقش دارند.

پیش‌نیاز اصلی برای به‌کارگیری روش پچ کلمپ این است که:

(مقاومت غشای سلول بسیار بیشتر از مقاومت پپیت باشد).

بسته به پرسشی که باید به آن پاسخ داد، پیکربندی‌های مختلفی از روش پچ کلمپ امکان‌پذیر است.

تمرین ها

۱. جدولی از نسخه های مختلف ولتاژ کلمپ به همراه کاربردهای مشخصه ی هر یک تهیه کنید.
 ۲. از نوسانات جریان چه اطلاعاتی را می توان استخراج کرد و فرضیات مربوط به آن ها چیست؟
 ۳. از حرکات گذرای بار چه اطلاعاتی می توان استخراج کرد؟
 ۴. مزایای الکتروفیزیولوژی خودکار در مقایسه با روش های دستی چیست؟
 ۵. چرا صنعت داروسازی به الکتروفیزیولوژی خودکار علاقه مند است؟
- تفاوت حیاتی بین الکتروفیزیولوژی و روش های نوری هنگام مشخصه یابی کانال های یونی یا ناقل های الکتروژنیک چیست؟
- چرا روش TEVC روی تخمک ها هنوز یک روش مفید و کاربردی است؟
۸. مبنا و اساس اکثر سیستم های خود کار پچ کلمپ بر چه چیزی استوار است؟

سپاس از توجه شما