



بیست و پنجمین کنفرانس اپتیک و
فوتونیک ایران و یازدهمین کنفرانس
مهندسی و فناوری فوتونیک ایران،
دانشگاه شیراز،
شیراز، ایران.
۱۳۹۷ بهمن ۹-۱۱



بررسی فعالیت غشاءهای لیپیدی چند جزئی با استفاده از طرح لک و پیس ها

شیوا ساسان، احمد درودی، وحیده فرزام راد

گروه فیزیک دانشگاه زنجان، زنجان

چکیده - غشاءهای لیپیدی مورد مطالعه با غشاءهای سلولی تشابه دارد. در این مقاله تحولات این غشاءهای لیپیدی را به کمک طرح لک و پیس ها مطالعه می کنیم. با بررسی تابع همبستگی برای هر تصویر، میانگین طول همبستگی بین لک و پیس ها بدست می آید. نمودار طول همبستگی بر حسب زمان را رسم می کنیم، روند صعودی نمودار نشانگر میزان زیاد فعالیت نمونه است و پس از ۲۵ ثانیه، نوسان طول همبستگی حول مقداری ثابت، حاکی از پایداری اندازه مناطق فازی و نظم بلند برد آنها است. در آخر با استناد به مرجع ۲، تشابه بین دو پژوهش را در به دست آوردن نتیجه یکسان بیان می کنیم.

کلید واژه - تفکیک فازی، طرح لک و پیس، طول همبستگی، غشاء لیپیدی، نظم بلند برد.

Investigation of dynamic multicomponent lipid membranes by means of speckle patterns

Shiva Sasan, Ahmad Darudi, Vahideh Farzam Rad

Department of Physics, University of Zanjan, Zanjan

Abstract-The lipid membranes of the study are similar to cell membranes. In this article, we study the evolution of this lipid membranes by means of speckle pattern. By investigation the correlation function for each image, the mean of the correlation length between the speckles is obtained. we drawing correlation length graph versus time, the upward trend in the graph indicates the high degree of sample activity and after 25 seconds, the oscillation of the correlation length around a constant is indicative of the stability of the size of phase domains and their long-range alignment. Finally, by referring to reference 2, we express the similarity between the two studies in obtaining the same result.

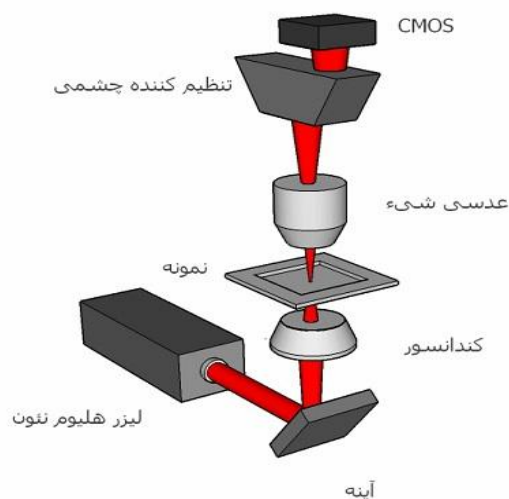
Keywords: phase separation, speckle pattern, correlation length, lipid membrane, long-range alignment.

مقدمه

غشاء سلولی بیشتر ارگان‌های زنده و بسیاری از ویروس‌ها از لیپید ساخته شده است. طبق علم امراض برخی از بیماری‌های مهم بشر، همچون تصلب شرایین، آلزایمر و سرطان شامل مولفه‌هایی از نوع لیپیدی هستند. ساختار لیپیدی غشاء و سازوکار جذب پروتئین‌های غشایی، وابسته به هم هستند. این وابستگی نتیجه حضور فضاها و جفت‌شدگی‌های میان‌غشایی است؛ که اثر مستقیمی بر بیماری سخت‌شدگی بافت‌ها به سبب عدم حضور مایلین دارد. غشاءهای لیپیدی مورد مطالعه مشابه با ترکیب چند جزئی لیپیدها و پروتئین‌ها با فازهای تفکیک یافته، می‌باشند [2]. فازهای لیوتروپیک چندلایه متعلق به غشاءهای لیپیدی دولایه، سبب ایجاد نظم اسمکتیک مایع-کریستال می‌شوند. این فازها در میان نیروهای آبگریز و در اثر برهم کنش‌های آب-لیپید تولید می‌شوند. در میان نظم مایع-کریستال اسمکتیک، هرلیپید مجزا دارای درجه آزادی مشخصی برای انتقالات درون صفحه‌ای است؛ اما به دلیل محدودیت‌های موجود در ممانعت فضایی اتم‌ها با لایه‌های مجاور، از نوسانات موجی برون صفحه‌ای آنها جلوگیری می‌شود [3]. این عامل سبب کاهش آنروپی (موسوم به هلفریچ) لیپید دولایه می‌شود، به دنبال آن برهم کنش‌های دافع میان لایه‌ای، عاملی برپایداری اسمکتیک یک بعدی (لیپید دولایه میان فازی) است [4]. کاربردهای ساختار منظم مایع-کریستال در زمینه ژن درمانی، زیست‌شناسی ترکیبی، فوتونیک و حسگرها، این ساختارها را در مرکز توجه قرار داده است [3]. در این کار، ما به بررسی فعالیت غشاءهای لیپیدی به کمک طرح‌های لک و پیس می‌پردازیم. سیر تحول نمونه و تشکیل مناطق به وسیله تفکیک فازی در لیپید چند جزئی مطالعه خواهد شد. غشاءهای چند جزئی بررسی‌های ما شامل مخلوطی از کلسترول (Chol)، اسفینگومایلین (Sm) و نوعی فسفولیپید

اشباع نشده 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-

phosphocholine (Dopc) است. از مهم‌ترین ویژگی‌های لیپید دولایه (غشاء منفرد) سیالیت ملکول‌های لیپید و تغییرات آن با دما است، که به عنوان رفتار فازی لیپید شناخته می‌شود. همه لیپیدها دارای یک دمای مشخص هستند که در آن دستخوش گذاری از فاز جامد (ژل) به مایع می‌شوند [5]. غشایی که شامل چند جزء لیپیدی متفاوت است، دارای دمای گذار ویژه‌ای می‌باشد. هنگامی که این غشاء در دمایی پایین‌تر از دمای گذارش قرار می‌گیرد، مخلوط لیپیدها به دو فاز مایع تفکیک خواهد شد؛



شکل ۱: نمایی از چیدمان آزمایش

یکی غنی از کلسترول و اسفینگومایلین به عنوان فاز Lo (liquid-ordered phase) و دیگری فاز Ld (liquid-disordered phase) که شامل Dopc اشباع نشده است. حالت غیر قابل اختلاط فازهای Lo و Ld در دولایه‌ها، وجود کشش خاصی را آشکار می‌کند، که ناشی از عدم تطابق زنجیره آبگریز ملکول‌ها در مناطق Lo و Ld است [3]. در توده‌ای از لیپیدها مناطق فازی تفکیک یافته، در یک راستا انباشته می‌شوند؛ و مجموع آنها در سراسر صدها لایه، مناطق هم راستای سه بعدی را تشکیل می‌دهد. مناطقی با فاز Lo (لیپید رفت‌ها) مسئولیت‌های

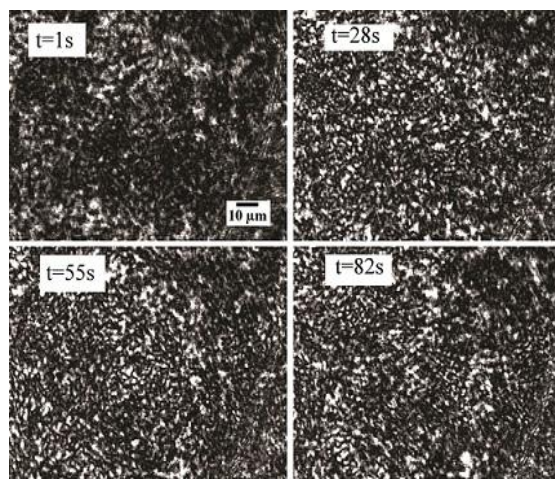
آماده سازی نمونه

لیپیدها در حالت پودری از شرکت آوانتی خریداری شده اند؛ و از کلروفرم به عنوان حلال استفاده کرده ایم. محلول لیپیدی حاصل، شامل اسفینگومایلین و Dopc با نسبت حجمی یکسان و کلسترول با غلظت تغییر یافته، از ۱۰٪ تا ۳۰٪ است. ۲/۵ میکرو لیتر از محلول را بر روی اسلاید شیشه ای قرار دادیم. پس از این که حلال خشک شد؛ نمونه را به مدت ۴۸ ساعت تحت رطوبت ۹۸٪ در دمای ۵۵-۵۸ درجه سانتیگراد قرار دادیم. سپس با کاهش دمای نمونه تا حدود ۲۲ درجه سانتیگراد (دمای اتاق) به کمک آب، مناطق فازی مجزا، شکل می گیرند. این مرحله از کاهش دما در شرایطی انجام می شود که نمونه در زیر میکروسکوپ قرار گرفته باشد.

چیدمان آزمایش و روش کار

نمونه زیر میکروسکوپ (Olympus، سری CH-2)، با عدسی شیء (40x, Olympus) قرار می گیرد. پرتو لیزر هلیوم-نئون (632.8 nm, 1mw) از میان نمونه عبور می کند، و به کمک دوربین (DCC1545M, Thorlabs) آشکار سازی می شود (شکل ۱). فیلم های ثبت شده با استفاده از نرم افزار به تصاویر متوالی تبدیل می شوند؛ و از روش عددی برای تجزیه و تحلیل طرح شدتی لک و سپس بهره خواهیم برد. فعالیت نمونه ها و ساختار پیچیده آنها، سبب تغییر فاز نور با زمان خواهد شد و یک تغییر در ساختار الگوی لک و سپس در چارچوب فضا-زمان آشکار می کند [1]. در لیپید دولایه ابتدا تفکیک فازی درون لایه ای در اثر کاهش دمای نمونه تا پایین تر از دمای گذار ویژه اش آغاز می شود، که مستقل از نظم مناطق فازی در لایه های مجاور شروع می شود؛ سپس جفت شدگی های میان لایه ای، نظم بلند برد مایع-کریستال را شکل می دهد [3]. در شکل ۲، تعدادی از تصاویر را که از مجموعه تصاویر

مربوط به دریافت و انتقال پیام را بر عهده دارند. بنابراین هم راستایی مناطق باید کانال های یون را در یک ردیف قرار دهد تا عملکرد غشاء به درستی انجام شود. این هم راستایی نتیجه ای است از اثر متقابل تفکیک فازی درون لایه ای و جفت شدگی های میان لایه ای که سبب تشکیل مناطق بزرگتر خواهد شد [3]. هنگامی که نور همدوس را بر روی نمونه می تابانیم، پرتوهای عبوری، به کمک دوربین (CMOS) آشکار سازی می شوند، و طرح شدتی لک و سپس نمایان خواهد شد. به دست آوردن طرح لک و سپس ها، روشی غیر تهاجمی و غیر مخرب برای آشکار سازی تغییرات یک سطح است [1]. در سایر روش ها همچون بررسی با میکروسکوپی تمام نگاری، نمونه باید در حالت فوکوس مشاهده شود، سپس تحولات آن ثبت شوند. فیلم های ثبت شده حاوی اطلاعاتی در مورد دامنه و فاز پرتو تابشی هستند. در آخر با تجزیه و تحلیل داده ها، تغییرات فاز پرتو تابشی به دست می آید؛ اندازه مناطق فازی لیپیدی از این بررسی ها حاصل می شود. در روش پیشنهادی ما، طرح لک و سپس در حالت ناکانونی ثبت می شود و مورد بررسی قرار می گیرد.



شکل ۲: الگوی لک و سپس حاصل از تفکیک فازی در توده لیپیدهای دولایه، با غلظت کلسترول ۲۰٪؛ که تحولات لک و سپس ها را با زمان نشان می دهد.

مناطق فازی که در هر غشاء رخ می‌دهد و سپس جفت شدگی‌های میان لایه‌ای سبب افزایش مقدار طول همبستگی با زمان می‌شوند. در انتهای بازه زمانی مقدار ثابت طول همبستگی به معنای دست یافتن به نوعی پایداری در اندازه مناطق فازی است. زیرا غشاءهای چندلایه از نظر ساختاری ستر هستند و نظم بلند بردی را از خود نشان می‌دهند [3]. همچنین مقدار ثابت این طول را می‌توان میانگین اندازه منطقه‌های فازی نمونه دانست. نتایج حاصله از این مقاله با آنچه که در مرجع [2] به دست آمده مطابقت دارد. در مرجع [2] بررسی‌ها نشان می‌دهد که با گذشت زمان، مناطق بزرگتر می‌شوند اما به دلیل افزایش جرم مناطق، سرعت رشد آنها کاهش می‌یابد تا جایی که اندازه مناطق به پایداری می‌رسند. در هر دو مقاله بر رسیدن به پایداری در اندازه مناطق اشاره شده است و تنها تفاوت بین آنها، زمان رسیدن به این پایداری می‌باشد، که آن هم وابسته به شرایط آزمایش است. بررسی‌های بیشتری در حال انجام است، تا به کمک فاصله لک و پیس‌ها از هم و یا چگالی آنها نتایج دیگری را به دست آوریم؛ نتایجی که بتوان براساس آنها ضخامت لایه های لیپیدی را اندازه‌گیری کرد.

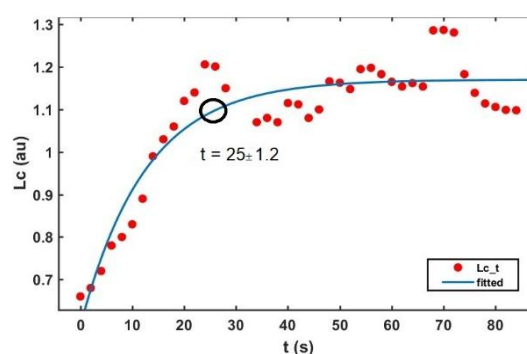
مرجع‌ها

- [1] H.J. Rabal, R.A. Braga jr, *Dynamic laser speckle and applications*, CRC Press, 2009.
- [2] V. Farzam Rad, A.R. Moradi, A. Darudi and L. Tayebi "Digital holographic microscopy of phase separation in multicomponent lipid membranes," *Biomed. Opt.*, Vol. 21, pp.126016(1-6), 2016.
- [3] L. Tayebi, Y. Ma, D. Vashaei, G. Chen, S. K. Sinha and A. N. Parikh "Long-range interlayer alignment of intralayer domains in stacked lipid bilayers," *Nat. Mater.*, Vol. 11, pp. 1074-1080, 2012.
- [4] P. Sharma, "Entropic force between membranes reexamined," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, pp. 1976-1977, 2013.
- [5] A. Johnson, L. Raff and R. Walter. (2005, October 17). *Molecular biology of the cell*, (4th ed.) [Online]. Available: <http://www.geocities.com/zrnet76/>.
- [6] J. Kim, Y.U. Nam, M. Lampert and Y.-c. Ghim "Reliability of the two-point measurement of the spatial correlation length from gaussian-shaped fluctuating signals in fusion-grade plasmas," *Nucl. Eng. Des.*, Vol. 56, 2016.

تبدیلی، انتخاب شده است، مشاهده می‌کنیم. تغییر موقعیت لک و پیس‌ها و اندازه آنها با زمان قابل توجه است.

بحث و نتیجه‌گیری

مناطق فازی تفکیک یافته و نظم بلند برد آنها را می‌توان با تحلیل تابع خود همبستگی (autocorrelation function) مطالعه کرد. تابع خود همبستگی شدت به صورت حاصل ضرب دو تابع شدتی با فاصله معین از هم تعریف می‌شود. این تابع برای بررسی داده‌های به دست آمده از فعالیت پراکنده‌های نور موجود در سطح نمونه استفاده می‌شود. تابع خود همبستگی، بیان کننده همبستگی (correlation) یک الگوی لک و پیس با کپی خودش است؛ به گونه‌ای که این کپی با فاصله همبستگی مشخصی نسبت به الگوی اصلی اعمال شود. طول همبستگی (Lc)، نوعی مقیاس طولی است که برای تخمین فاصله نقاطی با انحراف مشابه از میانگین شدت به کار می‌رود [6]. پس از محاسبه میانگین طول همبستگی برای هر تصویر (از طریق محاسبه خود همبستگی) از نمونه با غلظت کلسترول ۲۰٪، مقادیر آن را برحسب زمان مطابق شکل ۳ رسم می‌کنیم.



شکل ۳: طول همبستگی بر حسب زمان برای نمونه با غلظت کلسترول ۲۰٪. زمان رسیدن به پایداری در اندازه مناطق فازی است، خطای محاسبه شده برابر با $\pm 1,2$ می‌باشد.

طول همبستگی با گذر زمان افزایش می‌یابد و سپس نوسان در اطراف مقدار ثابتی را نشان می‌دهد. تفکیک