

الله
البر الرحيم
بسم



تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد

آقای نورا... کشاورزی رشته بیوشیمی بالینی پایان نامه کارشناسی ارشد خود را با عنوان «بررسی اثرات دوزهای سمی استامینوفن بر فعالیت ویژه آنزیم کبدی سیتوکروم های CYP1A2 و CYP2E1 و وضعیت آنتی اکسیدانی در رت های شیرخوار» در تاریخ ۱۳۹۰/۸/۳۰ ارائه کردند. بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این پایان نامه را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می کنند.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

| | | |
|---|------------------------|--------------------------|
|  | دکتر عبدالامیر علامه | (استاد راهنما) |
|  | دکتر محمد جواد رسایی | (استاد ناظر) |
|  | دکتر عباس صاحبقدم لطفی | (استاد ناظر) |
|  | دکتر علی بمان زارعی | (استاد ناظر) |
|  | دکتر سیدعلیرضا مصباح | (نماینده تحصیلات تکمیلی) |

آئین نامه پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله) ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

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

" کتاب حاضر، حاصل **پایان نامه کارشناسی ارشد** نگارنده در رشته **بیوشیمی بالینی** است که در سال **۱۳۹۰** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر عبدالامیر علامه**، از آن دفاع شده است.

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب **نورالله کشاورزی** دانشجوی رشته **بیوشیمی بالینی** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی
تاریخ و امضا

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش‌های علمی

دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهش‌های علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرح‌های تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان‌نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می‌باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان‌نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می‌باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده‌ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده‌ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته‌ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **نورالله کشاورزی** دانشجوی رشته **بیوشیمی بالینی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۷** مقطع **کارشناسی ارشد** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می‌شوم کلیه نکات مندرج در آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش‌های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته‌های علمی مستخرج از پایان‌نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین‌نامه فوق‌الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می‌دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم.»

امضا

تاریخ



دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان نامه

دوره کارشناسی ارشد در رشته بیوشیمی بالینی

عنوان

بررسی اثرات دوزهای سمی استامینوفن بر فعالیت ویژه آنزیم کبدی سیتوکروم های
CYP1A2 و CYP2E1 و وضعیت آنتی اکسیدانی در رت های شیرخوار

نگارش

نورالله کشاورزی

استاد راهنما

دکتر عبدالامیر علامه

تقدیم به :

همسر عزیز و مهربانم که با گذشت و تحمل بی پایانش موفقیت و آرامش را به من هدیه کرد. و تقدیم به فرزندم کیمیای عزیز.

تشکر و قدردانی

حمد و سپاس ذات پاک و بی همتای عبودی که به قلم قداست به انسان کرامت بخشید. ■
از پدر و مادر عزیزم به پاسخ همه زحمات و تلاش های بی دریغشان قدردانی می کنم. ■
صمیمانه ترین قدردانی ها را نثار همسر مهربانم می کنم که در لحظه لحظه زندگی و در تمام مراحل تحقیق یار و پشتیبانم بود. ■
از استاد راهنمای ارجمند جناب آقای دکتر علامه کمال تشکر را دارم که در تمام مراحل این پژوهش مرا یاری نمودند و امکانات لازم را برای پیشبرد این تحقیق در اختیار اینجانب قرار دادند. ■
از کارشناسان محترم گروه سرکار خانم ها افشار نادری، اعتمادی و بنیادق متشکرم. ■
از آقای دکتر افشین محسنی فر، خانم ناهید داوودیان و تمامی دوستان خوبم که در تمام مراحل کار بی هیچ چشمداشتی مرا یاری نمودند متشکرم. ■

با نام خدا ، با یاد خدا و برای خدا

مکاتب الهی و در راس آنها ، اسلام انسان ساز، انسان را موجودی پویا و کمال طلب می دانند. از نظر اسلام، انسان در حال تکامل است و جهت گیری او به سوی خدای تبارک و تعالی است. یکی از راههای تقرب به ذات اقدسش ، علم است. علمی که (به تعبیر علامه شهید مرتضی مطهری) زیبایی عقل است. علمی که انسان خداپرست در ذره ذره اش نشانی از آفریدگار می یابد و هر چه علمش افزون گردد ، تقربش به خدای تبارک و تعالی بیشتر می شود. و هم از این رو است که اسلام عزیز، توجهی بی نظیر به علم اندوزی و دانش اندوزی مبذول داشته است. توجهی که در هیچ مکتب دیگری، نظیر ندارد.

توصیه به علم آموزی در تعالیم بزرگان دین ، جایگاه ویژه ای دارد تا آنجا که امام صادق علیه السلام می فرمایند " مردم دو گروهند : یا عالم هستند یا جوینده علم. و دیگران که احمقان هستند و ابلهان جای در آتش خواهند داشت. "

اما علم و علم آموزی محتاج ابزاری است که مهمترین آنها کتاب است و کتاب نیز محتاج پژوهش است پژوهش حاضر که به مطالعه اثرات مقادیر سمی استامینوفن در نوزاد موش صحرایی شیرخوار بر روی فعالیت آنزیم سیتوکروم کبدی صورت گرفته ، گامی در این جهت می باشد. امید است که با کمک خداوند متعال توانسته باشیم گامی هرچند کوچک ، در این زمینه برداشته باشیم.

چکیده

استامینوفن پرمصرف ترین داروی ضد درد و ضد تب است که در کشور های مختلف مورد استفاده قرار می گیرد. در برخی از فورمولاسیون ها، استامینوفن به همراه اپیوئیدها (مخدرها) مثل کدئین، برای درمان درد های شدید تر استفاده می شود. بنابراین در بسیاری از موارد، مصرف زیاد و طولانی مدت این دارو، علت عمده ایجاد آسیب های شدید کبدی و کلیوی است. آسیب سلولی ناشی از مصرف این دارو با تبدیل به متابولیت آن -استیل پارا بنزو کوئینون ایمین (NAPQI) صورت می گیرد. چندین ایزوفرم از خانواده سیتوکروم P450 شامل CYP2E1 و CYP1A2 در تبدیل این دارو به متابولیت سمی NAPQI نقش دارند. آنزیم های سیتوکروم P450 در فاز اول متابولیسم این دارو نقش دارد. این آنزیم ها دارای چندین خانواده و زیر خانواده بوده که در بین آنها CYP2E1 و CYP1A2 در متابولیسم استامینوفن نقش دارد. این آنزیم ها در فعال کردن مواد شیمیایی خارجی و داخلی و تبدیل آن به متابولیت های سمی و سرطان زا نقش دارند.

از آنجا که در مورد اثر استامینوفن در نوزاد کمتر تحقیق شده است، تحقیق حاضر با هدف مقایسه القاء پذیری CYP2E1 و CYP1A2 توسط استامینوفن در نوزاد رت ویستار صورت گرفت به این منظور در ساعت های معین بعد از تزریق دارو، نمونه بافت کبدی از رت ها تهیه شد. همچنین در این تحقیق، اثر استامینوفن بر روی سطح پلاسمایی آنزیم های ALT و AST و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل پلاسما (FRAP) پس از تزریق دو دوز ۲۵۰ mg/kg B.W و ۴۵۰ مورد بررسی قرار گرفت. برای این کار نمونه های خون از رت ها، در ساعات معین جمع آوری شد. در مرحله بعد، فعالیت آنزیمی دو سیتوکروم دخیل در متابولیسم استامینوفن CYP2E1 و CYP1A2 در میکروزوم کبدی مورد اندازه گیری قرار گرفت و میزان تغییرات در فعالیت دو آنزیم فوق مشخص شد.

نتایج نشان داد که تزریق دوز ۴۵۰ mg/kg B.W از استامینوفن، منجر به القاء بیشتر آنزیم کبدی CYP1A2 در نوزادان رت شیر خوار تیمار شده با استامینوفن می شود. میزان القاء سیتوکروم کبدی CYP1A2، نسبت به سیتوکروم CYP2E1 در رت های شیر خواری که با استامینوفن تیمار شده بودند بیشتر می باشد. همچنین افزایش میزان فعالیت آنزیم های ALT و AST در پلاسمای نوزادان رت شیر خوار تیمار شده با استامینوفن، با میزان آسیب به سلول های (هپاتوتوکسیسیته) کبدی رابطه مستقیم دارد. همچنین تحقیق حاضر نشان داد که میزان فعالیت FRAP نیز در پلاسمای نوزادان رت شیر خوار تیمار شده با استامینوفن، نسبت به گروه کنترل افزایش می یابد که از نظر آماری معنی دار می باشد.

کلمات کلیدی: آن-استیل پارا بنزو کوئینون ایمین، آنتی اکسیدان، استامینوفن، سیتوکروم، هپاتوتوکسیسیته

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته

| | |
|----|--|
| ۲ | ۱-۱. سیتوکروم P450..... |
| ۴ | ۱-۱-۱. نام گذاری خانواده آنزیمی سیتوکروم P450..... |
| ۴ | ۱-۱-۲. مکانیسم عمل سیتوکروم P450..... |
| ۸ | ۱-۱-۳. خانواده و زیر خانواده سیتوکروم P450 در انسان..... |
| ۱۱ | ۱-۱-۴. سیتوکروم P450 در انسان..... |
| ۱۴ | ۱-۱-۵. P450 در سایر گونه ها..... |
| ۱۴ | ۱-۱-۶. تنظیم آنزیمی آنزیم های متابولیزه کننده سیتوکروم P450..... |
| ۱۵ | ۱-۲. رسپتور آریل هیدرو کربن ها..... |
| ۱۷ | ۱-۳. القاء کننده های سیتوکروم P450..... |
| ۱۹ | ۱-۴. مهار کننده های سیتوکروم P450..... |
| ۲۲ | ۱-۵. استامینوفن..... |
| ۲۲ | ۱-۵-۱. تاریخچه استامینوفن..... |
| ۲۴ | ۱-۵-۲. خصوصیات و ساختمان شیمیائی استامینوفن..... |
| ۲۵ | ۱-۵-۳. متابولیسم سم زدایی استامینوفن..... |
| ۲۸ | ۱-۵-۴. مکانیسم اثرات ضد درد و ضد تب استامینوفن..... |
| ۲۹ | ۱-۵-۵. مکانیسم ایجاد سمیت با استامینوفن..... |
| ۳۳ | ۱-۵-۶. عوامل موثر بر متابولیسم استامینوفن..... |
| ۳۵ | ۱-۵-۷. درمان مسمومیت با استامینوفن..... |
| ۳۶ | ۱-۶. اهداف تحقیق..... |

فصل دوم : مواد و روش ها

- ۱-۲. مواد خریداری شده از شرکت مرک آلمان..... ۳۸
- ۱-۱-۲. مواد خریداری شده از شرکت سیگما..... ۳۸
- ۲-۱-۲. سایر موارد..... ۳۸
- ۲-۲. حیوانات آزمایشگاهی و شرایط نگهداری..... ۳۹
- ۱-۲-۲. جفت گیری و جداسازی..... ۳۹
- ۲-۲-۲. تیمار حیوانات با استامینوفن..... ۴۰
- ۳-۲-۲. نحوه محاسبه دوز ۲۵۰ و ۴۵۰..... ۴۰
- ۳-۲. طرز تهیه بافر فسفات با غلظت ۱۰۰ mM و $pH=7/4$ ۴۱
- ۴-۲. طرز تهیه بافت هموزن و خونگیری از حیوانات..... ۴۱
- ۱-۴-۲. طرز تهیه میکروزوم..... ۴۲
- ۵-۲. طرز تهیه محلول های مورد نیاز جهت روش برادفورد..... ۴۳
- ۱-۵-۲. اندازه گیری غلظت پروتئین به روش برادفورد..... ۴۳
- ۲-۵-۲. رسم منحنی غلظت پروتئین به روش برادفورد..... ۴۳
- ۶-۲. روش FRAP..... ۴۵
- ۱-۶-۲. آزمون FRAP..... ۴۵
- ۳-۶-۲. رسم منحنی استاندارد برای روش FRAP..... ۴۶
- ۴-۶-۲. طرز تهیه محلول های مورد نیاز جهت روش کار FRAP..... ۴۸
- ۷-۲. روش CYP1A2..... ۴۸
- ۱-۷-۲. اندازه گیری آنزیم CYP1A2..... ۴۸
- ۲-۷-۲. روش انجام آزمایش CYP1A2..... ۴۸
- ۳-۷-۲. رسم منحنی استاندارد برای اندازه گیری CYP1A2..... ۵۰
- ۴-۷-۲. محاسبه فعالیت ویژه سیتوکروم CYP1A2..... ۵۱
- ۸-۲. روش CYP2E1..... ۵۲
- ۱-۸-۲. اندازه گیری آنزیم CYP2E1..... ۵۳
- ۲-۸-۲. روش انجام آزمایش CYP2E1..... ۴۳
- ۳-۸-۲. رسم منحنی استاندارد برای اندازه گیری CYP2E1..... ۵۴
- ۴-۸-۲. محاسبه فعالیت ویژه سیتوکروم CYP2E1..... ۵۵
- ۹-۲. روش فعالیت آنزیم ALT و AST..... ۵۷
- ۱-۹-۲. اندازه گیری فعالیت آنزیم ALT و AST..... ۵۷
- ۱۰-۲. آنالیز آماری..... ۵۹

فصل سوم : نتایج و یافته ها

| | |
|----|--|
| ۶۲ | ۱-۳. اثر استامینوفن بر میزان پروتئین نمونه های میکروزوم کبد..... |
| ۶۴ | ۲-۳. CYP1A2..... |
| ۶۴ | ۱-۲-۳. فعالیت آنزیم CYP1A2..... |
| ۶۵ | ۲-۲-۳. فعالیت ویژه CYP1A2..... |
| ۶۸ | ۳-۳. CYP2E1..... |
| ۶۶ | ۱-۳-۳. فعالیت آنزیم CYP2E1..... |
| ۶۸ | ۲-۳-۳. فعالیت ویژه CYP2E1..... |
| ۶۹ | ۴-۳. اثر استامینوفن بر میزان فعالیت آنزیم های کبدی AST و ALT پلاسما..... |
| ۶۹ | ۱-۴-۳. غلظت آنزیم کبدی AST..... |
| ۷۰ | ۲-۴-۳. غلظت آنزیم کبدی ALT..... |
| ۷۱ | ۵-۳. اثر استامینوفن بر میزان فعالیت FRAP پلاسما..... |
| ۷۱ | ۱-۵-۳. غلظت FRAP نمونه ها..... |

فصل چهارم : بحث ، نتیجه گیری و پیشنهادها

| | |
|----|---------------------------|
| ۷۳ | ۱-۴. بحث، نتیجه گیری..... |
| ۸۳ | ۲-۴. پیشنهادها..... |
| ۸۴ | فهرست منابع..... |
| ۹۵ | چکیده انگلیسی..... |

فهرست جداول

| عنوان | صفحه |
|---|------|
| جدول ۱-۱: طبقه بندی سیتوکروم P450 در انسان..... | ۷ |
| جدول ۲-۱: سیتوکروم های متابولیزه کننده زنبیوتیک هابا سوپسترا و مهارکننده انتخابی..... | ۱۲ |
| جدول ۱-۲: غلظت های مختلف استاندارد جهت روش برادفورد..... | ۴۴ |
| جدول ۲-۲: غلظت های مختلف استاندارد جهت روش FRAP..... | ۴۶ |
| جدول ۱-۳: میزان پروتئین نمونه های میکروزوم کبدی..... | ۶۲ |
| جدول ۲-۳: فعالیت سیتوکروم CYP1A2..... | ۶۴ |
| جدول ۳-۳: فعالیت ویژه سیتوکروم CYP1A2..... | ۶۵ |
| جدول ۴-۳: فعالیت سیتوکروم CYP2E1..... | ۶۶ |
| جدول ۵-۳: فعالیت ویژه سیتوکروم CYP2E1..... | ۶۸ |
| جدول ۶-۳: جدول فعالیت AST پلاسما..... | ۶۹ |
| جدول ۷-۳: جدول فعالیت ALT پلاسما..... | ۷۰ |
| جدول ۸-۳: جدول غلظت FRAP پلاسما..... | ۷۱ |

فهرست شکل ها

| عنوان | صفحه |
|---|------|
| شکل ۱-۱: ساختمان P450 و جایگاه اتم آهن در آن..... | ۳ |
| شکل ۱-۲: نقش اتم Fe در چرخه کاتالیتیکی سیتوکروم P450..... | ۶ |
| شکل ۱-۳: چرخه کاتالیتیکی سیتوکروم P450..... | ۷ |
| شکل ۱-۴: مکانیسم ملکولی فعال شدن گیرنده AHR..... | ۱۶ |
| شکل ۱-۵: ساختمان شیمیایی استامینوفن..... | ۲۴ |
| شکل ۱-۶: متابولیسم استامینوفن..... | ۲۷ |
| شکل ۱-۷: پروکسیداسیون چربی ها..... | ۳۱ |

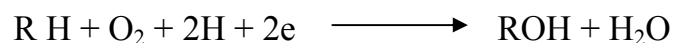
فصل اول

مقدمه و

مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱. سیتوکروم P450

خانواده p450 ، شامل گروه بزرگ و متنوعی از آنزیم ها هستند که عمل آنها کاتالیز واکنش اکسیداسیون ترکیبات آلی است. سوبستراهای آنزیم های سیتو کروم شامل متابولیت های حدواسط نظیر لیپید ها، هورمون های استروئیدی و همچنین مواد گزنبیوتیک شامل داروها و مواد شیمیایی هستند. مهم ترین واکنشی که به وسیله این آنزیم ها کاتالیز می شود، واکنش های منو اکسیداسیون^۱ هستند. بدین معنا که در این واکنش ها یکی از اتم های اکسیژن در داخل سوبسترای مورد کاتالیز وارد می شود و اتم دیگر اکسیژن به ملکول آب احیاء می شود.

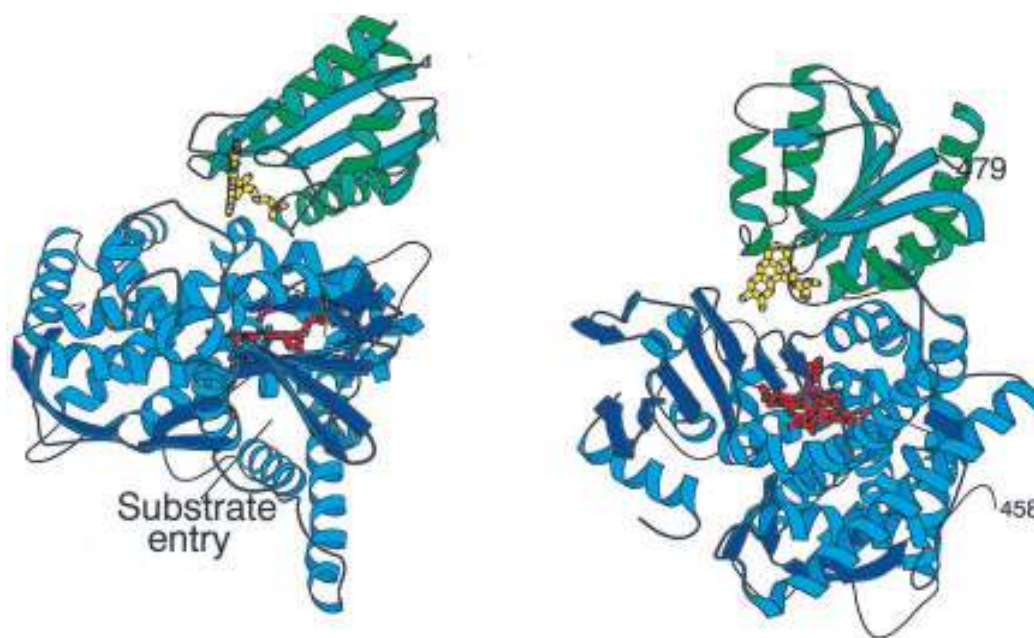


سیتوکروم های P450 ، به خانواده ایی از پروتئین های حاوی کوفاکتور هم^۲ ، به نام همو پروتئین ها تعلق دارند. آنزیم های سیتوکروم، طیف وسیعی از مواد کوچک و بزرگ را به عنوان سوبسترا در واکنش های آنزیماتیک مورد استفاده قرار می دهند. و آنها یک واحد چند جزئی متصل به یکدیگر را به عنوان زنجیره انتقال الکترون در ساختمان خود تشکیل می دهند که به نام سیستم حاوی P450 معروف است [۱].

1-monooxidation

2-hem

فعال شدن و انتقال اکسیژن ملکولی به سوپسترا ، به وسیله آنزیم های حاوی آهن اولین بار به وسیله دانشمندی به نام Hayaish در سال ۱۹۵۰ مطرح شد. او با ردیابی اتم های نشان دار شده اکسیژن که با ایزوتوپ های مختلف نشان گذاری شده بودند این عقیده را که برای سالیان زیادی تصور می شد که که ملکول های اکسیژن در واکنش های بیولوژیکی منحصر از ملکول های آب تامین می شوند را باطل کرد. در بیوسنتز کلسترول از اسکوالن نیز ملکول اکسیژن نقش فعال ایفاء می کند. به طور کلی در این واکنش ها یکی از اتم های اکسیژن از ملکول اکسیژن به سوپسترا منتقل می شود در حالی که اتم دیگر به ملکول آب منتقل می شود و به همین خاطر به واکنش های منو اکسیداسیون شهرت دارند [۲].



شکل ۱-۱ : ساختمان سیتوکروم P450 و جایگاه اتم آهن در آن

تصویر از رفرنس شماره [۳] گرفته شده است.

۱-۱-۱. نام گذاری سیتو کروم P450

نام گذاری لغوی P450 ، بر اساس محل آنها در سیتوزول^۱ سلول ، و همچنین خصوصیات اسپکتروفوتومتریک^۲ آنها صورت گرفته است. هنگامی که Fe موجود در ملکول هم احیاء می شود نور را در طول موج 450 nm جذب می کند که به نام نوار سره معروف است. آنزیم های سیتوکروم، در همه سلسله های موجودات زنده اعم از حیوانات، گیاهان، قارچها، باکتری ها و..... یافت می شوند. نامگذاری آنزیم های سیتو کروم ، مطابق قرارداد بین المللی بدین صورت است که بعد از واژه CYP که مخفف سیتوکروم است یک عدد عربی که نشانگر خانواده است می آید بعد از آن یک حرف بزرگ که نشان دهنده زیر خانواده است استفاده می شود و یک عدد عربی دیگر که به دنبال این حرف بزرگ به عنوان ترتیب کشف آنها می آید استفاده می شود. همچنین نامگذاری ژن این آنزیمها ، مطابق همین قاعده ولی با حروف ایتالیک صورت می گیرد. البته در بعضی مواقع نامگذاری از این قاعده کلی پیروی نمی کند و بر اساس خاصیت کاتالیزی آنزیم یا نام سوبسترای که استفاده می کند صورت می گیرد [۴].

۱-۱-۲. مکانیسم عمل سیتوکروم P450

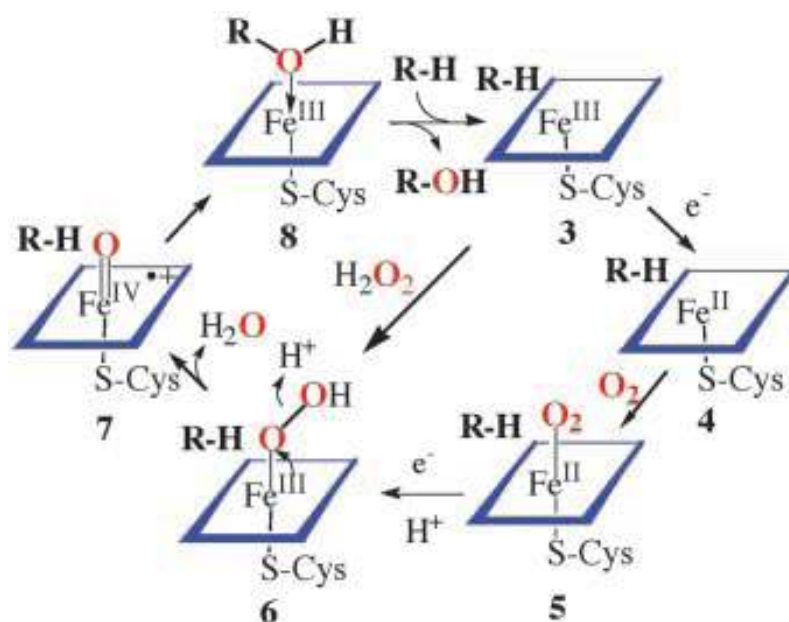
به خاطر طیف وسیعی از واکنش ها که به وسیله P450 کاتالیز می شود، ممکن است خصوصیات کاتالیزی و توانایی کاتالیزی در بعضی از جنبه ها متفاوت باشد. اما به طور کلی واکنش هایی که به وسیله آنها کاتالیز می شود شامل مراحل زیر است.

1-Cytosol

2-Chorome

- ۱- ابتدا سوبسترا به جایگاه فعال آنزیم متصل می شود و در ارتباط نزدیکی با گروه پروستتیک هم قرار می گیرد اتصال سوبسترا به جایگاه فعال باعث تغییر در شکل فضایی جایگاه فعال می شود و سبب جابجا شدن یک ملکول آب از موقعیت کوئوردینانس اتم آهن چسبیده به ملکول هم میشود. در بعضی از مواقع ، به جابجا شدن ملکول آب، تغییر حالت اتم آهن از حالت Low spin به High spin در ملکول هم صورت می گیرد و این حالت ها منجر به تغییر در خصوصیت نوری آنزیم در طول موج های ۴۰۰ nm و ۳۹۰ nm می شود.
- ۲- ابتدا سوبسترا به جایگاه فعال آنزیم متصل می شود و در ارتباط نزدیکی با گروه پروستتیک هم قرار می گیرد اتصال سوبسترا به جایگاه فعال باعث تغییر در شکل فضایی جایگاه فعال می شود و سبب جابجا شدن یک ملکول آب از موقعیت کوئوردینانس اتم آهن چسبیده به ملکول هم میشود. در بعضی از مواقع ، به جابجا شدن ملکول آب، تغییر حالت اتم آهن از حالت Low spin به High spin در ملکول هم صورت می گیرد و این حالت ها منجر به تغییر در خصوصیت نوری آنزیم در طول موج های ۴۰۰ nm و ۳۹۰ nm می شود.
- ۳- در مرحله بعد تغییر در حالت الکترونیکی جایگاه فعال منجر به انتقال یک الکترون از NADPH از طریق آنزیم ردوکتاز می شود و آهن فریک (اکسید شده) در جایگاه فعال آنزیم به آهن فرو (احیاء شده) تبدیل می شود.
- ۴- سپس ملکول اکسیژن به طور کووالانسی به آهن هم، در موقعیت کوئوردینانس متصل شده و با انتقال الکترون از اسید آمینه سیستئین به آن به مقدار بیشتری فعال می شود.
- ۵- الکترون دوم که از طریق زنجیره انتقال الکترون منتقل می شود هر دو اکسیژن را فعال می کند و حد واسط ناپایدار پروکسو^۱ را ایجاد می کند.
- ۶- این حدواسط ناپایدار پروکسو، که در مرحله قبل تولید شده بود به سرعت به وسیله ملکول آب یا به وسیله زنجیره اسید آمینه های محصور در آن، به تعداد دو بار پوتونه می شود که سبب آزاد شدن یک ملکول آب و تشکیل یک گروه فعال پروکسو^۲ iron-oxo می شود. بعد از اینکه محصول از جایگاه فعال آنزیم جدا شد، آنزیم دوباره به حالت اول بر می گردد [۵].

مسیر جایگزینی دیگری که برای سیستم منو اکسیژناسیون شناخته شده است به نام مسیروکسیدانت^۱ معروف است. واز طریق اکسیژن دهنده های تک بنیانی^۲ نظیر پروکسید ها و هیپوکلریت و..... صورت می گیرد و می تواند منجر به ایجاد حد واسط Iron-Oxo شود که بدون اینکه مراحل ذکر شده قبلی صورت گیرد می تواند تشکیل شود[۶].



شکل ۱-۲: نقش اتم آهن در چرخه کاتالیتیکی سیتوکروم P450

ملکول اکسیژن با کمک اتم آهن و اسید آمینه سیستمین فعال می شود و حدواسط ناپایدار پروکسو ایجاد

می شود که در مرحله بعد به ملکول آب تجزیه می شود.

1- Peroxidant Shunt

2- Single-oxygen donor