

دانشگاه علوم پزشکی تهران
دانشکده داروسازی

پایان نامه :
برای دریافت درجه دکترا در داروسازی

موضوع :

استخراج آنزیم CPK از جفت مادران ایرانی و خالص سازی ایزوآنزیم BB

استاد راهنما :

سرکار خانم دکتر پروین پاسا لار

نگارش :

ناصر صدقات زاده

شماره پایان نامه : ۳۰۱۹

سال تحصیلی : ۱۳۷۱-۷۲

۱۷۳۰۷

۳۱۵

بنام خدا

حمد و سپاس تنها شایسته خداوندی است که
ما را آفرید و چراغ هدایت که همانا ارجمندترین
نعمت هاست را به دستان امین راز خود، بنده خاص
خود محمد (ص) - کسی که یقین سیرابش نکرد و در
شب معراجی آنچنان شگرف به عالم "حضور" پای
گذاشت - فرا راهمان روشن ساخت .

این مجموعه با سپاس از پدر و مادرم

به پیشگاه اساتید ارجمند

دکتر پروین پاسالار

و دکتر ناصر ملک نیا

تقدیم می گردد.

با سپاس فراوان از :

دکتر سید مجتبی طباطبایی

دکتر بیژن فرزامی

دکتر اسماعیل علمی آخونی

دکتر بهزاد جلیلی

دکتر نرگس یاسا

دکتر مهین زهرایی

دکتر پوران‌دخت عصفدی فر

دکتر فریبا نباتچیان

دکتر فیروزه پور کبیرره

دکتر احمد رضا شاموردی

دکتر سعید عبدالوهابی

دکتر میرحسن قاضی شیراز

که همواره از مساعدتها و راهنمایی‌های روشنگرانه ایشان بهره‌مند
بوده‌ام.

فهرست :

۱	صفحه	مقدمه
۵	صفحه	تاریخچه
۹	صفحه	روش کار
۱۲	صفحه	اندازه گیری غلظت پروتئین بروش برادفورد روش اندازه گیری فعالیت آنزیم CK به
۱۷	صفحه	شیوه کلریمتری روش اندازه گیری فعالیت آنزیم CK به
۲۲	صفحه	شیوه اسپکتروفتومتری
۲۴	صفحه	مقدمه ای بر Gel filtration
۲۸	صفحه	فیلتراسیون با رزین sephadex G 100 مرحله تخلیص توسط رزین DEAE cellulose
۴۳	صفحه	به متد کروماتوگرافی Anion Exchange الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریلامید جهت
۵۲	صفحه	تائید نمودن مراحل خاص سازی به روش صفحه ای رنگ آمیزی SDS-PAGE توسط کوماسی
۶۰	صفحه	بریلیانت بلو رنگ آمیزی SDS-PAGE به روش نیترات
۶۳	صفحه	نقشه
۶۶	صفحه	روش Disc Electroforesis
۶۹	صفحه	نتایج
۷۴	صفحه	کتابنامه

بنام خدا

از دیرباز سعی بشر همواره بر این بوده است که قلمرو دانش خود را گسترش داده و همچنانکه از يك سوتا اعماق تاريخ زمين و يا ژرفاي پر شوكت كهكشانها به پيش مي رود از ديگر سوي از خود نيز غافل نشده و خويشتن را از دو بعد انفكاك ناپذير روح و جسم مورد مطالعه قرار داده و حقايق مستور اين عالم صغير را بيش از پيش از پس پرده هاي جهل كشف نمايد.

در اين راستا عنايت به اين نکته كه تعيين مقدار پاره اي از تركيبات موجود در خون انسان مي تواند راهنماي ارزنده اي در مورد شناسايي بيماريها گردد او را به مطالعه بيشتر در اين گستره پهناور برانگيخته است. كشف اين حقيقت كه غلظت خوني آنزيم كراتين فسفوكيناز در افراد مبتلا به بيماريهاي گوناگون خصوصا "افرادي كه دچار انفاركتوس ميوكارد شده باشند بطور چشم گيري افزايش مي يابد، انسان را ترغيب کرده است تا كوششهاي زيادي در راه تهيه استانداردارد قابل اعتمادي جهت اين سنجش به عمل آورد.

مطالعه بر روي بافت تازه قلب و يا مغزي انسان و حيواناتي همچون سگ، گرگ و خرگوش همه و همه نشانگر چنين انگيزه اي مي باشد.

از آنجا كه دستيابي به اين بافتها مشكل است و انجام مراحل استخراج و خالص سازي بعلت وجود چربي زياد خصوصا " در بافت مغز با مشكلات فراواني توام مي باشد در ثاني روش هاي پيشنهاده شده براي اعمال فوق الذكر از بازده چشمگيري برخوردار نبوده است.

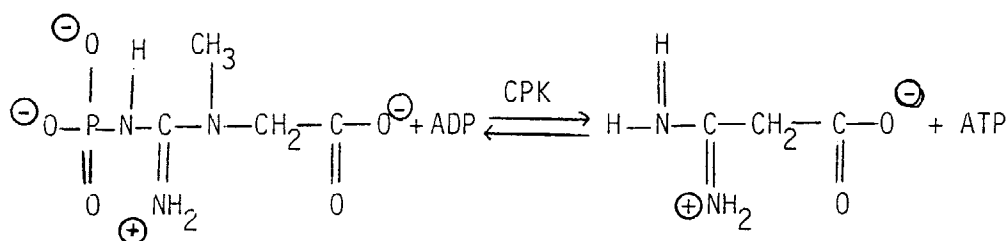
انگيزه دستيابي به منابع ارزشمندتر و سهل الوصول تر و همچنين روش هاي استخراج و خالص سازي بهتر را در انسان مي پرورد.

در این میان جفت انسان به علت سهولت دسترسی ، فراوان بودن نیز آسان بودن مراحل آماده سازی آن می تواند راهگشای نوینی در امر دست یابی بشر به آنزیم فوق الذکر باشد .

در این پروژه هدف ، جداسازی آنزیم CPK از جفت مادران ایرانی و خالص سازی ایزوآنزیم BB آن می باشد . این امر می تواند برای ساختن کیت های اندازه گیری این آنزیم در خون ، استاندارد قابل اعتمادی را فراهم آورد .

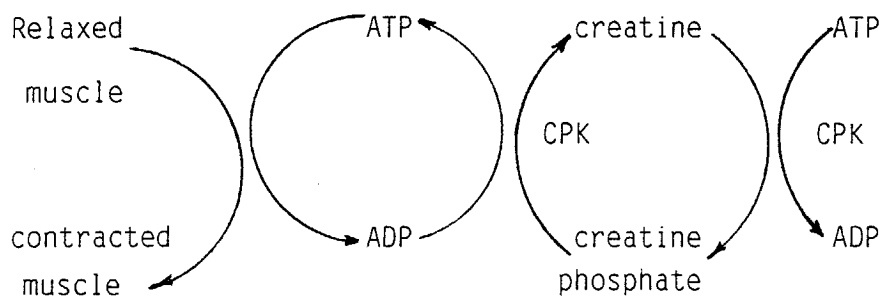
حال به شرح مختصری پیرامون آنزیم کراتین فسفوکیناز می پردازیم .

پروتئین فوق الذکر کاتالیز کننده واکنش انتقال فسفر از creatine phosphate به مولکول ADP و یا از مولکول ATP به بیومولکول creatine میباشد .



بنابراین فسفو کراتین وظیفه دارد که غلظت ATP را در سلولهای ماهیچه ای در سطح ثابت نگهدارد . این عمل به ویژه در سلولهای ماهیچه ای عضلانی که میبایست بطور پی در پی انقباض داشته باشند اهمیت زیادی دارد .

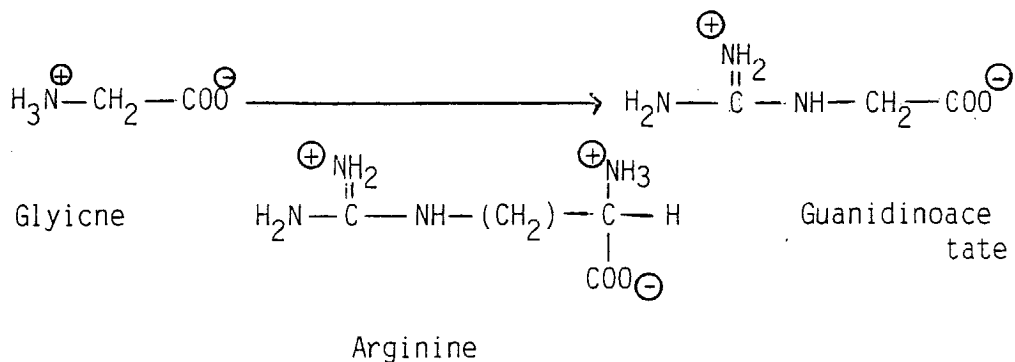
با توجه به اینکه ذخیره فسفو کراتین حدوداً سه یا چهار برابر بزرگتر از ذخیره ATP در سلول است پس فسفو کراتین قادر است که سطح ATP را در طول یک دوره کوتاه از فعالیت شدید ثابت نگه دارد این مکانیسم را در شمای زیر می توان خلاصه کرد.



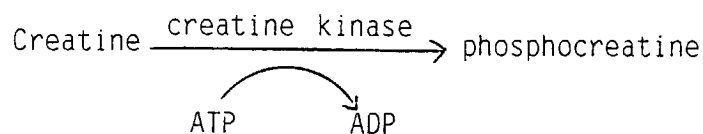
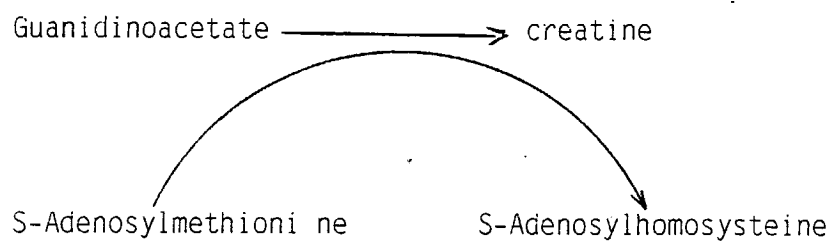
همانطور که ملاحظه می شود بیومولکول creatine بوسیله ATP مجدداً فسفریله شده و تحت اثر آنزیم CK به کراتین فسفات تبدیل می گردد. پس این واکنش برگشت پذیر است.

بیوسنتز کراتین و فسفو کراتین :

سه اسید آمینه گلیسین، آرژینین و متیونین در این بیوسنتز دخالت دارند. آرژینین دهنده گروه گوانیدین و متیونین دهنده گروه متیونین می باشد.



مرحله فوق در کلیه اتفاق می افتد سپس مولکول کراتین در کبد توسط متیونین کامل می گردد.



در بسیاری از بی مهرگان ، ماهیچه ها به جای فسفوکراتین از فسفوآرژینین جهت تامین انرژی استفاده می کنند . بطور کلی ترکیباتی از این قبیل را که قادرند انرژی را به شکل های مختلف تبدیل کنند فسفاژن گویند .

ایزوزیم های مختلف کراتین :

آنزیم CK یک مولکول Dimere است که وزن مولکولی آن 82000 دالتون می باشد این مولکول شامل دو نوع منومر M (Muscle type) و B (Brain type) می باشد که نامگذاری فوق براساس فراوانی هر

يك از منومرها در بافت های مختلف است بطوری که در مغز بیشتر ایزوزیم BB و در ماهیچه ها ایزوزیم MM و در قلب ایزوزیم MB بیشتر از سایر ایزوآنزیم ها یافت می شود.

این ایزوزیمها از روی سرعت مهاجرتشان به طرف کاتد نیز به شکل زیر شماره گذاری می شوند.

CK₁ (BB)

CK₂ (MB)

CK₃ (MM)

تاریخچه:

برای اولین بار در سال ۱۹۵۲ محققى به نام Ebashi گزارش داد که فعالیت CK در سرم بیماران در اثر پیشرفت دیستروفی ماهیچه ای افزایش می یابد.

در سال ۱۹۶۰ دکتر Dreyfus و همکارانش دریافتند که اندازه گیری CK سرم برای بیمارانی که دچار انفارکتوس میوکارد شده اند از اندازه گیری آنزیم گلوتامات اگزانوآستات ترانس آمیناز (GOT) اختصاصی تر است. وی همچنین مشاهده کرد که CK نسبت به آنزیمهای دیگر سرم حساس تر و اختصاصی تری برای شناسایی افراد مبتلا به Myopathic Disease می باشد. سپس Okinaka در سال ۱۹۶۱ گزارش داد که بیشترین افزایش مقدار CK در سرم در نتیجه پیشرفت دیستروفی ماهیچه دیده می شود.

در این میان دانشمندی به نام Colomb افزایش میزان CK در خون افراد مبتلا به انفارکتوس میوکارد را گزارش کرد در حالی که گزارش

آقای Dreyfus دال بر عدم افزایش CK در افراد مبتلا به انفارکتوس کبدی و ریوی بود که نتیجه این دو گزارش ارزش تشخیص CK جهت تمایز این ضایعات را هویدا می کند .

در سال ۱۹۶۸ Crowley نشان داد که سطح فعالیت CK در سرم انسان در سایر نارسایی‌ها غیر از نارسایی قلب افزایش پیدا نمی کند حال آنکه سطح GOT به میزان ۲۵٪ افزایش نشان می دهد. او همچنین اظهار داشت که مقدار CK در بیماران مبتلا به انفارکتوس ریوی و پرخونی سیاهرگی مجاری کبدی در سطح نرمال می باشد و این مسئله می تواند علامت مهمی جهت تشخیص نوع بیماری فرد بشمار رود.

به گفته دانشمندی به نام Smith در تمامی مواردی که او بیماران مبتلا به انفارکتوس ریوی را بررسی کرده است افزایش فعالیت CK وجود داشته اما در مواردی سطح GOT ویا HBD "کاملاً" نرمال بوده است این واقعیت به حساسیت بیشتر تست CK در تشخیص بیماران مذکور نسبت به آزمایش دو آنزیم دیگر دلالت دارد.

از آنجا که مقدار CK در بافت مغز زیاد است تحقیقات نشان داد که این آنزیم در مایع مغزی نخاعی بیمارانی با cerebrovascular-- Accident افزایش می یابد.

مطالعات بعدی وجود ارتباط بین CPK و بیماریهای مغزی (cerebrai) را مشخص نمود و تحقیقات نشان داد که تعیین مقدار CK می تواند در تعیین میزان تخریب بافت مغز مفید باشد.

بعدها آقای Nathan تعداد ۱۲ نفر از مجموع ۲۰ بیماری که در سیستم عصبی مرکزی آنها تومورهایی وجود داشت را با تعیین میزان CK در مایع مغزی نخاعی جدا کرد.

سپس معلوم شد که تعیین مقدار CK در مایع مغزی نخاعی برای تعیین آسیب مغزی از سایر پروتئین‌ها اهمیت بیشتری دارد.

در سال ۱۹۶۶ آقای Bengzon دید که CK سرم و همچنین فعالیت آلدولاز در ۳۰ نفر از ۶۰ بیمار روانی مورد ارزیابی از حد نرمال بالاتر بود و بعد از درمان با فنوتیازین‌ها به حد نرمال بازگشت.

نخسین کسی که افزایش فعالیت CK در مصرف کنندگان مزمن الکل را گزارش کرد علت این پدیده را آسیب ماهیچه‌ای ناشی از الکل برشمرد.

همچنین در موارد زیر افزایش سطح CK مشاهده می‌گردد. تزریق مکرر در عضله ، پنومونی ، افزایش ضربان قلب ، ماساژ قلب ، دیابت ، بیماریهای ریوی ، عمل جراحی ، هیپوتیروئیدیسم سندرم Guillium- Barre ، Hydrocephalus epilepsy ، Encephalitis ، حالت کما بعلت ضربات مغزی و داروها.

کوشش‌های مختلف جهت جداسازی این آنزیم:

برای اولین بار در سال ۱۹۸۰ ایزوزیم BB آنزیم Ck توسط Wang و Cushman از مغز انسان جدا شد. سپس در سال ۱۹۸۲ ایزوآنزیم

Bb از مغز انسان و سگ توسط Johnson و Miller خالص گردید. در همین سال Grace و Robert در طی تجربیات متعدده و چشمگیری توانستند از قلب و مغز انسان و مغز و قلب سگ ایزوزیمهای مختلف CK تخلیص نمایند.

در سال ۱۹۸۳ Steghens و همکارانش بافت جفت انسان را مورد ارزیابی قرار داده و آن را به عنوان یک منبع بیولوژیک خوب جهت دستیابی به این آنزیم معرفی کردند.

در ۱۹۸۴ Miller و همکارانش ایزوآنزیم BB را از برخی بافتهای سگ و انسان جدا نمودند.

سرانجام در سال ۱۹۸۹ مجدداً توجه Jian-Gue Geng و همکارانش به بافت جفت معطوف شد و توانستند با خلوص درخور توجهی این آنزیم را تهیه نمایند.

روش کار:

الف - دستگاههای مورد نیاز :

1-Ultra Centrifuge	۱- اولترا سانتریفوژ
2-Magnet Stirrer	۲- همزن مغناطیسی
3-PH Meter	۳- PH سنج
4-Hemogenizer	۴- هموژنایزر

ب - مواد مورد نیاز :

1-Ethanol %95	۱- اتانل ۹۵ درجه
2-Tris - Base	۲- تریس
3-Mercapto Ethanol	۳- مرکاپتواتانل
4-HCl 1N	۴- اسید کلریدریک ۱ نرمال

طرز تهیه بافر :

مواد مورد نیاز را برای ساختن یک لیتر بافر :

1-Tris Base	50 mmol	6.055 g
2-Mercapto Ethanol	5 mmol	0.17 ml