١٤٩٧٥٨

دانشگاه علوم پزشکی کرمان
دانشکده دارو سازی و علوم دارویی
مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس

پایان نامه دکترای عمومی دارو سازی

عنوان :

مطالعه کینتیک آنزیم تیروزیناز در حضور عصاره های متانولی و آبی مازو، هلیله کابلی و دانه کتان

توسط :
فرزانه اطلاعی

به راهنمایی :
دکتر فریبا شریفی فر
دکتر مهدی انصاری

۱۴۹۷۵۸
۱۳۸۹/۱۰/۱۳

اسفند ماه ۱۳۸۸

شماره پایان نامه: ٥٤٨

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
پژوهشگاه علوم و فناوری اطلاعات ایران
IRANDOC
مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران

تقدیم به پدرم

با تمام رود های جاری تنش،مایه استواری قامتم،او که قبل از هر قدم من قدم ها برداشت تا سالم به مقصد برسم،او که تپش مهرش تنها نوای قلبم است،او که پشتم به وجود مهربانش گرم است و هیچ برای جبران زحماتش ندارم.

هزاران بوسه بر دستان پرمهرش

تقدیم به مادرم

الهی ترین لحظه هستی‌ام، عزیز و مهربانی که وجودم را با جام محبتش لبریز ساخت، اوکه همیشه کوله بار سفرم را با دعای خیرش می‌بست و انتظاری سخت را به پایان رسانید تا شاهد چنین روزی باشد.

هزاران بوسه بر چشمان پرمهرش

تقدیم به برادرم

جاذبه لطیف عشق که با اشتیاق پر صداقتش دشت خشک را دریا می کند تا نخستین خواننده هر سرود تازه باشد تجلیگاه آرزوهایم آینده روشن اوست.

تقدیم به همسر عزیزم

او که ذره ذره وجودم از وجودش هستی می گیرد

او که عشقش همچون یک جویباردرجنبش پیوسته است

او که دستان پرمهرش پناهم، نگاه گرمش گرمی وجودم و گامهای استوارش پیشگامم بوده و هست.

تقدیم به خانواده عزیزومحترم همسرم

که تشکر واژه اندکی ست در برابر وسعت لطفشان

تنشان همیشه سالم و دلشان شاد باد.

تقدیم به محبوبه

نازنینی که گرمی وجودش در لحظه های سخت و سرد غربت همواره مرا آرام می کرد، همراه شبهای تنهایی وهمراز دلتنگی هایم. برایش از خداوند همیشه بهترین ها را خواهم خواست.

تقدیم به دوستان عزیزم

سمانه،زهرا،سوسن،دینا،حمیده

با تشکر فراوان

از اساتید ارجمند و گران قدر

سرکار خانم دکتر شریفی فر

و جناب آقای دکتر انصاری

به خاطر تمامی زحمات بی دریغ وراهنمایی هایشان در تدوین این پایان نامه

آرزوی سلامتی و موفقیت برای این بزرگواران دارم.

باتشکر از

سرکار خانم مهدوی، جناب آقای دانش پژوه، سرکار خانم عظیمی و سرکار خانم قلی زاده

خلاصه

تعیین کینتیک آنزیم تیروزیناز در حضور عصاره‌های متانولی و آبی مازو، هلیله‌کابلی و دانه‌ی کتان

مقدمه: از عوارض افزایش سنتز و توزیع اپیدرمال ملانین ایجاد تیرگی و لکه های پوستی می باشد که نیاز به پیشگیری و درمان دارد. ملانین از سوبسترای تیروزین به وسیله اکسیداسیون آنزیماتیک سنتز می شود. تیروزینازتیروزین را به لوودوپا و در ادامه به دوپاکینون و در نهایت به ملانین کاتالیز می‌کند. بنابراین مهار کننده های آنزیم تیروزیناز نقش اساسی را در درمان اختلالات پیگانتاسیون به عهده دارند و به عنوان ترکیبات سفید کننده در صنعت آرایشی و بهداشتی استفاده می شوند.

چندین مهار کننده آنزیم شامل آربوتین و کوجیک اسید نقش موثری را به عنوان ترکیبات سفید کننده و ضدلک دارا می باشند. با توجه به عوارض داروهای شیمیایی و اقبال عمومی به داروهای طبیعی، تحقیق جهت جستجوی گیاهان در این زمینه مورد توجه قرار گرفته است.

روش ها: در این تحقیق سه گیاه مازو *Quercus infectoria* Oliv.، هلیله کابلی *Terminalia chebula* Retz. و کتان *Linum usitatissimum* L. با متانول و آب عصاره گیری شده، به روش فریز دراییِنگ خشک شده و آزمایشات زیر روی آنها انجام گرفت.

مهار فعالیت آنزیم تیروزیناز با روش اسپکتروفوتومتری سنجیده می شود. در این مطالعه ۲/۸ میلی لیتر از محلول ال – تیروزین ۰,۵ میلی مولار در بافر فسفات (Ph =٦/٨) را در دمای ۳۱°C قرار می-دهیم و ۰/۱ میلی لیتر از محلول کوجیک اسید یا عصاره ی گیاهی را اضافه می کنیم و در آخر ۰/۱ میلی لیتر محلول تیروزیناز در بافر فسفات را می افزاییم (تمام محلول های مورد استفاده باید به مدت

۱۰ دقیقه قبل از انجام آزمایش در دمای $31°C$ انکوبه گردند). از کوجیک اسید به عنوان شاهد مثبت و از همین مخلوط بدون عصاره‌ی گیاهی یا کوجیک اسید بـه عنـوان کنتـرل منفـی اسـتفاده شـد. در فواصل زمانی ۱ دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه جذب محلول های مورد آزمون و همچنـین شـاهد مثبـت و شاهد منفی در طول موج ٤٩٢ نانومتر در دمای $31°C$ اندازه گیری و آنالیز اطلاعات به دسـت آمـده انجام شد.

آزمایشات در هر غلظت ۳ بار تکرار و نتایج به صورت Mean ± SD در هـر زمـان گـزارش گردیـد. چهار پارامتر اساسی Km، Vmax (از طریق معادله Lineweaver burk) IC۵۰ و Ki محاسبه شد و بـا در نظر گرفتن درصد مهار در زمان های مختلف و پارامترهای ذکر شده کینتیک آنزیم تیروزیناز مـورد بررسی قرار گرفت.

نتایج:درصدمهارعصاره متانولی مازودرمدت۳۰دقیقه شبیه به کوجیک اسیدبودودرصدمهارعـصاره‌هـای آبی ومتانولی‌کتان درمدت زمان ذکرشده پایین بود. دامنه درصد مهار در مدت زمان در نظر گرفته شده برای انجام آزمایش (۳۰ دقیقه) در مورد عصاره هـای متـانولی مـازو و هلیلـه کـابلی، رونـدی تقریبـا نزدیک به کوجیک اسید را نشان دادند و در مورد عصاره های آبی و متانولی کتان دامنه درصـد مهـار پایین بود. این موضوع در شروع، ادامه و همچنین در پایان زمان انجام آزمایش صدق می کرد. در اکثر نمونه های آزمایش شده در زمان بین (۱۵ تا ۲۵) دقیقه افزایش درصد مهار سرعت بیشتری گرفـت و نمودارهای درصد مهار در مقابل زمان در دامنه زمانی (۱۵ تا ۲۵) دقیقه‌مشخص‌تر بود. در ۵ دقیقـه ی آخر نیز در مورد اکثر نمونه ها افزایش چندانی در درصد مهـار مـشاهده نـشد و نمودارهـا بـه پلاتـو رسیدند.

در مورد Vmax بالاترین مقدار محاسبه شده مربوط به مازومتانولی و کمترین آن مربوط به کتان آبی بود (به ترتیب ۸۱/۹٦۷۲۱ و ۲۲/٦۲٤٤۳).

کمترین‌و بیشترین IC۵۰ و Ki به ترتیب مربوط به‌مازومتانولی و کتان آبی بوده است.

(به ترتیب IC۵۰: ۳/۳٤ ، Ki: ۰/۲۰۱ و IC۵۰: ۵٤۲٦/۹۵ ، Ki:۱۲٤۱/۲۹). مقادیر عددی این ۲ پارامتر در مورد هلیله متانولی و مازوآبی هم پایین بوده است.

(به ترتیب IC۵۰: ۳/۸۷ ، Ki: ۰/٤٤۰ و IC۵۰: ۱٤/٦۸۵ ، Ki: ۱/۳۵۷)

بحث و نتیجه گیری: عصاره های متانولی بسیار قوی‌تر و موثر نسبت به عصاره های آبی‌اثر مهاری روی تیروزینازنشان دادند. اثر مهار کنندگی آنزیم تیروزیناز دو گیاه مازو و هلیله کابلی بسیار قابل توجه بود و با توجه به پایین بودن مقدار محاسبه شده ی ki و IC۵۰ و بالا بودن سرعت حداکثر آنها، این دو گیاه می توانند به عنوان ترکیبات موثر مهار کننده تیروزیناز به تنهایی یا همراه با سایر عصاره های گیاهی مورد توجه قرار گیرند.

لغات کلیدی: تیروزیناز، کینتیک، ملانین، درصد مهار

Abstract

Study of tyrosinase kinetic in the presence of methanol and aqueous extracts of nutgall, Blackmyroblan and flaxseed.

Introduction: Pigmentation of skin is one of the most adverse effects of increase in sysnthesis and distribution of epidermal melanin which needs prevention and curing. Melanin is biosynthesized from tyrosin by enzymatic oxidation.

Tyrosinase, catalyzes tyrosin to L-DOPA and further oxidizes it to dopaquinone, which is used for the ultimate formation of melanin.Therefore tyrosinase inhibitors may have potential for treating abnormal pigmentation disorders and for use as skin- whitening agents in the cosmetic industry.Several tyrosinase inhibitors including arbutin and kojic acid have been widely used for the purpose of skin whitening.Considering the adverse effects of synthetic drugs, research for natural products is desired.

Methods: In the present study three plants including *Quercus infectoria* Oliv., *Terminalia chebula* Retz. and *Linum usitatissimum* L. were extracted with methanol and water,freeze dried and following experiments were done on these extracts: The inhibition of enzyme activity was measeured by spectrophotometry. At the present work, 2.8ml of L.tyrosine 0.5mM (in phosphate buffer, Ph= 6.8) was added to 0.1ml sample and 0.1ml tyrosinas solution (in phosphate buffer, Ph=6.8) and ancubated in 31^0C for ten minutes. Kojic acid and the same mixture without sample were used as positive and negative control respectively.

The absorbance of each sample was read in the 1 min intervals for 30 minutes at 492 nm, in 31^0C in triplicate.

Data was reported as Mean ± SD.Four parameters of Km, Vmax, IC50 and Ki was determined and the percent of inhibition in different times was considered.The kinetic prameters of enzyme were studied in the presence of various sample.

Results: The percent of inhibition of methanolic extract of *Q. infectoria* was similar to kojic acid. Aqueous and methanolic of *L.usitatissimum* exhibited low degree of inhibition.The range of inhibition in the initiations, through and end of reaction was the same for almost all of the tested sample.The rate of inhibition was increased at the intervals of 15-25 minutes and the inhibition was maximum in this interval.

In last 5 minutes of reaction, the rate of inhibition get to steady – state (plataeu).The highest and the least Vmax was exhibited by methanolic *Q.infectoria* and aqueous *L.usitatissimum* respectively (1.69721 and 22.62443).The least IC50 and Ki was pertained to methanolic *Q.infectoria* whereas the highest IC50 and Ki was considered by aqueous *L.usitatissimum* respectively (IC50: 3.34, Ki: 0.201 and IC50: 5426.95, Ki: 1241.294). Methanolic *T.chebula* and aqueous *Q.inffectoria* showed low IC50 and Ki.

Dicussion: In all, methanolic extracts exhibited more activity than those one of aqueous extract.Two methanolic extracts of *Q.infectoria* and *T. chebula* have shown the least IC50 and Ki in comparison to the other extracts.Regarding these values and their high Vmax, These two extracts would be valuable as a source of tyrosinase Inhibitors.

Key word: Tyrosinase, Kinetic, Melanin, Percent of Inhibition

فهرست مطـالب

عنوان صفحه

خلاصه فارسی I
خلاصه انگلیسی IV
فهرست مطالب VI

فصل اول: مقدمه

۱-۱- مقدمه و هدف ۲
۱-۲- پرتو فرابنفش خورشید و رنگ پوست ۳
۱-۳- بیماری های مرتبط با پیگمانتاسیون پوستی ٦
۱-۳-۱- ملاسما ٦
۱-۳-۲- کک و مک ۷
۱-۳-۳- هیپرپیگمانتاسیون پس از التهاب ۷
۱-۳-٤- تیرگی زیر چشم ۸
۱-٤- مهارکننده های تیروزیناز ۹
۱-٤-۱- هیدروکینون ۱۰
۱-٤-۲- آربوتین ۱۲
۱-٤-۳- کوجیک اسید ۱۲
۱-٤-٤- شیرین بیان ۱۳

عنوان صفحه

۱-٤-٥- ویتامین E ١٤
۱-٤-٦- آزلائیک اسید ١٤
۱-٤-٧- α هیدروکسی و β هیدروکی اسیدها ١٤
۱-٤-٨- لایه برداری با Resorcinol ١٥
۱-٤-٩- ویتامین C ١٥
۱-٤-١٠- سویا ١٥
۱-٤-١١- ترتینوئین ١٦
۱-٥- مشخصات گیاهان مورد استفاده ١٧
۱-٥-١- مازو (*Quercus infectoria*) ١٧
۱-٥-١-١- مشخصات کلی گیاه و محل رویش ١٧
۱-٥-١-٢- اندام دارویی و ترکیبات شیمیایی ١٨
۱-٥-١-٣- موارد استعمال ١٨
۱-٥-١-٤- موارد استعمال در پزشکی سنتی ١٨
۱-٥-٢- هلیله کابلی (*Terminalia chebula*) ٢٠
۱-٥-٢-١- مشخصات کلی گیاه و محل رویش ٢٠
۱-٥-٢-٢- اندام دارویی و ترکیبات شیمیایی ٢١
۱-٥-٢-٣- خواص درمانی ٢١

عنوان صفحه

۱-۵-۳- کتان (*Linum Usitatissimum*)..... ۲۳

۱-۵-۳-۱- مشخصات کلی گیاه و محل رویش..... ۲۳

۱-۵-۳-۲- اندام دارویی و ترکیبات شیمیایی..... ۲۳

۱-۵-۳-۳- موارد استعمال..... ۲٤

۱-۵-۳-٤- موارد استعمال در پزشکی سنتی..... ۲٤

فصل دوم: مواد، دستگاه‌ها و روش‌ها

۲-۱- مواد مورد استفاده ۲۷

۲-۲- دستگاههای مورد استفاده ۲۸

۲-۳- وسایل مورد استفاده..... ۲۹

۲-٤- تهیه گیاهان..... ۳۰

۲-۵- تست های فتوشیمیایی..... ۳۱

۲-۵-۱- شناسایی تانن ها..... ۳۱

۲-۵-۲- شناسایی ساپونین ها..... ۳۱

۲-۵-۳- شناسایی فلاونوئیدها..... ۳۲

۲-۵-٤- شناسایی آلکالوئیدها..... ۳۲

۲-٦- عصاره گیری..... ۳۳

عنوان صفحه

۲-۷- مهار هیدروکسیلاسیون ال - تیروزین توسط تیروزیناز و تعیین کینتیک آنزیم تیروزیناز در حضور عصاره های گیاهی ۳٤

۲-۸- تعیین km و Vmax در مورد نمونه‌ها و کوجیک اسید ۳۵

۲-۹- تعیین k_i (Affinity constant) ۳۷

فصل سوم: نتایج

۳-۱- نتایج به دست آمده ازتست های فیتوشیمیایی بر روی نمونه‌های گیاهی ۳۹

۳-۱- ۱- نتایج حاصل از شناسایی تانن ها ۳۹

۳-۱- ۲- نتایج حاصل از شناسایی ساپونین ها ۳۹

۳-۱- ۳- نتایج حاصل شناسایی فلاونوئیدها ٤۰

۳-۵- ٤-نتایج حاصل از شناسایی آلکالوئیدها ٤۱

۳-۲- نتایج به دست آمده از عصاره گیری ٤۲

۳-۳- نمودارها(درصد مهار در مقابل زمان) ٤۳

۳-٤- نتایج به دست آمده ازمعادله Lineweaver burk ۵۵

۳-۵-مقایسه Vmax درمقابل Km ۵٦

۳-٦- نتایج حاصل از آنالیز آماری ($IC_{۵۰}$) ومقادیر k_i های محاسبه شده ۵۷

عنوان صفحه

فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری

بحث و نتیجه‌گیری ۵۹

فصل پنجم: منابع

منابع ٦٤

فصل ششم: ضمائم

ضمائم ۷۱

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه و هدف

پوست یکی از ارگانهای ظاهری بدن است که نقش فیزیولوژیکی مهمی را بر عهده دارد. پیگمانتاسیون یکی از مشخصات فنوتیپی خپلی آشکار در جهان طبیعت است(۱). از بین رنگدانه ها، ملانین یکی از گسترده ترین آنهاست که در باکتری ها، قارچها، گیاهان و جانوران وجود دارد(۲). تولید ملانین پروسه مسؤل پیگمانتاسیون پوست، مو و چشم در پستانداران می باشد. افزایش و نقص تولید ملانین هر دو منجر به بروز بیماری هایی مانند ملانوما و آلبینسیم به ترتیب می گردد(۳). در سالهای اخیر تنظیم کننده های ملانوژنز اهمیت زیادی را در درمان اختلالات هیپو و هیپر پیگمانتاسیون پوست در فرآورده های دارویی و آرایشی پیدا کرده اند. تیروزیناز یا پلی فنل اکسیداز (مونوفنل، ارتودی فنل) یک آنزیم کلیدی در تنظیم مسیرملانوژنز است و حاوی دو اتم مس در ناحیه فعال می باشد که قابلیت کاتالیز کردن دو نوع واکنش با حضور اکسیژن مولکولی را داراست : ۱- هیدروکسیلاسیون مونوفنل به ارتودی فنل، ۲- اکسیداسیون ارتودی فنل به ارتوکینون مربوطه(٤).

مهار آنزیم تیروزیناز با مکانیسم های مختلفی مانند مهار رقابتی و غیر رقابتی و شلات با اتم های مس آنزیم انجام می گیرد. توانایی یک ماده شیمیایی در مهار رقابتی یا غیر رقابتی آنزیم توسط مطالعات مهار کینتیک آنزیم در حضور ماده مورد نظر انجام می گیرد(۵).

به طور کلی، مهار کننده های تیروزیناز به دو گروه عمده تقسیم بندی می شوند: مهار کننده های رقابتی یا غیر رقابتی(٦). مطالعات اولیه نشان می دهند که هیدروکینون و آزلائیک اسید هر دو از دسته مهار کننده‌های رقابتی می باشند که دارای سمیت سلولی روی ملانوسیت ها نیز می باشند (آربوتین یک مهار کننده رقابتی غیر سیتوتوکسیک می باشد). شلات کننده های آنزیم تیروزیناز نیز

فعالیت آنزیم را مهار کرده که از جمله این عوامل می توان از ۵- هیدروکسی -۲- (هیدروکسی متیل) -٤- پیروژن یا کوجیک اسید و نیزالاژیک اسید نام برد(۷).

دومین واکنش در آبشار ملانوژنز، تبدیل ٤ و ۳ دی هیدروکسی فنیل آلانین به ۳ و ٤ دی هیدروکسی فنیل آلانین کینون مانند دیگر واکنشهای غیر آنزیمی واکنشهای اکسیداسیون می باشند که آنتی اکسیدان هایی مانند آسکوربیک اسید یا توکوفریل فرولات می توانند با این مکانیسم در مهار ملانوژنز موثر باشند(۸). در این تحقیق از عصاره متانولی و آبی سه گیاه، گال مازو(*Quercus infectoria*) (از خانواده Fagaceae)، میوه‌ی هلیله‌کابلی (*Terminalia chebula*) (از خانواده Combertaceae) و از دانه کتان(*Linum usitatissimum*) (از خانواده Linaceae) برای مطالعه مهار آنزیم تیروزیناز استفاده شده است. عصاره متانولی دو گیاه اول در طرح تحقیقاتی گذشته، اثر مهاری قابل توجهی روی تیروزیناز نشان داده اند که در مطالعه حاضر اثر عصاره آبی آنها نیز مقایسه می گردد. دانه کتان به دلیل داشتن مقادیر زیاد اسیدهای چرب غیر اشباع از نوع لینولئیک اسید انتخاب شده است(۹). تحقیقات نشان می دهد که اسیدهای چرب غیر اشباع به صورت موضعی قادر به کاهش هیپرپیگمانتاسیون پوست ناشی از اشعه uv می باشند(۱۰). این اسیدهای چرب همچنین تجزیه تیروزیناز را افزایش می دهند که این بخصوص در رابطه با لینولئیک اسید بیشتر صادق می باشد(۱۱). لذادر این مطالعه اثر دانه کتان هم روی فعالیت تیروزیناز در مقایسه با کوژیک اسید بررسی می گردد.

۱-۲- پرتو فرابنفش خورشید و رنگ پوست

پرتو فرابنفش یک عامل محیطی مهم است که می تواند صدمه رساننده به پوست نیز باشد. زمانی که پوست در معرض نور uv قرار می گیرد، تولید ملانین (Melanogenesis) یا برنزه شدن

(Tanning) اتفاق می افتد که یک سد دفاعی بزرگ در مقابل آسیب ناشی از اشعه uv را فراهم می کند. این تیره شدن پوست زمانی که اشعه uv در واحدهای ملانین اپیدرمی در معرض تابش به عنوان ماده فعال کننده عمل می کند، اتفاق می افتد (۱۲و۱۳).به دنبال این روند، ملانوسیت هایی که فعالانه به تولید ملانین می پردازند و نیز انتقال ملانوزوم ها از ملانوسیت ها به کراتینوسیت ها افزایش می‌یابد. نتیجه این افزایش ملانین، جذب اشعه های uv ورادیکال های آزاد تولید شده از uv است، و از این رو حفاظت در مقابل صدمه بیشتر اشعه ی uv اتفاق می‌افتد.

تحقیق انجام شده توسط گیل کرست (GilCrest) و همکارانش نشان می دهد که واسطه های ناشی از تخریب و یا بازسازی DNA می توانند تولید ملانین را حتی در غیاب نور تحریک کنند. در واقع، اجزاء کوچک ناشی از گسستگی DNA مثل تیمیدین دینوسلئوتیدها (PTPT) زمانی که به صورت موضعی در پوست سالم استفاده می شوند می توانند برنزه شدن پوست را تحریک کنند.

مطالعات ثابت کرده است که PTPT می تواند سایر پاسخهای محافظتی در مقابل نور را القا کند.