بسم الله الرحمن الرحيم

٣٨٩٧٥

۱۱ /۱۰/ ۱۱۸۰
مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
تهیه مدارک

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوشیمی

«گرایش بالینی»

015177
۳۸۶۷۰

عنوان موضوع

جداسازی و تخلیص آنزیم استیل کولین استراز از مغز کوساله و مقایسه اثرات مهار کنندگی دو داروی فیزوستیگمین و پروکائین

نگارش
الیاس امیر محسنی انباردان

استاد راهنما
دکتر غلامعلی نادری

اساتید مشاور
دکتر بیژن فرزامی
دکتر زهیر محمد حسن

۱۳۸۰

«فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد آقای الیاس امیرمحسنی

رشته: بیوشیمی بالینی گرایش:

تقدیم می‌شود. اینجانبان نسخهٔ نهائی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تأیید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجهٔ کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنیم.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

جناب آقای دکتر غلامعلی نادری (ستاد راهنما)

جناب آقای دکتر بیژن فرزامی (استاد مشاور)

جناب آقای دکتر عباس صاحبقدم لطفی (نماینده تحصیلات تکمیلی)

جناب آقای دکتر غلامحسین ریاضی (استاد ناظر)

جناب آقای دکتر علیرضا مصباح (استاد ناظر)

بسمه تعالی

آیین‌نامهٔ چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرّس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرّس، مبیّن بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

مادّهٔ ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اطلاع دهد.

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

«کتاب حاضر، حاصل پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد/رسالهٔ دکتری نگارنده در رشتهٔ بیوشیمی است که در سال ۱۳۸۰ در دانشکدهٔ پزشکی دانشگاه تربیت مدرّس به راهنمایی سرکار خانم/جناب آقای دکترغلامعلی نادری، مشاورهٔ سرکار خانم/جناب آقای دکتر بیژن فرزامی و مشاورهٔ سرکار خانم/جناب آقای دکتر زهیر محمدحسن از آن دفاع شده است.»

مادّهٔ ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

مادّهٔ ۴ در صورت عدم رعایت مادّهٔ ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ‌شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرّس، تأدیه کند.

مادّهٔ ۵ دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در مادّهٔ ۴ را از محلّ توقیف کتابهای عرضه‌شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

مادّهٔ ۶ اینجانب **الیاس امیرمحسنی** دانشجوی رشته **بیوشیمی** مقطع **کارشناسی‌ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام‌خانوادگی: الیاس امیرمحسنی

تاریخ و امضا: ۱۳۸۰/۷/۲۰

تقدیم به :

پدر ومادر عزیزم

آن دو اسوه پرمعنای حیات، صداقت، صبر وشکیبایی که همواره درطول زندگی وتحصیل حامی وپشتیبان من بوده وهستند.

برادران وخواهران گرامیم

که همواره مشوق من در ادامه تحصیل می باشند.

تقدیر و تشکر

سپاس خداوندی را که به ما دانستن آموخت تا با فکر و تأمل در جهان هستی مسیر زندگی خویش را پیدا کرده وبسوی کمال ورستگاری حرکت کنیم.

اکنون که به لطف خداوند تحقیق خود رابه پایان رسانیده ام برخود لازم می دانم که ازاساتید گرامی جناب آقای دکتر غلامعلی نادری ،دکتر بیژن فرزامی،دکتر زهیر محمدحسن که زحمات زیادی را در طول این پایان نامه متحمل شده اند، تشکر نمایم.

همچنین از برادر بزرگوارم جناب آقای مهندس فریدون امیرمحسنی که در مراحل مختلف تحصیلی مرا یاری نموده اند،صمیمانه تقدیر و تشکرمی نمایم و از عموی گراممیم حاج عزیز امیر محسنی که در طول این تحقیق مرا یاری فرمودند نیز تشکر می نمایم.

همچنین از اساتید ودوستان گرامی آقایان دکتر عبدالامیرعلامه، دکتر رسایی، دکتر حسن رسولی صدقیانی، دکترمحسن ارزنلو، رضا چهرقانی،محمد سعادتمندزاده، سرکار خانم نازی آقاعلیخانی و سرکار خانم دیری، همچنین ازهمکاری صمیمانه کارشناسان محترم گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی تهران سرکار خانمها ذاکری، بوشهری تشکرو قدردانی می نمایم.

ازسایر دوستان عزیز وگرامی دوران پرخاطره دانشگاه آقایان رامین رادفر، امیر رسولی، خشایار معروفی، ساریخانی، مظلوم که درانجام این تحقیق بنحوی همکاری کرده اند تشکرمی نمایم.

موتلو اولون

الیاس امیرمحسنی

خلاصه فارسی

آنزیم استیل کولین استراز (AChE) به صورت واحدهای مونو، دی و ترامربوده وبصورت کلیG نمایش داده می شود. آنزیم استیل کولین استراز از بافت Caudate nucleus مغز گوساله جداسازی و تخلیص گردید و از نظر میزان مهار شوندگی توسط دو داروی فیزوستیگمین و پروکائین هیدروکلراید در in vitro بررسی شد. در ابتدا آنزیم AChE از بافت مغز گوساله توسط روش هموژناسیون و سانتریفوژ درچند مرحله در غلظت ۰/۳۲ مولار سوکروز و حاوی یک میلی مول EDTA استخراج گردید و سپس توسط سولفات آمونیوم ۳۰٪ رسوب داده شد.

پس ازآن با کروماتوگرافی تعویض یونی (توسط DEAE-cellulose) وژل فیلتراسیون(توسط ژل G-۲۰۰) دو پیک حاوی فراکشن های مختلفی که دارای فعالیت استیل کولین استراز بالایی میباشندبدست آمد.آنزیم استیل کولین استراز با فعالیت مخصوص ۷٤/٥Iu/mg به دست آمدکه ۸٦ برابر افزایش فعالیت را نشان می دهد. مقادیر V_{max} و K_m آنزیم با سوبسترای استیل تیوکولین به ترتیب برابر ٥۲/٦۳µM/ml/mg و ۰/۱۱ میلی مولار مشخص شد. الکتروفورز با ژل ۱۰ درصد پلی آکریل آمید سدیم دو دسیل سولفات نیز باندمربوط به آنزیم را نشان میدهد.

آنالیز الکتروفورزی استیل کولین استراز، جرم مولکولی ٦۷۰۰۰±۳۰۰۰D برای زیر واحد مونومر را نشان داد.* IC_{50} برای داروهای پروکائین و فیزوستیگمین به ترتیب برابر ۰/۸۷ و $۱۰^{-٤/٤۹}$ میلی مولار به دست آمد که نشان دهنده قدرت بالای مهار کنندگی داروی فیزوستیگمین نسبت به پروکائین می باشد.همچنین پارامترهای کینتیکی آنزیم AChE در حضور این داروها مطالعه گردیدند. بطوریکه Km آنزیم در حضور پروکائین و فیزوستیگمین به ترتیب برابر ۰/٦٥ و ۲/۲۲ میلی مولار به دست آمد. V_{max} آنزیم در حضور داروها و در عدم حضور داروها یکسان و برابر ٥۲/٦۳ µM/ml/mg مشخص گردید که این دو دارو به عنوان مهار کننده های رقابتی آنزیم فوق معرفی می‌گردند.

IC_{50}:غلظتی ازداروکه باعث مهار ٥۰ درصد آنزیم میشود.

لغات کلیدی: استیل کولین استراز- تخلیص- مهار شوندگی- فیزوستیگمین- پروکائین

فهرست مطالب

مقدمه و هدف ۱

فصل اول ۳

کلیات ۳

۱-۱- استیل کولین ۳

۱-۱-۱- دستگاه عصبی و اعمال آن ۵

۱-۱-۲- ساختمان شیمیایی و بیوسنتز استیل کولین ۶

۱-۱-۳- آزاد سازی استیل کولین ۹

۱-۱-٤- متابولیسم استیل کولین ۱۱

۱-۱-۵- انواع گیرنده‌های استیل کولین ۱۲

۱-۱-٦- اثرات فیزیولوژیکی و فارماکولوژیکی استیل کولین در بدن ۱۳

۱-۲- آنزیم استیل کولین استراز ۱۵

۱-۲-۱- کلیاتی در مورد انواع کولین استراز ۱٦

۱-۲-۲- ساختمان آنزیم کولین استراز و نقش آن در هیدرولیز استیل کولین ۱۹

۱-۲-۳- تغییرات ژنتیکی آنزیم کولین استراز ۲۳

۱-۲-٤- علل تغییرات سطح آنزیم کولین استراز ۲٤

۱-۳- ترکیبات مهار کنندهٔ آنزیم کولین استراز ۲۵

۱-۳-۱- انوع آنتی کولین استرازهای برگشت پذیر ۲۵

۱-۳-۲- انواع آنتی کولین استرازهای برگشت ناپذیر ۳۰

۱-٤- مکانیسم مهارکنندگی ترکیبات OP بر روی آنزیم AChE ۳٦

۱-۵- اثرات فیزیولوژیک و فارماکولوژیک آنتی کولین استرازها ۳۹

۱-٦- اکسایم‌ها و عمل آن ٤۵

۱-٦-۱- درمان دارویی و پادزهری در مسمومیت با ترکیبات OP ٤۵

۱-٦-۲- شرح و توضیح اکسایم‌ها: ٤٦

۱-٦-۳- داروی آتروپین در درمان مسمومیّت با ترکیبات OP ٤۷

۱-٦-٤- نقش هیدروکسیل آمین ٤۹

۱-٦-۵- مکانیسم عمل اکسایم‌ها ۵۰

فصل دوم ٥٤
مواد و روشها ٥٤
٢-١- اندازه گیری میزان پروتئین ٥٤
٢-٢-اندازه‌گیری فعالیت آنزیم AChE ٥٦
٢-٣- استخراج آنزیم استیل کولین استراز از مغز گوساله ٦١
٢-٤- دیالیز ٦٤
٢-٥- تغلیظ پروتئین ٦٦
٢-٦- مراحل تخلیص ٦٨
٢-٦-١- تخلیص نسبی توسط دیالیز و اولترافیلتراسیون ٦٨
٢-٦-٢- رسوب گیری با سولفات آمونیوم ٦٩
٣-٦-٣- کروماتوگرافی تعویض یونی ٧٠
٢-٦-٤- کروماتوگرافی الک مولکول ٧٦
٢-٧- الکتروفورز SDS-PAGE ٧٨
٢-٨- اندازه گیری Km و Vmax آنزیم AChE ٨٥
٢-٩- تاثیر داروهای مهار کننده روی آنزیم AChE ٨٦
٢-٩-١- اندازه گیری ثابت مهار کنندگی: (KI)(Inhibitor Constant) ٨٧
٢-٩-٢- تعیین بهترین غلظت مهار کنندگی ٨٨
فصل سوم ٩٠
نتایج (RESULTS) ٩٠
٣-١- میزان پروتئین ٩٠
٣-٢- تعیین فعالیت آنزیم: ٩١
٣-٣- مرحله استخراج ٩٢
٣-٤- مراحل تخلیص ٩٥
٣-٤-١- رسوب گیری با سولفات آمونیوم ٩٥
٣-٤-٢- اولترافیلتراسیون ٩٥
٣-٤-٣- کروماتوگرافی تعویض یونی توسط ژل DEAE-Cellulose ٩٥
٣-٤-٤- کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون روی ژل G-200 ..... ٩٩

۳-۵- الکتروفورز ۱۰۵

۳-٦- تعیین ثابت های کینتیکی آنزیم AChE (Vmax , Km) ۱۰۵

۳-۷- نتایج حاصل از بررسی مهار کنندگی آنزیم AChE ۱۰۷

۳-۷-۱- داروی پروکائین هیدروکلراید ۱۰۸

۳-۷-۲- داروی فیزوستیگمین ۱۱۱

فصل چهارم ۱۱۵

بحث و نتیجه گیری ۱۱۵

منابع ۱۲۲

خلاصه انگلیسی .....

فصل اول

کلیات

مقدمه و هدف

آنزیم استیل کولین استراز (AChE, EC 3. 1. 1. 7) اولین بـار توسـط David Nachmanson در سال ۱۹۳۸ کشف و از بافت الکتریکی Torpedo marmorate استخراج گردید. مطالعه بـرروی آنزیم AChE به کشف استیل کولین بر می‌گردد که عمل آن بعنوان میانجی عصبی توسط Taveav در سال ۱۹۰۶ شناخته شد. اولین خالص‌سازی کامل آنزیم توسط لوزینگر[1] در سال ۱۹۶۷ از بافت الکـتریکی eel[2] انجـام گرفـت. (۱) آنزیم‌هـای مختلـف از جملـه B اسـترازها توسـط ترکیبـات ارگانوفسفره و یکسری از داروها مهار می‌شوند. کولین استرازها دستهٔ کلی B استرازها می‌باشند که بدو صورت کولین استراز سرمی (ChE) و کولین استراز موجود در غشاء RBC و نیز در سلولهای عصبی در قسمت سیناپس‌ها وجود دارد (AChE). آنزیـم اسـتیل کولیـن اسـتراز یکـی از بـهترین آنزیم‌ها برای مطالعه از نقطه نظر مکانیسم عمل، طبیعت جایگاه فعال، توزیع و محـل اسـتقرار آن دریافت‌ها، و اعمال فیزیولوژیکی آن، حداقل در عقده‌ها و اتصالات عصبی، عضلانی می‌باشد. بنظر می‌رسد که فقط در تعداد کمی‌از بافت‌ها آثار آن مشخص‌شده است. بطور مثال نقش آنزیم خـارج سیناپس کولینرژیک مشخص نیست. استیل کولین استرازیک آنزیم ضـروری در سیسـتم اعصـاب می‌باشد که باعث هیدرولیز سریع میانجی استیل کولین می‌شود و در مغز پستانداران وجـود دارد و بیش از ۸۰ درصد آن بصورت محلول دترجنت می‌باشد.

تخلیص و شناسایی خواص مهار شوندگی آنزیم استیل کولین استراز مغز در شناسایی مولکولی وابسته به انتقال سیناپس و در تحریک عصب کولینرژیک دارای اهمیت اسـت. تحقیقـات زیـادی دربارهٔ استیل کولین استرازها بدست آمده که از منابع دیگر مانند بافت الکـتریکی مـاهی الکـتریک حاصل گردیده است. (۲) استیل کولین استراز از نظر فیزیولوژی و مکانسیم عملکرد دارای اهمیت است. می‌تواند بعنوان مارکر برای مطالعه فرآیند سیناپتوژن و میـانکنش عصبـی – عضلانـی مـورد

1- Leuzinger

2- Electrophorus Electricus

بررسی قرار گیرد. استیل کولین استراز عصبی و عضلانی از تعدادی آنزیم‌های هم خانواده تشکیل شده است که بصورت مونومر، دی‌مروتـترامر و کمپلکس‌هـای غـیر متقـارن می‌باشـند کـه شـبیه مولکول کلاژن کمپلکسی از ساختمانهای دیگر را نیز تشکیل داده‌اند.(۳) اغلب اطلاعات در مـورد استیل کولین استرازهای بدست آمده از مار ماهی الکتریکی و یا موش و خرگوش و مرغ دردسـت است. استیل کولین استرازهای عصبی و عضلانی بدو صورت متصل به غشاء و آزاد وجـود دارنـد که در این طرح بررسی استیل کولیـن اسـتراز آزاد و متصـل بـه غشـاء در مغـز گوسـاله بررسـی می‌گردد(٤). عمل استیل کولین استراز که باعث تجزیه استیل کولین در مواضع سیناپسـی می‌شـود توسط داروهای آنتی کولینرژیک مهار می‌شود. شناسایی مهار شوندگـی اسـتیل کولیـن اسـتراز در مقابل پاره‌ای از مهار کنندگان انجام شده است ولی از آنجا که امروزه بسیاری از راهـهای درمـانی بیماریـهای شـناخته شـده مثـل بیمـاری آلزایمـر[1]، گلوکـوم[2] و بیمـاری هـانتینگتون[3] و بیمـاری میاستیناگراوس[4] را از منشاء تاثیر مهار شوندگـی آنزیـم کولیـن اسـتراز می‌داننـد و فیزوسـتیگمین بعنوان یکی از داروهای مهم برای درمان این بیماری استفاده می‌شود و نیز پروکائین بعنوان داروی ضد آریتمی‌های بطنی و فوق بطنی استفاده می‌گردد لذا به این لحـاظ ایـن دو دارو بـرای بررسـی مهار آنزیم AChE انتخاب گردیده‌اند (۵). مـهار ایـن آنزیـم منجـر بـه تجمـع اسـتیل کولیـن در قسمت‌های مختلف بدن شده و می‌تواند نتایج وخیمی را داشته باشـد. هـدف مـا از ایـن تحقیـق استخراج و تخلیص آنزیم اسـتیل کولیـن اسـتراز از مغـز گوسـاله بـه روش سـاده و بررسـی اثـر مهار کنندگی دو داروی فیزوستیگمین و پروکائین برروی آنزیم مذکـور در شـرایط in vitro می‌باشد.

1- Alzheimer's discase

2- Glancoma

3- Huntington's disease

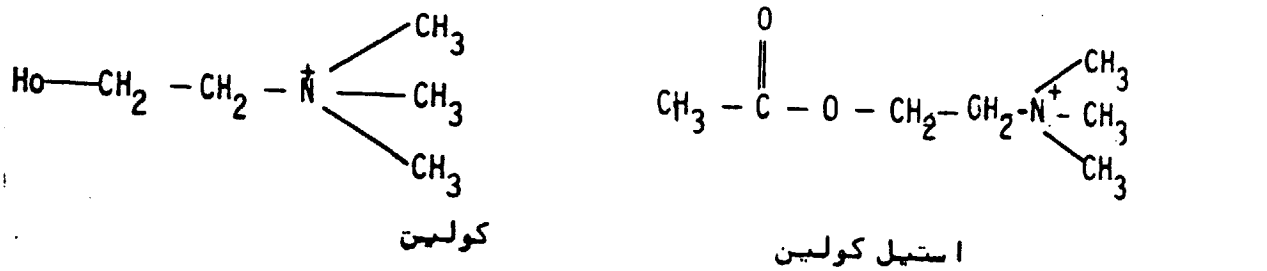
4- Myasthenia gravi

کلیات

۱-۱- استیل کولین

استیل کولین، استری با اهمیت فیزیولوژیک بسیار مهم است که برای اولین بار در سال ۱۸٦۷ توسط Bayer سنتز شد(٦) ولی عمل فارما کولوژیکی آن در سال ۱۹۰٦ توسط Reid Hunt و Taveav کشف گردید. با کشف استیل کولین بسیاری از دانشمندان فارماکولوژیست و فیزیولوژیست بیان داشتند که این ترکیب یک نوروترانسمیتر است که عمل آن برای ایجاد جریان الکتریکی که موج عصبی را از عصب به فیبرهای عضلانی منتقل می‌کند ضروری است (۷).

استیل کولین نقش بسیار مهمی را بعنوان یک مادهٔ هدایت کنندهٔ جریان عصبی در اعصاب کنترل کنندهٔ عضلات مخطط و صاف (عضلات صاف عروق و احشایی) عضلهٔ قلب و غده‌ها بازی می‌کند. استیل کولین استر اسید استیک و کولین می‌باشد. ساختمان شیمیایی استیل کولین و کولین در زیر نشان داده می‌شود (۸).



شکل (۱-۱)

Katz, Fatt در سال ۱۹۵۲ کشف کردند که در صفحهٔ حرکت انتهایی (motor end-plat) عضلات اسکلتی، تقریباً در هر ثانیه یک دپلاریزاسیون ناچیز در حدود ۳- ۰/۱ میلی‌ولت رخ می‌دهد، مقدار این پتانسیل‌های کوچک در صفحهٔ انتهایی، زیر آستانهٔ مورد (ACh) نیاز برای تولید پتانسیل عمل در عضله می‌باشد. این بافته‌ها با افزایش آزاد سازی استیل کولین توسط فیزوستیگمین (یک مهار کنندهٔ AChE) و همچنین توبوکورارین (آنتاگونیستی که بر گیرنده‌های

نیکوتینی اثر می‌کند) مشخص شد و همچنین محقیقن را به این نظریه هدایت کرد که ACh از انتهای اعصاب حرکتی و با میزان ثابت یا کوانتایی ترشح می‌شود. بعدها، این فرم ترشحی کوانتایی ACh، وزیکول‌های سیناپسی لقب گرفت. مسیر ذخیره و آزاد سازی ACh، عمدتاً بسیار بیشتر از دیگر فرآیندها در صحفهٔ انتهایی حرکتی بررسی شده است(Hille ; Hall and Sanes 1993).

زمانی که یک پتانسیل عمل به انتهای عصب حرکتی می‌رسد همزمان تعداد ۱۰۰ عدد یا بیشتر از بسته‌های یاد شده (وزیکول‌های) ACh (Katz and Miledi 1965) آزاد می‌شوند و در اصل دپلاریزاسیون انتهایی منجر به جریان یافتن یون Ca^{2+} از میان دریچهٔ ولتاژی می‌شوند و این جریان از بسیاری جهات سبب اتصال آکسونی و غشای وزیکولی در ناحیهٔ مورد بحث و باز شدن وزیکول‌ها می‌گردد.

تقریباً تعداد مولکول‌های استیل کولین در وزیکول‌های سیناپسی ۵۰۰۰۰-۱۰۰۰ عدد و تعداد وزیکول‌های موجود در یک انتهای عصب حرکتی، ۳۰۰۰۰۰ یا بیشتر تخمین زده شده است. ممکن است مقادیر قابل توجهی از استیل کولین در سیتوپلاسم‌های خارج وزیکولی، وجود داشته باشد محاسبهٔ جریانات الکتریکی ناشی از باز شدن یک دریچه در صفحهٔ انتهایی حرکتی، در طی مصرف مداوم استیل کولین سبب تخمین تغییر پتانسیل ناشی از یک مولکول استیل کولین (3×10^{-7} ولت) شده است. بوسیله این محاسبات مشخص گشته است که حتی مقادیر کمتر استیل کولین در هر وزیکول (۱۰۰۰ مولکول) برای ایجاد پتانسیل ناچیزی در صحفهٔ حرکتی انتهایی کافی است. (۹)

استیل کولین برای ایجاد جریان عصبی نفوذپذیری رشته‌های عصبی را به یون سدیم تغییر می‌دهد، بدین ترتیب پتانسیل الکتروشیمیایی لازم برای ایجاد جریان فراهم می‌شود.

بررسی استیل کولین و ماهیت شیمیایی – بیولوژیکی آن در این تحقیق، از آنجا دارای اهمیت است که این میانجی در مسمومیت با حشره‌کش‌های ارگانوفسفره در ناحیهٔ انتهای عصب تجمع می‌یابد و منجر به عوارض تحریکی شدید سیستم عصبی کولینرژیک می‌شود و شناخت علایم این