دانشگاه رازی
دانشکده علوم
گروه بیولوژی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته ی زیست شناسی

گرایش سلولی و مولکولی

عنوان پایان نامه

مطالعه اثرآنزیم اکتینیدین میوه کیوی در جداسازی جزایر لانگرهانس از پانکراس، سلول های اندوتلیال آئورت و سلول های چربی

اساتید راهنما:

دکتر علی مصطفایی

دکتر علی بید مشکی‌پور

استاد مشاور :

مهندس کامران منصوری

توسط:

مهوش حصاری

مهر ماه ۱۳۸۸

بافت پیوندی[1] و محتویات ماتریکس آن بخش بزرگی از بدن را در بر گرفته، اختصاصی شده و نقش های گوناگونی دارد. از جمله: حفاظت مکانیکی، انتقال مایع میان بافتی، مهاجرت سلولی، بهبود زخم و کنترل فرایندهای سوخت وساز (Junqueira et al., 2000). این بافت به علت ارتباط نزدیک با عروق خونی می تواند در تغذیه نیز نقش داشته باشد. بافت پیوندی بر اساس مواد بین سلولی (تنوع، آرایش و چگالی فیبرها) طبقه بندی می شود. بافت پیوندی دارای دو بخش سلولی و ماتریکس خارج سلولی (ECM) است. ماتریکس خارج سلولی شامل دو جزء فیبری و ماده زمینه ای است. جزء فیبری ماتریکس خارج سلولی شامل فیبرهای کلاژن و الاستیک است. فیبرهای کلاژن و الاستیک دو ترکیب فیبری مهم ماتریکس خارج سلولی هستند. ماده زمینه ای بی رنگ، هموژن و نیمه جامد بوده و از گلیکوز آمینو گلیکان ها و پروتئوگلیکان ها و گلیکوپروتئین ها (مانند فیبرونکتین) ساخته شده است. بخش سلولی‌بافت پیوندی شامل سلول‌های مزانشیم تمایز نیافته، فیبروبلاست‌ها، سلول های‌چربی(چربی سفید و قهوه ای)، ماکروفاژها، سلول‌های پلاسما و گلبول‌های سفید است (Hulboy et ; Culav et al., 1999 al., 1997).

۱-۱- کلاژن

کلاژن فراوان ترین پروتئین ماتریکس خارج سلولی مهره داران است که به وسیله چندین نوع سلول ساخته می شود و تقریباً در همه بافت ها وجود دارد. کلاژن از اجزای اصلی بافت نگهدارنده، بافت پیوندی، استخوان ها، غضروف، دندان و ماتریکس خارج سلولی پوست و رگ های خونی‌می باشد (Goldberg et al., 1986).

کلاژن انواع مختلفی دارد اما نوع غالب آن، کلاژن‌های رشته ای موجود در تاندون می باشد. دیگر کلاژن های رشته ای در اندام های نرم مانند کبد، شبکه فیبریلی کوچکی تشکیل می دهند. کلاژن ها از طریق تفاوت در ترکیب، اعمال و خصوصیات ظاهری از یکدیگر قابل تشخیص هستند. تقریباً ۲۷ نوع کلاژن وجود دارد که بر اساس ساختار و اندازه زنجیره آلفا و توزیع بافتی تقسیم شده اند(Culav et al., ; 1999 Boot-Handford et al.,2003).

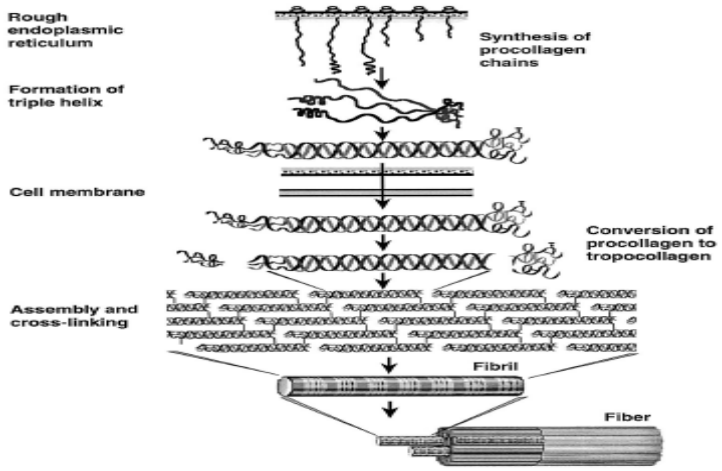
اسید های آمینه اصلی تشکیل دهنده کلاژن عبارتند از: گلایسین (۳۳/۵ ٪) ، پرولین (۱۲ ٪) ، هیدروکسی پرولین (۱۰ ٪). کلاژن دو اسید آمینه دارد که مختص همین پروتئین هستند: یکی هیدروکسی پرولین و دیگری هیدروکسی لیزین . همه انواع کلاژن ساختمان کلی مشابهی متشکل از یک

1 connective tissue

مارپیچ سه تایی (پروکلاژن) دارند که از سه زنجیره آلفا به طول حدود ۱۰۰۰ اسید آمینه با توالی تکراری Gly-X-Y ساخته شده است که X اغلب پرولین و Y اغلب هیدروکسی‌پرولین (HYP) و به ندرت لیزین و یا هیدروکسی‌لیزین می‌باشد. چون گلایسین به عنوان کوچکترین اسیدآمینه هسته مرکزی مارپیچ سه تایی را تشکیل می دهد، تکرار آن در هر توالی تکراری سه اسید آمینه ای برای پیچش صحیح سه زنجیره آلفا به صورت مارپیچ ضروری است (شکل ۱-۱). تنوع کلاژن ناشی از تنوع زنجیره های آلفا است. در بعضی کلاژن ها، هرسه زنجیره‌آلفایکسان، در برخی دیگر، دو زنجیره‌آلفا مشابه می‌باشد اما در بعضی‌کلاژن ها، هرسه زنجیره متفاوت هستند. انتهای ملکول کلاژن غیر مارپیچ بوده و برای شکل گیری فیبریل های کلاژن و میانکنش با دیگر ترکیبات خارج سلولی دارای اهمیت است. زنجیره های آلفای کلاژن ها با انتها های نسبتاً بلند سنتز می شوند. بعد از شکل گیری مارپیچ سه تایی، ملکول کلاژن تازه سنتز شده (پروکلاژن) از سلول به فضای خارج سلولی رها می گردد. در آنجا اغلب انتهاهای غیر مارپیچ حذف شده و تروپوکلاژن شکل می گیرد (Kleinman et al.,1981; Culav et al.,1999).

۱-۱- قسمتی از یک مولکول کلاژن نشان داده شده است که در آن زنجیره های مارپیچ آلفا بدور هم پیچ خورده و مارپیچ سه گانه کلاژن را ایجاد می‌کنند. اسیدامینه گلایسین با حرف G نشان داده شده است (Culav et al., 1999).

مجموعه چند تروپوکلاژن، فیبریل های کلاژن را می سازند. این فیبریل‌ها ساختمان های نازک و بلندی هستندکه قطری متغیر (از ۲۰ تا ۹۰ نانومتر) و خطوط عرضی با تناوب اختصاصی ٦٤ نانومتری دارند. فیبریل ها با میکروسکوپ الکترونی قابل رؤیت هستند (شکل۱-۲). فیبریل ها با یکدیگر فیبرهای کلاژن را تشکیل می دهند که به عنوان محافظ عمل می کنند و با میکروسکوپ نوری قابل رؤیت هستند. دسته های فیبرها را هم می توان با چشم غیر مسلح دید. بطور کلی فیبرهای کلاژن قطری بین ۲۰-۱ میکرومتر داشته، طولی متوسط دارند و غیر منشعب هستند (Kleinman et al., 1981; Culav et al., 1999).



۱-۲- نمایش سنتز، ترشح و تجمع رشته های کلاژن (Culav et al., 1999) .

در بافت پیوندی اشکال کلاژن رشته ای و غیر رشته ای وجود دارد. کلاژن های رشته ای (انواع I، II، III، V و XI) بیش از ۷۰٪ کل کلاژن ها را تشکیل می دهند.

کلاژن نوع I فراوان ترین کلاژن رشته ای است و در بافت هایی مانند رباط، استخوان، مفصل و عاج دندان، کپسول های اندام ها، پوست و غیره یافت می شود.

کلاژن نوع II عمدتاًدر غضروف و بافت ارتجاعی یافت می شود. در این نوع کلاژن فقط فیبریل های بسیار نازک موجودند.

کلاژن نوع III معمولاً در بافت ها همراه کلاژن نوع I یافت می شود و می تواند با انواع دیگر کلاژن تشکیل پلیمر دهد. این نوع کلاژن نقش مهمی در کشش بافت داشته و بطور اختصاصی در بافت های جنینی و تعداد زیادی از بافت های بالغ از جمله شریان ها و پوست وجود دارد.

کلاژن نوع V در پرده های جنینی، عروق خونی و به مقدار کم در دیگر بافت ها وجود دارد(Linsenmayer, 1991; mayne, 1986; Junqueira et al., 2000).

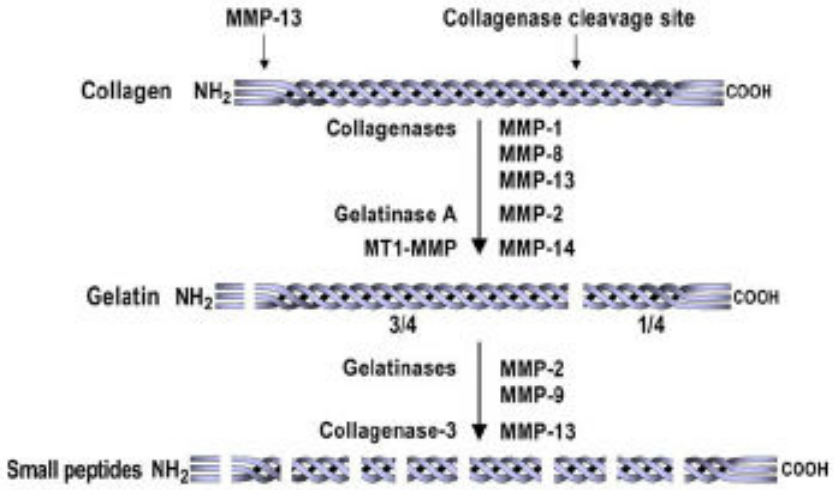
مولکول کلاژن نسبت به بیشتر پروتئاز ها مقاوم است و آنزیم های پروتئازی که در مهره-داران می توانند مارپیچ سه تایی کلاژن را بشکنند، کلاژناز نامیده می شوند (Goldberg et al., 1986; Culav et al., 1999).

۱-۲-آنزیم‌های کلاژناز[1]

کلاژن ها فراوان ترین پروتئین بدن هستند که تخریب آنها هم در شرایط طبیعی و هم در شرایط بیماری رخ می دهد. تنها آنزیم هایی که قادر به تخریب کلاژن های نوع I، II و III می باشند کلاژنازها هستند (Brinckerhoff et al., 1987).

کلاژنازهای پستانداران اعضای خانواده ماتریکس متالوپروتئینازها (MMP)[2] می باشند. این آنزیم ها سه زنجیرهٔ آلفای کلاژن‌ها را بعد از اسیدآمینه گلایسین (Gly) در توالی ویژه ای (Gln/Leu-Gly^{775}-Ile^{776}/Leu-Ala/Leu) می شکنند(شکل ۱-۳) (Billinghurst et al., 1997; Chung et al., 2004).

جایگاه فعال این آنزیم ها در حوزه (domain) کاتالیتیکی قرار دارد و یون روی را توسط پیوندهای کوئوردینانس به سه اسیدآمینه هیستیدین و یک مولکول آب متصل نگه می دارد. همه MMPها حاوی حوزه هموپکسین[3] هستند که از طریق یک لولای کوتاه اما متغیر به دومین کاتالیتیکی متصل می شوند. حضور این دومین در کلاژنازها، آنها را قادر به تخریب کلاژن رشته ای می‌سازد (شکل ۱-٤) (Ala-aho and Kahari, 2005).



۱-۳-تخریب کلاژن‌های رشته ای. کلاژن های رشته ای به وسیله کلاژناز ها در محل خاصی در زنجیره α شکسته می شوند و قطعاتی به فاصله ۱/٤ از انتهای کربوکسیلی و ۳/٤ از انتهای آمینی را ایجاد می کنند که فوراً در دمای بدن به ژلاتین دناتوره می شود. (Ala-aho and Kahari, 2005).

1 Collagenase
2 Matrix methaloproteinases
3 Hemopexin domain

کلاژنازهای MMP-1 ، MMP-8 و MMP-13 ، کلاژن های رشته ای را بیشتر از دیگر پروتئین ها می شکنند، این توانایی وابسته به توانایی آنها در باز کردن[1] مارپیچ سه تایی کلاژن های طبیعی است (Ala-aho et al., 2005).

۱-٤- ساختمان کلاژنازها. دومین کاتالیتیک آنزیم برای فعالیتش به یون روی نیازدارد (Ala-aho et al., 2005).

۱-۲-۱- انواع کلاژنازها

به‌طورکلی کلاژنازها براساس نوع فعالیت و نوع بافتی که تخریب می‌کنند به صورت زیر تقسیم می شوند (Goldberg et al., 1986):

۱- کلاژناز نوع I : فعالیت آن متوسط و شامل فعالیت های کلاژنازی، کازئینازی، کلستریپین[2] و فعالیت های تریپتیک[3] می باشد. این نوع آنزیم بیشتر برای هیدرولیز بافت های چربی، کلیه و کبد استفاده می‌شود.

۲- کلاژناز نوع II : بیشتر فعالیت کلستریپینی دارد. این نوع آنزیم بیشتر برای هیدرولیز بافت هایی چون قلب، استخوان، ماهیچه، تیروئید و غضروف به کار می رود.

۳- کلاژناز نوع III : دارای فعالیت پروتئولیزی کمی است و معمولا" برای جداسازی سلول های جنسی و پستانی به کار می رود.

٤- کلاژناز نوع IV : دارای فعالیت تریپتیکی کمی است و معمولا" برای هیدرولیز جزایر لانگرهانس استفاده می شود.

۱-۲-۲- کلاژنازهای باکتریایی

تاکنون کلاژنازها از چند نوع باکتری از جمله باکتری کلستریدیوم هیستولیتکوم[4] تخلیص شده‌اند. این باکتری دو نوع کلاژناز به نام های A و B یا I و II دارد که وزن مولکولی آنها به ترتیب ۱۰۵ و ۵۷/٤

1 Unwind
2 Clostripain
3 Tryptic
4Clostridium histolyticum

کیلودالتون می باشد. وجود یون روی یا کبالت در جایگاه فعال این آنزیم به اثبات رسیده است. توالی اسیدآمینه ای این آنزیم ها نیز توسط Mandle و همکارانش در سال ۱۹٦٤ کشف گردید. همچنین مشخص شده است که در ساختمان این دو آنزیم، متیونین و سیستئین وجود ندارد. pH مناسب برای فعالیت آنها ۹-۷ بوده و برای فعال شدن، به یون کلسیم نیاز دارند. عوامل کلاته کننده مانند EDTA ، مهارکننده این آنزیم ها می باشند. کلاژناز I یا کلستریدیوپپتیداز A، نواحی مارپیچ در کلاژن طبیعی پیوند Y-Gly در توالی -Pro-Y-Gly-Pro- را می شکند که Y در این توالی اغلب یک اسیدآمینه خنثی است. محققین برای مطالعات ساختاری و بیوسنتزی کلاژن، بیشتر از شکل خالص کلاژناز I استفاده می کنند. این نوع کلاژناز به طور وسیعی در تخریب بافت پیوندی و نیز جداسازی سلول‌ها از این‌بافت استفاده می‌شود (Jung et al., 1999).

۱-۲-۳- کلاژنازهای پستانداران

کلاژنازهای پستانداران توسط تعداد متنوعی از بافت ها و سلول ها ساخته می شوند. کلاژناز تولید شده توسط پوست انسان به صورت یک پروآنزیم سنتز و ترشح می شود و تنها بعد از فعال شدن می‌تواند روی سوبسترای خود یعنی کلاژن تأثیر بگذارد. آنزیم های فعال می توانند به راحتی توسط یک سری از مهارکننده ها غیرفعال شوند. تنظیم بسیار دقیق سنتز، ترشح، فعالیت و عدم فعالیت این آنزیم ها، اهمیت آنها را در متابولیسم پروتئین های ماتریکس خارج سلولی گوشزد می نماید. همان طور که گفته شد سلول های سازنده کلاژنازها از جمله گرانوسیت های نوتروفیل، ماکروفاژها، فیبروبلاست ها، کراتینوسیت ها و دیگر سلول ها بسیار متنوعند. این سلول ها نقشی مهم در مراحل مختلف ترمیم زخم دارند. ترمیم زخم یک نوع بازیابی مجدد بافت است و این تغییر در هر شکلی که باشد می تواند در فرایند های متنوعی مانند تکثیر، مهاجرت، تمایز و آپوپتوزیس شرکت کند. کلاژنازهای پستانداران می‌توانند کلاژن های نوع I ، II و III را بشکنند اما قادر به شکستن انواع دیگر کلاژن نیستند (Goldberg et al., 1986).

۱-۳-آنزیم اکتینیدین

میوه کیوی حاوی مقدار زیادی از یک نوع آنزیم پروتئاز به نام اکتینیدین (EC:3.4.22.14) است که اولین بارتوسط آرکوس مشخص گردید(Arcus, 1959). این آنزیم یک سیستئین‌پروتئاز است که از نظر خصوصیات کلی مشابه سایر سیستئین پروتئازهای گیاهی همچون پاپائین از انبه و فیسین از انجیر وسیستئین پروتئازهای حیوانی همچون کاتپسین B و L می باشد. درجه اختصاصی بودن این آنزیم برای سوبسترا بسیار بالا است (Boland & Hardman, 1972; Paul et al., 1995; Reid et al., 2004; Praekelt et al., 1988).

غلظت اکتینیدین در میوه کیوی(Hayward cultivar) زیاد است در حالی که در بقیه بافت های گیاه تقریباً وجود ندارد. البته نقش این پروتئازها که با غلظت بالایی در میوه گیاه وجود دارند، مشخص نشده است. مقدار نسبی محتوای پروتئینی میوه کیوی ۱–۰/۸ درصدگزارش شده است. پر مقدار ترین پروتئین این میوه آنزیم اکتینیدین است که در بعضی گونه ها بیش از ٦۰ درصد محتوای پروتئینی محلول میوه را تشکیل می دهد. بطور کلی غلظت پروتئین در میوه کیوی و میزان نسبی اکتینیدین، به عواملی همچون واریته، سن میوه، شرایط اقلیمی و روش اندازه گیری پروتئین بستگی دارد. پروتئین اکتینیدین در اواسط زمان رسیدن میوه کیوی بیان می شود ومیزان mRNA آن در طول رسیدن میوه افزایش می یابد و زمان بلوغ به ماکزیمم مقدار خود می رسد (Wang et al., 2000; Boyes et al., 1997; Paul et al., 1995).

بیشترین غلظت و فعالیت آنزیمی در بافت برون بر میوه است. مطالعات آنزیمی نشان داده که فعالیت ویژه اکتینیدین در طی تکامل میوه افزایش یافته و زمان بلوغ به ماکزیمم می رسد و سپس طی رسیدن میوه ثابت می ماند (Lewis & Lunch, 1988).

طبق مطالعات انجام شده اکتینیدین به‌وسیله یک خانواده چند ژنی با بیش از ۱۰ عضو رمز دهی و به دو شکل اسیدی و یا بازی تولید می شود (Keelling et al., 1990). دومین ژن این خانواده ژنی، شکل بازی اکتینیدین را بیان می کند. اکتینیدین بازی حدود ۸۰٪ با نوع اسیدی آن مشابهت دارد. نقش بیولوژیکی این آنزیم هنوز به طور دقیق شناخته نشده است ولی این احتمال وجود دارد که ایزوفرم های بازی و اسیدی اکتینیدین نقش مقابله با حمله عوامل بیماری زا را داشته باشند. ژن اکتینیدین در سال های ۱۹۸۹ و ۱۹۹۰ تعیین توالی گردید و مشخص شد که ۵ اگزون دارد که توسط اینترون هایی با ٤۱۲، ۹۱، ۹۱۳ و ۲۱۸ جفت باز از یکدیگر جدا می‌شوند (Snowden & Gardner, 1990; Podivinsky et al.,1989).

بررسی هیبریداسیون نورترن[1] نشان داد که اندازه mRNA برای اکتینیدین ۱/٤ kb است و اکتینیدین بصورت زیموژن ساخته می شود(Praekelt et al., 1988). سیستئین پروتئازها به صورت پری پرو پروتئین ساخته می شوند و دارای یک پپتید نشانه برای انتقال به شبکه آندوپلاسمی، NTPP[2] و CTPP[3] هستند. مشخص شده که اکتینیدین دارای یک CTPP با ۳٤ اسید آمینه است که یکی از بلندترینCTPP های شناخته شده تا کنون بوده و احتمال می رود که در پایداری پیش ساز این آنزیم نقش داشته باشد(Paul et al., 1995).

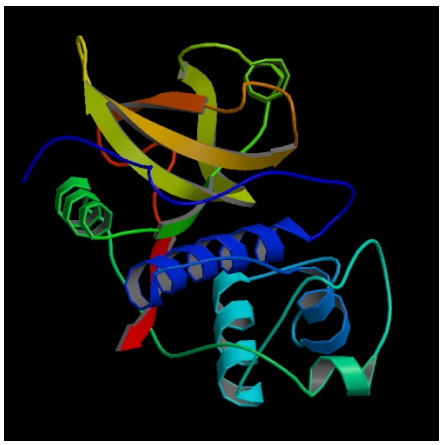
[1] Northern
[2] N-terminal propeptid
[3] C-terminal propeptid

۱-۳-۱- ساختمان اکتینیدین

این آنزیم با نام های دیگری مثل پروتئاز آنیونی اکتینیدیا[1] و یا پروتئاز B نیز خوانده می شود. از نظر ساختمان پروتئینی، اکتینیدین به صورت زیر طبقه بندی می شود (Baker et al., 1980):

Class: Alpha and beta proteins (a+b)
Fold : Cystein proteinase (Cys-His-Asn)
Super family : Cysteine proteinases
Family : Papain like
Protein : Actinidin
Species : *Chinese gooseberry or Kiwifruit*

وزن مولکولی پیش ساز آنزیم اکتینیدین در سلول (پری پروآنزیم) معادل ۳۲۷٤۵ دالتون است که از ۳۰۲ اسید آمینه تشکیل شده است. بعد از تبدیل شدن به شکل فعال، وزن آنزیم معادل ۲۳۵۰۸ دالتون شده و حاوی ۲۲۰ اسیدآمینه می گردد ودر پری پرو آنزیم انتهای آمینی آن دارای ۱۲٦ و انتهای کربوکسیلی دارای ۳۳ اسیدآمینه می شود (Baker, 1977; Podivinsky et al., 1989; Carne & Moore, 1978). وزن آنزیم در روش SDS-PAGE حدود ۲۹ کیلو دالتون تخمین زده می شود (مصطفایی و چلبی، ۱۳۸۵ Morimoto et al., 2004). در سال ۱۹۷۸ توالی اسید آمینه ای اکتینیدین با روش دانسی – ادمن[2] تعیین گردید (Carne & Moore, 1978). در سال های ۱۹۸۰ و ۱۹۸۵ ساختمان فضایی آنزیم مشخص شد (شکل۱-۵) (Pickersgill et al., 1988). اکتینیدین، پروتئین ها و پپتید ها را در نواحی خاصی هیدرولیز می کند و تمایل زیادی برای اسید آمینه های آب گریز و زنجیر جانبی آروماتیک دارد.



۱-۵- شمایی از آنزیم اکتینیدین.

در جایگاه فعال اکتینیدین ۳ اسید آمینه شامل سیستئین ۲۵، اسید آسپارتیک ۱۵۸ و هیستیدین ۱۵۹ وجود دارد که نقش عمده در فعالیت کاتالیتیکی آنزیم به عهده سیستئین ۲۵ است (Boland &

[1] Actinidia anionic protease
[2] Dansyl-Edman

(Hardman, 1972; Pickersgill et al., 1988). بیشترین اسید آمینه موجود در اکتینیدین، گلایسین (۱٤/٥ ٪) و کمترین اسیدهای آمینه این پروتئین، هیستیدین و متیونین (۰/۹ ٪) است. اکتینیدین اسیدی یک آنزیم آنیونی است زیرا دارای ۲۳ بار منفی (Asp+Glu) و ۹ بار مثبت (Arg+Lys) می باشد. این آنزیم تک رشته ای دارای ۳ پیوند دی سولفیدی درون زنجیره ای بین اسید آمینه های ٦٥-۲۲ و ۹۸-٥٦ و ۲۰٦-۱٥٦ است که تأثیر بسزایی در ساختمان سوم آن دارد (Carne & Moore, 1978; Thomas et Reid et al., 2004 al., 1995;). ملکول اکتینیدین دارای یک ساختار دو حوزه ای [1] است که جایگاه فعال آن در شکاف کم عمق بین دو حوزه واقع شده است حوزه اول شامل باقیمانده های ۱٥٥-۱۹ و ۲۱۸-۲۱٤ بوده و شامل چندین مارپیچ آلفا است. حوزه دوم شامل باقیمانده های ۱۸-۱ و ۲۱۳-۱۱٦ بوده، دارای یک مارپیچ آلفا و صفحات بتا است. برای اکتینیدین حداقل ٦ ایزوآنزیم (KP1-KP6) شناسایی کرده اند که این ایزوآنزیم ها، ظاهراً وزن مولکولی یکسانی دارند (تقریباً معادل ۲٤ کیلو دالتون) و نقطه ایزوالکتریک اکتینیدین ۳/۱ می‌باشد (Baker, 1977; Sugiyama et al., 1997; Carne & Moore, 1978) . در مطالعه ای دیگر مصطفایی وهمکاران SDS-PAGE آنزیم اکتینیدین در شرایط احیایی،غیر احیایی و اوره انجام دادند وIEF در آمفولین در محدوده PH:3/5-5 انجام شد. آنها نشان دادند که اکتینیدین کیوی حاوی حداقل ٦ ایزو آنزیم با نقطه ایزو الکتریک در دامنه ۰۳ /٤ -۳/۸ ویک ایزو آنزیم با PI ٥/ ۳ است(چلبی وهمکاران ۱۳۸۳). اکتینیدین حاوی ٦ باقیمانده تریپتوفان است که این مسأله می تواند توضیحی برای تغیر کانفورماسیون این آنزیم در غلظت های مختلف نمک باشد. فعالیت اکتینیدین در غلظت کمتر از نیم مولار نمک حداقل بوده و با افزایش غلظت به ۳-۰/٥ مولار فعالیت افزایش می یابد(Morimoto et al., 2006). از آنجائیکه گروه تیول سیستئین و زنجیره جانبی هیستیدین جایگاه فعال یونیزه می شوند، فعالیت کاتالایتیک این آنزیم بهpH وابسته است (Pickersgill et al., 1988).

۱-۳-۲- فعالیت پروتئازی اکتینیدین

در مطالعات مختلف، سوبستراهای طبیعی مثل کازئین، ژلاتین، کلاژن، اووآلبومین و آلبومین گاوی (Sugiyama et al., 1997) و یا سوبستراهای مصنوعی مثل سوکسینیل کازئین را جهت بررسی فعالیت پروتئازی آنزیم اکتینیدین به کار برده و نشان دادند که این آنزیم، کلاژن را هیدرولیز نمی کند و فعالیت کلاژنازی ندارد (Sugiyama et al., 1996). Vazquez-Lara و همکارانش در سال ۲۰۰۳ فعالیت پروتئازی آنزیم اکتینیدین بر پروتئین های آلفا- لاکتا آلبومین و بتا-لاکتو گلوبولین را تحت شرایط مختلف pH و دما مورد بررسی قرار دادند. آنها نشان دادند که اکتینیدین در دمای ٤۱/٦ درجه سانتی گراد و pH ٤ باعث تجزیه کامل آلفالاکتالبومین و تجزیه ٦٥ درصد بتالاکتاگلوبولین در مدت ۲ ساعت می گردد (Vázquez-Lara et al., 2003). در یک مطالعه نیز نشان داده شد که اکتینیدین بر روی پروتئین‌هایی مثل

[1] Dubbel domain

کازئین شیر ، آلفا کازئین و کلاژن تاندون موش(pH ۷ و بالاتر) تأثیر گذاشته و آنها را هیدرولیز می‌کند ولی بر پروتئین های دیگری مانند ژلاتین، IgG گوسفند، IgG خرگوش، IgY مرغ، آلفا لاکتآلبومین و بتا لاکتوگلوبولین تأثیرمحسوسی در اغلب شرایط ندارد و قادر به هیدرولیز آنها نمی باشد (مصطفایی و همکاران ۱۳۸۳). از طرف دیگر نشان داده اند که این آنزیم یک پروتئاز مناسب در ترد کردن گوشت یا هضم مواد پروتئینی در بیماران دارای مشکل گوارشی است (Boland & Burns, 1980). Morimoto و همکارانش در سال ۲۰۰٤ فعالیت پروتئازی آنزیم اکتینیدین بر روی آتلوکلاژن (کلاژن هیدرولیز شده توسط پپسین) را در pH های مختلف بررسی کرده و نشان دادند که اکتینیدین نمی‌تواند کلاژن طبیعی را بشکند ولی آتلوکلاژن را هیدرولیز می کند (Morimoto et al., 2004; Sugiyama et al., 1997). Ohyama و همکارانش در سال ۱۹۹۷ نشان دادند که اکتینیدین قادر است در شرایط اسیدی کلاژن نوع I را در دمای ۳۷ درجه و مدت زمان ٦۰ دقیقه بشکند(Ohyma et al., 1997). Wada و همکارانش در سال ۲۰۰٤ اثر اکتینیدین را بر روی کلاژن تاندون آشیل گاوی در pH ٦ و ۳/۳ و دمای ۲۰ درجه سانتیگراد بررسی کرده و نشان دادند که اکتینیدین قادر است در این شرایط کلاژن را به قطعات پپتیدی بشکند(Wada et al., 2004). مصطفایی و همکارانش در سال ۲۰۰۸ اثر اکتینیدین را بر روی کلاژن نوع I و II و جداسازی سلول های مختلف بررسی کرده و نشان دادند که اکتینیدین قادر است کلاژن را مشابه کلاژنازهای باکتریایی بشکند و در شرایط بازی و خنثی، آنزیمی مناسب در جداسازی سلول ها از چند بافت مختلف است(Mostafaie et al., 2008).

۱-۳-۳- مهار کننده‌های آنزیم اکتینیدین

به طور کلی آنزیم‌ها دارای دو گروه مهارکننده طبیعی و مصنوعی هستند. مهارکننده های گروه اول در سلول به صورت طبیعی همراه با آنزیم وجود دارد اما گروه دوم به صورت مصنوعی ساخته می شود. همانطورکه قبلا" هم ذکر شد اکتینیدین یک سیستئین پروتئاز است و مطالعات زیادی بر روی مهارکننده های آن صورت گرفته است. با استفاده از ترکیبات شناخته شده بلوکه کننده گروه سولفیدریل، مشخص شد که این آنزیم به یک گروه سولفیدریل دست نخورده، برای فعالیتش نیاز داشته و با یدو استات غیر فعال می گردد. این مسأله بیانگر این است که این آنزیم یک سیستئین پروتئاز است(McDowal, 1970). اکثر این مطالعات بر روی مهارکننده های E-64 و انواع سیستاتین انجام گرفته شده است. E-64 یک مهار کننده انتخابی با اثر غیرقابل برگشت سیستئین پروتئازها است و با آنزیم تشکیل یک کمپلکس می دهد. با کریستالوگرافی اشعه x ساختمان بلورین این کمپلکس مشخص شده است. معمولاً برای بررسی جایگاه فعال آنزیم از این مهار کننده استفاده می شود (Varughese et al., 1992).

۱-٤ - دستگاه گردش خون

دستگاه گردش خون و لنف شامل قلب، شریان ها، وریدها، مویرگ ها و رگ های لنفی است. خون پمپ شده از قلب که حاوی مواد غذایی و اکسیژن می باشد توسط شریان ها در بدن توزیع می-گردد.

۱-٤-۱ - شریان ها

شریان ها یا سرخرگ ها، خون را از قلب به ارگان های مختلف بدن حمل می کنند و براساس ساختمان هیستولوژیک و اندازه به سه دسته شرائین بزرگ یا الاستیک[۱] ، شرائین متوسط یا عضلانی[۲] و شرائین کوچک یا شریانچه ها[۳] تقسیم می شوند (Junqueira et al., 2000).

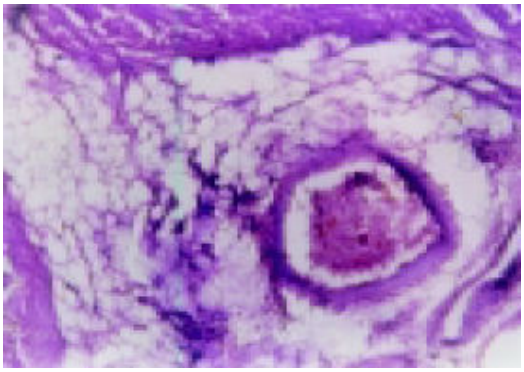
۱-٤-۱-۱ - شریان های الاستیک

این شریان ها شامل آئورت و شاخه های اصلی آن در مجاورت قلب و اغلب شرائین ریوی می باشد. شریان های الاستیک با توجه به خاصیت ارتجاعی خود که به سادگی اتساع می یابند، باعث می شوند خونی که از قلب بطور متناوب پمپ می گردد بصورت پیوسته جریان یابد(Junqueira et al., 2000).

۱-٤-۱-۲ - ساختار دیواره شریان:

در کلیه جانوران دیواره شریان دارای سه پوشش یا غلاف است که از درون به بیرون به ترتیب اینتیما[٤]، مدیا[٥] و ادونتیتیا[٦] خوانده می شوند. غلاف اینتیما شامل لایه اندوتلیال، بافت پیوندی زیر اندوتلیال[۷] و یک لامینای الاستیک درونی است. غلاف مدیا شامل عضله صاف است که در لایه های پیوندی آرایش یافته اند. غلاف ادونتیتیا شامل بافت پیوندی سست است که به وسیله بافت چربی زیر اپیکارد احاطه شده است (شکل ۱-٦). بافت پیوندی شامل فیبر های کلاژن و الاستیک است (Khan et al., 2006).

[1] Elastic arteries
[2] Masculr arteries
[3] Arterioles
[4] Tunica Intima
[5] Tunica Media
[6] Tunica Adventitia
[7] Subendothelial



۱-٦-فتومیکروگراف شریان موش صحرایی بهمراه بافت پیوندی زیر اپیکارد. غلاف ها به سختی قابل تشخیص بوده و مدیا شامل سلول های عضلانی صاف است (Khan et al., 2006).

۱-٤-۲- وریدها[1]

پس از مبادله مواد بین خون و محیط خارج سلولی، در سطح مویرگ ها، خون مویرگی به ترتیب از طریق وریدچه ها، وریدهای متوسط و وریدهای بزرگ به قلب منتقل می گردد. قطر وریدها بزرگتر از شریان ها است. دیواره وریدها همیشه نازکتر از شریان ها بوده و در مقایسه با شریان ها لایه میدیا در آنها نازکتر بوده ولایه ادونتیس ضخیم تر می باشد(Junqueira et al., 2000)

۱-٤-۳ - سلول های اندوتلیال

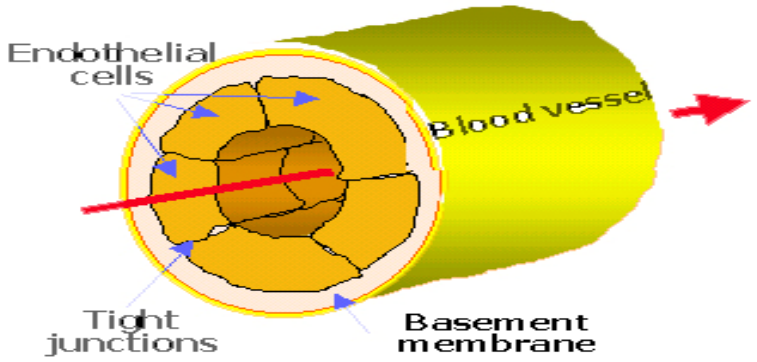
وریدها، شریان ها و مویرگ ها توسط یک لایه سلولی به نام سلول های اندوتلیال مفروش می شوند که ارتباط بافت ها و خون را به عهده دارند. سلول های اندوتلیال چند وجهی بوده و یک هسته مرکزی دارند. بعضی ۲-۱ میکرومتر و بعضی ۲۰- ۱۰ میکرومتر ضخامت دارند. آنها یک الگوی سنگفرشی را در سطح درونی عروق ایجاد می کنند. سیتوپلاسم این سلول ها نسبتاً ساده بوده و دارای ارگانل های کمی است که اغلب در محیط هسته تجمع یافته اند. واضحترین خصوصیت آنها هم تجمع وزیکول های پینوسیتوزی در نزدیکی غشای سلول های اندوتلیال است. یک دستگاه گلژی کوچک، تعداد کمی میتوکندری، ریبوزوم های آزاد و تعدادی شبکه آندوپلاسمی در این سلول ها دیده می شود. لبه های این سلول ها به تدریج نازک شده و ضخامت آن ممکن است به ۰/۲ میکرومتر یا کمتر برسد.

سلول‌های اندوتلیال عروقی حاوی گرانول‌های میله‌ای‌شکل موسوم به گرانول های ویبل – پالاد[2] هستند که بیشتر در شریان ها دیده شده اند. این گرانول ها، حاوی عناصر انعقاد خون موسوم به فاکتور وان ویلبراند[3] (عامل VIII) می‌باشند. این فاکتور یک گلیکوپروتئین است که توسط سلول‌های اندوتلیال

[1] Veins
1 Weibel – Palade granules
2 Von Willebrand

تولید و یک جزء ساختاری و اختصاصی این سلول ها محسوب می‌شود و در مقاطع بافتی برای شناسایی رگ ها مورد استفاده قرارمی گیرد. این ماکرومولکول، اتصال پلاکت ها به دیواره آسیب دیده رگ ها را باعث می شود. بنابراین کمبود این گروه از پروتئین ها، منجر به ایجاد اختلال در اتصال پلاکت ها به اندوتلیوم صدمه دیده و در نتیجه خونریزی طولانی می گردد (Junqueira et al., 2000; Ross et al., 2003; Zenetta et al., 2000).

سلول های اندوتلیال مشتق شده از عروق ارگان های مختلف وحتی نواحی متفاوت یک ارگان دارای عملکردهای متفاوتی هستند. به عنوان مثال سلول های اندوتلیال شریان و ورید از نظر پتانسیل میتوتیک، تمایل به لایه زیری[1]، ذخیره لیپید در سیتوپلاسم، حساسیت نسبت به تکنیک های برون تن و میزان بقا با هم متفاوت هستند (Blose et al., 1975).



۱-۷- شمایی از یک رگ خونی. سلول‌های اندوتلیال روی غشای پایه قرار دارند و توسط اتصالات محکم به یکدیگر متصل می شوند.

۱-٤-۳-۱- اعمال سلول‌های اندوتلیال

۱- سلول های اندوتلیال نفوذ پذیری نسبی داشته و عبور مایع و مولکول های مختلف را از عرض غشای خود تنظیم می کنند. این سلول ها نقش مهمی نیز در انتقال مواد از خون به بافت ها دارند. سلول های اندوتلیال برای ملکول های زیادی از جمله پروتئین ها(فاکتور رشد، پروتئین های انعقادی و ضد انعقادی)، ذرات انتقال دهنده لیپید(مثلاً LDL)، متابولیت ها(مثل NO و سروتونین) و هورمون ها (مثل اندوتلین-I) دارای گیرنده سطحی هستند.

۲- اعمال متابولیک: سلول های اندوتلیال می توانند انواع و اقسام مواد را متابولیزه کنند:

الف- فعال سازی: تبدیل آنژیوتنسین I به آنژیوتنسین II .

ب – غیر فعال سازی: تبدیل برادی کینین، سروتونین، پروستاگلاندین ها ، نور اپی نفرین و غیره به ترکیبات زیستی خنثی.

[1] substratum

ج – تجزیه چربی ها: تجزیه لیپوپروتئین ها به تری‌گلیسیرید ها (انرژی) و کلسترول (پیش ماده هایی که برای ساختن هورمون های استروئیدی و غشای سلول لازمند).

۳ – عملکرد ضد ترومبوژنیک: هنگامی که سلول های اندوتلیال ریزش می کنند، بافت پیوندی زیر اندوتلیالی که بدین وسیله عریان شده موجب انباشته شدن پلاکت های خون می گردد، سپس انعقاد فیبرین، توده های جامدی به نام ترومبوس پدید می آورد که می توانند بزرگ شده و جریان خون عروق را بند آورند. این پدیده واقعه ای است که می تواند زندگی فرد را به مخاطره افکند. اگر سلول‌های اندوتلیال موجود باشند، از اتصال پلاکت ها به بافت پیوندی زیر اندوتلیالی جلوگیری می کنند و بدین وسیله اثری ضد ترومبوژنیک از خود بر جای می گذارند.

٤– نقش سلول های اندوتلیال در رگ زایی و سرطان: این سلول ها واکنش های مهمی با بافت های سرطانی دارند. این بافت ها همچون سایر بافت ها برای تأمین مواد غذایی و دفع مواد زائد به خون نیاز دارند. بافت های سرطانی در حال توسعه، سیگنال های شیمیایی را تولید و آزاد می کنند که توسعه رگ های خونی جدید را تحریک می کند. رشد سلول های اندوتلیال برای تشکیل رگ های خونی جدید رگ زایی نامیده می شود که شامل آزادسازی آنزیم هایی از این سلول هاست. این آنزیم ها، بافت‌های اطراف را هضم و جایی برای رگ های خونی جدید باز می کنند. سلول‌های اندوتلیال به عنوان هدفی مهم برای روش های جدید درمان سرطان شناخته شده اند. چراکه با توقف رشد سلول‌های اندوتلیال برای تشکیل رگ های جدید (رگ زایی)، از رشد سرطان نیز جلوگیری می شود (Wang et al., 2004).

٥– اعمال ترشحی سلول های اندوتلیال: سلول های اندوتلیال شل کننده های عروقی همچون نیتریک اکساید (NO) و پروستاسیکلین (PGI2) و یا منقبض کننده های عروقی همچون اندوتلین (E1) و فاکتور فعال کننده پلاکت (PAF) را ترشح می کنند.

٦– میانکنش بین سلول های اندوتلیال و سلول های خونی: سلول های اندوتلیال ملکول های سطحی را بیان می کنند که عبور و مرور سلول های خونی در جریان را تسهیل می کنند. این ملکول های سطحی در شرایط فیزیولوژیک به مهاجرت لوکوسیت ها به درون بافت های خاص کمک کرده و در پاسخ به اینترلوکین٦[1] و اینتر لوکین ۸ [2] لوکوسیت ها را به محل التهاب هدایت می کنند.

۷– بیماری های عروقی مرتبط به سلول های اندوتلیال: با پیشرفت سن ساختمان دیواره شریان ها دچار تغییراتی می گردد که این تغییرات در شریان های نواحی مختلف بدن متفاوت می باشد. معمول

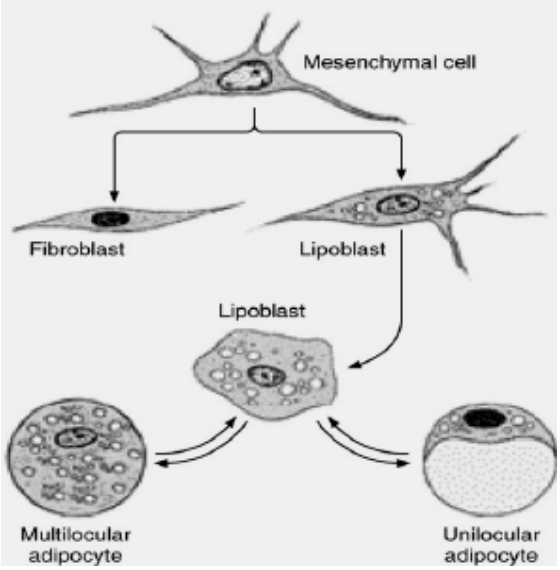
[1] IL-6
[2] IL-8

ترین این تغییرات آترواسکلروز[1] و یا آرتریواسکلروز[2] می باشد که با ضخیم شدگی اینتیما، تکثیر سلول های عضلانی و اجزای بافت همبندی و تجمع کلسترول در سلول های عضلانی و ماکروفاژها در محل ضایعه، مشخص می گردد و باعث افزایش فشار خون می گردد. ضایعات آترو اسکلروزی بعلت برجسته شدن بداخل شریان می توانند باعث انسداد رگ های خونی شده و منجر به ایسکمی(کم خونی) یا نکروز (مرگ) بافتی و نهایتاً انفارکتوس یا سکته گردد. شریان های آئورت، کلیوی و شریان های کرونر قلب مستعد ابتلا به آترواسکلروزیس هستند. نازک بودن غیر طبیعی لایه میانی مخصوصاً در شریان ها باعث برجسته شدن حباب مانند دیواره رگ می گردد که آنوریسم[3] نامیده می شود. (Junueira et al., 2000; Cines et al., 1998).

۱-۵- بافت چربی[4]

بافت چربی دارای منشاء مزانشیمی است. در این بافت سلول های مزانشیمی تمایز نیافته ابتدا به لیپوبلاست یا آدیپوبلاست تبدیل می شوند. تجمع چربی در درون آدیپوبلاست ها بصورت قطرات کوچک شروع و سپس با بهم پیوستن آنها قطره بزرگ و واحدی تشکیل و سلول در این حالت سلول چربی نامیده می شود(شکل۱-۸). آدیپوز یا بافت چربی شامل مجموعه ای از سلول های حاوی لیپید بنام آدیپوسیت ها است که به صورت شل در یک قالب فیبری کلاژن نگاه داشته شده اند. بافت چربی علاوه بر آدیپوسیت ها حاوی سلول های پری آدیپوسیت، سلول های خونی، سلول های اندوتلیال، فیبروبلاست ها، لوکوسیت ها، ماکروفاژها و مونوسیت ها است. آدیپوسیت ها در حدود ۲/۳ کل سلول های این بافت را شامل شده و به جهت اندازه شان بیش از ۹۰ درصد حجم این بافت را اشغال می کنند (Carey, 1998; Ramsay, 1996). در بافت پیوندی سست که آدیپوسیت ها را در کنار هم نگاه می دارد ۷ پروتئین ماتریکس خارج سلولی (به استثنای کلاژن نوع II) نسبتاً فراوان بوده و به صورت نامنظم آرایش یافته اند (Nakajima et al., 2004). توده بافت چربی با افزایش تعداد سلول ها (هایپرپلازی) و یا افزایش اندازه سلول ها (هایپر تروفی) افزایش حجم می یابد. این بافت در پستانداران به دو شکل چربی سفید و قهوه ای دیده می شود.

[1] Atherosclerosis
[2] Arteriosclerosis
[3] Aneurism
[4] Adipose Tissue



۱-۸-نحوه تمایز سلول های مزانشیمی به آدیپوسیت بالغ

۱-۵-۱- بافت چربی سفید یا تک حفره ای[1]

در این نوع چربی، چربی ذخیره شده در درون سلول ها بصورت قطره ای بزرگ و واحد می باشد و حجم عمده سیتوپلاسم را اشغال می کند. سیتوپلاسم به صورت باریکه ای در محیط و هسته بصورت پهن و کناری دیده می شود. سلول های چربی توسط غشای ظریفی احاطه شده اند و در حد فاصل آنها مقدار کمی بافت همبند شل حاوی عروق و اعصاب دیده می شود. این سلول ها دارای قطری بین ۲۰۰-۲۵ میکرون هستند. میتوکندری ها اغلب در نواحی ضخیم تر سیتوپلاسم و نزدیکی هسته دیده می-شوند(شکل۱-۹). تقریباً ۸۰-۶۰ درصد وزن بافت چربی سفید لیپید، ۳۰-۵ درصد آب و ۳-۲ درصد پروتئین است. نقش بافت چربی سفید در تعادل انرژی و تحقیقات چاقی امروزه مورد توجه است. رنگ این بافت به علت کاروتنوئید های موجود در آن از سفید تا زرد متغیر است.

بر خلاف دیگر ارگان ها این بافت در چندین جایگاه بدن از جمله در زیر جلد ونواحی درونی بدن گسترش یافته است. موقعیت بافت چربی سفید در بدن تحت تاثیر سن، جنس و هورمون ها است (Junueira et al., 2000; Tesler et al., 2007).

بافت چربی سفید دارای چند عملکرد است:

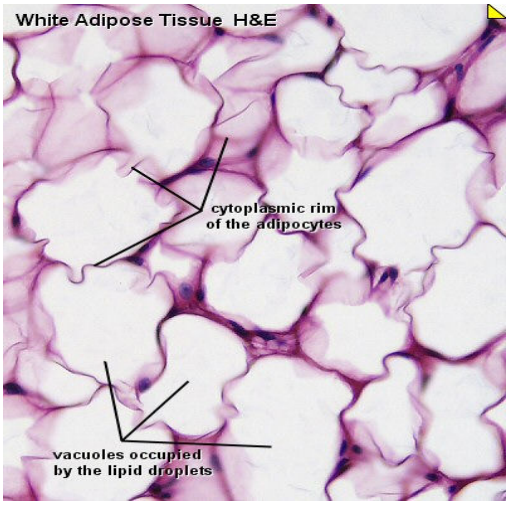
۱) می تواند به عنوان یک عایق حرارتی عمل کند.

۲) بافت های دیگر را در مقابل صدمات مکانیکی محافظت می کند.

۳) منبع ذخیره انرژی بصورت تری آسیل گلیسرول است و یک سوخت طولانی مدت برای جاندار فراهم می کند.

[1] Withe "unilocular" adipose tissue

٤) آدیپوسیت های سفید دارای فعالیت ترشحی بوده و بافت چربی را به یک ارگان اندوکراین تبدیل می کنند.

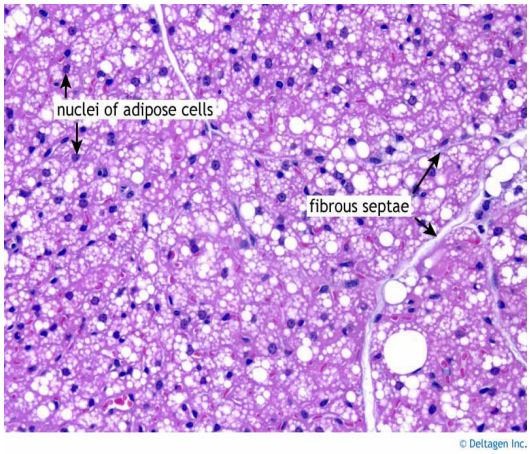


۱-۹-بافت چربی سفید یا تک حفره ای

۱-۵-۲- بافت چربی قهوه ای یا چند حفره ای[1]

از جمله خصوصیات بافت چربی قهوه ای سلول های چند حفره ای است که حاوی تعداد زیادی قطرات کوچک لیپید هستند. این سلول ها به صورت یک شکل گسترش یافته اند و دارای یک هسته مرکزی هستند. تعداد و اندازه قطرات چربی وابسته به سن، دمای خارجی، مواد مغذی، سیستم های عصبی و اندوکراین است. این سلول ها از نظر میکروسکوپی چند وجهی بوده و دارای یک هسته گرد در وسط سلول می باشند. قطر این سلول ها ممکن است به ٦٠ میکرون و قطر قطره لیپید درون آنها به ۲۵ میکرون برسد. رنگ بافت چربی قهوه ای به علت عروق و میتوکندری زیاد آن است این بافت بیشتر در نوزاد انسان در گردن، اطراف کلیه ها و پهلو ها دیده می شود (شکل۱-۱۰). چربی قهوه ای، برخلاف چربی سفید، محل ذخیره انرژی نمی باشد بلکه محلی برای تولید حرارت به شمار می رود. در این بافت به علت کاهش فسفریلاسیون اکسیداتیو در میتو کندری ها، ATP کمتری تولید شده و قسمت عمده انرژی حاصل از تجزیه، بصورت حرارت آزاد می گردد (Junueira et al., 2000; Tesler et al., 2007).

[1] Brown "multilocular" adipose tissue



۱-۱۰-بافت چربی قهوه ای یا چند حفره ای

۱-۵-۳ - اعمال بافت چربی

۱-۵-۳-۱- لیپوژنز

لیپوژنز ذخیره چربی است. این پروسه در بافت چربی و کبد رخ می دهد. انرژی به صورت چربی، کربوهیدرات ها و پروتئین ها در رژیم غذایی دریافت شده و آنچه که مازاد بر نیاز روزانه است در بافت چربی ذخیره می گردد.

۱-۵-۳-۲- لیپولیز

لیپولیز تجزیه شیمیایی و رهایی چربی از بافت چربی است.

۱-۵-۳-۳- فعالیت ترشحی بافت چربی

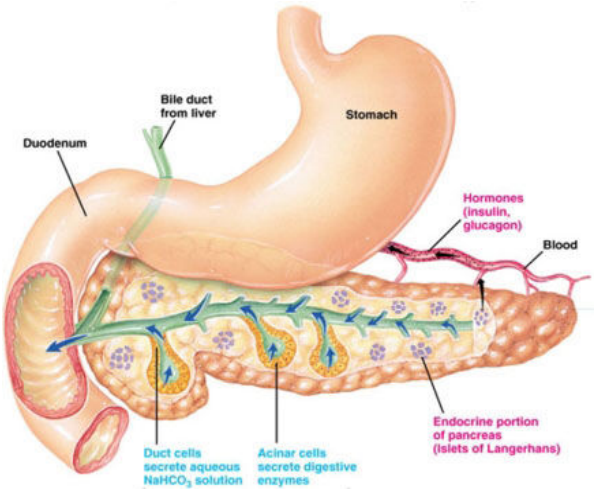
مهمترین ترشح آدیپوسیت ها، اسیدهای چرب است. علاوه بر اسیدهای چرب، بخش های لیپیدی همچون پروستانوئیدها، کلسترول و رتینول از این بافت رها می گردند. بافت چربی غنی از هورمون ها و دیگر فاکتور ها است. از جمله آدیپوکاین ها (آدیپونکتین، لپتین و رزیستین) که از نظر ساختارپروتئینی و عملکرد فیزیولوژیک بسیار متنوعند، سیتوکین ها (TNF-α) ، اینترلوکین ٦و ٨ ، فاکتورهای التهابی (فیبرونکتین و CRP)، اجزای سیستم کمپلمان (C_3وفاکتور D و B) (Summers et al., 2006).

۱-۵-٤- اختلالات مرتبط با بافت چربی

حین بزرگ شدن بافت چربی، تولید اغلب فاکتورهای آدیپوسیت افزایش می یابد و منجر به یکسری اختلالات می گردد، از جمله، مقاومت به انسولین (TNF-α)، فشار بالا(آنژیوتنسینوژن)، افزایش ترومبوز(PAI-1) و آترواسکلروزیس(IL-6) (Neels et al., 2004; Fried & Russel, 1998).

۱-٦- بافت شناسی پانکراس[1]

پانکراس غده مختلط برون ریز و درون ریزی است که در انحنای دوازدهه قرار گرفته است و از نظر آناتومیک از سه قسمت سر، تنه و دم تشکیل شده است. پانکراس از بیرون توسط کپسولی از جنس بافت همبند احاطه شده که استطاله هایی از آن به درون غده نفوذ کرده و آنرا به لبول های نا مشخصی تقسیم می کند (شکل ۱-۱۱).



شکل ۱-۱۱-بافت پانکراس

۱-٦-۱-بخش برون ریز پانکراس

این قسمت از پانکراس از نوع خوشه ای مرکب می باشد و از آسینی های ترشحی و مجاری تشکیل شده است. آسینی های ترشحی از تعدادی سلول هرمی تشکیل شده اند که در قسمت رأسی خود حاوی گرانول های ترشحی می باشند و در قسمت قاعده حاوی هسته و مقادیر زیادی شبکه آندوپلاسمی خشن هستند. آسینی ها توسط لامینای پایه احاطه شده اند و ترشحات خود را به درون مجرای رابط[2] تخلیه می کنند. مجاری رابط بهم پیوسته و مجاری بین لبولی را بوجود می آورند که به مجرای اصلی، در مرکز پانکراس، بنام مجرای ویرسونگ ختم می شوند. مجرای ویرسونگ پس از خروج از پانکراس در محلی بنام آمپول واتر[3]، همراه با مجرای صفراوی مشترک به دوازدهه باز می شود. سلول های مرکز آسینی[4] در مرکز آسینوس و ابتدای مجرای رابط قرار گرفته اند و توسط اتصالات محکم به سلول های آسینار متصلند (شکل ۱-۱۲).

[1] Pancreas
[2] Intercalated duct
[3] Ampulla of water
[4] centro acinar cells