



1000A

دانشگاه علوم پزشکی تهران
دانشکده داروسازی

پایان نامه :

برای دریافت درجه دکتری از دانشگاه تهران

موضوع :

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم منوآمین اکسیداز
و اثر داروها بر آن

برای همایشی استادارجمند :

جناب آقای دکتر مسعود محمودیان

نگارش :

زهرا عطاشی

شماره پایان نامه : ۲۶۲۶

سال تحصیلی ۶۸-۱۳۶۷

۱۰۰۵۱

تقدیم به :

استاد محترم جناب آقای دکتر محمودیان وبا

تشکرا زراهنمائیهای ایشان .

تقدیم به :

پدر و مادر عزیز و مهربانم که می دانم هرگز توان
جبران ذره ای از دریای محبت بی دریغشان
را نخواهم داشت .

تقديم به :

خواهران خوبم

و

برادر عزیزم

تقديم به :

هيئت محترم قضاة

تقديم به :

تمامي پويندگان و جويندگان حق و عدالت

کار مربوط به این پایان نامه در بخش فارما کولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام گردیده است. بخشی از مواد مورد استفاده در این پروژه یعنی مشتقات ایزاتین توسط دکتر سید حسین پژوهش و با همکاری خانم سیگاری در مرکز تحقیقات داروئی دارو بخش سنتز شده است که بدین وسیله از همکاران آن مرکز تشکر میشود.

همچنین فوراً زولیدون مورد استفاده در آزمایشات از کارخانه تهران دارو تهیه شده است که به همین جهت از مسئولین این کارخانه نیز کمال تشکر را دارم.

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱	تاریخچه
۴	انواع آنزیم منوآمین اکسیداز
۱۷	نقش فیزیولوژیک آنزیم MAO
۲۲	انواع سوبستراهای MAO
۲۸	انواع مهارکننده‌های MAO
۲۹	مهارکننده‌های برگشت پذیر
۳۳	مهارکننده‌های برگشت نا پذیر
۳۳	مهارکننده‌های غیرقابل برگشت MAO
۳۶	مهارکننده‌های برگشت پذیر و انتخابی MAO
۴۵	فارماکولوژی مهارکننده‌های MAO
	کاربردهای درمانی وقفه‌دهنده‌های انتخابی و
۴۸	برگشت پذیر MAO
۵۵	مزایای مهارکننده‌های انتخابی و برگشت پذیر MAO
۵۹	روشهای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم MAO
	کاربردهای بالینی اندازه‌گیری و سنجش فعالیت
۶۸	آنزیم MAO
۷۲	بخش کارهای تجربی
۹۳	نتایج
۱۰۴	بحث
۱۱۲	منابع

تاریخچه

مها رکننده‌های آنزیم منوآمین اکسیدازا سال ۱۹۵۷ در درمان افسردگی مورد استفاده قرار گرفتند. اولین مها رکننده قوی منوآمین اکسیدازکه در درمان مورد استفاده قرار گرفت ایپرونیا زید بود که ابتدا در درمان بیماری سل بعنوان داروی همخانواده ایپرونیا زیدبکار رفت و بزودی مشاهدات بالینی اثر مطلوب این دارو را روی افسردگی و آنژین پکتوریس نشان داد. بعداً "مشخص گردید که این دارو ها که دز آمینا سیون اکسیداتیونوراپی نفرین را مها ر میکنند، موجب کاهش فشارخون هم میشوند. اما بزودی معلوم گردید که استفاده از این داروها بدون عارضه هم نیست بعنوان مثال ایپرونیا زیدبخاطر سمیت کبدی کشنده از بازار داروئی آمریکا حذف شده است. (۱)

همچنین بدنیا ل مصرف غذا های حاوی تیرامین و برخی داروها با مها رکننده های منوآمین اکسیدازبحرانهای کشنده فشارخون ایجاد می گردد. به همین دلایل این داروها جای چندانی در کنترل فشارخون بالا نداشته و در درمان افسردگی هم انتخاب اول نیست و فقط در موارد شدید افسردگی بخصوص افسردگیهای توام با اضطراب تجویز میگردد.

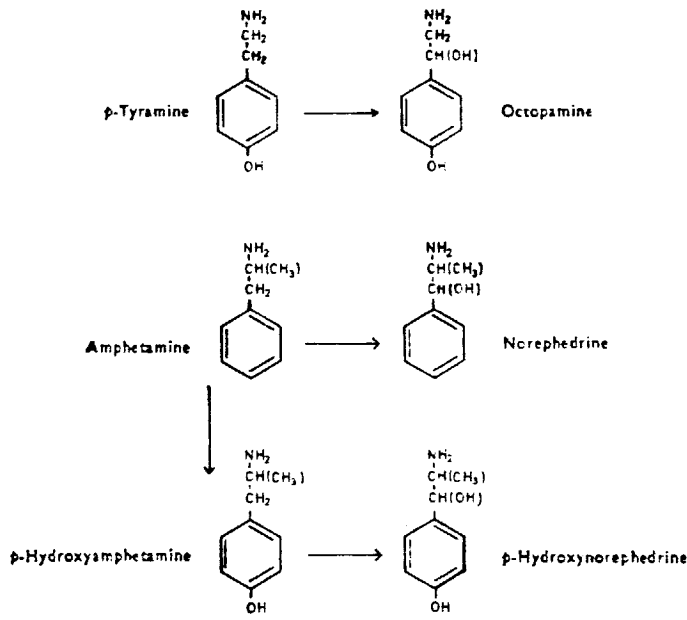
تاثير اين دارو ها روی فشارخون به دو صورت توجیه میگردد که هر دو به یک اثر مرکزی نسبت داده میشود. اول آنکه نوراپی نفرین محافظت شده (دز آمینه نخته) سبب تحریک رسپتورهای α_2 می گردد (مشابه عمل متیل دوپا و کلونیدین) و دوم اینکه واسطه های شیمیائی کاذب در نرونهای آدرنرژیک محیطی تجمع می یابد. (۲)

در مورد نحوه تشکیل و عملکرد واسطه های شیمیائی کاذب میتوان -

چنین توضیح داد که آنزیمهای بیوسنتز نوراپی نفرین ، خصوصاً " دوپا دکربوکسیلاز و دوپا مین β - هیدرکسیلاز دارای طیف وسیعی از سوبستراهای متفاوت می باشند . به عبارت دیگر مواد مختلفی که از نظر ساختمانی مشابه ترکیبات واسطه‌ای روند سنتز نوراپی نفرین هستند میتوانند توسط این آنزیمها متابولیزه شوند . (۳)

آمینهای مثل P- تیرامین در شرایط عادی به مقادیر قابل ملاحظه وارد گردش خون عمومی نمیشوند زیرا پس از جذب توسط منوآمین اکسیداز کبد و روده تجزیه میگردد و دولی در طی تجویزها رکننده‌های منوآمین اکسیداز ، چنین آمین‌هایی به گردش خون وارد شده و توسط نرونهای سمپاتیک جذب شده و در آنجا به واسطه‌های شیمیایی کاذب β - هیدرکسیلاز مبدل میشوند . در تجویز طولانی مدت آنها رکننده‌های منوآمین اکسیداز مقادیر اکتوپا مین حاصل از P- تیرامین افزایش یافته و در نرونهای آدرنرژیک ذخیره میگردد و سپس به عنوان یک واسطه شیمیایی کاذب آزاد میشود . لازم به یاد آوریست که واسطه‌های شیمیایی کاذب فعالیت آگونیستی بسیار ضعیف تری را نسبت به نوراپی نفرین دارا میباشند . این مطلب در توضیح اثر این داروها در کاهش فشار خون مورد استفاده قرار میگیرد . (۲) (۳) .

نمونه‌ای از عملکرد آنزیم دوپا مین β - هیدرکسیلاز در ایجاد واسطه شیمیایی کاذب در زیر نشان داده شده است :



Metabolism of p-tyramine and amphetamine.

بدنبال استفاده از ایپرونیا زید بعنوان مهارکننده آنزیم
منوآمین اکسیداز استفاده از ترکیبات استیلنیک (Propargyl)
مانند پارژیلین (N-بنزیل، ۱-متیل، ۲-پروپارژیلامین)
بعنوان مهارکننده های غیرقابل برگشت آنزیم منوآمین اکسیداز توسط
Gladish, Waykes, Everett, Taylor, Martin, Swett
در ۱۹۶۳ آغاز گردید. (۴)

همانطور که گفته شده علت عوارض خطرناکی که این داروها از خود
نشان دادند، استفاده از آنها محدود گردید. اما بدنبال کشف این
مطلب که آنزیم منوآمین اکسیداز بصورت ایزوآنزیم می باشد که هر فرم
آن سوبسترای اختصاصی داشته و می تواند بطور انتخابی مهار شود، مهار
کننده های منوآمین اکسیداز مجدداً " بعنوان عوامل درمانی اهمیت
خود را با زیافته اند و امروزه تلاش برای عرضه داروهای انتخابی تر و با
عوارض و خطرات هرچه کمتر همچنان ادامه دارد.

انواع آنزیم منوآکسیداز (MAO) :

Sourkes , Youdim در سال ۱۹۶۵ گزارش کردند که فرآورده های میتوکندریال کبد و مغز موش حداقل شامل ۲ فرم آنزیم MAO می باشد که این ۲ فرم از نظر pH مناسب ، پایداری در برابر حرارت و مهارکننده های انتخابی با هم متفاوت هستند . (۴)

همچنین بدنبال استفاده از ترکیبات استیلنیک که قبلاً "به آن اشاره گردید ، در سال ۱۹۶۸ ، Johnston گزارش نمود که یک ترکیب دیگر از پروپارژیلامین بنام کلرژیلین [N - متیل ، N - پروپارژیل ، ۳ - (۲ ، ۴ - دی کلرو فنوکسی) پروپیل امین] می تواند MAO کبد و مغز موش صحرائی را مهار کند و اگر ۵ - هیدروکسی تریپتامین (5-HT) بعنوان سوپسترا بکار رود اثر مهای خود را با غلظت کمتری نسبت به زمانیکه بنزیل آمین بعنوان سوپسترا بکار رود ، اعمال میکنند و در استفاده از تیرامین منحنی مهای ، دو مرحله ای میباشد . Johnston از این مشاهدات چنین نتیجه گیری کرد که آنزیم MAO یک آنزیم ساده نیست بلکه به ۲ فرم وجود دارد که وی آنها را اصطلاحاً "تیپ A و B نامید و بیان کرد که تیپ A در مقابل سروتونین ، تیرامین ، نوراپی نفرین اکتوپا مین و دوپا مین فعال بوده و به مهای توسط کلرژیلین حساس است و تیپ B نسبتاً " به مهای توسط کلرژیلین غیر حساس بوده و در مقابل بنزیل آمین ، فنیل اتیل آمین ، تیرامین ، و دوپا مین فعالیت نشان می دهد . (۲)

تقسیم بندی آنزیم به دو فرم یکا مر مطلق نیست بطوریکه در غلظتهای بالا، سوبستراها و یا مهارکنندهها بصورت اختصاصی و انتخابی فرم A یا B عمل نمی کنند و روی هر دو فرم آنزیم اثر خواهند داشت که در چندین گزارش از جمله گزارشات Green , Youdim در سال ۱۹۷۵ -
Kamijo , Hagashi , Toyoshima , Wakui, Kinemuchi در سال ۱۹۷۹ -
Houslay , Fowler در سال ۱۹۸۲ بررسی و اثبات این مطلب آمده است. (۴)

اگرچه تقسیم بندی MAO به دو ایزو آنزیم به بررسی و آزمایشات بیوشیمیائی و فارماکولوژیکی MAO در خصوص اختصاصی و انتخابی بودن سوبسترا و مهارکننده کمک میکند اما این مطلب که آیا این دو فرم آنزیم دو پروتئین مختلف هستند یا نه مهم نیست بلکه سئوالی که همچنان مطرح می باشد اینست که آیا دو فرم آنزیم در شرایط *In vivo* بصورت دو سیستم متفاوت اکسیداز عمل خواهند نمود یا نه.

در ضمن اکنون معین شده که در برخی اندامها فرم دیگری از آمین اکسیداز وجود دارد که برخی از صفات مشترک فرم A و B آنزیم MAO را دارا می باشد و از نظر کوفاکتور و تجمع در بافتها و سلولها و نیز از نظر سوبسترا و مهارکنندههای اختصاصی با دو فرم آنزیم MAO تفاوت دارد که بنام "آمین اکسیداز مقاوم به کلرژیلین" ($\text{CRAO} =$) و یا نام قابل قبول تر "آمین اکسیداز حساس به سمی کاربازید" ($\text{SSAO} =$) نامیده میشود. برخلاف MAO که یک آنزیم فلاوپروتئین است دارای FAD (فلاوین آدنین دی نوکلئوتید) نیست (۳) و برخی این آنزیم را دارای مس میدانند.

این آنزیم که بنام بنزیل آمین اکسیداز هم نامیده میشود و همچنین منوآمین اکسیداز تیپ B هر دو بطور انتخابی سبب دز آمینا سیون بنزیل - آمین میشوند اما فعالیت بنزیل آمین اکسیداز نسبت به غلظت 4×10^{-4} مولارد پرنیل حساس نیست در حالیکه این غلظت، هر دو فرم آنزیم منوآمین اکسیداز را مهار میکند تفاوت دیگر بنزیل آمین اکسیداز با منوآمین اکسیداز این است که کبد و مغز بیشترین فعالیت فرم B منوآمین اکسیداز را نشان میدهد ولی فعالیت بنزیل آمین اکسیداز بیشتر در آئورت و ریه دیده میشود. ضمناً " در پلاسما هم فعالیت اندکی از بنزیل آمین اکسیداز دیده میشود. همچنین طبق یک گزارش که در سال ۱۹۷۸ منتشر گردید در موش صحرائی فنیل اتیل آمین و دوپامین سوسترای بنزیل آمین اکسیداز هم هستند اما در انسان این دو آمین منحصر " توسط منوآمین اکسیداز دز آمینا - میشوند. (۵)

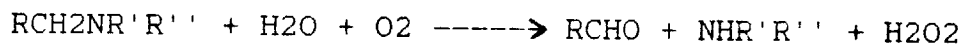
در بررسی دیگر اثرهای غیر قابل برگشت هیدرالازین روی آنزیم - بنزیل آمین اکسیداز در بافتهای مختلف موش صحرائی مانند قلب در شرایط *In vivo* و *In vitro* به اثبات رسیده و مشخص گردیده است که این دارو یک مهارکننده قوی بنزیل آمین اکسیداز می باشد. هیدرالازین با غلظت بیشتر روی MAO (بخصوص تیپ A) هم اثرهای دارد فعالیت بنزیل آمین اکسیداز در سرم در بیماران سرطانی و آنهایی که دچار سوختگیهای شدید و طولانی هستند بطور واضحی کاهش می یابد. (۶) وظیفه و عملکرد این آنزیم در *In vivo* هنوز نامشخص است. نتایج نشان داده است که مهار فعالیت این آنزیم در عضله، آناکوکسی ژئوس موش صحرائی موجب تقویت پاسخ انقباضی نسبت به آمین های سمپاتیک که سوسترای آن -

هشتمند میگردد. (۳)

سمی کاربازید، پروکاربا زین و کربی دوپا مها رکننده های قسوی
بنزیل آمین اکسیداز بوده و بطور انتخابی آنرا مها رمی کنند و اساساً " روی
MAO اثری ندارد. (۵)

آنزیم منوآمین اکسیداز بیشتر در غشاء خارجی میتوکندری متجمع
میشود. (۱ و ۲) با وجود بانندینگ محکم آنزیم، MAO از میتوکندری
کبدگذا و بصورت بسیار خالص بدست آمده است این آنزیم یک پروتئین زرد
روشن است و در مقابل، منوآمین اکسیداز خالص پلاسما ی گا و صورتی است.
طیف ما و راء بنفش آن کا ملا" با یک فلاوپروتئین مطابقت نمی کند اما
حضور دمول FAD در ازای هر مول آنزیم (وزن مولکولی آنزیم حدود
۳۰۰۰۰۰ است.) بطور قطعی ثابت شده است. (۳)

MAO واسطه های منوآمین مثل سروتونین، نوراپی نفرین، دوپا
- مین، Tele-methyl histamine (اولین متابولیت هیستامین در
درمغز) و آمین های معینی که به مقادیر جزئی در مغز یافت میشوند مانند
فنیل اتیل آمین، تربیتامین، تیرامین و نیز آمین های موجود در داروها
ورژیم غذایی را غیر فعال میکند. اخیراً " مشخص شده که MAO یک
ترکیب متفاوت یعنی MPTP (۱- متیل، ۴- فنیل، ۱-۲-۳-۶- تترا
هیدروپیریدین) را هم اکسیده می کند. MAO عموماً " واکنش زییرا
کاتالیزی کند: (R' & R'' : H or CH₃)



گفته شده که دو فرم A و B از آنزیم MAO سوپسترا و مها رکننده های
متفاوتی دارند. بعنوان مثال سروتونین ترجیحاً " توسط فرم A