علیرضا فرخ، دانشکده علوم و فناوریهای نوین، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد
دکتر طاهره ناجی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد

ارتباط بین داروهای پوستی و آنزیم تایروزیناز

تایروزیناز یک آنزیم حاوی مس است که دو واکنش مجزا در مسیر تولید ملانین را کاتالیز می کند. عمل هیدروکسیلاسیون تایروزیناز به وسیله فعالیت منوفنولازی و اکسیداسیون ۳ و ٤-دی هیدروکسی فنیل آلانین (L-Dopa) به O-دوپاکوئینون به وسیله فعالیت دی فنولازی میسر می شود. O-دوپاکوئینون ناپایدار است و در اثر فعالیت غیرآنزیمی تبدیل به دوپاکروم می شود. در هر دو واکنش فوق اکسیژن مولکولی به عنوان کو-سوبسترا استفاده می شود. در واقع آنزیم تایروزیناز یک آنزیم دو سوبسترایی است.

با توجه به اهمیت آنزیم تایروزیناز در تشکیل رنگدانه و اینکه عمل آنزیم تایروزیناز چه در پزشکی و داروسازی و چه در صنایع غذایی، موجب ایجاد اشکالاتی می شود مثل بدرنگ شدن پوست و ایجاد کک و مک، همچنین تغییر رنگ غذاها و میوه ها، بنابراین در این تحقیق تصمیم بر آن شد که تاثیر بعضی از داروهای موجود در بازار از نظر فعالیت ضد تایروزینازی مورد بررسی قرار گیرد.

محصولات ضد رنگدانه ای در حال حاضر در دسترس است، این ترکیبات روشن کننده پوســـت، رنگدانه های ناخواسته را به وسیله اثر Hyperpigmentation (تولید بیش از حد رنگدانه های پوست) که امروزه مشکلی بزرگ در میانسالی و بزرگسالی است با گذاشتن در یک مرحله و یا مراحل بیشتر از پروسه تولید رنگدانه حذف کرده و یا درجه آزادســـازی آنزیم هایی را که سبب تولید مواد شـــیمیایی به وسیله سلول ها می شـــود را محدود می کنند. بیشتر محصولات روشن کننده پوست به دلیل تاثیر آنها روی آنزیم به کاربرده می شوند. عوامل ضد رنگدانه ای که روی مسیر ساخت ملانین تاثیر می گذارند، به چند گروه تقسیم می شوند:

گروه اول: آنهایی است که قبل از ساخت ملانین، تاثیر خود را اعمال کرده و سبب تغییر در الگوی آزاد سازی آنزیم تایروزیناز می شود، مانند ترتینوئین.

گروه دوم: هنگام ساخت ملانین یا از طریق جلوگیری از آزاد سازی آنزیم تایروزیناز عمل کرده مانند هیدروکینون، آربوتین، کوجیک اسید، آزلائیک اسید و... و یا از طریق کاهش میزان ساخته شدن ملانین عمل می کنند مانند اسکوربیک اسید (ویتامین C).

گروه سوم: آنهایی است که پس از ساخت ملانین تاثیر گذار است که بعضی از آنها سبب تنزل در میزان تایروزیناز شده مانند لینولئیک اسید، و برخی دیگر مانع از انتقال ملانین ها و پخش شدن آنها می شود مانند عصاره سویا و نیاسینامید و برخی نیز سبب شتاب در بازسازی و ترمیم سلول های پوست می گردند مانند گلایکولیک اسید، لاکتیک اسید، لینولئیک اسید، رتونئیک اسید.

هیدروکینون: سال های بسیار زیادی است که ترکیبات فنولیک از جمله هیدروکینون در درمان ملاسما، التهاب و تولید بیش از حد رنگدانه بسیار موفق بوده است. هیدروکینون به طور طبیعی در بسیاری از گیاهان و در چای و قهوه و آب جو و شراب وجود دارد. خاصیت ضد رنگدانه ای هیدروکینون به خاطر جلوگیری کردن از تبدیل تایروزیناز به ملانین است. می تواند تا ۹۰٪ عملکرد تایروزیناز را کاهش دهد.

پوست یک ارگان حیاتی است که بدون آن هیچ موجودی قادر به ادامه حیات نیست. پوست به عنوان وسیع ترین عضو زنده بدن، در حقیقت یکی ار پیچیده ترین، جالب ترین و پرکارترین اعضاء نیز به شمار می آید. دستاوردها و تحقیقات انجام شده در زمینه شناخت ساختار و عملکرد پوست در بدن طی دهه گذشته از مجموعه مطالعات دو قرن اخیر بیشتر و مؤثرتر بوده است.

اجزا و ساختمان پوست

در هر اینچ مربع از پوست، با ضخامت متغیر اجزای متعددی را می توان مشاهده نمود که در کنار هم به ایفای نقش خود می پردازند. ٦٥٠ غده مترشحه عرق, ٦٥ فولیکول مو، ۱۹ یارد مویرگ های ظریف خونی، هزاران سلول لامسه، پایانه عصبی و سلول های لانگرهانس در هر اینچ مربع از پوست در کنار هم قرار دارند که علاوه بر آنها سلول های ملانوسیت و آنزیم های تیروزیناز (سازنده ملانین) را نیز باید اضافه کرد.

لایه های پوست

سطح پوست از تجمع سلولهای مرده تشکیل شده است. زیر این سطح، سه لایه جداگانه بسیار نازک به شرح ذیل وجود دارند: ۱- اپیدرم، ۲- درم، ۳- هیپودرم

اپیدرم

اپیدرم که ضخامتش از ۰,۰٤ تا ۱,٦ میلی متر متغیر است،

لایه مهمی است. سلول های لانگرهانس که ایمنی پوست را برعهده دارند، ملانوسیت ها و آنزیم تیروزیناز که عهده دار تولید رنگدانه های ملانین و تنظیم رنگ پوست است، در این لایه قرار دارند. محصولات آرایشی و بهداشتی نظیر پاک کننده ها، لایه بردارها، ترمیم کننده ها یا مرطوب کننده ها نیز بر این لایه تاثیر می گذارند.

درم

لایه دوم یا درم ۵ تا ۷ برابر ضخیم تر از اپیدرم است و به وسیله یک غشاء پیوندی پایه به آن متصل شده است. درم از یک غشاء ضخیم ارتباطی تشکیل شده است که در حقیقت شبکه بهم بافته ای است از مویرگ های خونی و لنفی، رشته ها و پایانه های عصبی و حسی، کلاژن و فیبرهای پروتئینی الاستینی که وظیفه آنها نگهداری و حفظ رشته های عصبی است. فولیکول های مو، مویرگ های خونی، غده های چربی و عرق نیز در این لایه قرار دارند. وظیفه اصلی این لایه حفظ استحکام و ارتجاع پوست است.

هیپودرم

هیپودرم، سومین و آخرین لایه پوست، پوست را به بافت های ماهیچه ای متصل می نماید این لایه به دلیل فراوانی سلول های چربی، خاصیت ارتجاعی بسیار داشته و به عنوان ضربه گیر (مثل عملکرد فنرها در اتومبیل) عمل می کند. ضربه گیری این لایه، نقش بسیار مهمی در حفظ و نگهداری مویرگ های خونی و پایانه های عصبی دارد (۱).

رنگدانه پوست

رنگدانه های ملانین واحدهای تکراری است که توسط پیوندهای کربن-کربن به هم متصلند. ملانین به دو دسته تقسیم می شود:

- ✓ یوملانین (eumelanin) پلیمر نامحلول قهوه ای- سیاه.
- ✓ فئوملانین (pheomelanin) پلیمر محلول در قلیا، سولفوردار قرمز- زرد (در ساختمان آن سیستئین وجود دارد).

آنزیم کلیدی برای سنتز ملانین، تیروزیناز است. رنگ پوست بیشتر به نسبت رنگدانه های یوملانین و فئوملانین و کمتر به هموگلوبین و کاروتنوئید وابسته است. فعالیت اصلی ملانین جذب انرژی پرتو UV و تبدیل آن به گرما است.

آلبنیسم

تایروزیناز منفی: معمولا در اکثر موارد این گونه است که فرد بیمار نقص در سنتز آنزیم کلیدی مسیر ملانوژنز دارد یعنی فرد فاقد آنزیم تیروزیناز است و بدن با کمبود ملانین مواجه است. تیروزین به DOPA هیدروکسی تیروزیناز تبدیل نمی شود.

تایروزیناز مثبت: در این نوع آلبنیسم تیروزیناز به اندازه کافی وجود دارد ولی نقص در پروتئین های منتقل کننده چرخه وجود دارد مثل نقص در .tyrosine related pro1 در واقع انتقال تیروزین به سایر ارگان ها دچار مشکل شده (انتقال سوبسترا مشکل است). در این بیماری افراد با موها و پوست بسیار سفید، چشمان روشن که نشان از عنبیه بدون رنگ دارد دیده می شود (۲).

مکانیزم آنزیم ها

آنزیم ها نمی توانند موجب تغییر تعادل در یک واکنش بیوشیمیائی شوند زیرا موجب افزایش سرعت رفت و برگشت به مقادیر یکسانی می شوند بنابراین آنزیم ها فقط باعث تسریع در برقراری تعادل می شوند.

مهارکننده ها

بعضی از ترکیبات قادرند که با عوامل شیمیائی موجود در جایگاه فعال آنزیم یا با کوآنزیم و یا با یون های فعال کننده آنزیم ترکیب شده و سدی در مقابل فعالیت کاتالیزوری آنزیم ایجاد کنند. مهارکننده ها را براساس نحوه اثر آنها به دو دسته تقسیم می کنند:

الف) مهارکننده های برگشت پذیر که خود به دو دسته می شوند: ۱-مهارکننده های رقابتی ۲-مهارکننده های غیررقابتی

ب) مهارکننده های برگشت ناپذیر (۵).

تایروزیناز یک آنزیم حاوی مس است که دو واکنش از واکنش های تولید ملانین را کاتالیز می کند: هیدروکسیله شدن تایروزیناز توسط عمل منوفنولازی و اکسید شدن ۳ و ٤ دی هیدروکسی فنیل آلانین به ارتودوپاکوئینون توسط عمل دی فنولازی. این آنزیم به میزان زیاد در میکروارگانیسم ها، گیاهان، حیوانات و قارچ یافت می شود و مسئول بیوسنتز ملانین و ترکیبات فنلیک می باشد. در پستانداران تایروزیناز مسئول تشکیل رنگدانه های پوست، مو و چشم است. در گیاهان اهمیت کلیدی تایروزیناز در فرایندهایی نظیر پیگمانتاسیون و سیاه شدگی انزیمی میوه ها و سبزیجات است. در حشرات نقش مهمی در عمل تدافعی و اسکلت سازی آنها ایفا می کند. مکانیسم آنزیم تایروزیناز به دلیل حضور همزمان دو فرم مت و اکسی بسیار پیچیده است. (۳). آنزیم تایروزیناز (پلی فنل اکسیداز) ابتدا از قارچ که حاوی ایزوآنزیمهای مختلفی است جدا شد. پلی فنل اکسیداز جدا شده از انبه شامل دو ایزوآنزیم است. این ایزوآنزیم ها نسبت به O- دی فنل ویژگی نشان می دهند. پلی فنل اکسیدازی که از موز جدا شده فقط فعالیت دی فنل اکسیدازی را دارد قادر به اکسیداسیون O- دی فنل بوده اما قادر به منودی فنل ها نبوده است (۱۵ و ۱٦).

در حشرات پلی فنل اکسیدازی که از کوتیکول جدا شده دارای فعالیت دی فنل کسیداز است در حالی که پلی فنل اکسیدازی که از همولنف جدا شده فعالیت منو فنل اکسیدازی را نشان می دهد. پلی فنل اکسیدازی که در کوتیکول میگو وجود دارد هر دو فعالیت را نشان می دهد (٦). تایروزینازها جزء دسته اکسیدوردوکتازها: ١.١٤.١٨.١) (EC می باشد که دسته ای از پلی فنل اکسیدازها است (١٠). این آنزیم معمولا در جانوران وجود دارد و نامگذاری آن سوبسترای مورد استفاده توسط این آنزیم (تیروزین) اشاره دارد (٢٠). تایروزیناز آنزیمی است که در صنایع دارویی و همچنین در تشخیص ترکیبات فنلی در حسگرهای زیستی اهمیت دارد (٣). تایروزیناز به عنوان یک آنزیم موثر در سطوح متفاوت حیات نشان داده شده است. این اهمیت هم از نظر عملکرد و هم از نظر ساختار و پایداری آنزیم مهم است. تنوع سوبسترایی آنزیم، امکان بررسی لیگاندهای متفاوت روی سینتیک آنزیم در هر دو فعالیت کاتکولازی و کرزولازی را فراهم می کند (٤). تایروزیناز یا پلی فنل اکسیداز (PPO) یک منواکسیژناز حاوی مس است که مسوول تولید ملانین در جانوران است. این آنزیم هر دو فعالیت هیدروکسیلاسیون منوفنل ها به O- دی فنل ها (فعالیت مونوفنلازی) و اکسایش آن به O- کوئینون ها (فعالیت دی فنلازی) را بروز می دهد (١٦). آنزیم تایروزیناز (پلی فنل اکسیداز: ١.١٤.١٨.١ (EC آنزیم کلیدی تولید رنگدانه های ملانین در پوست و مو است که در سطوح متفاوت حیات از سطوح پایین تا موجودات عالی تر دیده می شود. این آنزیم یک پروتئین تترامر مرکب از دو زیر واحد یکسان کاتالیتیکی ٣٢ کیلو دالتونی است. ساختار چهارم آنزیم به صورت تترامریک H٢L٢ با وزن مولکولی ١١٠ کیلو دالتون و حاوی چهار اتم مس است. میان کنش پروتئین با یون فلزی از نظر بیوشیمیایی و پاتولوژیک مورد توجه قرار دارد. مطالعه اندرکنش یون های فلزی و پروتئین با توجه به پایداری ترمودینامیکی و سینتیکی آن ها دارای اهمیت است. چنین مطالعاتی می توانند در خصوص فعالیت آنزیمی تحت شرایط سمیت و تحمل ناشی از حضور فلزات راه گشا باشند. یون های فلزی باعث دستکاری ساختاری ملانین شده، هم چنین روی تجمع و تولید دوپاکروم نیز تأثیرگذار هستند. یک خصوصیت قابل توجه بافت های حاوی ملانین، حضور مشخص یون های فلزات سنگین از جمله یون های روی، مس و آهن در آنها است. به عنوان نمونه، سطح بالایی از این یونهای فلزی در کوروئید چشم، موی سیاه، نقاط پیگمانتاسیونی و ملانوزوم های جداشده از اسب و ملانوم های انسانی یافت شده است. اگرچه استفاده از لیگاندهای فلزی روی فرایند ساخته شدن ملانین مطالعات متفاوتی را به خود اختصاص داده، اما مطالعه تأثیر مستقیم آن ها روی فعالیت آنزیم و به خصوص پایداری آنزیم انجام نشده است. قابل ذکر است، این آنزیم در بافت هایی وجود دارد که این یون های فلزی جزئی از محیط فیزیولوژیک آن هستند و وجود آن ها به خصوص در شرایط سمیت فلزی می تواند بر آنزیم تأثیرگذار باشد. نقش فلز مس به دلیل وجود آن در ساختار موضع فعال آنزیم و یک فلز واسطه انتقالی با قابلیت کئوردینانس و اتصال متنوع و نیز فلز نیکل به عنوان یک فلز نزدیک به مس برای مقایسه، روی فعالیت پایداری و ساختار آنزیم در مطالعات قبلی محققان مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعه، اثر فلز انتقالی کبالت که در جدول تناوبی از نظر ظرفیت و نیز قابلیت کئوردینانس و پیوند، نزدیک به دو فلز مس و نیکل است، روی فعالیت و ساختار آنزیم تایروزیناز مورد مطالعه قرار می گیرد (٤). تایروزیناز در پستانداران مسئول پیگمانتاسیون پوست، چشم و مو است (١٧). این آنزیم در گیاهان باعث رنگ قهوه ای ناخواسته محصولات کشاورزی، مانند سبزیجات و میوه های بریده شده و ضربه خورده، منجر به کاهش چشمگیری در ارزش غذایی و فروش آن ها می شود (٩ و ١٣). در حشرات تایروزیناز برای اسکلروتیزاسیون اسکلت خارجی، ترمیم زخم و کپسول سازی انگل ضروری است (٧ و ١٢). نتایج به دست آمده روی تایروزیناز تا به امروز نشان داده همه تایروزینازها از منابع مختلف منومر با بیش از یک ایزوفرم هستند (١١ و ٢١). هر دو فعالیت منوفنولازی و دی فنولازی آنزیم نیازمند اکسیژن مولکولی است (١٧ و ٢١). در حال حاضر خصوصیات جایگاه فعال و واکنش پذیری تیروزیناز عمدتا از طریق ارتباط آن با هموسیانین که یک پروتئین حاوی مس مایل به آبی در نرم تنان و بندپایان است، روشن شده است (١٤ و ١٩). دو اتم مس در جایگاه فعال قرار دارند و هندسه و ساختار الکترونیک این مرکز حاوی دو مس در فعالیت آنزیمی نقش بسیار مهمی دارد.

این مرکز حاوی دو مس در سه حالت مختلف در تایروزیناز آرایش می یابد. به عبارت دیگر سه ایزوفرم یعنی اکسی تایروزیناز، مت تایروزیناز و داکسی تایروزیناز وجود دارد. اکسی تایروزیناز حاوی دو اتم مس((Cu (II) چهار وجهی است. هر اتم مس به وسیله سه لیگاند با نیتروژن هیستدین کوردینه شده است. اکسیژن مولکولی (O_2) به صورت پراکسید به این سایت متصل شده و پلی بین دو یون مس ایجاد می کند (یک مولکول اکسیژن خارجی). در مت تایروزیناز یک اتم اکسیژن بین دو مس چهار وجهی پل می زند (یک اکسیژن داخلی). آنزیم خالص شده مخلوطی از مت تایروزیناز و اکسی تایروزیناز به نسبت ٨٥:١٥ است. داکسی تایروزیناز دو مس به صورت(Cu(I)–Cu(I دارد و پل اکسیژنی در این ساختار وجود ندارد. احیاء این سایت دیوکسی deoxy با انتقال دو الکترون که

با اتصال اکسیژن مولکولی دنبال می شود منجر به تشکیل مجدد اکسی تایروزیناز می شود (۸، ۱۶ و ۱۸).

تایروزیناز یکی از آنزیم های حاوی یون فلزی است که به مقادیر زیاد در طبیعت یافت می شود. این آنزیم حاوی مس دو واکنش را کاتالیز می کند یکی اورتوهیدروکسیلاسیون منوفنل ها به او-دی فنل ها و دیگری اکسید اسیون او-دی فنل ها به او-کینون ها است که هر دو واکنش با مصرف اکسیژن مولکولی همراه است. در واقع نقش اصلی تایروزیناز در تشکیل رنگدانه هایی مانند ملانین و اکسیداسیون ترکیبات پلی فنلی است. تشکیل رنگدانه ها به خصوص در سنین بالا با سرعت بیش تری انجام می گیرند و با مهار فعالیت آنزیم تایروزیناز می توان این واکنش را کند نمود. بررسی مهار کننده های این آنزیم موضوع تحقیقات گسترده بیوشیمیایی در حال حاضر است.

هدف از این تحقیق بررسی برخی داروهای پوستی موجود در بازار روی فعالیت آنزیم است. به عنوان مثال، کوجیک اسید یک داروی آنتی بیوتیک است که توسط برخی از گونه های قارچی مانند پنی سیلیوم ایجاد می شود. فعالیت بیولوژیکی آنزیم تایروزیناز قارچ با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در حضور این دارو و یا داروهای دیگر موجود و هم چنین مخلوط های آنها اندازه گیری خواهد شد. سپس در حضور غلظت های مختلف از داروها در شرایط اپتیمم فعالیت آنزیم با روش مشابه به دست آمد. بررسی های سینیتیکی با استفاده از روش اسپکتروفتومتری چگونگی سینیتیک منع و چگونگی عمل منع کننده بررسی و ثابت های معادله میکائلیس- منتن را قابل محاسبه خواهند کرد.

داروهای پوستی

۲ داروی پوستی که در بازار عرضه شده و از آن ها در این تحقیق استفاده می شود عبارتند از:

♦ **بنزوکائین**

نام آیوپاک

Ethyl 4-aminobenzoate

نام تجاری

Anbesol, Cepacol, Lanacane

داده های شیمی

تسکین درد، خارش و التهابات پوستی ناشی از سوختگی، آفتاب سوختگی، گزش حشرات و تماس با گیاهان سمی، تسکین موقت دندان درد

اشکال داروئی:

پماد جلدی۵٪

عوارض جانبی:

سوزش، گزش و قرمزی و تورمی که قبل از مصرف در موضع وجود نداشته‌اند و در صورت حساسیت نسبت به دارو، کهیر غول‌آسا. بنزوکائین، اتیل استر از پ-آمینوبنزوئیک اسید است (PABA).

آن از PABA و اتانول توسط استریفیکاسیون فیچر و یا احیا اتیل پ-بنزوات تهیه می شود. بنزوکائین به مقدار کم محلول در آب است. آن محلولیت بیشتر در اسیدهای رقیق دارد و بسیار محلول در اتانول است. نقطه ذوب بنزوکائین ۸۸-۹۰ درجه سانتی گراد است و نقطه جوش در حدود ۳۱۰ درجه سانتی گراد است. چگالی بنزوکائین ۱/۱۷ g/cm^3 است.

♦**کالامین دی**

نام تجاری

Clamax, Ivarest

موارد مصرف:

قابض و ضد حساسیت پوستی (در تماس با گیاهان سمی- گزش حشرات و آفتاب سوختگی)

ترکیبات:

کالامین (قابض و التیام بخش جلدی)+دیفن هیدرامین هیدروکلراید (ضد هیستامین و بی‌حس کننده موضعی). لوسیون (حاوی ۸٪ کالامین+ ۱٪ دیفن هیدرامین هیدروکلراید) در بسته بندی ۶۰ میلی‌لیتری کرم (حاوی۸٪ کالامین + ۱٪ دیفن هیدرامین هیدروکلراید)

کالامین مخلوطی دیگر از اکسید روی (ZnO) با حدود ٪ ۵/۰ اکسید فریک یا یک ترکیب کربنات روی است. آن جزء مهم در لوسیون کالامین است. اکسید روی و اکسید فریک موجود در فرآورده دارای اثر قابض برپوست است. به‌علاوه، باعث تسکین و بهبود پوست آسیب‌دیده نیز می‌شود. کالامین به شکل محلول موضعی کالامین ۸ درصد در بطری‌های ۶۰ میلی لیتری و کرم ۸ درصد در بسته ۳۰ گرمی در داروخانه یافت می‌شود.

رسوب گیری با سولفات آمونیم

برای رسوب دادن پروتئین ها از سولفات آمونیوم ۸۵ درصد استفاده می شود. نمونه های استخراجی درون استوانه مدرج ریخته می شود و روی همزن مغناطیسی قرار می گیرد و با قرار دادن در یخچال، سولفات آمونیوم طی شش مرحله ۱۰دقیقه ای به محلول پروتئینی افزوده می گردد. بعد از انحلال کامل سولفات آمونیوم، محلول در دمای $4\ C^\circ$ و با دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس محلول رویی دور ریخته می شود و رسوب پروتئینی در حداقل بافر فسفات حل می شود.

دیالیز

دیالیز با استفاده از کیسه دیالیز با اندازه منافذ ۱۲ کیلو دالتون جهت حذف نمک آمونیوم سولفات از رسوب پروتئینی و همچنین جدا کردن پروتئین هایی با اوزان مولکولی بیشتر از ۱۲ کیلو دالتون انجام می شود. پس از آماده سازی کیسه ها، دیالیز در بافر فسفات (۵۰ میلی مولار با pH=٦/٨) روی استیرر در دمای ٤ درجه سانتی گراد با سه بار تعویض بافر انجام می شود.

تخلیص تایروزیناز

برای تخلیص آنزیم تایروزیناز از کروماتوگرافی تبادل آنیونی استفاده می شود. برای انجام این کار از دستگاه FPLC مدل BIORAD و ستون (UNO-Q1) که فاز ثابت (رزین) آن Q- سفاروزاست، استفاده می شود. برای انجام این کروماتوگرافی، از دو نوع بافر A و B استفاده می شود و سرعت جریان(Flow Rate) بافر یک میلی متر در دقیقه تنظیم می شود. بافر A شامل تریس با غلظت ۲۰ میلی مولار pH=۷/۲ و بافر B شامل تریس با غلظت ۲۰ میلی مولار و NaCl یک مولار pH=۷/۲ است. پس از انجام کروماتوگرافی، فعالیت آنزیم تایروزیناز در فراکشن های هر پیک سنجیده شده، فراکشن هایی که حاوی آنزیم پلی فنلاکسیداز هستند برای انجام مراحل بعدی در دمای °20C- منتقل می شوند.

تغلیظ به روش اولترافیلتراسیون

با توجه به اینکه نمونه پروتئین خارج شده از FPLC رقیق شده، جهت تشخیص میزان خلوص، روی ژل سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز SDS-PAGE قابل رؤیت نخواهد بود، بنابراین، بعد از انجام کروماتوگرافی تبادل یونی فراکشن های حاوی آنزیم تایروزیناز که با سنجش فعالیت آنزیمی مشخص شده اند، به وسیله روش اولترافیلتراسیون با میکروتیوب سنتریکون تغلیظ می شود. برای تغلیظ در این روش از سانتریفیوژ با سرعت چرخش rpm۱۲۰۰۰ در دمای °4C به مدت ۱۰ دقیقه استفاده می شود.

سدیم دودسیل سولفات-پلی آکریل آمیدژل الکتروفورز SDS-PAGE:

به منظور مشاهده ایزوفرم های آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) و میزان خلوص آنزیم از عمل الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید ۱۲٪ استفاده استفاده می شود. الکتروفورزSDS-PAGE از نمونه های تغلیظ شده پس از انجام کروماتوگرافی تبادل آنیونی انجام می شود. پس از انجام الکتروفورز، ژل حاصل با روش کوماسی بریلیانت بلو G-۲۵۰ رنگ آمیزی می شود.

سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز:

برای سنجش فعالیت آنزیم از سوبسترای دوپامین هیدروکلراید با غلظت ۵۵ میلی مولار، ۳-متیل-۲-بنزوتیازولینون هیدرازون با غلظت(MBTH) (Merek)با غلظت ۵ میلی مولار، دی متیل فرم آمید ۲(DMF) درصد حجمی و اسید فسفریک ۰/۰۸ درصد حجمی و بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH=٦ استفاده می شود. محلول سوبسترا به شدت، نسبت به نور حساس است، بنابراین، باید از تابش نور به آن جلوگیری کرده، در درون ظرف تیره نگهداری شود. با توجه به ناپایدار بودن این سوبسترا، باید برای هر نوبت سنجش فعالیت آنزیمی، محلول سوبسترای تازه تهیه کرد. محیط سنجش یک میلی لیتری حاوی µL۹۹۰ سوبسترا و µL۱۰ آنزیم (نمونه استخراجی) است. تغییرات جذب روی زمان در طول موج ۵۰۵ نانومتر در مقابل بلانک حاوی µL۹۹۰ سوبسترا و µL۱۰ بافر استخراج، بررسی می شود.

محاسبه Km و Vmax

برای این آزمایش غلظت های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی مولار از سوبسترای تایروزیناز تهیه می شود. سوبسترای اصلی تایروزیناز دوپامین هیدروکلراید است و نمونه آنزیمی بعد از PPLC جهت محاسبه Km و Vmax با سه تکرار انجام می شود.

محاسبه دمای بهینه:

ابتدا رقت مناسب نمونه آنزیمی تهیه می شود و سپس در ۷ میکروتیوب ٤۰ میکرولیتر از آنزیم با رقت مناسب ریخته می شود. ابتدا یکی از میکروتیوب ها در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده و سپس سنجش آنزیمی سه بار انجام می شود. میکروتیوب دوم در دمای ۲۰ درجه به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری قرار داده و مانند روش قبل سه بار سنجش آنزیمی روی آن انجام می گیرد و به همین ترتیب، روی مابقی میکروتیوب ها دمای ۳۰، ٤۰، ۵۰، ٦۰ و ۷۰ درجه با مدت زمان ۲۰ دقیقه اعمال کرده، مورد سنجش قرار می گیرند. سپس با مقادیر جذب های بدست آمده، از طریق رسم نمودار در برنامه EXCEL میزان دمای بهینه فعالیت آنزیم محاسبه می شود.

اندازه گیری pH بهینه

برای تعیین pH بهینه آنزیم ابتدا با استفاده از منوهیدروژن دی سدیم فسفات، سیتریک اسید و آب دیونیزه، بافرهایی با pH مشخص تهیه می شود. و سپس فعالیت آنزیمی نمونه ها

با استفاده از سوبسترای دوپامین هیدروکلرید طبق روش فوق حداقل ۳ بار در هر یک از این بافر ها اندازه گیری خواهد شد.

زایموگرام تایروزیناز

به منظور انجام زایموگرام از روش electrophoresis Native gel استفاده می شود. بافرهای مورد نیاز در این نوع الکتروفورز، همانند بافرهای مربوط در روش SDS–PAGE بوده؛ با این تفاوت که در اینجا SDS به کار برده نمی شود. نمونه ها بدون اعمال حرارت در ته چاهک بارگذاری می شود و شرایط دمای ٤ درجه سانتی گراد برای نمونه ها در تمامی مراحل آزمایش فراهم می شود تا فعالیت آنزیم حفظ شود. ولتاژ دستگاه نیز روی ۱۰۰ تنظیم می شود. بعد از اتمام الکتروفورز ژل در محلول سوبسترای آنزیم غوطه ور و جهت رنگ آمیزی در شرایط دمایی 4C° داده می شود.

در ابتدا، دوپامین به سوبسترا اضافه نمی شود و ۱۵ دقیقه ژل در سوبسترای بدون دوپامین قرار می گیرد و سپس در چند مرحله دوپامین به آن اضافه خواهد شد. با این کار، از شدت رنگ گرفتن ژل (با رنگ آمیزی به روش روش کوماسی بریلیانت بلو G–۲۵۰) جلوگیری می شود. ژل در محلول سوبسترا به مدت ۱۲–۱۰ ساعت قرار می گیرد.

منابع

۱–بی نام. ۱۳۸۷.آشنایی با ساختمان و وظایف پوست بدن.

۲–بی نام. ۱۳۸۹. جزوه درسی بیوشیمی.

۳–بی نام. بررسی مکانیسم عمل آنزیم تیروزیناز از طریق مهار و فعال کردن آن با استفاده از برخی اکسیدکننده¬ها (مشتقات اگزالات) و احیاکننده¬ها (مشتقات اتیلن¬دی¬آمین). رساله دکتری دانشگاه تهران.

٤–غیبی، نعمت الله و مجید سیرتی ثابت. ۱۳۸۹. تاثیر فلز کبالت بر سینتیتک و ساختار آنزیم تایروزیناز قارچ خوراکی. دو ماهنامه علمی پژوهشی دانشگاه شاهد، سال هفدهم، شماره ۸٦، اردیبهشت ۱۳۸۹.

٥–وقاری، علیرضا. ۱۳۹۳. مکانیسم عمل آنزیم ها.

٦–هاشمی، فریده و محمد علی زارعی. ۱۳۹۳. گواهی نمایه سازی مقاله مهار آنزیم تیروزیناز توسط عصاره هگزانی ده گونه گیاهی غربالگری شده از فلور مرکزی استان کردستان. دومین همایش ملی گیاهان دارویی و کشاورزی پایدار.

7. Christensen, B. M., Li, J., Chen, C. and Nappi, A., Melanization immune responses in mosquito vectors. Trends parasitol., 2005, 21, 192-199.

8. Francisco, Garcia-Molina, Alexander, N. P. Heiner, Lorena G. Fenoll, Jose N. Rodriquez-Lopez, Pedro A. Garcia-Ruiz, Francisco, Garcia-Canovas, and Jose Tudela, Mushroom tyrosinase: Catalase activity, inhibition, and suicide inactivation, J. Agric. Food Chem. 2005, 53,3702-3709.

9. Friedman, M., Food browing and its prevention: An overwiew. J. Agric. Food Chem., 1996, 44, 631-653.

10. Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y. and Matusi, H. 2001. A large family of class III plant peroxidases. Plant Cell Physiology. 42: 462-468.

فرم اشتراک ماهنامه تشخیص آزمایشگاهی ۱۳۹۵

نام و نام خانوادگی: ..... رشته/تخصص: ..... کد ملی: .....

نام محل کار: ..... مسئولیت: .....

نشانی: .....

کدپستی: ..... تلفن: ..... فاکس: .....

موبایل: ..... ایمیل: .....

♦تکمیل تمام موارد فوق الزامی است♦

اشتراک یکساله (با پست عادی)	۹۶۰،۰۰۰ ریال	اشتراک ۶ ماهه (با پست عادی)	٤۸۰،۰۰۰ ریال
اشتراک یکساله (با پست سفارشی)	۱،۲۰۰،۰۰۰ ریال	اشتراک ۶ ماهه (با پست سفارشی)	۶۰۰،۰۰۰ ریال

مبلغ اشتراک یکساله خارج از کشور با پست سفارشی ۳۶۰ دلار است.

لطفاً برای شروع یا تمدید اشتراک، رسید فیش واریزی را همراه با فرم تکمیل شده فوق به شماره زیر فاکس نمایید.

کارت بانک پاسارگاد به شماره کارت ۹۱۵۲-٤۰۷۲-۲۹۱۰-۵۰۲۲ و شماره حساب ۱-۱۲۰۸٤۲۳٤-۸۰۰۰-۲۰۶ به نام آقای محمود اصلانی

ایمیل: matashkhis@gmail.com نمابر: ۸۹۷۷۶۷۶۹ تلفن: ۰۹۱۲۷۳۳۳٤۰۷