بررسی تأثیر کالامین دی و بنزوکائین روی فعالیت آنزیم تایروزیناز به روش لاینویوربرگ

علیرضا فرخ[1*]، ریحانه سریری[2]، نیکو نصوحی[1]

۱. گروه آموزشی علوم سلول مولکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی، تهران، ایران
۲. گروه آموزشی زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۱۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۱۰)

چکیده

اهمیت آنزیم‌ها در واکنش‌های بیوشیمیایی تا حدی است که به جرات می توان اظهار داشت بدون وجود این پروتئین‌های فعال واکنش‌های بیوشیمی امکان پذیر نیست. تایروزیناز آنزیم تولید کننده رنگدانه ملانین در انسان و حیوانات از اهمیت ویژه ای برخوردار است. تایروزیناز یک متالو آنزیم حاوی مس است که دو واکنش مجزا در مسیر تولید ملانین را کاتالیز می کند. عمل هیدروکسیلاسیون تایروزیناز بوسیله فعالیت منوفنولازی و اکسیداسیون ۳ و ۴-دی هیدروکسی فنیل آلانین (L-Dopa) به O-دوپاکوئینون بوسیله فعالیت دی فنولازی میسر می گردد. بازدارنده‌ها و فعال کننده‌های این آنزیم اثرات مختلفی در سلامتی انسان و هم‌چنین در صنایع مختلف خواهند داشت. در تحقیق حاضر، با توجه به اهمیت رنگدانه‌ها در پوست و نقش مهم تایروزیناز در تولید این رنگدانه‌ها، برای بررسی اثر کننده‌های تایروزیناز داروهای پوستی انتخاب شدند. در بخش عملی ابتدا آنزیم مورد نیاز برای بررسی‌های سینیتیکی از پوست موز استخراج و ویژگی‌های آن مورد بررسی قرار گرفت. سپس فاکتورهای سینیتیکی آن در حضور سه داروی اکسید روی، کوجیک اسید و بنزوکائین بررسی و نمودارهای مکالیس منتن و لاینویوربرک رسم شدند. نتایج نشان دادند که تایروزیناز پوست موز خواصی شبیه به تایروزیناز قارچ دارد و دمای بهینه آن بالاتر از تایروزینازهای شناخته شده است و با توجه به منبع استخراج ارزان قیمت می‌تواند جایگزین مناسب برای تایروزیناز رایج تجاری یعنی تایروزیناز قارچی باشد. نتایج هم‌چنین نشان دادند که هر سه داروی کالامین، کوجیک اسید و بنزوکائین بازدارنده‌های غیر رقابتی تایروزیناز بوده و موجب کاهش سرعت ماگزیمم واکنش آنزیمی(V_{max}) شدند ولی روی مقدار (K_m) آنزیم اثر نداشتند. بالاترین اثر بازدارندگی مربوط به اکسید روی (ماده موثر در داروی کالامین) و سپس کوجیک اسید و در نهایت بنزوکائین بود.

کلیدواژگان

بازدارنده، بنزوکائین، تایروزیناز، ضایعات موز، کوجیک اسید.

* نویسنده مسئول، رایانامه: Pb.science554@gmail.com

مقدمه

آنزیم‌های پلی فنول اکسیداز جزء دسته اکسیدورداکتازها با شماره آنزیمی EC: 1.14.18.1 می‌باشند. این آنزیم‌ها دارای دو ناحیه متصل شونده به اتم‌های مس یعنی (CuA, CuB) می باشد. این نواحی، که در پلی فنول اکسیداز موجودات مختلف به میزان زیادی حفظ شده است، غنی از هیستیدین می باشد که برای برهمکنش با مولکول اکسیژن و سوبستراهای فنولی لازم می باشد (۳۰). به عنوان مثال ۲۶ درصد توالی اسیدهای آمینه تایروزیناز انسان و کاتکول اکسیداز سیب زمینی شیرین مشابه می باشد و بیش از ۳۸۳ اسیدامینه از جمله ۱۶ اسیدآمینه متصل شونده به مس بین دو آنزیم حفظ شده است (۱۵). تشکیل رنگدانه‌های قهوه ای در برخی گیاهان از جمله چای، کاکائو و قهوه به کمک پلی فنل اکسیدازها انجام می گیرد. این آنزیم‌ها برای تشکیل رنگدانه‌های قهوه ای در میوه‌های خشک مثل کشمش، خرما، آلو و انجیر نیز نقش مهمی دارند (۳۰). نقش اصلی پلی فنل اکسیدازها در سخت پوستان و حشرات مربوط به سخت شدن و تولید کیتین طی چرخه رشد آنها می‌باشد. همچنین فعال شدن این آنزیم یک مکانیسم عمده برای کنترل مراحل مختلف پوست اندازی است. بنابراین مقاومت نسبت به بیماری را افزایش می دهد (۸). نقش اساسی آن در مهره داران تولید رنگدانه (پیگمانتاسیون) می باشد. سنتز رنگدانه‌ها غالبا در سلول‌هایی مانند سلول‌های پوست، فولیکول مو و بخش قرنیه چشم انجام می شود. پلی فنول اکسیدازها به طور کلی دارای دو نوع فعالیت آنزیمی هستند که در هر دو نوع فعالیت اثر آنها روی ترکیبات فنولی است. آنزیم منو فنول اکسیداز ترکیبات منو فنولی را در حضور اکسیژن به ترکیبات دی فنولی تبدیل می کند. این آنزیم همچنین آمین‌های آروماتیک را هیدروکسیله می نماید. فعالیت هیدروکسیلازی اولین مرحله تشکیل رنگدانه می باشد. کرسولازها فاقد فعالیت دی فنولازی هستند (۲۸). تایروزیناز هم چنین ترکیبات ارتو-دی فنولی را در حضور اکسیژن طی واکنش انتقال دو الکترونی به ارتو کوئینون تبدیل می کند. ارتو کوئینون تولید شده می تواند پلیمریزه شود و ملانین یا رنگدانه‌های قهوه ای را تشکیل دهد. تایروزیناز (منوفنول، O- دی فنول اکسیژن اکسیدورداکتاز EC:1.14.18.1) یک مونو اکسیژناز دارای مس است که دسته ای از پلی فنول اکسیدازها می باشد (۴ و ۱۵). این آنزیم اغلب در جانوران وجود دارد و نامگذاری آن به خاطر سوبسترای آن یعنی آمینو اسید تایروزین است (۳۰). تایروزیناز یک آنزیم دو سوبسترایی است که O_2 بعنوان سوبسترای دوم در واکنش شرکت می کند. تایروزیناز هر دو فعالیت منوفنولازی و دی فنولازی را دارد. در واقع این آنزیم O_2 را برای کاتالیز در دو واکنش متفاوت استفاده می کند: اکسیداسیون منوفنولی مثل تیروزین در سلول‌های جانوری به O-دی فنول‌های مربوطه آنها که فعالیت منوفنولاز یا Cresolase می باشد و اکسیداسیون بعدی آنها به O-کوئینون که فعالیت دی فنولاز یا Catecholase می باشد واکنش دوم سریع تر بوده و هیدروکسیله شدن تیروزین به L- دوپا مرحله محدودکننده سرعت در نظر گرفته می شود (۸). O - کوئینون از طریق یک سری فعالیت‌های آنزیمی و غیرآنزیمی دیگر پلیمریزه و ملانین یا پیگمانت‌های شبه ملانین سنتز می گردد (۴).

مواد و روش‌ها

وسایل و دستگاه‌ها

- دستگاه الکتروفورز شرکت پایا پژوهش
- دستگاه بهم زن غذایی (food mixer)
- سونیکاتور
- کیسه دیالیز

- دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-visible)
- دستگاه سانتریفوژ یخچال دار
- فریزر ۷۰- درجه
- ستون سفادکس (G-75)
- ستون S-DEAE (Diethylaminoethyl–Sepharose) Sepharose محدوده جداسازی ۴۰۰۰۰۰۰ دالتون. دی اتیل آمینو اتیل به سفارز که کربوهیدرات پلیمری است متصل شده است.
- دستگاه Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)
- انواع سمپلرها و ظروف شیشه ای

مواد طبیعی، ترکیبات شیمیایی و داروهای مورد استفاده

- موزهای تازه و سالم از بازار محلی خریداری و کاملا شسته شدند و برای شش روز در دمای آزمایشگاه نگه داشته شدند تا پوست آنها قهوه ای شود. سپس پوست آنها جدا گردید و بعد از خرد شدن در مخلوط کننده غذایی به صورت هموژن در آمد.
- معرف Folin-Ciocalteu، دی تری تراپتول (DTT) و تراپتون X-100 از شرکت سیگما
- آمونیوم سولفات، آکریل آمید، بیس آکریل آمید، تریس باز، گلیسین، آمونیوم پرسولفات، گلیسرول، تترا متیلن دی آمین TEME، سدیم دو دسیل سولفات، کوماسی بریلیانت‌بلو G۲۵۰ از سیگما
- مارکر وزن مولکولی پروتئین از شرکت Fermentas
- ستون‌های S-DEAE سفارز و سفادکس (G-75) از شرکت BioRad
- سدیم بیکربنات، سدیم هیدروکسید، اتانول ۹۶٪، متانول، کلرهیدریک اسید، استیک اسید، فسفریک اسید، آمونیم سولفات، آمونیاک، مونو هیدروژن دی پتاسیم فسفات، دی هیدروژن مونو پتاسیم فسفات، آلبومین سرم گاوی (BSA)، و سایر مواد و حلال‌ها از نماینده‌های ایرانی شرکت مرک
- اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) از شرکت سیگما
- آنزیم تیروزیناز قارچی از شرکت سیگما
- دوپامین هیدروکلراید از شرکت سیگما
- دی متیل فرمامید DMF (Dimethylformamid) از شرکت سیگما
- ترکیب MBTH (3-Methyl-2-Benzothiazolinone Hydrazone) از شرکت مرک
- بنزوکائین، اکسید روی و اکسید فریک به صورت هدیه از کمپانی داروسازی مرک تهیه شدند. مخلوط اکسید روی و اکسید فریک (کالامین) به صورت تازه و با درصدهای موجود در بازار در آزمایشگاه ساخته شد.

استخراج آنزیم

برای تهیه استخراج شده آنزیمی اولیه و ناخالص، ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار (pH 6.8) روی ۵ گرم از مخلوط هموژنیزه پوست موز ریخته و با استفاده از سونیکاتور برای ۵ دقیقه خوب بهم زده شد. محلول حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با ۶۵۰۰ (rpm) در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شده و سپس صاف شده، که حاوی آنزیم ناخالص بود، برای خالص سازی بعدی در فریزر قرار گرفت. فعالیت پلی فنل اکسیداز در مجاورت سوبسترای مربوطه، دوپامین هیدرو کلرید در هر مرحله از خالص سازی به روشی که در زیر آمده اندازه گیری گردید. روش مذکور سپس در حضور مقادیر مختلف داروها و مخلوط‌های آنها تعیین فعالیت گردید تا نوع اثر کنندگی و قدرت اثر کننده مشخص گردد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم تایروزیناز

برای سنجش فعالیت آنزیم از سوبسترای دوپامین هیدروکلراید با غلظت ۵۰ میکرومولار، MBTH با

غلظت ۵ میلی مولار، دی متیل فرم آمید (DMF) دو درصد حجمی و اسید فسفریک ۰/۰۸ درصد حجمی و بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH=۶/۸ استفاده شد. محلول سوبسترا شدیدا حساس به نور می باشد، بنابراین باید از تابش نور به آن جلوگیری نموده و در درون ظرف تیره نگهداری شود. محیط سنجش یک میلی لیتری حاوی ۹۹۰µL سوبسترا و ۱۰ µL آنزیم (نمونه استخراجی) است. تغییرات جذب بر روی زمان در طول موج ۵۰۵ نانومتر در مقابل بلانک حاوی ۹۹۰ µL سوبسترا و ۱۰ µL بافر استخراج، در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد بررسی شد. از طرفی، مانند همه آنزیم‌ها، برای محاسبه فعالیت ویژه تایروزیناز در هر مرحله از تقسیم کردن فعالیت کل آنزیم بر مقدار کل پروتئین در هر مرحله از جداسازی محاسبه گردید. جهت تهیه ۲۰ میلی لیتر سوبسترای مورد نیاز در هر سنجش مواد زیر تهیه و مخلوط شدند.

۱. DMF دی متیل فرم آمید دو درصد حجمی:

۲ میلی لیترDMF درون یک استوانه مدرجی ریخته شد و سپس با آب مقطر حجم آن به ۱۰۰ میلی لیتر رسید. برای ۲۰ میلی لیتر سوبسترا، ۴۰۰ µL از آن مورد نیاز می باشد.

۲. اسید فسفریک ۰/۰۸ درصد حجمی:

ابتدا ۸۰ µL از اسید فسفریک خالص را درون استوانه مدرجی ریخته و سپس با آب مقطر حجم آن به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. برای ۲۰ میلی لیتر سوبسترا ۲۰ µL از آن مورد نیاز می باشد.

۳. MBTH (۳- متیل ۲- بنزوتیازولینون هیدرازون) با غلظت ۵ میلی مولار:

با توجه به رابطه (حجم برحسب لیتر × غلظت برحسب مولار × وزن ملکولی) و با جایگذاری مقادیر (۰/۰۲۲ = ۰/۰۰۵ × ۰/۰۲ × ۲۱۵/۱۷) مقدار ۰/۰۲۲ گرم برای ۲۰ میلی لیتر سوبسترا مورد نیاز می باشد.

۴. DOPA دوپامین هیدروکلراید با غلظت ۵۵ میلی مولار:

با توجه به رابطه بالا و جایگذاری مقادیر مربوطه (۰/۲۱= ۰/۰۵۵ × ۰/۰۲ × ۱۸۹/۶۴) مقدار ۰/۲۱ گرم از دوپامین برای ۲۰ میلی لیتر سوبسترا مورد نیاز می‌باشد. برای ساخت سوبسترا، ابتدا لوله فالکون تمیزی برداشته و دور آن با فویل بسته شد تا از برخورد نور به سوبسترا تا حد امکان ممانعت شود، سپس به ترتیب زیر عمل شد. ابتدا DMF درون لوله ریخته شد و سپس اسیدفسفریک به آن اضافه گردید و بعد MBTH به آن افزوده گردیده و لوله به مدت ۵ دقیقه به همین حالت باقی گذاشته شد. سپس ۱۵ میلی لیتر بافر فسفات به آن اضافه و روی هیتر با دمای ۵۰°C به مدت پانزده تا نیم ساعت حرارت داده شد تا شفاف گردد. بعد از سرد شدن محلول، دوپامین به آن اضافه گردیده و سپس با بافر فسفات حجم آن به ۲۰ میلی لیتر رسانده شد. با توجه به ناپایدار بودن این سوبسترا می باید برای هر نوبت سنجش فعالیت آنزیمی، محلول سوبسترای تازه تهیه نمود. سنجش فعالیت آنزیم در پایان هر مرحله از خالص سازی انجام شد تا راندمان خالص سازی مشخص گردد. در نهایت، یک واحد آنزیمی (U) عبارت است از مقدار تایروزیناز لازم برای اکسیداسیون یک میکرومول سوبسترا در دقیقه تحت شرایط استاندارد و فعالیت ویژه نیز به عنوان واحدهای فعالیت آنزیم به ازای میلی گرم وزن پروتئین تعریف شد. از طرفی، بر اساس مقالات موجود، یک واحد فعالیت تایروزیناز عبارت است از مقدار ۰/۰۰۱ تغییر جذب سوبسترا در شرایط ۵۰۵ نانومتر، (pH) مساوی ۶/۸ و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و در یک میلی لیتر مخلوط واکنش (۸). به این ترتیب، هم چنین می توان فعالیت آنزیم را بر حسب (µM/min) یا سرعت واکنش با استفاده از تغییر جذب (ΔA) در هر مورد محاسبه نمود.

رسوب گیری با آمونیم سولفات

مقدار ۳۰۰ گرم پوست قهوه ای شده موز خرد شده

و در مخلوط کن غذایی ساییده شد و به آن ۲۰۰ میلی لیتر محلول بافر فسفات ۰/۰۵ مولار (pH 6.8) اضافه شده و با استفاده از سونیکاتور برای ۵ دقیقه خوب بهم زده شد. محلول حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با ۶۵۰۰ (rpm) در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شده و سپس صاف شده حاوی آنزیم خام با اضافه نمودن آمونیم سولفات ۸۵٪ استخراج شد. با قرار دادن ظروف آزمایش در یخ، در طول مراحل خالص سازی دما ۴ درجه سانتیگراد ثابت تنظیم شد و (pH 6.8) محلول نیز با استفاده از محلول آمونیاک یک نرمال تحت کنترل قرار گرفت. برای رسوب دادن همه پروتئین‌ها، نمونه برای ۳۰ دقیقه دیگر مخلوط شد و به دنبال آن با ۵۰۰۰ دور و تحت شرایط ۵ درجه سانتیکراد به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس ۲ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار به رسوب اضافه شده و به خوبی مخلوط شد. مخلوط دوباره تحت شرایط فوق به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید تا نمک آمومینیم کامل حذف شود. در ادامه ۲ میلی لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی مولار به رسوب اضافه شد.

دیالیز

برای انجام دیالیز از کیسه‌های دیالیز با اندازه حفره‌های کمتر از ۱۲۰۰۰ دالتون استفاده شد. در عمل، ابتدا کیسه‌ها به مدت ۵ دقیقه در محلولی حاوی ۲۵ میلی لیتر سدیم بیکربنات ۱۰۰ میلی مولار و ۲۵ میلی لیتر اتیلن دی آمین ترا استیک اسید (EDTA) ۱۰ میلی مولار جوشانیده شدند و سپس به ظرف حاوی آب دیونیزه وارد شده و مدت ۵ دقیقه دیگر جوشانیده شدند. سپس محلول خام آنزیمی ۳ بار در مقابل ۵۰۰ میلی لیتر بافر فسفات (pH 6.5) برای مدت ۸ ساعت دیالیز گردیدند. بعد از دیالیز، محلول باقیمانده در کیسه‌ها تعیین فعالیت شده و برای انجام خالص سازی بیشتر با سفادکس آماده شد.

خالص سازی با ستون سفادکس (G-75)

آنزیم تایروزیناز حاصل از ۳ بار دیالیز سپس وارد ستون سفادکس (G-75) با اندازه (1×50 cm) که توسط همان بافر به تعادل رسیده بود (equilibrated) گردید. نمونه‌های پروتئین با استفاده از بافر فسفات با حجمی حدود ۲ برابر نمونه در قسمت‌ها (فراکشن‌ها) شسته شدند. قسمت‌های پروتئینی جمع آوری شده و برای اندازه گیری کل پروتئین با استفاده از اسپکتروفتومتر در ۲۸۰ نانومتر به کار گرفته شدند. از طرف دیگر، فعالیت تایروزیناز نیز اندازه گیری شده و فراکشن‌هایی که دارای فعالیت تایروزیناز بودند در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند. برای رسیدن به فرم خالص آنزیم، بعد از ژل فیلتراسیون از کروماتوگرافی تعویض آنیون استفاده شد.

کروماتوگرافی تعویض آنیون

برای این منظور از دستگاه BioRad Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) مجهز به ستون (DEAE-Sepharose) برای کروماتوگرافی آنیونی تایروزیناز استفاده شد. یک رزین تعویض یون از یک ماتریکس غیر محلول منفذ دار شامل تعداد زیادی گروهای یونی خاص که قادر به اتصال به یون‌های دارای بار مخالف در محلول اطراف می باشند، تشکیل شده است. به این ترتیب، یک رزین تعویض آنیونی دارای کاتیون تثبیت شده و فاز متحرک، آنیونی می باشد. محلول پروتئینی حاصل از مرحله قبل (ژل فیلتراسیون) به مدت ۵ دقیقه با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. قبل از تزریق به ستون سفارز در دستگاه FPLC، نمونه به وسیله فیلتر سرسرنگی ۰/۲µ برای منظور جلوگیری از ورود هرگونه تجمع پروتئینی به درون ستون فیلتر می‌شود. این عمل جهت خالص‌سازی نهایی تایروزیناز انجام شد. در عمل، دستگاه به کمک بافر A (متشکل از بافر فسفات ۱۰ میلی مولار و EDTA ۰/۵ میلی مولار با pH ۷) به

تعادل رسید. و سپس ستون با بافر B (متشکل بافر فسفات ۱۰ میلی مولار، سدیم کلرید یک میلی مولار و EDTA ۰/۵ میلی مولار با pH ۷) از شستشو داده می‌شود تا پروتئین‌هایی که به ستون متصل نشده اند، خارج شوند. پس از اینکه جذب ۲۸۰ نانومتر فراکشن‌های خارج شده از ستون به صفر رسید، با استفاده از غلظت‌های مختلف نمک ۰ تا ۱ مولار پروتئین‌های متصل شده به رزین بر حسب میزان بار منفی سطحی شان و قدرت اتصال هر یک به رزین به ترتیب با افزایش قدرت یونی بافر شستشو و از ستون جدا می‌شود. در نهایت، فراکشن‌های مربوط به پیک‌های مختلف جمع‌آوری شدند و فعالیت تایروزینازی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته و بخش‌های فعال در فریزر ۲۰- درجه برای انجام الکتروفورز نگهداری شدند.

نکته: Flow rate دستگاه در مراحل شستشو و خارج نمودن پروتئین‌ها از ستون ml/min ۱ یک میلیتر در دقیقه و ستون مورد استفاده از نوع ستون‌های تبادل آنیونی DEAE-sepharose بود

اندازه گیری پایداری دمایی

پایداری حرارتی تایروزیناز خالص شده در محدوده حرارتی ۱۰ تا ۷۰ درجه سانتیگراد مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، ۱۰ میکرولیتر محلول آنزیمی و ۹۹۰ میکرولیتر بافر فسفات شامل سوبسترا، MBTH، DMF و فسفریک اسید برای ۲۰ دقیقه در دماهای ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۴۵، ۵۰، ۵۵، ۶۰، ۶۵ و ۷۰ درجه سانتیگراد انکوبه شده و سپس جذب هر یک در ۵۰۵ نانومتر اندازه گیری شد. با توجه به نمودار به دست آمده از این داده‌های دمای بهینه تایروزیناز پوست موز تعیین گردید.

تعیین pH بهینه

برای اندازه گیری pH بهینه تعدادی بافر با pHهای ۳ تا ۱۲ تهیه شدند. ۲۰۰ میکرولیتر از هر بافر با ۷۵۰ میکرولیتر محلول سوبسترا مخلوط شده و سپس ۵۰ میکرولیتر آنزیم به آنها اضافه گردید و بلافاصله جذب آنها در ۵۰۵ نانومتر اندازه گیری شد. هر گونه تغییرات pH با استفاده از کلریدریک اسید و سدیم هیدروکسید تحت کنترل قرار گرفتند. همه اندازه گیری‌های فعالیت آنزیم در دماها و (pH)های مختلف هر یک حداقل سه بار تکرار شدند و نمودارهای مربوط با استفاده از میانگین سه نوبت رسم گردیدند.

سدیم دودسیل سولفات ژل الکتروفورز (SDS-PAGE)

برای بررسی خلوص و مشاهده ایزوزیم‌های احتمالی و هم چنین تعیین وزن مولکولی آنزیم تایروزیناز خالص شده از SDS-PAGE استفاده شد. این الکتروفورز از نوع تغییر ماهیت بوده و سدیم دودسیل سولفات به عنوان یک شوینده آنیونی همه پروتئین‌های تغییر ماهیت یافته را به شکل میله‌هایی با بار منفی پوشش می دهد (۴ و ۲۲). در عمل ۲۰ میکرولیتر از آنزیم خالص با ۵ میکرولیتر بافر نمونه مخلوط شدند و پس از بسته شدن ژل، نمونه‌ها را درون چاهک‌های ژل قرار داده و با استفاده دستگاه منبع تغذیه با ولتاژ ۱۲۰V در محیط خنک با استفاده از یخ خشک الکتروفورز انجام شد. لازم به ذکر است که در این قسمت آنزیم آماده خریداری شده نیز داخل یکی از چاهک‌های ژل الکتروفورز تزریق گردید تا از خلوص آن اطمینان حاصل شود.

رنگ آمیزی با کوماسی بریلیانت بلو

بعد از رسیدن پروتئین‌ها به یک سانتی متری پائین ژل، عمل متوقف شده و ولتاژ قطع شد. ژل از دستگاه بیرون آورده شد و ژل بالایی با احتیاط جدا شد. ژل پائینی حاوی پروتئین‌ها جدا شده ابتدا در محلول تثبیت برای یک ساعت قرار داده شد و سپس درمحلول رنگ برای یک ساعت با به هم زدن ملایم

روی (shaker) باقی ماند. در نهایت، برای از بین بردن رنگ زمینه ژل، در محلول رنگ زدا برای نیم ساعت قرار گرفت و در پایان با آب مقطر دیونیزه شستشو شد.

رنگ آمیزی نیترات نقره

پس از انجام الکتروفورز ژل پلی آکریلامید و رنگ آمیزی به روش کوماسی بریلیانت بلو جهت بررسی بهتر پروتئین‌ها، ژل با نیترات نقره رنگ آمیزی شد. بافرهای رنگ آمیزی نیترات نقره شامل ۵ نوع بافر است که نحوه تهیه آن به شرح ذیل است:

۱. محلول تثبیت کننده (S_1): برای تهیه این محلول مقدار۳۰ میلی لیتر از اتانول و ۱۰ میلی لیتر استیک اسید در یک ظرف استریل با آب مقطر دیونیزه به حجم نهائی ۱۰۰ میلی لیتر رسید.

۲. محلول حساس گر (S_2): برای تهیه این محلول ۳۰ میلی لیتر اتانول و ۰/۵ میلی لیتر از گلوتارآلدهید به همراه ۶/۸ گرم سدیم استات و ۰/۲ گرم سدیم تیو سولفات، در یک ظرف استریل به طور جداگانه افزوده و با آب مقطر دیونیزه به حجم نهائی ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد.

۳. محلول رنگ آمیزی (S_3): این محلول باید به صورت تازه تهیه شود. به علت گران بودن نیترات نقره مقدار۵۰ میلی لیتر از آن در هر سری رنگ آمیزی تهیه می شود. برای تهیه آن نیز مقدار ۰/۰۵ گرم از نیترات نقره با ۲۷/۳ میکرولیتر فرمالدهید مخلوط شده و در یک ظرف استریل با آب مقطر دیونیزه به حجم نهائی ۵۰ میلی لیتر رسانده شد. همه محلول‌های فرمالدهید ۳۷ درصد بوده و با تقریب می‌توان از همان محلول استفاده کرد. بهتر است این محلول را در فاصله رنگ آمیزی ژل تهیه نمود تا به محض آماده شدن استفاده کرد.

۴. محلول ظاهر کننده (S_4): برای تهیه آن مقدار ۲/۴ گرم سدیم کربنات و ۲۸/۶ میکرولیتر فرمالدهید در یک ظرف استریل با آب مقطر دی یونیزه به حجم نهائی ۱۰۰ میلی لیتر رسید.

۵. محلول متوقف کننده (S_5): برای تهیه آن مقدار ۱/۸۶ گرم سدیم EDTA در یک ظرف استریل با آب مقطر دی یونیزه به حجم نهائی ۱۰۰ میلی لیتر رسید.

به منظور رنگ آمیزی ژل مراحل زیر به ترتیب و با لحاظ زمان مناسب در هر مرحله انجام شد. در تمامی مراحل زیر به منظور رنگ آمیزی بهتر ژل از شیکر استفاده شد.

- مرحله اول: مقدار ۱۰۰ میلی لیتر محلول S_1 به ژل پلی آکریلامید که در یک ظرف قرار دارد، افزوده شد. حجم این محلول به اندازه ای است که ژل در آن غوطه ور باشد. در این مرحله ژل پلی آکریلامید به مدت ۳۰ دقیقه همراه با محلول فوق shake شد.

- مرحله دوم: پس از خارج کردن محلول S_1 از ژل، مقدار۱۰۰ میلی لیتر از محلول S_2 به ژل اضافه شد. ژل می تواند به مدت حداقل ۴۵ دقیقه در محلول فوق کاملا به هم زده شود. برای انجام بهتر مرحله رنگ آمیزی می توان ژل را در این محلول از شب تا صبح (over night) قرار داد.

- مرحله سوم: بعد از خارج کردن محلول S_2، ژل سه بار شسته شد. شستشوی ژل در هر بار توسط آب مقطر دیونیزه و به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

مرحله چهارم: بعد از خارج کردن آب درون ظرف حاوی ژل، مقدار۵۰ میلی لیتر از محلول S_3 به ژل اضافه شد. ژل درون این محلول به مدت ۱۵ دقیقه قرارگرفت. در این محلول ژل رنگ آمیزی می شود و یک تغییررنگ در ژل اتفاق می افتد.

- مرحله پنجم: بعد از خارج کردن محلول S_3 به آرامی مقدار۱۰۰ میلی لیتر از محلول S_4 به ژل اضافه شد. این مرحله ظهور باندهای پروتئینی درون ژل است.

- مرحله ششم: به محض ظهور دقیق و کامل باندهای پروتئینی در این مرحله و برای جلوگیری از سیاه شدن ژل، سریعا محلول S_4 از ژل خارج و ۱۰۰ میلی لیتر از محلول S_5 به ژل اضافه شد. این محلول

متوقف کننده رنگ آمیزی است و ژل درون این محلول به مدت ۱۵ دقیقه بدون به هم زدن باقی ماند. پس از خارج کردن این محلول به ژل درون ظرف مقداری آب مقطر دیونیزه اضافه شد. در این صورت می توان ژل را برای مدت طولانی درون ظرف حاوی آب مقطر دیونیزه نگهداری کرد.

تعیین غلظت پروتئین

برای اندازه گیری غلظت پروتئین از روش لوری استفاده شد (۲۱). اساس روش لوری این است که تحت شرایط قلیایی یون مس دوظرفیتی با پیوند پپتیدی کمپلکسی تشکیل می دهد که در آن یون مس به فرم یک ظرفیتی احیاء شده است. یون مس یک ظرفیتی و گروه‌های آمینی در اسیدهای تریپتوفان و سیستئین با معرف فولین واکنش نموده و محصول ناپایداری تولید می کنند که به مولیبدنوم/تنگستن آبی رنگ احیاء می شود. محلول لوری شامل دو محلول A و B می باشد. محلول‌های A و B پس از تهیه به نسبت ۵۰ به ۱ با یکدیگر مخلوط می شوند. ترکیب این دو محلول تا یک ماه قابل نگهداری در یخچال است و به نام محلول لوری در اینجا از آن یاد شده است. در ۱۰ لوله آزمایش مقادیر صفر تا ۱۰۰ میکرولیتر آلبومین سرم گاوی و آب مقطر ریخته شد. سپس ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول لوری به لوله‌ها اضافه گردید و بلافاصله ورتکس شد. پس از ۱۵ دقیقه،۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگ (معرف فولین شامل ۵ سی سی فولین و ۶ سی سی آب مقطر) به همه لوله‌ها اضافه گردید و ۳۰ دقیقه در تاریکی باقی ماندند. جذب‌ها در طول موج ۷۵۰ نانومتر خوانده و منحنی استاندارد رسم گردید.

بررسی اثر داروها روی فعالیت تایروزیناز

برای سنجش فعالیت آنزیم تیروزیناز از سوبسترای دوپامین هیدرو کلراید، MBTH، DMF، فسفریک اسید، ۰۸٪ و بافر فسفات پتاسیم ۰/۵ مولار با pH=۶/۸ از طریق روشی مشابه تحقیقات قبلی با اندکی تغییرات استفاده شد (۱۲ و۲۳). دوپامین هیدرو کلراید سوبسترای اصلی تیروزیناز است که با استفاده از اکسیزن به دوپاکینون تبدیل می گردد MBTH با اتصال به این محصول تولید ماده رنگی می کند بنابراین فعالیت انزیم در واحد زمان قابل ردیابی است. فسفریک اسید این محصول را پایدار می سازد زیرا pH روی حلالیت و پایداری محصول-MBTH اثر می گذارد.DMF و بالاخره، MBTH به عنوان کمک حلال عمل می کند. محلول سوبسترای ساخته شده نباید در معرض مستقیم نور قرار گیرد، زیرا به سرعت تغییر رنگ می دهد بنابراین در ظروف تیره نگهداری شدند. همچنین ساخت سوبسترا باید روزانه و قبل از شروع کار باشد. برای بررسی اثر هر یک از داروها به عنوان اثر کننده‌های تایروزیناز روش فوق با غلظت ثابت سوبسترا انجام شد و داروها که با غلظت ۱۰۰ میکرومولار به عنوان استوک تهیه شدند سپس از طریق آزمایش و خطا با مقادیر مختلف به مخلوط واکنش اضافه شدند به طوری که حجم نهایی مخلوط همیشه یک میلی لیتر ثابت ماند. با توجه به کم محلول بودن بنزوکائین، کوجیک اسید و اکسید روی در آب، برای تهیه محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف از این داروها از حلال ۲۰٪ اتانول استفاده شد. بدیهی است برای صفر کردن اثر حلال روی بررسی‌های فعالیت آنزیم، حلال مورد استفاده بدون دارو نیز به عنوان مرجع استفاده شد (صفر دارو).

رسم منحنی پیشرفت واکنش‌های تایروزیناز

برای بدست آوردن منحنی پیشرفت واکنش از محیطی با غلظت سوبسترا ثابت در تمام سنجش‌ها و تنها غلظت اثر کننده‌ها تغییر داده شدند. حجم نهایی مخلوط آزمایش یک میلی لیتر انتخاب و اولین سنجش در محیطی فاقد اثر کننده انجام گردید. در

سنجش‌های بعدی از غلظت‌های آماده شده داروها به عنوان اثر کننده استفاده شد و به اندازه حجم محلول داروی اضافه شده از حجم بافر فسفات کاسته شد. هر کدام از سنجش‌ها ۳ بار تکرار شد و نتایج به صورت میانگین مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت غلظت داروی لازم برای تغییر ۵۰ درصدی فعالیت آنزیم یعنی مقدار (IC_{50}) نیز تعیین گردید. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت و میانگین، انحراف معیار و (*p-value*) پارامترهای مورد. داده‌ها پیش از آنالیز جهت بررسی نرمال بودن توسط ازمون اسمیرنوف- کلموگروف مورد ارزیابی قرار گرفتند. مقایسه بین مقادیر پارامترهای مورد نظر توسط آزمون one-way ANOVA صورت گرفت و $p < ۰/۰۵$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

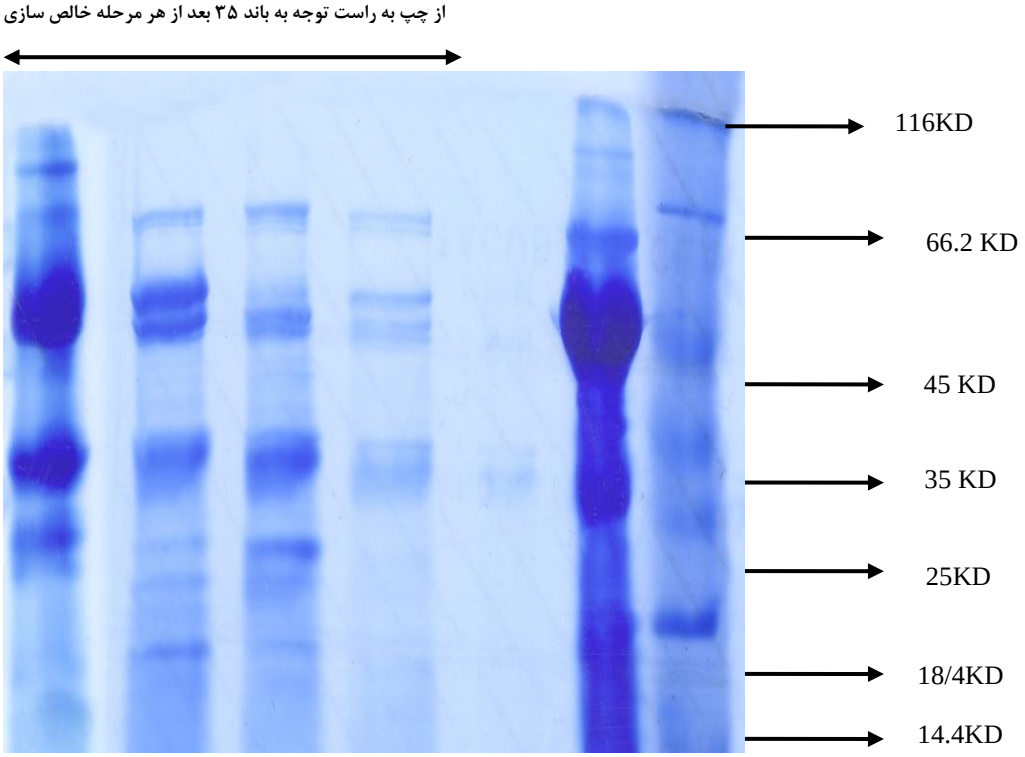
نتایج

پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز (SDS-PAGE)

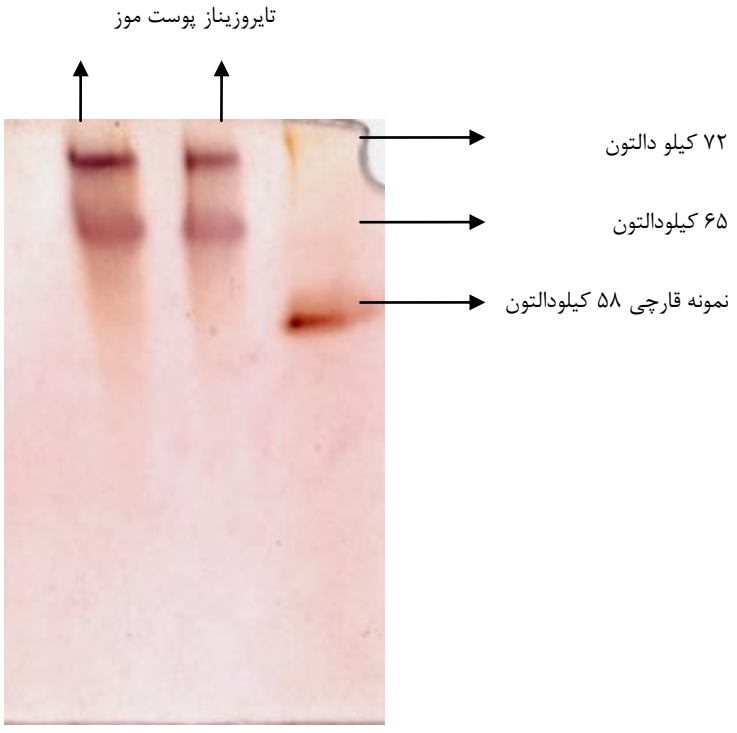
برای اطمینان از کارآیی روش‌های جداسازی و تخلیص تایروزیناز از روش الکتروفورز (SDS-PAGE) استفاده شد. در هر یک از مراحل جداسازی، قسمتی از نمونه‌ها برای بردن روی یک ژل واحد در یخچال نگهداری شدند. سپس با روشی، عمل الکتروفورز با استفاده از (SDS-PAGE)، که اساس آن همراه با تغییر ماهیت پروتئین می باشد، انجام گرفت..

الکتروفورز بدون تغییر ماهیت (PAGE)

برای تعیین وزن مولکولی آنزیم و اطمینان از خلوص آن، نمونه‌ها بعد از کروماتوگرافی تعویض یون توسط روش پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز بررسی شدند. این روش که سوبسترای آنزیم داخل ژل قرار دارد زایموگرام خوانده می شود و بر اساس آن پروتئین تغییر ماهیت نمی دهد زیرا در تهیه نمونه‌ها از (SDS) استفاده نشده است. لازم به توضیح است که در بررسی‌های سینیتیکی آنزیم‌ها لازم است از خلوص آنها اطمینان داشته باشیم زیرا ناخالصی‌ها ممکن است در محاسبات اشکال ایجاد نمایند. بنابراین، برای اطمینان از خلوص آنزیم خریداری شده، دریکی از چاهک‌ها آنزیم تیروزیناز قارچ Agaricus bisporus با وزن ملکولی ۵۸ کیلو دالتون نیز لود گردید تا هم با داشتن وزن مولکولی مشخص به عنوان شاخص باشد و هم اینکه درجه خلوص آن بررسی شود. و بعد از اتمام الکتروفورز و قراردادن ژل در سوبسترای ویژه آنزیم ppo، باندهای پروتئینی مربوط به آنزیم تایروزیناز پوست موز ظاهرگردید. شکل (۲) زایموگرام تایروزیناز پوست موز و هم چنین تایروزیناز خریداری شده را نشان می دهد. به حضور دو باند مجزا در ژل زایموگرام نشان می دهد که پوست موز دارای دو نوع ایزوفرم پلی فنل اکسیداز است. از طرفی، تک باند بودن نمونه سیگما نشان دهنده خلوص تایروزیناز قارچی (وزن مولکولی ۵۸ کیلو دالتون) است. به طوری که در شکل ۲ ژل الکتروفورز رنگ آمیزی شده با نیترات نقره نشان داده شده است. وجود دو باند برای تایروزیناز پوست موز نشان دهنده ۲ ایزوزیم برای این تایروزیناز است که وزن مولکولی آنها حدود حدود ۶۶ و ۷۲ کیلو دالتون بود که البته در ژل الکتروفورز (PAGE) ایزوزیم ۷۲ کیلو دالتونی دیگر مشاهده نشد.



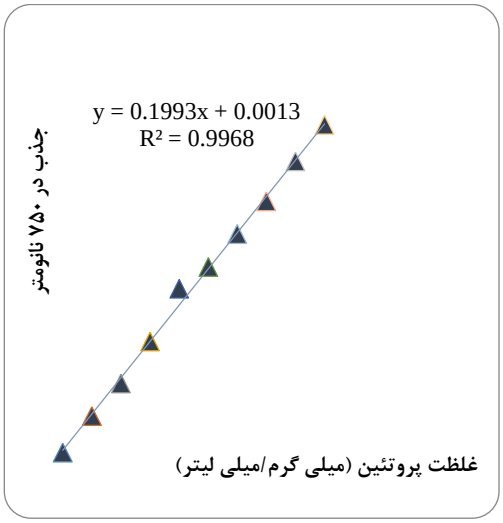
شکل ۱- الکتروفورگرام حاصل از عمل الکتروفورز SDS-PAGE بعد از هر مرحله خالص سازی و سرانجام کروماتوگرافی آنیونی. از راست به چپ چاهک اول مربوط به مارکر وزن مولکولی، دوم بعد از هموژناسیون، سوم آنزیم در نهایت خالص شده و ٤ تا ۶ نشان دهنده خلوص تدریجی آنزیم طی مراحل مختلف است. باندهای حدود ۶۵ کیلو دالتون مربوط به نمونه پوست موز است.



شکل ۲- ژل الکتروفورز پلی آکریلامید (زیموگرام). وزن مولکولی تایروزیناز قارچی ۵۸ و وزن مولکولی ایزوزیم‌های پوست موز استخراج شده در این تحقیق حدود ۶۵ و ۷۲ کیلو دالتون است. در بررسی‌های بعدی از مخلوط دو ایزوزیم استفاده گردید.

اندازه گیری مقدار پروتئین

غلظت پروتئین از روش لوری تعیین شد. بر اساس این روش، یون مس دوظرفیتی در محیط قلیایی با پیوند پپتیدی کمپلکسی تشکیل می دهد که در آن یون مس به فرم یک ظرفیتی احیاء شده است. این یون سپس همراه باقی مانده‌های تریپتوفان و سیستئین با معرف فولین واکنش نموده و به مولیبدنوم/تنگستن آبی رنگ احیاء می شود. در این آزمایش از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد استفاده شد. نمودار استاندارد روش لوری در شکل ۳ نمایش داده شده است. مقدار کل پروتئین بر حسب میلی گرم بر لیتر بعد از هر مرحله در محلول نمونه با استفاده از این نمودار محاسبه گردید. در همه بخش‌های عملی این تحقیق، اندازه گیری‌ها در سه نوبت انجام شدند و داده‌ها به صورت میانگین استفاده گردیدند.



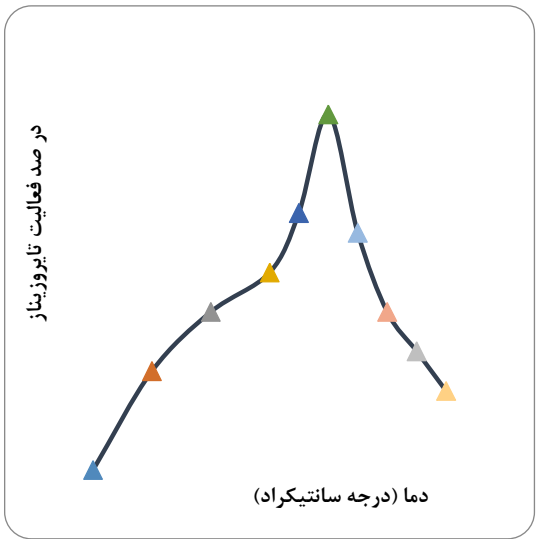
شکل ۳- نمودار استاندارد پروتئین به روش لوری. ملاحظه می شود که جذب در ۷۵۰ نانومتر با غلظت پروتئین رابطه خطی دارد.

اندازه گیری دمای بهینه تایروزیناز استخراجی

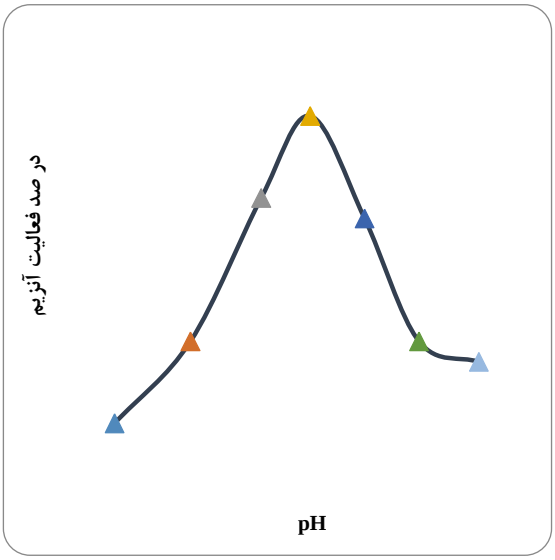
بررسی پایداری دمایی در محدوده دمایی ۱۰ تا ۷۰ درجه انجام شد و نتایج نشان دادند که بیشترین فعالیت تایروزیناز در ۵۰ درجه سانتیگراد است (دمای بهینه). این نوع نمودار زنگوله شکل برای پایداری دمایی در مورد اغلب آنزیم ایجاد می شود. بدیهی است که دمای بهینه به مقاومت دمایی آنزیم بستگی داشته و در هر مورد متفاوت است. لازم به تاکید است که اندازه گیری‌های فعالیت آنزیم در دماهای مختلف هر یک حداقل سه بار تکرار شدند و در نهایت نمودار مربوط با استفاده از میانگین سه نوبت رسم شدند.

بررسی فعالیت تایروزیناز استخراجی در اثر تغییرات (pH)

با اندازه گیری فعالیت آنزیم در (pH)های ۲/۵ تا ۹/۲ پایداری آنزیم در محیط‌های مختلف اسیدی و قلیایی مورد بررسی قرار گرفت. شکل (۵) نمودار تغییرات فعالیت آنزیم در مقابل (pH) را نشان می دهد. به طوری که در این شکل مشخص است آنزیم ما در محدوده (pH) ۵ تا ۷ حدود ۴۰ تا ۷۵٪ فعالیت خود را نشان داده است و (pH) بهینه آن ۶ می باشد. یادآوری می شود که در این مورد نیز فعالیت آنزیم در pHهای مختلف حداقل سه بار انجام و از میانگین سه نوبت برای رسم نمودار استفاده شد.



شکل ٤- اثر تغییرات دما روی فعالیت تایروزیناز پوست موز. دمای بهینه ۵۰ درجه سانتیگراد می باشد و در محدوده دمایی ٤۵ تا ۵۵ درجه سانتیگراد حدود ۷۰٪ فعالیت آنزیم حفظ شده است.



شکل ۵- فعالیت تایروزیناز پوست موز در مقابل تغییرات (pH). به طوری که ملاحظه می شود (optimum pH) آنزیم ۶ است که در آن ۱۰۰٪ فعالیت آنزیم باقی مانده است.

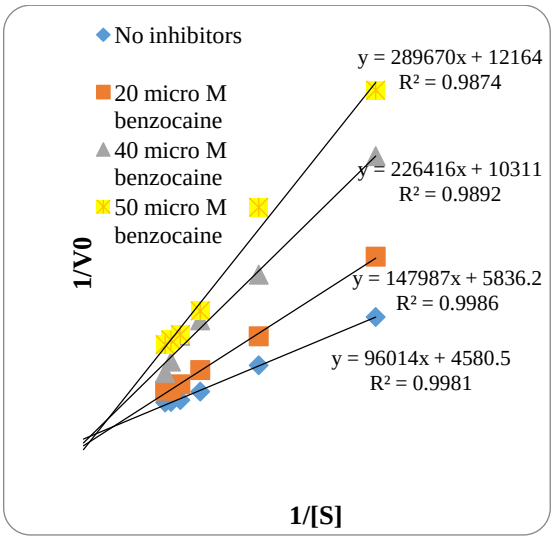
بررسی فعالیت تایروزیناز در غیاب و حضور داروها

در این قسمت ابتدا فعالیت آنزیم در غلظت‌های مختلف (۵ تا ۵۰ میکرومولار) سوبسترا و در غیاب داروها اندازه گیری شد. سپس غلظت‌های مختلف هر دارو در به محلول آنزیمی افزوده شده و سرعت واکنش آنزیمی در غلظت‌های مختلف سوبسترا در حضور مقادیر مختلف داروها بررسی شد. با استفاده از داده‌ها، نمودار مکالیس منتن برای آنزیم تایروزیناز پوست موز و تایروزیناز سیگما رسم گردید. غلظت سوبسترا برای رسیدن به ناحیه پلاتو به عنوان حداکثر سرعت آنزیمی (V_{max}) در بررسی‌های سینیتیکی بعدی استفاده شد.

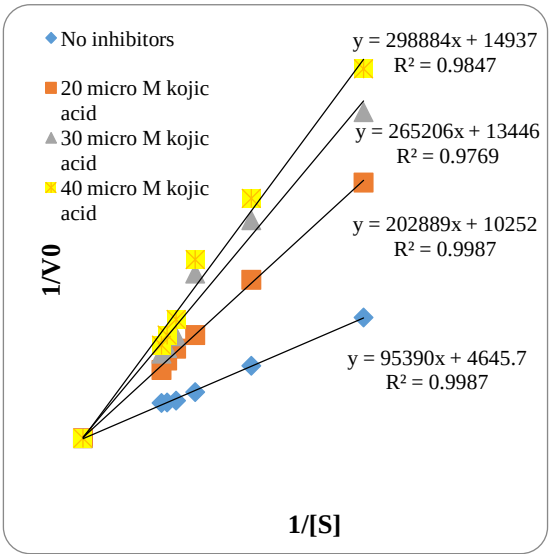
جدول ۱- میزان جذب محلول واکنش و فعالیت آنزیم در غلظت‌های مختلف سوبسترا.

غلظت سوبسترا (µM)	۵	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰
سرعت واکنش (µM/min)	۰/۰۰۰۴۲	۰/۰۰۰۷۰	۰/۰۰۱۱۰	۰/۰۰۱۳۵	۰/۰۰۱۴۲	۰/۰۰۱۴۴

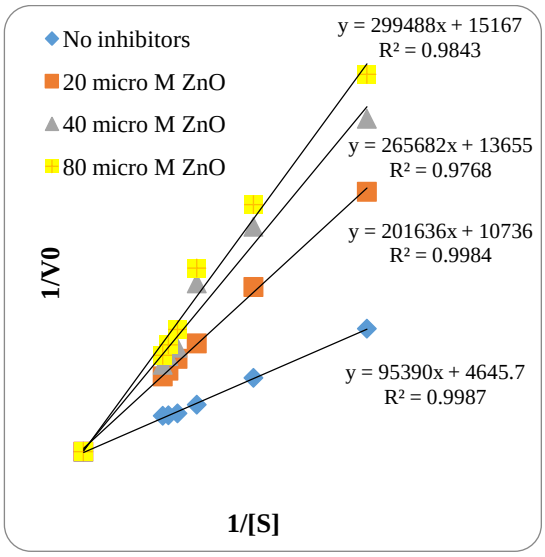
در ادامه، با استفاده از داده‌های جدول ۱، نمودارهای دو معکوسی خطی لاینویوربرک برای تایروزیناز در حضور بنزوکائین، کوجیک اسید و اکسید روی رسم شدند. فرم نمودارهای لاینویوربرک در مورد داروهای استفاده شده، بیان می دارد که کوجیک اسید، بنزوکائین و اکسید روی (ماده اصلی در داروی کالامین) بازدارنده‌های غیر رقابتی آنزیم (noncompetitive) هستند. به این معنی که مقدار (Km) را تغییر نداده اند ولی مقادیر (Vmax) در هر سه مورد کاهش یافته است. با توجه به کاهش قابل توجه سرعت در حضور اکسید روی و کوجیک اسید نسبت به بنزوکائین، می توان اظهار داشت که این داروها بازدارنده‌های قوی تری در مقایسه با بنزوکائین می باشند. جالب توجه این که اکسید روی حتی از کوجیک اسید نیز اثر بیشتری روی فعالیت تایروزیناز نشان داد. در واقع، کوجیک اسید بازدارنده استاندارد آنزیم تایروزیناز است که به عنوان مرجع استفاده می‌شود. ثابت‌های سینیتیکی برای هر یک از بازدارنده‌ها در غلظت‌های استفاده شده از مقادیر نمودار در غلظت مربوطه محاسبه شدند.



شکل ۶- نمودار لاینویور- برک فعالیت تایروزیناز روی دوپامین در حضور غلظت‌های ۲۰ تا ۵۰ میکرومولار بنزوکائین. کاهش سرعت و ثابت ماندن مقدار (K_m) نشان دهنده مکانیسم بازدارندگی از طریق غیر رقابتی و برگشت پذیر است. ثابت‌های سینیتیکی زیر از مقادیر نمودار در غلظت ۲۰ میکرومولار بازدارنده محاسبه شده اند.



شکل ۷- نمودار لاینویور- برک فعالیت تایروزیناز روی دوپامین در حضور غلظت‌های ۲۰ تا ٤۰ میکرومولار کوجیک اسید. کاهش سرعت و ثابت ماندن مقدار (K_m) نشان دهنده مکانیسم بازدارندگی از طریق غیر رقابتی و برگشت پذیر است.



شکل ۸- نمودار لاینویور- برک فعالیت تایروزیناز روی دوپامین در حضور غلظت‌های ۲۰ تا ۸۰ میکرومولار اکسید روی (ماده موثر داروی کالامین). کاهش سرعت و ثابت ماندن مقدار (K_m) نشان دهنده مکانیسم بازدارندگی از طریق غیر رقابتی و برگشت پذیر است.

در جدول‌های ۲ تا ۴ مقادیر ثابت‌های سینیتیکی (K_m و V_{max}) برای داروهای مورد استفاده به ترتیب اکسید روی، کوجیک اسید و بنزوکائین آورده شده اند و با ثابت‌های مذکور در عدم حضور دارو مقایسه شده اند. به طوری که ملاحظه می شود عدم تغییر (K_m) و کاهش (V_{max}) در هر سه مورد دلالت بر نوع بازدارندگی آنها از طریق غیر رقابتی دارند (۴ و ۹).

جدول ۲- تغییرات ثابت‌های سینیتیکی تایروزیناز پوست موز در حضور غلظت‌های مختلف بازدارنده اکسید روی

ثابت سینیتیکی	غلظت اکسید روی (میکرومولار)			
	0	**20**	**40**	**80**
K_m (μM)	20	20	20	20
$1/V_{max}$	4580.0	11080	13850	15268
V_{max} (μM/min)	0.00021	0.000090	0.000072	0.000065

جدول ۳- تغییرات ثابت‌های سینیتیکی تایروزیناز پوست موز در حضور غلظت‌های مختلف بازدارنده کوجیک اسید.

ثابت سینیتیکی	غلظت کوجیک اسید (میکرومولار)			
	0	**20**	**30**	**40**
K_m (μM)	20	20	20	20
$1/V_{max}$	4580.0	10308	13543	14934
V_{max} (μM/min)	0.00021	0.000097	0.000073	0.000066

جدول ٤- تغییرات ثابت‌های سینیتیکی تایروزیناز پوست موز در حضور غلظت‌های مختلف بازدارنده بنزوکائین.

ثابت سینیتیکی	غلظت بنزوکائین (میکرومولار)			
	0	**20**	**40**	**50**
K_m (μM)	20	20	20	20
$1/V_{max}$	4580.0	5836.2	10311	12164
V_{max} (μM/min)	0.00021	0.00017	0.000096	0.000082

به این ترتیب، کاهش فعالیت در حضور دارو در همه موارد مشاهده گردید و بیشترین اثر بازدارندگی مربوط به اکسید روی بود. سپس با استفاده از داده‌های این جدول نمودارهای (V_{max}^{+}/V_{max}^{-}) در مقابل غلظت‌های مختلف بازدارنده‌ها رسم و بعد از انجام محاسبات لازم مقدار (IC_{50}) برای اکسید روی، کوجیک اسید و بنزوکائین به ترتیب ۱۵، ۱۸ و ۳۶ میکرومولار به دست آمد (جدول ۵).

جدول ۵- مقادیر (IC_{50}) داروهای مورد استفاده.

بازدارنده	اکسید روی	کوجیک اسید	بنزوکائین
مقدار IC_{50} (μM)	۱۵	۱۸	۳۶

با توجه به این که نوع بازدارندگی در همه موارد غیر رقابتی است از رابطه زیر برای محاسبه (K_I) در هر مورد استفاده گردید. بدیهی است در این رابطه، (K_I) ثابت سرعت بازدارنده، ([I]) غلظت بازدارنده و (V_{max}^{+I}) و (V_{max}^{-I}) به ترتیب ماگزیمم سرعت آنزیمی در حضور و عدم حضور بازدارنده است.

بحث

بالا بردن سطوح بیان آنزیم تیروزیناز و افزایش فعالیت آن در فولیکول موی افراد مسن، ممکن است موجب از سر گرفته شدن سنتز پیگمانت ملانین و درنتیجه رنگی شدن ساقه مو گردد. در صورت عملکرد قوی فعال کننده‌های آنزیم تیروزیناز در *in vivo* و عدم وجود عوارض جانبی، این فعال کننده‌ها می توانند در صنعت داروسازی بطور گسترده ای مورد استفاده قرار گیرند و جایگزین مناسبی برای رنگ‌های شیمیایی گردند (۷ و ۱۸). فعال کننده‌های تایروزیناز هم چنین ممکن است کاندیدهای مناسب برای کاهش علائم آلبینیسم باشند. آلبینسم مجموعه ای از حالات وراثتی است که در نتیجه جهش ژنتیکی ایجاد می گردد. این افراد به دلیل کمبود یا فقدان رنگیزه در پوست، مو و چشم خود، شدیدا در معرض خطرات ناشی از اشعه uv نور خورشید می باشند و احتمال بروز انواع مشکلات پوستی و سرطان در آنها بالا است. تحقیقات نشان داده اند که جهش در نواحی بجز جایگاه فعال رخ می دهد و موجب کاهش فعالیت آنزیم می گردد در نتیجه سنتز رنگدانه‌های ملانین در این افراد به شدت کاهش یافته است (۱۷ و ۲۶). بر اساس یک پروژه تحقیقاتی در گروه تحقیقاتی بیوشیمی دانشگاه گیلان اسیدهای چرب ضروری مانند آراشیدونیک اسید و لینولئیک اسید موجب افزایش فعالیت تایروزیناز می شوند (۲۵). نتایج آن تحقیق در مورد اثر کننده‌های تایروزیناز و سینیتیک اثر آن در تضاد با یافته‌های تحقیق حاضر در مورد داروهای پوستی روی تایروزیناز است. دانشمندان بیان داشته اند که می توان امیدوار بود که با به کارگیری فعال کننده‌های قوی و مناسب برای آنزیم تیروزیناز در مبتلایان به برخی بیماری‌های پوستی ناشی از کمبود رنگدانه مشکلات آنها را کاهش داد. لازم به یادآوری است که بررسی فعال کننده‌های آنزیم تیروزیناز و به طور کلی همه آنزیم‌ها، نسبت به مهار کننده‌های طبیعی و سنتزی آنها کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است (۵). در مورد داروهای پوستی و اثر آنها روی عملکرد آنزیم‌ها منابع زیادی وجود نداشت، به خصوص داروهای رایج که ما استفاده کردیم. با توجه به اینکه بنزوکائین، کوجیک اسید و کالامین از داروهای ملایم با اثرات جانبی کم هستند، هنوز توجه محققین برای اثرات جانبی احتمالی آنها به طور جدی جلب نشده است. به همین دلیل، منابع زیادی برای بحث در مورد داروها وجود نداشتند. از طرفی، کوجیک اسید در دسته بازدارنده‌های شناخته شده تایروزیناز قرار دارد و در بسیاری از منابع آنرا به عنوان رفرانس برای تحقیقات بازدارندگی این آنزیم استفاده می کنند و نکته جالب توجه آنکه اکسید روی موجود در کالامین و برخی دیگر از داروهای پوستی بازدارنده قوی تری از کوجیک اسید است. این اثر اکسید روی در کنار اثرات دارویی آن می تواند از مزایای خوب ترکیب مذکور باشد. زیرا علاوه بر اثر دارویی می تواند روشن کننده پوست باشد و تیرگی‌های ناشی از آفتاب و یا بهبود برخی زخم‌ها را به تدریج برطرف نماید. اکسید روی یا اکسید دو زنگ، علاوه بر مصارف دارویی، همچنین در ساخت مواد آرایشی به کار می رود. این ماده غیر قابل حل در آب است، ولی در محیط اسیدی و در صد کم الکل حل می شود. اکسید روی به دلیل آثار ضد چربی پوست و منعکس کننده اشعه ماورای بنفش یا UV، در

ترکیب کرم‌های ضد آفتاب نیز استفاده می شود. در کاربردهای پزشکی و بهداشتی، اکسید روی در ترکیب پودر بچه، پمادهای پوستی، کرم ضد آفتاب و شامپو ضدشوره کاربرد دارد. اکسید روی به صورت پمادی به همین نام و یا در ترکیب داروهای پوستی مانند کالامین وجود دارد و برای درمان ضایعات پوستی مستعد عفونت مانند سوختگی، اگزما، سوختگی پای نوزادان، خراشیدگی و گزیدگی توسط حشرات توصیه می شود. این دارو برای حفاظت از پوست در اثر اشعه (UV) نیز کاربرد دارد. از آنجایی که نفوذ اشعه (UV) به داخل پوست تخریب بافتی را تسریع کرده و سرعت پیرشدن پوست را افزایش می دهد. از طرفی، تابش (UV) پوست را خشک کرده و خطر بروز سرطان پوست را بیشتر می کند. عمل اکسید روی می تواند در کاهش این خطرات بسیار موثر واقع شود. به علاوه، اثر ضد تایروزینازی قوی آن موجب کاهش ایجاد رنگدانه‌های ناشی از زخم، پیری، تابش آفتاب و بیماری مختلف می شود. این نوع یافته‌ها و گزارش‌ها در مورد اثرات مفید اکسید روی در واقع تائیدی براثر بازدارندگی آن روی تایروزیناز است که در این تحقیق گزارش شده است.

۵-هیدروکسی-۲-هیدروکسی متیل- ۷ - پیرون (HMP) یا کوجیک اسید، یکی از متابولیت‌های قارچی است که به عنوان داروی موضعی برای ملازما (melasma) در انسان استفاده می شود (۱۰ و ۱۳). به علاوه، به دلیل خاصیت آنتی تایروزینازی شناخته شده، در ترکیب داروهای روشن کننده پوست نیز کاربرد دارد (۱۱ و ۱۴). تحقیقات نشان داده اند که کوجیک اسید می تواند در صنایع غذایی برای کاهش اثر تایروزیناز و در نتیجه حفظ کیفیت مواد غذایی و میوه‌ها در دوره انبار استفاده شود (۲). به دلیل سمی بودن این ماده، تحقیق در مورد مسمومیت از آن هنگام استفاده از مواد غذایی و داروهایی که در آنها استفاده شده است هنوز ادامه دارد (۱ و ۲۰). این دارو هم چنین به عنوان آنتی اکسیدانت معرفی شده و خواص آن بررسی شده است و به دلیل خاصیت آنتی تایروزیناز و آنتی اکسیدانت می تواند در کاهش اثرات پیری موثر باشد (۶). کوجیک اسید هم چنین دارای خواص ضد تومور می باشد و می تواند در ترکیب داروهای درمان یا پیشگیری سرطان کاربرد داشته باشد (۱۹ و ۲۹). این ماده چند کاره هم چنین در رادیولوژی به عنوان محافظ در مقابل اشعه مضر استفاده می شود (۳). یکی از جدیدترین اثرات گزارش شده این ترکیب در درمان بیماری پوستی لشمانیازیس (Leishmaniasis) است (۲۱ و ۲۲). این بیماری یک زخم پوستی مزمن می باشد که در کشورهای آسیایی بیشتر دیده شده است و به نام بیماری شرقی نیز خوانده می شود. در ایران به این بیماری سالک نیز اطلاق می شود. عامل بیماری تک یاخته ای از جنس لیشمانیا می باشد و بیماری قابل انتقال بین انسان و تعدادی از حیوانات از جمله جوندگان و سگ است که توسط پشه خاکی از فرد بیمار به دیگران انتقال می‌یابد. این بیماری به ویژه در فصول گرم سال و در مناطق گرمسیر کشور بیشتر مشاهده می شود. در ابتدا زخم سالک به صورت یک برجستگی کوچک (پاپول) ظاهر می گردد که به تدریج بزرگ شده و به صورت زخم در می آید. در برخی موارد این زخم‌ها خود به خود ظرف چند هفته تا چند ماه و گاهی یکسال و یا بیشتر بهبود یابند. در برخی افراد عود بیماری پس از بهبود به صورت زخم و یا برجستگی کوچک در محل زخم قبلی بهبود یافته ظاهر می شود. در ایران لیشمانیوز جلدی به دو شکل متفاوت و با عنوان‌های سالک نوع روستایی (مرطوب) و شهری (خشک) وجود دارد.

نتیجه‌گیری نهایی

بر اساس یافته‌های تحقیق ما می توان نتایج را به صورت زیر جمع بندی نمود.

آنزیم تایروزیناز در پوست موز وجود دارد و خواص شبیه به تایروزیناز قارچی بروز می دهد. به این ترتیب می توان از یک منبع ارزان قیمت و دور ریختنی ماده ارزشمندی با راندمان زیاد تهیه نمود.

تایروزیناز پوست موز می تواند جایگزین مناسب و ارزان قیمتی برای تایروزیناز قارچ برای اهداف تحقیقاتی معرفی شود.

پیش بینی می شود که تایروزیناز در موزهای پوسیده و غیر قابل فروش و پوست آنها به مقدار بیشتر موجود باشد و با روشی مشابه می توان آنرا آزمایش و تعیین کیفیت نمود. تایروزیناز پوست موز دارای دمای بهینه بالاتری از تایروزینازهای شناخته شده است و می تواند در کاربردها دارویی که دمای بالاتری برای عملکرد لازم دارند به راحتی استفاده شود.

داروهای پوستی، علاوه بر خواص دارویی مورد انتظار دارای خواص آنتی تایروزیناز و گاه خواص آنتی اکسیدانت هستند.

اثرات جانبی داروهای موضعی پوستی می تواند ارزش افزوده ای بر عملکرد آنها داشته باشد زیرا فعالیت تایروزیناز موجب تیرگی و ایجاد لکه‌های پوستی می شود. این داروها با بازدارندگی قابل توجه روی تایروزیناز می توانند لکه‌های پوستی را از بین ببرند.

بر اساس یافته‌های سینیتیکی هر سه داروی کالامین، کوجیک اسید و بنزوکائین بازدارنده‌های غیر رقابتی تایروزیناز هستند. به این معنی که با وجود کاهش سرعت ماگزیمم واکنش آنزیمی (V_{max}) روی مقدار (K_m) آنزیم اثر ندارند.

از میان داروهای بررسی شده در این تحقیق بالاترین اثر بازدارندگی مربوط به اکسید روی (ماده موثر در داروی کالامین) و سپس کوجیک اسید و در نهایت بنزوکائین بود.

نکته قابل توجه این که مرور کتابخانه ای تحقیقات دیگران و آزمایش‌هایی که در کنار این تحقیق ما نیز انجام گرفت ثابت کننده اثر آنتی اکسیدانتی داروها نیز بود. این اثر در کاهش مضرات رادیکال‌های آزاد و احتمالا به تعویق انداختن علائم پیری اهمیت زیاد دارد.

منابع و مآخذ

1. Blumenthal, C. Z. 2004. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. Regul Toxicol Pharmacol. 39: 214-28.
2. Burdock, G. A, Soni, M. G, Carabin, I. G. 2001. Evaluation of health aspects of kojic acid in food. Regul Toxicol Pharmacol. 33: 80-101.
3. Emami, S, Hosseinimehr, S. J, Taghdisi, S. M, Akhlaghpoor, S. 2007. Kojic acid and its manganese and zinc complexes as potential radioprotective agents. Bioorg Med Chem Lett. 17: 45-8.
4. Garrett, R. H, Grisham, C. M. Biochemistry 6th edition. 2016. Harcourt Brace & Company.
5. Ghavami, S. M. 2016. Kinetic effect of some eye medications on peroxidase activity. MSc thesis, University of Guilan.
6. Gomes, A. J, Lunardi, C. N, Gonzalez, S, Tedesco, A. C. 2001. The antioxidant action of *Polypodium leucotomos* extract and kojic acid: reactions with reactive oxygen species. Braz J Med Biol Res. 34:1487-94.
7. Guan S, S. u W, Wang, N, Li. P, Wang, Y. 2008. A potent tyrosinase activator from Radix Polygoni multiflori and its melanogenesis stimulatory effect in B16 melanoma cells. Phytother Res. 22 (5): 660-3.
8. Klabunde, T, Eicken, C, Sacchettini, J. C, Krebs, B. 1998. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. Nature Structural Biology. 5: 1084-90.
9. Lehninger, A. L, Nelson, D. L, Cox, M. M. 2005. Lehninger Principles of Biochemistry. Freeman WH, United States of American.
10. Lim, J. T. 1999. Treatment of melasma using kojic acid in a gel containing hydroquinone and glycolic acid. Dermatol surg. 25:282-4.
11. Lin, C. H, Wu, H. L, Huang, Y. L. 2007. Combining high-performance liquid chromatography with on-line microdialysis sampling for the simultaneous determination of ascorbyl glucoside, kojic acid, and niacinamide in bleaching cosmetics. Anal Chim Acta. 581:102-7.
12. Lowry, O. H, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. J. 1951. Biol Chem. 193:265-75.
13. Lynde, C. B, Kraft, J. N, Lynde, C. W. 2006. Topical Treatments for Melasma and Postinflammatory Hyperpigmentation. Skin Therapy Letter. 11(9): 1-6.
14. Maeda K, Fukuda M. 1991. *In vitro* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. J Sic Cosmet Chem. 42:361-8.
15. Mayer, A. M. 2006. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. Phytochemistry. 67 (21): 2318-31.
16. Mayer, A. M, Staples, R. C. 2000. Laccase: new function for an old enzyme. Phytochemistry. 60:551-65.
17. Menasche, G, Ho, C, Sanal, O. 2003. Griscelli syndrome restricted to hypopigmentation results from a melanophilin defect (gs3) or a myo5a fexon deletion (gs1). J Clin Invest. 122: 450-8.
18. Moore BM, Flurkey WH. Sodium dodecyl sulfate activation of plant polyphenoloxidase. J Biol. Chem 1990; 265: 4982-8.
19. Moto, M, Mori, T, Okamura, M, Kashida, Y, Mitsumori, K. 2006. Absence of liver tumor-initiating activity of kojic acid in mice. Arch Toxicol. 80: 299-304.
20. Nohynek, G. J, Kirkland, D, Marzin, D, Toutain, H, Leclerc-Ribaud, C, et al. 2004. An assessment of the genotoxicity and human health risk of topical use of kojic acid [5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one]. Food Chem Toxicol. 42: 93-105.

21. Rodrigues, A. P. D, Farias, L. H. S, Carvalho, A. S. C, Santos, A. S, do Nascimento, J. L. M, Silva, E. O. 2014. A Novel Function for Kojic Acid, a Secondary Metabolite from *Aspergillus* Fungi, as Antileishmanial Agent. PLoS One. 9 (3): e91259.

22. Santos, A. S, Silva, E. O, Nascimento, J. L. M, Alves, C. N, Carvalho, A. S. C, et al. 2010. Use of 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-γ-pyrone as a macrophage activation agent to combat cutaneous leishmaniasis. European patent. WO2010017613.

23. Sariri, R, Moghimi, R, Ranjbar, B. 2006. Inhibition of tyrosinase activity on dopamine hydrochloride by kojic acid. Asian Journal of Chemistry. 18 (1): 2006:15-19.

24. Sariri, R, Mozafarzadeh, Z, Jafarian, V. 2008. Extraction, purification and characterization of polyphenol oxidase from tobacco grown in Northern Iran Bioscience Biotechnology Research Asia. 5(2): 337-342.

25. Sariri R, Shabani R. 2010. Increase of melanogenesis in the presence of fatty acids. Pharmacologyonline 1: 314-23.

26. Scott, G, Leopardi, S, Printup, S, Madden, B. 2002. Filopodia are condouits for melanosome transfer to keratinocytes. J Cell Sci. 115: 1441-51.

27. *Shapiro, A. L; Viñuela, E; Maizel, J. V J. r. 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochem Biophys Res Commun. 28 (5): 815-820.*

28. Sugumaran, M, Schinkmann, K, Dali, H. 1990. Mechanism of activation of 1,2-dehydro-N-acetyldopamine for cuticular sclerotization. Arch Insect Biochem Physiol. 14(2): 93-109.

29. Tamura, T, Mitsumori, K, Totsuka, Y, Wakabayashi, K, Kido, R, et al. 2002. Absence of in vivo genotoxic potential and tumor initiation activity of kojic acid in the rat thyroid. Toxicology. 222:213-24.

30. Vámos-Vigyázó, L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. Crit Rev Food Sci Nutr. 15 (1):49-127.