تخلیص و مختصر

# مطالعه کینیتیکی بر روی کولین استراز سرم انسان

ملتی ع.ا.[۱] ، اینجی اوزر[۲]

خلاصه

آنزیم کولین استراز از سرم انسان طی پروسه دو مرحله‌ای تخلیص شده و مقدار فعالیت مخصوص آن ۵۳۰ میکرومول در میلی‌متر در دقیقه و در یک میلی‌گرم پروتئین ( Mmol.ml-1. min-1. mg-1. protein ) تعیین شد. کولین استراز با درجه خلوص بالا در مطالعه بر روی داروهای جدید کشف شده، و از لحاظ نوع مهارکنندگی آنها (برگشت پذیر و غیر قابل برگشت) بر روی آنزیم ، همچنین تخمین دز بعضی از داروها (بمنظور اینکه به فعالیت فیزیولوژیکی کولین استراز بوسیله این دارو در بدن لطمه‌ای وارد نشود.) کاربرد دارد. همچنین آنزیم تخلیص شده، در تعیین مقدار دز ترکیبات مشابه به سوکسینیل کولین و متابولیسم ارگانوفسفات‌ها (حشره‌کشها) در آزمایشهای اولیه بکاربرده می‌شود.

با مهار بوسیله پروپرانونول و آیزوپروترنول (دو نوع دارو پرمصرف )بطور جداگانه یک رفتار نامتقارن کینیتیکی برای آنزیم تفسیرشده، که این رفتار خاصیت ارثی و یا نامتقارن شدن بر اثر مجاورت آنزیم بالیگانه‌ها (سوبستراها و مهارکننده‌ها ) می‌تواند باشد. بنابراین دقت لازم در تعیین نوع و دز داروهای دیگری که همزمان با دو داروی مذکور تجویز می‌شوندومکانیزم مهارکنندگی مشابهی بر روی آنزیم دارند لازم و ضروری است .

مقدمه:

کولین استرازها ئیدرولیز استرهای آبی از اسیدهای چرب یا زنجیره کوتاه از قبیل استیل کولین ،بنزوئیل کولین،استیل سالیسیلات ،پروکائین و سوکسینیل کولین راکاتالیز می‌کنند(۹).

$$R\text{-}CO_2CH_2CH_2N^+(CH_3) + H_2O \xrightarrow{CHOLINESTERASE} RCOOH + HOCH_2CH_2N^+(CH_3)_3$$

از نظر اختصاصات سوبسترایی و توزیع درون ماهیچه‌ای تفاوتهای اساسی بین آنزیم کولین استراز وجود دارد. کولین استراز سرمی درکبد سنتز شده و در پلاسما، پانکراس و مغز یافت می‌شود که ترکیبات استری کولین و غیرکولینی را بخوبی ئیدرولیز کرده ، در صورتی که استیل کولین استراز که در انتقال پالسهای عصبی سهیم است فقط بطور اختصاصی استیل کولین را ئیدرولیز می‌نماید(۳).

فعالیت کولین استراز در سرم انسان ، در راه‌های اصلی متابولیسم و وظایف فیزیولوژیکی ناشناخته بوده، ولی در

---

۱- عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی زنجان

۲-عضو هیأت علمی دانشگاه خاورمیانه - آنکارا

برداشتن سمیت بعضی از داروها از قبیل
ن (ماده بیهوشی محلی)، سوکسینیل کولین
پارالیز کردن بافتهای ماهیچه‌ای در عمل
سی) اسیداستیل سالیسیلیک و همچنین
بی از قبیل پامبوترال (۱۲) اهمیت بسزایی
همچنین از نقطه نظر بالینی آنزیم برای
خیص سمیت بوسیله کربامات‌ها و
کش‌های ارگانوفسفات بکاربرده می‌شود
ه بوسیله خیلی از ارگانو فسفات‌هابطور
ل برگشت مهارمی‌شود(۷،۱۱)که در نتیجه
تجمع و انباشته شدن استیل کولین در بدن
ه باعث تنگی نایژه ، ازدیاد ترشح بزاق
، شکمی و هیپوتانسیون و انقباض غیر ارادی
ه (به علت ضعیف شدن آن ) می‌شود. از
ژنتیکی ۹۷٪ مردم دارای ژنوتیپ *EIU* بوده
در سرم آنها به اندازه کافی کولین استراز سنتز
د و در حدود ۳٪ از انسانها ژنوتیپ *Ela* را
ه ژنهای آنها به اندازه کافی کولین استراز سنتز
ایند(۳/۱۰/۱۲)که این گروه افراد مواجه با
ژیک (افزایش ترکیبات استری در بدن ) شده
یدرولیز موادی چون پروکائین و سوکسینیل
ناتوان می‌باشند و اگر در عمل جراحی این
راد، سوکسینیل کولین به عنوان پارالیز بکار
ود ، طولانی شدن مدت پارالیز و یا احتمال
رای آنها وجود دارد. این دو نوع کولین استراز
لحاظ ژنوتیپی با هم متفاوتند را می‌توان با
مهار بوسیله دی‌متیل کربامیت ، دی‌بوکائین یا
نوتول از هم تشخیص داد(۱/۳/۱۰).
، آنزیم کولین استراز با درجه خلوص بالا که
طالعه متابولیسم بعضی از داروها از قبیل
ینیل کولین و حشره‌کش‌ها ، تعیین دز داروی
و همچنین نقائص ژنتیکی کاربرد دارد تهیه
ست و اکثر مطالعات با استفاده از آنزیم‌های با
خلوص پایین (*crude*)انجام گرفته است . در
ع پروژه تحقیقی سعی بر این داشتیم که آنزیم
استراز از سرم انسان را با جداکثر درجه
ن با بکار بردن کروماتوگرافی افینیته تخلیص
و نحوه مهار آن را بوسیله آبزوبرترنول و
نولول که از لحاظ مقایسه فارماکودینامیکی
ا کاربرد دارد، مورد مطالعه قرار دهیم.

مواد و روشها :

تمام مواد شیمیایی و *CH - Sepharose 4B* از شرکت سیگما خریداری شده *tris – acrylamide – DEAE* از شرکت *LKB* تهیه شده است ، خون از یک شخص داوطلب و بطور مستقیم بکاربرده شده است. پارانیتر و فنیل بوتیرات را در استونیتریل و بقیه مواد شیمیایی را در آب حل نمودیم .

با استفاده از روش دو مرحله‌ای لوکویچ و لادو (۸) آنزیم را تخلیص و الکتروفورز آنزیم تخلیص شده طبق روش دیویس (۴) با بکاربردن (*Polyacryl amide gel electropharesis*)(٪۵) *PAGE* ) انجام شده است.

اندازه گیری فعالیت آنزیم :

فعالیت آنزیم با استفاده از اسپکتروفتومتر(*Zeiss,PMQII*) در ۳۰c مورد اندازه‌گیری قرار گرفته‌است (۵). ترکیب مورد آزمایش درون کووت که شامل تامپون پتاسیم فسفات (*ph*=۷/۴) نیز می‌شود، یک میلی لیتر بوده و بوتیریل تیوکولین (*BTC*) و پارانیتروفنیل بوتیرات (*PNPB*) به عنوان دو سوبسترا در آزمایشهای جداگانه بکاربرده شده است . واکنش با اضافه نمودن ۲۰ میکرولیترآنزیم به کووت شروع می‌شد.

موقعی که *PNPB* به عنوان سوبستراً مورد آزمایش قرار می‌گرفت طول موج ۴۰۵*nm* و برای *BTC* به عنوان سوبسترا طول موج ۴۱۲*nm* در دستگاه اسپکتروفتومتر انتخاب می‌شد. برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین از جذب نوری در ۲۸۰*nm* استفاده شده است .

نتیجه

تخلیص کولین استراز از سرم انسان :

۱۲۰*mL* از نمونه دیالیز شده، به ستون کروماتوگرافی تعویض یونی *DEAE-tris-acrylamide Column* (۲/۵×۳۵*cm*) که با ۲۵*mm* تامپون سدیم استات (*PH*=۴/۵) متعادل شده بود، اضافه شده آنزیم بوسیله شیب غلظتی *Nacl* (از صفر تا ۰/۵*M*) از

ستون کروماتوگرافی استخراج شده و سپس قسمت‌هایی از محلول خارج شده از ستون که فعالیت آنزیمی را داشتند جمع‌آوری و آن را در مقابل تامپون فسفات ۲۰mm و EDTA ۱mm (pH=۷/۲) دیالیز نمودیم. نمونه دیالیز شده به ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی (Procainamide-Sepharose 4B) که با ۲۰mm پتاسیم فسفات و EDTA متعادل شده بود اضافه شد.آنزیم تخلیص شده بوسیله شیب غلظتی Nacl (۰/۶mm-۰/۱) استخراج شد (شکل ۱) قسمتهایی از محلول استخراج شده که دارای فعالیت آنزیمی بودند را جمع آوری کرده و به‌وسیله آلترافیلتراسیون (Amicon PMio) تغلیظ نموده و در ۲۰c- جهت مطالعه کنیتیکی نگهداری شد.

مهار پارانیترو فنیل بوتیرات (PNPB) بوسیله پروپرانولول و ایزوپروترنول:
پروپرانولول به صورت یک مهارکننده رقابتی با PNPB آنزیم را مهار می‌کند(شکل۳). طرح دیکسون برای مهار ئیدرولیز PNPB بوسیله پروپرانولول در دو غلظت ثابت سوبسترا(۰/۵ mm و۰/۲) خطهای مستقیم می‌باشند که تقاطع آن را بر روی ۱/Vmax دلالت بر رقابتی بودن مهارکننده را دارد.
مقدار KI (ثابت مهارکنندگی) برابر با ۲×۱۰ محاسبه شد.از مهار ئیدرولیز PNPB بوسیله آیزوپروترنول یک طرح مهار کمپلکس حاصل شد زیرا که تقاطع دو خط مستقیم (ئیدرولیزPNPB و ئیدرولیز همین سوبسترا در حضور ۴ میلی مولار ایزوپروترنول ) در طرح محورهای معکوس (عکس غلظت سوبسترا در مقابل عکس سرعت واکنش ) در پایین محور طولها می‌باشد (شکل ۴ ) و همچنین طرح دیکسون در دو غلظت ثابت سوبسترا (۰/۲ و۰/۵ میلی مولار) غیر مستقیم با شیب منفی می‌باشد (شکل۵) بنظر می‌آید که در این عمل مهارکنندگی Km و همچنین Vmax تحت تاثیر قرار گرفته‌اند.

ئیدرولیز بوتیریل تیوکولین (BTC) و اثر ایزوپروترنول بر روی آن:
طرح لینویور-برک جهت ئیدرولیز BTC توسط کولین استراز تخلیص شده در شکل ۶ نشان داده شده است . در این حالت یک رفتار کنیتیکی غیر خطی مشاهده می‌شود که نشان دهنده انحراف از قوانین میکائیلیس و منتون بوده که می‌توان آن را یک رفتار کوپراتیو منفی تفسیر کرد.
طرح دیکسون [ غلظت‌های ایزوپروترنول ( صفر تا ۱۰ میلی مولار) در مقابل عکس سرعت واکنش ] برای دو غلظت متفاوت BTC (۰/۵mm و۰/۲) در شکل ۷ نشان داده شده است که بصورت دو خط غیر مستقیم مشاهده می‌شوند. انحراف از خط مستقیم دلالت بر نا متقارن بودن و مکان پیوندآنزیم کولین استراز با مهارکننده آیزوپروترنول دارد.

بحث:
در این عملیات تحقیقی کولین استراز از سرم انسان با درجه خلوص بالا یعنی با فعالیت مخصوص ۵۳۰ mmol.ml-1.min-1.mg-1 protein تخلیص شد که هموژنه بودن و درجه خلوص زیادآن بوسیله یک بند بر روی صفحه پلی آکریل آمید الکتروفورز به اثبات رسید (شکل ۲). البته این آنزیم در سال ۱۹۷۸ توسط لوکریج ولادو تخلیص شده بود (۸) اما درجه خلوص آنزیم آنها ۱۷۰ Units/mg بسیار پایین‌تر از مقداری است که ما در این پروژه تحقیقی بدست آورده‌ایم.
آنزیم تخلیص شده در مطالعه بر روی بعضی از داروها از قبیل ترکیبات مشابه سوکسینیل کولین و از نقطه‌نظر کنیتیکی نحوه متابولیسم ارگانوفسفات‌ها (حشره‌کش‌ها) و بعضی از داروهای دیگر در دست آزمایش کاربرد دارد.
مطالعات کنیتیکی محدودی بر روی کولین استراز تخلیص شده فوق انجام دادیم. از روی ئیدرولیز بوتیریل تیوکولین ( شکل ۶ ) که خط غیر مستقیم با شیب معکوس به طرف بالا نشان می‌دهد را می‌توان ناهماهنگ بودن دو مکان پیوند مهارکننده برروی آنزیم دانست و پروپرانولول به صورت رقابتی با PNPB آنزیم را مهار می‌کند و در صورتی که آیزوپرترنول یک طرح مهاری کمپلکس را نشان می‌دهد زیرا که تقاطع دو خط مستقیم در پایین محور x هامی‌باشد(شکل ۳ و ۴ ) که البته طرح مهار کمپلکس را می‌توان بر وجود مکان‌های متعدد در

ضیح داد.
به متحنی‌های بدست آمده نتیجه‌گیری
که پروپرانولول و آیزوپروترنول کولین
ا بطور برگشت پذیر مهار می‌کنند یعنی با
ز شدن دارو در بدن آنزیمه عمر پروپرانولول
۱ تا ۶ ساعت می‌باشد (۱۱)) آنزیم کولین
وباره فعالیت خود را باز می‌یابد، در صورتی
ره‌کش‌های، ارگانوسولفونات و کربامات
، مهارکننده غیرقابل برگشت آنزیم کولین
! برای همیشه از فعالیت انداخته که این امر
کولینرژیک طولانی و یا اگر دز مواد سمی
ادباشد گرفتن حیات را از شخص حتمی
.. همچنین با مطالعه مقدار مهار آنزیم توسط
لول می‌توان کولین استراز نوع عادی از
تیکی (*E1u*) را با کولین استراز غیرعادی
ز هم تشخیص داد زیراکه پروپرانولول آنزیم
کولین استراز افرادی که ژنوتیپ غیر عادی برای این آنزیم دارند را مهار نمی‌کند.

از مجموع مطالعات کنیتیکی فوق نیز می‌توان یک رفتار کنیتیکی نا متقارن با توجه به سوبستراها و داروهای پروپرانولول و آیزوپروترنول برای آنزیم کولین استراز پیشنهاد کرد که این رفتار یک خاصیت ارثی و یا نا متقارن شدن بر اثر مجاورت آنزیم با لیگانه‌ها (سوبستراها و مهارکننده‌ها) می‌تواند باشد، البته رفتار کنیتیکی متقارن برای برای کولین استراز در بعضی از پستانداران و نا متقارن بودن در بعضی دیگر گزارش شده است (۶و۲) پس مطالعه در تعیین نوع و دز داروهای دیگری که همزمان با پروپرانولول و ایزوپروترنول تجویز می‌شوندو از لحاظ مهارکنندگی کولین استراز مکانیزم مشابهی با دو داروی مذکور دارند لازم و ضروری است.

*REFRENCES :*


*1.Alcantara /V./ chautard / F.M.E./ Culpi / L.? (1991) CHE 1 Uf Serum cholines phenotype in Whites and non-Whites from southern Brazil as determined by a method. Human Herediatry / Vol. 41/no2/ Pp. 103/6.*

*2.Auqstinsson(1974). A Mechanistic model for Butyrylcholinesterase / Biochim Biophysica Acta / Vol. 567 / Pp. 161-173.*

*3.Brown/ S.S./ Kalow/ W./ Pila/ W./ WhiHaker/ M./ and Woronick/ C.L./(1981) plasma cholinesterase./ A new prespective. Adv.Clin.Chem./ vol.22/Pp./-123.*

*4.DoVis/ b.I. (1964).Disc Electrophores;s II,Method of Application to human Proteins /Ann. N.Y. Acad. Sci.vol. 121./ Pp. 404-427.*

*5.Ellman, G.I.,Courtney/K.D./ Andres/ V./ Featherstone/ R.M./(1961) A new and colorimetric Determination of Acetychalinesterals Activity, Biochem. pharr vol.7./PP.88-956.*

*6-Eriksson/ H./ Augustinsson/ k.B./ (1979) A Mechanistic Model Butyrylcholinesterase/Biochim. Biophys. Acta, Vol. 567 / PP.161-173.*

*7.Lokridge/ O./ Erikson/ H.W./ LaDu/ B.N. (1979) Interchain Disulfide Bonds and s Organization in human serum cholinesterase / J. Biol. chem.Vol. 254/ PP.8234-8330.*

*8.Lockridgo, O./ laDu/ B.N./ Comparison of Atypical and Vsual Human. cholinesterase (1978)/ J. Biol Chem./ Vol. 253/ PP.361-366.*

*9.Oropall/ A. t./ (1978). Abnormal Pseudocholinesterase levels in a suryicall popu Amer. Soci of Anesth. vol. 48/ PP.284-286.*

10.prester. L. Simeon. V. (1991) / Kinetics of the inhibition of human serum cholinesterase phenotypes with the dimethylcarbamate of (2-hydroxy-5- phenylbenzyl)-trimethyl ammonium bromide. Biochem. pharmacol. Vol. 42. No 12. PP.2313-2316.
11.stein / J. H./ etal (1990) Internal Medicine Book / third Edition / PP.2402.
12.Tunek/ A./ Hyertberg/ E./Mogensen/ J./ (1991) Interactions of barnbuteral With human serum cholinesterase of the genotypes EuEa (normal)/ EaEa (arypical) and Euea.