مقاله پژوهشی

تهیه میکروزوم و اندازه‌گیری پروتیین آن در نمونه‌های کبد انسانی

امیر حیدری[۱]، تهمینه پیروی[۲]* اعظم اکبری[۳]، رحیم محمودلو[۴]

۱ استادیار گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

۲ دانشیار گروه آناتومی،بیمارستان مطهری، مرکز چاقی مادر و کودک، ارومیه، ایران

۳ کارشناس ارشد شیمی تجزیه، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

٤ دانشیار گروه جراحی عمومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

نشانی نویسنده مسئول: ارومیه، پردیس نازلو، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، تهمینه پیروی

E-mail: tpeirouvi@yahoo.co.uk

وصول:۹۳/۷/۲۲،اصلاح:۹۳/۸/۷،پذیرش:۹۳/۹/۸

چکیده

زمینه و هدف: آنزیم‌های سیتوکرومی نقش بسیار مهمی در متابولیسم داروها دارند. بیش از ۹٦ درصد این آنزیم‌ها در کبد وجود دارند. لذا، اندازه‌گیریپروتیینمیکرزوم‌هاجهت مشخص نمودن توانایی کبددرمتابولیسم داروها و تعیین پارامترهای فارماکوکینتیک مؤثّر خواهد بود. در این مطالعه بعد از تهیه میکروزوم، میزان پروتیین آنها در نمونه‌های کبدی انسان مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

مواد و روش‌ها:در این مطالعه مشاهد ه ای ۱۸ نمونه بافت کبدی سالم از بیماران تحت جراحی کبدی به صورت غیر تصادفی و در دسترس تهیه شد. این نمونه‌ها دربافر فسفات پتاسیم خرد گردیده و طی چندین مرحله سانتریفوژ، رسوب میکروزومی استخراج شد. سپس مقدار پروتیین تام میکروزمی با روش لوری اندازه‌گیری گردید.داده های بدست آمدهمورد تجزیه و تحلیل روش های آمار توصیفی قرار گرفتند.

یافته‌ها:نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مقدار پروتیین تام در نمونه های کبد بین ۱٤/۱ تا ۲۷/۲ میلی گرم بر هر گرم از کبد متفاوت است. میانگین پروتیین تام درنمونه‌های مورد آزمایش حدّود۳/۷۷ ±۲۰/۲٤ میلی گرم بر هر گرم است. لازم به ذکر است این نتایج برای اوّلین باردرایران گزارش می‌گردد.

نتیجه‌گیری: آگاهی از مقدار پروتیین میکروزوم‌های کبدی نقش بسیار مهمی در رابطه با توانایی کبدنژاد ایرانی از حیث متابولیسم داروها دارد. لذا، این پروژه اطّلاعات ارزشمندی در اختیار محقّقین قرار می‌دهد. مقدار پروتیین موجود در میکروزوم‌های کبدی در این منطقه نسبت به سایر گزارش های بین المللی پایین می باشد. این پدیده، می‌تواند زنگ خطری برای پزشکان بالینی از حیث کنترل دوز تجویز داروها به لحاظ توانایی پایین کبد در متابولیسم دارو و نهایتاً امکان بروز مسمومیّت دارویی، باشد.

واژه‌های کلیدی: *میکروزوم، پروتیین، کبد، انسان.*

مقدمه

متابولیسم دارویی، فرآیندی است که طی آن یک ترکیب دارویی از لحاظ ساختاری دچار تغییر شده و به شکل فعّال و مؤثّر در بدن و یا به اشکال بی اثر و قابل دفع از بدن، تبدیل می‌گردد. این فرآیند توسّط آنزیم‌های ویژه‌ای صورت می‌گیرد که مهم ترین دسته آنها، آنزیم-

های سیتوکروم P450 هستندو حدّاقل ۸۰ درصد متابولیسم داروها توسّط این آنزیم‌ها صورت می‌گیرد. امروزه سیتوکروم P450 به عنوان نام اصلی خانواده بزرگ هموپروتیین‌ها (پروتیین‌های دارای آهن) شناخته شده است که اغلب در غلظت‌های بالا در شبکه اندوپلاسمیک صاف سلول‌های کبدی یافت می‌شوند. این آنزیم‌ها از لحاظ متابولیزه داروهای مختلف، اختصاصی نبوده و در نتیجه تعداد خیلی کمی از این آنزیم‌ها قادر به متابولیسم هزاران نوع دارو و ترکیبات گزنوبیوتیک هستند. سیتوکروم هایcypزیر گروه های زیادی دارند که مهم ترین انواع آنها عبارتند از: CYP 2E1 - CYP 3A1 - CYP 2D6 و– CYP 1A2 CYP 3A4 (۱).

مقدار این آنزیم‌ها در بین افراد جوامع مختلف به دلیل اختلافات ژنتیکی (پلی مورفیسم)، متفاوت می‌باشد (۲). وراثت نیز می تواند روی فارماکودینامیک دارو از طریق حساسیّت گیرنده که منجر به ایجاد پاسخ به دارو می‌شود،تاثیر بگذارد. بنابراین، میزان متابولیسم و حساسیّت افراد به داروهادر بین افراد جوامع مختلف، متفاوت است[۳].در مواردی ممکن است داروها اثرات متفاوتی در افراد ایجاد کنند.گاهییکدارووهیچاثردرمانیدریک فرد ندارد و در تعدادی ازافراد برای دستیابی به اثر درمانی مشابه بادیگران،به دوزکم تریابیشتری ازدارو نیاز است. از این رو در جوامع پیشرفته افراد از لحاظ فعّالیّت کبدی به دو دسته افراد سریع متابولیزه کننده (EM) و افراد کند متابولیزه کننده(PM) تقسیم‌بندی می‌شوند. به‌عنوان مثال، چنانکه فردی دارای کمبودآنزیم متابولیزه کننده یک داروی خاص باشد، این دارو با دوز تجویزی متعارف، در بدن فرد تجمّع یافته و موجب بروز مسمومیّت دارویی خواهد گردید. بدین ترتیب وجود تفاوت آنزیمی، باید در تجویز دوز داروها در افراد مختلف،مد نظر قرار بگیرد(٤).

شناسایی سیتوکروم‌های میکروزومی و آگاهی از مقدار دقیق آنها، بسیار دشوار ولی حایز اهمیّت است. شناخت درصد افراد از لحاظ قدرت متابولیزه دارویی نقش به سزایی در تجویز و دوز داروها دارد. آمارهای جهانی در جوامع غربی و بعضی کشورهای شرق کمک شایانی در این زمینه نموده و این اطّلاعات به صورت بانک اطّلاعاتی در برنامه‌های کلینیکی و تحقیقاتی به کار گرفته می‌شود. در منابع علمی در صد این افراد در جوامع اروپایی و امریکایی ودر جوامع شرقی، از جمله در کشور ژاپن و چین مشخص گردیده است (۵). در حالی که چنین آماری در ایران تاکنون گزارش نشده است. به عنوان مثال در کشور های اروپایی در صد افرادکند **متابولیزه کننده** ۸ درصد جامعه را شامل می گردد (٦) و این آمار در کشور مکزیک به ۱۰ درصد می‌رسد (۳).در این پروژه برای اوّلین بار در ایران از نمونه های بیوپسی کبد انسان میکروزوم تهیه، و مقدار پروتیین آنها اندازه گیری گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده‌سازی نمونه‌های کبدی

در این مطالعه مشاهده ای۱۸ نمونه کبدی سالم (از نظر ماکروسکوپی) به صورت غیر تصادفی و در دسترس از بین بیمارانی که تحت جراحی کبد قرار گرفته بودند،با رضایت بیمارن و کمیته اخلاق دانشگاه تهیه و جهت بررسی در اختیار پژوهشگر قرار گرفت. نمونه‌های کبدی پس از نمونه‌برداری به داخل میکروتیوب‌هایی ۲ میکرولیتر منتقل و بلافاصله در داخل تانک ازت قرار داده شدند. پس از انجماد در ازت به داخل فریزر ۷۰ – درجه سانتی گراد انتقال و نگهداری شدند.

روش تهیه میکروزوم

به‌منظور تهیه میکروزوم نمونه‌های کبدی، ابتدا نمونه های فریز شده از فریزر خارج و به مدّت ۱۰ دقیقه بر روی یک قالب یخ قرار داده شدند تا ذوب گردند. سپس با کمک اسکالپل به قطعات ریز، خرد گردیدند. به قطعات خرد شده (pH=۷/۲۵ و ۰/۰۲۵ مولار)بافر فسفات پتاسیم‌با حجم ده برابر نمونه اضافه شد و توسّط هموژنایزر شیشه‌ای (ساخت شیشه گرارومیه) به اجزای

ریزتر تبدیل شد. در این مرحله به‌منظور همگن‌سازی بیشترمخلوط از دستگاه هموژنایزر برقی (IKA, Germany)استفاده شد. در انتها مخلوط هموژنیزه توسّط الک استیل با قطر منافذ ۲۵۰ میکرومتر صاف شد تا قطعات درشت تر مخلوط جدا شوند.جهت شست و شوی الک نیز مجدداً ازبافر فسفات پتاسیم‌استفاده شد تا اجزا باقی مانده در منافذ الک به مخلوط نهایی وارد گردند. در این مرحله حجم مخلوط نهایی، اندازه‌گیری و ثبت گردید. مقداری از این مخلوط صاف شده جهت اندازه گیری پروتیین تام و آنزیم های سیتوکروم‌به‌طور جداگانه نگهداری گردید و بقیه مراحل تهیّه میکروزوم ادامه یافت. به این منظور ابتدا محلول صاف شده توسّط دستگاه اولتراسانتریفوژ(Hanil Science, Korea) در g ۹۰۰۰ به مدّت ۲۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. این فرآیند به منظور جداسازی اجزای سلولی مانندهسته، میتوکندری و لیزوزم‌ها انجام شد.سپس محلول رویی، برداشته شده و پس از تعیین و ثبت دقیق مقدار حجم آن، جهت تهیّه رسوب یا پلت میکروزومی، مجدداً در g ۱۰۰،۰۰۰ به مدّت ۷۵ دقیقه با دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژگردید. محلول رویی حاصل از این مرحله حاوی سیتوزول می‌باشد که بلافاصله پس از تعیین و ثبت حجم دقیق آن، سریعاً در ازت مایع، منجمد شده و در دمای ۷۰–درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. رسوب باقی مانده (پلت) در انتهای تیوب‌ها، در واقع همان میکروزوم می‌باشد که مجدداً در داخل بافر فسفات پتاسیم‌مخلوط وهموژنیزه شد.حجم این نمونه نیزتعیین و ثبت گردید. سپس نمونه‌ها در نیتروژن مایع منجمد و در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد جهت اندازه گیری پروتیین تام و سیتوکروم P450 نگهداری گردیدند (۵)

روش اندازه گیری پروتیین تام میکروزوم‌ها

مقدار کمی پروتیین در نمونه‌های میکروزوم، بر اساس روش Lowry protein assay تعیین گردید. (۸و۹) و از کیت‌های آماده total protein-sl (ساخت شرکت زیست شیمی) استفاده شد.در این آزمایش ها، ابتدا سه سری لوله به ترتیب لوله‌های نمونه، استاندارد و شاهد، انتخاب شد. سپس درون هریک از لوله‌های فوق، مقدار ۲۵ میکرولیتر از هریک از مخلوط‌های نمونه میکروزوم، محلول استاندارد و آب مقطر به ترتیب اضافه گردید. در نهایت مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول Total Protein Reagent به هر سه لوله فوق اضافه شد.بعد از هم زدن به مدّت ۱۵ دقیقه در داخل بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس محلول نهایی را از لوله-ها خارج نموده و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب نور فرابنفش توسّط میکروزوم‌ها در طول موج ٥٤٠ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت بر اساس طول موج جذبی و غلظت محلول‌های استاندارد منحنی استاندارد ترسیم شد و با استفاده از آن غلظت پروتیین تام موجود در مخلوط‌های آزمایشی محاسبه و تعیین گردید.

روش آماری: جهت محاسبه میانگین و انحراف معیار نمونه های به دست آمده از روش آمار توصیفی و برنامه اکسل استفاده شد.

یافته‌ها

در جدول شماره (۱)، وزن نمونه‌های ارسالی، مقادیر میکروزوم تهیّه شده و نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار پروتیین تام هریک از نمونه‌های کبدی با روش لوری، ارایه گردیده است. مقدار میانگین پروتیین تام ۳/۷۷±۲۰/۲٤ میلی‌گرم در هر گرم از کبد به دست آمد.

بحث

دانشمندان دریافته‌اندکه افراد واکنش‌های بسیار متفاوتی نسبت به داروها بادوزهای مختلف نشان می‌دهند. این موضوع بیانگراین مطلب است که قدرت متابولیسم دارو ها در افراد مختلف متفاوت است و برای رسیدن به اثرات درمانی یکسان در افراد مختلف نیاز به شناسایی آنزیم ها باتوان متابولیزه دارو ها می باشد.ممکن است یک دارو که

جدول ۱: وزن نمونه‌های کبدی و حجم میکروزوم استخراج شده از هر نمونه

شماره نمونه	وزن نمونه کبد (گرم)	حجم میکروزوم (میلی لیتر)	مقدار پروتیین کلمیکروزوم میلی گرم/گرم کبد
۱	۰/۱۶	۱	۲۱/۵
۲	۰/ ۳۵	۲	۲٤/۲
۳	۰/۱۳	۰/۵	۱۶/۵
٤	۰/۲۸	۱/۵	۱۸/۰
۵	۰/۱۱	۰/۵	۱۷/۷
۶	۰/۲۵	۱	۱۶/۳
۷	۰/۲٤	۱	۱۶/۰
۸	۰/۱۸	۱	۱٤/۸
۹	۰/۲۱	۱	۲۲/۸
۱۰	۰/۱۶	۱	۲۱/۱
۱۱	۰/۱۲	۰/۵	۱٤/۱
۱۲	۰/۱۷	۰/۵	۱۹/۷
۱۳	۰/۱۶	۰/۵	۲۷/۲
۱٤	۰/۱۵	۰/۵	۲۳/٤
۱۵	۰/۱۹	۰/۵	۲۲/۵
۱۶	۰/۲۰	۰/۵	۲٤/۵
۱۷	۰/۲۰	۰/۵	۲۳/۲
۱۸	۰/۰۹	۰/۵	۲۰/۹
	میانگین		۲۰/۲٤
	انحراف معیار		۳/۷۷

برای یک فرد مؤثّر وایمن است، برای دیگری کشنده باشد (۹).

کبد مهم ترین اندام متابولیزه کننده داروها در بدن به حساب می‌آید که منجر به حذف یا دفع دارو از بدن می‌گردد. هرگونه تغییر روند متابولیسمی این اندام در نهایت می‌تواند به افزایش و یا کاهش غلظت دارو در بدن منتهی گردد. مطالعه حاضر با هدف تهیه میکروزوم و اندازه‌گیری مقدار پروتیین تام در میکروزوم‌های کبد انسان، برای اوّلین بار در ایران انجام شد.

شناخت بیشتر آنزیم‌های کبدی در افراد، نیازمند کسب اطّلاعات در زمینه میکروزوم‌های کبدی است. در بسیاری از جوامع پیشرفته اروپایی، این قبیل اطّلاعات در افراد جامعه جمع آوری و گزارش گردیده است. به‌گونه‌ای که به‌راحتی می‌توان نسبت به توانایی کبد در متابولیزه داروها اظهار نظر نمود. لذا، ایجاد بانک اطّلاعاتی در این زمینه، یکی از مباحث مهم در علوم پایه به شمار می‌رود. در این راستا تیم تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، بر آن شد تا با تشکیل بانک کبد در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی وابسته به دانشکده پزشکی، یک مرجع رفرانس در این زمینه ایجاد نموده و اقدامات اساسی جهت شناسایی و سایر پارامترهای مرتبط، صورت گیرد (۱۰). در حال حاضر از ۱۸ نمونه بیوپسی شده کبد میکروزوم تهیه گردیده است.

در مطالعه حاضر، مقدار متوسّط پروتیین میکروزوم در نمونه های کبدی بومی، پس از اندازه‌گیری نشان داد که این مقدار نسبت به مقادیر گزارش شده در سایر جوامع کم تر است.می‌توان این نتایج را به توانمندی کبد در متابولیسم ارتباط داد.در بین موارد گزارش شده، تاکنون تنها در یک مورد Beaune و همکاران در سال ۱۹۸۲ مقدار متوسّط میکروزوم را در تعداد ۱٤ نمونه کبد انسانی ۱۹ میلی گرم بر گرم از کبد گزارش نموده اند (۱۱).

نتایج مطالعه انجام شده توسّط Lipscomb و همکاران در سال ۲۰۰۳ بر روی ۲۰ نمونه کبدی با نتایج مطالعه ما متفاوت بود. آنها میزان پروتئین تام ۵۳ میلی گرم بر گرم گزارش نمودند(۱۲).در حالی که میزان

پروتئین تام در مطالعه ما ۲۰ میلی گرم بر گرم است.
نتایج حاصل از پروژه فوق و تکمیل آن در فاز های بعدی در خصوص تعیین فعّالیّت آنزیم ها کاربردهای مفیدی می تواند داشته باشد.از جمله این که با استناد به این نتایج، و مشخص نمودن فعّالیّت آنزیم ها، مقدار دوز تجویزی دارو توسّط پزشکان، تعدیل و متناسب با شاخص‌های مقادیر فعّالیّت های آنزیمی میکرزومی خواهد بود. این امر نه تنها باعث افزایش اثر دهی دارو می‌گردد بلکه، اثرات نامطلوب درمانی و امکان بروز سمیّت دارو رانیز خواهد کاست. از مزایای دیگر می‌توان به انتخاب درمان بهینه، سرعت بهبودی بیمار، کاهش هزینه‌های اضافی درمان و مراقبت‌های پزشکی و افزایش رضایت‌مندی بیمار برشمرد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه جهت حمایت مالی در اجرای پروژه حاضر در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، قدردانی می‌نماییم. همچنین از جناب آقای دکتر رضا کیان مهر رزیدنت بخش جراحی که در تهیه نمونه‌های کبدی ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی به عمل می‌آید. از خانم دکتر Zoe E Barter (Ph.D) عضو تیم تحقیقاتی SIMCYP انگلستان به خاطر مشاوره علمی و راهنمایی‌های ارزشمندشان، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Correia MA.Drug Biotransformations. In:Katzung B, Masters S, Trevor A. Basic and Clinical Pharmacology 12th ed. US: MaGraw-Hill. 2011: 466-70.
2. Watkins PB, Murray SA, Thomas PE, Wrighton SA. Distribution of cytochromes P-450, cytochrome b5, and NADPH-cytochrome P-450 reductase in an entire human liver. BiochemPharmacol.1990;39(3): 471-6
3. Lopez M, Guerrero J, Jung-Cook H, Alonso ME. CYP2D6 genotype and phenotype determination in a Mexican Mestizo population. Eur J Clin Pharmacol. 2005; 61:749-54.
4. Schoene B, Fleischmann RA, Remmer H, von Oldershausen HF. Determination of drug metabolizing enzymes in needle biopsies of human liver. Eur J Clin Pharmacol. 1972; 4(2): 65-73.
5. Wilson ZE, Rostami-Hodjegan A, Burn JL, Tooley A, Boyle J, Ellis SW, et al. Inter-individual variability in levels of human microsomal protein and hepatocellularity per gram of liver. Br J Clin Pharmacol. 2003 ; 56(4): 433-40.
6. Heydari A,Yeo KR, Lennard MS, Ellis SW, Tucker GT, Rostami-Hodjegan A.Mechanism-based inactivation of CYP2D6 by methylenedioxymethamphetamine. Drug MetabDispos. 2004; 32(11):1213-7.
7. Bradford MM.A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities ofprotein utilizing the principle of protein-dye binding.Anal Biochem.1976; 72: 248-54.
8. Lowry OH,Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.Protein measurementwith the folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193(1): 265-75
9. MatsubaraT, Koike M, Touchi A, Tochino Y, Sugeno K. Quantitative determination of cytochrome P-450 in rat liver homogenate.Anal Biochem. 1976; 75(2): 596-603.
10. von Bahr C, Groth CG, Jansson H, Lundgren G, Lind M, Glaumann H. Drug metabolism in human liver in vitro: establishment of a human liver bank. ClinPharmacolTher. 1980; 27(6): 711-25.
11. Beaune PH.Purificationof human cytochromes P450.PhD Thesis; 1982.
12. Lipscomb JC, Fisher JW, Confer PD, Byczkowski JZ.In vitro to in vivo extrapolation for trichloroethylene metabolism in humans.ToxicolAppl Pharmacol.1998;152(2): 376-87.

Preparing Microsom and Measuring it's Protein in human liver samples

Amir Heydari.,
Assistant Professor of pharmacology, Faculty of Pharmacy, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

Tahmineh Peirouvi.,
Associate Professor of Histology, Child and maternal,s obesity center,Motehary Hospital,Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

A'zam Akbari.,
Master of Analytical Chemistry, cellular and molecular of research center, Urmia University of Medical Sciences,Urmia, Iran

Rahim Mahmodlou.,
Associate Professor of General Surgery, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

Received:14/10/2014**, Revised:**29/10/2014**, Accepted:**29/11/2014

Corresponding Author:
Tahmineh Peirouvi,
Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
E-mail: tpeirouvi@yahoo.co.uk.

Abstract

Background and purpose: In human cytochrome P450 (CYP), enzymes are responsible for the oxidative metabolism of many medicines. The greatest metabolism proportions are carried out by enzymes that are found in the liver. CYPs are located in the microsomes. For these reasons preparation of microsomes and measurement of their protein are very important to determine the potency of liver for metabolic elimination of drugs in humans. The aim of this project was to extract microsmes and determine levels of microsomal protein in human tissue.

Methods: Eighteen biopsies of human liver were obtained with their consents from patients undergoing surgery. Liver samples were finely chopped and homogenized in the buffer. Liver homogenate was centrifuged in different steps to yield a microsomal pellet. Then content of total protein was determined according to Lowry method. Data were analyzed according to descriptive statistics method.

Results: The value of MPPGL (microsomal protein per gram of liver) ranged from14.1 to 27.2 mg per gram of liver (mean 20.24±3.77).

Conclusion: The values of MPPGL in this project were reported for the first time in Iran. The mean value of MPPGL in this project is lower than others studies. These results in this area, will aid the physicians to improve the level of safety of prescription of the medicines. Many doctors are unaware of the possible risks for patients whom have exposed by being treated with drugs.

Keywords: *Microsome, Protein, Liver, Human*