بسم الله الرحمن الرحیم

انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد: شمارهٔ ۱۷۴

روشهای سنجش بیولوژیک برای کشف داروهای جدید

تألیف:

عطاءالرحمن ـ م. اقبال چودری

ویلیام ج. تامسون

ترجمه:

دکتر مهرداد ایرانشاهی

دانشیار دانشکده داروسازی

دانشگاه علوم پزشکی مشهد

سرشناسه:	عطاءالرحمان، ۱۹۴۲ - م. Rahman, Atta-ur
عنوان و نام پدیدآور:	روش‌های سنجش بیولوژیک برای کشف داروهای جدید / تألیف عطاءالرحمان م، اقبال چودری، ویلیام ج. تامسون؛ ترجمه مهرداد ایرانشاهی.
مشخصات نشر:	مشهد: دانشگاه‌علوم‌پزشکی‌وخدمات‌بهداشتی‌درمانی مشهد، ۱۳۸۸.
مشخصات ظاهری:	۲۵۶ ص.
فروست:	(انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد؛ شماره ۱۷۴).
شابک:	(ISBN: 978-964-5944-52-8)
وضعیت فهرست‌نویسی:	فیپا.
یادداشت:	عنوان اصلی: Biossay techniques for drug development, C 2001.
موضوع:	عیارگیری زیستی -- فن.
موضوع:	گیاهان -- سنجش زیستی.
موضوع:	گیاهان دارویی.
شناسه افزوده:	چودری، محمد اقبال.
شناسه افزوده:	Choudhary, Muhammad Iqbal
شناسه افزوده:	تامسن، ویلیام ج.
شناسه افزوده:	Thomsen, William J
شناسه افزوده:	ایرانشاهی، مهرداد، ۱۳۵۳ - ، مترجم.
شناسه افزوده:	دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی مشهد.
رده‌بندی کنگره:	RS ۱۸۹ / ع ۶ ر ۹ ۱۳۸۸
رده‌بندی دیویی:	۱۹۰۱/۶۱۵
شماره کتابخانه ملی:	۱۹۴۴۱۱۷

انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد، شماره ۱۷۴

روش‌های سنجش بیولوژیک برای کشف داروهای جدید

تألیف

عطاءالرحمن ـ م، اقبال چودری ـ ویلیام ج. تامسون

ترجمه

دکتر مهرداد ایرانشاهی

وزیری، ۲۵۶ صفحه، ۳۲۰ نسخه، چاپ اول، بهار ۱۳۸۹

امور فنّی و چاپ: مؤسسهٔ چاپ و انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد

بها: ۵۲۰۰۰ ریال

بسمه تعالی

انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد ـ به عنوان یک نهاد علمی ـ فرهنگی، چاپ و نشر، کتابهای مورد استفاده استادان و دانشجویان رشته‌های علوم پزشکی را از وظایف اساسی خود می‌داند و بر آن است تا با انتشار متون مربوط به علوم پزشکی، هم بر اعتبار و اعتلای آنها بیفزاید و هم موجبات دل گرمی و شوق و نشاط امر تحقیق را در پی‌جوییهای علمی فراهم آورد.

به یقین چاپ و نشر آثار معتبر علمی، امکان دست‌یابی اهل تحقیق را به منابع مختلف و گوناگون علمی مورد نیاز به بهترین صورتی میسر و ممکن خواهد ساخت و راه را برای تحقیقات بعدی هموار خواهد کرد.

باید گفته شود که گستردگی فعالیتهای مربوط به نشر، در قلمرو ناشران خصوصی، نه تنها از مسؤولیت مراکز معتبر دانشگاهی، به کوشش در این زمینه‌ها با تکیه بر جنبه‌های علمی و فرهنگی موضوع نمی‌کاهد، بلکه به دلایل گوناگون، از جمله لزوم بررسیهای دقیق کارشناسی، ویرایشهای علمی و فنی، و نیز توجه حداکثر به توان مالی مخاطبان آثار، به‌ویژه دانشجویان، ایجاب می‌کند که دانشگاههای دولتی دامنه خدمات خود را با تکیه بر جنبه‌های کیفی، و گاه صرف‌نظر از بازده اقتصادی گسترش دهند.

مسؤولان انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد، با اشتیاق و اخلاص تمام می‌خواهند تا جدیدترین آثار مربوط به دانشهای پزشکی را به بهترین شیوه فراهم آورند و بکوشند تا آثار منتشر شده با کیفیت مطلوب عرضه گردد. در عین حال انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مترصد دریافت نظرها و انتقادهای به‌جا و سازنده اهل‌نظر می‌باشد تا از این طریق بتواند بر کمال آثار منتشره خویش بیفزاید.

معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد با استعانت از الطاف خداوندی امیدوار است که نشر این اثر همانند دیگر آثار انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد با نظارت همه‌جانبه این معاونت، و با تکیه بر ابتکار و کوشش اعضا و کارشناسان دانش‌آموخته خویش و نیز ایجاد ارتباط محکم و پایدار با جامعه پزشکی و دانشجویان پژوهشگر، در جهت ارتقای کیفی و تنوع موضوعات مورد نیاز دانش‌پژوهان رشته‌های علوم پزشکی گامهای مؤثر بردارد تا مورد استفاده دانشجویان و مقبول طبع صاحب‌نظران و دانشگاهیان نکته‌بین قرار بگیرد.

انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد

فهرست

فصل اول: آزمون‌های بیولوژیک مقدماتی ۱۹

۱-۱- آزمونهای سمیت ۱۹

۱-۱-۱- آزمون کشندگی میگوی آب شور ۱۹

۱-۱-۲- آزمون سمیت سلولی میگوی آب شور به روش چاهک پلیت ۲۱

۱-۱-۳- آزمون مهار غده‌های تاجی شکل بافت گیاهی (آزمون ضد تومور دیسک سیب زمینی) ۲۳

۱-۱-۴- آزمون سمیت حیوانی ۲۶

۱-۲- آزمونهای ضد میکروبی ۲۶

۱-۲-۱- آزمونهای ضد باکتری ۲۸

۱-۲-۱-۱- آزمون انتشار آگار ۲۸

۱-۲-۱-۲- آزمون رقت آگار ۳۰

۱-۲-۱-۲-۱- روش میکروتیتر صفحات ۹۶ خانه ای ۳۱

۱-۲-۱-۳- روش بیواتوگرافی مستقیم ۳۱

۱-۲-۲- آزمونهای ضد قارچ ۳۶

۱-۲-۲-۱- آزمون رقت لوله آگار ۳۶

۱-۲-۲-۲- روش بیواتوگرافی مستقیم ۳۸

۱-۳-۱- آزمون ضد HIV ۴۰

۱-۳-۲- آزمون ضد سرطان ۴۲

۱-۳-۲-۱- غربالگری برون تنی داروهای ضد سرطان ۴۳

۱-۳-۳- آزمون سمیت سلولی HCT ۵۴

۱-۴- آزمون ضد میتوز ۵۸

۱-۴-۱- آزمون ضد میتوز با استفاده از تخمهای خارپشت دریایی ۵۸

۱-۵- آزمونهای سمیت ژنی ۵۹

۱-۵-۱- آزمون SOS chromtest برای بررسی سمیت ژنی ۵۹

۱-۵-۲- آزمون Ames برای شناسایی ترکیبات سرطانزا یا عوامل جهش زا ۶۲

۱-۵-۳- آزمون سنجش فعالیت ضد فاژ ۶۸
۱-۶- آزمونهای مورد استفاده برای بیماریهای مناطق گرمسیری ۶۹
۱-۶-۱- آزمونهای ضد مالاریا ۶۹
۱-۶-۱-۱- آزمون شیزونت کشی ۹۶ خانه‌ای به روش برون تنی ۶۹
۱-۶-۱-۲- آزمون بازدارندگی عملکرد شیزونتوسیت خون (آزمون پیتر) ۷۱
۱-۶-۱-۳- آزمایش فعالیت شیزونت کشی در آزمون رین ۷۲
۱-۶-۲- آزمون لاروکشی ۷۲
۱-۶-۳- اثر کشندگی نرم تنان (حلزون کشی) ۷۴
۱-۶-۴- آزمون سنجش سمیت برای ماهی ۷۵
۱-۶-۵- آزمون آمیب کشی ۷۶
۱-۶-۶- آزمون بررسی اثرات سرکاریاکشی ۸۲
۱-۶-۷- فعالیت لشمانیاکشی ۸۴
۱-۶-۷-۱- آزمون برون تنی علیه پروماستیگوتهای لشمانیا ۸۴
۱-۶-۷-۲- آزمون برون تنی علیه آماستیگوتهای لشمانیا ۸۶
۱-۶-۷-۳- آزمون درون تنی ضد لشمانیا ۸۸
۱-۷- آزمونهای مورد استفاده در کشاورزی ۸۹
۱-۷-۱- آزمونهای سمیت گیاهی و محرک رشد با استفاده از عدس آبی (*Lemna minor*) ۸۹
۱-۷-۲- آزمون حشره کشی تماسی ۹۱
۱-۷-۳- آزمونهای ضد خوراک حشره ۹۳
۱-۷-۳-۱- آزمون ضد خوراک برگ ۹۳
۱-۷-۳-۲- آزمون ضد خوراک با رژیم غذایی مصنوعی ۹۴
۱-۷-۴- آزمون نماتودکشی ۹۸
۱-۸- آزمونهای سمیت کبدی ۱۰۱
۱-۸-۱- فعالیت ضد سمیت کبدی با استفاده از سمیت سلولی القا شده با تتراکلرید کربن ۱۰۱
۱-۸-۲- آزمون محافظت کبدی به روش درون تنی ۱۰۴
۱-۸-۳- فعالیت ضد سمیت کبدی با استفاده از گالاکتوزامین ۱۰۶
۱-۹- آزمونهای تعیین فعالیت کاهندگی قند خون یا ضد دیابت ۱۱۰
۱-۹-۱- آزمون فعالیت ضد دیابت روی خرگوشهای طبیعی و دیابتی شده با آلوکسان ۱۱۰
۱-۹-۲- آزمون فعالیت ضد دیابت (روش GOD-PAP) ۱۱۳

۱-۹-۳- آزمون تعیین فعالیت کاهندگی قند خون ۱۱۵
۱-۱۰- آزمون بررسی اثرات مدری ۱۱۶
۱-۱۱- آزمون‌های ضد کرم ۱۱۸
۱-۱۱-۱- آزمون ضد کرم به روش برون تنی ۱۱۸
۱-۱۱-۲- آزمون ضد کرم به روش درون تنی ۱۱۹
۱-۱۲- آزمونهای ضد باروری – ضد لانه گزینی جنین ۱۲۰
۱-۱۲-۱- آزمون ضد باروری ۱۲۰
۱-۱۲-۲- اثر ضد لانه گزینی جنین ۱۲۱
۱-۱۳- آزمون برون تنی تجمع پلاکتی ۱۲۲
۱-۱۴- آزمون ضد التهابی ۱۲۵
۱-۱۴-۱- آزمون تورم کف پای رت ۱۲۵
۱-۱۵- آزمون بررسی اثرات بر سیستم ایمنی ۱۲۶
۱-۱۵-۱- آزمون همولیتیک پلاک ۱۲۶
۱-۱۶- آزمون ضد تشنج ۱۲۸
۱-۱۶-۱- الگوی پیلوکارپین ۱۲۸
۱-۱۷- آزمونهای ضد درد ۱۳۲
۱-۱۷-۱- روش سندرم ریتینگ (Writhing) ۱۳۲
۱-۱۷-۲- روش صفحه داغ ۱۳۲
۱-۱۸- آزمونهای بررسی محافظت و اثرات ضد زخم دستگاه گوارش ۱۳۳
۱-۱۸-۱- آزمون محافظت دستگاه گوارش ۱۳۳
۱-۱۸-۲- آزمون ضد زخم ۱ ..... ۱۳۴
۱-۱۸-۳- آزمون ضد زخم ۲ ..... ۱۳۶
۱-۱۹- آزمونهای بیولوژیک با ترکیبات نشان‌دار ۱۳۶
۱-۱۹-۱- آزمون فعالیت میتوژنیک ۱۳۶
۱-۲۰- آزمون ضد تهوع ۱۳۹

فصل دوم: غربالگیریهای سریع ۱۴۱
۲-۱- مقدمه ۱۴۱
۲-۱-۱- ویژگیهای یک آزمون غربالگری ایده آل برای غربالگری عصاره‌های طبیعی ۱۴۱

۲-۱-۱-۱- آزمونهای بیوشیمیایی یا سلولی ۱۴۲
۲-۱-۱-۲- چارچوب آزمون ۱۴۳
۲-۱-۱-۳- منبع واکنشگر (بافتهای گیاهی، جانوری و ...) ۱۴۳
۲-۱-۱-۴- نسبت علایم واقعی به علایم کاذب در یک آزمون (Signal-to-noise-ratio) ۱۴۴
۲-۱-۱-۵- تیمار کردن ۱۴۵
۲-۱-۱-۶- دستکاریها یا تغییرات آزمون ۱۴۶
۲-۱-۱-۷- سازگار بودن با DMSO ۱۴۶
۲-۱-۱-۸- سازگاری با عصاره‌ها یا ترکیبات شیمیایی مورد استفاده در آزمون ۱۴۶
۲-۲- آزمونهای آنزیمی ۱۴۷
۲-۲-۱- مقدمه ۱۴۷
۲-۲-۲- ملاحظات در راه اندازی آزمونهای آنزیمی ۱۴۷
۲-۲-۲-۱- انتخاب منشأ آنزیم ۱۴۸
۲-۲-۲-۲- انتخاب غلظت آنزیم ۱۴۹
۲-۲-۲-۳- انتخاب سوبسترا و غلظت آن ۱۴۹
۲-۲-۲-۴- انتخاب غلظتهای کوفاکتور ۱۵۴
۲-۲-۲-۵- انتخاب روش اندازه‌گیری پایانی در آزمون ۱۵۵
۲-۲-۲-۶- انتخاب pH آزمون ۱۵۶
۲-۲-۲-۷- انتخاب دمای آزمون ۱۵۶
۲-۲-۲-۸- سازگاری با DMSO ۱۵۶
۲-۲-۲-۹- سازگاری با عصاره ۱۵۶
۲-۲-۲-۱۰- انواع مهارکننده‌ها ۱۵۷
۲-۲-۲-۱۱- مهار رقابتی ۱۵۸
۲-۲-۲-۱۲- مهار غیر رقابتی ۱۵۸
۲-۲-۲-۱۳- مهار نارقابتی ۱۵۹
۲-۲-۳- یک مثال از انجام یک آزمون آنزیمی برای غربالگری سریع ترکیبات طبیعی ۱۶۰
۲-۲-۴- چند نمونه از آزمونهای آنزیمی برون تنی ۱۶۷
۲-۲-۴-۱- آزمونهای مهار پروتئاز ۱۶۷
۲-۲-۴-۲- آزمون مهار تیروزیناز ۱۷۱
۲-۲-۴-۳- آزمون مهار آنزیم هیالورونیداز ۱۷۳

۲-۲-۴-۴- آزمون مهار استیل کولین استراز ۱۷۷
۲-۲-۴-۴-۱- آزمون طیف سنجی ۱۷۸
۲-۲-۴-۵- آزمون مهار بتالاکتاماز ۱۸۰
۲-۲-۴-۵-۱- آزمون طیف سنجی ۱۸۱
۲-۲-۴-۶- آزمون مهار ۵-لیپواکسیژناز ۱۸۳
۲-۲-۴-۶-۱- آزمون طیف سنجی ۱۸۴
۲-۳- آزمونهای مربوط به گیرنده سلول ۱۸۷
۲-۳-۱- مقدمه ۱۸۷
۲-۳-۱-۱- کاربرد آزمونهای مربوط به گیرنده ۱۸۷
۲-۳-۲- آزمونهای مربوط به گیرنده‌های مزدوج شده با G-پروتئین ۱۸۸
۲-۳-۲-۱- راههای انتقال پیام گیرنده مزدوج شده با Gi و Gs ۱۸۸
۲-۳-۲-۲- آزمونهای فانکشنال سریع برای گیرنده‌های مزدوج شده با Gs و Gi ۱۹۰
۲-۳-۳- آزمونهای فانکشنال معمولی گیرنده سلولی ۱۹۰
۲-۳-۳-۱- آزمون cAMP-SPA ۱۹۰
۲-۳-۳-۲- آزمون cAMP صفحه تابش ۱۹۲
۲-۳-۳-۳- آزمونهای اندازه‌گیری cAMP به روش ELISA ۱۹۳
۲-۳-۳-۴- آزمون ژن گزارشگر cAMP ۱۹۶
۲-۳-۳-۵- مسیرهای انتقال پیام گیرنده متصل به Gq ۱۹۷
۲-۳-۳-۵-۱- مقدمه ۱۹۷
۲-۳-۳-۵-۲- آزمونهای سریع (high throughput) برای گیرنده‌های Gq ۲۰۰
۲-۳-۳-۶- آزمونهای فانکشنال زود بازده برای کانالهای یونی وابسته به لیگاند ۲۰۲
۲-۳-۳-۷- آزمونهای فانکشنال گیرنده پروتئین تیروزین کیناز ۲۰۳
۲-۳-۳-۷-۱- مقدمه ۲۰۳
۲-۳-۳-۷-۲- مسیرهای انتقال پیام RPTK ها ۲۰۳
۲-۳-۳-۷-۳- آزمونهای فانکشنال سریع (high throughput) برای RPTKها ۲۰۶
۲-۳-۳-۷-۴- آزمون کلسیم داخل سلولی ۲۰۶
۲-۳-۳-۷-۵- آزمونهای تکثیر ۲۰۶
۲-۳-۳-۸- آزمونهای گیرنده سایتوکاین ۲۱۰
۲-۳-۳-۸-۱- مسیرهای انتقال پیام گیرنده سایتوکاین ۲۱۰
۲-۳-۳-۸-۲- آزمونهای گیرنده‌های سایتوکاین ۲۱۰

۲-۳-۳-۹- آزمون ترکیبی گیرنده‌ها ۲۱۱
۲-۳-۳-۹-۱- فن آوری سنجش عملکرد گیرنده‌های سلولهای ملانوفور ۲۱۱
۲-۳-۳-۱۰- فن آوری انتخاب گیرنده و افزایش تکثیر در سنجشهای عملکرد گیرنده‌ها ۲۱۵
۲-۴- سنجشهای اتصال رادیولیگاند ۲۱۶
۲-۴-۱- مقدمه ۲۱۶
۲-۴-۲- ملاحظات مهم برای سنجشهای اتصال رادیولیگاند ۲۱۷
۲-۴-۲-۱- منشأ گیرنده و غلظت آن ۲۱۷
۲-۴-۲-۱-۱- رده‌های سلولی انسانی غیر نوترکیب ۲۱۷
۲-۴-۲-۱-۲- تهیه غشاء از بافتها و سلولهای غیر نوترکیب ۲۱۸
۲-۴-۲-۱-۳- سلولها یا غشاهای حاوی گیرنده نوترکیب ۲۱۸
۲-۴-۲-۱-۴- انتخاب رادیولیگاند و غلظت آن در سنجش ۲۱۹
۲-۴-۲-۱-۵- انتخاب شرایط تیمار کردن ۲۲۱
۲-۴-۲-۱-۶- انتخاب بافر ۲۲۱
۲-۴-۲-۱-۷- انتخاب حجم آزمایش ۲۲۲
۲-۴-۲-۱-۸- انتخاب نوع روش جداسازی رادیولیگاندهای اتصال یافته از آزاد ۲۲۲
۲-۴-۳- مراحل راه‌اندازی سنجشهای رادیولیگاند ۲۲۳
۲-۴-۳-۱- اندازه‌گیری خطی غلظت غشای سلولی ۲۲۳
۲-۴-۳-۲- دوره‌های زمانی پیوند و تفکیک گیرنده و لیگاند ۲۲۵
۲-۴-۳-۳- ارزیابی اشباع گیرنده در شرایط هم دما ۲۲۹
۲-۴-۳-۴- مطالعات رقابتی ۲۳۲
۲-۴-۴- آزمونهای دیگر اتصال رادیولیگاند ۲۳۶
۲-۴-۴-۱- آزمونهای صفحه تابش (Flash Plate) ۲۳۶
۲-۴-۴-۲- آزمونهای Scintillation proximity ۲۳۸
۲-۴-۴-۳- آزمونهای صفحه نوار تابش (Scinti Strip Plate Micro Beta) ۲۴۰
۲-۴-۴-۴- شناسایی اتصال گیرنده بر اساس فلورسانس ۲۴۱
۲-۴-۴-۴-۱- فلورسانس زمان دار ۲۴۱
۲-۴-۴-۴-۲- پلاریزاسیون فلورسانس ۲۴۲
منابع ۲۴۳
نمایه فارسی ۲۵۲
نمایه انگلیسی ۲۵۵

پیشگفتار مترجم

کتاب حاضر مجموعه‌ای از متداولترین روشهای سنجش اثرات بیولوژیک عصاره‌ها، ترکیبات خالص طبیعی یا سنتزی می‌باشد. این کتاب از دو بخش تشکیل شده است. در بخش اول به آزمونهای مقدماتی مانند سمیت سلولی، اثرات ضد میکروب، اثرات ضد دیابت و غیره پرداخته می‌شود و در بخش دوم به روشهای نوین سنجشهای سریع (High throughput screening) که امروزه خواهان بیشتری پیدا کرده است می‌پردازد. هرچند گنجاندن تمامی روشهای سنجش در قالب یک کتاب امکان پذیر نمی‌باشد اما این کتاب می‌تواند زمینه تحقیقاتی مفیدی را برای متخصصان فارماکوگنوزی، شیمی ترکیبات طبیعی و شیمی دارویی که مایلند به بررسی اثر ترکیبات تهیه شده خود، بپردازند، ایجاد کند. بسیاری از تکنیکهای ارائه شده در این کتاب ساده بوده و به راحتی در هر آزمایشگاهی قابل راه اندازی می‌باشند. لازم به ذکر است که این تکنیکها علیرغم ساده بودن نیاز به بررسی‌های بیشتر و استفاده از روشهای دیگر برای اثبات اثر دارند. به عنوان مثال روش بررسی سمیت با میگوی آب شور ایجاد پاسخهای مثبت کاذب می‌کند و چنانچه عصاره یا ترکیبی در این آزمون خاصیت سمی نشان دهد باید با روشهای دیگر سمیت سلولی آن را تأیید کرد.

یکی از مزایای کتاب حاضر اشاره به مزیتها و معایب هر آزمون می‌باشد. بخصوص درمورد روشهای سلولی و آنزیمی نکات کاربردی و مفید زیادی توسط نویسندگان ارائه شده که ذهن محقق را نسبت به انجام آن آزمون و محدودیتهای آن روشن می‌کند.

اینجانب امیدوارم کتاب حاضر برای پژوهشگران و محققین کشورمان مفید واقع شود و چنانچه ایرادی مشاهده می‌کنند حتماً متذکر گردند. بر خود لازم می‌دانم از زحمات سرکار خانم شیرعلی در تایپ دقیق ترجمه این کتاب و همچنین از مساعدت معاون محترم پژوهشی دانشگاه و اعضای محترم شورای انتشارات دانشگاه که زمینه چاپ را فراهم نمودند تشکر نمایم.

مترجم

دکتر مهرداد ایرانشاهی

عضو هیأت علمی دانشکده داروسازی مشهد

بهار ۱۳۸۹

پیشگفتار

واژه «موج سبز» که با رشد آگاهی از محیط زیست آغاز شده است، منجر به افزایش توجه به داروهای گیاهی در سرتاسر جهان بخصوص در دههٔ اخیر شده است. مصرف گیاهان دارویی در غرب سالها با تردید همراه بوده است. کارآیی تعدادی از داروهای گیاهی توسط شرکتهای معتبر دارویی سنجیده شده است و شمار داروهایی که منشأ گیاهی دارند و یا غذاهایی که به سلامتی کمک می‌کنند به طور پیوسته با بالا رفتن تقاضا افزایش یافته است. در طول این سالها ارتباط جدیدی بین متخصصین شیمی گیاهی و فارماکولوژیست‌ها ایجاد شده که در بیشتر موارد نتایج خوبی به همراه داشته است.

متأسفانه علی‌رغم پیشرفتهای اخیر در روشهای کروماتوگرافی و طیف سنجی و وفور استفاده از گیاهان دارویی، اغلب متخصصین شیمی ترکیبات طبیعی در کشورهای توسعه یافته مشغول کارهای عملی فیتوشیمی هستند و کمتر به سمت جداسازی ترکیبات فعال بیولوژیک از منابع طبیعی می‌روند. این امر به خاطر فقدان مهارت و زیربنای لازم برای غربالگریهای بیولوژیک و نیز ائتلاف بیش از حد وقت جهت آزمایشگاههای فارماکولوژی می‌باشد. بنابراین طراحی آزمونهای بیولوژیک در آزمایشگاههای شیمی گیاهی که ارزان، سریع و بدون نیاز به دانش بیوشیمی، زیست شناسی یا فارماکولوژی باشد ضروری به نظر می‌رسد. تعدادی از آزمایشگاههای شیمی گیاهی در غرب آزمونهای ساده بیولوژیکی را تحت عنوان آزمایشهای «روی میزی[1]» طراحی کرده اند که توسط افراد غیرمتخصص انجام می‌شود. نتایج به دست آمده از این فرآیندها قویاً این رویکرد چند بعدی را بسیار سامان می‌دهد. امیدواریم کتاب روشهای سنجش بیولوژیک نیاز به یک مجموعه کامل را در این زمینه برطرف نموده و برای شمار زیادی از محققین شیمی ترکیبات طبیعی در سرتاسر جهان مفید واقع شود.

آزمونهای زیستی بر اساس شکلی از حیات که مورد استفاده می‌باشد به گروههای مختلف تقسیم می‌شود. این اشکال عبارتند از:

۱- جانوران کامل

۲- اندامهای جدا شده از مهره داران

۳- موجودات زنده پست تر مانند قارچها، باکتریها، حشرات، نرم تنان، گیاهان پست تر و غیره

۴- سلولهای کشت شده (مانند سلولهای سرطانی) و بافتهای انسانی یا حیوانی

۵- سامانه‌های تحت سلولی جدا شده مانند آنزیمها، گیرنده‌ها و غیره

1- bench-top

منظور از جداسازی هدفمند، جدا کردن مواد فعال بیولوژیک می‌باشد که قادر به درمان یا بهبود یک بیماری در انسان یا حیوان می‌شوند و سرانجام گسترش یافته و به صورت مستقیم به عنوان دارو و یا ساختمانهای الگو برای ساخت سایر داروها به کار می‌روند. فرآیند کشف دارو طولانی، خسته کننده و پرهزینه بوده، نیازمند همکاری چند جانبه بین گیاهشناسان، فارماکوگنوزیست ها، شیمی دانها، فارماکولوژیست ها، سم شناسان و متخصصان بالینی می‌باشد. سنجشهای ساده و سریع بیولوژیک می‌توانند به عنوان نقطه شروع این تلاشهای چند جانبه برای کشف دارو باشند. هدف از این سنجشهای بیولوژیک، غربالگری سریع فعالیتهای بیولوژیک مورد نظر می‌باشد که سپس با مطالعات دقیق تر مکانیسم اثر پیگیری شوند.

بنابراین ما احساس کردیم نیاز زیادی به کتابی مشتمل برگزیده‌ای از آزمونهای زیستی «روی میزی» می‌باشد. این آزمونها با برنامه‌های تحقیقاتی محققین شیمی ترکیبات طبیعی ادغام شده تا تلاشهای آنها سمت و سوی کشف دارو بیابد. تعداد کمی آزمونهای زیستی اختصاصی هم در قسمت آخر کتاب آمده است (به عنوان مثال غربالگری ضد سرطان بر رده‌های مختلف سلولهای سرطانی انسان) که برای آن دسته از آزمایشگاههایی می‌باشد که بودجه‌ها و مهارتهای لازم را برای اجرای این روشهای بالنسبه پرطرفدار دارند. قسمت دوم کتاب شامل تعدادی از آزمونهای آنزیمی، سنجشهای عملکرد سلولی و آزمونهای پیوند رادیولیگاندها و گیرنده‌ها همراه با توضیح مفصل آنها می‌باشد. این بخش عمداً مفصل تر بیان شده همانطور که پایه فن آوری سریع توسعه بوده و ما تصور می‌کنیم که موضوعات آن مورد توجه و علاقه خوانندگان قرار می‌گیرد. به هر حال، تأکید اصلی کتاب بر ارائه آزمونهای زیستی می‌باشد که در هر آزمایشگاه شیمی گیاهی با حداقل بودجه و امکانات یا دانش فنی لازم قابل راه اندازی باشند. اکثر این روشها به صورت گام به گام بیان شده به طوری‌که تا حد امکان ساده بوده و در آزمایشگاههای شیمی توسط کارشناسان آزمایشگاه با حداقل اطلاعات در مورد میکروب شناسی، بیوشیمی یا فارماکولوژی قابل اجرا باشند.

ما (پروفسور عطاءالرحمن و م. اقبال چوداری) از کمکهای آقایان محمود علم، م. آصف و س. توصیف هـ. ناکوی تشکر می‌کنیم. ما همچنین از خانمها زرین امتول و زبا پروین، دکتر محسن رضا، آقایان عثمان قانی، اسد خالد و عاطف زیدی لین (UCSD) که با ما در تألیف تعدادی از آزمونها همکاری کردند و خانم شازیا انجم و آقای م. یوسف، که در ویرایش نوشتار به ما کمک دادند قدردانی می‌کنیم. آقای م. اقبال چوداری از کمکهای مالی و فنی پروفسور جان کلاردی (دانشگاه کورنل، نیویورک) در طول اقامتش در سال ۱۹۹۲ در ایتاکای نیویورک که قسمت عمده‌ای از منابع را برای کتاب جمع آوری کردند تشکر می‌نماید.

مقدمه کلی

عصاره‌های طبیعی منابع با ارزشی از مولکولهای گوناگون برای بسیاری از برنامه‌های تحقیقاتی کشف دارو هستند و داروهای متعدد مهمی از ترکیبات طبیعی به دست آمده اند. در هر پروژه جداسازی ترکیبات طبیعی که قرار است به عنوان دارو یا ترکیب الگو برای ساخت دارو باشند، ضرورتاً برخی انواع غربالگری یا ارزیابی بیولوژیکی و فارماکولوژیکی به منظور هدایت به سمت ماده مؤثره خالص به کار می‌روند.

ارزیابی فارماکولوژیک عصاره‌های طبیعی و ترکیبات خالص به عنوان یک جنبه ضروری از فرآیند کشف دارو و پیشرفتها در زمینه روشهای برون تنی، اساساً این جنبه از شیمی ترکیبات طبیعی را متحول کرده است. در حالیکه قبلاً برای سنجش یک نمونه برای چند آزمون هفته‌ها و حتی ماهها وقت صرف می‌شد، امروزه در عرض چند ساعت انجام می‌گیرد.

در اینجا باید بین غربالگریهای اولیه و ثانویه در آزمونهای بیولوژیک تفاوتی قایل شد. آزمونهای غربالگری اولیه می‌توانند به سرعت بر روی تعداد زیادی از نمونه‌ها انجام گرفته تا معین کنند فعالیت مورد نظر وجود دارد یا خیر. از این رو باید با ظرفیت بالا و کم هزینه بوده و نتایج آن سریع مشخص شوند. این روشها معمولاً کمی نیستند. آزمونهای ثانویه شامل سنجش ترکیبات الگوی دارویی با جزئیات بیشتر بر روی یک سری از سامانه‌های الگو می‌باشند تا ترکیبات برگزیده برای کارهای بالینی مشخص گردد. این آزمونها ظرفیت کمتری داشته، آهسته و پرهزینه می‌باشند.

نیازهای عمده یک سنجش اولیه بیولوژیک باید به صورت زیر باشند:

۱- نتایج آزمون باید یا به صورت مستقیم یا با همخوانی با داروهای مؤثر بالینی که در همان فرآیند استفاده می‌شوند، نوع اثر درمانی را تخمین بزنند.

۲- فعالیت فارماکولوژیک مفید بالقوه نباید نامعلوم باشد حتی اگر فعالیت غیرقابل انتظار یا منحصر به فردی باشد.

۳- ماهیت احتمالی اثر باید ثابت شود تا تحقیق بعدی با آگاهی طراحی گردد.

۴- آزمونهای اولیه غربالگری باید نسبت به مقادیر زیاد ناخالصی موجود در عصاره خام حساس نباشند و به غلظتهای کم ترکیبات بالقوه مؤثر موجود حساسیت کافی داشته باشند (باید غلظتهای ۰/۰۰۰۱ درصد از ماده مؤثره در یک عصاره، بر اساس وزن خشک موجود زنده عصاره گیری شده را شناسایی کنند).

۵- فرآیند آزمون بیولوژیک باید غیرجانبدارانه بوده و تمام نمونه‌ها اعم از مواد استاندارد شناخته شده و نمونه‌های مجهول مورد آزمایش، کدگذاری شود.

۶- نتایج به دست آمده باید قابل تکرار باشد.

۷- روش غربالگری باید مورد استفاده هم برای مواد خام و هم ترکیبات خالص شده باشد تا بدین ترتیب در کارهای عصاره گیری، جداسازی و خالص سازی محققین ترکیبات طبیعی، به طور مستقیم به کار رود.

۸- انجام کامل یک غربالگری بیولوژیک نباید نیازمند بیش از ۱ تا ۲ گرم عصاره خشک گیاهی یا حیوانی باشد.

۹- آزمونهای غربالگری اولیه باید سریع انجام شوند، حتی اگر با نتایج سریع و سهل الوصولی که می‌دهند محتوای اطلاعاتی کمی داشته باشند.

۱۰- فرآیند نباید نیازمند وسیلهٔ گران یا آزمایشگاه مجهزی باشد تا غربالگریهای اولیه به موازات فرآیندهای جداسازی اداره شوند.

۱۱- فرآیند باید با مصرف دی متیل سولفوکساید (DMSO) سازگار باشد، زیرا DMSO معمولاً برای انحلال عصاره‌ها یا ترکیبات قطبی خالص به کار می‌رود.

۱۲- فرآیند باید به اندازه کافی ساده باشد تا به سادگی به کارشناسان آزمایشگاه آموزش داده شود تا محققین مجرب و با صلاحیت نیازمند اجرای معمول برنامه آزمون بیولوژیک نباشند.

۱۳- حیوانات مورد آزمایش (در صورتیکه برای سنجش بیولوژیک مورد نیاز هستند) باید به آسانی قابل تهیه، کار کردن و تکثیر باشند و نسبت به عفونتها مقاوم باشند.

۱۴- در نهایت آزمون بیولوژیک باید مقرون به صرفه باشد تا در طول یک دوره بلند مدت قابل اجرا باشد.

معمولاً یک درصد یا کمتر از نمونه‌های آزمایش شده توجیه منطقی برای ورود از آزمونهای غربالگری اولیه به ثانویه دارند تا فعالیت بیولوژیکی انتخابی آنها تشریح گردد.

آزمونهای هدفمند ترکیبات طبیعی برای کشف دارو عمدتاً به چهار مسیر کلی تقسیم می‌شوند:

۱- استفاده از یک آزمون بیولوژیک برای جستجوی نوع خاصی از فعالیت فارماکولوژیک (مثلاً ضد دیابت، کاردیوتونیک یا ضد التهاب).

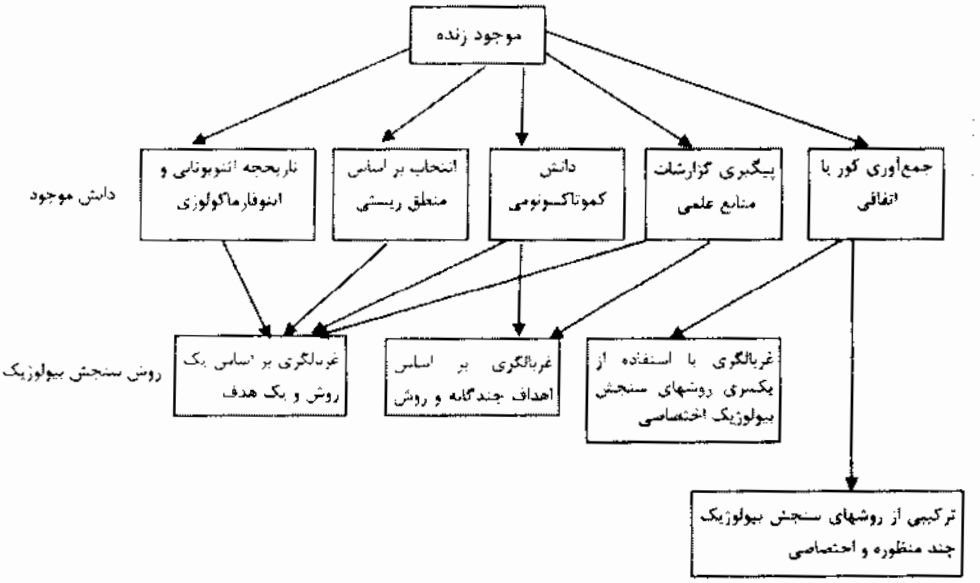
۲- استفاده از یک مجموعه آزمونهای اختصاصی بیولوژیک که منجر به‌یافتن نوع متفاوتی از اثرات می‌شود.

۳- استفاده از یک آزمون بیولوژیک که منجر به یافتن فعالیتهای چندگانه می‌شود (آزمونهای بیولوژیک غیر اختصاصی). به عنوان مثال آزمونهای سمیت سلولی برای برآورد طیف متغیری از فعالیتهای بیولوژیک مانند ضد تومور، حشره کش و ضد میکروب استفاده می‌شوند.

مثال دیگر مطالعه علایم القا شده بعد از تزریق یک دوز داخل صفاقی عصاره به یک رت سالم بیهوش شده می‌باشد (این علایم شامل دپرسیون CNS، آرامبخشی، شل کنندگی عضلانی، تحریک سمپاتیک، مدر، سمیت متابولیک، گشاد کنندگی عروق، تحریک کنندگی روانی و غیره می‌باشند).

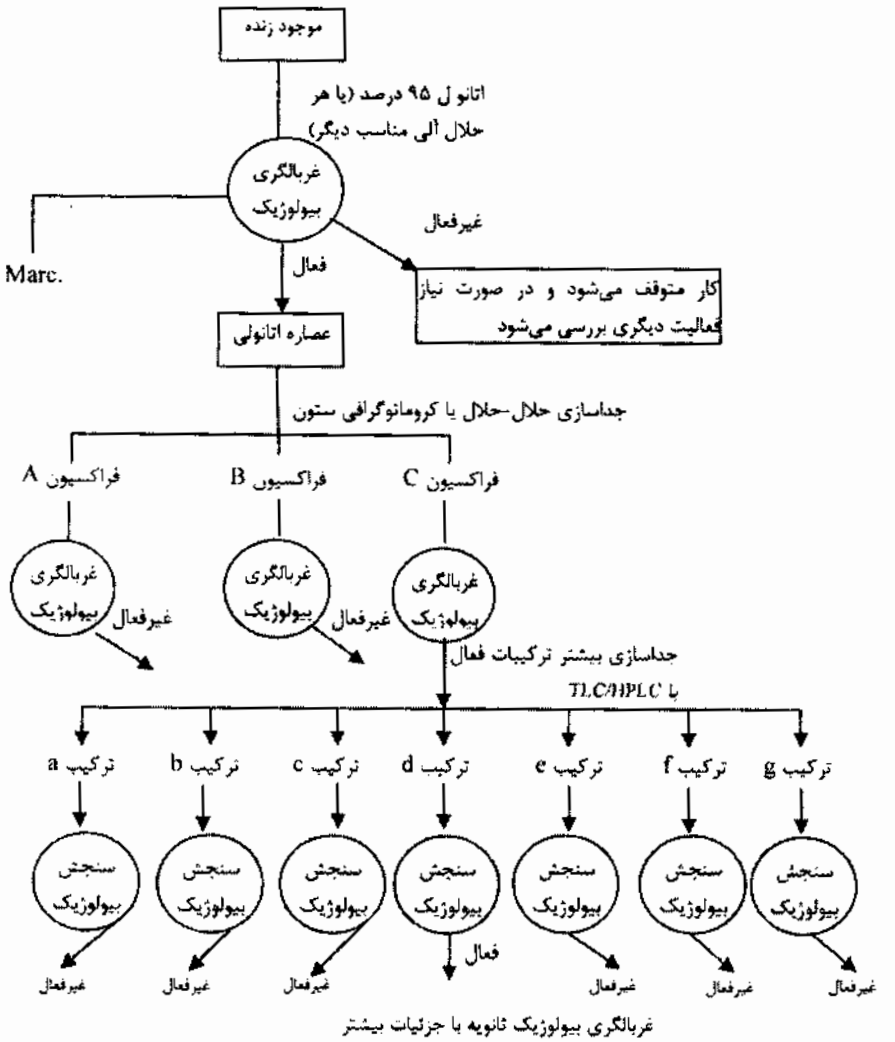
۴- استفاده از ترکیب آزمونهای مختلف بیولوژیک برای شناسایی اثرات اختصاصی و چندگانه.

انتخاب مسیر غربالگری معمولاً با توجه به نوع بیماری و یا اطلاعات قبلی در مورد ارگانیسم (گیاه، حیوانات دریایی و غیره) مورد مطالعه اتخاذ می‌شود. مثلاً گیاهی که سابقاً برای یک بیماری خاص مصرف می‌شده، پس باید به طور منطقی برای آن یک روش اختصاصی (غربالگری با هدف واحد) به کار برد تا بتوان اثر مشهور درمانی آن را پیش بینی کرده و ترکیبات مسئول این اثر را کشف کرد. به همین ترتیب، بر پایه اطلاعات کموتاکسونومی گونه‌های مرتبط، می‌توان یک آزمون بیولوژیک یا بیشتر را بر اساس اثرات گزارش شده یا مشهور گونه‌های مرتبط انتخاب کرد. انتخاب زیست منطق بر اساس دانش گیاهان، جانوران یا رفتارهای آنها در شرایط خاص می‌باشد. به عنوان مثال بعضی از میمون سانان ممکن است انواع خاصی از علفها را در موقع سوء هاضمه بخورند. از این رو دانش داروشناسی جانوری می‌تواند در انتخاب آزمونهای زیستی اختصاصی کمک کند. به همین طریق گیاهان در موارد زیادی در حمله حشرات مقاومت نشان می‌دهند. این چنین گیاهانی را می‌توان از نظر ترکیبات حشره کش با استفاده از روشهای سنجش توان حشره‌کشی غربالگری کرد.



شکل ۱: مسیرهای کشف دارو از طریق آزمونهای هدفمند بیولوژیک ترکیبات طبیعی

در مورد جمع آوری اتفاقی یک موجود زنده معمولی، غیرمعمولی یا بررسی نشده بهتر است مجموعه‌ای از غربالگریهای بیولوژیک در سطح عصاره انجام گرفته و سپس آزمونهای تخصصی تر برای غالبترین اثر متعاقباً اجرا شود (شکل ۱). یک نمای نمونه از مسیر جداسازی هدفمند مواد مؤثره از منابع طبیعی (گیاهان، ریز سامانه‌ها ، جانوران دریایی و غیره) در شکل ۲ نمایش داده شده است.



شکل ۲: جداسازی هدفمند مواد مؤثره طبیعی