دانشگاه پیام نور

دانشکده علوم

مرکز تهران

گروه بیولوژی

عنوان پایان نامه

بررسی فعالیت آنزیم آدنوزین دآمیناز وایزوآنزیمهایش در افرادمبتلا به لوسمی حاد

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته بیوشیمی

مولف

شهره جلیل فر

استاد راهنما

دکتر رضا صغیری

استاد راهنمای همکار

دکتر شهلا انصاری

استاد مشاور

دکتر رضا حاجی حسینی

ماه و سال انتشار

۱۳۸۷/۸

تقدیم به

پدر ومادر عزیزم به پاس فداکاریهایشان

همسر مهربانم به پاس حمایتها وتشویقهایش

ودوقلوهاي عزیزم به خاطرآنکه دوستشان دارم.

با کمال تشکر از

■ جناب آقای دکتر صغیری
■ سرکار خانم دکتر انصاری
■ جناب آقای دکترحاجی حسینی
■ جناب آقای دکترلامع راد
■ جناب آقای دکترناظم
■ سرکار خانم دکترابراهیمی راد
■ سرکار خانم دکتراحمدی
■ سرکارخانم قاضی زاده
■ انسیتوپاستورایران،بخش بیوشیمی
■ انسیتوپاستورایران،بانک سلولی ایران
■ بیمارستان کودکان علی اصغروابسته به خدمات بهداشتي درماني دانشگاه علوم پزشکی ایران

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: کلیات

۱-۱ تاریخچه آنزیمها ۱

۱-۱-۱ کوآنزیمها ۱

۱-۱-۲ ایزوآنزیمها ۲

۱-۱-۳ طبقه‌بندی و نامگذاری آنزیم‌ها ۲

۱-۱-۴ کاربردآنزیمها ۳

۱-۱-۵ ویژگی واختصاصی بودن عمل آنزیم‌ها ۴

۱-۱-۶ جایگاه فعال آنزیم ۴

۱-۱-۷ کنتیک واکنش‌های آنزیمی ۵

۱-۲-۱ آدنوزین دِآمیناز ۸

۱-۲-۲ مکانیسم کاتابولیسم پورینها ۹

۱-۲-۳ ساختمان آنزیم آدنوزین دِآمیناز ۱۰

۱-۲-۴ بیان ADA در موجودات ۱۱

۱-۲-۵ نقش فیزیولوژیک ADA ۱۱

۱-۲-۶ عملکردآدنوزین ۱۱

۱-۲-۷ ایزوآنزیم‌های ADA ۱۳

۱-۲-۸ پایداری آنزیم ۱۴

۱-۲-۹ کاربرد تشخیصی ADA دربیماریهای مختلف ۱۵

۱-۲-۱۰ نقش مهارکننده‌های ADA ۱۵

۱-۲-۱۰-۱ مهار کننده‌های ADA و ایزوآنزیم‌های آن ۱۶

۱-۳-۱خونسازی ۱۸

۱-۳-۲ بافت‌های خونساز ۱۹

۱-۳-۳ نظریه سلول بنیای در خونسازی ۱۹

۱-۳-۴ مسیر تمایزی خونسازی ۲۰

۱-۳-۵ سلول بنیادی چند ظرفیتی ۲۰

۱-۳-۷ رده‌های گرانولوسیت و منوسیت ۲۱

۱-۳-۸ سایر رده‌ها ۲۱

۱-۳-۹-۱ لنفوسیت ها ۲۴

۱-۳-۹-۲ لنفوسیتهای B ۲۴

۱-۳-۹-۳ انواع لنفوسیت T ۲۴

۱-۳-۹-۴ منوسیت‌ها ۲۶

۱-۳-۹-۵ ماکروفاژها ۲۶

۱-۴ لوسمی ۲۸

۱-۴-۱ تاریخچه لوسمی ۲۸

۱-۴-۲ لوسمی حاد ۲۸

۱-۴-۲-۱ طبقه‌بندی فرانسوی- آمریکایی- بریتانیایی ۲۹

۱-۴-۲-۲ لوسمی لنفوبلاستیک حاد ۳۱

۱-۴-۲-۲-۱پاتوژنز ۳۱

۱-۴-۲-۲-۲ تظاهرات بالینی ۳۱

۱-۴-۲-۲-۳ تشخیص ALL ۳۱

۱-۴-۲-۲-۴عوامل خطرساز ۳۲

۱-۴-۲-۲-۵ درمان ۳۳

۱-۴-۲-۳ لوسمی حاد میلوئیدی ۳۴

۱-۴-۲-۳-۱ تشخیص ۳۴

۱-۴-۲-۳-۲علائم بالینی ۳۵

۱-۴-۲-۳-۳ یافته‌های هماتولوژیک ۳۵
۱-۴-۲-۳-۴درمان ۳۶
۱-۴-۲-۴ لوسمی میلوژن مزمن ۳۷
۱-۴-۳ اثرات لوکمی بر بدن ۳۷
۱-۵ الکتروفورز ۳۸
۱-۵-۱ ژل آگارز الکتروفورز ۳۸
۱-۵-۲الکتروفورز با روش SDS-PAGE ۳۹
۱-۵-۲-۱ اثر ژل پلی آکریلامید ۴۰
۱-۵-۲-۲ SDS-PAGE در شرایط احیایی یا غیر احیایی ۴۱
۱-۶ موضوع وسابقه تحقیقات انجام شده ۴۱
۱-۷ اهداف و ضرورت تحقیق ۴۳

فصل دوم: مواد و روشها

۲-۱ MATERIAL ۴۵
۲-۱-۱ کیت آدنوزین دآمینازبه روش دستگاهی ۴۵
۲-۱-۲ محلول‌های موردنیازدرکیت Biuret ۴۵
۲-۱-۳ موادموردنیازدرSDS-PAGE ۴۵
۲-۱-۴ استانداردمارکرها ۴۶
۲-۱-۵ موادموردنیازرنگ آمیزی کوماسی بلوR_{250} ۴۶
۲-۱-۲موادموردنیازبرای رنگ بری ۴۶
۲-۱-۷ مواد مورد نیازدرالکتروفورزآگارز ۴۶
۲-۱-۸ مواد مورد نیازدر رنگ آمیزی اختصاصی ADA ۴۶
۲-۱-۹ سایرمواد ۴۷
۲-۲ وسایل ودستگاههای مورد نیاز ۴۷

۲-۳ *Methods* ۴۸

۲-۳-۱ نمونه‌گیری ۴۹

۲-۳-۲ سنجش آنزیمی ***total ADA*** ۴۹

۲-۳-۲-۱ معرف‌ها ۴۹

۲-۳-۲-۲ تهیه محلول آماده به کار ۴۹

۲-۳-۳ روش اندازه‌گیری ADA_2 ۴۹

۲-۳-۴ روش اندازه‌گیری ADA_1 ۴۹

۲-۳-۵ سنجش پروتئین توتال به روش **Biuret** ۵۱

۲-۳-۵- ۱ اساس آزمایش ۵۱

۲-۳-۵-۲ روش آماده‌سازی محلول‌ها ۵۱

۲-۳-۵-۳ حد سنجش ۵۱

۲-۳-۵-۴ حد طبیعی ۵۱

۲-۳-۵-۵ پایداری توتال پروتئین در سرم یا پلاسما ۵۲

۲-۳-۵-۶ روش اندازه‌گیری ۵۲

۲-۳-۵-۷ روش محاسبه ۵۲

۲-۳-۴ محلول‌های مورد نیاز برای تهیه ژل پلی آکریلامید ۵۳

۲-۳-۴-۲ روش آزمایش ۵۴

۲-۳-۴-۳ آماده سازی نمونه **RBC** برای تعیین وزن مولکولی ADA_1 ۵۶

۲-۳-۴-۴آماده سازی نمونه سرم برای تعئین وزن مولکولی ADA_2 ۵۶

۲-۳-۴-۵ تعیین وزن مولکولی ADA_{1+CP} درسرم ۵۷

۲-۳-۵ رنگ آمیزی ژل **Staining** ۵۸

۲-۳-۶ رنگبری ژل **Destaining** ۵۸

۲-۳-۷محلول ثابت کننده ۵۸

۲-۳-۸ ژل الکتروفورز پلی آکریلامید با شیب غلظت ۵۸

۲-۳-۹ تهیه ژل آگاروز ۵۹

۲-۳- ۱۰رنگ آمیزی اختصاصی ADA ۵۹

۲-۳-۱۰-۱ طرز تهیه بافر تری سیترات 1X ۵۹

۲-۳-۱۱ تهیه عصاره سلولی لنفوسیت ومنوسیت ۶۰

فصل سوم: نتایج

۳-۱ آمار توصیفی نتایج مربوط به سنجش آنزیمی ۶۲

۳-۲ آمار استنباطی ۶۷

۳- ۳ رابطه بین سن وADA ۷۳

۳-۴ نتایج مربوط به تشخیص ایزوآنزیمهایADA ۷۴

فصل چهارم: بحث

۴-۱ مروری بر گذشته ۸۰

۴-۲ سابقه تحقیقات انجام شده در ارتباط با ALLوADA ۸۱

۴ـ۳ سنجش آنزیمی tADA ۸۲

۴-۴ سنجش میزان ADA_1 ۸۳

۴ـ۵ سنجش آنزیمی ADA_2 ۸۳

۴-۶ بحث بر روی تشخیص ایزوآنزیمهای ADA ۸۴

پیشنهادات ۸۶

فصل پنجم: منابع ۸۷

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول۱-۱ کنتیک آنزیم آدنوزین دآمیناز ۱۴

جدول ۱-۲ میزان ADA وایزوآنزیم‌های آن دربافت وعصاره سلولی ۱۴

جدول ۱-۳ مقادیر طبیعی سلول‌های خون محیطی ۱۸

جدول ۱-۴ سیتوکین‌ها و فعالیت‌های آنها ۲۲

جدول۱-۵ مشخصات سلولهای خونی ۲۷

جدول۱-۶ نظام طبقه‌بندی ALL توسط FAB ۳۰

جدول ۱-۷ رهنمودهای آزمایشگاهی برای افتراق لوسمی میلوپلاستی حاد (AML) ۳۶

و لوسمی لنفوبلاستی حاد (ALL)

جدول۲-۱ اندازه گیری توتال پروتئین به روش بیورت ۵۲

جدول ۲-۲ مقادیر لازم برای سنتز ژل٪Stack5 درSDS-PAGE ۵۵

جدول ۲-۳ مقادیر لازم برای سنتز ژل Resolve با درصدهاي مختلف درSDS-PAGE ۵۵

جدول شماره ۳-۱ نتایج آمار توصیفی فعالیت ADA در چهار گروه آزمایشی ۶۲

جدول شماره ۳-۲ نتایج آمار توصیفی فعالیتADA1 در چهار گروه آزمایشی ۶۳

جدول شماره ۳-۳ نتایج آمار توصیفی فعالیت ADA2 بر اساس چهار گروه آزمایشی ۶۴

جدول شماره ۳-۴ نتایج آمار توصیفی فعالیت total-ADA درچهار گروه آزمایشی ۶۵

جدول ۳-۵ نتایج آمار تحلیل واریانس یک طرفه جهت بررسی تفاوت ۶۷

فعالیتADA1 چهار گروه آزمایشی

جدول شماره۳-۶ نتایج آمارتعقیبی شفه جهت بررسی دو به دوی گروههای آزمایشی ۶۸

جدول ۳-۷ نتایج آمار تحلیل واریانس یک طرفه جهت بررسی تفاوت ۶۹

فعالیت ADA2 چهار گروه آزمایشی

جدول ۳-۸ نتایج آمار تعقیبی شفه جهت بررسی دو به دوی گروهها ۷۰

جدول ۳-۹ نتایج آمار تحلیل واریانس یک طرفه جهت بررسی تفاوت فعالیت ADA-total چهار گروه آزمایشی ۷۰

جدول ۳- ۱۰نتایج آمار تعقیبی شفه جهت بررسی دو به دوی گروهها ۷۱

جدول ۳-۱۱ نتایج آمار ضریب همبستگی پیرسون جهت بررسی رابطه بین میزان فعالیت ADA1 و ADA2 در چهار گروه آزمایشی ۷۲

جدول شماره ۳-۱۲ نتایج آمار ضریب همبستگی پیرسون جهت بررسی رابطه بین میزان فعالیت ADA1 و ADA2 وtADA با سن در چهار گروه آزمایشی ۷۳

فهرست اشکال

عنوان	صفحه
شکل ۱-۱ نمای شماتیک آنزیم آدنوزین دآمیناز	۸
شکل۱-۲ کاتابولیسم پورینها	۹
شکل۱-۳ تنظیم غلظت آدنوزین داخل وخارج سلول	۱۲
شکل ۱-۴ نمای تکامل سلول‌های مغز استخوان	۲۳
شکل ۲-۱ نمائی ازالکتروفورز ژل آگارز	۶۰
شکل ۳-۱ تعیین وزن مولکولی ADA_1 برروی ژل ۱۰٪ SDS-PAGE	۷۴
شکل ۳-۲ مقایسه سرم وبافرنمونه جوشیده وسرم وبافر نمونه فاقد SDS ومرکاپتواتانل نجوشیده با اریتروسیتها جهت تشخیص ADA_1 در سرم	۷۵
شکل۳-۳ تعیین وزن مولکولی ADA2 درسرم برروی ژل ۸٪ SDS-PAGE	۷۶
شکل۳-۴ تعیین وزن مولکولی ADA_{1+CP} درسرم برروی ژل ۶٪ SDS -PAGE	۷۷
شکل ۳-۵ نمایش ایزوآنزیمهای ADA برروی ژل آگارز	۷۸
شکل ۳-۶ نمای شماتیک حرکت ایزوآنزیمهای ADA برروی ژل آگارز	۷۹
شکل ۳-۷ نمایش ایزوآنزیمهای ADA در سل لاینها وسرم واریتروسیت برروی ژل آگارز	۷۹
شکل ۳-۸ نمای شماتیک الگوی ایزوآنزیمهای ADA در اریتروسیت، لنفوسیت، منوسیت سرم ALL و سرم کنترل سالم برروی ژل آگارز	۷۹

فهرست نمودارها

عنوان	صفحه
نمودار۳-۱ مقایسه میانگین فعالیت ADA در چهار گروه آزمایشی	۶۲
نمودار۳-۲ مقایسه میانگین فعالیتADA1 در چهار گروه آزمایشی	۶۳
نمودار۳-۳ مقایسه میانگین فعالیت ADA2 در چهار گروه آزمایشی	۶۴
نمودار۳-۴ مقایسه فعالیت ADA-total در چهارگروه آزمایشی	۶۵
نمودار چند ضلعی۳-۵ مقایسه میانگین فعالیتADA1 و ADA2 در چهار گروه آزمایشی	۶۶
نمودار۳-۶ مقایسه میانگین فعالیت ADA1 و ADA2چهار گروه آزمایشی	۶۶
نمودار۳-۷ مقایسه تغییر فعالیت ADA وایزوآنزیمهایش قبل وپس از درمان	۶۷

چکیده

آدنوزین دآمیناز (ADA) با مشخصه(EC ۳.۵.۴.۴) یک آنزیم آمینوهیدرولازی می باشد که آدنوزین و داکسی آدنوزین را به اینوزین و داکسی اینوزین و آمونیاک تجزیه می کند به عبارت دیگر آدنوزین دآمیناز در متابولیسم پورینها نقش دارد. بالاترین میزان فعالیت آدنوزین دآمیناز در منوسیتها و لنفوسیتها می باشد. این آنزیم دارای سه ایزوآنزیم $ADA_{۱}$ و $ADA_{۲}$وADA_{1+CP} می باشد $ADA_{۱}$ در تمام بافتها بخصوص در لنفوسیتها یافت می شودوقتی از بافت وارد سرم شد بدلیل میل ترکیبی زیاد به پروتئینی بنام CP به آن متصل می شود.$ADA_{۲}$ تنها در منوسیت – ماکروفاژ یافت می شود . در این آزمایش بوسیله الکتروفورز SDS-PAGE و آگارز ورنگ آمیزی اختصاصی ADA، ایزوآنزیمها را در سرم، گلبول قرمز، لنفوسیت ومنوسیت مشخص کردیم. از اریترو 9-(2-هیدروکسی 3-نانیل)آدنوزین (EHNA) به عنوان مهار کننده اختصاصی $ADA_{۱}$ استفاده کردیم و غلظت سرمی ADA توتال و ایزوآنزیمهایش را به روش دستگاهی با اتوآنالیزر RA-1000 در سه گروه در ۵۴ بیمار مبتلا به لوسمی لنفو بلاستی حاد و ۳۰ فرد کنترل سالم در حدود سنی(۱۵-۱ سال) اندازه گیری کردیم. میزان متوسط فعالیت ADA توتال در۱۸ نفراز بیمارانی که دارو مصرف نکرده اند ودر شروع بیماری هستندو22نفر از آنهایی که بیماری آنها عود کرده است ونیز در14نفر از بیمارانی که بهبودی نسبی یا کامل یافته اند ونیز در30 فرد کنترل سالم بترتیب بر حسبIU/L 32/68±11/2 ،34/5±12/70 ، 14/50±1/82 ،15/40±2/74و میزان فعالیت ADA_1 بترتیب 21/95±9/3، 23/16±8/94، 5/07±1/20، 5/83±1/71 ومیزان فعالیت ADA_2بترتیب 11/45±4/23، 11/33±6/85 ،9/71±2/12 ، 9/56±1/94 بود.

از این بررسی متوجه شدیم که در مقایسه با افراد سالم ADAتوتال و $ADA_{۱}$ در افرادی که تازه به لوسمی حاد لنفوسیتی مبتلا شده اند و دارویی مصرف نکرده اند و افراد که بیماری آنها عود کرده است از نظر آماری افزایش معنی داری پیدا کرده است ($P<0.001$) و در افرادی که بهبودی نسبی یا کامل یافته اند به حد زیر نرمال رسیده است. ما نتیجه می گیریم از آنجا که در این بیماری افزایش تعداد لنفوسیتهای نارس صورت می گیرد و $ADA_{۱}$ بیشتر منشاء لنفوسیتی دارد در نتیجه افزایش $ADA_{۱}$ مسئول افزایش ADA توتال می باشد. میزان ADA توتال و $ADA_{۱}$ می تواند به عنوان شاخصی مفید برای ارزیابی کلینیکی میزان فعالیت بیماری و توده کلی سلولهای لوسمی در مغز استخوان بکار رود و به عبارت دیگر آنزیم ADA به عنوان یک تومور مارکر به حساب می آید.

علائم اختصاری

ADA= Adenosine Deaminase

AK= Adenosine kinase

ALL=Acute Lymphoblastic Leukemia

AML= Acute Myeloid Leukemia

APS=Amonium per sulfate

Ara-A=9-B-DArabino furanosyladenine

Asp=Aspartic Acid

BFu=Basophil

CP=Complex Protein

Megakaryocyte،Monocyte،Erythroeid،CFU-GEMM= Colony forming unit-Granulocyte

CFU-E=Colony forming unit-Erythroeid

CFU-M= Colony forming unit-Monocyte

CFU-G= Colony forming unit-Granulocyte

CLL=Chronic Lymphoblastic Leukemia

CML= Chronic Myeloid Leukemia

dcF=2- deoxy coformycin

DTT=Dithio Tritol

EHNA=Erythro-1-(9-Hydroxy-3-nanyl) Adenin

EDTA =Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid

Eo=Eosinophil

EPO =Thrombopoietin

G-CSF= Granulocyte -Colony factor unite

GDH=Glutamate dehydrogenase

Gly=Glycine

His=Histidine

Inhibition constant $=K_i$

K_m = Michaelis constant

K_s =Dissociation constant

K_{cat} =Turnover number

αKG=α-KetoGlutarate

IL=Inter Leukine

M- CSF=Monocyte-Colony factor unite

2-ME=2- Mercapto Ethanol

MTT=3-(4,5-Dimethyl -2 thiazolyl 2,5-diphenyl-2H-tetrazolium) bromide

$NADP^{+}$=Nicotinamide Adenin Dinucleotid Phosphate

NK= Natural Killer

NP=Nucleoside Phosphorylas

PBS=Phosphate Buffer Saline

PCR=Polymerase Chain Reaction

PMS= Phenazine MethoSulfate

RBC=Red Blood Cell

S=Substrate

SCID=Sever Combined Immuno Deficiency

SDS= Sodium Dodecyl Sulfat

SDS-PAGE=Sodium Dodecyl Sulfat-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis

TCR=T Cell Receptor

Tetra ethyl methyl diamine′,N′TEMED=N,N,N

TC=Tri Citrate

V_{max}=Maximum velocity

Publications

-Iran, Urimia, 8-9 October, 2008, Hematology and Oncology congress.

-Iran,Tehran, 22-24 October, 2008,Pathobiology and Hematology congress

Abstract

Adenosine Deaminase (ADA; EC 3,5,4,4) is an amino hydrolase enzyme that deaminates adenosine or deoxyadenosine to inosine or deoxyinosine and ammonia. The highest ADA activity was found in lymphocytes and monocytes. In serum, ADA is known to be divided into three isoenzymes, ADA-1 and ADA-2 and ADA_{1+CP}, which have different molecular weights and kinetic properties. ADA-1 (~ 35kDa) is a ubiquitous enzyme, which is especially found in lymphocytes.Wherease, ADA-2 (~110 kDa) is restricted to monocytes-macrophages.ADA_{1+cp} (~280 kDa) is composed of two ADA-1 molecules connected via a combing protein (cp; binding protein).We diagnosed its isoenzymes by using SDS-PAGE and Agarose electrophoresis method in serum, RBC, Lymphocyte an monocyte. In this study, the total ADA and its isoenzymes activities were assayed by using erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine (EHNA) that inhibites ADA-1.The evaluation was carried out using automatic analyzer (RA-1000). 54 patients with Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) , were included in the study of which 18 cases were (untreated), 22 with relapses and 14 with remission (1-15 years old),30 healthy control subjects were also evaluated in this study. The mean± SD values of total ADA in new cases, relapses, remissions and control subjects were found tobe 32.68± 11.02 IU/L, 34.50± 12.71 IU/L, 14.50 ± 1.82 IU/L, 15.40±2.74 IU/L, respectively.The mean ± SD ADA-1 activities were measured as, 21.95± 9.31 IU/L, 23.16± 8.94 IU/L , 5.07± 1.20 IU/L, 5.83± 1.78 IU/L, respectively.The mean ± SD values of ADA2 were 11.45± 4.23 IU/L, 11.33± 6.85 IU/L, 9.71± 2.12 IU/L, 9.56± 1.94 IU/L, respectively. Serum total ADA , ADA-1 activities in the ALL patients with new cases and relapses were significantly higher than those of healthy control individuals ($p<0.001$).However, the values were decreased to subnormal levels, during remission phase.It could be concluded that the increased ADA-1 might be lymphoblastic origin.Sera of the ALL patients showed that the elevated amount of serum ADA was due to increased level of ADA1.The finding shows the correlation of values with immune system.We concluded that serum total ADA and ADA-1 activity might serve as a useful indicator for evaluating the disease activity in patients with ALL.Therefore, serial determination of serum ADA activities, might provide a tool for assuming the total mass of leukemia cells in bone marrow.

Payame Noor University

School of Science
Tehran Center

Department Biology

Title

The Analysis of Serum Adenosine Deaminase and its Isoenzymes Activities in Patients with Acute Leukemia

Submitted in Partial Fulfillment
of the Requirements for the Degree of
M.S. (M.A.) in Biochemistry

By

Shohreh Jalilfar

Supervisors

Dr. Reza Saghiri
Dr. Shahla Ansar
Dr. Reza Hajihosseini

Month ,Year

2008/10

ق

ر