٢٥٤٧٩

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم پزشکی

# پایان نامه کارشناسی ارشد
# بیوشیمی (پزشکی)

**عنوان**

## نقش حفاظتی کاتالاز و گلوتاتیون در مقابل پراکسیداسیون چربیها در اریتروسیتهای بیماران مبتلا به آنمی فقر آهن و بتاتالاسمی ماژور

*نگارش:*

**سعید غفرانی**

*استاد راهنما:*

**جناب آقای دکتر عبدالامیر علامه**

*استاد مشاور:*

**جناب آقای دکتر محمود جلالی**

*بهار ۷۷*

۲۵۴۷۹

2553/2

"نمونه فرم تایید به اعضای هیأت داوران مندرج در پایان نامه کارشناسی ارشد"

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم/آقا سعید غفرانی تحت عنوان

نقش حفاظتی کاتالاز و گلوتاتیون در مقابل پراکسیداسیون چربیها در اریتروسیتهای بیماران مبتلا به آنمی فقرآهن و بتاتالاسمی ماژور

تقدیم می‌شود. اینجانبان نسخهٔ نهائی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تأئید کرده، و پذیرش آنرا برای تکمیل درجهٔ کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنیم.

نام و نام‌خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران : ۱۳۷۸ /۴/ ۲۰

جناب آقای دکتر عبدالامیر علامه (استاد راهنما)

آقای دکتر محمود جلالی (استاد مشاور)

سرکارخانم دکتر فاطمه کرمی تهرانی (نماینده شورای تحصیلات تکمیلی)

آقای دکتر عباس لطفی (استاد ناظر)

آقای دکتر ابراهیم جوادی (استاد ناظر)

آقای دکترمحمود دوستی (استاد ناظر)

کلیه حقوق اعم از تکثیر، نسخه‌برداری، ترجمه، اقتباس و ... از پایان‌نامه کارشناسی ارشد برای دانشگاه تربیت مدرس محفوظ است. نقل مطالب با ذکر ماخذ بالامانع است.

**تقدیم :**

«هل یستوی الذین یعلمون و الذین لا یعلمون»

آیا آنان که اهل دانشند با مردم جاهل نادان یکسانند «سوره زمر آیه ۹»

هر ظرفی بر اثر چیزی پر می‌گردد مگر ظرف علم که هر چه بر آن اضافه کنند فراخ تر میشود «مولای متقیان علی (ع)»

الهی عاجز و سرگردانم، نه آنچه دانم دارم و نه آنچه دارم دانم. الهی اگر بردارکنی رواست از خود دور مکن و اگر بدوزخ فرصتی رضاست مهجور مکن. «خواجه عبدالله انصاری»

پس از حمد و ثنای خداوند متعال و درود بر محمد (ص) خاتم پیامبران و برخاندان بزرگوار او این تلاش مختصر را تقدیم به پدر و مادر بزگوار و عزیزم می‌کنم، اگر چه با اینکار حتی نمی‌توان قطره‌ایی از محبتها، زحمات و ایثار آنها را جبران کرد.

## تشکر

بدینوسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از همه مدیران و کارکنان محترم و صدیق دانشگاه و دانشکده علوم پزشکی و اعضای محترم هیئت علمی و همه کسانی که در طول تحصیل و مراحل کار پایان‌نامه زحمات زیادی را متقبل شدند اعلام میدارم.

بر خود فرض می‌دانم صمیمانه از راهنمایی‌ها و الطاف بی‌شائبه جناب آقای دکتر عبدالامیر علامه استاد محترم راهنما که در تمام مراحل پیشرفت کار شامل حال اینجانب بود و نیز از مساعدت و مشاورت جناب آقای دکتر محمود جلالی استاد محترم مشاور کمال تشکر و سپاسگزاری را بنمایم.

همچنین از اساتید محترم گروه سرکار خانم دکتر کرمی، جناب آقای دکتر رسایی، جناب آقای دکتر لطفی، جناب آقای دکتر تقی خانی، جناب آقای دکتر نادری، سرکار خانم دکتر جلالی، سرکار خانم دکتر بطحایی، جناب آقای دکتر مصباح، سرکار خانم افشار، سرکار خانم جم و همدوره‌ای‌های محترم که طی چند سال تحصیل از علم و ادب ایشان بهره بردم تشکر نموده و برای آنها موفقیت و سلامت از درگاه خداوند متعال مسئلت می‌نمایم.

# چکیده

پراکسیداسیون لیپیدها علت اصلی آسیب به غشاء سلولی است که میتواند منجر به مرگ سلولی گردد. رادیکالهای واکنشگر تولید شده در غشاء میتواند آغازگر واکنشهای زنجیره‌ای اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع در غشاء گردد. تشکیل محصولاتی چون هیدروپراکسیدها از طریق واکنشهای رادیکالی میتواند باعث تغییر در مولکولهای غشاء سلولی و بعضاً تخریب آنها گردد. اریتروسیتهای بدست آمده از افراد نرمال و بعضی از بیماران واکنشهای متفاوتی را نسبت به آسیبهای ناشی از پراکسیداسیون چربیها از خود نشان میدهند. این تفاوتها را میتوان به کارآیی فعالیت آنتی‌اکسیدانی سلولها نسبت داد. در مطالعه حاضر میزان پراکسیداسیون چربیها و نیز تغییر در سیستم آنتی‌اکسیدانی در گلبولهای قرمز بدست آمده از بیماران بتاتالاسمی ماژور و آنمی فقر آهن با گروههای شاهد (تعداد ۳۰ نفر از هر گروه) با هم مقایسه شدند. میزان پراکسیداسیون چربیها با استفاده از معرف تیوباربیتوریک اسید اندازه‌گیری شد. انکوباسیون گلبولهای قرمز در حضور آب اکسیژنه نشان داد که غلظت محصول اصلی پراکسیداسیون چربیها یعنی مالونالدهید در سلولهای افراد بیمار نسبت به افراد نرمال بیشتر است.

افزایش پراکسیداسیون چربیها در گلبولهای قرمز بیماران بتاتالاسمی و آنمی فقر آهن بترتیب ۴۳ درصد و ۲۲ درصد نسبت به گروه شاهد است.

ارتباط بین تشکیل پراکسیداسیون و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سیستم In vitro در حضور و در غیاب آنتی‌اکسیدانهایی نظیر آلبومین و آلفاتوکوفرول مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت کاتالاز و میزان گلوتاتیون بترتیب در گلبولهای قرمز بیماران آنمی فقر آهن و بتاتالاسمی ماژور نسبت به گروههای شاهد کمتر است.

# فهرست مطالب


| عنوان | صفحه |
|---|---|
| **فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات انجام شده** | ۱ |
| ۱-۱- پراکسیداسیون لیپیدها | ۲ |
| ۱-۱-۱- رادیکالهای آزاد | ۲ |
| ۱-۱-۱-۱- رادیکالهای اکسیژن | ۲ |
| ۱-۱-۲- دفاع آنتی اکسیدانی | ۶ |
| ۱-۱-۳- اکسیداتیو استرس | ۱۱ |
| ۱-۱-۳-۱- علل اکسیداتیواسترس | ۱۱ |
| ۱-۱-۳-۲- نقش گلوتاتیون و کاتالاز در اکسیداتیو استرس | ۱۲ |
| ۱-۱-۴- مکانیسم پراکسیداسیون چربیها | ۱۳ |
| ۱-۱-۵- محصولات پراکسیداسیون چربیها | ۱۵ |
| ۱-۱-۶- مکانیسم تشکیل مالون دی آلدئید | ۱۹ |
| ۱-۱-۷- متابولیسم مالون دی آلدئید | ۲۲ |
| ۱-۲- بافت خون | ۲۳ |
| ۱-۲-۱- گلبول قرمز | ۲۳ |
| ۱-۲-۱-۱- هموگلوبین و واکنشهای اکسیداتیو آن | ۲۵ |
| ۱-۲-۱-۲- بتاتالاسمی | ۲۷ |
| ۱-۲-۱-۳- آنمی فقر آهن | ۲۹ |
| ۱-۳- کاتالاز | ۳۱ |
| ۱-۳-۱- مکانیسم واکنش کاتالاتیک | ۳۳ |
| ۱-۳-۲- کنترل ژنی کاتالاز | ۳۵ |
| ۱-۳-۳- نقش کاتالاز در سلامت و بیماری | ۳۶ |
| ۱-۴- گلوتاتیون | ۳۷ |
| ۱-۴-۱- بیوسنتز و متابولیسم گلوتاتیون | ۴۰ |
| ۱-۴-۲- اعمال گلوتاتیون | ۴۳ |
| ۱-۴-۳-۱- کاهش و افزایش مقدار گلوتاتیون | ۴۵ |
| **فصل دوم: وسایل، مواد وروشها** | ۴۷ |

۲-۱- وسایل ..... ۴۸
۲-۲- مواد ..... ۴۸
۲-۳- روشها ..... ۴۹
۲-۳-۱- آزمایش های مقدماتی هماتولوژیک و بیوشیمیایی ..... ۴۹
۲-۳-۲- آزمایش های اختصاصی روی گلبولهای قرمز ..... ۵۰
۲-۳-۲-۱- روشهای اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپیدها ..... ۵۰
۲-۳-۲-۱-۱- روشهای تعیین مالون دی آلدئید ..... ۵۱
۲-۳-۲-۱-۲- روشهای اسپکتروفتومتری تعیین مالون دی آلدئید ..... ۵۲
۲-۳-۲-۱-۲-۱- تهیه محلولهای لازم و دستورکار ..... ۵۴
۲-۳-۲-۱-۲-۲- روش تهیه گوست ..... ۵۸
۲-۳-۲-۱-۲-۳- اندازه‌گیری پروتئین به روش براد فورد ..... ۵۹
۲-۳-۲-۱-۲-۴- اندازه‌گیری هموگلوبین ..... ۶۰
۲-۳-۲-۲- روش اندازه‌گیری کاتالاز ..... ۶۱
۲-۳-۲-۳- روش اندازه‌گیری گلوتاتیون ..... ۶۴
۲-۳-۲-۳-۱- محلولهای مورد نیاز ..... ۶۵
۲-۳-۲-۳-۲- روش کار ..... ۶۶
**فصل سوم: نتایج** ..... ۶۹
۳-۱- داده‌های هماتولوژیک گروههای کنترل و بیمار ( بتاتالاسمی ماژور - آنمی فقر آهن ) ... ۷۰
۳-۲- داده‌های بیوشیمیایی گروههای بیمار و کنترل ..... ۷۱
۳-۳- میزان پراکسیداسیون لیپید گلبولهای قرمز ..... ۷۱
۳-۴- میزان گلوتاتیون اریتروسیت ها ..... ۷۲
۳-۵- فعالیت کاتالاز گلبولهای قرمز ..... ۷۳
۳-۶- پراکسیداسیون لیپیدها در گوست ..... ۷۴
۳-۷- اثر آلفا توکوفرول بر روی مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای گلبول قرمز ..... ۷۵
۳-۸- اثر آلبومین بر روی میزان پراکسیداسیون لیپیدهای گلبولهای قرمز ..... ۷۵
۳-۹- تاثیر غلظتهای مختلف هیدروژن پراکساید بر میزان پراکسیداسیون لیپیدها ..... ۷۶
**فصل چهارم: بحث، نتیجه گیری و پیشنهادات** ..... ۸۹
**فهرست منابع** ..... ۱۰۹

# فهرست شکلها

**عنوان** **صفحه**


شکل ۱-۱- تولید انواع فعال اکسیژن ..... ۳
شکل ۱-۲- هدفهای سلولی انواع فعال اکسیژن ..... ۵
شکل ۱-۳- مراحل مختلف پراکسیداسیون لیپید ..... ۸
شکل ۱-۴- مکانیسم پیشنهادی برای عمل حفاظتی کاروتنوئیدها در مقابل رادیکالهای پراکسیل ۸
شکل ۱-۵- ساختمان ویتامین E ..... ۹
شکل ۱-۶- نقش گلوتاتیون و کاتالاز در اکسیداتیو استرس ..... ۱۲
شکل ۱-۷- تقسیم مراحل پراکسیداسیون ..... ۱۳
شکل ۱-۸- مکانیسم تشکیل هیدروپراکسیدها ..... ۱۴
شکل ۱-۹- تشکیل محصولات پراکسیداسیون آراشیدونیک اسید ..... ۱۶
شکل ۱-۱۰ - مراحل تشکیل دی انهای کنژوگه ..... ۱۷
شکل ۱-۱۱- مراحل تشکیل اتان و پنتان از PUFAها ..... ۱۷
شکل ۱-۱۲- مکانیسم تشکیل MDA و واکنش آن با TBA ..... ۲۰
شکل ۱-۱۳- مکانیسم تشکیل پروستاگلاندینها ..... ۲۱
شکل ۱-۱۴- مکانیسم تشکیل TBARS در سیستم‌های دی ان ..... ۲۲
شکل ۱-۱۵- متابولیسم MDA ..... ۲۳
شکل ۱-۱۶ - برش عرضی غشای گلبول قرمز ..... ۲۵
شکل ۱-۱۷- خلاصه‌ایی از موتاسیونهای مسئول ایجاد بتاتالاسمی ..... ۲۸
شکل ۱-۱۸- منابع $H_2O_2$ و تجزیه آن ..... ۳۳
شکل ۱-۱۹- واکنشهای کاتالاز ..... ۳۵
شکل ۱-۲۰- ساختمان گلوتاتیون ..... ۳۹
شکل ۱-۲۱- مسیرهای اصلی متابولیسم گلوتاتیون ..... ۴۱
شکل ۱-۲۲- شکسته شدن گلوتاتیون ..... ۴۱
شکل ۱-۲۳- چگونگی انتقال آمینواسیدها در سلول توسط سیکل گاماگلوتامیل ..... ۴۲
شکل ۱-۲۴- اختلالات آنزیمی مسیر متابولیسمی گلوتاتیون ..... ۴۳
شکل ۱-۲۵- اعمال آنتی اکسیدانی گلوتاتیون ..... ۴۴
شکل ۱-۲۶- مکانیسم افزایش مقدار گلوتاتیون ..... ۴۶

شکل ۳-۱- منحنی استاندارد پروتئین ..... ۷۷
شکل ۳-۲- منحنی استاندارد هموگلوبین ..... ۷۸
شکل ۳-۳- پراکسیداسیون لیپیدهای گلبولهای قرمز (Intact) بیماران آنمی فقرآهن (IDA) و بتاتالاسمی ماژور (B-THALA) در مقایسه با کنترل ..... ۷۹
شکل ۳-۴- مقایسه پراکسیداسیون لیپیدها درگلبولهای قرمز تحت تاثیر $H_2O_2$درگروههای مختلف ..... ۸۰
شکل ۳-۵- مقدارگلوتاتیون اریتروسیت‌های (Intact) بیماران‌بتاتالاسمی ماژور و آنمی فقر آهن در مقایسه با کنترل ..... ۸۱
شکل ۳-۶- مقدارگلوتاتیون اریتروسیت‌ها تحت تاثیر $H_2O_2$ درگروههای مختلف..... ۸۲
شکل ۳-۷- مقایسه فعالیت کاتالاز اریتروسیت‌ها درگروههای مختلف ..... ۸۳
شکل ۳-۸- پراکسیداسیون لیپیدها درگوست (Intact) ..... ۸۴
شکل ۳-۹- پراکسیداسیون لیپیدهای گوست پس از مجاورت اریتروسیت‌ها با هیدروژن پراکساید ..... ۸۵
شکل ۳-۱۰- تاثیر آلفاتوکوفرول بر میزان پراکسیداسیون اریتروسیت‌ها ..... ۸۶
شکل ۳-۱۱- تاثیر غلظتهای مختلف آلبومین بر مقدار پراکسیداسیون گلبولهای قرمز ..... ۸۷
شکل ۳-۱۲- تاثیر غلظتهای مختلف هیدروژن پراکساید بر پراکسیداسیون لیپیدها..... ۸۸
شکل ۴-۱- سیستم‌های حفاظتی RBCدر مقابل واکنشهای پراکسیداتیو..... ۹۲
شکل ۴-۲- ساختمان غشاء گلبول قرمز در تالاسمی ..... ۹۴
شکل ۴-۳- حوادث اکسیداتیو در RBCهای تالاسمیک..... ۹۷
شکل ۴-۴- مدلی برای مکانیسم از دست دادن $K^+$ در RBC انسان ..... ۹۷
شکل ۴-۵- نمایش شماتیک تشکیل مت هموگلوبین و تشکیل آنیون سوپراکسیدبه همراه آن ۹۸
شکل ۴-۶- تولید و تجزیه اکسیژن فعال و ارتباط آن با مسیرهای گلیکولیتیک و پنتوزفسفات ۱۰۰
شکل ۴-۷- آسیب RBCبا واسطه نوتروفیلها ..... ۱۰۱
شکل ۴-۸- مکانیسم حذف $H_2O_2$در اریتروسیت‌ها ..... ۱۰۲
شکل ۴-۹- سیستم‌های آنتی اکسیدانت اریتروسیت‌ها ..... ۱۰۴

# فهرست جداول

**عنوان** **صفحه**


جدول ۱-۱- تعدای از آنتی اکسیدانتهای مهم ..... ۶

جدول ۱-۲- تشخیص افتراقی آنمی فقرآهن از بتا تالاسمی مینور و آنمی ناشی از بیماریهای مزمن ..... ۳۱

جدول ۱-۳- شباهتهای بین کاتالاز و گیرنده‌های بتا آدرنرژیک ..... ۳۹

جدول ۲-۱- واکنش TBA با ترکیبات مختلف ..... ۵۳

جدول ۲-۲- تهیه بافرفسفات ..... ۵۸

جدول ۳-۱- داده‌های هماتولوژیک در بیماران بتاتالاسمی ماژور و آنمی فقر آهن و کنترلهای نرمال ..... ۷۰

جدول ۳-۲- داده‌های بیوشیمیایی در بیماران بتاتالاسمی ماژور و آنمی فقر آهن و کنترلهای نرمال ..... ۷۱

جدول ۳-۳- مقدار پراکسیداسیون لیپیدها در گلبولهای قرمز ..... ۷۲

جدول ۳-۴- مقدار گلوتاتیون اریتروسیت ها ..... ۷۳

جدول ۳-۵- فعالیت کاتالاز اریتروسیت ها ..... ۷۴

جدول ۳-۶- میزان پراکسیداسیون لیپیدها درگوست ..... ۷۴

جدول ۳-۷- اثر آلفا توکوفرول بر میزان پراکسیداسیون لیپیدهای اریتروسیت ..... ۷۵

جدول ۳-۸- اثرآلبومین بر مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای گلبولهای قرمز ..... ۷۶

جدول ۳-۹- تاثیر غلظتهای مختلف $H_2O_2$بر مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای اریتروسیت ... ۷۶

جدول ۴-۱- خلاصه سیستم‌های تعمیر فسفولیپیدهای غشاء اریتروسیتهای انسان ..... ۱۰۶

# فهرست اختصارات

*Lp* = *Lipid peroxidation*

*RBC* = *Red Blood Cell*

*$G_6PD$* = *Glucose-6-phosphate dehydrogenase*

*Hb* = *Hemoglobin*

*MDA* = *Malondialdehyde*

*GSH* = *Reduced glutathione*

*SOD* = *Superoxide dismutase*

*IDA* = *Iron deficiency anemia*

*MCV* = *Mean corpuscular volume*

*MCH* = *Mean corpuscular Hemoglobin*

*PUFA* = *Polyunsaturated Fatty Acid*

*MCHC* = *Mean Corpuscular Hemoglobin concentration*

*TBA* = *Thiobarbituric acid*

*TBARS* = *TBA-Reactive substances*

*TIBC* = *Total Iron Binding Capacity*

*Ret* = *Reticulocyte*

*DTNB* = *Dithiobis nitrobenzoic acid*

*PCV* = *packed cell volume*

*GSSG* = *Oxidized glutathione*

*B-THALA* = *Beta Thalassemia Major*

# فصل اول

## مقدمه و مروری بر مطالعات انجام شده

## ۱-۱- پراکسیداسیون لیپیدها

سلولهای بدن و اعضا و ارگانهای مختلف آن بطور مداوم در معرض آسیبهای اکسیداتیو میباشند. در حالت سلامت سیستم دفاعی بدن از قسمتهای مختلف آن در مقابل این عوامل محافظت می‌کند. معهذا در برخی بیماریها این توازن به گونه‌ای بهم می‌خورد که این عوامل اکسیداتیو میتوانند به انواع مولکولهای بدن و بخصوص لیپیدیهای سلول صدمه وارد سازند و نهایتاً حیات سلول و متابولیسم کلی بدن را تحت تاثیر قرار دهند. با شناسایی این عوامل و سیستم دفاع سلولی میتوان گام بزرگی در جهت روشن شدن اساس مولکولی بیماریها و مقابله با آنها برداشت.

### ۱-۱-۱- رادیکالهای آزاد

رادیکال آزاد به مولکول یااتمی گفته می‌شود که دارای یک یا چند الکترون جفت نشده (Unpaired) باشد. اهمیت این رادیکالها در پزشکی و بیوشیمی در سالهای اخیرمورد توجه قرار گرفته است. رادیکالها میتوانند دارای بارمثبت، منفی و یا خنثی باشند. آنها میتوانند آنقدر کوچک باشند که براحتی از غشاهای بیولوژیک عبور کنند و یا ممکن است دارای ساختمانهای بزرگتری باشند [۴۹ و ۱۱۷].

رادیکالهای آزاد بیولوژیک میتوانند دارای هسته‌هایی از کربن، گوگرد، نیتروژن، هیدروژن و یا اکسیژن باشند، که دراین میان رادیکالهای مشتق از اکسیژن در موجودات هوازی و در فاز آبی مهمترین رادیکالهاو سرسلسله تشکیل انواع رادیکالهای دیگر و از جمله رادیکالهای آلی (Organic Radical) میباشند، که در قسمتهای مختلف سلول و از جمله قسمتهای هیدروفوبیک غشاء تأثیرات خود را بر جای میگذارد [۵۷].

#### ۱-۱-۱-۱ - رادیکالهای اکسیژن

چنانچه اکسیژن مولکولی یک الکترون دریافت کند به رادیکال آنیون سوپراکسید ($O_2^{\cdot -}$) تبدیل می‌شود که این آنیون میتواند آبشاری(Cascade) از واکنشهای تولید انواع فعال مولکول اکسیژن را