واحد تهران

گروه زیست شناسی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد بیوشیمی

موضوع :

بررسی آنزیم آدنوزین دآمیناز و ایزوآنزیمهایش در بیماران مبتلا به لوپوس اریتماتو سیستمیک و مقایسه آن با افراد سالم

نگارش:

نیلوفر قشقایی

استاد راهنما :

دکتر رضا صغیری

استاد راهنمای همکار :

دکتر شفیعه موثقی

استاد مشاور:

دکتر رضا حاج حسینی

پاییز ۸۷

دانشگاه پیام نور

واحد تهران

گروه زیست شناسی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد بیوشیمی

موضوع :

بررسی آنزیم آدنوزین دآمیناز و ایزوآنزیمهایش در بیماران مبتلا به لوپوس اریتماتو سیستمیک و مقایسه آن با افراد سالم

نگارش:

نیلوفر قشقایی

استاد راهنما :

دکتر رضا صغیری

استاد راهنمای همکار :

دکتر شفیعه موثقی

استاد مشاور:

دکتر رضا حاج حسینی

پاییز۸۷

تقدیم به:

مهربانترین همسر

چراکه بازحمات وفداکاریهای بی دریغش برای من پشتوانه محکمی در رویارویی با مشکلات می باشد.

و تقدیم به:

پسر عزیزم، محمد مهدی

امیدوارم که روزی او پایان نامه خیلی بهتری را به کسانیکه برایش زحمت کشیده اند، تقدیم نماید.

به نام خدا

«به نام آنکه دلها به نامش آرام می گیرد و به نام آنکه جان بخشید و ایمان و خاک را»

حمد و سپاس مخصوص پروردگار عالم است که هر آنچه که هست، از موجودات و کائنات همه از اوست و همه در ید قدرت واراده او می باشند. خداوند منان را هزاران هزار شکر می نمایم که به من که ذره ای بیش در برابر او نمی باشم این اجازت و نیرو را داد تا بتوانم در آزمون توانایی ها در عرصه علم و دانش تلاش نمایم تا بهتر بتوانم در معرفت به کمالات بی منتهی او وارد شوم و بنده لایقی برای بندگی او باشم. هر چند که به شکر نعمت او زبان گشودن مرتبه غرور است.

اکنون که در سایه توجهات خداوند منان، پایان نامه ام را به اتمام رسانده ام بر خود لازم می دانم که از عنایات و التفات اساتید گرامی و همراهان ارجمند تشکر و قدردانی نمایم.

از جناب آقای دکتر صغیری، استاد راهنمای بزرگوار که همواره از حمایت بی شائبه ایشان در مراحل مختلف انجام، تهیه و تنظیم این پایان نامه بهره مند بوده ام و برای من یک راهنمای فرزانه و معلمی دلسوز و از لحاظ اخلاقی یک اسطوره بوده اند صمیمانه تشکر می نمایم.

از استاد راهنمای همکار، سرکار خانم دکتر موثقی که در بخش انتخاب نمونه زحمات بسیاری را کشیده اند تشکر و قدردانی می نمایم. همچنین از جناب آقای دکتر حاجی حسینی که به عنوان استاد مشاور از ابتدا زحمات بسیاری کشیده اند تشکر می نمایم.

از جناب آقای دکتر ناظم و همچنین از کلیه کارکنان و کارمندان دانشگاه پیام نور تشکر می نمایم.

از نامی پرسنل بخش بیوشیمی انستیتو پاستور ایران به خصوص سرکار خانم دکتر ابراهیمی راد، خانم تمیمی و خانم سعیدی که من را در اجرای بهینه تحقیق یاری نموده اند تشکر می نمایم. از آقای دکتر عبداللهی در آزمایشگاه بیمارستان امام خمینی نیز تشکر می نمایم.

تشکر و قدردانی ویژه ای از پدر و مادر عزیزم به خاطر زحمات دلسوزانه و بی منتشان در طول تحصیلاتم می نمایم.

همچنین از خواهرم و برادرهایم به خاطر تشویقهایشان تشکر می کنم. از خانواده همسرم به خاطر حمایت و تشویقشان در امر پایان نامه تشکر می نمایم.

در اینجا لازم می دانم از زحمات دوست عزیزم سرکار خانم شهره جلیل فرکه در واقع برای من هم دوست خوب و هم استاد خوبی است تشکر و قدردانی نمایم.

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه

۱-۱آنزیم

۱-۱-۱: خواص عمومی آنزیم ۲

۱-۱-۲: کینتیک آنزیمها ۳

۱-۱-۲-۱-اثر حرارت بر روی آنزیم ۳

۱-۱-۲-۲-اثر pH بر روی آنزیم ۳

۱-۱-۲-۳-تأثیر غلظت آنزیم و سوبسترا ۳

۱-۱-۳- مکانیسم عمل ۴

۱-۱-۴-تنظیم فعالیت‌ها ۴

۱-۱-۵-ایزو آنزیم ۵

۱-۲-آدنوزین دآمیناز

۱-۲-۱- مقدمه ۶

۱-۲-۲-نقش فیزیولوژیکی آدنوزین دآمیناز(ADA) ۶

۱-۲-۳-ساختار آدنوزین دآمیناز(ADA) ۸

۱-۲-۴-موقعیت سلولی آدنوزین دآمیناز(ADA) ۱۰

۱-۲-۵- پایداری آنزیم آدنوزین دآمیناز(ADA) ۱۰

۱-۲-۶- مشخصات کینتیکی آنزیم آدنوزین دآمیناز توتال ۱۰

۱-۲-۷-بیان آدنوزین دآمیناز(ADA) در موجودات ۱۰

۱-۲-۸- ایزوآنزیمهای آدنوزین دآمیناز(ADA) ۱۱

۱-۲-۸-۱-فعالیت ایزوآنزیمها در بافت‌ها ۱۲
۱-۲-۸-۲-وزن مولکولی ایزوآنزیمها ۱۳
۱-۲-۸-۳- PH مناسب برای ایزوآنزیمها ۱۳
۱-۲-۸-۴-موقعیت ژنی ایزوآنزیمها ۱۳
۱-۲-۹-ارتباط ADA_1 و CP ۱۳
۱-۲-۱۰-مهار آدنوزین دآمیناز(ADA) ۱۴
۱-۲-۱۰-۱-مهار ایزوآنزیم‌های آدنوزین دآمیناز (ADA) ۱۵
۱-۲-۱۰-۲-اثر داروها بر مهارکنندگی آدنوزین دآمیناز ۱۵
۱-۳-الکتروفورز
۱-۳-۱-مقدمه: ۱۶
۱-۳-۲- رفتار پروتئین در میدان الکتریکی ۱۶
۱-۳-۳- نقش بافر ۱۷
۱-۳-۳-۱- سیستم بافری پیوسته و ناپیوسته ۱۸
۱-۳-۴- محیط‌های الکتروفورز پروتئین ۱۸
۱-۳-۵-اشکال الکتروفورز ۱۹
۱-۳-۶- روش‌های الکتروفورز ۱۹
۱-۳-۷- پلی اکریل آمید ۱۹
۱-۳-۷-۱-الکتروفورز با ژل پلی اکریل آمید، آلودگی‌های موجود در فرآورده‌های آنزیمی را تشخیص می‌دهد. ۲۰
۱-۳-۷-۲-روش SDS-PAGE ۲۱
۱-۳-۷-۲-۱- عوامل مؤثر در SDS-PAGE ۲۱
۱-۳-۷-۲-۲- نقش سدیم دو دسیل سولفات ۲۱
۱-۳-۷-۲-۳- اثر ژل پلی اکریل آمید ۲۲

۱-۳-۷-۲-۴- SDS-PAGE در شرایط احیایی یا غیر احیایی ۲۲

۱-۳-۷-۲-۵- سیستم بافری درSDS-PAGE ۲۳

۱-۳-۷-۲-۶- آماده‌سازی نمونه ۲۳

۱-۳-۸- آگارز ۲۴

۱-۴-سلول‌های خونی و دستگاه ایمنی بدن

۱-۴-۱- سلولهای خونی ۲۵

۱-۴-۱-۱-سلولهای بنیادی ۲۵

۱-۴-۱-۲-لنفوسیتها ۲۵

۱-۴-۱-۳-سلول‌های B ۲۶

۱-۴-۱-۴-سلول‌های T ۲۶

۱-۴-۱-۵- مونوسیتها ۲۷

۱-۴-۱-۶-ماکروفاژ ۲۷

۱-۴-۲- دستگاه ایمنی بدن ۲۷

۱-۴-۲-۱- فاگوسیتها ۲۸

۱-۴-۲-۲- اپسونین و اپسونیزاسیون ۲۸

۱-۴-۲-۳- انواع ایمنی بدن ۲۹

۱-۴-۲-۳-۱- ایمنی هومورال ۲۹

۱-۴-۲-۳-۲- آنتی بادی‌ها یا ایمونوگلوبین‌ها ۲۹

۱-۴-۲-۳-۳- ایمنی با واسطه سلولی ۲۹

۱-۴-۲-۴- بافت‌های و اعضای لنفی ۳۰

۱-۴-۲-۵- بافتهای لنفاوی ۳۰

۱-۵-لوپوس ارتیماتوی سیستمیک[1] (SLE)

۱-۵-۱-تعریف ۳۱

۱-۵-۲-اپیدمیولوژی ۳۳
۱-۵-۳-اتیولوژی ۳۳
۱-۵-۴-فاکتور ژنتیک در SLE ۳۴
۱-۵-۵-عوامل عفونی ۳۵
۱-۵-۶- فیزیوپاتولوژی SLE ۳۶
۱-۵-۷-تشخیص ۳۷
۱-۵-۷-۱علایم بالینی SLE ۳۷
۱-۵-۷-۲علائم آزمایشگاهی ۳۹
۱-۵-۸-درمان ۴۱
۱-۶- ارتباط آدنوزین دآمیناز با بیماری لوپوس اریتماتوی سیستمیک ۴۲
۱-۷-سابقه وضرورت انجام تحقیق
۱-۷-۱-سابقه ۴۳
۱-۷-۲-ضرورت انجام تحقیق: ۴۳
۱-۸-اهدف
۱-۸-۱-هدف اصلی ۴۴
۱-۸-۲- اهداف جزعی ۴۴

فصل دوم: مواد، ابزار و روش‌ها

۲-۱- مواد ۴۶
۲-۲-ابزار، وسایل ودستگاهها ۴۸
۲-۳-روشها
۲-۳-۱- روش تهیه نمونه ۴۹
۲-۳-۱-۱-انتخاب بیمار ۴۹
۲-۳-۱-۲-روش جدا کردن سرم ۴۹

۲-۳-۱-۳-روش اضافه کردن EDTA و جداسازی RBC ۴۹
۲-۳-۱-۴-تهیه عصاره سلولی لنفوسیت ومونوسیت ۵۰
۲-۳-۲-روش تعیین میزان فعالیت tADA و ADA_1 و ADA_2 توسط روش دستگاهی
۲-۳-۲-۱-اساس آزمایش ۵۱
۲-۳-۲-۲-تهیه محلول آماده به کار ۵۱
۲-۳-۲-۳-حد سنجش ۵۱
۲-۳-۲-۴-سنجش میزان t ADA ۵۲
۲-۳-۲-۵-سنجش میزان فعالیت ADA_2 و ADA_1 ..... ۵۲
۲-۳-۳-سنجش پروتئین توتال به روش بیورت[1] ۵۳
۲-۳-۳-۱-اساس آزمایش ۵۳
۲-۳-۳-۲-مواد واکنش دهنده ۵۳
۲-۳-۳-۳-روش آماده‌سازی محلول‌ها ۵۳
۲-۳-۳-۴-حد سنجش ۵۳
۲-۳-۳-۵-روش محاسبه ۵۴
۲-۳-۴-روش متداول SDS-PAGE ۵۵
۲-۳-۴-۱-مقدمه ۵۵
۲-۳-۴-۲- تهیه مواد ۵۵
۲-۳-۴-۳-روش آزمایش ۵۶
۲-۳-۴-۳-۱بررسی ایزو آنزیم‌های ADA روی ژل ۵۷
۲-۳-۴-۴-روش‌های رنگ‌آمیزی ۶۰
۲-۳-۴-۴-۱-رنگ‌آمیزی با کوماسی آبی R-۲۵۰ ..... ۶۰
۲-۳-۴-۴-۱-۱-تهیه مواد رنگ‌آمیزی و رنگ‌بری ۶۰
۲-۳-۴-۴-۱-۲-روش رنگ‌آمیزی ۶۱

۲-۳-۴-۵-تعیین وزن مولکولی ۶۱

۲-۳-۵- انجام الکتروفورز پلی اکریل آمید با شیب غلظت..... ۶۲

۲-۳-۶-روش آگارز ۶۲

۲-۳-۶-۱-تهیه ژل آگارز ۶۲

۲-۳-۶-۲-طرز تهیه بافر تری‌سیترات l X ۶۲

۲-۳-۶-۳-رنگ‌آمیزی اختصاصی ژل آگارز ۶۳

۳-۱- نتایج حاصل از سنجش میزان آدنوزین دآمیناز توتال (tADA)و ایزوآنزیمهای آن (ADA_1 و ADA_2) توسط دستگاه اتو آنالیزور RA-1000..... ۶۵

۳-۱-۱-آمار توصیفی..... ۶۵

۳-۱-۲:آمار استنباطی..... ۷۱

فصل سوم: نتایج

۳-۲- نتایج الکترو فورتیک

۳-۲-۱- نتایج حاصل از SDS-PAGEدر رابطه با وزن مولکولی ایزو آنزیمهای ADA

۳-۲-۱-۱- بررسی ایزوآنزیم ADA1..... ۷۶

۳-۲-۱-۲- بررسی ایزوآنزیم ADA1+CP..... ۷۸

۳-۲-۱-۳- بررسی ایزوآنزیم ADA2..... ۷۹

۳-۲-۲-۲- نتایج حاصل از ژل آگارز با رنگ آمیزی اختصاصی ۸۰

فصل چهارم: بحث و پیشنهادات ۸۳

فصل پنجم: منابع و علائم ۹۱

فهرست جداول

جدول۱-۱:بررسی میزان ADA1دربیماریهای مختلف ۱۱

جدول۲-۲:میزانADA وایزوآنزیمهای آن دربافتها..... ۱۲

جدول ۱-۳ :معیارهای منتشر شده درسال ۱۹۸۲ و (تجدیدنظر شده در سال ۱۹۹۷) برای طبقه‌بندی SLE ۳۸

جدول ۱-۴:اتوآنتی بادی‌ها در بیماران مبتلا به SLE..... ۴۰

جدول ۲-۱: مقادیر لازم برای سنتز ژل بالای 5٪ درSDS-PAGE..... ۵۹

جدول۲-۲: : مقادیر لازم برای سنتز ژل پایین با درصد های مختلف درSDS-PAGE..... ۵۹

جدول شماره ۳-۱. نتایج آمار توصیفی میزان غلظت tADA و ADA-1و ADA-2 بر اساس سه گروه..... ۶۵

جدول شماره۳-۲. نتایج آمار توصیفی میزان غلظت ADA1 بر اساس سه گروه ۶۷

جدول شماره۳-۳. نتایج آمار توصیفی میزان غلظت ADA2 بر اساس سه گروه..... ۶۸

جدول شماره۳-۴: نتایج آمار توصیفی میزان غلظت های total-ADA بر اساس سه گروه ۶۹

جدول ۳-۵: نتایج آمار تحلیل واریانس یک طرفه جهت بررسی تفاوت میزان غلظت ADA1 در سه گروه آزمایشی..... ۷۱

جدول ۳-۶: نتایج آمار تحلیل واریانس یک طرفه جهت بررسی تفاوت غلظت ADA2 سه گروه آزمایشی..... ۷۱

جدول شماره۳-۷: نتایج آمار تعقیبی شفه جهت بررسی دو به دوی گروهها ۷۲

جدول ۳-۸: نتایج آمار تحلیل واریانس یک طرفه جهت بررسی تفاوت غلظتtotal-ADA سه گروه آزمایشی..... ۷۲

جدول شماره ۳-۹: نتایج آمار تعقیبی شفه جهت بررسی دو به دوی گروهها ۷۳

جدول شماره۳-۱۰: نتایج آمار ضریب همبستگی پیرسون جهت بررسی رابطه بین میزان غلظت ADA1 و ADA2 در سه گروه آزمایشی..... ۷۴

جدول شماره۳-۱۱. نتایج آمار ضریب همبستگی پیرسون جهت بررسی رابطه بین میزان غلظت ADA1 و ADA2 و ADAT با سن در سه گروه آزمایشی..... ۷۵

فهرست نمودارها

نمودار ۳-۱ :نمودار ستونی مقایسه میانگینهای میزان غلظت tADA و ADA_1و ADA_{-2} بر اساس سه گروه.. ۶۶

نمودار۳-۲:نمودار چند ضلعی مقایسه میانگین های میزان غلظت tADA و ADA_{-1}و ADA_{-2} بر اساس سه گروه ۶۶

نمودار ۳-۳:نمودار مقایسه میانگین های سه گروه در میزان غلظتهای ADA1 ..... ۶۷

نمودار۳-۴:نمودار مقایسه میانگین های سه گروه در میزان غلظت های ADA2 ..... ۶۸

نمودار۳-۵:نمودار مقایسه میانگین های سه گروه در میزان غلظت های total-ADA ۶۹

نمودار۳-۶:نمودار چند ضلعی مقایسه میانگین های سه گروه در میزان غلظت های ADA1 و ADA2 ..... ۷۰

نمودار ۳-۷- نمودار ستونی مقایسه میانگین های سه گروه در میزان غلظت‌های ADA1 و ADA2 ..... ۷۰

فهرست شکلها

شکل ۱-۱ : تشکیل اسید اوریک از نوکلئوزیدهای پورین ۷

شکل۱-۲: ساختار آدنوزین دآمیناز ۹

شکل ۱-۳: ساختمان سدیم دو دسیل سولفات..... ۲۲

شکل۱-۴:سلول خونی ۲۵

شکل ۱-۵: لنفوسیتB ۲۶

شکل ۱-۶:تعامل بین لنفوسیت T,B..... ۲۹

شکل ۱-۷اثر ژنتیک بر SLE ۳۵

شکل۳-۱:بررسی ایزوآنزیم ADA۱ :ژل ۱۰ درصد..... ۷۶

شکل ۳-۲:بررسی مقایسه ای سرم واریتروسیت از نظر وجود ADA1 : ژل ۱۰ درصد ۷۷

شکل ۳-۳:بررسی ایزوآنزیمADA1+CP:ژل ۶ درصد..... ۷۸

شکل۳-۴:بررسی ایزوآنزیم ADA2:ژل ۸ درصد ۷۹

شکل ۳-۵ : عکس الکتروفورز آگارز ۸۰

شکل ۳-۶: عکس الکتروفورز آگارز ۸۰

شکل ۳-۷ : شکل شماتیک ایزوآنزیم های ADA بر روی ژل آگارزدربا فتهای مختلف..... ۸۰

شکل۴-۱:متابولیسم آدنوزین..... ۸۴

شکل۴-۲- روند افزایش ADA در بیماری SLE..... ۸۷

چکیده:

فعالیت آدنوزین دآمیناز و ایزوآنزیمهای آن در بیماری لوپوس اریتماتوی سیستمیک و مقایسه آن با افراد سالم

آدنوزین دآمیناز آنزیمی است که درمتابولیسم پورینها شرکت کرده و همچنین نقش مهمی در مکانیسم سیستم ایمنی بدن ایفا می کند .هدف از این مطالعه بررسی فعالیت ADA توتال(tADA) و ایزوآنزیمهایش ADA1 و ADA2 در سرم بیماران مبتلا به لوپوس اریتماتوی سیستمیک (SLE) در فازهای خاموش وعود یا فعال بیماری می باشد.

میزان tADA,ADA1,ADA2 سرم را در ۴۵ بیمار مبتلا بهSLE و۴۵ فرد سالم تو سط دستگاه اتوآ نا لیزورRA-1000 به روش اسپکتروفتومتریک

درحضور و عدم حضور اریترو ۹- (۲-هیدروکسی -۳-نانیل) آدنین (EHNA) اندازه گیری شده است.

با مطالعه‌ای که بر روی ۴۵ بیمار مبتلا به SLE و۴۵ فرد سالم صورت گرفته است ، متوسط فعالیت tADA و ADA_1 و ADA_2 در بیماران SLE به ترتیب در فازخاموش(remission)۲/۲۳ ± ۱۶/۵۹، ۲/۱۵ ± ۴/۴۵ و ۲/۸۵ ± ۱۲/۱۳ Iu/L در فازعود یا فعال(relapse) به ترتیب ۵/۱۳ ± ۲۱/۴۷، ۳/۵۶ ± ۴/۴۷ و۴/۱۱ ± ۱۷/۰۰ Iu/L می‌باشد و همچنین نمونه‌های سالم به ترتیب ۳/۲۹ ± ۱۴/۳۵، ۲/۷۶ ± ۵/۹ و ۲/۲۲ ± ۸/۴۴ Iu/L می‌باشد.

در مقایسه افراد بیمار با افراد سالم ، سطح ADA2,tADA افراد بیمار از نظرآماری افزایش معنی داری پیدا کرده (P<۰/۰۰۱) اما کاهش سطح ADA1 از نظر آماری بی معنی میباشد (P>۰/۰۰۱).

افزایش ADA2 ممکن است سرچشمه مونوسیت-ماکروفاژی داشته باشد که این در واقع با علائم کلینیکی بیماری در فاز ها ی مختلف آن ارتباط دارد.

فصل اول

مقدمه

۱-۱آنزیم

۱-۱-۱: خواص عمومی آنزیم

آنزیمها کاتالیستهای پروتئینی هستند که میزان رخ دادن روندهای فیزیولوژیک را تنظیم می‌کنند. بنابراین، نقایص عملکرد آنزیم‌ها به طور شایع منجر به بیماری می‌شوند. آنزیم‌هایی که واکنشهای انتقال گروه،ایزومریزاسیون، اکسیداسیون و احیاء و یا ساخته شدن پیوندهای کووالانسی را کاتالیز می‌کنند،نیازمند یک کوسوبسترا به نام کوآنزیم هستند. چون بسیاری از کوآنزیم‌ها از مشتقات ویتامین‌های**B** هستند، بنابراین کمبود ویتامین می‌تواند بر روی عملکرد آنزیم و بر روی هومئوستاز، تأثیر نامطلوب داشته باشد.

بسیاری از کوآنزیم‌ها حاوی نوکلئوتید آدنوزین مونو فسفات نیز هستند. اغلب آنزیم‌ها برای سوبستراها، کوآنزیم‌ها و نوع واکنش کاتالیز شونده، به میزان زیادی اختصاصی هستند. با وجود این، برخی از پروتئازها، استرها را نیز می‌شکنند. در مورد آنزیم‌های عمل کننده بر روی سوبستراهای دارای وزن مولکولی کم،آنالوگهای سوبسترا نیز ممکن است با آنزیم واکنش دهند اما چنین واکنشی عموماً از میزان اندکی برخوردار خواهد بود.

سنجش فعالیت آنزیم برای تعیین مقدار آنزیم در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی یا بالینی، جنبه اساسی دارد. فعالیت دهیدروژنازهای وابسته به $NAD(P)^+$ را به صورت اسپکتروفتومتریک توسط سنجش میزان تغییر جذب در ۳۴۰ نانومتر (که با اکسیداسیون یا احیای $NAD(P)^+$/ $NAD(P)H$همراه است)، مورد بررسی قرار می‌دهند. متصل کردن سایر آنزیم‌ها به دهیدروژنازها، می‌تواند سبب تسهیل آنالیز آنها شود. برای بررسی ساختمان، مکانیسم عمل و تنظیم فعالیت آنزیمها آنها را باید به میزان بیش از ۹۵ درصد خالص‌سازی کرد.

روش‌های موجود برای خالص‌سازی آنزیمها عبارتند از : پرسی پیتاسیون انتخابی توسط نکمها یا حلالهای آلی و کروماتوگرافی تعویض یونی، فیلتراسیون با ژل، تمایل سوبسترا، واکنش هیدروفوبیک. توانایی در به کارگیری تکنیک‌های ترکیبی **DNA** برای بروز آنزیمها در میزبانهای مشخص، خالص‌سازی آنزیم را متحول کرده است (با فراهم آوردن مقادیر زیادی از آنزیم که در اکثر موارد به راحتی می‌توان آنها را بطور یکنواخت خالص نمود). پیشرفت روند خالص‌سازی را می‌توان با سنجش افزایش یک فعالیت اختصاصی آنزیم (فعالیت به ازای واحد توده)، و یکنواختی آنهایی آن را می‌توان با الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید ، مورد بررسی قرار داد.

تعیین دقیق مکان داخل سلولی آنزیمها، توسط روش‌های هیستوکمیکال و قطعه‌قطعه کردن سلول توأم با آنالیزآنزیماتیک نمونه‌ها یا قطعات هموژن سلولی، صورت می‌گیرد. [۶۱]

۱-۱-۲: کینتیک آنزیمها

حرارت، **pH**، غلظت آنزیم و غلظت سوبسترا و مهار کننده‌ها، سرعت واکنش‌های کاتالیز شونده توسط آنزیم را (با کاربردهای مهمی برای سلامتی و بیماری) تغییر می‌دهند. اتصال به سوبسترا و کاتالیز، در ناحیهٔ کاتالیتیک (فعال) رخ می‌دهد؛ این منطقه یک ناحیه سه‌بعدی از آنزیم است که علاوه بر ریشه‌های اسیدآمینه‌ای می‌تواند حاوی کوآنزیم‌ها یا یونهای فلزی نیز باشد. نقاط فعال غالباً در شکاف‌های آنزیمها یا در سطح مشترک بین زیر واحدهای آنزیم‌های مولتی متر قرار دارند. [۶۱]

۱-۱-۲-۱- اثر حرارت بر روی آنزیم

با افزایش یافتن حرارت یک آنزیم، سرعت واکنش افزایش می‌یابد، اما این افزایش تنها تا هنگامی دوام می‌آورد که سطح انرژی کینتیک آنزیم از انرژی جدایی نیروهای ضعیف غیر کووالانسی که سبب بقای ساختمان ثانویه و سوم طبیعی می‌شوند، بیشتر باشد. در این نقطه، فعالیت به تدریج کاهش پیدا می‌کند.[۶۱]

۱-۱-۲-۲-اثر pH بر روی آنزیم

تغییرات متوسط **pH** (یعنی در محدودهٔ ۵ تا ۹)، با تغییر دادن حالت باردار گروه‌های **R** اسیدی یا بازی اسیدهای آمینه که در کاتالیز، اتصال به سوبسترا و یا در آرایش ناحیهٔ کاتالیتیک شرکت می‌کنند، بر فعالیت آنزیم تأثیر می‌گذارند. بنابراین آنزیم‌ها مقادیری از **pH** را نشان می‌دهند که در آن مقادیر فعالیت بهینه را دارا هستند.[1] [۶۱]

۱-۱-۲-۳-تأثیر غلظت آنزیم و سوبسترا

تقریباً در تمام حالات حایز اهمیت فیزیولوژیک، غلظت مولی یک آنزیم **(E)** کمتر از غلظت مولی سوبسترای آن است. چون سوبسترای کافی برای واکنش با آنزیم آزاد در دسترس است، بنابراین هر گونه افزایش یا کاهش در غلظت آنزیم، با یک افزایش یا کاهش در سرعت واکنش همراه خواهد شد. با وجود این، تغیرات غلظت سوبسترا **[S]** تنها در هنگام وجود آنزیم آزاد کافی در محیط پیرامون واکنش، بر سرعت واکنش تأثیر می‌گذارند. هنگامی که تمام آنزیم به صورت کمپلکس **ES** در می آید (حالت V_{max})، افزایش بیشتر در **[S]** سبب افزایش سرعت واکنش نخواهد شد. ثابت میکائیلیس **(K_m)**

1- Optima PH

غلظتی از سوبستراست که سرعت واکنش معادل نصف میزان حداکثرسرعت(V_{max}) است که در آن نصف آنزیم به صورت **ES** وجود دارد منجر می‌شود. [۶۱]

۱-۱-۳- مکانیسم عمل

مکانیسم‌های کاتالیز آنزیمی دقیقاً منعکس کنندهٔ مکانیسم‌های واکنش شیمیایی هستند. با وجود این، بر خلاف کاتالیتهای غیرآلی یا آلی ساده، آنزیمها نظم بسیار دقیقی از اختصاصی بودن سوبسترا و کارایی کاتالیتیک را نشان می‌دهند. این ویژگی‌ها پی‌آمد روند تکامل تحولی نقاط فعال است که دقیقاً برای کاتالیز سریع و انتخابی یکایک واکنش‌ها تناسب یافته‌اند. مسیرها یا طرقی که توسط آن آنزیمها سوبستراها را به محصولات تبدیل می‌کنند، به عوض یک مادهٔ حد واسط آنزیم سوبسترای واحد، در بر گیرندهٔ یک توالی از مواد حد واسط متصل به آنزیم است. هدف نهایی مطالعهٔ مکانیسم‌ها عبارت از درک مؤثر و اختصاصی بودن آنزیمها به عنوان کاتالیست در سطح مولکولی می باشد.[۶۱]

۱-۱-۴-تنظیم فعالیت‌ها

تنظیم فعالیت آنزیمها از یک طریق اصلی سبب حفظ هومئوستاز می‌شود :

برقراری یک محیط نسبتاً ثابت داخل سلولی و داخل ارگانیسمی علیرغم نوسانهای وسیع در محیط خارجی (مانند تغییر حرارت، حضور یا غیاب آب یا انواع غذاهای اختصاصی). برای حصول هومئوستاز، سرعت واکنش‌های بی‌شمار بیوشیمیایی باید پاسخگوی نیازهای فیزیولوژیک باشد.

غلظت‌های موضعی سوبسترا، حضور آنزیم در بخش‌های مختلف، و روند ترشح شدن به صورت پروآنزیمها یا زیموژنهای فاقد فعالیت کاتالیتیک، همگی در تنظیم روندهای متابولیک مشارکت دارند. به علاوه، تغییرات سریع و مبهم در فعالیت کاتالیتیک آنزیمهای کلیدی تنظیم شونده، نقش‌های مهمی را در جهت‌دار شدن انتخابی متابولیستها به طرف یک روند متابولیک ایفا می‌کنند.تعدیل فعالیت آنزیم از طریق تغییرات آرایشی در ناحیهٔ کاتالتیک، ممکن است با دخالت تغییر K_m برای یک سوبسترا، V_{max} برای واکنش کلی و یا اثر بر روی K_m و V_{max}، صورت بگیرد.

در انسان‌ها و سایر یوکاریوتها، فعالیت بسیاری از آنزیمها توسط تغییر کووالانسی تنظیم می‌شود. آنزیم هدف و آنزیمهای مبدل آن، ممکن است بخشی از یک آبشار تنظیمی را تشکیل دهند که به یک سیگنال شعله‌ور کننده از طرف یک هورمون و یا توسط یک پیامبر ثانویه مانند آدنوزین مونو فسفات حلقوی(**cAMP**) پاسخ می‌دهد. [۶۱]

۱-۱-۵-ایزو آنزیم

ایزو آنزیمها، اشکال فیزیکی مجزای یک فعالیت کاتالیتیک یکسان هستند. هنگامی که تکنیکهای خالص‌سازی آنزیمها مورد استفاده قرار می‌گرفتند این امر مشخص شد که اگر چه بعضی آنزیمها واکنش یکسانی را کاتالیز می‌نمایند اما خواص فیزیکی و شیمیایی آنها تفاوت‌های قابل توجه بسیاری را نشان می‌دهند. اشکال فیزیکی مجزای یک فعالیت کاتالیتیک یکسان، ممکن است در بافتهای مختلف یک ارگانیسم، در انواع سلولی مختلف در بخش‌های سلولی و یا در داخل یک پروکاریوت وجود داشته باشند. این کشف به دنبال به کارگیری روش‌های جداسازی و الکتروفورتیک برای جداسازی اشکال الکتروفورتیک مجزای یک فعالیت آنزیمی خاص، صورت گرفت.

در طب بالینی ایزوآنزیم یا ایزوزیم به معنی اشکال فیزیکی متفاوت و قابل جداسازی یک آنزیم مفروض محدود می‌شود که در انواع سلولی مختلف و یا بخش‌های تحت سلولی یک انسان وجود دارند. ممکن است بافتهای مختلف حاوی ایزوزیمهای مختلفی باشند و این ایزوزیمها از نظر تمایل به سوبستراها، تفاوت داشته باشند.

ایزوآنزیمها در تمام اشکال حیات و بافتها وجود دارند. وجود ایزوآنزیمهای مشخص از آنزیمهای سرمی فاقد عملکرد، نشاندهندهٔ آسیب بافتهای اختصاصی انسان است و اطلاعات با ارزشی را از نظر تشخیص و پیش‌آگهی به دست می‌دهد. [۶۱]

۱-۲-آدنوزین دآمیناز[1]

۱-۲-۱- مقدمه

آدنوزین دآمیناز یا آدنوزین آمینوهیدرولاز از طرف انجمن بین‌المللی بیوشیمی[2] **(IUB)** به صورت **EC**۰۳۰۵۰۴۰۴ بیان شده است.

این آنزیم در گونه‌های زیادی از میکروارگانیسمها، گیاهان و مهره‌داران دیده شده است در مجموع در سلول‌های پستانداران نقش مهمی در تمایز و تکامل سیستم لنفوئیدی ایفا می‌کند. با وجود مطالعات زیادی که صورت گرفته ولی نقش فیزیولوژیکی آدنوزین دآمیناز یا **ADA** در بافت‌ها هنوز مشخص نیست. نقص مادرزادی **ADA** سبب ایجاد بیماری **SCID**[3] می‌شود که در این بیماری تکامل لنفوسیتهای **T** و **B**دچار نقص می‌شود. چندین بیماری است که در آن **ADA** از حد نرمال افزایش می‌یابد. [۳۹و۸]

۱-۲-۲- نقش فیزیولوژیکی آدنوزین دآمیناز

آدنوزین دآمیناز یا آدنوزین آمینوهیدرولاز دآمیناسیون آدنوزین و '۲- داکسی آدنوزین به اینوزین و '۲ داکسی اینوزین را کاتالیز می‌کند.(شکل۱-۱)

بنابراین متابولیزه شدن این نوکلئوزیدهای د آمینه شده منجر به ایجاد هیپوگزانتین می شود. که یا می‌تواند به وسیله گزانتین اکسید از به اسید اوریک تبدیل گردد و یا به وسیله عمل هیپوگزانتین- گرانین فسفوریبوزیل ترانسفراز به مونو نوکلئوئیدها تبدیل می‌شود.(۱۹) علاوه بر نقش کلیدی **ADA** در متابولیسم پورینی که در بالا اشاره شد، همچنین نقشهای فیزیولوژیک مهم دیگری دارد. که این نقشها می‌تواند به دو گروه تقسیم شود :

۱- تنظیم غلظت آدنوزین خارج سلولی و آدنوزین داخل سلولی توسط فعالیتهای آنزیمی **ADA** سیتوزولی و **ecto-ADA**.

۲- فعالیت‌های غیرآنزیمی **ecto-ADA** توسط اتصال به مولکول‌های سطح سلولی. [۲۵]

1- Adenosine deaminase
2- International union of biochemistry
3- Serve Combind Immunodefisiency Disease=