٤٥٤٥.

پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی

موضوع

# میان کنش LDL و فنوتیپهای MZ و MS آلفا–۱–آنتی‌تریپسین در سرم انسانی

استاد راهنما

دکتر عباس صاحبقدم لطفی

۱۳۸۲ /۴/ ۵-

اساتید مشاور

دکتر عبدالامیر علامه

دکتر افشین محسنی فر

از اطلاعات مرکز علمی ایران
تهیه شده است

نگارش

فریبا فرجی

تابستان ۱۳۸۱

۶۸۴۴۰

«فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد **خانم فریبا فرجی**

رشته: **بیوشیمی** گرایش:

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

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

**جناب آقای دکتر عباس صاحبقدم لطفی (استاد راهنما)**

---

**جناب آقای دکتر عبدالامیر علامه (استاد مشاور)**

---

**جناب آقای دکتر غلامعلی نادری (نماینده تحصیلات تکمیلی)**

---

**جناب آقای دکتر ابراهیم جوادی (استاد ناظر)**

---

**جناب آقای دکتر غلامعلی نادری (استاد ناظر)**

---

بسمه تعالی

# آیین‌نامهٔ چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرّس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرّس، مبیّن بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

مادّهٔ ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اطلاع دهد.

مادّهٔ ۲ در صفحهٔ سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد/رسالهٔ دکتری نگارنده در رشتهٔ علوم سیاسی است که در سال ۸۱ در دانشکدهٔ علوم انسانی دانشگاه تربیت مدرّس به راهنمایی سرکار خانم/جناب آقای دکتر [illegible]، مشاورهٔ سرکار خانم/جناب آقای دکتر [illegible] و مشاورهٔ سرکار خانم/جناب آقای دکتر [illegible] از آن دفاع شده است.»

مادّهٔ ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

مادّهٔ ۴ در صورت عدم رعایت مادّهٔ ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ‌شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرّس، تأدیه کند.

مادّهٔ ۵ دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در مادّهٔ ۴ را از محلّ توقیف کتابهای عرضه‌شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

مادّهٔ ۶ اینجانب [illegible] دانشجوی رشته [illegible] مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی [illegible]

تاریخ و امضا: ۸۱/۱۲/۱

تقدیم به:

خانواده‌ام و به همسرم که با تحمل مشفقانه کمیها و کاستیها همیشه، یار و همراهی در هموار نمودن راهم بوده‌اند.

## تقدیر و تشکر

در این تحقیق خواهران و برادران زیادی اینجانب را یاری نموده‌اند که ذکر اسامی تمامی آنها مقدور نیست و بدینوسیله از یکایک آنان، خصوصاً از افراد زیر تشکر و قدردانی می‌نمایم:

۱- جناب آقای دکتر لطفی جهت راهنمائی‌های دلسوزانه و همکاریهای بیدریغ

۲- جناب آقای دکتر علامه برای مشاوره و همکاریهای فراوان

۳- جناب آقای دکتر رسائی بدلیل همکاری و راهنمائی اینجانب و بذل توجه در بین مشغله‌های فراوان کاری و تحقیقاتی

۴- جناب آقای دکتر محسنی‌فر برای مشاوره و همکاری‌های فراوان و مصروف ساختن وقت زیادی برای انجام این تحقیق

۵- جناب آقای دکتر جوادی بعلت همکاریهای فراوان برای جمع‌آوری نمونه. از بیمارستان شریعتی

۶- جناب آقای دکتر خداداد بدلیل همکاریهای بیدریغ جهت جمع‌آوری نمونه از مرکز طبی کودکان

۷- کارشناسان محترم گروه بیوشیمی بالینی، سرکار خانم افشار و سرکار خانم اعتمادی

۸- خانمها و آقایان:

مطهری، حسن نیا، کاشانیان، پاک‌نژاد، امیدفر، رجبی، محسنی، رهبری‌زاده.

## چکیده:

آلفا – ۱– آنتی تریپسین یکی از آنتی سرین پروتئازهای مهم پلاسماست کـه دارای ۳۹۴ اسـید آمینه و وزن مولکولی ۵۲ کیلو دالتون می‌باشد. این پروتئین، مهارکننده اصلی الاستاز نوتروفیلی است و در حفاظت بافت ریوی در برابر تخریب الاستولیتیک، نقش حیاتی دارد.

$ApoB_{100}$، آپوپروتئین موجود در LDL، دارای ۴۵۳۶ اسید آمینه و جرم مولکولی ۵۱۰ کیلودالتون می‌باشد. این آپوپروتئین هم در استحکام ساختمانی لیپوپروتئین اهمیـت دارد و هـم بعنوان یک واسطه در اتصال و برداشت LDL توسط بافتها عمل می‌کند.

مولکولهای آلفا– ۱– آنتی تریپسین و $apoB_{100}$ که توسط کبد سنتز می‌شوند، می‌توانند در سـرم به هم متصل شوند. ایـن اتصـال می‌توانـد در برداشـت LDL توسـط بافتـها تـأثیرگذار باشـد. کمپلکس LDL – AAT علاوه بر سرم، در پلاکهای تصلب شرائین نیز دیده شده است که ایـن پدیده، نشان دهنده نقش این کمپلکس در آتروژنـز می‌باشـد. در مطالعـه حـاضر بـرای اثبـات تشکیل این کمپلکس، ۲۱ نمونه سرم انسانی تهیه و همه نمونه‌ها بروش الکتروفورز کانونی و با استفاده از سرم استاندارد (تهیه شده از آزمایشگاههای رفرانس AAT در نروژ و کانـادا) تعییـن فنوتیپ شدند که ۱۸ نمونه دارای فنوتیپ MM و سه تـای دیـگر فنوتیپـهای SZ, MZ, MS داشتند. سپس در این نمونه‌ها میزان LDL و سایر چربیها با روش آنزیمـاتیک و بـا اسـتفاده از دستگاه اتوآنالایزر RA – 1000 و فعالیت AAT سرم بروش اسپکتروفتومتری و بـا اسـتفاده از آنزیـم تریپسـین و سوبسـترای BAPNA انـدازه‌گیـری شـد. میـانگین LDL نمونـه‌های سـرم ۲۹/۲±۱۵۸/۵ و میانگین TIC نمونه‌های سرمی برابر ۱ ± ۲/۴ محاسبه شد.

برای تأیید وجود کمپلکس LDL – AAT در نمونه‌های سرمی با LDL های مختلـف و AAT های متفاوت نمونه‌ها به ۳ گروه جداگانـه تقسـیم و در هـر گروه تشـکیل کمپلکـس LDL – AAT با استفاده از روش الایزای ساندویچی و با بکارگیری آنتی بـادی ضـد apoB و آنتی بادی ضد AAT بررسی شد. نهایتاً جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۹۲ نانومتر قرائت

شد که میانگین جذب کمپلکس در کل نمونه‌ها ۰/۶۵ به دست آمده نتایج آزمون الایـزا جـهت بررسی وجود کمپلکس میانگین چهار بار آزمایش می‌باشد.

بنابراین می‌توان اینچنین نتیجه‌گیری کرد که کمپلکـس LDL – AAT در نمونـه‌های سرم با فنوتیپ طبیعی و غیرطبیعی AAT تشکیل می‌گردد و نتایج اولیه حاکی از متفاوت بودن میزان کمپلکس در نمونه‌های مختلف می‌باشد. مطالعات بیشتر برای بررسی ارتباط قطعی LDL با AAT در بیماریهای مختلف به ویژه در بیماری آترواسکلروز می‌تواند ما را بـه ارتبـاط بیـن بیماریهای قلب و کبد رهنمون شود.

# فهرست مطالب

عنوان | صفحه


فصل اول - مقدمه و کلیات ..... ۱

۱-۱- آلفایک آنتی‌تریپسین ($\alpha_1$AT)..... ۲

۱-۱-۱- ساختمان آلفایک آنتی تریپسین..... ۲

۱-۱-۲- جایگاه فعال آلفایک آنتی تریپسین..... ۳

۱-۱-۳- میزان آلفایک آنتی تریپسین در سرم..... ۴

۱-۱-۴- ژن آلفایک آنتی تریپسین ..... ۵

۱-۱-۵- بلوغ آلفایک آنتی تریپسین..... ۵

۱-۱-۶- میکروهتروژنیتی ..... ۶

۱-۱-۷- سیستم Pi ..... ۶

۱-۱-۷-۱- اللهای طبیعی..... ۸

۱-۱-۷-۲- اللهای ناقص ..... ۹

۱-۱-۷-۳- اللهای نول ..... ۱۰

۱-۱-۷-۴- اللهای dysfunctional ..... ۱۰

۱-۱-۸- روشهای اندازه‌گیری ($\alpha_1$AT) در سرم ..... ۱۱

۱-۱-۸-۱- تعیین فعالیت آنتی پروتئازی $\alpha_1$AT در سرم ..... ۱۱

۱-۱-۸-۲- اندازه‌گیری غلظت $\alpha_1$AT در سرم ..... ۱۲

۱-۱-۹- روشهای تعیین اللهای آلفایک آنتی تریپسین..... ۱۲

| عنوان | صفحه |
|---|---|


۱-۱-۱۰- تشخیصهای قبل از تولد نقص $\alpha_1AT$ ..... ۱۳

۱-۲- لیپوپروتئینها ..... ۱۴

۱-۳- آپولیپوپروتئینها ..... ۱۵

۱-۴- لیپوپروتئین با چگالی کم ..... ۱۶

۱-۵-۱- ساختار apoB ..... ۱۶

۱-۵-۲- حلالیت $apoB_{100}$ ..... ۱۷

۱-۵-۳- ساختمان دوم $apoB_{100}$ ..... ۱۷

۱-۵-۴- دومنهای متصل به لیپید $apoB_{100}$ ..... ۱۸

۱-۵-۵- مدل پنج قسمتی ..... ۱۸

۱-۵-۶- مشابهت‌های $apoB_{100}$ و پروتئین لیپو و تیلین ..... ۱۹

۱-۵-۷- دومنهای اتصال به رسپتور ..... ۲۰

۱-۵-۸- سنتز apoB ..... ۲۰

۱-۵-۹- اتصال پروتئین به لیپید ..... ۲۱

۱-۶- بیماری آبتالیپوپروتئینمیا ..... ۲۱

۱-۷- ذره شبه HDL ..... ۲۲

۱-۸- کاتابولیسم LDL و $apoB_{100}$ ..... ۲۲

۱-۹- نقش apoB و LDL در بیماریهای قلبی ..... ۲۳

۱-۱۰- $\alpha_1AT$ و بیماریهای قلبی ..... ۲۶

| عنوان | صفحه |
|---|---|


۱-۱۱- تشکیل کمپلکس $\alpha_1$AT و LDL ..... ۲۷

**فصل دوم – مواد و روشها** ..... ۳۰

۲-۱- نمونه گیری از بیماران و نگهداری نمونه‌ها ..... ۳۱

۲-۲- اندازه‌گیری پروفایل لیپیدی ..... ۳۱

۲-۲-۱- اندازه‌گیری تری گلیسرید سرم ..... ۳۱

۲-۲-۲- اندازه‌گیری کلسترول سرم ..... ۳۳

۲-۲-۳- اندازه‌گیری کلسترول HDL سرم ..... ۲۵

۲-۲-۴- محاسبه کلسترول LDL سرم ..... ۳۶

۲-۳- اندازه‌گیری فعالیت $\alpha_1$AT سرم ..... ۳۶

۲-۴- تعیین فنوتیپ $\alpha_1$AT سرم بروش الکتروفورز کانونی بر روی ژل اکریلامید ..... ۳۹

۲-۴-۱- آماده سازی شرائط آزمایش ..... ۳۹

۲-۴-۲- انجام عمل الکتروفورز کانونی ..... ۴۲

۲-۴-۳- رنگ آمیزی و رنگ زدائی ژل ..... ۴۲

۲-۴-۴- خشک کردن و نگهداری ژل ..... ۴۳

۲-۴-۵- تعیین فنوتیپ نمونه‌های مجهول ..... ۴۳

۲-۴-۶- تعیین نواحی باندهای اللهای $\alpha_1$AT ..... ۴۳

۲-۵- شناسائی کمپلکس LDL-$\alpha_1$AT بوسیله تست الایزا ..... ۴۴

| عنوان | صفحه |
|---|---|


فصل سوم – نتایج ..... ۵۰

نتایج اندازه‌گیری لیپیدها، TIC، فتوتایپینگ و تست الایزا ..... ۵۱

ژل الکتروفورز کانونی نمونه‌های سرم ..... ۶۰

ژل الکتروفورز کانونی استانداردهای $\alpha_1AT$ ..... ۶۱

منحنی‌های چکر بورد در تست الایزا ..... ۶۲

فصل چهارم – بحث و پیشنهادات ..... ۶۵

منابع ..... ۷۱

# فصل اول

# مقدمه و کلیات

## ۱-۱- آلفا یک آنتی تریپسین[1] ($\alpha_1$AT)

آلفا یک آنتی تریپسین یک گلیکوپروتئین است که از مهمترین سرین پروتئازهای سرم می‌باشد و بطور عمده در کبد سنتز می‌شود.

این مهار کننده پروتئازی همچنین بوسیله ماکروفاژها و سلولهای اپی تلیال دیواره روده تولید می‌شود. آلفا یک آنتی تریپسین مهار کننده اصلی الاستاز نوتروفیلی است و در حفاظت بافت ریوی در برابر تخریب الاستولیتیک دارای نقش حیاتی می‌باشد. نقص مادرزادی آن با خطر بالای آمفیزم[2] ریوی در ارتباط است.همچنین نقص آلفا یک آنتی تریپسین می‌تواند با بروز بیماری مزمن کبدی و یک فرم نادر عفونتهای جلدی[3] آرتریت روماتوئید، وسکولیت‌ها، گلومرولونفریت و ... مربوط باشد [۱].

### ۱-۱-۱- ساختمان آلفا یک آنتی تریپسین:

همانطور که گفته شد، آلفا یک آنتی تریپسین یک گلیکوپروتئین است که دارای وزن مولکولی ۵۲ کیلو دالتون و ۳۹۴ اسید امینه می‌باشد [۲،۲۰،۲۵و۲۷]. این تک زنجیره پروتئینی از طریق ۳ اسید امینه مختلف ($Asn^{247}$,$Asn^{89}$,$Asn^{46}$) به سه زنجیره کربوهیدرات متصل می‌شود. این زنجیره‌های کربوهیدراتی از N استیل گلوکز امین، مانوز، گالاکتوز و سیالیک اسید ترکیب شده و بصورت دو شاخه یا سه شاخه قرار می‌گیرند. این زنجیره‌های کربوهیدراتی در یک الگوی هتروژنوس قرار می‌گیرند و این مسئله در هتروژنیتی الکتروفورتیک دخالت می‌کند.

آلفا یک آنتی تریپسین یک شکل گلبولار دارد ابعاد آن ۶/۷*۳/۲nm می‌باشد. مطالعاتی که بر روی ساختمان آلفا یک آنتی تریپسین توسط اشعه x انجام شد مشخص کرد که در

---

1- Alpha-1- antitypsin

2- Emphysema

3- Panniculitis

ساختمان ثانویه این پروتئین هشت ناحیه آلفاهلیکس و سه ناحیه صفحات چین دار بتا وجود دارد [۲،۲۵و۲۶].

۲۰ اسید امینه ابتدائی N انتهائی از این اشکال مستثنی هستند و می‌توانند از مولکول جدا شوند. نقاط متفاوتی که این شکست و جدا شدن اتفاق می‌افتد می‌تواند در هتروژنیتی الکتروفورتیک شرکت کند [۲و۳].

در ساختمان آلفایک آنتی تریپسین یک رزیدوسیستئین وجود دارد ولی در ساختمان آن پیوند دی سولفید ایجاد نمی‌شود اما این پروتئین می‌تواند بواسطه آن با سایر پروتئینها پیوند دی سولفید برقرار کند [۳،۲۰،۲۵و۲۶].

یک بخش مهم از ساختمان پروتئین، پلهای نمکی است: $Glu^{342}$-$lys^{290}$ و $Glu^{264}$-$lys^{387}$ در صورتیکه این پلهای نمکی شکل نگیرند (در گونه پاتولوژیکZ) پروتئین نمی‌تواند بدرستی ترشح شود و در نتیجه در سیسترنای شبکه اندوپلاسمی خشن[1] جمع می‌شود [۲و۳].

## ۱-۱-۲- جایگاه فعال[2] آلفایک آنتی تریپسین

جایگاه فعال $\alpha_1$AT بین اسید امینه‌های $Met^{358}$ و $Ser^{359}$ قرار گرفته و یک شاخه قلاب مانند دارد که از سطح مولکول بیرون می‌آید. این ساختار دارای تمایل بالائی برای جایگاه فعال الاستاز نوتروفیلی بوده و یک پیوند غیر کووالان بین دو مولکول شکل می‌گیرد. این میان کنش برای هر دو مولکول مخرب بوده [۴] پس از شکل گیری کمپلکس $\alpha_1$AT با سرین پروتئازها، $\alpha_1$AT در جایگاه لوپ واکنش دهنده با سرپین شکسته می‌شود و به فرم غیر فعال تغییر شکل می‌یابد.[۲۱] کمپلکس $\alpha_1$AT و الاستاز نوتروفیلی سریعاً توسط ماکروفاژها فاگوسیته می‌شود. در هر صورت $\alpha_1$AT در میان مهار کننده‌های الاستازی متعدد، مؤثرترین مهار کننده

1- Cisterna of the rough endoplasmic reticulum

2- Active site