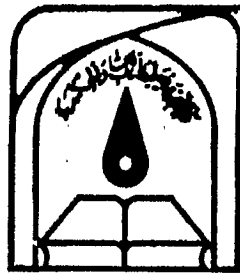


بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



پایان نامه کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی

موضوع

میان کنش LDL و فنوتیپهای MZ و MS آلفا-۱-آنتی تریپسین  
در سرم انسانی

استاد راهنما

دکتر عباس صاحبقدم لطفی

۱۳۸۲ / ۴ / ۵

اساتید مشاور

دکتر عبدالامیر علامه

دکتر افشین محسنی فر

وزارت بهداشت و درمان گیلان  
تعمیرات

نگارش

فریبا فرجی

تابستان ۱۳۸۱

۴۸۴۶۰

«فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان نامه کارشناسی ارشد»

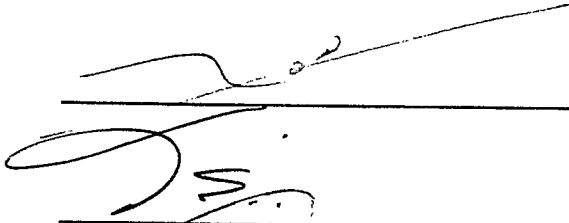
بدینوسیله پایان نامه کارشناسی ارشد خانم فریبا فرجی

رشته: بیوشیمی گرایش:

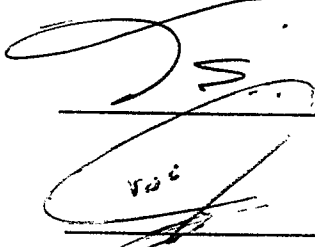
تقدیم می شود. اینجانبان نسخه نهائی این پایان نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تأیید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می کنیم.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

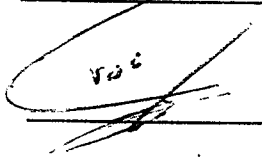
جناب آقای دکتر عباس صاحبقدم لطفی (استاد راهنما)



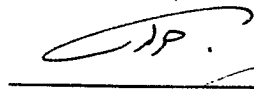
جناب آقای دکتر عبدالامیر علامه (استاد مشاور)



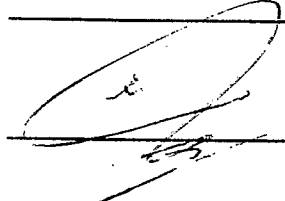
جناب آقای دکتر غلامعلی نادری (نماینده تحصیلات تکمیلی)

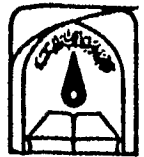


جناب آقای دکتر ابراهیم جوادی (استاد ناظر)



جناب آقای دکتر غلامعلی نادری (استاد ناظر)





بسمه تعالی

## آیین نامه چاپ پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

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

ماده ۲ در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:  
«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد / رساله دکتری نگارنده در رشته سوسم است که در سال ۸۱ در دانشکده علوم رسمی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی سرکار خانم / جناب آقای دکتر لغوی، مشاوره سرکار خانم / جناب آقای دکتر علازم و مشاوره سرکار خانم / جناب آقای دکتر سحیحی از آن دفاع شده است.»

ماده ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر صورت چاپ) را به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵ دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور اسبقای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

ماده ۶ اینجانب فرسا فرح دانشجوی رشته سوسم مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: فرسا فرح

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 راهنمایی‌های دلسوزانه و همکاریهای بیدریغ

۲- جناب آقای دکتر علامه برای مشاوره و همکاریهای فراوان

۳- جناب آقای دکتر رسائی بدلیل همکاری و راهنمایی 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 پروتئازهای مهم پلاسماست که دارای ۳۹۴ اسید 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<sub>100</sub>، آپوپروتئین موجود در LDL، دارای ۴۵۳۶ اسید آمینه و جرم مولکولی ۵۱۰ کیلودالتون می‌باشد. این آپوپروتئین هم در استحکام ساختمانی لیپوپروتئین اهمیت دارد و هم بعنوان یک واسطه در اتصال و برداشت LDL توسط بافتها عمل می‌کند.

مولکولهای آلفا - ۱ - آنتی تریپسین و apoB<sub>100</sub> که توسط کبد سنتز می‌شوند، می‌توانند در سرم به هم متصل شوند. این اتصال می‌تواند در برداشت LDL توسط بافتها تأثیرگذار باشد. کمپلکس LDL - AAT علاوه بر سرم، در پلاکهای تصلب شرائین نیز دیده شده است که این پدیده، نشان دهنده نقش این کمپلکس در آتروژنز می‌باشد. در مطالعه حاضر برای اثبات 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 کانادا) تعیین فنوتیپ شدند که ۱۸ نمونه دارای فنوتیپ MM و سه تای دیگر فنوتیپهای SZ, MZ, MS داشتند. سپس در این نمونه‌ها میزان LDL و سایر چربیها با روش آنزیماتیک و با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر RA - 1000 و فعالیت AAT سرم بروش اسپکتروفوتومتری و با استفاده از آنزیم تریپسین و سوبسترای BAPNA اندازه‌گیری شد. میانگین LDL نمونه‌های سرم  $158/5 \pm 29/2$  و میانگین TIC نمونه‌های سرمی برابر  $1 \pm 2/4$  محاسبه شد.

برای تأیید وجود کمپلکس LDL - AAT در نمونه‌های سرمی با LDL های مختلف و AAT های متفاوت نمونه‌ها به ۳ گروه جداگانه تقسیم و در هر گروه تشکیل کمپلکس LDL - AAT با استفاده از روش الیزای ساندویچی و با بکارگیری آنتی بادی ضد 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 الیزا جهت بررسی وجود کمپلکس میانگین چهار بار آزمایش می‌باشد.

بنابراین می‌توان اینچنین نتیجه‌گیری کرد که کمپلکس AAT - LDL در نمونه‌های 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 به ارتباط بین بیماری‌های قلب و کبد رهنمون شود.



## فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول - مقدمه و کلیات .....	۱
۱-۱- آلفایک آنتی تریپسین ( $\alpha_1AT$ ) .....	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- میکروهترورژنیته .....	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 اندازه گیری ( $\alpha_1AT$ ) در سرم .....	۱۱
۱-۱-۸-۱- تعیین فعالیت آنتی پروتئازی $\alpha_1AT$ در سرم .....	۱۱
۱-۱-۸-۲- اندازه گیری غلظت $\alpha_1AT$ در سرم .....	۱۲
۱-۱-۹- روشهای تعیین اللهای آلفایک آنتی تریپسین .....	۱۲

- ۱-۱-۱۰-۱ تشخیص‌های قبل از تولد نقص  $\alpha_1AT$  ..... ۱۳
- ۱-۲-۱ لیپوپروتئینها ..... ۱۴
- ۱-۳-۱ آپولیپوپروتئینها ..... ۱۵
- ۱-۴-۱ لیپوپروتئین با چگالی کم ..... ۱۶
- ۱-۵-۱-۱ ساختار apoB ..... ۱۶
- ۱-۵-۲-۱ حلالیت apoB<sub>100</sub> ..... ۱۷
- ۱-۵-۳-۱ ساختمان دوم apoB<sub>100</sub> ..... ۱۷
- ۱-۵-۴-۱ دومنهای متصل به لیپید apoB<sub>100</sub> ..... ۱۸
- ۱-۵-۵-۱ مدل پنج قسمتی ..... ۱۸
- ۱-۵-۶-۱ مشابهت‌های apoB<sub>100</sub> و پروتئین لیپو و تیلین ..... ۱۹
- ۱-۵-۷-۱ دومنهای اتصال به رسپتور ..... ۲۰
- ۱-۵-۸-۱ سنتز apoB ..... ۲۰
- ۱-۵-۹-۱ اتصال پروتئین به لیپید ..... ۲۱
- ۱-۶-۱ بیماری آبتالیپوپروتئینمیا ..... ۲۱
- ۱-۷-۱ ذره شبه HDL ..... ۲۲
- ۱-۸-۱ کاتابولیسم LDL و apoB<sub>100</sub> ..... ۲۲
- ۱-۹-۱ نقش apoB و LDL در بیماریهای قلبی ..... ۲۳
- ۱-۱۰-۱  $\alpha_1AT$  و بیماریهای قلبی ..... ۲۶

۱۱-۱- تشکیل کمپلکس $\alpha_1AT$ و LDL	۲۷
<b>فصل دوم - مواد و روشها</b>	
۱-۲- نمونه گیری از بیماران و نگهداری نمونه‌ها	۳۰
۲-۲- اندازه‌گیری پروفایل لیپیدی	۳۱
۱-۲-۲- اندازه‌گیری تری گلیسرید سرم	۳۱
۲-۲-۲- اندازه‌گیری کلسترول سرم	۳۳
۳-۲-۲- اندازه‌گیری کلسترول HDL سرم	۲۵
۴-۲-۲- محاسبه کلسترول LDL سرم	۳۶
۳-۲- اندازه‌گیری فعالیت $\alpha_1AT$ سرم	۳۶
۴-۲- تعیین فنوتیپ $\alpha_1AT$ سرم بروش الکتروفورز کانونی بر روی ژل اکریلامید	۳۹
۱-۴-۲- آماده سازی شرائط آزمایش	۳۹
۲-۴-۲- انجام عمل الکتروفورز کانونی	۴۲
۳-۴-۲- رنگ آمیزی و رنگ زدائی ژل	۴۲
۴-۴-۲- خشک کردن و نگهداری ژل	۴۳
۵-۴-۲- تعیین فنوتیپ نمونه‌های مجهول	۴۳
۶-۴-۲- تعیین نواحی باندهای الهای $\alpha_1AT$	۴۳
۵-۲- شناسائی کمپلکس LDL- $\alpha_1AT$ بوسیله تست الایزا	۴۴

۵۰	فصل سوم - نتایج
۵۱	نتایج اندازه‌گیری لیپیدها، TIC، فتوتایپینگ و تست الیزا
۶۰	ژل الکتروفورز کانونی نمونه‌های سرم
۶۱	ژل الکتروفورز کانونی استانداردهای $\alpha_1AT$
۶۲	منحنی‌های چکر بورد در تست الیزا
۶۵	فصل چهارم - بحث و پیشنهادات
۷۱	منابع

فصل اول

مقدمه و کلیات



ساختمان ثانویه این پروتئین هشت ناحیه آلفاهلیکس و سه ناحیه صفحات چین دار بتا وجود دارد [۲۶و۲۵،۲].

۲۰ اسید آمینه 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 هتروژنیسی الکتروفوریتیک شرکت کند [۳و۲].

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 [۲۶و۲۵،۲،۳].

یک بخش مهم از ساختمان پروتئین، پلهای نمکی است:  $\text{Glu}^{342}\text{-lys}^{290}$  و  $\text{Glu}^{264}\text{-lys}^{387}$  در صورتیکه این پلهای نمکی شکل نگیرند (در گونه پاتولوژیک Z) پروتئین نمی‌تواند بدرستی ترشح شود و در نتیجه در سیستمهای شبکه اندوپلاسمی خشن<sup>۱</sup> جمع می‌شود [۳و۲].

### ۱-۱-۲- جایگاه فعال<sup>۲</sup> آلفایک آنتی تریپسین

جایگاه فعال  $\alpha_1\text{AT}$  بین اسید آمینه‌های  $\text{Met}^{358}$  و  $\text{Ser}^{359}$  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 منخرب بوده [۴] پس از شبکل گیری کمپلکس  $\alpha_1\text{AT}$  با سرین پروتئازها،  $\alpha_1\text{AT}$  در جایگاه لوپ واکنش دهنده با سرین شکسته می‌شود و به فرم غیر فعال تغییر شکل می‌یابد. [۲۱] کمپلکس  $\alpha_1\text{AT}$  و الاستاز نوتروفیلی سریعاً توسط ماکروفاژها فاگوسیتیه می‌شود. در هر صورت  $\alpha_1\text{AT}$  در میان مهار کننده‌های الاستازی متعدد، مؤثرترین مهار کننده

1- Cisterna of the rough endoplasmic reticulum

2- Active site