

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

991۴

دانشگاه تهران

دانشکده داروسازی

پایان نامه:

برای دریافت درجه دکتری

موضوع:

اندازه‌گیری AFP در سرم بیماران مبتلابه‌های توم

باروش Enzym Immuno Assay و مقایسه

با سایر روشها

براهنمائی:

استادارجمندخانم دکترماهرومیراحمدیان

نگارش:

ماحب‌مشهدی

شماره پایان نامه:

سال تحصیلی: ۱۳۶۴-۶۵

۹۹۱۳

تقدیم به :

استاد ارجمند خانم دکتر ما هر و میرا حمدیان که مشوق و  
راهنمای من در تدوین این رساله بوده اند .

تقدیم به :

اعضاء هیئت محترم قضات .

۱- آقای دکتر عبدالحسین کیهانی

۲- آقای دکتر سیدرضا مرتضوی

تقدیم به :

پدر و مادرم .

تقدیم به :

همسر عزیزم که در تمام مراحل زندگی و تحصیل صمیمانه

مرا یاری نمودند .

تقدیم به :

فرد و فرزند

عزیزم .

## فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱	مقدمه
۳	تومورهای بدخیم کبد
Hepato cellular carcinoma	کارسینوم هیپاتوسلولار
۴	عوامل موثر در پیدایش کارسینوما هیپاتوسلولار
۷	آلفا فتوپروتئین Alfa feto Proteine
۱۰	خصوصیات فیزیکی AFP
۱۲	ساختار پروتئینی AFP
۱۴	ترکیب آمینواسیدهای آلفا فتوپروتئین های مختلف
۱۸	سنتز آلفا فتوپروتئین
۲۰	متابولیسم و بیولوژی نرمال آلفا فتوپروتئین در حاکم ملی
۲۴	روش جمع آوری نمونه
۲۵	روشهای اندازه گیری AFP
۲۶	روش راکنت ایمنوالکتروفورز Racket Immuno electrophoresis
۳۰	روش رادیو ایمنو ساسی Radio Immuno Assay

فهرست مطالب

<u>صفحه</u>	<u>عنوان</u>
۳۵	روش آنزیم ایمنواسای Enzym Immuno Assay
۴۷	نتیجه
۵۰	پرسشنامه مربوط به بیماران هپاتوم
۵۴	پرسشنامه مربوط به بیماران هپاتیت و سیروتیک
۵۷	پرسشنامه مربوط به افراد سالم
۶۰	محاسبات آماری
۶۵	بحث
۸۰	خلاصه

مقدمه :

### اهداف تحقیق حاضر

الفافتوپروتئین یک گلیکوپروتئین است که در صفحات آیین شده این پایان نامه به تفصیل خواص شناخته شده این پروتئین که توسط پژوهشگران مختلف تحقیق و بررسی گردیده است ، مورد بحث و تفسیر قرار میگیرد .

سنتز AFP توسط کبد جنین آغاز میشود و پس از آن نیز کیسه زرده آنرا سنتز مینماید . طبق تحقیقات انجام شده روشن گردیده که سلولهای سرطانی کبد از نظر تولید AFP ما نند سلولهای کبد جنین عمل مینمایند .

سرطان اولیه کبدیا Hepato cellular carcinoma تولید الفافتوپروتئین را با لانموده و میزان آنرا افزایش میدهد که اندازه گیری این پروتئین در سرم بیماران مذکور از نظر تشخیص هیاتوم بسیار مفید میباشد<sup>X</sup> . در برخی از بیماران مبتلابه بیماریهای مزمن کبدی مانند سیروز و هیپاتیت مزمن نیز غلظت سرمی AFP با درصد کمتری نسبت به بیماران هیاتوم بالامی رود . بعلاوه اندازه گیری AFP بعد از عمل جراحی برداشت تومور هیپاتوکتومی ارزش تشخیصی دارد . بطوریکه غلظت بالای

آن بعد از عمل جراحی نشانه عدم موفقیت و سیر صعودی آن تا چند ماه بعد از عمل نشانه متاستاز می باشد.

هدف از مطالعه ما بررسی و اندازه گیری الفافتوپروتئین در سرم بیماران

مبتلابه سرطان اولیه کبد قبل از عمل جراحی برداشت تومور و بعد از

آن و هنگام مصرف داروهای ضد تومور و همچنین در بیماران مبتلابه سیروز

و هیپاتیت و افراد سالم با روش Enzym Immuno Assay و

مقایسه این روش با روشهای دیگر مانند

Rocket Immuno electro phoresis

Radio Immuno Assay



تومورهای بدخیم کبد

کارسینوم هیاتوسلولار (هیاتوما): Hepato cellular carcinoma

کارسینوم هیاتوسلولار که بنام سرطان اولیه کبد معروف است حدود

۹۰-۸۰٪ کل تومورهای کبد را تشکیل میدهد.

این بیماری در مردها بیشتر دیده میشود و نسبت آن در زنان  $\frac{1}{4}$  مردان

میباشد. بیشتر از کبد سیروتیک منشاء میگیرد. بنظر میرسد که خطر ابتلا

در سیروز همراه با هماکروما توم همچنین در عفونت ویروسی از نوع هیاتیت

B زیاد و در سیروز صفراوی اولیه و بیماری ویلسون کم تر میباشد. در سیروز

الکلیک و کریپتوزونیک متوسط است.

شواهد زیادی وجود دارد که هیاتیت B مزمن ممکن است زمینه‌ای جهت

کارسینوم هیاتوسلولار فراهم آورد. و پیدایش کارسینومای هیاتوسلولار

در نژاد فرادیکه مبتلا به هیاتیت ویروسی HBS مبتلا بوده اند

بیشتر از افراد دیگر است. بطوریکه در نژاد این افراد ۲۰٪ بیشتر از سایرین

گزارش شده است. (۲۳).

مکانیسم که سبب این تصور میشود اینست که در بافت یا سلولهای کارسینومای هیپاتوسلولار انسان رشته‌های به‌همان نظم و ترتیب DNA ویروس نشان داده شده است. محققین مانند Alberto maringhini و Mario cotton و دیگر محققین در سالهای اخیر مطالعات گسترده‌ای در مورد عده‌ای از بیماران مبتلابه هیپاتوم انجام داده‌اند که طی آن نشان داده شده که ۸۰٪ کارسینوم هیپاتوسلولار در بیماران پیدا شده است که قبلاً مبتلابه هیپاتیت ویرال بوده‌اند. نیز از موارد ابتلا ۱۷٪ در رابطه با سیروز الکلی بوده است. (۱-۲۳).

محققین اظهار میدارند که چون سیروزیک فاکتور بسیار مهم و خطرناک در پیدایش هیپاتوم میباشد لذا غلظت‌های بالاتر از AFP 500 mg/ml در افراد سیروتیک یک تست تقریباً " مطمئن و ارزشمند برای تشخیص بیماران سیروزی که بطرف هیپاتوم پیش میروند می باشد که تاکنون حدود ۸۵٪ بین موارد گزارش شده است. (۲۳ و ۲۲).

همچنین بر طبق شواهد اپیدمیولوژیک رابطه‌ای بین کارسینومای هیپاتوسلولار و مصرف ( افلاتوکسین ها ) - میکوتوکسین های حاصله از قارچ اسپرزیلیوس فلاووس، قارچی که در مناطق گرم و مرطوب رشد کرده و میوه‌های هسته‌دار

و غلات ذخیره شده را آلوده میسازد گزارش شده است . ( ۲۳ ) .

گزارشات موارد گوناگون از این بیماری نیز گواه بر وجود رابطه بین  
 کارسینومای هیپاتوسلولار و فقر الفایک آننتی تریپسین و مصرف  
 استروئیدهای آندروژنیک و احتمالاً " استروئیدهای استروژنیک که بشکل  
 کنتراسپتیوهای خوراکی است وجود دارد . ( ۲۳ ) .

عوارض ناشی از درمان ایتروژنیک که از میان آنها دی اکسیدتوریسم  
 را میتوان نام برد ، که این ماده کاربرد وسیعی در رادیولوژی داشته است .  
 این ماده در کبد ذخیره شده و به مقدار بسیار کم تجزیه میشود و باعث التهاب  
 مزمن کبدی و هیپاتوم میشود .

در مورد سیر بیماری کشنده است اما اگر بیماران و از سلامت عمومی برخوردار  
 باشند میتوان ضایعات کبدی را بوسیله عمل جراحی برداشت توموریسم  
 هیپاتوکتومی از بین برد .

افزایش صعودی میزان AFP پس از برداشتن تومور حاکی از باقی ماندن یا  
 عود آنست .

هیپاتوم ممکن است برای مدت کوتاهی به شیمی درمانی سیستمیک جواب  
 بدهد .

پیوند کبد نیز در معالجه سرطان کبد بکار رفته است ولی عودت مورهـــــــــــــــــا  
و شایع بودن متاستاز پس از پیوند باعث شده این روش کمتر مورد استفاده قرار

بگیرد. (۲۳).

الفافتوپروتئین      Alfa feto Proteine :

---

مقدمه و تاریخچه کشف :

الفافتوپروتئین در ۱۳ سپتامبر ۱۹۴۴ توسط Kaio pedersen

کشف گردید. نامبرده مطالعاتی بر روی پروتئین های سرم با استفاده از سولفات آمونیوم و سانتریفوز با دور بالا انجام داد و پروتئینی با وزن ملکولی ۵۰۰۰۰ را گزارش کرد.

تجارب انجام شده بر روی سرم جنین گاو آن زمان نشان داد که حاوی گلیکوپروتئینی بنام فتوئین میباشد که مشتق از نام لاتین Fetus به معنی جنین میباشد.

بعدا " ملاحظه شد که سرم جنین انسان نیز حاوی الفاکلوبولینی است که ظاهرا " در سرم افراد بالغ نرمال دیده نمیشود. در سال ۱۹۵۶ با استفاده از روش الکتروفورزیک پروتئین جدید را در سرم جنین چند هفته ای یافتند که باند آن بین آلبومین و الفاکلوبولین قرار داشت. در حالیکه این پروتئین در سرم مادر دیده نمی شد. این ماده پروتئین X نامیده شد. در سال ۱۹۶۵ آنرا فتوپروتئین و از سال ۱۹۶۹ به بعد بنام الفافتوپروتئین بنام

اختماری AFP نامیده شد. نامهای دیگر این پروتئین F کلبولین و  $\alpha_2$  فتوپروتئین و  $\alpha_1$  فتوگلبولین و پروتئین F میباشد.

در سال ۱۹۶۳ دانشمندان برای اولین بار وجود یک پروتئین را در سرم سرطان موش گزارش نمودند که در سرطان اولیه کبد انسان نیز دیده شد. و با آزمایش ایمونوالکتروفورز مشخص گردید که همان AFP است. سپس از آن توانستند توسط Radial Immuno diffusion غلظتهای بیشتری از پروتئین مذکور در سرم بیماران مبتلابه سرطان اولیه کبد جستجو کنند. در مطالعات بعدی و با استفاده از تکنیک های جدید مثل اتورادیو-گرافی و هماگلوตินاسیون وجود AFP را در سرم بیماران با حساسیت بیشتری گزارش کردند. (۳).

Abelev و همکارانش در سال ۱۹۷۱ آلفا فتوپروتئین را در سرم زنان حامله و بیماران کبدی پیدا نمودند. حضور AFP در دوران حاملگی توسط Albert, Zuekerman, Boesman گزارش شده بود سپس Seppala و Ruoslathi موفق به جداسازی و شناسایی AFP

جنین شدند و در مورد بیماران کبدی نیز گزارشات بیشتری انتشار یافت.

روشی که جهت اندازه گیری AFP توسط Seppala و Rouslati

بکار گرفته شد، روش Radio Immuno Assay ~~بشود~~.

و مقادیر خیلی جزئی را نیز در سرم اشخاص بالغ طبیعی به اثبات رسانیدند.

AFP یکی از چندین پروتئین ویژه دوران جنین است و در روزهای

اول زندگی جنین در حالیکه آلبومین و ترانسفرین هنوز به مقادیر جزئی

در سرم وجود دارد بعنوان پروتئین اصلی مطرح می باشد. (۱۹ و ۱۸).

محل سنتز آن در ماههای اول و دوم در کبده زرده و کبد است اما از ماه

دوم به بعد تنها کبد آنرا می سازد و مقدار جزئی AFP توسط دستگاه معدی

- روده ای جنین انسانی تولید می شود. (۲۵ و ۲۵).

که در مقایسه با میزان سنتز آن در کبد بسیار کم است. در بعضی از جنین ها

AFP بمقدار جزئی توسط کلیه و جفت تولید می گردد. (۴ و ۱۹ و ۱۸):