مجله علوم آزمایشگاهی،دوره اول(شماره ۱)، بهاروتابستان۱۳۸٦

تحقیقی

مقایسه سطح سرمی آلفا-۱-آنتی تریپسین (AAT) با سه روش آنزیمی، الکتروفورز و ایمونودیفیوژن

محسن محمدیان یاجلو
گروه بیوشیمی بالینی دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی تهران

عباس صاحبقدم لطفی
گروه بیوشیمی بالینی دانشکده
پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

مهرداد نصراله زاده ثابت
دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

نغمه ژاله جو
گروه بیوشیمی بالینی دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی ایران

مرضیه امیریان
مرکز تربیت معلم کرمانشاه

مریم بیگلرزاده
مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم
دانشگاه علوم پزشکی تهران

نویسنده مسئول: محسن محمدیان یاجلو
تلفن: ۰۹۱۲۲۹۵۲۹۱۶
پست الکترنیک: mohammadian@razitums.ac.ir
آدرس: دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

وصول مقاله:۸۶/۲/۱۷
اصلاح نهایی:۸۶/۴/۱۰
پذیرش مقاله:۸۶/۵/۳

چکیده

زمینه و هدف: *کمبودآلفا-۱- آنتی تریپسین (AAT) با بیماری‌های ریوی، کبدی و چندین اختلال دیگر همراه است. به همین دلیل این پروتئین دارای اهمیت بالینی بوده ، ارزیابی سرمی دقیق آن از دیدگاه تشخیصی مهم می باشد. در این مطالعه سطح سرمی AAT با سه روش الکتروفورز استات سلولز(CAE)، ظرفیت مهاری تریپسین(TIC) و ایمونودیفیوژن شعاعی(SRID) ارزیابی و نتایج حاصله مقایسه شد.*

روش بررسی: *۳۱۸ نمونه سرم از دانشجویان داوطلب خوابگاههای دانشگاههای تهران تهیه و میزان AAT آن با سه روش CAE، SRID و TIC ارزیابی شد.*

یافته ها: *در روش TIC، SRID و CAE به ترتیب ۳۴، ۸۴ و ۱۱۲ نمونه غیر طبیعی بود. ۲۰۱ نمونه با هر دو روش TIC و CAE در محدوده طبیعی و ۲۹ نمونه غیرطبیعی بود. ۸۳ نمونه با روش TIC طبیعی و با روش CAE غیرطبیعی و ۵ نمونه با روش TIC غیرطبیعی و با روش CAE طبیعی بود. ۲۲۷ نمونه با هر دو روش TIC و SRID طبیعی و ۲۷ نمونه غیرطبیعی بود. ۵۷ نمونه با TIC طبیعی و با SRID غیرطبیعی و ۷ نمونه با TIC غیرطبیعی و با SRID طبیعی بود. نتایج ارزیابی AAT نشان داد که روش های CAE و SRID در مقایسه با TIC به ترتیب حساسیت ۷۰٪ و ۸۳٪ و ویژگی ۸۵٪ و ۹۰٪ دارند.*

نتیجه گیری: *هر چند روش CAE و تعیین درصد باند آلفا-۱ گلوبولین روشی رایج در آزمایشگاههای بالینی است ، از ویژگی و حساسیت بالایی برای ارزیابی AAT برخوردار نمی باشد. روش SRID نیز با اینکه نسبت به روش CAE از ویژگی و حساسیت قابل توجهی برخوردار است ویژگی و حساسیت آن کمتر از روش TIC است. بنابراین روش TIC به عنوان روش ارجح برای ارزیابی AAT سرمی توصیه می گردد.*

واژه های کلیدی: *آلفا-۱-آنتی تریپسین، الکتروفورز استات سلولز، ایمونودیفیوژن شعاعی، ظرفیت مهاری تریپسین*

مقدمه

آلفا-۱-آنتی تریپسین (AAT) یک گلیکوپروتئین تک زنجیری با ۳۹۴ اسید آمینه است که به طور غالب در کبد سنتز می شود (۱،۲). این پروتئین بعنوان داروی جایگزین نقش مهمی در درمان کمبود AAT دارد(۳). مهمترین عمل فیزیولوژیک AAT مهار الاستاز نوتروفیل در مجرای تنفسی تحتانی است. کمبود AAT موجب مختل شدن این عملکرد مهاری و تخریب بافت همبند آلوئولی می شود و آمفیزم را به دنبال دارد (۷-۴). همچنین کمبود این پروتئین با افزایش خطر بیماریهای کبدی و چندین بیماری دیگر همراه است (۱۱-۸). به همین دلیل AAT دارای اهمیت بالینی است و اندازه گیری صحیح و دقیق آن در آزمایشگاه بالینی ضروری می باشد. در این مطالعه AAT سرمی ۳۱۸نمونه افراد سالم با سه روش-الکتروفورزی(CAE)،آنزیمی(TIC)وایمونودیفیوژن(SRID) ارزیابی شد و ویژگی و حساسیت این روشها مورد مقایسه قرار گرفت.

روش بررسی

جمع آوری نمونه ها: در سطح معنی داری ۵ درصد با قبول خطای تقریبی ۳ درصد تعداد ۳۱۸ نمونه سرم از دانشجویان داوطلب ساکن در خوابگاههای دانشگاههای تهران اخذ شد. نمونه گیری فقط از مردان ۲۰-۲۵ ساله، فاقد هرگونه تاریخچه پزشکی و غیر سیگاری انجام گرفت , سطح AAT سرم افراد سیگاری کمتر از افراد غیر سیگاری است (۱۳،۱۲،۱). براساس نسبت دارندگان واریانتهای طبیعی AAT در کل جمعیت که طبق مطالعات انجام یافته در کشورهای مختلف، (۱۴) حدود ۹۰ درصد است حجم نمونه ۳۸۴ به دست آمد. اما به دلایل مختلف، مثل همولیز، تعدادی از نمونه ها کنار گذاشته شد. در نهایت تعداد ۳۱۸ نمونه راآزمایش کردیم. به همین دلیل میزان خطای این مطالعه کمی بیشتر از ۳ درصد (۳/۳ درصد) می باشد.

الکتروفورز استات سلولز: در این مطالعه از الکتروفورز استات سلولز هلنا (Helena) استفاده شد.

۲- ۳میکرولیترسرم توسط اپلیکاتور مربوطه به استریپ استات سلولز (که قبلا ۲۰ دقیقه در بافر بوده است) اضافه گردید و الکتروفورز به مدت پانزده دقیقه در ولتاژ ۱۸۰ انجام داده شد. غشاهای استات سلولز با استفاده از مخلوط حلالی شامل ۹۵ قسمت متانول و ۵ قسمت اسید استیک گلاسیال، شفاف و برای دانسیتومتری آماده شد. بیش از ۹۰ درصد باند آلفا-۱ گلوبولین پروتئینهای سرم را AAT تشکیل می دهد. بنابراین درصد باند آلفا-۱ می تواند معیار قابل قبولی از غلظت AAT در سرم طبیعی باشد. سرعت جداسازی و قابلیت نگهداری غشاهای شفاف به مدت طولانی از مزایای الکتروفورز استات سلولز می باشد (۱۵).

ایمونودیفیوژن شعاعی: سرم کنترل و سرم مجهول به چاهکهای ژل آماده کیت SRID (واجد آنتی بادی اختصاصی AAT) اضافه گردید و قطر حلقه رسوبی بعد از ۲۸-۲۴ ساعت اندازه گیری شد. در هر کیت استانداردهای با غلظت مشخص به کار رفت و در نهایت غلظت AAT سرم مجهول (برحسب میلی گرم در دسی لیتر) از روی منحنیهای استاندارد به دست آمد (۱۶).

ظرفیت مهاری تریپسین: AAT هیدرولیز سوبسترای آلفا-N-بنزوئیل-DL-آرژنین-P-نیتروآنیلید (BAPNA، سیگما) با تریپسین در بافر تریس را مهار می کند. واکنش با اضافه کردن اسید استیک متوقف و جذب در ۴۰۰ نانومتر خوانده شد. سپس فعالیت AAT از روی فرمول $TIC=7000/10.5 \times \Delta A/X.Y$ محاسبه شد،که در آن TIC؛ ظرفیت مهاری تریپسین بر حسب میکرومول در دقیقه در میلی لیتر، ۷۰۰۰؛ کل حجم محتوی هر لوله آزمایش بر حسب میکرولیتر، ۱۰/۵؛ ضریب خاموشی محصول واکنش تریپسین و BAPNA بر حسب میلی مولار، ΔA؛ تفاضل بین جذب لوله محتوی نمونه و لوله کنترل (آلبومین)، X؛ حجم اولیه سرم رقیق شده و Y مدت زمان آزمایش (ده دقیقه) است (۱۶).

یافته ها

نتایج آنالیز AAT با سه روش TIC، CAE و SRID در جدول یک آمده است. ۲۰۱نمونه با هر دو روش TIC و CAE در محدوده طبیعی و ۲۹ نمونه با هر دو روش خارج از محدوده طبیعی بود. ۸۳نمونه با روش TIC، طبیعی و با روش CAE، غیر طبیعی و برعکس پنج نمونه با روش TIC، غیرطبیعی و با روش CAE، طبیعی بود. همچنین ۲۲۷ نمونه با هر دو روش TIC و SRID در محدوده طبیعی و ۲۷ نمونه با هر دو روش غیرطبیعی بود. ۵۷ نمونه با استفاده از TIC، طبیعی و با استفاده از SRID،

غیرطبیعی بود. در حالی که تنها هفت نمونه با TIC، غیرطبیعی و با استفاده از SRID، طبیعی بود (جدول ۲).

جدول ۱. نتایج آنالیز آلفا-۱- آنتی تزیپسین سرم دانشجویان پسر با سه روش CAE.TIC وSRID

روش / موارد آنالیز	TIC	CAE	SRID
تعداد نمونه آزمایش شده	۳۱۸	۳۱۸	۳۱۸
دامنه طبیعی واحد اندازه گیری	۲/۱-۳/۵ µmol/min/ml	۲-٤/٥ درصد	۱۲٦-۲۲٦ mg/dl
تعداد نتایج طبیعی	۲۸٤	۲۰٦	۲۳٤
تعداد نتایج غیر طبیعی	۳٤	۱۱۲	۸٤
میانگین نتایج	۲/٤۰	۲/۸٥	۱۷٦/٥۰

جدول ۲. مقایسه تعداد نتایج طبیعی و غیر طبیعی روش های CAE و SRID با روش TIC

TIC	CAE		SRID	
	طبیعی	غیر طبیعی	طبیعی	غیر طبیعی
طبیعی	۲۰۱	۸۳	۲۲۷	۵۷
غیر طبیعی	۵	۲۹	۷	۲۷

بحث

به دلیل اهمیت بالینی کمبود AAT و نیز کاربرد وسیع آن در درمان بیماری، تعیین دقیق غلظت سرمی AAT فوق العاده مهم است. به همین دلیل روش‌های دارای ویژگی و حساسیت بالا برای اندازه گیری سرمی این مهارکننده مورد نیازند. روشهای مختلفی برای این منظور ابداع و توسعه یافته اند. الکتروفورز استات سلولز قدیمی ترین روش جداسازی پروتئینهای سرم محسوب می شود (۱۵). TIC و SRID روشهای جدید تری هستند (با حدود ۳۰ سال قدمت) که امروزه برای اندازه گیری غلظت AAT به کار می روند (۱۶). روش SRID بیشتر در تعیین AATعملکردی (Functional AAT) مورد توجه بوده و واکنش پذیری ایمونولوژیکی AAT را نشان می دهد (۱۶). در این مطالعه میزان AAT سرمی ۳۱۸ نمونه سرم که از دانشجویان خوابگاههای دانشگاههای تهران گرفته شده بود با سه روش فوق مورد مقایسه قرار گرفت. در روش الکتروفورز ۱۱۲ نمونه و در روش ایمونودیفیوژن ۸۴ نمونه باند آلفا-۱ غیر طبیعی داشتند. در حالی که در روش TIC تنها ۳۴ نمونه غیر طبیعی بود (جدول ۱). موارد غیر طبیعی با در نظر گرفتن دامنه طبیعی قابل قبول هر روش مشخص شده اند و لزوما موارد غیر طبیعی بالینی نیستند. چراکه تمامی نمونه ها از افراد سالم، غیر سیگاری و فاقد هرگونه تاریخچه پزشکی اخذ شده است. این مطالعه نشان داد که روش‌های CAE و SRID در مقایسه با TIC به ترتیب حساسیت ۷۰درصد و ۸۳درصد و ویژگی۸۵درصدو ۹۰درصد دارند. در اینجا طبیعی یا غیر طبیعی بودن نتایج در هر روش مورد مقایسه قرار گرفته است.

نتایج در روش TIC به صورت میکرومول در دقیقه در میلی لیتر (µmol/min/ml)، ولی در SRID به صورت میلی گرم در دسی لیتر (mg/dl) گزارش می شود ،(۱۶،۱۵) که اعداد حاصله قابل مقایسه باهم نیستند اما این نتایج از نظر طبیعی یا غیر طبیعی بودن می توانند باهم مقایسه شوند. به عنوان مثال زمانی که AAT یک نمونه با روش TIC، 3.25 µmol/min/ml گزارش می شود، با توجه به محدوده طبیعی قابل قبول روشTIC (2.1-3.5 µmol/min/ml)، AAT آن نمونه طبیعی است.

همچنین زمانی که AAT همین نمونه با روش SRID، 300 mg/dl گزارش می شود با توجه به محدوده طبیعی قابل قبول روش SRID (126-226 mg/dl)، AAT آن غیر طبیعی است. در اینجا هر چند 3.25 با 300 قابل مقایسه نیست اما می توانیم بگوییم نمونه فوق با روش TIC، طبیعی و با روش SRID، غیر طبیعی گزارش شده است.

نتیجه گیری: ما نتیجه گرفتیم که روش CAE برای اندازه گیری سرمی AAT مطمئن نیست واز این روش تنها می توان برای غربالگری، استفاده کرد. همچنین روش SRID ، هر چند از ویژگی و حساسیت قابل توجهی نسبت به روش CAE برخوردار است ، ویژگی و حساسیت آن کمتر از روش TIC می باشد و این روش بیشتر در تعیین AAT عملکردی مورد توجه است.

REFERENCES

1) Raja TA. *Alpha$_1$-antitrypsin deficiency*. *Respiratory Medicine*: COPD Update. 2006; 1: 80–87.

2) Hashemi M, Naderi M, Rashidi H, Ghavami S. *Impaired activity of serum alpha-1-antitrypsin in diabetes mellitus*. Diabetes Research and Clinical Practice. 2007;75(2):246-8.

3) Coan MH, Brockway WJ, Eguizabal H, Krieg T, Fournel M.*Preparation and properties of alpha-1-proteinase inhibitor concentrate from human plasma.* Vox.Song. 1985; 48(6): 333-42.

4) Yajloo M.M, Lotfi A.S, et al. Rapid α-1-*antitrypsin M-variant Genotyping by Primer-induced Restriction Analysis*. Diagn. Mol. Pathol. 2007; 16(1): 54-56.

5) Topic AS, Jelic-Ivanovic ZD, Spasojevic-Kalimanovska VV, Spasic *SM. Association of Moderate Alpha-1 Antitrypsin Deficiency with Lung Cancer in the Serbian Population.* Archives of Medical Research. 2006; 37: 866-870.

6) Travis J, Salvesen GS. *Human plasma proteinase inhibitors*. Annu.Rev.Biochem. 1983; 52: 655-709.

7) Brantly ML, Paul LD, Miller BH, Falk RT, Wu M, Cristal RG. *Clinical features and history of the destructive lung disease associated with alpha-1-antitrypsin deficiency of adults with pulmonary symptoms*. Am.Rev.Respir.Dis. 1988; 138: 327-36.

8) Van Veen IH, Brinke AT, Linden AC, Rabe KF, Bel EH. *Deficient alpha-1-antitrypsin phenotypes and persistent airflow limitation in severe asthma*. Respiratory Medicine. 2006; 100: 1534–1539.

9) Ronald G. *Alpha-1-antitrypsin deficiency, Emphysema and Liver disease; Genetic Basis and Strategies for therapy*. J.Clinical.Investigation. 1990; 85: 1343-52.

10) Loche F, Tremean C, Laplanche G. *Panniculitis reveling qualitative alpha-1-antitrypsin deficiency(MS variant).* Eur.J.Dermatol. 1999; 9: 565-7.

11) Cox DW. *Alpha-1-antitrypsin deficiency. The metabolic and molecular bases of inherited disease.* 1995; 3: 4125-58.

12) Janciauskione S. *Conformational properties of serine proteinase inhibitors (serpins) confer multiple pathophysiological roles*. Biochimica et Biohpysica Acta. 2001; 1535: 221-35.

13) Stavngaard T, Shaker SB, Dirksen A. *Quantitative assessment of emphysema distribution in smokers and patients with a1-antitrypsin deficiency*. Respiratory Medicine. 2006; 100: 94–100.

۱۴. صاحبقدم لطفي عباس، محمديان ياجلو محسن و همكاران. فراوانی واريانت‌های M_1، M_2، M_3، S و Z آلفا-۱-آنتی‌تريپسين در جامعة ايراني، مجله علمي دانشگاه علوم پزشكي رفسنجان، جلد چهارم، شماره اول، صفحه ۴۰-۳۵، زمستان ۱۳۸۳.

15) Zak B, Baginski E, Epstain E. *Associated problems of protein electrophoresis, staining and densitometry*. Ann.Clin.Lab.Sci. 1978; 8: 385-95.

16) Albert A, Hurbert M. *Measurement of Alpha-1-antitrypsin in serum, by immunodiffusion and by enzymatic assay*. Clinical chemistry. 1974; Vol.20. No.3.