

مقایسه فعالیت مهارای تریپسین در سرم بیماران هیپرتیروئیدی و گروه شاهد (Euthyroid)

علیرضا خیرالله *

چکیده:

آلفا-۱-آنتی تریپسین ($\alpha 1$ -AT) یک $\alpha 1$ - پروتئازمهارای و جزء پروتئینهای مرکب از نوع گلیکوپروتئین و از لحاظ عمل جزو خانواده مهارکننده های پروتئازهای سربینی (Serpin) می باشد. تاکنون گزارشات فراوانی در خصوص کاهش مقادیر پلاسمائی $\alpha 1$ -AT به همراه بیماریهایی مانند آمفیژم، ناراحتیهای پوستی، سیروز کبدی بالغین ... و هیپوتیروئیدی منتشر شده است. در بیماران هیپوتیروئیدی به همراه کاهش T_3 کاهش معنی داری در مقدار $\alpha 1$ -AT و در نتیجه (TIC) (Trypsin Inhibitory Capacity) ایجاد می شود بنابراین در هیپرتیروئیدی می توان انتظار داشت که بموازات افزایش T_3 افزایشی هم در مقدار $\alpha 1$ -AT و TIC مشاهده شود.

در این مطالعه تغییرات TIC در بیماران هیپرتیروئیدی در مقایسه با گروه کنترل مورد بررسی و تحقیق قرار گرفت مجموعاً روی ۷۲ نمونه اندازه گیری صورت گرفت و با استفاده از آزمون t و تعیین ضریب همبستگی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

بر اساس نتایج حاصله معلوم شد که ظرفیت مهارای تریپسین (TIC) در بیماران هیپرتیروئیدی ($n=42$) در مقایسه با گروه کنترل ($n=30$) افزایش می یابد. ($n=30$, TIC = $1/87 \pm 0/29$ mg/ml) ($n=42$, TIC = $2/54 \pm 0/414$ mg/ml). همبستگی مثبتی بین مقدار T_3 و TIC در بیماران هیپرتیروئیدی مشاهده شد ($r=0/71$, $P < 0/0001$). بنابراین از لحاظ مقایسه ای و بررسیهای آماری معلوم گردید فعالیت مهارای تریپسین TIC در بیماران هیپرتیروئیدی افزایش می یابد و احتمالاً T_3 یکی از فاکتورهائی است که روی مقدار $\alpha 1$ -AT و در نتیجه TIC اثر تنظیمی دارد.

کلید واژه ها: آلفا یک آنتی تریپسین / بازدارنده های تریپسین / پرکاری تیروئید

مقدمه:

تخریب رشته های الاستین در بافتهای مختلف مخصوصاً حبابچه های ریوی می شوند (بعلت اینکه اولین بار اثر مهارای آن روی فعالیت تریپسین معلوم گردید به این اسم نامیده شد اما بیشترین اثر مهارای را روی الاستاز اعمال میکند) بیشتر $\alpha 1$ -AT موجود در پلازما توسط کبد سنتز و ترشح می شود علاوه بر این برخی بافتها و سلولهای دیگر

خون و دیگر مایعات بدن حاوی پروتئینی بنام آلفا یک آنتی تریپسین ($\alpha 1$ -AT) هستند که روی تعداد زیادی از آنزیمهای پروتئولیتیک اثر مهارای دارد مهمترین نقش فیزیولوژیک $\alpha 1$ -AT مهار الاستاز ناشی از نوتروفیل ها می باشد که در فضای خارج سلولی رها شده و موجب

که تریپسین BAEE را هیدرولیز کرده و موجب کاهش جذب آن در طول موج ۲۵۴nm می شود اما اگر α1-AT در محیط باشد تریپسین را مهار کرده و کاهش جذب کمتری ایجاد خواهد شد.

TIC از طریق رسم نمودار مهاری آن و یا از طریق اندازه گیری که معروف به اندازه گیری روتین است بدست می آید در این بررسی ما از اندازه گیری روتین و با استفاده از رابطه زیر TIC را بدست آوریم .

$$TIC = \frac{OD_{St} - OD_t}{OD_{St}} \times C_E \times F \times \frac{I}{V}$$

در این رابطه :

C_E = غلظت تریپسین استفاده شده در هر آزمایش میباشد
 V = حجم سرم مصرفی در هر آزمایش
 F = فاکتور بدست آمده از استاندارد کردن تریپسین با STI^4 می باشد (فاکتور تبدیل)

از تقسیم نسبت ترکیبی تریپسین با STI بصورت تنوریک بر نسبت واقعی ترکیبی تریپسین با STI که از آزمایش استاندارد کردن تریپسین بدست می آید فاکتور F قابل محاسبه است (۸،۹). ما در این مطالعه پس از استاندارد کردن تریپسین مصرفی (ساخت کارخانه سیگما U/mg ۱۹-۱۳) و سپس TIC را بدست آوردیم و نتایج حاصله را با استفاده از نرم افزار آماری $spss$ و آزمون t و آنالیز رگرسیون مورد تجزیه و تحلیل قرار دادیم.

نتایج:

بر اساس نتایج بدست آمده معلوم گردید که TIC در بیماران هیپرتیروئیدی ($TIC = 2/54 \pm 0/414 mg/ml$) نسبت به گروه شاهد ($TIC = 1/87 \pm 0/29 mg/ml$) افزایش می یابد و ظرفیت مهاری تریپسین (TIC) همانند T_3 و T_4 در بیماران هیپرتیروئیدی نسبت به افراد نرمال افزایش می یابد و رابطه مستقیم و معنی داری بین هورمونهای تیروئیدی و TIC وجود دارد (جدول ۱ و ۲).

جدول ۱: مقایسه مقادیر T_3 ، T_4 و TIC برای افراد

هیپرتیروئیدی و گروه شاهد

TIC & St.d mg/ml	T3 ng/dl	T4 µg/dl	سن (به سال)	تعداد
۲/۵۴ ± ۰/۴۱۴	۲۸۲ ± ۱۳۲/۹۸	۱۸/۲ ± ۵/۲۹	۲۶ ± ۱۳/۱	۴۲
۱/۸۷ ± ۰/۲۹	۱۳۸ ± ۲۸/۷۵	۸/۷ ± ۱/۵۷	۳۲ ± ۱۳/۴۲	۳۰
---	۸-۲۰۰	۵-۱۲	---	---

مانند منوسیتها و ماکروفاژهای حبابچه های ریوی نیزمقداری α1-AT می سازند (۲،۱).

از لحاظ ساختمانی خصوصاً جایگاه فعال آن بسیار شبیه CBG^1 و TBG^2 می باشد . TBG بیشتر از ۳۰٪ با اصلی ترین عضو خانواده Serpin یعنی α1-AT همولوگ می باشد جفت شدن ترادف اسیدهای آمینه آنها دلالت دارد بر اینکه بخشهایی از ساختمان دوم و سوم آنها مشابه می باشند (۳).

در سیروز کبدی بالغین، سیروز نوزادان، یرقان نوزادان ، آمفیزم ریوی و ناراحتیهای پوستی بهمراه هیپوتیروئیدی مقدار α1-AT و به تبع آن TIC کاهش می یابد (۵،۴). برعکس در برخی حالات پاتولوژیک مانند التهابات، شکستگی استخوانها، عفونها و سرطان مقدار آن تا چهار برابر افزایش می یابد (۶). سؤال این است که افزایش و کاهش غلظت α1-AT تحت تاثیر چه فاکتورهایی صورت می گیرد . تاکنون فاکتورهایی مانند سیتوکین ها شناخته شده اند (۶) فاکتورهای دیگری که احتمالاً روی این آنزیم اثر تنظیمی دارند هورمونهای تیروئیدی می باشند . در هیپوتیروئیدی کاهش T_3 موجب کاهش α1-AT و در نتیجه TIC می شود (۷) بنابراین در هیپرتیروئیدی انتظار می رود بهمراه افزایش T_3 افزایش α1-AT هم مشاهده شود . در این مطالعه نظر براین است که از نظر آماری و توصیفی به این پرسش پاسخ دهیم که آیا با افزایش هورمونهای تیروئیدی افزایشی در TIC مشاهده خواهد شد؟

روش کار:

پس از تأیید علائم بالینی هیپرتیروئیدی (علائمی مانند تپش قلب، نبض سریع، پوست گرم، کاهش وزن، تعریق زیاد، عدم تحمل گرما، لرزش ظریف دستها، تغییرات چشمی و...) توسط متخصصین غدد از بیماران هیپرتیروئید (۴۲ مورد) و گروه کنترل (Euthyroid) (۳۰ مورد) نمونه هپارینه تهیه و برای هر کدام پرونده ای تشکیل شد سپس T_3 و T_4 را با روش رادیوایمنواسی و با استفاده از γ-کانتور (مدل Kontron) اندازه گیری کردیم TIC با استفاده از سوبسترای سنتتیک $BAAE^3$ (ساخت کارخانه سیگما) در طول موج (۲۵۴ nm) $U.V$ اندازه گیری و برحسب میلیگرم تریپسین مهار شده در یک میلی لیتر بیان شد. (۸) واکنش براین اساس است

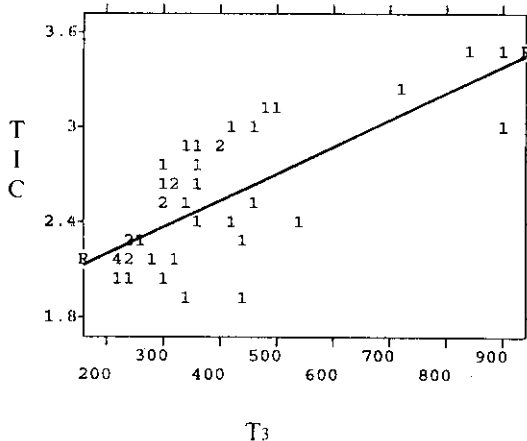
1- Cortisol Binding Globulin

2- Thyrosin Binding Globulin

3- n-α-Benzoyl-L-Arginine-Ethyl Ester hydrochlorid

4- Soybean Tyrosin Inhibitory

PLOT OF TIC WITH T3



42 cases plotted. Regression statistics of TIC on T3
 Correlation .71907 R Squared .51706
 S.E. of Est .29113
 Sig. .0000
 Intercept (S.E.) 1.88794 (.10937)
 Slope (S.E.) .00171 (.00026)

نمودار ۲: رسم TIC برحسب T3 برای گروه هیپرتیروئیدی
 $n=42 \quad r=0.71, P<0.0001$

* اعداد داخل نمودار توزیع فراوانی هر مورد را بیان می کنند.

بحث:

بعلت اینکه رابطه مستقیم و معنی داری بین غلظت $\alpha 1\text{-AT}$ و TIC گزارش شده است ($P < 0.0001$), $r=0.95$ (۴) نتیجتاً در این تحقیق مشخص شد که غلظت $\alpha 1\text{-AT}$ و بتبع آن TIC در بیماران هیپرتیروئیدی افزایش می یابد و نیز بعلت اینکه از بین هورمونهای تیروئیدی T3 نقش مؤثرتری در رونویسی ژنها دارد (۱۰) بنابراین میتوان این احتمال را داد که افزایش T3 در بیماران هیپرتیروئیدی در مقایسه با گروه کنترل می تواند موجب افزایش mRNA مربوط به $\alpha 1\text{-AT}$ و در نهایت افزایش TIC گردد یعنی اینکه T3 تأثیر تنظیمی روی $\alpha 1\text{-AT}$ دارد. مؤید این مسئله اینکه افزایش هورمونهای تیروئیدی موجب افزایش غلظت mRNA مربوط به $\alpha 1\text{-AT}$ در rat می شود (۱). نتایج مشابه در خصوص تأثیر هورمونهای تیروئیدی روی فعالیت مهاری $\alpha 1\text{-AT}$ در رابطه بامهار فعالیت الاستازی، الاستاز نیز براین مسئله صحه می گذارد (۳). مسئله دیگری که ممکن است موجب تشدید این روند گردد اینکه $\alpha 1\text{-AT}$ یکی از پروتئین های فازحاد و در حال تعادل با میزان الاستاز میباشد که بصورت عمده از نوتروفیل ها و

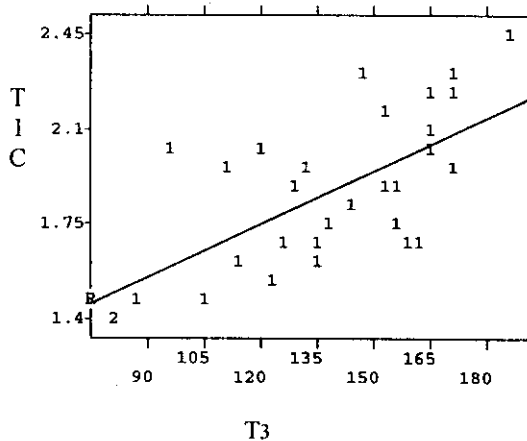
جدول ۲: نتایج آزمون -t و آنالیز رگرسیون برای T3 و TIC T4

T4	T3	TIC
$r=0.59, P<0.0001$	$r=0.71, P<0.0001$	هیپرتیروئیدی
$r=0.36, P<0.045$	$r=0.68, P<0.0001$	گروه شاهد

و نیز براساس جداول و نمودارهای شماره ۱ و ۲ مشاهده می شود که همبستگی TIC به T3 برای بیماران هیپرتیروئید ($r=0.71$) و گروه شاهد ($r=0.68$) بیشتر از T4 است.

براساس جدول و نمودار شماره ۲ مشخص است که همبستگی TIC به T4 برای گروه کنترل ($r=0.36, P<0.045$) پائین ولی برای بیماران هیپرتیروئیدی ($r=0.59$) بالاتر می باشد بنابراین T4 در غلظت بالا روی TIC مؤثرتر می باشد در صورتی که T3 در غلظت های نرمال یا بالاتر فاکتور بسیار مؤثری می باشد (نمودار ۲۰).

PLOT OF TIC WITH T3



30 cases plotted. Regression statistics of TIC on T3
 Correlation .68053 R Squared .46312
 S.E. of Est .21616
 Sig. .0000
 Intercept (S.E.) .92199 (.19657)
 Slope (S.E.) .00686 (.00140)

نمودار ۱: رسم TIC برحسب T3 برای گروه شاهد
 $n=30 \quad r=0.68, P<0.0001$

Now York : Academic Press, inc,
1988: 400 – 418

۶. گودرزی محمد تقی . α -TGF سنتز آلفا - ۱ - آنتی

تریپسین را در سلولهای هپاتومای انسانی (HepG2)

تحریک می کند . مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی

همدان . سال ششم ، شماره ۱ ، ۱۳۷۸ : ۱۵ - ۱۰

۷. خیرالله علیرضا . بررسی تغییرات آلفا - ۱ - آنتی

تریپسین (α 1-AT) در سرم بیماران هیپوتیروئیدی .

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی همدان . سال

پنجم ، شماره ۲ ، ۱۳۷۷ : ۳۰ - ۲۷

8. Hutchison DCS , Cook PJ , Barter CE.
Pulmonary emphysema and α 1 - AT
deficiency. Br Med J 1971; 1 :
689 – 694

9. Eriksson S. Determination of serum
tyrpsin inhibitor capacity. Acta Med
Scand 1965 ;suppl 1 (432) : 6-13.

10. Franklin HE, Gregory AB. The
molecular basis of thyroid hormone
action. N Engl J Med 1994 Sept ;
331(13) : 847 – 853.

11. Woodward SC. Elastase breakdown
and regeneration in emphysema.
Hum pathol 1989 July ;20 (7) :
613 – 614.

۱۲. قراگوزلو محمد جواد . بررسی اتوانتی بادیها و

کمپلکس ایمنی در بیماری گریوز همراه با

اگزوفتالمی . پایان نامه دکتری تخصصی ایمونولوژی

دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران .

۷۰-۱۳۶۹ .

13. Hard H , Ban Y. Plasma
polymorphonuclear elastase in
patients with hyperthyroidism. Endocr
J 1993 Dec ; 40(6) : 711 – 714.

بمیزان کمتر از سایر منابع تولید می شود (۱۱) و از
طرفی در خصوص اتیولوژی هیپرتیروئیدی خصوصاً نوع
گریوز گفته میشود که رابطه تنگاتنگی بین
هیپرتیروئیدی و سیستم ایمنی وجود دارد و این نوع
هیپرتیروئیدی نتیجه آشفنگی سیستم ایمنی می باشد
(۱۲). بنابراین شاید یکی از جنبه های این آشفنگی
سیستم ایمنی، افزایش α 1-AT و در نتیجه TIC باشد .
بر اساس مطالعه ای که در ژاپن روی بیماران
هیپرتیروئید صورت گرفته است مشخص گردید که
مقادیر پلاسمائی الاستاز ناشی از پلی مورفونکلئورها
(PMNE) در این بیماران افزایش می یابد که این
افزایش، همبستگی معنی داری با هورمونهای تیروئیدی
خصوصاً FT3 دارد(۱۳). بنابراین بدن برای حفظ تعادل
protease-antiprotease احتمالاً مقدار بیشتری α 1-
AT تولید کرده که مسئول افزایش TIC در بیماران
هیپرتیروئیدی می باشد.

نهایتاً اینکه رابطه معنی داری بین مقدار هورمونهای
تیروئیدی و TIC وجود دارد و افزایش هورمونهای
تیروئیدی احتمالاً به طروق مختلف موجب افزایش
مقدار α 1-AT و در نتیجه TIC می گردند و بر همین
اساس پیشنهاد شده است که برای درمان برخی موارد
کمبود α 1-AT می توان از هورمونهای تیروئیدی
استفاده کرد(۶).

منابع:

1. Champe PC , Harvy RA . Lippincotts
reviews biochemistry 2nd ed.
Philadelphia : J.B. Lippincott , 1994 :
43 – 44.
2. Putnam FW. The plasma protein
(structure , function and genetic
control) Vol 1. New York : Academic
Inc 1974 : 231 – 245 , 259 – 292.
3. Pemberton PA , Stein PE , Pepys MB.
Hormone binding globulins undergo
serpin conformational change in
inflammation . Nature 1988 Nov ;
336 : 257.
4. Wortsman J, Mastuoka LY, Kueppers
F. Elastase inhibitory activity in serum
of patients with thyroid dysfunction.
Clin Chem 1991; 37(1) : 108 – 110.
5. Arnud PH, Chappuis CC.
Methods in enzymology (study of
acute – phase reactants) Vol 163.