مقایسه آنزیم اورنیتین کربامیل ترانسفراز با آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینو ترانسفراز در میان بیماران کبدی

حمیدرضا جوشقانی [۱] ، دکتر محمود جلالی [۲] ، دکترعباسعلی صاحبقدم لطفی [۳]

دکتر ابراهیم جوادی [۴] ، احمد رضا بندگی [۵]

چکیده

کبد یکی از اعضاء بسیارمهم بدن است که در سوخت و ساز (متابولیسم) کربوهیدرات‌ها ، پروتئین‌ها و چربی ها نقش اساسی دارد. همچنین این عضو نقش بسیار مهمی در دفع و ترشح سموم بازی می‌کند. این عضو حیاتی درمعرض انواع عفونت های انگلی ، ویروسی ، باکتریایی و آسیب‌های جدی به وسیلهٔ سموم قرار دارد. امروزه یکی ازراه های تشخیص و بررسی آسیب‌های کبدی سنجش برخی از آنزیم‌های کبدی مانند آلانین آمینوترانسفراز (ALT یا GPT) و آسپارتات آمینوترانسفراز (AST یا GOT) می‌باشد. به علت آن که این آنزیم‌ها در سایر بافت‌ها نیز وجود دارند ، نیاز به سنجش سایر آنزیم ها با ویژگی بیشتر احساس می‌گردد. در این مطالعه فعالیت آنزیم اورنیتین کربامیل ترانسفراز (EC2.1.3.3) ، دومین آنزیم چرخه اوره ، در ٥٦ بیمار کبدی (مبتلا به سیروز و هپاتیت ویروسی) مورد مطالعه قرار گرفت. برای تایید ضایعه کبدی در گروه بیماران و همچنین برای صحت سلامتی در گروه شاهد آزمایش‌های گلوتامیک پیروویک ترانس آمیناز سرم (SGPT) و گلوتامیک اگزالواستیک ترانس آمیناز سرم (SGOT) ، آلبومین ، بیلی روبین ، γGT و آلکالن فسفاتاز انجام گردید. برای سنجش فعالیت اورنیتین کربامیل ترانسفراز (OCT) از روش رنگ سنجی استفاده شد. ما دریافتیم که بین فعالیت OCT با آنزیم SGOT (P<۰/۰۰۱ ، r = ۰/۷۸۲) و SGPT (P < ۰/۰۰۱ ، r = ۰/۸۵۷) همبستگی وجود دارد. با توجه به این که آنزیم OCT برای کبد تا حد بسیار زیادی اختصاصی می‌باشد ، لازم است که در سایر مطالعات ، فعالیت این آنزیم در ضایعات مختلف کبدی مورد ارزیابی قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی : *بیماری کبدی ، اورنیتین کربامیل ترانسفراز ، آلانین آمینوترانسفراز ، آسپارتات آمینوترانسفراز*

۱- دانشجوی دکترای بیوشیمی بالینی ، نشانی : گرگان ، کیلومتر ۲ جاده گرگان به ساری ، ابتدای جاده شصت کلا ، دانشگاه علوم پزشکی گرگان (بنیاد فلسفی) ، آموزشکده پیراپزشکی، تلفن : ۰۱۷۱-۴۴۲۱۶۵۴ ، E-mail: hr_joshaghani@yahoo.com

۲- دانشیار بیوشیمی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران ، دانشکده بهداشت ، گروه تغذیه و بیوشیمی

۳-دانشیار بیوشیمی ، دانشگاه تربیت مدرس ، دانشکده پزشکی ، گروه بیوشیمی

۴-استادیار بیوشیمی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران ، دانشکده پزشکی ، بیمارستان شریعتی

۵- دانشجوی دکترای بیوشیمی بالینی ، دانشگاه علوم پزشکی سمنان ، دانشکده پزشکی

مقدمه

کبد جایگاه مناسبی برای بسیاری ازعوامل بیماری‌زا مانند انگل‌ها (۱) ، ویروس‌ها (۲) و باکتری‌ها (۳) می باشد. برای ارزیابی آسیب‌های کبدی ازآزمایش‌های گوناگونی بهره می‌برند. از جمله آزمایش‌هایی که بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند می‌توان از گلوتامیک اگزالواستیک ترانس آمیناز (SGOT) [۱] یا آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) [۲] ، گلوتامیک پیرویک ترانس آمیناز (SGPT) [۳] یا آلانین آمینوترانسفراز (ALT) [۴] ، آلکالن فسفاتاز ،γGT (γ-گلوتامیل ترانس پپتیداز[۵]) ، آلبومین و بیلی‌روبین نام برد. GPT عمدتاً در کبد یافت می‌شود ولی GOT در بسیاری از بافت‌های دیگر نیز وجود دارد. بنابراین ، کمتر به عنوان یک علامت اختصاصی در بیماری‌های کبدی مطرح می شود (٤). در بیماری‌های کبدی تغییرات سطح آنزیم γGT به موازات آلکالن فسفاتاز است. اما باید دانست که افزایش این آنزیم مختص سیستم صفراوی نبوده و در اختلالات اندام‌های دیگری چون پانکراس، قلب ، ریه و بیماری‌هایی مانند دیابت و الکلیسم نیز افزایش می‌یابد (۵). با توجه به محدودیت‌های آزمایش‌های فوق به نظر می‌رسد که نیاز به آزمایش‌های مکمل دیگری مانند سنجش اورنیتین کربامیل ترانسفراز(OCT[٦]) درکناراین آزمایش وجود دارد. کاربرد OCT در برخی از ضایعات کبدی مانند مصرف الکل نشان داده شده است (٦). سنجش OCT در ارزیابی ضایعات کبدی بالاخص هنگام بررسی اثر داروها می‌تواند مفید باشد (۷).

OCT (EC2.1.3.3) دومین آنزیم چرخه اوره می باشد که در میتوکندری سلول‌های کبدی وجود دارد (۸). این آنزیم به وسیلهٔ گریزولیا[۷] و کوهن[۸] کشف شد و در سال ۱۹۵۲ ازکبد تخلیص گردید (۹). در پستانداران تقریباً به طور کامل در میتوکندری سلول‌های کبدی و به میزان بسیار اندک در گیاهان دیده شده است (۱۰). ژن آنزیم OCT روی بازوی کوتاه کروموزوم X و روی باند Xp21.1 قراردارد (۱۱).

ساختمان OCT : پروتئین پیش‌ساز OCT ، ۳۵٤ اسید آمینه دارد و وزن مولکولی آن حدود ٤۰ هزار دالتون است (۸). پلی‌پپتید بالغ ۳٦۰۰۰ دالتون وزن دارد که واحد کاتالیتیک آنزیم است. آنزیم فعال یک هوموتریمر است که درماتریکس میتوکندری به غشاء داخلی میتوکندری متصل بوده و دارای سه جایگاه فعال می باشد (۱۲و۱۳).

ویژگی‌های آنزیم OCT : آنزیم OCT خالص تا یک‌ماه در ٤درجه‌سانتی‌گراد پایدار می‌باشد. در ۲۰- درجه سانتی‌گراد در گلیسرول ۵۰درصد ، فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مول (PH=۷) و یک میلی مول 2ME برای مدت چهارماه پایدار است. بر طبق برخی گزارش‌ها تحت شرایط سترون در حرارت اتاق تا یک هفته و در ۱۵- درجه‌سانتی‌گراد بیش از یک‌سال پایدار است (١٤). PH مطلوب برای فعالیت OCT ، ۷/۷ در تری‌اتانول‌آمین می باشد. آنزیم خالص به تغییرات PH تاحد زیادی مقاوم است. اما اگر ۱۲۰ دقیقه در ۳۷درجه‌سانتی‌گراد در PH بالاتر از ۸/۲ ویا پایین‌تر از ۵/۸ قرار گیرد از فعالیتش اندکی کاسته می گردد (۱۵). OCT نیازی به کوآنزیم ندارد و فعال کننده ویژه‌ای برای آن شناسایی نشده است. فعالیت این آنزیم به وسیلهٔ موادی که گروه‌های SH را مسدود می‌سازند مهار می گردد (١٦).

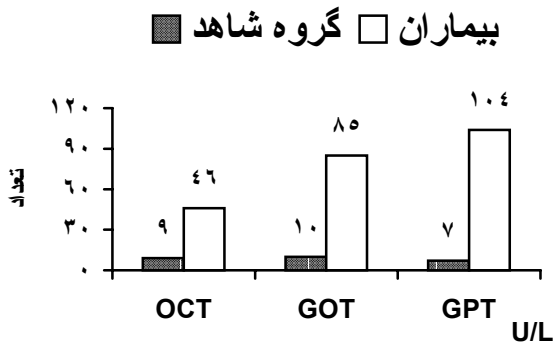
[۱] Serumglutamate-Oxaloacetate transaminase(SGOT)
[۲] Aspartate aminotransferase (AST)
[۳] Serum-glutamate-pyruvate transaminase (SGPT)
[٤] Alanine aminotrasferase (ALT)
[۵] Glutamyl Transpeptidase (GTP)
[٦] Ornithine carbamyl trasferase (OCT)
[۷] Grisolia
[۸] Cohen

مواد و روش‌ها

در این مطالعه طی سال ۱۳۷۷ ، ٥٦ فرد مبتلابه بیماری کبدی (سیروز و هپاتیت) بستری در بیمارستان‌های امام خمینی و شریعتی تهران و ۵۳ نفر مراجعه کننده به آزمایشگاه بیوشیمی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران که هیچ‌گونه سابقه بیماری کبدی نداشتند در سنین مختلف و از هر دوجنس انتخاب شدند. از افراد موردنظر ۵ میلی‌لیتر خون گرفته شد و سرم آنها جدا گردید. برای تایید ضایعه کبدی در گروه بیماران و همچنین برای صحت سلامتی در گروه شاهد روی نمونه ها آزمایش‌های SGPT ، SGOT (کیت شیم آنزیم) ، آلبومین (کیت زیست شیمی) ، بیلی روبین (۱۷) ، γGT (کیت شیم آنزیم) و آلکالن فسفاتاز (کیت زیست شیمی) انجام گردید. به منظور سنجش فعالیت OCT از روش رنگ‌سنجی استفاده شد (۱۸). برای کارهای آماری از نرم افزار spss وآزمون تی و برای رسم نمودار از نرم افزار Excel استفاده گردید.

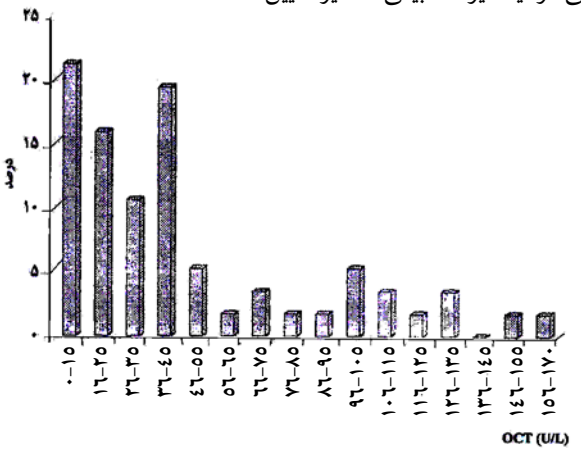
یافته‌ها

میانگین OCT ، SGOT و SGPT در گروه بیماران و شاهد به ترتیب ٤٦ U/L در برابر ۹ U/L ، ۸۵ U/L در برابر ۱۰ U/L و ۱۰٤ U/L در برابر ۷ U/L بدست آمد (نمودار ۱). میزان OCT در ۷۳/۲درصد بیماران (٤۱ نفر از ٥٦ بیمار) کمتر از ٥٥ U/L بود (نمودار ۲).

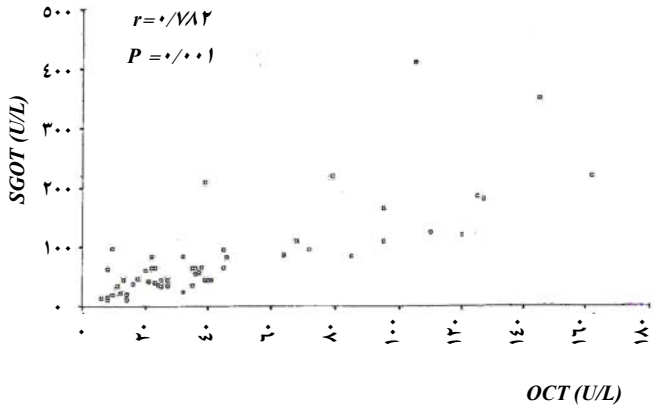


نمودار ۱ : مقایسه میانگین آنزیم‌های کبدی در گروه بیماران و شاهد

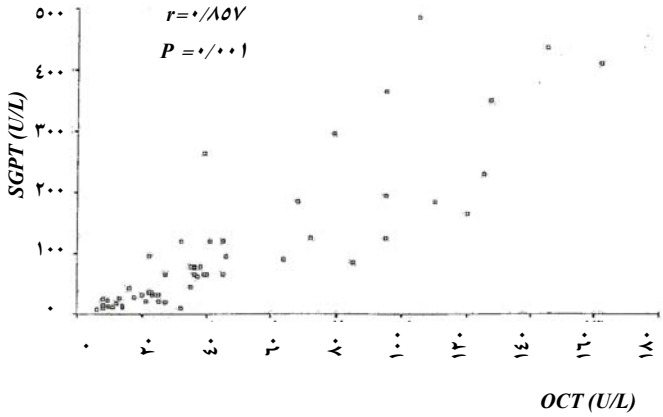
براساس آزمایش‌های انجام شده مشخص گردیدکه میزان OCT با SGOT در بیماران کبدی رابطه مستقیم دارد (r = ۰/۷۸۲ , P <۰/۰۰۱) (نمودار ۳). همچنین افزایش OCT با SGPT هماهنگ است (r = ۰/۸۵۷ , P < ۰/۰۰۱) (نمودار ٤). چون آزمایش OCT برای اولین بار در ایران انجام می‌گردید میزان طبیعی آن نیز تعیین شد(۱۳-٥ U//L).



نمودار ۲ : توزیع فراوانی بیماران کبدی برحسب فعالیت OCT



نمودار ۳ : بررسی همبستگی OCT با SGOT در ٥٦ بیمار کبدی



نمودار ٤ : بررسی همبستگی OCT با SGPT در ٥٦ بیمار کبدی

بحث

میزان OCT بدست آمده طی این مطالعه با مقادیر ذکر شده در سایر جمعیت‌ها که U/L ۱۵-۵ گزارش گردیده است (۱۸) مطابقت دارد. با توجه به نمودار یک افزایش همزمان OCT ، SGPT و SGOT در بیماران کبدی مشاهده می‌گردد. به دلیل آن که ضایعات خارج کبدی نیز می‌توانند سبب افزایش میزان SGOT و SGPT شوند ، در چنین مواردی اندازه‌گیری میزان OCT می‌تواند در افتراق بیماری کبدی از ضایعات خارج کبدی مفید باشد. باتوجه به این که OCT برخلاف سایرآنزیم های کبدی فقط درکبد وجود دارد و افزایش معنی‌دار آن در سرم بیانگر ضایعات کبدی می‌باشد ، می‌توان اندازه‌گیری آن را معیاری برای افتراق ضایعات کبدی از سایر موارد مشکوک قرار داد. همچنین به دلیل عدم تاثیر همولیز روی سنجش OCT و تاثیر فراوان همولیز روی میزان SGOT و SGPT ، در نمونه های همولیز و بیماران همولیتیک ، برای ارزیابی وضعیت کبد ، اندازه‌گیری OCT توصیه می‌گردد. امروزه یکی از کاربردهای شایع OCT در ارزیابی پیوند کبد بالاخص در نقص چرخه اوره می‌باشد (۱۹). نقص OCT شایع‌ترین اختلال چرخهٔ اوره است که می‌تواند سبب هیپرآمونمی شود (۲۰). ارزیابی این آنزیم در تشخیص علت هیپرآمونمی ارزش فراوانی دارد. هرچند اکنون اندازه‌گیری OCT به تنهایی در تشخیص نوع ضایعه کبدی کمک کننده نمی‌باشد. یکی از عللی که سبب محدودیت استفاده از OCT در بیماری‌های کبدی شده است طولانی بودن نیمه عمر زیست‌شناختی آن نسبت به SGOT و SGPT می‌باشد. آنزیمهای آمینوترانسفراز ذکر شده ، در موارد حاد افزایش یافته و پس از مدتی سریعاً کاهش می‌یابند. اما OCT تا مدت زمان بیشتری در حد بالا می‌ماند. در نتیجه افتراق موارد حاد از مزمن را با مشکل روبرو می سازد. برای مشخص شدن رابطه احتمالی افزایش OCT با نوع خاصی از بیماری‌های کبدی پیشنهاد می‌شود که میزان این آنزیم در چند بیماری کبدی به تفکیک ، مورد ارزیابی قرار گیرد. همچنین بهتر است میزان این آنزیم در موارد حاد و مزمن جداگانه مورد بررسی قرار گیرد. در صورتی که اندازه‌گیری OCT به صورت روزمره درآید می‌توان قیمت تمام شده برای هر آزمایش را تاحد زیادی کاهش داد. حتی امروزه شرکت بیومریوکس (Biomerieux) کیت سنجش OCT به روش رنگ سنجی را تولید نموده است. با توجه به این که این مطالعه اولین سنجش فعالیت آنزیم OCT در ایران است قضاوت بیشتر در مورد این آنزیم و کارایی آن، نیاز به مطالعه بیشتر در آینده دارد.

تشکر و قدردانی

این طرح با حمایت مالی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گردید. در اینجا برخود لازم می‌دانیم از زحمات اساتید و کارکنان محترم گروه بیوشیمی و تغذیه دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران سپاسگزاری نماییم که بدون کمک آنان امکان انجام این مطالعه مقدور نبود. نیز از دکترمحمد شعبانی استاد بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی ایران که در ویرایش متن ما را یاری دادند ، متشکریم.

منابع

1)Chaves DM, Sakai P, Mucenic M, Iriya K, Ishioka S. Comparative study of portal hypertensive gastropathy in schistosomiasis and hepatic cirrhosis. Endoscopy. 2002; 34(3): 199-202.

2)Evans AA, Chen G, Ross EA, Shen FM, Lin WY, London WT. Eight-year follow-up of the 90000-person Haiman city cohort: I Hepatocellular carcinoma mortality, risk factors, and gender

Rosenberg LE, Francke U. Human ornithine transcarbamylase locus mapped to band Xp 21.1 near the Duchene muscular dystrophy locus. Science. 1984; 226: 698-700.

12)Hata A, Tsuzuki T, Shimada K, Takiguchi M, Mori M, Matsuda I. Structure of human ornithine transcarbamylase gene. J Biochem.1988; 103: 302-308.

13)Tuchman M, Jaleel N, Morizone H, Sheehy L, Lynch M. Mutations and polymorphisms in the human ornithine transcarbamylase gene. Hum Mutat. 2002; 19(2): 93-107.

14)Reichard H. Determination of ornithine carbamyltransferase in serum. J Lab Clin Med. 1958; 52: 707-717.

15)Kleczkowski K. Purification of ornithine transcarbamylase from pea seadling. Arch Biochem Biophys. 1964; 107: 271-278.

16)Gursu MF. Biochemical analysis of arginase and ornithine carbamoyltransferase in human vitreose humor. Arch Med Res. 2001; 35(5) 423-425.

17)Burtis CA, Ashwood ER. Tietz textbook of clinical chemistry. 3rd edition. Philadephia. W.B.Sanders company. 1999; 1169-1171.

18)Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grabl M. Methods of enzymatic analysis.3rd edition. Hamburg. Velag cheie. 1983; Volume III: 319-325.

19)Nagasaka H, Yorifiji T, Egawa H, Kikuta H, Tanaka K, Kobayashi K. Successful living-donor liver transplantation from an asymptomatic carrier mother in ornithine transcarbamylase deficiency. J Pediatr.2001; 138(3): 432-434.

20)Brusilow SW, Maestri NE. Urea cycle disorders:Diagnosis. Pathophysiology and Therapy Advances in Pediatrics. 1996; 43: 127-170.

differences. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2002; 11(4): 369-376.

3)Fernandez J, Navasa M, Gomez J, Colmenero J, Vila J, Arroyo V, Rodes J. Bacteria infections in cirrhosis: Epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis. Hepatology. 2002; 35(1):140-148.

4)Reitman S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. Am J Clin Path. 1957; 28: 56.

5)Braunwald E, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson JL. Harrison s principles of internal medicine. 15th edition. New York. Mc Graw-Hill. 2001; P: 1721-1737.

6)Takase S, Takada A, Tsutsumi M, Matsuda Y. Biochemical markers of chronic alcoholism. Alcohol. 1985; 2(3): 405-410.

7)Brucnkner JV, Kyle GM, Luthra R, Acosta D, Metha SM, Sethuraman S, Muralidhara S. Acute, short term and subchronic oral toxicity of 1,1,1-trichloro ethane in rats. toxicol-sci. 2001; 60(2): 363-372.

8)Legarin C, Stalon V, Noullez JP, Mercenier A, Simon JP, Broman K, wiame JM. Structure and function of ornithine carbamyltransferase. Eur J Biochem. 1977; 80(2): 401-409.

9)Grisolia S, Cohen PP. The catalytic role of carbamyl glutamate in citrulline biosynthesis. J Biol Chem.1952; 198: 561-57.

10)Kalousek F, Francois B, Rosenberg LE. Isolation and characterization of ornithine transcarbamylase from normal human liver. J Biol Chem. 1978; 3(11): 3939-3944.

11)Lindgren V, Martinville B, Horwich A,