دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیستم– شماره ۱۰۵
تیر ۱۳۹۲

بررسی فعالیت آنـزیم آمینوپپتیـداز N (CD13) در افرادی با تیتر بالای آنتی‌بادی ضدبروسلا

نویسندگان: نرگس دوست‌خواه[۱]، سوسن کبودانیان اردستانی*[۲]، فروزنده جلیلوند[۳]، شهره جلائی پور[٤]، رضا حاجی حسینی[٥]، عبدالفتاح صراف‌نژاد[٦]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۲-استاد بیوشیمی مرکز تحقیقات بیوشیمی بیوفیزیک دانشگاه تهران، ایران
۳-دانش‌آموخته کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی دانشگاه تهران، ایران
٤-استادیار آمار حیاتی دانشکده توان‌بخشی دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
٥- استادیار بیوشیمی دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
٦-استاد ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

* نویسنده مسئول: سوسن کبودانیان اردستانی E-mail: ardestany@ibb.ut.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۲/۳/۲۷
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۲/۶/۱۹
پذیرش: ۱۳۹۲/٦/۲۳

چکیده

مقدمه و هدف: آمینوپپتیدازها تجزیه اسیدآمینه‌ها را از انتهای آمینی پروتئین‌ها و پپتیدها برعهده‌دارند. آمینوپپتیداز N (CD13) و لوسین آمینوپپتیداز در پردازش و عرضه آنتی‌ژن‌ها به سلول‌های سیستم ایمنی نقش‌دارند و فعالیت آنها در بعضی بیماری‌ها و بدخیمی‌ها افزایش‌می‌یابد. در این بررسی، فعالیت CD13 درسرم افرادی با تیتر بالای آنتی‌بادی ضدبروسلا اندازه‌گیری‌شد. با توجه به نقش عواملی چون میزان پروتئین، بیلی‌روبین، آنتی‌اکسیدان کل وکورتیزول در فعالیت آنزیم، موارد بالا در سرم ارزیابی‌شد.

مواد و روش‌ها: ۳۷ سرم باتیتر بالای آنتی‌بادی ضدبروسلا و ۳۰ سرم سالم جمع‌آوری و فعالیت CD13 با استفاده از سوبسترای ال لوسین پارا نیترو آنیلید به روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری‌شد. میزان پروتئین، آنتی‌اکسیدان کل و بیلی‌روبین توتال به روش کالری‌متری و کورتیزول به روش الایزا اندازه‌گیری‌شد.

نتایج: فعالیت CD13 به‌طور معنی‌داری در سرم افرادی با تیتر بالای آنتی‌بادی بیشتر از افراد سالم نبود و میان فعالیت آنزیم و تیتر آنتی‌بادی همبستگی وجودنداشت. درحالی‌که میان فعالیت آنزیم و میزان کورتیزول سرم همبستگی مثبت و معناداری وجوددارد و میان میزان بیلی‌روبین، آنتی‌اکسیدان کل وکورتیزول با میزان پروتئین سرم همبستگی منفی و معناداری وجوددارد؛ همچنین میان میزان بیلی روبین و مواد احیاکننده در سرم افراد با تیتر بالای آنتی‌بادی همبستگی مثبت و معناداری وجوددارد.

نتیجه‌گیری: میان تیترآنتی‌بادی ضدبروسلا و فعالیت CD13 همبستگی وجودندارد و فاکتورهای تداخل‌کننده مانند میزان پروتئین مواد احیاکننده، بیلی‌روبین و کورتیزول نیز روی نتیجه به‌دست‌آمده دخالت‌نداشتند.

واژگان کلیدی: آمینوپپتیداز N (CD13)، تیترآنتی‌بادی ضدبروسلا، بیلی‌روبین، کورتیزول، آنتی‌اکسیدان کل سرم

مقدمه

آمینوپپتیدازها (Ec 3.4.11) گروهی از آنزیم‌ها هستند که در طبیعت به فراوانی مشاهده‌می‌شوند و تجزیه اسید-آمینه‌ها را از انتهای آمینی‌پروتئین‌ها و پپتیدها برعهده-دارند؛ انواع این آنزیم در ارگانیسم‌های مختلف و در سیتوپلاسم و اجزای غشای سلول‌های متفاوت دیده-می‌شود (۱). یکی از انواع آمینوپپتیدازها آمینوپپتیداز N (CD13) است، CD13 پروتئین همودایمرسطح سلول است که ۱٦۷ کیلودالتون وزن دارد. قسمت داخل سیتوپلاسمی کوتاه ۱۹ اسیدآمینه دارد که به قسمت N ترمینال پروتئین مربوط است. دومین‌های خارج سلولی ۹۳۵ اسیدآمینه دارد که جایگاه فعال آنزیم در این قسمت قرارگرفته‌است. آنزیم توسط ژن ANPEP که روی بازوی بلند کروموزوم ۱۵ انسان قراردارد، کد می-شود. آنزیم به تغییرهای پس از ترجمه شامل گلیکوزیلاسیون و پروتئولیز، دچار می‌شود، پروتئولیز توسط آنزیم ناشناخته‌ای انجام‌شده که به رهایی فرم محلول آنزیم منجرمی‌شود (۲). فرم محلول CD13 در پلاسما و ادرار وجوددارد و غلظت آن در سرم انسان حدود ٤/٦ nM است و مشابه نوع غشایی، دارای فعالیت آنزیماتیک است و مسئول تجزیه پپتیدهای کوچک در تومورها و مواضع التهابی است (۸).

CD13 در تجزیه آنزیمی پپتیدهایی که در قسمت N ترمینال آنها اسیدآمینه‌های خنثی وجوددارد شرکت‌می-کند؛ همچنین در تنظیم فشار خون، جذب کلسترول، چسبندگی، حرکت وکموتاکسی سلول‌ها، اندوسیتوز، فاگوسیتوز، ایجاد رگ‌های خونی و ارائه آنتی‌ژن به کمپلکس سازگاری بافتی نوع یک و ... نقش‌دارد (۳). بیشترین میزان بیان نوع غشایی آن در میکروویلی روده کوچک و توبول‌های کلیه است؛ علاوه‌براین در سیستم اعصاب مرکزی، بافت پیوندی، رگ‌های خونی و سلول‌هایی مانند مونوسیت، ماکروفاژو فیبروبلاست‌ها مشاهده‌می‌شود. در روده کوچک CD13 ، مسئول تجزیه پپتیدهای تولیدشده از آخرین مرحله هضم مواد غذایی و تبدیل آنها به اسیدآمینه است (٤و۵). در کلیه آنزیم، اسیدآمینه آرژنین را از قسمت N ترمینال آنزیوتانسین III برداشته، در سیگنال رنین، آنژیوتانسین، آلدوسترون نقش‌دارد (٦). در مغز CD13 با هیدرولیز پپتیدهای کوچک مانند انکفالین در تنظیم ساختار درد، نقش ایفا-می‌کند (٤ و۷).

میزان بیان CD13 در سلول‌های نابالغ رده میلوئیدی، افزایشی چشمگیر دارد؛ بنابراین به‌عنوان مارکر تشخیصی در لوسمی میلوئیدی حاد (AML) استفاده-می‌شود. CD13 با تجزیه کلاژن تیپ چهار در ماتریکس، باعث هجوم سلول‌های توموری و آغاز متاستاز می‌شود (۲). CD13 سایتوکاین پیش‌التهابی IL8 را تجزیه‌کرده، در تنظیم پاسخ‌های ایمنی در فاز التهاب شرکت‌می‌کند. در بیماری‌های کبدی- صفراوی، پانکراسی (۹) لوپوس و التهاب لوزه، افزایش فعالیت CD13 مشاهده‌می‌شود (۱۰).

به دلیل نقش CD13 در بعضی عفونت‌های ویروسی (مانند کرونا ویروس انسانی (HCOV-229E) که از میزان بیان بالای CD_{13} در سلول‌های اپیتلیال روده و فیبروبلاستها بهره‌می‌برد و با استفاده از آن به سلول، وارد می‌شود و ویروس سایتومگالو انسانی (HCMV) و موشی که از طریق CD_{13} غشایی سلول‌های تک هسته‌ای خون را آلوده‌می‌کند و آنتی‌بادی ضد CD13 از عفونت‌زایی سایتومگالو ویروس ممانعت‌می‌کند)، سرطان و در پردازش و عرضه آنتی‌ژن‌های داخلی دارد (۱۱و۱۲)، فرضیه‌ای مطرح می‌شود که آیا CD13 با بیماری‌هایی با منشأ میکروبی نیز مرتبط است؟ ازآنجاکه میکروب بروسلا پاتوژن گرم منفی داخل سلولی است و درون ماکروفاژهای مناطق خاصی از بدن (کبد، طحال، مغز، قلب و استخوان) مستقرمی‌شود و موجب تب‌های رجوع-کننده و دردهای استخوانی و همچنین افزایش تیتر آنتی‌بادی در سرم می‌شود (۱۳)، ما از سرم افرادی که تیتر بالای آنتی‌بادی ضدبروسلا داشتند و به‌احتمال به این بیماری، مبتلا بودند برای اندازه‌گیری فعالیت CD13 استفاده‌کردیم.

مواد و روش‌ها

مواد مصرفی از شرکت Merk و Sigma خریداری‌شد. نمونه‌های سرم از بیمارستان‌های شریعتی و امام خمینی و آزمایشگاه پاتوبیولوژی نور تهران جمع‌آوری‌شدند. نمونه‌های تست براساس تیتر آنتی‌بادی ضدبروسلا به روش آگلوتیناسیون رایت (SAT) و ELISA انتخاب‌شدند و سرم افراد کنترل براساس نداشتن سابقه بیماری بروسلوزیس و تست SAT و ELISA منفی برگزیده - شدند. تست SAT و ELISA به‌ترتیب برای تعیین تیتر آنتی‌بادی از کلاس IgM , IgG و IgG ضدبروسلا در آزمایشگاه‌های یادشده انجام‌شد و نتایج موجود در دفاتر این آزمایشگاه‌ها، در مطالعه حاضر استفاده‌شدند.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آمینوپپتیداز N (CD13)

فعالیت آنزیم، طبق روشی که اسپاندینگ[1] و همکاران انجام‌داده‌بودند با کمی تغییر در آزمایشگاه انجام‌شد. ۲۰ میکرولیتر از سرم به ۹۸۰ میکرولیتر از محلول ۳ میلی‌مولار L-Leucine P-Nitroanilid (سوبسترا) اضافه شد و جذب نوری نمونه، فوری در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH = ۸ در طول موج ٤٠٥ نانومتر به‌مدت ۵ دقیقه هر ۳۰ ثانیه با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Sinco کشور کره) در مقایسه با بلانک مناسب اندازه‌گیری‌شد (١٤). فعالیت ویژه آنزیم برحسب میلی- گرم پروتئین گزارش‌می‌شود، لذا میزان پروتئین سرم‌ها نیز تعیین‌شد.

اندازه‌گیری پروتئین

میزان پروتئین سرم به روش Brad ford اندازه‌گیری- شد. ۱۰ میکرولیتر از سرم رقیق‌شده (۱/۵۰۰) با μl ۲۰۰ معرف برادفورد مخلوط و جذب نمونه حدود ۳۰ تا ٦٠ دقیقه بعد، توسط پلیت ریدر (مدلPower ware XS2 شرکت biotek کشور آمریکا) در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت‌شد؛ در این روش، غلظت پروتئین سرم با استفاده از نمودار استاندارد که با رقت‌های متوالی از آلبومین گاوی تهیه‌شده‌بود، تعیین‌شد (۱۵).

اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان کل

اساس روش اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان کل، بی‌رنگ- شدن ماده رادیکالی[2] $ABTS^{\cdot+}$ در واکنش با آنتی‌اکسیدان- های کل سرم است که با استفاده از اسپکتروفتومتری انجام‌می‌شود. $ABTS^{\cdot+}$ رادیکال‌های کاتیونی ABTS است که در نتیجه واکنش با پتاسیم پرسولفات تولیدمی‌شود. $ABTS^{\cdot+}$ سبز پررنگ است. حضور آنتی‌اکسیدان‌ها در نمونه، باعث احیاشدن آن و ایجاد ABTS بی‌رنگ می‌شود. برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف Trolox[3] (۲/۵ mM) در بافر فسفات استفاده‌شد که در شرایط مشابه باعث احیا $ABTS^{\cdot+}$ می‌شود. برای اندازه‌گیری فعالیت کل آنتی‌اکسیدان‌ها در سرم ۵ µl از سرم رقیق‌شده (۱/۵۰۰) با ۱۹۵ µl از محلول کار $ABTS^{\cdot+}$ در میکروپلیت مخلوط و جذب آن بین ۱ تا ٦ دقیقه با الایزاریدر (مدل Power ware XS2 شرکت biotek کشور آمریکا) قرائت‌شد؛ غلظت نمونه‌ها از روی جذب قرائت‌شده و با به‌کارگیری منحنی استاندارد محاسبه‌شد (١٦).

اندازه‌گیری کورتیزول

میزان کورتیزول با کیت الایزا رقابتی که از شرکت bioactive diagnostic کشور آلمان تهیه‌شده‌بود، انجام‌شد. ۲۰ میکرولیت از سرم با ۲۰۰ µl محلول حاوی کورتیزول کنژوکه با آنزیم پراکسیداز مخلوط شد و به هر ول که با آنتی‌بادی ضد کورتیزول کوت شده‌بود، اضافه شد و به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه‌شد؛ پس از اتمام زمان انکوباسیون پلیت شسته شد؛ در مرحله بعد ۱۰۰ µl محلول سوبسترای اختصاصی آنزیم پراکسیداز (TMB) اضافه شد و پس از ۳۰ دقیقه، واکنش آنزیمی با ۱۰۰ µl اسید هیدروکلریک ۰/۱۵ مول در لیتر متوقف و جذب نوری در طول موج ٤٥٠ نانومتر با استفاده از الایزا ریدر (مدل 2100 Stat fax کشور آمریکا) قرائت‌شد. غلظت

[1] - Spunding

[2]- 2,2^'- azinobis –(3ethyl benzo thiazolin-6-sulfonic acid)

[3]- (6-hydroxy-2,5,7,8-tetra methy chroman -2-carboxylic acid)

کورتیزول نمونه براساس منحنی استاندارد محاسبه‌شد. غلظت رنگ نهایی با غلظت کورتیزول در نمونه مورد نظر رابطه عکس دارد (۱۷).

اندازه‌گیری بیلی‌روبین

بیلی‌روبین با استفاده از کیت بیلی‌روبین توتال شرکت پارس آزمون و اتوآنالایزر (هیتاچی مدل ۷۰٤) اندازه‌گیری‌شد؛ در این روش، بیلی‌روبین موجود در سرم یا پلاسما با ۲ و ٤ دی‌کلروآنیلین (دارای دو مولکول ازت) ترکیب اذتی قرمزرنگی در محیط اسیدی تشکیل‌می‌دهد. که در طول موج nm ٥٤٦ دارای بیشترین جذب نوری است (۱۸).

۲۵ میکرولیت از سرم یا استاندارد با µl ۱۰۰۰ بافر فسفات mM ٤۰ حاوی Nacl ۹ گرم در لیتر ودترجنت، اضافه شد و مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (یا ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) انکوبه‌شد و جذب نوری اولیه نمونه یا استانداردها اندازه‌گیری‌شد؛ سپس µl ۲۵۰ از محلولی که یک میلی‌مول 2,4-Dichlorophenyl-diazoniumsalt و ۳۰ میلی‌مول HCl و دترجنت بود به نمونه اضافه شد و به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (یا ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) انکوبه‌شد و جذب نوری ثانویه نمونه‌ها یا استانداردها اندازه‌گیری‌شد و با استفاده از فرمول زیر، غلظت بیلی‌روبین در نمونه‌ها محاسبه‌شد:

$$\text{Bilirubin } (^{mg}/_{dl}) = \frac{DA\ Sample}{DA\ Cal} * \text{Conc.Cal}(^{mg}/_{dl})$$

روش آماری

آزمون آماری T student برای بررسی اختلاف میان گروه تست و شاهد به‌کارگرفته‌شد؛ همچنین به‌منظور بررسی همبستگی (Correlation) عوامل مختلف با یکدیگر از نرم‌افزار SPSS استفاده‌شد.

یافته‌ها

متوسط سن گروه تست ۱۵/۷±۳۵/۳ (به‌جز هفت مورد که سن آنها مشخص نیست) و متوسط سن گروه کنترل ۱۳/۹±۳٦/٤ است و اختلافی معنی‌دار را با هم نشان‌نمی‌دهند. در گروه تست تیتر آنتی‌بادی ضدبروسلا با روش SAT در ۲۱ سرم بالاتر از ۱٦۰ و در ٤ سرم تیتر برابر ۱٦۰ است درحالی‌که در همه سرم‌های تست تیتر IgG ضدلیپوپلی ساکارید بروسلا بالاتر از ۱۱ است. SAT بالاتر از ۱٦۰ و تیترIgG ضدلیپوپلی ساکارید بالاتر از ۱۱ در افرادی که با دام سروکارندارند دلیل بر عفونت مثبت بوده، فرد، مبتلا به بروسلوز محسوب‌می‌شود (۱۹).

همان‌طورکه در جدول ۱ نشان‌داده‌شده‌است فعالیت ویژه آنزیم در گروه تست بیش از کنترل است ولی اختلافی معنی‌دار را با هم نشان‌نمی‌دهند (p =۰ /۱۲). میزان پروتئین در گروه تست افزایش کمی (۱/٤۲ g/ml ±۸/۰۲۵) در مقایسه با گروه کنترل (۱/۲٦ g/ml ±۷/٤۳) نشان‌می‌دهد. اما میزان پروتئین در گروه تست و کنترل هر دو در حد طبیعی پروتئین سرم است و اختلافی معنی‌دار را با هم نشان‌نمی‌دهند؛ به‌علاوه میزان کورتیزول و بیلی‌روبین در گروه تست و کنترل اختلافی معنی‌دار را نشان‌نمی‌دهند، درحالی‌که میان میزان آنتی‌اکسیدان کل گروه کنترل (mmol/m ۱٦۹/۵±۳۰۸/۳۹) و گروه تست (mmol/ml ۱٦/۷±٦۳/۸) اختلافی معنی‌دار وجوددارد و در گروه تست، بسیار کاهش‌یافته‌است.

میان فعالیت CD13 و تیتر آنتی‌بادی ضدبروسلا همبستگی وجودندارد. درحالی‌که میان فعالیت CD13 و میزان کورتیزول همبستگی مثبت و معنی‌داری (p=۰/۰٤، r=۰/۲٤) وجوددارد، یعنی با افزایش میزان کورتیزول سرم فعالیت آنزیم افزایش‌یافته‌است (شکل ۱)؛ شیب خط در گروه تست، بیشتر از گروه کنترل است.

همچنین همان‌طورکه در جدول ۲ نشان‌داده‌شده‌است، میان میزان پروتئین سرم با بیلی‌روبین، آنتی‌اکسیدان کل و کورتیزول، همبستگی منفی و معنی‌داری دیده‌می‌شود با اینکه در گره تست ما شاهد افزایش خیلی کم پروتئین بوده‌ایم (P =۰/۰۷)، همین تغییر کم، ارتباطی معنی‌دار با بیلی‌روبین، آنتی‌اکسیدان کل و کورتیزول ایجادکرده‌است؛ به‌علاوه، کاهش میزان آنتی‌اکسیدان کل سرم گروه تست در مقایسه با گروه کنترل را مشاهده‌می‌کنیم؛ درعین‌حال، همبستگی مثبت و معنی‌داری (۰/۰۳ ۰

P = ، ۰/۲۶ =r) میان میزان بیلی‌روبین و مواد احیاکننده در سرم گروه تست وجوددارد (جدول ۲).

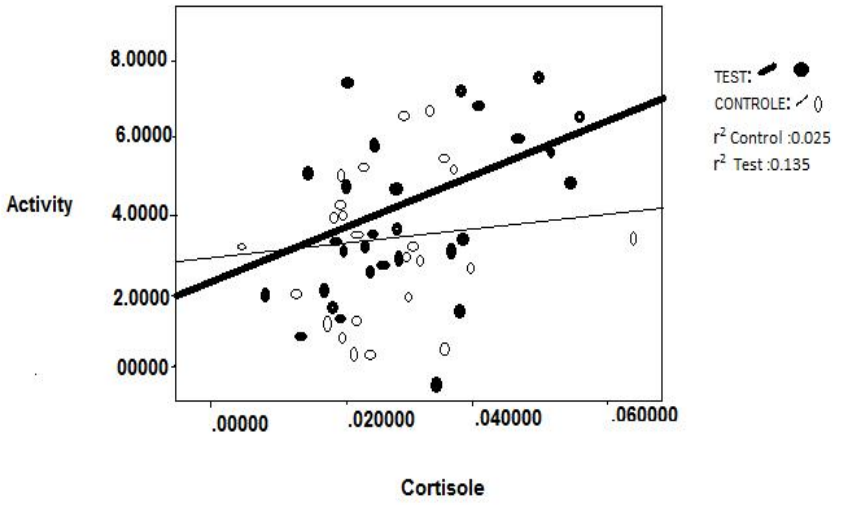
جدول ۱. میانگین ± SD میزان فعالیت آنزیم آمینوپپتیداز N ، پروتئین ، آنتی اکسیدان کل، کورتیزول و بیلی‌روبین و تیتر آنتی‌بادی

میانگین ± SD	بیلی روبین mg/dl	کورتیزول ng/mg protein	آنتی اکسیدان کل mmol/ml	پروتئین mg/ml	فعالیت ویژه آنزیم IU/mg protein	تیتر آنتی‌بادی SAT
تست	۰/۶۸±۰/۱۹	۰/۰۲±۰/۰۱	۶۳/۸۹±۱۶/۷۷	۸۰۲۵±۱۴۲۹	±۳/۱۷ ۷/۱۶×۱۰-۷	۵۲۲±۶۶۰
کنترل	۰/۷۷ ±۰/۲۲	۰/۰۲±۰/۰۱	۳۰۸±۱۶۹	۷۴۳۰±۱۲۶۹	±۲/۴۹ ۶/۰۳×۱۰-۷	-
P value	۰/۱	۰/۸۲	۱/۴×۱۰-۱۲	۰/۰۷	۰/۱۲	-

جدول۲. همبستگی بین فعالیت آنزیم آمینو پپتیداز، تیتر آنتی‌بادی، بیلی‌روبین، پروتئین، موادآنتی‌اکسیدان، کورتیزول با یکدیگر

		فعالیت آنزیم	تیتر آنتی‌بادی	بیلیروبین	پروتئین	مواد آنتی‌اکسیدان	کورتیزول/پرو تئین
فعالیت آنزیم	r	1.00	0.01	-0.02	-0.18	0.20	0.24*
	Pvalue	.	0.91	0.87	0.12	0.10	0.04
	N	67	37	66	67	67	67
تیتر آنتی‌بادی	r	0.01	1.00	0.14	-0.2	0.03	-0.07
	Pvalue	0.91	.	0.39	0.22	0.85	0.67
	N	37	37	36	37	37	37
بیلیروبین	r	-0.02	0.14	1.00	-0.2*	0.26*	0.14
	Pvalue	0.87	0.39	.	0.01	0.03	0.26
	N	66	36	66	66	66	66
مواد آنتی‌اکسیدان	r	0.20	0.03	0.26*	-0.5**	1.00	0.14
	Pvalue	0.10	0.85	0.03	0.00	.	0.25
	N	67	37	66	67	67	67
کورتیزول/ پروتئین	r	0.24*	-0.07	0.14	-0.34**	0.14	1.00
	Pvalue	0.04	0.67	0.26	0.004	0.25	.
	N	67	37	66	67	67	67

***Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).**
****. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).**
Correlation Coefficient=r , Sig. (2-tailed)= Pvalue , N=Number



شکل ۱. نمودار همبستگی فعالیت ویژه آنزیم و میزان کورتیکول در گروه تست و کنترل (شیب خط =r^2)

بحث و نتیجه‌گیری

در سرم افرادی که با دام سروکارندارند و تیتر آنتی‌بادی ضدبروسلا به روشSAT بالاتر از ۱۶۰ و به روش الایزا بالاتر از ۱۱ باشد، دلیل بر عفونت فعال در این افراد است (۱۹). بروسلوز بیماری مشترک میان انسان و حیوان است که از حیوان آلوده به انسان منتقل‌می‌شود. بروسلا با تشکیل فاگوزوم به سلول، وارد می‌شود. زمانی که بروسلا به سلول‌های فاگوسیت‌کننده، وارد می‌شود، به ساختارهای کشندگی سلول‌های فاگوسیت‌کننده مقاومت نشان‌می‌دهد. بروسلوز انسانی، اغلب با تثبیت ماکروفاژهای آلوده در مناطقی خاص از بدن (کبد، طحال، مغز، قلب و استخوان) مشخص می‌شود. بروسلوز باعث ایجاد اندوکاردیت، آرتریت، منتژیت و استئومیلیت و در بعضی موارد باعث مرگ می‌شود. یکی از راه‌های تشخیص آزمایشگاهی بروسلوز استفاده از روش‌های سروآگلوتیناسیون (SAT) برای تعیین تیتر آنتی‌بادی‌ها ضدبروسلا است. آنتی‌بادی‌ها اغلب در پایان هفته نخست بیماری در خون آشکار می‌شوند. ابتدا IgM و پس از آن IgG ظاهر می‌شود. در تست SAT وقوع پدیده‌هایی مانند زیادی آنتی‌ژن و آنتی‌بادی، تفسیر تست را مشکل‌می‌کند. تعیین آنتی‌ژن باکتری به روش الایزا (Linked Immunosorbent Assay Enzyme) به‌عنوان روش جایگزین کشت خون برای تشخیص بروسلوز مفید است؛ حساسیت این روش ۱۰۰ درصد و اختصاص‌های آن ۹۹/۲ درصد هستن. به دلیل مشکلاتی که بیماری ایجادمی‌کند، تشخیص بیماری و پیگیری درمان در بیماران بروسلوز اهمیتی خاص دارد. با توجه به گزارش‌هایی که نقش CD13 را در پروسیده‌کردن و عرضه آنتی‌ژن و ارائه آن به سلول‌های سیتم ایمنی در بیماری‌های مزمن و بدخیمی‌ها نشان‌داده‌اند، برای اولین‌بار در این مطالعه، اندازه‌گیری فعالیت ویژه CD13 و بررسی نقش عوامل مؤثر بر آن در افرادی با تیتر بالای آنتی‌بادی ضدبروسلا نشان‌داد که فعالیت CD13 اختلافی معنی‌دار را با افراد سالم نشان‌نمی‌دهد و میان فعالیت آنزیم و تیتر آنتی‌بادی همبستگی وجود‌ندارد؛ پس، از اندازه‌گیری فعالیت CD13 به‌عنوان روش تشخیصی یا نحوه پاسخ به درمان نمی‌توانیم استفاده‌کنیم. مطابق با سایر مطالعات در این بررسی نیز میزان کورتیزول سرم در افرادی با تیتر بالای آنتی‌بادی ضد‌بروسلا در مقایسه با گروه کنترل افزایش نشان‌می‌دهد (۲۰)؛ ازطرفی، میان میزان کورتیزول و فعالیت آنزیم، ارتباطی مثبت و معنی‌دار وجوددارد یعنی با افزایش کورتیزول در بیماران، فعالیت آنزیم بیشتر از افراد سالم است؛ همچنین درست مانند سایر بیماری‌های عفونی که بدن با التهاب حاد مواجه است، ما در سرم این افرادی با تیتر بالای آنتی‌بادی ضدبروسلا شاهد کاهش میزان آنتی‌اکسیدان‌های کل و بیلی‌روبین به‌عنوان یکی از آنتی‌اکسیدان‌های کل هستیم. با توجه به همبستگی میان فاکتورهای بررسی‌شده در سرم گروه تست مانند آنتی‌اکسیدان کل، بیلی‌روبین و پروتئین می‌توان از اندازه‌گیری این عوامل برای تشخیص و پیگیری درمان بهره‌برد.

منابع

1. Mina-Osorio P. The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. Molecular Medicine . 2008; 14(8): 361-371.
2. Van Hensbergen Y, et al. Soluble aminopeptidase N/CD13 inmalignant and nonmalignant effusions and intratumoral fluid. Clin. Cancer Res 2002; 8: 3747–3754
3. D. Thesis, and D.o.P. (Ph.D.). Generation and characterization of the CD13/aminopeptidase N knockout mouse .2009: Dissertation.
4. Sträter N, et al. A bicarbonate ion as a general base in the mechanism of peptide hydrolysis by dizinc leucine aminopeptidase. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999; 96(20): 11151-11155.
5. Hooper N.M. Families of zinc metallop roteases. FEBS Lett. 1994; 354: 1–6
6. Danziger R.S. Aminopeptidase N i n arterial hypertension. Heart Fai l. Rev. 2008;13:293–2 98.
7. Xu Y, et al. Subst ance P and bradykinin are natural inhibitor s of CD13/aminopeptidase N. iochem . Biophys . Res . Commun. 1995; 208: 664–674
8. Lohn M.e.a. Aminopeptidase N-mediated signal transduction and inhibition of proliferation of human myeloid cells. Adv. Exp. Med. Biol.1997;421: 85-91.
9. Mericas G , E.A , Hadziyannis St and Kakari S. The diagnostic value of serum leucine aminopeptidase. 1964;17(1): 52-55.
10. Vlahovic P, et al. Elevated serum dipeptidyl peptidase IV activity in patients with chronic tonsillitis. Ann Clin Biochem. 2007; 44: 70-4.
11. Tokuda, N and Levy R.B. 1,25-dihydroxyvitamin D3stimulates phagocytosis but suppresses HLA-DR and CD13 antigenexpression in human mononuclear phagocytes. Proc. Soc. Exp. Biol.Med. 1996; 211: 244–250
12. Amoscato A.A , et al. Rapid extracellular degradation of synthetic class I peptides by human dendritic cells. J. Immunol. 1998; 161: 4023–4032
13. Mantur BG, Amarnath SK , Shinde RS . Review of clinical and laboratory features of human Brucelosis. 2007; 25: 188-202
14. Spungin A , and Blumberg S. Enzymatic Assay of aminopeptidase I . European Journal of Biochemistry. 1989; 183: 471-477
15. Bradford D, M. M. A. rapid and sensitive method for the quantitaton of microgram quantities ofprotein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemestry. 1976; 722: 248-254.
16. Roberta R, Proteggente A, Ananth P, Min Y and Riceevans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radicalication decolorization assay. Free Radical Biology & Medicine. 1999; 26: 1231-1237.
17. Arakawa H , Maeda M ,Tsuji A . Anal Biochem. 1979; 97: 248.
18. T.L.e. Clinical Labratory Diagnostic, ed. TH-Book. Frankfurt. Verlagsgesellschaft. 1998;192-202.
19. Gazapo E, Gonzalez Lahoz J, Subiza JL, Baquero M , Gil J, de la Concha EG. Changes in IgM and IgG antibody concentrations in brucellosis over time: Importance for diagnosis and follow-up. J Infect Dis .1989;159 : 219-25.
20. Yildiz O, G. C., Alp E, Durak AC, Aygen B, Kelestimur F, Doganay M. Investigation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and changes in the size of adrenal glands in acute brucellosis. Endocr J .2005; 52(2): 183-188.

Daneshvar

Medicine

Evaluation of the enzyme activity of aminopeptidase N (CD13) in people with high level of brucella antibody

Narges Doostkhah[1], Sussan Kaboudanian Ardestani[2], Foruzandeh Jalilvand[3], Shohre Jalaeipour[4], Reza Hajehossaini[5], Abdolfattah Sarrafnejad[6]

1. Biochemistry Post-graduate Student, Tehran Payam Noor University, Iran.
2. Professor - Institute of Biochemistry and Biophysics, Tehran University, Tehran, Iran.
3. Graduated Biochemistry, Tehran University
4. Assistant Professor - School of Rehabilitation, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
5. Assistant Professor - Tehran Payam Noor University, Iran.
6. Professor of Immunology - Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

E-mail: nargesdoost58@gmail.com

Background and Objective: Aminopeptidases remove the amino acids from the N-terminal of proteins and peptides. Aminopeptidase N (CD13) and leucine aminopeptidase are involved in processing and presentation of pathogens to immune cells. Also, enzyme activity in some viral infection and tumors are high. In this study, the activity of CD13 in serum with high level of brucella antibody was measured. Due to the effect of protein, cortisol, bilirubin, and total antioxidant concentration on enzyme activity, these factors were also measured.

Materials and Methods: In this study, 37 sera with high level of brucella antibody and 30 sera from healthy subjects were collected and enzyme activity was measured by spectrophotometry using L-leucine para-nitro-anilid substrate. Protein concentration was determined by the Bradford method, total antioxidant levels was assessed by spectrophotometry method, cortisol level was measured by ELISA method and total bilirubin was determined by calorimetric method.

Results: CD13 activity was not significantly higher in test group than in healthy subjects and there was no correlation between enzyme activity and antibody titer in test group. But there was a direct positive and significant correlation between enzyme activity and cortisol levels. Also, there was a negative correlation between serum protein level with cortisol, bilirubin, and total antioxidant. Also, there was a positive correlation between bilirubin and total antioxidant in test group.

Conclusion: There were no correlation between brucella antibody titer and CD13 activity. Also, factors such as protein, reducing substances, bilirubin and cortisol did not interfere with the results achieved.

Key words: Aminopeptidase N (CD13), Brucella antibody titer, Bilirubin, Cortisol, Total antioxidant

Scientific-Research Journal of Shahed University Twenteeth Year, No.105 June- July, 2013

Received: 2013/6/17

Last revised: 2013/9/10

Accepted: 2013/9/14