به نام خدا

بیوشیمی و آسیب‌شناسی بالینی

مولف :

حمید اسلام پور

انتشارات ارسطو
(چاپ و نشر ایران)
۱۳۹۹

فهرست مطالب

فصل ۱ : سلول ۶

فصل ۲ : آب و بافر ۱۹

فصل ۳ : آنزیم‌شناسی ۲۸

فصل ۴ : آنزیم‌های بالینی ۴۴

فصل ۵ : چرخه کربس و زنجیره تنفسی ۵۷

فصل ۶ : استرس اکسیداتیو ۷۶

فصل ۷: کربوهیدرات‌ها ۸۹

فصل ۸ : اسیدهای چرب ۱۴۹

فصل ۹ : لیپیدها ۱۷۱

فصل ۱۰ : کلسترول ۱۸۹

فصل ۱۱ : لیپوپروتئین‌ها ۲۰۰

فصل ۱۲ : ایکوزانوئیدها ۲۱۷

فصل ۱۳ : اسیدهای آمینه ۲۲۵

فصل ۱۴ : پروتئین ها ۲۷۳

فصل ۱۵ : نوکلئوتیدها ۳۱۹

فصل ۱۶ : اسیدهای نوکلئیک ۳۳۴

فصل ۱۷ : متابولیسم هم ۳۵۱

فصل ۱۸ : آب و الکترولیت ها ۳۶۶

فصل ۱۹ : ویتامین‌ها و عناصر معدنی ۳۹۸

فصل ۲۰ : پیام‌رسانی سلولی ۴۳۸

فصل ۲۱ : هورمون‌ها ۴۵۸

فصل ۲۲ : غشاهای سلولی ۵۱۹

فصل ۲۳ : گلبول‌های قرمز ۵۴۵

فصل ۲۴ : انعقاد خون ۵۵۶

فصل ۲۵ : آنالیز مایعات بدن ۵۶۸

فصل ۲۶: بیوشیمی بافت‌ها ۶۰۴

فصل ۲۷ : تکنیک‌های تشخیص بیوشیمیایی ۶۳۸

فصل ۲۸: همانندسازیDNA ۶۷۹

فصل ۲۹: نوترکیبی DNA ۶۹۷

فصل ۳۰ : جهش‌ها و ترمیم DNA ۷۱۲

فصل ۳۱: رونویسی و پردازش RNA ۷۲۵

فصل ۳۲ : ترجمه و تغییرات پروتئین‌ها ۷۵۳

فصل ۳۳ : تنظیم بیان ژن ۷۸۹

فصل ۳۴: چرخه سلولی و سرطان ۸۰۴

فصل ۳۵: تکنیک‌های تشخیص مولکولی ۸۲۷

فصل ۳۶: محلول سازی ۸۶۷

فصل ۳۷: کنترل کیفی ۸۷۱

به نام او که کتاب و حکمت می‌آموزد.

پیشگفتار:

فراگیری علم بیوشیمی اغلب برای دانشجویان رشته‌های مختلف دشوار است. در عین حال یادگیری مباحث پایه بیوشیمی برای آن دسته از دانشجویان و نیز داوطلبانی که قصد شرکت در آزمون‌های مقاطع کارشناسی ارشد و دکتری تخصصی (Ph.D) رشته بیوشیمی را دارند ضروری می‌باشد. از این رو مجموعه ای از نکات اصلی بیوشیمی گردآوری شده است تا در اختیار دانشجویان عزیز قرار گیرد. لازم به ذکر است که مجموعه حاضر با اقتباس از کتب مرجع بیوشیمی نظیر بیوشیمی هارپر، لنینجر، دولین، هنری–دیویدسون، تیتز و ... نگاشته شده است؛ لذا پیشنهاد می‌شود قبل از مطالعه آن، مطالعه کافی از منابع فوق به عمل آورده شود. در آخر از تمامی عزیزان استدعا می‌شود نظرات خود را در مورد این اثر به آدرس الکترونیکی bidgani777@yahoo.com ارسال نمایند.

فصل ۱ : سلول

انواع سلول‌ها:

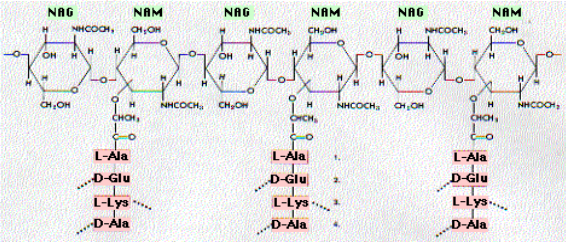
تمامی موجودات زنده را می‌توان در یکی از سه گروه اصلی آرکی باکتری ها، یوباکتری‌ها و یوکاریوت‌ها قرار داد. پروکاریوت‌ها شامل آرکی باکتری‌ها و یوباکتری ها، فاقد هسته سازمان یافته‌اند و ماده ژنتیکی آن‌ها به صورت یک توده مجزای فاقد غشاء به نام ناحیه نوکلئوئیدی مشاهده می‌شود. آرکی باکتری‌ها بر خلاف یوباکتری‌ها در دیواره سلولی خود پپتیدوگلیکان ندارند. همچنین در آرکی باکتری ها، همانند ژن‌های یوکاریوت‌ها اینترون وجود دارد. سلول‌های یوکاریوتی دارای هسته سازمان

یافته و اندامک‌های غشاء دار می‌باشند.

ساختمان دیواره سلولی باکتری‌ها :

دیواره سلولی باکتری‌ها از پپتیدوگلیکان ساخته شده است که تحت عنوان مورئین یا موکوپپتید نیز شناخته می‌شود. هر زنجیره پپتیدوگلیکان از دو بخش ساخته شده است: ۱- بخش گلیکان که از واحدهای تکراری N-استیل گلوکزآمین و N-استیل مورامیک اسید تشکیل شده است و به یک صورت یک در میان با واسطه پیوندهای بتا گلیکوزیدی در کنار یکدیگر قرار گرفته شده‌اند. ۲- بخش پپتیدی که پلیمری از چهار اسید آمینه است که به مورامیک اسید اتصال می‌یابد. این اسید آمینه‌ها به ترتیب عبارتند از: L-آلانین، D-گلوتامیک اسید، دی آمینوپیمیلیک اسید (یا L-لیزین) و D-آلانین. اتصال مورامیک اسید به زنجیره پپتیدی از طریق گروه هیدروکسیل لاکتات مورامیک اسید با گروه آمینو اسید آمینه اول زنجیره پپتیدی (L-آلانین) می‌باشد. لیزوزیم (مورامیداز) که به صورت طبیعی در اشک، بزاق و ترشحات

مخاطی وجود دارد، با شکســتن پیوندهای بتا گلیکوزیدی در ســاختمان زنجیره هتروپلی ساکاریدی، باعث تخریب پپتیدوگلیکان می‌شــود. در باکتری اشریشــیا کلی اتصال دو زنجیــره پپتیدی در ســاختمان پپتیدوگلیکان از طریق اتصال اســید آمینه ســوم یــک زنجیره پپتیدی با اســید آمینه چهارم زنجیره پپتیدی (D-آلانین) دیگر می‌باشــد. در اســتافیلوکوک اورئوس این اتصــال از طریق پل‌های عرضی پنتا گلیســین بین اســید آمینه ســوم یک زنجیره تتراپپتیــدی با اســید آمینه چهارم تتراپپتیــد (D-آلانین) دیگر صورت می‌گیرد.



شکل ۱-۱: ساختمان پپتیدوگلیکان دیواره سلولی باکتری ها

اندامک‌های سلولی:

هسته:

هســته توسط دو غشاء احاطه می‌شود. غشای خارجی هســته که در حقیقت امتداد غشای شــبکه آندوپلاسمی می‌باشــد با ســیتوزول در تماس است و غشای داخلی در تماس با محتویات درون هسته است. فضای بین دو غشاء از امتداد لومن شــبکه آندوپلاسمی خشن به وجود می‌آید. غشای داخلی هسته دارای پروتئین‌های اختصاصی است که جایگاه اتصال پروتئین‌هایی به نام لامین می‌باشــند. غشای خارجی و غشــای داخلی در فواصلی معین به هم پیوســته و ســوراخ‌ها یا منافذی را به نام منافذ هسته ای به وجود می‌آورند. این منافذ ساختارهای پروتئینی پیچیده ای هســتند که محل تــردد مولکول‌ها بین ســیتوزول و هسته می‌باشــند. انتقال ماکرومولکول ها، نیازمند صرف انرژی اســت و توســط مجموعه متنوعی از پروتئین‌های کارگــو (Cargo Proteins) و عوامــل انتقالی محلولی وساطت می‌شــود که میان این دو بخش در حال گردش

هســتند. لامین A، یک پروتئین ساختاری در هسته است که در ســنتز DNA و RNA هســته ای درگیر می‌باشد. این پروتئین از طریق یک واکنش کاتالیز شونده با آنزیم، از یک پروتئین پیش ســاز متصل به غشای هسته، ایجاد می‌شود. در بیماران ســندرم هاچینسون–گلیفورد پروگریا (HGPS)، بــه دلیل بروز اختلال در این واکنش آنزیمی، لامین A غیرطبیعی در ســلول‌های نرمال تجمع می‌یابد و ســبب پیر شدن سلول‌ها می‌شــود. حضور این پروتئین غیرطبیعی باعث تورم هســته، تغییر بیان ژن و اختلال در میتوز می‌شود.

شبکه آندوپلاسمی:

سیتوپلاســم ســلول‌های یوکاریوتــی دارای شــبکه گسترده ای از غشاهای ارتباطی است که از غشای هسته ای تا غشای پلاسمایی امتداد می‌یابد. این ساختار گسترده شبکه آندوپلاسمی (ER) نام دارد و متشکل از غشاهایی بــا ظاهر صــاف (ERصاف یــا SER) در برخی نقاط و غشــاهایی با ظاهر خشــن (ERخشن یا RER) در نقاط

دیگر می‌باشد. در طی قطعه قطعه شدن سلول، شبکه آندوپلاسمی تجزیه می‌شود و غشاها پس از ادغام مجدد با هم وزیکول‌های کوچکی تحت عنوان میکروزوم‌ها را تشکیل می‌دهند. این وزیکول‌ها در داخل سلول یافت نمی‌شوند.

ریبوزوم:

ریبوزوم‌ها بر روی شبکه آندوپلاسمی خشن و یا به صورت آزاد در سیتوزول وجود دارند و مسئول سنتز پروتئین‌ها می‌باشند و در ابعاد ۱ تا ۱۰۰ نانومتر وجود دارند. عملکرد اصلی ریبوزوم‌های شبکه آندوپلاسمی خشن بیوسنتز پروتئین‌ها به منظور ادغام آن‌ها با غشاءها و اندامک‌های سلولی و یا صدور آن‌ها به خارج از سلول می‌باشد. اکسپورتین ۱ (Exportin1) ناقل مربوط به انتقال زیر واحدهای ریبوزومی از هسته به سیتوپلاسم است.

دستگاه گلژی:

دستگاه گلژی شبکه ای متشکل از کیسه‌های غشایی صاف و هموار (سیسترنا) و وزیکول‌ها است و دارای دو سطح سیس و ترانس می‌باشد. وزیکول‌هایی که از کمپلکس‌های گلژی منشاء می‌گیرند، مسئول انتقال مواد به غشای پلاسمایی می‌باشند. فرآیندهای گلیکوزیلاسیون و تشکیل وزیکول‌های ترشحی در سطح ترانس گلژی صورت می‌گیرند. مرحله نهایی بیوسنتز گلیکواسفنگولیپیدها در دستگاه گلژی صورت می‌پذیرد. سندرم لوی (Lowe syndrome) با اختلال در ژن مسئول فسفاتیدیل اینوزیتول فسفاتاز واقع در بخش ترانس گلژی ایجاد می‌شود. سوبسترا برای این فسفاتاز یک فسفولیپید مهم در چند فرآیند اساسی سلول از جمله انتقال داخل سلولی، ترافیک سلولی، و پلیمریزاسیون اکتین اسکلت سلولی است. عوارض چشمی شامل گلوکوم یا کاتاراکت مادرزادی، عوارض مغزی شامل عقب ماندگی شدید ذهنی، عوارض کلیوی شامل آمینواسیدوری عمومی نوع فانکونی، اسیدوز توبولی کلیوی، و ریکتز هیپوفسفاتمیک

می‌باشد. در این بیماران، سطح لیزین ادرار نسبت به سایر آمینواسیدها بالاتر است.

میتوکندری:

میتوکندری‌ها به عنوان نیروگاه سلولی، مسئول سنتز بیش از ۹۰ درصد ATP مورد نیاز برای سلول هستند. علاوه بر این میتوکندری در اعمال مختلف سلولی از جمله آپوپتوز، تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن، پیام رسانی سلولی و فرآیندهای مختلف نیز شرکت دارد. میتوکندری یک اندام خود تکثیر نیست، زیرا ژن‌های بیش از ۹۰% کل پروتئین‌های میتوکندریایی در هسته وجود دارند. این پروتئین‌ها توسط ریبوزوم‌های آزاد سیتوزول سنتز می‌شوند. آنزیم‌های منوآمین اکسیداز و کینورنین هیدروکسیلاز در غشای داخلی میتوکندری و آنزیم‌های آدنیلات کیناز، نوکلئوزید دی فسفات کیناز و کراتین کیناز در فضای بین غشایی آن قرار دارند. از رنگ آمیزی سبز ژانوس برای مشاهده میتوکندری‌های فعال در سلول‌های زنده استفاده می‌شود.

لیزوزوم:

لیزوزوم‌ها عمدتا از بخش ترانس دستگاه گلژی منشاء می‌گیرند و مسئول هضم درون سلولی مواد خارج سلولی و داخل سلولی می‌باشند. لیزوزوم با داشتن یک غشای واحد، pH اسیدی داخل لیزوزومی را در حد ۵ حفظ می‌کند. تجزیه اسفنگولیپیدها در لیزوزوم‌های فاگوسیت‌های کبد صورت می‌گیرد. سلول‌های گیاهی معمولا فاقد لیزوزوم می‌باشند. از تست گومری برای مشخص کردن اسید فسفاتاز لیزوزومی استفاده می‌شود.

پراکسی زوم:

پراکسی زوم‌ها اندامک‌های کوچک و دارای اشکال کروی یا بیضوی بوده و توسط یک غشاء احاطه می‌شوند. آن‌ها در ماتریکس خود دارای شبکه نازکی از لوله‌ها هستند. این اندامک‌ها در اکسیداسیون اسیدهای چرب دارای زنجیره بسیار بلند و نیز سنتز گلیسرولیپیدها، پلاسمالوژن‌ها و ایزوپرونوئیدها نقش دارند. این اندامک

واجـد آنزیم‌هــای کاتــالاز، اوریــکاز (اورات اکســیداز)، D–آمینواســید اکســیداز، آلفا هیدروکسی اســید اکسیداز و گلیکــولات اکســیداز (آنزیم دخیــل در تنفس نوری در گیاهان) می‌باشد. اختلالات بیوژنز پراکسی زوم (PBDs) بیماری‌هــای اتوزوم مغلوب نادر هســتند کــه با کاهش مقادیر گلیســرول–اتر لیپیدها و پلاسمالوژن ها، افزایش مقادیر اســیدهای چرب با زنجیره بسیار بلند (C_{24} و C_{26}) و مشــتقات اسید کلســتانوئیک (پیش سازهای اسیدهای صفراوی) مشخص می‌شوند. از میان بیماری‌های PBDs ســندرم زلوگر (Zellweger syndrome) شــدیدترین بیمــاری بــوده که بــه دلیل فقــدان پراکســی زوم‌های عملکردی همراه با مرگ در قبل از ۶ ماهگی می‌باشد. در ایــن بیماری نقص ژنتیکی در مکانیســم ورود آنزیم‌ها به ماتریکس پراکسی زوم وجود دارد.

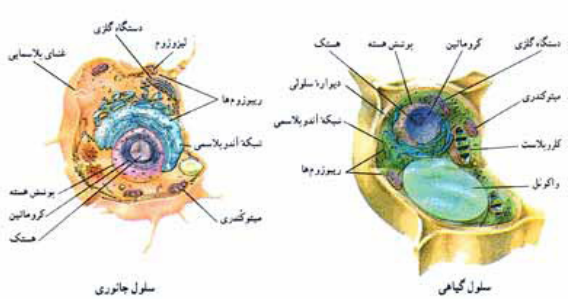
گلی اکسی زوم:

گلی اکسی زوم در اکسیداسیون چربی‌ها و تبدیل آن‌ها به قند که برای رشــد گیاه جوان لازم اســت، نقش دارد.

تبدیل لیپیدها به قند فقط در گلی اکسیزوم‌های دانه‌های گیاهی صورت می‌گیرد و چنین فرایندی در سلول‌های حیوانی دیده نمی‌شود. در این فرایند آنزیم‌های چرخه گلی اکسیلات نظیر ایزوسیترات لیاز و مالات سنتاز نقش دارند.

اسکلت سلولی:

سلول‌های یوکاریوتی حاوی ریز لوله ها، رشته‌های حد واسط و ریز رشته‌ها (رشته‌های اکتین) می‌باشند. اسکلت سلولی نقش مهمی در حفظ شکل سلولی، انتقال درون سلولی، حرکت و تقسیم سلول دارد.



شکل ۲-۱ : ساختمان سلول‌های یوکاریوتی

انواع سلول‌های بنیادی:

سلول بنیادی با پتانسیل خیلی بالا (totipotential stem cell):

توانایی تولید سلول‌های هر سه لایه جنینی (اکتودرم، مـزودرم و اندودرم) و حتی جفـت را نیز دارد، لذا می‌تواند منشاء یک ارگانیسم باشد.

سـلول بنیادی با پتانسـیل بـالا (pluripotential stem cell):

توانایی تولید همه سـلول‌های مربوط به هر سه لایه جنینی را دارد ولی قادر به ساختن جفت نمی‌باشد.

سلول بنیادی چند قوه ای متعهد (multipotential stem cell):

توانایی تولید فقط یک بافت را داشـته و خودسـازی (self-renewality) آن محـدود بوده و بیشـتر توانایی

تمایز دارد.

سـلول بنیادی تک قـوه ای (unipotential stem cell):

فقط توانایی ایجاد یک رده سـلول را داشته و قادر به خودسازی نبوده و تنها توانایی تمایز دارد.

فصل ۲ : آب و بافر

بافر:

بافر مخلوطی از یک اسید ضعیف و نمک آن می‌باشد. جزء پروتونه در برابر افزایش pH ناشـــی از افزودن بازها و جزء دپروتونه در برابر کاهش pHناشی از افزودن اسیدها مقاومـــت می‌کند. قدرت بافر بســـتگی بـــه pk گروه قابل یونیزاســـیون و غلظت‌های اســـید و باز کونژوگه بســـتگی دارد. زمانـــی یک بافر بـــه خوبی در برابـــر تغییرات pH مقاومـــت می‌کند که غلظت هر دو جزء آن بالا باشـــد. در pH برابـــر با pk، غلظـــت این دو برابر بوده و بیشـــترین مقاومت را در برابر تغییرات pH نشان می‌دهد.

بافرهای بدن:

بافر بی کربنات:

بافر بی کربنات (HCO_3^-،H_2CO_3) در غلظت بالا در خون وجود دارد و به عنــوان مهمترین بافر مایعات خارج سلولی عمل می‌کند. این بافر با دارا بودنpK برابر با ۶/۱، عملکرد ضعیف تری نسبت به بافرهای دیگر بدن دارد.

بافر فسفات:

بافــر فســفات (HPO_4^{--} ، $H_2PO_4^-$)، با غلظت کم در خون وجــود دارد و با دارا بــودن pk برابر ۶/۸، کارآترین بافر بدن به ویژه در مایع داخل سلولی محسوب می‌شود.

پروتئین‌ها:

پروتئین‌هــا به علت داشــتن گروه‌های قابــل یونیزه کربوکســیل و آمینو که به عنوان اسید و باز ضعیف عمل

می‌کنند، از جمله بافرهای بدن به شمار می‌آیند.

هموگلوبین:

هر مولکــول هموگلوبین دارای ۳۸ اســید آمینه His اســت. حلقــه ایمیــدازول Hisدارای pk نزدیک به pH فیزیولوژیک است، لذا هموگلوبین می‌تواند به عنوان یک بافر داخل سلولی عمل کند.

آنالیز گازهای خون شریانی (Arterial blood gases):

pH:

دامنه مرجع برای pH خون شــریانی ۷/۳۵ تا ۷/۴۵ و به طور متوســط ۷/۴۰ می‌باشد. pH خون شریانی ۰/۰۳ واحد کمتر از pH خون وریدی است.

فشار اکسیژن (PO_2):

نمایانگر میزان اکسیژن موجود در خون شریانی می‌باشد و مقدار طبیعی آن برابر با ۹۵ mmHg است. در آنالیزور گازهای خونی از یک سنسور الکتروشیمیایی (آمپرومتر) برای اندازه گیری PO_2 استفاده می‌شود.

فشار دی اکسید کربن (PCO_2):

نمایانگر میزان دی اکسید کربن موجود در خون شریانی می‌باشد و مقدار طبیعی آن برابر با ۴۰ mmHg است. مقدار Co_2 حل شده در خون تحت دمای ۳۷ درجه سانتیگراد از رابطه به دست می‌آید: $dCO2 = PCO2 \times 0.03$

بی کربنات (HCO_3^-):

مقدار طبیعی HCO_3^- خون شریانی برابر با mmol/L ۲۴ است که ۲۰ برابر بیشتر از غلظت H_2CO_3 خون می‌باشد.

CO_2 تام (Total CO_2):

شـامل مجموع غلظت یون بی کربنـات (HCO_3^-)، کربنیک اسید (H_2CO_3) و دی اکسید کربن (CO_2) خون اسـت. حدود ۹۸% میزان CO_2 تام را یـون بی کربنات تشکیل می‌دهد، لذا میزان CO_2 تام تقریبا برابر با غلظت HCO_3^-، یعنی حدود ۲۵/۲ mEq/L می‌باشد.

درصد اشباع اکسیژن (SaO_2):

رایـج ترین روش جهـت اندازه گیری درصد اشـباع اکسیژن (SaO_2) خون شـریانی، تکنیک نوری است. در این روش با آنالیز شدت نور عبوری از نمونه خون می‌توان میزان SaO_2 را محاسبه کرد.

افزایش باز (Base Excess, BE):

به مقدار اسـید یا بازی اطلاق می‌گردد که برای حفظ pH در حـد طبیعـی و نیـز حفظ بی کربنـات به میزان

۲۴ mEq/L مورد نیاز اســت. به عبــارت دیگر مقدارBE وابسته به تجمع اسید یا باز غیر فرار در خون است. مقدار طبیعی BEبین ۲- و ۲+ متغیر بوده و بر حسب mEq/L بیان می‌شود. افزایش BE از ۲+ نمایانگر احتباس باز غیر فــرار یا به عبارت دیگر آلکالوز متابولیک و کاهشBE از ۲- نمایانگــر احتباس اســید غیر فرار یا بــه عبارت دیگر اسیدوز متابولیک است.

باز بافر (Buffer Base, BB):

یک معیار تشــخیصی برای تغییرات متابولیک اسید و باز اســت و هنگامی به کار برده می‌شود که تعادل اسید-باز با تعادل الکترولیت‌ها مورد مقایســه قرار گیرد. در واقع BB حاصــل جمع آنیون‌های پلاســما یعنی تغییرات بی کربنات، پروتئین، هموگلوبین‌ها و فسفات‌ها بوده و مقدار آن برابر با ۴۲ mmol/L اســت. رابطه ســاده ای بینBE و BB پلاســما وجود دارد که عبارتست ازBB=BE+42 و از آنجایــی کهBE پلاســما در حالت تعادل تقریبا برابر صفر اســت،BB=42 خواهد بود. در صورت بروز آلکالوز

متابولیـک مقـدار آن افزایـش یافته و در صـورت ایجاد اسـیدوز متابولیک از میزان آن کاسـته می‌شود. تغییرات CO_2 خون شریانی تاثیری روی مقدار BB ندارد.

شکل ۱-۲ : دستگاه آنالیزر گازهای خون

اختلالات اسید و باز:

برخی از عوامل ایجاد اسیدوز تنفسی:

شایع ترین علت اسیدوز تنفسـی، بیماری‌های ریوی مزمن انسـدادی (COPD)، و علت کمتر شایع آن، تولید

بیش از حد CO_2 به دلیل سریع شدن متابولیسم یا افزایش متابولیسم کربوهیدرات‌ها است؛ مهار مرکز تنفسی واقع در بصل النخاع توسط داروها یا ضایعات عصبی نیز می‌تواند از دیگر عوامل ایجاد اسیدوز تنفسی باشد.

برخی از عوامل ایجاد اسیدوز متابولیک:

کتواسیدوز دیابتی، اسیدوز لاکتیک، کاهش دفع اسیدها از کلیه‌ها در نارسایی‌های کلیوی، دفع بیش از حد بی کربنات در اسهال شدید، مسمومیت با منواکسید کربن (CO)، مسمومیت با سالیسیلات‌ها به علت تولید اسیدهای آلی، مسمومیت با متانول به علت تولید اسید فرمیک و فرمالدهید، مسمومیت با اتیلن گلیکول (ضد یخ) به علت تولید گلیکولیک اسید و اگزالیک اسید، اورمی

برخی از عوامل ایجاد آلکالوز تنفسی:

افزایش تهویه (مثلا در تشنج)، مسمومیت با سالیسیلات‌ها (آسپیرین) در بزرگسالان به علت تحریک

مرکز تنفسی و دفع CO_2 ، تب

برخی از عوامل ایجاد آلکالوز متابولیک:

مصرف بیش از حد داروهای قلیایی مانند بی کربنات، دفع HCl از معده به علت استفراغ شدید، تزریق مکرر خون به دلیل افزایش سیترات خون (سیترات در بدن به بی کربنات تبدیل می‌شود)، هیپرآلدوسترونیسم (به علت بازجذب فعال سدیم به همراه بی کربنات و افزایش ترشح یون H^+)، مصرف بیش از حد دیورتیک‌ها (به علت افزایش بازجذب سدیم به همراه ترشح یون H^+ و افزایش بازجذب بی کربنات)، تزریق داخل وریدی مایعات کم پتاسیم

فصل ۳ : آنزیم‌شناسی

آنزیم‌ها:

پروتئین‌هایی هستند که واکنش‌های زیستی را کاتالیز می‌کنند. با این حال RNAهای کاتالیتیکی (ریبوزیم) نیز شناسایی شده‌اند که در فرآیند پیرایش اینترون‌ها شرکت می‌کنند.

آبزیم‌ها:

آنزیم‌های هســتند که با طراحی آنتــی بادی بر علیه آنالوگ‌های حالت گذار واکنش‌های شیمیایی سنتز شده‌اند.

ایزوزیم‌ها:

ایزوزیم‌ها اشــکال ساختاری مختلف پروتئینی هستند که یک واکنش مشابه را کاتالیز می‌کنند. آن‌ها محصولات ژن‌های مختلفی هســتند که درجات خاصی از تشــابه در توالی خود داشته و می‌توانند ویژگی‌های کینتیکی و توزیع بافتی متفاوت داشته باشند.

طبقه بندی آنزیم‌ها:

بــرای هر آنزیم یــک EC.name و EC. number تعیین شــده اســت. در EC. Number، عدد اول، دوم ، ســوم و چهارم به ترتیب نشــان دهنده طبقــه، گروه، زیر گروه و نوع واکنش می‌باشند.

گروه ۱: اکسیدوردوکتازها:

واکنش‌های اکسیداســیون–احیاء را کاتالیز می‌کنند و شامل دهیدروژنازها، اکسیدازها، ردوکتازها، پراکسیدازها،

کاتالازها، اکسیژنازها و هیدروکسیلازها می‌باشند.

گروه ۲: ترانسفرازها:

یک گروه شیمیایی را از یک مولکول به مولکول دیگر منتقل می‌کنند.

گروه ۳: هیدرولازها:

واکنش‌های هیدرولیز را بـا افزودن آب به یک پیوند شیمیایی کاتالیز می‌کنند.

گروه ٤: لیازها:

لیازهـا باعث افزودن گروه‌ها بـه پیوندهای دوگانه و یا ایجاد پیوندهای دوگانه با برداشـت گروه‌ها می‌شـوند و شـامل دکربوکسـیلازها، آلدولازها، دهیدراتازها (مانند انولاز و فوماراز)، هیدراتازها و سنتازها می‌باشند.

گروه ۵: ایزومرازها:

جابــه جایی یک گروه یا یک پیوند دوگانه داخل یک مولکــول را کاتالیز می‌کنند و شــامل اپیمرازها، موتازها و راسمازها می‌باشند.

گروه ٦: لیگازها:

با صرف انرژی (عمدتــا از ATP) موجب ایجاد پیوند بین دو مولکول می‌شوند. مانند کربوکسیلازها و سنتتازها

انواع واکنش‌های کاتالیزی آنزیم ها:

کاتالیز همجواری:

از طریق اتصال به سوبسترا و افزایش غلظت سوبسترا با موقعیت مناسب در جایگاه فعال

کاتالیز اسید-بازی:

با همکاری زنجیره‌های جانبی اسـید آمینه موجود در جایگاه فعال آنزیم به عنوان یک اسید یا باز ضعیف. مانند واکنش کاتالیز بازی اسـترازها و یا آنزیم‌های آسـپارتیک پروتئازی نظیر پروتئاز HIV

کاتالیز به واسطه کشش:

از طریق اتصال به سوبسـترا و تغییر ساختمان آن در جهت سست نمودن برخی پیوندها

کاتالیز کووالانسی:

از طریـق ایجاد اتصال کووالانسـی بین یک ریشـه موجود در جایگاه فعال آنزیم نظیر سیسـتئین، سـرین و هیسـتیدین با یک گروه عاملی که در داخل یک مولکول یا بین دو مولکول انتقال داده می‌شود. نظیر کیموتریپسین و فروکتوز ۲ و ۶-بیس فسفاتاز

واکنش‌های دو سوبسترایی:

واکنش‌هایی را که از دو نوع سوبسترا، دو نوع محصول متفاوت ایجاد می‌شود، واکنش‌های دو سوبسترایی (BiBi) گویند. بر اساس توالی شرکت سوبستراها در واکنش دو نوع واکنش آنزیمی وجود دارد:

۱) واکنش‌های ترتیبی یا تک جایگزینی:

در این واکنش‌ها هر دو سوبسترا اتصال یافته و ایجاد کمپلکس سه تایی می‌گردد. بر اساس ترتیب اتصال سوبستراها دو نوع واکنش متوالی وجود دارد:

- تصادفی یا نامنظم: دو سوبسترای A و B می‌توانند با هر ترتیبی اضافه شوند. مانند کینازها و دهیدروژنازها
- اجباری یا منظم: اتصال مثلا A قبل از اتصال B ضروری است. مانند دهیدروژنازهای وابسته به NAD(P)

۲) واکنش‌های پینگ-پنگی یا دو جایگزینی:

در ایـن واکنش‌ها ابتـدا گروه Xبه گـروه A منتقل شـده و محصول P به وجود می‌آید، سپس جابه جایی X به وسـیله اتصال سوبسـترای دوم یعنی B باعث تشکیل محصول دیگر یعنی Q می‌شـود. ماننـد ترانس آمینازها، دهیدروژنازهـای وابسـته به FAD و کربوکسـیلازهای وابسـته به بیوتین. در واکنش‌های ترانس آمیناسیون ابتدا کربن گروه آلدهیدی پیریدوکسـال فسفات (PLP) و اتم نیتروژن ریشه لیزین آنزیم ایجاد باز شیفت اولیه می‌نمایند. سـپس گروه آمینوی اسید آمینه سوبسترا با گروه ε-آمینو لیزین جایگزین شـده و یک پیوند باز شیف جدید با گروه آمین سوبسترای آمینواسید شکل می‌گیرد.

نقش یون‌های فلزی در واکنش‌های آنزیمی:

یون‌های فلزی دارای نقش‌های ساختاری مانند Zn و Fe، اسید لوئیس مانندMn ، دهنده یا گیرنده الکترون در واکنش‌های اکسیداسیون-احیاء مانند Cu و Fe، تشکیل

کمپلکس سه تایی پل فلزی از طریق اتصال سوبسترا یا ATP به آنزیم مانند Mg ، تثبیت کنفورماسیون فعال آنزیم از طریق اتصال مستقیم به آن و یا القاء تشکیل جایگاه فعال آنزیم مانند Na^+، Mn^{++} و K^+ (به عنوان مثال K^+ موجب تحریک کنفورماسیون اصلی در پیروات کیناز می‌شود).

مرتبه واکنش‌های آنزیمی:

مرتبه واکنش یک شاخص برای بیان تعداد عوامل واکنشگر موثر بر سرعت واکنش می‌باشد. مرتبه کینتیکی یک واکنش نشان می‌دهد که چند مولکول در آهسته ترین مرحله واکنش با یکدیگر واکنش می‌دهند. این میزان برابر مجموع توان‌ها در معادله واکنش می‌باشد.

واکنش مرتبه صفر:

در واکنش مرتبه صفر، سرعت واکنش یک مقدار ثابت و مستقل از غلظت سوبسترا می‌باشد.

واکنش مرتبه اول:

در واکنش مرتبه اول، سرعت واکنش تنها وابسته به غلظت یک سوبسترا می‌باشد.

واکنش مرتبه دوم:

در واکنش مرتبه دوم، سرعت واکنش وابسته به غلظت دو سوبسترا می‌باشد.

عدد نوسازی (Turnover number) یا ثابت کاتالیتیک (k_{cat}):

برابر با تعداد مول سوبسترایی است که توسط یک مولکول آنزیم در واحد زمان (ثانیه) به محصول تبدیل می‌شود.

معادله میکائیلیس-منتن (Michaelis-Menten):

$$V_0 = V_{max} [S] / K_m + [S]$$

در این رابطه فرض بر این است که غلظت سوبسترا نسبت به غلظت آنزیم آن قدر زیاد است که تشکیل کمپلکس آنزیم-سوبسترا (ES) اثر قابل توجهی بر روی غلظت سوبسترا ندارد. ضریب میکائیلیس (Km)، غلظتی از سوبسترا است که در آن غلظت سرعت واکنش آنزیمی نصف حداکثر سرعت واکنش است و واحد آن میلی مول در لیتر می‌باشد.

معادله لینوور-برک: (Lineweaver-Berk):

$$1/V_0 = (K_m/V_{max}) 1/[S] + 1/V_{max}$$

$$m = K_m/V_{max}$$

معادله ادی-هافستی (Eadie-Hofstee):

$$V_0/[S] = V_{max}/K_m - V_0/K_m$$

$$m = -1/K_m$$

برای به دســت آوردن این معادله، باید دو طرف رابطه لینوور-برک را در V0Vmax ضرب کرد.

معادله هانس (Hanes):

$$[S]/V_0 = [S]/V_{max} + K_m/V_{max}$$

$$m = 1/V_{max}$$

ثابت ویژگی آنزیم:

نسبت k_{cat}/K_m می‌باشد. این نسبت یک ثابت سرعت درجه دوم با واحد $M^{-1}s^{-1}$ اســت. حداکثر ثابت ویژگی در مورد یک آنزیم توســط سرعت انتشار سوبسترا و آنزیم در

محلول تعیین می‌گردد.

واحدهای اندازه گیری فعالیت آنزیم ها:

واحد بین المللی (IU):

میزان آنزیمی اســت که در هر دقیقه یک میکرومول سوبسترا را به محصول تبدیل می‌کند.

واحد کاتال:

میزان آنزیمی است که در هر ثانیه یک مول سوبسترا را به محصول تبدیل می‌کند.

فعایت ویژه آنزیم:

میــزان فعالیــت موجود در هــر میلی گــرم پروتئین می‌باشد.

مهارکننده‌های آنزیمی:

مهارکننده‌های رقابتی (Competitive):

این نوع مهار کننده‌ها با سوبسترا جهت اتصال به جایگاه فعال آنزیم آزاد (E) رقابت می‌کنند. در مهار رقابتی مقدار Vmax ثابت، ولی Km افزایش می‌یابد.

رابطه Km ظاهری در مهار رقابتی:

$$K_m^{app} = K_m (1 + [I] / K_i)$$

مهارکننده‌های غیر رقابتی (Noncompetitive):

این نوع مهار کننده‌ها هم به آنزیم آزاد (E) و هم به کمپلکس آنزیم-سوبسترا (ES) متصل می‌شوند. در مهار غیر رقابتی، مقدار K_m ثابت، ولی V_{max} کاهش می‌یابد. مهار مخلوط (Mixed) نوعی مهار غیر رقابتی

است که در آن‌ها ثابت تعادل کمپلکس مهار کننده–آنزیم (EI) و کمپلکس آنزیم–سوبسترا (ES) برابر است.

رابطه Vmax ظاهری در مهار غیر رقابتی:

$$V_{max}^{app} = V_{max} (1 + [I] /K_i)$$

مهارکننده‌های نارقابتی (Uncompetitive):

این نوع مهار کننده‌ها ترجیحا به کمپلکس آنزیم–سوبسترا (ES) متصل می‌شوند. در مهار نارقابتی مقدار K_m و V_{max} هر دو کاهش می‌یابند. مهار سوبسترایی نوعی مهار نارقابتی است که در آن مهار کننده به کمپلکس آنزیم–سوبسترا (ES) متصل می‌شود.

مهار کننده‌های برگشت ناپذیر:

ترکیباتی چون دی ایزوپروپیل فلوئوروفسفات و یا دی ایزوپروپیل فسفوفلوریدات با اتصال کووالانسی به گروه

هیدروکسیل ریشه سرین جایگاه فعال آنزیم‌های سرین پروتئاز نظیر استیل کولین استراز سبب مهار برگشت ناپذیر آن‌ها می‌شوند (در جایگاه فعال تمامی سرین پروتئازها سه اسید آمینه سرین، هیستیدین و آسپارتات وجود دارد). در مهار برگشت ناپذیر مقدار K_m و V_{max} هر دو کاهش می‌یابند.

آنزیم‌های آلوستریک:

آنزیم‌های آلوستریک مولکول‌های الیگومر متشکل از دو یا چند زیر واحد زوج (پروتومر) می‌باشند. این آنزیم‌ها علاوه بر جایگاه فعال، دارای یک جایگاه تنظیمی نیز می‌باشند. آنزیم‌های آلوستریک به دو نوع آرایش فضایی متفاوت وجود دارند که یکی از آن‌ها فعال (R) و دیگری غیر فعال (T) می‌باشد. فعالیت این آنزیم‌ها به وسیله ترکیبات اثر کننده یا افکتور تغییر می‌کند. آنزیم‌های آلوستریک از معادله میکائیلیس–منتن پیروی نمی‌کنند و به جای منحنی هیپربولیک (سهمی) دارای منحنی سیگموئیدی (S) هستند. ترکیبات فعال

کننده یا افکتور مثبت، منحنی را به سمت چپ و ترکیبات مهار کننده یا افکتور منفی، منحنی را به سمت راست جا به جا می‌کنند. معمولا محصولات آن‌ها روی آنزیم اثر مهاری دارند. بر اساس نحوه اثر افکتور آنزیم‌های آلوستریک در یکی از دو سری K و V قرار می‌گیرند: در سری K کینتیک اشباع آنزیمی مشابه مهارکننده‌های رقابتی می‌باشد که در آن V_{max} تغییر نمی‌کند. در این حالت دو نوع اتصال افکتوری مثبت و منفی وجود دارد. در سری V کینتیک آنزیم آلوستریک مشابه کینتیک مهار کننده غیر رقابتی است که در آن K_m ثابت بوده و با افزایش سوبسترا فعالیت آنزیم به حداکثر نمی‌رسد (کاهش V_{max}).

فصل ۴ : آنزیم‌های بالینی

لاکتات دهیدروژناز (LD):

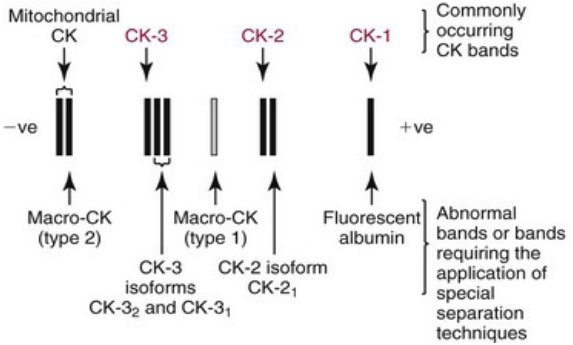
این آنزیم واکنش برگشت پذیر تبدیل پیروات به لاکتات را کاتالیز می‌کند. واکنش در pH حدود ۷/۴ تا ۷/۸ بیشتر به سمت لاکتات و در حدود ۸/۸ تا ۹/۸ به سمت پیروات است. LDپروتئین تترامری است که دارای ۵ ایزوآنزیم مختلف متشکل از دو نوع زیر واحد متفاوت قلبی (H) و عضله ای (M) می‌باشد. زیر واحد H تمایل بیشتری به لاکتات دارد، لذا بیشتر تولید پیروات می‌کند (اغلب در شرایط هوازی). ایزوزیم‌های LDشامل LD1 (HHHH)، LD2 (HHHM)، LD3 (HHMM)،

(HMMM LD4) و(MMMM LD5) می‌باشند. LD1و LD2 اغلب در عضله قلب و گلبول‌های قرمز،LD3 عمدتا در مغز، ریه و کلیه، و LD5در کبد و عضله اسکلتی وجود دارد. در حالت طبیعی، LD2 دارای بیشترین سطح سرمی در بین ایزوآنزیم‌های LDمی باشد. در انفارکتوس میوکارد (MI)، میزان LD ظرف ۱۲ تا ۱۸ ساعت افزایش یافته و بعد از گذشت ۱ تا ۳ روز به حداکثر می‌رسد و تا بعد از ۸ تا ۱۴ روز به سطح طبیعی خود بر می‌گردد. در MI به دلیل افزایش LD1، نسبتLD1 به LD2 افزایش می‌یابدکه به این حالت،Flipped LD گفته می‌شود.

کراتین کیناز (CK):

این آنزیم واکنش برگشت پذیر تبدیل کراتین به کراتین فسفات را کاتالیز می‌کند. در pH حدود ۹/۰ به سمت کراتین فسفات و pH حدود ۶/۷ به سمت کراتین است. این واکنش نیازمند یون Mg^{++} است. کراتین کیناز دارای ایزوآنزیم‌های CK-MB، CK–BB (CK1) (CK2 و(CK3 CK-MM) می‌باشد.CK-BB بیشتر

در مغز وجود داشــته و بیشــترین حرکت به ســوی آند را دارد. CK-MB بیشــتر در عضلــه قلبی وجود داشــته و دارای حرکت متوســط به ســمت آند می‌باشد. CK-MM بیشتر در عضله اسکلتی وجود داشته و کمترین حرکت به سوی آند را دارد. در صورتی که CK به ایمونوگلوبولین‌ها متصل شــود، کمپلکس CK Macro تشکیل می‌دهد که در الکتروفورز بین CK2 و CK3 قرار می‌گیرد. ایزوآنزیم CK میتوکندری (CK-Mt) در ســنتز کراتین فســفات از ATP در میتوکنــدری نقش دارد. افزایش CK در ســکته قلبــی، بیماری‌هــای عضله اســکلتی مانند دیســتروفی عضلانی (۵۰ تا ۱۰۰ برابر مقدار طبیعی)، تزریق عضلانی و ورزش شدید دیده می‌شود. در آسیب عضله قلب، میزان CK-MB ظرف ۶ ساعت افزایش یافته و طی ۲۴ ساعت به حداکثر مقدار خود می‌رسد و در نهایت طی ۲ تا ۳ روز به مقدار طبیعی خود بر می‌گردد.



شکل ۱-٤: ایزوآنزیم‌های CK

آلانین ترانس آمیناز (ALT):

افزایش مقادیر ALT در هپاتیت ویروسی، هپاتیت سمی، یرقان انسدادی، سکته قلبی و مصرف برخی داروها دیده می‌شود.

آسپارتات ترانس آمیناز (AST):

این آنزیم در سیتوپلاسم و در غشای میتوکندری تعداد

زیادی از سلول‌ها از جمله کبد، قلب، ماهیچه اسکلتی و گلبول‌های قرمز وجود دارد. ایزوآنزیم غالب در سرم از نوع سیتوپلاسمی است. افزایش مقادیر AST در سکته قلبی، هپاتیت ویروسی، سیروز کبدی، آسیب عضله اسکلتی، آمبولی ریه، پانکراتیت حاد و کم خونی همولیتیک دیده می‌شود.

فسفاتاز قلیایی (ALP):

فسفاتاز قلیایی (ALP) هیدرولیز پیوندهای فسفومنواستری ترکیبات آلی را در pH قلیایی (حدود ۹ تا ۱۰) کاتالیز می‌کند. آنزیم دارای Zn^{++} بوده و برای فعالیت خود نیاز به یون‌های Mn^{++}، Mg^{++} و Co^{++} دارد. فسفاتاز قلیایی یک آنزیم متصل به غشای سلولی بوده و دارای ایزوآنزیم‌های کبدی، استخوانی، روده ای و جفتی است. افزایش ALP کبدی در انسداد صفراوی دیده می‌شود. ALP استخوانی در بیماری‌های استخوانی، بیماری پاژه، هیپرپاراتیروئیدیسم و رشد استخوانی در بچه‌ها افزایش می‌یابد. از نظر مقاومت به حرارت ۵۶ درجه

سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه، ایزوآنزیم استخوانی دارای بیشترین حساسیت، ایزوآنزیم‌های کبدی و روده ای دارای حساسیت متوسط و ایزوآنزیم جفتی-سرطانی (رگان) فاقد حساسیت می‌باشد. در حضور اوره ۳ مولار، ۹۰% فعالیت ایزوآنزیم استخوانی و ۶۰% فعالیت ایزوآنزیم‌های کبدی و روده ای مهار می‌شود ولی ایزوآنزیم جفتی-سرطانی (رگان) مقاوم به اوره است. فنیل آلانین سبب مهار عمده ایزوآنزیم‌های جفتی و روده ای می‌شود. مسمومیت مزمن با فلوئور (فلوئوروزیس) سبب افزایش ALP سرمی می‌شود و کمبود کلسیم اثر آن را تشدید می‌کند.

فسفاتاز اسیدی (ACP):

این آنزیم واکنش مشابه ALP را کاتالیز می‌کند ولی pH مطلوب آن اسیدی (حدود ۵) می‌باشد. ACP دارای دو ایزوآنزیم پروستاتی و غیر پروستاتی است. افزایش ACP پروستاتی در سرطان پروستات اهمیت دارد. ایزوآنزیم ACP پروستاتی با تارتارات و ایزوآنزیم ACPغیر پروستاتی توسط فرمالدهید، اوره و Cu^{++} مهار می‌شود.

گاماگلوتامیل ترانسفراز (GGT):

این آنزیم متصل به غشای سلولی کانالیکول‌های کبدی و به ویژه مجاری صفراوی وجود دارد. این امر موجب شده که مقدار آن در تمام اختلالات کبدی و صفراوی افزایش یابد. مقدار GGT در پانکراتیت حاد، بیماری‌های کلیوی، مصرف الکل و فنوباربیتورات‌ها نیز افزایش می‌یابد. بیشترین افزایش مقدار آنزیم در یرقان انسدادی یا متاستاز کبدی دیده می‌شود. فعالیت GGT در خانم‌ها به علت سرکوب شدن فعالیت این آنزیم توسط هورمون‌های استروژنی و پروژسترونی کمتر از مردان است.

آلفا-آمیلاز:

آلفا-آمیلاز دارای دو نوع بزاقی (S) و پانکراسی (P) می‌باشد و برای فعالیت خود نیاز به یون‌های Cl^- دارد. آمیلاز به علت کوچک بودن، به طور طبیعی در ادرار دفع می‌شود. آمیلاز یک آنزیم پایدار است و در نمونه سرم تا یک هفته در دمای اتاق ماندگار است. با توجه به

این که آمیلاز برای فعالیت کامل به یون‌های کلسیم نیاز دارد، لذا در نمونه‌های پلاسما که با سیترات یا اگزالات از انعقاد آن‌ها جلوگیری می‌شود، فعالیت آنزیم به طور کاذب کمتر نشان داده شده است. افزایش مقادیر آمیلاز در پانکراتیت حاد، اوریون، نارسایی کلیوی، انسداد مجاری صفراوی و زخم‌های پپتیک دیده می‌شود. مقدار آمیلاز سرم معمولا ۲ تا ۱۲ ساعت پس از ایجاد درد شکمی حاد ناشی از پانکراتیت به ۲ تا ۶ برابر مقدار طبیعی رسیده و در مدت ۳ تا ۴ روز، به حد طبیعی برمی گردد. آمیلاز ادراری همزمان با نوع سرمی آن به حداکثر رسیده، اما مقدار آن افزایش بیشتری دارد و به مدت یک هفته در سطح بالا باقی می‌ماند. در پانکراتیت مزمن اغلب تخریب سلول‌های آسینی اتفاق می‌افتد که به توقف تولید آمیلاز و لیپاز منجر می‌شود.

روش متداول تعیین فعالیت آمیلاز، روش ساکاروژنیک می‌باشد که در آن از نشاسته به عنوان سوبسترا استفاده می‌شود. در این روش میزان قند احیاء کننده ای که از عمل آمیلاز به وجود می‌آید، اندازه گیری می‌شود؛ سپس

فعالیت آنزیم که متناسب با میزان قند احیاء کننده است محاسبه می‌شود. مقدار آمیلاز در واحد سوموجی بیان می‌شود؛ واحد سوموجی برابر با میزان فعالیتی از آمیلاز است که یک میلی گرم گلوکز را پس از انکوباسیون سرم و نشاسته به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد از نشاسته جدا می‌کند. در روش آمیلوکلاستیک (نشاسته-ید)، نشاسته ای که با ید پیوند شیمیایی دارد، به عنوان سوبسترای آمیلاز به کار می‌رود. همزمان با هیدرولیز مولکول نشاسته توسط آمیلاز، ید نیز آزاد شده که در نتیجه آن از شدت رنگ آبی تیره کمپلکس نشاسته-ید کاسته شده و میزان کاهش رنگ متناسب با میزان فعالیت آمیلاز است. در روش کرومولیتیک (رنگ-نشاسته)، از نشاسته ای که یک ماده رنگی به آن متصل است، به عنوان سوبسترا استفاده می‌شود. در حین هیدرولیز سوبسترا توسط آمیلاز، مولکول‌های رنگی از آن آزاد می‌شود. شدت رنگ متناسب با فعالیت آمیلاز است. ماکروآمیلازمی، افزایش آمیلاز سرم بدون علائم بالینی واضح می‌باشد. ماکروآمیلاز کمپلکس آمیلاز طبیعی متصل به آنتی بادی

موجود در گردش خون اســت، که به علت بزرگی توســط گلومرول‌ها تصفیه نمی‌شود. تشــخیص ماکروآمیلازمی، مستلزم نشــان دادن مستقیم مولکول‌های ماکروآمیلاز با اواتراســانتریفوژ و کروماتوگرافی یا تکنیک‌های فیزیکی دیگر است.

لیپاز:

در پانکراتیــت حاد مقــدار لیپاز پلاســما کمی زودتر از آمیــلاز یعنی ۴ تا ۸ ســاعت بعد از شــروع پانکراتیت حاد زیاد می‌شــود و طی ۲۴ ســاعت به ۲ تا ۱۰ برابر حد طبیعــی افزایش یافتــه و مدت زمان طولانی نســبت به آمیــلاز یعنی ۸ تــا ۱۴ روز باقی می‌ماند. لذا اندازه گیری آن در پانکراتیت حاد، حساس تر و اختصاصی تر از آمیلاز می‌باشــد. مســمومیت با دگزامتازون باعث افزایش لیپاز سرمی می‌شود.

الاستاز:

در پانکراتیت مزمن عود کننده و پانکراتیت حاد نسبت به فعالیت آمیلاز سـرم به میزان بیشتری افزایش می‌یابد. علاوه بر افزایش مقادیر، مدت زمان بیشتری نیز در سرم پایدار می‌ماند. لذا الاسـتاز بهتر از فعالیت آمیلاز نمایانگر وضعیت بالینی می‌باشد.

کولین استراز (Ch.E):

کولین استراز یک آنزیم متصل به غشای سلولی بوده و به دو نوع وجود دارد: کولین استراز نوع ۱ (کولین استراز واقعـی) که در ماده خاکسـتری مغـز، گلبول‌های قرمز، ریـه و طحـال وجود دارد و کولین اسـتراز نوع ۲ (کولین استراز کاذب) که در ماده سفید مغز، سرم، کبد و پانکراس دیده می‌شود. سطح سـرمی کولین استراز در مسمومیت با حشره کش‌ها (سـموم ارگانوفسفره) کاهش می‌یابد. از علائم مسمومیت با سموم ارگانوفسفره می‌توان به تهوع، استفراغ، تعریق، ترشح بزاق، تنگ شدن مردمک، گرفتگی

عضلات، تشـنج و کما اشاره کرد. سـطح سرمی کولین اسـتراز در عوارض کبدی کاهـش می‌یابد و این کاهش متناسـب با کاهش آلبومین اسـت. کاهش آن در هپاتیت تا ۵۰٪ و در سـیروز تا ۷۰٪ است. در عفونت‌های حاد، کم خونی و سوء تغذیه نیز سطح آنزیم کاهش می‌یابد. در بیماران حسـاس به سوکسینیل کولین (داروی شل کننده عضلانی) مقدار فعالیت کولین استراز در حضور مهارکننده دی بوکائین کاهش نشـان می‌دهد. سـطح سرمی آنزیم کولین اسـتراز در نقائص لوله عصبی (NTD) و سـندرم نفروتیک افزایش می‌یابد.

آلدولاز A:

آلدولاز دارای سـه ایزوآنزیم A، B و C است. آلدولاز A، ایزوآنزیم غالب بوده و عمدتا در عضله اسـکلتی وجود دارد. بیشترین میزان افزایش آن در بیماری‌های عضلات اسکلتی دیده می‌شود. سـطح سرمی آلدولاز A در سکته قلبـی تـا ۱۵ برابـر، در هپاتیت تا ۲۵ برابـر، در عوارض نئوپلاسـتیک تـا ۱۰ برابر و در عـوارض عضلانی نظیر

دیستروفی عضلانی تا ۵۰ برابر افزایش می‌یابد.

آنتی ژن اختصاصی پروستات (PSA):

یک گلیکوپروتئین با فعالیت سرین پروتئازی در سلول‌های پروستات است و به صورت آزاد و متصل وجود دارد. افزایش نسبت آزاد به تام PSA در هیپرپلازی خوش خیم پروستات و کاهش آن در سرطان پروستات دیده می‌شود.

۵'-نوکلئوتیداز (5N):

یک آنزیم متصل به غشای سلولی بوده و مقدار آن در انسداد صفراوی افزایش می‌یابد.

آدنوزین دآمیناز (ADA):

بیشترین میزان افزایش ADA در بیماری‌های تنفسی مانند سل (توبرکلوز) دیده می‌شود.

فصل ۵ : چرخه کربس و زنجیره تنفسی

کمپلکس پیروات دهیدروژناز:

پیــروات حاصــل از گلیکولیــز و ســایر مســیرهای متابولیکی توســط کمپلکس پیــروات دهیدروژناز واقع در ماتریکس میتوکندری (متصل به غشای داخلی) به استیل کوآ و CO_2 تبدیل می‌شود. کمپلکس پیروات دهیدروژناز متشــکل از سه آنزیم پیروات دهیدروژناز (E1) با کوآنزیم تیامیــن پیروفســفات (TPP)، دی هیدرولیپوئیل ترانس اســتیلاز (E2) با کوآنزیم لیپوآمید (لیپوئیک اسید با پیوند

آمیدی به لیزین زیر واحد ترانس استیلاز متصل شده و لیپوآمید نامیده می‌شود) و دی هیدرولیپوئیل دهیدروژناز (E3) با کوآنزیم FAD که با اتصال محکم به زیر واحد دی هیدرولیپوئیل دهیدروژناز چسبیده است. حین انجام واکنش، انتقال الکترون‌ها به FAD، منجر به تولید FADH2 می‌شود. در نهایت الکترون‌ها از FADH2 به NAD^+ منتقل شده و NADH تولید می‌شود.

پیروات دهیدروژناز توسط پروتئین کیناز وابسته به Mg^{++}-ATP که محکم به کمپلکس چسبیده است و ریشه سرین آنزیم را فسفریله می‌کند، غیر فعال می‌شود. پروتئین کیناز با NADH و استیل کوآ فعال و توسط ADP، NAD^+، CoASH و پیروات مهار می‌شود. پیروات دهیدروژناز توسط فسفوپروتئین فسفاتاز که اتصال سست به کمپلکس دارد فعال می‌شود. پروتئین فسفاتاز توسط یون های Mg^{++} و Ca^{++} تحریک می‌شود. انسولین، پیروات دهیدروژناز بافت چربی، و کاتکول آمین‌ها مانند اپی نفرین پیروات دهیدروژناز بافت قلبی را فعال می‌کنند. اثرات هورمون‌ها بر پیروات دهیدروژناز مستقیما به واسطه

cAMP صورت نمی‌گیرد، زیرا پروتئین کیناز و پروتئین فسفاتاز مربوط به پیروات دهیدروژناز به cAMP وابسته نیستند. یون‌های جیوه و آرسنیت با تشکیل کمپلکس با گروه تیول (SH–) لیپوئیک اسید آنزیم E2 آن را مهار می‌نمایند. زیر واحد پروتئین کیناز کمپلکس پیروات دهیدروژناز با دی کلرواستات مهار می‌شود. نقائص کمپلکس پیروات دهیدروژناز با اسیدوز لاکتیک و تجمع پیروات همراه می‌باشند.

واکنش‌های چرخه کربس:

این واکنش‌ها در ماتریکس میتوکندری صورت می‌گیرند و شامل مراحل زیر می‌باشند:

مرحله ۱: ترکیب استیل کوآ و اگزالواستات و تولید سیترات توسط سیترات سنتاز

مرحله ۲: تبدیل سیترات به آکونیتات توسط آکونیتاز (با افزودن یک مولکول آب) و تبدیل آکونیتات به ایزوسیترات توسط آکونیتاز (با حذف یک مولکول آب).

آکونیتاز دارای یک گروه آهن–سولفور (S–Fe) غیر همی است که در مکانیسم کاتالیتیکی دخالت می‌کند. آکونیتاز توسط فلوئورواستات مهار می‌شود.

مرحله ۳: تبدیل ایزوسیترات به آلفا–کتوگلوتارات و تولید یک مولکول NADH و CO_2 توسط ایزوسیترات دهیدروژناز. ایزوسیترات دهیدروژناز به وسیلهADP و AMP تحریک و به وسیله ATP و NADH مهار می‌گردد.

مرحله ۴: تبدیل آلفا–کتوگلوتارات به سوکسینیل کوآ و تولید یک مولکول NADH و CO_2 توسط آلفا–کتوگلوتارات دهیدروژناز (کمپلکس مشابه پیروات دهید روژناز)

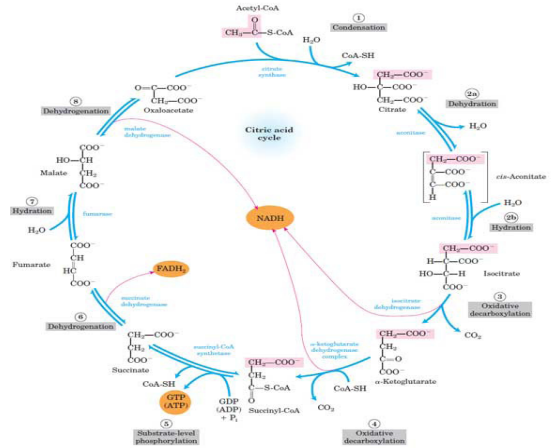
مرحله ۵: تبدیل سوکسینیل کوآ به سوکسینات و تولید یک مولکول GTP توسط سوکسینات تیوکیناز یا سوکسینات سنتتاز

مرحله ۶: تبدیل سوکسینات به فومارات و تولید یک مولکول FADH۲توسط سوکسینات دهیدروژناز. کمپلکس آنزیمی سوکسینات دهیدروژناز به صورت محکم

به غشـــای داخلی میتوکندری متصل اســـت. سوکسینات دهیدروژناز به شدت به وسیله مالونات و اگزالواستات مهار و به وسیله ATP و Piفعال می‌شود.

مرحلــه ۷: تبدیــل فومارات به مالات توســط فوماراز (فومـــارات دهیدراتاز) با افــزودن یک مولکول آب. کمبود فوماراز با فوماریک اســیدوری همراه است. اولین جهشی که در ژن فوماراز مشـــخص شـــد، جایگزینی گلوتامات با گلوتامین ۳۱۹ بود.

مرحله ۸: تبدیل مالات به اگزالواســـتات توسط مالات دهیدروژناز و تولید یک مولکول NADH



شکل ۱-۵ : چرخه کربس

اجزای زنجیره تنفسی:

فلاووپروتئین ها:

دارای FAD هستند و الکترون‌ها و پروتون‌ها (H+) را دریافت نموده و انتقال می‌دهند.

پروتئین‌های آهن-سولفور (Fe-S):

دارای آهــن غیر همی بــوده و در انتقال تک الکترون نقش دارند. در این پروتئین‌ها اتصال Fe به اتم ســولفور ریشه سیستئین پروتئین می‌باشد.

یوبی کینون (کوآنزیم Q):

الکترون‌ها و پروتون‌ها (H^+) را دریافت نموده و سپس الکترون‌ها را در اختیار سیتوکروم‌ها قرار می‌دهد.

سیتوکروم ها:

دارای گروه پروســتتیک هم هســتند که دو اتم آهن آن در حالــت Fe^{+++} الکترون‌ها را قبول نموده و در حالت Fe^{++} الکترون را به جزء بعدی می‌دهند تا به حالت Fe^{+++} برگردند. تمامی ســیتوکروم‌ها از انواع دهیدروژنازهای بی هوازی هســتند به غیر از سیتوکروم a3 که به عنوان یک اکسیداز الکترون‌ها را در اختیار O_2 قرار می‌دهد.

انواع سیتوکروم ها:

سیتوکروم‌های نوع:a

دارای پروتوپورفیرین IX به همراه یک گروه فرمیل و یک زنجیره جانبی ایزوپرنوئید هستند.

سیتوکروم‌های نوع:b

دارای پروتوپورفیریــن IX موجــود در هموگلوبیــن و میوگلوبین می‌باشند. این نوع مولکول‌های هم درون غشا قرار گرفته و قادر به اتصال با O_2 نیستند.

سیتوکروم‌های نوع:c

در هم نوع cزنجیره‌های جانبی وینیل پروتوپورفیرین IX از طریــق اتصال کووالانســی تیواتری به سیســتئین پروتئین متصل شده است. در بین سیتوکروم‌های زنجیره تنفسی سیتوکروم c تنها سیتوکروم محلول و آزاد زنجیره

بوده و با نیروی الکترواستاتیکی ضعیفی به سطح خارجی غشـای داخلی متصـل اسـت. در سـیتوکروم c آهن با نیتروژن هیسـتیدین ۱۸ و اتم سولفور متیونین ۸ پروتئین پیوند کوئوردینانسی برقرار کرده و از این طریق از اتصال هم به اکسیژن جلوگیری به عمل می‌آید.

کمپلکس‌های زنجیره تنفسی:

اجزای زنجیره تنفسی بر اساس افزایش میزان پتانسیل احیاء (تمایل به الکترون) قرار می‌گیرند.

$$NADH \rightarrow CoA\ Q \rightarrow Cyt\ b \rightarrow Cyt\ c_1 \rightarrow Cyt\ c \rightarrow cyt\ a \rightarrow Cyt\ a_3 \rightarrow O_2$$

کمپلکس I (NADH–دهیدروژناز):

بزرگتریـن کمپلکس این زنجیره بوده و دارای FMN و Fe-Sمی‌باشـد. روتنون (حشره کش رایج) پیریسیدین و باربیتورات‌ها (نظیر آمیتال، آموباربیتال، سکوباربیتال) با

اتصـــال بـــه کمپلکس I و جلوگیری از انتقـــال الکترون از مراکز Fe-S، از احیاء یوبی کینون جلوگیری می‌کند.

کمپلکس II (سوکسینات دهیدروژناز):

متشـــکل از چهـــار زنجیره پلی پپتیدی بـــوده و دارای FAD و Fe-S و سیتوکروم b560 است. آنزیم گلیسرول ۳-فســـفات دهیدروژناز یـــک نـــوع فلاووپروتئین با یک زنجیر پلی پپتیدی در ســـطح غشـــای داخلی میتوکندری بوده و الکترون‌های گلیســـرول ۳-فســـفات را به واسطه FADمســـتقیما به یوبی کینون منتقل می‌کند. آسیل کوآ دهیدروژناز فلاووپروتئینی اســـت که الکترون‌ها را از اسید چرب به FAD و ســـپس به فلاووپروتئیـــن انتقال دهنده الکترون (ETF) منتقل می‌کند. سپس الکترون‌ها از ETF به ETF-یوبی کینون اکســـید و ردوکتاز که الکترون‌ها را مستقیما به یوبی کینون غشاء داخلی منتقل می‌کند انتقال می‌یابند. کمپلکس II قادر بـــه انتقال پروتون‌ها از عرض غشای داخلی نمی‌باشد و به وسیله مالونات، کربوکسین و تنوایل تری فلوئورواستن مهار می‌شود.

کمپلکس III (یوبی کینون-سیتو کروم c اکسید و ردوکتاز):

دارای سیتوکروم‌های b (b562 و b566)، Cyt c_1 و Fe-S ریسکه (Fe متصل به His) می‌باشد. این کمپلکس مسئول انتقال الکترون‌ها از CoA Q به Cyt c است. آنتی مایسین A و دی مرکاپرول انتقال الکترون‌ها از Cyt b به Cyt c_1 را مهار می‌کنند؛ لذا مانع از انتقال الکترون‌ها از CoA Q به Cyt c می‌شوند.

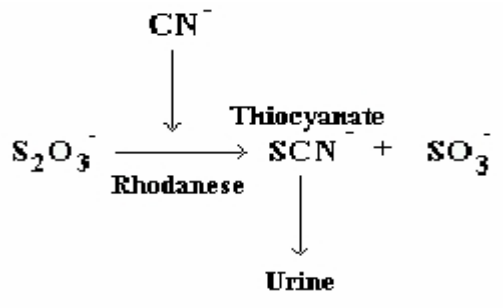
کمپلکس IV (سیتوکروم اکسیداز):

دیمری است که هر منومر آن دارای ۱۳ زنجیره پلی پپتیدی است. زیر واحدهای ۱، ۲ و ۳ آن توسط ژنوم میتوکندریایی و بقیه توسط ژنوم هسته کد می‌شوند. این کمپلکس فاقد Fe-S می‌باشد. تمامی کوفاکتورها در دو زیر واحد قرار دارند: زیر واحد ۱ حاوی دو سیتوکروم a و a_3 و یک یون CuB و زیر واحد ۲ حاوی دو یون CuA است. هم a_3 و CuB الکترون‌ها را از هم a دریافت

کرده و به O_2 متصل به هم a_3 انتقال می‌دهند. در این کمپلکس چهار الکترون و چهار پروتون از ماتریکس به O_2 منتقل شده و آن را به دو مولکول آب احیا می‌کنند. کمپلکس IV به وسیله منواکسید کربن (CO)، سیانید (CN-)، آزید (N_3^-) و سولفید هیدروژن (H_2S) مهار می‌شود. سیانید و آزید محکم به شکل اکسید شده هم (Fe^{+++} a_3) متصل شده و از انتقال الکترون‌ها از هم به مرکز دو هسته ای جلوگیری می‌کنند. منواکسید کربن در رقابت با O_2 به شکل احیاء هم (Fe^{++} a_3) متصل شده و از انتقال الکترون به O_2 جلوگیری می‌کند. نیتریک اکسید (NO) با پیوند ضعیف به سیتوکروم‌ها و سایر هموپروتئین‌ها متصل می‌شود. NO با اشغال جایگاه های O_2، به عنوان مهارکننده رقابتی آنزیم سیتوکروم اکسیداز عمل می‌کند.

از نیترات‌ها به عنوان پادزهر جهت مقابله با مسمومیت سیانیدی استفاده می‌شود. این ترکیبات با اکسیداسیون Fe^{++} به Fe^{+++}، اکسی هموگلوبین را به متهموگلوبین تبدیل می‌کند. متهموگلوبین (Fe^{+++}) برای تشکیل

کمپلکس سیانید–متهموگلوبین با سیتوکروم Fe^{+++} هم a_3 رقابت می‌کند. همچنین مصرف تیوسولفات ($S_2O_3^{2-}$) موجب واکنش سیانید با آنزیم روداناز و تشکیل تیوسیونات (SCN–) غیر سمی می‌شود. روداناز (به نام تیوسولفات سولفور ترانسفراز، تیوسولفات سیانید ترانس سولفوراز و تیوسولفات تیوترانسفراز نیز شناخته می‌شود)، یک آنزیم میتوکندریایی است که سیانید را به وسیله تبدیل آن به تیوسیانات سمیت زدایی می‌کند. این واکنش در دو مرحله انجام می‌شود؛ در مرحله اول، تیوسولفات با گروه تیول یا سولفیدریل (SH-) سیستئین ۲۴۷، به شکل پرسولفیت (SO_3^-) و سولفیت (SO_3^{2-}) درمی آید. در مرحله دوم، پرسولفیت با سیانید واکنش می‌دهد و تولید تیوسیانات می‌نماید و تیول سیستئین به حالت اول بر می‌گردد.



شکل ۲-۵: واکنش روداناز

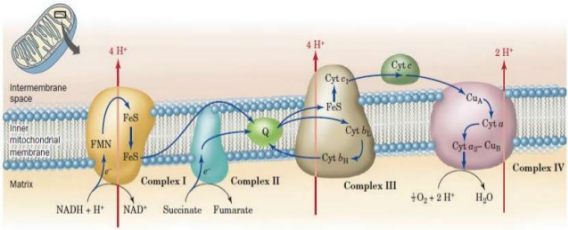
کمپلکس V (ATP سنتاز):

با استفاده از انرژی گرادیان پروتون ایجاد شده در عرض غشای داخلی میتوکندری، سنتز ATP را کاتالیز می‌کند. از میان چهار کمپلکس زنجیره انتقال الکترون، کمپلکس‌های I، III و IV انرژی حاصل از انتقال الکترون را با پمپ پروتون از ماتریکس به فضای بین دو غشای میتوکندری به شکل گرادیان پروتونی ذخیره می‌کنند. ATP سنتاز دارای دو دومن F1 و F0 می‌باشد: جزء

F0، یک پروتئین سراسری است که یک منفذ برای عبور پروتون‌ها در غشای داخلی میتوکندری ایجاد می‌کند و از سه زیر واحد a، b و c تشکیل شده است. جزء F1، یک کمپلکس محیطی (سرهای کروی) در سمت ماتریکس است و از ۹ زیر واحد از ۵ نوع مختلف به صورت $\alpha\delta\varepsilon\gamma\beta_3\beta_3$تشکیل شده است. جزء F1 به طور مجزا، یک ATPase بوده و جایگاه اتصالی ATP و ADP بر روی زیر واحدهای α و β و جایگاه کاتالیتیکی آن بر روی زیر واحد β قرار گرفته است. زیر واحد γ، هسته مرکزی F1 را تشکیل می‌دهد. زیر واحد δ در اتصال دومن F1 به غشاء دخالت دارد. ترکیباتی چون اولیگومایسین، ونتوریسیدین، اوروورتین، و دی سیکلوهگزیل کربودی ایمید (DCCD) با مهار کمپلکس V (ATP سنتاز)، به طور کامل اکسیداسیون و فسفریلاسیون را مهار می‌کنند. در این کمپلکس، ابتدا ATP و سپس آب تولید می‌شود.

ترانس لوکاز ATP-ADP :

ADP را بــه ماتریکــس وATP را به خــارج انتقال می‌دهد. توســط آتراکتیلوزید و بونگ کرکیک اسید مهار می‌شود.



شکل ۳-۵ : زنجیره انتقال الکترون

عوامــل جداکننــده اکسیداســیون از فسفریلاسیون:

ایــن ترکیبات بــا انتقال پروتون‌ها از عرض غشــا به داخــل ماتریکــس میتوکندری شــیب پروتونی را کاهش داده و فسفریلاسیون (سنتز ATP) را از اکسیداسیون جدا

می‌کنند. این عوامل عبارتند از: تیروکسین، اسیدهای چرب، بیلی روبین، ترموژنین (UCP-1)، ۲، ۴-دی نیترو فنول (DNP)، کلروکربونیل سیانید فنیل هیدرازین (CCCP)، یونوفورهایی نظیر والینومایسین (تریمر تتراپپتیدی حلقوی، یونوفور K^+ و Rb^+)، نیگرسین (یونوفور K^+ و H^+)، آلامتیسین (یونوفور K^+ و Rb^+)، گرامیسیدین A (یک کانال دیمر برای عبور یون‌های K^+، Na^+، Rb^+ و H^+ ایجاد می‌کند.)

اختلالات ارثی میتوکندریایی:

نوروپاتی بینایی ارثی لبر (LHON):

به علت جهش‌های تک بازی در ژن‌های میتوکندریایی سه زیر واحد کمپلکس I زنجیره تنفسی (ND1, ND4, ND6) ایجاد می‌شود.

صرع میوکلونیک و فیبر خشن-قرمز (MERRE):

به علت جهش در ژن tRNA-لیزین میتوکندری ایجاد می‌شود.

میوپاتی، آنسفالوپاتی، اسیدوز لاکتیک همراه با حمله (MELAS):

به علت جهش در ژن tRNA-لوسین میتوکندری ایجاد می‌شود.

سندرم کرن-سایر (Kearns-Sayre syndrome):

به علت جهش در ژن tRNA-لوسین میتوکندری ایجاد می‌شود.

سندرم لی (Leigh syndrome):

بـه علـت جهش‌هـای نقطـه ای در ژن زیـر واحد ATPase 6 میتوکندری ایجاد می‌شود.

سندرم پیرسون (Pearson syndrome):

به علت جهش‌های بزرگ در DNA میوکندری ایجاد می‌شـود و بـا علائم عـدم کفایت پانکـراس، پان سـیتوپنی، کم خونی سیدروبلاستیک، اسیدوز لاکتیک و بروز سندرم کرن–سایر در دهه دوم زندگی همراه می‌باشد.

فصل ۶ : استرس اکسیداتیو

گونه‌هـای واکنشـگر اکسـیژن (ROS) و نیتروژن (RNS):

آنیون سوپراکسید (O_2^-):

طی واکنش‌هـای اکسیداسـیون NADH در زنجیره انتقال الکترون تولید می‌شود.

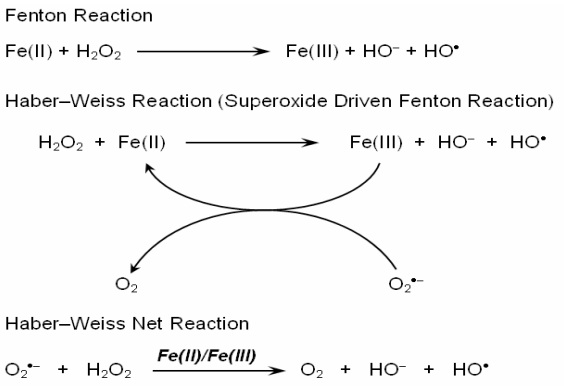
پراکسید هیدروژن (H_2O_2):

طـی واکنش‌های متابولیک مختلف در بدن و به ویژه

در پراکسی زوم تولید می‌شود.

رادیکال هیدروکسیل (OH):

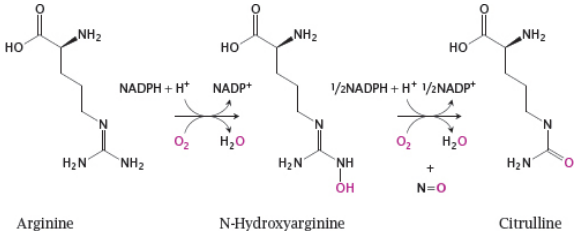
فعال ترین گونه واکنشگر اکسیژن است و طی دو واکنش فنتون و هابر–ویس تولید می‌شود. در واکنش فنتون، H_2O_2 در حضور Fe^{++} به رادیکال هیدروکسیل (OH) و آنیون هیدروکسیل (OH^-) تبدیل می‌شود. این واکنش با اکسیداسیون یون فرو (Fe^{++}) به فریک (Fe^{+++}) همراه بوده و توسط یون کوپرو (Cu^+) نیز انجام می‌شود. در واکنش هابر–ویس، از واکنش O_2^- و H_2O_2 در حضور یون‌های فلزی مانند Fe^{++} و Cu^+، ترکیبات OH، O_2 و OH^- تولید می‌شوند.



شکل ۱-٦: واکنش‌های فنتون و هابر-ویس

نیتریک اکسید (NO):

یک عامل متسع کننده عروقی است که در پاسخ به استیل کولین در سلول‌های اندوتلیال عروق سنتز می‌شود. NO توسط آنزیم نیتریک اکسید سنتاز (NOS) و در حضور NADPH وO_2، ضمن تبدیل آرژینین به سیترولین تولید می‌شود. NOS دارای گروه پروستتیک هم می‌باشد.



شکل ۲-٦: واکنش تولید NO از آرژینین

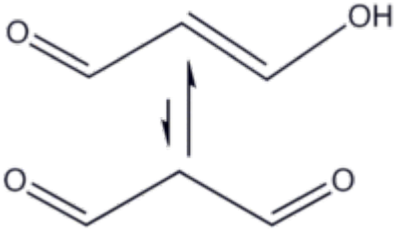
پراکسی نیتریت (ONOO-):

یک ماده اکسیدان قوی است که از ترکیب آنیون سوپراکسید و نیتریک اکسید تولید می‌شود.

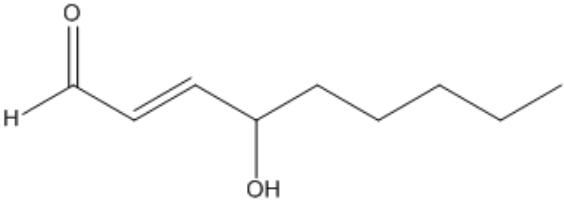
پراکسیداسیون لیپیدها:

پراکسیداسیون لیپیدها منجر به تولید مالون دی آلدهید (MDA)، اتان، پنتان و ۴-هیدروکسی نوننال (4-HNE) می‌شود. ۸-ایزوپروستان (8-Isoprostane) یکی دیگر از محصولات استرس اکسیداتیو لیپیدها

بـوده که از اکسیداسـیون آراشـیدونیک اسـید به وجود می‌آید. لیپوفوشـین مخلوطـی از لیپیدهای متصل به هم و محصولات پراکسیداسیون لیپیدها می‌باشد که در طول دوره زندگی در لیزوزوم افراد مسـن تجمع می‌یابد از این رو آن را رنگدانه پیری می‌نامند.



شکل ۳-٦: مالون دی آدهید (MDA)



شکل ٤-٦: ٤-هیدروکسی نوننال (HNE-٤)