

تاثیر سالبوتامول در کاهش پلیمریزاسیون آلفا-۱ آنتی تریپسین

سیده مریم حسینی PhD

گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

صادق حسن‌نیا* PhD

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

بیژن رنجبر* PhD

گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

آلفا-۱ آنتی تریپسین یک گلیکوپروتئین متشکل از ۳۹۴ آمینواسید با وزن ۵۲ کیلودالتون است. این پروتئین به‌طور عمده توسط سلول‌های هیپاتوسیت سنتز و به بافت‌های ریوی ترشح می‌شود و نقش اساسی در حفاظت بافت ریه در مقابل اثر نوتروفیل‌لاستاز دارد. از چالش‌های عمده در مواجهه با آلفا-۱ آنتی تریپسین، ناپایداری ساختاری فرم تاخوردی این پروتئین و در نتیجه تجمع آن به‌صورت پلیمرهای غیرفعال در بافت ریه است. این امر فرد را مستعد ابتلا به بیماری‌های مزمن ریوی، آسم شدید و آمفیوزم می‌نماید. یکی از درمان‌های رایج برای این اختلال، تزریق داخل وریدی آلفا-۱ آنتی تریپسین است. از طرفی، بیماران کاندید دریافت آلفا-۱ آنتی تریپسین، دارای علائم اختلال تنفسی هستند و استفاده از بازکننده‌های برونش (سالبوتامول) خط اول درمان محسوب می‌شود. در این مطالعه تخلیص پروتئین توسط روش کروماتوگرافی تمایلی انجام و خلوص آن توسط روش ژل الکتروفورز تایید شده است. اثر غلظت‌های مختلف سالبوتامول بر پلیمریزاسیون آلفا-۱ آنتی تریپسین القا شده توسط حرارت در دمای ۶۰°C با روش‌های الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌امید غیردنا توره‌کننده، پراکندگی دینامیکی نور و دورنگ‌نمایی دورانی مورد سنجش قرار گرفته است. فعالیت پروتئین توسط روش تعیین ظرفیت مهار تریپسین بررسی شده است. نتایج نشان می‌دهند که سالبوتامول با کاهش انعطاف‌پذیری حلقه مرکزی واکنشگر، سبب کاهش سرعت پلیمریزاسیون و در نتیجه کاهش سرعت ازدست‌رفتن فعالیت در پروتئین آلفا-۱ آنتی تریپسین می‌شود. این افزودنی می‌تواند گزینه مناسبی برای همراهی پروتئین آلفا-۱ آنتی تریپسین و راهکاری مناسب برای درمان بیماری‌های وابسته به پلیمریزاسیون این پروتئین باشد.

کلیدواژه‌ها: آلفا-۱ آنتی تریپسین، سالبوتامول، پلیمریزاسیون، فعالیت، طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۰۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۲۹

*نویسنده مسئول اول: Ranjbarb@modares.ac.ir

*نویسنده مسئول دوم: Hasannia@modares.ac.ir

مقدمه

زیست‌فناوری دانشگاه تربیت مدرس
۱۱، شماره ۳، تابستان ۱۳۹۹

آلفا-۱ آنتی تریپسین یک گلیکوپروتئین ۵۲ کیلودالتونی متشکل از ۳۹۴ آمینواسید است. این پروتئین یکی از اعضای اصلی خانواده بزرگ مهارکننده‌های سرین‌پروتئاز (Serine Protease Inhibitors; Serpin)، با اندازه متوسط حدود ۳۰/۷×۶ نانومتر است [1,2]. آلفا-۱ آنتی تریپسین بیش از ۸۰٪ توسط هیپاتوسیت‌ها سنتز و ترشح می‌شود. همچنین در مقادیر کمتر، به‌وسیله ماکروفاژها، مونوسیت‌ها، پانکراس، انتروسیت، اندوتلیوم تولید می‌شود و در خون دارای نیمه‌عمر ۴ تا ۵ روز است [2-5]. انسان روزانه مقدار ۳۴ میلی‌گرم بر هر کیلوگرم وزن بدن از این پروتئین را تولید می‌کند و در نتیجه باعث می‌شود که غلظت پلاسمايي این پروتئین در خون بین یک تا ۲ گرم بر لیتر ثابت بماند. غلظت سرمی آلفا-۱ آنتی تریپسین در موارد التهاب یا صدمه بافتی تا مقدار ۴ برابر افزایش می‌یابد. ۸۰٪ این پروتئین از پلاسما به فضاهای میان‌بافتی و ۵ تا ۱۰٪ به مایعات زیستی، شامل مایع آلوئولار جایی که غلظت موضعی آن ۰/۱ تا ۰/۳ گرم بر لیتر می‌رسد، انتشار می‌یابد [6-8]. این پروتئین نقش اساسی در حفظ تعادل پروتئاز-آنتی پروتئاز داشته و بیش از ۹۰٪ فعالیت آنتی پروتئازی سرم انسانی را تامین می‌نماید [6,9]. با وجود نام‌گذاری آلفا-۱ آنتی تریپسین این پروتئین اثر مهارتی بزرگ‌تری بر نوتروفیل‌لاستاز در مقایسه با تریپسین دارد و عملکرد اصلی آن محافظت بافت در مقابل نوتروفیل‌لاستاز است و نقش کم‌رنگ‌تری در حفاظت مقابل آسیب ایجاد شده به‌وسیله سایر سرین‌پروتئازها دارد [1,3,9]. ساختار کریستال آلفا-۱ آنتی تریپسین بر پایه ۳ صفحه بتا و یک حلقه مرکزی واکنشگر (Reactive Center Loop; RCL) که به‌عنوان محل اتصال پروتئاز هدف عمل می‌کند، استوار است [10,11]. سرپین‌ها به‌علت داشتن یک بازوی قابل چرخش، دارای سطح با انرژی بالا و لذا ناپایدار هستند و به یک تله موش دارای طعمه، تشبیه می‌شوند. در مورد آلفا-۱ آنتی تریپسین، زنجیره جانبی اسید آمینه متیونین در حلقه مرکزی واکنشگر به‌عنوان طعمه (سوبسترا) برای به‌دام‌اندازی پروتئاز الاستین عمل می‌کند [12]. بعد از اتصال پروتئاز نوتروفیل‌لاستاز به این متیونین، حلقه مرکزی شکافته شده و پروتئین آلفا-۱ آنتی تریپسین را از حالت ناپایدار با انرژی بالا آزاد کرده و اجازه می‌دهد حلقه واکنشگر به عقب بازگردد. این بازآرایی ساختار باعث چرخش پروتئاز هدف از قسمت جلویی به بخش انتهایی پروتئین و در نتیجه غیرفعال شدن غیرقابل بازگشت پروتئاز و سرپین می‌شود؛ بنابراین، مهار پروتئازها توسط سرپین‌ها، یک سازوکار خودکشی با سوبسترا تلقی می‌شود [10, 13].

نوره

بزرگ به‌منظور استفاده کلینیکی، سعی در تولید آلفا-۱ آنتی‌تریپسین مشتق از پلاسما‌ی انسانی و نو ترکیب نموده‌اند^[6]. این محصولات، مجوز درمان نقص‌های شدید آلفا-۱ آنتی‌تریپسین، آسم شدید، پیوند شش و واسکولیت را دریافت نموده‌اند^[5, 14]. به‌علاوه، تاکنون روش‌های متعددی برای جلوگیری از فرآیند پلیمریزاسیون سرپین‌ها صورت گرفته است؛ از جمله استفاده از ترکیبات اسمولیت یا استفاده از پپتیدهای همولوگ با حلقه مرکزی واکنشگر که می‌توانند به صفحه A مولکول طبیعی افزوده و مانع از پلیمریزاسیون آن در حالت آزمایشگاهی شوند^[20-22].

از آنجا که علایم ریوی مهم‌ترین عامل پیش‌آگهی‌دهنده بیماران مبتلا به نقص آلفا-۱ آنتی‌تریپسین است، درمان‌های سیپتوماتیک مانند استفاده از برونکودیلاتورها برای کاهش علایم تنگی نفس بسیار رایج است و سبب بهبود کیفیت زندگی فرد بیمار خواهد شد^[9, 19, 23-26]. در میان داروهای پرکاربرد در مواردی همچون آسم، آمفیزم و تنگی نفس، دو داروی سالیوتامول و تیوتروپیوم (Spiriva) از پر فروش‌ترین برونکودیلاتورهای موثر و امن مورد استفاده است که به‌عنوان اولین قدم در درمان بیماران دچار انسداد ریوی و اسپاسم مجاری هوایی تجویز می‌شود^[27-30]. در واقع سالیوتامول با جلوگیری از فعال‌سازی ژن‌های التهابی مانع از آزادسازی هیستامین و عوامل گرفتگی ریه از ماست سل‌ها و نیز افزایش آزادسازی عوامل مخاط‌مژگانی عمل می‌نماید^[31]. به‌علاوه، مسئول برونکودیلاسیون و تحریک گیرنده‌های بتا-۲-آدرنژیک و در نتیجه استراحت ماهیچه‌های ریه است و برای افراد مبتلا به بیماری انسدادی مزمن ریوی (COPD) و آسم متوسط تا شدید تجویز می‌شود^[27, 28, 30].

همان‌گونه که توضیح داده شد، درمان جبرانی برای افراد مبتلا به COPD کارآمد بوده و همچنین داروهای برونکودیلاتور، به‌ویژه سالیوتامول به‌منظور جلوگیری و درمان علایم این بیماری‌ها استفاده می‌شود^[29]؛ بنابراین، ریه بافت هدف هر دو داروی سالیوتامول و آلفا-۱ آنتی‌تریپسین محسوب می‌شود. در این پژوهش، اثر سالیوتامول در فعالیت و پلیمریزاسیون آلفا-۱ آنتی‌تریپسین به‌صورت آزمایشگاهی توسط روش‌های ژل الکتروفورز و طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی، مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

فرآیند تخلیص: تخلیص پروتئین توسط کروماتوگرافی

پلیمریزاسیون سرپین‌ها از طریق یک چرخش دُمین صورت می‌پذیرد که از طریق آن حلقه مرکزی واکنشگر یک مولکول به داخل صفحه بتای A مولکول دیگر وارد می‌شود. این فرآیند می‌تواند به‌صورت بین مولکولی رخ داده و منجر به تشکیل ساختار پنهان یا دلتا شود یا به‌صورت درون مولکولی انجام شده و به تشکیل یک پلیمر غیرفعال فیبریل‌مانند منجر شود. همه این ساختارهای به‌وجودآمده، دارای پایداری بالایی هستند؛ بنابراین، آلفا-۱ آنتی‌تریپسین به‌طور طبیعی به شکل یک ساختار با پایداری کم، تا می‌خورد. اگرچه این ساختار از نظر ترمودینامیکی پایدارترین حالت نیست ولی این ساختار برای حفظ فعالیت آن ضروری است^[5]. این تحرک ساختاری سبب ناپایداری حرارتی آلفا-۱ آنتی‌تریپسین شده و بنابراین ناحیه ژنی این منطقه چنانچه در معرض جهش‌های نقطه‌ای قرار گیرد باعث تغییرات ساختاری بزرگ از جمله تاخوردگی اشتباه، انتقالات ساختاری خودبه‌خودی و به‌خصوص تشکیل پلیمرهای غیرفعال و در نتیجه نقص سرپین خواهد شد^[10].

نقص شدید آلفا-۱ آنتی‌تریپسین منجر به بیماری‌های شدید مزمن ریوی (COPD) و به‌خصوص آمفیزم خواهد شد^[1, 3, 8, 14].^[6] تحقیقات در دهه‌های گذشته نشان داده است که آلفا-۱ آنتی‌تریپسین یک مولکول آنتی‌پروتئاز چندمنظوره ضدالتهابی، ضدعفونت و بازسازی‌کننده بافت است^[6, 17]. این ویژگی‌ها، آلفا-۱ آنتی‌تریپسین را تبدیل به یک عامل برای درمان بیماری‌های التهابی، خودایمنی و عفونی می‌نماید^[6]. درمان‌های مرتبط با نقص آلفا-۱ آنتی‌تریپسین شامل تزریق جبرانی (Augmentation Therapy) این پروتئین استخراج‌شده از پلاسما‌ی انسانی، درمان استنشاقی آلفا-۱ آنتی‌تریپسین نو ترکیب، ژن‌درمانی و استفاده از سلول‌های بنیادی است^[1, 9].^[16] تمامی این روش‌ها به‌منظور کاهش علایم التهابی و جلوگیری از آسیب ریوی است. در سال‌های اخیر، پیشرفت چشم‌گیری در استفاده از آلفا-۱ آنتی‌تریپسین صورت گرفته است. به‌عنوان مثال درمان افراد مبتلا به بیماری‌های شدید مزمن ریوی یا آسم علاوه‌بر درمان‌های رایج آنها (از جمله قطع مصرف سیگار، استعمال برونکودیلاتورهای استنشاقی و کورتیکواستروئیدها و دریافت اکسیژن) استفاده از درمان خاص به‌وسیله تزریق جبرانی آلفا-۱ آنتی‌تریپسین در دسترس قرار گرفته است^[12, 18]. هدف از این نوع درمان، بازیابی سطح آلفا-۱ آنتی‌تریپسین در پلاسما‌ی خون (۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بیمار در هفته) به‌منظور حفظ حد آستانه سرمی آلفا-۱ آنتی‌تریپسین (۱ مول بر لیتر) و در نتیجه حفظ بافت پارانشیم ریوی از آسیب بیشتر است^[5, 19]. تاکنون چندین شرکت دارویی

تمایلی، با استفاده از رزین اختصاصی جداسازی آلفا- ۱ آنتی تریپسین از سرم انسانی (GE Healthcare Co.) انجام شده است. پس از انعقاد خون، نمونه‌ها برای مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و سرم به دست آمده توسط بافر اتصال (۲۰ میلی مولار تریس، ۱۵۰ میلی مولار سدیم کلرید با pH=۷/۴) مرتبه رقیق شد. محلول رقیق شده، روی ستون بارگذاری و سپس توسط بافر شست و شو (۲۰ میلی مولار تریس، ۲۰ میلی مولار منیزیم کلرید با pH=۷/۴)، شسته شد. نمونه‌های به دست آمده توسط بافر دیالیز (۵۰ میلی مولار تریس، ۵۰ میلی مولار پتاسیم کلرید و گلیسرول ۵٪ با pH=۷/۴) به مدت ۲۴ ساعت و با ۳ مرتبه تعویض بافر، دیالیز شد. برای تخمین درجه خلوص، با استفاده از الکتروفورز پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) خروجی‌های ستون توسط روش لاملی در ژل ۱۲٪ انجام و به وسیله کوماسی بریلینت بلو R-250 رنگ آمیزی شد. در انتهای فرآیند، تعیین غلظت پروتئین تام با استفاده از روش بردفورد و رنگ کوماسی بلو G-25 و سرم آلبومین گاوی در طول موج ۴۹۵ نانومتر انجام شد و رسم منحنی استاندارد صورت پذیرفت [32-34].

ارزبابی پلیمریزاسیون: به منظور بررسی پلیمریزاسیون آلفا- ۱ آنتی تریپسین الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید غیردنا توره کننده انجام پذیرفت. تهیه پلیمرهای آلفا- ۱ آنتی تریپسین به وسیله انکوباسیون آلفا- ۱ آنتی تریپسین تخلیص شده با غلظت ۰/۵۷ میلی گرم بر میلی لیتر در دمای ۶۰°C برای زمان‌های ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه در حضور و عدم حضور سالبوتامول سولفات (Ventolin) با غلظت ۳/۶ نانوگرم بر میلی لیتر انجام شد. شناسایی باندهای پروتئینی توسط رنگ آمیزی نیترات نقره انجام شد [35]. در اینجا باید ذکر شود برای محاسبه مقادیر انتخابی از سالبوتامول و آلفا- ۱ آنتی تریپسین از روش زیر استفاده شد: دوز یک بار تزریق ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از سالبوتامول که سطح پلاسمایی ۳/۶ نانوگرم بر میلی لیتر را به وجود می آورد به عنوان بیشینه دوز برای سالبوتامول و حد آستانه محافظ سطح سرمی مهارکننده آلفا- ۱ پروتئیناز به مقدار ۱۱ میکرومول بر لیتر یا ۰/۵۷ میلی گرم بر میلی لیتر از آلفا- ۱ آنتی تریپسین به عنوان مبنای مقدار سرپین انتخاب شد. **روش پراکندگی دینامیکی نور (DLS):** این روش به طور گسترده و ساده برای تعیین قطر میانگین ذرات و پراکندگی اندازه و نیز تجمع پروتئین استفاده می شود [36]. این مطالعه توسط دستگاه زتاسایزر نانو (شرکت Malvern) انجام شد. ابزار تجزیه و تحلیل ملورن برای تحلیل داده‌ها مورد استفاده قرار

گرفت. در این پژوهش، تجمع حرارتی آلفا- ۱ آنتی تریپسین به وسیله DLS مورد مطالعه قرار گرفته است. نمونه‌های رقیق و فیلتر شده آلفا- ۱ آنتی تریپسین و محلول سالبوتامول سولفات متناسب با آن در دمای ۶۰°C (دمای شتاب گرفته آزمایش) و نزدیک به دمای دناتوراسیون پروتئین‌های سرم در pH فیزیولوژیک مورد تحلیل قرار گرفت. به این منظور برای بررسی هر نوع اثر سالبوتامول سولفات بر پایداری آلفا- ۱ آنتی تریپسین و پلیمریزاسیون حرارتی آن، آلفا- ۱ آنتی تریپسین تخلیص شده و محلول سالبوتامول سولفات متناسب با آن با غلظت ۳/۶ نانوگرم بر میلی لیتر آماده شده و اندازه گیری ابعاد ذرات بعد از زمان‌های ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه صورت پذیرفته است. همچنین، تمامی این مراحل در عدم حضور سالبوتامول مورد بررسی قرار گرفت. روش DLS یک روش مناسب برای کنترل کیفیت و بررسی همگن بودن نمونه‌ها به منظور تعیین اندازه ذرات، سنجش تاثیر رفتارهای فیزیکی و شیمیایی، کاوش اتصال لیگاند و نیز مطالعه برهم کنش میان ماکرومولکول‌ها است. در نهایت، اندازه گیری‌های DLS امکان مقایسه پایداری حرارتی پروتئین طبیعی و جهش یافته و همچنین اثرات پایدارکننده لیگاندهای مختلف بر پروتئین‌ها را فراهم می نماید [37]. در روش DLS، اصلی ترین پارامتر اندازه گیری شده، ضریب انتشار انتقالی (D) است که می تواند به منظور تعیین قطر ظاهری ذرات (d) به وسیله رابطه استوک- انیشتین به صورت رابطه ۱ به دست آید [38].

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta(t)d} \quad (1)$$

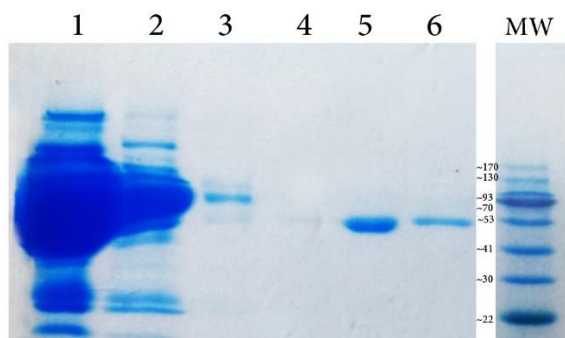
در رابطه فوق، k_B ثابت بولتزمان (1.38×10^{-23} J/K)، T دما بر حسب کلونین، $\eta(t)$ ویسکوزیته بر حسب پاسکال که در آن t زمان بر حسب ثانیه در نظر گرفته شده است.

طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی (CD): تغییرات ساختار دوم پروتئین تخلیص شده در ناحیه فرابنفش دور (۱۹۰ تا ۲۴۰ نانومتر)، در حضور و عدم حضور سالبوتامول سولفات در ۳ نسبت غلظتی صفر، یک و ۱۰ برابر غلظت اولیه ۳/۶ نانوگرم بر میلی لیتر به عنوان تابعی از پلیمریزاسیون ناشی از حرارت توسط طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی مورد بررسی قرار گرفته است. اندازه گیری‌ها در طیف سنج دورنگ نمایی دورانی مدل جاسکو ۷۱۵ در بافر ۵۰ میلی مولار تریس و پتاسیم کلرید و گلیسرول ۵٪ در pH=۷/۴ انجام پذیرفت. پیش از انجام آزمایش، غلظت آلفا- ۱ آنتی تریپسین با به کارگیری ضریب دوره

بین‌المللی به‌جای واحد رایج مورد استفاده یعنی میلی‌گرم تریپسین مهارشده، بیان می‌شود.

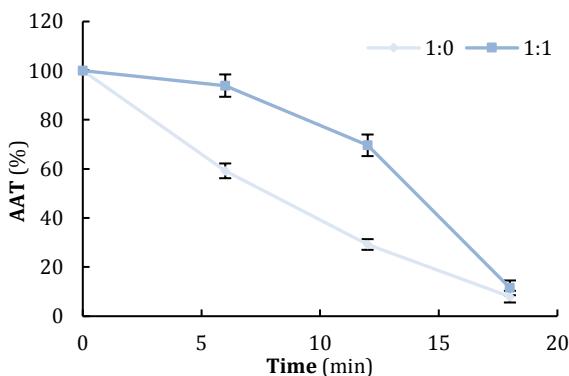
یافته‌ها و بحث

بررسی درجه خلوص خروجی‌های ستون فرآیند تخلیص توسط روش ژل الکتروفورز سدیم‌دودوسیل سولفات انجام پذیرفته است. در شکل ۱ پروفایل مراحل تخلیص نشان داده شده است. حضور تک‌بند پروتئین با وزن مولکولی ظاهری حدود ۵۲ کیلودالتون که تطابق خوبی با مقادیر منتشرشده پژوهش‌های پیشین دارد، نشان‌دهنده تایید حضور پروتئین با خلوص بالا است [4, 9].



شکل ۱) تصویر ژل SDS-PAGE مربوط به مراحل مختلف تخلیص آلفا-۱ آنتی‌تریپسین از سرم خون انسان؛ ستون‌های ۱ و ۲ به ترتیب نشان‌دهنده سرم خون قبل و بعد از بارگذاری در ستون کروماتوگرافی هستند، ستون ۳ خروجی مرحله نخست شست‌وشو، ستون ۴، خروجی دومین مرحله شست‌وشو است و ستون‌های ۵ و ۶، خروجی‌های مراحل جداسازی اول و دوم

برای تایید فعالیت مهار آلفا-۱ آنتی‌تریپسین و بررسی اثر سالیتامول، روش تعیین فعالیت مهار (TIC) استفاده شده است. این فرآیند، به‌منظور نمایش اثر القای حرارت بر مقدار ازدست‌رفتن فعالیت آلفا-۱ آنتی‌تریپسین و نیز بررسی نقش سالیتامول در این روند انجام شده است (نمودار ۱).



خاموشی ۰/۵۲، توسط طیف‌سنجی فرابنفش در ۲۸۰ نانومتر تعیین شده است. درجه بیضوی نمونه‌ها با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پس از انکوباسیون در دمای ۶۰°C در مدت زمان‌های ۵، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه اندازه‌گیری شده است.

تعیین فعالیت مهار آلفا-۱ آنتی‌تریپسین با استفاده از روش تعیین ظرفیت مهار تریپسین (TIC): تخمین فعالیت مهار آلفا-۱ آنتی‌تریپسین بر اساس روش دیترو همکاران انجام شده است [39]. در این روش، تریپسین با تاثیر بر سوبسترای مصنوعی، پپنا (n-آلفا-بنزوئیل-L-آرژنین-۴-نیتروآنالید-هیدروکلرید) و هیدرولیز آن سبب تولید p-نیتروآنیلید زردرنگ می‌شود که در طول موج ۴۰۰ نانومتر دارای جذب است. آلفا-۱ آنتی‌تریپسین سرمی می‌تواند با مهار این فرآیند سبب کاهش رنگ ایجادشده و در نتیجه کاهش جذب در طول موج مربوطه شود.

در این مطالعه اندازه‌گیری فعالیت آلفا-۱ آنتی‌تریپسین تخلیص‌شده و بررسی تغییرات آن در حضور و عدم حضور بازکننده برونش سالیتامول، در غلظت ثابت ۰/۵۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و انکوباسیون در دمای ۶۰°C در فواصل زمانی مختلف در مقابل غلظت ۳/۶ نانوگرم بر میلی‌لیتر سالیتامول انجام شده است. بدین منظور در لوله‌های شاهد، کنترل و مجهول، محلول رقیق‌شده تریپسین افزوده شد. پس از ۱۰ دقیقه سوبسترای تریپسین پپنا به هر کدام از نمونه‌ها افزوده شد. پس از گذشت مدت ۱۰ دقیقه برای ختم واکنش اسیداستیک ۳۰٪ به کلیه نمونه‌ها افزوده و جذب آنها در ۴۰۰ نانومتر خوانده شد. فعالیت برای همه واکنش‌ها با استفاده از رابطه ۲ قابل محاسبه است.

$$\text{TIC} = \frac{7000 \cdot \Delta A}{10.5 \cdot x \cdot y} \quad (2)$$

(میکرومول بر دقیقه در میلی‌لیتر)

در رابطه فوق، ۷۰۰۰ حجم واکنش بر حسب میکرولیتر، ۱۰/۵ جذب مولی، ΔA تفاوت بین جذب نمونه سنجش و کنترل آلبومین تریپسین، x حجم سرم بر حسب میکرولیتر و y زمان واکنش بر حسب دقیقه است. تحت شرایط ذکرشده رابطه به شکل رابطه ۳ می‌شود:

$$\text{TIC} = \frac{66.6 \cdot \Delta A}{x} \quad (3)$$

(میکرومول بر دقیقه در میلی‌لیتر)

در اینجا فعالیت آلفا-۱ آنتی‌تریپسین سرم بر حسب واحد

تجزیه و تحلیل ژل پلی‌آکریل‌آمید غیردنا‌توره‌کننده نمونه‌ها، به خوبی تایید می‌کند که ازدست‌رفتن فعالیت نمونه‌ها به دلیل پلیمریزاسیون آنها است که در حضور سالبوتامول سولفات، این روند رشد سریع پلیمریزاسیون و تشکیل فرم‌های پلیمر برای مدت حدود کمتر از ۳۰ دقیقه با تاخیر نسبی انجام می‌شود.

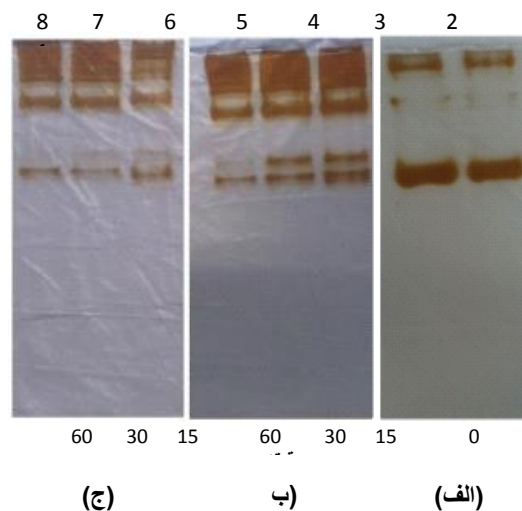
به منظور بررسی بیشتر اثر سالبوتامول بر پلیمریزاسیون القاشده توسط حرارت در آلفا- ۱ آنتی‌تریپسین و سهولت مقایسه بین نمونه‌ها در شرایط ذکر شده، آنالیز پراکندگی اندازه ذرات (DLS) انجام شده است و قطر هیدرودینامیک گونه‌ها بر حسب زمان در نمودار ۲ نشان داده شده است.

در نمودار ۲، روند تغییر اندازه پروتئین آلفا- ۱ آنتی‌تریپسین در فواصل زمانی مختلف در حضور و عدم حضور سالبوتامول در دمای ۶۰°C نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، مقدار قطر هیدرودینامیک پروتئین آلفا- ۱ آنتی‌تریپسین تخلیص‌شده در ابتدای زمان اندازه‌گیری حدود ۵/۸ نانومتر است که در تطابق با یافته‌های پژوهش‌های پیشین است [2]. نتایج نشان می‌دهد در عدم حضور سالبوتامول در دمای ۶۰°C اندازه آلفا- ۱ آنتی‌تریپسین در مدت ۶۰ دقیقه به مقدار ۵/۱۷۵ نانومتر می‌رسد؛ در حالی که در حضور سالبوتامول با غلظت ۳/۶ نانوگرم بر میلی‌لیتر اندازه آلفا- ۱ آنتی‌تریپسین به ۱۶۸ نانومتر می‌رسد. داده‌های به دست آمده نشان‌دهنده افزایش اندازه ذرات آلفا- ۱ آنتی‌تریپسین با گذشت زمان در دمای ۶۰°C است و حضور سالبوتامول سولفات در محلول پروتئین روند افزایش سایز پروتئین را تا مدت حدود ۱۵ دقیقه، به خوبی کنترل نموده است.

طیف دورنگ‌نمایی دورانی فرابنفش دور حاصل از انکوباسیون پروتئین آلفا- ۱ آنتی‌تریپسین در زمان‌های صفر، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه در دمای ۶۰°C در نمودار ۳ مشاهده می‌شود. در این نمودار کاهش سطح زیر منحنی ناشی از پلیمریزاسیون ساختار پروتئین پس از گذشت حدود ۱۵ دقیقه انکوباسیون، در دمای ۶۰°C به وضوح قابل رویت است. کاهش ساختار دوم با در نظر گرفتن مقدار θ_{222} ، حدود ۱۵٪ به دست آمده است که مطابق یافته‌های به دست آمده توسط دولین و همکاران (حدود ۲۰٪) است [40].

شایان ذکر است که مقادیر فعالیت، نسبت به مقدار اولیه سنجیده شده و بر حسب درصد ارایه شده است. نتایج نشان می‌دهد که در عدم حضور سالبوتامول سولفات، روند ازدست‌رفتن فعالیت آلفا- ۱ آنتی‌تریپسین، نسبت به شرایط در حضور آن تا مدت حدود ۱۰ دقیقه با شتاب بیشتری پیش رفته و تفاوت مقادیر کاهش درصد فعالیت در حضور و عدم حضور سالبوتامول در این مدت به صورت معنی‌دار است ($p < 0.05$).

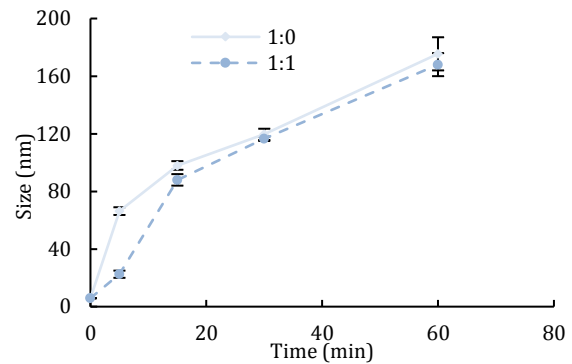
اثر سالبوتامول بر پلیمریزاسیون آلفا- ۱ آنتی‌تریپسین با استفاده از روش الکتروفورز ژل غیردنا‌توره‌کننده و پراکندگی دینامیکی نور مورد بررسی قرار گرفته است. تحلیل داده‌های ژل در عدم حضور سالبوتامول، نشان می‌دهد که فرم‌های مولتی‌مری از آلفا- ۱ آنتی‌تریپسین پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در ۶۰°C، به سرعت شروع به تشکیل نموده و مقدار و اندازه آنها همگام با ازدست‌رفتن ساختار مونومری پروتئین در طی انکوباسیون افزایش می‌یابد. در حضور سالبوتامول پلیمریزاسیون و ظهور باندهای مولتیمر تا حدود ۳۰ دقیقه با شدت کمتری نسبت به عدم حضور این افزودنی انجام می‌پذیرد. نتایج الکتروفورز ژل با رنگ‌آمیزی نترات نقره در شکل ۲ ارایه شده است.



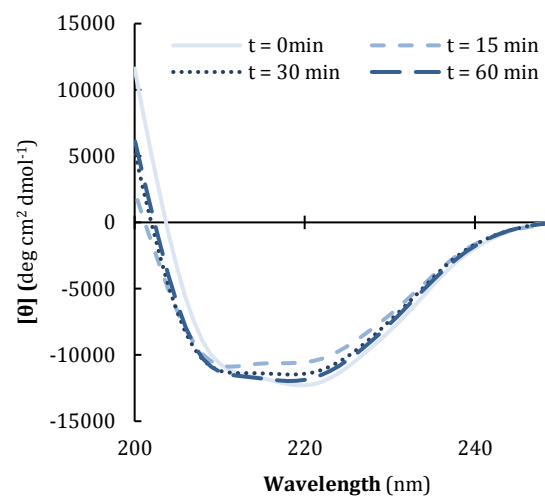
شکل ۲) تصاویر ژل الکتروفورز غیردنا‌توره‌کننده نمونه‌های پروتئین آلفا- ۱ آنتی‌تریپسین در عدم حضور و حضور سالبوتامول در دمای ۶۰°C؛ الف: ستون‌های ۱ و ۲ به ترتیب نشان‌دهنده آلفا- ۱ آنتی‌تریپسین در عدم حضور و حضور سالبوتامول در زمان شروع، ب: ستون‌های ۳ تا ۵ روند پلیمریزاسیون در عدم حضور سالبوتامول در فواصل زمانی به ترتیب ۱۵ تا ۶۰ دقیقه و ج: ستون‌های ۶ تا ۸، روند پلیمریزاسیون آلفا- ۱ آنتی‌تریپسین

تغییرات آن بر حسب زمان ترسیم شده است (نمودار ۵). در لحظه شروع، مقدار θ_{222} در شرایط بدون حضور سالیتامول برابر با مقدار ۱۲۰۱۹- بوده است که با افزودن غلظت‌های ۱:۱ و ۱:۱۰ به ترتیب به مقدار ۱۲۷۱۵- و ۱۲۹۶۱- رسیده است. پس از گذشت ۱۵ دقیقه، θ_{222} به صورت وابسته به غلظت، به مقادیر ۷۶۳ و ۱۴۸۵ واحد به ترتیب در غلظت‌های ۱:۱ و ۱:۱۰ افزایش یافته است. در ۳۰ دقیقه مقدار θ_{222} در غلظت ۱:۱ به مقدار ۲۸۶ واحد افزایش و در غلظت ۱:۱۰ به مقدار ۵۴ واحد کاهش (نسبت به شرایط بدون حضور سالیتامول) یافته است. در مدت ۶۰ دقیقه، مقدار θ_{222} در عدم حضور سالیتامول در حدود ۱۱۵۰۰ بوده است. ساختار در حضور غلظت‌های ۱:۱ و ۱:۱۰ نسبت به عدم حضور سالیتامول به ترتیب دارای میزان فشردگی بیشتر به مقادیر ۶۵۲ و ۱۹۶ واحد است.

پلیمریزاسیون آلفا-۱ آنتی‌تریپسین و انباشته شدن آن در هپاتوسیت‌ها منجر به نقص آلفا-۱ آنتی‌تریپسین می‌شود و افراد حامل این نقص، مستعد ابتلا به آمفیوزم ریوی و بیماری‌های کبدی خواهند بود [41-43]. از طرفی سرپین‌های مهارتی طبیعی نیز تحت تأثیر آنکوآسیون در دماهای بالا دست‌خوش چنین پلیمریزاسیونی قرار خواهند گرفت. طبق پژوهش‌های پیشین فرآیند پلیمریزاسیون از طریق دو مکانیسم صورت می‌پذیرد که هر دو این مکانیسم‌ها شامل ورود حلقه مرکزی واکنشگر از مولکول دهنده به درون یکی از صفحات بتای A یا C مولکول سرپین گیرنده است [44]. در واقع تغییرات ساختاری خاص مولکول سرپین غالباً توسط دو ناحیه ورودی منفذ حلقه مرکزی واکنشگر و صفحه بتای A کنترل می‌شوند و انعطاف‌پذیری این بخش‌ها برای حفظ عملکرد مهارتی مولکول سرپین ضروری است [45-47]. با این حال، هر عاملی که سبب افزایش این انعطاف‌پذیری و باز شدن بیشتر صفحه بتای مولکول سرپین شود، سبب ترویج تشکیل فرم پلیمریزه شده آلفا-۱ آنتی‌تریپسین خواهد شد.



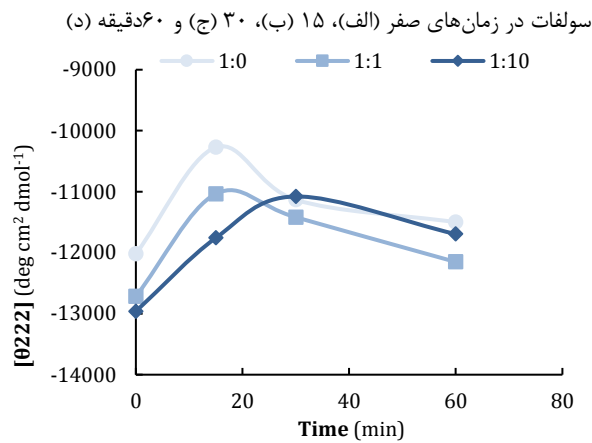
نمودار ۲) تغییرات اندازه پروتئین (نتایج آزمون DLS) بر حسب مدت آنکوآسیون در دمای ۶۰°C



نمودار ۳) طیف دورنگ‌نمایی دورانی فرابنفش دور حاصل از آنکوآسیون آلفا-۱ آنتی‌تریپسین در دمای ۶۰°C و در زمان‌های متفاوت

مطالعه تغییرات ایجاد شده در ساختار دوم ناشی از پلیمریزاسیون القا شده توسط دمای ۶۰°C بر پروتئین آلفا-۱ آنتی‌تریپسین در حضور و عدم حضور دو غلظت از سالیتامول سولفات انجام شده است. منحنی تغییرات ساختار دوم پروتئین در زمان‌های صفر، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه در نمودار ۴ ارائه شده است. همان‌طور که در این نمودار مشاهده می‌شود، حضور سالیتامول سولفات در زمان‌های صفر و ۱۵ دقیقه تا حدی باعث افزایش ساختار دوم پروتئین آلفا-۱ آنتی‌تریپسین و در نتیجه افزایش پایداری ساختاری پروتئین شده است. در این زمان مقدار افزایش به صورت وابسته به غلظت بوده و به ازای غلظت ۱:۱۰ دارای بیشترین میزان فشردگی است. پس از آن در زمان‌های ۳۰ و ۶۰ دقیقه، غلظت ۱:۱ سبب القای بیشترین میزان فشردگی در ساختار شده است.

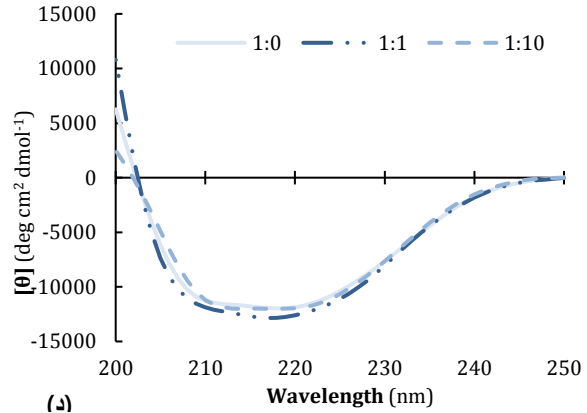
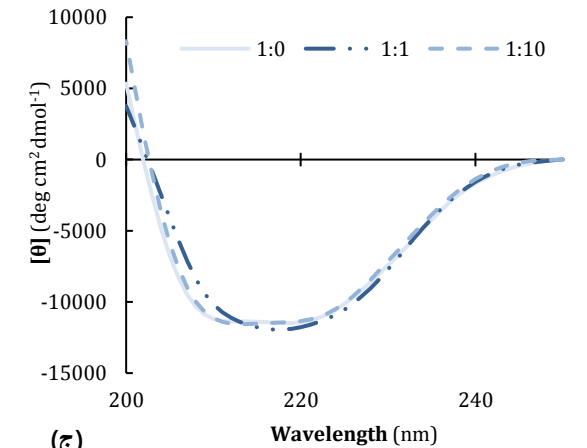
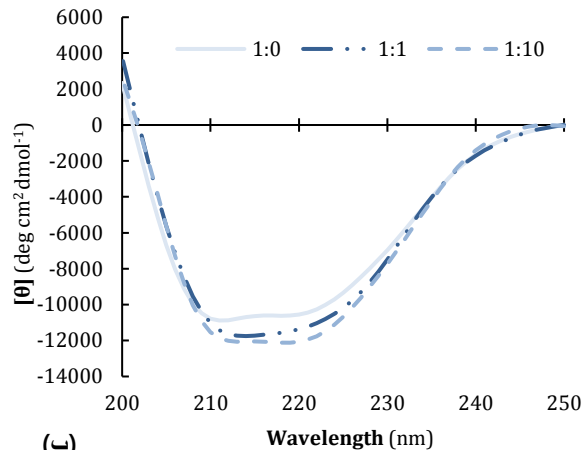
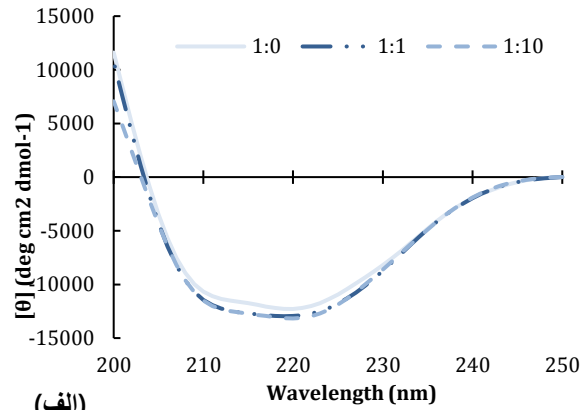
به منظور بررسی دقیق‌تر اثر افزودن سالیتامول سولفات در غلظت‌های مختلف بر درجه بیضوی‌واری در غلظت‌های مختلف بر درجه بیضوی‌واری در طول موج ۲۲۲ نانومتر (θ_{222})، نمودار



نمودار ۵) منحنی تغییرات ساختار دوم پروتئین آلفا-۱ آنتی‌تریپسین بر حسب مدت انکوباسیون در غلظت‌های مختلف سالی‌تامول سولفات و در دمای ۶۰°C

مطابق با پژوهش‌های پیشین، در روند پلی‌میریزاسیون آلفا-۱ آنتی‌تریپسین، ابتدا حالت طبیعی پروتئین تحت یک انتقال سریع ساختاری به سمت تشکیل یک ساختار حد واسط پیش می‌رود. در مرحله بعد، ساختار حد واسط تشکیل شده با سرعت کمتری دست‌خوش تشکیل پلیمر و اتصالات لوپ شیت قرار می‌گیرد^[48-49]. از طرفی تشکیل این حالت حد واسط تولید پلیمر در پروتئین آلفا-۱ آنتی‌تریپسین در فاز اول از نظر ساختاری شامل بازشدن جزیی ساختار و از جمله بازشدن بخش بالایی صفحه بتای A به‌منظور پذیرش حلقه مرکزی واکنشگر مولکول دیگر و در نتیجه افزایش در معرض قرارگرفتن زنجیره اصلی پلی‌پپتیدی این حلقه است^[41]. فاز دوم شامل ورود حلقه مرکزی واکنشگر از مولکول سرپین دهنده به داخل صفحه بتای A باز شده مولکول پذیرنده است که مرحله آهسته واکنش است. همان‌طور که مطالعات دافورن و همکاران نشان داد که افزایش انعطاف‌پذیری ساختار آلفا-۱ آنتی‌تریپسین نقش مهمی در تمایل پروتئین در تشکیل پلیمر ایفا می‌نماید، افزایش دما نیز سبب بهم‌ریختگی رشته‌های بخش بالایی صفحه بتای A خواهد شد که این امر منجر به افزایش میزان پلی‌میریزاسیون آلفا-۱ آنتی‌تریپسین است. در واقع هر عاملی که پایداری پروتئین را کاهش دهد سبب افزایش سرعت تشکیل حالت و میزان حد واسط خواهد شد و در نتیجه سبب افزایش پلی‌میریزاسیون می‌شود^[48]. داده‌های موجود بیانگر امکان کندشدن روند انتقال اولیه از حالت طبیعی به حالت حد واسط و بنابراین، تاخیر در روند پلی‌میریزاسیون پروتئین در حضور سالی‌تامول سولفات است.

در این پژوهش نتایج اتصال مولکولی سالی‌تامول سولفات و پروتئین آلفا-۱ آنتی‌تریپسین نشان می‌دهد که اتصال دوره



نمودار ۴) طیف دورنگ‌نمایی دورانی فرابنفش دور حاصل از انکوباسیون آلفا-۱ آنتی‌تریپسین در دمای ۶۰°C و در غلظت‌های مختلف سالی‌تامول

زیستی به‌شمار آید.

تشکر و قدردانی: مطالعه حاضر در دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. از معاونت پژوهشی این دانشگاه برای حمایت مالی در انجام این مطالعه کمال تشکر و قدردانی می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان ذکر نشد.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافع وجود ندارد.

سهم نویسندگان: سیده‌مریم حسینی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۴۰٪)؛ صادق حسن‌نیا (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۳۰٪)؛ بیژن رنجبر (نویسنده سوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۳۰٪).

منابع مالی: حمایت مالی مطالعه حاضر توسط معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس تامین شده است.

منابع

- 1- Camelier AA, Winter DH, Jardim JR, Barboza CE, Cukier A, Miravittles M. Deficiência de alfa-1 antitripsina: Diagnóstico e tratamento. *J Bras Pneumol.* 2008;34(7):514-27.
- 2- Blanco I, Lara B, De Serres F. Efficacy of alpha-1-antitrypsin augmentation therapy in conditions other than pulmonary emphysema. *Orphanet J Rare Dis.* 2011;6(1):1-11.
- 3- Wood AM, Stockley RA. Alpha one antitrypsin deficiency: From gene to treatment. *Respiration.* 2007;74(5):481-92.
- 4- Kolarich D, Turecek PL, Weber A, Mitterer A, Graninger M, Matthiessen P, et al. Biochemical, molecular characterization, and glycoproteomic analyses of α_1 -proteinase inhibitor products used for replacement therapy. *Transfusion.* 2006;46(11):1959-77.
- 5- Karnaukhova E. Recent advances in the research and development of alpha-1 proteinase inhibitor for therapeutic use. In: Irusen E. Lung diseases: Selected state of the art reviews. Norderstedt: Books on Demand; 2012. pp. 83-104.
- 6- De Serres F, Blanco I. Role of alpha-1 antitrypsin in human health and disease. *J Intern Med.* 2014;276(4):311-35.
- 7- Rudnick DA, Perlmuter DH. Alpha-1-antitrypsin deficiency: A new paradigm for hepatocellular carcinoma in genetic liver disease. *Hepatology.* 2005;42(3):514-21.
- 8- Mulgrew AT, Taggart CC, McElvaney NG. Alpha-1-antitrypsin deficiency: Current concepts. *Lung.* 2007;185(4):191-201.
- 9- Kelly E, Greene CM, Carroll TP, McElvaney NG, O'Neill SJ. Alpha-1 antitrypsin deficiency. *Respir Med.* 2010;104(6):763-72.
- 10- Law RH, Zhang Q, McGowan S, Buckle AM, Silverman GA, Wong W, et al. An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol.* 2006;7(5):1-11.
- 11- Lomas DA, Parfrey H. α_1 -Antitrypsin deficiency 4: Molecular pathophysiology. *Thorax.* 2004;59(6):529-35.
- 12- Ioachimescu OC, Stoller JK. A review of alpha-1 antitrypsin deficiency. *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis.* 2005;2(2):263-75.
- 13- Knaupp AS, Bottomley SP. Serpin polymerization and its role in disease-the molecular basis of α_1 -antitrypsin deficiency. *Iubmb Life.* 2009;61(1):1-5.

سالیوتامول به این پروتئین در سه منطقه در نزدیکی ورودی منفذ حلقه مرکزی واکنشگر با سطح انرژی حدود ۷/۸۷-، پشت رشته بتا با سطح انرژی حدود ۷/۹۲- و نیز زنجیره اصلی حلقه مرکزی با سطح انرژی ۷/۸۲- و ثابت مهاری مطلوبی انجام می‌شود. این اتصال باعث کاهش انعطاف‌پذیری حلقه شده و مانعی برای خروج آن و در نتیجه درج نسبی آن در صفحه بتای A است که این امر با کاهش مقدار پلیمریزاسیون پروتئین همراه است. داده‌های حاصل از الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید غیردنا توره‌کننده نشان می‌دهند پیشرفت پلیمریزاسیون که توسط گسترش باندهای مربوط به دایمرها و تریمرها و غیره مشاهده می‌شود، در حضور سالیوتامول سولفات با تاخیر صورت می‌پذیرد. به‌منظور بررسی و ارزیابی تغییرات ساختاری در ارتباط با پلیمریزاسیون آلفا-۱ آنتی‌تریپسین، تغییرات سیگنال‌های CD در θ^{222} مورد توجه قرار گرفته است. حضور دو غلظت ۱:۱ و ۱:۱۰ سالیوتامول سولفات با کندنمودن روند کاهش ساختار، احتمالاً سبب تاخیر تشکیل حد واسط در مرحله اول روند پلیمریزاسیون شده است که این تاخیر در غلظت ۱:۱۰ قابل توجه است. پس از آن و تشکیل حد واسط پلیمری، تأثیر حضور سالیوتامول در مرحله دوم پلیمریزاسیون میزان قابل توجهی نبوده و احتمالاً نتوانسته مانع نوسانات ساختاری آلفا-۱ آنتی‌تریپسین شود. این امر در روند کاهش فعالیت آلفا-۱ آنتی‌تریپسین نیز به‌خوبی قابل رویت است و حضور سالیوتامول در مدت زمان کمتر از ۱۵ دقیقه با کاهش چشم‌گیر شدت روند کاهش فعالیت پروتئین همراه بوده است که خود گواه بر نقش مثبت آن در کندنمودن مرحله اول پلیمریزاسیون آلفا-۱ آنتی‌تریپسین است. از آنجا که بافت ریه بافت هدف داروی سالیوتامول و نیز پروتئین آلفا-۱ آنتی‌تریپسین محسوب می‌شود، انجام چنین مطالعاتی برای تأثیر مصرف سالیوتامول و درک عمیق‌تر مکانیسم پلیمریزاسیون به‌منظور تولید داروهای مورد نیاز برای افراد مبتلا به اختلال آلفا-۱ آنتی‌تریپسین حائز اهمیت است.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر اولین گزارش در مورد اثر سالیوتامول سولفات بر پلیمریزاسیون آلفا-۱ آنتی‌تریپسین است. نتایج به‌دست‌آمده نشان‌دهنده اثرات مطلوب سالیوتامول سولفات بر فعالیت و ساختار آلفا-۱ آنتی‌تریپسین است. بنابراین، این افزودنی می‌تواند گزینه مناسبی برای همراهی پروتئین آلفا-۱ آنتی‌تریپسین و درمان بیماری‌های وابسته به آن در شرایط

- 32- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
- 33- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1-2):248-54.
- 34- Stoscheck CM. [6] Quantitation of protein. In: *Methods in enzymology*. Cambridge: Academic Press; 1990. pp. 50-68.
- 35- Jha S, Agarwal S, Sanyal I, Jain GK, Amla DV. Differential subcellular targeting of recombinant human α_1 -proteinase inhibitor influences yield, biological activity and in planta stability of the protein in transgenic tomato plants. *Plant Sci*. 2012;196:53-66.
- 36- Khodabandehloo A, Chen DD. Particle sizing methods for the detection of protein aggregates in biopharmaceuticals. *Bioanalysis*. 2017;9(3):313-26.
- 37- Lorber B. Analytical light scattering methods in molecular and structural biology: Experimental aspects and results. arXiv:1810.00611. 2018.
- 38- Beliciu CM, Moraru CI. Effect of solvent and temperature on the size distribution of casein micelles measured by dynamic light scattering. *J Dairy Sci*. 2009;92(5):1829-39.
- 39- Dietz AA, Hodges LK, Rubinstein HM, Briney RR. Estimation of the antitrypsin activity of serum. *Clin Chem*. 1967;13(3):242-54.
- 40- Devlin GL, Chow MK, Howlett GJ, Bottomley SP. Acid denaturation of α_1 -antitrypsin: Characterization of a novel mechanism of serpin polymerization. *J Mol Biol*. 2002;324(4):859-70.
- 41- James EL, Bottomley SP. The mechanism of α_1 -antitrypsin polymerization probed by fluorescence spectroscopy. *Arch Biochem Biophys*. 1998;356(2):296-300.
- 42- Carrell RW, Lomas DA, Sidhar S, Foreman R. α_1 -Antitrypsin deficiency. *Chest*. 1996;110(6):243S-7S.
- 43- Lomas DA. New insights into the structural basis of α_1 -antitrypsin deficiency. *QJM Int J Med*. 1996;89(11):807-12.
- 44- Stein PE, Carrell RW. What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease?. *Nat Struct Mol Biol*. 1995;2(2):96-113.
- 45- Hopkins PC, Stone SR. The contribution of the conserved hinge region residues of .alpha. 1-antitrypsin to its reaction with elastase. *Biochemistry*. 1995;34(48):15872-9.
- 46- Hopkins PC, Carrell RW, Stone SR. Effects of mutations in the hinge region of serpins. *Biochemistry*. 1993;32(30):7650-7.
- 47- Hopkins PC, Chang WS, Wardell MR, Stone SR. Inhibitory mechanism of serpins mobility of the C-terminal region of the reactive-site loop. *J Biol Chem*. 1997;272(7):3905-9.
- 48- James EL, Whisstock JC, Gore MG, Bottomley SP. Probing the unfolding pathway of α_1 -antitrypsin. *J Biol Chem*. 1999;274(14):9482-8.
- 49- Dafforn TR, Mahadeva R, Elliott PR, Sivasothy P, Lomas DA. A kinetic mechanism for the polymerization of α_1 -antitrypsin. *J Biol Chem*. 1999;274(14):9548-55.
- 14- Kaplan A, Cosentino L. α_1 -Antitrypsin deficiency: Forgotten etiology. *Can Fam Physician*. 2010;56(1):19-24.
- 15- DeMeo DL, Silverman EK. α_1 -Antitrypsin deficiency 2: Genetic aspects of α_1 -antitrypsin deficiency: Phenotypes and genetic modifiers of emphysema risk. *Thorax*. 2004;59(3):259-64.
- 16- Stockley RA, Turner AM. α -1-Antitrypsin deficiency: Clinical variability, assessment, and treatment. *Trends Mol Med*. 2014;20(2):105-15.
- 17- Greulich T, Nell C, Herr C, Vogelmeier C, Kotke V, Wiedmann S, et al. Results from a large targeted screening program for alpha-1-antitrypsin deficiency: 2003-2015. *Orphanet J Rare Dis*. 2016;11(1):75.
- 18- Stoller JK, Brantly M. The challenge of detecting alpha-1 antitrypsin deficiency. *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis*. 2013;10(1):26-34.
- 19- Chapman KR, Chorostowska-Wynimko J, Koczulla AR, Ferrarotti I, McElvaney NG. Alpha 1 antitrypsin to treat lung disease in alpha 1 antitrypsin deficiency: Recent developments and clinical implications. *Int J Chronic Obstr Pulm Dis*. 2018;13:419-32.
- 20- Lomas DA, Dyfed LE, Finch JT, Carrell RW. The mechanism of Z α_1 -antitrypsin accumulation in the liver. *Nature*. 1992;357(6379):605-7.
- 21- Lomas DA, Evans DL, Stone SR, Chang WS, Carrell RW. Effect of the Z mutation on the physical and inhibitory properties of .alpha.1-antitrypsin. *Biochemistry*. 1993;32(2):500-8.
- 22- Mast AE, Enghild JJ, Salvesen G. Conformation of the reactive site loop of .alpha.1-proteinase inhibitor probed by limited proteolysis. *Biochemistry*. 1992;31(10):2720-8.
- 23- Stockley RA. Alpha1-antitrypsin Review. *Clin Chest Med*. 2014;35(1):39-50.
- 24- Mak G, Hanania NA. New bronchodilators. *Curr Opin Pharmacol*. 2012;12(3):238-45.
- 25- Torres-Durán M, Lopez-Campos JL, Barrecheguren M, Miravittles M, Martinez-Delgado B, Castillo S, et al. Alpha-1 antitrypsin deficiency: Outstanding questions and future directions. *Orphanet J Rare Dis*. 2018;13(1):114.
- 26- Malerba M, Radaeli A, Ceriani L, Tantucci C, Grassi V. Airway hyperresponsiveness in a large group of subjects with alpha1-antitrypsin deficiency: A cross-sectional controlled study. *J Intern Med*. 2003;253(3):351-8.
- 27- Fitchett DH, McNicol MW, Riordan JF. Intravenous salbutamol in management of status asthmaticus. *Br Med J*. 1975;1(5949):53-5.
- 28- Uzkeser H, Cadirci E, Halici Z, Odabasoglu F, Polat B, Yuksel TN, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of salbutamol on acute and chronic models of inflammation in rats: Involvement of an antioxidant mechanism. *Mediat Inflamm*. 2012;2012:438912.
- 29- Malfait AM, Malik AS, Marinova-Mutafchieva L, Butler DM, Maini RN, Feldmann M. The β_2 -adrenergic agonist salbutamol is a potent suppressor of established collagen-induced arthritis: Mechanisms of action. *J Immunol*. 1999;162(10):6278-83.
- 30- Balint B, Watz H, Amos C, Owen R, Higgins M, Kramer B, et al. Onset of action of indacaterol in patients with COPD: Comparison with salbutamol and salmeterol-fluticasone. *Int J Chronic Obstr Pulm Dis*. 2010;5:311-8.
- 31- Anderson GP. Formoterol: Pharmacology, molecular basis of agonism, and mechanism of long duration of a highly potent and selective β_2 -adrenoceptor agonist bronchodilator. *Life Sci*. 1993;52(26):2145-60.

