Archive of SID

مقاله پژوهشی

یک روش ساده برای اندازه گیری هیستامین و فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز در مغز موش آزمایشگاهی

دکتر دردی قوجق *، دکتر یارحسین صفری **

چکیده:

مقدار هیستامین در اکثر بافتهای پستانداران از جمله مغز بسیار کم است ، بنابراین یک روش ساده وحساس برای اندازه گیری غلظت هیستامین در بافت های استخراج شده اولیه ضرورت دارد.در این پژوهش ،هدف ارایه یک روش ساده برای اندازه گیری مقدارهیستامین ومیزان فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز در مغز موش آزمایشگاهی است.

برای انجام این پژوهش ۲ میلی گرم از بافت مغزدر ۵ میلی لیتر از پر کلرات ۰/۵ مولار هموژنه گردید. هموژنه تهیه شده در دور ۳۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شدو pHمحلول رویی بدست آمده توسط اسید کلریدریک ۰/٤ مولار به ۵ رسانده شد. رسوب حاصل از طریق سانتریفوژدر دور ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه حذف گردیدومحلول رویی آن به لوله میکروسانتریفوژ انتقال داده شد ودر دور ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردیدوسپس محلول رویی آن به لوله آزمایش دیگر انتقال داده شد. هیستامین تولید شده در هریک از نمونه ها با استفاده از واکنش با معرف ۲و٤و۶ تری نیترو بنزن سولفونات در طول موج ٤۲۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد.یک واحد فعالیت آنزیمی ،معادل آنزیمی در نظر گرفته شد که یک میکرومول هیستامین را در دمای ۲۵ درجه در هر دقیقه تولید می نماید.

یافته های این پژوهش نشان داد که بیشترین مقدار هیستامین وفعالیت آنزیم هیستدین دکربوکسیلاز در بخش هیپوتالاموس مغز وجود دارد.

یافته های بدست آمده در این پژوهش نشان دادند که روش استفاده شده در این مطالعه برای اندازه گیری مقدار هیستامین وفعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز مغز با توجه به ساده بودن مراحل انجام آزمایش ،تکرار پذیر بودن وارزان بودن آن ، روش مناسبی است.

کلید واژه ها: اسپکتروفتومتری/ موش / هیستامین / هیستیدین دکربوکسیلاز

مقدمه :

هیستامین به عنوان میانجی عصبی یا تنظیم کننده عصبی در مغز پستانداران شناخته شده است (۱). هیستامین در پاسخ به بسیاری از شرایط آلرژیک پوستی نقش مهمی دارد. هیستامین در تحریک شرایط انبساط رگهای خونی و افزایش نفوذپذیری مویرگها اهمیت دارد(۲). تعداد

* دانشیار گروه بیوشیمی بالینی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل

** دکتری حرفه ای پزشکی

www.SID.ir

Archive of SID

گیرنده های هیستامین در سیستم عصبی تنوع زیادی دارند ومکانیزم اثر آن نیز متفاوت است ، اما هیستامین در سطح سلولهای هدف بافت مغز پستانداران بیشتر از طریق تحریک دونوع رسپتور (H1,H2) که به ترتیب از یون کلسیم و AMPحلقوی به عنوان پیام بر ثانویه استفاده می کند ،عمل می نماید.همچنین نشان داده شده است که هیستامین میزان آزاد شدن خود را در بافت مغز کنترل می کند واین عمل را از طریق گیرنده نوع H3 نشان می دهد ،که از نظر فارماکولوژیکی با دو نوع رسپتور (H1,H2)متفاوت است(۳).

در سالهای اخیر هیستامین مورد توجه محققان قرار گرفته است وبسیاری از خصوصیات فیزیولوژیکی وپاتولوژیکی آن مشخص شده است(۴،۵). نشان داده شده است که هیستامین نفوذپذیری یون کلسیم را در بخش میکروزومی عضلات صاف حیوان آزمایشگاهی افزایش می دهد(۶). روش های زیادی برای اندازه گیری هیستامین تا بحال مورد استفاده قرار گرفته است ،یکی از این روش ها برای اندازه گیری هیستامین استفاده از کروماتوگرافی با کار کرد عالی است ،که در این روش گروه آمینو هیستامین توسط ماده رنگی ۴ ان وان دی متیل آمینو ـ آزوبنزن ۴ـ ایزوتیوسیونات در حضور کربنات سدیم نشاندار شده ودر نهایت مشتق حاصل آنالیز گردیده است (۷). روش دیگر برای اندازه گیری هیستامین پس از جدا سازی آن توسط روش کروماتوگرافی با استفاده از معرف او-فتالدئید وروش فلورومتری بوده است (۸). اندازه گیری دقیق مقدار هیستامین درترکیبات بیولوژیک، به ویژه دربافت مغز، به دلیل غلظت کم آن وامکان ایجاد آلودگی با سایر ترکیبات بیولوژیک ، بطوردقیق بسیار مشکل است (۹). هیستامین بر اثر دکربوکسیلاسیون اسید آمینه هیستیدین تحت اثرآنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز (EC.4.1.1.22) ، که یک آنزیم وابسته به کوفاکتور پیریدوکسال فسفات است، تولید می شود(۱۰). فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز در بافت های پستانداران از جمله در مغز بسیار کم است ، بنابراین روش دقیق وحساس برای اندازه گیری این آنزیم در بافت مغز مورد نیاز است وبا استفاده از روش اسپکتروفتومتری ، اندازه گیری فعالیت آن محدودیتی ندارد (۱۱،۱۲).بنابراین با نظر به محدودیت های روش های موجود در اندازه گیری مقدار هیستامین به دلیل نیاز به مراحل مختلف خالص سازی آن وبا توجه به اهمیت هیستامین وغلظت کم آن در بافت ها ومایعات بیولوژیک ،طراحی روشی ساده ودقیق برای اندازه گیری آن ضرورت دارد.به همین منظور این مطالعه با هدف تعیین یک روش ساده برای اندازه گیر ی مقدار هیستامین و میزان فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلازدر مغز موش آزمایشگاهی انجام گردید.

روش کار :

مواد شیمیایی ودستگاهها

دی متیل سولفوکساید ، هیستامین ، اسید بوریک ، پرکلرات ، اسید کلریدریک ، بیکربنات سدیم ، فنیل متان سولفونیل فلوراید ، هیستیدین ، پرکلریک اسید و۶،۴،۲ تری نیترو بنزن سولفونات ، سروتونین ، گلوتاتیون و پوترسین از نمایندگی شرکت سیگما تهیه شد.سایر ترکیبات شیمیایی در حد آزمایشگاهی خالص بوده واز نمایندگی شرکت مرک تهیه شد. اسپکتروفوتومتر مدل Cecil,C.E.1020 ، سانتریفوژ مدل Clements 2000 وترازوی مدل Sartorius با دقت ۰/۰۰۰۱گرم در طول آزمایش ها استفاده شد.

حیوان آزمایشگاهی

موش های سفید آزمایشگاهی (با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم) در قفسها به تعداد ۶ تایی در درجه حرارت (۴ ± ۱۷ درجه سانتی گراد) نگهداری و پرورش داده شدند. غذای فشرده استاندارد و آب در اختیار موش های آزمایشگاهی بود و از نور ساعت ۷ صبح الی ۷ عصر استفاده می کردند.

تهیه هموژنه مغز موش آزمایشگاهی

موش های آزمایشگاهی از طریق قطع نخاع کشته شدند ، سپس سریعاً مغز موش ها برداشته و قسمت های مختلف آن جدا گردید. وزن هر بخش از مغز توسط ترازو تعیین شد. مقدار ۲ میلی گرم از بافت مغزموش سفید آزمایشگاهی در ۵ میلی لیتر از محلول پرکلرات ۰/۵ مولار توسط هموژنایزر ، هموژنه گردید. محلول تهیه شده به مدت ۳ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفوژشد. محلول رویی حاصل جدا شد و با افزودن محلول اسید کلریدریک ۰/۴ مولار به آن pH محلول به ۵ رسانده شد. سپس مجددا در دور ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ ومحلول رویی حاصل به میکروفیلتر انتقال داده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جداسازی هیستامین

مقدار ۲ میلی لیتر از محلول رویی تهیه شده به میکروفیلتر (برای جداسازی ذرات با وزن مولکولی ۱۰۰۰۰ دالتون) انتقال داده شدوبه مدت ۵ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ شدومحلول رویی آن تهیه گردید،سپس ۰/۵ میلی لیتر از بافر بورات۰/۴ مولار با pHبرابر با ۸/۵ وکلراید سدیم۰/۰۲مولار به آن اضافه شد و مجدداً سانتریفوژگردید و محلول رویی آن که حاوی هیستامین بود در مرحله بعدی آزمایش مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین مقدار هیستامین

به ۲۰۰ میکرولیتر از هموژنه نمونه تهیه شده مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از معرف ۶،۴،۲ تری نیتروبنزن سولفونات اضافه گردید و در دمای ۴۵ درجه به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد، سپس محلول حاصل در ظرف یخ سرد گردید و در طول موج ۴۲۰ نانومترجذب هر یک از نمونه ها اندازه گیری شد(۸). مقدار هیستامین تولید شده بر اساس غلظت استاندارد و ضریب خاموشی بر حسب میکرومول در میلی گرم پروتئین بافت مغز بدست آمد. در آزمایش های مشابه جهت بررسی اثر تداخل سایر ترکیبات آمینی در اندازه گیری هیستامین در حضور مقدار ۵ میکرومول در لیتر ترکیبات سروتونین ، گلوتاتیون و پوترسین با معرف ۶،۴،۲ تری نیترو بنزن سولفونات آزمایش ها تکرار گردید. پروتئین بافت مغز موش آزمایشگاهی با استفاده از روش لوری اندازه گیری شد(۱۳).

محلول بافرهیستیدین دکربوکسیلاز

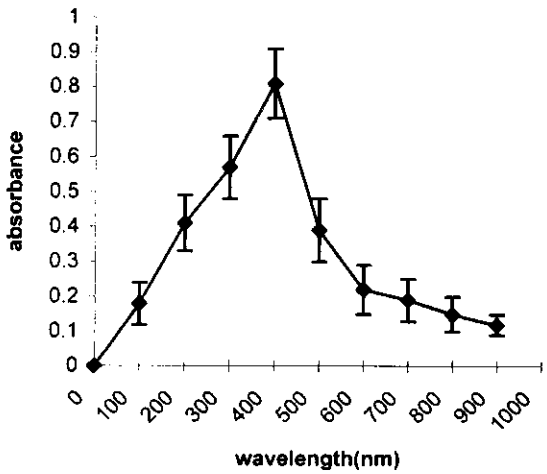
حاوی بافر ۰/۲۵مولار فسفات پتاسیم با pH برابر با ۶/۸ و مقدار ۱/۷ میلی مول دی تریتول ۰/۲۵ میلی مول پیریدوکسال ۵ ـ فسفات و پلی اتیلن گلایکل ۳٪ بود. مقدار۱میلی گرم در یک میلی لیتر محلول فنیل متان سولفونیل فلوراید نیز به بافر فوق اضافه گردید. مقدار ۲۰۰ میلی گرم از هر قسمت مغز به ۱ میلی لیتر محلول بافر هیستیدین دکربوکسیلاز اضافه شد، سپس هموژنه بافت مغز در این محلول تهیه گردید. هموژنه هر قسمت از مغز ۴ بار به مدت ۱۰ ثانیه و با فرکانس ۵۰ هرتز همزده شد. سپس هموژنه حاصل را در دور ۴۵۰۰ سانتریفوژ کرده و محلول رویی آن که حاوی آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز بود، تهیه شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم

مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از سوپرنیتانت تهیه شده از هر قسمت مغز موش آزمایشگاهی ، حاوی آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز ، از میکروفیلتر عبور داده شد ، سپس در دور۴۵۰۰به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از آن مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از بافر هیستیدین دکربوکسیلاز به این محلول حاوی آنزیم اضافه شد. مجدداً در دور ۴۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. با افزودن حجم ۲۰۰ میکرولیتر از محلول ۲ میلی مول در لیتر هیستیدین به محلول فوق و با انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه واکنش آنزیمی شروع شد. پس از ۳ ساعت از شروع واکنش با افزودن ۲۰ میکرولیتر محلول پر کلریک اسید ۷۵ درصد ، واکنش آنزیمی متوقف گردید. پس از آن به این محلول ۰/۲ میلی لیتر از محلول ۶،۴،۲ تری نیتروبنزن سولفونات ۰/۰۱ مولار اضافه شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد محلول حاصل حرارت داده شد و پس از سرد کردن محلول آزمایش ، هیستامین تولید شده در این مدت که محصول فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز است ، به طریقه اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه گیری شد و فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه گردید(۸،۱۱،۱۴).

نتایج:

ترکیب هیستامین و معرف ۶،۴،۲ تری نیتروبنزن سولفونات در طول موج ۴۲۰ نانومتر حداکثر جذب نوری را داشت (نمودار ۱).

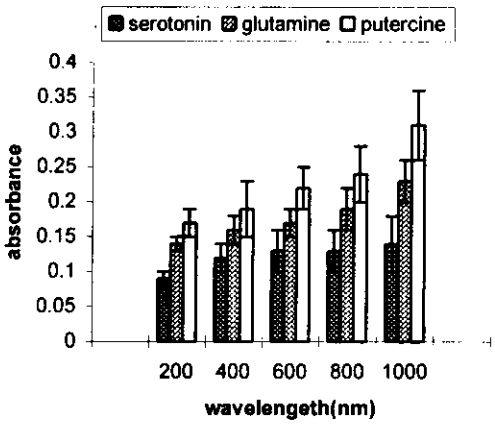


نمودار ۱ : جذب نوری ترکیب هیستامین ومعرف ۶،۴،۲ تری نیتروبنزن سولفونات . مقادیر برحسب Mean ± SD ارایه شده است. هریک از نقاط حاصل تکرار ۶ بار آزمایش است.

www.SID.ir

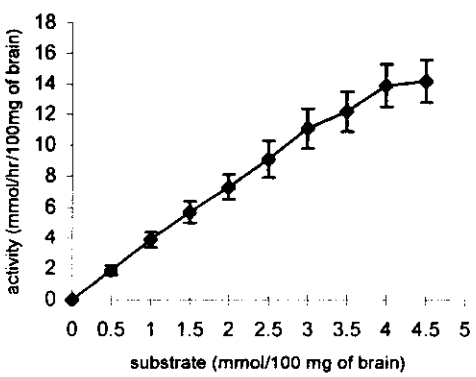
Archive of SID

در نمودار ۲ جذب نوری ترکیبات آمینی دیگر مانند سروتونین،گلوتامین وپوترسین در حضور معرف ۶،۴،۲ تری نیتروبنزن سولفونات در طول موج ۴۲۰ نانومتر نشان داده شده است که در شرایط یکسان در این طول موج جذب نوری بسیار پایینی دارند.



نمودار۲: جذب نوری سروتونین ،گلوتامین وپوترسین در حضور معرف ۶،۴،۲ تری نیتروبنزن سولفونات . مقادیر برحسب Mean ± SD ارایه شده است. هریک از نقاط حاصل تکرار ۶ بار آزمایش است

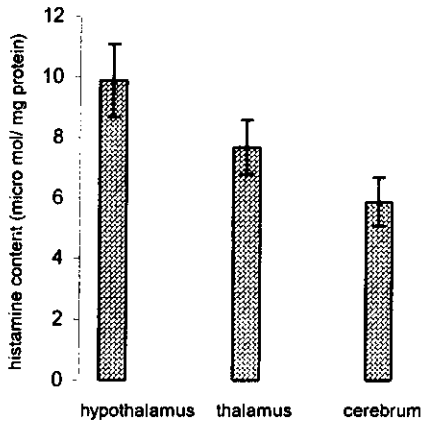
منحنی استاندارد برای اندازه گیری فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز بر حسب مقادیر مختلف حجم هموژنه مغز موش آزمایشگاهی در نمودار ۳ نشان داده شده است. همانگونه که در این نمودار دیده می شود تا مقدار حجم هموژنه مغز استفاده شده در این روش منحنی بصورت خطی است.



نمودار ۳ : منحنی استاندارد اندازه گیری فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز مغز موش آزمایشگاهی . مقادیر برحسب Mean ± SD ارایه شده است. هریک از نقاط حاصل تکرار ۶ بار آزمایش است.

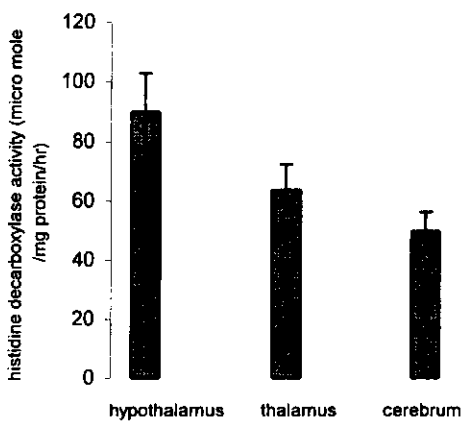
www.SID.ir

در نمودار ۴ مقدار هیستامین در بخش های مختلف مغز موش آزمایشگاهی با هم مقایسه شده است.



نمودار ۴: مقدار هیستامین بر حسب میکرومول در میلی گرم پروتئین مغز . مقادیر برحسب Mean ± SD ارایه شده است. هریک از نقاط حاصل تکرار ۶ بار آزمایش است.

در نمودار ۵ فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز موش آزمایشگاهی در بخش های مختلف بافت مغز با هم مقایسه شده است.



نمودار ۵ :فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز بر حسب میکرومول در میلی گرم پروتئین مغز در ساعت. مقادیر برحسب Mean ± SD ارایه شده است. هریک از نقاط حاصل تکرار ۶ بار آزمایش است.

همانگونه که در نمودارهای ۴و۵ نشان داده شده است ، بیشترین مقدار هیستامین و میزان فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز در بخش هیپوتالاموس مغز وجود دارد.

Archive of SID

بحث:

یافته های بدست آمده ازاین پژوهش نشان می دهند که هیستامین موجود در هموژنه بخش های مختلف مغز موش آزمایشگاهی با معرف ۶،۴،۲ تری نیترو بنزن سولفونات واکنش داده و در طول موج ۴۲۰ نانومتر جذب نوری مناسبی دارد(مقدار جذب نوری۰/۸۹ است)، سایر ترکیبات آمینی احتمالی موجود در هموژنه بافت مغز از جمله سروتونین ،گلوتاتیون و پوترسین در حضور معرف ۶،۴،۲ تری نیترو بنزن سولفونات در شرایط واکنش یکسان در این طول موج جذب نوری پایینی دارند (مقدار جذب نوری حداکثر ۰/۳). بنابراین در اندازه گیری مقدار هیستامین بخش های مختلف مغز تداخلی ندارند و ویژگی روش استفاده شده برای اندازه گیری مقدارهیستامین را نشان می دهد. منحنی استاندارد تهیه شده در طول موج ۴۲۰ نانومتر برای اندازه گیری مقدار هیستامین تا مقدار حجم هموژنه مغز استفاده شده در این روش نمودار بصورت خطی است ، بنابراین برای بدست آوردن مقدار هیستامین در حجم های هموژنه استفاده شده در این پژوهش مناسب است. در این پژوهش بدون نیاز به مراحل استخراج و خالص سازی ، با روش ساده مقدار هیستامین و فعالیت آنزیم هیستدین دکربوکسیلاز در بخش های مختلف مغز موش آزمایشگاهی در حد میکرومول در میلی گرم پروتئین بافت مغز بدست آمد. نتایج بدست آمده نشان می دهند که بیشترین مقدار هیستامین در بخش هیپوتالاموس مغز وکمترین مقدار هیستامین در بخش مخچه مغز موش آزمایشگاهی است و این یافته با گزارش سایر محققان که با روش های دیگرمقدار هیستامین را اندازه گیری کرده اند منطبق است (۱،۹). همچنین نتایج حاصل از این پژوهش نشان می دهند که بیشترین مقدار فعالیت آنزیم هیستدین دکربوکسیلاز دربخش هیپوتالاموس وکمترین مقدار فعالیت آنزیم در بخش مخچه موش آزمایشگاهی است، این یافته ها نیز با نتایج سایر محققان منطبق است(۴،۸،۱۱). با توجه به ساده بودن مراحل انجام این پژوهش،قابلیت تکرار و کم هزینه بودن روش ، با بکار گیری این روش می توان در آینده میزان اثر ترکیبات آنتاگونیست و آگونیست های مختلف هیستامین وهمچنین اثر ترکیبات مختلف مهار کننده و تحریک کننده بیولوژیک را بر فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز در بافت های مختلف مطالعه نمود.

www.SID.ir

منابع:

1. Sakai N , Onodera K , Maeyama K , et al. Effects of thioperamide ,a histamine H3 receptor antagonist ,on locomotor activity and brain histamine content in mast cell-deficient w/w mice. Life Sci 1991; 48 : 2397-2404.
2. Clough GF , Bennett AR , ChurchMK. Effects of H1 antagonists on the cutaneous vascular response to histamine and bradykinin. A study using scanning laser doppler imaging. Br J Dermatol 1998 ; 138(5): 806-814.
3. Arrang JM , Garbarg M , Schwartz JC. Autoinhibition of brain histamine release mediated by a novel class of histamine receptor. Nature 1983 ; 303: 823-837.
4. Watanabe T , Nakamura H , Liang L , et al. Partial purification and characterization of L-histidine decarboxylase from fetal rats. Biochem Pharmacol 1989 ; 28: 1149-1155.
5. Iversen LL, Iversen SD, Snyder SH (eds). Handbook of psychopharmacology. New York : Plenum ,1975 : 327-328.
6. Blayney LM , Newby AC. Histamine and a guanine nucleotide increase calcium permeability in pig aortic microsomal fractions. Biochem J 1990; 267 : 105-109.
7. Kinoshita E , Saito M. Novel histamine measurement by HPLC analysis used to assay histidine decarboxylase inhibitory activity of shoyuflavones from soysauce. Bio Sci Biotechnol Biochem 1998; 62(8): 1488-1491.
8. Nimura T, Maeyama K, Sakai N , et al. A simple method for the assay of histidine decarboxylase activity in crude brain extracts: Regional distribution in various strains of mice. Biogent Amin 1992; 8(5): 315-322.
9. Yamatodani A , Fukuda H , Wada H. High-performance liquid chromatographic determination of plasma and brain histamine without previous purification of biological samples, cation-exchange

Archive of SID

chromatography couple with post-column derivatization fluorometry. J Chromatogr 1995 ;344:115-123.
10. White MV. The role of histamine in allergic disease. J Allergy Clin Immunol 1990 ; 86 :599-609.
11. Yamada M , Watanabe T , Fukui H , et al. Comparison of histidine decarboxylase from rat stomach and brain with that from whole bodies of rat fetus. Agents Actions1984 ; 14: 143-152.
12. Hocker M , Zhang Z , Koh TJ , et al. The regulation of histidine decarboxylase gene expression Yale. J Biol Med 1996 ; 69(1): 21-33.
13. Lowery OH , Passonneau JV , Schulz DW , et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951 ; 193: 265-275.
14. Endo Y. A simple method for the determination of polyamines and histamine and its application to the assay of ornithine and histidine decarboxylase activities. Methods Enzymol 1983 ; 94: 42-47.

www.SID.ir