

اثر مهاری سدیم دودسیل سولفات (SDS) بر تفکیک زیر واحدهای هورمون گوناودتروپین جفت انسانی (hCG)

* دکتر محمد رضا حسینیخت، **دکتر امید رجبی، ***دکتر عبدالرضا وارسته، ****دکتر بی بی صدیقه فضلای نراز
* بخش شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
**گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی مشهد و مرکز تحقیقات علوم دارویی پژوهشکده بوعلی
*** مرکز تحقیقات ایمنولوژی پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
****گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی مشهد و مرکز تحقیقات علوم دارویی پژوهشکده بوعلی

خلاصه

در این مطالعه شدت نور فلورسانس ایجاد شده در طول موج ۴۸۰ nm که در پی تهیه هورمون گوناودتروپین جفت انسانی (hCG) با نوری با طول موج ۳۸۰ nm و در حضور ۱- آنیلینو ۸- نفتالن سولفونات (ANS) ایجاد می گردد، به عنوان شاخصی از میزان وجود هورمون دست نخورده اندازه گیری گردید. تفکیک hCG به زیر واحدهایش در محدوده pH بین ۲ الی ۱۰ و در محدوده دمائی ۲۵°C الی ۷۰°C از نوع کینتیک درجه اول ارزیابی شد و ثوابت سرعت تفکیک در این محدوده تعیین گردید. سرعت تفکیک hCG در محیط اسیدی نسبت به سایر شرایط بیشتر است. مطالعات ژل فیلتراسیون hCG نشان داد که حجم شستشوی این هورمون با افزایش pH از محیط اسیدی به خنثی و قلیایی افزایش می یابد. سدیم دودسیل سولفات (SDS) که یک سورفکتانت آنیونی قوی می باشد، تفکیک hCG را به زیر واحدهایش در محدوده غلظتی مطالعه شده کاهش می دهد. SDS بهترین اثر مهاری خود را در غلظت ۰/۷ mM اعمال می کند. با تعیین انرژی فعال سازی hCG در حضور و عدم حضور SDS مشخص گردید که بیشترین انرژی فعال سازی جهت تفکیک این هورمون بر غلظت ۰/۷mM از SDS منطبق است. افزایش در حجم شستشوی hCG در حضور SDS (۰/۷ mM) در pH های اسیدی، خنثی و قلیایی واقع می گردد. کاهش در سرعت تفکیک hCG و افزایش در انرژی فعال سازی این هورمون در حضور SDS احتمالاً به دلیل تاخوردگی جزئی می تواند باشد که نتیجه عملکرد SDS است.

کلمات کلیدی: هورمون گوناودتروپین جفت انسانی (hCG)، سدیم دودسیل سولفات (SDS)، مهار کننده، تفکیک، فلورسانس

مقدمه

هستند (۱۱). کینتیک تفکیک هورمون های گلیکوپروتئینی توسط چندین محقق مورد بررسی قرار گرفته است. روشهای رایج برای تعیین سرعت تفکیک این مواد به زیر واحد هایشان عبارتند از: سیرکولار دایکوریسک (Circular dichoric) و طیف سنجی افتراقی (۱۲)، تعیین فعالیت بیولوژیکی (۸، ۲۷) و کاهش در فلورسانس ANS (۱، ۱۸).

تفکیک hCG به زیر واحدهایش وابسته به وقوع تغییرات ساختاری، مواد همراه و شرایط نگهداری است (۱). محلول آبی hCG در دمای اتاق پایدار است (۱۸). تفکیک این هورمون به زیر واحدهایش در شرایط زیر تسریع می یابد: pH های پایین

hCG هورمون با منشاء جفتی است. این هورمون با سایر هورمون های گلیکوپروتئینی بدن آدمی نظیر: FSH, LH و TSH که از هیپوفیز ترشح می شوند، به لحاظ ساختمانی شباهت فراوانی دارد. تمام این هورمون ها از دو زیر واحد به نام های زیر واحد آلفا و زیر واحد بتا تشکیل شده اند که زیر واحد های فوق با اتصالات غیر کووالان در کنار یکدیگر قرار می گیرند (۱۳، ۱۹، ۲۰، ۲۴، ۲۸، ۲۹، ۳۰، ۳۲).

زیر واحد آلفا در تمام هورمون های گلیکوپروتئینی یکسان است و تفاوت آنها فقط در زیر واحد بتا می باشد (۲۵، ۲۶). زیر واحدهای این هورمون فاقد فعالیت بیولوژیکی

تعیین شیب تغییرات جذب در محلول آبی hCG در مقابل غلظت مولی آن به دست آمد (۱۴). محلول های ANS با استفاده از اندازه گیری جذب محلول در ۳۵۰ nm با استفاده از ضریب خاموشی مولی آن ($\epsilon_{350} = 5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) تهیه شدند (۱۹).

فلوریمتری

اندازه گیری فلورسانس با استفاده از یک دستگاه فلوریمتر از نوع Shimadzu مدل RF-540 مجهز به ترموستات برای کنترل دما و در یک میکروسول کوارتز انجام گرفت. در این مطالعه، محلول موجود در سل با نوری با طول موج ۳۸۰ nm تهییج می گردید و با توجه به حداکثر نور منتشر شده در ۴۸۰ nm شدت فلورسانس اندازه گیری می شد. دانسیته نوری محلول ها در طول موج حداکثر نشر از ۰/۱ بیشتر نبود. روش اندازه گیری سرعت تفکیک hCG به صورت زیر است: محلول ذخیره hCG در بافر استاندارد تهیه شد. این محلول در طی مطالعات در دمای ۴۰ C نگهداری شد. ۲۵ μl از محلول ذخیره به میکروسول حاوی ۴۰۰ μl از محلول ۲۰ μM از ANS در بافر استاندارد، انتقال یافت و مخلوط شد. شدت فلورسانس در طول موج ۴۸۰ nm پس از تهییج در ۳۸۰ nm تعیین گردید. در حین آزمایشات pH با اسید کلریدریک و سود ۱N تنظیم گردید. برای تعیین سرعت در زمان های مشخصی از محلول های تعریف شده حاوی هورمون، فلوریمتری انجام گردید.

ژل فیلتراسیون

ژل فیلتراسیون در ستون کروماتوگرافی ۱×۵۷ cm حاوی سفادکس G-100 در ۴۰ C و با استفاده از روش فلوریمتری انجام گرفت. پارامترهای ستون با استفاده از دکستران بلو (V₀) و ویتامین B_{۱۲} (V₀) در pH های ۷.۳ و ۱۰ در حضور و عدم حضور SDS (۰/۷ mM) تعیین شد (۳۱).

نتایج و بحث

اطلاعات آزمایشگاهی حاکی از آن است که hCG بر اساس کنتیک درجه اول تفکیک می شود و با معادله $\ln(I/I_0) = -kt$ وفاق دارد. که در اینجا I₀ و I به ترتیب

(۱۴، ۱۸)، غیرطبیعی کننده هایی چون اوره، گوانیدین هیدروکلراید (۱۸، ۲۷) و دماهای بالا (۱۸). تفکیک این هورمون نتیجه تغییر در ساختمان سوم و یا دوم آن است (۱۶). در این مطالعه سرعت تفکیک hCG به زیر واحدهای خود با تعیین سرعت کاهش شدت فلورسانس این هورمون در حضور ANS برآورد گردید (۱). این روش سریع و دقیق است و در غلظت های کم هورمون نیز کاربرد دارد. hCG می تواند به ANS متصل شده و خواص فلورسانسی آن را به شدت افزایش دهد، این در حالی است که زیر واحدهای آن قادر به چنین کاری نیستند (۱۱).

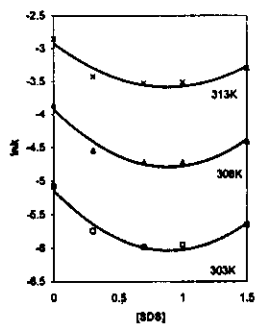
سورفکتانت ها یکی از مواد بسیار مهمی هستند که در فرمولاسیون فرآورده های دارویی مصرف می شوند. SDS احتمالاً یکی از موثرترین غیرطبیعی کننده هاست. صرف نظر از سمیت آن این ماده اثرات متضادی بر ساختمان سوم و چهارم پروتئینی دارد. در حالی که برخی از مطالعات حاکی از تخریب ساختمان مارپیچ آلفا در ساختمان پروتئین ها می باشد، مطالعات دیگر نیز نشان می دهد که این ماده باعث ایجاد ساختمان مارپیچ آلفا شده است (۱۲، ۱۵، ۲۱، ۳۱، ۳۲).

مواد و روش کار

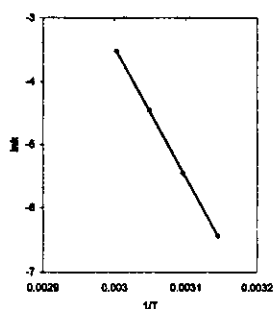
hCG خالص از ماده خام با استفاده از روش ابداع شده به وسیله مورگان و کن فیلد (۱۰، ۱۷، ۲۲)، با فعالیت بیولوژیکی بین ۱۶۰۰۰ الی ۱۸۰۰۰ واحد بر میلی گرم (با روش اندازه گیری وزن پروستات Rat، روش مورد استفاده اولسین استاندارد بین المللی) تهیه شد (۳، ۴، ۷). ANS و SDS خریداری از شرکت سیگما شد. محلول بافر (بافر استاندارد)، تهیه شده از ۰/۰۲ M فسفات پتاسیم، ۰/۱ M کلرید پتاسیم pH=۷/۴ و سایر مواد از خالص ترین درجه تهیه شدند.

طیف سنجی

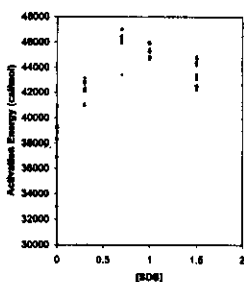
تهیه محلول های با غلظت معینی از هورمون با استفاده از اندازه گیری میزان جذب آنها در طول موج ۲۰۵ nm در یک سل کوارتز ۱cm انجام شد. ضریب خاموشی مولی هورمون با



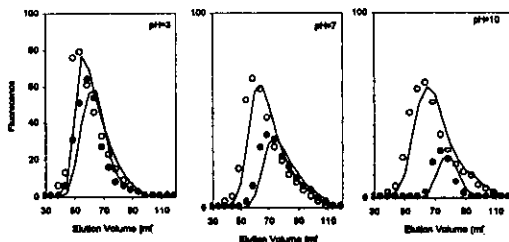
شکل ۴: lnk در مقابل غلظت مولی SDS در pH=۳ و در سه دمای مختلف



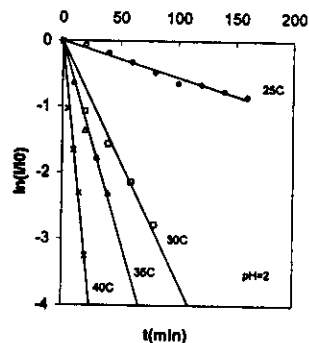
شکل ۵: نمودار آرنیوس برای hCG در pH=7



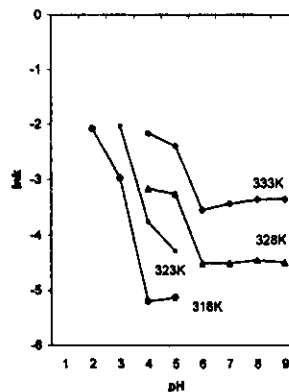
شکل ۶: تغییر در انرژی فعال سازی تفکیک hCG در اثر تغییر در غلظت SDS در pH های مختلف.



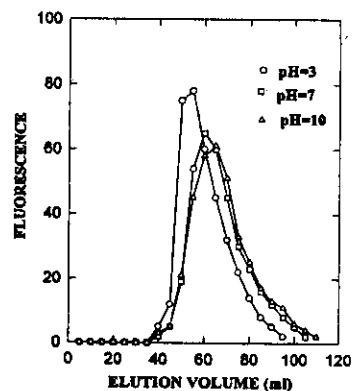
شکل ۷: ژل فیلتراسیون hCG در ۴°C روی Sephadex G-100 به ابعاد (۱×۵۸ cm)، در حضور ۰/۷ mM SDS (دایر توپر) و در عدم حضور SDS (دایر توخالی).



شکل ۸: ln(I/I0) در مقابل t (دقیقه) در pH=2



شکل ۹: lnk در مقابل pH در چند دما (۳۱۸ °K, ۳۲۳ °K, ۳۲۸ °K, ۳۳۳ °K)



شکل ۱۰: ژل فیلتراسیون hCG در ۴°C روی Sephadex G-100 به ابعاد (۱×۵۸ cm)، بافرهای استفاده شده جهت تنظیم pH عبارتند از: سیترات (۰/۰۲ M) برای pH=۳، فسفات (۰/۰۱ M) برای pH=7 و بورات (۰/۰۲ M) برای pH=10.

روش ژل فیلتراسیون برای مطالعه تاثیر SDS بر ساختار مولکولی hCG مورد استفاده قرار گرفت. شکل ۷ نشان دهنده حجم های شستشو hCG در حضور و عدم حضور SDS (غلظت ۰/۷mM) در pH های ۷،۳ و ۱۰ است، که مبین بیشتر بودن حجم شستشو در تمام pH ها در حضور SDS نسبت به عدم حضور آن می باشد. این افزایش در حجم شستشو می تواند ناشی از تاخوردگی جزئی باشد که در حضور SDS روی می دهد. کاهش در سرعت تفکیک زیرواحدها و همچنین افزایش در انرژی فعال سازی در حضور SDS ممکن است مربوط به این تاخوردگی باشد.

تشکر و قدردانی

مولفین مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد به خاطر حمایت مالی ایشان اعلام می نمایند.

References

1. Aloj S. M., Edelhoeh H., Ingham K., Morgan F. J., Canfield R.E and Ross G. T., 1973, The rates of dissociation and reassociation of subunits of human chorionic gonadotropin, Arch. Biochem. Biophys., 159: 497-504.
2. Andrew K., Margaret M.E., Gawinowicz M.A. Birken S. and Cole A. L., 1991, Heterogeneity of human chorionic gonadotropin (hCG). I., Endocrinology, 129: 1541-1550.
3. Bahl O. P., Marz. I. and Kessler M. J., 1978, Isolation and characterization of N- and O-glycosidic carbohydrate units of human chorionic gonadotropin, Biochem. Biophys. Res. Commun., 84: 667-676.
4. Bangham D. R. and Grab B., 1964, The second international standard for chorionic gonadotropin, Bull. of World Health Org., 31: 111-125.
5. Bo M. and Boime I., 1992, Identification of the transcriptionally active genes of the chorionic gonadotropin beta gene cluster in vivo J. Bio. Che. 267: 3179-3199.
6. Butler S. A., Cole L. A., Chard T. and Iles R. K., 1998, Dissociation of human chorionic gonadotropin into its free subunits in dependent on naturally occurring molecular structure variation, sample matrix and storage conditions, Am. Clin. Biochem., 35:754-760.
7. Canfield R. E. and Ross G. T., 1976, A new reference preparation of human chorionic gonadotropin and its subunits Bull. World Health Organ, 54:463-468.
8. Canfield R. E. and Ross G. T., 1976, A new reference preparation of human

شدت نور فلورسانس منتشر شده در ۴۸۰nm در زمان های صفر و t است. کینتیک درجه یک تفکیک این هورمون در محدوده pH برابر ۲ الی ۱۰ و در دماهای بین ۲۵ °C الی ۷۰ °C صادق است. به عنوان نمونه شکل ۱ نمودار $\ln(I/I_0)$ در مقابل t را برای چهار دمای متفاوت و در pH=۲ نشان می دهد. ثوابت سرعت تفکیک براساس شیب خط حاصل از چنین نمودارهایی به دست آمد. ثابت سرعت با افزایش دما افزایش می یابد، این موضوع در تمام محدوده pH مطالعه شده صادق است. از طرف دیگر، این ثابت در pH های اسیدی بیشتر از خنثی و قلیایی است (شکل ۲). برای مطالعه تاثیر pH بر ساختار مولکولی hCG از تکنیک ژل فیلتراسیون استفاده شد. نمودار ژل فیلتراسیون hCG در pH های ۷،۳ و ۱۰ در شکل ۳ نشان داده شده است. حجم شستشوی hCG با کاهش pH کم می شود.

تفسیر این مطلب براساس تئوری های مربوط به ژل فیلتراسیون مبین یک باز شدگی جزئی در ساختمان مولکولی hCG است. تاثیر غلظت های مختلف SDS بر ثابت سرعت تفکیک hCG در محدوده pH بین ۲ الی ۹ و در دماهای بین ۲۵°C الی ۷۰°C از دیگر موارد مورد مطالعه بود. شکل ۴ تغییرات $\ln k$ در برابر غلظت های مختلف SDS در pH=۳ نشان می دهد. در تمام محدوده غلظتی SDS، باعث کاهش ثابت سرعت تفکیک این هورمون می گردد. همان طوری که در شکل ۴ نیز نشان داده شده است، حداقل ثابت سرعت در زمانی است که غلظت ۰/۷ mM از SDS استفاده شده باشد. میزان انرژی فعال سازی hCG در حضور SDS، با رسم نمودار $\ln k$ مقابل 1/T در تمام محدوده pH استفاده شده به دست آمد، (شکل ۵)، در شکل ۶ تغییرات انرژی فعال سازی در مقابل غلظت های مختلف SDS نمایش داده شده است. انرژی های فعال سازی در تمام pH ها در حضور SDS افزایش می یابد. به عبارت دیگر حضور SDS باعث کاهش سرعت تفکیک در تمام محدوده pH می گردد. حداکثر انرژی فعال سازی جهت تفکیک در غلظت ۰/۷mM از SDS است.

20. Loeber J. G., 1977, Human luteinizing hormone: structure and function of some preparations, *Acta Endocrinol* {Suppl.210} 85:1-6.
21. Moosavi-Movahedi A. A., Goodarzi M. and Housaindokht M. R., 1990, Folding of the interaction of sodium n-dodecyl sulphate with histone H1, *J. Sci. I. R. Iran* 1: 81-86.
22. Morgan F. J. and Canfield R. E., 1971, Nature of subunits of human chorionic gonadotropin, *Endocrinology*, 88: 1045-1053.
23. Mulder C. Schutter E. M. J., Van Uxem W. I. M. and Van Kamp G. J., 1997, Stability of human urinary gonadotropin peptide, *Tumor. Biol.*, 18: 274-277.
24. Papkoff H., Sairam S., Walker Farmer and Li C. H., 1973, Studies on the structure and function of interstitial cell-stimulating hormone, *Recent Prog. Horm. Res.*, 29:563-571.
25. Pierce J. G. and Parsons T. F., 1981, Glycoprotein hormones: Structure and function, *Annu. Rev. Biochem.*, 50: 465-495.
26. Pierce J. G., Liao T. Howard S. M., Shome B. and Cornell S. S., 1971, Studies on the structure of thyrotropin: its relationship to luteinizing hormone, *Recent Prog. Horm. Res.*, 27:165-172.
27. Rechert L. E., Jr and Parlow A. F., 1963, Preparation of ovine luteinizing hormone (LH, ICSH) having high biological activity, *Endocrinology*, 73: 285-293.
28. Reichert L. E., 1971, Electroforetic properties of pituitary gonadotropins as studied by electrofocusing, *Endocrinology*, 88:1029-1035.
29. Saxena B. B. and Rathnam P., in: Martini L. and Jams V. (eds), *Human chorionic gonadotropin early of pregnancy and parturition*, Academic Press, New York, P.P. 97-125.
30. Swaminathan N. and Bahl O.P., 1970, Dissociation and recombination of the subunits of human chorionic gonadotropin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40: 422-427.
31. Tanford C., 1978, The hydrophobic effect and the organization of living matter, *Science* 200: 1012-1018.
32. Yamasaki M., Yamashita T., Yano H., Tatsumi K. and Aokika 1996, Differential scanning calorimetric studies a bovine serum albumin IV Effect of anionic surfactants with various length of hydrocarbon chain, *Int. J. Biol. Macromol*, 19: 241-246.
- chorionic gonadotropin and its subunits, *Bull. World Health Org*, 54: 1321-1334.
9. Canfield R. E., Agosto G. M. and Bell J. J., in: Butt W. R., Crooke A.C. and Ryle M. (eds), *Gonadotropins and Ovarian Development* Plenum Press, New York, 1971, 88:1045-1049.
10. Canfield R. E., Morgan F. J., Kammerman S., Bell J.I and Agosto G. L., 1971, study of human chorionic gonadotropin, *Recent Prog. Horm. Res.* 27: 121-164.
11. Catt K. J., Dafau M. L. and Tsuruhara T., 1973, Absence of intrinsic biological activity in LH and hCG subunits, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 36:73-80.
12. D'auria S., Barone R., Rossi M., Nucci R., Barone G., Fessas D., Bertoli E. and Tanfani F., 1997, Effects of temperature and SDS on the structure of beta-glycosidase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* *Biochem.*, 323:833-840.
13. De La Liosu P. and Jutisz M., 1969, Reversible dissociation into subunits and biological activity of ovine luteinizing hormone, *Biochem. Biophys. Acta.*, 181:426-436.
14. Forashtieri H. and Ingham K. C., 1980, Acid and temperature induced conformational changes in human chorionic gonadotropin and the mechanism of subunit dissociation *Arch. Biochem. Bophys.* 205:104-113.
15. Gaiandola C., De Sena C., Fessaa D., Graziano G. and Barrone G. 1997, Bovine serum albumin denaturation. Effect of ionic strength and SDS concentration, *Int. J. Bio. Macromol.* 20:193-204.
16. Garnier J., Salesse R. and Pernollet J. C., 1974, Reversible folding of human chorionic gonadotropin at acid pH or upon recombination of the alpha and beta subunits *FEBS-lett.*, 45: 166-171.
17. Greep R. O., Van Dyke H. B. and Chow B. F., 1941, Use of anterior lobe of [rat] prostate gland in the assay of metakention (interstitial cell - stimulating hormone) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 46:644-649.
18. Ingham K. C. and Boltin C., 1978, Intrinsic and extrinsic fluorescence probes of subunit interactions in ovine lutropin, *Arch. Biochem. Biophys.*, 191: 134-145.
19. Laemmli U. K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680-685.