Archive of SID

مقاله پژوهشی

اثر تیوپرآمید بر فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز در قسمتهای مختلف مغز موش سفید آزمایشگاهی

دکتر دردی قوجق[1]، دکتر یار حسین صفری[2]

چکیده

مقدمه: تیوپرآمید، آنتاگونیست رسپتور H3 هیستامین است که آزاد سازی هیستامین را از پری سیناپس نورون‌های هیستامینی مهار می کند، در نتیجه بر غلظت هیستامین و متابولیت‌های آن در مغز تاثیر می گذارد و فعالیت سیستم نورون هیستامینی را تغییر می دهد. این‌آمین بیولوژیک در ارتباطات سلولی نقش بسیار مهمی دارد. هیستامین در قسمت‌های مختلف از جمله ایمنوگلوبولین E، سلول‌های غدد مترشحه داخلی و خارجی، سیستم اعصاب مرکزی ومحیطی، ذخیره وترشح می‌شود. هیستیدین دکربوکسیلاز (E.C.4.1.1.22)، آنزیمی است که در بافت‌های پستانداران، آمین بیولوژیک، هیستامین را تولید می‌کند.

مواد وروش: در این پژوهش، یک روش ساده برای بررسی اثر تیوپرآمید بر فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز در بخش‌های مختلف مغز موش آزمایشگاهی استفاده گردید. برای انجام آزمایش به موش‌های سفید آزمایشگاهی گروه کنترل، محلول فیزیولوژیک و به گروه مورد مطالعه، مقدار ۵۰ میکروگرم بر هرکیلوگرم وزن موش، تیوپرآمید تزریق شد. یک ساعت پس از تزریق، از طریق قطع نخاعی، حیوان آزمایشگاهی راکشته و مغز را از جمجمه برداشته و پس از توزین هموژنه مغز تهیه شد سپس سوپرنیتانت محلول هموژنه به لوله آزمایش انتقال داده ودر دور ۴۵۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژگردید. فعالیت‌آنزیم هیستیدین دکربوکسیلازاز طریق واکنش هیستامین تولید شده با معرف ۲و۴و۶- تری نیتروبنزن سولفونات به روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۲۰ نانومتراندازه‌گیری شد.

نتایج و بحث: نتایج حاصل نشان می‌دهد که در گروه کنترل بیشترین مقدار فعالیت آنزیم در بخش هیپوتالاموس مغز و کمترین مقدار فعالیت آنزیم در مخچه است وتیوپرآمیدیک ساعت‌پس از تزریق، سبب کاهش فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز دربخش های تالاموس ومخچه مغزمی شود.

گل واژگان: هیستیدین‌دکربوکسیلاز،هیستامین،تیوپرآمید

مجله پزشکی ارومیه، سال دوازدهم، شماره یک، ص ۷۳-۶۵ ، بهار ۱۳۸۰

۱- دانشیار گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی بابل

۲- پزشک عمومی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تیوپرآمید،آنتاگونیست رسپتور H3 هیستامین‌است‌که‌آزاد شدن هیستامین‌راازپری سیناپس هیستامینی مهارمی‌کند وبدین ترتیب غلظت هیستامین ومتابولیت های آن رادرمغز کاهش می‌دهد(۱).تیوپرآمید از طریق مهارفعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز،سبب تغییرفعالیت نورون‌های هیستامینرژیک می‌گردد(۲و۱). هیستیدین دکربوکسیلاز (E.C. 4.1.1.22) آنزیمی‌است که دربافت‌های پستانداران،آمین بیولوژیک، هیستامین را تولید می‌کند. هیستیدین دکربوکسیلازدر تشکیل هیستامین، بافت عصبی مرکزی ومحیطی پستانداران، نقش مهمی دارد(۱). تا کنون برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز روش‌هایی مانند اندازه‌گیری مقدارCo2 نشاندار و یا هیستامین نشاندار حاصل از دکربوکسیلاسیون هیستیدین، توسط محققین مورد استفاده قرار گرفته است (۳و۲). اما این روش‌ها در سنجش رادیوایزوتوپ‌های تولید شده محدودیت‌هایی را دارند. در روش غیر ایزوتوپیک نیز هیستامین تولید شده بعد از مراحل استخراج و خالص سازی توسط روش‌های کروماتوگرافی اندازه‌گیری می‌شود، در این روش وجود هیستامین داخلی در اندازه‌گیری فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز دخالت می‌کند (۴و۱). روش کروماتوگرافی با کارکرد عالی(HPLC) نیز برای اندازه‌گیری هیستامین توسط سایر پژوهشگران مورد استفاده قرار گرفته است. اما در این روش نیز مراحل خالص‌سازی اولیه و تولید مشتق هیستامین ضرورت دارد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم، زمان زیادی طول می‌کشد(۴). همچنین بعضی از محققین هیستامین را با به کار گرفتن فتالدئید اندازه‌گیری کرده اندوبدین طریق خصوصیات فیزیکی و شیمیایی این آنزیم را در جنین موش آزمایشگاهی مورد بررسی قرار داده‌اند(۴). روش‌های کروماتوگرافی تعویض‌یونی‌برای‌اندازه‌گیری پلی آمین‌هااستفاده شده‌است،به طوریکه دراین‌روش پلی آمین‌برروی سلولز فسفریله شده جداگردیدوسپس به روش اسپکتروفتومتری فعالیت آنزیم اندازه گیری شده‌است(۷و۶و۵). فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلازدربافت‌های مختلف بدن از جمله در بافت مغز بسیار پایین است، بنابراین اندازه گیری فعالیت این آنزیم‌در پلاسما وسایر بافت‌ها باروش های موجود بسیار مشکل است. با توجه به اهمیت هیستامین به عنوان نوروترانسمیتر در کنترل حالت های خواب، بیداری، متابولیسم، انرژی و ترشح هورمون‌های هیپوتالاموس، به کارگیری روشی ساده که اثرترکیبات مختلف را بر مقدار هیستامین بدون احتیاج به مراحل استخراج و خالص‌سازی تعیین کند، مورد نیاز است. هدف این پژوهش به کارگیری روشی است که در هموژنه بافت مغزموش آزمایشگاهی به طور مستقیم اثرتیوپرآمید بر فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز تعیین شود.

موادوروش‌ها

مواد شیمیایی و دستگاه‌ها: تیوپرآمید، فسفات پتاسیم، دی‌تریتول، پیریدوکسال -۵- فسفات، پلی‌اتیلن‌گلایکل (P3015) با وزن مولکولی ۲۰۰، اسیدکلریدریک، بیکربنات سدیم، فنیل‌متان سولفونیل‌فلوراید، هیستیدین، پرکلریک‌اسید و ۶،۴،۲ تری‌نیتروبنزن سولفونات از شرکت سیگما تهیه شد. سایر ترکیبات شیمیایی در حد آزمایشگاهی بوده و از شرکت مرک، تهیه گردید. از اسپکتروفتومتر مدل Cecil,C.E. 1020 و سانتریفوژ مدل Clements ،2000 و ترازوی مدل Sartorius استفاده شد.

حیوان آزمایشگاهی: موش های سفید آزمایشگاهی (با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم) در قفس های ۶تایی در درجه حرارت

www.SID.ir

Archive of SID

(۲ + ۱۷درجه سانتیگراد) نگه داری و پرورش داده شدند. غذای فشرده استاندارد و آب در اختیار موش‌های آزمایشگاهی بوده و از ساعت ۷ صبح الی ۵ عصراز نور استفاده می‌کردند.

تزریق تیوپرآمید به موش های آزمایشگاهی: ۵ گرم از تیوپرآمید در محلول اسید کلریدریک ۰/۱ مولار حل شد. سپسpH آن با افزایش آب مقطر تا حجم ۱۰ میلی لیتر با استفاده از سدیم‌بی‌کربنات ۰/۱ مولار به ۷/۲۵ رسانده شد.

به موشهای آزمایشگاهی‌گروه کنترل(تعداد۴۸) به طریقه داخل صفاقی۰/۱میلی لیتر محلول فیزیولوژیک وبه موش‌های تحت آزمایش(تعداد۴۸)، ۰/۱ میلی لیتر محلول حاوی ۵۰ میلی گرم تیوپرآمید به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن موش تزریق شد.

تهیه هموژنه مغز موش آزمایشگاهی: یک ساعت پس از تزریق، موش های آزمایشگاهی از طریق قطع نخاعی کشته شدند،سپس سریعاً مغز موش‌ها رابرداشته وقسمت‌های مختلف آن جدا گردید. وزن هربخش از مغزتوسط ترازوی سارتریوس با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم توزین شد. سپس هموژنه هر قسمت از بافت مغز در محلول (HDC) تهیه گردید.

محلول (HDC): حاوی بافر۰/۲۵مولار فسفات پتاسیم با pH=۶/۸ و ۱/۷ میلی مول دی تریتول ۰/۲۵میلی مول پیریدوکسال ۵-فسفات وپلی اتیلن گلایکل ۳٪ بود.سپس ۱میلی‌گرم‌دریک‌میلی‌لیتر محلول فنیل متان سولفونیل فلورایدنیز به مخلوط اضافه گردید. ۲۰۰میلی گرم از هر قسمت مغز به ۱ میلی لیتر محلول (HDC)اضافه شد،سپس هموژنه بافت مغز در این محلول تهیه شد.هموژنه هرقسمت‌از مغز ۴ باربه مدت ۴۰ ثانیه با فرکانس ۵۰ سونیکه گردید.سپس هموژنه حاصل را در دور ۴۵۰۰ سانتریفوژکرده وسوپرنیتانت آن که حاوی آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز است ،تهیه شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم: ۲۵۰میکرولیترازسوپرنیتانت تهیه شده‌ازهرقسمت مغزموش آزمایشگاهی که حاوی‌آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز است ،از میکروفیلتربرای جداسازی ذرات بااندازه مولکولی ۱۰۰۰۰دالتون عبورداده شد،سپس دردور ۴۵۰۰ به‌مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژگردید.پس از آن ۲۰۰ میکرولیترازبافر (HDC) به این محلول حاوی آنزیم اضافه شد.مجددا"در دور ۴۵۰۰به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژگردید.با افزودن حجم ۲۰۰ میکرولیترازمحلول ۲میلی مول در لیتر هیستیدین به محلول فوق وباانکوباسیون در دمای ۳۷ درجه واکنش‌آنزیمی شروع شد.۳ساعت پس از شروع واکنش با افزودن ۲۰ میکرولیتر محلول پرکلریک اسید۷۵ درصدواکنش آنزیمی متوقف گردید.به این محلول ۰/۲ میلی لیتر از محلول ۲،۴،۶تری نیتروبنزن سولفونات ۰/۰۱مولار اضافه شد.سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد محلول حاصل حرارت داده شدوپس از سرد کردن محلول آزمایش هیستامین تولید شده در این‌مدت که محصول فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز است به طریقه اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه گیری شدوفعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه گردید.یک واحد آنزیمی بر اساس ۱ میکرومول محصول تولید شده در هر دقیقه در دمای ۳۷ درجه تعیین گردیدوفعالیت ویژه بر حسب واحد به ازاءهر میلی گرم پروتئین بافت مغز تعیین گردید. پروتئین بافت مغز توسط روش لوری اندازه گیری شد(۸).

برای مقایسه نتایج به دست آمده از گروه کنترل، تزریق شده با محلول فیزیولوژیک و گروه تزریق شده با تیوپرآمید از روش آماری Students t-test استفاده شد. در تمام شرایط برای مقایسه نتایج $P< ۰/۰۵$ معنی‌دار تلقی شد.

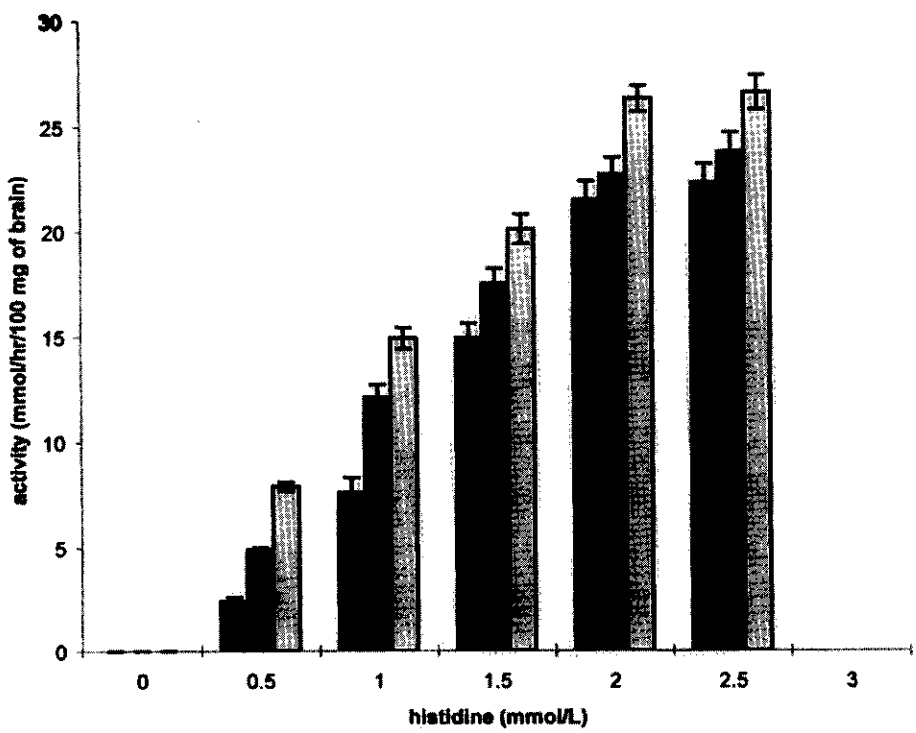
نتایج

منحنی استاندارد برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم هیستیدین

www.SID.ir

Archive of SID

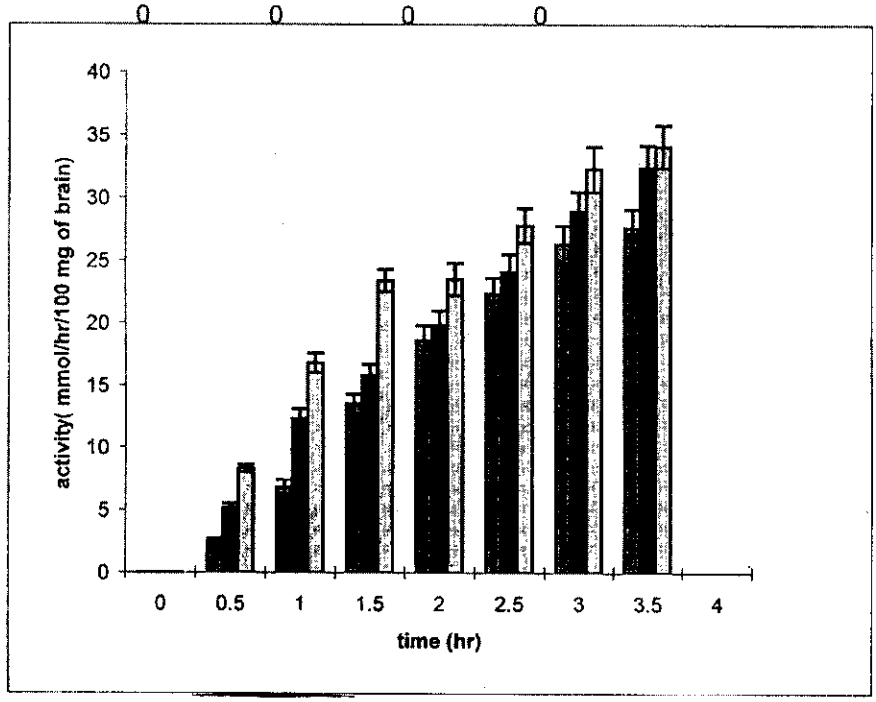
دکربوکسیلاز از مغزموش آزمایشگاهی رسم شد. در منحنی استاندارد تا غلظت ۱۰ میکرو مول در لیتر حجم هموژنه فعالیت آنزیم به صورت خطی بود، که نشان دهنده غلظت مناسب سوبسترا برای اندازه گیری فعالیت آنزیم است (نمودار۱). تا زمان انکوباسیون، ۳ ساعت، مقدار تولید هیستامین به صورت خطی افزایش می‌یابد(نمودار ۲)، بنابراین نتایج حاصل نشان می‌دهند که زمان مناسب برای اندازه گیری فعالیت آنزیم انتخاب شده‌است. .در(نمودار ۳) فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز در بخشهای مختلف مغز موش در گروه کنترل، تزریق شده با سرم فیزیولوژیک و گروه تزریق شده باتیوپرآمید نشان داده شده‌است. نتایج حاصل نشان می‌دهند که بیشترین مقدار فعالیت آنزیم در گروه کنترل در بخش هیپوتالاموس‌مغزبه دست آمده‌است‌که‌برابربا ۳/۵۹ + ۸۷/۴۱ میکرو مول در ساعت در میلی گرم پروتئین مغزوکمترین مقدار فعالیت آنزیم در مخچه است که برابربا ۲/۴۷ + ۵۲/۹۸ میکرومول در ساعت در میلی گرم وزن مغز وفعالیت آنزیم در تالاموس برابربا ۱۶/۴ + ۶۳/۲۸میکرومول در ساعت در میلی گرم‌پروتئین مغز است.در گروه تزریق شده با تیوپرآمیدفعالیت آنزیم در هیپوتالاموس برابربا ۹۲/۴ + ۸۹/۷۳ میکرومول در ساعت درمیلی گرم پروتئین مغز ودر مخچه برابربا ۱/۳۲ + ۱۹/۸۲میکرومول در ساعت در میلی گرم پروتئین مغز ودر تالاموس برابر با ۱/۱۶ + ۲۶/۹۵ میکرومول در ساعت در میلی گرم پروتئین مغز است.



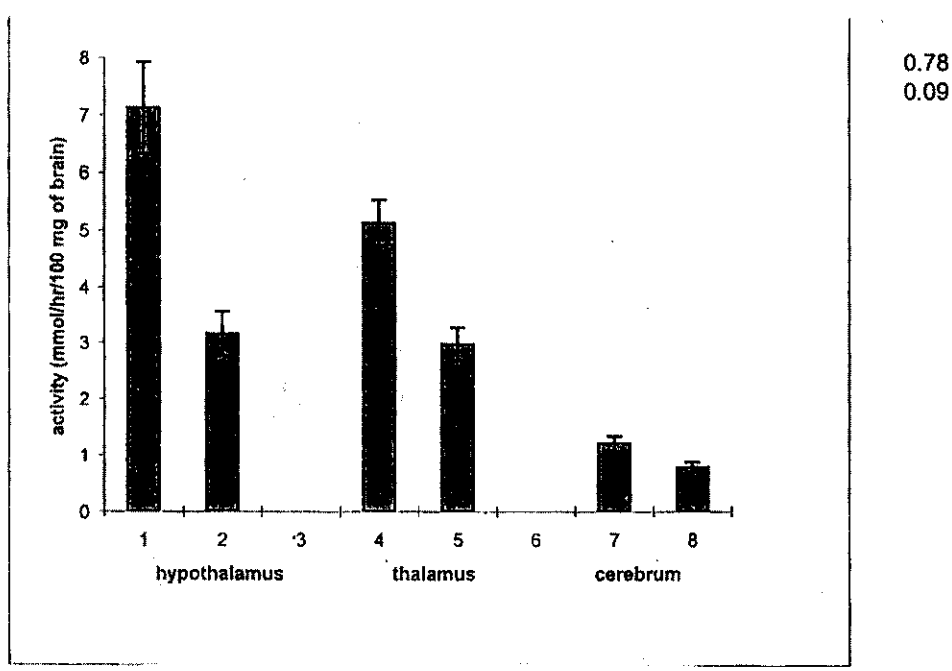
نمودار ۱: فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلازمغز موش آزمایشگاهی (هیپوتالاموس، تالاموس ومخچه) در غلظت های مختلف سوبسترا. مقادیر Mean +/-SD ارایه شده است. تعدادآزمایش‌ها ۶ بار است. در هر قسمت نمودار (ستون ۱: هیپوتالاموس، ستون ۲:تالاموس و ستون ۳: مخچه) است.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار۲: فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز (هیپوتالاموس،تالاموس و مخچه) در زمان های مختلف ارایه شده است Mean.تعداد آزمایش‌ها۶ بار است. در هر قسمت نمودار (ستون انکوباسیون. مقادیر۱: هیپوتالاموس، ستون۲: تالاموس SD-/+ و ستون۳: مخچه) است.



نمودار ۳: مقایسه اثر تیوپرآمیدبرفعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلازمغزموش آزمایشگاهی (هیپوتالاموس، تالاموس و مخچه) نسبت به گروه کنترل. مقادیر Mean +/-SD ارایه شده است و تعداد آزمایش‌ها ۶ بار است. ستون‌های قسمت اول نمودار مربوط به: هیپوتالاموس، ستون‌های قسمت دوم مربوط به: تالاموس و ستون‌های قسمت سوم مربوط به: مخچه) است. در هر قسمت منحنی (ستون ۱:کنترل، ستون ۲: با تزریق تیوپرآمید) است.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

یافته‌های به دست آمده‌از این پژوهش نشان می دهند که تیوپرآمید از طریق مهار فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز در بخش های تالاموس و مخچه مغز غلظت هیستامین را کاهش می دهد .در روش به کارگرفته شده در این مطالعه در مقایسه با روش های قبلی(۶و۵و۴)استفاده از روش های کروماتوگرافی و خالص سازی ضرورتی ندارد، به طوریکه برای اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم سوپرنیتانت محلول حاصل‌ازبافت مغزازیک میکروفیلتر عبورداده شدوآنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز از سایرمواد موجوددر هموژنه بافت مغز مستقیماً جدا گردید. روش به کارگرفته شده در این پژوهش در مقایسه با سایر روش ها زمان اجرای کمتری دارد ودقت آن بیشتر است ، یافته های به دست آمده از فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز در بخش های مختلف مغزبا نتایج گزارش شده توسط سایر محققان منطبق وقابل مقایسه است(۱۰و۹و۷).همچنین‌بانتایج محققان دیگرکه اثر تیوپرآمیدرابر فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز مطالعه کرده‌اندمنطبق است (۱۳و۱۲و۱۱و۱۰). یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان می‌دهند که فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز در بخش هیپوتالاموس مغز موش آزمایشگاهی نسبت به سایر بخش‌های مغز بیشتر است. بالا بودن فعالیت آنزیم در بخش هیپوتالاموس، احتمالاً به دلیل پراکندگی بیشتر سیستم نورون های هیستامینرژیک در هیپوتالاموس نسبت به سایر بخش های مغز باشد. یافته های حاصل از این پژوهش نشان می دهند در مخچه نیز فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز کمتر از سایر بخش‌های مغز است. این کاهش فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز در این بخش از مغز به دلیل پراکندگی کم‌نورون‌های هیستامینرژیک در مخچه است. یافته‌های جدید این تحقیق نشان می دهند که آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز در هیپوتالاموس بیشترین فعالیت ودر مخچه کمترین مقدار فعالیت را دارد.علاوه بر نتایج بدست آمده، از روش بکار گرفته شده دراین تحقیق می‌توان برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز در سایر بافتها نیز در آینده استفاده کرد.

References:

1- Acuna Y,Mathison Y,Campos HA,Israel A: Thioperamide, a histamine H3- receptor blocker, facilitates vasopressor response to footshocks. Inflamm Res, 1998, 47(3): 109-114.

2- Lamberti C, Ipponi A, Bartolini A, Schunack W, Malmberg AP: Antidepressant - like effects of endogenous histamine and of two histamine H receptor agonists in the mouse foced swim test.Br J Pharmacol, 1998, 123(7):1331-1336.

3- Arrange J M, Garbarg M, Lancelot J C, Schwartz J C: Highly potent and selective ligands for histamine H3-receptors. Nature, 1994,327:117-123.

4- Yamatodani A,Fukuda H, Wada H: High-performance liquid chromatographic determination of plasma and brain histamine without previous purification of biological samples,cation-exchange chromatography couple with post-column derivatization fluorometry. J Chromat, 1995, 344:115-123.

5- Watanabe T,Nakamura H,Liang L,Yamatodani

www.SID.ir

Archive of SID

A, wada H: Partial purfication and Characterization of L-Histidine decarboxylase from fetal rats.Biochem pharmacol, 1989, 28 : 1149-1155.

6- Endo Y :A simple method for the determination of polyamines and histamine and its application to the assay of ornithine and histidine decarboxylase activities.Method in Enzymology ,1994,94:42-47.

7- Blayney L M ,Newby A C: Histamine and a guanine nucleotide increase calcium permeability in pig aortic microsomal fractions. Biochem J, 1990, 267: 105-109.

8- Lowery OH, Passonneau J V, Schulz DW, Rock MK: protein measurement with the folin phenol reagent.J Biol Chem, 1951, 193:265-275.

9- Arrang J M ,Garbarg M , Schwartz J C: Autoinhibition of brain histamine release mediated by a novel class of histamine receptor. Nature, 1983, 302: 823-837.

10-Sakai N, Onodera K Maeyama K, Yanai K, Watanabe T: Effects of thioperamide,a histamine H3 receptor antagonist,on locomotor activity and brain histamine content in mast cell-deficient w/w mice.Life Science,1991,48:2397-2404.

11-Meguro K ,Yanai,K Saki N ,Sakurai E ,Maeyama K, Saaaki H,Watanabe T,: Effect of thioperamide, a histamine H3 antagonist,on the step-through passive avoi response and histamine decarboxylase activity in senscence-accelerated mice.Pharmacol Biochem Behav, 1995, 50(3): 321-325.

12-Yamato Y ,Mochizuki T,Okakura Mochizuki K, Uno A,Yamatodani A: Thioperamide, a histamine H3 recptor antagonist,increases GABA release from the rat hypothalamus. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 1997, 19(5):289-298.

13-Sakai N,Sakurai A,Sakurai E,Yanai K,Maeyama, K.: Effects of the histamine H3 receptor ligands thioperamide, and (R)-alpha-methylhistamine on histidine decarboxylase activity of mouse brain. Biochem Biophys Res Commun,1992,185(1): 121-126.

www.SID.ir

Archive of SID

The Journal of Urmia University of Medical Sciences 12(1) Spring 2001

EFFECT OF THIOPERAMIDE ON THE HISTIDINE DECARBOXYLASE ACTIVITY IN RAT BRAIN

D Qujeq [1] ,Ph.D. ; Y.H.Safari [2] , M.D.

Abstract

Intraductcon: *Thioperamide,an histamin H3 receptor antagonist, blocks histamine release from the histaminergic presynapse, thus affecting histamine and its metabolite levels in the brain and being able to modify activity of the histaminergic neuron system. The multiple function of histamin as a chemical messenger in cell to cell communication have been progressively reveals.Histamine is stored in,and released from,various cellular populations including immunoglobulin E receptor bearing cells,endocrine cells and neurons in the central or peripheral nervous system.Histidine decarboxylase (E.C.4.1.1.22) the enzyme which forms histamine in mammalian tissues.*

Method & Material: *A simple method for the assay of histidine decarboxylase activity in brain tissue was studied. Rats were injected with saline or thioperamide (50 micro g/Kg) i.p..One hour later, the animal was sacrified and the brain was homogenated. The supernatant of homogenates was placed in tube and centifuge at 4500 *g for 30 min.The activity of histidine decarboxylase was assayed by measuring the histamine formed*

1. Associate professor of Biochemistry , Babol university of Medical Scieces

2. General parctitianer , Babol university of Medical Scieces

www.SID.ir

Archive of SID

spectropphotometry by the reaction with 2,4,6-trinitrobenzene sulfonate at 420 nm.

Results & Discussia: *Results show that the enzyme activity was highest in the hypothalamus,lower in the cerebrum.The brain histidine decarboxylase activity was decreased by thioperamide 1 hr after administration in the thalamus and cerebrum.*

Key words: *Histidine decarboxylase,histamine,thioperamide*

Address: *Department of Biochemistry and Biophysics,Babol University of Medical Sciences,Babol,I.R.IRAN*

Source: *UMJ 2001; 12(1) 65-73 . ISSN: 1027-3727*

www.SID.ir