

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

دکتر دردی قوجق^۱، دکتر یار حسین صفری^۲

چکیده

مقدمه: تیوپر آمید، آناگونست رسپتور H3 هیستامین است که آزاد سازی هیستامین را از پری سیناپس نورون‌های هیستامینی مهار می‌کند، در نتیجه بر غلظت هیستامین و متابولیت‌های آن در مغز تاثیر می‌گذارد و فعالیت سیستم نورون هیستامینی را تغییر می‌دهد. این آمین بیولوژیک در ارتباطات سلولی نقش بسیار مهمی دارد. هیستامین در قسمت‌های مختلف از جمله ایمنوگلوبولین E، سلول‌های غده مترشحه داخلی و خارجی، سیستم اعصاب مرکزی و محیطی، ذخیره و ترشح می‌شود. هیستیدین دکربوکسیلاز (E.C.4.1.1.22)، آنزیمی است که در بافت‌های پستانداران، آمین بیولوژیک، هیستامین را تولید می‌کند.

مواد و روش: در این پژوهش، یک روش ساده برای بررسی اثر تیوپر آمید 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 هر کیلوگرم وزن موش، تیوپر آمید تزریق شد. یک ساعت پس از تزریق، از طریق قطع نخاعی، حیوان آزمایشگاهی راکشته و مغز را از جمجمه برداشته و پس از توزین هموزنه مغز تهیه شد سپس سوپرناتانت محلول هموزنه به لوله آزمایش انتقال داده و در دور ۴۵۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز از طریق واکنش هیستامین تولید شده با معرف ۲ و ۴ و ۶-تری نیتروبنزن سولفونات به روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری 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 و تیوپر آمید یک ساعت پس از تزریق، سبب کاهش فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز در بخش‌های تالاموس و مخچه مغزی می‌شود.

کل واژگان: هیستیدین دکربوکسیلاز، هیستامین، تیوپر آمید

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

۱- دانشیار گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی بابل

۲- پزشک عمومی

دکتر دردی توجح ، دکتر یار حسین صفری

مقدمه

کروماتوگرافی تعویض یونی برای اندازه گیری پلی آمین ها استفاده شده است، به طوریکه در این روش پلی آمین بر روی سلولز فسفریله شده جدا گردید و سپس به روش اسپکتروفتومتری فعالیت آنزیم اندازه گیری شده است (۷ و ۵). فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز دریافت های مختلف بدن از جمله در بافت مغز بسیار پایین است، بنابراین اندازه گیری فعالیت این آنزیم در پلاسما و سایر بافت ها با روش های موجود بسیار مشکل است. با توجه به اهمیت هیستامین به عنوان نوروترانسمیتر در کنترل حالت های خواب، بیداری، متابولیسم، انرژی و ترشح هورمون های هیپوتالاموس، به کارگیری روشی ساده که اثر ترکیبات مختلف را بر مقدار هیستامین بدون احتیاج به مراحل استخراج و خالص سازی تعیین کند، مورد نیاز است. هدف این پژوهش به کارگیری روشی است که در هموزنه بافت مغز موش آزمایشگاهی به طور مستقیم اثر تیوپرآمید بر فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز تعیین شود.

مواد و روش ها

مواد شیمیایی و دستگاه ها: تیوپرآمید، فسفات پتاسیم، دی تریتول، پیریدوکسال -۵- فسفات، پلی اتیلن گلیکل (P3015) با وزن مولکولی ۲۰۰، اسید کلریدریک، بیکربنات سدیم، فنیل متان سولفونیل فلوراید، هیستیدین، پرکلریک اسید و ۶،۴،۲ تری نیتروبنزن 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 سانتیفریژ مدل Clements, 2000 و ترازوی مدل Sartorius استفاده شد.

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

تیوپرآمید، آنتاگونیست رسپتور H3 هیستامین است که آزاد شدن هیستامین را از پیری سیناپس هیستامینی مهار می کند و بدین ترتیب غلظت هیستامین و متابولیت های آن را در مغز کاهش می دهد (۱). تیوپرآمید از طریق مهار فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز، سبب تغییر فعالیت نورون های هیستامینرژیک می گردد (۲ و ۱). هیستیدین دکربوکسیلاز (E.C. 4.1.1.22) آنزیمی است که در بافت های پستانداران، آمین بیولوژیک، هیستامین را تولید می کند. هیستیدین دکربوکسیلاز در تشکیل هیستامین، بافت عصبی مرکزی و محیطی پستانداران، نقش مهمی دارد (۱). تا کنون برای اندازه گیری فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز روش هایی مانند اندازه گیری مقدار CO2 نشاندار و یا هیستامین نشاندار حاصل از دکربوکسیلاسیون هیستیدین، توسط محققین مورد استفاده قرار گرفته است (۳ و ۲). اما این روش ها در سنجش رادیوایزوتوپ های تولید شده محدودیت هایی را دارند. در روش غیر ایزوتوپیک نیز هیستامین تولید شده بعد از مراحل استخراج و خالص سازی توسط روش های کروماتوگرافی اندازه گیری می شود، در این روش وجود هیستامین داخلی در اندازه گیری فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز دخالت می کند (۴ و ۱). روش کروماتوگرافی با کارکرد عالی (HPLC) نیز برای اندازه گیری هیستامین توسط سایر پژوهشگران مورد استفاده قرار گرفته است. اما در این روش نیز مراحل خالص سازی اولیه و تولید مشتق هیستامین ضرورت دارد. اندازه گیری فعالیت آنزیم، زمان زیادی طول می کشد (۴). همچنین بعضی از محققین هیستامین را با به کار گرفتن فتالئید اندازه گیری کرده اند و بدین طریق خصوصیات فیزیکی و شیمیایی این آنزیم را در جنین موش آزمایشگاهی مورد بررسی قرار داده اند (۴). روش های

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

(۲ + ۱۷ درجه سانتیگراد) نگه داری و پرورش داده شدند. غذای فشرده استاندارد و آب در اختیار موش های آزمایشگاهی بوده و از ساعت ۷ صبح الی ۵ عصر از نور استفاده می کردند.

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

به موشهای آزمایشگاهی گروه کنترل (تعداد ۴۸) به طریقه داخل صفاقی ۱/۰ میلی لیتر محلول فیزیولوژیک و به موش های تحت آزمایش (تعداد ۴۸)، ۱/۰ میلی لیتر محلول حاوی ۵۰ میلی گرم تیوپرآمید به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن موش تزریق شد.

تهیه هموزنه مغز موش آزمایشگاهی: یک ساعت پس از تزریق، موش های آزمایشگاهی از طریق قطع نخاعی کشته شدند، سپس سریعاً مغز موش ها را برداشته و قسمت های مختلف آن جدا گردید. وزن هر بخش از مغز توسط ترازوی سارتریوس با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم توزین شد. سپس هموزنه هر قسمت از بافت مغز در محلول (HDC) تهیه گردید.

محلول (HDC): حاوی بافر ۲۵/۰ مولار فسفات پتاسیم با pH=۶/۸ و ۱/۷ میلی مول دی تریتول ۲۵/۰ میلی مول پیریدوکسال ۵-فسفات و پلی اتیلن گلیکل ۳٪ بود. سپس ۱ میلی گرم دریک میلی لیتر محلول فنیل متان سولفونیل فلورایدنیز به مخلوط اضافه گردید. ۲۰۰ میلی گرم از هر قسمت مغز به ۱ میلی لیتر محلول (HDC) اضافه شد، سپس هموزنه بافت مغز در این محلول تهیه شد. هموزنه هر قسمت از مغز ۴ بار به مدت ۴۰ ثانیه با فرکانس ۵۰ سونیکه گردید. سپس هموزنه حاصل را در دور ۴۵۰۰ سانتریفوژ کرده و سوپرناتانت آن که حاوی آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز است، تهیه شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم: ۲۵۰ میکرولیتر از سوپرناتانت

تهیه شده از هر قسمت مغز موش آزمایشگاهی که حاوی آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز است، از میکروفیلتر برای جداسازی ذرات با اندازه مولکولی ۱۰۰۰۰۰ دالتون عبور داده شد، سپس در دور ۴۵۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از آن ۲۰۰ میکرولیتر از بافر (HDC) 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. ۳ ساعت پس از شروع واکنش با افزودن ۲۰ میکرولیتر محلول پر کلریک اسید ۷۵ درصد واکنش آنزیمی متوقف گردید. به این محلول ۲/۰ میلی لیتر از محلول ۲،۴،۶ تری نیتروبنزن سولفونات ۱/۰ 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. یک واحد آنزیمی بر اساس ۱ میکرومول محصول تولید شده در هر دقیقه در دمای ۳۷ درجه تعیین گردید و فعالیت ویژه بر حسب واحد به ازاء هر میلی گرم پروتئین بافت مغز تعیین گردید. پروتئین بافت مغز توسط روش لوری اندازه گیری شد (۸).

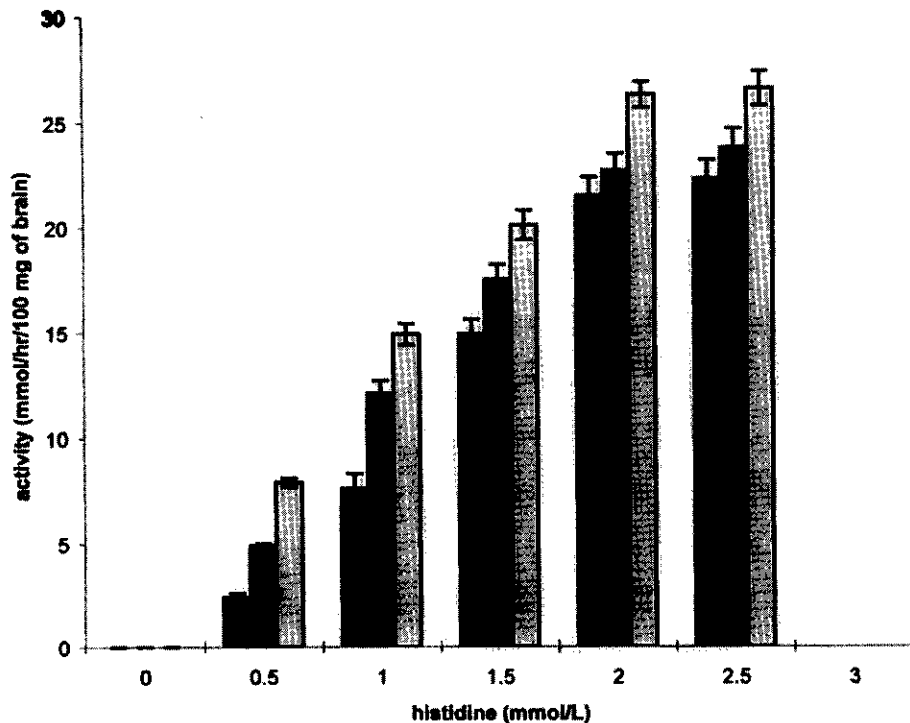
برای مقایسه نتایج به دست آمده از گروه کنترل، تزریق شده با محلول فیزیولوژیک و گروه تزریق شده با تیوپرآمید از روش آماری Students t-test استفاده شد. در تمام شرایط برای مقایسه نتایج $P < 0/05$ معنی دار تلقی شد.

نتایج

منحنی استاندارد برای اندازه گیری فعالیت آنزیم هیستیدین

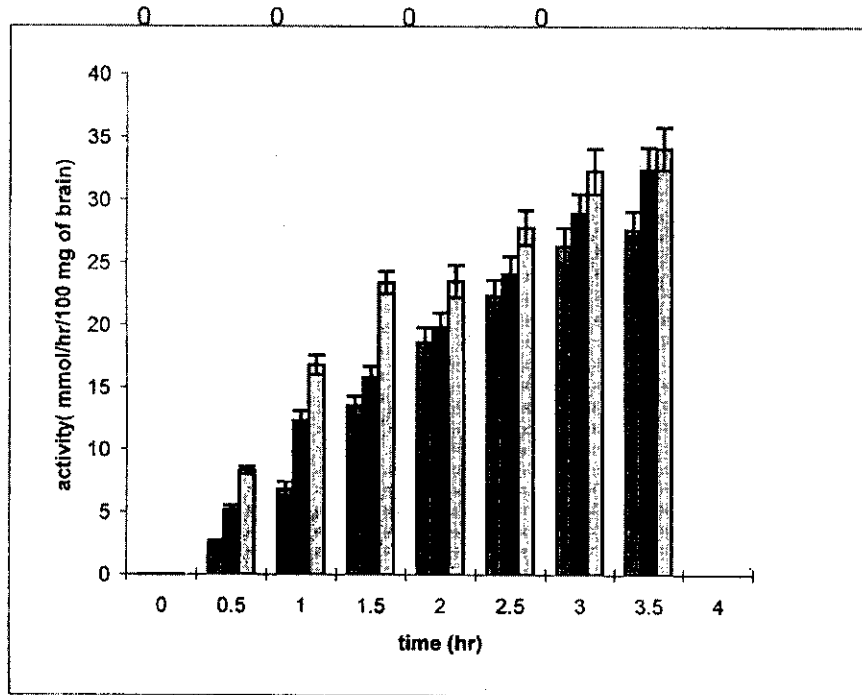
دست آمده است که برابر با $3/59 + 87/41$ میکرومول در ساعت در میلی گرم پروتئین مغز کمترین مقدار فعالیت آنزیم در مخچه است که برابر با $2/47 + 52/98$ میکرومول در ساعت در میلی گرم وزن مغز و فعالیت آنزیم در تالاموس برابر با $16/4 + 63/28$ میکرومول در ساعت در میلی گرم پروتئین مغز است. در گروه تزریق شده با تیوپر آمید فعالیت آنزیم در هیپوتالاموس برابر با $92/4 + 89/73$ میکرومول در ساعت در میلی گرم پروتئین مغز و در مخچه برابر با $1/32 + 19/82$ میکرومول در ساعت در میلی گرم پروتئین مغز و در تالاموس برابر با $1/16 + 26/95$ میکرومول در ساعت در میلی گرم پروتئین مغز است.

دکربوکسیلاز از مغز موش آزمایشگاهی رسم شد. در منحنی استاندارد تا غلظت 10 میکرومول در لیتر حجم همورثه فعالیت آنزیم به صورت خطی بود، که نشان دهنده غلظت مناسب سوبسترا برای اندازه گیری فعالیت آنزیم است (نمودار ۱). تا زمان انکوباسیون، 3 ساعت، مقدار تولید هیستامین به صورت خطی افزایش می یابد (نمودار ۲)، بنابراین نتایج حاصل نشان می دهند که زمان مناسب برای اندازه گیری فعالیت آنزیم انتخاب شده است. در (نمودار ۳) فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز در بخشهای مختلف مغز موش در گروه کنترل، تزریق شده با سرم فیزیولوژیک و گروه تزریق شده با تیوپر آمید نشان داده شده است. نتایج حاصل نشان می دهند که بیشترین مقدار فعالیت آنزیم در گروه کنترل در بخش هیپوتالاموس مغز به

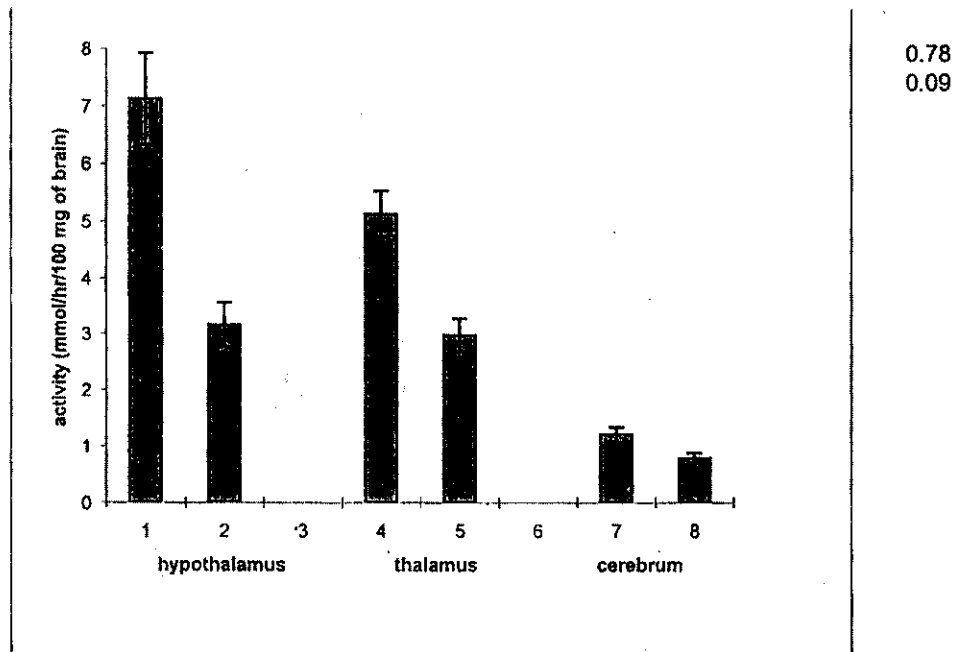


نمودار ۱: فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز مغز موش آزمایشگاهی (هیپوتالاموس، تالاموس و مخچه) در غلظت های مختلف سوبسترا. مقادیر $Mean \pm SD$ ارائه شده است. تعداد آزمایش ها ۶ بار است. در هر قسمت نمودار (ستون ۱: هیپوتالاموس، ستون ۲: تالاموس و ستون ۳: مخچه) است.

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



نمودار ۲: فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز (هیپوتالاموس، تالاموس و مخچه) در زمان‌های مختلف ارزیابی شده است. Mean تعداد آزمایش‌ها ۶ بار است. در هر قسمت نمودار (ستون انکوئاسیون، مقادیر ۱: هیپوتالاموس، ستون ۲: تالاموس \pm SD و ستون ۳: مخچه) است.



نمودار ۳: مقایسه اثر تیوپرآمید بر فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز مغز موش آزمایشگاهی (هیپوتالاموس، تالاموس و مخچه) نسبت به گروه کنترل. مقادیر \pm SD Mean ارزیابی 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.

بحث

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 نورون‌های هیستامینرژیک در هیپوتالاموس نسبت به سایر بخش‌های مغز باشد. یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان می‌دهند 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 کم نورون‌های هیستامینرژیک در مخچه است. یافته‌های جدید این تحقیق نشان می‌دهند که آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز در هیپوتالاموس بیشترین فعالیت و در مخچه کمترین مقدار فعالیت را دارد. علاوه بر نتایج بدست آمده، از روش بکار گرفته شده در این تحقیق می‌توان برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز در سایر بافتها نیز در آینده استفاده کرد.

یافته‌های به دست آمده از این پژوهش نشان می‌دهند که تیوپرآمید از طریق مهار فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز در بخش‌های تالاموس و مخچه مغز غلظت هیستامین را کاهش می‌دهد. در روش به کار گرفته شده در این مطالعه در مقایسه با روش‌های قبلی (۴ و ۵ و ۶) استفاده از روش‌های کروماتوگرافی و خالص‌سازی ضرورتی ندارد، به طوری که برای اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم سوپرنیتانت محلول حاصل از بافت مغز از یک میکروفیلتر عبور داده شد و آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز از سایر مواد موجود در هموزنه بافت مغز مستقیماً جدا گردید. روش به کار گرفته شده در این پژوهش در مقایسه با سایر روش‌ها زمان اجرای کمتری دارد و دقت آن بیشتر است، یافته‌های به دست آمده از فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز در بخش‌های مختلف مغز با نتایج گزارش شده توسط سایر محققان منطبق و قابل مقایسه است (۷ و ۹ و ۱۰). همچنین با نتایج محققان دیگر که اثر تیوپرآمید را بر فعالیت آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز مطالعه کرده‌اند منطبق است (۱۳ و ۱۲ و ۱۱ و ۱۰). یافته‌های

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 forced 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

- A, wada H: Partial purification 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 thiooperamide, 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 thiooperamide, a histamine H3 antagonist, on the step-through passive avoi response and histamine decarboxylase activity in senescence-accelerated mice. *Pharmacol Blochem Behav*, 1995, 50(3): 321-325.
- 12-Yamato Y ,Mochizuki T, Okakura Mochizuki K, Uno A, Yamatodani A: Thiooperamide, a histamine H3 receptor 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 thiooperamide, and (R)-alpha-methylhistamine on histidine decarboxylase activity of mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 185(1): 121-126.

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 sacrificed and the brain was homogenated. The supernatant of homogenates was placed in tube and centrifuge 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 parctitioner , Babol university of Medical Scieces

spectrophotometry 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*