خصوصیات کنتیکی آنزیم ۳ - بتا - هیدروکسی استروئید دهیدروژناز بیضه موش صحرایی

دکتر دردی قوجق[۱]

چکیده

آنزیم ۳ - بتا - هیدروکسی استروئید دهیدروژناز یکی از آنزیم‌های شرکت کننده در مسیر بیوسنتز هورمون‌های استروئیدی است. این آنزیم در تبدیل پرگننولون به پروژسترون در مسیر بیوسنتز هورمون‌های جنسی شرکت می‌کند. هدف این پژوهش بررسی خصوصیات کنتیکی آنزیم ۳ - بتا - هیدروکسی استروئید دهیدروژناز بیضه موش صحرایی است. برای انجام تحقیق مقادیر معین سوبسترا و غلظت‌های متفاوت هموژنه بافت بیضه موش صحرایی در گرم‌خانه گذاشته (انکوبه) شد. مخلوط واکنش ، شامل پرگننولون ، کوآنزیم نیکوتین آمید دی نوکلئوتید و ایزونیتر و ترازولیم در ۰/۱۵۰ مولار بافر تریس و با PH = ۷/۷ همچنین آنزیم استخراج شده از بیضه موش صحرایی بود که در زمان‌های مختلف و دماهای مختلف انکوبه شد. جذب نوری به وسیلهٔ اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. یافته‌ها نشان دادند مقدار PH بهینه و زمان انکوباسیون به ترتیب برابر با ۷/۹ و ۱/۵ ساعت بود. مقدار Kmax برابر با $۵/۳ \times ۱۰^{-۶}$ مولار و Vmax برابر با $۳/۱۱ \times ۱۰^{-۶}$ نانومول در میلی‌گرم در دقیقه بود. روش به کار گرفته شده در این مطالعه حساسیت کافی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استروئید دهیدروژناز بیضه موش را داشت. نتیجه این که خصوصیات کنتیکی آنزیم ۳ - بتا - هیدروکسی استروئید دهیدروژناز حاصل از این پژوهش قابل مقایسه با نتایج سایر محققان است و برای بررسی فعالیت این آنزیم در بافت‌ها کاربرد دارد.

واژه‌های کلیدی : خصوصیات کنتیکی ، ۳ - بتا - هیدروکسی استروئید دهیدروژناز ، بافت بیضه موش صحرایی

۱- دانشیار بیوشیمی بالینی گروه آموزشی بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه علوم پزشکی بابل ، Email : dqujeq@hotmail.com

مقدمه

دو سیستم آنزیمی در تبدیل آنزیمی کلسترول به پروژسترون دخالت دارند. در این مکانیسم شاخه جانبی کلسترول باید به وسیله آنزیم حذف شود. این شاخه جانبی حاوی ٦ کربن است که در صورت حذف آن مولکول کلسترول به پروگننولون تبدیل می‌شود. این مرحله آنزیمی سرعت واکنشی آهسته‌ای دارد ، بنابراین مرحله‌ای کنترل کننده است و مقدار تولید پروژسترون را تنظیم می‌کند. آنزیمی که پرگننولون را در مرحله بعدی به پروژسترون تبدیل می‌کند ، شامل دو سیستم آنزیم است. یکی از این آنزیم‌ها ، ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز ، NAD اکسیدوردکتاز (E.C.1.1.1.145) و آنزیم دیگر ۳ – کتواستروئید دلتا ٤ و ٥ ایزومراز (E.C.5.3.3.1) است که به طور اختصار به صورت 3B-HSDH نوشته می‌شود. این کمپلکس آنزیمی نه تنها نشان‌دهنده خصوصیات دهیدروژناز است ، بلکه خصوصیات ایزومرازی نیز دارد. دهیدروژناسیون ، یک مرحله آهسته ، کنترل کننده و آنزیم کلیدی این واکنش است (۲-۱). در باکتری پسودوموناس ، هر دو فرم آنزیم ، قابل جداسازی و تفکیک می‌باشند (٤-۳). در بافت پستانداران این آنزیم همراه با تکّه (فراکشن)های زیرسلولی است (٥). در بافت جفت انسان نیز آنزیم 3B-HSDH در میتوکندری و میکروزوم‌ها وجود دارد (٦). محققان مختلفی آنزیم 3B-HSDH را از میتوکندری و میکروزوم جدا کرده‌اند و خصوصیات آن را مطالعه نموده‌اند (۷). محققان فعالیت آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز را از طریق جذب نور ماوراء بنفش پروژسترون در طول موج ۲٤۰ نانومتر اندازه‌گیری کرده‌اند. در این واکنش پروژسترون از پرگننولون تولید و جذب نوری مناسبی در طول موج ذکر شده ، ایجاد می‌شد (۸). سایر محققان از محصولات فرعی دیگری که در این واکنش تولد می‌شود ، توانستند فعالیت آنزیم را اندازه‌گیری کنند. در این واکنش‌ها آنزیم دخالت کننده در مسیر واکنش یا آنزیم ایزومراز به اندازه کافی وجود داشت ، اما در شرایط اندازه‌گیری ، این آنزیم ناپایدار بود. در روشی دیگر ، پرگننولون به عنوان تنها سوبسترا برای اندازه‌گیری ، فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار گرفت که برای اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم ، حساسیت بیشتری نسبت به روش‌های قبلی داشت (۸). آنزیم استروئید ۳ – بتا – ال – دهیدروژناز به وسیله خصوصیات زیست – شیمیایی و بافت‌شناختی در تمام بافت‌هایی که هورمون‌های استروئیدی تولید می‌کنند ، می‌تواند شناسایی شود. این آنزیم و استروئیدهای C-19 و C-21 را با ساختمان ۳ – بتا – هیدروکسیل به فرم دلتا – ۳ – کتون تبدیل می‌کند که یکی از مشخصه‌های هورمون‌های فعال استروئیدی است (۹). توالی واکنش‌های زیستی – ترکیبی (بیوسنتزی) لازم برای تولید کورتیکواستروئیدها از کلسترول ، در کورتکس آدرنال ، ظاهراً دربرگیرنده جابجایی مواد از یک بخش سلولی به بخش دیگر آن است. مراحل اولیه و نهایی در داخل میتوکندری صورت می‌گیرد.

بسیاری از واکنش‌های واسطه‌ای به وسیلهٔ آنزیم‌های میکروزومی هموژنه ادرنال صورت می‌گیرد. یکی از این مراحل بسیار مهم ، مسیر تبدیل پرگننولون تولید شده در میتوکندری به پروژسترون از طریق ۳ – بتا اکسیداسیون و ٤ و ٥ دلتا ایزومریزاسیون است (۱۰). اولین مرحله کنترل کننده آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز است (۳ – هیدروکسی – استروئید NAD – ، اکسیدوردوکتاز (EC.1.1.1.51). در یک بررسی ، فعالیت این آنزیم در بخش میکروزومی هموژنه ادرنال تعیین گردید (۱۰). در قسمت‌های دیگر آدرنال نیز ، فعالیت آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز در حدود ۱۲/٥ ± ٥/۳۳ گزارش شده است (۱۰).

براساس این مطالعه ، فعالیت آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز به دلیل عدم خالص‌سازی نسبی این آنزیم و عدم پایداری آن کاهش یافته است. ۳۱درصد فعالیت آن در بخش میتوکندری و در ٤٥درصد فعالیت در بخش میکروزومی گزارش شده است. مطابق همین نتایج ، نسبت فعالیت اندازه‌گیری شده به وسیلهٔ دهیدرواپی‌اندروستین دیون یا پرگنولون ثابت است ، اما فعالیت ویژه آنزیم در بخش میکروزومی تقریباً دو برابر بخش میتوکندریایی است. فعالیت آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز در فولیکول پرندگان اهلی نیز مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۱). نتایج این مطالعه نشان داده است که فعالیت این آنزیم در مدت ۱۵ ساعت پس از تخمک‌گذاری کاهش می‌یابد و در طی ۵۰ ساعت به حداقل مقدار فعالیت خود می‌رسد. مقایسهٔ فعالیت آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز و گلوکز – ٦ – فسفات دهیدروژناز در سلول‌های گرانولزا نشان داد که تغییرات در فعالیت آنزیمی می‌تواند به ترکیبات آن نسبت داده شود و فعالیت آنزیمی در سلول‌های گرانولزا تا حدود ۳۵ ساعت پس از تخمک‌گذاری پایدار و ثابت است (۱۱). مقایسهٔ مقادیر شاخص‌های کنتیکی Km و Vmax با استفاده از کوآنزیم نیکوتین آمید دی نوکلئوتید ، برای سوبسترای استروئیدی تخمدان پرندگان نشان داد که پرگنولون نسبت به دهیدرواپی‌اندروستین دیون بهتر است (۱۲). محققان گزارش داده‌اند که پروژسترون ، مقدار mRNA و آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز را افزایش می‌دهد (۱۲). همچنین پروژسترون بیان ژن آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز را تحریک می‌کند (۱۲). هدف این پژوهش بررسی خصوصیات کنتیکی آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز بیضه موش صحرایی با توجه به اهمیت آن در ترکیب زیستی (بیوسنتز) هورمون‌های استروئیدی است.

مواد و روش‌ها

۱ – مواد شیمیایی : پرگنولون(۵ – پرگنه ۳–بتا–ال۲ – اون) ، تستوسترون (۱۷–بتا–هیدروکسی اندروستان–٤–ان–۳–ان) از نمایندگی شرکت سیگما و از آزمایشگاه تهیه شد. همچنین ، نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید نمک سدیم (NAD) ، فرم احیاء شده نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید (NADH) ایدونیتروتترازولیم کلراید (INT) ، فنازن متوسولفات (PMS) از نمایندگی شرکت مرگ خریداری شدند.

۲ – معرف‌ها : ۱–۲) بافر فتالدئید (۱۰۰ میلی‌مول ، PH=۳/٤). به این منظور ، ۵/۲۰ گرم از پتاسیم هیدروژن فتالدئید به ۱۰۰ میلی‌لیتر از اسیدکلریدریک نرمال و ۵ میلی‌لیتر از توئین ۲۰ ، اضافه شد و PH آن روی ۳/۵ تنظیم شد و حجم نهایی محلول به وسیلهٔ آب مقطر به میزان ۵۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. این بافر در هر سری آزمایش در آزمایشگاه تهیه می‌شد. ۲–۲) بافر تریس – اسیدکلریدریک (۰/۱۵ مولار ، PH=۷/۸) به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر در آزمایشگاه تهیه شد. ۳–۲) نیکوتینامید آدنین دی – نوکلئوتید (NAD) (۵ میلی‌مول در لیتر) به حجم ۲۰ میلی‌لیتر تهیه گردید. ٤–۲) معرف رنگی ، ۵۰ میلی‌گرم ایدونیتروتترازولیم کلراید ، ۱۵ میلی‌گرم فنازن متوسولفات و ۱میلی‌لیتر توئین ۲۰ در ۱۰۰ میلی‌لیتر از آب مقطر حل شد. از این محلول رنگی برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. در شرایط اندازه‌گیری آنزیم از بافت بیضه موش آزمایشگاهی فنازن متوسولفات افزوده نشد و معرف رنگی در شیشه‌های تیره نگه‌داری و در یخچال ذخیره شد.

۳ – سوبسترا : پرگنولون در ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول دی متیل فرم آمید حل شد و محلول غلیظ ذخیره با غلظت ۱ میلی‌مول در ۱۰۰ میلی‌لیتر از بافر تریس (۰/۱ مولار PH ۷/۸) تهیه گردید و در یخچال نگه‌داری شد.

٤ – حیوان آزمایشگاهی : موش آزمایشگاهی صحرایی (Rat) از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و به تعداد مورد نیاز در آزمایشگاه پرورش و تکثیر ، و در قفسه‌های جداگانه به تعداد ٦تایی نگه‌داری شدند. درجه حرارت نگه‌داری در حدود ٥± ۲۳ درجه بود. به علاوه ، آنها ، تقریباً ۱۲ ساعت در روشنایی و ۱۲ ساعت در تاریکی بودند.

٥ – طریقه تهیه بافت و هموژنیزه بیضه موش آزمایشگاهی : در هر سری آزمایش ، ۱۲ رأس موش آزمایشگاهی صحرایی بالغ (Rat) از طریق بیهوش کردن با اتر کشته شدند و بیضه‌های آن‌ها بیرون آورده شد. بافت بیضه روی ظرف یخ قرار داده شد و تا حد امکان لیپید بافت بیضه جدا گردید و هر بیضه به وسیله ترازوی مدل سارتریوس با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم ، وزن شد. سپس حدود ۲ تا ٤ تا بیضه از موش آزمایشگاهی و با وزن متوسط در حدود ٥ میلی‌گرم به لوله آزمایش ۱۰ میلی‌لیتری انتقال داده شد. در هر بار آزمایش ۳ تا ٦ سری از لوله آزمایش برای تهیه هموژنه بافت بیضه تهیه می‌شد سپس در سری لوله آزمایش بافت تهیه شده در ٥ میلی‌لیتر از بافر تریس = HCL ۱ /۰ مولار با PH =۷/۸ به طریقه مکانیکی هموژنیزه گردید. پس از آن هموژنه تهیه شده با دور ۳٥۰۰ در دمای حدود ۱٥-٥ درجه محیط آزمایشگاه به وسیله دستگاه مدل کلمنت ۲۰۰۰ ، سانتریفوژ شد. محلول رویی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ۳ – بتا استروئید دهیدروژناز مورد استفاده قرار گرفت. در هر روز تهیه بافت بیضه فعالیت آنزیم ۳ – بتا هیدروکسی استروئید دهیدروژناز اندازه‌گیری شد.

٦ – اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز : برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در هر سری آزمایش و در هر روز کاری تعداد ۷۲ لوله آزمایش تهیه شد و در ٦ گروه ۱۲ تایی تقسیم گردید و محلول‌های بافر تهیه شده و سوبسترا به ترتیب زیر به هر سری از لوله آزمایش افزوده شد.

فعالیت آنزیم ۳ – بتا هیدروکسی استروئید دهیدروژناز در هر سری لوله آزمایش در بافر تریس HCL ، ۰/۱٥ مولار و PH=۷/٥ حاوی ٥۰۰ میکرومول NAD و سوبسترا (پرگنولون) به مقدار ۱۰۰ میکرومول و با حجم کلی ٥میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. واکنش آنزیمی و سوبسترا با اضافه نمودن آنزیم (محلول رویی هموژنه) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر و انکوبه کردن در دمای ۳٦ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه شروع شد. همچنین واکنش آنزیمی و سوبسترا با افزودن ۲ میلی‌لیتر از بافر فتالدئید با PH =۳/٥ متوقف شد. کدورت محلول تهیه شده از طریق انجام سانتریفوژ در ۳٥۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه برطرف شد و محلول رویی برداشته شد ، پس از آن جذب نوری هریک از نمونه‌ها در طول موج ٤۹٥ نانومتر به کمک اسپکتروفتومتر (دستگاه مدل سیسیل ۱۰۲۰) اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیمی با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد و برحسب مقدار نانومول NADH تولید شده در ساعت در هر میلی‌گرم پروتئین بافت بیضه محاسبه گردید. مقدار پروتئین بافت بیضه نیز به روش لوری تعیین شد.

۷ – نمودار استاندار : محلول ۱ میلی‌مول از کوآنزیم NADH در آب مقطر تهیه شد. غلظت NADH در حدود مقادیر متغیر صفر تا ۱٥۰ نانومول تهیه و در ٦ سری لوله آزمایش به تعداد ٦تایی به طور جداگانه افزوده شد. در هر سری با حجم حدود ۰/٥ میلی‌لیتر با معرف رنگی واکنش داده شد. پس از ایجاد رنگ ، ۲ میلی‌لیتر از بافر فتالدئید به هر یک از لوله آزمایش اضافه گردید و میزان جذب در طول موج ٤۹٥ نانومتر قرائت شد. منحنی استاندارد براساس نتایج به دست آمده در ٦ غلظت مختلف رسم گردید. منحنی استاندارد برای هر سری آزمایش و در هر روز انجام آزمایش تهیه شد. به منظور کنترل نتایج به دست آمده همچنین به ترتیب در هر

هفته و در هر ماه انجام آزمایش منحنی استاندارد رسم ، و در نهایت منحنی استاندارد کلی که بیان کننده متوسط مقادیر به دست آمده است ارایه شد.

۸ – مطالعه کنتیکی آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز بافت بیضه موش آزمایشگاهی : برای بررسی هریک از شاخص‌های مربوط به کنتیک این آنزیم به طور جداگانه تعداد ٦ سری ۱۲ تایی لوله آزمایش تهیه و شماره‌گذاری شد ، و هریک از شاخص‌ها در یک روز انجام و تکرار گردید. جزئیات انجام هریک از این سری آزمایش‌ها به شرح ذیل است:

۱–۸– اثر مقدار وزن بافت بیضه بر فعالیت آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز بافت بیضه موش آزمایشگاهی : مقدار فعالیت آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز در نمونه‌های مختلف وزن بافت بیضه موش آزمایشگاهی اندازه‌گیری شد به طوری که در هر سری از وزن‌های صفر تا ۰/۵۵ میلی‌گرم فعالیت آنزیم سنجش شد.

۲–۸– اثر PH بر فعالیت آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز (3BHSDH) بافت بیضه موش آزمایشگاهی : اثر PH برای کنترل اثر غلظت یون هیدروژن بر فعالیت 3BHSDH مطالعه شد. اثر یون هیدروژن بر فعالیت آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز استخراج شده از بافت بیضه موش آزمایشگاهی نیز نشان داده شد. به‌علاوه ، محلول‌های مختلف با PHهای متفاوت (از صفر تا ١٤) تهیه ، و فعالیت آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز در هرسری اندازه‌گیری شد. برای تعیین PH بهینه در اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز سیستم‌های بافری مختلف مورد استفاده قرار گرفت. در این مورد ، بافر تریس HCL و ۹–٦/۵=PH و بافر گلایسین – سود ۱۱–۹/۰=PH در غلظت ۰/۱۵ مولار مناسب بود. PH بهینه برای فعالیت بهینه آنزیم 3BHSDH برابر ۷/۷ بود.

۳–۸– اثر غلظت سوبسترا بر فعالیت آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز بافت بیضه موش آزمایشگاهی: اشباع شدن آنزیم برای سیستم استاندارد با غلظت‌های متفاوت (از غلظت صفر تا ۲۵۰ میکرومول در لیتر پرگنولون) از سوبسترا انجام شد. با مقادیر متفاوت از محلول سوبسترا که به محلول سنجش فعالیت آنزیمی اضافه گردید ، مشخص شد که بیش از مقدار مطمئن (۱۰۰ میکرومول) ، سرعت واکنش آنزیمی به صورت خطی از مقدار سوبسترا تبعیت نمی‌کند. بنابراین در بخش فعالیت آنزیمی در حد پایین‌تر از ۱۰۰ میکرومول مورد استفاده قرار گرفت تا رابطه بین سرعت واکنش آنزیمی و محلول سوبسترا به صورت خطی باشد.

٤–۸– اثر وزن بافت در سنجش فعالیت آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز بیضه موش آزمایشگاهی : رابطه بین وزن هموژنه بافت بیضه موش آزمایشگاهی (صفر تا ٦ میلی‌گرم وزن بافت بیضه) و فعالیت آنزیم 3BHSDH بررسی شد. فعالیت آنزیم ، تا ۵ میلی‌گرم وزن مرطوب بافت بیضه موش آزمایشگاهی به صورت خطی بود.

۵–۸– اثر مدت زمان انکوباسیون بر فعالیت آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز بافت بیضه موش آزمایشگاهی : اثر مدت زمان انکوباسیون (زمان بین صفر تا ۱۲۰ دقیقه) بر فعالیت آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز بافت بیضه موش آزمایشگاهی نیز بررسی شد. معلوم شد تا زمان ۱۰۰ دقیقه فعالیت آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز را می‌توان اندازه‌گیری نمود و منحنی تا این زمان به صورت خطی است.

٦–۸– منحنی لینویوربرگ آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی

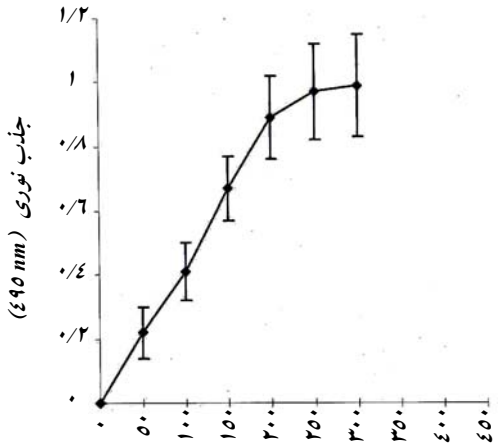
استروئید دهیدروژناز بافت بیضه موش آزمایشگاهی : منحنی لینویوربرگ آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز بیضه موش آزمایشگاهی رسم شد. منحنی اشباع از طریق تهیه غلظت‌های مختلف سوبسترا (پرگنولون) از غلظت صفر تا ۲۵۰ میکرومول در لیتر پرگنولون رسم و مقادیر عکس غلظت و عکس سرعت محاسبه شد. به علاوه ، مقدار km آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز با استفاده از رسم منحنی لینویوربرگ محاسبه گردید.

۷–۸– تاثیر درجه حرارت محلول‌های واکنش بر فعالیت آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز : تاثیر درجه حرارت محلول‌های واکنش (۳۲ درجه تا ٤١ درجه سانتی‌گراد) بر فعالیت آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز بررسی شد. درجه حرارت ۲۰ تا ٤٠ درجه سانتی‌گراد برای به دست آوردن فعالیت بهینه آنزیم آزمایش شد. در حدود درجه حرارت ۳۲ تا ۳۸ برای فعالیت بهینه آنزیم مناسب بود که درجه حرارت ۳۷ به عنوان درجه حرارت ماکزیمم فعالیت آنزیم انتخاب شد.

۹ – روش آمار : مقادیر سنجش فعالیت آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز بافت بیضه موش آزمایشگاهی بر حسب میانگین ± انحراف استاندارد ارایه و برای بررسی تفاوت بین گروه‌ها نیز از تحلیل واریانس استفاده شد. با مقدار P< ۰/۰۵ اختلاف مقادیر ، قابل توجه درنظر گرفته شد.

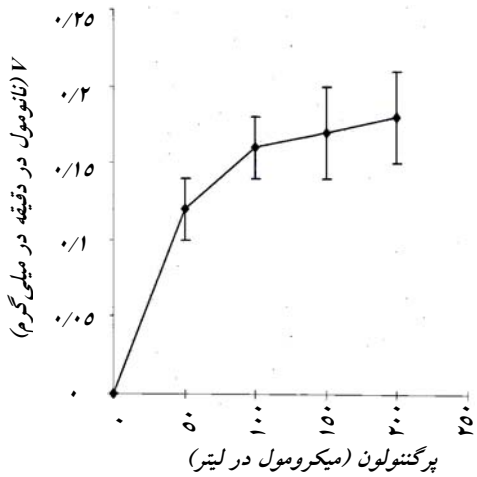
یافته‌ها

در نمودار ۱ ، منحنی استاندارد اندازه‌گیری NADH توسط احیاء تترازولیم نشان داده شد. غلظت‌های مختلف NADH در حضور فنازن متوسولفات و بافر تریس – HCL (۰/۱۵ مولار ، PH=۷/۵۰) واکنش داده است. کمپلکس رنگی حاصل از این واکنش در طول موج ٤٩٥ نانومتر اندازه‌گیری شد. سیستم سنجش فعالیت آنزیم شرح داده شده در این پژوهش با غلظت‌های پرگنولون در غلظت‌های متفاوت در نمودار ۱ نشان داده شده است. سرعت واکنش آنزیمی تا غلظت ۱۰۰ میکرومول در لیتر سوبسترا (پرگنولون) به صورت خطی بود.

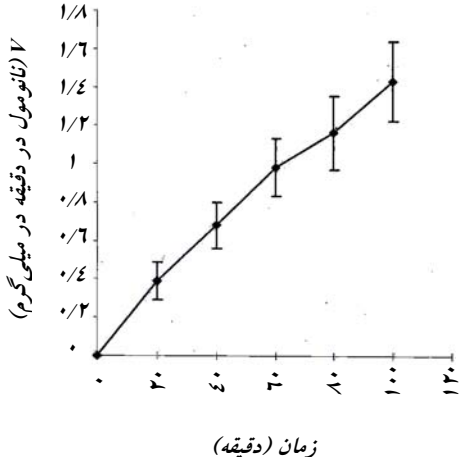


نمودار ۱ : منحنی استاندارد اندازه‌گیری NADH به وسیله احیای تترازولیم. مقادیر برحسب میانگین ± انحراف استاندارد ارایه شده است که حاصل تکرار حداقل ٦ بار انجام آزمایش به طور جداگانه است.

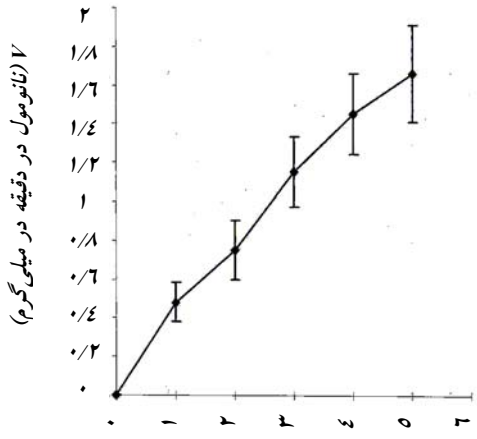
براساس نمودار ۲ ، اشباع شدن آنزیم برای سیستم استاندارد با غلظت‌های متفاوت از سوبسترا نشان داده شده است. با مقادیر متفاوت از محلول سوبسترا که به محلول سنجش فعالیت آنزیمی اضافه گردید مشخص شد که بیش از مقدار مطمئن (۱۰۰ میکرومول) سرعت واکنش آنزیمی به صورت خطی از مقدار سوبسترا تبعیت نمی‌کند ، بنابراین در بخش فعالیت آنزیمی در حد پایین‌تر از ۱۰۰ میکرومول از محلول سنجش فعالیت استفاده شد که رابطه بین سرعت واکنش آنزیمی و محلول سوبسترا به صورت خطی باشد. همچنین ، در نمودار ۳ ، رابطه بین وزن هموژنه بافت بیضه موش آزمایشگاهی و فعالیت آنزیم 3BHSDH نشان داده شده است. همان‌طور که در این نمودار آمده است فعالیت آنزیم تا ۵ میلی‌گرم وزن مرطوب بافت بیضه موش آزمایشگاهی به صورت خطی است.



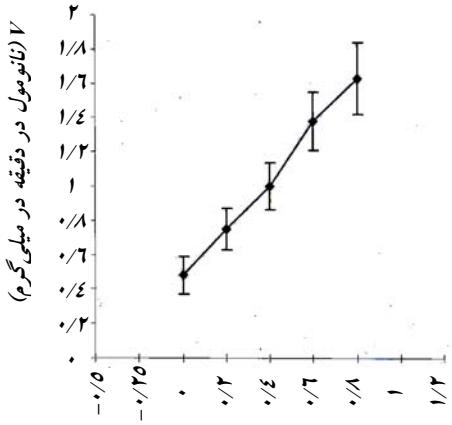
نمودار ۲ : منحنی اشباع برای آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز بیضه موش آزمایشگاهی با سوبسترای پرگننولون در سیستم سنجش استاندارد آنزیمی. مقادیر برحسب میانگین ± انحراف استاندارد ارایه شده است که حاصل تکرار حداقل ٦ بار انجام آزمایش به طور جداگانه است.



نمودار ٤ : اثر مدت زمان انکوباسیون بر فعالیت آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز بیضه موش آزمایشگاهی. مقادیر برحسب میانگین ± انحراف استاندارد ارایه شده است که حاصل تکرار حداقل ٦ بار انجام آزمایش به طور جداگانه است.



نمودار ۳ : منحنی اشباع آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز بیضه موش آزمایشگاهی برای سیستم سنجش فعالیت آنزیم با استفاده از وزن‌های مختلف بافت مرطوب. مقادیر برحسب میانگین ± انحراف استاندارد ارایه شده است که حاصل تکرار حداقل ٦ بار انجام آزمایش به طور جداگانه است.

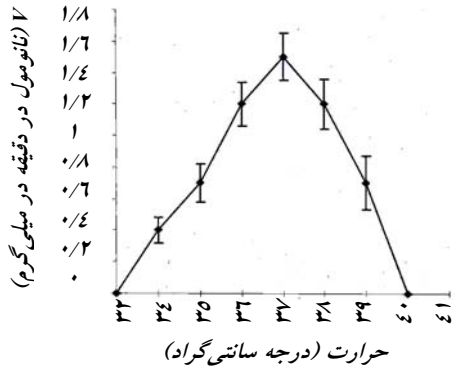


نمودار ٥ : منحنی لینویروبرگ آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز بیضه موش آزمایشگاهی. مقادیر برحسب میانگین ± انحراف استاندارد ارایه شده است که حاصل تکرار حداقل ٦ بار انجام آزمایش به طور جداگانه است.

در نمودار ٤ ، اثر مدت زمان انکوباسیون بر فعالیت آنزیم ۳ – بتا هیدروکسی استروئید دهیدروژناز بافت بیضه موش آزمایشگاهی نشان داده شده است. همان‌طور که در این نمودار نشان داده شد ، تا زمان ۱۰۰ دقیقه فعالیت آنزیم ۳ – بتا هیدروکسی استروئید دهیدروژناز را می‌توان اندازه‌گیری نمود و منحنی تا این زمان به صورت خطی است.

در نمودار ٥ ، منحنی لینویوربرگ آنزیم ۳ – بتا هیدروکسی استروئید دهیدروژناز بیضه موش آزمایشگاهی نشان داده شد. منحنی اشباع از طریق تهیه غلظت‌های مختلف سوبسترا (پرگنولون) به دست آمد. مقدار Km آنزیم ۳ – بتا هیدروکسی استروئید دهیدروژناز با استفاده از رسم منحنی لینویوربرگ محاسبه گردید.

مطابق نمودار ٦ ، تاثیر درجه حرارت محلول‌های واکنش بر فعالیت آنزیم ۳ – بتا هیدروکسی استروئید دهیدروژناز بررسی شد. درجه حرارت ۲۰ تا ٤۰ درجه سانتی‌گراد برای به دست آوردن فعالیت بهینه آنزیم آزمایش شد. در حدود درجه حرارت ۳۲ تا ۳۸ برای فعالیت بهینه آنزیم مناسب بود که درجه حرارت ۳۷ به عنوان درجه حرارت بیشینهٔ فعالیت آنزیم انتخاب شد.



نمودار ٦ : درجه حرارت بهینه برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز بیضه موش آزمایشگاهی. مقادیر برحسب میانگین ± انحراف استاندارد ارایه شده است که حاصل تکرار حداقل ٦ بار انجام آزمایش به طور جداگانه است.

بحث

با روش به کار گرفته شده در این پژوهش ، فعالیت آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز ، که تا به حال به روش ماوراء بنفش[1] (UV) قابل اندازه‌گیری نبود ، به دلیل جذب بالای فورمازان قابل اندازه‌گیری است. حتی فعالیت آنزیم تا حدود مقدار ۰/٥ میلی‌گرم پروتئین بافت بیضه به صورت خطی است (نمودار ۱). کنتیک آنزیمی آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز در ارتباط با غلظت سوبسترا مورد بررسی قرار گرفت (نمودار ۲). همچنین رابطه بین وزن مرطوب بافت و فعالیت آنزیم مطالعه شد (نمودار ۳). کنتیک آنزیمی درجهٔ اول (سرعت اولیه) در زمان انکوباسیون ۱۲۰ دقیقه و تا ۱۰۰ میکرومول در لیتر سوبسترا بود. رابطهٔ بین سرعت اولیه ، زمان و مقدار سوبسترا به ترتیب تا زمان ۱۲۰ دقیقه و مقدار سوبسترای ۱۰۰ میکرومول در لیتر به صورت خطی است (نمودارهای ۲ و ٤). مطالعه کنتیکی آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز نشان داد که Km آن در حدود $۵/۳ \times ۱۰^{-٦}$ مولار پرگنولون و Vmax آن $۳/۱۱ \times ۱۰^{-٦}$ نانومول در دقیقه در میلی‌گرم بافت بیضه موش صحرایی است (نمودار ٥). سنجش داخلی گروه‌های آزمایش نشان داد که میانگین گروه‌ها اختلاف قابل توجهی ندارند و نتایج آزمایش‌ها تکرارپذیر است. یافته‌های حاصل در این پژوهش با نتایج گزارش شده از سوی سایر محققان منطبق و قابل مقایسه است (۷و۱۲و۱). برای به دست آوردن مقدار Km و Vmax آنزیم ۳ – بتا – هیدروکسی استروئید دهیدروژناز در غلظت‌های مختلف از پرگنولون (سوبسترا) استفاده ، و با استفاده از رسم منحنی لینویوربرگ مقادیر Km و Vmax محاسبه شد. مقدار Km و Vmax به دست آمده از این

[1] Ultraviolet

پژوهش در مقایسه با نتایج سایر محققان بالاتر است ، این اختلاف مقدار شاخص‌های کنتیکی آنزیم ممکن است به روش اندازه‌گیری ، زمان انکوباسیون ، PH مورد استفاده و غلظت هموژنه بافت بستگی داشته باشد (۱۲و۲و۱). به علاوه ، درجهٔ حرارت بهینه فعالیت آنزیم 3BHSDH در درجه‌های مختلف تعیین ، و معلوم شد که حرارت ۳۷ درجه ، شرایط بهینه برای فعالیت آنزیم است. در درجهٔ حرارت پایین‌تر و بالاتر از ۳۷ درجه فعالیت آنزیم 3BHSDH کاهش می‌یابد ، به طوری که محصول تولید شده در این شرایط قابل اندازه‌گیری نمی‌باشد (نمودار ٦). ما در این مطالعه ، رابطه بین فعالیت آنزیم 3BHSDH و درجه حرارت را نیز بررسی ، و پس از انکوباسیون آنزیم در دمای ۳۷ درجه بدون سوبسترا در زمان‌های مختلف و با اضافه نمودن سوبسترا (پرگننولون) فعالیت آنزیم را تعیین کردیم. فعالیت ۳ – بتا هیدروکسی استروئید دهیدروژناز در نمودار ٤ نشان داده شده است. همچنین ، در این پژوهش علاوه بر دقت و حساسیت بالا نسبت به سایر روش‌ها از مقدار بافت کمتری برای مطالعه کنتیکی استفاده شد (٦و٨). در نتیجه ، مطالعه کنتیکی آنزیم ۳ – بتا هیدروکسی استروئید دهیدروژناز نشان داد که Km آن در حدود $۵/۳ \times ۱۰^{-٦}$ مولار پرگننولون و Vmax آن $۳/۱۱ \times ۱۰^{-٦}$ نانومول در دقیقه در میلی‌گرم بافت بیضه موش آزمایشگاهی است. یافته‌های حاصل از این پژوهش برای بررسی فعالیت این آنزیم در بافت‌های استروئیدی کاربرد خواهد داشت.

تشکر و قدردانی

از شورای محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل که با تصویب این طرح تحقیقاتی ما را در اجرای آن یاری نمودند بسیار متشکریم.

منابع

1)Neville AM, Orr JC, Engel LL. The data 5-3 beta – hydroxysteroid dehydrogenase of bovine adrenal microsomes. J Endocr. 1969; 43: 599-608.

2)MC. Cune R.W. Roberts, S. Young PL. Competitive inhibition of adrenal delta – 5 – 3 – B – hydroxysteroid dehydrogenase and delta 5-4-ketosteroid isomerase activities by adenosine 3, 5 – monophosphate. J Biol Chem. 1970; 245: 3859-3867.

3)Basch RS, Finegold MJ. 3 beta- hydroxysteriod dehydrogenase activity in the mitochondrria of rat adrenal homogenates. Biochem J. 1971; 125: 983-989.

4)Frre F, Breuiller M, Duchesne MJ, Saintot M, Descomps B, Crastes de paulet A. Human placental delta 5-3 beta hydroxysteriod dehydrogenase activity. Intracellular distribution, kinetic properties retroinhibition and influence of membrane de lipidation. Steroids. 1975; 26: 551-570.

5)Gibb W. Kinetic analysis of the placenta mirosomal 3 beta – hydroxysteroid dehydrogenase activity. Steroids. 1979; 33: 459-466.

6)Philpott JE, Peron FG. A microassay procedure for delta 5-3 beta- hydroxysteriod dehydrogenase based on substrate depletion. Endocrionology. 1971; 88: 1082-1085.

7)Basch RS, Finegold MJ. 3 beta – hydroxysteroid dehydrogenase activity in the mitochondria of rat adrenal homogenate. Biochem J. 1971; 125:983-989.

8)Goldman AS, Sheth K. Inhibitors of human placental c19 and c21, 3beta- hydroxysteroid dehydrogenase. Biochimica and Biophy. 1973; 315:233-249.

9)Ar Mstrong DG, Davidson MF, Gilbert AB, Wells JW. Activity of 3 beta – hydroxysteriod dehydrogenase in the postovulatory follicle of the domestic fowls. J Reprod Fert. 1977; 49: 253-259.

10)Arif S, Vallian S, Farzaneh F, Zanone MM, James SL, Pietropaolo M, Hettiarachchi S, Vergani D,

Conway GS, Pe Akman M. Identification of 3 beta – hydroxysteroid dehydrogenase as a novel traget of steroid cell autoantibodies: associatior of autoantibodies with endoctine autoimmune disease. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 1996; 81: 4439-4445.

11)Armstrong DG, Wells JW. The measurment of 3 beta – hydroxysteroid dehydrogenase in ovaries of fowls. General and Comparative Endocrinology. 1976; 29: 313-318.

12)Rodway MR, Swan CL, Crelin NK, Gillio-meina C, Chefrese PJ. Steroid regulation of porgesterone synthesis in a stable procine granulosa cell line: a role of progestins. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 1999; 68: 173-180.