

ارائه یک روش جدید برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ۳-بتا-هیدروکسی استروئید

دهیدروژناز

چکیده

دکتر دردی قوجق I

۳-بتا-هیدروکسی-دلتا-۵-استروئید دهیدروژناز، مهمترین آنزیم کلیدی در بیوسنتز هورمونهای استروئیدی است که در تبدیل پرگنولون به پروژسترون در مسیر بیوسنتز هورمونهای جنسی نقش دارد. این کمپلکس آنزیمی دومین آنزیم شرکت کننده در مسیر بیوسنتز هورمونهای استروئیدی است که در این پژوهش یک روش ساده برای اندازه‌گیری فعالیت آن در بیضه موش آزمایشگاهی ارائه شده است. برای انجام این تحقیق مقادیر زیاد پرگنولون همراه با غلظتهای متفاوت هموژنه بافت بیضه موش آزمایشگاهی انکوبه شد. مخلوط واکنش شامل پرگنولون، کوآنزیم نیکوتین آمید دی‌نوکلئوتید و ایزونیتر و تترازولیم در ۰/۱۵۰ مولار بافر تریس با $PH=8$ و همچنین آنزیم استخراج شده از بیضه موش آزمایشگاهی بود که به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد و جذب نوری آن در طول موج ۴۹۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید. نتایج به دست آمده نشان داد که فعالیت ۳-بتا-هیدروکسی استروئید دهیدروژناز از زمان و غلظت پروتئین محلول آنزیمی به صورت خطی تبعیت می‌کند. لازم به ذکر است که روش به کار رفته در این مطالعه حساسیت کافی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استروئید دهیدروژناز بیضه موش آزمایشگاهی را داشت.

کلیدواژه‌ها: ۱- ۳-بتا-هیدروکسی استروئید دهیدروژناز ۲- بیضه موش ۳- اسپکتروفتومتر

مقدمه

آنزیمی که پرگنولون را در مرحله بعدی به پروژسترون تبدیل می‌کند شامل، ۳-بتا هیدروکسی استروئید دهیدروژناز، NAD اکسیدوردوکتاز (E.C.1.1.1.145) و ۳-کتواستروئید دلتا ۴ و ۵ ایزومراز (E.C.5.3.3.1) است که به صورت 3B-HSDH نوشته می‌شود (۳). در سالهای اخیر توزیع آنزیم ۳-بتا-هیدروکسی استروئید دهیدروژناز در بافت مغز و غده هیپوفیز توسط روشهای ایمونوشیمی مورد بررسی قرار گرفته که نتایج آن در شناخت مکانیسم سنتز نورواستروئیدها اهمیت فراوانی داشته است (۴).

فاکتور رشد اپیدرمال، سنتز آنزیم ۳-بتا-هیدروکسی استروئید دهیدروژناز (E.C.1.1.1.145) را تنظیم می‌کند و مکانیسم این کنترل بخوبی شناسایی شده است (۱). محققان نشان داده‌اند که فعالیت آنزیم ۳-بتا-هیدروکسی استروئید دهیدروژناز در بیوسنتز هورمونهای استروئیدی از اهمیت زیادی برخوردار است (۲). دو سیستم آنزیمی در تبدیل آنزیمی کلسترول به پروژسترون دخالت دارند. شاخه جانبی کلسترول باید توسط یک آنزیم حذف شود تا مولکول کلسترول به پرگنولون تبدیل گردد.

این طرح پژوهشی تحت حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی بابل انجام شده است (شماره ثبت: ۱۳۷۹۹) همچنین در ششمین کنگره بیوشیمی در تهران سال ۱۳۸۰ و در نهمین کنگره بین‌المللی بیوشیمی در هند سال ۱۳۸۱ و ارائه گردیده است. (I) دانشیار گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی بابل.

بتا - هیدروکسی استروئید دهیدروژناز در بافت بیضه موش آزمایشگاهی (Rat) بوده است. بدین ترتیب که از یک روش کالریمتریک ساده برای اندازه‌گیری ۳ - بتا - هیدروکسی استروئید دهیدروژناز در بیضه موش آزمایشگاهی استفاده شد.

روش بررسی

در این بررسی مواد شیمیایی مورد نیاز عبارت بودند از: پرگنولون (۵ - پرگنه ۳ - بتا - ال ۲ - اون) و تستوسترون، (۱۷ - بتا - هیدروکسی اندروستان - ۴ - ان - ۳ - اون) که از نمایندگی شرکت سیگما خریداری شده بود و نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید نمک سدیم (NAD)، فرم احیا شده نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید (NADH) ایدونیترو تترازولیم کلراید (INT) و فنازن متوسولفات (PMS) از نمایندگی شرکت مرک تهیه شده بودند.

معرف‌های به کار برده شده در این بررسی عبارت بودند از: ۱- بافر فتالدید (۱۰۰ میلی مول $\text{PH}=3/4$) که $0/20$ گرم از پتاسیم هیدروژن فتالدید به ۱۰۰ میلی‌لیتر از اسید کلریدریک نرمال و ۵ میلی‌لیتر از توئین ۲۰، اضافه و PH آن روی $3/4$ تنظیم گردید و حجم نهایی محلول توسط آب مقطر به ۵۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد.

۲- بافر تریس - اسید کلریدریک (۰/۱۵ مولار، $\text{PH}=8$):
(Nicotinamide adenine dinucleotide) NAD (۵ میلی‌مول در لیتر).

- برای تهیه معرف رنگی ۵۰ میلی‌گرم ایدونیترو تترازولیم کلراید، ۱۵ میلی‌گرم فنازن متوسولفات و ۱ میلی‌لیتر توئین ۲۰ در ۱۰۰ میلی‌لیتر از آب مقطر حل شد و از آن برای رسم منحنی استاندارد استفاده گردید. در شرایط اندازه‌گیری آنزیم، پس از حذف فنازن متوسولفات، معرف رنگی در شیشه‌های تیره نگهداری و ذخیره شد. برای تهیه سوستر، پرگنولون در $0/5$ میلی‌لیتر از محلول دی متیل فرم آمید حل شد و محلول غلیظ ذخیره با غلظت ۱ میلی‌مول در ۱۰۰ میلی‌لیتر از بافر تریس (۰/۱۵ مولار، $\text{PH}=8$) تهیه گردید. حیوانات آزمایشگاهی در این مطالعه

محققان مختلفی آنزیم 3B-HSDH را از میتوکندری و میکروزوم جدا کرده و خصوصیات آن را مورد مطالعه قرار داده‌اند. در این مطالعات به نقش آنزیم ۳ - بتا - هیدروکسی استروئید دهیدروژناز و پروژسترون در طناب نخاعی نیز اشاره شده است (۵). همچنین مشخص شد که هورمون تستوستون بطور مستقیم روی غده آدرنال اثر کرده و سبب مهار فعالیت آنزیم ۳ - بتا - هیدروکسی استروئید دهیدروژناز می‌گردد (۶). در یک مطالعه که اثر مهار کننده‌ها بر تبدیل پرگنولون و دهیدرواپی آندروسترون توسط هموزنه آنزیمهای استروژنیک بررسی شده بود، نشان داده شد که هموزنه جفت انسان، اپی اندروستین دیون را به اندروستین دیون، تستوسترون و ۱۷ - بتا - استرادیول و استرون و پرگنولون را به پروژسترون و ۵ - آلفا پروژسترون تبدیل می‌کند (۷). فعالیت آنزیم ۳ - بتا - هیدروکسی استروئید دهیدروژناز از طریق تبدیل دهیدرو اندروسترون به پروژسترون با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری می‌شود (۸). نارسایی فعالیت آنزیم ۳ - بتا - هیدروکسی استروئید دهیدروژناز در کودکان مبتلا به کلستازیس مشخص شده است (۹). مرحله کلیدی در بیوسنتز هورمونهای استروئیدی تبدیل استروئیدهای ۵ - دلتا - ۳ - بتا ال به استروئیدهای ۴ - دلتا - ۳ - اکسو توسط گنادها یا غده آدرنال است، مانند پروژسترون و آندرواستات ۴ - ان و ۳ و ۱۷ دی ان (اندروستین دیون) که از نظر بیولوژیکی بسیار فعال بوده و می‌تواند پس از انتقال به داخل اندروژن‌ها، استروژن‌ها یا کورتیکوستروئیدها عمل کند. این مرحله تبدیل توسط ۲ آنزیم کاتالیز می‌شود که به صورت کمپلکس است و شامل آنزیم ۵ - دلتا - ۳ - بتا هیدروکسی استروئید دهیدروژناز (E C. 1.1.1.51) و ۵ - دلتا - ۳ - اکسو استروئید ایزومراز (E C. 5.3.3.1) می‌باشد. اولین واکنش نیاز به کوآنزیم NAD دارد (۱۰). محققان گزارش کرده‌اند که پروژسترون بیان ژن آنزیم ۳ - بتا هیدروکسی استروئید دهیدروژناز را تحریک می‌کند (۱۱). هدف از انجام این پژوهش دست یافتن به یک روش سریع و حساس برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ۳ -

لوله‌های آزمایش اضافه گردید و میزان جذب در طول موج ۴۹۵ نانومتر خوانده شد. برای مقایسه نتایج از روش آماری Student T-t-test استفاده شد. مقادیر سنجش فعالیت آنزیم ۳ - بتا - هیدروکسی استروئید دهیدروژناز بافت بیضه موش آزمایشگاهی بر حسب میانگین و خطای استاندارد ارائه شد و برای بررسی تفاوت بین گروهها نیز از آنالیز واریانس استفاده گردید و مقدار $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. نمودارها با برنامه اکسل ۲۰۰۰ رسم شدند.

نتایج

منحنی استاندارد اندازه‌گیری NADH توسط احیای تترازولیم در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. غلظت‌های مختلف NADH پس از واکنش دادن در حضور فنازن متوسولفات و بافر تریس - HCL (۰/۱۵ مولار، PH=۸) و ایجاد کمپلکس رنگی در طول موج ۴۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. سیستم سنجش فعالیت آنزیم در این پژوهش با غلظت‌های پرگنولون در غلظت‌های متفاوت نیز در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. سرعت واکنش آنزیمی تا غلظت ۲۵۰ میکرومول در لیتر سوبسترا (پرگنولون)، به صورت خطی بود. در جدول شماره ۱ فعالیت آنزیم با روش کالریمتریک و اسپکتروفتومتری مقایسه شده است.

جدول شماره ۱ - مقایسه فعالیت آنزیم ۳ - بتا - هیدروکسی استروئید

دهیدروژناز با ۲ روش اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی (مقادیر بر حسب میانگین \pm خطای استاندارد ارائه شده است و حاصل تکرار حداقل ۶ بار انجام آزمایش بطور جداگانه)

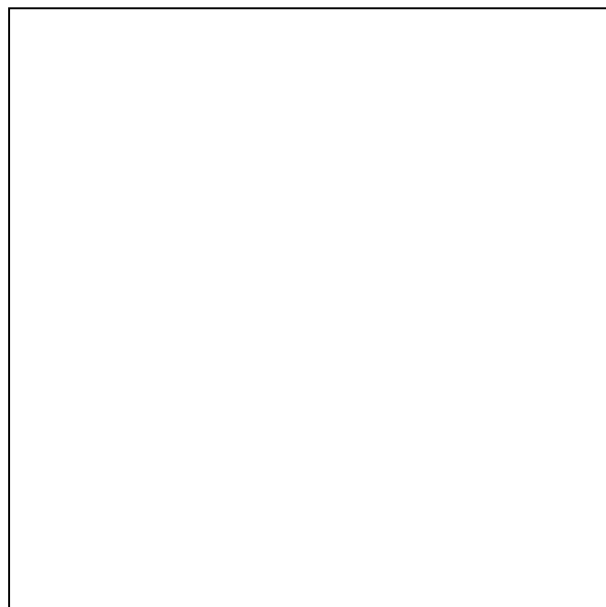
روش اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی	مقدار فعالیت آنزیمی
روش اسپکتروفتومتری	0.054 ± 0.013 نانومول در میلی‌گرم در دقیقه
روش کالریمتریک	0.16 ± 0.016 نانومول در میلی‌گرم در دقیقه

نمودار شماره ۲ نشان‌دهنده تغییرات سرعت بر حسب مقدار عصاره آنزیمی می‌باشد. با مقادیر متفاوت از محلول سوبسترا که به محلول سنجش فعالیت آنزیمی اضافه شد، مشخص گردید که در مقادیر بیش از مقدار مطمئن (۱۰۰ میکرومول) سرعت واکنش آنزیمی از مقدار سوبسترا به صورت خطی تبعیت نمی‌کند، بنابراین سوبسترا در بخش

در قفسه‌های جداگانه به تعداد ۶ تایی و درجه حرارت حدود 23 ± 5 درجه و دوره‌های ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری می‌شدند. در این بررسی بیضه موشهای آزمایشگاهی صحرایی بالغ (Rat) پس از کشته شدن از طریق بیهوشی با اتر خارج می‌شد و حدود ۲ تا ۴ بیضه از موش آزمایشگاهی با وزن ۵ میلی‌گرم در لوله آزمایش قرار داده می‌شد، سپس در ۵ میلی‌لیتر از بافر تریس - HCL (۰/۱۵ مولار با PH=۸) هموژنیزه می‌گردید و پس از سانتریفوژ با دور ۴۵۰۰ در دمای حدود ۱۰-۵ درجه محیط آزمایشگاه (کلمنت ۲۰۰۰) محلول رویی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ۳ - بتا استروئید دهیدروژناز مورد استفاده قرار می‌گرفت.

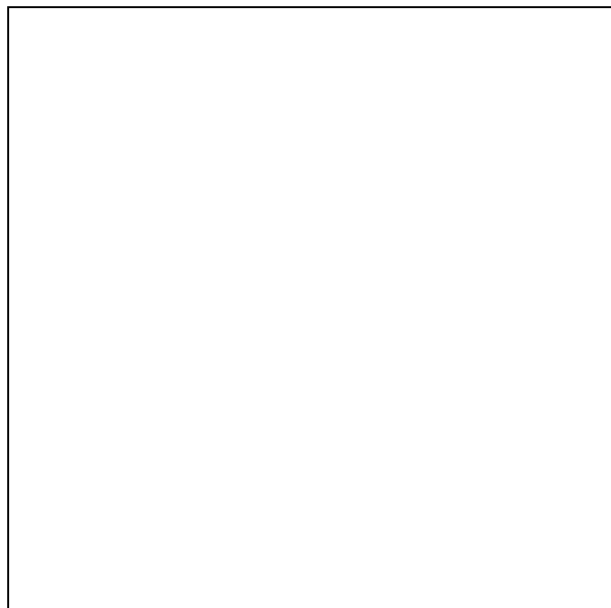
اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ۳ - بتا - هیدروکسی استروئید دهیدروژناز: فعالیت آنزیم در بافر تریس HCL، ۰/۱۵ مولار و PH=۸ حاوی ۵۰۰ میکرومول NAD و سوبسترا (پرگنولون) به مقدار ۱۰۰ میکرومول در حجم محلول به میزان ۵ میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. واکنش آنزیمی و سوبسترا با اضافه کردن آنزیم (محلول رویی هموژنه) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر و انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه شروع شد. همچنین واکنش آنزیمی و سوبسترا با افزودن ۲ میلی‌لیتر از بافر فتالدئید با PH=۸ متوقف گردید. پس از رفع کدورت از طریق انجام سانتریفوژ در ۳۵۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه محلول رویی برداشته شد و جذب نوری هر یک از نمونه‌ها در طول موج ۴۹۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (سیسیل ۱۰۲۰) اندازه‌گیری گردید. فعالیت آنزیمی با استفاده از منحنی استاندارد و بر حسب مقدار نانومول NADH تولید شده در ساعت در هر میلی‌گرم پروتئین بافت بیضه محاسبه شد. مقدار پروتئین بافت بیضه نیز به روش لوری تعیین گردید. برای دست یافتن به نمودار استاندارد محلول ۱ میلی‌مول از کوآنزیم NADH در آب مقطر و غلظت NADH در مقادیر متغیر صفر تا ۳۰۰ نانومول تهیه شد و پس از واکنش دادن با حجم حدود ۰/۵ میلی‌لیتر با معرف رنگی و ایجاد رنگ، ۲ میلی‌لیتر از بافر فتالدئید به هر یک از

فعالیت آنزیمی در حد پایین‌تر از ۱۰۰ میکرومول مورد استفاده قرار گرفت تا رابطه بین سرعت واکنش آنزیمی و محلول سوپسترا به صورت خطی باشد.



نمودار شماره ۱ - منحنی استاندارد اندازه‌گیری NADH توسط احیای تترازولیم. مقادیر بر حسب میانگین \pm خطای استاندارد ارائه شده است و حاصل تکرار حداقل ۶ بار آزمایش بطور جداگانه است.

نمودار شماره ۲ اثر مدت زمان انکوباسیون را بر فعالیت آنزیم ۳ - بتا - هیدروکسی استروئید دهیدروژناز بافت بیضه موش آزمایشگاهی نشان می‌دهد همان‌طور که در این نمودار مشاهده می‌شود، تا زمان ۱۰۰ دقیقه، فعالیت آنزیم ۳ - بتا - هیدروکسی استروئید دهیدروژناز را می‌توان اندازه‌گیری نمود و منحنی تا این زمان به صورت خطی است.

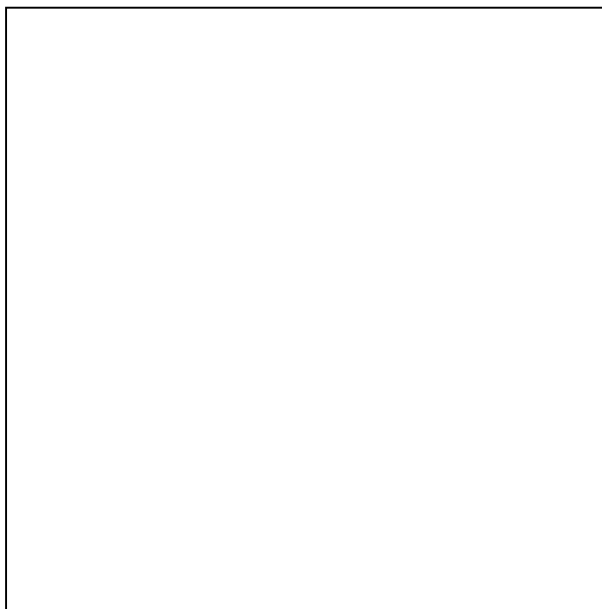


نمودار شماره ۳ - اثر مدت زمان انکوباسیون بر فعالیت آنزیم ۳ - بتا - هیدروکسی استروئید دهیدروژناز بافت بیضه موش آزمایشگاهی. مقادیر بر حسب میانگین \pm خطای استاندارد ارائه شده است و حاصل تکرار حداقل ۶ بار انجام آزمایش بطور جداگانه است.

بحث

در این پژوهش یک روش کالریمتریک ساده برای اندازه‌گیری ۳ - بتا - هیدروکسی استروئید دهیدروژناز در بیضه موش آزمایشگاهی به کار برده شد. جایگزینی ایدونیتروازولیم کلراید، نمک تترازولیم در این روش، موجب افزایش توانایی این روش در اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استروئید دهیدروژناز شده است.

در این روش مقدار NADH تولید شده از طریق اکسیداسیون استروئید بافت بیضه موش آزمایشگاهی و جفت کردن NADH ایجاد شده با واکنش احیای تترازولیم



نمودار شماره ۲ - منحنی تغییرات سرعت بر حسب مقدار عصاره آنزیمی برای آنزیم ۳ - بتا - هیدروکسی استروئید دهیدروژناز بیضه موش آزمایشگاهی با سوپسترای پرگنولون در سیستم سنجش استاندارد آنزیمی. مقادیر بر حسب میانگین \pm خطای استاندارد ارائه شده است و حاصل تکرار حداقل ۶ بار آزمایش بطور جداگانه است.

mapping of porcine 3 β hydroxy steroid dehydrogenase/delta 5 delta 4 isomerase, *Anim Genet*, 2001, 32(5):298-302.

3- Hashimoto N., Yamanaka H., Mizushima T., Noguchi K. Increased expression of 3 β hydroxy steroid dehydrogenase mRNA in dorsal root ganglio neurons of adult rats following peripheral nerve injury, *Neurosci Lett*, 2003, 340(1):45-48.

4- Mathieu M., Mensah-Nyagan AG., Vallarino M., Do-Rego JL., Beaujean D., Vaudry D., et al. Immunohistochemical localization of 3 β hydroxy steroid dehydrogenase and 5 alpha-reductase in the brain of the african lungfish *Protopterus annectens*, *J Comp Neuro*, 2001, 438(2):123-135.

5- Coirini H., Gouezou M., Liere P., Delespierre b., Pianos A., Eychenne B., et al. 3 β hydroxy steroid dehydrogenase expression in rat spinal cord, *Neroscience*, 2002, 113(4):883-891.

6- Stalvey JR., Inhibition of 3 β hydroxy steroid dehydrogenase isomerase in mouse adrenal cells, a direct effect of testosterone. *Steroids*, 2002, 67(8):721-731.

7- Goldman AS., and Sheth K. Inhibitors of human placental c19 and c21, 3 β - hydroxysteroid dehydrogenase, *Biochimica et Biophys*, 1973, 315: 233-249.

8- Nagendra RJ., Datta M., Bhattacharya S. Differential regulation of leydig cell 3 β hydroxy steroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase activity by gonadotropin and thyroid hormone in a freshwater perch, *Anabas testudineus*. *Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol*, 1999, 124(2):165-173.

9- Yamato Y., Kimura A., Murai T., Yoshimura T., Kurosawa T., Terazawa S., et al. 3 β hydroxy delta 5-C27steroid dehydrogenase deficiency, diagnosis and treatment, *J Paediatr Child Health*, 2001, 37(5):516-519.

10- Armstrong DG., and wells JW. The measurment of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in ovaries of fowls. *General and Comparative Endocrinology*, 1976, 29: 313-318.

11- Rodway MR., Swan CL., Crelin NK., Gillio- Meina C., and Chedrese PJ. Steroid regulation of progesterone synthesis in a stable porcine granulosa cell line: a role for progestins, *Journal of steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, 68: 173-180.

توسط دیافورز بافت بیضه موش آزمایشگاهی اندازه‌گیری گردید، مقدار فعالیت ۳-بتا-هیدروکسی استروئید دهیدروژناز با روش ما برابر با $1/64 \pm 0/16$ نانومول در میلی‌گرم در دقیقه بود اما باروش اسپکتروفتومتری برابر با $0/54 \pm 0/13$ نانومول در میلی‌گرم در دقیقه به دست آمد. آزمون T مستقل با سطح معنی‌دار بودن $P < 0/05$ نشان داد که روش ما بطور معنی‌داری از روش اسپکتروفتومتری بهتر است. آنالیز واریانس با تکرار، اختلاف معنی‌داری را بین روش ما و روش اسپکتروفتومتری نشان داد. روش به کار رفته در این پژوهش فعالیت آنزیم ۳-بتا-هیدروکسی استروئید دهیدروژناز را که به روش UV قابل اندازه‌گیری نبود، به دلیل جذب بالای فورمازان اندازه‌گیری نمود که فعالیت آنزیم تا حدود $0/5$ میلی‌گرم پروتئین بافت بیضه به صورت خطی بود (نمودار شماره ۱). یافته‌های به دست آمده در این پژوهش با نتایج گزارش شده توسط سایر محققان قابل مقایسه است (۲ و ۴). در این مطالعه کنتیک آنزیمی آنزیم ۳-بتا-هیدروکسی استروئید دهیدروژناز در ارتباط با زمان و غلظت سوبسترا مورد بررسی قرار گرفت (نمودار شماره ۲ و ۳). کنتیک آنزیمی درجه اول (سرعت اولیه) در زمان آنکوباسیون ۱۲۰ دقیقه و تا ۱۰۰ میکرومول در لیتر سوبسترا بود. رابطه بین سرعت اولیه، زمان و مقدار سوبسترا به ترتیب تا زمان ۱۲۰ دقیقه و مقدار سوبسترای ۱۰۰ میکرومول در لیتر به صورت خطی بود. روش ما برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در سایر بافتهای استروژنیک نیز قابل استفاده می‌باشد.

منابع

1- Feltus FA., Kovacs WJ., Nicholson W., Silva CM., Nagdas SK., Ducharme NA., et al. Epidermal growth factor increases cortisol production and type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase /delta 5 delta 4 isomerase expression in human adrenocortical carcinoma cells, *Endocrinology*, 2003, 144(5):1847-1853.

2- Teichman A., Joerg H., Werner P., Brenig B., Stranzinger G., CDNA cloning and physical

DEVELOPMENT OF A NEW METHOD FOR DETERMINATION OF 3 β -HYDROXY STEROID DEHYDROGENASE ACTIVITY

D. Qujeq, PhD¹

ABSTRACT

3 beta-Hydroxy-Delta-5-steroid dehydrogenase is an important key enzyme of steroid hormone biosynthesis, which is involved in catalyzing the conversion of pregnenolone to progesterone in the biosynthesis of steroid sex hormones. This complex enzyme is the second enzyme in the steroid hormone biosynthesis pathway and it is identified as an autoantigenic target. In this study, a simple method is presented for the quantitative assay of 3 β -Hydroxy steroid dehydrogenase activity in testis of rat. An excess of pregnenolone was incubated with several concentrations of whole testis homogenate. The reaction mixture containing the pregnenolone, NAD, isonitrotetrazolium in 0.15 M Tris-HCL buffer (PH=8) and the enzyme extract from testis of rat was incubated for 1.5 at 37°C. Absorbance at 495 nm was read in a spectrophotometer. The results showed that 3- β -hydroxy steroid dehydrogenase activity was linear with time and protein concentration. The present method can easily be performed and is sensitive enough to assay 3- β -hydroxy steroid dehydrogenase activity in rat testis.

Key Words: 1) 3 β -hydroxy steroid dehydrogenase 2) Rat testis 3) Spectrophotometer

This research is conducted under financial support of Babol University of Medical Sciences and Health Services (NO.13799). It is also presented in the 9th International Congress of Biochemistry in India (2002) and in the 6th Congress of Biochemistry in Tehran (2001).

D) Associate Professor of Biochemistry. Babol University of Medical Sciences and Health Services, Babol, Iran.