

بررسی میزان فعالیت بعضی از آنزیم‌ها در نسوج مختلف جنین گوسفند در سنین مختلف

دکتر صغری غلامی^۱، دکتر محمود امین لاری^۲، دکتر غلامرضا لک^۳

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۴، شماره ۲، ۷۲ - ۶۷ (۱۳۷۸)

مواد و روش کار

نمونه‌های تازه جنین گوسفند از مجتمع صنعتی گوشت فارس و کشتارگاه‌های اطراف شیراز جمع‌آوری و در کنار یخ به دانشکده منتقل گردیدند. سن جنینها با روش اوانس و ساک (۱۹۷۲) تعیین گردید (۳). جنینها در پنج گروه سنی ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵ و ۴ ماهه قرار گرفتند. پس از تشریح جنینها اندامهای کبد، پانکراس، قلب و مغز آنها خارج و چربی و سایر بافتهای اضافی جدا گردید و نمونه‌ها درون ظرفهای نمونه‌گیری قرار داده شدند و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. برای تهیه عصاره بافتی، پس از خارج نمودن نمونه‌ها از حالت انجماد به مقدار یک گرم از هر نمونه در حضور نیتروژن مایع در هاون چینی هموژنیزه و سپس ۴ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۰۲۵ مولار، pH برابر ۷/۲ اضافه گردید. نمونه‌های مورد نظر با سانتریفوژ ASE (ساخت انگلستان) با دور ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد و محلول فوقانی به عنوان عصاره بافتی جمع‌آوری و مورد آزمایش قرار گرفت. آنزیمهای ALT و AST با روش ریتمن و فرانکل (۱۹۵۷) (۱۹)، ALP بر اساس اساس هیدرولیز پارانیتروفنیل فسفات (ناتلسون ۱۹۷۱) (۱۶)، آرژیناز بر اساس روش اندازه‌گیری اوره تولیدشده توسط آنزیم (Geyer, 1971) (۶)، CK با روش آلفا نفتیل دی استیل (Hughes, 1962) (۸) و پروتئین تام با روش لوری (۱۲) اندازه‌گیری شدند.

آزمونهای آنالیز واریانس یک طرفه و دانکن برای بررسی اختلاف آماری در نتایج فعالیت آنزیمی و پروتئین و آزمون T-test مستقل برای تعیین اختلاف آماری بین دو گروه بکار گرفته شد.

نتایج

نتایج حاصل از کلیه آزمایشات در نمودار ۱ تا ۴ نشان داده شده است. براساس نتایج نشان داده شده در نمودار ۱ در سنین مختلف جنینی در کبد میزان فعالیت آنزیمهای ALT، AST، ALP هیچ‌گونه اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نمی‌شود ($P > 0/05$). میزان ALT در کبد در ۳ و ۲/۵ ماهگی نسبت به سنین ۲ و ۲/۵ ماهگی کاهش نشان می‌دهد ($P < 0/05$). میزان فعالیت آرژیناز در کبد در سنین مختلف دارای اختلاف معنی‌داری است و با افزایش سن جنین افزایش می‌یابد ($P < 0/05$).

در نمودار ۲ تغییرات آنزیمهای قلب نشان داده شده است. میزان AST در سنین مختلف جنینی دارای اختلاف آماری معنی‌داری است ($P < 0/05$)، به طوری که در سنین ۲/۵ و ۳ ماهگی بالاتر از ۲ و ۳/۵ ماهگی است. میزان ALT فقط در سنین ۲ ماهگی با بقیه سنین اختلاف آماری معنی‌داری دارد و کمتر است. در نمودار ۳ فعالیت ALT و AST در قلب و کبد در سنین مختلف مقایسه شده است. میزان هر دو آنزیم در تمام سنین در قلب بیشتر از کبد می‌باشد.

در مورد آنزیم CK با بالارفتن سن جنین فعالیت ویژه آنزیم افزایش یافته و در ۳ ماهگی بیشترین مقدار را نشان می‌دهد. میزان آنزیم CK در مغز و قلب در نمودار ۴ با یکدیگر مقایسه شده است. در سنین مختلف جنینی به استثنای سن ۲ ماهگی اختلاف آماری معنی‌داری بین مغز و قلب وجود دارد، به طوری که در تمام سنین به جز سن ۲ ماهگی میزان فعالیت ویژه آنزیم CK در قلب بیشتر از مغز است.

در این بررسی میزان تغییرات فعالیت آنزیمهای آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST یا *Aspartate aminotransferase*)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT یا *Alanine aminotransferase*)، آلکالین فسفاتاز (ALP یا *Alkaline phosphatase*)، آرژیناز (*Arginase*) و کراتین کیناز (CK یا *Creatine kinase*) در ارگانهای قلب، مغز، کبد و پانکراس جنین گوسفند در پنج گروه سنی ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵ و ۴ ماهه مورد مطالعه قرار گرفت. در اندامهای مختلف هیچ‌گونه تغییری در میزان فعالیت آنزیم AST در سنین مختلف مشاهده نشد ولی فعالیت ویژه این آنزیم در قلب در ۳/۵ ماهگی نسبت به سایر سنین کاهش نشان داد. فعالیت ویژه آنزیم ALT در کبد در ۳ و ۲/۵ ماهگی نسبت به ۲ و ۲/۵ ماهگی کاهش یافته و در قلب رابطه سنی مشخصی با میزان فعالیت این آنزیم مشاهده نشد. در قلب و کبد میزان فعالیت AST در مقایسه با ALT بیشتر بود. میزان فعالیت ALP در اندامهای مورد مطالعه با افزایش سن جنین تغییر نکرد. میزان فعالیت آنزیم آرژیناز با افزایش سن جنین افزایش معنی‌داری را نشان داد، به طوری که در ۴ ماهگی حداکثر فعالیت را داشت. فعالیت آنزیم CK با افزایش سن جنین افزایش معنی‌داری را نشان داد. میزان این آنزیم در قلب در تمام سنین به استثنای ۲ ماهگی بیشتر از مغز بود. تغییرات فعالیت آنزیم آمیلاز در پانکراس رابطه معنی‌داری را با سن نشان نداد. پروتئین تام در تمام ارگانها با افزایش سن حیوان افزایش داشت و در کبد و پانکراس بیشتر از قلب و مغز بود. این نتایج نشان می‌دهد که مسیرهای متابولیکی که این آنزیمها را شامل می‌شوند در بافتهای مختلف در دوران مختلف زندگی قبل از تولد متفاوت هستند. افزون بر آن، حضور آنزیم ویژه در بافت خاصی می‌تواند سنجش آن را از دیدگاه بالینی برای تشخیص ناهنجاریهای جنین با ارزش نماید.

واژه‌های کلیدی: گوسفند، جنین، فعالیت آنزیمی

تعیین میزان فعالیت آنزیمهایی که نقش بیولوژیکی آنها به اثبات رسیده است در بافتهای مختلف در سنین مختلف نشان دهنده حضور پدیده‌های متابولیکی خاص در بافتها و تغییر آن پدیده‌ها در هنگام رشد و بیماری است (۱ و ۲). در بعضی موارد با افزایش سن حیوان فعالیت بعضی آنزیمها افزایش یا کاهش می‌یابد. نظر به اهمیتی که دانشمندان برای جنین به عنوان یک مدل تحقیقات بیولوژیکی قائل هستند، مطالعات بیوشیمیایی روی جنین می‌تواند اطلاعات وسیعی را در مورد روندهای بیوشیمیایی و بیولوژیکی در اختیار قرار دهد. تحقیقات معدودی که روی جنین حیوانات اهلی انجام شده است نشان می‌دهد که بعضی روندهای بیوشیمیایی در جنین پیوسته دستخوش دگرگونی می‌باشند و این دگرگونی‌ها بیانگر نقشی است که فعالیت‌های بیوشیمیایی خاص در دوران ویژه‌ای از رشد به عهده دارند (۲، ۱۴، ۱۷، ۱۸ و ۲۰). با شناخت دقیق این فرآیندهای بیوشیمیایی امکان بررسی پدیده‌های مهم بیولوژیکی مانند رشد و تفریق سلولی، اهمیت آنزیمها و پروتئین‌های ویژه در این فرآیندها و همچنین تغییرات این پدیده‌ها در هنگام بیماریها فراهم می‌گردد.

در این زمینه اطلاعات محدودی در مورد چگونگی تغییرات فعالیت آنزیمها در جنین حیوانات اهلی در دست است. در این تحقیق میزان فعالیت بعضی از آنزیمها که ویژه اندامهای خاصی هستند مورد مطالعه قرار گرفت.

۱) گروه آموزشی علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز - ایران.

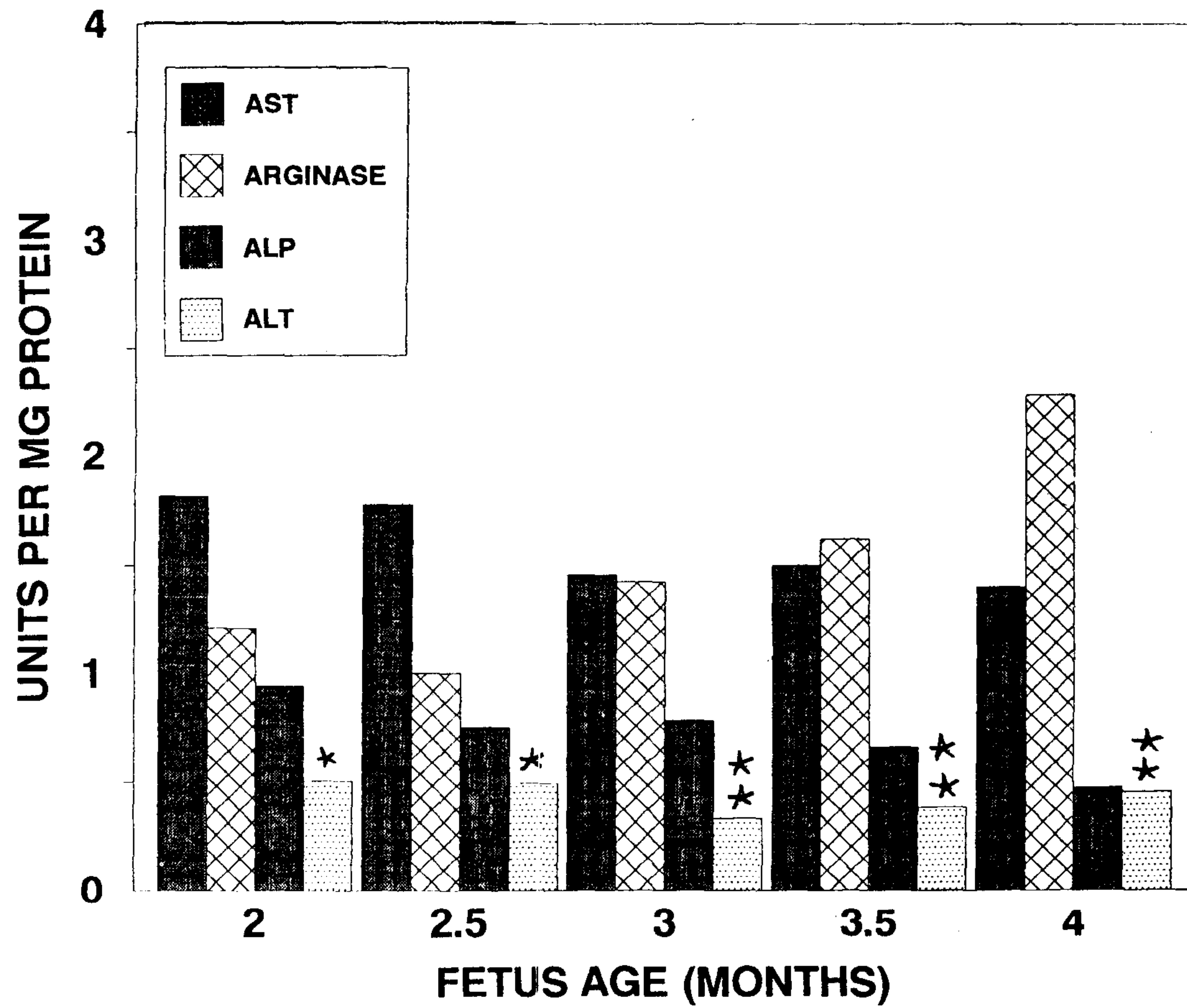
۲) گروه آموزشی علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز - ایران.

۳) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز - ایران.

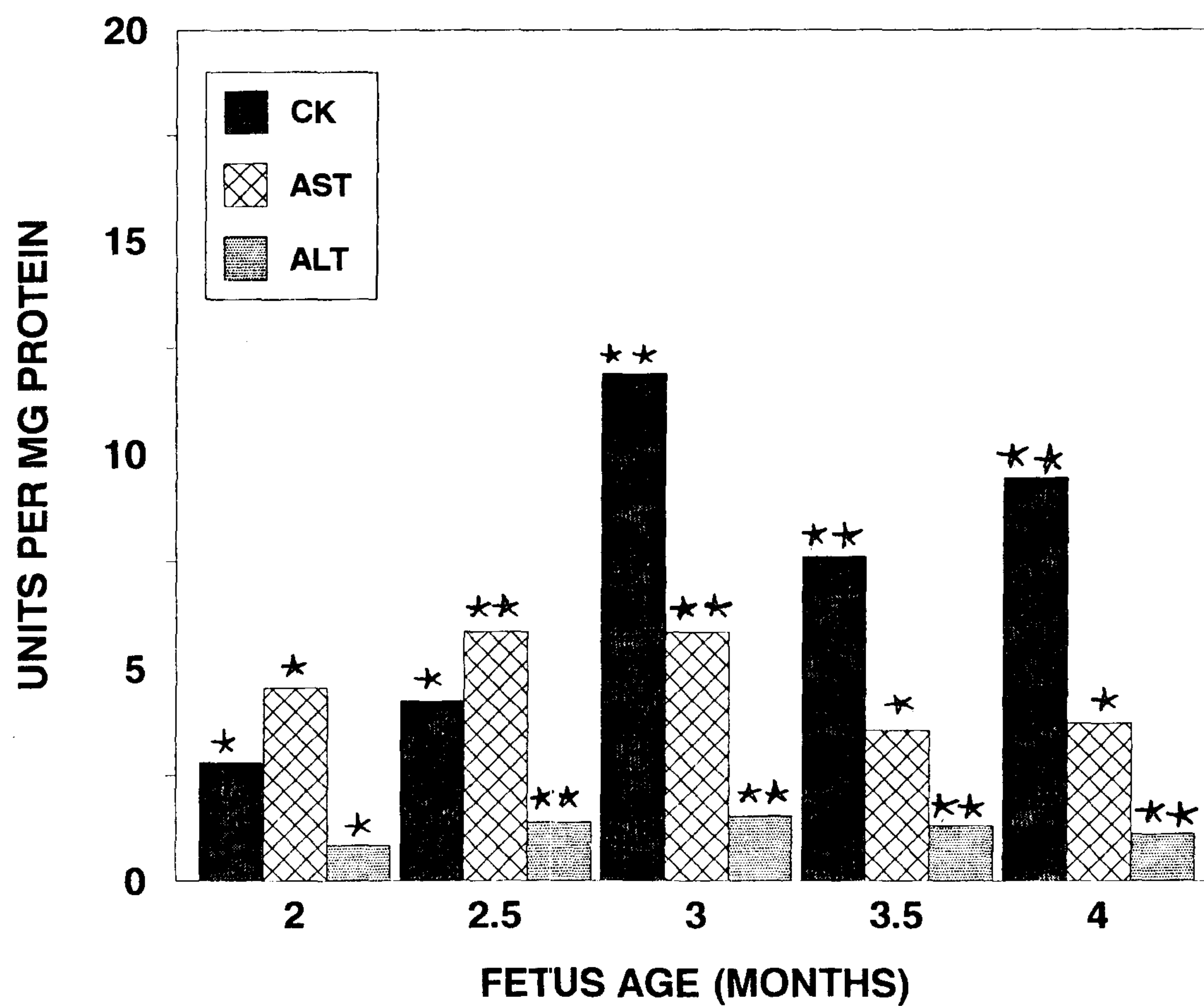


مقایسه میزان پروتئین بافتها در تمام سنین نشان می‌دهد که مقدار پروتئین کبد بیشتر از سایر بافتها است و پس از آن پانکراس، مغز و قلب قرار می‌گیرند، به استثنای سن دو ماهگی که میزان پروتئین قلب بیشتر از مغز است.

مطابق نمودار ۵ در میزان پروتئین بافتها تام کبد و قلب اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد. در مغز تغییرات معنی‌داری در اثر افزایش سن در میزان پروتئین مشاهده نمی‌شود. در پانکراس مقدار پروتئین با بالا رفتن سن جنین افزایش می‌یابد.

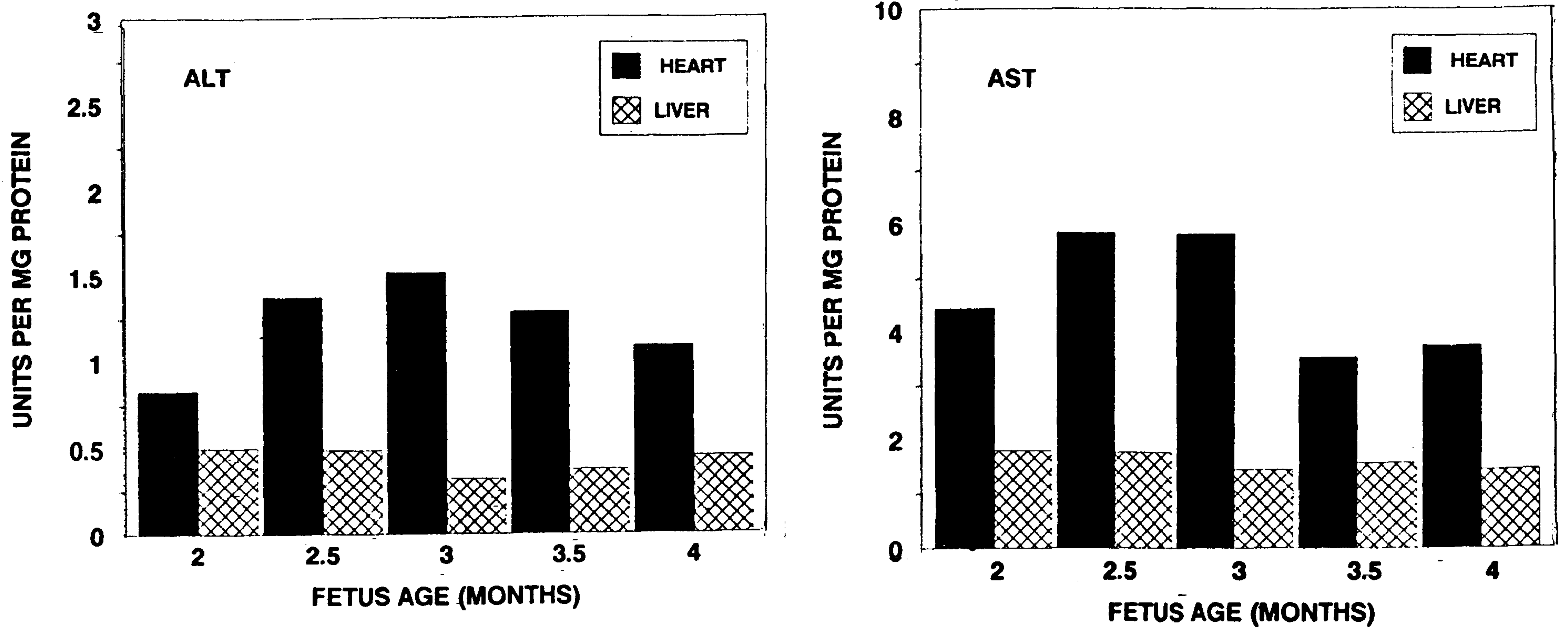


نمودار ۱ - میزان تغییرات آنزیمهای AST، آرژیناز، ALP و ALT در کبد گوسفندان در سنین مختلف جنین. برای هر آنزیم نمونه‌هایی که با یک ستاره (*) مشخص شده‌اند دارای اختلاف آماری معنی‌داری ($P < 0/05$) با آنهایی که با دو ستاره (**) مشخص شده‌اند می‌باشند.

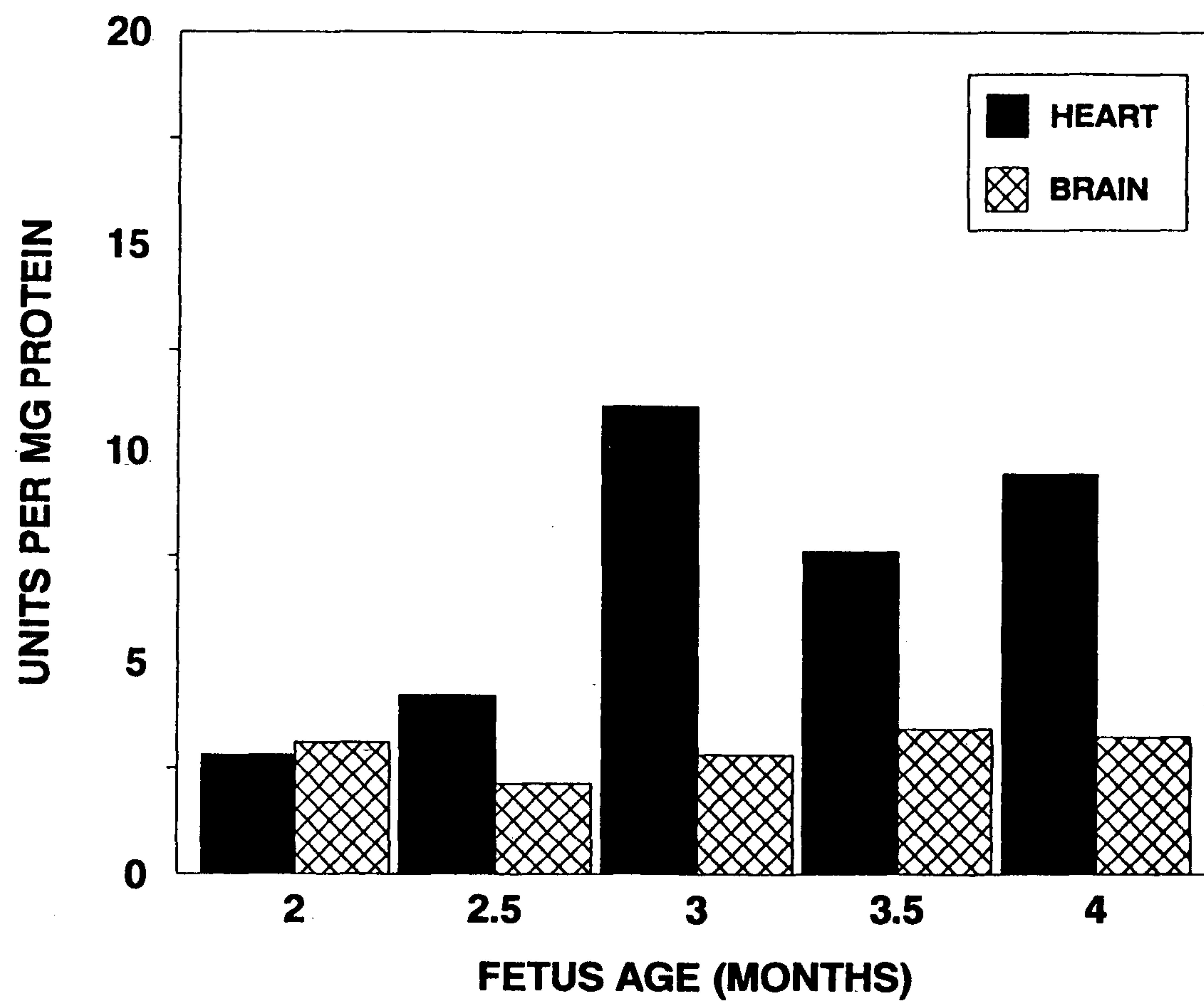


نمودار ۲ - میزان تغییرات آنزیمهای AST، کراتین کیناز (CK) و ALT در قلب گوسفندان در سنین مختلف جنین. برای هر آنزیم نمونه‌هایی که با یک ستاره (*) مشخص شده‌اند دارای اختلاف آماری معنی‌داری ($P < 0/05$) با آنهایی که با دو ستاره (**) مشخص شده‌اند می‌باشند.



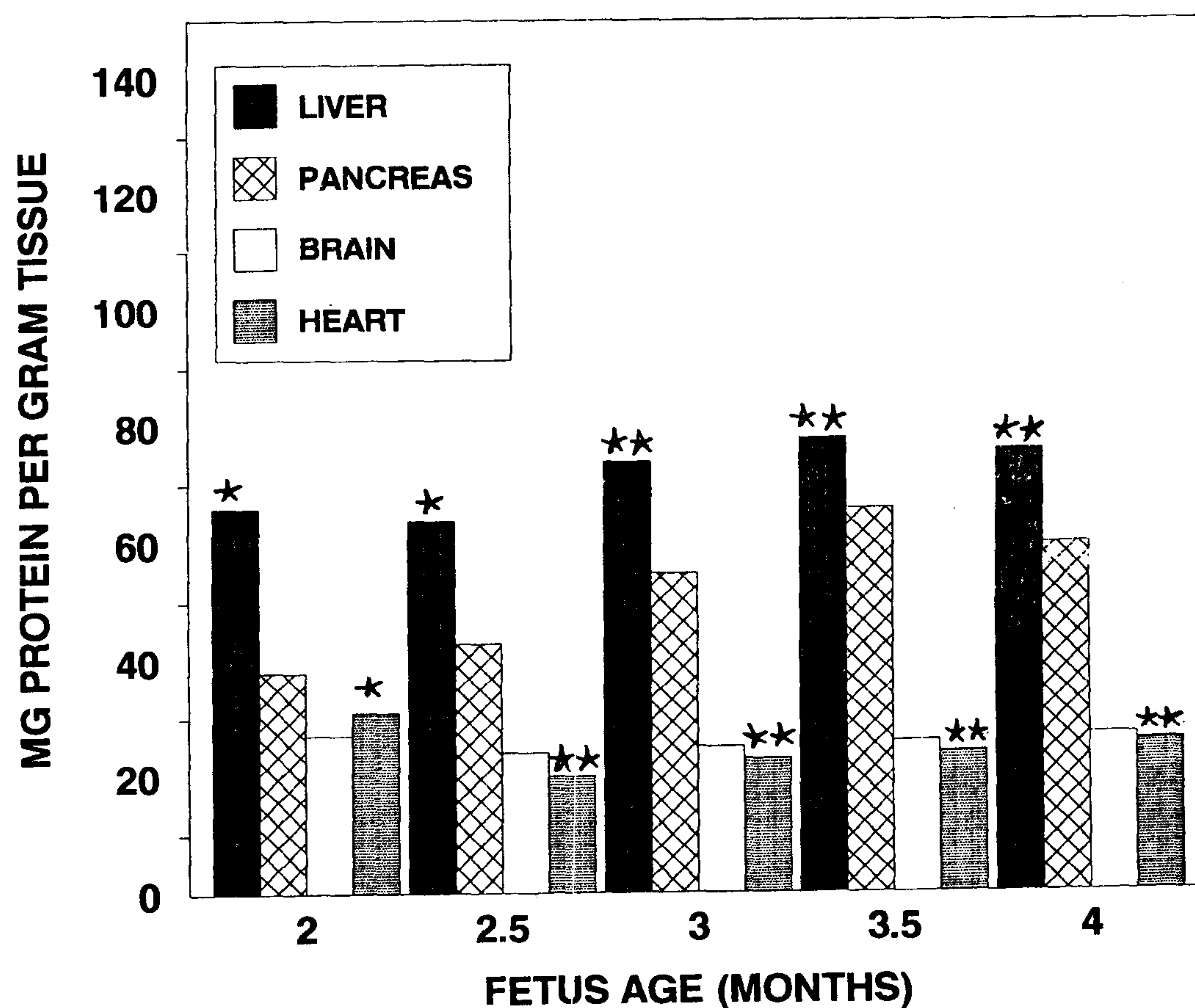


نمودار ۳ - مقایسه تغییرات آنزیم‌های ALT و AST در قلب و کبد گوسفندان در سنین مختلف جنین. در تمام سنین میزان ALT و AST در قلب بیشتر از کبد است (P < ۰/۰۵).



نمودار ۴ - مقایسه تغییرات آنزیم‌های کراتین کیناز در قلب و مغز گوسفندان در سنین مختلف جنین. در تمام سنین به استثنای سن دو ماهگی میزان CK در قلب بیشتر از مغز است (P < ۰/۰۵).





نمودار ۵ - مقایسه تغییرات پروتئین تام کبد، پانکراس، قلب و مغز گوسفندان در سنین مختلف جنین. میزان پروتئین در اندامهای مختلف دارای اختلاف معنی داری است ($P < 0/05$). در قلب و کبد علامت یک ستاره (*) نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار ($P < 0/05$) با نمونه‌های دارای دو ستاره (***) می‌باشد.

بیشتر از قلب می‌باشد (۹).

مطالعات کلر (۱۹۷۳) در گوسفند بالغ نشان داد که میزان آنزیم AST در عضلات اسکلتی و قلب چندین برابر کبد می‌باشد (۱۰). بر طبق مطالعه حاضر در جنین گوسفند در تمام سنین نسبت هر دو آنزیم AST و ALT در قلب از کبد بیشتر است بنابراین احتمالاً واکنشهایی که توسط این آنزیمها صورت می‌گیرد در سنین مختلف جنینی به طور فعال در قلب بیشتر از کبد وجود دارد.

فعالیت آنزیم ALP با افزایش سن جنین در کبد ثابت می‌باشد. مطالعات نشان داده است که مهمترین منبع ALP سرم در حیوانات جوان در حال رشد استخوان است و ALP کبدی در طی زندگی به ALP سرم افزوده می‌شود و زمانی که حیوان به سن بلوغ می‌رسد کبد منبع اصلی ALP سرم است (۹). کلر (۱۹۷۳) نشان داده است که کورتکس کلیه دارای بیشترین میزان ALP است و پس از آن کبد دارای میزان قابل توجهی از این آنزیم می‌باشد (۱۰). با توجه به اینکه آنزیم ALP در کبد هیدرولیز فسفوریل کولین و در نتیجه تولید کولین را انجام می‌دهد و این ماده در صفر ترشح می‌شود (۹)، احتمالاً به دلیل فعالیت محدود دستگاه گوارش در جنین، میزان این ماده کم بوده و بنابراین این آنزیم در سنین مختلف جنین تغییرات زیادی را نشان نمی‌دهد.

بر اساس یافته‌های تحقیق حاضر فعالیت آنزیم آرجیناز با افزایش سن جنین افزایش می‌یابد. مکرم و همکاران (۱۹۹۲) با مطالعه بر روی آنزیمهای سیکل اوره در کبد جنین انسان در سنین مختلف نشان دادند که با بالا رفتن سن جنین فعالیت آنزیمهای این سیکل نیز افزایش می‌یابد (۱۴).

امین لاری و واثقی (۱۹۹۲) با مطالعه بر روی توزیع آنزیمهای آرجیناز در بافتهای حیوانات اهلی نشان دادند که کبد غنی‌ترین منبع آرجیناز است و این آنزیم در همه حیوانات در کلیه و مغز نیز از فعالیت قابل توجهی برخوردار است

بحث

با مقایسه میزان فعالیت ALT, AST مشاهده می‌گردد که هیچ گونه تغییری در فعالیت آنزیم AST در سنین مختلف در کبد مشاهده نمی‌شود ولی در قلب میزان فعالیت ویژه این آنزیم در ۲ و ۳/۵ ماهگی نسبت به سایر سنین کاهش دارد. همچنین رابطه سنی مشخصی بین میزان فعالیت آنزیم ALT در قلب وجود ندارد ولی فعالیت ویژه این آنزیم در کبد در ۳ و ۳/۵ ماهگی نسبت به ۲ و ۳/۵ ماهگی کاهش داشت و در قلب کمترین فعالیت ویژه آنزیم ALT در سن ۲ ماهگی است. فودن و همکاران (۱۹۹۲) نیز ثابت نمودند میزان فعالیت اکثر آنزیمهای گلوکونئوتیک از جمله ALT و AST در کبد و کلیه جنین و کره اسب تازه متولد شده ثابت است (۴). همچنین مطالعه بر روی اسیدهای آمینه آلانین و آسپارتیک جنین گاو نشان داده است که میزان این اسیدها با افزایش سن تقریباً ثابت می‌ماند (۱۵). با توجه به نقش آنزیمهای ترانس آمیناز (ALT و AST) در متابولیسم این اسیدهای آمینه می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که متابولیسم اسیدهای آمینه فوق و واکنش ترانس آمیناسیون در سنین مختلف در قلب و کبد روند ثابتی را در بر دارد. این موضوع می‌تواند به این دلیل باشد که جنین به طور فعال گلوکز را از جفت برداشت می‌کند و همچنین به دلیل پایین بودن میزان گلوکونئوتز و عدم تغییر در آن با افزایش سن جنین، تغییرات چندانی در میزان این اسیدهای آمینه روی نمی‌دهد. پس از تولد به دلیل فعال شدن روند گلوکونئوتز مقدار این اسیدهای آمینه و در نتیجه آنزیمهای دخیل در متابولیسم آنها افزایش می‌یابد (۱۵). در این بررسی میزان آنزیم AST در مقایسه با ALT در قلب و کبد از فعالیت بیشتری برخوردار بود و میزان آنزیم AST در این دو ارگان چند برابر آنزیم ALT اندازه‌گیری شد. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که حتی در سنین جنینی آنزیم AST یک آنزیم اختصاصی برای کبد می‌باشد. و تغییرات آن می‌تواند نشان دهنده بیماری کبدی قلمداد گردد. در گوسفند بالغ نیز نسبت AST در قلب بیشتر از کبد است و ALT در کبد



افزایش از نظر آماری معنی‌دار نیست. همچنین افزایش پروتئین در کبد و پانکراس در سنین مختلف جنینی بیشتر از قلب و مغز می‌باشد. لامپر و پینریو (۱۹۹۲) نشان دادند که در طول روند تکاملی جنین خوک اکثر پروتئینهای اصلی پلاسما با بالا رفتن سن جنین افزایش می‌یابد اما آلومین تا سن یک ماهگی در جنین قابل تشخیص نیست (۱۱). با توجه به اینکه کبد مرکز بیشتر فعالیت‌های متابولیکی از جمله سنتز پروتئین می‌باشد و نیز با افزایش سن جنین بر میزان پروتئین این ارگان افزوده می‌شود بنابراین در مقایسه با قلب و مغز از میزان پروتئین بیشتری برخوردار می‌باشد. همچنین با بالا رفتن سن جنین به دلیل افزایش نیاز به پروتئین بر میزان پروتئین بافتی نیز افزوده می‌گردد (۷ و ۱۱). در مجموع نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که تغییرات بیوشیمیایی وسیعی در روند تکامل جنین در جریان است که این تغییرات احتمالاً با تغییر در نیاز جنین به انجام فرآیندهای بیوشیمیایی ویژه همزمان است. با انجام مطالعات بیشتر در این زمینه اهمیت این تغییرات بیوشیمیایی بیشتر روشن خواهد شد.

References

- 1 . Aminlari, A. and Vaseghi, T. Arginase distribution in tissues of domestic animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 103:385-389, (1992).
- 2 . Emmanuel, B. and Gilanpour, H. Studies on enzymes of nitrogen metabolism, nitrogen and products in the developing chick (*Gallus domesticus*) embryo. *Comp. Biochem. Physiol.* 287-289, (1978).
- 3 . Evans, H.E. and Sack, W.O. Prenatal development of domestic and laboratory mammals. *Anat. Histol. Embryol.* 2: 11-45, (1973).
- 4 . Fowden, A.L., Mijovic, J., Ousey, J.C., Mcgladdery, A. and Silver, M. The development of gluconeogenic enzymes in the liver and kidney of fetal and newborn foals. *J. Dev. Physiol.* 18: 137-142, (1992).
- 5 . Galitzer, S.J. and Oehme F.W. Creatine kinase isoenzymes in bovine tissues. *Am. J. Vet. Res.* 46: 1427-1429, (1985).
- 6 . Geyer, J.W. and Dobiach, D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Anal. Biochem.* 39: 412-417, (1971).
- 7 . Greengard, G. Biochemical base of the development of physiological functions. S. Karger. New York, PP. 24-39, 139-160, (1974).
- 8 . Hughes, B.P. A method for the estimation of creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. *Clin Chem. acta*, 7: 597-603, (1962).
- 9 . Kaneko, J.J. Clinical biochemistry of domestic animals. 3rd ed. Academic Press. New York, (1980).
- 10 . Keller. P. The activity of enzyme in serum and tissues of clinically normal sheep. *Newzeland. Vet. J.* 21: 221-227, (1973).
- 11 . Lampreave, F. And Pinerio, A. Concentration of majorplasma, Serum and whole tissue proteins of porcine fetus during development. *J. Reprod. Fert.* 95: 441-449, (1992).
- 12 . Lowry, O.H., Resenbrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., Protein measument with foline phenol reagent. *J.m Biol. Chem.* 193: 265-275, (1951).
- 13 . Morray, R.K., Granner, D.K., Mayes, R.A., and Rodwell, V.W. Harper's biochemistry. 23 rd. ed, Appleton and lange, Norwall. PP: 287-325, (1993).
- 14 . Mukaram, A.B., Habibullah, M., Swamy, C.M., Hassan, N., Ayash, Q. and Devis, B.G. Studies on urea cycle enzyme levels in human liver at different gestational ages. *J. Peldiatr. Res.* 31: 43-45, (1992).
- 15 . Munro, H.N., Alliosn, J.B. Mammalian protein metabolism. Vol. 2,3 Academic Press. New York. PP: 182-193, (1964).
- 16 . Natelson, S. Techinques of clinical chemistry 3rd. ed. Thomas. Pub. Illinois PP: 146-152, (1971).
- 17 . Pacifici, G.M., Franchi, M, Giuliani, L. and Rane, A. Development of the glucurony / transferase and sulphotransferase towards 2-naphtol in human fetus. *J.Dev. Pharmaco. Ther.*14: 108-114, (1989).
- 18 . Piras, R. and Piras, M.M. The development formation of enzymens involved in glycogen metabolism. *Enzyme.* 15: 82-96, (1973).
- 19 . Ritman S. and Frankel, S., A Colorimetric method for determination of serum glutamic Oxalacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J., Clin. Path* 25: 56, (1957).
- 20 . Roberts, M. The development and distribution of mucosal enzymes in the small intestine of the fetus and young foals. *J. Reprod Fert. suppl.* 23: 717-723, (1975).



Changes in the activities of selected enzymes in different tissues of sheep at different Prenatal Stages

Gholami, S.¹, Aminlari, M.², Lak, G.R.³

¹Department of Anatomical Sciences School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz 71345, Iran. ²Department of Biochemistry, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz - Iran.

³School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz - Iran.

The purpose of this study was to investigate the activities of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), creatine kinase (CK) and arginase in liver, heart and brain of sheep fetus at different ages. Results showed no significant differences in AST and ALP in liver

at 2, 2.5, 3, 3.5 and 4 months old fetuses ($P > 0.05$). The level of ALT of liver was lower at 3 and 3.5 old than other ages ($P < 0.05$). Liver arginase increased with the age of fetus and reached the highest value at 4 months old. Heart AST, ALT and ALP levels differed at different ages of sheep fetus but no specific pattern persisted. At all ages, level of AST and ALT of heart was higher than those of liver. CK activity of heart increased with age and reached the highest value at 3 months old. At all ages, CK of heart was significantly higher than brain. These results indicate that metabolic pathways which involve these enzymes are different in various tissues at different stages of development. Furthermore, the prevalence of specific enzymes in certain tissues might make these enzyme valuable markers for detection and diagnosis of abnormalities in animals in prenatal stages.

Key words: sheep, Prenatal, Enzymes Activity.

