استخدام الطريقة الكهرومترية في قياس نشاط خميرة الكولين استراز في القطط

أمجد الياس كتا[1] وأشرف صديق الياس
كلية الطب البيطري/ جامعة الموصل

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية الكشف عن دقة الطريقة الكهرومترية المحورة لاستخدامها في قياس نشاط خميرة الكولين أستراز في دم ذكور القطط البالغة غير معاملة لتكون هذه القيم أساساً لمقارنتها مع قيم نشاط خميرة الكولين أستراز للقطط التي تتعرض للمبيدات الفسفورية العضوية والكاربميتية في البيئة الطبيعية. استخدمت الطريقة الكهرومترية المحورة لقياس النشاط الطبيعي لخميرة الكولين استراز في دم ذكور القطط البالغة، حيث سُجل أعلى نشاط طبيعي للخميرة (التغير في الدالة الحامضية/ 30 دقيقة) في كريات الدم الحمر 0.63، ثم عموم الدم 0.49 واقلها في بلازما الدم 0.37. تم استخدام خميرة الكولين استراز في كريات الدم الحمر كنموذج لتحديد العلاقة الخطية بين حجم عينة كريات الدم الحمر ونشاط الخميرة، وتراوحت حجم العينة من 0.05– 0.5 مل وكان أفضل حجم للعينة 0.2 مل لقياس نشاط خميرة الكولين استراز في كريات الدم الحمر. كذلك استخدمت خميرة الكولين استراز في كريات الدم الحمر كنموذج لتحديد العلاقة الخطية بين وقت الحضن ونشاط الخميرة، وكان الوقت 30 دقيقة أفضل وقت للحضن وبحجم العينة 0.2 مل لقياس نشاط خميرة الكولين استراز في كريات الدم الحمر. أدى إضافة حامض الخليك 50 مايكرومول/ مل لمزيج التفاعل لعينات بلازما الدم وكريات الدم الحمر لبيان كفاءة المحلول الداريء المستخدم في هذه الطريقة تم إجراء المعايرة بحامض الخليك، حيث كان الانخفاض في بأها لمزيج التفاعل (بدون المادة الأساس) خطياً وتدريجياً ما بين الدالة الحامضية 8 و7. سُجّل وجود إختلاف معنوي في نشاط خميرة الكولين استراز في كريات الدم الحمر لدى مقارنة نشاط الخميرة بين مادتي الأساس يوديد الاستيل ثايوكولين ويوديد الاستيل كولين. ولم تلاحظ أي تغيير معنوي في نشاط الخميرة لدى استعمال لكل من الهيبارين وأي دي تي كمانعي للتخثر. ولبيان دقة الطريقة كان معامل الاختلاف في بلازما الدم، كريات الدم الحمر وعموم الدم (18.1، 12.1،11.2)% على التوالي. وتم ذلك باستخدام 0.1 مل يوديد الاستيل كولين 7.5% كمادة أساس في مزيج التفاعل للدراسة الحالية. أدى إستخدام كبريتات الكويندين إلى تثبيط نشاط خميرة الكولين استراز الكاذبة في كريات الدم الحمر وبلازما دم لذكور القطط البالغة وكانت نسبة نشاط الخميرة الكاذبة (12، 9.1)% على التوالي، في حين كانت نسبة نشاط الخميرة الحقيقية (88، 90.9)% على التوالي. تشير هذه النتائج إلى أن الطريقة الكهرومترية الحالية تمتاز بالدقة والسهولة والكفاءة والشرعية لقياس نشاط خميرة الكولين استراز في ذكور القطط البالغة.

Application of an electrometric method for measurement of blood cholinesterase activities in cats

A. A. Kata and A. S. Alias
College of Veterinary Medicine\ University of Mosul

Abstract

The aim of the present study is to detected for the accuracy of the way Electrometric method which used in the measurement of cholinesterase activity in the blood of untreated

[1] بحث مستل من رسالة ماجستير للطالب امجد الياس كتا.

adult male cats. To serve these values a basis for comparison with the values of cholinesterase activity for cats that are exposed to organophosphorus pesticides and carbamate in the natural environment. Electrometric method applied to measure the normal activity of the cholinesterase in blood of adult male cats, highest cholinesterase activity recorded (the change in the function acidic\ 30 minutes) in the red blood cell 0.63, then the general blood 0.49 and the least in the blood plasma 0.37. Used cholinesterase activity in the red blood cell as a model to determine the linear relationship between the sample size of red blood cell and the activity of the cholinesterase, sample size ranged between (0.05 to 0.2 ml) was the best size of the sample 0.2 ml to measure activity of cholinesterase in the red blood cell. Cholinesterase activity used in the red blood cells as a model to determine the linear relationship between the time of incubate and activity of cholinesterase, 30 minutes was the best time of the incubate and the size of the 0.2 ml sample to measure the activity of cholinesterase the in red blood cells. Addition of Acetic acid (50 µmol/ml) to the reaction mixture of erythrocytes and Homogenized brain tissue linearly and gradually decreased the pH between the values 8 and 7. Recorded a significant difference in the cholinesterase activity, in red blood cells when comparing between acetylthiocholine iodide and acetylcholine iodide as substrates. Did not notice any significant change in the activity of the yeast with the use of both heparin and EDTA the anticoagulant. To illustrate the accuracy of the way Electrometric method was the coefficient of variation in plasma, red blood cells and whole blood (18.1, 11.2, 12.1)%, respectively when using 0.1 ml acetylcholine iodide as the basis of 7.5% in the reaction mix for the current study. Quinidine sulfate used to inhibition pseudo choinesterase ctivity in the red blood cell and plasma for male adult cats the percentage of pseudo choinesterase ctivity (12, 9.1)%, respectively, while the true cholinesterase activity is (88, 90.9)%, respectively. These results indicate that the used of modified electrometric method for measurement of ChE activities in adult male cats is simple, precise and efficient.

المقدمة

يعد قياس نشاط خميرة الكولين استراز في الدم ذا أهمية كبيرة في مراقبة وتقييم وتشخيص حالات التسمم بالمبيدات الفسفورية العضوية والكارباميتية في الإنسان والحيوان وخاصة في المراحل الأولى من التسمم حيث أن علامات التسمم غير واضحة (1، 2، 3، 4) ويعد انخفاض نشاط الخميرة في بلازما الدم أو كريات الدم الحمر بنسبة 25–30% دليلاً على التعرض لأحد هذه المركبات السامة (5، 6، 7)، وعليه فقد ظهرت طرائق عديدة لقياس نشاط الخميرة في الدم والأنسجة، المختلفة أهمها طريقة هسترين اللونية (8) وطريقة المان اللونية (9) والطريقة الراديومترية (10)، وطرقة مايكل (11) فضلاً عن الطريقة الكهرومترية Electrometric method وأساس هذه الطريقة هو تحلل الأستيل كولين إلى كولين Choline وحمض الخليك Acetic acid بواسطة حميرة الولن استراز، ويسبب حمض الخليك إنخفاض البأها pH في مزيج التفاعل Reaction mixture (12). وتمتاز الطريقة الأخيرة بكونها طريقة دقيقة وموثوق بها وسهلة وغير مكلفة ولا تحتاج إلى أجهزة معقدة فقط جهازي مقياس الدالة الحامضية pH meter والحمام المائي Water bath. إن طريقة مايكل الأصلية (11) تم تطبيقها بصورة ناجحة على عينات مأخوذة من دم الإنسان، في حين لا يمكن تطبيقها بصورة مباشرة على عينات لمختلف فصائل الحيوانات (13، 14، 15، 16) بسبب الاختلاف الطبيعي Inherent في نشاط خميرة الكولين استراز في الدم والأنسجة بين فصائل الحيوانات المختلفة (12، 13). وعليه فقد ظهرت تحويرات عديدة على الطريقة الكهرومترية لمايكل تركزت على

إستخدام محاليل دارئة مختلفة التركيب والقوة فضلاً عن تغيير حجم العينة الداخلة في التفاعل مع إستخدام أوقات مختلفة من الحضن وبدرجات حرارة متباينة (16، 17). ومن أهم التحويرات تلك التي قام بها (12) بزيادة درجة حرارة الحضن من 20م°إلى37م° وزيادة حجم عينة الدم في التفاعل وتقليص مدة الحضن وحسب نوع الحيوان. وقام (18) وكذلك (12) بتحوير إضافي على هذه الطريقة، بتكييف أحجام المحاليل والنماذج لجعلها أكثر ملائمةً للعمل المختبري السريع، وطبقت هذه الطريقة على الأغنام (12، 19). وقام (18) بتعديل إضافي على الطريقة الكهرومترية بإلغاء فترة الحضن الأولى التي تستغرق عشر دقائق (بدون المادة الأساس) لتكون فترة القياس أقصر ولجعل الطريقة أكثر ملائمة لقياس التثبيط الناتج عن التعرض للمركبات الفسفورية العضوية والكارباميتية، وشهد التعديل الأخير تطبيقه في دم الأغنام (19)، إلا أنه لم يتم فحص وتطبيق الطريقة الكهرومترية المحورة في القطط، وما للقطط من أهمية وعلاقة وطيدة مع الإنسان في بيئته لذلك تم إجراء هذه الدراسة لبيان كفاءة الطريقة Efficiency وشرعيتها Validity في قياس النشاط الطبيعي للخميرة في عينات دم ذكور القطط البالغة.

المواد وطرائق العمل

استخدمت في هذه الدراسة ذكور القطط البالغة السائبة التي تم جمعها من سهل نينوى، تراوحت أوزانها بين 2.5– 3.8 كغم، جمعت ووضعت في أقفاص بحجم 100 × 50 × 50 سم^3 وتم تغذيتها بغذاء مركز خاص بالقطط والكلاب من إنتاج شركة Hi-Tek Rotions، الولايات المتحدة. جمعت عينات الدم من الوريد الوداجي ثم وضعت في أنابيب تحتوي على محلول الهيبارين– صوديوم Heparin – sodium (5000 وحدة دولية/ مل) إنتاج شركة B.Braun Melsungen، المانيا. والمخفف بنسبة 10:1، ومجموعة الثانية EDTA (1ملغم/ مل من الدم) (Ethylene diamine tetra acetic acid) شركة فلوكا Fluka، سويسرا بالمحلول الملحي الفسلجي ثم وضعت في الثلج المجروش وبعد الحصول على عينات الدم فصلت كريات الدم الحمراء مباشرتاً عن باقي مكونات الدم باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/ الدقيقة، لمدة 15دقيقة، واستخدمت عينات الدم لغرض قياس النشاط الطبيعي لخميرة الكولين استراز في عموم الدم Whole blood والبلازما وكريات الدم الحمر لذكور القطط البالغة، تم قياسها في نفس اليوم الذي جمعت فيه العينات وكان عددها تسعة عينات بإستخدام الطريقة الكهرومترية المحورة (19)، والتي تشتمل على وضع 3 مل من الماء المقطر في إناء زجاجي سعته 10 مل، يليه إضافة 0.2 مل العينة المراد قياسها، ثم إضافة 3 مل من محلول دارئ الفوسفات ذو الدالة الحامضية 8.1 المكون من إضافة هي 0.309 غم باربيتون الصوديوم Sodium barbiton شركة (B.D.H)، انكلترا و0.041 غم فوسفات البوتاسيوم ثنائي الهدروجين KH_2PO_4 شركة (B.D.H)، انكلترا، و8.768 غم من كلوريد الصوديوم Nacl شركة (B.D.H)، انكلترا، يكمل الحجم إلى 225 مل من الماء المقطر، وبعدها عدلت الدالة الحامضية للمحلول النهائي إلى 8.1 باستخدام حمض الهيدروكلوريك 0.1 عياري أو بمحلول هيدروكسيد الصوديوم حسب الدالة الحامضية للمحلول، وأكمل الحجم إلى 250 مل بإضافة الماء المقطر. بعدها قيست الدالة الحامضية–1 (1 –pH) للمزيج بوساطة جهاز مقياس الدالة الحامضية PH meter شركة هانا HANNA، ثم أضيف 0.1 مل من محلول يوديد الاستيل كولين 7.5% لعينات كريات الدم الحمر شركة (B.D.H)، انكلترا (كمادة أساس) والمجموعة الثانية يوديد الاستيل ثايوكولين Acetylthiocholine iodide شركة (B.D.H)، انكلترا. نقل المزيج إلى الحمام المائي شركة elektro. mag، تركيا المضبوط عند درجة حرارة 37°م، وحضنت لمدة 30 دقيقة، بعدها قيست الدالة الحامضية –2 (2 – pH) بعد إخراج العينة مباشرة من الحاضنة. يحسب مقدار التغيير في قيمة الدالة الحامضية حسب المعادلة التالية $\Delta pH/30min = (pH2-pH1) - \Delta pH$ of blank. كذلك تم قياس خميرة الكولين استراز في

كريات الدم الحمر كنموذج لتحديد العلاقة الخطية بين حجم عينة كريات الدم الحمر ونشاط الخميرة، وتراوحت حجم العينة من (0.05 إلى 0.4 مل) لقياس نشاط خميرة الكولين استراز في كريات الدم الحمر. كذلك تم استخدم خميرة الكولين استراز في كريات الدم الحمر كنموذج لتحديد العلاقة الخطية بين وقت الحضن ونشاط الخميرة، من وقت (صفر – 60 دقيقة) وبحجم العينة 0.2 مل لقياس نشاط خميرة الكولين استراز في كريات الدم الحمر. جُمعت عينات كريات الدم الحمر ومجانسة الدماغ من عشرة قطط، شملت المعايرة Titration عشرة عينات لكل من كريات الدم الحمر ومجانسة الدماغ. وتمت المعايرة باستخدام محلول حمض الخليك (0.3 مل حمض الخليك المركز/100 مل ماء مقطر)، وذلك بإضافة 20 مايكروليتر من حمض الخليك المخفف في كل مرة ولغاية 200 مايكروليتر لمزيج التفاعل للعينات، الذي يحتوي على كافة المحاليل عدا المادة الأساس (يوديد الاستيل كولين). وبعد كل إضافة لحمض الخليك، يتم حضن المزيج لمدة 30 دقيقة، ثم تقاس الدالة الحامضية للمزيج لمعرفة الاستقامة الخطية Linearity ومدى تداخل السعة الدارئة Buffering capacity للمزيج (17، 21، 22). كذلك تم جمع عينات الدم من الوريد الداجي لعشرة قطط ذكور بالغة ثم قسمة كل عينة بين أنبوبتي إختبار، المجموعة الأولى من أنابيب الاختبار تحتوي على محلول الهيبارين– صوديوم Heparin – sodium والمخفف بنسبة 10:1 بالمحلول الملحي الفسلجي، أما المجموعة الثانية فتحتوي على محلول EDTA شركة فلوكاFluka، سويسرا والمخفف (1ملغم/مل من الدم) كمانع تخثر (20) وتم قياس نشاط خميرة الكولين استراز في المجموعتين لكل من البلازما وكريات الدم الحمر بالطريقة الكهرومترية المحورة (21، 22، 23). تم تحديد الدقة Precision في قياس نشاط خميرة الكولين استراز في البلازما وكريات الدم الحمر وعموم الدم في القطط بالطريقة الكهرومترية المحورة، حيث جمعت عينات البلازما وكريات الدم الحمر وعموم الدم من 10 ذكور قطط بالغة، وتم قياس نشاط الخميرة في البلازما وكريات الدم الحمر وعموم الدم. وحُسب معدل نشاط الخميرة Mean والانحراف القياسي Standard deviation فضلاً عن معامل الاختلاف Coefficient of variation كما يأتي:–

$$\text{معامل الاختلاف} = \frac{\text{الانحراف القياسي}}{\text{المعدل}} \times 100 \quad (24)$$

تم تقدير النسبة المئوية لنشاط خميرة الكولين استراز الحقيقة والكاذبة في بلازما دم وكريات الدم لذكور القطط البالغة، حيث جمعت عينات الدم من 10 قطط (ذكور بالغة)، قسمت كل عينة إلى جزئيين أُستخدم الجزء الأول لقياس نشاط خميرة الكولين استراز (كما ذكر سابقاً)، في حين أضيف إلى الجزء الثاني من العينات 40 مايكروليتراً من كبريتات الكويندين (0.1%) Quinidine sulphate شركة سيكما Sigma، امريكا لكل عينة. وبعد ذلك حضنت العينات لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة 37م° لتثبيط نشاط الخميرة الكاذبة (18، 25)، حيث تقوم كبريتات الكويندين بتثبيط خميرة الكولين إستراز الكاذبة في بلازما الدم وكريات دم الحمر تثبيطاً نوعيا (9، 21، 25). تم قياس النشاط الكلي المتبقي لخميرة الكولين استراز في بلازما الدم وكريات دم الحمر (الخميرة الحقيقية)، وحُسب نشاط خميرة الكولين استراز الكاذبة كما يأتي:

نشاط خميرة الكولين استراز الكاذبة = نشاط الخميرة الكلي (بدون كويندين)– نشاط الخميرة الحقيقية (بعد إضافة الكويندين)

- **التحليل الإحصائي:** حللت النتائج إحصائيا باستخدام تحليل التباين Analysis of variance ثم أخضعت النتائج إلى إختبار الفرق المعنوي الأدنى Least significant difference test وكذلك Paired sample T-test (26)، وكان مستوى الاختلاف المعنوي المستخدم لجميع الاختبارات عند مستوى معنوية أقل من 0.05 ($P<0.05$).

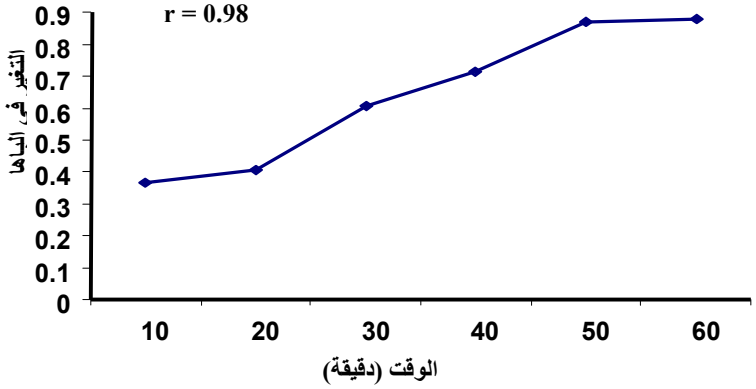
النتائج

- **التجربة الأولى: قياس النشاط الطبيعي لخميرة الكولين استراز في عموم الدم والبلازما وكريات الدم الحمر لذكور القطط البالغة:** يبين الجدول (1) القيم الفردية والمعدل والخطأ القياسي والانحراف القياسي و95% فاصل الثقة والمدى، لنشاط خميرة الكولين إستراز الطبيعي لذكور القطط البالغة حيث بينت النتائج أن أعلى قيم لنشاط الخميرة كان في كريات الدم الحمر 0.63 يليها نشاط الخميرة في عموم الدم 0.49، ثم في بلازما الدم 0.37 على التوالي.

جدول (1) قياس النشاط الطبيعي لخميرة الكولين استراز في عموم الدم والبلازما وكريات الدم الحمر في ذكور القطط البالغة

العينات	ΔpH/ 30 دقيقة		
	عموم الدم	البلازما	كريات الدم الحمر
1	0.48	0.36	0.67
2	0.42	0.36	0.63
3	0.43	0.53	0.62
4	0.56	0.43	0.64
5	0.49	0.32	0.60
6	0.50	0.33	0.66
7	0.59	0.33	0.59
8	0.49	0.36	0.66
9	0.49	0.35	0.60
المعدل	0.49±0.018	0.37±0.022	0.63±0.009
95% فاصل الثقة	0.54-0.45	0.43-0.32	0.65-0.61
المدى	0.17=0.42-0.59	0.21=0.32-0.53	0.08=0.59-0.67

- **التجربة الثانية: تقدير مدة حضن عينة التفاعل وعلاقتها بنشاط خميرة الكولين استراز:** أدى زيادة وقت الحضن من 10 إلى 60 دقيقة في قياس نشاط خميرة الكولين أستراز في عينات كريات الدم الحمر تغيراً في الدالة الحامضية من 0.356 إلى 0.878، وبزيادة طردية وخطية لنشاط الخميرة مع زيادة وقت الحضن وبمعامل توافق r = 0.98 وقد توسطت قيمة التغيير في الدالة الحامضية لكريات الدم الحمر لكل 30 دقيقة مع هذه العلاقة الخطية، لذلك كان وقت الحضن (30 دقيقة) أكثر ملائمةً للقياس من بقية الأوقات(الشكل 1).



شكل (1) خميرة الكولين استراز في كريات الدم الحمر في ذكور القطط البالغة عند أوقات مختلفة للحضن

* تمثل كل قيمة المعدل ± الخطأ القياسي لعشر عينات.

- **التجربة الثالثة: تحديد العلاقة بين حجم العينة ونشاط خميرة الكولين استراز:** تمت إضافة حجوم مختلفة إلى مزيج التفاعل المستخدم لقياس نشاط خميرة الكولين أستراز في عينات كريات الدم الحمر حيث تباينت مابين 0.05 إلى 0.4 مل، وكانت العلاقة مابين نشاط الخميرة وحجم العينة طردية وخطية مع زيادة حجم العينة وبمعامل توافق 0.94= r لكريات الدم الحمر. حيث كان الحجم 0.2 مل عينة التفاعل هو الأنسب وتحت ظروف التفاعل المذكورة سابقاً، حيث ظهر أقصى نشاط ملائم للخميرة ضمن العلاقة الخطية عند هذا الحجم (شكل 2).

الشكل (2) نشاط خميرة الكولين استراز في أحجام مختلفة من كريات الدم الحمر في ذكور القطط البالغة