المجلة العراقية للعلوم البيطرية، المجلد ٢٨، العدد ٢، ٢٠١٤ (١٥٣-١٥٩)

قياس نشاط خميرة الكولين استراز في دم الكلاب السائبة بطريقة كهرومترية

أشرف صديق الياس

كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، الموصل، العراق
Ashrafqahwach@yahoo.com

(الإستلام ٣١ آذار ٢٠١٤؛ القبول ٨ أيار ٢٠١٤)

الخلاصة

كان الهدف من الدراسة الحالية فحص القيم قدرة وكفاءة وشرعية الطريقة الكهرومترية المحورة لاستخدامها في قياس نشاط خميرة الكولين أستراز في دم الكلاب البالغة غير المعاملة لتكون هذه القيم أساساً بشكل اولي لمقارنتها مع قيم نشاط خميرة الكولين أستراز للكلاب التي تتعرض للمبيدات الفسفورية العضوية والكاربميتية في البيئة الطبيعية. تم تطبيق الطريقة الكهرومترية المحورة لقياس النشاط الطبيعي لخميرة الكولين استراز في دم الكلاب البالغة، حيث سجل أعلى نشاط طبيعي للخميرة (التغير في الدالة الحامضية/٣٠ دقيقة) في بلازما الدم (٠,٨١)، ثم كريات الدم الحمر (٠,٧٣) واقلها في عموم الدم (٠,٦٧). وتم ذلك باستخدام ٠,١ مل يوديد الاستيل كولين ٧,٥% كمادة اساس في مزيج التفاعل. ولم يلاحظ أي تغيير معنوي في نشاط الخميرة لدى استعمال كل من الهيبارين أو أي دي تي كمانعي للتخثر. ولبيان دقة الطريقة كان معامل الاختلاف في بلازما الدم وكريات الدم الحمر وعموم الدم (٥,٥%، ٥,٤% و٥%) على التوالي. أدى إستخدام كبريتات الكويندين إلى تثبيط نشاط خميرة الكولين استراز الكاذبة في بلازما دم، كريات الدم الحمر وعموم الدم للكلاب وكانت نسبة نشاط الخميرة الكاذبة (٤%، ٢٨%، ٦%) على التوالي، في حين كانت نسبة نشاط الخميرة الحقيقية (٩٦%، ٧٢%، ٩٤%) على التوالي. سبب إضافة المونوكروتوفوس بتركيز (صفر، ٠,٥ و١ مايكرومول/لتر) والكاربارايل بتركيز (صفر، ٥ و١٠مايكرومول/لتر) إلى مزيج التفاعل لبلازما الدم وعموم الدم (في الزجاج) تثبيطاً معنوياً في نشاط خميرة الكولين استراز. تشير هذه النتائج إلى أن الطريقة الكهرومترية الحالية تمتاز بالدقة والسهولة والكفاءة والشرعية لقياس نشاط خميرة الكولين استراز في الكلاب.

Electrometric method determination of blood cholinesterase activity in stray dogs

A.S. Alias

College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq

Abstract

The aim of the present study was to detect preliminarily the capacity and capability of a modified electrometric method for use in the measurement of cholinesterase (ChE) activity in the blood of adult stray dogs. These values could be used for comparison with the values of cholinesterase (ChE) activity in dogs exposed to organophosphorus and carbamate pesticides. The highest activity of ChE (the change in pH / 30 minutes) in the blood plasma was 0.81, erythrocytes 0.73 and least in the whole blood (0.67).There was no significant difference between EDTA and heparin when used as anticoagulants in blood samples. To illustrate the accuracy of the way the coefficients of variation in blood plasma, erythrocytes and the whole blood were 5.5%, 5.4% and 5%, respectively. This was done using 0.1 ml iodide acetylcholine iodide (7.5%). Quinidine sulfate specifically inhibited pseudo ChE in the plasma, erythrocytes and whole blood, and it was estimated to be (4%, 28%, 6%), whereas true ChE activity was (96%, 72%, 94%). Monocrotophos at a concentration (0.5, 1 µM) and carbaryl at (5, 10 µM) significantly inhibited plasma, erythrocyte and whole blood ChE in vitro. These results suggest that the used modified electrometric method is simple, precise, efficient and have the validity of measuring blood ChE activities in dogs.

Available online at http://www.vetmedmosul.org/ijvs

المقدمة

تعد المركبات الفسفورية العضوية والمركبات الكاربامايتية من المبيدات واسعة الاستعمال في مجال الطب البيطري والزراعة للسيطرة على الحشرات الخارجية الضارة والديدان في الحيوانات المدجنة ولقتل القوارض والأدغال (١-٤). وتسبب هذه المركبات مشاكل التلوث البيئي للانسان والحيوان على حد سواء (٥-٧). واستعمالها الواسع أدى إلى حدوث حالات التسمم بها نتيجة لأستعمالها غير الصحيح والواسع أو التعرض غير المقصود لها (٨،٩) وتظهر حالات التسمم نتيجة لتثبيط نشاط خميرة الكولين استراز من قبل هذه المركبات مؤدياً إلى تجمع الناقل العصبي الاستيل كولين في نهايات الاعصاب ومن ثم ظهور علامات التسمم المسكرينية والنيكوتينية وتلك المرتبطة بالجهاز العصبي المركزي نتيجة التحفيز المفرط للجهاز العصبي الكوليني الفعل مؤديا في النهاية إلى موت الحيوان (٢،٩-١٣). ويعد قياس نشاط خميرة الكولين استراز في الدم ذا أهمية كبيرة في مراقبة وتقييم وتشخيص حالات التسمم بالمبيدات الفسفورية العضوية والكاربامايتية في الإنسان والحيوان وخاصة في المراحل الأولى من التسمم اذ أن علامات التسمم غير واضحة (٧،١٣،١٤) ويمكن عد الانخفاض المعنوي نشاط الخميرة في بلازما الدم أو كريات الدم الحمر بنسبة ٢٥-٣٠% دليلاً على التعرض لأحد هذه المركبات السامة (١٥)، وعليه فقد ظهرت طرائق عديدة لقياس نشاط الخميرة في الدم والأنسجة، المختلفة أهمها طريقة هسترين اللونية (١٦) وطريقة المان اللونية (١٧) والطريقة الراديومترية (١٨) فضلاً عن الطريقة الكهرومترية (١٩). وتمتاز الطريقة الأخيرة بكونها طريقة دقيقة وموثوق بها (شرعية) وسهلة وغير مكلفة ولا تحتاج إلى أجهزة معقدة(فقط جهاز مقياس الدالة الحامضية والحمام المائي وجهاز الطرد المركزي). إن طريقة مايكل الاصلية تم تطبيقها بصورة ناجحة على عينات مأخوذة من دم الإنسان، في حين لايمكن تطبيقها بصورة مباشرة على عينات لمختلف فصائل الحيوانات (١١،٢٠-٢٢) بسبب الاختلاف الطبيعي في نشاط خميرة الكولين استراز في الدم والأنسجة بين فصائل الحيوانات المختلفة (١١،٢٣). 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 (٢٣،٢٤). ومن أهم التحويرات تلك زيادة درجة حرارة الحضن من٢٠م°إلى٣٧م° وزيادة حجم عينة الدم في التفاعل وتقليص مدة الحضن وحسب نوع الحيوان (٢٣). وظهر تحوير إضافي على هذه الطريقة، بتكييف أحجام المحاليل والنماذج لجعلها أكثر ملاءمةً للعمل المختبري السريع (٢٣،٢٥)، وطبقت هذه الطريقة في الأغنام (٢٣،٢٦) وأضيف تعديل أخر على الطريقة الكهرومترية بالغاء فترة الحضن الاولى التي تستغرق عشر دقائق (بدون المادة الاساس) لتكون فترة القياس أقصر ولجعل الطريقة أكثر ملاءمة لقياس التثبيط الناتج عن التعرض للمركبات الفسفورية العضوية والكاربامايتية، وشهد التعديل الاخير تطبيقه في دم الاغنام (٢٦)، إلا أنه لم يتم فحص وتطبيق الطريقة الكهرومترية المحورة في الكلاب، لذلك تم إجراء هذه الدراسة لبيان كفاءة الطريقة وشرعيتها في قياس النشاط الطبيعي للخميرة في عينات دم الكلاب البالغة. فضلاً عن قياس التثبيط في نشاط الخميرة نتيجة التعرض في الزجاج لبعض المثبطات الفسفورية العضوية والكاربامايتية في نماذج دم الكلاب البالغة.

المواد وطرائق العمل

استخدمت في هذه الدراسة سبعة من ذكور الكلاب السائبة البالغة وقد تراوحت أوزانها بين ١٥- ٢٥ كغم، جمعت عينات الدم من الوريد الداجي ثم وضعت في أنابيب تحتوي على محلول الهيبارين - صوديوم Heparin – sodium (٥٠٠٠ وحدة دولية/مل) إنتاج شركة B.Braun Melsungen، المانيا. والمخفف بنسبة (١:١٠) بالمحلول الملحي الفسلجي ثم وضعت في الثلج المجروش وبعد الحصول على عينات الدم فصلت كريات الدم الحمراء مباشرة عن باقي مكونات الدم بإستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة ٣٠٠٠ دورة/الدقيقة، لمدة ١٥ دقيقة، واستخدمت عينات الدم الكلي لغرض قياس النشاط الطبيعي لخميرة الكولين استراز في عموم الدم والبلازما وكريات الدم الحمر، تم قياسها في يوم الجمع نفسة الذي جمعت فيه العينات، بإستخدام الطريقة الكهرومترية المحورة (٢٦)، والتي تشتمل على وضع ٣ مل من الماء المقطر في إناء زجاجي سعته ١٠ مل، يليه إضافة ٠,٢ مل من العينة المراد قياسها، ثم إضافة ٣ مل من محلول دارئ الفوسفات ذي الدالة الحامضية ٨,١ المكون من أضافة هي ١,٢٣٦ غم باربيتون الصوديوم شركة بي، دي، إج (B.D.H)، انكلترا و٠,٠٤١غم فوسفات البوتاسيوم ثنائي الهدروجين KH_2PO_4 شركة بي، دي، إج، و ٣٥,٠٧ غم من كلوريد الصوديوم Nacl شركة بي، دي، إج، يكمل الحجم إلى ٩٠٠ مل من الماء المقطر، وبعدها عدلت الدالة الحامضية للمحلول النهائي إلى ٨,١ باستخدام حمض الهيدروكلوريك (٠,١ عياري) أو بمحلول هيدروكسيد الصوديوم (حسب الدالة الحامضية للمحلول)، وأكمل الحجم إلى ١٠٠٠ مل بإضافة الماء المقطر. بعدها قيست الدالة الحامضية-١ (pH_1) للمزيج بوساطة جهاز مقياس الدالة الحامضية شركة هانا HANNA الرومانية، ثم أضيف ٠,١ مل من محلول يوديد الاستيل كولين ٧,٥% شركة بي، دي، إج، (كمادة أساس)، نقل المزيج إلى الحمام المائي شركة elektro. mag، تركيا المضبوط عند درجة حرارة ٣٧°م، وحضنت لمدة ٣٠ دقيقة، بعدها قيست الدالة الحامضية -٢ (pH_2) بعد إخراج العينة مباشرة من الحاضنة. يحسب مقدار التغيير في قيمة الدالة الحامضية حسب المعادلة الاتية ΔpH of (pH2-pH1)- ΔpH/30min = blank. جمعت عينات الدم من الوريد الداجي لسبعة كلاب أخرى ثم قسمت كل عينة بين أنبوبتي إختبار،

المجموعة الاولى من أنابيب الاختبار تحتوي على مانع تخثر الهيبارين ـ صوديوم والمخفف بنسبة (١:١٠) بالمحلول الملحي الفسلجي، أما المجموعة الثانية فتحتوي على مانع تخثر أي دي تي ئي EDTA شركة فلوكا Fluka، سويسرا والمخفف (١ملغم/مل من الدم) كمانع تخثر(٢٧) وتم قياس نشاط خميرة الكولين استراز بعد إجراء الطرد المركزي وفصل البلازما لوحدها وكريات الدم الحمر لوحدها لكلا عينات المجموعتين بإستخدام الطريقة الكهرومترية المحورة (٢٩،٢٨). تم تحديد الدقة Precision في قياس نشاط خميرة الكولين استراز في البلازما وكريات الدم الحمر وعموم الدم في الكلاب بالطريقة الكهرومترية المحورة، اذ جمعت عينات البلازما وكريات الدم الحمر وعموم الدم من سبعة كلاب، وتم قياس نشاط الخميرة في البلازما و كريات الدم الحمر وعموم الدم بإستخدام مانع تخثرالهيبارين. وحُسب معدل نشاط الخميرة الانحراف القياسي فضلاً عن معامل الاختلاف كما يأتي(٣٠):

$$\text{معامل الاختلاف} = \frac{\text{الانحراف القياسي}}{\text{المعدل}} \times ١٠٠$$

لتقدير النسبة المئوية لنشاط خميرة الكولين استراز الحقيقة والكاذبة في بلازما دم وكريات الدم وعموم الدم للكلاب، جمعت عينات الدم من ٧ كلاب بالغة، قسمت كل عينة إلى جزئيين أُستخدم الجزء الاول لقياس نشاط خميرة الكولين استراز (كما ذكر سابقاً)، في حين أضيف إلى الجزء الثاني من العينات ٤٠ مايكروليتراً من كبريتات الكويندين (٠,١%) Quinidine sulphate شركة سيكما Sigma، امريكا لكل عينة. وبعد ذلك حضنت العينات لمدة (١٠) دقائق بدرجة حرارة ٣٧م° لتثبيط نشاط الخميرة الكاذبة (٣١،٢٥)، حيث تقوم كبريتات الكويندين بتثبيط خميرة الكولين إستراز الكاذبة في بلازما الدم وكريات دم الحمر وعموم الدم تثبيطاً نوعيا(٣٢،٢٩،١٧). تم قياس النشاط الكلي المتبقي لخميرة الكولين استراز في بلازما الدم وكريات دم الحمر وعموم الدم (الخميرة الحقيقية)، وحسب نشاط خميرة الكولين استراز الكاذبة كما يأتي:

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

قياس تثبيط نشاط خميرة الكولين استراز في بلازما الدم و كريات الدم الحمراء وعموم الدم للكلاب البالغة في الزجاج *In vitro* بوساطة مونوكروتوفوس Monocrotophos الزراعي بتركيز ٤٠% من إنتاج شركة Green River، ايطاليا. و المبيد الحشري الكاربارايل ٨٥ % مسحوق، شركة Sociedad Anonima De agroquimicos، اسبانيا. حيث تم حضن خميرة الكولين استراز والمادة المثبطة معاً لمدة ٣٠ دقيقة وبتراكيز صفر (السيطرة) و٠,٥ و١ مايكرومول/لتر للمجموعة المعاملة بالمونوكروتوفوس وبتراكيز صفر (السيطرة) و٥ و١٠ مايكرومول/لتر للمجموعة المعاملة بالكاربريل (٣٢،٢٩،٢٨). حضنت العينات بدرجة حرارة ٣٧°م ولمدة عشر دقائق لإجراء عملية التثبيط حيث كان حجم العينة الداخلة في التفاعل ٠,٢ مل، ثم تم قياس نشاط خميرة الكولين الاستراز المتبقي بالطريقة المحورة المذكورة آنفاً وحسبت النسبة المئوية للتثبيط و كما يأتي:

$$\text{النسبة المئوية لتثبيط نشاط خميرة الكولين استراز} = \frac{\text{نشاط الخميرة لعينة السيطرة (بدون مونوكروتوفوس) - نشاط الخميرة مع المونوكروتوفوس}}{\text{نشاط الخميرة لعينة السيطرة}} \times ١٠٠$$

التحليل الاحصائي

حللت النتائج احصائيا باستخدام تحليل التباين Analysis of variance ثم أخضعت النتائج إلى إختبار الفرق المعنوي الادنى Least significant difference test. وكذلك unpaired sample t-test (٣٣)، وكان مستوى الاختلاف المعنوي المستخدم لجميع الاختبارات عند مستوى معنوية أقل من ٠,٠٥.

النتائج

قياس نشاط خميرة الكولين استراز بطريقة كهرومترية محورة

يوضح الجدول (١) القيم الفردية والمعدل والخطأ القياسي والانحراف القياسي و ٩٥% فاصل الثقة والمدى، لنشاط خميرة الكولين إستراز الطبيعي في الكلاب البالغة. إذ بينت النتائج أن أعلى قيم لنشاط الخميرة كان في بلازما الدم (٠,٨١) يليها نشاط الخميرة في عموم الدم (٠,٧٣)، ثم في كريات الدم الحمر (٠,٦٧).

تأثير الهيبارين و أي دي تي ئي على فعالية الخميرة

لم يظهر إستخدام الـ أي دي تي ئي كمانع تخثر أي إختلاف معنوي في نشاط خميرة الكولين استراز مقارنةً مع العينات التي أُستخدم فيها الهيبارين كمانع تخثر في كلٍ من البلازما وكريات الدم الحمر وعموم الدم. وكما مبين في (الجدول ٢).

تحديد الدقة في قياس نشاط خميرة الكولين استراز في البلازما وكريات الدم الحمر وعموم الدم في الكلاب بالطريقة الكهرومترية المحورة

كان معامل الاختلاف، الذي يشير إلى دقة الطريقة في قياس نشاط خميرة الكولين استراز، في البلازما ٥,٥% وفي كريات الدم الحمر ٥,٤% وفي عموم الدم (٥%) (الجدول٢).

تقدير النسبة المئوية لنشاط خميرة الكولين استراز الحقيقة والكاذبة في بلازما دم وكريات الدم وعموم الدم للكلاب

تم إستعمال كبريتات الكويندين لتثبيط نشاط خميرة الكولين استراز الكاذبة في بلازما الدم، كريات الدم الحمر وعموم الدم أدى ذلك إلى تثبيط نشاط الخميرة الكلي بنسبة ٤%، ٢٨% و٦% على التوالي (الجدول٣).

الجدول (١) قياس النشاط الطبيعي لخميرة الكولين استراز في عموم الدم والبلازما وكريات الدم الحمر في الكلاب

العينات	ΔpH / ٣٠ دقيقة		
	كريات الدم الحمر	البلازما	عموم الدم
١	٠,٦٧	٠,٧١	٠,٧٤
٢	٠,٧١	٠,٨٠	٠,٧٣
٣	٠,٦٧	٠,٨٣	٠,٦٨
٤	٠,٧١	٠,٨٢	٠,٧٦
٥	٠,٦٥	٠,٨٥	٠,٧٨
٦	٠,٦٣	٠,٨٦	٠,٧٥
٧	٠,٦٢	٠,٧٩	٠,٦٩
المعدل	٠,٦٧	٠,٨١	٠,٧٣
الخطأ القياسي	٠,٠١٣٤	٠,٠١٩	٠,٠١٤
الانحراف القياسي	٠,٠٣٦	٠,٠٥٠	٠,٠٣٦
٩٥% فاصل الثقة	٠,٦٩٩-٠,٦٣٣	٠,٨٥٥-٠,٧٦٢	٠,٧٦٧-٠,٦٩٩
المدى	٠,٠٩=٠,٦٢-٠,٧١	٠,١٥=٠,٧١-٠,٨٦	٠,١=٠,٦٨-٠,٧٨

الجدول (٢) نشاط خميرة الكولين استراز (التغير في الدالة الحامضية/٣٠ دقيقة) في البلازما وكريات الدم الحمر في الكلاب، بعد استعمال الهيبارين و أي دي تي ئي كمانعي تخثر

القياسات	نشاط الخميرة في البلازما		نشاط الخميرة في كريات الدم الحمراء		نشاط الخميرة في عموم الدم	
	هيبارين	أي دي تي ئي	هيبارين	أي دي تي ئي	هيبارين	أي دي تي ئي
المعدل	٠,٨٠	٠,٧٩	٠,٦٧	٠,٦٣	٠,٧٣	٠,٧٣
الخطأ القياسي	٠,٠١٧	٠,٠١٩	٠,٠١٣٤	٠,٠٠٨	٠,٠١٤	٠,٠٢١
الانحراف القياسي	٠,٠٤٤	٠,٠٤٩٩	٠,٠٣٦	٠,٠٢٠	٠,٠٣٦	٠,٠٥٥
معامل الاختلاف	٥,٥%	٦,٣%	٥,٤%	٣,٢%	٥%	٧,٥%

تمثل القيم القياسات لسبع عينات في المجموعة الواحدة.

الجدول (٣) تقدير النسبة المئوية لنشاط خميرة الكولين استراز الحقيقية والكاذبة في بلازما دم،كريات الدم الحمراء وعموم الدم الكلاب

القياسات	بلازما الدم		كريات الدم الحمراء		عموم الدم	
	التغير في الدالة الحامضية /٣٠ دقيقة ± الخطأ القياسي	النسبة المئوية لنشاط خميرة الكولين استراز	التغير في الدالة الحامضية /٣٠ دقيقة ± الخطأ القياسي	النسبة المئوية لنشاط خميرة الكولين استراز	التغير في الدالة الحامضية /٣٠ دقيقة ± الخطأ القياسي	النسبة المئوية لنشاط خميرة الكولين استراز
الكولين استراز الكلي (بدون كبريتات الكويندين)	٠,٨١ ± ٠,٠١٩	١٠٠%	٠,٦٧± ٠,٠١٣٤	١٠٠%	٠,٧٣±٠,٠١٤	١٠٠%
الكولين استراز الحقيقي (مع كبريتات الكويندين)*	٠,٧٨ ± ٠,٠١٨	٩٦%	٠,٤٨±٠,٠٠٧	٧٢%	٠,٦٨٥ ± ٠,٠١٨	٩٤%
الكولين استراز الكاذب	٠,٠٤ ± ٠,٠١٨	٤%	٠,١٩±٠,٠١٦	٢٨%	٠,٠٤٤ ± ٠,٠١١	٦%

* تم استخدام كبريتات الكويندين لتثبيط نشاط خميرة الكولين استراز الكاذبة.
تمثل القياسات المعدل ± الخطأ القياسي لسبع عينات للمجموعة الواحدة.

وتمثل هذه النسبة ظاهرياً نسبة خميرة الكولين استراز الكاذبة، في حين بلغت نسبة خميرة الكولين استراز الحقيقية ٩٦%، ٧٢% و٩٤% من النشاط الكلي للخميرة في البلازما وكريات الدم الحمر وعموم الدم على التوالي (الجدول ٣).

قياس تثبيط نشاط خميرة الكولين استراز في البلازما وكريات الدم الحمر في الزجاج بوساطة المونوكروتوفوس والكاربايريل

التثبيط بالمونوكروتوفوس

أدى اضافة المونوكروتوفوس في الزجاج بالتراكيز (صفر، ٠,٥، ١) مايكرومول/لتر إلى مزيج التفاعل الخاص بقياس نشاط خميرة الكولين استراز في البلازما أو عموم الدم إلى تثبيط معنوي في نشاط الخميرة، واعتماداً على تركيز المادة المثبطة مقارنة بمجموعة السيطرة، وكانت نسبة التثبيط في عموم الدم أعلى من نسبة التثبيط في بلازما الدم (الجدول ٤).

التثبيط بالكاربايريل

أدى إضافة الكاربايريل في الزجاج بالتراكيز (صفر، ٥، ١٠) مايكرومول/لتر إلى مزيج التفاعل الخاص بقياس نشاط خميرة الكولين استراز في البلازما أو عموم الدم إلى تثبيط معنوي في نشاط الخميرة واعتماداً على تركيز المادة المثبطة مقارنة بمجموعة السيطرة (الجدول ٥).

الجدول (٤) نشاط خميرة الكولين استراز في البلازما وكريات الدم الحمر للكلاب البالغة في الزجاج بوساطة الكاربريل

تركيز الكاربريل (مايكرومول/لتر)	بلازما الدم		عموم الدم	
	التغير في الدالة الحامضية /٣٠ دقيقة	النسبة المئوية للتثبيط	التغير في الدالة الحامضية /٣٠ دقيقة	النسبة المئوية للتثبيط
صفر	٠,٨٠ ± ٠,٠١٧	صفر	٠,٧٣ ±٠,٠١٤	صفر
٥	٠,٤٧ ± ٠,٠٠٩*	٤١%	٠,٣٢ ± ٠,٠١١*	٥٦%
١٠	٠,٣١ ± ٠,٠٠٨*أ	٦١%	٠,٢٣ ± ٠,٠١٢*أ	٦٩%

القياسات تمثل المعدل ± الخطأ القياسي لسبع عينات ضمن المجموعة الواحدة،
* القيم تختلف معنوياً مقارنة مع قيم مجموعة السيطرة عند مستوى احتمال أقل من ٠,٠٥.
أ القيم تختلف معنوياً مقارنة مع قيم المجموعة المعاملة بتركيز ٥ مايكرومول/لتر عند مستوى احتمال اقل من ٠,٠٥.

الجدول (٥) نشاط خميرة الكولين استراز في البلازما وكريات الدم الحمر للكلاب البالغة في الزجاج بوساطة المونوكروتوفوس

تركيز المونوكروتوفوس (مايكرومول/لتر)	بلازما الدم		عموم الدم	
	التغير في الدالة الحامضية /٣٠ دقيقة	النسبة المئوية للتثبيط	التغير في الدالة الحامضية /٣٠ دقيقة	النسبة المئوية للتثبيط
صفر	٠,٨٠ ± ٠,٠١٧	صفر	٠,٧٣ ±٠,٠١٤	صفر
٠,٥	٠,٧٣ ± ٠,٠١٣*	٩%	٠,٦٨ ± ٠,٠٠٨*	٧%
١	٠,٦٥ ± ٠,٠٠٥*أ	١٨%	٠,٥١ ± ٠,٠٠٦*أ	٣٠%

القياسات تمثل المعدل ± الخطأ القياسي لسبع عينات ضمن المجموعة الواحدة،
* القيم تختلف معنوياً مقارنة مع قيم مجموعة السيطرة عند مستوى احتمال أقل من ٠,٠٥.
أ القيم تختلف معنوياً مقارنة مع قيم المجموعة المعاملة بتركيز ٥ مايكرومول/لتر عند مستوى احتمال اقل من ٠,٠٥.

المناقشة

أستخدمت في هذه الدراسة الطريقة الكهرومترية المحورة عن طريقة مايكل الأصلية (١٩) لقياس نشاط خميرة الكولين استراز في البلازما وكريات الدم الحمر، كونها طريقة موثوق بها ودقيقة وبسيطة وغير مكلفة، ويمكن تكرارها ولاتحتاج لأجهزة معقدة عدا مقياس الدالة الحامضية والحمام المائي (٣٤,٢٦,٢٣,٢١) فطريقة مايكل الأصلية (١٩) يمكن تطبيقها بصورة ناجحة على عينات مأخوذة من الإنسان (بلازما أو كريات دم حمر)، على حين لايمكن تطبيقها وبصورة مباشرة على عينات لمختلف فصائل الحيوانات وذلك بسبب الاختلاف الطبيعي في نشاط خميرة الكولين استراز في الدم والأنسجة بين الفصائل اذ ينعدم نشاط

خميرة الكولين استراز في كريات الدم الحمر في الدواجن والطيور الأخرى بعكس اللبائن (٣٥,٢١,١٥). واعتمدت الطريقة الكهرومترية الحالية على التحويرات السابقة (٢٤). لقياس نشاط خميرة الكولين استراز في دم الحيوانات الحقلية مثل (الأبقار والأغنام والماعز)، واعتمد التحوير على زيادة درجة حرارة الحضن إلى ٣٧م° وزيادة حجم عينة التفاعل وتقليص مدة الحضن إلى فترات مابين (١٥–٤٥) دقيقة (٢٤). لذا فإن التحويرات التي اجريت في الطريقة الكهرومترية الحالية من اختزال فترة الحضن الى ٣٠ دقيقة وتغير في المحلول الدارئ مع زيادة حجم عينة التفاعل تفيد في جعل الطريقة ملائمة في كشف التثبيط الناتج من قبل المبيدات الكارباميتية في نشاط خميرة الكولين استراز في الكلاب السائبة (٢٦). سجل أعلى نشاط طبيعي للخميرة (التغير في الدالة الحامضية/٣٠ دقيقة) في بلازما دم (٠,٨١)، ثم كريات الدم الحمراء (٠,٧٣) واقلها في عموم الدم (٠,٦٧) (٤). ولم يلاحظ أي تغيير معنوي في نشاط الخميرة لدى استعمال مانعي التخثر الهيبارين و أي دي تي أي وهذا يتوافق مع كل من الباحثين (٢١,١٤,٤). ولبيان دقة الطريقة كان معامل الاختلاف في بلازما الدم وكريات الدم الحمر وعموم الدم (٥,٥%، ٥,٤% و ٥%) على التوالي وهذا يتوافق مع الباحثين (٢٦,٢٤,٤). ان معامل الاختلاف يمثل نسب دقة الطريقة داخل المختبر الواحد. إستخدام كبريتات الكويندين يؤدي إلى تثبيط نشاط خميرة الكولين استراز الكاذبة حيث تختلف هذه النسب من حيوان إلى أخر وهذا ما أتفق علية الباحثون (٣٧,٣٦,٢٢,٤) في بلازما دم، كريات الدم الحمر وعموم الدم للكلاب وكانت نسبة نشاط الخميرة الكاذبة (٤%، ٢٨%، ٦%) على التوالي، في حين كانت نسبة الخميرة الحقيقية في بلازما دم، كريات الدم الحمر وعموم الدم للكلاب (٩٦%، ٧٢%، ٩٤%) أدى إضافة المبيد الفسفوري العضوي المونوكروتوفوس بالتركيزين (٠,٥ و١مايكرومول/لتر) إلى مزيج التفاعل لبلازما الدم وعموم الدم (في الزجاج) تثبيط معنوي في نشاط خميرة الكولين استراز بنسبة (٤٢%،٦١%) و(٥٦%، ٦٩%) على التوالي، والكاربارايل بالتركيزين (٥ و١٠مايكرومول/لتر) إلى مزيج التفاعل لبلازما الدم وعموم الدم (في الزجاج) إلى تثبيط معنوي في نشاط خميرة الكولين استراز بنسبة (٩% و ١٨%) و(٧%، ٣٠%) على التوالي وهذا يوافق كل من (٣٨,٣٢,١٤,٦,٥). تشير هذه النتائج إلى أن الطريقة الكهرومترية الحالية تمتاز بالدقة والسهولة والكفاءة والشرعية لقياس نشاط خميرة الكولين استراز في دم الكلاب، فضلاً عن قدرة الطريقة على الكشف عن التثبيط الحاصل في نشاط الخميرة نتيجة التعرض للمركبات الفسفورية العضوية والكاربامية.

الشكر والتقدير

اشكر كل من ساعدني في إنجاز هذا البحث (كلية الطب البيطري/جامعة الموصل) التي زودتني بالأجهزة المختبرية والمواد الكيماوية وما قدمه الأستاذ الدكتور فؤاد قاسم محمد من توجيهات سديدة ورعاية كريمة.

المصادر

1. Nalon MP, Roberson EL. External Parasite Control. In:Booth, N. H. and McDonald, L. E. (Editors). Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 5th ed., Iowa State University Press, Ames, Iowe;1982; pp:892-927.
2. Moretto A. Experimental and clinical toxicology of anticholinesterase. Toxicol. Lett. 1988. 102-103:509-513.
3. Wilson BW. Cholinesterase Inhibition. In: Wexler, P. (editors). Encyclopaedia of Toxicology, Vol.Academic Press, San Diego.1998; pp. 326-340.
4. Fernando Tecles, Ca´ndido Gutie´rrez Panizo, Silvia Martı´nez Subiela, Jose´ J. Cero´n. Effects of different variables on whole blood cholinesterase analysis in dogs. J Vet Diagn Invest. 2002;14:132–139.
5. WHO. Organophosphorus Insecticides: A General introduction. World Health organization, Geneva.1986a; pp.13-181.
6. WHO. Carbamate Pesticides: A General Introduction, Environmental Health Criteria. No. 64. Geneva. 1986b.
7. Lotti M. Cholinesterase inhibition : complexities in interpretation. Clin. Chem. 1995; 41/12: 1814-1818.
8. Keck G, Lorgue G, Jaussaud P Toxicological field datd in ruminants. In: Ruckebusch, Y, Totain, P-L , Koritz GD. (Editors), Veterinary Pharmacology and Toxicology. MTP Press. Ltd., Boston;1983. p. 733-736.
٩. محمد، فؤاد قاسم والخفاجي، نزار جبار. علم السموم البيطرية، جامعة الموصل،الموصل، العراق، ٢٠٠١.
10. Perry AS, Iyamamoto, Ishaya RY. Anticholinestrases : Organophosphate and carbamate insecticides. In: Insecticides in agriculture and environment. Chapters. 1998; p:11-12.
11. Wlison BW. Clinical enzymology. In: Leob WF, Guimby FW. (editors), The Clinical Chemistry of Laboratory Animals, Taylor and Francis, Philadelphia, PA, USA;1999. Pp: 399-454.
12. Guilhermino L, Barros P, Silva MC, Soares A: Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned Biomarkers. 1998;3:157–163.
13. Tilson HA. New horizons: Future directions in neurotoxicology. Environ. Health Perspect. 2000; 108: 439-441.
14. Furlanello T, Simonato G, Caldin M, Lorenzi De D, Lubas G, Bernardini D ,Solano- Gallego L.Validation of an automated spectrophotometric assay for the determination of cholinesterase activity in canine serum.Vet Res Communi.,30,2006;723-733.
15. Wilson BW, Hooper MJ, Hansen ME. Reactivation of organophosphates inhibited Acetylcholinesterase with Oximes. In: Chamber Academic Press, New York.1992; pp: 110-135.
16. Hestrin S. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytical application. J Biol Chem.1949; 189:249-261.
17. Ellman G L, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetyl cholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 1961;7:88-95.
18. Johnson CD, Russel RL. A rapid simple radiometric assay for cholinesterase suitable for multiple determinations. Anal. Biochem. 1975;64:229-238.
19. Michel HO. An electrometric method for the determination of the cell and plasma cholinesterase activity. J Lab Clin Med. 1949; 34:1564-1568.
20. Wills JH. The measurement and significance of changes in the cholinesterase activities of erythrocytes and plasma in man and animals. CRC Critical Rev. Toxicol. 1972;1:153-202.

21. Fairbrother A, Marden BT, Bennett JK, Hooper MJ. Methods used in determination of cholinesterase activity. In: Mineau, P.(editors), Cholinesterase- Inhibiting Insecticides. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV. 1999; pp: 35-71.
22. Wilson BW, Henderson JD, McCarthy SAM, Billitti JE. Cholinesterase and agriculture. In: Humans, laboratory animal, wildlife. In: Doctor BP. (eds).Structure and Function of Cholinesterase and Related Proteins Plenum Press, New York; 1998; pp:539-546.
23. Mohammd F K, St Omer V E V. Modifications of Michel's electrometric method for rapid measurement of blood cholinesterase activity in animals: A mini review. Vet Hum Toxicol. 1982;24:119-121.
24. Silvestri G. New techniques to measure blood cholinesterase activity in domestic animals. Am. J Vet Res. 1977; 38: 659-662
25. Mohammad FK. Interaction of Organophosphorus Insecticide (Ciovap) and Phenothiazine Anthelmentic In Sheep with or without Haemonchus and Trichostrongylus Species Infection. M. Sc. Thesis, University of Missouri, Columbia, MO, U. S. A. 1981; pp: 36-41.
26. Mohammad FK, Faris GA-M, AL- Kassim NA.A modified method for measurement of erythrocyte acetylcholinesterase activity in sheep. Vet Hum Toxicol. 1997; 36:337-339.
27. Coles EH. Veterinary Clinical Pathology, 4th ed., W. B. Saunders Company, Philadelphia.1986; pp: 12-57.
28. Ahmed OAH. Modification and application of an electrometric cholinesterase method for monitoring exposure to organophosphate and carbamate insecticides. MSc. Thesis, Mosul University, Mosul, Iraq. 2001.
٢٩. عباس، قاسم سكران. طريقة كهروميترية لقياس نشاط خميرة الكولين استراز في بلازما الدم والأنسجة في أفراخ الدجاج وتأثرها بمثبطاتها الدايكلورفوس والكاربارايل، أطروحة ماجستير، جامعة الموصل، الموصل، العراق،٢٠٠٠.
30. Petrie A. Lecture Notes on Medical Statistics. Black well Scientific Publications, Oxford.1978.
31. Scarsella G, Toschi G, Bareggi SR, Giacobin,i E. Molecular forms of cholinesterase in cerebrospinal fluid, blood plasma, and brain tissue of the beagle dog. J Neurosci Res.1979; 4:19-24.
٣٢. الجبوري، محمد مرعي حسن. قياس نشاط خميرة الكولين استراز في دم الماعز بطريقة كهرومترية : التثبيط بالمبيدات الفسفورية العضوية والكاربامايتية، رسالة ماجستير جامعة الموصل، الموصل، العراق، ٢٠٠٤.
33. Runyon RP. Non Parametric Statistics:Acotemporary Approach Addison–Wesley publishing Co., Reading, Massachusetts.1977;42 – 44, 83–87.
34. Faris G A M. The use of an electrometric method for measuring cholinesterase activity in rats treated with organophosphates and carbamate. Iraqi. J Vet Sci. 2003;17:7-15.
35. Pickering CE, Pickering RG. The interference by erythrocyte "Acetylthiocholinesterase" in the estimation of the blood cholinesterase activity of the chicken. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1977;39:229-237.
36. Farage – Elawar M, Francis MB. Effect of multiple dosing of fenthion, fenitrothion, and desbromoleptophos in young chicks. J Toxicol Environ Health. 1988;23:217-228.
37. Kolf-Clauw M, Jez S, Ponsart C, Delamanche IS. Vet Hum Toxicol.Acetyl- and pseudo-cholinesterase activities of plasma, erythrocytes, and whole blood in male beagle dogs using Ellman's assay 2000;42(4):216-9.
٣٨. كتا، أمجد الياس وأشرف صديق الياس.استخدام الطريقة الكهرومترية في قياس نشاط خميرة الكولين استراز في القطط. مجلة الأنبار للعلوم البيطرية، المجلد (٦)، العدد(١),٢٠١٣.ص٢٣٠-٢٤١