آنزیم کولین استراز پلاسما و تعیین فعالیت آن به روش اسپکتروفتومتری در موارد مشکوک به مهار این آنزیم

دکتر اسماعیل علمی آخونی

دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران (گروه بیوشیمی)

پژوهشگاه علوم انسانی و مطالعات فرهنگی
پرتال جامع علوم انسانی

خلاصه

تعیین فعالیت آنزیم کولین استراز، با افزایش و تنوع آلاینده‌های شیمیایی، اعم از حشره‌کشها، سموم گیاهی و سایر مهارکننده‌های این آنزیم مورد توجه روزافزون است.

در این مقاله ضمن نگاهی اجمالی بر خصوصیات این آنزیم، یک طریقه حساس و ساده اندازه‌گیری آن بدون استفاده از کیتهای تجارتی ارائه می‌گردد تا پاسخگوی نیاز پزشکان و بیماران در موارد مشکوک به مسمومیت با ترکیبات مهارکننده آنزیم کولین‌استراز گردد.

مقدمه

کولین استرازها گروهی از آنزیمها هستند که عمل کاتالیز و هیدرولیز استرهای کولین را به عهده دارند و برحسب خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی آنها به دو گروه تقسیم می‌گردند:

استیل کولین استراز یا کولین استراز حقیقی که در انتقال عصبی سیستم عصبی حرکتی سوماتیک و خودکار نقش داشته و در اریتروسیت‌ها نیز یافت می‌شود و کولین استراز کاذب که در پلاسما وجود دارد و چون سوبسترای بوتیریل کولین را سریعتر از استیل کولین کاتالیز می‌کند به بوتیریل کولین استراز نیز معروف است. کولین استراز پلاسما به نسبت کمتری از استیل کولین استراز در گونه‌های مختلف پراکنده است. در انسان و سایر پستانداران بیشترین حد فعالیت آن در پلاسما و کبد بوده و سنتز آن عمدتاً در کبد صورت می‌گیرد (۱).

سطح فعالیت آنزیم کولین استراز پلاسما در مسمومیت با سموم اورگانوفسفره به حساسیت آن نسبت به اثر اورگانوفسفات برمی‌گردد. ترکیبات اورگانوفسفره قادرند بطور برگشت‌ناپذیری موجبات مهار این آنزیم را فراهم نمایند. این ارتباط سبب می‌گردد که کاهش فعالیت آنزیم قبل از ظهور علائم مسمومیت بتواند نقش هشداردهنده ایفا نموده و یا به تشخیص و درمان مسمومیتهای حاد با سموم مهارکننده این آنزیم یاری رساند (۲).

از سوی دیگر کولین‌استراز پلاسما نقش مهمی در تجزیه سوکسینیل کولین دارد. استفاده از این دارو به عنوان شل کننده عضلانی در جراحیها و در افرادی که دچار کاهش فعالیت آنزیم بطور ارثی و یا اکتسابی می‌باشند، سبب افزایش طول مدت آپنه می‌گردد که حتی ممکن است به مرگ بیانجامد، بنابراین اطلاع از میزان فعالیت این آنزیم قبل از اعمال جراحی نیز امری ضروری است (۳).

روشهای اندازه‌گیری کولین‌استراز پلاسما:

برای اندازه‌گیری این آنزیم روشهای مختلفی ارائه گردیده است که مهمترین آنها عبارتند از: روشهای الکترومتری، تیترومتری، اسپکتروفتومتری UV، کالریمتری و گاز کروماتوگرافی می‌باشد (۴).

روشهای الکترومتری و تیترومتری به علت عدم برخورداری از دقت و حساسیت لازم و نیز وقت‌گیر بودن فاقد کارآیی لازم می‌باشند.

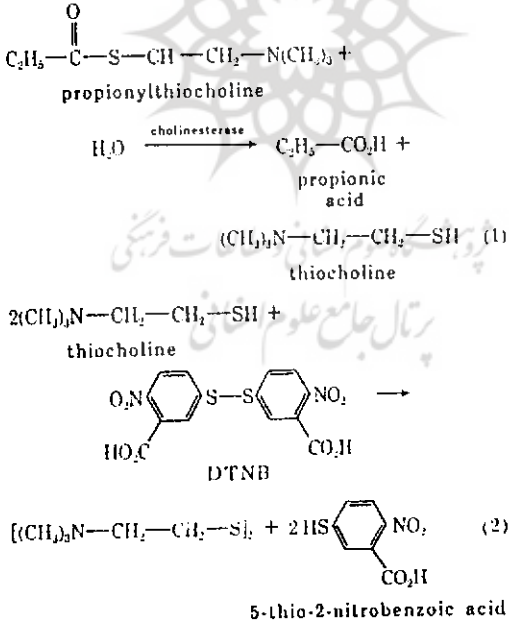
روش کالریمتری در مقایسه با روش

اسپکتروفتومتری UV و گاز کروماتوگرافی از امتیازات بیشتری برخوردار است. زیرا این روش علاوه بر برخورداری از سرعت و حساسیت لازم، انجام آن با دستگاههای ساده‌تری (نسبت به اسپکتروفتومتری UV و گاز کروماتوگرافی) میسر است.

روش مورد بحث یک روش کالریمتری است که به روش المن (Ellman) معروف است (۵).

اساس روش اندازه‌گیری آنزیم به روش Ellman

در این روش مجاورت کولین استراز با پروپیونیل تیوکولین سبب هیدرولیز آن به اسید پروپیونیک و تیوکولین می‌شود. تیوکولین حاصل باعث شکسته‌شدن DTNB در محل اتصال تیولی این مجموعه شده و آن را به ماده رنگی ۵-تیو-۲-نیتروبنزوئیک اسید تبدیل می‌نماید (۲). رنگ زرد حاصله قابل اندازه‌گیری در طول موج ۴۱۰ نانومتر می‌باشد.



شکل ۱ ـ مکانیسم اندازه‌گیری کولین استراز به روش Ellman

مواد و وسایل

۱ـ فسفات بافر

۲ـ سوبسترا

۳ـ معرف رنگی

۴ـ کینیدین فسفات

۵ـ اسپکتروفتومتری

۱ـ فسفات بافر PH=7.6: ۴/۷۳ گرم فسفات دی سدیک و ۱۳/۶۱ گرم فسفات مونوپتاسیک را جداگانه در یک لیتر آب مقطر حل کرده و سپس PH محلول حاصل با اضافه کردن تدریجی فسفات مونوپتاسیک به ۷/۶ می‌رسانیم. برای این منظور حدوداً ۶۰ میلی‌لیتر فسفات مونوپتاسیک کفایت می‌نماید.

۲ـ سوبسترا، پروپیونیل تیوکولین[1] **۲۰ میلی مولار در لیتر:** ۰/۶۰۶۴ گرم از سوبسترا را در صد میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و مقدار اضافی آن را می‌توان در منهای ۱۷ درجه سانتیگراد نگهداری کرد.

۳ـ معرف رنگی DTNB[2] **۰/۴۲۳ میلی‌مول در لیتر:** ۱۶۷ میلی‌گرم DTNB را در یک لیتر بافر فسفات حل کرده و در ظرف قهوه‌ای رنگ در درجه حرارت اطاق و یا ۴ درجه سانتیگراد نگهداری می‌نماییم. این محلول در ۴ درجه سانتیگراد به مدت یکسال پایدار می‌باشد.

۴ـ کینیدین سولفات[3]: ۰/۵ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر.

۵ـ هر نوع اسپکتروفتومتری که بتواند Optical Density (OD) محلولهای حاصل را قرائت نماید.

روش آزمایش

قبل از شروع آزمایش سرم خون را به نسبت یک به صد و سوبسترا را به نسبت یک به دو با آب مقطر رقیق می‌نماییم. برای هر نمونه سرم خون دو لوله پیش‌بینی می‌شود، یک لوله برای بلانک و دیگری برای تست.

سه میلی‌لیتر از معرف DTNB را در هر دو لوله قرار داده می‌دهیم سپس هر دو لوله به مدت ۵ دقیقه در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد (حمام ماری) می‌گذاریم. پس از این مدت یک میلی‌لیتر از محلول سوبسترا به هر دو لوله افزوده و سپس بلافاصله یک میلی‌لیتر سرم فقط به لوله تست اضافه می‌نماییم. بعد از سه دقیقه در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد یک میلی‌لیتر از محلول کینیدین سولفات به هر دو

۱- *Propionylthiocholine*

۲- *5-5' dithiobis - (2-nitrobenzioc Acid)*

۳- *Quinidine Sulfate*

لوله اضافه و مخلوط می‌کنیم و در پایان یک میلی‌لیتر سرم به لوله بلانک اضافه می‌شود. رنگ حاصله در مدت کمتر از نیم‌ساعت در طول موج ۴۱۰ نانومتر در حضور بلانک مربوطه قرائت می‌شود. بطور تجربی مشخص شده است که در حالت طبیعی دانسیته اوپتیک بین ۰/۴ تا ۰/۶ متغیر می‌باشد. در پایان محاسبه نهائی را می‌توان از رابطه زیر بدست آورد:

$$\text{واحد در لیتر} = \frac{\Delta A/min}{۱۳/۶} \times \frac{۶}{۰/۱} = \Delta A/min \times ۱۴۷۱۰$$

در این رابطه ریاضی عدد ۶ حجم نهائی، ۰/۰۱ رقت سرم خون و ۱۳/۶ عدد ثابت جذب میلی‌مولار رنگ حاصل از تیوکولین و DTNB در ۴۱۰ nm می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

در این روش حد طبیعی آنزیم کولین استراز در اشخاص بطور طبیعی عددی بین ۴۰۰۰ تا ۸۰۰۰ واحد بین‌المللی در لیتر تعیین گردیده است. اعداد پایین‌تر از ۴۰۰۰ واحد مشکوک تلقی شده و این میزان هرقدر بیشتر به سمت ۱۰۰۰ واحد در لیتر نزدیکتر شود حکایت از وخامت مسمومیت دارد.

کولین‌استراز پلاسما در شرایطی که هنوز رقیق نشده باشد پایدار بوده بطوری که می‌توان آن را بدون استفاده از یخچال از نقطه‌ای به نقطه دیگر منتقل نمود و در فعالیت این آنزیم مادامی که آلودگی دیگری پیدا ننماید تغییری حاصل نمی‌شود.

به جز در موارد مسمومیت با ترکیبات شیمیایی مهارکننده، کاهش ۳۰ تا ۵۰ درصد فعالیت آن در هپاتیت حاد و مزمن و کاهش ۵۰ تا ۷۰ درصد فعالیت آن در سیروزکارسینومای متاستاتیک مشاهده شده است، در عفونتهای حاد، آمبولی ریه، دیستروفی عضلانی و نیز بیماریهای مزمن کلیه، حاملگی و بعد از اعمال جراحی نیز کاهش آن گزارش گردیده است. پس از حمله قلبی تا پنجمین روز سطح آن کاهش یافته و در صورت بهبودی به تدریج به حد طبیعی باز می‌گردد.

ترکیبات آلی فسفره از جمله پاراتیون، مالاتیون و تتراتیل پیروفسفات قادر به مهار آنزیم کولین‌استراز می‌باشند.

اندازه‌گیری این آنزیم در موارد مشکوک به مسمومیت با سموم گیاهی و نیز قبل از انجام اعمال جراحی و مصرف داروی شل‌کننده عضلانی سوکسینیل کولین مورد تقاضای پزشکان می‌باشد. ولی متأسفانه اندازه‌گیری فعالیت آن جز در مراکز آزمایشگاههای دولتی معدود انجام نمی‌پذیرد.

با عنایت به سادگی حساسیت و سرعت روش توصیه شده، امید می‌رود بکارگیری آن در آزمایشگاههای دیگر نیز بتواند گامی مؤثر در جهت کمک به پزشک و درمان بیماران باشد.

منابع

1 _ *Silver, A; (1974)*

The biology of Cholinesterase. Amesterdom, North Holland Press.

2 _ *Sullivan, J.B., Krieger, G.R., (1992).*

Hazardous Materials Toxicology, P: 1018-1019.

Maryland, williams & wilkins.

3 _ *Bauld, HW, et al. (1974).*

Aetiology of Prolonged apnoea after Suxame thonium.

Br.J. Anaesth, 46: 273-280.

4 _ *Henry. J.B. (1996).*

Clinical Diagnosis and management by laboratory Methods, P: 286-288.

5 _ *Dietz A., Rubinstein HM., Lubrano T., (1973).*

Colorimetric Determinaticm of Serum Cholinesterase and its geuetic variants by the propionylthioCholine-dithiobis (nitrobenzoic) procedure. Clin. Chen 19:1309-1313.

پژوهشگاه علوم انسانی و مطالعات فرهنگی
پرتال جامع علوم انسانی