

عزل انزيم اسيتايل كولين استريز من سائل النخاع الشوكي للأطفال الاصحاء والمصابين بالاستسقاء الدماعي في مدينة الموصل

سيران ستار صالح
قسم الكيمياء/كلية العلوم/ جامعة كركوك

لؤي عبد الهلالي
قسم الكيمياء/كلية العلوم/ جامعة الموصل

ليلاس فرحان بديوي

Sayran_university@yahoo.com

Luayhelaly@yahoo.com

Lelas77244@gmail.com

(أستلم 2018/5/30 ؛ قُبل 2018/11/1)

الملخص

تضمن البحث عزلا جزئيا لإنزيم اسيتايل كولين استريز من سائل النخاع الشوكي للأطفال المصابين بالاستسقاء الدماغي والأصحاء، إذ تم فصل حزمة رئيسة واحدة فقط ذات فعالية عالية بتقنية الترشيح الهلامي للراسب البروتيني الناتج عن ترسيب البروتينات باستخدام كبريتات الامونيوم (70%) بعد عملية الفرز الغشائي عند استخدام عمود الترشيح الهلامي من نوع سيفادكس G-100 وبعدد مرات تنقية وصلت الى (27،17) مرة للمرضى والأصحاء على التوالي، ومن ثم حققت الحزمة الناتجة فيما بعد في عمود الترشيح الهلامي من نوع سيفادكس G-200، وظهر أن هناك حزمتان ذات فعالية للإنزيم لكن الحزمة الثانية اظهرت فعالية اعلى من الحزمة الاولى إذ وصل عدد مرات التنقية للحزمة الثانية الى (33، 24) المرضى والأصحاء على التوالي. كما أوضحت النتائج أن فعالية الإنزيم المفصول من سائل النخاع الشوكي للمرضى اعلى من فعالية الأنزيم المفصول من سائل النخاع الشوكي للأصحاء، وقد استخدمت الحزم البروتينية ذات الفعالية العالية لتحديد الوزن الجزيئي التقريبي للأنزيم باستخدام تقنية الترشيح الهلامي وكان بحدود (163606 ± 4000) دالتون عند استخدام عمود الفصل الحاوي على الهلام من نوع سيفادكس G-200.

الكلمات الدالة: الاستسقاء الدماغي، انزيم اسيتايل كولين استريز، سائل النخاع الشوكي.

Isolation of Acetylcholinesterase Enzyme from Cerebrospinal Fluid of Healthy and Hydrocephalus Disease Patients' Children in Mosul City

*Lelas F. Bdaiwi

*Luay A. Al-Helaly

**Sayran S. Saleh

* Department of Chemistry / College of Science / University of Mosul

** Department of Chemistry / College of Science/ University of Kirkuk

ABSTRACT

The research includes the partial isolation of acetylcholinesterase enzyme, from CSF of hydrocephalus patients and healthy children, the results showed that there was one peak with high activity from gel filtration chromatography using sephadex G-100 for protienous solution resulted from ammonium sulfate precipitation (70%) after dialysis process, with purification folds up to (27,17) times of patients and healthy children respectively.

Another column was used with sephadex G-200 and the results showed two protienous peak for Acetylcholinesterase with purification folds up to (33, 24) times of patients and healthy children respectively, the second protienous peak had higher activity than the first peak.

The results showed also that the enzyme which was isolated from CSF of patients children had a higher activity than the enzyme isolated from CSF of healthy children, the peak with high activity was used to determine the comparative molecular weight using gel filtration chromatography with sephadex G-200. which was (163606 ± 4000) Dalton.

Keywords: Hydrocephalus, Cerebrospinal fluid, Acetylcholinesterase Enzyme.

المقدمة

يعرف مرض الاستسقاء الدماغى Hydrocephalus على انه تجمع غير طبيعى لسائل النخاع الشوكى فى البطينيات Ventricles وتحت العنكبوتية Subarachnoid للدماغ و يكون فى الاغلب مرتبطا بزيادة الضغط داخل الدماغ Increased intracranial pressure (ICP)، ويشخص بإفراز ودوران وامتصاص غير طبيعى لسائل النخاع الشوكى (Tully and Dobyns, 2014). يصنف مرض الاستسقاء الدماغى إلى صنفين هما: الاستسقاء الولادى أو الخلقى Congenital hydrocephalus والاستسقاء الدماغى المكتسب Acquired hydrocephalus (Shim et al., 2016)، وكل صنف يقسم الى قسمين فرعيين بناء على سبب الاستسقاء الدماغى من حيث كون الخلل فى إعادة الامتصاص أو وجود إنسداد معين فى البطينيات (Taboo, 2014) وهذان القسمان اولهما، يسمى الأستسقاء الدماغى غير المتصل أو الأنسدادى Non communicating hydrocephalus : الذى يكون سبب إعاقة سريان أو انسياب سائل النخاع الشوكى هو وجود انسداد فى البطينيات وتحت العنكبوتية. والقسم الآخر يدعى بـ الاستسقاء الدماغى المتصل أو غير الأنسدادى Communicating hydrocephalus: وفى هذه الحالة من الاستسقاء الدماغى يوجد اتصال بين البطينيات وتحت العنكبوتية، وسبب المرض هو قلة امتصاص سائل النخاع الشوكى أو زيادة إنتاج سائل النخاع الشوكى وهذا النوع عادة يصيب الأطفال (Kinsman and Johnston, 2016; Tully and Dobyns, 2014).

وانزيم أسيتايل كولين أستريز (Acetylcholinesterase (AChE) يدعى كذلك بإنزيم أسيتايل كولين هايدروليز (EC3.1.1.7) ويوجد فى منطقة التقاء العضلات والأعصاب والتشابكات العصبية ووظيفته تحليل الناقل العصبى الاسيتايل كولين. إن الإنزيم ليس محددًا بوظيفته الأساسية فى تحليل الأسيتايل كولين فقط ولكن له دورا فى بناء وهدم الخلايا العصبية وله علاقة بمرض الزهايمر، فضلاً عن دوره فى تنظيم موت الخلية المبرمج وانقسام الخلايا وتطورها، وهذا يشير إلى دور إنزيم AChE فى تكوين الأورام السرطانية وتطورها (Zhang and Greenberg, 2012)، وله دور أيضاً فى الإستجابة للتوتر والتفاعلات التى لها علاقة بالآلتهابات. الأسيتايل كولين أستريز له فعالية نوعية عالية ولا سيما عند تحليل مركبات السيرين حيث إن كل جزيئة من الإنزيم تحلل يقرب من 25000 جزيئة من الأسيتايل كولين لكل ثانية (Colevic et al., 2013)، ولهذا الانزيم فعاليات عدة منها كشف التعرض للتسمم بالمبيدات الحشرية مثل مركبات الفسفور العضوية وتشخيص وجود التغيرات الوراثية غير الطبيعية فى هذا الانزيم (Miswon et al., 2015). فضلاً عن كونه مؤشرا حيويًا مهماً لتتبع مختلف أنواع السرطانات والأمراض العصبية ومتابعة تفاقمها وشدتها (Xi et al., 2015).

وتتأتى أهمية هذا البحث من عدم توفر دراسة حول فصل انزيم الاسيتايل كولين استريز عن سائل النخاع الشوكى للأصحاء ومن ثم دراسة صفاته المختلفة ومقارنته مع الانزيم المفصول من مرضى الاستسقاء الدماغى، اذ ويعرف سائل النخاع الشوكى Cerebrospinal fluid (CSF) على انه سائل صافٍ عديم اللون وهو أحد سوائل الجسم الناقلة ويتم إفرازه فى البطينيات وتحت العنكبوتية ويحيط بالدماغ والحبل الشوكى، ويدور سائل النخاع الشوكى فى تجاوب عديدة فى البطينيات،

ومعظم سائل النخاع الشوكي يتكون في آخر بطنينين فرعيين، ثم ينتقل إلى الأخدود الثالث عن طريق الفتحة البطنية، ثم إلى القناة الشوكية والبطين الرابع، ثم يمر السائل خلال ثلاث فتحات إلى التجويف العنكبوتي، إذ ينتقل سائل النخاع الشوكي بطريقة النبضات، ولسائل النخاع الشوكي العديد من الوظائف الحيوية المهمة حيث ان له وظائف مناعية، فيزيائية ميكانيكية، ودفاعية وله دور مهم في التوازن الكيميائي للجسم (Jamalabadi and Keikha, 2016).

المواد وطرائق العمل

1. جمع العينات:

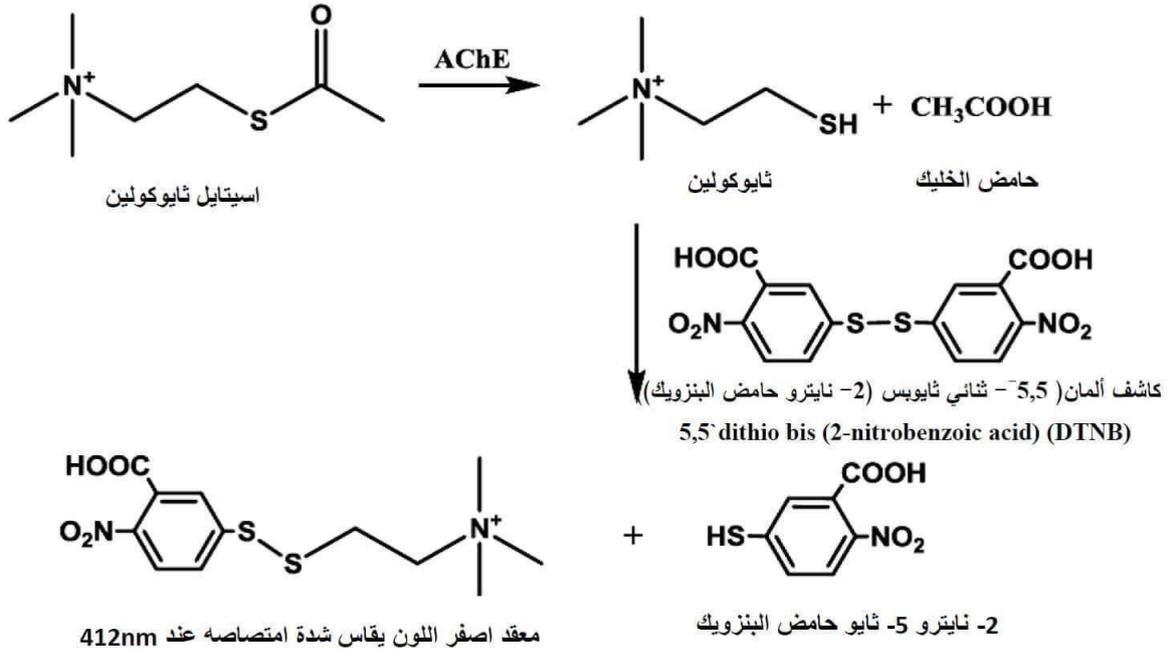
جمعت عينات سائل النخاع الشوكي المستخدمة للفحوصات السريرية من المرضى والأصحاء ظاهرياً تحت اشراف اطباء متخصصين في مستشفى اربيل التعليمي ومستشفى رابرين للأطفال في محافظة اربيل ودونت جميع المعلومات المطلوبة، وضمن الفئة العمرية نفسها كمجموعة سيطرة، وتم جمع العينات من شهر ايار الى شهر تشرين الاول لسنة 2016. اما عينات سائل النخاع الشوكي المستخدمة لفصل وتنقية الانزيم باستخدام التقنيات الحيوية المختلفة فقد تم جمعها من مستشفى ابن سينا التعليمي في الموصل للفترة من شهر اذار الى شهر حزيران سنة 2014. وتم الحصول على عينات سائل النخاع الشوكي للأطفال المصابين بالاستسقاء الدماغية في اثناء اجراء عملية ادخال الصمام او ما يعرف بـ Shunt، اما عينات مجموعة السيطرة فتم سحب سائل النخاع الشوكي بعد تعقيم المنطقة بين الفقرتين الثالثة والرابعة وادخال سرنجة خاصة في تلك المنطقة داخل القناة الشوكية ومن ثم سحب السائل وتسمى تلك الطريقة لعملية السحب بالبزل القطني (Lumbar puncture) (Matata et al., 2012). بعد اخذ السائل تم اجراء عملية طرد مركزي له بسرعة (7000 x g) لمدة (5) دقائق وذلك للحصول على السائل بشكله الرائق واجراء بعض الفحوصات بشكل مباشر وحفظ ما تبقى من السائل فيما بعد بالتجميد عند درجة حرارة 20°C - لحين اجراء عملية عزل الانزيم، اذ كان حجم سائل النخاع الشوكي لمرضى الاستسقاء الدماغية ما بين (5-8) مليلتر لكل عينة ويحدود (5) مليلتر لمجموعة الأصحاء.

2. قياس فعالية انزيم الاسيتايل كولين استريز:

تم قياس فعالية الانزيم حسب طريقة الباحث Ellman (Ellman et al., 1961) التي تعتمد على استخدام كاشف ألمان كما يلاحظ في الشكل ادناه الذي يوضح تفاعل الانزيم مع مادة الأساس اسيتايل ثايوكولين ايوديد (S-Acetylthiocholine iodide) ليعطي ناتجا يتفاعل فيما بعد مع كاشف ألمان ليعطي سائلا معقدا ذي لون اصفر تقاس شدته عند الطول الموجي 412 نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي.

3. عزل وتنقية إنزيم الاسيتايل كولين استريز من سائل النخاع الشوكي : استخدمت تقنيات حياتية مختلفة لعملية عزل الإنزيم وهي كالاتي :

1.3. الترسيب بالإزاحة الملحية بواسطة كبريتات الامونيوم: تعد عملية الترسيب بكبريتات الأمونيوم Ammonium sulphate من المراحل الأولى للتنقية التي يتم خلالها ترسيب البروتينات الموجودة في المستخلص اعتماداً على درجة تشبع المستخلص بكبريتات الأمونيوم (Robyt and White, 1987). وتمت إضافة كبريتات الامونيوم إلى المستخلص الإنزيمي بحالته الصلبة بنسبة تشبع (70%) وكانت الإضافة بصورة تدريجية مع التحريك المستمر بالمحرك الكهربائي لمدة 60 دقيقة عند درجة حرارة 4°C ، ومن ثم ترك المحلول لمدة (24 ساعة) عند درجة حرارة 4°C (في الثلجة) لإتمام عملية الترسيب بصورة كاملة-Al (Helaly, 2007).



الشكل 1: معادلات تفاعل انزيم AChE لقياس فعاليته.

2.3. الفصل بالطرد المركزي المبرد Cooling centrifuge separation: بعد الترسيب تم فصل الراسب عن السائل الرائق بجهاز الطرد المركزي المبرد لقسم علوم الحياة من شركة Andreas Hottich GmbH and Co. KG الألمانية بسرعة 9000 xg ولمدة 45 دقيقة، ثم أذيب الراسب الذي تم الحصول عليه في كمية قليلة من الماء المقطر، وبعد حساب حجم محلول الراسب البروتيني والسائل الرائق الناتج قدرت كمية البروتين بطريقة لاوري المحورة (Schacterle and ollack, 1973) وقيست فعالية إنزيم الاسيتايل كولين استريز في محلول الراسب البروتيني والسائل الرائق باستخدام طريقة الباحثين (Ellman *et al.*, 1961) قبل إجراء خطوات التنقية اللاحقة. ثم حفظ محلول الراسب البروتيني والسائل الرائق في درجة حرارة 20°C- لحين استخدامه في الخطوات اللاحقة.

3.3. الفرز الغشائي (الديليزة) Dialysis: تمت عملية الفرز الغشائي من خلال وضع المحلول البروتيني (الراسب) المحضر في الفقرة (2.3) في أنابيب السيلوفين المغسولة والمحكمة الربط من الأسفل مسبقاً، وبعد وضع العينة في الأنبوب و ربط أعلى الأنبوب بخيط رطباً محكماً، ثم غسل بالماء المقطر وغطس في وعاء حجمي يحتوي على 2.5 لتر من محلول بيكاربونات الأمونيوم (NH₄HCO₃) بتركيز (0.1M) (Plummer, 1978) (Al-Helaly, 2018)، وأجريت عملية الفرز الغشائي عند درجة حرارة 4°C مع التحريك بالمحرك المغناطيسي، واستمرت عملية الفرز الغشائي لمدة 24 ساعة مع مراعاة تبديل محلول الفرز الغشائي ثلاث مرات ومن ثم ترك إلى اليوم التالي، إذ يتم التخلص من الأيونات الناتجة من ملح الترسيب وكذلك من البروتينات ذات الأوزان الجزيئية أقل من 10 كيلودالتون. وبعد الانتهاء من عملية الفرز الغشائي تم حساب الحجم النهائي للمحلول الناتج، وتقدير كمية البروتين بطريقة لاوري المحورة فضلاً عن قياس فعالية الإنزيم في المحلول الناتج من الفرز الغشائي ثم حفظ المحلول في درجة حرارة (20-)°م بغية استخدامه مرة أخرى.

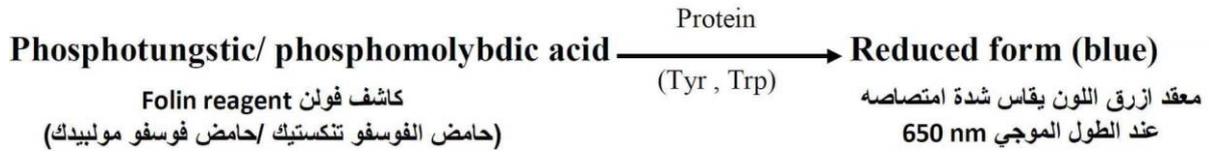
4.3. كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي Gel filtration chromatography: تتضمن تقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي فصل المركبات عن بعضها استناداً إلى الاختلاف في الحجم والوزن الجزيئي عند إمرارها في العمود الحاوي على حبيبات ذات مسامية معينة منتقخة مترابطة (محببة للماء) تدعى الهلام (جيل) Gel مثل هلام الديكستران Dextran

(السيفاديكس Sephadex)، ويتم حساب حجم الماء المقطر لإزاحة كل بروتين من عمود الفصل. وتعزل المواد البروتينية من خلال قراءة الامتصاصية للأجزاء المفصولة عند الطول الموجي 280 نانوميترًا، إذ إن الهلام المستخدم في هذه التقنية هو السيفاديكس G-100 و G-200 (Buritit et al., 2015; Robyt and White, 1987). وإن تقنية الترشيح الهلامي تستخدم أيضاً بوصفها طريقة لتقدير الوزن الجزيئي التقريبي للمواد البروتينية (Berg et al., 2012). واستخدم عمود الفصل ذو الأبعاد (2 X 90) سم الذي يحتوي على هلام السيفادكس من نوع Sephadex G-100 ونوع Sephadex G-200، إذ وضعت مادة الهلام عند ارتفاع (80) سم وذلك بسكبها على الجدران الداخلية للعمود بهدوء لمنع تكون الفقاعات الهوائية، وترك الهلام ليستقر وسحب الماء الزائد فيه، وكررت هذه العملية عدة مرات لحين الحصول على الارتفاع المطلوب واستقرار الهلام، وتم غسل العمود بمحلول الفوسفات المنظم عند أس هيدروجيني 7 وبتركيز 0.1 مولاري (Morris and Morris, 1976) وبذلك أصبح العمود جاهزاً لأمرار الأتمودج وهو المحلول البروتيني (السائل الرائق الناتج عن عملية الديليزة) وتم حساب الحجم الداخلي للعمود (Internal volume (V_i) باستخدام الحامض الأميني التريبتوفان (Trp) والحجم الخارجي للعمود (Void volume (V_o) باستخدام الكستران الأزرق الذي حقن في العمود لغرض تحديد صفات العمود (Berg et al., 2012).

المواد والمحاليل الأخرى المستخدمة في عمود الفصل: محلول الفوسفات المنظم ذو أس هيدروجيني 7 وبتركيز 0.1 مولاري، المحلول البروتيني (السائل الرائق الناتج عن عملية الديليزة وكذلك الحزمة البروتينية ذات الفعالية العالية من العمود الأول)، وهي مواد قياسية مستخدمة لتحديد الوزن الجزيئي التقريبي لإنزيم الاسيتايل كولين استريز وهي (إنزيم الهكسوكاينيز Hexokinase، وإنزيم اليوريز Urease، ألبومين مصل البقر Bovine serum albumin (BSA)، الببسين Pepsin والبابين Papain) وإنزيم الفا-اميليز α -amylase وألبومين البيض Egg albumin وهورمون الأنسولين Insulin.

5.3. تقنية التجفيد (التجميد والتجفيف) بواسطة جهاز اللايوفلايزر: استخدمت هذه التقنية في تقليص حجم القمم الناتجة عن عمود الفصل سيفادكس G-100 لكلا العينتين، وكذلك تم تجفيد الحزمة البروتينية الناتجة عن عمود الفصل سيفادكس G-200 لكل العينتين إذ أظهرت فعالية عالية للإنزيم لغرض الحصول على الإنزيم بهيئة مسحوق جاف تمت بوضع المحاليل المراد تجفيفها في دوارق بلاستيكية وتجميدها بدرجة حرارة (-20)°م لمدة (72) ساعة تقريباً وضعت بعد ذلك في جهاز التجفيد Lyophilizer إلى حين التخلص من الماء، ثم حفظت مواد الرواسب البروتينية الخام بعد ذلك في أنابيب محكمة الغطاء، وضعت في المجمدة بدرجة حرارة (-20)°م لحين استعمالها في دراسة فعالية الإنزيم (Robyt and White, 1987).

5.3. التقدير الكمي للبروتين بطريقة فولن - لاوري Folin - Lowry method المطورة من قبل Schacterle: قدرت كمية البروتين خلال خطوات التنقية للأنزيمات باستخدام طريقة فولن - لاوري (Schacterle and Pollack, 1973)، إذ تعتمد هذه الطريقة على اختزال كاشف فولن إلى أزرق الموليبدنيوم الذي يمكن قياسه لونياً باستخدام جهاز المطياف الضوئي عند الطول الموجي 650 نانوميترًا وتعتمد شدة اللون الناتج على محتوى البروتينات من الأحماض الأمينية كالتايروسين والتريبتوفان، واستخدم البومين مصل البقر (BSA) بوصفه محلولاً قياسياً لتحضير المنحنى القياسي للبروتين، الذي له معامل امتصاص مولاري يساوي $0.67 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.



4. التحليل الإحصائي **Statistical analysis** : تم تحليل جميع نتائج الفحوصات السريرية باستخدام البرنامج الإحصائي SPSS 17 لإيجاد طرائق الإحصاء القياسي Standard statistical methods لتحديد المعدل Mean والانحراف القياسي للمعدل (SD) Standard deviation، واختبار (t- test unpaired) للمقارنة بين متغيرين، وإيجاد الاختلاف بين القيم التي ظهرت من خلال القيمة الاحتمالية (p-value) التي عُدت عند ($p \leq 0.05$) اختلافاً معنوياً Significant وعند ($p > 0.05$) اختلافاً غير معنوي (Hinton, 2004).

النتائج والمناقشة

1. نسبة الإصابة بمرض الاستسقاء الدماغي في الأطفال :

أشارت النتائج التي تم التوصل إليها من الدراسة الحالية الى أن نسبة الإصابة بمرض الاستسقاء الدماغي في الذكور أعلى منه في الإناث، حيث بلغت نسبة الإصابة في الذكور (5.62%) في حين كانت نسبة الإصابة في الإناث بمقدار (37.5%) وهذه النتائج متفقة مع دراسات سابقة (AlSufi, 2012; Taboo, 2014) وبما أن إحدى أهم أسباب مرض الاستسقاء الدماغي هو حدوث خلل جيني (Kahle *et al.*, 2016)، لذا فقد يكون للذكور استعداد جينيا للإصابة بالمرض أكثر من الإناث.

2. فعالية إنزيم الأسييتايل كولين استريز في سائل النخاع الشوكي للأطفال المصابين بالاستسقاء الدماغي ومقارنتها بمجموعة الأصحاء:

تشير النتائج الموضحة في (الجدول 1) إلى وجود ارتفاع معنوي ($p \leq 0.05$) في فعالية إنزيم الأسييتايل كولين استريز في سائل النخاع الشوكي للأطفال المصابين بالاستسقاء الدماغي لكلا الجنسين، مقارنة مع الأصحاء وظهرت لدى الذكور أعلى من الإناث، إذ اتفقت هذه النتيجة مع دراسة سابقة للباحثين (Martins *et al.*, 2012)، فضلاً عن أن هذه النتيجة متفقة مع دراسات سابقة لوحظ فيها ارتفاع في فعالية الإنزيم عند المرضى المصابين بالأمراض العصبية، فعلى سبيل المثال لوحظ ارتفاع فعالية الإنزيم في لعاب مرضى باركنسون (Fedorova *et al.*, 2015) وفي سائل النخاع الشوكي لكل من الأطفال المصابين بالسحايا (AlNoori, 2010) والمرضى المصابين بالزهايمر (García-Ayllón *et al.*, 2010) وهذا الارتفاع يعود الى الدور الفعال للإنزيم في بناء وانحلال الاعصاب، وبالتالي له دور مهم في العديد من الامراض العصبية (Xi *et al.*, 2015). كما يعد الإنزيم مؤشراً للتسمم العصبي في الدماغ (Gupta *et al.*, 2015) ولمتابعة التأثير السمي للأدوية (Kumar and Gopalkrishnan, 2014)، وأشارت العديد من الدراسات الى أن مستويات الإنزيم تزداد في أثناء الموت المبرمج للخلايا حيث إن الكرب التأكسدي العالي يحفز قشرة الغدة التوتية Thymus gland على افراز الإنزيم (Xi *et al.*, 2015)، وقد يعود سبب ارتفاع مستويات الإنزيم إلى التلف الحاصل في أنسجة الدماغ والأعصاب (Fedorova *et al.*, 2015) أو إلى الدور المناعي الذي تؤديه جزيئية الناقل العصبي الأسييتايل كولين إذ إنه يحفز اطلاق الساييتوكينات المسببة للالتهاب ومنها عامل انتشار أو انبثاث السرطان Tumor necrosis factor (TNF) (Pohanka, 2012) أو قد يكون الخلل جيني الذي هو أحد الأسباب الرئيسية في حدوث مرض الاستسقاء الدماغي المسبب لارتفاع فعالية الإنزيم.

الجدول 1: فعالية إنزيم أسيتايل كولين استريز في سائل النخاع الشوكي للأطفال المصابين بالاستسقاء الدماغى لكلا الجنسين.

تركيز الإنزيم في سائل النخاع الشوكي (المعدل ± الانحراف القياسي)				فعالية الإنزيم
الذكور		الإناث		
المرضى العدد(110)	الأصحاء العدد(39)	المرضى العدد(66)	الأصحاء العدد(28)	
* 3.93 ± 23	0.87 ± 8.617	* 4.6 ± 21.88	0.72 ± 8.57	أسيتايل كولين أستريز (نانومول/ملييلتر/دقيقة)

* فرق معنوي عن مجموعة السيطرة عند مستوى $p \leq 0.05$.

3. الفصل الجزئي لإنزيم الاسيتايل كولين استريز من سائل النخاع الشوكي للأطفال المصابين بالاستسقاء الدماغى والأصحاء

1. فصل البروتين بطريقة الإزاحة الملحية **Salting out**: بينت عملية فصل البروتين أن الفعالية العالية تتركز في جزء الراسب، إذ بلغت عدد مرات التنقية بمقدار مرتين مقارنة ب الراشح والسائل الخام لذلك تم إهمال الراشح واستكمال عملية التنقية باستخدام الراسب في عملية الفرز الغشائي.

2. الفرز الغشائي **Dialysis**: أظهرت عملية الفرز الغشائي (الديليزة) للراسب الناتج من عملية الترسيب زيادة في الفعالية النوعية للإنزيمات المعزولة، وكذلك زيادة كميتها نسبة إلى البروتين الكلي، إذ كانت عدد مرات التنقية بمقدار 3 مقارنة ببداية فصل للإنزيم، وذلك بسبب خروج المركبات البروتينية ذات الأوزان الجزيئية الصغيرة (التي تقل عن 10000 دالتون) حسب السيلوفين المستخدم في هذه الدراسة، وكذلك إزالة أيونات ملح كبريتات الأمونيوم المستخدم في عملية ترسيب البروتينات المستخدم في الخطوة السابقة وإزالة الجزيئات الصغيرة الأخرى (Berg et al., 2012)، مما يؤدي إلى زيادة الفعالية النوعية للإنزيم المعزول في المحلول الناتج عن الفرز الغشائي على الرغم من تخفيف المحلول نتيجة عملية الفرز الغشائي كما هو موضح في (الجدول 2 و 3).

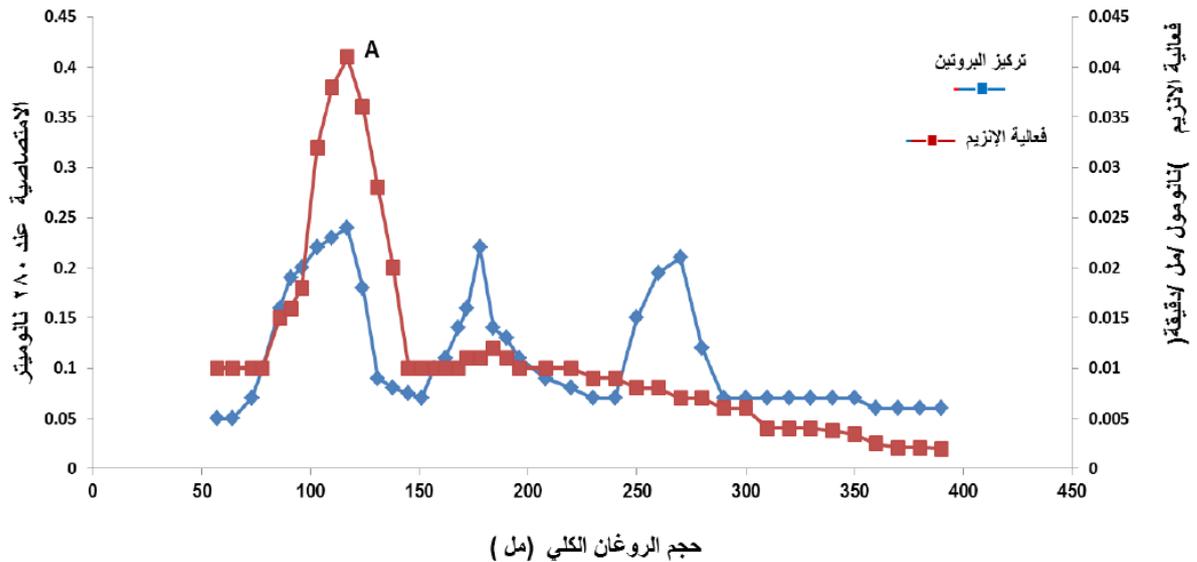
3. كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي **Gel filtration chromatography**: أشارت النتائج الموضحة في الأشكال: (2) و(3) إلى ظهور حزمة بروتينية واحدة ذات فعالية عالية لإنزيم الاسيتايل كولين استريز المفصول بتقنية الترشيح الهلامي عند إمرار المحلول البروتيني الذي تم الحصول عليه من سائل النخاع الشوكي للأصحاء والمرضى بالاستسقاء الدماغى على عمود الفصل الحاوي على الهلام من نوع سيفادكس G-100، وعند إمرار القمة البروتينية A الناتجة عن عمود الفصل الأول للإنزيم المفصول من عمود الفصل الأول (سيفادكس G-100) على عمود الفصل الثاني الحاوي على الهلام من نوع G-200 ظهرت حزمتان بروتينيتان (قمة A و قمة B) كما موضح في الأشكال (4) و(5) وكانت الحزمة الثانية B تحوي على فعالية عالية للإنزيم بالنسبة للأصحاء والمرضى على التوالي.

كما أشارت النتائج الموضحة في (الجدولين 2 و 3) إلى ارتفاع الفعالية النوعية لإنزيم الاسيتايل كولين استريز في اثناء مراحل تنقية الإنزيم من عملية الإزاحة الملحية والفرز الغشائي والترشيح الهلامي للسائل النخاع الشوكي من الأصحاء والمرضى بالاستسقاء الدماغى، كما أشارت نتائج الترشيح الهلامي باستخدام سيفادكس G-100 عند إمرار المحلول البروتيني الناتج عن عملية الديليزة إلى ظهور حزمة بروتينية A واحدة وكانت احجام روغانها (117) ملييلتر و(116) ملييلتر لسائر الأصحاء والمرضى

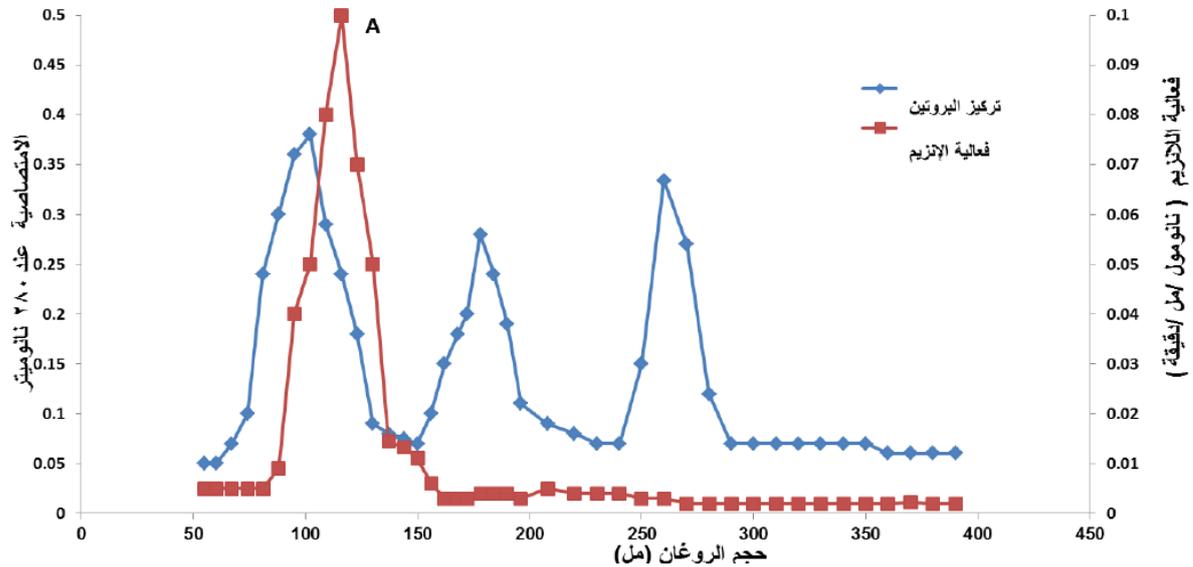
على التوالي كما يلحظ في الشكلين (2) و(3) وعند تتبع فعالية إنزيم الاسيتايل كولين استريز. تبين أن الحزمة تعطي فعالية نوعية عالية للإنزيم وصلت إلى (87.6) نانومول/دقيقة/ملغم وعدد مرات تنقية وصلت إلى (17) مرة مقارنة بالإنزيم الخام بالنسبة للأصحاء أما بالنسبة للمرضى فقد ارتفعت الفعالية النوعية للإنزيم عند استخدام عمود الفصل الحاوي على G-100 إلى (227.1) نانومول/دقيقة/ملغم ومرات تنقية وصلت إلى (27) مقارنة بالإنزيم الخام كما يلحظ في (الجدولين 4 و5).

إن الحزمة A التي أعطت فعالية عالية للإنزيم المفصول من الأصحاء والمرضى والنتيجة عن العمود الأول تم إمرارها على عمود الفصل الثاني الذي يحتوي على الهلام من نوع G-200 لسائر المرضى والأصحاء، وأظهرت النتائج وجود حزمتين بروتينيتين هما A وB عند احجام روغان (90 و120) مليلتر للأصحاء و(90 و125) مليلتر للمرضى كما موضح في الشكلين (4) و(5) حيث امتلكت الحزمة البروتينية الثانية B فعالية نوعية عالية لإنزيم الاسيتايل كولين استريز وصلت إلى (124.6) نانومول/مل/دقيقة وعدد مرات تنقية وصلت إلى (24) مرة بالنسبة للإنزيم من سائل النخاع الشوكي للأصحاء في حين أن الفعالية النوعية للإنزيم من سائل النخاع الشوكي للمرضى قد ازدادت إلى (283.53) نانومول/مل/دقيقة وعدد مرات تنقية وصلت إلى (33) مرة أي أن الفعالية النوعية للإنزيم من سائل النخاع الشوكي للمرضى أعلى من الأصحاء، لذلك تم اعتماد هذه الحزمة في تقدير الوزن الجزيئي التقريبي للإنزيم أما الحزمة البروتينية الاولى A فأعطت فعالية نوعية أقل للإنزيم كما يلاحظ في (الجدولين 3 و4).

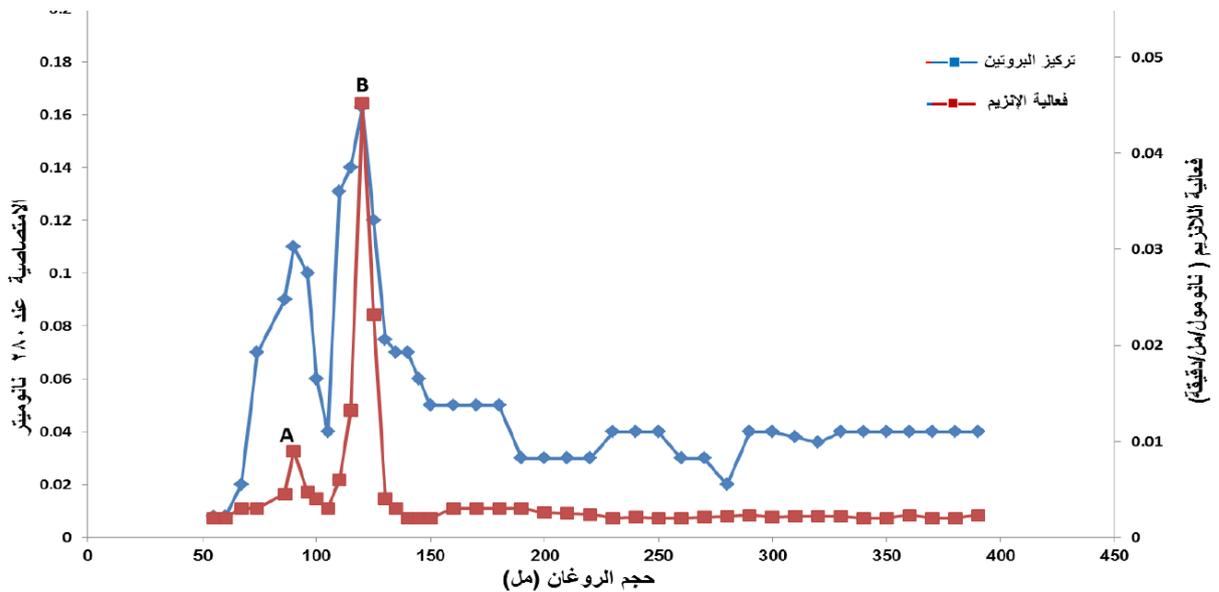
ويوجد إنزيم الاسيتايل كولين استريز في العديد من أنواع الخلايا، كالأعصاب والعضلات والأنسجة المركزية والمحيطية والألياف الحسية والحركية الودية واللاودية وفي مختلف مناطق الجسم حيثما وجدت نقاط التقاء بين الخلايا (Tripathi and Srivastava, 2008) ولأهميته الحيوية فقد تم عزله في العديد من أنسجة الجسم المختلفة حيث عزل من دماغ الإنسان باستخدام كروماتوغرافي الألفة والهجرة الكهربائية وقد أجرى الباحثان (Zhu et al., 1993) ذلك العزل، كما عزل إنزيم الاسيتايل كولين استريز من اغشية كريات الدم الحمراء باستخدام راتنجات مختلفة حيث كانت نسبة الاستعادة 23.5% والفعالية النوعية 9.22 وحدة عالمية/ملغم بروتين (Kaya et al., 2013)، أمكن استخدام الإنزيم المعزول من كريات الدم الحمر كمؤشر حيوي للدلالة على تسمم الأعصاب بالرصاص، لا سيما عند الأشخاص الذين يتعرضون للرصاص بكثرة (Gupta et al., 2015).



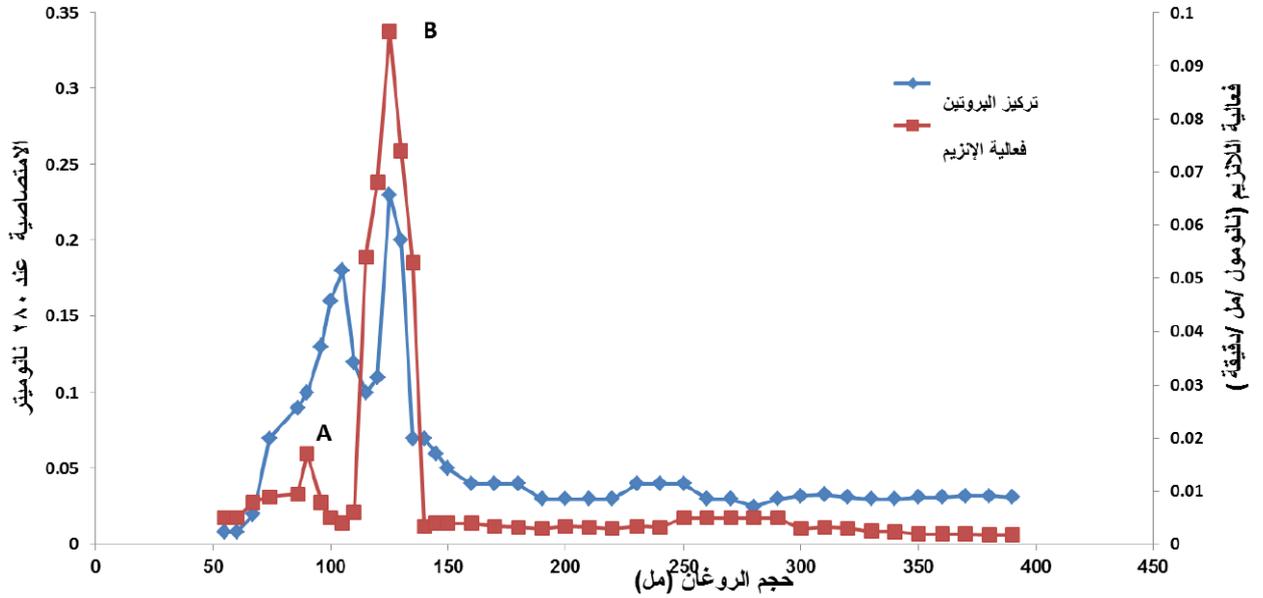
الشكل 2: المظهر الجانبي يبين روغان الحزمة البروتينية لإنزيم AChE الناتجة عن عملية الفرز الغشائي والعادة لسائل النخاع الشوكي للأصحاء على عمود الفصل الحاوي على الهلام من نوع G-100.



الشكل 3: المظهر الجانبي يبين روغان الحزمة البروتينية لإنزيم AChE الناتجة من عملية الفرز الغشائي والعائدة لسائل النخاع الشوكي لمرضى الاستسقاء الدماغي على عمود الفصل الحاوي على الهلام من نوع G-100.



الشكل 4: المظهر الجانبي يبين روغان الحزمة البروتينية ذات الفعالية العالية لإنزيم AChE الناتجة عن عمود الترشيح الهلامي الأول (نوع G-100) والعائدة لسائل النخاع الشوكي للأصحاء على عمود الفصل الحاوي على الهلام من نوع G-200.



الشكل 5: المظهر الجانبي يبين روغان الحزمة البروتينية ذات الفعالية العالية لإنزيم AChE الناتجة عن عمود الترشيح الهلامي الأول (نوع G-100) والعائدة لسائل النخاع الشوكي للأطفال المرضى المصابين بالاستسقاء الدماغي على عمود الفصل الحاوي على الهلام من نوع G-200.

الجدول 2 : خطوات تنقية إنزيم AChE من سائل النخاع الشوكي للأطفال الأصحاء:

خطوات التنقية	الحجم (مل)	تركيز البروتين الكلي (ملغم/مل)	الفعالية * (نانومول/مل/دقيقة)	الفعالية الكلية (نانومول/مل/دقيقة)	الفعالية النوعية (نانومول/دقيقة/ملغم)	عدد مرات التنقية	الاستعادة %
سائل النخاع الشوكي	30	0.68	8.6	258	12.64	1	100
الترسيب بكبريتات الامونيوم 70%	19	0.38	11.88	225.7	31.26	2	87.5
الراشح	22	0.094	0.61	13.42	6.49	1	5.2
الديليزة للراسب	14	0.24	9.3	130.2	38.75	3	50.5
القيم الناتجة عن عمود الفصل الترشيح الهلامي سيفادكس G-100							
القمة A	20	0.071	6.22	124.4	87.6	17	48.2
القيم الناتجة عن عمود الفصل الترشيح الهلامي سيفادكس G-200							
القمة A	12	0.014	1.03	12.36	73.57	14	4.8
القمة B	13	0.026	3.24	42.12	124.6	24	16.3

*الفعالية تعرف بأنها كمية الإنزيم AChE التي تعمل على تحويل نانومول واحد من المادة الأساس إلى ناتج تحت الظروف المحددة للقياس لكل ميليتر لكل دقيقة، الفعالية الكلية: تمثل حاصل ضرب الفعالية في الحجم الكلي الفعالية النوعية: تمثل حاصل قسمة الفعالية (نانومول/مل/دقيقة) على تركيز البروتين (ملغرام/مل).

الجدول 3 : خطوات تنقية إنزيم AChE من سائل النخاع الشوكي للأطفال المصابين بالاستسقاء الدماغي.

خطوات التنقية	الحجم (مل)	تركيز البروتين الكلي (ملغم/مل)	الفعالية* (نانومول/مل/دقيقة)	الفعالية الكلية (نانومول/مل/دقيقة)	الفعالية النوعية (نانومول/دقيقة/ملغم)	عدد مرات التنقية	الاستعادة %
سائل النخاع الشوكي	60	2.49	21	1260	8.43	1	100
الترسيب بكبريتات الامونيوم 70%	28	1.06	26.44	740.32	24.94	3	58.76
الراشح	42	0.12	1.51	63.42	12.58	1	5.03
الديليزة للراسب	16	0.53	23.6	377.6	44.52	5	30
القمم الناتجة من عمود الفصل الترشح الهلامي سيفادكس G-100							
القامة A	32	0.0458	10.4	332.8	227.1	27	26.79
القمم الناتجة من عمود الفصل الترشح الهلامي سيفادكس G-200							
القامة A	16	0.013	1.1	17.6	84.62	10	1.4
القامة B	15	0.034	9.64	144.6	283.53	33	11.48

*الفعالية تعرف بأنها كمية الإنزيم AChE التي تعمل على تحويل نانومول واحد من المادة الأساس إلى ناتج تحت الظروف المحددة للقياس لكل ميليتر لكل دقيقة، الفعالية الكلية: تمثل حاصل ضرب الفعالية في الحجم الكلي الفعالية النوعية: تمثل حاصل قسمة الفعالية (نانومول/مل/دقيقة) على تركيز البروتين (ملغرام/مل).

4. تقدير الوزن الجزيئي التقريبي لإنزيم AChE المفصول عن سائل النخاع الشوكي للأطفال الأصحاء والمصابين بالاستسقاء الدماغي:

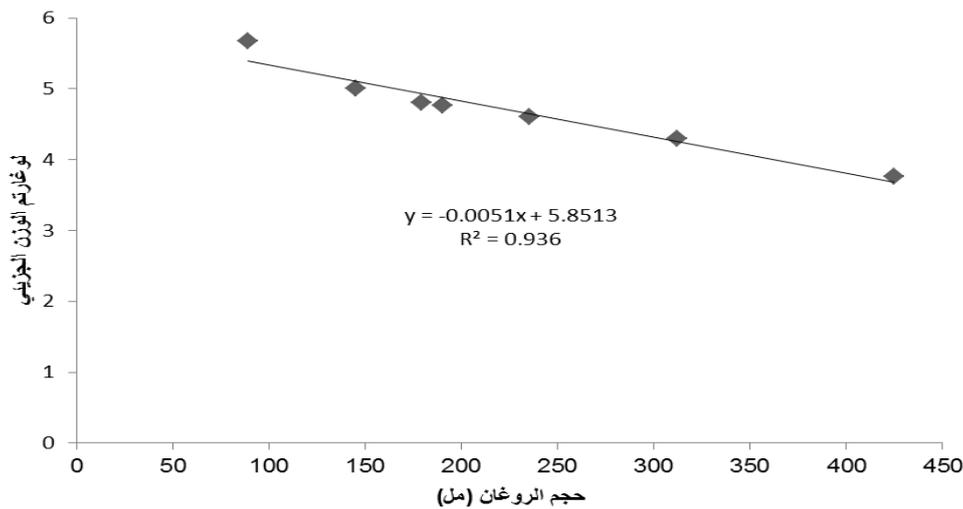
قدر الوزن الجزيئي التقريبي للحزمة البروتينية التي تتركز في القمة الثانية (B) الناتجة عن امرار سائل النخاع الشوكي للأطفال الأصحاء على عمود الفصل الحاوي على الهلام Sephadex G-200 كما في الشكلين (4) و(5)، حيث اعطت هذه القمة أعلى فعالية نوعية للإنزيم بلغت (124.6) نانومول/دقيقة/ملغم، ونفاوة وصلت إلى (24) مرة، لذا تم استخدامها في تقدير الوزن الجزيئي التقريبي للإنزيم وكانت بحدود (4000± 173500) دالتون، أما الحزمة البروتينية الثانية القمة (B) الناتجة عن إمرار المحلول البروتيني لسائل النخاع الشوكي للأطفال المصابين بالاستسقاء الدماغي على عمود الفصل الحاوي على الهلام من نوع G-200 والتي أعطت أعلى فعالية نوعية بلغت (283.58) نانومول/دقيقة/ملغم ونفاوة وصلت إلى (33) مرة، وكان الوزن الجزيئي للإنزيم في حدود (4000±163606) دالتون كما في الشكل (6) و(الجدول 5).

ان هذه النتائج كانت مقارنة للوزن الجزيئي للإنزيم المعزول من جدران كريات الدم الحمراء البالغ (70000) دالتون للوحدة الفرعية الواحدة المعزولة باستخدام تقنية الهجرة الكهربائية (Kaya et al., 2013)، كما أشار الباحثون (Tripathi and Srivastava, 2008) إلى أن الوزن الجزيئي للوحدة الفرعية للإنزيم باستخدام تقنية الهجرة الكهربائية كان بحدود (60000) دالتون، وأشار الباحثون (Xi et al., 2015) إلى أن الإنزيم يوجد بأشكال مختلفة وأن الشكل الموجود في دماغ الإنسان يكون بشكل رباعي الوحدة، لذا يكون الوزن الجزيئي التقريبي للإنزيم يتراوح ما بين (280000-240000) دالتون.

الجدول 5: الوزن الجزيئي وحجم الروغان للمواد القياسية المستخدمة في تقنية الترشيح الهلامي باستخدام هلام Sephadex G-200 لتحديد الوزن الجزيئي التقريبي لإنزيم AChE.

اسم المادة	الوزن الجزيئي (دالتون)	حجم الروغان (مل)
الدكستران الأزرق Blue dextran (الحجم الخالي V_0)	2000000	75
انزيم اليوريز Urease	480000	89
انزيم هيكسو كاينيز Hexokinase	100000	145
ألبومين مصل البقر (BSA)	67000	179
انزيم الفا-اميليز α - amylase	58000	190
ألبومين البيض Egg albumin	45000	235
البابين Papain	21000	312
هورمون الأنسولين Insulin	5750	425
التربتوفان Tryptophan (الحجم الداخلي V_i)	204	450
المجهول (AChE) (القمة ذات فعالية عالية B) للأصحاء	173500	*120
المجهول (AChE) (القمة ذات فعالية عالية B) للمرضى	163606	*125

*أخذت هذه القيمة من الشكل (4) والشكل (5) الذي يظهر فيه حجم روغان القمة المفصولة للإنزيم AChE من سائل النخاع الشوكي للأطفال الأصحاء والمرضى على التوالي بواسطة تقنية الترشيح الهلامي لعمود الفصل G-200.



الشكل 6: المنحني القياسي لتقدير الوزن الجزيئي التقريبي لإنزيم AChE باستخدام عمود الفصل الحاوي على مادة الهلام سيفاديكس G-200.

من خلال هذه النتائج التي تم الحصول عليها استنتجت الدراسة الحالية :

- 1- أن فعالية الانزيم المفصول من المرضى اعلى من فعالية الإنزيم المفصول من الأصحاء.
- 2- ظهور حزمتان بروتينيتان للمحلول البروتيني الناتج عن الديلزة لسائل النخاع الشوكي باستخدام الهلام من نوع G-100 الحزمة الأولى، ومن ثم فإن امرار الحزمة البروتينية الأولى على عمود الترشيح الهلامي من نوع سيفادكس G-200 يظهر أن هناك حزمة ذات فعالية عالية لإنزيم AChE إذ وصلت عدد مرات التنقية للحزمة 33 مرة.
- 3- الوزن الجزيئي التقريبي لانزيم الاسيتايل كولين استريز باستخدام تقنية الترشيح الهلامي كان بحدود (4000 ± 163606) دالتون باستخدام هلام من نوع سيفادكس G-200.

المصادر

- Al Noori, M.K.J.(2011). Cerebrospinal fluid cholinesterase activity in children with meningitis. *Iraq J. Pharm.* **11**(2),70-76.
- Al Sufi, S.M.(2012). An Epidemiological approach of hydrocephaly parameters in Duhok province. *Iraqi National J. Nursing Specialties.* **25**(2),17-22.
- Al-Helaly, L.A.(2007). Partial Separation and and some Kinetic studies of Glutathion S-Transferase (GST) in Human Serum. *Raf. J. Sci.*,**18**(2),71-84.
- Al-Helaly, L.A.(2018). Studies on Paraoxonase-1 Isolated from Amoniotic Fluid and its Effect Against Cisplatin-Induced Hepatotoxicity and Cardiotoxicity in Rats. *Raf. J. Sci.*, **27**(2),42-56.
- Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L. (2012). "Biochemistry". 17th ed. W.H. Freeman and Company. New York. USA. pp. 68,69,138, 139, 145, 146.
- Buritis, C.A.; Ashwood, E.R.; Bruns, D.E. (2015). "Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics". By Saunders, an imprint of Elsevier Inc. USA. pp.356, 368.
- Čolović, M.B.; Krstić, D.Z.; Lazarević-Pašti, T.D.; Bondžić, A.M.; Vasić, V.M.(2013). Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Curr Neuropharmacol.*, **11**(3), 315-335.
- Ellman G.L.; Courtney, K.D.; Andrews, V.J.; Featherstone R.M.(1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, **7**,88-95.
- Fedorova, T.; Knudsen, C.S.; Mouridsen, K.; Nexø, E.; Borghammer, P.(2015). Salivary acetylcholinesterase activity is increased in Parkinson's disease: A Potential marker of parasympathetic dysfunction. *Parkinson's Disease Volume 2015*, Article ID 156479, 7 pages.
- Gupta, V.K.; Pal, R.; Siddiqi, N.J.; Sharma, B. (2015). Acetylcholinesterase from Human Erythrocytes as a Surrogate Biomarker of Lead Induced Neurotoxicity. *Enzyme Research* Vol. 2015, Article ID 370705, 7 pages.
- García-Ayllón, M.S.; Riba-Llena, I.; Serra-Basante, C.; Alom, J.; Boopathy, R.; Sáez-Valero, J. (2010). Altered levels of acetylcholinesterase in Alzheimer plasma. *PLoS ONE* **5**(1),e8701.
- Hinton, P.R.(2004). "Statistics Explained". 2nd ed by Routledge. Printed in the USA and Canada. pp.85,125.
- Jamalabadi, A.; Keikha, A.J. (2016). Fluid -solid interaction modeling of cerebrospinal fluid absorption in ara chnoid villi. *J. Chem. and Pharmaceutical Research.* **8**(2),428-442.
- Kahle, K.T.; Kulkarni, A.V.; Limbrick, D.D.; Warf, C.(2016). Hydrocephalus in children. *Lancet.* **387**(10020),788-99.
- Kaya, H.B.; Özcan, B.; Şişecioğlu, M.; Ozdemir, H.(2013). Purification of acetylcholinesterase by 9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine from human erythrocytes. *App. Biochem. and Biotechno.* **170**(1),198-209.
- Kinsman, S.L.; Johnston, M.V.(2016). "Congenital Anomalies of the Central Nervous System". Textbook of Pediatrics. 20th ed. Philadelphia, PA: Elsevier: chap.591.
- Kumar, M.S.; Gopalkrishnan, S. (2014). Evaluation, partial characterization and purification of acetylcholine esterase enzyme and antiangiogenic activity from marine sponges. *J. Coastal Life Medicine.* **2**(11),849-854.

- Matata, C.; Michael, B.; Garner, V.; Solomon, T. (2012). Lumbar puncture: diagnosing acute central nervous system infections. *Nursing Standard*. (Royal College of Nursing (Great Britain): 1987). **27**(8), 49-56.
- Martins, D.B.; Mazzanti, C.M.; França, R.T.; Pagnoncelli, M.; Costa, M.M.; De Souza, E.M.; Gonçalves, J.; Spanevello, R.; Schmatz, R.; Da Costa, P.(2012). 17- β estradiol in the acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain and blood of ovariectomized adult and middle-aged rats. *Life Sci.*, **90**, 351–359.
- Miswon, N.H.; Hashim, Z.; How, V.; Chokeli, R. (2015). Blood cholinesterase level and learning ability of primary school children in an agricultural village, Tanjung Karang, Malaysia. *British J. Medicine and Medical Research*. **8**(1), 52-60.
- Morris, C.J.; Morris, P.(1976). "Separation Method in Biochemistry". 2nd ed., Pitman Publishing, 442 p.
- Pohanka, M. (2012). Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor is a target in pharmacology and toxicology. *Internat. J. Molecular. Sci.*, **13**(12),2219-2238.
- Plummer, D.T.(1978). "An Introduction to Practical Biochemistry". 2nd ed. McGraw-Hill Book Company.UK. 142 p.
- Roby, J.F.; White, B.J. (1987). "Biochemical Techniques, Theory and Practice." Wadsworth, Inc., Belmont, California, USA.
- Schacterle, G.R.; Pollack, R.L. (1973). A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biological material. *Anal. Biochem.* **51**, 654-55.
- Shim, W.J.; Sand-Land, J.; Hameed, Q.M.; Blazwr-Yost, B.; Zouh, F.C.; Klagsbrun, M. (2016). Excess HB-EGF, which promotes VEGF signaling, leads to hydrocephalus. *Scientific Reports* **6**, Article number 26794.
- Taboo, Z.A. (2014). Evaluation of congenital hydrocephalus association with aqueduct stenosis in Mosul pediatric patients. *The Iraqi Post Graduate Medical J.*, **12**(8).
- Tripathi, A.; Srivastava, U.C. (2008). Acetylcholinesterase: Aversatile enzyme of enzyme of nervous system. *Annals of Neurosciences*, **1**(4).
- Tully, H.M.; Dobyns, W.B. (2014). Infantile hydrocephalus: A review of epidemiology, classification and causes. *Eur J. Med. Genet.*, **57**(8), 359.
- Xi, H.J.; Wu, R.P.; Liu, J.J.; Zhang, L.J.; Li, Z.S.(2015). Role of acetyl cholinesterase in lung cancer. *Thorac Cancer* **6**(4),390-398.
- Zhang, X.J.; Greenbreg, D.S.(2012). Acetyl cholinesterase involvement in apoptosis. *Front Mol Neuro Sci.*, **5**(40).
- Zhu, M.C.; Xin, Y.B.; Sun, M.J.; Fang, Y.Z. (1993). Purification and properties of acetylcholinesterase from human brain. *Sci China B.*, **36** (10),1207-15.