

ارزش اندازه‌گیری برخی از آنزیمها و کراتینین مایع آمنیوتیک گوسفند بعنوان شاخص سن و تکامل جنین

دکتر سعید نظیفی حبیب‌آبادی^۱، دکتر محمود امین‌لاری^۲، دکتر شاهرخ رضایی‌ترنگی^۳

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۳، شماره ۱ و ۲، ۵۴-۵۲، (۱۳۷۷)

جنینها، بلافاصله بعد از خارج کردن آنها از رحم بوسیله یک متر نواری فاصله سر تا مقعد و سر تا دم اندازه‌گیری شد و با استفاده از فرمول ریچاردسن سن جنین مشخص گردید (۲).

در آزمایشگاه، کراتینین بروش ژافه، فسفاتاز قلیایی بروش اصلاح‌شده یورز و مک‌کامب، کراتین کیناز بروش کالری متری سیگما (روش اصلاح‌شده هوگز)، لاکتات دهیدروژناز بروش کالری متری سیگما (کابود - ربولوسکی)، آسپارات آمینوترانسفراز بروش اصلاح‌شده ریتمن فرانکل و آرژیناز بروش اوره اندازه‌گیری شدند (۵). برای پی‌بردن به اختلاف آماری معنی‌دار بین گروههای سنی مختلف از آزمونهای آنالیز واریانس و دانکن استفاده شد. در مرحله بعد، از آزمون رگرسیون چندتایی برای هر پارامتر استفاده شد. سن بعنوان متغیر وابسته برای هر فاکتور در نظر گرفته شد و ضریب همبستگی هر پارامتر با سن محاسبه گردید.

نتایج

نتایج بدست آمده از تجزیه بیوشیمیایی مایع آمنیوتیک جنین ۱۱۰ رأس گوسفند در سنین مختلف در جدول ۱ آمده است. کمترین میزان تمامی فاکتورهای اندازه‌گیری شده در گروه زیر یک ماه و بیشترین میزان آنها در گروه ۴ تا ۵ ماه می‌باشد. در سنین مختلف، هیچ طرح مشخص معنی‌داری در فعالیت آنزیمهای مورد سنجش دیده نشد. اما میزان کراتینین مایع آمنیوتیک در تمام سنین دارای اختلاف آماری معنی‌دار بود ($p < 0/01$).

بین سن جنین و کراتینین مایع آمنیوتیک ($r = +0/65$ و $p < 0/001$)، آرژیناز ($r = +0/84$ و $p < 0/001$)، کراتین کیناز ($r = +0/78$ و $p < 0/001$)، لاکتات دهیدروژناز ($r = +0/55$ و $p < 0/001$)، آسپارات آمینوترانسفراز ($r = +0/57$ و $p < 0/001$) و فسفاتاز قلیایی ($r = +0/60$ و $p < 0/001$) همبستگی معنی‌داری مشاهده شد. بطوری که با افزایش سن جنین، غلظت کراتینین و فعالیت آنزیمهای آرژیناز، کراتین کیناز، لاکتات دهیدروژناز، آسپارات آمینوترانسفراز و فسفاتاز قلیایی افزایش یافتند.

بحث

کراتینین، محصول متابولیسم عضلات می‌باشد (۶). افزایش کراتینین در مایعهای جنین (آمنیوتیک و آلتوتویس) همزمان با افزایش سن جنین، احتمالاً بدلیل افزایش توده عضلانی و رشد جنین می‌باشد. وقتی کلیه‌ها شروع بکار می‌کنند کراتینین را از سرم جنین می‌گیرند. سپس کراتینین وارد ادرار جنین شده و از طریق مجاری اوراکوس و میزراه به کیسه آلتوتویس و آمنیوتیک وارد می‌گردد.

بیتز و همکاران (۱۹۷۶) نشان دادند که میزان کراتینین و اسید اوریک با افزایش سن جنین (در گاو) بطور منظم در سرم، محتویات معده و مایع آلتوتویس جنین افزایش می‌یابد (۴). در انسان نیز غلظت کراتینین مایع آمنیوتیک با افزایش سن جنین افزایش می‌یابد (۱). همچنین میزان کراتینین، شاخص خوبی برای رسیده یا نارس بودن جنین محسوب می‌شود (۸).

در این تحقیق بمنظور بررسی تغییرات برخی پارامترهای بیوشیمیایی در سنین مختلف جنین گوسفند، ۱۱۰ نمونه مایع آمنیوتیک جنین گوسفند در سنین مختلف (کمتر از یک ماه تا پنج ماه) مورد آزمایش قرار گرفته و میزان کراتینین، کراتین کیناز (CK)، فسفاتاز قلیایی (ALP)، آسپارات آمینوترانسفراز (AST)، لاکتات دهیدروژناز (LDH) و آرژیناز آنها اندازه‌گیری شد. با افزایش سن، کراتینین مایع آمنیوتیک افزایش معنی‌داری نشان داد ($p < 0/01$). کمترین میزان کراتینین مایع آمنیوتیک در سن کمتر از یک ماه و بیشترین آن در سن ۴ تا ۵ ماه بود. با افزایش سن جنین، آنزیمهای LDH، AST، ALP، CK و آرژیناز مایع آمنیوتیک، هیچ طرح خاص معنی‌داری را نشان ندادند. نتیجه کمی این تحقیق نشان می‌دهد که بهترین فاکتور بیوشیمیایی برای تعیین سن و مرحله تکاملی جنین گوسفند، کراتینین مایع آمنیوتیک است.

واژه‌های کلیدی: کراتینین، آنزیم، مایع آمنیوتیک، سن جنین، گوسفند

در انسان، مایع آمنیوتیک ارزش زیادی در تشخیص برخی اختلالات جنینی، رسیده‌بودن جنین یا نارس بودن آن و همچنین تشخیص یا تأیید برخی بیماریهای مربوط به جنین و مادر و تعیین سن جنین دارد (۱۱). برخی محققین سنجش غلظت برخی اسیدهای آمینه آزاد را در مایع آمنیوتیک انسان در سنین مختلف بعنوان شاخصی برای تعیین سن جنین مفید دانسته‌اند (۳). آنزیمهای لاکتات دهیدروژناز، آسپارات، آمینوترانسفراز، فسفاتاز قلیایی، آلانین آمینوترانسفراز، کراتین کیناز و اسید فسفاتاز در مایع آمنیوتیک گوسفند، درست قبل از مرگ جنین، سقط جنین و بعد از آلودگی با کتریایی یا جراحی افزایش می‌یابند (۱۰).

بین غلظت کراتینین مایع آمنیوتیک انسان و سن بارداری ارتباط خطی مستقیمی وجود دارد (۱). با توجه به اینکه تاکنون در گوسفند هیچگونه تحقیقی در زمینه تغییرات پارامترهای بیوشیمیایی مایع آمنیوتیک و ارتباط آن با سن جنین صورت نگرفته است از اینرو تصمیم گرفته شد تا غلظت کراتینین و فعالیت آنزیمهای کراتین کیناز، لاکتات دهیدروژناز، آسپارات آمینوترانسفراز، آرژیناز و فسفاتاز قلیایی در مایع آمنیوتیک گوسفند اندازه‌گیری و با تغییرات سن جنین مقایسه کردند. شاید بتوان از سنجش این پارامترها در مایع آمنیوتیک بعنوان شاخصی برای بررسی تکامل و سن جنین گوسفند استفاده کرد.

مواد و روش کار

در این تحقیق ۱۱۰ نمونه مایع آمنیوتیک جنین گوسفند در سنین مختلف کمتر از یک ماه تا پنج ماه مورد آزمایش قرار گرفتند. بلافاصله بعد از کشتار، رحم گوسفندان مورد بازرسی قرار گرفت و رحمهای آبستن از گردن رحم قطع و از لاشه خارج گردید. در ناحیه شاخ رحم، بوسیله قیچی، بافت ماهیچه‌ای رحم بدقت کنار زده شد. پس از مشخص شدن حفره آلتوتویس و آمینون، در تمامی رحمها از محل مشابه (ناحیه پشت جنین) سر سوزن متصل به نرسنگ بدقت وارد کیسه آمینون شده و مقدار ۱۰ تا ۵ میلی‌لیتر مایع آمنیوتیک کشیده شد. نمونه‌ها به لوله‌های آزمایشی انتقال یافتند. در مرحله بعد، جنینها از رحم خارج شده و سن آنها مشخص گردید. برای تعیین سن

۱) گروه آموزشی علوم درمانگاهی 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.



جدول ۱ - میانگین (\pm انحراف معیار) پارامترهای بیوشیمیایی مایع آمنیوتیک جنین گوسفند در سنین مختلف ($n = 110$)

ALP (U/L)	AST (U/L)	LD (U/L)	(U/L) CK	ارژیناز (U/L)	کراتینین (mg/dl)	تعداد نمونه	پارامتر سن به ماه
۵/۲۱+۳/۰۹ ^a	۵/۱۶+۲/۴۹ ^a	۳۱/۹۶+۲۱/۶۸ ^a	۱/۸۷+۱/۶ ^a	۴/۶+۲/۰۱ ^a	۰/۵۵+۰/۱۳ ^a	۱۰	کمتر از یک ماه
۷/۵۶+۵/۳۴ ^a	۷/۰۸+۴/۳۵ ^a	۴۲/۵۷+۲۲/۹۷ ^a	۲/۵۲+۱/۷۲ ^a	۵/۱۸+۳/۱۹ ^a	۲/۳۳+۱/۹۳ ^b	۳۰	یک تا دو ماه
۸/۴۵+۴/۶ ^a	۱۱/۲۸+۹/۹۵ ^b	۴۸/۸۵+۲۷/۶۱ ^a	۳/۳۶+۲/۰۶ ^b	۱۱/۲۱+۷/۲۷ ^b	۳/۹۱+۲/۵۱ ^c	۳۰	دو تا سه ماه
۱۱/۶۰+۷/۷۸ ^b	۱۲/۰۷+۳/۷۱ ^b	۵۱/۶۹+۳۰/۹۴ ^a	۴/۸۷+۱/۴۶ ^c	۲۴/۸۷+۱۱/۱۶ ^c	۴/۲۶+۱/۱ ^d	۳۰	سه تا چهار ماه
۱۶/۱۸+۸/۵۵ ^c	۱۴/۸۵+۴/۳۱ ^b	۸۴/۷۵+۳۸/۱۱ ^b	۷/۴۳+۲/۵۶ ^d	۳۱/۶۲+۱۳/۲۴ ^d	۵/۷۹+۳/۹۶ ^e	۱۰	چهار تا پنج ماه

در هر ستون میانگینهایی که دارای حروف لاتین نامشابه هستند اختلاف معنی دار دارند ($p < 0.01$).

صنعتی گوشت فارس، مدیریت محترم دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز و سرکار خانم شریف پور منشی محترم گروه علوم درمانگاهی صمیمانه تشکر و قدردانی می شود.

منابع

1. سیداخوان، م. و بابالو، ز. ارزش اندازه گیری کراتینین مایع آمنیوتیک بعنوان شاخص تکامل جنین. سومین کنگره سراسری بیوشیمی و علوم آزمایشگاهی ایران، تبریز، شماره ۱۲، (۱۳۷۴).
2. Arthur, G.H., Noakes, D.E. and Pearson, H. Veterinary Reproduction and Obstetrics. Sixth ed. Billier & Tindall. London, pp: 49-59, (1989).
3. Baetz, A.L., Hubbert, W.T. and Graham, C.K. Developmental changes of free amino acids in bovine fetal fluids with gestational age and the interrelationships between the amino acid concentrations in the fluid compartments. J. Reprod. Fert. 44: 437-444, (1975).
4. Baetz, A.L., Hubbert, W.T. and Graham, C.K. Changes of biochemical constituents in bovine fetal fluids with gestational age. Am. J. Vet. Res. 37: 1047-1052, (1976).
5. Burtis, C.A. and Ashwood, E.R. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 2nd ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia, pp: 735-896, 1529-1533, (1994).
6. Duncan, J.R., Prasse, K.W. and Mahaffey, E.A. Veterinary Laboratory Medicine. Clinical Pathology. 3rd ed. Iowa State University Press. Ames, Iowa, pp: 130-151, (1994).
7. Grun, E. and Muller, C. Occurrence of enzymes in amniotic fluid of farm animals. Monatshefte-fur Veterinarmedizin, 31: 540-546, (1976).
8. Michael, L., Bishop, J.D. and Englikirk, E.P.F. Chemical Chemistry. 1st ed. Lippincott. Raven Publishers, pp: 469-474, (1996).
9. Mohamed, A.R. and Noakes, D.E. Enzyme activities in amniotic fluid and maternal blood in cattle before and after induced foetal death and abortion. Br. Vet. J. 141: 49-59, (1985).
10. Mohamed, A.R. and Noakes, D.E. Enzyme activities in amniotic fluid and maternal blood in sheep, before and after induced foetal death and abortion. Br. Vet. J. 141: 498-506, (1985).

آسیارات آمینوترانسفراز یک آنزیم غیر اختصاصی است که در بافتهای بدن وجود دارد ولی فعالیت آن در عضلات و کبد بیشتر است. این آنزیم در گلبولهای قرمز نیز وجود دارد (۶). بنابراین با افزایش سن جنین و تشکیل و رشد بافتهای بدن به ویژه کبد و ماهیچه های اسکلتی و خونسازی که در زمان جنینی در کبد انجام می شود میزان این آنزیم نیز افزایش می یابد و احتمالاً از طریق سرم و محتویات معده و از راه ادرار وارد مایع آمنیوتیک می شود.

آنزیم فسفاتاز کلیایی مختلف دارای ایزوآنزیمهای مختلفی می باشد. این آنزیم در جفت، کلیه، روده، لکوسیتها، استخوان، کبد و مجاری صفراوی وجود دارد (۶). بنابراین در ابتدا با تشکیل جفت و در مرحله بعد با تشکیل بافتهای مختلف از جمله کلیه، روده ها، استخوان، کبد و مجاری صفراوی فعالیت این آنزیم افزایش می یابد. این آنزیم احتمالاً از راه ادرار، سرم و محتویات معده به مایع آمنیوتیک وارد می شود.

آنزیم لاکتات دهیدروژناز آنزیمی غیر اختصاصی است که در گلبولهای قرمز، عضلات اسکلتی، قلبی، کبد، ریه، کلیه و سایر بافتها وجود دارد (۶). بنابراین با افزایش رشد جنین و توده عضلانی آن، همچنین با تشکیل و رشد سیستم قلبی - عروقی، کبد، ریه و کلیه میزان این آنزیم نیز افزایش می یابد. با توجه به اینکه این آنزیم در بافتهای مختلف وجود دارد احتمالاً بیشتر از طریق ادرار و ترشحات ریه و حلق به مایع آمنیوتیک وارد می شود و مایع آمنیوتیک احتمالاً حاوی هر پنج ایزوآنزیم این آنزیم می باشد.

آنزیم کراتین کیناز مهمترین آنزیم موجود در عضلات می باشد (۶). با رشد عضلانی و عروقی جنین، ایزوآنزیمهای CK_2 و CK_3 و با افزایش رشد و تکامل مغز و سیستم عصبی ایزوآنزیم CK_1 افزایش می یابند. این آنزیم نیز احتمالاً بیشتر از طریق سرم و ادرار وارد مایع آمنیوتیک می شود. آنزیم ارژیناز در سیکل اوره وجود دارد و آنزیم اختصاصی کبد محسوب می شود (۶). با توجه به حضور این آنزیم در کبد، با تشکیل و رشد کبد میزان این آنزیم نیز افزایش می یابد. این آنزیم نیز احتمالاً از طریق سرم و ادرار وارد مایع آمنیوتیک می شود. گراون و مولر (۱۹۷۶) مشاهده کردند که در تمام حیوانات فعالیت آنزیمها در مایع آمنیوتیک پایینتر از سرم است (۷).

محامد و همکاران (۱۹۸۵) میزان فعالیت آنزیمهای LDH، AST و ALP را در روزهای ۹۰ تا ۱۰۵ آبیستی در مایع آمنیوتیک گوسفند بترتیب $3.8/17 \pm 1.1/11 AU/L$ ، $4.1 \pm 0.2 U/L$ و $1.7 \pm 0.2 U/L$ گزارش کردند (۱۰). همین محققین نتایج مشابهی را در مورد آنزیمهای یاد شده در مایع آمنیوتیک گاو گزارش کردند (۹).

با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق، اگرچه آنزیمهای اندازه گیری شده در برخی گروههای سنی افزایش معنی داری نشان می دهند، اما کراتینین شاخص بهتری برای تخمین سن و تکامل جنین می باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری و زحمات مسئولین محترم کشتارگاه مجتمع



11. Potier, M., Guay, P., Lamothe, P., Bousquet, D., Dallaire, L. and Melancon, S.B. Origin and developmental patterns of lactase and other glycosidases in sheep amniotic and allantoic fluid. *J. Reprod. Fert.* 57: 49-57, (1979).

Significance of measuring some enzymes and creatinine of amniotic fluid as an indicator of fetal age and development in sheep

Nazifi Habibabadi S.¹, Aminlari M.², Rezai Tezengi Sh.³

¹*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz - Iran.* ²*Department of Basic Sciences Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University Shiraz - Iran.*

³*Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz - Iran.*

In this study 110 samples of amniotic fluid of sheep at different stage of pregnancy were assessed for creatinine (CR), alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), creatin kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH) and arginase. Significant increase ($p < 0.01$) in CR with increase in the age of fetus was observed. The lowest CR concentration was at less than one month old fetus and highest value was at 4-5 month old. No specific pattern was observed in LDH, AST, ALP, CK and arginase due to the age of fetus. In this case of enzymes, the lowest value were observed at less than one month old and the highest at 4-5 months old. However no significant pattern was seen in the enzymes at different ages. It is concluded that the best biochemical factor for determination of the age and development stage of sheep fetus is amniotic fluid CR.

Key words : Creatinine, Enzyme, Amniotic fluid, Fetal age, Sheep

