

الكشف عن إنزيم الكربونك أنهيدريز في التلم الناصف Sulcus median في البطين الرابع للدماغ الخلفي في الجرذ الأبيض البالغ (*Rutts rutts*)

ذكرى عطا إبراهيم

قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى

أنعم رشيد الصالحي

معهد أبحاث الأجنة ومعالجة العقم / جامعة النهدين

نهلة عبد الرضا البكري

قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة – (ابن الهيثم) / جامعة بغداد

استلم البحث في: 25/اذار /2014 ، قبل البحث في 22/حزيران /2014

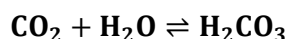
الخلاصة

أعدت طريقة ترسيب المعادن الثقيلة والمعتمدة على الكوبالت في الكشف عن إنزيم الكربونك أنهيدريز (Carbonic anhydrase) في التلم الناصف (Sulcus median) في الدماغ الخلفي (البطين الرابع Fourth ventricle) في الجرذ الأبيض البالغ (*Rutts rutts*). وقد أجري تعديل أساسي في طريقة العمل، إذ استعمل كلوريد الكوبالت ($CoCl_2$) بدلاً من فوسفات الكوبالت ($Co_3(PO_4)_2$) في وسط التفاعل. لم تظهر في هذه النتيجة أية فعالية كيميائية لأنزيم الكربونك أنهيدريز في المقاطع النسيجية. حيث ظهرت أرضية البطين الرابع للدماغ محددة بشكل واضح ولم يتم العثور على رواسب التفاعل الكيميائي في التلم الناصف لأرضية البطين الرابع. كان الملون المضاد (المثيل الأخضر) واضح بشكل جيد، وواضحاً في منطقة التلم الناصف. يتألف السطح البطني (Venter surface) للباحة المنخفضة (Area postrema) من خلايا عمودية لم تظهر فيها أية فعالية لأنزيم سواء في المنطقة الأمامية منها إذ تكون تركيباً مفرداً و سطحياً أو في المنطقة الخلفية حين تكون تركيباً مزدوجاً مستمراً مع بطانة القناة المركزية (Central canal).

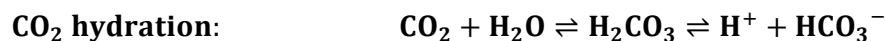
الكلمات المفتاحية: الباحة الخلفية، أنزيم كربونك أنهيدريز، التلم الناصف.

المقدمة :

إن إنزيم كربونيك أنهيدريز هو من مجموعة الأنزيمات الفازية ، الذي يضم 14 نظيراً إنزيمياً فعالاً ، مختلفاً في التركيب والخواص التحفيزية. يوجد هذا الإنزيم في مختلف الأنسجة ، و يشترك في عمليات وظيفية واسعة مثل توازن الحامض والقاعدة ، إنتقال الأيونات ، و ثاني أكسيد الكربون ، والتنفس ، وإمتصاص العظم ، والتحميض الكلوي ، وتكوين الكلوكرز ، وتكوين اليوريا ، وإفراز هورمونات الفص الأمامي للغدة النخامية ، وتكوين السائل المخي الشوكي والحامض المعدي [1]. يحفز إنزيم الكربونيك أنهيدريز التحلل المائي للتفاعل العكسي لثاني أكسيد الكربون في خلايا الجسم في الثدييات ، وقد اكتشف إنزيم الكربونيك أنهيدريز للمرة الأولى في خلايا الدم (Blood cells) للجرذ من [2] كعاملاً مساعداً لتفاعل غاز ثاني أكسيد الكربون والماء الذي يكون تفاعلاً عكسياً :



والميكانيكية الأكثر قبولاً لعمل هذا الإنزيم هي التفاعل العكسي بين ثنائي أكسيد الكربون وأيون الكربونيك (HCO_3^-) ، وميكانيكية مثل هذا التفاعل من المرجح أن تكون واحدة من المسارين الاتيين أو كليهما كما أشار إلى ذلك [3]:



لقد إقترح (4) أن إنزيم الكربونيك أنهيدريز يحتوي على مواقع تخص (CO_2) وأخرى تخص أيون الكربونيك (HCO_3^-) لكن ليس لحامض الكربونيك (H_2CO_3) لذلك غالباً ما يحفز هذا الإنزيم الأوكسدة المائية العكسية لثنائي أكسيد الكربون (CO_2) بدلاً من التحلل المائي له . وأن النتيجة النهائية من عمل هذا الإنزيم هي إنتاج أيونات الهيدروجين (H^+) والكربونيك (HCO_3^-) التي تكون جاهزة لأغراض التبادل مع المواد المتفاعلة غير الأيونية مثل ثنائي أكسيد الكربون (CO_2) والماء (H_2O) . إن الهدف من الدراسة الحالية هو الكشف عن إنزيم الكربونيك أنهيدريز في التلم الناصف في ارضية البطن الرابع لدماع الجرذ الأبيض البالغ .

المواد وطرق العمل

تفاعل إنزيم الكربونيك أنهيدريز الكيميانسجي

أتمدت طريقة ترسيب المعادن الثقيلة المستعملة من [5] والمعتمدة على الكوبالت مع تحويلها من [6]. وقد أستعمل في طريقة العمل كلوريد الكوبالت (CoCl_2) بدلاً من فوسفات الكوبالت في وسط التفاعل ، اذ يكون كلوريد الكوبالت أكثر ذوباناً من فوسفات الكوبالت [7] ، واستعملت في التفاعل مقاطع متسلسلة حضرت بطريقة شمع البارافين . إن نتائج هذه الطريقة هي نتائج نوعية وليست كمية بناءً على الطبيعة الكيميائية لحركيات التفاعل الكيميانسجي . يجري إعداد وسط التفاعل بإضافة المكونات الآتية حسب التسلسل المدرج لتقليل فرصة تكون رواسب ويتم ترشيح الوسط قبل استعماله :

1 – محلول بيكاربونات الصوديوم (NaHCO_3) (Fluka) ويحضر أنياً من إذابة 188 ملغم من بيكاربونات الصوديوم في 10 مل من الماء المقطر .

2 – محلول كلوريد الكوبالت (CoCl_2) (Fluka) ، ويحضر من إذابة 25 ملغم من كلوريد الكوبالت في 10 مل من الماء المقطر اللاأيوني .

3 – محلول فوسفات البوتاسيوم أحادية القاعدة (KH_2PO_4) بتركيز $\frac{1}{5}$ مولا ري .

4 – حامض الكبريتيك (H_2SO_4) بتركيز نصف مولا ري .

طريقة إجراء التفاعل

1 – وضعت الشرائح في الزايلين (Xylene) لإزالة الشمع منها ثم مررت بسلسلة تنازلية التركيز من الكحول المثلي ، ثم وضعت بشكل عمودي على ورق الترشيح .

2 – يتم إضافة وسط التفاعل على شكل قطرة بإستخدام قطارة باستور وترك القطرة تتساق لتغطي الشريحة النسجية بالكامل ووضع ورق الترشيح أسفل الشرائح.

3 – بعد مرور ثلاثين ثانية يتم إضافة قطرة أخرى من وسط التفاعل وتكرر هذه العملية عشرين مرة (مدة عشر دقائق) وفي درجة حرارة الغرفة (22 – 25 درجة مئوية) .

إظهار نتائج التفاعل

ويتم إظهار نتائج التفاعل وذلك بتكون (فوسفات الكوبالت) ، إذ يتم غمر الشرائح النسجية في محلول مخفف لكبريتيد الأمونيوم ($\text{NH}_4)_2\text{S}$ (مكون من خمس قطرات من كبريتيد الأمونيوم في 10 مل من الماء المقطر اللابوني) لثواني عدة ، ثم تغسل الشرائح سريعاً بالماء .

التلوين المضاد :

لونت المقاطع النسجية بملون أخضر المثل (C.I. 42000, Methyl green) بتركيز 0.25 % مدة ثلاث دقائق ، غسلت بعدها سريعاً بالماء وجففت بإستخدام ورق الترشيح . وحملت المقاطع بإستعمال مادة راتنجية (PVP) لغرض تثبيت غطاء الشريحة وتركت المقاطع النسجية لتجف في درجة حرارة الغرفة

النتائج

الكشف عن انظيم الكربونك أنهيدريز

لم تظهر النتيجة أية فعالية كيميائية لأنظيم الكربونك أنهيدريز في المقاطع النسجية المدروسة حيث كانت أرضية البطين الرابع للدماغ محددة ، بشكل واضح ولم يتم العثور على راسب التفاعل الكيميائي في الأخدود الوسطي لأرضية البطين الرابع وكان ملون المثل الأخضر هو ما تم ملاحظته بشكل جيد وواضح في المنطقة ، وظهرت نوى الخلايا ملونة بلون داكن (شكل 1) . وكانت الخلايا الأسطوانية العمودية المكونة للسطح البطني للباحة المنخفضة (Area postrema) متميزة ودون ظهور أية فعالية لأنظيم فيها وهذا ينطبق على الطبقات دون السطحية منها والنوى العصبية في المنطقة . ولم تظهر الباحة المنخفضة أية فعالية سواء في المنطقة الأمامية منها ، إذ تكون تركيباً مفرداً وسطياً أو في المنطقة الخلفية حين تكون تركيباً مزدوجاً مستمراً مع بطانة القناة المركزية (Central canal) (شكل 2) وبرهنت الكيمياء النسجية للإنظيم الكربونك أنهيدريز بإستخدام طريقة فوسفات الكوبالت المعدلة فقدان النشاط المحفز لهذا الإنظيم في الخلايا المبطنة والطبقات السطحية . وقد استخدم ملون أخضر المثل ملوناً مضاداً لهذا التفاعل .

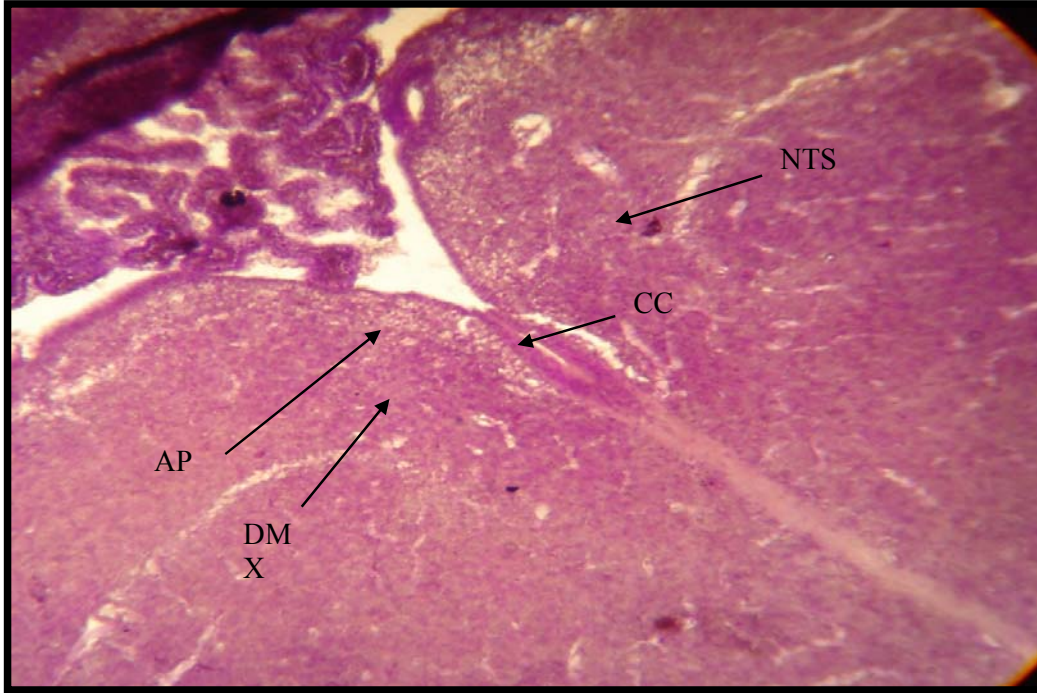
المناقشة

هدفت الدراسة الحالية التحقق من وجود نوعي qualitative لأنظيم الكربونك أنهيدريز في التلم الناصف للبطين الرابع ومنطقة الباحة المنخفضة (Area postrema) وأجريت تحويلات عدة لطريقة العمل للوصول إلى التحقق النوعي المطلوب . إن التفاعل الكيميائي المستخدم في هذه الدراسة يركز على تثبيت ثاني أكسيد الكربون CO_2 الناتج من

الفعالية الأنظمية لأنظيم الكربونك أنهيدريز وذلك بربطه بأيون الكوبالت . وقد إستبدل كلوريد الكوبالت (CoCl_2) بفوسفات الكوبالت ($\text{Co}(\text{PO}_4)_2$) للحصول على تركيز عالٍ لأيون الكوبالت [7] . كما استعمل فوسفات البوتاسيوم أحادية القاعدة لمعادلة تأثير تجمع أيون الهيدروكسيل الذي قد ينتج من الفاعلية الأنظمية ويغير معدل الحموضة في وسط التفاعل بالاتجاه القاعدي . إلا أنه على الرغم من هذه التعديلات والتحويلات والعمل ضمن إجراءات وظروف قياسية متكررة لم يتم الحصول على ما يؤيد وجود أنظيم الكربونك أنهيدريز في النلم الناصف للبطين الرابع أو في الأجزاء المحيطة به ، وهذا يعني أن لهذا الموقع من الدماغ الخلفي ، ليس له فعالية ضمن الأعضاء حول البطينية ، إذ لا يتمتع بفعاليات كيميائية أنظمية تؤهله ل يتم إدراجه ضمن الأعضاء حول البطينية كما إقترح [8] . وب الاستناد الى هذه الدراسة يمكن عد خلايا البطانة العصبية (Ependymal cells) لهذه المنطقة هي مماثلة لباقي أجزاء بطانة البطين الرابع وإمتداداتها الخلفية خلال القناة المركزية من الناحية الكيميائية . وقد بينت دراسة الباحث [9] أن التركيب المستدق لهذه المناطق من البطين الرابع متماثلة أيضا . ويظهر من الدراسات الحديثة أن دور خلايا البطانة العصبية لا يقع ضمن منظور الحاجز الدموي – الدماغى انما يقع ضمن فعاليات هذه الخلايا كخلايا جذعية توفر رصيذاً متجدداً من الخلايا للجهاز العصبى ، فقد بين (10) أن هذه الخلايا في بطانة تجاوير مقدم الدماغ (Telen cephalon) تولد خلايا نجميه وأخرى مولدة عصبية (Neurobalasts) .

المصادر

- 1-Parkkila S. and Parkkila A.-K. (1996): Carbonic anhydrase in the alimentary tract – role of the different isozymes and salivary factors in the maintenance of optimal conditions in the gastrointestinal canal. Scand. J. Gastroenterol. 31(4): 305-317
- 2- Meldrum N. U. and Rouphton F. J. W. (1933): Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. J. Physiol. (Lond.) 80: 113-142
- 3- Maren T. H. (1967): Carbonic anhydrase: chemistry, physiology and inhibition. Physiol. Rev. 47: 595-781
- 4- Coleman J. E. (1984): Carbonic anhydrase: zinc and the mechanism of catalysis. In: Tashian R. E. & Hewett-Emmett D. (Eds.): Biology and chemistry of the carbonic anhydrases. Ann. N. Y. Acad. Sci. 429: 26-48.
- 5- Hansoon, H. P. (1967): Histochemical demonstration of carbonic anhydrase. Histochemie. 11(2):112-128.
- 6- Brown, D.; Kumpulainen, T.; Routh, J.; and Orci, L. (1983): Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase in post-natal and adult rat kidney. Am.J.Physical, 245:F118-F118.
- 7- Styer, L. (1995): Biochemistry. 4th ed., W. H. Freeman and Co. USA.
- 8- Collin, P. (1989): The sulcus medianus organ in the fourth ventricle of the rabbit: A previously undescribed circumventricular organ. J.Anat. 162, 185-193.
- 9- Stumpf, W. E. and Barbero, M. G. (1978): SEM studies of the fourth ventricle: collicular recess, sulcus medianus, and recess of locus ceruleus and lateral recess, Scanning Electron Microscopy II, 811-816.
- 10- Carlen, M.; Meletis, K.; and Goritz C. (2009) Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuro blasts and astrocytes after stroke. Nature Neuroscience 12(3):259-267.



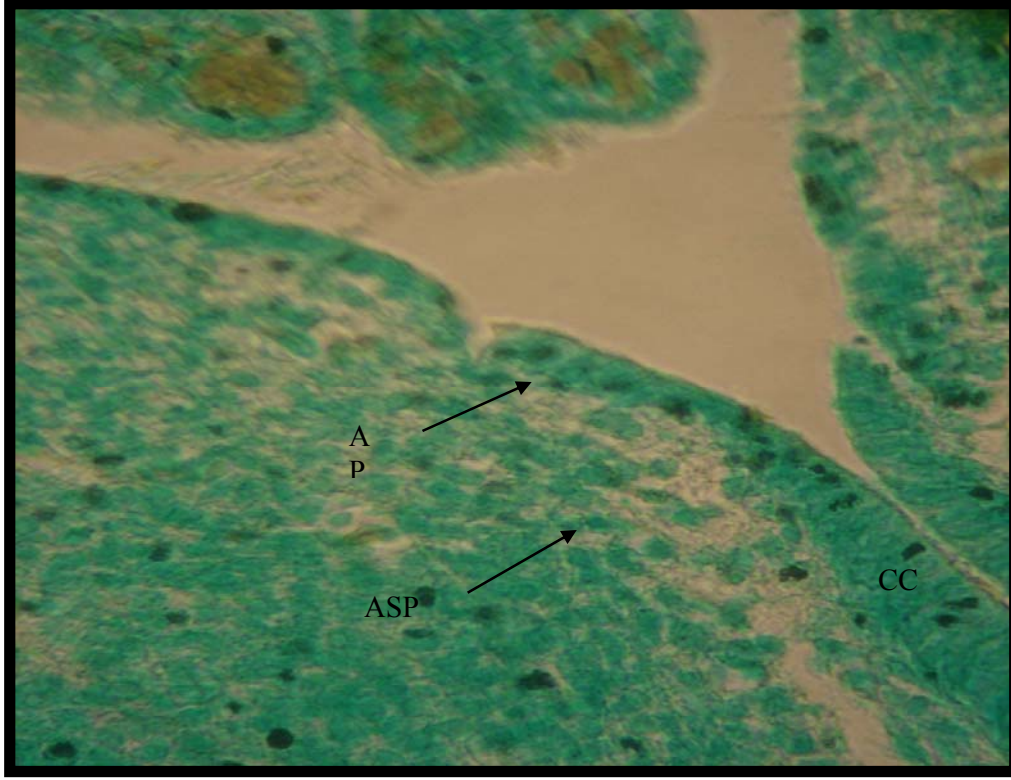
شكل رقم (1) مقطع تاجي مار في البطين الرابع يوضح التلم الناصف والباحة المنخفضة. ملون الهيماتوكسلين والايوسين ، 200×.

AP: Area postrema الباحة المنخفضة

DMX: Dorsal motor nucleus of vagus النواة الحركية الظهرية للعصب التائه

NTS: Nucleus of tractus solitaries نواة الرقعة المفردة

CC: Central canal القناة المركزية



شكل رقم (2) : مقطع تاجي مار في الثلم الناصف يظهر الجزء المنقاري من الباحة المنخفضة و المستمر مع بطانة القناة المركزية . ملون الميثيل الأخضر, $\times 400$

AP: Area posterema الباحة المنخفضة

SAP: Sub layers cells of area posterema الطبقات الخلوية تحت الباحة المنخفضة

CC: Central canal القناة المركزية

Detection of Carbonic Anhydrase Enzyme in Sulcus Median in Hind Brain (Fourth Ventricle) in the Hind Brain of the Adult White Rat (*Rutts rutts*)

Thekra A. Ibrahim

Dept. of Biology /College of Education for Pure Science / University of Diyala

Anam R. Al-Salihi

Institute of Embryo Researchers and Infertility Treatment / University of Al-Nahrain

Nahla A. Al-Bakri

Dept. of Biology /College of Education for Pure Science - Ibn Al-Haitham / University of Baghdad

Received in:25/March/2014, Accepted in :22/June/2014

Abstract

The method of heavy metals deposition which is based on cobalt in detection of Carbonic anhydrase enzyme in the Sulcus median in the hind brain (fourth ventricle) in the adult white rat (*Rutts rutts*). An essential amended in the method has been done by using cobalt chloride (CoCl_2) instead of cobalt phosphate ($\text{Co}_3(\text{PO}_4)_2$) in the reaction medium. Any efficacy of enzymic histochemical for carbonic anhydrase enzyme did not show in histological sections. The floor of the fourth ventricle of the brain is specific, clearly any histochemical reaction sediments have not been found in sulcus median of the floor of the fourth ventricle. The corresponding stain to green methyl which was observed clearly in sulcus median region. The ventral surface of area postrema composes of differentiated columnar cells without existence for any efficacy for carbonic anhydrase enzyme in it. Area postrema did not show any effective in both outerion region where appears as one mid line component or in back region where as continuing couple with central canal lining appears.

Key words: area postrema, carbonic anhydrase enzyme, sulcus median