

## تغییرات تکوینی برخی گلیکوکانژوگیت‌ها در طی تکامل غضروف مکمل (Meckel) در موش

آتنا فرخنده کلات\*؛ دکتر جواد بهارآراء<sup>۱</sup>؛ دکتر جینا خیاط زاده<sup>۲</sup>؛ دکتر علیرضا فاضل<sup>۳</sup>

### چکیده

**مقدمه:** گلیکوکانژوگیت‌ها مولکول‌هایی دارای یک قند متصل شده به چربی یا پروتئین هستند. قند انتهایی گلیکوکانژوگیت‌ها به صورت کاملاً اختصاصی توسط ترکیباتی به نام لکتین‌ها شناسایی می‌شود. گلیکوکانژوگیت‌ها در فرایندهای مختلف تکوینی نقش مهمی را ایفا می‌نمایند. در پژوهش حاضر با استفاده از روش لکتین هیستوشیمی تغییرات تکوینی برخی از گلیکوکانژوگیت‌ها در طی تکوین غضروف مکمل بررسی شد تا بتوان از این طریق به زمان‌های بحرانی در طی تکوین این غضروف پی برد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه جنین‌های ۱۵-۱۰ روزه و رویان ۱۸ روزه موش‌های Balb/C در فرمالین، فیکس شدند و برش‌های سریال از این نمونه‌ها تهیه شد و سپس در مجاورت سه نوع لکتین کنژوگه شده با آنزیم HRP شامل: Glycine max (SBA) اختصاصی برای قند N-استیل گالاکتوز آمین (GalNAc)، Arachis hypogaea (PNA) اختصاصی برای دی‌ساکارید گالاکتوز / N-استیل گالاکتوز آمین (Gal/GalNAc) و Maclura Pomifera (MPA) اختصاصی برای گالاکتوز (Gal) قرار گرفتند و سپس این واکنش‌های آنزیمی با مطالعات میکروسکوپ نوری بررسی گردیدند.

**یافته‌ها:** نتایج حاصل نشان داد که قند انتهایی GalNAc و دی‌ساکارید انتهایی Gal/GalNAc از ابتدای تجمع سلول‌های مزانشیمی در مرکز کمان اول تا تکوین نهایی غضروف مکمل و تبدیل آن به استخوان حضور داشته‌اند، اما قند انتهایی Gal نیز از روز ۱۳ به بعد قابل شناسایی گردید.

**نتیجه‌گیری:** بر اساس این یافته‌ها گلیکوکانژوگیت‌های دارای قند انتهایی N-استیل گالاکتوز آمین و دی‌ساکارید انتهایی گالاکتوز / N-استیل گالاکتوز آمین در کلیه مراحل تکوین غضروف مکمل از تجمع سلول‌های مزانشیمی تا تمایز کندروسیت‌ها به استئوبلاست‌ها در سطوح و ماتریکس سلول‌ها نقش داشته‌اند. به علاوه گلیکوکانژوگیت‌های دارای قند انتهایی گالاکتوز احتمالاً تنها در فرایند تمایز کندروسیت‌ها به استئوبلاست‌ها نقش مؤثری را ایفا نموده‌اند.

**کلیدواژه‌ها:** غضروف مکمل، گلیکوکانژوگیت، لکتین هیستوشیمی، موش. «دریافت: ۱۳۸۷/۱/۲۴ پذیرش: ۱۳۸۷/۱/۱»

۱. کارشناس ارشد زیست‌شناسی علوم جانوری گرایش سلولی-تکوینی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد و عضو باشگاه پژوهشگران جوان

۲. استادیار گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد

۳. استاد جنین‌شناسی و بیولوژی سلولی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

\* عهده‌دار مکاتبات: مشهد، بلوار وکیل آباد، خیابان صدف، صدف ۲، پلاک ۶۶. تلفن: ۰۵۱۱-۸۶۷۰۸۲۳

## مقدمه

در تکوین غضروف مکل، سیگنال‌های متقابل میان اکتودرم کمان اول حلقی و سلول‌های مزودرمی (با منشأ ستیغ عصبی جمجمه‌ای) اهمیت خاص دارند (۱). تراکم سلول‌های مزانشیمی در کمان اول و تمایز آن‌ها به کندروبلاست‌ها و سپس کندروسیت‌ها، غضروف مکل را ایجاد می‌نماید. غضروف مکل به‌عنوان یک الگو برای رشد استخوان ماندیبول توسط سیگنال‌های پاراکرین عمل می‌کند (۲ و ۳). قبلاً تصور می‌شد که غضروف مکل در فرایند تشکیل استخوان ماندیبول دخالت نداشته اما هم‌اکنون مشخص شده که بخش خلفی این غضروف با مکانیسم کلسیفیه شدن درون‌غضروفی در تشکیل استخوان ماندیبول شرکت می‌کند (۴). سلول‌های ستیغ عصبی در تشکیل غضروف مکل نقش اساسی دارند (۵). غضروف مکل در قسمت پشتی به کپسول گوش متصل می‌شود و دو استخوانچه چکشی (malleus) و رکابی (Incus) را به‌طریقه استخوانی شدن داخل غضروفی ایجاد می‌کند. قسمت میانی غضروف نیز ناپدید شده و پری‌کندریوم غضروف لیگامان قدامی مالنوس و لیگامان اسفینومانندیولار را ایجاد می‌نماید (۱۰-۵). در مطالعه‌ای مشخص شده که مسیر سیگنال‌دهی Hh برای تکوین غضروف مکل و همچنین میزان ایجاد غضروف، در مراحل انتهایی تکوین این غضروف مهم است (۳). در پژوهش دیگری در روی عامل رشد بافت پیوندی (CTGF) مشاهده شده که این عامل در مرحله تراکم مزانشیمی در تکوین غضروف مکل بیان می‌شود و در طی تمایز کندروسیت‌ها این عامل کاهش می‌یابد و احتمالاً

این عامل در مرحله آغاز تکوین غضروف مکل یعنی مرحله تراکم سلول‌های مزانشیمی از طریق القاء بیان ژن فیبرونکتین و میان‌کنش‌های سلول-سلول نقش دارد (۱۱). ثابت شده که سیگنال‌دهی اعضای خانواده TGF- $\beta$ ، با افزایش تکثیر کندروسیت‌های مشتق‌شده از سلول‌های ستیغ عصبی جمجمه‌ای و تولید ماتریکس خارج سلولی، آغازگر فرایند ایجاد غضروف مکل است. تأثیرات سیگنال‌دهی اعضای خانواده TGF- $\beta$  به سطوح بیان ژن Smad بسیار وابسته می‌باشد، به‌طوری‌که بیان زیاد Smad-7 به‌شدت مانع از تشکیل غضروف مکل است (پروتئین‌های Smad از طریق فسفریله شدن، سیگنال‌های TGF- $\beta$  را از غشای سلولی به هسته منتقل می‌کنند) (۵). همچنین مشاهده شده که پروتئین Hsp25 از طریق عملکرد در تمایز کندروسیت‌ها و دژنره شدن آن‌ها برای تکوین غضروف مکل ضروری است (۱۲). از آنجایی‌که گلیکوکانزوگیت‌ها ترکیباتی واجد کربوهیدرات هستند که در ماتریکس خارج سلولی و سطح سلول‌ها انتشار یافته‌اند و اهمیت بخش کربوهیدراتی این مولکول‌ها، همچنین قند انتهایی آن‌ها در پدیده‌های بیولوژیک و در مسیر تکوین توسط بسیاری از متخصصین عنوان شده است (۱۳ و ۲۱-۱۵). با توجه به این‌که تکوین مناسب غضروف مکل در فرایند ایجاد اسکلت در ناحیه کرانیوفاشیال و عدم بروز ناهنجاری‌ها در این ناحیه نقش مهمی را ایفا می‌نماید (۶)، لذا پژوهشگران بر آن شدند تا تغییرات تکوینی برخی از گلیکوکانزوگیت‌ها را با استفاده از روش لکتین هیستوشیمی در طی تکوین غضروف مکل بررسی نمایند

شفاف‌سازی شدند. پس از تهیه بلوک‌های پارافینی، برش‌ها به صورت سریال و به ضخامت  $5\mu$  با دستگاه میکروتوم آلمانی Leitz مدل 1512 تهیه گردیدند، که تعداد برش‌ها به طور متوسط ۲۰۰ برش برای هر جنین بوده است.

● مراحل انجام روش لکتین هیستوشیمی: برای انجام مطالعات، تعداد ۹۰ برش از مراحل جنینی به طور تصادفی انتخاب شدند و به روش‌های معمول بافتی پارافین‌زدایی و آب‌دهی گردیدند. سپس لکتین‌های موجود در جدول ۱ که با آنزیم HRP<sup>۱</sup> (خریداری شده از شرکت سیگما) کنژوگه شده‌اند، برای انجام مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. بدین منظور لکتین‌ها با بافر PBS<sup>۲</sup> برای رسیدن به غلظت  $10\mu\text{gr/ml}$  رقیق شدند. در مرحله بعد برش‌ها به مدت دو ساعت در اتاقک مرطوب در مجاورت لکتین‌های رقیق شده قرار گرفتند. پس از این مرحله، نمونه‌ها با محلول بافر شستشو شدند و به مدت دو دقیقه در محلول سوپسترای ۳ درصد DBA<sup>۳</sup> و بافر فسفات که مقدار  $20\mu\text{l}$ ،  $\text{H}_2\text{O}_2$  (به ازای هر  $10\text{ml}$  از محلول مذکور) به آن اضافه گردیده، قرار داده شدند. سپس کلیه مقاطع پس از شستشو با آب جاری برای ایجاد رنگ زمینه به مدت ۵-۲ دقیقه در محلول آلسین بلو با pH 2.5 قرار گرفتند. اتصال لکتین به قندهای انتهایی اختصاصی خود به صورت رنگ قهوه‌ای بروز می‌کند که حاصل واکنش آنزیم HRP با سوپسترای خود یعنی DAB می‌باشد و با استفاده از میکروسکوپ ۵ نفره Olympus

تا بتوان از این طریق به زمان‌های بحرانی در طی تکوین این غضروف پی برد.

## مواد و روش‌ها

● مراحل تهیه جنین‌ها: برای انجام آزمایش‌ها تعداد ۲۰ سر موش سفید از نژاد Balb/C (از مرکز واکسن و سرم‌سازی رازی)، دو ماهه و باکره انتخاب شدند و با موش‌های نر هم‌نژاد خود در قفس‌های مخصوص جفت‌گیری، آمیزش داده شدند. با مشخص شدن پلاک واژینال، آن روز، روز صفر حاملگی محسوب و سپس موش باردار در قفس مجزایی در شرایط استاندارد نگهداری گردید. در این آزمایش موش‌های حامله از روز دهم تا روز پانزدهم و به اضافه روز هجدهم تحت بی‌هوشی عمیق با کلروفورم قرار گرفته و به سرعت و دقت تشریح شدند. پس از سزارین موش‌ها و خارج نمودن جنین‌ها از دو شاخ رحمی، آن‌ها در پتری دیش محتوی سرم فیزیولوژی قرار داده شدند و پس از برداشتن پرده‌های جنینی، جنین‌های سالم پس از شستشو در سرم در محلول فیکساتور که فرمالین ۱۰ درصد بود قرار گرفتند. در این آزمایش تعداد ۹۰ جنین، مورد استفاده قرار گرفتند و روزهای مورد مطالعه شامل: روز دهم تا روز پانزدهم رویانی و روز هجدهم جنینی بوده است.

● مراحل تهیه برش‌های بافتی: پس از اتمام مراحل فیکس شدن، نمونه‌ها به روش‌های معمول بافتی توسط الکل اتیلیک با غلظت‌های افزایشی آبیگری و با گزین

1. Horseradish peroxidase

2. Phosphate buffered Saline

3. Diamino Benzidin

جدول ۱- انواع لکتین‌های مورد استفاده و خصوصیات آن‌ها

لکتین‌های آزمایش شده	علامت اختصاری	Carbohydrate – binding specific
Glycine max (Soybean)	SBA	$\alpha$ $\beta$ - D - GalNac
Arachis hypogaea (Peanut agglutinin)	PNA	$\beta$ - D - Gal -(1→3)- D - GalNac
Maclura Pomifera (Osage orange)	MPA	D – Gal

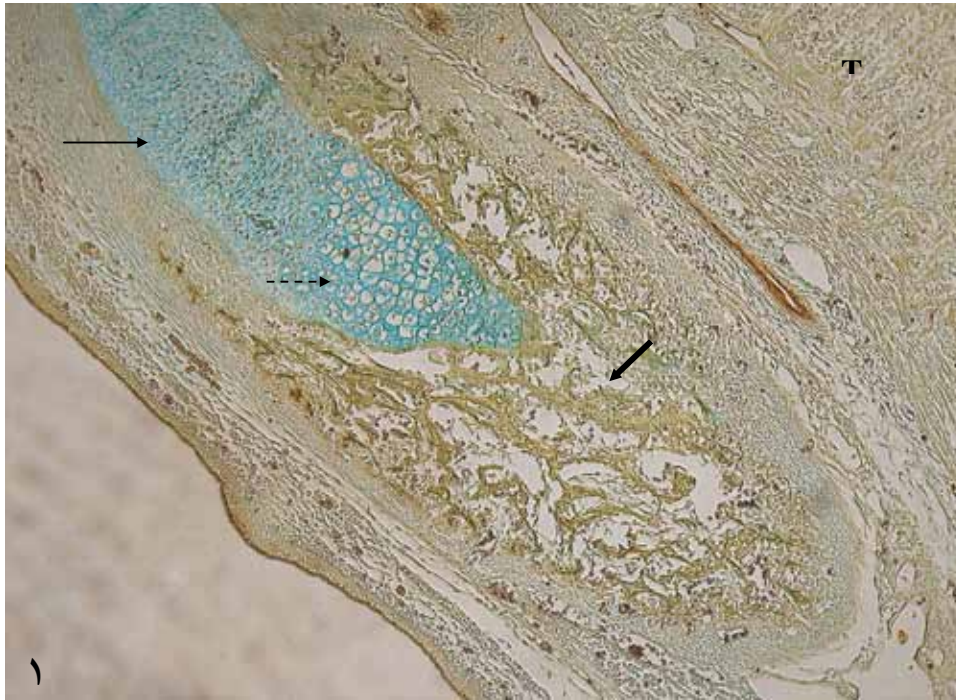
و در سطوح سلولی و گاهی نیز در نواحی گلزی با شدت متوسط به لکتین SBA پاسخ داده‌اند (این تراکم سلول‌های مزانشیمی، پیش‌ساز غضروف مکل خواهد بود). آندودرم کمان اول نیز در سطح راسی و سیتوپلاسم فوقانی، با شدت متوسط با لکتین مذکور واکنش داشته است. در روز دوازدهم، غضروف مکل پدیدار شده است و سیتوپلاسم و سطوح کندروبلاست‌ها با شدت کم و متوسط و سلول‌های مزانشیمی اطراف غضروف مکل در سیتوپلاسم، سطوح و استتاله‌ها با شدت متوسط و بالا با لکتین SBA واکنش داده‌اند.

در روز سیزدهم، سیتوپلاسم، سطوح و استتاله‌های کندروسیت‌های غضروف مکل و سلول‌های مزانشیمی اطراف آن با شدت متوسط به لکتین SBA پاسخ داده‌اند. در روز چهاردهم، سیتوپلاسم و سطوح کندروسیت‌های در حال دژنره شدن با شدت کم و سلول‌های مزانشیمی اطراف نیز در سیتوپلاسم، سطوح و ماتریکس بین سلولی با شدت بسیار کم با لکتین SBA واکنش داشته‌اند. در روز پانزدهم، سیتوپلاسم و سطوح کندروسیت‌های در حال دژنره شدن و سلول‌های مزانشیمی اطراف با شدت توسط با لکتین مذکور واکنش داده‌اند (تصویر ۱). در روز هیجدهم، غضروف مکل کاملاً از بین رفته و در ماتریکس

این واکنش‌ها در لام‌ها بررسی شدند. مشاهدات به صورت چندنفره صورت گرفت تا امکان بروز خطا به حداقل ممکن برسد. نمونه‌ها براساس شدت واکنش به لکتین‌ها طبق جدول درجه‌بندی شدت واکنش Gong و همکارانش (۲۲) درجه‌بندی شدند (جدول ۱).

### یافته‌ها

● لکتین SBA: در روز دهم، سلول‌های مزانشیمی با منشأ مزودرمی در درون کمان اول با شدت بسیار کم و سلول‌های مزانشیمی با منشأ ستیغ عصبی با شدت کم در سیتوپلاسم و سطوح خود به لکتین SBA پاسخ داده‌اند. در همین روز سلول‌های آندودرمی کمان اول در سطح راسی و سیتوپلاسم فوقانی و سلول‌های اکتودرمی در سیتوپلاسم و سطوح با شدت کم و متوسط با لکتین SBA واکنش داشته‌اند. سلول‌های مزانشیمی زیر این اپیتلیوم‌ها که عمدتاً از نوع سلول‌های ستیغ عصبی هستند و از نورواکتودرم به این مکان مهاجرت نموده‌اند، با شدت کم با لکتین مذکور واکنش مشخص داشته‌اند. در روز یازدهم، سلول‌های مزانشیمی درون کمان اول که عمدتاً از نوع سلول‌های ستیغ عصبی هستند، تراکم پیدا کرده‌اند



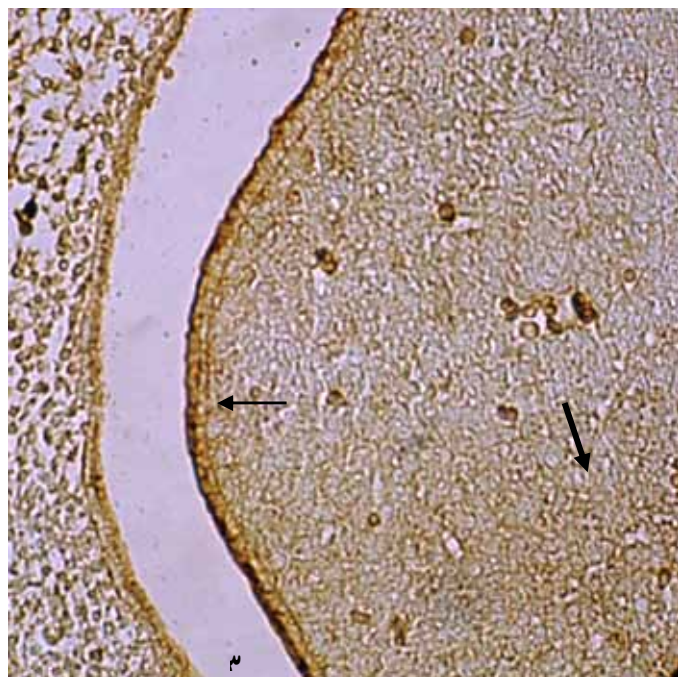
تصویر ۱- روز پانزدهم رویانی، غضروف مکل . T زبان ، پیکان سیاه باریک سلول‌های کندروسیت تمایز یافته با شدت متوسط، پیکان سیاه منقطع سلول‌های کندروسیت در حال دژنره شدن با شدت کم و پیکان سیاه ضخیم ماتریکس استخوان سازی برای ایجاد ماندیبول را با شدت متوسط و بالا نشان می دهند. لکتین SBA ; 100X .

عصبی می باشند و در مرکز کمان اول تراکم پیدا کرده اند، در ماتریکس بین سلولی با شدت بالا و در سیتوپلاسم و سطوح با شدت متوسط با لکتین PNA واکنش نشان داده اند. سلول‌های آندودرمی نیز همانند روز دهم واکنش نشان داده بودند (تصویر ۲ و ۳).

در روز دوازدهم، غضروف مکل ایجاد شده و سیتوپلاسم و سطوح کندروبلاست‌ها با شدت کم و متوسط و سلول‌های مزانشیمی اطراف غضروف با شدت بالا در سیتوپلاسم، سطوح و ماتریکس بین سلولی با لکتین PNA واکنش نشان داده اند. در روزهای سیزدهم و چهاردهم نیز به تدریج کندروسیت‌های در حال دژنره شدن با شدت کم و متوسط با لکتین PNA واکنش داشته اند، اما سلول‌های مزانشیمی اطراف غضروف روند رو به کاهش

استخوان ساز، که به طریقه درون غضروفی استخوانی گردیده، سیتوپلاسم و سطوح سلول‌های استئوبلاست و مزانشیمی شدت کم و متوسطی از واکنش با لکتین SBA را نشان داده اند.

● لکتین PNA: روز دهم، سلول‌های مزانشیمی درون و زیر اپیتلیوم کمان‌ها که عمدتاً از نوع ستیغ عصبی هستند در سیتوپلاسم، سطوح و استتاله‌ها با شدت بالا به لکتین PNA پاسخ داده اند. در همین روز سلول‌های آندودرمی کمان اول در سطح راسی و سیتوپلاسم فوقانی و در غشایی پایه اپیتلیوم با شدت بالا و در سیتوپلاسم و سطوح سلول‌های اکتودرمی کمان اول با شدت متوسط و بالا با لکتین مذکور واکنش داده اند. در روز یازدهم، سلول‌های مزانشیمی که عمدتاً از نوع سلول‌های ستیغ



**تصویر ۳-** روز یازدهم رویانی، نمایی از درون کمان اول حلقی. پیکان سیاه باریک اپیتلیوم آندودرمی کمان اول حلقی با واکنش بالا و بسیار بالا و پیکان سیاه ضخیم تجمع سلول‌های مزانشیمی (عمدتاً ستیغ عصبی) و واکنش متوسط و بالا را در مرکز کمان اول که پیش‌ساز غضروف مکل می‌باشند، مشخص می‌کنند. لکتین PNA ; 400X.

**تصویر ۲-** روز یازدهم رویانی، نمایی از کمان‌های حلقی اول و دوم. پیکان سیاه محل تجمع سلول‌های مزانشیمی (عمدتاً از نوع ستیغ عصبی) و واکنش آن‌ها را نشان می‌دهد. لکتین PNA ; 40X.

را مانند آنچه در واکنش با لکتین SBA مشاهده شد، مشخص کرده‌اند. در روز پانزدهم، سیتوپلاسم و سطوح کندروسیت‌های در حال دژنره‌شدن که در مراحل انتهایی از بین رفتن غضروف مکل می‌باشند و سلول‌های مزانشیمی اطراف غضروف با شدت متوسط و بالا به لکتین PNA پاسخ داده‌اند. در روز هجدهم، که غضروف مکل کاملاً از بین رفته است، در ماتریکس استخوان‌سازی، سیتوپلاسم، سطوح و استتاله‌های سلول‌های استئوبلاست و مزانشیمی با شدت متوسط و بالا با لکتین PNA واکنش

● **لکتین MPA:** در روز دهم، سلول‌های مزانشیمی درون کمان اول با لکتین MPA واکنش نشان نداده‌اند. سیتوپلاسم و سطوح سلول‌های اکتودرمی با شدت کم و سلول‌های آندودرمی و سلول‌های مزانشیمی زیر این اپیتلیوم‌ها که عمدتاً از نوع ستیغ عصبی هستند با شدت بسیار کم با لکتین MPA واکنش داشته‌اند. در روز یازدهم، سلول‌های آندودرمی کمان اول در سطح راسی و سیتوپلاسم فوقانی با شدت کم با لکتین MPA واکنش

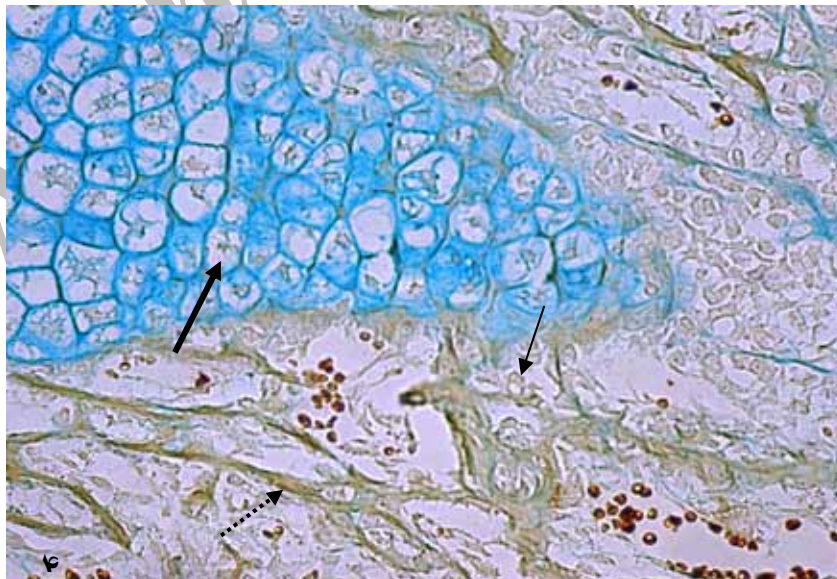
آنهایی که دژنره شدن پیشرفته تری را نشان می دهند با شدت بسیار کم و در ماتریکس استخوان سازی شده، سیتوپلاسم و سطوح سلول های مزانشیمی با شدت کم و متوسط به لکتین MPA پاسخ داده اند (تصویر ۴). در روز هیجدهم، سیتوپلاسم، سطوح و استتاله های سلول های مزانشیمی و استئوبلاست با شدت متوسط و بالا با لکتین MPA واکنش داشته اند.

#### بحث

به طور کلی حضور برخی از گلیکوکانژوگیت های مورد مطالعه با وقوع برخی از پدیده های تکوینی هم زمان بوده است که به تفصیل به قرار ذیل می باشد:

● لکتین SBA: در پژوهشی عنوان شده که سیگنال های متقابل میان اکتودرم و آندودرم کمان و سلول های سستیغ

داشته اند و سلول های مزانشیمی درون کمان اول که تراکم هم پیدا کرده اند، با لکتین مذکور واکنش نداده اند. در روز دوازدهم، که غضروف مکل پدیدار گشته، سیتوپلاسم و سطوح کندروبلاست ها و سلول های مزانشیمی اطراف با شدت کم و گاهی متوسط به لکتین MPA پاسخ داده اند. در روز سیزدهم، واکنش در سیتوپلاسم و سطوح کندروسیت ها با شدت کم و در سیتوپلاسم، سطوح و استتاله های سلول های مزانشیمی اطراف با شدت کم و گاهی متوسط با لکتین MPA واکنش داشته اند. در روز چهاردهم، سیتوپلاسم و سطوح کندروسیت های در حال دژنره شدن با شدت کم و متوسط و سلول های مزانشیمی اطراف با شدت بسیار کم با لکتین MPA واکنش داده اند. در روز پانزدهم، سیتوپلاسم و سطوح کندروسیت های در حال دژنره شدن با شدت کم و



تصویر ۴- روز پانزدهم رویانی، غضروف مکل و ماتریکس استخوان سازی برای ایجاد استخوان ماندیبول. پیکان سیاه ضخیم سلول های کندروسیت دژنره شده با شدت بسیار کم و کم، پیکان سیاه باریک سلول های مزانشیمی درون ماتریکس استخوان ساز با شدت کم و پیکان سیاه منقطع

سلول های استئوبلاست را با شدت متوسط و بالامشخص می نمایند. لکتین MPA ; 400X.

عصبی در مورفوژنز غضروف مکل اهمیت دارند (۱). این احتمال هست که حضور گلیکوکانزوگیت‌های دارای قند انتهایی N-استیل گالاکتوز آمین در اکتودرم و آندودرم کمان اول در طی روزهای دهم و یازدهم که روندی روبه افزایش را نشان داده‌اند، با سیگنال‌های القاء تراکم سلول‌های مزانشیمی برای ایجاد و تکوین اولیه غضروف مکل در ارتباط باشند. در مطالعه دیگری مشخص گردیده که عامل رشد بافت پیوندی (CTGF) از طریق القاء بیان ژن فیبرونکتین و میان‌کنش‌های سلول-سلول، در مرحله تراکم سلول‌های مزانشیمی در طی تکوین غضروف مکل نقش دارد (۱۱). از آنجایی که فیبرونکتین گلیکوپروتئینی دارای قند GalNAc می‌باشد (۲۳ و ۲۴)، لذا تصور می‌شود که گلیکوکانزوگیت‌های دارای قند انتهایی GalNAc که با شدت متوسط در سطوح و نواحی گلژی در سلول‌های مزانشیمی ستیغ عصبی متراکم در درون کمان حضور دارند، با بیان گلیکوپروتئین فیبرونکتین و عملکرد این مولکول به‌عنوان بستری برای مهاجرت، حرکات سلولی و تمایز درگیر باشند (۱۳). از روز دهم تا دوازدهم سلول‌های مزانشیمی، نواحی اطراف غضروف روند رو به افزایشی را در واکنش با لکتین SBA نشان داده‌اند و در روزهای سیزدهم و چهاردهم از شدت واکنش به تدریج کم می‌گردد. پیشنهاد می‌شود که حضور گلیکوکانزوگیت‌های دارای قند انتهایی N-استیل گالاکتوز آمین در کاندروسیت‌ها با حضور پروتئین Hsp25 و عملکرد آن در تمایز و دژنره‌شدن مرتبط باشد. تصور می‌شود که افزایش شدت واکنش به لکتین SBA در سلول‌های مزانشیمی اطراف غضروف و تا حدودی هم در کاندروسیت‌های در حال دژنره‌شدن در روز پانزدهم و در روز هیجدهم به‌علت دخالت گلیکوکانزوگیت‌های دارای

عصبی در مورفوژنز غضروف مکل اهمیت دارند (۱). این احتمال هست که حضور گلیکوکانزوگیت‌های دارای قند انتهایی N-استیل گالاکتوز آمین در اکتودرم و آندودرم کمان اول در طی روزهای دهم و یازدهم که روندی روبه افزایش را نشان داده‌اند، با سیگنال‌های القاء تراکم سلول‌های مزانشیمی برای ایجاد و تکوین اولیه غضروف مکل در ارتباط باشند. در مطالعه دیگری مشخص گردیده که عامل رشد بافت پیوندی (CTGF) از طریق القاء بیان ژن فیبرونکتین و میان‌کنش‌های سلول-سلول، در مرحله تراکم سلول‌های مزانشیمی در طی تکوین غضروف مکل نقش دارد (۱۱). از آنجایی که فیبرونکتین گلیکوپروتئینی دارای قند GalNAc می‌باشد (۲۳ و ۲۴)، لذا تصور می‌شود که گلیکوکانزوگیت‌های دارای قند انتهایی GalNAc که با شدت متوسط در سطوح و نواحی گلژی در سلول‌های مزانشیمی ستیغ عصبی متراکم در درون کمان حضور دارند، با بیان گلیکوپروتئین فیبرونکتین و عملکرد این مولکول به‌عنوان بستری برای مهاجرت، حرکات سلولی و تمایز درگیر باشند (۱۳). از روز دهم تا دوازدهم سلول‌های مزانشیمی، نواحی اطراف غضروف روند رو به افزایشی را در واکنش با لکتین SBA نشان داده‌اند و در روزهای سیزدهم و چهاردهم از شدت واکنش به تدریج کم می‌گردد. پیشنهاد می‌شود که حضور گلیکوکانزوگیت‌های دارای قند انتهایی N-استیل گالاکتوز آمین در سلول‌های مزانشیمی در مراحل آغازین تکوین غضروف مکل و تمایز سلول‌های مزانشیمی به کاندروبلاست‌ها و سپس به کاندروسیت‌ها نقش داشته باشند، اما در مراحل دژنره‌شدن کاندروسیت‌ها در



در جنین Zebrafish مشخص نموده که Alk-8 گرادیان‌هایی از سیگنال‌دهی BMP را برای تشکیل غضروف‌های کمان‌های حلقی حاصل از سلول‌های ستیغ عصبی ایجاد می‌نماید (۲۶). لذا این احتمال وجود دارد که گلیکوکانژوگیت‌های دارای دی‌ساکارید انتهایی گالاکتوز N-استیل گالاکتوز آمین که در شدت‌های بالا در سلول‌های مزانشیمی درون کمان اول در روزهای دهم و یازدهم مشاهده شده‌اند، با بیان ژن‌های خانواده Pairad box و یا اعضای خانواده TGF- $\beta$  در ارتباط باشند. واکنشی که در ماتریکس بین سلول‌های مزانشیمی درون کمان اول رخ داده است، می‌تواند به دلیل حضور گلیکوپروتئین ترومبواسپاندین باشد که در تکثیر و مهاجرت سلول‌ها نقش دارد (۱۳ و ۲۳). همچنین واکنشی که در غشای پایه اپیتلیوم‌ها رخ داده، امکان دارد در ارتباط با حضور هر یک از گلیکوپروتئین‌های غشای پایه نظیر: کلاژن نوع IV، لامینین و انتاکتین باشد که هر یک عملکردهای خاصی را بر عهده دارند (۱۳). بنابراین این احتمال هست که گلیکوکانژوگیت‌های دارای دی‌ساکارید انتهایی Gal/GalNac در سلول‌های مزانشیمی در روزهای دوازدهم، سیزدهم و چهاردهم، در روند تمایز کندروبلاست‌ها و آغاز تکوین غضروف نقش داشته باشند، اما در مراحل دژنره‌شدن کندروسیت‌ها نقش خاصی را ایفا ننمایند. این امکان وجود دارد که عدم واکنش لکتین PNA در مراحل دژنره‌شدن به دلیل عدم حضور دی‌ساکارید انتهایی گالاکتوز N-استیل گالاکتوز آمین باشد و یا این‌که این دی‌ساکارید با مولکول‌هایی چون اسیدسیالیک پوشیده شده باشد که برای اطمینان از

قند انتهایی GalNac در فرایند تمایز سلول‌های مزانشیمی به استئوبلاست‌ها و یا پروسه دژنره‌شدن کندروسیت‌ها باشد. این امکان هست که گلیکوکانژوگیت‌های دارای قند انتهایی GalNac در تمایز سلول‌های مزانشیمی به استئوبلاست‌ها و تمایز استئوبلاست‌ها به استئوسیت‌ها تا حدودی مؤثر باشند.

● لکتین PNA: در پژوهشی که اثر سیگنال‌دهی میان اکتودرم، آندودرم و سلول‌های ستیغ عصبی بعد از مهاجرت را در کمان اول بررسی نموده، نشان داده شده است که ژن BMP-4 که یک زیررده از خانواده TGF- $\beta$  می‌باشد، در اکتودرم و آندودرم کمان اول بیان می‌گردد و ژن FGF-8 نیز در بخش پروکسیمال اکتودرم بیان می‌شود و بیان ژن‌های Msx-1 و Msx-2 را در مزانشیم کمان تنظیم می‌نماید (۱). این امکان وجود دارد که گلیکوکانژوگیت‌های دارای دی‌ساکارید انتهایی گالاکتوز N-استیل گالاکتوز آمین که با شدت بالا در سطح راسی و سیتوپلاسم فوقانی و به‌خصوص غشای پایه آندودرم و اکتودرم کمان اول و سیتوپلاسم، سطوح و استتاله‌های سلول‌های مزانشیمی زیر این اپیتلیوم‌ها در روزهای دهم و یازدهم حضور داشته‌اند، با بیان ژن‌های BMP-6 و FGF-8 در اکتودرم و آندودرم و ژن‌های Msx-1 و Msx-2 در مزانشیم رابطه داشته باشند. در مطالعه‌ای که در روی ژن‌های خانواده Paired box در موش انجام شده، نشان داده شده که ژن Cart-1 در طی تکوین اولیه مزانشیم سر و سپس در کمان‌های حلقی و در نهایت در نواحی ایجاد غضروف بیان می‌شود (۲۵). همچنین در پژوهش دیگری در روی رسپتوری از خانواده TGF- $\beta$  تیپ I، به نام Alk-8

حالی که PGCهای جنین Rat دارای قند انتهایی GalNAc می‌باشند (۲۸). واکنشی که در ماتریکس استخوان‌ساز در پاسخ به لکتین‌های SBA و PNA مشاهده می‌گردد، می‌تواند به دلیل حضور گلیکوپروتئین‌هایی چون کلاژن نوع I که ویژه ماتریکس‌های استخوان‌ساز هستند (۱۳) و (۱۴) و یا به دلیل حضور سایر عوامل مؤثر در تکوین استخوان باشد.

● لکتین MPA: این تصور وجود دارد که در روزهای دهم و یازدهم، گلیکوکانژوگیت‌های دارای قند انتهایی گالاکتوز در فرایند ایجاد غضروف مکل و تکوین اولیه آن نقش چندانی نداشته باشند و یا در مقادیر کم مؤثر باشند، اما این احتمال هست که گلیکوکانژوگیت‌های دارای قند انتهایی گالاکتوز که در اکتودرم و آندودرم حضور دارند تا حدودی در سیگنال‌دهی این سلول‌ها برای تکوین اولیه غضروف تأثیرگذار باشند. این توزیع با نتایج پژوهشی که در روی رت انجام شده در این خصوص که لکتین MPA بعد از از بین رفتن ساختار غضروفی واکنش داده است (۲۹)، تا حدودی مطابقت می‌نماید. این احتمال وجود دارد که گلیکوکانژوگیت‌های دارای قند انتهایی گالاکتوز در فرایند استخوان‌سازی و تمایز سلول‌های مزانشیمی به استئوبلاست‌ها نقش داشته باشند که این حالت تقریباً مشابه با پاسخ لکتین PNA بوده است و پیشنهاد می‌شود که برخی از ترکیبات دارای قند انتهایی گالاکتوز از زمان آغاز تکوین استخوان، شروع به تشکیل نموده‌اند.

در یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان چنین عنوان نمود که احتمالاً گلیکوکانژوگیت‌های دارای قند انتهایی N-استیل

این احتمال می‌بایست از آنزیم سیالیداز قبل از به‌کارگیری لکتین PNA استفاده نمود. این افزایش شدت واکنش در روز پانزدهم، امکان دارد نشان‌دهنده این موضوع باشد که گلیکوکانژوگیت‌های دارای دی‌ساکارید انتهایی Gal/GalNAc در سیتوپلاسم و سطوح کندروسیت‌هایی که در مراحل پایانی دژنره‌شدن در غضروف هستند و در سیتوپلاسم و سطوح، استتاله‌ها و ماتریکس بین سلول‌های مزانشیمی اطراف غضروف حضور دارند، در فرایند تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاست و یا پروسه دژنره‌شدن کندروسیت‌ها دخالت داشته باشند. شدت واکنش در لکتین PNA در روز هیجدهم نسبت به لکتین SBA بالاتر بوده است و می‌تواند بیان‌گر این مطلب باشد که گلیکوکانژوگیت‌های دارای دی‌ساکارید انتهایی Gal/GalNAc در فرایند استخوانی شدن غضروف مکل مؤثرتر و با اهمیت‌تر از گلیکوکانژوگیت‌های دارای قند انتهایی GalNAc بوده‌اند. در پژوهشی که در روی غضروف مکل در جنین رت انجام شده، مشخص شده که اولیگوساکارید انتهایی N-استیل گلوکزآمین ویژه استخوان‌ها است (۲۷). اما در مطالعه حاضر به نظر می‌رسد که دی‌ساکارید انتهایی گالاکتوز N-استیل گالاکتوز آمین، ویژه استخوان در غضروف مکل می‌باشد و این اختلاف می‌تواند به دلیل تفاوت در گونه‌های مورد مطالعه باشد، چرا که یافته‌ای شبیه به این در پژوهشی در روی مارکروهای اختصاصی PGCهای موش و رت که در حال مهاجرت به سوی گنادها هستند صورت گرفته و مشاهده شده PGCهای جنین موش دارای قند انتهایی  $\alpha$ -Fucos بوده‌اند، در

را ایفا نمایند. حضور گلیکوکانژوگیت‌های مذکور می‌تواند با حضور ژن‌ها و محصولات ژنی که به آن‌ها اشاره گردید مرتبط باشد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که از زحمات سرکارخانم متجدد و جناب آقای دکتر مهدی جلالی و همکاری گروه ژنتیک و علوم تشریح دانشکده علوم پزشکی مشهد و گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد به‌منظور انجام این پژوهش کمال تشکر و قدردانی را به‌عمل آورد.

گالاکتوز آمین و گلیکوکانژوگیت‌های دارای دی‌ساکارید انتهایی گالاکتوز/N- استیل گالاکتوز آمین در کلیه مراحل تکوین غضروف مکل از تجمع سلول‌های مزانشیم و سیگنال‌دهی سلول‌های آندودرمی و مزانشیمی، تا تمایز کندروسیت‌ها به استئوبلاست‌ها در سطوح و ماتریکس سلول‌ها نقش داشته‌اند، گرچه گلیکوکانژوگیت‌های دارای دی‌ساکارید انتهایی گالاکتوز/N- استیل گالاکتوز اغلب حضور بیشتری را نشان داده‌اند. به‌علاوه به‌نظر می‌رسد که گلیکوکانژوگیت‌های دارای قند انتهایی گالاکتوز تنها در فرایند تمایز کندروسیت‌ها به استئوبلاست‌ها نقش مؤثری

Archive of SID

## Abstract

### *The developmental changes in certain glycoconjugates during the development of Meckel's cartilage in the mouse*

*Farkhondeh Kalat, A. <sup>1</sup>; Baharara, J. <sup>2</sup>; Khayatzadeh, J. <sup>2</sup>; Fazel, A. <sup>3</sup>*

*1. M.S in Animal Cellular and Developmental Biology, Mashhad Islamic Azad University*

*2. Assitant Professor, Department of Biology, Mashhad Islamic Azad University*

*3. Professor of embryology and Cellular Biology, Mashhad University of Medical Sciences*

**Introduction:** *Glycoconjugates are molecules with a carbohydrate bounded to proteins. The terminal sugars of glycoconjugates are specific identified by lectins. Glycoconjugates play an important role in various developmental processes. This study examines the developmental changes in certain glycoconjugates during the development of Meckel's cartilage through lectin histochemistry.*

**Materials and Methods:** *10-15-day-old Balb/C mice embryos as well as 18-day-old fetuses were fixed in formalin. Serial sections of the samples were gathered for incubation with three types of conjugated lectins with HRP enzyme including: Glycine max (SBA) specific to N-acetylgalactoseamin (GalNAc), Arachis hypogaea (PNA) specific to Galactose / N-acetylgalactoseamin (Gal/GalNAc) and Maclura Pomifera (MPA) specific to Galactose (Gal). The enzymatic reactions were then studied using optical microscope.*

**Results:** *Our results indicated that terminal carbohydrate of GalNAc and terminal disaccharide of Gal/GalNAc were presented from initiate condensation of mesenchyme cells in the center of first branchial arch until the end of Meckel's cartilage development. But terminal carbohydrate of Gal was noticed from day 13 on. .*

**Conclusion:** *Our study showed that glycoconjugates with terminal carbohydrate of N-acetylgalactoseamin and terminal disaccharide of Galactose / N-acetylgalactoseamin have critical role in condensation of mesenchyme cells, cartilage formation and chondrocyte differentiation to osteocyte. Furthermore, glycoconjugates with terminal carbohydrate of Galactose probably play an important role in chondrocyte differentiation to osteoblasts.*

**Key words:** *Meckel's cartilage, glycoconjugate, lectin histochemistry, mouse.*

## منابع

1. Liu W, Selever J, Murali D, Sun X, Brugger SM, Schwartz Ma L, et al. Threshold-specific requirements for Bmp4 in mandibular development. *Developmental Biology*. 2005; 283(2): 282-293
2. Ramaesh T, Bard JBL. The growth and morphogenesis of the early mouse mandible: a quantitative analysis. *J Anat*. 2003; 203(2): 213-222
3. Melnick M, Witcher D, Bringas PJr, Carlsson P, Jaskoll T. Meckel's Cartilage Differentiation is Dependent on Hedgehog Signaling . *Cells Tissues Organs*. 2005; 179:146-157
4. Ishizeki K, Saito H, Shinagawa T, Fujiwara N, Nawa T. Histochemical and immunohistochemical analysis of the mechanism of calcification of Meckel's cartilage during mandible development in rodents. *J Anat* 1999; 194: 265-277
5. Ito Y, Bringas P, Mogharei A, Jingsong Z, Chuxia D, Yang C. Receptor-regulated and inhibitory Smads are critical in regulating transforming growth factor  $\beta$ -mediated Meckel's cartilage development . *Developmental dynamics* 2002; 224 (1): 69-78
6. Drake RL, Vogl W, Mitchell AWM. *Gray's Anatomy for Students*. 3<sup>rd</sup> volume, Philadelphia, chapter8, Head & neck; 2005; PP: 748-757
7. Orliaguet T, Darcha C, Déchelotte P, Vanneuville G. Meckel's cartilage in the human embryo and fetus. *The Anatomical Record*. 1994; 238(4): 491 – 497
8. Luke DA. Cell proliferation in palatal processes and Meckel's cartilage during development of the secondary palate in the mouse. *J Anat*. 1989; 165: 151-158
9. Rodríguez-Vázquez JF, Mérida-Velasco JR, Mérida-Velasco JA, Sánchez-Montesinos I, Espín-Ferra J, Jiménez-Collado J. Development of Meckel's cartilage in the symphyseal region in man . *The Anatomical Record*. 1998; 249: 249 – 254
10. Orliaguet T, Dechelotte P, Scheye T, Vanneuville G. The relationship between meckel's cartilage and the development of the human fetal mandible. *Surgical and Radiologic Anatomy* 1993; 15(2): 113-118
11. Shimo T. Connective Tissue Growth Factor in Meckel's Cartilage Development. *Craniofacial Development and Growth; Molecular Biology*. San Diego Convention Center Room 17B, International Congress Series 2002

12. Mayumi S, Miyuki Y, Tomohiko W, Shoichi I, Osamu A. Different expression of 25-kDa heat-shock protein (Hsp25) in Meckel's cartilage compared with other cartilages in the mouse. *Anatomy and embryology* 2003; 206(3): 163-173
13. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell* (Forth Edition) . Published by Garland Science, a member of the Taylor & Francis Group 2002; pp: 583-614, 1065-1125
14. Gerald K. *Cell and molecular biology: concepts & experiments* (3rd Edition). John Wiely & Sons.inc 2001; pp: 243-278
15. Lodish H, Berk A, Zipursky Lawrence S, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular Cell Biology* (4th Edition) . W. H. Freeman & Co. 2000; pp: 968-1002
16. Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze F, Hart G, Marth J. *Essentials of Glycobiology* . Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York , Edition: illustrated, 1999; pp: 1-17.
17. Fazel AR, Sumida H, Schulte BA, Thompson RP. Lectin histochemistry of the embryonic heart: fucose-specific lectin binding sites in developing rats and chicken. *American J. of Anatomy*. 1989; 184: 76-84
18. Fazel AR, Schulte BA, Thompson RP, Spicer SS. Presence of unique glycoconjugate on the surface of rat primordial germ cells during migration. *Cell Differentiation*. 1987; 21: 199-211
19. Murray Robert K, Granner Daryl K, Mayes Peter A, Rodwell Victor W. *Harper's Illustrated Biochemistry* (26th Edition) . McGraw-Hill. 2003; chapter 13(pages 100-112), chapter 14 (pages 112-121) , chapter 48 (pages 565-588).
20. Morrison-Graham K, Schatteman GC, Bork T, Bowen-Pope DF, Weston JA. A PDGF receptor mutation in the mouse (Patch) perturbs the development of a non-neuronal subset of neural crest-derived cells. *Development*. 1992; 115: 133-142
21. Griffith CM, Sanders EJ. Changes in glycoconjugate expression during early chick embryo development: a lectin-binding study. *Anat Rec* 1991; 231(2):238-50
22. Gong H, Wen YE, Freddo TF, Hernandez MR. Hyaluronic acid in the normal and glaucomatous optic nerve. *EXP Eye Res* 1997; 64:587-595
23. Marino TA. Development and fat of the face, nasal cavity, palate, salivary glands, teeth and hypophysis. Text for Facial Development

24. Graham A. Development of the pharyngeal arches. *Am J Med Genet A* 2003; 119(3):251-6
25. West PF, Ladher R, Barlow A, Graveson A. Signalling interactions during facial development . *Mechanisms of Development* 1998; 75(1-2): 3-28
26. Payne-Ferreira TL, Yelick PC. Alk8 Is Required for Neural Crest Cell Formation and Development of Pharyngeal Arch Cartilages. *Developmental Dynamics*. 2003; 228:683-696
27. Zschäbitz A, Weiser H, Stofft E, Krahn V, Gabius HJ, Khaw A, et al. Characterization of glycoconjugate expression during development of Meckel's cartilage in the rat. *Anatomy and Embryology* 1995; 191(1): 47-59
28. Fazel AR, Schulte BA, Spicer SS. Glycoconjugate unique to migrating primordial germ cells differs with genera. *Anatomical Record* 1990; 228: 177-184
29. Nakamura M, Akita H, Mizoguchi I, Kagayama M. A histochemical localization on Maclura pomifera lectin during osteogenesis. *Histochemistry and Cell Biology* 1989; 92(3): 225-230

Archive of SID