Archive of SID

پراکندگی اسیدهای سیالیک در گانگلیوژنز عصب تری جمینال

*دکتر مختار جعفرپور، دکتر علیرضا فاضل

* گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

خلاصه

مهاجرت وتکامل سلولهای نورال کرست در جهت تشکیل گانگلیونهای درحال تکامل تری جمینال درحین دوره تکامل جنینی مورد مطالعه قرارگرفت. با استفاده از لکتین های ویژه، گلیکوپروتئینهای کونژوگه با اسیدسیالیک، موجود درسطح سلولهای نورال کرست، در این دوره تکاملی مورد مطالعه قرارگرفتند. لکتین های مورد استفاده شامل WGA, SBA, MPA, PNA و GSA1B4 همگی با HRP کونژوگه شده بودند.

جنین های رت از نژاد Sprague Dauley ، در سنین مختلف بارداری، برای مطالعات بافت شناسی و هیستوشیمیایی تهیه شدند. هر برش تهیه شده ازنمونه های فوق درمعرض لکتین قرارگرفته و با استفاده از رنگ DAB، قندهای انتهایی گلیکوکونژوگیت ها شناسایی شدند. با این ردیابی هیستوشیمیایی مهاجرت سلولهای نورال کرست درجهت شکمی_طرفی لوله عصبی مشاهده شد. بعضی از این سلولهای مهاجر با WGA که ویژه اسیدهای سیالیک است، به شدت واکنش نشان دادند. مجموعه بزرگی از این سلولها در روزهای بالاترجنینی، درطرفین پل مغزی مستقر شده وهمچون مورد بالا واکنش شدیدی با WGA نشان دادند. باتوجه به این یافته ها پیشنهاد می شود که سیالوگلیکوکونژوگیت ها درتکامل گانگلیون های تری جمینال و تشکیل و توزیع رشته های عصبی وابسته دخیل هستند.

واژه های کلیدی: اسیدهای سیالیک، گانگلیون های تری جمینال، لکتین، DAB، MPA، SBA، WGA

مقدمه

اهمیت گلیکو کونژوگیت ها در سیستم های تکاملی موجودات زنده به خوبی شناخته شده است (۶، ۷). اسید های سیالیک به عنوان قندهای انتهائی زنجیره های گلیکوکونجوگیت ها نقش مهمی در مهاجرت سلولهای نورال کرست، تکامل سلولهای گانگلیونی و رشته های عصبی مربوطه ایفا می کنند(۹، ۱۳). پیدایش اسید سیالیک در مکان و زمان خاصی از مراحل مختلف تکاملی عناصر عصبی مورد تحقیق بسیاری از محققین قرار گرفته است. توزیع وسیع اسید سیالیک درسطوح مولکولی و سلولی و بار منفی قوی آن، و وجود انواع ویژه بافتی آن، موجب این پیشنهاد می شود که درفعالیت های سلولی نقش دارند. از میان فرایند های بیولوژیکی زیادی که اسیدهای سیالیک در آن شرکت دارند، تنظیم شناسایی مولکولی و سلولی از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۴، ۹، ۱۲). علیرغم وجود این ماده در مسیر تکاملی سلولهای تشکیل دهنده گانگلیون های اعصاب مغزی از جمله گانگلیون های تری جمینال، تاکنون مورد توجه چندانی قرار نگرفته است. دراین مطالعه با استفاده از لکتین هیستوشیمی، توزیع قندهای انتهایی در فرایند تکامل گانگلیون های تری جمینال موردتحقیق قرارگرفته است.

مواد و روش کار

حیوانات آزمایشگاهی رت از نژاد Sprague Dauley به تعداد دوازده راس ماده و چهار راس نر با مشخصات و شرایط مشابه از نظر سن، وزن و مشابهت ژنتیکی انتخاب شدند. برای منظور اخیر از رت های همزاد استفاده شده است. این حیوانات در موسسه سرم سازی رازی مشهد نگهداری می شدند. شرایط برای مقاربت حیوانات مهیا شد. هر حیوان نر به همراه سه ماده قرار داده شد. مشاهده اسپرم دراسمیر واژینال به عنوان روز صفر حاملگی در نظر گرفته شد. حیوانات آزمایشگاهی باردار به ترتیب از روز نهم تا روز بیست ویکم بارداری با کلروفرم بیهوش شده و با عمل لاپاراتومی، جنین ها از رحم مادران خارج شدند. هر رت به

www.SID.ir

Archive of SID

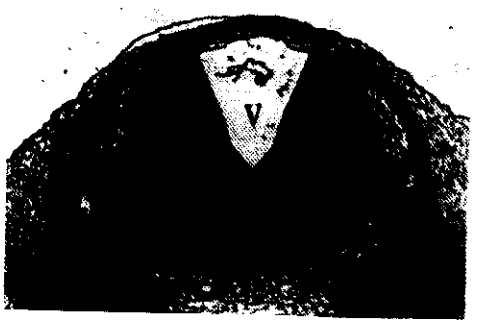
طور متوسط دوازده جنین در رحم خود داشت. جنین ها به مدت ۵ دقیقه در نرمال سالین شستشو داده شده و سپس به مدت دو روز در فیکساتورهای فرمالین، بوئن و محلول B4G (گلوتارآلدئید ۱٪+ سدیم استات۱٪+ مرکوریک کلرید۶٪) قرار داده شدند. قبل از قرار دادن جنین ها در فیکساتور چنانچه جنینی ظاهری غیر طبیعی داشت، از مسیر مطالعه حذف می شد. بعد از خروج از فیکساتور جنین ها به مدت ۵ دقیقه در نرمال سالین شستشو داده شده و سپس توسط غلظت های مختلف الکل مراحل آبگیری انجام شد و قالب گیری با پارافین صورت گرفت. از هر کدام از بلوك های به دست آمده برشهایی به ضخامت ۱۰ میکرون با روش سریال سکشن تهیه شده و تعدادی از آنها با آلسین بلو جهت بررسی مورفولوژی گانگلیون ها رنگ آمیزی شد. در مطالعه لکتین هیستوشیمی از لکتین های WGA, SBA, MPA وPNA کونژوگیت شده با HRP که از شرکت سیگما خریداری شده بودند، استفاده شد. این لکتین ها به غلظت ۱۰ میکروگرم در لیتر در بافر PBS رقیق شدند و روش لکتین هیستوشیمی در pH= ۶/۸ انجام شد (۸). قبل از اضافه کردن محلول لکتین به برشها، این برشها به مدت ۵ تا۱۰ دقیقه در متانول حاوی ۱٪ آب اکسیژنه جهت خنثی کردن پراکسیداز آندوژن (endogeneous peroxidais) قرار داده شدند. سپس برشها به مدت یك ساعت در PBS شستشو داده شدند. سپس در یك اتاقك مرطوب محلول لکتین که قبلا آماده شده بود، به صورت قطره قطره روی بافتها چکانده شد. محلول لکتین به مدت ۲ ساعت روی بافتها قرار داشت. کلیه برشها با PBS شستشو داده شده و سپس در محلول ۳٪ DAB (diaminobenzidin) حل شده در PBSC به مدت ده دقیقه قرار داده شد و به آن به میزان ۲۰ میکرولیتر در هر ۱۰۰ میلی لیتر، آب اکسیژنه اضافه گردید. بعد از خارج کردن برش از محلول فوق، به مدت ده دقیقه با جریان ملایم آب معمولی شستشو داده شدند. سپس جهت رنگ آمیزی زمینه بافتها به مدت ۵ دقیقه درآلسین بلو (pH= ۲/۵) قرار داده شدند. در صورت وجود قند انتهایی مورد نظر و واکنش آن با لکتین آزمایش شده، رنگ قهوه ای بروز می کرد و بقیه موارد شامل هسته سلولها و ماده خارج سلولی، با توجه به میزان کم کربوهیدراتها با آلسین بلو در pH= ۲/۵ واکنش داده و به رنگ آبی در می آمدند. کلیه برشهای فوق با میکروسکوپ نوری مورد مشاهده و بررسی قرارگرفت و از موارد انتخابی، تصویربرداری با استفاده ازمیکروسکپ نوری الیمپوس AH2 دوربین دار، در بخش ژنتیك انجام شد.

نتایج

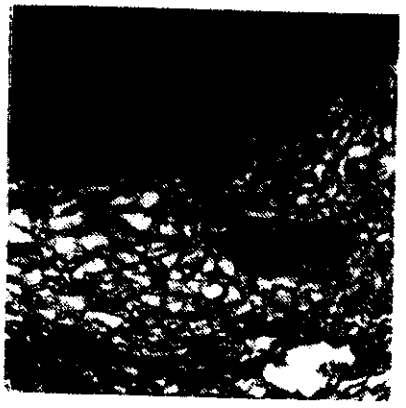
در مشاهدات برشهای مختلف فقط لکتین WGA با سلولهای عصبی تشکیل دهنده گانگلیون های تری جمینال واکنش نشان داد. درگروه های کنترل، یعنی برشهایی که درمعرض SBA, GSA1B4, PNA وMPA قرارگرفته بودند، واکنشی مشاهده نشد. در روز یازدهم جنینی، هسته اولیه گانگلیون های تری جمینال در طرفین پل مغزی مشاهده شد. این هسته های اولیه از اجتماع سلولهایی تشکیل شده بودند که برخی از آنها واکنش شدیدی به WGA نشان دادند (تصویر۱). در مجاورت این هسته ها از خلف به قدام سلولهایی مشاهده شدند که در حال مهاجرت به سوی هسته اولیه بوده و به شدت با WGA واکنش داده بودند. در سایر سلولهای مجاور چنین واکنشی مشاهده نشد (تصویر ۲). در روز دوازدهم جنینی، هسته های اولیه از تمرکز بیشتر سلولها در این هسته ها حکایت داشت (تصویر۳). این تمرکز و افزایش سلولی هر روز از روز قبل بیشتر می شد. در این روز رشته های عصبی مشاهده شدند که از گانگلیون به سمت پل مغزی کشیده شده بودند. در این روز هر گانگلیون به صورت دو توده چسبیده به هم دیده شد. این روند مهاجرت سلولها در روزهای بالاتر همچنان مشابه روزهای ۱۱ و ۱۲ مشاهده شد. در روزهای آخر بارداری، تمرکز سلولی با واکنش شدیدتری به WGA دیده شد. در این مرحله سلولهای مهاجر کمتر دیده شدند. به تدریج گانگلیون ها تقریبا به حد نهائی تکامل خود نزدیك شده بودند.

www.SID.ir

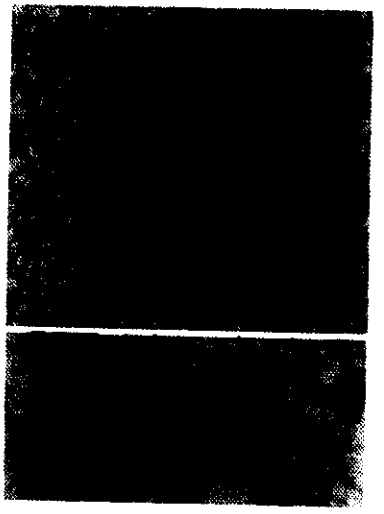
Archive of SID



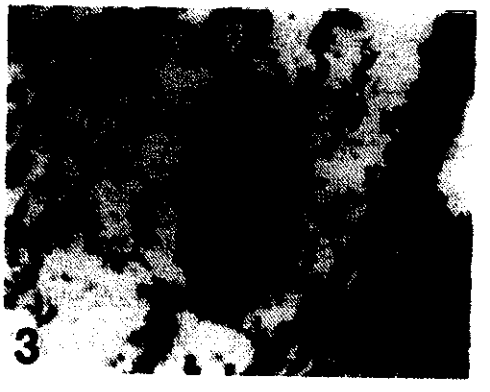
تصویر A۱ : برش عرضی از مغز خلفی جنین روز یازدهم جنینی. V= بطن چهارم درحال تکامل. فلش گانگلیون تری جمینال را نشان می‌دهدکه به پل مغزی متصل است.



تصویر B۱ : گانگلیون تری جمینال با بزرگنمایی زیاد (ستاره ها)که به شدت با WGA واکنش داده است. بخشی از CNS (پل درحال تکامل) و مزانشیم مجاور نیز با لکتین فوق واکنش داده است.



تصویر۲ (A و B): سلولهای مهاجر درحال تکامل (سلولهای نورال کرست) به میزان زیادی باWGA واکنش داده اند. مزانشیم مجاور نیز با این لکتین واکنش داده است (سرفلش ها). یک سلول با بزرگنمایی زیاد از تصویر A۲ درتصویرB۲ نشان داده شده است (فلش).



تصویر۳: گانگلیون تری جمینال درحال تکامل در روز سیزدهم بارداری (ستاره). سلولهای گانگلیونیک با WGA واکنش متفاوت دارند.

تصویر٤: گانگلیون تری جمینال درحال تکامل در روز هیجدهم جنینی. گانگلیون تری جمینال (ستاره)، واکنش خفیف تری باWGA دارد، درحالی که اتصال این گانگلیون به CNS (پل مغزی) واکنش قوی تری دارد.

www.SID.ir

Archive of SID

در روز هیجدهم، رشته های عصبی به خوبی مشخص شدند. در این روز سلولهای داخل گانگلیون نیز برخی به WGA واکنش داده اند. در روزهای آخر حاملگی تعداد سلولهای مهاجر بسیار اندك هستند و فقط در بعضی برشها دیده می شود (تصویر۴).

بحث

نقش کربوهیدراتها به صورت قند انتهایی زنجیره های گلیکوکونژوگیت ها در تکامل سلولهای عصبی به خوبی شناخته شده است (۴). علاوه بر این نوع قند انتهایی که در هر مرحله از تکامل شرکت می کند، در برخی مراحل تکاملی شناخته شده است(۸، ۱۲). در این میان اسید سیالیك به عنوان یك قند انتهایی در زنجیره NCAM نقش هدایتی مهمی برای سلولها دارد (۲، ۳، ۱۰). در این مطالعه سلولهای مهاجر نورال کرست که به سمت محل استقرار خود جهت تشکیل گانگلیون های تری جمینال حرکت می کنند، به کلیه لکتین های مورد آزمایش به جز WGA واکنش نشان ندادند. واکنش شدید این سلولها با WGA که ویژه قند اسید سیالیك می باشد، نشان دهنده وجود اسید سیالیك در این سلولها است. از این رو پیشنهاد می شود که اسید سیالیك نقش هدایتی و تکاملی در مورد سلولهای مهاجر نورال کرست دارد که گانگلیون های تری جمینال را تشکیل می دهند. این نکته را باید به خاطر داشت که همه سلولهای گانگلیونیك تری جمینال با WGA واکنش نمی دهند. فقط سلولهای عصبی هستند که با WGA واکنش داده و در مرحله تشکیل رشته نیز این واکنش در رشته های عصبی مربوطه دیده می شود. رشته های عصبی سلولهای گانگلیونیك به همان شدت جسم سلولهای خود با WGA واکنش نشان دادند. این پدیده نشان از انتشار اسید سیالیك به طور یکنواخت در جسم سلولی و رشته های عصبی دارد. نقش هدایتی اسید سیالیك در مورد رشته های عصبی توسط دیگران نیز به اثبات رسیده است (۸، ۱۱). همانطوری که در تصاویر روزهای آخر جنینی مشاهده می شود، به تدریج از تعداد سلولهایی که در داخل گانگلیون به WGA واکنش نشان می دهند، کاسته می شود. این پدیده نشان می دهد که به محض ورود سلولها به داخل گانگلیون شدت واکنش به WGA به تدریج کم می شود. وقتی که سلولهای فوق مراحل نهایی تکامل خود را طی کردند، به تدریج اسید سیالیك موجود در آنها با قند دیگری جایگزین می شود و یا در اثر تغییرات فضایی واکنش آن با WGA از بین می رود. این پدیده یکبار دیگر نقش هدایتی و تکاملی اسید سیالیك را مشخص می کند. اسیدهای سیالیك انواع مختلف دارند. برخی از اسیدهای سیالیك در بالغین و در مناطق خاصی از بدن دیده می شوند.

اسیدهای سیالیك موجود در یك بافت، در دوران جنینی و دوران بلوغ با یکدیگر تفاوت دارند(۱، ۵). اسیدهای سیالیك موجود در سلولهای گانگلیون تری جمینال و همینطور سلولهای مهاجر احتمالا دو عمل مهم را انجام می دهند. اولا برخی قندهای موجود در سطح سلولی را ماسك می نمایند و شاید به همین علت است که با لکتین های دیگر مشاهده نشده است و ثانیا بار منفی شدیدی به سطح سلولها می دهند. هر دو پدیده بار منفی شدید و ماسك سطح سلولی، سلولهای مهاجر و همینطور سلولهای گانگلیونی را به صورت موقت و در مراحل خاص تکاملی از واکنش های خاصی باز می دارند و در مراحل بعدی با عمل سیالیداز، اسیدهای سیالیك از بین رفته و قندهای دیگر وارد عمل می گردند. این پدیده در برخی دیگر از سیستمهای تکاملی نظیر NCAM نیز مورد مشاهده قرار گرفته است (۱، ۵). در نهایت پیشنهاد می‌شود که اسیدهای سیالیك نقش هدایتی وتکاملی در مورد سلولهای گانگلیون های تری جمینال دارند. این سلولها ازنورال کرست مهاجرت می کنند.

تقدیر و تشکر

این طرح تحقیقاتی با تصویب نامه شماره ۵/۱۵۸۰ مورخه۷۸/۵/۴ معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد به انجام رسیده است. ازحمایت و کمك های مالی آن معاونت محترم و همکاری سرکارخانم متجدد به خاطر کمك درتهیه بافتها و سرکار خانم میرزایی به جهت کمك درتصویر برداری صمیمانه تشکر می گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. Accili D., Gabrielli. M. G., Materazzi G., Menghi G., 2001, Sialoglycoconjugate expression in acinar cells of rat developing submandibular gland, The Histochemical Journal, 33: 355-361.
2. Acheson A., Sunshine J. L., Rutishauser U., 1991, NCAM polysialic acid can regulate both cell- cell and cell- substrate interactions, J. Cell biol., 114: 143- 153.
3. Angata K., Suzuki M., McAuliffe J., Ding Y., Hind Sgaul D., Fukuda M., 2000, Differential biosynthesis of polysialic acid on neural cell adhesion molecule (NCAM) and oligosaccharide acceptors by three distinct alpha 2,8- sialyl transferases, ST 8Sia IV (PST), ST 8 SiaII (STX), and ST 8 Sia III, J. Biol. Chem., 16; 275 (24): 18594-601.
4. Codongo P., Botti Y., Font Y., Auberty M., 1985, Modification of the N-linked oligosuccharides in cell surface glycoprotein during chick embryo development. A using lectin affinity and a high resolution chromatography study, Eur. J. Biochem., 149:433-460.
5. Faraggiana T., Villari D., Jagirdar J., Patie J., 1986, Expression of sialic acid on the alveolar surface of adult and fetal human lungs, J. Histochem. Cytochem., 34: 811- 816.
6. Fenderson B. A., Eddy E. M., Hakomori S. I., 1990, Glycoconjugate expression during embrygenesis and its biological significance, Bio. Essary., 12: 173-179.
7. Gheri G., Gheri Beryx S., Sgambati E., Gulisano M., 1993, Characterization of the glycoconjugate sugar residues in developing chick esophageal epithelium, Histol. Histopathol., 8: 351-358.
8. Landmesser L., Dahm L., Tang J., Rutishauser U., 1990, Polysialic acid as a regulator of intramuscular nerve branching during embryonic development, Neuron, 4: 655- 667.
9. Rutishauser U., 1992, NCAM and its polysialic acid moiety: A mechanism for push/pull regulation of cell intractions during development, Development (Suppl.): 99-104.
10. Rutishauser U., landmesser L., 1996, Polysialic acid in the vertebrate nervous system: A promotor of plasticity in cell- cell interaction, Trends Neurosci., 19: 422- 427.
11. Varky A., 1992, Diversity in the sialic acids, Glycobiology, 2: 25-40.
12. Vmir E. R., Mccoy R. D., Vollger H. F., Wilkin Son N. C., Troy F. A., 1984, Use of prokaryotic- derived probes to identify poly (sialic acid) in neonatal neuronal membranes, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 1971-1975.
13. Zhang H., Miller R. H., Rutishauser U., 1992, Polysialic acid is required for optimal growth of axons on a neuronal substrate, J. Neurosci., 12:3107-3114.