نقش اختصاصی ان- استیل گالاکتوز آمین در تبدیل سلولهای متراکم مزانشیم جوانه اندام به غضروف در موش

*دکتر حسن مفیدپور،** دکتر رستم قربانی کلخواجه،* دکتر علیرضا فاضل*

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

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

خلاصه

ماده خارج سلولی و پوشش ترکیبات قندی در سطح سلولهای جنینی در انجام اعمال سلولی نقش بحرانی ایفا می نمایند. هدف از مطالعه اخیر تعیین زمان ظهور ترکیبات قندی در مرحله گذر سلولهای مزانشیمی جوانه های اندام در جنین به تراکم مزانشیمی و سپس تبدیل به غضروف می باشد. با به کارگیری روشهای هیستوشیمیایی جوانه های اندام جنین های ۱۶-۱۰ روزه موش برای مطالعات لکتین هیستوشیمی آماده شدند. در این مطالعات از لکتین های DBA، VVA، VVA/B4 و SBA استفاده گردید که همگی به HRP متصل شده بودند. این لکتین ها اختصاصاً قند انتهای ان- استیل گالاکتوز آمین را در زنجیره های قندی مربوط به پروتئین ها مشخص می نمایند. نتایج نشان داد که در طی این دوران گذر فقط دو لکتین VVA و VVA/B4 با تراکم سلولهای مزانشیمی واکنش دادند که مشخص می کند این قند انتهایی اختصاصاً نقش عمده ای در این مرحله تکاملی دارد. زمان و توزیع واکنش ها به مزانشیم و تراکم مزانشیمی و تبدیل آنها به غضروف نیز موید این موضوع می باشد.

کلمات کلیدی: لکتین هیستوشیمی، مزانشیم، جوانه اندام ، ان- استیل گالاکتوز آمین

مقدمه

تکامل جوانه اندام مورد مطالعه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است(۱، ۴، ۵، ۸). مورفوژنز اندام مدل بسیار خوبی برای مطالعه مراحل مختلف تغییرات سلولی و ملکولی در ضمن دوران تکامل جنینی است. ضمن مطالعات مورفولوژیك جوانه اندام در رابطه با رشد آن، چرخش اندامها و شکل گیری قسمتهای مختلف اندام و نقش فاکتورهایی مانند ZPA (Zone of Polarizing Activity)، میانکنش ضخامت لبه اکتودرمی (Apical Ectodermal Ridge) AER با مزودرم زیر خود و همین طور نقش FGF (Fibroblast Growth Factor) و عوامل دیگر مشخص شده‌اند(۳، ۵، ۱۰، ۱۷، ۲۰). سلولهای مزانشیمی اندام که مسؤول شکل گیری قالبهای غضروفی و سپس استخوانها می‌باشند از مزودرم صفحات طرفی جنینی سرچشمه می گیرند(۱۷). این سلولها در مرکز جوانه اندام تراکم پیدا نموده و به تدریج تبدیل به غضروف می گردند(۸، ۱۱)، اما عواملی که باعث این تغییر و تبدیل می شوند به خوبی شناخته نشده است. یکی از فاکتورهای با اهمیت در تکامل دستگاههای مختلف جنینی کربوهیدراتها می‌باشند که به صورت زنجیره‌های قندی به پروتئینها و یا لیپیدها متصل بوده به طور کلی تحت عنوان گلیکوکانجوگیتها نامگذاری شده‌اند(۵، ۷، ۱۲، ۱۳). با توجه به نقش گلیکوکانجوگیتها در تمایزات سلولی باید گفت کربوهیدراتهای انتهایی زنجیره های قندی در میان کنش‌های سلولی شرکت فعال و کلیدی دارند. در این بررسی مطالعه تعیین زمان ظهور این قندها و تأثیر آنها در روند تکامل و تغییراتی که مزانشیم در تبدیل به غضروف با استفاده از چهار لکتین (جدول ۱) ویژه تشخیص ان- استیل گالاکتوز آمین(۷، ۹، ۱۱، ۱۳،۱۶، ۱۸) دارد، انجام شد. نتایج این بررسی ها نقش این ملکول ها را در این مطالعات هیستوشیمیایی با استفاده از لکتین VVA و VVA/B4 در مرحله حساس تبدیل مزانشیم به غضروف در جوانه اندام به خوبی مشخص نموده است.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش کار

موشهای آزمایشگاهی نژاد BALB/c (سه نر با یك ماده) به مدت یك شب در قفس نگهداری شدند. با مشاهده پلاك واژن (Vaginal plaque) در صبح روز بعد زمان صفر حاملگی مشخص گردید. سپس موشهای حامله در قفسهای جداگانه ای قرار داده شدند و به ترتیب از روزهای دهم تا شانزدهم جنینی با اتر بیهوش و جنین های آنها خارج گردیده و بلافاصله پس از شستشو در سرم فیزیولوژی در محلول ثابت کننده B4G قرار گرفتند(۱۸). پس از ۲۴ ساعت طبق روال معمولی مطالعات هیستولوژی(۲) جنین ها از الکل‌های با درجات مختلف (۳۰٪، ۷۰٪، ۸۰٪، ۹۰٪، ۹۵٪ و ۱۰۰٪) در مدت معین عبور داده و آبگیری انجام گردید، بعد از پایان مرحله آبگیری و قرار گرفتن در گزیلن نمونه ها در وضعیت های متفاوت در پارافین مذاب قرار داده شده و در حرارت معمولی آزمایشگاه قالب‌گیری شدند به طوری که بتوان از آنها برشهای فرونتال، ساژیتال و عرضی تهیه نمود. برشها به ضخامت ۵ میکرون به طریقه پشت سرهم (Serial section) تهیه گردیدند(۲، ۱۸).

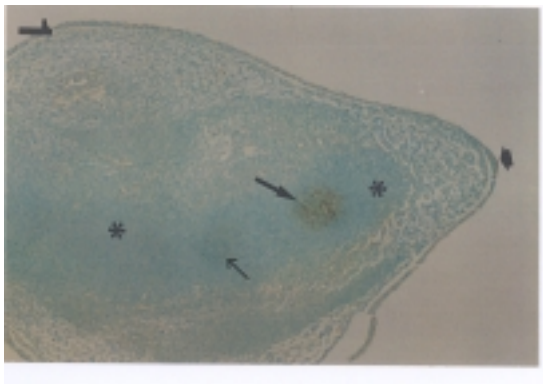
روش کار در این مطالعات هیستوشیمیایی مشابه موارد گزارش شده قبل می باشد (۷، ۱۸)، لکتین های کانجوگیت شده با HRP (Horse Radish Peroxiase) عبارت بودند از VVA، VVA/B4، DBA، SBA برای قند انتهایی ان- استیل گالاکتوزآمین (GalNac) (جدول شماره ۱) که بوسیله بافر فسفات (PBS) رقیق شده به طوری که در هر میلی‌لیتر بافر ۱۰ میکروگرم ماده موثر وجود داشت. pH محلول برابر ۷/۲ و مدت قرار گرفتن لکتین بر روی بافت ها دو ساعت در درجه حرارت معمولی آزمایشگاه بود. سپس تمام لامهای تجربی با بافر شستشو داده شده و به مدت ۱۰ دقیقه در مجاورت محلول DAB (Diamiobenzedine) و آب اکسیژنه قرار گرفتند، نواحی که با هر یك از لکتین ها واکنش نشان دادند به رنگ قهوه ای درآمدند. جهت تشخیص قسمتهای مختلف بافت‌های جنینی از رنگ زمینه آلیسن بلو با pH برابر ۲/۵ استفاده گردید که این نواحی به رنگ آبی در می‌آیند. کلیه مقاطع تهیه شده توسط پژوهشگران با میکروسکوپ استاد و دانشجو مدل Olympus BX50-F3 با دقت مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت و از برش های انتخابی تصویربرداری انجام گردید.

نتایج

لکتین‌های به کار رفته از روز دهم جنینی مورد استفاده قرار گرفتند، به نظر می رسد اولین اثر و نشانه های واکنش سلولهای مزانشیمی به لکتین VVA و VVA/B4 در اولین ساعات روز ۱۲ جنینی در جوانه اندام فوقانی ظاهر شد (تصویر ۱) در حالی که قبل از روز ۱۲ جنینی هیچ گونه اثر و نشانه ای از آنها مشاهده نگردید. مقاطعی که در اوایل روز ۱۴ جنینی تهیه شده بود با لکتین SBA مجاورت داده شدند که واکنش و عکس العمل مثبتی در سلولهای مزانشیمال مشاهده نشد. اما، در همین مقاطع با لکتین VVA و VVA/B4 سلولهای مزانشیمی واکنش نموده و نواحی از تراکم سلولی به صورت توده گردی را مشخص نمود. در این تراکم سلولهای مرکزی در مناطق گلژی خود و ماده خارج سلولی واکنش شدیدتری نشان داده بودند (تصویر ۳). علاوه بر این باید گفت که تراکم سلولهای مزانشیمی در حقیقت توده سلولی هستند که پیش سازهای غضروفی که در آینده استخوان اولنا و رادیوس را می سازند، تشکیل می دهند. در ضمن در مقاطع مذکور نشانه هایی از ظهور عروق خونی مشهود است (تصویر ۴). در مقاطع مربوط به اواخر روز ۱۴ جنینی از جوانه اندام فوقانی تراکم سلولهای مزانشیمی گسترش بیشتری یافته و منطقه بین غضروفهای در حال تشکیل واکنش نشان داده و فیبرهای عضلانی نیز در حال تشکیل دیده می‌شوند (تصویر ۵). مطالعه مقاطع جوانه اندام فوقانی با استفاده از درشت نمایی بزرگتر نواحی مرکزی پیش سازهای غضروفی با دقت بیشتری مورد بررسی قرار گرفتند و مشخص گردید که میزان واکنش در نواحی مرکزی بیشتر شده اما شدت آن در نواحی اطراف توده های غضروفی کمتر بود (تصویر۵و۶). به منظور افتراق بیشتر نواحی زمینه ای بافت ها با آلسین بلو رنگ‌آمیزی و به خوبی

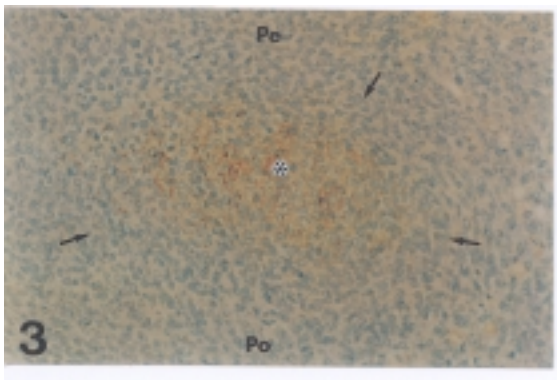
Archive of SID

www.SID.ir

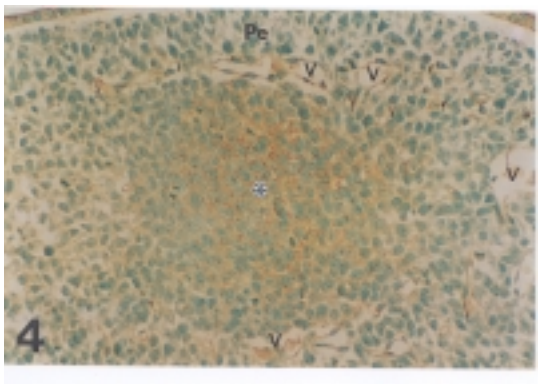


تصویر ۱: برش فرونتال اندام فوقانی جنین ۱۲ روزه موش (لکتین به کار رفته VVA/B4). واکنش نسبتاً شدید با لکتین (فلش بزرگ)، واکنش کم (فلش کوچک)، تراکم سلولهای مزانشیمی (ستاره ها) و ناحیه AER واکنش کمی داشته است (سر فلش). (درشت نمایی ۱۰×۱۰).

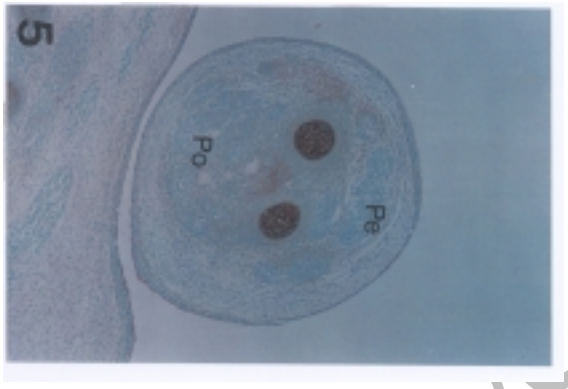
تصویر ۲: برش فرونتال اندام فوقانی جنین ۱٤ روزه موش (لکتین به کار رفته SBA). نواحی تراکم سلولی با واکنش منفی (ستاره ها)، قسمت هایی از تراکم سلولی با واکنش مثبت (فلش) و C ناحیه در حال غضروفی شدن که با SBA واکنش مثبت نشان داده است (درشت نمایی ۱۰×۱۰).



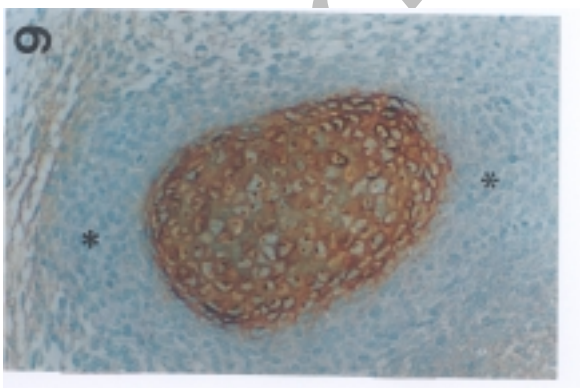
تصویر۳: مقطع عرضی جوانه اندام فوقانی جنین ۱٤ روزه موش (لکتین به کار رفته VVA/B4). تراکم سلولی مزانشیم بیشتر و سلولهای مرکزی آن واکنش بیشتری با لکتین داشته است در حالی که سلول های اطراف بدون واکنش بوده و Pe و Po نواحی پره و پست اگزیال هستند. (درشت نمایی ۲۰×۱۰).



تصویر ٤: مقطع عرضی اندام فوقانی در آخر روز ١٤ جنینی موش (لکتین به کار رفته VVA/B4). سلولها و ماده خارج سلولی بیشتری واکنش با لکتین نشان داده و عروق خونی (V) نیز ظاهر شده و سلولهای مهاجر (فلش ها) با واکنش خفیف دیده می شوند (درشت نمایی ٤٠×١٠).



تصویر ٥: مقطع عرضی اندام فوقانی جنین ١٦ روزه موش (لکتین به کار رفته VVA/B4). دو توده قهوه ای غضروفهای در حال تشکیل با واکنش شدید دیده می‌شوند. m فیبرهای عضلانی در حال تشکیل است (درشت نمایی ٢٠×١٠).



تصویر ٦: یکی از غضروفهای در حال تشکیل با بزرگ نمایی بیشتر، سلول های اطراف توده غضروفی (ستاره ها) تراکم بیشتری دارند و با آلسین بلو رنگ گرفته‌اند (درشت نمایی ٤٠×١٠).

www.SID.ir

جدول ۱: مشخصات لکتین هایی که مورد استفاده قرار گرفتند

نام لکتین	اختصار	نوع قند انتهایی که اختصاصاً به آن متصل می گردند
Dolichos Biflorus	DBA	α-D-GlaNac
Vicia villosa	VVA	α-D-GalNac
ایزومر Vicia villosa	VVA/B4	Ser(thr.)- α-D.GalNac
Glycine Max	SBA	α-β-D-GalNac>D-Gal

GalNac = N-acetylgalactosamine, Gal = Galactose

قابل مشاهده هستند. با توجه به تصاویر ۶-۱ مشاهده می گردد که پس از ایجاد تراکم سلولهای مزانشیمی در اوایل دوران مورفوژنز از مرکز به خارج به تدریج لکتین VVA/B4 به سلولهای مزانشیمی واکنش نشان داده و در روز پانزدهم جنینی به اوج شدت خود می رسد. در حالی که مزانشیم متراکم اطراف مناطق واکنش داده شده فقط با آلسین بلو عکس‌العمل دارند و قسمت‌هایی از همین نواحی در روزهای ۱۲ و ۱۳ جنینی و همین طور نواحی از قسمتهای قبل از غضروفی (تصویر ۲) به لکتین SBA واکنش نشان دادند.

بحث

در این مطالعات هیستوشیمیایی مرحله خاصی از تکامل جوانه اندام یعنی تمایزات مزانشیم متراکم (Condense mesenchyme) به مرحله قبل از غضروفی و سپس غضروفی، مورد بررسی قرار گرفت. مزانشیم متراکم به دو صورت طولی در مرکز جوانه اندام شکل می گیرد در حالی که خود از سلولهای مهاجر مزودرم صفحات طرفی ناشی شده است. در ابتدا مزانشیم به سمت میدان اندام حرکت نموده و سپس با شکل‌گیری AER و ZPA به همراه رشد و تکامل بعدی اندامها، این مزانشیم در مرکز اندامها متراکم شده و به تدریج به غضروف تمایز پیدا می‌کنند(۸، ۱۱، ۱۲، ۱۹، ۲۰). روند تغییرات شیمیایی این مرحله مورد توجه چندانی قرار نگرفته و به ویژه نقش ترکیبات قندی در این مراحل مبهم است، ترکیبات قندی در بسیاری از سیستمهای تکاملی بدن نقش کلیدی به خصوص در تمایزات سلولی و میان کنشهای بین سلولی (cell interactions) دارند(۱، ۳، ۴، ۵).

هر چهار لکتینی که در این مطالعات هیستوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفت قند انتهایی ان - استیل گالاکتوزآمین را مشخص می نمایند، اما هرکدام به تنهایی ویژگیهای خود را داشته و بستگی به موقعیت فضایی، نوع اتصال به قند ماقبل آخر در زنجیره قندی و نوع قند ماقبل از آخر، واکنش نشان می دهند(۷، ۹، ۱۶، ۱۸). برای مثال DBA به صورت کاملاً اختصاصی سلولهای جنینی اولیه را مشخص می نمایند. در حالی که هیچ نوع سلول دیگر در طی مرحله مهاجرت سلولهای جنسی اولیه به این لکتین واکنش ندارند. اما سایر لکتین های مشابه DBA مانند VVA، VVA/B4 و SBA با اینکه سلولهای جنسی را مشخص می نمایند، اما اختصاصی وارد عمل نمی شوند. علاوه بر این سلولها، با سایر بافتهای دیگر بدن نیز واکنش می دهند(۷). در مطالعات ما مشابه همین واکنش در روند تبدیل سلولهای متراکم مزانشیمی در مرکز جوانه در حال تکامل اندام مشاهده می شود، به این معنی که پس از ایجاد تراکم سلولی، مرکز این تراکم به تدریج به دو لکتین VVA و VVA/B4 واکنش نشان می دهند در حالی که سایر لکتین های نامبرده واکنشی با این منطقه ندارند. واکنش به VVA و VVA/B4 ابتدا در مناطق گلژی سلولها و سپس در سطح آنها مشاهده می گردد و در روز شانزدهم حاملگی به حداکثر خود می‌رسند. این طور به نظر می رسد که سلولهای پیش‌ساز غضروفها (از مرحله تراکم مزانشیمی تا مرحله غضروفی) ضرورتاً می بایستی وارد مراحل تمایزات سلولی شده و گلیکوکانجوگیت حساس به VVA و VVA/B4 نقش عمده ای را در این مورد ایفا می نماید. متذکر می شود همان طوری که در تصویر۲ مشخص شده است مراحل غضروفی شدن از ناحیه پروکسیمال به سمت دیستال پیشروی می نماید. در مرحله غضروفی گلیکوکانجوگیت نامبرده شده ناپدید شده و قند انتهایی دیگری که به SBA حساس است، وارد عمل می گردد. با توجه به موارد فوق این طور به نظر می آید که

Archive of SID

www.SID.ir

تمایزات سلولهای مزانشیمی که در مرکز اندامهای جنینی تبدیل به تراکم های سلولی و سپس مرحله قبل از غضروفی می شوند، در اثر تغییرات مولکولی سطح سلولی و ماده خارج سلولی بوده که میان کنش های منظم آنها نهایتاً باعث بوجود آمدن مرحله غضروفی می گردد. در این پدیده های شیمیایی مولکول ان- استیل گالاکتوز آمین که اختصاصاً با VVA و VVA/B4 واکنش می دهد و گلیکوپروتئین وابسته به آن، نقش عمده ای در این مرحله انتقالی (از مزانشیم به غضروف) ایفا می نماید.

تشکر و قدردانی

پژوهشگران این مقاله از خدمات تکنیکی ارزنده خانم فاطمه متجدد قدردانی می نمایند.

References

1. Arteage-Sol E., Gayraud B., Lee S., Shum L., Sakail I., Ramirez F., 2001, Regulation of limb patterning by extracellular microfibrils, J. Cell Biol., 154(2): 275-81.
2. Bancroft J. D., Stevens A., Theory and practice of histological techniques, 2nd ed., Churchill livingston, 1982, p. 20-61.
3. Bushdid P. B., Brantly D. M., Yull F. F., Blaeuer G. L., 1998, Inhibition of NF – Kappa B Activity results in disrution of the apical ectodermal ridge and aberran limb morphogenesis, Nature, 392: 615-618.
4. Capdevila J., Johnson R., 2000, Hedgehog Signaling in verterbrate and invertebrate limb pettering, Cell Mol. Life Sci., 57(12): 1682-84.
5. Capdevila J., Izpisua Belmonte J., 2001, Pattering mechanism controlling vertebrate limb development, Annu. Rev. Cell Biol., 17: 87-132.
6. Crackower M. A., Motoyama J., Tsui L. C., 1998, Defect in maintenance of the apical ectodermal ridge in the dactylaplasis mouse, Dev. Biol., 201(1): 78-89.
7. Fazel A. R., Schulte B. A., Thompson R. P., Spicer S. S., 1987, Presence of a unique glycoconjugate on surface of rat primordial germ cells during migration, Cell Diff., 21: 199-211.
8. Gould P., Day A., Wolpert L., 1972, Mesenchymal condensation and cell contact in early morphogenesis of the chick limb, Exp. Cell. Res.,72: 325-336.
9. Hammarstrom S., Murphy L. A., 1977, Carbohydrate binding specificity of four N-Acetyl galactosamine “Specific” lectins: Helix pomatia a hemagglutinin, Soybean agglutinin, lima bean lectin and dolichos biflorus lectin, Bichemistry, 16: 2556-2750.
10. Johnson R., Tabin C., 1997, Molecular modes for vertebrate limb development, Cell, 90: 979-990.
11. Knudson C. B., Toole B. P., 1985, Changes in the pericellular matrix during differentiation of limb bud mesoderm, Development Biology, 112: 308-318.
12. Knudson C. B., Toole B. P., 1984, Hyaluronate interaction with the cell surface during chondrogenesis, J. Cell Biochem., 88: 301.
13. Laden S. A., Schulte B. A., 1984, Histochemical evaluation of secretory glycoprotein in human salivary glands with lectin-horseradish peroxiase conjugates, J. Histochem. Cytochem., 32: 965-972.
14. Milaire J., 1991, Lectin binding sites in developing mouse limb buds, Anat. Embryol. 184: 479-488.
15. Moscona A. A., Surface specification of embryonic cell: Lectin receptors in the cell surface in development, Moscona ed., New York Wiley Anderson, 1974, PP. 67-99.
16. Ponder B. A. J., Wikinson M. M., 1983, Organ-related differences in binding of dolichos biflorus agglutinin to vascular endothelium, Dev. Bio., 96: 535-541.
17. Schaller S., Nyo-Muller V., 2001, Cell biolgy of Limb Pattering, Int. Rev. Cytol., 203: 483-517.
18. Schulte B. A., Spicer, 1983, Ligh microscopic detection of sugar residues in glycoconjugates of salivary glands and the pancreas with lectin-horse radish peroxidase conjugate, I. Mouse, Histochem. J., 15: 1217-1238.
19. Smith S. M., Pank K., 1989, Molecular approaches to vertebrate limb morphogenesis, Development., 121-131.
20. Tickle C., 1995, Vertebrate limb development, Cur. Opin. Genet. Dve., 5(4): 478-484.

Archive of SID
www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir