مطالعات لکتین هیستوشیمیایی در توزیع اسیدسیالیک در سیستم عصبی و غددی کولون موش بالغ

*دکتر حسن مفیدپور، **دکتر رستم قربانی کلخواجه، * دکتر مختار جعفرپور

*گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

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

خلاصه

زنجیره های کربوهیدراتی گلیکوکونجوگیت های، واقع در سطح سلول ها و ماتریکس خارج سلولی، و به ویژه قندهای انتهایی آنها نقش کلیدی در بسیاری از اعمال بیولوژیك دارند. یکی از این قندهای انتهایی اسید سیالیك می باشد که مولکول بزرگی بوده و خواص شیمیایی متفاوتی دارد. توزیع مولکولهای این کربوهیدرات در عناصر عصبی روده و بقیه بخش های لوله گوارش مورد توجه کمتری قرار گرفته است. برش‌های پارافینی ۵ میکرونی در معرض WGA (Triticum vulgaris) قرار داده شدند تا توزیع اسید سیالیك و N- استیل گلوکز آمین در جدار روده بالغ مشخص شود. یافته‌های ما حاکی از واکنش شدید تمام عناصر عصبی لوله گوارش از جمله شبکه های عصبی اورباخ با WGA بود. کریپت های کولون، به ویژه سطح سلول های بازال نیز با این لکتین واکنش شدید نشان دادند. ممکن است اسید سیالیك در نواحی که واکنش دیده شد، میان کنش بین سلولی در سطح میکروسکوپی را تسهیل کند. در این نواحی همانطور که قبلاً هم گزارش شده، با افزایش سن و یا در فرآیندهای پاتولوژیك تغییرات مولکولی رخ می دهد. بار منفی شدید اسید سیالیك، ناحیه بیولوژیکی مناسبی فراهم می کند که واکنش های مولکولی در ضمن اعمال سیستم عصبی روده ای انجام پذیرد. تحقیقات بیشتری در زمینه سایر گلیکوکونجوگیت ها در شرف انجام است.

کلمات کلیدی: گلیکوکونجوگیت‌ها، لکتین هیستوشیمی، اسید سیالیك، سیستم عصبی روده، کریپت های کولون.

مقدمه

کولون در پستانداران نظیر انسان و حیواناتی چون موش، خرگوش، رت و همین طور سایر جانوران به لحاظ اهمیت ساختاری و عملکردی آن به میزان زیادی مورد مطالعه پژوهشگران قرار گرفته است (۱، ۴، ۱۱، ۲۳، ۲۷،۳۲). با این وجود زوایای تاریکی از لحاظ طبیعت مولکولی سطح سلولی و نوع عمل و به ویژه در تمایزات و تکامل آن به خوبی روشن نشده است. تشخیص این ترکیبات و عملکرد آنها در مراحل مختلف زندگی از اهمیت فراوانی برخوردار است. امروزه گذشته از روشهای تشخیصی معمولی از تکنیکهای پیشرفته و اختصاصی چون ایمونوسیتوشیمی و ایمونوهیستوشیمی استفاده های شایانی شده است (۲، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۷).

یکی از این روشهای اختصاصی استفاده از تکنیك لکتین هیستوشیمیایی است که به علت ویژگی خاص لکتین‌ها و توانایی آنها در تشخیص و اتصال به قندهای انتهایی و ما قبل انتهایی زنجیره‌های قندی سطوح خارجی سلولی که در طی تکامل جنینی و همچنین بعد از تولد پدیدار می شوند، می تواند مسیر روشن تری را برای شناخت برخی مولکول‌ها و در پی آن سلولهای متشکله کریپهای روده (غده لیبرکون) در حالت طبیعی و غیر طبیعی نشان دهد(۵، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۵، ۱۸، ۲۹). مطالعات متعددی در ارتباط با نقش اساسی گلیکوکانجوگیت‌ها به خصوص قند انتهایی آنها در ارتباطات سلولی در طی دوران تکاملی و زندگی و زندگی بعد از تولد انجام یافته است (۷، ۸، ۹، ۱۷، ۱۹، ۲۰، ۲۴، ۲۵، ۲۹). یکی از پدیده های جالب این ملکولها تغییرات آنها در طی مراحل مختلف تکاملی و همین طور وضعیت های مختلف سنی می باشد. گروهی از این ملکولهای مهم ترکیبات قندی به نام سیالوگلیکوکانجوگیتها (Sialoglycoconjugetes)زنجیره‌های قندی در سطح برخی

Archive of SID

www.SID.ir

سلولها هستند که در انتهای احیا نشده (non-reducing) زنجیره خود اسیدسیالیك دارند (۲۲، ۲۴، ۲۵، ۳۱). اسید سیالیك یك قند با ۹ کربن می باشد که به انتهای زنجیره قندی در نواحی ۳ $\rightarrow$ ۲ α و ۶ $\rightarrow$ ۲ α و ۸ $\rightarrow$ ۲ α متصل می گردد. ملکول اسیدسیالیك اعمال زیادی را در سطح سلولها انجام می دهد، از جمله می توان از ایجاد محیط الکتریکی و خصوصیت آب دوستی (Hydrophilicity) در سطح سلول نام برد. علاوه بر این در طی دوران تکامل جنینی در زمانهای خاصی از تکامل با ماسك کردن برخی دیگر از ملکولها از فعالیت آنها به طور موقت و طبق روند برنامه ریزی شده جلوگیری می کند (۷، ۱۰، ۱۱، ۱۹، ۲۴، ۲۹، ۳۰، ۳۱، ۳۲). علاوه بر موارد مذکور در ارتباطات ملکولی و بین سلولی به صورت کاملاً اختصاصی نقش عمده ای ایفا می نماید (۲۴،۹).

دراین پژوهش باید گفت اگرچه نقش سلولهای کریپت های کولون در اعمال گوارشی تا اندازه زیادی مشخص گردیده اما توزیع و پراکندگی این گلیکوکانجوگیت ها هنوز مورد تردید و ابهام بوده و مطالعات کافی در این زمینه بسیار محدود است. با استفاده از روش لکتین هیستوشیمیایی (در این مطالعه از لکتین WGA استفاده گردید) که مخصوص تشخیص قند انتهایی اسید سیالیك و تا حدودی ان استیل گلوکز آمین است (Sialic acid << Glu-N-acetyl) ، در این مرحله از مطالعات هیستوشیمیایی محل و توزیع دقیق این قندها در سلولهای متشکله کریپتهای کولون و شبکه‌های عصبی در موش بالغ مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش کار

تعداد پنج موش نر بالغ از نژاد BALB/C را در شرایط آزمایشگاهی از نظر نور،حرارت رطوبت و تغذیه به مدت یك ماه نگهداری و سپس با کلروفرم بیهوش و با قطع شریان آئورت از قید حیات خارج نموده و مقاطعی از قسمت های مختلف روده بزرگ را جدا و بلافاصله در سرم فیزیولوژی شسته و در محلول B4G قرار داده شد (۲۶) . پس از ۲۴ ساعت با روش های معمولی هیستولوژی (۳) قطعات را از الکل های با درجات مختلف در مدت معین عبور داده و آبگیری به طور کامل انجام گردید. سپس نمونه ها به منظور شفاف شدن وارد گزیلل گردیدند و متعاقب آن در پارافین مذاب قرار داده شدند. سپس قالب گیری به نحوی انجام شد که نمونه های کولون به صورت عرضی در بلوك پارافین قرار گیرند. پس از برش زدن به وسیله میکروتوم و تهیه مقاطعی به ضخامت ۵ میکرون تعدادی از آنها هماتوکسیلین – ائوزین رنگ آمیزی شدند و بقیه برش های رنگ نشده برای مطالعات لکتین هیستوشیمیایی آماده گردیدند. لکتین WGA کانجوگه شده با HRP (Horse radish peroxidase) برای تشخیص قند انتهایی اسید سیالیك و ان استیل گلوکز آمین استفاده گردید (۸، ۱۲، ۱۶، ۲۸). این لکتین از شرکت Sigma تهیه شده بود. لکتین ابتدا در بافر فسفات (pH =۷/۲) رقیق شد به نحوی که هر میلی لیتر بافر حاوی ۱۰ میکروگرم ماده موثر بود. لکتین ها به مدت دو ساعت بر روی برشها در درجه حرارت آزمایشگاه قرار داده شدند، سپس مقاطع به مدت ۱۰ دقیقه در مجاورت DAB (Diaminobenzidine) و آب اکسیژنه مجاورت داده شدند. قسمت هایی از بافت کولون که با لکتین فوق واکنش نشان داده بودند، براساس شدت به رنگ قهوه ای روشن تا تیره درآمده و از سایر بخش های بافت کولون متمایز گردیدند که نشانه وجود قندهای مورد نظر می باشد. به منظور افتراق زمینه از رنگ آلسین بلو با pH =۲/۵ استفاده گردید (۳، ۲۶) سپس برشها با میکروسکوپ نوری استاد و دانشجو و مدل Olympus BX50-F3 با دقت مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند و از نواحی مورد نظر تصویربرداری گردید.

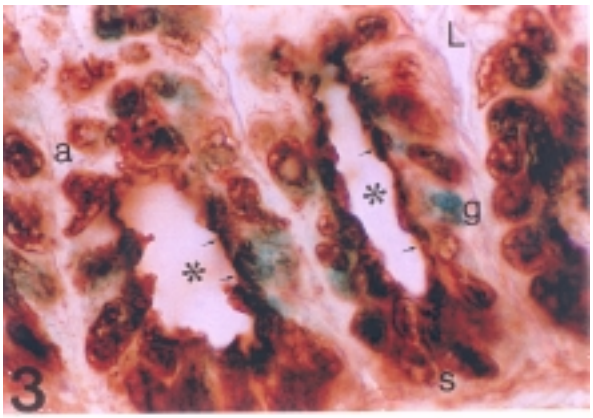
نتایج

در بررسی لکتین هیستوشیمیایی مقاطع بافتی از روده بزرگ موش بالغ که با لکتین WGA انجام گردیده، نتایج زیر به دست آمده است. استفاده از لکتین WGA به خوبی در مشخص نمودن لایه ها و سلولها و ساختارهای مختلف آناتومیکی مؤثر بوده به طوری که در کلیه مقاطع عرضی تهیه شده از کولون با درشت نمایی های مختلف موارد بسیاری قابل بررسی و مطالعه بودند.

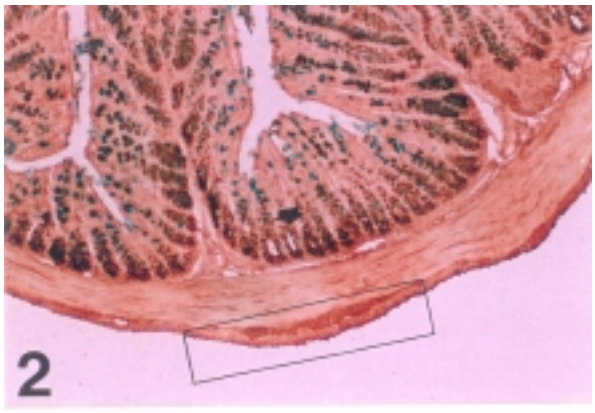
Archive of SID

www.SID.ir

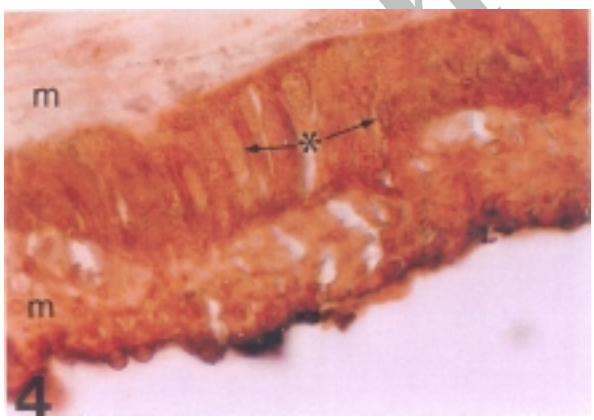
تصویر ۱: مقطع عرضی از کولون موش با درشت نمایی ٤٠ را نشان می دهد. ستاره لومن را مشخص نموده است.



تصویر ۳: مقطع عرضی از کریپت های کولون را با درشت نمایی ۱۰۰۰ نشان می دهد. در این مقطع L لامیناپروپریا، a سلولهای جذب کننده، g سلولهای پیاله ای (گابلت)، s سلولهای پایه ای (استم سلها)، ستاره ها لومن کریپت ها و فلش های کوچک رئوس سلولها را در کریپت نشان می دهد که واکنش شدید نسبت به لکتین WGA داشته اند.



تصویر ۲: مقطع عرضی با درشت نمایی ۱۰۰ از تصویر شماره ۱ می باشد که ضمن به نمایش گذاشتن لایه های مختلف کولون دو ناحیه را به طور ویژه مشخص نموده است، یکی سرفلش بزرگ که انتهای کریپت ها و در حقیقت غدد لیبرکون و دومی ناحیه کادر شده در مستطیل که شبکه عصبی مزانتریک (اوئرباخ) را مشخص نموده است.



تصویر ٤ : مقطع عرضی از عضلات کولون m و شبکه عصبی مزانژیک (اوئرباخ) را که با ستاره و فلشها مشخص شده است به خوبی نشان می دهد. پریکاریون نورون ها با هسته روشن دیده می شوند، درشت نمایی تصویر ۱۰۰۰ می باشد.

www.SID.ir

این موارد در تصاویر ۱ و ۲ به وسیله ستاره و قرار دادن در مستطیل مشخص گردیده و سپس در تصاویر ۳ و ۴ به شرح زیر قابل تجزیه و تحلیل و نتیجه گیری هستند:

۱ – در تصویر ۳ سطح غشایی سلولهای غددی کولون به شدت با WGA واکنش نشان داده، علاوه بر این سلولهای مختلف شامل سلولهای پایه ای، پیاله ای و جذبی به خوبی قابل تشخیص هستند.

۲ – تصویر ۴ سلولهای تشکیل دهنده گانگلیون عصبی و مناطق گلژی به شدت کمتر نسبت به غدد کولونی به WGA واکنش داشته که خود باعث وسعت منطقه شارژ منفی الکتریکی در این ناحیه است.

در تصویر۳ که انتهای چند کریپت (غده لیبرکون) با ستاره مشخص گردیده سلولهای پایه ای S (Stem cells) در قاعده آنها است. آنها می توانند با تکثیر خود به طور مدام سایر سلولها را به وجود بیاورند(۶،۱، ۲۳، ۲۸، ۳۲). سلولهای گابلت یا پیاله ایG (Goblet cells) می باشند و بالاخره سلولهای جاذب A (Absortive cells) و به خصوص واکنش شدید رئوس این سلولها به لکتین WGA دیده می شوند. از نکات بارز استفاده از این لکتین در تصویر ۴ قابل توجه است که واکنش پریکاریون نورونهای تشکیل دهنده شبکه عصبی مزانتریك (اوئرباخ) را به عنوان یك ساختمان کاملاً مجزا مشخص در بین عضلات مشخص نموده است.

بحث

میلیونها سلول اپی تلیالی در انواع مختلف با نظم و ترتیب خاص و ساختمان و اعمال ویژه گوناگون سطوح داخلی دیواره لوله گوارش را مفروش نموده و هر کدام در ناحیه آناتومیکی خود وظایف متعددی از جمله ترشح، دفع، هضم، جذب، حفاظت، جایگزینی و تقسیم را انجام می دهند که همگی تحت تاثیر سیستم عصبی هستند. از طرف دیگر در دیواره لوله گوارش حدود 10^8 میلیون نورون تخمین زده می شود که به اندازه تقریبی نورونهای نخاع می باشند. این نورونها در دو شبکه مزانتریك یا اوئرباخ بین عضلات طولی و حلقوی و شبکه زیر مخاطی (Submucous) قرار دارد. گرچه بعضی از محققین شبکه زیر مخاطی را نیز به دو شبکه داخلی و خارجی مجدداً تقسیم می کنند (۱۳) که در بافت همبند زیر مخاط قرار دارند. با وجودیکه پژوهشهای فراوانی در مورد سیستم عصبی دیواره لوله گوارش و سلولهای اپی تلیالی سطوح داخلی آن انجام گردیده، اما ابهامها و نکات تاریك و کشف نشده زیادی هنوز وجود دارد. از جمله چگونگی ارتباط گانگلیوهای پاراسمپاتیك جدار روده ها و به خصوص کولون (که موضوع مورد بحث است) با محیط میکروسکوپیك (microenvironment) و سلولهای آن می باشد. به نظر می رسد ارتباط نورونهای متشکله این گانگلیونها و تاثیر آنها بر سلولهای اطراف به وسیله ملکولهای سطحی غشای سلولی نورونها و سایر سلولها تامین می شود که از مهمترین این ملکولهای سطحی باید از زنجیره های قندی سطوح سلولی آنها نام برد.

در این مطالعات هیستوشیمیایی دو ملکول سیالیك اسید و ان استیل گلوکز آمین به وسیله لکتین WGA تشخیص داده می شوند. اما با توجه به اینکه لکتین WGA در درجه اول ملکولهای سیالیك اسید و با شدت کمتر ان استیل گلوکز آمین را تشخیص داده و به آن متصل می شوند (Sialic acis >> glu-n-acetyl). بنابراین در این پژوهش تنها (بیشتر) به ملکولهای سیالیك اسید توجه شده است. در مطالعات هیستوشیمیایی قبلی مشخص گردیده است که پس از به کارگیری آنزیم سیالیداز در کولون سیستم عصبی و غددی هیچ واکنشی به WGA نداشته است (۳۰، ۳۱)، بنابراین با توجه به مشاهدات در این نواحی WGA فقط می تواند سیالیك اسید را تشخیص دهد که در بخش نتایج در تصاویر ۳و۴ به آن اشاره شده است .

در این نواحی یکی از اعمال اسیدهای سیالیك ماسك کردن برخی ملکولهای دیگر زنجیره های قندی مانند گالاکتوز و یا دی ساکارید گاکتوز ان استیل گالاکتوز آمین است(۲۵). احتمال می رود با ازدیاد سن و تغییر وضعیت سلامت روده میزان سیالیك اسیدها نیز تغییر یابند که این موضوع در

Archive of SID

www.SID.ir

مطالعات دیگران به اثبات رسیده است، به عنوان مثال با ازدیاد سن میزان و توزیع سیالو گلیکوکانجوگیت های سطح برخی از سلولهای مغزی چون ناحیه هیپوکامپ و سلولهای پورکنژ مخچه تغییرات فاحشی به وجود می آید(۲۵، ۳۱). این موضوع در سایر ملکولهای وابسته به نورونها مانند ملکول N-CAM که دارای سیالوگلیکوکانجوگیت هستند، نیز دیده شده و تغییرات کاهش میزان اسیدهای سیالیك در بعد از تولد در سطح سلولهای در حال تکامل به وجود می آید(۲، ۵، ۲۹).

از این مطالعات لکتین هیستوشیمیایی می توان این طور نتیجه گرفت که تراکم بیش از حد ملکولهای اسیدسیالیك در سطح سلولهای عصبی روده و اپی تلیوم غددی آنها باعث ارتباط سلولهای عصبی با محیط میکروسکوپیك خود و عملکرد سلولهای اپی تلیالی غددی می شود، گرچه طبیعت این ارتباط هنوز به خوبی مشخص نمی باشد. مطالعات تغییرات فوق با ازدیاد سن در شرایط طبیعی و همین طور در برخی وضعیت های فیزیولوژیك و پاتوژنیك از اهداف بعدی این مطالعات هیستوشیمیایی است.

References

1. Abraham L. K., Histology and cell biology an introduction to pathology, Mosby, 2002, p.p. 438.
2. Accili D., Menghi M., Materazzi G., Menghi G., 2001, Sialic acid derivatives and their distribution in rat sublingual gland acini during pre – and post – natal development, The Histochemical Journal, 33: (363-371).
3. Bancroft J. D., Stevens A., Theory and practice of histological techniques, 2nd ed., Churchill Livingstone, 1982, p.p .1-61.
4. Bloom W., Fawcett A., A textbook of histology , 21-th ed., 1994, p.p. 741-743 .
5. Bryk S. G., Gheri G., 2002, Lectin histochemistry of entracytes sugar residues in the gut of the chick embryo and of a newborn, Ital. J. Anat. Embryol., 107(11): 37-49.
6. Bryk S. G., Sgambati E., Gheri Bryk G., 1999, Lectin histochemistry of goblert cell sugar residues in the gut of the chich embryo and of the newborn, Tissue Cell, 31(2): 170-5.
7. Chylek V., Kolar Z., Lichnovsky V., 1991, Glycoconjugates in colon mucosa during the development to human fetuses., Acta Univ. Palackiolomuc Fac. Med., 131: 175-8.
8. Fazel A. R., Schlute B. A., Thompson R. P., Spicer S. S., 1987, Presence of a unique glycoconjugate on surface of rat primordial germ cells during migration, Cell Diffe., 21. 199-211.
9. Fukuda M., Hiraoka N., Yeh J. C., 1999, C-Type lectins and sialy lewisx oligasacharides. Rersatile roles in cell – cell interaction. J. Cell Biol., 147(3): 467-470.
10. Gill R. K., Mahmood S., Nagpaul J. P., Mahmood A., 1999, Functional role of sialic acid in IgG binding to microvillus membranes in neonatal rat intestin, Biol. Neonate, 76(1): 55-64.
11. Jeong K. I., Sohn Y. S., Ahn K., 2002, Lectin histochmistry of peyer's patches in the procine ileum, J. Vet. Med. Sci., 64(6): 535-8.
12. Kodaira H., Ishihara K., Hotta K., Kagoshima M., Shimada H., 2002, Reaction of various lectins to mucin derived from the different layers of rat gastric gland mucosa: comparison of enzyme linked lectin binding assay with lectin histochemistry, Biol. Pharm. Bull., 23(10): 1137-9.
13. Laden S. A., Schulte B. A., 1984, Histochemical evulation of secretory glycoprotein in human salivery gland with lectin horse redish peroxidase conjugates, Cytochem, 32: 965-972.
14. Leverkoehne I., Gruber A. D., 2002, The Murin mclcA3 (Alias gob – 5) protein is located in the mucin Grenaule membranes of intestine, respiratory and uterin goblet cells, The Journal of Histochemistry and cytochemistry, 50 (6): 829-838.
15. Maya V., Gulubova T., 2001, Tenascin immunoreactivity in the lavge bowell and liver in petients with colorectal cancer, The Histochemical Journal, 33:(111-120).
16. Muchmore E. A., Varki N. M., Fukuda M., 1987, Developmentat regulation of sialic acid modifications in rat and human colon, FASEB J., 1(3): 229-35.
17. Park C. M., Reid P. E., Owen D. A., Volz D., Dunn W. L., 1987, Histochemical studies of epithelium cell glycoproteins in normal rat colon, Histochem. J., 19(10-11) 546-54.
18. Poorkhalkali N., Jacobson I., Helander H. F., 2000, Lectin histochemistry of the esophagus in several mammalin species, Anat. Embryol., (5): 54-9.
19. Richard G. K., Basic medical histology, Oxford University press, 309-310.
20. Roland S., Sialic acid and their role as biological marks, Elsevier Science publishers B.V, Amesterdam, 1985, pp 357-360.
21. Rosenberg R., Biology of the sialic acids, New York, Plenum press,1995, 1-30.
22. Roth K. A., Steve K., Jeffrey I. 1992, Immunocytochemistry studies suggest two pathways for entroendorine cell differentiation in colon, Am. J. Physiol., 263G, 174-G180.
23. Sanchez M. J., Miguel, Maria A., 2002, Immunocytochemical detection of orexin A in

Archive of SID

www.SID.ir

endocrine cell of developing mouse gut, The Juornal of Histochemistry, 50 (1): 63-69.
24. Sasaki T. I., Akimoto Y. I., Sato Y. I., Hayato K. I., Hirono H. I., Endo T., 2002, Distribution of sialoglycoconjugates in the rat cerebellum and it's chamye with aging, J. Histochem. Cytochem., 50(9): 1179-1186.
25. Sato Y. I., Akimoto Y.I., Kamakami H. I., Hirano H. I., Endo T., 2001, Location of the sialoglycoconjugates containing the sia α 2-3 Gal. and Sia α 2-6. Gal groups in the rat hypocampus and the effect of aging on their expression., J. Histochem. Cytochem., 49: 1311-1320.
26. Schulte B. A., Spicer S. S., 1983, Light microscopic Salivary glands and pancreas with lectin – horse radish peroxidase conjugate, Histochem. J., 15: 1217-1238.
27. Stephen S. S., Histology for pathologist, Lippincott- Raven, 1997, p.p. 521-523.
28. Taatjes D. J., Roth J., 1988, Alteration in sialytransferase and sialic acid expression accompanies cell differentiation in rat intestine, Eur. J. Cell Biol., 46(2): 289-98.
29. Taatjes D. J., Roth J., 1990, Selective loss of sialic acid from rat small intestine epithelia cell during postnatal deveolpment: demonstration with lectin – gold techniques, Eur. J. Cell Biol., 53(2): 255-60.
30. Tasuku S., Yohihiro A., Yuji S., 2002, Distribution of sialoglycoconjugates in the rat cerebellum and it's change with aging, The Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 50(9): 1179-1186.
31. Timmermans J. P., Jurgen H., Dirk A., 2001, Outer Submucouse plexus: An interinsic nerve network involved in both secretory and motility processes in the intestine of large mammalian and humans, The Anatomical Recored, 262: 71-78.
32. Yamashita K., Fukushima K., Sakiyama T., Murata F., Kuroki M., Matsuoka Y., 1995, Expression of sia alpha 2- 6 Gal beta 1 $\rightarrow$ 4 GalNac residues on sugar chains of glycoproteins including carcinoembryonic antigen in human colon adenocarcinoma: application of trichosanthes japonica agglutinin I for early diagnosis, Cancer Res., 55(8): 1675-9.

Archive of SID

www.SID.ir