بررسی تکامل غده هیپوفیز رت و مقایسه اثر چند فیکساتیو در آماده‌سازی بافتهای آن

دکتر علیرضا ابراهیم‌زاده بیدسکان[1]- دکتر محمدرضا نیکروش[2]- دکتر محمدمهدی حسن‌زاده طاهری[3]

چکیده

زمینه و هدف: غده هیپوفیز دارای سه لوب قدامی، میانی و خلفی می‌باشد که لوب قدامی و میانی را با هم آدنوهیپوفیز می‌نامند. آدنوهیپوفیز از اپیتلیوم سقف دهان اولیه با تشکیل بن‌بست راتکه ایجاد می‌گردد و لوب خلفی با تشکیل اینفاندیبولوم از کف دیانسفالون منشأ می‌گیرد. مطالعه حاضر با هدف تعیین مراحل تکاملی و سیر تمایزات غده هیپوفیز و نیز یافتن فیکساتیو برتر در هنگام مطالعه مراحل تکاملی این غده انجام شد تا در مطالعات پیشرفته‌تر مورد استفاده قرارگیرد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، به منظور بررسی مراحل تکاملی غده هیپوفیز، جنین‌های رت از روز دهم تا روز بیستم در فیکساتیوهای نرمالین، کارنوی، بوئن و B_4G فیکس و سپس در پارافین قالب گیری شدند و برشهایی با ضخامت ۵ میکرومتر به صورت سریال از آنها تهیه گردید. سپس این برشها به روش متداول در آزمایشگاه بافت‌شناسی با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند و سپس به کمک میکروسکوپ نوری چند نفره $Olympus\text{-}AH_2$ مورد مطالعه و تصویربرداری قرارگرفتند.

یافته‌ها: تکامل آدنوهیپوفیز که با تشکیل بن‌بست راتکه شروع می‌گردد، از روز دهم قابل مشاهده بود و تغییرات مورفولوژیکی آن نیز با الگوی زمانی مشخص تا روز بیستم ادامه یافت. از ابتدای تشکیل بن‌بست راتکه تا روز هفدهم، همه سلول‌های تشکیل‌دهنده این بن‌بست نسبت به هماتوکسیلین واکنش نشان دادند. از روز هجدهم واکنش برخی از سلول‌ها نسبت به ائوزین آغاز شد. پس از آن با ادامه تکامل بر شدت واکنش این سلول‌ها نسبت به ائوزین افزوده گردید؛ همچنین شروع تکامل هیپوفیز خلفی با تشکیل اینفاندیبولوم از کف دیانسفالون در روز دهم قابل مشاهده بود. از طرفی نمونه‌هایی که در کارنوی فیکس شده بودند، نتایج بهتری را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: مروری عملی بر تغییرات بن‌بست راتکه و سیر تمایزات سلولی آن با استفاده از این رنگ‌آمیزی می‌تواند در تعیین مراحل تکاملی و انتخاب نوع فیکساتیو بهتر به هنگام استفاده از تکنیک‌ها و پروژه‌های پیشرفته‌تر مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه‌ها: هیپوفیز، تکامل، هماتوکسیلین، ائوزین، فیکساتیو، رت

افق دانش؛ مجله دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی گناباد (دوره ۱۱؛ شماره ۲؛ سال ۱۳۸۴)

[1] نویسنده مسؤول: استادیار گروه آموزشی علوم پایه، دانشکده علوم پزشکی گناباد

آدرس: گناباد – حاشیه جاده آسیایی- دانشکده علوم پزشکی گناباد- گروه علوم پایه

تلفن: ۰۵۱۱-۸۸۲۸۲۴۳ نمابر: ۰۵۱۱-۸۸۲۸۲۴۳ پست الکترونیکی: ebrahimzadeh43@yahoo.com

[2] دانشیار گروه آموزشی علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

[3] استادیار گروه آموزشی علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

غده هیپوفیز دارای سه لوب قدامی میانی و خلفی می‌باشد که لوب قدامی و میانی آن را با هم آدنوهیپوفیز می‌نامند (۲،۱). غده هیپوفیز از دو منشأ متفاوت ایجاد می‌گردد. یکی از این دو منشأ عبارت است از دیورتیکولی که از سقف دهان اولیه به سمت بالا رشد می‌کند و بن‌بست راتکه [1] را تشکیل داده که در جهت تشکیل آدنوهیپوفیز تکامل می‌یابد. این دیورتیکول در روز ۲۴ زندگی جنینی انسان (۳-۷) و در روزهای ۱۰-۱۱ جنینی رت قابل مشاهده است (۸). بخش دیگر آن از کف دیانسفالون به سمت پایین رشد نموده و اینفاندیبولوم را تشکیل می‌دهد و سرانجام هیپوفیز خلفی را ایجاد می‌نماید.

با ادامه روند تکامل, ابعاد بن‌بست راتکه افزایش می‌یابد و فقط توسط کانال استومودیو-آدنوهیپوفیزیال به حفره دهان مرتبط می‌گردد که بعداً این کانال به طور پیشرونده‌ای تحلیل می‌رود و آدنوهیپوفیز ارتباط خود را با ناحیه حلق در حدود هفته هفتم در جنین انسان و در روز پانزدهم در جنین رت از دست می‌دهد. در طی زندگی جنینی چند جوانه از بخش روسترال بن‌بست آدنوهیپوفیز ایجاد می‌گردد که تعدادی از این جوانه‌ها ابتدا به صورت جانبی و سپس به سمت روسترال رشد می‌کنند و در نهایت به طرف خط وسط رشد نموده و ناحیه‌ای که رگ‌زایی مزانشیمی در آن صورت می‌گیرد را در بر می‌گیرند و پارس دیستالیس را ایجاد می‌نمایند. جوانه‌های دیگر به سمت مدیال امیننس آینده رشد می‌کنند و ساقه اینفاندیبولوم را در بر می‌گیرند و پارس توبرالیس را تشکیل می‌دهند.

دیواره خلفی بن‌بست راتکه به صورت باریک و رشد نیافته، باقی می‌ماند و پارس اینترمدیا را تشکیل می‌دهد (۸).

تشکیل و تغییر شکل بن‌بست راتکه در حین تکامل و نیز زمان ظهور فنوتیپ‌های مختلف سلولی در آدنو هیپوفیز در گونه‌های مختلف در تعیین مرحله تکاملی (Staging) از اهمیت بسزایی برخوردار است و می‌تواند به صورت زیربنایی عملی به هنگام استفاده از تکنیک‌های پیشرفته مورد توجه قرار گیرد؛ از طرف دیگر فیکساسیون یکی از مراحل مهم آماده‌سازی بافتها محسوب می‌گردد که در این راستا انتخاب فیکساتیو مناسب با توجه به نوع بافت و نوع رنگ‌آمیزی از اهمیت بسزایی بر خوردار است.

در این پژوهش سعی گردید تا با استفاده از چهار نوع فیکساتیو نرمالین، کارنوی، بوئن و B_4G و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین (H&E) مورفوژنز غده هیپوفیز به طور عملی مورد ارزیابی قرار گیرد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، از رت‌های ماده باکره دو ماهه نژاد N-Mary و رت نر هم‌نژاد آنها که از مؤسسه سرم‌سازی رازی مشهد خریداری شده بودند، استفاده گردید. رت‌ها مطابق دستورالعمل NIH [2] و DHEW [3] در مورد مراقبت از حیوانات در شرایط استاندارد خانه حیوانات بخش طب تجربی مرکز پزشکی قائم مشهد و با دسترسی آزادانه به آب, غذا (روزانه دو بار صبح و عصر توسط پلیت و جوانه گندم تغذیه می‌شدند)، دوره تاریکی و روشنایی ۱۲ ساعته (از ساعت ۸ صبح تا ساعت ۸ بعدازظهر), درجه حرارت ۱۸تا ۲۴ درجه سانتیگراد و رطوبت مناسب نگهداری و پس از یک هفته تطبیق با محیط جدید در قفسهای مخصوص جفت‌گیری به صورت پلی گامی (به ازای هردو رت ماده یک رت نر) آمیزش داده شدند و با تهیه اسمیر واژینال، روز صفر حاملگی (E_0) در آنان تعیین گردید. از رت‌هایی که به این طریق حامله تشخیص داده شدند، در قفسهایی جداگانه و در شرایط استاندارد خانه حیوانات نگهداری و مراقبت شد (۱۰،۹).

به منظور تهیه جنین و آماده‌سازی بافت، در هر یک از روزهای ۱۰ تا ۲۰ حاملگی، رت‌های حامله ابتدا توسط کلروفرم تحت بیهوشی عمیق قرار گرفتند و پس از سزارین, شاخه‌های رحم در آنها جدا گردید و در سرم فیزیولوژی قرار داده شد. سپس جدار رحم و پرده‌های جنینی با سرعت و دقت شکافته شد و جنین‌های آنها از شاخه‌های رحم خارج شدند و هر دسته از آنها به مدت ۲۴ ساعت با استفاده از نرمالین ۱۰٪ (فرمالین+سرم

[1] Adenohypophyseal Pouch

[2] The National Institutes of Health

[3] Department of Health Education and Well Fare

Archive of SID

www.SID.ir

فیزیولوژی)، محلول کارنوی (۶۰ ml اتانول مطلق، ۳۰ ml کلروفرم و ۱۰ ml اسیداستیک گلاسیال)، محلول بوئن (۷۵ ml محلول آبی اسید پیکریک اشباع‌شده، ۲۵ ml فرمالدئید ۴۰٪، ۵ ml اسیداستیک گلاسیال) و محلول B_4G (۶٪ کلرید مرکوریک، ۱٪ گلوتارلدئید و ۱٪ استات سدیم) ثابت شدند (۱۱). سپس نمونه‌ها مطابق روشهای معمول در بافت‌شناسی پاساژ داده شدند و در بلوک‌های پارافینی قرار گرفتند و در نهایت برشهایی به صورت سریال و به ضخامت ۵ میکرومتر در دو جهت ساژیتال و کرونال از هر نمونه تهیه گردید (۱۲،۱۱).

پس از ثابت‌شدن[1] نمونه‌ها، عمل آبگیری[2] به منظور جانشین ساختن الکل با آب بافتها، صورت گرفت و برای انجام آن، نمونه‌ها از محلول‌های اتانول با غلظت‌های صعودی عبور داده شدند. سپس عمل شفاف‌سازی[3] به منظور جایگزین ساختن گزیلل به جای الکل و شفاف‌شدن بافتها در محلول گزیلل صورت پذیرفت. آنگاه جهت نفوذ پارافین در بافت و جانشین‌شدن آن با گزیلل، عمل آغشته‌سازی[4] در پارافین مذاب انجام شد و در نهایت نمونه‌ها در پارافین قالب گیری شدند و بلوک‌های پارافینی محتوی نمونه‌ها تهیه گردیدند. از این بلوک‌ها برشهای بافتی به صورت سریال و در جهات ساژیتال و کرونال به ضخامت ۵ میکرومتر به کمک دستگاه میکروتوم تهیه گردید (۱۰-۱۲).

در بررسی و مقایسه وضعیت بافتها و یافتن مقاطعی که دارای نمونه هیپوفیزی در مقاطع متوالی بودند، از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین (H&E) استفاده شد. این رنگ‌آمیزی می‌تواند به وضوح ساختمانهای بافتی متعددی را نشان دهد.

در این روش از هماتوکسیلین Harris (۲/۵gr هماتوکسیلین، ۵۰ ml الکل مطلق، ۵۰g پتاسیم آلوم، ۱/۲۵ اکسید مرکوریک و ۵۰۰ml آب مقطر) و ائوزین ۱٪ (۱ g ائوزین در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) استفاده گردید.

پس از تهیه رنگهای مورد نیاز، نمونه‌های انتخابی مطابق روش معمول رنگ‌آمیزی H&E ارائه شده در مراجع، رنگ‌آمیزی شدند و سپس به کمک میکروسکوپ نوری چند نفره Olympus-AH_2 موجود در آزمایشگاه هیستوتکنیک دانشکده پزشکی مشهد مورد مطالعه و تصویربرداری قرارگرفتند (۱۰-۱۳).

یافته‌ها

بررسی نمونه‌های رنگ‌آمیزی‌شده با H&E در روزهای دهم و یازدهم جنینی که مقارن با شروع تشکیل بن‌بست راتکه است، نشان داد که تقریباً همه سلول‌های تشکیل‌دهنده این بن‌بست نسبت به هماتوکسیلین واکنش مثبت نشان می‌دهند (شکل ۱).

در ادامه روند تکامل، در روز سیزدهم جنینی، لومن بن‌بست راتکه که در مقطع ساژیتال مشابه شعله شمع شد و از روز چهاردهم Atwell's Recess نیز ظاهر گردید. در همین زمان لومن شروع به تغییر شکل نمود، به طوری که در روز پانزدهم شکل آن مشابه حرف S شد و همه سلول‌های آن با هماتوکسیلین واکنش مثبت نشان دادند (شکل ۲).

از روز شانزدهم با افزایش رشد دیواره قدامی بن‌بست راتکه، لومن آن L شکل گردید؛ در حالی که سلول‌های تشکیل‌دهنده آن، همچنان نسبت‌به هماتوکسیلین واکنش‌مثبت نشان دادند (شکل ۳). تا این که در روز هجدهم در بعضی از سلول‌ها واکنش با ائوزین آغاز شد که این واکنش به صورت نواحی صورتی‌رنگی در سیتوپلاسم آنها قابل مشاهده بود (شکل ۴).

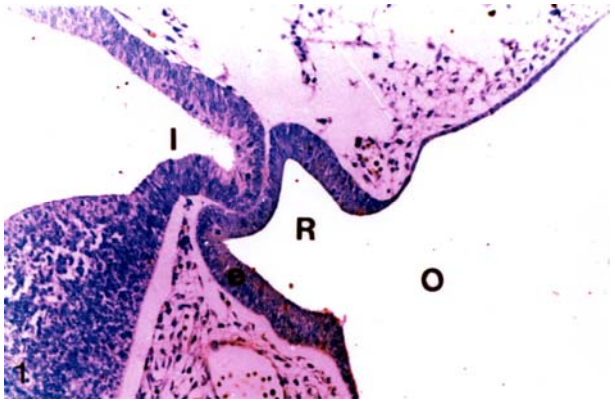
با ادامه تمایز سلولی در روزهای بعد، شدت واکنش این سلول‌ها با ائوزین افزایش یافت، به طوری که در روز بیستم سلول‌های اسیدوفیل به راحتی قابل تشخیص بودند. لومن بن‌بست راتکه با ادامه رشد دیواره قدامی آن بتدریج باریک شد تا این که در روز بیست‌ویکم فقط به شکل شکاف باریکی قابل مشاهده بود.

مقایسه برشهای متعددی که در هر یک از مراحل جنینی با فیکساتیوهای مختلف تهیه و با H&E رنگ‌آمیزی شده بودند، نشان داد که نمونه‌هایی که با محلول کارنوی فیکس شده بودند (شکل ۱)، از کیفیت بهتری برخوردار هستند و ویژگیهای بافت‌شناختی آنها بهتر حفظ شده و قابل مشاهده بودند.

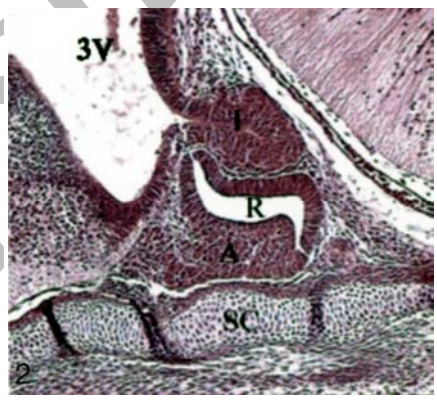
[1] Fixation
[2] Dehydration
[3] Clearing
[4] Impregnation

Archive of SID

www.SID.ir



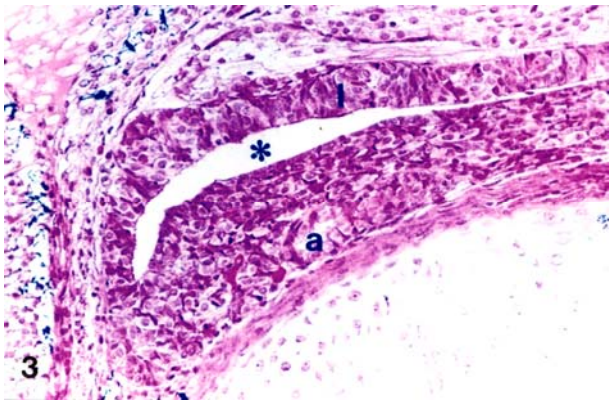
شکل ۱- مقطع ساژیتال هیپوفیز در حال تکامل جنین‌های ۱۰ روزه (فیکس‌شده با محلول کارنوی). رنگ‌آمیزی: H&E؛ بزرگنمایی: ۲۰۰×. R: بن‌بست راتکه O: دهان اولیه، I: انفاندیبولوم (لوب خلفی در حال تکامل)



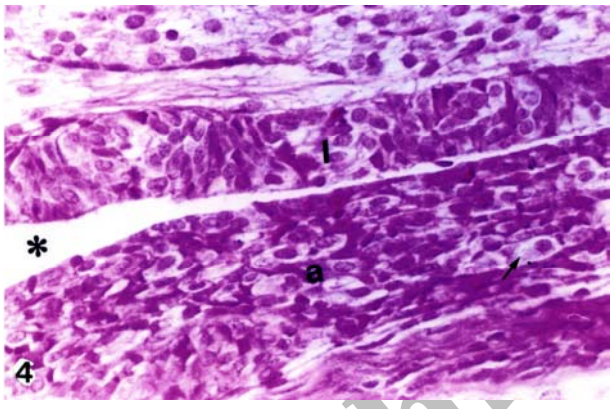
شکل ۲- مقطع ساژیتال هیپوفیز جنین ۱۵ روزه رت (فیکس‌شده با محلول نرمالین). رنگ‌آمیزی: H&E؛ بزرگنمایی: ۲۰۰×. R: فضای بن‌بست راتکه, A: لوب قدامی در حال تکامل, I: لوب خلفی هیپوفیز در حال تکامل. در این مرحله از تکامل، همه سلول‌ها با هماتوکسیلین واکنش نشان داده‌اند.

بحث و نتیجه‌گیری

بررسی تغییرات هیستوشیمیایی نمونه‌هایی که با H&E رنگ‌آمیزی شده بودند، مشخص نمود که در مراحل اولیه روند تکامل غده هیپوفیز تقریباً هسته و سیتوپلاسم همه سلول‌ها رنگ آبی هماتوکسیلین را به خود می‌گیرند. با توجه به این که هماتوکسیلین یک رنگ قلیایی است، با قسمت‌هایی از سلول که خاصیت اسیدی دارند و یا به عبارت دیگر بازوفیل هستند، واکنش نشان می‌دهد. در سلول‌های در حال تمایز به علت فعالیت شدید پروتئین سازی, هسته سلول‌ها که محتوی



شکل ۳- مقطع ساژیتال هیپوفیزجنین ۱۶ روزه رت (فیکس‌شده با محلول B_4G). در این مرحله از تکامل، همه سلول‌ها با هماتوکسیلین واکنش نشان داده‌اند. رنگ‌آمیزی: H&E؛ بزرگنمایی: ۲۰۰×.*: فضای بن‌بست راتکه, a: لوب قدامی در حال تکامل, I: دیواره خلفی بن‌بست



شکل ۴- مقطع ساژیتال هیپوفیزجنین ۱۸ روزه رت (فیکس‌شده با محلول بوئن). رنگ‌آمیزی: H&E؛ بزرگنمایی: ۲۰۰×.*: فضای بن‌بست راتکه, A: لوب قدامی در حال تکامل، I: دیواره خلفی بن‌بست راتکه در حال تکامل

یوکروماتین در حال رونویسی است، با رنگهای قلیایی واکنش نشان می‌دهد و در سیتوپلاسم نیز به علت وجود مقادیر زیادی مولکول‌های RNA که در فرایند پروتئین‌سازی دخیل می‌باشند، با هماتوکسیلین رنگ‌پذیری نشان می‌دهند (۱۳).

با ادامه فرایند تمایز سلولی در گروهی از سلول‌ها که در جهت سلول‌های سازنده هورمون‌های گلیکوپروتئینی تمایز می‌یابند، زیر واحد β موجب تفکیک و تشخیص سلول‌هایی می‌شود که با الگوی زمانی مشخصی پدیدار می‌گردند؛ به طوری

Archive of SID
www.SID.ir

که سلول‌های مترشحه ACTH, TSH و LH به ترتیب در روزهای شانزدهم, هفدهم و هجدهم قابل تشخیص می‌باشند (۸). این گروه از سلول‌ها در هیپوفیز در حال تکامل و همچنین هیپوفیز بالغ با رنگ قلیایی هماتوکسیلین واکنش نشان می‌دهند و بازوفیل هستند. اما گروه دیگری از سلول‌ها که در مراحل اولیه تکامل به علت فعالیت پروتئین‌سازی بازوفیل بودند، با ادامه تمایزات سلولی و سنتز هورمون‌های پروتئینی سوماتوتروپ و لاکتوتروف سیتوپلاسم آنها اسیدوفیل می‌شود و رنگ ائوزین را به خود می‌گیرد. این تغییرات که از روز هجدهم شروع می‌شود و تا روز بیستم به حداکثر خود می‌رسد، بی‌شک بازگوکنندهٔ تکامل نهایی این بخش از هیپوفیز و شروع فعالیتهای ترشحی آن است.

در مورد انتخاب فیکساتیو مناسب باید اذعان نمود که مشکل است بتوان قانون مشخصی برای آن بیان کرد؛ زیرا انتخاب ماده فیکساتیو مناسب، به نوع بافت و نوع رنگ‌آمیزی که انجام می‌گیرد، بستگی دارد؛ اگر چه در آزمایشگاههای هیستوپاتولوژی معمولاً از محلولهای فرمالدئید و یا بوئن برای ثابت‌کردن بافتها استفاده می‌گردد و کاربرد محلول بوئن برای مطالعات سیتولوژیکی مناسب است ولی به دلیل درجه نفوذ کمی که دارد، باعث طولانی شدن زمان ثبوت می‌شود و می‌تواند زیان‌بخش باشد و نیز فرمالین مشخصات هسته‌ای و خصوصیات بافتی را خوب حفظ می‌کند ولی گرانول‌های سیتوپلاسمی را حل و سیتوپلاسم را نیمه‌شفاف می‌نماید (۱۲،۱۱). بنابراین به نظر می‌رسد برای بافتهای ترشحی از جمله هیپوفیز مناسب نباشد. از طرف دیگر محلول کارنوی فیکساتیوی مناسب برای هسته سلول است و زمان ثبوت آن کم است؛ بنابراین باعث طولانی شدن زمان فیکساسیون نمی‌شود و از این نظر زیان‌بخش نیست. از طرفی تحقیقات نشان داده‌اند که این محلول برای ثابت‌کردن نمونه‌هایی که در پارافین قالب گیری می‌شوند، بسیار مناسب است (۱۱). با توجه به مطالب فوق و نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان اظهار داشت که برای ثابت‌نمودن بافتهای جنینی و ترشحی از جمله هیپوفیز فیکساتیو کارنوی، محلول مناسب‌تری است و می‌تواند در مطالعات این عضو مورد استفاده قرار بگیرد. همچنین شایسته است با توجه به نوع نمونه‌برداری نسوج (بیوپسی یا اتوپسی)، اندازه نمونه، نوع بافت، تکنیک‌ها و روشهای رنگ‌آمیزی و هدفی که از آماده‌سازی بافت دنبال می‌گردد، انتخاب فیکساتیو مناسب، همواره مورد نظر قرار بگیرد تا نتایج دقیق‌تری در مطالعات بافت‌شناختی حاصل گردد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد و همچنین خدمات فنی سرکار خانم متجدد در زمینه آماده‌سازی برشهای بافتی سپاسگزاری می‌گردد..

منابع:

1- Bancrof JD, Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. 5th ed. London: Churchill Livingston; 2002.
2- Dubois PM, el Amraoui A, Heritier AG. Development and differentiation of pituitary cells. Microsc Res Tech. 1997; 39 (2): 98-113.
3- Dubois PM, el Amraoui A, Embryology of the pituitary gland. Trends Endocrinol Metab. 1995; 6:1-7
4- Eagleson GW, Jenks BG, Van Overbeeke AP.The pituitary adrenocorticotropes originate from neural ridge tissue in Xenopus laevis. J Embryol Exp Morphol. 1986; 95: 1-14.
5- Kiernan JA, Histological and Histochemical Methods Theory and Practice. 3rd ed. Oxford: Butter Worth: 1990. pp: 232-36.
6- Treier M, Gleiberman AS, O'Connell SM, Szeto DP, McMahon JA, McMahon AP, et al. Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. Genes Dev. 1998; 12 (11): 1691-704.
7- Treier M, O'Connell S, Gleiberman A, Price J, Szeto DP, Burgess R, et al. Hedgehog signaling is required for pituitary gland development. Development. 2001 Feb;128(3):377-86.
8- Takuma N, Sheng HZ, Furuta Y, Ward JM, Sharma K, Hogan BL, et al. Formation of Rathke's pouch requires dual induction from the diencephalon. Development. 1998; 125 (23): 4835-40.
9- Sheng HZ, Westphal H. Early steps in pituitary organogenesis. Trends Genet. 1999; 15 (6): 236-40.
10- Kouki T, Imai H, Aoto K, Eto K, Shioda S, Kawamura K, et al. Developmental origin of the rat adenohypophysis prior to the formation of Rathke's pouch. Development. 2001; 128 (6): 959-63.
11- Myrin B, Theodore B. Functional Histology. 3rd ed. Boston: Little Brown; 1989. pp: 1-10.
12- Hafez ESE. Reproduction in Farm Animals. 5th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1987. pp. 363-78
13- Junqueira LC, Carnerio J, Long JA. Basic Histology. 10th ed. New York: McGraw Hill; 2003. pp. 27-35

Archive of SID
www.SID.ir