Archive of SID

مقالهٔ پژوهشی

مطالعه لکتین هیستوشیمیائی تغییرات تکاملی گلیکوکانژوگیت‌ها در سلول‌های نوتوکورد در اوایل دوران مورفوژنز در موش

محمدمهدی حسن‌زادهٔ طاهری [۱]، دکتر محمدرضا نیکروش [۲]، دکتر مهدی جلالی [۳]، دکتر علیرضا فاضل [۴]

چکیده

پیش‌زمینه و هدف : نوتوکورد یکی از ساختارهای محوری جنینی با منشاء مزودرمی است که علاوه بر نقش ساختمانی و پشتیبانی در القای بافت‌های مجاور خود و تمایز آنها مانند لوله عصبی، سومایتها و آندودرم نقش دارد. هدف این تحقیق مشخص ساختن گلیکوکانژوگیت‌ها در سلول‌های نوتوکوردی و مزانشیم مجاور آن در اثنای دوره جنین‌زایی می‌باشد.

مواد و روش: برای این منظور از جنین‌های موش در فاصله روزهای دهم تا چهاردهم جنینی استفاده گردید. پس از فیکس جنین‌ها و پردازش آنها، در پارافین قالبگیری شدند و مقاطع ۶ میکرومتری از آنها تهیه گردید. سپس مطالعات هیستوشیمیائی لکتین‌ها به‌کمک چهار لکتین کنزوگه شده‌با HRP (Horse Radish Peroxidase) انجام گرفت. لکتین‌های مورد استفاده عبارت بودند از:Maclura Pomifera(MPA) وWistaria(WFA) Floribunda که به قند انتهایی N- acetylgalactosamine (D-Gal NAc) باند می‌شوند و Lotus tetragonolobus (LTA) و Ulex Europeus (UEA1) که برای قند انتهائی فوکوز به‌صورت a-L Fucose اختصاصی می‌باشند.

یافته‌ها: نتایج حاصله نشان دادند که قند انتهائی فوکوز احتمالاً در تکامل نوتوکورد دخالت دارد اما در تمایز سلول‌های مزانشیمی اطراف آن تأثیر ندارد. از طرفی سلول‌های نوتوکوردی و مزانشیم اطراف آن در روزهای جنینی مورد مطالعه با لکتین‌های MPA و WFA که برای قند انتهائی ان استیل گالاکتوز آمین اختصاصی می‌باشند، واکنش شدیدی نشان دادند بنابراین ممکن است این قند در تکامل نوتوکورد و تمایز بافت‌های مزانشیمی اطراف آن دخالت داشته باشد.

بحث و نتیجه‌گیری : با توجه به‌نتایج حاصله، گلیکوکانژوگیت‌های سطح سلول‌های نوتوکوردی با قندهای انتهائی ان استیل گالاکتوز آمین و فوکوز احتمالاً در تکامل نوتوکورد و القای مزانشیم اطراف آن در اثنای تکامل تأثیر دارند که با پیشرفت تکامل تغییر می‌نمایند و احتمالاً این تغییرات از نظر ژنتیکی تنظیم می‌گردد.

گل‌واژگان : نوتوکورد، لکتین ، ایمونوهیستوشیمی، میان کنش‌های سلولی، مزانشیم

مجلهٔ پزشکی ارومیه، سال چهاردهم، شمارهٔ سوم، ص ۱۹۷ - ۱۸۷، پائیز ۱۳۸۲

آدرس مکاتبه : مشهد - دانشگاه علوم پزشکی مشهد - دانشکده پزشکی - بخش بافت‌شناسی - محمدمهدی حسن‌زاده طاهری

۱ - دانشجوی دورهٔ دکترای علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی مشهد.

۲ - دانشیار گروه علوم تشریحی دانشکدهٔ پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد.

۳ - دانشیار گروه علوم تشریحی دانشکدهٔ پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد.

۴ - استاد جنین‌شناسی و بیولوژی سلولی دانشکدهٔ پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

نوتوکورد[1] یکی از ساختمان‌های محوری با منشاء مزودرمی است که در اثنای تکامل جنینی ظاهر شده و یکی از مشخصه‌های شاخه‌ای از جانوران به‌نام طناب داران محسوب می‌شود(۱). تحقیقات نشان داده است که سلول‌های پیش ساز نوتوکوردی در اثنای گاسترولاسیون از یک ناحیه سازمان دهنده جنینی منشاء می‌گیرند. این مرکز در دوزیستان لبهٔ بلاستوپور[2] و در پرندگان و پستانداران گره هنسن[3] می‌باشد(۲). سلول‌های منشاء گرفته از این مرکز در جهت سری مهاجرت نموده و ضمن القای صفحه عصبی در حال تکامل، در خط وسط در زیر آن قرار می‌گیرند. ضمن اینکه در طول دورهٔ نورولاسیون ارتباط فضایی خود را با این صفحه و لوله عصبی حاصل از آن حفظ می‌نمایند، به سرعت و هماهنگ با نوروایپیتلیوم روی خود گسترش می‌یابند(۲). این سلولها ابتدا صفحه پهنی را تشکیل می‌دهند که صفحه نوتوکوردی[4] نام دارد. صفحه نوتوکوردی در سطح پشتی خود به لوله عصبی متصل است و در سطح شکمی با سلول‌های آندودرمی تلفیق گردیده و با یکدیگر سقف کیسه زرده ثانویه و سپس روده اولیه حاصل از آن را می‌سازند(۲ و ۳). این صفحه سلولی بعداً از لوله عصبی و آندودرم زیرین جدا گردیده و ساختمان طنابی شکلی را می‌سازد که نوتوکورد نامیده می‌شود. همزمان با تکامل بیشتر نوتوکورد به تدریج از لوله عصبی و روده اولیه فاصله می‌گیرد و از نظر ساختار سلولی و ماتریکس خارج سلولی دچار تغییر ماهیت می‌شود(۲ و ۳).

براساس مطالعات انجام شده مشخص گردیده است که نوتوکورد به‌عنوان یک ساختمان پشتیبان برای جنین انجام وظیفه می‌نماید(۴). به هر حال نقش نوتوکورد چه موقتی باشد مانند آنچه در مهره داران عالی دیده می‌شود، و چه پایدار مانند آنچه در مهره‌داران پست به اثبات رسیده است، نقش آن در قوام بخشیدن به شکل پذیری ساختمان جنین غیر قابل انکار است زیرا شرایطی را فراهم می‌کند که جنین در امتداد محور طولی خود رشد نماید(۴ و ۲). به علاوه مطالعات متعددی نشان داده‌اند که این عضو علاوه بر نقش پشتیبانی نقش‌های کلیدی در القاء و در پی آن شکل‌پذیری بافت‌های مزودرمی، مانند سومایت‌ها(۵ و ۶) و عروق خونی(۷)، بافت‌های اکتودرمی مانند لوله عصبی (۱۱ و ۸) و بخش قدامی غده هیپوفیز(۴) و همچنین بافت‌های آندودرمی مانند جوانه پشتی پانکراس(۱۴ و ۱۲) دارد. با این وجود هنوز کاملاً مشخص نیست که نوتوکورد چگونه این فعالیت‌های القایی متنوع را به انجام می‌رساند. این تنوع ممکن است نتیجه تفاوت در صلاحیت‌های ژنتیکی بافت‌های پاسخ دهنده و یا به خاطر تفاوت سیگنال‌های موضعی نوتوکورد باشد(۴).

در این راستا، با توجه به نقش مهم نوتوکورد در القای بافت‌های مجاور، این عضو از نظر نحوه شکل‌گیری، مورفولوژی و ژنتیک مورد مطالعات گسترده‌ای قرار گرفته است اما به توزیع گلیکوکانژوگیت‌های سطح سلول‌های آن و تغییرات احتمالی آن‌ها در طی فرایند تکاملی کمتر توجه شده است و فقط مطالعات محدودی در این زمینه از آن جمله به‌وسیلهٔ گوتز[5] و همکارانش بر روی پنج نمونه جنین انسانی صورت گرفته است(۱۵). با توجه به اهمیت نقش‌های القائی نوتوکورد از طرفی و اهمیت گلیکوکانژوگیت‌ها از سوی دیگر و با توجه به‌اینکه ملکول‌های قندی این ترکیبات در اثنای تکامل سلول‌ها و تمایز آن‌ها تغییر می‌کنند و باعث می‌شود که در فرایندهای تکاملی نظیر مهاجرت سلولی و میان کنش‌های سلولی[6] نقش داشته باشند(۱۸ و ۱۵) از این رو مطالعهٔ گسترده‌تر این عضو در

1. Notochord
2. Blastopore Lip
3. Hensen,s Node
4. Notochordal Plate
5. Gotz
6. Cell Interaction

www.SID.ir

Archive of SID

حیوانات آزمایشگاهی ضروری به نظر می‌رسد. لذا در این پژوهش با استفاده از تکنیک‌های لکتین هیستوشیمی که روش‌های اختصاصی برای شناسایی قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت‌ها محسوب می‌شوند، توزیع گلیکوکانژوگیت‌های سطح سلول‌های نوتوکوردی و تغییرات احتمالی آنها در اوایل دوران مورفوژنز مورد مطالعه قرار گرفت تا فرایند تکامل نوتوکورد و مزانشیم مجاور آن از این دیدگاه مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرد.

مواد و روش

تهیه جنین‌های موش : برای انجام این مطالعه از ۴۰ سر موش دو ماهه باکره ماده نژاد Balb/C تهیه شده از مرکز سرم سازی رازی مشهد استفاده گردید که با موش‌های نر هم نژاد در قفس‌های مخصوص جفتگیری آمیزش داده شدند. با مشاهده پلاگ واژینال روز صفر حاملگی برای هر یک از آنها مشخص گردیده، در خانه حیوانات در شرایط استاندارد خانه حیوانات مورد مراقبت قرار گرفتند. در روزهای دهم تا چهاردهم حاملگی موشها ابتدا به وسیله کلروفورم بیهوش و سپس قطع نخاع گردیده و سزارین شدند. آنگاه شاخه‌های رحم به دقت جدا گردیده و برای جداسازی پرده‌های جنینی به سرم فیزیولوژی انتقال داده شدند. پس از این که شستشو با سرم فیزیولوژی انجام گرفت، جنین‌های جمع آوری شده به محلول‌های فیکساتیو فرمالین ۱۰ درصد و B4G (کلرید جیوه ۶٪، استات سدیم ۱٪ و گلوتارآلدئید ۱٪) در دمای اتاق منتقل گردیدند.

تهیه برش‌های بافتی : با کامل شدن مرحله فیکس جنین‌ها که مطابق روش‌های معمول بافت‌شناسی انجام گرفت(۱۹)، نمونه‌ها با استفاده از الکل اتیلیک با غلظت افزایشی پاساژ داده شدند و پس از آب‌گیری در گزیلن شفاف سازی شدند. سپس از این نمونه‌ها اقدام به تهیه بلوک‌های پارافینی شد و برش‌های سریال به ضخامت ۶ میکرون در جهت‌های افقی و ساژیتال به وسیله میکروتوم روتاری موجود در آزمایشگاه هیستوتکنیک دانشکده پزشکی مشهد تهیه گردید.

مطالعات لکتین هیستوشیمیایی : در این مرحله مقاطع به روش معمول در بافت‌شناسی آبدهی گردیده و نمونه‌های تثبیت شده با B4G رسوب برداری شدند(۱۹ و ۲۰). برای حذف پراکسیدازهای داخلی مقاطع برای مدت ۴۵ دقیقه و در شرایط تاریکی در محلول ۱٪ پراکسید هیدروژن در متانول قرار داده شدند(۱۵). سپس از لکتین‌های جدول شماره ۱ که به صورت کنجوگه شده با HRP از شرکت سیگما خریداری شده بودند استفاده گردید. برای این منظور ابتدا لکتین‌های مذکور به کمک بافر فسفات به‌نحوی رقیق گردیدند که در هر میلی‌لیتر از محلول حاصله، ۱۰ میکروگرم لکتین وجود داشته باشد(۲۰). در مرحله بعد برش‌ها برای مدت دو ساعت با هر کدام از لکتین‌های رقیق شده فوق مجاورت داده شدند. پس از این مرحله نمونه‌های بافتی با بافر شستشو داده شدند و در محلول ۰/۰۳ درصد دی‌آمینوبنزیدین[1] در بافر فسفات قرار گرفتند و به‌ازای هر ۱۰ میلی لیتر محلول فوق، مقدار ۲۰ میکرولیتر آب اکسیژنه به محیط اضافه گردید(۲۰). در مرحله بعد کلیه مقاطع پس از شستشو با آب جاری، برای ایجاد رنگ زمینه در آلسین بلو با pH=2.5 برای مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند. در این صورت واکنش لکتین‌ها با قند انتهائی مربوط به‌صورت رنگ قهوه‌ای در مشاهدات میکروسکوپی مشخص گردید. برای مشاهده واکنش‌های انجام شده، نمونه‌ها به کمک میکروسکوپ الیمپوس AH-2 مورد مطالعه و تصویربرداری قرار گرفتند. متعاقب این موضوع سعی شد تا براساس روش گانگ[2] و همکارانش(۲۱) به‌صورت سه نفره و جدای از یکدیگر، نمونه‌ها براساس شدت واکنش با لکتین‌های استفاده شده و مطابق جدول شماره ۲ مورد درجه‌بندی قرار گیرند.

1. Diaminobenzidine (DAB)
2. Gong

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

در این تحقیق بررسی‌های لکتین هیستوشیمیایی روی مقاطع میکروسکوپی جنین‌های موش در فاصله روزهای دهم تا چهاردهم جنینی صورت گرفت و از لکتین‌های MPA و WFA که برای قند انتهائی Gal NAc و LTA و UEA1 که‌برای قند انتهائی α-L-Fucose اختصاصی می‌باشند، استفاده گردید (جدول شماره ۱) و نتایج زیر حاصل شد.

در روز دهم سلول‌های تشکیل دهنده نوتوکورد در حالی‌که در قسمت پشتی به لوله عصبی متصل می‌باشند، به لکتین MPA واکنش نسبتاً شدیدی نشان داده‌اند. این واکنش‌ها در محل غشاء پایه این سلول‌ها نیز مشهود است (تصویر ۱). به علاوه واکنش این سلولها به لکتین WFA نیز شدید بوده و این واکنش در سلول‌های مزانشیمی اطراف نیز مشاهده می‌گردد. اما واکنش به لکتین‌های UEA1 و LTA مثبت ولی در حد متوسط می‌باشد. در این روز تراکم سلول‌های مزانشیمی در اطراف نوتوکورد کم بوده و سلول‌ها در حال مهاجرت به اطراف نوتوکورد دیده می‌شوند (تصویر ۱).

در روز یازدهم در حالی که نوتوکورد از لوله عصبی جداگردیده و ساختمان طنابی شکلی پیدا نموده است، به لکتین MPA واکنش شدیدی نشان داده است و سلول‌های مزانشیمی اسکلروتومی در اطراف نوتوکورد تراکم بیشتری نشان می‌دهند. واکنش به لکتین WFA نیز شدید بوده اما واکنش به لکتین‌های UEA1 و LTA همچنان مثبت و در حد متوسط می‌باشد.

در روز دوازدهم نوتوکورد از لوله عصبی فاصله بیشتری گرفته و در اطراف آن حلقه آبی رنگی که حاکی از واکنش ماتریکس خارج سلولی با آلسین بلو می‌باشد، دیده می‌شود تراکم سلول‌های اسکلروتومی در اطراف آن افزایش بیشتری یافته است. در این روز واکنش به لکتین‌های MPA و WFA همچنان شدید بوده ولی واکنش به LTA منفی گردیده است. واکنش به UEA1 همچنان مثبت است و در حد خفیف ادامه دارد.

در روز سیزدهم برخی سلول‌های نوتوکوردی شروع به دژنره شدن نموده‌اند و حلقه آبی رنگ اطراف نوتوکورد که غلاف غشائی نامیده می‌شود، ضخیم‌تر گشته و علاوه بر آن نواحی آبی رنگی در لابلای سلول‌های نوتوکوردی ظاهر گشته‌اند که حاکی از تجمع گلیکوزآمینوگلیکان‌ها مانند اسید هیالورونیک در لابلای این سلول‌ها می‌باشد که با آلسین بلو رنگ گرفته‌اند. واکنش سلول‌های نوتوکوردی به لکتین‌های MPA و WFA همچنان شدید است ولی واکنش به لکتین UEA1 منفی گردیده است در حالی که واکنش به LTA همچنان منفی است.

در روز چهاردهم در حالی که غلاف غشائی در اطراف نوتوکورد ضخیم‌تر گردیده است، تحلیل سلول‌های نوتوکوردی ادامه داشته و در مقاطع تعداد محدودی سلول در لابلای ماتریکس خارج سلولی آبی رنگ که حاصل واکنش با آلسین بلو می‌باشد، دیده می‌شوند. واکنش این سلول‌ها به لکتین MPA همچنان شدید است و در مورد لکتین WFA نیز وضعیت به همین گونه است. به‌علاوه سلول‌های مزانشیمی متراکم شده که پیش ساز سلول‌های غضروفی می‌باشند، نیز به این لکتین واکنش نشان داده‌اند و این واکنش در سلول‌های موجود در جلوی نوتوکورد بسیار شدید است (تصویر ۲). واکنش سلول‌های نوتوکوردی به لکتین‌های LTA و UEA1 نیز همچنان منفی است.

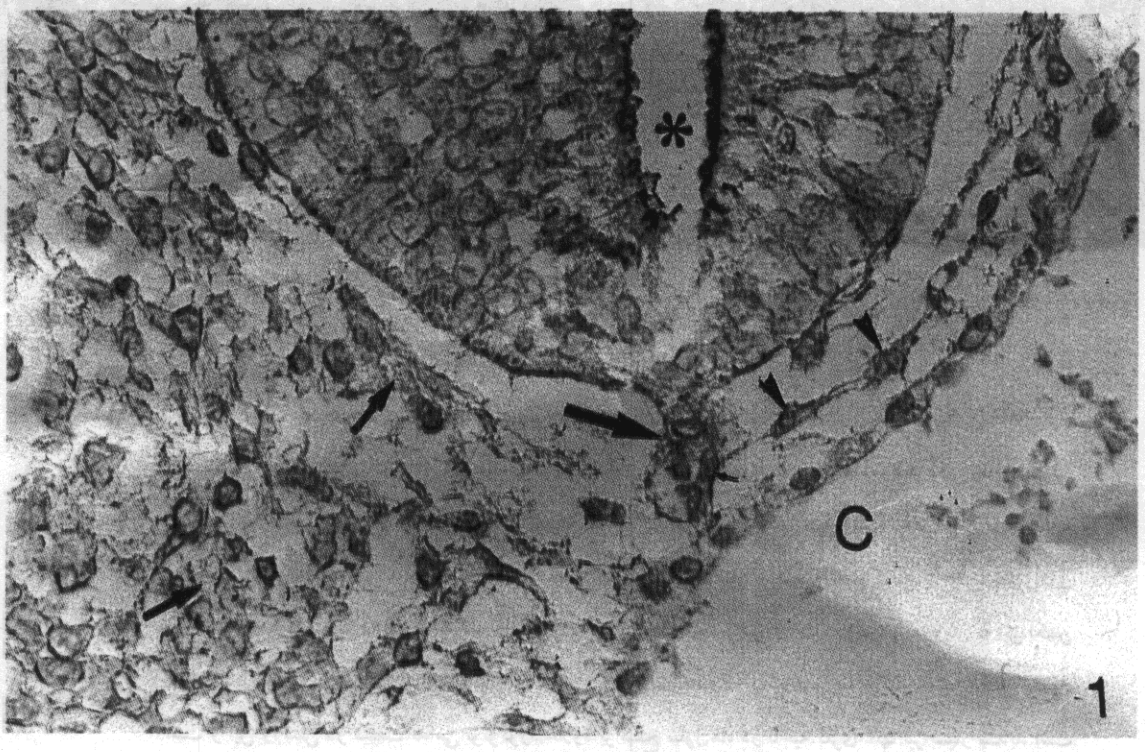
در مقایسه بین دو فیکساتیو مورد استفاده، مشخص گردید که فیکساتیو B4G برای فیکس بافت‌ها جهت مطالعات هیستوشیمیائی لکتین‌ها مناسب‌تر است و در مقایسه نمونه‌های فیکس شده با این فیکساتیو شدت رنگ بیشتری نسبت به نمونه‌های فیکس شده با فرمالین نشان می‌دهند که علت آن می‌تواند حفظ بهتر ملکول‌های قندی در سطح سلول‌ها باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۱ : انواع لکتین‌های مورد استفاده و خصوصیات آنها

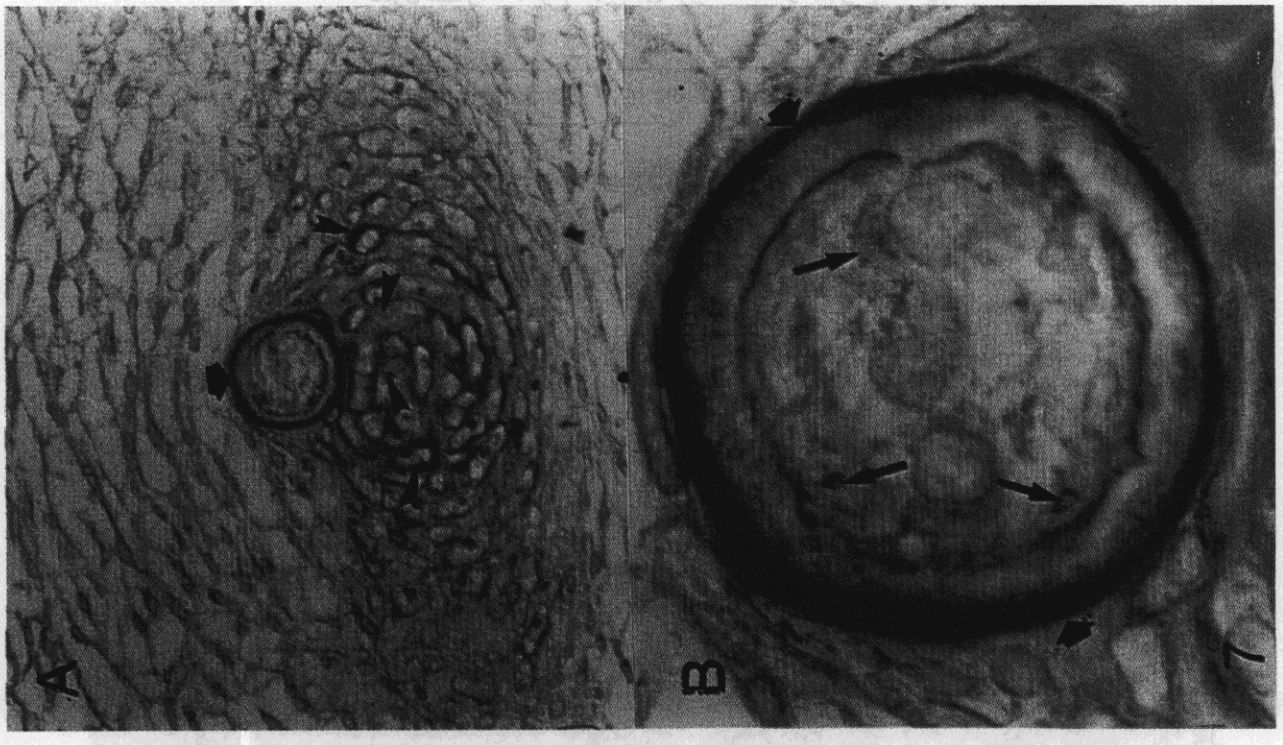
Lectins tested	Abbrevation	Carbohydrate-binding specificity
Maclura pomifera	MPA	Gal NAc (Gal β1-3) Gal NAc
Wistaria floribunda	WFA	D-Gal NAc
Lotus tetragonolobus	LTA	α-L-fucose
(Asparagus Pea)		
Ulex Europeus	UEA1	α-L-fucose
(Gorse seed)		



تصویرشماره ۱ : مقطع عرضی جنین ده روزه که در مجاورت لکتین MPA قرار گرفته است. در این مرحله نوتوکورد (پیکان ضخیم) در قسمت خلفی خود به لوله عصبی مربوط است. تراکم سلول‌های مزانشیمی در اطراف نوتوکورد بسیار کم است و سلول‌های مزانشیمی در حال مهاجرت به اطراف نوتوکورد دیده می‌شوند (نوک‌های پیکان) سلول‌های نوتوکوردی و غشاء پایه اطراف آنها (پیکانهای نازک) و همچنین سلول‌های مزانشیمی اسکلروتومی و ماتریکس خارج سلولی آن‌ها (پیکانهای متوسط) واکنش نسبتاً شدیدی به این لکتین نشان داده‌اند. علامت ستاره مشخص کنندهٔ لوله عصبی و حرف (C) نمایانگر سلوم داخل رویانی می‌باشد. (بزرگنمایی تصویر ۱۰×۴۰ می‌باشد).

www.SID.ir

Archive of SID



تصویرشماره ۲ - A: مقطع عرضی نوتوکورد و مزانشیم اطراف آن در جنین چهارده روزه که در مجاورت لکتین WFA قرار گرفته است. غلاف غشائی در اطراف نوتوکورد کاملاً مشخص است (پیکانهای ضخیم کوتاه) و ماتریکس خارج سلولی در بخش خارجی این غشاء تراکم بیشتری را نشان می‌دهد. تعداد سلول‌های نوتوکوردی بر اثر آتروفی شدن کاهش یافته است در حالی که ماتریکس موکوئید خارج این سلول‌ها افزایش حاصل کرده است. واکنش برخی سلول‌های نوتوکوردی در ناحیه گلژی (مجموعهٔ دستگاه گلژی به اضافهٔ سیتوپلاسم راسی و غشاء پلاسمائی مجاور) به این لکتین بسیار شدید است (پیکانهای بلند). سلول‌های اسکلروتومی متراکم شده و در سطح سلول‌ها واکنش به این لکتین مشهود است و این واکنش در قسمت قدامی نوتوکورد علاوه بر سطح سلول‌ها، در ناحیه گلژی آنها نیز بسیار شدید است (سرهای پیکان) و در ماتریکس خارج سلولی نیز با شدت کمتری دیده می‌شود. (بزرگنمایی تصویر ۱۰×۲۰) است. B: تصویر نوتوکورد شکل A با بزرگنمایی ۱۰×۱۰۰ را نشان می‌دهد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۲ : درجه بندی تغییرات واکنش بافت نسبت به لکتین‌ها

میزان واکنش	درجه
عدم واکنش	-
واکنش خفیف	+
واکنش متوسط	++
واکنش شدید	+++
واکنش بسیار شدید	++++

بحث

زایده نوتوکورد ساختاری محوری با منشاء مزودرمی است که در اوایل دوره رویانی ظاهر می‌گردد. این ساختمان ابتدا منظره‌ای صفحه‌ای شکل داشته و در قسمت پشتی خود به اکتودرم مربوط بوده و ضمن القای آن باعث تبدیل این اکتودرم به صفحه عصبی و سپس لوله عصبی می‌شود(۱۱ و ۸) و در قسمت شکمی به آندورم تشکیل دهنده روده اولیه متصل بوده و در القای آن جهت ساختارهائی مانند جوانه پشتی پانکراس نقش دارد(۱۴ و ۱۲). این صفحه سلولی بعداً از لوله عصبی و آندودرم زیرین جدا گردیده و ساختمانی طنابی شکل پیدا می‌نماید. رشد این زایده بخشی مرهون اضافه شدن سلول‌های جدید به انتهای دمی آن که حاصل تکثیر سلول‌های پیش ساز نوتوکورد در ناحیه سازمان دهنده می‌باشند، بخشی مربوط به تکثیر سلول‌ها در صفحه نوتوکوردی و نوتوکورد و بالاخره بخشی حاصل تجدید آرایش سلول‌های نوتوکوردی در تبدیل از حالت صفحه‌ای به حالت طنابی می‌باشد(۲۲). این زایده در انتهای سری خود ضمن القای هیپوفیز قدامی در تشکیل بخش پایه استخوان پس سری و بخش خلفی جسم پرویزنی شرکت می‌نماید (۲۳ و ۴). زایده نوتوکورد در مابقی طول خود به‌وسیله سلول‌های مزانشیمی اسکلروتومی احاطه گردیده، آنها را القاء می‌نماید و باعث تبدیل آنها به سلول‌های پیش ساز غضروفی می‌گردد و این سلول‌ها در نهایت مهره‌ها را می‌سازند (۵ و ۶). تغییرات تدریجی این زایده نشان می‌دهد که ابتدا منظره صفحه‌ای شکل داشته و سپس سلول‌ها با تجدید آرایش خود به آن نمائی طنابی شکل می‌بخشند که به‌تدریج از لوله عصبی و روده اولیه فاصله گرفته و قطر آن کوچکتر می‌شود. در محل جسم مهره‌ها کاملاً تحلیل رفته و سلول‌های اسکلروتومی پس از تبدیل شدن به بافت غضروفی کاملاً جای آن را پر می‌کنند. در فاصله بین مهره‌های در حال تکامل به صورت تجمعات سلولی، در حالی که فاصله آن‌ها را ماتریکس موکوئید پر می‌نماید، بخش هسته ژلاتینی[1] دیسک‌های بین مهره‌ای را تشکیل می‌دهد(۲۴). این هسته به وسیله سلول‌های بینابینی مزانشیمی دیسک پری کوردی احاطه می‌شود و سلول‌های اخیر در نهایت حلقه لیفی[2] را در اطراف هسته مرکزی دیسک تشکیل می‌دهند. سلول‌ها در هسته ژلاتینی از روز سیزدهم شروع به تحلیل رفتن نموده و سلول‌هائی از ناحیه داخلی حلقه فیبروز جای آن‌ها را می‌گیرند. این سلول‌ها نیز در نهایت از بین خواهند رفت و این هسته به صورت ماتریکس ژله‌ای تا پایان عمر در مرکز دیسک بین مهره‌ای باقی می‌ماند(۲۴، ۲۳، ۲ و ۳).

قندهای انتهائی گلیکوکانژوگیت‌ها در پدیده‌های مختلف تکاملی از قبیل تکثیر، تمایز و مهاجرت سلول‌ها و تبادلات سلول‌ها با ماتریکس خارج سلولی نقش مهمی ایفا می‌نمایند (۱۸ و ۱۵) این مواد در طی تکامل در سطح بعضی سلول‌ها ظاهر شده و یا از آن‌ها ترشح می‌شوند و پس از انجام وظیفه تکاملی خود توسط سایر ملکول‌ها نظیر اسید سیالیک حذف گردیده و یا به وسیله برخی مواد شیمیائی مانند آنزیم‌ها تجزیه شده و کاملاً از بین می‌روند. میان کنش‌های سلولی یکی از همین موارد

1. Nucleus Pulposus
2. Anulus Fibrosus

www.SID.ir

Archive of SID

است که در مراحل بسیار حساس و کلیدی برای تمایزات بعدی در سلول‌های جنینی به‌وجود می‌آیند(۱۷ و ۲۰). از جمله این موارد به نقش زایده نوتوکورد در القای سلول‌های اکتودرمی و تبدیل آنها به بافت عصبی، القای سلول‌های اسکلروتومی منشعب از سومایت‌ها و تبدیل آنها به سلول‌های غضروفی پیش ساز مهره‌ها و همچنین القای سلول‌های آندودرمی روده اولیه جهت تشکیل پانکراس می‌توان اشاره نمود(۱۴ و ۵).

به کمک مطالعات لکتین هیستوشیمیائی می‌توان ماکرو-ملکول‌های دارای زنجیره‌های قندی را شناسائی و تغییرات آن‌ها را مطالعه نمود. و با توجه به این که این گونه مطالعات روی سلول‌های نوتوکوردی کمتر صورت گرفته است، از این رو در مطالعه حاضر توزیع قندهای انتهائی فوکوز و ان استیل گالاکتوز آمین روی این سلول‌ها در اوایل دوران مورفوژنز مطالعه گردید. و از نتایج حاصله موارد زیر استنباط می‌گردند:

اول اینکه نوتوکورد بافتی فوق‌العاده گلیکوزیله است و کربوهیدرات‌های مختلفی را در اوایل دوران مورفوژنز داراست. زیرا با تمام لکتین‌های مورد استفاده در این پژوهش و همچنین لکتین WGA که در مطالعات دیگری در همین زمینه، مورد استفاده قرار گرفت، واکنش نشان داده است که مؤید ظهور انواعی از گلیکوکانژوگیت‌ها با قندهای انتهائی مختلف از قبیل ان استیل گالاکتوز آمین، فوکوز و اسید سیالیک در این عضو می‌باشد و این یافته بر یافته‌های گوتز و همکارانش(۱۵) و کونداماتوا[1] و همکارانش(۱۸) منطبق می‌باشد.

دوم اینکه واکنش بافت‌های مورد نظر با لکتین‌های UEA1 و LTA که برای قند α-L-fucose اختصاصی می‌باشند تا شروع پدیدهٔ تخریب سلول‌های نوتوکوردی در محل جسم مهرهٔ آینده ادامه پیدا نموده و از آن پس ناپدید شدند که مؤید دخالت این قند در پدیده هائی مانند تکثیر، تمایز و تجدید آرایش سلول‌های نوتوکوردی می‌باشد. اختلاف اندک مشاهده شده بین واکنش‌های این دو لکتین این گونه قابل توجیه است که LTA به فوکوزی باند می‌شود که نوع قند ما قبل آخر آن α-1-6 GalNac (Penultimate sugar) می‌باشد در حالی که لکتین UEA1 به فوکوزی باند می‌شود که قندهای ماقبل آخر آن به‌صورت α 1-2) Gal (β1-4) GlcNac) می‌باشد(۲۵).

سوم اینکه واکنش سلول‌های نوتوکوردی به لکتین‌های MPA و WFA در تمام روزهای جنینی مورد مطالعه هم در سلول‌های نوتوکوردی و ماتریکس خارج سلولی آنها و همچنین در مزانشیم اطراف نوتوکورد شدید بوده است و از آنجائیکه این لکتین‌ها برای قند انتهای GalNac اختصاصی می‌باشند، وجود این قند انتهائی در زنجیره‌های گلیکوکانژوگیت‌ها در سطح سلول‌ها و دخالت احتمالی آنها در تغییرات تکاملی سلول‌های نوتوکوردی و مزانشیم اطراف آن محرز می‌گردد. به‌علاوه در دهه‌های اخیر مشخص گردیده است که سلول‌های نوتوکوردی با ترشح موادی مانند Sonic hedgehog (Shh) در مهاجرت سلول‌های اسکلروتومی به اطراف نوتوکورد و همچنین تمایزات بعدی این سلول‌ها نقش دارند(۲۶، ۸، ۰، ۱۱ و ۱۲). از طرفی در تحقیقات متعددی نشان داده شده است که این مواد دارای ترکیبی گلیکوپروتئینی می‌باشند مثلاً کریس[2] و همکارانش نشان دادند که Shh ملکولی گلیکوپروتئینی است که از نوتوکورد ترشح شده و فعالیت میوبلاست‌ها را در ناحیهٔ درمومیوتوم‌ها جهت تشکیل فیبرهای آهستهٔ عضلات مخطط اسکلتی تنظیم می‌نماید(۲۷). همچنین روئیز[3] و همکارانش اظهار داشته‌اند که ملکول Shh گلیکوپروتئینی ترشحی است که در تکامل اولیهٔ سیستم عصبی مرکزی نقش دارد(۲۸). به‌علاوه

1. Quondamatteo
2. Chris
3. Ruiz

www.SID.ir

Archive of SID

داکتر[1] (۲۹) و همچنین وید[2] و همکارانش(۳۰) این ملکول را گلیکوپروتئینی می‌شناسند که از نوتوکورد ترشح شده و در مهاجرت سلول‌های اسکلروتومی به اطراف نوتوکورد و تمایزات بعدی ایفای نقش می‌نماید. از این رو به‌نظر می‌رسد باتوجه به‌حضور گسترده زنجیره‌های قندی دارای قند انتهائی GalNAc که هم در سطح سلول‌های نوتوکوردی و هم در سلول‌های اسکلروتومی و ماتریکس خارج سلولی این سلول‌ها وجود دارند و به‌کمک لکتین‌های MPA و WFA مشخص گردیده‌اند، احتمالاً به عنوان قند انتهائی در ساختمان ملکول Shh حضور داشته و در فاصله روزهای جنینی مورد مطالعه نقش القائی خود را اعمال می‌نمایند. این نظریه به کمک مطالعهٔ دو جانبهٔ لکتین هیستوشیمی با استفاده از دو لکتین فوق‌الذکر و ایمونوهیستوشیمی با استفاده از آنتی‌بادی مونوکولونال برای Shh قابل اثبات می‌باشد.

سپاسگزاری :

مقاله حاضر بخشی از نتایج حاصله مربوط به طرح پژوهشی ۸۲۴/۱۷۶۳۸ معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد می‌باشد. لذا از آن معاونت محترم و خدمات مربوط به نگهداری و مراقبت حیوانات در خانه حیوانات بیمارستان قائم (عج) و همچنین زحمات سرکارخانم متجدد در جهت تهیه و آماده سازی برش‌های بافتی مربوط به این پژوهش قدردانی می‌شود.

References

1. Smith H M: Evolution of chordate structure: An Introduction to Comparative Anatomy. 6th Ed, New York, Holt Rinehart and Winston Inc, 1960: 20.
2. Sausedo R A, Schoenwolf G C: Quantitative Analysis of Cell Behaviors Underlying Notochord Formation and Extension in Muouse Embryos. Anat rec, 1994, 239: 103-112.
3. Sausedo R A, Schoenwolf G C: Cell behaviors underlying notochord formation and extention in avian embryos: Quantitative and immunochemical studies. Anat Rec, 1993, 237: 58-70.
4. Cleaver O, Kerieg P A: Notochord patterning of the endoderm. Dev Biol, 2001, 234: 1-12.
5. Correia K M, Conlon R A: Surface ectoderm is necessary for morphogenesis of somites. Mec Dev, 2000, 91: 19-30.
6. Kimelmen D, Griffin K: Vertebrate mesoderm induction and patterning. Curr Opi Gen Dev, 2000, 10: 350-356.
7. Sumoy L, Keasey J B, Dittman T D, Kimelman D: A role for notochord in axial vascular development revealed by analysis of phenotype and the expression of VEGR-2 in

1. Dockter
2. Weed

www.SID.ir

Archive of SID

zebrafish flh and ntl mutant embryos. Mec dev, 1997, 63: 15-27.

8. Charrier J, Lapointe F, Douarin N, Tallet M: Anti- apoptotic role of sonic hedgehog protein at the early stages of neural system organogenesis. Dev, 2001, 128(20): 4011-4020.
9. Griffith C M, and Wiley M J:Distribution of cell surface glycoconjugates during secondary neurulation in the chick embryo. Anat Rec, 1990, 226: 81-90.
10. Placzek M, Dodd J, Jessel T M: The case for floor plate induction by the notochord. Curr Opi Neurobiol, 2000, 10: 15-22.
11. Placzek M, Tessier Lavigne M, Yamada T, Jessel T, Dodd J: Mesodermal control of neural cells identity: floor plate induction by the Notochord. Science, 1990, 250: 985-988.
12. Edlund H: Pancreas: how to get there from the gut? Curr Opi Cell Biol, 1999, 11: 663-668.
13. Dilorio P J, Moss J B, Sbrogna J L, Karlstrom R O, Moss L G: Sonic hedgehog is required early in pancreatic islet development. Dev Biol, 2002, 244: 75-84.
14. Schwitzgebel V M: Programming of the pancreas. Molec cell Endocrinol, 2001, 185: 99-108.
15. Gotz W, Quondumatteo F: Glycoconjugate distribution in early human notochord and axial mesenchyme. Acta Histochem, 2001, 103: 21-35.
16. Damjanov I: Biology of disease. Lectin cytochemistry and histochemistry. Lab Invest, 1987, 57: 5-20.
17. Qasba P K: Involvement of sugars in protein-protein interactions. carbohydrate polymers, 2000, 41: 293-309.
18. Quondamatteo F, Zieger J, Gots W, Miosge N, and Herken R: Extensive glycosilation changes revealed by lectin histochemistry in morphologically normal tissues of the mouse mutant undulated (un/un). Anat Rec, 2000, 258(3): 243-51.
19. Bancrof J D, Steven A: Theory and practice of histological techniques. 5th Ed, New York, Churchill Livingstone, 1991: 20-70.
20. Fazel A, Schulte, B, Thompson R: Lectin histochemistry of the embryonic heart: Fucose-specific lectin binding sites in developing rats and chicks. Am J Anat, 1989, 184: 76-84.
21. Gong H, Wen Y E, Freddo T F, Hernandez M R: Hyaloronic acid in the normal and glaucomatous optic nerve. EXP Eye Res, 1997, 64: 587-595.
22. Adams D S, Keller R, and Koehl M A: The mechanism of notochord elongation, strai-

www.SID.ir

Archive of SID

ghtening and stiffening in the embryo of xenopus laevis. Development, 1990, 110: 115-130.

23. Williams P L, Warwick R, Dyson M, and Bannister LH: Gray's Anatomy. 38th Ed, London, Cherchill Livingstone, 1995: 105-107.
24. Hays A, Benjamine M, and Ralphs J: Extracellular matrix in development of the intervertebral disc. Matrix Biol, 2001, 20(2): 107-121.
25. Montreuil J, Vliegenthart J F G, Schachter H: Glycoproteins II. 3rd Ed, New yourk, Elsevier, 1997: 403-470.
26. Yamada T, Pfaff S L, Edlund T,Jessel TM: Control of cell pattern in the neural tube: motor neuron induction by diffusible factors from notochord and floor plate. Cell, 1993, 73: 673-686.
27. Blagden C S, Currie P D, Ingham P W, Hughes S M: Notochord induction of zebrafish slow muscle mediated by sonic hedgehog. Genes & Development, 1997, 11: 2163-2175.
28. Altaba R I, Palma V, Dahmane N: Hedgehog signaling and growth of the brain. Nature Rev Neurosci, 2002, 3: 24-33.
29. Dockter JL: Sclerotome induction and differentiation. Curr Top Dev Biol, 2000, 48: 77-127.
30. Weed M, Mundlos S, Olsen B R: The role of sonic hedgehog in vertebrate development. Matrix Biol, 1997, 16: 53-58.

www.SID.ir