

تحقیقی

توزیع قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت طی تکامل نوروهیپوفیز موش صحرایی

دکتر علیرضا ابراهیم زاده بیدسکان*^۱، دکتر محمدرضا نیکروش^۲، دکتر علیرضا فاضل^۲

۱- استادیار گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد.

۲- استاد گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد.

چکیده

زمینه و هدف: نوروهیپوفیز از کف دیانسفالون مشتق می‌گردد و تکامل آن حاصل میان‌کنش‌های متعددی سلولی است که به‌واسطه مولکول‌های شیمیایی از جمله قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت میان‌جیگری می‌گردد. این مطالعه به منظور تعیین تغییرات برخی از قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت‌ها طی تکامل نوروهیپوفیز در موش صحرایی با روش لکتین هیستوشیمیایی انجام گردید.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی از ۴۰ سر موش صحرایی ماده دوماهه و ۲۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۸۰-۲۵۰ گرم استفاده شد. پس از آمیزش و تعیین روز صفر حاملگی، موش‌های باردار در فاصله روزهای ۱۰ تا ۲۰ حاملگی قطع نخاع گردیدند و جنین‌های آنان به منظور مطالعات بافت‌شناسی جمع‌آوری گردید. سپس با جداسازی و فیکس سرهای نمونه‌های یاد شده و تهیه برش‌های سریال از مناطق دارای بافت هیپوفیز به رنگ‌آمیزی لکتین هیستوشیمیایی مبادرت گردید. لکتین‌های *OFA*، *LTA*، *UEA-I*، *SBA*، *GSAI-B4*، *VVA*، *PNA* و *WFA* با نشان‌دار شدند. به طوری که *OFA*، *LTA*، *UEA-I* برای قندهای انتهایی، *D-GalNAc* و *D-Gal-(1-3)*، *D-GalNAc*، α ، β -*D-GalNAc*، α -*D-Gal* به ترتیب برای *WFA* و *PNA*، *SBA*، *GSAI-B4* و α -*L-Fucose* اختصاصی هستند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که اکثر سلول‌های نوروهیپوفیز با لکتین *OFA* از روز دهم حاملگی واکنش نشان دادند و در روز پانزدهم افزایش آماری معنی‌داری در شدت واکنش سلول‌ها ملاحظه گردید ($P < 0/05$). در روز هفدهم به‌طور معنی‌داری شدت واکنش کاهش یافت ($P < 0/05$). لکتین *PNA* از روز سیزدهم جنینی با تعدادی از سلول‌های نوروهیپوفیز واکنش نشان داده و تا روز شانزدهم بر شدت این واکنش‌ها افزوده شد و پس از آن شدت واکنش کاسته شد ($P < 0/05$). واکنش لکتین *SBA* از روز چهاردهم شروع و تا روز هیجدهم با همان شدت ادامه یافت و سپس کاهش یافت ($P < 0/05$). واکنش به لکتین *WFA* از روز سیزدهم شروع شد و در روزهای چهاردهم و پانزدهم به صورت معنی‌داری شدت یافت ($P < 0/05$) و پس از آن به تدریج از شدت واکنش کاسته شد. در مورد لکتین‌های *UEA-I*، *LTA*، *VVA* و *GSAI-B4* هیچ‌گونه واکنشی مشاهده نگردید.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که احتمالاً بیان قندهای انتهایی α -*L-Fucose*، α ، β -*D-GalNAc* و *D-Gal-(1-3)* - *D-GalNAc* با استفاده از یک نقش کلیدی و نوعی الگوی زمانی و مکانی مشخص در فرایندهای تکاملی از جمله تکامل نوروهیپوفیز تنظیم شده است.

کلید واژه‌ها: نوروهیپوفیز، لکتین، گلیکوکانژوگیت، تکامل، موش صحرایی

* نویسنده مسؤول: دکتر علیرضا ابراهیم زاده بیدسکان، پست الکترونیکی ebrahimzadehba@mums.ac.ir

نشانی: مشهد، میدان آزادی، پردیس دانشگاه، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، تلفن ۸۰۰۲۳۲۵ - ۰۵۱۱، شماره ۸۰۰۲۳۳۳
وصول مقاله: ۸۹/۶/۲۱، اصلاح نهایی: ۸۹/۱۱/۲۷، پذیرش مقاله: ۸۹/۱۲/۳

مقدمه

غده هیپوفیز دو منشاء جنینی متفاوت دارد. به طوری که آدنوهیپوفیز از اکتودرم سقف دهان اولیه بلافاصله در جلو پرده دهانی - حلقی با تشکیل بن بست راتکه به وجود می آید. در صورتی که نوروهیپوفیز از کف دیانسفالون با تشکیل اینفادیپلوم ایجاد می گردد (۴-۱). نوروهیپوفیز که مشتمل بر ساقه و پارس نوروزا می باشد و عمدتاً حاوی رشته عصبی است که از هیپوتالاموس منشأ گرفته و سلول های نوروگلی به نام پیتئوسیست می باشد (۵). تکامل این غده با فعال شدن سلول های اکتودرمی سقف دهان اولیه شروع شده که با انجام میان کنش متقابل با کف دیانسفالون با نظم خاصی مسیر تکامل خود را طی می نمایند. به طوری که در موش صحرائی در روز نهم تکامل ژن های Shh و Ptix1/2 در اکتودرم دهان اولیه بیان می گردد و از روز نهم تا دوازدهم فاکتور BMP4 در کف دیانسفالون موجب القاء پلاک بن بست (Pouch placode) در جهت تشکیل بن بست راتکه می شود (۸-۶). سپس از روز دهم تا چهاردهم نیز فاکتور FGF8 در اینفاندیپلوم تولید می شود و موجب القاء بن بست راتکه و تکثیر سلولی در آن می گردد (۹). در این راستا فاکتورهای Lhx2، Lhx3 و Lhx4 در حدود روز دهم در سلول های بن بست راتکه بیان می گردد و موجب شکل گیری این بن بست و تکثیر سلول های پیش ساز غده هیپوفیز می شود (۹ و ۱۰). در این رابطه ثابت شده است که ترکیبات قندی (Glycoconjugates) که در سطح سلول ها و همچنین در ماتریکس خارج سلولی وجود دارند؛ در تمایزات سلولی، مهاجرت سلولی و تعیین مسیر تکاملی نقش اساسی دارند (۱۰ و ۱۱). از این لحاظ نقش قندهای انتهایی (Terminal sugars) مربوط به زنجیره های قندی گلیکوکانژوگیت ها بسیار حائز اهمیت است (۱۲).

با توجه به این که تمایز سلول ها تحت تاثیر پدیده ای به نام القاء صورت می گیرد؛ به نظر می رسد بروز این پدیده تحت تاثیر عوامل القاکننده (Inductive factors) انجام می گیرد (۱۳). علی رغم مشخص نبودن ماهیت دقیق عوامل القایی، عقیده بر این است که عوامل تغییردهنده رشد $\beta 2$ (Transforming growth Factor $\beta 2$: TGF- $\beta 2$) و اکتیوین (Activin) همچنین ظهور و یا ناپدید شدن مولکول های

اتصالی در سطح سلول (Cell adhesion Molecule: CAM) به عنوان شاخصی در پدیده القاء و تمایزات سلولی نقش دارند (۱۴). علاوه بر القاء، اثرات متقابل محیط بلاواسطه اطراف سلول و عوامل ژنتیکی از دیگر عواملی هستند که در ایجاد تمایزات سلولی دخالت دارند (۱۵).

از طرف دیگر دانش ما در مورد اهمیت عملی تغییر بخش کربوهیدراتی گلیکوکانژوگیت ها در دهه اخیر افزایش چشمگیری یافته است. این موضوع به همراه توسعه روش های مطالعه ساختمان زنجیره های الیگوساکاریدی و پلی ساکاریدی، بیولوژی کربوهیدرات ها را در بخش اصلی مطالعات میان کنش ها و رفتارهای سلولی قرار داده است (۱۶). به طوری که امروزه ثابت شده گلیکوکانژوگیت های سطح سلول و ماتریکس خارج سلولی دارای نقش ویژه ای در تمایز، مهاجرت، میان کنش های سلولی و سایر پدیده های تکاملی در طی مورفوژنز جنینی دارند (۱۰ و ۱۵ و ۱۶). این ترکیبات شامل گلیکوپروتئین ها، گلیکولیپیدها و پروتئوگلیکان ها می باشند که ماهیت بخش الیگوساکاریدی آنها علاوه بر نوع گونه، به نوع بافت، مرحله تکاملی، توالی اسیدهای آمینه و ساختمان سه بعدی پروتئین ها وابسته است (۱۰). به طوری که نقص در گلیکوزیلاسیون این ترکیبات عواقب پاتولوژیک جدی به دنبال دارد. غیرفعال نمودن ژن هایی که در سنتز الیگوساکاریدهای N-Link دخالت دارند؛ با روش ترانس ژنیک نشان می دهد که این ژن ها در مراحل اولیه تکامل جنینی ایفای نقش می نمایند. چنان که غیرفعال نمودن ژن GalNac ترانسفراز در موش موجب صدمه به جنین ها پس از روز نهم می گردد و جنین های فاقد این ژن تا روز دهم از بین می روند (۱۰). لذا با توجه به مطالب فوق و نقش ترکیبات قندی در فرایندهای تکاملی، در این مطالعه ظهور و تغییرات احتمالی این ترکیبات در طی تکامل نوروهیپوفیز در موش صحرائی با استفاده از روش لکتین هیستوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی از ۴۰ سر موش صحرائی ماده دوماهه و ۲۰ سر موش صحرائی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۸۰-۲۵۰ گرم خریداری شده از دانشکده پزشکی مشهد؛

جدول ۱: مشخصات لکتین‌های مورد استفاده (۱۷ و ۱۹)

Lectin	Abbreviation	Carbohydrate – binding specificity
<i>Aleuria aurantia</i> (Orange fungus)	OFA	L-fuc(α 1-6)GlcNAc
<i>Lotus tetragonolobus agglutinin</i>	LTA	L-fuc(α 2-4)GlcNAc
<i>Ulex europeus agglutinin</i>	UEA-I	L-fuc(α 1-3)Gal(β 1-4)Glc
<i>Arachis Hypogaea</i> (peanut) agglutinin	PNA	D-Gal-(β 1-3)-D-GalNAc
<i>Glycine max</i> (soybean) agglutinin	SBA	β , α -D-GalNAc
<i>Vicia villosa agglutinin</i>	VVA	GalNAc
<i>Griffonia simplicifolia agglutinin</i>	GSAI-B4	α -D-Gal
<i>Wistaria floribunda</i>	WFA	D-GalNAc

استفاده گردید. (یک) که از شرکت سیگما تهیه شده بود؛ به شرح ذیل آماده گردیدند.

حیوانات در شرایط استاندارد خانه حیوانات با دسترسی آزادانه به غذا، آب، دوره تاریکی و روشنایی ۱۲ ساعته، رطوبت و دمای ۲۴-۱۸ درجه سانتی‌گراد مطابق دستورالعمل NIH (The National Institutes of Health) نگهداری شدند. موش‌ها پس از سازگاری با محیط در قفس‌های مخصوص جفت‌گیری (دو موش ماده و یک موش نر) آمیزش داده شدند. پس از معاینه اسمیر واژینال و مشخص شدن روز صفر حاملگی، موش‌های حامله به قفس‌های جداگانه منتقل و مورد نگهداری و مراقبت قرار گرفتند. سپس در هر یک از روزهای دهم تا بیستم حاملگی به ترتیب موش‌های حامله با استفاده از کلروفورم بیهوش و با عمل سزارین و شکافتن شاخه‌های رحم، جنین‌ها از پرده‌های جنینی جدا گردیدند و در محلول نرمالین در دمای اتاق فیکس شدند (۱۷). نمونه‌ها به روش‌های معمول بافت‌شناسی پساژ داده شدند. سپس نمونه‌ها از ناحیه سر در بلوک‌های پارافینی قالب‌گیری شدند و به منظور دستیابی به مقاطع جنینی که حاوی بافت نورو هیپوفیز باشد؛ برش‌هایی به صورت سریال با ضخامت ۵ میکرون توسط میکروتوم روتاری در جهت ساژیتال از هر نمونه تهیه گردید.

در هر مرحله تکاملی (روزهای دهم تا چهاردهم جنینی) در هر روز تعداد ۸ جنین و در مراحل تکاملی بالاتر در هر روز تعداد ۴ جنین مورد استفاده قرار گرفت. سپس از هر مرحله تکاملی (روز دهم تا بیستم) تعداد ۲۴ مقطع آماده گردید و به ۸ دسته سه‌تایی برای هر یک از لکتین‌ها تقسیم شدند. در ادامه کار مقاطع تهیه شده برای رنگ‌آمیزی به روش لکتین هیستوشیمی با استفاده از لکتین‌های مورد نظر (جدول

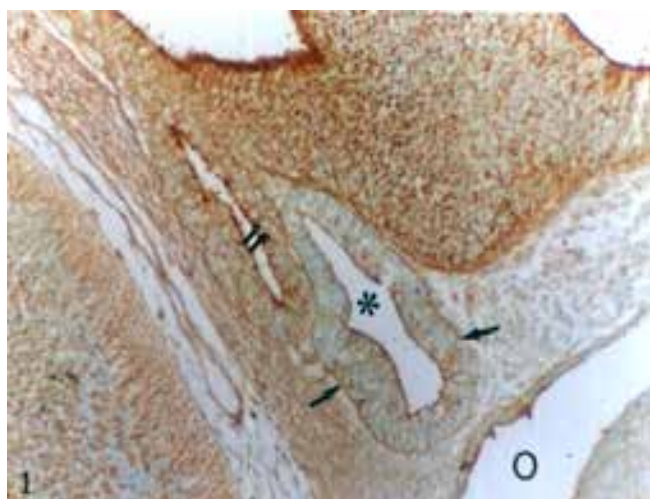
ابتدا مقاطع بافتی به روش معمول بافت‌شناسی آبدهی شدند. سپس نمونه‌های بافتی به مدت نیم ساعت در محلول بافر فسفات سالین (PBS) تازه تهیه شده قرار داده شد. این محلول دارای ۳۶ گرم کلرید سدیم، ۷/۴ گرم سدیم هیدروژن فسفات و ۴/۱۵ گرم پتاسیم دی‌هیدروژن در یک لیتر آب مقطر است. این محلول Stock بوده و در هنگام کار محلول فوق را به نسبت یک به پنج رقیق نمودیم (۱۷). برای رنگ‌آمیزی ابتدا هریک از لکتین‌های مورد نظر با غلظت ۱۰ میکروگرم ماده مؤثر (Lectin- Horse Radish Peroxidase conjugate) در یک میلی‌لیتر PBS (Phosphate Buffered Saline) رقیق شدند. پس از خارج کردن نمونه‌ها از محلول PBS برش‌های مربوط به هر مرحله تکاملی برای استفاده از سه لکتین یاد شده به سه دسته تقسیم گردید. آنگاه بر روی هر سری از برش‌ها چند قطره از لکتین رقیق شده مورد نظر چکانده شد و به مدت دو ساعت در درجه حرارت اتاق قرار گرفتند. بعد از این مدت مقاطع در PBS به مدت ۳ دقیقه شستشو داده شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۰/۳ درصد DAB (Diaminobenzidine) (۰/۳ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر PBS) و آب اکسیژنه (۲۰۰ میکرولیتر در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول DAB) مجاور گردید. پس از آن با آب جاری شستشو داده شدند (۱۷ و ۱۸). برای رنگ‌زمینه از آلسین‌بلو با pH ۲/۵ استفاده گردید. در مرحله بعد مقاطع مورد نظر طبق روش‌های معمول در بافت‌شناسی آبدگی، با گزیرلول شفاف‌سازی و سپس مونت‌ه گردیدند. در هر مرحله حداقل سه نمونه به‌عنوان گروه آزمایش با هر لکتین

جدول ۲: میانگین و انحراف معیار شدت واکنش نوروهیپوفیز با لکتین‌های مختلف روزهای جنینی متفاوت مورد مطالعه

لکتین	E10-12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20
OFA	۶/۱±۰/۵۴۷۱	۱/۶±۰/۵۴۷۷	۱/۸±۰/۸۳۶۷	۳/۰	۲±۰/۸۳۶۷	۱/۹±۰/۴۴۷۲	۱/۸±۰/۴۴۷۲	۱/۸±۰/۴۴۷۲	۱/۸±۰/۴۴۷۲
PNA	۰±۰/۰	۰/۸±۰/۴۴۲۲	۱±۰	۰/۸±۰/۴۴۷۲	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰
SBA	۰±۰	۰±۰	۱±۰	۱/۲±۰/۸۳۶۷	۱/۲±۰/۴۴۷۱	۱±۰	۰/۸±۰	۰±۰/۰	۰±۰/۰
WFA	۰/۰±۰	۰±۰	۱±۰	۲/۲±۰/۸۳۶۷	۰/۸±۰/۴۴۷۱	۰±۰	۰±۰	۰±۰/۰	۰±۰/۰
ECM	۰/۰±۰	۰±۰	۱/۲±۰	۲/۲±۰/۸۳۶۷	۲±۰/۴۴۷۱	۱/۲±۰	۰±۰	۰±۰/۰	۰±۰/۰
MPA	۰/۰±۰	۰±۰	۱/۲±۰	۲/۲±۰/۸۳۶۷	۲±۰/۴۴۷۱	۱/۲±۰	۰±۰	۰±۰/۰	۰±۰/۰

ECM ، $P < 0/05$: ماتریکس خارج سلولی

هیپوفیز در حال تکامل) به لکتین OFA واکنش نشان دادند (شکل یک). در روزهای سیزدهم و چهاردهم شدت واکنش در آن دسته از سلول‌هایی که به لکتین فوق واکنش نشان داده بودند؛ تغییر آماری معنی‌داری را نشان نداد. در ادامه روند تکامل، در روز پانزدهم افزایش معنی‌داری در شدت رنگ‌پذیری سلول‌ها ملاحظه گردید ($P < 0/05$) (شکل ۲). پس از آن، به‌طور معنی‌داری شدت واکنش در لوب خلفی هیپوفیز کاهش یافت ($P < 0/05$).



شکل ۱: مقطع سائیتال هیپوفیز در حال تکامل مربوط به جنین دهروزه موش صحرائی که در مجاورت با لکتین OFA قرار گرفته است (بزرگ‌نمایی $200 \times$).
* فضای داخل بن‌بست راتکه ، if : اینفاندیبولوم یا لوب خلفی هیپوفیز در حال تکامل که سلول‌های آن با لکتین OFA واکنش نشان داده‌اند.

واکنش به PNA

در بررسی مقاطع میکروسکوپی شروع واکنش با لکتین PNA در تعدادی از سلول‌های نوروهیپوفیز از روز سیزدهم قابل مشاهده بود. در ادامه روند تمایز سلولی تقریباً در همان سلول‌هایی که از روز سیزدهم واکنش شروع شده بود؛ در روز چهاردهم نیز با همان شدت ملاحظه گردید (شکل ۲). مقایسه

رنگ‌آمیزی شدند و یک برش به عنوان شاهد در معرض DAB ، HRP و آب اکسیژنه (بدون استفاده از لکتین) قرار گرفت. به‌علاوه با هر لکتین در هر مرحله جنینی یک نمونه ترکیبی (Composite) به عنوان کنترل مثبت رنگ‌آمیزی گردید. با توجه به این که در صورت اتصال لکتین با قندانت‌هایی در مجاورت DAB و آب اکسیژنه به علت وجود HRP رنگ قهوه‌ای ظاهر می‌شود؛ لام‌های آماده شده با میکروسکوپ نوری معمولی مورد بررسی قرار گرفتند و شدت رنگ‌آمیزی براساس طیف لیکرت مورد ارزیابی قرار گرفت. به این ترتیب که به عدم واکنش یا واکنش منفی رتبه صفر، واکنش خفیف یا ضعیف رتبه (+)، واکنش متوسط رتبه (++) و به واکنش قوی رتبه (+++) تعلق گرفت (۱۹).

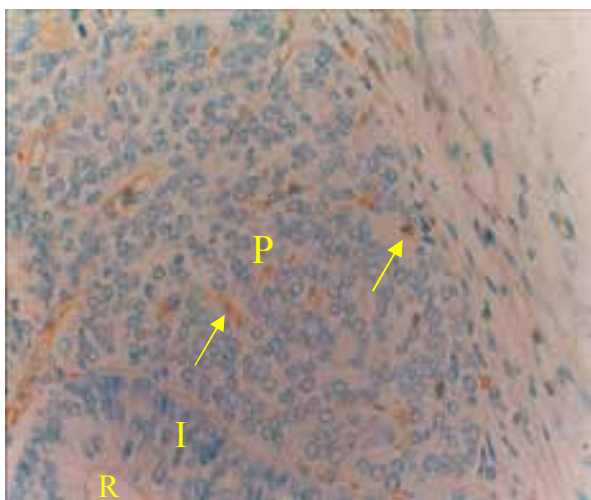
در این روش شدت رنگ‌آمیزی براساس مشاهده سه نفر به‌صورت Blind تعیین گردید و نمونه‌ها براساس شدت واکنش با هر لکتین در روزهای مختلف جنینی یاد شده (جدول ۲) به‌طور جداگانه رتبه‌بندی شدند. برای مقایسه آنها از آزمون آماری غیرپارامتری کروسکال - والیس استفاده شد و اختلاف در سطح کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار محسوب گردید. در انتها از شدت و تغییرات واکنش‌های ایجاد شده در نمونه‌ها توسط میکروسکوپ Olympus مدل Bx51 عکس تهیه گردید.

یافته‌ها

مراحل مختلف مورفوژنز نوروهیپوفیز موش‌های صحرائی با لکتین‌های مختلف براساس یافته‌های زیر مورد ثبت و بررسی قرار گرفت.

واکنش به OFA

بررسی مقاطع رنگ‌آمیزی شده نشان داد که از روز دهم جنینی اکثر سلول‌های تشکیل‌دهنده اینفاندیبولوم (لوب خلفی



شکل ۴: مقطع سائیتال هیپوفیز در حال تکامل موش صحرایی را در روز چهاردهم جنینی را نشان می‌دهد که در مجاورت لکتین SBA قرار گرفته است (بزرگ‌نمایی $400 \times$). * بن‌بست راتکه، I: لوب میانی، P: لوب خلفی، فلش: برخی از سلول‌های لوب خلفی واکنش نشان داده با لکتین SBA

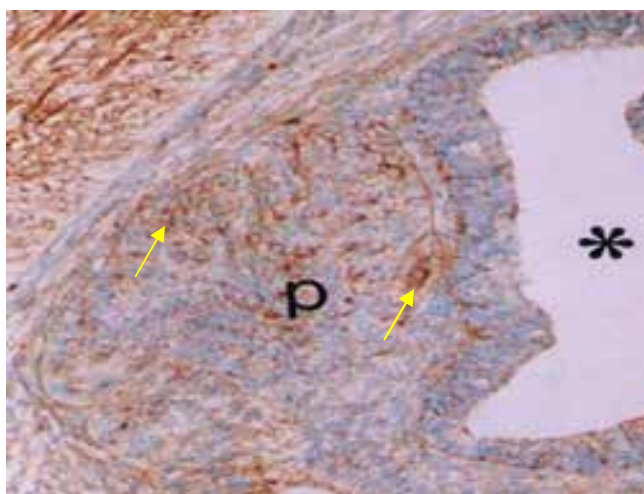
واکنش به SBA

در بررسی برش‌هایی که در مجاورت با لکتین SBA قرار گرفتند؛ واکنش تعدادی از سلول‌های لوب خلفی هیپوفیز به‌طور خفیف در روز چهاردهم قابل ملاحظه بود (شکل ۴)؛ سلول‌هایی که به نظر می‌رسد به عروق خونی تمایز می‌یابند. واکنش‌های اشاره شده با لکتین SBA تا روز هیجدهم با همان شدت ادامه یافت که از نظر آماری معنی‌دار نبود و پس از آن در روزهای نوزدهم و بیستم تکامل جنینی هیچ‌گونه واکنشی در سلول‌های نورو هیپوفیز مشاهده نگردید.

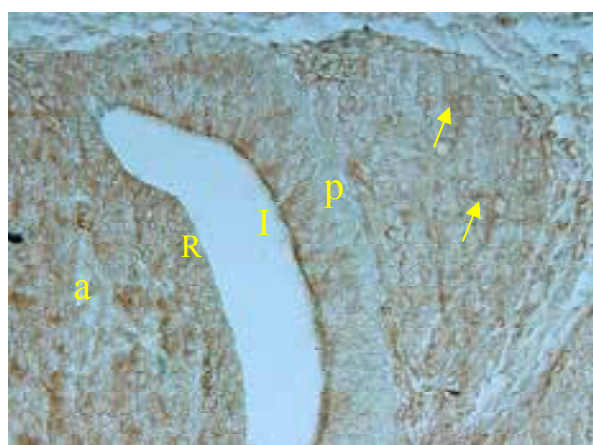
واکنش به WFA

واکنش لکتین WFA نیز با ماتریکس خارج سلولی موجود در لوب خلفی هیپوفیز در حال تکامل از روز سیزدهم شروع شد و سپس در روزهای بعدی بر شدت واکنش افزوده گردید. به‌طوری که در روز پانزدهم ماتریکس خارج سلولی در لوب خلفی هیپوفیز واکنش کاملاً قابل ملاحظه‌ای را نشان داد (شکل ۵). این افزایش در شدت رنگ از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0.05$). سپس با ادامه روند تکامل در روز شانزدهم اگرچه این واکنش قابل مشاهده بود؛ ولی نسبت به روز پانزدهم شدت واکنش به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.05$) و از روز شانزدهم به بعد هیچ‌گونه واکنش ملاحظه نگردید.

شدت واکنش بین روزهای سیزدهم و چهاردهم افزایش آماری معنی‌داری را نشان نداد. واکنش سلول‌های مذکور با لکتین PNA در روزهای چهاردهم و پانزدهم تقریباً با همان شدت قبلی ادامه یافت و در روزهای هفدهم تا بیستم هیچ‌یک از سلول‌های تشکیل‌دهنده لوب خلفی با لکتین PNA واکنش قابل ملاحظه‌ای را نشان ندادند. در حالی که سلول‌های دیواره خلفی بن‌بست راتکه که در جهت لوب میانی تمایز می‌یابند؛ واکنش نسبتاً شدیدی را نشان داد که می‌توان از این مشاهده در تایید صحت رنگ‌آمیزی نیز استفاده نمود (شکل ۳).



شکل ۲: مقطع سائیتال هیپوفیز در حال تکامل مربوط به جنین پانزده‌روزه موش صحرایی که در مجاورت با لکتین OFA قرار گرفته است (بزرگ‌نمایی $200 \times$). a: لوب قدامی هیپوفیز، * فضای داخل بن‌بست راتکه، P: لوب خلفی هیپوفیز در حال تکامل که برخی از سلول‌های آن (فلش) با لکتین OFA واکنش نشان داده‌اند Sc: غضروف اسفنوئید



شکل ۳: مقطع سائیتال هیپوفیز در حال تکامل موش صحرایی در روز پانزدهم جنینی که در مجاورت لکتین PNA قرار گرفته است (بزرگ‌نمایی $400 \times$). a: لوب قدامی، I: لوب میانی، R: فضای بن‌بست راتکه، sc: غضروف اسفنوئید، فلش: برخی از سلول‌های لوب خلفی واکنش نشان داده با لکتین PNA

($P < 0.05$) و در روز هیجدهم تا بیستم هیچ گونه واکنشی مشاهده نشد.

لکتین های UEA1 و LTA ، VVA ، GSA1-B4

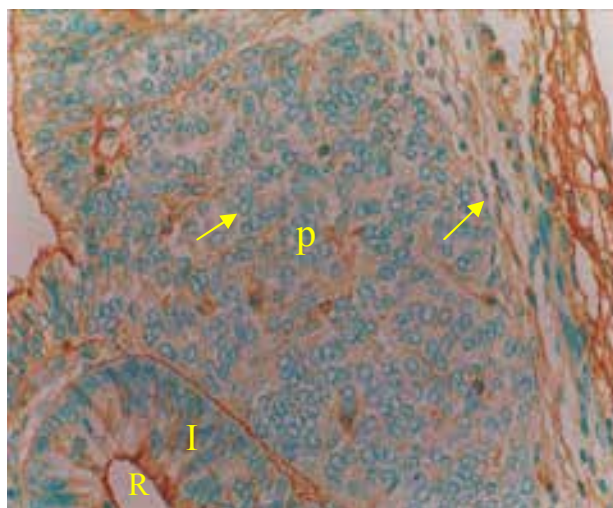
برش های میکروسکوپی که با لکتین های GSA1-B4 ، UEA1 و LTA ، VVA رنگ آمیزی شده بودند؛ نیز در روزهای مختلف جنینی مورد ارزیابی قرار گرفتند و واکنش قابل ملاحظه ای در هیچ یک از مراحل تکاملی نوروهیپوفیز مشاهده نگردید.

بحث

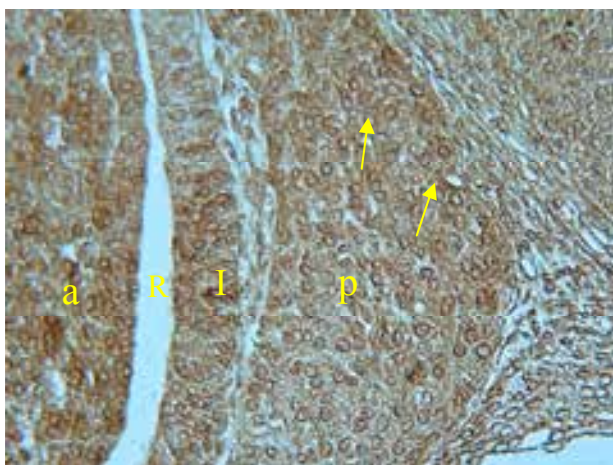
در این مطالعه لکتین OFA از روزهای دهم که مقارن با شروع تشکیل اینفاندیبولوم و بن بست راتکه است؛ با سلول های تشکیل دهنده اینفاندیبولوم واکنش نشان داد. این لکتین می تواند به صورت اختصاصی با قند انتهایی α -L فوکوزی وارد عمل شود که با قند ماقبل خود با اتصال ۶-۱ باند شده باشد. این مطالعه نشان داد که لکتین مذکور با سلول های اکتودرمی و نورال اکتودرم واکنش نشان می دهد که می تواند تأییدی بر مطالعات گذشته باشد (۱۹).

همچنین در این مطالعه مشخص شد که واکنش لکتین PNA که با قند انتهایی D-Gal(β1-3)-D-GalNAc می شود؛ در سیر تکامل جنینی از الگوی زمانی معینی تبعیت می نماید که دلیل بر ظهور قند مذکور در یک مرحله خاص تکاملی است. این پدیده می تواند به نوعی تفسیر شود که پس از انجام میان کنش های لازم، احتمالاً این مولکول قندی خاص توسط مولکول های دیگری از جمله اسیدسیالیک ماسک شده و یا این که توسط آنزیم های مترشحه از سلول تجزیه می گردد (۲۰ و ۲۱). بنابر این وقایعی از این دست می تواند دلیل بر نقش قند انتهایی D-Gal(β1-3)-D-GalNAc در روند تمایز سلولی طی روند تکامل نوروهیپوفیز قلمداد شود. همچنین واکنش لکتین MPA با ماتریکس خارج سلولی و نیز واکنش سلول های پارانشیم نوروهیپوفیز با لکتین های SBA و MPA با الگوی زمانی و مکانی مشخصی که به آن اشاره گردید؛ می تواند دلیلی بر نقش کلیدی قندهای انتهایی در تمایز و تکامل نوروهیپوفیز تلقی شود.

علت این که لکتین های UEA1 ، VVA ، LTA و



شکل ۵ : مقطع ساژیتال هیپوفیز در حال تکامل موش صحرایی را در روز شانزدهم جنینی را نشان می دهد که در مجاورت لکتین WFA قرار گرفته است (بزرگنمایی $400 \times$). R : فضای بن بست راتکه، I : لوب میانی ، P : لوب خلفی ، فلش : نمونه ای از سلول های لوب خلفی واکنش نشان داده با لکتین WFA



شکل ۶ : مقطع ساژیتال هیپوفیز در حال تکامل موش صحرایی در روز شانزدهم جنینی را نشان می دهد که در مجاورت لکتین MPA قرار گرفته است (بزرگنمایی $200 \times$). a : لوب قدامی ، I : لوب میانی ، p : لوب خلفی ، S : غضروف اسفنوئید فلش : سلول های لوب خلفی واکنش نشان داده با لکتین MPA

واکنش لکتین MPA

واکنش لکتین MPA نیز با سلول های لوب خلفی هیپوفیز از روز چهاردهم شروع شد و سپس در روزهای بعدی بر شدت واکنش افزوده گردید. به طوری که در روز شانزدهم سلول های لوب خلفی واکنش کاملاً قابل ملاحظه ای را نشان دادند. این افزایش در رنگ آمیزی از نظر آماری معنی دار بود ($P < 0.05$). سپس با ادامه روند تمایز سلولی در روز شانزدهم شدت واکنش مشابه روز پانزدهم بود (شکل ۶). در روز هفدهم از شدت واکنش به طور معنی داری کاسته شد

را متوقف می‌نماید و نیز بار منفی شدیدی را به سطح سلول‌ها می‌رساند که خود واکنش‌های متفاوتی را در پی دارد (۲۰). همچنین مولکول‌های گلیکوکانژوگیت‌ها و از جمله قندانت‌هایی آنها، ممکن است در مرحله خاصی از تکامل از طریق پدیده آندوسیتوز وارد سلول شده و کاملاً در لیزوزوم‌های سلولی هضم گردند (۱۹ و ۱۲). لذا شاید علت این که لکتین‌ها در سلول‌های خاص و در مراحل معینی از تکامل جنینی واکنش نشان می‌دهد را بتوان بر این اساس تفسیر نمود. مقایسه الگوی اتصال لکتین به ترکیبات قندی در بافت‌های طبیعی و غیرطبیعی نیز بر این واقعیت دلالت دارد که چنانچه اختلالی در روند گلیکوزیلاسیون در دوران جنینی رخ دهد؛ ممکن است نقایص تکاملی متفاوتی گردد (۲۴). به عبارت دیگر اگر در روند طبیعی گلیکوزیلاسیون داخل سلولی، هریک از قندهای تاثیرگذار به هر علتی دچار اختلال شود؛ این احتمال وجود دارد که زنجیره‌های قندی موردنظر به درستی ساخته نشوند و یا این که طبیعت شیمیایی قندهای انتهایی در این زنجیره‌ها دستخوش تغییر گردد و بر روند تکامل طبیعی جنین تاثیر گذارد و تکامل هیپوفیز نیز از این قاعده مستثنی نخواهد بود.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه گمان می‌رود که بیان قندهای انتهایی α -L-Fucose، β -D-GalNAc، α -D-Gal - (β -1-3) - D-GalNAc با استفاده از یک نقش کلیدی و نوعی الگوی زمانی و مکانی مشخص در فرایندهای تکاملی از جمله تکامل نوروهیپوفیز تنظیم شده است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب (شماره ۸۱۳۰۳) معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد بود. نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی به خاطر تامین اعتبار مالی تحقیق و نیز از سرکار خانم متجدد به خاطر زحمات بی‌دریغ تکنیکی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1. Dubois PM, Elamraoui A. Embryology of the pituitary gland. Trends Endocrinol Metab. 1995 Jan-Feb;6(1):1-7.
2. Tobet SA, Bless EP, Schwarting GA. Developmental aspect of the gonadotropin-releasing hormone system. Mol Cell Endocrinol.

در حال تکامل نوروهیپوفیز نشان ندادند؛ به واسطه عدم وجود قندانت‌هایی مربوطه در زنجیره‌های قندی گلیکوکانژوگیت‌ها در این مرحله از تکامل هیپوفیز باشد که با توجه به ساختار بافت‌شناسی نوروهیپوفیز که بیشتر از رشته‌های عصبی تشکیل شده که جسم سلولی آن در هیپوتالاموس قرار دارد و فقط ۲۰ درصد آن را سلول‌های گلیال موسوم به پیتوئیسیت تشکیل می‌دهد (۲۲). لذا با توجه به عدم تنوع سلولی در این بخش از غده هیپوفیز می‌توان عدم واکنش لکتین‌های مذکور را توجیه نمود.

براساس مطالعات انجام شده به نظر می‌رسد که منشاء سلولی نوروهیپوفیز بخش و نترال دیانسفالون باشد که تحت کنترل عوامل متعددی از جمله اثرات القایی بن‌بست راتکه (مشتق از سقف دهان اولیه) صورت گرفته باشد (۲۰). در این رابطه مولکول‌های شیمیایی زیادی دخیل دانسته شده‌اند که می‌توانند فرآیندهای تکاملی جنینی را تحت تأثیر قرار دهند. از جمله این مولکول‌ها می‌توان به گلیکوکانژوگیت‌ها اشاره کرد که در سطح سلول‌ها و ماتریکس خارج سلول یافت می‌شوند و نیز بخش کربوهیدراتی آنها به‌خصوص قندانت‌هایی زنجیره‌های قندی در طی تمایز و تکامل سلولی دچار تغییر می‌شوند (۲۱). تحقیقات مشابه در این زمینه نشان داده است که چنین تغییراتی می‌توانند نقش بسیار حساس و تعیین‌کننده‌ای در پدیده‌های مختلف تکاملی مانند تمایزات سلولی، میان‌کنش‌های سلولی و مهاجرت سلولی ایفا نمایند (۲۱ و ۲۳).

تغییرات مولکولی سطح سلول‌ها، به خصوص گلیکوپروتئین‌ها که در ضمن تکامل سلول‌های جنینی به‌وقوع می‌پیوندد؛ رابطه مستقیمی با پدیدار شدن وظایف بیولوژیکی این سلول‌ها دارد که به صورت‌های مختلف شکل می‌گیرد (۲۰). به عنوان مثال ممکن است قندانت‌هایی توسط مولکول دیگری مانند اسیدسیالیک پوشانده شود که به این ترتیب عمل قندانت‌هایی را که معمولاً به‌صورت یک گیرنده عمل می‌نماید

2001 Dec 20;185(1-2):173-84.

3. Treier M, Rosenfeld MG. The hypothalamic-pituitary axis: co-development of two organs. Curr Opin Cell Biol. 1996 Dec; 8(6):833-43.

4. Sheng HZ, Westphal H. Early steps in pituitary organogenesis. *Trends Genet.* 1999 Jun;15(6):236-40.
5. Fawcett DW. Bloom and Fawcett Textbook of Histology. 11th. Philadelphia: WB Saunders Company. 2002; pp:250-60.
6. Takor TT, Pearse AG. Neuroectodermal origin of avian hypothalamo-hypophyseal complex: the role of the ventral neural ridge. *J Embryol Exp Morphol.* 1975 Oct;34(2):311-25.
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 Dec;125(23):4835-40.
9. Zhao Y, Mailloux CM, Hermesz E, Palkóvits M, Westphal H. A role of the LIM-homeobox gene Lhx2 in the regulation of pituitary development. *Dev Biol.* 2010 Jan; 337(2):313-23.
10. Qasba PK. Involvement of sugars in protein-protein interactions. *Carbohydrate Polymers.* 2000; 41(3): 293-309.
11. Bless EP, Pays L, Schwarting GA, Tobet SA. Expression of a cell surface glycoconjugate in gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons in mice. *Soc Neurosci Abstr.* 2000;26:1350.
12. Hassanzadeh Taheri MM, Nikraves MR, Jalali M, Fazel AR, Ebrahimzadeh Bideskan AR. Distribution of specific glycoconjugate in early mouse embryonic notochord and paraxial Mesenchyme. *Iran Biomed J.* 2005 Jan; 9(1):21-6.
13. Sadler TW, Langman J. Langman's Medical Embryology. 8th. Philadelphia: Williams and Wilkins Company. 2000; pp: 535-40.
14. Hulley P, Schachner M, Lübbert H. L1 neural cell adhesion molecule is a survival factor for fetal dopaminergic neurons. *J Neurosci Res.* 1998 Jul;53(2):129-34.
15. Carlson BM. Human embryology and developmental biology. 2nd. London: Mosby Louis Company. 1994; pp:235-42.
16. Poirier F, Kimber S. Cell surface carbohydrates and lectins in early development. *Mol Hum Reprod.* 1997 Oct;3(10):907-18.
17. Bancroft J D, Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. 5th. London: Churchill Livingstone Company. 2007; pp: 20-100.
18. Kiernan JA. Histological and histochemical methods: theory and practice. 3rd. Oxford: Butter worth Company. 1990; pp: 232-6.
19. Ebrahimzadeh Bideskan AR, Hassanzadeh Taheri MM, Nikraves MR, Fazel AR. [Lectin histochemical study of vasculogenesis during Rat pituitary morphogenesis]. *Iran J Basic Med Sci.* 2010;1(14): 35-41. [Article in Persian]
20. Schulte BA, Spicer SS. Light microscopic histochemical detection of terminal galactose and N-acetylgalactosamine residues in rodent complex carbohydrates using a galactose oxidase--Schiff sequence and peanut lectin--horseradish peroxidase conjugate. *J Histochem Cytochem.* 1983 Jan;31(1):19-24.
21. Nakamura K, Kimura S, Yamazaki M, Kawaguchi A, Inoue K, Sakai T. Immunohistochemical analyses of thyroid-specific enhancer-binding protein in the fetal and adult rat hypothalami and pituitary glands. *Brain Res Dev Brain Res.* 2001 Oct; 130(2):159-66.
22. Carneiro Junqueira J, Carneiro Junqueira LC. Basic Histology. 11th. California: LMP. 2005; pp:436-45.
23. Wu AM, Lisowska E, Duk M, Yang Z. Lectins as tools in glycoconjugate research. *Glycoconj J.* 2009 Nov;26(8):899-913.
24. Miosge N, Götz W, Quondamatteo F, Herken R. Comparison of lectin binding patterns in malformed and normal human embryos and fetuses. *Teratology.* 1998 Feb;57(2):85-92.

Original Paper

Distribution of Glycoconjugates terminal sugars during neurohypophysis development in RatEbrahimzadeh Bideskan AR (PhD)^{*1}, Nikravesheh MR (PhD)², Fazel AR (PhD)²¹Assistant Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. ²Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.**Abstract**

Background and Objective: The neurohypophysis originates from the floor of diencephalon. Its development controls by several cellular interactions that mediated by some molecules such as cell surface and extra cellular matrix Glycoconjugates terminal sugars. In this study we used lectin histochemical technique to evaluate distribution of the Glycoconjugates and their changes during development of neurohypophysis.

Materials and Methods: This experimental study carried on 40 female and 20 male adult Rats. After mating and appointment day zero of pregnancy, pregnant Rats were sacrificed from days 10-20 of gestation and their embryos were collected for histochemical study. The serial section of head specimens were fixed and incubated with different HRP-lectins from Orange fungus (OFA) *Vicia villosa* (VVA), *Glycine max* (SBA), *Wistaria floribunda* (WFA), peanut (PNA), *Griffonia simplicifolia* (GSA1-B4), *Lotus tetragonolobus* (LTA) and *Ulex Europeus* (UEA-1). OFA, LTA and UEA-1 lectins are specific for terminal sugars α -L-Fucose and WFA, SBA, VVA and PNA are specific for D-GalNAc, α , β -D-GalNAc and GalNAc, D-Gal-(β -1-3)- D-GalNAc of complex glycoconjugates respectively.

Results: Our findings demonstrated that the reaction of neurohypophysis cells with OFA initiated from gestational GD10 and increased to GD15 ($P < 0.05$) and then increased to GD17 ($P < 0.05$). A few cells of neurohypophysis reacted with PNA from GD13 to GD16 and decreased afterward ($P < 0.05$). Some cells of neurohypophysis reacted with SBA from GD14 to GD18 and decreased afterward ($P < 0.05$). Reacting of many cells of neurohypophysis with WFA started on GD13 and increased to GD15 ($P < 0.05$) and then decreased afterward ($P < 0.05$). Neurohypophysis cells showed no reaction with the UEA-1, LTA, VVA and GSA1-B4 lectins.

Conclusion: The expression of Glycoconjugates with terminal sugars α -L-Fucose, α , β -D-GalNAc and D-Gal-(β -1-3)- D-GalNAc have important role and special spatiotemporal situation in neurohypophysis development.

Keywords: Neurohypophysis, Development, Glycoconjugates, Lectin, Rat

* **Corresponding Author:** Ebrahimzadeh Bideskan AR (PhD), E-mail: ebrahimzadehba@mums.ac.ir

Received 12 September 2010 Revised 16 February 2011 Accepted 22 February 2011