مطالعه هیستوشیمیایی تکامل غضروف پیش ساز مهره‌ها در جنین رت

عباسعلی معین Ph.D☆، زهرا حیدری Ph.D.☆♦، علیرضا فاضل Ph.D.*

☆ دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

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

♦آدرس مکاتبه: زاهدان، صندوق پستی ۳۹۶-۹۸۱۳۵، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

چکیده

* **هدف:** تعیین حضور قندهای انتهایی در طی تکامل غضروف پیش‌ساز مهره‌ها در جنین رت با استفاده از تکنیک لکتین هیستوشیمیایی

* **مواد و روشها:** ۵۰ سر رات ماده و ۲۵ سر رت نر نژاد Wistar به روش نمونه برداری تصادفی انتخاب شدند. پس از یک هفته سازش با محیط، جفت‌گیری انجام شد و روز مشاهدهٔ واژینال پلاک معادل روز صفر بارداری در نظر گرفته شد. نمونه‌های جنینی از روز ۹ تا ۱۸ جمع آوری شدند، نمونه‌ها در محلول B4G ثابت شدند، پس از پاساژ معمول بافتی در پارافین قالب‌گیری شدند و سپس برشهایی به ضخامت ۴ میکرون از این قالبها تهیه گردید. برشها توسط روشهای هیستوشیمی (پاس-آلسین‌بلو) و هیستوشیمی لکتین (WFA، MPA، VVA-B4) رنگ‌آمیزی شدند، سپس مقاطع بر اساس شدت رنگ‌آمیزی به صورت مجزا رتبه‌بندی و توسط آزمون آماری غیر پارامتری کروسکال - والیس با یکدیگر مقایسه شدند.

* **یافته‌ها:** شروع تمایز کندروبلاستها در سانتروم مهرهٔ آینده با ظهور قند انتهایی D-Gal در روز سیزدهم جنینی مشخص شد. در طی روزهای چهاردهم تا شانزدهم حضور قند انتهایی D-GalNac و Gal/GalNac نیز در مهره‌های در حال تکامل محقق شد، این واکنشها نیز ابتدا در سانتروم یا جسم مهره و سپس در پدیکولها و لامیناها ظاهر شدند. از روز هفدهم واکنش پیش ساز مهره‌ها با لکتینهای فوق کاهش معناداری نشان داد ($P<0.05$).

* **نتیجه‌گیری:** تغییرات قندهای انتهایی و ماتریکس خارج سلولی تغییرات مورفولوژیک منظمی را در پی خواهد داشت که سرنوشت آیندهٔ تمایزات بافتی را مشخص می‌کند.

گل واژگان: قند انتهایی، لکتین، غضروف، مهره

مقدمه

برای پیدایش غضروف و استخوان، سلولهای مزانشیمی بایستی از جایگاه اصلی خود به نقاط دور و نزدیک بدن مهاجرت کنند، هر گونه اختلال در روند مهاجرت و تمایز این سلولها، باعث بد شکل شدن استخوانها، تاخیر تکامل مراکز استخوانسازی یا عدم تشکیل تمام یا قسمتی از اندامها می‌گردد. در مورد چگونگی پیدایش غضروف و مراکز استخوانسازی مطالعات وسیعی صورت گرفته و بر هم کنش (intration)، مهمترین عامل در این روند قلمداد شده است (۱). در تشکیل ستون مهرهٔ جنین، اولین پیش ساز، مزانشیم محوری قطعه‌بندی نشده است که رشد و تمایز آن اساساً تحت تاثیر نوتوکورد قرار می‌گیرد، در کندروژنز مهره‌ها ماتریکس Perinotochordal، Prispinocaudal نقش مهمی دارد و محصولات فعال این ماتریکس احتمالاً درون غشاهای پایهٔ اپی‌تلیال قرار دارند (۲).

اخیراً اهمیت زنجیره‌های کربوهیدراتی پیچیده در ساختمان و عمل گلیکوکونژوگه‌ها در بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی مهم به حوبی اثبات شده است (۳، ۴). کربوهیدراتها، در کنار اسیدهای نوکلئیک و پروتئینها، بیشترین ظرفیت را برای انتقال اطلاعات نشان می‌دهند، چراکه بیشترین پتانسیل را برای تغییرات ساختمانی دارند. با اتصال کئووالان گروههای سولفات، فسفات، استیل و متیل به قندها تنوع ساختمانی بیشتری ایجاد می‌شود (۵). قندهای انتهایی زنجیره‌های کربوهیدراتی معمولاً در روند تکامل، تمایز، مهاجرت سلولی، تبادلات سلولی، و ارتباط سلولهای بالغ با محیط نقش مهمتری ایفا می‌کنند، نوع قند انتهایی، تخصصی بودن سلول و چگونگی پاسخ به عوامل هورمونی القایی را مشخص می‌کند. تکامل مهره‌ها نیز به اعمال متقابل پیچیده و منظمی میان اجزاء سومیتها، نوتوکورد و لولهٔ عصبی بستگی دارد. اعمال متقابل سلولی در هدایت صحیح روند مورفوژنز بافتی در تمام اعضاء و از جمله ستون مهره‌ای اهمیت دارد (۶، ۷) و در این میان گلیکوکونژوگه‌های سطح سلول و اجزاء ماتریکس خارج سلولی نقش بسیار با اهمیتی در هدایت این اعمال متقابل دارد (۸). تمام سلولهای در حال تکامل، در دوره‌ای از زندگی خود اجزائی از جمله ترکیبات رشته‌ای، پروتئینها و گلیکوآمینوگلیکانها را در اطراف خود ترشح می‌کنند. این ترکیبات، به هنگام مورفوژنز رفتار سلولها در برابر سیگنالهای خارجی، نظیر فاکتورهای رشد را تعیین می‌کنند و به همین دلیل اجزاء ماتریکس خارج سلولی و گلیکوکونژوگه‌های سطح سلول توجه محققان زیادی را به خود جلب کرده است (۸، ۹، ۱۰).

مطالعهٔ جنبه‌های بیوشیمیایی این اجزاء و نقش احتمالی آنها در فرآیند تمایز ستون مهره در انسان و جانوران نیز در سالهای اخیر مورد توجه قرار گرفته است (۶، ۷، ۸، ۱۰، ۱۱).

شواهدی نیز وجود دارد که اختلال در تکامل طبیعی گلیکوزیلاسیون در روند ناهنجاری‌زایی در موش و انسان نقش دارد (۱۲، ۱۳، ۱۴).

در بسیاری از پدیده‌های تکاملی حضور ترکیبات قندی به ویژه قند انتهایی موجود در زنجیرهٔ آنها اساسی‌ترین نقش را در ارتباطات سلولی و تمایز پیچیدهٔ موروفولوژیک ایفا می‌کند (۱۵، ۱۶، ۱۷). در این مطالعه بر آن شدیم که حضور و توزیع برخی از قندهای انتهایی را با روشهای بسیار حساس هیستوشیمیایی، در تکامل غضروف پیش ساز مهره‌ها در رت (Rat) بررسی نماییم. مطالعهٔ تغییرات ترکیبات قندی باکمک روشهای هیستوشیمیایی و هیستوشیمی لکتینها (به عنوان ترکیباتی که به طور کاملاً اختصاصی با قندهای انتهایی واکنش نشان می‌دهند) و بررسی زمان پیدایش و ترکیب پیدایش قندهای انتهایی در طی تکامل مهره‌ها احتمالاً در فهم مکانیسم موروفوژنز و تمایز این بخش مهم اسکلت محوری موثر خواهد بود.

مواد و روشها

پنجاه سر رت (Rat) ماده و ۲۵ سر رت نر از نژاد Wistar به طریق تصادفی انتخاب شدند، رتها در شرایط استاندارد حیوانخانه و با دسترسی آزادانه به آب و غذا، دوره تاریکی و روشنایی ۱۲ ساعته، درجه حرارت ۲۴-۱۸ درجه سانتیگراد قرار گرفتند، پس از یک هفته زمان سازش با محیط جدید، رتهای نر به قفس رتهای ماده انتقال یافتند (بازای هر دو رت ماده یک رت نر). پس از جفت گیری، مشاهده واژینال پلاک به عنوان روز صفر بارداری در نظر گرفته شد. رحم رتهای حامله از روز نهم تا هجدهم تحت بیهوشی با کلروفرم برداشته شد و در سرم فیزیولوژی قرار گرفت (برای هر روز ۵ رت). بلافاصله جنینها از داخل رحم و پرده‌های جنینی جدا شدند و در محلول B4G (محلول ۶ درصد کلرید جیوه، ۱/۲۵ درصد استات سدیم و ۰/۴۰ درصد گلوتار آلدهاید در آب مقطر) تثبیت شدند و از جنینها هر روز ۱۰ نمونه به طور تصادفی انتخاب گردید. پس از طی مراحل معمول پاساژ بافتی و قالب‌گیری با پارافین، مقاطع ۴ میکرونی از نمونه‌ها تهیه گردید که با روشهای PAS آلسین بلو با PH=۲/۵ و لکتین هیستوشیمیایی رنگ‌آمیزی شدند.

لکتینهای WFA، VVAB4 و MPA (سیگما) در بافر فسفات با غلظت ۰/۱ مولار PH=۶/۸ به میزان ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر رقیق شدند، مقاطع بافتی پس از آب دهی و حذف پیگمان کلرید جیوه، به منظور خنثی کردن پراکسید از درون بافتی به مدت ۱۰-۵ دقیقه در محلول آب اکسیژنه ۱ درصد در متانول و سپس به مدت ۲ ساعت در اتاقک مرطوب در مجاورت لکتینهای فوق و پس از آن در محلول بافر فسفات که محتوی ۰/۳ درصد دی آمینوبنزیدین (DAB) و ۰/۱ درصد آب اکسیژنه بود قرار گرفتند. برای توقف واکنش DAB، مقاطع به روش معمول آب‌گیری، شفاف سازی و سپس مونته شدند و با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند و میکروگرافهای لازم از آنها تهیه گردید. نمونه‌ها بر اساس شدت واکنش با لکتینها به طور جداگانه رتبه‌بندی شدند (جدول ۱) و برای مقایسهٔ آنها از آزمون غیر پارامتری کروسکال - والیس استفاده شد و اختلاف در سطح ($P<0.05$) معنادار محسوب شد.

جدول ۱: رتبه بندی تغییرات واکنش بافت نسبت به لکتینها

میزان واکنش	رتبه
عدم واکنش	-
واکنش مختصر	+
واکنش متوسط	++
واکنش شدید	+++

یافته‌ها

مقطع عرضی جنین تا روز ۱۲ با لکتین VVA-B4 که برای قند انتهایی Gal/Gal Nac (Galactose/N acetylgalactosamine) اختصاصی است و با لکتین WFA که برای قند D-Gal Nac (D-N acetylgalactosamine) اختصاصی است هیچ‌واکنشی نشان نداد (جدول ۲)، در این مرحله تمایز سومیتها، مهاجرت سلولهای بخش اسکلروتوم سومیت به اطراف نوتوکورد، لوله عصبی و جدار تنه قابل توجه است.

جدول ۲: شدت واکنش غضروف پیش‌ساز جسم مهره‌ها نسبت به لکتینهای مختلف در روزهای مختلف مورد مطالعه

مرحله جنینی (روز)	لکتین VVA-B4	لکتین MPA	لکتین WFA
۹-۱۲	-	-	-
۱۳	-	+	-
۱۴	++	++	+++
۱۵	++	+++	+++
۱۶	+++	+	++
۱۷-۱۸	+	-	-

- در روز ۱۳ تنها لکتین MPA با مزانشیم اطراف نوتوکورد واکنش مختصری نشان داد (جدول ۲).

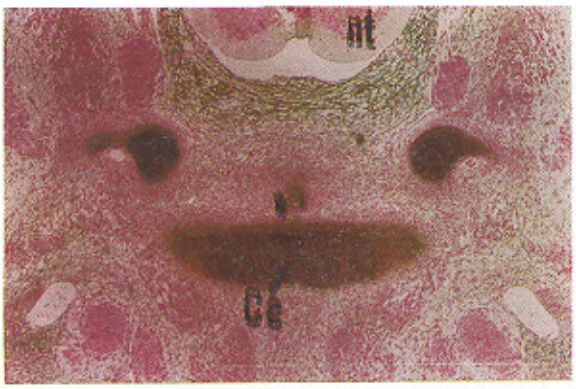
- در روز ۱۴ و ۱۵ لکتین VVA-B4 با سلولهای مزانشیمی اطراف نوتوکورد فراوان واکنش نشان داده است (جدول ۲)، در این مرحله هنوز مناطقی که در آینده پدیکولا و لامیناهای مهره را خواهند ساخت عکس‌العملی با لکتین فوق نشان نمی‌دهند.

لکتین WFA با نواحی سانتروم و پدیکول واکنش نشان داده است (جدول ۲). این عکس العمل بیشتر در مناطق پدیکولها تمام سطح سلول را شامل می‌شود، در این ناحیه تعداد اندکی کندروبلاست به صورت پراکنده دیده می‌شود. در نیمه قدامی سانتروم سلولهای مزانشیم بیشتری به پیش‌ساز غضروفی و کندروبلاست تبدیل شده‌اند، در حالی که نوتوکورد در حال تحلیل، و نیمه قدامی سانتروم واکنش با لکتین اندک و غیر قابل مشاهده است (شکل ۱).

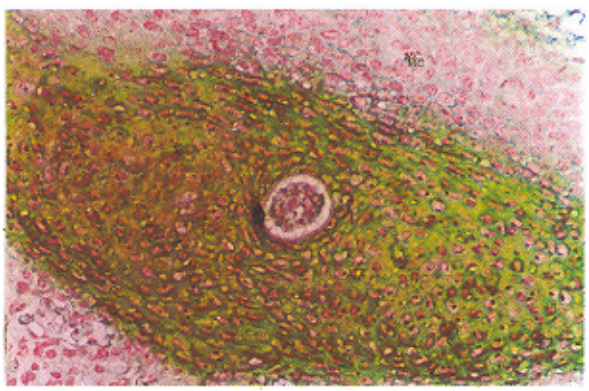
لکتین WFA با HRP باند شده با جسم مهره شدیداً و به صورت اختصاصی با تمام قسمتهای ماتریکس بین سلولهای کندروبلاست واکنش نشان داده است (جدول ۲). کندروبلاستهای در حال تمایز سلولی در سطح خود عکس‌العمل بسیار شدیدتری نشان داده‌اند (شکل ۲).

مقایسهٔ شدت واکنش با این لکتین با روزهای ۱۲ و ۱۳ تفاوت معنادار آماری را نشان داد ($P<0.05$). در این مرحله نوتوکورد در حال تحلیل و رگ سلولی در آن قابل مشاهده و واکنش آن با WFA بسیار ضعیف است. واکنش با لکتین MPA به طور فزاینده در سانتروم مشاهده می‌شود. واکنش با پدیکول و لامیناها نیز به مقدار کم و متوسط وجود دارد.

در جنین ۱۶ روزه، لکتین VVA-B4 عکس‌العمل شدیدی نشان داده است (جدول ۲)؛ این عکس‌العمل بیشتر در اطراف و روی نوتوکورد در محل اتصال پدیکولها با جسم مهرهٔ آتی است. این لکتین بیشتر با ماتریکس خارج سلولی واکنش داده و غضروف سازی در این مرحله مشهودتر است (شکل ۳).



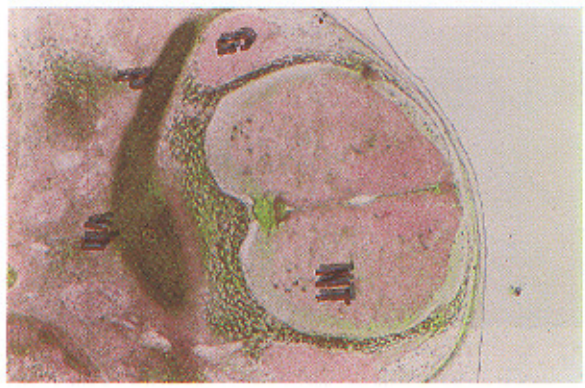
شکل ۱: مقطع عرضی جنین رت ۱۵ روزه، واکنش با لکتین WFA - لولهٔ عصبی (NT)، نوتوکورد (پیکان)، سلولهای غضروفی (CC)



شکل ۲: مقطع عرضی مهرهٔ در حال تکامل در جنین رت ۱۵ روزه، واکنش با لکتین WFA که با HRP باند شده است. نوتوکورد (پیکان)، سلولهای مزانشیمی (MC)، ماتریکس خارج سلولی (E)

واکنش سانتروم متوسط (جدول ۲) و واکنش پدیکولها با لکتین WFA شدید است. مقایسهٔ شدت واکنش با روز ۱۲ و ۱۳ افزایش معناداری را نشان می‌دهد ($P<0.05$). در حالی که با وجود کاهش واکنش نسبت به روز ۱۵ تفاوت معناداری نشان نمی‌دهد ($P<0.05$) و تنها گسترش واکنش به این لکتین در پدیکولها مشهود است. کندروبلاستهای در حال تمایز در میان تراکم سلولهای مزانشیمی جلب توجه می‌کند. نوتوکورد در حال تحلیل واکنش کمی نشان داده است (شکل ۴).

شکل ۳: مقطع عرضی جنین رت ۱۶ روزه، واکنش با لکتین VVA-B4 - لولهٔ عصبی (NT)، نوتوکورد (نوک پیکان)، پدیکول مهره (P)، گانگلیون ریشه خلفی (G)



شکل ۴: مقطع عرضی جنین رت ۱۶ روزه، واکنش با لکتین WFA - لولهٔ عصبی (NT)، جسم مهره (Vb)، پدیکول مهره (P)، گانگلیون ریشهٔ خلفی (G)

الگوی غضروفی مهره در ناحیه سانتروم و پدیکولها با لکتین WFA مشخص است، نوتوکورد به خوبی مشخص نیست و هیچ واکنشی نسبت به لکتین فوق در مناطق غضروف سازی مشاهده نمی‌شود. در این مرحله واکنش با لکتین MPA نیز در سانتروم مهره به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد.

در جنین ۱۸ روزه جسم مهره و دیسک بین مهره‌ای در حال شکل‌گیری است سلولهای کندروبلاست از ناحیه نوکلئوس پالپوزوس به طرف جسم مهره در حال تکثیر و تمایزند، در مرکز به تعداد گروههای ایزوژن و کندروسیتهای هیپرتروفیه افزوده شده، نوکلئوس پالپوزوس در حال تحلیل است، تراکم سلولهای مزانشیمی اطراف بیشتر دیده می‌شود تا در تشکیل آنولوس فیبروزوس شرکت کنند. به جز واکنش خفیف با لکتین VVA-B4، هیچ واکنشی با لکتینهای دیگر در مناطق غضروفی پیش ساز مهره‌ها دیده نمی‌شود (جدول ۲). مقایسه شدت واکنش با روزهای ۱۵ و ۱۶ کاهش معناداری را نشان می‌هد ($P<0.05$).

بحث

قندهای انتهایی در تکامل، تمایز، مهاجرت سلولی، تبادلات سلولهای بالغ با محیط خارج سلولی نقش مهمی ایفا می‌کنند. نوع قند انتهایی تخصصی بودن سلول و نوع هورمون مؤثر بر آن را مشخص می‌نماید، برای شناسایی قندهای انتهایی از لکتینها استفاده می‌شود (۲، ۳، ۵، ۷). تا روز دوازدهم که مراحل تمایز سومیتها، مهاجرت سلولهای بخش اسکلروتوم به اطراف نوتوکورد و لوله عصبی و جدار تنه مشاهده می‌شود، لکتینهای فوق هیچ واکنشی با سلولهای مزانشیم پیش‌ساز مهره نداشته و سلولهای پیش‌ساز مهره‌ها هیچ آثاری از تمایز سلولی به طرف کندروبلاست را نشان نمی‌دهند. مشاهده واکنش مختصری با لکتین MPA در اطراف نوتوکورد در روز سیزدهم نشانگر شروع تمایز سلولی و ظهور قند D-Gal در سطح سلولها است. این در حالی است که واکنش نسبت به سایر لکتینها منفی بود و عدم ظهور قندهای انتهایی مربوطه را در سطح سلول نشان می‌دهد.

در روز ۱۴ و ۱۵ لکتین VVA-B4 را در سلولهای ناحیه سانتروم آینده نشان می‌دهد، ولی مناطقی که پدیکولها و لامیناهای مهره آینده را خواهند ساخت عکس‌العملی نشان نداده‌اند، بنابراین سانتروم مهره آینده اولین منطقه‌ای است که تمایز سلولی به کندروبلاست در آن اتفاق می‌افتد. مطالعات متعدد گذشته نیز نشان داده است که مراکز غضروف سازی مهره‌ها ابتدا در سانتروم و سپس در پدیکولها و لامیناها ظاهر می‌شوند (۸، ۱۱، ۱۸).

لکتین WFA با نواحی سانتروم و پدیکول واکنش نشان داده در نیمه قدامی سانتروم با پیشرفت تمایز غضروفی، شدت واکنش ضعیف‌تر است. لذا چنین به نظر می‌رسد که هر چه تمایز کندروبلاست و تبدیل آن به سلولهای غضروفی بالغ پیشرفت کند واکنش با لکتین WFA ضعیف‌تر و تظاهر قند D-Gal Nac در سطح سلولها نیز کاهش می‌یابد. احتمالاً حضور این قند انتهایی برای مرحلهٔ مورفوژنز سلولهای غضروفی ضرورت دارد. واکنش با لکتین MPA در ناحیهٔ سانتروم به طور فزاینده‌ای بیشتر شده است.

در جنین ۱۶ روزه لکتین VVA-B4 عکس‌العمل در اطراف و روی نوتوکورد و در محل اتصال پدیکولها با جسم مهرهٔ آتی نیز مشهود است، در این روز ماتریکس خارج سلولی بیشترین واکنش را نشان داده است و پیشرفت غضروف‌سازی به منطقهٔ پدیکولها و لامیناها مشهود است. واکنش سانتروم و پدیکول با لکتین WFA نیز شدید است، در حالی که نوتوکورد در حال تحلیل، واکنش کمی نشان داده است که احتمالاً به علت شروع روند آپوپتوز (Apoptosis) و مرگ سلولی برنامه ریزی شده در نوتوکورد و از دست رفتن قند انتهایی D-Gal Nac از سطح سلولها می‌باشد. مطالعات Gotz و همکاران با لکتین PNA، وجود قند دی‌ساکارید Gal-Gal Nac را در پیش‌ساز جسم مهره در مرحلهٔ پیش غضروفی تکامل مهره‌ها، نشان داده است (۱۱). در مطالعه حاضر نیز اولین آثار تمایزی در سانتروم یا پیش ساز جسم مهره مشاهده شد. در یک مطالعه دیگر Gotz و همکاران نشان دادند که مزانشیم محوری کرانیال ابتدا با لکتین SAB و در مراحل بعد با لکتین PNA واکنش نشان می‌دهد. البته این واکنش با افزایش سن جنین مجدداً کاهش می‌یابد (۸). در مطالعهٔ حاضر نیز با افزایش سن جنین در مناطق غضروف‌سازی تمایل با لکتین WFA و VVA-B4 ابتدا افزایش و

بعد از تکمیل تمایز مورفولوژیکی غضروف کاهش نشان داد. بنابراین می‌توان گفت که الگوی ظهور قندهای انتهایی و زمان پیدایش و ناپدید شدن آنها در مراحل مختلف تکامل متفاوت بوده و با توجه به مطالعه حاضر و مطالعات و تحقیقات قبلی (۲، ۶، ۸، ۱۰) بیان ترکیبات قندی سطح سلول و اجزاء خارج سلولی در دوره‌های مختلف تکامل جنینی و در بخشهای مختلف عضو از الگوی یکسانی تبعیت نمی‌کند. این تغییرات الگوی زمانی و مکانی خاصی دارد که ضمن ویژه بودن برای هر گونه، مسئول هدایت اعمال متقابل سلول - سلول و سلول با مادهٔ خارج سلولی است (۱۵، ۱۶، ۱۷). حضور یا حذف این مولکولهای با تاثیرگذاری بر روند تمایز و مورفوژنز فرایند تکامل عضو را دستخوش تغییراتی خواهد کرد (۱۲، ۱۳، ۱۴). لذا اهمیت این مولکولها نیاز به طرح‌ریزی مطالعات بعدی در مورد تغییرات گلیکوکونژوگه‌ها در ناهنجاریها و مقایسه با موارد تکامل طبیعی را مطرح می‌سازد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از معاونت محترم و شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد که امکانات انجام این طرح را فراهم نمودند و همچنین، از همکاریهای صمیمانه دکتر محمدرضا محمودزاده ثاقب، دکتر حسن مقیدپور و دکتر رستم قربانی و نیز از خدمات ارزندهٔ تکنیکی سرکار خانم متجدد تشکر و قدردانی می‌نماید.

References

1. Scott KS, BALN DS: Intramembranous Bone Matrix is Osteonindnctive. Anat Rec 1994; 238; 23-30
2. Goetz W, Osmers R, Herken R: Localization of extracellular matrix components in the embryonic human notocord and axial mesenchyme. J Anat 1995; 186: 111-121
3. Hughes RC: Role of glycosylation in cell interactions with extracellular matrix. Biochem Society Transactions 1992; 20: 279-284
4. Arenas MI, Madrid JF, Bethencourt FR, Fraile B, Paniagua R: Lectin histochemistry of the human testis. Int J Androl 1998; 21: 332-342
5. Sharon N, Lis H: Carbohydrates in cell recognition. Scientific American 1993; 268: 74-81
6. Gotz W, Kasper M, Miosge N, Hughes RC: Detection and distribution of carbohydrate binding protein galectin 3 in human notochord intervertebral disc and chordoma. Differentiation 1997; 62(3): 149-157
7. Faraldi E, Falngi C, Fasulo S: Glycoconjugate expression changes during Rona dalmatina early development. Eur J Histochem 1996; 40(1): 67-74
8. Gotz W, Quondamatteo F: Glycoconjugate distribution in early human notochord and axial mesenchyme. Acta histochem 2001; 103(1): 21-35
9. Gullberg D, Ekbolm P: Extracellular matrix and it's receptor during development. Int J Der Biol 1995; 39: 845-854
10. Gotz W, Frisch D, Osmer R, Herken R: Lectin binding patterns in the Embryonic human paraxial mesenchyme. Anat Embryol 1993; 188(6): 579-585
11. Gotz W, Fischer G, Herken R: Lectin binding patterns in the embryonic and early human vertebral column. Anat Embryol 1991; 184(4): 345-353
12. Griffith CM, Hsieh T, Smith C, Sanders J: Glycoconjugate in normal and abnormal secondary neurulation. Teratol 1995; 52: 286-297
13. Miosge N, Gotz W, Quondamatteo F, Herken R: Comparison of lectin binding pattern in malformed and normal human embryos and fetuses. Teratol 1998; 57: 85-92
14. Quondamatteo F, Zieger J, Gotz W, Miosge N, Herken R: Extensive glycosylation changes revealed by lectin histochemistry in morphologically normal prenatal tissues of the mouse mutant nudulated (un/un). Anat Rec 2000; 258: 243-251
15. Milaire J: Lectin Binding sites in developing mouse limb buds. Anat Embryol 1991; 184: 479-488
16. Fazel AR, Schulte BA, Thompson RP, Spicer SS: Presence of a unique glycoconjugate on the surface of rat primordial germ cell during migration. Cell Differentiation 1987; 21: 199-211
17. Monsoro-Burq AH, Le Douarin N: Duality of molecular signaling involved in vertebral chondrogenesis. Current Top Dev Biol 2000; 48: 43-75
18- Moore KL, Persaud J: The Developing Human. 6th Ed WB Saunders Comp 1998; 412-414