تغییرات تکاملی گلیکوکانجوگیتها در سلولهای نورواپی‌تلیوم، نوتوکورد و مزانشیم مجاور آن در اوایل دوران مورفوژنز موش

محمدرضا نیکروش .Ph.D☆، مهدی جلالی .Ph.D☆، علیرضا فاضل .Ph.D☆

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

♦ آدرس مکاتبه: مشهد، کدپستی ۹۱۳۷۵، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکدهٔ پزشکی، گروه علوم تشریح

چکیده

* **هدف:** با توجه به نقش گلیکوکانجوگیتها در بسیاری از پدیده‌های تکاملی، نقش قندهای انتهایی فوکوز و GalNac در میانکنشهای نوتوکورد با لولهٔ عصبی، لولهٔ گوارش و مزانشیم مجاور مورد مطالعه قرار گرفت.

* **مواد و روشها:** با استفاده از روش لکتین هیستوشیمی و بکارگیری لکتینهای VVA-B4، DBA، WFA (برای GalNac)، UEA-1 و OFA (برای a-fucose)، برشهای پارافینی ۵ میکرونی تهیه شده از جنینهای روزهای دهم تا چهاردهم موش مورد مطالعه قرار گرفت و شدت واکنشهای لکتینی در نوتوکورد و بافتهای مجاور آن گزارش شد.

* **یافته‌ها:** نتایج حاصل از مطالعات هیستوشیمیایی مشخص نمود که نوتوکورد و مادهٔ خارج سلولی حد فاصل آن با صفحهٔ کفی لولهٔ عصبی در روز دهم، شدیداً به OFA واکنش می‌دهند. این واکنش در روز بعد ناپدید شده و با فاصله گرفتن نوتوکورد از لولهٔ عصبی واکنش به OFA در صفحهٔ کفی به شدت ظاهر شد. واکنش به VVA-B4 نیز از روز دهم در سطح شکمی نوتوکورد ظاهر شده و به سمت لولهٔ گوارش گسترش یافت اما به تدریج از شدت آن کاسته شد. لکتین WFA از روز دوازدهم به بعد در نوتوکورد و در برخی از سلولهای مزانشیمی اطراف آن واکنش نشان داد. لکتینهای UEA-1 و DBA در هیچ نمونه‌ای واکنش ندادند و با پیشرفت تکامل، واکنش کلیهٔ لکتینها نیز ضعیف شد.

* **نتیجه‌گیری:** نتایج حاصله نشان دهندهٔ آن است که گلیکوکانجوگیتهای با قندهای انتهایی فوکوز و یا GalNac با پیشرفت روند تکامل تغییر می‌نمایند که خود نشان دهندهٔ این است که احتمالاً از نظر ژنتیکی تنظیم می‌گردند. زمان توزیع و شدت واکنش لکتینها بیانگر این مسئله نیز است که فوکوز و GalNac تولید شده در نوتوکورد در میانکنشهای سلولی نقش دارند که نتیجهٔ آن تمایزات و تکامل بعدی بافتهای اطراف نوتوکورد می‌باشد.

گل واژگان: لکتین هیستوشیمی، میانکنشهای سلولی، نوتوکورد، لولهٔ عصبی

مقدمه

زایدهٔ نوتوکورد عبارت است از یک ساختار محوری با منشاء مزودرمی که در مراحل بسیار ابتدایی دورهٔ رویانی به وجود می‌آید. نوتوکورد علاوه بر اینکه به عنوان یک ساختمان پشتیبان برای ادامهٔ تکامل دیسک سه لایهٔ رویانی محسوب می‌شود، در بسیاری از طرحهای تکاملی اکتودرمی و مزودرمی نیز نقش بسیار حساسی را ایفا می نماید (۱، ۲، ۳). از جملهٔ این نقشهای کلیدی می‌توان به میانکنش آن با اکتودرم جهت شکل‌گیری لولهٔ عصبی، میانکنش با مزودرم (خصوصاً اسکلروتوم) جهت تشکیل ستون مهره‌ها و میانکنش با آندودرم جهت سایر تمایزات اشاره کرد (۴، ۵، ۶). اگرچه در خلال چند دههٔ گذشته تجربیات زیادی در ارتباط با نقش نوتوکورد و اثرات القایی آن بر بافتهای مختلف به دست آمده است اما هنوز تا به امروز ماهیت پیامهای شیمیایی که در میانکنشهای متفاوت نوتوکورد با بافتهای اطراف آن به وقوع می‌پیوندد به درستی روشن نشده است (۲). بنابراین با توجه به اینکه گلیکوکانجوگیتها در بسیاری از پدیده‌های تکاملی مانند میانکنشهای سلولی (Cell interactions) مهاجرت سلولها و همچنین تمایزات سلولی و نظایر آن (۲، ۷، ۸) نقش بسیار اساسی و کلیدی ایفا می‌نمایند و می‌توان اثرات القایی نوتوکورد را از این طریق مورد ارزیابی قرار داد (۳، ۴، ۵). از سوی دیگر در مورد نقش القایی نوتوکورد در تکامل لولهٔ عصبی، مهاجرت و تمایزات سلولهای مزانشیمی مشتق از سومایتها و بالاخره ارتباط این اثرات با رودهٔ اولیه تاکنون مطالعات چندانی صورت نگرفته است (۶). لذا با توجه به اهمیت موضوع ما بر آن شدیم تا با استفاده از برخی لکتینها که اختصاصاً برای شناسایی و ردیابی مولکول قندهای فوکوز و إن‌استیل گالاکتوزامین به کار می‌روند، این تغییرات تکاملی را مورد بررسی قرار دهیم. شایان ذکر است که دو مولکول اخیر در وضعیتهای مختلف پیوندهای شیمیایی قادرند به عنوان قند انتهایی زنجیره‌های قندی سطح سلولهای جنینی و همچنین مادهٔ خارج سلولی آنها حضور یابند. بر این اساس می‌توان مراحل تکاملی نوتوکورد و اثرات القایی آن را بر روی شکل‌گیری لولهٔ عصبی با توجه به نحوهٔ توزیع آنها مورد بررسی قرار داد. از آنجایی که مشخص شده است نقش نوتوکورد در انجام میانکنشهای سلولی، در مراحل اولیهٔ دوران مورفوژنز حائز اهمیت است و بعد از این دوره، نوتوکورد روند تحلیلی در پیش گرفته و بخش اعظم آن دچار مرگ سلولی می‌گردد (۱، ۹)، در این پژوهش که در آزمایشگاه پژوهشی میکرو آناتومی دانشکدهٔ پزشکی مشهد صورت گرفت سعی شده است تا دورهٔ رویانی موش از روزهای دهم تا چهاردهم مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفته و تغییرات نوتوکورد در رابطه با بافتهای مجاور بر اساس بروز و ظهور گلیکوکانجوگیتها بررسی شود.

مواد و روشها

برای این مطالعه ۹ سر موش ماده از نژاد balb/c با موشهای نر هم نژاد در قفسهای مخصوص جفت‌گیری در طول یک شب آمیزش داده شدند. با مشاهدهٔ واژینال پلاگ در صبح روز بعد زمان صفر بارداری برای هرکدام از آنان مشخص شد. سپس این حیوانات در شرایط یکسان و استاندارد خانهٔ حیوانات (پریود نور و تاریکی، آب و غذای کافی و حرارت مناسب) قرار گرفتند. در فاصلهٔ روزهای نهم تا یازدهم، مادران حامله تحت بیهوشی عمیق سزارین شده و شاخه‌های رحم در آنان جدا گردید و به سرم فیزیولوژی انتقال یافت. سپس جدار رحم و پرده‌های جنینی با سرعت و دقت شکافته شد و جنینهای به دست آمده به محلول نرمالین (محلول ۱۰درصد فرمالدئید در سرم فیزیولوژی) انتقال یافتند. پس از گذشت ۲۴ ساعت جنینهای مربوط به هر یک از روزهای به دست آمده به صورت عرضی به چند برش تقسیم شدند و طبق روشهای معمول بافت شناسی، پس از آبگیری و شفاف کردن (باگزیلن)، قطعات به دست آمده به گونه‌ای در قالبهای پارافینی قرار گرفتند که بتوان از آنان برشهای عرضی میکروسکوپی تهیه نمود و سپس از تک تک نمونه‌های مورد نظر با استفاده از میکروتوم روتاری آزمایشگاه هیستوتکنیک برشهای سریال با ضخامت ۵ میکرون تهیه گردید.

* مطالعات لکتین هیستوشیمیایی

لکتینهای مورد نظر (به اسامی و مشخصات جدول ۱) که تماماً با تهیه HRP کانجوگیت شده و در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند، با واسطهٔ هلال احمر جمهوری اسلامی ایران از شرکت Sigma خریداری شد. لکتین OFA نیز از راه ارتباط شخصی با آزمایشگاه Dr. Kochibe (دانشگاه گابا، ژاپن) تهیه شده بود.

جدول ۱: مشخصات لکتینهایی که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته‌اند

Lectin tested	Abbreviation	Carbohydrate-binding specificity
Aleuria aurantia (orangefungus)	OFA	α-L-fucose
Ulex europeus(gorse seed)	UEA-I	α-L-fucose
Vicia villosa(hairy winter watch)	VVA-B4	GalNac-Ser.(Ther)
Dolichos biflorus (horse gram)	DBA	α-D.GalNac.
Wistaria floribunda	WFA	D.GalNac

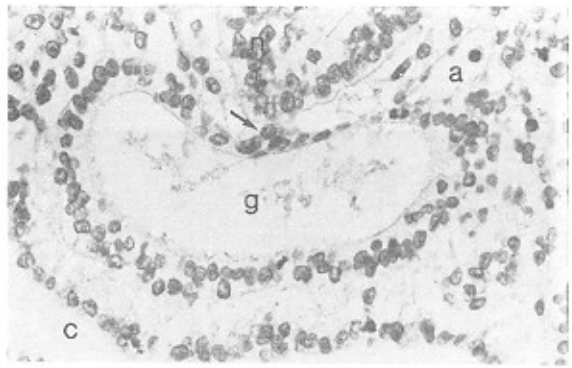
* روش کار

برای این منظور، ابتدا کلیهٔ لکتینها با بافر PBS رقیق شدند به طوری که در هر میلی‌لیتر آن ۱۰ میکروگرم مادهٔ مؤثر قرار داشت. سپس برشهای ۵ میکرونی برای مدت ۲ ساعت در مجاورت لکتین رقیق شده قرار گرفتند. پس از این مرحله، نمونه‌های بافتی با بافر شستشو داده شدند و بعد از آن در محلول DAB (Di Amino Benzidine) قرار گرفتند. (به ازای هر ۱۰ میلی‌لیتر محلول DAB مقدار ۲۰ میکرولیتر آب اکسیژنه اضافه گردید.) در مرحلهٔ بعد کلیهٔ مقاطع با رنگ آلسین بلو در PH=۲/۵ جهت نشان دادن زمینهٔ بافتی رنگ آمیزی شدند و در نتیجهٔ واکنش هر لکتین با قند انتهایی مربوطه در زنجیره‌های گلیکوکانژوگیتی به رنگ قهوه‌ای مشاهده شد. در این حالت سایر سلولها به علت واکنش با آلسین بلو زمینهٔ برشها را به رنگ آبی در آوردند. بعد از کامل شدن مراحل رنگ آمیزی، کلیهٔ برشهای به دست آمده توسط نویسندگان مقاله با استفاده از میکروسکوپ چند نفره مورد مطالعهٔ دقیق قرار گرفت و از مناطق مورد نظر در هریک از برشها با استفاده از میکروسکوپ Olympus AH-2 شکل برداری شد.

یافته‌ها

بررسیهای لکتین هیستوشیمیایی برشهای عرضی ۵ میکرونی از جنینهای روزهای دهم تا چهاردهم موارد ذیل را مشخص نمود:

- لکتینهای UEA-I و DBA در هیچ یک از مراحل تکاملی نسبت به سلولهای تشکیل دهندهٔ اپی‌تلیوم عصبی، نوتوکورد و بافتهای مجاور آن واکنشی نشان ندادند اما نحوهٔ آرایش سلولهاکه با آلسین بلو هم رنگ زمینه شده بودند مجاورت بسیار نزدیک نوتوکورد را با لولهٔ عصبی و لولهٔ گوارش اولیه به خوبی نشان دادند. در این وضعیت (شکل ۱)، هنوز غشای پایهٔ نوتوکورد مشخص نیست.



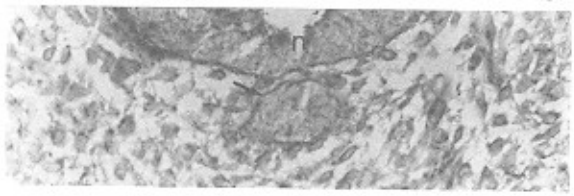
شکل ۱: مقطع عرضی جنین موش در روز دهم که در مجاورت DBA قرار گرفته است. در این شکل نوروایی‌تلیوم (n)، نوتوکورد (فلش) و رودهٔ اولیه (g) هیچ واکنشی نسبت به این لکتین نشان نداده‌اند. در این حالت نوتوکورد در حد فاصل لولهٔ عصبی و رودهٔ اولیه قرار گرفته است. در این شکل سلوم داخل جنینی با حرف c مشخص گردیده است

شکل ۲: مقطع عرضی جنین موش در روز دهم که با لکتین VVA-B4 مجاورت یافته است. در این نما نوتوکورد و سطح وسیعی از سلولهای آندودرمی ناحیهٔ لومبنال لولهٔ گوارش اولیه شدیداً با این لکتین واکنش داده‌اند. همچنین واکنش سلولهای نوتوکورد در سمت لولهٔ گوارش اولیه از ناحیهٔ اپیتلیوم عصبی (n) شدیدتر است. در این شکل آئورت پشتی (a)، سلوم داخل جنینی (c) و با سر فلش به پردهٔ آمنیون اشاره شده است.

- لکتین VVA-B4 در روزهای دهم تا چهاردهم، از نظر شدت، واکنشهای مختلفی با بافتهای فوق‌الذکر نشان داد که این واکنشها در محدودهٔ روزهای دهم تا یازدهم بیشتر در نوتوکورد دیده شد و سپس به سمت لولهٔ گوارش اولیه گسترش یافت. در طول این تغییرات در حد فاصل لولهٔ عصبی و نوتوکورد واکنشی انجام نگرفت و فقط قسمتهایی از مادهٔ خارج سلولی لولهٔ عصبی به صورت خفیف با این لکتین واکنش داد. موضوع دیگر اینکه واکنش به VVA-B4 تا روز دوازدهم به کلی از میان رفت اما دوباره از روز چهاردهم، زمانی که سلولهای مزانشیمی اطراف نوتوکورد به حالت متراکم در آمده بودند، واکنشهایی در مناطق گلژی سلولهای مزانشیمی ناحیهٔ ونترال نوتوکورد بروز نمود (شکل ۸).

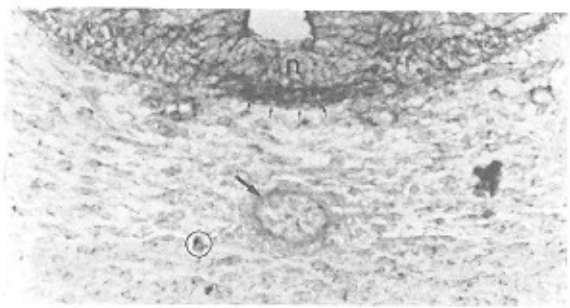
- لکتین WFA نیز از روز یازدهم تا روز چهاردهم نسبت به سلولهای نوتوکوردی و سلولهای مزانشیمی مجاور آن واکنش شدیدی نشان داد (شکل ٦).

- لکتین OFA از روز دهم در اطراف نوتوکورد و خصوصاً در حد فاصل نوتوکورد و لولهٔ عصبی در حال تکامل، واکنش شدیدی بروز داد (شکل ۳).



شکل ۳: مقطع عرضی نوتوکورد و لولهٔ عصبی جنین موش در روز یازدهم که در مجاورت لکتین OFA قرار گرفته است. در این حالت واکنش در حد فاصل لولهٔ عصبی و نوتوکورد شدید است. همچنین بخشهایی از لولهٔ عصبی و برخی از سلولهای مزانشیمی اطراف نوتوکورد نیز به OFA واکنش نشان داده‌اند. علاوه بر این واکنش نسبتاً شدیدی بین نوتوکورد و سلولهای مزانشیمی قابل مشاهده است.

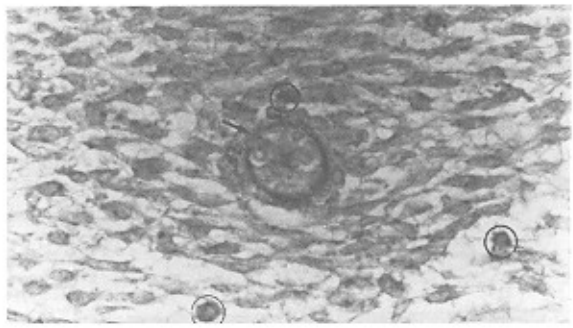
با فاصله گرفتن نوتوکورد از لولهٔ عصبی و همزمان با پر شدن اطراف نوتوکورد توسط سلولهای مزانشیمی، صفحهٔ کفی (Floor plate) نیز به شدت با این لکتین واکنش نشان داد (فلشها در شکل ۴).



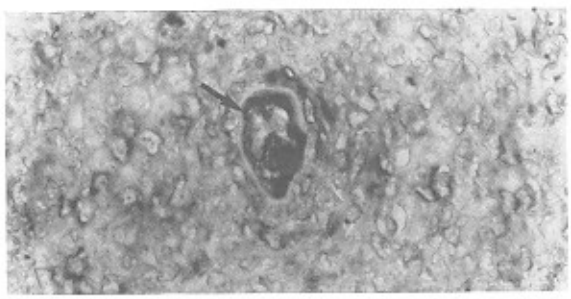
شکل ۴: مقطع عرضی نوتوکورد و قسمتی از لولهٔ عصبی جنین موش در روز یازدهم جنینی که در مجاورت لکتین OFA قرار گرفته است. در این مرحله صفحهٔ کفی (Floor plate) لولهٔ عصبی (فلش کوچک) شدیداً به این لکتین واکنش نشان داده است. نوتوکورد از لولهٔ عصبی فاصله گرفته و اطراف آن را سلولهای مزانشیمی پر کرده‌اند. علاوه بر این واکنش خفیفی بین سلولهای مزانشیمی و نوتوکورد خصوصاً در بخش شکمی و بخشهای طرفی قابل مشاهده است. همچنین بخشهایی از لولهٔ عصبی و برخی از سلولهای مزانشیمی اطراف نوتوکورد نیز به OFA واکنش نشان داده‌اند. علاوه بر این واکنش نسبتاً شدیدی بین نوتوکورد و سلولهای مزانشیمی قابل مشاهده است، و بسیاری از سلولهای مزانشیمی نیز در مناطق گلژی خود نسبت به OFA واکنش نشان داده‌اند که در تعدادی از سلولها (نابره) شدیدتر است.

علاوه بر این در لابلای سلولهای مزانشیمی سلولهای متعددی با OFA واکنش دادندکه به تدریج از شدت واکنش کاسته شد، به طوری که در روز دوازدهم فقط تعداد اندکی از سلولهای مزانشیمی به OFA

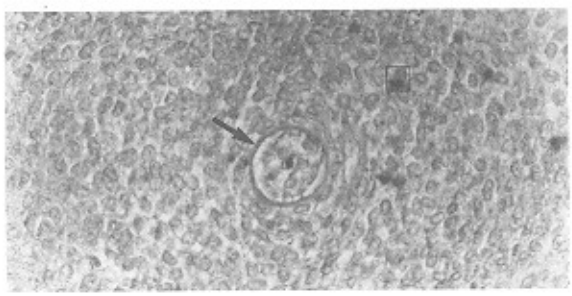
واکنش دادند و پس از آن واکنشی دیده نشد.



شکل ۵: مقطع عرضی نوتوکورد در دوازدهم جنینی که در مجاورت لکتین OFA قرار گرفته است. در این مرحله واکنش بین نوتوکورد و سلولهای مزانشیمی کمتر شده است اما در عوض تعدادی از سلولها (دایره) به OFA واکنش شدیدی نشان داده اند. علاوه بر این همان طور که در شکل دیده می‌شود اطراف نوتوکورد به آلسین بلو شدیداً واکنش داده است.

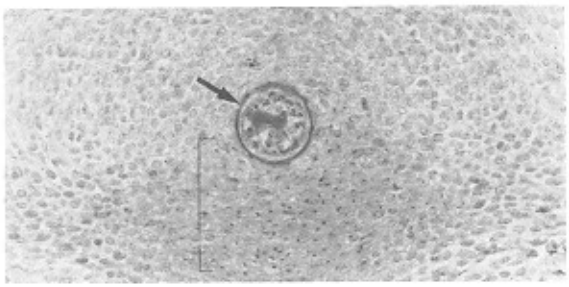


شکل ۶: مقطع عرضی نوتوکورد و مزانشیم اطراف آن در روز دوازدهم جنینی که در مجاورت لکتین WFA قرار گرفته است. در این حالت سلولهای داخلی نوتوکورد و اطراف آن (فلش) نسبت به این لکتین واکنش شدیدی نشان داده است. واکنش غشای پایهٔ بخش خارجی آن نیز با آلسین بلو مشخص گردیده است. همچنین برخی از سلولهای مزانشیمی که در اطراف نوتوکورد تجمع یافته‌اند در مناطق گلژی و سطح سلولی مجاور نیز واکنش داده‌اند.



شکل ۷: مقطع عرضی نوتوکورد و مزانشیم اطراف آن در روز سیزدهم جنینی که در مجاورت لکتین OFA قرار گرفته است. واکنش این لکتین به صورت خفیف بیشتر در مادهٔ خارج سلولی سلولهای مزانشیمی است که به صورت دایره وار در اطراف نوتوکورد آرایش یافته‌اند. در لایه‌ای این سلولها برخی سلولهای نسبتاً درشت‌تر وجود دارند که در مناطق گلژی مربوط به خود و سطح سلولی مجاور واکنش داده‌اند. در این مرحله و با این لکتین واکنش سلولهای نوتوکوردی بسیار ضعیف است و غشای پایهٔ آنها با آلسین بلو واکنش شدیدی نشان داده است.

در بررسی کلی، پی‌گیری روند این تغییرات مشخص نمود که نوتوکورد با فاصله گرفتن تدریجی از لولهٔ عصبی به تدریج کوچکتر شده و بر تراکم سلولهای مزانشیمی اطراف آن افزوده می‌شود به گونه‌ای که در مقطع عرضی کاملاً دایره‌ای شکل به نظر می رسد. غشای پایهٔ سلولهای حاشیهٔ نوتوکورد که قبلاً مشخص نبود از روز یازدهم جنینی شروع به ظاهر شدن نمود و با آلسین بلو به خوبی واکنش نشان داد (شکلهای ۳ تا ۸). از روز دوازدهم به بعد نوتوکورد روند تحلیلی در پیش گرفته و بخش اعظم آن تا روز چهاردهم دچار مرگ سلولی شد. از این مرحله به بعد نوتوکورد ساختار سلولی خود را از دست داده و به هستهٔ دیسکهای بین مهره‌ای (Nucleus pulposus) تبدیل می‌گردد.



شکل ۸: مقطع عرضی نوتوکورد در روز چهاردهم جنینی که در مجاورت لکتین VVA-B4 واقع شده است. در این حالت سلولهای مزانشیمی اطراف نوتوکورد با آرایشی دایره وار متراکمتر شده و واکنش سلولها به این لکتین در منطقهٔ ونترال (علامت مشخصه) در مناطق گلژی مشاهده می‌گردد. سلولهای نوتوکوردی نیز واکنش خفیفی نسبت به این لکتین نشان داده‌اند.

بحث

یکی از اساسی‌ترین پدیده‌هایی که در تمام طول زندگی داخل رحمی خصوصاً در دوران مورفوژنز (دوران رویانی Embryonic period) به وقوع می‌پیوندد ظهور مولکولهایی است که در زمانهای نسبتاً کوتاهی ظاهر شده و پدیده‌های مختلف تکاملی نظیر تمایز سلولی، میانکنشهای سلولی، مهاجرتهای سلولی و نظایر آن را باعث می‌شوند. این مولکولها که به صورت پروتئین، گلیکوپروتئین، پپتید و غیره می‌باشند در مراحل خاصی در سطح بعضی از سلولها ظاهر شده و یا از آنها ترشح می‌گردند و پس از انجام وظیفهٔ تکاملی خود توسط سایر مولکولها نظیر اسید سیالیک ماسک شده و یا اینکه توسط برخی از مواد شیمیایی مانند آنزیمها تجزیه می‌شوند و کاملاً از بین می‌روند. میانکنشهای سلولی یکی از همین موارد است که مراحل بسیار کلیدی را برای تمایزات بعدی در سلولهای جنینی به وجود می‌آورند (۱۰، ۱۱). از جملهٔ این موارد نقش زایدهٔ نوتوکورد در میانکنش با سلولهای اکتودرمی برای القاء صفحهٔ عصبی و ادامهٔ این میانکنش برای تمایزات بعدی است. نوتوکورد در مراحل دیگری نیز با آندودرم میانکنش دارد و قسمتهایی از آن را برای ایجاد برخی ساختمانهای تشریحی همانند پانکراس القاء می‌کند (۶، ۱۲). نوتوکورد در طی دوران مورفوژنز نقش دیگری نیز ایفا می‌نماید که عبارت است از آرایش دادن

به سلولهای مزانشیمی منشعب از سومایتها (سلولهای اسکلروتوم) جهت تجمع و تبدیل تدریجی آنها به غضروف پیش ساز مهره‌ها (۴، ۹).

گلیکوکانجوگینهایی که در سطح سلولهای جنینی و یا در مادهٔ خارج سلولی قرار می‌گیرند، قند انتهایی آنها نقش بسیار کلیدی در انواع موارد تکاملی فوق الذکر دارند (۴، ۷، ۸، ۱۳، ۱۴). براساس مطالعات لکتین هیستو شیمیایی، ماکرومولکولهایی که دارای زنجیره‌های قندی هستند در سلولهای جنینی متفاوت بوده و با پیشرفت مراحل جنینی نیز ممکن است تغییر یابند که این پدیده بستگی به وضعیت و سیر تکاملی آن دسته از سلولهای خاص است (۱، ۲، ۳). اما با توجه به اهمیت موضوع، با مراجعه به سایر مطالعاتی که در این زمینه‌ها به ثبت رسیده است مشخص می شود که مطالعهٔ این گلیکوکانجوگینها در ارتباط با میانکنشهای نوتوکورد بسیار اندک است (۸، ۱۳، ۱۴). بنابراین، مطالعهٔ ما بر اساس توزیع برخی از قندهای انتهایی و به طور عمده بر فوکوز و ان‌استیل گالاکتوزامین در اوایل دوران رویانی طی فعالیتهای اولیهٔ نوتوکورد متمرکز شده است. نتایج بیانگر آن است که لکتینهای به کار گرفته شده در اوایل شکل‌گیری لولهٔ عصبی و لولهٔ گوارش و ارتباط آنها با نوتوکورد واکنشهای مختلفی نشان دادند.

هر چند دو لکتین OFA و UEA-1 جهت اتصال به قند انتهایی a-L-fucose هستند اما هر کدام به طور مستقل و بسته به نوع قند ماقبل آخر (Penultimate sugar) عملکرد متفاوتی دارند. OFA در زنجیره‌های قندی اختصاصاً به قندهای انتهایی فوکوز متصل می‌شود اما قند ماقبل آخر فوکوز در اتصال به فوکوز اهمیتی ندارد (۷، ۱۵، ۱۶). مطالعات متفاوت نشان داده‌اند که OFA اختصاصاً گلیکوپروتئینهایی را که در انتقال سریع اکسونی کاربرد دارند و به صورت اتصال۶ -a1به قند مجاور می‌باشد بخوبی مشخص می‌نماید (۱۵، ۱۷). در ناحیهٔ بافت مغزی این لکتین اختصاصاً فوکوزی را مشخص می کند که به صورت ۳ -1 به اِن استیل گالاکتوزامین اتصال دارد (۷، ۱۶، ۱۸). اما UEA-1 برای فوکوزی اختصاصی است اتصال۲ -a1 را با قند ما قبل آخر گالاکتوز برقرار می‌نماید. در این مطالعه UEA-1به بافتهای جنینی مورد مطالعه مطلقاً واکنشی نشان نداد اما OFA خصوصاً در مناطقی که بین نوتوکورد و لولهٔ عصبی و همین طور صفحهٔ کفی لولهٔ عصبی قرار دارد واکنش بسیار شدیدی از خود بروز داد. این موضوع بیانگر این مطلب است که مولکولی که در میانکنش بین نوتوکورد و سلولهای نوروایپی‌تلیال سطح ونترال لولهٔ عصبی شرکت می‌کند گلیکوپروتئینی است که در انتهای زنجیرهٔ قندی آنها فوکوز قرار دارد. پس از انجام این میانکنش و فاصله گرفتن نوتوکورد از بافت عصبی، از روز یازدهم رویانی صفحهٔ کفی (Floor plate) شدیداً به OFA واکنش نشان داد. این واکنش در روز قبل از آن یعنی در روز دهم و در مرحله‌ای که میانکنش بین نوتوکورد و سلولهای عصبی برقرار بود وجود نداشت. این نتایج که برای اولین بار با این روش مشخص می‌شوند با دیگر مطالعاتی که با سایر روشها در ارتباط با شکل‌گیری لولهٔ عصبی و تمایز نورونهای حرکتی انجام پذیرفته است تطبیق می‌نماید (۴). در طی دههٔ گذشته، خصوصاً چند سال اخیر ثابت شده است که پروتئین Sonic hedgehog (Shh) در بسیاری از پدیده‌های تکاملی خصوصاً در اوایل دوران رویانی نقش اساسی دارد. در ارتباط با القاء لولهٔ عصبی این مطالعات به خوبی مشخص نموده‌اند که در اوایل دوران رویانی نوتوکورد مولکول Shh را تولید می‌کند و قسمت شکمی لولهٔ عصبی که صفحهٔ کفی (Floor plate) نامیده می‌شود را القاء می‌نماید (۱۹). متعاقباً صفحهٔ کفی نیز شروع به تولید Shh نموده و به نوبهٔ خود سلولهای متعددی را در صفحهٔ قاعده‌ای (Basal plate) لولهٔ عصبی القاء می‌کند که نورونهای حرکتی اکثراً از این سلولها تمایز می‌یابند (۴، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳). مولکول Shh احتمالاً دارای زنجیرهٔ قندی واحد فوکوز است که آن را می‌توان اختصاصاً با OFA نیز مشخص نمود (۴). بررسی دو جانبهٔ لکتین هیستوشیمی با OFA و ایمونوهیستوشیمی با مونوکلونال آنتی بادی برای Shh به اثبات این نظریه کمک خواهد نمود.

در مطالعات ما نوتوکورد و هیچکدام از بافتهای مجاور آن به DBA واکنش نشان نداد. لکتینهای DBA، VVA-B4 و WFA نیز واکنش قابل توجهی از خود نشان دادند. این لکتینها تماماً و به طور اختصاصی به قند انتهایی اِن استیل گالاکتوزامین (Gal Nac) در زنجیره‌های قندی گلیکوپروتئینها اتصال می‌یابند (۱۰، ۲۴). با وجود این واقعیت در مطالعات متعدد مشخص شده است که بستگی به نوع اتصال و همین طور نوع قند ماقبل آخر مولکول اِن استیل گالاکتوزامین واکنشهای لکتینی نیز متفاوت است. برای مثال به منظور مشخص نمودن اِن استیل گالاکتوزامینی که بر سطح سلولهای جنسی اولیه (Primordial germ cells) در حین مهاجرت به سمت گنادهای مربوط به رت وجود دارد، فقط لکتین DBA اختصاصاً آن را مشخص می‌نماید نه سایر لکتینهای مشابه برای مولکول Gal Nac. به همین علت است که این لکتین به صورت یک مارکر قوی برای مشخص نمودن این سلولها مورد استفاده قرار گرفته است (۸). VVA-B4 اختصاصاً به مولکول GalNac متصل شده به سرین (Serine) و یا ترونین (Threonine) اتصال می‌یابد (۲۴). این لکتین (ایزومر لکتین دیگری به نام VVA) در روز دهم واکنش شدیدی نسبت به زایدهٔ نوتوکورد جنین موش از خود نشان داد. این واکنش در تمام سلولهای نوتوکوردی مشاهده شد و نکتهٔ جالب اینکه در سطح ونترال نوتوکورد که مجاور رودهٔ اولیه است این واکنش شدیدتر بود. علاوه بر این آندوتلیوم روده خصوصاً در ناحیهٔ خلفی آن نیز واکنش شدیدی به این لکتین داد. این مورد جالب نشان دهندهٔ دو واقعیت است. اولاً همان طور که ذکر شد نوتوکورد از قسمت خلفی خود با مولکول حاوی فوکوز، صفحهٔ کفی را القاء می‌نماید. ثانیاً از ناحیهٔ شکمی خود با مولکول حاوی Gal Nac-Ser. (Ther.) به عنوان قند انتهایی، روده را القاء می‌نماید. در سایر مطالعات نیز تأثیر نوتوکورد بر روی روده و ایجاد جوانهٔ پانکراس پیشنهاد شده است (۶، ۱۲).

مطالعات انجام گرفته نشان می‌دهند که فاصله گرفتن نوتوکورد از رودهٔ اولیه و تجمع سلولهای مزانشیمی که از ناحیهٔ سومایتها به سمت نوتوکورد مهاجرت می‌نمایند به دنبال اثرات القایی نوتوکورد به وقوع می‌پیوندد. در این حالت میزان واکنش VVA-B4 کاهش می‌یابد اما از روز چهاردهم این سلولهای مزانشیمی در جنین موش تراکم زیادی پیدا

نموده و در اطراف نوتوکورد حلقه وار تجمع می‌یابند. سپس بار دیگر در میان سلولهای مزانشیمی واکنشهایی از سطح ونترال شروع به ظاهر شدن می‌نماید که احتمالاً مربوط به تمایزات سلولی در جهت شکل دادن به پیش ساز غضروفی در اطراف نوتوکورد است.

واکنش متفاوت WFA نیز قابل توجه است. این لکتین در نوتوکورد واکنش شدیدی از خود نشان داد، به علاوه مزانشیم نزدیک به نوتوکورد نیز با آن واکنش داد. به رغم آن مولکول حاوی GalNac که با WFA واکنش می‌دهد احتمالاً برای جذب سلولهای مزانشیمی به سمت نوتوکورد لازم است و یا شاید در سرنوشت تحلیل روندگی نوتوکورد مؤثر باشد که این موضوع هنوز به اثبات نرسیده است.

در رابطه با واکنش بعضی از سلولها نسبت به OFA که در ابتدای بحث به آن اشاره شد باید گفت که عمل و ماهیت این سلولها که در بین سلولهای مزانشیمی قرار دارند، هنوز برای ما روشن نیست. بر اساس برخی مطالعات در اوایل حرکت سلولهای نورال کرست، OFA به خوبی با آنها واکنش می‌دهد و این لکتین مارکر خوبی برای این سلولها محسوب می‌شود (۷). بنابراین شاید این سلولها نیز با منشاء نورال کرست باشند که به جهت برخی از میانکنشها با سایر سلولهای مزانشیمی (با منشاء سومایتی) در بین سایر سلولها مشاهده می‌گردند. یا اینکه ممکن است سلولهایی در حال عبور و حاوی پیامی برای تشکیل ساختار تشریحی خاص باشند. این نظریه نیز بایستی با مطالعات ایمونوهیستوشیمی و بکارگیری مونوکلونال آنتی بادی اختصاصی برای سلولهای نورال کرست به اثبات برسد. همان گونه که در نتایج مشخص شده است ماده خارج سلولی مزانشیم اطراف نوتوکورد نیز واکنش روشنی به OFA دارد که امیدواریم ادامهٔ مطالعات نقش اساسی آن و همین طور پاسخ به سؤالات فوق را مشخص نماید.

تقدیر و تشکر

نتایج حاصل از این مطالعه مربوط به بخشی از یافته‌های طرح پژوهشی مصوب شمارهٔ ۵/۴۵۳۸ معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد است. لذا بدینوسیله از آن معاونت محترم و شورای محترم پژوهشی دانشگاه و خدمات تکنیکی سرکار خانم متجدد تشکر و قدر دانی می‌شود.

References

1. Furumoto TA, Miura N, Akasaka T, Mizutani-Koseki Y, Sudo H, Fukuda K, Maekawa M, Yuasa S, Fu Y, Moriya H, Taniguchi M, Imai K, Dahl E, Balling R, Pavlova M, Gossler A, Koseki H: Notochord-dependent expression of MFH1 and PAX1 cooperates to maintain the proliferation of sclerotome cells during the vertebral column development. Dev Biol 1999; 210(1): 15-29

2. Gotz W, Quondamatteo F: Glycoconjugate distribution in early human notochord and axial mesenchyme. Acta Histochem 2001; 103(1): 21-35

3. Teillet M, Lapointe F, LeDuarin N: The relationships between notochord and floor plate in vertebrate development revised. Proc Nati Acad Sci USA 1998; 95: 11733-11738

4. Liem K, Jessell T, Briscoe J: Regulation of the neural pattering activity of sonic hedgehog by secreted BMP inhibitors experessed by notochord and somites. Dev 2000; 127(22): 4855-4866

5. Roelink H, Porter J, Chiang C, Tanabe Y, Chang D, Beachy P, Jessell T: Floor plate and motor neuron induction by different concentration of the amino-terminal clevage product of sonic hedgehog outoproteolysis. Cell 1995; 81: 445-455

6. Wells JM, Melton DA: Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. Develop 2000; 127(8): 1563-1572

7. Fazel A, Sumida H, Schulte B, Thompson R: Lectin histochemistery of the embryonic heart: Fucoss-specific lectin binding sites in developing rats and chicks. Am J Anat 1989; 184: 76-84

8. Fazel A, Schulte B, Thompson R, Spicer S: Presence of unique glycoconjugates on the surface of rat primordial germ cells during migration. Cell Diff 1987; 21: 199-211

9. Gotz W, Kasper M, Miosge N, Hughes R: Detection and disttribution of the carbohydrate binding protein galectin-3 in human notochord, interverteberal disc and chordoma. Differentiation 1997; 67(3): 149-157

10. Schulte B, Spicer S: Light microscopic histochemical detection of terminal galactose and N-acetylgalactoseamine residus in rodent complex carbohydrates using galactose oxidase schiff sequence and lectin-horsradish peroxidase conjugate. J.Histochem. Cytochem 1983; 31(1): 19-24

11. Fitch J, Mentzer A, Mayne R, Lensenmayer T: Independent deposition of collagen types II and IX at epithelial-mesenchmal interfacees. Develop 1989; 105(1): 85-95

12. Cleaver O, Krieg P: Notochord patterning of the endoderm. Developmental Biology. 2001, 234: 1-12

13. Griffin C, Hsieh T, Smith C, Sanders E: Glycoconjugate in normal and abnormal secondary neurolation. Teratol 1995; 52(5): 286-297

14. Griffith C, Wiley M: Distribution of cell surface glycoconjugates during secondary neurolation in chich embryo. Anat Rec 1990; 226(1): 81-90

15. Kochibe N: Furukama: Purification and properties of a novel fucose-specific hemagglutinin of Aleuria aurantia. Biochem 1980; 19: 2841-2846
16. Allen H, Johnson E: Asimple procedure for the isolation of L-fucose-binding lectins from ulex europaeus and tetragonolobus. Carbohydrate Res. 1977; 58: 253-265
17. Ohlson C, Nillson E: Karlsson J: Uptake and anterograde anoval transport of Aleuria lectin in retinal ganglion cell of the rabbit. J Neurochem 1985; 44: 1785-1790
18. Bemett G, Leblond C, Haddad A: Migration of glycoprotein from the Golgi apparatus to the surface of the various cell types and shown by radioautography after labeled fucose intection into rats. J Cell Biol 1974; 60: 258-284
19. Nikravesh MR, Fazel A, Jalali M: From mesenchyme to cartilage: Lectin histochemical studies of ventro-medial mesenchyme to the developing neural tube during embryonic period. Iranian Jurnal of Bascic Medical Sciences. Submitted for publication
20. Clwang P, Kornberg T: On the range of hedgehog signaling. Current opinion in Genetics and Develop 2000; 10: 515-522
21. Ericson J, Morton S, Kovakami A, Roelink H, Jessell M: Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling requaired for the specification of motorneuron identity Cell 1995; 87: 661-673
22. Placzeh M, Dodd J, Jessell T: The case for floor plate induction by the notochord. Current opinion in neurobiol 2000; 10: 15-22
23. Roelink H, Augsburger A, Heemskerk J, Korzh V: Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homologof hedgehog expressed by the notochord Cell 1994; 76:761-775
24. Torres B, McCrimb D: Glycolipid lectin interactions reactivity of lectins with Helix Pomatia, Wisteria floribunda and dolichos biflorus with Glycolipids containing N-acetylgalactosamine. Arch Biochem Biophys 1988; 262: 1-12