

# تمایزات مولکولی سطح سلولها در طی مورفوژنز آدنوهیپوفیز رت با استفاده از روش لکتین هیستوشیمیایی

علیرضا ابراهیمزاده<sup>§</sup> M.Sc.<sup>\*</sup>، محمدرضا نیکروش<sup>§</sup> Ph.D.<sup>\*</sup>، فاطمه کبری گنجی<sup>§</sup> Ph.D.<sup>\*</sup>

علیرضا فاضل<sup>§</sup> Ph.D.<sup>\*</sup>

<sup>§</sup> دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

<sup>§</sup> آدرس مکاتبه: مشهد، کدپستی ۹۱۳۲۵، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

## چکیده

دریافت مقاله: ۸۲/۴/۲۴، پذیرش مقاله: ۸۲/۹/۱۵

**هدف:** بررسی توزیع گلیکوکانژوگیتهای سطح سلولها در طی مراحل تمایز جنینی آدنوهیپوفیز

**مواد و روشها:** در این پژوهش با استفاده از روشهای لکتین هیستوشیمیایی به بررسی انواع قندهای انتهایی و تغییرات آنها در طی تکامل آدنوهیپوفیز پرداخته شد، برای این منظور ۹۰ جنین رت از روز دهم تا روز بیستم حاملگی مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌ها پس از ثبوت در نرمالین و پاساژ آنها با بکارگیری لکتین‌های WGA، PNA، GSA1-B<sub>4</sub> که با HRP نشان دار شده بودند و به ترتیب برای قندهای انتهایی اسیدسیالیکن، N-acetylgalactosamine و  $\alpha$ -D-Galactos اختصاصی هستند به مطالعه قندهای انتهایی و تغییرات آنها پرداخته شد. سپس شدت رنگ آمیزی مقاطع میکروسکوپی برای هر لکتین در روزهای مختلف جنینی به روش Gong به صورت مجزا رتبه بندی شدند و توسط آزمون آماری غیر پارامتری کروسکال - والیس با یکدیگر مقایسه گردیدند.

**یافته‌ها:** نتایج حاصل از این مطالعات هیستوشیمیایی مشخص نمود که لکتین WGA از روز سیزدهم جنینی با گروهی از سلولهای لوب قدامی هیپوفیز واکنش نشان داد و با ادامه روند تکامل شدت واکنش با لکتین مذکور در این گروه از سلولها افزایش یافت ( $P < 0.05$ ). واکنش لکتین PNA از روز سیزدهم تکامل جنینی شروع شد و در روز چهاردهم بر شدت واکنش افزوده گردید ( $P < 0.05$ ) سپس تا روز هفدهم شدت واکنش تغییری را نشان نداد. و سپس به تدریج از شدت واکنش کاسته شد ( $P < 0.05$ ). به طوری که در روز بیستم هیچگونه واکنشی ملاحظه نگردید. و لکتین GAB1-B<sub>4</sub> در هیچ یک از مراحل تکاملی مورد بررسی واکنش قابل ملاحظه‌ای را بروز نداد.

**نتیجه‌گیری:** ظهور و تغییرات گلیکوکانژوگیتهای سطح سلولها با قندهای انتهایی اسید سیالیک و N-acetylgalactosamine ممکن است نقش کلیدی در میانکنش‌های یافتی داشته باشد که منجر به تغییرات تکاملی برخی از ارگانهای جنینی از جمله آدنوهیپوفیز می‌گردد.

**کل واژگان:** آدنوهیپوفیز، تکامل، گلیکوکانژوگیت، لکتین، رت (Rat)

## مقدمه

درک و فوایع مولکولی که موجب می‌شود از یک سلول اولیه ساختمانهای پیچیده ارگانیها با انواع سلولهای مختلف ایجاد گردد به عنوان نقطه عطفی در بیولوژی تکوینی شناخته شده است (۱).

دوران مورفوژنز با پدیده‌هایی مانند القاء (Induction) و تمایز گام به گام گروههای سلولی (Determination) به تمایزات و تغییرات گوناگون و پیچیده‌ای می‌انجامد که سبب می‌شود تا سلولهای جنینی با نظم بسیار دقیقی و هدایت شده مسیر تکامل جنینی خود را طی نمایند (۲). هر چند اطلاعات مربوط به این تغییرات تکاملی و نهایتاً سرنوشت سلولها در ژنوم آن نهفته است اما مشخص است که میانکشیهای سلولی (Cell interactions) در بروز به موقع آنها نقش عمده‌ای ایفا می‌نماید (۲، ۳). قدر مسلم آنکه این میانکشیها که با ماده خارج سلولی (Extracellular matrix) و یا سلولهای دیگر بوقوع می‌پیوندد (۴، ۵) بر تکامل همه ارگانهای جنینی و منجمله تکامل هیپوفیز اثر می‌گذارد. در این راستا با توجه به اینکه بخشهای مختلف هیپوفیز، از یک سو متشابه جنینی متفاوتی دارد و از سوی دیگر از نظر تنوع سلولی گسترده‌گی نشان می‌دهد می‌توان چنین نتیجه گرفت که تغییرات تکاملی هیپوفیز در بخشهای مختلف آن الگویی مناسب برای درک و فوایع مولکولی محسوب می‌شود (۱). موضوع دیگر اینکه با بررسی جنبه‌های مولکولی پروسه‌های تکاملی این واقعیت مشخص می‌شود که مولکولهای متعدد و متفاوتی به انجام این گونه فرایندها کمک می‌کنند و تکامل جنینی را تحت تاثیر قرار می‌دهند که گلیکوکالیزوگنیها یک دسته از آنها به حساب می‌آیند (۵، ۶). اینگونه ترکیب که در سطح غشای سلولها و ماتریکس خارج سلولی به فراوانی یافت می‌شوند بعنوان شاخص مناسبی در شناسایی نوع سلولها، مهاجرتهای سلولی و میانکشیهای آنان اینفای نقش می‌نمایند (۸-۵).

لذا با تاکید بر این موضوع، و اینکه نقش این ترکیبات در تکامل هیپوفیز کمتر مورد بررسی قرار گرفته است در این پژوهش سعی گردیده است تا از نقطه نظر بروز و ظهور گلیکوکالیزوگنیهایی که احتمالاً حضور آنها در مسیر تکامل چرخه‌های سلولی آدنوهیپوفیز مؤثر است. تغییرات تکاملی آدنوهیپوفیز رت مورد مطالعه و ارزیابی قرار گیرد.

## مواد و روشها

### \* حیوان آزمایشگاهی

در این پژوهش از ۲۰ رت ماده باکره دو ماهه نژاد NMRI و ۱۰ رت هم نژاد آنها که از مؤسسه سرم سازی رازی مشهد خریداری شده بودند، استفاده گردید. رت‌ها در شرایط استاندارد خانه حیوانات (دسترسی به غذا، آب، نور، رطوبت و حرارت مناسب) قرار گرفتند. پس از تطابق در قفسهای مخصوص جفت‌گیری آمیزش داده شدند (بازای هر دو رت ماده یک رت نر). و با تهیه اسپرم واژینال روز صفر حاملگی در آنان تعیین گردید. سپس رت‌های حامله در قفس‌های جداگانه نگهداری و مراقبت شدند.

### \* تهیه جنین و آماده سازی بافت

در هر یک از روزهای دهم تا بیستم حاملگی به ترتیب دو رت تحت بیبوشی قرار گرفتند و جنین‌های آنها از شاخه‌های رحم خارج گردید و هر دسته از آنها به منظور دستیابی و مقایسه فیکس بهتر به مدت ۲۴ ساعت با استفاده از فیکساتیوهای مختلف شامل نرمالین ۱۰ درصد (فرمالین + سرم فیزیولوژی) محلول B4G (۶ درصد کلرید مرکوریک، ۱ درصد گلوتارآلدیهاید و ۱ درصد استات سدیم)، بوئن و کارنوی فیکس شدند (۹). در مورد جنینی‌های چهارده روزه، و پس از آن سعی گردید تا سرهای آنان ضمن جداسازی با ایجاد یک برش ساژیتال میانی در فیکساتیو قرار گیرند تا عمل فیکس کاملتر انجام شود. سپس با استفاده از پاساژ نمونه‌ها به روشهای معمول بافت‌شناسی و قرار دادن آنها در بلوکهای پارافینی برشهایی بصورت سریال در دو جهت ساژیتال و کروئال از هر نمونه تهیه و با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین بخشی از سریال سکشن که دارای نمونه هیپوفیز بود مشخص گردید. و در هر مرحله جنینی از تعداد ۹ جنین و از هر جنین یک نمونه بطور تصادفی انتخاب و برای رنگ آمیزی با لکتین مورد استفاده قرار گرفت.

### \* رنگ آمیزی لکتین هیستوشیمی

در این روش که با استفاده از لکتین‌های مورد نظر (جدول ۱) که از شرکت سیگما تهیه شده بودند رنگ آمیزی به شرح ذیل انجام گرفت.

جدول ۱: مشخصات لکتینهایی که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته‌اند. (۱۵)

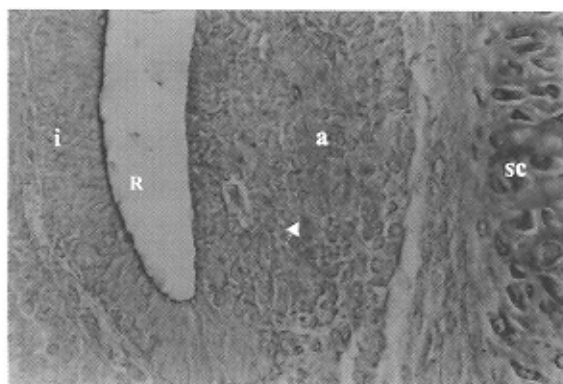
Lectin	abbreviation	Carbohydrate-binding specificity
Triticumvulgaris (Wheat germ)	WGA	[ $\beta$ 1-4)-D-GlcNAc]2 $\alpha$ 3-Sialic acid
Acachistypopsis(peanut)	PNA	D-Gal-( $\beta$ -3)-Gal NAc
Griffonia simplicifolia	GSA1-B <sub>4</sub>	$\alpha$ -D-Gal

ابتدا مقاطع بافتی به روش معمول در بافت‌شناسی آبدی شدند (به منظور رسوب زدایی اصلاح مرکوریک نمونه‌هایی که در B4G فیکس شده بودند به مدت ۱۰ دقیقه در محلول در Alcoholic Iodine قرار گرفتند) (۱۰). سپس نمونه‌های بافتی به مدت نیم ساعت در محلول بافر فسفات سالین (PBS) تازه تهیه شده قرار داده شدند. این محلول دارای ۳۶ گرم کلرید سدیم، ۷/۴ گرم سدیم هیدروژن فسفات و ۴/۱۵ گرم پتاسیم دی هیدروژن در یک لیتر آب مقطر است که این محلول Stock بود و هنگام استفاده به نسبت ۱ به ۵ رقیق شد (۱۰).

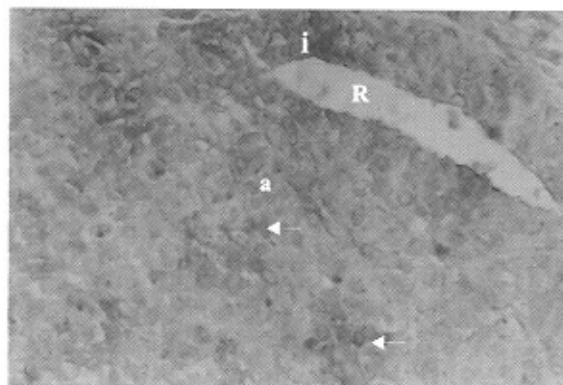
برای رنگ آمیزی ابتدا هر یک از لکتین‌های مورد نظر به مقدار ۱۰ میکروگرم ماده موثر (Lectin-HRP conjugate) در یک میلی لیتر PBS رقیق شدند. پس از خارج کردن نمونه‌ها از محلول PBS برشهای مربوط به هر مرحله برای استفاده از سه لکتین یاد شده به سه دسته تقسیم گردید، آنگاه بر روی هر سری از برشها چند قطره از لکتین رقیق شده مورد نظر چکانده و به مدت دو ساعت در درجه حرارت اطاق قرار گرفت. بعد از این مدت مقاطع در PBS به مدت ۳ دقیقه شستو داده شد، سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۰/۳ درصد (Diaminobezidine) DAB (۰/۳ / گرم در ۱۰۰ میلی لیتر PBS) و

قدامی هیپوفیز در حال تکامل دیده می‌شوند. این واکنش بیشتر در منطقه گلژی (منظور از منطقه گلژی فسنی است که شامل دستگاه گلژی، سیتوپلاسم بین دستگاه گلژی و پرده سلولی مجاور آن که مجموعاً توسط میکروسکوپ نوری قابل مشاهده است) قابل ملاحظه بود.

در ادامه روند تکامل دیواره قدامی بن‌بست راتکه و واکنش با لکتین WGA در آن گروه از سلولهایی که در مرحله قبل واکنش نشان داده بودند واضحتر گردید بطوریکه در روز چهاردهم در تعدادی از این سلولها نسبت به روز سیزدهم شدیدتر شده که این اختلاف از نظر آماری معنی دار بود ( $P < 0.05$ ). و در گروهی از سلولها اپیتلیالی دیواره قدامی بن‌بست راتکه نسبت به بقیه سلولهای دیواره قدامی شدیدتر بود (شکل ۱).



شکل ۱: فتومیکروگراف مربوط به قطع سائیتال آدنو هیپوفیز در حال تکامل جنین‌های ۱۴ روز، با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر می‌باشد که در مجاورت یا لکتین WGA قرار گرفته است. در لوب قدامی، لوب میانی، R- فضای بن‌بست راتکه و SC غضروف اسفنجی را مشخص می‌نماید. برخی از سلولهای لوب قدامی هیپوفیز با فلش‌ها با لکتین WGA واکنش نشان دادند.



شکل ۲: این فتومیکروگراف برش سائیتال هیپوفیز در حال تکامل مربوط به جنین بیست روز، رت که در مجاورت یا لکتین WGA قرار گرفته است را با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر نشان می‌دهد. در لوب قدامی (a) فضای داخلی بن‌بست راتکه، i- لوب سلولی میانی هیپوفیز در حال تکامل و فلش‌ها گروه‌های سلولی را که با لکتین WGA واکنش نشان داده‌اند را مشخص می‌نماید.

در روزهای پانزدهم، شانزدهم و هفدهم با ادامه روند نمایز سلولها در لوب قدامی هیپوفیز سلولهایی که با لکتین WGA واکنش نشان داده بودند بصورت مجموعه‌های کوچک سلولی مشاهده گردیدند بطوری که از روز چهاردهم تا روز هفدهم اختلاف بین شدت رنگ نمونه‌ها معنی دار نبود ( $P < 0.02$ ) سپس در ادامه فرایند تکامل هیپوفیز و نمو بیشتر سلولها در روزهای هجدهم تا بیستم بتدریج سلولهایی که با لکتین

آب اکسیژنه (۲۰۰ میکرولیتر در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول DAB) مجاور گردید و سپس با آب جاری شستشو داده شد (۱۳-۱۰) برای رنگ زمینه نیز از آلینیلو با  $pH = 2/5$  استفاده گردید. در مرحله بعد، مقاطع مورد نظر طبق روشهای معمول در بافت‌شناسی آنگیری، با گزینلول شفاف سازی و سپس مونته گردیدند. در هر مرحله حداقل سه نمونه به عنوان گروه آزمایش با هر لکتین رنگ‌آمیزی شدند و یک برش به عنوان شاهد در معرض HRP، DAB و آب اکسیژنه (بدون استفاده از لکتین) قرار گرفت. با توجه به اینکه در صورت اتصال لکتین با قند انتهایی 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 با استفاده از روش درجه بندی Gong و همکارانش ارزیابی گردید (۱۴). در این حالت شدت رنگ‌آمیزی بر اساس مشاهده سه نفر بصورت Blind تعیین گردید و نمونه‌ها بر اساس شدت واکنش با هر لکتین در روزهای مختلف جنینی (۲۰-۱۰) به طور جداگانه رتبه بندی شدند (جدول ۲).

جدول ۲: شدت سلولهای لوب قدامی هیپوفیز در حال تکامل با لکتین‌های مختلف در روزهای مختلف مورد مطالعه

مرحله جنینی (روز)	لکتین WGA	لکتین PNA	لکتین GSAI-4
۱۰-۱۲	-	-	-
۱۳	+	+	-
۱۴	++	++	-
۱۵	++	++	-
۱۶	++	++	-
۱۷	++	++	-
۱۸	+++	+	-
۱۹	+++	+	-
۲۰	+++	-	-

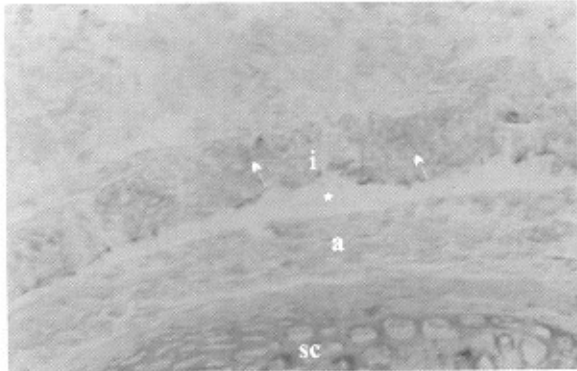
عدم واکنش (-)، واکنش مختصر (+)، واکنش متوسط (++)، واکنش شدید (+++)

برای مقایسه نمونه‌ها از آزمون آماری غیر پارامتری کروسکال-والیس استفاده و اختلاف در سطح  $P < 0.05$  معنی‌دار محسوب گردید و نیز از شدت و تغییرات واکنشهای ایجاد شده در نمونه‌ها توسط میکروسکوپ دوربین‌دار Olympus-AH-2 فتومیکروگراف تهیه شد.

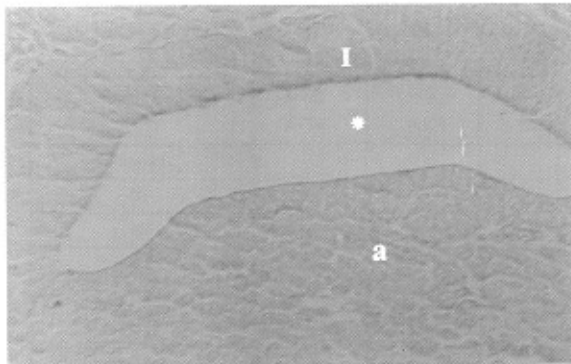
## یافته‌ها

بررسی برشهای میکروسکوپی مربوط به روزهای مختلف جنینی نشان داد که تکامل آدنو هیپوفیز از روز دوم بصورت یک دیورتیکول از اکتودرم سقف دهان اولیه که در جهت تشکیل بن‌بست راتکه رشد می‌نماید قابل تشخیص است. بر اساس شدت واکنش به رنگ‌آمیزی لکتین هیستوشیمی با لکتین‌های مورد نظر (جدول ۲) مشخص شد که تعدادی از سلولهای دیواره قدامی بن‌بست راتکه که در روز سیزدهم با لکتین WGA واکنش نشان می‌دهند و سلولهایی که با لکتین مذکور واکنش نشان داده‌اند بصورت پراکنده تقریباً در تمام قسمتهای لوب

مراحل تکاملی لوب قدامی هیپوفیز مشاهده نشد (شکل ۵).



شکل ۲: فوئومیکروگراف مربوط به برش سائینال هیپوفیز در حال تکامل رت در روز بیستم جنینی با بزرگنمایی ۴۰۰ می باشد که در مجاورت با لکتین PNA قرار گرفته است. a- لوب قدامی، ۱- دیواره خلفی بن بست رانکه، علامت \* فضای بن بست رانکه و SC- غضروف اسفونید و فلش ها سلولهای رانکه در دیواره خلفی با لکتین عکس عمل نشان داده اند را مشخص می نماید.

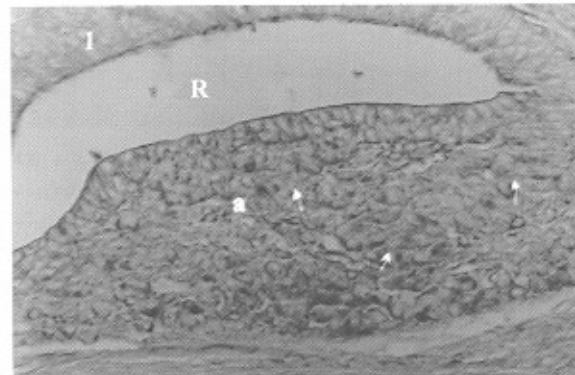


شکل ۵: فوئومیکروگراف مربوط به برش سائینال هیپوفیز در حال تکامل رت در روز چهاردهم جنینی با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر می باشد که در مجاورت لکتین GSA1-B4 قرار گرفته است همانطور که در تصویر ملاحظه می شود هیچگونه عکس العملی مشاهده نمی گردد. در این تصویر a- لوب قدامی، علامت \* فضای بن بست رانکه و ۱- دیواره خلفی را مشخص می نماید.

علاوه بر نمونه های رنگ آمیزی شده با لکتین نمونه هایی که با همتوکسیلین - اتوزین رنگ آمیزی شده بودند مورد بررسی قرار گرفتند. این بررسی در روزهای دهم و یازدهم جنینی مقارن با شروع تشکیل بن بست رانکه، نشان داد که تقریباً همه سلولهای تشکیل دهنده بن بست رانکه نسبت به همتوکسیلین واکنش مثبت نشان می دهند (شکل ۶). سپس در ادامه روند تکامل در روزهای بعد نیز واکنش با همتوکسیلین قابل مشاهده بود تا اینکه در روز هجدهم در بعضی از سلولها واکنش با اتوزین آغاز گردید که این واکنش بصورت نواحی صورتی رنگی در سیتوپلاسم آنها قابل مشاهده بود. با ادامه تمایز سلولی در روزهای بعد شدت واکنش این سلولها با اتوزین افزایش یافت بطوریکه در روز بیستم سلولهای اسیدوفیل به راحتی قابل تشخیص بودند. نظر به اینکه در این پژوهش چهار نوع فیکساتیو مختلف شامل نرمالین ۱۰ درصد، محلول B4G، بوئن و کارنوی مورد استفاده قرار گرفتند. در مقایسه این فیکساتیوها، نمونه هایی که در B4G فیکس شده بودن نتایج بهتری را نشان دادند.

WGA واکنش نشان داده بودند کاملاً واضح تر نسبت روزهای قبل بوده و اختلاف بین شدت رنگ آمیزی بین روزهای هفدهم و بیستم از نظر آماری معنی دار بود ( $P < 0.05$ ) و بصورت گروهبندی از سلولها (Cluster) در مقاطع میکروسکوپی قابل مشاهده بودند (شکل ۲).

بررسی مقاطع میکروسکوپی همچنین مشخص نمود که شروع واکنش با لکتین PNA در تعدادی از سلولها دیواره قدامی بن بست رانکه نیز از روز سیزدهم قابل مشاهده است. در این مرحله تعدادی از سلولها به طور پراکنده با لکتین مذکور واکنش نشان دادند. تعداد این سلولها و نیز شدت واکنش در سلولهایی که نسبت به اپیتلیوم دیواره قدامی بن بست در فاصله دورتری قرار داشتند شدیدتر بود. در ادامه روند تمایز سلولی دیواره قدامی بن بست رانکه، تقریباً در همان تعداد سلولهایی که از روز سیزدهم واکنش شروع شده بود در روز چهاردهم نیز این واکنش بطور شدیدتری مشاهده گردید و مقایسه شدت واکنش بین روزهای سیزدهم و چهاردهم افزایش معنی داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ). سلولهایی که با لکتین PNA واکنش نشان دادند دارای هسته گرد و کوچکی که خارج از مرکز قرار داشت از سایر سلولها متمایز گردیدند (شکل ۳).



شکل ۳: فوئومیکروگراف مربوط به قطع سائینال هیپوفیز در حال تکامل رت در روز چهاردهم جنینی با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر نشان می دهد که در مجاورت لکتین PNA قرار گرفته است در a- لوب قدامی، R- بن بست رانکه، ۱- لوب میانی و فلش های کوچک برخی از سلولهای لوب قدامی هیپوفیز که با لکتین PNA واکنش واضحتری نشان داده اند را مشخص می نماید.

واکنش سلولهای مذکور با لکتین PNA از چهاردهم تا روز هفدهم تقریباً با همان شدت قبلی ادامه یافت ولی در روز هجدهم از شدت واکنش کاسته شد. بطوریکه در روز بیستم هیچ یک از سلولهای تشکیل دهنده دیواره قدامی بن بست با لکتین PNA واکنش قابل ملاحظه ای را نشان ندادند و مقایسه شدت واکنش بین روزهای هفدهم، هجدهم و بیستم اختلاف معنی داری را نشان می دهد ( $P < 0.05$ ). در حالی که سلولهای دیواره خلفی بن بست رانکه که در جهت لوب میانی تمایز می یابند واکنش نسبتاً شدیدی را نشان دادند که از این می توان به عنوان شاهد در جهت تایید صحت رنگ آمیزی در این نمونه ها استفاده نمود (شکل ۴).

برشهای میکروسکوپی که با لکتین GSA1-B4 رنگ آمیزی شده بودند نیز در روزهای مختلف جنینی مورد ارزیابی قرار گرفتند. ولی واکنش قابل ملاحظه ای در هیچ بگ از

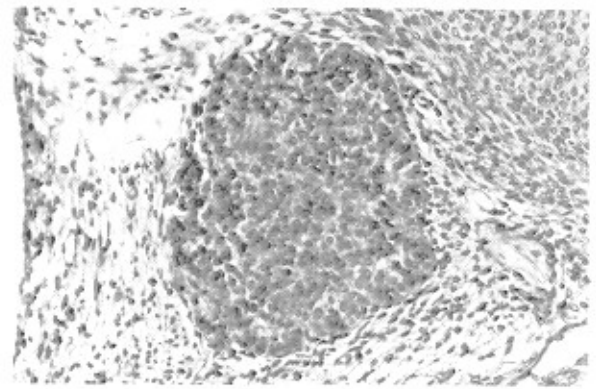


از این لحاظ نقش قندهای انتهایی (Terminal sugars) مربوط به زنجیره‌های قندی گلیکوکائوگلیکها بسیار حائز اهمیت است (۷، ۱۲، ۱۳).

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که لکتین WGA از روز سیزدهم با تعدادی از سلولهای دیواره قدامی بن بست رانگه واکنش نشان می‌دهند. این لکتین با قند انتهایی اسید سیالیک باند می‌شود و با توجه به اینکه واکنش ابتدا در ناحیه گلژی پدیدار شده و بتدریج در روزهای بعد شدیدتر گردیده و در تمام سلول گسترش یافته، نشان دهنده این واقعیت است که ترکیبات پروتئینی و لیپیدی پس از گلیکوزیلاسیون نهایی در دستگاه گلژی به سایر قسمتهای سلول و حتی خارج سلول منتقل می‌گردند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که ظهور اسید سیالیک در تعدادی از سلولها و سپس تمایل این سلولها به تشکیل گروههای سلولی مشخص، نشان دهنده نقش اسید سیالیک و تغییرات سازمان یافته آن در میانکنشهای سلولی در طی تمایز و تکامل ارگانها و منجمله تکامل هیوفیز است. از طرفی هورمونهای گلیکوپروتئینی مترشحه از سلولهای بازوفیل غده هیوفیز دارای دو زیر واحد  $\alpha$  و  $\beta$  هستند که زیر واحد  $\alpha$  در همه هورمونهای گلیکوپروتئینی این غده مشترک است و در حدود روز پانزدهم جنینی در گروهی از سلولهای هیوفیز بیان می‌شود (۲۳). مولکول mRNA مربوط به زیر واحد  $\beta$  که در هورمونهای گلیکوپروتئینی مختلف با یکدیگر تفاوت دارند در جمعیتی از سلولها که بصورت Cluster هستند زیر واحدهای TSH $\beta$  و LH $\beta$  و FSH $\beta$  به ترتیب در روزهای ۱۶/۵ و ۱۷/۵ زندگی جنینی بیان می‌شوند (۲۴، ۲۳). شاید به همین دلیل باشد که در روزهای پانزدهم و شانزدهم سلولهایی که با WGA واکنش نشان داده‌اند به صورت مجموعه‌های چند سلولی مشاهده می‌شوند و سپس در روزهای هجدهم و بیستم بتدریج واکنش با این لکتین واضحتر گردیده و تجمعات سلولی مشخص تری را ایجاد می‌نمایند.

این مطالعه همچنین مشخص نمود که لکتین PNA که با قند انتهایی D-Gal( $\beta$ 1-3)-D-GalNAc باند می‌شود از روز سیزدهم در تعدادی از سلولهای دیواره قدامی واکنش نشان داد و بتدریج با ادامه روند تکامل و تمایز سلولی این واکنش تا روزهای شانزدهم و هفدهم ادامه پیدا کرد. سپس در روز هجدهم از شدت واکنش کاسته شد بطوریکه در روز بیستم هیچ یک از سلولها با این لکتین واکنش نشان ندادند. نظر به اینکه سلولهایی که با PNA واکنش نشان دادند کوچک و دارای هسته گرد می‌باشند احتمالاً این سلولها به اسیدوفیلها تمایز می‌یابند و با توجه به اینکه واکنش با لکتین PNA در مقطع زمانی مشخصی از روز سیزدهم تا روز هجدهم قابل مشاهده است، شاید بتوان چنین نتیجه گرفت که نقش قند انتهایی D-Gal( $\beta$ 1-3)-D-GalNAc در روند تمایز سلولی در این مقطع زمانی اهمیت پیدا می‌کند و پس از انجام این مرحله، احتمالاً توسط مولکولهای دیگر منجمله اسید سالیک ماسک شده و با اینکه توسط آنزیمهای سلولی تجزیه می‌گردد (۱۱).

لکتین GSA1-B $\alpha$  که با قند انتهایی D-Gal $\alpha$  باند می‌شود نیز در روزهای مختلف جنینی واکنشی را نشان نداد که احتمالاً به علت عدم وجود قند انتهایی D-Gal $\alpha$  در زنجیره‌های قندی گلیکوکائوگلیکها



شکل ۱۶: این فئومیکروگراف مقطع سائیتال لوب قدامی هیوفیز جنین چهارده روزه رت را نشان می‌دهد که با H&E رنگ آمیزی شده است. این تصویر با بزرگنمایی ۲۰۰ برابر تهیه گردیده است. همانطور که در محور ملاحظه می‌گردد سلولهای بارشیم غده رنگ بنفش همتوکسین را به خود گرفته‌اند و نفاطی که تقریباً صورتی رنگ دیده می‌شوند (فلس‌ها) مورکهای جوی هستند که هم در داخل بارشیم غده و هم در بافتهای مجاور دیده می‌شوند.

## بحث

یکی از مهمترین وقایعی که در تمام دوران رویانی به وقوع می‌پیوندد ظهور مولکولهایی است که در زمانهای نسبتاً کوتاه ظاهر شده و پدیده‌های مختلف تکاملی نظیر تمایز، میانکنش و مهاجرت را در سلولها باعث می‌شوند. این مولکولها که به صورت گلیکوکائوگلیکها (گلیکولیپید، گلیکو پروتئین، پروتئوگلیکانها)، پروتئین، و پپتیدها و غیره هستند در مرحله خاصی در سطح سلول و ماتریکس خارج سلولی ظاهر شده و پس از انجام وظیفه تکاملی خود توسط سایر مولکولها از جمله اسید سیالیک ماسک شده و با اینکه توسط آنزیمهای سلولی ناپدید می‌گردند (۱۰، ۱۱، ۱۲). لذا با توجه به رده‌های مختلف سلولی که در ساختار غده هیوفیز وجود دارد می‌توان اذعان کرد که تکامل این غده الگویی مناسب برای بررسی وقایع مولکولی و میانکنشهای سلولی است. تحقیقات در این زمینه نشان می‌دهد که تکامل این غده با فعال شدن سلولهای اکتودرمی سقف دهان اولیه شروع شده که با انجام میان کنش متقابل با کف دیانسفالون با نظم خاصی مسیر تکامل خود را طی می‌نمایند. بطوریکه در روز نهم تکامل، ژنهای Shh و Ptix1/2 در اکتودرم دهان اولیه بیان می‌گردد و از روز نهم تا دوازدهم فاکتور BMP $_4$  در کف دیانسفالون موجب القاء Pouch Placode در جهت تشکیل بن بست رانگه می‌شود (۱، ۱۶، ۱۷). سپس از روز دهم تا چهاردهم نیز فاکتور FGB $\beta$  در ایشاندیپلوم تولید می‌شود و موجب القاء بن بست رانگه و تکثیر سلولی در آن می‌گردد (۱، ۱۸). در این راستا فاکتورهای Lhx $_3$  و Lhx $_4$  در حدود روز دهم در سلولهای بن بست رانگه بیان می‌گردد و موجب شکل‌گیری این بن بست و تکثیر سلولهای پیش سازنده هیوفیز می‌شود (۱۷، ۱۸). همچنین در روز چهاردهم نیز فاکتور Pit1 موجب تمایز سوماتوتروفها لاکتوتروفها می‌گردد (۲۲-۱۸). در راستا ثابت شده است که ترکیبات قندی (Glycoconjugates) که در سطح سلولها و همچنین در ماتریکس خارج سلولی وجود دارند در تمايزات سلولی، مهاجرت سلولی و تعیین مسیر تکاملی و غیره نقش اساسی دارند (۵، ۷، ۱۲، ۱۳).

تشخیص است (۲۳، ۲۴). این گروه از سلولها در هیپوفیز در حال تکامل و هیپوفیز بالغ با همتوکسیلین واکنش نشان داده و بازوفیل هستند اما گروهی از سلول که در مرحله اولیه تکامل به علت فعالیت پروتئین سازی بازوفیل بودند با ادامه تمایز سلولی و سنتز هورمونهای پروتئینی سوماتوتروپ و لاکتوتروف سیتوپلاسم آنها اسپدوفیل شده و رنگ انوزین را به خود می گیرند. این تغییرات که از روز هجدهم شروع و تا روز بیستم به حداکثر خود می رسد بدون شک بازگوکننده تکامل نهایی این بخش از هیپوفیز و شروع فعالیتهای ترشحی آن به حساب می آید. ما امیدواریم در آینده با شناسایی نقش دقیق گلیکوکائوگیت در هیستورژنز بافتها و ارگانهای بدن از اطلاعات مربوط به آنها در تفسیر دقیق تر هیستوپاتوژنز بیماریها استفاده نماییم که این نیز راه پیشگیری و درمان بیماریهای مرتبط با این ترکیبات را آسانتر خواهد نمود.

### تقدیر و تشکر

نتایج اصلی از این مطالعه مربوط به یافته های طرح پژوهشی مصوب شماره ۵/۲۸۷۴ 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 تقدیر می گردد.



### References

1. Dasen JS, Rosenfeld MG: Signaling mechanisms in pituitary morphogenesis Signaling and transcriptional control of pituitary development and cell fate determination. *Current Opinion in cell biol* 1999; 11: 669-677
2. Gillert SF: Cell interaction in development. *Developmental Biology*. Sinauer associates. Sunderland, 1985: 471-508
3. Gurdon JB: Embryonic induction molecular prospects. *develop* 1987; 99: 285-306
4. Ganji FC, Fazel AR: Lectin-binding patterns in the microenvironment of mouse developing T-cell. *Iranian Biomedical Journal* 2003; 7(1): 19-22
5. Zagris N: Extracellular matrix in development of the early embryo. *Micron* 2000; 32: 427-438
6. Reyes-Leyva J, Vallejo V, Hernandez J: Differential expression of sialic acid on porcine organs during the maturation process. *Comparative biochemistry and physiol (CBP)* 2000; 126: 415-424
7. Qasba PK: Involvement of sugars in protein-protein interaction. *Carbohydrate polymers* 2000; 41: 293-309
8. Burgers R, Lunyak V, Rosenfeld M: Signaling and transcriptional control of pituitary development. *Curr Opin Genet Dev*. 2002; 12(5): 534-39
9. Bancroft JD, Gamble M: Theory and practice of histological techniques, 5nd Churchill Livingstone, London. 2002, pp20-100
10. Kiernan JA: Histological and histochemical methods theory and practice, 3rd ed. BUTTERWORTH, Oxford, 1990; 232-236
11. Fazel AR, Thompson RP, Sumia H, Shulte BA: lectin histochemistry of the embryonic heart expression of terminal and penultimate galactose residues in developing rat and chicks. *Am J of Anat*. 1989; 184: 85-94
12. Schutel B, Spincer S: Light microscopic histochemical detection of terminal galactose and N-acetylgalactosamine residus in rodent complex carbohydrates using galactose oxidase schiff sequence and lectin- horseradish peroxidase conjugate. *J Histochem cytochem*. 1983; 31(1): 19-24
13. Fazel A, Shulte B, Thompson RP, Spincer S: Presence of Unique glycoconjugates on surface of Rat primordial germ cells migration. *Cell Diff*. 1987; 21: 199-211
14. GongH, Ye V, Freddo TF: Hyaluronic acid in the normal and glaucomatous optic nerve. *EXP. Eye. Res*. 1997; 64: 587-595
15. Schachter R, Kamerling JP: Chemistry, biochemistry and biology of sialic acid in: Montreuil J.

vliegthar, J.F.G., Schachter H., Glycoprotein 2. Elsevier, Science, 1997: 243-402

16. Jacobson AG, Myamoto DM: Rathke spouch morphogenesis in chick embryo. J. EXP. Zool 1997; 351-366

17. Sheng HZ, Westphal H: Early steps in pituitary organogenesis. TIG, 1999; 15: 236-240

18. Ericson J: integrated FGF and BMP signaling control the progression of pattern in embryonic anterior pituitary . Develop 1998; 125, 1005-1015

19. Treier M: Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. Gene Dev, 1999; 12: 1691-1704

20. Pierantoni R, Cobellis G, Meccariello R:

Evolutionary aspects of cellular communication in the vertebrate hypothalamo-hypophysio-gonadal axis. Int. Rev Cytol 2002; 218: 69-141

21. Takuma N: formation of Rathke's pouch requires dual induction from the diencephalons. Develop 1998; 125: 4835-4840

22. Sandra J, Sara B, Pamela L: Complementary Expression of IGF- and IGFBP-5 during anterior pituitary development. Develop biol 2002; 244: 319-328

23. Dubois PM, Elamraoui A: Embryology of the pituitary gland. TEM 1995; 6: 1-7

24. Primus E: Transcription factors in pituitary development. Molecular and Cellular Endocrinol 2001; 185(1): 1-6

