

بررسی نقش گلیکوکانژوگیت‌ها در تکامل صفحه کفی لوله عصبی در اوایل دوران ریختزایی موش

محمد مهدی حسن زاده طاهری^۱، دکتر محمدرضا نیکروش^۲، دکتر مهدی جلالی^۳ و دکتر علیرضا فاضل^۴

خلاصه

صفحه کفی لوله عصبی گروه کوچکی از سلول‌ها هستند که در قسمت قدامی میانی لوله عصبی قرار دارند و در مرحله نوروژنز نقش کلیدی در تمایز بخش قدامی لوله عصبی ایفا می‌کنند. هدف از مطالعه حاضر بررسی توزیع گلیکوکانژوگیت‌ها در صفحه کفی لوله عصبی و نوتوکورد و اثرات القائی آنها در جنین موش بود. برای این منظور جنین‌های ۱۰ تا ۱۴ روزه موش‌های Balb/C در فرمالین فیکس شدند و سپس مقاطع میکروسکوپی از آنها تهیه گردید. این مقاطع جهت مطالعات هیستوشیمیایی پردازش شدند و سپس در مجاورت پنج لکتین مختلف کنجوگه شده با Horseradish peroxidase (HRP) قرار داده شدند. این پنج لکتین عبارت بودند از: Glycin max (SBA) که برای قندهای انتهایی گالاکتوز و ان استیل گالاکتوز آمین اختصاصی است، Vicia villosa (VVA) و Arachis hypogaea (PNA) که به قند انتهایی ان استیل گالاکتوز آمین باند می‌شوند و Lotus tetragonolobus (LTA) و europus (UEA-1) که برای قند انتهایی فوکوز اختصاصی می‌باشند. نتایج حاصله نشان داد که گلیکوکانژوگیت‌های حساس به SBA در صفحه کفی لوله عصبی، سلول‌های نوتوکوردی و ماتریکس خارج سلولی اطراف آنها واکنش می‌نمایند و در اثنای تکامل تغییرات معنی‌داری نشان می‌دهند ($p < 0.05$). اختلاف چشمگیری بین لکتین‌های مختلفی که با ان استیل گالاکتوز آمین باند می‌شوند، در اثنای تمایز نورون‌های حرکتی مشاهده گردید و به‌جز با SBA هیچ‌کدام از آنها واکنش نشان ندادند. لکتین‌های اختصاصی قند انتهایی فوکوز تغییرات معنی‌داری ($p < 0.05$) در اثنای تکامل نوتوکورد نشان دادند. بر اساس یافته‌های این تحقیق زمان ظهور و نحوه توزیع گلیکوکانژوگیت‌های حساس به SBA ممکن است نقش کلیدی در میان‌کنش‌های سلولی و شکل‌پذیری متعاقب آن در بافت‌هایی از قبیل صفحه کفی لوله عصبی و نوتوکورد در دوره بحرانی مورفوژنز داشته باشند. به‌علاوه گلیکوکانژوگیت‌های دارای قند انتهایی فوکوز ممکن است در تکامل نوتوکورد دخالت داشته باشند اما احتمالاً در تکامل صفحه کفی لوله عصبی دخالت ندارند.

واژه‌های کلیدی: گلیکوکانژوگیت، نوتوکورد، صفحه کفی، میان‌کنش، ریختزایی

۱- دانشجوی دوره دکتری آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی مشهد و عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی بیرجند ۲- دانشیار

گروه آناتومی، ۳- استاد جنین‌شناسی و بیولوژی سلولی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی مشهد

دریافت مقاله: ۱۳۸۲/۴/۳ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۲/۹/۱۹ پذیرش مقاله: ۱۳۸۲/۱۱/۱

مقدمه

سیستم عصبی در مهره‌داران از سلول‌های اکتودرمی که در محور پشتی میانی بدن جنین قرار گرفته‌اند تکامل پیدا می‌کند و به وسیله میان‌کنش‌های مربوط به اکتودرم و مزودرم مجاور القاء می‌گردد. پس از القاء شدن، اکتودرم عصبی ضخیم گردیده و صفحه عصبی را می‌سازد که متعاقباً دچار اینواژیناسیون شده و لوله عصبی را تشکیل می‌دهد. این لوله پس از شکل‌گیری دارای بخش‌های مختلفی از قبیل صفحات قاعده‌ای، بالی، سقفی و کفی می‌باشد (۲،۱۴). حضور مارکرهای مشابه در انواعی از مهره‌داران منجر به این فرضیه کلی گردیده است که مکانیسم‌های القاء و شکل‌پذیری لوله عصبی مشابه هستند اما شکلی نیست که از نظر زمانی، هندسی و نقش سیگنال‌ها بین گونه‌های مختلف تفاوت‌هایی وجود دارد (۲،۱۴).

صفحه کفی لوله عصبی گروه کوچکی از سلول‌ها هستند که در بخش قدامی میانی لوله عصبی قرار گرفته‌اند و نقش حساسی در شکل‌پذیری سیستم عصبی مهره‌داران ایفا می‌نمایند (۱۵). به نظر می‌رسد که سلول‌های پیش‌ساز این ناحیه در دوزیستان و پرندگان منشاء مشترکی با سلول‌های سازنده نوتو کورد داشته و از گره اولیه (primitive node) منشاء می‌گیرند و با وجود شکل‌گیری همزمان از نظر عملکرد از یکدیگر مجزا هستند (۱۵،۱۸،۲۷). Charrier و همکاران در جدیدترین یافته‌های خود نشان داده‌اند که صفحه کفی لوله عصبی در پرندگان منشاء دوگانه‌ای داشته به طوری که قسمت میانی آن از گره هسنس و نواحی طرفی آن از اکتودرم عصبی منشاء می‌گیرند و هر کدام از این دو قسمت الگوی بیان ژنی خاصی دارند (۴).

تحقیقات نشان داده است که از سلول‌های صفحه کفی لوله عصبی ماده‌ای بنام Sonic hedgehog (Shh) ترشح می‌شود که در اختصاصی شدن نورون‌های حرکتی و ایترنورون‌ها دخالت دارند (۲۸،۲۴،۲۸). به علاوه ترشح فاکتور Netrin-1 از سلول‌های این ناحیه مسیر گسترش آکسون‌های کومیسورال و نورون‌های حرکتی را مشخص می‌نماید (۶،۱۸).

زائده نوتو کورد ساختاری محوری با منشاء مزودرمی است که در اوایل دوران مورفوژنز ظاهر می‌گردد و در خط وسط در زیر اکتودرم پشتی قرار گرفته و باعث القاء و تبدیل آن به صفحه عصبی و سپس لوله عصبی می‌شود. این ساختمان علاوه بر نقش پشتیبانی، نقش‌های کلیدی در القای بافت‌های مزودرمی مجاور خود و سپس شکل‌پذیری آنها مانند سومیت‌ها و عروق محوری (۲۵،۱۹،۲۰،۳)، بافت‌های اکتودرمی مانند لوله عصبی و

آدنوهیپوفیز (۱۹،۱۸،۱۵،۵۸) و بافت‌های آندودرمی مانند جوانه پشتی پانکراس دارد (۲۳،۵۷). تنوع پاسخ به القاءات می‌تواند حاصل دارا بودن پتانسیل‌های ویژه بافت‌های پاسخ‌دهنده و یا تفاوت در سیگنال‌های موضعی نوتو کورد باشد (۵).

بر اساس نظر Le Douaraine و همکاران صفحه کفی لوله عصبی از سلول‌هایی ناشی شده‌اند که پیش‌ساز آنها در مزودرم محوری جای داشته و پس از کسب پتانسیل‌های لازم این بخش از لوله عصبی را تشکیل می‌دهند (۱۹،۱۶). Jessel و همکاران نیز نشان داده‌اند که سلول‌های بخش قدامی میانی لوله عصبی تازه شکل گرفته صلاحیت تشکیل صفحه کفی لوله عصبی را ندارند مگر این که به وسیله سیگنال‌های ناشی از نوتو کورد القاء گردند. بنابراین Shh مترشح از نوتو کورد علاوه بر خاصیت میتوژنیک بر سلول‌های عصبی، نقش اختصاصی کردن سلول‌های کفی لوله عصبی، بقای آنها و متعاقب آن تکامل و گسترش این صفحه را نیز برعهده دارد (۱۹،۱۵).

علی‌رغم مطالعات گسترده مورفولوژیکی، ژنتیکی و جنین‌شناسی که بر روی تکامل لوله عصبی و از جمله صفحه کفی آن صورت گرفته است، به نقش گلیکوکائوگیت‌های سطح سلول‌های آن در اثنای تکامل کمتر توجه شده است و از طرفی با توجه به این که این ترکیبات نقش کلیدی در پدیده‌های مختلف تکاملی از قبیل تکثیر سلولی، تمایز، مهاجرت و همچنین تماس و چسبندگی آنها به یکدیگر دارند و در طی مراحل تکاملی تغییر می‌نمایند (۲۱،۲۰،۱۰)، بر آن شدید تا به کمک لکتین‌ها به مطالعه هیستوشیمیایی صفحه کفی لوله عصبی و نوتو کورد پردازیم.

لکتین‌ها پلی‌پپتیدهای طبیعی هستند که عمدتاً از گیاهان به دست می‌آیند. این ترکیبات به طور اختصاصی به انشعابات قندی گلیکوپروتئین‌ها و گلیکولیپیدها باند می‌شوند و به طور گسترده‌ای به عنوان شاخص در مطالعات میان‌کنش‌های سطح سلول‌ها در سیستم‌های در حال تکامل از جمله سیستم عصبی به کار گرفته شده‌اند (۱۳). مثلاً مشخص گردیده است که سلول‌های اکتودرمی قبل از تمایز به لوله عصبی، نورال کرست و اکتودرم سطحی صلاحیت خود را برای تفرق رده‌های متفاوت سلولی به وسیله واکنش به لکتین‌های مختلف نشان می‌دهند.

هدف از مطالعه حاضر بررسی نحوه توزیع گلیکوکائوگیت‌ها و تغییرات تکاملی آنها در سلول‌های صفحه کفی لوله عصبی و نوتو کورد با توجه به میان‌کنش‌های آنها با یکدیگر در اوایل دوران مورفوژنز به کمک تکنیک‌های

هیستوشیمیایی لکتین‌ها در موش می‌باشد.

مواد و روش کار

۱- تهیه جنین‌های موش

در این تحقیق از موش‌های نژاد Balb/C استفاده گردید. برای این منظور تعداد ۲۰ سر موش ماده با کره از مرکز واکسن و سرم‌سازی رازی مشهد خریداری گردیده و با موش‌های نر هم‌نژاد در قفس‌های مخصوص جفت‌گیری آمیزش داده شدند. با مشاهده پلاک واژینال روز صفر حاملگی منظور گردید و در شرایط استاندارد خانه حیوانات مورد مراقبت قرار گرفتند. در روزهای دهم تا چهاردهم حاملگی برای هر مرحله تعداد چهار موش حامله ابتدا به وسیله کلروفورم عمیقاً بیهوش گردیده و سپس سزارین شدند. آنگاه شاخه‌های رحم به دقت جدا گردیده و برای جداسازی پرده‌های جنینی به سرم فیزیولوژی انتقال داده شدند. پس از شستشو با سرم فیزیولوژی جنین‌های جمع‌آوری شده به محلول فیکساتیو فرمالین ۱۰ درصد در دمای اتاق منتقل گردیدند. تعداد جنین‌های به دست آمده برای هر مرحله به طور متوسط ۳۰ عدد بود.

۲- تهیه برش‌های بافتی

پس از فیکس شدن جنین‌ها، مطابق روش‌های معمول بافت‌شناسی ابتدا نمونه‌ها با عبور از الکل اتیلیک با غلظت افزایشی آگیری و سپس در گزین شفاف‌سازی شدند. پس از قالب‌گیری نمونه‌ها در پارافین برش‌های سریال به ضخامت ۶ میکرون در جهت‌های عرضی و ساژیتال تهیه گردید (۱).

۳- مطالعات هیستوشیمیایی

برای انجام این مطالعات از هر مرحله جنینی تعداد ۳۰ برش به طور تصادفی انتخاب و به روش معمول در بافت‌شناسی آبدهی شدند. برای حذف پراکسیدازهای داخلی، مقاطع برای مدت ۴۵ دقیقه و در شرایط تاریکی در محلول ۱٪ پراکسید هیدروژن در متانول قرار داده شدند (۲۱). سپس از لکتین‌هایی که به صورت کنجوجه شده با HRP از شرکت سیگما خریداری شده بودند (جدول ۱) استفاده گردید. برای این منظور ابتدا لکتین‌های مذکور به کمک بافر فسفات (PBS) به نحوی رقیق گردیدند که در هر میلی‌لیتر از محلول حاصله، ۱۰ میکروگرم لکتین وجود داشته باشد (۹،۱۰). در مرحله بعد برش‌ها برای مدت دو ساعت با هر کدام از لکتین‌های رقیق شده فوق مجاور شدند. پس از این

مرحله نمونه‌های بافتی با بافر شستشو داده شدند و در محلول ۰/۰۳ درصد DAB (Diaminobenzidine) در بافر فسفات قرار گرفتند. به ازای هر ۱۰ میلی‌لیتر محلول فوق، مقدار ۲۰ میکرولیتر آب اکسیژنه به محیط اضافه گردید (۹،۱۰). در مرحله بعد کلیه مقاطع پس از شستشو با آب جاری، برای ایجاد رنگ زمینه به مدت ۵ دقیقه در آلین بلو با pH=۲/۵ قرار داده شدند. در این صورت واکنش لکتین‌ها با قند انتهایی مربوطه به صورت رنگ قهوه‌ای در مشاهدات میکروسکوپی مشخص گردید. برای مشاهده واکنش‌های انجام شده، نمونه‌ها به کمک میکروسکوپ Olympus AH-2 مورد مطالعه و تصویربرداری قرار گرفتند. متعاقب این موضوع سعی شد تا نمونه‌ها بر اساس روش Gong و همکاران به صورت سه نفره و جدای از یکدیگر، بر اساس شدت واکنش با لکتین‌های مورد استفاده، مورد درجه‌بندی قرار بگیرند (۱۱). نتایج حاصله به کمک آزمون آماری غیر پارامتری کروسکال-والیس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و اختلاف در سطح $p < 0/05$ معنی‌دار محسوب گردید.

نتایج

در این تحقیق بررسی‌های لکتین هیستوشیمیایی بر روی مقاطع میکروسکوپی جنین‌های موش در فاصله روزهای دهم تا چهاردهم جنینی صورت گرفت و از لکتین‌های جدول ۱ استفاده گردید. نتایج حاصله به صورت خلاصه در جدول ۲ آورده شده است.

در روز دهم جنینی سلول‌های نوتوکوردی و ناحیه کفی لوله عصبی واکنش خفیفی به لکتین SBA نشان داده‌اند و این واکنش در محل غشاء پایه سلول‌های نوتوکوردی در حد متوسط بود (تصویر ۱). واکنش نوتوکورد به سایر لکتین‌های مورد مطالعه نیز در حد خفیف بود. واکنش سلول‌های ناحیه کفی لوله عصبی به این لکتین‌ها نیز تقریباً منفی بود فقط واکنش خفیفی به لکتین UEA-1 مشاهده شد.

در روز یازدهم جنینی واکنش سلول‌های نوتوکوردی و همچنین صفحه کفی لوله عصبی به لکتین SBA نسبت به روز قبل قدری شدیدتر شده و در حد متوسط می‌باشد ($p < 0/05$). واکنش سایر لکتین‌ها در محل صفحه کفی لوله عصبی و سلول‌های نوتوکوردی نیز مشابه روز دهم است و فقط واکنش به LTA قدری افزایش نشان می‌دهد ($p < 0/05$). واکنش این سلول‌ها به لکتین VVA منفی گردیده است (تصویرهای ۲ و ۳).

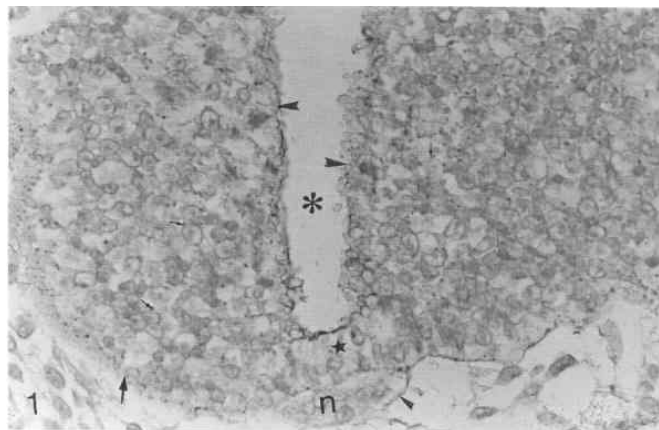
جدول ۱: انواع لکتین های مورد استفاده و خصوصیات آنها

نوع قند اختصاصی	علامت اختصاری	لکتین مورد استفاده
α, β -D-GalNac > D-Gal	SBA	Glycine max (Soybean)
D-Gal-(β 1 \rightarrow 3)-D-GalNac	PNA	Arachis hypogaea (peanut)
GalNac	VVA	Vicia villosa (hairy winter vetch)
α -L-fucose	LTA	Lotus tetragonolobus (asparagus pea)
α -L-Fucos	UEA-1	Ulex europaeus (gorse seed)

جدول ۲: نتایج حاصل از مجاور ساختن مقاطع میکروسکوپی با لکتین های مورد مطالعه

صفحه کفی لوله عصبی					زایده نوتوکورد					محل تغییر هیستوشیمیایی
۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	روز
+	++	+++	+	-	+	++	++	++	-	لکتین
-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	SBA
+	+	-	-	-	+	+	++	++	-	PNA
-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	UEA-1
-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	LTA
-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	VVA

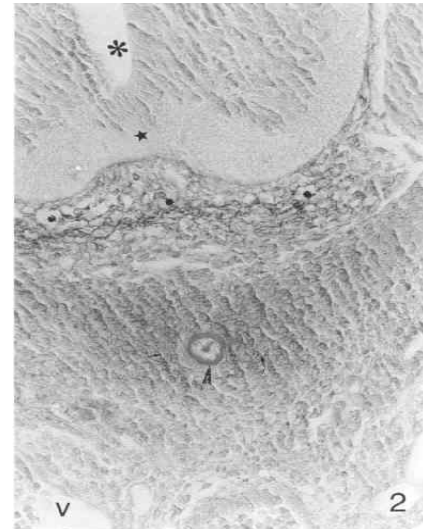
عدم واکنش -، واکنش خفیف +، متوسط ++، نسبتاً شدید +++



تصویر ۱: مقطع عرضی لوله عصبی در اوایل روز دهم جنینی که در مجاورت لکتین SBA قرار داده شده است.

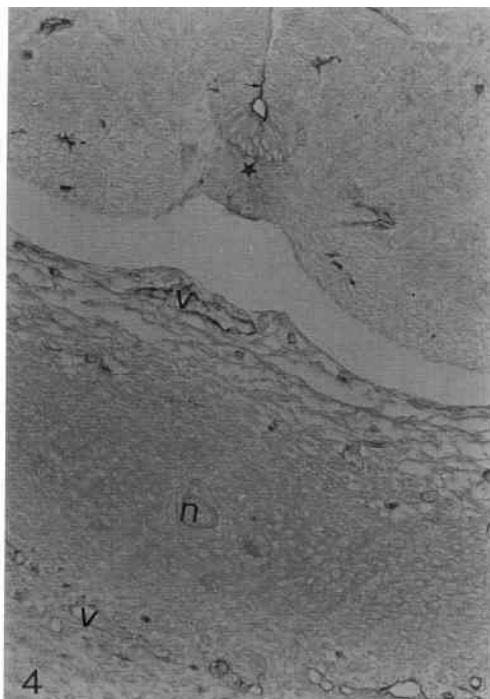
در این تصویر نوتوکورد (n) حالت صفحه ای داشته و در تماس با صفحه کفی لوله عصبی می باشد. واکنش سلول های نوتوکوردی به این لکتین خفیف بوده و در ناحیه غشاء قاعده ای قلدی شدیدتر است (سر پیکان کوچک). صفحه کفی لوله عصبی (ستاره کوچک) نیز واکنش خفیفی نشان داده است. سطح لومینال لوله عصبی (سرهای پیکان ضخیم) واکنش بسیار شدیدی به این لکتین نشان داده است. سلول های نورواینیال نیز در ناحیه گلژی خود (این ناحیه شامل دستگاه گلژی، سیتوپلاسم راسی و غشاء سیتوپلاسمی مجاور می باشد) واکنش شدیدی با این لکتین نشان داده است (پیکان های کوچک). واکنش ناحیه تشکیل دهنده پرده های منژ نیز شدید است (پیکان ضخیم). (بزرگ نمایی تصویر ۲۰۰ می باشد).

در روز دوازدهم جنینی واکنش سلول‌های صفحه کفی لوله عصبی به لکتین SBA افزایش یافته و در حد نسبتاً شدید می‌باشد ($p < 0/05$) ولی واکنش نوتوکورد به این لکتین تغییری نشان نمی‌دهد. واکنش سایر لکتین‌ها در محل صفحه کفی لوله عصبی منفی است. واکنش سلول‌های نوتوکوردی به سایر لکتین‌ها نیز منفی بوده و فقط لکتین UEA-1 (تصویرهای ۴ و ۵) واکنش شدیدتری نسبت به روز قبل نشان داده است ($p < 0/05$).



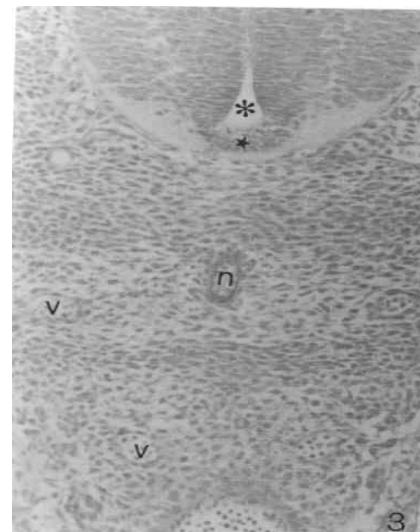
تصویر ۲: مقطع عرضی جنین یازده روزه که در مجاورت لکتین UEA-1 قرار داده شده است.

در این تصویر صفحه کفی لوله عصبی (ستاره متوسط) واکنش خفیفی نشان داده است. واکنش نوتوکورد (سریکان) نیز به این لکتین خفیف بوده است اما واکنش سلول‌های اسکروتومی در اطراف نوتوکورد در حد متوسط می‌باشد (پیکان‌های نازک). ناحیه تشکیل دهنده پرده‌های منژ (ستاره‌های کوچک) واکنش نسبتاً شدیدی به این لکتین نشان داده است. ستاره بزرگ نشان دهنده لوله عصبی و حرف V نشانگر عروق خونی است. (بزرگ‌نمایی تصویر ۲۰۰ می‌باشد).



تصویر ۴: مقطع عرضی جنین دوازده روزه که در مجاورت لکتین SBA قرار داده شده است.

در این تصویر صفحه کفی لوله عصبی (ستاره کوچک) واکنش نسبتاً شدیدی نشان داده است و این واکنش در سطح لومینال لوله عصبی در مجاورت صفحات قاعده‌ای (پیکان کوچک) بسیار شدید است. نوتوکورد واکنش متوسطی به این لکتین نشان داده است. حرف V نشان دهنده عروق خونی می‌باشد. (بزرگ‌نمایی تصویر ۲۰۰ می‌باشد).



تصویر ۳: مقطع عرضی جنین یازده روزه که در مجاورت لکتین LTA قرار گرفته و برای رنگ زمینه از آل‌سین بلو استفاده شده است.

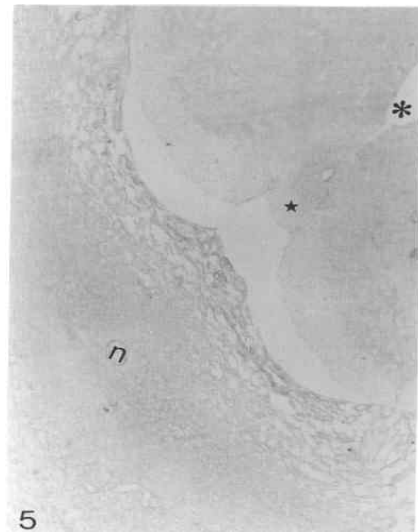
در این تصویر صفحه کفی لوله عصبی (ستاره کوچک) و نوتوکورد (n) و سلول‌های اسکروتومی اطراف آن هیچکدام با این لکتین واکنش نداشته‌اند. ستاره بزرگ نشانگر لوله عصبی و حرف V عروق خونی را نشان می‌دهد. (بزرگ‌نمایی تصویر ۲۵ می‌باشد).

در روز سیزدهم جنینی واکنش سلول‌های کفی لوله عصبی به لکتین SBA کاهش پیدا نموده ($p < 0.05$) و در حد خفیف می‌باشد. واکنش سلول‌های نوتوکوردی به این لکتین تغییری نشان نمی‌دهد و همچنان در حد متوسط می‌باشد. واکنش صفحه کفی به سایر لکتین‌ها منفی است. واکنش سلول‌های نوتوکوردی به لکتین‌های LTA PNA و VVA منفی است ولی واکنش به لکتین UEA-1 تغییری نشان نمی‌دهد و همچنان در حد متوسط باقی مانده است (تصویر ۵).

در روز چهاردهم جنینی واکنش صفحه کفی و نوتوکورد به کلیه لکتین‌های مورد استفاده منفی گردیده است.

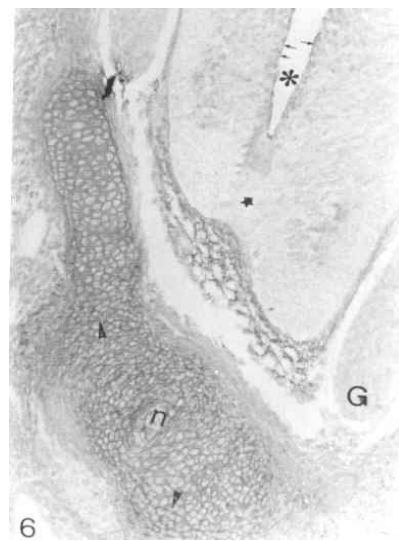
بحث و نتیجه گیری

صفحه کفی لوله عصبی ناحیه ویژه‌ای در بخش قدامی میانی لوله عصبی است که سلول‌های آن در اثنای نورون‌ز نقش‌های کلیدی در تمایز بخش‌های قدامی لوله عصبی ایفا می‌نمایند. تمایز پیش‌سازهای نورون‌های حرکتی در صفحات کفی و قاعده‌ای مربوط به میان‌کنش‌های پیچیده‌ای است که بین نوتوکورد و صفحه کفی لوله عصبی و همچنین بین صفحه کفی و صفحات قاعده‌ای بوقوع می‌پیوندد و مولکول‌های متعددی در این پدیده دخیلند که شناخته‌شده‌ترین آنها Shh است که به‌عنوان یک مولکول مورفوژن اصلی شناخته شده است و در تمایز نورون‌ها در بخش قدامی لوله عصبی دخالت دارد (۸، ۱۵، ۱۸، ۱۹، ۲۴). فاکتورهای دیگری نیز از قبیل ماکرومولکول‌های دارای زنجیره‌های قندی از قبیل گلیکوپروتئین‌ها و گلیکولیپیدها که دارای تغییرات برنامه‌ریزی شده‌ای در اثنای تکامل می‌باشند، در سطح سلول‌ها و همچنین ماتریکس خارج سلولی به‌طور موقت ظاهر گردیده و در تمایز و میان‌کنش‌های سلول‌های عصبی و برخی سیستم‌های دیگر در حال تکامل نقش‌های کلیدی ایفا می‌نمایند. این مولکول‌ها با سلول‌های اطراف و ماتریکس خارج سلولی آنها واکنش نموده و باعث تغییرات مورفولوژیکی در سلول‌های در حال تکامل و تمایز جنین می‌شوند (۱۰، ۲۰، ۲۱). این مواد در طی تکامل در سطح بعضی سلول‌ها ظاهر شده و یا از آنها ترشح می‌شوند و پس از انجام وظیفه تکاملی خود توسط سایر مولکول‌ها نظیر اسید سیالیک پوشیده شده و یا به‌وسیله برخی مواد شیمیایی مانند آنزیم‌ها تجزیه شده و کاملاً از بین می‌روند. میان‌کنش‌های سلولی یکی از همین موارد است که در مراحل بسیار حساس و کلیدی برای تمایزات بعدی در سلول‌های جنینی بوجود می‌آیند



تصویر ۵: مقطع عرضی جنین دوازده روزه که در مجاورت لکتین VVA قرار داده شده است.

در این تصویر هیچ واکنشی به این لکتین در محل صفحه کفی لوله عصبی (ستاره کوچک) و نوتوکورد (n) مشاهده نمی‌شود. سلول‌های اسکروتومی اطراف نوتوکورد نیز به این لکتین واکنش نشان نداده‌اند. ستاره بزرگ نشان دهنده لوله عصبی است. (بزرگ‌نمایی تصویر ۲۰۰ می‌باشد).



تصویر ۶: مقطع عرضی جنین سیزده روزه که در مجاورت لکتین PNA قرار داده شده است.

در این تصویر صفحه کفی لوله عصبی (ستاره کوچک) واکنشی به این لکتین نشان نداده است اما واکنش سطح لومینال سلول‌های اپاندیمی (پیکان‌های کوچک) نسبتاً شدید می‌باشد. واکنش نوتوکورد (n) به این لکتین منفی است اما سلول‌های اسکروتومی اطراف نوتوکورد (سر پیکان‌ها) واکنش نسبتاً شدیدی به این لکتین نشان داده‌اند. ستاره بزرگ نمایانگر لوله عصبی و حرف G نشان دهنده گانگلیون نخاعی می‌باشد. (بزرگ‌نمایی تصویر ۲۰۰ می‌باشد).

اثبات می‌باشد. به علاوه یافته‌های ما نشان می‌دهد که سایر لکتین‌های حساس به GalNac بکار گرفته شده در این تحقیق (جدول ۱) هیچکدام با صفحه کفی و زایده نوتوکورد واکنشی نشان ندادند که این عدم واکنش می‌تواند بیانگر اختلاف در شکل فضایی این مولکول بوده و یا وابسته به قند ماقبل آخر آن (Penultimate sugar) باشد. شواهد بیوشیمیایی و هیستوشیمیایی دال بر اختلاف باند شدن انواع لکتین‌های حساس به آن استیل گالاکتوز آمین وجود دارد. توجه دیگری که در مورد این عدم واکنش احتمال می‌رود حضور قند انتهایی Gal بجای GalNac در سطح این سلول‌ها می‌باشد زیرا لکتین SBA به قند انتهایی Gal نیز باند می‌شود. به طور کلی یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهند که SBA تنها لکتین اختصاصی GalNac است که با صفحه کفی در محدوده زمانی خاص واکنش نشان داده و در تشکیل طناب‌های عصبی قدامی دخیل است. این قند در فاصله روزهای دهم تا دوازدهم جنینی با صفحه کفی لوله عصبی و زایده نوتوکورد واکنش نشان داده و احتمالاً در میان کنش‌های بین این دو عضو دخالت داشته است. به علاوه از یافته‌های دیگر این تحقیق این است که ممکن است قند انتهایی فوکوز در تکامل زایده نوتوکورد نقش داشته باشد اما در میان کنش‌های این زایده با صفحه کفی لوله عصبی و تمایز آن احتمالاً نقشی ندارد.

تقدیر و تشکر

مقاله حاضر بخشی از نتایج طرح پژوهشی ۸۲۴/۱۷۶۳۸ معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد می‌باشد. لذا از مساعدت‌های بیدریغ آن معاونت محترم تشکر می‌شود و همچنین زحمات سرکار خانم متجدد در زمینه تهیه و آماده سازی برش‌های بافتی پژوهش مورد تقدیر است.

(۹،۱۲،۲۱). از جمله این موارد به نقش زایده نوتوکورد در القای صفحه کفی لوله عصبی و میان کنش‌های بین صفحات کفی و قاعده‌ای می‌توان اشاره نمود.

تحقیق حاضر مطالعه واکنش انواعی از لکتین‌ها (جدول ۱) را در اثنای تکامل صفحه کفی لوله عصبی و زایده نوتوکورد مورد مطالعه قرار داده و از نتایج حاصله چنین استنباط می‌گردد که در مراحل اولیه تکامل لوله عصبی گلیکوپروتئین حساس به لکتین SBA در زایده نوتوکورد و همچنین صفحه کفی لوله عصبی بیان گردیده و بتدریج میزان آن تا روز دوازدهم جنینی افزایش و از آن پس کاهش می‌یابد. این لکتین به طور انتخابی به قند انتهایی آن استیل گالاکتوز آمین به میزان بیشتری نسبت به قند انتهایی گالاکتوز باند می‌شود (α, β, D -GalNac > D-Gal) (۱۷). بیان گلیکوکانژوگیت‌هایی با این قند انتهایی در سطح سلول‌های نوتوکورد و صفحه کفی رفتاری شبیه Shh نشان می‌دهند و از طرفی کاملاً تأیید گردیده است که ماده اخیر در تکامل اولیه صفحه کفی و پیش‌ساز نورون‌های حرکتی در سیستم عصبی مرکزی دخیل است. برخی تحقیقات نشان داده اند که این ماده دارای ماهیت گلیکوپروتئینی می‌باشد. مثلاً Ruiz و همکاران مولکول Shh را گلیکوپروتئینی ترشحی معرفی نموده‌اند که در تکامل اولیه سیستم عصبی مرکزی نقش دارد (۲۲) و همچنین Weed و همکاران این مولکول را گلیکوپروتئینی می‌شناسند که از نوتوکورد ترشح شده و در مهاجرت سلول‌های اسکروتومی به اطراف نوتوکورد و تمایزات بعدی ایفای نقش می‌نماید (۲۶). بنابراین ممکن است قند انتهایی GalNac با آرایشی که تنها به لکتین SBA پاسخ می‌دهد در ساختمان مولکول Shh حضور داشته باشد. این نظریه به وسیله مطالعه دوجانبه ایمونوهیستوشیمی به کمک آنتی‌بادی مونوکلونال برای Shh و لکتین هیستوشیمی با استفاده از لکتین SBA قابل

Summary

The Role of Glycoconjugates in Development of Floor Plate During Early Morphogenesis in Mouse Embryo

Hasanzadeh- Taheri M.M., MSc.¹, Nikravesh M.R., PhD.², Jalali, M. PhD.² and Fazel A.R., PhD.³

1. PhD Student of Anatomy, Faculty Member, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran. 2. Associate Professor of Anatomy, 3. Professor of Embryology and Cellular Biology, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

The floor plate is a small group of cells located at the ventral midline of neural tube. During early neurogenesis the floor plate plays critical role (s) in differentiation of ventral portion of neural tube. The purpose of this study was to determine the distribution of glycoconjugates in floor plate as well as underlying mesoderm (notochord) and their inductive activities in mouse embryos. Formaline fixed sections embedded in paraffin from 10 to 14 days old Balb/C mouse embryos were processed for histochemical studies by using five different horseradish peroxidase (HRP) labelled

lectins including; *Glycin max* (SBA) specific for Gal and GalNac terminal sugar, *Vicia Villosa* (VVA) and *Arachis hypogaea* (peanut) for GalNac, *Ulex europeus* (UEA-1) and *Lotus tetragonolobus* (LTA) for α -L-fucose. Our results showed that SBA sensitive glycoconjugates react and change in floor plate, notochordal cells and surrounding extracellular matrix and these changes were significant ($P < 0.05$). Extensive differences between GalNac sensitive lectins were observed during motoneuron differentiation. There was no reaction with other tested GalNac lectins. Furthermore we observed significant changes ($P < 0.05$) in fucose glycoconjugates during notochordal development. The results suggest that the timing and distribution of SBA sensitive glycoconjugates may play a key role (s) in interactions and subsequent formation of adjacent tissues such as floor plate and notochord during critical period of morphogenesis. Our finding also showed that glycoconjugates with fucose terminal sugar may play a role (s) in notochordal development but probably have no function on floor plate development.

Key Words: Glycoconjugate, Notochord, Floor plate, Interaction, Embriogenesis
Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2004; 11(2): 85-93

References

1. Bancroft JD and Steven A : Theory and practice of histological techniques . 5th ed., New York, Churchill Livingstone, 1991; PP20-82.
2. Bronner-Fraser M and Fraser SE. Differentiation of the vertebrate neural tube. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9(6): 885-891.
3. Charrier JB, Lapointe F, LeDouarin NM and Teillet MA. Anti-apoptotic role of sonic hedgehog protein at the early stages of nervous system organogenesis. *Development* 2001; 128(20): 4011-4020.
4. Charrier JB, Lapointe F, Le Douarin NM and Teillet MA. Dual origin of the floor plate in the avian embryo. *Development* 2002; 129(20): 4785- 4796.
5. Cleaver O and Kerieg PA. Notochord patterning of the endoderm. *Dev Biol* 2001; 234(1): 1-12.
6. Colamarino SA and Tessier-Lavigne M . The role of the floor plate in axon guidance. *Annu Rev Neurosci* 1995; 18: 497-529.
7. Dilorio PJ, Moss JB, Sbrogna JL, Karlstrom RO and Moss LG. Sonic hedgehog is required early in pancreatic islet development. *Dev Biol* 2002; 244(1): 75-84.
8. Ericson J, Briscoe J, Rashbass P, VanHeyningen V and Jessel TM. Graded sonic hedgehog signaling and the specification of cell fate in the ventral neural tube. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1997; 62: 451-466.
9. Fazel AR, Thompson RP, Sumida H and Schulte BA. Lectin histochemistry of the embryonic heart expression of terminal and penultimate galactose residues in developing rats and chicks. *Am J Anat* 1989; 184(1): 85-94.
10. Ganji FC and Fazel AR. Lectin-binding pattern in the microenvironment of the mouse developing T-cell. *Iranian Biomedical Journal* 2003; 7 (1): 19-22.
11. Gong H, Ye W, Fredo TF and Hernandez MR. Hyaluronic acid in the normal and glaucomatous optic nerve. *EXP Eye Res* 1997; 64(4): 587-595.
12. Gotz W and Quondamatteo F. Glycoconjugate distribution in early human notochord and axial mesenchyme. *Acta Histochem* 2001; 103(1): 21-35.
13. Griffith CM and Wiley MJ. Distribution of cell surface glycoconjugates during secondary neurulation in the chick embryo. *Anat Rec* 1990; 226(1): 81-90.
14. Hollyday M. Neurogenesis in the vertebrate neural tube. *Int J Dev Neurosci* 2001; 19(2): 161-173.
15. Jessel TM and Dodd J. Floor plate-derived signals and the control of neural cell pattern in vertebrates. *Harvey Lect* 1990; 86: 87-128.
16. Le Douarin NM, Teillet MA and Catala M. Neurulation in amniote vertebrates: a novel

- view deduced from the use of quail-chick chimeras. *Int J Dev Biol* 1998; 42(7): 909-916 .
17. Montreuil J, Vliegenthart JFG and Schachter H: Glycoproteins II. 3rd ed., New yourk. Elsevier, 1997; PP403- 470.
 18. Placzek M, Dodd J and Jessell TM. Discussion point. The case for floor plate induction by the notochord. *Curr Opin Neurobiol* 2000; 10(1): 15-22.
 19. Placzek M, Tessier-Lavigne M, Yamada T, Jessell T and Dodd J. Mesodermal control of neural cell identity: floor plate induction by the Notochord. *Science* 1990; 250(4983): 985-988.
 20. Q asba PK. Involvement of sugars in protein – protein interactions. *Carbohydrate Polymers* 2000; 41: 293-309.
 21. Quondamatteo F, Zieger J, Gotz W, Miosge N and Herken R. Extensive glycosylation changes revealed by lectin histochemistry in morphologically normal prenatal tissues of the mouse mutant undulated (un/un). *Anat Rec* 2000; 258(3): 243-51.
 22. Ruiz I Altaba A, Palma V and Dahmane N. Hedgehog-Gli signaling and the growth of the brain. *Nat Rev Neurosci* 2002, 3(1): 24-33.
 23. Schwitzgebel VM. Programming of the pancreas. *Mol cell Endocrinol* 2001; 185(1-2): 99-108.
 24. Sporle R and Schughart K. Neural tube morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 1997; 7(4): 507-512.
 25. Sumoy L, Keasey JB, Dittman TD and Kimelman D. A role for notochord in axial vasuclar development revealed by analysis of phenotype and the expression of VEGF-2 in zebrafish flh and nt1 mutant embryos. *Mech dev* 1997; 63(1): 15-27.
 26. Weed M, Mundlos S and Olsen BR. The role of sonic hedgehog in vertebrate development. *Matrix Biol* 1997, 16(2): 53-58.
 27. Williams PL, Warwick R, Dyson M and Bannister LH: Gray's Anatomy, 38th ed., London, Churchill Livingstone, 1995; pp150-160.
 28. Yamada T, Pfaff SL, Edlund T and Jessell TM. Control of cell pattern in the neural tube: motor neuron induction by diffusible factors from notochord and floor plate . *Cell* 1993; 73(4): 673-686.