تحقیقی

نحوه گسترش ترکیبات قندی در دیواره‌های جانبی نخاع در دوران مورفوژنز موش BALB/c با استفاده از روش لکتین هیستوشیمی

الهام وجودی[۱]، وحید ابراهیمی[۲]، دکتر علیرضا ابراهیم زاده بیدسکان[۳]، دکتر علیرضا فاضل*[٤]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی مهندسی بافت، گروه مهندسی بافت، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ۲- دانشجوی دکتری تخصصی علوم تشریحی، گروه بیولوژی و علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی، تهران، ایران. ۳- دانشیار، گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران. ٤- استاد، گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

چکیده

زمینه و هدف : *ارگانیزرهای متفاوتی با ارسال پیام‌هایی باعث تکامل و تمایز نخاع می‌شوند. گلیکوکانجوگیت‌های مترشحه از سلول های دیواره جانبی نخاع نیز می‌تواند به‌عنوان پیام‌رسان‌های نوروژنزیس و تمایز عصبی باشد. این مطالعه به منظور تعیین نحوه گسترش ترکیبات قندی در دیواره‌های جانبی نخاع در دوران مورفوژنز موش BALB/c با استفاده از روش لکتین هیستوشیمی انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه تجربی جنین‌های ۱۰ تا ۱٦ روزه در فرمالین فیکس شدند. سپس مقاطع میکروسکوپی از آنها تهیه گردید. نمونه‌های بافتی برای واکنش با گلیکوکانجوگیت‌ها در مجاورت لکتین‌های DBA، OFA، GSA1B4 و MPA قرار داده شدند. برای رنگ‌آمیزی زمینه از آلیسن‌بلو با pH=2.5 استفاده گردید.*

یافته ها : *لکتین DBA هیچ واکنشی در ناحیه دیواره جانبی نخاع نشان نداد. لکتین MPA واکنشی نسبتاً شدید ولی یکنواخت به خصوص در قسمت رشته‌های عصبی دیواره جانبی نخاع نشان داد. واکنش لکتین GSA1B4 در قسمت سلول ها و رشته‌های عصبی دیواره‌های جانبی نخاع خفیف بود؛ ولی این واکنش در عروق خونی به‌صورت شدید و واضح مشاهده شد. لکتین OFA با قند انتهایی α-L-Fucose واکنشی شدید و مشخصی از همان اوایل دوران مورفوزنز در ناحیه دیواره‌های جانبی نخاع نشان داد.*

نتیجه‌گیری : *بیشترین واکنش در قسمت دیواره‌های جانبی نخاع مربوط به OFA بود که نشان‌دهنده اهمیت قند انتهایی فوکوز با اتصال (6→1) به قند ما قبل آخر N-acetyl-D-glocosamin (Glc-Nac) در تکامل این ناحیه است. همچنین به‌دلیل واکنش شدید GSA1B4 با عروق خونی نخاع استفاده از این لکتین برای مطالعات عروقی توصیه می‌گردد.*

کلید واژه‌ها : *تکامل ، نخاع ، لکتین ، هیستوشیمی ، لکتین OFA ، موش آزمایشگاهی*

* نویسنده مسؤول : دکتر علیرضا فاضل ، پست الکترونیکی fazela@mums.ac.ir

نشانی : مشهد، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، گروه علوم تشریحی، تلفن ۳۸۰۰۲۳۲٦-۰۵۱، نمابر ۳۸۰۰۲٤۸٤

وصول مقاله : ۹۲/۷/۲ ، اصلاح نهایی : ۹٤/۹/۲ ، پذیرش مقاله : ۹٤/۹/۷

مقدمه

تکوین و تمایز نهایی تمامی ارگان‌ها در دوره جنینی نتیجه وقایع پیچیده و منحصر به‌فردی است که در مسیرهای از پیش تعیین شده و کاملاً منظم منجر به تعیین سرنوشت سلول های تمایز نیافته جنینی می‌گردد (۱). تشکیل دیواره لوله عصبی از مراحل ابتدایی نورولاسیون است که به‌دنبال آن سلول های نوروایپیتلیالی این دیواره منشاء همه سلول‌های تشکیل‌دهنده سیستم عصبی شامل نوروبلاست‌ها و نوروگلیاها خواهند بود و سه بخش لوله عصبی شامل لایه مارژینال، لایه مانتل و لایه اپاندیمال از خارج به داخل را تشکیل خواهند داد. لایه اپاندیمال به‌عنوان داخلی‌ترین بخش لوله عصبی از تمایز نهایی سلول های نوروایپیتلیوم ایجاد می‌شود و لایه مانتل در شاخ‌های قدامی و خلفی به ترتیب بخش‌های حرکتی و حسی نخاع و در طرفین مجرا بخش اتونوم نخاعی را به وجود خواهند آورد (۲و۳).

سلول های متفاوتی در قسمت‌های مختلف لوله عصبی وجود دارند که در مراحل مختلف تکامل نخاعی مواد متفاوتی ترشح می‌کنند. اگرچه در تمامی مراحل پروسه تکامل و تمایز نخاع، SHH مترشحه از صفحه کفی و نوتوکورد نقش مهمی دارد؛ ولی مطالعات متعددی ترشحات متفاوتی از پروتئین‌ها و گلیکوپروتئین‌ها را از سلول‌های نوروایپیتلیوم و اپاندیمال اطراف مجرا و همچنین سلول‌های طرفین لوله عصبی را در نوروژنزیس، تمایز نورونی و هدایت آکسونی نخاع مهم دانسته‌اند (۶-۴). برخی مطالعات نشان‌دهنده

پیام‌های ارسالی از این سلول‌ها، به دلیل وجود نواحی غنی از ترکیبات گلیکوکانجوگیت و نیز نقش مهم آنها را در تکامل لوله عصبی و CNS هستند (۷).

بیان و بروز گلیکوکانجوگیت‌ها در میان‌کنش‌ها و تمایزات سلول‌ها و بافت‌ها نقش مهمی دارند و پس از انجام وظیفه توسط سایر مولکول‌هایی مانند اسید سیالیک پوشیده شده و یا توسط آنزیم‌ها تجزیه شده و کاملاً از بین می‌روند. هر کدام از این ترکیبات همزمان با حادثه تکاملی ویژه‌ای در تشکیل اعضاء ظاهر می‌گردد. یکی از پدیده‌های جالب این مولکول‌ها تغییرات آنها طی مراحل مختلف دوره جنینی است (۸و۹).

گلیکوکانجوگیت‌ها در اصل ترکیباتی واجد کربوهیدرات هستند که در ماتریکس خارج سلولی و سطح سلول ها انتشار یافته‌اند و در طی تکامل به‌طور موقت در سطح برخی سلول‌ها ظاهر شده یا از آنها ترشح می‌شوند و در پدیده‌های متعدد تکاملی نظیر حرکت و تمایزات سلولی نقش بسیار اساسی دارند و با پدیدار شدن به موقع در سطح سلول ها و یا ماده خارج سلولی در میانکنش‌ها که برای وقایع تکاملی سلول‌ها لازم و ضروری است؛ به‌عنوان واسطه شیمیایی و یا مورفوژن وارد عمل می‌گردند. شناسایی عملکرد و توزیع این مولکول‌ها توسط آشکارسازهای اختصاصی همچون لکتین‌ها در بسیاری از موارد برای تکامل ساختارهای جنینی امری حیاتی به‌شمار می‌رود (۱۲-۱۰).

تاکنون مطالعات هیستوشیمیایی و ایمونوهیستوشیمیایی پیرامون اجزای سیستم عصبی مرکزی انجام گرفته است. Dawson و همکاران با بهره‌گیری از آنتی‌بادی‌هایی بر علیه سلول‌های واجد NG2 (پروتئوگلیکان کوندروئیتین سولفات) و همچنین لکتین GSAI-B4 در سیستم عصبی مرکزی به مطالعه تکوین الیگودندروسیت‌ها در مغز و نخاع (روزهای ۱۴ تا ۱۷ جنینی) پرداختند. در هیچ‌کدام از مراحل، سلول های پارانشیم CNS واکنشی با لکتین از خود نشان ندادند؛ اما پاسخ برخی از عروق خونی abluminal به لکتین مورد نظر مثبت ارزیابی شد (۱۳).

مطالعه Mazzetti و همکاران با استفاده از لکتین LEA (Lycopersicon Esculentum) و سلول‌های جنینی تمایز نیافته نمونه‌های طبیعی موش و خوک و نیز مدل گلیوسارکوما نشان داد سلول های مختلف سیستم عصبی مرکزی به‌خصوص اندوتلیوم عروقی در نمونه‌های مغز و نخاع تمامی مراحل تکوین به LEA واکنش نشان دادند و بدین ترتیب لکتین LEA به عنوان یک مارکر مناسب برای مطالعات تکاملی و نحوه خونرسانی CNS پیشنهاد گردید (۱۴).

در مطالعه دیگری وجودی و همکاران با استفاده از قرار دادن نمونه‌های جنینی ۱۰ تا ۱۶ روزه موش در معرض طیف گسترده‌ای از لکتین‌های اختصاصی (نظیر OFA، LTA، DBA و SBA) به شناسایی قندهای انتهایی سازمان دهنده‌های نخاعی در دوره‌های بحرانی تشکیل طناب نخاعی پرداختند. نتایج حاصل، بیانگر واکنش شدید سلول‌های صفحه کفی در روزهای پایانی مورفوژنز به لکتین‌های OFA و WFA و نیز واکنش شدید سلول های صفحه کفی در روزهایی ابتدایی مورفوژنز به لکتین SBA بود (۱۵).

این مطالعه به منظور تعیین نحوه گسترش ترکیبات قندی در دیواره‌های جانبی نخاع در دوران مورفوژنز موش BALB/c با استفاده از روش لکتین هیستوشیمی انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی بررسی واکنش‌های لکتین هیستوشیمیایی بر روی مقاطع میکروسکوپی نمونه‌های جنینی موش در سه گروه لکتین حساس به قند انتهایی فوکوز و لکتین‌های حساس به ان استیل گالاکتوزآمین و گالاکتوز صورت گرفت. لکتین‌های به‌کار رفته در جدول یک آمده است.

پس از جفت‌گیری موش‌های نر و ماده BALB/c با استفاده از روش اسمیر واژینال روز صفر حاملگی تعیین شد. سپس موش‌های باردار طبق دستورالعمل مؤسسه ملی بهداشت (NIH) در شرایط استاندارد از نظر رطوبت (۵۰درصد)، درجه حرارت (حدود ۲۴ درجه سانتی‌گراد) و نور (۱۲ ساعت روشنایی- تاریکی) با دسترسی به آب و مواد غذایی نگهداری شدند. جنین‌های موش‌های حامله از روز دهم (E10) تا روز شانزدهم جنینی (E16) از لوله‌های رحمی خارج و در محلول فیکساتور قرار داده شدند. نمونه‌های جنینی به روش معمول بافت‌شناسی پاساژ داده شدند و بلوک‌های تولید شده توسط میکروتوم به روش سریال سکشن و در ضخامت‌های ۵ میکرومتر به صورت Transverse، Sagittal و Frontal برش داده شدند. پس از پارافین‌زدایی در گزیلن توسط الکل‌های نزولی آب‌دهی شده و بعد از یک ساعت شستشو در محلول PBS برای خنثی نمودن پراکسیداز موجود به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه لام‌ها را در

جدول ۱ : لکتین‌های مورد استفاده و نحوه اتصال به قندهای اختصاصی

Carbohydrate-binding specificity	*Abbreviation*	*Lectin tested*
Aleuria aurantia (Orange peel fungus)	*OFA*	*α-L-Fuc. (1→6) GlcNac*
Dolichos biflorus (horse gram lectin)	*DBA*	*α GalNAc (1→3) GalNac*
Maclura pomifera agglutinin	*MPA*	*Gal - (β1→3)-GalNAc*
Griffonia Simpliciflia	*GSA1B4*	*Gal > Gal Nac*

Fuc; Fucose, Gal; Galactose, GalNac; N-Acetylgalactosamine

محلول آب اکسیژنه یک درصد در متانول قرار داده شدند و برای شستشو ۴۵ دقیقه سکشن‌ها در محلول PBS در اتاقک مرطوب و در دمای اتاق قرار گرفتند (۱۶و۱۷).

در ادامه کار برروی هر سری از سکشن‌ها چند قطره از لکتین‌های کونژوگه با آنزیم HRP با غلظت ۱۰ تا ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ریختیم و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق لام‌ها در معرض آن قرار داده شد. حداقل سه نمونه با هر لکتین رنگ‌آمیزی و یک برش به عنوان شاهد در معرض HRP، DAB و آب اکسیژنه (بدون استفاده از لکتین) قرار گرفتند. لکتین‌ها با محلول بافر فسفات PBS در pH=۷/۲ و در دمای اتاق قرار گرفتند. بعد از شستشو با محلول PBS برش‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول حاوی DAB (Diaminobenzidin) و PBS (Phosphate buffer saline) قرار داده شدند. محلول ذکر شده با غلظت ۰/۰۳ گرم DAB در PBS بوده و به ازای هر ۱۰۰ سی‌سی محلول ۲۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه به آن اضافه گردید. در مرحله بعد، پس از شستشوی برش‌ها با آب جاری رنگ‌آمیزی زمینه با استفاده از محلول یک درصد آلسین‌بلو در pH= ۲/۵ به مدت یک دقیقه انجام گرفت (۱۰و۱۶). در نهایت لام‌ها به روش معمول، آبگیری و مونته گردید. نمونه‌های بافتی به کمک میکرسکوپ نوری توسط محققین مورد مطالعه قرار گرفت و سپس با توجه به روش‌های موجود شدت رنگ‌پذیری که تابعی از میزان قند اختصاصی موجود در نمونه‌ها است؛ تعیین و درجه‌بندی گردید. میزان شدت واکنش شیمیایی بر اساس شدت رنگ موجود در نمونه‌ها به صورت کور و به صورت رتبه‌ای درجه‌بندی شد. لام‌ها بر اساس شدت واکنش به لکتین و بر مبنای طیف لیکرت به ترتیب جدول ۲ درجه‌بندی شدند (۱۸).

جدول ۲ : واکنش نمونه‌ها به لکتین‌های مورد استفاده در روزهای مختلف جنینی بر اساس مشاهده شدت رنگ مپتنی بر طیف لیکرت

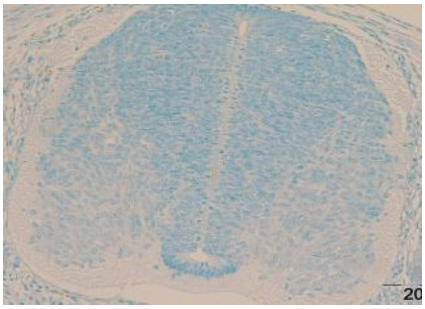
Lectins	*E12*	*E13*	*E14*	*E15*	*E16*
DBA	-	-	-	-	-
GSA1B4	-	-	+	+	+
OFA	+	+	+++	+++	+++
MPA	-	-	++	++	+++

بدون واکنش (-)، واکنش ضعیف (+)
واکنش متوسط (++)، واکنش شدید (+++)

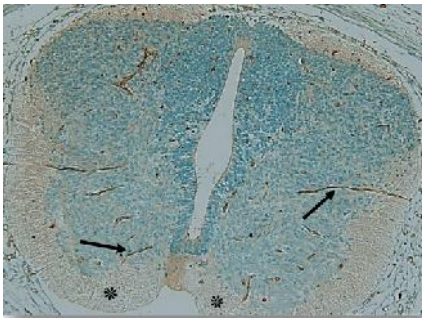
یافته‌ها

در تمامی مراحل مورفوژنز هیچ‌کدام از سلول های دیواره عصبی به لکتین DBA واکنشی نشان ندادند (شکل یک).

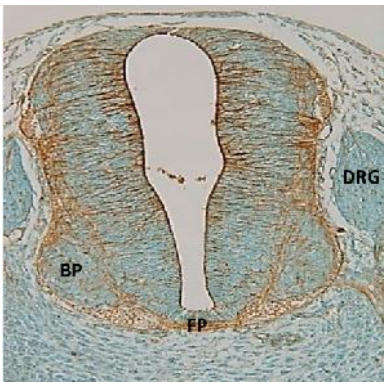
واکنش به لکتین GSA1B4 در اوایل دوران مورفوژنز خفیف بود و تا اواخر این دوران کمی بر شدت آن افزوده شد. واکنش به این لکتین به صورت یکنواخت در طرفین نخاع در مناطق با رشته‌های عصبی، به صورت خفیف دیده شد؛ ولی در قسمت‌های با عروق خونی، واکنش به نسبت شدیدی مشاهده گردید (شکل ۲).



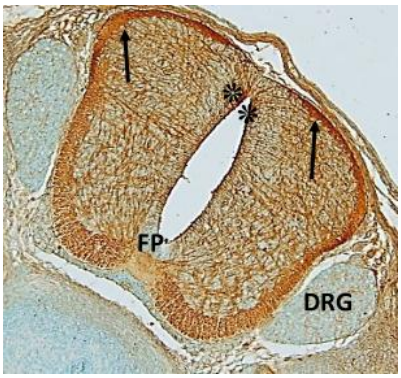
شکل ۱ : نمونه میکروسکوپی مربوط به روز ۱۲ جنینی و لکتین DBA هیچ‌گونه واکنشی در سلول‌ها با لکتین موردنظر مشاهده نمی‌شود. (درشت‌نمایی ۲۰۰×)



شکل ۲ : نمونه میکروسکوپی مربوط به روز ۱۵ جنینی و لکتین GSA1B4
در ناحیه شاخ قدامی ناحیه لامینار واکنش در سلول‌های اپاندیمال آن دیده می‌شود که ترشحات آن همراه با رشته‌ها (فلش) واکنش داده‌اند. همزمان با آن واکنش در ناحیه فونیکولوس‌ها (*) و رشته‌های عصبی لابلای سلول‌های Basal plate و Alar plate به صورت خفیف دیده می‌شود. (درشت‌نمایی ۲۰۰×)



شکل ۳ : نمونه میکروسکوپی مربوط به روز ۱۲ جنینی و لکتین OFA رشته‌های عصبی در هر دو ناحیه شاخ قدامی شاخ خلفی واکنش شدیدی نشان می‌دهند. در لوله عصبی در ناحیه صفحه قاعده‌ای (BP) تمایز پیشرفته‌تر است. در ناحیه طرفی جایی که قرار است فونیکولوس‌های طرفی را به وجود آورد؛ واکنش شدیدتری را نشان می‌دهد. در سلول‌های گانگلیون ریشه خلفی (DRG) واکنش خفیف‌تر است. FP : صفحه کفی (درشت‌نمایی ۲۰۰×)



شکل ٤ : نمونه میکروسکوپی مربوط به روز ۱۵ جنینی و لکتین OFA واکنش به‌صورت یکنواخت (ubiquitous) دیده می‌شود. واکنش در ناحیه سلول‌های اپاندیمال داخل لومن به‌خصوص در ناحیه صفحه سقفی (*) به‌صورت شدید است. همزمان با آن واکنش بسیار شدیدی در ناحیه فونیکولوس خلفی (فلش) دیده می‌شود که در حال تشکیل است. واکنش با OFA در مسیرهای عصبی شدیدتر است. در ناحیه سلول‌های صفحه کفی (FP) واکنشی مشاهده نمی‌شود و سلول‌های اپاندیمال این ناحیه نیز واکنش خفیف‌تری دارند؛ ولی در ناحیه رشته‌ای صفحه کفی که نهایتاً رابط قدامی را خواهد ساخت واکنش به‌صورت شدید مشاهده می‌شود. گانگلیون ریشه خلفی (DRG) به‌صورت بسیار خفیف واکنش داده است. (درشت‌نمایی ×۲۰۰)

شکل ٥ : نمونه میکروسکوپی مربوط به روز ١٦ جنینی و لکتین MPA
فونیکولوس قدامی (AF) با این لکتین به‌صورت خفیف واکنش داده است. در حالی که فونیکولوس‌های طرفی (*) واکنش شدیدی به لکتین مورد استفاده داده‌اند. واکنش در ناحیه اپاندیمال (E) صفحه سقفی نیز به‌صورت شدید مشاهده می‌شود. (درشت‌نمایی ۲۰۰×)

واکنش به لکتین OFA از همان آغاز دوران مورفوژنز به‌صورت شدید بود و بیشترین شدت آن در ناحیه دیواره‌های کناری مجرای عصبی در ناحیه سلول‌های نوروایپی‌تلیال طرفین مجرا و فونیکولوس‌های طرفی بود (شکل ۳). هر چه از میزان تکوین لوله عصبی جنین گذشت؛ بر شدت این واکنش افزوده شد و این واکنش با شدت بالاتر در رشته‌های پراکنده در بین سلول‌های نوروایپی‌تلیال طرفین مجرا و فونیکولوس‌های طرفی نخاع مشاهده شد. طبق شکل ۴ در جنین با تکوین بالاتر، شدت واکنش در اطراف مجرای عصبی به ویژه در ناحیه خلفی مجرا و فونیکولوس‌های طرفی و خلفی نخاع بیشتر بود.

واکنش به MPA نیز به‌صورت متوسط ولی واضح در ناحیه فونیکولوس‌های طرفی به‌خصوص در اواخر دوران مورفوژنز مشاهده شد. با توجه به شکل ۵ در طرفین به‌صورت قرینه در سطح لومینال واکنش شدیدی دیده شد؛ اما سلول‌های abluminal هیچ‌گونه واکنشی به لکتین موردنظر نشان ندادند. همچنین بیشترین واکنش در رشته‌های عصبی طرفین مجرا به‌خوبی مشاهده شد.

بحث

بیان و بروز گلیکوکانجوگیت‌ها در میان‌کنش‌ها و تمایزات سلول ها و بافت‌ها نقش مهمی دارند و پس از انجام وظیفه توسط سایر مولکول‌هایی مانند اسید سیالیک پوشیده شده و یا توسط آنزیم‌ها تجزیه شده و کاملاً از بین می‌روند. هر کدام از این ترکیبات همزمان با حادثه تکاملی ویژه‌ای در تشکیل اعضاء ظاهر می‌گردد. یکی از پدیده‌های جالب این مولکول‌ها تغییرات آنها طی مراحل مختلف دوره جنینی است (۸و۹).

در مطالعه پیش رو از چهار لکتین برای شناسایی تغییرات گلیکوکانجوگیت‌های سطح سلولی و ماتریکس خارج سلولی سلول های سطح لومینال نخاع در مراحل مختلف مورفوژنز موش نژاد BALB/c استفاده شد. به‌دلیل اتصالات مختلف قندانتهایی GalNAc واکنش‌های متفاوتی با لکتین‌های مختلف ایجاد شد. برطبق مطالعات یازده نوع مختلف اتصال برای GalNAc با گلیکوپروتئین‌ها در بافت‌های پستانداران شناسایی شده است که می‌توانند با انواع لکتین‌ها به‌صورت متفاوت و اختصاصی واکنش دهند و لکتین DBA از جمله لکتین‌هایی است که با این قند انتهایی واکنش می‌دهد. به‌طوری که Albert Wu و همکاران در مطالعه‌ای با هدف مقایسه واکنش لکتین‌های اختصاصی گیرنده‌های کربوهیدراتی حاوی مولکول‌های انتهایی گالاکتوز (Gal) و ان-استیل گالاکتوزآمین (GalNac) در سطح سلول‌ها اهمیت حضور و بیان این دو ترکیب را در سیستم عصبی به اثبات رساندند (۱۹). براین اساس در مطالعه ما لکتین اختصاصی GalNac یعنی DBA تقریباً در تمامی مراحل مورفوژنز مورد مطالعه با دیواره‌های طرفی نخاع هیچ واکنشی نشان نداد و به‌نظر می‌رسد با وجود نقش حیاتی این ترکیب طی تکوین جنینی، DBA قادر به شناسایی دقیق GalNac در سطح سلول های طناب نخاعی در مراحل تکامل این ناحیه از نخاع نبوده است. از طرفی دیگر استفاده از لکتین MPA برای شناسایی GalNac پیوند شده با قند ماقبل انتهایی خود یعنی گالاکتوز، حاکی از تایید نتایج حاصل از مطالعه Albert Wu (۱۹) مبنی بر واکنش سلول‌های سیستم عصبی با لکتین‌های اختصاصی GalNac است.

لکتین OFA اختصاصی برای اتصال و آشکارسازی قند انتهایی فوکوز اتصال است. مطالعات نشان داده‌اند اتصالات این مولکول با

قندهای ما قبل آخر و همچنین موقعیت فضایی آن نیز در انتهای زنجیره قندی متفاوت است. بر این اساس مجموعه‌ای از لکتین‌ها برای شناسایی موقعیت خاصی از فوکوز به‌کار می‌روند. طبق مطالعات لکتین OFA تنها لکتینی است که قادر است اتصال (1→6) فوکوز را به قند ما قبل آخر N-acetyl-D-glocosamin (Glc-Nac) شناسایی نماید (۲۰و۲۱). طبق یافته‌های حاصل از مطالعه ما لکتین OFA در دوران مورفوژنز نخاع به‌ویژه در ناحیه دیواره‌ای لوله عصبی بیشترین واکنش را با سلول ها نشان داد. بدین ترتیب می‌توان پیشنهاد نمود گیرنده‌های α-L-Fucose Glc-Nac (1→6) فوکوز در این نواحی نقش اساسی در تکامل ساختارهای سازنده طناب نخاعی بالغ برعهده دارند.

دو لکتین دیگر شامل GSA1B4 و MPA بیشتر با قند انتهایی گالاکتوز با اتصالات متفاوت واکنش می‌دهند و این تفاوت را می‌توان در نحوه واکنش آنها در همین مطالعه مشاهده کرد. بیشترین واکنش لکتین MPA با رشته‌های عصبی موجود در بین سلول های دیواره جانبی نخاع است. واکنش GSA1B4 با رشته‌های عصبی به‌صورت خفیف بوده و بیشترین واکنش این لکتین با عروق داخل نخاعی است. بدین ترتیب با ارزیابی نتایج حاصل از مطالعه، به‌نظر می‌رسد از GSA1B4 می‌توان بیشتر به منظور مطالعات عروقی سیستم عصبی مرکزی استفاده نمود. در مطالعه Dawson و همکاران نیز لکتین GSA1B4 یک مارکر کاملاً اختصاصی و مناسب برای شناسایی عروق خونی سیستم عصبی پیشنهاد شده است (۱۳).

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به تعیین دقیق روزهای جنینی اشاره نمود.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج مطالعه حاضر و سایر مطالعات هیستوشیمیایی می‌توان گفت الگوی تشکیل و تمایز سلول های سازنده بخش‌های مختلف سیستم عصبی مرکزی از لحاظ نحوه ظهور و بروز قندهای انتهایی سطح سلولی در سرتاسر لوله عصبی جنین یک فرآیند کاملاً منظم بوده و علاوه بر این قندهایی نظیر آلفا-ال-فوکوز و ان-استیل گالاکتوزآمین می‌توانند نقشی کلیدی در تکوین صحیح دیواره‌های جانبی طناب نخاعی ایفا نمایند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه دانشجویی خانم الهام وجودی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته علوم تشریحی از دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد بود. همچنین حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب (شماره ۹۱۱۲۱۵) معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد بود و با حمایت مالی آن معاونت محترم به انجام رسید. بدین وسیله از تلاش‌های دلسوزانه و خدمات تکنیکی سرکار خانم فاطمه متجدد کمال سپاس خود را اعلام می‌داریم.

References

1. Dalby MJ, Gadegaard N, Tare R, Andar A, Riehle MO, Herzyk P, et al. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. Nature Materials. 2007; 6(12): 997-1003. doi: 10.1038/nmat2013

2. Kondrychyn I, Teh C, Sin M, Korzh V. Stretching morphogenesis of the roof plate and formation of the central canal. PLoS One. 2013;8(2): e56219. doi: 10.1371/journal.pone.0056219

3. Emsley JG, Mitchell BD, Kempermann G, Macklis JD. Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. Prog Neurobiol. 2005 Apr;75(5): 321-41.

4. Sarnat HB. Histochemistry and immunocytochemistry of the developing ependyma and choroid plexus. Microsc Res Tech. 1998 Apr; 41(1):14-28.

5. Takahashi M, Arai Y, Kurosawa H, Sueyoshi N, Shirai S. Ependymal cell reactions in spinal cord segments after compression injury in adult rat. J Neuropathol Exp Neurol. 2003 Feb; 62(2):185-94.

6. Moreno-Manzano V, Rodríguez-Jiménez FJ, García-Roselló M, Laínez S, Erceg S, Calvo MT, et al. Activated spinal cord ependymal stem cells rescue neurological function. Stem Cells. 2009 Mar; 27(3):733-43. doi: 10.1002/stem.24

7. Kleene R, Schachner M. Glycans and neural cell interactions. Nat Rev Neurosci. 2004 Mar; 5(3):195-208.

8. Przybyło M, Lityńska A, Hoja-Łukowicz D, Kremser E. Rat submandibular gland during the maturation process: changes in enzyme activities, protein and lectin-binding profiles. Physiol Res. 2004; 53(3): 317-26.

9. Bernardi A, Jiménez-Barbero J, Casnati A, De Castro C, Darbre T, Fieschi F, et al. Multivalent glycoconjugates as anti-pathogenic agents. Chem Soc Rev. 2013 Jun; 42(11): 4709-27. doi: 10.1039/c2cs35408j

10. Pasdar FA, Khooei A, Fazel A, Mahmoudi M, Nikravesh MR, Delui MK. Diagnostic value of lectins in differentiation of molar placentas. Iran J Basic Med Sci. 2012 Nov-Dec; 15(6): 1140-7.

11. Quondamatteo F, Zieger J, Götz W, Miosge N, Herken R. Extensive glycosylation changes revealed by lectin histochemistry in morphologically normal prenatal tissues of the mouse mutant undulated (un/un). Anat Rec. 2000 Mar; 258(3): 243-51.

12. Haltiwanger RS, Lowe JB. Role of glycosylation in development. Annu Rev Biochem. 2004; 73: 491-537.

13. Dawson MR, Levine JM, Reynolds R. NG2-expressing cells in the central nervous system: Are they oligodendroglial progenitors? J Neurosci Res. 2000 Sep; 61(5): 471-9. doi: 10.1002/1097-4547(20000901)61:5<471::AID-JNR1>3.0.CO;2-N

14. Mazzetti S, Frigerio S, Gelati M, Salmaggi A, Vitellaro-Zuccarello L. Lycopersicon esculentum lectin: an effective and versatile endothelial marker of normal and tumoral blood vessels in the central nervous system. Eur J Histochem. 2004 Oct-Dec; 48(4): 423-8.

15. Vojoudi E, Ebrahimi V, Ebrahimzadeh-Bideskan A, Fazel A. Glycoconjugates distribution during developing mouse spinal cord motor organizers. Iran Biomed J. 2015 Jan; 19(1): 63-68. doi: 10.6091/ibj.1298.2015

16. Ebrahimi V, Vojoudi E, Fazel A, Ebrahimzadeh-Bideskan A. Histochemical study of retinal photoreceptors development during pre- and postnatal period and their association with retinal pigment epithelium. Iran J Basic Med Sci. 2014 Jul;17(7):483-9.

17. Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. Vet Pathol. 2005 Jul; 42(4): 405-26.

18. Nikmard F, Ebrahimzadeh Bideskan A, Mahmoodian A, Mohammadzadeh E, Fazel A. [Study of glycoconjugates terminal sugars during gonadogenesis in rat by lectin histochemical method]. Razi Journal of Medical Sciences (RJMS). 2011; 18(82-83): 44-53. [Article in Persian]

19. Wu AM. Carbohydrate structural units in glycosphingolipids as receptors for Gal and GalNAc reactive lectins. Neurochem Res. 2002 Aug; 27(7-8):593-600.

20. Fujihashi M, Peapus DH, Kamiya N, Nagata Y, Miki K. Crystal structure of fucose-specific lectin from Aleuria aurantia binding ligands at three of its five sugar recognition sites. Biochemistry. 2003; 42(38): 11093-9. doi: 10.1021/bi034983z

21. Wimmerova M, Mitchell E, Sanchez J-F, Gautier C, Imberty A. Crystal structure of fungal lectin: six-bladed beta-propeller fold and novel fucose recognition mode for Aleuria aurantia lectin. J Biol Chem. 2013 Jul; 278: 29: 27059-67.

Original Paper

Glycoconjugates distribution in the lateral walls of spinal cord during mouse morphogenesis using lectin histochemical method

Vojoudi E (M.Sc)[1], Ebrahimi V (M.Sc)[2]
Ebrahimzadeh Bideskan AR (Ph.D)[3], Fazel AR (Ph.D)*[4]

[1]Ph.D Candidate in Tissue Engineering, Department of Tissue Engineering, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [2]Ph.D Candidate in Anatomical Sciences Department of Biology and Anatomical Sciences, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [3]Associate Professor, Department of Anatomy and Cell Biology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. [4]Professor, Department of Anatomy and Cell Biology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

Abstract

Background and Objective: Different organizers are involved in spinal cord development and differentiation by sending various messages. Specific glycoconjugates secreted from the cells of lateral wall of spinal cord can also act as neurogenesis and neural differentiation messengers. This study was carried out to determine the distribution of sugar compounds in the lateral walls of spinal cord during mice morphogenesis using lectin histochemistry method.

Methods: In this experimental study, sections of BALB/c mice from 10-16 embryonic days were fixed in formalin and then histological sections were prepared. Tissue samples for reaction to the glycoconjugates were incubated with DBA, OFA, GSA1B4 and MPA lectins. Alcian blue with pH equal 2.5 was used for background staining.

Results: DBA lectin did not react with the lateral wall of the spinal cord. MPA lectin showed severe reaction but consistent, especially in nerve fibers of the lateral wall of spinal cord. GSA1B4 lectin showed weak reaction in the cells and nerve fibers of the spinal cord, but severe reaction was clearly observed in blood vessels. OFA lectin showed severe reaction with α-L-Fucose terminal sugar in the lateral walls of the spinal cord in early stages of morphogenesis.

Conclusion: The most reaction in the lateral walls of the spinal cord was related to OFA, which reflects the importance of fucose terminal sugar by connecting (1→6) to the penultimate sugar N-acetyl-D-glocosamin (Glc-Nac) in the development of spinal cord. Due to severe reaction of GSA1B4 to blood vessels of spinal cord, use of this lectin for vascular studies, is recommended.

Keywords: Development, Spinal Cord, Lectin, Histochemistry, OFA Lectin, Mouse

*** Corresponding Author: Fazel AR (Ph.D), E-mail: fazela@mums.ac.ir**

Received 24 Sep 2013 **Revised** 23 Nov 2015 **Accepted** 28 Nov 2015

Cite this article as: Vojoudi E, Ebrahimi V, Ebrahimzadeh Bideskan AR, Fazel AR. [Glycoconjugates distribution in the lateral walls of spinal cord during mouse morphogenesis using lectin histochemical method]. J Gorgan Uni Med Sci. Spring 2016; 18(1): 16-22. [Article in Persian]