گسترش اختصاصی مولکول فوکوز در ردیابی با لکتین Aleuria Aurantia در تکامل رشته‌های عصبی ناحیه نخاع لوله عصبی در طی دوران مورفوژنز موش

دکتر علیرضا فاضل[1]- دکتر محمدرضا نیکروش[2]- دکتر مهدی جلالی[2]

چکیده

زمینه و هدف: در مطالعات متعددی مشخص شده است که مولکول فوکوز در زنجیره‌های قندی گلیکوپروتئین خاصی وجود دارد که مسؤول نقل و انتقال مواد مختلف در طول زواید عصبی نورون‌های نابالغ محسوب می‌شود. علاوه بر این در ضمن تکامل جنینی نیز در سطح سلول‌های مشتق شده از اکتودرم ظاهر شده و در بسیاری از پدیده‌های تکاملی نقش بحرانی ایفا می‌نماید. هدف از این پژوهش بررسی این واقعیت بود که آیا مولکول فوکوز در گسترش رشته‌های عصبی در اوایل شکل‌گیری لوله عصبی و همچنین تمایزات سلولی آن وجود دارد و نحوه توزیع آن در خلال این پروسه تکاملی چگونه است؟

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی از ۲۴ موش ماده نژاد Balb/c استفاده شد و جنین‌های مربوط به روزهای دهم تا پانزدهم حاملگی جمع‌آوری گردید و پس از ثبوت و تهیه برشهای بافتی با استفاده از لکتین‌های اختصاصی LTA، UEA-1 و OFA رنگ‌آمیزی شدند.

یافته‌ها: یافته‌های این تحقیق نشان داد که از میان سه لکتین به کار رفته برای ردیابی مولکول فوکوز، فقط OFA (Aleuria Aurantia) قادر است در اوایل تکامل لوله عصبی واکنش نشان دهد. این واکنش‌ها در مناطق حسّی و حرکتی نخاع از روز یازدهم آغاز و تا روز چهاردهم جنینی کامل گردید. در طیّ این مدت فونیکولوس‌های قدامی، طرفی و خلفی و رشته‌های عصبی در صفحات بالی و قاعده‌ای به این لکتین واکنش نشان دادند. گانگلیون‌های ریشه پشتی نخاع نیز در مراحل خاصی از تکامل واکنش نشان دادند. در آزمایش با لکتین‌های LTA وUEA-1 هیچ نوع واکنشی در هیچ‌یک از بخشهای لوله عصبی در هیچ مرحله‌ای مشاهده نگردید.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این تحقیق، در طی دوران مورفوژنیک لوله عصبی موش، رشته‌های عصبی در حال تکامل دارای گلیکوکانجوگیت بسیار اختصاصی حاوی فوکوز بوده که فقط با لکتین OFA مشخص می‌گردد. علاوه بر این، وجود گلیکوپروتئین مزبور در سطح سلولی و ماده خارج سلولی مناطقی از لوله عصبی، نقش کلیدی این مولکول را در پدیده نوروژنز مشخص می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: تکامل لوله عصبی؛ لکتین هیستوشیمی؛ فوکوز؛ موش

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند (دوره ۱۵؛ شماره ۲؛ تابستان ۱۳۸۷)

دریافت: ۱۳۸۶/۴/۲۴ اصلاح نهایی: ۱۳۸۶/۸/۵ پذیرش: ۱۳۸۶/۹/۲۷

[1] نویسنده مسؤول؛ استاد گروه آموزشی علوم تشریحی و ژنتیک، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
آدرس: مشهد- خیابان دانشگاه- دانشگاه علوم پزشکی مشهد- دانشکده پزشکی- گروه آموزشی علوم تشریحی و ژنتیک کد پستی: ۹۱۳۷۶
تلفن: ۴- ۸۵۴۴۰۸۱ پست الکترونیکی: fazela@mums.ac.ir و fazelalireza@hotmail.com
[2] دانشیار گروه آموزشی علوم تشریحی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

مقدمه

زنجیره‌های قندی سطح سلول‌ها در طی دوران تکامل جنینی در پدیده‌های متعدد تکاملی نظیر حرکت و تمایزات سلولی نقش بسیار اساسی دارند. این مولکول‌ها با پدیدار شدن بموقع در سطح سلول‌ها و یا ماده خارج سلولی در میانکنش‌ها* که برای وقایع بعدی سلول‌ها ضروری است، به عنوان واسطه شیمیایی و یا مورفوژن وارد عمل می‌گردند. عملکرد این مولکول‌ها در بسیاری از موارد، برای روند تکامل جنینی جنبه بحرانی دارد و به همین علت چنانچه بافتهای جنینی در حال تکامل در معرض برخی تراتوژن‌ها قرار گیرند، ممکن است باعث اختلال این مولکول‌ها شده و در نهایت منجر به بروز ناهنجاریهای متعدد جنینی گردند (۱-۶).

هرچند تکامل سیستم عصبی مرکزی مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است اما مطالعات هیستوشیمیایی مرحله به مرحله سلول‌های عصبی و گسترش میلیونها رشته عصبی در اوایل دوران مورفوژنز هنوز مراحل اولیه خود را طی می‌نماید (۷-۱۰). برخی از مطالعات هیستوشیمیایی نشان می‌دهد که قند انتهایی فوکوز (۱۱) به صورت بسیار اختصاصی در گلیکوپروتئین‌هایی با عنوان گلیکوپروتئین‌های با انتقال سریع (FTG)† در اکسون‌های عصبی نورون‌های بالغ وجود دارد که فقط با استفاده از روشهای لکتین هیستوشیمیایی قابل رؤیت می‌باشد (۱۲-۱۴).

در برخی از مطالعات دیگر نیز ثابت شده است که لکتین Aleuria Aurantia با برخی سلول‌های عصبی و یا سلول‌های مشتق شده از سلول‌های عصبی از قبیل سلول‌های ستیغ عصبی و همچنین سلول‌های بخش وسیعی از دیواره آئورتیکوپولمونواری در دوران تکامل جنینی نیز واکنش نشان می‌دهند (۱۵).

با توجه به این واقعیت که این نوع گلیکوپروتئین FTG فقط در رشته‌های عصبی نورون‌های بالغ موجود است و در نقل و انتقال بسیاری از مولکول‌های دیگر از جسم سلول به محل سیناپس‌های عصبی و انتهای اکسون‌ها و بر عکس نقش دارد، در این تحقیق وجود و گسترش این گلیکوپروتئین در دوران رویانی‡ تکامل نخاع و در اوایل شکل‌گیری لوله عصبی مورد بررسی قرار گرفت.

هدف از این مطالعه لکتین هیستوشیمی پاسخ به این سؤال بود که اولاً با توجه به تغییرات لحظه به لحظه نوروبلاست‌ها در دوران جنینی که در نتیجه، فعل و انفعالات زیادی را طلب می‌نماید، مشخص شود که آیا FTG می‌تواند در نورون‌های اولیه وجود داشته باشد؟ دوم این که گسترش این زواید نسبت به پیشرفت مراحل تکاملی چگونه است و سوم این که فوکوز که به صورت قند انتهایی در زنجیره انتهایی FTG وجود دارد، دارای چه نوع اتصالات اختصاصی شیمیایی است؛ بنابراین جهت مشخص‌نمودن اختصاصی‌تر این گلیکوپروتئین§ در اوایل تشکیل لوله عصبی در ناحیه تکامل نخاع از سه نوع لکتین اختصاصی LTA**، UEA-1†† وOFA‡‡ استفاده گردید که مولکول فوکوز را با اتصالات خاصی به قند ما قبل آخر در زنجیره قندی مشخص می‌نمایند.

روش تحقیق

در این مطالعه تجربی از ۲۴ موش سفید بالغ نژاد Balb/c استفاده شد که طی چند مرحله کوتاه جفتگیری و پس از مشاهده واژینال پلاگ، زمان صفر حاملگی در آنان مشخص شد؛ سپس در دوران جنینی (روزهای دهم تا پانزدهم حاملگی) در ابتدا و پایان هر روز دو موش با استفاده از اتر بیهوش شدند. پس از شکافتن لوله‌های رحمی و پرده‌های جنینی، جنین‌های آنان با سرعت به فیکساتوری مرکب از ۶٪ مرکوریک کلراید، ۱٪ سدیم استات و ۰/۱٪ گلوتار آلدئید منتقل گردید (۱۵،۱۴) و به مدت ۲۴ ساعت در

* Cell Interactions
† Fast Transported Glycoprotein (FTG)
‡ Embryonic Periods
§ Fucosylated Glycoprotein
** Lotus Teragenolobus
†† Ulex Europaeus
‡‡ Aleuria Aurantia

آن نگهداری شدند. تعداد جنین‌ها در هر موش بین ۸ تا ۱۲ عدد بود که ظاهری سالم داشتند و برای هر آزمایش هیستوشیمیایی از بین جنین‌های متعلق به هر مادر سه جنین به طور تصادفی انتخاب شدند. جنین‌های ثابت‌شده با روشهای معمول آزمایشات هیستولوژیک در وضعیتهای مختلف (ساژیتال، فرونتال و عرضی) در پارافین قالبگیری و سپس به صورت سریال برش داده شدند.

آزمایشات لکتین هیستوشیمی: در این مرحله از سه لکتین مخصوص اتصال به فوکوز استفاده شد. لکتین‌های UEA-1 و LTA از شرکت شیمیایی سیگما خریداری شدند و لکتین Aleuria Aurantia (Orange Peel Fangus Lectin OFA) از آزمایشگاه دکتر Kochibe گروه بیولوژی دانشگاه Gaba در ژاپن تهیه شد. کلیه لکتین‌ها که با HRP* متصل بودند با بافر PBS† در pH: ۷/۲ رقیق شدند؛ به طوری که در هر میلی‌لیتر از آن، ۱۰–۱۵ میکروگرم از ماده مؤثر لکتین قرار داشت. روش کار مطابق روال قبلی (۱۵–۱۷) انجام پذیرفت؛ بدین ترتیب که برشهای ۵ میکرونی در PBS قرار داده شد و سپس به مدت ۲ ساعت در مجاورت لکتین رقیق شده در درجه حرارت محیط آزمایشگاه قرار گرفتند. برشهای مزبور سپس با PBS شسته شدند و در مجاورت محلول DBA (دی‌آمینو بنزدین)–آب اکسیژنه به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. پس از شستشوی کامل که در چند نوبت انجام گرفت. برای ایجاد رنگ زمینه، تمامی برشها با محلول آلسین بلو با pH۲/۵ به مدت ۵ دقیقه مورد رنگ‌آمیزی قرار گرفتند. مناطقی از برشها که با لکتین‌ها واکنش نشان می‌دهند با توجه به عملکرد شیمیایی H2O2-DBA با HRP متصل شده به لکتین‌ها از خود رنگ قهوه‌ای بروز می‌دهند که نشانه قند انتهایی فوکوز در زنجیره گلیکوپروتئینی سطح سلول‌ها می‌باشد. برای کنترل از برشهایی که به آنها لکتین اضافه نشده بود، استفاده گردید. علاوه بر این از برشهای دیگری نیز که از قالبگیری بافتهای مختلف بدن به دست آمده بودند، به عنوان گروه شاهد مثبت استفاده شد؛ سپس کلیه برشها توسط پژوهشگران این طرح پژوهشی، توسط میکروسکوپ چند نفره به طور همزمان مورد بررسی دقیق قرار گرفتند و از محلهای مورد نظر لوله عصبی تصویربرداری شد. بر اساس پدیدارشدن شدت واکنش‌های شیمیایی، نتایج به دست آمده جهت مقایسه با یکدیگر مطابق جدول ۱ رتبه‌بندی و ثبت گردید (۱۵).

جدول ۱- درجه بندی واکنش به رنگ پذیری

شدت واکنش به رنگ‌پذیری	رتبه رنگ‌پذیری
عدم واکنش	۰
واکنش ضعیف	+
واکنش متوسط	++
واکنش شدید	+++
واکنش بسیار شدید	++++

یافته‌ها

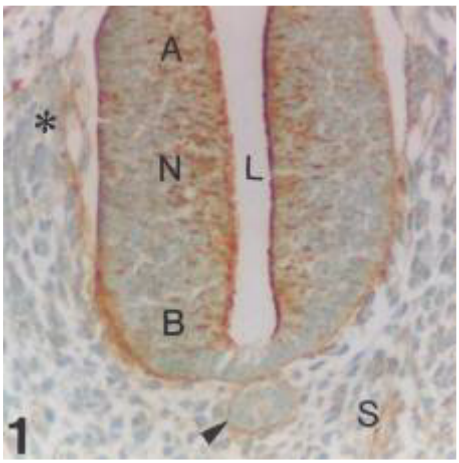
بررسیهای به عمل آمده نشان داد که لکتین‌های UEA-1 و LTA در هیچیک از مراحل تکاملی لوله عصبی در منطقه نخاع واکنش نشان ندادند اما واکنش لکتین OFA از اواخر روز دهم در منطقه ونتریکولار لوله عصبی آغاز شد و تا اوایل روز یازدهم گسترش یافت. سلول‌های نورال کرست در ناحیه تشکیل گانگلیون ریشه پشتی نخاع در مجاورت لوله عصبی و لابه‌لای سلول‌های اسکلرتوم نیز واکنش دادند (شکل ۱). در این مرحله بخشهای حسّی (صفحه بالی‡) و حرکتی (صفحه کفی§) لوله عصبی در حال شکل‌گیری هستند و واکنش به OFA بیشتر در مناطق حسی و میانی لوله عصبی ایجاد می‌شود.

در اوایل روز دوازدهم جنینی (شکل ۲)، شیار محدودکننده مشخص می‌گردد و واکنش به OFA در مناطق حسّی و میانی لوله عصبی در این مرحله شدّت بیشتری می‌یابد. در این مرحله اعصاب نخاعی در حال شکل‌گیری

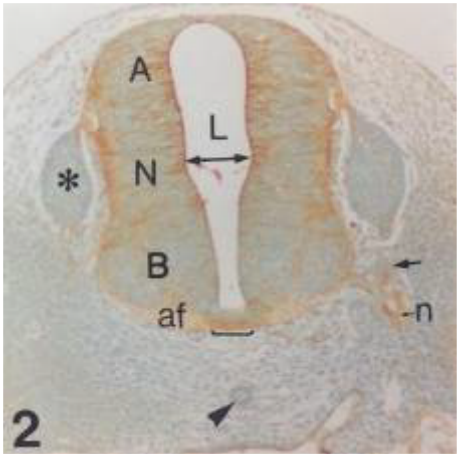
* Horse Radish Peroxidase (HRP)
† Phosphte-Bufer-Saline (PBS)
‡ Alar Plate
§ Basal Plate

هستند و به OFA واکنش نشان می‌دهند. فونیکولوس‌های قدامی نخاع که تازه شروع به شکل‌گیری نموده‌اند، واکنش ضعیفی از خود نشان می‌دهند. نکته مهم در این مرحله واکنش نسبتاً شدیدی است که در ناحیه صفحه کفی بروز می‌کند.

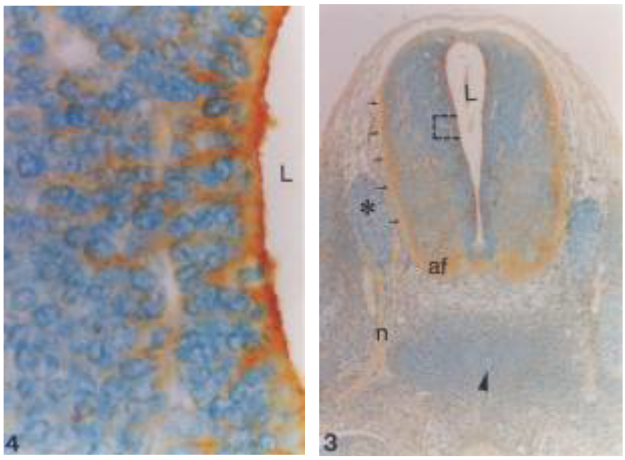
در اواخر روز دوازدهم جنینی (شکل ۳ و ۴)، فونیکولوس‌های طرفی در حال شکل‌گیری هستند و همراه با فونیکولوس‌های قدامی نسبت به OFA عکس‌العمل نشان می‌دهند. نکته دیگر این که الگوی واکنش در مناطق حسی و حرکتی متفاوت با اوایل روز دوازدهم است؛ به این معنی که واکنش‌های خفیف و پراکنده‌ای در ناحیه حرکتی مشاهده می‌گردد. منطقه اپاندیمال نیز بخصوص در نواحی حسّی واکنش بسیار شدیدی به OFA نشان می‌دهد. این واکنشها در سیتوپلاسم سلول‌های این منطقه و نیز ماده خارج سلولی و سطح سلولی آنها بسیار بارز است.



شکل ۱- برش عرضی از لوله عصبی در ناحیه نخاع در اوایل روز یازدهم جنینی که در مجاورت OFA قرار گرفته است. رنگ قهوه‌ای نشانه لکتین می‌باشد که در ناحیه ونتریکولار و اسکلروتوم لوله عصبی مشاهده می‌گردد. تعدادی از سلول‌های مهاجر نورال کرست در محل تشکیل گانگلیون ریشه خلفی (ستاره) و واکنش شدید قسمت هایی که محل تشکیل فونیکولوس قدامی است در قسمت صفحه پایه‌ای (B) لوله عصبی مشاهده می‌گردد. نوتوکورد (نوک پیکان) به لوله عصبی چسبیده و اطراف آن واکنش خفیفی نشان داده است. در این تصویر L حفره لوله عصبی، صفحه بالی (حسی)، B صفحه پایه‌ای (حرکتی) با بزرگنمایی ٤٠٠ برابر

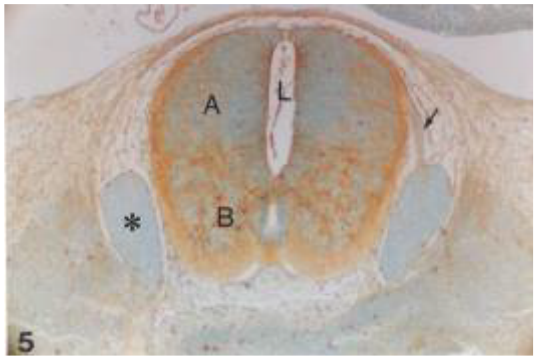


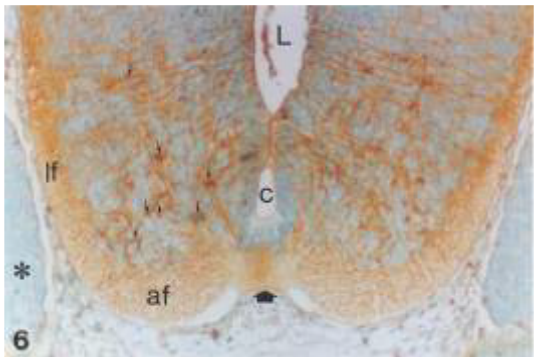
شکل ۲- برش عرضی از لوله عصبی در ناحیه نخاع در اوایل روز دوازدهم جنینی که در مجاورت OFA قرار گرفته است. در این مرحله ناحیه ونتریکولار و مارژینال لوله عصبی (N) بخصوص در مناطق حسی (A) و میانی به OFA واکنش نشان داده‌اند که مسیر آنها به سمت یکدیگر است. در این مرحله شیار محدودکننده (پیکان نشانه) شکل گرفته، عصب نخاعی (n) که در حال شکل‌گیری است واکنش نسبتاً شدیدی به OFA نشان داده است. گانگلیون ریشه پشتی (ستاره) واکنش بسیار کمی دارد. صفحه کفی در ناحیه شکمی لوله عصبی واکنش متوسط و فونیکولوس قدامی (af) در حال شکل‌گیری است و واکنش خفیفی از خود نشان می‌دهد. نوتوکورد (سر پیکان) از لوله عصبی فاصله گرفته است (بزرگنمایی ۲۵۰ برابر).



شکل ۳ و ٤- برش عرضی لوله عصبی در اواخر روز دوازدهم جنینی که فونیکولوس های طرفی (پیکانهای نشانه) در حال شکل‌گیری بوده و نسبت به OFA واکنش خفیفی نشان داده‌اند؛ در حالی که این واکنش در فونیکولوس‌های قدامی (af) شدیدتر است. صفحه کفی در حد فاصل فونیکولوس‌های قدامی واکنش کمتری دارد. در صفحه پایه‌ای واکنشهای شعاعی شکل مشاهده می‌شوند. ناحیه ونتریکولار در تمام لوله عصبی (شکل ٤ از ناحیه مربعی شکل ۳) واکنش شدیدی به OFA

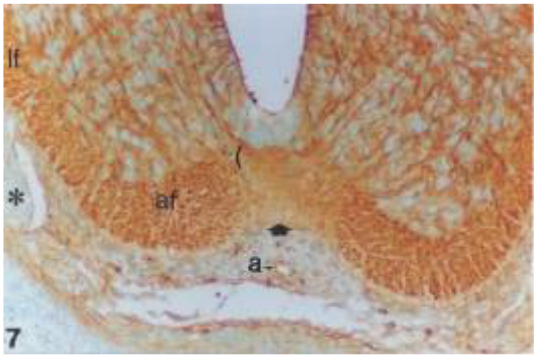
دارد. این واکنش در سطح سلولی و ماده خارج سلولی بسیار بارز است. در این شرایط عصب نخاعی (n) واکنش ضعیفی نشان داده و نوتوکورد بدون واکنش و با فاصله نسبتاً زیادی از لوله عصبی واقع شده است. مزانشیم متراکم اطراف آن و نیز گانگلیون ریشه پشتی (ستاره) نسبت به لکتین بدون واکنش می‌باشد و فقط با آلسین بلو رنگ گرفته است (شکل ۳ با بزرگنمایی ٤۰۰ و شکل ٤ با بزرگنمایی ۱۲۰۰ برابر است).

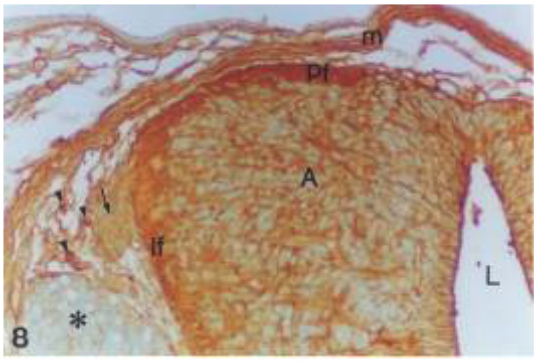




شکل ٥ و ٦- مربوط به اواخر روز سیزدهم جنینی است که صفحه پایه‌ای واکنش‌های شعاعی شکل شدیدی نشان داده است. همان گونه که پیداست تا اواخر روز سیزدهم شدت واکنش افزایش یافته و تعداد نسبتاً زیادی سلول عصبی با اندازه‌های متوسط (پیکانهای شکل ٦) نیز در این ناحیه مشاهده می‌گردند. صفحه کفی (پیکان بزرگ) و فونیکولوس‌های قدامی و طرفی نیز واکنش شدیدی نشان داده‌اند (شکل ٥ با بزرگنمایی ۲٥۰ و شکل ٦ با بزرگنمایی ٤٥۰ برابر).

در این حالت گانگلیون‌های ریشه پشتی واکنشی نشان نمی‌دهد اما در اعصاب نخاعی واکنش خفیفی ملاحظه می‌گردد. در روز سیزدهم جنینی (شکل ٥ و ٦)، بخشهای طرفی لوله عصبی به صورت بسیار گسترده نسبت به OFA واکنش نشان داد. در آن ناحیه از صفحه پایه‌ای که نورون‌های حرکتی در حال شکل‌گیری هستند، تعدادی از سلول‌ها با اندازه متوسط واکنش شدیدی از خود نشان می‌دهند؛ در حالی که فونیکولوس‌های قدامی واکنش متوسط و فونیکولوس‌های طرفی واکنشی شدید از خود نشان می‌دهند. در روز چهاردهم جنینی (شکل ۷ و ۸)، شدّت واکنش رشته‌های عصبی موجود در ضخامت صفحات بالی و پایه‌ای زیاد بود؛ علاوه بر این فونیکولوس‌های قدامی و طرفی نیز واکنش بیشتری نسبت به اوایل روز قبل نشان دادند. فونیکولوس‌های خلفی (شکل ۸) و بخشهایی از فونیکولوس‌های طرفی در این مرحله واکنش بسیار شدیدی نسبت به این لکتین نشان دادند. علاوه بر این، جمعیت جدیدی از سلول‌های نورال کرست نیز با واکنشهای شدید





شکل ۷- (اوایل روز چهاردهم جنینی) و شکل ۸ (اواخر روز چهاردهم): در این مرحله به طور کلی تمام فونیکولوس‌ها به لکتین OFA واکنش شدید نشان دادند که این واکنش در اواخر روز چهاردهم شدیدتر بود. در تمام مقاطع مورد مطالعه رشته‌های عصبی زیادی در روز چهاردهم نشان دادند. علاوه بر این نسل جدیدی از سلول های ستیغ عصبی در مجاورت گانگلیون ریشه پشتی با واکنش شدید مشاهده گردید (سر پیکانها). صفحه کفی (پیکان ضخیم) واکنش متوسطی دارد اما در نواحی نزدیک به ماده خاکستری (پرانتز) این واکنش شدیدتر است (af= فونیکولوس قدامی، Lf= فونیکولوس طرفی، Pf= فونیکولوس خلفی، با بزرگنمایی ۸۰۰ برابر).

منطقه بالای گانگلیون ریشه خلفی مشاهده گردیدند. صفحه کفی نیز در این مرحله واکنشی متوسط نسبت به OFA نشان داد. واکنش به OFA در لوله عصبی، از این مرحله به بعد ثابت باقی ماند و تغییرات چندانی از نظر واکنش به لکتین در نخاع دیده نشد.

بحث

گلیکوکانجوگیت‌ها چه در سطح سلول‌ها و ماده خارج سلولی و چه در سیتوپلاسم و اکسوپلاسم سلول‌ها نقش بسیار مهمّی در تغییرات سلولی در خلال دوران تکامل ایفا می‌نمایند (۱-۶) که این نقش در زمانهای بحرانی تشکیل یک عضو و یا قسمتهایی از یک عضو به شکل بارزتری بروز می‌کند. شکل‌گیری و تکامل میلیون‌ها رشته عصبی که در طی دوران نورولاسیون به وقوع می‌پیوندد، یکی از معجزه‌هایی است که درک آن بسیار دشوار و اطلاعات علمی ما در مورد چگونگی آن بسیار ناچیز است. در این مطالعه فقط بخش بسیار اندکی از این پدیده بسیار بزرگ مورد مطالعه قرار گرفت.

مولوکول فوکوز در زنجیره‌های قندی گلیکوکانجوگیت‌ها به صورت قند انتهایی* پدیدار می‌گردد (۱۱) و همین موقعیت شیمیایی اهمیت بسزایی به این مولکول می‌دهد؛ زیرا توسط این مولکول است که میانکنش‌های مولکولی با محیط اطراف انجام می‌پذیرد و در نهایت به میانکنش‌های سلول‌ها با یکدیگر و یا محیط خارج سلولی منجر می‌شود. مطالعات متعددی مشخص نموده‌اند که در سایر سیستم‌های بیولوژیکی مولکول فوکوز در تمایزات سلولی و مهاجرت آنها در جنین و بخصوص در سلول‌های عصبی و یا سلول‌هایی که از آنها مشتق می‌شوند، نقش کلیدی دارد (۱۸،۱۶،۱۵). یکی دیگر از خصوصیات مولکول فوکوز این است که با اتصالات متفاوتی با قندهای ما قبل آخر† ظاهر می‌گردد و علاوه بر این، موقعیت فضایی این مولکول نیز در انتهای زنجیره قندی نیز ممکن است متفاوت باشد (۲۰،۱۹،۱۶).

سه لکتین مخصوص شناسایی فوکوز، سه نوع موقعیت مختلف این مولکول را در زنجیره قندی مشخص می‌نمایند. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که لکتین LTA به صورت α1 → 6 به فوکوز متصل شده و به مولکول N-acetyl-D-glucosamin (Glc-Nac) واکنش نشان می‌دهد. لکتین LTA، آلفا فوکوز را که با اتصال 4 → 1(یا 3→1) به Gle-Nac متصل است، مشخص می‌نماید. لکتین UAE-1 نیز مولکول آلفا فوکوز را که به صورت 2→1 به مولکول گالاکتوز متصل است، مشخص می‌کند (۲۱-۲۳).

لکتین OFA قادر به تشخیص کلیه اتصالات فوق می‌باشد و علاوه بر این قادر است اتصال 6→1 را به Glc-Nac مشخص نماید (۲۵،۲۴،۲۳،۱۴).

مطالعات هیستوشیمیایی انجام گرفته در این پژوهش نشان داد که در طی دوران مورفوژنز، بافت در حال تکامل نخاع فقط لکتین OFA واکنشهای متفاوتی داشته است که نشانگر عدم واکنش UEA-1 و یا LTA به بافت مورد نظر در این دوره است. با توجه به این یافته‌ها، در این تحقیق فقط گیرنده‌های گلیکوکانجوگیتی فوکوز با اتصالات بسیار اختصاصی α-fucose→ 6, Glc-Nac مشاهده شد. در اوایل دوران جنینی موش (روزهای دهم تا چهاردهم حاملگی)، همزمان با شکل‌گیری ضخامت عصبی صفحات بالی و پایه‌ای که به ترتیب سازنده مناطق حسی و حرکتی نخاع می‌باشند، رشته‌های عصبی در مناطق ونتریکولار، مارژینال و صفحه کفی، شروع به واکنش به OFA نمودند که خود نشان‌دهنده تشکیل گلیکوپروتئین خاصی با قند بسیار اختصاصی فوکوز می‌باشد. مطالعات گوناگون مشخص نموده‌اند که این نوع گلیکوپروتئین در رشته‌های عصبی بالغ، نوعی حمل‌کننده سریع مواد شیمیایی از جسم سلول‌های عصبی به مناطق دورتر بخصوص سیناپس‌های عصبی می‌باشد. پیدایش این نوع گلیکوپروتئین در طی دوران تکامل جنینی هنوز گزارش نشده است. اطلاعات این مقاله برای اولین بار، پیدایش و گسترش آن را همزمان با پیشرفت پدیده

* Terminal Sugar
† Penultimate Sugar

بسیار وسیع و پیچیده رشته‌های عصبی بیان می‌کند. علاوه بر رشته‌های عصبی موجود در لوله عصبی، عصب نخاعی در مراحل تشکیل اولیه خود (شکل ۲)، سلول‌های نورال کرست در مرحله تشکیل گانگلیون‌های ریشه پشتی و همین‌طور صفحه کفی که محل تقاطع رشته‌های عصبی است، حاوی این نوع گلیکوپروتئین می‌باشند. در این مطالعه مشخص شد که روند واکنش به OFA در اواخر دوران جنینی بسیار شدید می‌باشد و علاوه بر فونیکولوس‌های نخاع (ماده سفید)، شبکه جدیدی از رشته‌ها بخصوص در صفحه پایه‌ای (ناحیه حرکتی) در اواخر دوران جنینی ظاهر می‌گردند (شکل ۶ و ۷) که علاوه بر واکنش شدید در رشته‌ها، سلول‌های عصبی کوچک دیگری نیز وجود دارند که نسبت به OFA به شدت واکنش نشان می‌دهند. این سلول‌ها شباهت زیادی به نورون‌های واسطه‌ای دارند و با توجه به زمان ظاهر شدن آنها، احتمالاً در ارتباط سگمنت‌های نخاع و همچنین رفلکس‌های نخاعی می‌توانند سهیم باشند. شایان ذکر است که این پدیده نیز تا کنون به این شکل گزارش نشده است.

فونیکولوس خلفی در اواخر دوران جنینی و بعد از قسمتهای دیگر ماده سفید به وجود می‌آید و نسبت به OFA واکنش شدید نشان می‌دهد. (شکل ۸). رشته‌های عصبی گسترده همراه با تعداد بیشماری نورون متوسط در صفحه بالی (مناطق حسّی) نیز در همین زمان مشاهده می‌گردند. علاوه بر این موج جدیدی از سلول‌های ستیغ عصبی در اطراف گانگلیون ریشه پشتی شروع به فعالیت می‌نمایند که تمام این پدیده نشانه شکل‌گیری و فعال‌شدن قسمتهای حسی نخاع است که پس از نواحی حرکتی به وجود می‌آیند.

همان‌گونه که اشاره شد دو لکتین UEA-1 و LTA که هر دو مخصوص شناسایی مولکول فوکوز در زنجیره‌های قندی گلیکوکانجوگیت‌ها محسوب می‌شوند، در مطالعات هیستوشیمیایی این تحقیق، هیچ‌گونه واکنشی به سلول‌های عصبی نخاع نشان ندادند. اما مطالعات سایر پژوهشگران نشان می‌دهد که لکتین UEA-1 و نورون‌های حسی کوچک تا متوسط در شاخ خلفی و همچنین نسبت به سلول‌های گانگلیون ریشه پشتی واکنش می‌دهد. در این رابطه چنین نتیجه‌گیری شده است که این نورون‌ها مخصوص گیرنده‌های حس درد می‌باشند. احتمالاً این واکنشها به دلایلی، به نوع خاص موجود مورد آزمایش* و مرحله تکامل لوله عصبی مربوط می‌شود. نکته دیگر این که در مطالعه حاضر فقط نورون‌های در حال تکامل در طی دوران مورفوژنز در نخاع موش مورد مطالعه قرار گرفتند؛ در صورتی که در سایر مطالعات در نخاع بالغ و همچنین موجوداتی غیر موش مورد آزمایش قرار گرفته‌اند. از طرفی یافته‌های دیگران وجود گلیکوکانجوگیت‌های دیگری را نیز در قسمتهای مختلف سیستم عصبی مشخص نموده است که خود نشان‌دهنده نقش اساسی این مولکول‌ها در ارسال سیگنال‌های متعدد، در خلال تکامل و یا فعالیت نورون‌ها پس از تولد محسوب می‌شود؛ همچنین در این مطالعه مشخص گردید که در این نوع حیوان آزمایشگاهی، مولکول فوکوز در تکامل رشته‌های عصبی و فعالیتهای بعدی آنها نقش اساسی دارد و از آنجا که در سلول‌های نخاع و سایر بخشهای سیستم عصبی انسان نیز چنین فعالیتهایی وجود دارد، این نوع پژوهش، روش بسیار جالبی برای مطالعات بعدی تکامل سیستم عصبی انسان از جمله مطالعه ناهنجاریهای مادرزادی و پی بردن به فرایند عمل تراتوژن‌ها به حساب می‌آید.

تقدیر و تشکر

نتایج این مطالعه مربوط به بخشی از یافته‌های طرح پژوهشی با عنوان «مطالعه تمایزات هیستوشیمیایی‌و ایمونو هیستوشیمیایی تکامل نخاع» است که با شماره ۵/۴۵۳۸ از طرف معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تصویب و به اجرا رسیده است؛ در پایان از آن معاونت محترم و شورای محترم پژوهشی دانشگاه و نیز سرکار خانم متجدد تشکر و قدردانی می‌گردد.

* Species Specific

منابع:

1- Kudo T, Kaneko M, Iwasaki H, Togayachi A, Nishihara S, Abe K, et al. Normal embryonic and germ cell development in mice lacking alpha 1,3-fucosyltransferase IX (Fut9) which show disappearance of stage-specific embryonic antigen 1. Mol Cell Biol. 2004; 24(10): 4221-28.

2- Ito T, Ito K, Tsukuda M, Kitamura H, Kanisawa M. Changes in glycoconjugates revealed by lectin staining and stage-specific embryonic antigen-1 immunostaining in hamster submandibular glands during the postnatal period. Anat Embryol (Berl). 1995; 192 (2): 101-106.

3- Poirier F, Kimber S. Cell surface carbohydrates and lectins in early development. Mol Hum Reprod. 1997; 3 (10): 907-18.

4- Clark GF, Oehninger S, Patankar MS, Koistinen R, Dell A, Morris HR, et al. A role for glycoconjugates in human development: the human feto-embryonic defence system hypothesis. Hum Reprod. 1996; 11 (3): 467-73.

5- Marani E, van Oers JW, Tetteroo PA, Poelmann RE, van der Veeken J, Deenen MG. Stage specific embryonic carbohydrate surface antigens of primordial germ cells in mouse embryos: FAL (S.S.E.A.-1) and globoside (S.S.E.A.-3). Acta Morphol Neerl Scand. 1986; 24 (2): 103-10.

6- Muramatsu T. Developmentally regulated expression of cell surface carbohydrates during mouse embryogenesis. J Cell Biochem. 1988; 36 (1): 1-14.

7- Elmonem ME, Mohamed SA, Aly KH. Early embryonic development of the camel lumbar spinal cord segment. Anat Histol Embryol. 2007; 36 (1): 43-46.

8- Luo J, Ju MJ, Redies C. Regionalized cadherin-7 expression by radial glia is regulated by Shh and Pax7 during chicken spinal cord development. Neuroscience. 2006; 142 (4): 1133-43.

9- Lange C, Mix E, Rateitschak K, Rolfs A. Wnt signal pathways and neural stem cell differentiation. Neurodegener Dis. 2006; 3 (1-2): 76-86.

10- Ohlson C, Karlsson JO. Glycoproteins of axonal transport: polypeptides interacting with the lectin from Aleuria aurantia. Brain Res. 1983; 264 (1): 99-104.

11- Bennett G, Leblond CP, Haddad A. Migration of glycoprotein from the Golgi apparatus to the surface of various cell types as shown by radioautography after labelled fucose injection into rats. J Cell Biol. 1974; 60 (1): 258-84.

12- Gerke MB, Plenderleith MB. Analysis of the unmyelinated primary sensory neurone projection through the dorsal columns of the rat spinal cord using transganglionic transport of the plant lectin Bandeiraea simplicifolia I-isolectin B4. J Neurol Sci. 2004; 221 (1-2): 69-77.

13- Dodd J, Jessell TM. Cell surface glycoconjugates and carbohydrate-binding proteins: possible recognition signals in sensory neurone development. J Exp Biol. 1986; 124: 225-38.

14- Kochibe N, Furukawa K. Purification and properties of a novel fucose-specific hemagglutinin of Aleuria aurantia. Biochemistry. 1980; 19 (13): 2841-46.

15- Fazel AR, Sumida H, Schulte BA, Thompson RP. Lectin histochemistry of the embryonic heart: fucose-specific lectin binding sites in developing rats and chicks. Am J Anat. 1989; 184 (1): 76-84.

16- Fazel AR, Thompson RP, Sumida H, 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.

17- Nikravesh MR, Jalali M, Fazel A. Unique carbohydrate appearance of the floor plate during early neurolation. Iranian Bio Med J. 2003; 7 (3): 133-37.

18- Alonso E, Saez FJ, Madrid JF, Hernandez F. Lectin histochemistry shows fucosylated glycoconjugates in the primordial germ cells of Xenopus embryos. J Histochem Cytochem. 2003; 51 (2): 239-43.

19- Sato M, Yonezawa S, Uehara H, Arita Y, Sato E, Muramatsu T. Differential distribution of receptors for two fucose-binding lectins in embryos and adult tissues of the mouse. Differentiation. 1986; 30 (3): 211-19.

20- Ducray A, Propper A, Kastner A. Detection of alpha-L fucose containing carbohydrates in mouse immature olfactory neurons. Neurosci Lett. 1999; 274 (1): 17-20.

21- Gerke MB, Plenderleith MB. Distribution of binding sites for the plant lectin Ulex europaeus agglutinin I on primary sensory neurones in seven different mammalian species. Histochem J. 2002; 34 (1-2): 79-84.

22- 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): 11093-99 .

23- Wimmerova M, Mitchell E, Sanchez JF, 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. 2003; 278 (29): 27059-67.

24- Muramatsu T, Condamine H, Gachelin G, Jacob F. Changes in fucosyl-glycopeptides during early post-implantation embryogenesis in the mouse. J Embryol Exp Morphol. 1980; 57: 25-36.

25- Mueller BK, Yamashita T, Schaffar G, Mueller R. The role of repulsive guidance molecules in the embryonic and adult vertebrate central nervous system. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2006; 361 (1473): 1513-29 .

Title: Distribution of Aleuria aurantia fucose-specific lectin binding sites in neuronal projection, during mouse morphogenic periods

Authors: AR. Fazel[1], MR. Nikravesh[2], M. Jalali[2]

Abstract

Background and Aim: Various investigations have shown that fucosylated glycoconjugates components of the cell surface and extracellular matrix play crucial roles in critical morphogenetic and histogenetic events along neuronal projections of immature neurons during embryonic development. In addition, fucosylated glycoconjugate within the axoplasm of the adult neurons is involved in fast transporting protein molecules (FTP). The aim of the present study was to investigate whether fucose terminal sugar is present during early projection of developing central nervous system.

Materials and Methods: In this experimental study, 24 female Balb/C mice were selected randomly and from embryonic day 10 to 15, all specimens were sacrificed and their embryos were fixed, serially sectioned and lectin histochemistry carried out. by using LTA-1, UEA-1 and OFA which are all specific to fucose.

Results: Our study revealed that among the three fucose binding lectins tested; only OFA (Aleuria aurantia) reacted with the neural tube during development.These reactions in motor and sensory zones of spinal cord started on the eleventh day of embryonic period and ended by the fourteenth day. During this period anterior, lateral and posterior funiculus, neuronal fibers in alar and basal plates as well as medium-sized neurons around posterior root ganglion showed reactions. The other fucose specific lectins, UEA-1 and LTA, failed to bind to any part of spinal cord during neurolation

Conclusion: These data indicate that fucosylated glacoconjugate specific for Aleuria aurantia appears to play a crucial role in neuronal projection during early mouse neurolation and may illustrate also the decisive function of this molecule in controlling cell surface interactions during neuronal development

Key Words: Neural tube development, Lectin histochemistry, Fucose, Mouse

[1] Corresponding author, Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences. Mashhad, Iran fazelalireza@hotmail.com
[2] Associate Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences. Mashhad, Iran