

Assessment of Glycoconjugates Terminal Sugars expression during Rat Skin Morphogenesis

**Mohammadzadeh E., M.Sc., Ebrahimzadeh bideskan A.R., Ph.D.* ,
Nikravesh M.R., Ph.D., Jalali M., Ph.D., Nikmard F., M.Sc., Fazel A.R., Ph.D.**

**P.O.Box: 91735588 , Anatomy Department, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*

Abstract

Purpose: This study was conducted in order to determine distributions and changes of glycoconjugates terminal sugars during skin morphogenesis.

Materials and Methods: using lectin histochemistry technique, 10% formalin fixed, paraffin embedded rat embryonic sections for days 12, 14, 16 of gestation (N=30) were incubated with different HRP-lectins from Lotus tetragonolobus (LTA), Maclura pomifera(MPA) and Arachis hypogaea or Peanut (PNA) that are specific for terminal α -L Fuc, Gal(β 1 \rightarrow 3)GalNAC and D-Gal(β 1 \rightarrow 3)DGalNAC respectively. On the basis of colorimetry data that was determined by blind's method, sections were graded. SPSS statistic soft ware and Kruskal-Wallis non-parametric statistical test were used to compare different embryonic stages.

Results: Our results demonstrated that the reaction of ectodermal cells with LTA observed from gestational day12 (E12) was weak. This reaction increased E14 significantly ($p=0.0001$) and then decreased. Extracellular matrix (ECM) of mesenchyme did not react with LTA lectin. Ectodermal cells as well as ECM of mesenchyme reacted with PNA on E12 was fairly weak . It increased E14 ($p=0.009$). From E14 to E16 intensity staining remain the same in ectodermal cells but decreased in ECM mesenchyme ($p=0.0001$). Ectodermal cells and ECM of mesenchyme reacted with the MPA lectins from E12 to E16.

Conclusion: According to our result, it is suggested that the distributions and changes of glycoconjugates with terminal sugars L-Fuc (α 2-4) GlcNAC, Gal (β 1 \rightarrow 3) GalNAC and D-Gal (β 1 \rightarrow 3) DGalNAC be stage - regulated during rat skin morphogenesis.

Key words: Skin, Development, Glycoconjugates, Lectin, Rat

ارزیابی نحوه بیان قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت‌ها طی مورفوژنز پوست رت

الهام محمدزاده *M.Sc.، علیرضا ابراهیم‌زاده بیدسکان *Ph.D.، محمدرضا نیکروش *Ph.D.، مهدی جلالی *Ph.D.،

فاطمه نیک‌مرد *M.Sc.، علیرضا فاضل *Ph.D.

* گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

تاریخ دریافت: مهرماه ۸۹ تاریخ پذیرش: آذرماه ۸۹

چکیده

هدف: تعیین توزیع و تغییرات قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت‌ها طی دوران مورفوژنز پوست رت

مواد و روش‌ها: در این پژوهش به منظور استفاده از روش لکتین هیستوشیمی، مقاطع مربوط به جنین‌های رت در روزهای ۱۲، ۱۴ و ۱۶ بارداری در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت و پس از آماده سازی بافتی، در پارافین قالب‌گیری شدند. به منظور مطالعه تغییرات تکاملی پوست و ردیابی گلیکوکانژوگیت‌های موثر در آن، از لکتین‌های *Arachis hypogaea* (PNA) or peanut، *Lotus tetragonolobus* (LTA) و *Maclura panifera* (MPA) از لکتین‌های α -L Fuc، Gal-(β 1 \rightarrow 3) GalNAC و D-Gal-(β 1 \rightarrow 3) DGalNAC اختصاصی هستند، استفاده شد. شدت واکنش‌های به دست آمده ناشی از رنگ‌پذیری هر یک از قندهای مذکور به صورت کور تعیین شد، یافته‌های حاصل با استفاده از آزمون آماری غیرپارامتری کروسکال والیس و نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل آماری شد.

یافته‌ها: نتایج بررسی حاضر نشان داد که واکنش سلول‌های اکتودرمی با LTA در دوازدهم جنینی (E_{12}) به نسبت ضعیف بود. این واکنش در E_{14} افزایش یافت ($p \leq 0/05$) و سپس در E_{16} کاهش یافت ولی ماتریکس خارج سلولی مزانشیم در سه مرحله جنینی مورد بررسی واکنشی نسبت به LTA نشان نداد. سلول‌های اکتودرمی و همچنین ماتریکس خارج سلولی با PNA در E_{12} واکنش ضعیفی را بروز داد به طوری که در E_{14} افزایش معنی داری نشان داد ($p \leq 0/05$). این واکنش از E_{14} تا E_{16} در سلول‌های اکتودرمی تغییری نکرد؛ در صورتی که واکنش مذکور در ماتریکس خارج سلولی به طور معنی داری کاهش یافت ($p < 0/05$). سلول‌های اکتودرمی و ماتریکس خارج سلولی مزانشیم با MPA از E_{12} تا E_{16} به طور یکنواخت واکنش نشان دادند؛ به طوری که شدت رنگ در روزهای مختلف اختلاف معنی داری را نشان نداد.

نتیجه گیری: بر اساس شواهد حاصل از این تغییرات می‌توان اظهار نمود که توزیع و تغییرات قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت‌های $D-Gal(\beta 1 \rightarrow 3)DGalNAC$ ، $Gal(\beta 1 \rightarrow 3)GalNAC$ ، $L-Fuc(\alpha 2-4)GlcNAC$ طی مورفوژنز پوست در رت به گونه‌ای تنظیم شده که روند تکامل و تمایزات سلولی لایه‌های مختلف پوست به آن وابسته است.

کلید واژه‌ها: مورفوژنز پوست، تکامل، گلیکوکانژوگیت، لکتین، رت

مقدمه

ساختار هیستولوژیکی از سه لایه اکتودرم، درم و هیپودرم تشکیل شده است [۱-۳]. این ارگان دارای دو منشأ جنینی

پوست به عنوان بزرگترین ارگان بدن، اولین سد دفاعی و رابط منحصر به فرد انسان با محیط اطراف اوست و از نظر

آدرس مکاتبه: مشهد، میدان آزادی، مقابل پارک ملت، پردیس دانشگاه، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی

Email: Ebrahimzadehba@mums.ac.ir

در شناسایی بین سلول‌ها که فرایندهای تمایزی، تکامل، پاسخ‌های ایمنی و دیگر اعمال بافت‌ها را تنظیم می‌کند، نقش مهمی بازی می‌کند [۸] و همچنین گلیکوکانژوگیت‌های سطح سلول و ماتریکس خارج سلولی دارای نقش کلیدی در اتصالات سلول به سلول و سلول با سلول با ماتریکس، مهاجرت، تکثیر، مورفوژنز و میان‌کنش‌های سلولی است [۷، ۹ و ۱۰]. بنابراین با توجه به اینکه گلیکوکانژوگیت‌ها از مهمترین ترکیبات سطح سلول‌ها و ماتریکس خارج سلولی است و بر نقش این ترکیبات در پدیده‌های بیولوژیکی، تکاملی و تمایزات بافت‌ها و ارگان‌های مختلف توسط بسیاری از پژوهشگران اتفاق نظر وجود دارد و با توجه به اهمیت پوست سالم در حفظ سلامتی و عملکرد پوست به عنوان اولین سد دفاعی بدن، در پژوهش حاضر سعی شد تا ظهور و تغییرات این ترکیبات طی تکامل پوست رت با استفاده از روش لکتین هیستوشیمیایی بررسی شود.

مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق ۴۰ سر رت نژاد ویستار (۳۰ رت ماده و ۱۰ رت نر) با وزن تقریبی ۲۵۰-۳۰۰ گرم از خانه حیوانات دانشکده پزشکی مشهد تهیه و با رعایت دستورالعمل (The National Institutes of Health) NIH و (Department of Health Education and Well fare) برای مراقبت از حیوانات و تحت شرایط استاندارد در دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت 50 ± 5 درصد، سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دسترسی آزاد به غذا و آب نگهداری و پس از آداپتاسیون به نسبت ۳ به ۱ در قفس‌های مخصوص جفت‌گیری قرار گرفتند و با استفاده از اسپریم واژینال و مشاهده اسپرم، روز صفر بارداری تعیین شد. سپس به منظور به‌دست آوردن جنین‌های ۱۲، ۱۴ و ۱۶ روزه رت‌های باردار در روزهای دوازدهم (E_{12})، چهاردهم (E_{14}) و

متفاوت است به طوری که لایه سطحی آن یعنی اپیدرم، از اکتودرم سطحی تکامل می‌یابد و لایه‌های درم و هیپودرم از مزانشیم مزودرمی مشتق می‌شود که خود دارای سه قسمت است که عبارتند از: ۱- مزودرم صفحه جانبی که سلول‌های درم را در اندام‌ها و دیواره بدن تولید می‌کند؛ ۲- مزودرم پاراکزیال که درم را در ناحیه پشت به وجود می‌آورد؛ ۳- سلول‌های نورال کرست که منشاء درم در سر و گردن هستند. به‌علاوه ضمایم پوست مانند غدد عرق، چربی و فولیکول مو در اثر اینواژینه شدن اکتودرم به داخل درم تشکیل و تکامل می‌یابند [۳].

ارگانوژنز ارگان‌های مختلف بدن از جمله پوست، حاصل مورفوژنز و تمایزاتی است که خود متأثر از میان‌کنش‌ها و آثار القایی بین انواع مختلف سلول‌ها و بافت‌ها بوده و توسط مولکولی‌های شیمیایی متعددی میان‌جیگری می‌شود. شناخت مولکول‌هایی که فرایندهای تکاملی را هدایت می‌کند نقطه عطفی در درک بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی از جمله تمایزات سلولی و تکامل است [۴].

طی تکامل پوست و تشکیل لایه‌ها و ضمایم آن، میان‌کنش‌های متقابل (Interactions) بین لایه‌های جنینی رخ می‌دهد که مولکول‌های بسیاری در این فرآیند دخالت دارند. از جمله این ملکول‌ها می‌توان به مولکول SHH که در فرآیندهای مورفوژنیک مانند تکثیر سلولی، تراکم مزانشیمی نقش دارد اشاره کرد. این مولکول همچنین در مورفوژنز مو نقش مهمی را ایفا می‌کند [۵]. همچنین مولکول FGF-22 در $E_{17.5}$ در موش به عنوان یک لیگاند برای $FGFR2$ III b عمل می‌کند که در مورفوژنز فولیکول مو که در همین زمان شروع می‌شود، نقش دارد [۶].

علاوه بر این، مولکول‌های پروتئینی و گلیکوکانژوگیت‌ها از جمله مولکول‌هایی است که در میان‌کنش‌های سلولی و همچنین میان‌کنش‌های لایه‌های جنینی دخالت دارد [۷]. بخش کربوهیدراتی گلیکوپروتئین‌ها، گلیکولیپیدها و پروتئوگلیکان‌ها

[۱۲]. همچنین در این آزمایش یک لام کامپوزیت نیز به عنوان شاهد با هر یک از لکتین‌ها طبق روش بالا رنگ‌آمیزی شد. در محل اتصال هر لکتین به قندهای انتهایی اختصاصی خود، رنگ قهوه‌ای ایجاد شد که در واقع نتیجه واکنش آنزیم HRP متصل به لکتین با سوبسترای خود (DAB) است. لام‌های تهیه شده توسط میکروسکوپ ۵ نفره Olympus مدل Bx51 بررسی شد و نمونه‌ها بر اساس شدت واکنش لکتین‌ها بر اساس طیف لیکرت، (عدم واکنش -، واکنش ضعیف +، واکنش متوسط ++، واکنش شدید +++) توسط سه نفر به صورت کور (Blind) درجه بندی شد [۱۳] و میانگین شدت واکنش‌ها در روزهای مختلف جنینی با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون‌های آماری ANOVA و توکی با هم مقایسه شد و اختلاف در سطح $p < 0/05$ معنی‌دار تلقی شد. سپس از نمونه‌های مورد نظر با استفاده از میکروسکوپ Olympus مدل Bx51 عکس برداری شد.

جدول ۱. انواع لکتین‌های مورد استفاده و خصوصیات آن‌ها

Lectin	Abbreviation	Carbohydrate binding specificity
Maclura pomifera agglutinin	MPA	Gal-($\beta 1 \rightarrow 3$)-GalNAC
Arachis hypogaea agglutinin	PNA	D-Gal-($\beta 1 \rightarrow 3$)-D-Gal NAC
Lotus tetragonolobus	LTA	L- Fuc- α

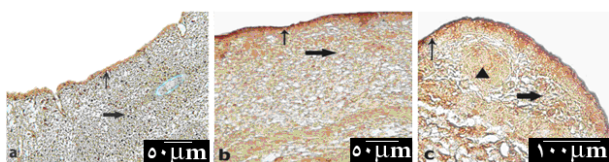
یافته‌ها

بررسی مقاطع میکروسکوپی مربوط به ناحیه پوست در حال تکامل جنین‌های دوازده روزه (E_{12}) که با لکتین MPA مجاور شده بودند، نشان داد که سلول‌های اکتودرمی و ماتریکس خارج سلولی در مزانشیم مزودرمی با MPA واکنش می‌دهد، به طوری که شدت واکنش در سلول‌های اکتودرمی بیشتر از ماتریکس خارج سلولی مزانشیم بود (شکل ۱-a). همچنین ارزیابی مقاطع مربوط به جنین‌های چهارده روزه

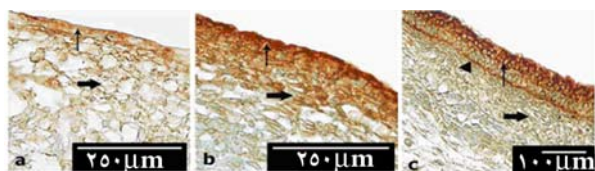
شانزدهم (E_{16}) بارداری موش‌ها با کلروفرم بیهوش و سپس با سرعت و دقت تشریح شدند. جنین‌ها پس از خارج شدن از رحم در پتری دیش محتوی سرم فیزیولوژی قرار داده شدند. پس از جدا کردن پرده‌های جنینی، جنین‌ها با استفاده از محلول فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت تثبیت شدند. پس از اتمام تثبیت، نمونه‌ها به روش‌های معمول بافتی توسط درجات صعودی الکل اتیلیک (۵۰-۷۰-۸۰-۹۰-۱۰۰) آبیگری و با استفاده از گزین شفاف‌سازی شد. سپس از نمونه‌ها بلوک‌های پارافینی تهیه شد. با استفاده از دستگاه میکروتوم آلمانی Leitz مدل ۱۵۱۲، برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرونی تهیه شد [۱۱]. به منظور رنگ‌آمیزی به روش لکتین هیستوشیمی از هر مرحله جنینی تعداد ۱۵ لام انتخاب و به روش معمول آزمایشگاه بافت‌شناسی پارافین‌زدایی و سپس آبدهی شد. این تعداد لام به سه دسته ۵ تایی برای رنگ‌آمیزی با سه لکتین MPA, PNA, LTA مطابق جدول ۱ تقسیم شد. این لکتین‌ها از شرکت سیگما با شماره کاتالوگ (SBA(L:2650), PNA(L:7759) و MPA(M:3267) خریداری و با آنزیم Horseradish peroxidase (HRP) نشاندار شد. هر یک از لکتین‌های مذکور با استفاده از محلول بافر فسفات سالین (PBS) برای رسیدن به غلظت ۱۵ میکروگرم در میلی‌لیتر رقیق شد. به منظور خنثی کردن Endogenous peroxidases، لام‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در آب اکسیژنه ۱ درصد محلول در PBS در شرایط تاریکی قرار داده شد. در مرحله بعد برش‌ها به مدت دو ساعت در اتاقک مرطوب در معرض لکتین‌ها قرار گرفت. سپس نمونه‌ها با محلول بافر فسفات سالین شستشو داده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در محلول سوبسترای ۰/۰۳ درصد Diaminobenzidine (DAB) در بافر فسفات که مقدار ۲۰ میکرولیتر آب اکسیژنه به ازای هر ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول فوق به آن اضافه شد، قرار داده شد. سپس کلیه نمونه‌ها بعد از شستشو با آب جاری و آب مقطر برای ایجاد رنگ زمینه به مدت ۱۰ دقیقه در محلول آلسین بلو با pH:2.5 قرار گرفت

پوست در روز شانزدهم جنینی (E_{16}) شدت واکنش در سلول‌های اکتودرمی به‌طور قابل توجهی کاهش یافت ($p=0/0001$).

همچنین ماتریکس خارج سلولی در مزانشیم مزودرمی در حال تمایز، در روزهای مورد بررسی با لکتین LTA واکنشی نشان نداد و رنگ قهوه‌ای که نشان دهنده واکنش اختصاصی لکتین مذکور با قند انتهایی α -L Fuc است، در این مراحل از تکامل در ماتریکس خارج سلولی مشاهده نشد.



شکل ۱. فتومیکروگراف‌های مربوط به پوست در حال تکامل رت که در مجاورت با لکتین MPA قرار گرفته است. (a) روز دوازدهم جنینی (بار: ۵۰ میکرومتر). (b) روز چهاردهم جنینی (بار: ۵۰ میکرومتر). (c) روز شانزدهم جنینی (بار: ۱۰۰ میکرومتر). پیکان‌های باریک نشان‌دهنده سلول‌های اکتودرمی است. پیکان‌های پهن به ماتریکس خارج سلولی مزانشیمی اشاره دارد، همچنین سر پیکان در تصویر c نشان دهنده یک تراکم مزانشیمی است که در مراحل بعدی تکامل به فولیکول مو، غدد عرق یا چربی تکامل می‌یابد.



شکل ۲. فتومیکروگراف‌های مربوط به پوست در حال تکامل رت که در مجاورت لکتین PNA قرار گرفته است. (a) روز دوازدهم جنینی (بار: ۲۵۰ میکرومتر). (b) روز چهاردهم جنینی (بار: ۲۵۰ میکرومتر). (c) روز شانزدهم جنینی (بار: ۱۰۰ میکرومتر). پیکان‌های باریک سلول‌های اکتودرمی و پیکان‌های پهن، ماتریکس خارج سلولی ناحیه مزانشیم در حال تمایز به درم را نشان می‌دهد و خط پررنگی که درست در زیر اکتودرم قرار دارد و با سر پیکان نشان داده شده است نشان دهنده غشای پایه است که جداکننده ناحیه اپیدرم در حال تکامل از سلول‌های مزانشیمی درم است و رنگ قهوه‌ای در این ناحیه نشان‌دهنده وجود قند انتهایی D-Gal-NAC ($\beta 1 \rightarrow 3$) در غشای پایه است که با PNA واکنش داده است.

(E_{14}) و شانزده روزه (E_{16}) که با لکتین MPA رنگ‌آمیزی شده بود، مشابه مقاطع روز دوازدهم جنینی (E_{12}) بود (شکل‌های ۱-b و ۱-c). شدت واکنش در این سه مرحله تکامل جنینی اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($p=0/735$).

در ادامه، بررسی نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که در مقاطع مربوط به جنین‌های دوازده روزه (E_{12}) که با لکتین PNA رنگ‌آمیزی شده بود، سلول‌های اکتودرمی که در این مرحله از تکامل به‌صورت یک لایه قابل مشاهده است و در راستای تشکیل اپیدرم تمایز خواهد یافت، با لکتین PNA واکنش نشان می‌دهد به‌طوری‌که شدت واکنش در سلول‌های مذکور در روز چهاردهم جنینی (E_{14}) افزایش قابل توجهی را نشان داد که از نظر آماری معنی‌دار بود ($P=0/009$). میزان واکنش سلول‌های اکتودرمی از روز چهاردهم (E_{14}) تا روز شانزدهم جنینی (E_{16}) که اپیدرم به‌صورت چند لایه مشاهده می‌شود، یکسان بود و تغییر قابل ملاحظه‌ای مشاهده نشد (شکل ۲-a).

ماتریکس خارج سلولی مزانشیم مزودرمی پوست در حال تکامل با لکتین PNA در روز دوازدهم (E_{12}) واکنش اندکی را نشان داد. درحالی‌که شدت واکنش در این ناحیه در روز چهاردهم (E_{14}) افزایش یافت ($p=0/0001$) و سپس در روز شانزدهم (E_{16}) این ناحیه واکنش به نسبت ضعیفی را در مقایسه با روز چهاردهم جنینی (E_{14}) با لکتین PNA نشان داد ($p=0/0001$).

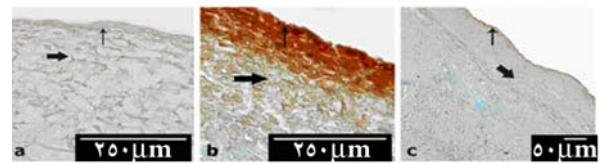
در ادامه بررسی روند تکامل پوست مقاطع جنینی‌های دوازده روزه (E_{12}) که با LTA رنگ‌آمیزی شده بود، واکنش اندکی در سلول‌های اکتودرمی در حال تمایز مشاهده شد در حالی که سلول‌های مذکور در روز چهاردهم جنینی (E_{14}) شدت واکنش، افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان داد به‌طوری‌که در مقایسه با روز دوازدهم (E_{12})، سلول‌های اکتودرمی در این مرحله رنگ قهوه‌ای قابل توجهی را به‌خود گرفتند ($p=0/0001$). با این وجود در ادامه روند تکامل

سلولی، شناخت سلول-سلول و میانکنش های سلولی طی تکامل جنینی دارلی اهمیت فراوان است [۱۴]؛ به عبارت دیگر بخش کربوهیدراتی این مولکول ها، از جمله تنظیم کننده های اصلی اعمال سلولی است که در میان کنش های سلول-سلول و سلول-ماتریکس شرکت می کند و نقش بیولوژیکی بسیار موثری در تکثیر، تمایز و مهاجرت فیبروبلاست ها از طریق تعدیل فنوتیپ سلولی بازی می کند [۱۵].

نتایج تحقیقات نشان می دهد که در رت در روز هفدهم بارداری اپیدرم، درم و بافت های زیر پوستی به صورت نابالغ دیده می شود. پس از آن بافت های مذکور شروع به ضخیم شدن نموده به طوریکه در روز نوزدهم بارداری غشای پایه قابل مشاهده می شود. لایه های شاخی و گرانولوزا در روز بیست و یکم در پوست جنین رت مشاهده شده و همچنین فاصله بین سطح پوست و سیستم خونی با تکامل جنین افزایش پیدا می کند [۱۶]. در واقع مراحل نهایی تکامل اپیدرم در پوست جوندگان بین روزهای ۲۰ تا ۲۲ بارداری رخ می دهد [۱۷] و لایه شاخی اپیدرم ۲ تا ۳ روز قبل از تولد وهمزمان با ناپدید شدن پریدرم تکامل می یابد [۱۷].

با توجه به این مطالعات و نتایج پژوهش حاضر که با بررسی ظهور و تغییرات بخش قندی گلیکوکانژوگیت های سطح سلول و ماتریکس خارج سلولی طی تکامل و مورفوژنز پوست رت در روزهای دوازدهم، چهاردهم و شانزدهم جنینی به دست آمده است، مکانیسم های احتمالی و مقایسه نتایج با نتایج حاصل از سایر مطالعاتی که در این زمینه انجام شده است تبیین می شود. نتایج مطالعات دانشمندان نشان می دهد که تغییرات گلیکوکانژوگیت های سطح سلول ها و ماتریکس خارج سلولی طی دوره رویانی انسان، موش، رت و جوجه از نظر تکاملی تنظیم شده است [۱۴].

در این مطالعه لکتین MPA که برای قند انتهایی Gal-(β1→3)GalNAc اختصاصی است با سلول های اکتودرمی



شکل ۳. فتومیکروگراف های مربوط به پوست در حال تکامل رت که در مجاورت لکتین LTA قرار گرفته است. (a) روز دوازدهم جنینی، پیکان باریک نشان دهنده واکنش اندک سلول های اکتودرمی با LTA است و پیکان پهن نشان دهنده ماتریکس خارج سلولی مزانشیمی است (بار: ۲۵۰ میکرومتر). (b) روز چهاردهم جنینی، پیکان باریک سلول های اکتودرمی را نشان می دهد که با LTA واکنش قابل ملاحظه ای نشان داده اند و پیکان پهن، ماتریکس خارج سلولی مزانشیمی که با لکتین LTA واکنش نشان نداده است را مشخص می کند. (بار: ۲۵۰ میکرومتر). (c) روز شانزدهم جنینی، پیکان باریک کاهش واکنش اکتودرم را نشان می دهد و پیکان پهن ماتریکس خارج سلولی مزانشیم را نشان می دهد که با LTA واکنش نداده است (بار: ۵۰ میکرومتر)

جدول ۲. میانگین شدت واکنش انواع لکتین ها با بافت های در حال تکامل پوست رت در روزهای مختلف جنینی

انواع لکتین	مرحله جنینی			P- valve
	E ₁₂	E ₁₄	E ₁₆	
۱۲ روزدم	MPA	++	++	۰/۷۳۵
	PNA	*	++	۰/۰۰۹
	LTA	+	**	۰/۰۰۱
۱۴ روزدم	MPA	++	++	۰/۳۰۴۰
	PNA	+	++	۰/۰۰۱
	LTA	-	-	۰

بحث

در این مطالعه که با استفاده از روش لکتین هیستوشیمیایی صورت گرفت، ظهور، تغییرات و همچنین ناپدید شدن احتمالی قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت ها، طی تکامل پوست رت در روزهای دوازدهم (E₁₂)، چهاردهم (E₁₄) و شانزدهم (E₁₆) بارداری بررسی شد.

نتایج تحقیقات نشان می دهد که ماکرومولکول های سطح سلول ها و ماتریکس خارج سلولی به ویژه ترکیبات قندی گلیکوکانژوگیت ها در فرایندهای تکوینی از قبیل تمایزات

قابل ملاحظه‌ای در آن مشاهده نشد. سلول‌های اکتودرمی که در روز دوازدهم جنینی (E_{12}) به صورت تک لایه‌ای است در روز شانزدهم جنینی (E_{16}) به صورت اپیدرمی چند لایه قابل مشاهده بوده که نشان‌دهنده سیر تکامل اپیدرم در این مراحل است.

افزایش شدت واکنش سلول‌های اپیدرمی در روز چهاردهم (E_{14}) نتیجه‌ای است که مشابه آن در مطالعاتی که روی جنین جوجه انجام شده نیز گزارش شده است [۱۹]. در این راستا در روز شانزدهم (E_{16}) تغییر قابل ملاحظه‌ای نسبت به روز چهاردهم (E_{14}) ملاحظه نشد.

اپیدرم به صورت تک لایه‌ای مشاهده شد و همان‌طور که نتایج نشان داد در این مرحله از تکامل جنینی قند D-Gal- $\beta(1\rightarrow3)$ -D-Gal NAC به میزان اندکی در این سلول‌ها قابل مشاهده بود و سپس همزمان با افزایش این قند در روز چهاردهم (E_{14}) و شانزدهم (E_{16}) جنینی اپیدرم به سمت مطبق (چند لایه‌ای شدن) تکامل یافت و علاوه بر این می‌توان گفت که قند انتهایی D-Gal- $\beta(1\rightarrow3)$ -D-Gal NAC در تکامل غشای پایه نیز نقش دارد به طوری که با افزایش میزان این قند در این ناحیه در روز شانزدهم جنینی محل غشای پایه به وضوح قابل تشخیص است. اگرچه در روز شانزدهم مطابق منابع موجود با رنگ آمیزی‌های معمولی در روز نوزدهم به طور کامل تشکیل شده و مشاهده می‌شود [۱۶] با توجه به نتایج حاصل مبنی بر واکنش واضح محل تشکیل غشای پایه با لکتین PNA در روز شانزدهم می‌توان نتیجه گرفت که قند انتهایی D-Gal- $\beta(1\rightarrow3)$ -D-GalNAC در ترکیب گلیکوکانژوگیت‌های تشکیل دهنده غشای پایه بیان شده و در شکل‌گیری غشای پایه نقش دارد. بنابراین می‌توان گفت که گلیکوکانژوگیت‌های واکنش‌پذیر با PNA طی تمایز سلول‌های اپیدرمی در این ناحیه وجود دارد و احتمالاً در نگهداری ساختارهای تنظیم شده (regulated) اپیدرم موثر است. همچنین نتایج تحقیقات در مورد تکامل پوست در جنین جوجه نشان می‌دهد که گلیکوکانژوگیت‌های محتوی این قند روی سطح

در روز دوازدهم جنینی (E_{12}) واکنش نشان داد به طوری که شدت واکنش در روز چهاردهم (E_{14}) و شانزدهم (E_{16}) جنینی تغییر قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با روز دوازدهم (E_{12}) نشان نداد. همچنین لکتین MPA با ماتریکس خارج سلولی مزانشیم در سه مرحله مورد مطالعه، واکنش شدید و در عین حال یکسانی را نشان داد به طوری که اختلاف شدت واکنش در سه مرحله تکاملی مورد مطالعه معنی‌دار نبود. بنابراین می‌توان گفت که قند انتهایی Gal- $\beta(1\rightarrow3)$ GalNac در هر سه مرحله تکاملی جنینی مورد بررسی در سلول‌های اکتودرمی و ماتریکس خارج سلولی بیان شده است و میزان آن در مراحل تکاملی مورد مطالعه تغییر چندانی نکرده است و همچنین می‌توان اذعان نمود که قند انتهایی مذکور به عنوان یکی از عوامل مؤثر در فرایند مورفوژنز دارای اهمیت است. لکتین‌ها برای مونوساکاریدهای موجود در زنجیره‌های قندی گلیکوکانژوگیت‌ها اختصاصی هستند و در عین حال با قند انتهایی بر اساس نوع زنجیره‌های اولیگوساکاریدی مختلف که به قند انتهایی ختم می‌شود با میل ترکیبی متفاوت واکنش نشان می‌دهد که این میل ترکیبی متفاوت می‌تواند به دلیل نوع اتصال، نوع قند ما قبل آخر و ایزومرهای فضایی زنجیره‌های قندی باشد همچنین تفاوت‌های قابل اندازه‌گیری در الگوی واکنش‌پذیری بین لکتین‌های مختلف که مونوساکارید انتهایی یکسانی را شناسایی می‌کند، وجود دارد که این می‌تواند به نوع آرایش مولکولی خاص قند انتهایی و همچنین زنجیره قندی متصل به آن مربوط باشد [۱۸].

با توجه به نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر در خصوص لکتین PNA که برای قند انتهایی D-Gal- $\beta(1\rightarrow3)$ -D-Gal Nac اختصاصی است، سلول‌های اکتودرمی که در راستای تشکیل اپیدرم در حال تمایزند در روز دوازدهم (E_{12}) با لکتین مذکور واکنش نشان داد به طوری که شدت واکنش در روز چهاردهم جنینی (E_{14}) افزایش قابل توجهی را نشان داد. میزان واکنش سلول‌های اکتودرمی از E_{14} تا E_{16} یکسان بود و تغییر

نتیجه گرفت که این قند یکی از مولکول‌های دخیل در فرآیند مورفوژنز اپیدرم است ولی در تکامل ماتریکس خارج سلولی مزانشیم در سه مرحله مورد مطالعه بیان نشده که این خود می‌تواند دلیلی بر عدم تأثیر این قند طی تکامل درم باشد. با این وجود ممکن است در مراحل قبلی یا بعدی نقش مؤثری داشته باشد که نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد. همچنین نتایج بررسی‌هایی که با استفاده از لکتین LTA طی تکامل جنین یک دوزیست (*Rana dalmatina*) صورت گرفته است، نشان می‌دهد که سلول‌های اکتودرمی و ماتریکس خارج سلولی طی گاسترولاسیون با LTA واکنش نشان داده‌اند که بیانگر نقش قند انتهایی α -L Fuc در این مرحله از تکامل پوست در این دوزیست است [۲۱].

بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه و بررسی‌های مشابه می‌توان نتیجه گرفت که قندهای انتهایی α -L Fuc، GalNAc (Gal-(β 1 \rightarrow 3)-D-Gal NAC و D-Gal-(β 1 \rightarrow 3)-D-Gal و α -L Fuc گلیکوکانز و گیت‌ها طی تکامل سلول‌های اکتودرمی و تبدیل آن‌ها به اپیدرم از نظر زمانی و مکانی تنظیم شده است و احتمالاً در تکامل طبیعی پوست اهمیت دارد به طوری که وجود آن‌ها طی این سه مرحله تکامل جنینی مورد مطالعه، طی مورفوژنز طبیعی پوست ضروری به نظر می‌رسد. همچنین با توجه به الگوی بیان و تغییرات قندهای انتهایی Gal- (Gal-(β 1 \rightarrow 3)-D-Gal NAC و GalNAc (β 1 \rightarrow 3)) در ماتریکس خارج سلولی مزانشیم مزودرمی می‌توان نتیجه گرفت که این قندها در مورفوژنز درم دارای اهمیت بوده و احتمالاً در میان کنش‌های اکتودرمی - مزانشیمی دخالت دارد.

تقدیر و تشکر

پژوهش حاضر حاصل بخشی از نتایج طرح مصوب (۱۳۸۸/۱۰/۲۶ مورخ ۸۸/۳۰/۲۶۵۵) معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد است که بدینوسیله از آن معاونت محترم و همچنین خدمات تکنیکی سرکار خانم متجدد در آزمایشگاه

سلول، جایی که سلول‌های اپیدرمی از ناحیه قاعده‌ای به سمت اپیدرم سطحی مهاجرت می‌کند، تجمع می‌یابد [۱۴]. همچنین در این مطالعه مشخص شد که سلول‌های لایه شاخی با PNA رنگ نشده‌اند که این حالت ممکن است به علت وجود یک پوشش (ماسک) روی قند انتهایی باشد یا برداشت گلیکوکانز و گیت‌های واکنش پذیر با PNA که طی کراتینیزه شدن رخ می‌دهد. از طرف دیگر ممکن است که لکتین‌های کونژوگه شده با avidin-HRP که در مطالعات روی جنین جوجه انجام شده است به فضای بین سلولی سلول‌های کراتینیزه دسته‌بندی شده نفوذ نکرده باشد. بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده، قند انتهایی که با لکتین PNA که با HRP نشان دار شده، واکنش نشان داده است می‌تواند نشانگر خوبی برای سلول‌های اپیدرمی در حال تمایز باشد [۲۰].

الگوی خاص واکنش ماتریکس خارج سلولی مزانشیم با لکتین مذکور به طوری که در روز دوازدهم (E_{12}) ضعیف، سپس در روز چهاردهم (E_{14}) افزایشی در حد متوسط و در روز شانزدهم (E_{16}) در مقایسه با روز چهاردهم (E_{14}) از شدت واکنش کاسته شده بود، نشان دهنده بیان قند انتهایی D-Gal- (Gal-(β 1 \rightarrow 3)-D-Gal NAC در مزانشیم در حال تکامل است و با توجه به الگوی زمانی ظهور و میزان این قند که از نظر مراحل تکاملی تنظیم شده است، می‌توان به نقش آن در تکامل و تشکیل لایه‌های مختلف پوست اذعان نمود.

در ادامه بررسی‌ها، لکتین LTA با سلول‌های اکتودرمی در جنین‌های دوازده روزه (E_{12}) واکنش اندکی را نشان داد که بیانگر میزان کم قند انتهایی α -L Fuc در این ناحیه است و میزان این قند در روز چهاردهم جنینی (E_{14}) به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت و در روز شانزدهم (E_{16}) بسیار کاهش پیدا کرد که این الگوی واکنش لکتین LTA می‌تواند تاییدی بر نقش این قند انتهایی طی تشکیل اپیدرم باشد به طوری که توزیع آن در سلول‌های اکتودرمی دارای نوسان بوده و از نظر تکاملی میزان بیان آن تنظیم شده است. پس می‌توان

سلولی دانشکده پزشکی مشهد قدردانی می‌شود.

تخصصی بافت شناسی گروه علوم تشریحی و بیولوژی

References

1. **Auerbach**: Wilderness Medicine. 5th ed. Mosby Elsevier Philadelphia 2007, pp 30-5.
2. **Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC**. Kumar: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition. 8th ed. Saunders Elsevier Philadelphia 2009; pp 225-40.
3. **Thomas S**. Langman's medical embryology. 10th ed. Madison country Montana 2007; 333-335 .
4. **Mikkola ML**. TNF superfamily in skin appendage development. Cytokine Growth Factor Rev 2008; 19:219-230.
5. **Choung CM, Patel N, Lin J, Jung H, Widelitz RB**. Sonic hedgehog signaling pathway in vertebrate epithelial appendage morphogenesis: perspectives in development and evolution. Cell Mol Life Sci 2000; 57: 1672-81.
6. **Beyer TA, Werner S, Dickson C, Grose R**. Fibroblast growth factor 22 and its potential role during skin development and repair. Exp Cell Res 2003; 287:228-36.
7. **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 Anat 1989; 184:85-94.
8. **Muramatsu T**. Essential Roles of Carbohydrate Signals in Development, Immune Response and Tissue Functions, as Revealed by Gene Targeting. J Biochem 2000; 127:171-6.
9. **Pelli AA, Cinelli LP, Mourao PAS, Brito-Gitirana LD**. Glycosaminoglycans and glycoconjugates in the adult anuran integument (*Lithobates catesbeianus*). Micron 2010; 1478:1-6.
10. **Zagris N**. Extracellular matrix in development of the early embryo. Micron 2001; 32:427-438.
11. **Kiernan JA**. Histological and histochemical methods theory and practice. 3rd ed. Butterwort Heinemann Oxford 1990, p 225.
12. **Bancroft JD, Stevens A**. Theory and practice of histological techniques. 5th ed. Churchill Livingstone London 2003, pp 20-100,513.
13. **Fukuo N, Bradley AS, Samuel S**. Lectin cytochemical evaluation of somatosensory neurons and their peripheral and central processes in Rat and man. Cell Tissue Res 1986; 245: 579-89.
14. **Gheri G, Gheri Bryk S, Sgambati E**. Use of horseradish peroxidase conjugated lectins for detection of glycoconjugate changes in developing lingual epithelium of the chick embryo. Develop. Growth and Differ 1991; 33(4):371-7.
15. **Armengol C, Carretero A, Nacher V, Ruberte J, Navarro M**. Carbohydrate characterization of quail primordial germ cells during migration and gonadal differentiation. J Anat. 2007; 210(1): 98-111.
16. **Narita A, Kumakura M, Shibabe S, Ito M, Shigematsu A, Nanbo T**. Histological and absorptional changes of skin with development of rat fetuses. J Reprod Dev 1998; 44: 205-8.
17. **Fluhr JW, Behne MJ, Brown BE, Moskowitz DG, Selden C, Man-Qiang M, et al**. Sratum Corneum Acidification in Neonatal Skin: Secretory Phospholipase A₂ and the Sodium/Hydrogen Antiporter-1 Acidify Neonatal Rat Stratum Corneum. J invest dermatol 2004; 122: 320-9.
18. **Doering T, Brade H, Sandhoff K**. Sphingolipid metabolism during epidermal barrier development in mice. J Lipid Res 2002; 43:1727-33.
19. **Wu AM, Lisowska E, Duk M, Yang Z**. Lectins as tools in glycoconjugate research. Glycoconj J 2009; 26: 899-913.
20. **Takata K, Hirano H**. Changes in soybean agglutinin (SBA) and peanut agglutinin (PNA) binding pattern in the epidermis of the developing chick embryo.

Develop. Growth and Differ 1983; 25(3): 299-305.
21. **Faraldi C, Falugi C, Fasulo S.** Glycoconjugate

expression changes during *Rana dalmatina* early development. Eur J Histochem 1996; 40(1): 67-74.