Quarterly of the Horizon of Medical Sciences
Volume 20, Issue 2, Summer 2014
Pages: 101-107
Type: Original Research

Histochemical Lectin Study of Glycoconjugates Terminal Sugars during Retina Ganglionic Cell Differentiation in Rat Eye

Ebrahimi V.[1] *MSc*, Vojoudi E.[1] *MSc*, Fazel A.R. [1] *PhD*, Ebrahimzadeh Bideskan A.R.* *PhD*

[*]Anatomy & Cell biology Department, Medicine Faculty, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[1]Anatomy & Cell biology Department, Medicine Faculty, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Abstract

Aims: Development of organs during embryonic period is the result of complex events and changes such as cellular reactions and molecular differentiations of every dependent structure that determine the ultimate fate of an embryonic undifferentiated cell. The aim of this study was to investigate the distribution of glycoconjugates terminal sugars and their changes on ganglionic cells surface of rat's retina using histochemichal lectin technique during eye morphogenesis.

Materials & Methods: Wistar rats were used. Zero day of pregnancy was determined. Pregnant rats were anesthetized on 14th, 15th and 16th days of gestation and the fetuses were removed and fixed in formalin solution which after tissue passage and 5µ sections preparation exposed to GSA1-B4, DBA, OFA and MPA lectins. Samples color background was Alcian blue with pH equal 2.5.

Findings: 14-day samples ganglionic cells showed a poor reaction to the DBA and GSA1-B4 lectins. No reaction was observed on 15th and 16th days with the mentioned lectins. Response of these cells to MPA lectin began from 14th day weakly, increased on 15th day sharply and decreased on 16th day (average response). Reaction of the mentioned cells was moderate with OFA lectin on 14th day, was intense on 15th day and was weak 16th day.

Conclusion: Changes in glycoconjugates terminal sugars of cell surface in terms of time is a set process in ganglion cells regulations during eye development and glycoconjugates containing fucose, α-D-Gal, β-D-Gal and N-acetylgalactoseamin terminal sugars play a crucial role in eye retina ganglionic cells development.

Keywords
Growth & Development [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68048788];
Retina [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68012160];
Ganglia [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68005724];
Lectins [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68037102]
Histocytochemistry [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68006651];
Rats [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68051381]

[*]Corresponding Author
Tel: +985118828572
Fax: +985118002484
Address: Anatomy & Cell Biology Department, Medicine Faculty, Vakilabad Bolevard, Azadi Square, Mashhad, Iran. Postal Code: 91779-48564
ebrahimzadehba@mums.ac.ir
Received: December 16, 2013 Accepted: June 15, 2014 ePublished: July 1, 2014

بررسی لکتین هیستوشیمیایی قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت‌ها طی تمایزات سلول‌های گانگلیونی شبکیه چشم موش صحرایی

وحید ابراهیمی MSc
گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
الهام وجودی MSc
گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
علیرضا فاضل PhD
گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
علیرضا ابراهیم‌زاده بیدسکان* PhD
گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

اهداف: تکامل ارگان‌ها در دوران جنینی حاصل رخدادها و تغییرات پیچیده‌ای همچون واکنش‌های سلولی و تمایزات مولکولی تک‌تک ساختارهای وابسته است که موجب تعیین سرنوشت نهایی یک سلول تمایزنیافته جنینی می‌شود. هدف از این مطالعه، بررسی الگوی توزیع قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت‌ها و تغییرات آنها در سطح سلول‌های گانگلیونی شبکیه رت طی مورفوژنز چشم با استفاده از روش لکتین هیستوشیمیایی بود.

مواد و روش‌ها: از موش‌های صحرایی نژاد ویستار استفاده شد. روز صفر حاملگی مشخص شد. موش‌های صحرایی حامله در روزهای ۱۴، ۱۵ و ۱۶ حاملگی تحت بی‌هوشی قرار گرفتند و جنین‌های آنها برداشته و با محلول فرمالین تثبیت شدند که پس از پاساژ بافتی و تهیه برش‌های ۵میکرومتری در معرض لکتین‌های GSA1-B4، DBA، OFA و MPA قرار گرفتند. رنگ زمینه نمونه‌ها آلسین‌بلو با pH برابر با ۲/۵ بود.

یافته‌ها: سلول‌های گانگلیونی نمونه‌های ۱۴روزه به لکتین‌های DBA و GSA1-B4 واکنش ضعیفی نشان دادند. هیچ‌گونه واکنشی در روزهای ۱۵ و ۱۶ با لکتین‌های مذکور مشاهده نشد. واکنش این سلول‌ها با لکتین MPA از روز ۱۴ به‌طور ضعیف شروع، در روز ۱۵ به‌شدت افزایش و در روز ۱۶ کاهش یافت (واکنش متوسط). واکنش سلول‌های مذکور با لکتین OFA در روز ۱۴ با شدت متوسط، در روز ۱۵ شدید و در روز ۱۶ ضعیف بود.

نتیجه‌گیری: تغییرات قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت‌های سطح سلول از نظر زمانی در تمایزات سلول‌های گانگلیونی طی تکامل چشم فرآیندی تنظیم‌شده است و گلیکوکانژوگیت‌های حاوی قندهای انتهایی فوکوز، آلفا- دی‌گالاکتوز، بتا- دی‌گالاکتوز و ان- استیل‌گالاکتوزآمین نقشی حیاتی در تکامل سلول‌های گانگلیونی شبکیه چشم ایفا می‌کنند.

کلیدواژه‌ها: تکامل؛ شبکیه؛ سلول‌های گانگلیونی؛ لکتین هیستوشیمی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۹/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۳/۲۵
* نویسنده مسئول: ebrahimzadehba@mums.ac.ir

مقدمه

تکامل ارگان‌ها در دوران جنینی حاصل رخدادها و تغییرات پیچیده‌ای همچون واکنش‌های سلولی و تمایزات مولکولی تک‌تک ساختارهای وابسته است که در مسیری کاملاً کنترل‌شده و منظم موجب تعیین سرنوشت نهایی یک سلول تمایزنیافته جنینی می‌شود [۱، ۲]. با وجود مطالعات مولکولی و میکروسکوپی فراوان، بسیاری از وقایع مربوط به این دوران همچنان ناشناخته باقی مانده است. اما آنچه که مسلم است میان‌کنش‌های سلولی و سلول با ماتریکس خارج‌سلولی در فرآیندهای مرتبط با تکامل همچون مهاجرت سلولی، مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی و تمایزات سلولی نقش به‌سزایی دارند [۳، ۴]، به‌طوری که این میان‌کنش‌ها در تکامل شبکیه چشم به‌عنوان یک ساختار منحصربه‌فرد عصبی با تنوع سلولی، بسیار تاثیرگذار هستند [۵-۷].

نتایج تحقیقاتی که به‌روش لکتین هیستوشیمی و با تاکید بر سیر تمایز سلول‌های گانگلیونی شبکیه در مهره‌داران مختلف انجام شده است نشان می‌دهد که قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت‌ها در مسیر تمایزات این سلول‌ها و رشته‌های عصبی آنها در سرتاسر شبکیه با الگویی تنظیم‌شده بیان می‌شوند [۸-۱۰]. در این راستا نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد که سلول‌های گانگلیونی جانوری مثل شتر تنها به Con A (لکتین اختصاصی آلفا- دی- مانوز) واکنشی خفیف بروز می‌دهند. در حالی که عصب اپتیک که بخش قابل توجهی از آن را آکسون سلول‌های گانگلیونی تشکیل می‌دهد، به لکتین‌های PNA، VVA، ECA و UEAI که به‌ترتیب برای قندهای بتا- دی- گالاکتوز، دی- اِن- استیل‌گالاکتوزآمین، آلفا- دی- گالاکتوز- (۱-۴)- ان- استیل‌گلوکزآمین و آلفا- اِل- فوکوز اختصاصی هستند، شدیداً واکنش نشان می‌دهد. در عین حال این رشته‌های عصبی به لکتین‌های Con A (لکتین اختصاصی برای آلفا- دی- مانوز)، WGA (لکتین اختصاصی برای ان- استیل‌گلوکزآمین)، LTA (لکتین اختصاصی برای آلفا- اِل- فوکوز)، SBA (لکتین اختصاصی قند انتهایی دی- ان- استیل‌گالاکتوزآمین) و GSAI (لکتین اختصاصی قند انتهایی آلفا- گالاکتوز) هیچ‌گونه واکنشی نشان نمی‌دهند [۷].

در یکی از تازه‌ترین پژوهش‌ها که به‌منظور مقایسه واکنش لایه‌های مختلف شبکیه مهره‌داران به لکتین‌ها در موش صحرایی آلبینو، گونه‌ای فاخته و نوعی ماهی کپور انجام گرفت، حضور کربوهیدرات‌های حاوی فوکوز (به‌استثنای موش صحرایی آلبینو)، گالاکتوز، ان- استیل‌گالاکتوزآمین، سیالیک‌اسید (به‌استثنای ماهی

کپور) و مانوز در سلول‌های گانگلیونی هر سه گونه مورد مطالعه، به اثبات رسید [۸].

از آن جا که مطالعات لکتین هیستوشیمیایی پیرامون شناسایی و تکامل سلول‌های گانگلیونی و همچنین الگوی توزیع گلیکوکانژوگیت‌ها به‌خصوص در دوران جنینی به‌صورت اندک و پراکنده انجام گرفته است، در مطالعه حاضر با به‌کارگیری مجموعه‌ای از لکتین‌ها، بیان و تغییرات برخی از قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت‌ها در سیر تمایزات سلول‌های گانگلیونی شبکیه چشم در برخی از روزهای جنینی موش صحرایی مورد مطالعه قرار گرفت.

هدف از این مطالعه، بررسی الگوی توزیع قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت‌ها و تغییرات آنها در سطح سلول‌های گانگلیونی شبکیه موش صحرایی طی مورفوژنز چشم با استفاده از روش لکتین هیستوشیمیایی بود.

مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش، از ۲۰ سر موش صحرایی ماده دوماهه نژاد ویستار به‌همراه ۱۰ سر موش صحرایی نر هم‌نژاد آنها که از خانه حیوانات دانشکده پزشکی مشهد خریداری شده بودند، استفاده شد. این حیوانات مطابق دستورالعمل NIH (موسسه ملی بهداشت) برای مراقبت از حیوانات و در شرایط استاندارد خانه حیوانات با دسترسی آزاد به غذا، آب، دوره تاریکی و روشنایی ۱۲ساعته، رطوبت مناسب و دمای ۲۴–۱۸درجه سانتی‌گراد نگهداری و پس از آداپته‌شدن در قفس‌های مخصوص جفت‌گیری، آمیزش داده شدند (به‌ازای هر دو موش صحرایی ماده یک موش صحرایی نر) و با تهیه اسمیر واژینال روز صفر حاملگی در آنان تعیین شد. موش‌های صحرایی حامله در قفس‌های جداگانه مورد نگهداری و مراقبت قرار گرفتند. سپس در هر یک از روزهای چهاردهم تا شانزدهم حاملگی به‌ترتیب موش‌های صحرایی حامله با کلروفرم تحت بیهوشی قرار گرفتند و با عمل سزارین شاخه‌های رحم از بدن موش صحرایی خارج شد و بلافاصله در سرم فیزیولوژی، جنین‌ها از پرده‌های جنینی جدا شده و در محلول فرمالین در دمای اتاق فیکس شدند [۱۱]. سپس نمونه‌ها به‌روش‌های معمول بافت‌شناسی پاساژ داده شده و در بلوک‌های پارافینی قالب‌گیری شدند و برش‌هایی به‌صورت سریال با ضخامت ۵میکرون توسط میکروتوم روتاری 1512 (Leit؛ آلمان) در دو جهت ساژیتال و کرونال از هر نمونه تهیه شد.

در ادامه کار، مقاطع تهیه‌شده برای رنگ‌آمیزی به‌روش لکتین هیستوشیمی با استفاده از لکتین‌های مورد نظر (سیگما، آلدریچ؛ ایالات متحده) آماده شدند (جدول ۱). ابتدا مقاطع بافتی به‌روش معمول بافت‌شناسی آب‌دهی شدند. سپس نمونه‌های بافتی به‌مدت نیم‌ساعت در محلول بافرفسفات‌سالینِ (PBS) تازه‌تهیه‌شده قرار داده شدند. این محلول دارای ۳۶گرم کلریدسدیم، ۷/۴گرم سدیم‌هیدروژن‌فسفات و ۴/۱۵گرم پتاسیم‌دی‌هیدروژن در یک لیتر آب مقطر است. محلول مورد نظر استوک بوده که در هنگام کار، به‌نسبت یک به ۵ رقیق شد [۱۲].

جدول ۱) مشخصات لکتین‌های مورد استفاده در مطالعه

لکتین DBA	
نام کامل	Horse gram (Dolichos biflorus)
اختصاصی برای	آلفا–دی–اِن–استیل‌گالاکتوزآمین
لکتین GSA1-B4	
نام کامل	Griffonia simplicifolia agglutinin
اختصاصی برای	آلفا–دی–گالاکتوز
لکتین MPA	
نام کامل	Maclura Pomifera
اختصاصی برای	بتا–دی–اِن–استیل‌گالاکتوزآمین
لکتین OFA	
نام کامل	Aleuria aurantia (Orange fungus)
اختصاصی برای	آلفا–ال–فوکوز–(۱–۶)–اِن–استیل‌گلوکزآمین

برای رنگ‌آمیزی، ابتدا هر یک از لکتین‌های مورد نظر با غلظت ۱۰میکروگرم ماده موثر (لکتین کونژوگه با HRP) در یک میلی‌لیتر PBS رقیق شدند. پس از خارج‌کردن نمونه‌ها از محلول PBS، برش‌های مربوط به هر مرحله تکاملی برای استفاده از ۳ لکتین یادشده به ۳ دسته تقسیم شدند. آن‌گاه روی هر سری از برش‌ها چند قطره از لکتین رقیق‌شده مورد نظر چکانده شد و به‌مدت ۲ساعت در درجه حرارت اتاق قرار گرفتند. بعد از این مدت، مقاطع در PBS به‌مدت ۳دقیقه شست‌وشو داده شدند. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۱۰دقیقه در محلول ۰/۰۳٪ DAB (دی‌آمینوبنزیدین) (۰/۰۳گرم در ۱۰۰میلی‌لیتر PBS) و آب‌اکسیژنه (۲۰۰میکرولیتر در ۱۰۰میلی‌لیتر محلول DAB) مجاور شده سپس با آب جاری شست‌وشو داده شدند [۱۱، ۱۲]. برای رنگ زمینه نیز از آلسین‌بلو با برابر با ۲/۵ استفاده شد. در مرحله بعد، مقاطع مورد نظر طبق روش‌های معمول در بافت‌شناسی آبگیری، با گزیلول شفاف‌سازی و سپس چسبانده شدند. در هر مرحله حداقل ۳ نمونه به‌عنوان گروه آزمایش با هر لکتین رنگ‌آمیزی شد و یک برش به‌عنوان شاهد در معرض HRP، DAB و آب‌اکسیژنه (بدون استفاده از لکتین) قرار گرفت. به‌علاوه این که با هر لکتین در هر مرحله جنینی، یک نمونه ترکیبی به‌عنوان کنترل مثبت رنگ‌آمیزی شد. با توجه به این که در صورت اتصال لکتین با قند انتهایی در مجاورت DAB و آب‌اکسیژنه به‌علت وجود HRP رنگ قهوه‌ای ظاهر می‌شود، لام‌های آماده‌شده با میکروسکوپ نوری معمولی مورد بررسی قرار گرفتند و شدت رنگ‌آمیزی بر اساس طیف لیکرت مورد ارزیابی قرار گرفت. روش درجه‌بندی و نمره‌گذاری شدت واکنش‌های مختلف به لکتین‌های مورد استفاده به این صورت بود که برای عدم واکنش یا

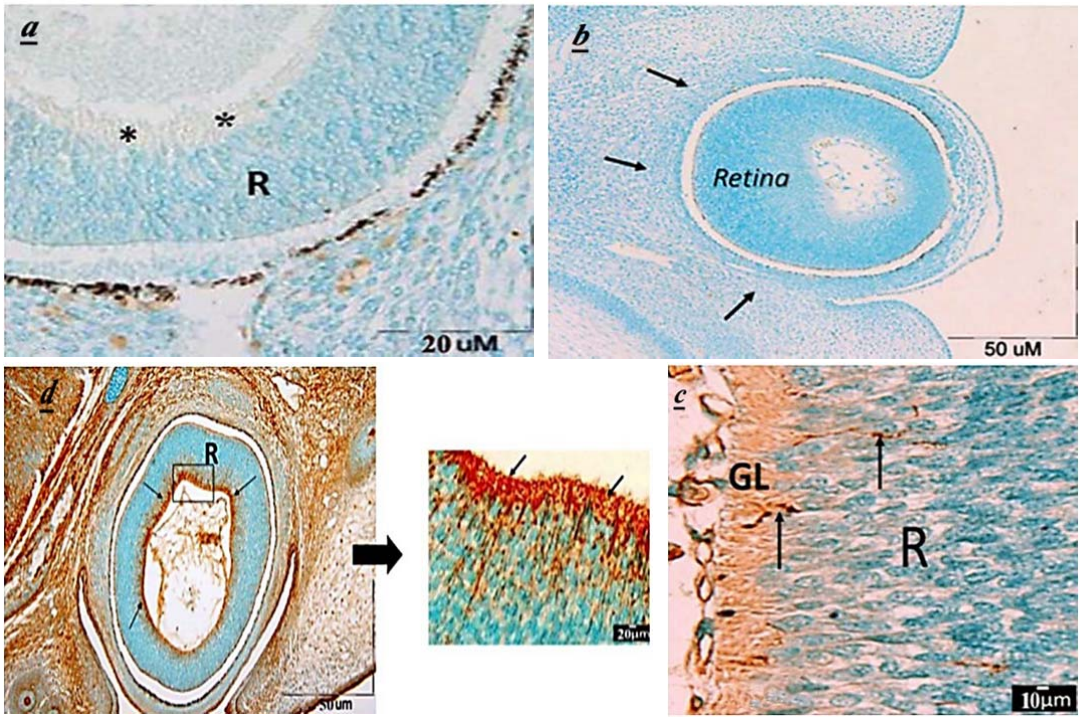
واکنش منفی رتبه صفر (−)، برای واکنش خفیف یا ضعیف رتبه یک (+)، برای واکنش متوسط رتبه ۲ (++) و برای واکنش قوی رتبه ۳ (+++) در نظر گرفته شد [۱۲]. در این روش، شدت رنگ‌آمیزی بر اساس مشاهده ۳ نفر به‌صورت بلایند (Blind) تعیین شد و نمونه‌ها بر اساس شدت واکنش با هر لکتین در روزهای مختلف جنینی (روزهای ۱۴ تا ۱۶) به‌طور جداگانه رتبه‌بندی شدند. در انتها، از شدت و تغییرات واکنش‌های ایجادشده در نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ مدل Bx51 (Olympus؛ ژاپن) تصویربرداری صورت گرفت.

یافته‌ها

از آن جا که سلول‌های تشکیل‌دهنده شبکیه و همچنین سلول‌های گانگلیونی در روزهای متفاوت جنینی و به‌تبع آن، در دوره‌های متفاوت تکاملی قرار داشتند، پاسخ این سلول‌ها به لکتین‌های اختصاصی طیف متنوعی از شدت واکنش را نشان داد (جدول ۲).

جدول ۲) شدت واکنش سلول‌های گانگلیونی شبکیه چشم به لکتین‌های مختلف در روزهای ۱۴، ۱۵ و ۱۶ جنینی

لکتین‌ها	شدت واکنش
DBA	
روز ۱۴ جنینی	+
روز ۱۵ جنینی	−
روز ۱۶ جنینی	−
GSA1-B4	
روز ۱۴ جنینی	+
روز ۱۵ جنینی	−
روز ۱۶ جنینی	−
OFA	
روز ۱۴ جنینی	++
روز ۱۵ جنینی	+++
روز ۱۶ جنینی	+
MPA	
روز ۱۴ جنینی	+
روز ۱۵ جنینی	+++
روز ۱۶ جنینی	++



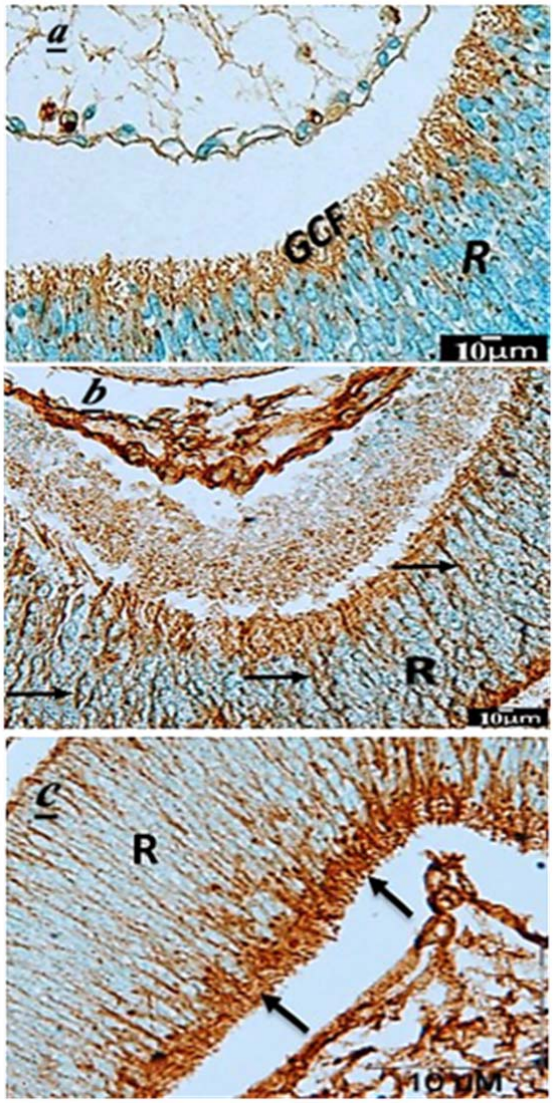
شکل ۱) (a) فتومیکروگراف شبکیه چشم جنین ۱۴روزه رت که در معرض لکتین DBA قرار گرفته است. واکنش خفیف (+) لایه گانگلیونی شبکیه چشم قابل ملاحظه است. به‌جز واکنش ضعیف سلول‌های لایه گانگلیونی که در مجاورت این لکتین قرار گرفته‌اند، هیچ‌گونه اثری از واکنش رشته‌های عصبی داخل شبکیه (R) دیده نمی‌شود؛ **(b)** فتومیکروگراف مربوط به کره چشم جنین ۱۵روزه رت که در معرض لکتین DBA قرار گرفته است. همان طور که مشاهده می‌شود هیچ‌کدام از لایه‌ها و سلول‌های شبکیه (Retina) به این لکتین واکنش نشان ندادند. فلش‌های موجود در تصویر، سلول‌های مژانشیمی تمایزنیافته اطراف کره چشم را نشان می‌دهند؛ **(c)** فتومیکروگراف شبکیه چشم جنین ۱۴روزه رت که در مجاورت لکتین GSA1-B4 قرار گرفته است. واکنش خفیف (+) سطح سلول‌های لایه گانگلیونی (GL) به‌خوبی نمایان است. رشته‌های عصبی تعدادی از این سلول‌ها در لابه‌لای سایر سلول‌های شبکیه (R) واکنش‌های پراکنده و البته شدیدتری نسبت به سطح سلول‌های گانگلیونی به این لکتین نشان داده‌اند (پیکان‌ها)؛ **(d)** فتومیکروگراف چشم جنین ۱۵روزه رت که در معرض لکتین MPA قرار گرفته است. تصویر سمت چپ مربوط به برش کامل کره چشم است که در آن واکنش شدید (+++) سلول‌های گانگلیونی تشکیل‌دهنده لایه داخلی شبکیه (R) به لکتین MPA به‌وضوح مشخص است. خط مقیاس برابر با ۵۰میکرومتر. تصویر سمت راست، همان نمونه با بزرگنمایی ۴برابر را نشان می‌دهد. شدت بالای واکنش سلول‌های گانگلیونی (نوک پیکان‌ها) قابل مشاهده است. رشته‌های عصبی که ارتباط بین لایه گانگلیونی و سایر لایه‌های خارجی‌تر شبکیه را برقرار می‌کنند نیز به‌شدت با لکتین MPA واکنش نشان داده‌اند.

در مقاطع بافتی رنگ‌آمیزی‌شده مربوط به روز چهاردهم جنینی که در مجاورت با لکتین DBA قرار گرفته بودند، واکنش خفیفی (+) در سلول‌های گانگلیونی شبکیه مشاهده شد. این در حالی است که واکنش قابل توجهی در رشته‌های عصبی پراکنده در سراسر شبکیه ملاحظه نشد (شکل ۱، A). در برش‌های بافتی به‌دست‌آمده از نمونه‌های جنینی ۱۵روزه رنگ‌آمیزی‌شده با لکتین DBA، هیچ‌کدام از لایه‌های تشکیل‌دهنده کره چشم از جمله شبکیه، واکنشی به لکتین فوق بروز ندادند (شکل ۱، B). در سلول‌های گانگلیونی جنینی روز شانزدهم نیز هیچ‌گونه واکنشی به لکتین DBA مشاهده نشد (جدول ۲).

سلول‌های گانگلیونی شبکیه در مقاطع بافتی متعلق به روز چهاردهم تکامل، واکنش خفیفی (+) به لکتین GSA1-B4 نشان دادند. علاوه بر این، تعدادی از رشته‌های ارتباطی سلول‌های گانگلیونی که به‌سمت سایر سلول‌های شبکیه کشیده شده‌اند، به لکتین GSA1-B4 پاسخ دادند؛ با این تفاوت که واکنش آنها نسبت به جسم سلولی و ترکیبات سطح سلول‌های گانگلیونی با شدت بیشتری همراه بود (شکل ۱، C). مقاطع مربوط به جنین‌های ۱۵ و ۱۶روزه، واکنشی به لکتین GSA1-B4 بروز ندادند (جدول ۲).

سلول‌های گانگلیونی شبکیه مربوط به نمونه‌های روز چهاردهم که در مجاورت با لکتین MPA قرار گرفته بودند، واکنش ضعیفی (+) نشان دادند. ولی سلول‌های گانگلیونی شبکیه مربوط به مقاطع بافتی روز پانزدهم جنینی در معرض لکتین MPA شدیدترین واکنش را نشان دادند (+++). همچنین تعداد فراوانی از شاخه‌های ارتباطی عصبی سلول‌های لایه گانگلیونی با سایر لایه‌های شبکیه با MPA به‌شدت واکنش نشان دادند (شکل ۱، A). از سوی دیگر، واکنش سلول‌های گانگلیونی مربوط به مقاطع بافتی روز شانزدهم که در مجاورت لکتین MPA قرار داده شده بودند با شدت متوسط همراه بود (++). نکته حایز اهمیت این است که همچنان واکنش شدیدی به‌صورت پراکنده در بین فیبرهای عصبی در لابه‌لای سلول‌های شبکیه دیده شد (شکل ۲، A؛ جدول ۲).

در مقاطع بافتی مربوط به روز ۱۴ جنینی که در مجاورت با لکتین OFA قرار گرفته بودند واکنش در سطح لایه گانگلیونی، متوسط (++) بود. همچنین واکنش رشته‌های عصبی خارج از لایه گانگلیونی با شدت متوسط قابل مشاهده بود (شکل ۲، B). مقایسه مقاطع بافتی مربوط به روزهای ۱۴ و ۱۵ جنینی که در معرض لکتین OFA قرار گرفته بودند، حاکی از افزایش شدت واکنش (+++) در سلول‌های گانگلیونی و همین طور رشته‌های عصبی آنها در روز ۱۵ جنینی نسبت به لکتین مورد استفاده بود (شکل ۲، C). در سلول‌های لایه گانگلیونی شبکیه جنین‌های ۱۶روزه واکنش ضعیفی (+) به لکتین OFA مشاهده شد (جدول ۲).



شکل ۲) (a) فتومیکروگراف شبکیه چشم جنین ۱۶روزه رت که در معرض لکتین MPA قرار گرفته است. در این تصویر رشته‌های عصبی لایه گانگلیونی (GCF) که مجموعاً عصب اپتیک را می‌سازند، با شدت متوسط (++) به لکتین MPA پاسخ داده‌اند. آنچه که مشخص است بیانگر واکنش‌های پراکنده نسبتاً شدید در برخی از رشته‌های عصبی در میان سایر سلول‌های شبکیه (R) است که به‌صورت نقاط قهوه‌ای تیره آشکار شده است؛ **(b)** فتومیکروگراف مربوط به لایه شبکیه جنین‌های ۱۴روزه رت که در مجاورت لکتین OFA قرار گرفته است. سلول‌های گانگلیونی در روز چهاردهم جنینی به‌طور متوسط (++) به لکتین OFA واکنش نشان داده‌اند. از سوی دیگر، در بین رشته‌های عصبی کشیده‌شده از سلول‌های گانگلیونی به سمت خارج شبکیه (R) نیز واکنش‌های متفاوتی دیده می‌شود (نوک پیکان‌ها)؛ **(c)** فتومیکروگراف مربوط به لایه شبکیه جنین‌های ۱۵روزه رت که در مجاورت لکتین OFA قرار گرفته است. واکنش شدید (+++) سلول‌های گانگلیونی شبکیه نسبت به لکتین مذکور قابل مشاهده است. واکنش سلول‌های گانگلیونی به لکتین مذکور نسبت به روز ۱۴ افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان می‌دهد. واکنش شدید رشته‌های عصبی گسترده‌شده در بین سایر سلول‌های شبکیه (R) نیز به‌خوبی قابل مشاهده است.

بحث

تکامل چشم مهره‌داران به‌طور کلی وابسته به واکنش متقابل بین اکتودرم سطحی، نوروایپیتلیوم و سلول‌های مزانشیمی مزودرم جنینی است. بخش قابل ملاحظه‌ای از این واکنش‌های متقابل مربوط به گلیکوکانژوگیت‌ها و گلیکوپروتئین‌های اجزای ماتریکس خارج‌سلولی است که در اطراف سلول‌ها سازمان‌دهی شده‌اند [۱، ۱۳].

ردیابی میزان بروز ترکیبات دخیل در رخدادهای تکامل جنین همچون گلیکوکانژوگیت‌های سطح سلول به‌عنوان رسپتورهای مولکولی و به‌تبع آن، ارسال پیام‌های درون‌سلولی مربوط به فرآیندهای تکاملی از دوره رویانی تا بلوغ همواره مورد توجه محققان بوده است. تا آن جا که بارها بحث‌های فراوانی پیرامون نقش این ترکیبات به‌ویژه قندهای انتهایی آنها در پدیده‌های بیولوژیکی از شروع تمایز تا مرگ سلولی صورت گرفته است و در این بین، نقش کلیدی مطالعات لکتین هیستوشیمی در شناسایی پدیده‌های تکاملی مربوط به تعداد زیادی از ساختارهای سلولی غیرقابل انکار است [۱۶-۱۴]. در بین لایه‌های اصلی تشکیل‌دهنده چشم، شبکیه با دارابودن طیف متنوعی از سلول‌ها از جمله نورون‌ها و سلول‌های رابط، همواره به‌عنوان یکی از بهترین مدل‌های ساختاری برای مطالعه سیر تکاملی اجزای منشاگرفته از اکتودرم عصبی و همچنین مطالعه میان‌کنش‌های بین‌سلولی مورد توجه قرار گرفته است [۵، ۱۵].

در راستای ارتباط علمی مطالب فوق، نتایج نهایی مطالعه حاضر نیز موید بسیاری از تحقیقات پیشین مبنی بر تاثیر ترکیبات قندی بر رخدادها و تغییرات دوران تکامل جنینی سلول‌های گانگلیونی شبکیه چشم بود. سلول‌های گانگلیونی شبکیه در روز چهاردهم جنینی واکنشی هر چند ضعیف ولی مثبت به لکتین‌های DBA و GSA1-B4 نشان دادند. تفسیر مشاهدات ما حضور مولکول‌های آلفا- دی- ان- استیل‌گالاکتوزآمین و آلفا- دی- گالاکتوز و نقش آنها را در تمایز جنینی سلول‌های مورد نظر در روز چهاردهم به‌اثبات رساند. از سوی دیگر، در روزهای ۱۵ و ۱۶ جنینی هیچ‌گونه واکنشی به دو لکتین فوق مشاهده نشد.

به‌نظر می‌رسد که قندهای انتهایی اختصاصی آشکارشده توسط این لکتین‌ها یعنی آلفا- دی- ان- استیل‌گالاکتوزآمین و آلفا- دی- گالاکتوز علی‌رغم حضور در سطح بسیاری از سلول‌های شبکیه و اثبات نقش کلیدی آنها در شبکیه بالغ، دوران جنینی و بلافاصله پس از تولد در تحقیقات گذشته [۶، ۱۹-۱۷]، نمی‌توانسته‌اند نقش تعیین‌کننده‌ای در تشکیل و تمایز سلول‌های مورد نظر ما در روزهای مذکور داشته باشند.

در پژوهشی مشابه مطالعه حاضر که توسط چو و همکاران و با هدف مقایسه الگوی توزیع گلیکوکانژوگیت‌های سلول‌های مختلف شبکیه بالغ انجام شد، مشخص شده که لکتین RCA1 (اختصاصی برای قند انتهایی دی- گالاکتوز) با هر دو لایه مشبک داخلی و خارجی شبکیه واکنش می‌دهد. همچنین سلول‌های میکروگلیا به‌طور اختصاصی با لکتین GS1-B4 (اختصاصی برای دی- گالاکتوز) وارد واکنش می‌شوند. علاوه بر این، عروق بزرگ و مویرگ‌های شبکیه به‌شدت به دو لکتین فوق واکنش نشان می‌دهند [۶]. در مطالعه‌ای دیگر که توسط *لی* و همکاران روی تکامل سلول‌های شبکیه در دوران جنینی و پس از تولد انجام گرفت، نخستین واکنش مثبت سلول‌های اندوتلیال عروق گسترده‌شده در لایه فیبرهای عصبی شبکیه به لکتین GS1-B4، در روز سوم پس از تولد (P_3) مشاهده شده است. به‌علاوه در همین روز، GS1-B4 توانسته است سلول‌های میکروگلیا در لایه مشبک داخلی را آشکار کند [۱۸].

از آن جا که مشاهدات ما اثبات کرد سلول‌های گانگلیونی در مقاطعی از دوران تکامل چشم جنین اعم از روزهای ۱۴، ۱۵ و ۱۶ با شدت‌های مختلف به لکتین‌های MPA و OFA واکنش نشان دادند، بر این اساس می‌توان اذعان کرد که به‌احتمال فراوان مولکول‌های بتا- دی‌گالاکتوز و فوکوز نقش تعیین‌کننده‌ای در تکامل و تمایز این سلول‌ها ایفا می‌کنند.

علاوه بر این، یافته‌های این پژوهش شاید برای نخستین بار بیانگر این موضوع بود که شدت واکنش سلول‌های گانگلیونی در روز پانزدهم به لکتین MPA بسیار بیشتر از نمونه‌های مشابه در روزهای ۱۴ و ۱۶ بوده است. بنابراین به‌نظر می‌رسد که الگوی بیان مولکول بتا- دی‌گالاکتوز در روز پانزدهم تکامل جنین به‌میزان بسیار بیشتری نسبت به یک روز قبل و یک روز بعد از آن در سلول‌های گانگلیونی شبکیه انجام می‌گیرد. مشابه این مطلب در مورد لکتین OFA نیز صادق است، به‌طوری که نحوه بیان و توزیع قند انتهایی فوکوز طیف گسترده‌ای از تغییرات را در روزهای مورد مطالعه نشان می‌دهد، بدین ترتیب که روز چهاردهم واکنش متوسط، روز پانزدهم واکنش شدید و روز شانزدهم واکنش ضعیف را بروز دادند. به همین منظور به‌نظر می‌رسد تشکیل سلول‌های مذکور در دوران جنینی شامل زمان‌های بحرانی تکامل است و واکنش شدید آنها به این لکتین‌های اختصاصی گویای این مطلب است که احتمالاً روزهای مورد مطالعه در این پژوهش به‌خصوص روز پانزدهم و شانزدهم تکامل جنینی از جمله این دوره‌های بحرانی به‌شمار می‌روند که مربوط به گسترش فراوان قندهای سطح سلول و فعالیت شدید درون‌سلولی است. با این وجود، سخن‌گفتن با قطعیت در خصوص دوران‌های بحرانی تشکیل و تمایز این سلول‌ها نیازمند مطالعات مولکولی وسیع‌تر است.

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به عدم تعیین دقیق مراحل مختلف جنینی اشاره نمود. مطالعات لکتین هیستوشیمیایی می‌تواند اساس پژوهش‌های آینده در زمینه بیماری‌های مرتبط با شبکیه را پایه‌ریزی کند.

نتیجه‌گیری

الگوی متفاوت بیان قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت‌ها از نظر زمانی در تمایزات سلول‌های گانگلیونی شبکیه طی تکامل چشم فرآیندی کاملاً تنظیم‌شده است. علاوه بر این، گلیکوکانژوگیت‌های سطح سلول حاوی قندهای انتهایی فوکوز، آلفا- دی- گالاکتوز، بتا- دی- گالاکتوز و ان- استیل‌گالاکتوزآمین، نقشی اساسی در تکامل سلول‌های گانگلیونی شبکیه چشم ایفا می‌کنند.

تشکر و قدردانی: نویسندگان لازم می‌دانند از تلاش‌های مشفقانه سرکار خانم *فاطمه متجدد* به‌واسطه ارایه خدمات تکنیکی و آزمایشگاهی قدردانی نمایند.

تاییدیه اخلاقی: نگهداری از حیوانات آزمایشگاهی با دستورالعمل موسسات ملی بهداشت (NIH) برای استفاده انسانی از حیوانات آزمایشگاهی مطابق بود.

تعارض منافع: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع مالی: نتایج ارایه‌شده در این پژوهش مربوط به پایان‌نامه دانشجویی دوره کارشناسی ارشد است که به‌عنوان طرح پژوهشی با شماره ۹۱۱۲۱۶ تصویب شده است و با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام گرفته است.

منابع

1- Arab MR, Talaei Khouzani T, Fazel AR. Histochemistry and lectin histochemistry of the sclera and choroid in development of the eyes. J Mazandaran Univ Med Sci. 2002;12(34):1-8. [Persian]

2- 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. Nat Mater. 2007;6(12):997-1003.

3- Chung S, Sudo R, Vickerman V, Zervantonakis IK, Kamm RD. Microfluidic platforms for studies of angiogenesis, cell migration, and cell-cell interactions. Ann Biomed Eng. 2010;38(3):1164-77.

4- Zagris N. Extracellular matrix in development of the early embryo. Micron. 2000;32(4):427-38.

5- Blackshaw S, Harpavat S, Trimarchi J, Cai L, Huang H, Kuo WP, et al. Genomic analysis of mouse retinal development. PLOS Biol. 2004;2(9):247-68.

6- Cho EYP, Choi HL, Chan FL. Expression pattern of glycoconjugates in rat retina as analysed by lectin histochemistry. Histochem J. 2002;34(11-12):589-600.

7- Aly K, Salem-Bekhit MM. Histochemical mapping of glycoconjugates in the eyeball of the one humped Camel (Camelus dromedarius). J Pharm Biomed Sci. 2012;2(4):33-46.

8- Mubarak HJ, Mghamis MM. Comparative lectins histochemical study of vertebrates' retina. Kufa Med J. 2012;15(1):147-54.

9- Gulati AK, Zalewski AA, Sharma KB, Ogrowsky D, Sohal GS. A Comparison of lectin binding in rat and human peripheral nerve. J Histochem Cytochem. 1986;34(11):1487-93.

10- Sarthy PV, Curtis BM, Catterall WA. Retrograde labeling, enrichment, and characterization of retinal ganglion cells from the vertebrates. J Neurosci. 1983;3(12):2532-44.

11- Ebrahimzadeh Bideskan A, Nikmard F, Mohammadzadeh E, Razavi H, Fazel A. Lectinhistochemistry study of Glycoconjugate terminal sugars during Rat kidney development. Horizon Med Sci. 2012;18(1):26-38. [Persian]

12- Ebrahimzadeh Bideskan A, Hassanzadeh MM, Nikravesh MR, Fazel AR. Lectin histochemical study of vasculogenesis during rat pituitary morphogenesis. Iranian J Basic Med Sci. 2011;14(1):35-41.

13- Alles AJ, AR Fazel, SS Spicer, Dom RM. Distribution of glycoconjugates in the optic vesicle and optic cup. Anat Embryol. 1990;182(6):611-6.

14. White JM. ADAMs: Modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. Curr Opin Cell Biol. 2003;15(5):598-606.

15- Wu AM, Lisowska E, Duk M, Yang Z. Lectins as tools in glycoconjugate research. Glycoconjugate J. 2009;26(8):899-913.

16- Mertz AF, Che Y, Banerjee S, Goldstein JM, Rosowski KA, Revilla SF, et al. Cadherin-based intercellular adhesions organize epithelial cell-matrix traction forces. Proc Natl Acad Sci. 2013;110(3):842-7.

17- Bee JA. Glycoconjugates of the avian eye: The development and maturation of the neural retina as visualized by lectin binding. Differentiation. 1982;23(2):128-40.

18- Lee JH, Park HS, Shin JM, Chun MH, Oh SJ. Nestin expressing progenitor cells during establishment of the neural retina and its vasculature. Anat Cell Biol. 2012;45(1):38-46.

19- Soderstrom KO. Lectin binding to the human retina. Anat Rec. 1998;220(2):219-23.