



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

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

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

How to cite this article

Ebrahimi V, Vojoudi E, Fazel AR, Ebrahimzadeh Bideskan AR. Histochemical Lectin Study of Glycoconjugates Terminal Sugars during Retina Ganglionic Cell Differentiation in Rat Eye. Horizon of Medical Sciences. 2014;20(2):101-107.

* 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

Correspondence

Address: Anatomy & Cell Biology Department, Medicine Faculty, Vakila-bad Boulevard, Azadi Square, Mashhad, Iran. Postal Code: 91779-48564
Phone: +985118828572
Fax: +985118002484
ebrahimzadehba@mums.ac.ir

Article History

Received: December 16, 2013

Accepted: June 15, 2014

ePublished: July 1, 2014

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 histochemical 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; Retina; Ganglia; Lectins; Histochemistry; Rats

CITATION LINKS

[1] Histochemistry and lectin histochemistry of the sclera and choroid in development of the eyes [2] The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder [3] Microfluidic platforms for studies of angiogenesis, cell migration, and cell-cell interactions [4] Extracellular matrix in development of the early embryo [5] Genomic analysis of mouse retinal development [6] Expression pattern of glycoconjugates in rat retina as analysed by lectin histochemistry [7] Histochemical mapping of glycoconjugates in the eyeball of the one humped Camel (Camelus dromedarius) [8] Comparative lectins histochemical study of vertebrates' retina [9] A Comparison of lectin binding in rat and human peripheral nerve [10] Retrograde labeling, enrichment, and characterization of retinal ganglion cells from the vertebrates [11] Lectin histochemistry study of Glycoconjugate terminal sugars during Rat kidney development [12] Lectin histochemical study of vasculogenesis during rat pituitary morphogenesis [13] Distribution of glycoconjugates in the optic vesicle and optic cup [14] ADAMs: Modulators of cell-cell and cell-matrix interactions [15] Lectins as tools in glycoconjugate research [16] Cadherin-based intercellular adhesions organize epithelial cell-matrix traction forces [17] Glycoconjugates of the avian eye: The development and maturation of the neural retina as visualized by lectin binding [18] Nestin expressing progenitor cells during establishment of the neural retina and its vasculature [19] Lectin binding to the human retina

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 ۵ میکرومتری در معرض لکتین‌های DBA، GSA1-B4، OFA و MPA قرار گرفتند. رنگ زمینه نمونه‌ها آلسین‌بلو با pH برابر با ۲/۵ بود.

یافته‌ها: سلول‌های گانگلیونی نمونه‌های ۱۴ روزه 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 نقش 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 الگوی 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-ان-استیل‌گالاکتوزآمین، آلفا-دی-گالاکتوز (۱-۴)-ان-استیل‌گلوکزآمین و آلفا-یل-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-یل-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

بررسی لکتین هیستوشیمیایی قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت‌ها طی تمایزات سلول‌های گانگلیونی شبکیه چشم موش صحرایی ۱۰۳ داده شدند. این محلول دارای ۳۶ گرم کلرید سدیم، ۷/۴ گرم سدیم هیدروژن فسفات و ۴/۱۵ گرم پتاسیم دی‌هیدروژن در یک لیتر آب مقطر است. محلول مورد نظر استوک بوده که در هنگام کار، به نسبت 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-ان-استیل گالاکتوز آمین
لکتین GSA1-B4	
نام کامل	Griffonia simplicifolia agglutinin
اختصاصی برای	آلفا-دی-گالاکتوز
لکتین MPA	
نام کامل	Maclura Pomifera
اختصاصی برای	بتا-دی-ان-استیل گالاکتوز آمین
لکتین OFA	
نام کامل	Aleuria aurantia (Orange fungus)
اختصاصی برای	آلفا-ال-فوکتوز (۱-۶)-ان-استیل گلوکز آمین

برای رنگ‌آمیزی، ابتدا هر یک از لکتین‌های مورد نظر با غلظت ۱۰ میکروگرم ماده موثر (لکتین کونژوگ با HRP) در یک میلی‌لیتر PBS رقیق شدند. پس از خارج کردن 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 به مدت ۲ ساعت در درجه حرارت اتاق قرار گرفتند. بعد از این مدت، مقاطع در PBS به مدت ۳ دقیقه شست‌وشو داده شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۰/۳٪ DAB (دی‌آمینوبنزدین) (۰/۳٪ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر PBS) و آب اکسیژنه (۲۰۰ میکرولیتر در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول DAB) مجاور شده سپس با آب جاری شست‌وشو داده شدند [۱۱، ۱۲]. برای رنگ زمینه نیز از آلسین‌لو با برابر با ۲/۵ استفاده شد. در مرحله بعد، مقاطع مورد نظر طبق روش‌های معمول در بافت‌شناسی آبیگری، با گزینول 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 آب اکسیژنه (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 آب اکسیژنه به‌علت وجود HRP رنگ قهوه‌ای ظاهر می‌شود، لام‌های آماده‌شده با میکروسکوپ نوری معمولی مورد بررسی قرار گرفتند و شدت رنگ‌آمیزی بر اساس طیف لیگرت مورد ارزیابی قرار گرفت. روش درجه‌بندی و نمره‌گذاری شدت واکنش‌های مختلف به لکتین‌های مورد استفاده به این صورت بود که برای عدم واکنش یا

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 مورفوژن 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 ۱۲ ساعته، رطوبت مناسب و دمای ۲۴-۱۸ درجه 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 ۵ میکرون توسط میکروتوم روتاری 1512 (Leit؛ آلمان) در دو جهت سائیتال و کروئال از هر نمونه تهیه شد.

در ادامه کار، مقاطع تهیه‌شده برای رنگ‌آمیزی به‌روش لکتین هیستوشیمی با استفاده از لکتین‌های مورد نظر (سیگما، آلدريج؛ ایالات متحده) آماده شدند (جدول ۱). ابتدا مقاطع بافتی به‌روش معمول بافت‌شناسی آبدهی شدند. سپس نمونه‌های بافتی به‌مدت نیم‌ساعت در محلول بافر فسفات‌سالین (PBS) تازه‌تهیه‌شده قرار

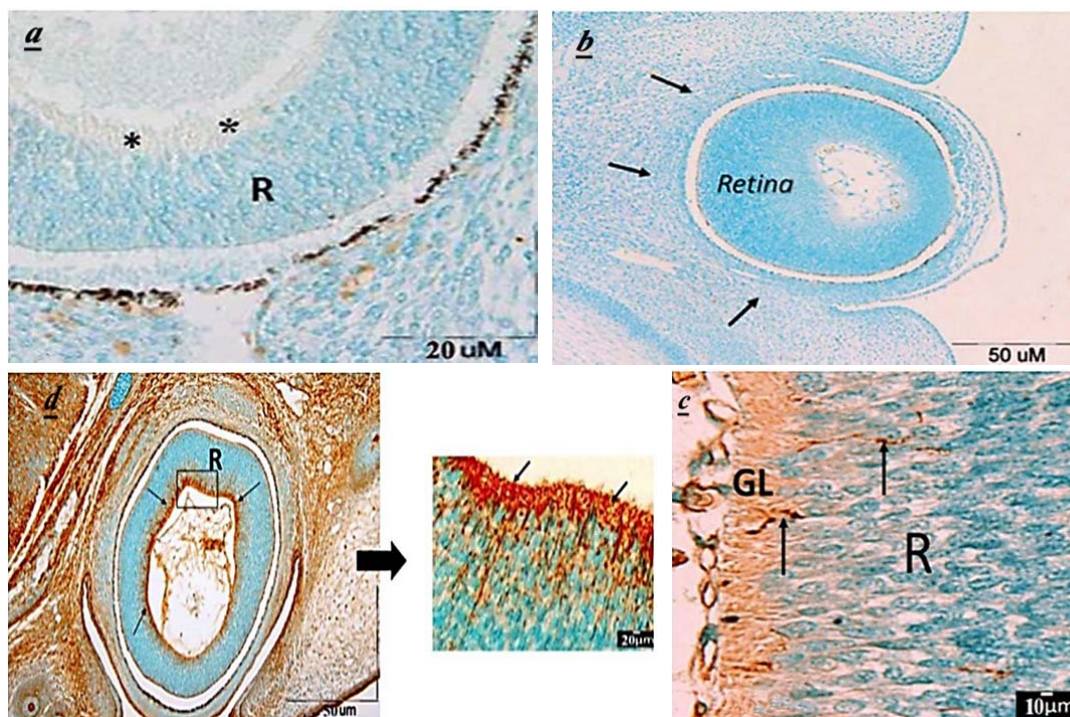
جدول ۲) شدت واکنش سلول‌های گانگلیونی شبکیه چشم به لکتین‌های مختلف در روزهای ۱۴، ۱۵ و ۱۶ جنینی

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	++

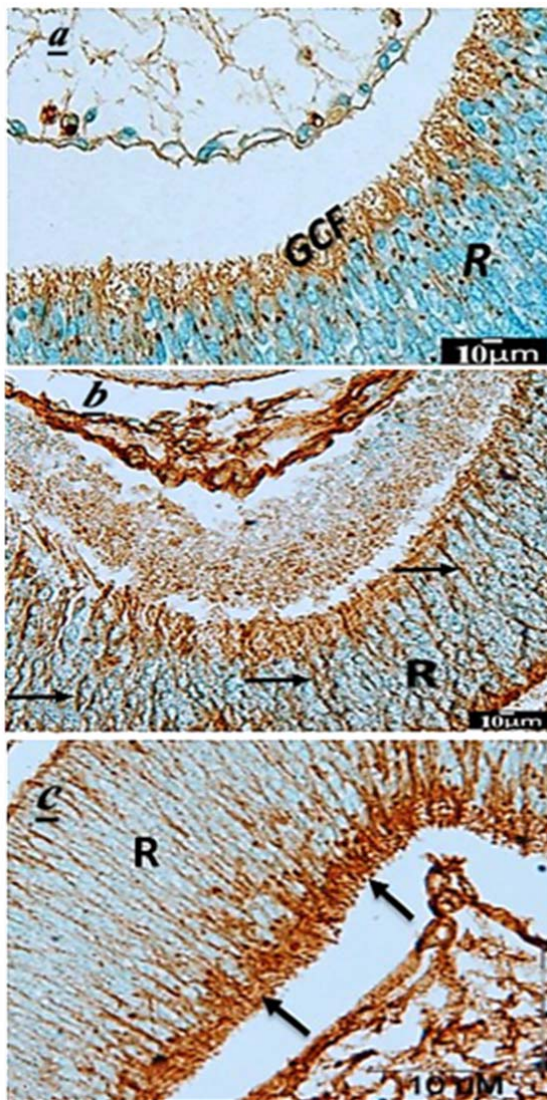
واکنش منفی رتبه صفر (-)، برای واکنش خفیف یا ضعیف رتبه یک (+)، برای واکنش متوسط رتبه ۲ (++) و برای واکنش قوی رتبه ۳ (+++) در نظر گرفته شد [۱۲]. در این روش، شدت رنگ‌آمیزی بر اساس مشاهده ۳ نفر به صورت بلایند (Blind) تعیین شد و نمونه‌ها بر اساس شدت واکنش با هر لکتین در روزهای مختلف جنینی (روزهای ۱۴ تا ۱۶) 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).



شکل ۱) (a) فوتومیکروگراف شبکیه چشم جنین ۱۴ روزه 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)** فوتومیکروگراف مربوط به کره چشم جنین ۱۵ روزه رت که در معرض لکتین DBA قرار گرفته است. همان‌طور که مشاهده می‌شود هیچ‌کدام از لایه‌ها و سلول‌های شبکیه (Retina) به این لکتین واکنش نشان ندادند. فلش‌های موجود در تصویر، سلول‌های مزانشیمی تمایزنیافته اطراف کره چشم را نشان می‌دهند؛ **(c)** فوتومیکروگراف شبکیه چشم جنین ۱۴ روزه 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 لایه‌لای سایر سلول‌های شبکیه (R) واکنش‌های پراکنده و البته شدیدتری نسبت به سطح سلول‌های گانگلیونی به این لکتین نشان داده‌اند **(پیکان‌ها)؛ (d)** فوتومیکروگراف چشم جنین ۱۵ روزه 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 ۵۰ میکرومتر. تصویر سمت راست، همان نمونه با بزرگنمایی ۴ برابر 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.



شکل ۲ (a) فتومیکروگراف شبکه چشم جنین ۱۶ روزه 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 شبکه (R) است که به صورت نقاط قهوه‌ای تیره آشکار شده است؛ **(b)** فتومیکروگراف مربوط به لایه شبکه جنین‌های ۱۴ روزه 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 شبکه (R) نیز واکنش‌های متفاوتی دیده می‌شود (نوک پیکان‌ها)؛ **(c)** فتومیکروگراف مربوط به لایه شبکه جنین‌های ۱۵ روزه رت که در مجاورت لکتین OFA قرار گرفته است. واکنش شدید (+++) سلول‌های گانگلیونی شبکه 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 شبکه (R) نیز به‌خوبی قابل مشاهده است.

در مقاطع بافتی رنگ‌آمیزی‌شده مربوط به روز چهاردهم جنینی که در مجاورت با لکتین DBA قرار گرفته بودند، واکنش خفیفی (+) در سلول‌های گانگلیونی شبکه مشاهده شد. این در حالی است که واکنش قابل توجهی در رشته‌های عصبی پراکنده در سراسر شبکه ملاحظه نشد (شکل ۱، A). در برش‌های بافتی به‌دست‌آمده از نمونه‌های جنین‌های ۱۵ روزه رنگ‌آمیزی‌شده با لکتین DBA، هیچ‌کدام از لایه‌های تشکیل‌دهنده کره چشم از جمله شبکه، 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 شبکه 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 به سمت سایر سلول‌های شبکه 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 ۱۶ روزه، واکنشی به لکتین GSA1-B4 بروز ندادند (جدول ۲).

سلول‌های گانگلیونی شبکه مربوط به نمونه‌های روز چهاردهم که در مجاورت با لکتین MPA قرار گرفته بودند، واکنش ضعیفی (+) نشان دادند. ولی سلول‌های گانگلیونی شبکه 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 شبکه 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 لایه‌های سلول‌های شبکه 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 همین‌طور رشته‌های عصبی آنها در روز ۱۵ جنینی نسبت به لکتین مورد استفاده بود (شکل ۲، C). در سلول‌های لایه گانگلیونی شبکه جنین‌های ۱۶ روزه واکنش ضعیفی (+) به لکتین OFA مشاهده شد (جدول ۲).

بحث

تکامل چشم مهره‌داران به‌طور کلی وابسته به واکنش متقابل بین اکتودرم سطحی، نوروپیتلیوم 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 [۱۳].

ردیابی میزان بروز ترکیبات دخیل در رخدادهای تکامل جنین همچون گلیکوکانژوگیت‌های سطح سلول به‌عنوان رستپورهای 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، شبکه 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 رخدادهای تغییرات دوران تکامل جنینی سلول‌های گانگلیونی شبکه چشم بود. سلول‌های گانگلیونی شبکه 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 شبکه و اثبات نقش کلیدی آنها در شبکه بالغ، دوران جنینی و بلافاصله پس از تولد در تحقیقات گذشته [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 شبکه بالغ انجام شد، مشخص شده که لکتین RCA1 (اختصاصی

برای قند انتهایی دی-گالاکتوز) با هر دو لایه مشبک داخلی و خارجی شبکه واکنش می‌دهد. همچنین سلول‌های میکروگلیا به‌طور اختصاصی با لکتین GSI-B4 (اختصاصی برای دی-گالاکتوز) وارد واکنش می‌شوند. علاوه بر این، عروق بزرگ و مویرگ‌های شبکه به‌شدت به دو لکتین فوق واکنش نشان می‌دهند [۶]. در مطالعه‌ای دیگر که توسط لی و همکاران روی تکامل سلول‌های شبکه در دوران جنینی و پس از تولد انجام گرفت، نخستین واکنش مثبت سلول‌های اندوتلیال عروق گسترده‌شده در لایه فیبرهای عصبی شبکه به لکتین GSI-B4، در روز سوم پس از تولد (P۳) مشاهده شده است. به‌علاوه در همین روز، GSI-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-دی-گالاکتوز 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-دی-گالاکتوز در روز پانزدهم تکامل جنین به‌میزان بسیار بیشتری نسبت به یک روز قبل و یک روز بعد از آن در سلول‌های گانگلیونی شبکه 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، سخن گفتن 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 شبکه 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 به واسطه ارائه خدمات تکنیکی و آزمایشگاهی قدردانی نمایند.

تأییدیه 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 ارائه‌شده 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. Lectin histochemistry study of Glycoconjugate terminal sugars during Rat kidney development. Horizon Med Sci. 2012;18(1):26-38. [Persian]
- 12- Ebrahimzadeh Bideskan A, Hassanzadeh MM, Nikraves 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.