دانشگاه آزاد اسلامی

واحد علوم و تحقیقات

رساله دکتری ـ رشته زیست‌شناسی جانوری ـ تکوینی (ph.D)

موضوع:

مطالعات هیستو شیمیا ئی روند هیستوژنز با فت غضروفی در رت

استادان راهنما:

دکتر علیرضا فاضل ـ دکتر ناصر مهدوی شهری

استاد مشاور:

دکتر کاظم پریور

کتابخانه واحد علوم و تحقیقات
بخش پایان نامه

نگارش

جینا خیاط‌زاده

کتابخانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات
شماره ثبت: ۷۵۷۸
تاریخ ورود: ۸۲/۸/۱۳

سال تحصیلی

۱۳۷۹-۸۰

فهرست

عنوان صفحه

خلاصه ۱

فصل اول ـ مقدمه ۳

بخش اول : بافت غضروفی ۴

۱ـ هیستولوژی بافت غضروفی ۴

۲ - انواع بافت غضروفی ۴

۳ـ ترمیم غضروف *(Regeneration)* ۸

۴ـ تحلیل غضروف *(Degeneration)* ۸

۵ـ هیستوفیزیولوژی غضروف ۸

۶ـ هیستوژنز بافت غضروف ۹

بخش دوم : ترکیبات قندی یا گلیکوکانژوگه‌ها ***(Glycoconjugates)*** ۱۰

بخش سوم : لکتین‌ها ۲۷

بخش چهارم : مروری بر مطالعات رشد و نمو سلولی ملکولی بافت غضروفی ۳۰

فصل دوم ـ مواد و روش تحقیق ۳۷

بخش اول : نمونه برداری و تهیه بافت‌های جنینی ۳۸

بخش دوم : مطالعات هیستو شیمیایی ۳۸

بخش سوم : روش ***Lectin Histochemistry*** هیستوشیمی لکتین ۴۱

بخش چهارم : روش رنگ‌آمیزی آلسیان بلو ـ آلیزارین رد *S* ۴۴

بخش پنجم : تجزیه و تحلیل آماری ۴۵

فصل سوم ـ نتایج ۴۶
بخش اول : گزارش ماکروسکوپی رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز اس ـ آلسین بلو ۴۷
بخش دوم : گزارش بافت‌شناسی روند تکوین بافت غضروفی ۵۱
بخش سوم : گزارش روشهای هیستوشیمیائی ۵۳
بخش چهارم : گزارش بررسیهای لکتین هیستوشیمیایی ۷۹

فصل چهارم ـ بحث ۹۸
بخش اول : مطالعات هیستوشیمیایی ۱۰۰
بخش دوم : مطالعات هیستوشیمیایی لکتین ۱۱۲

پیشنهادات ۱۲۲
منابع ۱۲۴

خلاصه

تشکیل بافت غضروفی نیازمند پدیده‌های پیچیده و منظم بیولوژیکی است که طی آن میان کنش‌های سلول - سلول و سلول با ماتریکس خارج سلولی (ECM) موجب مهاجرت، تکثیر و تمایز سلولهای پیش ساز مزانشیم و تشکیل بافت غضروفی می‌شود. تمام سلولهای حیوانی طی رشد و نمو خود انواعی از مواد خارج سلولی راترشح می‌کنند که رفتارهای سلولی را در برابر پیامهای خارجی کنترل و سرنوشت آینده آنها را تعیین می کنند. ترکیبات قندی (Glycoconjugate) از جمله این ترکیبات هستند که همه سلولهای در حال تمایز انواع متناوتی از آنها را نشان می‌دهند. از این نظر نقش گلیکوکانژوگه‌ها در امبریوژنز مهم است . اهمیت این ترکیبات در ECM از طریق تاثیر بر مهاجرت سلولی، اتصال سلولها بهم یا به ECM، تعیین قطبیت در سلول و... است. قند انتهایی (Terminal suger) در زنجیره هیدارت کربن گلیکوکانژوگه‌ها بعنوان لیگاند برای ملکولهای تنظیم کننده، در فرآیند رشد و نمو اثر دارد.

در تحقیق حاضر با هدف تعیین برخی پدیده‌های ملکولی دخالت‌کننده در روند رشد و نمو طبیعی بافت غضروفی، شناسایی بعضی از انواع گلیکوکانژوگه‌های مهم در فرآیند تکوین این بافت بوسیله تکنیک‌های هیستوشیمی و نیز تشخیص قندهای انتهایی آنهابا استفاده از روش‌های هیستوشیمیائی لکتین مورد مطالعه قرار گرفت. به این منظور از جنینهای رت نژاد Wistar از روز E_{12} تا E_{21} نمونه‌برداری انجام و پس از تثبیت و پاساژ بافتی، مقاطع ۵ تا ۷ میکرون تهیه و رنگ‌آمیزی آلسین بلو pH=2/5 و pH =1، رنگ‌آمیزی پاس و آبی تولوئیدین برای ردیابی انواع ترکیبات قندی اسیدی و خنثی، GAG اسیدی سولفاته یا کربوکسیله و ترکیبات متاکروماتیک انجام شد. سپس در انتها درجه بندی شدت تراکم رنگ تعیین شد . تجزیه و تحلیل آماری از طریق آزمون کروسکال والیس و دیگر تستهای آماری مشخص نمود که زمان سنتز این مواد و میزان آنها در بین روزهای مورد مطالعه دارای اختلاف آماری معنی‌دار است. بصورتی‌که ترکیبات قندی اسیدی (سولفاته و کربوکسیله) در

کتابخانه واحد علوم و تحقیقات

روزهای آخر مطالعه به حداکثر مقدار خود رسیدند و ترکیبات قندی خنثی درین مرحله در حداقل مقدار بودند. این امر احتمالاً به نقش ترکیبات فوق در وقایع حساس رشد و نمو بافت غضروفی مربوط می‌شود. همچنین در مطالعات هیستوشیمیائی بااستفاده از لکتین‌های متعدد (WFA, VVA , MPA , OFA)، پایانه‌های قندی در دوران رشد و نمو بافت غضروفی الگوی انتشار زمانی - مکانی خاصی را نشان دادند. از این نظر، پایانه قندی α - Gal Nac یکی از مهمترین پایانه‌های ترکیبات قندی در مراحل کلیدی تکوین بافت غضروفی معرفی شد.

فصل اول

مقدمه

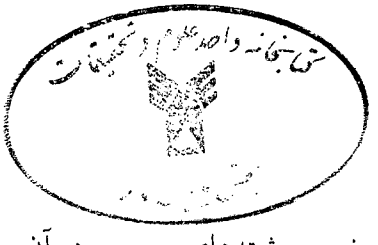
Introduction

بخش اول: بافت غضروفی

۱ـ هیستولوژی بافت غضروفی

غضروف یک نوع بافت تخصص یافته از بافت همبند است که شامل سلولهای کندروسیت و ماتریکس خارج سلولی (ECM) ژل مانند می‌باشد و ماتریکس حاوی رشته‌های خارج سلولی و ماده بنیادی است که توسط کندروبلاست ساخته و ترشح می‌شوند. در ماده بنیادی ماکروملکولهای مهمی از جمله گلیکوز آمینوگلیکانها (مانند اسید هیالورنیک)، پروتئوگلیکانها و گلیکوپروتئین‌ها وجود دارند. این ماکرومولکولها با رشته‌های ماتریکس دارای عمل متقابل هستند. کندروسیت‌ها پس از ترشح ECM، خود در حفرات کوچکی در ماتریکس بنام لاکونا منزوی می‌شوند(بلوم‌وفاوست، ۱۳۷۵).

پری کندریوم: یک پوشش شبه کپسولی از بافت همبند متراکم است که حاوی رشته‌های کلاژن نوع ۱ و فیبروبلاست‌های زیاد می‌باشد. پری‌کندریوم دارای عروق خونی است و نقش آن در رشد و حفظ بافت غضروفی ضروری است. به استثنای غضروف آرتیکولار یا مفصلی (که سطح استخوانهای قابل تحرک مفاصل را پوشانده و در معرض مایع سینوویال مفاصل قرار دارد)، در همه موارد اطراف غضروف را این پوشش احاطه کرده است. همه انواع غضروفی فاقد عروق خونی (آواسکولار) هستند و مواد غذایی از عروق خونی بافت همبند مجاور (پری کندریوم) یا بوسیله مایع سینوویال در حفرات مفصلی انتقال می‌یابند. لذا مانند همه بافتهای آواسکولار، کندروسیت‌ها متابولیسم کمی دارند. غضروف فاقد عروق لنفی و اعصاب است (Langman,1990).



۲ - انواع بافت غضروفی

بر اساس مقدار ماتریکس بی شکل (آمورف) و وفور نسبی رشته‌های محصور در آن سه نوع بافت غضروفی از هم متمایز می‌شوند:غضروف شفاف، الاستیک و رشته ائی (فیبرو). غضروف شفاف فراوانترین نوع است و انواع دیگر بمنزله متغیرهائی از آن بکار می‌روند (Junqueira,etal,1992).

غضروف شفاف یا هیالین: مهمترین مدل مطالعه هر سه نوع مدل غضروفی است. غضروف شفاف تازه، رنگ

خاکستری متمایل به آبی شفاف دارد. در پستانداران بالغ این بافت در انتهای شکمی دنده‌ها، در حلقه‌های غضروفی حنجره، نای و نایژه و بر روی سطوح مفصلی استخوانها در مفاصل متحرک یافت می‌شود.در جنین، اسکلت تا زمان جایگزینی بوسیله استخوان،موقتاً بوسیله غضروف شفاف ایجاد می‌شود.

کندروسیت‌ها: در حواشی غضروف شفاف، بلافاصله در زیر پری‌کندریوم یا در زیر سطح آزاد غضروف مفصلی، کندروسیت‌های جوان در مقطع بیضی شکل با محور طویل موازی با سطح قرار دارند، در حالیکه در عمق بیشتر، نیمه دایره‌ای یا گوشه دارند. در غضروف زنده اغلب، شکل کندروسیت‌ها با شکل کامل محفظه لاکونا مطابقت دارد اما در طی مراحل هیستولوژیک از دیواره محفظه جدا شده ، شکل نامنظم پیدا می‌کنند و ستاره‌ای شکل می‌شوند. این امر تنها در تصاویر میکروسکوپ الکترونی مشخص است. گاهی گروههای کوچکی از چند سلول گردهم می‌آیند که ایزوژن هستند و از تقسیمات میتوزی یک کندروسیت منفرد در جریان رشد میان بافتی غضروف تولید شده‌اند. در غضروف صفحه اپی‌فیز استخوان‌های طویل این تقسیمات یک آرایش سلولی بصورت ستونهای طویل ایجاد می‌کنند. هسته کندروسیت‌ها گرد یا بیضوی و حاوی یک یا چند هستک است. در مجاور هسته یک جفت سانتریول و یک دستگاه گلژی توسعه یافته وجود دارد. قطرات چربی و گلیکوژن در سیتوپلاسم به همراه میتوکندریها پراکنده‌اند. سیتوپلاسم در سلولهای جوان در حال ترشح ماتریکس یا در حال ترمیم، بیشتر بازوفیلی است. شبکه اندوپلاسمی دانه‌دار گسترده و حفرات گلژی بزرگ هستند. این سلولها ترشح کننده پروتئین بوده و سنتز کلاژن نوع دو، گلیکوکانژوگه‌ها و دیگر ترکیبات ماتریکس راانجام می‌دهند (Langman,1990) .

ماتریکس = ماده زمینه‌ای خارج سلولی: ***(ECM= Extra Cellular Matrix)***

در موجودات پرسلولی ، ECM سلول را از خارج احاطه کرده و با آن واکنش متقابل دارد. این محیط خارج سلولی متشکل از مولکولهایی است که بوسیله سلول به فضای بین سلولی ترشح و بصورت شبکه در می‌آیند و گاهی تشکیل یک لایه متراکم را برروی سطح قاعده‌ایی سلولهای پوششی می‌دهند که غشاء پایه Basal lamina نامیده می‌شود. این مولکولها قادرند در نواحی ویژه اتصالی، به یکدیگر متصل شوند (Scott,1997) .

از جمله مهمترین انواع این ملکولها کلاژن و گلیکوکانژوگه‌ها هستند. ماتریکس غضروفی یا ECM در غضروف شفاف تازه، یک زمینه یکنواخت را تشکیل می‌دهد، زیرا ماده بنیادی و کلاژن محصور در آن ضریب شکست

مساوی دارند. تا چهل درصد وزن خشک ماتریکس از کلاژن ساخته شده که بصورت رشته های ظریف به قطر ۱۰۰ تا ۲۰۰ آنگستروم و تناوب (پریودیسیته) عرضی ۶۵۰ آنگسترومی هستند (Hay,1981). غضروف شفاف ابتدا حاوی کلاژن نوع دو می‌باشد. کلاژن فوق یک نوع نشانگر مراحل اولیه رشد و نمو بافت غضروفی است (Johnson,etal,1999). ۹۰ درصد ECM از کلاژن و پروتئوگلیکان‌ها است که در سازمان‌یابی ماتریکس دخالت دارند. بخش پلی ساکاریدی در پروتئوگلیکانها، کندروئتین -۶- سولفات (نوع C) و کندروئتین -۴- سولفات (نوع A) و کراتان سولفات است که بطور کوالان به مراکز پروتئینی وصل‌اند. گروه‌های سولفات خاصیت بازوفیلی به ماتریکس می‌دهند. اتصال آب به زنجیرهای با بار منفی گلیکوز آمینوگلیکانها (GAG_s) از جمله عوامل ایجاد حالت ژل مانند ماتریکس است و بخصوص در غضروف مفصلی (آرتیکولار) در قدرت جذب و عمل بیوشیمیائی آن بسیار مهم است. برخی پروتئوگلیکانها با ملکولهای طویل اسیدهیالورنیک همراهند که خود با رشته‌های کلاژن ارتباط دارند. اتصالات الکترواستاتیک کلاژن و GAGs در ایجاد حالت ژل مانند نیز مهم است (Neame,Tapp -1999).

از دیگر اجزاء مهم ماتریکس، گلیکوپروتئین نوع کندرونکتین است که باعث چسبندگی کندروسیت‌ها به کلاژن می‌شود. فیبرونکتین نیز از انوع دیگر این ملکولها است که در ارتباط متقابل سلولها (Cell Interaction) دخالت دارد (Bennett,etal- 1991).

ترشح اجزاء ماتریکس: با ظهور اتورادیوگرافی نشان داده شد که تزریق S^{35} را می‌توان در فواصل زمانی در کندروسیت‌ها و سپس در ماتریکس ردیابی کرد. پس از تزریق پرولین رادیواکتیو به جانوری که در حال ساخت غضروف است، می‌توان این ملکول پیش ساز کلاژن را ابتدا در شبکه اندوپلاسمی (ER) کندروسیت‌ها مشاهده کرد. پس از مدتی در ناحیه گلژی و سپس در واکوئلهای اطراف سلول ظاهر می‌شوند و بتدریج تمامی نشانه‌ها از سلول پاک و در فضای ماتریکس حضور می‌یابند. محل سنتز اجزاء پیچیده کربوهیدراتی ماتریکس، کمپلکس گلژی است. احتمالاً قندها و گروههای سولفات مستقیماً به ناحیه گلژی می‌روند و در اثنای سنتز پلی‌ساکاریدهای سولفاته، با هم ترکیب می‌شوند. اسیدهای آمینه نیز بطرف ER دانه‌دار رفته ، بصورت پروتئین درمی‌آیند و سپس در دستگاه گلژی با پلی‌ساکاریدها ترکیب و در آخر کندروموکوپروتئین‌ها از سلول

خارج می‌شوند. مهار سنتز پروتئوگلیکانها منجر به توقف تشکیل ماتریکس غضروف بوسیله سلولهای پیش‌ساز آنها می‌شود (Molteni,etal-1999).

غضروف الاستیک: در پستانداران در لاله گوش، دیواره‌های مجرای گوش خارجی و لوله‌های استاش، اپی‌گلوت، در قسمتهائی از غضروف شاخی (Corniculate) و سر استخوان میخی (Corniform) مچ پا یافت می‌شود. تفاوت ماکروسکوپی آن با غضروف شفاف در رنگ متمایل به زرد، کدروت بیشتر و قابلیت انعطاف و ارتجاع آن است که بدلیل حضور رشته‌های منشعب ایجاد شده است. این رشته ها شبکه‌ای را تشکیل می‌دهند که بسیار متراکم است و ماده بنیادی در آن نامرئی می‌شود. رشته‌های الاستیکی غضروف به درون پری‌کندر ادامه پیدا می‌کنند (Junqueira,etal-1992).

غضروف رشته‌ای (Fibrous): در نواحی که تحمل وزن زیاد را دارند، در دیسک بین مهره‌ها، در غضروف انتهای استخوان شرمگاهی (symphysis pubis)، در غضروفهای مفصلی، در لیگامان گرد استخوان ران و در محل اتصال بعضی از تاندون‌ها به استخوان موجودند. این بافت همواره به همراه بافت همبند متراکم یافت می‌شود و فاقد مرز مشخصی با آن است. کندروسیت‌ها معمولاً در ردیف‌های بلند در بین دسته‌هایی از رشته‌های کلاژن قرار دارند. ماتریکس حاوی مقدار زیاد کلاژن نوع یک است که با L.M نیز مشاهده می‌شود. رشته‌های کلاژن بصورت دستجات نامنظم بین سلولها یا ردیف‌های منظم در طول ستونهای کندروسیتی قرار دارند. این جهت‌یابی به نیروهای وارد بر بافت بستگی دارد. زیرا کلاژن در جهت موازی با فشار قرار می‌گیرد. پری کندر قابل تشخیص وجود ندارد، زیرا رشته‌های کلاژن بافت در پری‌کندریوم فرو می‌روند. غضروف رشته‌ائی وابستگی نزدیکی با بافت همبند کپسول‌ها و لیگامانهای مفصلی دارد. این غضروف یک فرم انتقالی بین غضروف و بافت همبند متراکم است (Scott,1997).

بافت شبه غضروف : طی رشد و نمو جنین، هنگام تشکیل غضروف شفاف، یک مرحله موقتی وجود دارد که گاهی این وضعیت تا آخر عمر در بعضی بخشهای بدن باقی می‌ماند و بنام غضروف کاذب یا شبه غضروف است (بلوم و فاوست ، ۱۳۷۵).

۳ـ ترمیم غضروف (Regeneration)

در پستانداران به جز در افراد جوان، در بالغین صدمه به غضروف به سختی ترمیم می‌شود. در ناحیه مجروح یا شکستگی ، ترمیم بدلیل فعالیت پری‌کندریوم صورت می‌گیرد. کندروسیت‌های پری‌کندر به ناحیه صدمه دیده هجوم آورده و غضروف تازه می‌سازند. در صورت حذف بخشی از غضروف، پری‌کندر به جای تشکیل غضروف جدید، یک بافت همبند جدید به محل فرستاده و تشکیل یک scar از بافت همبند متراکم می‌دهد. هر چند اگر سلولهای غضروفی آسیب یابند، استعداد ترمیم ناچیز است، اما اگر سلولها سالم باشند، اجزاء ماتریکس بسرعت دوباره‌سازی می‌شوند (Molteni,etal-1999) .

۴ـ تحلیل غضروف (Degeneration)

برخلاف دیگر بافت‌ها، غضروف هیالین با ازدیاد سن، فرآیند تحلیل رفتن را طی می‌کند. این پدیده همراه با کلسیفیه شدن ماتریکس است که بوسیله ازدیاد اندازه و حجم سلولها و سپس مرگ آنها دنبال می‌شود. کلسیفیه شدن فرایندی است که بطور نرمال در غضروف برای ایجاد مدل استخوانی از طریق استخوان سازی درون غضروفی (Endochondral) صورت می‌گیرد. تحلیل همچنین می‌تواند در اثر تجمعات غیرطبیعی و ضخیم رشته‌های کلاژن در این بافت مشاهده شود (Kergosien,Sautier,1998-Junqueira,etal-1992) .

۵ـ هیستوفیزیولوژی غضروف

عمل اصلی غضروف پشتیبانی بافتهای نرم است. با توجه به سطح صاف غضروف یک ناحیه لغزنده برای مفاصل و تسهیل حرکت استخوان‌ها فراهم می‌شود. غضروف مفاصل دارای قدرت تحمل وزن زیادی است. در نقاط دیگر از قبیل گوش و مجرای تنفسی، بمنزله یک داربست قابل انعطاف و در عین حال مقاوم است. از طرفی غضروف در بسیاری از استخوانهای دراز قبل و بعد از تولد بعنوان یک الگوی اولیه غضروفی است و در رشد و نمو آنها دخالت دارد. غضروف صفحه متافیزی استخوانهای دراز، رشد طولی آنها را امکان‌پذیر می‌سازد و در تعیین اندازه و شکل آن موثر است (Langman,1990) .

۶ـ هیستوژنز بافت غضروف

اسکلت بدن از سلولهای مزانشیمی با دو منشاء جنینی مختلف حاصل می‌شود: ۱ـ منشاء مزودرمی از لایه مزودرم جنینی ۲ـ منشاء نورال کرست از جداره لوله عصبی. در غضروف با منشاء مزودرمی، از طبقه مزودرم جنب محوری، توده‌های متراکمی در دو طرف خط وسط بطور قرینه تشکیل می‌شوند که سومیت نام دارند. سلولهای قسمت شکمی میانی سومیت‌ها بنام ناحیه اسکلرتوم هستند و بتدریج به خط وسط مهاجرت کرده، تشکیل بافت سستی بنام مزانشیم یا بافت همبند جوان را می‌دهند که بنوبه خود به بافت همبند بالغ، غضروف و استخوان تبدیل می‌شود. سلولهای مزانشیمی با توان مهاجرت به مناطق مختلف به فیبروبلاست، کندروبلاست و یا استئوبلاست متمایز خواهند شد.

علاوه بر مزودرم ، سلولهای ستیغ عصبی ناحیه سر (Cranial Neural Crest) به مزانشیم تمایز یافته و استخوانهای صورت (ویسرالوکرانیوم) را می‌سازند . این استخوانها از غضروف‌های کمان حلقی اول و دوم تشکیل می‌شوند(Bronner ,1994 - Johnston,1996 - Malinets,1997). در جائیکه غضروف باید ساخته شود سلولهای مزانشیمی تکثیر (proliferation) یافته، مدور شده و پس از تراکم و تجمع‌یابی (Condensation)، یک بافت پرسلول پیش غضروفی (precartilage) را بوجود می‌آورند. به سلولهای گرد که مستقیماً از تمایز سلولهای مزانشیم حاصل می‌شوند، کندروبلاست می‌گویند که سیتوپلاسم بازوفیلی غنی از ریبوزوم دارند. سپس سنتز و موقعیت یابی ماتریکس شروع شده و با پیشرفت رشد و نمو مواد بین سلولی، سلولها از هم فاصله می‌گیرند. ماده زمینه بازوفیلی و حاوی الیاف کلاژن است. اطراف غضروف‌ها را یک بافت مزانشیم نسبتاً متراکم بنام پری کندر احاطه می‌کند. در واقع سلولهای مزانشیمی سطحی به کندروبلاست‌ها و فیبروبلاست‌های پری‌کندریوم تکوین می‌یابند(Atkinson,1997).

رشد غضروف: به دو طریق مختلف انجام می‌شود: ۱) رشد میان بافتی یا از داخل غضروف (Interstitial growth) که حاصل تقسیم میتوز در کندروبلاست های از پیش موجود است. تقسیم فوق و ترشح ماتریکس جدید در بین سلولهای دختر، منجر به انبساط غضروف از داخل می‌شود. ۲) رشد هم گام (Appositional growth) حاصل تمایز سلولهای پری‌کندریوم است. مزانشیمی که اطراف غضروف را فرا گرفته (پری کندریوم)، از سطح داخلی در تماس با غضروف است و لایه غضروف ساز پری‌کندریوم است، زیرا

مداوماً بصورت کندروبلاست تمایز می‌یابد، ماتریکس ترشح می‌کند و از این راه به سطح توده غضروفی می‌افزاید.بنابراین رشد واقعی بسیار بیشتر از ازدیاد ساده تعداد سلولها است. رشد از داخل اهمیت کمتری دارد و تنها در طی مراحل اولیه تشکیل غضروف است. این رشد همچنین در صفحه اپی‌فیزی استخوانهای دراز برای ازدیاد طول استخوان و در غضروف آرتیکولار (مفصلی) اهمیت دارد.غضروف سازی یا کندروژنز نوعی تمایز غضروف است که منجر به تغییر محتوای ECM می‌شود(Bradhman,etal-1995).

بخش دوم : ترکیبات قندی یا گلیکوکانژوگه‌ها *(Glycoconjugates)*

دسته بزرگی از ترکیبات حاوی کربوهیدرات در بافتها بصورت پلی‌ساکاریدهای بلند منشعب یا غیرمنشعب هستند که در سطح یا درون سلول و یا در ماده بنیادی بافت‌ها (ECM) وجود دارند. پلی‌ساکاریدها (قندها) ترکیبات پلی هیدروکسی آلدئید یا پلی هیدروکسی ستونی هستند. این زنجیره‌های هیدرات کربن بدلیل گروههای سولفات و کربوکسیل متصل به آنها قویاً آنیونیک بوده و دارای بار منفی هستند.قندها به دو گروه موکوپلی ساکاریدها (فقط به قندساده تجزیه می‌شوند) و هتروپلی ساکاریدها (در اثر هیدرولیز به زنجیرهٔ هیدرات کربن و مواد دیگر مانند پروتئینها و چربیها تجزیه می‌شوند) تقسیم می‌شوند(پریور،۱۳۷۵). در ساختمان پلی‌ساکاریدها در اتصال واحدها به یکدیگر ممکن است باقیمانده قندی (Suger residue) اتصال به سه یا چهار موقعیت مختلف گروه هیدروکسی در باقیمانده قندی واحد مجاور داشته باشد. اتصال بین دو باقیمانده قندی می‌تواند دو حالت ایزوفرم α و β تولید کند. این خصوصیات باعث ایجاد انشعاب در زنجیرهٔ کربوهیدرات‌ها شده، کربوهیدرات‌ها را از ملکولهای بیولوژیک غیرفعال (که معمولاً خطی هستند) جدا می‌نماید و در نتیجه ساختمان بسیار متنوعی را به آنها می‌دهد. دومین علت تنوع کربوهیدرات‌ها این است که می‌توانند بدون اتصال به مولکولهای دیگر (ترکیبات گلیکوز آمینو گلیکان) و یا بصورت متصل با پروتئینها و چربیها باشند (تشکیل گلیکوپروتئینها و گلیکولیپیدها)(Fukuda,etal-1994).

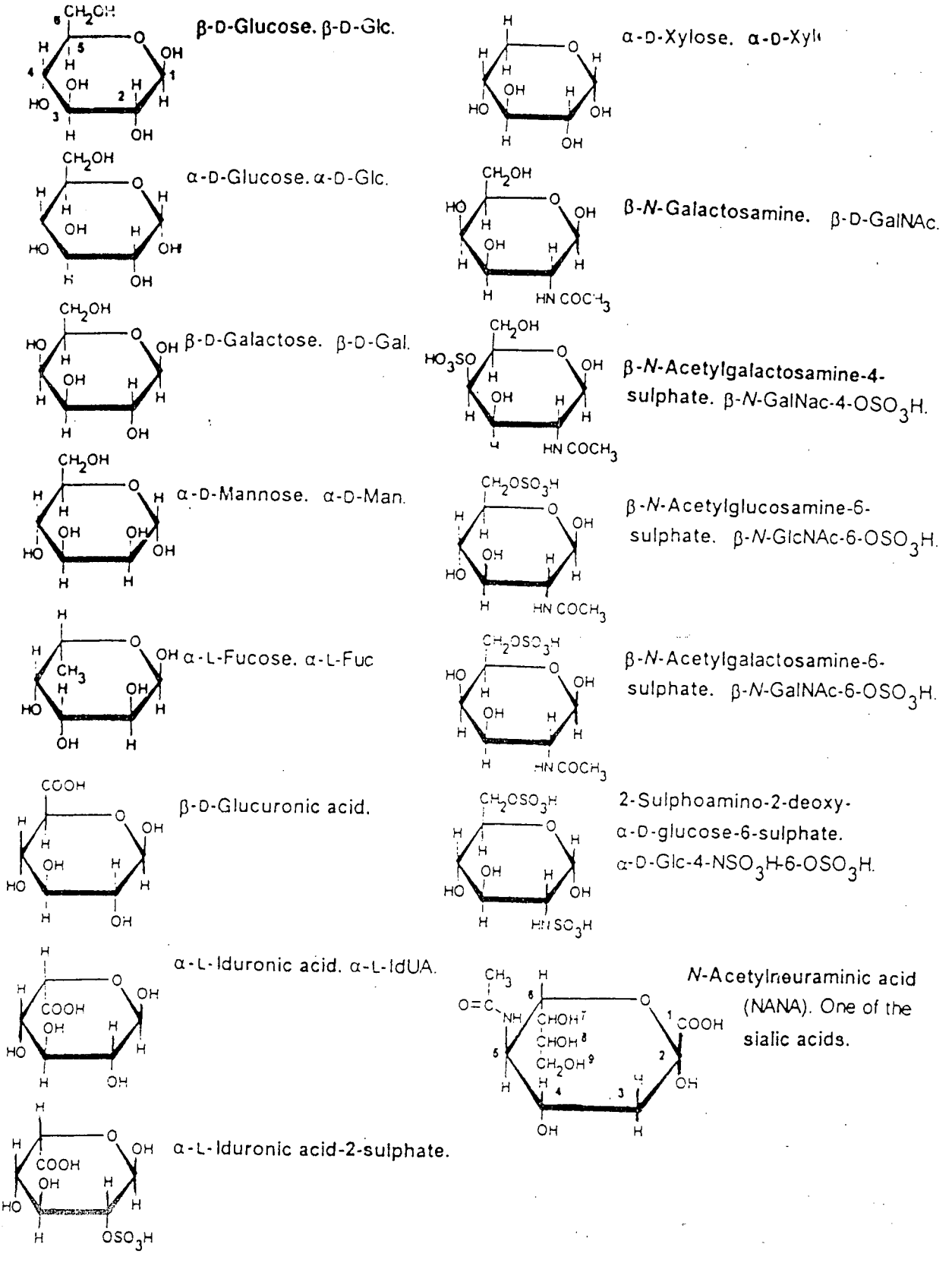
۱ - انواع ترکیبات قندی

۱-۱ گلیکوز آمینو گلیکان‌ها (GAG_s) :

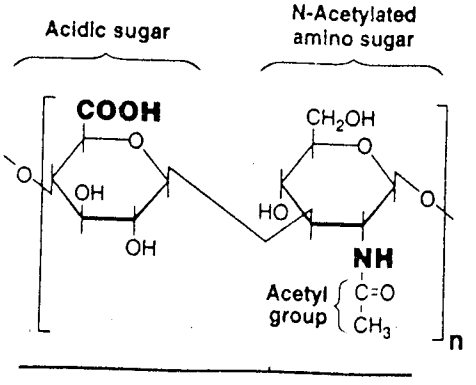
این ملکولها یک دسته بزرگ و اختصاصی از زنجیره‌های طویل کربوهیدراتی (موکوپلی ساکاریدی) هستند که در واقع بخش قندی مولکولهای هتروپلی ساکاریدی را تشکیل می‌دهند و شامل واحدهای دی ساکاریدی تکراری (قند آمینی ـ قند اسیدی) نسبتاً بزرگ بیشتر از ۳۰۰۰ دالتون می‌باشند، به تصویر ۱-۱ و ۲-۱ توجه شود (Murray,1996).

قند آمینی به نام هگزوزآمین مانند D-گلوکز آمین یا Dگالاکتوز آمین است که گروه آمین معمولاً استیله شده و تشکیل مثلاً N- استیل گلوکز آمین و Nاستیل گالاکتوز آمین رامی دهد. این قندها گاهی روی کربن ۴ و ۶ یا روی نیتروژن غیراستیله سولفاته هم می‌شوند. گروههای فوق دارای شارژ منفی قوی بوده و خصوصیات فیزیولوژیک ترکیبات GAG را باعث می‌شوند. قند اسیدی در GAG_s بنام هگزورنیک اسید دارای گروههای کربوکسیل (بار منفی) است مانند D-گلوکورنیک اسید و L- ایدرونیک اسید.

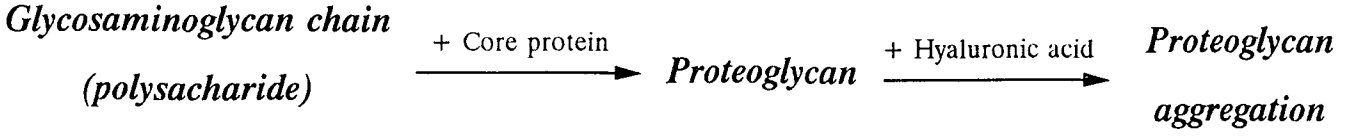
در تشکیل دی ساکاریدهای GAG_s هر یک از هگزوزهای :گلوکز، گالاکتوز، مانوز، فوکوز، Nاستیل گلوکز آمین، Nاستیل گالاکتوز آمین، Nاستیل نورامینیک اسید (یا اسید سیالیک)، Dگلوکورونیک اسید و Lایدرونیک اسید، میتوانند شرکت کنند (Fukuda,1994).



تصویر (۱-۱) دیاگرامی است از واحدهای منوساکاریدی تکراری در GAG (Bradbury,1990)



تصویر (۲-۱) واحدهای دی ساکاریدی تکرار شونده در ترکیبات قندی (Murray,1996)



تصویر (۳-۱) خلاصه سازمان‌یابی گلیکوز آمینوگلیکانها به پروتئوگلیکان‌ها (Browder,1986)

طبقه‌بندی GAG_s :

بر حسب واحدهای منومریک، پیوند گلیکوزیدی، تعداد و محل گروه‌های سولفات، GAGها به چند گروه اصلی تقسیم می‌شوند:

الف ـ نوع اسیدی:

۱ـ هیالورنیک اسید: دی ساکارید تکراری آن شامل واحدهای هگزوزکربوکسیله (D-گلوکورنیک اسید) و هگزوزآمین استیله (N- استیل D-گلوکز آمین) می‌باشد. ساده‌ترین نوع گلیکوز آمینو گلیکانهاست که وزن مولکولی آن تا چند میلیون دالتون می‌رسد. انتشار بافتی آن در بافت پیوندی، پوست، غضروف، مایع سینوویال و غیره دیده می‌شود.

۲ـ کندروئتین ۴ یا ۶ سولفات: دارای واحدهای هگزوزکربوکسیله (Dگلوکورنیک اسید) و هگزوزآمین سولفاته و استیله است (Nاستیل Dگالاکتوز آمین سولفاته). یک زنجیر کوتاه الیگوساکارید (گالاکتوز یا گزیلوز) به انتهای سرین وصل است. وزن مولکولی آن حدود ۵۰ هزار دالتون است و در ECM غضروف فراوان است.

۳ـ کراتین سولفات: یک مولکول گالاکتوز و یک مولکول N- استیل گلوکز آمین سولفاته تشکیل دی ساکارید تکراری آن را می‌دهند. وزن مولکولی آن کمتر از ۲۰ هزار دالتون است و تنها GAG است که به جای قند اسیدی در دی ساکارید آن گالاکتوز وجود دارد.

۴ـ هپاران سولفات: دی ساکارید تکراری آن شامل یک مولکول Dگلوکورنیک اسید و یک مولکول Nاستیل Dگالاکتوز آمین است که زنجیره‌های کوتاه گالاکتوز و گزیلوز به آن وصل‌اند. وزن مولکولی آن حدود ۵۰۰۰ تا ۱۲۰۰۰است.

۵ـ هپارین و درماتان سولفات: ساختمان مولکولی آنها مشابه هپاران سولفات است. وزن مولکولی اولی تا ۲۵۰۰۰ دالتون و دومی تا ۱۵۰۰۰ دالتون است.

۶ـ کراتین: در دی ساکارید تکراری یک مولکول Dگالاکتوز، Nاستیل Dگلوکز آمین ، L- فوکوز یا سیالیک اسید وجود دارد که زنجیره‌های Dگالاکتوز آمین و Dمانوز ممکن است به آن وصل باشند. وزن مولکولی آن ۴۰۰۰ تا ۱۹۰۰۰است .

بخش پایان نامه

ب ـ نوع خنثی:

ـ کیتین: شامل کربوهیدراتهایی است که واحدهای هگزوز، مانند گلوکزآمین دارند (Murray,1996-lewin,1997).

بیوسنتز GAG_s :

زنجیره‌های پلی‌ساکاریدی بوسیله ترادف‌های قند آمینی و اسیدی طویل می‌شوند. این واکنش با مشارکت مشتقات یوریدین دی فسفات (UDP) و بوسیله انواع ترانسفرازها کاتالیز می‌شود. سنتز **GAG_s** مشابه گلیکوژن در ER و گلژی است. اما بعد از سنتز به خارج از سلول فرستاده می‌شوند. برای قندهای آمینی منوساکارید فروکتوز ۶ فسفات پیش‌ساز Nاستیل گلوکز و گالاکتوز آمین و اسید سیالیک (Nاستیل نورامینیک اسید NANA) است. در این قندها یک گروه هیدروکسیل بوسیله گروه آمینی جایگزین می‌شود و معمولاً آمین استیله هم می‌شود. نیتروژن گروه آمین بوسیله اسید آمینه گلوتامین فراهم می‌شود. در نتیجه Nاستیل گلوکز آمین ۶ فسفات و گلوتامات تولید می‌گردد. در تهیه اسید سیالیک کربن و نتیروژن از Nاستیل مانوز آمین و فسفوانول پیروات تهیه می‌شود و فرم فعال بوسیله CTP ایجاد می‌شود. آنزیم Nاستیل نورامینیک CMP ـ پیروفسفوریلاز انتقال پیروفسفات از CTP و اتصال CMP به NANA را انجام می‌دهد.

در سنتز قندهای اسیدی Dگلوکورنیک، ماده پیش ساز اسیداسکوربیک (ویتامین C) است که در لیزوزوم از تخریب GAG یا از مسیر ارونیک اسید بدست می‌آید. پس از سنتز زنجیرهٔ هیدرات کربن، افزوده شدن گروه سولفات طی واکنش سولفاته شدن بوسیله سولفوترانسفراز صورت می‌گیرد (Scott,1992).

تجزیه GAG_s :

بوسیله آنزیم‌های هیدرولیتیک لیزوزوم که در pH حدود ۵ فعالند، مانند آنزیم هیدرولاز صورت می‌گیرد. به جز کراتان سولفات که نیمه عمر بیش از ۱۲۰ روز دارد، بقیه عمرکوتاه دارند. مثلاً در هیالورنیک اسید تا ۳ روز و در سولفاته‌ها تا ده روز است. برای GAGهای خارج سلولی، سلول با فاگوسیتوز، آنها را به داخل حبابها کشیده و سپس با لیزوزم جوش می‌خورند. تحلیل نهایی از طریق شکسته شدن زنجیرهای پلی‌ساکاریدی بوسیله آنزیم آندوگلیکوزیداز و تولید الیگوساکاریدها وسپس تجزیه الیگوساکاریدها انجام می‌شود (Rademacher,1997).

۲-۱ پروتئوگلیکان‌ها:

ماکرومولکولهایی هستند که از اتصال GAG_s به یک پروتئین مرکزی تشکیل می‌شوند. همه GAG_s به جز

هیالورنیک اسید با اتصال کوالان به پروتئین متصل می‌شوند و ساختمان سه بعدی تشکیل می‌دهند که ۸۰ تا ۹۰ درصد وزن آن از کربوهیدراتهای با بار منفی است(تصویر ۳-۱). کربوهیدراتها دایمریک و متشکل از دو دسته متناوب منوساکاریدند (قند اسیدی ـ قند آمینی). منومرهای کربوهیدراتی GAG بصورت زنجیرهایی اطراف مرکز پروتئینی پراکنده‌اند و ساختمان مشابه برس شیشه‌شوی (Bottle brush)ایجاد می‌کنند. GAGهادر این مورد می‌توانند کندروئتین و کراتان سولفات باشند. پیوند بین GAG و پروتئین بصورت پیوند گلیکوزیدی بین‌تری هگزوز (گالاکتوز، گالاکتوز ـ گزیلوز) با هیدروکسیل دریک انتهای سرینی از پروتئین است. این سنتز در ER صاف شروع و در گلژی کامل می‌شود (Neame,Barry,1994-Hascall,Hascall,1195).

۳-۱ گلیکوپروتئین‌ها:

اتصال کوالان در این ملکولها بین قند الیگوساکاریدی و پروتئین است. لذا آنها را بنام موکوپروتئین نیز می‌نامند. زنجیرهٔ الیگوساکاریدی برخلاف پروتئوگلیکان‌ها، دارای طول کوتاه و منشعب است. لذا در گلیکوپروتئین‌ها قسمت اعظم ساختمان را بخش پروتئینی تشکیل می‌دهد و غالباً واحدهای تکراری دی‌ساکاریدی ندارند. به جز Nاستیل لاکتوز آمین که در آن اتصال الیگوساکارید به گروه NH_2 آسپارژین یا به گروه OH در سرین یا ترئونین صورت می‌گیرد. لذا بر حسب نوع اتصال، گلیکوپروتئینها به دو دسته تقسیم می‌شوند:

الف ـ نوع N گلیکان (N-Linked): ترمینال Nاستیل گلوکز آمین یا Nاستیل نورامینیک اسید (NANA) به گروه آمید آسپارژین متصل می‌شود. در اینها اسکلت مرکزی‌تری مانوزیل (سه مانوز متصل به دو مولکول N استیل گلوکز آمین) است که به آن تا ۶ مولکول مانوز، اسید سیالیک یا Nاستیل لاکتوز آمین ممکن است متصل شود. این نوع فراوان‌تر است (schachter,1992).

ب ـ نوع O ـ گلیکان (O-Linked): الیگوساکارید N استیل گالاکتوز یا گلوکز آمین متصل به گروه هیدروکسی (OH) در سرین یا ترئونین مربوط به پلی‌پپتید می‌شود. چون اولین بار در موسین لوله گوارش و تنفس یافت شد بنام گلیکان نوع موسینی است. گروه O-Linked از اجزاء گلیکو پروتئینی غشائی یا خارج سلولی است، مثل گروههای خونی ABO (Fukuda,etal-1994).

بیوسنتز گلیکوپروتئینها:

ابتدا پروتئین در ER ساخته می‌شود. از جمله فعالیتهای بعد از ترجمه مولکولهای پروتئینی

(posttranslation)، سولفاته شدن ، فسفریله شدن ، هیدروکسیله شدن و گلیکوزیله شدن را می‌توان نام برد. گلیکوزیله شدن از مهمترین تغییرات مولکول‌های پروتئینی است که باعث اتصال زنجیرهای الیگوساکارید به گروه آمین یا هیدروکسیل اسیدهای آمینه توسط آنزیم‌های مهم گلیکوزیل ترانسفراز می‌شود. این فرآیند در دستگاه گلژی صورت می‌گیرد و طی آن منوساکارید از یک دهنده قند مناسب به پذیرنده آن منتقل می‌شود. نوکلئوتید قندها، دهنده مناسب هستند مثل:

سایتیدین منو فسفات ـ N استیل نورامینیک اسید = CMP-NANA

گوانوزین دی فسفات ـ مانوز (گلوکز) = GDP-mannose

یوریدین دی فسفات ـ گلوکز آمین = UDP-Glucosamine

گروه پذیرنده یک پایانه آسپارژین در فاصله سکانس هدف Asn-x-Ser یا Asn-x-thr است.اولین مرحله گلیکوزیله شدن ، انتقال قند به یک مولکول چربی بنام دولیکول فسفات (Dolicolphosphate) است که حاوی یک هسته مرکزی الیگوساکاریدی مشتمل بر ۹ مولکول مانوز، ۳ ملکول گلوکز و دو مولکول N استیل گلوکز آمین است.دومین مرحله، انتقال این هسته الیگوساکاریدی از دولیکول به پروتئین هدف مناسب (در محل سکانس هدف) است . گالاکتوزیل یوریدیل ترانسفراز آنزیم کلیدی تولید گلوکز فسفات و گالاکتوز UDP است(Daude,Ellie,1996) . اتصال نوع N-Linked در ER شروع و در گلژی کامل می‌شود در حالیکه اتصال نوع O-Linked تنها در گلژی انجام می‌شود (Perez,Hidalgo,1991) .

از جمله پایانه‌هایی که می‌توانند به کمپلکس الیگوساکاریدی افزوده شونده ، N استیل گلوکز آمین، گالاکتوز، اسید سیالیک، فوکوز و مانوز هستند . ضمن انتقال پروتئینها از ER به گلژی، قندها به الیگوساکاریدهای در حال رشد توسط گلیکوزیل ترانسفراز افزوده می‌شوند. گلیکوپروتئینهای ترشحی از سلول، در داخل فضای حبابهای گلژی آزاد هستند، اما گلیکوپروتئینهای غشاء سلول به غشاء حبابهای گلژی وارد می‌شوند و کربوهیدرات آنها به طرف داخل حباب قرار می‌گیرد.وقتی غشاء آنها به غشاء سلول جوش می‌خورد اگر دارای گلیکوپروتئینهای غشایی باشند، کربوهیدرات‌ها بطرف خارج سلول قرار می‌گیرند. لذا سرنوشت گلیکوپروتئینهای O یا N لینکد بصورت ترشح از سلول، الحاق به غشاء سلول و یا انتقال به لیزوزم است (Parekh,1991) .

تجزیه گلیکوپروتئینها در لیزوزوم و مشابه GAG_s است (Werb,Tremble,1990) .

چند گلیکوپروتئین مهم شامل انواع زیر هستند :

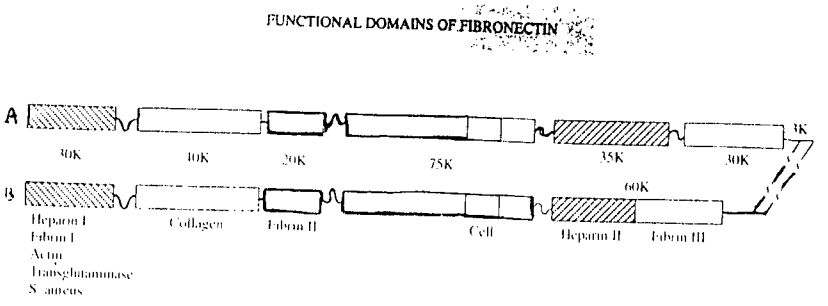
۱- **فیبرونکتین**: در فیبروبلاست‌ها و سلولهای اپی‌تلیال ساخته می‌شود و با وزن مولکولی حدود ۴۶۰ کیلو دالتون، دارای ناحیه اتصال برای GAG، کلاژن و سلولهاست. این ماده دایمری است که در آن دو زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی با پیوندهای گوگردی دی سولفیدی بهم وصل می‌شوند(تصویر ۴-۱). دایمر بودن باعث اتصال عرضی سلولهای مختلف بهم یا به اجزاء ماده زمینه بین سلولی می‌شود (Burton,Lust,1997).

۲- **لامی نین**: در غشاء پایه با وزن مولکولی 10^6 دالتون ، به شکل ضربدری با سه بازوی کوتاه و یک بازوی بلند با کلاژن و گیرنده‌های غشاء سلولی اتصال دارد(تصویر ۵-۱). به همین دلیل باعث اتصال سلولها به ماده زمینه بین سلولی و غشاء پایه می‌شود (Kleinman,1986).

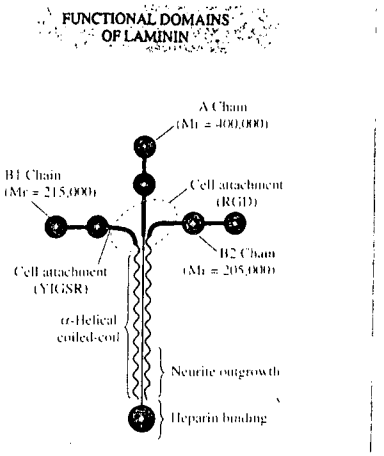
۳- **کندرونکتین**: در غضروف در چسبندگی کندروسیت‌ها به کلاژن II نقش دارد (Browder,1986).

۴-۱ گلیکولیپیدها:

از انواع هتروپلی ساکاریدها هستند که در آنها اسید چرب با کربوهیدرات اتصال دارد. ناحیه سرقطبی، ساکاریدی است و ناحیه دم هیدروفیل ، حاوی اسید چرب است. بیشتر در غشاء سلول‌ها و بخصوص در سلولهای عصبی مشخص هستند (مثلاً گانگلیوزیدها و سربروزیدها). از مهمترین انواع آنها دارای اتصال دنباله قندی به اسفنگوزین (یک آمینوالکل) بوده و بنام گلیکواسفنگولیپید است (مانند فسفولیپید اسفنگومیلین). تقریباً تمام گلیکولیپیدها مشتقات سرامید هستند(ناحیه دم) که با قند ناحیه سر بوسیله پیوند O-گلیکوزیدی متصل می‌شوند. این ملکولها آمفی پاتیک هستند. انواع گلیکولیپیدهای اسیدی و خنثی در غشاء سلولهای عصبی نقش ساختمانی داشته و تغییرات آنها مسئول برخی بیماریهای عصبی و روانی است (Naisberg,Weizman,1997-Farrer,etal-1996).



تصویر (۴-۱) مدل شماتیک یک ملکول فیبرونکتین نشان‌دهنده نواحی اتصال آن به مولکولهای ECM و سلولهای دیگر (Browder,1986).



تصویر (۵-۱) مدل شماتیک ملکول لامی‌نین با نواحی اتصال آن به ملکولهای ECM و سلولها (Browder,1986).

۲ - نقش ترکیبات قندی ECM و سطح سلولها در رشد و نمو بافت‌ها

اهمیت بیولوژی کربوهیدرات‌ها آنچنان است که بنظر می‌رسد علم گلیکوبیولوژی شاید در آینده مقدم بر علوم سلولی مولکولی قرارگیرد. بسیاری اثرات کربوهیدرات‌ها در گلیکوکانژوگه‌ها حاصل خواص فیزیکی آنها و تاثیر متقابل ساکاریدها با یکدیگر یا با پروتئینها و لیپیدهاست (Griffith ,Hsich -1995). مثلاً نقش فعال کننده پلاسمینوژن بافتی بوسیله الیگوساکاریدهای متصل به آن تعیین می‌شود (Wittwer,Howard-1990) و بسیاری اثرات پروتئین‌ها در گلیکوکانژوگه‌ها به نقش هیدراتهای کربن آنها برمی‌گردد (Wai,1998-Yue,Watanabe-1996).

جهت تشکیل بافت‌ها و سایر سطوح سازمان یافتگی موجود زنده، اعمال متقابل بین سلولی (cell-cell Interaction) وجود دارد که در پدیده‌های تشخیص سلولی (Cell Recognition)، چسبندگی سلولی (Cell Adhesion)، القاء سلولی (Cell Induction)، تمایز (Differentiation) و تعیین سرنوشت سلولی (Determination) دخالت دارند(لاهیجانی، ۱۳۷۷). سلول‌های جنینی دارای عملکرد متفاوت نسبت به هم هستند، به طوریکه تغییر در آنها می‌تواند روند هیستوژنز و مورفوژنز را تغییر دهد (Edelman,1988). تغییر در میزان اتصالات بین سلولی دقیقاً زمان‌بندی شده و به منظور تولید طرحهای ویژه مهاجرت در سلول‌های مزانشیم جنینی است.اساس مولکولی تماسهای فیزیکی و چسبندگیهای سلولی، در اعمال متقابل بین گلیکوکانژوگه‌های ECM و سطح غشاء سلولها، بخصوص قند انتهایی اسید سیالیک است (Fazel,Schult- 1990).

به منظور حرکت یا تغییر شکل، سلول‌ها باید قادر به چسبیدن به هم یا به محیط زمینه خود (ECM) باشند. سلول‌های در حال حرکت به سطوح پیچیده محیط که متشکل از گلیکوکانژوگه‌های ECM و غشاء سلول است، می‌چسبند. به این دلیل در مسیر مهاجرت بسیاری سلول‌ها، مولکول‌های فیبرونکتین و لامی‌نین فراوان‌تر هستند (Eritson,Turley,1983-Franeeschini,Lazzari,1996).

ECM همزمان با اندام‌زایی یا زودتر از آن ترشح شده و لذا بستر سلول‌های مهاجر و در حال تمایز است. ECM ضمن حمایت ساختمانی سلولها، برای انجام اعمال سلول‌ها ضروری است. مثلاً تماس هپاتوسیت‌ها با غشاء پایه،باعث سنتز پروتئینهای اختصاصی آن می‌شود (Gullberg,1995).

نقش ECM در بافت‌های جنینی و بالغ عمدتاً بواسطه وجود گلیکوکانژوگه‌های آن است که به کمک آنها اتصال به فاکتورهای رشد، کشش برای مهاجرت سلول‌ها، اتصال سلول‌ها بهم و به ماده زمینه، تکثیر، تمایز و در نتیجه

مورفوژنز را موجب می‌شوند و اینها از طریق تاثیر بر بیان ژنهایی است که بر میان کنش‌ها اثر دارند (Makihira,etal-1999). نقش ECM در تکثیر، تمایز و شکل‌زایی، از جمله بدلیل نقش ذخیره‌ایی ECM برای فاکتورهای رشد است که بعنوان واسطه عملکردی ایفای نقش می‌کنند. ارتباط متقابل فاکتورهای رشد و اجزاء ECM از جمله عوامل موثر بر مورفوژنز بافتی است (Bonen,etal-1999-Burton,etal-1995). همپاران سولفات و کندروئتین سولفات از جمله ترکیباتی هستند که با فاکتورهای رشد میان کنش دارند (Litwack,etal-1998). اسید هیالورنیک که به ویژه در جنین فراوان‌تر است، به سطح سلول‌ها چسبیده، از طریق مهار چسبندگی سلول‌ها به یکدیگر، باعث آزادی حرکت و لذا تسهیل مهاجرت سلولی، ریخت زایی، ترمیم و تمایز می‌شود. همچنین اسید هیالورونیک ضمن حفظ ساختمان ماتریکس، باعث هدایت مسیر مهاجرت سلولهای ستیغ عصبی می‌شود (Gong,1997). هپارین بااتصال به گلیکوپروتئینهایی بنام Neurotrophin باعث هدایت رشد outgrowth می‌شود (Li,1997) و در نرونها پاسخ به گلیکوپروتئین Collapsin (که مهارکننده رشد اکسونهاست) را تعدیل می‌بخشد (Goshima,Nakamora-1995). GP_{55} گلیکوپروتئینی است که اتصال نرونها به سوبسترا را مهار کرده و مولکول ضد چسبندگی است (Willson-1996).

GAG_s به دلیل بار منفی خود با پوسته‌ایی از مولکول‌های آب محاصره شده و وقتی کنار هم قرار می‌گیرند مانند دو مغناطیس با قطبیت یکسان روی یکدیگر لیز خورده و لذا خاصیت لغزندگی موکوس را باعث می‌شوند. این توانایی اتصال به مقدار زیاد آب که تولید ماتریکس ژل مانند را می‌کند، اساس ماده زمینه یا ECM است. تحت فشار، GAGها آب خود را از دست داده و فضای کمتری اشغال می‌کنند و با حذف فشار به وضع اول برمی‌گردند و هیدراته می‌شوند. حفظ تعادل آب و نمک نیز با همین مکانیسم است (Harper,1996). در مایع سینوویال و غضروف مفصلی انسان در شرایط طبیعی پروتئوگلیکانهایی وجود دارند که در آنها کندروئتین ۴ و ۶ سولفات یا کراتان سولفات متصل به پروتئین مرکزی است (Morris,Tucke-1989). کندروئتین سولفات در تبدیل سلولهای ستیغ عصبی به مزانشیم برای سرنوشت عصبی یا غضروفی از طریق اتصال به لامی‌نین و فیبرونکتین دخالت دارد (Tsubouchi,1996). فیبرونکتین که در ECM دارای نواحی اتصال برای کلاژن و سلول‌ها می‌باشد، در عملکرد متقابل سلولها با یکدیگر یا با ECM نقش دارد. لامی‌نین، مولکول دیگر ECM از طریق چندین ناحیه اتصال برای گلیکوپروتئینهای ECM و سطح خارجی سلول‌ها در میان کنش های سلولی

دخالت دارد. Dystroglycan پروتئوگلیکانی است در سطح سلول که باعث اتصال سیتواسکلتون به لامی‌نین در ECM می‌شود (Griffith,Wiley-1990).

گلیکوکانژوگه‌های غشاء سلولی اختصاصی هستند

نوع کربوهیدرات‌های سطح سلولی از ویژگیهای هر نوع سلول خاص است و تنوع زیاد این ترکیبات به عمل خاص هر نوع سلول یا بافت یا هر مرحله ویژه از رشد و نمو سلولی بستگی دارد (Calaora,Cazal-1996-Albert,etal-1989). تنوع الیگوساکاریدها و تغییرات قند انتهایی گلیکوکانژوگه‌ها در هر مرحله از تمایز سلولی، نقش این مولکول‌ها را در انتقال اطلاعات به درون یا بیرون سلول برای تشکیل اعضاء آشکار می‌کند (Faraidi,etal-1996). میان کنش کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها را بعنوان لیگاندی برای پروتئینهای متصل شونده به آنها معرفی می‌کند. لذا در پدیده تشخیص سلولی، از طریق اتصال آنها به پروتئینهای رسپتور ایفای نقش می‌کنند (Buchstaller,etal-1996).

سلول‌های گیرنده پیام، در سطح خارجی خود دارای مولکول‌های گیرنده‌ائی هستند که عمدتاً زنجیره‌های جانبی هیدرات کربن در گلیکوپروتئینها و گلیکولیپیدها می‌باشند. با دریافت پیام (انواع هورمونها، فاکتورهای رشد، میانجی‌های عصبی و...) انواع پاسخ‌های سلولی، القاء سلول‌ها، کسب تخصص یافتگی و تمایز حاصل می‌گردد. حضور گلیکوپروتئینهای ویژه شاید مرتبط با شیمیوتاکسی و انتقال پیام بصورت سیگنال باشد (Dezawa,Nagona-1996). CSPG (کندروئتین سولفات پروتئوگلیکان‌ها) در ECM با دیگر پروتئینهای ماتریکس و رسپتورهای سطح سلول واکنش متقابل داشته و از این طریق بر چسبندگی سلولی و رشد و نمو بافت‌ها تاثیر دارند (Grumet,Friedlander-1996). DSD.1 مثالی ازاین ترکیب است که آغازگر رشد نورونها است (Garwood,Schnadelbach-1995). مولکولهای چسباننده سلولی (CAMs=Cellular Adhesion Molecules) گلیکوپروتئینهای مرتبط با غشاء سلول هستند. این مولکولهابه دو دسته تقسیم‌می‌شوند: الف) یک‌نوع‌وابسته به یون کلسیم بنام کادهرین. ب) نوع غیر وابسته به یون کلسیم یا CAM از خانواده ایمنوگلوبولین‌ها: بخش خارج سلولی اینها شامل دو زنجیرهٔ سبک و دو زنجیرهٔ سنگین است که با پیوند دی سولفیدی بهم متصلند و آرایش مولکولی مشابه Ig_s دارند (Jacobs,1996). در سلولهای مختلف انواع مهم‌ومتنوعی از CAM_s وجود دارد. لذا در هیستوژنز بافتهای مختلف مولکولهای متفاوتی از CAM ها نقش

دارند (Kamiguchi,Lemmon-1998) و بخصوص در مراحل اولیه جنینی باعث اتصال سلولها بهم می‌شوند (Buchstaller,etal-1996).بیشترین مولکول شناخته شده فوق N-CAM است . یک گلیکوپروتئین با وزن ملکولی ۱۶۰۰۰۰ دالتون که جزء قندی آن اسیدسیالیک دارای بار منفی است (Haas,Tran-1999) . سه ناحیه مهم این مولکول، انتهای آمینی برای اتصال به سلول مجاور، انتهای کربوکسیل در غشاء سلول و ناحیه میانی، قند غنی از اسید سیالیک است(تصویر شماره ۶-۱). دو سلولی که این مولکول را دارند بهم متصل می‌شوند. زیرا انتهای آمینی هر N-CAM به انتهای آمینی مولکول دیگر متصل می‌شود. به این نوع اتصال مولکولهای مشابه،اتصال هوموفیلیک گویند(تصویر ۷-۱). این مولکولها از گلیکوکانژوگه‌های سطحی غشاء سلول هستند که بخشی از ساختمان آنها نیز در ECM قرار می‌گیرد (Schachner,1989) . ملکولهای CAM در سطح سلولها با ازدیاد تجمع سلولی، بر استحکام ارتباطات بین سلولی cell-cell Interaction موثرند (Kelppel,etal-1996) . گلیکوپروتئین TAG-1 از خانواده Igs و یک نوع CAM است که در جنین انسان در سلولهای عصبی به GPI (گلیکوزیل فسفاتیدیل ایزوزیتول) در سطح غشاء متصل می‌شود (Karagogeos,etal-1997) .

گیرنده‌های چسباننده سلولی *(Cell Adhesion Receptors)* اینتگرین‌ها

اینها پروتئینهای عمقی غشاء هستند که ارتباط غشاء سلول را با ECM باعث شده و در آن به مولکولهای کلاژن یا گلیکوپروتئینهای لامی‌نین، فیبرونکتین، ویترونکتین و غیره متصل می‌شوند و بر عملکرد ECM دخالت می‌کنند (Berm,etal-1994) . مولکولهای هترودایمر اینتگرین همگی دو زیر واحد دارند که زنجیرهٔ آلفا و بتا است و در آنها ناحیه اتصال دارای سه اسید آمینه Arg-Gly-Asp است (سکانس RGD) که توسط مولکولهای مورد نظر شناسایی می‌شود(تصویر ۸-۱).حدود بیست نوع اینتگرین وجود دارد. مثلاً مولکول فیبرونکتین در ECM بوسیله گیرنده‌های خود در اینتگرین‌های غشاء باعث اتصال ECM به غشاء سلول می‌شود. لامی‌نین نیز از طریق اتصال به اینتگرین‌های ویژه خود در غشاء سلول و نیز اتصال به کلاژن ECM از سمت دیگر، باعث ارتباط سلول با ماده زمینه می‌شود (Yue,1996-Hall,etal-1997).هر نوع اینتگرین متصل به جزء خاصی از اجزاء ECM شده و لذا مسئول پاسخ سلول به تغییرات ECM برای تمایز یا مهاجرت آنها است(Shakibaet,1998) .

از جـــمله دیگـــر مـــولکولهای غشـــاء ســـلول گـــلیکوپروتئینها و گـــلیکولیپیدها هســـتند کـــه زنـــجیره‌های جـــانبی الیگـــوساکـــاریدی آنها در سطح خـــارجی سلول قـــرار دارنـــد و بـــعنوان مـــولکولهای ویـــژه گـــیرنده یـــا گـــلیکوکالیکس (Glycocalix) یـــا cell coat یـــا Antenna در ســـطح غشـــاء عـــمل مـــی‌کنند. ایـــن زنـــجیره‌های الیگـــوساکـــاریدی دارای تـــرمینال اسید سیالیک بـــا بـــار منفی در سطح سلول هستند کـــه در تشـــخیص ســـلولی و واکـــنش‌های مـــتقابل ســـلول‌ها بـــا یکـــدیگر و بـــا ECM نـــقش دارند (Collins,Yang-1997-Carratu,Steardo-1996).

از جمله ملکولهای پیچیده در سطح خارج سلولی، گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول است (GPL-anchor) که به گروه کربوکسیل آمینو اسید پروتئین غشاء سلول در سطح خارج آن متصل شده است. این گلیکوپروتئین در پدیده‌های تشخیص سلولی و مهاجرت دخالت دارد (Powell,Riwas-1997).

مولکول دیگری که در اتصال سلول به گلیکوپروتئینهای ECM نقش دارد، آنـزیم غشـایی گـلیکوزیل ترانسفراز است که انتقال کربوهیدرات به پروتئین را انجام می‌دهد. این آنـزیم پـذیرنده کـربوهیدرات را در ECM شـــناسایی مـــی‌کند(مـــثلاً لامـــی‌نین) و بـــه ایـــن طـــریق ســـلول را بـــه ECM مـــتصل می‌نماید (Cohen.etal-1995).

Syndecan و Glypican دو نـــوع پـــروتئوگلیکان هـــپاران سـولفاته سطح سلول در مـراحـل جـنینی هســـتند (Bonen,etal-1999-Bernfield,Kokenyesi-1992). پـــاسخ ســـلول‌ها بـــه بســـیاری انـــواع سیگنال‌های رشد و نموی از طریق پروتئوگلیکان‌های هپاران سولفات (HSPG) سطح سلولهاست. هپاران سولفات (GAG)به مولکول‌های چسباننده سلولی (CAM)، پروتئینهای ECM، فـاکـتورهای رشد و پروتئازهامتصل می‌شود و در اتصالات بین سلولی، سلول بـه زمـینه ECM، رشـد بـه خـارج outgrowth وپاسخ بـه فـاکـتورهای رشـد مـؤثر است و لذا ازایـن طـریق بـر تشکـیل انـدامـها نـقش دارد (Ruoslahti,1987-Litwack,etal-1998). گلیکو پروتئینهای سطح سلول در پدیده‌های مـختلف سلولی مانند تشخیص سطح سلول (Cell Surface Recognition) بوسیله سلولهای دیگر، هورمونها، ویروس‌ها یا باکتری‌ها نقش دارند.از جمله رسپتور پـولیوویروس، گـلیکوپروتئین مـتعلق بـه خـانواده Ig و در سطح غشاء نورونهای CNS انسان قرار دارد (Solecki,Schevavz-1997). اتصال ویروس آلفا به

نـورونهادر مـوش (Gorrell,Lenn-1997)، اتـصال سـلول اسـپرم بـه تـخم (Wassarman,1992)، چسبندگی باکتریها و ویروسها به سلولهای میزبان (Karlsson , 1989) مثالهای دیگری از این مواردند. عـفونت سـلولهای عـصبی بـا بـورلیا در اثـر چسـبندگی بـه گـالاکـتوسربروزید رسـپتورگلیکولیپیدی غشاء است (Garcia-Monco,Benach,1997) و پیوند برخی سموم باکـتریال مـانند وروتـوکسین بـه رسپتورهای گلیکولیپیدی سلول‌های عصبی انسان در عفونت‌های E.coli مسؤول اختلالات عصبی است (Ren,Utsvnomiya-1999).

مولکول‌های کربوهیدراتی سطح سلول در سلول‌های توموری، تغییر یافته و بخصوص در مواردی که متاستاز زیادتر است، هیدرات‌های کربن افزایش در نوع N گلیکان را نشان مـی‌دهند (Saitoh,1992). CD44 یک گـروه از گـلیکوپروتئینهای سـطحی غشـاء سـلولی است کـه بـا ECM مـیان کـنش دارد (Kaaijk,Pals-1997) و در بسـیاری تـومورهای مـتاستازیس شـناخته شـده است (Peach,etal-1993) CD9 . گلیکوپروتئین سطحی غشایی است که سیگنال رشد و تمایز را در نورونها ایجاد می‌کند (Baner,Hadjiargyroo-1997).

بخش سوم: لکتین‌ها

لکتین‌ها ملکولهای بزرگ پروتئینی یا گلیکوپروتئینی هستند که در طبیعت توزیع وسیع داشته، از گیاه، قارچ، حشره، باکتری یا جانوران استخراج می‌شوند. لکتین‌ها اتصال کوالان به برخی گروههای آمین آزاد در ملکولها یا نشانه‌ها برقرار می‌کنند. یک ملکول لکتین میتواند به دو یا چند ملکول گلیکوپروتئین در سطح خارجی سلولها متصل و لذا سلولها را بهم متصل کند. از جمله خاصیت آگلوتیناسیون ارتیروسیت‌های پستانداران بوسیله لکتین‌ها را می‌توان مثال زد. از سالها قبل مشخص شد که برخی از لکتین‌ها بطور انتخابی برای برخی از گروههای خونی بعنوان آنتی‌بادیهای گردش خون عمل می‌کنند . مواد تعیین کننده گروههای خونی، گلیکوپروتئینهای سطح ارتیروسیت‌ها هستند و لکتین‌ها به کربوهیدراتهای ویژه این ملکولها متصل می‌شوند (Drury,1980) . تمایل اتصال به سلولها بدلیل اتصال لکتین‌ها به باقیمانده قندی (suger residue) منوساکاریدی گلیکوپروتئینها است. لکتین‌ها بر حسب تمایل برای قندهای مختلف به ۵ دسته تقسیم می‌شوند. هر نوع ملکول لکتین بصورت یک دایمر یا تترامر است که از نظر خاصیت اتصال به قندها متفاوتند. ماهیت اتصال اختصاصی لکتین‌ها به قندها مشابه ارتباط آنتی‌ژن ـ آنتی‌بادی ، ویژه است. لکتین‌های حیوانی بر اساس تشابه توالی اسیدهای آمینه به دو گروه تقسیم می‌شوند : گروه C که تشابه ساختمانی کمی دارند و برای اتصال به قندها نیاز به یون کلسیم دارند. گروه S که تشابه ساختمانی بیشتر دارند و برای اتصال نیاز به رادیکال تیول (-SH) دارند (Vasta,1994) .

روشهای هیستوشیمی لکتین‌ها، با روشهای ایمینوهیستوشیمی اشتراک دارند . هیستوشیمیست‌ها از لکتین‌های نشاندار استفاده می‌کنند. اغلب نشانه‌هایی که بکار می‌روند فلوروکروم‌ها هستند (به خصوص مشتقات rhodamine و fluorescein) همچنین آنزیم‌های قابل مشاهده هیستوشیمیائی (پراکسیداز horse radish و آلکالین فسفاتاز)، فریتین و گروه‌های acetyl [3H] (برای مراحل اتورادیوگرافی) که با بکار بردن این نشانه‌ها نواحی اتصال لکتین در بافت مشخص می‌شوند. گاهی اتصال لکتین‌ها با روشهای ایمینوهیستوشیمی توسط آنتی‌لکتین anti-lectin antisera مشخص می‌شود (Drury,1980) .

از این نظر در مقاطع پارافینی ، مطالعه لکتین به دو روش مستقیم و غیر مستقیم صورت می‌گیرد. در روش مستقیم لکتین با آنزیم یا فلورسین باند می‌شود و سپس در معرض بافت قرار گرفته و مطالعه فلورسانس صورت می‌گیرد. در روش غیر مستقیم لکتین به محل اختصاصی خود در بافت متصل و توسط آنتی‌لکتین آنتی‌بادی نشاندار شده یا آنتی‌بادی متصل به Audin-biotin، موضع اتصال لکتین مشخص می‌شود (Leathman,1983).

نتیجه: نواحی اتصال به لکتین در اجزاء یک بافت دو اهمیت دارد: ۱)درمواردی ناحیه اتصال اختصاصی است و این امر بوسیله نمونه‌های کنترل معین می‌شود. ۲) مقدار اتصال لکتین در هر ناحیه (که بوسیله تراکم رنگ مشخص می‌شود)، متناسب با غلظت منوساکارید اختصاصی در آن بافت است.هر لکتین دارای مکان اتصال به یک واحد قندی اختصاصی است. مثلاً لکتین Concanavalin A (Con A) و Lentil (LCA) دارای خاصیت اتصال به ترکیبات قندی هستند که قند انتهایی آنها آلفامانوز است. اما علی‌رغم این اتصال یکسان، این دو نوع لکتین یک نوع ترکیب بافتی مشابه را ردیابی نمی‌کنند، زیرا Con A در بافتها به آلفا مانوزی می چسبد که قند ماقبل قند انتهایی آنها Glc(Glucose) و Glc Nac (N-استیل‌گلوکزآمین) باشد (α-D Man>α-Glc>α-GlcNac). در حالیکه Lentil به گروه α-Manose-Fucosyl وصل می‌شود (Fazel,1989). با توجه به حساسیت زیاد لکتین‌ها در شناسایی قند انتهایی سطح سلولها یا ECM، کاربرد آنهابرای نشان دادن ترکیباتی است که به سادگی با روشهای معمول هیستوشیمیایی قابل تشخیص نیستند . بهمین دلیل استفاده از لکتین‌ها ابزار قابل اعتماد و مناسبی در تحقیقات پزشکی و زیست‌شناسی می‌باشد. امروزه انواع بسیار متفاوت لکتین‌ها WGA، PNA، SBA و... در سطح وسیع جهت مطالعه ترکیبات قندی سلولها مورد استفاده قرار می‌گیرد و راه را برای درک فرایندهای جنین‌شناسی، پاتولوژی و فیزیولوژی طبیعی اندام‌ها فراهم می‌کند.

در جدول شماره ۱ برخی لکتین‌هایی را که در مطالعات هیستوشیمیایی مورد استفاده قرار می‌گیرند ، همراه با قند انتهایی که به صورت اختصاصی با آنها واکنش می‌دهند نوشته شده‌اند (Fazel,1990).

جدول شماره ۱

نوع قندی که اختصاصاً با آن واکنش می‌دهد (Carbohydrate Binding spectificity)	خلاصه نام لکتین (abbreviation)	لکتین (Lectins)
α - D- GalNac	DBA	Dolichos bifiorus (horse gram)
GalNac	VVA	Vicia Villosa (hairy winter vetch)
GalNac-Ser(Thr)	VVA/B4	(ایزومر)
D - GalNac	WFA*	wistaria floribunda
α , β - GalNac > D - Gal	SBA	Glycine max
D - Gal	MPA	Maclura Pomifera (Osago Orange)

WFA علاوه بر قند انتهایی زنجیره قندی گلیکوپروتئین‌ها ممکن است که به سایر قندهای مشابه در زنجیره‌های قندی گلیکوپروتئین‌ها نیز اتصال یابد.

Galactose = Gal.

N-acetylgalactosamine = GalNac.

بخش چهارم : مروری بر مطالعات رشد و نمو سلولی ملکولی بافت غضروفی

بیشتر دانشمندان نقش میان کنش‌های مختلف ECM را در تکامل بسیاری بافتها موثر می‌دانند. Edelman در سال ۱۹۷۶، میان کنش سلول - سلول و بافت ـ بافت را در تکامل ارگانهای مهره‌داران مطرح کرد و دراین مورد ماتریکس خارج سلولی را یک واسطه میان کنش دانست و نقش پروتئوگلیکانها را در پدیده فوق موثر خواند. بنظر وی در سال ۱۹۸۸ کندروژنز در سه ناحیه مختلف جنین (مهره، اندام، جمجمه) جاهایی که غضروف آنها از سه مزانشیم مختلف جنینی تمایز می‌یابد(اسکلروتوم، سوماتوپلورال و نورال کرست)، تحت اثر ماتریکس خارج سلولی می‌باشند. وی ماتریکس‌هایی را که شروع تمایز غضروف را در جنین جوجه باعث می‌شوند بصورت زیر معرفی کرد:

منبع ماتریکس مورد نیاز برای تمایز	منشاء مزانشیمی	غضروف
اپی‌تلیوم‌اندام	سوماتوپلورا	اندام
نوتوکورد نخاع	اسکلرتوم	مهره‌ها
اکتودرم کرانیال	ستیغ عصبی	مکل

این میان کنش‌های بین سلولی با منشاء تکاملی متفاوت (هتروتیپیک)، بین سلولهای مزانشیم و اپی‌تلیوم اجازه تشکیل غضروف و استخوان را می‌دهد(Edelman-1988). در سال ۱۹۸۳ مطرح کرد سلولهای با سرنوشت غضروفی، خود تمایز نیستند. سلولهای درون جوانه اندام‌ها یا محل تکامل صورت، قبل از اینکه بتوانند عضروفی شوند، بیشترین اثر متقابل را با اپی‌تلیوم دارند. این میان کنش از نوع Short Rang است زیرا فاصله کوتاهی برای انتشار ملکولهای تاثیرگذار وجود دارد.اغلب این ملکولها میانجی‌های ماتریکس هستند(Eritson,1983). میان کنش اپی‌تلیوم ـ مزانشیم برای وادارکردن یا تعیین سرنوشت (Determination) سلولها برای تمایز به اسکلت ، مخصوص گونه‌ای نبوده و مثلاً اپی‌تلیوم جوجه برای القاء مزانشیم گونه‌های دیگر موثر است(طلایی، ۱۳۷۸)،ملکولهایی که واسطه این میان کنش‌ها هستند ، متفاوتند: فاکتورهای رشد، فاکتورهای نسخه برداری، ترکیبات سطح سلول و ECM. مهم‌ترین ترکیبات ECM و سطح سلولی گلیکوکانژوگه‌ها می‌باشند(Cormak,1988) .

گلیکوکانژوگه‌های مهم در رشد و نمو بافت غضروفی

Matrilin : گلیکوپروتئین ماده خارجی سلول (ECM) غضروف است که قبل از این بنام پروتئین ماتریکس غضروف نامیده می‌شد(CMP). در موش کندروسیت‌های ناحیه رسیدگی در صفحه رشد استخوانهای بلند حاوی ژن مربوط به این ماده هستند که در تشکیل رشته‌های کلاژن نوع دوم و سازمان یابی رشته‌ائی آن نقش دارند(Huang,Bark-1999). در کندروسیت‌های اندامها و استرنوم جوجه نیز CMP وجود دارد(Muratoglu,etal-1995). تفاوت غضروف مفصلی و اپی‌فیز خرگوش از نظر بیان گلیکوپروتئینها، از مراحل اولیه رشدونمو آنها مشخص می‌شود.از جمله تفاوت در ماتریلین و انتشار دوگلیکوپروتئین کوچک بنام biglycan و decorin در طی مراحل مختلف رشد و نمو این دو اندام مشاهده می‌شود (Kavanagh,Ashhvertst-1999). بیان ماتریلین را می‌توان بعنوان یک نشانه تمایز سلولی در غضروف معرفی نمود ، زیرا این ماده اختصاصاً در غضروف بیان می‌شود و در اپی‌فیز انسان در چسبندگی سلولی کندروسیت‌ها موثر است (Deak,etal-1999). بین بسیاری از گلیکوکانژوگه‌ها تاثیر متقابل وجود دارد. از جمله در غضروف موش ماتریلین با کلاژن نوع دو و آگریکان مرتبط است(Aszodi,etal-1999).

Aggrecan: مهمترین پروتئوگلیکانی که درکندروسیت‌های با فنوتیپ معمولی و ECM غضروف در حال رشد ونمو وجود دارد (Buschman,etal-1999). در ناحیه c ترمینال این ملکول زنجیره GAG کندروئتین سولفاتی وجود دارد(Luo,etal-1996). یک گلیکوپروتئین با MW=40KDa تجمع و ارتباط بین ملکولهای آگریکان و هیالورنیک اسید را در غضروف ایجاد نموده و از این طریق پایداری این ملکولها را افزایش می‌دهد(Neame,Tapp-1999).

perlecan : یک پروتئوگلیکان هپاران سولفاته (HSPG) بزرگ در ECM غضروف است که با پروتئینها، فاکتورهای رشد و رسپتورها ارتباط متقابل دارد و بر سیگنالهای سلولی تاثیر می‌نهد. در موش غضروفهای فاقد این ماده، عدم سازمان یابی کندروسیتها و نواقص استخوانسازی درون غضروفی را نشان می‌دهند .این ماده احتمالاً در تکثیر کندروسیت‌ها وا یجاد ناحیه هیپرتروفی نقش داشته و در غضروف سازی یک ماد. ضروری است (Arikawa,Watanab-1999) و بعنوان نشانه تمایز غضروف تلقی می‌شود(French,etal-1999).

Thrombospondin : گلیکوپروتئینی در ECM جنین است که ارتباط متقابل سلولها با ECM را میانجی‌گری کرده و در بافتهای مختلف بر مهاجرت و تکثیر سلولی اثر دارد(Iruela,Liska-1993) .تنوع مکانی انواع TSP نشاندهنده نقش مشخص آنها در رشد و تمایز بافتهای غضروف، تاندون و استخوان است(Tucker,etal-1995) TSP-1 . در کندروسیت‌های ابتدایی و TSP-3 در مراحل دیرتر در کندروسیت‌های مرحله تکثیر و هیپرتروفی وجود دارد ، در جوجه محلی اصلی TSP-4 بافت همبند است(Tucker,Hagios-1997) .

Tenascin : تناسین یک گلیکوپروتئین بزرگ خارج سلولی بسیاری از بافتهااست که در دو نوع TN-C و TN-R شناسایی شده و حاوی ناحیه شبه فاکتور رشد EGF است .این ماده در ترمیم و برخی مراحل امبریوژنز مانند تشکیل غضروف و استخوان نقش دارد(Schumacher,1997) . در غضروف آرتیکولار انسان در حالت نرمال مقدار اندکی تناسین وجود دارد. اما در بیماریهای مفصلی از جمله آرتریت روماتوئید مقدار آن افزایش می‌یابد(Salter , 1993) . تناسین ارتباط متقابل اجزاء ECM و سلولها را در جنین همه مهره‌داران تنظیم می‌کند و دارای بیان بسیارکنترل یافته در نواحی مختلف است(Riou,etal-1992 -wehrle,Chiquet-1990). تناسین گلیکوپروتئین بافت‌های همبندی است که در آینده تغییر سرنوشت (remodeling) می‌دهند و بصورت غضروف، استخوان یا درم در می‌آیند، لذا از جمله بر تمایز کندروسیت‌ها و طویل شدن جوانه‌های اندامی تاثیر دارد(Mackie , 1994) . تناسین در مسیر مهاجرت سلولهای ستیغ عصبی یک آغازگر حرکت سلولی است و با فیبرونکتین نیز ارتباط دارد (Tucker ,etal,1994 -Gates,Laywell-1996) .

fibronectin : در غضروف طبیعی در سازمان یابی ECM دخالت دارد. در بیماری استئوآرتریت ازدیاد سنتز فیبرونکتین در کندورسیت‌ها مشاهده می‌شود (Chevalier , 1993) و در بیماریهای غضروف مفصلی ، تغییر موقعیت فیبرونکتین در ECM باعث اثرات شیمیوتاکسی آن روی فیبروبلاست‌هامی‌شود(Mohamed,1991) .

Chondromodulin : گلیکوپروتئین ۲۵ کیلو دالتونی ماتریکس غضروف که از کندروسیت‌های صفحه رشد استخوانها درگاو(Bovine) استخراج شده و دارای عمل ویژه بافتی است. این ماده فقط در غضروف است و دارای نقش ساختمانی نیز می‌باشد(Hiraki,etal-1991) گلیکوپروتئین ۵۵۰ هزار دالتونی دی سولفیدی در

ECM غضروف گاو با نقش انتقال دهندگی فلزات یافت شده است (Fife,Backerman-1993).

Fetuin,α-2HS : گلیکوپروتئینهای هپاران سولفاته القا کننده فعالیت آلکالین فسفاتاز در کندروسیت‌های صفحه رشد اپی‌فیز جوجه هستند که در تمایز غضروف نقش دارند (Ishiwaka,etal-1991). در اپی‌فیز جنین انسانی این مکانیسم در تنظیم فنوتیپ کندروسیت‌ها نقش مهمی دارد (Yang,Schwartz-1991).

Decorin : یک پروتئوگلیکان کوچک از نوع درماتان سولفات است که بوسیله کندروسیت‌ها بیوسنتز می‌شود و در بسیاری پستانداران در ناحیه غضروف مفصلی در مراحل جنینی یا بعد از تولد مشخص شده است (Sawhney,Hering-1991).

Gp-39 : گلیکوپروتئین غضروف انسانی با وزن مولکولی ۳۹ هزار دالتون است که از جمله بزرگترین پروتئینهای کندروسیت‌های مفصلی انسان است. بیان Gp در بیماریهای مفصلی در ارتباط با پاسخ سلولهای کندروسیت به تغییرات محیطی بافت است (Hakala,White-1993).

نقش بیولوژیک بسیاری از پروتئوگلیکانهای ECM و سطح سلول در کندروژنز، بدلیل اتصال آنها به فاکتورهای رشد است. از جمله هپاران سولفات با اتصال به فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF) باعث رشد سلولهای کندیل rat در شرایط In vitro بوده است. در ناحیه ماندیبولار اسکلت Rat مکانیسم اثر FGF بر سلولهای پیش‌ساز اسکلتی طی تشکیل غضروف از طریق ارتباط متقابل این فاکتور با گلیکوپروتئینی بنام سیندیکان است (Molteni,Modrowski-1999) و این نقش را از طریق تحریک بیان گلیکوکانژوگه‌های سلولی، فیبرونکتین، تناسین و نیز ملکولهای CAM_s (N کادهرین) انجام می‌دهد (Chimal,etal-1999) Glypican . پروتئوگلیکان هپاران سولفاته سطح سلولی در مهره‌داران است. موتاسیون ژن GP3 در انسان و موش باعث ناهنجاریهای متعدد می‌شود (سندرم Simpson-Golabi). لذا احتمالاً گلیپیکان (GP3) در تعیین الگوی اندامها Limb Patterning و رشد و نمو طبیعی اسکلت دخالت دارد (Paine ,etal- 2000).

Keratocan : پروتئوگلیکان دارای کراتان سولفات است در غضروف و برخی بافتهای گاو بمقدار اندک وجود دارد (Corpuz,etal-1996).

از جمله مهمترین بیماریهای مشکل آفرین بشری آرتریت روماتوئید (RA) است. گلیکوپروتئین Gp-39

غضروف انسان یک اتوآنتی‌ژن عامل ایجاد این بیماری است (Verheijden,Rijnders-1997) و لذا در ایمینوتراپی از آنتی‌ژن‌های ویژه این ماده می‌توان استفاده نمود.در RA مهار آنزیم متالوپروتئیناز (که در تشکیل گلیکوپروتئینهای ماتریکس غضروف ضروری است) در کندروسیت‌های مفصلی مطرح می‌شود(Nemato,etal-1997). در استئوآرتریت سطح فیبرونکتین تا ۲۰ برابر در غضروف آرتیکولار افزایش می‌یابد(Burton,etal-1995). در برخی تومورهای کندروسارکوما، پروتئوگلیکان p به مقدار زیاد تولید می‌شود(Rosier,etal-1997). موتاسیون ژن EXT که مهارکننده توموری است همراه ایجاد گلیکوپروتئینهای عرضی غشاء از جمله گلیکوزآمینهای هپاران سولفات، باعث ایجاد کندروسارکوما و ناهنجاریهای اسکلتی می‌شود (Mccormick,Leduc-1998). بسیاری اختلالات دیگر اسکلتی مانند کندرودیسپلازی در اثر فقدان پروتئوگلیکان‌ها (آگریکان) هنگام تمایز کندروسیت‌ها ایجاد می‌شود (Wai,Watanabe-1998). در تشکیل انگشتان اکتوپیک جوجه،تغییر موقعیت (deposition) تناسین طی مراحل کندروژنز مشاهده می‌شود (Hurle,Colombatti-1996-Merino,etal-1999). در دو بیماری دیسپلازی اسکلت باکوتاهی اندام‌ها بنام آکاندروپلازی و آکاندروپلازی کاذب ملکولهای کندروئتین سولفات در مراکز پروتئینی که به آن اتصال دارند، نواقص ساختمانی ملکولی را نشان می‌دهند (Finkelstein,etal-1991). کمبود نوعی پروتئوگلیکان غضروفی باعث تولید بیماری Nanomelia در پرندگان (Avian) می‌شود (Velleman,Clark-1992). از این لحاظ تحقیق در مورد تغییرات گلیکوکانژوگه‌ها بعنوان علل ایجاد بسیاری از بیماریهای اسکلتی، توجه دانشمندان را به خود معطوف ساخته است.

اهداف اجرای طرح

تشکیل یک اندام در طی تمایز نیاز به تغییراتی در رفتار سلول دارد. برای پیدایش غضروف بایستی سلولهای مزانشیمی از جایگاه اصلی خود به نقاط دور و نزدیک بدن مهاجرت کنند. اختلال در نحوه مهاجرت و تمایز این سلولها، بد شکل شدن یا عدم تشکیل اندام را بدنبال دارد (Reddi,1998 - Murphy,etal-1999). تغییر شکل، حرکت و عمل سلول بدنبال تغییر انواع ملکولهای مسئول وقایع مورفوژنیک است(۱۴۹). بسیاری از این ترکیبات گلیکوکانژوگه‌ها هستند که اطلاعات تنظیم کننده را به سلولها منتقل کرده، بر رشد، تمایز و مرگ سلولی اثر دارند(Loeb,Susanto-1998). تغییرات تدریجی نوع و مقدار این ملکولها در ارتباط با هر مرحله از رشد و نمو جنینی، اهمیت وجود آنها را در وقایع مورفوژنیک و هیستوژنیک مشخص می‌کند. برخی از آنها در زمان خاصی که در آن یک واقعه بیولوژیک روی می‌دهد بیان می‌شوند و از بین می‌روند (Maclaren,1996). در این میان اهمیت بیشتر مربوط به بخش کربوهیدراتی و بخصوص قند انتهایی (suger residue) آنهاست که در پدیده‌های بیولوژیک و در مسیر رشد و نمو موثرند. مثلاً قند انتهایی ترکیبات سطح سلول مانند فوکوز، اسید سیالیک و گالاکتوز در امبریوژنز مهم هستند (Fazel,etal-1987). مطالعات هیستوشیمیایی تغییرات سطح سلولها در روند رشد و نمو به ویژه از قندهای انتهایی گلیکوپروتئین‌ها استفاده می‌کنند . این ترکیبات بعنوان آنتی‌ژنهای سطح سلول با آنتی‌بادیهای خاص واکنش نشان می‌دهند (Farrer,etal,1996-Baner,1997). قند انتهایی ترکیبات سطح سلول با تکنیک‌های هیستوشیمی لکتین نیز مشخص می‌شوند از جمله در سطح سلولهای T (فاضل، ۱۳۷۳)و سلولهای قلبی در موش ، قند انتهایی در روزهای حساس تمایز افزایش یافته و سپس حذف می‌شود (Fazel,etal-1990). بدلیل نقش حساس این ملکولها در فرآیند طبیعی رشد ، تمایز و مورفوژنز اندام‌ها، این مواد مسئول پاتوژنز بسیاری بیماریهای مربوطه هستند و اختلال در تولید آنها در روند رشد و نمو، منجر به تولید بسیاری حالات پاتولوژیک عفونت‌ها و اختلالات متابولیکی شدید در نوزادان یا مراحل‌بعدی‌زندگی می‌شود (Garcia,Benach,1997-Ruiero,etal,1997-Cliffer,Daugherly,1997-Fife,1991-Ardman,1990) .

با توجه به اهمیت مشخص ترکیبات قندی در رشد و نمو بافتها و میان‌کنش‌های سلولی، مطالعه زمان پیدایش و تغییرات این ملکولها در مراحل مختلف جنینی و تعیین الگوی توزیع طبیعی این ترکیبات، درک پاتوژنز بیماریها

را سهل‌تر خواهد نمود.

اختلالات اسکلتی و مفصلی مشکلات بزرگی را در زندگی اجتماعی انسانها باعث می‌شود ، مانند آرتریت روماتوئید (Verheijden,Rignders-1997) یا ناهنجاریهای متفاوت غضروفی (Rosior,etal-1997-Wai,Watanabe-1998) . لذااز آنجا که بافت غضروف بستر مناسبی برای تحقیق میان کنش‌های سلولی، مهاجرت سلولی و مشاهده تغییرات ملکولی رشد و نمو بافتی است و نیز اطلاعات جنین‌شناسی Rat برای انسان نیز قابل تعمیم است، بر آن شدیم تا با تکنیک‌های هیستوشیمیایی اختصاصی به ردیابی این ترکیبات بپردازیم. هدف ما در این مطالعه، بررسی سنتز زمان بندی شده ترکیبات قندی از ابتدای تشکیل الگوی غضروفی و تجمع سلولهای مزانشیمی تا مراحل انتهایی رشد و نمو غضروف است تا با ارائه توزیع طبیعی این ملکولها و معرفی ویژگی اختصاصی ترکیبات قندی موثر در این فرآیند، پایانه‌های قندی مهم در این وقایع را نمایش دهیم. شاید با توجه به بیولوژی ملکولی فرآیند مورفوژنز و ارگانوژنز، بتوان به درمان بیماریهای ذکر شده برآمد و یا با استفاده از علم جدید مهندسی بافتی (Tissue engineering) از طریق سیگنالهای ملکولی فوق، مسیر شکل سازی Pattern formation اندام‌ها و تشکیل غضروف نابجا(اکتوپیک) را فراهم نمود (Reddi,1998) . لذا برای تعیین دقیق پایانه‌های قندی، از حساس‌ترین و دقیق‌ترین تکنیک‌ها که استفاده از لکتین‌های اختصاصی است، کمک جستیم.

فصل دوم

مواد و روش تحقیق

Materials & Methods

بخش اول : نمونه برداری و تهیه بافت‌های جنینی

تعداد ۳۰ رات باکره از نژاد wistar انتخاب شدند و پس از جفت‌گیری، مشاهده واژنیال پلاک به عنوان روز صفر حاملگی (E_0) (Embryonic day) در نظر گرفته شد. رتها در شرایط استاندارد آب و مواد غذایی، نور (۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی)، رطوبت (۵۰ درصد) و درجه حرارت $22^{\circ}C$ نگهداری شدند. سپس جنین راتهای حامله بر اساس روز حاملگی (E_{12}-E_{20}) تحت بیهوشی عمیق با کلروفرم، از لوله رحمی و پرده‌های جنینی و جفت خارج شدند. از هر رت ۸ جنین بطور متوسط خارج شد. تعداد متوسط آنها در شاخ چپ و راست بترتیب ۵/۸ و ۴/۳ سر بود. نمونه‌های جنینی سالم به فیکساتور فرمالین ده درصد منتقل شدند(پریور - ۱۳۷۲). سپس به کمک غلظتهای مختلف الکل ۵۰ درصد، ۷۰ درصد، ۸۰ درصد، ۹۰ درصد، ۹۶ درصد و ۱۰۰ درصد دوبار تعویض (هرکدام یکساعت) آبگیری شدند و پس از شفاف کردن (در زایلین با سه بار تعویض هرکدام سه ربع) قالب‌های پارافینی تهیه شد و برشهای سریال $5\mu m$ بطور عرضی،جبهه‌ای و سهمی تهیه گردید(فاضل ،۱۳۷۴).

تعدادی از جنینهای مرحله E_{16}-E_{20} بدون انتقال به فیکساتور، برای نمایش کامل اسکلت غضروفی جنین ، جدا شدند. پوست و احشاء حفره شکم بدقت و بطور کامل از بدن خارج شده و سپس جنینها به الکل 95° انتقال یافتند (Mcleod,1980).

بخش دوم : مطالعات هیستو شیمیایی

رنگ‌آمیزی آلسین بلو *pH=1*:

الف) تهیه محلول آلسین بلو: برای ساختن این محلول، مواد زیر را با هم مخلوط کردیم :

۱) آلسین بلو ۶ گرم

۲) اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال ۱۰۰ سی سی

ب) روش کار رنگ‌آمیزی بافتی:

۱ - آبدهی مقاطع پس از پارافین زدایی در زایلین،با استفاده از الکل ۱۰۰° (دوبار تعویض)، الکل ۹۰°، ۹۶°، ۷۰°، ۵۰° و آب مقطر (هر یک ۵ دقیقه) انجام گرفت .

۲ - رنگ‌آمیزی بمدت ۳۰ دقیقه در محلول آلسین بلو انجام شد .

۳ - سریعاً در محلول اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال شستشو شدند .

۴ - آبگیری با کاغذ خشک کن انجام شد .

۵ - آبگیری مقاطع در الکل، شفاف‌کردن بوسیله زایلین و سپس مونته کردن با چسب انتلان صورت گرفت (Drury,1980).

رنگ‌آمیزی پاس ـ آلسین بلو ۲/۵=*pH*

الف) تهیه محلول‌ها:

A- محلول آلسین بلو با pH=۲/۵ شامل

۱- آلسین بلو ۰/۵ گرم

۲- اسید استیک ۳ سی سی

۳- آب مقطر ۱۰۰ سی سی

B- محلول اسید پریودیک ۱ درصد

C- محلول شیف شامل :

۱ - فوشین بازی ۱ گرم

۲ - آب مقطر جوشان ۲۰۰ سی سی

پس از سرد شدن این محلول، آن را صاف کرده، یک شب در حرارت آزمایشگاه در شیشه تیره نگه داشتیم . سپس با یک گرم زغال فعال charcol، محلول را بی‌رنگ نمودیم .

D- محلول هماتوکسیلین آهن وایگرت

هماتوکسیلین ۱ گرم

محلول ۱)

بخش پایان نامه

۱ - الکل مطلق ۱۰۰ سی سی

۲ - محلول ۳۰ درصد کلرید آهن بدون آب ۴ سی سی

محلول ۲)

۱ - اسید کلریدریک غلیظ ۱ سی سی

۲ - آب مقطر ۹۵ سی سی

محلول کار: حجم‌های مساوی از محلول شماره ۱ و ۲ را درست بلافاصله قبل از شروع کار، با هماتوکسیلین مخلوط کردیم .

ب) روش کار رنگ‌آمیزی بافتی :

۱ - آبدهی مقاطع بافتی مانند روش قبلی انجام شد.

۲ - رنگ‌آمیزی به مدت ۳۰ دقیقه در آلسین بلو pH=۲/۵ صورت گرفت.

۳ - شستشو در آب جاری و سپس با آب مقطر انجام شد.

۴ - مقاطع ۵ دقیقه در اسید پریودیک قرارگرفتند .

۵ - ۵ دقیقه شستشو در آب جاری و بعد در آب مقطر صورت گرفت .

۶ - سپس مقاطع ۵ دقیقه در محلول شیف قرارگرفتند .

۷ - ۵ دقیقه در آب جاری شستشو انجام شد.

۸ - رنگ‌آمیزی مقاطع به مدت ۵ دقیقه در محلول کارهماتوکسیلین صورت گرفت .

۹ - آبگیری، شفاف‌سازی و مونته کردن مقاطع مشابه روش قبل انجام گرفت (Bradbury 1990).

رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو (pH = ۴/۵):

الف) تهیه محلول‌ها:

A - محلول آبی تولوئیدین شامل :

۱ - آبی تولوئیدین ۰/۰۲۵ گرم

۲ - با فر ورنول ۱۰۰ سی سی

B- محلول بافر ورنول شامل :

۱ - کریستال سدیم استات ۱۹/۴ گرم

۲ - سدیم دی استیل باربیتورات (ورنول) ۲۹/۴ گرم

۳ - آب مقطر ۱۰۰۰ سی سی

مقادیر مشخص موارد فوق درست قبل از رنگ‌آمیزی با هم مخلوط شده و سپس تنظیم pH صورت گرفت.

تنظیم pH محلول: با استفاده از اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال و دستگاه pH متر دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ انجام شد.

ب) روش کار رنگ‌آمیزی بافتی :

۱ - آبدهی مقاطع مطابق روش معمول انجام شد .

۲ - رنگ‌آمیزی مقاطع بمدت ده ثانیه در محلول آبی تولوئیدین صورت گرفت .

۳ - آبگیری با کاغذ خشک کن انجام گردید .

۴ - آبگیری، شفاف سازی ، مونته کردن مطابق روش قبل انجام شد (عرب ،۱۳۷۸) .

بخش سوم : روش Lectin Histochemistry هیستوشیمی لکتین

الف) تهیه محلول *PBS (Phosphote Buffer Solution)*

محلول ذخیره *(Stock sol.)* : برای ساختن این محلول به روش زیر عمل می‌کنیم.

۱ـ سدیم کلراید (Sodium chloride) ۷۲ گرم

۲ـ فسفات هیدروژن سدیم (Sodiym Hydrogen phosphate) ۱۴/۸ گرم

۳ـ فسفات دی هیدروژن پتاسیم (Potasium Dihydrogen phosphate) ۴/۳ گرم

برای ساخت محلول ذخیره PBS مقادیر گفته شده فوق را در دو لیتر آب مقطر حل نمودیم . عمل حل کردن بوسیله هم‌زن مغناطیس انجام گرفت .

توجه: برای تهیه محلول کار PBS با غلظت ۰/۱M، دویست میلی‌لیتر از محلول فوق را به حجم یک لیتر رسانده و مواد زیر را به آن اضافه کردیم :

۱ -کلرورمنیزیوم ۰/۰۲ گرم

۲ -کلرورمنگنز ۰/۰۲ گرم

۳ -کلرورکلسیم ۰/۰۵ گرم

pH محلول حاصله ۶/۸-۶/۶ بود .

ب) تهیه محلول لکیتن *(PNA)*

۱- برای حل کردن ۱mg لکتین PNA، ابتدا یک میلی‌لیتر محلول PBS_c را به داخل ظرف لکتین به آرامی تزریق نمودیم (از به هم زدن سریع آن اجتناب شد).

۲- یک سی‌سی محلول فوق را به حجم بیست سی‌سی رسانده، غلظت حاصله ۵۰μg/ml بود.

۳- برای جلوگیری از خراب شدن لکتین ۲۰ سی‌سی محلول فوق را به چهل لوله آزمایش در حجم‌های ۰/۵ میلی‌لیتر تقسیم و آنها را در فریزر نگهداری نمودیم .

۴- برای تهیه محلولهای کار لکتین بعد از خارج کردن یکی از لوله‌های لکتین از فریزر، آن را با محلول PBS_c به حجم ۵ میلی‌لیتر رساندیم. غلظت لکتین در محلول کار ۱۰μg/ml بود .

۵- بعد از استفاده از لکتین بلافاصله آن را به یخچال برگرداندیم (قسمت فوقانی یخچال).

ج)تهیه محلول *DAB/H_2O_2*

۱- به کمک دستکش و ماسک در زیر هود آزمایشگاه مقدار ۰/۰۳gr از DAB (دی آمینوبنزوئیدین) را در صد میلی‌لیتر محلول PBS به آرامی حل کردیم ۰

۲- سپس محلول را فیلتر نمودیم .

۳- بلافاصله قبل از استفاده به کمک میکروپی‌پت مقدار ۲۰۰ میکرولیتر محلول H_2O_2 اضافه کردیم. بعد از مدتی رنگ محلول حاصله قهوه‌ای کم رنگ و تدریجاً به شدت رنگ افزوده شد.

۴- محلول اضافی ، بعد ازکار بلافاصله تخلیه و با آب اضافی به طورکامل شستشو شد (حدود نیم‌ساعت شیر آب باز بود) (Bradbury,1990).

د) تهیه محلول آلسین بلو pH=2.5 روش تهیه آن قبلاً گفته شد .

ه) روش کار رنگ‌آمیزی با لکتین :

۱ـ مقاطع پنج میکرونی را به روش معمول بافت‌شناسی آبدهی کردیم (بهتر است تمام محلولها تازه باشند).

۲ـ برشها را بمدت ۳۰ دقیقه در محلول PBS شستشو دادیم .

۳ـ تعدادی از برشها را بمدت دو ساعت در مجاورت لکتین PNA(10μg/ml) و بقیه را در مجاورت لکتین SBA و دیگر لکتین‌ها قرار دادیم .

۴ـ مقاطع را بمدت ۳۰-۲۰ دقیقه در محلول PBS به آرامی شستشو دادیم .

۵ـ مقاطع را بمدت ۱۰ دقیقه در محلول DAB/H_2O_2 قرار دادیم.

۶ـ مقاطع را بمدت ۱۰ دقیقه در آب جاری شستشو دادیم .

۷ـ مقاطع بمدت ۵دقیقه درمحلول آلسین بلو pH=2.5 جهت رنگ آمیزی مکمل Counter Stain قرارگرفتند.

۸ـ شستشو در آب جاری انجام شد .

۹ـ مراحل معمول آبگیری، شفاف‌سازی و مونته کردن صورت گرفت (Leathman,1983)

لکتین‌ها با لطف و مساعدت دانشکده پزشکی مشهد و از شرکت Sigma تهیه شدند و قبل از استفاده با آنزیم پراکسیداز (Horse radish peroxidase)متصل (Conjugate) گشتند. این آنزیم پس از تاثیر DAB/H_2O_2 (بعنوان عامل ایجاد رنگ یا کروموژن) با پراکسیداز واکنش داده و با ظهور رنگ قهوه‌ای نقطه اثر لکتین را در بافتها مشخص نمود. مقاطع رنگ‌آمیزی شده فوق برای تمام رنگ‌آمیزی‌ها توسط دو نفر (مجری و همکار) و با نظارت استاد راهنما از نظر شدت رنگ‌آمیزی درجه بندی و مورد مطالعه قرار گرفتند. جدول زیر راهنمای درجه‌بندی شدت رنگ‌آمیزی برای روشهای معمول هیستوشیمی و هیستوشیمی لکتین است (Gong,1997) .

جدول شماره ۲ ـ راهنمای درجه‌بندی شدت رنگ‌آمیزی برای روش‌های هیستوشیمی

رتبه‌ها	توضیح
-	هیچ رنگی مشاهده نشد
+	شدت رنگ بسیار کم
++	شدت رنگ کم
+++	شدت رنگ متوسط
++++	شدت رنگ زیاد
+++++	شدت رنگ خیلی زیاد

بخش چهارم : روش رنگ‌آمیزی آلسیان بلو ـ آلیزارین رد S

برای نشان دادن غضروف در کل بدن جنین رت (بدون تهیه برش) از این روش استفاده شد .

الف) تهیه محلولهای مورد نیاز:

۱ـ Alcian blue 8GX ۰/۳ درصد در اتانول ۷۰ درصد (محلول ذخیره)

۲ـ Alizarin redS ۰/۱ درصد در اتانول ۹۵ درصد (محلول ذخیره)

۳ـ KOH آبی یک درصد

۴ـ محلول گلیسیرین ۲۰ درصد در KOH آبی یک درصد :برای تهیه این محلول یک حجم گلیسیرین را با چهار حجم KOH آبی یک درصد مخلوط کردیم .

۵ـ محلول گلیسیرین ۵۰ درصد در KOH آبی یک درصد : یک حجم گلیسیرین را با یک حجم KOH آبی یک درصد مخلوط نمودیم .

۶ـ محلول گلیسیرین ۸۰ درصد در KOH آبی یک درصد : چهار حجم گلیسیرین با یک حجم KOH آبی یک درصد مخلوط شد .

ب) روش کار:

برای جنینهای E_{17}-E_{20} پس از تثبیت نمودن نمونه‌ها در الکل ۹۶ درجه به مدت حداقل یک هفته و حداکثر ۳ ماه، نمونه‌ها به مدت دو روز برای حذف چربی و سفت شدن آنها، در آستون قرار گرفتند. سپس محلول رنگ‌آمیزی به طریقه ذیل تهیه و نمونه‌ها سه روز و در درجه حرارت ۳۷ درجه درین محلول قرار گرفتند.

روش تهیه رنگ: یک حجم آلسیان بلو ۰/۳ درصد، یک حجم آلیزارین - رد S ۰/۱ درصد، یک حجم اسیداستیک گلاسیال و هفده حجم اتانول ۷۰ درصد به خوبی با هم مخلوط شده، به ازای ده برابر حجم هر جنین از این محلول رنگی استفاده گردید.

پس از رنگ‌آمیزی ، نمونه‌ها بوسیله آب مقطر شستشو و بمنظور شفاف کردن بلافاصله درمحلول KOH آبی یک درصد قرار گرفتند. پس از ۴۸-۱۲ ساعت نمونه‌ها از محلول پتاس خارج و بترتیب در محلول گلیسرین ۲۰٪ و ۵۰٪ و ۸۰٪ بسته به اندازه جنین و تعداد جنین‌ها در هر ظرف بمدت ۴-۲ هفته منتقل شدند. سپس جهت نگهداری، کلیه نمونه‌ها به گلیسرین خالص انتقال یافتند (Mcleod,1980) .

بخش پنجم : تجزیه و تحلیل آماری

درکلیه لامهای رنگ‌آمیزی شده به روش هیستو شیمیائی ،درجه بندی شدت رنگ تعیین و برای هر نوع رنگ جدول مربوطه تهیه شد. سپس اطلاعات به کامپیوتر وارد و توسط آنالیز واریانس غیرپارامتری کروسکال- والیس ، Freidman و Wilcoxon توسط برنامه SPSS، تجزیه و تحلیل آماری انجام شد. آنالیز داده‌ها همچنین توسط تست دوطرفه Mann-Whitney نیز صورت گرفت.

سپس جداول میانگین شدت رنگ تهیه و رسم گراف‌های مربوطه توسط HG انجام شد(Bland,1995) .

نتایج در جداول ۱-۳ الی ۱۳-۳ و نمودارهای ۱-۳ الی ۱۷-۳ مشاهده می‌شوند.

عکس‌برداری:

برای این منظور از فتومیکروسکوپ دوربین‌دار با فیلم‌های Konica 135/36 ASA 100 استفاده شد. تمام نگاتیوها در یک محل چاپ گردید.

فصل سوم

نتایج

Results

نتایج حاصل از مطالعات را در چند دسته تقسیم بندی نمودیم :

بخش اول: گزارش ماکروسکوپی رنگامیزی آلیزارین قرمز ـ اس، آلسین بلو در جنین کامل رت

بخش دوم: گزارش بافت‌شناسی روند رشد ونمو بافت غضروفی

بخش سوم: گزارش روشهای هیستوشیمیایی روند رشد ونمو بافت غضروفی

بخش چهارم: گزارش روشهای هیستوشیمیایی لکتین در روند رشد ونمو بافت غضروفی

بخش اول : گزارش ماکروسکوپی رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز اس ـ آلسین بلو

به کمک این روش در جنینهای کامل موش Whole mounts نواحی استخوانی با آلیزارین به رنگ قرمز و نواحی غضروفی با آلسین‌بلو به رنگ آبی درآمدند.

جنین کامل ۱۵ روزه در رت: جمجمه بصورت کاملاً غضروفی تشکیل شده بود. همچنین اندام‌های حرکتی، مهره‌ها، دنده‌ها، آرواره و لگن بصورت غضروفی و به رنگ آبی مشاهده شدند.

جنین کامل ۱۷ روزه در رت: در ناحیه سر و تنه نقاط استخوانی قرمز رنگ مشاهده شدند که شامل استخوان‌های ماندیبول، ماگزیل، نازال، فرونتال، پاریتال و قسمتی از تمپورال، مهره‌های گردنی، قسمت پروکسیمال دنده‌ها، بخش‌های میانی یا دیافیز بازو و ساعد بودند.تیغه‌ها یا ترابکولهای استخوانی در قطعات استخوانی ناحیه سر دیده شدند. بخشهای غضروفی در قطعه پس سری، مهره‌های سینه‌ائی، قسمت عمده دنده‌ها و انگشتان مشخص و به رنگ آبی بودند.در ناحیه کمر و لگن، قسمتهای استخوانی شده شامل لگن، مهره‌های کمری، بخش میانی (دیافیز) تنه استخوانهای ران و ساق بودند. مهره‌های دمی، انگشتان و بخشهایی از مهره‌های لگن غضروفی بودند. (تصویر ۱-۳)

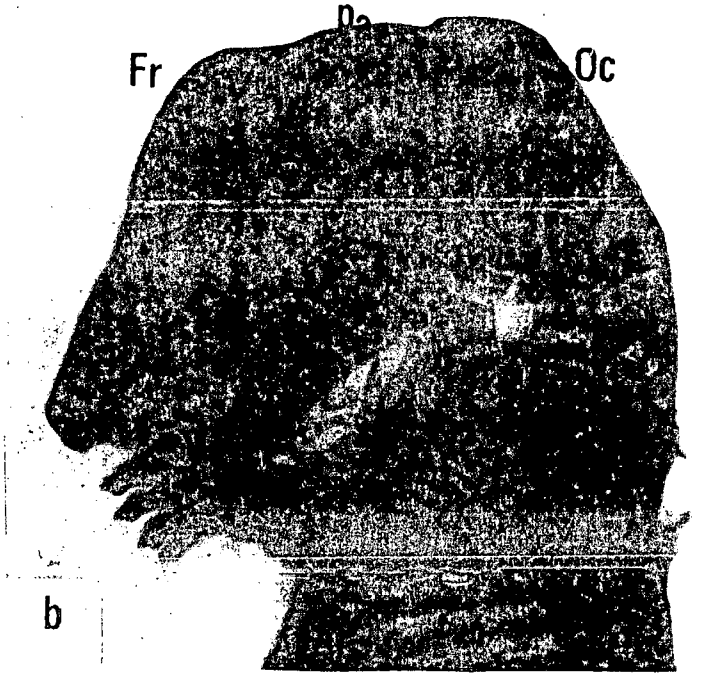
جنین کامل ۱۹ روزه در رت: ناحیه گردن و تنه نشان دهنده پیشرفت تشکیل بافت استخوانی مهره‌های گردنی و سینه‌ائی، قسمتی از استخوان شانه، دنده‌ها و دیافیز بازو و ساعد بوده و به رنگ قرمز دیده شدند. در تنه و لگن نیز ناحیه نیم‌لگن، مهره‌ها و قسمتهای وسیعی از دیافیز هر اندام قرمز دیده شد. در سر، بخشهای ماندیبول، ماگزیل و قسمت زیادی از پس سر قرمز دیده شدند.

قالب غضروفی کارپ و بندهای متاکارپ در انگشتان کاملاً آبی رنگ بودند. قطعات سازنده مچ نیز همینطور بودند. (تصویر ۲-۳).

علائم و اختصارات

سلول مزانشیمی	m	آلسین بلو	AB
مانديبول	ma	آنولوس فیبروزوس	AF
قطعه پس سری	Oc	سانتروم	C
منطقه تکثیر	Pr	کارپ	Ca
پری کندریوم	P	کندوروسیت	Ch
پدیکول	Pe	دیسک بین مهره‌ای	D
دنده	R	فمور	F
نخاع	S	فیبولا	Fi
شانه	Sc	قطعه فرونتال	Fr
جناغ	St	منطقه هیپرتروفی	H
ناحیه سینه	T	بازو	Hu
اولنار	Ul	اندام حرکتی	L
تیبیا	Ti	نوتوکورد	n
جسم مهره	VB	قطعه نازال	Na
منطقه غضروفی دارای واکنش	*	نوکلئوس پولپوزوس	NP





تصویر ۱-۳ : جنین کامل رت در روز ۱۷ جنینی رنگامیزی آلیزارین رد اس – آلسین بلو

a : نمای طرفی کل بدن (x ۳) b ناحیه سر و تنه (x ۶)



تصویر ۲-۳ : جنین کامل رت در روز ۱۹ جنینی رنگمیزی آلیزارین رد اس – آلسین بلو

a : نمای طرفی سینه و تنه b : اندام حرکتی (x ۸)

بخش دوم : گزارش بافت‌شناسی روند تکوین بافت غضروفی

۱ـ برش جنین‌های ۱۳-۱۱ روز موش رت

در محل جسم مهره آینده (سانتروم)، درا طراف نوتوکورد سلولهای مزانشیمی اسکلرتوم تجمع مختصری را نشان دادند. در محل آینده اندام‌های حرکتی و دنده‌ها ، تجمع ضعیفی مشاهده شد. تراکم سلولی فوق حاوی سلولهای مزانشیمی ستاره‌ائی شکل بود که بفاصله از هم قرار داشتند. هسته ها به اشکال نامنظم و بسیار تیره بودند . در داخل نوتوکورد نیز سلولهای فعال با هسته‌های مشخص و جدا از هم مشاهده شدند.

۲ـ برش جنین‌های ۱۵-۱۳ روزه موش رت

در اوایل این مرحله، در محل جسم مهره سلولهای مزانشیمی تجمع افزایش یافته داشته و تشکیل بافت پیش‌ساز غضروفی precartilage مهره را دادند. تجمعات سلولی در ناحیه پدیکول مهره و دنده‌ها نیز ایجاد شده بود. تجمع سلولهای پیش‌ساز غضروفی دنده، اندام حرکتی (در بخش پروکسیمال)، قاعده جمجمه و مکل (Meckel) افزایش داشت. جوانه اندام حرکتی فوقانی Limb bud بصورت پاروئی شکل قابل مشاهده‌بود که در این زمان از یک تنه مزانشیمی متراکم و اکتودرم سطحی پوشیده شده بود.بتدریج با پیشرفت رشدونمو ، بطور پراکنده سلولهای کندروبلاست کروی شکل از سلولهای مزانشیم تمایز یافتند.

۳ـ برش جنین‌های ۱۷-۱۵ روزه موش رت

در ابتدای این دوره کندروبلاست‌های متعددی تمایز یافتند. در محل جسم مهره، منطقه غضروفی حاوی کندروبلاست‌های متعدد با هسته تیره و بزرگ و ماتریکس خارج سلولی مشخص بود. بتدریج تااواخر این دوره بخشهای زائده عرضی، پدیکول و لامینا تشکیل یافته بود. اکثر سلولهای غضروفی در مرحله استراحت یا تکثیر بودند. تعدادی از سلولهای اطراف نوتوکورد بزرگ‌تر شده با سیتوپلاسم شفاف خود حالت هیپرتروفی را مشخص کردند. لذا مراحل مختلف تمایز سلولهای غضروفی برای رسیدن به سرنوشت استخوانی آغاز شده بود. در داخل نوتوکورد برخی از سلولها در حالت تحلیل بوده و حاشیه سفید رنگی را در داخل نوتوکورد ایجاد کردند. در اندام حرکتی و دنده‌ها قالب غضروفی تشکیل شده و حاوی کندروبلاست‌های در حال تکثیر و

ماتریکس فراوان بود. در اندام حرکتی فوقانی، ناحیه اپی‌فیز در دو انتها، مرحله استراحت و تکثیر کندروبلاست‌ها را نشان می‌داد و در بخش میانی اندام در دیافیز، تعدادی از سلولها وارد مرحله هیپرتروفی شده بودند. در غضروف کف جمجمه و مکل نیز همین نتایج دیده شد. بافت همبند پری‌کندریوم اطراف اندامهای فوق تشکیل شده بود.

۴ـ برش جنین‌های ۲۰-۱۷ روزه موش رت

در اوایل این دوره بخشهای مختلف ساختمان مهره با تشکیل بخش خلفی آن کامل شده، قالب غضروفی مهره بصورت یکپارچه ملاحظه شد. در بافت غضروفی ، سلولها مراحل مختلف تمایز را نشان داده، مراحل تکثیر،استراحت و هیپرتروفی به خوبی از هم قابل تفکیک بودند. در جسم مهره، ناحیه هیپرتروفی در اطراف نوتوکورد و در زائده عرضی بسیار افزایش یافته بود و اولین مراحل تحلیل بافت غضروفی و تشکیل استخوان مشاهده شد. نوتوکورد در این قسمت بتدریج تحلیل رفته و منطقه تنه یا جسم مهره را تشکیل می‌داد.در فاصله بین دو جسم مهره، در منطقه دیسک بین مهره‌ها، نوتوکورد باقیمانده و بزرگ شده بود،اما در اثرتغییرات تحلیل رونده تقریباً توخالی بنظر می‌رسید. این ساختمان نوکلئوس پولپوزوس (N.P.) یا مرکز دیسک را تشکیل می‌داد. سلولهای غضروفی اطراف .N.P تکثیر یافته و آنولوس فیبروزوس (A.F) دیسک را تشکیل دادند. در اندام حرکتی فوقانی بخش دیافیز دارای ناحیه هیپرتروفی بسیار گسترش یافته بود و اولین نمایش استخوانسازی همراه با تخریب سلولهای ناحیه هیپرتروفی و ظهور تعدادی تیغه‌های استخوانی مشاهده شد. اینجا مرکز ابتدائی استخوانسازی درون غضروفی بود.قسمتهای اساسی اندام حرکتی فوقانی (بازو، ساعد و دست) کاملاً از هم مشخص بود و در دست شیار انگشتان آنها را از هم تفکیک کرده بود. در دنده‌ها و غضروف قاعده جمجمه مراحل تمایز سلولهای غضروفی و تبدیل به بافت استخوانی (در مرکز تنه اندام‌ها) مشخص بود.

با پیشرفت سن جنین در روزهای ۱۹ تا ۲۱ وسعت نواحی تکثیر و هیپرتروفی کاهش و نواحی استخوان‌سازی درون غضروفی گسترش یافته بود.

بخش سوم : گزارش روشهای هیستوشیمیائی

۱ـ جنین‌های ۱۳-۱۱ روزه موش رت

الف ـ رنگ آمیزی آلسین بلو $pH=۱$

در محل جسم مهره آینده (سانتروم)، در اطراف نوتوکورد، واکنش تجمع سلولهای مزانشیمی به این رنگ بسیار ضعیف بود (+). واکنش (AB) روی نوتوکورد با شدت متوسط (+++)، به رنگ آبی ظاهر شد و سلولهای داخل آن واکنش مشخصی نداشتند. درتجمع سلولهای مزانشیمی اندام حرکتی و دنده واکنش ضعیف و در سایر نواحی تقریباً منفی بود.

ب ـ رنگ آمیزی آلسین بلو $pH=۲/۵$

در محل سانتروم ، سلولهای مزانشیمی با واکنش متوسط (+++) در بخشهایی از درون و سطح سلول‌ها به رنگ آبی مشاهده شدند . واکنش رنگ (AB) روی نوتوکورد شدید بود (++++). سلولهای داخل نوتوکورد با هسته‌های مجزا از هم واکنش متوسط داشتند (تصویر۳a-۳). در تجمع سلولهای مزانشیمی نواحی دیگر، واکنش متوسط مشاهده شد.

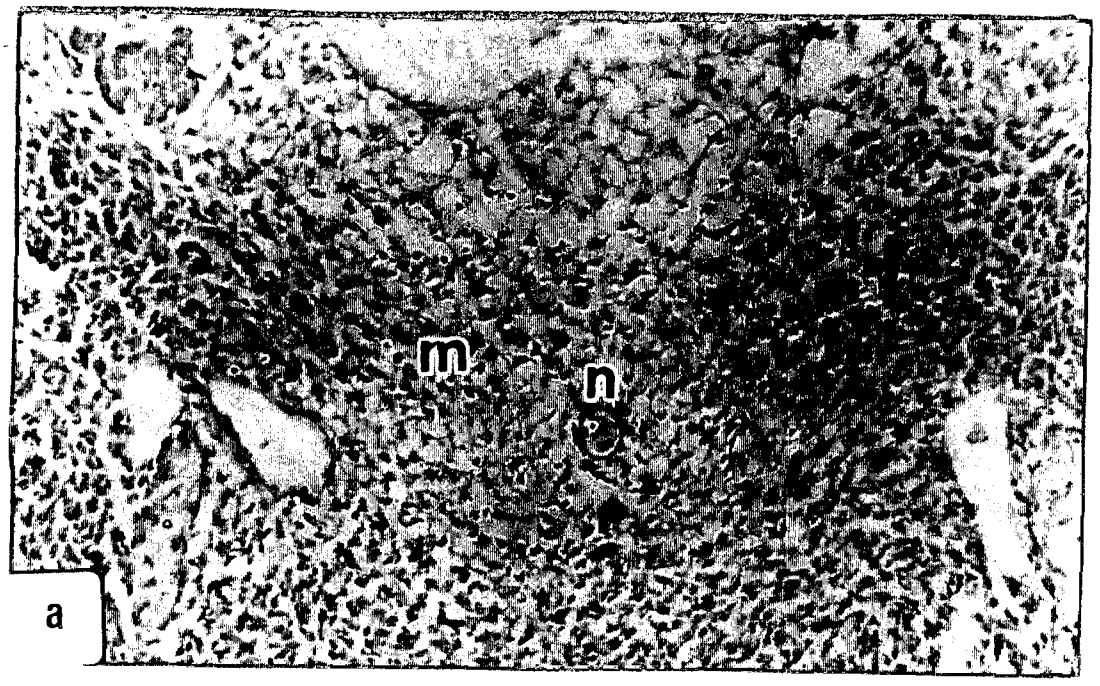
ج ـ رنگ آمیزی پاس ـ آلسین بلو $pH=۲/۵$

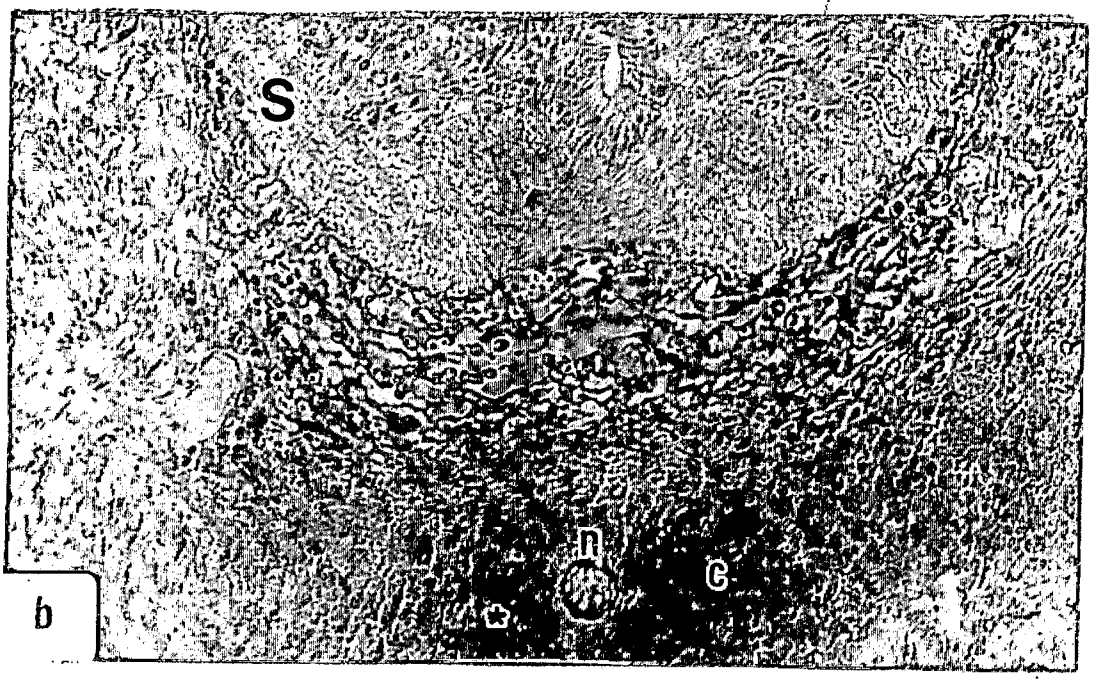
در اطراف نوتوکورد غلافی به رنگ آبی شدید دیده شد. سلولهای مرکز نوتوکورد با هسته‌های مشخص و واکنش متوسط برای PAS به رنگ قرمز بودند. در تجمع سلولهای ناحیه دنده، اندام حرکتی و محل جسم مهره آینده، واکنش متوسط در برابر رنگ پاس، بصورت قرمز رنگ در داخل سلولها دیده شد. واکنش AB در اندامهای فوق متوسط بود .

د ـ رنگ‌آمیزی آبی تولوئیدین

درکلیه نواحی آغاز تجمع سلولهای مزانشیمی ، پاسخ متاکرومازی تقریباً منفی بود. اما دورتادور نوتوکورد تاثیر رنگ با واکنش متاکرومازی متوسط (+++) مشاهده شد.

نتایج بررسی شدت واکنش‌های فوق در جداول ۱-۳ تا ۳-۳ و نیز میانگین شدت رنگ در جداول ۴-۳ تا ۹-۳ مشاهده می‌شوند.





تصویر ۳-۳ : برش عرضی ناحیه جسم مهره (ساکروم)

a : در جنین ۱۲ روزه رت (x ۸۰) AB .pH=2.5 b : در جنین ۱۴ روزه رت (x ۲۵)

کتابخانه دانشکده علوم و تحقیقات
پایان نامه

۲ـ جنین ۱۵-۱۳ روزه موش رت

الف ـ رنگ آمیزی آلسین بلو ۱ = *pH*

در محل جسم مهره در بافت پیش‌ساز غضروفی واکنش متوسط در ECM و سلولها دیده شد. در پدیکول مهره نیز تجمع زیاد سلولهای مزانشیمی با واکنش متوسط در برابر AB مشاهده شد.بافت بین دو مهره پاسخ مختصری داشت (+). روی نوتوکورد واکنش شدید دیده شد. در محل دنده‌ها، بافت پیش‌ساز غضروفی دنده با واکنش متوسط در برابر AB دیده شد.در جوانه اندام حرکتی فوقانی، پیش ساز غضروفی دارای واکنش متوسط در بخش پروکسیمال بود. سلولهای مرکزی این بخش پاسخ شدید داشتند.در پیش ساز غضروفی کف جمجمه نیز واکنش متوسط و در پیش‌ساز غضروفی مکل واکنش ضعیف دیده شد.

قسمتی از واکنش‌ها در ECM و سطح سلولها و قسمتی در درون سلولها مشاهده شد.

ب ـ رنگ آمیزی آلسین بلو ۲/۵ = *pH*

در پیش‌ساز غضروفی جسم مهره، با تمایز برخی کندروبلاست‌ها، شروع غضروفسازی با واکنش شدید در ECM و سطح سلولها همراه بود . در پدیکول مهره نیز همینطور بود. غلافی از اثر بسیار شدید رنگ (+++++) اطراف نوتوکورد بصورت ضخیم دیده شد. (تصویر۳b-۳).در محل دنده‌ها سلولهای پیش‌ساز غضروفی واکنش شدید داشتند که شدت آن به سمت محیط کاهش می‌یافت.در جوانه اندام حرکتی فوقانی ، در بخش پروکسیمال پیش‌ساز غضروفی واکنش شدید دیده شد. واکنش سطح سلولی در همه موراد بیشتر از دیگر اجزاء بافتی بود.

ج ـ رنگ آمیزی پاس - آلسین بلو ۲/۵ = *pH*

در محل مهره‌ها، در تجمع سلولی پیش ساز غضروفی جسم مهره واکنش به AB در ECM و سطح سلول شدید (++++) بود. سلولها دارای واکنش تقریباً شدید PAS بودند . این واکنش‌ها بتدریج که از نوتوکورد دور می‌شدیم باکاهش تجمع سلولی، کمتر می‌شد. در پیش‌ساز غضروفی پدیکول مهره همین واکنش دیده شد. در داخل نوتوکورد سلولها واکنش شدید PAS را نشان دادند.

در محل دنده‌ها: در برش طولی ، در بخش مرکزی پیش‌ساز غضروفی واکنش بیشتر مشخص بود. در پاسخ به AB واکنش شدید خارج سلولی و در برابر PAS در داخل سلولها واکنش تقریباً شدید مشاهده شد (تصویر۴a-۳).

در جوانه اندام حرکتی فوقانی در بخش پروکسیمال ، واکنش شدید برخی قسمتها در برابر AB و واکنش متوسط سلولها در مقابل PAS مشاهده شد . بتدریج به سمت حاشیه و دیستال اندام اثرات فوق کم می‌شد(تصویر۴b-۳) .

د ـ رنگ آمیزی آبی تولوئیدین

در اکثر نواحی تجمع سلولهای پیش‌ساز غضروفی ، واکنش متاکرومازی مشاهده شد. این واکنش در ECM ضعیف و در برخی سطوح سلولی متوسط بود. اطراف نوتوکورد رانواری از واکنش متاکرومازی شدید احاطه کرده بود. واکنش متاکرومازی در داخل سلولها منفی بود. در پیش‌ساز غضروفی مکل و کف جمجمه تقریباً واکنش منفی بود. (تصویر۵a-۳).

نتایج بررسی شدت واکنش‌های فوق در جداول ۱-۳ تا ۳-۳ و نیز جداول میانگین شدت رنگ از شماره ۴-۳ تا ۹-۳ آمده است.

۳ـ جنین‌های ۱۷-۱۵ روزه رت

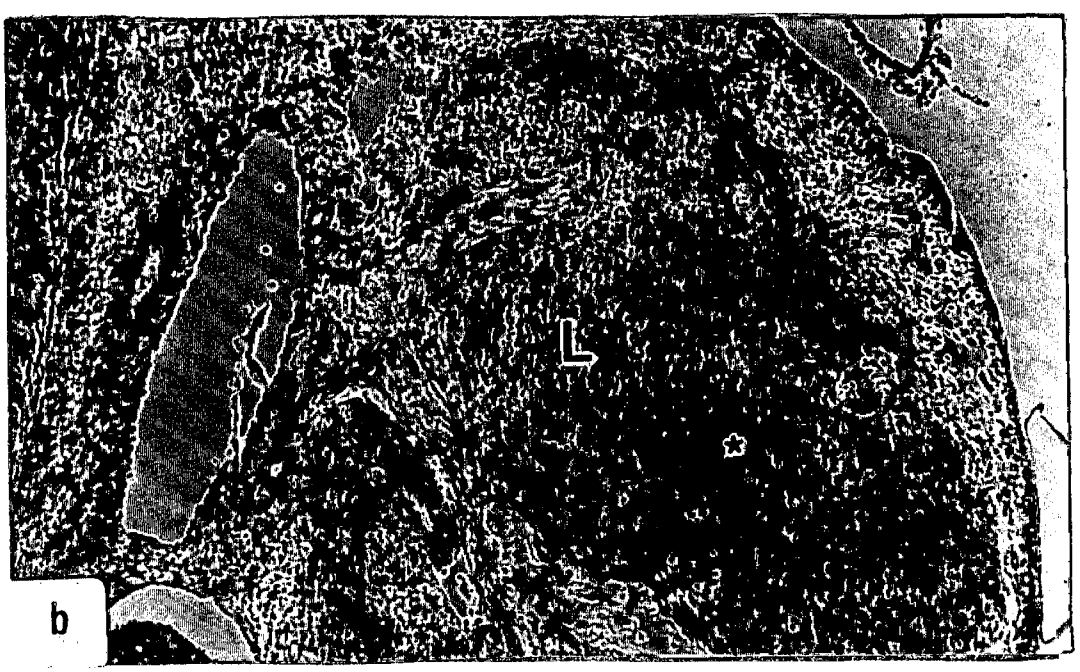
الف ـ رنگ آمیزی آلسین بلو (pH=۱)

در محل جسم مهره فعالیت کندروبلاست‌ها پاسخ مشخص و شدید رنگ را ایجاد نمود . بخشهای مختلف مهره به جز بخش خلفی، واکنش مشابه داشتند. واکنش منطقه تکثیر یک درجه کمتر بود و در ناحیه هیپرتروفی واکنش بیشتر مربوط به ECM و سطح سلولها بوده، واکنش داخل سلولی ضعیف بود. (تصویر۵b-۳).

اطراف نوتوکورد غلاف نازکی از رنگ شدید آبی مشاهده شد. در داخل نوتوکورد بدلیل تحلیل سلولی ، حاشیه سفید رنگی ایجاد شد. قالب غضروفی دنده کاملاً مشخص شده بود و واکنش شدید رنگ در منطقه هیپرتروفی و فضای خارج سلولی آنها مشخص‌تر بود.اندام حرکتی فوقانی در ناحیه هیپرتروفی دیافیز واکنش شدید را در ECM و سطح سلولها نشان داد . شدت واکنش منطقه تکثیر و استراحت کمتر بود و در همه نواحی واکنش داخل سلولی ضعیف‌تر بود.

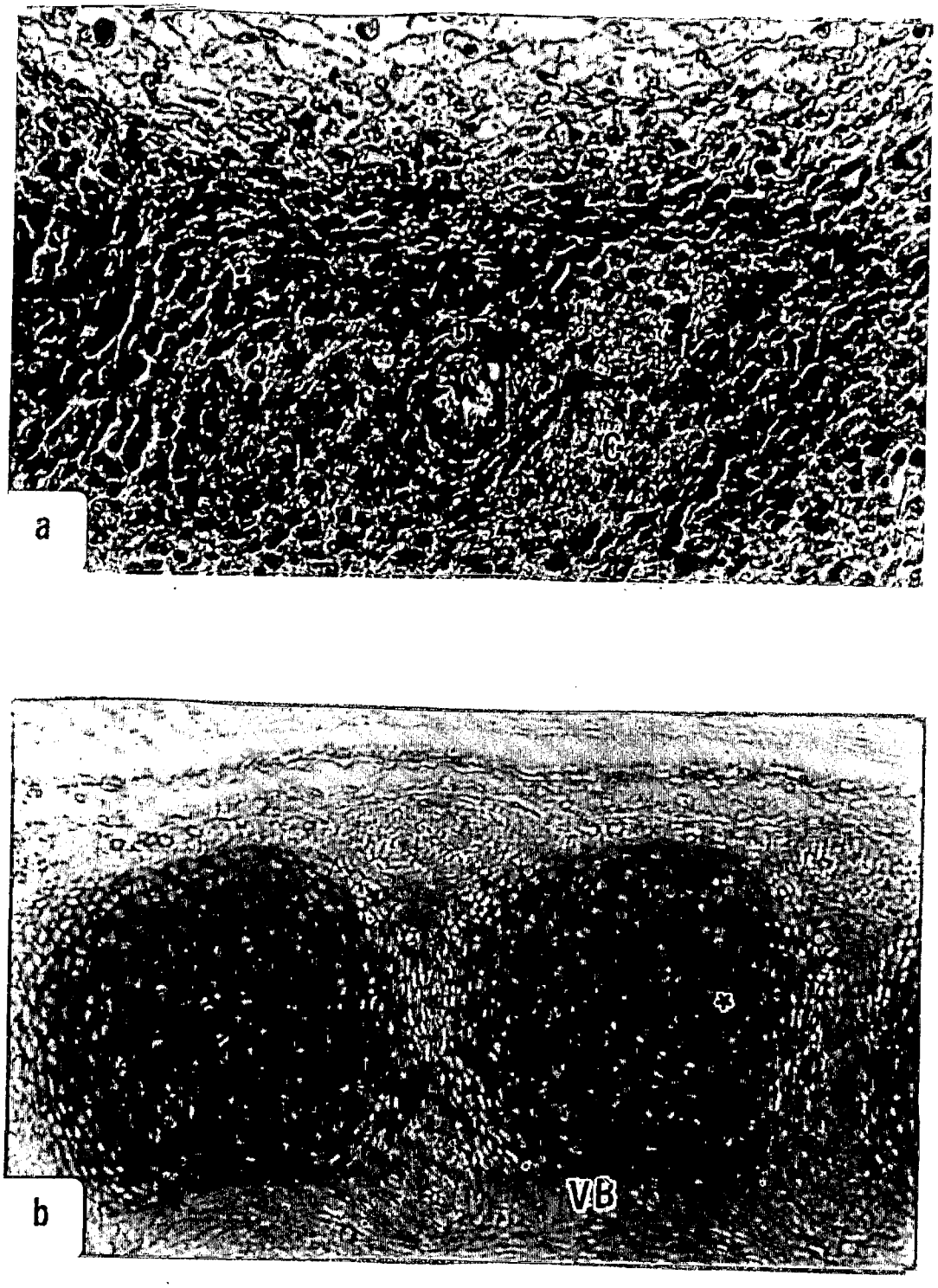
قاعده جمجمه : در نواحی تکثیر و استراحت واکنش در ECM متوسط و در غشاءها شدید بود.ناحیه هیپرتروفی شدت رنگ بیشتری را بخصوص در سطح سلولها نشان داد. غضروف مکل نیز همین نتایج را داشت. بافت پری‌ـ کندریوم در همه اندامها تشکیل شده بود اما واکنشی به آلسین بلو pH=1 نشان نداد.





تصویر ۴-۳ : برش سهمی جنین ۱۴ روزه رت (x ۲۵) PASAB

a : در ناحیه دنده ها b : جوانه اندام حرکتی



تصویر ۵-۳ : برش ناحیه جسم مهره a : برش عرضی در جنین ۱۴ روزه رت با واکنش متاکرومازی همراه AB . pH = 1 بود . (x ۱۰۰) b : برشی سهمی جنین ۱۶ روزه (x ۵۰)

ب ـ رنگ آمیزی آلسین بلو ۲/۵ = *pH*

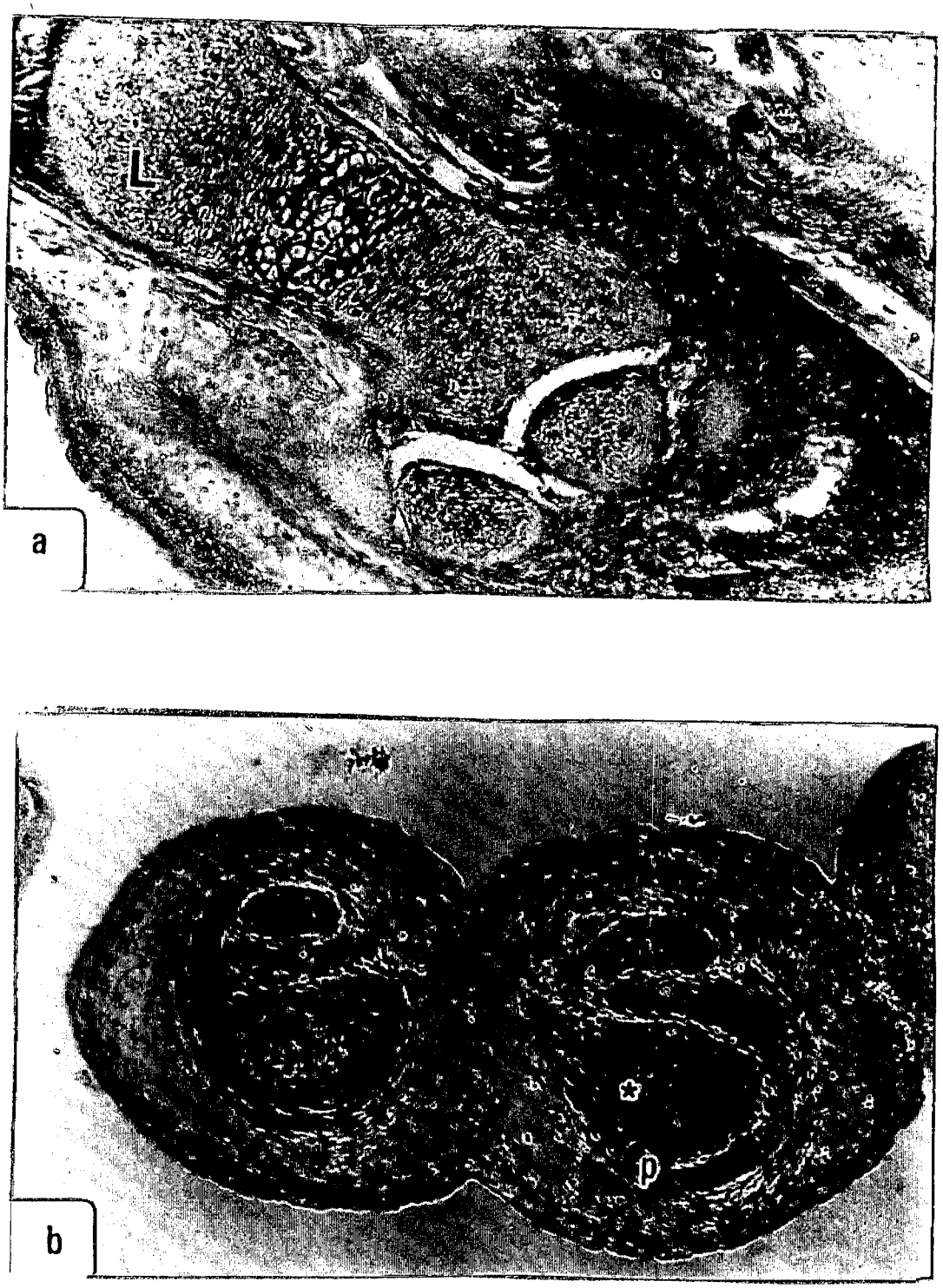
در سانتروم جسم مهره ترشح شدید ماتریکس بوسیله سلولهای غضروفی ، واکنش بسیار شدید (+++++) رنگ را در ECM و بخصوص سطح سلولها بهمراه داشت. در محل مجاور نوکلئوس پولپوزوس، سلولهای ناحیه هیپرتروفی واکنش داخل سلولی ضعیفی داشتند. قالب غضروفی پدیکول، لامینا و زائده عرضی مهره واکنشی مشابه جسم مهره نشان دادند.غلاف رنگی دور نوتوکورد با واکنش بسیار شدید در برابر AB دیده شد. در دنده‌ها در ناحیه هیپرتروفی واکنش سطوح سلولی بسیار شدید (+++++) بود. در نواحی غیرهیپرتروفی شدت واکنش کمتر بود.در اندام حرکتی فوقانی، واکنش ناحیه هیپرتروفی بیشتر از بقیه و در حد بسیار شدید و به خصوص در سطح سلولها مشخص‌تر بود (تصویر۶-۳). اما واکنش درون سلولی بسیار ضعیف شده بود. درقاعده جمجمه، در ناحیه هیپرتروفی، ECM و غشاءها فعالیت بسیار شدید AB را مشخص کردند. این واکنش در ناحیه غیرهیپرتروفی ضعیف‌تر بود. در غضروف مکل همین پاسخ دیده شد.در مرحله هیپرتروفی بطور کلی واکنش‌ها مربوط به سطح سلولها و ECM بود و سیتوپلاسم سلولها شفاف بود. در همه نواحی. پری‌کندر واکنش متوسط را به رنگ نشان داد.

ج ـ رنگ آمیزی پاس ـ آلسین بلو ۲/۵ = *pH*

در جسم مهره بخش هیپرتروفی در اطراف نوتوکورد ، واکنش شدید ECM و غشاءهای سلولی را در برابر AB و واکنش متوسط را برای رنگ پاس در داخل سلولها به همراه داشت . در بخشهای هیپرتروفی زائده عرضی و پدیکول مهره نیز همینطور بود. در نواحی در حال استراحت و تکثیر واکنش پاس یک درجه بیشتر بود.

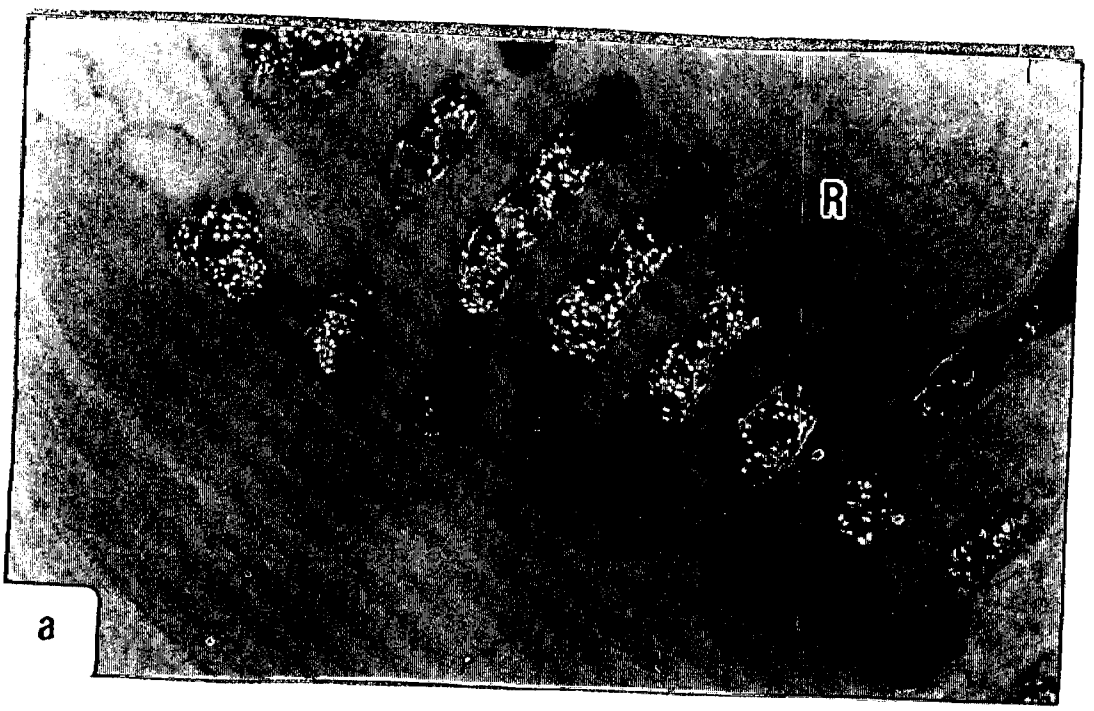
دنده‌ها در نواحی هیپرتروفی واکنش بسیار شدید ECM و بخصوص غشاءها را برای AB نشان دادند. واکنش رنگ پاس فقط درون سلولی و با شدت متوسط دیده شد.در اندام حرکتی فوقانی در نواحی تکثیر، ECM دارای واکنش شدید AB بود. رنگ پاس در داخل سلولهای این ناحیه دارای واکنش شدید اما در ناحیه هیپرتروفی دارای واکنش داخل سلولی کمتری بود. غضروف کف جمجمه، مکل و جناغ نتایج مشابهی را داشتند.

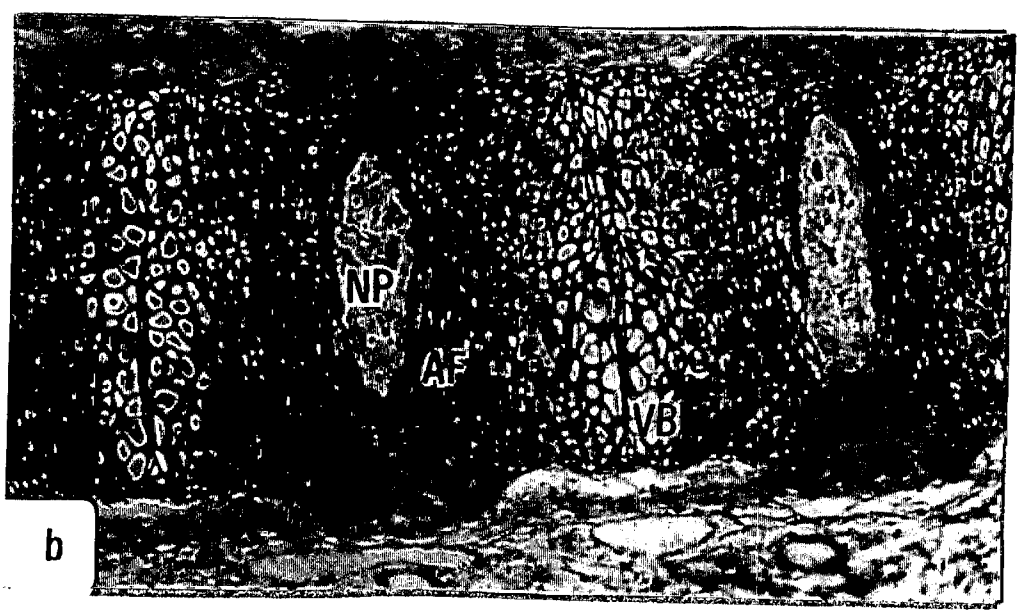
پری‌کندریوم ضخیم همه اندام‌ها دارای واکنش متوسط در درون سلولها برای پاس و واکنش متوسط ECM و رشته‌ها در برابر AB بود.



تصویر ۶-۳ : برش اندام حرکتی در جنین ۱۶ روزه رت (x ۲۵) AB . pH =2.5

a : ناحیه غضروف بازو در برش طولی b : برش عرضی انگشتان با نواحی غیر هیپرتروفی





تصویر ۷-۳ : برش سهمی جنین ۱۷ روزه رت a : ناحیه دنده ها (x ۱۰) AB . pH =1

b : جسم مهره و دیسک بین مهرها در منطقه نوتوکورد (x ۴۰) AB . pH =2.5

د ـ رنگ آمیزی آبی تولوئیدین

در نواحی مختلف تمایز سلولهای غضروفی واکنش رنگ یکسان نبود ـ در کلیه بافتهای غضروفی پاسخ متاکرومازی در مرحله تکثیر سلولها شدید تا بسیار شدید بود و منحصر به ناحیه ECM و سطح سلولها می‌شد. در ناحیه هیپرتروفی واکنش رنگ یک درجه کاهش داشت. اطراف نوتوکورد واکنش شدید و در پری کندریوم همه اندامها واکنش منفی بود.

نتایج مطالعه شدت پاسخ‌های فوق در جداول ۱-۳ تا ۳-۳ و میانگین شدت واکنش‌ها در جداول ۴-۳ تا ۹-۳ آمده است.

۴ـ جنین‌های ۲۰-۱۷ روزه

الف ـ رنگ آمیزی آلسین بلو ۱=pH

مهره: نواحی تکثیر سلولهای غضروفی جسم مهره، واکنش شدیدی در برابر رنگ نشان دادند. در محل نوکلئوس پولپوزوس کندروبلاست‌ها وارد مرحله هیپرتروفی شدید شده، واکنش بسیار شدید رنگ را بخصوص در سطوح سلولی نشان دادند. درون نوتوکورد سلولها تحلیل رفته و واکنش ضعیفی به AB داشتند اما غلاف آبی شدید همچنان دور نوتوکورد دیده می‌شد. در برش طولی لابلای جسم مهره‌ها، ساختمان کاملاً غضروفی دیسک بین مهره‌ها دیده شد. واکنش AB در ECM آنها متوسط و در برخی از غشاءهای سلولی شدید بود.

دنده: در ناحیه هیپرتروفی واکنش رنگ بخصوص در سطوح سلولی شدید بود. واکنش بخشهای تحلیل رفته در ناحیه هیپرتروفی منفی بود و سفید رنگ دیده شدند (تصویر۷a-۳). در اندام حرکتی فوقانی ناحیه هیپرتروفی با واکنش بسیار شدید رنگ در غشاءهای سلولی دیده شد. ECM بدلیل کاهش مقدار، واکنش کمتری داشت. کندروبلاست‌های منطقه تکثیر واکنش ضعیف درون سلولی و واکنش متوسط تا شدید خارج سلولی را نشان دادند. در غضروف قاعده جمجمه مراحل متناوبی از نواحی هیپرتروفی و غیرهیپرتروفی با شدت رنگ متفاوت مشاهده شد. در منطقه هیپروفی واکنش بخصوص در سطوح سلولی شدید بود. غضروف مکل نشان دهنده هیپرتروفی شدید سلولها و واکنش شدید بخصوص در غشاء آنها بود. در کلیه اندام‌ها بافت همبند پری‌کندریوم واکنش بسیار اندک تا منفی نشان داد.

ب ـ رنگ آمیزی آلسین بلو ۲/۵ = pH

در ناحیه دیسک بین مهره‌ها در سلولهای غضروفی اطراف نوتوکورد که در حال تراکم برای تولید آنولوس فیبروزوس (AF) بودند، واکنش در ECM متوسط و در غشاء کندروبلاست‌ها شدید بود. در جسم مهره در سلولهای غضروفی، مراحل رشد و نمو تا رسیدن به مرحله استخوانسازی مشخص بود . در حالت هیپرتروفی واکنش بسیار شدید AB در ECM و بخصوص غشاء سلولها دیده شد(تصویر۷b-۳). قسمتهای غضروفی دنده‌ها در مرحله هیپرتروفی با واکنش بسیار شدید ECM و غشاءها مشاهده شدند.

در اندام حرکتی فوقانی کندروبلاست‌های ناحیه اپی‌فیز در دو سر اندام در مرحله استراحت واکنش ضعیف را در ECM و واکنش شدید را در برخی غشاءها نشان دادند.در مرحله تکثیر واکنش متوسط بود. در بخش دیافیز تنه اندام ناحیه هیپرتروفی واکنش بسیار شدید را به خصوص در غشاءها نشان داد.تیغه‌های استخوانی در مجاور منطقه هیپرتروفی واکنش متوسط تا شدید داشتند.واکنش غضروف جناغ، مکل و انگشتان نیز بهمین صورت مشاهده شد.پری‌کندریوم اندام‌ها واکنش تقریباً متوسط داشت.

ج ـ رنگ آمیزی پاس ـ آلسین بلو ۲/۵ = pH

در نواحی هیپرتروفی جسم مهره و دیگر قسمتها واکنش بسیار شدید AB بخصوص در سطوح سلولی دیده شد. واکنش پاس بسیار ضعیف بود(+). در نواحی در حال تکثیر، ECM واکنش متوسط و غشاءها واکنش شدید به AB داشتند . داخل سلولها واکنش پاس ضعیف بود. در دنده‌ها سلولهای غضروفی در انتهای مرحله هیپرتروفی و واکنش آنها در برابر AB بسیار شدید و در مقابل پاس ضعیف بود. در اندام حرکتی فوقانی در مرحله استراحت و تکثیر، ECM واکنش شدید در پاسخ به AB و داخل سلولها واکنش متوسط را در برابر PAS نشان دادند. در مرحله هیپرتروفی واکنش بسیار شدید ECM و غشاءها در برابر AB و واکنش ضعیف سلولها در مقابل پاس وجود داشت. در غضروف مکل واکنش PAS ضعیف و در قاعده جمجمه در ناحیه هیپرتروفی بسیار ضعیف تا منفی بود. در مراحل انتهایی این دوره تیغه‌ها یا ترابکولهای تازه ساز استخوانی واکنش متوسط تا شدید را در برابر AB نشان دادند و واکنش PAS نیز در سلولها متوسط بود.

بافت همبند پری کندریوم دارای واکنش متوسط AB در ECM و واکنش متوسط PAS در سلولها بود.

د ـ رنگ آمیزی آبی تولوئیدین

در نواحی تکثیر و هیپرتروفی پاسخ به رنگ مشابه قبل بود . در مراحل اولیه استخوانسازی، تیغه‌های استخوانی واکنش متوسط داشتند. در بخشهایی از مهره‌ها که نوتوکورد باقی مانده بود، واکنش اطراف آن شدید بود. پری‌کندر واکنش منفی داشت.

نتایج فوق در بررسی شدت پاسخ به رنگ در جداول ۱-۳ تا ۳-۳، میانگین آنها در جداول ۴-۳ تا ۸-۳ و نمودارهای مربوطه از شماره ۱-۳ تا ۹-۳ آمده است. همچنین برای مقایسه نتایج میانگین شدت رنگ غضروف اندامهای مختلف با یکدیگر، جدول ۹-۳ و نمودارهای ۱۰-۳ تا ۱۳-۳ ارائه گردید.

TUL			PAS			AB pH=۲/۵			AB pH=1			رنگ روز	
ECM	سطح سلول	سیتوپلاسم	ECM	سطح سلول	سیتوپلاسم	ECM	سطح سلول	سیتوپلاسم	ECM	سطح سلول	سیتوپلاسم		
+	+	−	−	−	+++	++	+++	+++	+	+	+	E 11 - 13	
++	+++	−	−	−	+++	+++	++++	+	++	+++	+	E 13-15	
++++	+++++	−	−	−	+++	+++	++++	+	++	+++	++	تکثیر	E 15-17
+++	+++++	−	−	−	+	++++	+++++	+	+++	+++	+	هیپرتروفی	
++++	+++++	−	−	−	++	++	++++	++	+++	++++	++	تکثیر	E 17-20
+++	+++++	−	−	−	+	+++	+++++	+	++++	+++++	+	هیپرتروفی	

جدول ۱-۳ شدت رنگ‌آمیزی درپاسخ به روشهای هیستوشیمیایی طی دوره های مورد مطالعه در غضروف جسم مهره

رنگ / روز		AB pH=1			AB pH=۲/۵			PAS			TUL		
		سینوبلاسم	سطح سلول	ECM	سینوبلاسم	سطح سلول	ECM	سینوبلاسم	سطح سلول	ECM	سینوبلاسم	سطح سلول	ECM
E 11- 13		+	−	−	+++	+	+	+++	−	−	−	+	+
E 13 - 15		+	+++	++	++	++++	+	++	−	−	−	+	++
E 15-17	تکثیر	++	++++	++	+	++++	+++	++	−	−	−	+	++++
	هیپرتروفی	+	++++	+++	++	++++	++++	+	−	−	−	+	+++
E 17-20	تکثیر	++	++++	+++	+++	++++	+++	++	−	−	−	+++++	++++
	هیپرتروفی	+	+++++	+++	++	+++++	++++	+	−	−	−	+++++	+++

جدول ۲-۳ شدت رنگ آمیزی در پاسخ به روشهای هیستوشیمیایی طی دوره های مورد مطالعه در غضروف دنده

TUL			PAS			AB pH=۲/۵			AB pH=1			رنگ روز	
ECM	سطح سلول	سبتوپلاسم	ECM	سطح سلول	سبتوپلاسم	ECM	سطح سلول	سبتوپلاسم	ECM	سطح سلول	سبتوپلاسم		
–	–	–	–	–	+++	++	++	+++	–	–	+	E 11 - 13	
++	++	–	–	–	++++	++	++++	+++	+++	++++	+	E 13-15	
++++	+++++	–	–	–	+++	+++	++++	+	+++	+++	++	تکثیر	E 15-17
+++	++++	–	–	–	++	++++	+++++	+	+++	++++	+	هیپرتروی	
++++	+++++	–	–	–	++	+++	++++	++	+++	++++	++	تکثیر	E 17-20
+++	+++++	–	–	–	+	+++	+++++	–	++++	+++++	+	هیپرتروی	

جدول ۳-۳ شدت رنگ آمیزی درپاسخ به روشهای هیستوشیمیایی طی دوره های مورد مطالعه در غضروف اندام حرکتی

TUL	PAS	$AB_{PH=2.5}$	$AB_{PH=1}$	رنگ / روز	
۱	۳/۰۷	۲/۱	۰/٤٥	E 11-13	
۲/٥	۳/٦	۳/٥	۲/۲۳	E 13-15	
٤	۲	۳/۷	۳/۱	Pro	E 15-17
۳/۷٥	۱	۳/۹	۳/٦	Hyp	
٤/٤۲	۲	۳/۸	۳/۲	Pro	E 17-20
٤	۰/٤	٤	۳/٥	Hyp	

جدول ۴-۳ میانگین شدت رنگ در پاسخ به روشهای هیستوشیمیایی در غضروف جسم مهره طی دوره های مورد مطالعه

TUL	PAS	$AB_{PH=2.5}$	$AB_{PH=1}$	رنگ / روز
۱/۲	۳/۳٥	۲	۰/۷	E 11-13
۲/٥	۳/٥	۳/۲	۲/٤	E 13-15
٥	۳	۳/۸	۲/٦۳	E 15-17
٤	۱	۳/۹	۲/۹	
٥	۲	۳	۳/۱	E 17-20
٤	۱	۳/۸	۳/۳	

جدول۵ - ۳میانگین شدت رنگ در پاسخ به روشهای هیستوشیمیایی در غضروف دنده طی دوره های مورد مطالعه

TUL	PAS	ABPH=2.5	ABPH=1	رنگ / روز
۰/۵	۳	۱/۹	۰/٦٤	E 11-13
۲	٤	۳/۲	۲	E 13-15
٤/٤	۳	۳/۷	۳/۱	E 15-17
۳/۵	۱	۳/۹۵	۳/٤	
٤/٦	۲	۳/۷	۳	E 17-20
۳/۹	۰/۷	۳/۹	۳/٤	

جدول ۶ - ۳ میانگین شدت رنگ در پاسخ به روشهای هیستوشیمیایی در غضروف اندام حرکتی طی دوره های مورد مطالعه

TOL.	PAS	AB PH=2.5	AB PH=1	رنگ / روزها
0.16	2.66	2	0.83	E 15-17
0.16	2.5	2.8	0.8	E 17-19
0.13	2.7	2.6	0.85	E 19-21

جدول ۷ - ۳ میانگین شدت رنگ پری کندریوم در روشهای هیستو شیمیایی طی دوره های مورد مطالعه

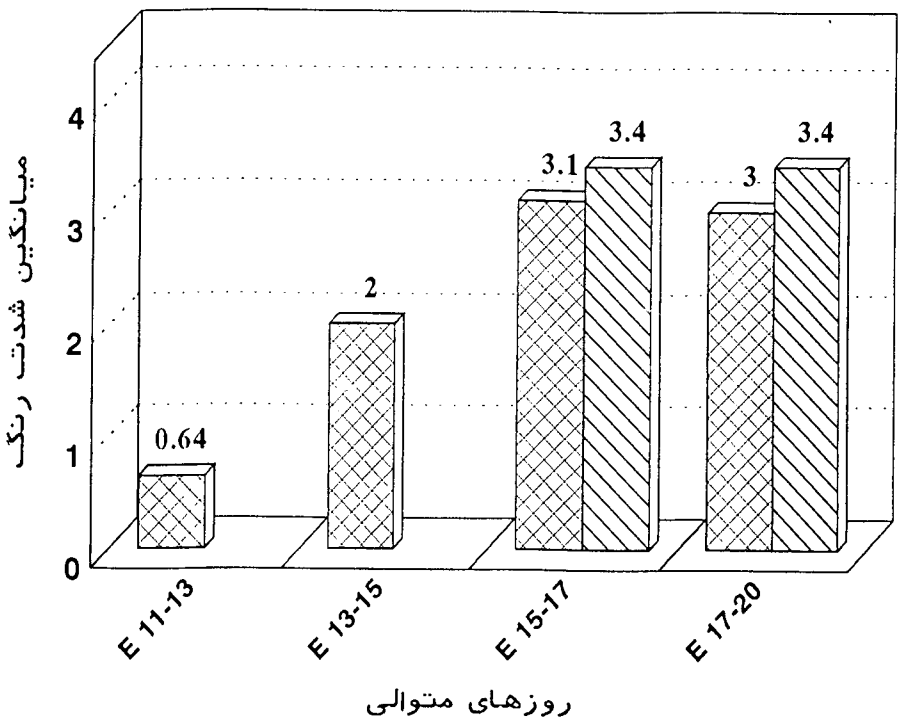
رنگ روز		AB pH=1			AB pH=۲/٥			PAS			TUL		
		سیتوپلاسم	سطح سلول	ECM	سیتوپلاسم	سطح سلول	ECM	سیتوپلاسم	سطح سلول	ECM	سیتوپلاسم	سطح سلول	ECM
E 11-13		۰/۸٥	۰/٦٤	۰/٤	۳/٥	۲	۲	۳	۰	۰	۰	۰/۱٤	۰/۲۸
E 13 -15		۱/٥	4	3	۳	٤	۲	۳/٥	۰	۰	۰	۲	۲
E 15-17	تکثیر	۱/۸	۳	۳	۲	٤	۲	۳	۰	۰	۰	٤/۸	٤
	هیپرتروفی	۰/٥٦	٤	۳	۰/٥	٥	٤	۲	۰	۰	۰	٤	۳
E 17-20	تکثیر	۲	٤	۳	۲	٤	۳	۲/٥	۰	۰	۰	٤/۸	٤
	هیپرتروفی	۱	٤/٥	۳/٥	۰/٥	٥	۳/۷	۰/۸	۰	۰	۰	٤/۳	۳

جدول ۸-۳ میانگین شدت رنگ در پاسخ به روشهای هیستوشیمیایی در اجزا مختلف بافت غضروفی اندام حرکتی طی دوره های مورد مطالعه

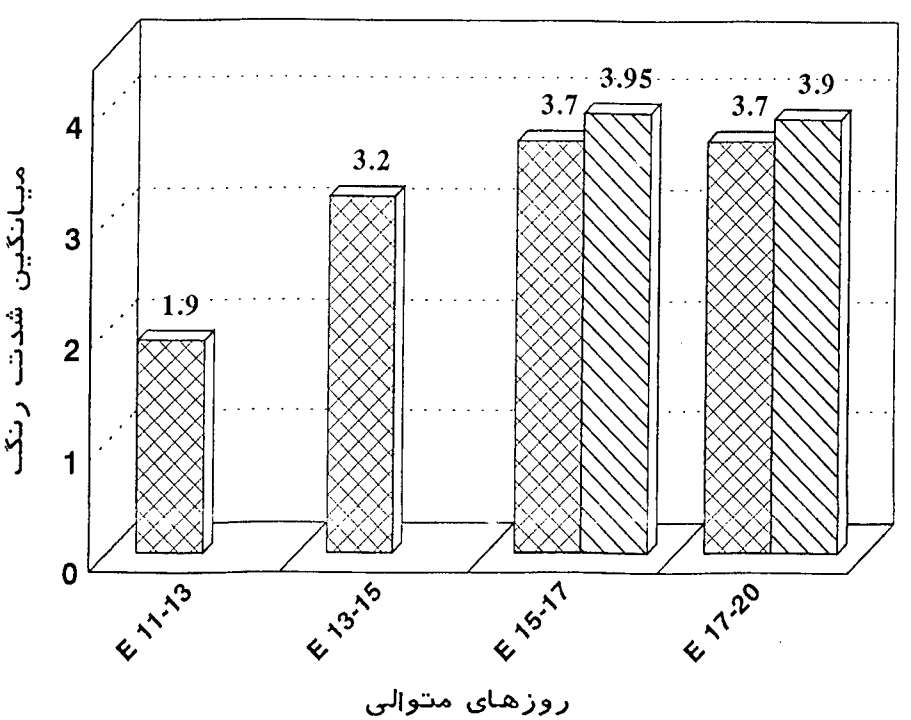
TUL	PAS	ABPH=2.5	ABPH=1	رنگ / روز
۰/۸	۳/۲	۲/۲۵	۰/٦٥	E 11-13
۲/۳	۳	۲/۹	۲/۳	E 13-15
٤/٤	۲/۲	۳/٥	۳/۲	E 15-17
۳/۷	۱/۲	۳/۹	۳/٦	
٤/٦	۲	۳/۲	۳	E 17-20
٤	۰/۷	۳/۸	۳/٥	

جدول ۹-۳ میانگین شدت رنگ غضروف در سه اندام (دنده ، جسم مهره و اندام حرکتی) در پاسخ به روشهای هیستوشیمیایی طی دوره های مورد مطالعه

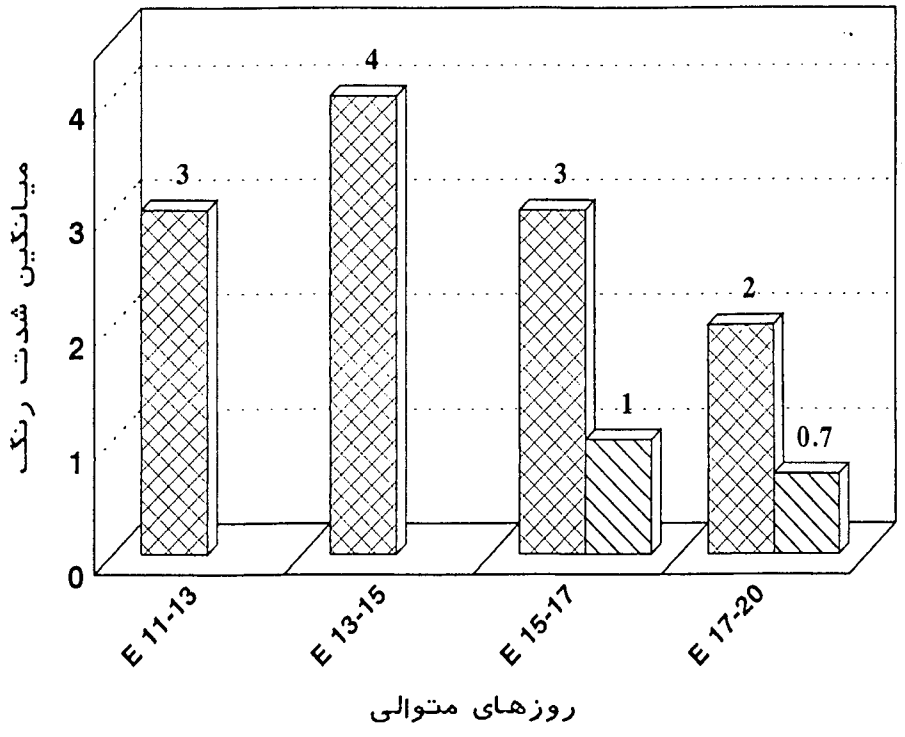
نمودار (۱-۳) : مقایسه میانگین شدت رنگ GAG سولفاته در بین گروههای مختلف در غضروف اندام حرکتی



نمودار (۲-۳) : مقایسه میانگین شدت رنگ GAG کربوکسیله در بین گروههای مختلف در غضروف اندام حرکتی



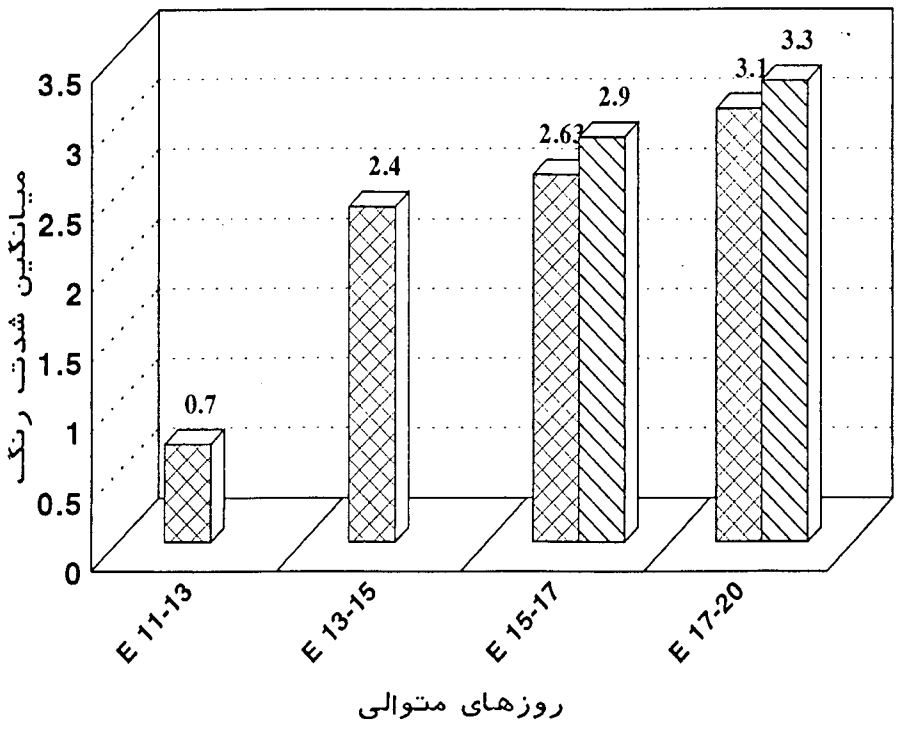
نمودار (۳-۳) : مقایسه میانگین شدت رنگ ترکیبات قندی خنثی در بین گروههای مختلف در غضروف اندام حرکتی



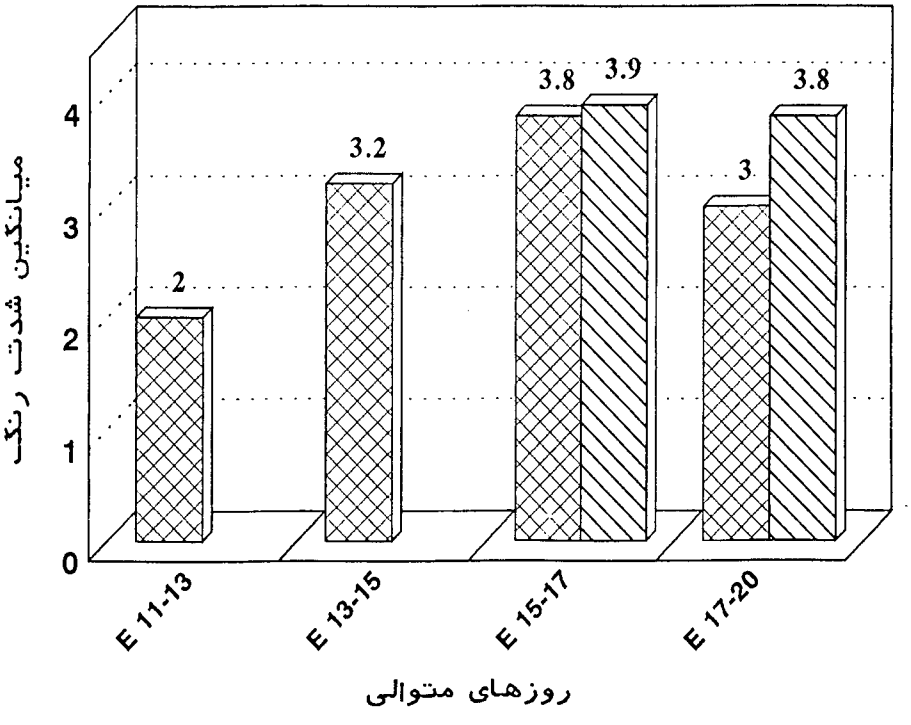
نمودار (۴-۳) : مقایسه میانگین شدت رنگ مواد متاکروماتیک در بین گروههای مختلف در غضروف اندام حرکتی



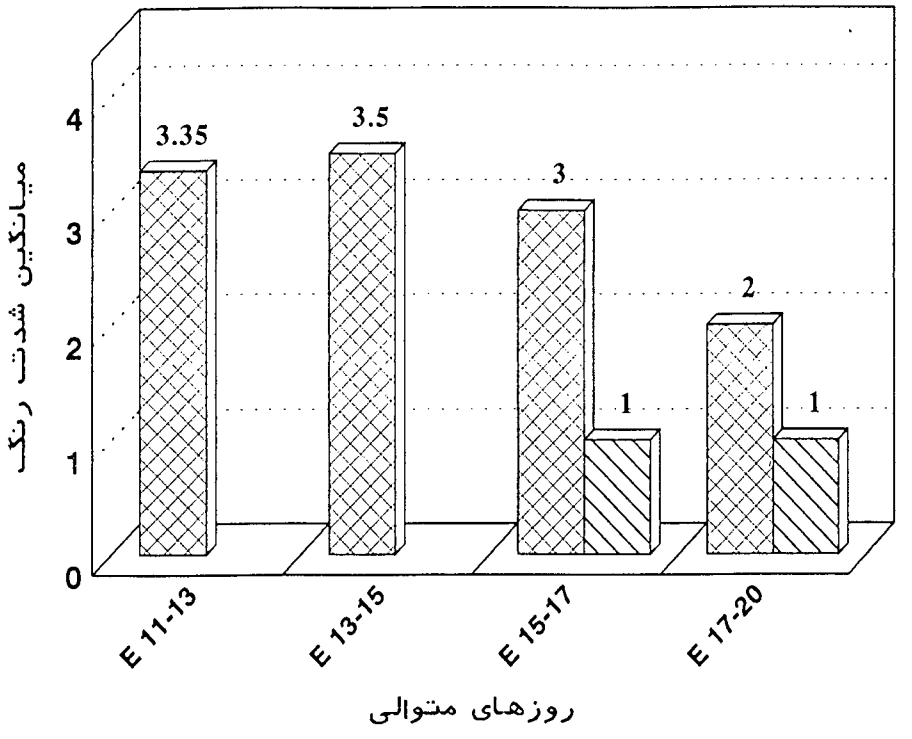
نمودار (۵-۳) : مقایسه میانگین شدت رنگ GAG سولفاته در بین گروههای مختلف در غضروف دنده



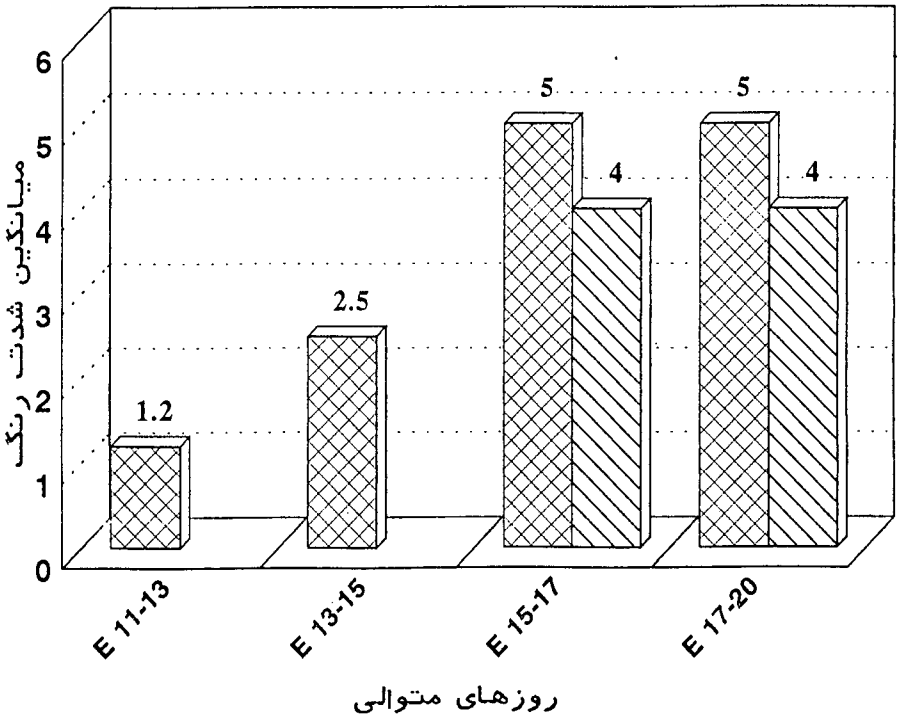
نمودار (۶-۳) : مقایسه میانگین شدت رنگ GAG کربوکسیله در بین گروههای مختلف در غضروف دنده



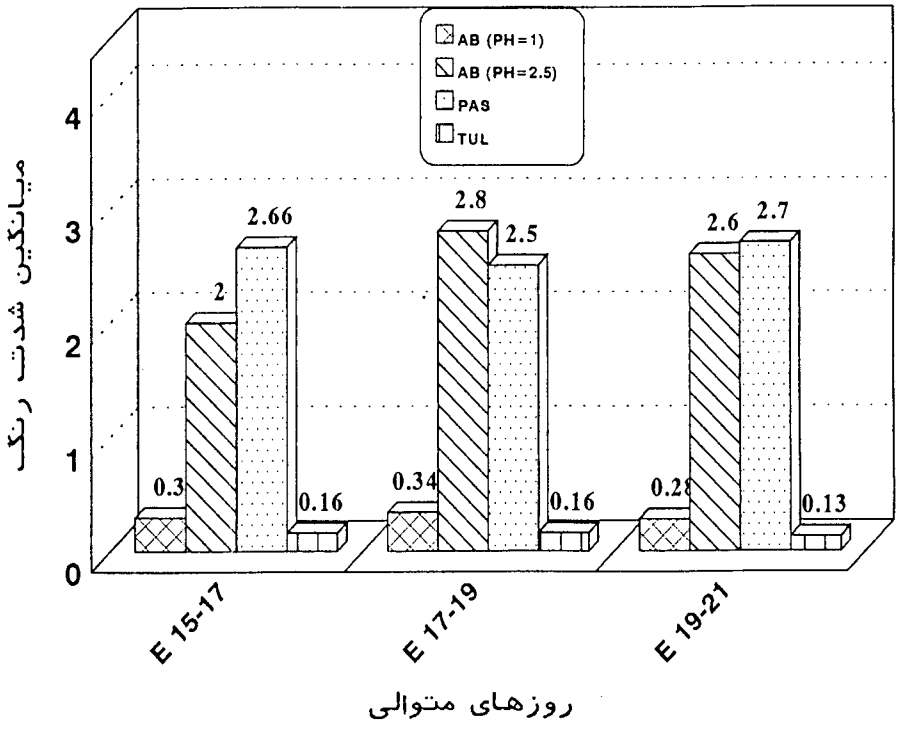
نمودار (۷-۳) : مقایسه میانگین شدت رنگ ترکیبات قندی خنثی در بین گروههای مختلف در غضروف دنده



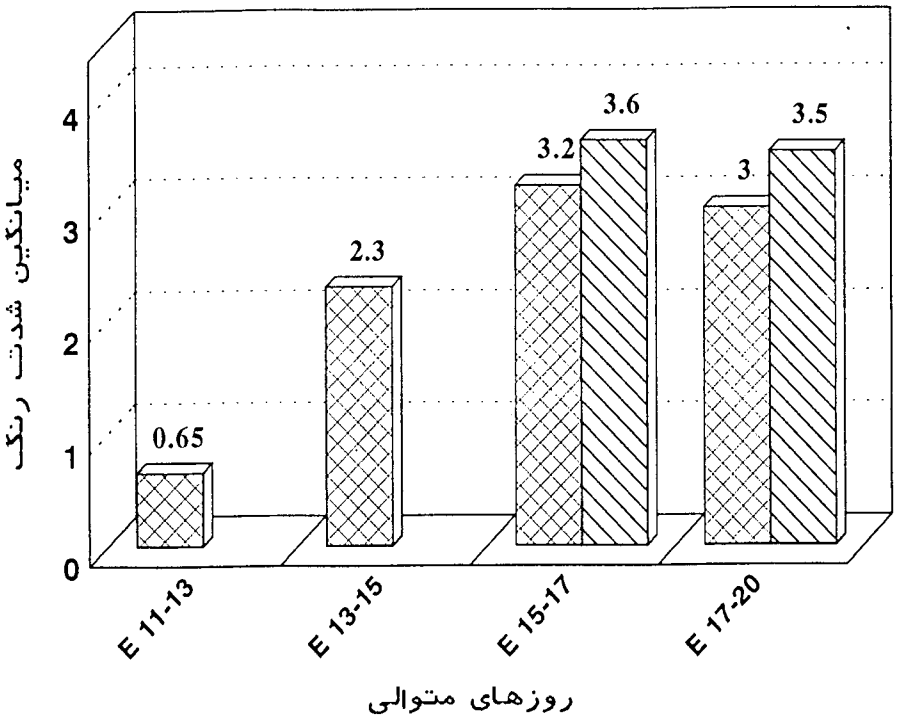
نمودار (۸ - ۳) : مقایسه میانگین شدت رنگ مواد متاکروماتیک در بین گروههای مختلف در غضروف دنده



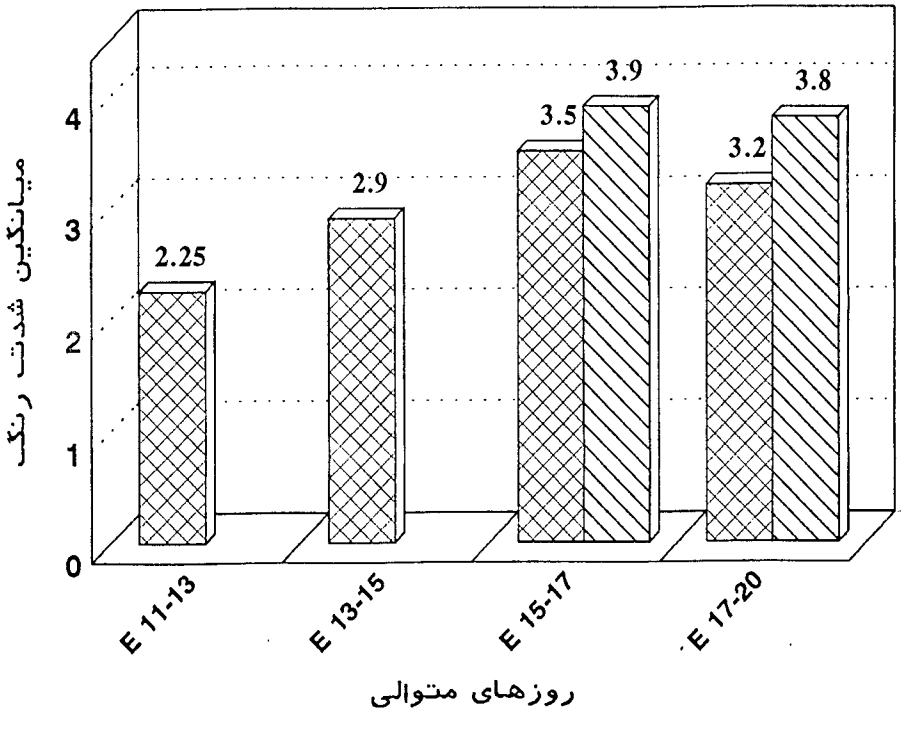
نمودار (۹ـ۳) : مقایسه میانگین شدت رنگ درپاسخ به روشهای هیستو شیمیایی طی دوره‌های مورد مطالعه در بافت پری کندریوم



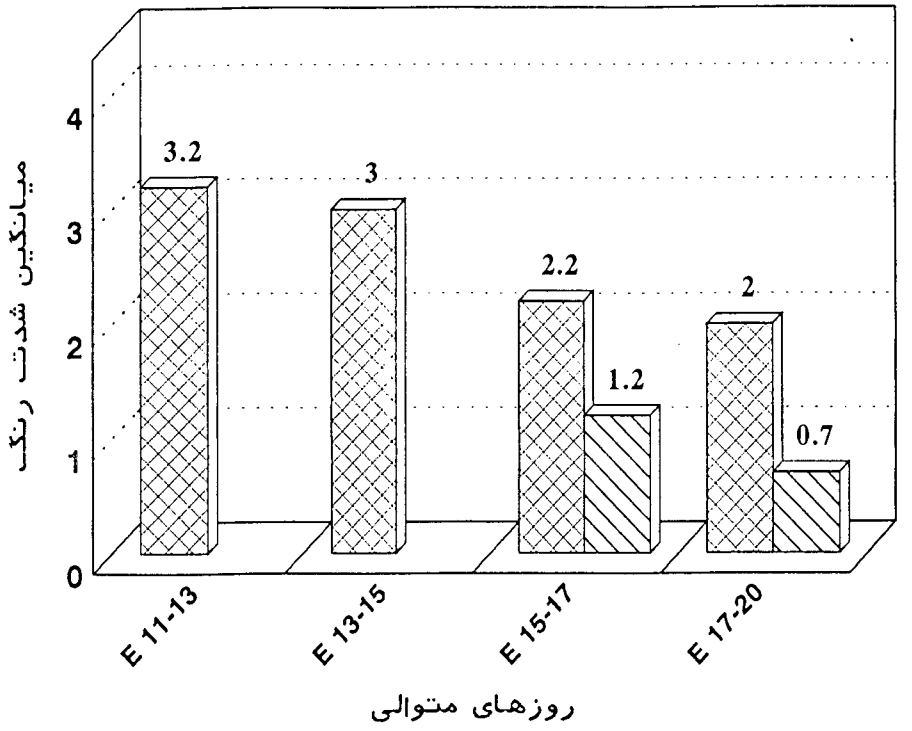
نمودار ۱۰ - ۳ : مقایسه میانگین شدت رنگ GAG سولفاته در بین گروههای مختلف در غضروف سه اندام (دنده - اندام حرکتی - جسم مهره)



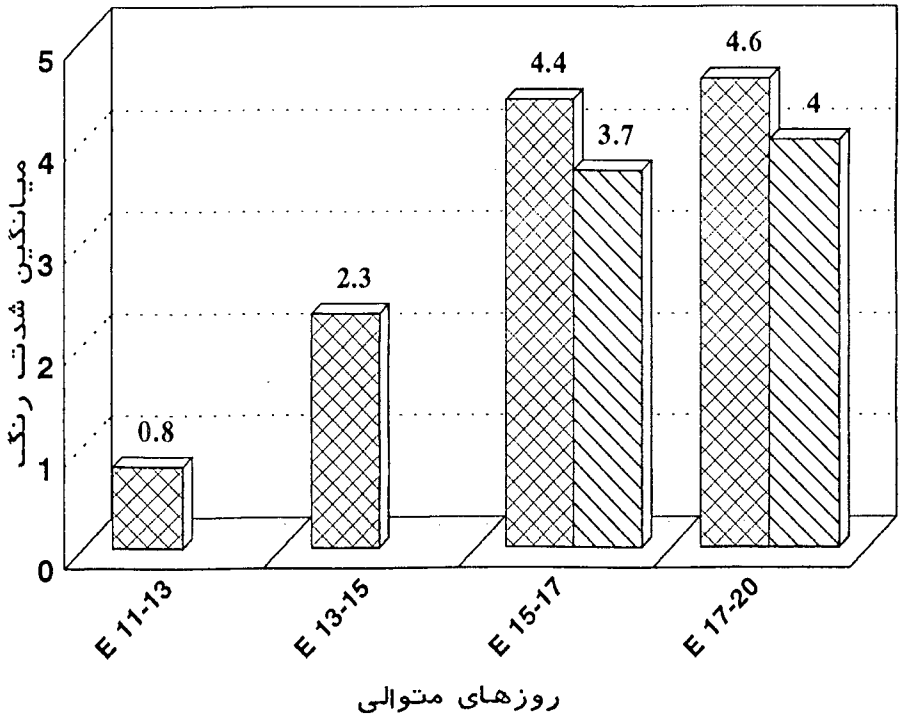
نمودار ۱۱ - ۳ : مقایسه میانگین شدت رنگ GAG کربوکسیله در بین گروههای مختلف در غضروف سه اندام (دنده - اندام حرکتی - جسم مهره)



نمودار ۱۲ - ۳ : مقایسه میانگین شدت رنگ ترکیبات قندی خنثی در بین گروههای مختلف در غضروف سه اندام (دنده - اندام حرکتی - جسم مهره)



نمودار ۱۳-۳ : مقایسه میانگین شدت رنگ مواد متاکروماتیک در بین گروههای مختلف در غضروف سه اندام (دنده - اندام حرکتی - جسم مهره)



بخش چهارم : گزارش بررسیهای هیستوشیمیایی لکتین

۱ - جنینهای ۱۳-۱۱ روزه رت

در این دوره در دو ناحیه جسم مهره و اندام حرکتی فوقانی تاثیر لکتین MPA (Maclura pomifera) بررسی شد. این لکتین شناسایی پایانه قندی $\alpha-$GalNac > $\alpha-$Gal را انجام می‌دهد. در مورد جسم مهره بعلاوه لکتین OFA (Orange fungus) نیز تاثیر داده شد که پایانه $\alpha-$L-Fuc را شناسایی میکند.

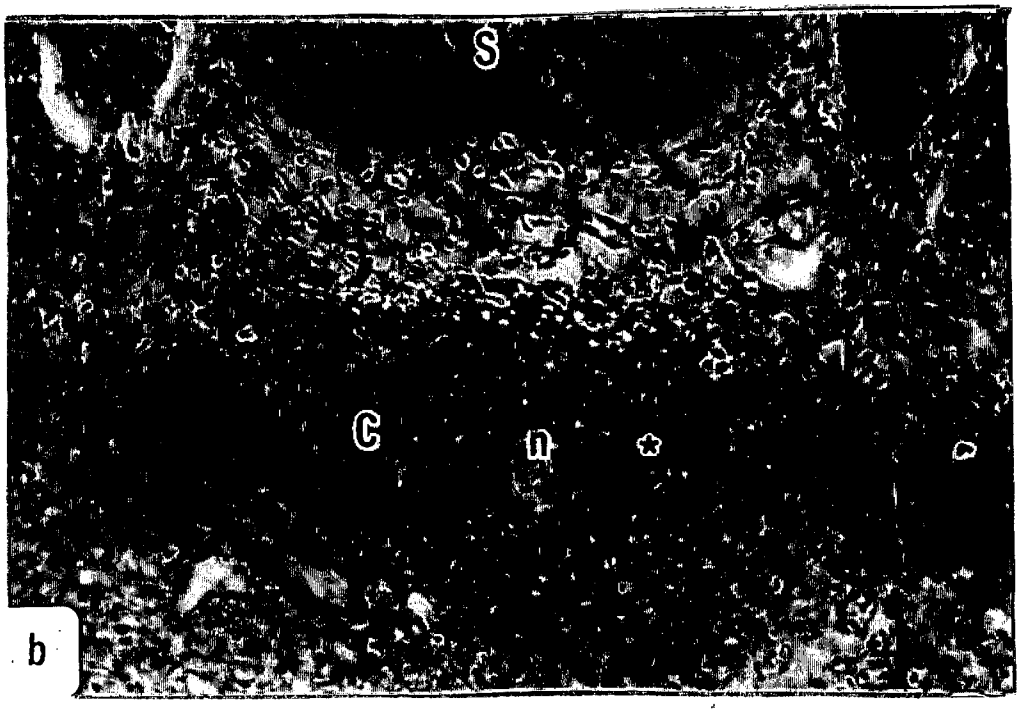
در جسم مهره در سلولهای مزانشیمی اطراف نوتوکورد واکنش شدید لکتین MPA در برخی نواحی ECM و در بقیه نواحی واکنش متوسط با ایجاد رنگ قهوه‌ای همراه بود. وسعت منطقه واکنش کم بود و بتدریج به سمت حاشیه، واکنش ضعیف و حذف می‌شد. نوتوکورد پاسخ منفی داشت . واکنش متوسط تا شدید سلولها در پاسخ به AB مشخص بود (تصویر۸a-۳) .واکنش به لکتین OFA در جسم مهره منفی بود.

در ناحیه شکل‌گیری اندام حرکتی، واکنش به لکتین MPA در بخش پروکسیمال که تجمع سلولهای مزانشیمی بیشتر بود، مشاهده شد. این واکنش بصورت رنگ قهوه‌ائی شدید بود و در ECM و سطوح سلولی مشخص‌تر بود. در بخش دیستال اندام، واکنش متوسط وجود داشت که به سمت حاشیه ضعیف می‌شد، واکنش شدید AB نیز در سلولها مشاهده شد(تصویر ۸b-۳) . در جدول ۱۱-۳ میانگین شدت رنگ لکتین‌های فوق و در نمودار ۱۴-۳ مقایسه میانگین آنها گزارش شده است.

۲ - جنین‌های ۱۷-۱۳ روزه رت

دراین‌دوره‌واکنش لکتینهای WFA (Wistaria floribunda)، SBA (Soybean)، VVA (Visia villosa) و MPA در غضروفهای اندام حرکتی، جسم مهره، دنده، قاعده جمجمه، شانه و مکل بررسی شد. این لکتینهابه ترتیب شناسایی پایانه‌های قندی D-GalNac , D-Gal>D-GalNac-α,β، GalNac و $\alpha-$Gal>$\alpha-$GalNac را بعهده دارند.



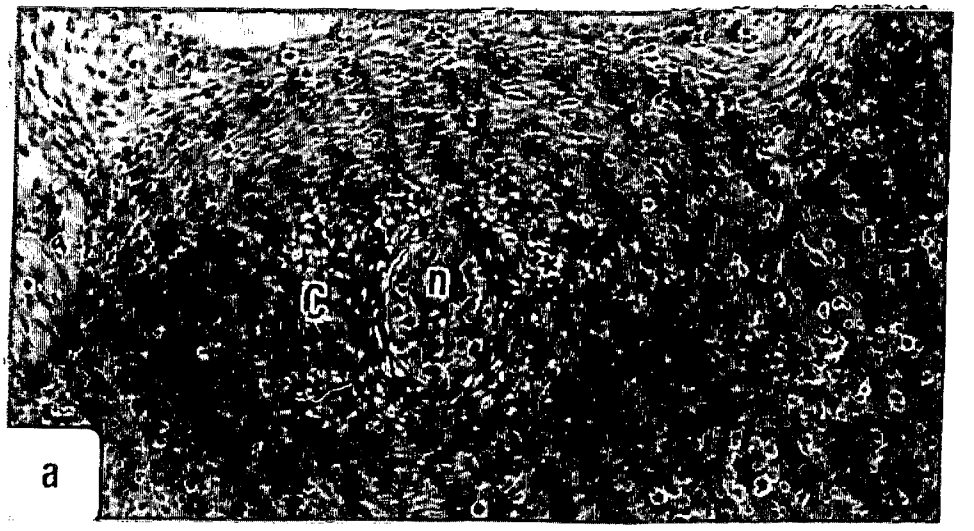


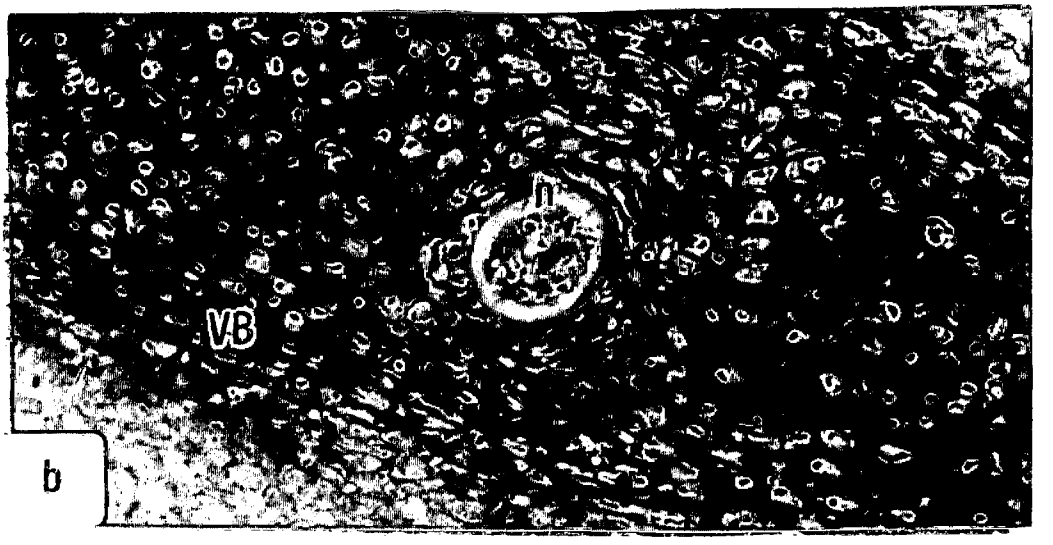
تصویر ۸- ۳ : برش جنین ۱۲ روزه رت . واکنش با لکتین MPA a : ناحیه شکل گیری غضروف اندام حرکتی در برش سهمی منطقه واکنش قهوه ای رنگ است (۲۵ x) b : برش عرضی ناحیه جسم مهره و نوتوکورد

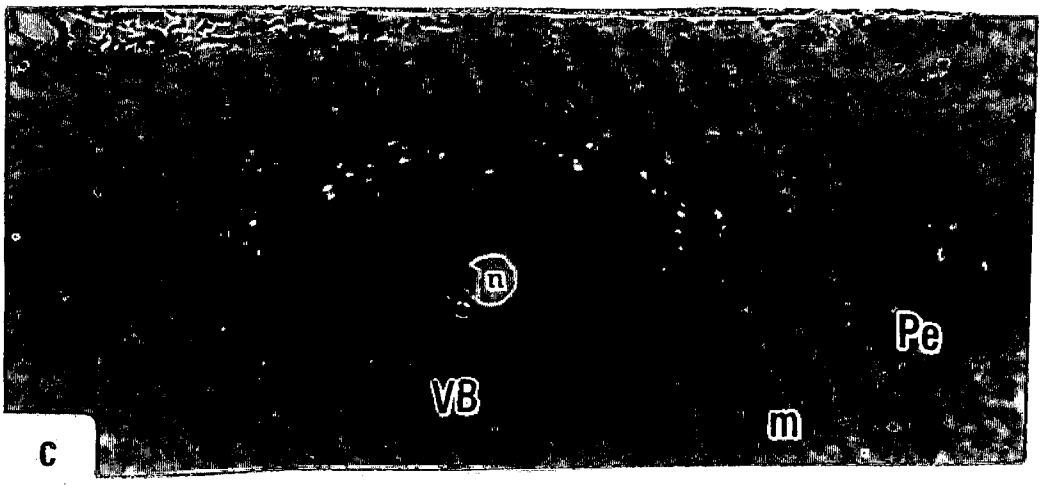
در جنین‌های ۱۴ روزه رت در واکنش به لکتین SBA در ناحیه جسم مهره واکنش (ضعیف تا متوسط) در قسمتی از سلولهای نوتوکورد و مزانشیم اطراف آن مشاهده شد که عمدتاً به فضای خارج سلولی مربوط بود(تصویر۹a-۳). در جنین ۱۵ روزه در منطقه غضروفسازی جسم مهره واکنش به لکتین WFA در همه جای ECM متوسط، در بسیاری سطوح سلولی شدید و در بسیاری مراکز داخل سلولی بسیار شدید دیده شد. در بافت اطراف واکنش منفی بود (تصویر۹b-۳). واکنش با لکتین VVA در این ناحیه متوسط بوده، سلولهای محیطی در سطوح خود و در ECM واکنش شدید داشتند. تقریباً همه واکنش‌ها خارج از سلول مشاهده شد(تصویر۹c-۳) . در پاسخ به لکتین MPA نیز واکنش منطقه غضروف سازی مهره منفی بود. اما سلولهای مزانشیم اطراف واکنش متوسط داشتند.

غضروف قاعده جمجمه در پاسخ به لکتین MPA واکنشی نشان نداد . در بررسی با لکتین VVA پاسخ در برخی نواحی حاشیه‌ائی شدید و در بقیه قسمتها متوسط بود . تقریباً همه پاسخها در ECM و سطوح سلولها ایجاد شده بود. با لکتین WFA در سرتاسر طول این غضروف پاسخ یکسانی دیده نشد، بلکه نواحی هیپرتروفی در برخی قسمتهای ECM واکنش ضعیف داشتند و در سطوح سلولی پاسخ افزایش می‌یافت. اما واکنش ناحیه تکثیر در ECM و سطوح سلولی تا حد شدید مشاهده شد. برخی نواحی استراحت نیز واکنش متوسط داشتند. نوار نازکی از واکنش شدید لکتین در طرفین سطح منطقه هیپرتروفی مشاهده شد. شدت رنگ‌های گزارش شده در نواحی مختلف در مورد برخی معدود سلولها تفاوتهایی را با انواع دیگر خود نشان می‌داد. واکنش پری‌کندر شدید بود(تصویر ۱۰-۳).

در غضروف دنده‌ها واکنش لکتین VVA در ECM متوسط بود و در برخی سلولها نواحی با واکنش بسیار شدید درون سلولها مشاهده شد. بافت اطراف واکنش منفی داشت. واکنش با WFA در همه جای دنده یکسان نبود. در مرکز منطقه غضروفی واکنش ضعیف ECM و نقاط بسیار تیره درون سلولی دیده شد. سلولهای منطقه حاشیه‌ائی پاسخ تقریباً منفی داشتند. پری‌کندر واکنش متوسط داشت. در جناغ یا استرنوم در ناحیه متصل به دنده‌ها واکنش فوق در ECM و غشاءها بسیار شدید بود. در پاسخ به لکتین SBA در برخی سلولها واکنش شدید و در برخی ضعیف دیده شد. در پری‌کندریوم واکنش منفی بود (تصویر۱۲و۱۱-۳). واکنش MPA منفی بود.

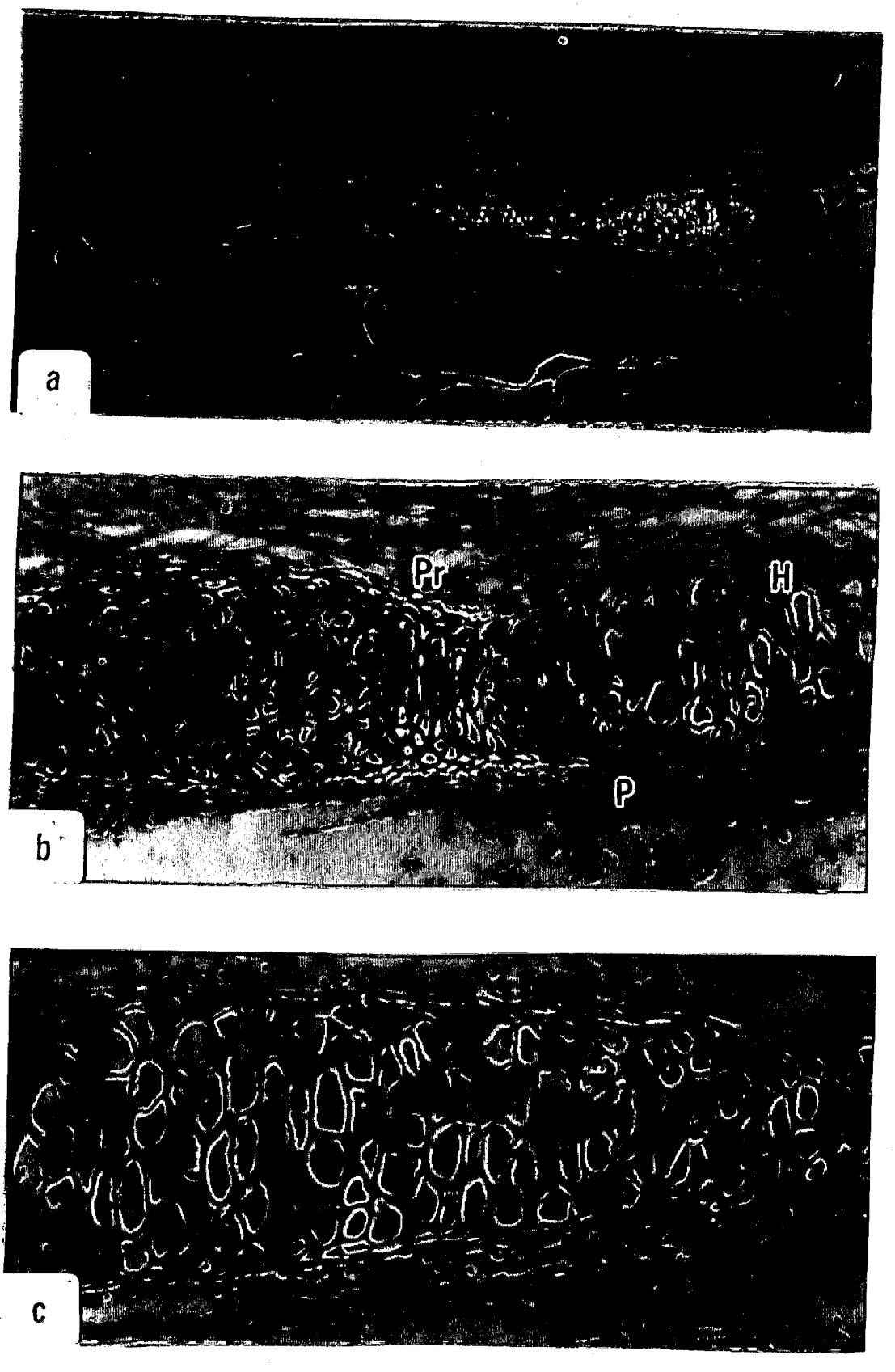






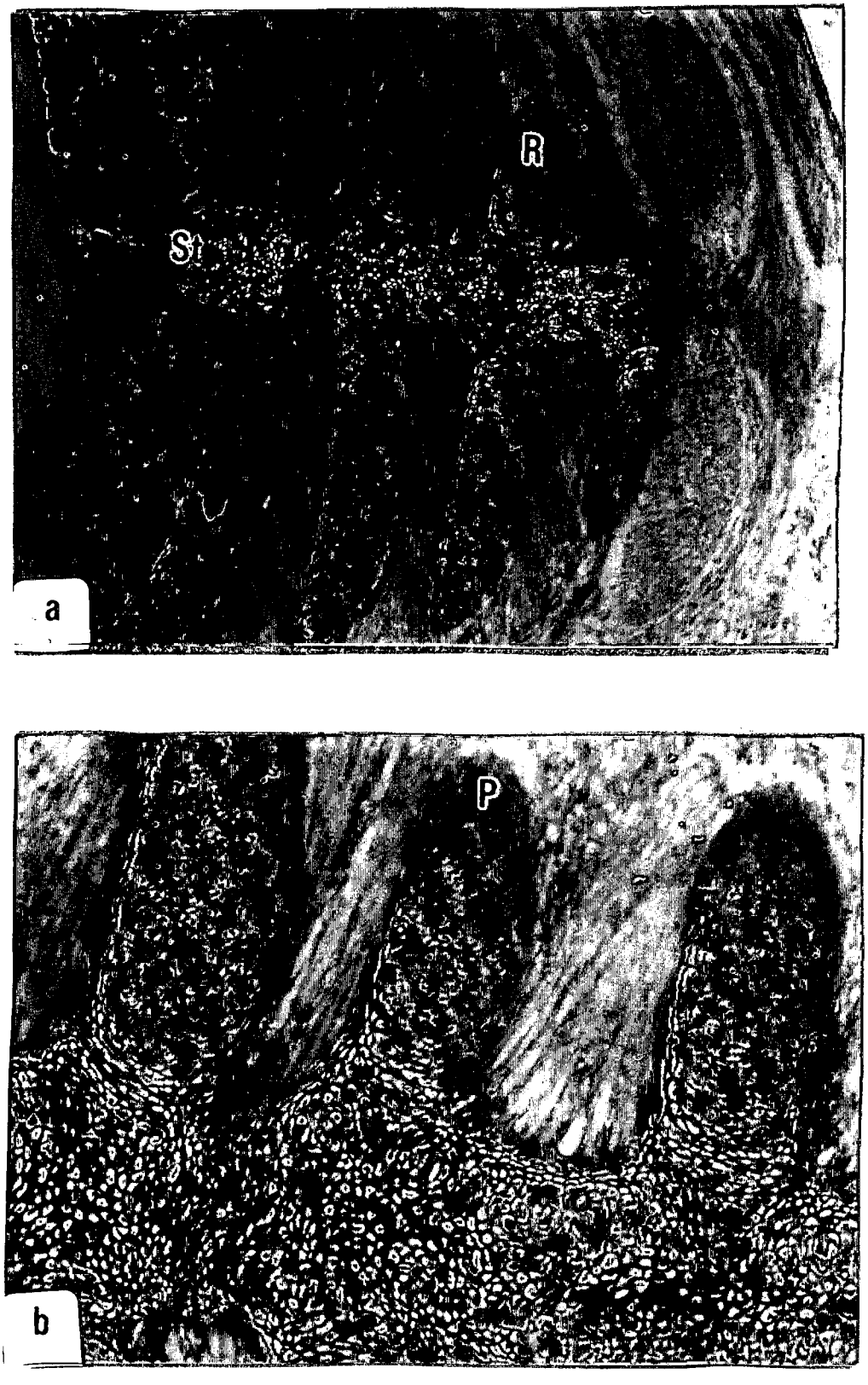
تصویر ۹ – ۳ : برش عرضی جسم مهره و نوتوکورد a : در جنین ۱۴ روزه در واکنش به لکتین SBA (۵۰)

b : در جنین ۱۵ روزه با لکتین WFA (x ۸۰) c : جنین ۱۵ روزه با لکتین VVA (x ۴۰)



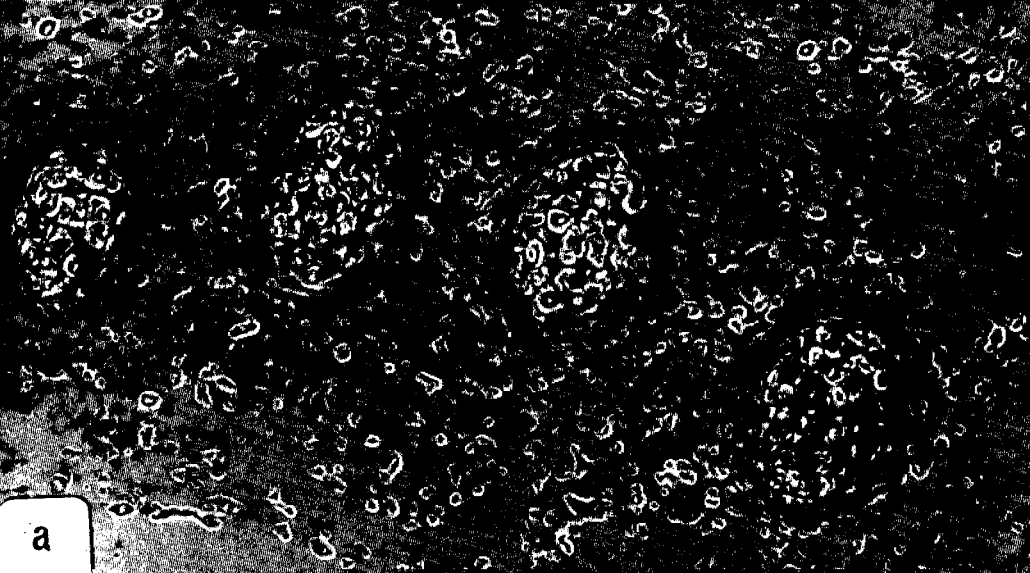
تصویر ۱۰ – ۳ : مقطع سهمی جنین ۱۵ روزه رت در ناحیه غضروف قاعده جمجمه با لکتین WFA

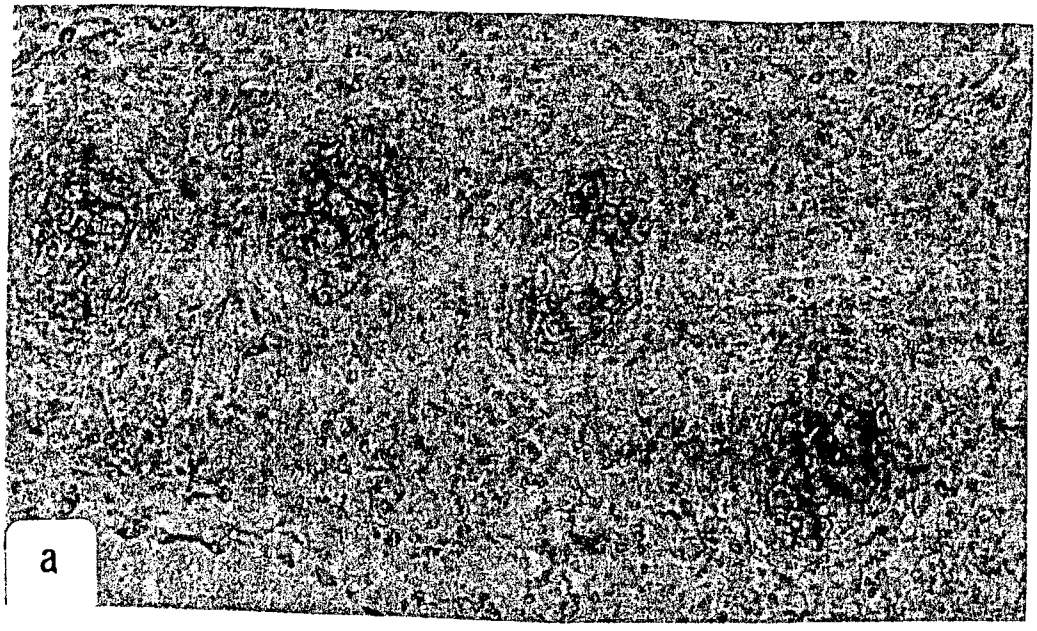
a : بزرگ نمایی (x ۱۳) b : واکنش در ناحیه تکثیر (x ۶۰) c : ناحیه هیپرتروفی (x ۱۰۰)

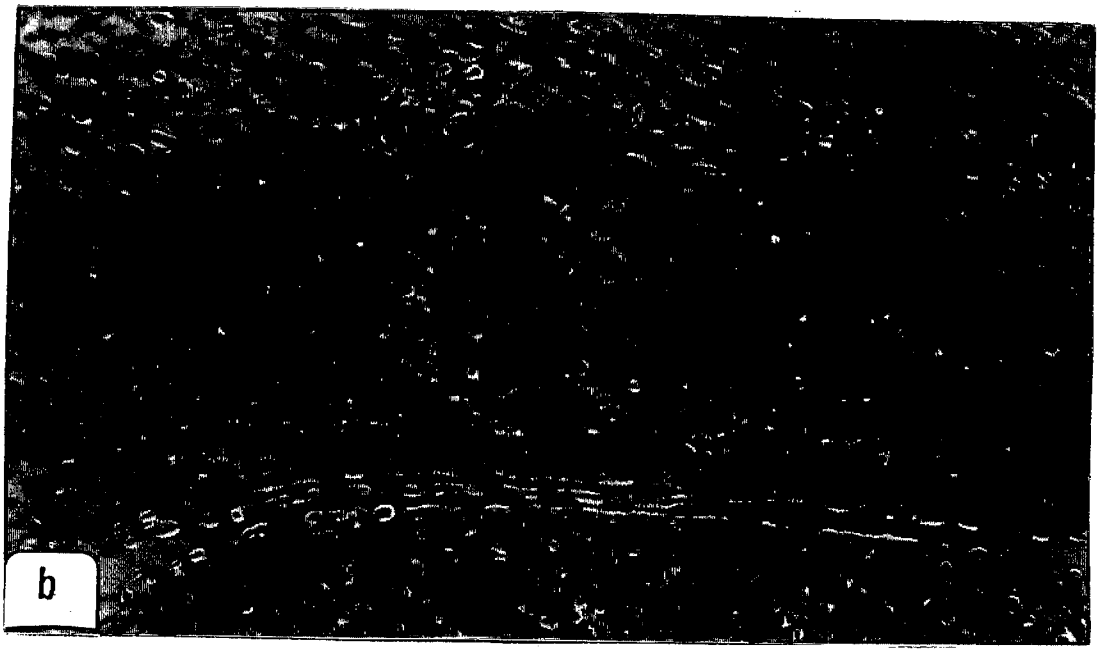


تصویر ۱۱ – ۳ : مقطع طولی جنین ۱۵ روزه در ناحیه استرنوم و دنده - لکتین WFA

(x ۴۰) : b (x ۱۶) : a


a



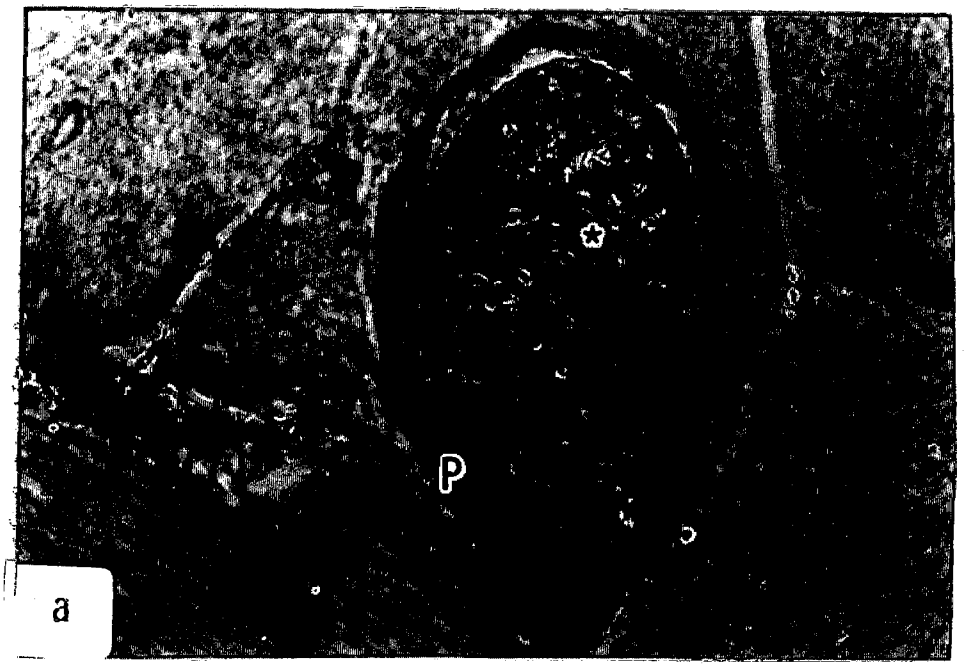


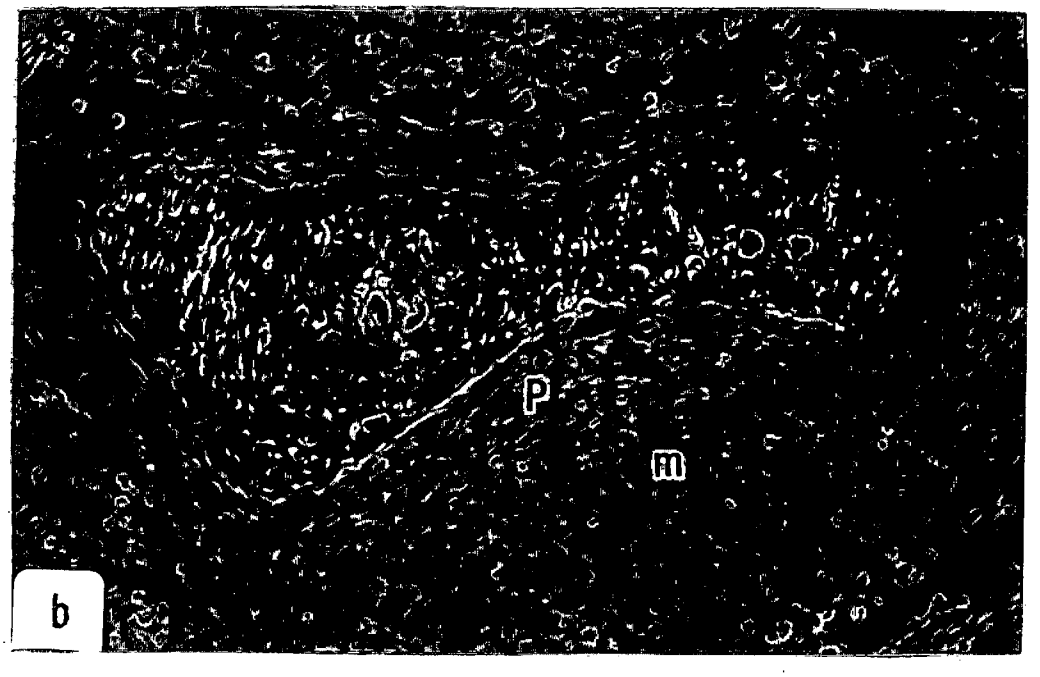
تصویر ۱۲ – ۳ : مقطع عرضی دنده در جنین ۱۵ روزه a : لکتین SBA (x ۲۵) b : لکتین VVA (x ۵۰)

دراندام حرکتی فوقانی در پاسخ به لکتین WFA پاسخ همه قسمتها یکسان نبود. دربخش مرکزی غضروف شانه واکنش WFA باشدت متوسط در ECM ودرحد شدید درداخل سلولهادیده شد(تصویر۱۳a,b-۳). درغضروف بازوواکنش منطقه تکثیردرECMوسطح سلولهاشدیدودرمنطقه هیپرتروفی ضعیف بود(تصویر۱۴a,b-۳). در واکنش با لکتین MPA کلیه واکنش‌ها داخل سلولی بود. در منطقه هیپرتروفی پاسخ متوسط تا ضعیف و در منطقه تکثیر بسیار شدید بود. منطقه غضروفی دیستال اندام واکنش متوسط داشت(تصویر۱۵-۳). واکنش به لکتین VVA نیز در ECM و سطح سلولهای محیطی اندام، شدید بود. در مرکز اندام سلولها در مرحله هیپرتروفی و واکنش آنها متوسط بود.اما در ناحیه اخیر برخی سلولها نیز واکنش بسیار شدید داشتند. واکنش بافت مزانشیم اطراف منفی بود(تصویر ۱۶-۳).واکنش SBA منحصر به داخل سلولهابوده،درمنطقه تکثیربسیار شدید و بتدریج تا منطقه هیپرتروفی ، واکنش به متوسط و ضعیف کاهش می‌یافت. واکنش پری‌کندر منفی بود. در غضروف مکل واکنش VVA عمدتاً در ECM و غشاء سلولها بود اما همه سلولها واکنش یکسان نداشتند. در چند سلول واکنش بسیار شدید و در بقیه متوسط بود. واکنش پری‌کندر منفی بود. واکنش WFA در اغلب نواحی ECM متوسط بود . برخی سلولها در غشاء و داخل سلول واکنش شدید داشتند و در پری‌کندر واکنش متوسط بود. واکنش در برابر MPA منفی بود(تصویر۱۷ - ۳) . نتایج فوق در جدول ۱۰-۳ و میانگین شدت واکنش‌ها در جدول ۱۲-۳ و نمودارهای مربوطه از شماره‌های ۱۵-۳ تا ۱۷-۳ آمده است.

۳ - جنین‌های ۲۰-۱۷ روزه رت

درجنین‌های ۱۸ روزه رت درمنطقه مهره‌هاودیسک بین‌مهره‌ها، واکنش WFA بررسی شد. در منطقه جسم مهره این واکنش عمدتاً در داخل سلولها بود و بخصوص در منطقه تکثیر شدید بود. پری‌کندر واکنش شدید داشت. درمنطقه‌بین‌دومهره، واکنش‌شدید ECM وغشاءها دیده‌شد. اطراف‌نوتوکوردسلولهای‌درحال تراکم برای‌تولید AF، واکنش متوسط در ECM و شدید در داخل سلولها نشان دادند(تصویر۱۸ - ۳).در جنین ۱۹ روزه منطقه جسم مهره در واکنش به MPA اثر شدید به خصوص در نواحی حاشیه‌ائی نشان داد.این‌واکنش تماماً درون سلولی بود.امادرمرکزمنطقه، واکنش‌منفی ودرون‌معدودی‌ازسلولهاواکنش‌متوسط تاشدیدبود. پری‌کندر واکنش متوسط‌داشت(تصویر۱۹a-۳).واکنش‌بالکتین OFA درجسم‌مهره‌منفی‌بود.پری‌کندرواکنش‌منفی‌داشت. تعداد بسیارمعدودی‌از سلولهای در حال تراکم دور نوتوکورد واکنش ضعیف داخل سلولی نشان‌دادند (تصویر۱۹b-۳).

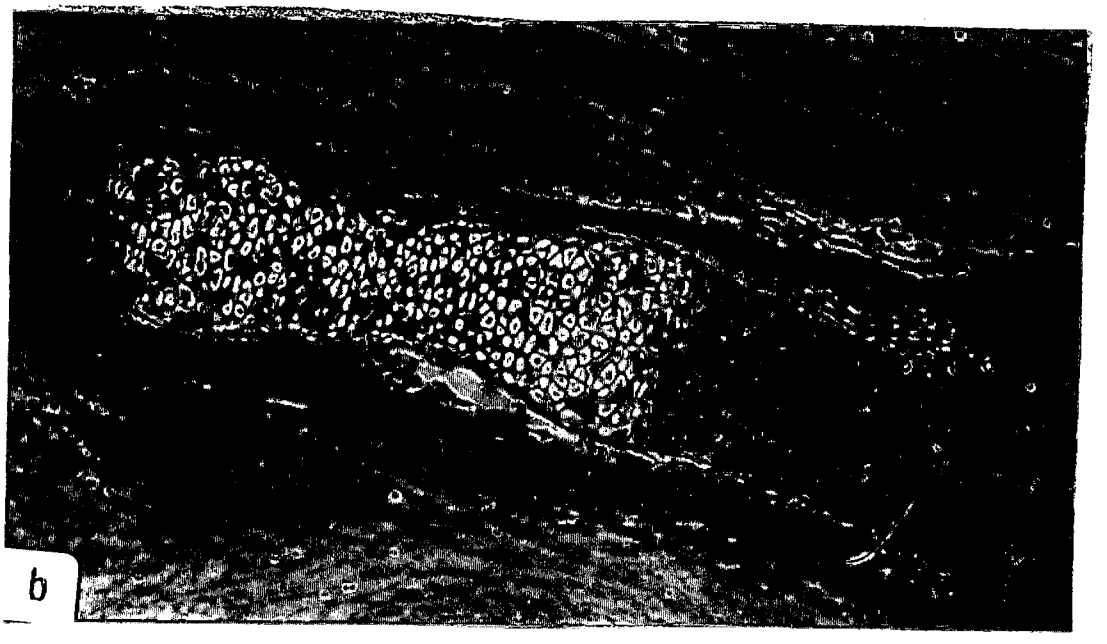




تصویر ۱۳-۳ : مقطع غضروفی شانه در جنین ۱۵ روزه

a : مقطع عرضی با لکتین WFA (x ۲۵) b : مقطع طولی با لکتین SBA (x ۵۰)

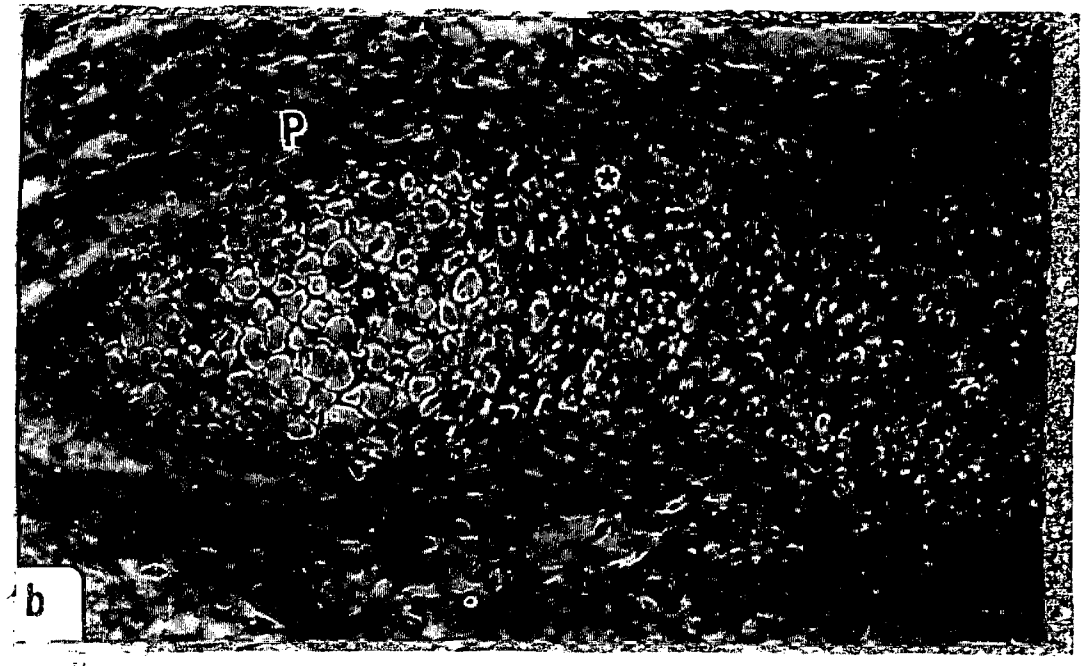




تصویر ۱۴ – ۳ : مقطع سهمی اندام فوقانی در جنین ۱۵روزه رت با لکتین WFA

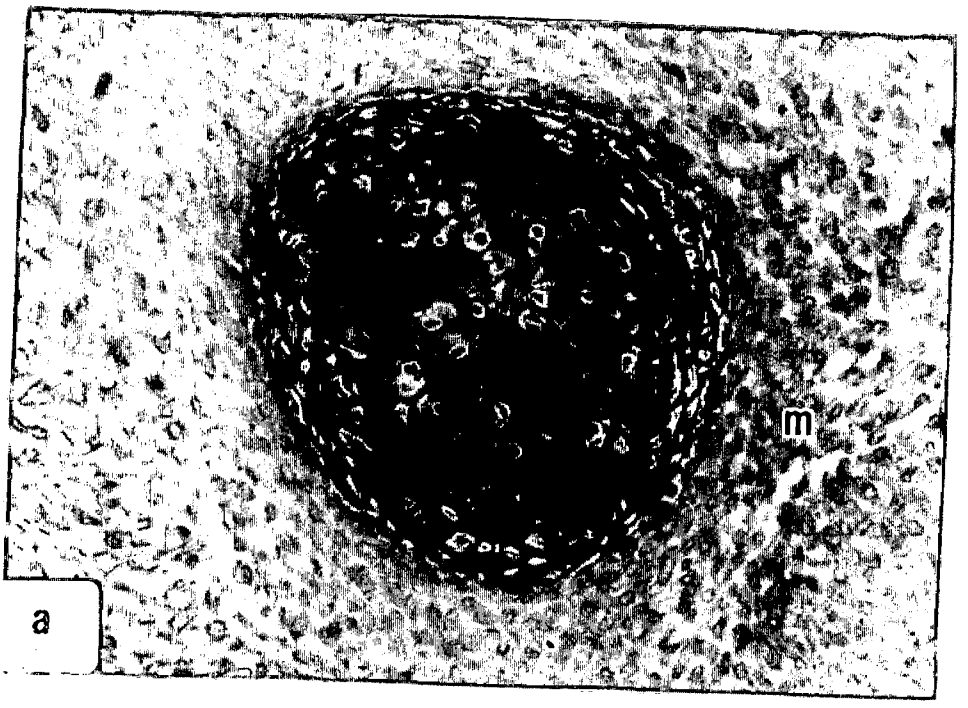
a : ناحیه دست ، بازو و شانه (x ۸) b : ناحیه بازو (x ۳۳)

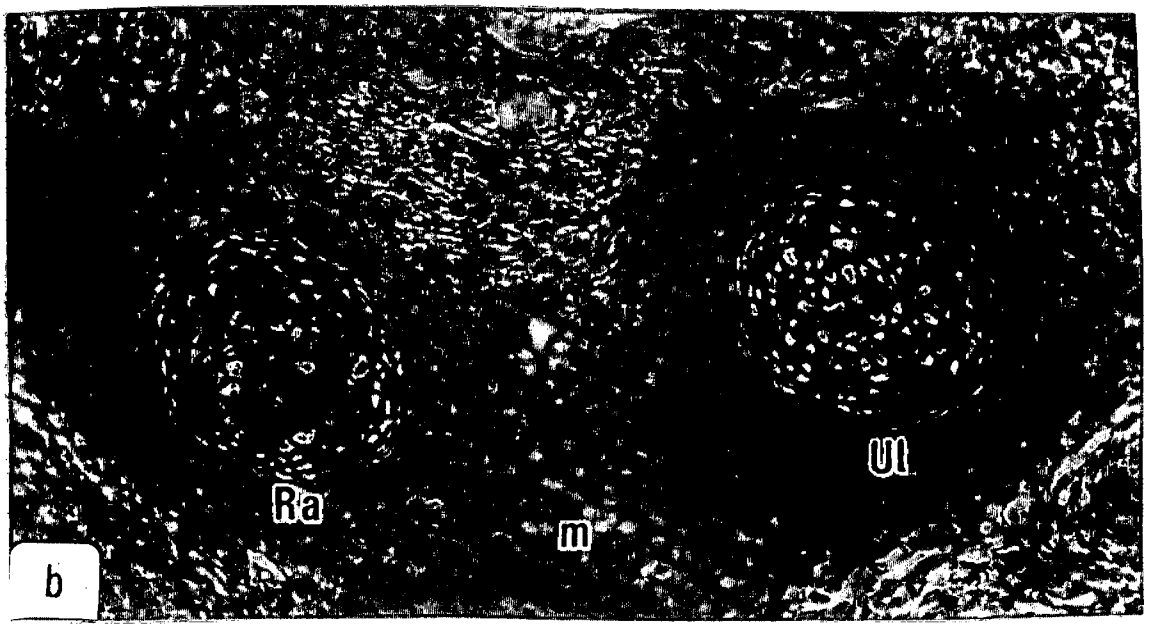




تصویر ۱۵ –۳ : مقطع سهمی اندام فوقانی جنین ۱۵ روزه رت . واکنش با لکتین MPA

a : قطعات مختلف غضروف اندام (x ۱۶) b : درشت نمایی (x ۴۰)

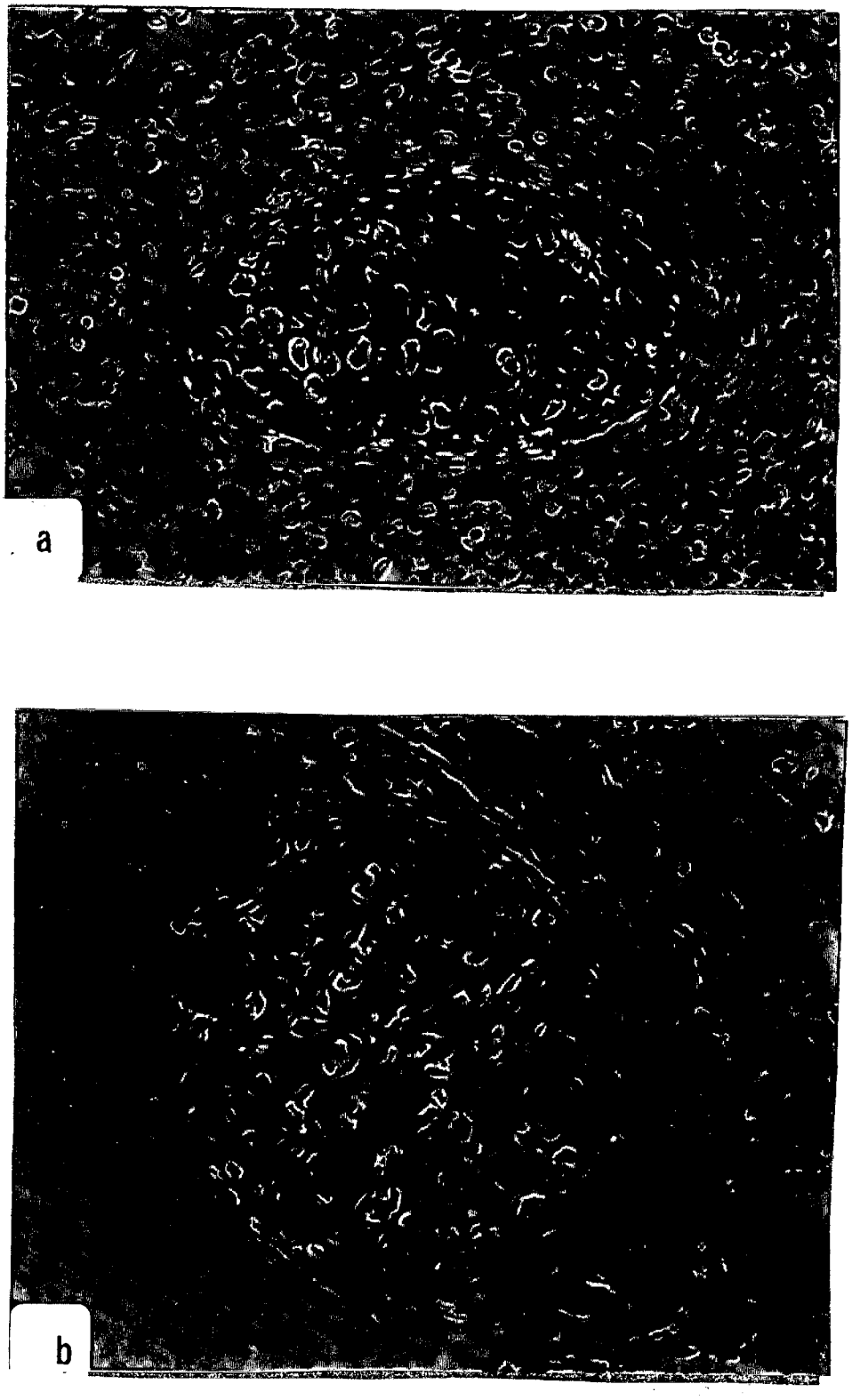




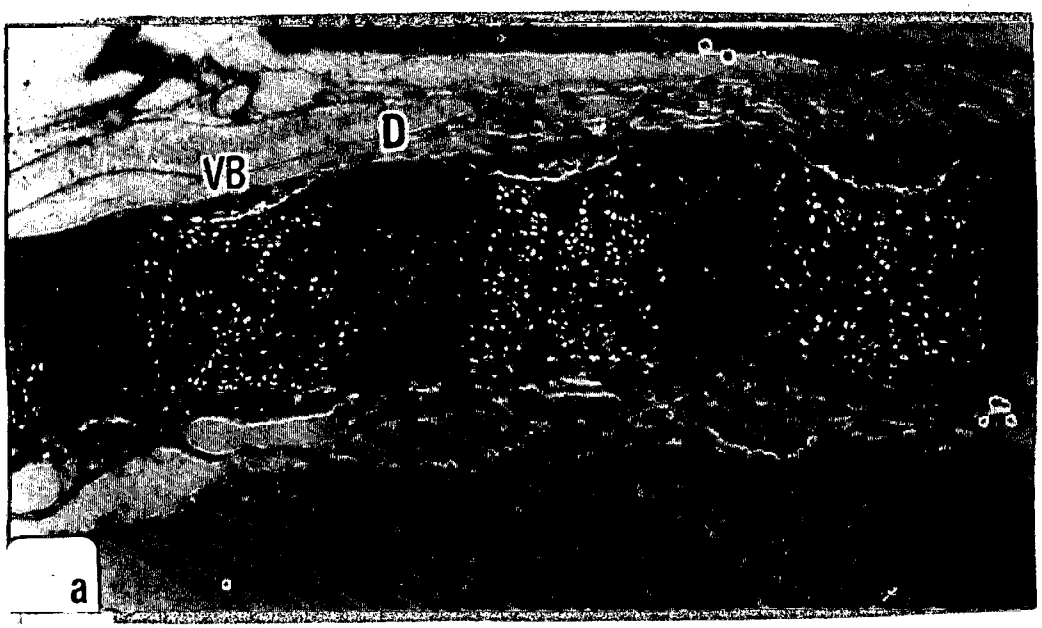
تصویر ۱۶ – ۳ : مقطع عرضی غضروف ساعد (رادیوس و اولنار) در جنین ۱۶ روزه

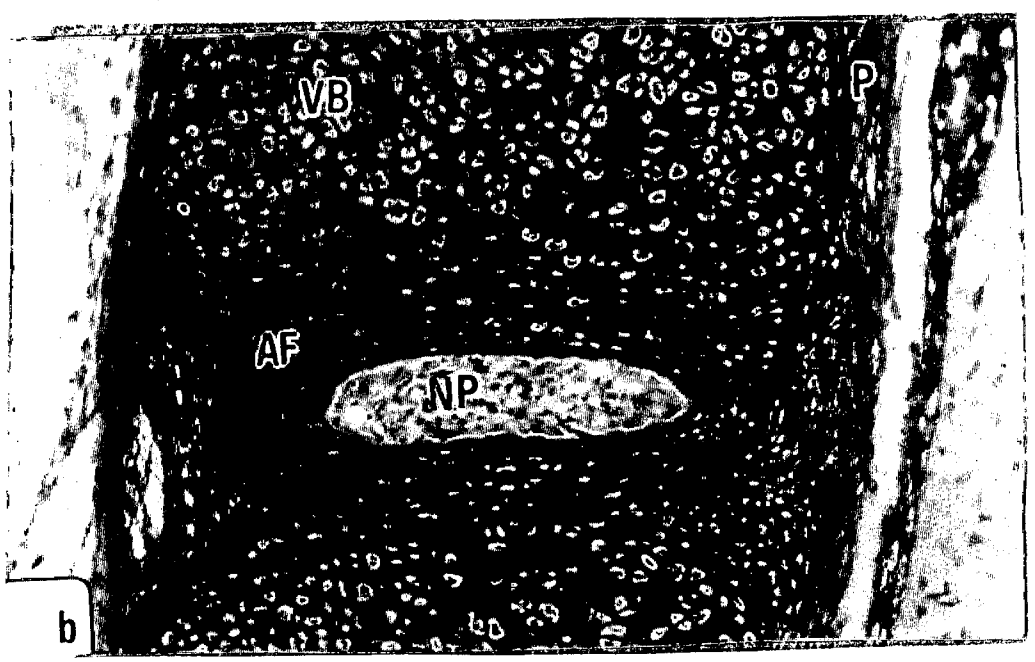
a : اثر لکتین VVA (x ۸۰) b : لکتین WFA (x ۱۶)

کتابخانه دانشگاه علوم و تحقیقات
بخش پایان نامه



تصویر ۱۷- ۳ : برش عرضی غضروف مکل در جنین ۱۵ روزه a : لکتین VVA b : WFA (x ۸۰)

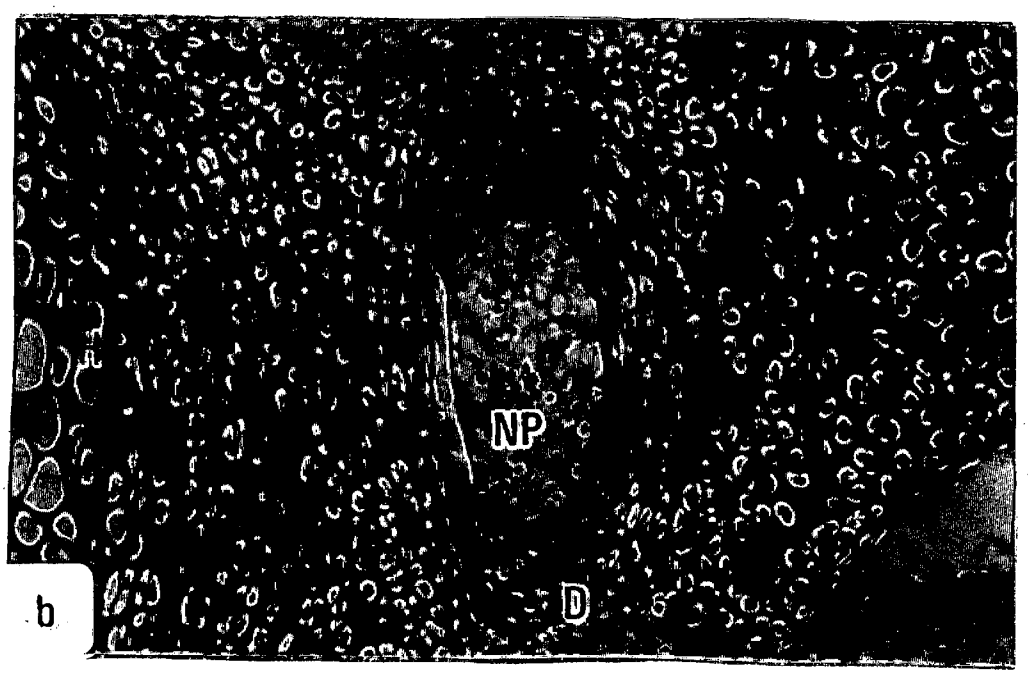




تصویر ۱۸ -۳ : مقطع طولی جنین ۱۸ روزه در محل جسم مهره و دیسک بین مهره ها با لکتین WFA

a : درشت نمایی (x ۱۶) b : ناحیه نوتوکورد (x ۴۰)





تصویر ۱۹ - ۳ : مقطع ناحیه مهره ها در جنین ۱۹ روزه a : جسم مهره در برش عرضی MPA (۱۰ x)

b : ناحیه نوتوکرود بین دو جسم مهره در برش طولی - لکتین OFA (۸۰ x)

لکتین / اندام	WFA		VVA	MPA
اندام حرکتی	سلول	+++++	+++++	++++
	Ecm	++++	++++	+
جسم مهره	سلول	++++	-	-
	Ecm	+++	++++	+
دنده	سلول	++++	+++++	+
	Ecm	++	+++	-
کف جمجمه	سلول	-	-	+
	Ecm	+++++	++++	-
شانه	سلول	++++	-	-
	Ecm	++	++++	-
مکل	سلول	+++	++	-
	Ecm	++	++++	-

جدول ۱۰ - ۳ شدت رنگ درغضروف اندامهای مختلف در برابر سه لکتین WFA و VVA و MPA در روز ۱۵ جنینی

E 17-20	E 15-17	E 13-15	E 11-13	روزها / لکتین ها
3.92	0.28	0.28	2.78	MPA
0.07	0.21	0.14	0.14	OFA

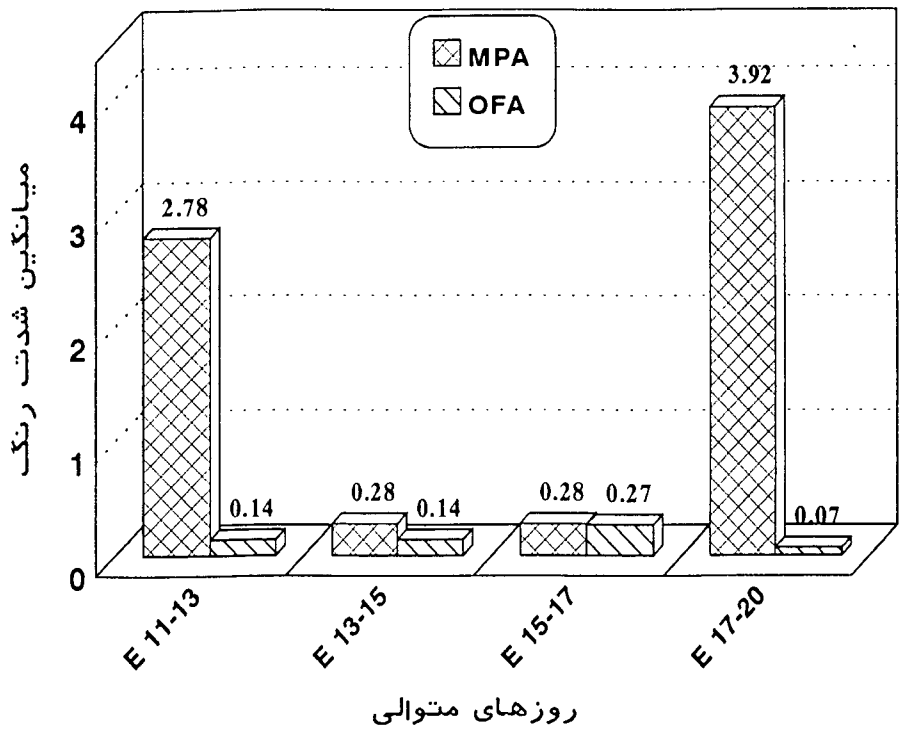
جدول۱۱ - ۳ میانگین شدت رنگ غضروف جسم مهره با دو لکتین MPA و OFA طی دوره های مورد مطالعه

دنده	جسم مهره	مکل	کف جمجمه	اندام حرکتی	اندامها / لکتین ها
3	3.71	2.5	2.5	4.42	WFA
3.71	1.82	2.96	2.07	4.17	**VV A**
0.53	0.53	0.1	0.32	2.72	MPA

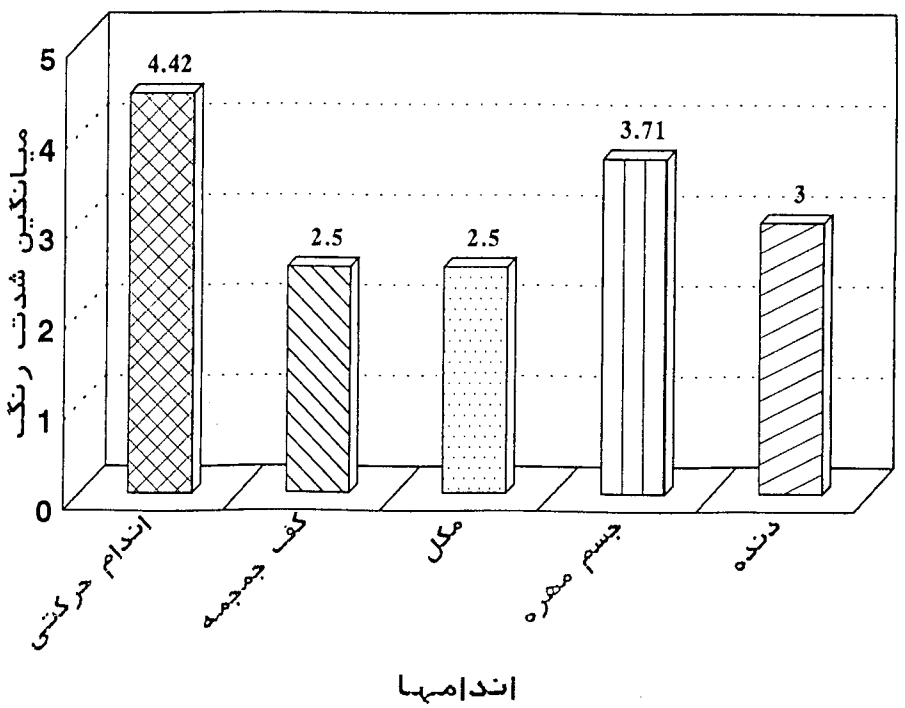
جدول ۱۲ - ۳ میانگین شدت رنگ غضروف اندامهای مختلف با لکتین های **WFA , VV A**

و MPA در روز ۱۵ جنینی

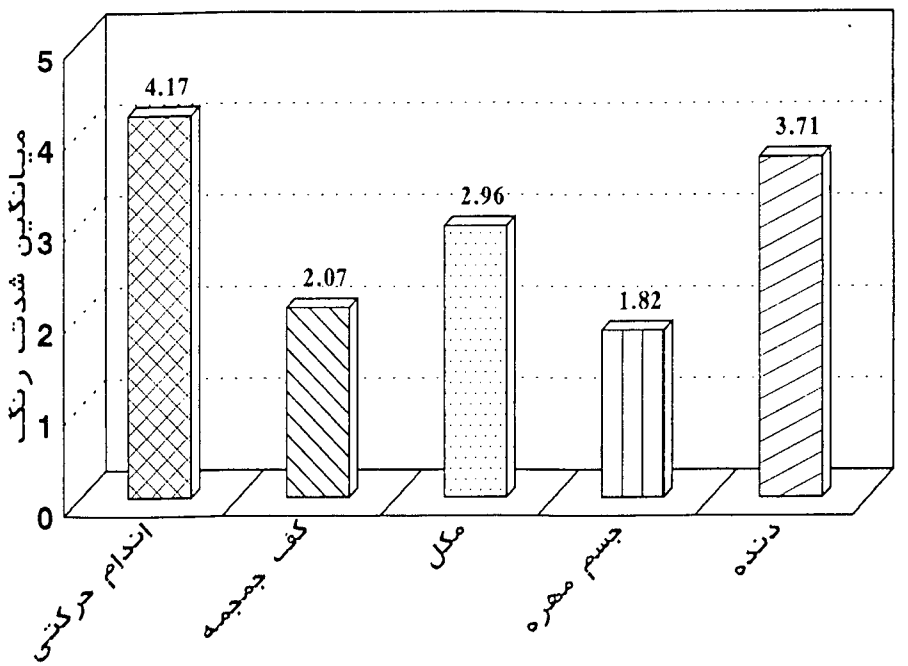
نمودار ۱۴ ـ ۳ : مقایسه میانگین شدت رنگ غضروف جسم مهره در برابر دو لکتین MPA و OFA طی دوره‌های مورد مطالعه



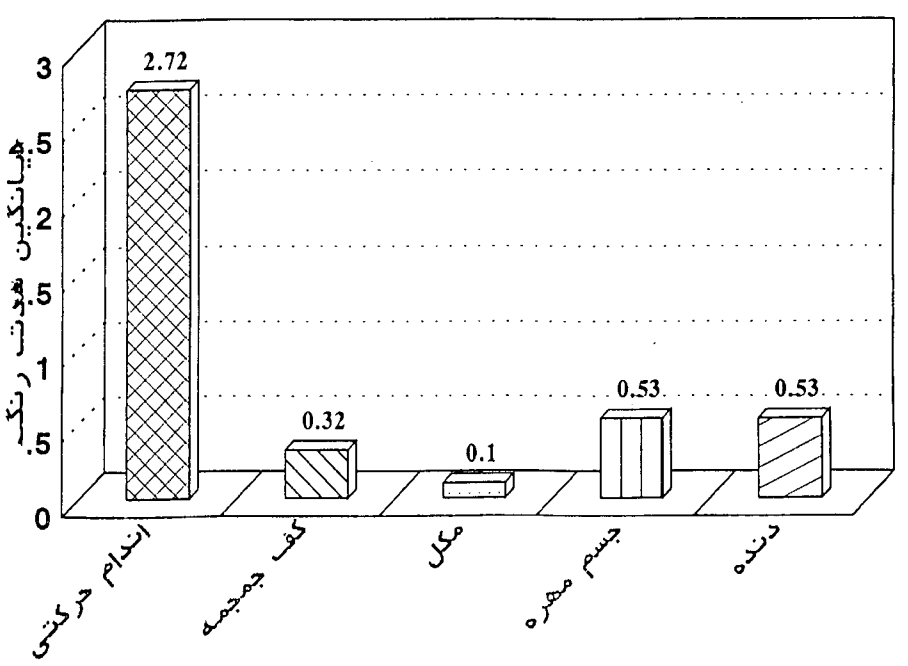
نمودار ۱۵ ـ ۳ : مقایسه میانگین شدت رنگ غضروف اندامهای مختلف در برابر لکتین WFA در روز ۱۵ جنینی



نمودار ۱۶ - ۳ : مقایسه میانگین شدت رنگ غضروف اندامهای مختلف در برابر لکتین VVA در روز ۱۵ جنینی



نمودار ۱۷ - ۳ : مقایسه میانگین شدت رنگ غضروف اندامهای مختلف در برابر لکتین MPA در روز ۱۵ جنینی



فصل چہارم

بحث

Discussion

در مسیر تکوین ، اندام زایی (organogenesis) وابسته به چهار عامل اساسی است: تعیین (Determination) رشد و نمو، موفوژنز و شکل سازی Pattern formation(Scott,1990) . هر یک از این مراحل به نوبه خود نیاز به تغییراتی در رفتار سلول دارد. مثلا در طی تمایز، سلول بیان مولکولهای مسئول چسبندگی را تغییر می‌دهد، از جمله مولکولهای CAMs ،گیرنده‌های سطح سلولی و مولکولهای ECM (Scott,1992) . تغییر چسبندگی با تغییر شکل سلول یا حرکت و عمل سلول همراه خواهد شد(Eritson,Torly-1993) . بسیاری از انواع مهم این ترکیبات گلیکوکانژوگه‌ها هستند که شامل ترکیبات قندی متصل به مولکولهای ECM یا سطح سلولها (مانند کلاژن، فیبرونکتین، لامی نین، فیبرینوژن و CAMها) می‌شوند (Werb,1997) . گلیکوپروتئینهای ECM دارای گیرنده‌های اختصاصی Integrin روی غشاء سلولها هستند و لذا اطلاعات متفاوت تنظیم کننده را به درون سلول منتقل می‌کنند و بر رشد، تمایز و مرگ سلولی تاثیر می‌گذارد (Yue,1996) . ترکیبات قندی در پدیده‌های مختلف رشد و نمو از جمله تشخیص، چسبندگی، مهاجرت، تکثیر سلولی، میان کنش سلولها و... اهمیت دارند (LE Douarin,1980-Gocht,Struckhoff-1996) . از طرفی میزان انواع ترکیبات قندی در همه مراحل رشد ونمو جنینی یکسان نیست. برخی در زمان خاصی که یک واقعه تکوینی روی می‌دهد بیان شده و سپس از بین میروند. (فاضل، ۱۳۷۴ - عرب، ۱۳۷۸). لذا نقش اختصاصی هر یک از آنها در هر مرحله از رشد و نمو، بصورت ویژه مرحله‌ای یا Stage specific مطرح می‌شود (Carratu,Steardo-1996-Van,etal-1997) . قند انتهایی بخش کربوهیداتی (Suger residue) این ترکیبات از جمله فوکوز، اسید سیالیک، گالاکتوز، N استیل گلوکز آمین و... در فرایند رشد و نموی بافتها نقشی حساس نشان می‌دهد و بر میان کنش‌های بین سلولی، سلول باECM، مهاجرت و تشخیص سلولی اثرات تنظیم کننده دارد (Maclaren,1996-Haynesworth,etal-1991) . عقیده بر این است که آنچه به عنوان القاء در هیستوژنز وجود دارد، مجموعه‌ای از ماکرومولکولهای بافتی است که به عنوان سیگنال عمل نموده و ECM واسطه این عملکرد است (Gullberg,1995-Ruoslahti,1987) . ترکیبات قندی مانند لکتینهای اندوژن، بعنوان لیگاند برای مولکولهای تشخیصی تنظیم کننده، در فرایند رشد ونمو دخالت دارند. (Vasta,Ahmad,1994) . در مطالعه حاضر بررسی برخی تغییرات این ترکیبات در سطح سلول، ECM یا داخل سلول انجام شد و با روشهای هیستوشیمیایی ردیابی ترکیبات قندی خنثی، اسیدی سولفاته یاکربوکسیله

و انواع متاکرومانیک از E_{12}-E_{21} در جنین رت صورت گرفت. اطلاعات حاصل از درجه بندی شدت رنگ آمیزی برای ترکیبات فوق مورد بررسیهای آماری قرارگرفته، تغییرات معنی دار برخی از آنها در دوره‌های مورد مطالعه گزارش شده است.با بررسی‌های هیستوشیمی لکتین نیز با دقت و حساسیت بیشتر انواع پایانه‌های قندی این ترکیبات در دوره‌های مورد مطالعه، متفاوت از هم، به قرار زیر معرفی شده‌اند.

بررسیهای هیستوشیمیایی :

غضروف اندامهای مورد مطالعه (شامل جسم مهره، دنده، اندام حرکتی، کندروکرانیوم و مکل) از رشد ونمو سلولهای مزانشیمی با سه منشاء مختلف جنینی (اسکلرتوم، سوماتوپلورا، ستیغ عصبی) حاصل می‌شوند(لاهیجانی - ۱۳۷۷). این سلولها در مسیرهای مختلف بدن جنین مهاجرت کرده، پس از استقرار در محل خود و تکثیر و تراکم سلولی (Condensation) بافت پیش ساز عضروف را تشکیل می دهند. سرنوشت بعدی ، تمایز کندروبلاست‌ها و سپس سنتز و ترشح ماتریکس بازوفیلی غضروف است(بلوم - ۱۳۷۵). در بروز هر یک از پدیده‌های رشد و نموی فوق که منجر به مورفوژنز بافتی می‌شوند، میان کنش‌های مختلف القایی دخالت دارند. ملکولهای واسطه در این فرآیند القایی عمدتاً گلیکوکانژوگه‌های ECM یا سطوح سلولی هستند (Haas,Tren1999) .گرچه اصول کلی روند تکوین بافت عضروفی اندامهای مختلف از طرح یکسانی پیروی می‌کنند، اما احتمالاً سلولهای مزانشیمی مختلف، مسیرهای تعیین شده (Determination) متفاوتی را طی میکنند که سبب تشکیل الگوهای اندامی متفاوت می‌شود. آیا در تعیین این مسیرهای مشخص، سلولها تحت تاثیر متفاوت انواع ملکولهای محیط پیرامون خود قرار دارند و آیا اهمیت نقش این ترکیبات و تغییرات آنها هماهنگ با الگوی زمانی خاصی است و مهم‌تر اینکه آیا کدامیک از این الگوها دارای ویژگی گونه‌ائی (Species specific) هستند و کدامیک قابل تعمیم به دیگر جانوران و انسان است؟ پژوهشگران متعددی نقش حساس بسیاری از ترکیبات قندی را در هریک از پدیده‌های تکوینی فوق مطرح کرده‌اند. اینها عمدتاً از تکنیک‌های آنتی بادیهای مختلف سودجسته‌اند (Johnson,etal-1999-Dezawa,Nagona-1996) . برخی مشاهدات نیز مانند بیماریهای التهابی و روماتوئیدی که درآنها اختلالات سنتز و حضور این ترکیبات در بافت غضروفی وجوددارد،نظریه‌های فوق راتایید می‌کنند(Heimer,etal-1992-Wittwer,Howard,1990-Goodarzi,1999) . از آنجا که مطالعه این ترکیبات در بسیاری از بافتهای بدن از جمله در چشم (عرب،۱۳۷۸)، گوش

(طلایی،۱۳۷۸)، قلب و تیموس (Fazel,1990) برپایه مطالعات هیستوشیمیایی، گویای وجود یک الگوی مشخص زمانی مکانی مطابق با پدیده‌های رشد و نموی بوده است، و از طرفی در بافت غضروفی مطالعات هیستوشیمیایی به موازات بررسیهای مرفولوژیک کمتر صورت گرفته است، ما بر آن شدیم تا با روشهای هیستوشیمیایی، بعضی ترکیبات ECM یا سطوح سلولی را در روزهای مختلف جنینی مشخص کرده و اهمیت آنها را در دوره رشد ونموی بافت غضروفی بررسی کنیم. لذا به کمک روشهای رنگ آمیزی آلسین بلو در pH های مختلف، پاس و تولوئیدین بلو بترتیب ترکیبات قندی اسیدی (سولفاته و کربوکسیله)، خنثی و متاکروماتیک را در اجزاء مختلف بافتی ردیابی و به کمک آنالیزواریانس، داده‌های حاصل از درجه بندی شدت رنگ آمیزی را تجزیه تحلیل نمودیم.

۱ - رنگ آمیزی آلسین بلو :

رنگ آلسین بلو با خاصیت بازی خود، برای شناسایی گلیکوزآمینوگلیکانهای (GAG) با خاصیت اسیدی در بافت‌های طبیعی و بیمار بکار می‌رود . برای تعیین جزئیات ملکولی انواع GAGهای اسیدی، از سطوح مختلف pH یا غلظت‌های بحرانی برخی کاتیونها به روش آلسین بلو CEC1-4 (Critical Electrolite Consentration) استفاده می‌شود(Bradbuty,1990) . GAG های اسیدی مانند هپارین، کراتان سولفات، کندروئتین سولفات و هپاران سولفات مقادیر مختلفی از گروههای سولفات یا کربوکسیل دارند. از این نظر انواع اسیدی به دو دسته S-GAG (سولفاته) و CGAG (کربوکسیله) تقسیم می‌شوند. برخی نمونه‌های کربوکسیله ممکن است سولفاته هم باشند. در شرایط عمومی گروههای سولفات در pH پائین‌تری نسبت به کربوکسیلات واکنش می‌دهند. GAG اسیدی سولفاته در pH=۱ و انواع کربوکسیله در pH=۲/۵ واکنش می‌دهند. در pH<۱ ترکیبات شدیداً سولفاته دارای رنگ پایدار خواهند بود. با توجه به خواص رنگهای فوق در اتصال تقریباً اختصاصی به ترکیبات اسیدی، می‌توان نتیجه گرفت که شدت رنگ مشاهده شده گویای شدت غلظت ترکیبات فوق می‌باشد. لذا با توجه به اختلاف معنی دار شدت رنگ در برخی موارد، نمی‌توان این تفاوت را تصادفی تلقی نمود.

در نتایج حاصل از این تحقیق بررسیهای درون گروهی شدت رنگ با استفاده از تست Wilcoxon در اوایل دوره مورد مطالعه (E_{11}-E_{13}) در غضروف اندامهای مختلف گویای تفاوت آماری معنی دار (p=۰/۰۰۱) بین

واکنش آلسین بلو در pH=۱ و pH=۲/۵ بود (جداول ۴-۳ تا ۶-۳، نمودارهای ۱-۳ و ۲-۳). در اوایل دوره مطالعه واکنش در pH=۲/۵ در حد متوسط ظاهر شد در حالیکه واکنش مثبت برای pH=۱ در این مرحله ضعیف و از مراحل بعدی آغاز می‌شد. لذا ظاهراً وجود ترکیبات اسیدی کربوکسیله در اوایل دورهٔ مورد مطالعه نقش بسیار مهمی بعهده دارد. از جمله ترکیبات GAG اسیدی کربوکسیله که احتمالاً باعث قسمتی از پاسخ در شرایط pH=۲/۵ شده است، اسید هیالورنیک می‌باشد. از حوادث کلیدی در مورفوژنز اندامها و اولین پدیده در رشد و نمو بافت غضروفی، مهاجرت سلولهای مزانشیمی اجدادی از مراکز اولیه به سمت محل آینده اندام‌ها است (Bradhman,Passaniti-1995).

اسید هیالورنیک به سلولهای مزانشیمی در حال مهاجرت ودیگر سلولهای مهاجر (ستیغ عصبی) متصل شده و به علت هیدراته بودن، سطح سلولها را سست و سلولها را از هم جدا نگه میدارد و از طریق سست کردن اتصالات بین سلولی، به طرز غیر مستقیم در مهاجرت آنها دخالت می‌کند. از طرفی اسید هیالورنیک (H.A) به گیرنده‌های خود در سطح غشاءهای سلولی متصل و مستقیماً در مهاجرت آنها دخالت می‌کند(Peach,etal-1993). با در نظر داشتن نقش H.A به عنوان یک GAG کربوکسیله، افزایش زود هنگام پاسخ آلسین بلو در pH=۲/۵ نسبت به pH=1 قابل توجیه می‌شود. به عبارتی در مراحل اولیه تکوین بافت غضروفی که سلولهای مزانشیم درحال مهاجرت به این منطقه هستند، مقدار GAG کربوکسیله نسبت به انواع سولفاته بیشتر بوده است. منطبق با این یافته تحقیق حاضر Peachو همکارانش در سال ۱۹۹۳ در ماتریکس پیش ساز غضروفی جوانه اندام حرکتی، در مراحل اولیه رشدونمو مقدار H.A را نسبت به کندروئتین سولفات بیشتر برآورد نمودند. همچنین Krahn وZschabitz در سال ۱۹۹۵ نیز درمراحل اولیه تکامل غضروف کندروکرانیوم، مکل، اندام حرکتی، جسم مهره و دنده با روشهای هیستوشیمیائی غلظت H.A را در نواحی پیش ساز غضروفی بیشتر ارزیابی نمودند.بدنبال استقرار سلولهای پیش ساز غضروفی درنواحی مورد نظر، دومین حادثه مهم درکندروژنز اندام‌ها، تجمع و تراکم سلولهای مزانشیم اجدادی (Condensation) می‌باشد(Cormak,1988). این مرحله در مطالعه مرفولوژیک به دوره مربوط می‌شد. در این مرحله شدت رنگ آلسین بلو pH=۲/۵ نسبت به مرحله قبل بیشتر بود. آزمون Mann-Whitney (E_{13}-E_{15}) اختلاف شدت واکنش به AB (pH=۲/۵) را بین مرحله (E_{11}-E_{13})

و (E_{13}-E_{15}) با ($P=۰/۰۰۱$) معنی‌دار نشان داد. (جداول ۴-۳ تا ۷-۳، نمودارهای ۱-۳ تا ۵-۳). این امر گویای افزایش حضور GAG های سولفاته درمرحله تجمع سلولهای مزانشیمی بود. از جمله ترکیبات فوق که احتمالاً قسمتی از واکنش مثبت رادر این بررسی موجب شده‌اند، کندروئتین سولفات (C.S) و هپاران سولفات (H.S) می‌باشند. کندروئتین سولفات (C.S) مقدمه تجمع سلولهای پیش ساز غضروفی رافراهم کرده (Grumet,Friedlander-1996)، در تنظیم تحرک سلولی و چسبندگی آنها دخالت دارد (Morris,Tucke,1989-Snow,Brown-1996) H.S . (هپاران سولفات) نیز با توانائی اتصال به فاکتورهای رشد، بر تنظیم تکثیر سلولی و رشد بافتی تاثیر می‌نهد (Gould,etal-1995). نقش فاکتور رشد TGF در کندروژنز موش از طریق اتصال H.S وایجاد تراکم پیش سازهای کندروژنیک به‌عنوان یک واقعه مشخص غضروف‌سازی اعمال می‌شود (Frade,1996,Kawai,1999). کلیه پژوهشهای فوق در اهمیت نقش C.S و H.S (به عنوان S-GAG) در تراکم سلولهای مزانشیمی اتفاق نظر دارند. گرچه هریک از محققین ذکر شده مکانیزم‌های متفاوتی راپیشنهاد نموده‌اند .در نتیجه مشاهده ازدیاد غلظت GAG های سولفاته از مرحله (E_{13}-E_{15}) در مطالعه حاضر، که همگام با ازدیاد تراکم سلولی است، احتمالاً به دلیل تاثیر مولکولهای فوق براین واقعه مهم غضروف زائی است.

Arikawa و Watanabe در سال ۱۹۹۹ یک نوع پروتئوگلیکان هپاران سولفاته (HSPG) به نام Perlecan معرفی نمودند. با تخریب ژن مربوطه ۴۰٪ از جنین‌های E_{10} موش به دلیل نواقص ناحیه سفالیک از بین رفتند. وجود پرلکان در بافت پیش غضروفی ارتباط ECM با فاکتورهای رشد را باعث شده و درحکم یک سیگنال سلولی عمل می‌کند (Arikawa,Watanabe-1999). French و همکارانش نیز در سال ۱۹۹۹ طی مطالعه نواحی پیش ساز غضروفی در مرحله E_{14} جنین موش، مقدار perlecan را نسبت به مرحله E_{12} بیشتر گزارش کردند. آنها در مطالعه دیگری با روش آلسین بلو نشان دادند که این ماده در محیط کشت، فعالیت کندروسیتی سلولهای تمایز نیافته راالقاء می‌کند (French,etal-1999). همچنین Sechriest و Miao در سال ۲۰۰۰ با تجارب مشابه، صحه بر مطالب فوق نهادند. حضور C.S نیز در مرحله تجمع سلولهای مزانشیمی کپسول گوش در رت به روش آلسین بلو CEC توسط طلایی در سال ۱۳۷۸ به نمایش درآمد.

نتایج تحقیقات فوق همگی ازدیاد ترکیبات GAG سولفاته را در مراحل میانی کندروژنز نشان میدهند. ما نیز در

کتابخانه دانشکده علوم و تحقیقات
بخش پایان نامه

تحقیق خود ازدیاد ترکیبات فوق را در مرحله E_{13}-E_{15} به نمایش درآوردیم که با نتایج بدست آمده در مطالعات مشابه، همخوانی داشته است. از طرفی بررسی دقیق منطقه واکنش، غلظت ترکیبات S-GAG را در فضای داخل سلول بیشتر نشان داد. این واکنش احتمالاً مربوط به نواحی فعالیت گلیکوزیله شدن یا سولفاته شدن ترکیبات قندی در منطقه گلژی است. به نظر می‌رسد بتوان با ردیابی S-GAGها به عنوان یک نشانه مشخص، از تعیین سرنوشت غضروفی و تمایز کندروبلاست‌ها اطمینان حاصل کرد، کما اینکه Atkinson و همکاران در سال ۱۹۹۷ در مطالعه رشد و نمو بافت غضروفی برای تشخیص سرنوشت بافت غضروف از چند روش نام برده اند از جمله: ۱ - تشخیص هیستولوژیک پروتئوگلیکانهای سولفاته ۲ - تشخیص مورفولوژیک کندروسیت‌ها ۳ - بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی. مانیز جهت نیل به اهداف این تحقیق از یافته‌های این دانشمند سود جستیم.

در بررسی‌های آماری از طریق تست Kruskal Wallis میانگین شدت رنگ آلسین بلو در pH های مختلف، طی دوره‌های مورد مطالعه با $P=۰/۰۰۱$ و $P=۰$ دارای اختلاف آماری معنی‌دار بود (جداول ۴-۳ تا ۶-۳، نمودارهای ۲و۱-۳، ۶و۵-۳). در این مورد در اواسط مراحل رشد و نمو بافت غضروفی همه اندام‌ها (E_{15}-E_{17})، شدت واکنش در برابر آلسین بلو نسبت به مراحل اولیه بسیار شدیدتر مشاهده شد. این اختلاف واکنش در دوره‌های مورد مطالعه، دال بر وجود مقادیر زیاد GAG های اسیدی در مراحل میانی و انتهایی کندروژنز بود. مطالعه مرفولوژیک رشد و نمو بافت غضروفی نشان داد که پس از مرحله تراکم سلولی، تمایز با سرنوشت کندروبلاستی صورت گرفت. این پدیده با تغییرات مشخص مرفولوژیک و فیزیولوژیک در سلولها همراه بود. کندروبلاست‌های کروی که به تازگی از مزانشیم تکوین یافته بودند، با ساختن ترکیبات اسیدی ماتریکس غضروف و ترشح آن، طرح غضروفی پیش ساز اندام را مشخص نمودند. مراحل فوق در دوره (E_{15}-E_{17}) مشاهده شد. همانطورکه قبلاگفته شد، بخشی از واکنشهای فوق در برابر آلسین بلو، احتمالا مربوط به انواع مولکولهای GAG از جمله کندروئتین سولفات، هپاران سولفات، اسید هیالورنیک و غیره است. ازدیاد کندروئتین سولفات شکل کروی سلولهای غضروفی را القا می‌کند (Chen,Johenson-1995) و همچنین استحکام ماتریکس را باعث شده و حالت منفذدار (Porous) آن را از بین می‌برد. این ماده در تنظیم چسبندگی سلولی و تکثیر و تمایز آنها نیز دخالت دارد (Grumet,1995). از طرفی هپاران سولفات نیز با توانایی اتصال به

فاکتورهای رشد، کنترل مراحل تمایز بافت را بعهده دارد(Litweak,etal-1998) . اسید هیالورنیک به عنوان یک C-GAG مهم با دخالت در تقسیم سلولی، بر پیشرفت مرحله تکثیر کندروبلاست‌ها اثر می‌نهد(Edelman,1988) . با توجه به اعمالی که برای انواع GAG های اسیدی ذکر گردید، لذا بنظر می‌رسد ازدیاد این دسته از ترکیبات در مراحل میانی کندروژنز، احتمالا در تکثیر و تمایز کندروبلاست‌ها و تعیین مرفولوژی و فیزیولوژی مناسب آنها، موثر است. مطالعات دیگر محققین نیز به روشهای متفاوت وجود این ترکیبات را در مرحله تکثیر بافت غضروفی تایید می‌نماید. از جمله Yang در سال ۱۹۹۱ با مطالعه کندروسیت‌های صفحه رشد اپی‌فیز جنین جوجه، با استفاده از رنگ‌آمیزی ایمینوهیستوشیمیایی در سلولهای ناحیه استراحت و تکثیر، یک نوع گلیکوپروتئین هپاران سولفاته بنام Fetuin شناسایی نمود. این ماده با دخالت در فعالیت آلکالین فسفاتاز، تنظیم فنوتیپ کندروسیتها را بدنبال دارد. Neam در سال ۱۹۹۴ و Lvo در سال ۱۹۹۶ نوعی پروتئوگلیکان کندروئتین سولفاته بنام Aggrecan را به روش مشابه در ماتریکس غضروف در مرحله تکثیر معرفی نمودند.

مطالعات مرفولوژیک در انتهای دوره تکوین بافت غضروفی (E_{17}-E_{20}) حاکی از گسترش نواحی هیپرتروفی کندروسیت‌ها بود. درین مرحله همچنان شدت واکنش به آلسین بلو با pH های متفاوت، بالا بود و انجام آزمون Mann-Whitney بین دوره‌های میانی و انتهایی مورد مطالعه، اختلاف معنی دار شدت رنگ را نشان نداد. این نتیجه برحضور قابل توجه مولکولهای GAG اسیدی در نواحی هیپروتروفی و تقریبا به همان مقدار در نواحی تکثیرگواهی داشت. از آنجاکه طی این مراحل، فعالیتهای تکثیر و تمایز سلولهای غضروفی همچنان ادامه دارد، لذا عدم تغییر شدت واکنش بازوفیلی که ما به آن دست یافتیم، منطقی بنظر می‌رسد. در همین راستا Tucker در سال ۱۹۹۵ ضمن مطالعه کندروژنز در جنین جوجه نتایج مشابهی ارائه کرد. او در سال ۱۹۹۷ با معرفی نوعی H.S.P.G که به آن Thrombospondin نام نهاد، از طریق روشهای in situ هیبریداسیون و تخریب آنزیمی بوسیله RNAse، نوع TSP-1 را در کندروسیت‌های ابتدایی و نوع TSP-3 را در مرحله دیرتر یعنی مرحله تکثیر و هیپرتروفی ردیابی نمود. French نیز در سال ۱۹۹۹ حضور Perlecan (HSPG) را در مراحل انتهایی در ایجاد ناحیه هیپرتروفی موثر دانست واز این نظر آن را مارکر مراحل انتهایی کندروژنز معرفی کرد. مطالب فوق همسو با نتایج حاصل از این تحقیق با استفاده از روش آلسین بلو برای نمایش GAGهای اسیدی

در مراحل هیپرتروفی بوده است و بنظر می‌رسد مواد فوق در این مرحله از روند کندروژنز نقشی حساس برعهده دارند.

بررسی آماری نتایج حاصل از شدت واکنش داخل سلولی در پاسخ به اثر آلسین بلو نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار ($P=۰/۰۱$) در بین گروههای مورد مطالعه بود. در این مورد واکنش داخل سلولی بتدریج در اواخر مرحله هیپروتروفی (E_{17}-E_{20}) بسیارکاهش یافته بود که خود بیانگر حضور مقادیر بیشتر GAGهای اسیدی در فضای داخل سلولی ناحیه رشد و تکثیر بود(جدول ۸-۳). این مسئله شاید بدلیل شدت فعالیت هسته و اندامکهای داخل سلولی به منظور ازدیاد سنتز پروتئوگلیکانهای اسیدی باشد که از طریق افزایش فعالیتهای پروتئین سازی، گلیکوزیله‌شدن، سولفاته‌شدن و غیره صورت می‌گیرد. احتمالا مناطق دارای دستگاه گلژی در سلول از جمله نواحی مهم تولید این ترکیبات و پاسخ به رنگ مزبور می‌باشند. نتایج تحقیقات متعددی حاکی از اوج فعالیت آنزیماتیک سلولهای غضروفی در مرحله تکثیر و تمایز است (Tsonis,Walker,1991-Granovsky,etal-1995). این پژوهشها بطور غیرمستقیم با معرفی آنزیم‌های فعال در این مرحله، شدت فعالیت سلولها را در سنتز و ترشح ترکیبات قندی و بعضا ایجاد خاصیت بازوفیلی مطرح کرده‌اند. Granovskyو همکارانش در سال ۱۹۹۵ با مطالعه بافت‌های در حال غضروف‌سازی در جنین موش مرحله E_{13}-E_{15} با روش in situ RNA هیبریداسیون، حضور گالاکتوز N استیل آمین‌تر انسفراز را گزارش نمودند. این آنزیم از مهمترین آنزیمهای سنتز گلیکوکانژوگه‌های مسیر O-Link یا N-Link است(Fukuda,etal-1994). در نتیجه با توجه به شرایط فیزیولوژیک سلولها، مشاهده مقدار زیاد GAG های اسیدی در مرحله تکثیر سلولی طبیعی به نظر می‌رسد. از طرفی در مراحل انتهایی تکوین بافت غضروفی (E_{17}-E_{20}) میانگین شدت واکنش به رنگ آلسین بلو در سطوح سلولی و ECM درگروههای مورد مطالعه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار با $P<۰/۰۵$ بود(جدول ۸-۳). لذا از مجموع آزمونهای آماری فوق در بخش‌های مختلف هر بافت، این نتیجه حاصل شد که شدت واکنش در مراحل انتهایی عمدتا مربوط به افزایش حضور GAGهای اسیدی در سطوح سلولی و ECM آنها است. در واقع واکنش شدید درون سلولی که در مراحل قبل دیده می‌شد، اکنون به محیط خارج سلول منتقل شده است. بدیهی است ارگانل‌های سلولی و حتی هسته سلول طی مرحله اخیر در حداقل فعالیت بیولوژیک به سر می‌برند. قسمتی از واکنش‌های فوق احتمالاً مربوط به ترکیبات قندی سطوح سلولی است. سلولهای مختلف در سطح خود حاوی مولکولهای گیرنده‌ای هستند که عمدتا از زنجیره‌های جانبی هیدرات کربن تشکیل شده‌اند و به عنوان گلیکوکالیکس معرفی می‌شوند(Molteni,Modrowski-1999). سلولها با دریافت انواع پیامها (مانند هورمونها، فاکتورهای رشد و

غیره) از طریق گیرنده‌های سطحی خود و پاسخ‌های مناسب سلولی، تخصص یافتگی و تمایز را باعث می‌شوند (Gullberg,1995). از این جهت انواع گلیکوپروتئین‌های سطح سلولی شامل مولکولهای چسبانده سلولی (CAM_s) و کادهرین‌ها با استفاده از مکانیزم فوق بر روند هیستوژنز مؤثرند. بعلاوه این مولکولها با نواحی کربوکسیله خود در غشاء سلولها از محل انتهای آمینی مولکول به دیگر مولکولهای مشابه سلول مجاور می‌چسبند و به این طریق باعث تجمع و تکثیر سلولی می‌شوند (Schachner,1989). در ارتباط با اهمیت نقش ترکیبات GAG اسیدی در ECM و سطوح سلولی، یافته‌های فراوان محققین به چشم می‌خورد. از جمله ترکیب Syndecan از انواع پروئیوگلیکانهای هپاران سولفاته‌ای است که در سطح سلولهای جنینی شناسایی شده است (Bernfield,Kokenyesi,1992-Tucker,etal,1994). همانطور که می‌دانیم هپاران سولفات، گلیکوزآمینوگلیکانی است که در ارتباط مستقابل بین سلول و ECM دخالت می‌کند (Molteni,1999-Garcia,1997). همچنین ترکیب هپاران سولفاته دیگری بنام Perlecan در غشاء پایه کندروسیت‌ها معرفی گردید که در سازمان‌یابی ساختمان ستونی آنها و استخوان سازی درون غضروفی تاثیر می‌گذارد (Arikawa,Watanabe-1999). با توجه به نقشی که به این مولکولها نسبت داده می‌شود، افزایش غلظت آنها در ECM و سطوح سلولی در روزهای آخر جنینی که ما نیز در تحقیق خود به آن دست یافتیم، بدلیل نقش کلیدی این ترکیبات در فرآیند کندروژنز و انجام مناسب مراحل استخوانسازی داخل غضروفی است.

کندروسیت‌های هر ناحیه غضروفی در ECM مشخصی با ماکرومولکولهای معین قرار می‌گیرند. طی تمایز کندروسیتها، کلیدهای مشخصی جهت انتقال منطقه تکثیر به رسیدگی و تبدیل این مرحله به منطقه هیپروتروفی وجود دارند. ECM (و سطوح سلولها) با سیگنال‌های جدید دریافتی به وسیله گیرنده‌های گلیکوکالیکس خود، عامل این پیشرفت تمایزی می‌گردند (Rademacher,Parkh-1988). Chen و Johenson در سال ۱۹۹۵ با جداسازی کندروسیتهای مرحله هیپرتروفی از محیط ECM خود، آنها را در شرایط انکوباسیون قرار دادند. سپس با ردیابی ایمینوسیتوشیمی، توقف سنتزکلاژن و آگریکان را گزارش نمودند و از این طریق بر اهمیت ریز محیط سلولها Microenvirnoment در فرآیند رشد و نمو آنها تاکید کردند.

شدت رنگ حاصل از واکنش آلسین بلو در pH های مختلف که در تحقیق ما الگوی پراکندگی زمانی - مکانی متفاوتی را نشان داد، به تفاوت درجه سولفاته شدن و کربوکسیله‌شدن ترکیبات قندی اندامها مربوط است(Bradbury,1990) و به نظر می‌رسد با سن جنین نیز ارتباط دارد (Brahman,1995). انتشار متفاوت این ترکیبات به وظایف فیزیولوژیک آنها مربوط بوده و ظاهرا همراه با رخدادهای مهم تکوینی است.

۲ - رنگ‌آمیزی *PAS*

از جمله ترکیبات مهم بافت‌ها که PAS مثبت هستند ترکیبات قندی خنثی (موکوپلی ساکاریدها یا پرتئوگلیکانها و گلیکو پروتئین‌های خنثی) را می‌توان نام برد. از آنجا که ترکیبات مختلفی در بافت‌ها دارای واکنش PAS مثبت هستند و این رنگ‌آمیزی یک روش نیمه اختصاصی است، برای یک بافت منفرد روش تشخیص مشخص و منحصربفردی نیست و بهتر است از دیگر روشها تواماً استفاده گردد. از جمله روش پاس - آلسین بلو (pH=۲/۵) که به افتراق ترکیبات قندی خنثی و اسیدی از هم می‌پردازد(Bradbury,1980).

در بررسی این تحقیق بین دوره‌های ابتدایی و انتهایی مورد مطالعه، میانگین شدت پاسخ به رنگ، تفاوت آماری معنی‌دار با P=۰/۰۰۳ نشان داد (جداول ۴-۳ تا ۷-۳، نمودارهای ۳-۳ و ۷-۳) به واسطه وجود این اختلاف، واکنش منطقه هیپرتروفی در اواخر دوره مورد مطالعه تقریبا منفی بود. گرچه پاسخ منفی واکنش رنگ به طور قطعی حاکی از فقدان آن ماده نیست و شاید غلظت کم ترکیب فوق مانع از تشخیص آن به کمک روشهای مورد استفاده در این تحقیق می‌شد. واکنش شدید رنگ PAS که تا دوره میانی کندروژنز مشاهده شد، بدلیل وجود مقادیر زیاد ترکیبات قندی خنثی (گلیکوپروتئین‌ها و پروتئوگلیکانهای خنثی) می‌باشد. از آنجا که واکنش PAS مختص پروتئوگلیکانها نیست و گلیکوپروتئین‌ها نیز به آن پاسخ می‌دهند، لذا حداقل قسمتی از رنگ مشاهده شده شاید مربوط به حضور این ترکیبات باشد.

از گلیکوپروتئین‌های مهم بافت غضروفی، کلاژن (نوع یک،دو و ده) و فیبرنکتین را می‌توان نام برد. انواع مولکولهای کلاژن احتمالا در قسمتی از واکنش مشاهده شده در این تحقیق دخالت داشته و لذا در فرآیند کندروژنز نقش اساسی دارند. اهمیت این نقش به حدی است که بسیاری از دانشمندان برخی از انواع مولکولهای کلاژن را به عنوان مارکر مراحل کندروژنز معرفی نموده‌اند. از جمله Kergossen در سال ۱۹۹۸ در تحقیقات خود با کشت سلولهای غضروف بینی (nasal) در جنین ۱۵ روزه رت با استفاده از تکنیک‌های

ایمینوهیستوشیمی و ردیابی مولکولهای کلاژن، آنرا به عنوان مارکر تمایز کندروسیتی معرفی نمود. همچنین Sechries و Miao در سال ۲۰۰۰، Johnson و همکارانش در سال ۱۹۹۹ کلاژن نوع دو را مارکر اولیه و کلاژن نوع ده را مارکر نهایی کندروژنز معرفی کردند. بواسطه نقشهای فوق، حضور احتمالی این ترکیب در مرحله تجمع سلولی (E_{11}-E_{13}) و تمایز کندروبلاست‌ها (E_{13}-E_{15}) قابل توجیه می‌شود. Huang و Bark در سال ۱۹۹۹ با مطالعه سلولهای متراکم مزانشیمی در غضروف جنینی نازال و ماندیبول موش، حضور کلاژن نوع I و II را در مرحله (E_{11}-E_{14}) با روشهای ایمینوهیستوشیمی گزارش کردند. یافته‌های فوق منطبق با نتایج تحقیق حاضر، دال بر اهمیت حضور گلیکوپروتئین‌های فوق در مراحل مختلف کندروژنز است.

فیبرونکتین دیگر گلیکوپروتئین مهم بافت غضروفی است که احتمالا در ایجاد بخشی از واکنش مشاهده شده در برابر PAS دخالت داشته است. از جمله نقشهای اساسی این ترکیب تاثیر در مهاجرت سلولهای مزانشیمی و تکثیر و تمایز آنها است (Burton,Last-1995). فیبرونکتین به کمک دیگر ترکیبات بافتی (ازجمله CAMها)، در میان کنش سلول - سلول یا سلول - ECM دخالت دارد و از این طریق سبب چسبندگی سلولهای کندروسیتی به زمینه خود می‌گردد (Chevalier,1993). با توجه به نقشهای ذکر شده برای این ترکیب، حضور فیبرونکتین به عنوان یک نوع گلیکوپروتئین خنثی در مرحله تجمع سلولهای مزانشیمی (E_{11}-E_{13}) و مرحله تمایز بافت غضروفی (E_{13}-E_{15}) بسیار ضروری بنظر می‌رسد. برخی مشاهدات پژوهشگران نیز این انتشار مکانی - زمانی خاص را تایید می‌کنند. Chimal و همکارانش در سال ۱۹۹۹ بیشترین مقدار فیبرونکتین را در شرایط In vitro، در مرحله تجمع سلولهای مزانشیمی جوانه اندام حرکتی موش به دست آورد. Kawai نیز در همان سال در سلولهای فوق با بکار بردن فیبرونکتین کندروژنز را تحریک نمودند. از آنجا که در تکنیک پاس، ترکیبات گلیکوپروتئینی و پروتئوگلیکانهای خنثی هر دو در بروز واکنش مثبت نقش دارند، ما در نتایج این تحقیق، علاوه بر احتمال حضور گلیکوپروتئینهای ذکر شده (کلاژن و فیبرونکتین)، به حضور احتمالی پروتئوگلیکانهای خنثی و نقش آنها در مراحل تجمع سلولی و تمایز بافت غضروفی اشاره می‌کنیم. گرچه استفاده از روشهای هضم آنزیمی، در معرفی دقیق هر یک از انواع ترکیبات فوق بطور جداگانه، سودمند خواهد بود.لازم به ذکر است که واکنش PAS مثبت در فضای داخل سلولی بیشتر مشاهده می‌شد و بخصوص در مرحله میانی رشد و نمو بافت غضروفی که ECM به حداکثر مقدار خود رسیده بود، پاسخ قابل توجهی با PAS در

ECM مشاهده نشد. این مسئله شاید بعلت تمرکز زیاد ترکیبات قندی خنثی در فضای کوچک داخل سلولی باشد که پاسخ به رنگ را مناسب‌تر نشان می‌دهند. از طرفی احتمالاً اثر پوششی شدید واکنش AB بواسطه غلظت بسیار بیشتر ترکیبات اسیدی ماتریکس، مانع از مشاهده شدت اصلی واکنش ECM در برابر PAS می‌شود. لذا بررسیهای بیشتر این نکته با استفاده از روشهای متعدد، جنبه‌های بیشتری از مسئله فوق را توضیح خواهد داد.

۳ - رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو

این رنگ‌آمیزی یکی از روشهای متاکرومازی است. واکنش متاکروم در ترکیبات GAG اسیدی مثبت بوده، شدت واکنش به درجه سولفاته شدن آنها بستگی دارد. ترکیبات مختلف از این نظر متفاوتند و یک زنجیره ساده GAG می‌تواند بصورت ۴ سولفات، ۶ سولفات یا ۶ و ۴ سولفات باشد. بعلاوه واحد اسید گلوکورنیک هم می‌تواند سولفاته شود. هپارین، هپاران سولفات و کراتان سولفات، سولفاسیون یکسانی ندارند. گروههای اسیدی روی ترکیبات GAG توانایی اتصال به رنگ را دارند. اگر این گروهها خیلی بهم نزدیک باشند، ملکولهای رنگ نیز بهم متصل و پلیمر می‌سازند و در نتیجه واکنش متاکرومازی پیش می‌آید. GAG های با سولفورکمترکه واکنش تغییر رنگ را نشان نمی‌دهند، ترکیبات ارتوکروماتیک هستند. برخی GAG های اسیدی مثل کندروئتین سولفات به روش رنگ‌آمیزی آلسین بلو در غلظتهای بحرانی کاتیون (CEC2) پاسخ می‌دهند، اما متاکروم نیستند. زیرا فاصله گروههای سولفوری در آنها بیشتر از حد لازم برای ایجاد حالت متاکرومازی است. لذا عدم مشاهده واکنش متاکرومازی دلیل عدم وجود سولفاته‌ها نیست. در بین GAGهای سولفاته، هپارین و کراتان سولفات بسیار قویتر سولفاته هستند (Kaaijk,1997-Hiraki,1991) و بخصوص کراتان سولفات تنها دارای گروههای سولفاته است (گروه کربوکسیله ندارد). برخی ترکیبات سولفاته، کربوکسیله نیز می‌شوند (Azuma,1994).

ما در تحقیق حاضر با تجزیه تحلیل آماری نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو در بین گروههای مورد مطالعه، از نظر شدت واکنش متاکرومازی اختلاف آماری معنی داری با $P=0$ مشاهده کردیم (جداول ۴-۳ تا ۷-۳، نمودارهای ۴-۳ و ۸-۳). این اختلاف شدید، گویای حضور بسیار افزایش یافته ترکیبات قندی شدیداً سولفاته در روزهای میانی و انتهایی مورد مطالعه بود. در حالیکه سلولهای مزانشیمی تجمع یافته در نواحی

پیش ساز غضروفی اندامها، حالت ارتوکرومازی نشان دادند. تغییر شدت واکنش ترکیبات GAG قویا سولفاته، احتمالا به دلیل تغییرات فیزیکی شیمیایی این ترکیبات در روزهای مختلف جنینی است. اما بهرحال بنظر میرسد GAG های فوق نقشی مهم در مراحل میانی تمایز و هیستوژنز بافت غضروفی بعهده دارند. گرچه عدم مشاهده واکنش متاکرومازی در روزهای اول مطالعه، مبنی بر فقدان حضور این مواد نبوده و شاید غلظت اندک آنها مانع تولید واکنش متاکرومازی در این روش شده باشد. از جمله GAG های شدیداً سولفاته و دارای واکنش متاکرومازی، می توان کراتان سولفات را نام برد (Scott,1992) . Corpus در سال ۱۹۹۶ نوعی پروتئوگلیکان حاوی کراتان سولفات را در بافت غضروفی معرفی نمود که کراتوکان نام گرفت. کراتان سولفات حاوی زنجیرهٔ پلی لاکتوزآمین سولفاته است که ۲۵ درصد از پایانه‌های هگزوز آن سولفاته هستند (Murphy,1999) . ازدیاد واکنش GAG های اسیدی سولفاته و کربوکسیله در روزهای آخر مورد مطالعه (که به روشهای آلسین‌بلو و تولوئیدین بلو شناسایی شدند) گویای شیب غلظت آنها در مراحل فوق است. این امر در ایجاد یک ریزمحیط مناسب (Microenvirnoment) موثر است. GAG های اسیدی بعنوان مولکولهای پلی الکترولیت با ایجاد این شیب یونی، در رشد و تمایز سلولها و تغییرات آنها در رشدونمو اندامها نقش دارند (فاضل،۱۳۷۴) . شاید حضور GAG های اسیدی در ایجاد یک محیط مناسب برای عمل دیگر اجزاء بافتی و میان کنش‌های سلولی موثر باشد.

ما در بخش دیگری از مطالعه حاضر به بررسی واکنش بافت پری کندریوم اندام‌های مورد مطالعه، در پاسخ به روشهای مختلف هیستوشیمیایی پرداختیم. در روزهای مختلف مطالعه، این بافت هیچگونه واکنشی با AB (pH=۱) و آبی تولوئیدین نشان نداد، اما واکنش در برابر رنگ‌آمیزی‌های PAS و AB (pH=۲/۵) مثبت بود. (جدول ۹-۳ و نمودار ۹-۳) . گرچه عدم مشاهده واکنش در مورد AB (pH=۱) و تولوئیدین بلو بطور قطعی وجود ترکیبات GAG سولفاته را نفی نمی‌کند، اما بهرحال حضور مقادیر بسیار بیشتر ترکیبات GAG کربوکسیله و ترکیبات قندی خنثی در بافت پری کندریوم بدنبال این تحقیق گزارش شد. ظاهرا این دسته از ترکیبات قندی در پری کندریوم نقش مهمتری در روند رشدونمو بافت غضروفی بعهده دارند. از جمله مهمترین ترکیبات فوق می توان به اسید هیالورونیک اشاره کرد که حضور آن در همه بخشهای پیش ساز غضروفی اندام‌ها فراوان است و با توجه به نقشهای ذکر شده برای آن، زمینه مهاجرت سلولهای مزانشیمی به این محل و سپس

تکثیر و تقسیم سلولی را فراهم می‌کند (Peach,etal-1993). از جمله دیگر ترکیبات گلیکوپروتئینی فوق می‌توان Thrombospondin نوع دوم (TSP-2) را نام برد که یک ترکیب کربوکسیله مختص پری کندریوم جنینی است و در مهاجرت و تکثیر سلولی دخالت دارد (Tucker,Hagios-1997-Iruela,Liska-1993). گزارش تحقیقات فوق همگی دال بر اهمیت نقش این ترکیبات در تکامل بافت غضروفی دارند.

در تفسیر نهایی مجموعه نتایج حاصل از این بخش از تحقیق، باید ذکر شود که غضروف اندامهای مختلف در پاسخ به انواع روشهای هیستوشیمیایی، اختلاف واکنش کاملا متفاوتی را طی دوره‌های مورد مطالعه نشان می‌دهند که بیانگر تفاوت الگوی انتشار زمانی مکانی هریک از انواع ترکیبات قندی فوق طی مراحل مختلف کندروژنز است.از طرفی همانطورکه در متن بحث به چشم می‌خورد، ما در نتایج این تحقیق علاوه بر توجه به وجود واکنش در بافت غضروف، اجزاء مختلف بافتی شامل ECM، سلول و سطوح سلولی را از این نظر مورد مطالعه قرار دادیم که نتایج مربوطه در جدول ۸-۳ بطورکاملتری مشاهده می‌شود. بدنبال کسب نتایج حاصل از مطالعهٔ بافتهای غضروفی اندامهای مختلف، برای هر کدام از آنها جداول شدت رنگ بطور جداگانه تهیه و تجزیه و تحلیل آماری مورد نظر صورت گرفت و در نهایت آنالیز کلی در مورد میانگین شدت واکنش همه اندامهای غضروفی، بطور یک جا انجام شد. نتایج حاصل از این بررسی با نتایج آنالیز هر یک از اندامها بطور منفرد، هم‌خوانی داشت. لذا در مجموع، اینگونه تفسیر می‌نمائیم که ظاهرا غضروف اندامهای مختلف در مراحل مختلف تکوین، در اصول کلی پدیده‌های مولکولی کندروژنز طرح یکسانی را از نظر زمان و مقدار تولید برخی ترکیبات قندی ارائه می‌دهند. بررسی‌های آماری میانگین شدت رنگ هر یک از اجزاء بافتی ECM و سلول، سطح سلول در بین همه اندامهای غضروفی صورت گرفت و از بین ۱۲ متغیر آنها، فقط در چند مورد معدود اختلافات آماری معنی‌دار مشاهده شد که البته جای بحث و توجه بیشتری دارد. لذا در تحقیقات آینده، توجه به اختلافات هیستوشیمیایی فوق بین برخی اجزاء بافتی اندامها برای کسب دلایل منطقی و کامل‌تر، بسیار ارزنده خواهد بود.

بررسیهای هیستوشیمیائی لکتین:

هدف ما از بررسی این بخش، مطالعه و نمایش برخی تغییرات ملکولی بافت غضروفی در جنین پستاندار بود. به این منظور از روش مطالعه لکتین که کاملاً اختصاصی عمل می‌کند کمک جستیم تا تنوع و تغییرات ترکیبات

قندی و موقعیت فضایی قند انتهایی آنها را در بافت غضروفی هرچه بیشتر شناسائی کنیم .

با توجه به اینکه روند تکوین بافت غضروفی طی مراحل مختلف آن از جمله مهاجرت، تجمع، تمایز سلولهای مزانشیمی و رشد و تغییر شکل سلولهای غضروفی متفاوت است، در هر مرحله یک نوع لکتین خاص واکنش نشان می‌دهد. ما در مطالعاتی که در روزهای مختلف رشدونمو انجام دادیم، از چند نوع لکتین که ترکیبات قندی حاوی پایانه GalNac و Gal (گالاکتوز و گالاکتوز N– استیل آمین) را شناسایی می‌کنند، استفاده نمودیم. در بررسی تکوین جسم مهره طی دوره‌های مورد مطالعه از لکتین MPA و OFA استفاده شد. MPA در ترکیبات قندی به پایانه قندی α–GalNac>α–Gal (آلفاگالاکتوز ـN ـاستیل آمین، بیشتر از آلفاگالاکتوز) متصل می‌شود. در حالیکه OFA اتصال به باقیمانده قندی α–L–FUC (آلفا ـال ـفوکوز) را نشان می‌دهد (vasta,Ahmad-1994).

در بررسی‌های آماری بوسیله آزمون کروسکال والیس در دوره‌های ابتدایی، میانی و انتهایی مورد مطالعه، شدت واکنش به MPA در پیش‌ساز غضروفی جسم مهره، دارای اختلاف آماری معنی‌دار بود (جدول ۱۱-۳ و نمودار ۱۴-۳). بصورتی‌که در دوره میانی، شدت رنگ مشاهده شده تقریباً منفی بود. در حالیکه قبل و بعد از آن در حد شدید بود. سلولهای مزانشیمی با منشاء اسکلرتوم سومایت‌ها پس از مهاجرت، در اطراف نوتوکورد مستقر شده، تراکم و تکثیر آنها صورت می‌گیرد(لاهیجانی،۱۳۷۷). مهاجرت سلولی از بارزترین پدیده‌های اوایل دوران رویانی (مورفوژنز) است که گاهی بسیار پیچیده و طولانی (مانند ستیغ عصبی) وگاهی نسبتاً ساده و کوتاه است مانند سلولهای اسکلرتوم (Serbedzija,Bronner-1992). سلولهای اسکلرتوم در مسیر مهاجرت از مبدأ خود به لکتین MPA واکنشی نشان نمی‌دهند (Fazel,etal-1987). اما در دوره ابتدایی مطالعه حاضر (E_{11}-E_{13}) که زمان تجمع آنها در اطراف نوتوکورد بود، پس از استقرار در محل، شروع به ترشح گلیکوپروتئینی در ECM نمودند که حاوی ترمینال قندی α–GalNac>α–Gal بود. لذا ظاهراً سلولهای مهاجر پس از استقرار، قند انتهایی خود را تغییر می‌دهند و حاوی ترمینال مزبور می‌شوند در حالیکه پس از شروع تمایز کندروبلاستی و ترشح ماتریکس غضروفی (در دوره میانی مورد مطالعه)، مجدداً این قند را از دست می‌دهند و یا به طریقی آن را تغییر می‌دهند. از جمله تغییراتی که شاید سبب عدم بروز واکنش به لکتین فوق می‌باشد، احتمالاً افزوده شدن اسیدسیالیک روی قند انتهایی و پوشاندن آن (Masking) می‌باشد، به این

طریق بار منفی بیشتری در ملکول ایجاد نموده و یا عمل آن را تغییر می‌دهد که هر یک شاید فعالیت بیولوژیک دیگری را برای سلول بدنبال آورد. با منفی شدن بار ملکولی یک قند انتهایی نه تنها از عمل بیولوژیک آن جلوگیری می‌شود بلکه شاید از بروز مراحل تمایز بعدی بطور پیش هنگام نیز ممانعت کند. از جمله در سلولهای مزانشیمی قلب قند انتهایی مورد واکنش به لکتین PNA، با اسید سیالیک پوشیده می‌شود زیرا پس از اثر سیالیداز واکنش PNA مثبت می‌شود (Fazel,1989). لذا پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده در بافت غضروفی جسم مهره رت از اثر آنزیم سیالیداز قبل از بکار بردن MPA استفاده شود تا از وجود نقش پوششی ملکول اسید سیالیک اطمینان حاصل گردد. از دیگر تغییراتی که گاهی مانع بروز واکنش یک لکتین حتی در حضور پایانه قندی ویژه آن می‌شود، نحوه اتصال این پایانه به زنجیره قندی و یا نوع قند ماقبل آخر زنجیره می‌باشد. مطالعات بیوشیمیائی در مورد لکتین DBA نشان داده است که قند انتهایی روی زنجیر قندی گلیکوپروتئینی باید بصورت $GalNac.\alpha_{1,3}(Fuc.\alpha 1\text{-}2)Gal\beta_{1\text{-}4}$ باشد و در صورتی‌که فوکوسیل (FUC) در این ترکیب حاضر نباشد، لکتین فوق واکنشی نشان نمی‌دهد. در حالیکه سایر لکتین‌های مربوط به قند انتهایی GalNac واکنش دارند(فاضل،۱۳۷۴). بررسی محققین دیگر در پیش‌ساز جسم مهره در زمانیکه MPA دارای واکنش منفی بود واکنش مثبت دیگر لکتین‌ها را نشان داده است . در تحقیق Tucker در سال ۱۹۹۵ ، لکتین PNA مارکر مشخص سلولهای پیش‌ساز غضروفی جنین جوجه بود. Zschabitz نیز در همان سال در رت نتایج مشابهی بدست آورد. این لکتین پایانه قندی $D-Gal(\beta_{1\text{-}3})-D-GalNac$ را معرفی می‌کند (Drury,1980). لذا الگوی پراکندگی هر یک ازگلیکوکانژوگه‌های خاص، بسیار ویژه و از طرفی موقت و مرتبط با خصوصیت هر مرحله تکوینی است. در بررسی واکنش لکتین OFA درکلیه مراحل پاسخ منفی بود و ظاهراً پایانه α فوکوزیل در رشدونمو بافت غضروفی جسم مهره ظاهرنمی‌شود. اماآیااین عدم‌واکنش، بدلیل اثرپوششی اسیدسیالیک یا ملکولهای‌دیگر برروی قند انتهایی فوکوزیل است؟ برای کسب پاسخ مناسب، پیشنهاد می‌شود در هر یک از مراحل جنینی پس از تاثیر سیالیداز یا دیگر آنزیم‌ها واکنش لکتین OFA مجدداً مطالعه شود.

بررسی کمّی تعداد سلولهای واکنش دهنده به لکتین MPA در تجربه بالا گویای اختلاف آماری معنی‌دار با $P<۰/۰۵$ بود. به عبارتی همراه با ازدیاد شدت واکنش در اواخر دوره تکوین بافت، این واکنش از ECM معطوف به فضای داخل سلولی می‌شد و سلولهای بسیار بیشتری این واکنش شدید را در داخل خود نشان

می‌دادند. نواجی واکنش درون سلولی احتمالاً منطقه گلژی است (دستگاه گلژی و سیتوپلاسم اطراف) و بنظر می‌رسد نواحی فعال سلول را از نظر سنتز ترکیبات قندی دارای پایانه $\alpha-GalNac>\alpha-Gal$ و محل افزوده شده زنجیرهٔ ئیدرات کربن به ملکول مشخص می‌کند. آیا در روزهای ماقبل و مابعد دوره مورد مطالعه ما مجدداً این پاسخ از سلول به ماتریکس منتقل می‌شود؟ برای پاسخ‌به این سئوال نیاز به ادامه مطالعه با لکتین فوق در دوره‌های مزبور است.

در بررسی دیگر این تحقیق مطالعه شدت واکنش لکتین MPA در اندام حرکتی فوقانی در دوره‌های مختلف رشدونمو انجام شد. اما اختلاف آماری معنی‌داری بین دوره‌های مورد مطالعه دیده نشد و واکنش مشاهده شده در همه مراحل شدید بود. از طرفی بررسی کمّی واکنش درون سلولی بین دوره‌های فوق دارای اختلاف آماری معنی‌دار بود. زیرا در اوایل دوره مورد مطالعه (E_{11}-E_{13}) واکنش شدید و در فضای ECM مشاهده شد. در دوره میانی رشدونمو بافت (E_{15}-E_{17})، واکنش شدید مربوط به سلولهای منطقه تکثیر و مختص به فضای داخل سلولی بود. در این مرحله ماتریکس واکنش منفی داشت و واکنش ناحیه هیپرتروفی در همه بخشها اختلاف چشمگیری با منطقه تکثیر داشته و شدت آن ضعیف بود. لذا ظاهراً تا اواسط مسیر رشدونمو بافتی، واکنش لکتین MPA به فضای داخل سلولی منحصر می‌گردد و سپس در مرحله انتهایی تمایز سلولها، واکنش محو می‌شود. گیرنده‌های سطح سلول و ECM و از جمله قند انتهایی آنها پس از آنکه وارد مرحله خاصی از رشدونمو شدند، از طریق اندوسیتوز وارد سلول شده و در لیزوزوم هضم می‌شوند (Berm,1994). لذا بنظر می‌رسد نواحی واکنش درون سلولی در مورد اخیر، مربوط به نواحی تجمع این ترکیبات در لیزوزوم‌های سلولی است که عمل تجزیه ترکیبات قندی با پایانه مربوط به MPA را انجام می‌دهند. در تحقیقات دیگری نیز این مورد گزارش شده است. در سلولهای پیش‌ساز لنفوسیتهای T گلیکوپروتئین خاصی که قند انتهایی آن با DBA عکس‌العمل نشان می‌دهد، از روز ۱۷ جنینی در موش سوری، بتدریج کاهش می‌یابد(فاضل،۱۳۷۴). شاید به همین علت است که از دوره میانی مورد مطالعه ما، سلولهای مرحله هیپرتروفی واکنشی ضعیف دارند و اثرات اندکی از ترکیبات فوق نشان می‌دهند. زیرا بتدریج تجزیه و حذف پایانه قندی فوق در این مرحله مشاهده می‌شود. ظاهراً ترکیبات با پایانه آلفا N استیل گالاکتوز آمین بیشتر در مرحله تجمع مزانشیمی و تمایز کندروبلاستها، در تکوین این اندام نقش دارند.

در تشکیل غضروف اندام حرکتی، سلولهای مزانشیمی با منشاء سوماتوپلورال، در این منطقه تجمع کرده، بافت پیش‌ساز غضروفی را در دوره میانی مورد مطالعه تشکیل دادند. ظاهراً دو نوع مزانشیم با منشاء مختلف در این مطالعه (در جسم مهره و اندام حرکتی)، نسبت به لکتین MPA دارای واکنش تقریباً مشابه می‌باشند. لذا بنظر می‌رسد ترکیب قندی با پایانه $\alpha-GalNac>\alpha-Gal$ حداقل در قسمتی از مراحل رشدونمو سلولهای مزانشیمی مختلف به سرنوشت غضروفی متفاوت خود، یعنی در مرحلهٔ تجمع و تکثیر سلولی و مرحله تمایز کندروبلاست‌ها دخالت دارد. پیش‌بینی می‌شود ترکیب حاوی پایانه $\alpha-GalNac>\alpha-Gal$ تنها ملکول مؤثر در این مرحله نباشد. در نتایج محققین دیگر از جمله Zschabitz در سال ۱۹۹۵ در ابتدای مرحله تجمع سلولی در E_{12} اندام حرکتی جنین موش واکنش PNA برای اتصال به قند انتهایی $Gal\beta-1\rightarrow3-GalNAC$ مثبت بود، اما از E_{14} به بعد در تجمعات مزانشیمی اثری از واکنش در برابر PNA مشاهده نشد. در حالیکه در همین مرحله تحقیقات ما واکنش شدیداً مثبت MPA را نشان داد. لذا این احتمال قوت می‌یابد که در طی تکوین سلولهای جنینی، یک یا چند نوع پایانه قندی در یک مرحله کوتاه ظاهر و وظیفه بیولوژیک خاصی را برای سلول به ارمغان می‌آورند، سپس بتدریج یا بسرعت این ترکیبات ناپدید یا به صور مختلف تغییر شکل می‌یابند. در نتیجه حضور یک ترکیب قندی خاص در هر مرحله جنینی منطبق با رخداد یک پدیده بیولوژیک کلیدی است و این امر تغییراتی را در اجزاء مختلف بافتی از جمله ECM، سطوح سلولی یا واکنش در ارگانلهای درون سلولی بدنبال دارد.

در مرحله دیگری از تحقیقات، واکنش غضروف اندامهای مختلف را در برابر چند لکتین مختلف در دوره بحرانی رشد و تمایز این بافت (حدود روز ۱۵ جنینی d.15) بررسی نمودیم. لکتینهای انتخابی شامل WFA (برای اتصال به ترمینال قندی D-GalNac)، VVA (شاخص شناسایی قند انتهایی $\alpha GalNAC>Gal\alpha_{1\rightarrow3}-GalNAC>\beta GalNAC$) و MPA (برای شناسایی پایانه $\alpha-GalNac>\alpha-Gal$) بودند (Leathman,1983). اندامهای مورد مطالعه شامل اندام حرکتی فوقانی، جسم مهره، غضروف کف جمجمه، غضروف دنده، شانه و مکل بودند. در غضروف اندام حرکتی روز d.15 برای لکتین‌های WFA و VVA واکنش بسیار شدید و با لکتین MPA واکنش شدید مشاهده شد(جداول ۱۰-۳ و ۱۲-۳، نمودارهای ۱۵-۳ تا ۱۷-۳). لذا بنظر می‌رسد در این مرحله از رشد و نمو اندام حرکتی،

ترکیبات قندی دارای پایانه آلفاگالاکتوز N– استیل آمین که با تراکم بیشتری مشاهده شدند، در تمایز بافت غضروفی احتمالاً دخالت دارند. پس از این ترکیب، پایانه آلفاگالاکتوز در درجه بعدی اهمیت قرار دارد. در تحقیقات Tsubouchi در سال ۱۹۹۶، در سلولهای مزانشیمی جوانه اندام حرکتی در شرایط کشت (In vitro)، حضور گالاکتوزیداز یا GalNacase کندروژنز را مهار کرده است. نتایج این تحقیق نقش گالاکتوز و N استیل گالاکتوز آمین را که ما در تحقیق حاضر با روش هیستوشیمیائی لکتین شناسایی کردیم، در تمایز غضروف جوانه اندام حرکتی تایید می‌کند.

در غضروف جسم مهره روز ۱۵ جنینی، واکنش شدید داخل سلولی برای WFA، واکنش شدید VVA در ماتریکس و واکنش منفی MPA مشاهده شد. MPA گرچه به پایانه قندی α–GalNac متصل می‌شود (مانند لکتین WFA و VVA)، اما در این بافت واکنشی نشان نداد. علت این امر شاید وضعیت فضایی ملکول، نوع اتصال قند انتهایی آن در زنجیرهٔ الیگوساکاریدی و یا قند ماقبل آخر زنجیرهٔ قندی باشد. این موضوع ویژگی خاص گلیکوپروتئینها و حساسیت شناسایی لکتین‌ها را می‌رساند. چرا که موقعیت قند انتهایی را دقیقاً در مولکول مشخص می‌کنند. Fazel و همکارانش در سال ۱۹۸۷ در مطالعه واکنش سلولهای مهاجر ستیغ عصبی در جنینهای رت با استفاده از لکتینهای SBA، WFA، VVA و MPA که همگی با قند انتهایی GalNac واکنش دارند، تنها واکنش SBA را مشاهده کردند. آیا تاثیر SBA در زمانهای قبل یا بعد از روز پانزدهم همین تاثیر را نشان می‌دهد؟ در غیر اینصورت، پایانه قندی مربوطه در مراحل مختلف جنینی تغییراتی را متحمل شده است.

واکنش شدید سلولهای پیش غضروفی و ماتریکس در دولکتین فوق، فعالیت بیولوژیک پایانه قندی مربوطه را در تمایز مزانشیم به کندروبلاست‌ها و کندروسیت‌ها نشان می‌دهد. در نوتوکورد برخی سلولها فعال و به WFA واکنش نشان دادند. این منطقه نهایتاً تبدیل به مرکز یا هسته دیسک (Nucleus pulposus=NS) بین مهره‌ها می‌شود. سلولهای مزانشیمی اطراف نوتوکورد در حال تکثیر و تراکم بوده تشکیل آنولوس فیبروزوس (A.F.) دیسک را خواهند داد. واکنش لکتین در این منطقه شدید بود. لذا احتمالاً ترکیبات فوق در تشکیل غضروف دیسک بین مهره‌ها نیز دخالت دارند. در غضروف قاعده جمجمه (کندروکرانیوم)، دنده، شانه و مکل تقریباً نتایج مشابهی حاصل شد. واکنش WFA و VVA شدید اما پاسخ MPA منفی بود.

دانشگاه علوم و تحقیقات
بخش پایان نامه

بافت غضروفی در اندامهای فوق از سه مزانشیم با منشاء مختلف جنینی حاصل می‌شود که شامل اسکلرتوم، سوماتوپلورا و ستیغ عصبی است (Sadler,1987). مطالعه ملکولهای قندی این سلولها طی رشدونمو بافت غضروفی E_{15} بیانگر تفاوتها و شباهتهایی بود. غضروف همه اندامها در این مرحله واکنش مثبت WFA و VVA را نشان دادند. گرچه شدت واکنش درهمه اندامها یکسان نبود، نواحی اتصال لکتین در برخی اندامها داخل سلولی و در بعضی در فضای خارج سلولی یا سطح سلولها مشاهده شدند. از طرفی به جز در اندام حرکتی، در بقیه اندامها MPA پاسخ مثبت نشان نداد. لذا احتمالاً سلولهای مزانشیمی مختلف در قسمتی از مراحل تکوین به بافت غضروفی، به پایانه قندی α-GalNac نیاز دارند. اما نحوه اتصال این انتهای قندی به زنجیرهٔ هیدرات کربن، در همه انواع سلولهای مزانشیمی در مسیر رشدونمو غضروف اندامها یکسان نیست و یا قند ماقبل آخر قند انتهایی در این موارد متفاوت است. به صورتی که حداقل یکی از لکتین های متصل به α-GalNac، (که در این مطالعه MPA بود)، حتی در حضور این پایانه، در غضروف اندامهای مختلف (به جز اندام حرکتی) قادر به اتصال با آن نیست. لذا هر نوع سلول در هر مرحله رشدونموی برای میان کنش با محیط خود، بایستی لااقل در محدوده زمانی خاصی ملکولهای متفاوتی تولید کند که وقایع بیولوژیک آن دوره را بدنبال آورد. در نتیجه یک مرحله رشدونموی مشخص را نمی‌توان در همه اندامها با یک نشانه یا مارکر واحد معرفی نمود. سلولهای مزانشیمی مختلف در مسیرهای تکوینی به طرف مشتقات خود، حتی به یک نوع لکتین خاص هم واکنش مشابهی نشان ندادند. مقایسه میانگین شدت واکنش اندامهای مختلف در پاسخ به لکتین MPA در روز ۱۵ جنینی نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار با $P=۰/۰۰۱$ بود(نمودار ۱۷-۳). در این بررسی فقط مزانشیم اندام حرکتی نسبت به MPA واکنش شدیداً مثبت داشت. لذا شاید بتوان این لکتین را برای تعیین مسیر تکوین قسمتی از سلولهای مزانشیمی اسکلرتوم به سرنوشت اندام حرکتی مارکر مناسب دانست. Vasta از جمله پژوهشگرانی بود که در سال ۱۹۹۴ لکتین‌های جانوری را بعنوان مارکر مراحل جنینی آنها قابل استفاده دانست. محققین دیگر در مسیرهای رشدونمو مزانشیم، نشانه‌های تکوینی دیگری را معرفی نموده‌اند. Zschabitz در سال ۱۹۹۵ لکتین GSL (Griffonia simplicifolia) را که به پایانه قندی α-Gal، α-GalNac متصل می‌شود، در رت بعنوان مارکر سلولهای مزانشیمی پیش‌ساز غضروف مکل و صورت (که سلولهای مزانشیمی با منشاء ستیغ عصبی در تکوین آنها دخالت دارند)، معرفی نمود. به نظر وی تنظیم

رشدونمو اولیه غضروفی در ارتباط با ترمینال N– استیل گلوکزآمین است. قابل توجه است که برخی از این خصوصیات، ویژه نوع گونه (Species specific) است. در تحقیقات Fazel و همکاران در سال ۱۹۹۰، برای سلولهای P.G.C در حال مهاجرت موش، قند انتهایی L-fuc و در رت قند انتهایی Galnac معرفی شد.

تصور می‌شود در ملکولهای ترکیبات قندی، ترمینال قندی نقشی شبیه به Active site آنزیم‌ها را داشته باشد که با هر مرحله رشدونموی خاص، تغییر قند انتهایی صورت گرفته و فعالیت سلول را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در واقع راه اقتصادی برای سلول جهت تغییر تظاهرات تمایزی و بیولوژیک خود، تغییر قند انتهایی است تا تغییر کل مولکول گلیکوکانژوگه در سلول. همانطورکه در بررسی گزارشهای بافتی مطرح شد، غضروف قاعده جمجمه در روز ۱۵ جنینی، در مقطع طولی نشان‌دهنده مراحل مختلف تمایز سلولهای غضروفی بطور همزمان و متناوبا بدنبال یکدیگر است. بدین معنی که مرحله استراحت، تکثیر و هیپرتروفی بترتیب تکرار می‌شوند. نکته جالب آن است که پاسخ لکتین WFA نیز از این آرایش پیروی کرده، در نواحی استراحت و تکثیر واکنش شدید و در نواحی هیپرتروفی واکنش ضعیف نشان داد. در همه نواحی، واکنش منحصر به ECM و سطوح سلولی بود. از طرفی این حالت تناوبی در واکنش به لکتین VVA مشاهده نشد و پاسخ تقریبا یکسانی در سراسر طول غضروف نشان داد. مشابه اثر WFA در غضروف کف جمجمه d/15، در غضروف اندام حرکتی نیز همین پاسخ برای WFA مشاهده شد. لذا بنظر می‌رسد باقیمانده قندی D-Gal Nac طی فرآیند منظم سلولی برای تبدیل بافت غضروفی به بافت استخوانی، تغییراتی را نشان می‌دهد و بیشترین ناحیه مشاهده فعالیت بیولوژیک این ترکیب در ناحیه تکثیر و رشد سلولهای غضروفی است، در حالیکه با شروع مراحل استخوان‌سازی در ناحیه هیپرتروفی واکنش آن کم می‌شود. این امر اهمیت بیولوژیک پایانه‌های قندی فوق و انتشار زمانی - مکانی آنها را بصورت اختصاصی، نمایش می‌دهد و پیدایش یا ناپدید شدن آنها را همراه با رخدادهای ویژه سلولی توجیه می‌کند. در تایید نتایج این تحقیق، گزارش محققین دیگر نیز به چشم می‌خورد، از جمله Mcclure در ۱۹۹۷ کندروسیت‌های انتهای سفالیک و کودال غضروف استرنوم جنین جوجه را در محیط کشت با استفاده از ۲۱ نوع لکتین مورد بررسی قرار داد. وی الگوی پراکندگی ترکیبات قندی مربوطه را در ۶ ناحیه مختلف در استرنوم تقسیم بندی نمود و بزرگ‌ترین اختلاف ناحیه ائی را مربوط به ترکیبات قندی با پایانه GalNac و B-Gal معرفی نمود. نکته جالب توجه اینکه ما نیز در تحقیق حاضر در استرنوم جنین رت در

روز ۱۵ جنینی، در واکنش به لکتین WFA نتایج مشابهی بدست آورده و قادر به ناحیه بندی طولی استرنوم از نظر شدت واکنش به WFA بودیم. ما به این طریق نشان دادیم نواحی وسیعی از این اندام اما بطور غیریکنواخت، حاوی ترکیبات قندی با پایانه D-Galnac هستند. از طرفی در غضروف برخی دیگر اندامها نیز معدودی از کندروبلاست‌ها نسبت به کل سلولهای بافت واکنش بسیار شدیدتر یا بسیار ضعیف‌تری در تاثیر بعضی لکتینها نشان دادند. لذا ظاهراً کل سلولهای تشکیل دهنده ساختمان بافت غضروفی یک اندام، همگی درجه یکسانی از فعالیتهای بیولوژیک را در یک زمان خاص نشان نمی‌دهند. Tsoni در سال ۱۹۹۱ در نواحی پیش غضروفی جوانه اندام حرکتی جوجه مطرح کرد سلولهای پیش‌ساز کندروسیت‌ها همگی با توان غضروفسازی یکسان در طول اندام ظاهر نمی‌شوند. از جمله به تفاوت نیمه پروکسیمال و دیستال اندام اشاره کرد. نیمه پروکیسمال ابتدا دارای سلولهای هموژن پیش ساز است و در مرحله بعدی سلولهای فوق در مرحله دیستال مشاهده می‌شوند. بنظر Zschabitz در سال ۱۹۹۹ در فرآیند مورفوژنز، واکنش متقابل تجمع سلولهای منفرد و اجزاء ECM هر بافت، اهمیت اختصاصی دارد و زنجیره‌های قندی آنها علاوه بر تعیین خصوصیت مرفولوژیک، اطلاعات بیولوژیک لازم برای رشدونمو را نیز بهمراه دارند. لذا الگوی پراکندگی گلیکوکانژوگه‌ها وابسته به تغییرات ساختمانی سلولها نیز هست و بیان آنها نه تنها در طی دوره‌های مختلف رشدونمو، بلکه حتی در یک مرحله جنینی نیز در بخشهای مختلف یک عضو، طرح یکسانی ندارد (Zschabitz,1999). این مطلب انتشار مکانی - زمانی ترکیبات قندی را منطبق با رویدادهای مهم رشدونموی نشان می‌دهد.

مقایسه دو دسته مطالعات هیستوشیمیایی و هیستوشیمیایی لکتین در تحقیق حاضر، انطباق نتایج مربوطه را نشان می‌دهد. بخش مهمی از گلیکوپروتئینها و پرتئوگلیکانهای غضروف که در واکنش‌های پاس، آلسین بلو و آبی‌تولوئیدین پاسخ مثبت داشتند، احتمالا فیبرونکتین (با واحدهای قند انتهایی GalNac)، هپاران سولفات و کندروئتین سولفات (بادی ساکارید تکراری GlunA - GalNac)، اسید هیالورنیک (با واحد انتهایی GlcNac) یا کراتان سولفات (با واحد انتهایی Gal - GalNac) است (Rademacher,1988). لذا در زمان اوج فعالیت بیولوژیک سلولها برای تولید ملکولهای فوق، پاسخ لکتین‌های مربوط به این پایانه‌های قندی نیز مثبت بود. از آنجاکه نوع قند انتهایی هر زنجیره ئیدرات کربن در مولکولهای گلیکوکانژوگه در حکم کلید فعالیت بیولوژیک آنهاست، لذا تعیین قند انتهایی ترکیبات قندی بافتها، از اهمیت اساسی برخوردار است. بدنبال این

اصل در تحقیق حاضر قند انتهایی α-Gal Nac از جمله پایانه‌های مهم دوره تمایز بافت غضروفی معرفی شد. تحقیقات وسیع Zschabitz و همکارانش در ۱۹۹۵ از مجموع بررسی ۲۴ نوع لکتین در بسیاری از غضروفهای شفاف (هیالین) دوران جنینی رت، این نتیجه کلی را ارائه دادند که Gal(B-1,3)Nac gal در موقعیت ماقبل آخر قند انتهایی در بافت مزانشیم سازنده غضروفهای مختلف پراکنده است و قند انتهایی B-Gal در برخی نواحی در حال تکوین مزانشیم پیش‌ساز غضروفی حاضر می‌شود. در تعقیب یافته‌های فوق در این تحقیق با بررسی انواع متفاوتی از لکتین‌ها در بافت غضروفی چند اندام در روز ۱۵ جنینی رت این نکته آشکار شد که ظاهراً در قسمتی از مراحل رشدونمو بافت غضروفی حضور پایانه قندی N– استیل گالاکتوزآمین (آلفا و بتا) و نیز آلفاگالاکتوز، خصوصیت طبیعی غضروف است و این قندها سهم نسبتاً مهمی در زنجیره‌های الیگوساکاریدی بافت غضروفی این مرحله دارا هستند. از طرفی در بخش دیگر این تحقیق مسئله الگوی پراکندگی موقت و ویژه هر یک از پایانه‌ها برای هر یک از اندامهامطرح شد. انتشار موقت و اختصاصی گلیکوکانژوگه‌ها و عمدتاً پایانه‌های قندی آنها، نشان‌دهنده یک ارتباط آشکار آنها با تغییرات مرفولوژیک و فیزیولوژیک اختصاصی بافت‌های مربوطه در روند تشکیل الگوی غضروف می‌باشد. از آنجا که بسیاری از پژوهشگران بر شناخت جنبه‌های بالینی این ترکیبات کوشیده‌اند، لذا باگسترش تحقیقات مشابه و با شناخت هر چه بیشتر وقایع ملکولی بافت‌های طبیعی، امید است زمینه درک بهتر پاتولوژی بیماریهای غضروفی، استخوانی و مفصلی و ارائه راهکارهای مناسب درمانی فراهم شود.

پیشنهادات:

اهمیت حضور گلیکوکانژوگه‌ها در بیولوژی آنچنان است که بنظر می‌رسد شاخه جدید علم گلیکوبیولوژی در آینده فراتر از علوم سلولی مولکولی قرارگیرد و این در حالی است که ناشناخته‌های این علم روز به روز بیشتر نمایان گشته و ضرورت پرداختن به جزئیات بیشتر این علم را ایجاد می‌نماید.

در این زمینه و در ارتباط با تحقیق حاضر، موارد زیر پیشنهاد می‌گردد :

۱- از آنجاکه لکتین‌ها بسیار اختصاصی ترکیبات قندی را شناسایی می‌کنند و بسیاری از مارکرهای لکتینی برای هر مرحله از تمایز بافت غضروفی معرفی شده است، شاید بتوان با استفاده از لکتین‌ها به عنوان مارکر یک نوع تومور یا التهاب خاص، زمینه استفاده تشخیصی از لکتینها را در آزمایشگاههای طبی فراهم نمود. این روش گرچه در حال حاضر مقرون به صرفه نیست، اما بدلیل حساسیت بالا در تشخیص، بسیار سریعتر و با دقت بیشتر در تشخیص موارد فوق برخواهد آمد و مراحل درمان را مناسبتر خواهد نمود .

۲- بررسی تغییرات ترکیبات قندی سطح سلول یا ECM در شرایط دیابتی، نیکوتینی، پرتوتابی یا عفونتهای باکتریال و ویرال (و مقایسه آنها با حالت طبیعی) بعنوان تراتوژنهای مهم و نیز استفاده از فاکتورهای رشد برای ایجاد راهکارهای جدید درمانی .

۳- استفاده از تکنیک‌های دقیق‌تر آنتی بادی منوکلونال برای بررسی انتشار گلیکوز آمینوگلیکانهای با درجه متفاوت سولفاسیون و تعیین زیرگروههای مولکولی هر دسته از این ترکیبات در تکوین بافت غضروفی.

۴- استفاده از آنزیم‌ها برای هضم برخی ترکیبات قندی و سپس بررسیهای هیستوشیمیایی، از جمله بکاربردن آنزیم سیالیداز یا هیالورونیدازکه هر یک GAG مربوطه را از مولکول کنار زده و با استفاده از آنزیم‌ها، واکنش آلسین بلو و یا برخی لکتین‌ها تغییر خواهد نمود. با این روش اطلاعات دقیق‌تری از ساختمان کربوهیدرات‌ها حاصل خواهد شد .

۵- بررسی وضعیت گلیکوکانژوگه‌ها در برخی غضروف‌های بدن در زمانهای بعد از تولد نوزادان بخصوص با استفاده از روشهای هیستوشیمیایی لکتین یا CEC (Critical Electrolite Consentration).

۶ - تکرار نتایج تحقیق حاضر در مورد دیگر گونه‌های جانوری به جهت تأیید وجود یا عدم وجود ویژگی گونه‌ائی Species specific واکنش این بافت در برابر روش‌های هیستو شیمیایی.

REFRENCES

۱- بلوم وفاوست ترجمه خدیجه تمدن ۱۳۷۵،بافت شناسی جلد اول صفحه۲۰-۴۱۳.

۲- پریور کاظم،۱۳۷۲ ، اطلس جنین شناسی و جنین شناسی تجربی.صفحه ۵۰۰-۴۳۰.

۳- پریور کاظم، ۱۳۷۵،زیست شناسی مولکولی، صفحه ۱۳۰- ۱۱۵.

٤- شمس لاهیجانی مریم،۱۳۷۷، جنین شناسی. جلد دوم ،صفحه ۲۰- ۱۱۸.

۵- عرب محمد رضا ، ۱۳۷۸، مطالعات هیستوشیمیائی در روند هیستوژنز اجزاء تشکیل دهنده کره چشم، پایان نامه دکتری،دانشگاه علوم پزشکی مشهد .

٦- فاضل علیرضا۱۳۷٤، مطالعات هیستوشیمیایی ترکیبات قندی سطح سلولهای لنفوسیتT در روندتکامل جنینی، مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، شماره٤۹صفحه ۱۳- ۳.

۷.۱- طلائی طاهره ۱۳۷۸ مطالعه هیستوشیمیائی تشکیل اجزاءگوش در رت، تز دکتری. دانشگاه علوم پزشکی مشهد .

8- Albert -B., Bray - D. , Lewis - J. , 1989. Molecalar biology of the cell: 2nded, P.802

9-Ardman - B., 1990, Human immunodeficiency virus type. Infected individuals, auto antibodies that bind to CD_{43} on normal thymic lymphocytes., j.Exp . Med., 172A

10- Arikawa- Hirasawa- E., watanabe-H. , 1999. Perlecan is essential for cartilage and cephalic development.Nat.Genet.23 (3): 354- 8

11- Aszodi-A. , Bateman –JE., Hirsch – E., 1999.Normal skeletal development of mice lacking matrilin 1:redundant function of matr:lins in cartilage. Mol. Cell. Boil, 19(11): 78 41-5

12- Atkinson – Bl. , Fantle – Ks. ,Benedict– J. 1997.Combination of osteoinductive bone protein differentiates mesenthmal cells specitically to the cartilage lineage .J- cell Biochem. 65(3):325-39

13- Azuma N., Hirsota A., Hido T., 1994, Histochemical and immunohisto chemical, Tudies on keraton Sulfate in developing human eye.Exp.Res.Eye. 58:277.86.

14- Baner Jee-SA., Hadjiargyroo-M.,1997. An antibody to the tetraspan membrane protein CD, promotes neurite formation. J. Neurosci . Apr 15 , 11(8):2756-65.

15- Bennett – VD. , pallante – KM. , Adams – SL. ,1991. The splicing pattern of fibronectin mRNA changes during chondrogenesis. J.Biol. Chem., 266(9):5918-24

16- Berm R.E. , Robinns-S.G. , wilson -D., 1994, Immunolocalization of integrins in the humanr retina Inuest . Dphthalmol . vis.Sci., 35(9) 3466-72.

کتابخانه واحد علوم و تحقیقات
بخش پایان نامه

17- Bernfield M. ,Kokenyesi R. , 1992. Biology of the Syndecans:a family of transmembrance heparan sulfate proteoglycan. Annv.Rev.Cell Biol. 8;365-93.
18- Bland M. ,1995, An introduction to medical statistics. Oxford medical publication, P:212,259.
19- Bonen -Borkey- D. , shlissel – M. ,Berman -B. , 1999. Identification of glypican as a modulator of the biologyical activity of fibroblast growlt factors. J. Biol. Chem.272:12415-21.
20- Bradbury P., 1990 . Theory and practice of histological techniques. Edited by J.D. Bancroff., pp:119-142.
21- Bradhman – DM. , passaniti – A. , 1995. Mesenchymal cell chondrogenesis is stimulated by Basement membrane matrix and inhibited by age . associated factors. , Matrix – Biol.,14(7):561 – 71
22- Bronner-Fraser-M. ,1944 jul, Neural crest cell formation and migration in the developing embryo. Faseb. J. 81(10): 699-706.
23- Browder , 1986., Developmental biology , pp: 352-73.
24- Buchstaller-A. ,kunz-s. , Berger-p. ,1996. Cell adhesion moleculs Ng CAM and axonin-1 from heterodimers in the neural membrance and cooperate in neurite Outgrowth promotion. J. Cell.Biol. 135(6 pt 1) :1593-607.
25- Burton – Wurster – N; Lust – G; 1997. Cartilage fibronectin isoforms. Matrix. Biol . 15 (7):491 – 54
26- Burton– Wurster – N. ,Zhang – DW.,Lust – G., 1995. Accumulation of fibronectin in articular cartilage explants cultures with TGF beta. Arch - Biochem – Biophys : 316(1):452 – 60
27- Buschman – MD., Kim – Yj. , wong – M., 1999. Stimulation of aggrecan synthesis in cartilage explants by cyclic loding is localized to regions of high interestial fluid. Flow. Biochem.Biophys. 366(1):1-7
28- Calaora-V, ,Ckazal-G. ,1996 jul. MCD 24 expression in developing brain and in Zones of secondary neurogenesis in the adult. Neuro science., 73(2):581-94.
29- Carratu – MR. , steardo-L., 1996.Role of polysialic acid in PNS myelination. Microscope., Res.Tech. Aug 15 .34(6): 499-91.
30- Chen- Q. , Johenson – DM. , 1995. progression and recapitulation of the chondrocyte differentiation program.Dev . Biol. 172(1): 293 – 306
31- Chevalier –X. , 1993. Fibronectin, cartilage and osteoarthritis. Semin – Arthritis – Rheam – 22(5) ; 307 – 18
32- Chimal – Monroy – J , Diaz – de- Leon – L. , 1999. Expression of –N-cadherin , fibronectin and tenascin is stimulated by TGF – Beta during the formation of precartilage condensations – Int – J – Dev. Biol. 43(1) : 59 - 67
33- Cho-SS. , Lucas-J. ,etal , 1977, Distribution of transferring binding protein Immonoreactivity in chicken CNS, PNS. J.Comp. Neurol. ,382(2):260-71.
34- Clark-GA ., Moss-Dj. ,1997. Gp55 inhibits both cell adhesion and growth of neuron, but non - neuronal cell , via a G-protein coupled receptor.Eur- J - Neurosci., 9(2):334-41.

35- Cliffer-Fp. , Dougherly-PM. , 1997. Time course of degcnerative and regenerative changein dorsal norn rat model of peripheral nevropatty. J.comp.Nevrol.Mar ., 17,379(3):428-42.
36- Cohen-Tannoodji-M. , Beccari-T. ,1995, Disruption of murine Hexa gene leads to enzymatic deficiency. Mamm. Genome. 6(12): 844-9.
37- Collins-BE., Yang-Lj. ,1997. Sialic acid Specificity of myelin associated glycoprotion binding.j.Biol. chem. Jan 10,272(2) :1248-55.
38- Cormak - D.H. ,1988, Ham's histology. 9th ed. pp:75-80.
39- Corpuz – LM. , Funderburg – J., etal. ,1996. Molecular cloning and tissue distribution of keratocan., J. Biol. Chem., 271 (16): 9759-63.
40- Daude-N. , Ellie-E. , 1996, Invivo and vitro expression of rat galactose-L-phosphate Uridyl Transpherase (Gal T) in developing CNS , PNS., Brain.Res.Dev. 94(2);190-6.
41- Deak – F. , Wagener – R. , Kiss – I. , 1999. The matrilins : a novel family of oligomeric extracellular matrix protein. Matrix. Biol., 18(1): 55 – 64.
42- Dezawa –M. , Nagona-T. , 1996 Sep., Immunohistochemical localization of cell adhesion molecules and cell-cell contact protein during regenration rat nerue;Anat.Rec., 246(1):114-26.
43- Drury - R.A.B., 1980 . Carleton's Histological techmiques. fifthed oxford univ ., pp:36-57,232-280.
44- Edelman.G.M ,1988. Morphoregulatory moleculs.Biochemistry,27:3533-43.
45- Edelman,G.M,1976.Surface modulation and all growth. Sience, 192:218-226.
46- Eritson - C.A., Torley- E.A. , 1986. Substrata by combinations of ECM components after neural crest cell motility in vitro. J . Cell. Sci. 61: 299-23.
47- Faraidi - c. , Falugic-S. , Fasula -I.,1996.Glycoconjugate expression changes during rana early development. Eur. J.Histochem., 40(1)67-74.
48- Farrer-RG., etal ,1996 May. Multiple antibodies tonerve glycoconjugates inapatient with neuropathy. J. Neuroimmunol. 66(1-2): 71-6.
49- Farrer-R.G. , Quarles-R.H. , 1996 Aug. ECM upregulates synthesis of glycosylceramide based glycosphingolipid in primary schwan cells. J.Neurosci.Res. 1 , 45(3):248-57.
50- Fazel A.R. , Schulte-B. ,1990. Glycoconjugate unique to migrating primordial germ cell differs with genera. Anatomical Rec., 228:177-84.
51- Fazel - A.R., Schulte - B.A. , Tompson - R.p., 1987. Presence of aunique glycoconjugate on the surface of rat P.G.K. during migration.cell differntiation., 21:199-211.
52- Fazel - A.R., Sumida - H. , Schulte- B.A. , Tompson - R.P., 1989. Lectin histoche mistry of embryonic heart :Fucose-Specific Lectin binding sites in developing rats and chicks. AM. J. Anat. 184:76-84.
53- Fife – RS. ,1991. Cartilage matrix glycoprotein as apossible marker of osteoarthritis. J. Rheumato- Suppl. 27:30-1
54- Fife – RS. , Klure – Beckerman-B. ,1993. Evidence that a 550000 Dalton cartilage matrix glycoprotein is a chondrocyte membrane associated protein closely related to ceruloplasmin.j. Biol. Chem. 268(6):4407 – 11.

55- Finkelstein- JE. , Doege – K. , etal.1991. Analysis of chondroitin sulfate proteoglycan core protein gene in achondroplasia and pseudo achondroplasia. Am. J.Hum.Genet. 48(1):97 – 102.

56- Frade- J.M. , Marti -E. ,1996. Insulin like growth factor-1 stimulate neurogenesis in chick retina by regulating expression of the α 6 integrin subunit.Dev.122:2497-2506.

57- Franeeschini-v. ,Lazzari-M. ,1996. Identification of surface glycoconjugates in the olfactory system of Turtle. Brain.Res. 24, 725(1):81-9.

58- French-M. ,Smith-SE. ,Akanbi-k.,1999. Expressian of hepran sulfate proteoglycan , perlecan, during mouse embryogenesis and perlecan chondrogenesis in vitro. J. Cell - Biol. May 31,145(5): 1103 _15.

59- Fukuda-M., etal. (editors) ,1994. Molecular Glycobiology. pp:20-50

60- Garcia-Monco-Jc., Benach-Jl.,1997 Mar., Mechanism of injury in lymeneuroborreliosis. Semin Neural .; 17(1):57-62.

61- Garwood- J. ,Schnadelbach-O.,1995. DSD-proteoglycan is the mouse homolog of phospho can effect on neurite outgrowth dependent on neuronal lineage. J. NeuroSci. May 15.(9110): 3888-99.

62- Gates – MA., Laywell-FD. , 1996 Sep. Astrocytes and ECM following intracerebral transplantation of embryonic ventrou mesencephalone. Neuro science;. 74(2): 579-97.

63- Gocht-A, struckhoff-G. .1996. CD15 containing glycoconjugatis in CNS. Histol. Histopathol. oct;11(4), p: 28-1007.

64- Gong -H. wen - YE. ,1997. Hyaluronic acid in the normal and glucomatous optic nerue. Exp.Eye. Res.64: 587-95.

65- Goodarzi -M.T., 1999. Changes in glycosylation of α-protease in hibitor in inflammation. Ckheumatoid Arthritis Disease. Iran. Biomed. J. 3(1,2): 23-29.

66- Gorrell-MD. , Lemm-JA. ,1997.Immunization with the nonstructhral proteins promotes functional recovery of alphavirus-infected neurons. J .virol; 71(5);3415-9.

67- Goshima-Y. , Nakamura-F.,1995, Collapsin induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein. Nature. Aug, 10.376(6540):509-14.

68- Gould -SE, Upholt -WB,Kosher -RA. ,1995,characterization of chiken syndecan 3 as a heparan sulfate proteglycan and its expression during embryogenesis. Biol.168: 438-51.

69- Granovsky –M, Fode – C; Warren –CE. , 1995. Gl. NA – transferase and corez GlcNAc – trasferase.

70- Griffith-C.M., Hsich-T,. ,1995 ,Glycoconjugates in normal and abnormal secondary neurvlation.Teratology. 52(5):286-97.

71- Griffith -C.M.,wiley -M.,1990, Distribution of all Surface glycoconjugates during secondory neurulation in the chick embrgo. Anat. Rec.226: 81-96.

72- Grumet-M, Friedlander-DR., 1996, Function of brain chondroitin Sulfate proteoglycons during developements: interactions with adhesion molecules. perspect.Dev. Neurobiol. 3(4):319-30.

73- Gullberg – D. ,1995. Extracellular matrix and its receptors during development., Int.J: Dev. Biology, 39: 845-54.
74- Haas-AR, Tran – RS.,1999. Chondrogenic differentiation of murine C3H10T,12 multipotential mesenchymal cell : II .Stimulation by BMP requires modulation of N-cam expression and function. Differentiation,. 64(2): 77-89.
75- Hakala – BE, White – C. ,1993. Human cartilage gp-39 a major secrewry product of articular chondrocytes and synorial cell. J-Biol. Chem. 268(34): 25803-10.
76- Hall-H, Carbonetlo-S., Schachner-M. 1997,. L1/HNK-1 carbohydrate and beta-1 integrin dependent neural cell adhesion to laminin.1.J.Neurochem. leb.63(2).544-53.
77- Harper- ,1996.Harper s Biochemistry , 24th edition , pp:648-60
78- Hascall,V.C., Hascall,G.K. ,1995. Proteoglycans, In E.D. Hay,cell Biol.of ECM. Plenum press, New york,pp:39-63.
79- Hay,E.D. 1981. Extracellular matrix . J . Cell . Biol.,91: 205-223.
80- Haynesworth – SE., Carrino-DA. , Caplan-AI. , 1991. Comparison of the cartilage proteoglycan core protein synthesize by chondrocytes in different stages. Connect. Tissue.Res: 25. 311-26.
81- Heimer–R;Sporer–R.;Molinaro-L.,1992,Normal human synovial fluid and articular cartilage contain similar intact proteoglycons lab. Invest. 66(6) :701 – 7.
82- Hiroki – Y., Tanaka – H., Inore – H. ,1991.Molecular cloning of a new class of cartilage spicific matrix, chondromodulin, I, which stimulates growth of cultured chondrocytes. Biochem- Biophys- Res- commum. 175(3): 971-7.
83- Huang– X. ,Birk-SE.,1999. Mice lacking matrilin-1 (Cartilage matrix protein) have alterations in type II collagen fibrillogenesis. Dev. Dyn. 216(4-5) : 434-41.
84- Hurle – M., Colombatti-A . ,1996. ECM modifications in the interdigital spaces of the chick embryos legbud during the formation of ectopic digits . Anat – Embryol. Berl. 193(4): 355-64.
85- Iruela –Arispe–M. ,Liska–D., 1993. Differential expression of thrombospondin 1,2,3 during murine development. Dev. Dyn., 197(1) : 40-56.
86- Ishiwaka-y,,WU-LN, Walhmu – WB., 1991, Fetuin and alpha-2HS glycoprotein induce alkaline phosphatase in epiphysed growth plate chondrocytes.J.cell. Physiol. 149(2) : 223-34.
87- Jacobs-JM,,1996.Morphological changes at pavanodes in IgM pavaproteinamic neuropathy. Microsc. Res-Tech. Aug 15; 34(6): 544-53.
88- Johnson-J. , etal , 1999. Expression and localization of PG-LP epiphcan during mouse development. Dev.Dyn. 216(4-5) : 499-510.
89- Johnston -MC. , 1966. A rodioavtographic study of the migration and fate of cronal neural crest cells in the chick embryo. Anatomical Rec.Vol . 156: 143-156.
90- Junqueira - L.C. etal , 1992. Basic Histology.7th edition. pp:132-40
91- Kaaijk-p, pals-st, 1997 Mar, Differential expression of CD_{44} in normal human CNS. J. Neureimmonbl.73(1-2):70-6.

92- Kamiguchi-H. , Lemmon-v.1998 May. the N-CAm L_1 contains a tyrosine-based signal required for sorting to the axonal growth cone. J.Neurosc.15, 18(10):3749-56.

93- Karagogeos.D., etal, 1997 Mar ,. Expression of cell adhesion protein TAG-1 defines early step of axogenesis in the human spinal cord. J comp. Neurol. 17. 379(3); 415 – 27.

94- Korlsson- K. .1989. Animal glycophingolipids as memberane attachment sites for bacteria Annu. Rev. Biochem., 85. 309.

95- Kavanagh – E., Ashhvrtst – DE., 1999, Development and aging of the articular cartilage of the rabbit knee joint. Histochem. Cytochem. 47(12): 1603 – 14.

96- Kawai–J., Akiyama–H., etal,1999. Effect of TGF Beta staining on chandogenesis in mouse chendrogenic EC cells, $ATDC_5$. Eur – J. Cell Biol.,78(10)707 – 14.

97- Kergosien – N. etal, 1998. Gene and protein expression during diffentiation and matrix mineralijation in a chondrocyte cell cutture system. Calcif – Tissue – Int. 62 (2) ; 114 – 21.

98- Kleinman, H.K, 1986. Biological activities of laminin. J. cell. Biochem, 27: 317 – 25.

99- Kelppel -M. etal, 1996.Expression of novel basement membrane conponent in the developing human kidney and eye. Am. J. Anat. 187: 165 – 74.

100- Langman –J.,1990,Langman s medical embryology .6th edition .pp:140-50

101-LE Douarin -N.M.,1980. Migration and differentiation of neural crest cells. Current topies in development biology, Vol. 16, pp.31-81.

102 -Leathman – A.J. , Atkins - N.,1983 . Lectin binding to parafin section . pp :240-58

103-Lewin - B ,1997. Genes VI. pp:85-112

104-Li-x. , 1997 jun. Recombinant fish neurotrophin - 6- is a heparin- binding glycoprotein . Biochem. J. : 324(pt2):461- 6.

105-Litwack-E.D., etal ,1998. Expression of the heparin sulfat proteoglycan Glypican-1 in development vodent. Dev. Dyn, 211: 72-87.

106-Loeb-JA., Susanto – ET. ,1998 .The neuregulin precursor is processed after expression on the cell surface by a protein kinas enhan ed mechanism, Mol.Cell. Neuro sci. 11(1-2);77-91.

107-Luo –W. ,etal ,1996. Divergent secretory behavier of apposite ends of aggrecan. J- Biol- Chem., 271(28): 16- 447-50.

108-Mackie–E. ,1994, Tenascin in connective tissue development and pathogenesis. Perspect- Dev- Neuro biol. 2(1): 125- 32.

109-Maclaren- RE.,1996. Expression of myelin protein in the opossum optic nerue. J. Comp. Neurol. Aug 12; 372(1): 27- 36.

110-Makihira- S. , Yan- w. , Ohno- s. 1999. Enhancement of cell adhesion and spreading by a cartilage. Specific noncollagenous protein, cartilage matrix protein,Via integrin. J- Biol- Chem. 274(16): 11417- 23.

111-Malinets- VA., 1997. Cells of the neural crest and their derivatives in vertebrates mechanism of migration- Ontogenes., 28(1): 18- 36.

112-Mcclure- Sf. , Stod dart - RW. ,1997. A comparative study of lectin binding to cultured chick sternal chondrocytes and intact chick sternum. Glycoconj. J – 14(3): 365 – 77.

113-Mccormick-C. , Leduc – Y. ,1998. The putative tumour suppressor EKT_1 alters the expression of cell – surface heparan sulfate. Nat – Genet – 19(2): 158 – 61.

114-Mcleod – MJ. ,1980, Differential staining of cartilage and bone in whole mouse fetuses by Alcian Blue and Alizarin Red -s. Teratology, 22: 299 – 301.

115-Melgarejo–Morono–P. , Hellin– D.,1999. Differences between epiglottis and cricoid cartilages histochemical study with loctins in hamster. An ottorinolaringol. 26(2): 197 – 204.

116-Merino–R., Macias–D.,Ganan –Y., 1999. Control of digit formation by activin signaling development., 126(10): 2161 – 70.

117-Mglinets-VA. ,1997, Cells of the neural crest and their derivatives in Vertebrates: the mechanism of migration and its role in tissue formation. Ontogenez.28(1):18-30.

118-Mohamed–Ali – H; 1991. Protelytic enzymes and the destruction of articular cartilage in arthritis and chronic polyarthritis. Wien – Med – Wochenschr. 141(4): 77 – 85.

119-Molteni –A. , etal ,1999. Alterations of matrix and cell associated proteoglycans inhibit osteogenesis and growth response to fibroblast growth response to fibroblast growth factor –2 in cultured rat mandibular condyl and calvaria. Cell – Tissue Res. 295(3): 523 – 36.

120-Molteni – A. , Modrowski – D. , 1999. Differential expression of FGF recptor –1, 2,3 and syndecan 1 ,2,3 in neonatal rat mandibular condyle in vitro. Bone. 24(4): 337 – 47.

121-Morriss-kay-G. ,Tucke-F.,1989. Immunohistochemical localization of chondroltin sulfate proteoglycans and the effect of chondroitinase ABC in 9-11 day rat embryos. Development ,106, pp:787-98.

122-Muratoglu– S., Bachrati – C. , Malpeli – M. ,1995. Expression of the cartilage matrix protein gene at different chondrocyte development stage. Eur – J – Cell – Biol – 68(4): 411 – 8.

123-Murphy–J., etal, 1999, Distribution of cartilage molecules in the developing mouse joint. Matrix – Biol, 18(5): 487 – 97

124-Naisberg –Y. , Weizman–A., 1997. Role of lipid induced changes in plasma membrane in the biophysical shunt theory of psychopathology. Med. Hypotheses. 48(4): 277 – 80.

125-Neame – Pj., Barry – F., 1994, The link proteins. Exs.70: 53-72.

126-Neame – Pj. , Tapp – H. ,1999. Noncollagenous , nonproteoglycan macromolecules of cartilage. Cell – Mol – Life – Sci. 55(10): 1327 – 40.

127-Nemato –O., Yamada–H., etal, 1997. Suppression of matrix metallo proteinase synthesis in human articular chondrocytes. J. Rhevmatol. 24(9): 1774 – 9.

128-Paine -sunders–S. , Beth – L., 2000. Glypican – 3 controls cellular response to BMP in limb patterning and skeletal development. Dev– Biol. 225: 179 – 86.
129-parekh- R.B. , 1991. Effect of glycosylation on protein function . Curv. Opinion struct. Biol, 1, 750.
130-Peach –RJ. , Hollenbaugh –D. , Stamenkovic-I., 1993. Identification of hyaluronic acid binding sites in the extracellular domain of CD_{44} . J – cell – Biol – 122(1) : 257 – 64.
131-Perez–vilar–J. ,Hidalgo–J.,1991.Presence of terminal N–acetygalactosamine residues in subregions of the ER is influenced by cell differentiation in culture . J. Biol – Chem., 266(35): 23967 – 76.
132-Powell-Sk. ,Rivas-RJ., 1997. Development of polarity in cerebllar granule neurons. J. Weurobiol. 32(2): 223-36.
133-Rademacher-T. , Parkh - R. , 1988. Glycobiology - Ann, Rev. Biochem, 57,785.
134-Reddi–A. ,1998. Role of morphogenic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration, Nat. Biotechnol., 16(3): 247 – 52.
135-Ren-J., Utsvnomiya-I. , 1999. Localization of verotovin receptors in neruous system. Brain Res. Apr. 825(1-2), 183-8.
136-Riou – JF. , Umbhauer – M., Shi – DI., 1992 . Tenascin: apotential modulator of cell – ECM intractions during Vertebrate embryogenesis. Biol. Cell,75 (1):1-9.
137-Rosior – Rn., O'keefe – RJ., Teot – LA. , 1997. P – Glycoprotein expression in cartilage tumour. J – Surg – Oncol – 65(2): 95– 105.
138-Ruoslahti -E. ,1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. Science , 238: 491-97.
139-Ruiero - o., Leconete -M., Michoud -E. ,1997. Involvment of cell-cell interactions in the pathogenesis of diabetic retinopathy. Diabetes. Metal. 23(1): 30-42.
140-Saitoh - O. ,1992. Differential glycosylation in human colon cancer exhibiting distinct metastatic potentals. J. Biol. Chem. 267.5700.
141-Salter – DM. ,1993. Tenascin is increased in cartilage and synovium from arthritic knees – Br – J – Rheumatol. 32(9): 780-6.
142-Sawhney– Rs., Hering –TM. , 1991. Biosynthesis of small proteoglycan II (decorin) by chondrocytes and evidence for a procore protein. J – Biol – Chem. 266(14): 9231 – 40.
143-Schachner- M. ,1989. Families of neural adhesion molecules. cib a Foundation Symposium 145, p. 154. wiley, NewYork.
144-Schachter - H. ,1992. Branching of N-ando glycans: biosynthetic controls and functions trends. Glyco technol.4,241.
145-Schumacher -S. ,1997. Chicken Acidic heucine-rich EGF-Like Domain Containing Brain protein (CALEB) , a Neural member of EGF Family of differentiation factors, is implicated in Nevrite formation. The J. of cell Biol. 136(4): 895-906.
146-Scott - F.G. ,199. Developmental biology .pp:284-300.
147-Scott-JE., 1992. Supramolecular organization of ECM glycosaminoglycans. Invitro and in tissue. FASEB. J . 6:2639-45.

148-Sechriest – VF., Miao – YJ., 2000.GAG augmented polysaccharide hydrogel: a novel biocompatible and biodegradable material to support chondrogenesis. J – Biomed – Mater – Res. Mar 15, 49(4): 534 – 41.
149-Serbedzija -G. , Bronner -M. ,1992. Vital dye analysis of cranial neural crest CCU migration in the mouse, Development, 116(2): 297-307.
150-Shakibaet – M., 1998. Inhibition of chondrogenesis by integrin antibody in vitro. Exp – Cel – Res. 240(1) : 95 – 106.
151-Snow-DM., Brown- EM. ,1996 Jun. Growth cone behavior in the presence of soluble chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG), compared to behavior on CSPG bound to Laminin or fibro nectin. Int. J. Neurosci;14(3):331-49.
152-Solecki-D., Schevavz-S. 1997, The promoters for human and monkey poliovirus receptors. J.Biol. chem.Feb 28, 272(9): 5579-86.
153-Tomschy – A., fauser – C., landwehr – R.,1996. Homophilic adhesion of E-cadherin occurs by co– operative two step interaction of N- terminal domains. EMBO – J. 15(14): 3507 – 14.
154-Tsonis–PA. ,Walker–E.,1991. Cell population synthsized cartilage proteoglycan core protein in the early chick limb bud. Biochem – Biophys – Res – Commum. 174(2): 688 – 95.
155-Tsubouchi-M., Tsubochi-Y., 1996 Dec. Perineuronal Sulfated proteoglycans, cell surface glycoproteins and dark neurons in the cingulate cortex of newborn and adult rats. Acta Med.Okayama. 50(6): 313-7.
156-Tucker – RP., Adams- JC., Lawler – J .,1995. Thrombospondin – 4 is expressed by early osteogenis tissues in the chick embryo. Dev. Dyn. 203(4): 477 – 96.
157-Tucker-RP., Brunso-JK . etal .1994, Cellular origins of Tenascin in the developing nervous system. perspect Dev. Neurobiol. 2(1):89-99.
158-Tucker – RP., Hagios – C.,1997 , Insitue localization of thrombospondin 1, 3 transcripts in avian embryo. Dev. Dyn, 208(3): 326 – 37.
159-Van – denbrule- F.A. etal,1997. Differential expression of galectin-1,3 during first trimester human embryogenesis.Dev. dyn.209.399-405.
160-Vasta – G.R., Ahmad – H., 1994. Animal lectins as self nonself recognition molewles. Ann. New York. Acad . Science:15(712): 55 _ 73.
161-Velleman – SG., Clark – SH; 1992, The cartilage proteoglycan deficient mutation nanomelia. Matriy. 12(1): 66 – 72.
162-Verheijden – GF., Rijnders _ Aw., 1997. Human cartilage glycoprotein - 39 as a candidate autoantigen in rheu matoid arthritis .Rheum ., 40 (6): 1115 -25.
163-Wai – Aw., Watanabe – H ., 1998. Disrupted expression of matrix genes in the growth plate of the mouse cartilage matrix deficiency mutant . Dev – Genet . 22(4): 349 – 59.
164-Worren -L.,Buck ,-C.A. ,1987. Glycopeptid changes and malignant transformation a possible role for carbohydrate in malignant behavior. Biochem. Biophys. Acta , 516.97.
165-Wassarman -P.M.,1992. Cell surface carbohydrates and mamalian fertilization (chapter.8). In_cell surface carbohydrates and all development.

166-Wehrle - B., Chiquet - M., 1990 , Tenascin is accumulated along developing peripheral neurves and allows neurite outgrowth . Development, 116;461-15.
167-Werb - Z., 1997, ECM and cell Surface proteolysis. Cell.91:439-42.
168-Werb -Z., Tremble - P., 1990, Regulation of extracellular matrix degradation by ECM interaction cell Differ.Dev.32: 299-306.
169-Willson-DJ.,1996, A family of glycoproteins(Gp55) , which inhibit neurite outgrowth, are members of the Ig Superfamily.J.cell.Sci ;109(pt 13):3129-38.
170- Wittwer -A. and Howard . S.C. 1990, Glycosylation inhibits the conversation of Single chain tissue-Type plasminogen activator by plasmin. Biochem. 29,4175.
171-Yang – F., schwartz –Z., 1991, Alpha–2HS glycoprotein. Expression in the chondrocytes and augmentation of alkaline phosphatase activity . Bon .12(1): 7- 15.
172-Yue -B.Y. ,1996. The extracellular matrix and its modulation in the trabecular meshwork.Sur. ophthalmol. 40(5): 379-87.
173-Zschabitz – A. , 1998, Glycoconjugate expression and catiloge development of the cranial skeleton . Acad – Anat – Basel. 161(1-4):254 – 74.
174-Zschabitz – A., Krahn – V. 1995. Golycoconjugate expression of chondrocytes and perichondrium during hyaline cartiloge development in the rat. J – Anat – Aug , 187 (pt 1):67 – 83.
175-Zschabitz – A. , Krahn –V.,1999 . Experession Pattern of complex glycoconjugates and endogenous lectins during fetal development of the viseralo cranium. Anat – Anz . , Jon, 181(1);117 – 21.

Histochemical studies of chondrogenesis

(Jina khayatzadeh)

The formation of the cartilage tissue depends on the coordination of cell to cell or cell to ECM interaction that cause to the cell polarity,migration and differentiation of precursor mesenchymal cells during chondrogenesis Many of these events are mediated by ECM components such as glycocojugates which with their suger residues such as galactose or aminosuger have a ligand role for regulatory molecules .The aim of this study was to identify the presence and distribution of some different glycoconjugates and their suger residues in the chondrogenesis by histochemistry and lectin-histochemistry techniques.

For this purpose , embryos from pregnant wistar rats from E_{12}-E_{20} were collected and fixed . Some of them were stained with alizarin red S,alcin blue staining to demonstrate cartilage and bone formation in whole mount embryos. Other embryos with serial sections (5-7μ m thikness) were stained by: 1-alcian blue (pH:1) for S-GAG,2-alcin blue (pH:2.5)for C-GAG, 3-PAS alcian blue for neutral and acidic sugers,4- tuloidin blue for metachromatic substances. Stained sections were graded according to the staining intensity (0-5 grading s method).

Statistical analysis showed significant difference for those substances among experimental groups.

Lectin histochemistry with MPA,VVA,SBA,OFA demonstrated differences between organs for suger residues during chondrogensis.

It seems that synthesis and secretion of glycocojugates and change of their suger residues follows a spatiotemporal pattern and developmentaly regulated.

دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات
امور پروژه‌ها

بسمه تعالی

دانشگاه آزاد اسلامی

واحد علوم و تحقیقات

صورتجلسه دفاع از رساله دکتری (Ph.D)

زیست‌شناسی جانوری

رشته: زیست‌شناسی جانوری

موضوع: مطالعات هیستوشیمیایی روند هیستوژنز بافت غضروف

نام و نام خانوادگی دانشجو: [illegible]

تاریخ: ۸۰/۷/۲۵

نام و نام خانوادگی اعضاء هیئت داوری	سمت	مقام اعضاء هیئت داوری
۱ - دکتر احمد مجد	مدیر گروه تخصصی زیست‌شناسی جانوری (دارا)	
۲ - دکتر علیرضا فاضل	استاد راهنما	
۳ - دکتر ناصر مهدوی شهری	استاد راهنما	
۴ - دکتر کاظم پریور	استاد مشاور	
۵ - دکتر احمد مجد	عضو کمیته نظارت بر تحقیق	
۶ - دکتر علی حائری روحانی	عضو کمیته نظارت بر تحقیق	
۷ - دکتر فتح‌اله فلاحیان	عضو کمیته نظارت بر تحقیق	مدیر گروه تخصصی زیست‌شناسی و علوم آبی
۸ - دکتر تقی	عضو هیئت داوران بر جلسه دفاعیه	
۹ - دکتر مهناز آذرنیا	عضو هیئت داوران بر جلسه دفاعیه	

دفاع از رساله در تاریخ ۸۰/۷/۲۵ برگزار و با درجه عالی و نمره ۱۹ به تصویب رسید.

توضیحات:

لوزنده ۷۵

۱۳۸۰/۷/۲۰