مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۱، شماره ۳ (شماره پیاپی ۴۴)، پاییز ۱۳۸۷، ۱۳۶-۱۲۷

شناسایی و تعیین موقعیت برخی از گلیکوکانژوگیت‌ها در طی تکوین تیموس در جنین های موش Balb/C

آتنا فرخنده کلات[1*] ، دکتر جواد بهارآراء[2]، دکتر علیرضا فاضل[3]

۱- کارشناس ارشد زیست شناسی علوم جانوری گرایش سلولی - تکوینی ، دانشگاه آزاد اسلامی مشهد و عضو باشگاه پژوهشگران جوان، مشهد، ایران

۲ – استادیار، دکترای زیست شناسی علوم جانوری ،گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد، ایران

۳ – استاد، دکترای جنین شناسی و بیولوژی سلولی دانشگاه علوم پزشکی مشهد ، ایران

تاریخ دریافت ۸۷/۱/۲۴ ، تاریخ پذیرش ۸۷/۳/۸

چکیده

مقدمه: گلیکوکانژوگیت‌ها نقش‌های مهمی را در فرآیندهای مختلف تکوینی از قبیل: تکثیر، مهاجرت، چسبندگی و تمایز سلولی بازی می‌کنند. در این مطالعه از تکنیک لکتین هیستوشیمی برای شناسایی و تعیین موقعیت برخی از گلیکوکانژوگیت‌ها در طی تکوین تیموس استفاده شده است.

روش کار: رویان‌های ۱۰ تا ۱۵ روزه و جنین ۱۸ روزه موش Balb/C تهیه و در فرمالین فیکس گردیدند و برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرون و به صورت سریال برای مطالعات هیستوشیمیایی آماده شدند. برش‌ها در مجاورت سه نوع لکتین کنژوگه شده با آنزیم HRP شامل: SBA اختصاصی برای قندN – استیل گالاکتوزآمین (α,β-D-GalNAc)، PNA اختصاصی برای دی ساکارید گالاکتوز /N–استیل گالاکتوزآمین (β-D-Gal-(1→3)-D-GalNAc) و MPA اختصاصی برای قند گالاکتوز (D- Gal)، قرار گرفتند.

نتایج: لکتین SBA در روزهای مورد مطالعه با شدت‌های رو به کاهش در نواحی گلژی و سطوح سلول‌های مزانشیمی، اپیتلیالی و محیط میکروسکوپیک سلول‌های T واکنش داشته است. سلولهای T در روزهای ۱۲ و ۱۳ واکنش بالایی را با SBA در غشاها و نواحی گلژی نشان داد. لکتین PNA در روزهای مورد مطالعه با شدت‌های مختلفی در غشاهای پایه، سطوح سلول‌های مزانشیمی و اپیتلیالی و محیط میکروسکوپیک سلول‌های T حضور داشته است. لکتین MPA به طور ضعیفی در تمامی روزها در سلول‌های آندودرمی، مزودرمی و محیط میکروسکوپیک سلول‌های T حضور پیداکرده‌اند.

نتیجه گیری: گلیکوکانژوگیت‌های دارای قند انتهایی GalNAc ممکن است در تکوین اولیه غده تیموس و بلوغ اولیه سلول‌های T نقش داشته باشند. گلیکوکانژوگیت‌های دارای دی ساکارید انتهایی Gal/GalNAc احتمال دارد در تمامی مراحل تکوین تیموس و بلوغ سلول‌های T با اهمیت باشند. به علاوه گلیکوکانژوگیت‌های دارای قند انتهایی گالاکتوز امکان دارد نقش در تکوین تیموس و سلول‌های T نداشته و یا در مقدار کم موثر باشند.

واژگان کلیدی : گلیکوکانژوگیت، تیموس، لکتین هیستوشیمی، سلول‌های T

***نویسنده مسئول:** مشهد ، بلوار وکیل آباد ، خیابان صدف ، صدف ۲ ، پلاک ۶۶ .

Email: atena_farkhondeh@yahoo.com

مقدمه

میان کنش‌های اپیتلیال– مزانشیال در تکوین غده تیموس نقش مهمی را ایفا می‌کنند(۱). این غده از آندودرم سومین بن بست حلقی به وجود می‌آید که توسط سلول‌های مزودرمی مشتق شده از ستیغ عصبی احاطه می‌شود. گاهی بخش‌هایی از تیموس از بن بست حلقی چهارم نیز منشا می‌گیرد(۹-۱). کمی بعد، پیش سازهای لنفوسیت T [1] از کبد و مغز استخوان برای تکثیر، تمایز و بلوغ به داخل تیموس فیتال وارد می‌شوند(۴ ،۱۰). میان کنش‌های بین اجزای لنفوسیت و اپیتلیال برای بلوغ سلول‌های T ضروری است (۶ ، ۱۱ ، ۱۲). مزانشیم احاطه کننده تیموس که از سلول‌های ستیغ عصبی ناحیه پس سری منشاء می‌گیرد نقش مهمی را در تکوین سلول‌های T ، گسترش اپیتلیوم تیموس و مورفوژنز آن بر عهده دارند(۲ ، ۶ ، ۸). تکوین غده تیموس وابسته به تشکیل یک محیط میکروسکوپیک(ECM) است که شامل یک ماتریکس خارج سلولی وسیع می‌باشد. این ECM توسط سلول‌های مزانشیمی که عمدتا از سلول‌های ستیغ عصبی منشاء می‌گیرند به وجود می‌آید. این محیط میکروسکوپیک باعث الگویابی، تکثیر و تمایز سلول‌های اپیتلیالی (آندودرمی) خواهد شد(۱، ۸، ۱۳، ۱۴). در پژوهشی مشخص شده که میان کنش‌های بین اجزاء لنفوسیت و اپیتلیال در تیموس برای بلوغ سلول‌های T لازم هستند(۱۲). پیشنهاد شده است که فیبروبلاست‌های حاصل از مزانشیم و ECM ایجاد شده توسط این سلول‌ها در تکوین سلول های T ازطریق میان کنش تیموست‌های نا بالغ با اینتگرین و یا سایتوکاین اهمیت دارند(۶).

مطالعات لکتین هیستوشیمی بر روی محیط میکروسکوپیک سلول‌های T در موش نشان داده است که گلیکوکانژوگیت‌های فوکوزیله شده و قندهای انتهایی GalNAc ممکن است نقش مهمی را در محیط میکروسکوپیک درون تیموس داشته باشند که احتمالاً سبب تمایز لنفوسیت‌های T خواهند شد(۱۳). یک پژوهش دیگر در ارتباط با محیط میکروسکوپیک تیموس در جوجه با تکنیک لکیتن هیستوشیمی انجام شده که نشان می‌دهد، لکتین WGA در تیموس واکنش داشته است که احتمالاً این رسپتورهای لکتین Con-A، در رابطه با چسبندگی سلولی می‌باشند. لکتین RCA نیز در سلول‌های استرومال و تیموسیت‌ها در تیموس در حال تکوین واکنش نشان داده و این واکنش بین روزهای پنج تا نوزده جنینی شدت داشته است که این افزایش ممکن است با ترشح فاکتورهای هورمونی تیموس در این مراحل در ارتباط باشد(۱۵).

از آنجایی که گلیکوکانژوگیت‌ها ترکیباتی واجد کربوهیدرات هستند که در ماتریکس خارج سلولی و سطح سلول‌ها انتشار یافته‌اند و اهمیت بخش کربوهیدراتی این مولکول‌ها و هم‌چنین قند انتهایی آنها در پدیده‌های بیولوژیک و در مسیر تکوین توسط بسیاری از متخصصین عنوان شده است(۲۳-۱۶) و با توجه به نقش غده تیموس در حفظ سلامتی و عملکردی که در از بین بردن واکنش خودی سلول‌های T دارد(۴-۲)، لذا بر آن شدیم تا تغییرات تکوینی و الگوی حضور برخی از گلیکوکانژوگیت‌ها را با استفاده از تکنیک لکتین هیستوشیمی در طی تکوین غده تیموس بررسی نماییم تا گامی را در جهت درک ناشناخته‌های فراوانی که در ارتباط با تکوین این ارگان و به خصوص نحوه بلوغ سلول‌های T وجود دارد، برداریم. این پژوهش به عنوان یک مطالعه پایه‌ای بوده و می‌تواند با آزمایشات تکمیلی دیگر نظیر پژوهش‌های ژنتیکی و آنتی بادی برای تعیین دقیق نوع خاصی از گلیکوکانژوگیت‌هایی که در طی تکوین این غده دخالت دارند دنبال گردد و در درک تکوین طبیعی این غده و شناسایی موارد ناهنجاری ها و یا راههای تشخیصی و شناخت زمان‌های بحرانی تکوین مورد استفاده قرار گیرد.

روش کار

برای انجام آزمایشات لکتین هیستوشیمی تعداد ۲۰ سر موش سفید از نژاد Balb/C (تهیه شده از مرکز واکسن

1 - Hematopoietic Stem cells.

و سرم سازی رازی) دو ماهه و باکره انتخاب شدند و با موش‌های نر هم نژاد خود در قفس‌های مخصوص جفت‌گیری آمیزش داده شدند. با مشخص شدن پلاک واژینال، همان روز، روز صفر حاملگی محسوب و سپس موش باردار در قفس مجزایی در شرایط استاندارد نگه داری گردید . در این آزمایش موش‌های حامله از روز دهم تا روز پانزدهم و به علاوه روز هجدهم تحت بیهوشی عمیق با کلروفرم قرار گرفتند و به سرعت و دقت تشریح شدند. پس از سزارین موش‌ها و خارج نمودن جنین‌ها از دو شاخ رحمی، آنها در پتری دیش محتوی سرم فیزیولوژی قرار داده شدند. با برداشتن پرده‌های جنینی، جنین‌های سالم پس از شستشو در سرم، در محلول فیکساتور (فرمالین ۱۰ درصد) قرار گرفتند. در این آزمایش تعداد ۹۰ جنین مورد استفاده قرار گرفتند و روزهای مورد مطالعه شامل : روز دهم تا روز پانزدهم رویانی و روز هیجدهم جنینی بوده است.

با اتمام مراحل فیکس شدن، نمونه‌ها به روش‌های معمول بافتی توسط الکل اتیلیک با غلظت‌های افزایشی، آبگیری و با گزیلن شفاف سازی شدند. پس از تهیه بلوک‌های پارافینی، برای این نوع مطالعه، برش‌ها به صورت سریال و به ضخامت ۵ میکرون توسط دستگاه میکروتوم آلمانی Leitz مدل ۱۵۱۲ تهیه گردید.

برای مطالعات لکتین هیستوشیمی از میان ۳۰۰۰ لام تهیه شده از کلیه روزها و جنین‌ها، تعداد ۹۰ برش از روزهای مورد مطالعه جنینی و دارای ارگان تیموس به طور تصادفی انتخاب شدند و به روش‌های معمول بافتی پارافین زدایی و آبدهی گردیدند. سپس لکتین‌های موجود در جدول ۱ که با آنزیم horseradish peroxidase (HRP) (خریداری شده از شرکت سیگما) کنژوگه شده و برای انجام مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. بدین منظور لکتین‌ها توسط بافر (PBS) فسفات برای رسیدن به غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر رقیق شدند. در مرحله بعد برش‌ها به مدت دو ساعت در اتاقک مرطوب در مجاورت لکتین‌های رقیق شده قرار گرفتند. پس از این مرحله، نمونه‌ها با محلول بافر شستشو شدند و به مدت دو دقیقه در محلول سوبسترای ۰/۰۳ درصد diaminobezidine (DAB) در بافر فسفات که مقدار ۲۰ میکرو لیتر آب اکسیژنه به ازای هر ۱۰ میلی لیتر از محلول فوق نیز به آن اضافه گردیده، قرار داده شد. سپس کلیه مقاطع پس از شستشو با آب جاری برای ایجاد رنگ زمینه به مدت ۲ تا ۵ دقیقه در محلول آلسین بلو با PH: ۲/۵ قرار گرفتند. حاصل اتصال لکتین‌ها به قندهای انتهایی اختصاصی خود تولید رنگ قهوه‌ای است که نتیجه واکنش آنزیم HRP با سوبسترای خود یعنی DAB می باشد. لام‌های تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ ۵ نفره Olympus و به روش مشاهده توسط چند نفر مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌ها بر اساس شدت واکنش به لکتین‌ها طبق جدول درجه بندی شدت واکنش گونگ و همکاران (۲۴) درجه بندی شدند.

نتایج

لکتین SBA : در روز یازدهم، اپیتلیوم آندودرمی بن بست سوم که درون رفتگی دیورتیکول مانند عمیقی پیدا کرده، در نواحی عمقی دیورتیکول در سیتوپلاسم فوقانی و سطوح راسی با شدت متوسط و در ناحیه ابتدای دیورتیکول در محل بسته شدن اپیتلیوم با شدت بالا به لکتین SBA پاسخ داده است. سلول های مزانشیمی که بطور عمده از نوع ستیغ عصبی هستند، در زیر اپیتلیوم و اطراف دیورتیکول پیش ساز تیموس در سطوح و نواحی گلژی با شدت متوسط با لکتین فوق واکنش داده‌اند. در روز دوازدهم، در غده تیموسی که تقریبا شکل گرفته اما هنوز حالت لبوله پیدا نکرده است ، برخی از سلول‌های T که عمدتا در نواحی قشری و رو به مرکز حضور دارند در غشای سلولی خصوصا و گاهی در نواحی سیتوپلاسمی و نواحی گلژی با شدت بالا با لکتین SBA مشخص شده‌اند. سلول‌های اپیتلیالی هم با شدت کم و متوسط در سیتوپلاسم و سطوح با لکتین SBA واکنش نشان داده‌اند. سلول‌های مزانشیمی اطراف غده با شدت متوسط در سیتوپلاسم و سطوح با لکتین مذکور واکنش داشته‌اند (تصویر۱). در روز سیزدهم، برخی از سلول‌های T

در نواحی قشری غده در سیتوپلاسم و سطوح با شدت کم و برخی دیگر در نواحی مرکزی تر غده با شدت متوسط و بالا با لکتین SBA واکنش نشان دادهاند. سلول‌های مزانشیمی اطراف غده تیموس هم با شدت متوسط و بالا با لکتین SBA واکنش داده‌اند. در روز چهاردهم، تنها ماتریکس بین سلولی درون غده با شدت بسیارکم با لکتین SBA واکنش داشته است و سلول‌های مزانشیمی درون بافت پیوندی غده نیز باشدت کم به لکتین فوق پاسخ داده‌اند. در روز پانزدهم، سیتوپلاسم و سطوح برخی از سلول‌های T با شدت کم و سلول های مزانشیمی و ماتریکس بافت پیوندی با شدت متوسط با لکتین SBA واکنش نشان داده‌اند. در روز هجدهم، سلول‌های T و بافت پیوندی با شدت بسیارکم و کم با لکتین SBA واکنش داده‌اند. (تصویر ۱).

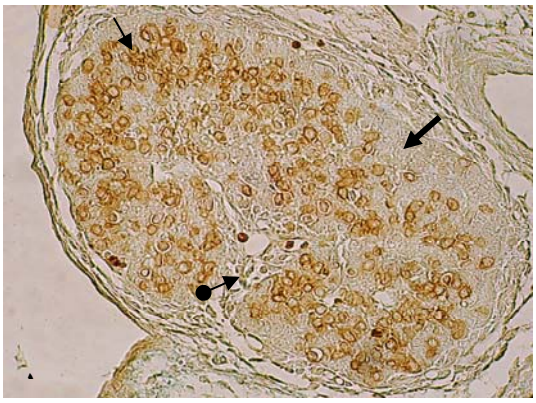
لکتین PNA : درروز یازدهم، اپیتلیوم آندودرمی بن بست سوم که درون رفتگی دیورتیکول مانند عمیقی پیدا کرده، در سطح راسی اپیتلیوم با شدت بسیار بالا، در غشای پایه این اپیتلیوم چند لایه فرورفته، با شدت بالا و در ماتریکس بین سلول‌های اپیتلیومی درون رفته نیز با شدت متوسط به لکتین PNA پاسخ داده‌اند. سلول‌های مزانشیمی احاطه کننده بن بست و دیورتیکول پیش ساز تیموس در سیتوپلاسم، سطوح و ماتریکس بین سلولی با شدت بالا با لکتین PNA واکنش داشته‌اند.

در روز دوازدهم، سیتوپلاسم، سطوح و ماتریکس بین سلولی عمدتاً در نواحی قشری با شدت بسیارکم، برخی از سلول‌ها در نواحی مرکزی تر در غشای سلولی و نواحی گلژی با شدت متوسط و سلول‌های اپیتلیالی نیز با شدت متوسط با لکتین PNA واکنش داده‌اند. سلول‌های مزانشیمی اطراف با شدت متوسط و بالا با لکتین فوق واکنش نشان داده‌اند. در روز سیزدهم، برخی از سلول‌های T در نواحی مرکزی تر با شدت متوسط و بالا و در ماتریکس بین سلولی با شدت کم و برخی دیگر از سلول‌های T هم با شدت کم با لکتین PNA واکنش داده‌اند. سلول‌های مزانشیمی اطراف غده با شدت متوسط و بالا به لکتین فوق پاسخ داده‌اند. در روز چهاردهم، سیتوپلاسم، سطوح و ماتریکس بین سلولی با شدت بسیارکم و سیتوپلاسم و سطوح سلول‌های مزانشیمی درون بافت پیوندی غده با شدت کم با لکتین PNA واکنش داشته‌اند. در روز پانزدهم، غشاها، سیتوپلاسم، سطوح و نواحی گلژی برخی از سلول‌ها با شدت متوسط و بالا وماتریکس بین سلولی با شدت کم و متوسط با لکتین PNA واکنش داده‌اند. سلول‌های مزانشیمی نیز با شدت متوسط با لکتین فوق واکنش نشان داده‌اند. در روزهجدهم، سلول‌ها در غشاها، سیتوپلاسم، سطوح، ماتریکس بین سلولی و نواحی گلژی با شدت بالا و برخی هم با شدت بسیار بالا با لکتین PNA واکنش داده‌اند(تصویر ۲).

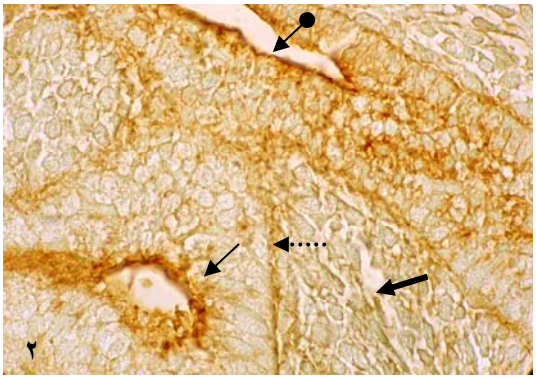
لکتین MPA: در روز یازدهم، اپیتلیوم آندودرمی بن بست سوم در محل درون رفتگی دیورتیکول مانند در سیتوپلاسم فوقانی و سطوح راسی با شدت کم و در نواحی فرو رفته و لایه‌های زیرین در ماتریکس بین سلولی با شدت بسیارکم با لکتین MPA واکنش داده‌اند. سلول‌های مزانشیمی هم یا بدون واکنش بوده‌اند و یا در سیتوپلاسم و سطوح یک، شدت بسیارکم را نسبت به لکتین MPA نشان داده‌اند(تصویر۳). در روز دوازدهم، در ماتریکس بین سلولی شدت بسیارکمی از واکنش با لکتین MPA مشاهده می‌گردد و سلول‌های مزانشیمی نیز با شدت بسیارکم یا بدون واکنش با لکتین فوق بوده‌اند. در روز سیزدهم، تنها برخی از سلول‌های T با شدت بسیارکم با لکتین MPA واکنش داده‌اند، سیتوپلاسم و سطوح سلول‌های مزانشیمی موجود در بافت پیوندی غده با شدت بسیارکم و گاهی کم با لکتین MPA واکنش داشته‌اند. در روز چهاردهم، واکنش خاصی به جزء یک واکنش بسیارکم و کم در سلول‌های مزانشیمی موجود در بافت پیوندی غده به لکتین MPA وجود ندارد. در روز پانزدهم، سلول‌های T در سیتوپلاسم و سطوح شدت بسیارکم و سلول‌های مزانشیمی نیز با شدت کم به لکتینMPA پاسخ داده‌اند. در روز هجدهم، واکنش خاصی در هیچ یک از سلول‌ها نسبت به لکتین MPA مشاهده نمی‌شود(۳).

جدول ۱ . انواع لکتین های مورد استفاده و خصوصیات آنها

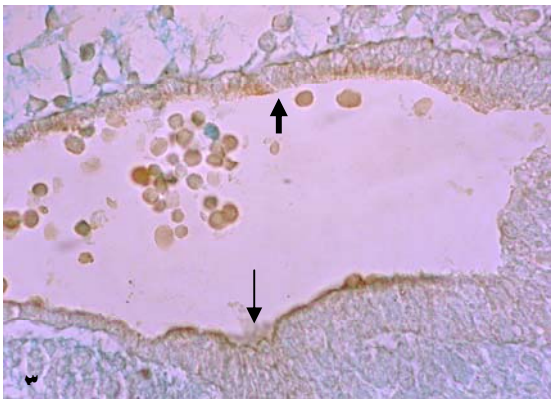
لکتین مورد آزمون	محفف نام لکتین	اتصال کربوهیدراتی اختصاصی
Glycine max (Soybean)	SBA	β - D - GalNacα ،
Arachis hypogaea (Peanut agglutinin)	PNA	β - D - Gal -(1→3)- D - GalNac
Maclura Pomifera (Osage orange)	MPA	D - Gal



تصویر۱ . روز دوازدهم رویانی، غده تیموس. پیکان سیاه باریک سلول‌های T دارای واکنش بالا و بسیار بالا، پیکان سیاه ضخیم سلول‌های T فاقد واکنش و پیکان سیاه با انتهای گرد سلول‌های مزانشیمی درون غده را با شدت واکنش متوسط مشخص می کنند. لکتین SBA ; 400X .



تصویر ۲ . روز یازدهم رویانی، بن بست سوم حلقی. پیکان سیاه باریک اپیتلیوم درون رفته و واکنش بالا و بسیار بالا در سطوح راسی، پیکان سیاه منقطع واکنش بالا در غشای پایه اپیتلیوم، پیکان سیاه ضخیم واکنش بالای سلول‌های مزانشیمی زیر اپیتلیوم درون رفتگی و پیکان سیاه با انتهای گرد سلول‌های اپیتلیوم آندودرمی و واکنش بالا و بسیار بالا آن ها در دهانه درون رفتگی را نشان می‌دهند. لکتین PNA ; 1000X .



تصویر ۳ . روز یازدهم رویانی، پیکان سیاه باریک اپیتلیوم بن بست سوم حلقی و واکنش کم در سطح راسی و پیکان سیاه ضخیم اپیتلیوم سقف دهان اولیه و سلول‌های مزانشیمی زیر آن را مشخص می‌نمایند . لکتین MPA ; 1000X .

بحث

لکتین SBA: نتایج نشان می‌دهند که گلیکوکانژوگیت‌های دارای قند انتهایی N- استیل گالاکتوز آمین که دراپیتلیوم آندودرمی درون رفته بن بست سوم در روز یازدهم حضور دارند، احتمال دارد در فرآیندهای تکثیر و درون رفتگی سلول‌های اپیتلیالی نقش داشته باشند. در پژوهش مانلی و همکاران مشخص شده که ژن Hoxa-3 در طی تکوین تیموس در آندودرم بن بست بیان می‌شود(۲۵). این امکان وجود دارد که گلیکوکانژوگیت‌های دارای قند انتهایی N- استیل گالاکتوز آمین (GalNAc) با بیان ژن‌های Hoxa-3 در آندودرم بن بست سوم مرتبط باشند. هم‌چنین گلیکوکانژوگیت‌هایی که در این روز در سلول‌های مزانشیمی اطراف دیورتیکول حضور دارند، احتمالاً در گسترش اپیتلیوم و مورفوژنز آن دخالت می‌نمایند. در تحقیقات ژول ، تریانتافیلو و همکاران نشان داده شده که

ژن Eya-1 در سلول‌های مزانشیمی بیان می‌شود و در وقایع اولیه آغاز ارگانوژنز تیموس و الگویابی بن بست سوم نقش ضروری دارد(۲۶، ۲۷). لذا احتمال دارد که گلیکوکانژوگیت‌های دارای قند انتهایی N- استیل گالاکتوز آمین حاضر در سلول‌های مزانشیمی و نواحی گلژی آنها در بیان این ژن درگیر باشند.

گلیکوکانژوگیت‌های دارای قند انتهایی N- استیل گالاکتوز آمین که در روز دوازدهم در برخی از سلول‌های T حضور دارند، احتمال دارد که با تکثیر سلول‌های T در ناحیه قشری و فرآیند ایجاد رسپتورهای T در سطوح سلولی دخالت داشته باشند(۵-۳، ۱۱). گلیکوکانژوگیت‌هایی که در سلول‌های اپیتلیالی حضور دارند امکان دارد که در میان واکنش‌های بین لنفوسیت‌ها و سلول‌های اپیتلیالی برای بلوغ سلول‌های T شرکت نمایند(۱۲).

گلیکوکانژوگیت‌های دارای قند انتهایی GalNAc که در روز سیزدهم در سلول‌های T با شدت‌های مختلف مشاهده می‌شوند، امکان دارد در فرآیند ایجاد رسپتورهای T در سطح سلول‌ها و یا مراحل انتخاب سلول‌های T درگیر باشند. هم‌چنین گلیکوکانژوگیت‌هایی که در سلول‌های مزانشیمی در این روزها مشاهده می‌شوند احتمالاً در القاء پروسه‌های بلوغ تیموسیت‌های نابالغ و فازهای انتخابی سلول‌های T فعالیت داشته باشند. چرا که مشخص شده سلول‌های مزانشیمی احاطه کننده تیموس در تکوین سلول‌های T نقش مهمی را برعهده دارند (۲، ۶، ۸، ۱۳) . در کل به نظر می‌رسد که گلیکوکانژوگیت‌های دارای قند انتهایی N- استیل گالاکتوز آمین در بلوغ اولیه تیموسیت‌ها درگیر می‌باشند.

واکنش‌هایی که در ماتریکس بین سلولی در غده تیموس مشاهده می‌گردند، به دلیل حضور گلیکوکانژوگیت‌های دارای قند انتهایی GalNAc است که طبق پژوهش پروفسور فاضل و همکاران (۲۰۰۳) ممکن است این نوع گلیکوکانژوگیت‌ها نقش مهمی را در محیط میکروسکوپیک درون تیموس داشته و احتمالاً سبب تمایز لنفوسیت‌های Tخواهند شد(۱۳).

بتدریج از روز چهاردهم تا هجدهم با نزدیک شدن به زمان بلوغ مورفوژنیک غده تیموس از شدت حضور گلیکوکانژوگیت‌های دارای قند انتهایی N- استیل گالاکتوز آمین در سلول‌های اپیتلیالی، سلول های T و مزانشیمی کاسته می‌شود که بیانگر اهمیت این نوع گلیکوکانژوگیت‌ها در تکوین غده می‌باشد.

لکتین PNA: گلیکوکانژوگیت‌های دارای دی ساکارید انتهایی گالاکتوز/N- استیل گالاکتوز آمین (Gal/GalNAc) که در روز یازدهم در آندودرم بن بست سوم حلقی و سلول‌های مزانشیمی اطراف دیورتیکول حضور دارند و نسبت به گلیکوکانژوگیت‌های دارای قند انتهایی GalNAc شدت بیشتری را در این روز نشان می‌دهند، احتمالاً در میان کنش‌های اپیتلیال – مزانشیمال برای تکوین تیموس نقش مهمی را ایفا می‌نمایند(۱). میان کنش‌های مذکور می‌توانند سبب تکثیر سلول‌های اپیتلیالی و مورفوژنز تیموس گردند(۲ ، ۶ ، ۸ ، ۱۳). حضور گلیکوکانژوگیت‌های دارای دی ساکارید انتهایی Gal/GalNAc امکان دارد با بیان ژن Haxa-3 که در آندودرم بن بست در طی تکوین تیموس بیان می‌شوند(۲۵ ، ۲۸) و یا بیان ژن Eya-1 در مزانشیم کمان که برای آغاز ارگانوژنز تیموس ضروری است (۲۷، ۲۶)، در ارتباط باشند.

هم‌چنین در مطالعه ژنکینسون و همکارانش مشخص گردیده که، سلول‌های مزانشیمی از طریق فاکتورهای FGF-7 و FGF-10 تکثیر را در سلول‌های اپیتلیالی تنظیم نموده و گسترش می‌دهند(۸ ، ۱۱)، که متحمل است حضور گلیکوکانژوگیت‌های فوق در سلول های مزانشیمی با بیان فاکتورهای ذکر شده درگیر باشند. واکنشی که در ماتریکس بین سلول‌های مزانشیمی در اطراف دیورتیکول پیش ساز تیموس مشاهده می‌شود، در واقع

محیط میکروسکوپیک است که باعث الگویابی تکثیر و تمایز سلول‌های آندودرمی خواهد شد(۱ ، ۸ ، ۱۳، ۱۴) که گلیکوکانژوگیت‌های دارای دی ساکارید انتهایی گالاکتوز/N- استیل گالاکتوز آمین در این محیط میکروسکوپیک حضور داشته‌اند.

گلیکوکانژوگیت‌های دارای دی ساکارید انتهایی Gal/GalNAc که در غشای پایه حضور دارند، احتمال دارد با گلیکوپروتئین‌ها و پروتئوگلیکان‌های موجود در غشای پایه و ECM نظیر کلاژن‌ها، لامینین‌ها، انتاکتین‌ها، پرلکان و فیبرونکتین مرتبط باشند.

گلیکوکانژوگیت‌هایی که در روز دوازدهم در سلول‌های T حضور دارند، امکان دارد که در تشکیل رسپتورهای T در این سلول‌ها درگیر باشند. هم‌چنین گلیکوکانژوگیت‌هایی که در روزهای پانزدهم و هجدهم مشاهده می‌شوند ممکن است به علت شرکت گلیکوکانژوگیت‌های دارای دی ساکارید انتهایی گالاکتوز/N- استیل گالاکتوز آمین در میان کنش‌هایی باشد که منجر به انتخاب سلول‌های T سالم و بدون واکنش به سلول‌های خودی می‌گردد و البته حضور گلیکوکانژوگیت‌های فوق Gal/GalNAc در این روزها در سلول‌های T به مراتب بیشتر از گلیکوکانژوگیت‌های دارای قند انتهایی GalNAc بوده است. تفاوت در واکنش سلول‌های مختلف T به لکتین‌های SBA و PNA احتمالا به دلیل درگیربودن این سلول ها در فازهای مختلف بلوغ می‌باشد.

سونیارا و همکاران پیشنهاد کرده‌اند که فیبروبلاست‌های حاصل از مزانشیم و ECM ایجاد شده توسط این نوع سلول‌ها، در تکوین سلول‌های T از طریق میان کنش تیموسیت‌های نابالغ با اینتگرین و سایتوکاین‌ها صورت می‌گیرد(۶). لذا این احتمال وجود دارد که گلیکوکانژوگیت‌های دارای دی ساکارید انتهایی Gal/GalNAc که در غشای سلول‌های T و ماتریکس بین سلولی آنها حضور دارند، با بیان و حضور اینتگرین یا سایتوکاین‌ها در ارتباط باشند.

گلیکوکانژوگیت‌های دارای دی ساکارید انتهایی گالاکتوز/N- استیل گالاکتوز آمین، روند رو به کاهشی را در سلول‌های اپیتلیالی و سلول‌های مزانشیمی نشان داده‌اند، اما در سلول‌های T این روند رو به کاهش مشاهده نشده است که می تواند به دلیل شرکت گلیکوکانژوگیت‌های فوق در فازهای نهایی بلوغ تیموسیت‌ها باشد. درکل به نظر می‌رسد، این نوع از گلیکوکانژوگیت‌ها در تمام پروسه تکوین تیموس و خصوصا بلوغ سلول‌های T اهمیت داشته باشند.

لکتین MPA: نتایج نشان می‌دهد که گلیکوکانژوگیت‌های دارای قند انتهایی گالاکتوز در آندودرم بن بست سوم حلقی در روز یازدهم و در مرحله درون رفتگی سلول‌های آندودرمی موثر بوده‌اند. سلول‌های T نیز در روزهای سیزدهم و پانزدهم حضور بسیارکمی را از گلیکوکانژوگیت‌های فوق نشان داده‌اند. سلول‌های مزانشیمی و ماتریکس بین سلولی در کلیه روزها حضور بسیارکم و کمی از گلیکوکانژوگیت‌های دارای قند انتهایی گالاکتوز ارائه نموده‌اند.

در پژوهش فماندز وهمکاران که بر روی تکوین تیموس در جوجه توسط لکتین RCA (که قندβ-D-Gal α, را شناسایی می کند) صورت گرفته، مشخص گردیده که قند انتهایی فوق بین روزهای پنجم و نوزدهم جنین در سلول‌های استرومال و تیموسیت‌ها شدت داشته است(۱۵). نتایج این پژوهش با مشاهدات ما درموش سفید Balb/C مطابقت ندارد، چراکه در هیچ یک از روزها شدتی از واکنش برای قند گالاکتوز مشاهده نشده است. این عدم تطابق امکان دارد به دلیل تفاوت گونه‌های مورد مطالعه و یا به دلیل تفاوت در نحوه اتصال لکتین RCA و لکتین MPA نسبت به قند انتهایی گالاکتوز باشد. در کل می توان چنین نتیجه گرفت که گلیکوکانژوگیت‌های دارای قند انتهایی

گالاکتوز در طی تکوین تیموس و بلوغ تیموسیت‌ها نقش چندانی را نداشته‌اند و یا حداقل در غلظت‌های کم در پروسه‌های مذکور موثر بوده‌اند.

نتیجه گیری

به عنوان یک نتیجه‌گیری کلی می توان چنین بیان نمود که احتمالاً گلیکوکانژوگیت‌های دارای قند انتهایی N – استیل گالاکتوز آمین و گلیکوکانژوگیت‌های دارای دی ساکارید انتهایی گالاکتوز/N- استیل گالاکتوز آمین هر دو در کلیه مراحل تکوین غده تیموس، از تکثیر و درون رفتگی سلول‌های اپیتلیالی تا تکثیر سلول‌های T اجدادی و مراحل بلوغ این سلول‌ها موثر بوده‌اند. اما به نظر می‌رسد گلیکوکانژوگیت‌های دارای دی ساکارید انتهایی گالاکتوز/N- استیل گالاکتوز آمین در امر تکثیر و درون رفتگی سلول‌های اپیتلیالی و مراحل پایانی بلوغ سلول‌های T با اهمیت‌تر بوده‌اند در حالی که، گلیکوکانژوگیت‌های دارای قند انتهایی N – استیل گالاکتوز آمین احتمالاً در تکثیر سلول‌های T اجدادی نقش مهم‌تری را داشته باشند. گلیکوکانژوگیت‌های دارای قند انتهایی گالاکتوز، در مرحله درون رفتگی سلول‌های آندودرمی تا حدودی موثر بوده‌اند اما در طی تکوین تیموس و بلوغ تیموسیت‌ها نقش چندانی را نداشته‌اند و یا حداقل در غلظت‌های کم در پروسه‌های مذکور موثر بوده‌اند. احتمال دارد حضور گلیکوکانژوگیت‌های مورد مطالعه با حضور ژن‌ها و محصولات ژنی که به آنها اشاره گردید مرتبط باشد.

تشکر و قدردانی

از زحمات سرکار خانم متجدد و جناب آقای دکتر مهدی جلالی و همکاری گروه ژنتیک و علوم تشریح دانشکده علوم پزشکی مشهد و گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد در جهت انجام این پژوهش کمال سپاس‌گذاری را می‌نماییم.

منابع

1. Itoi M, Tsukamoto N, Yoshida H, Amagai T. Mesenchymal cells are required for functional development of thymic epithelial cells. International Immunology 2007; 10.1093/ intimm/ dxm060.
2. Moore K, Persaud T. The developing thymus. 7th ed. Translated by Fazel AR. Mashhad: Mashhad University of Medical Sciences; 2006.
3. Thymus Development. Huntsman Cancer Institute, University of Utah, 2005. Available from http://www.huntsmancancer.org.
4. Wikipedia, the free encyclopedia, Wikimedia Foundation, Inc 2007. Thymus. Available from: http://wikimediafoundation.org.
5. Hollander G, Gill J, Zuklys S, Iwanami N, Liu C, Takahama Y. Cellular and molecular events during early thymus development. Immunol Rev. 2006; 209:28-46.
6. Suniara RK, Jenkinson EJ, Owen JJT. An essential role for thymic mesenchyme in early T Cell development. The Journal of Experimental Medicine 2000; 191(6): 1051-1056.
7. Bockman DE, Kirby M. Dependence of thymus development on derivatives of the neural crest. Science 1984; 223(4635): 498 – 500.
8. Jenkinson WE, Jenkinson EJ, Anderson G. Differential Requirement for Mesenchyme in the Proliferation and Maturation of Thymic Epithelial Progenitors. The Journal of Experimental Medicine 2003; 198(2): 325-332.
9. Yamazaki H, Sakata E, Yamane T, Yanagisawa A, Abe K, Yamamura KI, et al. Presence and distribution of neural crest-derived cells in the murine developing thymus and their potential for differentiation. International Immunology 2005; 17(5):549-558.
10. Ivanov V, Ceredig R. Transcription factors in mouse fetal thymus development. International Immunology 1992; 4(7): 729-737.
11. Hill M .Endocrine Development – Thymus. UNSW Embryology 2007. Available from: http://embryology.med.unsw.edu.au.
12. Britz JS, Hart JW. Biosynthesis of glycosaminoglycans by epithelial and

lymphocytic components of murine thymus. The Journal of Immunology 1983; 130(4):1848-1855.
13. Fazel AR, Ganji FC. Lectin-Binding Patterns in the microenvironment of the mouse developing T-Cells. Iran Biomed J 2003; 7(1): 19-22.
14. Boehm T, Bleul CC, Schorpp M. Genetic dissection of thymus development in mouse and zebrafish. Immunological Reviews 2003; 195(1): 15–27.
15. Fernandez JG, Sanchez AJ, Melcon C, Chamorro CA, Garcia C, Paz P. Development of the chick thymus microenvironment: a study by lectin histochemistry. J Anat 1994; 184(Pt 1): 137–145.
16. Macmillan D, Daines AM. Recent developments in the synthesis and discovery of oligosaccharides and glycoconjugates for the treatment of disease. Curr Med Chem 2003; 10(24): 2733-73.
17. Muramatsu T. Essential Roles of Carbohydrate Signals in Development, Immune Response and Tissue Functions, as Revealed by Gene Targeting. J Biochem 2000; 127(2): 171-176.
18. Hennet T, Ellies LG. The remodeling of glycoconjugates in mice. Biochim Biophys Acta 1999; 1473(1):123-36.
19. Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. J cell 2006; 126(5): 855-867.
20. Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. Cell 2006; 126(5):855-67.
21. Desnoyers L. Structural basis and therapeutic implication of the interaction of CCN proteins with glycoconjugates. Curr Pharm Des 2004; 10(31):3913-28.
22. Fazel AR, Sumida H, Schulte BA, Thompson RP. Lectin histochemistry of the embryonic heart: fucose- specific lectin binding sites in developing rats and chicken. American J of Anatomy 1989; 184(1): 76-84.
23. Yarema K, Bertozzi CR. Characterizing glycosylation pathways. Genome Biol. 2001; 2(5): reviews0004.1–reviews0004.10.
24. Clark D. Molecular Biology- Understanding the Genetic Revolution. Elsevier academic press 2005; p. 68-74, 172-177.
25. Manley NR, Capecchi1 MR, Hox Group 3 paralogs regulate the development and migration of the thymus, thyroid, and parathyroid glands. Developmental Biology 1998; 195(1): 1–15.
26. Xu1 PX, Zheng W, Laclef C, Maire P, Maas RL, Peters H, Xu1 X. Eya1is required for the morphogenesis of mammalian thymus, parathyroid and thyroid. Development 2002; 129: 3033-3044.
27. Zou D, Silvius D, Davenport J, Grifone R, Maire P, Xu P.X. Patterning of the third pharyngeal pouch into thymus/parathyroid by Six and Eya1. Developmental Biology 2006; 293(2): 499-512.
28. Napier A. The role of Hoxa3 in fetal thymus development. Alabama State University 2007.

Journal of Arak University of Medical Sciences
Autumn 2008; 11(3): 127-136

Original Article

Identification and localization of certain glycoconjugates during the development of thymus in the mice embryos Balb/C

Farkhondeh Kalat A[1*], Baharara J[2], Fazel AR[3]

1- M.S in Animal Biology field Cellular and Developmental, Islamic Azad University of Mashhad, member of Young Researchers Club, Mashhas, Iran.
2- Assistant professor, PhD of Animal Biology, Islamic Azad University of Mashhad, Science University, Mashhad, Iran.
3- Professor, PhD of Embryology and Cell Biology, Mashhad University of Medical Science, Mashhad, Iran.

Received 12 Apr, 2008 Accepted 28 May, 2008

Abstract

Background: Glycoconjugates molecules showed a programmed changes during the development. These components in the cell-surface and extracellular matrix plays important roles for different developmental processes. In this study lectin histochemistry technique was used for identification and localization of some glycoconjugates during the development of thymus.

Methods and Materials: Balb/C mice embryos from days 10 to 15 and also day 18 fetuses fixed in formalin and provided 5m serial sections of these samples for histochemical study. Slices were incubated with three types of HRP-conjugated lectins (HRP) include: SBA specified for α, β-D-N-acetylgalactoseamin (α,β-D-GalNAc), PNA specified for β-D-Galactose -(1-3)-D-N-acetylgalactoseamin (β-D-Gal-(1-3)-D-GalNAc) , MPA specified for D-Galactose (D- Gal).

Results: SBA lectin was presented with decreasing intensity in the Golgi zone (GZ) and cell surfaces of mesenchymal cells, epithelial cells and T-cells microenvironment in studying days. In first day (12&13) T-cells had high reaction with SBA in membranes and GZ. PNA lectin was revealed with several intensity in basal membranes and membranes of mesenchymal cells, epithelial and microenvironment of T-cells in studying days. MPA lectin weakly presented in the endodermal and mesenchymal cells and microenvironment of T-cells in all days.

Conclusion: Results indicated that glycoconjugates molecules with terminal carbohydrate of GalNAc might have a role in the development of thymus gland and maturation of the T-cells. Glycoconjugates with terminal disaccharide of Gal/GalNAc probably have significant effect on the total developmental process of thymus gland. Further, Glycoconjugates with terminal carbohydrate of Gal probably had not a key role in the development of thymus gland and T-cells or with low quantity effect.

Key words: Glycoconjugate**,** thymus**,** lectin histochemistry**,** T-cells

*Corresponding author;
Email: atena_farkhondeh@yahoo.com
Address: No.66, Sadaf St., Vakil Abad Av., Mashhad, Iran.