

## مطالعه هیستوشیمیایی آنژیوژنز سیستم پورت هیپوتالاموسی-هیپوفیزی در جنین‌های رت

دکتر علیرضا ابراهیم‌زاده<sup>۱\*</sup>، دکتر محمدرضا نیکروش<sup>۱</sup>، دکتر فاطمه کبری گنجی<sup>۱</sup>، دکتر علیرضا فاضل<sup>۱</sup>

۱- گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

**Title:** *Histochemical study of hypothalamo – hypophyseal portal system angiogenesis in rat embryos.*

**Authors:** *Ebrahimzadeh AR, (PhD); Nikravesh MR, (PhD); Ganji FK, (PhD); Fazel AR, (PhD).*

**Introduction:** *Angiogenesis is controlled by series of cellular interactions which are mediated by cell surface glycoconjugates terminal sugars. The aim of this study was to investigate the distribution and changes of the cell surface terminal sugars during hypothalamo– pituitary portal (HPP) system angiogenesis in rat embryos.*

**Methods:** *In this study, 70 N-mary rat fetuses (10-20 gestational days) were used by lectin histochemical technique as a tool to study distribution of the glycoconjugates and their changes during HPP system angiogenesis. All paraffin sections were incubated with different HRP- lectins from *Vicia villosa* (VVA), *Glycine max* (SBA) and *Wistaria floribunda* (WFA) specific for terminal sugars D-Gal,  $\alpha$ ,  $\beta$ -D-GalNAc and D- GalNAc of complex glycoconjugates, respectively. On the basis of staining intensity, the sections were graded and nonparametric statistical test was used to compare differences between samples.*

**Results:** *The results demonstrated that some cells around Rathke's pouch reacted with VVA from day 13 and increased to day 14 and then decreased afterward, significantly ( $P < 0.05$ ). Some cells around Rathke's pouch reacted with SBA from day 14 to day 18 and then decreased afterward ( $P < 0.05$ ). Many cells around Rathke's pouch reacted with WFA from day 13 and increased on days day 14 and day 15 ( $P < 0.05$ ), then decreased with developmental advancement.*

**Conclusion:** *Our findings indicated that the distribution and changes of glycoconjugates with terminal sugars D-Gal,  $\alpha$ ,  $\beta$ -D-GalNAc and D- GalNAc were regulated spatiotemporally and might play critical role (s) in cell interactions and tissue differentiations such as angiogenesis during embryonic development.*

**Keywords:** *Hypothalamo – hypophyseal portal system, glycoconjugates, lectin, rat.*

*Hakim 2005; 8(1); 52-59.*

\*- نویسنده مسؤول: مشهد- خیابان دانشگاه، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی، تلفن: ۴-۸۱-۸۵۴۴۰۸۱-۰۵۱۱، فاکس: ۰۵۱۱-۸۵۹۱۹۲۲.  
E-mail: Ebrahimzadeh43@yahoo.com

**چکیده:**

**مقدمه:** آنژیوژنز حاصل واکنش‌های متقابل (Interactions) متعدد سلولی است که از آنجمله می‌توان به میانکنش‌های سلولی مربوط به قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت‌ها اشاره نمود. لذا در این پژوهش بر آن شدیم تا با استفاده از لکتین‌ها نحوه توزیع گلیکوکانژوگیت‌ها و تغییرات قندهای انتهایی آنها را در روند آنژیوژنز سیستم پورت هیپوتالاموسی - هیپوفیزی بررسی نماییم. روش کار: برای این منظور تعداد ۷۰ جنین رت نژاد N-mary از روز دهم تا روز بیستم مورد استفاده قرار گرفتند. پس از اینکه نمونه‌ها در فرمالین فیکس گردیده و پاساژ بافتی آنها به انجام رسید، در پارافین قالب‌گیری شدند و برش‌های ۵ میکرونی بصورت سریال از آنها تهیه گردید. در ادامه با بکارگیری لکتین‌های SBA, VVA و WFA که با HRP نشان‌دار شده بودند و به ترتیب برای قندهای انتهایی  $\alpha, \beta$ -D-GalNAc و D-GalNAc اختصاصی هستند به مطالعه قندهای انتهایی و تغییرات آنها مبادرت گردید. شدت رنگ‌آمیزی مقاطع میکروسکوپی برای هر لکتین، در روزهای مختلف جنینی به روش Gong و همکاران به صورت مجزا رتبه‌بندی و توسط آزمون آماری غیرپارامتری کروسکال-والیس با یکدیگر مقایسه گردیدند.

**نتایج:** نتایج حاصل از این ارزیابی‌ها مشخص نمود که لکتین VVA از روز سیزدهم جنینی با تعدادی از سلول‌های اطراف لوب قدامی هیپوفیز واکنش نشان داده و تا روز چهاردهم بر شدت این واکنش‌ها افزوده شد. در حالیکه در روز پانزدهم به شکل معنی‌داری از شدت واکنش کاسته شد ( $p < 0.05$ ). واکنش به لکتین SBA نیز از روز چهاردهم بطور عمده در سلول‌های اطراف بن بست راتکه شروع شد و تا روز هیجدهم با همان شدت ادامه یافت و سپس محو گردید. ادامه بررسی‌ها نشان داد که واکنش به لکتین WFA نیز از روز سیزدهم شروع شده و در روزهای چهاردهم و پانزدهم به شکل معنی‌داری شدت یافت ( $P < 0.05$ ). اما در روزهای شانزدهم و هفدهم به تدریج از شدت واکنش کاسته شد، بگونه‌ای که پس از آن اثری از واکنش نسبت به آن مشاهده نگردید.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به اینکه لکتین‌های مورد استفاده در این مطالعه واکنش‌های متفاوتی را با سلول‌های اطراف بن بست راتکه نشان می‌دهند و نیز با توجه به پیدایش و تغییر قندهای انتهایی  $\alpha, \beta$ -D-GalNAc, Gal و D-GalNAc با الگوی زمانی و مکانی مشخص شاید بتوان گفت که قندهای انتهایی احتمالاً در میان کنش‌های سلولی و تمایزات بافتی از جمله آنژیوژنز نیز می‌توانند ایفای نقش داشته باشند.

**کلواژگان:** سیستم پورت هیپوتالاموسی - هیپوفیزی، آنژیوژنز، گلیکوکانژوگیت، لکتین، رت.

**مقدمه:**

نحوه آرایش و ارتباط عروق خونی در غده هیپوفیز فاکتور مهمی در فرآیند تنظیم هورمونی محسوب می‌شود و نیز فعالیت‌های ترشحی آدنوهیپوفیز توسط نوروهورمون‌های مترشحه از مدیال امیننس تنظیم می‌گردد و این نوروهورمون‌ها توسط سیستم پورت هیپوتالاموسی - هیپوفیزی به لوب قدامی آن منتقل می‌گردد (۱).

ساختار عروقی سیستم پورت اهمیت زیادی در عمل آن دارد. خونرسانی به غده هیپوفیز توسط دو شریان هیپوفیزی تحتانی که بیشتر در کپسول آن توزیع می‌گردد و خون‌رسانی به لوب خلفی آن را انجام می‌دهد و چندین شریان هیپوفیزی فوقانی است که در اطراف مدیال امیننس آناستوموز می‌دهند.

مویرگ‌های ایجاد شده از این رگ‌ها به داخل مدیال امیننس نفوذ کرده تشکیل شبکه مویرگی اول را می‌دهد. این مویرگ‌ها بهم پیوسته و تشکیل ندول‌هایی را می‌دهند که به سمت پایین رفته و در اطراف ساقه هیپوفیزی به شبکه وسیعی از سینوزوئیدهای دیواره نازک در داخل آدنوهیپوفیز می‌پیوندند. نکته حایز اهمیت این است که لوب قدامی هیپوفیز تقریباً به طور مستقیم از شریان‌های هیپوفیزی خون دریافت نمی‌کند و خون‌رسانی آن از طریق سیستم پورت انجام می‌گیرد (۱).

تقریباً همه بافت‌های بدن به میزان خونی که دریافت می‌کنند وابسته هستند و میزان خونی که هر بافت دریافت می‌کند به سلول‌های آندوتلیوم آن وابسته است (۲).

آندوتلیوم اولین جزء رگ‌های خونی است که در حین تکامل

۲۰ رت نر هم‌نژاد آنها که از موسسه سرم سازی رازی مشهد خریداری شده بودند استفاده گردید. رت‌ها در شرایط استاندارد خانه حیوانات با دسترسی به غذا، آب، دوره تاریکی و روشنایی ۱۲ ساعته، رطوبت مناسب و حرارت ۱۸-۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از تطابق در قفس‌های مخصوص جفت‌گیری آمیزش داده شدند (بازای هر دو رت ماده یک رت نر) و با تهیه اسمیر واژینال روز صفر حاملگی در آنان تعیین گردید. سپس رت‌های حامله در قفس‌های جداگانه مورد نگهداری و مراقبت قرار گرفتند.

## ۲- تهیه جنین و آماده سازی بافت

در هر یک از روزهای دهم تا بیستم حاملگی به ترتیب رت‌های حامله تحت بیهوشی قرار گرفتند و با عمل سزارین شاخه‌های رحم از بدن رت خارج و بلافاصله در سرم فیزیولوژی جنین‌ها از پرده‌های جنینی جدا گردیدند و جنین‌ها در محلول B<sub>4</sub>G (۶٪ کلرید مرکوریک، ۱٪ گلوکارآلدهاید و ۱٪ استات سدیم)، در دمای اطاق ثابت شدند (۱۰). سپس با استفاده از پاساژ نمونه‌ها به روش‌های معمول بافت‌شناسی و قرار دادن آنها در بلوک‌های پارافینی برش‌هایی بصورت سریال با ضخامت ۵ میکرونی توسط میکروتوم روتاری در دو جهت ساژیتال و کروئال از هر نمونه تهیه گردید. تعداد کل نمونه‌هایی که در این پژوهش پس از آماده سازی و سریال سکشن هیپوفیز آنها قابل دستیابی بود ۷۰ جنین بودند.

## ۳- رنگ آمیزی لکتین هیستوشیمی

در این روش که با استفاده از لکتین‌های مورد نظر (جدول ۱) که از شرکت سیگما تهیه شده بودند رنگ آمیزی به شرح ذیل انجام گرفت.

جدول ۱- مشخصات لکتین‌هایی که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۶).

کربوهیدرات باند شونده اختصاصی	مخفف	لکتین
$\alpha, \beta$ -D-GalNAc>D-Gal	SBA	Glycin max (Soybean)
GalNAc	VVA	Vicia villosa (hairy winter vetch)
D- GalNAc	WFA	Wistaria floribunda A
Gal= Galactose Glc= Glucose	GalNAc= N-Acetylgalactosamine	

ابتدا مقاطع بافتی به روش معمول در بافت‌شناسی آبدی شدند و به منظور رسوب زدایی املاح مرکوریک از نمونه‌ها که در B<sub>4</sub>G فیکس شده بودند به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ید الکل قرار گرفتند (۱۱ و ۱۲). و نیز برای حذف پراکسیدازهای آندوژن

تشکیل می‌گردد و الگوی عروق خونی را تعیین می‌نماید. عروق خونی اصلی بصورت یک مدل نسبتاً قالبی<sup>۱</sup> در بدن جنین توسط فرایند واسکولوژنز تشکیل می‌گردد (۳). در جنین‌های بیشتر پرندگان و پستاندارانی که مورد بررسی قرار گرفته‌اند این واقعیت پذیرفته شده است که سلول‌های پیش‌ساز عروق خونی<sup>۲</sup> از مزودرم جنینی مشتق می‌شوند و سپس در سرتاسر جنین گسترش می‌یابند. لذا شبکه‌های عروقی اولیه در جنین از طریق واسکولوژنز ایجاد می‌گردد و عروق کوچکتر از طریق فرایند آنژیوژنز تشکیل می‌شوند (۴). آنچه بطور کلاسیک مطرح می‌شود این است که عروق خونی و بافت همبند غده هیپوفیز از بافت مزانشیمی منشأ می‌گیرد و این در حالی است که تحقیقات نشان می‌دهد که احتمالاً سلول‌های اندوتلیال سینوزوئیدهای لوب قدامی غده هیپوفیز از منابع دیگری از جمله سلول‌های نورال کرسٹ مزانسفالیک منشأ می‌گیرد (۵). لذا با توجه به اینکه در مورد منشأ سلول‌های رگ‌ساز قسمت‌های مختلف سیستم پورت اتفاق نظر وجود ندارد و انواعی از لکتین‌ها تمایل دارند با قندهای انتهایی سطح سلول‌های اندوتلیالی که دارای منشأ مزانشیمی هستند واکنش نشان دهند (۶) و از طرف دیگر آنژیوژنز حاصل واکنش‌های متقابل<sup>۳</sup> متعدد سلول با سلول و سلول با ماتریکس خارج سلولی است (۲). در رابطه با این واکنش‌های متقابل، مولکول‌های شیمیایی زیادی از جمله قندهای انتهایی گلیکوکانژوگها مؤثر دانسته شده‌اند که می‌توانند فرآیندهای تکاملی را در بافت‌های جنینی تحت تأثیر قرار دهند. قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت‌ها در سطح سلول‌ها و نیز در ماتریکس خارج سلولی یافت می‌شوند و تکامل طبیعی به ظهور و توزیع زمانی و مکانی مناسب این قندها وابسته است (۹-۷).

نظر به اینکه مطالعات لکتین هیستوشیمیایی و بررسی نقش قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت‌ها در مورد روند آنژیوژنز غده هیپوفیز مورد بررسی قرار نگرفته است، در این پژوهش بر آن شدیم تا با استفاده از لکتین‌های SBA, VVA و WFA توزیع گلیکوکانژوگه و تغییرات آنها را در طی روند آنژیوژنز سیستم پورت هیپوتالاموسی - هیپوفیزی بررسی نماییم.

## روش کار:

### ۱- حیوان آزمایشگاهی

در این پژوهش از ۴۰ رت ماده باکره دو ماهه نژاد N-mary و

<sup>1</sup> - Stereotypic

<sup>2</sup> - Angioblasts

<sup>3</sup> - Interactions

از آزمون آماری غیرپارامتری کروسکال-والیس استفاده شد و اختلاف در سطح  $P < 0.05$  معنی‌دار محسوب گردید و نیز از شدت و تغییرات واکنش‌های ایجاد شده در نمونه‌ها توسط میکروسکوپ دوربین‌دار Olympus-AH-2 فتومیکروگراف تهیه شد.

**جدول ۲ - میانگین و انحراف معیار شدت واکنش سلول‌های اطراف لوب قدامی هیپوفیز در حال تکامل با لکتین‌های مورد استفاده در روزهای مختلف جنینی مورد مطالعه**

مرحله جنین (روز)	لکتین VVA	لکتین SBA	لکتین WFA
۱۰-۱۲	۰±۰/۰	۰±۰/۰	۰±۰/۰
۱۳	۰/۸±۰/۴	۰±۰/۰	۰/۸±۰/۴
۱۴	۲/۲±۰/۴	۱±۰/۰	۱/۸±۰/۴
۱۵	۱±۰/۰	۱/۲±۰/۸	۳±۰/۰
۱۶	۰±۰/۰	۱/۲±۰/۴	۱/۸±۰/۴
۱۷	۰±۰/۰	۱±۰/۰	۰/۸±۰/۴
۱۸	۰±۰/۰	۰/۸±۰/۰	۰±۰/۰
۲۰	۰±۰/۰	۰±۰/۰	۰±۰/۰

### یافته‌ها:

اگرچه تکامل عمومی آندوهیپوفیز در رت شناخته شده است ولی سوؤالات متعددی در مورد جنبه‌های مولکولی تکامل آندوهیپوفیز وجود دارد. لذا در بیان نتایج تحقیق در موارد لزوم به طور اختصار به بیان تکامل عمومی آن اشاره شده و بیشتر بر تغییرات واکنش‌های هیستوشیمیایی که مبین تغییرات مولکولی در حین تکامل است تاکید گردیده است.

تکامل آندوهیپوفیز از روز دهم بصورت یک دیورتیکول از سقف دهان اولیه که در جهت تشکیل بن بست راتکه رشد می‌نماید قابل تشخیص می‌باشد. بررسی مقاطع رنگ‌آمیزی شده از روزهای جنینی مورد نظر نشان داد که شروع واکنش با لکتین VVA از روز سیزدهم در سلول‌های اطراف غده هیپوفیز در حال تکامل قابل ملاحظه بود در ادامه روند تکامل و تمایز سلولی در روز چهاردهم شدت واکنش در سلول‌های اطراف لوب قدامی هیپوفیز در حال تکامل نسبت به روز سیزدهم شدیدتر بود که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). علاوه بر این، گستردگی واکنش مذکور نسبت به روز سیزدهم افزایش یافته بطوری که در ناحیه Atwell's recess که در تصویر با فلش بزرگ نشان داده شده این واکنش بطور واضح قابل مشاهده است (تصویر ۱).

مقاطع برای مدت ۴۵ دقیقه در محلولی مرکب از متانول و آب اکسیژنه در تاریکی قرار داده شدند (۱۳). سپس نمونه‌های بافتی به مدت نیم ساعت در محلول بافر فسفات سالین (PBS) تازه تهیه شده قرار داده شدند. این محلول دارای ۳۶ گرم کلرید سدیم، ۷/۴ گرم سدیم هیدروژن فسفات و ۴/۱۵ گرم پتاسیم دی‌هیدروژن در یک لیتر آب مقطر می‌باشد که این محلول Stock بوده و در هنگام کار محلول فوق را به نسبت ۱ به ۵ رقیق می‌نماییم (۱۱).

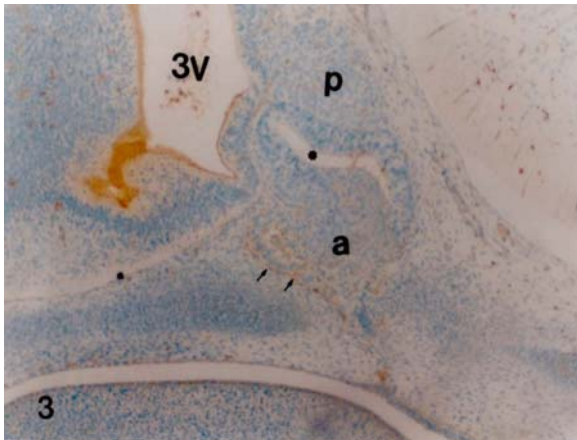
برای رنگ‌آمیزی ابتدا هر یک از لکتین‌های مورد نظر به مقدار ۱۰ میکروگرم ماده مؤثر (Lectin<sup>۱</sup>-HRPconjugate) در یک میلی‌لیتر PBS رقیق شدند. پس از خارج کردن نمونه‌ها از محلول PBS برش‌های مربوط به هر مرحله برای استفاده از سه لکتین یاد شده به سه دسته تقسیم گردید. آنگاه بر روی هر سری از برش‌ها چند قطره از لکتین رقیق شده مورد نظر چکانده و به مدت دو ساعت در درجه حرارت اتاق قرار گرفتند. بعد از این مدت مقاطع در PBS به مدت ۳ دقیقه شستشو داده شدند، سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۰/۰۳ درصد DAB<sup>۲</sup> (۰/۰۳ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر PBS) و آب اکسیژنه (۲۰۰ میکرولیتر در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول DAB) مجاور گردیده، سپس با آب جاری شستشو داده شدند (۱۴-۱۰). برای رنگ زمینه نیز از آل‌سین بلو با  $pH=2/5$  استفاده گردید. در مرحله بعد مقاطع مورد نظر طبق روش‌های معمول در بافت‌شناسی آبیگری، با گزیلول شفاف‌سازی و سپس مونت‌گردیدند. در هر مرحله حداقل سه نمونه بعنوان گروه آزمایش با هر لکتین رنگ‌آمیزی شدند و یک برش به عنوان شاهد در معرض HRP، DAB و آب اکسیژنه (بدون استفاده از لکتین) قرار گرفت. با توجه به اینکه در صورت اتصال لکتین با قند انتهایی در مجاورت DAB و آب اکسیژنه به علت وجود HRP رنگ قهوه‌ای ظاهر می‌شود لام‌های آماده شده با میکروسکوپ نوری معمولی مورد بررسی قرار گرفتند و شدت رنگ‌آمیزی با استفاده از روش درجه‌بندی Gong و همکارانش مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۵). در این حالت شدت رنگ‌آمیزی بر اساس مشاهده سه نفر بصورت Blind تعیین گردید و نمونه‌ها بر اساس شدت واکنش با هر لکتین در روزهای مختلف جنینی (۲۰-۱۰) به طور جداگانه رتبه‌بندی شدند. در این روش از یک منفی (عدم واکنش) تا سه مثبت (واکنش شدید) برای هر نمونه استفاده گردید که میانگین شدت واکنش‌ها در جدول ۲ خلاصه شده است. برای مقایسه آنها

<sup>۱</sup> - Horse Radish Peroxidase

<sup>۲</sup> - Phosphate - buffered saline

<sup>۳</sup> - Diaminobenzidine

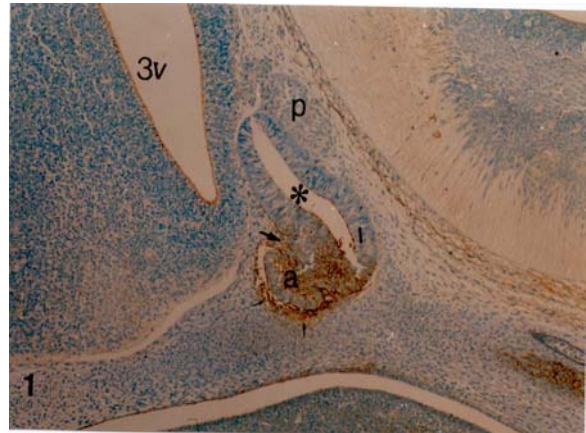
راتکه، I- لوب میانی هیپوفیز در حال تکامل و D دیانسفالون و Sc غضروف اسفنوئید را مشخص می‌نمایند. در بررسی برش‌هایی که در مجاورت با لکتین SBA قرار گرفته بودند واکنش سلولها در اطراف محل تشکیل لوب قدامی هیپوفیز بطور خفیف در روز چهاردهم قابل ملاحظه بود. در اطراف محل تشکیل لوب قدامی هیپوفیز، و همچنین در مسیری که بن بست راتکه از سقف دهان اولیه مشتق می‌گردد واکنش با لکتین SBA قابل تشخیص بود ( تصویر ۳).



تصویر ۳ - فتومیکروگراف مربوط به برش ساژیتال هیپوفیز در حال تکامل رت را در روز چهاردهم جنینی با بزرگنمایی ۱۰۰ برابر را نشان می‌دهد که در مجاورت لکتین SBA قرار گرفته است. a- لوب قدامی، \* بن بست راتکه، I- لوب میانی، p لوب خلفی، 3v بطن سوم و پیکانهای نشانه برخی از سلول‌هایی که در اطراف لوب قدامی هیپوفیز با لکتین SBA واکنش واضح‌تری نشان داده‌اند را مشخص می‌نمایند.

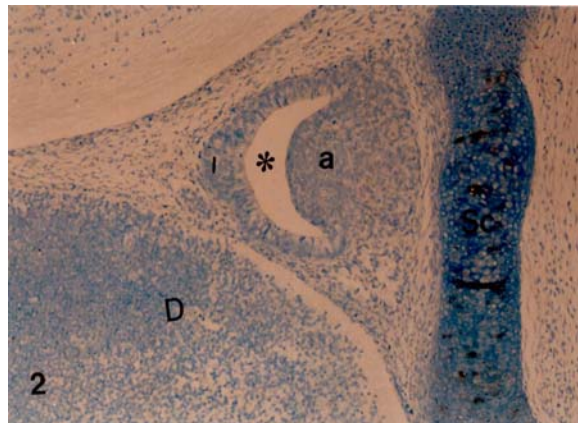
این در حالی است که لکتین SBA در روز قبل از روز چهاردهم واکنش قابل ملاحظه‌ای را نشان ندادند. واکنش‌های اشاره شده در فوق با لکتین SBA تا روز هیجدهم تقریباً با همان شدت ادامه یافت، بطوریکه روز شانزدهم نیز بیشتر سلول‌های آندوتلیال عروق خونی که در اطراف غده هیپوفیز در حال تکامل وجود دارند با لکتین SBA واکنش نشان دادند (تصویر ۴). پس از آن در روزهای نوزدهم و بیستم تکامل جنینی هیچگونه واکنشی در سلول‌های اطراف غده و یا در داخل غده قابل مشاهده نبود.

واکنش لکتین WFA نیز با سلول‌های مزانشیمی اطراف محل تشکیل لوب قدامی هیپوفیز واکنش نشان دادند بطوری که شدت واکنش از روز سیزدهم شروع شده و سپس در روزهای



تصویر ۱- فتومیکروگراف مربوط به قطع ساژیتال هیپوفیز در حال تکامل جنین ۱۴ روزه با بزرگنمایی ۱۰۰ برابر می‌باشد که در مجاورت با لکتین VVA قرار گرفته است. a- لوب قدامی، I- لوب میانی، \* فضای بن بست راتکه، p لوب خلفی و 3v بطن سوم را مشخص می‌نماید. برخی از سلول‌های اطراف لوب قدامی هیپوفیز (پیکان‌های نشانه کوچک) و Atwell's recess (پیکان نشانه بزرگ) با لکتین VVA واکنش نشان داده‌اند.

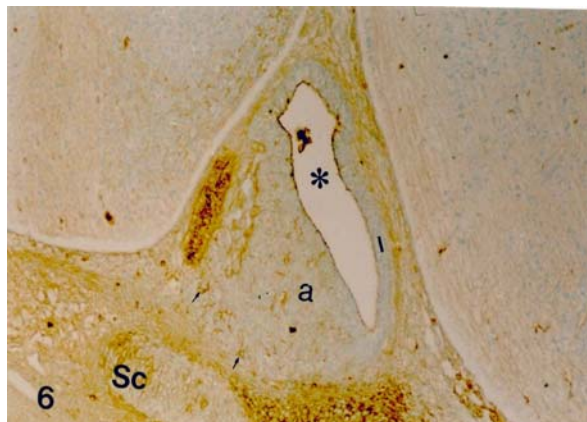
در صورتی که در روز سیزدهم واکنشی در این ناحیه ملاحظه نگردید سپس در روز پانزدهم از شدت واکنش سلول‌ها با لکتین VVA کاسته شد بطوریکه در روز شانزدهم (تصویر ۲) و بعد از آن هیچگونه واکنشی قابل مشاهده نبود.



تصویر ۲- این فتومیکروگراف برش ساژیتال هیپوفیز در حال تکامل مربوط به جنین شانزده روزه رت که در مجاورت با لکتین VVA قرار گرفته است را با بزرگنمایی ۲۰۰ برابر نشان می‌دهد. a- لوب قدامی، علامت \* فضای داخل بن بست

راتکه از طریق مجرای کرانیو فارینژیال (پیکان‌های نشانه کوچک) و Atwell's recess (پیکان نشانه بزرگ) که با لکتین WFA واکنش نشان داده‌اند در این تصویر مشخص شده است. P لوب خلفی در حال تکامل را نشان می‌دهد.

بن بست راتکه تشکیل می‌گردد، و سپس در مسیر بن بست راتکه و نهایتاً در اطراف لوب قدامی هیپوفیز و Atwell's recess واکنش کاملاً قابل ملاحظه‌ای را نشان می‌دهد (تصویر ۵) که این افزایش در شدت رنگ‌آمیزی از نظر آماری معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). سپس با ادامه روند تمایز سلولی در روزهای شانزدهم (تصویر ۶) و هفدهم اگر چه واکنش لکتین WFA با بافت اطراف غده قابل مشاهده است ولی نسبت به روز پانزدهم شدت واکنش به طور معنی‌داری کاهش یافته ( $P < 0.05$ ) و از روز هیجدهم تا بیستم هیچگونه واکنش ملاحظه نگردید.

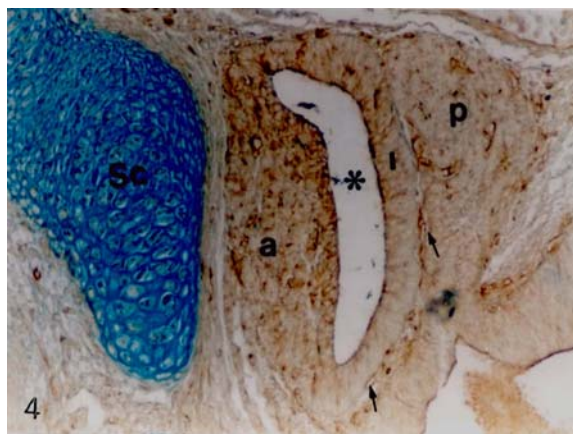


تصویر ۶- فتومیکروگراف مربوط به برش ساژیتال هیپوفیز در حال تکامل رت در روز شانزدهم جنینی با بزرگنمایی ۲۰۰ برابر را نشان می‌دهد که در مجاورت لکتین WFA قرار گرفته است. a- لوب قدامی در حال تکامل، I- دیواره خلفی بن بست راتکه، علامت \* فضای بن بست راتکه، و Sc غضروف اسفنوئید را نشان می‌دهد. پیکان‌ها سلول‌هایی را که با لکتین WFA واکنش نشان داده است را مشخص می‌نماید.

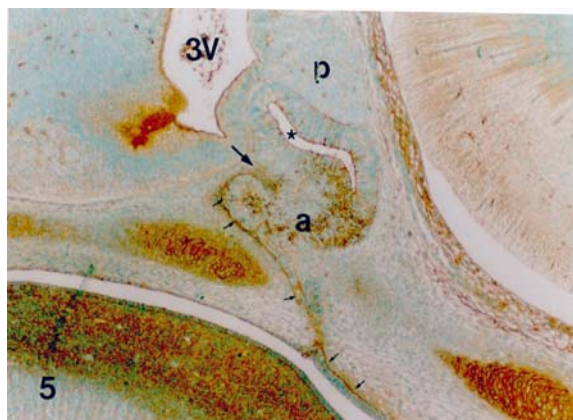
### بحث و نتیجه‌گیری:

مولکول‌های مخابراتی hedgehog مشتق شده از نوتوکورد می‌توانند مستقیماً بر روی آنژیوبلاست‌ها اثرات القایی داشته باشد و باعث تمایز آنها شوند (۱۶) و نوتوکورد نیز بر روی هیپوفیز دارای اثر القایی است (۱۷). مولکول‌های القایی دیگری نظیر

بعدی بر شدت واکنش افزوده گردید. در روز پانزدهم در مسیری مشخص از زیر اپتلیوم سقف دهان اولیه در حدود ناحیه‌ای که



تصویر ۴- فتومیکروگراف مربوط به برش ساژیتال هیپوفیز در حال تکامل رت در روز شانزدهم جنینی با بزرگنمایی ۲۰۰ می‌باشد که در مجاورت با لکتین SBA قرار گرفته است. در این تصویر a- لوب قدامی، I- دیواره خلفی بن بست راتکه، علامت \* فضای بن بست راتکه، Sc غضروف اسفنوئید و پیکان‌های نشانه سلول‌های اندوتلیالی را که در اطراف غده با لکتین SBA عکس العمل نشان داده‌اند را مشخص می‌نماید.



تصویر ۵- فتومیکروگراف مربوط به قطع ساژیتال هیپوفیز در حال تکامل جنین ۱۵ روزه با بزرگنمایی ۲۰۰ برابر می‌باشد که در مجاورت با لکتین WFA قرار گرفته است. در این تصویر علامت \* بن بست راتکه و O دهان اولیه را نشان می‌دهد. برخی از سلول‌های اطراف لوب قدامی هیپوفیز و نیز محل تشکیل عروق سقف دهان اولیه و مسیر ارتباط این عروق با بن بست

سینوزوئیدهای موجود در بخش پارس دیستال می‌رود نیز مشاهده می‌گردد (۲۷). این نواحی که با لکتین‌های WFA و VVA واکنش نشان داده بودند در روز پانزدهم بر شدت واکنش WFA افزوده گردیده و از شدت واکنش VVA کاسته شده است در صورتی که شدت واکنش SBA تغییری نکرده است که می‌تواند دلیل بر بروز قندهای انتهایی مذکور بایک الگوی زمانی مشخص باشد. تکامل Mantel plexus و ارتباط توپوگرافی آن با سینوزوئیدهای لوب قدامی در روز شانزدهم تکامل جنبی صورت می‌گیرد (۲۸). به همین دلیل بنظر می‌رسد به علت اینکه از این روز و پس از آن سرعت تمایزات سلولی کاهش یافته، لذا در روز شانزدهم لکتین VVA واکنشی را نشان نداده و نیز از شدت واکنش WFA کاسته شده است. از روز هفدهم تا روز بیست و یکم تغییر عمده‌ای در توزیع و تمایز سیستم پورت وریدی هیپوتالاموسی - هیپوفیزی رخ نداده و در روز بیست و یکم این سیستم کاملاً مشخص می‌گردد (۲۸). با توجه به انطباق مراحل آنژیوزنز سیستم پورت با واکنش‌های متفاوت لکتین‌های مذکور در مراحل مختلف جنبی می‌تواند تأییدی بر نقش تنظیم شده مکانی و زمانی قندها انتهایی در روند آنژیوزنز باشد.

تغییرات سطح سلولی خصوصاً قندهای انتهایی گلیکوکانژوگه‌ها که در ضمن تکامل سلول‌های جنبی به وقوع می‌پیوندد رابطه مستقیمی با پدیدار شدن وظایف بیولوژیکی این سلول‌ها دارد موضوع دیگر اینکه مولکول‌های گلیکوکانژوگه‌ها از جمله قند انتهایی آنها ممکن است پس از اینکه وظیفه تکاملی خود را به انجام رسانند، از طریق پدیده آندوسیتوز وارد سلول شده و در لیزوزوم سلول هضم گردند و یا توسط مولکول دیگری پنهان گردند (۱۰ و ۱۲). نوع قند انتهایی، زمان ظهور، بقا و تغییر این قندها در زنجیره‌های قندی متفاوت سطح سلول‌ها و ماتریکس خارج سلولی کاملاً تنظیم شده است که می‌تواند در تکامل آدنوهیپوفیز و آنژیوزنز سیستم پورت وریدی هیپوتالاموسی - هیپوفیزی دارای اهمیت باشد.

محققین این پژوهش امیدوارند در مطالعات بعدی با استفاده از لکتین‌هایی که با قندهای انتهایی موجود در سلول‌های نورال کرست بطور اختصاصی واکنش نشان می‌دهند و یا با استفاده از روش‌های ایمونوهیستوشیمی در مورد منشاء سلولی بخش‌های مختلف سیستم پورت و مقایسه واسکولوزنز و آنژیوزنز این سیستم اطلاعات بیشتر و دقیق‌تری را بدست آورند.

## تشکر و قدردانی:

$FGF^1$ ,  $FGF^2$  و  $FGF-4$  قابل ذکرند که در تمایز آژیوبلاست‌ها نقش دارند (۱۸ و ۱۹). در این رابطه مشخص گردیده است که FGF بر روی سلول‌های آندوتلیال خاصیت میتوزنیک دارد و رسپتورهای مربوط به این فاکتور در سلول‌های آندوتلیال بالغ بیان می‌گردد (۱۸ و ۱۹) و امکان دارد در آنژیو بلاست‌های جنبی نیز بیان شوند (۲۰). در بین مولکول‌های ماتریکس خارج سلولی که احتمالاً نقش میانجی دارد، مولکول‌های فیبرونکتین کاندید می‌باشند که در نوتوکورد بیان می‌شوند و از طرفی عدم بیان ژن فیبرونکتین و رسپتور اینتگرین آن منجر به بروز نقایص عروقی می‌گردد (۲۰). علاوه بر این تحقیقات نشان می‌دهد قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت که در سطح سلول‌ها و نیز در ماتریکس خارج سلولی یافت می‌شوند، با ظهور و توزیع زمانی و مکانی مناسب تکامل طبیعی را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۹-۷) و نیز قندهای انتهایی تخصصی بودن سلول‌ها و نوع رسپتورهای سطح سلول را مشخص می‌نمایند (۲۳-۲۱).

در فرآیند تکامل سیستم عروقی، رگهای پورت اولیه در روز سیزدهم جنبی در اطراف هیپوفیز قابل تشخیص می‌باشند (۲۴) و در همین روز نیز تکامل عروق سقف Stomatodeum شروع شده و ارتباط آن با بن بست رانکه از طریق مجرای کرانیو فاریژیتال از روز چهاردهم به بعد عنوان یک منبع تغذیه، قابل مشاهده می‌گردد که این مسیر با لکتین WFA بطور واضح و با لکتین SBA با وضوح کمتر واکنش نشان داده است. در همین زمان یعنی در روز سیزدهم واکنش دو لکتین VVA, WFA و که به ترتیب با قندهای انتهایی Gal Nac و D- GalNA باند می‌شوند می‌تواند دلیل بر نقش کلیدی این قندها در شروع روند آنژیوزنز باشد و سپس در روز چهاردهم با تکامل بیشتر در بخشی از سیستم پورت که در خارج غده قرار دارد شدت واکنش VVA و WFA افزایش یافته و نیز واکنش سلول‌ها با لکتین SBA که با قند انتهایی  $\alpha, \beta$ -D-GalNAc باند می‌شود شروع گردیده است که حاکی از اهمیت این قند انتهایی در میانکنش‌های سلولی در روند آنژیوزنز می‌باشد.

در ادامه تکامل، آنژیوزنز در هیپوفیز خلفی کمی زودتر، و در روز چهاردهم شروع می‌گردد ولی تشکیل سینوزوئیدهای خونی پارس دیستال و نفوذ مویرگ‌های خونی به سطح غده در روز پانزدهم تکامل جنبی رخ می‌دهد (۲۵ و ۲۶). از طرف دیگر در روز پانزدهم عروق پورتال اولیه که از طریق Attwel's recess به سمت

<sup>1</sup> - Fibroblast growth factor

<sup>2</sup> - Epithelial fibroblast growth factor

پژوهشی دانشگاه و خدمات تکنیکی سرکار خانم متجدد تشکر و تقدیر می‌شود.

نتایج حاصل از این مطالعه مربوط به یافته‌های طرح پژوهشی مصوب شماره ۵/۲۸۷۴ معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد است. لذا بدینوسیله از آن معاونت محترم و شورای محترم

## References:

- 1- Fawcett DW, Bloom and Fawcett, Text Book of Histology. 11th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 2002: 250-60.
- 2- Abraham LK. Histology and Cell Biology. London: Mosby: 2002: 370-90.
- 3- Risau w, Flamme I. Vasculogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol 1995; 11: 73-91.
- 4- Wilting J, Brad Saberi B, Huang R, et al. Angiogenic potential of the avian somite . Dev Dyn 1988; 125: 441-50.
- 5- Dubois PM, Elamraoui A. Embryology of the pituitary gland; TEM 1995; 6: 1-7.
- 6- Montreuil J, Vliegenter JFG, Schachter H. Glycoprotein 2 1st ed. Amsterdam: Elsevier; 1997: 243-402.
- 7- Qasba PK. Involvement of sugars in protein- protein interaction. Carbohydrate Polymers 2000; 41: 293-309.
- 8- Schultze B, Krempl C, Ballesterons ML. Transmissible Gastroenteritis corona virus, but not the related porcine respiratory corona virus, sialic acid (N- Acetyl neuraminic acid) binding activity. J Virol 1994; 13: 2056-65.
- 9- Metzler M, Gertz A, Sarkar M. Complex asparagines-linked oligosacarides are required for morphogenic event during post-implantation development. EMBO J 1994; 13: 2056-65.
- 10- Fazel AR, Thompson RP, Sumia H, et al. lectin histochemistry of the embryonic heart expression of terminal and penultimate galactose residues in developing rat and chicks, Am J Anat 1989; 184: 85-94.
- 11- Bancroft JD, Stevens A, Eds. Theory and Practice of Histological Techniques. 5th ed. London: Churchill Livingstone, 2003: 20-100, 513.
- 12- Kiernan JA, eds., Histological and Histochemical Methods Theory and Practice, 3rd ed. Oxford: Butterwort Heinemann; 1990: 225.
- 13- Gotz W, Quondumatto F. Glycoconjugate distribution in human notochord and axial mesenchyme. Acta Histochem 2001; 103: 21-35.
- 14- Fazel A, Shulte B, Thompson RP, et al. Presence of unique glycoconjugates on surface of rat primordial germ cells migration. Cell Diff. 1987; 21: 199-211.
- 15- Gong H, Ye V, Fredo TF. Hyaluronic acid in the normal and glaucomatous optic nerve. EXP Eye Res 1997; 64: 587-95.
- 16- Concordet JP, Lewis KE, Moor JW, et al. Spatial regulation of a zerbafish patched homologue reflects the roles of sonic hedgehog and protein kinase-A in neural tube and somite patterning. Development 1996; 122: 2835-46.
- 17- Hori A, Schmidt D, Kuebber S. Immunohistochemical survey of migration of human anterior pituitary cells in development, pathological, and Clinical Aspects. Microsc Res Tech 1999; 1(46): 59-68.
- 18- Isaacs HV, Pownall ME, Slack JM. eFGF is expressed in dorsal midline of xenopus laevis. Int J Dev Biol 1995; 39: 575-9.
- 19- Thisse B, Thiss C, Weston JA. Novel FGF receptor (Z-FGF-4) is dynamically expressed in mesoderm and neuroectoderm during early zerbafish embryogenesis. Dev Dyn 1995; 203: 377-91.
- 20- Risau W, Lemmon V. Changes in the vascular extracellular matrix during embryonic vasculogenesis and angiogenesis. Dev Bio 1988; 125: 441-50.
- 21- Hughes BC. Role of glycosilation in cell interactions with extracellular matrix. Biochem Soc Trance Actions 1992; 20: 279-84.
- 22- Sharon N, Lis H. Carbohydrates in cell recognition. Sci Am 1993; 268: 74-81.
- 23- Faraldi E, Flangi C, Fasulo S. Glycoconjugate expression changes during Rona dalmatina early development. Eur J Histochem 1996; 40(1): 67-74.
- 24- Kalman S, Karoly C. The vascular architecture of the developing pituitary-median eminence complex in rat. Cell Tissue Res 1982, 224: 563-77.
- 25- Szabo K, Csanyi K. The blood supply of the developing hypophysis in rat embryos. Verh Anat Ges 1981; 75: 507-9.
- 26- Daikoku S, Davano H, Abe K, et al. Topographical appearance of adenohipophyseal cells with special reference to the development of the portal system. Arch Histol Jpn 1981; 44: 103-116.
- 27- Glydon RS. The development of the blood supply of the pituitary in Albino rat, with special reference to the development of the portal system. J Anat 1975; 91: 237-44.
- 28- Szabo K. Origin of the adenohipophyseal vessels in the rat. J Anat 1987; 154: 229-35.