# بررسی تغییرات قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت ها طی گنادوژنز در موش صحرایی به روش لکتین هیستوشیمیایی

**فاطمه نیکمرد،** دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تشریحی، گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران. Email: NikmardF@mums.ac.ir

***دکتر علیرضا ابراهیم زاده بیدسکان:** استادیار علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران(*نویسنده مسئول). Email: Ebrahimzadehba@mums.ac.ir

**دکتر علیرضا محمودیان:** استادیار علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران. Email: MahmodianA@mums.ac.ir

**الهام محمد زاده:** دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تشریحی، گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران. Email: MohammadzadehE871@mums.ac.ir

**دکتر علیرضا فاضل:** استاد علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران . Email: FazelA@mums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۵ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۱/۱۱

## چکیده

**زمینه و هدف:** تشکیل گناد ها حاصل فرایند های پیچیده تکاملی است. از طرفی فرایند های تکاملی توسط میان کنش های مولکولی متعددی از جمله قندهای انتهایی گلیکوکونژوگیت ها ی موجود در سطح سلول ها و ماتریکس خارج سلولی تنظیم می شود. لذا این مطالعه به منظور بررسی بیان قندهای انتهایی گلیکوکونژوگیت ها و تغییرات آن ها طی گنادژنز در رت انجام شد.

**روش کار:** این مطالعه که از نوع توصیفی- آزمایشگاهی است انجام شد. در این پژوهشتعداد۳۰ سر جنین رت نژاد ویستار در روزهای ۱۲،۱۴و۱۶ حاملگی در فرمالین فیکس و پس از پاساژ بافتی در پارافین قالب گیری، و برش هایی به ضخامت ۵ میکرون تهیه و با استفاده از لکتین های Lotus tetragonolobus agglutinin, Maclura pamifera agglutinin(MPA), Arachis hypogaea (peanut) که با HRP کونژوگه شده بودند و به ترتیب برای شناسایی قند های انتهایی D-Gal(β1-3) DGalNAC وGal(β1-3)GalNAC وL-Fuc(α1→-4)GlcNAC اختصاصی هستند، رنگ آمیزی شدند . سپس شدت رنگ مقاطع میکروسکوپی برای هر لکتین در مراحل مختلف جنینی به روش کور تعیین و نمونه ها رتبه بندی شدند. در انتها اطلاعات به دست آمده با استفاده آزمون آماری غیر پارامتری کروسکال والیس و نرم افزار SPSS باهم مقایسه گردیدند.

**یافته ها:** یافته ها نشان داد که گناد های در حال تکامل در روز دوازدهم جنینی با LTA واکنشی ملاحظه نگردید. در حالیکه روز چهاردهم ماتریکس خارج سلولی با لکتین مذکور واکنش نشان داد ($p <۰/۰۵$). در روز شانزدهم جنینی سلول های جنسی اولیه ، ماتریکس خارج سلولی و سلول‌های اپیتلیالی با لکتین LTA واکنش نشان دادند ($p <۰/۰۵$). واکنش تعدادی از سلول های اپیتلیالی و مزانشیمی گناد در حال تکامل در روز دوازدهم جنینی با لکتین MPA قابل مشاهده بود. به علاوه در روز چهاردهم ماتریکس خارج سلولی، اپیتلیال سطحی با لکتین مذکور واکنش نشان دادند($P<0.05$). در روز شانزدهم سلول های جنسی اولیه، سلول های اپیتلیالی با لکتین MPA واکنش نشان دادند. ($p <۰/۰۵$). لکتین PNA با گناد های در حال تکامل در روز دوازدهم هیچگونه واکنشی بروز نداد در صورتی که در روز چهاردهم با سلول های جنسی اولیه واکنش نشان داد ($p <۰/۰۵$). و در روز شانزدهم با سلول‌های جنسی اولیه ، ماتریکس خارج سلولی و سلول های اپیتلیوم سطحی واکنش نشان داد، به طوری که شدت رنگ نسبت به روز چهاردهم معنی دار بود ($p <۰/۰۵$).

**نتیجه گیری:** طبق یافته های این پژوهش می توان نتیجه گرفت که بیان و تغییرات گلیکوکونژوگیت ها با قند های انتهایی L-Fuc (α1→4)GlcNAC, Gal(β1-3) GalNAC و D-Gal(β1-3)DGalNAC در طی گنادوژنز تنظیم شده است.

**کلیدواژه‌ها:** گنادوژنزیس، تکامل، گلیکوکونژوگیت‌ها، لکتین،

## مقدمه

گناد ها در طی تکامل جنینی ابتدا به صورت یک زوج ستیغ تناسلی طولی که حاصل تکثیر اپیتلیوم سلومی و متراکم شدن مزانشیم زیرین آن است، ظاهر می گردند. به علاوه سلول های جنسی اولیه(PGCs) که از اپی‌بلاست منشاء می‌گیرند در طول شیار اولیه مهاجرت نموده، در میان سلول های آندودرمی دیواره کیسه زرده در مجاورت آلانتوئیس جا می‌گیرند[1]. درجنین‌های رت این سلول ها در روز دهم جنینی در اندودرم دیواره کیسه

[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-18 ]

زرده ودر روز دوازدهم جنینی در مزانتر خلفی روده یا در مزانشیم بین روده و ستیغ های تناسلی یافت می شوند، به طوری که در روز سیزدهم بیشتر $PGC_S$در ستیغ تناسلی قرار دارند و در روز چهاردهم تقریبا" تمام $PGC_S$ به ستیغ های تناسلی می‌رسند[۲]. کمی قبل از رسیدن $PGC_s$ به ستیغ‌های تناسلی، اپیتلیوم ستیغ تناسلی تکثیر یافته و به مزانشیم زیرین خود نفوذ می کند و به همراه $PGC_s$ طناب‌های جنسی اولیه را به وجود می‌آورند، به طوری که ستیغ های تناسلی اولیه در این مرحله گناد های تمایز نیافته نامیده می شوند. در صورتی که $PGC_s$ به ستیغ‌های تناسلی نرسند گنادها تکامل نمی‌یابند، بنابراین، وجود $PGC_s$ بر تکامل گناد ها و تبدیل آن ها به تخمدان و یا بیضه ضرورت داشته و احتمالا دارای اثرات القائی می باشند.[۴،۳]

فرایندهای تکامل جنینی، من جمله تکامل گناد ها تحت تاثیر کنش های متقابل سلول با سلول و یا سلول با ماتریکس خارج سلولی صورت می گیرد. این میان کنش ها توسط مولکول های متعددی میانجی گری و هدایت می شوند[۵،۶]. از جمله مولکول های موثر در این فرایندها، گلیکوکونژوگیت های سطح سلول ها و ماتریکس خارج سلولی هستند. در این میان، قند ها ی انتهایی زنجیره های قندی گلیکوکانژوگیت ها در روند ارتباطات و میان کنش سلول های جنینی با محیط خود نقش به سزایی داشته، موجب می شود سلول ها وارد مراحل پیچیده مورفوژنیک گشته ومسیر طبیعی تکامل و تمایز خود را طی می کنند[۷]. میان کنش کربوهیدرات با کربوهیدرات به عنوان سیگنال های حین امبریوژنز یا ارگانوژنز شناخته شده اند [۸]. نظر به این که گلیکوکانژوگیت‌های سطح سلول ها در فرایند های تکاملی از قبیل شناسایی، مهاجرت و میان کنش های سلولی نقش کلیدی دارند[۹،۱۰] و در این راستا بخش کربوهیدراتی این ترکیبات درطی تمایزات سلولی دچار تغییر می شوند[۱۱]. از طرف دیگر تکامل گنادها که یکی از فرایندهای پیچیده تکاملی محسوب می شود، حاصل میان کنش های متعدد سلولی و مولکولی می باشد و از جمله مولکول هایی که ممکن است در این میان کنش‌ها دخالت داشته باشد قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت ها می‌باشند. در این راستا اگرچه ممکن است در گنادهای در حال تکامل در هر دو جنس انواع کربوهیدرات‌ها شبیه باشند، ولی الگوی ظهور، توزیع و تغییرات این ترکیبات در داخل واطراف طناب های اپیتلیالی گنادهای اولیه مستلزم تکامل وتمایز طبیعی گناد ها در پستانداران محسوب می‌گردد [۳]. با این وجود پیدایش، تغییرات و ناپدید شدن احتمالی این ترکیبات و ارتباطات آن ها با شکل گیری گناد ها کمتر مورد بررسی قرار گرفته است.

از طرفی چون لکتین‌ها، پروتئین یا گلیکوپروتئین‌های غیر ایمونولوژیک هستند که به طور اختصاصی با قندهای انتهایی گیکوگانژوگیت ها متصل می شوند، وسیله‌ای مناسب برای شناسایی این ترکیبات محسوب می‌گردند[۱۲]. لذا این مطالعه با هدف بررسی تغییرات برخی از قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت در سطح سلول‌ها و ماتریکس خارج سلولی در طی گنادژنز رت با استفاده از روش لکتین هیستوشیمیایی انجام شد.

## روش کار

این مطالعه که از نوع توصیفی- آزمایشگاهی است به منظور شناسایی قند های انتهایی در مراحل مختلف جنینی با استفاده از روش لکتین هیستوشیمیایی انجام شد. در این مطالعه از تعداد ۴۰ سر رت نژاد ویستار (۳۰ رت ماده و۱۰ رت نر) با وزن تقریبی ۳۰۰-۲۵۰ گرم که از خانه حیوانات دانشکده پزشکی مشهد تهیه شده بودند، استفاده گردید. این حیوانات در شرایط استاندارد خانه حیوانات با دسترسی آزادانه به آب، غذا (روزانه دو بار صبح و عصر توسط پلیت تغذیه می شدند)، دوره تاریکی و روشنایی ۱۲ ساعته (از ساعت ۸ صبح تا ساعت ۸ بعدازظهر)، درجه حرارت ۲۴-۱۸ درجه سانتی گراد و رطوبت مناسب نگهداری و در طی مراحل تحقیق دستوالعمل The National Institutes of Health (NIH) و Welfare Department of Health Education & (DHEW) [۲] برای مراقبت از حیوانات مورد توجه و اجرا گردید. پس از آداپتاسیون به نسبت ۱ به ۳ در قفس های مخصوص جفت گیری قرار گرفتند و با تهیه اسمیر واژینال و مشاهده اسپرم روز صفر حاملگی تعیین و رت‌های حامله در قفس های جداگانه نگهداری شدند. در روزهای دوازدهم، چهاردهم وشانزدهم رت های حامله تحت بیهوشی با کلروفرم قرار گرفتند وبا عمل سزارین جنین ها از رحم خارج گردید. سپس جنین ها از پرده‌های جنینی خارج و در سرم فیزیولوژی شستشو داده شدند.



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-18 ]

جدول شماره ۱- اسامی و مشخصات لکتین ها

| Carbohydrate binding specificity | abbreviation | Lectin |
|---|---|---|
| Gal-( β1→3) GalNAc | MPA | Maclura pamifera Aagglutinin |
| L-fuc(α1→4)GlcNAc | LTA | Lotus tetragonolobus Aagglutinin |
| D-Gal-( β1→3)-D-Gal NAc | PNA | Arachis hypogaea Agglutinin |

جنین های به دست آمده در فرمالین ٪ ۱۰ به مدت ۲۴ ساعت فیکس شدند و بعد از فیکساسیون، نمونه‌ها به روش معمول آزمایشگاه بافت شناسی توسط الکل اتیلیک با غلظت های افزایشی آبگیری و سایر مراحل آماده سازی بافتی انجام شد. سپس نمونه ها در بلوک های پارافینی قالب گیری و برش های عرضی به ضخامت ۵ میکرومتر به منظور یافتن مقاطع بافتی مناسب و حاوی گناد های در حال تکامل، به صورت سریال توسط میکروتوم مدل $Leitz_{1512}$ تهیه گردید.

برای رنگ آمیزی با لکتین ها، در هر مرحله جنینی تعداد ۱۵ مقطع از برش های سریالی که حاوی بافت‌های گنادی بودند به طور تصافی انتخاب و با روش معمول آزمایشگاه بافت شناسی مراحل آب دهی انجام شد. برای انجام این مراحل، به ترتیب برش‌های بافتی داخل محلول گزیلن و درجات نزولی الکل (۱۰۰٪،۹۰٪، ۷۰٪ و۵۰٪ ) ودر نهایت آب مقطر قرار داده شدند. به این ترتیب که نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در محلول بافر فسفات نمکی (PBS) قرار داده شدند و سپس به منظور خنثی کردن آنزیم پراکسیداز داخلی Endogenous، لام ها به مدت ۴۵ دقیقه در آب اکسیژنه ۱٪ محلول در PBS در شرایط تاریکی قرار داده شدند. سپس لام ها به سه گروه ۵ تایی تقسیم و هر پنج لام به طور جداگانه با هر یک از لکتین ها با غلظت نهایی ۱۵ میکروگرم در میلی لیتر به مدت ۲ ساعت در دمای اطاق در محیطی مرطوب انکوبه شدند. در این پژوهش از لکتین‌های LTA (Cat. N. L-5759)، (Cat. N. M-3267) MPA و PNA (Cat. N. L-7759) که با HRP نشاندار و از شرکت سیگما تهیه شده بودند استفاده گردید (جدول۱).

در مرحله بعد برای حذف لکتین های اضافی نمونه ها با بافر فسفات سالین شستشو داده شدند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در محلول۰/۰۳ درصد دی آمینوبنزدین DAB (Diaminobenzedin)(۰/۰۳گرم دی آمینوبنزیدین در ۱۰۰ میلی لیتر PBS) وآب اکسیژنه (۲۰۰میکرولیتر در ۱۰۰میلی لیتر محلول DAB) مجاور شدند. پس از آن مقاطع بافتی با آب جاری شستشو و برای ایجاد رنگ زمینه از رنگ آمیزی آلسین بلو(pH: ۲/۵) به مدت ۵ دقیقه استفاده شد. مقاطع مورد نظر با درجات افزایشی الکل آبگیری و با گزیلن شفاف سازی و سپس بر روی لام چسبانده شدند. لازم به ذکر است که یک لام نمونه، حاوی بافت های مختلف (Composite) به عنوان کنترل مثبت با هر لکتین رنگ آمیزی شد. در این روش در محل اتصال لکتین های کونژوگه شده با HRP با قند انتهایی اختصاصی خود، رنگ قهوه ای ظاهر می شود که نتیجه واکنش HRP با DAB است[۱۳،۱۴].

نمونه های آماده شده توسط سه نفر به صورت کور Blind با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند و شدت واکنش برای هر لکتین در مراحل مختلف جنینی با استفاده از طیف لیکرت مطابق جدول ۲ تعیین گردید (عدم واکنش =۰ واکنش ضعیف = + واکنش متوسط ++ واکنش شدید +++ و واکنش بسیار شدید ++++). سپس اطلاعات به دست آمده برای هر لکتین در مراحل مختلف جنینی با استفاده تست آماری کروسکال والیس و نرم افزار SPSS باهم مقایسه گردیدند، سپس از نمونه‌های مورد نظر توسط میکروسکوپ دوربین دار Olympus مدل BX51 تصویر تهیه گردید[۱۳].

## یافته ها

بررسی مقاطع میکروسکوپی مربوط به روز های مختلف جنینی نشان داد که تکامل گناد ها در رت از روز دهم جنینی به صورت دو ستیغ تناسلی طولی ظاهر می گردند و $PGC_S$ در طی روزهای دوازدهم تا چهاردهم جنینی، از دیواره کیسه زرده به سمت ستیغ های تناسلی در طول مزانتر خلفی مهاجرت می نمایند. بطوریکه از روزسیزدهم در اپیتلیوم و مزانشیم گناد های در حال تکامل قابل ملاحظه می‌باشند.

[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-18 ]

جدول شماره۲: رتبه بندی شدت واکنش سلول ها و نواحی مختلف گناد با لکتین های مورد استفاده در این پژوهش در روزهای مختلف جنینی

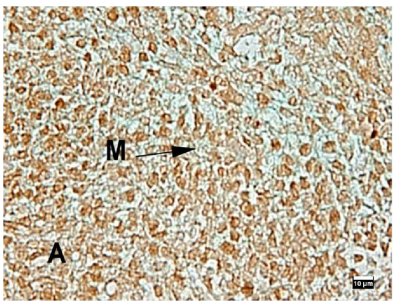
| | *$PGC_s$* | | | *Matrix* | | | *Epithelial cells* | | | *Mesenchyme* | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Day<br>lectin | $E_{12}$ | $E_{14}$ | $E_{16}$ | $E_{12}$ | $E_{14}$ | $E_{16}$ | $E_{12}$ | $E_{14}$ | $E_{16}$ | $E_{12}$ | $E_{14}$ | $E_{16}$ |
| LTA | - | – | + | - | + | ++ | - | - | +++ | - | - | - |
| MPA | - | – | + | - | + | - | + | + | +++ | + | + | + |
| PNA | - | + | ++ | - | - | + | – | - | ++ | - | - | + |

بر اساس شدت واکنش ایجاد شده در روش لکتین هیستوشیمیایی (جدول ۲) و لکتین های مورد استفاده (جدول ۱) مشخص شد که در روز دوازدهم جنینی ستیغ‌های تناسلی به صورت ابتدایی و سازمان نیافته دیده می‌شوند و در واکنش با لکتین LTA، سلولی که واجد ویژگی های $PGC_S$ باشد در ستیغ های تناسلی مشاهده نگردید. ماتریکس خارج سلولی(M)، که به میزان کمی وجود دارد، بدون واکنش با لکتین مذکور قابل مشاهده بودند. هسته سلول هایی که ظاهری مزانشیمی داشتند و به صورت یکنواخت در گناد پراکنده بودند واکنش ضعیفی با لکتین LTA بروز دادند. در سایر نواحی گناد های در حال تکامل در این مرحله واکنش قابل ملاحظه ای مشاهده نشد( شکل 1-A ).

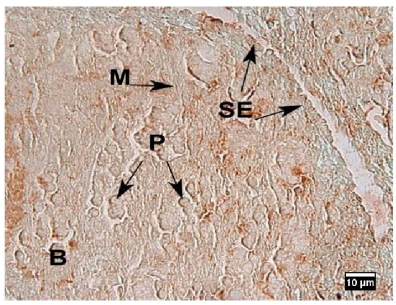
در روز چهاردهم جنینی در مقایسه با روز دوازدهم $PGC_S$ (P )در گناد ها قابل مشاهده بودند و لی با لکتین LTA واکنشی نشان ندادند. ماتریکس خارج سلولی (M) در این مرحله واکنش ضعیفی را نشان داد ($P<0.05$). سایر نواحی از جمله اپی تلیوم سطحی(SE) و مزانشیم زیرین آن، که بدون حدود مشخصی در امتداد با ماتریکس قرار دارد، با لکتین LTA واکنشی بروز ندادند(شکل 1-B ).

در روز شانزدهم جنینی تغییر ساختار گناد به وضوح قابل مشاهده بود به طوری که $PGC_S$ در دسته های سلولی منظم قرار گرفته و واکنش ضعیفی در این سلول‌ها ظاهر گردید($p <$ ۰/۰۵). ماتریکس خارج سلولی در ناحیه مرکزی واکنش متوسطی را نشان دادند که در مقایسه با روز چهاردهم واکنش شدیدتر بود($p <$ ۰/۰۵). اپی تلیوم سطحی که به صورت لایه نازکی در سطح گناد قرار قابل مشاهده بود، واکنش شدیدی را در این مرحله از تکامل با لکتین LTA نشان داد($p <$ ۰/۰۵). ناحیه زیرین اپی تلیوم، بافت همبندی به صورت متراکم قابل مشاهده بود که با لکتین LTA واکنش قابل

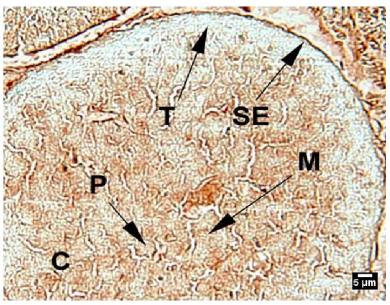
شکل۱: فتومیکروگراف های مربوط به گناد در حال تکامل رت که در مجاورت با لکتین LTA قرار گرفته و از آلسین بلو (pH=2.5) به عنوان رنگ زمینه استفاده شده است.




شکل 1-A: مقطع عرضی گناد در حال تکامل جنین ۱۲ روزه رت را نشان می دهد. ماتریکس خارج سلولی( M) که در تصویر با پیکان مشخص شده است با لکتین LTA واکنش نشان نداده است در صورتیکه هسته سلول ها واکنش ضعیفی را با لکتین مذکور بروز داده اند(Scale bar = 10µm).




شکل 1-B: مقطع عرضی گناد در حال تکامل جنین ۱۴ روزه رت می باشد که در این مرحله از تکامل $PGC_S$ ها در گناد ها قابل مشاهده اند(P) ولی با لکتین LTA واکنش نشان ندادند. ماتریکس خارج سلولی(M) واکنش ضعیفی را نشان می دهد و سایر نواحی مشخص از جمله اپی تلیوم سطحی(SE) و مزانشیم زیرین(Mes) بدون واکنش دیده می شوند(Scale bar = 10µm).




شکل 1-C: مقطع عرضی گناد در حال تکامل جنین ۱۶ روزه را نشان می دهد. دسته های سلولی $PGC_S$ (P) که در تصویر مشخص شده اند واکنشی ضعیف، ماتریکس خارج سلولی(M) واکنشی متوسط و اپی تلیوم سطحی(SE) در تصویر فوق بصورت یک لایه نازک در سطح گناد واکنش شدیدی را نشان می دهند. بافت همبند (T) زیر ناحیه اپی‌تلیوم سطحی(تونیکا آلبوژینه ) بدون هیچ واکنشی دیده می شوند. (Scale bar = 5µm).

[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-18 ]

ملاحظه ای بروز نداد(شکل C-1 ).

در ارزیابی مقاطع مربوط به جنین های دوازده روزه که در مجاورت با لکتینMPA قرار گرفته بود حضورPGCs کاملا"مشهود نبود زیرا در این مرحله تکاملی، این سلول ها به ستیغ های تناسلی نرسیده اند و در نتیجه مدرکی دال بر واکنش این سلول ها با لکتین مذکور مشاهده نگردید. در این مرحله از تکامل سلول‌هایی به صورت پراکنده دیده می شوند که هسته آنها واکنش ضعیفی نیز با لکتین MPA نشان می دهند. سلول های اپی تلیوم سطحی ستیغ ها واکنش نسبتا" ضعیفی با لکتین مذکور نشان دادند (شکل A-2 ).

در بررسی گناد ها در روز چهاردهم جنینی، ساختار این ارگان تقریبا" سازمان یافته قابل مشاهده بود و در بررسی واکنش این ارگان در حال تکامل با لکتین MPA مشخص شد که $PGC_S$ با لکتین مذکور واکنش ندادند و ماتریکس خارج سلولی در این مرحله بر خلاف روز دوازدهم واکنش ضعیفی را بروز دادند($p<0/05$) در صورتیکه سلول های اپی تلیوم سطحی مانند روز دوازدهم واکنش ضعیفی نشان دادند. هم چنین ظهور واکنش در مزانشیم زیرین در این روز به صورت واکنش ضعیفی شروع گردید($p<0/05$). در واقع سه ناحیه ماتریکس، اپی تلیوم سطحی و مزانشیم زیرین به صورت یکنواخت با لکتین مذکور واکنش نشان دادند(شکل 2-B).

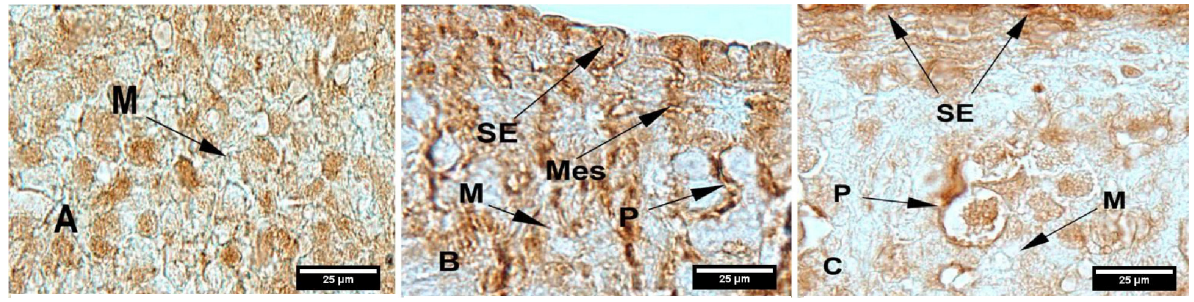
در روز شانزدهم جنینی $PGC_S$ برای اولین بار در مقایسه با روز های دوازده و چهارده جنینی با لکتین MPA واکنش ضعیفی را نشان دادند($p<0/05$). واکنش ماتریکس خارج سلولی در مقایسه با روز چهارده کاهش یافت($p<0/05$). اپی تلیوم سطحی چند لایه واکنش شدیدی را نشان دادند که در مقایسه با روز دوازده و چهارده از افزایش چشمگیری بر خوردار بود ($p<0/05$). در این مرحله مزانشیم زیرین، (ناحیه ای که عمدتا در تشکیل تونیکا آلبوژینه شرکت خواهد نمود) و سایر سلول‌ها واکنش ضعیفی بروز دادند(تصویر C-2 ).

در ارزیابی مقاطع عرضی گناد ها در جنین های دوازده روزه که در مجاورت با لکتین PNA قرار گرفته اند، هیچ گونه واکنشی در $PGC_s$ و سایر سلول های گنادی و ماتریکس خارج سلولی مشاهده نگردید(A-3).

در بررسی مقاطع مربوط به روز چهاردهم جنینی که با لکتین PNA رنگ آمیزی شده بودند، $PGC_s$ به صورت تجمعات سلولی قابل مشاهده بودند که با لکتین مذکور واکنش بسیار ضعیفی نشان دادند($p<0/05$) به طوری که تنها حدود سلول با این رنگ آمیزی قابل مشاهده است. سلول‌های دیگر موجود در گناد ها و ماتریکس خارج سلولی واکنشی با لکتین مذکور نشان ندادند(B-3).

در بررسی مقاطع مربوط به روز شانزده جنینی در

شکل۲: فتومیکروگراف های مربوط به گناد در حال تکامل رت که در مجاورت با لکتین MPA قرار گرفته و از آلسین بلو( pH=2.5 ) به عنوان رنگ زمینه استفاده شده است.




شکل A-2: مقطع عرضی گناد در حال تکامل جنین ۱۲ روزه رت را نشان می دهد که در مجاورت با لکتین MPA قرار گرفته است. سلول ها ی پراکنده در تصویر در این مرحله از تکامل واکنش ضعیفی را نشان می دهند. بعلت اینکه احتمالا" $PGC_S$ در این مرحله از تکامل در گناد وجود ندارند در نتیجه واکنشی در رابطه با این سلول ها با لکتین مذکور مشاهده نمی شود. سلول های اپی تلیوم سطحی(SE) در این تصویر با واکنش ضعیفی قابل مشاهده هستند(Scale bar =25µm).

شکلB-2: مقطع عرضی گناد در حال تکامل جنین ۱۴ روزه رت را نشان می دهد که در مجاورت با لکتین MPA قرار گرفته است. همانطور که در تصویر ملاحظه می گردد، $PGC_S$ با لکتین مذکور واکنش نشان نداده اند. ماتریکس خارج سلولی(M)، اپی تلیوم سطحی( SE) و مزانشیم زیرین آن بصورت یکنواخت واکنش ضعیفی را بروز دادند. (Scale bar = 25µm).

شکل C-2: مقطع عرضی گناد در حال تکامل جنین ۱۶ روزه رت را نشان می دهد. $PGC_S$ بصورت سلول های بزرگی دیده می شود(P) در سطح این سلول ها واکنش ضعیفی ملاحظه می گردد در حالیکه در ماتریکس خارج سلولی(M) واکنشی دیده نمی شود. سایر سلول ها در این تصویر واکنش ضعیفی را نشان می دهند. اپی تلیوم سطحی(SE) با واکنش نسبتا شدیدی در تصویر قابل مشاهده است(Scale bar =25µm).



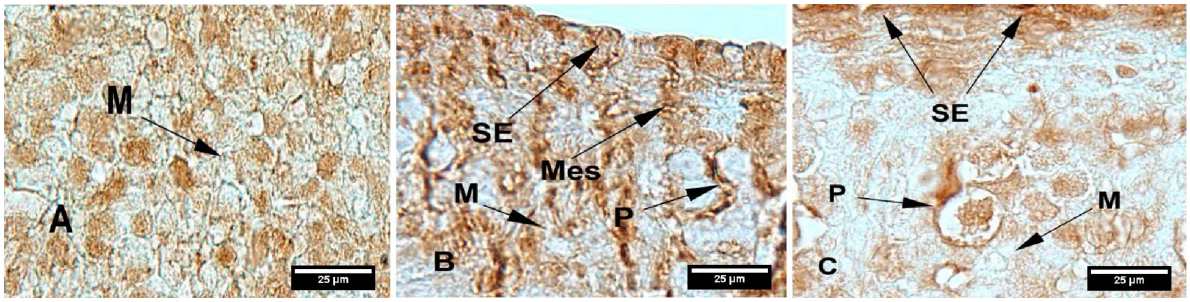
[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-18 ]

واکنش با لکتین PNA ، ماتریکس خارج سلولی(M) در مقایسه با روز چهاردهم در ناحیه خلفی گناد واکنش بیشتری را نشان داد ($p <$ ۰/۰۵).در این مرحله تکاملی $PGC_s$ در دسته های سلولی منظم قرار گرفته اند که با لکتین مذکور واکنش متوسطی را نشان دادند($p <$ ۰/۰۵) و اپی تلیوم سطحی گناد که به صورت چند لایه سلولی مشخص شده اند واکنش متوسطی را نشان دادند که نسبت به روز های دوازدهم و چهاردهم افزایش معنی داری را نشان داد($p <$ ۰/۰۵). در مزانشیم زیرین اپی تلیوم واکنشی ضعیفی قابل مشاهده بود. سایرسلول های گنادی که به صورت پراکنده در گناد ها وجود داشتند واکنشی را نشان ندادند (در شکل 3-C).

## بحث و نتیجه گیری

تشکیل گنادها حاصل مراحل پیچیده تکاملی است، به طوری که ابتدا گنادها به صورت یک زوج ستیغ تناسلی طولی که حاصل تکثیر اپیتلیوم سلومی و متراکم شدن مزانشیم زیرین آن است شکل می گیرند. سپس سلول‌های جنسی اولیه$PGC_s$ با منشا اپی بلاستی، از دیواره کیسه زرده و از طریق مزانتر پشتی به سمت ستیغ‌های تناسلی مهاجرت نموده و وارد آن می شوند و تمایز گنادهای اولیه را به تخمدان و بیضه القاء می کنند[۱]. سلول های جنسی اولیه علاوه براین که اطلاعات ژنتیکی را از یک نسل به نسل بعد منتقل می‌نمایند، در تکامل و تمایز گناد ها نقش منحصر به فردی دارند[۱۵]. از طرف دیگر، فرایند های تکاملی توسط میان کنش های متعدد مولکولی از جمله قندهای انتهایی گلیکوکونژوگیت‌ها و گلیکوپروتئین ها موجود در سطح سلول ها و ماتریکس خارج سلولی تنظیم می گردد. در این راستا، برای بروز به موقع تمایزات پیچیده سلولی، میان کنش‌های سلول ها با یکدیگر و با ماتریکس خارج سلولی، برخی از مولکول های شیمیایی در مراحل خاص تکاملی ظاهر شده، سپس تغییر می نمایند و احتمالا ناپدید می‌شوند[۱۶]. به طوری که عدم توازن کنش های سلول- سلول و یا سلول با ماتریکس خارج سلولی در مراحل مختلف مورفولوژنیک موجب ایجاد حالت های پاتوژنیک و نقایص مادر زادی شده و یا بروز عوارض پاتولوژیک به ویژه ایجاد تغییرات نئوپلاستیک می‌شود[۱۷]. تکامل و تمایز گناد ها در پستانداران مستلزم تغییراتی در نوع و توزیع پروتئین‌ها و گلیکوپروتئین ها در داخل واطراف طنابهای اپیتلیالی گنادها(لوله های سمینفر آینده در بیضه و فولیکول ها در تخمدان)است به طوری که توزیع فراوان ومشابه کربوهیدرات ها در گناد های اولیه در هر دو جنس، عدم تمایز جنسی آن ها را تأیید می کند. تغییرات کربوهیدرات ها با تمایز در گنادها ظهور پیدا می کند که می تواند موید نقش کلیدی این ترکیبات در تمایز گناد ها باشد[۱۷،۱۸]. نتایج مطالعات متعددی که در زمینه پیدایش، حضور و ناپدید شدن

شکل ۳ : فتومیکروگراف های مربوط به گناد در حال تکامل رت که در مجاورت با لکتین PNA قرار گرفته و از آلسین بلو (pH=2.5) به عنوان رنگ زمینه استفاده شده است.




شکل A-3: مقطع عرضی گناد در حال تکامل جنین ۱۲ روزه رت که در مجاورت با لکتین PNA قرار گرفته است همانطور که در تصویر ملاحظه می گردد فقط سلول های سطحی گناد(SE) و ماتریکس خارج سلولی با لکتین مذکور واکنش بسیار ضعیفی را نشان دادند. (Scale bar = 25µm).

شکل B-3: مقطع عرضی گناد در حال تکامل جنین ۱۴ روزه رت را نشان می دهد که $PGC_S$ بصورت تجمعات سلولی دیده می‌شوند(P) و واکنش نسبتا ضعیفی در آنها قابل مشاهده است و سلول های دیگر گناد، ماتریکس خارج سلولی و اپیتلیوم سطحی واکنشی را نشان ندادند. (Scale bar = 25µm).

شکلC-3: مقطع عرضی گناد در حال تکامل جنین ۱۶ روزه رت را نشان می دهد که $PGC_S$ در دسته های سلولی منظم (P) با لکتین مذکور واکنشی متوسط، ماتریکس خارج سلولی واکنشی ضعیف را نشان می دهند در حالیکه سایر سلول های گنادی واکنشی بروز ندادند. درسلول های اپی تلیوم سطحی(SE) واکنشی متوسط و مزانشیم زیرین اپی تلیوم نیز واکنش ضعیفی دیده می شود. (Scale bar = 25µm).



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-18 ]

قندهای انتهایی طی تکامل جنینی و اهمیت حضور این مولکول ها انجام گرفته است نشان می دهد که هر یک از ارگان ها در مراحل مختلف تکاملی خود، الگوی ویژه‌ای از نظر زمان ظهور، نوع قند های انتهایی و تغییرات آن از خود نشان می دهند. در بیضه های در حال تکامل در جنین های رت یک الگوی تکاملی آشکار در سلول های لیدیگ و سلول های سرتولی و اسپرماتوژنیک(مانند سلول های در حال شکل‌گیری آکروزوم) یافت شده است. هم چنین تمایز اپیدیدیم با افزایش باند شوندگی با لکتین در ناحیه راسی گلژی، سطح راسی سلول ها و ترشحات داخل لوله ای (قبل از ورود اسپرم)مشخص شده است[۱۹]. نتایج تحقیقاتی که با استفاده از لکتین های نشاندار با مواد فلوروسنت در بیضه رت انجام شده است نشان می‌دهد که بیضه رت غنی ازگلیکوکونژوگیت های متنوع است که تغییردر توزیع آن‌ها در طی تکامل واضح است[۲۰].

با توجه به این که تکامل گناد ها در رت از روز دهم جنینی به صورت دو ستیغ تناسلی ظاهر می شود و سلول‌های جنسی اولیه ($PGC_S$) از روز دوازدهم از دیواره کیسه زرده به طرف ستیغ های گنادی شروع به مهاجرت می نمایند، احتمالا در روز دوازدهم هنوز $PGC_S$ درگنادهای در حال تکامل وجود ندارد. نتایج حاصل از این پژوهش نیز موید این موضوع بوده به طوری که در این روز در بررسی مقاطع میکروسکوپی هیچ کدام از لکتین های LTA, MPA و PNA با سلولی که واجد ویژگی های $PGC_S$ باشد واکنشی مشاهده نگردید.

بیش ترسلول های جنسی اولیه($PGC_S$) در روز سیزدهم جنینی، و تقریبا همه آن ها در روز چهاردهم به ستیغ های گنادی می رسند. نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که در روز چهاردهم جنینی $PGC_S$ با لکتین LTA وMPA واکنشی را نشان ندادند در حالی که لکتین PNA با $PGC_S$ که به صورت گروه های سلولی دیده می شوند واکنش نسبتا ضعیفی را بروز دادند. عدم واکنش این سلول ها با LTA وMPA و واکنش ضعیف آنها با PNA که در واقع به ترتیب نشان دهنده عدم بیان قند L-fuc(α1→4)GlcNAc و D-Gal-(β1→3)-D-Gal NAc و بیان Gal-(β1→3) alNAc می باشد می تواند موید بیان تنظیم شده این قندها از نظر تکاملی باشد. به علاوه واکنش لکتین ها با $PGC_S$ وابسته به جنس بوده و بیان قندهای انتهایی در $PGC_S$ دو جنس متفاوت است[۲۱]. در ادامه روند تکاملی گناد ها اندکی قبل و یا با رسیدن $PGC_S$ به ستیغ های گنادی و القای تشکیل طناب های جنسی اولیه، نقش این سلول‌ها در تکامل گناد ها مشخص‌تر می‌گردد. این طناب ها که حاصل تزاید سلول های اپیتلیال به مزانشیم زیرین آن است در هر دو جنس مونث و مذکر رخ می دهد و افتراق دو جنس از یکدیگر در این مرحله از تکامل در مقاطع میکروسکوپی غیر ممکن است[۱۵] القای تشکیل طناب‌های جنسی اولیه مستلزم بیان مولکول های ویژه در سطح $PGC_S$ هاست. در این راستا نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که در روز شانزدهم جنینی $PGC_S$ در دسته های سلولی منظم قرار گرفته و با لکتین های LTA و MPA واکنش ضعیفی را نشان دادند و با لکتین PNA واکنش شدیدتری را ظاهر ساختند که این مشاهدات می تواند تاکیدی برنقش قند های انتهایی L-fuc(α1-4)GlcNAc، D-Gal-(β1→3)-D-GalNAc و Gal-(β1→3) GalNAc در تشکیل طناب های جنسی اولیه و درنتیجه تکامل گناد ها باشد. در ادامه فرایند تکامل در جنین هایی که از نظر جنسیت مذکر باشند ($PGC_S$ حاوی ترکیب کروموزومی XY) تزاید طناب‌های جنسی اولیه ادامه داشته و طناب های مدولاری یا بیضه‌ای را تشکیل می‌دهند. در حالی که در جنین هایی که از نظر جنسیت مونث هستند ($PGC_S$ حاوی ترکیب کروموزومیXX) تزاید طناب های جنسی اولیه به دسته‌های سلولی نامنظمی در ناحیه مدولا تفکیک می‌شوند که بعدا از بین می روند و با ادامه تزاید سلولهای سطحی در گنادهای مونث، طناب های جنسی ثانویه (Cortical) در زیر اپی تلیوم سطحی را تشکیل می‌دهند[۱]. با توجه به این روند تکاملی، بررسی مقاطع میکروسکوپی گناد های جنین های شانزده روزه نشان داد که برخی از$PGC_S$ که به صورت توده های سلولی در ناحیه مدولای گناد قرار داشتند و به صورت طناب سلولی آرایش یافته بودند واکنش نسبتا شدیدی را با لکتین MPA نشان دادند. این توده های سلولی با لکتین‌های LTA و PNA واکنش ضعیفی را نشان دادند که این می تواند به دلیل لزوم ایفای نقش قندهای انتهایی خاص در مراحل متفاوت تمایزات جنینی باشد.

تعداد لایه های سلولی اپیتلیوم سطحی گنادهای اولیه که در تشکیل ستیغ های تناسلی و سپس در شکل گیری وتمایز طناب های جنسی اولیه وثانویه شرکت



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-18 ]

می‌کند در حین تکامل جنینی در دو جنس نر و ماده متفاوت است به طوری که در جنس نر معمولا به صورت یک لایه و در جنس ماده به علت شرکت آن در تشکیل طناب های جنسی ثانویه به صورت چند لایه دیده می شود که از این ویژگی می توان در تشخیص نوع گناد (جنسیت) در این مرحله از تکامل جنینی استفاده نمود[۱۵] و هم چنین علت تعداد متفاوت لایه های سلولی اپیتلیوم سطحی را درنمونه های مختلف پژوهش حاضر تبیین نمود. از طرف دیگر واکنش متفاوت این سلول ها با لکتین‌های مختلف در مراحل تکاملی مورد بررسی به ویژه واکنش قابل ملاحظه آن ها در روز شانزدهم جنینی نیز نشان می‌دهد که بیان مولکول های قندی از نظر تکاملی تنظیم شده است.

بر اساس یافته های این پژوهش می توان نتیجه گرفت که الگوی بیان و تغییرات گلیکوکونژوگیت ها با قند های انتهایی L-Fuc (α1→4)GlcNAC, Gal(β1-3)GalNAC و D-Gal(β1-3)DGalNAC در طی گنادوژنز تنظیم شده است و تعیین این الگو می تواند پایه‌ای برای مطالعات آینده و مقایسه آن با حالت های پاتولوژیک و تراتولوژیک باشد.

## تشکر وتقدیر

پژوهش حاضر حاصل بخشی از نتایج طرح تحقیقاتی شماره ۸۸/۳۰۲۶۶۵ مورخ ۱۳۸۸/۱۰/۲۶ مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد است که به این وسیله از آن معاونت محترم و هم چنین خدمات تکنیکی سرکار خانم متجدد در آزمایشگاه تحقیقاتی گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی دانشکده پزشکی مشهد تشکر و تقدیر می گردد.

## فهرست منابع

1. Sadler TW. Longman's Medical Embryology. 11nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkin; 2009 .p. 246-50.

2. Bandyopadhyay S, Banerjee S, Pal AK, Goswami SK, Chakravarty B, Kabir SN. Primordial Germ Cell Migration in the Rat: Preliminary Evidence for a Role of Galactosyltransferase. Biol Reprod ; 2004. 71(6):1822-7.

3. Fröjdman K, Malmi R, Pelliniemi LJ.Lectin-binding carbohydrate in sexual differentiation of rat male and female gonads.Histo Chem; 1992. 97(6):469-77.

4. Fröjdman K, Ekblom P, Sorokin L, Yagi A, Pelliniemi LJ.Differential distribution of laminin chains in the development and sex differentiation of mouse internal genitalia. Int J Dev Biol ;1995. 39(2):335-44.

5. Zagris N :Extracellular matrix in development of the early embryo. Micron; 2001 . 32(4):427-38.

6-Lodish HF. Molecular Cell Biology.6nd ed. NewYork: Freeman ; 2008. p. 987-8 .

7. Hassanzadeh Taheri M.M, Nikravesh M.R, Jalali M, Fazel A.R Ebrahimzadeh bideskan A.R. Distribution of Specific Glycoconjugate in Early Mouse Embryonic Notochord and Paraxial Mesenchyme. Iran Biomed J; 2005. 9(1): 21-26.

8. Eggence I, Fenderson BA, Toyokuni T, Hakomori S. A role of carbohydrate-carbohydrate interaction in the process of specific cell recognition during embryogenesis and organogenesis: a preliminary note.Biochem Biophys Res Commun;1989. 158(3):913-20.

9. Fazel AR, Schulte BA, Spicer SS. Glycoconjugate unique to migrating primordial germ cells differs with genera.Anat Rec; 1990. 228(2):177-84.

10. Zhang L, Tran DT, Ten Hagen KG.An O-glycosyltransferase promotes cell adhesion during development by influencing secretion of an extracellular matrix integrin ligand. J Biol Chem ;2010 .285(25):19491-501.

11. Qasba PK.Involvement of sugars in protein- protein interaction. Carbohydr Polym; 2000. 41:293-309.

12. Hewiston TD, Darby IA. Histology Protocols. New York: Humana Press; 2008. p. 103-14.

13. Wong SE, Winbanks CE, Samuel CS, Hewitson TD. Lectin histochemistry for light and electron microscopy. Methods Mol



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-18 ]

Biol ;2010. 611:103-14.

14-Ahi M, Zamansoltani F, Hassanzadeh Taheri M.M, Ebrahimzadeh bideskan A.R.The role of GalNac terminal sugar on adrenal gland development. Adv Bio Res; 2007. 1(2): 34-39.

15. Armengol C, Carretero A, Nacher V, Ruberte J, Navarro M.Carbohydrate characterization of quail primordial germ cells during migration and gonadal differentiation.Anat J;2007. 210(1):98-111.

16. Mina M, Kollar EJ, Bishop JA, Rohrbach DH. Interaction between The Neural Crest and Extracellular Matrix Proteins in Craniofacial Skeletogenesis.Crit Rev Oral Biol Med ;1990 1(2):79-83.

17. Simon-Assmann P, Lefebvre O, Bellissent- Waydelich A, Olsen J, Orian-Rousseau V, De Arcangelis A.The Laminins: Role in Intestinal Morphogenesis and Differentiation.Ann N Y Acad Sci; 1998. 859:46-64.

18. Lehninger AL, Cox MM,Nelson DL. Lehninger principles of biochemistry.5nd ed. New York: W.H. Freeman; 2008. P. 252-8.

19. Arya M, Vanha-Perttula T.Postnatal development of lectin-binding pattern in the rat testis and epididymis.Acta Anat (Basel); 1986. 127(2):100-9.

20. Malmi R, Fröjdman K, Söderström O.Differentiation-relate changes in the distribution of glycoconjugates in rat testis.Histochemistry; 1990. 94: 387-395.

21. Alonso E, Sáez FJ, Madrid JF, Hernández.Lectin Histochemistry Shows Fucosylated Glycoconjugates in the Primordial Germ Cells of Xenopus Embryos.J Histochem Cytochem;2003. 51(2):239-43.

[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-18 ]

Original Article

# Study of glycoconjugates terminal sugars during gonadogenesis in rat by lectin histochemical method

**F. Nikmard**, MSc student, Department of Anatomy, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran**.** Email: NikmardF@mums.ac.ir
***A. Ebrahimzadeh Bideskan, PhD.** Assistant professor of Anatomy, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran (*Corresponding author). Email: Ebrahimzadehba@mums.ac.ir
**A. Mahmoodian, PhD.** Assistant professor of Anatomy, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran**.** Email: MahmodianA@mums.ac.ir
**E. Mohammadzadeh,** MSc student, Department of Anatomy, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran**.** Email: MohammadzadehE871@mums.ac.ir
**A. Fazel, PhD.** Professor of Anatomy, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. Email: FazelA@mums.ac.ir

## Abstract

**Introduction**: Introduction: Gonadogenesis is a complex developmental process which is regulated by molecular interactions such as cell surface and extracellular matrix (ECM) Glycoconjugates terminal sugars. The aim of this study was to determine Glycoconjugates terminal sugars expressions and changes during Gonadogenesis in Rat using Lectin histochemical technique.
**Methods**: To determine of glycoconjugate terminal sugers by Lectin histochemistry method, thirty Wistar Rat embryos at different stages from days 12 to 16 of gestation were fixed in formalin, embedded in paraffin and cut in to 5µm thickness sections serially. The sections were incubated with different HRP-lectins from Lotus tetragonolobus (LTA), Maclura pomifera(MPA) and Arachis hypogaea or Peanut (PNA), that are specific for terminal sugars L-Fuc (α2-4)GlcNAc, Gal(β1-3)GalNAc and D-Gal(β1-3)DGalNAc respectively. On the basis of colorimetery data that was determined by blind's method, sections were graded and SPSS statistic soft ware and kruscal Wallis tests were used for comparing different embryonic stages.
**Results**: Our finding showed that LTA did not react with developing gonads at gestational day 12($E_{12}$). LTA reactivity was found in extracellular matrix (ECM) of developing gonads from $E_{14}$ through $E_{16}$ ($P<0.05$) and $PGC_S$ as well as surface epithelium at $E_{16}$ ($P<0.05$). Surface epithelium were reacted with MPA from $E_{12}$ to $E_{14}$ and increased LTA reactivity at $E_{16}$ ($P<0.05$). ECM was reacted with MPA at $E_{14}$ and diminished at $E_{16}$ ($P<0.05$). LTA reactivity was found in $PGC_S$ at $E_{16}$. PNA did not react with developing gonads at gestational day 12($E_{12}$) but its reaction was started with $PGC_S$ from $E_{14}$ and increased to $E_{16}$ ($P<0.05$). In addition, PNA reactivity was started with ECM and surface epithelium from $E_{14}$ and increased at $E_{16}$ significantly ($P<0.05$).
**Conclusion**: According to our result, it is concluded that the expression and changes of glycoconjugates with terminal sugars L-Fuc (α2-4) GlcNAC, and D-Gal (β1-3) DGalNAC are regulated developmentally during rat gonadogenesis.

**Keywords**: Gonadogenesis, Development, Glycoconjugates, Lectin, L-Fucos, N-Accetyle Galactose.

[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-18 ]