

مطالعه توزیع و تغییرات قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت‌ها در طی تکامل فولیکول مو در رت با استفاده از فن لکتین هیستوشیمیایی

الهام محمدزاده^۱، دکتر علیرضا ابراهیم زاده بیدسکان*^۲، دکتر محمد رضا نیکروش^۳، دکتر مهدی جلالی^۴،
فاطمه نیک مرد^۵، دکتر علیرضا فاضل^۶

تاریخ دریافت: 90/05/25 تاریخ پذیرش: 90/07/02

چکیده

پیش زمینه و هدف: مورفوژن فولیکول مو توسط میان کنش‌های پیچیده اکتودرمی - مزانشیمی که توسط مکانیسم‌های مولکولی تنظیم می‌شود کنترل می‌گردد. بعلاوه گلیکوکانژوگیت‌ها از جمله ترکیباتی هستند که در میان کنش‌های سلولی در طی تکامل جنینی نقش دارند. لذا هدف این پژوهش مطالعه توزیع و تغییرات گلیکوکانژوگیت‌ها در طی مورفوژن فولیکول مو در رت با استفاده از میکروسکوپ نوری و فن لکتین هیستوشیمی تعیین گردید.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، جنین‌های رت ۱۶، ۱۸ و ۲۰ روزه در فرمالین فیکس و در پارافین قالب گیری شدند. سپس به منظور مطالعه تغییرات و توزیع قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت‌ها در طی مورفوژن فولیکول مو، از لکتین‌های (LTA) *Lotus tetragonolobus*، *Glycine max*(soybean)agglutinin (SBA) و *Arachis hypogaea* or peanut (PNA) که به ترتیب برای قندهای انتهایی α -L Fuc، GalNAC و Gal-(β 1 \rightarrow 3) DGalNAC اختصاصی هستند، استفاده گردید. براساس شدت واکنش‌های بدست آمده ناشی از رنگ‌پذیری هر یک از قندهای یاد شده، نمونه درجه‌بندی شدند و از نمونه‌های مورد نظر عکس تهیه گردید.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این پژوهش مشخص نمود که جوانه اپیدرمی، غشاء پایه و تراکم مزانشیمی با لکتین PNA در روز شانزدهم جنینی واکنش نشان داد. تعدادی از اجزای فولیکول مو در حال تکامل منجمله غلاف اپیدرمی و کورتکس با لکتین مذکور واکنش متوسطی را نشان دادند به طوری که این واکنش‌ها در روز بیستم به ترتیب به طور ضعیف و شدید ادامه یافت. واکنش جوانه اپیدرمی و تراکم مزانشیمی با لکتین SBA در روز شانزدهم به ترتیب ضعیف و متوسط ارزیابی گردید. واکنش غشاء پایه، غلاف اپیدرمی و کورتکس با لکتین مذکور در روز هیجدهم نسبتاً ضعیف بود. واکنش کورتکس، کوتیکول و غلاف اپیدرمی خارجی با لکتین SBA در روز بیستم شدید ارزیابی گردید. جوانه اپیدرمی، غشاء پایه و تراکم مزانشیمی با لکتین LTA در روز شانزدهم واکنش متوسطی را نشان دادند. واکنش غشاء پایه، غلاف اپیدرمی و کورتکس با لکتین مذکور در روز هیجدهم نسبتاً قوی ارزیابی گردید. در روز بیستم تکامل فولیکول مو واکنش غشاء پایه، کورتکس و غلاف اپیدرمی با لکتین LTA شدید و واکنش ماتریکس نیز متوسط بود.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که بیان قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت‌ها منجمله α -L Fuc، Gal-(β 1 \rightarrow 3) GalNAC و DGalNAC در طی مورفوژن فولیکول مو تنظیم شده است.
کلید واژه‌ها: تکامل فولیکول مو، کلیکوکانژوگیت، لکتین PNA، لکتین LTA، لکتین SBA

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و دوم، شماره پنجم، ص ۴۵۸-۴۴۹، آذر و دی ۱۳۹۰

آدرس مکاتبه: مشهد، میدان آزادی، مقابل پارک ملت پردیس دانشگاه، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، تلفن تماس: ۹۱۵۵۰۴۱۵۰۶۰

Email: Ebrahimzadehba@mums.ac.ir

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تشریحی، گروه آموزشی علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
^۲ استادیار علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
^۳ استاد، علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
^۴ استاد علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
^۵ دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تشریحی، گروه آموزشی علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
^۶ استاد علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

مقدمه

مو یکی از ضمایم کراتینی پوست است که اندازه، ترتیب قرار گیری و رنگ آن بسته به نژاد، سن، جنس، منطقه بدن و یا در گونه‌های مختلف پستانداران تغییر می‌کند. هر مو، از یک فولیکول مو که در اثر انواژینه شدن اپیدرم به داخل درم ایجاد می‌گردد، به وجود می‌آید. فولیکول مو در انتهای عمقی خود حجیم شده پیاز مو^۱ را به وجود می‌آورد. پیاز مو در قاعده خود دارای ناحیه تو رفته‌ای است که حاوی درم بوده، پاپی درمی نامیده می‌شود که غنی از عروق خونی و انتهای عصبی بوده و در تشکیل مو نقش القایی داشته، برای تغذیه و رشد مو، اهمیت حیاتی دارد. بدین ترتیب فولیکول‌های مو که از اجزاء اپیدرمی و درمی ساخته شده‌اند، شامل جمعیت تخصص یافته‌ای از سلول‌های اپی تلیالی، رنگدانه‌ای و مزانشیمال هستند که چرخه مو را کنترل می‌کنند (۲،۱).

در پیاز مو، محلی که سلول‌های اپیدرمی بلافاصله روی پاپیلا قرار می‌گیرند، ماتریکس و پاپیلا درمی در شکل‌گیری و نگهداری مو در تعامل هستند (۳). فولیکول مو تقریباً از هشت دودمان اپی تلیالی ساخته شده است که به صورت دو غلاف اپیدرمی داخلی و خارجی آرایش یافته‌اند همچنین سلول‌های مزانشیمی که تنه فولیکول را احاطه نموده و غلاف درمی را تشکیل می‌دهند، سیگنال‌های لازم را برای رشد و تمایز سلول‌های اپی تلیالی فولیکولار فراهم می‌کنند (۴،۵).

مورفوژنز فولیکول‌های مو توسط سیگنال‌هایی از درم جنینی آغاز می‌شود که اکتودرم رویی را برای شروع شکل‌گیری پلاکودها هدایت می‌کنند. پلاکودها سیگنال‌هایی را به مزانشیم زیرین خود، برای تشکیل تراکم‌های درمی می‌فرستند (۶). در این راستا تعدادی از فاکتورهای رشد و تمایز و رسپتورهایشان در فولیکول‌های موی در حال تکامل و یا بالغ بیان می‌شوند که موتاسیون در آن‌ها در شکل‌گیری مو موثر است (۵).

در واقع میان کنش‌های اپی تلیالی - مزانشیمی که شکل‌گیری فولیکول‌های مو را تنظیم می‌کنند توسط بعضی از مولکول‌های سیگنالی میانجیگری می‌شوند. این سیگنال‌ها بیشتر به چهار گروه فاکتور رشد تغییر دهنده β (TGF β)، فاکتورهای رشد فیبروبلاستی (FGFS)، خانواده Sonic hedgehog (Shh) و خانواده WNT تعلق دارند (۶). علاوه بر این، پروتئین‌های تنظیم کننده شامل Shh، BMPs و چندین پروتئین WNT و رسپتورهای EGFR، FGFR و TGFR در فولیکول‌های در حال تکامل و در فاز آنژن مو بیان می‌گردند (۷).

از سوی دیگر شواهد ژنتیکی مبین نقش انکار ناپذیر EGF در شکل‌گیری مو بوده همچنین فاکتور رشد مشتق از پلاکت‌ها A (PDGF-A) و رسپتور آن PDGF-R α که در چرخه فولیکول‌های مو بیان می‌شوند با مزانشیم مرتبط بوده، در تکامل فولیکول‌های مو موثر هستند (۵).

در واقع از میان فاکتورهای فوق‌الذکر، Wnt و FGFs به عنوان فعال کننده‌ها عمل نموده به طوری که توزیع، جهت‌گیری و پیگمانتاسیون ضمایم پوست تا اندازه‌ای توسط سیگنال Wnt تنظیم می‌شود و BMPs (به ویژه BMP2 و BMP4) به عنوان مهارکننده‌های شکل‌گیری (fate) پلاکودهای مو عمل می‌کنند. همچنین Eda-A1/Edar یک نقش مرکزی در تنظیم شکل‌گیری پلاکودها دارد که در صورت عدم حضور این سیگنال، پلاکودهای اولیه شکل نمی‌گیرند و بیان موضعی سایر مارکرها نیز صورت نمی‌گیرد. بعلاوه میان کنش‌های فولیستاتین و اکتیوین نقش مهمی را در تکامل فولیکول بازی می‌کنند (۱۰-۸).

در راستای بیان مکانیسم‌های مولکولی مختلف در فرایندهای تکاملی، می‌توان به مولکول‌های پروتئینی و گلیکوکانژوگیت‌ها اشاره نمود که در میان کنش‌های سلولی و همچنین میان کنش‌های لایه‌های جنینی دخالت دارند (۲). بخش کربوهیدراتی گلیکوپروتئین‌ها، گلیکولیپیدها و پروتئوگلیکان‌ها در شناسایی بین سلول‌ها که فرایندهای تمایزی، تکامل، پاسخ‌های ایمنی و دیگر اعمال بافت‌ها را تنظیم می‌کنند، نقش مهمی ایفا می‌نمایند (۸). همچنین گلیکوکانژوگیت‌های سطح سلول و ماتریکس خارج سلولی در میان کنش‌های سلول به سلول و سلول با ماتریکس و در نتیجه فرایندهای تکاملی منجمله مهاجرت سلولی، تکثیر و مورفوژنز دارای نقش کلیدی می‌باشند (۹،۱۰).

بنابراین با توجه به نقش گلیکوکانژوگیت‌ها در فرایندهای تکاملی و تمایزی و نقش ترکیبات قندی آن‌ها در تکامل طبیعی ارگان‌های بدن که به صورت تنظیم شده بیان می‌شوند و از سوی دیگر با توجه به اهمیت و سلامت مو به عنوان یکی از ضمایم پوست که در زیبایی نقش بسزایی دارد، این مطالعه با هدف افزایش اطلاعات در خصوص ظهور و تغییرات احتمالی برخی از گلیکوکانژوگیت‌ها از مرحله سیتوژنز تا مرحله کراتینیزاسیون در طی تکامل فولیکول‌های مو در رت از طریق قابل مشاهده نمودن این ترکیبات با استفاده از فن لکتین هیستوشیمیایی انجام شد.

مواد و روش کار

الف) تهیه جنین‌های رت:

برای انجام این تحقیق تعداد ۴۰ سر رت نژاد ویستار (۳۰ رت نر و ۱۰ رت ماده) با وزن تقریبی ۲۵۰-۳۰۰ گرم از خانه حیوانات

¹ Hair bulb

دانشکده پزشکی مشهد تهیه و در شرایط استاندارد از نظر دسترسی به آب و مواد غذایی، نور (۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی)، رطوبت (۵۰-۵۵ درصد) و درجه حرارت 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و پس از آداپتاسیون به نسبت ۳ به ۱ (سه ماده و یک نر) در قفس‌های مخصوص جفت‌گیری قرار داده شدند و توسط اسمیر واژینال و مشاهده اسپرم، روز صفر حاملگی E0 آن‌ها تعیین شد. در مرحله بعد به منظور به دست آوردن جنین‌های ۱۶، ۱۸ و ۲۰ روزه، رت‌های حامله در روزهای شانزدهم (E16)، هجدهم (E18) و بیستم (E20) بارداری تحت بیپوشی عمیق با کلروفورم قرار گرفتند. سپس با سرعت و دقت جنین‌ها از لوله رحمی، پرده‌های جنینی خارج شدند. در صورت مشاهده هرگونه ناهنجاری ظاهری، نمونه جنینی از روند مطالعه حذف گردیدند. سپس نمونه‌های مورد نظر در فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت در دمای اطاق ثابت شدند (۱۲، ۱۱).

(ب) تهیه برش‌های بافتی:

پس از کامل شدن مرحله فیکس، جنین‌ها با عبور از الکل اتیلیک با غلظت افزایشی پاساژ داده شدند و پس از آب‌گیری، در گزین شفاف سازی شدند. در مرحله بعد نمونه‌ها در بلوک‌های پارافینی قالب‌گیری و برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرون در سطوح مختلف مطابق شکل (۱) از ناحیه بولبار و سوپرابولبار، توسط میکروتوم آلمانی Leitz مدل ۱۵۱۲ در آزمایشگاه تحقیقاتی گروه علوم تشریحی دانشکده پزشکی مشهد تهیه گردید.

(ج) لکتین هیستوشیمیایی:

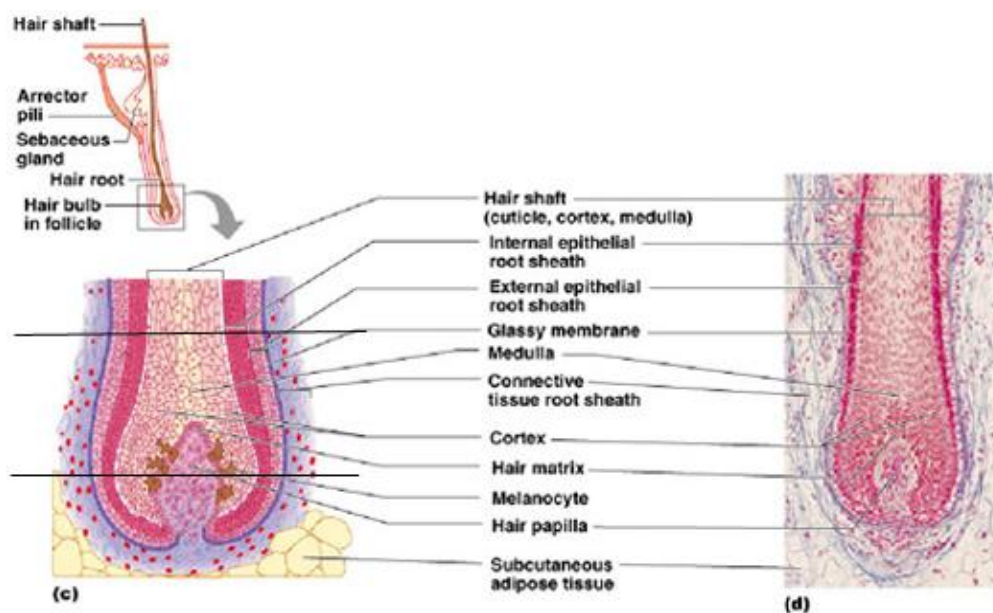
برای انجام این مطالعه از هر مرحله جنینی ۱۵ لام به طور تصادفی انتخاب شدند (برای هر لکتین پنج لایم) و به روش معمول در بافت شناسی پارافین زدایی و آب‌دهی گردیدند. سپس به

منظور حذف پراکسید از آندوژن مقاطع به مدت ۴۵ دقیقه در شرایط تاریکی در محلول آب اکسیژنه ۱ درصد محلول در PBS قرار داده شدند. در این پژوهش از لکتین‌های PNA، SBA و LTA کونژوگه شده با HRP مطابق جدول (۱) که از شرکت سیگمای آمریکا خریداری شده بودند، استفاده گردید. برای این منظور ابتدا لکتین‌های مذکور با کمک بافر فسفات سالین (PBS) به غلظت ۱۵ میکروگرم در میلی‌لیتر رقیق شدند. در مرحله بعد برش‌ها با هر کدام از لکتین‌های رقیق شده فوق در محیطی مرطوب و در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند. سپس نمونه‌ها توسط محلول بافر فسفات سالین شستشو داده شدند و به مدت ۵-۱۰ دقیقه در محلول سوپسترای ۰/۰۳ درصد (DAB) Diaminobenzidine در بافر فسفات که مقدار ۲۰ میکرولیتر آب اکسیژنه به ازای هر ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول فوق به آن اضافه گردیده بود، قرار داده شدند. در مرحله بعدی کلیه مقاطع پس از شستشو در آب جاری و آب مقطر، برای ایجاد رنگ زمینه در محلول آلسین بلو با $pH=2/5$ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند.

همچنین در این آزمایش یک لام ترکیبی (Composite) نیز به عنوان کنترل مثبت با هر یک از لکتین‌ها مطابق روش بالا رنگ آمیزی شد. در صورت بروز واکنش لکتین‌ها با قند انتهایی مربوطه، رسوب قهوه‌ای رنگی ایجاد می‌گردد که حاصل واکنش آنزیم HRP متصل به لکتین با DAB است. نمونه‌ها بر اساس شدت واکنش با لکتین‌ها به صورت رتبه‌ای (عدم واکنش -، واکنش ضعیف +، واکنش متوسط ++، واکنش شدید +++) توسط سه نفر به صورت کور (Blind) درجه‌بندی شدند. سپس از نمونه‌های مورد نظر با استفاده از میکروسکوپ Olympus مدل Bx51 عکس تهیه گردید (۱۴-۱۲).

جدول شماره (۱): لکتین‌های مورد استفاده در این پژوهش

Lectin	Abbreviation	Major Carbohydrate binding specificity
Arachis hypogaea agglutinin	PNA	D-Gal-($\beta 1 \rightarrow 3$)-D-Gal NAC
Lotus tetragonolobus	LTA	α -L- Fuc
Glycine max(soybean)agglutinin	SBA	α , β -D-GalNAc > D- Gal



شکل شماره (۱): نواحی مختلف فولیکول مو خطوط افقی مشخص کننده برش از ناحیه بولبار و سوپرابولبار هستند.

یافته‌ها

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که اجزای ساختمانی فولیکول مو واکنش‌های متفاوتی را با هر یک از لکتین‌های مورد استفاده در مراحل مختلف تکاملی از خود نشان دادند که به شرح زیر ارائه می‌گردد.

لکتین PNA

بررسی مقاطع مربوط به فولیکول‌های مو در حال تکامل که با لکتین PNA مجاور شده است نشان داد که در روز شانزدهم جنینی (E₁₆) تورفتگی اکتودرمی که برای تکامل مو به درون مزانشیم اینواژینه شده بود، با لکتین PNA واکنش نسبتاً قوی بروز داده است و همان‌طور که در تصویر ۲ ملاحظه می‌گردد ناحیه مرکزی این تورفتگی واکنش شدیدتری را نسبت به این لکتین نشان داده است. همچنین غشای پایه نیز با لکتین مذکور واکنش نشان داد. در ادامه، بررسی مقاطع مربوط به جنین‌های هیجده روزه (E₁₈) که با لکتین PNA رنگ آمیزی شده بودند نشان داد که کورتکس با لکتین PNA واکنش بسیار اندکی را نشان داد و غلاف اپیدرمی نیز با این لکتین واکنش نسبتاً بارزی را نشان داد ولی غشای پایه، کوتیکول و غلاف درمی با این لکتین واکنشی را نشان ندادند. در ادامه بررسی، مقاطع مربوط به جنین‌های بیست روزه (E₂₀) می‌توان به تنوع در اندازه و اختلاف در کرنولوژی تکامل فولیکول‌های مو در این مرحله از تکامل جنینی اشاره نمود و همچنین در این مرحله تکاملی، مدولا و کوتیکول و غلاف درمی با

این لکتین هیچ واکنشی را نشان ندادند و کورتکس واکنش شدیدی را نسبت به این لکتین بروز داد که نشان دهنده حضور قند انتهایی GalNAc - (β1→3)-D - Gal در گلیکوکانژوگیت‌های موجود در کورتکس فولیکول مو در روز بیستم جنینی است. و غلاف اپیدرمی (مخصوصاً غشای سلول‌های آن) واکنش اندکی را نسبت به PNA نشان دادند (شکل ۲ و جدول ۲).
لکتین SBA

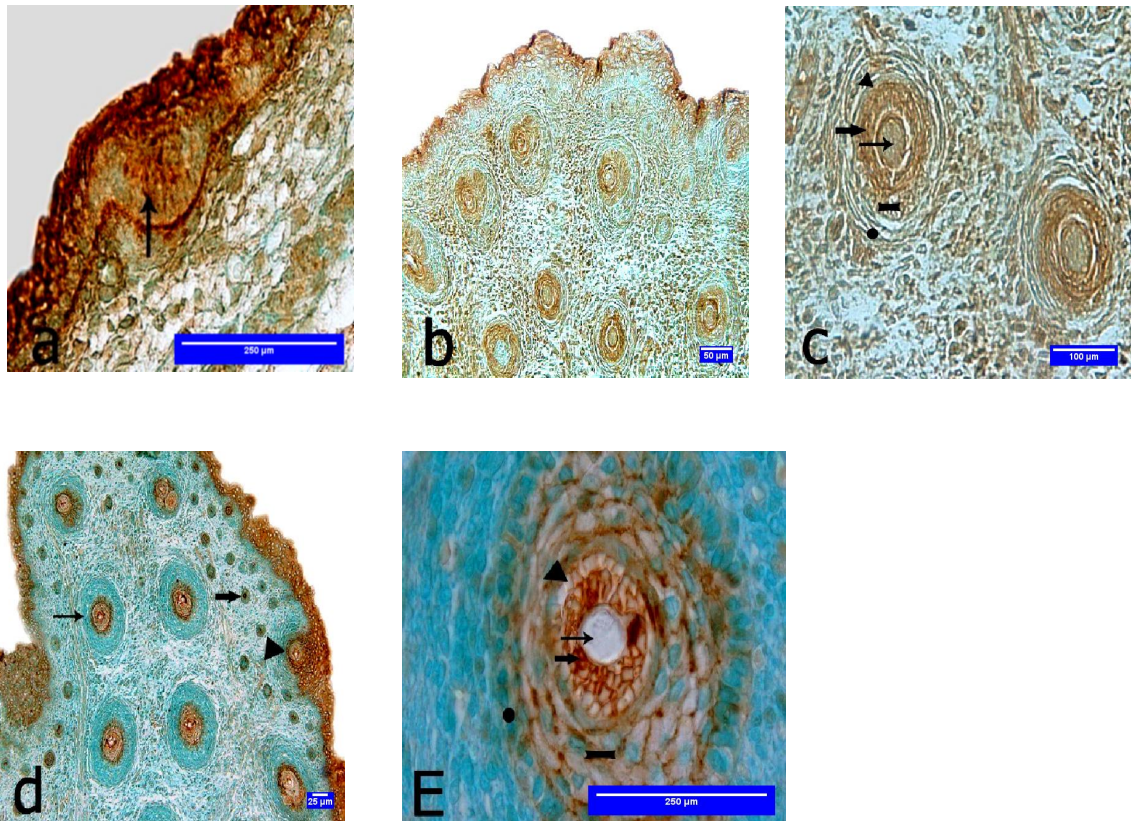
در بررسی مقاطع جنین‌های شانزده روزه (E₁₆) که با لکتین SBA رنگ آمیزی شده بودند، مشخص گردید که تراکم مزانشیمی که در مراحل بعدی تکامل، به فولیکول مو تبدیل خواهد شد، با لکتین SBA واکنش نشان داده است. در مرحله تکاملی بعدی، مقاطع مربوط به روز هجدهم جنینی (E₁₈)، که در مجاورت با لکتین SBA قرار گرفته بودند، مدولا و غلاف اپیدرمی فولیکول مو واکنش اندکی را با این لکتین نشان دادند و کورتکس نیز واکنش نسبتاً شدیدی را نسبت به SBA نشان داد است که نشان دهنده حضور مقدار فراوانی از قند انتهایی α, β-D-GalNAc > D-Gal در گلیکوکانژوگیت‌های این ناحیه است، همچنین کوتیکول و غلاف درمی نیز نسبت به این لکتین واکنش نشان دادند. در روز بیستم جنینی (E₂₀)، مدولا هیچ واکنشی را نسبت به لکتین SBA نشان نداد است و کورتکس واکنش بسیار اندکی را نسبت به SBA نشان دادند و همچنین غلاف اپیدرمی با این لکتین واکنش نشان داد، واکنش کوتیکول با SBA شدید بود در حالی که غلاف درمی با

یعنی روز هجدهم جنینی (E₁₈)، مشاهده شد که کورتکس و کوتیکول با این لکتین واکنش شدیدی را نشان دادند در حالی که مدولا با لکتین LTA واکنشی را نشان نداد. همچنین غلاف اپیدرمی و غلاف درمی واکنش اندکی را با LTA نشان دادند. در روز بیستم جنینی (E₂₀)، مدولا، غلاف اپیدرمی و درمی هیچ گونه واکنشی را نسبت به LTA نشان ندادند در حالی که کورتکس واکنش شدیدی را نسبت به این لکتین نشان داد و کوتیکول نیز واکنش بسیار اندکی با LTA داشت (شکل ۴ جدول ۴).

این لکتین هیچ گونه واکنشی را نشان نداد از طرفی می توان به واکنش غشای پایه با این لکتین اشاره نمود که به معنی حضور قند انتهایی $\alpha, \beta\text{-D-GalNAc} > \text{D-Gal}$ در گلیکوکانژوگیت های این ناحیه است (شکل ۳ و جدول ۳).

لکتین LTA:

بررسی مقاطع مربوط به جنین های شانزده روزه (E₁₆) با لکتین LTA نشان داد که تراکم مزانشیمی القا شده توسط پلاکود اکتودرمی به منظور تشکیل فولیکول مو، با لکتین LTA واکنش متوسطی را نشان داده است. در مرحله تکاملی بعدی مورد بررسی،

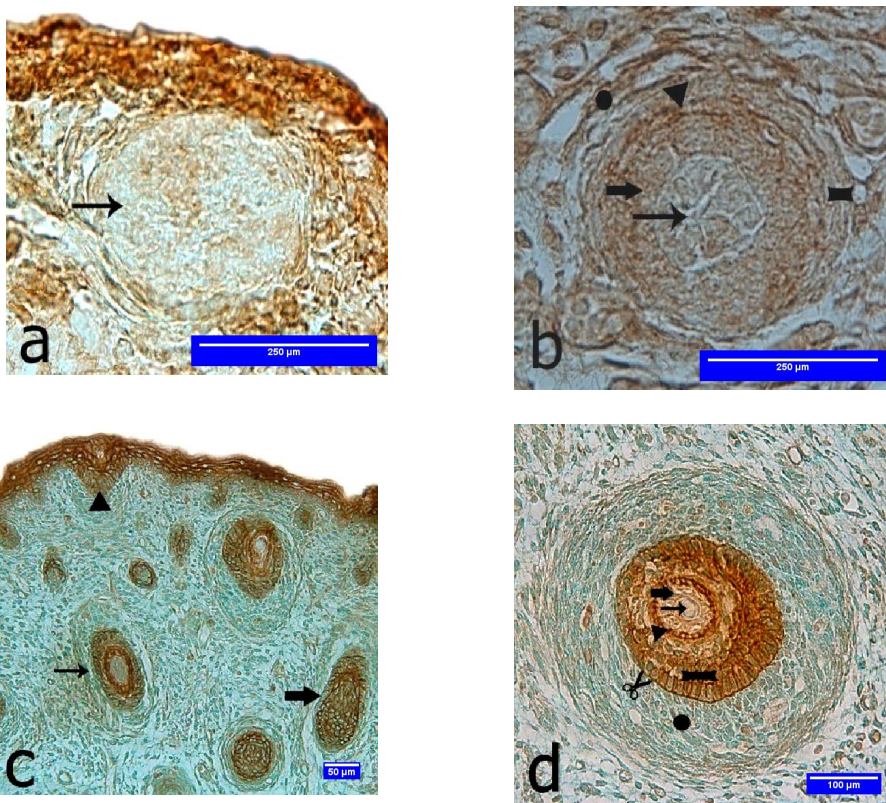


شکل شماره (۲): فتومیکروگراف های مربوط به مقاطع عرضی فولیکول های موی در حال تکامل رت که در مجاورت با لکتین PNA قرار گرفته است.

(a) روز شانزدهم جنینی (E₁₆)، پیکان باریک نشان دهنده یک تورفتگی اکتودرمی به داخل مزانشیم است.
 (b) روز هجدهم جنینی (E₁₈)، در این تصویر مقاطع عرضی فولیکول های موی در حال تکامل در نواحی مختلف سوپرابولبار (Superabulbar) و بولبار (Bulbar) قابل مشاهده هستند که بعضی از بخش های آن با PNA واکنش نشان داده است.
 (c) روز هجدهم جنینی (E₁₈) در ناحیه بولبار، پیکان باریک نشان دهنده کورتکس، پیکان پهن بیانگر واکنش غلاف اپیدرمی، سر پیکان به غشای پایه و انتهای پیکان به غلاف درمی اشاره دارد.
 (d) مقطع عرضی فولیکول مو در روز بیستم جنینی (E₂₀)، پیکان باریک نشان دهنده یک فولیکول موی نسبتاً تکامل یافته و بزرگ است و پیکان پهن نشان دهنده یک فولیکول موی کم تر تکامل یافته و کوچک است که بخش هایی از آن ها با لکتین PNA واکنش نشان داده است که همچنین سر پیکان در این تصویر به اینواژینه شدن یک پلاکود اکتودرمی به داخل مزانشیم اشاره دارد.
 (e) مقطع عرضی فولیکول مو در روز بیستم جنینی (E₂₀) در ناحیه سوپرا بولبار (Suprabulbar)، پیکان باریک نشان دهنده مدولا و پیکان پهن به کورتکس اشاره می کند، سر پیکان نشان دهنده غلاف اپیدرمی است و دایره بیانگر غلاف درمی است.

جدول شماره (۲): تغییرات شدت رنگ در قسمت‌های مختلف فولیکول مو در حال تکامل که در مجاورت لکتین PNA قرار گرفته است

نواحی مختلف فولیکول مو در حال تکامل							
روز جنینی	تراکم مزانشیمی	جوانه اکتودرمی	غشای پایه	مدولا	کورتکس	کوتیکول	غلاف اپیدرمی
E16	++	+++	++	-	-	-	-
E18	-	-	-	-	+	-	++
E20	-	-	-	-	+++	-	+

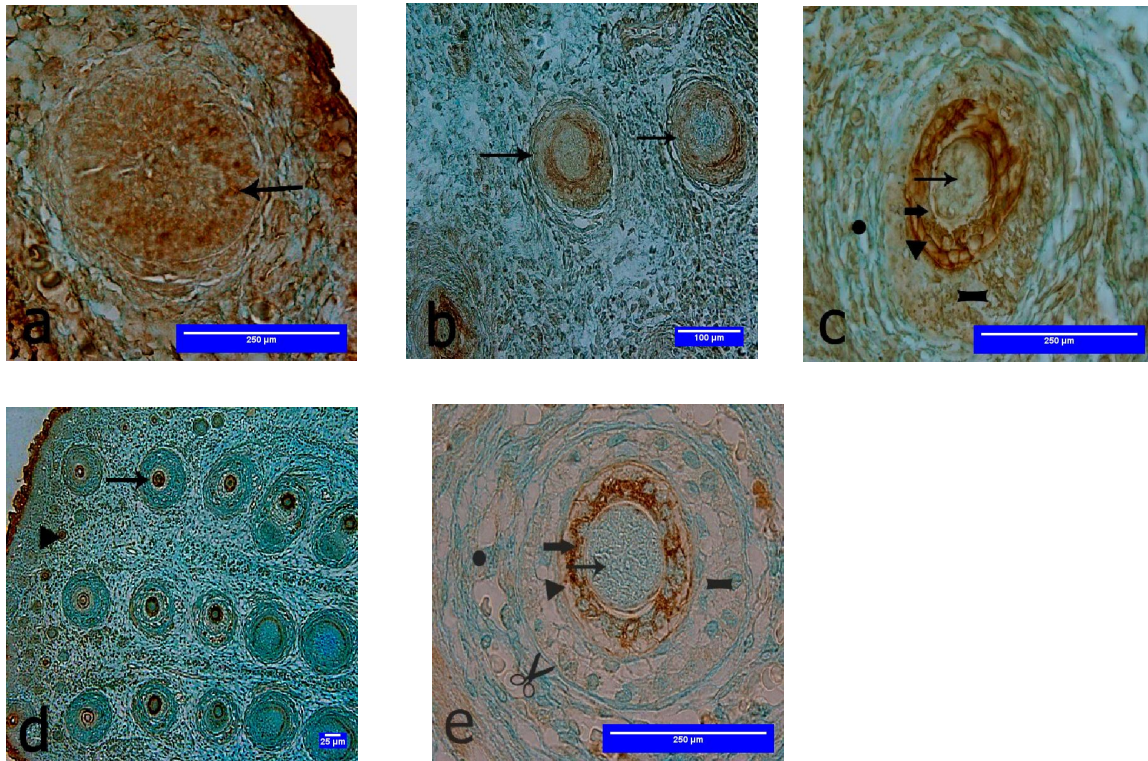


شکل شماره (۳): فتومیکروگراف‌های مربوط به فولیکول موی در حال تکامل رت که در مجاورت با لکتین SBA قرار گرفته است.

(a) روز شانزدهم جنینی (E16). پیکان باریک نشان دهنده تراکم مزانشیمی است.
 (b) مقطع عرضی فولیکول مو در حال تکامل مربوط به ناحیه بولبار (Bulbar) در روز هجدهم جنینی (E18). پیکان باریک در این تصویر نشان دهنده واکنش اندک پاپیلای درمی نسبت به لکتین SBA است و پیکان پهن به واکنش شدید سلول‌های کورتکس با این لکتین اشاره دارد. سر پیکان بیانگر کوتیکول و انتهای پیکان نشان دهنده غلاف اپیدرمی و دایره نشان دهنده غلاف درمی است.
 (c) مقطع عرضی فولیکول مو در حال تکامل مربوط به ناحیه سوپرا بولبار (Suprabulbar) روز بیستم جنینی (E20). در این تصویر پیکان باریک نشان دهنده غلاف درمی است که با لکتین SBA واکنش نشان نداده است و سر پیکان به اینواژینه شدن بخشی از اکتودرم به داخل درم برای تشکیل فولیکول مو که با SBA واکنش نشان داده است و اشاره دارد.
 (d) مقطع عرضی فولیکول مو در حال تکامل مربوط به ناحیه سوپرا بولبار (Suprabulbar) روز بیستم جنینی (E20). پیکان باریک نشان دهنده مدولا و پیکان پهن نشان دهنده کورتکس است سر پیکان بیانگر واکنش شدید کوتیکول با این لکتین است. انتهای پیکان به واکنش غلاف اپیدرمی با SBA اشاره دارد. نوک قیچی به غشای پایه اشاره دارد و دایره غلاف درمی را نشان می‌دهد.

جدول شماره (۳): تغییرات شدت رنگ در قسمت‌های مختلف فولیکول مو در حال تکامل که در

نواحی مختلف فولیکول موی در حال تکامل							
روز جنینی	تراکم مزانشیمی	جوانه	غشا پایه	مدولا	کورتکس	کوتیکول	غلاف اپیدرمی
E16	+	++	-	-	-	-	-
E18	-	-	+	-	+	-	+
E20	-	-	+++	-	++	+++	++

**شکل شماره (۴):** فتومیکروگراف‌های مربوط به فولیکول‌های موی در حال تکامل رت که در مجاورت با لکتین LTA قرار گرفته است

(a) روز شانزدهم جنینی (E16). پیکان باریک در تصویر نشان دهنده واکنش تراکم مزانشیمی است.

(b) مقطع عرضی فولیکول مو در حال تکامل مربوط به ناحیه بولبار (Bulbar) مربوط به روز هجدهم جنینی (E18). در این تصویر، پیکان‌های باریک نشان دهنده فولیکول‌های مو هستند که بخش‌هایی از آن‌ها با LTA واکنش نشان داده است.

(c) مقطع عرضی فولیکول مو در حال تکامل مربوط به ناحیه بولبار (Bulbar) در روز هجدهم جنینی (E18). پیکان باریک درم پایلا را نشان می‌دهد که با لکتین LTA واکنش نداده است و پیکان پهن نشان دهنده ماتریکس فولیکول مو است که با این لکتین واکنش شدیدی را نشان دادند و انتهای پیکان به غلاف اپیدرمی اشاره دارد و غلاف درمی که با دایره نشان داده شده است.

(d) مقاطع عرضی فولیکول مو در حال تکامل در سطوح مختلف مربوط به نواحی بولبار (bulbar) و ساب بولبار (supra bulbar) در روز بیستم جنینی (E20). در این تصویر پیکان باریک نشان دهنده یک فولیکول موی کوچک در مراحل ابتدایی تمایز می‌باشد.

(e) مقطع عرضی فولیکول مو در حال تکامل مربوط به ناحیه بولبار (bulbar) در روز بیستم جنینی (E20). پیکان باریک پایلای درمی را نشان می‌دهد است و پیکان پهن به واکنش شدید ماتریکس با LTA اشاره دارد. انتهای پیکان به غلاف اپیدرمی و دایره به غلاف درمی اشاره دارد که با LTA واکنش نشان نداده است ولی با آلسین بلو واکنش نشان داده‌اند (رنگ آبی) که نشان دهنده حضور پروتئوگلیکان‌های فراوان در این نواحی است و نوک قیچی به غشای پایه اشاره دارد که با آلسین بلو واکنش نشان داده است.

جدول شماره (۴): تغییرات شدت رنگ در قسمت‌های مختلف فولیکول مو در حال تکامل که در مجاورت لکتین LTA قرار گرفته است

نواحی مختلف فولیکول مو در حال تکامل									
روز	تراکم	جوانه	غشا پایه	مدولا	کورتکس	ماتریکس	کوتیکول	غلاف	غلاف
جنینی	مزانشمی	اکتودرمی					اپیدرمی	درمی	
E16	++	++	-						
E18			+	-	+	+++	-	+	-
E20			+++	-	+++	++	+++	+++	-

بحث

با توجه به مطالعات انجام شده و نتایج پژوهش حاضر که حاصل بررسی ظهور و تغییرات بخش قندی گلیکوکانژوگیت‌های سطح سلول و ماتریکس خارج سلولی در طی تکامل و مورفوژن فولیکول مو در رت در روزهای شانزدهم، هجدهم و بیستم جنینی می‌باشد. مکانیسم‌های احتمالی و مقایسه نتایج حاصله با نتایج حاصل از سایر مطالعاتی که در این زمینه انجام شده است بیان می‌گردد.

با توجه به نتایج بدست آمده از این پژوهش در خصوص لکتین PNA که برای قند انتهایی $D-Gal-(\beta 1 \rightarrow 3)-D-Gal$ Nac اختصاصی می‌باشد در روز شانزدهم جنینی (E16)، تورفتگی اکتودرمی که برای تکامل مو به درون مزانشیم اینواژینه شده است با لکتین PNA واکنش نشان داد. در روز هجدهم جنینی (E18) ناحیه کورتکس واکنش بسیار اندکی را نسبت به PNA نشان داد و غلاف اپیدرمی نیز نسبت به لکتین مربوطه واکنش نشان داد که نشان دهنده حضور قند انتهایی $D-Gal-(\beta 1 \rightarrow 3)-D-Gal$ Nac به میزان کم‌تر در گلیکوکانژوگیت‌های موجود در ناحیه کورتکس و به میزان بیشتر در گلیکوکانژوگیت‌های ناحیه غلاف اپیدرمی در این مرحله از تکامل است. علی‌رغم واکنش دو ناحیه فوق‌الذکر با PNA، عسای پایه، کوتیکول، غلاف درمی به دلیل عدم حضور قند انتهایی $D-Gal-(\beta 1 \rightarrow 3)-D-Gal$ Nac در این مرحله از تکامل فولیکول مو در گلیکوکانژوگیت‌های این ناحیه، با این لکتین واکنش نشان ندادند. در روز بیستم جنینی (E20)، مدولا، کوتیکول و غلاف درمی با PNA واکنشی را نشان ندادند ولی غلاف اپیدرمی واکنش اندکی را با PNA نشان داده است در حالی که کورتکس واکنش شدیدی را نسبت به این لکتین نشان داد که این نتایج نشان دهنده عدم حضور قند انتهایی $D-Gal-(\beta 1 \rightarrow 3)-D-Gal$ Nac در گلیکوکانژوگیت‌های نواحی مدولا، کوتیکول و غلاف درمی است و تجمع این قند انتهایی در گلیکوکانژوگیت‌های کورتکس و فراوانی اندک آن‌ها در غلاف اپیدرمی است. در کل می‌توان گفت که مقدار قند انتهایی $D-Gal-(\beta 1 \rightarrow 3)-D-Gal$ Nac در گلیکوکانژوگیت‌های ناحیه مدولا با پیشرفت تکامل

از آنجا که تغییرات تکاملی فولیکول‌های مو در روزهای آخر بارداری رت به وقع می‌پیوندد، در این مطالعه که با استفاده از روش لکتین هیستوشیمیایی صورت گرفت، سعی گردید تا روند بخشی از تغییرات تکاملی که مربوط به ظهور، تغییرات و یا ناپدید شدن قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت‌ها است در روزهای شانزدهم (E16) تا بیستم (E20) حاملگی در جنین رت مورد بررسی قرار گیرد. با توجه به اینکه گلیکوکانژوگیت‌ها، به ویژه قند انتهایی زنجیره‌های جانبی آن‌ها، در طی تمایزات سلولی تغییر می‌کنند و این تغییرات نقش مهمی را در فرایندهای تکامل جنینی منجمله میانکنش‌ها، اتصالات سلولی، فرایندهای مورفوژنیک و پینوسیتوز ایفا می‌نمایند. در این راستا تغییرات تکاملی در گلیکوکانژوگیت‌های سطح سلول‌ها و ماتریکس خارج سلولی در برخی از ارگان‌ها در طی تکامل جنینی گونه‌های مختلف از قبیل انسان، موش، رت و جوجه گزارش شده است (۱۹-۱۶).

نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که در رت، در روز سیزدهم جنینی، لایه سطحی اپیدرم شامل سلول‌های هسته داری است که هنوز کراتینیزه نشده‌اند. همچنین بیشتر سلول‌های مزانشیم مزودرمی به طور یکنواختی در دم توزیع شده‌اند. با این وجود در بعضی نواحی که تجمعات اندکی از بافت همبند مزانشیمی دیده می‌شود اپیدرم به سمت دم اینواژینه شده است.

در روز چهاردهم جنینی، تکامل مورفوژنیک فولیکول مو با تشکیل جوانه اپیدرمی که در حال گسترش به سمت دم می‌باشد شروع می‌شود و سلول‌های مزانشیمال برای شکل دادن تراکم مزانشیمی شروع به تجمع بیشتر در اطراف جوانه اپیدرمی می‌کنند. در روز پانزدهم جنینی، سلول‌های مزانشیمال به رأس ستیغ اپیدرمی که در حال نفوذ به دم می‌باشد نزدیک می‌شوند. در روز شانزدهم جنینی، قاعده فولیکول ابتدایی موی مقعر می‌شود و شروع به احاطه کردن سلول‌های پایپلا می‌کند. پایین‌ترین بخش فولیکول که شامل پایپلا درمی نیز می‌باشد، پیاز مو نامیده می‌شود (۲۰).

یافت در مقابل، میزان قند انتهایی مربوطه در گلیکوکانژوگیت‌های کوتیکول با پیشرفت تکامل افزایش پیدا کرد. در این راستا تحقیقات نشان می‌دهد که بیان پروتئوگلیکان‌های اختصاصی غشای پایه، مرتبط با فعالیت مورفوزنتیک در فولیکول‌های مو است. پروتئوگلیکان‌های هپاران سولفات به طور یکنواختی در تقاطع درمال - اپیدرمال جنین‌های رت در سرتاسر زمان شکل‌گیری فولیکول مو یافت شده است (۲۲).

در مورد لکتین LTA مشاهده شد که تراکم مزانشیمی که موجب القاء پلاکود اکتودرمی به منظور تشکیل فولیکول مو القا شده بود با LTA در روز شانزدهم جنینی (E₁₆) واکنش نشان داد که بیانگر حضور قند انتهایی α -L Fuc در گلیکوکانژوگیت‌های این ناحیه است. در روز هجدهم جنینی (E₁₈)، مدولا با LTA واکنشی را نشان نداد که دلیلی بر عدم حضور قند انتهایی α -L Fuc در گلیکوکانژوگیت‌های ناحیه مدولا است در حالی که کورتکس و کوتیکول واکنش شدیدی را با LTA نشان دادند که نشانه تجمع قند انتهایی مربوطه در گلیکوکانژوگیت‌های این ناحیه است و همچنین غلاف اپیدرمی با این لکتین واکنش اندکی را نشان داد و غلاف درمی واکنش بسیار اندکی را با LTA نشان داد. در ادامه بررسی، در روز بیستم جنینی (E₂₀)، مدولا، غلاف اپیدرمی و درمی هیچ‌گونه واکنشی را نسبت به LTA نشان ندادند که نشان دهنده عدم حضور قند انتهایی α -L Fuc در گلیکوکانژوگیت‌های این نواحی در این مرحله از تکامل فولیکول مو است در حالی که کورتکس واکنش شدیدی را نسبت به این لکتین نشان داد که بیانگر قند انتهایی مربوطه در گلیکوکانژوگیت‌های این ناحیه از فولیکول مو در روز بیستم (E₂₀) جنینی است و همچنین کوتیکول نیز واکنش اندکی را با LTA در این مرحله تکاملی نشان داد. واقع می‌توان گفت که واکنش کوتیکول و غلاف اپیدرمی و درمی نسبت به لکتین LTA با پیشرفت تکامل فولیکول مو کاهش پیدا کرده است و ناحیه مدولا در هیچ کدام از مراحل تکاملی با LTA واکنش نشان نداده است که می‌توان نتیجه گرفت که قند انتهایی α -L Fuc در تکامل ناحیه مدولا در فولیکول مو نقش تعیین کننده‌ای ایفا نمی‌کند.

تقدیر و تشکر

پژوهش حاضر حاصل بخشی از نتایج طرح مصوب (۳۰۲۶۵۵/۸۸ مورخ ۱۳۸۸/۱۰/۲۶) معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد است که بدین وسیله از آن معاونت محترم و همچنین مساعدت سرکار خانم متجدد در آزمایشگاه تخصصی بافت شناسی گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی دانشکده پزشکی مشهد تشکر می‌گردد.

کاهش می‌یابد ولی در ناحیه کورتکس و غلاف اپیدرمی با پیشرفت تکامل افزایش می‌یابد. از طرفی نتایج بررسی‌های دانشمندان نشان می‌دهد که شکل‌گیری فولیکول مو همراه با ظهور گلیکوژن است که بیانگر اینست که گلیکوژن ممکن است یک نقش مهمی را در فرآیندهای تکامل مو بازی کند. در طی تکامل مو، گلیکوژن ابتدا در اپیدرم جنینی ظاهر می‌شود، سپس در توده سلولی مرکزی از ریشه مو و در نهایت در غلاف خارجی فولیکول مو در زیر سطح غدد سباسه ظاهر می‌گردد. علاوه بر این، جنین پستانداران در غلاف داخلی ریشه فولیکول مو و مدولای مو محتوی یک موادی هستند که ممکن است گلیکوژن خالص نباشد ولی توسط Bauer-Feulgen's fluid و Best's carmin fluid رنگ آمیزی شده است (۲۱).

در ادامه بررسی‌ها تراکم مزانشیمی در حال تکامل به فولیکول مو در روز شانزدهم جنینی (E₁₆) نسبت به لکتین SBA واکنش نشان داد که بیانگر حضور قند انتهایی α , β -D-GalNAc > D- Gal در گلیکوکانژوگیت‌های تراکم مزانشیمی در حال تکامل به فولیکول‌های مو است و همچنین در یک بررسی پروتئوگلیکان کندروئیتین سولفات اختصاصی غشای پایه تنها به طور ضعیفی در روز شانزدهم جنینی در تقاطع درمال - اپیدرمال توسط آنتی بادی مونوکلونال تشخیص داده شده است در صورتی که رنگ شدیدی در جوانه‌های فولیکول مو در طی تکامل مشاهده شده است (۲۲).

در مرحله بعدی، روز هجدهم جنینی (E₁₈)، مدولا و غلاف اپیدرمی فولیکول مو، واکنش اندکی را نسبت به SBA نشان دادند و همچنین کورتکس، کوتیکول و غلاف درمی نیز نسبت به این لکتین واکنش نشان دادند که بیانگر وجود قند انتهایی α , β -D-Gal > D- Gal در گلیکوکانژوگیت‌های کورتکس، کوتیکول و غلاف درمی در این مرحله از تکامل جنینی است و همچنین حضور قند انتهایی مربوطه به میزان کم‌تر در گلیکوکانژوگیت‌های مدولا و غلاف اپیدرمی است. در روز بیستم جنینی (E₂₀)، مدولا و کورتکس واکنش بسیار اندکی را با SBA نشان دادند که بیانگر میزان اندک قند انتهایی α , β -D-Gal > D- Gal در گلیکوکانژوگیت‌های این دو ناحیه از فولیکول مو در حال تکامل است و غلاف درمی نیز با این لکتین واکنش نشان داد و واکنش کوتیکول با لکتین SBA شدید بود که نشان دهنده تجمع قند انتهایی مربوطه در گلیکوکانژوگیت‌های این ناحیه است در حالی که این قند انتهایی در ناحیه غلاف درمی در این مرحله از مورفوزنتز فولیکول مو وجود نداشت و بنابراین عدم واکنش غلاف درمی با SBA مشاهده گردید. در مقایسه مراحل تکاملی با یکدیگر مشاهده گردید که میزان قند انتهایی α , β -D-Gal > D- Gal در گلیکوکانژوگیت‌های ناحیه کورتکس با پیشرفت تکامل کاهش

References:

1. Goldman L, Ausiello D. Cecil medicine. 23rd Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. P. 326-36.
2. Falcone T, Hurd WW. Clinical reproductive medicine and surgery. 1st Ed. Philadelphia: Elsevier; 2007. P. 290-6.
3. Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF. Nelson textbook of pediatrics. 18th Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. P. 189-236.
4. Driskell RR, Giangreco A, Jensen KB, Mulder KW, Watt FM. Sox2-positive dermal papilla cells specify hair follicle type in mammalian epidermis. *Development* 2009; 136(16): 2815-23.
5. Karlsson L, Bondjers C, Betsholtz CH. Roles for PDGF-A and sonic hedgehog in development of mesenchymal components of the hair follicle. *Development* 1999; 126: 2611-21
6. Laurikkala J, Piapa J, Jung HS, Nieminen P, Mikkola M, Wang X et al. Regulation of hair follicle development by the TNF signal ectodysplasin and its receptor Edar. *Dev Dis* 2002; 129: 2541-53.
7. Rogers GE. Hair follicle differentiation and regulation. *Int J Dev Biol* 2004; 48: 163-70.
8. Nakamura M, Matzuk MM, Gerstmayr B, Bosio A, Lauster R, Miyachi Y et al. Control of pelage hair follicle development and cycling by complex interactions between follistatin and activin. *FASEB J* 2003; 17(3): 497-9.
9. Widelitz RB. Wnt signaling in skin organogenesis. *Organogenesis* 2008; 4(2): 123-33.
10. Mikkola ML. TNF super family in skin appendage development. *Cytokine Growth Factor* 2008; 19: 219-30.
11. Hewitson D, Darby A. Histology Protocols. 1st Ed. New York: Humana Press; 2009. P. 103-15.
12. Ebrahimzadeh Bideskan AR, Hassanzadeh Taheri MM, Nikravesht MR, Fazel AR. Lectin histochemical study of vasculogenesis during rat pituitary morphogenesis. *Iran J Basic Med Sci* 2011; 14(1) 35-41.
13. Bancroft JD, Stevens A. Theory and practice of histological techniques. 5th Ed. London: Churchill Livingstone; 2003. P. 20-100,513.
14. Hassanzadeh Taheri MM, Nikravesht MR, Jalali M, Fazel AR, Ebrahimzadeh Bideskan AR. Distribution of specific glycoconjugate in early mouse embryonic notochord and paraxial mesenchyme. *Iran Biomed J* 2005;9(1): 21-6.
15. Wheater PR, Burkitt HG, Daniels VG. Functional histology. 2nd Ed. New York: Churchill Livingstone; 1987. P.136-7.
16. Takata K, Hirano H. Changes in soybean agglutinin (SBA) and peanut agglutinin (PNA) binding pattern in the epidermis of the developing chick embryo. *Dev Growth Differ* 1983; 25(3):299-305.
17. Fazel AR, Sumida H, Schulte BA, Thompson RP. Lectin histochemistry of the embryonic heart: fucose-specific lectin binding sites in developing rats and chicks. *Am J Anatomy* 1989; 184(1): 76-84.
18. Faraldi C, Falugi C, Fasulo S. Glycoconjugate expression changes during Rana dalmatina early development. *Eur J Histochem* 1996; 40(1): 67-74.
19. Gheri G, Gheri Bryk S, Sgambati E. Use of horsedish peroxidase conjugated lectins for detection of glycoconjugate changes in developing lingual epithelium of the chick embryo. *Dev Growth Differ* 1991; 33(4):371-7.
20. Osada A, Kobayashi K. Appearance of hair follicle-inducible mesenchymal cells in the rat embryo. *Dev Growth Differ* 2000; 42: 19-27.
21. Tamate H. Appearance of glycogen in skin and hair of mammal embryos. *Tohoku J Agr Res* 1950; 2: 169-75.
22. Couchman JR, King JL, McCarthy KJ. Distribution of two basement membrane proteoglycans through hair follicle development and the hair growth cycle in the rat. *J Invest Dermatol* 1990; 94(1): 65-70.