

نقش اسکلت سلولی در تشکیل لوله عصبی در جنین

جوجه با استفاده از روش ایمونوپراکسیداز

دکتر طویی مهران نیا، استادیار گروه تشریح، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمانشاه

دکتر تقی الطریحی، استادیار پاتولوژی دانشگاه تربیت مدرس

دکتر عبدالفتاح صراف نژاد، استادیار ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران

دکتر یوسف محمدی، استاد جراحی و تشریح دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران

THE ROLE OF CYTOSKELETON ON THE DEVELOPMENT OF NEURAL TUBE IN CHICK EMBRYO BY IMMUNOPEROXIDASE METHOD ABSTRACT

The effect and arrangement of cytoskeleton (microtubules, microfilaments and neurofilaments) in neurulation of chick embryo examined by immunoperoxidase method from stage 6 to stage 12.

The results were as follows:

1. Microtubules aggregated in the perinuclear region from which they radiated to take longitudinal course beneath the membrane.
2. Microfilaments were aggregated in the apical ends (free-surface) of neural epithelium causing the cells to become flask-shaped.
3. Neurofilaments (Nfs) had no important role in neural tube formation.

خلاصه

در این تحقیق تأثیر اسکلت سلولی (میکروتوبولها، میکروفیلانتهها، ونوروفیلانتهها) در تکامل لوله عصبی در جنین جوجه با استفاده از روش ایمونوپراکسیداز مورد بررسی قرار گرفته است. نتیجه نشان می دهد که میکروتوبولها در ناحیه اطراف هسته می باشند و حول محور طولی سلول کشیده می شوند. همزمان با افزایش سن جنین، کشیدگی در سلولها بیشتر شده و در نتیجه میکروتوبولها به صورت طولی در داخل سلول و در زیر غشاء قرار می گیرند و باعث کشیدگی سلولهای نوروپسی تلیوم می شوند. میکروفیلانتهها در راس سلولهای اپی تلیوم به صورت دستجاتی

تجمع پیدا کرده و باعث انقباض در کنار آزاد آنها می شوند. این عمل سبب بطری شکل (flask shape) شدن سلولها می شوند و آنها به طرف داخل انحناء پیدا می کنند. نوروفیلانتهها نقش عمده ای در تشکیل لوله عصبی ندارند و در مراحل پیشرفته تکامل عصبی موثر بوده و در ارتباط با ریشه های عصبی نوروپسی تلیوم هستند.

مقدمه

چگونگی تشکیل لوله عصبی یکی از مهمترین مباحث تکامل جنینی است. در سلولهای اکتودرم عصبی در جنین جوجه، صفحه کفی (floor-plate) بین ۲-۱/۵ روز اول جنین تشکیل

می‌شود (۱). طبق تحقیقات (۲)، روزهای بین ۴-۲ در محلی که حداکثر تقسیم میتوز صورت گرفته است، سلولها به آرامی از صفحه عصبی به طرفین کشیده می‌شوند و برحسب پژوهشهای انجام شده (۳)، این عمل باعث ایجاد ناودان عصبی (neural -plate) می‌شود (۴، ۵).

لبه‌های ناودان عصبی به هم متصل شده و لوله عصبی (neural tube) را تشکیل می‌دهند. بررسی تکامل لوله عصبی ابتدا در دوزستان انجام شد (۵). در این بررسی نشان داده شد که سلولهای استوانه‌ای به شکل طولی قرار می‌گیرند. کنار داخلی سلولها به وسیله اتصالاتی به یکدیگر متصل می‌شوند که موازی با لوله عصبی می‌باشند (۴ و ۶).

پس از تشکیل لوله عصبی، نورونهای جوان و سلولهای گلیال به وجود آمده، جهت متمایز شدن از لومن به طرف محیط لوله عصبی مهاجرت می‌کنند (۷). تمایز یافتن بعدی سلولهای عصبی بستگی به موقعیت نوروبلاستهای دارد که در خارج از سلولها تقسیم شده‌اند. عمل تکامل لوله عصبی (نورولاسیون) شامل دو مرحله است (۸). ابتدا تغییر در شکل سلول و تبدیل سلولهای مکعبی به سلولهای استوانه‌ای نوروایی تلیال و مرحله بعد انقباض در راس سلول و ایجاد حالت بطری شکل کشیده شدن سلولها در ابتدای تکامل لوله عصبی صورت می‌گیرد و علت آن میکروتوبولهای موجود در نوروایی تلیوم است که موازی با محور طولی سلولها قرار می‌گیرند. بعد از این مرحله کنار آزاد سلولها به طرف داخل انحنا پیدا کرده و باعث بطری شکل شدن آنها می‌شود (۹). به نظر می‌رسد این تغییر جدید در شکل سلول به علت فعالیت میکروفیلامنتی است که در زیر غشاء پلاسمایی کنار آزاد سلولها به صورت دستجاتی موازی قرار می‌گیرند. نوروفیلامنتها نیز در ارتباط با استتاله‌های نورونها هستند (۱۰) و در مراحل پیشرفته تکامل لوله عصبی نمایان می‌شوند. "Tonsney & Oakley" پیشنهاد کردند که مزانشیم اطراف نوتوکورد مانند یک ناقل در رشد و خروج استتاله‌های نورونها موثر است.

مواد و روشها

آنتی بادی‌هایی که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند از شرکت SIGMA تهیه شده و مشخصات آنها به شرح زیر می‌باشد. - آنتی بادی مونوکلونال علیه آلفا توبولین ۱- (از کلون موش DMIA و ایزوتیپ IgG) شماره کارخانه T-9026 - آنتی بادی مونوکلونال علیه بتا توبولین (از کلون موش TUB 2-1 و ایزوتیپ IgG) شماره کارخانه T - 4026 - آنتی بادی مونوکلونال علیه آکتین ۳ (از کلون موش KJ و ایزوتیپ IgG) شماره کارخانه A - 1804

- آنتی بادی مونوکلونال علیه نوروفیلامنت ۶۸ (از کلون موش NR4 و ایزوتیپ IgG) شماره کارخانه N-5139
در این تحقیق تعدادی تخم مرغ نطفه دار از نژاد "Lohmann"

انتخاب شدند که جهت رشد جنین در دستگاه انکوباتور با درجه حرارت ۳۸ درجه سانتیگراد و رطوبت حدود ۶۰ درصد قرار داده شدند. جنینها در مراحل ۸، ۶، ۱۰ و ۱۲ جمع آوری شدند (۱۱) و در دو گروه مورد بررسی قرار گرفتند.

۱- گروه اول: پس از جمع آوری نمونه‌ها طی مراحل مختلف تکنیک میکروآناتومی (فیکس کردن، آنگیری، شفاف کردن، قالب گیری) از آنها مقاطعی به ضخامت ۵ میکرومتر بطور سریال گرفته و به طریقه H&E رنگ آمیزی شدند. این آزمایش جهت بررسی کلی تشکیل لوله عصبی و مقایسه با گروه اصلی انجام شده است. ۲- گروه دوم: این گروه نمونه اصلی این پروژه است. جنینها در مراحل ذکر شده فوق برداشته شده و با استفاده از روش ایمونوپراکسیداز، مورد مطالعه قرار گرفتند. مراحل بررسی به شرح زیر است:

پس از جدا نمودن جنینها، جهت ثابت شدن، آنها را در محلول بوئن (Bouin) قرار دادیم. و بعد از مراحل آنگیری، شفاف کردن و قالب گیری در پارافین، از آنها مقاطع عرضی به صورت سریال به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه شد. از این نمونه‌ها جهت مطالعه ایمونو هیسٹوشیمیایی استفاده گردید.

پس از آنگیری اسلاید، آنها را به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه جهت بلوکه کردن پراکسیداز درون بافت در محلول ۱ درصد هیدروژن پراکسیداز در متانول قرار داده، سپس آنها را در محلول فسفات بافرمالین ۰/۱ مولار و $P.H=7/4$ شستشو دادیم. و مدت ۵ دقیقه در محلول P.B.S قرار دادیم. سپس اسلایدها را بیرون آورده و خشک کردیم آنتی بادیهای مورد نظر را با محلول P.B.S به رفتهای مربوط به خود که در تابلوی شماره ۱ نشان داده شده است، رساندیم و آنها را بر روی مقاطع بافتی اضافه ریختیم. به مدت یک ساعت اسلاید را در اتاقک مرطوب قرار داده سپس آنها را با چند قطره محلول P.B.S شستیم و ۵ دقیقه در بافر نامبرده قرار دادیم و سپس بر روی شیکر گذاشتیم. پس از مدت لازم، اسلایدها را خارج کرده، خشک نمودیم و روی آنها "Antimouse IgG" کونژوگه پراکسیداز ریختیم و به مدت ۳۰ دقیقه مجدداً در اتاقک مرطوب قرار دادیم. بعد از بیرون آوردن اسلایدها، آنها را در بافر ۰/۱ مولار "Tris-Hcl" با $P.H=7/6$ قرار دادیم. بعد از این مرحله نمونه‌ها را در محلول دی آنتی‌بندی (D.A.B) به مدت ده دقیقه جهت نمایان شدن کمپلکسر آنتی بادی قرار دادیم.

سلول باعث انقباض در راس سلولهای نوروابی تلیومی هستند و میکروتوبولها نیز که یکی از عناصر اسکلت سلولی می‌باشند، در تعیین شکل سلول موثر بوده و در حین تکامل لوله عصبی باعث کشیده شدن سلولها و تبدیل اپیتلیوم استوانه‌ای می‌شوند. این تحقیق نیز قبلاً انجام شده است (۱۲) لذا این پروژه برای پی بردن دقیق بر نقش اسکلت سلولیدر تکامل لوله عصبی با استفاده از آنتی‌بادیهای مختلف انجام شده است. با بررسی نتایج حاصل شده از این تحقیق و مقایسه آن با تحقیقات انجام شده در مراکز علمی جهان می‌توانیم ادعا کنیم که عوامل داخل سلولی (سیتواسکلتونها) در تشکیل لوله عصبی نقش دارند. نوروفیلامنتها نیز که بعد از تکامل لوله عصبی ظاهر می‌شوند، در ارتباط با ریشه نورها هستند (۱۶، ۱۷).

نتیجه

در این پروژه مراحل مختلف تشکیل لوله عصبی در جنین جوجه را با استفاده از روش ایمونوپراکسیداز مورد نظر و بررسی قرار داده‌ایم که نتایج زیر در مورد چگونگی آرایش اسکلت سلولی به هنگام تشکیل لوله عصبی به دست آمده است:

- ۱- میکروتوبولها معمولاً در اطراف هسته وجود دارند که از آن منطقه به صورت شعاعهایی به اطراف کشیده شده و در زیر غشاء سلول، حول محور طولی قرار می‌گیرند. این امر سبب کشیده شدن سلولها و تبدیل آنها از حالت مکعبی به استوانه‌ای می‌شود (تصویرهای ۳، ۲، ۱).
- ۲- میکروفیلامنتها نیز عموماً در زیر غشاء پلاسمایی و در راس سلولها تجمع پیدا کرده و سبب انقباض در کنار آزاد سلولها می‌شوند و در نتیجه صفحه عصبی گودتر می‌گردد. این امر با تکامل لوله عصبی منجر به بسته شدن آن می‌شود (تصویرهای ۵، ۴).
- ۳- نوروفیلامنتها در مراحل اولیه تشکیل لوله عصبی دیده نمی‌شوند، بنابراین نقشی در تشکیل آن نداشته ولی پس از تشکیل لوله عصبی در حاشیه آن ظاهر می‌گردد و با افزایش سن جنین، مقدار آنها نیز افزایش می‌یابد و بیشتر در محل خروج ریشه‌های قدامی و خلفی اعصاب قابل رؤیت هستند (تصویرهای ۶ و ۷).

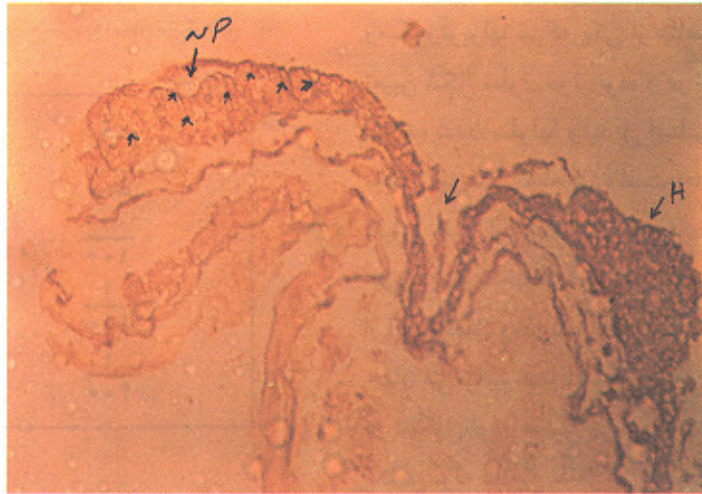
تابلو شماره (۱) آنتی‌بادیهای که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

رقم $\frac{1}{500}$	شماره تولید کارخانه T = ۹۰۲۶
$\frac{1}{100}$	T = ۴۰۲۶
$\frac{1}{100}$	A = ۱۸۰۴
$\frac{1}{400}$	N = ۵۱۴۹

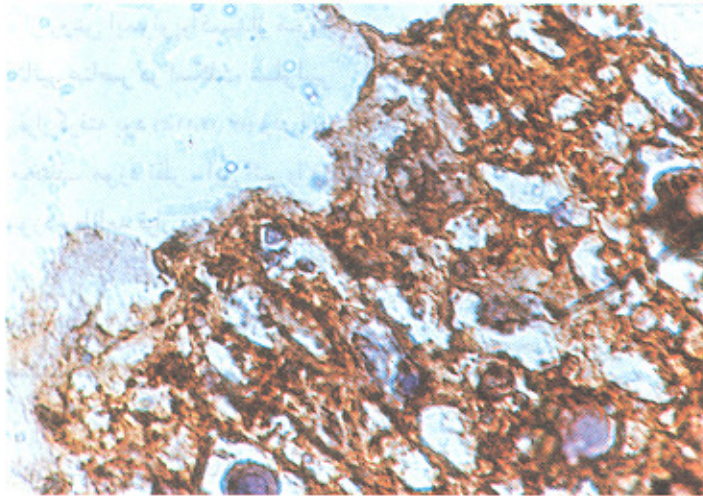
بحث

در این تحقیق نقش اسکلت سلولی در ایجاد پدیده تشکیل لوله عصبی در جنین جوجه با استفاده از روش ایمونوپراکسیداز مورد بررسی قرار گرفته است. قبلاً نیز تاثیر عناصر در اسکلت سلولیدر تشکیل لوله عصبی مورد بررسی قرار گرفته بود (۱۲، ۱۲، ۱۱، ۱۳) و در این پروژه با استفاده از آنتی‌بادیهای مختلف مورد نظر، این اثر را در مراحل مختلف در جنین جوجه مورد مطالعه قرار دادیم و نظرات فوق تأیید شد.

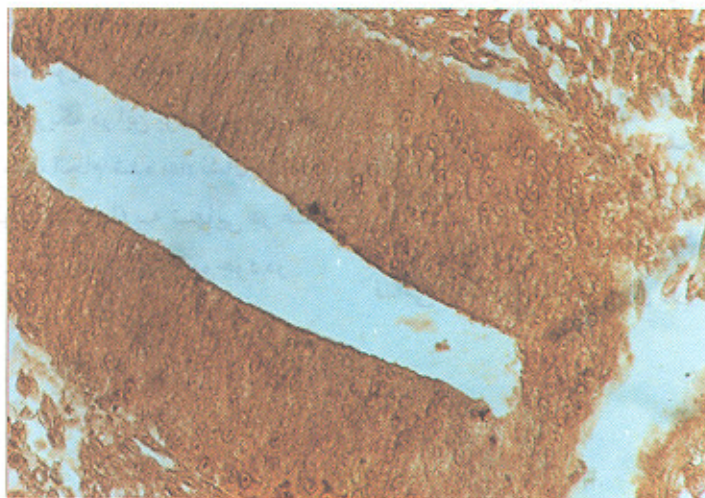
در این پروژه پدیده تشکیل لوله عصبی در جنین در مراحل مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. عمل تکامل لوله عصبی با دو تغییر در شکل سلول همراه است. کشیده شدن سلولهای نوروابی تلیومی و تبدیل به سلولهای استوانه‌ای و انقباض در راس سلول که باعث بطری شکل شدن سلولها در ابتدای تکامل لوله عصبی می‌شود و در نهایت منجر به بسته شدن لوله عصبی می‌گردد. این شواهد با مطالعات انجام شده (۱۲، ۲) در این تحقیق مطابقت دارد و مطالعات دیگر انجام شده نیز (۱۵) موید تاثیر اسکلت سلولی بر تغییر شکل سلول می‌باشد. همانطوریکه در این پروژه نیز مورد تأیید قرار گرفت، همچنین مطالعات انجام شده (۱۵) نشان می‌دهند که عوامل داخلی نوروئها (سیتواسکلتونها) به تنهایی در عمل تشکیل لوله عصبی موثر هستند. میکروفیلامنتهای موجود در



تصویر شماره ۱: مرحله ۶- صفحه عصبی را نشان می‌دهد. فلشها محل تجمع میکروتوبولها را مشخص می‌کنند. NP- صفحه عصبی H- گره عصبی درشتنمایی $\times 16$



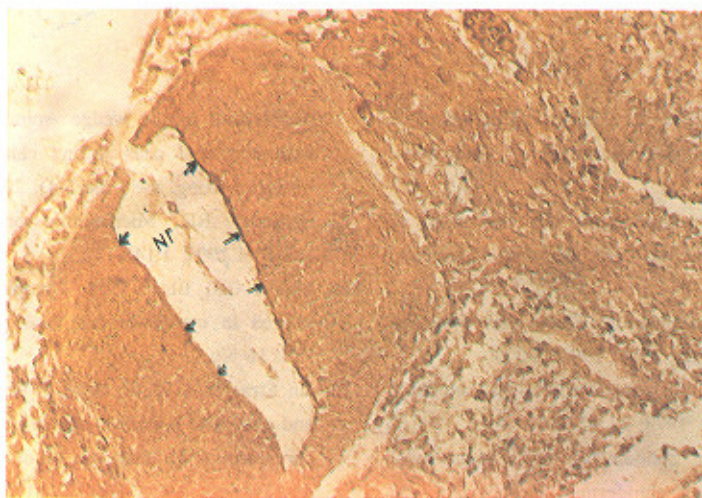
تصویر شماره ۲: مرحله ۶- صفحه عصبی، اجتماع میکروتوبولها رنگ قهوه‌ای نمایان هستند. هسته برنگی بنفش دیده می‌شود درشتنمایی $\times 1000$



تصویر شماره ۳: مرحله ۸- لوله عصبی، در حال تشکیل است. میکروتوبولها در طول لوله عصبی رنگ قهوه‌ای دیده می‌شوند درشتنمایی $\times 200$



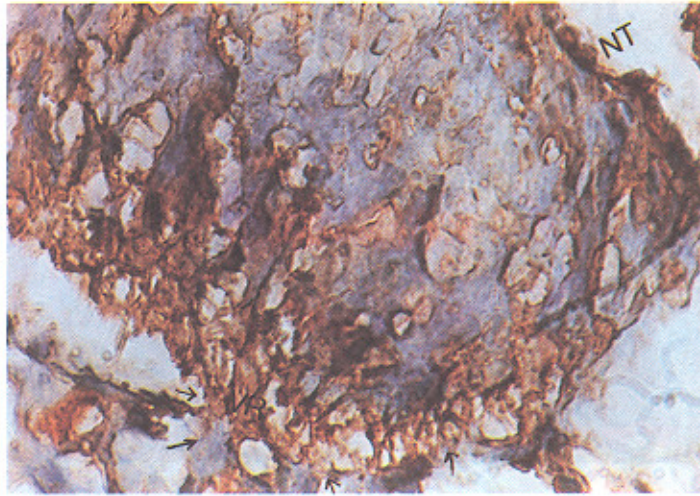
تصویر شماره ۴: مرحله ۸ - نودان عصبي، میکروگيلانستها برنگ قهوه‌اي تيره در زير غشاء نودان عصبي نمايان هستند. درشتنماي X۲۰۰



تصویر شماره ۵: مرحله ۱۰ - لوله عصبي در حال بسته شدن است. میکروگيلانستهاي زير غشاء و مجاور مجرای عصبي تجمع پيدا کرده‌اند که با فلش نشان داده شده‌اند. درشتنماي X۲۰۰



تصویر شماره ۶: مرحله ۱۰ - نوروفيلانستها در حاشيه لوله عصبي برنگ قهوه‌اي ديده مي‌شوند. درشتنماي X۲۰۰



تصویر شماره ۷ - مرحله ۱۲ - نوروبلاستهای مجاور ریشه قدامی لوله عصبی برنگ قهوه‌ای نمایان هستند. درشتنمایی X۱۰۰۰

مراجع

1. Fernandez IG, Chamorro CA. Effects of colchicine on the shape of chick neuroepithelial cells during neurulation. *Anatomical Record*. 1987;219 : 296-303.
2. Schoenwolf GC, Moe A. A reexamination of the role of microfilaments in neurulation in the chick embryo. *Anatomical Record* 1988; 220: 84-102.
3. Schoenwolf GC, Mechanisms of neurulation: Traditional viewpoint and recent advances. *Development* 1990; 109,243-370.
4. Armstrong PB, Parentid. Scanning electron microscopy of the chick embryo. *Developmental biology*. 1973; 33 457-462.
5. Ellis LE, Smith Alvarez IS, Schoenwolf GC. Monoclonal antibodies identifying subsets of ectodermal, mesodermal and endodermal cells ingastrulating and neurulating avian embryos. *Anta rec* 1993 ; 235(4): 591-603.
6. Schoenwolf GC. Shaping and bending of the avian neuroepithelium. *Morphometric/analyses Develop Biol* 1985; 109;127-139.
7. Gordon R. A review of the theories of vertebral neurulation and their relationship to the mechanism of neural tube birth defect. *Embr. & Gexpermental Morph Supplement* 1985; 229-255.
8. Bovolenta P, Dodd J. Guidance of commissural growth cones at the floor plate in embrionic rat spinal cord. *Development* 1990; 190:435-447.
9. Dahl D, Maggini-L, Gilad VH. Brain filament proteins in primary cultures derived from chick embryos early in development. *Int J Dev Neurosci*. 1993; 10(5):473-80.
10. Fujinaga M, Brow NA, Baden JM. Comparison of staging systems the gastrulation and early neurulation period in rodents: for proposed new system. *Teratology* 1992; 46(2):183-90
11. Schoenwolf GC. Cell movements during neurulation in avian embryos. *Dvelopment. Suppl* 1991; 2:157-68.
12. Fernandez JG, Chamorro CA, Paz P, Villay JM. Organell distribution in the wedge -spindle and inverted wedge shaped neuroepithelial cells during chick embryo neurulation. *Acta Morphol Hung*. 1988; 36(3-4): 203-13.
13. Brinkley BR. Microtubule organization centers. *Ann Rev ce'l Biol* 1995; 1:145-172.
14. Sujata GR, Bhisey AN. Cytoplasmic microtubule assembly is altered in cytoplasts cell biology. *International reports*, 1992; Vol. 16 No.3.
15. Van Straaten HW, Hekking J W, Consten C, Topp AJ. Intrinsic and extrinsic factors in the mechanism of neurulation. Effect of curvature of the body axis on closure of the posterior neuropore development. 1991; 114(3) : 1163-42.
16. Dodd J, Jessell TW. Axon guidance and patterning of neuronal projections in vertebrates. *Science* 1988; 242:692-299.
17. Akitaya T, Bronner, Fraser M. Expression of cell adhesion molecules during initiation and cessation of neural crest cell migration. *Dev Dyn* 1993; 194(1):12-20.
18. Altman J, Bayer SA. The development of the rat spinal cord. *Adv-Anat.Embryol Cell Biol*. 1984; 85:1-166.
19. Artinger KB, Bronner, Fraser M. Notochord grafts do not suppress formation of neural crest cells or commissural neurons. *Development*. 1992; 116(4):877-86.
20. Berry M, Mcconnel P, Sievers J. Dendritic growth and the control of neuronal form. *Curr Top Dov Biol* 1980; 15:67-101.
21. Van-Straaten WM, Hekking J W.M. Wiertz Thossels EL, Thors F, Drukker J. Effect of the notochord on the differentiation embryo. *Anat Embryol Ber*. 1988; 147 317-324.