نقش اسکلت سلولی در تشکیل لوله عصبی در جنین جوجه با استفاده از روش ایمونوپراکسیداز

دکتر طوبی مهران نیا، استادیار گروه تشریح، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی کرمانشاه
دکتر تقی الطریحی، استادیار پاتولوژی دانشگاه تربیت مدرس
دکتر عبدالفتاح صراف نژاد، استادیار ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تهران
دکتر یوسف محمدی، استاد جراحی و تشریح دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تهران

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

ABSTRACT

The effect and arrangement of cytoskeleton (microtubules,microfilamenis 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، میکروفیلامنتها، ونوروفیلامنتها) در تکامل لوله عصبی در جنین جوجه با استفاده از روش ایمونوپراکسیداز مورد بررسی قرار گرفته است. نتیجه نشان می‌دهد که میکروتوبولها در ناحیه اطراف هسته می‌باشند وحول محور طولی سلول کشیده می‌شوند.

همزمان با افزایش سن جنین، کشیدگی در سلولها بیشتر شده ودر نتیجه میکروتوبولها به صورت طولی در داخل سلول و در زیر غشا، قرار می‌گیرند وباعث کشیدگی سلولهای نورواپی‌تلیوم می‌شوند.

میکروفلامنتها در راس سلولهای اپی تلیوم به صورت دستجاتی تجمع پیدا کرده وباعث انقباض در کنار آزاد آنها می‌شوند. این عمل سبب بطری شکل (flask shape) شدن سلولها می‌شوند وآنها به طرف داخل انحناء پیدا می‌کنند.

نوروفیلامنتهانقش عمده‌ای در تشکیل لوله عصبی ندارند ودر مراحل پیشرفته تکامل عصبی موثر بوده ودر ارتباط با ریشه‌های عصبی نورونها 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

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-04]

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

لبه‌های ناودان عصبی به هم متصل شده ولوله عصبی (neural tube) را تشکیل می‌دهند. بررسی تکامل لوله عصبی ابتدا در دوزیستان 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 وسلولهای 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 نوروبلاستهایی دارد که در خارج از سلولها تقسیم شده‌اند.

عمل تکامل لوله عصبی (نورولاسیون) شامل دومرحله است (۸). ابتدا تغییر در شکل سلول وتبدیل سلولهای مکعبی به سلولهای استوانه‌ای نوروایی تلیال و مرحله‌بعدانقباض درراس سلول وایجاد حالت بطری شکل کشیده شدن سلولها درابتدای تکامل لوله عصبی صورت می‌گیرد وعلت 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 پیداکرده وباعث بطری شکل شدن آنها می‌شود(۹) به نظر می‌رسد این تغییر جدید در شکل سلول به علت فعالیت میکروفیلامنتهایی است که درزیر غشاء پلاسمایی کنار آزاد سلولها به صورت دستجاتی موازی قرارمی‌گیرند. نوروفیلامنتها نیز در ارتباط با استطاله‌های نورونها هستند (۱۰) و درمراحل پیشرفته تکامل لوله عصبی نمایان می‌شوند. "Tonsney & Oakley" پیشنهاد کردند که مزانشیم اطراف نوتوکورد مانند یک ناقل در رشد وخروج استطاله‌های نورونهاموثر است.

مواد وروشها

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 ـ۱ (از کلون موش DMIA و ایزوتیپ IgG) شماره کارخانه T-9026
- آنتی بادی مونوکلونال علیه بتا توبولین (ازکلون موش TUB 2-1 و ایزوتیپ IgG) شماره کارخانه T - 4026
- آنتی بادی مونوکلونال علیه آکتین ۳ (ازکلون 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 ورطوبت حدود ۶۰درصد قرار داده شدند . جنینها در مراحل ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ جمع آوری شدند (۴) ودر دوگروه‌مورد بررسی قرار گرفتند.

۱- گروه اول : پس از جمع آوری نمونه‌ها طی مراحل مختلف تکنیک میکروآناتومی (فیکس کردن، آبگیری ، شفاف کردن، قالب گیری) از آنها مقاطعی به ضخامت ۵ میکرومتر بطور سریال گرفته وبه طریقه H&E رنگ آمیزی شدند. این آزمایش جهت بررسی کلی تشکیل لوله عصبی ومقایسه باگروه اصلی انجام شده است .

۲- گروه دوم : این گروه نمونه‌اصلی 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 آبگیری ، شفاف کردن وقالب گیری در پارافین ، از آنها مقاطع عرضی به صورت سریال به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه شد . از این نمونه‌ها جهت مطالعه ایمونوهیستوشیمیایی استفاده گردید.

پس از آبگیری اسلاید، آنها را به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه جهت بلوکه کردن پراکسیداز درون بافت در محلول ۱درصد هیدروژن پراکسیداز در متانول قرار داده، سپس آنها را درمحلول فسفات بافرمالین ۰/۱ مولار و P.H=۷/۴ شستشو دادیم. ومدت ۵ دقیقه در محلول P.B.S قرار دادیم . سپس اسلایدهارا بیرون آورده وخشک کردیم آنتی بادیهای مورد نظر را با محلول P.B.S به رقتهای 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 اطاقک 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 وروی آنها "Antimouse IgG" کونژوگه‌پراکسیداز ریختیم و به مدت ۳۰ دقیقه مجدداً در اتاقک مرطوب قرار دادیم. بعد از بیرون آوردن اسلایدها ، آنهارا در بافر ۰/۱ مولار"Tris-Hcl" با PH=۷/۶ قرار دادیم . بعد از این مرحله نمونه‌ها رادر محلول دی آمنیوبنزیدین (D.A.B) به مدت ده دقیقه جهت نمایان شدن کمپلکس آنتی بادی قرار دادیم.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-04]

جدول شماره (۱) آنتی بادیهایی که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

شماره تولید کارخانه	رقت
T= ۹۰۲۶	$\frac{۱}{۵۰۰}$
T= ۴۰۲۶	$\frac{۱}{۱۰۰}$
A= ۱۸۰۴	$\frac{۱}{۱۰۰}$
N= ۵۱۴۹	$\frac{۱}{۴۰۰}$

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 سلولیبر تشکیل لوله عصبی مورد بررسی قرار گرفته بود (۳، ۱۱، ۱۲، ۱۳) ودر این پروژه با استفاده از آنتی بادیهای مختلف مورد نظر ، این اثر را در مراحل مختلف در جنین جوجه مورد مطالعه قرار دادیم ونظرات فوق تایید شد.

در این پروژه پدیده تشکیل لوله عصبی در جنین در مراحل مختلف مورد بررسی قرار گرفته‌است . عمل تکامل لوله عصبی با دوتغییر در شکل سلول همراه است . کشیده شدن سلولهای نوروایی‌تلیومی وتبدیل به سلولهای استوانه‌ای وانقباض در راس سلول که باعث بطری شکل شدن سلولها در ابتدای تکامل لوله عصبی می‌شود و درنهایت منجر به بسته شدن لوله عصبی می‌گردد. این شواهد با مطالعات انجام شده (۳ ، ۱۲) در این تحقیق مطابقت دارد ومطالعات 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 نورونها(سیتواسکلتونها) به تنهایی در عمل تشکیل لوله عصبی موثر هستند. میکروفیلامنتهای موجود در سلول باعث انقباض در راس سلولهای نوروایی‌تلیومی هستند ومیکروتوبولها نیز که یکی از عناصر اسکلت سلولی می‌باشند، در تعیین شکل سلول موثر بوده و در حین تکامل لوله عصبی باعث کشیده شدن سلولها وتبدیل اپیتلیوم استوانه‌ای می‌شوند . این تحقیق نیز قبلاً انجام شده است (۱۴) لذا این پروژه برای پی بردن دقیق‌بر نقش اسکلت سلولیدر تکامل لوله عصبی با استفاده از آنتی‌بادیهای مختلف انجام شده است . با بررسی نتایج حاصل شده از این تحقیق ومقایسه آن با تحقیقات انجام شده در مراکز علمی جهان می‌توانیم ادعا کنیم که عوامل داخل سلولی (سیتواسکلتونها) در تشکیل لوله عصبی نقش دارند. نوروفیلامانتهانیز که بعد از تکامل لوله عصبی ظاهر می‌شوند، در ارتباط با ریشه نورنها هستند (۱۶، ۱۷).

نتیجه

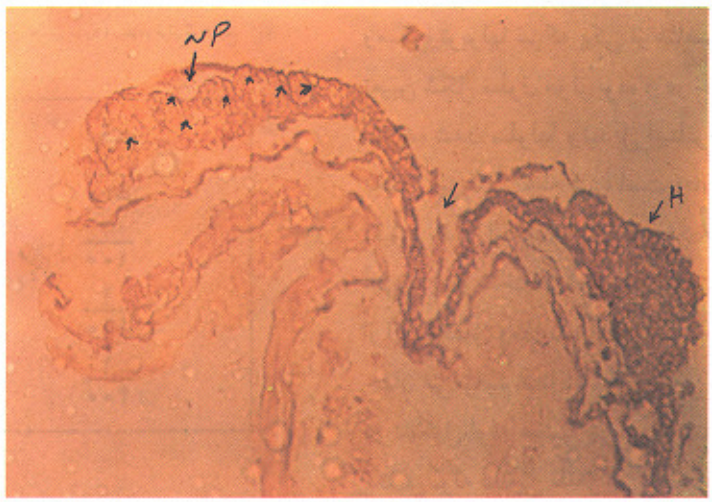
دراین پروژه مراحل مختلف تشکیل لوله عصبی در جنین جوجه را با استفاده از روش ایمونوپراکسیداز مورد نظر و بررسی قرار داده‌ایم که نتایج زیر در موردچگونگی آرایش اسکلت سلولی به هنگام تشکیل لوله عصبی به دست آمده است :

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 وتبدیل آنها از حالت مکعبی به استوانه‌ای می‌شود(تصویرهای ۱، ۲، ۳).

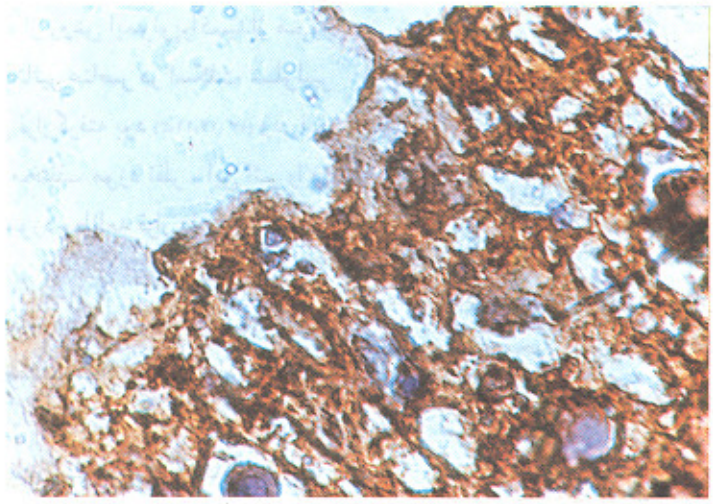
۲- میکروفیلامنتها نیز عموماً در زیر غشاء پلاسمایی و در راس سلولها تجمع پیدا کرده و سبب انقباض درکنار آزاد سلولها می‌شوند و در نتیجه صفحه عصبی گودتر می‌گردد. این امر باتکامل لوله عصبی منجر به بسته شدن آن می‌شود (تصویرهای ۴ و ۵).

۳- نوروفیلامنتها در مراحل اولیه تشکیل لوله عصبی دیده نمی‌شوند ، بنابراین نقشی در تشکیل آن نداشته ولی پس از تشکیل لوله عصبی درحاشیه آن ظاهر می‌گرددو با افزایش سن جنین ، مقدار آنها نیز افزایش می‌یابد وبیشتر در محل خروج ریشه‌های قدامی و خلفی اعصاب قابل رؤیت هستند (تصویرهای ۶ و ۷).

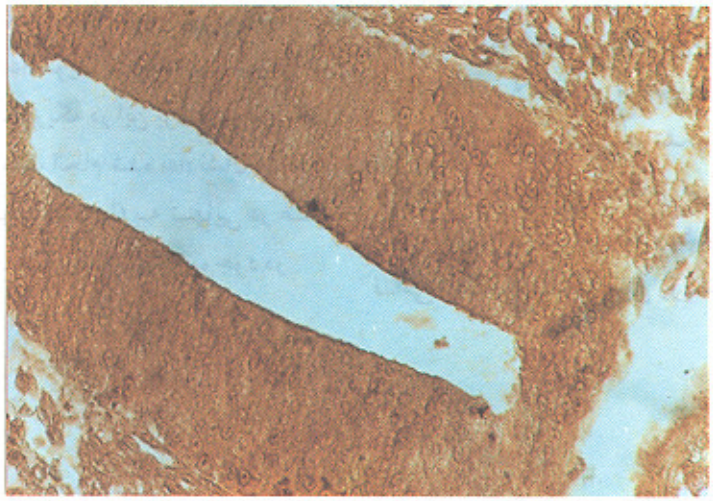
[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-04]



تصویر شماره ۱: مرحله ۶- صفحه عصبی را نشان می‌دهد. فلشها محل تجمع میکروتوبولها را مشخص می‌کند. NP- صفحه عصبی H- کرد هسته درشتنمایی X۱۶۰



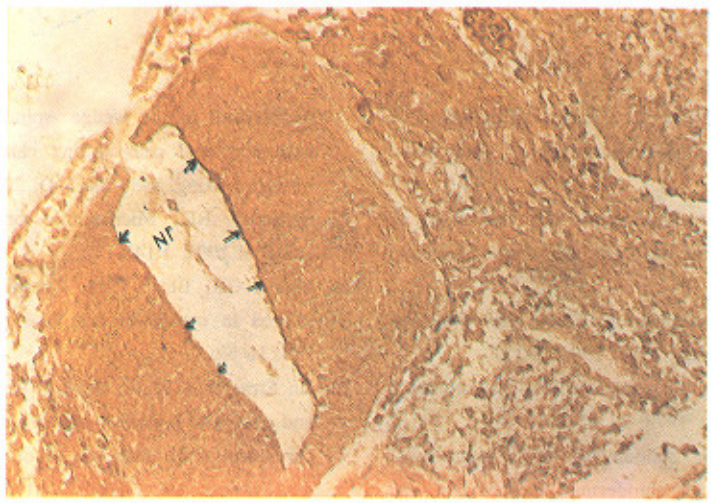
تصویر شماره ۲: مرحله ۷- صفحه عصبی، اجتماع میکروتوبولها برنگ قهوه‌ای تیره‌ای بصورت هسته‌ای مختلف دیده می‌شوند درشتنمایی X۱۰۰۰



تصویر شماره ۳: مرحله ۸ - لوله عصبی، در حال تشکیل است. میکروتوبولها در طول لوله عصبی برنگ قهوه‌ای دیده می‌شوند درشتنمایی X۴۰۰

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-04]

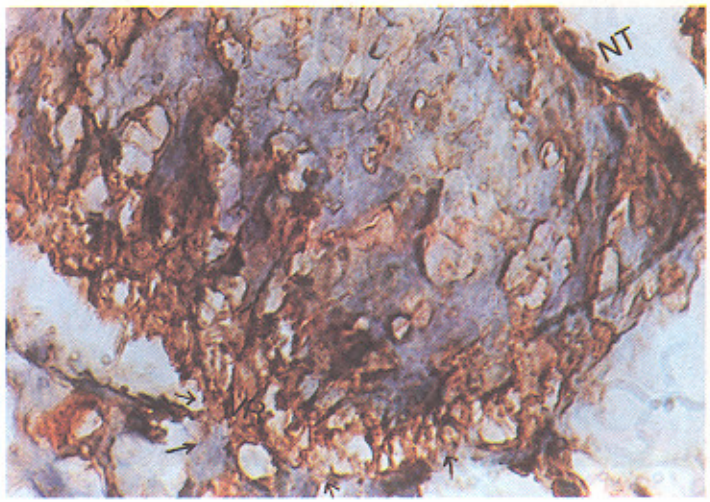
تصویر شماره ۴: مرحله ۸ - ناودان عصبی، میکروفیلامنتها برنگ قهوه‌ای تیره در زیر غشاء ناودان عصبی نمایان هستند. درشتنمایی X۲۰۰



تصویر شماره ۵: مرحله ۱۰ - لوله عصبی در حال بسته شدن است میکروفیلامنتهای زیر غشاء و مجاور مجرای عصبی تجمع پیدا کرده‌اند که با فلش نشان داده شده‌اند. درشتنمای X۲۰۰

تصویرشماره ۶: مرحله ۱۰ - نوروفیلامنتها در حاشیه لوله عصبی برنگ قهوه‌ای دیده می‌شوند. درشتنمایی X۲۰۰

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-04]



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

مراجع

1. Fernandez IG, chamorr CA . Effects of colchicine on the shape of chick neuroepithelial cells during neurulation. Anatomical Record. 1987;219 : 296-303.

2.Schoenwolf GC, Moe A. Areexamination of the role of microfilements in neurulation in the chick embryo .Anatomical Record 1988; 220: 84-102.

3.Schoenwolf GC, Mechanisms of nerulation: Traditional viewpoint and rceent advances. Development 1990; 109,243-370.

4. Armstrong PB,Parentid. Scaning electron microscopy of the chick embryo . Developmental biolgy. 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.& Gexperimental 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, Chamarro CA, Paz P, Villay JM. Organell distribution in the wedge -spindle and inverted wedge shaped neuroepithelial cells during chick embryo neurolation . 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. Intrinic and extrinssic factors in the mechanism of neurolation. Effect of curvature of the body axis on clousre 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. D'ukker J. Effect of the notochord on the differentiation embryo. Anat Emboryol Ber. 1988; 147 317-324.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-04]