

باسمه تعالی



دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی

گرایش علوم جانوری - سلولی تکوینی

بیان فاکتور رشد اندوتلیال عروق خونی (VEGF) در مایع آمنیوتیک در طی رشد و نمو جنینی

ارائه دهنده:

شریعت ظهیری بررسی

استاد راهنما:

جناب آقای دکتر فرهاد مشایخی

اساتید مشاور:

جناب آقای دکتر علی نیک پی

جناب آقای دکتر ابراهیم میرزاجانی

شهریور ۸۹

تقدیم به همسر عزیزم مهندس مهدی امیری نظری
که همواره مشوق و حامی من بوده اند.

پروردگارا از تو سپاسگزارم که نعمت فراگیری دانش را به ما عطا نمودی

نور هدایتت را به قلبهایمان بتابان

با تقدیر و تشکر از استاد راهنمای عزیزم جناب آقای دکتر فرهاد مشایخی که دلسوزانه در تمامی مراحل کار یاریم نمودند.

با تشکر از استاد عزیزم سرکار خانم دکتر صالحی که راهنمایی هایشان را از من دریغ ننموده و داوری دفاعیه را پذیرفتند.

از استاد مشاور محترم جناب آقای دکتر علی نیک پی نیز به خاطر راهنمایی هایشان سپاسگزارم.

همچنین از استاد مشاور گرامی جناب آقای دکتر ابراهیم میرزاجانی که در انجام آزمایشات یاریم نمودند سپاسگزارم.

از جناب آقای دکتر حمیدرضا وزیری که زحمت داوری را پذیرفته و در طی کار راهنمایی ام نمودند کمال تشکر را دارم.

با تشکر از پدر و مادر عزیزم که همواره برای موفقیتم تلاش کردند.

از دوستان و همکلاسی های عزیزم، به ویژه خانم مهدیه صادقی و خانم سیده زهرا حسینی بسیار ممنونم که در طی مراحل کار همواره یاریم کردند.

فهرست

عنوان.....	صفحه
چکیده فارسی.....	د
چکیده انگلیسی.....	ذ
فصل اول: مقدمه	
۱- اهمیت بررسی مایع آمنیوتیک.....	۲
۲-۱ تکامل تکوین جفت و پرده های خارج جنینی.....	۳
۳-۱ تکوین پرده های خارج جنینی و عروق زایی کیسه زرده در جوجه.....	۳
۱-۳-۱ کوریون.....	۳
۲-۳-۱ آلانتوئیس.....	۴
۳-۳-۱ کیسه زرده.....	۶
۱-۳-۳-۱ نحوه ایجاد رگها روی کیسه زرده.....	۷
۲-۳-۳-۱ باز آرای عروق کیسه زرده.....	۸
۴-۳-۱ آمنیون.....	۹
۴-۱ برخی از اعمال پرده های خارج جنینی.....	۹
۱-۴-۱ عمل اندوکرنی پرده های خارج جنینی.....	۹
۲-۴-۱ انقباض آمنیون و کیسه زرده در جنین جوجه.....	۱۰
۵-۱ مایع آمنیوتیک در جنین جوجه.....	۱۰
۶-۱ ترکیب بیوشیمیایی مایع آمنیوتیک و تنظیم آنها توسط سدهای موجود.....	۱۱
۱-۶-۱ ترکیب شیمیایی مایع آمنیوتیک در جنین انسان.....	۱۱
۲-۶-۱ تنظیم مواد در مایع آمنیوتیک و آلانتوئیک جنین جوجه و نقش سدهای موجود.....	۱۳
۷-۱ فیزیولوژی مایع آمنیوتیک.....	۱۴
۱-۷-۱ منابع تولید مایع آمنیوتیک.....	۱۵
۲-۷-۱ مکانیسم های کنترل حجم مایع آمنیوتیک.....	۱۵

- ۸-۱ سایتوکاین های موجود در مایع آمنیوتیک و اهمیت آنها در تکوین جنین ۱۵
- ۱-۸-۱ اعمال فاکتور رشد انسولین مانند نوع ۱ (IGF-1 = Insulin-like growth factor-I) ۱۵
- ۲-۸-۱ اعمال فاکتور مهار کننده لوکمیا (LIF = Leukaemia inhibitory factor) ۱۶
- ۳-۸-۱ اعمال فاکتور رشد اپیدرمی (=EGF Epidermal growth factor) : ۱۶
- ۴-۸-۱ اعمال $TGF-\beta$ ۱۶
- ۵-۸-۱ اعمال فاکتور نکروز تومور ($TNF\alpha$ =tumor necrosis factor alpha) ۱۶
- ۶-۸-۱ اعمال آلفا فیتو پروتئین (Alpha-fetoprotein) ۱۷
- ۹-۱ ساختمان ژن VEGF و ساختار ایزوفرم های این پروتئین ۱۸
- ۱-۹-۱ بیوشیمی ایزوفرم های اصلی VEGF ۱۹
- ۲-۹-۱ حفاظت تکاملی از پردازش افتراقی در تکامل جوجه ۲۰
- ۱۰-۱ محل های بیان VEGF در بافتهای جنینی ۲۱
- ۱۱-۱ گیرنده های VEGF ۲۱
- ۱-۱۱-۱ سیگنال دهی از طریق گیرنده های VEGF در تکوین مهره داران ۲۱
- ۲-۱۱-۱ مکانیسم فعالسازی گیرنده های VEGF ۲۲
- ۳-۱۱-۱ محلهای بیان گیرنده های VEGF در بافتهای جنینی ۲۲
- ۱۲-۱ تنظیم تولید VEGF ۲۳
- ۱-۱۲-۱ اثر اکسیژن روی بیان VEGF ۲۳
- ۲-۱۲-۱ تنظیم VEGF به وسیله نیتریک اکساید (Nitric oxid = NO) : ۲۳
- ۳-۱۲-۱ اثر گلوکز روی بیان VEGF : ۲۳
- ۴-۱۲-۱ اثر سایر فاکتورهای رشد روی بیان VEGF ۲۳
- ۵-۱۲-۱ اثر اینترلوکین-4 روی تولید VEGF در فیبروبلاستهای سینوویال روماتوئیدی ۲۴
- ۱۳-۱ VEGF و گیرنده های آن در مایعات بدن ۲۴
- ۱-۱۳-۱ VEGF و گیرنده های آن در مایع آمنیوتیک ۲۴
- ۲-۱۳-۱ VEGF و گیرنده های آن در خون ۲۵
- ۱۴-۱ اعمال VEGF ۲۶

- ۱-۱۴-۱ ارتباط بین VEGF و جذب مایع آمنیوتیک از طریق غشا..... ۲۶
- ۲-۱۴-۱ میانجی کننده های بیان VEGF در جفت و پرده های جنینی..... ۲۶
- ۱-۲-۱۴-۱ منبع میانجی کننده ها..... ۲۷
- ۲-۲-۱۴-۱ جریان خون پرده ها و جذب آمنیوتیک ۲۷
- ۳-۱۴-۱ انتقال و جریان از طریق پرده ها..... ۲۷
- ۴-۱۴-۱ نقش VEGF در ایجاد و حفظ رگهای خونی..... ۲۸
- ۱-۴-۱۴-۱ مکانسیم های پایه ای تشکیل رگها..... ۲۸
- ۲-۴-۱۴-۱ فاکتورهای رشد آنژیوژنیک..... ۲۹
- ۵-۱۴-۱ نقش VEGF در اندام زایی..... ۳۳
- ۱-۵-۱۴-۱ VEGF و تکوین اندام های مشتق از اندودرم..... ۳۳
- ۲-۵-۱۴-۱ VEGF و تکوین اندامهای مشتق از مزودرم..... ۳۴
- ۳-۵-۱۴-۱ VEGF و تکوین اندامهای مشتق از اکتودرم..... ۳۶
- ۶-۱۴-۱ عملکرد VEGF در سیستم تولید مثلی ماده..... ۳۷
- ۱۵-۱ هدف از انجام تحقیق..... ۳۸

فصل دوم: مواد و روشها.....

- ۱-۲ لیست دستگاه های مورد استفاده..... ۴۰
- ۲-۲ تهیه نمونه ها..... ۴۱
- ۳-۲ اندازه گیری غلظت کل پروتئین..... ۴۲
- ۱-۳-۲ تهیه استوک..... ۴۲
- ۲-۳-۲ تهیه محلول های استاندارد..... ۴۲
- ۳-۳-۲ آماده سازی نمونه ها..... ۴۳
- ۴-۲ انجام الیزا..... ۴۴

فصل سوم: نتایج.....

- ۱-۳ سنجش غلظت کلی پروتئین در مایع آمنیوتیک..... ۴۸

۲-۳ بررسی غلظت VEGF در مایع آمنیوتیک..... ۵۳

۳-۳. مقایسه عروق کیسه زرده طی تکوین جنین جوجه..... ۵۶

..... فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

۱-۴ بحث و نتیجه گیری ۵۹

پیشنهادات ۶۲

..... فصل پنجم: منابع

منابع..... ۶۴

فهرست شکل ها

- شکل ۱-۱ ترسیم شماتیک از پرده های جنینی جوجه..... ۵
- شکل ۲-۱ عروق خونی ایجاد شده روی کیسه زرده و آلانتوئیس..... ۷
- شکل ۳-۱ اولین مکانهای خونسازی در جنین..... ۸
- شکل ۴-۱ پردازش افتراقی و ایجاد ایزوفرم های مختلف VEGF..... ۱۸
- شکل ۵-۱ موقعیت های متفاوت سه ایزوفرم VEGF..... ۲۰
- شکل ۶-۱ گیرنده های تایروزین کینازی و غیر تایروزین کینازی VEGF..... ۲۲
- شکل ۷-۱ نقش ژنهایی که بیان آنها در مراحل مختلف ایجاد عروق ضروری است..... ۳۱
- شکل ۸-۱ مکانیسم های تکوین شش و نقش VEGF..... ۳۴
- شکل ۹-۱ نقش VEGF در تکوین استخوان به صورت داخل غضروفی..... ۳۵
- شکل ۱۰-۱ نقش VEGF مشتق شده از سلولهای شوان در سیستم عصبی..... ۳۷
- شکل ۱-۲ شیوه ساختن محلول های استاندارد از محلول استوک VEGF استاندارد..... ۴۵
- شکل ۱-۳ منحنی جذب - غلظت استاندارد..... ۴۹
- شکل ۲-۳ غلظت کلی پروتئین در مایع آمنیوتیک در روزهای مختلف جنینی..... ۵۱
- شکل ۳-۳ تغییرات غلظت VEGF در روزهای مختلف جنینی..... ۵۴
- شکل ۴-۳ تصویر جنین جوجه ۵ روزه و رگهای روی کیسه زرده..... ۵۶
- شکل ۵-۳ تصویر جنین جوجه ۸ روزه و رگهای کیسه زرده..... ۵۶
- شکل ۶-۳ تصویر جنین جوجه ۱۲ روزه و رگهای کیسه زرده..... ۵۷
- شکل ۷-۳ تصویر جنین جوجه ۱۵ روزه و رگهای کیسه زرده..... ۵۷

فهرست جداول

جدول ۱-۳	جدول ۱-۳ جذب محلول استاندارد.....	۴۸
جدول ۲-۳	میانگین غلظت کلی پروتئین در روزهای مختلف جنینی.....	۵۰
جدول ۳-۳	آزمون T-test بین غلظتهای کل پروتئینی در روزهای مختلف.....	۵۲
جدول ۴-۳	غلظت VEGF در مایع آمنیوتیک طی روزهای ششم تا پانزدهم جنینی.....	۵۳
جدول ۵-۳	آزمون T-test بین غلظت VEGF در روزهای مختلف.....	۵۵

بیان فاکتور رشد اندوتلیالی عروق خونی (VEGF) در مایع آمنیوتیک در طی رشد و نمو جنین جوجه

چکیده:

ایجاد رگهای خونی از سلولهای اندوتلیال شامل دو مرحله واسکولوژنز و آنژیوژنز است. واسکولوژنز فرآیندی است که طی آن پیش سازهای سلولهای اندوتلیال عروق (آنژیوبلاستها) تکثیر و تمایز پیدا می کنند تا رگهای خونی اولیه را شکل دهند. شکل گیری شبکه عروقی یا آنژیوژنز در نتیجه ی جوانه زدن یا منشعب شدن رگهایی ایجاد میشوند که از قبل وجود دارند. واسکولوژنز توسط سیگنال های پاراکرین تنظیم می شود. از میان فاکتورهایی که موجب واسکولوژنز و آنژیوژنز می شوند، اعضای خانواده فاکتور رشد اندوتلیال عروق (Vascular endothelial growth factor=VEGF) و گیرنده های آنها قویترین محرک مستقیم رشد سلولهای اندوتلیال عروق است. تاکنون مشخص شده است که VEGF در جفت، مایعات بیولوژیک، و در بافتهای جنینی مختلف بیان می شود. هدف از این مطالعه اندازه گیری غلظت کل پروتئین ها و بیان VEGF در نمونه های مایع آمنیوتیک جنین جوجه با استفاده از روش Bio-Rad protein assay و Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) و ارتباط آن با تکوین عروق خونی در کیسه زرده است. افزایش قابل توجهی در غلظت VEGF در روز چهارم جنینی دیده میشود که با شکل گیری عروق خونی در کیسه زرده همزمان است و سپس میزان آن از روز پنجم تا روز دهم افزایش نشان داد. از آنجایی که VEGF در شکل گیری رگهای خونی مهم است، تغییر در بیان VEGF در مایع آمنیوتیک طی تکوین جنینی جوجه ممکن است با شکل گیری رگهای خونی در کیسه زرده مرتبط باشد. همچنین نتیجه گیری می شود که VEGF به عنوان یک ترکیب دائمی در مایع آمنیوتیک در طی رشد و نمو جنینی جوجه وجود دارد. کلمات کلیدی: فاکتور رشد اندوتلیال عروق، مایع آمنیوتیک، جنین جوجه

Vascular endothelial growth factor expression in the amniotic fluid during early chick embryonic development

Abstract :

Embryonic development of blood vessels from endothelial cells consists of vasculogenesis and angiogenesis. Vasculogenesis is a process by which vascular endothelial cell precursor, angioblasts, proliferate and differentiate to form primitive blood vessels. Vascular network formation, or angiogenesis, subsequently occurs as a result of sprouting or branching from pre-existing vessels. Vasculogenesis regulated by paracrine signals. Among the vasculoangiogenic factors, vascular endothelial growth factor (VEGF) family members and their receptors are known to be critical for vasculoangiogenesis. VEGF is the most potent direct stimulator for vascular endothelial cell growth. VEGF is known to be expressed in the placenta, biological fluids and in several fetal tissues. The aim of this study was to measure total protein concentration and VEGF expression in amniotic fluid samples from chick embryos using a Bio- Rad protein assay and Enzyme –linked immunosorbent assay (ELISA) and its relation to blood vessel formation in yolk sac. There was a rapid increase in VEGF concentration on embryonic day4 (E4) which, coincide with the blood vessels formation in the yolk sac and thereafter the levels increased from E5 to E10. Since VEGF is important in blood vessels formation, changes in VEGF expression in amniotic fluid during chick embryonic development may be correlated with the formation of blood vessels in the yolk sac. It is also concluded that VEGF is a constant component of the amniotic fluid during chick embryonic development.

Key words: VEGF, amniotic fluid, chick embryo

مقدمه

۱-۱) اهمیت بررسی مایع آمنیوتیک :

مایع آمنیوتیک درون کیسه آمنیون و در اطراف جنین در آمنیون داران قرار دارد. این مایع از پلاسما منشاء گرفته و از نظر بیوشیمیایی مشابه خون می باشد. اکثر ترکیبات خون قادر است به مایع آمنیون وارد شوند. به طور معمول ترکیب شیمیایی مایع آمنیوتیک تا حدودی منعکس کننده ترکیب شیمیایی خون و فرایندهای بیوشیمیایی جنین است. مایع آمنیوتیک همچنین توسط جنین بلعیده شده و مواد موجود در آن به جنین وارد می شود. و حتی در تکوین ریه ها و دستگاه گوارش نقش دارد. یکی از فرایندهای مهم در طی رشد و نمو جنین پرندگان، ایجاد رگهای خونی بر روی کیسه زرده می باشد و فاکتور رشد اندوتلیال رگی ($\text{Vascular endothelial growth factor} = \text{VEGF}$) نقش مهمی در این فرایند دارد؛ لذا در این تحقیق به بررسی میزان این فاکتور در مایع آمنیوتیک جنین جوجه پرداخته شده است. بنابراین در این قسمت درباره نحوه ایجاد پرده های جنینی پرداخته می شود.

۱-۲) تکامل تکوین جفت و پرده های خارج جنینی:

ایجاد کیسه آمنیون از دیدگاه فیلوژنی و انتوژنی بسیار با اهمیت است. این امر باعث می شود تا جانوران بتوانند جنین خود را در محیط خشکی رشد و پرورش دهند. ماهیان در آب تخم گذاری می کنند و لذا هیچ خطری در مورد خشک شدن سلول تخم آنها وجود ندارد. تخم ماهیان به وسیله غشایی احاطه شده که اجازه تبادل گازهای متابولیک و سایر مواد دفعی را می دهد. دوزیستان که ماهیان تکامل یافته اند به خشکی آمدند؛ آنها سازگاری زیادی با خشکی پیدا کردند. اما برای تولید مثل به آب وابسته هستند. خزندگان این مشکل را حل کردند و برای ۱۵۰ میلیون سال موجودات غالب این سیاره بودند. رمز موفقیت آنها تخم آمنیوتیک بود. تخم آمنیوتیک اثر زیادی روی مسیر تکوینی مهره داران داشته است. خزندگان، پرندگان و پستانداران آمنیون داران (Amniotes) نامیده می شوند [۱].

تخم آمنیوتیک خود شامل یک محیط آبی است که اجازه می دهد آمنیون داران در خارج از آب تولید مثل کنند. پرده های خارج جنینی متابولیسم جنین را حفظ کرده و از جنین محافظت می کنند. لقاح در این گروه داخلی است. تخم در رحم تکوین پیدا می کند؛ سپس به وسیله سفیده (شامل ۸۰٪ آب و ۲۰٪ آلبومن) و یک پوسته (shell) شامل فیبر های کراتینی برای تبادل گاز، احاطه می شود. آلبومن و زرده مواد محدود مورد نیاز برای تکوین جنین را تامین می کند. در برخی از آمنیون داران بلاستودیسک در بالای حجم زیادی از زرده تکوین پیدا می کند. لایه های بافتی از بدن جنین گسترش می یابند تا پرده های خارج جنینی را شکل دهند. سلوم خارج جنینی بین جنین و

کیسه زرده شکل می گیرد. لایه های اکتودرم و مزودرم چین های کوریوآمنیوتیک را شکل می دهند که دور جنین رشد کرده و در بالای آن به هم می رسند. لایه داخلی آمنیون است که جنین را احاطه می کند. مایع آمنیوتیک در داخل حفره آمنیون تجمع می یابد تا یک محیط مایع را برای جنین فراهم کند. لایه خارجی کوریون نامیده می شود که جنین و کیسه زرده دو لایه ای (مزودرم ، اندودرم) را احاطه می کند. به محض تکوین جنین پایک زرده ای شکل می گیرد. رگهای خونی از مزودرم اسپلانکتیک کیسه زرده ایجاد می شوند و به سمت داخل جنین می روند. این رگها مواد سفیده و زرده را برای جنین تامین می کنند. آلتوتویس یک فرو رفتگی روده ای اولیه (آرکترون یا گاستروسل) است که سلوم خارج جنینی را پر می کند. کیسه آلتوتویس دارای رگ است، بنابراین بعد از شکل گیری رگهای خونی ایجاد می شود. در مقابل آمنیون و کوریون فاقد رگ هستند. آلتوتویس به کوریون متصل می شود تا غشای کوریو آلتوتویک را شکل دهد. غشای کوریو آلتوتویک اجازه تبادل مواد را می دهد و این امکان از طریق پوسته و نیز به کمک رگهای موجود در آلتوتویس فراهم می شود.

اجداد پستانداران خزندگان بودند که تخم آنها ماکرولسییتال و دارای پوسته (shell) بود. سلول تخم انسان در رحم تکوین می یابد و میکروولسییتال بوده و نیاز های تغذیه ای جنین توسط مادر تامین می شود. لایه خارجی بلاستوسیست تروفوبلاست را شکل می دهد و همولوگ با اکتودرم کوریونی خزندگان و جنین پرندگان است. تروفوبلاست پیش ساز بخش جنینی جفت است. سلولهای اندودرمی در بخش پایینی بلاستوسیست به صورت جانبی-شکمی رشد می کنند تا کیسه زرده را شکل دهند. حفره آمنیون در بخش پشتی توده سلولی داخل جنینی (Inner Cell Mass= ICM) تشکیل می شود که شامل اندودرم و اکتودرم است. در این مرحله از تکوین، جنین وارد فاز نورولاسیون می شود که مزودرم تمایز می یابد و جنین از کیسه زرده جدا می شود. مزودرم اطراف آمنیون و کیسه زرده گسترش می یابد. پایک باقی مانده جنین را به تروفوبلاست اکتودرمی متصل کند. مزودرم از طریق پایک گسترش می یابد تا زیر تروفوبلاست کوریون را شکل دهد. پرده آلتوتویک از بخش پشتی آرکترون رشد کرده در انسان کوچک می ماند، اما اجازه می دهد جفت دارای رگ شود. بنابراین جفت همولوگ با غشای کوریوآلتوتویک خزندگان و پرندگان است. بنابراین ایجاد پرده های خارج رویانی در طی تکامل جانوران باعث تغییراتی در روش های تولید مثلی و رشد و نمو جنینی می شود [۱].

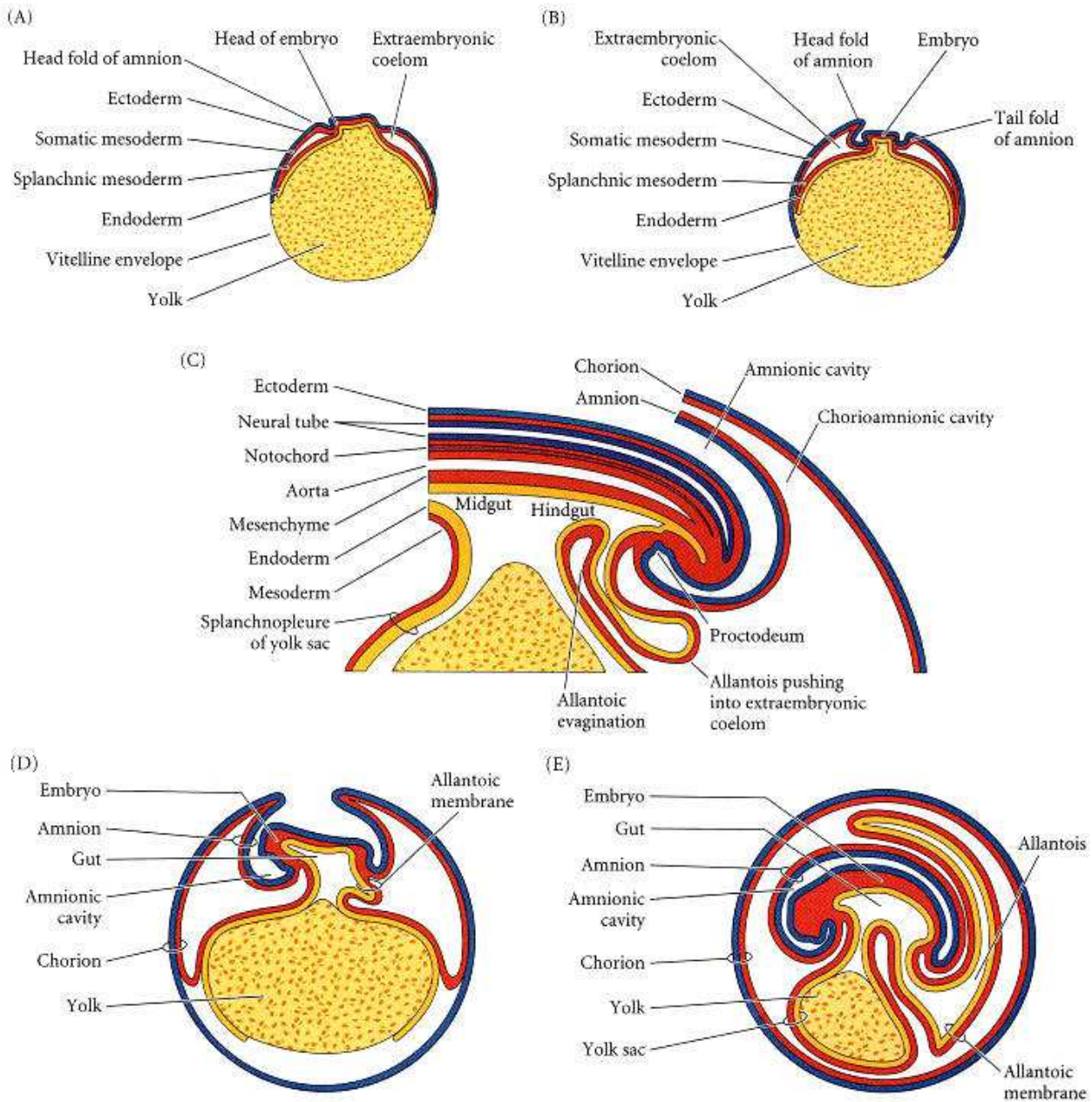
۳-۱) تکوین پرده های خارج جنینی و عروق زایی کیسه زرده در جوجه:

۱-۳-۱) کوریون

کوریون از بافت‌هایی که ادامه آمنیون هستند، شکل می‌گیرد. این شامل یک لایه خارجی اکتودرم در مجاورت غشای پوسته داخلی و یک مزودرم فاقد رگ داخلی است. سرانجام این مزودرم با مزودرم دارای رگ آلتوتوئیس ادغام می‌شود تا رگهای خونی را فراهم کند و شکل دهنده کوریو آلتوتوئیس باشد. در روز یازدهم پس از انکوباسیون آلتوتوئیس به طور کامل کوریون را فرا گرفته و کوریو آلتوتوئیس ۹۸٪ از مساحت غشاهای پوسته تخم را می‌پوشاند. بنابراین به عنوان سطح تنفسی اولیه برای جنین طی نیمه دوم انکوباسیون عمل می‌کند [۲].

۱-۳-۲) آلتوتوئیس:

در روز دوم انکوباسیون، آلتوتوئیس یک جوانه کوچک از سلول های اندودرمی است و در روز چهارم به صورت یک کیسه آزاد و در حال رشد از لوله گوارش پستی اولیه قابل مشاهده است. در شکل ۱-۱ تصویر شماتیک این پرده خارج جنینی آورده شده است [۳]. بخش داخلی آن اندودرم و سطح خارجی آن مزودرم فاقد رگ است که به سمت داخل گسترش می‌یابد و در روز ششم انکوباسیون مزودرم دارای رگ با کوریون و نیز با مزودرم فاقد رگ آمنیون ادغام می‌شود. ادغام مزودرم دارای رگ با کوریون منجر به تشکیل کوریو آلتوتوئیس می‌شود. بنابراین آلتوتوئیس سیستم خونی را برای کوریو آلتوتوئیس و آمنیون فراهم می‌کند. آلتوتوئیس پر از مایع و محلی برای دفع مواد در کلیه است که اولین بار در روز پنجم پس از انکوباسیون ظاهر می‌شود و از طریق مجرای آلتوتوئیک از ناحیه کلوآکی لوله گوارش پستی وارد می‌شود [۲].

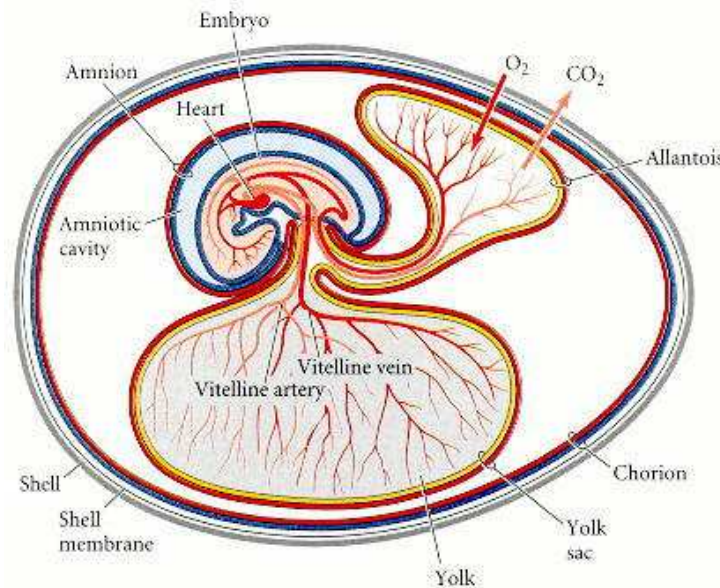


شکل ۱-۱) ترسیم شماتیک از پرده های جنینی جوجه. (A) جنین دو روزه (B) جنین سه روزه (C) دیاگرام شماتیک از ناحیه دم جنین جوجه که در آن تشکیل آلانتویس نشان داده شده است. (D) جنین ۵ روزه (E) جنین ۹ روزه (گرفته شده از Gilbert, 2003).

۱-۳-۳) کیسه زرده:

اولین پرده از پرده های خارج جنینی که تکوین می یابد، کیسه زرده است. ابتدا به عنوان ناحیه زرده ای (area vitellina) شناخته می شود. این ناحیه خارجی بلاستودرم است، شامل سه لایه سلولی است که ادامه لایه های سلولی دیسک جنینی است. یک لایه اکتودرمی در مجاورت غشای زرده (vitelline membrane)، یک لایه اندودرمی در مجاورت زرده و بین آنها یک لایه از سلولهای مزودرمی وجود دارد. این مزودرم توسط یک حفره (سلوم خارج جنینی) به دو بخش تقسیم می شود. تنها مزودرمی که در مجاورت اندودرم است رگهای خونی در آن تکوین می یابد و این مزودرم، مزودرم دارای رگ (vascular mesoderm) نامیده می شود. این دو لایه سلولی است که دیواره کیسه زرده را می سازند. این غشاهای زرده ای کیسه زرده را تا روز چهارم انکوباسیون احاطه می کنند. در روی این ساختار جزء میان کیسه زرده و آلبومن که محل پیوند (umbilicus) نامیده می شود، در این قطب گیاهی حفظ می شود و غشای کیسه زرده تا روز هفدهم کامل نمی شود. غشای کیسه زرده از استوای کیسه زرده عبور می کند. طی روزهای پنجم تا هفتم و بیشترین ناحیه در روزهای دهم تا یازدهم و سر انجام در روزهای چهاردهم تا پانزدهم آن را احاطه می کند. از روز دوازدهم به یک توده سه لوبی تبدیل می شود [۲].

سیستم رگی ابتدایی کیسه زرده (area vasculosa) روز دوم تا سوم انکوباسیون آشکار می شود. هنگامی که شریانهای زرده ای خون را از قلب به پیرامون بلاستودرم حمل می کنند؛ در همین زمان یک سیاهرگ از حاشیه بلاستودرم تکوین می یابد که سینوس انتهایی (terminal sinus). نامیده می شود. خون از مویرگهای محیطی به این سیاهرگ تخلیه می شود که خون را به سمت جلو حمل می کند؛ به سمت سیاهرگ زرده ای جلویی که خون را به طرف قلب می برد. یک سیستم خونی ثانویه از سیاهرگهای جدید در حالی ظاهر می شود که سیستم خونی اولیه هنوز در حال تکوین است. در روز پنجم انکوباسیون سیاهرگهای زرده ای به موازات شریانهای زرده ای رشد کرده اند و در مویرگهای محیطی که خون را به سمت سینوس انتهایی حمل می کردند، جریان بر عکس می شود. خون از پیرامون بلاستودرم به قلب جریان پیدا می کند و از طریق سیاهرگهای جانبی با یک مسیر مستقیم بیشتر این کار صورت می گیرد. در روز ششم انکوباسیون سینوس انتهایی شروع به تحلیل رفتن می کند (شکل ۱-۲) [۲].

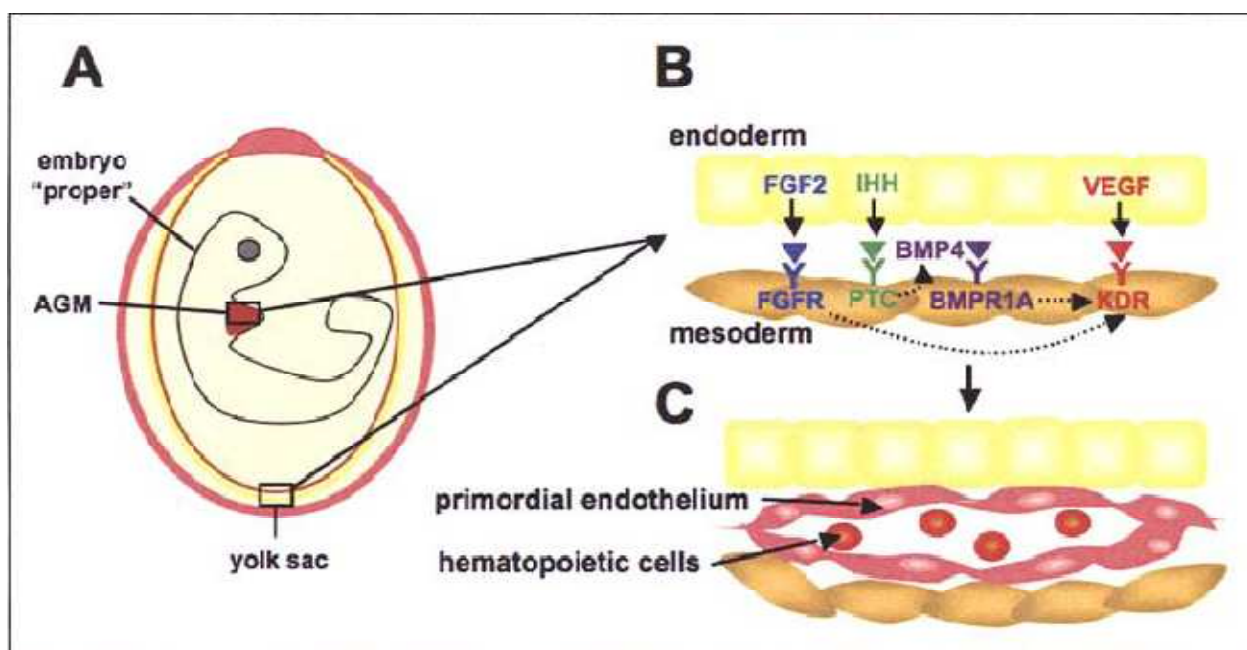


شکل ۱-۲) عروق خونی ایجاد شده روی کیسه زرده و آلانتوئیس برای تامین مواد غذایی جنین و تبادل گاز (گرفته شده از Gilbert, 2003).

۱-۳-۳-۱) نحوه ایجاد رگها روی کیسه زرده:

یکی از اولین مکانهای خونسازی و شکل گیری رگهای خونی طی جنین زایی موش کیسه زرده احشایی است؛ یک بخش خارج جنینی که از مشتقات مزودرمی و اندودرمی ترکیب یافته است. سلولهای اندودرمی کیسه زرده از اندودرم اولیه حاصل می شوند. در حالی که سلولهای مزودرمی کیسه زرده از اکتودرم اولیه طی گاسترولاسیون ایجاد می شوند و بین روزهای هفتم تا هفت و نیم پس از لقاح به زیر اندودرم احشایی مهاجرت می کنند. این سلولهای مزودرمی تکثیر می شوند و به سمت جزایر خونی تمایز می یابند؛ ساختار هایی شامل سلولهای هماتوپوئتیکی که به وسیله شبکه سستی از سلولهای اندوتلیالی احاطه شده اند. خونسازی در کیسه زرده به میزان زیادی با تمایز سلولهای اندوتلیالی و تکوین رگهای خونی همراه است. مطالعات روی موش، جوجه و سایر گونه ها پیشنهاد می کند که یک سلول پیش ساز مشترک (همانژیوبلاست) به اریتروسیتها و سلولهای اندوتلیالی ارتقا می یابد. در موش موتاسیونهایی که موجب تخریب ژنهای کد کننده پروتئین های ضروری واسکولوژنز از قبیل فیبرونکتین (Fibronectin)، $\alpha 5$ - اینتگرین ($5-\alpha$ integrin)، پروتئین مورفوژنیک استخوانی (Bone morphogenic protein-4=BMP4)، فاکتور رشد ترانسفورم کننده ($\beta = \text{TGF-}\beta$ Transforming growth factor- β)، فاکتور رشد اندوتلیال عروق (Vascular endothelial growth factor = VEGF) و گیرنده های آنها می شوند، خونسازی اولیه را تحت تاثیر قرار می دهند. بنابر این پیشنهاد می شود این دو فرایند به میزان زیادی به هم مرتبط اند. تولید سلولهای خونی

در مزودرم کیسه زرده به دودمانهای ماکروفاژ و اریترئوئید محدود می شود. بسیاری از مطالعات نشان می دهند که اندودرم احشایی می تواند تمایز مزودرم مجاور را تحت تاثیر قرار دهد. حذف اندودرم از محیط کشت کیسه زرده جنین موش یا جوجه موجب اختلال در شکل گیری جزایر خونی و رگها می شود. مارکر های بیوشیمیایی اندودرم احشایی شامل آلفا فیتو پروتئین (Alpha-fetoprotein = AFP) و فاکتور هسته ای هپاتوسیتی-۴ (= HNF4) = Hepatic nuclear factor-4 است (شکل ۱-۳) [۴].



شکل ۱-۳ (A) اولین مکانهای خونسازی در جنین (B) مولکولهای سیگنالی حاصل از اندودرم و نقش آنها در اختصاصی شدن پیش ساز های مزودرم (C) تکوین سلولهای خونساز اولیه در کیسه زرده (گرفته شده از 2008 Ruhrberg).

۱-۳-۲ باز آرای عروق کیسه زرده:

تکوین نرمال سیستم قلبی- عروقی به تعداد زیادی از ژنها وابسته است و بنابراین پیشنهاد می شود سیستم سیگنالی پیچیده ای درگیر باشد. در واقع باز آرای عروق در کیسه زرده موش به ۶۰ ژن شناخته شده نیاز دارد که شامل اعضای hedgehog، VEGF، Notch، TGF-β و مسیر های سیگنالی رتینوئیک اسید است. از آنجا که برای باز آرای مناسب عروق ژنهای زیادی مورد نیاز است که در سلولهای اندوتلیالی بیان شوند و مستقیماً در این سلولها ایفای نقش کنند، بنابراین موتاسیون در بسیاری از این ژنها به تنهایی باعث نقص در سیستم رگی می شود [۵].

[.

جریان خون برای باز آرای قلی- عروقی مورد نیاز است. جریان خون برای تامین اکسیژن و مواد غذایی به بافتهای در حال باز آرای نیاز است. شرایط هایپوکسیک می تواند مستقیما موجب آسیب سلولهای اندوتلیالی شده و میزان فاکتورهای رشد مورد نیاز از قبیل VEGF را تغییر دهد و بنابراین موجب نقص در باز آرای شود [۵].

۱-۳-۴) آمنیون:

آمنیون از یک لایه اکتودرم و مزودرم بدون رگ (avascular mesoderm) زیرین که در مجاورت جنین قرار دارد، ساخته شده است. بافتهای مسطح بالا می آیند، رشد می کنند تا چین ها را اطراف سر و دم در حال تکوین تشکیل دهند. در روز چهارم انکوباسیون چین ها با هم ادغام می شوند تا کیسه آمنیون شکل بگیرد. در پی آن لایه داخلی آمنیون که اکتودرم است و لایه خارجی آن که مزودرم فاقد رگ است، مشاهده می شوند. سلولهای ماهیچه ای در این مزودرم دیده می شوند و بنابراین آمنیون در روز پنجم انکوباسیون قابل انقباض می شود اما رگهای خونی آمنیون از اتصال بعدی این مزودرم فاقد رگ و مزودرم دارای رگ مربوط به آلانتوئیس حاصل می شود. در روز دوازدهم پس از انکوباسیون مجرای بین آلبومن و کیسه آمنیوتیک ایجاد می شود، این ارتباط (sero-amniotic) محلی است که چین های سری و دمی آمنیون در روز چهارم انکوباسیون به یکدیگر می رسند. این مجرا اجازه حرکت پروتئین های آلبومن را به مایع آمنیوتیک می دهد [۲].

۱-۴) برخی از اعمال پرده های خارج جنینی:

۱-۴-۱) عمل اندوکربینی پرده های خارج جنینی:

در طی تکوین در میان تمام آمنیون داران پرده های خارج جنینی شکل می گیرد تا تبادل آب و گاز را تنظیم کنند، مواد دفعی حاصل از متابولیسم را گرفته و مواد غذایی را از مادر به جنین منتقل می کنند. اتصال کوریون و آلانتوئیس جفت کوریوالانتویکی یا غشای کوریوالانتویکی را در گونه های تخم گذار شکل می دهند. آزمایش ها روی جفت پستانداران مشخص کرده است که پرده های خارج جنینی و بافت های مادری در سنتز هورمونها و متابولیسم دخالت دارند. با وجود تفاوتی که در شکل گیری اکتودرم کوریونی بین جانوران جفت دار و تخم گذار وجود دارد، شباهتهای زیادی از نظر ساختار و عملکرد در میان آمنیون داران وجود دارد که از جمله این شباهتها