بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده : علوم

گروه : زیست شناسی

مقایسه تاثیر سمیت و تراتوژنیک سالن و کمپلکس سالن وانادیوم اکساید بر جنین جوجه

استاد راهنما:

دکتر صابر زهری

اساتید مشاور:

دکتر ابوالفضل بضاعت پور، دکتر رئوف علایی

توسط:

آرش عبدالملکی

دانشگاه محقق اردبیلی

تابستان، ۱۳۹۰

نام خانودگی دانشجو: عبدالملکی **نام:** آرش

عنوان پایان‌نامه: مقایسه تاثیر سمیت و تراتوژنیک سالن و کمپلکس سالن وانادیوم اکساید بر جنین جوجه

استاد راهنما: دکتر صابر زهری

اساتید مشاور: دکتر ابوالفضل بضاعت پور، دکتر رئوف علایی

مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد **رشته:** زیست شناسی **گرایش:** علوم جانوری

دانشگاه: محقق اردبیلی

دانشکده: علوم **تاریخ فارغ التحصیلی :** **تعداد صفحه:** ۷۹

کلید واژه ها: تخم‌مرغ‌بارور، salen ، vo-salen ، ناهنجاری، سیتوتوکسیسیتی.

چکیده: در این مطالعه سمیت واثرات تراتوژنیک ترکیبات salen و VOS نسبت به جنین جوجه بعنوان جانور مدل و سلولهای کبدی و فیبروبلاستی مشتق از آن مورد بررسی قرار گرفت ، تخم‌مرغ‌های بارور توسط ترکیبات salen و VOS در روز سوم گرماگذاری با روش تزریق داخل کیسه هوا تیمار گردیدند. و در روز نوزدهم گرماگذاری از پوسته خارج و توزین شدند، سپس با استفاده از روش رنگ آمیزی الایزرین برای تشخیص ناهنجاری‌های اسکلتی بررسی شدند. برای بررسی اثرات سیتوتوکسیسیتی این ترکیبات، سلول‌های کبدی و فیبروبلاستی در محیط کشت RPMI1640 رشد داده شد و با غلظت‌های مختلف کمپلکس‌ها تیمار گردیدند. نتایج نشان داد غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ٤٠، ۸۰، ١٦٠ و ۳۰۰ میکرومولار/تخم‌مرغ از salen منجر به افزایش مرگ و میر در سطح معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل می‌گردد. بررسی اسکلتی با استفاده از روش رنگ آمیزی الایزرین در روز نوزدهم گرماگذاری ناهنجاری در استخوان‌های پا، حذف و تاخیر در کلسیفه شدن مهره-های دمی، بدشکلی در منقار، بسته نشدن کامل حفره‌ی شکمی و پا چنگکی را نشان داد. برای بررسی اثرات تراتوژنیک و سمیت VOS غلظت‌های ۷/۵، ۱۵/۰۱، ۷۵/۰۷، ۱۲۰/۱، ۱۵۰/۱، ۲٤۰/۲ و ۳۰۰/۳ میکرومولار/تخم‌مرغ درون کیسه هوا تزریق شد. نتایج نشان داد که مرگ و میر جنین‌ها در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافته است. همچنین بررسی ناهنجاری‌های اسکلتی در روز نوزدهم گرماگذاری نشانگر تاخیر در رشد، حذف مهره‌های دمی و بدشکلی در منقار بود. همچنین سمیت سلولی salen و VOS روی کشت سلول‌های کبدی و فیبروبلاستی بررسی شد، IC_{50} برای salen در سلول‌های کبدی و فیبروبلاستی به ترتیب ۱۱۵۹ و ۹۶۴/۷۳ و برای VOS ۱۰۴۷/۲۵ و ۱۰۳٦/۷۲ میکرومولار بود.کسرزنده‌مانی سلول‌ها بوسیله‌ی تست احیاء فورمازون(MTT) اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که کسرزنده‌مانی سلول‌های تیمار شده با salen و VOS به طور معنی‌داری کاهش یافت. بررسی با میکروسکوپ اینورت تغییرات زیادی را در شکل سلول‌ها و شکسته شدن اتصالات بین سلولی نشان داد.

فهرست مطالب :

عنوان ..... صفحه

فصل اول: مقدمه و تاریخچه

۱- مقدمه ۲

۱-۱- ناهنجاری ۲

۱-۱-۱- عوامل نا هنجاری زا ۳

۱-۲- جنین جوجه به عنوان یک مدل در مطالعات تراتوژنی ٤

۱-۳- تکوین جنین جوجه: ٥

۱-۳- ۱- مراحل اولیه تکوین جنین جوجه: ٥

۱-۳-۲- خط اولیه ۸

۱-۳-۳- شکل گیری آندودرم و مزودرم ۱۰

۱-۳-٤- عقب نشینی خط اولیه ۱۲

۱-۳-٥- روخزیدگی اکتودرم ۱۲

۱-۳-٦- شکل گیری محورها در جنین جوجه ۱۳

۱-۳-٦-۱- نقش PH در تعیین محور پشتی و شکمی ۱۳

۱-۳-٦-۲- نقش جاذبه در شکل گیری محور عقبی – جلویی ۱۳

۱-۳-٦-۳- شکل گیری محور چپ و راست ۱٤

۱-۴- تکوین نهایی ۱٥

۱-۴-۱- تکوین اسکلت ۱٥

۱-۴-۱-۱- ستون مهره ۱٥

۱-۴-۱-۲- دندهها ۱۷

۱-۴-۱-۳- استخوان جناغ سینهای ۱۹

۱-۴-۱-۴- کمر بند سینهای ۲۰
۱-۴-۱-۵-کمر بند لگنی ۲۱
۱-۴-۱-۶- استخوان های بال و پا ۲۱
۱-۴-۱-۷- جمجمه ۲۲
۱-۵-۱- کمپلکسهای سالن ۲۳
۱-۵-۱-۱-کمپلکسهای نوع سالن ۲۳
۱-۵-۱-۱-۱-جنبههای عمومی کمپلکسهای سالن ۲۳
۱-۵-۱-۱-۲-کمپلکسهای سالن محلول در آب ۲۳
۱-۵-۱-۱-۳- کمپلکسهای متالوسالن: ۲٤
۱-۶- مروری بر تحقیقات گذشته ۲٤

فصل دوم: مواد و روشها

۲- مواد و روشها ۳۵
۲-۱- موادهای مورد استفاده ۳۵
۲-۱-۱- سنتز لیگاند H_2L^2 ..... ۳۵
۲-۱-۱-۲- سنتز کمپلکس VOL^2 : ۳۵
۲-۱-۲- تهیه محلول رنگی الایزرین ۳٦
۲-۱-۴- طرز تهیه محیط کشت RPMI : ۳٦
۲ ـ۱ ـ ۵ ـ آنتی بیوتیک ۳٦
۲-۱-۷- محلول آنزیمی ۳۷
Error! Bookmark not defined. ..... ۲-۱- ۸- جعبه کندلینگ
۲-۱-۹- تهیه تخم مرغ نطفهدار ۳۷
۲-۱-۱۰- MTT ۳۷

۲-۲- روشها.....۳۷
۲-۲-۱- روش کندلینگ: ۳۷
۲-۲-۲- روش تزریق.....۳۸
۲-۲-۳- گرماگذاری ۳۸
۲-۲-۴- بازکردن جنین و رنگ آمیزی اسکلت ۳۹
۲-۲-۵- جداسازی سلولهای کبدی.....۳۹
۲-۲-۶- جداسازی سلولهای فیبروبلاستی ۴۰
۲-۲-۷- تعویض محیط کشت ۴۰
۲-۲-۸ سنجش حیات سلولها با تست MTT.....۴۱
۲-۲-۱۰- محاسبه غلظت کشنده پنجاه درصد(LD_{50}) ترکیبات ۴۲
۲-۲-۱۱- روش آماری برای تحلیل دادهها.....۴۲

فصل سوم: نتـــایج

۳- نتایج ۴۴
۳-۱- بررسی تاثیر سمیت سلولی ترکیب Salen بر سلولهای کبدی جنین جوجه ۴۴
۳-۱-۲- بررسی تاثیر سمیت سلولی ترکیب VOS بر سلولهای کبدی جنین جوجه ۴۶
۳-۱-۳- بررسی تغییرات مورفولوژی سلولهای کبدی تیمار شده با ترکیب VOS ۴۸
۳-۱-۴- بررسی تاثیر سمیت سلولی ترکیب Salen بر سلولهای فیبروبلاستی جنین جوجه ۴۸
۳-۱-۵- بررسی تغییرات مورفولوژی سلولهای فیبروبلاستی تیمار شده با ترکیب Salen.....۵۰
۳-۱-۷- بررسی تغییرات مورفولوژی سلولهای فیبروبلاستی تیمار شده با ترکیب VOS ۵۲
۳-۲- بررسی سمیت ترکیبات Salen و VOS بر جنین جوجه (in ovo).....۵۲
۳-۲-۱- بررسی تاثیر ترکیب Salen بر درصد تلفات جنین جوجه ۵۳
۳-۲-۲- بررسی تغییرات وزنی Salen بر جنین جوجه ۵۴

۳-۲-۳- بررسی ناهنجاری جنین حاصل از Salen ۵۵
۳-۲-٤- بررسی تاثیر ترکیب VOS بر درصد تلفات جنین جوجه ٦۲
۳-۲-۵- بررسی تغییرات وزنی VOS بر جنین جوجه ٦٤
۳-۲-٦- بررسی ناهنجاری جنین حاصل از VOS ٦٤

فصل چهارم: بحث

پیشنهادها ۷۳
منابع: ۷٤

فصل اول:

مقدمه و تاریخچه

۱- مقدمه

امروزه طیف وسیعی از ترکیبات شیمیایی در ساخت داروها و صنایع مختلف به کار گرفته می‌شود که بسیاری از آنها دارای اثرات سمیت در بخش‌های مختلف بدن موجودات زنده هستند.علاوه بر آن بخش عمده‌ای از این ترکیبات پایدار بوده و منجر به اختلالات در کارکرد طبیعی بدن شده و برخی از طریق مادر به جنین انتقال یافته و باعث ناهنجاری‌هایی در جنین می‌شود(۸). لیگاندهای سالن به طور وسیع در شیمی فلزات واسطه و بطور خاص در مدل‌سازی آنزیم‌ها و فعالیت‌های کاتالیستی استفاده می‌شوند(۲۰). کمپلکس‌های فلزی لیگاند در محدوده وسیعی در داروسازی و صنایع شیمیایی نیز بکار می‌روند. همچنین کمپلکس‌های اکسووانادیوم دارای فعالیت ضدتوموری هستند، بنابراین بررسی اثرات سمیت و تراتوژنیک این ترکیبات که جزء پیش‌سازهای مواد دارویی و صنعتی هستند، امری اجتناب ناپذیر محسوب می‌گردد. در این تحقیق اثرات ترکیبات Salen و VO-salen به طور جداگانه بر روی جنین جوجه و سلول‌های استخراج شده از آن بررسی شدند. هدف از این تحقیق بررسی اثرات تراتوژنیکی[1] و ناهنجاری‌های اسکلتی این ترکیبات در جنین جوجه به عنوان جانور مدل و همچنین بررسی اثرات سمیت آن‌ها بر سلول‌های استخراج شده از جنین بود. بدین ترتیب تاثیر سمیت کمپلکس در روند طبیعی رشد و تکوین و همچنین رشد سلول‌های طبیعی مورد ارزیابی قرار گرفت.

۱-۱- ناهنجاری

به مجموعه اختلال ناشی از موادشیمیایی خاص، ویروس و ... ناهنجاری یا سندروم گفته می‌شود زیست شناسان علوم تکوین و ژنتیک‌دانان پزشکی اغلب سندروم‌های انسانی (و عامل آن) را با مطالعه بر روی حیوانات که سندروم مشابه را نشان می‌دهند مطالعه می‌کنند. این عمل مطالعه مدل حیوانی

1- teratogenic effects

بیماری نامیده می‌شود عوامل پیدایش اختلال (مواد شیمیایی خاص، ویروس، اشعه و دمای زیاد) را تراتوژن[1] می‌گویند. و مطالعه‌ای که برای کشف مکانیسم و نوع اختلال این عوامل خارجی به کار می‌رود تراتولوژی[2] می‌نامند. Mcbride و lens درسال ۱۹۶۱ شواهدی را جمع آوری کردند که حاکی از تراتوژن بودن تالیدومید[3](دارویی مسکن برای زنان باردار) را نشان می‌داد. قابل توجه‌ترین اثر این دارو فوکوملیا[4] (بد شکلی یا ضعف استخوان‌های بلند) است (۵).

مطالعات علمی نشان می‌دهند که بعضی از نقایص جنینی در خانواده‌ها به طور ارثی وجود دارند. این نوع نقایص که از طریق ژن‌ها انتقال می‌یابند در حدود ٪۱۰ از کل ناهنجاری‌های جنینی را شامل می‌شود. در حدود ۱۰٪ دیگر از بدشکلی‌ها به صورت‌های مختلف به وسیله عوامل طبیعی موجود در محیط ایجاد می‌گردند. به عنوان مثال ناهنجاری سیکلوپی[5] (ایجاد یک چشم در وسط، بر اثر ترکیب پیش فرم‌های چشم‌ها با یکدیگر) بر اثر یون‌های لیتیوم القاء می‌شود. در حالی که یون‌های پتاسیم می‌توانند در بعضی بی‌مهرگان نقایص قلبی ایجاد کنند. نمک‌های لیتیوم در توتیای دریایی باعث ایجاد گاسترولاسیون خارجی می‌شوند که در آن آندودرم و آرکنترون در خارج جنین به وجود می‌آید. قرار دادن تخم‌های تریتون در محلول‌های نمک هیپرتونیک، نیز در این جانوران منجر به گاسترولاسیون خارجی می‌گردد. در حدود ۸۰٪ دیگر از انواع ناهنجاری‌های جنینی در اثر عمل متقابل یا بر هم کنش بین ژن‌ها و عوامل محیطی به وجود می‌آید (۱).

۱-۱-۱- عوامل نا هنجاری زا

عواملی که باعث بروز ناهنجاری می‌شوند به دو دسته تقسیم می‌گردند شامل: عوامل فیزیکی و عوامل شیمیایی.

گروه اول عوامل فیزیکی:

۱- نیروی ثقل

1- teratogen
2- teratology
3- thalidomide
4- phocomelia
5- syclopia

۲- نیروی الکترومغناطسی

۳- دما (این عامل به عنوان عامل جهش‌زا شناخته شده است)

٤- امواج پر انرژی با طول موج کوتاه یا پرتوهای یونیزه کننده مواد مانند پرتوهای فرابنفش x، گاما، بتا، آلفا و ذرات رادیواکتیو که آن‌ها نیز جهش زا هستند.

۵- رطوبت

٦- نیروی گریز از مرکز

۷- فشار

در میان عوامل فیزیکی ناهنجاری‌زا پرتوهای یونیزه کننده تاثیرات بیشتری بر رشد و نمو جنین دارند. زیرا اکثراً باعث ایجاد جهش در ژن‌های جنین شده و مسیرهای متابولیسمی غیر عادی به وجود می‌آورند. در صورتی که این عوامل بر روی ژن‌های سلول‌های جنسی اثر کند جهش منتقل می‌گردد. صفت غیر عادی در افراد مبتلا، چنانچه زنده بماند و زایا باشد موروثی خواهد شد. بیشترین مطالعات در زمینه پرتوهای یونیزه کننده بر روی پرتوهای x انجام گرفته است و نتایجی به طور تجربی در مورد جانوران آزمایشگاهی نظیر موش به دست آمده‌اند (۱).

گروه دوم از عوامل ناهنجاری زا عوامل شیمیایی هستند که عبارتند از:

۱- غذا (کربوهیدرات، پروتئین‌ها و چربی‌ها)

۲- یون‌های فلزات سنگین مانند لیتیوم، کادمیوم، سرب، آلومینیوم، روی و.....

۳- عوامل دارویی تراتوژنیک مانند داروهای آرام بخش

٤- ترکیبات مخدر و الکل

۵- سموم دفع آفات

٦- ویتامین‌ها

۷- هورمون‌ها

۱-۲- جنین جوجه به عنوان یک مدل در مطالعات تراتوژنی

با وجود اینکه تکوین بسیاری از موجودات مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است اما بیشترین

اطلاعات موجود در مورد تکوین مربوط به تعداد کمی از جانوران می‌باشد، که ما آنها را می‌توانیم به عنوان مدل برای درک بهتر مکانیسم‌های تکوین درنظر بگیریم. به عنوان مثال توتیای دریایی و قورباغه به عنوان دو مدل مهم محسوب می‌گردند که در ابتدای قرن حاضر برای تحقیقات در زمینه تکوین استفاده می‌شدند. اصلی ترین دلیل برای انتخاب آن‌ها به عنوان مدل قابل دسترسی، بزرگ و قابل دستکاری بودن جنین‌ها بود. هم اکنون در میان مهره‌داران، قورباغه زنوپوس، موش، جوجه، گورخر ماهی و در بین بی-مهره‌گان، مگس سرکه درزوفیلا، کرم لوله‌ای الگانس از مدل‌های مهم به حساب می‌آیند. برای مثال جنین جوجه برای مدت طولانی به عنوان یک مدل به نمایندگی از مهره‌داران مورد توجه قرار گرفته است. از جنبه‌های مهم آن به عنوان مدل می توان، قابل دسترس بودن و سادگی در دستکاری آن را نام برد (۶).

جنین پرنده از نظر پیچیدگی و مورفولوژیکی و مراحل عمومی تکوین، شباهت زیادی به جنین پستانداران دارد لذا به عنوان مکمل برای مطالعه تکوین پستانداران به کار می‌رود. همچنین جنین جوجه را می‌توان به راحتی کشت داد. این عمل راه را برای بسیاری از تحقیقات که نیاز به میکرو جراحی دارند و همچنین برای بررسی تاثیر مواد شیمیایی بر روی جنین را هموار کرده است (۶).

علاوه بر آن، مطالعات نشان می‌دهد، داده‌هایی که از تاثیر مواد و سموم بر روی جنین جوجه بدست می‌آید تا حد زیادی منطبق بر داده‌هایی است که از مطالعه پستانداران حاصل می‌آید. و همچنین به دلیل جدا بودن جنین از مادر بسیاری از متابولیت‌های مادر حذف شده و این شرایط برای مطالعات تراتوژنی بسیار ایده‌آل می‌باشند. بخصوص اگر بخواهیم ماده شیمیایی گران قیمت را بر روی جنین تست کنیم و یا احتمال سمیت ماده بر روی مادر قابل توجه باشد، جنین جوجه از اهمیت بالایی برخوردار می‌شود(۸).

۱-۳- تکوین جنین جوجه:

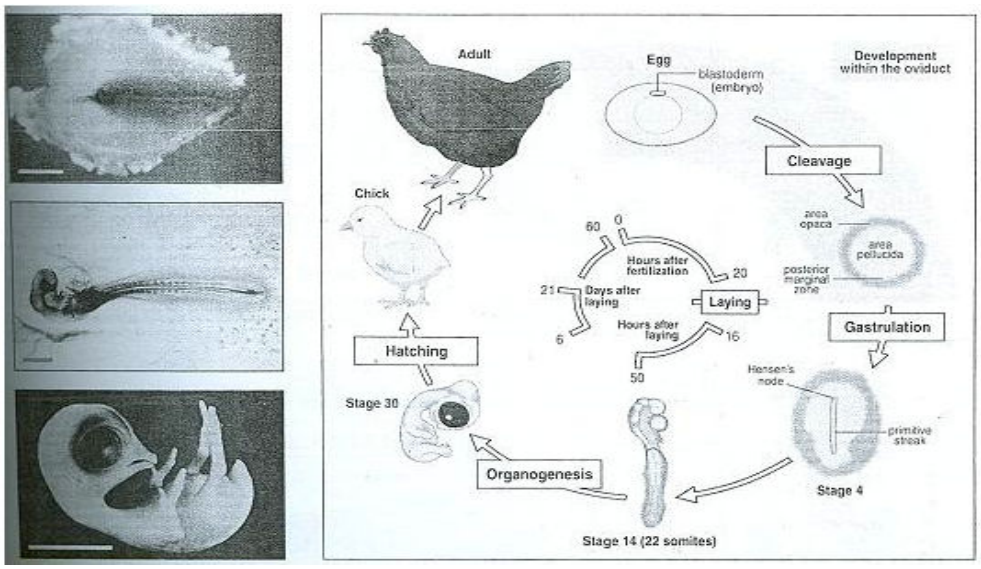
۱-۳- ۱- مراحل اولیه تکوین جنین جوجه:

تخم‌مرغ در درون اویداکت[1] مرغ بارور تقسیمات ابتدایی خود را شروع می‌کند. سیتوپلاسم تخم‌مرغ و هسته آن بر روی زرده به صورت توده کوچکی که به قطر چند میلیمتر است محدود شده است.

1 -oviduct

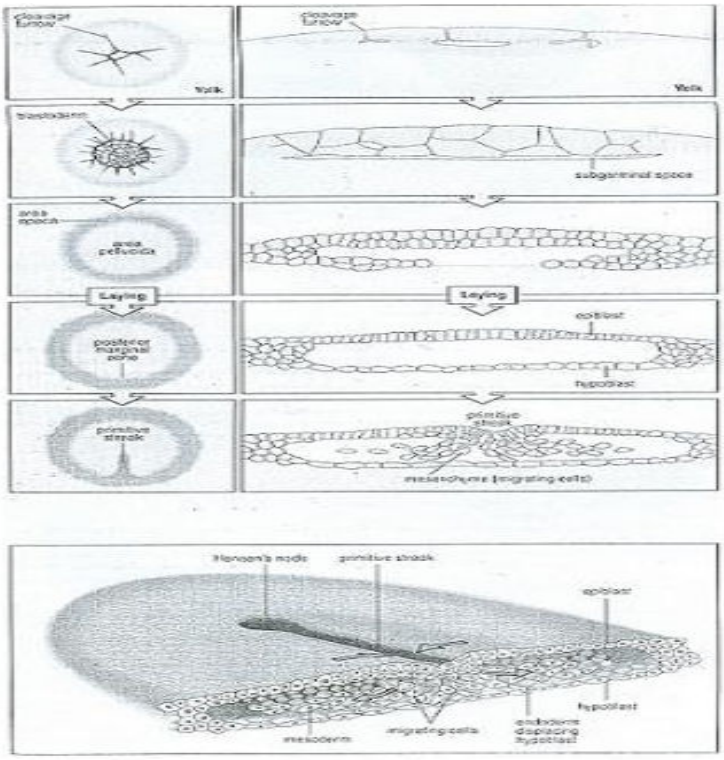
تقسیماتی که در مسیر اویداکت صورت می‌گیرد باعث تشکیل بلاستودرم یا بلاستودیسک می‌شود. تخم به مدت بیست ساعت در اویداکت باقی مانده و باعث اضافه شدن سفیده تخم مرغ و غشای پوسته‌ای و خود پوسته به آن می‌گردد. در زمان تخم‌گذاری بلاستودیسک ۶۰۰۰۰ سلولی است که این مرحله معادل بلاستولای دوزیستان است (۶) (شکل۱-۱).

بعد از اینکه تخم‌گذاری صورت گرفت تقسیمات ادامه می‌یابد شکافتگی که برای تسهیم صورت می-گیرد به صورت شکاف[1] است. شکاف‌های اولیه از سطح غشایی سیتوپلاسمی شروع شده و به سمت پایین حرکت می‌کند اما این شکافتگی سلول را کاملاً از هم جدا نمی‌کند به طوری که قسمت شکمی به سمت زرده باز باقی می‌ماند. شکافتگی‌ها سرانجام به شکل یک دایره‌ای که ضخامت چند سلولی دارد منتج می‌شود. که قسمت مرکزی این ناحیه (بر روی حفره‌ای قرار می‌گیرد) شفاف است و ناحیه شفاف[2] نامیده می‌شود و نواحی حاشیه ای را ناحیه کدر[3] گویند. بین ناحیه شفاف و زرده حفره‌ای وجود دارد که فضای زیر لایه زایا نامیده[4] می‌شود (۶) (شکل ۱-۲).



(شکل۱-۱): مراحل تکوین جنین جوجه (بخشی از تکوین جنین جوجه در اویداکت انجام می شود) (۶).

1- Furrow
2- Area Pellucida
3-Area Opaca
4-Subgerminal Space



(شکل ۱-۲): تصویر شماتیک از برش عرضی تخم‌مرغ در حال تکوین (بالا، سمت راست) و نمای بالایی از تسهیم (پایین، سمت چپ). همچنین شکل سه بعدی از بلاستولا (پایین) (۶).

در زمان تخم‌گذاری اکثر سلول‌های ناحیه شفاف در سطح قرار می‌گیرند که منجر به تشکیل اپی-بلاست می‌شوند. در حالی که بقیه سلول‌های ناحیه شفاف لایه‌ای شده و از سطح مهاجرت کرده و به سمت حفره زیر لایه زایا ریخته می‌شوند که منجر به تشکیل هیپوبلاست اولیه یا جزیره‌های اینواژینه شده[1] می‌شوند. که هر کدام از این جزیره تقریباً دارای ۲۰- ۵ سلول است. در مدت کوتاهی پس از آن یک لایه از سلول که از حاشیه عقبی[2] (این ناحیه از حاشیه قسمت‌های دیگر به وسیله ضخیم شدگی و تشکیل توده سلولی که کولر سیکل[3] نامیده می‌شود متمایز می‌گردد) به قسمت جلو مهاجرت می‌کند و در مسیرشان به جزایر که از اپی بلاست مشتق شده‌اند برخورد کرده و باعث ایجاد هیپوبلاست ثانویه[4] می‌گردند. بلاستودرم دو لایه‌ای (اپی بلاست و هیپوبلاست) در ناحیه کدر به هم دیگر می‌رسند و فضایی که بین لایه‌ها ایجاد شد بلاستوسل نامیده می‌شود. اپی بلاست منشأ جنین در پرندگان است.

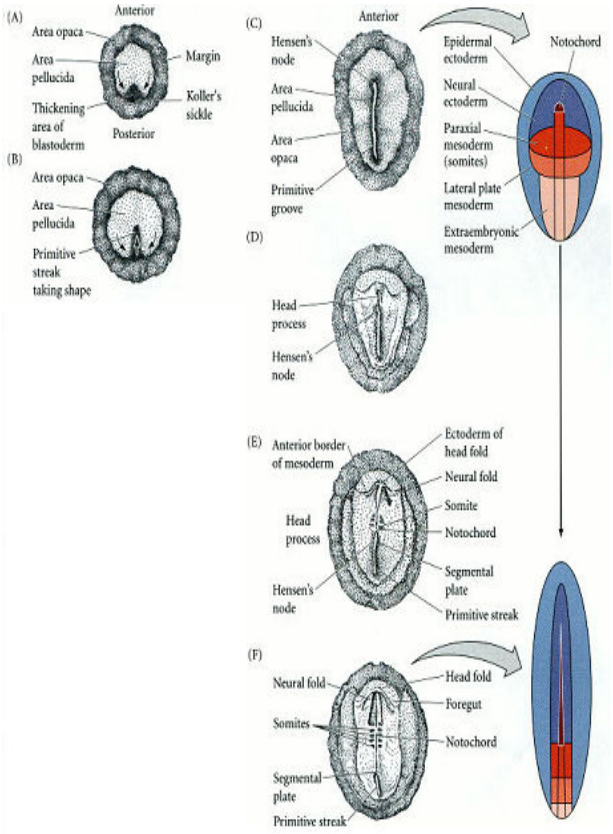
1-Primary Hypoblast (polyinvagination island)
2- Posterior margain
3- Koller Sickle
4 -Secondary Hypoblast

هیپوبلاست در تشکیل خود جنین هیچ نقشی ندارد اما در تشکیل پرده‌های خارج رویانی به خصوص کیسه زرده و ساقه که کیسه زرده را به آندودرم دستگاه گوارش متصل می‌کند نقش مهمی را ایفا می‌کند. سه لایه زایا و جنین و مقداری از غشای خارج رویانی از اپی بلاست مشتق می‌شوند (۵).

۱-۳-۲- خط اولیه

ویژگی ساختاری اصلی گاسترولاسیون پرندگان، خزندگان و پستاندارن خط اولیه است. این خط ابتدا به صورت ضخیم شدگی در اپی بلاست دیده می‌شود که دقیقاً در سمت جلویی کولر سیکل واقع شده است. این ضخیم شدگی به علت ریزش سلول‌های آندودرمی به داخل بلاستوسل و حرکت سلول‌های اپی‌بلاستی جانبی قسمت عقبی به سمت مرکز می‌باشد. همزمان با حرکت سلول‌های کناری اپی‌بلاست به خط اولیه و حرکت خط اولیه به سمت جلو، هیپوبلاست ثانویه نیز از ناحیه عقبی به سمت جلو حرکت می‌کند. بنابراین حرکت خط اولیه و سلول‌های هیپوبلاست ثانویه به صورت هم زمان به سمت جلو ادامه می‌یابد و سرانجام خط اولیه تقریباً ٪۷۰-۶۰ از طول ناحیه شفاف را طی می‌کند (۵) (شکل ۱-۳).

خط اولیه محور جنین را تعیین می‌کند و منجر به مشخص شدن قسمت‌های چپ و راست جنین می‌گردد. و از قسمت عقبی به سمت جلو یا سری گسترش پیدا می‌کند. سلول‌های درحال مهاجرت به داخل آن از قسمت پشتی وارد و از سمت قسمت شکمی به حرکت‌شان ادامه می‌دهند. سلول‌هایی که در نزدیکی آن وجود دارند بعداً ساختار میانی (مرکزی) جنین، در حالی سلول‌هایی که در قسمت جانبی‌تر خط قرار می‌گیرند ساختارهای طرفین جنین را تشکیل می‌دهند. همزمان با همگرایی سلول‌ها برای تشکیل خط اولیه تورفتگی در آن ایجاد می‌گردد که شیار اولیه گویند. این شیار باعث ایجاد مسیر برای عبور سلول‌های در حال مهاجرت به داخل بلاستوسل می‌گردد و بنابراین شیار اولیه معادل بلاستوپور در دوزیستان است.



(شکل۱-۳): تصاویر A, B, C, D, E, F مراحل تشکیل خط اولیه و امتداد یافتن آن را نشان می دهد (۵).

در قسمت جلویی شیار اولیه سلول‌ها تجمع پیدا کرده و باعث ضخیم شدگی موضعی می‌گردد که گره اولیه یا گره هنسن[1] نامیده می‌شود. در مرکز این گره یک فرورفتگی به وجود می‌آید که قیفی شکل است (بعضی مواقع چاله اولیه نامیده می‌شود) و محل عبور سلول‌ها به داخل بلاستوسل است. گره هنسن معادل لبه پشتی بلاستوپور جنین دوزیستان است. به محض شکل‌گیری خط اولیه سلول‌ها شروع به مهاجرت به داخل بلاستوسل می‌کنند و شامل جمعیتی از سلول‌های درحال تغییر است. سلول‌های که از گره هنسن به داخل بلاستوسل مهاجرت می‌کنند تشکیل دهنده‌ی روده پیشین، مزودرم سری و نوتوکورد هستند. و سلول‌هایی که از بخش‌های جانبی خط اولیه به داخل بلاستوسل مهاجرت می‌کنند، بخش‌های اصلی آندودرم و بافت‌های مزودرمی را تشکیل می‌دهند. برخلاف مزودرم زنوپوس که به صورت لایه‌ای از سلول به داخل بلاستوسل حرکت می‌کند، سلول‌ها به صورت منفرد با حرکت ریزش و با یک تغییر ماهیت از سلول‌های اپی‌تلیالی به مزودرمی وارد می‌شوند. در گره هنسن و خط اولیه، جدا

1-Hensen node

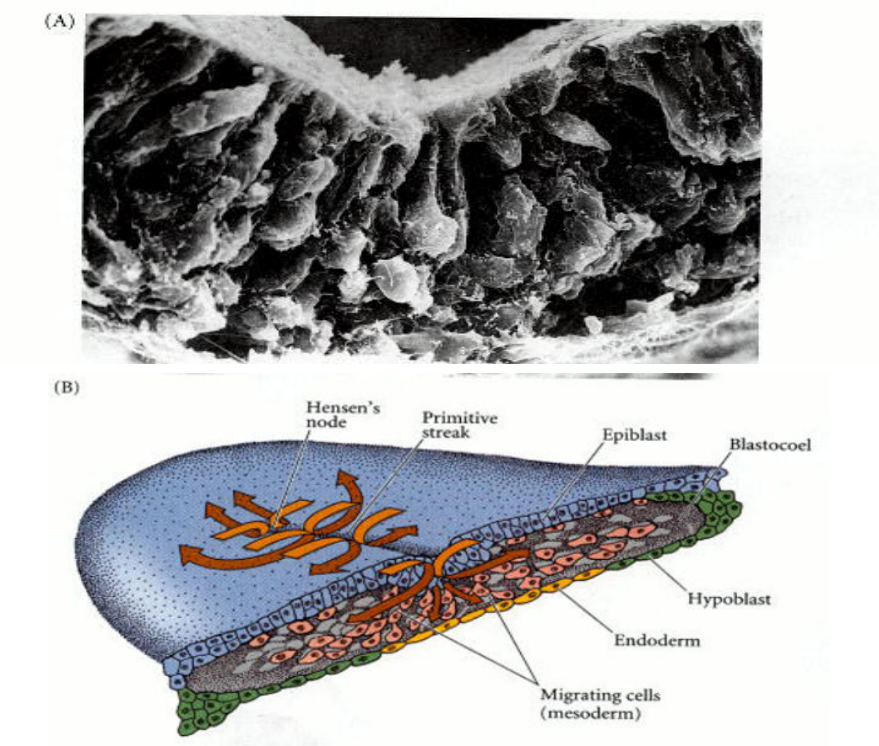
شدن سلول‌ها از غشای قاعده‌شان و آزاد شدن آن به داخل بلاستوسل به نظر می‌رسد به خاطر فاکتور اسکاتر[1] باشد. این فاکتور یک پروتئین kda90 است. که به وسیله سلول‌ها ترشح می‌شود و سلول‌های اپیتلیالی را به سلول‌های مزودرمی تبدیل می‌کند. که این عمل از دو طریق یا به صورت سرکوب cadherine- E یا از طریق کاهش بیان ژن cadharine -E عمل می‌کند (۵) (شکل ۱-۴).

۱-۳-۳- شکل گیری آندودرم و مزودرم

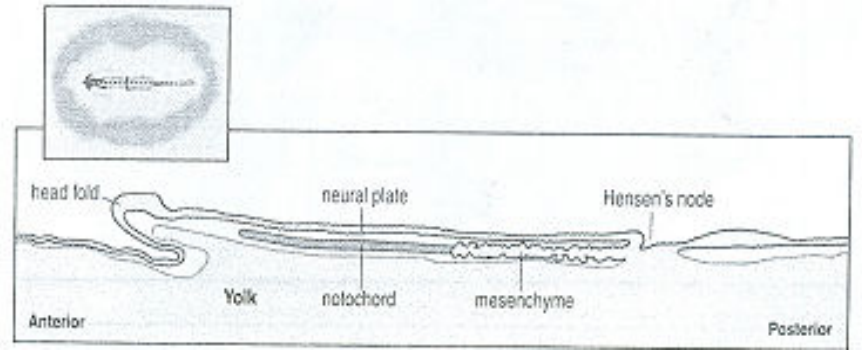
نخستین سلول‌هایی که از طریق گره هنسن وارد می‌شوند به آندودرم حلقی روده پیشین تبدیل می-گردند. به محض ورود به بلاستوسل سلول‌های آندودرمی به قسمت جلویی مهاجرت کرده و سرانجام باعث جابجایی سلول‌های هیپوبلاست می‌گردند که این فرآیند منجر به محدود شدن سلول‌های هیپوبلاست به قسمت جلویی ناحیه شفاف می‌شود. که در مراحل بعدی به سلول‌های اجدادی سلول‌های جنسی تبدیل می‌گردند. و از طریق رگ‌های خونی به گنادها (غده جنسی) مهاجرت می‌کنند (۵).

سلول‌های بعدی که بعد از سلول‌های آندودرم حلقی از طریق گره هنسن وارد بلاستوسل می‌شوند به سمت جلو حرکت کرده اما آن‌ها به اندازه سلول‌های آندودرم حلقی فرو نرفته بلکه ما بین آندودرم و اپی‌بلاست قرار می‌گیرند و سلول‌های مزدرم سری[2] و مزودرم صفحه‌ای پروکوردال[3] را تشکیل می‌دهند. این سلول‌ها ضمناً به سمت جلو حرکت کرده و به اپی بلاست قسمت جلوی درخط میانه فشار وارد کرده و منجر به تشکیل زائده سری[4] می‌گردد. بنابراین سر پرنده یک قسمت بر آمده یا نوک داری[5] است که در قسمت جلوی گره هنسن تشکیل می‌شود. آخرین سلول‌هایی که از گره هنسن می‌گذرند سلول-هایی هستند که نوتوکورد را تشکیل می‌دهند(شکل۱-۵).

1-Scatter factor
2-Head mesenchyme
3-Prechordal Plate Mesoderm
4-Head Process
5-Rostral



(شکل۱-۴): نفوذ سلول‌ها از لایه اپی‌بلاست به داخل بلاستوسل و نفوذ آن به هیپوبلاست و تشکیل دادن مزودرم و آندودرم A- عکس میکروسکوپ الکترونیکیB- تصویر شماتیک (۵).



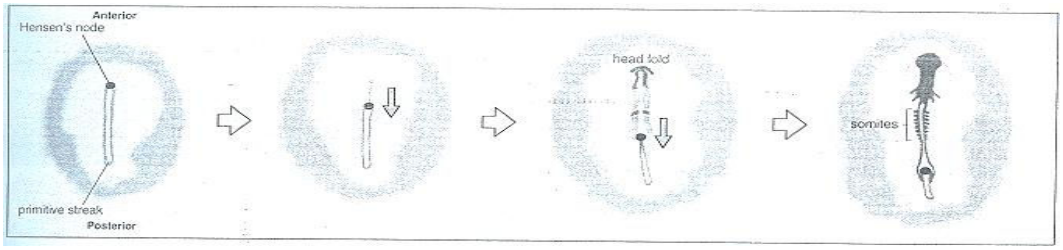
(شکل ۱-۵): تصویر شماتیک از تشکیل زائده سری توسط حرکت مزودرم به سمت جلو (۶).

ضمن ریزش سلول‌ها از قسمت‌های جانبی خط اولیه به درون بلاستوسل، دو لایه شدن هم رخ می-دهد، بنابراین لایه‌هایی که در عمق فرو رفته به هیپو بلاست می‌چسبند و باعث جابجایی آن شده و آن را به قسمت جانبی می‌رانند. این سلول‌ها، آندودرم اندام‌های جنین و همچنین بخش زیادی از غشای خارج رویانی را تشکیل می‌دهند. لایه دومی بین آندودرم و اپی‌بلاست قرار می‌گیرد که همان مزودرم شلی است که رفته رفته به مزدرم خارج رویانی و مزودرم خود رویان تبدیل می‌گردد. بیشتر سلول‌های

آندودرمی بعد از ۲۲ ساعت گرماگذاری وارد جنین شده اما حرکت سلول‌های مزودرم به داخل رویان برای مدت طولانی ادامه می‌یابد (۵).

۱-۳-٤- عقب نشینی خط اولیه

در حالی که نفوذ سلول‌های مزودرمی ادامه می‌یابد خط اولیه عقب نشینی را شروع می‌کند. عقب نشینی گره هنسن تقریباً از مرکز ناحیه شفاف شروع شده و به قسمت عقب حرکت می‌کند. همزمان با عقب نشینی گره به سمت عقب، تشکیل ساختار نوتوکورد از مغز پسین شروع می‌شود. با حرکت گره به سمت عقب سلول‌های تشکیل دهنده نوتوکورد از طریق گره وارد بلاستوسل شده و منجر به شکل‌گیری آن (تا ۱۷ سومیت) می‌گردند. بقیه نوتوکورد با همگرایی سلول‌ها به سمت خط اولیه و نفوذ آن‌ها به داخل بلاستوسل صورت می‌گیرد. سرانجام گره هنسن به حداکثر موقعیت عقبی خود می‌رسد. در این زمان اکثر سلول‌های فرضی مزودرمی و آندودرمی به داخل نفوذ می‌کنند(۵) (شکل ۱-۶).



شکل(۱-۶): عقب نشینی گره هنسن و شکل گیری نوتوکورد و سومیت (۶).

با توجه به شکل گیری مزودرم و نوتوکورد که از قسمت سری به دمی انجام می‌گردد جنین پرنده (جنین پستانداران) یک شیب از تکوین را از قسمت جلویی به سمت عقب نشان می‌دهد. به طوری که وقتی سلول‌های عقبی در حال نفوذ به داخل و گاسترولاسیون هستند سلول‌های قسمت جلویی در حال تشکیل دادن اندام‌ها هستند و در روزهای آتی تکوین قسمت جلویی جنین کامل تر از قسمت عقبی جنین است (۵).

۱-۳-۵- روخزیدگی اکتودرم

همزمان با نفوذ مزودرم و آندودرم فرضی جنین به درون بلاستوسل، تکثیر سلول‌های اولیه اکتودرم شروع می‌شود. علاوه بر آن سلول‌های اکتودرم برای احاطه کردن زرده به سمت آن مهاجرت می‌کنند. در

بر گرفتن کیسه زرده به وسیله اکتودرم (به یاد آورنده رو خزیدگی در دوزیستان) به مدت چهار روز طول می‌کشد. سلول‌های لبه خارجی ناحیه کدر به پوشش زرده می‌چسبند و ذاتاً متفاوت از سلول‌های بلاستودرم هستند. این سلول‌ها زوائد پا مانند تشکیل داده که به عنوان دستگاه حرکتی عمل کرده و وارد پوشش زرده می‌شوند. این زائده پا مانند به فیبرونکتین و لایه پایه پوشش زرده ای می‌چسبد. (۵).

۱-۳-۶- شکل گیری محورها در جنین جوجه

شکل گیری محور جنین در زمان گاسترولاسیون صورت می‌گیرد اما مشخص شدن این محورها در مراحل اولیه شکافتگی است.

۱-۳-۶-۱- نقش PH در تعیین محور پشتی و شکمی

محور شکمی و پشتی برای تشکیل شدن هیپوبلاست و همچنین برای پیشرفت تکوین نقش مهمی دارند. این محور زمانی به وجود می‌آید که سلول‌های در حال تقسیم، سدی را بین آلبومین (PH=9/5) و فضای بین دیسک (PH=6/5) ایجاد می‌کند که قسمت پشتی دیسک قلیایی و قسمت شکمی دیسک اسیدی می‌باشد. آب و یون‌های سدیم از آلبومین وارد سلول و فضای بین دیسک شده و منجر به اختلاف پتانسیل غشایی ۲۵ میکرو ولتی میان لایه سلولی اپی‌بلاست می‌گردد (در قسمت شکمی سلولها مثبت می‌باشد). این فرایند منجر به شکل‌گیری طرفین اپی‌بلاست می‌شود. یک طرف در تماس با آلبومین (منفی) است که قسمت پشتی جنین را تشکیل می‌دهد و طرف دیگر در تماس با فضای زیر لایه ژرمینال (مثبت) است طرف شکمی جنین را تشکیل می‌دهد. این محور به طور تجربی از طریق برعکس کردن PH یا دخول یون سدیم تغییر داده می‌شود(۵).

۱-۳-۶-۲- نقش جاذبه در شکل گیری محور عقبی – جلویی

تبدیل بلاستودرم متقارن شعاعی به ساختار متقارن دو طرفی به وسیله جاذبه تعیین می‌شود. تخم‌مرغ از مسیر دستگاه تولید مثل مرغ حرکت کرده و به مدت ۲۰ ساعت در آن می‌چرخد این چرخش با سرعت ۱۲-۱۰ بار در ساعت انجام می‌گیرد. این عمل منجر به تغییر وضعیت زرده شده و ترکیب روشن‌تر آن در زیر یک طرف بلاستودرم قرار می‌گیرند. این عمل قسمت عقبی بلاستودرم را بالا نگه