

بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ

دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی

گرایش سلولی - تکوینی

اثر میدان های الکترومغناطیس بر الگوی الکتروفورزی پروتئین های مایع آمنیوتیک جنین موش

شهین اسمعیل نژاد

استاد راهنما

دکتر فرهاد مشایخی

شهریور ۱۳۹۲

تقدیم به

زیباترین وجود هستی

و

پدر و مادر و برادر

تشکر و قدردانی

در ابتدا از خداوند مهربانم و از پدر و مادر عزیزم که همواره حامی من بودند، سپاسگزارم.

از استاد ارجمند جناب پروفسور فرهاد مشایخی به خاطر تمام راهنمایی های ارزشمندشان تشکر و قدردانی می نمایم، همچنین از خانم دکتر زیور صالحی و آقای دکتر محمدجواد مهدی پور که زحمت داوری این پایان نامه را تقبل نمودند، کمال تشکر را دارم. از کارشناسان محترم گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه به ویژه خانم مهوش هادوی صمیمانه سپاسگزاری می نمایم، و در آخر از تمامی دوستانم به ویژه خانم هلاله شایگان که همواره در کنارم بودند بسیار ممنون و سپاسگزارم.

شهبین اسمعیل نژاد

شهریور ۹۲

فهرست مطالب

عنوان	شماره صفحه
چکیده فارسی.....	ذ.
چکیده انگلیسی.....	ر.
فصل اول: مقدمه	
۱- مقدمه.....	۱
۱-۱- پرده آمیون پستانداران.....	۲
۱-۱-۱- آمیون و تشکیل آن در انسان.....	۲
۱-۱-۲- آمیون و تشکیل آن در مدل جانوری موش.....	۴
۱-۱-۳- ساختار بافت شناسی آمیون.....	۷
۱-۲- مایع آمنیوتیک.....	۸
۱-۳- حجم مایع آمنیوتیک.....	۸
۱-۴- منابع مایع آمنیوتیک.....	۹
۱-۵- ترکیبات مایع آمنیوتیک.....	۹
۱-۵-۱- الکتروولیت ها.....	۱۰
۱-۵-۲- متابولیت ها.....	۱۰
۱-۵-۳- پروتئین ها.....	۱۰
۱-۵-۳-۱- آلفا فیتوپروتئین.....	۱۲
۱-۶- اسمولالیت و اسیدیت مایع آمنیوتیک.....	۱۳
۱-۷- اجزاء سیستم ایمنی در مایع آمنیوتیک.....	۱۳
۱-۸- سارکولکتین در مایع آمنیوتیک.....	۱۴
۱-۹- مایع آمنیوتیک و تکوین کلیه جنینی.....	۱۴
۱-۹-۱- بلوغ فیلتراسیون گلومرولار کلیوی.....	۱۴
۱-۹-۲- بلوغ توبول های کلیوی.....	۱۵
۱-۱۰- مایع آمنیوتیک و ناهنجاری های رشد جنین.....	۱۵
۱-۱۱- اکتیوین A در مایع آمنیوتیک.....	۱۵
۱-۱۲- آمنیوسنتز مایع آمنیوتیک و ناهنجاری های جنینی.....	۱۶
۱-۱۲-۱- سندرم کلاین فلتر.....	۱۷
۱-۱۲-۲- اسپاینا بایفیدا.....	۱۷
۱-۱۲-۳- سندرم دان (تری زومی ۲۱).....	۱۷
۱-۱۲-۴- ونتریکولومگالی جنینی و فاکتور رشد عصبی.....	۱۸
۱-۱۲-۵- هیدروپس جنینی.....	۱۹

- ۱- ۱۳- بررسی بیان پروتئین در مایع آمنیوتیک..... ۱۹
- ۱- ۱۴- میدان های الکترومغناطیسی ۲۰
- ۱- ۱۴- ۱- انواع میدان های الکترومغناطیسی ۲۰
- ۱- ۱۴- ۲- طیف الکترو مغناطیسی ۲۱
- ۱- ۱۵- اثرات زیستی میدان های الکترومغناطیسی ۲۲
- ۱- ۱۶- تولید رادیکال های آزاد در معرض میدان های الکترو مغناطیسی ۲۳
- ۱- ۱۷- اثرات میدان های الکترومغناطیسی بر متابولیسم سلول ها ۲۴
- ۱- ۱۸- اثر میدان های الکترومغناطیسی بر آنزیم لاکتات دهیدروژناز ۲۴
- ۱- ۱۹- اثر میدان های الکترومغناطیسی بر تعداد سلول های خونی ۲۵
- ۱- ۲۰- اثر میدان های الکترومغناطیسی بر چرخه سلولی ۲۵
- ۱- ۲۱- اثر میدان های الکترومغناطیسی بر ترشح هورمون های تستوسترون، LH و FSH ۲۵
- ۱- ۲۲- تاثیر میدان های الکترومغناطیسی بر غده پینه آل ۲۶
- ۱- ۲۳- اثر میدان های الکترومغناطیسی بر سیستم تولیدمثلی ۲۶
- ۱- ۲۳- ۱- تغییر در سیستم اندوکراین تولیدمثلی در معرض میدان های الکترومغناطیسی ۲۶
- ۱- ۲۳- ۲- اثر میدان های الکترومغناطیسی بر دستگاه تولید مثلی ماده ۲۷
- ۱- ۲۳- ۳- اثر میدان های الکترومغناطیسی بر دستگاه تولید مثلی نر ۲۷
- ۱- ۲۴- اثرات تکوینی میدان های الکترومغناطیسی ۲۸
- ۱- ۲۵- اثر میدان های الکترومغناطیسی بر تکوین بیضه ۲۹
- ۱- ۲۶- اثر میدان الکترومغناطیسی بر سلول های آمنیوتیک ۲۹
- ۱- ۲۷- اثر میدان الکترومغناطیسی بر سد های زیستی ۲۹
- ۱- ۲۸- اثر میدان های الکترومغناطیسی بر بیان ژن و سنتز پروتئین سلول ها ۳۰
- ۱- ۲۸- ۱- اثر میدان های الکترومغناطیسی بر پروتئین های شوک حرارتی ۳۱
- ۱- ۲۹- هدف ۳۱

فصل دوم: مواد و روش ها

- ۲- ۱- دستگاه ها و وسایل مورد استفاده ۳۴
- ۲- ۲- مواد مورد نیاز ۳۵
- ۲- ۳- تهیه نمونه های مایع آمنیوتیک ۳۶
- ۲- ۴- بررسی الگوی الکتروفورزی پروتئین های مایع آمنیوتیک جنین موش ۳۶
- ۲- ۵- آماده سازی محلول ها و بافر های مورد نیاز برای الکتروفورز ۳۶
- ۲- ۵- ۱- تهیه بافر مخزن یا بافر الکترو ۳۶
- ۲- ۵- ۲- تهیه بافر نمونه ۳۷
- ۲- ۵- ۳- تهیه بافر ژل بالا ۳۷
- ۲- ۵- ۴- تهیه بافر ژل پایین ۳۸

۳۸.....	۲-۵-۵- تهیه آکريل آميد ۳۰٪ و بيس آکريل آميد ۰/۸٪.....
۳۸.....	۲-۵-۶- تهیه آمونيوم پر سولفات ۴۰٪.....
۳۸.....	۲-۶-۶- آماده سازی ژل پلی آکريل آميد.....
۳۸.....	۲-۶-۱- تهیه ژل پايين.....
۳۹.....	۲-۶-۲- تهیه ژل بالا.....
۴۰.....	۲-۷- آماده سازی نمونه ها به منظور الکتروفورز.....
۴۰.....	۲-۸- انجام الکتروفورز ژل پلی آکريل آميد.....
۴۱.....	۲-۹- رنگ آمیزی نيترات نقره.....
۴۱.....	۲-۹-۱- تهیه بافر های مورد نیاز در رنگ آمیزی نيترات نقره.....
۴۲.....	۲-۹-۲- مراحل رنگ آمیزی نيترات نقره.....
۴۳.....	۲-۱۰- بررسی بيان نسبی آلفا فیتوپروتئين در مايع آمينوتیک جنين موش به روش وسترن بلات.....

فصل سوم: نتايج

۴۷.....	۳-۱- بررسی اثر ميدان الکترومغناطیسی بر الگوی الکتروفورزی پروتئين های مايع آمينوتیک.....
۴۸.....	۳-۲- بررسی الگوی الکتروفورزی پروتئين های مايع آمينوتیک جنين در روز ۱۶ جنینی.....
۵۴.....	۳-۳- بررسی الگوی الکتروفورزی پروتئين های مايع آمينوتیک جنين در روز ۱۸ جنینی.....
۶۰.....	۳-۴- بررسی بيان آلفا فیتوپروتئين در مايع آمينوتیک جنين موش در روز های ۱۶ و ۱۸ جنینی.....

فصل چهارم: بحث

۶۴.....	۴-۱- بحث و نتیجه گیری.....
۶۹.....	۴-۲- پيشنهادات.....

۷۰.....	فصل پنجم: منابع.....
---------	----------------------

فهرست جدول ها

عنوان	شماره صفحه
جدول ۱-۱: میزان پروتئین ها در مایع آمنیوتیک.....	۱۱
جدول ۱-۲: محلول ژل پایین ۱۲/۵٪.....	۳۹
جدول ۲-۲: محلول ژل بالا ۳/۴٪.....	۳۹
جدول ۳-۱: تعداد نمونه های مورد استفاده.....	۴۷
جدول ۳-۲: بیان نسبی باند های پروتئینی ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ در روز جنینی ۱۶ در گروه کنترل و تیمار (EMF).....	۵۰
جدول ۳-۳: بیان نسبی باند های پروتئینی ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ در روز جنینی ۱۸ در گروه کنترل و تیمار (EMF).....	۵۵
جدول ۳-۴: بیان نسبی آلفا فیتوپروتئین در مایع آمنیوتیک در روزهای جنینی ۱۶ و ۱۸.....	۶۱

فهرست شکل ها

عنوان	شماره صفحه
شکل ۱-۱: تشکیل بافت و پرده آمنیون در جنین انسان بین روزهای ۷ و ۱۱.....	۳
شکل ۱-۲: بلاستوسیست ۱۳ روزه انسانی.....	۴
شکل ۱-۳: پرده آمنیون در جنین موش.....	۵
شکل ۱-۴: تشکیل آمنیون در موش.....	۶
شکل ۱-۵: تصویر شماتیک ساختار پرده های جنینی و ترکیبات ماتریکس خارج سلولی هر لایه.....	۷
شکل ۱-۶: تغییرات پویای آلفا فیتوپروتئین در مایع آمنیوتیک.....	۱۲
شکل ۱-۷: طیف الکترومغناطیسی.....	۲۲
شکل ۳-۱: ژل SDS- PAGE مربوط به مایع آمنیوتیک جنین موش.....	۴۸
شکل ۳-۲: ژل SDS- PAGE مربوط به مایع آمنیوتیک جنین موش در روز جنینی ۱۶.....	۴۹
شکل ۳-۳: نمودار میزان بیان نسبی باند ۱ در مایع آمنیوتیک جنین ۱۶ روزه موش.....	۵۱
شکل ۳-۴: نمودار میزان بیان نسبی باند ۲ در مایع آمنیوتیک جنین ۱۶ روزه موش.....	۵۱
شکل ۳-۵: نمودار میزان بیان نسبی باند ۳ در مایع آمنیوتیک جنین ۱۶ روزه موش.....	۵۲
شکل ۳-۶: نمودار میزان بیان نسبی باند ۴ در مایع آمنیوتیک جنین ۱۶ روزه موش.....	۵۳
شکل ۳-۷: نمودار میزان بیان نسبی باند ۵ در مایع آمنیوتیک جنین ۱۶ روزه موش.....	۵۳
شکل ۳-۸: ژل SDS- PAGE مربوط به مایع آمنیوتیک جنین موش در روز جنینی ۱۸.....	۵۴
شکل ۳-۹: نمودار میزان بیان نسبی باند ۱ در مایع آمنیوتیک جنین ۱۸ روزه موش.....	۵۶
شکل ۳-۱۰: نمودار میزان بیان نسبی باند ۲ در مایع آمنیوتیک جنین ۱۸ روزه موش.....	۵۶
شکل ۳-۱۱: نمودار میزان بیان نسبی باند ۳ در مایع آمنیوتیک جنین ۱۸ روزه موش.....	۵۷
شکل ۳-۱۲: نمودار میزان بیان نسبی باند ۴ در مایع آمنیوتیک جنین ۱۸ روزه موش.....	۵۸
شکل ۳-۱۳: نمودار میزان بیان نسبی باند ۵ در مایع آمنیوتیک جنین ۱۸ روزه موش.....	۵۸
شکل ۳-۱۴: نمودار میزان بیان نسبی باند ۶ در مایع آمنیوتیک جنین ۱۸ روزه موش.....	۵۹
شکل ۳-۱۵: نمودار میزان بیان نسبی باند ۷ در مایع آمنیوتیک جنین ۱۸ روزه موش.....	۶۰
شکل ۳-۱۶: بیان نسبی آلفا فیتوپروتئین در مایع آمنیوتیک جنین موش در روز ۱۶ جنینی بین گروه کنترل و تیمار.....	۶۱
شکل ۳-۱۷: بیان نسبی آلفا فیتوپروتئین در مایع آمنیوتیک جنین موش در روز ۱۸ جنینی بین گروه کنترل و تیمار.....	۶۱
شکل ۳-۱۸: نمودار میزان بیان نسبی آلفا فیتوپروتئین در مایع آمنیوتیک در روز های جنینی ۱۶ و ۱۸.....	۶۲

اثر میدان های الکترومغناطیس بر الگوی الکتروفورزی پروتئین های مایع آمینوتیک جنین موش

شهین اسمعیل نژاد

مایع آمینوتیک یک عامل ضروری برای تکوین جنین و بلوغ آن طی بارداری است. در بسیاری از مطالعات غربالگری سطح پروتئین های مایع آمینوتیک، بعنوان نشانگر زیستی برای ناهنجاری های وابسته به بارداری تعیین می شود. آلفافیتوپروتئین، پروتئینی مهم در مایع آمینوتیک و پلاسما است که توسط کیسه زرده و کبد طی دوران جنینی تولید می شود. طی دومین سه ماهه بارداری غلظت آلفافیتوپروتئین سرم جهت غربالگری سندرم دان بررسی می شود. انسان ها در جوامع مدرن در معرض تعداد بیشماری از میدان های الکترومغناطیسی قرار دارند. طبق گزارشات اخیر، میدان های الکترومغناطیسی باعث آسیب به DNA و بیماری های نورولوژیکال می شوند. هدف از این پژوهش بررسی اثر میدان الکترومغناطیسی ۱ میلی تسلا (۵۰هرتز) بر الگوی الکتروفورزی پروتئین ها و بیان آلفافیتوپروتئین در مایع آمینوتیک جنین موش بود. موش های باردار در روزهای بارداری ۱۵ و ۱۷ به مدت ۵ ساعت داخل سولنوئید قرار داده شدند. موش ها ۲۴ ساعت بعد از آخرین پرتوگیری کشته شدند. نمونه های مایع آمینوتیک از موش های باردار در روزهای بارداری ۱۶ و ۱۸ بدست آمد. جهت جداسازی سلول های تخریب شده، نمونه مایع آمینوتیک بلافاصله تحت سانتریفوژ در دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. الگوی الکتروفورزی و بیان نسبی آلفافیتوپروتئین توسط الکتروفورز و وسترن بلاتینگ مطالعه شد. الکتروفورز ژل - SDS پلی آکریل آمید با استفاده از ژل پلی آکریل آمید ۱۲/۵٪ انجام شد. باند های ژل تحت آنالیز دندسیتومتری قرار گرفت. تغییرات معنی داری در الگوی الکتروفورزی در نمونه های تیمار شده توسط میدان الکترومغناطیسی در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید. همچنین بیان نسبی آلفافیتوپروتئین در نمونه های تیمار در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت. بنابراین می توان نتیجه گرفت که میدان های الکترومغناطیسی الگوی بیان پروتئین ها را در مایع آمینوتیک با اثر بر بیان ژن شامل ژن آلفا فیتوپروتئین و/یا سد های خونی، تغییر می دهد.

واژه های کلیدی: مایع آمینوتیک، الگوی الکتروفورزی، میدان های الکترومغناطیسی، آلفا فیتوپروتئین

Abstract

The effect of electromagnetic fields on electrophoretic pattern of amniotic fluid proteins in mouse embryo

Shahin Esmailnezhad

Amniotic fluid (AF) is an essential component for fetal development and maturation during pregnancy. The levels of proteins in AF have been determined in many studies to screen for potential biomarkers of pregnancy-associated abnormalities. Alpha fetoprotein (AFP) is a major amniotic fluid and plasma protein produced by the yolk sac and the liver during the fetal period. During the second trimester of pregnancy, AFP serum concentrations are commonly used for screening Down syndrome. Humans in modern society are exposed to an ever-increasing number of electromagnetic fields (EMFs). Recently, EMFs were reported to cause DNA damage and neurological diseases. The aim of this research was to assess the effects of 50Hz/1mT electromagnetic field on electrophoretic pattern and AFP expression in the amniotic fluid in the mouse embryo. The pregnant mice were placed inside the solenoid for five hours on gestational days 15 and 17. Mice were sacrificed 24 hours after the final exposure session. AF samples were obtained from pregnant mouse in gestational days 16 and 18. Fresh AF immediately underwent centrifugation at 12,000 rpm at 4°C for 10 min to separate cell debris. Electrophoretic pattern and AFP relative expression were studied by electrophoresis and western blot. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was performed using 12.5% polyacrylamide gels. The bands on the gel were analyzed by densitometer. The results of this study show that there is significant changes in the electrophoretic pattern of the samples treated by EMF as compared to control group. It was also shown that AFP expression increases in the EMF treated AF as compared to controls. It is concluded that EMF changes the pattern of protein expression in the AF by affecting on the gene expression including AFP, and/or blood barriers.

Keywords: Amniotic fluid, Electrophoretic pattern, Electromagnetic field, Alpha fetoprotein

فصل اول

مقدمه

۱- مقدمه

امروزه با پیشرفت تکنولوژی میدان های الکترومغناطیسی که محیط اطراف انسان را احاطه نموده افزایش یافته اند از نیمه قرن بیستم الکتریسیته یکی از اجزای ضروری زندگی بشر شد و طی چند دهه گذشته با استفاده روزافزون از وسایل تولید کننده میدان های الکترومغناطیسی ضعیف در منازل، محیط های کار، بیمارستان ها و حتی وسایل الکتریکی که افراد با خود حمل می کنند، انسان همواره در معرض این میدان ها قرار دارد (Torregrossa, 2005). نتایج مطالعات فراوان در رابطه با اثرات گوناگون امواج الکترومغناطیسی حاکی از آن است که تغییرات شدت میدان حتی به اندازه ی چند میلی تسلا نیز دارای اثرات زیستی متفاوتی است، لذا تحقیق درباره تاثیرات امواج الکترومغناطیسی می تواند در طیف بسیار گسترده ای انجام شود. مطالعه درباره اثرات میدان های الکترومغناطیسی بر روی ارگانیسم های زنده نخستین بار توسط اپیدمیولوژیست ها صورت گرفت (Polk, 1996). بعنوان مثال، مطالعات اپیدمیولوژیک روی استفاده از تلفن همراه مدارکی را مبنی بر بالا رفتن خطر سرطان ارائه داده است (Kundi et al., 2004). همچنین اخیراً، وجود خطر افزایش سرطان مغز در ارتباط با استفاده شدید و طولانی مدت از تلفن های همراه توسط محققین مطرح شده است (Hardell et al., 2007). میدان های الکترو مغناطیسی با شدت های مختلف بر شیوع اختلالات تکوینی جنین، نازایی، بروز اختلالات عصبی و خواب، بیماری های گوارشی، قلبی-عروقی موثر است (Polk, 1996; Christ et al., 2006). یکی از بحث های داغ محافل علمی بررسی اثرات منفی میدان های الکترومغناطیسی بر فرآیند های تکوینی است. در مطالعه ای اثر میدان های الکترومغناطیسی بر رویان موش و موش صحرائی بررسی شد که تأخیر رشد در موش و افزایش ناهنجاری های جمجمه ای در موش صحرائی مشاهده شد (Zusman et al., 1990). تاثیرات میدان های الکترومغناطیسی بر فرآیندهای تکوینی و جنینی بسیار بحث برانگیز است اما برخی اثرات منفی این میدان ها بر مدل های جانوری مشاهده شده است که لازم است زنان باردار در برخورد با اینگونه میدان ها اصول ایمنی را رعایت کنند (Gye and Park, 2012). اثر میدان های الکترومغناطیسی بر روی جنین و پرده های جنینی بسیار شدیدتر است. در این تحقیق به بررسی اثر میدان الکترومغناطیسی بر الگوی الکتروفورزی پروتئین های مایع آمنیوتیک جنین موش پرداخته شده است.

مایع آمنیوتیک مایعی غلیظ و شفاف است که حفره آمنیوتیک را پر می کند. مایع آمنیوتیک برای تکوین جنین و بلوغ آن طی بارداری ضروری است (Underwood et al., 2005). منبع مایع آمنیوتیک در طی بارداری تغییر می کند و منعکس کننده این حقیقت است که در دومین و سومین سه ماهه بارداری کلیه جنین منبع اصلی مایع می باشد (Defoort, 2005). مایع آمنیوتیک دارای انواع مختلفی از پروتئین ها، پپتیدها و آنزیم های مختلف است و بیشتر این پروتئین های شناسایی شده فاکتور های رشد، سایتوکاین ها و نشانگر های تومور می باشد. تعیین میزان این ترکیبات در مایع آمنیوتیک می تواند به عنوان یک نشانگر زیستی برای غربالگری ناهنجاری های جنینی مورد استفاده قرار گیرد (Blahovec et al., 1997). یکی از

آزمایشات تشخیصی قبل از تولد انجام آمنیوسنتز^۱ است که مایع بدست آمده از نظر عوامل شیمیایی نظیر غلظت نشانگر های زیستی همچون آلفا فیتوپروتئین و استیل کولین استراز مورد بررسی قرار می گیرد. بعلاوه می توان از سلول های جنینی موجود در مایع آمنیوتیک جهت بررسی های ژنتیکی و کروموزومی نظیر بررسی کاربوتایپ متافاز استفاده نمود (Sadler, 2010).

۱-۱- برده آمنیون پستانداران

جهت تکوین و زنده ماندن در رحم، جنین پستانداران تعدادی از بافت های خارج جنینی را برای تأمین حمایت غذایی و حفاظت مناسب از جنین ایجاد می کند (Pereira et al., 2011). آمنیون پرده خارج جنینی است که رویان آمنیون داران را احاطه می کند. بدین وسیله یک بستر محدود را برای جنین فراهم می سازد که از آن در برابر شوک های محیطی محافظت می کند (Schmidt, 1992). نسبت به پرده های خارج جنینی دیگر، آمنیون از لحاظ مورفولوژیکی محافظت شده تر^۲ می باشد. در مقایسه با کیسه زرده احشایی، کوریون و آلانتوئیس، آمنیون پرده شفاف و نازکی است که در اکثر آمنیون داران فاقد رگ خونی می باشد (Pereira et al., 2011).

۱-۱-۱- آمنیون و تشکیل آن در انسان

نخستین جدایی سلولی درون، توده سلولی داخلی رویان موجب ایجاد دو لایه می شود. لایه پایین تر هیپوبلاست^۳ نام دارد و باقی مانده ی توده سلولی داخلی اپی بلاست^۴ نامیده می شود. سلول های هیپو بلاست به صورت ورقه ای، از توده سلولی داخلی جدا شده و حفره بلاستوسل را می پوشانند. این سلول ها بعداً اندودرم خارج جنینی را ایجاد می کنند که کیسه زرده را به وجود می آورد. لایه سلولی اپی بلاست با ایجاد شکاف های کوچکی در نهایت دو لایه ای می شود که اپی بلاست رویانی را از سایر اپی بلاست که حفره آمنیون را می پوشاند جدا می کند. با تکمیل آستر حفره آمنیون، حفره پر از مایع ترشحي آمنیوتیک می شود. مراحل تشکیل حفره آمنیون از روز هفتم تا روز دهم در شکل ۱-۱ نشان داده شده است (Gilbert, 2006). پس برای اولین بار طی تکوین جنین حفره آمنیوتیک در لایه سلولی اپی بلاست به وجود می آید. به سلول های اپی بلاست مجاور سیتو تروفوبلاست، آمنیوبلاست گویند که این سلول ها همراه با باقیمانده اپی بلاست حفره آمنیوتیک را مفروش می کنند در روز ۱۳ جنینی سلوم خارج رویانی وسعت می یابد و حفره بزرگی را می سازد که حفره کوریون نامیده می شود.

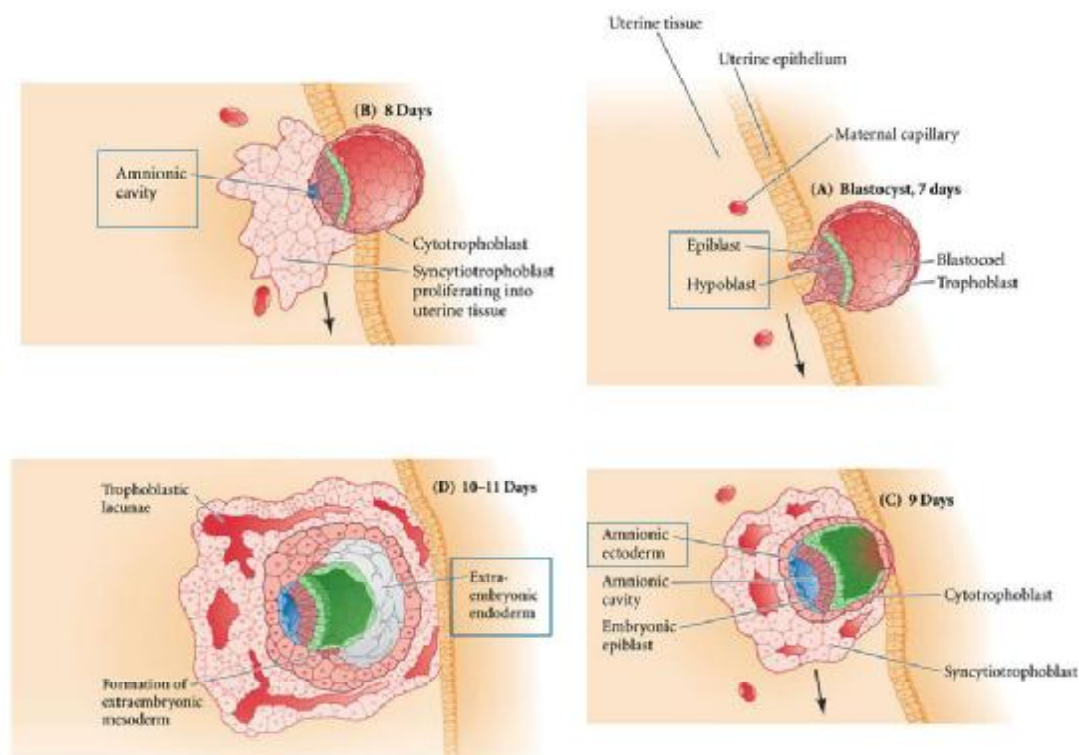
¹ - Amniocentesis

² - Conserved

³ - Hypoblast

⁴ - Epiblast

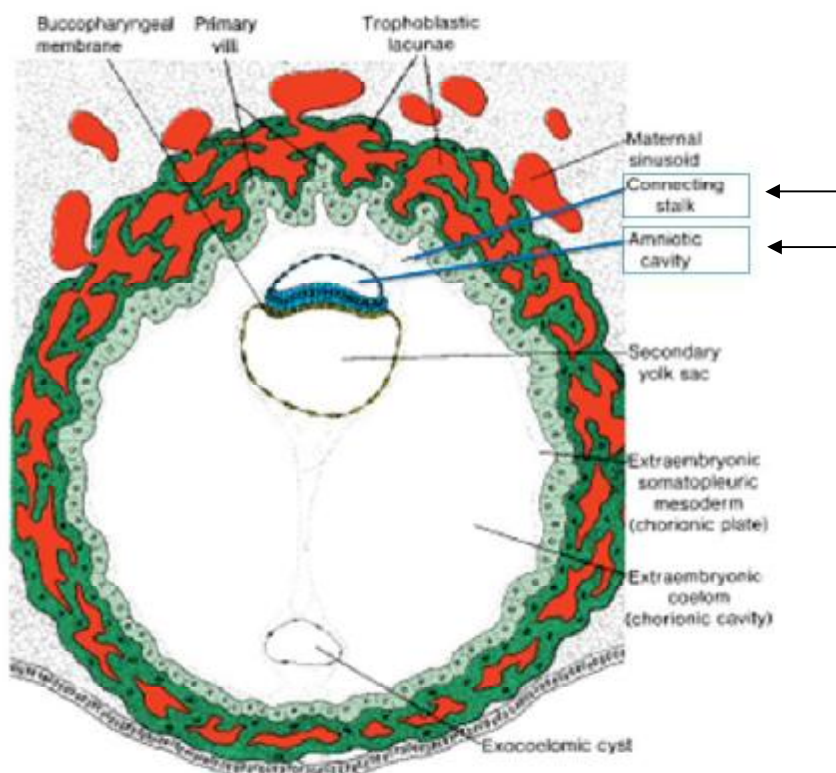
بدین ترتیب مزودرم خارج رویانی که سطح درونی سیتوتروفوبلاست را مفروش می کند صفحه ی کوریونیک^۱ نامیده می شود. تنها مکانی که مزودرم خارج رویانی از حفره کوریون می گذرد در محل ساقه اتصال دهنده^۲ است. با رشد عروق خونی، ساقه اتصالی تبدیل به بند ناف می شود، شکل ۱-۲ جنین انسان را در روز ۱۳ جنینی نشان می دهد. پرده کوریون رشد می کند و حفره رحم را مسدود می کند و همچنین در تشکیل جفت همکاری می کند. تا پایان ماه دوم جنینی پرده های کوریون و آمنیون از هم جدا هستند و حفره کوریونیک بین آنها تشکیل می شود. در پایان ماه سوم جنینی آمنیون و کوریون به هم جوش می خورند (Sadler, 2010). مشابه جفت، پرده های جنینی هم مبادله گاز و مواد زائد را تسهیل می کنند و نقش حیاتی به عنوان سد دفاعی و حمایت از بارداری و زایمان دارند (Cross, 1998).



شکل ۱-۱: تشکیل بافت و پرده آمنیون در جنین انسان بین روزهای ۷ و ۱۱. A و B. بلاستوسیت انسان در مرحله پیش از گاسترولاسیون. سلول های هیپوبلاست به صورت ورقه ای از توده سلولی داخلی جدا شده، حفره بلاستوسل را می پوشاند و بلاستودیسک دو لایه ای را می سازد. C، اپی بلاست به دو قسمت اکتودرم آمنیونی که حفره آمنیون را در بر می گیرد، و اپی بلاست جنینی تقسیم می شود. D، اندودرم خارج جنینی، کیسه زرده را می سازد. حفره آمنیوتیک نیز شکل گرفته است (Gilbert, 2006).

¹- Chorionic plate

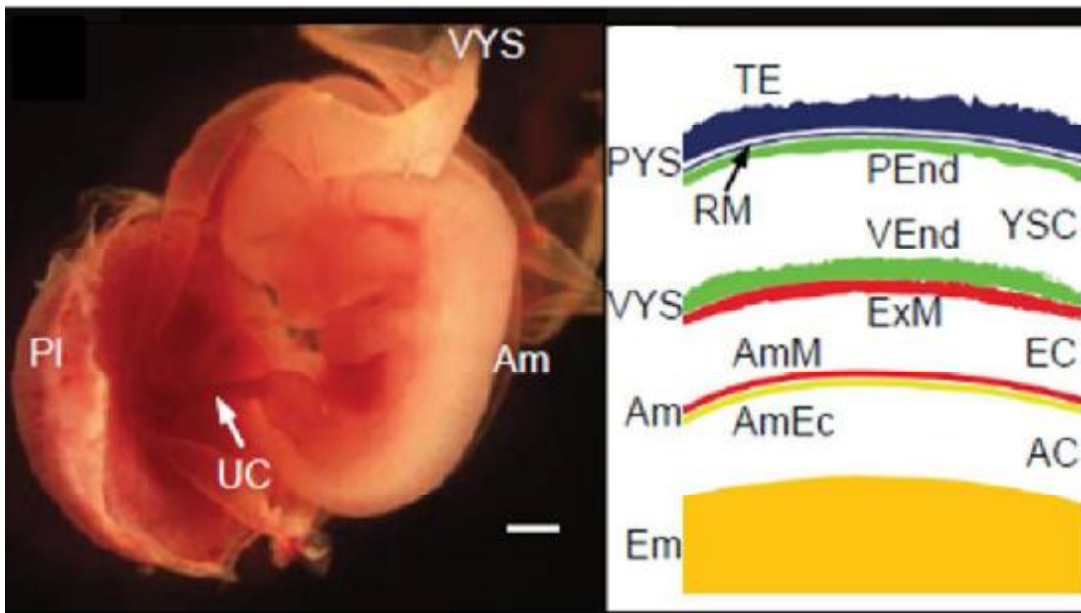
²- Connecting stalk



شکل ۱-۲: بلاستوسیست ۱۳ روزه انسانی. ساقه اتصال دهنده و حفره آمنیوتیک در شکل مشخص شده است (Sadler, 2010).

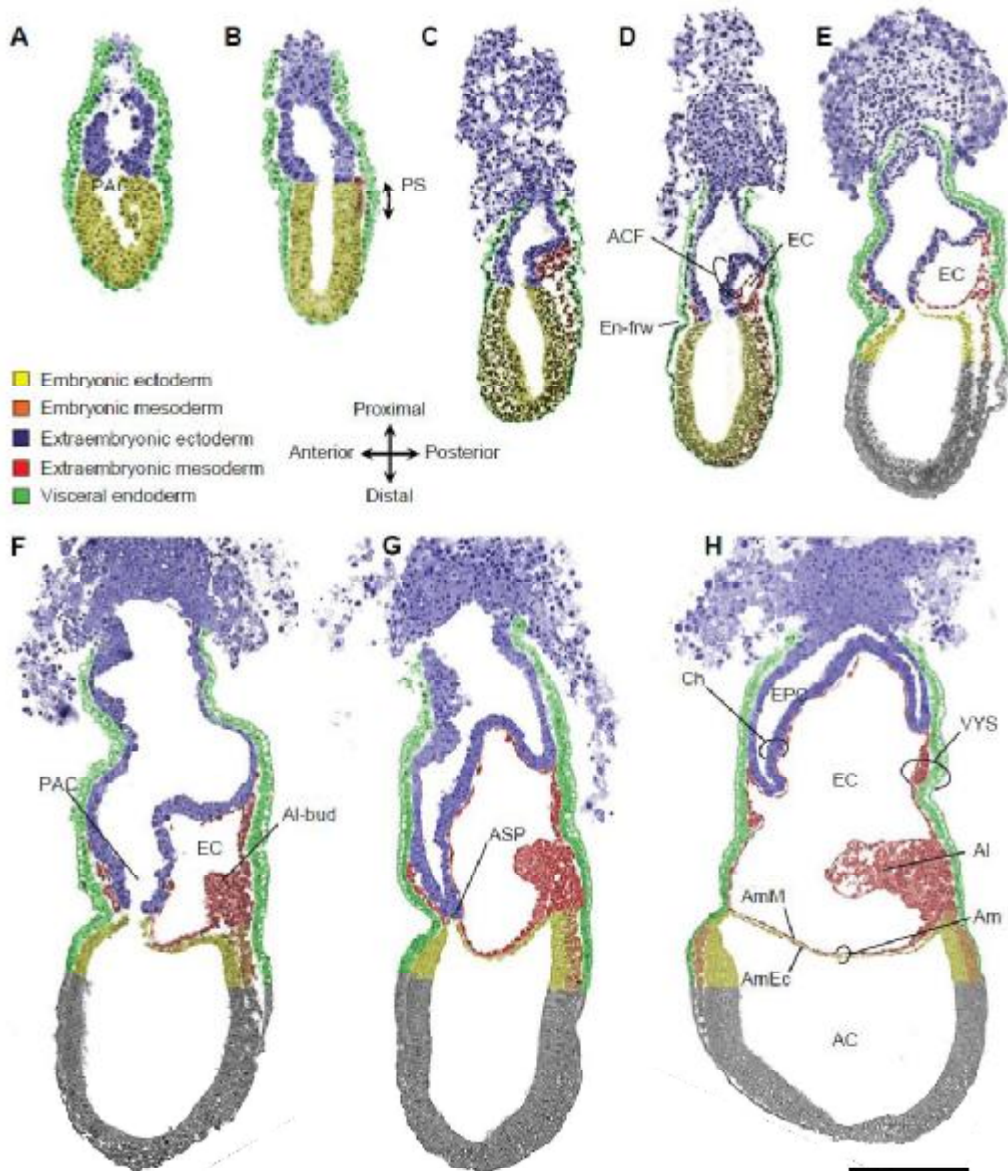
۱-۲-۱- آمنیون و تشکیل آن در مدل جانوری موش

در جنین موش آمنیون شامل یک پرده دو لایه از مزودرم و اکتودرم به ترتیب در حفره اگزوسلوم و حفره آمنیوتیک می باشد که در شکل ۱-۳ نشان داده شده است (Gardner, 1978). به تدریج یک غشای پایه مرکب از کلاژن، لامینین، نیدوژن و فیبرهای فیبرونکتین بین اکتودرم و مزودرم آمنیوتیک تشکیل می شود (George *et al.*, 1993). مزودرم و اکتودرم آمنیوتیک از مناطق متفاوتی از اپی بلاست مشتق می شوند (Pereira *et al.*, 2011).



شکل ۱-۳: پرده آمنیون در جنین موش. AmEc (اکتودرم آمنیوتیک)، AmM (مزودرم آمنیوتیک)، AC (حفره آمنیوتیک)، EC (حفره اگزوسلومی)، Em (جنین)، ExM (مزودرم خارج جنینی)، PEnd (اندودرم جداری)، RM (غشای ریچارد)، TE (تروفوبلاست)، VEnd (اندودرم احشایی)، YSC (حفره کیسه زرده)، AM (آمنیون)، VYS (کیسه زرده احشایی)، PYS (کیسه زرده جداری) و UC (بند ناف) (Pereira *et al.*, 2011).

تشکیل آمنیون در موش طی گاسترولاسیون شروع می شود که مراحل آن در شکل ۱-۴ مشاهده می شود. مزودرم خارج جنینی بین اکتودرم خارج جنینی و اندودرم احشایی در بخش خلفی جنینی انباشته می شود و یک چین خارج جنینی و جنینی در حفره پیش آمنیوتیک به صورت یک برآمدگی ایجاد می شود (شکل B ۱-۴). این چین، چین آمنیوتیک خلفی یا چین آمنیوکوریونیک نامیده می شود. همچنین لاکوناهاى كوچكى در مزودرم خارج جنینی پدیدار می گردد (شکل C ۱-۴). در نهایت این لاکوناها به هم پیوسته و ادغام می شوند و بدین ترتیب یک حفره بزرگتر اگزوسلوم را به وجود می آورند (شکل D ۱-۴). اکتودرم چین آمنیوکوریونیک مشتق از اپی بلاست و اکتودرم خارج جنینی می باشد (Ciruna and Rossant, 1999). سپس کانال پیش آمنیوتیک شروع می کند به قرار گیری در بخش قدامی، نزدیک جایی که باله های جانبی اگزوسلوم همگرا می شوند (شکل F ۱-۴). در اینجا است که اکتودرم آمنیوتیک، حفره آمنیوتیک را مشخص می کند و اکتودرم خارج جنینی، اکتودرم کوریونیک نامیده می شود. حفره اگزوسلوم به بزرگ شدن با تجمع مزودرم خارج جنینی برای تشکیل کیسه زرده احشایی، آلانتویس و جزایر خونی بعلاوه تفکیک آمنیون و کوریون، ادامه می دهد (شکل H ۱-۴). پرده های آمنیوتیک و کوریونیک، حفره پیش آمنیوتیک را به حفرات آمنیوتیک، اگزوسلوم و اکتوپلسنتا تقسیم می کنند (شکل H ۱-۴) (Pereira *et al.*, 2011).



شکل ۱-۴: تشکیل آمنیون در موش. PS (خط اولیه)، ACF (چین آمنیوکوریونیک)، EN-fw (شیار اندودرمی)، EC (حفره ی آگزوسلومی)، PAC (حفره ی پیش آمنیوتیک)، AL-bud (جوانه آلانتوئیس)، ASP (نقطه جدایی قدامی)، Ch (پرده ی کوریونیک)، EPC (حفره ی اکتوپلسنتا)، VYS (کیسه زرده احشایی)، AI (آلانتوئیس)، Am (پرده آمنیوتیک)، AmM (مزودرم آمنیوتیک)، AmEc (اکتودرم آمنیوتیک)، AC (حفره ی آمنیوتیک). جهت توضیح به متن مراجعه شود (Pereira *et al.*, 2011).

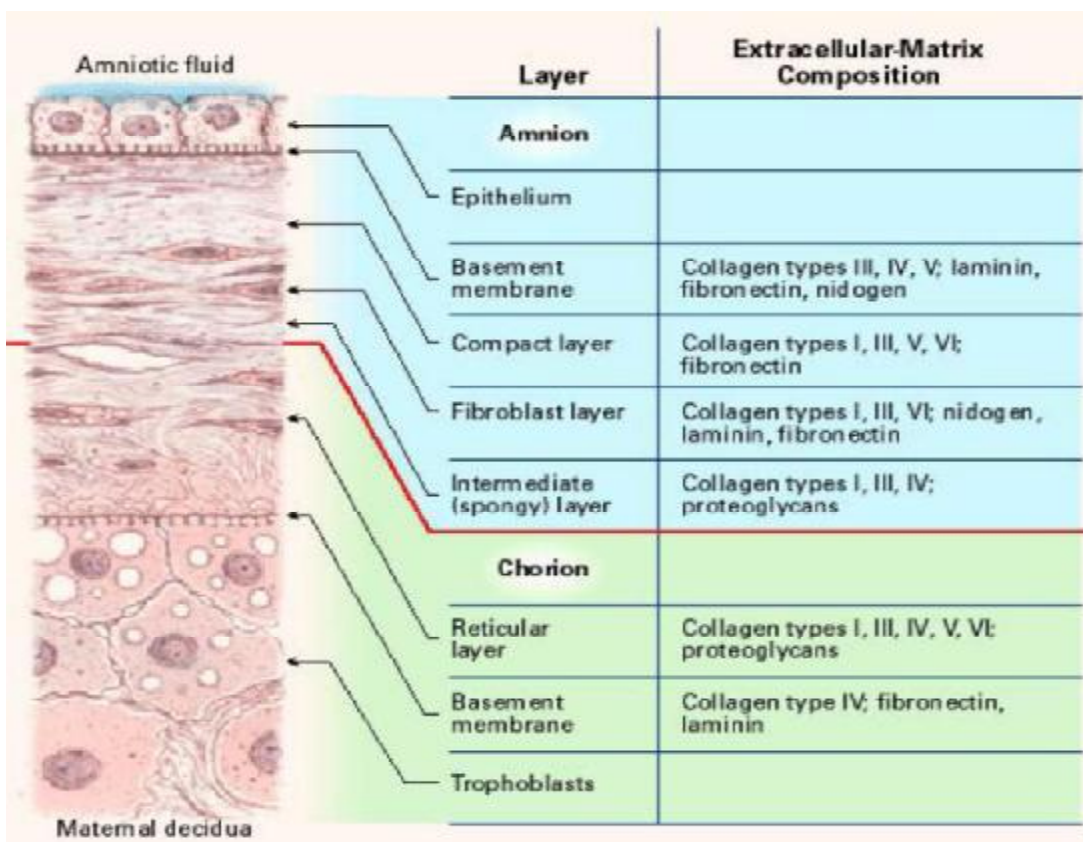
۱-۱-۳- ساختار بافت شناسی آمنیون

پرده آمنیون از لحاظ بافت شناسی فاقد رگ خونی و اعصاب است. پرده آمنیون مطابق شکل ۱-۵ متشکل از چندین لایه است

که عبارتند از: الف) لایه تک سلولی اپی تلیال ج) لایه فشرده ه) لایه اسفنجی

ب) غشای پایه د) لایه فیبروبلاست

درونی ترین و نزدیک ترین لایه به جنین اپی تلیوم آمنیوتیک است که شامل لایه ای تک سلولی است که سلول های آن به صورت یکنواخت کنار هم و بر روی غشای پایه چیده شده اند. غشای پایه لایه نازکی است که حاوی انواع کلاژن، لامینین و فیبرونکتین است. لایه فشرده، اسکلت فیبروزی اصلی پرده آمنیوتیک را فراهم می کند؛ کلاژن لایه فشرده توسط سلول های مزانشیمی لایه فیبروبلاستی ترشح می شود. لایه میانی یا لایه اسفنجی نزدیک ترین لایه به پرده کوریون است؛ این لایه حاوی محتوای بالای پروتئوگلیسین و گلیکوپروتئین است که هنگام آماده سازی بافتی؛ ظاهری اسفنجی پیدا می کند (Parry and Strauss, 1998).



شکل ۱-۵: تصویر شماتیک ساختار پرده های جنینی و ترکیبات ماتریکس خارج سلولی هر لایه (Parry and Strauss, 1998).

ژن های بسیاری در تشکیل آمیون دخیل هستند، از جمله این ژن ها می توان به ژن Bmp 2 و Smad 5 اشاره کرد که جهش در آن موجب تأخیر در بسته شدن آمیون می شود. همچنین ژن Amn که جهش در آن مانع تشکیل کیسه آمیون می شود (Reviewed by Pereira *et al.*, 2011).

۱-۲- مایع آمیوتیک

مایع آمیوتیک مایعی غلیظ و شفاف است که حفره آمیوتیک را پر می کند. مایع آمیوتیک برای تکوین جنین و بلوغ آن طی بارداری ضروری است (Underwood *et al.*, 2005). پرده آمیوتیک یک کیسه محافظ را دور جنین تشکیل می دهد که به جنین اجازه حرکت و رشد می دهد و از جنین در حال رشد در برابر شوک های مکانیکی و حرارتی محافظت می کند (Akinbi *et al.*, 2004). مایع آمیوتیک مانع چسبندگی بافت های در حال رشد جنین اولیه با بافت های اطراف می شود و فضایی را ایجاد می کند که به عنوان ضربه گیر در برابر ضربه وارد به جنین عمل می کند و برای حرکت و رشد فعال جنین مهم است (Potte, 1946; Dunn, 1972). مایع آمیوتیک به عنوان بخشی از سیستم ایمنی ذاتی دارای نقش مهمی است زیرا این مایع دارای منبع سازمان یافته ای از پپتیدهای ضد میکروبی است که در برابر عفونت، باکتری های عمومی و قارچ های بیماری زا ایمنی ایجاد می کند (Akinbi *et al.*, 2004; Defoort, 2005). ناقل های یونی^۱ فعال در سراسر پرده آمیوتیک وجود دارد که یون ها را به داخل حفره آمیوتیک انتقال می دهد که به دنبال آن آب هم در جهت شیب غلظت وارد حفره می شود (Callen, 2000). نبود مایع آمیوتیک جلوی رشد جنین را می گیرد و به انواع بدشکلی های جنینی، بدشکلی های صورت و اندام حرکتی و عدم چرخش طبیعی گوش ها و چندین ناهنجاری دیگر منجر می شود (Potte, 1946; Dunn, 1972).

۱-۳- حجم مایع آمیوتیک

ارزیابی حجم مایع آمیوتیک و تعیین مقدار آن یک موضوع مهم در فیزیولوژی جنین و جفت و ابزاری مهم برای مراقبت های کلینیکی جنین است (Callen, 2000; Schrimmer and Moore, 2002). میزان این مایع مرتب افزایش می یابد و از ۳۰ میلی لیتر در هفته دهم به ۴۵۰ میلی لیتر در بیست هفتگی می رسد. بیشترین مقدار مایع آمیوتیک به طور تقریبی ۸۰۰ تا ۱۰۰۰ میلی لیتر در سی و هفت هفتگی است. از ناهنجاری های حجم مایع آمیوتیک می توان به پلی هیدروآمیوس، که به

^۱- Ion Transport