بررسی تکامل اولیه لنز در جنین جوجه به‌وسیلهٔ مدلسازی سه‌بُعدی باکامپیوتر

سعید رهبر Ph.D☆♦، مجتبی رضازاده ولوجردی Ph.D★، احمد حسینی Ph.D★

☆ جهاد دانشگاهی علوم پزشکی ایران ـ پژوهشکده رویان

★ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

★ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی

چکیده

* **هدف:** بررسی تکامل اولیه لنز در جنین جوجه به‌وسیلهٔ مدلسازی سه‌بُعدی باکامپیوتر

* **مواد و روشها:** مقاطع سریال از لنز اولیه پردازش و به‌وسیلهٔ میکروسکوپ نوری نقشه‌های توموگرافی تهیه شد. سپس توسط نرم‌افزار اتوکد سه‌بُعدی سازی انجام شد.

* **یافته‌ها:** در این بررسی مشخص شد که: ۱) اپی‌تلیوم اکتودرم سطحی ضخیم شده و سپس به سمت داخل انحنا می‌یابد. ۲) این تورفتگی وسیع‌تر شده و در لبهٔ شکمی شیب کمتر و وسعت بیشتری دارد. ۳) ناحیهٔ تورفته اپی‌تلیوم اکتودرمی سطحی، حباب لنزی نامتقارن را با لبه‌های برآمده و قسمت گود مرکزی ایجاد می‌کند و روزنهٔ لنزی بسته شده و لنز اوّلیه حاصل از اینواژینه شدن از قسمتهای فوقانی شروع و تا نواحی تحتانی ادامه می‌یابد.

* **نتیجه‌گیری:** به‌نظر می‌رسد که تورفتگی ناحیهٔ مرکزی پلاک لنزی همزمان با برآمدگی نواحی کناری پلاک لنزی است.

گل واژگان: پلاک لنزی، تورفتگی، مدلسازی سه‌بُعدی

مقدمه

مدلسازی سه‌بُعدی یا بازسازی حجمی با کامپیوتر یکی از روشهای جدیدی است که در علوم ریخت‌شناسی جایگاه ویژه‌ای را به‌خود اختصاص داده است. به‌طوری‌که مطالعات انجام شده به‌وسیلهٔ این تکنیک، نظرات و اطلاعات جدیدی را فراروی محققان قرار داده است. اهمیت استفاده از روش مدلسازی سه‌بُعدی با کامپیوتر در جنین‌شناسی دو چندان است، زیرا از یک‌سو حرکتهای مورفوژنتیک بسیاری در روند تکاملی جنین دیده می‌شود و از سوی دیگر؛ نگرش حجمی به ساختارهای جنینی باعث درک بهتر تکامل آن اندام خواهد شد (۱).

در این بررسی تکامل اولیه لنز در جنین جوجه به‌وسیلهٔ مدلسازی سه‌بُعدی با کامپیوتر مطالعه شد.

تغییر شکل پلاک لنزی[1] به جام لنزی[2] وابسته به تماس غیرمستقیم پلاک لنزی و جام بینایی است (۲). احتمالاً انحناها و تورفتگی‌ها در چشم در اثر انقباض میکروفیلامانهای ناحیهٔ راسی سلولها انجام می‌شود. از آنجایی که سلولها با هم دارای اتصالات پیچیده‌ای هستند، همگی با هم به داخل کشیده می‌شوند و در نتیجه انحنا یا تورفتگی در لنز اولیه ایجاد می‌شود (۳). جام لنزی حاصل از پلاک لنزی است که در اثر جداشدن پلاک لنزی از اپی‌تلیوم اکتودرمی سطحی به‌وسیلهٔ یک تورفتگی با ساختمانی نامتقارن به‌وجود می‌آید (۴، ۵). تورفتگی لبهٔ قدامی روزنهٔ لنزی شیب ملایم‌تری نسبت به بقیهٔ قسمتها دارد (۴). به‌عبارت دیگر؛ ابتدا یک تورفتگی در پلاک لنزی پدید می‌آید، سپس این تورفتگی عمیق‌تر شده و یک روزنهٔ لنزی[3] کاملاً وسیع را ایجاد می‌کند. در مرحله بعد ابعاد دهانهٔ روزنهٔ لنزی کاهش یافته و جام لنزی کاملاً توسعه یافته، به‌صورت یک قسمت مستقل از اپی‌تلیوم اکتودرمی سطحی[4] تشکیل می‌شود (۶، ۷).

این نامتقارن بودن حرکتهای مورفوژنتیکی در تکامل اولیه از جمله پلاک لنزی چشم به‌دلیل تغییرات ساختمانهای دیگر در سر جنین است (۸). آنچه که با مرور بر مطالعات انجام شده در بررسی تکامل اولیه به‌نظر می‌رسد این است که با وجود بررسیهای بسیار دقیق در تمام جوانب، حتی ژنتیکی و بیوشیمیایی، مطالعهٔ چندانی در مورد ساختمان حجمی لنز اولیه صورت نگرفته است در حالی‌که بسیاری از حرکتهای مورفوژنتیک و تغییرات مورفولوژیکی در تکامل چشم اوّلیه، مستلزم بررسی ابعاد فیزیکی با زمینه هندسه فضایی است.

در این تحقیق ضمن ارایهٔ تکنیکهای مُدلسازی سه‌بُعدی به‌عنوان یک روش با مزیّتهای فراوان، سعی شده است که چگونگی تقارن در تشکیل لنز اولیه، ساختار حجمی آن، هندسهٔ فضایی حرکتهای مورفوژنتیکی و تغییرات مورفولوژیکی لنز اولیه بررسی شود.

مواد و روشها

تخم‌مرغ نطفه‌دار نژاد White Leghorn در داخل انکوباتور با درجه حرارت ۳۸° تا ۳۹° سانتی‌گراد و رطوبت مناسب قرار داده شد و از ساعت ۳۵ تا ۷۰ انکوباسیون، جنینهای حاصله هر نیم ساعت خارج شده و براساس مرحله‌بندی هامبرگر، هامیلتون طبقه‌بندی شدند. پس از جداکردن جنین از داخل تخم‌مرغ به‌وسیلهٔ حلقهٔ کاغذی، فیکساسیون با محلول بوئن انجام گرفت و پردازش بافت جنینی شامل آبگیری، شفاف کردن و آغشتگی با پارافین انجام شد. سپس مقاطع سریال به ضخامت ۶ میکرومتر تهیه شد و اسلایدها با رنگ هماتوکسیلین، ائوزین رنگ‌آمیزی شدند و از مقاطع رنگ‌آمیزی شده با میکروسکوپ نوری مجهز به لولهٔ رسم، تصاویر توموگرافیکی ترسیم شد (بزرگنمایی ۲۳۰×).

* چگونگی ورود اطلاعات به کامپیوتر

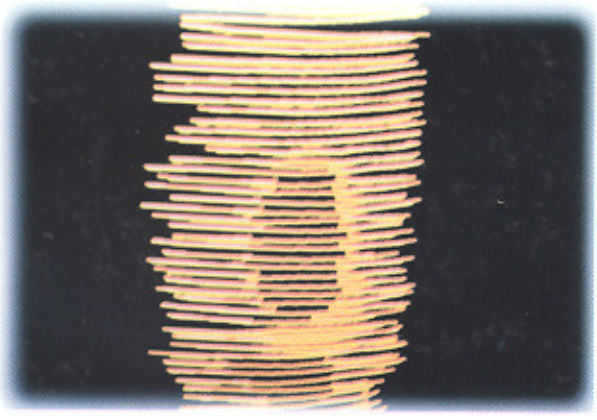
قبل از واردکردن اطلاعات حدود دقیق تصاویر نسبت به هم تعیین شد که برای این منظور از نقطه مرجع استفاده گردید. دیوارهٔ خارجی جنین و دیوارهٔ منفرد اولیه که در تمام مقاطع تکرار شده بود به‌عنوان نقاط مرجع داخلی تعیین شده و با تطابق دو نقشه پشت سر هم، یک نقطه و خط فرضی به‌عنوان نقطه مرجع خارجی تعیین گردید و این روش برای تمامی تصاویر تکرار شد. تصاویر به‌وسیلهٔ قلم Stylus دیجیتایزر رسم و بعد از تعیین ارتفاع، تصاویر بر روی هم سوار شدند.

یافته‌ها

برای سهولت در این بررسی، تکامل لنز اولیه به ۴ مرحله طبقه‌بندی شد که اساس آن سن جنین و مرحله‌بندی تعریف شده به‌وسیلهٔ هامبرگر و هامیلتون[5] (۱۱) است.

* فاز I: مرحلهٔ ۱۲ و ۱۳ و ساعت ۴۸ تا ۵۲ جنینی

در این مرحله اپی‌تلیوم اکتودرمی سطحی ضخیم شده و تورفتگی به داخل شروع می‌شود. خطوط حاصل از مقاطع مابقی نقاط اپی‌تلیوم اکتودرمی سطحی بدون انحنا قابل مشاهده است (شکل ۱).



شکل ۱: اپی‌تلیوم اکتودرمی سطحی و قسمت ضخیم شده به‌وجود آورندهٔ پلاک لنزی: جنین جوجه فاز I، مرحلهٔ ۱۲ و ۱۳ و ساعت ۴۸ تا ۵۲ جنینی (H-H) (بزرگنمایی ۲۳۰×).

1. Lens placode
2. Lens cap
3. Lens pit
4. Surface ectodermal epithelium
5. Hamburger and Hamilton

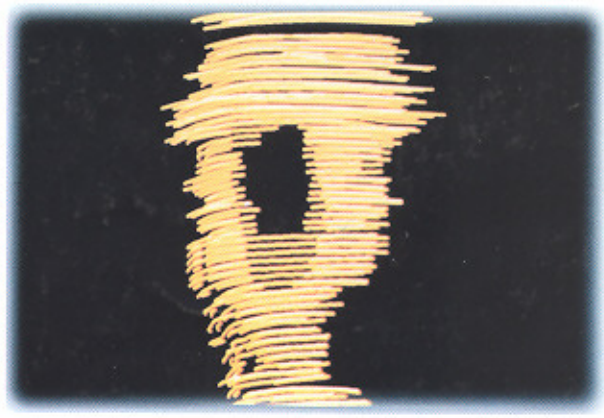
* فاز II: مرحلهٔ ۱۴ و ۱۵ و ساعت ۵۲ تا ۵۶ جنینی

تورفتگی اپی‌تلیوم اکتودرمی سطحی بسیار وسیع شده و در لبهٔ شکمی[1] شیب کمتری نسبت به دیگر لبه‌ها مشهود است. انحنای خطوط حاصل از مقاطع بافتی نسبت به فاز I، بسیار وسیعتر شده و میزان انحنا نیز بسیار شدیدتر است و در ناحیهٔ شکمی وسعت ناحیهٔ انحنادار بیش از نواحی دیگر است. مطلب قابل توجه، عدم تقارن دو طرف لبه‌های ناحیهٔ اینوازینه شده است (شکل ۲).

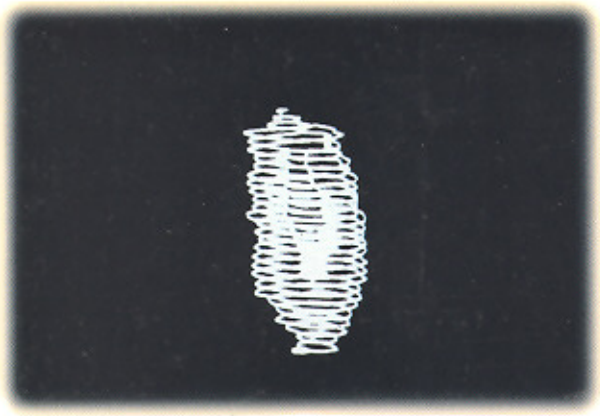
شکل ۲: اپی‌تلیوم اکتودرمی سطحی با انوازیناسیون وسیع. قسمت ضخیم شدهٔ آن بیانگر پلاک لنزی است: فاز II، مرحلهٔ ۱۴ و ۱۵ و ساعت ۵۲ تا ۵۶ جنینی (H-H) (بزرگنمایی ۲۳۰×).

* فاز III: مرحلهٔ ۱۶ و ۱۷ ساعت ۵۶ تا ۶۴ جنینی

به‌علت تورفتگی بیشتر پلاک لنزی فضای ایجاد شده نسبت به فاز II کاهش می‌یابد و این محدوده به‌صورت یک حفرهٔ دارای انحنا در نواحی کناری، مشاهده می‌شود. قسمت تورفته اپی‌تلیوم اکتودرمی سطحی که همان حباب لنزی[2] است به‌صورت ناحیه‌ای با لبه‌های برآمده و قسمت گود مرکزی به‌خصوص در بخشهای میانی مشاهده می‌شود که این برآمدگی و تورفتگی تقریباً نامتقارن است (شکل ۳ و ۴).



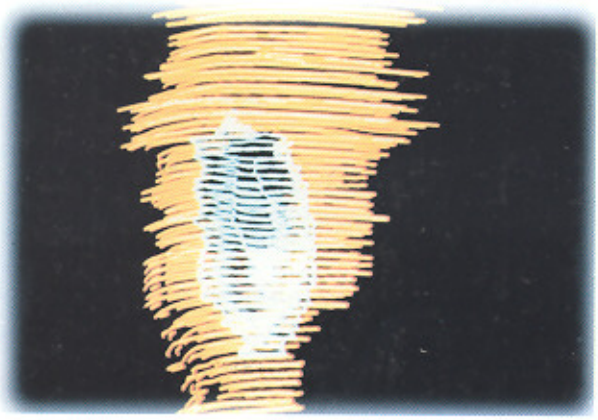
شکل ۳: اپی‌تلیوم اکتودرمی سطحی و ناحیه‌ای که تبدیل به جام لنزی شده و به‌صورت حفره‌ای توخالی مشاهده می‌گردد. در نواحی تحتانی به‌علت عدم جداسازی کامل فقط تورفتگی دیده می‌شود: فاز III، مرحلهٔ ۱۶ و ۱۷ ساعت ۵۶ تا ۶۴ جنینی (H-H) (بزرگنمایی ۲۳۰×).



شکل ۴: جام لنزی در حال تشکیل و منشعب از اپی‌تلیوم اکتودرمی سطحی که به‌صورت مستقل نشان داده شده‌است: فاز III، مرحلهٔ ۱۶ و ۱۷ ساعت ۵۶ تا ۶۴ جنینی (H-H) (بزرگنمایی ۲۳۰×).

به‌طوری که در شکل ۵ مشاهده می‌شود در نواحی از لنز اولیه که تورفتگی کامل شده است اپی‌تلیوم اکتودرمی سطحی کاملاً جدا شده و به‌صورت یک لایه مستقل بر روی لنز اولیه قرار گرفته است، اما در نواحی تحتانی و مرکزی جدا شدن به‌طور کامل انجام نشده است.

نکتهٔ مهمی که در مدلسازی سه‌بُعدی با کامپیوتر مشخص شده این است که بسته شدن روزنه لنزی و ایجاد لنز اولیه حاصل از تورفتگی، از قسمتهای فوقانی شروع و سپس به سمت نواحی تحتانی ادامه می‌یابد.



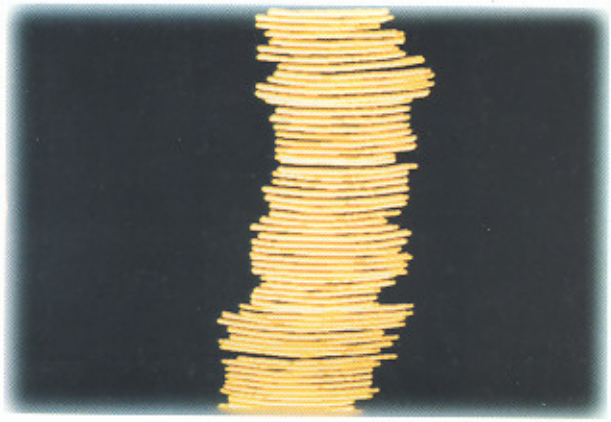
شکل ۵: اپی‌تلیوم اکتودرمی سطحی و جباب لنزی به‌صورت تلفیقی و چگونگی ارتباط آنها: فاز III، مرحلهٔ ۱۶ و ۱۷ ساعت ۵۶ تا ۶۴ جنینی (H-H) رنگ زرد: اپی‌تلیوم اکتودرمی سطحی، رنگ آبی: جام لنزی (بزرگنمایی ۲۳۰×).

* فاز IV: مرحلهٔ ۱۸ ساعت ۶۴ تا ۶۹ جنینی

در این فاز اپی‌تلیوم اکتودرمی سطحی کاملاً از حباب لنزی جدا شده و به‌صورت یک لایهٔ مستقل بدون هیچ‌گونه انحنا یا تورفتگی و برآمدگی بر روی سطح خارجی چشم اولیه کشیده

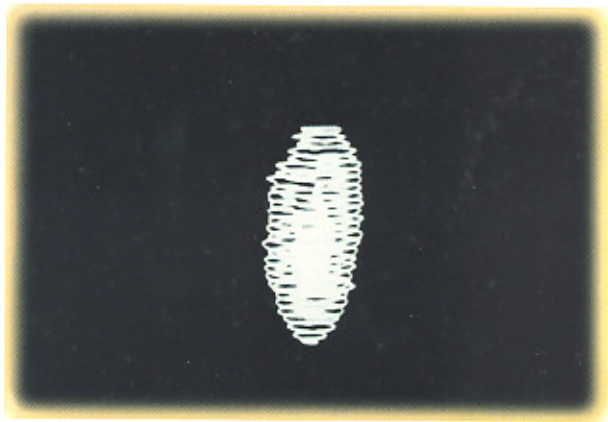
1. Ventral
2. Lens vesicle

شده است (شکل ٦).



شکل ۶: اپی‌تلیوم اکتودرمی سطحی که به‌صورت یک لایه کاملاً مستقل دیده می‌شود: فاز IV. مرحلهٔ ۱۸ ساعت ۶۴ تا ۶۹ جنینی (H-H) (بزرگنمایی ۲۳۰×).

حباب لنزی کاملاً بسته شده و به‌صورت لنز اولیه مشاهده می‌گردد و فقط در قسمت مرکزی دارای یک انحنای بسیار جزئی بسته با شیب کم است. وسعت لنز اولیه در نواحی میانی زیاد بوده و در دو انتها به‌مرور کاهش می‌یابد (شکل ۷).



شکل ۷: جام لنزی کاملاً تشکیل شده به‌صورت لنز اولیه: فاز IV. مرحلهٔ ۱۸ ساعت ۶۴ تا ۶۹ جنینی (H-H) (بزرگنمایی ۲۳۰×).

در شکل ۸ می‌توان چگونگی ارتباط بین اپی‌تلیوم اکتودرمی سطحی و لنز اولیه را مشاهده کرد و ایجاد تقارن در قسمتهای مختلف لنز اوّلیه و اپی‌تلیوم اکتودرمی سطحی قابل رویت است. همچنین جداسازی دو ناحیهٔ ذکر شده به‌صورت کامل انجام شده است.

مزیّت مدلسازی سه‌بُعدی در فازهای یاد شده را نسبت به تکنیکهای دیگر می‌توان در نمایش اپی‌تلیوم اکتودرمی سطحی و لنز اولیه به‌صورت جداگانه، همراه با یکدیگر، جدا از سایر نواحی لنز اولیه و در تمام نقاط به‌صورت همزمان عنوان نمود.

شکل ۸: تلفیق تصاویر لنز اولیه و اپی‌تلیوم اکتودرمی سطحی و چگونگی ارتباط آن: فاز IV. مرحلهٔ ۱۸ ساعت ۶۴ تا ۶۹ جنینی (H-H). رنگ زرد: اپی‌تلیوم اکتودرمی سطحی، رنگ آبی: لنز اولیه (بزرگنمایی ۲۳۰×).

بحث

در مطالعات قبلی بیان شده بود که پلاک لنزی در اثر ضخیم شدگی اپی‌تلیوم اکتودرمی سطحی در ناحیه‌ای مجاور با حباب بینایی، تشکیل می‌شود (۲، ۳، ۴) و ناحیهٔ ضخیم شده اپی‌تلیوم اکتودرمی سطحی به‌صورت نامتقارن دیده می‌شود (۷، ۸). همچنین مطرح شده که پلاک لنزی یک ساختمان نامتقارن است که تورفتگی آن نیز پدیده‌ای نامتقارن می‌باشد. به‌طوری‌که لبهٔ شکمی روزنه لنزی حاصل از تورفتگی دارای شیب ملایم‌تری نسبت به لبه‌های کناری و خلفی است (۴، ٦، ۷).

در بررسی حاضر نیز ضخیم‌شدگی اپی‌تلیوم اکتودرمی سطحی موسوم به پلاک لنزی در فاز I مشاهده می‌شود (شکل ۱). همچنین در فاز II تورفتگی پلاک لنزی و ایجاد یک روزنهٔ لنزی گسترده با دهانهٔ نامتقارن و غیریکنواخت مشاهده می‌شود (شکلهای ۳، ۴، ۵). چنین به‌نظر می‌رسد که تورفته شدن ناحیهٔ مرکزی پلاک لنزی همراه با برآمده شدن نواحی کناری پلاک لنزی است و اپی‌تلیوم اکتودرمی سطحی از حالت یکنواخت خارج شده و به‌صورت ناهموار دیده می‌شود که این ناهمواری در لبهٔ قدامی به‌علت شیب کمتر، مشخص‌تر است که این مشاهدات به‌وسیلهٔ انحنای خطوط حاصل از مقاطع بافتی در مدلسازی سه‌بُعدی به‌خوبی دیده می‌شود (شکل ۲، ۳)؛ گرچه در گزارشهای قبلی توضیحی داده نشده است.

پدیده‌های مورفوژنتیکی از قبیل تورفتگی و برآمدگی ادامه می‌یابند تا اینکه لبه‌های روزنهٔ لنزی به‌هم نزدیک و نزدیک‌تر شده و روزنهٔ لنزی کوچکتر می‌شود و سپس از اپی‌تلیوم اکتودرمی سطحی جدا شده و جام لنزی را ایجاد می‌کند (۷، ۹، ۱۰).

با بررسی به‌وسیلهٔ مدلسازی سه‌بُعدی با کامپیوتر در فاز III مشخص شد که بسته شدن روزنهٔ لنزی و ایجاد لنز اولیه از نواحی فوقانی شروع می‌شود و سپس به ناحیهٔ میانی و تحتانی امتداد می‌یابد (شکل ۳، ۴).

در فاز IV اپی‌تلیوم اکتودرمی سطحی کاملاً از جام لنزی جدا شده و به‌صورت یک لایه مستقل و بدون انحنا بر روی سطح خارجی لنز اولیه

کشیده می‌شود (شکلهای ٦، ٧، ٨). مدلسازی سه‌بُعدی با کامپیوتر هم‌چنین مشخص نمود که وسعت لنز اولیه در نواحی میانی بیشتر از نواحی فوقانی و تحتانی بوده و از وسعت لنز اولیه به‌سمت دو انتها کاسته می‌شود که در گزارشات قبلی اشاره‌ای به دو مطلب اخیر نشده است.

تقدیر و تشکر

نویسندگان بدینوسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین و کارکنان دانشگاه تربیت مدرس و جهاد دانشگاهی علوم پزشکی ایران که در انجام این تحقیق مساعدت فراوان نمودند ابراز می‌دارند.

References

1. Poggon PI: Rapid three dimensional reconstruction at the light microscopic level and a technique for reembedding the same semithin sections. Biotech Histochem 1992; 67(1): 55-57
2. Mckeehan M: Induction of portions of the chick lens without contact with the optic cup. Anat Rec 1985; 132: 297-306
3. Wrenn J, Wessel SK: An ultrastructural study of lens invagination in the mouse. J Exp Zool 1969; 171: 359-368
4. Wakely J: Observations on the role of ectodermal spreading in the early stages of lens placode invagination in the chick embryo. Exp Eye Res 1984; 38: 627-638
5. Nippon Ika, Daigaku Zasshi: Scanning electron microscopic study of the development of crystalline lens fiber. Hotta K eye 1995; 62(2): 161-175
6. Francis PS, Berry V: Lens biology development and cataractogenesis. Trends Genet 1999; 15(5): 191-196
7. Bancroft M, Bellairs R: Placode of the chick embryo studied by scanning electron microscope: Anat Embryol 1977; 151: 97-108
8. Lovicu FJ, Mcavoy J: Spatial and temporal expression during lens development. Mech Develop 1999; 86 (1-2): 165-169
9. Hifler SR: Development of the eye of the chick embryo. SEM 1983; III: 1353-69
10. Silver R: The initial stage in the development of the lens capsule chick and mouse embryos: Exp Eye Res 1974; 19: 73-77
11. Hamburger and Hamilton H: Development of the chick (Revised) Henry holt and co, New York, 1952
12. Branele K: A new method for aligning histological serial sections for three dimensional reconstruction. Comput Biomed Res 1989; 22(1): 52-62