بررسی سلولهای آپوپتوز غشایی بین انگشتی جنین جوجه و اردک

طاهره مازوچی M.Sc.☆♦، مجتبی رضازاده Ph.D.*، احمد حسینی Ph.D.*

☆ دانشگاه علوم پزشکی کاشان، دانشکده علوم پزشکی، گروه پاتولوژی

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

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

♦ آدرس مکاتبه: کاشان، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، گروه پاتولوژی، صندوق پستی ۱۱۱-۸۷۱۵۵

چکیده

* **هدف:** مقایسه ساختمان غشاء بین انگشتی جنین جوجه (با انگشت آزاد) و جنین اردک (با انگشت پرده‌دار) و تعیین نقش مورفوژنتیک مرگ سلولی در تکامل غشاء بین انگشتی

* **مواد و روشها:** جنینهای جوجه از روز شش و نیم تا نهم انکوباسیون (stage 30-35) و جنینهای اردک از روز ۸/۵ تا ۱۰ انکوباسیون در فواصل ۱۲ ساعته برای این مطالعه انتخاب شدند. در این پژوهش از سه تکنیک رنگ‌آمیزی حیاتی، میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی استفاده شد.

* **یافته‌ها:** نتایج حاصل از این تحقیق به ما نشان داد که مرگ سلولی بین انگشتی هم در جوجه و هم در اردک وجود دارد؛ اما شدت و گسترش مناطق اشغال شده در اردک کمتر است. این تفاوت را با آزاد بودن انگشتان در جوجه و وجود پرده در پای اردک تفسیر کردیم. مقایسه طرح مرگ سلولی بین انگشتی در جوجه و اردک نشان داد که مرگ سلولی، با برداشتن مزانشیم بین انگشتی در جداکردن و شکل دادن انگشتان (Sculpturing) نقش دارد. باید خاطرنشان ساخت که این مرگ سلولی از نوع آپوپتوز است. علاوه بر مرگ سلولی مزانشیمی- تغییرات مهمی در Epithelio-mesenchymal interface مشاهده شد. موجی شدن و پاره شدن غشای پایه اکتودرمی و رسوب شدید کلاژن و مواد بی شکل، برجسته‌ترین تغییرات در ماتریکس خارج سلولی بود. به‌علاوه از سلولهای قاعده‌ای اکتودرمی، پروسسهایی به‌طرف داربست مزانشیمی غشاکشیده شده بود که شاید در اینترکشن اپی‌تلیوم و مزانشیم نقش داشته باشد. همزمان با این تغییرات در ماتریکس خارج سلولی، رگهای خونی نیز پسروی پیدا می‌کنند.

* **نتیجه‌گیری:** از تحقیق حاضر، این‌طور استنتاج می‌شود که حذف غشای بین انگشتی یک فرآیند پیچیده‌ای است که محتاج واکنشهای متقابل همه ترکیبات بافتی در غشا است.

کل واژگان: مرگ سلولی، غشای بین انگشتی، جنین جوجه، جنین اردک

مقدمه

جوانه اندام جوجه یکی از بهترین مدلهای مطالعه مورفوژنز است. در مراحل اولیه تکامل، جوانه اندام شامل یک مرکز سلولهای مزانشیمی غنی در عروق خونی است که به‌وسیله یک پوشش اکتودرمی پوشیده شده است. تشکیل عناصر اسکلتی در یک مسیر Proximo-distal صورت می‌گیرد. بدین ترتیب که سلولهای مزانشیمی متراکم شده زوائد پرکندروژنیک[1] را که مقدمه‌ای برای تشکیل عناصر اسکلتی هستند، تشکیل می‌دهند. تشکیل انگشتان به‌وسیلهٔ متراکم شدن اشعه‌های پرکندروژنیک انگشتان در انتهایی‌ترین دوره مورفوژنز اندام به‌وقوع می‌پیوندد. درحالی‌که فضاهای بین انگشتی تمایز یافته باقی می‌مانند.

مکانیسم جدا شدن انگشتان توجه بسیاری از جنین شناسان را به‌خود جلب کرده است زیرا این قسمت یکی از بهترین مدلهای مطالعهٔ نقش مرگ سلولی در سیستمهای در حال تکامل است. مرگ سلولی بین انگشتی به‌عنوان فاکتور اصلی این فرآیند گزارش شده است (۱، ۲، ۳).

ایجاد انگشتان بهم چسبیده در جوجه با منشاء ژنتیکی یا القای داروی مانع کننده مرگ سلولی بین انگشتی، INZ[2]، یک دلیل آزمایشگاهی برای این تئوری است (۴، ۵).

همچنین مطالعات زیادی وجود دارد که نقش مهم بافت اکتودرمی را در جدا شدن انگشتان نشان می‌دهد (۶، ۷).

Kelley حدس زد که اکتودرم ممکن است به‌طور فعال به‌داخل مناطق نکروتیک (NZ) که در تفکیک انگشتان آزاد شرکت می‌کنند، کشیده شود[3] (۶).

Colvee و Hurle در یک مطالعه SEM مشاهده کردند که اکتودرم بین انگشتی در جوجه به‌طور قابل ملاحظه‌ای با اردک فرق دارد. این مطالعه فرضیهٔ دخالت اکتودرم در تفکیک انگشتان را تأیید می‌کند (۷). همچنین Fernandez-Teran و Hurle عبور ماکروفاژهای مزانشیمی را از عرض اپی‌تلیال مشاهده کردند که این خود گواهی بر نقش فعال اکتودرم در تفکیک انگشتان است (۸).

بنابراین حذف غشای بین انگشتی یک فرآیند پیچیده است که محتاج اینتراکشن همه ترکیبات بافتی در غشا است. در این تحقیق با مقایسه تکامل غشای بین انگشتی جنین جوجه (انگشت آزاد) با جنین اردک (انگشت پرده‌دار) نقش مرگ سلولی در تکامل انگشتان آزاد بررسی می‌شود.

مواد و روشها

تخم مرغها (White leghorn) و تخم اردکهای (Royal Pekin) نطفه‌دار در حرارت ۳۸° سانتی‌گراد و رطوبت، انکوبه شدند. جنینهای جوجه از روز شش و نیم تا نهم انکوباسیون (Stage 30-36) و جنینهای اردک از روز ۸/۵ تا دهم انکوباسیون، در فواصل ۱۲ ساعته، برای این مطالعه انتخاب شدند. در این پروژه از تکنیکهای زیر استفاده شد:

* الف) رنگ‌آمیزی حیاتی[4]

مناطق نکروتیک بین انگشتی به‌وسیله رنگ‌آمیزی Inovo جنین ترسیم می‌شود. در این پروژه از روش H & E (۹) و از نوترال رد به عنوان رنگ حیاتی استفاده شد. بدین ترتیب که بعد از بازکردن پنجره روی تخم‌مرغها و تخم اردکها در روزهای موردنظر، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول نوترال رد (۰/۰۰۰۰۱ در سالین) به‌داخل کیسه آمنیون تزریق شد. سپس جنینها برای ۳۰ دقیقه مجدداً انکوبه شدند تا رنگ در محلهای انتخابی خاص متمرکز شود. بعد از برداشتن جنینها از تخم، پای آنها قطع شده و در یک ظرف محتوی سرم فیزیولوژی قرار داده شد و بلافاصله توسط استریو میکروسکوپ دوربین‌دار عکبرداری صورت گرفت.

* ب) میکروسکوپ نوری (LM)

جنینهای جوجه و اردک، بسته به نوع رنگ‌آمیزی در محلولهای فرمال سالین و بوئینز تثبیت شدند. سپس پای آنها را قطع کرده، مراحل پردازش انجام شد. از نمونه‌ها به‌طور سریال از دیستال به پروگزیمال اندام، برشهای عرضی و طولی به‌ضخامت ۵ میکرون تهیه شد. از برشهایی که در بوئینز تثبیت شده بودند جهت رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ـ ائوزین و نیترات نقره و از نمونه‌هایی که در فرمالین تثبیت شده بودند برای رنگ‌آمیزی فرلگن استفاده شد.

* ج) میکروسکوپ الکترونی (TEM)

جنینهای جوجه در مراحل ۳۲، ۳۳ و ۳۴ که دارای شدت مرگ سلولی بالایی بودند، برای این تکنیک انتخاب شدند. پای آنها در گلوتارآلدئید ۲/۵ درصد (pH=۷/۲) به مدت ۴ ساعت و درجه حرارت ۴° سانتی‌گراد تثبیت شد.

بعد از شستشو در بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH=۷/۲)، در تتروکسید ازمیوم به مدت یک ساعت و در حرارت اتاق Post Fixed شد. نمونه‌ها توسط الکلهای صعودی آبگیری و بعد از انجام مراحل نفوذ توسط پروتئین اکساید در رزین قالبگیری شدند. سپس برشهای Semithin به ضخامت یک میکرون به‌وسیلهٔ میکروتوم LKB تهیه و با تولوئیدین بلو ۱٪ رنگ‌آمیزی شدند. برشهای نازک Ultrathin از مناطقی که مرگ سلولی زیادی دیده شد انتخاب و بعد از رنگ‌آمیزی با یورانیل استات و سیترات سرب با یک میکروسکوپ الکترونی EM-10C مشاهده شد.

یافته‌ها

* الف) نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی حیاتی

مناطق مرگ سلولی به‌وسیلهٔ رنگ‌آمیزی حیاتی مشخص می‌شود. این رنگها در لیزوزومهای ثانویهٔ بزرگ موجود در سلولهای در حال مرگ و ماکروفاژها که قطعات سلول مرده و سلولهای در حال مرگ را می‌بلعند، مشاهده می‌شود.

1. Prechondrogenic anlage
2. Interdigital Necrotic Zones
3. Invaginate
4. Vital Staining

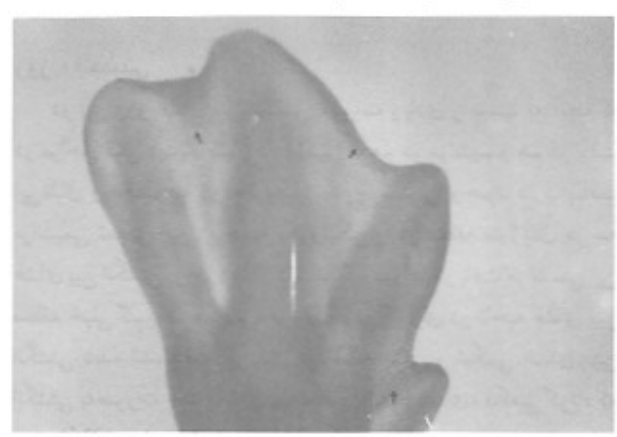
۱ـ جوجه

در جوجه مرگ سلولی بین انگشتی در روز ۶/۵ جنینی (مرحله ۳۰) شروع شده و در روز ۷ جنینی گسترش پیدا کرده و در همه فضاهای بین انگشتی مشاهده شد. در انتهای این روز در Web بین انگشتی اول یک منطقه نکروتیک وسیع از پروگزیمال تا دیستال غشا وجود دارد. در Web بین انگشتی دوم دو منطقه نکروتیک یکی در پروگزیمال و دیگری در دیستال دیده می‌شود. در Web بین انگشتی سوم تنها در قسمت پروگزیمال غشای یک منطقه نکروتیک ملاحظه می‌شود (شکل ۱). در روز ۷/۵ جنینی (مرحله ۳۲ و ۳۳) مرگ سلولی به اوج خود رسید. در روز ۸ (مرحله ۳۴) تنها کمی مرگ سلولی در اطراف چهار انگشت دیده شد و سپس در روز ۸/۵ (مرحله ۳۵) خاتمه پیدا کرد و این درست زمانی است که بافت بین انگشتی به‌طور کامل پسروی کرده و پا شکل بالغ خود را با انگشتان آزاد پیدا کرده است.

شکل ۱: پای جوجه در روز ۷ جنینی در مرحله پیشرفته (رنگ‌آمیزی نوترال رد- بزرگنمایی: x۲۵)

۲ـ اردک

در اردک مرگ سلولی بین انگشتی از روز ۹ تا ۱۱ جنینی مشاهده شد، اولین فضای بین انگشتی بزرگترین منطقه نکروتیک را نشان داد درحالی‌که در سومین و دومین فضای بین انگشتی به‌ترتیب از شدت مرگ سلولی کاسته می‌شد (شکل ۲).



شکل ۲: پای اردک در روز ۹/۵ جنینی (رنگ‌آمیزی: نوترال رد- بزرگنمایی: x۲۵)

مرگ سلولی در هر سه غشاء بین انگشتی وجود دارد اما شدت و تراکم آن نسبت به جوجه کم‌تر است.

* ب) نتایج حاصل از میکروسکوپ نوری

نتایج حاصل از میکروسکوپ نوری در مورد شروع، گسترش و خاتمه مرگ سلولی در غشای بین انگشتی مشابه نتایج به‌دست آمده به‌وسیلهٔ رنگ‌آمیزی حیاتی بود. به‌علاوه، این نتایج نشان داد که علاوه بر مرگ سلولی مزانشیمی در روز ۷/۵ جنینی (مرحله ۳۲) تغییراتی در دیگر قسمتهای غشای بین انگشتی در حال پسروی صورت می‌گیرد.

در طول تمام مراحل جنینی مورد مطالعه، غشای بین انگشتی، ساختمان نسبتاً ساده‌ای شامل یک مرکز سلولهای مزانشیمی پوشیده شده با اکتودرم را دارا است.

۱ـ جوجه

روز ۶/۵ جنینی (مرحله ۳۰)

در غشای بین انگشتی یک داربست مزانشیمی که به‌وسیلهٔ اکتودرم پوشیده شده است، مشاهده می‌شود. داربست مزانشیمی غشای بین انگشتی یک منطقهٔ مرکزی ست سرشار از عروق خونی را نشان می‌دهد. در مقابل در محیط یعنی درست زیر غشای اکتودرمی، بافت مزانشیمی با تراکم بیشتری مشاهده می‌شود. مرگ سلولی مزانشیمی در غشای بین انگشتی اول و سوم مشاهده می‌شود، لایه اپی‌تلیال در سطح پشتی و شکمی از دو ردیف سلول تشکیل شده است. یک ردیف سلولهای مکعبی قاعده‌ای که به‌وسیلهٔ یک ردیف سلولهای سطحی پهن پوشیده شده است. ضخامت غشای پایه، در ناحیه Web بیشتر از نقاط دیگر بوده و آرژینوفیلی بیشتری را از خود نشان می‌دهد.

روز ۷/۵-۷ جنینی (مرحله ۳۱-۳۲)

ساختمان غشای بین انگشتی در این مرحله از رشد، همانند مرحله قبل شامل اکتودرم و یک مرکز مزانشیمی است. محیط این مرکز مزانشیمی متراکم‌تر از مرکز آن است.

مرگ سلولی مزانشیمی در سه غشای بین انگشتی مشاهده می‌شود. با پیشرفت جنین شدت مرگ سلولی افزایش پیدا می‌کند تا اینکه سراسر غشا را دربرمی‌گیرد. در بین سلولهای مرده منفرد، سلولهای بزرگی مشاهده می‌شود که در داخل آنها چندین سلول مرده یا قطعات آنها وجود دارد. به‌نظر می‌رسد که سلولهای مرده به‌وسیلهٔ سلولهای سالم مجاور که خاصیت بیگانه خواری پیدا کرده‌اند، فاگوسیتوز شده‌اند.

لایهٔ اپی‌تلیال غشای بین انگشتی یک طرح ساختمانی مشابه با آنچه که در روز ۷ جنینی مشاهده شد را نشان می‌دهد. در لبه قدامی و خلفی، AER[1] دیده می‌شود. در این قسمت، اپی‌تلیوم به جای دو لایه، استوانه‌ای مطبق کاذب است.

غشای پایه همچنان در ناحیه Web نسبت به قسمتهای دیگر غشا ضخامت بیشتری را از خود نشان می‌دهد.

روز ۷/۵-۸ جنینی (مرحله ۳۳)

محور مزانشیمی غشای بین انگشتی تمرکز برجسته نکروتیکی را در

1. Apical Ectodermal Ridge

منطقهٔ مارژینال غشا از خود نشان می‌دهد. سلولهای مرده جدا از هم و تعدادی ماکروفاژ درون این مرکز دیده می‌شود.

ساختمان لایهٔ اپی‌تلیال غشای بین انگشتی، مشابه مراحل قبلی بود. در AER تعدادی سلول مرده اپی‌تلیال مشاهده شد.

غشای پایه اپی‌تلیالی در ناحیهٔ Web کاملاً ضخیم بوده و آرژینوفیلی بیشتری را از خود نشان می‌دهد.

روز ۸ جنینی (مرحله ۳۴)

در این مرحله، غشای بین انگشتی اختلاف ساختمانی زیادی را با آنچه که در روزهای قبلی دیدیم نشان می‌دهد. تغییرات هم در مزانشیم و هم در بافت اپی‌تلیال و مخصوصاً در Epithelio-mesenchymal interface دیده می‌شود.

بافت مزانشیمی غشاء بین انگشتی متراکم‌تر از مراحل قبل بود. سلولهای مردهٔ جدا و ماکروفاژهای بزرگ در این ناحیه دیده می‌شود. اما شدت آن نسبت به مرحله ۳۳ کمتر شده بود. این سلولها همچنین در مزانشیم اطراف غضروفهای انگشتی به‌خصوص در نوک انگشتان، در زیر اکتودرم مشاهده شد.

بافت اپی‌تلیال غشای بین انگشتی در این مرحله، اختلاف واضحی را نشان داد. در سطح شکمی و پشتی غشای سلولهای سطحی، ظاهر گرد به‌خود گرفته بودند. سلولهای قاعده‌ای اکتودرمی، مکعبی کوتاه بودند. بین سلولهای اکتودرمی سلولهای مرده مشاهده شد. برجستگی اکتودرمی رأسی (AER) در این مرحله در صفحه انگشتان مشاهده نشد.

فاصله بین اپی‌تلیوم و مزانشیم یعنی Epithelio-mesenchymal interface زیادتر از مراحل قبلی بود بدین معنی که در این محل ماتریکس خارج سلولی و مواد بی‌شکل زیاد شده‌اند.

روز ۸-۹ جنینی (مرحله ۳۵)

Web بین انگشتان بسیار نازک شده و در بعضی از نقاط کاملاً از بین رفته است. بافت مزانشیمی غشای بین انگشتی، اساساً شامل سلولهای مزانشیمی سالم بود. علاوه بر این سلولها، ماکروفاژهای بزرگ و سلولهای مردهٔ جدای از هم نیز وجود داشت. همانند مرحله قبل سلولهای مرده و ماکروفاژهای زیادی در مزانشیم اطراف انگشتان درست در زیر اکتودرم مشاهده شد.

بافت اپی‌تلیال غشای بین انگشتی، هنوز هم نامنظم بود. سلولهای مرده و ماکروفاژها در بین سلولهای اپی‌تلیالی سالم دیده می‌شد. غشای پایه در این مرحله، در بعضی از نقاط غیرممتد دیده شد.

روز ۱۰ جنینی (مرحله ۳۶)

در این مرحله Web بین انگشتان کاملاً از بین رفته است. فقط یک منطقه مثلثی کوچک از بافت بین انگشتی در قاعده انگشتان وجود دارد. بافت اپی‌تلیالی غشای بین انگشتی، شامل یک لایه سلولهای مکعبی قاعده‌ای است که به‌وسیلهٔ سلولهای سطحی پهن پوشیده شده است. غشای پایه برخلاف مرحلهٔ قبل مجدداً به‌صورت ممتد دیده شد.

۲-اردک

غشای بین انگشتی در حال رشد ساختمانی مانند این ساختار در جوجه داشت؛ یعنی یک بافت مزانشیمی در مرکز که به‌وسیلهٔ اکتودرم پوشیده شده است.

روز ۹ جنینی

در این مرحله از رشد، شعاعهای انگشتی و غشاهای بین انگشتی به‌طور واضح از یکدیگر قابل تشخیص است.

غشای بین انگشتی شامل یک داربست مزانشیمی است که به‌وسیلهٔ اکتودرم پوشیده شده است. تراکم بافت مزانشیمی در محیط بیشتر بود، در مرکز این بافت عروق خونی زیادی دیده شد.

در هر سه غشای بین انگشتی سلولهای مرده و ماکروفاژها مشاهده شدند ولی شدت و گسترش آن در غشای بین انگشتی اول بیشتر بود.

لایه اپی‌تلیال در سطح پشتی و شکمی شامل یک اپی‌تلیوم دو لایه‌ای بود. یک لایه سلولهای قاعده‌ای مکعبی که به‌وسیله یک ردیف سلولهای پهن پوشیده شده است.

غشای پایهٔ ممتد و ضخیمی بافت اپی‌تلیال و مزانشیم را از یکدیگر جدا کرده است. مواد فیبریل رنگ‌پذیری در ماتریکس خارج سلولی به‌خصوص در جاهایی که مرگ سلولی دیده می‌شود، وجود دارد.

روز ۹/۵ جنینی

یک مرکز نکروتیک برجسته‌ای در منطقه مارژینال هر سه غشای بین انگشتی که در آن سلولهای مرده بسیاری به‌همراه ماکروفاژها وجود دارند، مشاهده شد. در این منطقه سلولهای مرده زیاد و ماکروفاژها دیده می‌شوند.

لایهٔ اپی‌تلیال مانند مرحلهٔ قبل، از دو ردیف سلول تشکیل شده بود. برجستگی اکتودرمی رأسی (AER) هنوز قابل تشخیص بود. سلولهای دژنره در این قسمت زیادتر شده بود.

در حد فاصل اپی‌تلیوم و مزانشیم، غشای پایه و در بعضی از نقاط قطعات کوچک بازال لامینا دیده شد. ماتریکس خارج سلولی همانند مرحله قبل بود.

روز ۱۰ جنینی

در این روز غشای بین انگشتی تغییرات زیادی را نسبت به آنچه که در مراحل قبلی دیدیم، نشان داد. تغییرات هم در مزانشیم و هم در بافت اپی‌تلیال و مخصوصاً در ماتریکس خارج سلولی وجود دارد. بافت مزانشیمی تمرکز خیلی برجسته نکروتیکی را در منطقه مارژینال هر سه غشای بین انگشتی از خود نشان داد. تراکم سلولها در بافت مزانشیمی این منطقه خیلی کم بود. همچنین عروق خونی کمتری در ناحیه غشای بین انگشتی دیده شد. بافت اپی‌تلیال در سطح پشتی و شکمی غشای بین انگشتی به‌صورت چند لایه‌ای دیده شد. لایه قاعده‌ای، مکعبی کوتاه که به‌وسیلهٔ لایه سطحی ضخیمی پوشیده شده بود.

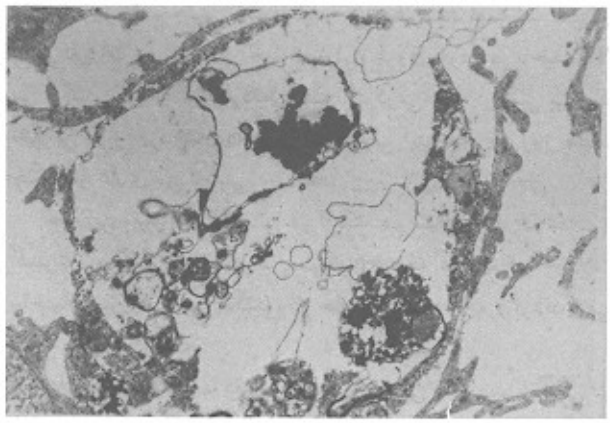
بین سلولهای اکتودرمی ماکروفاژهای بزرگی مشاهده شد. برجستگی اکتودرمی رأسی (AER) در این روز در قسمت مارژینال غشا دیده نشد.

ماتریکس خارج سلولی در این روز به‌طور شگفت‌آوری غنی از مواد بی‌شکل و فیبریل مثبال رنگ‌پذیر بود.

* ج) نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی

مطالعه میکروسکوپ الکترونی در Web بین انگشتان در بررسی ما، اغلب بر روی فراساختار سلول مرده و ماکروفاژها و غشای پایه در مراحل ۳۲ و ۳۳ متمرکز شده است که شرح آن به‌صورت زیر است:

در مرحلهٔ ۳۲، تجمع سلولهای مرده و ماکروفاژها را می‌توان در محل Epithelio-mesenchymal interface مشاهده کرد؛ همان‌طوری‌که در مطالعه میکروسکوپ نوری اشاره شد در این محل عروق خونی وجود ندارد. به‌طور کلی چه در مطالعات میکروسکوپ نوری و چه در مطالعات میکروسکوپ الکترونی، سلول مرده کمتر به صورت منفرد مشاهده شد. این سلولها ابتدا دارای هسته‌ای متراکم و در اکثر مواقع قطعه قطعه شده هستند واین در حالی است که ارگانلهای سلول هنوز سالم به‌نظر می‌رسند. در مرحله پیشرفته‌تر این ارگانلها نیز از بین رفته، سیتوپلاسم واکوئلی شده، غشای هسته با موادکروماتین متراکم شده فاصله گرفته و به غشای سلول متصل شده است. تکه‌های کروماتین در نهایت به صورت وزیکولهایی از سلول مرده جدا می‌شود و اجسامی را به‌وجود می‌آورند که در اندازه‌های متفاوت بوده و می‌توان آنها را آپوپتوتیک نامید (شکل ۳).

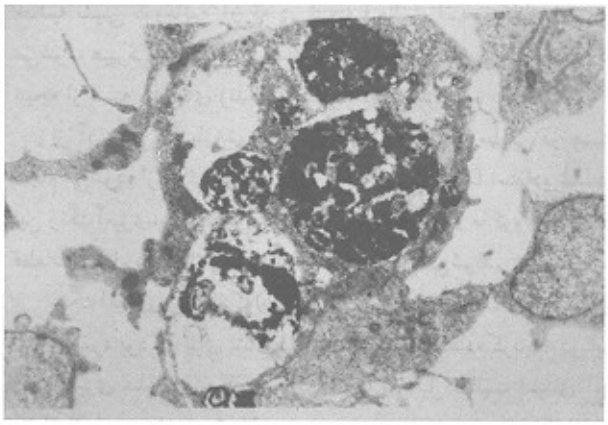


شکل ۳: میکروگراف الکترونی از یک سلول مرده غشای بین انگشتی جوجه در روز ۷/۵جنینی
هسته متراکم و قطعه قطعه شده و غشای آن از مواد کروماتینی متراکم شده فاصله گرفته است.
(بزرگنمایی ۲۲۵۰۰x)

این اجسام سپس به‌وسیلهٔ سلولهای مزانشیمی اطراف که در حال تبدیل به ماکروفاژها هستند، برداشته شده و یا اینکه در محل پراکنده می‌شود و در مراحل بعدی در زیر غشای پایه اپی‌تلیومی تجمع می‌یابد.

سلولهای مزانشیمی که تبدیل به ماکروفاژ شده‌اند، دارای هسته‌ای Convoluted بوده که دارای یک یا دو هستک هستند. سیتوپلاسم آنها دارای R.E.R[1]، میتوکندری میله‌ای شکل و اجسام الکترون دنس است. وزیکولهایی در سیتوپلاسم مشاهده می‌شود که در آنها چندین جسم آپوپتوتیک وجود دارد. در مراحل پیشرفته‌تر، این مواد فاگوسیتوز شده و داخل این وزیکولها لامینی شده به‌نظر می‌رسد؛ این لامینها به‌صورت تیغه‌های متحدالمرکز هستند.

در مرحله ۳۳ نیز می‌توان تجمع سلولهای ماکروفاژی راکه سلولهای مرده را فاگوسیتوز نموده‌اند، در محل غشاء پایه بافت (شکل ۴).



شکل ۴: میکروگراف الکترونی از سلول ماکروفاژی غشای بین انگشتی جوجه،روز ۸ ۷/۵ جنینی
قطعات سلولهای مرده که توسط این سلول فاگوسیتوز شده‌اند مشاهده می‌شود
(بزرگنمایی ۲۲۵۰۰x)

سلولهای مزانشیمی چه در مرحله ۳۲ و چه در مرحله ۳۳ دارای R.E.R و میتوکندری بوده اما این ارگانلها از نظر فراوانی کمتر از سلولهای اپی‌تلیومی هستند.

غشای پایه در مرحله ۳۳ کاملاً ممتد بوده و سلولهای اپی‌تلیومی پایه به‌صورت مکعبی و یا استوانه‌ای و هسته آنها گرد یا بیضی شکل بود. تجمع R.E.R و میتوکندری به‌خصوص در سیتوپلاسم مجاور غشای پایه به‌وفور یافت می‌شود. این سلولها دارای پروسسهایی هستند که با سلولهای پهن پری‌درم، اتصال دسموزوم برقرار کرده‌اند. بین سلولهای پایه نیز اتصالات سلولی برقرار بود. پروسس سلولهای مزانشیمی در بعضی نواحی به غشای پایه متصل شده است. مقدار کمی رشته‌های کلاژن نیز در ناحیه زیر غشای پایه مشاهده می‌شود.

در مرحله ۳۳ سلولهای پایه اپی‌تلیومی در ناحیه Web بین انگشتان قدری پهن شده و سرشار از ریبوزوم آزاد و پلی ریبوزوم است. R.E.R و میتوکندری نیز در آن به‌وضوح مشاهده می‌شود. خروج Fine Fibril در محل غشای پایه از این سلولها نیز قابل مشاهده است. پینوسیتوز وزیکولهای که از بافت مزانشیمی حرکت کرده و در محل غشای پایه هستند، در این سلولها مشاهده گردید؛ غشای پایه کاملاً ضخیم شده و ارتباط تنگاتنگ آن با رشته‌های کلاژن قابل مشاهده بود. در بعضی از نقاط، پیشروی سیتوپلاسم سلولهای اپی‌تلیومی به‌طرف بافت مزانشیمی دیده می‌شود.

بحث

در این پروژه برای نشان دادن سلولهای مرده از تکنیکهای مختلفی مانند روش رنگ‌آمیزی نرترال رد که یک نوع رنگ‌آمیزی حیاتی است

1. Rough Endoplasmic Reticulum

برای نشان دادن نواحی مرگ سلولی و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین برای مطالعه ساختمان کلی غشای بین انگشتی و همچنین هسته سلولهای مرده استفاده شد. هسته سلولهای مرده به‌علت متراکم شدن و حاشیه نشینی کروماتین آن که در نتیجه فعالیت آندونوکلئازها ایجاد می‌شود، هیپرکروم بوده و به هماتوکسیلین بیشتری متصل می‌شوند و در نتیجه از هسته سلولهای زنده تشخیص داده می‌شوند.

از آن جایی که بارزترین تغییرات دژنراتیو مرگ سلولی در هسته انجام می‌شود، از روش فولگن برای رنگ‌آمیزی DNA استفاده شد. در این رنگ‌آمیزی، هسته سلولهای مرده، قطعات آنها و ماکروفاژهایی که قطعات سلول مرده را می‌بلعند تا حدی مشخص می‌شوند.

رنگ‌آمیزی دیگری که در این پروژه انجام شد، رنگ‌آمیزی نیترات نقره بود که برای نشان دادن غشای پایه استفاده کردیم؛ در این رنگ‌آمیزی سلولهای مرده و ماکروفاژها به دلیل فعالیت اسیدی آنها کاملاً تشخیص داده می‌شوند.

همچنین برای نشان دادن تغییرات فراساختاری که در سلولهای در حال مرگ رخ می‌دهد، برشهای بسیار نازکی برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی تهیه کردیم.

بر اساس همه این تکنیکها، خصوصیات مورفولوژیکی سلولهای مرده نشان می‌دهد که مرگ سلولی در این ناحیه از نوع آپوپتوز است. اولاً سلولهای مرده برخلاف نکروز که مجموعه‌ای از سلولهای نزدیک به‌هم را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد به‌صورت مجزا و پراکنده داخل بافت قرار داشتند؛ ثانیاً برخلاف نکروز که اولین و بارزترین مشخصه مورفولوژیک آن در سیتوپلاسم ظاهر می‌شود، پیکنوز هسته در مراحل اولیه مرگ سلولی مشاهده شد؛ ثالثاً سلولهای مرده کمتر به‌صورت منفرد دیده شدند یعنی سلولهای مرده و قطعات آنها خیلی سریع به‌وسیلهٔ سلولهای مجاور سالم که خاصیت بیگانه‌خواری پیدا کرده بودند فاگوسیتوز می‌شد.

علاوه بر این مشخصات، ترتیب دقیق حوادث ساختمانی در پسروی غشای بین انگشتی و ایجاد انگشتان به‌هم چسبیده به‌وسیلهٔ تغییر در طرح ژنتیکی سلولها (۲) نشان می‌دهد که مرگ سلولی بین انگشتی از نوع مرگ سلولی پروگرام است. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که پسروی غشای بین انگشتی شامل تغییرات ساختمانی وسیعی در بافت اکتودرم و مزانشیم است.

نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی نوترال رد به ما نشان داد که مرگ سلولی بین انگشتی هم در جوجه و هم در اردک وجود دارد اما شدت و گسترش مناطق اشغال شده‌اش در اردک کمتر از جوجه است.

مشاهدات ما نشان داد که تفاوت در شدت و گسترش مرگ سلولی در سلولهای بین انگشتی به شکل نهایی انگشتان بستگی دارد اما رابطه بین مرگ سلولی و مورفولوژی انگشت به اندازه‌ای نیست که بتوان از الگوی مرگ سلولی به مورفولوژی انگشت پی برد.

نتایج رنگ‌آمیزی حیاتی و میکروسکوپ نوری به ما نشان داد که وقتی مرگ سلولی در غشای بین انگشتی تمام می‌شود (مرحله ۳۴)، مرگ سلولی در طول حاشیه قدامی[1] و خلفی[2] انگشتان ادامه پیدا می‌کند تا مزانشیم تمایز نیافتهٔ اضافی را بردارد. بنابراین **می‌توان گفت که مرگ** سلولی بین انگشتی، نقش تراشکاری[3] را در تکامل اندام به‌عهده دارد.

Deleanu و Menkes در سال ۱۹۶۴ بیان داشتند که مرگ سلولی بین انگشتی به‌وسیلهٔ برداشتن مزانشیم بین انگشتی در جدا کردن و شکل دادن انگشتان نقش دارد (۸).

Hurle در سال ۱۹۹۸ با توجه به مطالعات قبلی اینگونه استنتاج کرد که مرگ سلولی بین انگشتی در آمنیوتها دارای دو نقش است (۸):
۱ـ شکل دادن به انگشتان؛ ۲ـ کنترل تعداد انگشتان.

Tabin در سال ۱۹۹۴ نقش مرگ سلولی بین انگشتی را در کنترل تعداد انگشتان بیان نمود (۱۱).

علاوه بر مرگ سلولی، تغییراتی در تمامی اجزای غشای بین انگشتی در حال پسروی دیده می‌شود. ضخیم شدن و موجی شدن غشای پایه، رسوب مواد کلاژنی در ماتریکس خارج سلولی و ایجاد پروسس سلولهای قاعده‌ای اکتودرمی از جمله این تغییرات است.

در جوجه، مرگ سلولی مزانشیمی بین انگشتی در روز ۶/۵ جنینی (مرحله ۳۰) شروع شد. برجستگی اکتودرمی رأسی از روز ۷/۵ جنینی شروع به پهن شدن کرد و در روز هشتم به‌صورت یک برجستگی اکتودرمی دیده نشد. همان‌طورکه روند پسروی بافت ادامه پیدا می‌کرد ماتریکس خارج سلولی به‌خصوص در فاصله بین اپی‌تلیوم و مزانشیم به میزان قابل توجهی کلاژن و مواد بی‌شکل در خود ذخیره کرده بود. غشای پایه که حد فاصل اکتودرم و مزانشیم است، در ابتدا ضخیم بود ولی در روز هشتم جنینی به‌صورت موجی و غیرممتد دیده شد. همزمان با این تغییرات در ماتریکس خارج سلولی، عروق خونی در ناحیه Web بین انگشتی کمیاب شده بودند. بافت اکتودرمی هم در این مرحله تغییراتی را از خود نشان داد و مرگ سلولی اپی‌تلیال در روز هشتم جنینی در غشای بین انگشتی دیده شد.

همهٔ این تغییرات ساختمانی در اردک هم مشاهده شد اما شدت و گسترش آن کمتر بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اختلاف ساختمانی بین بافت بین انگشتی در حال پسروی جوجه و اردک کیفی نیست بلکه کمّی است.

علاوه بر این، ترتیب دقیق حوادث ساختمانی غشای بین انگشتی در طول پسروی این بافت به ما نشان می‌دهد که پسروی بافت بین انگشتی یک پروسه منظم است که احتمالاً به‌وسیلهٔ مرگ سلولی مزانشیمی شروع می‌شود اما به‌وسیلهٔ تغییرات در همه اجزای بافتی باقیماندهٔ مناطق بین انگشتی ادامه پیدا می‌کند.

اهمیت ذخیره و رسوب کلاژن و نقش آن در پسروی بافت بین انگشتی هنوز مشخص نشده است. آنچه می‌توان گفت این است که شاید رسوب مواد کلاژنی نشان دهندهٔ واکنش متقابل بین اپی‌تلیوم و مزانشیم باشد چراکه واکنشهای متقابل بافت اپی‌تلیال و مزانشیم اغلب به‌وسیلهٔ تغییرات در ترکیب و ترتیب مواد خارج سلولی واسطه می‌شود.

به‌علاوه، بر اساس مورفولوژی سلولهای مزانشیمی و اکتودرمی می‌توان حدس زد که منشاء کلاژن می‌تواند از سلولهای مزانشیمی و

1. Anterior
2. Posterior
3. Sculpturing

مخصوصاً اکتودرمی باشد. شاید عامل القاکننده این سلولها برای ترشح کلاژن وزیکولهایی باشدکه از پراکنده شدن سلولهای مزانشیمی در حال مرگ ایجاد شده است؛ این وزیکولها به‌وسیلهٔ سلولهای اپی‌تلیالی پینوسیتوز شده و عاملی برای تشریح کلاژن از سلولهای اپی‌تلیومی می‌شوند. به‌علاوه، این وزیکولها شاید در پاره شدن غشای پایه نقش داشته باشند.

References

1. Ballard JK, Holt SJ: Cytological and cytochemical studies on cell death anddigestion in the foetal rat foot, the role of macrophages and hydrolytic enzymes. J Cell Sci 1968; 3: 245-261

2. Fallon JF, Cameron J :Interdigital cell during limb development of the turtle and lizard with an interpretation of evolutionary significance. J Embryol Exp Morph 1977; 40:485-489

3. Hinchliffe JR: Cell death in embryogenesis. In cell Death in Biology and pathology. ID Bowen, RA Lockshin (eds). London, Chapman and Hall, 1981. pp 35-78

4. Hinchliffe JR, Thorogood PV: Genetic inhibition of mesenchymal cell death and the development of form and skeletal pattern in the limbs of talpid (Ta3) mutant chick embryo. J Embryol Exp Morph 1974; 31: 747-760

5. Menkes B, Deleanu M: Leg differentiation and experimental syndactyly in chick embryo. Rewe Romaine d' Embryologie et de Cytologie 1964; 1, 69-77

6. Kelley RO: Fine structure of the apical rim-mesenchyme complex. during limb morphogenesis in man. J Embryol Exp Morph 1973; 29, 117-131

7. Hurle JM: Colvee E Surface change in the embryonic interdigital epithelium during the formation of the free digits a comparative study in the chick and duck foot. J Embryol Exp Morph 1982; 69: 251-263

8. Hurle JM, Fernandez-Teran MA: Fine structure of the regressing interdigital membranes during the formation of the digital of the chick embryo leg bud. J Embryol Exp Mporh 1983; 78: 195-209

9. Hinchliffe JR, EDE DA: Cell death and the development of limb form and skeletal pattern in normal and Wingless (WS) chick embryos. J Embryol Exp Morph 1973; 30(3): 753-772