

## بررسی سلولهای آپوتوز غشایی بین انگشتی جنین جوجه و اردک

طاهره مازوچی <sup>☆</sup>M.Sc. <sup>♣</sup>، مجتبی رضازاده <sup>☆</sup>Ph.D.، احمد حسینی <sup>☆</sup>Ph.D.

<sup>☆</sup> دانشگاه علوم پزشکی کاشان، دانشکده علوم پزشکی، گروه پاتولوژی

<sup>♣</sup> دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

<sup>☆</sup> دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

<sup>♣</sup> آدرس مکاتبه: کاشان، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، گروه پاتولوژی، صندوق پستی ۸۷۱۵۵-۱۱۱

### چکیده

**هدف:** مقایسه ساختمان غشاء بین انگشتی جنین جوجه (با انگشت آزاد) و جنین اردک (با انگشت پرده‌دار) و تعیین نقش مورفوژنیک 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 رنگ آمیزی 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 جدا کردن و شکل دادن انگشتان (Sculpturing) نقش دارد. باید خاطر نشان ساخت که این مرگ سلولی از نوع آپتوز 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. به علاوه از سلولهای قاعده‌ای اکتودرمی، پروسه‌هایی به طرف داربست مزانشیمی غشاکشیده شده بود که شاید در اینترکشن اپی تلیوم و مزانشیم نقش داشته باشد. همزمان با این تغییرات در ماتریکس خارج سلولی، رگهای خونی نیز پسروری پیدا می‌کنند.

**نتیجه‌گیری:** از تحقیق حاضر، این طور 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

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 پنجه روی تخم مرغها و تخم اردکها در روزهای موردنظر، ۵/۰ میلی لیتر از محلول نوترال رد (۰/۰۰۰۰۱ در سالیان) به داخل کیسه آمینون تزریق شد. سپس جنینها برای ۳۰ دقیقه مجدداً آنکوبه 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 دوربین دار عکسبرداری صورت گرفت.

## \* (ب) میکروسکوپ نوری (LM)

جنینهای جوجه و اردک، بسته به نوع رنگ آمیزی در محلولهای فرمال سالیان و بوئیتز تثبیت شدند. سپس پای آنها را قطع کرده، مراحل پردازش انجام شد. از نمونه‌ها به‌طور سریالی از دیستال به پروگزیمال اندام، برشهای عرضی و طولی به ضخامت ۵ میکرون تهیه شد. از برشهایی که در بوئیتز تثبیت شده بودند جهت رنگ آمیزی هماتوکسیلین - اتوزین و نیترات نقره و از نمونه‌هایی که در فرمالین تثبیت شده بودند برای رنگ آمیزی 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 گلو تار آلدهید ۲۰/۵ درصد ( $\text{pH} = 7/2$ ) به مدت ۴ ساعت و درجه حرارت ۴ سانتی‌گراد تثبیت شد.

بعد از شستشو در بافر فسفات ۰/۱ مولار ( $\text{pH} = 7/2$ )، در تتروکسید ازمیوم به مدت یک ساعت و در حرارت اتاق Post Fixed شد. نمونه‌ها توسط الکلهای صعودی آگیری و بعد از انجام مراحل نفوذ توسط پروتئین اکساید در رزین قالبگیری شدند. سپس برشهای Semithin به ضخامت یک میکرون به وسیله میکروتوم LKB تهیه و با تولوئیدین بلو ۱٪ رنگ آمیزی شدند. برشهای نازک Ultrathin از مناطقی که مرگ سلولی زیادی دیده شد انتخاب و بعد از رنگ آمیزی با پورانیل استات و سیترات سرب با یک میکروسکوپ الکترونی EM-10C مشاهده شد.

## یافته‌ها

## \* (الف) نتایج حاصل از رنگ آمیزی حیاتی

مناطق مرگ سلولی به وسیله رنگ آمیزی حیاتی مشخص می‌شود. این رنگها در لیزوزومهای ثانویه بزرگ موجود در سلولهای در حال مرگ و ماکروفاژها که قطعات سلول مرده و سلولهای در حال مرگ را می‌بلعند، مشاهده می‌شود.

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 به وسیله یک پوشش اکتودرمی پوشیده شده است. تشکیل عناصر اسکلتی در یک مسیر Proximo-distal صورت می‌گیرد. بدین ترتیب که سلولهای مزانشیمی متراکم شده زوائد پرکنندروژنیک<sup>۱</sup> را که مقدمه‌ای برای تشکیل عناصر اسکلتی هستند، تشکیل می‌دهند. تشکیل انگشتان به وسیله متراکم شدن اشعه‌های پرکنندروژنیک انگشتان در انتهای ترین دوره مورفوژنز اندام به وقوع می‌پیوندد. درحالی‌که فضاهای بین انگشتی تمایز یافته باقی می‌مانند.

مکانیسم جدا شدن انگشتان توجه بسیاری از جنین شناسان را به خود جلب کرده است زیرا این قسمت یکی از بهترین مدل‌های مطالعه 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 ممانع کننده مرگ سلولی بین انگشتی، INZ<sup>۲</sup>، 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 به داخل مناطق نکروتیک (NZ) که در تفکیک انگشتان آزاد شرکت می‌کنند، کشیده شود<sup>۳</sup> (۶).

Hurle و Colvee در یک مطالعه SEM مشاهده کردند که اکتودرم بین انگشتی در جوجه به‌طور قابل ملاحظه‌ای با اردک فرق دارد. این مطالعه فرضیه دخالت اکتودرم در تفکیک انگشتان را تأیید می‌کند (۷). همچنین Hurle و Fernandez-Teran عبور ماکروفاژهای مزانشیمی را از عرض اپی تلیال 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، آنکوبه 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) رنگ آمیزی حیاتی<sup>۱</sup>

مناطق نکروتیک بین انگشتی به وسیله رنگ آمیزی Inovo جنین

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



## ۱- جوجه

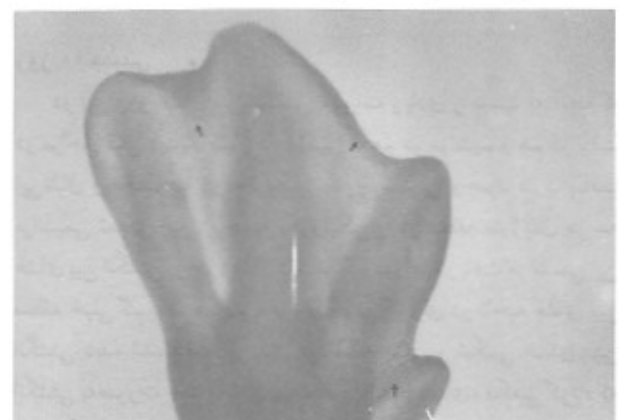
در جوجه مرگ سلولی بین انگشتی در روز ۶/۵ جنینی (مرحله ۳۰) شروع شده و در روز ۷ جنینی گسترش پیدا کرده و در همه فضاهای بین انگشتی مشاهده شد. در انتهای این روز در Web بین انگشتی اول یک منطقه نکروتیک وسیع از پروگزیمال تا دیستال غشا وجود دارد. در Web بین انگشتی دوم دو منطقه نکروتیک یکی در پروگزیمال و دیگری 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) خانمه پیدا کرد و این درست زمانی است که بافت بین انگشتی به‌طور کامل پرویی کرده و پا شکل بالغ خود را با انگشتان آزاد پیدا کرده است.



شکل ۱ پای جوجه در روز ۷ جنینی در مرحله پیشرفته از گامیزی (توتال رد-مرگه‌ایی: x۲۵)

## ۲- 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 (رنگ آمیزی نونرال رد-مرگه‌ایی: x۲۵)  
مرگ سلولی در هر سه فضای بین انگشتی وجود دارد اما شدت و تراکم آن نسبت به جوجه کمتر است.

## ۳- 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 به‌وسیله رنگ آمیزی 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 پرویی 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.

### ۱- جوجه

#### روز ۶/۵ جنینی (مرحله ۳۰)

در غشای بین انگشتی یک داربست مزانشیمی که به‌وسیله اکتودرم پوشیده شده است، مشاهده می‌شود. داربست مزانشیمی غشای بین انگشتی یک منطقه 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 پستی و شکمی از دو ردیف سلول تشکیل شده است. یک ردیف سلولهای مکعبی قاعده‌ای که به‌وسیله یک ردیف سلولهای سطحی بین پوشیده شده است. ضخامت غشای پایه، در ناحیه Web بیشتر از نقاط دیگر بوده و آرژینوفیلی بیشتری را از خود نشان می‌دهد.

#### روز ۷-۷/۵ 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 تراکم‌تر از مرکز آن است.

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

لایه 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 دیده می‌شود. در این قسمت، اپی‌تلیوم به جای دو لایه، استوایه‌ای 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

**۲- اردک**

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

**روز ۹ جنینی**

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

غشای بین انگشتی شامل یک داربست مزانشیمی است که به وسیله 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 اپی تلیال در سطح پستی و شکمی شامل یک اپی تلیوم دو لایه ای بود. یک لایه سلولهای قاعده‌ای مکعبی که به وسیله یک ردیف سلولهای پهن پوشیده شده است.

غشای پایه ممتد و ضخیمی بافت اپی تلیال و مزانشیم را از یکدیگر جدا کرده است. مواد فیبری رنگ پذیر در ماتریکس خارج سلولی به خصوص در جاهایی که مرگ سلولی دیده می شود، وجود دارد.

**روز ۹/۵ جنینی**

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

لایه اپی تلیال مانند مرحله 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 اپی تلیوم 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 اپی تلیال 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 اپی تلیال در سطح پستی و شکمی غشای بین انگشتی به صورت چند لایه‌ای دیده شد. لایه قاعده‌ای، مکعبی کوتاه که به وسیله 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.

منطقه مارژینال غشا از خود نشان می دهد. سلولهای مرده جدا از هم و تعدادی ماکروفاژ درون این مرکز دیده می شود.

ساختار لایه اپی تلیال غشای بین انگشتی، مشابه مراحل قبلی بود. در AER تعدادی سلول مرده اپی تلیال مشاهده شد. غشای پایه اپی تلیالی در ناحیه Web کاملاً ضخیم بوده و آرژنوفیلی بیشتری را از خود نشان می دهد.

**روز ۸ جنینی (مرحله ۳۴)**

در این مرحله، غشای بین انگشتی اختلاف ساختمانی زیادی را با آنچه که در روزهای قبلی دیدیم نشان می دهد. تغییرات هم در مزانشیم و هم در بافت اپی تلیال و مخصوصاً در Epithelio-mesenchymal interface دیده می شود.

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

بافت اپی تلیال غشای بین انگشتی در این مرحله، اختلاف واضحی را نشان داد. در سطح شکمی و پستی غشای سلولهای سطحی، ظاهر گرد به خورد 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 اپی تلیوم و مزانشیم یعنی Epithelio-mesenchymal interface زیادتر از مراحل قبلی بود بدین معنی که در این محل ماتریکس خارج سلولی و مواد بی شکل زیاد شده اند.

**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 مرده جدای از هم نیز وجود داشت. همانند مرحله قبل سلولهای مرده و ماکروفاژهای زیادی در مزانشیم اطراف انگشتان درست در زیر اکتودرم مشاهده شد.

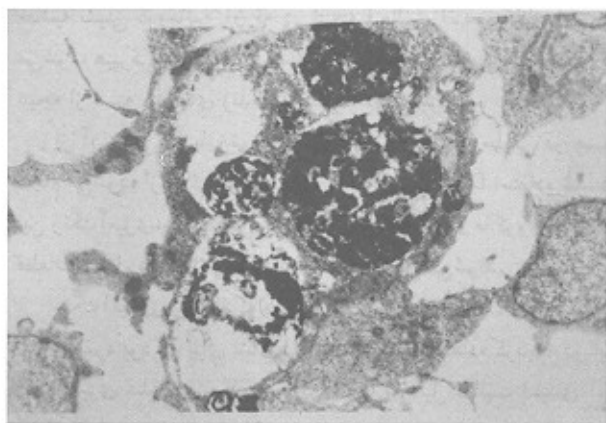
بافت اپی تلیال غشای بین انگشتی، هنوز هم نامنظم بود. سلولهای مرده و ماکروفاژها در بین سلولهای اپی تلیالی سالم دیده می شد. غشای پایه در این مرحله، در بعضی از نقاط غیرممتد دیده شد.

**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 اپی تلیالی غشای بین انگشتی، شامل یک لایه سلولهای مکعبی قاعده‌ای است که به وسیله سلولهای سطحی پهن پوشیده شده است. غشای پایه برخلاف مرحله قبل مجدداً به صورت ممتد دیده شد.

تیغه‌های متحدالمركز هستند.

در مرحله ۳۳ نیز می‌توان تجمع سلولهای ماکروفازی را که سلولهای مرده را فاگوسیتوز نموده‌اند، در محل غشای پایه یافت (شکل ۴).



شکل ۴: میکروگراف الکترونی از سلول ماکروفازی غشای بین انگشتان در روز ۸ و ۷:۵ جنینی. قطعات سلولهای مرده که توسط این سلول فاگوسیتوز شده‌اند مشاهده می‌شود (بزرگنمایی: ۲۲۵۰x)

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

غشای پایه در مرحله ۳۳ کاملاً ممتد بوده و سلولهای اپی تلیومی پایه به صورت مکعبی و یا استوانه‌ای و هسته آنها گرد یا بیضی شکل بود. تجمع R.E.R. و میتوکندری به خصوص در سیتوپلاسم مجاور غشای پایه به وفور یافت می‌شود. این سلولها دارای پروسسهای هستند که با سلولهای پهن پری درم، 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 اپی تلیومی 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 به وضوح مشاهده می‌شود. خروج Fine Fibril در محل غشای پایه از این سلولها نیز قابل مشاهده است. پینوسیتوز و زیگولهای 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 اپی تلیومی به طرف بافت مزانشیمی دیده می‌شود.

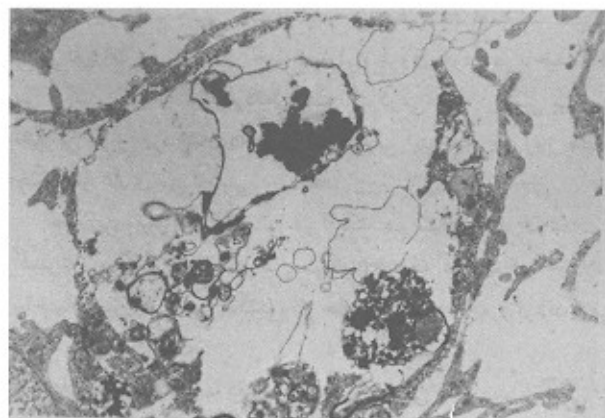
### بحث

در این پروژه برای نشان دادن سلولهای مرده از تکنیکهای مختلفی مانند روش رنگ آمیزی نوترال رد که بک نوع رنگ آمیزی حیاتی است

ماتریکس خارج سلولی در این روز به طور شگفت آوری غنی از مواد بی شکل و فیبریل متربال رنگ پذیر بود.

### \* ج) نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی

مطالعه میکروسکوپ الکترونی در Web بین انگشتان در بررسی ما، اغلب بر روی فراساختار سلول مرده و ماکروفازها و غشای پایه در مراحل ۳۲ و ۳۳ متمرکز شده است که شرح آن به صورت زیر است: در مرحله ۳۲، تجمع سلولهای مرده و ماکروفازها را می‌توان در محل Epithelio-mesenchymal interface مشاهده کرد؛ همان طوری که در مطالعه میکروسکوپ نوری اشاره شد در این محل عروق خونی وجود ندارد. به طور کلی چه در مطالعات میکروسکوپ نوری و چه در مطالعات میکروسکوپ الکترونی، سلول مرده کمتر به صورت منفرد مشاهده شد. این سلولها ابتدا دارای هسته‌های متراکم و در اکثر مواقع قطعه قطعه شده هستند و این در حالی است که ارگانهای سلول هنوز سالم به نظر می‌رسند. در مرحله پیشرفته تر این ارگانها نیز از بین رفته، سیتوپلاسم واکوتلی شده، غشای هسته با مواد کروماتین 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 به وجود می‌آورند که در اندازه‌های متفاوت بوده و می‌توان آنها را آپپتوتیک نامید (شکل ۳).



شکل ۳: میکروگراف الکترونی از سلول مرده غشای بین انگشتی جوجه در روز ۷:۵ جنینی. هسته متراکم و قطعه قطعه شده و غشای آن از مواد کروماتینی متراکم شده فاصله گرفته است. (بزرگنمایی: ۲۲۵۰x)

این اجسام سپس به وسیله سلولهای مزانشیمی اطراف که در حال تبدیل به ماکروفازها هستند، برداشته شده و با اینکه در محل پراکنده می‌شود و در مراحل بعدی در زیر غشای پایه اپی تلیومی تجمع می‌یابد. سلولهای مزانشیمی که تبدیل به ماکروفاز شده‌اند، دارای هسته‌های Convoluted بوده که دارای یک یا دو هسته‌ک هستند. سیتوپلاسم آنها دارای R.E.R.، میتوکندری میله‌ای شکل و اجسام الکترون دهن است. وزیکولهایی در سیتوپلاسم مشاهده می‌شود که در آنها چندین جسم آپپتوتیک وجود دارد. در مراحل پیشرفته تر، این مواد فاگوسیتوز شده و داخل این وزیکولها لامینی شده به نظر می‌رسد؛ این لامینها به صورت

سلولی بین انگشتی، نقش تراشکاری آن را در تکامل اندام به عهده دارد. Menkes و Deleanu در سال ۱۹۶۴ بیان داشتند که مرگ سلولی بین انگشتی به وسیله 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 آمیوتها دارای دو نقش است (۸):  
۱- شکل دادن به انگشتان؛ ۲- 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 پیروی دیده می شود. ضخیم شدن و موجی شدن غشای پایه، رسوب مواد کلاژنی در ماتریکس خارج سلولی و ایجاد پروسوس 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 به صورت یک برجستگی اکتودرمی دیده شد. همان‌طور که روند پیروی بافت ادامه پیدا می کرد ماتریکس خارج سلولی به خصوص در فاصله بین اپی تلیوم و مزانشیم به میزان قابل توجهی کلاژن و مواد بی شکل در خود ذخیره کرده بود. غشای پایه که حد فاصل اکتودرم و مزانشیم است، در ابتدا ضخیم بود ولی در روز هشتم جنینی به صورت موجی و غیرمستد 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 اپی تلیال در روز هشتم جنینی در غشای بین انگشتی دیده شد.

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

علاوه بر این، ترتیب دقیق حوادث ساختمانی غشای بین انگشتی در طول پیروی این بافت به ما نشان می دهد که پیروی بافت بین انگشتی یک پروسه منظم است که احتمالاً به وسیله مرگ سلولی مزانشیمی شروع می شود اما به وسیله تغییرات در همه اجزای بافتی باقیمانده مناطق بین انگشتی ادامه پیدا می کند.

اهمیت ذخیره و رسوب کلاژن و نقش آن در پیروی بافت بین انگشتی هنوز مشخص نشده است. آنچه می توان گفت این است که شاید رسوب مواد کلاژنی نشان دهنده واکنش متقابل بین اپی تلیوم و مزانشیم باشد چرا که واکنشهای متقابل بافت اپی تلیال و مزانشیم اغلب به وسیله تغییرات در ترکیب و ترتیب مواد خارج سلولی واسطه می شود.

به علاوه، بر اساس مورفولوژی سلولهای مزانشیمی و اکتودرمی می توان حدس زد که متشاه کلاژن می تواند از سلولهای مزانشیمی و

1. Anterior
2. Posterior
3. Sculpturing

برای نشان دادن نواحی مرگ سلولی و رنگ آمیزی هماتوکسیلین - اتوزین برای مطالعه ساختمان کلی غشای بین انگشتی و همچنین هسته سلولهای مرده استفاده شد. هسته سلولهای مرده به علت متراکم شدن و حاشیه نشینی کروماتین آن که در نتیجه فعالیت آندونوکلازها ایجاد می شود، هیپرکروم بوده و به هماتوکسیلین بیشتری متصل می شوند و در نتیجه از هسته سلولهای زنده تشخیص داده می شوند.

از آن جایی که بارزترین تغییرات دژنراتیو مرگ سلولی در هسته انجام می شود، از روش فولگن برای رنگ آمیزی DNA استفاده شد. در این رنگ آمیزی، هسته سلولهای مرده، قطعات آنها و ماکروفاژهایی که قطعات سلول مرده را می بلعند تا حدی مشخص می شوند.

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

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

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

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

نتایج حاصل از رنگ آمیزی نورال 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 رنگ آمیزی حیاتی و میکروسکوپ نوری به ما نشان داد که وقتی مرگ سلولی در غشای بین انگشتی تمام می شود (مرحله ۳۴)، مرگ سلولی در طول حاشیه قدامی<sup>۱</sup> و خلفی<sup>۲</sup> انگشتان ادامه پیدا می کند تا مزانشیم تمایز نیافته اضافی را بردارد. بنابراین می توان گفت که مرگ

پینوسیتوز شده و عاملی برای تشریح کلاژن از سرنوهای اپی تلیومی می شوند. به علاوه، این وزیکولها شاید در پاره شدن غشای پایه نقش داشته باشند.

مخصوصاً اکترودرمی باشد. شاید عامل الفاکتنده این سرنوها برای ترشح کلاژن وزیکولهایی باشد که از پراکنده شدن سرنوهای مزانشیمی در حال مرگ ایجاد شده است؛ این وزیکولها به وسیله سرنوهای اپی تلیالی

## References

1. Ballard JK, Holt SJ: Cytological and cytochemical studies on cell death and digestion 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. Hurlle 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. Hurlle 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 Morph* 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

