بررسی تکامل اولیه چشم در جنین جوجه به وسیله میکروسکوپ الکترونی اسکن

دکتر سعید رهبر* دکتر مجتبی رضازاده* دکتر احمد حسینی**

واژه‌های کلیدی : پلاک عدسی، روزنه عدسی، جام بینایی، ساقه اتصالی بینایی

خلاصه :

در این بررسی تکامل اولیه چشم در جنین جوجه از ساعت ۴۸ تا ۶۹ در ۴ مرحله و در دو دیدگاه مطالعه سطحی و مقاطع عرضی جهت مشاهده با میکروسکوپ الکترونی اسکن (SEM) آماده شد.

در مرحله I، ساعت ۴۸ تا ۵۲، پلاک عدسی تشکیل شده و حباب بینایی مشهود می‌باشد و در مرحله II، ساعت ۵۲ تا ۵۶، تورفتگی پلاک عدسی و ایجاد روزنه عدسی با لبه‌های خلفی و جانبی تیزتر نسبت به لبه قدامی و سلول‌های جبابی شکل قابل مشاهده است و وسعت ارتباط بین حباب بینایی با مغز اولیه کاهش یافته است و اجزاء چشم نسبت به هم غیرمتقارن می‌باشند.

در مرحله III، ساعت ۵۶ تا ۶۴ قطر دهانه روزنه عدسی بسیار کاهش یافته و سلول‌های حبابی کمتر شده‌اند و حباب عدسی در حال تشکیل می‌باشد. جام بینایی نیز تشکیل شده و ساقه بینایی نیز تحلیل رفته و عدم تقارن چشم اولیه نیز کاهش یافته است. در مرحله IV ساعت ۶۴ تا ۶۹ لنز اولیه تشکیل شده و از اپیتلیوم اکتودرم سطحی کاملاً جدا گشته و جام بینایی نیز کاملاً توسعه یافته و تقارن اجزاء چشم نسبت به هم کاملاً مشهود است. تأکید بررسی حاضر بر این نکات می‌باشد که اولاً مطالعه تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی روش بسیار مفیدی برای بررسی حرکت‌های مورفوژنیک همچون تکامل اولیه چشم می‌باشد، ثانیاً در تکامل اولیه چشم در مرحله II سلول‌های حبابی لبه قدامی بیشتر از لبه‌های دیگر مشاهده می‌گردد و ثالثاً در تشکیل عدسی اولیه به موازات تورفتگی پلاک عدسی، برآمدگی اطراف روزنه عدسی نقش بسزایی را بازی می‌کند.

مقدمه :

تکامل جنینی چشم یکی از بحث‌انگیزترین تغییرات را در دوران جنینی دارا می‌باشد. غالب حرکت‌های مورفوژنیکی از قبیل Invagination برآمدگی Evagination و چرخش‌ها Rotation را می‌توان در تکامل اولیه چشم مشاهده نمود. لذا تحقیق حاضر علاوه‌بر این که روند تغییرات تکاملی اولیه چشم را بررسی می‌کند، بسیاری از روندهای مشابه را نیز مورد بحث قرار می‌دهد.

از آنجایی که حرکت‌های مورفوژنیک یاد شده، همگی در ابعاد هندسی فضایی قابل فهم می‌باشند، بنابراین استفاده از میکروسکوپ الکترونی اسکن (SEM) برای نمایش چگونگی این تغییرات کمک شایانی را می‌نماید. همچنین تکامل اولیه چشم در جنین جوجه بسیار واضح‌تر و دقیق‌تر از سایر حیوانات دیگر بوده و روند کاملاً نزدیکی با

* - گروه آموزشی علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران - ایران.

** - گروه آموزشی علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران، تهران - ایران.

تکامل اولیه چشم در انسان دارد.

این بررسی در ۴ مرحله طبقه‌بندی شد که اساس آن طبق تقسیم‌بندی Humburger و Hamilton در سال (1952) می‌باشد و دنباله بررسی‌هایی به شرح ذیل می‌باشد :

Wakely. J. در سال (1976) با مقاله‌ای تحت عنوان تورفتگی پلاک عدسی در جنین جوجه، Vanrybroek. J. در سال (1976) با تحقیقی در مورد تکامل حباب عدسی در جنین جوجه و Hilfer.S در سال (1983) که به تکامل جنین چشم در جوجه پرداخت و Ede. A, Anderson.S در سال (1988) که تکامل چشم را در حالت نرمال و غیرنرمال توضیح داد.

مواد و روش کار :

این بررسی بر روی جنین جوجه در ۴ مرحله یاد شده انجام گرفت. ابتدا تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار نژاد White Leghorn در دمای ۲۸ - ۳۹ درجه سانتی‌گراد از ساعت ۴۸ الی ۶۹ جنینی به روش ایجاد حلقه کاغذی (Paper ring) استفاده از فیکساسیون مستقیم در محیط زنده (In vivo) جدا شد. سپس از گلوتارالدئید ۲/۵ درصد به عنوان فیکساسیون اولیه (Prefixation) استفاده گردید و نمونه‌ها به مدت ۸ ساعت در آن قرار داده شد. در گروه الف که جنین‌ها از دیدگاه سطحی (Surface) مورد مطالعه قرار گرفتند، لایه‌های مختلف جنینی به وسیله پنس و قیچی بسیار ظریف در زیر استریومیکروسکوپ از روی جنین برداشته شد و در گروه ب که جنین‌ها از مقطع عرضی چشم مورد مطالعه قرار گرفتند، ابتدا نمونه‌ها به روش معمولی آماده‌سازی بافت مهیا شد و سپس به وسیله پارافین قالب‌گیری انجام گرفت، بعد از آن نمونه‌ها مرحله به مرحله با میکروتوم برش خورد تا به مقطع کاملاً عرضی چشم اولیه رسید بعد نمونه‌ها به وسیله گزیلل، پارافین‌زدایی گردید.

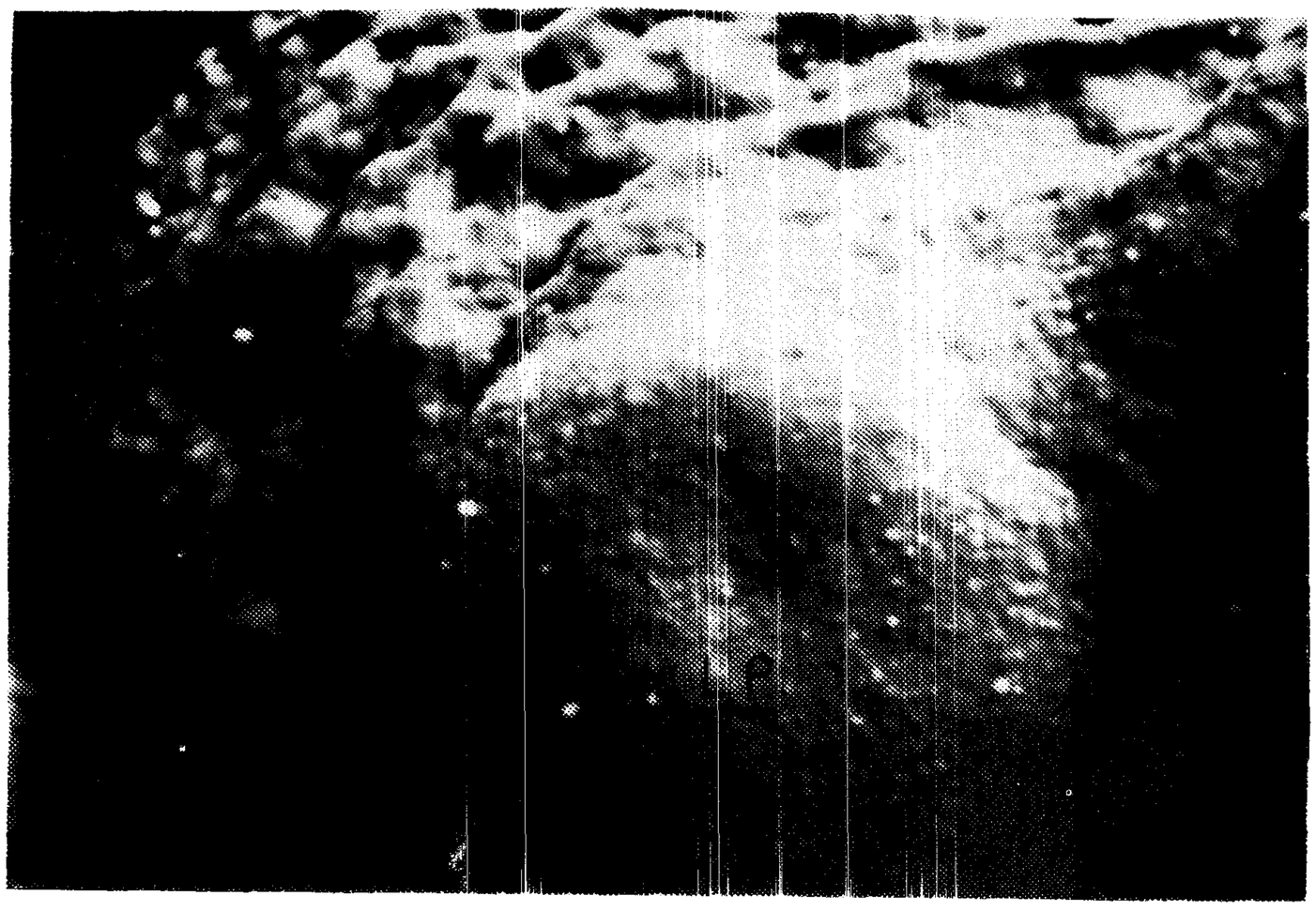
از این جا به بعد ۲ گروه الف و ب به طور مشترک ابتدا در فیکساسیون ثانویه (postfixation) تتراکسیداسمیوم ۱ درصد به مدت ۱ ساعت قرار داده شدند بعد از آن با قرار دادن در الکل با درجات صعودی آبگیری انجام گرفت و سپس به روش Airdrying نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت خشک و بعد نمونه‌ها بر روی گیره‌های مخصوص در جهت مورد نظر چسبانده شد و بعد از آن با پلاتین پوشش داده شد و به وسیله میکروسکوپ الکترونی اسکن مدل هیتاچی مورد مطالعه قرار گرفت.

الف - نتایج حاصل از دیدگاه مطالعه سطحی (Surface)

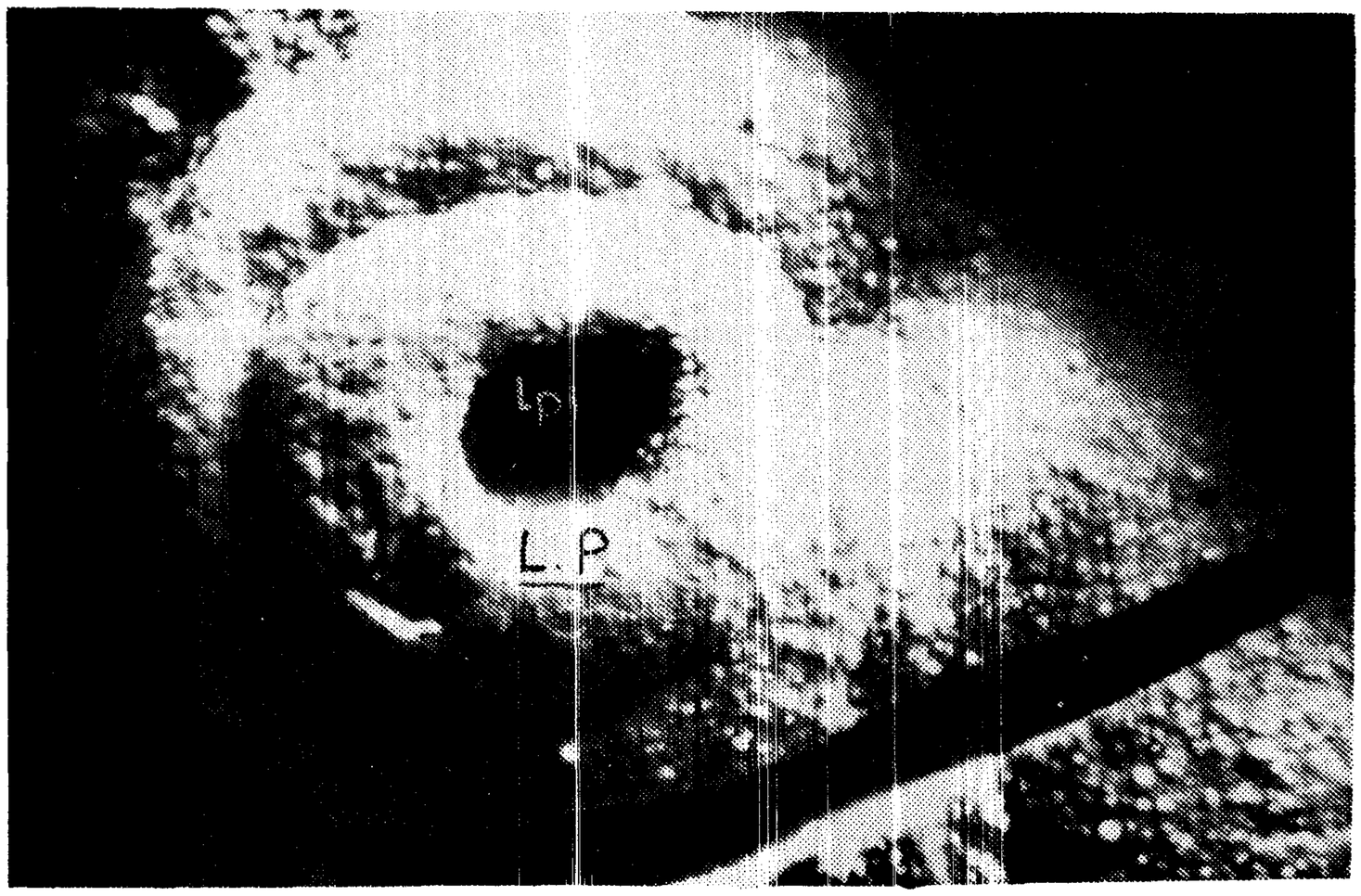
مرحله I : در این مرحله در محل چشم آینده یک ضخیم شدگی اپیتلیوم اکتودرمی سطحی مشاهده می‌گردد که به پلاک عدسی (Lens Placode) مرسوم می‌باشد در ساعات آخر این مرحله در قسمت مرکزی پلاک عدسی شروع به تورفتگی (Invagiation) مشاهده می‌گردد که بسیار کم عمق و وسیع می‌باشد (تصویر شماره ۱).

مرحله II : در این مرحله فرورفتگی پلاک عدسی کاملاً توسعه یافته و ایجاد یک روزنه عدسی (Lens Pit) را می‌نماید که دهانه آن نامتقارن بوده و لبه‌های خلفی و جانبی بسیار تیزتر از لبه قدامی می‌باشند و لبه قدامی دارای شیب ملایمی است. فرورفتگی ناحیه مرکزی پلاک عدسی همراه با برآمده شدن (Evagination) نواحی کناری پلاک عدسی می‌باشد. همچنین سلول‌های حبابی شکل (Bulb shape) در حاشیه حفره به خصوص در ناحیه شیب کناره قدامی دیده می‌شوند (تصویر شماره ۲).

مرحله III : در این مرحله قطر دهانه روزنه عدسی بسیار کاهش یافته است. سلول‌های حبابی کمتر دیده



تصویر ۱ - در این تصویر مرحله **I** تکامل اولیه چشم به صورت سطحی به وسیله میکروسکوپ الکترونی اسکن دیده می‌شود. به ناحیه پلاک عدسی (**L.P**) و ابتدای تورفتگی توجه شود. (بزرگنمایی ۳۵۰ برابر)



تصویر ۲ - در این تصویر مرحله **II** تکامل اولیه چشم به صورت سطحی به وسیله میکروسکوپ الکترونی اسکن دیده می‌شود. به پلاک عدسی (**L.P**) و روزنه عدسی (**Lip**) و لبه‌های قدامی و جانبی و خلفی روزنه توجه شود. (بزرگنمایی ۳۵۰ برابر)

تصویر ۳ - در این تصویر مرحله **III** تکامل اولیه چشم به وسیله میکروسکوپ الکترونی اسکن دیده می‌شود. به بسته شدن روزنه عدسی **(Lip)** نسبت به مرحله **(II)** و هم چنین سلول‌های حبابی توجه شود. (بزرگنمایی ۵۰۰ برابر)

تصویر ۴ - در این تصویر مرحله **IV** تکامل چشم به وسیله میکروسکوپ الکترونی اسکن دیده می‌شود. روزنه عدسی کاملاً بسته شده و اپیتلیوم اکتودرم سطحی **(S.E.E)** روی وزیکول عدسی را کاملاً پوشانده است. (بزرگنمایی ۵۰۰ برابر)

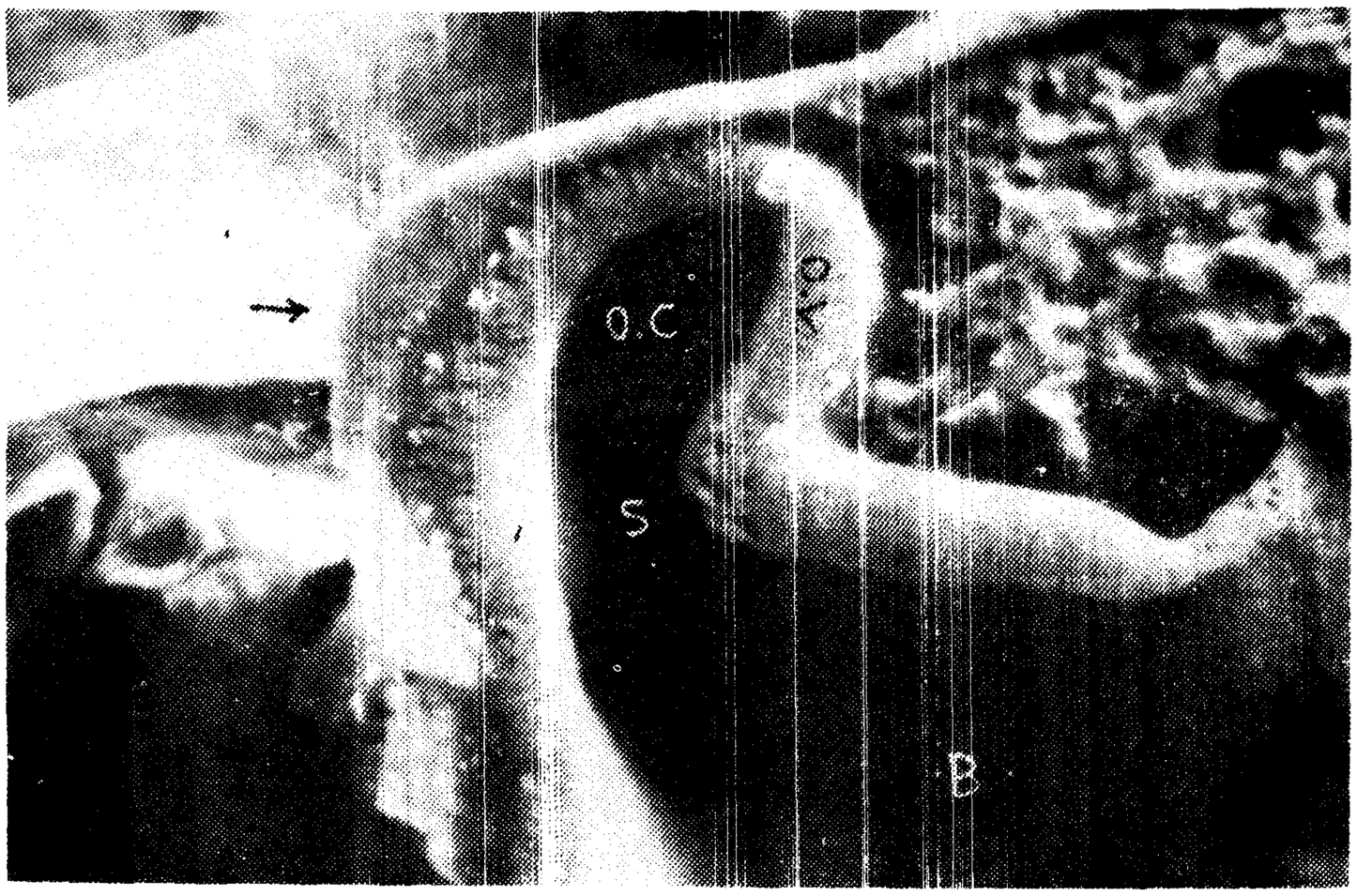
می‌شوند. میزان برآمدگی اطراف روزنه عدسی توسعه بیشتری یافته و در ساعات آخر این مرحله تورفتگی پلاک عدسی و بسته‌شدن آن در حال تکوین است (تصویر شماره ۳).

مرحله IV : در این مرحله به علت تشکیل حباب عدسی، روزنه عدسی مسدود شده و اثری از آن و سلول‌های حبابی دیده نمی‌شود و فقط ناحیه وسیع برآمده شده‌ای در زیر اپیتلیوم اکتودرمی سطحی قابل مشاهده است (تصویر شماره ۴).

ب - نتایج حاصل از دیدگاه مطالعه مقاطع عرضی

مرحله I : حباب بینایی به صورت یک بیرون‌زدگی با ارتباط وسیع از مغز اولیه دیده می‌شود که بر روی آن قسمتی از اپیتلیوم اکتودرم سطحی به طور متقارن ضخیم شده و پلاک عدسی را به‌وجودآورده‌است (تصویر شماره ۵).

مرحله II : تورفتگی پلاک عدسی و ایجاد روزنه عدسی و در اطراف آن ضخیم‌شدگی و برآمدگی (Evagination) پلاک عدسی مشهود می‌باشد. همچنین حباب بینایی به سمت تشکیل جام بینایی پیش می‌رود به طوری که لایه‌ای خارجی و داخلی در حال شکل گرفتن بوده و سلول بینایی مشخص و ساقه بینایی باریک‌تر شده است وسعت ارتباط بین چشم اولیه و مغز اولیه کاهش یافته است بین حباب بینایی و پلاک عدسی فضای زجاجی (Vitreous space) در حال تشکیل می‌باشد. عدم تقارن در تمام قسمت‌های چشم اولیه قابل مشهود است (تصویر شماره ۶).



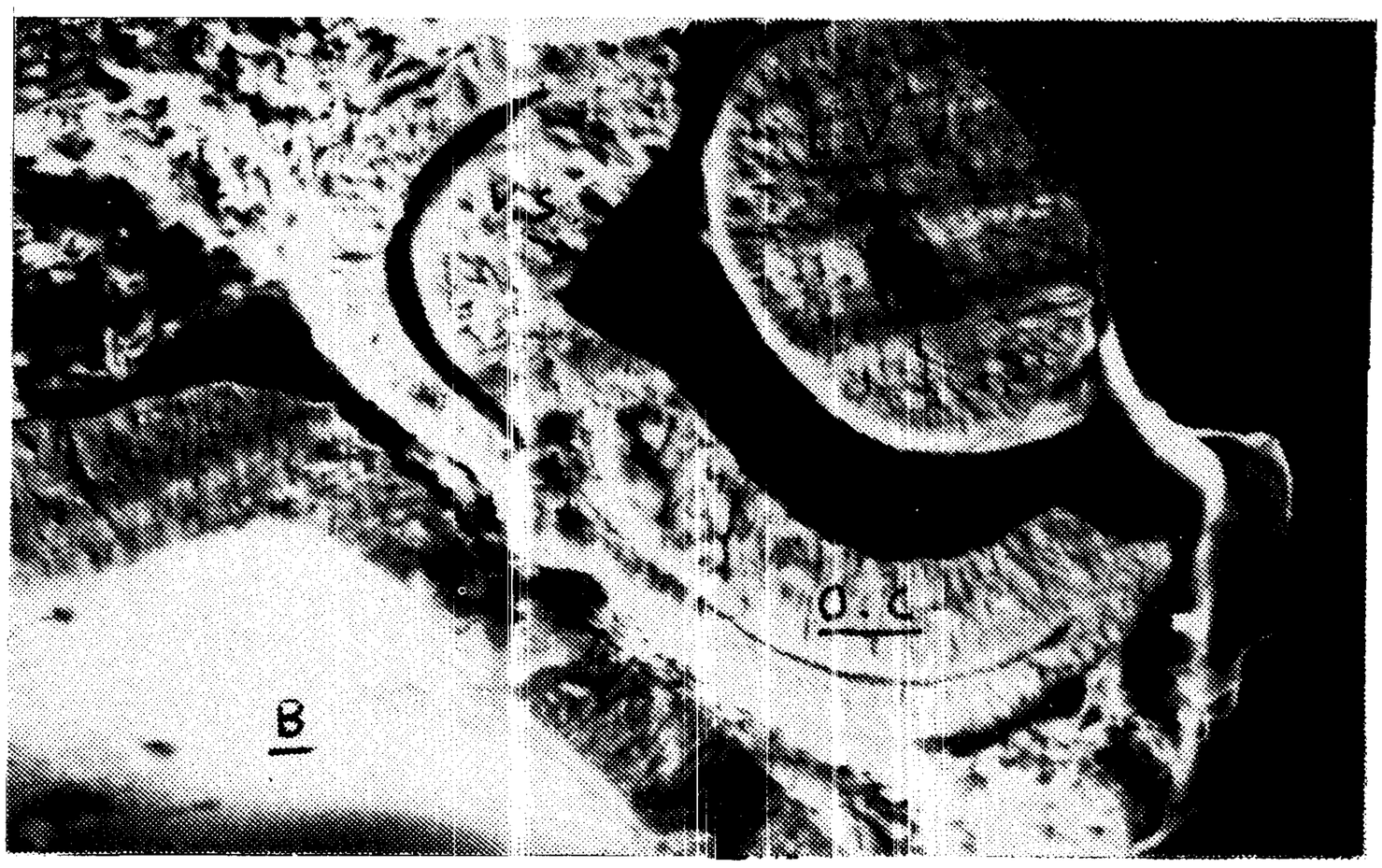
تصویر ۵ - در این تصویر مقطع عرضی از مرحله I تکامل اولیه چشم به وسیله میکروسکوپ الکترونی اسکن دیده می شود.
پلاک عدسی سلوم بینایی (OC) حباب بینایی (OV) ساقه اتصالی (S) و مغز اولیه (B) در تصویر دیده می‌شود.
(بزرگنمایی ۳۵۰ برابر)

تصویر ۶ - در این تصویر مقطع عرضی از مرحله **II** تکامل اولیه چشم به وسیله میکروسکوپ الکترونی اسکن دیده می‌شود. پلاک عدسی **(L.P)** تورفتگی حاصل نموده و حباب بینایی **(OV)**، سلوم بینایی **(OC)** و مغز اولیه **(B)** دیده می‌شود.
(بزرگنمایی ۳۵۰ برابر)

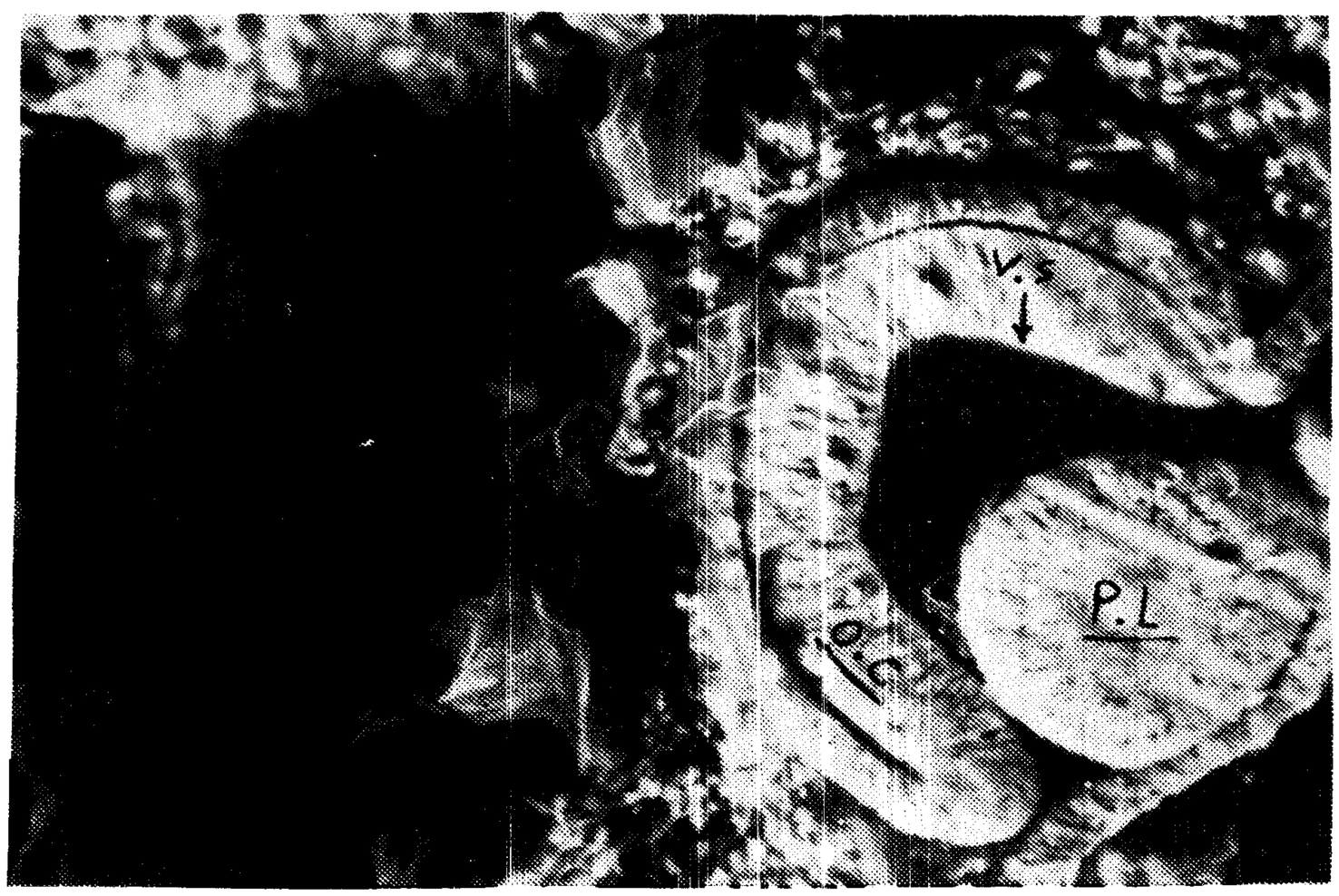
مرحله III : در این مرحله حباب عدسی (Lens vesicle) تشکیل شده است اما بقایایی از روزنه عدسی دیده می‌شود. حباب عدسی از اپیتلیوم اکتودرم سطحی جدا شده است (البته نه به طور کامل). جام بینایی (Optic cup) کاملاً تشکیل شده است و حفره بینایی کوچک شده است و در مقطع عرضی اثری از ساقه بینایی دیده نمی‌شود (زیرا ساقه بینایی تحلیل یافته و فقط در قسمت انتهایی به صورت مجرایی باریک دیده می‌شود).

عدم تقارن به میزان زیادی کاهش یافته است و محور طولی چشم اولیه به ناحیه مرکزی نزدیک شده است. مغز اولیه در کنار چشم اولیه مشاهده می‌گردد و فضای زجاجی افزایش یافته است (تصویر شماره ۷).

مرحله IV : مراحل اولیه تکامل چشم در مراحل آخر بوده و عدسی اولیه تشکیل شده است، اثری از روزنه عدسی نبوده وعدسی اولیه کاملاً از اپیتلیوم اکتودرم سطحی جدا شده است. جام بینایی نیز کاملاً توسعه یافته است و به صورت دو لایه قابل تمایز مشاهده می‌گردد که به وسیله شیار ظریفی از بقایای حفره بینایی از هم جدا شده است. روند تکامل به سویی است که تقارن اجزاء چشم قابل تمیز می‌باشد (تصویر شماره ۸).



تصویر ۷ - در این تصویر مقطع عرضی از مرحله **III** تکامل اولیه چشم به وسیله میکروسکوپ الکترونی اسکن دیده می‌شود. و حباب عدسی **(L.V)** فضای زجاجی **(V.S)** و جام بینایی **(O.C)** و مغز اولیه **(B)** دیده می‌شود. (بزرگنمایی ۳۵۰ برابر)



تصویر ۸ - در این تصویر مقطع عرضی از مرحله **IV** تکامل اولیه چشم به وسیله میکروسکوپ الکترونی اسکن دیده می‌شود. عدسی اولیه **(P.L)** فضای زجاجی **(V.S)** و جام بینایی **(O.C)** دیده می‌شود و تقارن در چشم ایجاد شده و اپیتلیوم اکتودرم سطحی کاملاً از عدسی اولیه جدا گردیده. (بزرگنمایی ۳۵۰ برابر)

بحث :

در تحقیقات قبلی (۶ و ۲) چنین عنوان شده بود که استفاده از تصاویر سه بعدی حاصل میکروسکوپ الکترونی اسکن جهت مطالعه تکامل اعضاء بسیار سودمند می‌باشد. لذا بررسی حاضر بر پایه مطالعه به وسیله میکروسکوپ الکترونی اسکن استوار گردید و از آن جایی که جهت فهم شکل‌گیری اعضاء علاوه بر تجزیه و تحلیل سه‌گانه (طولی، عرضی و ارتفاع) عامل زمان نیز بسیار مثمرثمر است (۶ و ۸) به این جهت تکامل اولیه چشم در ۴ مرحله زمانی با تعریف جدید مورد مطالعه قرار گرفت. دیگر این که تورفتگی (Invagination) پلاک عدسی به عنوان یکی از مثال‌های بسیار جالب در مورد حرکت‌های مورفوژنیک و ایجاد ساختمان‌های انحنادار مطرح گردیده است (۲) بنابراین تأکید مقاله حاضر نیز بر تکامل اولیه چشم به عنوان یک مدل تجربی این گونه حرکت‌های قابل توجیه می‌باشد.

در گزارشات قبلی (۱۱ و ۷، ۶، ۳، ۲) سلول‌های حبابی اپیتلیوم اکتودرم سطحی مشابه حالت ایجاد لوله عصبی، در تشکیل عدسی اولیه نیز عامل مهمی در تورفتگی پلاک عدسی تلقی گردیده‌اند و مهاجرت نامتقارن سلول‌ها در فرآیند تورفتگی و شکل نامتقارن پلاک عدسی رل مهمی را بازی می‌کنند. در بررسی حاضر نیز علاوه بر تأکید دوباره بر موارد فوق توجه به این نکته معطوف می‌شود که فراوان بودن سلول‌های حبابی در دیواره قدامی روزنه عدسی نسبت به سایر روزنه‌های (تصویر شماره ۲) ادله بسیار قوی بر مطلب یاد شده می‌باشد و همان طور که تورفتگی پلاک عدسی در ناحیه مرکزی در تشکیل عدسی اولیه نقش مهمی را ایفا می‌کند، برآمدگی (Evagination) قسمت‌های محیطی پلاک عدسی نیز عامل مهمی در تشکیل عدسی اولیه می‌باشد.

با توجه به گزارش‌هایی (۱۱ و ۵) مبنی بر این که در پروسه تکاملی پلاک عدسی به تنهایی این روند را طی نمی‌کند و ساختمان‌هایی مجاور احاطه‌کننده آن نیز این فرآیند را انجام داده و باالطبع بر روی نامتقارن بودن و شکل نهایی پلاک عدسی اثر می‌گذارند که این ساختمان‌ها وزیکول بینایی می‌باشد که به طور مستقیم اثر القایی بر ایجاد و شکل پلاک عدسی دارد (۱۱)، به نظر می‌رسد که ارتباط وسیع وزیکول بینایی بامغز اولیه در مرحله‌ای I و II و عمل ساقه بینایی وسیع در ایجاد نیرو کشش نامساوی بر روی حباب بینایی احتمالاً نقش به سزایی در عدم تقارن اجزاء چشم اولیه نسبت به هم بازی می‌کنند. به طوری که با کاهش وسعت ساقه بینایی در مرحله‌های بعدی III و IV عدم تقارن اجزاء به میزان زیادی کاهش می‌یابد. اگر چه تغییرات شکل سر و طویل شدن آن و ایجاد جنین نیز بر روی تغییرات یاد شده اثر می‌گذارد (۷).

References :

1 - Anderson, S. et al. 1987: developrnent in the noraml and pupoidEye foetus Mutant mouse Anat-Embryol-Berl 170 (2): 243-249.

2 - Back house. 1974: M - Proceeding of the workshop on advance in Biomedical Applications of the Scanning electron microscope P.535 I.E.T Research Institute. Chicage. Illionis.

3 - Bancroft Mary and Bellairs ruth 1977: Placode of the chick embryo studied by SEM. Anat. Embryol. 151, 97-108.

4 - Hamilton, H.L., Lillie's. 1952: Development of the chick (Revised) Henry Holt and co, New York 258-307.

5 - Handrix, r. and Wandswann. 1974: J-changes in the glycoprotein concentration of the extra cellular matrix between lens and optic vesicle associated with early lens differentiation. Journal of Differentiation. 2: 357-362.

6 - Hilfer, S.R. 1983: Development of the eye of the chick embryo SEM III 1353-1369.

7 - Jennifer. Wakely. 1976: Scanning electron microscopy of lens Placode inveagination in the chick embryo - Exp. Eye Res. 22: 642-651.

8 - Mckeehan, M.S. 1951: Cytological aspects of embruonic lens induction in the chick. J exp. Zool. 117,3164.

9 - Kretzschmar - D and et al - 1942: Giant Lens, a gene involved incell determination and axon guidance in the visual system of drosophila melanogaster- Emrbo - Embryology J. Jvl 11(7) - 2531-9.

10 - Sadler, T.W. 1940: Langman's medical embryology. phil. pub chap 19 , PP. 457-468.

11 - Spemann. H. 1962: Embryonic development and induction. Publishing co. Nwe York pp, 536-578.

The early development of eye in chick embryo by three dimensional reconstruction

Rahbar, S.* Rezazadeh, M.* Hosseini, A.**

Key words : Lens placode, lens pit, optic cvp, optic stalk

Summary :

In this study, early development of chick embryo in the 48 to 69 hours of formation was studied in the four predefined phases. Surface and transverse preparations were obtained for SEM.

In the first phase of formation (48 to 52 hours), lens placode and optic vesicle were observed. In the second phase (52 to 56) optic placode invagination lens pit with posterioy and lateral walls were sharper than anterior ones, and bubbling cells were visible. Extent of optic vesicle and primary brain relation decreased and pronunced assymetric eye coponents formation were noticele. In the third phase (56 to 64) lense decreased apprature radius, decreased number of bulbing cells and formation of lense vesicle and optic cup were observed. In this phase, optic stalk narrowed and early eye assymerry corrected to some extent. Finally, in the forth phase (64 to 69 hours) primaty lens formed and separated from epithelium ectodermal sorface. Completerly developed optic cup and symerry of eye companent were also observed in this phase. Wiht regard to the availble litratures in this contentandthe results mentioned above it could be concluded that SEM is a good tools for studing of morphogenic movements as early eye development. Additianally in the defined second phase of the development, the number of bubbling cells in the ventral wall were big Finally in addition to invagination of lens Placode, evagination of sourrunding tissues of lens apprature plays an important role in the Proccess of early eye development.

* - Department of Anatomy, Medical School, Tarbiat Modares University, Tehran - Iran.

** - Department of Anatomy, Medical School, Shahid Beheshti University, Tehran - Iran.