

سطح تمایز و عملکرد سیستم عصبی روده‌ای در جنین مرغ

صمد محمدنژاد^۱ حسینعلی عرب^{۱*} سعیده نعیمی^۲

(۱) گروه فارماکولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران

(۲) گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان-ایران

(دریافت مقاله: ۲۹ خرداد ماه ۱۳۹۲، پذیرش نهایی: ۴ آبان ماه ۱۳۹۲)

چکیده

زمینه مطالعه: بروز ناهنجاری‌های تکاملی سیستم عصبی روده‌ای می‌تواند زمینه‌ساز بروز بیماری‌های مادرزادی دستگاه گوارش شود. **هدف:** هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی نحوه تمایز یافتگی ساختاری و فعالیت سیستم عصبی روده‌ای جنین مرغ بوده است. **روش کار:** تعداد ۱۰ عدد از جنین‌های ۱۹ روزه مرغ با جدا کردن سر قربانی گردیدند و پس از باز کردن محوطه بطنی، قطعاتی از ژژونوم و کولون آنها جمع‌آوری شدند. حلقه‌های مجزایی از این قطعات روده‌ها تهیه و فعالیت حرکتی آنها در سیستم عضو مجزا مورد بررسی قرار گرفت. این فعالیت‌ها در وضعیت پایه و بدنبال تحریک گیرنده‌های کولینرژیک و آدرنرژیک با آگونیست‌های مربوطه و همچنین تحریک سیستم غیر آدرنرژیک- غیرکولینرژیک توسط تحریک میدان الکتریکی ثبت گردیدند. وضعیت ساختاری قطعات اخذ شده از روده نیز با استفاده از نشانگر Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) به روش ایمنو هیستوشیمی ارزیابی شد. **نتایج:** انقباضات ریتمیک خودبخودی هم در ژژونوم و هم در کولون مجزای جنین نوزده روزه مرغ وجود داشت. تحریکات کولینرژیک به طور معنی‌داری سبب افزایش دامنه انقباضات ژژونوم ($p < 0/01$) و کولون ($p < 0/001$) نسبت به حالت پایه شد. اما تحریکات آدرنرژیک به شکل معنی‌داری دامنه انقباضات رادر ژژونوم ($p < 0/05$) و کولون ($p < 0/001$) کاهش داد. تحریک میدان الکتریکی، موجب کاهش کشش روده مجزای منقبض شده با کلرید پتاسیم در ژژونوم ($p < 0/001$) و کولون ($p < 0/001$) گردید. نتایج مطالعه ایمنو هیستوشیمی حاکی از مثبت بودن واکنش پذیرای ایمنی گانگلیون‌های عصبی روده‌ای با GFAP بوده است. **نتیجه‌گیری نهایی:** به نظر می‌رسد سیستم عصبی روده‌ای قبل از تولد به تمایز یافتگی ساختاری می‌رسد و می‌تواند سبب تنظیم الگوهای حرکتی روده‌ها شود.

واژه‌های کلیدی: روده جنین مرغ، سیستم عصبی روده‌ای، ایمنو هیستوشیمی، انقباضات ریتمیک خودبخودی

مقدمه

سیستم عصبی روده‌ای در برگیرنده مجموعه‌ای از نورون‌های حسی، بینابینی و حرکتی است که می‌تواند مستقل از سیستم عصبی مرکزی عمل نماید (۱۰). این سیستم حرکات، ترشحات برون ریز و درون ریز و گردش خون دستگاه گوارش را کنترل می‌کند، لذا در متون مختلف از سیستم عصبی روده‌ای با عنوان «مغز روده» یا مغز کوچک یاد می‌کنند (۱۲). سیستم عصبی روده‌ای حاوی حدود ۱۰^{۱۰} نورون در انسان بوده که به اندازه تعداد نورون‌هایی است که در نخاع یافت می‌شوند. از این رو می‌توان این سیستم را بخش جابجا شده سیستم عصبی مرکزی دانست که با وظیفه تنظیم عمل گوارش را بر عهده دارد (۲). جسم سلولی نورون‌های سیستم عصبی روده‌ای در داخل گانگلیون‌های کوچکی واقع شده‌اند که با دستجات رشته‌های عصبی به یکدیگر متصل می‌شوند و در کنار هم شبکه‌های عصبی زیرمخاطی و میان‌تریک را شکل می‌دهند.

به نظر می‌رسد وظیفه اصلی سیستم عصبی روده‌ای تنظیم الگوهای حرکتی دستگاه گوارش باشد (۱۰). یکی از این الگوهای حرکتی که توسط این سیستم کنترل می‌شود، انقباضات ناشی از ریتم الکتریکی پایه (Basic Electrical Rhythm) می‌باشد. ریتم الکتریکی پایه فعالیت

حرکتی دستگاه گوارش را هم‌آهنگ می‌کند، به گونه‌ای که انقباضات پر استالتیک و سایر الگوهای حرکتی تنها در خلال مرحله دپولاریزان امواج الکتریکی رخ می‌دهند (۲). انقباضات ناشی از ریتم الکتریکی پایه را می‌توان با سامانه ارگان مجزا (Isolated Organ System) ثبت نمود (۱۶). بروز ناهنجاری‌های تکاملی سیستم عصبی روده‌ای می‌تواند زمینه‌ساز بروز برخی بیماری‌های مادرزادی فعالیت‌های حرکتی دستگاه گوارش باشد. این ناهنجاری‌ها عمدتاً در بخش‌های خلفی روده مشاهده می‌شوند (۲۱). بیماری هیرشپرونک (Hirschsprung) یا مگاکولون ناشی از فقدان گانگلیون عصبی شایع‌ترین ناهنجاری تکاملی سیستم عصبی روده‌ای می‌باشد. نوزادان مبتلا به این عارضه ممکن است هر سه هفته یک بار بیشتر نتوانند اجابت مزاج کنند. مطالعات نشان می‌دهد در جمعیت‌های انسانی از هر چهار هزار و پانصد تولد، یک نوزاد به این عارضه مبتلا می‌گردد (۲۰، ۲۸). دیسپلازی نورونی روده‌ای (Intestinal Neuronal Dysplasia) یکی دیگر از ناهنجاری‌های مادرزادی سیستم عصبی روده‌ای می‌باشد که افزایش عقده‌های عصبی و یا وجود عقده‌های نابجا از ویژگی‌های این عارضه محسوب می‌شوند. منشاء نورون‌ها و سلول‌های گلیای سیستم عصبی روده‌ای عمدتاً قطعه واگی ستیغ عصبی می‌باشد. این سلول‌های پیش‌ساز که از عصب واگ مشتق شده‌اند در ابتدا به بخش قدامی روده مهاجرت می‌نمایند و



بدن قربانی گردیدند. پس از وزن‌کشی جنین، محوطه شکمی باز و بعد از بررسی مورفولوژی یک روده‌ها، قطعه‌ای از ابتدای ژژونوم به عنوان نماینده روده کوچک و قطعه‌ای از کولون به عنوان نماینده روده بزرگ از بدن جدا گردید.

قطعات جدا شده روده بلافاصله در پتری دیش حاوی محلول کربس - هنسلیت سرد (شامل: 120 mM NaCl , $5/9 \text{ mM KCl}$, $1/2 \text{ mM MgCl}_2$, $1/2 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, 15 mM NaHCO_3 , 11 mM گلوکز و $1/8 \text{ mM CaCl}_2$) قرار داده شدند که با گاز کربوژن (۹۵٪ اکسیژن و ۵٪ دی‌اکسیدکربن) هوادهی می‌شد پس از شستشو و جداسازی بافت‌های همبند همراه آنها، حلقه‌ای به طول ۱۱ Cm از هر نمونه تهیه گردید. قطعات در جهت فیبرهای عضلات صاف طولی روده در داخل حمام بافتی حاوی محلول کربس - هنسلیت 39°C (با حجم ۳۰ mL) که با گاز کربوژن هوادهی می‌شد، قرار داده شدند. پس از اتصال به یک مبدل با نیروی ایزومتریک، قطعات معلق در داخل حمام بافت تحت کشش $0/5 \text{ g}$ قرار گرفتند و سیگنال‌های خروجی ناشی از حرکات مکانیکی بافت‌ها توسط یک ثبت‌کننده چند کاناله کامپیوتری ثبت می‌گردید (AD Instruments Pty Ltd, Bella Vista, NSW, Australia). مدت ۴۵ دقیقه به نمونه‌ها فرصت داده شد تا به مرحله سازگاری و تعادل در محیط جدید برسند. در این مدت ۴۵ دقیقه هر ۱۵ دقیقه یک بار محلول کربس - هنسلیت موجود در حمام بافتی تعویض می‌شد. پس از برقراری تعادل، انقباضات ناشی از ریتم الکتریکی پایه به مدت ۱۰ دقیقه ثبت گردیدند.

ارزیابی فعالیت‌های کولینرژیک، آدرنرژیک و غیر آدرنرژیک و غیر کولینرژیک: برای بررسی میزان پاسخ دهی سیستم کولینرژیک روده جنین، داروی استیل‌کولین کلراید (Novartis, Switzerland) به عنوان آگونیست گیرنده‌های موسکارینی با غلظت 10^{-4} mol به محلول کربس - هنسلیت موجود در حمام بافت افزوده شد و انقباضات ثبت گردید. سپس محلول کربس - هنسلیت داخل حمام بافتی دوبار تعویض گردید و بعد از برقراری تعادل، قطعات بافتی به مدت ۱۰ دقیقه در مجاورت با آتروپین (Sigma-Aldrich, USA) به عنوان آنتاگونیست گیرنده‌های موسکارینی با غلظت $4 \times 10^{-6} \text{ mol}$ قرار گرفتند. برای ارزیابی نحوه پاسخ‌دهی سیستم عصبی آدرنرژیک قطعات ایزوله جنین، داروی اپی نفرین (Sigma-Aldrich, USA) به عنوان آگونیست گیرنده‌های آدرنرژیک با غلظت $5 \times 10^{-6} \text{ mol}$ به محلول کربس - هنسلیت موجود در حمام‌های بافتی اضافه گردید و اثرات آن روی انقباضات روده ثبت شد. سپس با تعویض محلول کربس - هنسلیت و برقراری تعادل، قطعات روده در معرض پروپرانولول (Sigma-Aldrich, USA) به عنوان آنتاگونیست گیرنده‌های β -آدرنرژیک با غلظت 10^{-6} mol و پرازوسین (Sigma-Aldrich, USA) به عنوان آنتاگونیست گیرنده‌های α_1 -آدرنرژیک با غلظت 10^{-6} mol به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. میانگین

سپس به بخش‌های خلفی حرکت می‌کنند و پس از تکثیر، سیستم عصبی روده‌ای را تشکیل می‌دهند. شواهد حاکی است که قطعه خاجی ستیغ عصبی نیز در تشکیل شبکه‌های سیستم عصبی روده‌ای بخش خلفی دستگاه گوارش نقش دارد (۷). گفته شده که گیرنده‌های متعدد دارای فعالیت تیروزین کینازی در مهاجرت و تکوین نوروبلاست‌های روده حائز اهمیت هستند.

در طی چند دهه اخیر، جنین مرغ به عنوان یکی از مدل‌های حیوانی برای مطالعه تکامل سیستم عصبی روده‌ای مطرح بوده است (۱۱). مسیر مهاجرت سلول‌های پیش‌ساز سیستم عصبی روده‌ای در جنین مرغ توسط پژوهشگران مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است (۲۶، ۷، ۹). یکی از ویژگی‌هایی که جنین مرغ را از سایر مدل‌های حیوانی متمایز می‌سازد، دسترسی آسان به مراحل مختلف جنینی و امکان مداخله در سیر تکوین جنین می‌باشد (۱۱). تعیین توالی ژنوم مرغ در طی سال‌های اخیر و میسر شدن دستکاری‌های ژنتیکی، فصل جدیدی را در استفاده از جنین این حیوان برای مطالعات پایه‌ای روندهای تکامل جنینی گشوده است (۱۴). هر چند تاکنون مطالعات زیادی در ارتباط با مسیرها و زمان بندی مهاجرت نوروبلاست‌های روده در مدل حیوانی جنین مرغ انجام شده است، اما پرسش‌های بدون پاسخی چون، آیا سلول‌های سیستم عصبی روده‌ای تا قبل از تولد به طور کامل تمایز می‌یابند و یا اینکه سیستم عصبی روده‌ای از چه زمانی عملکرد خود در تنظیم حرکات روده را شروع می‌کند؟ پاسخ به پرسش‌های فوق می‌تواند در درک بنیادین روند فعالیت سیستم عصبی روده‌ای و پاتوژنز ناهنجاری‌های آن راهگشا باشد. لذا هدف از انجام پژوهش حاضر، مطالعه سطح تمایز یافتگی سلول‌های سیستم عصبی روده‌ای و ارزیابی الگوهای حرکتی ناشی از فعالیت آن قبل از تولد در مدل حیوانی جنین مرغ می‌باشد.

مواد و روش کار

الف) حیوانات: جهت انجام این مطالعه، ۱۰ عدد تخم مرغ نطفه‌دار نژاد لگهورن سفید از شرکت مرغک تهیه شد. به منظور یکسان سازی مرحله تکامل جنینی، تخم مرغ‌ها به مدت یک شب در دمای 14°C تا ۱۶ نگه‌داری شدند. تخم مرغ‌های مذکور در دستگاه انکوباتور / هچر (ککس ماشین؛ ایران) در دمای $37/5^\circ\text{C}$ و رطوبت نسبی ۵۸ تا ۶۰٪ قرار داده شدند. روز قرار گرفتن تخم مرغ‌ها در انکوباتور به عنوان روز صفر جنینی در نظر گرفته شد. به منظور حصول اطمینان از زنده بودن جنین‌ها، تخم مرغ‌ها هر روز با نطفه‌سنج ارزیابی می‌شدند. پروتکل تحقیق بر اساس رعایت سه اصل مهم اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی شامل کاهش (Reduction)، پالایش (Refinement) و جایگزینی (Replacement) طراحی گردید (۲۷).

ب) تهیه قطعات مجزای روده و ثبت انقباضات ناشی از ریتم الکتریکی پایه: در روز نوزدهم تخم مرغ‌ها شکسته شدند و جنین‌ها با جدا شدن سراز



مقاطع اضافه گردید و بعد از ۱۰ دقیقه با محلول بافر فسفات شسته شدند. در پایان، پس از افزودن کروموزن سوبسترا به مدت ۱۰ دقیقه بر روی مقاطع بافتی و سپس شستشو با آب مقطر، رنگ آمیزی زمینه با Mayer Hematoxylin انجام گرفت.

لام‌هایی که با H&E رنگ آمیزی شده بودند، با میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند و مناطقی که احتمال حضور شبکه‌های عصبی زیرمخاطی و میان‌تريک می‌رفت، در پشت اسلاید علامت‌گذاری شدند. برای تفریق شبکه‌های عصبی واکنش داده با GFAP از عوامل غیر واقعی و مزاحم موجود در اسلایدهای ایمونوهیستوشیمی، نقاط علامت‌گذاری شده در لام‌های H&E با اسلایدهای ایمونوهیستوشیمی تهیه شده از بلوک‌های پارافینی متناظر انطباق داده شدند.

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های بدست آمده از مطالعه مقاطع روده‌های جنین در سیستم عضو مجزا به صورت خطای معیار (Standard Error) \pm میانگین (Mean) نمایش داده شده‌اند ($n=10$). برای مقایسه میانگین تواتر و دامنه انقباضات روده در سیستم بافت مجزا و نیز واکنش پذیری ایمنی در مطالعات هیستوشیمی و ایمونوهیستوشیمی از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) استفاده شد. در مقایسه میانگین گروه‌ها به شکل دوطرفه دو نیز از Bonferroni t-test بهره گرفته شد. برای مقایسه میانگین داده‌ها بین ژژونوم و کولون از Student's t-test استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار BioStat® ۲۰۰۸ انجام گرفت.

نتایج

منحنی انقباضات ناشی از ریتم الکتریکی پایه: در تصویر نمونه‌ای از منحنی انقباضات ناشی از ریتم الکتریکی پایه جنین نوزده روزه مرغ در وضعیت پایه (نرمال) و در شرایطی که مقاطع مجزا در معرض تحریکات کولینرژیک، آدرنرژیک و غیر کولینرژیک و غیر آدرنرژیک قرار گرفته‌اند، نشان داده شده است. همانگونه که در این شکل مشاهده می‌شود، انقباضات خود بخودی ناشی از ریتم الکتریکی پایه هم در ژژونوم و هم در کولون مجزای جنین نوزده روزه مرغ وجود دارد. در نمودار این انقباضات در حالت پایه و نیز در حضور آگونیست و سپس در حضور مقادیر هم ارز آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های کولینرژیک به طور هم‌زمان مقایسه شده است. محاسبات آماری نشان داد که در حالت پایه، میانگین تواتر انقباضات خود بخودی در ژژونوم به طور معنی داری بیشتر از کولون بوده است (به ترتیب 0.18 ± 0.05 در برابر 0.11 ± 0.03 انقباض در دقیقه، $p < 0.001$). اما مشاهدات نشان داد که کشش انقباضات ناشی از ریتم الکتریکی پایه در کولون به شکل معنی داری بیشتر از ژژونوم می‌باشد (به ترتیب $0.2g \pm 0.07$ در برابر $0.1g \pm 0.06$ ، $p < 0.001$).

افزودن استیل کولین به حمام بافت، دامنه انقباضات ژژونوم را به شکل معنی داری ($0.13g \pm 0.01$ ، $p < 0.001$) نسبت به حالت پایه افزایش

تواتر انقباضات هر قطعه بر حسب تعداد انقباضات در دقیقه در بازه زمانی ۱۰ دقیقه محاسبه شد. میانگین دامنه انقباضات نیز با اخذ میانگین فاصله بین بیشینه و کمینه کشش قطعات روده مجزا در بازه زمانی ۱۰ دقیقه بر حسب گرم محاسبه گردید.

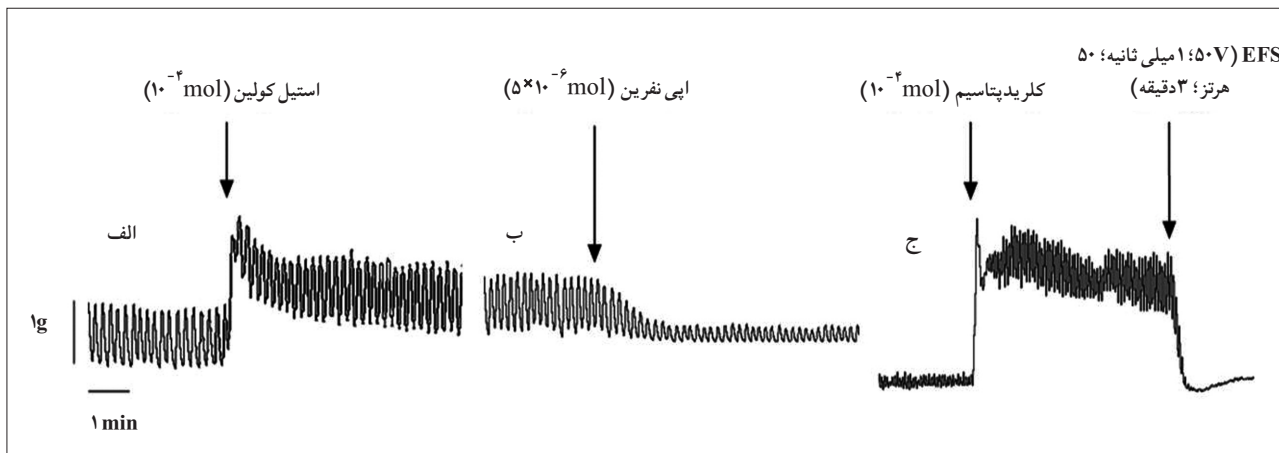
برای تعیین میزان پاسخ‌دهی سیستم غیر آدرنرژیک - غیر کولینرژیک (Non-Adrenergic-Non-Cholinergic) روده‌های تحت مطالعه از تحریک میدان الکتریکی (Electrical Field Stimulation) بهره گرفته شد. ابتدا قطعات بافتی در مجاورت با آتروپین، پرازوسین و پروپرانولول با غلظت‌های ذکر شده در فوق به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. سپس یک انقباض بیشینه با کلرید پتاسیم (Aldrich, USA) - Sigma با غلظت 10^{-4} مول ایجاد گردید. پس از ایجاد پاسخ انقباضی کفه، تحریک میدان الکتریکی ($50V$; 1 میلی ثانیه؛ 50 هرتز؛ 3 دقیقه) با استفاده از الکترودهایی که در دو سمت بافت مجزا در داخل حمام بافتی تعبیه شده بودند، ایجاد شد (Harvard Apparatus Stimulator, USA). میزان انقباض عضلانی بدنبال تحریک میدان الکتریکی که ناشی از فعالیت سیستم غیر آدرنرژیک - غیر کولینرژیک روده می‌باشد بر حسب درصد انقباض بیشینه بافتها تعیین گردید.

غلظت آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های به کار رفته در این پژوهش با استفاده از مقالات منتشر شده Denac و همکاران در سال ۱۹۹۰ و Villamo و همکاران در سال ۲۰۰۲ و مطالعات امکان‌سنجی اولیه نویسندگان این مقاله تعیین گردیده است (۶، ۲۹).

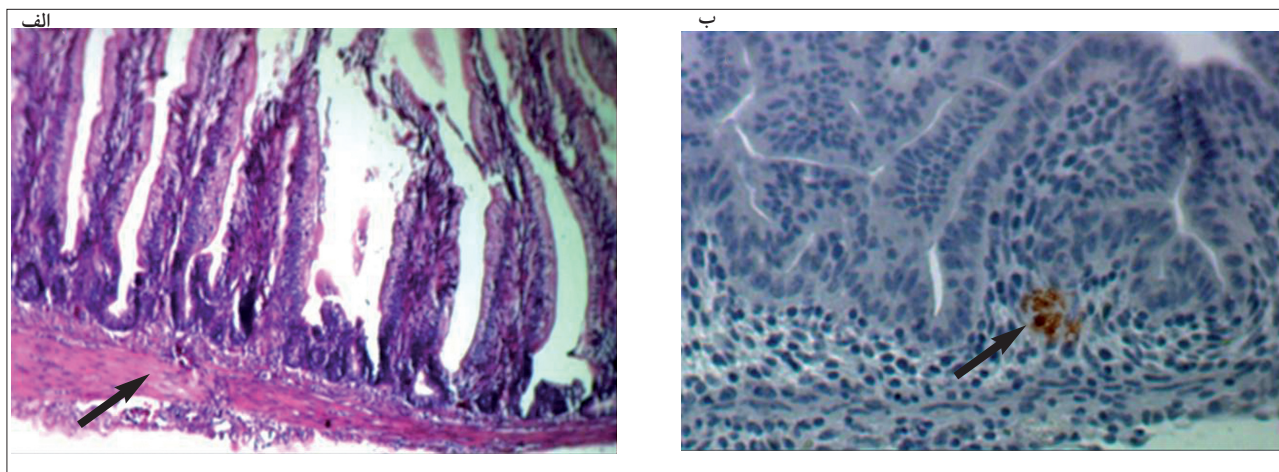
د) مطالعات هیستوشیمی و ایمونوهیستوشیمی: مقاطع ژژونوم و کولون روده‌های جنین در فرمالین ۱۰٪ رقیق شده با محلول فسفات بافر 0.1 mol تثبیت شدند و پس از آبگیری و با گذر از غلظت‌های متوالی اتانول، بلوک‌های پارافینی آنها تهیه گردید. اسلایدهای تهیه شده از این بلوک‌ها با روشی که توسط Aitken در سال ۱۹۵۸ بیان گردیده است، با (H&E) Hematoxylin-Eosin رنگ آمیزی شدند (۱).

برای مطالعه ایمونوهیستوشیمی، بلوک‌های پارافینی قبل از برش‌گیری به مدت ۳۰ دقیقه در مخلوط آب یخ سرد گردیدند. سپس برش‌های 4 mm تهیه و بر روی اسلاید قرار داده شدند. بعد از گذشت ۱۵ دقیقه، برش‌های بافتی در دمای $37^{\circ}C$ بر روی اسلایدها تثبیت گردیدند. بعد از پارافین زدایی و آبگیری در غلظت‌های متوالی اتانول، مقاطع بافتی به روش ایمونوهیستوشیمی با (DAKO, Glostrup, Denmark) Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) و بر اساس دستورالعمل سازنده کیت رنگ آمیزی گردیدند. به طور خلاصه، بازیابی آنتی ژن به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از حرارت و بافر سیترات انجام شد. سپس، پراکسید هیدروژن ۳٪ و متانول خالص بر روی مقاطع به مدت ۵ دقیقه افزوده شد و بعد از آن اسلایدها با آب مقطر شستشو داده شدند. در ادامه، آنتی بادی اولیه (همراه با کنترل منفی) به مدت ۱۰ دقیقه بر روی مقاطع اضافه شدند و شستشو گردیدند. سپس، آنتی بادی ثانویه بیوتینیل‌ه‌ی روی





تصویر ۱. منحنی انقباضات ناشی از ریتم الکتریکی پایه روده مجزای جنین ۱۹ روزه مرغ. (الف) افزایش دامنه انقباضات کولون در پاسخ به مدیاتور سیستم کولینرژیک؛ (ب) کاهش دامنه انقباضات کولون در پاسخ به واسطه‌های سیستم آدرنرژیک؛ (ج) انقباض عضلات صاف ژژونوم در پی فعال‌سازی سیستم غیر آدرنرژیک - غیر کولینرژیک با تحریک میدان الکتریکی بعد از بلوکه نمودن سیستم‌های کولینرژیک و آدرنرژیک با آنتاگونیست‌های مربوطه.



تصویر ۲. ریزنگاره‌های شبکه‌های سیستم عصبی روده‌ای در جنین ۱۹ روزه مرغ. (الف) رنگ‌آمیزی H&E ژژونوم، بزرگنمایی ۱۰۰×؛ (ب) رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی کولون با GFAP، بزرگنمایی ۴۰۰×. نوک پیکان‌ها نشان‌دهنده گانگلیون‌های سیستم عصبی روده‌ای می‌باشند.

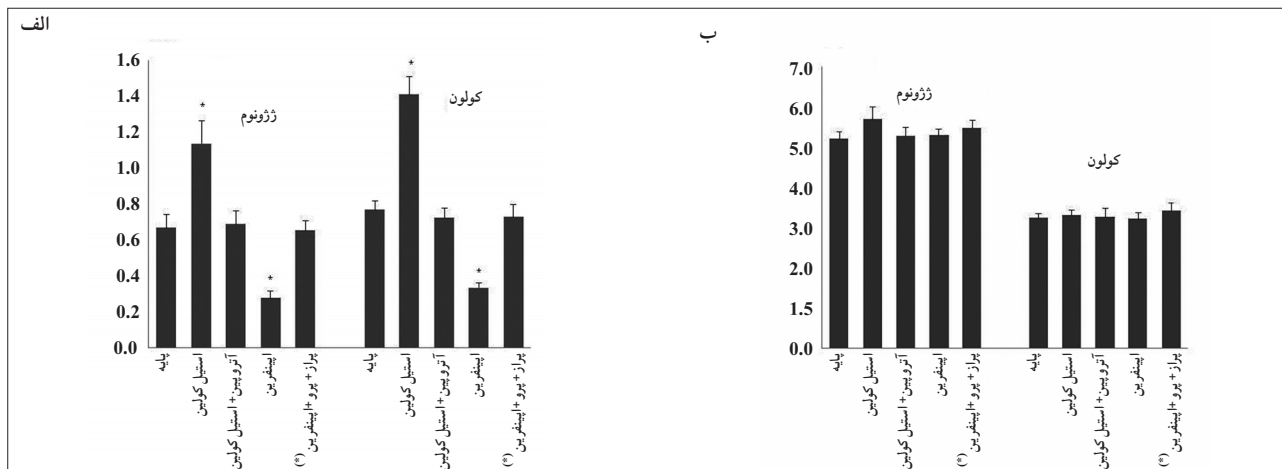
پایه ژژونوم و کولون مجزا در مقایسه با حالت پایه به وجود نیآورد (نمودار ۱-ب).

تحریک میدان الکتریکی، موجب کاهش معنی‌دار کشش روده مجزا که قبلاً با کلرید پتاسیم منقبض شده بود، به میزان $2/14 \pm 53/24\%$ در ژژونوم ($p < 0/001$) و $6/61 \pm 48/71\%$ در کولون ($p < 0/001$) گردید (تصویر ۱-ج). اما در میزان کاهش کشش روده تفاوت آماری معنی‌داری بین ژژونوم و کولون به‌دنیال تحریک میدان الکتریکی مشاهده نگردید.

مشاهدات عقده‌های عصبی با ایمونوهیستوشیمی: نمونه‌ای از مشاهدات میکروسکوپی ژژونوم جنین ۱۹ روزه با رنگ‌آمیزی H&E و کولون آن با رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی توسط GFAP در تصویر ۲ نشان داده شده است. در نمونه‌های رنگ‌شده با H&E وجود عقده‌های عصبی در جدار قطعات ژژونوم و کولون بدست آمده از جنین، مشهود بوده است. ایجاد واکنش‌پذیری ایمنی مثبت با GFAP در نمونه‌های رنگ‌آمیزی

داد. استیل‌کولین در کولون نیز موجب افزایش معنی‌دار دامنه انقباضات ($1/41 \pm 0/10g$) نسبت به حالت پایه گردید (نمودار ۱-الف). افزودن استیل‌کولین به حمام بافت حاوی قطعات مجزای ژژونوم و کولون که قبلاً در مجاورت با آتروپین قرار گرفته بودند، تغییر معنی‌داری در دامنه انقباضات خودبخودی ژژونوم یا کولون به وجود نیآورد (نمودار ۱-الف). اما پی‌نفرین دامنه انقباضات خودبخودی ژژونوم مجزا را نسبت به حالت پایه به صورت معنی‌داری کاهش داد ($0/28 \pm 0/04g$) ($p < 0/05$). همچنین افزودن پی‌نفرین به حمام بافتی، دامنه انقباضات ناشی از ریتم الکتریکی پایه در کولون مجزا را نیز به طور معنی‌داری، مشابه آنچه در ژژونوم دیده شد، کاهش داد ($0/34 \pm 0/03g$) ($p < 0/001$) (نمودار ۱-ب). اما پی‌نفرین در حضور پروپرانولول و پرازوسین تغییری در دامنه انقباضات خودبخودی ژژونوم و کولون ایجاد نمود (نمودار ۱-الف). کاربرد استیل‌کولین و پی‌نفرین تفاوت معنی‌داری را در تواتر انقباضات ناشی از ریتم الکتریکی





نمودار ۱. انقباضات ناشی از ریتیم الکتریکی پایه روده مجزای جنین ۱۹ روزه مرغ در حالت پایه و نیز در پاسخ به مدیاتورهای سیستم کولینرژیک و سیستم آدرنرژیک. پاسخ‌دهی به سیستم‌های کولینرژیک و آدرنرژیک نخست در حضور آگونیست و سپس در حضور مقادیر هم‌ارز آگونیست و آنتاگونیست ارزیابی شد. (الف) میانگین دامنه انقباضات؛ (ب) میانگین تواتر انقباضات. نمودار خطا (Error Bar) نمایانگر خطای معیار می‌باشد. * $p < 0.001$ در مقایسه با حالت پایه. (۱) پراز-پرازوسین، پرو-پرو پرانولول.

به ژژونوم (۱) به نظر می‌رسد که دامنه کشش انقباضات ناشی از ریتیم الکتریکی پایه در کولون بیشتر از ژژونوم باشد.

روده دارای یک عصب‌گیری دوگانه از سیستم عصبی خودمختار است که بخش پاراسمپاتیکی آن فعالیت عضله صاف روده را به طور کلی افزایش می‌دهد و وظیفه بخش سمپاتیکی آن کاهش فعالیت عضله صاف روده می‌باشد (۲). در پژوهش حاضر، پاسخ‌دهی به استیل‌کولین و اپی نفرین در روده‌های مجزایی که عصب‌دهی خارجی آنها قطع شده بود، بر حضور کامل گیرنده‌های کولینرژیک و آدرنرژیک روده در جنین ۱۹ روزه مرغ دلالت داشته است. علاوه بر سیستم‌های آدرنرژیک و کولینرژیک، سیستم عصبی غیر آدرنرژیک - غیر کولینرژیک نیز نقش مهمی در کنترل حرکات روده‌ها و باز و بسته شدن همزمان اسفنکترهای دستگاه گوارش ایفا می‌کند (۲۵). گاز نیتریک اکساید به عنوان مدیاتور احتمالی سیستم عصبی غیر آدرنرژیک - غیر کولینرژیک مطرح می‌باشد. نیتریک اکساید آزاد شده از پایانه‌های سیستم عصبی روده وارد سلول‌های عضلات صاف دستگاه گوارش شده و با نیتروزه کردن بخش هم‌آنزیم گوانیل سیکلاز (Guanylyl Cyclase) سیتوزولی، موجب افزایش میزان گوانیدین مونو فسفات حلقوی (cGMP) در این سلول‌ها و به دنبال آن شل‌شدگی عضلانی می‌شود (۱۹). در مطالعه حاضر، برای ارزیابی فعالیت سیستم غیر آدرنرژیک - غیر کولینرژیک از تحریک میدان الکتریکی در حضور آنتاگونیست‌های سیستم‌های آدرنرژیک و کولینرژیک استفاده گردید. نتایج بعضی مطالعات حاکی است که تحریک میدان الکتریکی موجب آزاد شدن استیل‌کولین، نوراپی نفرین و نیتریک اکساید از پایانه‌های سیستم‌های عصبی فعال روده می‌گردد (۱۸). اما در مطالعه حاضر از آنجایی که گیرنده‌های نور آدرنرژیک و کولینرژیک توسط آنتاگونیست‌های مربوط اشغال شده بودند، لذا به نظر می‌رسد شل‌شدگی عضلانی ناشی از تحریک میدان الکتریکی به علت رهایش

شده با ایمونوهیستوشیمی تأییدی بر وجود شبکه‌های عصبی در نواحی فوق الذکر می‌باشد (تصویر ۲).

بحث

در مطالعه حاضر، میزان تمایز ساختاری و نحوه فعالیت شبکه عصبی روده‌ای قبل از تولد در مدل حیوانی جنین مرغ مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج برآمده از این پژوهش از وجود انقباضات ناشی از ریتیم الکتریکی پایه در ژژونوم و کولون جنین ۱۹ روزه مرغ حکایت داشت. اجزای کولینرژیک، آدرنرژیک و غیر آدرنرژیک - غیر کولینرژیک سیستم عصبی روده‌ای در روده این جنین‌ها فعال بوده‌اند. مطالعه ساختاری بر روی قطعات ژژونوم و کولون این جنین‌ها با روش هیستوشیمی و ایمونوهیستوشیمی نیز مؤید تمایز سلول‌های شبکه‌های عصبی روده‌ای قبل از تولد در این مدل حیوانی بوده است. انقباضات خودبخودی ناشی از ریتیم الکتریکی پایه روده در انسان و گونه‌های مختلف حیوانات بالغ توسط شماری از پژوهشگران مطالعه شده است (۲۳، ۱۳، ۸، ۳). امادر بررسی متون، مطالعه‌ای که وجود یا عدم وجود این انقباضات را قبل از تولد ارزیابی کرده باشد، یافت نشد. لذا مطالعه حاضر، تمایز سیستم عصبی و وجود انقباضات خودبخودی را قبل از تولد در جنین مرغ اثبات نمود.

در انسان بالغ، تواتر انقباضات روده باریک از دوازدهه به سمت ایلتوم روندی نزولی دارد، در حالی که تواتر انقباضات خودبخودی کولون از قدام به خلف بیشتر می‌شود. تواتر انقباضات در بخش ابتدایی ژژونوم انسان حدود ۱۲ بار در دقیقه و در بخش ابتدایی کولون حدود ۹ بار در دقیقه می‌باشد (۲). نتایج مطالعه حاضر نیز گویای بالا بودن تواتر انقباضات خودبخودی در بخش ابتدایی ژژونوم نسبت به کولون در جنین مرغ و قبل از تولد بوده است. اما با توجه به بالا بودن حجم لایه عضلانی کولون نسبت



تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به سبب تأمین هزینه مالی پروژه و همچنین از همکاری خانم منصوره بهارلو کارشناس آزمایشگاه فارماکولوژی در انجام آزمایشات تشکر و قدردانی نمایند.

References

1. Aitken, R.N. (1958) A histochemical study of the stomach and intestine of the chicken. *J Anat.* 92: 453-66.
2. Barrett, K.E., Barman, S.M., Boitano, S., Brooks, H.L. (2010) *Ganong's Review of Medical Physiology*. (23th ed.) McGraw-Hill. New York, USA.
3. Bowman, W.C., Hall, M.T. (1970) Inhibition of rabbit intestine mediated by alpha- and beta-adrenoceptors. *Br J Pharmacol.* 38: 399-415.
4. Burns, A.J., Douarin, N.M. (1998) The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut: spatiotemporal analysis of the development of the enteric nervous system. *Development.* 125: 4335-47.
5. Dabbs, D. (2006) *Diagnostic Immunohistochemistry*. (2nd ed.) Churchill Livingstone. Philadelphia, USA.
6. Denac, M., Kümin, G., Scharrer, E. (1990) Effect of electrical field stimulation on muscle strips from chicken crop. *Exp Physiol.* 75: 69-73.
7. Doyle, A.M., Roberts, D.J., Goldstein, A.M. (2004) Enteric nervous system patterning in the avian hindgut. *Dev Dyn.* 229: 708-712.
8. Everett, S.D. (1968) Pharmacological responses of the isolated innervated intestine and rectal caecum of the chick. *Br J Pharmacol Chemother.* 33: 342-56.
9. Fairman, C.L., Clagett-Dame, M., Lennon, V.A., Epstein, M.L. (1995) Appearance of neurons in the developing chick gut. *Dev Dyn.* 204: 192-201.
10. Furness, J.B. (2008) The enteric nervous system: normal functions and enteric neuropathies. *Neurogastroenterol Motil.* 20: 32-8.
11. Goldstein, A.M., Nagy, N. (2008) A bird's eye view

نیتریک اکساید و فعال بودن بخش غیر آدرنرژیک - غیرکولینرژیک سیستم عصبی روده‌ای در جنین‌های تحت آزمایش بوده است.

نحوه تکامل ساختاری سیستم عصبی روده‌ای جنین مرغ توسط پژوهشگران مختلفی مطالعه شده است. Le Douarin و Teillet در سال ۱۹۷۳ نشان دادند که نورون‌ها و سلول‌های گلیای سیستم عصبی روده‌ای از ستیغ عصبی منشأ می‌گیرند (۱۷). سلول‌های مذکور در مسیرهای دقیقی در طول لوله گوارشی مهاجرت می‌کنند و دو شبکه متحدالمرکز از گانگلیون‌های داخلی زیرمخاطی و خارجی میانتریک را تشکیل می‌دهند (۷). سلول‌های پیش‌ساز مشتق شده از ستیغ عصبی واگی در جنین مرغ در روز سوم از لوله عصبی پشتی مهاجرت می‌کنند و وارد مزانشیم روده قدامی می‌شوند. سلول‌های مذکور در مزانشیم روده از قدام به خلف مهاجرت می‌کنند و در روز ۸/۵ جنینی به انتهای روده خلفی می‌رسند (۹،۴). ستیغ عصبی خاجی نیز در تشکیل نورون‌ها و سلول‌های گلیایی سیستم عصبی روده‌ای نقش ایفا می‌کند (۲۲،۲۶). اما این مارکت عمدتاً به بخش دیستال روده خلفی محدود می‌شود، به گونه‌ای که تنها ۱۷٪ از کل سیستم عصبی روده‌ای از ستیغ عصبی خاجی سرچشمه می‌گیرد. مهاجرت سلول‌های عصبی خاجی در روز چهارم جنینی آغاز می‌شود و در روز نهم به انتهای روده خلفی می‌رسد (۴،۲۲). بنابراین تا روز ۹ جنینی، شبکه‌های عصبی زیرجلدی و میانتریک به طور کامل شکل می‌گیرند (۷). در بررسی متون، گزارشی که نشان‌دهنده زمان تمایز ساختاری کامل سلول‌های گانگلیونی روده باشد، یافت نشد. بر اساس مطالعه قبلی نویسندگان این مقاله، به نظر می‌رسد که GFAP در سلول‌های تمایز یافته گانگلیون‌های عصبی روده‌ای مرغ به میزان بالایی بیان می‌گردد (زیر چاپ). از سوی دیگر، مطالعه Kawana و همکارانش در سال ۱۹۸۹ حاکی از واکنش پذیری ایمنی بالای سلول‌های گانگلیون‌های عصبی روده‌ای به GFAP می‌باشد (۱۵). پروتئین مذکور یک پپتید رشته‌ای واسط است که در سلول‌های مختلف سیستم عصبی بیان می‌شود و به نظر می‌رسد که در استحکام مکانیکی سلول‌ها و شکل بخشیدن به آنها ایفای نقش می‌کند (۵). نتایج مطالعه حاضر گویای بیان مناسب GFAP در سلول‌های گانگلیونی روده جنین ۱۹ روزه مرغ و در نتیجه، تمایز و بلوغ ساختاری آنها می‌باشد.

بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر می‌توان به این نتیجه رسید که سیستم عصبی روده‌ای قبل از تولد به بلوغ ساختاری می‌رسد و فعالیت حرکتی دستگاه گوارش نیز پیش از تولد آغاز می‌شود. اما زمان شروع فعالیت حرکتی روده‌ها در دوره جنینی در این تحقیق مطالعه نشده است. این مسأله می‌تواند در پژوهش‌های بعدی مورد بررسی قرار گیرد. از سوی دیگر، با توجه به اینکه تکامل سیستم عصبی مرکزی بعد از تولد نیز ادامه می‌یابد (۲۴)، با در نظر گرفتن شباهت‌های فراوان موجود بین سیستم عصبی مرکزی و روده‌ای، ارزیابی روند حرکتی دستگاه گوارشی در مرحله نوزادی در تحقیقات آتی ضروری باشد.



- of enteric nervous system development: lessons from the avian embryo. *Pediatr Res.* 64: 326-33.
12. Goyal, R.K., Hirano, I. (1996) The enteric nervous system. *N Engl J Med.* 334: 1106-15.
 13. Harlow, H.J., Weekley, B.L. (1986) Effect of melatonin on the force of spontaneous contractions of in vitro rat small and large intestine. *J Pineal Res.* 3: 277-84.
 14. International Chicken Genome Sequencing (2004) Consortium. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature.* 432: 695-716.
 15. Kawana, T., Nada, K., Ikeda, S., Goto, S., Hirose, R., Taguchi, T., Kubota, M., Toyohara, T., Shono, T. (1989) Distribution and localization of glial Fibrillary acidic protein in colons affected by Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 24: 448-452.
 16. Lammers, W.J., Stephen, B., Karam, S.M. (2012) Functional reentry and circus movement arrhythmias in the small intestine of normal and diabetic rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 302: G684-9.
 17. Le Douarin, N., Teillet, M.A. (1973) The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J Embryol Exp Morphol.* 30: 31-48.
 18. Maggi, C.A., Patatcchini, R., Santicioli, P., Giuliani, S., Turini, D., Barbanti, G., Giachetti, A., Meli, A. (1990) Human isolated ileum: motor responses of the circular muscle to electrical field stimulation and exogenous neuropeptides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 341: 256-61.
 19. Matsuda, N.M., Miller, S.M. (2010) Non-adrenergic non-cholinergic inhibition of gastrointestinal smooth muscle and its intracellular mechanism(s). *Fundam Clin Pharmacol.* 24: 261-8.
 20. Metzger, M. (2010) Neurogenesis in the enteric nervous system. *Arch Ital Biol.* 148: 73-83.
 21. Newgreen, D., Young, H.M. (2002) Enteric nervous system. Development and developmental disturbances - part 1. *Pediatr Dev Pathol.* 5: 224-47.
 22. Pomeranz, H.D., Rothman, T.P., Gershon, M.D. (1991) Colonization of the post-umbilical bowel by cells derived from the sacral neural crest: direct tracing of cell migration using an intercalating probe and a replication-deficient retrovirus. *Development.* 111: 647-655.
 23. Popescu, L.M., Vidulescu, C., Curici, A., Caravia, L., Simionescu, A.A., Ciontea, S.M., Simion, S. (2006) Imatinib inhibits spontaneous rhythmic contractions of human uterus and intestine. *Eur J Pharmacol.* 546: 177-81.
 24. Raznahan, A., Greenstein, D., Lee, N.R., Clasen, L.S., Giedd, J.N. (2012) Prenatal growth in humans and postnatal brain maturation into late adolescence. *Proc Natl Acad Sci.* 109: 11366-71.
 25. Riviere, J.E., Papich, M.G. (2009) *Veterinary Pharmacology and Therapeutics.* (9th ed.) Willey-Blackwell. New York, USA.
 26. Serbedzija, G.N., Burgan, S., Fraser, S.E. (1991) Bronner-Fraser M. Vital dye labeling demonstrates a sacral neural crest contribution to the enteric nervous system of chick and mouse embryos. *Development.* 111: 857-66.
 27. Sirois, M. (2005) *Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedures.* (1st ed.) Mosby. New York, USA.
 28. Ure, B.M., Holschneider, A.M., Meier-Ruge, W. (1994) Neuronal intestinal malformations: a retro- and prospective study on 203 patients. *Eur J Pediatr Surg.* 4: 279- 86.
 29. Villamor, E., Ruijtenbeek, K., Pulgar, V., De Mey, J.G., Blanco, C.E. (2002) Vascular reactivity in intrapulmonary arteries of chicken embryos during transition to ex ovo life. *Am J Physiol Integr Comp Physiol.* 282: R917-27.



The level of differentiation and function of the enteric nervous system in the chicken embryo

Muhammadnejad, S.¹, Arab, H.A.^{1*}, Naeimi, S.²

¹Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran

²Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan-Iran

(Received 18 June 2013 , Accepted 25 October 2013)

Abstract:

BACKGROUND: Any developmental disorder in enteric nervous system (ENS) may lead to congenital motility diseases of the gastrointestinal tract. **OBJECTIVES:** The present study aimed to examine the structural differentiation and functional activity of the ENS in the Chick embryo. **METHODS:** Ten Chick embryos were sacrificed at embryonic day 19 and then, their jejunum and colon specimens were collected. The isolated rings of the intestine were prepared and their motor activity was tested in an organ bath system. The contraction of the tissues was recorded in basic condition and following the stimulation by cholinergic and adrenergic agonists as well as the stimulation of the non-adrenergic-non-cholinergic system by electrical field stimulation (EFS). The structure of the intestinal specimen was assessed immunohistochemically (IHC) using glial fibrillary acidic protein (GFAP) biomarker. **RESULTS:** Spontaneous rhythmic contractions were seen in both jejunum and colon specimens. Cholinergic stimulations significantly increased the amplitude of contractions in jejunum ($p < 0.01$) and colon ($p < 0.001$) tissues. However, adrenergic stimulation decreased significantly the amplitude of contractions in isolated tissues prepared from the jejunum ($p < 0.05$) and colon ($p < 0.001$). The EFS-induced decreases significantly the tension of isolated tissues pre-contracted with potassium chloride in both jejunum ($p < 0.001$) and colon ($p < 0.001$). The results of IHC were showed a positive immunoreactivity of enteric nervous ganglia with GFAP biomarker. **CONCLUSIONS:** It seems that the ENS in chick intestine is fully differentiated before birth and it can control the intestinal motility patterns in birds.

Key words: chick embryo, enteric nervous system, immunohistochemistry, spontaneous rhythmic contractions

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. The curve of intestinal contractions induced by basic electrical rhythm in isolated ring taken a 19-day chicken embryo in which: (a) increased amplitude of colonic contractions in response to cholinergic mediator, (b) reduced amplitude of colonic contractions in response to adrenergic mediator (c) The smooth muscle relaxation of jejunum that was induced by non-adrenergic, non-cholinergic system activated by electrical field stimulation after blockade of cholinergic and adrenergic systems with corresponding antagonists.

Figure 2. Microscopic view of enteric nervous system network in 19-day chicken embryos in which: (a) H & E staining of jejunum with magnification of $\times 100$. (b) Immunohistochemical staining of colon with GFAP and magnification of $\times 400$. The arrowhead indicates the presence of enteric nervous system ganglions.

Graph 1. Intestinal contraction induced by basic electrical rhythm in isolated intestine taken from 19-day chicken embryos in response to cholinergic and adrenergic mediators. The responses to the cholinergic and adrenergic systems were tested first in the presence of agonists and then, in the presence of equivalent amount of both agonists and antagonists. (a) The average range of contractions, (b) The average frequency of contractions. The error bar represents the standard error and $* = p < 0.001$ compared to the base line.

*Corresponding author's email: harab@ut.ac.ir, Tel: 021-61117086, Fax: 021-66693322

