موسسه‌ی آموزش عالی علمی

دانشکده‌ی علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه‌ی تحصیلی جهت اخذ مدرک لیسانس

موضوع:

پدیده‌ی باززایی شاخک حسی بینایی در یک گونه از لیسک‌ها

نگارنده:

نازنین ابوالحسنی

استاد راهنما:

دکتر نعیم خاضعی

سال تحصیلی ۸۷-۱۳۸۶

شماره‌ی پایان نامه:۱۲-۹

فهرست

عنوان صفحه

۱- خلاصه..... ۱

۲- مقدمه..... ۲

۳- بخش اول (بررسی مقالات و کتب)..... ۴

۴- بخش دوم(روشها و مواد)..... ۱۰

فصل اول (معرفی حیوان)..... ۱۲

فصل دوم (روش مطالعه بافت)..... ۳۴

۵- بخش سوم (مشاهدات)..... ۴۳

۶- بخش چهارم (بحث)..... ۶۲

۷- بخش پنجم (نتیجه گیری)..... ۷۶

۸- Abstract..... ۷۸

۹- بخش ششم (مراجع)..... ۷۹

به‌نام دوست حقیقی

تقدیم به جامعه‌ی علمی بهائیان ایران

سپاس فراوان خود را تقدیم استاد ارجمند جناب آقای دکتر نعیم خاضعی می نمایم.

با آرزوی اینکه با ارائه‌ی این رساله‌ی بی مقدار حق شاگردی را اندکی به جا آورده باشم.

بهترین آرزوها و احترامات تقدیم ایشان باد.

مادر مهربان و پدر عزیزم را می ستایم که هرچه دارم از ایشان و دعای خیرشان است.

از محبتهای بی‌دریغ خواهر عزیزم ندا ابوالحسنی و همسر گرامیشان مهرداد موفقی و ثمره‌ی زندگیشان هانای شیرینم که در این راه همیشه حامی و مشوق و مایه‌ی دلگرمیم بودند تشکر می کنم.

فهرست

عنوان صفحه

۱- خلاصه..... ۱

۲- مقدمه..... ۲

۳- بخش اول (بررسی مقالات و کتب)..... ۴

۴- بخش دوم(روشها و مواد)..... ۱۰

فصل اول (معرفی حیوان)..... ۱۲

فصل دوم (روش مطالعه بافت)..... ۳۴

۵- بخش سوم (مشاهدات)..... ۴۳

۶- بخش چهارم (بحث)..... ۶۲

۷- بخش پنجم (نتیجه گیری)..... ۷۶

۸- Abstract..... ۷۸

۹- بخش ششم (مراجع)..... ۷۹

خلاصه "Abstract"

لیسک یک نرم‌تن از زیرردهٔ شُش‌داران (*Pulmonata*) می‌باشد که در نوک شاخک‌های بینایی سفالیک آن یک جفت چشم قرار دارد. این حیوان بعد از قطع شدن شاخک بینایی، توانایی باززایی کامل آن را دارد. قطع شاخک تغییراتی را در ویژگیهای سلولی ساقهٔ بینایی ایجاد می‌کند. به‌نظر می‌رسد با قطع شاخک، یک فرورفتگی در اپیتلیوم پوشانندهٔ زخم در نوک ساقهٔ بینایی ایجاد می‌گردد که در نهایت منجر به ایجاد "*eyecup*" می‌شود. تمایز همه‌ی ساختارهای چشم و ضمائم، توسط فرایند transdetermination این سلول‌های اپیتلیالی اتفاق می‌افتد. تمایز شبکیه و ظهور لنز جدید حدود سی روز پس از قطع شاخک مشاهده می‌شود. شاخک حسی و چشم تازه باززایی شده از نظر مورفولوژیکی و هیستولوژیکی مشابه ساختمان شاخک و چشم نرمال است ولکن فیزیولوژی حس بینایی در حیوانات تحت تجربه نیازمند بررسی‌های جدید و دقیق است.

مقدمه "Introduction"

فرایند باززایی (regeneration) بافت‌های از دست رفته در موجودات زنده، از پست ترین بی‌مهره تا عالی‌ترین مهره دار، از مسائل مورد توجه پژوهشگران و محققین علاقمند به علم زیست شناسی است. باززایی در علم زیست شناسی به معنی رشد مجدد و یا توانایی ایجاد مجدد بافت یا ارگان‌های ازدست رفته یا آسیب دیده‌ی بدن است. بروز این فرایند را در بافتهای گوناگون جانداران مختلف، از بی‌مهره تا مهره‌دار می‌توان مشاهده کرد:

از جمله‌ی بی‌مهرگان می‌توان *Sea squirt*، *Planaria*، ژله ماهی (Jelly fish)، حلزون (snail)، لیسک (slug) و از مهره داران: گورخر ماهی(Zebra fish)، سمندر، قورباغه و پستاندارانی مانند: موش (mouse) و حتی انسان را نام برد.

در این میان، شناخت فرایند باززایی چشم، بررسی تغییرات هیستولوژیکی و مورفولوژیکی و بررسی ژن‌های دخیل در آن، از مباحث جالب و کاربردی محسوب می شود.

در این تحقیق که در ارتباط با فرایند باززایی چشم در یک گونه لیسک متعلق به جنس *Limax* انجام گرفت، شواهدی جالب و قابل توجه در تایید بروز این فرایند و حفظ حالت هیستولوژیکی و مورفولوژیکی کامل در چشم باززایی شده این بی‌مهره، بدست آمد که ارائه می گردد.

در بیان علت انتخاب چنین موضوع باید گفت که بررسی‌های مورفولوژیک، هیستولوژیک و عملکردی بسیار در گونه‌های مختلف نرم تنان (molluscs) از جمله حلزون‌های آب شیرین و خشکی‌زی در سراسر دنیا انجام گرفته است، ولی در این بررسی‌ها به نمونه‌ی تحت بررسی در این رساله پرداخته نشده و چنین تحقیقی نیز در ایران ثبت نگردیده است.

اگرچه تحقیقات در زمینه‌ی باززایی در مورد حیوانات بسیاری انجام شده است، با این حال امید است با جمع‌آوری اطلاعات بیشتر و انجام تحقیقات و مطالعات دقیق‌تر در آینده، بتوان راهی جهت وقوع این پدیده در انسان نیز یافت.

بخش اول

بررسی سابقه‌ی تحقیق

"Review of literaturs"

در بررسی و مطالعه‌ی منابع مختلف تحقیقاتی تجربیات مشابه که مربوط به باززایی چشم در یک بی‌مهره است وجود دارد. در این قسمت خلاصه‌ای از تجاربی که در خصوص این موضوع روی چندین موجود بی‌مهره، و در ادامه مهره‌دار، انجام شده است، ذکر می‌شود.

از نظر ساختمان، چشم در بعضی از بی‌مهرگان، مانند حلزون، دارای ساختمانی تقریباً مشابه ساختمان چشم مهره‌داران است یعنی دارای اپیتلیوم رنگدانه‌دار، لنز و شبکیه است. چشم‌ها دراین حیوانات دارای توانائی قابل ملاحظه در فرایند باززایی می‌باشند.

بیش از دویست سال پیش، Spallanzani موضوع توانایی حلزون‌ها در باززایی شاخک‌های حسی (*tentacles*) را که یا آسیب دیده و یا از دست رفته بودند مورد بررسی قرارداد (۳).

بررسی‌های بعدی در تعدادی از گونه‌های خاک‌زی حلزون مانند *Melampus bidentatus*، *Gryptomphallus ospersa*، *Agrio limax agrestis* و بعضی گونه‌های آب‌زی مانند *Ilyanassa obsoleta* و *Hydrobia* alvae معلوم نمودند که فرایند باززایی کامل شاخک‌های حسی بینایی، ساختار چشم را نیز اصلاح می‌نماید (۳).

در این حلزون‌ها اگر با قطع ساقه‌ی بینایی از قسمت میانی، چشم برداشته شود، اپیتلیوم پوششی ساقه، در رأس ساقه ایجاد یک تورفتگی (invagination) می‌کند که در نتیجه یک شکاف کم عمق یا"eyecup" ایجاد می‌شود.

باززایی چشم از طریق تمایز سلول‌های اپیتلیوم صورت می‌پذیرد به گونه‌ای که ابتدا شبکیه و به دنبال آن لنز متمایز می‌گردد. کل مراحل ذکر شده حدوداً دو هفته طول می‌کشد. چشم باززایی شده معمولاً دارای همان ساختار چشم طبیعی است و اساساً تنها تفاوت آن با چشم نرمال، از نظر اندازه می‌باشد.

وقایع زایش دوباره چشم، که به ترتیب شامل ایجاد فرورفتگی (invagination)، تولید رنگدانه (pigmentation)، تمایز لنز، عصب بینایی و الگوهای شبکیه (retinal pattern) می‌باشد، از توانایی‌های حیوان است که از زمان جنینی تا "زمان بلوغ" (maturation) و یا حتی بعد از آن "تا آخر حیات" همچنان حفظ شده است.

تست‌های رفتاری با چشم‌های تازه ایجاد شده در گونه‌ی *Ilyanassa obsoleta* واکنش و عملکرد حلزون را به نور نشان می‌دهد.

اگرچه به نظر می‌رسد نوع دیگری از حلزون به‌نام *Achatina fulica*، بزرگترین حلزون خاکزی دنیا، از این حیث استثناء است. در این حیوان، بعد از قطع ساقه چشم یا اصلاً چشم به وجود نمی‌آید و یا روی شاخک حسی بینایی چندین چشم به وجود می‌آید.

باززایی چشم در این جنس دو تا سه ماه طول می‌کشد در حالی‌که در جنس *Helix aspersa* یک ماه و در جنس *Limax* بین سی تا چهل روز این فرایند طول می‌کشد (۳).

در گونه دیگری به‌نام *Mystery snail* (خانواده *Ampullariidae*) که یک *Prosobranch* آب‌زی است نیز این فرایند دیده می‌شود. *Mystery snail* یک جاندار آب‌زی است که در نوک شاخک سفالیک دارای چشم‌هایی است که از نظر ساختاری پیچیده می‌باشند. همراه با این ساقه‌ی بینایی، اندام‌های حسی دیگری وجود ندارند. این حلزون قادر به انجام فرایند باززایی بعد از قطع از ناحیه‌ی میانی ساقه‌ی چشم می‌باشد. در ابتدا یک فرورفتگی در اپیتلیوم پوششی در نوک باقی‌مانده‌ی شاخک (stump) ایجاد می‌شود که باعث ایجاد *eyecup* می‌گردد. تمایزهمه‌ی اجزاء چشم ظاهراً توسط فرایند تراتعیین (transdetermination) این سلول‌های اپیتلیال اتفاق می‌افتد. تمایز شبکیه و ظهور یک لنز جدید در روز چهاردهم بعد از قطع دیده می‌شود. چشم

کامل باززایی شده اگرچه از چشم اصلی کوچک‌تر است اما در روز بیست و پنجم بعد از قطع شاخک حسی، کاملاً به وجود می‌آید (۱۱).

در مطالعات انجام شده توسط C. T. Achuthankutty و U. M. Desai بر روی بی‌مهره دیگری به‌نام *Penaeus monodon* که یک سخت‌پوست (crustacea) از خانواده *Peneaid prawn* است نیز فرایند باززایی کامل ساقه‌ی بینایی قطع شده مشاهده شد. اگرچه انجام این تحقیق برای بررسی باززایی ساقه‌ی بینایی و ارتباط آن با میزان تولید مثل در این موجود در قبل نیز توسط محقق دیگری به نام Panouse انجام گرفت که نتیجه‌ی این تحقیق درنهایت مشابه بوده و مبنی بر باززایی کامل ساقه‌ی بینایی و بازگشت کامل تمام صفات از جمله ساختمان، شکل، رنگ و اندازه‌ی چشم بوده‌است (۵).

بیش از ۱۰۰سال پیش دانشمندان مختلفی از جمله Philipeax (۱۸۸۰)، Marchio و Graffini (۱۸۸۹)، Coluci (۱۸۹۱)، Wolf (۱۸۹۵) اولین مدارک قابل اطمینان برای درک فرایند باززایی در مهره‌داران را پیشنهاد دادند. این دانشمندان نشان دادند که سمندرها توانایی باززایی شبکیه و لنز را بعد از برداشت آنها دارند. البته بعد از گذشت یک قرن از اولین مشاهدات، زمینه‌ی ترمیم چشم در حیوانات مختلف مهره‌دار همچنان پیگیری و بیش از پیش توسعه یافته است. اگرچه به گفته‌ی Stone (۱۹۶۷) توانایی باززایی لنز فقط ویژگی دوزیستان محسوب می شود، اما در بسیاری از گونه‌های مهره‌داران مانند قورباغه‌ها، ماهی‌ها، پرندگان و حتی پستانداران نیز این فرایند اتفاق می‌افتد. البته سمندرها مهمترین مدل برای تحقیق و بررسی این ویژگی بوده‌اند. فرایند باززایی لنز در قورباغه‌ها فقط در زمان پیش از بلوغ اتفاق می‌افتد و این فرایند شامل ترا-تعیین سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه‌ای و تمایز بعدی آن‌ها به سلول‌های لنز می‌باشد(۶).

دربررسی‌های جدید، محققین Schepens Eye Research Institute موفق به کشف و شناسایی ماده‌ای شیمیایی در چشم شده‌اند که می‌تواند سلول‌های غیرعصبی خاموش خاصی را برای تبدیل به سلول‌های پیش‌ساز

(progenitor cells) که" مشابه سلول‌های بنیادی هستند "و قادرند سلول‌های شبکیه‌ای جدید را تولید کنند تحریک کند. این دستیابی امید تازه‌ای را برای غلبه بر برخی از بیماری‌های چشمی که در آن به شبکیه آسیب رسیده است مانند تخریب ماکولاری(macular degeneration) و التهاب رنگدانه‌ی شبکیه (*retinitis pigmentosa*) پیش روی علم پزشکی قرارداده‌است. دستاورد مذکور این امکان را به شبکیه‌ی آسیب دیده می‌دهد که بدون نیاز به کاشت بافت خارجی و یا سلول‌های بنیادی، باززایی گردد. محققان ادعا می‌کنند که سلول‌های مولار موجود در شبکیه علاوه بر حمایت از بافت شبکیه و پاک کردن محیط آن از ذرات خارجی و میکروارگانیسم‌ها، گاهی نیز رفتار و ویژگی سلول‌های پیش‌ساز "که از نظرعملکردی مشابه سلول‌های بنیادی هستند ولی نسبت به آن‌ها بالغ‌ترند و به انواع کمتری از سلول‌ها می‌توانند تمایز یابند" را ازخود بروزمی‌دهند. یعنی وارد چرخه‌ی سلولی شده، تقسیم می‌شوند و به انواع سلول‌ها تمایزمجدد می‌یابند. مشاهده شده است که وقتی برخی مواد شیمیایی مانند گلوتامیت (*glotamate*) و آمینوآدیپیت (*aminoadipate*) که ازمشتقات گلوتامیت است به چشم تزریق می‌شوند، سلول‌های مولار شروع به تقسیم و تمایز می‌کنند. البته این دانشمندان از تاثیر مستقیم این مواد بر ایجاد سیگنال‌های لازم برای تغییر شکل سلولی مطمئن نیستند. افزایش هر یک از این مواد بصورت جداگانه به محیط کشت سلول‌های مولار و به دنبال آن تزریق به فضای زیر شبکیه در موش نشان داد که در هر دو مورد سلول‌های مولار به سلول‌های پیش‌ساز تبدیل شده و سپس به سلول‌های شبکیه‌ای تغییر می‌یابند و با *aminoadipate*، سلول‌های شبکیه‌ای تازه ساخته شده به محلی درشبکیه که به آن‌ها احتیاج است مهاجرت کرده و به انواع سلولی مورد نیاز تبدیل می‌شوند. این تحقیقات نشان داده‌اند که با تزریق این مواد شیمیایی به زیر شبکیه، سلول‌ها به گیرنده‌های نوری جدید "سلول‌هایی که در شبکیه‌ی بیمار مبتلا به بیماری *macular degeneration* و یا *retinitis pigmentosa* از بین رفته بودند و منجر به کوری شده‌اند" تبدیل می‌شوند.

درکل، این آزمایشات نشان داده‌اند که با استفاده از ماده‌ی شیمیایی خاصی مانند *aminoadipate* یا ترکیب مشابه آن، که فقط به سلول‌های مولار متصل می‌شود و برخلاف گلوتامیت هیچگونه اثر جانبی بر روی شبکیه ندارد، می توان به باززایی و ترمیم شبکیه‌ی آسیب دیده پرداخت(۲۱).

بخش دوم

روشها و مواد

"Material and Methods"

فصل اول: معرفی حیوان

الف: طبقه بندی

- نرم‌تنان "The molluscs"
- رده‌ی شکم پایان "Gastropoda"
- زیررده‌ی شُش داران "subclass pulmonata"
- خانواده‌ی "Limacidae "

ب: مختصری از زیست‌شناسی حیوان (لیسک)

ج: روش‌های مراقبت و تکثیر حیوان در این تحقیق

د: روش‌های برداشت بافت از حیوان

فصل دوم: روش مطالعه بافت (Histology)

فصل اول: معرفی حیوان

در این تحقیق از لیسک (slug) از جنس *Limax* استفاده شد. با آن‌که سعی در شناسایی گونه‌ی مزبور با برقراری تماس با بعضی مراکز تحقیقی و تخصصی نرم‌تنان در جهان به‌عمل آمد لکن مکاتبات انجام شده بی‌پاسخ ماند. بدین لحاظ عمداً از اظهار نظر در مورد گونه‌ی حیوان خودداری می‌گردد. لکن مختصری از طبقه‌بندی و خصوصیات زیست‌شناسی و ویژگیهای زیستی آن ذکر می گردد.

الف: طبقه بندی

جایگاه این حیوان در سلسه‌ی جانوری به قرار زیر است:

Classification
Kingdom: *Animala*
Phylum: *Mollusca*
Class: *Gastropoda*
Subclass: *Pulmonata*
Order: *Stylommatophora*
Family: *Limacidae*
Genus: *Limax*
Species: ?

همانگونه که ملاحظه می‌شود حیوان مورد بررسی از شاخه‌ی نرم تنان است به همین لحاظ مختصری ازویژگی‌های این حیوان در سلسله‌ی جانوری بیان می گردد:

نرم‌تنان "The molluscs"

ویژگی‌های عمومی "Introduction and general characteristics"

۱- اپیتلیوم پشتی یک پوشش (*mantle*) را تشکیل می‌دهد که این پوشش خارهای آهکی (*calcareous spicules*) و یا یک یا چند صدف آهکی (shell) را ترشح می‌کند.

۲-حفره مانتل در دفع، تبادل گازی، محو مواد زائد گوارشی و رها کردن تولیدات تولید مثلی دارای عملکرد است.

۳- وجود یک ردیف زوائد کوتیکولی (*radula*) اغلب در خلف دهان که برای رنده نمودن مواد غذائی (feeding) از آنها استفاده می‌شود.

۴- دارای تقارن دو طرفی هستند.

۵-سلوم (coelom) به حفراتیکه قلب، نفریدیوم‌ها و گنادها را احاطه می‌نماید تحلیل یافته است.

شاخه‌ی (phylum) نرم‌تنان از بزرگ‌ترین شاخه‌های حیوانی است، که بین پنجاه هزار تا یکصد و ده هزار گونه‌ی (species) زنده را شامل می‌شود.

لازم به ذکر است که صدف‌های خوراکی دوکفه ای مانند کلامها (clams)، حلزون‌ها (snails)، لیسک‌ها (slugs) و اختاپوس‌ها (octapuses) از راسته‌ی نرم‌تنان هستند (۱۰).

رده‌ی شکم پایان "Gastropoda"

شکم‌پایان (Gastropoda) بزرگ‌ترین کلاس نرم‌تنانند که تا هفتاد و پنج‌هزار گونه‌ی زنده‌ی حلزون و لیسک پراکنده در آب دریا، آب شیرین، درختان و خشکی‌ها را شامل می شوند. از میان آن‌ها تا کنون بیست هزار گونه شرح داده شده‌اند. مضافاً تا کنون تا پانزده هزار فسیل نیز شناسائی شده‌اند.

حدود هفتاد و پنج تا هشتاد درصد همه‌ی نرم‌تنان زنده جزء کلاس شکم‌پایان هستند. این کلاس از نظر روش زندگی (life style) وتغذیه تنوع قابل توجهی دارد. برخی گونه‌ها معلق خوار (Suspension feeder)، برخی گوشت‌خوار (carniverouse) و برخی گیاه‌خوار(herbivorous) هستند.

حلزون‌ها دارای صدف (Shell) تکامل یافته‌ای هستند که شکل آن‌ها عموماً مارپیچ (spiral) است. در مقابل، لیسک‌ها فاقد این صدف سخت و مارپیچ هستند که البته بعضی گونه ها مانند گونه‌ی مورد بررسی در این رساله صدف داخلی دارند، بنابراین می‌توانند به راحتی از بین شکاف‌ها و سوراخ‌های کوچک در محیط‌های خاکی حرکت کنند(۱۰).

مورفولوژی اصلی همه شکم‌پایان شامل موارد زیر است:

۱- سر، که شامل دهان، شاخک‌های حسی (sensory tentacles) و چشم‌های ساده است.

۲- پا، برای خزیدن.

۳-مانتل (mantle)، که یک چین یا پیچ (fold) پوستی روی سطح پشتی بدن است که شکاف تنفسی را تشکیل می‌دهد و احشاء (viscera) را می‌پوشاند.

۴- احشاء، که شامل ارگان‌های داخلی است(۱۰).

زیرردهٔ شُش داران "subclass pulmonata"

تعداد کمی از هزار و هفتصد گونهٔ شُش‌داران (pulmonate) دریازی هستند و همین تعداد کم در دهانه‌ی رودخانه‌ها و محل‌های جزر و مدی قرار دارند؛ اما بیشتر گونه‌های شُش‌داران در محیط‌های مرطوب و یا آب شیرین زندگی می‌کنند. لیسک‌ها و اسکارگات ها (*escargots*) اعضای خشکی‌زی این زیرکلاس (subclass) هستند. تعداد کمی از گونه‌ها روی پا *operculum* (پوششی که دهانه صدف حلزون را می‌پوشاند) دارند. بیشتر آن‌ها دارای *radula* هستند (۱۰).

خانوادهٔ "Limacidae "

لیسک جزو جنس *Limax* است که از خانوادهٔ *Limacidae* محسوب می شود.

مورفولوژی اصلی لیسک:

۱- بدن حیوان طویل و ضخیم است و از سر، پا، مانتل (*mantle*) و توده‌ی احشایی (*viseral mass*) تشکیل شده است. در این حیوانات صدف خارجی وجود ندارد و یا صدف ممکن است بصورت صفحه‌ای باشد که در داخل مانتل محاط شده باشد. عدم وجود صدف خارجی و یا داخلی شدن آن این امکان را به حیوان می دهد که بتوانند به راحتی از بین شکاف‌ها و سوراخ‌های کوچک در محیط‌های خاکی حرکت کنند.

پا پهن و مسطح و برای خزیدن است و تقریباً همه‌ی سطح شکمی بدن حیوان را اشغال کرده است.

سر، در انتهای قدامی بدن حیوان و نسبتاً کوچک و کوتاه است. توده‌ی احشایی بیشترین قسمت بدن را تشکیل می‌دهد که نسبت به موقعیت پا، پشتی (dorsal to the foot) و نسبت به سر، خلفی قرارگرفته است.

۲- پا کل طول شکمی بدن را اشغال می کند. گاهی مژه دار است و با سلول های غده‌ای پوشیده می‌شود، ترشحات غدد موکوسی موجب می گردد تا حیوان به راحتی بر روی سطح حرکت کند.

در هر طرف بدن حیوان یک شیارپائی (pedal groove) طولی سطحی وجود دارد که به عنوان مرز، پا را از بقیه‌ی قسمت‌های بدن که بالای آن است جدا می کند. این دو شیار پائی در قسمت قدامی و در ناحیه‌ی خط میانی شکمی (ventral midline) به هم می‌رسند و یک شیار پائی عرضی (transverse pedal groove) برای جدا کردن سر از پا تشکیل می‌دهند.

۳- همانطور که گفته شد سر، قدامی‌ترین قسمت بدن است که توسط شیار پائی عرضی از پا جدا می‌شود. بین سر و توده احشایی که پشت آن قرار دارد جدایی خاصی وجود ندارد. سر توسط یک ناحیه‌ی باریک کوچک که همان گردن است به توده‌ی احشایی متصل می‌شود. دهان در سر، جائیکه شکمی- قدامی- میانی علامت‌گذاری می شود، و درست در جلو شیار پائی عرضی قرار گرفته است.

سر دارای دو جفت شاخک حسی است. شاخک‌های حسی سفالیک، پشتی (dorsal) و بزرگ‌تر از شاخک‌های حسی دهانی شکمی هستند. شاخک‌های سفالیک هر کدام یک چشم در نوک دیستال (distal) خود دارند. شاخک‌های حسی دهانی (oral) واجد گیرنده‌های مکانیکی و شیمیایی هستند. هر دو جفت شاخک کاملاً قابلیت انقباض داشته و انقباض آن ها با فرایند واژگونی (inversion) همراه است.

ماهیچه‌ی منقبض شونده‌ی طویلی از شاخک‌های حسی وارد بدن می‌شوند که انقباض آن نوک شاخک را به درون سرمی کشد و انبساط آن شاخک را به بیرون برمی گرداند که می توان این بافت را عضله‌ی پس کشنده (retractor muscle) نامید.

۴- توده‌ی احشایی (visceral mass) طویل و باریک است و بیشتر بدن را اشغال می کند.

۵- مانتل دیواره‌ی بدنی- پشتی (dorsal body wall) توده‌ی احشایی است.

۶-حفره‌ی مانتل (*mantle cavity*) کاملاً عروقی شده (vascularized) و به عنوان شُش (lung) عمل می‌کند. حرکت رو به پایین کف حفره‌ی مانتل حجم حفره را افزایش داده و در نتیجه هوا و در بعضی گونه ها آب، برای تنفس وارد *mantle cavity* می‌شود. با کاهش حجم حفره‌ی مانتل هوا و یا مایع به بیرون رانده می‌شود.

جریان هوا به درون و یا بیرون شش از طریق یک منفذ کوچک به نام *pneumostome* انجام می‌شود (۸).

این موارد از ویژگی‌های عمومی حیوان مورد بررسی در این رساله است.

اعضاء جنس *Limax* جزء کلاس شُش‌داران خشکی‌زی بوده و محل اصلی و اولیه‌ی آن‌ها اروپا است؛ که بعدها در قسمت‌های شمالی آمریکا و آسیا و نقاط دیگر جهان منتشر شده‌اند. بعضی از گونه‌های این جنس آفات گیاهی محسوب می‌شوند و می‌توانند به محصولات گیاهی و کشاورزی آسیب برسانند (۱۳).

در ذیل به چند نمونه از افراد متعلق به این جنس به همراه مختصری از خصوصیات و ویژگی‌های عمومی آن‌ها اشاره می‌شود.

لازم به ذکر است که چون هدف اصلی این رساله بررسی فرایند باززایی چشم در لیسک‌ها بود، گونه‌ی لیسک تحت بررسی دقیقاً معین و مشخص نگردید و لکن با تردید می‌توان از نظر شکل ظاهری آن‌را قابل مقایسه و مشابه با گونه‌ی *Lehmannia valentiana* در نظر گرفت.

گونه‌های مختلف لیسک در جنس *Limax* :

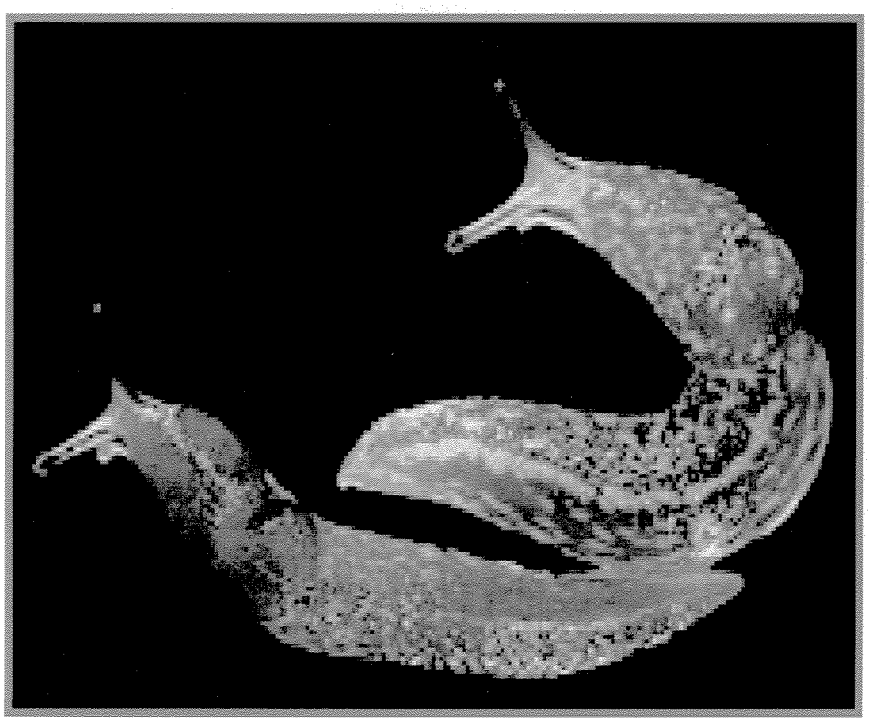
الف:

۱- *Limax flavuse* یا لیسک زرد باغ (Yellow garden slug)

۲- مشخصات: رنگ بدن زرد- خاکستری به همراه خطوط زرد رنگ در طرفین بدن و تعداد زیادی دانه که به صورت نامنظم روی سطح بدن پراکنده است. شاخک‌های حسی حیوان به رنگ آبی و طول بدن بین ۷۵ تا ۱۰۰ میلیمتر.

۳- پراکندگی (distribution): به طور طبیعی در اروپای معتدل وجود دارند اما با گذشت زمان به نقاط مختلف جهان پراکنده شده‌اند.از جمله در امریکای شمالی، نیوجرسی، فیلادلفیا و...(۱۴).

۶- تصویر(image) : a



(a) اقتباس از شبکه جهانی اینترنت

ب:

۱- *Limax maximus*

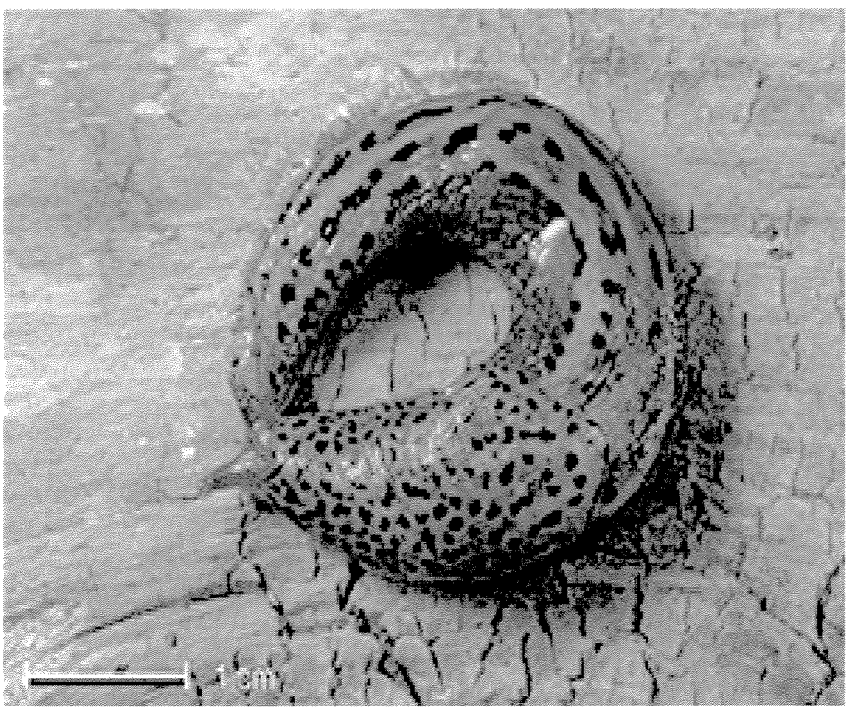
مانتل افراد این گونه دارای تعداد زیادی دانه است که در قسمت فوقانی بدن به صورت راه‌هایی در آمده است.

طول بدن ۲۰۰ میلیمتراست.

۲- پراکندگی:

در اروپا و آسیای میانی به چشم می‌خورند (۱۵).

۳- تصویر:b



(b) اقتباس از شبکه جهانی اینترنت

ج:

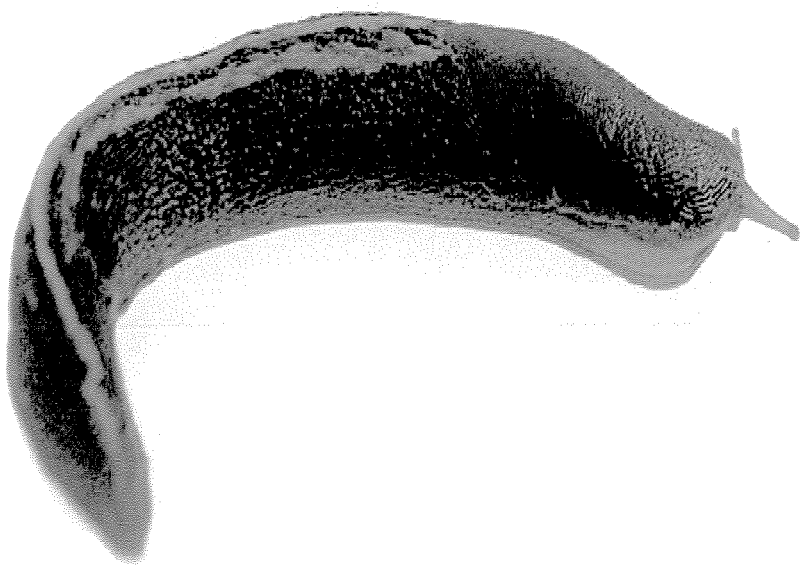
۱- *Limax cinereoniger*

۲- بدنی تیره همراه با دو خط روشن در طرفین پشتی. انتهای تحتانی بدن در حاشیه سیاه رنگ است و در قسمت‌های مرکزی روشن می‌باشد. طول بدن می‌تواند تا بیش از ۲۰۰ و کمتر از ۳۰۰ میلیمتر باشد. افراد این گونه بزرگ‌ترین لیسک خشکی‌زی می‌باشند.

۳- پراکندگی:

در تمام اروپا به‌جز اروپای شمالی پراکنده هستند (۱۶).

۴- تصویر :c



(c) اقتباس از شبکه جهانی اینترنت

د:

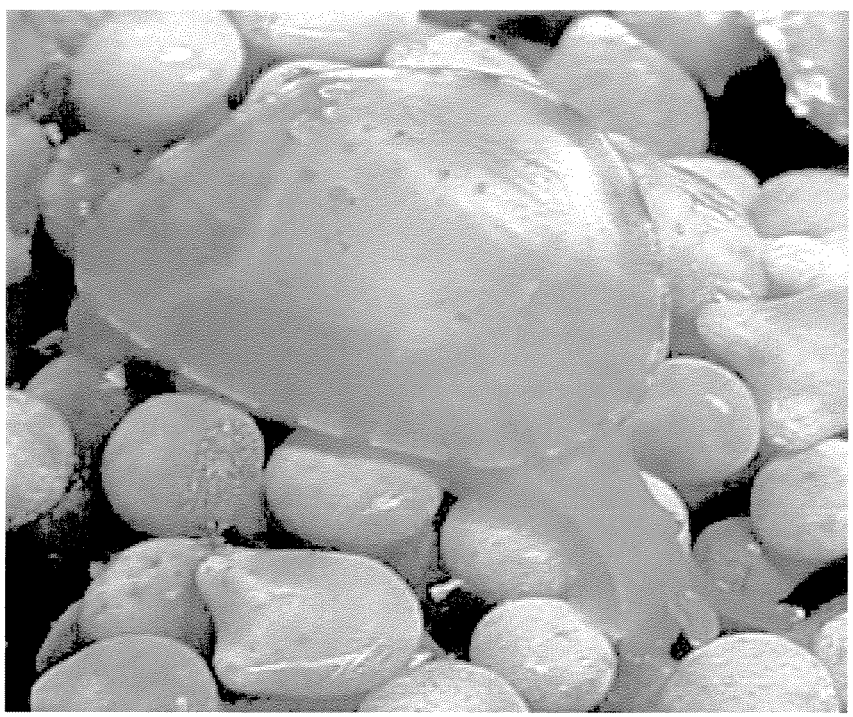
۱- *Limax tamanovalva* یا *Sea slug forum*

۲- اولین دوکفه‌ای که دارای صدف است.

۳- پراکندگی:

تا به‌حال فقط در ژاپن شناسایی شده‌اند اما احتمالاً پراکندگی بیشتری دارند (۱۷).

۴- تصویر:d



(d) اقتباس از شبکه جهانی اینترنت

ذ:

۱- *Lehmannia valentiana*

۲-رنگ بدن زرد- خاکستری است با ظاهری ژلاتینی و مرطوب. طول بدن افراد بالغ ۵۰ تا۷۵ میلیمتر و عرض بدن آن‌ها ۷ میلیمتر است.

۳- پراکندگی:

به احتمال زیاد محل و مبداء اصلی این گونه در Iberina peninsula می‌باشد که بعدها به شمال ایتالیا و نقاط مختلف جهان منتشرشده‌اند (۱۸).

۴- تصویر :e



(e) اقتباس از شبکه جهانی اینترنت

ب: مختصری از زیست‌شناسی حیوان (لیسک)

۱- ریخت‌شناسی حیوان (morphology):

حیوان مورد مطالعه دارای خصوصیات ظاهری زیر است:

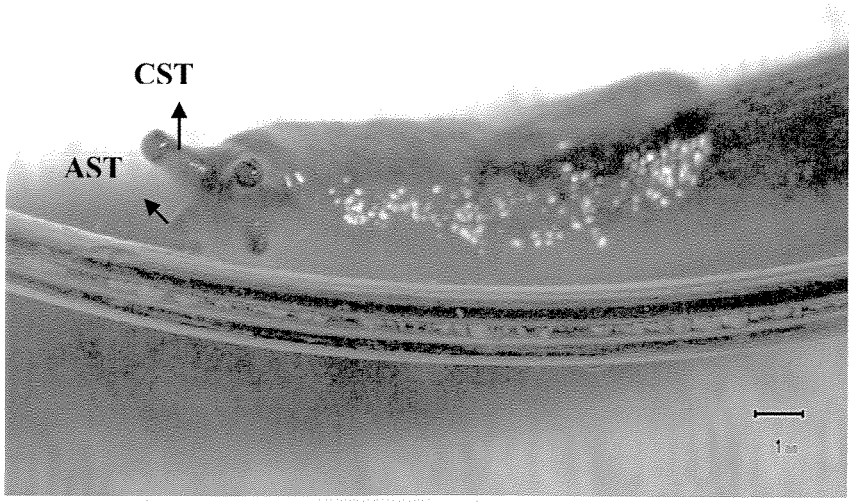
الف: طول بدن در حالت کشیده و در حال حرکت به ۶۰ تا ۷۰ میلیمتر می‌رسد.

ب: قطر بدن ۷ تا ۸ میلیمتر است.

ج: رنگ بدن قهوه‌ای-خاکستری همراه با نقاط تیره‌ی به هم پیوسته‌ی نوار مانند است.

د: شاخک‌های حسی: حیوان دارای دو جفت شاخک حسی است:

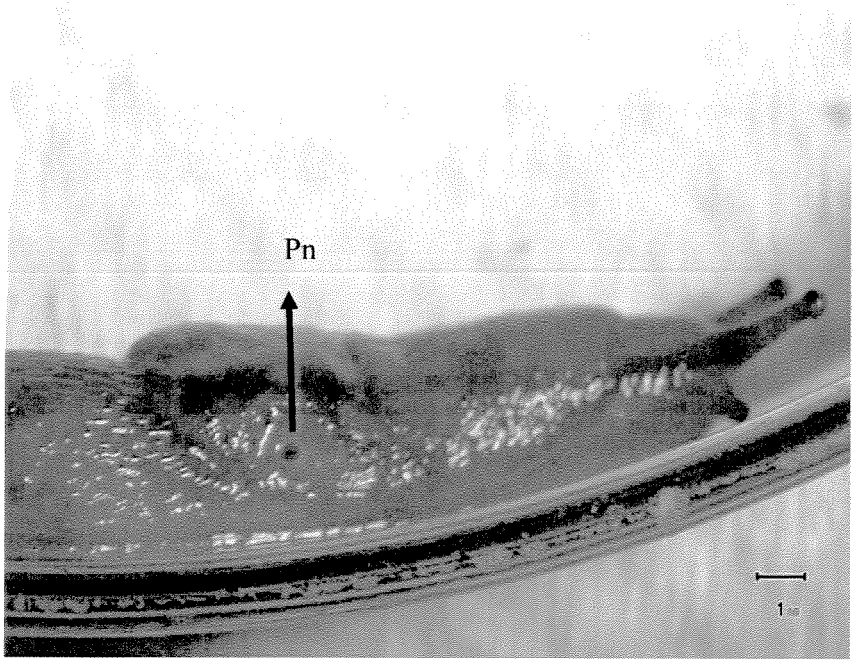
- ❖ شاخک‌های حسی سفالیک که پشتی و بزرگ‌تر از شاخک‌های حسی شکمی هستند. هر یک از این دو شاخک حسی پشتی دارای یک چشم ساده در انتهای دور یا (distal) هستند.
- ❖ شاخک‌های حسی شکمی که حامل گیرنده‌های مکانیکی و شیمیایی هستند.



تصویری از حیوان تحت بررسی :CST :شاخک حسی سفالیک، AST: شاخک حسی شکمی

ر: رادولا ساختار ماهیچه‌ای بسیار تخصصی زبان مانندی است، که جهت تغذیه به کار می‌رود این ساختار که در خلف دهان واقع است در سطح، واجد ردیف‌هایی از زائده‌های دندان مانند (سوهانی شکل) است که آن را می‌پوشاند.

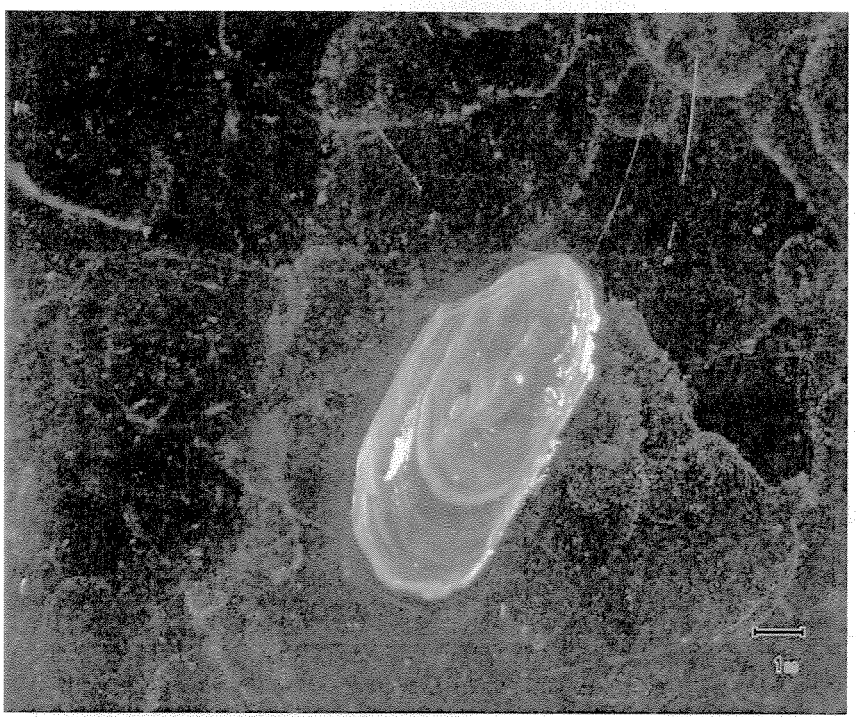
ز: *Pneumostome* منفذی کوچک جهت ورود و خروج هوا به درون شش.



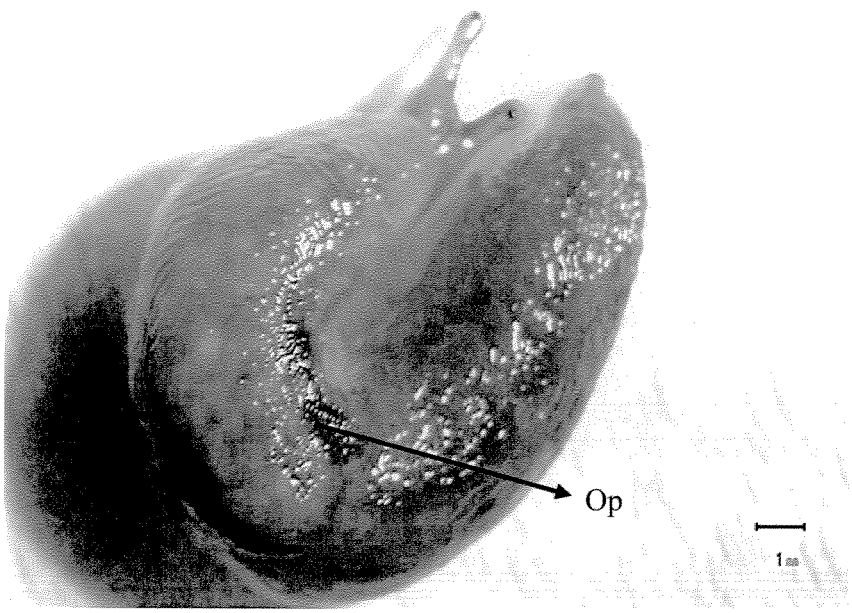
تصویری از حیوان تحت بررسی: Pn: Pneumostome

د: genital pore: در سمت راست بدن حیوان، نزدیک به انتهای قدامی- میانی سوراخ ژنیتال جهت تولید مثل حیوان قرار دارد.

ذ: صدف حیوان، داخلی است که در زیر operculom قرار دارد.



صدف بعد از تشریح و خارج شدن از بدن حیوان تحت بررسی در این تحقیق



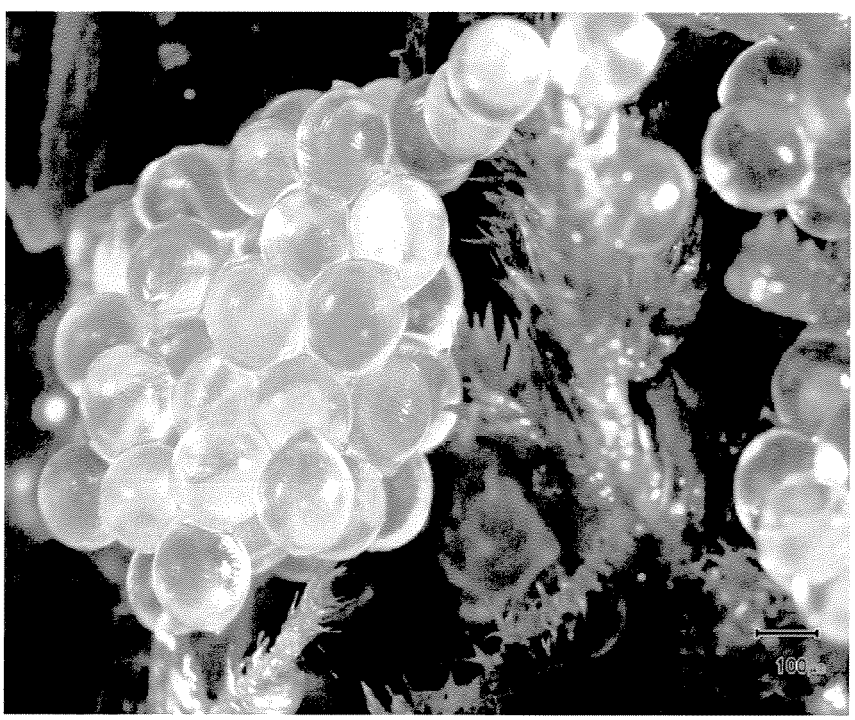
تصویری ازحیوان تحت بررسی: operculom:op

۲- عادات غذایی (food habits):

این حیوان در محیط طبیعیِ زندگی، از انواع مختلف سبزیجات مثل برگ گیاهان، کاهو، کلم، قارچ و حتی لاشه‌ی حیوانات مرده تغذیه می‌کند (۱۹).

۳- تولید مثل (reproduction):

لیسک‌ها حیواناتی هرمافرودیت هستند بدین معنی که هر دو سیستم تولیدمثلی نر و ماده در یک حیوان وجود دارد. با این حال حیوان برای انتقال اسپرم نیاز به جفت‌گیری با فرد دیگر دارد. چند روز بعد از جفت‌گیری حیوان می‌تواند حدود بیست و پنج تا سی تخم درون حفره‌ای در خاک بگذارد (۱۹-۱۰).



تصویری از تخمهای توده ای ژله مانند لیسک تحت بررسی در این تحقیق

۴- چرخه‌ی زندگی (life cycle):

همانطور که در قسمت تولیدمثل ذکر شد، لیسک‌ها حیوانات هرمافرودیت هستند که هر فرد، دارای هر دو سیستم جنسی نر و ماده است، اما معمولاً جهت باروری تخم‌ها، نیاز به جفت‌گیری دارد.

هر حیوان قادر است در تمام طول عمر خود ۳۰ تا ۳۰۰ تخم بگذارد. لیسک‌ها در تمام فصول سال قادر به تخم‌گذاری هستند اما اوج زمان تخم‌گذاری در فصل‌های بهار و پاییز است. ساختار تخم‌ها ژله‌ای است و لیسک‌ها تخم‌هایشان را در توده‌های ۲۵تایی در عمق حدود ۲/۵ سانتی‌متر در زیر خاک، در محیط مرطوب می‌گذارند و دور آن‌ها را با لایه‌ای از ترشحات موکوسی می‌پوشانند. سی روز پس از تخم‌گذاری، نوزاد کامل حیوان از تخم خارج می‌شود (hatching).

لازم به ذکر است که تخم‌ها در شرایط محیطی نامناسب و خشک، تا مناسب و مرطوب شدن محیط باز نمی‌شوند. مدت ۳ تا ۱۲ ماه طول می‌کشد تا نوزاد لیسک بالغ شود و پس از بلوغ، حیوان می‌تواند تا چندین سال عمر کند.

موارد مهم و اصلی برای ادامه‌ی زندگی لیسک، رطوبت و دما است. اگر شرایط محیطی و رطوبت مناسب و کافی نباشد، لیسک ها تا مساعد شدن شرایط، با کندن حفره‌ای به عمق حدود یک متر درون خاک می‌روند و تا مساعد شدن شرایط آنجا زندگی می‌کنند (۲۰).

۵- محیط زندگی(habitat):

محیط زندگی این حیوان به‌طور طبیعی در مکان‌های مرطوب وخاک‌های مرطوب است (۱۰).

۶- رفتار(behaviour)

حیوان بیشتر در شب و یا نور کم فعال است. در هنگام کاهش نور از محیط خارج می‌شود و به‌دنبال غذا می‌آید. حرکت حیوان توسط موکوسی که ترشح می‌کند تسهیل می‌شود. موکوس علاوه بر کمک به حرکت حیوان، به‌دلیل طعم و مزه بدِی که دارد، مانع خورده شدن و مورد حمله قرارگرفتن او توسط سایر حیوانات می‌شود. همچنین حیوان از موکوس به عنوان طنابی لعابی برای پایین آمدن به سمت زمین استفاده می‌کند.

ازجمله شکارچیان لیسک، قورباغه‌ها، وزغ‌ها، جوجه‌تیغی، بعضی پرندگان و حتی انسان‌ها هستند که از این حیوان به‌عنوان منبع تغذیه استفاده می‌کنند.

وقتی لیسک مورد حمله قرار می‌گیرد، بدن خود را منقبض و سفت می‌کند، بنابر این برای بیشتر حیوانات شکار این حیوان مشکل می‌شود (۱۹).

۷-اهمیت اقتصادی لیسک برای انسان (economic important for human):

- این حیوان یک نوع آفت گیاهی مهم محسوب می‌شود(۲۰).
- انواعی از این حیوان به عنوان منبع غذایی در بعضی مناطق دنیا مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۹).

ج: روش‌های مراقبت و تکثیر حیوان

محل و روش نگهداری و تکثیر و جابه‌جایی حیوان

حیوان‌های مورد مطالعه از باغچه حیاط جمع‌آوری و در درون آکواریوم شیشه‌ای به ابعاد یک متر طول، نیم متر عرض و هفتاد سانتی‌متر ارتفاع نگهداری می شدند. دهانه آکواریوم توسط پارچه‌ای توری که با کش و چسب به دیواره ها ثابت می گردید بسته می شد تا حیوان‌ها نتوانند از محیط خارج شوند و در عین حال اکسیژن کافی نیز برای تنفس داشته باشند.

کف آکواریوم از خزه، شن، ماسه و مقداری چوب پوشیده می شد تا محیطی طبیعی فراهم شود. آکواریوم در محیط گلخانه با دما و رطوبت مناسب و همچنین نور معمول شبانه روز قرار داشت. غذای حیوانات بیشتر برگ کاهو و گاهی کلم و سبزیجات دیگر بود که هر سه روز یک‌بار با غذای تازه تعویض می گردید. در ضمن مقداری آب نیز برای ایجاد رطوبت در محیط اضافه می‌شد.

لازم به ذکر است که حیوانات به دو دسته شاهد (control) و تجربی (experimental) تقسیم می‌شدند. شرایط محیطی برای هر دو گروه یکسان بود. برای جابه‌جا کردن حیوان‌ها از قلم‌مو استفاده می شد تا بدن حیوان آسیب نبیند. بعد از قطع شاخک، لیسک‌ها به درون شیشه‌های کوچک با همان شرایط محیطی قبل گذاشته می شدند تا نمونه‌های مورد بررسی از یکدیگر تفکیک و مشخص شوند و ادامه کار راحت‌تر صورت گیرد. در عین حال روی هر شیشه نیز تاریخ، شماره حیوان، محل قطع شاخک حسی و این‌که کدامیک از شاخک‌ها قطع شده است مشخص می شد. بعد از گذشت مدت معین (به‌طور مثال چهل، پنجاه، شصت روز) لیسک‌ها دوباره به همین صورت برای بررسی از محیط خارج شدند. در کلیه تجربیات سن لیسک ها به دلیل آنکه کلیه آن ها از محیط بیرون (باغچه حیاط) صید شده بودند مشخص نبود.

د: روش برداشت اندام بینایی از حیوان

برای بررسی ساختار آناتومیکی و هیستولوژیکی چشم‌های حیوان که در نوک شاخک‌های حسی سفالیک قرار دارند، و متعاقباً باززایی بافت های برداشته شده و مطالعه‌ی آن ها از روش‌های مختلفی استفاده شد تا بتوان بهترین و عملی‌ترین روش را به‌کار گرفت.

۱- از آن‌جایی که چشم حیوان در نوک شاخک حسی قرار دارد و بسیار کوچک است در نتیجه برای بررسی آن می‌بایست شاخک حسی حیوان قطع شود. برای قطع شاخک حسی بینایی و بررسی بافت چشم تأمل می‌شد تا حیوان به حالت آرامش (relax) درآید در این صورت بدن کاملاً کشیده شده در عین حال شاخک های حسی نیز در حالت طبیعی، کشیده و کاملاً خارج از بدن قرار می گرفتند. سپس یکی از شاخک‌ها، معمولاً طرف راست، توسط قیچی بسیار ظریف (iridectomy scissors) قطع می‌شد (محل قطع می‌توانست از قسمت میانی پایک (mid-stalk) یا قسمت انتهایی (base) و یا از قسمت پایه چشم یعنی تقریباً نوک شاخک حسی (eye base) باشد و این واقعه بر حسب حرکتی که حیوان می نمود کاملاً تصادفی بود) [این روش جهت بدست آوردن نمونه‌ی تجربی مناسب بود تا با گذشت زمان معین شاخک قطع شده رشد کرده و مورد مطالعه قرار گیرد]. بلافاصله به جهت جلوگیری از تخریب و اتولیز شدن بافت و تغییر در ساختار واقعی آن، بخش قطع شده در درون تثبیت کننده (fixative) قرار داده می‌شد. نظر به ریز بودن نمونه‌ی مورد مطالعه و دشواری کار با آن، بخصوص در هنگام جادهی در پارافین و نداشتن احاطه‌ی کامل در کنترل آن، سمت و سودهی (orientation) بافت اغلب همراه با اشکال بود و در نتیجه در اغلب موارد جواب و نتیجه‌ی مطلوب به دست نمی‌آمد. به عبارت دیگر هنگام مطالعه در زیر میکروسکوپ چندان مشخص نبود که برش‌ها طولی‌اند یا عرضی. همچنین چون در این روش، حیوان فعال و هوشیار بود با نزدیک نمودن قیچی و برخورد آن با شاخک

حسی، حیوان احساس خطر نموده سریعاً شاخک حسی خود را منقبض و جمع می نمود و نتیجتاً بخش قطع شده بسیار کوچک و غیر دلخواه می شد، روشی که در جهت رفع این مشکل به ذهن رسید این بود که:

۲- شاید بتوان با غیرفعال کردن حیوان، راحت‌تر شاخک حسی را قطع نمود و اندازه‌ی مناسبی از نمونه به دست آورد، بنا براین درابتدا ازسرما جهت غیر فعال نمودن حیوان استفاده شد.

روش کار به این صورت بود که حیوان به مدت ۱ دقیقه در دمای $18^{\circ}C$- قرار داده می شد تا شاید بدنش به کشیده ترین حالت ممکن در آید و شاخک‌های حسی از بدنش بیرون بیایند و بدین ترتیب بتوان به راحتی نمونه‌ی مورد نظر را به دست آورد، اما بعد از بیرون آوردن حیوان از محیط سرما دیده شد که حیوان بر خلاف انتظار، کاملاً بدن خود را منقبض و جمع کرده و شاخک ها کاملاً منقبض شده (retracted) و به داخل بخش قدامی بدن فرورفته بودند. به نظر می رسید حیوان بدین ترتیب سعی در محافظت خود از سرما می کند.

۳- راه دیگری که در جهت رفع مشکل ملاحظه شده به کار گرفته شد به این صورت بود که حیوان درون شیشه‌ای قرار داده شده و مقداری پنبه به اتر آغشته به در شیشه الصاق می گردید و در شیشه برای مدت حدود ۲– ۱ دقیقه بسته می شد، تا حیوان در اثر وجود اتر در محیط بی‌هوش و بی‌حرکت گردد اما متأسفانه بعد از گذشت زمان معین مشاهده شد که حیوان باز هم بدنش را جمع کرده است و حتی شاخک‌های حسی قابل رویت نبودند.

بنابراین به نظر رسید که شاید بهترین و عملی‌ترین روش این باشد که زمانی که حیوان زنده و کاملاً فعال است و بدنش به طور کامل کشیده شده و شاخک‌های حسی بینایی کاملاً از قسمت قدامی بدن بیرون هستند، بدون تحریک کردن حیوان، انتهای قدامی بدن (سر حیوان) از ناحیه اتصال به بدن (خلف شاخک‌ها)، توسط اسکالپل با تیغه‌ی سرگرد قطع شود، تا هم شاخک‌ها در بهترین حالت باشند و هم از بخش انتهای قدامی بدن به عنوان گیره جهت گرفتن و جابه‌جایی بافت در هنگام فرایند قالب گذاری استفاده شود. با استفاده از این روش

به حد قابل ملاحظه ای بر توانائی های لازم برای کار با بافت بسیار ریزی که نتیجه‌ی برداشت از حیوان بود افزوده گردید. بلافاصله بعد از قطع قسمت قدامی بدن، نمونه درون تثبیت کننده انداخته می‌شد تا از اتولیز بعدی بافت جلوگیری شود.

بعد از طی مراحل مختلفه و قبل از آغشته کردن به گزیلول (شرح کامل روش تهیه برش های بافتی در فصل ۲ ذکر می‌شود) ، نمونه‌ی حاوی شاخک های حسی بینایی از ناحیه خط وسط (midsagital) به دو نیم می‌شد. چنانکه قبلاً اقدام تجربی بر روی حیوان به عمل نیامده بود هر دو شاخک حسی بینایی به عنوان شاهد (control) تلقی می گردید ولکن چنانچه بر روی یک شاخک قبلاً توسط iridectomy scissors عمل جراحی انجام گردیده بود(که معمولاً شاخک سمت راست حیوان بود) از بخش حاوی شاخک حسی بینایی جراحی نشده جهت مقایسه با بخش جراحی شده استفاده می گردید. همانگونه که در قسمت های دیگر این رساله ملاحظه خواهد شد برداشت بخشی از شاخک حسی بینایی موجب آغاز ترمیم در قسمت جراحی شده می گردد که در زمان های مختلفه (ده، بیست، سی، چهل، پنجاه، شصت روز) تحت بررسی قرار گرفت.

وسایل و مواد لازم برای برداشت شاخک‌های حسی بینایی به قرار ذیل است:

۱- سینی تشریح حاوی چوب‌پنبه برای تثبیت حیوان بر روی آن.

۲- اسکالپل در سایزهای مختلف، پنس، قیچی مخصوص جراحی چشم.

تعداد حیوان	کل	تعداد بعد از عمل	ملاحظات (تعداد)		
			نمونه های غیرقابل بررسی	نمونه‌های ازبین رفته	مطالعه ساختمان طبیعی و یا بازسازی شده
شاهد	۱۱	–	–	۴	۷
تجربی	۱۹	۱۰ روز بعد از عمل (۲ نمونه)	۲	–	–
		۲۰ روز بعد از عمل(۲ نمونه)	۲	–	–
		۳۰ روز بعد از عمل(۲ نمونه)	۲	–	–
		۴۰ روز بعد از عمل(۴ نمونه)	–	–	۴
		۵۰ روز بعد از عمل(۴ نمونه)	–	۱	۳
		۶۰ روز بعد از عمل(۵ نمونه)	–	۲	۳

جدول ۱: تعداد حیوانات شاهد و تجربی تحت بررسی در این تحقیق

فصل دوم

روش مطالعه بافت (Histology)

برای مطالعه‌ی جزئیات ساختمانی بافت مورد نظر انجام مراحل زیر ضروری است تا برش‌های برداشته شده آماده‌ی مشاهده در زیر میکروسکوپ گردند (۲و۱):

❖ الف- فیکساسیون (fixation):

مقطع کوچکی از بافت یا عضو مورد نظر در محلول ثابت کننده قرار داده می شود تا ساختار بافت تغییر نیافته و ثابت گردد. این اقدام تا حد ممکن از تغییرات بعد ازمرگ (postmortem changes) بافت‌ها جلوگیری می‌نماید. در تحقیق کنونی از ثابت کننده بوئن (Bouin) استفاده گردید. این ثابت کننده متداول‌ترین فیکساتیو آزمایشگاه‌های بافت‌شناسی است و فرمول ساخت آن به شرح ذیل است:

روش تهیه محلول بوئن:

۱- ml ۷۵ محلول اشباع شده اسید پیکریک

۲- ml ۲۵ فرمالدهید

۳- ml ۵ اسید استیک گلاسیال مدت زمان لازم : ۲۴- ۶ ساعت

این محلول باید تازه به تازه تهیه شود و مقدار مایع فیکساتیو در ظرف باید ۲۵ تا ۵۰ برابر حجم بافت برداشت شده باشد .

ظرف باید طوری باشد که بافت به آسانی در آن قرارگرفته و بعد از ثبوت به آسانی ازآن خارج شود ؛ بافت‌ها باید حتی المقدور نازک باشند تا مایع فیکساتیو به مقدار کافی در آن نفوذ کند. به‌هرحال با توجه به ضخامت بافت می‌توان مدت زمان لازم برای فیکساسیون را تغییر داد. ضخامت متوسط بافت برای کارهای معمولی ۵- ۳ میلیمتر است.

در عمل ثبوت نکات زیر مورد نظر بود:

۱- جلوگیری از اتولیز بافت ، در این صورت حداکثر کوشش به عمل آمد تا بلافاصله پس از برداشت بافت از بدن بخش مورد نظر در محلول بوئن قرار داده شود.

۲- پایداری بافت در وضعی که بافت در زمان حیات داشته و این عمل در ثبوت بی‌نهایت مهم بود.

۳- عمل ثبوت ، بافت را بوضعی نگه می‌داشت که دستکاری بعدی بافت آن را خراب نکند.

۴- جامد کردن مواد کلوئیدی

۵- کمک به رنگ‌آمیزی بهتر بافت

❖ ب-آب‌گیری (dehydration)

برای انجام مراحل بعدی نیاز به خارج نمودن آب از لابلای نسوج است. برای این مقصود به کمک الکل‌های مختلف الدرجه که معمولاً از درجه ۷۰ شروع می‌گردد اقدام به آب‌گیری می گردد و این عمل تا عبور از الکل مطلق (صد در صد) ادامه می یابد. در درجات ضعیف الکل، مدت نگاهداری بافت در آن می‌تواند طولانی باشد اما در الکل خالص و یا نزدیک به خالص زمان عبور بافت تا حداکثر ۱۵ دقیقه است.

معمولاً برای آب گیری از مواد زیر استفاده می کنند :

۱- استون ۲- الکل اتیلیک ۳- الکل متیلیک ۴- ایزو پروپیل یا الکل بوتیلیک

که در این تحقیق از الکل اتیلیک استفاده شد.

نحوه‌ی عمل بدین صورت بود که بافت مورد نظر پس از ۶ تا ۲۴ ساعت قرار گرفتن درمحلول ثابت کننده (بسته به ضخامت بافت) با پنس به آرامی از داخل ظرف حاوی محلول فیکساتیو خارج می‌گردید

و به آرامی به دیواره‌ی ظرف کشیده می‌شد تا حتی المکان مایه‌ی فیکساتیو از آن خارج شود و سپس بافت وارد اولین مرحله از پاساژ صعودی الکل با غلظت ۷۰٪ می گردید.

لازم به ذکر است که عمل عبور بافت از محلول‌های مختلف به عنوان "پاساژ دادن" معروف است. پس از اتمام زمان مقرر بافت از ظرف مذکور خارج می‌شد و در ظرف الکل بعدی با غلظت بیشتر قرار می گرفت و به همین ترتیب روند کار ادامه می‌یافت.

به طور معمول شروع پاساژهای صعودی آب گیری با الکل ۷۰°-۵۰° می‌باشد ، اگر بافت ناگهان در الکل غلیظ‌تر قرار گیرد چروکیده می‌شود ، زیرا آب درون بافت خیلی سریع برداشته می‌شود سپس غلظت‌ها بتدریج زیاد می‌شوند تا نهایتاً نسج در الکل ۱۰۰° قرار بگیرد.

غلظت الکل	۷۰°	۸۰°	۸۵°	۹۰°	۹۶°	۱۰۰°
تعداد پاساژ در این الکل	۳	۱	۱	۱	۱	۱
مدت زمان هر پاساژ	۲-۳ روز	۱ ساعت	۳۰ دقیقه	۳۰ دقیقه	۱۵ دقیقه	۱۵ دقیقه

❖ ج- شفاف کردن(Clearing)

این اقدام با عبور از گزیلول و الکل (۵۰-۵۰) و دو عبور از گزیلول خالص که هر مرحله حدود ۱۵ دقیقه است انجام می‌شود، برای نفوذ دادن پارافین به لابلای بافت و فراهم نمودن استحکام لازم برای برش‌برداری می‌باید الکل موجود در بافت به وسیله گزیلل زدوده گردد.

بهترین مواد برای این کار عبارتند از :

۱-کلروفورم ۲- بنزن ۳- گزیلل

۴- تولوئن ۵- روغن سدر ۶- تتراکلرورکربن

در این تحقیق از گزیلل (xylol) استفاده شد.

گزیلل خالص	الکل مطلق-گزیلل ٪۵۰-٪۵۰	محلول
۲	۱	تعداد دفعات
پانزده دقیقه	پانزده دقیقه	مدت زمان

❖ د- آغشتگی با پارافین (wax impregnation):

بافت برداشته شده در حرارت ۵۸-۵۶ درجه بوسیله چندین عبوربه پارافین آغشته می گردد که در این اقدام گزیلول از لابه‌لای بافت‌ها برداشته شده و پارافین جانشین آن می گردد. معمولاً در ابتدای این مرحله بافت به جهت جلوگیری از به وجود آمدن تغییرات مورفولوژیک به مدت ۱۵ دقیقه در پارافین-گزیلول ۵۰-۵۰ گذاشته شده سپس با دوتا سه بار عبور از پارافین خالص، هر بار به مدت ۱۵ دقیقه، این مرحله به پایان می‌رسد.

پارافین III	پارافین II	پارافین I	گزیلل- پارافین	محلول
۱	۱	۱	۱	تعداد پاساژها
۱۵ دقیقه	۱۵ دقیقه	۱۵ دقیقه	۱۵ دقیقه	مدت زمان

❖ ر- قالب گیری با پارافین (wax embedding):

با پارافین بلوک‌هائی که حاوی بافت هستند تهیه می‌شود. طرز قرار دادن بافت در داخل پارافین بر حسب هدف و نظر محقق است تا برش‌ها به صورت عرضی و یا طولی تهیه شوند. برای تهیه‌ی بلوک‌ها از قالب‌های کاغذی و یا شیشه‌ای و یا فلزی استفاده می‌شود که در این تحقیق از قالب‌های کاغذی استفاده شد. لازم به ذکر است که کلیه‌ی عملیات در پارافین با نقطه ذوب ۵۶-۵۸ درجه انجام گردید تا ضمن ایجاد پشتیبانی لازم از بافت، حرارت‌های بالاترموجب تخریب بافت نشود.

❖ و- برش‌برداری (sectioning):

بعد از برداشت پارافین اضافی از اطراف بافت (trimming) برحسب هدف مطالعه قطعات ۸-۷ میکرونی عرضی، طولی و یا مایل از بلوک حاوی بافت به کمک دستگاه میکروتوم و به صورت پشت سرهم (serial) گرفته و برای اقدامات بعدی حفظ و ذخیره می گردید.

❖ ه- تثبیت برش‌ها برروی لام (sections mounting):

در این مرحله برش‌ها بر روی لام چسبانده می‌شوند برای این مقصود به کمک لام‌های حاوی لایه‌ی نازکی از چسب آلبومین، تعداد معینی برش بر روی لام‌های میکروسکوپیک چسبانده می‌شد (بعد از جزئی حرارت دادن و حذف چین خوردگی‌های آن‌ها) .

طرز تهیه چسب آلبومین دار به‌قرار ذیل است :

چسب را با حجم مساوی از گلیسرین ، آب مقطر و سفیده‌ی تخم مرغ مخلوط نموده ، سپس بوسیله‌ی صافی ضخیم صاف می شود ، افزودن یک قطعه‌ی کوچک تیمول به داخل آن موجب می گردد تا از رشد قارچ جلوگیری شود ، این محلول در ظرف درداری نگهداری شده و مدت‌ها قابل استفاده است.

❖ ی-رنگ آمیزی(staining):

لام‌های آماده به جهت متمایز نمودن اجزا و قسمت‌های مختلف سلول‌ها یا بافت‌ها از یکدیگر توسط روش‌های مختلفی رنگ‌آمیزی می‌شوند. جهت انجام این مرحله می‌باید ابتدا پارافین موجود در برش‌ها برداشته شود، سپس آب‌دهی به بافت‌ها صورت گیرد (rehydration). این اقدامات معکوس کلیه عملیات انجام شده در مراحل ب و ج است. در این حالت است که برش‌های موجود در سطح لام‌ها را می‌توان با رنگ‌ها رنگ‌آمیزی نمود. استفاده از ارلیش هماتوکسیلین جهت رنگ‌آمیزی اجزاء بازوفیلیک بافت (۲۰ دقیقه)، شستشو و متعاقباً به کارگیری ائوزین برای قسمت‌های اسیدوفیلیک (به مدت ۵-۲ دقیقه) رنگ‌هایی بودند که در این تحقیق از آن‌ها استفاده شد. با پایان رنگ‌آمیزی اقدام به حفظ لام‌ها می گردید که همراه با آب‌گیری و سپس چسباندن

لامل‌ها بر روی لام‌ها (به کمک Canada balsam) بود (permanent preparation). این کار در حقیقت انجام مجدد دو مرحله ب و ج مندرج در قبل بود.

طرز تهیه رنگ هماتوکسلین ارلیش :

هماتوکسیلین کریستال	gr	۶ (گرم)
الکل مطلق	Cm^3	۳۰۰ (سانتیمتر مکعب)
آب مقطر	Cm^3	۳۰۰ (سانتیمتر مکعب)
گلیسیرین	Cm^3	۳۰۰ (سانتیمتر مکعب)
اسید استیک گلاسیال	Cm^3	۳۰۰ (سانتیمتر مکعب)
زاج آلومینیوم یاپتاس	gr	۶ (گرم)

طرز تهیه رنگ ائوزین:

محلول یک درصد الکلی ائوزین ذخیره (استوک) (Stock's l% alcoholic eosin)

ائوزین Y محلول در آب	gr	۱
آب مقطر	Cm3	۲۰

محلول استوک ائوزین به نسبت ۱/۴ به وسیله‌ی الکل ۸۰ درجه رقیق می‌شود و سپس آماده‌ی استفاده می گردد.

با استفاده از این روش رنگ‌آمیزی افتراقی که به روش "هماتوکسیلین-ائوزین" معروف است بین اجزای مختلف سلول افتراق رنگ حاصل می‌شود، بدین معنی که هسته به رنگ بنفش وسیتوپلاسم صورتی رنگ می‌شود.

روش تهیه کانادا بالزام:

کانادا بالزام	gr	۵
گزیلل	cc	۱۰

پس از اضافه نمودن کانادا بالزام به گزیلل، ظرف حاوی آن آنقدر تکان داده می‌شود تا کانادا بالزام که حالت پودر دارد به‌خوبی در گزیلل حل گردد. در این ظرف شیشه‌ای باید همواره بسته باشد تا از نفوذ گرد و غبار به داخل چسب و ایجاد مشکلات بعدی در هنگام مطالعه‌ی اسلایدها جلوگیری گردد.

بخش سوم

مشاهدات

"Observations"

۱-حیوان تحت تجربه و رفتار آن در هنگام قطع شاخک حسی:

پس از خارج کردن حیوان از محیط نگهداری و قراردادن آن بر روی چوب‌پنبه برای انجام عمل جراحی در ابتدا به دلیل برخورد قلم‌مو با بدن، حیوان بدن خود را جمع می‌کرد اما پس از مدت کوتاهی شروع به حرکت نموده که این حرکت کمی کند به نظر می‌رسید و احتمال می‌رود که دلیل آن خشک بودن محیط و همچنین ایجاد اصطکاک در هنگام حرکت باشد. برای دقت در قطع شاخک درمحل مناسب نیاز به روشن بودن محیط عمل بود، لذا حرارت و نور زیاد حاصل از تابش چراغ روشنایی نیز ممکن است مزید بر علت شده و حرکت را با مشکل مواجه سازد. اغلب با تاباندن نور مستقیم حیوان خود را جمع می‌کرد و مسیر حرکت را عوض می‌نمود."در حالت طبیعی و در فقدان نور اغلب حیوان جهت تغذیه و جابجایی به حرکت در می‌آید(nocturnal)". به همین خاطر گاهی می‌بایست در حداقل نور مستقیم عمل قطع انجام می‌گرفت. لازم به ذکر است که برای قطع سر حیوان هر دفعه بین بیست تا سی دقیقه وقت صرف می‌شد تا بدن حیوان کاملاً بصورت کشیده و در حال آرامش دربیاید. تماس قیچی مخصوص جراحی برای قطع شاخک حسی بینایی، حیوان را بلافاصله به عکس العمل وامی داشت و شاخک را به درون بدن می‌کشید اما با سرعت بخشیدن به عمل جراحی حیوان دیگر فرصتی برای به داخل کشیدن شاخک نداشت. هنگام برداشتن قسمت قدامی بدن جهت مطالعه‌ی شاخک حسی باززایی شده و یا نرمال نیز ترشحی لزج و لعابی و تقریباً سفید رنگ از محل قطع خارج می شد. مضافاً حیوان به مدت حدود پنج تا ده دقیقه به حرکت بی‌جهت و تقلا نمودن ادامه می‌داد. بدن حیوان متعاقباً حالتی چروکیده به خود می‌گرفت و حیوان از حرکت باز می‌ماند.

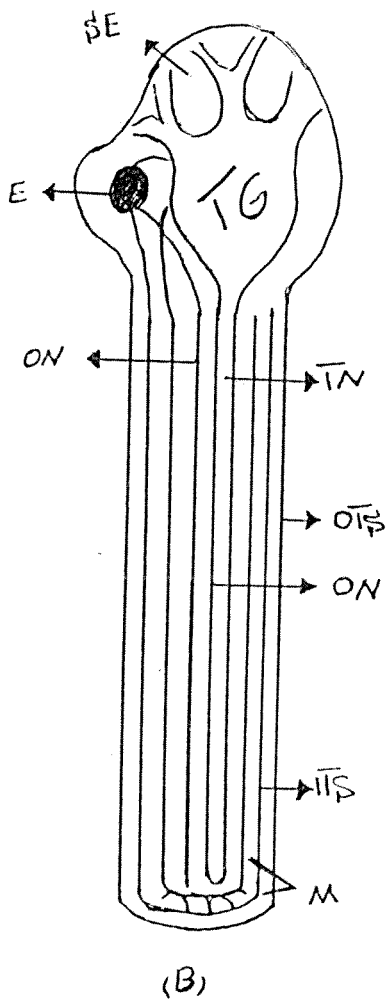
در نمونه‌های تحت بررسی اگر قطع شاخک حسی از ناحیه‌ی پایه‌ی شاخک، یعنی محل اتصال شاخک با بخش قدامی حیوان، صورت می‌پذیرفت، خیلی زود ناحیه‌ای کوچک و گنبدی شکل در محل قطع ظاهر می‌گردید که گاهی در آن لکه‌ای تیره حاوی رنگدانه‌ها نیز دیده می‌شد و حتی در بعضی موارد پس از قطع

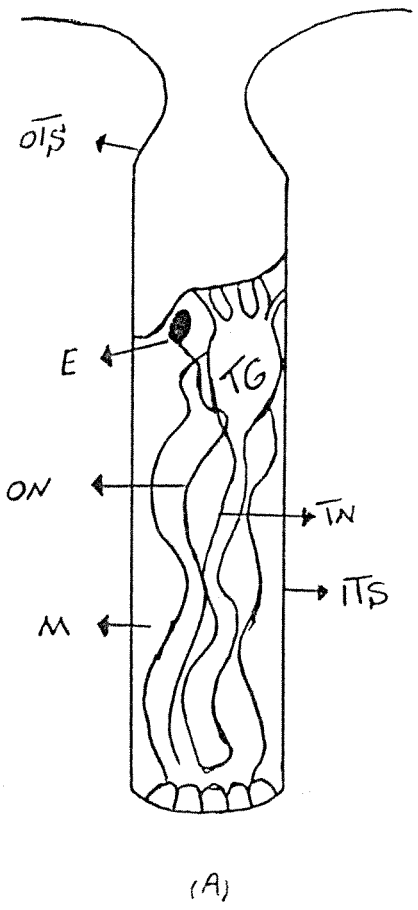
شاخک حسی توده‌ای تیره رنگ از کناره‌ی پایه‌ی شاخک به بیرون می‌زد. به‌موازات باززایی شاخک، این نوار رنگ‌دانه‌دار که در حیوان شاهد مسیری در گردن و سر داشته و به مجاورت ساختمان چشم می‌رسد، در حیوان تحت بررسی نیز تدریجاً باززایی می‌گردید لکن در اغلب موارد باززایی آن کندتر از رشد و نمو شاخک بود بطوریکه در مواردیکه چشم باززایی شده در زیر ذره‌بین قابل تشخیص بود این نوار پیگمان‌دار به قاعده‌ی چشم هنوز نرسیده بود و به‌نظر می‌رسید که متناسب با رشد و تجدید ساختمان شاخک نباشد. بطور مثال با گذشت چهل روز از قطع شاخک در یک نمونه‌ی مورد بررسی مشاهده شد که در قسمت‌های میانی شاخک، خط پیگمان‌دار که از گردن حیوان شروع می‌گردید از توده‌ی پیگمانته‌ی چشم جدا مانده و به آن متصل نشده‌است اما با گذشت پنجاه روز این اتصال کامل شده و ساختار ظاهری نوار پیگمان‌دار، چشم و شاخک مانند شاخک حیوان شاهد است.

۲-ساختار شاخک حسی (anatomy of optic tentacle):

حیوان تحت مطالعه‌ی این رساله دارای یک جفت چشم در قسمت دیستال شاخک سفالیک است. چشم‌ها درسطح پشتی و کمی متمایل به کناره‌ی خارجی شاخک‌ها، زیر اپیتلیوم شفاف تک لایه‌ای اختصاصی خارجی آن که این بخش در ادامه به عنوان گیرنده‌ی شیمیایی (chemoreceptor) و گیرنده‌ی مکانیکی (mechanoreceptor) یا همان اپیتلیوم حسی (sensory epithelium) عمل می‌کند قرار گرفته‌است.

شکل شماتیک زیر ساختار شاخک حسی سفالیک را به همراه چشم حیوان تحت تجربه نشان می‌دهد:





A) ساختار شاخک (تنتاکل) جمع شده

B) ساختار شاخک (تنتاکل) در حالت کشیده

E: چشم ITS : تنتاکل داخلی یا لایه داخلی تنتاکل M :ماهیچه انقباضی ON: عصب بینایی

OTS: لایه خارجی تنتاکل SE : اپیتلیوم حسی TG :گانگلیون شاخکی TN :عصب شاخکی

۳- بافت شناسی شاخک حسی بینایی در حیوان شاهد:

شاخک سفالیک با طول ۶mm-۴ و قطر ۱mm-۰/۹ در انتهای دیستالی خود کمی حالت پلکانی به خود گرفته و اندام بینایی آن کاملاً در انتها (tip) واقع نشده‌است. ادامه‌ی شاخک از طرف رأسی توسط اپیتلیوم حسی که حالت چین‌داری دارد پوشیده می‌شود. سلول‌های اپیتلیالی در این ناحیه استوانه‌ای شکل (تصویر شماره ۱) همراه با عناصر عصبی (*dendrites*) فراوان می‌باشد. این رشته‌های عصبی برخی به سطح آزاد اپیدرمیس می‌رسند و برخی در لابلای آن قرار می‌گیرند.

پریکاریون‌های رشته‌های عصبی در بخش بافت همبند درمی در زیر تیغه‌ی قاعده‌ای (*basal lamina*) و تا حد گانگلیون شاخکی (*tentacular ganglion*) قرار دارند (تصاویر شماره۱و ۲). سلول‌های عصبی (*nerve cells*) بردونوع کوچک و بزرگ هستند که نوع کوچک‌تر بیشتر از اشکال بزرگ‌تر است. این سلول‌ها توسط سلول‌های دیگری که پشتیبانی‌کننده یا غلاف نامیده می‌شوند (*supporting or sheath cells*) احاطه می‌گردند. سطح خارجی اپیدرمیس توسط لایه‌ای به نام کوتیکول (*cuticle*) (تصویر شماره ۱) که خود از دو بخش مرکب می‌گردد پوشیده شده است. بخش زیرین از انشعابات متعدد پلاسماتیک (plasmatic processes) بخش‌های رأسی سلول‌های استوانه‌ای حاصل می‌گردد که به نام لایه‌ی اسفنجی (*spongy layer*) خوانده می‌شود. این انشعابات در انتها خود به شاخه‌های فرعی متعدد منشعب شده و لایه‌ای تحت عنوان شاخه‌های انتهایی (*terminal twigs*) را به‌وجود می‌آورد. تمایزدر این دو لایه با روش رنگ‌آمیزی به‌کارگرفته‌شده در این پژوهش و استفاده ازمیکروسکوپ نوری چندان میسر نیست.

سلول‌های استوانه‌ای اپیتلیالی که واجد هسته‌های کشیده وهتروکروماتین محدودی هستند در ادامه و هنگامیکه به دیواره‌های جانبی شاخک می‌رسند به صورت مکعبی و حتی نهایتاً سنگ‌فرشی در می‌آیند

(تصویرشماره ۳). با تغییر شکل این سلول‌ها از اندازه‌ی زوائد پلاسماتیک آن‌ها به تدریج کاسته شده، انشعابات آن‌ها محو می گردد.

علاوه بر سلول‌های استوانه‌ای اپیتلیالی و عصبی، محققین از دو نوع سلول دیگر در شاخک سفالیک برخی گاستروپودها یاد می کنند، سلول‌های کناری (*lateral cells*) و سلول‌های یقه‌ای (*collar cells*) که عمل ترشح موکوس به آن‌ها نسبت داده می‌شود. سلول‌های یقه‌ای بسیار بزرگ بوده هسته‌ای کروی یا بیضی با یک یا دو هستک دارند. سیتوپلاسم آن‌ها رنگ‌پذیری مشخصی داشته تیره به نظر می‌رسند(تصویر شماره۳). سلول‌های کناری در مقایسه کوچکتر بوده و استطاله‌های نازک و محدودی دارند .

در انتهای شاخک و در بخش پشتی کناری، چشم حیوان قرار دارد که در زیر لایه‌ی تک سلولی شفاف (*transparent*) قرنیه (*cornea*) که در امتداد اپیدرمیس قرار دارد واقع شده است. کره‌ی چشم شباهت نزدیکی به چشم مهره داران عالی داشته و کروی شکل است. از خارج بافت متراکم کپسول (*capsule*) چشم را احاطه نموده و از بخش خلفی آن نیز عصب چشم (*optic nerve*) خارج و در امتداد شاخک به طرف گانگلیون‌های سری (*cerebral ganglion*) می‌رود. عضله‌ی قدرتمند پس کشنده (*retractor muscle*) از یک طرف به کپسول و از طرف دیگر به دیواره‌ی شاخک متصل است (تصویرشماره ۴).

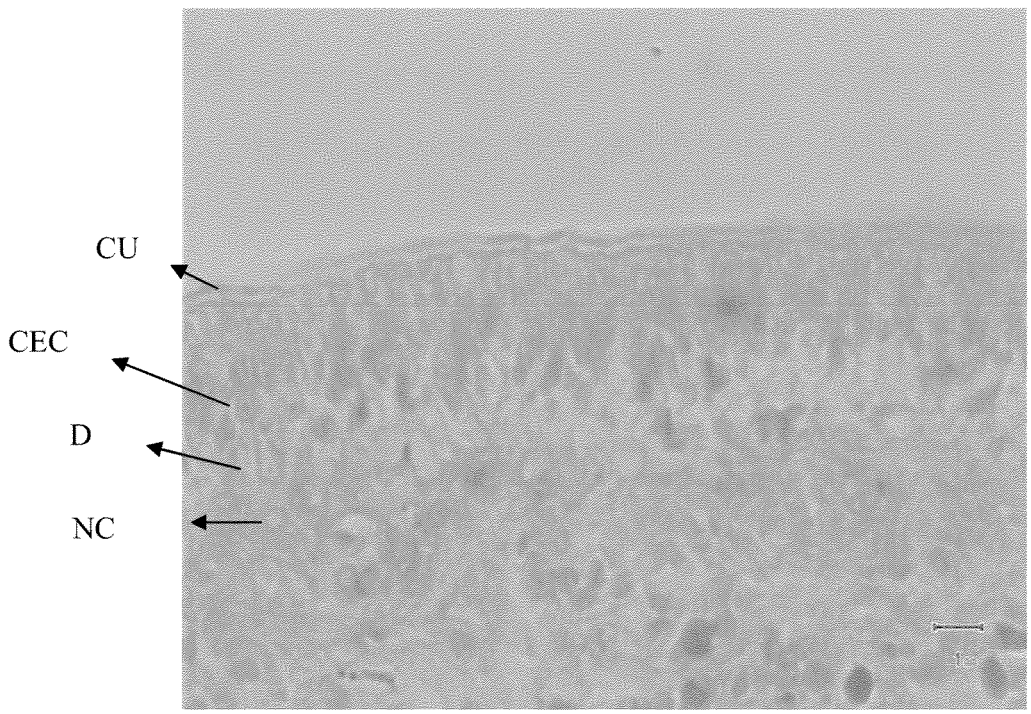
در زیر قرنیه، عدسی (*lens*) کروی شکل قرار دارد. عدسی بخشی غیر سلولی بوده که بعد از فیکساسیون ممکن است قدری سخت شود و هنگام برش‌برداری گاه اتفاق می‌افتد که مقطع حاصله از آن از درون مقطع کره چشم خارج گردد. در اطراف عدسی نیز جسم ویتروس (*vitreous body*) قراردارد (تصویرشماره ۵). شبکیه (*retina*) جسم ویتروس را احاطه نموده و خود از چهار لایه متشکل می‌شود: داخلی‌ترین بخش، لایه‌ی میکروویلوسی (*microvillar layer*) است که از تجمع میکروویلوس‌های بلند فتورسپتورهای نوع I و(photoreceptor type I) همچنین میکروویلوس‌های کوتاه فتورسپتورهای معدود نوع II (*type II photoreceptor*) به وجود آمده‌است. تجمع

میکروویلوس‌ها دستجات مشخص و مجزا از یکدیگری را به وجود می‌آورد که در برش‌های مماسی (tangential) به وضوح قابل رویت هستند (تصویر شماره ۶).

لایه‌ی بعدی لایه‌ی پیگمانته است (pigmented) که در نتیجه‌ی حضور دانه‌های پیگمان در سلول‌های پشتیبانی کننده و سلول‌های فتورسپتور نوع I به وجود می‌آید. لایه‌ی سوم لایه‌ی سوماتیک (somatic) است که در حقیقت از هسته‌های بزرگ فتورسپتورهای نوع I بعلاوه هسته‌های کوچک‌تر فتورسپتورهای نوعII و همچنین سلول‌های پشتیبانی کننده تشکیل می‌شود. دیگر تفاوت هسته‌های فتورسپتورهای نوع I از دیگر هسته‌ها در حقیقت بیشتر بودن یوکروماتین آن است و بالاخره لایه‌ی چهارم لایه‌ای است که تحت نام *plexiform* خوانده می‌شود که از اکسون‌های دو گروه سلول فتورسپتوری I و II تشکیل می‌شود (تصویر شماره۶) . اکسون‌ها پس از عبور از کپسول چشم با یکدیگر مجتمع شده عصب بینایی را به وجود می‌آورد. سلول‌های گلیال (*glial cells*) نیز عصب بینایی را از اطراف احاطه می‌نماید (تصویرشماره ۷) .

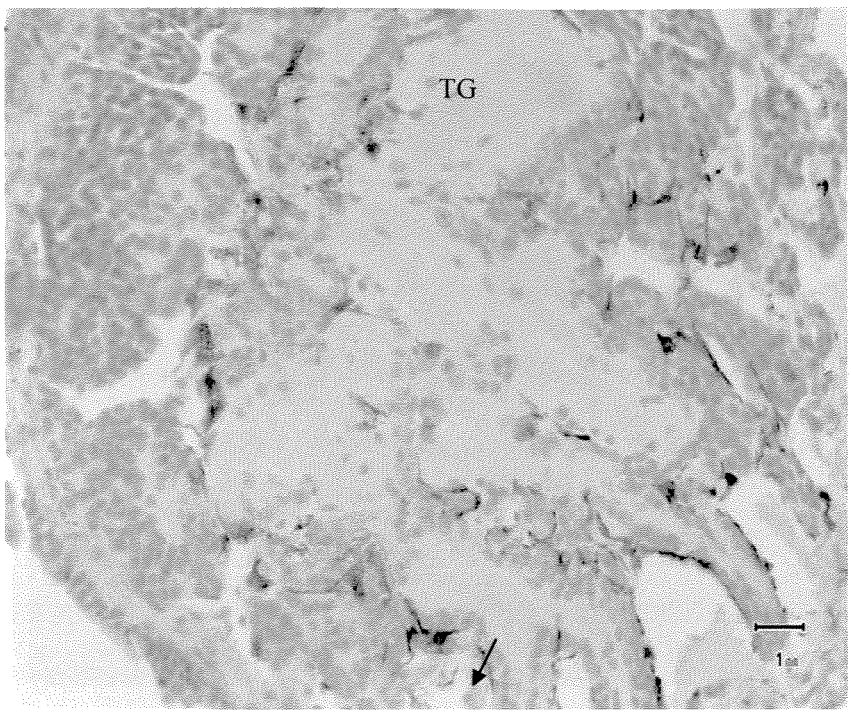
نزدیک به رأس شاخک و در مجاورت کره‌ی چشم ساختاری وجود دارد که تحت نام گانگلیون شاخکی (tentacular ganglion) خوانده می‌شود. از این مجموعه‌ی سلول‌های عصبی، رشته‌های آکسونی به صورت رشته‌ای ضخیم به نام (tentacular nerve) درآمده که در مسیر قاعده‌ی شاخک به پیش می‌رود. این عصب در مقایسه با عصب بینایی ضخیم‌تر بوده و مانند آن همراه با سلول‌های گلیال چه از خارج و چه از درون است. ما بین این دو عصب و همچنین در فاصله‌ی آن‌ها تا عضلات پس‌کشنده که لایه‌ای ضخیم از رشته‌های عضلانی است و به طور طولی سمت و سو یافته‌اند، سلول‌های بینابینی (interstitial cells) پیگمان‌دار، اعصاب حرکتی (motor nerve)، فضاهای همولنفاتیک (*hemolymphatic spaces*) که حاوی مایع لنفی هستند قراردارند. سلول‌های بینابینی نامنظم، کشیده و حاوی دانه‌های فراوان پیگمان و واجد استطاله‌های متعدد و باریک هستند (تصاویر شماره ۷و۸). دو غلاف استوانه‌ای شکل که یکی در داخل دیگری قراردارد تحت نام (inner tentacular sheath and outer tentacular sheath) دیواره تنه شاخک را می‌سازند.سلول‌های عضلات پس‌کشنده در حقیقت دیواره غلاف داخلی و اپیدرمیس مکعبی و یا

سنگ فرشی خارجی، غلاف خارجی را به وجود می آورند. حضور سلول‌های پیگمانته در لابلای سلول‌های عضلانی و همچنین مجاورت دیواره خارجی (تصویر شماره ۹) موجب تیره رنگ شدن شاخک بینایی هنگامیکه از خارج به آن نگاه می‌شود می گردد. مضافاً فاصله بین سلول‌های عضلانی و بخش میانی شاخک بافت همبند شلی (loose) که فضاهای لنفاتیک با اندازه های کوچک و متوسط دارند ملاحظه می‌شود (تصویر شماره ۹).



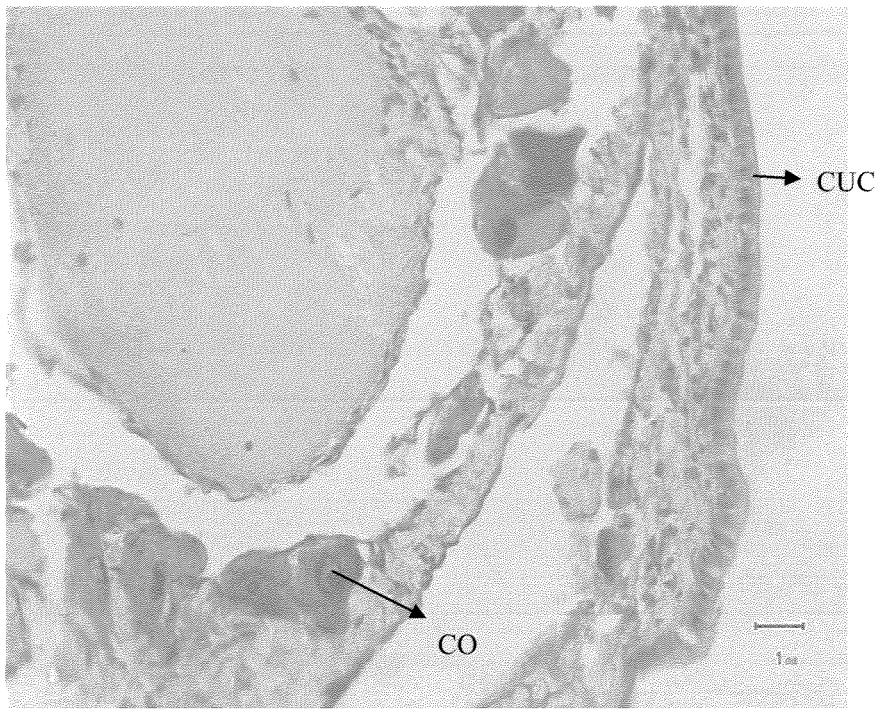
۱ برش عرضی ازقسمت دیستال شاخک بینایی:

cu : کوتیکول، CEC:سلول‌های اپیتلیوم استوانه‌ای، NC :سلول های عصبی، D: دندریت‌ها



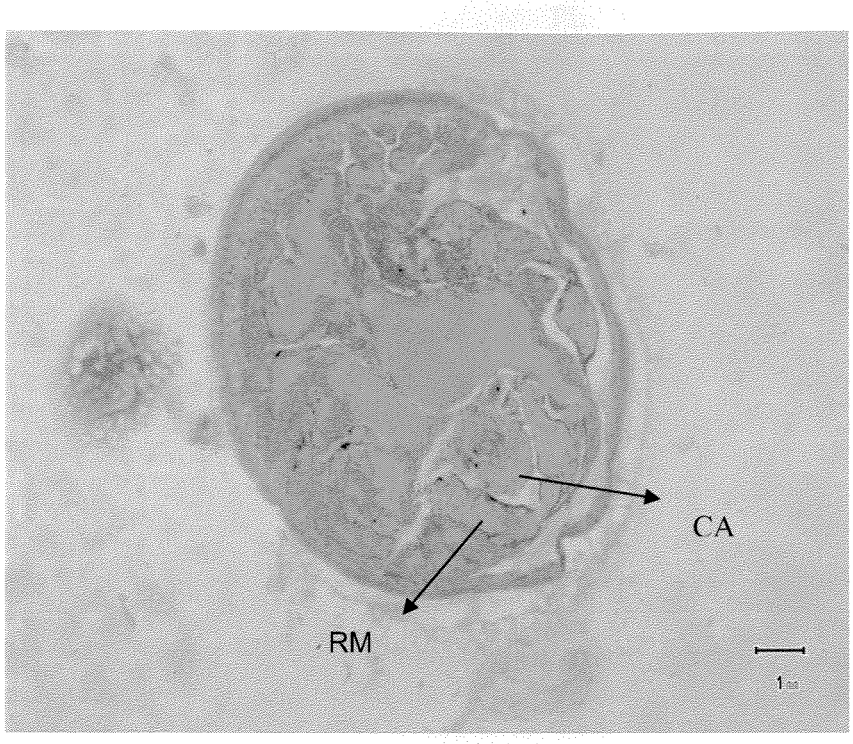
۲ برش عرضی شاخک بینایی: A

A: رشته های عصبی (اکسون ها) در حال حرکت به سمت TG: گانگلیون شاخکی



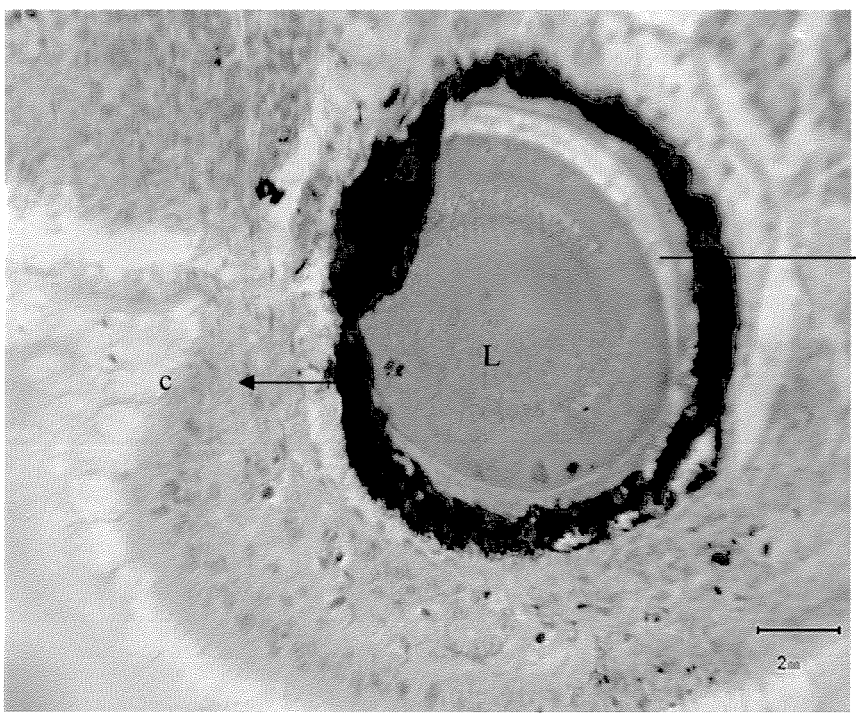
۳ برش عرضی شاخک بینایی:

CUC: سلول‌های مکعبی، CO: سلول های یقه ای



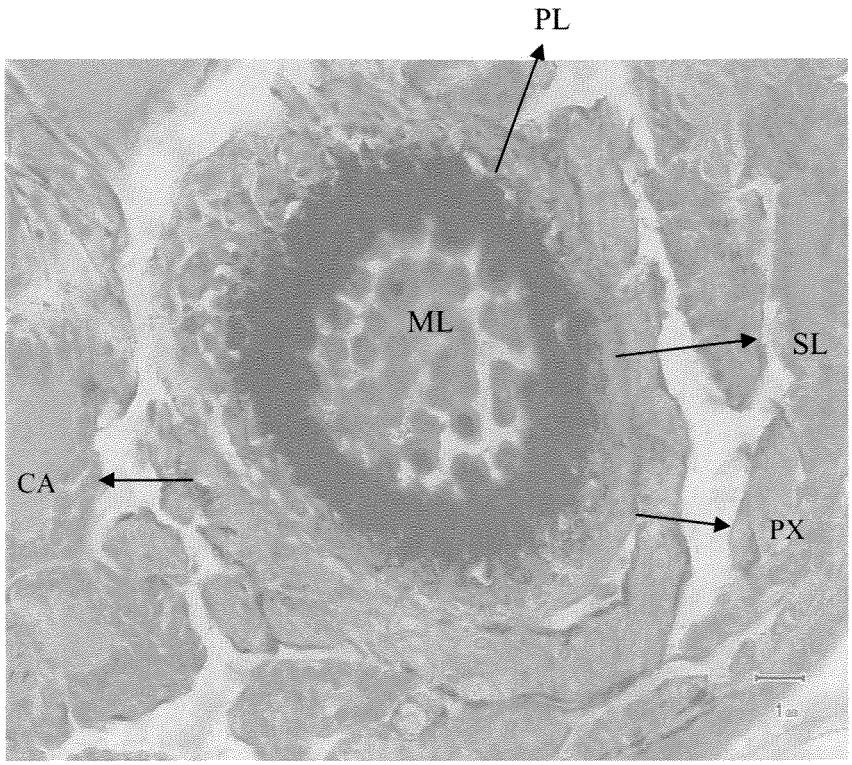
۴ـ برش عرضی شاخک بینایی:

CA: کپسول چشم در ناحیه قاعده آن، RM: عضله پس کشنده



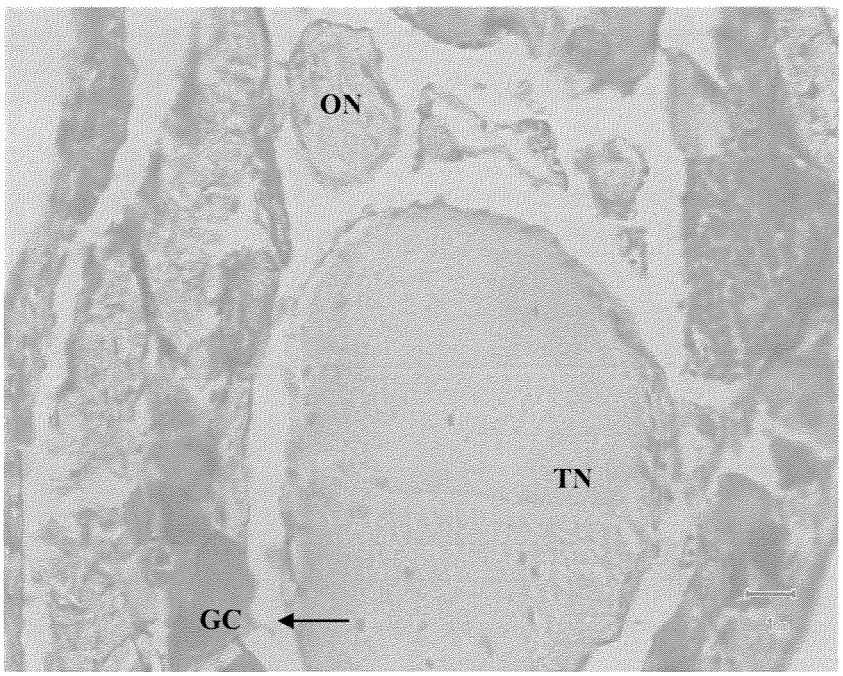
۵ـ برش عرضی شاخک بینایی:

L: لنز، VB: جسم ویتروس، c: قرنیه



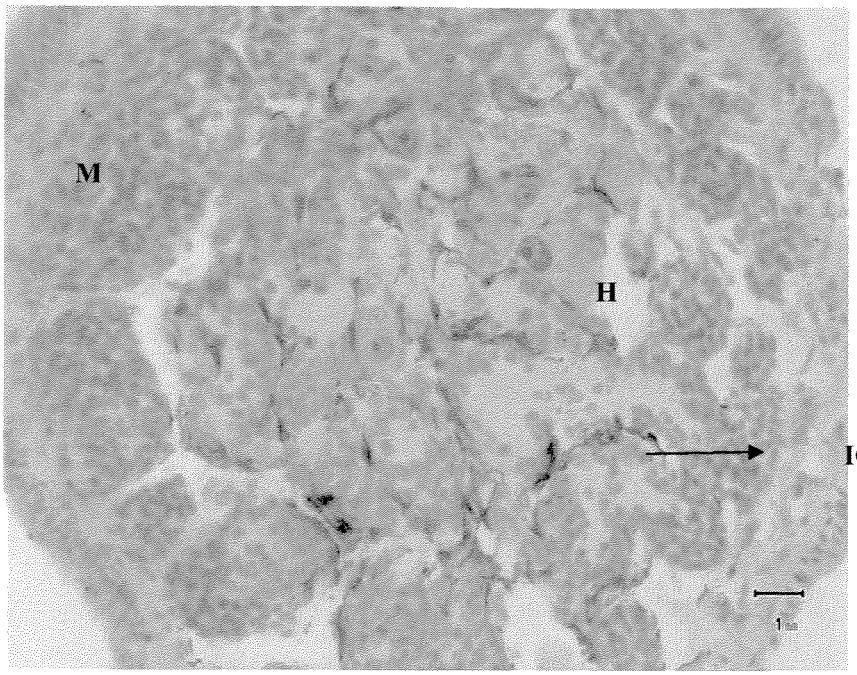
۶ برش عرضی شاخک بینایی در مجاورت لایه میکروویلوسی: PL: لایه پیگمانته،

ML: لایه میکروویلوسی، SL: لایه سوماتیک ، PX: پلکسیفرم، CA : کپسول



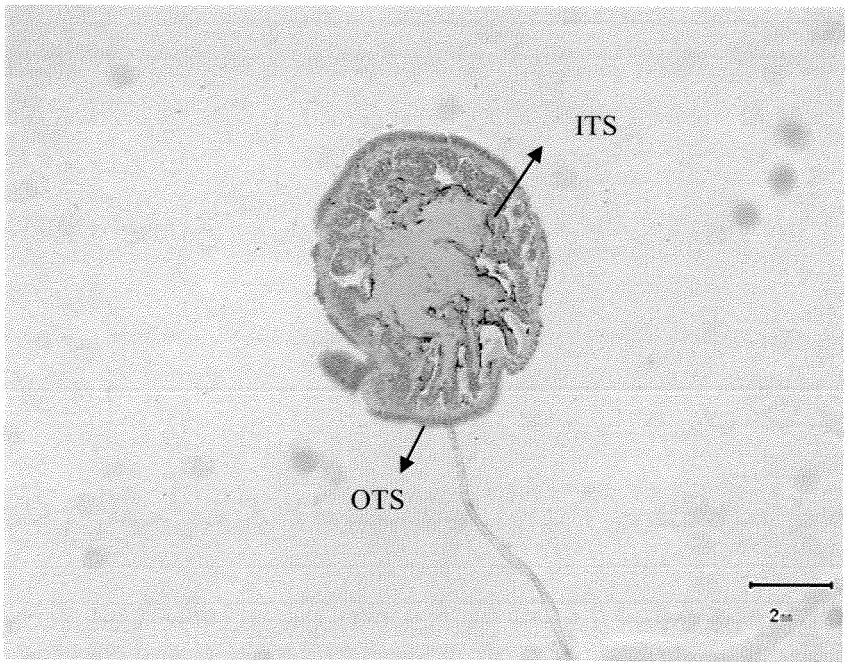
۷ برش عرضی شاخک بینایی:

TN : عصب شاخکی، ON: عصب بینایی ، GC: سلول گلیال



۸ برش عرضی شاخک بینایی:

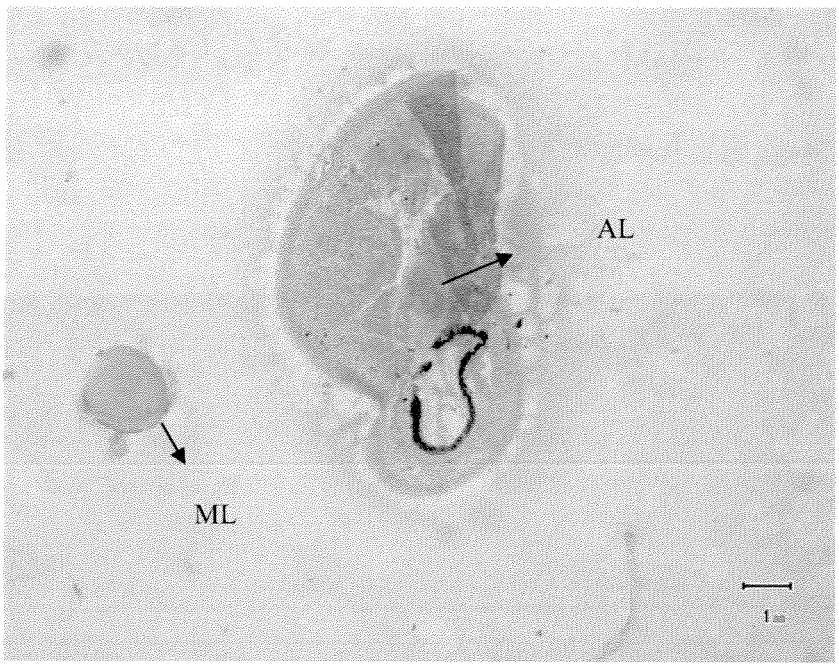
IC : سلول های بینابینی، H: فضاهای همولنفاتیک، M: دستجات عضلانی



۹ برش عرضی شاخک بینایی نزدیک قاعده آن:

ITS: لایه داخلی، OTS: لایه خارجی

لازم به ذکر است که در بررسی تنتاکل و چشم یکی از حیوان های نرمال، در یک نمونه در کنار کره چشم اصلی، یک چشم فرعی کوچک نیز قابل تشخیص بود. هرچند این ساختار وضوح چندانی نداشت ولکن لنز ائوزینوفیلیک و در اطراف آن لایه ای پیگمانته که در حکم شبکیه تلقی می گردید قابل تفکیک بودند (تصویر شماره ۱۰).



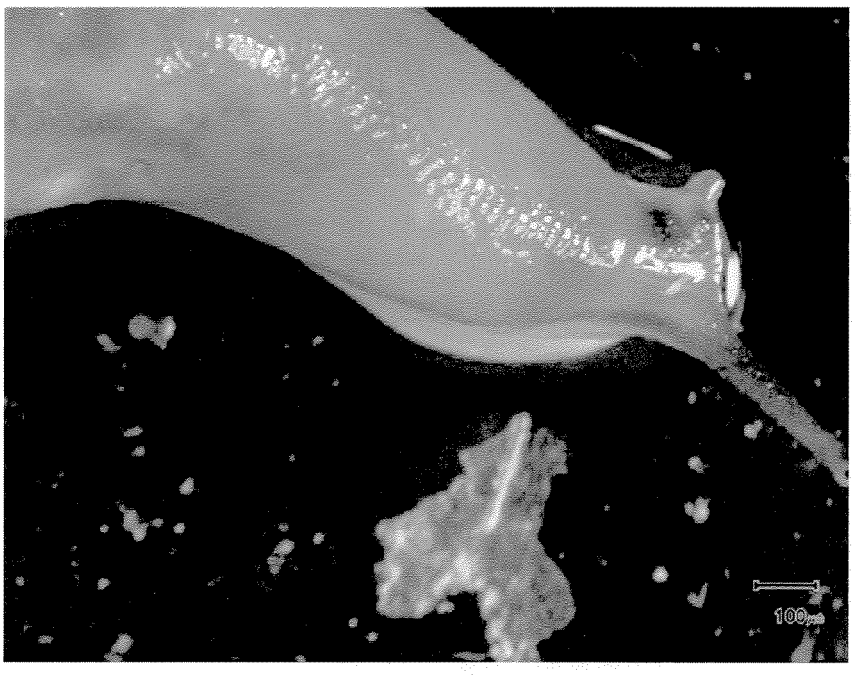
۱۰ برش عرضی شاخک بینایی در ناحیه چشم:

AL: لنزچشم فرعی،ML : لنز چشم اصلی. "بخشی از برش چین خورده و artifact است."

۴-بافت‌شناسی شاخک بینایی باززایی شده:

همانگونه که در جدول شماره‌ی ۱ نشان داده شد مجموعاً ۱۹ بار عمل جراحی و قطع شاخک حسی بینایی انجام گرفت که از این تعداد جمعاً ۴ لیسک قبل ازمرحله بررسی و مطالعه فرایند باززایی ازبین رفتند. بقیه‌ی لیسک‌های جراحی شده در فاصله زمانی ده، بیست، سی، چهل، پنجاه و شصت روز قربانی و شاخک آن‌ها جهت بررسی مطابق روش پیشنهادی برداشته شد. بعلت واکنش سریع حیوان و پس‌کشیدن شاخک‌ها به داخل

بخش قدامی بدن در هنگام کشته‌شدن و همچنین کوچکی بسیار بافت برداشته شده متاسفانه نمونه‌های ده، بیست و سی روزه قابل مطالعه نشدند. تصویر شماره ۱۱ نمونه بیست روزه را قبل از کشته‌شدن نشان می‌دهد که شاخک سمت چپ (جراحی شده) در حال رشد و باززایی است و به‌وضوح در بخش دیستالی این شاخک لکه‌ی تیره رنگی قابل رویت است که مقدمه‌ی باززایی چشم حیوان را منعکس می‌نماید. شاخک‌های باززایی شده حیوانات چهل، پنجاه و شصت روزه واجد بافت‌هایی بودند که در این تحقیق به توصیف آن‌ها پرداخته شده و در موارد مناسب تصاویری از آن‌ها ارائه گردیده‌است.



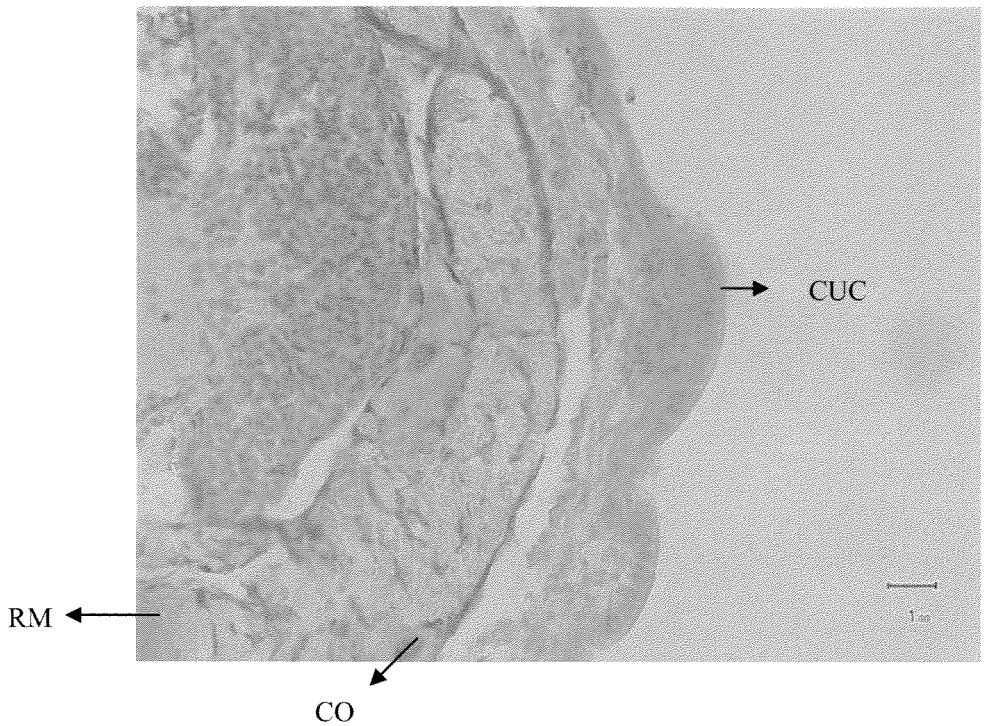
۱۱ شاخک درحال باززایی بیست روز پس از قطع

مورفولوژی شاخک تجربی: شاخک‌های باززایی شده هر چند در سنین کمتر رشد طولی یکسانی با شاخک‌های شاهد (به‌جای مانده در طرف دیگرحیوانات) نداشتند ولکن مانند آن‌ها باریک و در انتها حامل چشم حیوان بودند. نوارهای رنگین (پیگمانته) به‌وضوح بر روی آن‌ها مشاهده می‌گردد. حرکت آن‌ها و

پس‌کشیده شدنشان به داخل بدن تفاوت با اهمیتی را از شاخک شاهد نشان نمی‌داد. برش‌های عرضی که از جهت دیستال به پروکسیمال شاخک گرفته شدند بخش‌های مختلفه‌ای را نشان می‌دادند که با نمونه‌های کنترل قابل قیاس بودند و کوتیکول، اپی‌درمیس مرکب از سلول‌های استوانه‌ای، بخش مربوط به سلول‌های عصبی و دندریت‌های برخاسته از آن‌ها در زیر اپیدرمیس که به طرف پوشش خارجی شاخک کشیده شده‌بودند، دستجات آکسونی و حرکت آن‌ها به طرف دیگر دستجات و الحاق با آن‌ها و نهایتاً ایجاد عصب شاخکی در مرکز شاخک ،سلول‌های بینابینی پیگمان‌دار همراه با استطاله‌ها، توده‌های عضلانی کناری یا حاشیه‌ای که در مجموع عضلات پس‌کشنده را می‌ساختند و فضاهای لمفاتیک و بالاخره چشم همراه با عصب بینایی، باززایی شده‌بودند (تصاویر شماره۱۸-۱۲).

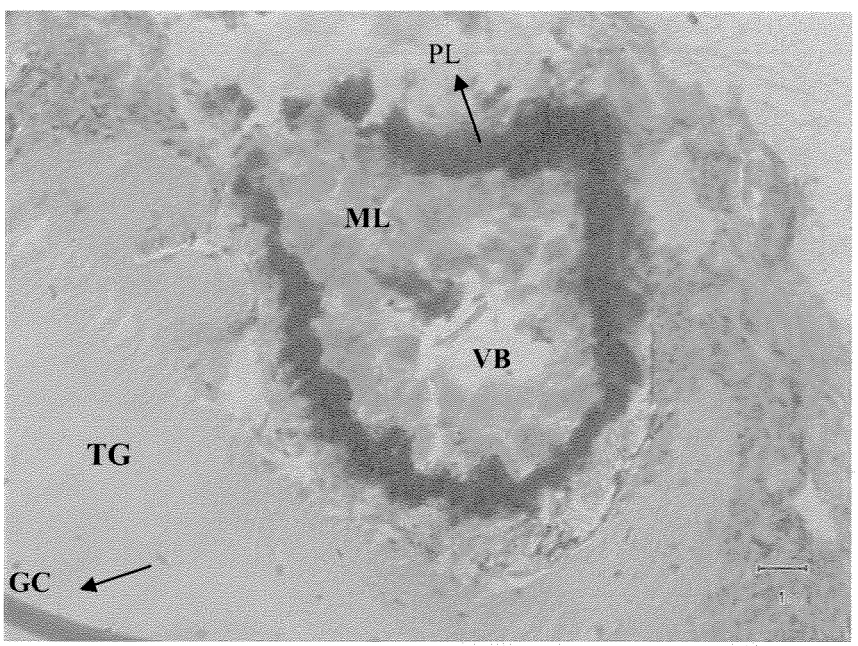


۱۲ برش عرضی ازقسمت دیستال شاخک بینایی تجربی:
CU: کوتیکول، CEC: سلول‌های اپیتلیوم استوانه‌ای،NC: سلول های عصبی، D: دندریت‌ها



۱۳ برش عرضی شاخک بینایی تجربی:

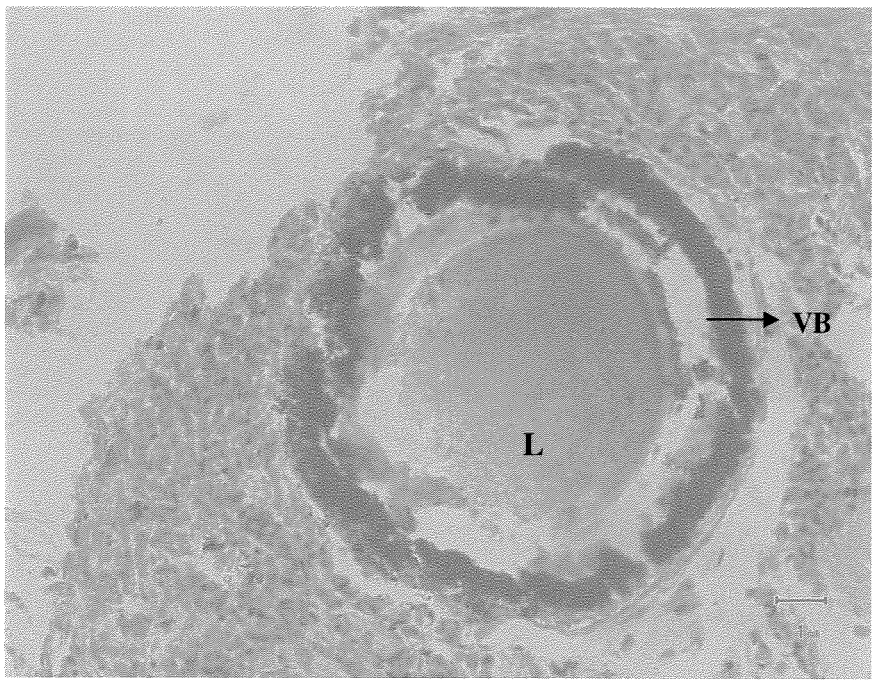
CUC: سلول‌های مکعبی، CO: سلول های یقه ای، RM: عضلات پس کشنده



۱۴ رش عرضی شاخک بینایی تجربی:

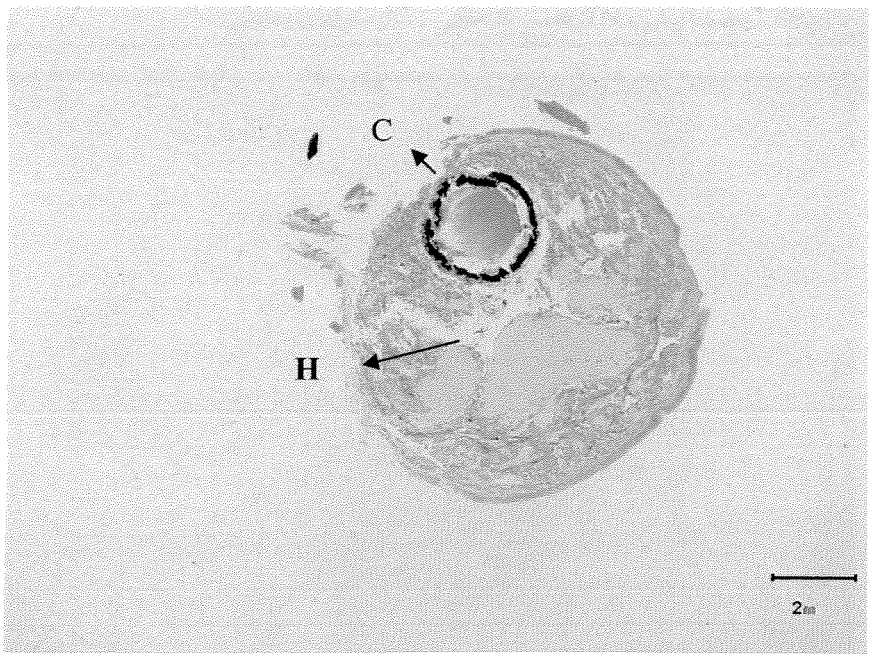
PL: لایه پیگمانته، VB: جسم ویتروس، ML : لایه میکروویلوسی، TG: گانگلیون شاخکی،

GC :سلولهای گلیال



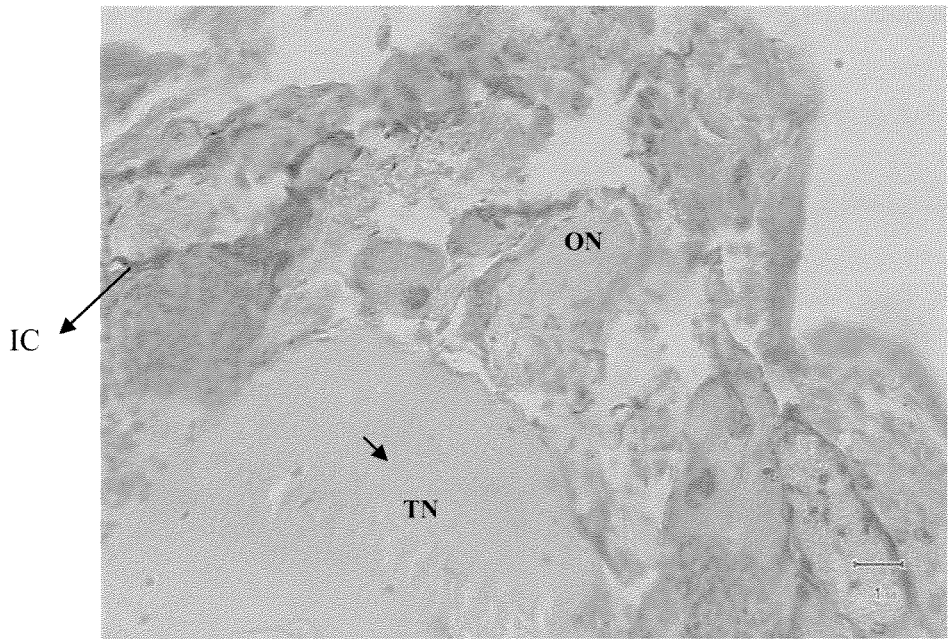
۱۵ برش عرضی شاخک بینایی تجربی:

L: لنز، VB: جسم ویتروس



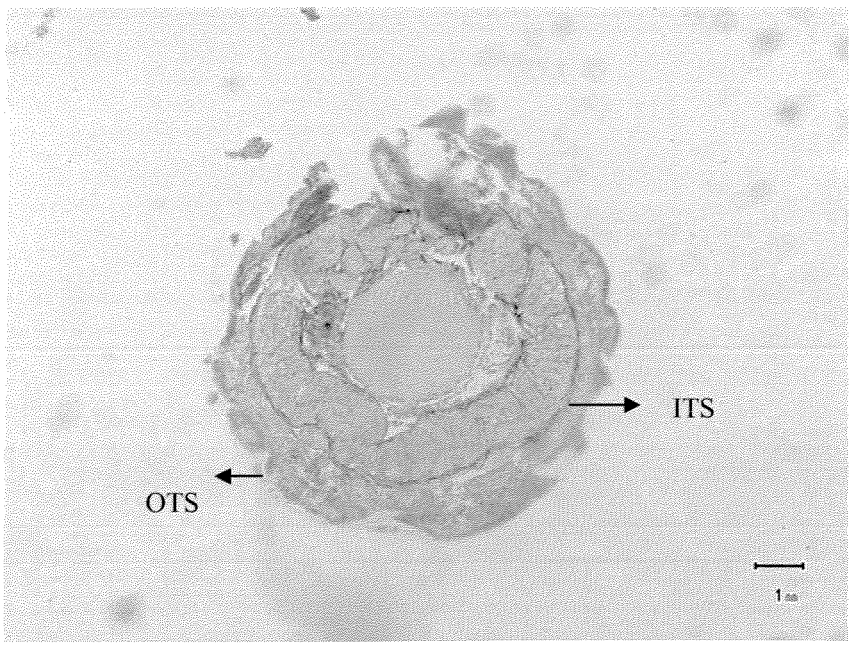
۱۶ برش عرضی شاخک بینایی تجربی:

H: فضاهای همولنفاتیک، c: قرنیه



۱۷ برش عرضی شاخک بینایی تجربی:

ON: عصب بینایی، TN: عصب شاخکی ، IC: سلولهای بینابینی



۱۸ برش عرضی شاخک بینایی تجربی :

ITS: لایه تنتاکولار داخلی، OTS : لایه تنتاکولار خارجی

هر چند عملکرد فیزیولوژیکی چشم معین نبود ولکن موقعیت این ساختمان پیچیده‌ی تجربی و باززایی شده در انتهای شاخک بود. شبکیه‌ی‌پیگمان‌دار به‌خوبی رشد نموده و اغلب لایه‌های آن بخصوص لایه‌ی میکروویلوسی قابل تشخیص و تفکیک بودند. از بخش تحتانی کره‌ی چشم عصب بینایی در مسیر قائده‌ی شاخک امتداد یافته بود. در حفره‌ی درونی چشم، عدسی با ساختاری کاملاً مشابه با نمونه‌های شاهد، در میان جسم ویتروس ملاحظه می‌گردید. ساختاری مشابه‌ی کپسول چشم نیز می‌توان در اطراف شبکیه تشخیص داد که معرف ایجاد لایه‌ای محکم برای اتصال بخش دیستالی عضله پس‌کشنده می‌باشد (تصاویر شماره ۱۵و۱۶و۱۷).

توضیح: تصاویر مربوط به صفحات ۵۰ تا ۶۰ توسط نگارنده ثبت شده است.

بخش چهارم

بحث

"Discussion"

در بحث آنچه که در این تحقیق ملاحظه گردید و در مشاهدات صفحات قبل بطور مشروح آورده شد به نظر می رسد لازم باشد در ابتدا اتفاق نظر محققین در مورد پدیده‌ی باززایی و مکانیسم های آن بطور خلاصه آورده شود و سپس نتیجه گیری نهائی در مورد تحقیق حاضر به عمل آید (۹).

پدیده باززایی (regeneration) :

باززایی به معنی باز- ساخت و رشد و نمو اندام ها یا بافت های از دست رفته درزندگی پس از دوران جنینی (postembryonic life) و بازگرداندن آن‌ها به حالت اولیه است .

باور مشاهده‌ی بروز این پدیده در*newt* و ستاره‌ی دریایی (starfish) و عدم بروز این فرایند در انسان (مثلاً باززایی دست و پا) سخت است.و این سوال همیشه وجود دارد که چه توانایی در سمندرها برای باززایی بخش‌هایی از بدن وجود دارد که دیگر موجودات عالی و من جمله انسان، از آن توانایی محروم اند؟

علم بیولوژی تجربی (experimental biology) در اثر تلاش‌های طبیعی‌دانان (naturalists) در قرن ۱۸ و به جهت اثبات باززایی و پاسخ به سوال فوق به وجود آمد و آزمایش‌های باززایی محققینی نظیر Tremblay در هیدر(hydra)،Raeumur در سخت‌پوستان (crustaceans) و Spallanzani درسمندرها (Salamander) مقدماتی را برای تحقیقات تجربی (experimental research) در این زمینه فراهم آورد.

در طول حدود دو قرن گذشته توجه دانشمندان اغلب معطوف به پیدا کردن راه حل برای فائق آمدن بر مشکل بزرگ باززایی شده و پیشرفت‌های اخیر ممکن است انسان را بزودی قادر سازد تا در باززایی برخی از اعضاء بدن و از جمله سیستم عصبی به موفقیت‌های شایانی دست یابد ارگان‌های بیمار و نارسا را بردارد و زایش مجدد آن‌ها را در بدن میسر سازد.

برای فراهم آوردن راهی جهت بروز این فرایند در مهره داران عالی، لازم است که در ابتدا توجه شود که باززایی چگونه در گونه‌هایی که این توانایی را دارند اتفاق می‌افتد.

چهار روش اصلی در باززایی:

روش اول شامل استفاده از سلول‌های بنیادی (stem cells) برای رشد مجدد ارگان‌ها یا بافت‌های از دست رفته است. موارد متعددی از این نوع باززایی نرمال شامل رشد مجدد بدنه‌های مو(hair shaft) از سلول‌های بنیادین فولیکولی مو (hair follicle stem cells) در پیاز مو و تعویض دائمی سلول‌های خونی از سلول‌های بنیادین(hematopoietic stem cells) در مغز استخوان را می‌توان مثال زد. این روش stem cell-mediated regeneration نامیده می‌شود.

مکانیسم دوم شامل از دست دادن تمایز (dedifferentiation) ساختارهای بالغ برای تشکیل یک توده سلولی تمایز نیافته (undifferentiated) و سپس تمایز وتخصصی شدن مجدد (respecification). این نوع باززایی epimorphosis نامیده می شود که از ویژگیهای باززایی کرم‌های پهن (planarian) و همچنین اعضای بدن دوزیستان می باشد.

مکانیسم سوم *morphallaxis* نامیده می‌شود، که باززایی از طریق شکل‌دهی مجدد (repatterning) بافت‌های موجود است. در این پدیده رشد خیلی کم اتفاق می‌افتد. این نوع باززایی در هیدر دیده می‌شود.

چهارمین نوع باززایی به نام باززایی جبرانی (compensatory regeneration) شناخته شده است. که در این نوع باززایی سلول‌های تمایز یافته تقسیم می شوند اما عملکردهای تمایز یافته شده‌ی خودشان را حفظ می‌کنند. سلول‌های جدید نه از سلول‌های بنیادین به وجود می آیند و نه در نتیجه از دست دادن تمایزسلولی

(dedifferentiation) سلول‌های بالغ. هر سلول، سلول‌های مشابه خود را به وجود می آورد و هیچ توده‌ای از بافت تمایز نیافته تشکیل نمی‌شود. این نوع باززایی از ویژگیهای کبد پستانداران است.

در ادامه باززایی اعضاء در سمندر ، هیدر و کبد پستانداران که از کتاب زیست‌شناسی رشد و نمو (۹) اقتباس شده است مورد بحث قرار می گیرد:

باززایی اپی مورفیک اندام های حرکتی سمندر

(epimorphic regeneration of salamander limb):

هنگامیکه پای سمندر بالغ قطع شود (amputated)، سلول‌های باقی مانده عضو قادر به ساخت مجدد پای جدید کامل، با تمام سلول های تمایز یافته آن که در نظم مناسبی قرار گرفته اند هستند. به بیان دیگر سلول‌های جدید فقط ساختارهای از دست رفته را می‌سازند نه بیشتر. برای مثال وقتی مچ قطع می‌شود ، سمندر یک مچ جدید به وجود می‌آورد نه یک آرنج جدید. یعنی سمندر "می‌داند" چه بخشی از محور نزدیک- دور (proximal-distal axis) پا قطع گردیده است.

سمندرها این نوع باززایی را توسط فرایند از دست دادن تمایزسلولی (dedifferentiation)، تکثیر(proliferation) و بالاخره تخصصی شدن (respecification) مجدد سلول‌ها انجام می‌دهند.

تشکیل کلاه اکتودرمی راسی(apical ectodermal cap) و بلاستمای باززایی

(*regeneration blastema*) :

زمانیکه پای سمندر قطع می شود، یک لخته‌ی پلاسمائی در محل تشکیل می شود و در طی ۶ تا ۱۲ ساعت سلول‌های اپیدرمی از باقی مانده‌ی اندام برای پوشش دادن سطح زخم به طرف آن مهاجرت می کنند و اپیدرمیس زخم را تشکیل می‌دهند. این ساختار تک لایه متعاقباً برای تشکیل کلاه اکتودرمی رأسی تکثیر می‌شود. بنابراین برعکس ترمیم زخم در پستانداران ، هیچ جای زخمی (scar) تشکیل نمی شود و درمیس نیز همراه با اپیدرمیس برای پوشش دادن محل قطع حرکت نمی کند. لکن اعصاب در زیر محل قطع تخریب می‌شوند. طی ۴ روز بعد ، سلول های زیر کلاه رأسی در حال رشد دچار فرایند از دست دادن تمایزمی‌شوند. سلول های استخوانی ، سلول های غضروفی ، فیبروبلاست ها ، میوسیت ها و سلول های عصبی همگی ویژگی‌های تمایز یافته‌ی قبلی خود را از دست داده و از همدیگر جدا می شوند .

ژن‌هایی که در بافت‌های تمایز یافته بیان شده اند (مثل mrf4 و myf5 در سلول‌های ماهیچه‌ای) از فعالیت طبیعی باز می‌مانند .در حالیکه افزایشی مشخص در بیان ژن‌هایی مانند msx1 که با ناحیه‌ی در حال تکثیر مزانشیمی پای جنینی همراه هستند دیده می‌شود.

بنابراین، درمحل عضو قبلی در لبه‌ی بریده شده‌ی ریشه‌ی آن، توده‌ی سلول‌های در حال رشد و غیرقابل تشخیص و فاقد تمایز، درست زیر کلاه اکتودرمی رأسی تشکیل می‌شود. این توده‌ی سلولی بلاستمای باززایی (regeneration blastema) است. این سلول‌ها به تکثیر ادامه می‌دهند و در نهایت برای تشکیل ساختارهای جدید عضو ، تمایز مجدد می‌یابند (redifferentiation).

ایجاد بلاستمای باززایی مبتنی بر تشکیل سلول های تک هسته ای از سلول های عضلانی و سلول های اپیتلیالی است. سلول های عضلانی چند هسته ای که تمایز یافته تلقی می شوند برای آنکه تکثیر یابند باید چرخه سلولی

(cell cycle) را بدست آورند (قابلیت تقسیم یابند) که در این حال تک هسته ای شده و پس از تکثیر به بافت‌های مختلفه تمایز جدید می‌یابند. وادار نمودن سلول‌ها به وارد شدن به چرخه سلولی در نتیجه‌ی تاثیر متقابل ترومبین (که در نتیجه‌ی قطع حاصل می‌شود) با سرم و ایجاد فاکتوری است که سلول‌ها را به این مرحله می‌کشاند.

تکثیر سلول‌های بلاستما ونیاز به اعصاب:

تکثیر بلاستمای باززایی به وجود اعصاب وابسته است. نشان داده شده است که تعداد کمی از رشته‌های عصبی لزوماً برای بروز باززایی باید وجود داشته باشند. معتقدند که نورون‌ها فاکتورهایی را که تکثیر سلول‌های بلاستما را افزایش می‌دهند، آزاد می‌کنند. یکی از این فاکتورها، فاکتور رشد گلیال (glial growth factor) است که برای ثابت نگاهداشتن نسبت بالای تکثیر سلولی مورد نیاز است. لازم به ذکر است که fgf2 یا فاکتور رشد فیبروبلاست ۲-(fibroblast growth factor 2)- فاکتوری که در اکسونهای عصبی اندام حرکتی دوزیست پیدا شده است نیز جهت این فرایند مورد نیاز است. البته ، fgf2 بیش از یک نقش در باززایی دارد. این فاکتور ممکن است به عنوان یک عامل سازنده‌ی عروق خونی (angiogenesis) عمل کند ، زیرا بافت‌های در حال باززایی مدت کوتاهی بعد از قطع برای رشد نیاز به خون دارند. علاوه بر این، این فاکتور ممکن است که به عنوان محرک میتوز و عامل شکل دهی پای در حال باززایی شدن نیز عمل کند.

مضافاً محققین توانسته‌اند با وارد کردن دانه های حاوی fgf2 در بلاستمای بدون عصب باززایی را القاء کنند و یا با تزریق fgf2 به بلاستمای عاری از عصب، میتوز را باعث شوند.

تکثیر سلول های بلاستما و نیاز به fgf10:

احتمالاً فاکتور مزانشیمی که با آن بخش فاقد انتها (distal-less) پاسخ می‌دهد fgf10 است. fgf10 در مزانشیم جوانه‌های طبیعی پای جنین بیان می‌شود و تفاوت جدی درباززایی پای جنینی دوزیستان را باعث می‌شود. برای مثال در Xenopus ، نوزادان (tadpoles) پیش از انجام دگردیسی قادرند اعضای حرکتی عقبی (hind limbs) بدن را باززایی کنند اما در مراحل بعدی از حیات نوزادان و همچنین افراد بالغ در بروز این فرایند ناتوانند.

در تجربیات متقابل پیوند (reciprocal transplantation experiments) محققین دریافته‌اند که مزانشیم و نه اکتودرم در تنظیم باززایی نقش مهم و اساسی دارد.

اندام حرکتی عقبی در صورت داشتن مزانشیم پیش از انجام دگردیسی اندام حرکتی عقبی و اکتودرم پیرتر و قدیمی‌تر این اندام می‌تواند باززایی شود اما اگر از اکتودرم قبل از انجام دگردیسی و مزانشیم پیرتر استفاده شود باززایی رخ نمی‌دهد. مزانشیم پیرتر عضو عقبی fgf10 را نمی‌سازد. زمانی‌که Yokoyoama و همکارانش دانه‌های حاوی fgf10 را به بقایای اندام عضو عقبی پیرتر اضافه کردند، این عضو باززایی شد. علاوه بر این دانه‌های fgf10 بیان fgf8 را در اکتودرمی که برروی دانه‌ها قراردارد القاء می‌کنند.

بنابراین باززایی پای دوزیستان ممکن است به تکامل اولیه و اصلی آن خیلی شبیه باشد. در هر دو مورد، فیدبکی مابین fgf10 تولید شده در مزانشیم و fgf8 تولید شده در اکتودرم پوشاننده وجود دارد. شرط اولیه بیان fgf است تا اکتودرم را توانا در بیان fgf خودش نماید. این اتفاق به نظر می‌رسد در رشد طبیعی توسط صفحه جانبی مزودرم (lateral plate mesoderm) و در طول باززایی به کمک نورون‌ها انجام می شود.

باززایی مورفولاکتیک در هیدر (morphallactic regeneration in hydra):

هیدراز شعاعیان (cnidaria) آب شیرین است. بیشتر هیدرها حدود ۳۰mm-۲۵ طول دارند. بدن آن‌ها ستونی با یک انتهای aboral (head) است. ستون بدن یا پایه (stalk) به صفحه‌ی پایه‌ای (basal disc) منتهی می‌شود. بخش رأسی شامل یک ناحیه‌ی برجسته‌ی مخروطی شکل (Hypostom) شامل دهان است که یک حلقه مرکب از۱۰-۶ شاخک توخالی (تنتاکل) برای به دام انداختن غذا در زیر آن قرار دارد. هیدر یک cnidarianساده است که دیواره‌ی بدن حفره‌ی گاستروواسکولار (gaster) را احاطه می‌نماید. این دیواره مرکب است از اپیدرمیس خارجی (*ectodermal*) و یک گاسترودرمیس (*gastrodermis*) داخلی (*endodormal*) که بین این دو مزوگلا (*mesoglea*) قرار دارد. هیدرها فاقد یک مزودرم حقیقی هستند و به صورت جنسی تولید مثل کنند اما تحت شرایط خاص مثل هوای سرد به صورت غیر جنسی توسط جوانه زدن تکثیر می‌نمایند. برخلاف اغلب موجودات بدن هیدر چندان پایدار "stable" نیست. به عنوان مثال انتظار نیست سلول پوست در تنه‌ی انسان‌ها و حشرات مهاجرت نموده و در ناحیه‌ی صورت و یا پا از بدن جدا شود در حالی‌که سلول‌ها در ستون بدن هیدر این اتفاق را نشان می‌دهند. این سلول‌ها مداوماً تقسیم میتوز انجام داده و جابجا می‌شوند و سرانجام به منتهی علیه بخش‌های مختلفه‌ی بدن می‌رسند و از آنجاست که از بدن جدا می‌گردند (shed). در این صورت هر سلول برحسب سن ممکن است چندین نقش بازی نماید و علائمی که سرنوشت خاص هر سلول را معین می‌نماید باید در تمام مدت فعال باشند. حال اگر ستون بدنی به چند قسمت تقسیم شود هر قطعه باززایی لازمه را انجام خواهد داد و طی آن سر در انتهای اصلی راسی و پا در انتهای اصلی قاعده‌ای به‌وجود می‌آید و تقسیم سلولی برای این اتفاق لازم نیست و نتیجه‌ی نهایی پیدایش یک هیدر کوچک است. نظر به آن‌که هر سلول قابلیت تغییر (plasticity) وضع خویش را حفظ می‌نماید هر قطعه می‌تواند تشکیل مجدد موجود کوچکتر را باعث شود. تجربیات انجام شده در زمینه‌ی پیوند بخش‌های مختلفه‌ی

تکه‌هایی از بدن یک هیدر به بدن هیدری دیگر ظرفیت‌های مورفوژنتیک متفاوت در محور رأسی-قاعده ای هیدر را نشان می‌دهد. فی‌المثل بافت هیپوستوم چنانچه به تنه‌ی میزبان پیوند شود ایجاد محور ثانویه‌ای همراه با هیپوستوم را القاء می‌نماید و چنانچه بافت از بخش دیسک قاعده‌ای باشد محور ثانویه با یک دیسک قاعده‌ای را به‌وجود می‌آورد. پیوند همزمان بافت‌های هیپوستوم و دیسک قاعده‌ای در کنار یکدیگر القاء ناچیزی را باعث می‌شوند. این تجربیات وجود دو شیب را، یکی شیب فعال شدن سری (head activation gradient) که در ناحیه هیپوستوم تندتر است و دیگری شیب فعال شدن پائی (foot activation gradient) که در ناحیه دیسک قاعده‌ای تندتر است، مطرح می‌نماید. ادامه‌ی تجربیات فوق‌الذکر وجود پروتئین‌هایی را تحت عناوین سازمان‌دهنده و یا مهارکننده در دو انتهای رأسی و قاعده‌ای هیدر که در نتیجه‌ی عمل ژن‌های گوناگونی هستند به اثبات رسانده است.

باززایی جبرانی در کبد پستانداران

(Compensatory regeneration in the mammalian liver):

باززایی جبرانی - هنگامیکه سلول‌های تمایز یافته برای بازسازی ساختار و عملکرد یک اندام آسیب دیده، تقسیم می‌شوند- در کبد پستانداران و همچنین قلب گورخر ماهی به اثبات رسیده است.

امروزه روش بررسی برای باززایی کبد برداشت بخشی از آن (partial hepatectomy) می‌باشد. در این روش لُب‌های خاصی از کبد برداشته شده و بقیه‌ی لُب‌های کبدی دست‌نخورده باقی می‌مانند. اگرچه لُب برداشته شده رشد نمی کند لکن لُب‌های باقی‌مانده برای جبران بافت از دست رفته بزرگ می‌شوند تا میزان کبد باززایی شده برابر میزان کبد از دست رفته گردد.

کبد انسان با تکثیر بافت موجود باززایی شده و سلول‌ها بی‌آنکه کاملاً تمایز خویش را از دست دهند وارد چرخه‌ی تقسیم می‌گردند. بلاستمای باززایی به‌وجود نمی‌آید، و هر پنج نوع سلول کبدی : هپاتوسیت‌ها، سلول‌های مجرایی، سلول‌های ذخیره چربی (fat storing cells)، سلول‌های اندوتلیال و ماکروفاژهای کوپفر (*kupffer maecrophages*) شروع به تقسیم می‌کنند تا تعداد بیشتری از سلول‌های مشابه خود را تولید کنند.

این سلول‌ها هویت و توانائی خویش را حفظ کرده و کبد قادر به ساخت آنزیم‌های خاص کبدی لازم برای تنظیم گلوکز، بی اثر کردن سموم، سنتز صفرا، تولید آلبومین و سایرعملکردهای کبدی همچنان هست. برداشت و یا آسیب به کبد از طریق جریان خون حس می‌شود، چراکه بعضی از فاکتورهای اختصاصی کبد محو می‌شوند درحالی‌که سایر آنزیم‌ها مانند لیپوپلی ساکاریدهای روده (gut lipopolysacarieds) در بدن افزایش می‌یابند. لیپوپلی ساکاریدها دو نوع از سلول‌های غیرهپاتوسیتی (hepatocytes) را فعال نموده تا ترشح فاکتورهای پاراکرین نمایند و اجازه دهند تا هپاتوسیت‌ها مجدد به چرخه سلولی وارد گردند: سلول‌های کوپفر، اینترلوکین۶ *(interleukin 6)* و فاکتور نکروز کننده تومور–α یا TNFα *(tumor necrosis factor-α)* و سلول‌های ستاره‌ای *(stellate)* فاکتور رشد هپاتوسیت یا HGF *(hepatocyte growth factor)* وTGF-β .جراحت حاصل از برداشت قسمتی از کبد موجب فعال شدن متالوپروتئازها *(metalloproteinases)* شده و این آنزیم‌ها با هضم ماتریکس خارج سلولی سبب جداسازی هپاتوسیت‌ها از یکدیگر و تکثیر آن‌ها می‌شوند. مضافاً این آنزیم‌ها ممکن است HGF را جهت ایجاد شکل فعال آن بشکافد. فاکتورهای تولید شده به اتفاق اجازه می‌دهند تا هپاتوسیت‌ها با ممانعت از مرگ برنامه ریزی شده (apoptosis)، سرانجام فعال نمودن cyclin D,Eو سرکوب مهارکننده‌های cyclin مانند p27، تقسیم شوند.

هرچند هنوز مکانیسم مداخله کننده‌ی رشد معلوم نشده است، رشد کبد در اندازه‌ی مناسب متوقف می شود و به نظر می‌رسد TGF-β در تنظیم اندازه‌ی کبد مداخله داشته باشد.

لازم به ذکر است اگرهپاتوسیت‌ها ناتوان از باززایی کبد باشند در یک دوره‌ی زمانی خاص ، سلول‌های *oval* برای تشکیل هپاتوسیت‌های جدید تقسیم می‌شوند. سلول‌های *oval* جمعیت کوچکی از سلول‌های پیش‌سازند که می‌توانند هپاتوسیت‌ها و سلول‌های مجاری صفرا را تولید کنند. به نظر می‌رسد آن‌ها به صورت ذخیره نگه داشته می‌شوند و فقط پس از ناموفق بودن تلاش هپاتوسیت ها برای درمان کبد، وارد عمل می‌شوند.

در تحلیل وقایعی که در تحقیق جاری ملاحظه گردید به نظر می‌رسد باید بیان و عمل پدیده *epimorphosis* و فرایند حاکم در آن را علت باززایی شاخک بینایی دانست: از دست دادن تمایز سلولی در بخشی از سلول‌های تمایز یافته‌ی شاخک و قرارگرفتن هر گروه سلولی در موقعیتی خاص و از دست دادن عمل تخصصی خود (*dedifferentiation*) با بازماندن بیان و عمل ژن‌هایی که تا کنون در این سلول‌ها فعال بوده‌اند، تکثیر و تمایز مجدد (redifferentiation) توده‌ی سلول‌های حاصله با روشن شدن و بیان دسته ژن‌هایی دیگر.

Eakin و همکاران در مطالعه باززایی چشم در یک نوع حلزون (*Helix aspersa*) معتقد هستند که رشته‌های عصبی در القاء (induction) باززایی از اپیتلیوم تازه به وجود آمده " غلاف شاخکی خارجی" به ایجاد چشم نقش موثر و غیر قابل اغماضی دارد. آن‌ها با گره زدن غلاف شاخکی داخلی کمی پائین‌تر از محل قطع شاخک و در تنگنا قراردادن اعصاب بینایی و شاخکی باقی مانده ملاحظه کرده‌اند که باززایی چشم در حلزون رخ نمی‌دهد درحالیکه در حالت آزادگذاری بخش باقی‌مانده‌ی شاخک (stump) باززایی چشم و میکروویلوس‌های فتورسپتوری مشابه آنچه که در دوران جنینی رخ می‌دهد، انجام می‌گردد. آن‌ها این توانائی را به تولید احتمالی "عنصری" از نرون‌های باقی‌مانده و تاثیرآن بر روی اپیتلیوم رویی می‌دانند. این محققین با استفاده از میکروسکوپ الکترونی و دنبال نمودن مسیر ترمیم شاخک بینایی ملاحظه نمودند که اپیتلیوم نوپدید غلاف شاخکی خارجی که محل برش را می‌پوشاند ایجاد یک فرورفتگی (invagination) در بافت زیرین نموده که به تدریج به اعماق آن فرو می‌رود. سلول‌ها با ایجاد میکروویلوس‌های فراوان، تولید قطرات ترشحی،

که ماده‌ی سازنده‌ی عدسی می‌باشد و به داخل لومن (lumen) ترشح می‌شوند و همچنین دیگر اورگانل‌ها مسیری کاملاً مشابه با تکامل چشم در دوره‌ی جنینی را می‌پیمایند (۷). به‌وضوح در این نمونه نحوه باززایی از طریق پدیده اپی‌مورفوز می‌باشد.

Bever و همکاران باززایی چشم را در حلزون مرموز (*Ampullariide*) تحت بررسی قرار دادند و ملاحظه کردند که بعد از قطع شاخک سفالیک، چشم بطورکامل باززایی می‌شود. قطع شاخک ویژگی معمولی ساقه‌ی چشم را بکلی تغییر داده و مانند نمونه‌ی قبل پیدایش "*eyecup* " ازاپیتلیوم جلدی در محل قطع را به دنبال دارد. بنابر پیشنهاد آن‌ها در این نمونه نیز تمام عناصر سازنده‌ی چشم از سلول‌های اپیتلیالی به‌وجود می‌آیند (۱۱).

Tartakoskayaو همکاران هر چند عامل سن را در باززایی چشم در یک نرم‌تن شکم پا به‌نام *Achatina fulica* مورد مطالعه قرار دادند و ملاحظه کردند در گروه‌های پیرتر این حلزون احتمال باززایی شاخک چشمی کاهش می‌یابد و در آن‌هایی که این باززایی رخ می‌دهد چشم کوچک‌تر از چشم شاهد است لکن این محققین به نکته‌ای نیز پی‌بردند و آن، فعالیت حرکتی (motor activity) به محرک‌های بینایی در حلزون‌های جوان با چشم باززایی شده بود که معرف ایجاد ارتباط ما بین چشم و گانگلیون‌های مرکزی است و این مشاهده معرف ترمیم کامل اندام باززایی شده در دو وجه ساختمانی و فیزیولوژیکی است که در این حال باز پدیده‌ی اپیمورفوز را مطرح می‌نماید، بدین معنی که حتی با حذف بخش‌های تخصص یافته‌ی بافت‌های به‌جا مانده، که خود مسیر تمایز را طی کرده‌اند، با تغییر خصوصیات عملی و شکلی خود آن‌ها را مجدداً به وجود می‌آورند(۴).

M.V.Bobkova و دیگر همکاران نیز همین نتیجه‌گیری را_ یعنی برقراری خصوصیات مورفولوژیکی وعملکردی چشم باززایی شده، در حلزون *Achatina fulica* بابررسی‌های میکروسکوپی نوری والکترونی و همچنین ثبت الکتروفیزیولوژیکی (electrophysiological recordings)وآزمون‌های رفتاری(behavioural tests)_ به‌دست آوردند. این محققین شروع ترمیم را با ایجاد" *eyecup* " در محل زخم که توسط اپیتلیوم پوشیده‌شده است می‌دانند که پیدایش سلول‌های تمایز یافته مختلفه را به‌دنبال دارد (۳).

در تحقیق جاری به علت ناموفق بودن در تهیه برش‌های میکروسکوپی از حلزون‌های ده، بیست، و سی روز بعد از عمل (postoperation) این امکان میسر نشد تا مراحل اولیه‌ی شروع باززایی مشاهده و مطالعه گردد. ولکن بسیار محتمل است که مراحل باززایی در این نوع خاص از لیسک ها نیز مشابه مواردی باشد که در نمونه های قبل از آن ها ذکر شد. در حقیقت در مراحل اولیه بعد از عمل جراحی ، اپیتلیوم جدید که بر روی سطح زخمی تشکیل شده است در درون توده ای از سلول‌های یک شکل بافت بینابینی نفوذ می‌نماید. این مجموعه سلول‌ها هستند که یکی چشم و دیگری بافت اطراف کره چشم و از جمله سطوح خارجی شاخک را پایه‌گذاری می‌نمایند. در قبل نیز اشاره شد که به وضوح و کمتر از سی روز بعد از قطع شاخک حسی بینایی می‌توان با چشم غیرمسلح لکه‌ی تاریکی را که معرف تجمع بافت پیگمانته (شبکیه چشم) در زیر اپیتلیوم شفاف سطحی است دید. در ادامه‌ی رشد و نمو چشم، سلول‌های سازنده‌ی شبکیه با ساختار خاص سلولی خود تولید قطرات ترشحی محدود به غشاء (secretory droplets) می‌نمایند که در نهایت با تخلیه‌ی آن‌ها به داخل حفره‌ی درونی و اجتماع قطرات ترشحی با یکدیگر پیدایش عدسی را موجب می‌گردد. به‌نظر می‌رسد پیدایش مجدد سلول‌های عضلانی ، سلول‌های بینابینی پیگمانته که همراه با استطاله‌های بلندی هستند، سلول‌های بزرگ یقه‌ای که عمل ترشحی نیز به آن‌ها نسبت داده می‌شود، استطاله‌های سلول‌های عصبی واحتمالاً جسم سلولی برخی از آن‌ها وبالاخره ساختار اپیتلیومی رأس شاخک باززایی شده که نقش chemoreceptors و

mechanoreceptor و همچنین ترشحی به این قسمت نسبت می‌دهند همگی در نتیجه‌ی فرآیند فراتعیین (transdetermination) حاصل شوند و سلول‌های به‌جای مانده در ساقه‌ی شاخک مولد آن‌ها باشند(۱۲).

بخش پنجم

نتیجه گیری

"Conclusion"

لیسک تحت بررسی از جمله جانورانی است که قادر به باززایی بخش‌های از دست رفته‌ی خود در شاخک حسی بینایی است. این توانایی تا حد پیدایش مجدد ساختار بسیار پیچیده و مهمی چون چشم است که در آن تنوع سلولی و از جمله سلول‌های عصبی، ملاحظه می‌گردد. مشخص نیست که این قدرت منحصر به شاخک حسی فوق‌الاشاره است و یا دیگر قسمت‌های بدن این حیوان نیز قابلیت باززایی را دارا هستند که این موضوع می‌تواند درپژوهش‌های بعدی تحت بررسی قرار گیرد. به‌نظر می‌رسد در باززایی بخش برداشته شده، پدیده‌ی اپیمورفوسیز که در آن از دست دادن تمایز سلولی در آن دسته از سلول‌های به‌جای‌مانده در محل و سپس تمایز جدید آن‌ها به انواع سلول‌های مختلفه برقرار باشد نقش دارد. ساختارهای جدیداً به‌وجودآمده ممکن است کوچک‌تر و یا همراه با برخی ناهنجاری‌ها در مقایسه با نمونه‌های شاهد باشند لکن نحوه‌ی پیدایش آن‌ها مسیر پیدایش و رشد و نمو جنینی آن‌ها است (recapitulation). مشخص نیست چه عاملی موجب آغاز باززایی می‌گردد و حیوان چگونه از فقدان بخشی از بافت و یا اندام شاخک خود مطلع می شود. اما محتمل است فقدان برخی تولیدات بافت‌های برداشته شده و یا در جهت عکس، عرضه‌ی بعضی محرک‌ها از بافت‌های به‌جای مانده و یا واکنش ما بین این تولیدات محرک و موجبی برای آغاز باززایی و تکمیل بخش‌های از دست‌رفته باشند. شناخت این مکانیسم‌ها ممکن است راه گشای ترمیم اعضاء در جانوران عالی و در نهایت انسان باشد.

بجاست محققین شناسائی دقیقی از موقعیت لیسک تحت بررسی در طبقه‌بندی جانوری و در بین نرم‌تنان به‌عمل آورند تا وجوه مشترک و یا افتراق ما بین این جانور با دیگر لیسک‌ها در زمینه‌ی باززایی بیش از پیش معلوم گردد. مضافاً هرچند برخی مشاهدات دلالت بر عمل طبیعی حس بینایی در شاخک باززایی شده دارد ولکن اثبات این ادعا نیازمند تجربیات فیزیولوژیکی است.

Abstract

Slug is classified as a pulmonat, belonging to the phylum of mollusk. It has a pair of eye at the distal part of the cephalic tentacles. When one of the tentacles is amputated, the animal has the ability to regenerate it. The amputation seems to initiate some changes in the characteristics of tentacle cells. First an epithelium covers the wound on which an invagination seems to form. It ultimately leads to formation of eyecup. The trend of trans-determination in epithelial cells results in differentiation of the eye structure and the related components on the whole. The differentiation of retina and appearance of the new lens is observed about 30 days after the amputation. The regenerated tentacle and eye are morphologically and histologically identical to the original ones. However further investigations are required to be carried out as far as the physiology of the visual sence of such animals are concerned.

بخش ششم

مراجع

"References"

کتب و مقالات فارسی و انگلیسی

۱- بهادری، مسلم، فن آسیب شناسی و روش های رنگ آمیزی، انتشارات دانشگاه تهران، بهمن ماه ۱۳۶۹

۲- رجحان، محمد صادق ، اطلس بافت شناسی، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۶۸

3- Bobkova,M.V, O.S.Tartakovskaya, S.L.Borissenko, V.V.Zhukov and V.B.Meyer- ochow, 2004 Restoration of morphological and functional integrity in the regeneration eye of the giant land snail *Achatina fulica*. The Journal of Acta zoologica (Stockholm). V.184: pps 81-76.

4- Tartakovskaya,O.S, S.L.Borisenko , & V.V.Zhukov , 2003, Role of the Age Factor in Eye Regeneration in the Gastropod *Achatina fulica*. The Journal of Biology Bulletin.v.30 pp.228-235.

5- Desai,U.M & C.T Achuthankutty, 2000, Complete regeneration of ablated eyestalk in penaeid Prawn, Penaeus mondon. The Journal of Current science, v.79: pp.1602-1603

6- Rio-Tsonis,K & P.A.Tsonis .2003. Eye regeneration at the molecular age. The Journal of Developmental Dynamics .V.226: pp 211-224.

7- Eakin,R.M & M.M.Ferlatte.1973.Studies on Eye Regeneration in a Snail, *Helixaspersa* . The Journal of Experimental zoology.V 184: pp 81-96.

8- Fox.R, 2004, Invertebrate Anatomy Online, pp 3-17.

9- Gilbert,S.F, 2006, Developmental Biology, pp 573-585.

10- Pechenik,J.A ,2005, Biology of the invertebrates.pp 207-284.

11- Bever,M.N & R.B.Borgens.1988.Eye regeneration in the *Mystery Snail* .The Journal of Experimental zoology, 245: pp 33-12 .

12- Kataoka, S. 1976. Fine structure of the epidermis of the optic tentacle in a slug, *Limax flavus* The Journal of Tissue and cell. V. 8(1) :pp 74-60.

منابع اینترنتی

13- (http://en.wikipedia.org/wiki/Limax)

14- (http://en.wikipedia.org/wiki/Limax_flavus)

15- (http://en.wikipedia.org/wiki/Limax_maximus)

16- (http://en.wikipedia.org/wiki/Limax_cinereoniger)

17- (http://www.seaslugforum.net/factsheet.cfm?base=tamalina)

18-(http://www.animalbase.uni-goettingen.de/zooweb/servlet/animalbase home/species?id=2637)

19- (http://en.wikipedia.org/wiki/slug)

20- (http://www.hgic.umd.edu/-media/document=/hg92-1001.pdf)

21- (http://www sciencedaily.com/releases/2008/03/080318113517.htm)