

« خلاصه »

به منظور مطالعه ساختار هیستولوژیک و مورفولوژیک غده هارد در موش خانگی، حیوانات در سنین مختلف کشته شدند و غدد هارد در چشم های چپ و راست آنها جدا گردید. غده هارد در غده نعل اسبی شکل و لبوله ای است که در ناحیه خلفی کره چشم قرار دارد. رنگ غده مذکور در سرم فیزیولوژی، خاکستری متمایل به سفید و یا خاکستری متمایل به صورتی مشاهده گردید. پس از توزین غدد مذکور همچنین توزین حیوان، نسبت های وزن غده به وزن بدن اندازه گیری شدند. میانگین نسبت وزن غده به وزن بدن ۱:۲۵۰۰ تخمین زده شد.

همچنین هیستولوژی غده هارد با استفاده از تکنیک قالب گیری با پارافین و متد رنگآمیزی هماتوکسیلین-ئوزین در زیر میکروسکوپ نوری مطالعه شد. غدد هارد در غدد آلوئولی حاوی سلول های اپیتلیالی استوانه ای هستند که هسته های گرد در قاعده خود دارند. ماده اصلی مترشح، لیپید است و واکوئل های خالی فراوان در سیتوپلاسم سلول ها نماینده حضور لیپیدها در سلولها است که طی فرایند رنگ آمیزی، تخلیه و شسته شده اند. با توجه به اندازه واکوئل های لیپیدی، ۳ نوع سلول اپیتلیالی ترشحی در غده هارد در موش خانگی مشاهده شد. فعالیت ترشحی رأسی سلولها همچنین حضور ترشحات در مجرای آلوئولی حاکی از مکانیسم ترشحی اگزوکرین می باشد. این فعالیت ترشحی مداوم است اما دچار نوساناتی می شود که از تغییر در اندازه آلوئولها و لومن ها، تغییر شکل سلولها و حضور بقایای سلولی در مجرای آلوئولی می توان به آن پی برد. همچنین حضور عروق خونی در اطراف آلوئولها ممکن است بیانگر مکانیسم ترشحی اندوکرین نیز باشد. عوامل زیربط در پیدایش احتمالی این نوسانات و همچنین مشخص نمودن ترشح احتمالی اندوکرینی این غده، موکول به بررسی و تحقیقات بیشتر است. در ارتباط با نقش احتمالی ترشحات

فرومونی در ایجاد رابطه مابین مادر و زاده ها واکنش زاده ها نسبت به غده هاردر له شده مادر بررسی گردید. مشاهده حرکات جستجوکننده سر زاده ها در این ارتباط، میتواند بیانگر واکنشهای حسی- شیمیایی سیستمهای بویایی(عمدتاً ومرونازال) نسبت به غده هاردر مادر و نقش احتمالی آن در ایجاد رابطه بین مادر و زاده ها باشد.

Abstract

In order to study morphology and histology of the Harderian gland in house mouse, the animals were killed in different days of their life and the Harderian glands of the left and the right eyes were dissected.

Harderian glands are horse - shoe shaped and lobulated . It is located in the posterior region of the eye ball. Its color as observed in saline solution is white - grey or pinkish – grey.

The Harderian glands and the animals were weighed at every occasion of killing to find out the ratio. The average ratio of the Harderian gland to body weight was approximately 1:2500.

Also using paraffin embedding technique and the staining method of Hematoxylin and Eosin, the histology of the Harderian gland was studied under light microscope. Harderian glands are alveolar glands with columnar cells having round nuclei at the base. The main secretory product of the gland is lipid inside the vacuoles that have been discharged and washed away during the process of staining. The presence of the empty vacuoles supports the mentioned idea. Considering the size of the lipid vacuoles, 3 types of secretory epithelial cells were observed in house mouse Harderian gland . Apical secretory activity , in addition to the presence of secretion in alveolar ducts (lumens), represent exocrine mechanism. Although this activity is continual, it undergoes fluctuations. The signs to these fluctuations could be observed by changing the size of alveolus and lumens, transformation of cells and presence of cell debris in alveolar ducts. Also presence of blood vessels around alveoles may indicate endocrine mechanism. Factors involved in probable fluctuations on the one hand, and the idea of endocrine secretions , on the other hand should be determined in future studies. Regarding the probable role of pheromonal secretion in existing relationship between mother and the littermates, the reaction of littermates to the crushed Harderian glands of their mother was studied. The seeking movement of the head of the littermates may indicate chemosensory reactions of the olfactory systems (mainly vomeronasal system) to

the crushed Harderian glands of the mother . It may also indicate to a probable role in initiating communication between mother and littermates.

مقدمه (Introduction)

دستگاه اشکی (lacrimal apparatus) در جوندگان (rodents) مرکب است از غدد حلقه ای (orbital gland) و مجرای بینی- اشکی یا nasolacrimal duct (Rehorek *et al.*, 2005).

در موش خانگی (mouse) غدد دستگاه اشکی مشتمل بر دو قسمتند: یکی داخل حلقه ای و دیگری خارج حلقه ای. اولی پشت کره چشم (eye ball) قرار گرفته است در حالی که دومی نزدیک زاویه فکی و در ارتباط نزدیک با پاروتید میباشد (Robert *et al.*, 1923).

غدد داخل حلقه ای شامل غدد اشکی داخل حلقه ای (intraorbital lacrimal gland) و غدد هارد (Harder's glands) هستند (Rehorek *et al.*, 2005; Robert *et al.*, 1923).

غدد هارد غدد فرعی اشکی هستند (Nemet *et al.*, 2007; Buzzell *et al.*, 2005; Nicola *et al.*, 2005, reviewed by: *al.*, 1995). آنها در حلقه بیشتر مهره داران وجود دارند (Tomás- Zapico *et al.*, 2003; Chieffi *et al.*, 2000; Buzzell *et al.*, 1995; Pradidarcheep *et al.*, 2003; Rehorek, 1997; Varriale and Esposito, 2005)؛ گرچه در پستانداران عالی تر (higher primates) وجود ندارند (Buzzell *et al.*, 1995; Pradidarcheep *et al.*, 2003). این غدد در جوندگان بزرگترین ساختار حلقه ای هستند (Varriale & Esposito, 2005; Buzzell *et al.*, 1995).

غدد هارد ابتدا در گوزن داما داما (*Dama dama*) یافت شدند (Shanas *et al.*, 1998; Rehorek *et al.*, 2005; reviewed by: Nicola *et al.*, 2005; Pradidarcheep *et al.*, 2003; Buzzell, 1996).

از زمان کشف غدد هارد در مورد جنبه های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی، مورفولوژی و تکاملی آن، مطالب زیادی از مطالعه بسیاری از گونه ها بدست آمده است. اکثریت قابل ملاحظه ای از این مطالعات، بر روی جوندگان انجام گرفته است (Rehorek, 1997). اما علی رغم گذشت بیش از سه قرن مطالعه، بسیاری از خصوصیات این

غده، مثل تعریف و توصیف دقیق آن و عملکرد آن، هنوز به نحو رضایتبخش مشخص نشده است (Buzzell, 1996; Rehorek *et al.*, 2000).

لکن با کمی شواهد در شناخت عمل و ساختار غده، اندازه آن و حضورش در بین گونه های مختلف جانوران مهره دار حاکی از نقش مهم بالقوه اش می باشد (Raucci *et al.*, 2005).

غدد هاردر پستانداران لیپید ترشح می کنند. مطالعاتی بر روی بیوشیمی این لیپید در تعدادی از گونه ها انجام شده است. با این وجود، این مطالعات منجر به درک بیشتر این غده یا درک علت ترشحات لیپیدی در هیچ یک از گونه های پستانداران نگردیده است (Buzzell *et al.*, 1995). مشکل میتوان یک نقش مخصوص را در پستانداران به این غده نسبت داد و اهمیت فیزیولوژیکی آن دارای ابهام است (Satoh *et al.*, 1996). تحقیق بر روی غدد هاردر جانوران غیر پستاندار محدود بوده است (Buzzell, 1996).

ابهامات در مورد ساختار و عملکرد این غده موجب شد تا بررسی های جدیدی در مورد ساختار و عملکرد آن در موش خانگی انجام شود که مشروحاً در این رساله آورده شده است.

بخش اول
بررسی مقالات و کتب
(Review of literatures)

الف- تاریخچه (History)

نخستین بار در سال ۱۶۹۴ میلادی، هنگامی که جوهان جاکوب هارددر (۱۶۵۶-۱۷۱۱) پزشک و طبیعی دان سویسی در حال مطالعه گوزن قرمز داما ولگاریس (*Dama vulgaris*) بود غدد هارددر کشف شد. او این غدد را از نوع غدد اشکی تلقی کرد و آن را *glandula nova lachrymalis* نامید. ترشحات این غده سطح چشم را در گوزن مرطوب مینماید. بعد از آن، غدد مذکور در دوزیستان، خزندگان، پرندگان و پستاندارانی که پلک سوم دارند نیز یافت شدند. در سال ۱۸۷۷ میلادی، ونت (Wendt) آنها را *die Harder's sche Druse* نامید (Buzzell, 1996). پس از آن به اسامی متعددی چون *deep nictitating membrane* , *Harder's gland* , *cherry eye* و *nictitans gland* و واژه های پزشکی *glandula palpebrae tertiae superficialis or profunda* نامیده شد (Buzzell, 1996; Praag, 2004). امروزه محققان متفقاً آن را *Harderian glands* یا *glands of Harder* مینامند (Buzzell, 1996).

غدد هارددر در طی ۲۰۰ سال بعد از کشفشان در سطح وسیع مطالعه شده اند (Sakai, 1981). در طی اواخر قرن نوزده و اوایل قرن بیستم میلادی، غدد هارددر در بعضی از گروه های پستانداران (mammals) و خزندگان (reptiles) تشریح شدند (Buzzell, 1996). این غدد در حلقه همه مهره داران به استثنای ماهی ها، پستانداران عالی (primates) و بعضی از گونه های دیگر وجود دارند (Buzzell et al., 1995, 1996; Varriale and Chieffi, 1997). در جانوران خشکی زی، بخصوص آنهایی که در چشم واجد پرده نیکتیتنز پلک سوم (*third eyelid nictitating membrane*) هستند، غدد هارددر رشد قابل توجهی کرده اند (Ferrara et al., 2004; Praag, 2003; Pradidarcheep et al., 2003). در بین خزندگان، مارها (snakes) و جکوها (geckoes) با اینکه فاقد پرده نیکتیتنز (*nictitans membrane*) و غدد اشکی هستند، اما غدد هارددر را دارند. در یک نوع مار از تیره جکونیده (*gekkonidae*)، این غدد تنها غدد داخل حلقه ای هستند و اگر چه رشد خوبی داشته اند، اما مانند غدد حلقه ای بیشتر

خزندگان، توجه کمی را به خود جلب کرده اند (Chieffi Baccari *et al.*, 2000, 2004). به طور کلی غدد هاردنر خزندگان و دوزیستان، غدد توسعه یافته ای می باشند. این غدد در قورباغه های بی دم وجود دارند اما در دوزیستان دمدار آبی و در مرحله لاروی قورباغه های بی دم وجود ندارند. همچنین در کروکودیل ها (crocodiles) و نهنگها (cetaceans) وجود دارند (Payne, 1994).

غدد هاردنر در بسیاری از پستانداران وجود دارند. موش کور زیرزمینی غدد هاردنر بزرگ دارد (Shanas *et al.*, 1998). گفته می شود غدد هاردنر در برخی از انواع پستانداران مانند خفاش ها، گاو و اسب و گوشتخواران خشکی زی و پستانداران عالی تر (higher primates) ملاحظه نمی شوند (Payne, 1994).

خیلی پیش نوشته ها حاکی از آن بود که در حدقه چشم انسان غدد هاردنر وجود ندارند، اما در ساختارهای جنینی، بین هفته های ۱۱ و ۳۰ در فتوس (fetus) شواهدی از ظهور غدد هاردنر دیده شده است (Buzzell, 1996; Loewenthal, 1910). حتی برخی از نوشته ها حاکی از بقای این غدد در بزرگسالی می باشند (Giacomini, 1887; Fleischer, 1907)؛ گرچه مطالعات پیشرفته در این مورد انجام نشده است (Payne, 1994). همچنین بر طبق گفته کندي (Kennedy, 1970) بنظر می رسد در طی ۸۷ سال گذشته، کاری تحقیقی در پاسخ به سوال غده هاردنر رشد نکرده انسانی (human Harderian rudiment) انجام نشده باشد.

بیشتر مطالعاتی که در مورد غدد هاردنر پستانداران صورت گرفته است در راسته های جونندگان (مانند موش خانگی، رت (rat)، هامستر (hamster) و لاگومورف ها (lagomorphs) مانند خرگوش انجام شده است. در این رابطه در گروه های دیگر پستانداران اطلاعات بسیار کمی بدست آمده است (Buzzell, 1996).

ب - آناتومي (gross anatomy of the Harderian gland)

غدد هاردر در اکثر مهره داران خشكي زي، درون حذقه و در قسمت مياني- خلفي حفره اربیتال قرار دارند (Varriale and Esposito, 2005; Villalpando *et al.*, 2005; Pradidarcheep *et al.*, 2003; Shanas *et al.*, 1998).

A. دوزيستان و خزندگان (*amphibia and reptiles*)

در دوزيستان بي دم فقط يك غده حذقه اي وجود دارد كه پيشتر، محققين آن را غده اشكي توصيف کرده اند اما اخيراً نويسندگان آن را غده هاردر تلقي کرده اند (Chieffi *et al.*, 1992). رشد و تکامل اين غده در گونه اي از وزغ (*Bufo bufo*)، قورباغه ژاپونيكا (*Rana japonica*) و يك نوع دوزيست گوشتخوار آفريقايي (*Xenopus laevis*) توسط شيراما (۱۹۸۲) مطالعه گرديده است.

در جاييكه پرده نيكتيتنز وجود داشته باشد، هم پرده و هم غده در طي آخرين مراحل لاروي و به طور همزمان رشد مي کنند گرچه زمان آن در گونه هاي مختلف متفاوت است (Payne, 1994).

زنوپوس لويس (*Xenopus laevis*) پرده نيكتيتنز ندارد اما غده هاردر را دارا مي باشد. در وزغ سبز ويريديس (*Bufo viridis*)، (Minucci *et al.*, 1989) و يك نوع قورباغه خوردني (*Rana esculenta*)، (di Matteo *et al.*, 1989)، غدد هاردر داراي ساختار بيضي شكل و به شدت عروقي هستند، ۲-۳ ميلي متر طول دارند و در قسمت مياني حذقه قرار گرفته اند و مجري دفعي واحدي دارند كه بداخل كيسه ملتحمه در عمق پرده نيكتيتنز باز مي شود. غدد حذقه اي خزندگان در بسياري از گونه هاي مارمولك (*lizard*)، مار، كروكوديل، و لاک پشت (*turtle*) تشریح شده است (Bellairs & Boyd, 1947; Smith & Bellairs, 1947; Cowan, 1973; Saint-Girons, 1985, 1988). همه گونه ها پرده نيكتيتنز ندارند (مانند مار) و در بسياري از اشكال (مارمولك ها و برخي از مارها)، پلك ها بهم چسبيده اند تا پوسته نازك شفاف و غير متحرك روي چشم (*brille*) را بوجود آورند. مراحل ميانه بين از دست دادن كامل پلك و تشكيل كامل

این پوسته وجود دارد (Bellairs & Boyd, 1947). در مار که فاقد غده اشکی است، آناتومی غدد هارد در توسط اسمیت و بلیرز (۱۹۴۷) و نیز بلیرز و بوید (۱۹۴۷) مرور گردیده است (Payne, 1994).

این غده نسبتاً بزرگ، چشم و عصب بینایی را به طور کامل احاطه کرده است. در همه موارد، جسم اصلی غده در قسمت خلف حلقه قرار گرفته است. سپس غده در جهت رو به جلو از ناحیه تحتانی استخوان پشت حلقه ای (post-orbital bone) و ناحیه تحتانی عصب اپتیک (optic nerve) می‌گذرد تا به داخل مجرای اشکی باز شود (Payne, 1994). غدد هارد در مارهای بدوی (primitive snakes)، توسط چند مجرای کوچک به داخل فضای ملتحمه (subbrillar space) باز می‌گردند (Chieffi Baccari et al., 2000) و یک مجرای اصلی به تنهایی، مستقیماً به مجرای اشکی وارد می‌شود. آرایش مشابهی در مارمولک وجود دارد. غدد هارد در مار دریایی (sea snake) وجود دارد، اما به نظر می‌رسد در بیشتر اشکال دریایی و اقیانوسی، کوچک هستند (Saint-Girons, 1989).

در لاک پشت ها (turtles, tortoises, etc.) بر سر شناسایی غدد حلقه ای به عنوان غدد اشکی خلفی یا غدد هارد، توافق وجود ندارد. لاک پشت های تیره کلونیا (chelonina) مجرای اشکی ندارند و ترشحات هارد/اشکی یا درون کیسه ملتحمه می‌ماند و یا از آن بیرون می‌ریزد (Payne, 1994). این غده در تیره جکونیده بخوبی تکامل یافته است، حدود ۲ میلی متر طول دارد و در قسمت میانی حلقه کشیده شده است (Chieffi Baccari et al., 2000).

B. پرندگان (Birds)

غده هارد در در یک گونه گنجشک (*Passer domesticus*) توصیف و تشریح شده است (Slonaker, 1918). غدد هارد در این گونه دارای شکل نامنظم است و بزرگتر از غدد اشکی می‌باشد. غدد هارد بیشتر سطح خلفی-میانی چشم را از ناحیه عصب بینایی تا جایی که مجرای باریک غده از زیر اتصال نزدیک عضلات مورب تحتانی و فوقانی

(inf. & sup. oblique muscles) میگذرد، می پوشانند. بر طبق گفته برنز (۱۹۹۲)، مورفولوژی بیش از هشتاد غده هارد در پرندگان، متفاوت از هم نبوده است (Payne, 1994).

C. پستانداران (mammals)

این غدد در یک گونه سنجاب بدوی (*Tupaia glis*) دارای سطوح مقعر و محدب می باشند. بخش مقعر آن در تماس با کره چشم و عضلات است؛ در حالیکه بخش محدبش به استخوان های حدقه ای متصل است. این غده که مخروطی شکل و به طول یک سانتی متر است در میان خلفی-تحتانی (medioposterioinferior) کره چشم و درون اربیت قرار گرفته است (Pradidarcheep et al., 2003).

غده هارد در خرگوش از دو لوب تشکیل شده است: یک لوب پشتی سفید رنگ و یک لوب شکمی صورتی رنگ. لوب سفید بر عکس لوب صورتی کوچک است. با وجود اختلاف رنگ، دو لوب از نظر هیستولوژی از هم متفاوت نیستند (Praag, 2004).

در جوندگان، غده هارد از دو بخش تشکیل شده است: یک لوب کوچکتر که بخش بالایی حفره چشمی (eye socket) را اشغال می کند و یک لوب بزرگتر پایینی که کف حفره بینایی را اشغال می کند (Chieffi Baccari et al., 2004). این غدد در هامستر سوریه ای (syrian hamster)، از لوب های کوچک و بزرگ تشکیل می شود. در رت، غدد هارد دارای شکل بسیار نامنظمی هستند و بیشتر سطح خلفی کره چشم را می پوشانند؛ همچنین در قسمت میانی در فضایی بین کره چشم و حاشیه حدقه قرار می گیرند. جسم غده در قسمت وسط یکنواخت است اما در قسمت جانبی توسط ۳ شکاف تقسیم می شود که از میان آنها عصب بینایی و چند عضله خارج چشمی می گذرد. غده هارد در رت بسیار بزرگ است. غیر از ارتباط غده با عضلات خارج چشمی، سطح عمیق غده نیز در قسمت خلفی، نزدیک به عضله گیجگاهی (temporalis muscle) است. مجرای غده در پایه پرده نیکتیتنز به داخل کیسه ملتحمه باز

می شود. غده هارد در رت به علت شکل نامنظمی که دارد تا حدی غیر عادی است و با بسیاری از ساختارهای دیگر درون حلقه بهم پیوستگی دارد. بیشتر غدد هارد تشریح شده در پستانداران دارای ظاهر یکنواخت تر هستند، اغلب نعل اسبی شکلند و یک لوب کوچک در بالا و یک لوب بزرگ در پایین دارند (Payne, 1994). این غدد در موش مکزیک کوه آتشفشان (*Neotomodon alastoni alastoni*) دارای ساختار دو لوبه (bilobulate) است، سفید رنگ است و توسط کپسولی از بافت همبند احاطه می شود (Villapando et al., 2005).

ج- بافت شناسی غده هارد (histological structure of the Harderian gland)

غدد هارد در گونه های مختلف، دارای ساختارهای هیستولوژیکی متنوع هستند.

در جکو (*Tarentola mauritanica*) غدد هارد غدد آسینوسی هستند. در جوندگان غدد هارد ساختمانی توبولی-آلوئولی دارند که به خصوص در هامستر سوریه ای (*Mesocricetus auratus*) بخوبی تکامل یافته اند. همچنین در موش مکزیک کوه آتشفشان، غده هارد یک سازمان یافتگی توبولی-آلوئولی را نشان می دهند (Payne, 1994).

دوزیستان و خزندگان (amphibia and reptiles)

در مارمولک (*Podarcis sicula*)، غده هارد به ۳ ناحیه تقسیم می شود که از لحاظ خصوصیات رنگ آمیزی و فوق ساختاری (ultrastructural) متفاوتند. در قورباغه خوردنی، غدد هارد فقط یک نوع سلول غده ای از نوع اپیتلیالی دارند، اما این سلول تنوع فصلی بزرگی نشان می دهد. این مورد در وزغ سبز (*Bufo viridis*) نیز صادق است. در فصل تابستان، سلول های وزغ ماده دارای یک جزء ترشحي اضافه به شکل واکوئل های لیپیدی هستند که در قسمت قاعده ای هسته قرار می گیرند. واکوئل های لیپیدی در غدد نر وجود ندارند و محققین احتمال می دهند که واکوئل ها ممکن است نقش فرومونی داشته باشند. Chieffi-Baccari و همکارانش در ۱۹۹۲

میلا دی در یک نوع لاک پشت آبی (*Pseudemys scripta*) ۴ نوع سلول را کشف کرده اند. ۳ تای آنها سلول های ترشحي هستند که به وسیله نوع گرانول ترشحي که دارند متمایز می شوند. نوع چهارم سلول های ترشح کننده نمک هستند. لاک پشت یونانی (*Testudo graeca*) نیز دارای یک سلول ترشح کننده نمک علاوه بر تنها یک نوع سلول ترشحي اش میباشد. در جکو آسینوس ها فقط دارای یک نوع سلول هستند.

پرندگان (*birds*)

ساختار غدد هاردر پرندگان در مرغ و بوقلمون شرح داده شده است. مطالعات میکروسکوپ نوری در دامنه وسیعی از گونه ها مانند کلاغ سیاه (*rook*)، پنگوئن (*rock-hopper penguin*) و اردک (*duck*) انجام شده است. بسیاری از این مطالعات بر روی مورفولوژی سلول های بینا بینی، خصوص سلول های پلاسمایی متمرکز گردیده اند، چرا که غدد هاردر پرندگان برای مطالعات ایمنولوژیکی وسیعاً مورد استفاده قرار می گیرند. در بوقلمون اپیتلیوم غدد هاردر در همه سنین یکسان است و از سلول های اپیتلیالی استوانه ای تشکیل می شود که دارای ۲ تجمع کاملاً متمایز وزیکولی هستند: (۱) یک گروه قاعده ای که دارای ماده لیپیدی هستند. (۲) یک گروه رأسی که وزیکولهایشان محدود به غشاست و با ماده فیبریلی خشن پر شده است. گروه رأسی توسط مکانیسم اگزوسیتوز خارج می شود اما شاهی بر خروج گروه قاعده ای وجود ندارد. هسته گرد/بیضی بین این دو گروه وزیکول قرار گرفته است.

ساختارهای مشابه در اپیتلیوم مجرای غدد هاردر و اشکی هم در مرغ و هم در بوقلمون وجود دارد. در مرغ غدد هاردر دارای ۴ نوع سلول هستند. این انواع بر حسب میزان تکامل سیستم گلژی (که بیشتر در سلول های نوع II توسعه یافته است)، لاملاهای رتیکولار شبکه آندوپلاسمی خشن (در سلول های نوع III) یا گرانول های ترشحي (در سلول های نوع IV) از هم متفاوتند. همچنانکه در مورد وجوه دیگر این غده ابهام وجود دارد مشخص نیست که آیا این

سلول ها انواع سلول هاي متمايز از همد يا نشاندهنده مراحل مختلف يك سيكل ترشحي مي باشند.

پستانداران (mammals)

غدد هاردر پستانداران داراي انواع متفاوتي از سلولهاي اپيتليالي و ارگانل هاي سلولي است ولكن در همه آنها داراي خصوصيت مشترك ترشح ليپيد مي باشد. ليپيدي كه در سلول هاي اپيتليالي تشكيل مي شود درون واكوئل هايي با اندازه هاي مختلف قرار دارد و توسط فرايند اگزوسيتوز به بيرون مي ريزد.

غدد هاردر در سنجاب درختي (*Tupaia glis*) داراي فقط يك نوع سلول آسينوسي است. غده هاردر در موش مكزيكي كوه آتشفشان نيز منحصرأ از يك نوع سلول ترشحي تشكيل شده است. درون اين غدد هيچ سيستمي از مجاري منشعب ديده نشده است. در موش استراليائي (*Pseudomys australis*) اشكال مختلفي از سلول هاي ترشحي وجود دارند. در گونه اي از جوندگان، در *gerbil* (*Meriones meridianus*)، اپيتليوم غده اي منحصرأ از يك نوع سلول تشكيل شده است. در *wistar rat*، دو نوع سلول اپيتليالي غده اي (سلول هاي تيپ I و II يا A و B) وجود دارند كه حدود ۷۵% اپيتليوم استوانه اي را تشكيل مي دهند. سلول هاي نوع II كمتر از نوع I هستند. چندين گونه ديگر هم هستند كه دو نوع سلول دارند مانند موش خانگي كه دو نوع A و B واكوئل هاي يك اندازه دارند اما محصولات ترشحي متفاوتي درون آنها وجود دارد. در موش استراليائي، نوع سومي هم تشخيص داده شده است كه خصوصيت عمده آن داشتن هسته مركزي بزرگ است. ۱۱% تا ۲۹% از سلول هاي اپيتليالي از اين نوع هستند.

د- توليدات ترشحي غده هاردر (gland products)

غدد هاردر داراي انواع ترشحات هستند. اين غده در دوزيستاني مثل *bull frog* و *leopard frog* از نظر هيستوشيميائي، موكوسي است (Paule, 1957)، گر چه توليدات ترشحي ليپيدي هم در برخي از

گونه ها، مثل وزغ سبز ویریدیس وجود دارد (Chieffi et al., 1992). تجزیه هیستوشیمیایی غدد هارد در خزندگان نشان داده است که این غدد یا ترشحات موکوسی تولید می کنند یا سרוزی و یا ترکیبی از هر دو.

غده هارد در نوعی خزنده (collard lizard) ترشح کننده موکوس است (Paule, 1957) و در مجموع، در مارمولک مرکب از بخشهای سروزی و موکوسی است (Schwartz-Karsten, 1937; Cowan, 1973)، در انواعی از مارها (garter & water snakes)، سروموکوئیدی است (Paule, 1957) و در مارمولکها و کروکودیلها یک ترشح روغنی نیز تولید می کند (Walls, 1942).

غده هارد در گونه ای از مارمولکها (*Podarcis sicula*) از لحاظ هیستوشیمیایی، ۳ ناحیه دارد: موکوس قدامی، سروزخلفی و بینابینی. ناحیه موکوئیدی را به عنوان غده اشکی قدامی توصیف کرده اند. در مار (*Pseudonaja textiles*)، انواع سلولی سروزی و موکوسی در دو ناحیه متمایز آناتومیکی قرار دارند. آنالیز هیستوشیمیایی غده هارد در جک، وجود لیپید و پروتئین را در سلول های ترشحي آن آشکار کرده است. گرانول های لیپیدی در غدد هارد هیچ خزنده دیگری یافت نشده است، اگر چه وجود آن ها در دوزیستان، پرندگان و پستانداران به اثبات رسیده است (Rehorek, 1997). در پرندگان ترشحات عمدتاً موکوسی می باشد (Slonaker, 1918; Paule, 1957) اما مقداری ترشح لیپیدی هم در سلول های نوع I پرندگان وجود دارد (Burns, 1992).

غدد هارد پستانداران ۳ نوع ترشح دارد: لیپیدها، محصولات ایندولیک و پورفیرین ها. پورفیرین، ماده مترشح از غدد هارد برخی از جوندگان مثل رت است. غلظت پورفیرین در غدد هارد جوندگان طبق گونه و جنس متغیر است و در ماده ها بالاتر از نرها است. این اختلاف غلظت بین نر و ماده در رت به اندازه گونه های دیگر مانند هامستر سوریه ای و plains mouse زیاد نیست (Djeridane, 1996). غدد هارد در رت، لیپیدها را نیز سنتز می کند

و به داخل کیسه ملتحمه می ریزد، همچنین پورفیرین ها را سنتز می کند که به صورت تجمع تدریجی ماده جامد در داخل لومن ملاحظه می شود. علاوه بر این، این غدد دارای سروتونین، ملاتونین و چند هیدروکسی و متوکسی ایندول دیگر می باشند (Chieffi Baccari *et al.*, 2004). در غدد هاردر موش آتشفشان مکزیکی، حداقل ۲ نوع مولکول تولید می شود: پروتئین و لیپید (Villalpando *et al.*, 2005).

در بیشتر گونه های مطالعه شده، لیپید تقریباً ۲۰٪ وزن تر و حدود ۳۵٪ وزن خشک غده را تشکیل می دهد. هر واکوئل بالغ شامل یک قطره لیپیدی است که توسط ساختار غشایی ساده احاطه می شود (Chieffi Baccari *et al.*, 2004). غدد هاردر در موش کور (mole rat) دارای اجزای لیپیدی بیشتری نسبت به جوندگان دیگر می باشد. بیش از ۵۰٪ وزن تر غده در این موش از لیپیدها تشکیل شده است (Shanas *et al.*, 1998). محصول دیگری که توسط غدد هاردر ترشح می شود، مشتقات ایندولیک است. مدارک ایمونوسیتوشیمی ملاتونین در غده هاردر نشان می دهد که این ماده در این غده نیز سنتز می شود.

مکانیسم های ترشح لیپید (mechanisms of lipid secretions)

در جکو نوع ترشحات اساساً مروکرینی است. اگر چه ترشح از نوع آپوکرین هم گاهی مشاهده می شود. غالباً لومن های آسینوسی غدد از مواد مختلف مثل بقایای سلولی و بعضی از قطعات سیتوپلاسمی پر شده اند (Chieffi Baccari *et al.*, 2000).

غدد هاردر پستانداران غدد اگزو کرینی هستند که مواد لیپیدی را بر روی سطح خارجی قرنیه تخلیه می کنند. در سنجاب درختی، محتوای واکوئل های لیپیدی درون سلول های آسینوسی توسط فرایند اگزوسیتوز از بخش های رأسی ترشح می شود و این نشان دهنده عمل اگزوکرینی غدد مذکور است. گفتنی است که واکوئل هادر اندازه های متفاوت هستند (Pradidarcheep *et al.*, 2003).

در سلول های اپیتلیالی موش مکزیکی آتشفشان فرایند اگزوسیتوز دیده می شود. در ساختار ظریف این غده واکوئل های خالی در اندازه های متفاوت دیده می شود که حضور آن ها نشان دهنده این است که محتوای واکوئلی بوسیله فرایند اگزوسیتوز ترشح می شود (Villalpando *et al.*, 2005). در موش خانگی نژاد آلبینو، ترشح اپیتلیوم غده ای مداوم است (reviewed by : Nicola *et al.*, 2005).

Djeridane (۱۹۹۶) اظهار داشت که در بسیاری از گونه های مطالعه شده در جوندگان، فرایند ترشحي ضرورتاً اگزوسیتوز است گرچه ترشح هولوکراین هم ممکن است اتفاق بیفتد چرا که بقایای سیتوپلاسمی و هسته ای در لومن آسینوس ها مشاهده شده اند.

در آرمادیلو (armadillo) غدد هاردر، مشابه گونه های دیگر پستانداران، لیپید فراوان ترشح می کند. غدد هاردر آرمادیلو غدد اگزوکراین هستند و از طریق مکانیسم مروکراین، لیپیدها را ترشح می کنند (Cavagnari *et al.*, 2001).

ه - دو شکلی جنسی (sexual dimorphism)

در جکو هیچ اختلاف هیستولوژیکی بین غدد هاردر دو جنس مشاهده نشد. در سنجاب درختی غدد هاردر نر و ماده از هم متفاوت نیستند و در هر دو جنس تنها دارای یک نوع سلول ترشحي می باشند.

اخیراً نشان داده شده است که در موش کور زیر زمینی غدد هاردر دارای دو شکلی جنسی هستند و اجزای لیپیدی غدد نر و ماده به طور قابل توجهی متفاوتند. در هامستر سیرایی (*Phodopus sungorus*)، غدد هاردر، هر دو نوع سلول های I و II را در هر دو جنس دارند و تفاوت های مرتبط با جنس نشان ندادند. همچنین اختگی بر روی ساختار غده یا نسبت قطرات لیپیدی نوع I و II تاثیری نداشتند. در هامستر های سوریه ای غدد هاردر دو شکلی جنسی کاملاً واضحی را نشان می دهند. هامستر سوریه ای (*Mesocricetus auratus*) و دلفین سیاه دریایی (*Tursiops truncatus*) تنها دو گونه ای هستند که غدد هاردر

آن ها دو شکلي جنسي نشان مي دهند؛ در هر دو مورد غده نر از دو نوع سلول ترشحي تشكيل شده (نوع I شبیه سلول هاي غدد هاردر ماده بوده و نوع II حاوي واکوئل هاي ليپيدي بزرگ مي باشد) در حالیکه غده ماده از يك نوع سلول ترشحي حاوي قطرات كوچك چربي تشكيل شده است. در ميان جوندگان تنها هامستر سوريه اي است كه تفاوت هاي مرتبط با جنس بارزي در سلول هاي اپيتليالي غدد هاردر آن ملاحظه شده است. در اين گونه برداشت بيضه منجر به افزايش قابل توجه سلول هاي نوع I شد. در مقابل، تزريق تستوسترون به ماده ها، منجر به افزايش سلول هاي نوع II شد.

در غدد هاردر نر، بخش هاي ترشحي هر دو لوب داراي لومن هاي وسيع هستند كه وجود مواد ترشحي و قطعات سيتوپلاسمي در آن ها، حاكي از فرايند اگزوسيتوز و ترشح آپوكرين مي باشد. در غدد ماده، لومن هاي بيشتر بخش هاي ترشحي در لوب بزرگ، حاوي پورفيرين است و تنها مكانيسم ترشحي اگزوسيتوز مي باشد. در موش مكزيكي آتشفشان در مورفولوژي و هيستولوژي غده، هيچ تفاوت مرتبط با جنس بين غدد هاردر نر و ماده مشاهده نشد. اما در مجموع غدد هاردر اين موش، در محتواي تري گليسيريدي، دو شكلي جنسي نشان دادند. محتواي ليپيد غدد هاردر نر و ماده، شامل تري گليسريدها و كلسترول بود. در غدد ماده فراوان ترين ليپيد، تري گليسريدها بودند، در حالي كه در غدد نر مقدار كم تري از آن ها يافت شدند. مضافاً غدد هاردر جوندگان ماده، پورفيرين بيش تري از غدد هاردر نر دارند. مثال آن در موش خانگي، جربيل (*Meriones unguiculatus*) و *plains mouse (Pseudomys australis)* است. اساس هورموني اين دو شكلي جنسي توجه كمی جلب کرده است. شيراما (Shirama, 1981) دريافت كه آندروژن ها محتواي پورفيريني غدد هاردر موش خانگي ماده را كاهش مي دهند، در حالیکه اولريخ (Ulrich, 1974) هيچ تأثيري از آندروژن ها روي محتواي پورفيريني غده هاردر در رت هاي تخمدان برداري شده مشاهده نكرد.

و- گیرنده های هورمونی (hormone receptors)

گیرنده های آندروژنی در اردک، مرغ، لاک پشت دریایی (marine turtle) و مارمولک وجود دارند (Vilchis *et al.*, 1992).

در دوزیستان از جمله قورباغه سبز یا *Rana esculenta* گیرنده های آندروژنی در دو جنس نر و ماده وجود دارند (d'Istria *et al.*, 1991). در غدد هاردر آرمادیلوی ماده گیرنده های استرادیولی یافت شده اند (Cavagnari *et al.*, 2001). همچنین این گیرنده ها در غدد هاردر هامستر سوریه ای وجود دارند.

Vilchis و همکارانش (1991) گیرنده های استروژنی را در غدد اردک و مرغ یافتند. گیرنده های پروژسترونی در غدد هاردر پستانداران یافت نشده اند. در موش (Shirama *et al.*, 1981)، جربیل (Johnston *et al.*, 1983) و Plains mouse پایه های هورمونی تفاوت های مرتبط با جنس، توجه کمی به خود جلب کرده است.

در هامستر سوریه ای، لوب های بزرگ غدد هاردر نر و ماده توسط هورمون های جنسی کنترل می شوند. به نظر می رسد لوب های کوچک غدد جداگانه ای هستند و تحت تأثیر هورمون های جنسی نیستند. به هر حال مطالعات پیشین دلالت می کند که آندروژن ها بازیگرهای اصلی در حفظ تفاوت های مرتبط با جنس در غدد هاردر هامستر سوریه ای هستند. برخی ژن های مسئول در ایجاد تفاوت های مرتبط با جنس غدد هاردر در هامستر، توسط آندروژن ها کنترل می شوند. وجود عناصر فعال به عنوان گیرنده های آندروژنی، استروژنی، گلوکوکورتیکوئیدی و تیروئیدی (گیرنده های هورمون تیروئید) در غدد هاردر هامستر به اثبات رسیده است.

ز- اعمال غده هاردر (functions of the Harderian gland)

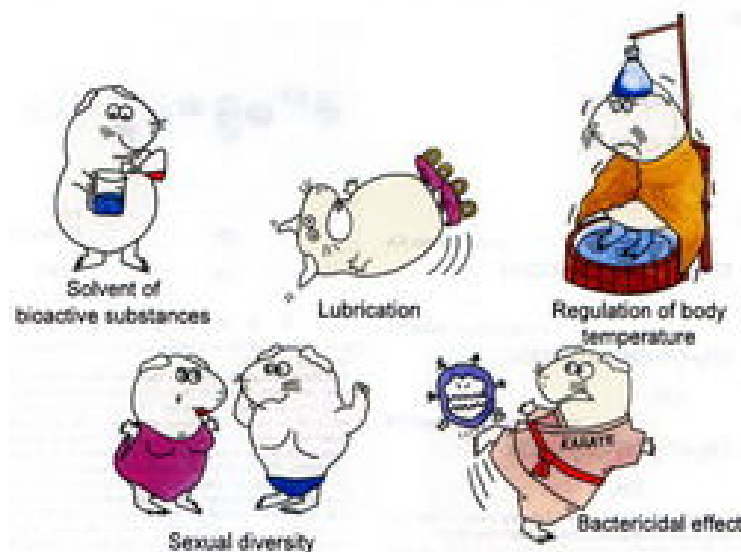
یکی از جنبه های فوق العاده بررسی غده هاردر، تنوع بسیار وسیع اعمالی است که به این غده نسبت می دهند. عملکرد غدد هاردر در بین گونه های مختلف متفاوت است (payne, 1994). در خزندگان، ۳ فرضیه در مورد عملکرد غده وجود دارد: ایفای نقش

در نرم کردن چشم و تسهیل حرکات پلك، هضم و بویایی و مری (vomeroolfaction) .

مورفولوژی غدد هاردر خزندگان، حاکی از آن است که عمل غده در رابطه با نرم کردن چشم نیست، شواهد کمی هم در رابطه با نقش آن در هضم وجود دارد. اما ارتباط دستگاه اشکی (و در نتیجه غده هاردر) با سیستم و مروننازال (VNO) و خاصیت ترشحي ارگان و مروننازال (vomeronasal organ) نشان می دهد که غدد هاردر ممکن است در بویایی و مری نقش داشته باشند (Rehorek *et al*, 2005).

در این مورد، مقالاتی در مورد غدد هاردر در گونه ای از مارها (*Thamnophis serpentis*) در دست است. در پرندگان به نظر می رسد غدد هاردر در پاسخ ایمنی مشارکت داشته باشند. غدد هاردر پرندگان احتمالاً ارگان های لنفاوی اند. به نظر نمی آید این مطلب در مورد پستانداران صحت داشته باشد. گرچه در بافت های بینابینی در رت یا Trumpet tailed rat تجمعات لنفوسیته گزارش شده اند. در موش مکزیکی آتشفشان، فراوانی لیپید مترشحه باعث نرم شدن قرنیه می شود و ممکن است به عمل حفظ و تطبیق موش آتشفشان با محل طبیعی زندگی اش در طی فصل های سرد و خشک کمک کند. بعلاوه غدد هاردر ممکن است در تنظیم دمای بدن مشارکت نمایند. اعمال دیگری که به این غدد نسبت داده شده عبارتند از سنتز ملاتونین، دخالت در تولید مثل، سنتز پورفیرین و نقش فرومونی. علی رغم اطلاعات در دست، نقش دقیق این غده ناشناخته مانده است. در آرمادیلو لیپیدهای مترشحه از غدد هاردر مهم بنظر می رسند و اعمال زیادی به آن ها نسبت داده شده است. برای مثال آن ها تسهیل کننده حرکات پلك هستند؛ همچنین دارای اثر باکتری کش (bactericidal) هستند، به عنوان حلال مواد بیواکتیو عمل می کنند و نقش مهمی در تنظیم حرارت بدن نیز دارند. در موش کور، به نظر می رسد عمل اساسی غدد هاردر نرم کردن قرنیه باشد. اما اعمال دیگری که به آن نسبت داده اند عبارتند از پاسخ ایمنی، تنظیم حرارت و تنظیم اسمزی (osmoregulation). گفته

می شود در رت یکی از اعمال این غده، حفاظت از چشم در برابر نور (از طریق تنظیم نور روی شبکیه) و در نوزادان تازه متولد، دریافت نور (photoreception) می باشد. همچنین به حضور فاکتور رشد (growth factor) در غدد هاردر جوندگان اشاره شده است (Seyama *et al.*, 1992).



* شکل ۱-۱: اعمال غده هاردر

* برگرفته از: (Seyama & Uchijima, 2007)

ح- تکامل غده هاردر (the gland in development and evolution)

غده هاردر در دوزیستان فاقد دم در طی متامورفوز (metamorphosis) و در مرحله اتصال لایه های قرنیه ای لارو و تکامل پرده نیکتیتنز ظاهر می شود. در پستانداران به نظر می رسد غده هاردر در زمان تولد وجود داشته باشد. تکامل غده هاردر در موش خانگی توسط شیراما و هکانو (Shirama & Hokano, 1991) مطالعه شده است. سلول های نوع A در روز پنجم بعد از تولد و سلول های نوع B در روز هفتم ظاهر می شوند. ظهور سلول های نوع B با حضور مقادیر پورفیرین قابل اندازه گیری، همزمان می شود و این منجر شده است که محققین نتیجه گیری کنند که سلول های B مسئول بیوسنتز پورفیرین در درون غده موش هستند.

ط- غده هاردر در ارتباط با محیط زیست (The Harderian gland in relation to habitat and the environment)

آب (water)

در خزندگان غده هاردر بعنوان یکی از ساختار های ترشح کننده نمک در گونه هایی است که در محیط های زیست شورمزه زندگی می کنند. در واقع ارتباط قوی بین نوع محیط زیست و ساختار غده وجود دارد.

در پرندگان ۳ نوع متمایز غده هاردر توصیف گردیده است. نوع I که توبولی-آسینوسی مرکب است در گروه هایی مانند بازها (falconiformes)، کبوترها و قمری ها (columbiformes) و طوطی ها (psittaciformes) وجود دارد؛ در حالی که نوع II که توبولی مرکب است در پنگوئن ها، پلیکان ها، لک لک ها، اردک ها و غازها می باشد. نوع III که مخلوط I و II است در درنا و دارکوب مشاهده می شود. هیچ گونه خشکی زی، غده نوع II را ندارد، در حالی که گروه های آبزی ممکن است غده نوع II یا III را داشته باشند.

نور (lighting)

در بسیاری از مهره داران غدد هاردر تحت تاثیر طول روز (روشنایی و تاریکی) یا درجه حرارت محیط زیست، دچار تغییراتی می شوند. در مطالعه ای که رت های ماده را در معرض نور ۲۴ ساعته قرار دادند، مشاهده کردند که محتوای پورفیرینی غدد هاردر ۵۰٪ افزایش یافت. همچنین غدد هاردر در نرهای که در معرض تاریکی قرار گرفتند افزایش محتوای پورفیرین نشان دادند.

دما (temperature)

در هامسترهای ماده تغییر فصل در محتوای پورفیرین و فعالیت آنزیم های پورفیرینوژنیک تاثیر می گذارد؛ حتی اگر حیوانات تحت کنترل ثابت نور نگهداری شوند.

در جربیل، از ترشحات غده هاردر برای تنظیم دما استفاده می شود. در این گونه، کاهش دما منجر به افزایش رها شدن لیپیدها و افزایش زمان تیمار کردن می شود. در میان جانوران غیر پستاندار، میزان ترشح غده در قورباغه سبز در طی ماههای تابستانی در بالاترین سطح خود قرار دارد.

بخش دوم
مواد و روش ها

(materials and methods)

الف- حیوان مورد استفاده

مختصري از زیست شناسي موش خانگي (*Mus musculus*)

در این تحقیق از موش خانگي (house mouse) استفاده شد. جایگاه این حیوان در سلسله جانوري به قرار ذیل است:

Taxonomy

Kingdom: animalia

Phylum : chordata

Class:mammalia

Order : rodentia

Suborder : myomorpha

Family: muridae

Genus : *Mus*

Species : *musculus*

نام علمي (*Scientific name*) : *Mus musculus*

نام رایج (*common name*) : house mouse

موش آزمایشگاهی احتمالاً شناخته شده ترین پستاندار در جهان از لحاظ بررسی های ژنتیکی و بیولوژیکی است. اولین بار از موش ها برای مطالعه تنفس در قرن هفدهم استفاده شد. بعدها در قرن نوزدهم و بیستم آن ها را برای مطالعه رنگ پوشش بدنشان تکثیر و از نظر ژنتیکی بررسی کردند. بیشتر نژادهای آزمایشگاهی معمول در سال های اولیه ۱۹۰۰ میلادی گزینش شدند.

۱- پراکندگی جغرافیایی (*geographic range*)

Mus musculus یکی از گونه های پستانداران است که شامل چند نژاد و حدود ۳۰۰۰ نمونه جهش یافته (*mutant*) است. گفته می شود منشأ این پستاندار جونده، منطقه شرقی مدیترانه (اطراف چین و هند) در قاره آسیا بوده و به تدریج توسط انسان به آفریقا،

ایالات متحده آمریکا و اروپا آورده شده است و در محیط زندگی انسان ملاحظه می شود.

۲- محیط زندگی (habitat)

حیوان در محیط آزاد در شکاف های دیوارها، صخره ها و تونل های زیر زمینی زندگی می کند، در حالی که چندین محل ذخیره غذا و استراحت دارد. کف محیط زندگی خود را همواره با مواد نرم مثل خرده چوب، کاغذ، دستمال کاغذی و ... می پوشاند. این جانور به خوبی خود را با محیط اطراف وفق می دهد، لذا براحتی می تواند در شرایط مختلف زندگی کرده و در نقاط مختلف دنیا پراکنده شود.

۳- ریخت شناسی حیوان

موش خانگی دارای موهای کوتاه، دم طویل فاقد مو، گوش های گرد و برآمده، چشم های بیرون زده، پوزه کشیده و انگشت در دست ها و پاها می باشد. رنگ آنها متنوع است. موش ها یک جفت دندان پیشین و ۳ جفت آسیای بالا و پایین دارند. فرمول دندانی آن ها به این ترتیب است: I 1/1 C 0/0 P 0/0 M 3/3
نوع بالغ این حیوان دارای خصوصیات زیر است:

۱- طول سر و بدن: ۱۵۰ تا ۱۹۰ میلی متر

۲- طول دم: ۶۰ تا ۱۰۵ میلی متر

۳- طول موهای روی بدن: ۷ میلی متر

۴- دارای یک جفت دندان پیشین (incisors) باعاج زردرنگ در فك بالا و پایین

۵- وزن: ۱۲ تا ۳۰ گرم

۶- رنگ: در wild type، از قهوه ای روشن تا سیاه

۴- تولید مثل (reproduction)

این پستاندار جونده قابلیت تولید مثل بالایی دارد. یک ماده بالغ می تواند زایمان های متعددی در طول سال داشته

باشد (۷-۸ بار). سیکل استروس (oestrus cycle) در این حیوان ۴ تا ۶ روز است که به ۳ فاز تقسیم می شود: پرواستروس، استروس و متاستروس. استروس واقعی کمتر از یک روز طول می کشد. مرحله سیکل استروس از طریق سیتولوژی واژینال شناسایی می شود. مرحله تخمک گذاری در انتهای متاستروس است. جفت گیری منجر به تشکیل پلاک واژنی (vaginal plug) می شود. پلاک واژنی ۱۶-۲۴ ساعت باقی می ماند. ممکن است تا ۴۸ ساعت هم پلاک بر جای بماند. حاملگی ۱۹-۲۱ روز طول می کشد و اگر مادر در حال شیر دادن نوزادان قبلی باشد دیرتر باردار میشود.

جدول ۱-۲: تولید مثل و زاد و ولد

سن بلوغ	۲۸-۴۹ روز
فصل جفت گیری	ندارد
نوع سیکل جنسی و طول دوره	پلی استروس دائمی (continually polyoestrus) و ۴-۵ روز
استروس پس از زایمان	حیوان ماده در ظرف ۱۴-۲۴ ساعت بعد از زایمان قابلیت باروری را به دست می آورد.
طول دوره حاملگی	۱۹-۲۱ روز
تعداد زاده ها	۴-۱۲ زاده
دوره باروری	۷-۹ ماه
وزن هنگام تولد	۱/۵ - ۱/۰ گرم
زمان باز شدن چشم ها	۱۲-۱۳ روزگی
زمان از شیرگرفتن زاده ها	۲۱ روزگی

جدول ۲-۲: داده های فیزیولوژیک در يك موش نرمال

دوره زندگي	۳-۱ سال
وزن بالغين	نرها ۲۰-۴۰ گرم، ماده ها ۳۵ - ۱۸ گرم
وزن هنگام تولد	۲ - ۱ گرم
ضربان قلب	۳۱۰-۸۴۰ بار در هر دقيقه
سرعت تنفس	۲۳۰ - ۸۰ بار در هر دقيقه
دماي بدن	۳۸-۳۶/۵ درجه سانتیگراد
حجم خون	۸ - ۷٪ (۲/۵ - ۱/۵ میلی لیتر)
حجم ادرار	۱ - ۰/۵ میلی لیتر در روز
تعداد کروموزوم ها (2n)	۴۰
مصرف آب	روزانه براي بالغين ۶/۷ میلی لیتر
مصرف غذا	روزانه براي بالغين ۵ گرم
تعداد لکوسیت ها	$5-12 \times 10^3 / \text{mm}^3$ مجموعاً
نوتروفیل ها	۳۷٪ - ۷
لنفوسیت ها	۷۵٪ - ۶۳
مونوسیت ها	۳٪ - ۰
ائوزینوفیل ها	۴٪ - ۰
بازوفیل ها	۱/۵٪ - ۰

۵- جفت گيري

۱- جفت گيري معمولاً در دوره استروس و در طی ساعات تاریک اتفاق می افتد.

۲- جفت گيري غالباً از طریق بررسی وجود پلاک واژني (vaginal plug) که به وسیله مخلوط شدن ترشحات غده فرعی جنسی نر و برآمدگی و اتساع واژن تشکیل می شود، مشخص می گردد. زایمان معمولاً در شب اتفاق می افتد و ۱۲- ۱۰ بچه بدنیا می آیند.

بچه ها يا از سر و يا دم به دنيا مي آيند. معمولاً مادر جفت را مي خورد. خوردن جفت يك عامل تحريكي براي شير دادن است. زايان ۴-۱ ساعت به طول مي كشد. زاده ها در هنگام تولد فاقد مو هستند. چشم ها بسته بوده و دهانه مجراي گوش خارجي نيز توسط لاله آن بسته است. رشد موها در ۵ روزگي آغاز مي شود و در ۱۰ روزگي كاملاً سطح بدن پوشيده از مو مي شود. چشم ها بعد از ۱۰ تا ۱۲ روز باز مي شوند و روند باز شدن مجراي گوش تا حدود ۴-۵ روزگي طول مي كشد. زاده ها بعد از ۲۱ روز و هنگامي كه ۱۰-۱۲ گرم وزن دارند از شير گرفته مي شوند (weaning).

بلوغ در هفته هاي ۴-۶ زندگي حاصل مي شود. آغاز زاد و ولد، هفته هفتم مي باشد و طول دوره توليد مثل ۷-۹ ماه است. زمان تقريبي شروع روندي كه در نهايت به بلوغ حيوان ماده مي انجامد از باز شدن دهانه واژن (vaginal orifice) قابل پيگيري است. دهانه واژن در موش تحت اين تجربه به طور متوسط، در ۴۰-۴۱ روزگي باز شد. در جنس نر زمان دقيق بلوغ همراه با علامت خاصي نيست؛ لذا تعيين زمان دقيق كار مشكلي است. اما بررسي هاي هيستولوژيكي نشان دهنده اين مطلب است كه به طور آشكار جنس نر از جنس ماده ديرتر بالغ مي شود. اگر چه توليد اسپرم در ۳۰ روزگي آغاز مي شود، اما توان جفت گيري بعد از ۴۵ روزگي حاصل مي شود. لازم به ذكر است كه جنسيت نوزادان را مي توان در همان ساعات اوليه پس از تولد مشخص نمود. تشخيص جنسيت از طريق مشاهده تفاوت فاصله بين غلاف آلت جنس نر و كليتوريس جنس ماده با مقعد امكان پذير است.

متوسط عمر موش خانگي ۲ سال است اما تا ۶ سال هم ممكن است به درازا بكشد، به هر حال در طبيعت عموماً بيش تر از ۱۲ تا ۱۸ ماه زنده نيست.

طراحی متدهای جفت‌گیری

۱- جفت شدن مونوگامی (monogamous)

یک نر و یک ماده در یک قفس قرار داده می‌شوند. زاده‌ها را در حدود روز ۲۱ (زمان از شیر گرفتن) از قفس والدین جدا می‌کنند.

الف- فواید: به دلیل استفاده از پیش‌رسی استروس بلافاصله بعد از زایمان، می‌توان از حداکثر قابلیت تولید مثل ماده والد بهره‌برداری نمود.

ب- عیب: تعداد زیاد نرهای مورد نیاز برای جفت‌گیری، عیب این نوع جفت شدن می‌باشد.

۲- جفت شدن پلی‌گامی (polygamous)

یک نر با ۲-۵ ماده در یک قفس قرار می‌گیرند.

الف- ماده‌ها را می‌توان در زمان حاملگی به قفسهای جداگانه منتقل کرد و سپس بعد از روز بیست و یکم از تولد زاده‌ها (زمان از شیر گرفتن)، آنها را به قفسهای اولیه باز گرداند. گرچه ثبت تاریخ جفت‌گیری، با این متد سهل می‌گردد، اما نمی‌توان از قابلیت تولید مثل ماده‌ها در استروس بعد از زایمان استفاده کرد.

ب- اگر ماده‌ها را در همان قفس جفت‌گیری نگهداری کنیم زاده‌های ماده‌های مختلف، همزمان در همان قفس تغذیه می‌شوند (colony mating). این روش، تولید مثل را به دلیل استفاده از استروس بعد از زایمان به حد اکثر خواهد رساند. اما ثبت و حفظ آمار در مورد زمان باروری و جفت‌گیری را بسیار مشکل می‌سازد. در این تحقیق برای تکثیر موش‌ها از متد جفت شدن مونوگامی استفاده شده است.

۶- رفتار (behaviour)

حیوان بیشتر در شب فعال است، به سرعت می‌دود (تا ۸ مایل در ساعت)، به خوبی می‌جهد، بالا می‌رود و شنا می‌کند. موشها

حیواناتی هستند که معمولاً در طبیعت به صورت کلی زندگی می کنند، یعنی معمولاً یک نر با چندین ماده و زاده ها در یک محل مشخص به سر می برند و از قلمرویشان به شدت دفاع می کنند. مادرها نیز از بچه های تازه بدنیا آمده و قلمرویشان به حالت تهاجمی دفاع می نمایند. بیشتر رفتارهای موشها، براساس محرک های فرومونی می باشد. این جانداران دارای حواس بسیار قوی شنوایی، بویایی، چشایی و لامسه هستند و از این طریق، برای یافتن غذا، جفت و نوزادان و ... استفاده می کنند.

۷- اهمیت اقتصادی برای انسان (economic importance for human)

۱) موشها به وجود آورنده مشکلات بهداشتی هستند؛ چرا که انواعی از آنها می توانند حامل عوامل بیماری زایی نظیر نوعی تیفوس (murine typhus)، آبله ریکتسیایی (rickettsial pox)، تولارمی (tularemia)، مسمومیت غذایی (food poisoning) و نوعی طاعون (bubonic plague) باشند.

۲) از آفات کشاورزی اند.

۳) از بین برنده وسایل چوبی، لوازم منزل و لباس هستند.

اما دانش پزشکی و زیست شناسی از بسیاری جهات مدیون این موجود است؛ چرا که:

الف- به دلایلی نظیر کوچک بودن اندازه و ارزان بودن وسایل نگهداری، بسیار راحت می توان از آنها نگه داری کرد.

ب- کار کردن با این حیوان آسان است.

ج- ژنوم این حیوان کاملاً شناخته شده است.

د- توانایی تولید مثل زیادی دارد.

ه- طول عمر کوتاهی دارد.

روش های مراقبت و تکثیر حیوان در این تحقیق

۱- محل نگهداری حیوان

یک خانواده از حیوان مورد نظر شامل یک جفت والد و زاده هایشان از انستیتو پاستور خریداری شد. به گفته مسئول حیوانات در انستیتو پاستور، این حیوانات به روش inbreeding تکثیر شده اند. به این معنی که آمیزش بین حیوانات نزدیک بوده و در هر خانواده، زاده ها با یکدیگر جفت می شوند. مزیت این روش این است که ژنوم این حیوانات بسیار نزدیک به هم می شود و تا حدود زیادی هموزیگوسیتی پیش می آید. در این تحقیق این روش ادامه یافت. در اتاق نگه داری حیوانات (animal room) جهت یکسان بودن تمام فاکتورهای محیطی سعی شد تا متوسط دما ۲۷-۲۵ درجه سانتیگراد باشد. مدت زمان روشنایی و تاریکی در تابستان ۱۴ و ۱۰ ساعت و در زمستان ۱۰ و ۱۴ ساعت بود. جهت تهویه هوا از هواکش استفاده شد. همچنین پنجره کوچکی نیز جهت تهویه هوا، همواره به حالت نیمه باز بود.

۲- روشهای نگه داری، جایابی و تکثیر حیوان

حیوانات در قفس های مدور از جنس پلاستیک محکم به قطر دهانه ۲۶/۵ سانتی متر و عمق ۱۲ سانتی متر نگه داری شدند. در قفس ها از جنس استنلس و با طراحی جدید جهت قرار دادن در ظروف مدور همراه با سوراخ هایی جهت تهویه مناسب و محل گذاشتن غذا و شیشه آب آنها بود. ظرف آب شیشه ای بوده و جهت دسترسی حیوانات به آب موجود در آن، لوله ای شیشه ای که دهانه آن به کمک شعله، باریک تر شده بود با کمک درپوش لاستیکی مناسب در دهانه شیشه قرار می گرفت. آب درون شیشه هر ۴-۳ روز یک بار تعویض میگردید. کف قفس از پوشال نرم چوب و مقداری دستمال کاغذی پوشیده می شد و قفس ها هفته ای یکبار تمیز می شدند. غذای حیوانات از کارخانه تولید کننده غذای دام و طیور به نام

«خوراك دام پارس، شركت سهامی عام» واقع در جاده مخصوص كرج تهیه می شد.

برای جا به جا کردن حیوانات بالغ، این عمل به كمك دم آنها و به آرامی صورت می گرفت و حیوان جابجا می شد. اما برای جابجا کردن نوزادان، نوزاد به آرامی و با دست گرفته می شد و منتقل می گردید.

نحوه تشخیص حیوان ماده :

۱- حیوان ماده دارای ۵ جفت غدد پستانی در دو طرف پوست سینه و شكم است که از زیر بغل تا کشاله ران کشیده شده اند.

۲- فاصله کلیتوریس (قسمتی از اندام تناسلی که مشابه پنیس بوده لکن كوچك و بدون مو است واز سطح بدن كاملاً دیده می شود) تا مقعد كمتر از فاصله غلاف آلت تناسلی تا مقعد در حیوان نر است.

نحوه تشخیص حیوان نر:

۱- حیوان نر دارای کیسه اسکروتوم (کیسه محتوی يك جفت بیضه) در انتهای بدن و زیر دم است که وقتی هوا گرم باشد بیضه ها كاملاً از داخل شكم خارج شده و در درون این کیسه قرار میگیرند و لذا تشخیص حیوان نر آسان می شود؛ اما اگر هوا سرد باشد توسط لیگامانی به داخل شكم کشیده می شوند.

۲- فاصله غلاف آلت تناسلی تا مقعد حیوان بر خلاف حیوان ماده زیاد است.

لازم به ذکر است تمام قفسها نام گذاری شده و شرح حال و تاریخ وقایع مشاهده شده در هر يك و برای هر يك از حیوانات داخل آن، به دقت یادداشت می گردید. در این تحقیق، حدود باز شدن مجرای گوش ها و چشم ها، حدود زمانی رویش كامل مو بر سطح بدن، حدود زمانی حاملگی و حدود زمانی از شیر گرفته شدن نوزادان ثبت گردید. برای مشخص نمودن سن زاده ها اولین روز بعد از تولد، روز اول در نظر گرفته شد و همواره سعی گردید تاریخ

دقیق زایمان ها ثبت گردد. بررسیهای هیستولوژیکی بر روی حیوانات نر و ماده در ماه اول زندگی و در روزهای ششم، دهم، پانزدهم، هفدهم، بیست و یکم و بیست و سوم و در ماه دوم در روزهای سی و پنجم و چهل و پنجم و در ماه های بعدی در روزهای نود و نهم، صد و یازدهم، صد و پنجاهم، صد و شصت و پنجم و سیصد و سی و ششم صورت گرفت.

روش تشریح و برداشت بافت از حیوان

قبل از بیهوش کردن و کشتن حیوان، آخرین بررسی های لازم از نظر مشخصات ظاهری، سن، وزن، جنس و دیگر فاکتورهای لازم به دقت انجام و ثبت می گردید. درون ظرف شیشه ای درداري پنبه آغشته به اتر(دي اتیل اتر) که ماده بیهوش کننده است قرار داده می شد تا جو داخل ظرف مملو از این ماده گردد. سپس حیوان مورد نظر به آرامی درون ظرف گذاشته می شد و در ظرف مسدود می گردید. پس از گذشت يك دقیقه حیوان کاملاً بیهوش و سپس خفه می شد. قبل از بیهوشی کامل، حرکات و راه رفتن حیوان نا متعادل شده و در نهایت به طور کامل بیهوش می گردید. بعد از خفگی، عضلات حیوان همچنان برای مدتی دچار اسپاسم های مکرر می شد، رنگ چشم تغییر کرده و به دلیل شل شدن اسفنکترهای ماهیچه ای بدن (muscle relaxation) ممکن بود مقداری مدفوع، ادرار یا مایع منی از بدن حیوان خارج شود. بعد از این مرحله باید بقیه کارها در نهایت سرعت انجام گیرد تا بافت ها حداقل آسیب را ببینند.

وسایل و مواد لازم جهت تشریح و اتوپسی:

- ۱- سینی تشریح به همراه يك قطعه مقوای ضخیم جهت تثبیت نمودن حیوان در هنگام تشریح
- ۲- لوازم تشریح شامل قیچی، پنس و اسکالپل در اندازه های مختلف

۳- چند عدد سوزن ته گرد

۴- چند تکه كوچك دستمال كاغذي و يا پنبه جهت پاك كردن خون اضافي هنگام تشریح

۵- زنبیل مخصوص حمل بافت (basket)، طرز تهیه زنبیل حمل بافت بدین طریق بود که اطراف استوانه های كوچك شیشه ای قطعه ای توري نخی به كمك نخ محكم می گردید:



يك تکه پارچه متخلخل يك تکه نخ استوانه شیشه ای

۶- سرم فیزیولوژی

طرز تهیه سرم فیزیولوژی (saline):

۹ گرم نمك طعام خالص در ۱۰۰۰ سي سي آب مقطر

حيوان كشته شده به پشت داخل سيني تشریح قرار داده می شد. با توجه به اينكه در اين تحقيق بافت هدف، غدد هاردر چشم چپ و راست بود، لذا به كمك پنس سر حيوان ثابت می گردید و سپس با قیچی جدا می شد، پوست سر با قیچی برداشته می شد و پوزه حيوان از ناحیه جلوي چشم قطع میگردید. سر از وسط به دو نیم شده و قسمت خلفي آن از پشت چشم جدا می شد. اینگونه، نفوذ محلول ثابت کننده (fixative) به داخل بافت مورد نظر به دلیل كوچكتر شدن بافت بهتر انجام می پذیرد. در این تجربه از فیکساتیو بوئن استفاده شد که ترکیب آن در زیر آورده شده است.

محلول بوئن:

۷۵ سانتي متر مكعب

محلول اشباع شده اسيد پيكریک

۲۵ سانتي متر مكعب

فرمالين تجاري

۵ سانتي متر مكعب

اسيد استيك گلاسيال

حداکثر مدت زمان قرار دادن بافت در فیکساتیو، ۲۴-۴۸ ساعت است. لازم به یادآوری است که باید تمام این اعمال به سرعت انجام گیرد تا تخریب بافتی و جمود نعشی به حداقل برسد. بعد از طی این زمان، بافت از فیکساتیو خارج گردیده در زیر میکروسکوپ تشریح درون یک پتری دیش که حاوی مقدار کمی سرم فیزیولوژی است تا از خشک شدن بافت جلوگیری شود و همچنین به منظور مشاهده رنگ بافت، به کمک پنس ها و سوزن تشریح از حواشی جدا می شدند. به این ترتیب که در هر نیمه سر، با توجه به موقعیت غده که داخل استخوان حدقه و چسبیده به قسمت خلفی کره چشم است، از قسمت خلف کره چشم و به کمک پنس، استخوان اربیت و ضمام ماهیچه ای کنار زده شده، با دقت زیاد و به طوری که آسیبی متوجه این بافت بسیار نرم و کوچک و ظریف نشود، غده به همراه کره چشم از حدقه بیرون آورده شده و با پنس نوک تیز و باریک و همچنین به دقت و سرعت، این غده از کره چشم جدا می گردید.

برداشت غدد هاردر از حیوان

غده هاردر دارای سطوح مقعر و محدب است. بخش مقعرش در تماس با کره چشم و عضلات است؛ در حالیکه بخش محدبش توسط بافت همبند به استخوانهای اربیت متصل است. این غده در ناحیه رترواربیتال (retro orbital-) و سطح خلفی استخوان فرونتال قرار دارد.

نکات:

۱- اهمیت علامت گذاری و مشخص کردن هویت بافت و نمره گذاری آن بر کسی پوشیده نیست. چه که اشتباه و سهل انگاری در آن، در نتایج کار اشکالات جدی بوجود خواهد آورد.

۲- بعد از کشته شدن حیوان بقیه مراحل به سرعت انجام می گرفت؛ چرا که زمان طولانی تر مساوی با اتولیز بیشتر بافت و تغییر در ساختار واقعی آن است. لذا تمام مواد و وسایل، بخصوص محلول ثابت کننده قبل از کشتن حیوان آماده می گردید و در ظرف مورد نظر (vial) ریخته می شد تا امور در اسرع وقت انجام پذیرد.

لازم به ذکر است که مشخصات خود بافت نیز معین، نمره گذاری و بر روی برجسب یادداشت و روی شیشه حاوی غده مزبور قرار می گرفت. ضمناً برای جلوگیری از اشتباه و به منظور کاهش خطا، وزن بافت، رنگ بافت، تاریخ فیکسسیون، سمت چپ یا راست بودن غده و شرایط تشریح در دفترچه ای یادداشت می گردید.

توزین موش و غدد هاردر

برای مطالعه نسبت وزن غده به وزن بدن، موشها قبل از کشته شدن وزن می شدند (با قرار دادن آنها در داخل بشر و توزین توسط ترازوی OHAUS تا حدود دهم گرم).

همچنین غده هاردر نیز پس از تشریح و جدا شدن از حواشی و حتی المقدور گرفته شدن رطوبت کاملاً اضافی ناشی از فیکساتیو و قرار دادن آن ها بر روی یک قطعه کاغذ آب خشک کن، با استفاده از ترازوی دیجیتال (TANITA (model 1210 که دقت آن تا یک هزارم گرم است، وزن می شدند. نسبت های تقریبی محاسبه شده که در جداول ۱-۳ و ۲-۳ آمده است بر اساس تناسب زیر محاسبه شده است: (لازم به ذکر است این روش توسط روبرت ا. و همکارانش (۱۹۲۳) برای محاسبه نسبت تقریبی مجموع وزن غدد هاردر و اشکی به وزن بدن در رت بکار گرفته شد).

$$\frac{\text{وزن غده هادر (mg.)}}{\text{وزن بدن (mg.)}} = \frac{1}{X}$$

ب- روش تهیه مقاطع بافتی جهت مطالعه ساختار آنها

تثبیت (fixation)

حفظ ساختمان سلول ها و بافت ها اساس مطالعه بافت شناسی است و آن نیز در گرو ثبوت (fixation) کامل و کافی بافت ها است. هر گونه کوتاهی در انجام این تثبیت را به هیچ وجه نمی توان در مراحل بعدی جبران نمود. بافت ها بعد از آنکه از بدن جدا شدند باید هر چه زودتر ثابت گردند و به همین جهت همواره باید در کنار میز اتاق تشریح یک ظرف محتوی محلول ثابت کننده موجود باشد. مقدار مایع ثابت کننده در ظرف باید ۲۵ تا ۵۰ برابر حجم بافت برداشته شده باشد. ظرف ها باید طوری باشند که بافت ها به آسانی در آن قرار گرفته و از آن خارج شوند. بافتها باید حتی المقدور نازک باشند تا مایع ثابت کننده به مقدار کافی در آنها نفوذ کند. بهر صورت با توجه به ضخامت بافت می توان مدت لازم برای فیکساسیون را تغییر داد. ضخامت اغلب بافت ها برای کارهای جاری حدود ۵-۳ میلی متر بود. در عمل ثبوت نکات زیر مورد نظر است:

۱- جلوگیری از اتولیز و تجزیه

اتولیز عبارتست از لیز یا تجزیه شدن بافتی که توسط آنزیم های موجود در خود بافت انجام می گیرد.

۲- پایداری بافت در وضعی که بافت در زمان حیات داشته است.

۳- چون با دستکاری غالباً بافت های حیوانی تغییر شکل ظاهری می دهند با عمل ثبوت می توان بافت را به وضعی نگه داشت که دست کاری (manipulation)، آن را خراب نکرده و بتوان آنها را تا حد ممکن مورد مطالعه قرار داد.

۴- جامد کردن مواد کلوییدی: چون مواد نیم کلوییدی به آسانی جا به جا می شوند، با عمل ثبوت آن را تبدیل به مواد نیم جامد (gel) می کنیم.

۵- چون در محیط بدن اندکس های انکساری بافت ها خیلی نزدیک همد و امکان تفکیک ساختمان ها وجود ندارد با عمل ثبوت تا حدودی درجه انکسار بافت تغییر داده می شود تا بعداً بتوان با رنگ آمیزی آن را متمایزتر کرد.

۶- بعضی از مواد ثابت کننده در رنگ آمیزی بافت نیز اثر می گذارند. غالباً مواد ثابت کننده، ارتباطی بین مواد شیمیایی بافت و رنگ ایجاد می نمایند.

سه اصل کلی برای ثبوت بافت عبارتند از:

الف- نسج تازه باشد.

ب- ضخامت بافت حتی المقدور نازک باشد تا مایع نفوذ کند.

ج- ماده پایدار کننده صحیح انتخاب شود.

ثابت کننده ها در انواع گوناگون هستند. در این تحقیق از ثابت کننده ای به نام محلول بوئن (Bouin's fluid) استفاده شده است.

زمان ثبوت ۶-۲۴ ساعت است و زمان طولانی ثبوت (چند روز)، زیان بخش است. این محلول باید تازه به تازه تهیه شود.

آب گیری (dehydration)

در این عمل باید با مواد جاذب آب، آب بافت را گرفت. معمولاً برای آب گیری، استون، الکل اتیلیک، ایزو پروپیل الکل یا الکل بوتیلیک را با غلظت های افزایشی به کار می برند. در این تحقیق از الکل اتیلیک مختلف درجه که بتدریج غلظت الکل زیاد می شد استفاده گردید. درجه غلظت اولین الکل بستگی به نوع ماده ثابت کننده، اندازه و جنس بافت دارد. معمولاً شروع با الکل ۵۰ تا ۷۰ درجه مناسب تر است (در این تحقیق از الکل ۷۰ به عنوان اولین الکل استفاده شد). اگر بافت ثابت شده بلافاصله در الکل با درجه زیاد قرار گیرد چروکیده می شود؛ زیرا که آب محتوی بافت خیلی سریع کشیده می شود.

روش کار

بعد از ثابت شدن، بافت درالکل ۷۰ درجه قرار داده می شد. حجم الکل باید ۵۰ تا ۱۰۰ برابر حجم بافت باشد. پس از چندین بار جابجا نمودن در این الکل بر حسب جدول ذیل در الکل های مختلف الدرجة دیگر و با زمان های معین شده قرار داده می شد.

الکل مطلق یا ۱۰۰ %	۹۵ %	۹۰ %	۸۵ %	۸۰ %	۷۰ %	غلظت الکل
۱	۱	۱	۱	۱	۳	تعداد پاساژ در این الکل
۱۵ دقیقه	۱۵ دقیقه	۱۵ دقیقه	۱۵ دقیقه	۱۵ دقیقه	۲-۳ روز	مدت زمان هر پاساژ

نکات مهم :

۱- روش تهیه الکل ها با درجات مختلف:

الکل ۹۶° بنام الکل طبی در بازار موجود است. به کمک الکل سنج و ریختن حجم متناسبی از آب مقطر، الکل ۹۶° را به الکل های رقیق تر با غلظت های دلخواه می توان تبدیل نمود. لازم به ذکر است که الکل اتیلیک ۱۰۰% را باید جداگانه خریداری نمود.

۲- چون الکل مطلق گران قیمت است و خیلی زود از خلوص خارج می شود می توان با به کار بردن سولفات مس (CuSO_4) که جاذب رطوبت است، صرفه جویی در مصرف الکل نمود. سولفات مس به دو صورت وجود دارد: نوع بدون آب آن (anhydrous copper sulphate) به رنگ سفید می باشد و خاصیت جذب آب آن زیاد است و نوع سولفات

مس بلور (crystal copper sulphate) که دارای ۷ مولکول آب بوده و به رنگ آبی می باشد و قابلیت جذب آب کمتری دارد.

طرز بکار بردن سولفات مس در عمل آب گیری به این طریق است که مقدار کمی از سولفات مس بدون آب در کف ظرف الکل مطلق ریخته می شود و چند ورقه کاغذ صافی بر روی آن قرار داده می شود. این عمل بر طول زمان استفاده از الکل مطلق می افزاید. سولفات مس رفته رفته از الکل، آب گرفته و از سفیدی به طرف رنگ آبی متمایل می شود. با ملاحظه تغییر رنگ باید الکل مطلق تازه را جانشین ظرف قدیم نمود.

۳- جهت صرفه جویی می توان الکل ها را بعد از استعمال تغییر درجه داد؛ بدین معنی که الکل مطلق را به الکل ۹۶° و الکل ۹۶° را بجای الکل پایین تر تبدیل نمود. با این اقدام الکل اول (۷۰ درجه) کنار گذاشته می شود و الکل مطلق نیز تجدید و تازه می شود.

۴- برای سرعت در عمل آب گیری ممکن است نسج را به وسیله دست یا دستگاه خودکار تکان داد. حرارت نیز آبیگری را تسریع می کند. ولی این کار فقط در موارد فوری مورد احتیاج است و به طور معمول نباید انجام گیرد.

الکل گیری و شفاف کردن (clearing)

بافتی که دارای الکل باشد نمی تواند با پارافین مخلوط گردد و لازم است قبلاً الکل آن را گرفت. از طرف دیگر چون درجه انکسار نور بافت ها مشابه و یا نزدیک بهم است لازم است که درجه انکسار تغییر یابد. برای این منظور عمل شفاف کردن (clearing) انجام می گیرد. بهترین مواد برای این کار عبارتند از:

کلروفرم، بنزن، گزیل، تولوئن، تتراکلرور کربن و روغن سدر. در این تحقیق از گزیل (xylol) استفاده شد.

روش کار:

برای جلوگیری از چروک خوردن و صدمه دیدن، ابتدا بافت به مدت ۱۵ دقیقه در ظرفی محتوی الکل مطلق و گزلیل با نسبت حجمی ۵۰٪-۵۰٪ گذارده میشود. بعد از آن بافت به گزلیل خالص وارد می شود. روش شفاف کردن نیز مثل آب گیری است و حجم مایع لازم باید ۵۰ تا ۱۰۰ برابر حجم بافت باشد.

محل	الکل مطلق - گزلیل ۵۰٪-۵۰٪	گزلیل I	گزلیل II
تعداد پاساژها در این محلول	۱	۱	۱
مدت زمان	۱۵ دقیقه	۱۵ دقیقه	۱۵ دقیقه

آغشتگی با پارافین (impregnation)

نفوذ پارافین به بافت در یک گرم خانه و در درجه حرارت $56^{\circ} - 58^{\circ}$ درجه سانتی گراد انجام می گیرد که در این تحقیق درجه روی 58° ثابت شده بود.

پارافین :

پارافین جامد باید خالص، عاری از گرد و خاک و یا اجسام خارجی و به رنگ شفاف باشد. پارافین را همیشه باید بعد از آب کردن و قبل از استعمال، با کاغذ صافی در داخل کوره صاف کرد. درجه ذوب پارافین ها مختلف است. جهت جلوگیری از تخریب بافت ها باید نوعی از آن را مورد استفاده قرار داد که در حدود درجه حرارت $56^{\circ} - 58^{\circ}$ ذوب گردد.

طرز عمل:

نسج به آهستگی از گزیل خارج و در داخل گزیل-پارافین ۵۰-۵۰ و با حجم ۲۵ تا ۵۰ برابر حجم بافت وارد می‌گردد (مدت در جدول پیوست وارد شده است). این عمل برای جلوگیری از بوجود آمدن تغییرات مورفولوژیک است. نسج بعد از این عمل حداقل دو بار از پارافین خالص عبور داده می‌شود. این عمل جایابی، به کمک پنس گرم و در داخل اِتو انجام می‌گردد. در این تحقیق پارافین، ۲ بار و هر بار بفاصله ۱۵ دقیقه تعویض گردید. معمولاً بعد از مدتی ظرف دوم با پارافین جدید تجدید شده و پارافین دوم به پارافین اول تبدیل می‌شود. در تمام این مراحل همراه با بافت برچسب و نمره آن نیز انتقال می‌یابد که از بروز اشتباهات جلوگیری گردد.

پارافین II	پارافین I	گزیل-پارافین	محل
۱	۱	۱	تعداد پاساژها
۱۵ دقیقه	۱۵ دقیقه	۱۵ دقیقه	مدت زمان

طول زمان آغشته نمودن به پارافین

مدت آغستگی و تعداد دفعات عوض نمودن بافت در جریان آغستگی، به ۳ عامل زیر بستگی دارد:

۱- اندازه و نوع بافت: مدت زمان آغستگی با پارافین با اندازه بافت در تناسب است. اگر بافت ضخیم باشد مدت طولانی‌تری لازم است. نوع بافت نیز در تعیین مدت لازم برای آغستگی موثر است. مثلاً بافت‌های نرم مثل کلیه و جگر، اجسامی که حاوی عروق خونی

فراوان و بافت همبندی و عضله هستند تمایل زیادی به سخت شدن دارند. لذا برای آغشتگی حداقل زمان را احتیاج دارند.

۲- نوع ماده شفاف کننده

بعضی از مواد شفاف کننده زود تر و آسانتر زدوده میشوند. مثلاً گزلیل و تولوئن و بنزن آسان تر زدوده می شوند و یک بار عوض کردن کافی است.

خطاهای مهم تکنیکی در عمل گردش بافت

۱- فیکساسیون ناقص، آب گیری ناکامل و عبور از پارافین بدون توجه به میزان درجه حرارت و یا پاک نمودن ناکامل بافت از حلال الکل و پارافین می تواند در انجام برش برداری اختلالات زیادی ایجاد نماید.

۲- متبلور شدن بلوک (crystallization of the wax)

بلوک های حاوی پارافین باید یکنواخت و شفاف باشند. اگر چین دار هستند ممکن است بر اثر پارافین یا موم متبلور شده باشد و این به علت آنست که یا ماده مصرف شده برای قالب گیری خراب بوده و یا آنکه خیلی آهسته آن را سرد کرده اند.

۳- سختی بی جهت بلوک (unduly hard block)

ممکن است بلوک آن قدر سخت باشد که نتوان آن را برید. شایع ترین علت آن دکالسیفیکاسیون نا کامل است.

۴- قالب گیری با پارافین (embedding)

در قالب گیری، بافت از آخرین پارافین به داخل پارافینی که برای ایجاد بلوک به کار می رود گذاشته می شود. در انجام این کار از ظرف های مخصوصی بنام قالب استفاده می شود.

انواع قالب (mould)

انواع مختلفی از قالب ها برای قالب گیری پیشنهاد شده اند که عبارتند از:

۱- قطعات L لوکهارت (Leukhardt) که از دو قطعه فلز برنجی که روی هم شکل یک مربع را درست می کنند تشکیل شده است. چون اندازه های L متفاوت است با بهم چسبانیدن آنها قالب به اندازه های مختلف بوجود می آید.

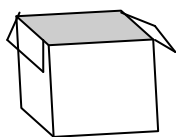
۲- ظروف شیشه ای پتری (petri) که باید قبلاً با گلیسرین آغشته شده باشند.

۳- ظروف فلزی پتری که از آلومینیوم ساخته شده اند.

۴- قایق های کاغذی (paper boats) خیلی ارزان تر تمام می شود. طرز ساخت آن خیلی ساده است و از هر نوع کاغذ می توان استفاده کرد. ولی کاغذ روغنی برای این کار بهتر است. در تحقیق حاضر از جعبه های کاغذی استفاده شد.

روش کار:

کاغذ شطرنجی در قطع مناسبی بریده شد و سپس با تازدن کاغذ در مسیرهای مشخص، جعبه کوچک مکعبی شکل به صورت زیر حاصل شد:



۵- شیشه های ساعت که به گلیسرین آغشته می شود.

۶- لوله آزمایش که برای بافت های کوچک مثل مغز استخوان و کورتاژ آندومتر به کار برده می شود.

۷- قالب های پلاستیکی:

الف - قالب های پلاستیکی با پارافین

ب- قالب های پلاستیکی با رزین های پلاستیکی

روش قالب گيري

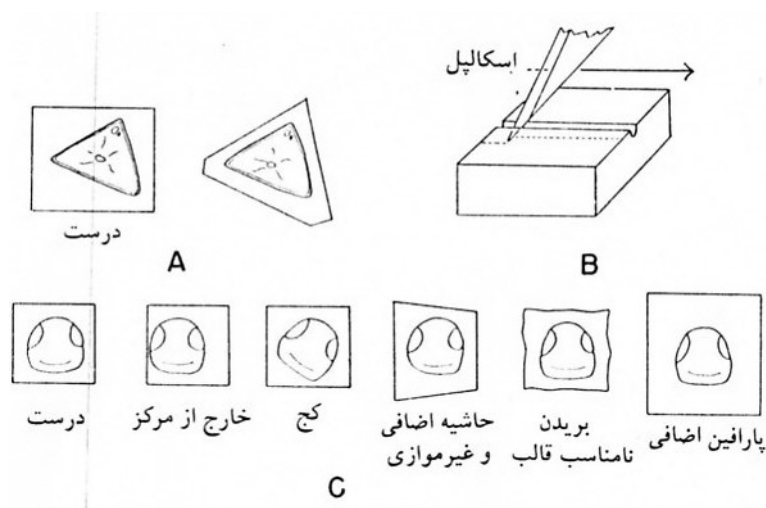
- ۱- پارافين ذوب شده تازه را در قالب مي ريزيم بطوري كه يك ورقه نازك جامد در كف ظرف درست كند.
- ۲- بوسيله پنس گرم بافت را با سمت و سوي خاص و دخواه (orientation) به آهستگي در آن قرار داده و سعي مي كنيم كه حباب هوايي در آن باقي نماند.
- ۳- بقيه پارافين مذاب روي بافت كاشته شده اضافه مي شود تا كاملاً بافت را بپوشاند.
- ۴- مشخصات بافت نيز علاوه بر دفتر ثبت اطلاعات بر روي كاغذ بلوك وارد مي شود. اين بلوك ها را براي مدت زمان قابل ملاحظه اي مي توان در ظرف هاي در بسته نگاه داري كرد.
- ۵- وقتي كه پارافين سخت شد بايد آن را از ظرف جدا كرد و به صورت بلوك هاي كوچك درآورد. بايد درهر ظرف بيش از ۳ ميلي متر پارافين، روي بافت را بپوشاند.

برش برداري بلوك هاي پارافيني (paraffin sectioning)

مرتب كردن بلوك (trimming the blocks)

قبل از شروع برش برداري بايد بلوك را آماده كرد و پارافين هاي زيادي را به كمك اسكالپل يا تيغ جدا نمود (trimming). به طوري كه پارافين از اطراف فقط به ضخامت ۳ ميلي متر دور بافت را احاطه كند. بايد دقت كرد كه به هيچ وجه نبايد قسمتي از بافت از بلوك بيرون بماند و سطوح بلوك بخصوص سطوح بالا و پايين بايد موازي هم باشند تا برش هاي حاصل به صورت نواري مستقيم و بدنبال يكدیگر از روي تيغ ميكروتوم برداشته شود (serial sectioning).

در بریدن پارافین هاي زيادي اطراف بلوك بايد دقت نمود و پارافين اضافي را به آرامي و به صورت صفحات نازك از بلوك جدا كرد تا از ترك خوردن يا شكستن بلوك جلوگیری شود و اگر بلوك ترك برداشت يا شكست بايد دو مرتبه آن را ذوب نمود و قالب گيري را تکرار کرد.



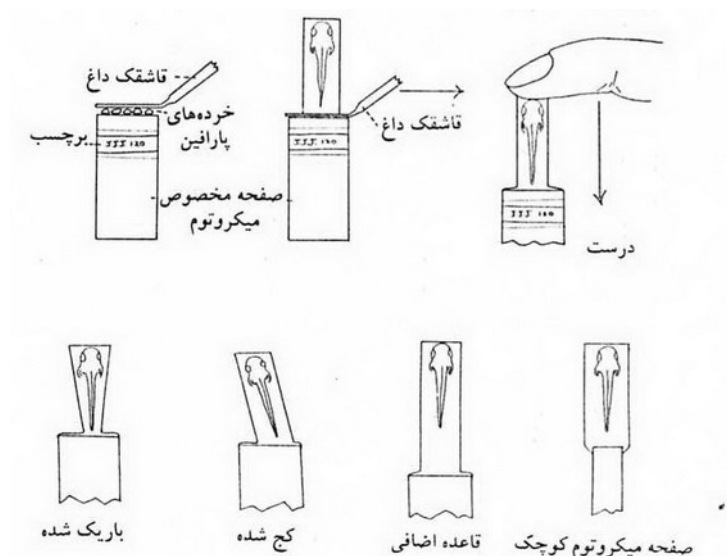
شکل ۱-۲: نحوه مرتب کردن بلوك پارافيني را جهت نصب بر صفحه ميكروتوم نشان مي دهد.

بلوك پارافيني بعد از آماده شدن بر ديسك يا صفحه ميكروتوم نصب مي شود. اين صفحات در انواع مختلف فلزي و چوبي است. اندازه سطح صفحه بايد همواره بزرگتر از قطر بلوك پارافيني باشد.

ثابت کردن بلوك روي پايه و سپس ميكروتوم (fixing the blocks)

براي ثابت کردن بلوك روشهاي مختلف وجود دارد كه بر حسب ميزان ورزیدگی افراد و ميكروتوم بكار رفته، فرق مي كند. با يك قطره چكان گرم، يك قطره پارافين $58^{\circ}-56^{\circ}$ مذاب را روي سطح پايه چكانده و مدت كوتاهي تأمل نموده تا كمی سرد شود. سپس بلوك را بر روي آن قرار داده تا سرد شود. سپس با استفاده از اسكالپل و پارافين، اطراف بلوك را شكل مي دهيم تا بلوك كاملاً در پارافين مستقر و محكم گردد. بعد به جهت اتصال برش هاي برداشته شده به

یکدیگر در هنگام تهیه سری برش ها (serial sectioning) مقدار بسیار کمی پارافین 44° را با نوک اسکالپل برداشته، ذوب می کنیم و به دو سطح بالا و پایین بافت لایه ای اضافه می کنیم. این نوع پارافین به جهت نرمی در هوای آزاد، باعث اتصال برشهای بافتی به یکدیگر می گردد.



شکل ۲-۲: نحوه نصب بلوک بافتی را بر روی پایه یا صفحه میکروتوم نشان می دهد.

برش بافت

برای بریدن بافت از دستگاهی بنام میکروتوم یا بافت بر اسنفاده میشود. بعد از اینکه بلوک به صفحه میکروتوم متصل شد آماده برای برش برداری است. ساختمان میکروتوم به شرح زیر است:

میکروتوم (microtom)

میکروتوم دستگاهی است مکانیکی که با گرداندن چرخ دنده تعبیه شده در آن، می توان به طور یکنواخت قطعات بافتی با ضخامت های مختلفه تهیه نمود.

ضخامت بر حسب میلیونیم متر یا میکرون (μ) سنجش شده که در تحقیق حاضر حدود ۷-۸ میکرون بود.

شش نوع میکروتوم بر حسب شش نوع مکانیسم وجود دارند که به ترتیب عبارتند از:

۱- راکینگ (rocking) یا مَوَاج

۲- روتاری (rotary) یا دَوَّار

۳- سلج (sledge) یا سورتمه ای

۴- سلیدینگ (sliding) یا پس و پیش رو

۵- فریزینگ (freezing) یا انجمادی

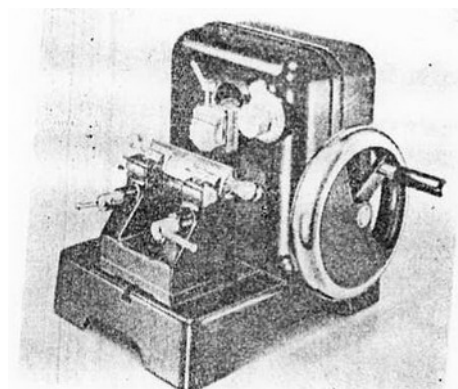
۶- the new JB- 4 porter - Blum

در انجام این تحقیق از نوع دوم یعنی rotary microtom استفاده شد.

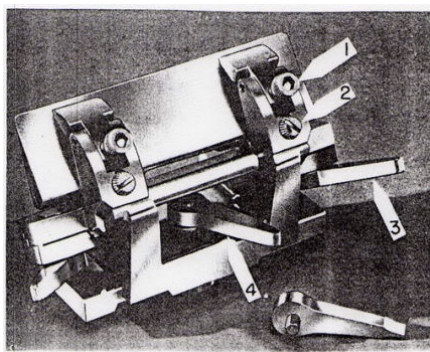
بافت بُر دَوَّار (rotary microtom)

حرکت دَوَّار دسته که برای بکار انداختن میکروتوم وجود دارد (مثل دسته دوار چرخ خیاطی)، این نام را به این نوع میکروتوم ها داده است. این میکروتوم ها بسیار سنگین بوده و میز زیر آن در هنگام کار باید سنگی باشد تا از تکان خوردن و لرزش دستگاه در حین انجام کار برش برداری جلوگیری شود. با قرار دادن بافت در جایگاه مخصوص و چرخاندن دسته، بلوک و پایه آن مستقیماً در جهات بالا و پایین به حرکت در می آید و این عمل موجب برخورد بافت با تیغه میکروتوم که در جلو و به نحوی ثابت قرار دارد و در نهایت ایجاد برش می شود و بالنتیجه قطعات بریده شده کاملاً مسطح است. چون اولین بار این میکروتوم ها توسط پروفیسور مینوت (Minot) تعبیه شده بعضی ها آنرا بافت بُر مینوت - روتاری گویند. این میکروتوم متداول ترین نوع میکروتوم ها است که در اکثر آزمایشگاه های بافت شناسی وجود دارد و بخش هایی که باید در آن شناسایی شوند عبارتند از چرخ جلو برنده (advance wheel) و قفل آن، چرخ برگشت دهنده (return wheel)، جایگاه نگاه دارنده بلوک

و گیره آن، حمل کننده تیغ میکروتوم (knife carriage) و قفل آن و پیچ تنظیم ضخامت برش.



شکل ۲-۳: بافت بر دوار (rotary microtom)



شکل ۲-۴: نوعی حمل کننده تیغ میکروتوم را نشان می دهد. ۱- پیچ های گیرنده تیغ میکروتوم، ۲- پیچ های بالابرنده ۳- اهرم های زاویه ۴- قفل حمل کننده

تیغه میکروتوم

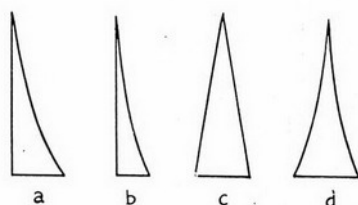
معمولاً تیغه میکروتوم را بر حسب وضع سطوح آن طبقه بندی می کنند و از این رو اقسام زیر وجود دارد:

۱- مسطح- مقعر (plano – concave)

۲- مسطح- خیلی مقعر (plano – very concave)

۳- مسطح- گوه ای (plano – wedge)

۴- مقعر الطرفین (biconcave)



شکل ۵-۲: مقطع عرضی تیغه های میکروتوم

Plano-Concave	a - مسطح - مقعر
Plano-very concave	b - مسطح - خیلی مقعر
Plano-wedge	c - مسطح - گوه ای
Biconcave	d - مقعر الطرفین

استفاده از هر کدام از انواع این تیغه ها سلیقه ای است ولی برای کارهای معمولی مثل برش گیری از بلوک های پارافینی بهتر است از تیغه های مسطح-گوه ای استفاده شود (تیغه ای که در برش گیری از بافت ها در این تحقیق نیز از آن بهره برداری شد).

تیغه میکروتوم باید بعد از استفاده روزانه با گزیل تمیز شود و با یک لایه از روغن پوشانده شود تا از تماس آن با اکسیژن هوا و اکسید شدن جلوگیری به عمل آید.

تیز کردن تیغه میکروتوم (*sharpening microtome knives*)

تیغه میکروتوم را با سنگ مخصوصی بنام hone تیز می کنند که انواع مختلف دارد:

۱- سنگ سیاه بلژیکی

۲- ارکانزاس (arcansas)

۳- الوکسیت (alloxite)

۴- سنگ اسکاچ

۵- کاربوران دوم

۶- شیشه صاف

طرز برش (*cutting technique*)

۱- بلوک روی پایه ثابت می شود.

۲- فاصله نگاهدارنده تیغه میکروتوم تا بلوک حداکثر ممکن ایجاد می شود.

۳- تیغه در محل قرار داده می شود و درجه انحراف آن تعیین می گردد.

۴- با گرداندن چرخ دوار، بلوک به بالا و پایین حرکت داده می شود و بدین ترتیب بافت بطرف تیغه نزدیک شده و سرانجام به مجاورت یکدیگر می رسند. برای تسریع در کار، می توان تیغه را با دست به نزدیکی های سطح برش نیز رساند و سپس آن را ثابت کرد.

۵- برای مرتب کردن بلوک باید آنقدر از سطح بئرم تا کاملاً تمام سطح بافت، ظاهر و قابل مقطع گیری باشد.

۶- به کمک پیچ تنظیم، ضخامت برش میزان می شود. در این تحقیق، برشها ۷-۸ میکرونی بودند.

۷- عمل برش برداري تا حد مورد نظر ادامه يافته و كليۀ برشها جهت مطالعه حفظ مي شوند. قطعات بريده شده روي يك ورقه نازك مقوا يا مستقيماً روي لام قرار داده مي شوند. در اين تحقيق نوار برشها در ظرف مسطح تميز و برداري كه با يك تکه مقوای مشكی مفروش شده بود گذارده شدند و شروع برش برداري نيز با علامتي مشخص گرديد.

اشكالات برش برداري و علت آنها

يك برش برداري مطلوب از بلوك بافتي، عبارتست از بدست آوردن نواري يكنواخت از برشها كه بدون پارگي و يا چين خوردگي است. برخي از اشكالاتي كه فرد عموماً در برش برداري با آن مواجه است بقرار زير است:

۱- برش هاي متوالي به يكدیگر نچسبيده و نوار تشكيل نمي شود. معمولاً چنانچه لايۀ نازك پارافين با نقطه ذوب پايين 45° به نحو مطلوب در دو طرف بالا و پايين بلوك آغشته شود اين اشكال ملاحظه نمي شود.

۲- برش ها در حين بریدن لوله مي شوند. اين اشكال را مي توان با بریدن چندین برش و سپس صاف کردن و خوابانیدن آنها بر روي تيغ ميكروتوم و تداوم برش گيري برطرف نمود. در اين حال وزن نوار از پيچ خوردن بعدي جلوگیری خواهد کرد. کندی تیغ و عدم رعايت حرارت مناسب براي قالب گيري بافت (بيشتر از 58° - 56°) از عواملی هستند كه موجب خورد شدن بافت و پارافين و يا لوله شدن آنها مي شوند.

۳- نوار بافتي به يك سمت خميده مي شود.

بايد بررسی شود كه اضلاع بلوك كاملاً موازي باشند يا دو ضلع مقابل هم مربع كاملاً موازي با يكدیگر و موازي با لبه تیغ باشند. حتي اندك زاويه موجب مي شود كه نوار به سمت پهلوي

کوتاهتر خم شده و از حالت مستقیم خارج گردد. در این حال لازم است که بلوک را مجدداً مرتب کنیم.

۴- نوار بطور طوی شکاف برداشته و یا خراش های سطحی دارد. این اشکال ممکن است بر اثر چسبیدن یک جسم آلوده کننده و یا پارافین بر لبه تیغ ایجاد شود که باید با مقدار کمی گزلیل که بر قطعه ای پنبه ریخته می شود بدقت تیغ را پاک کرد. معمولاً جهت تمیز کردن به سمت لبه تیغ است؛ زیرا حرکت به سمت پایین بر روی لبه تیغ باعث کند شدن تیغ میشود و یا حتی شکاف های بدی در آن ایجاد خواهد کرد. گاهی این اشکال به علت سخت شدن شدید بافت ممکن است رخ دهد. همانگونه که قبلاً ذکر شد ناهموار بودن لبه تیغ و کندي آن نیز سبب پاره شدن برشها می شود.

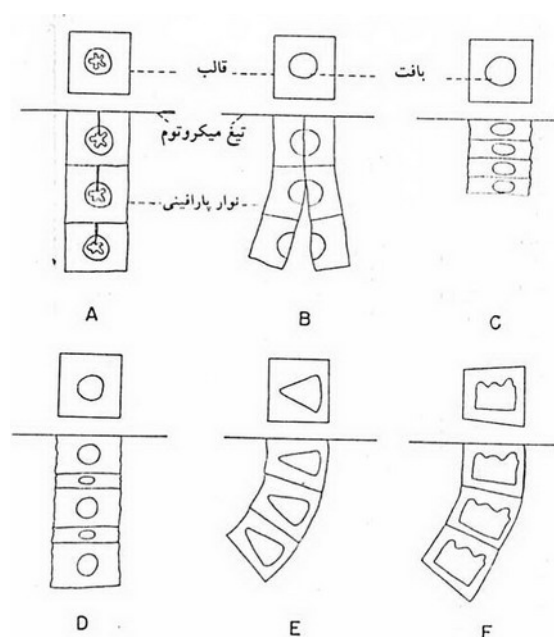
۵- برشها فشرده می شوند بطوریکه هر برش فقط بخشی از اندازه بلوک اصلی را دارا می باشد. در برش برداری نازک هر قدر ضخامت برشها نازک تر باشد معمولاً فشردگی برش ها بیشتر است (بخصوص اگر لبه تیغ از تیزی لازم برخوردار نباشد). با سرد کردن بلوک در آب یخ و بریدن برشهای بسیار نازک در اتاق سرد می توان این اشکال را به حداقل رساند. مضافاً فشردگی بیش از حد نشانه آنست که نقطه ذوب پارافین استفاده شده نیز پایین است. در این حالت با مخلوط کردن پارافین های مختلفه میباید نقطه ذوب مناسب را پیدا نمود.

۶- برشها فشرده شده یا نامنظم هستند و خرد و فشرده می شوند. اگر سطح بلوک بخصوص در لبه ها سفید یا خرد شده بنظر رسند ممکن است زاویه انحراف، مناسب نباشد. باید زاویه تیغ را افزایش دهیم.

۷- برش ها خرد می شوند و بلوک نرم بنظر می رسد.

پارافینی که برای قالب گیری استفاده شده است با ماده الکل گیر (گزلیل یا تولوئن) آلوده شده است. نمونه را مجدداً قالب گیری می کنیم.

۸- ممکن است تیغ کند باشد. ممکن است پارافین نرم باشد یا اتاق برای نقطه ذوب پارافین بسیار گرم باشد. ممکن است نفوذ پارافین به درون بافت، کامل صورت نگرفته است.



شکل ۶-۲: اشکالاتی که معمولاً در هنگام برش برداری رخ می دهد.

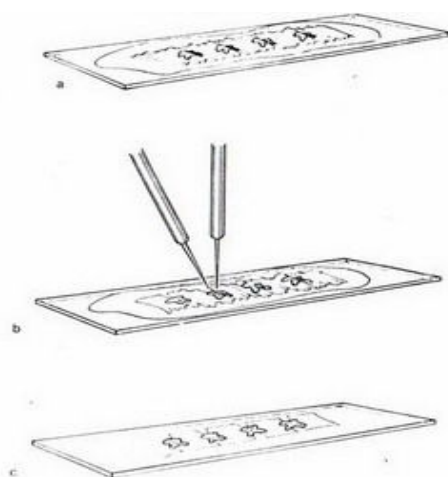
A: خراش یا شکافتگی نسبی در نوار پارافینی، B: خراش یا شکافتگی طولی در نوار پارافینی، C: فشردگی بیش از حد برش ها، D: تفاوت در ضخامت برش ها، E: خم شدن نوار پارافینی به یک طرف با وجود موازی بودن اضلاع بلوک، F: خم شدن نوار پارافینی به یک طرف به علت موازی نبودن اضلاع بلوک

چسباندن برش ها بر روی لام (mounting)

قبل از چسباندن برشها بر لام، ابتدا با یک مداد مخصوص شیشه ای که دارای نوک الماس است لامها شماره گذاری یا علامت گذاری می شوند. این عمل به دو علت انجام می شود: اولاً، در صورت تهیه

برشهای متوالی، ردیف لامها مشخص می گردد. ثانیاً، سمتی از لام که برشها بر آن چسبانده می شود معلوم است تا در مراحل رنگ آمیزی، برشها اشتباهاً پاک نشوند. برای چسباندن برشهای پارافینی به لام از چسب مخصوص استفاده می شود. در این تحقیق از چسب آلبومین استفاده شد. لامها باید کاملاً تمیز باشند در غیر این صورت برشها کاملاً به لام نمی چسبند و ممکن است در مراحل رنگ آمیزی از آن جدا شوند. برای تمیز کردن لامها بعد از شماره زدن، آنها را داخل ظرف الکل هفتاد با چند قطره اسید قرار می دهند تا چنانچه چربی و گرد و غبار روی آنها باشد زدوده گردد. سپس لامها را خشک کرده برای انجام کار محفوظ می کنند. قطره بسیار کوچکی از چسب به کمک میله شیشه ای بر روی لام ریخته می شود و بوسیله انگشت کوچک که تمیز و عاری از چربی باشد کاملاً بر روی لام مالیده می شود. لازم به ذکر است که لایه ضخیم چسب، رنگ را بخود گرفته و لام بسیار کثیف و بد منظره ای را ایجاد می کند که رؤیت میکروسکوپی را کاهش می دهد. بر سطح لام مقداری آب مقطر قرار داده می شود. برشها را بر سطح آب قرار می دهند (باید دقت کرد که برشها از سطح بزاق بر سطح آب قرار گیرند). عمل انتقال بکمک یک قلم موی کوچک و یا با نوک یک سوزن تشریح انجام می شود و تعداد برشها نیز بر حسب اندازه دخواه معین می شود. بسته به اندازه برشها میتوان دو الی سه ردیف از برشها را در زیر یکدیگر بر روی یک لام قرار داد. برای گستردگی هر چه بیشتر برشها لامهای حاوی برشها روی Hot plate با درجه حرارت حدود 60° قرار داده می شوند. درجات حرارت بالاتر موجب گسترده شدن سریع برشها می شود ولیکن خود مشکلاتی مانند ایجاد حباب، تغییر شکل بافت، پاره شدن و جابجایی اجزای بافتی و یا از بین نرفتن چین و چروک بافتها به علت خشک شدن سریع آب را باعث میشوند. بافتهای ضخیم کمتر از پارافین اطراف خود فشرده می شوند و چون پارافین بر صفحه گرم کننده بقدر کافی گسترده نمی شود بنابراین به بافت اجازه پهن شدن را نداده و در نتیجه چین می خورد. این عیب در قطعات بافتی واجد لومن

یا حفره همیشه دیده می شود. برای اصلاح آن می توان پارافین را در لبه بیرونی بافت پاره کرد. این عمل را هنگامی که نوار پارافینی بر سطح آب و بر روی لام شناور است میتوان انجام داد. بعد از اینکه لام خنک شد پارافین را با استفاده از یک سوزن کاملاً تمیز به طوریکه به بافت آسیب نرسد شکاف می دهند (شکل ۷-۲).



شکل ۷-۲: a. برشهای پارافینی فشرده شده یا چین خورده b. پاره کردن پارافین با سوزن های تشریح تا نوار پارافینی امکان گسترده شدن یابد. c. برشهای گسترده و مسطح شده

با استفاده از کاغذ آب خشک کن آب اضافی روی لام برداشته می شود و جهت خشک شدن مدتی نیز در حرارت اتاق آزمایشگاه بحال خود رها می گردد. بدین ترتیب بافتها به لام می چسبند. لامها تا هنگام رنگ آمیزی در درون ظرف دردار مخصوص نگهداری می شوند.

طرز تهیه چسب آلومین:

برای تهیه چسب، حجم مساوی از گلیسرین، آب مقطر و سفیده تخم مرغ را در هم مخلوط نموده، سپس بوسیله صافی ضخیم، صاف

می گردد. افزودن یک قطعه کوچک تیمول به داخل آن موجب می گردد تا از رشد قارچ جلوگیری شود. این محلول که در ظرف درداری نگهداری می شود را میتوان تا مدتی نگهداری و استفاده نمود.

رنگ آمیزی (staining)

مقصود از رنگ آمیزی متمایز نمودن اجزا و قسمت های مختلف سلول یا بافت از یکدیگر توسط رنگ های مختلفه است.

رنگ آمیزی را میتوان به انواع زیر تقسیم کرد:

۱- رنگ آمیزی حیاتی (vital staining) :

رنگ کردن بافت های زنده را گویند که ممکن است در بدن یا در آزمایشگاه انجام گیرد.

۲- رنگ آمیزی حیاتی به کمک عمل بیگانه خواری:

ذرات مواد رنگی را سلول های بیگانه خوار جذب می کنند در نتیجه این ذرات در داخل سیتوپلاسم سلولی دیده می شوند.

۳- واکنش های هیستوشیمی (histochemical reactions) :

این رنگ آمیزی یک نوع واکنش رنگی است که وابسته به ترکیبات شیمیایی سلول است.

۴- رنگ های چربی (fat stain) :

در این نوع رنگ آمیزی ماده رنگی بیشتر در عنصری که باید نشان داده شود حل می شود.

۵- رنگ آمیزی های غیر حیاتی (non vital staining) :

این روش عبارتست از رنگ کردن نسوج غیر زنده بوسیله مواد رنگی که توسط نسوج جذب می شوند. اکثر روشهای رنگ آمیزی جزو این نوع محسوب می شوند.

هماتوکسیلین (Hematoxylin)

عمومی ترین رنگ مورد استفاده در آزمایشگاه های بافت شناسی و آسیب شناسی است. این ماده از مغز درخت چوب سرخ (Log wood tree) که نام علمی آن (*Haematoxylon campechianum*) است و در Campeche مکزیکو می روید، بدست می آید. هِماتوکسیلین دارای خاصیت رنگ دهی نیست مگر آنکه آن را اکسید کرده تبدیل به هماتئین (hematein) کنند. عمل اکسیداسیون یا قابل استفاده شدن (ripening) را در هوای آزاد یا در آفتاب با مخلوط کردن با مواد اکسیدان مثل یدور دو سدیم، پرمنگنات دو پتاس و اکسید مرکوریک به مدت ۶ تا ۸ هفته انجام می دهند. در این عمل هِماتوکسیلین که فرمول آن $C_{16}H_{14}O_6$ است دو اتم هیدروژن خود را از دست داده تبدیل به هماتئین $C_{16}H_{12}O_6$ می شود که دارای ترکیب کلینوئید در یکی از حلقه ها می باشد و اگر اکسیداسیون ادامه یابد هماتئین تبدیل به یک ماده بی رنگ می شود. حتی هِماتوکسیلین اکسید شده بندرت به تنهایی مصرف می شود زیرا علاقه ای به بافت ندارد و معمولاً باید با یک مردانت (mordant) مصرف گردد. این مواد که ارتباط دهنده بین نسوج و رنگ هستند عبارتند از املاح فلزات مثل آلومینیوم، املاح آهن سه ظرفیتی و زاج که قبل از استعمال رنگ یا به همراه رنگ، آن را مصرف میکنند.

هماتوکسیلین یک رنگ بازیک بوده و از رنگ کننده های قوی هسته و کروماتین است. رنگ های هِماتوکسیلین معروف عبارتند از:

۱- هِماتوکسیلین ارلیش Erlich's Alum Hematoxylin

۲- هِماتوکسیلین الوم هاریس Harris's Alum Hematoxylin

۳- هِمالوم می یر Meyer's Hemalum

۴- هِماتوکسیلین الوم دلا فیلد Delafield's Alum Hematoxylin

۵- هِماتوکسیلین آهن وایگرت Weigert's Iron Hematoxylin

۶- هِماتوکسیلین الوم بوهر Bohmer's Alum Hematoxylin

۷- فسفوتنگستیک اسید هماتئین مالوري

۸- هماتوکسیلین بولارد Bullard's Hematoxylin

در این تحقیق از هماتوکسیلین ارلیش استفاده شد که تناسب مواد متشکله آن بقرار ذیل است :

هماتوکسیلین کریستال ۶ gr.

الکل مطلق 300 cm^3

آب مقطر 300 cm^3

گلیسرین 300 cm^3

اسید استیک گلاسیال 30 cm^3

زاج آلومینیوم یا پتاس ۶ gr.

هماتوکسیلین را در الکل مطلق حل کرده و بقیه مواد را بر حسب ترتیبی که ذکر شد اضافه می کنند. در تهیه این رنگ، مردانت با خود رنگ مخلوط است. استفاده از گلیسرین باعث می شود رنگ یکنواخت و بهتر گردد و مانع اکسید شدن زیاد شود و رنگ تخمیر نگردد. عمل اکسیداسیون با قرار دادن رنگ در مقابل نور و هوا در چند ماه انجام می شود، ولی اگر ۶/ گرم یدور پتاسیم اضافه شود عمل اکسیداسیون سریعتر انجام می گیرد. هماتوکسیلین ارلیش برای سال ها رنگ خود را حفظ می کند.

از مواد متفاوتی برای افتراق رنگ در رنگ آمیزی های هماتوکسیلین استفاده می شود. مناسب ترین این رنگ ها رنگ اسیدی ائوزین نام دارد که از محلول آبی و یا محلول الکلی آن در رنگ آمیزی سیتوپلاسم استفاده می شود. ائوزین باید به صورت محلول تازه تهیه شود.

محلول یک درصد ائوزین در آب ذخیره (استوک) (Eosin 1 % aqueous):

ائوزین (yellowish) G ۳ gr.

آب مقطر 300 cm^3

پودر ائوزین را در آب مقطر ریخته، حل می کنیم. سپس به منظور جلوگیری از تشکیل کپک، یک کریستال فنول یا تیمول به محلول آماده اضافه می کنیم. محلول را قبل از استفاده صاف می کنیم.

وسایل لازم جهت رنگ آمیزی لامها

- ۱- زنبیل (holder) جهت حمل لامها از ظرفی به ظرف دیگر
- ۲- قطره چکان
- ۳- لام و لامل
- ۴- محلول تمیز کننده لام و لامل: این محلول، محلولی از اسید و الکل است. ۱۰۰ سی سی الکل ۷۰ درجه را در ظرف شیشه ای ریخته و ۸ قطره اسید کلریدریک (HCl) غلیظ به آن افزوده می شود.
- ۵- پارچه ملل برای تمیز کردن لام و لامل هایی که در داخل محلول اسید-الکل قرار داده شده اند.
- ۶- پنس، اسکالپل، سوزن ته گرد، سوزن تشریح و چراغ الکلی که در مراحل مختلف بکار می آیند.

روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (routine H. & E. staining)

نکات اصلی در رنگ آمیزی و چسبانیدن لامهای پارافینی بشرح زیر است:

- الف- پاک کردن پارافین برشها بوسیله گزیلل (removal of wax)
- ب- آبدهی به بافت ها با درجات نزولی الکل (hydration)
- ج- رنگ آمیزی (staining)
- د- آب گیری برش ها (دهیدراسیون) از طریق درجات صعودی الکل (dehydration)
- ه- شفاف کردن در گزیلل (clearing)

و- چسباندن لامل

الف- پاک کردن پارافین

در این عمل لامها را به ترتیب از دو مرحله از گزلیل، هر کدام به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه عبور می دهند. بدین ترتیب پارافین موجود در لابلاي بافت حل شده و برش شفاف می گردد.

ب- آبدهی با کمک درجات نزولي الكل (hydration)

لامها را از گزلیل خارج کرده و برای اینکه بافتها به یکباره تغییر محیط نیابند و تغییرات فیزیکی در آنها روی ندهد ابتدا آنها را وارد محلول ۵۰%-۵۰% گزلیل-الکل مطلق بمدت ۱۰-۱۵ دقیقه نموده، سپس عبور نزولي الكل جهت آبدهی کامل برشها انجام می شود. مدت زمان لازم جهت پاساژ الكل ۱۰-۱۵ دقیقه است.

بنابراین:

۱- الكل-گزلیل

۲- الكل مطلق (۲ بار)

۳- الكل ۹۶ درجه

۴- الكل ۹۰ درجه

۵- الكل ۸۵ درجه

۶- الكل ۸۰ درجه

۷- الكل ۷۰ درجه

ج- رنگ آمیزی

سپس لامها بمدت ۱ دقیقه در آب مقطر قرار داده می شوند و متعاقباً وارد هماتوکسیلین می گردند. مدت زمان لازم جهت رنگ آمیزی با هماتوکسیلین ۱۵ دقیقه است. سپس لامها بمدت ۱۵

دقیقه در آب جاری قرار می گیرند تا ضمن شستشو، تمایز رنگ (differentiation) در بخش های مختلف سلول رخ دهد. آنگاه آنها را بمدت چند ثانیه وارد ظرف اسید-الکل برده و تکان می دهیم تا رنگ اضافی زمینه و برشها گرفته شود.

سپس لامها بمدت ۱۰ دقیقه در آب مقطر قرار داده شده، بدین ترتیب بخشهای مناسب آبی رنگ می شوند. گاهی لازم است که توسط بخار آمونیاك به این تغییر مشخص كمك نمود. باید دقت کرد که پس از طی این مراحل خصوصاً وارد کردن برشها در ظرف اسید-الکل، تمایز یافتگی رنگ بخوبی انجام شده باشد. بعد از این مرحله لامها بمدت ۱۰ دقیقه داخل محلول ائوزین برده می شوند تا بخش های اختصاصی برای این رنگ نیز رنگین گردند (سیتوپلاسم سلول ها).

بعد از رنگ آمیزی با ائوزین لامها بمدت ۳-۴ دقیقه در آب مقطر شستشو می شوند.

د- دهیدراتاسیون (dehydration)

چون برشها مجدداً حاوی آب شده اند باید آب گیری شوند. لذا می بایست لامها از الکل های مختلف الدرجه، این بار به نحو صعودی عبور داده شوند. مدت زمان لازم جهت هر پاساژ الکل ۱۵-۱۰ دقیقه است و از الکل ۷۰ درجه شروع می شود.

۱- الکل ۷۰ درجه

۲- الکل ۸۰ درجه

۳- الکل ۸۵ درجه

۴- الکل ۹۰ درجه

۵- الکل ۹۶ درجه

۶- الکل ۱۰۰ درجه

ه- شفاف کردن (clearing)

بافت ها را از الکل مطلق وارد محلول ۵۰%-۵۰% الکل- گزلیل نموده و سپس وارد مرحله عبور از گزلیل ها می شوند (دوبار).

مدت زمان لازم برای هر پاساژ ۱۵-۱۰ دقیقه است.

و- چسباندن لامل

برای مطالعه لازم است برش های بافت را زیر یک ورقه نازک شیشه ای دیگر (لامل یا coverslip) محفوظ کرد. موادی که برای چسباندن لامل بر روی لام بکار می روند دو نوع هستند:

۱- مواد آبی (aquous media)

۲- مواد صمغی (resinous media)

انتخاب مواد لازم برای چسباندن خیلی مهم است. این مواد به طور کلی عبارتند از:

۱- دی.پی. اکس D.P.X

۲- کانادا بالزام (بم دو کانادا) (Canada Balsam)

۳- ژله گلیسرین (glycerine jelly)

۴- ژله گلیسرین کروم دار (chrome glycerine jelly)

۵- محیط صمغ (Farrant's media) *

۶- محیط دانه کارو (corm syrup) **

در این تحقیق از کانادا بالزام استفاده شد.
روش تهیه

کانادا بالزام ۵ gr.

**و* معادل فارسی این کلمات از کتاب فن بافت شناسی و روشهای رنگ آمیزی تألیف دکتر مسلم بهادری اقتباس گردیده است.

پس از اضافه نمودن کانادا بالزام به گزیلل ظرف حاوي، آنقدر تکان داده مي شود تا کانادا بالزام بخوبي در گزیلل حل شود. در این ظرف شیشه اي بايد همیشه بسته باشد تا از نفوذ گرد و غبار بداخل چسب و ایجاد مشکلات بعدي در هنگام مطالعه لامها جلوگیری گردد.

چسبانیدن

لامها را از محلول گزیلل خارج کرده دقت مي شود که مایع زیاد نداشته باشند و در عین حال خشک نیز نشوند. يك يا دو قطره کانادا بالزام روي لام و کنار برش گذاشته می شود.

عده اي ترجیح مي دهند که کانادا بالزام را ابتدا روي لامل بگذارند. در عمل این طریقه مزیت دارد. بسرعت لام را روي لامل خم کرده (یا لامل بر روي لام خم می شود) و با فشار مختصر، ماده چسباننده پخش و سعی می شود تا بطور یکنواخت زیر لامل قرار گیرد. باید هر گونه حباب هوا را از لابلای آن دو خارج نمود. برای مدتی لامهای تهیه شده نگاهداری می شوند تا خشک گردند.

بطور خلاصه رنگ آمیزی معمولي هماتوکسیلین-ائوزین شامل مراحل زیر است:

- ۱- محلول گزیلل (I) : ۱۵ - ۱۰ دقیقه
- ۲- محلول گزیلل (II) : ۱۵ - ۱۰ دقیقه
- ۳- الكل مطلق-گزیلل : ۱۵ - ۱۰ دقیقه
- ۴- الكل مطلق (I) : ۱۵ - ۱۰ دقیقه
- ۵- الكل مطلق (II) : ۱۵ - ۱۰ دقیقه
- ۶- الكل ۹۶ درجه : ۱۵ - ۱۰ دقیقه
- ۷- الكل ۹۰ درجه : ۱۵ - ۱۰ دقیقه
- ۸- الكل ۸۵ درجه : ۱۵ - ۱۰ دقیقه

- ۹- الکل ۸۰ درجه : ۱۵ - ۱۰ دقیقه
- ۱۰- الکل ۷۰ درجه : ۱۵ - ۱۰ دقیقه
- ۱۱- آب مقطر : ۱۰ دقیقه
- ۱۲- همتوکسیلین : ۱۵ دقیقه
- ۱۳- شستشو در آب جاری : ۱۵ دقیقه
- ۱۴- اسید-الکل : ۱۰ ثانیه
- ۱۵- شستشو در آب مقطر : ۱۰ دقیقه
- ۱۶- ائوزین : ۱۰ دقیقه
- ۱۷- آب مقطر : ۱۰ دقیقه
- ۱۸- الکل ۷۰° : ۱۵ - ۱۰ دقیقه
- ۱۹- الکل ۸۰° : ۱۵ - ۱۰ دقیقه
- ۲۰- الکل ۸۵° : ۱۵ - ۱۰ دقیقه
- ۲۱- الکل ۹۰° : ۱۵ - ۱۰ دقیقه
- ۲۲- الکل ۹۵° : ۱۵ - ۱۰ دقیقه
- ۲۳- الکل مطلق (I) و (II) : ۱۵ - ۱۰ دقیقه
- ۲۴- الکل مطلق - گزلیل : ۱۵ - ۱۰ دقیقه
- ۲۵- گزلیل (I) : ۱۵ - ۱۰ دقیقه
- ۲۶- گزلیل (II) : ۱۵ - ۱۰ دقیقه
- ۲۷- چسباندن لامل با کانادا بالزام

نتیجه رنگ آمیزی:

هسته سلول ها: آبی رنگ

سیتوپلاسم: صورتی

مشخصات مواد بکار رفته در طول انجام این تحقیق به قرار ذیل است :

Distilled water	۱- آب مقطر (تهیه شده در آزمایشگاه)
Ethanol, absolute and extra pure, C_2H_6OH , $M=46.07$	۲- اتانول مطلق
Acetic acid glacial 100%, CH_3COOH , $M=60.5$	۳- اسید استیک گلاسیال
C_2H_5OH 96%	۴- الکل اتیلیک شرکت ایران-آرارات و شرکت سهامی خاص اصطک طبّی
Eosin G	۵- ائوزین G محلول در آب مقطر
Paraffin pastilles, solidification point about 56° - 58° & 45° , Merck	۶- پارافین
Picric acid, extra pure, $C_6H_3N_3O_7$, $M=229.11$ gr./mol, Merck	۷- اسید پیکریک
Egg	۸- تخم مرغ
Thymol cryst, extra pure, $M=150.22$ gr./mol, Merck	۹- تیمول
Diethyl ether (Ethyl ether), $(C_2H_5)_2O$, $M=74.12$, parschemie	۱۰- دی اتیل اتر
Aluminium Potassium sulphate, $AlK(SO_4)_2.12H_2O$, Merck	۱۱- زاج آلومینیوم یا پتاسیم
Copper(II) sulphate, $M=159.60$ gr./mol, Merck	۱۲- سولفات مس II
Formaldehyde solution min. 37% Merck	۱۳- فرمالدهید
Phenol, C_6H_5OH , $M=94.11$ gr./mol, Merck	۱۴- فنل

Canada balsam, Merck	۱۵- کانادا بالزام
Xylene, extra pure, C_8H_{10} , $M=106.17\text{ gr./mol}$, Merck	۱۶- گزیل
Glycerine(Glycerole), $C_3H_8O_3$, Merck	۱۷- گلیسرین
Hematoxylin(monohydrate), $C_6H_{14}O_6H_2O$, $M=320.29\text{ gr./mol}$, Merck	۱۸- هماتوکسیلین کریستال
HCl, Hydrochloric acid fuming 37%, extra pure. $M=36.46\text{ gr./mol}$, Merck	۱۹- هیدروکلریک اسید

ج- روش مطالعه رفتار (method of behavioural study)

به منظور انجام مطالعات رفتار شناسی، ۹ آزمایش مستقل در طی چند هفته انجام شد. در هر نوبت انجام آزمایش، سه قفس (یک قفس برای مشاهده تجربی و دو قفس بعنوان کنترل) در نظر گرفته می شد. قفسهای تجربی و شاهد دارای همان شرایط قفس اولیه که زاده ها به همراه پدر و مادر در آن نگهداری می شدند، بود؛ به این معنی که در هر سه آنها خاک اره و مقداری دستمال کاغذی ریخته شده بود.

زاده های حیوان ماده بین ۴۵-۳۰ دقیقه قبل از شروع آزمایش و بعد از آخرین نوبت تغذیه، از حیوان ماده (مادر) جدا می گردیدند و در سه قفس مذکور قرار می گرفتند. بعد از گذشت این زمان، حیوان ماده توسط اتر و در ظرف مخصوص کشته شده، سپس به روش مشروح در بخش تشریح و برداشت غده، در اسرع وقت قسمت رأسی بدن تشریح و غدد هارد در چشمهای چپ و راست از بقیه قسمتها جدا می گردیدند و درون یک پتری دیش حاوی سرم فیزیولوژی قرار داده می شدند تا خون اضافه شسته شود. متعاقباً بافت شش مادر و پوست خز مانند گوش آن نیز از بدن جدا گردیده و به همان ترتیب در سرم فیزیولوژی شستشو داده می شدند. از بافت های شش و خز گوش به عنوان شاهد استفاده می گردید.

بعد از این مرحله، غدد هارد بر روی لام قرار داده شده، با انتهای پنس له می شدند و لام محتوی توده بافتی در قفس تحت تجربه و در نزدیکی موقعیت زاده ها و به فاصله چند میلیمتری آنها قرار داده شدند. همچنین دو بافت دیگر که به عنوان شاهد تلقی می گردیدند (پوست خز و شش) بر روی دو لام جداگانه و نزدیک به حاشیه آنها قرار داده می شدند و در هر یک از قفسهای شاهد و در نزدیکی زاده ها قرار می گرفتند.

لازم به ذکر است که تمام این مراحل به سرعت انجام شد تا از خشک شدن بافت ها جلوگیری شود.

بعلاوه، قبل از شروع آزمایش، تهویه اتاق حیوانات برای مدت کوتاهی خاموش می شد و پنجره نیز بسته می شد تا بدین ترتیب، آزمایش بهتر انجام شود و از تأثیر عوامل احتمالی جانبی در حین انجام آزمایش کاسته شود.

طرز تهیه محلول نه دهم درصدی سرم فیزیولوژی (saline):

نمک طعام خالص ۹ gr.

آب مقطر 1000 cm^3

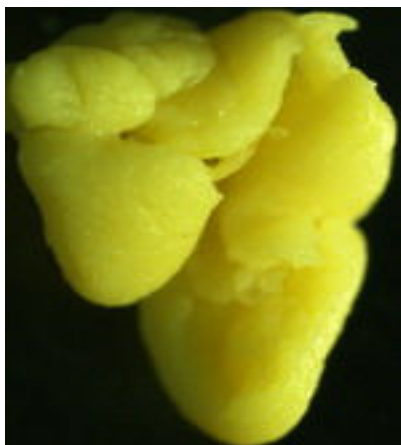
نمک طعام خالص در آب مقطر حل می شود.

بخش سوم
مشاهدات یا نتایج تجربی

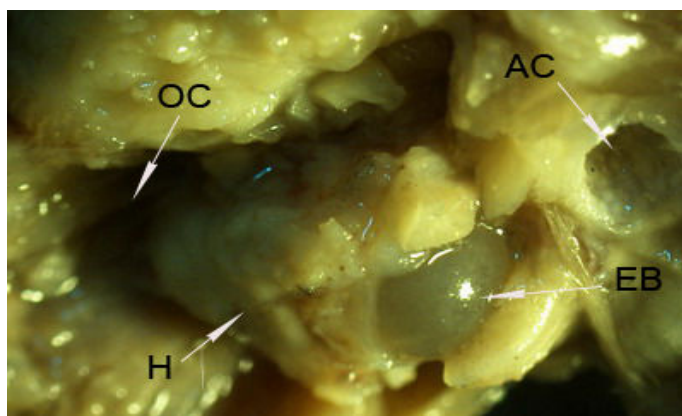
(observations or experimental results)

الف-آناتومی غده هاردر (anatomy of the Harderian gland)

غده هاردر یک غده بزرگ، کاملاً برجسته و داخل حدقه ای (intraorbital) است که به شکل ساختار نعل اسبی (horse - shoe) است. غده هاردر بیشتر سطح خلفی کره چشم را میپوشاند، همچنین از قسمت میانی خود، وارد فضای بین کره چشم و حاشیه اربیتالی (orbital rim) می شود. بافت غده ای در وسط یکپارچه است؛ اما در قسمت جانبی سه شکاف (cleft) دارد که از آن عصب بینایی و چند عضله خارج چشمی (extraocular muscle) عبور می کنند.

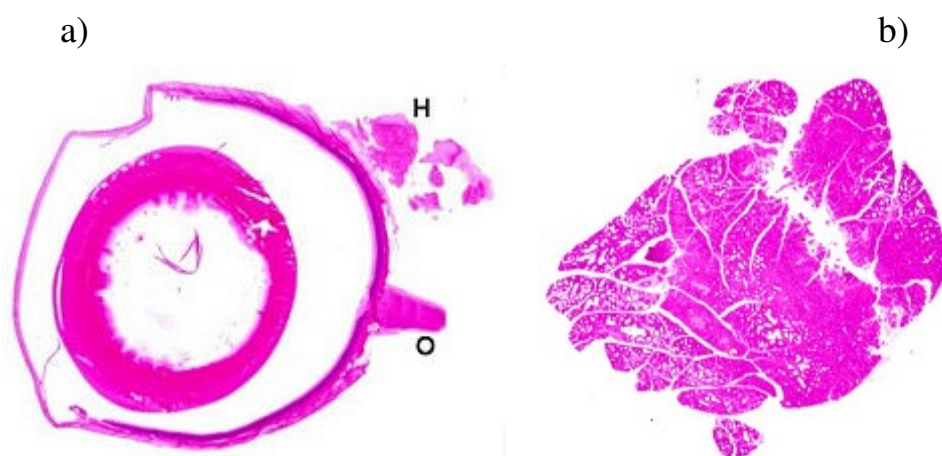


شکل ۱-۳: غده هاردر. به لوبولاسیون غده توجه کنید.

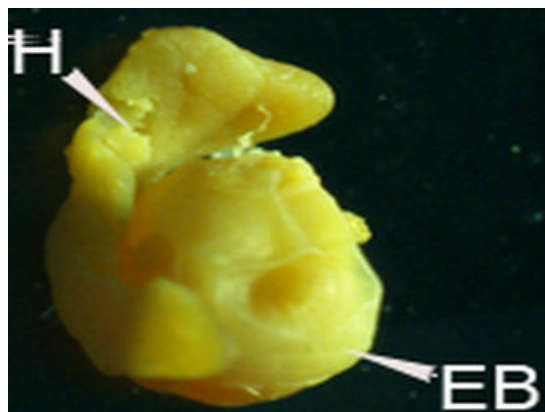


شکل ۲-۳: موقعیت غده هاردر (H) درون حدقه و در سطح خلفی کره چشم (EB). AC: مجرای شنوایی گوش خارجی. OC: حفره بینایی.

طول غده هاردر تقریباً ۰/۵ سانتی متر است. غده هاردر دارای ۲ لوب است که در طرفین بالا و پایین عصب بینایی قرار دارند (شکل ۳-۳). لوب کوچک در بالا (در حاشیه اربیتالی) و لوب بزرگ در پایین است. همچنین این غدد دارای سطوح مقعر و محدب هستند. سطح مقعر در تماس با کره چشم و عضلات است، در حالیکه بخش محدب آن به استخوان‌های اربیت متصل است. بخش کوچکی از غده هاردر در ارتباط بسیار نزدیک و چسبیده به کره چشم (eye ball) می باشد (شکل ۴-۳).



* شکل ۳-۳: (a) چشم (فیکساتیو Davidson) بخش مرکزی لنز بدلیل سختی زیاد در هنگام برش گیری خورد و شسته شده است. (O) عصب بینایی، (H) غده هاردر (b) غده هاردر



شکل ۳-۴: موقعیت غده هاردنر (H) در اطراف کره چشم، (EB): کره چشم

در بررسی های انجام شده از غده هاردنر ۳۱ حیوان (۱۹ نر و ۱۲ ماده) در سرم فیزیولوژی و زیر میکروسکوپ تشریح، رنگ غده از خاکستری- سفید تا خاکستری- صورتی مشاهده گردید. بعلاوه در موش آلبینو (نژاد BALB/c) هیچ اختلاف رنگ قابل بررسی بین غدد نر و ماده در مقیاس ماکروسکوپی (macroscopic) مشاهده نشد. میانگین وزن غده به طور تقریبی ۵ میلی گرم می باشد. نسبت تقریبی میانگین وزن غده به وزن بدن، در نر و ماده ۱:۲۵۰۰ است (جدول ۱-۳ و ۲-۳).

جدول ۱-۳: نسبت های تقریبی وزن غده به وزن بدن در روزهای مختلف زندگی در حیوان نر

شماره	سن حیوان (day)	وزن		نسبت تقریبی وزن غده به وزن بدن
		بدن (m.) (g)	غدد هاردر چپ و راست (mg.)	
۱	۶	۴/۳۲	۲	۱:۲۱۶۰
۲	۱۰	۶/۰۵	۲	۱:۳۰۲۵
۳	۱۵	۶/۶۴	۳	۱:۲۲۱۳
۴	۱۵	۶/۴	۳	۱:۲۱۳۳
۵	۱۵	۶/۲	۳	۱/۲۰۶۶
۶	۱۷	۷	۴	۱:۱۷۵۰
۷	۱۷	۶/۴۵	۳	۱:۲۱۵۰
۸	۱۷	۷/۴۵	۳	۱:۲۴۸۳
۹	۱۷	۶/۱۰	۳	۱:۲۰۳۳
۱۰	۱۹	۴/۴۵	۳	۱:۱۴۸۳
۱۱	۲۱	۵/۶۵	۳	۱:۱۸۸۳
۱۲	۳۵	۸/۴۱	۴	۱:۲۱۰۲
۱۳	۳۵	۱۳/۳۰	۴	۱:۳۳۲۵
۱۴	۳۵	۱۱/۶۰	۴	۱:۲۹۰۰
۱۵	۴۶	۱۶/۲۵	۱۰	۱:۱۶۲۵
۱۶	۱۶۵	۲۵/۹	۱۱	۱:۲۳۵۴
۱۷	۲۲۳	۲۲/۴	۶	۱:۳۷۳۴
۱۸	۲۵۴	۲۴/۵	۱۲	۱:۲۰۴۲
۱۹	۳۳۶	۲۷	۱۱	۱:۲۴۵۴

جدول ۲-۳: نسبت های تقریبی وزن غده به وزن بدن در روزهای مختلف زندگی در حیوان ماده

شماره	سن حیوان (day)	وزن		نسبت تقریبی وزن غده به وزن بدن
		بدن (gm.)	غدد هارد رچپ و راست (mg.)	
۱	۱۲	۳/۸۵	۲	۱:۱۹۲۵
۲	۱۳	۳/۷۵	۲	۱:۱۸۷۵
۳	۱۵	۵/۹۵	۳	۱:۱۹۸۳
۴	۱۵	۶/۰۳	۳	۱:۲۰۱۰
۵	۲۱	۵/۴۵	۳	۱:۱۸۱۶
۶	۳۵	۱۲/۹۵	۳	۱:۴۳۱۷
۷	۸۱	۱۹/۱۲	۹	۱:۲۱۲۴
۸	۹۹	۱۸/۸۶	۶	۱:۳۱۴۳
۹	۱۶۵	۲۰/۴۵	۲	۱:۱۰۲۳۵
۱۰	۲۲۰	۲۱/۶	۱۰	۱:۲۱۶۰
۱۱	۲۲۶	۲۱/۸۹	۸	۱:۲۷۳۶
۱۲	۳۷۸	۲۵	۱۰	۱:۲۵۰۰

ب- مطالعات بافت شناسی (histological observations)

از ۲۵ حیوان ماده و ۲۹ حیوان نر جهت مطالعات بافت شناسی در این تحقیق استفاده شده است.

سنین حیوانات ماده برابر پنجمین، دهمین، پانزدهمین، بیست و یکمین، سی و پنجمین، نودونهمین و صدوشصت و پنجمین و در زمان شیر دهی، صدویازدهمین روز حیات بود.

حیوانات نر نیز در روزهای پنجم، دهم، پانزدهم، هفدهم، بیست و سوم، سی و پنجم، چهل و ششم، صد و پنجاهم، صد و شصت و پنجم و سیصد و سی و ششم کشته شده و تحت بررسی قرار گرفتند.

برای توضیح بهتر مطلب لازم است ابتدا مختصری از آنچه انتظار می رود در مقطعی از غده هاردر دیده شود، ذکر گردد. آنچه در ذیل آمده است ویژگی های عمومی هیستولوژیکی غده هاردر در همه جوندگان می باشد.

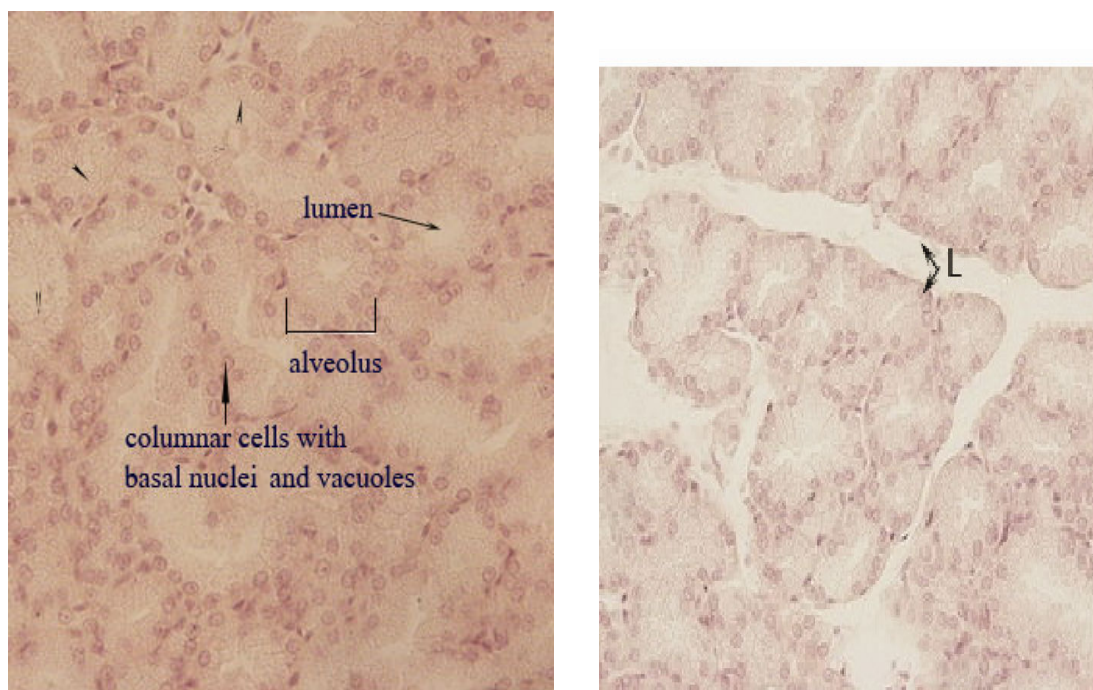
غده هاردر غده اگزوکرینی است که مواد لیپیدی را بر روی سطح خارجی قرنیه تخلیه می کند. این غده علاوه بر واکوئل های حاوی مواد لیپیدی دارای تولیدات پورفیرین و ملاتونین نیز می باشد.

غده هاردر توسط کیسولی از بافت همبند (connective tissue) احاطه می شود. استطاله هایی (septa) از این کیسول به داخل غده وارد شده آن را به لبول هایی تقسیم می کند. غدد هاردر غدد توبولی-آلوئولی منشعبند (branched tubuloalveolar). هر لبول از تعداد زیادی واحد های توبولی-آلوئولی تشکیل می شود. توبول ها و آلوئولها بزرگند. هر توبول دارای یک لایه از سلول های مترشحه اپیتلیالی در دیواره است. سلولهای اپیتلیالی، استوانه ای شکلند و دارای اندازه یکسان می باشند. سیتوپلاسم فراوان این سلول ها که توسط ائوزین، بخوبی رنگ گرفته اند دارای واکوئل های لیپیدی متعددند که در فرایند رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلین-ائوزین

(Hematoxylin & Eosin)، همچنان که در شکل مشاهده می شود، محتوای لیپیدی آنها شسته شده و تنها واکوئل های خالی بر جای مانده اند. همچنین سلول های اپیتلیالی دارای هسته های بزرگ هستند که در قاعده سلول قرار گرفته اند. نکته جالب توجه این است که محتوای لیپیدی واکوئل ها حتی در شرایط عدم تحریک هم، از طریق اگزوسیتوز تخلیه می شوند.

هر توبول یا آلوئول، لومن عریضی دارد. پورفیرین ها به صورت توده های داخل لومنی در آلوئول ها ذخیره می گردند. بافت اپیتلیالی در سطح قاعده ای خود که در تماس با بافت همبند

زیرین است دارای یک ساختمان خارج سلولی صفحه مانند و ممتد موسوم به لایه بازال (basal lamina) است. درون لایه بازال، سلول های میواپیتلیالی (myoepithelial cells) وجود دارند و همچنین در حد فاصل آلوئول ها، سلول های خونی مشاهده می شوند.



شکل ۳-۵: مقطعی از بافت غده هاردر موش خانگی نر سی و پنج روزه. شکل سمت چپ: سر پیکانها واکوئل های خالی از لیپید را نشان می دهند. شکل سمت راست (L): لیول $\times 400$.

ج- نتایج مطالعات بافت شناسی

همانطور که در بخش پیشین ذکر شد، کلیه مطالعات هیستولوژیکی بر روی لام‌های رنگ آمیزی شده با دو رنگ هماتوکسیلین و ائوزین و در زیر میکروسکوپ نوری انجام شده‌اند.

در مطالعه مقطع غده هارد در موش خانگی **شش روزه** نتایج ذیل بدست آمد:

آلوئول‌ها، کوچک و دارای قطر تقریبی میانه $17/2$ میکرون ($d \approx 17/2 \mu m$) هستند. سلول‌های استوانه‌ای، بزرگ و کف آلود بوده و دارای قطر تقریبی میانه $7/27$ میکرون ($d \approx 7/27 \mu m$) هستند. همچنین هسته‌های کروی و بزرگ در قاعده سلول‌ها هستند. لومن‌های آلوئول‌ها دارای قطر تقریبی میانه $2/42$ میکرون می‌باشند ($d \approx 2/42 \mu m$). همچنین در اطراف آلوئول‌ها میتوان نفوذ بافت همبند را ملاحظه نمود.

در مطالعه مقطع غده هارد در موش خانگی **ده روزه** نتایج ذیل بدست آمد:

اندازه آلوئول‌ها نسبت به اندازه آلوئول‌های غده هارد در ۶ روزه بزرگتر است. با این وجود، همه آلوئول‌های یک لوب، دارای یک اندازه نمی‌باشند. قطر آلوئول‌ها بطور میانگین در نرها بیشتر از ماده‌ها (نرها: $d \approx 43/7 \mu m$ ، ماده‌ها: $d \approx 33 \mu m$) و تراکم آلوئولی بسیار کمتر می‌باشد. بعلاوه لومن‌ها نیز عریضتر از لومنهای غده هارد در ۶ روزه هستند (نرها: $d \approx 11/4 \mu m$ ، ماده‌ها: $d \approx 10/5 \mu m$)؛ هر چند لومن‌ها بویژه در جنس ماده در بسیاری از موارد بسیار کوچک به نظر می‌رسند و یا سلول‌های سازنده آن آنقدر بزرگ و حجیم شده‌اند که فضایی برای لومن باقی نمانده است. سیتوپلاسم واکوئله (vacuolated cytoplasm) بسیار کشیده شده است و حاوی واکوئل‌های خالی گرد می‌باشد که محتوای لیپیدی آنها در طی فرایند رنگ آمیزی شسته شده‌اند. وفور واکوئل‌های خالی از لیپید، نمای کف آلودی

به آلوئول‌ها داده است. بنظر می‌رسد تراکم و بهم فشردگی واکوئل‌ها در سلول‌های ماده بیش از نر باشد. میانگین طول سلول‌ها بطور تقریبی در نرها، $16/1$ میکرون و در ماده‌ها $11/3$ میکرون است (نرها: $d \approx 16/1 \mu m$ ، ماده‌ها: $d \approx 11/3 \mu m$). سلول‌ها، دارای هسته‌های با نواحی هتروکروماتینی متعدّدند که در قاعده قرار گرفته‌اند. استطاله‌های بافت همبند که بداخل غده کشیده شده، آن را به لبول‌هایی تقسیم کرده است. دراین فضاهای همبند بینابینی، سلول‌های خونی مشاهده می‌شوند. همچنین در لایه بازال (basal lamina)، سلول‌هایی که تصور می‌شود سلول‌های میوآپیتلیالی باشند، در حالت استراحت مشاهده می‌شوند.

در مطالعه مقطع غده هاردر موش خانگی **پانزده روزه** نتایج ذیل بدست آمد:

در مقطع غده هاردر ۱۵ روزه، آلوئول‌ها و توبولوآلوئول‌ها در وضعیت‌های متفاوت ترشحي قرار دارند. در غالب موارد، سلول‌های آلوئول‌ها و توبولوآلوئول‌ها در حال تخلیه واکوئل‌های لیپیدی هستند؛ بگونه‌ای که سلول کشیده شده، از قسمت رأسی خود در حال تخریب می‌باشد و واکوئل‌ها را بداخل لومن رها می‌کند. تخریب رأسی در بسیاری از موارد بطرف قاعده پیش می‌رود؛ بطوریکه از سیتوپلاسم فقط لایه نازکی در اطراف هسته قرار گرفته در قاعده سلول، باقی می‌ماند. در بسیاری از موارد مشاهده شد که هسته نیز به همراه بقایای سیتوپلاسمی به فضای لومنی می‌رود. این نوع تخلیه و ترشح، نشان‌دهنده مکانیسم ترشحي هولوکراین (holocrine) می‌باشد.

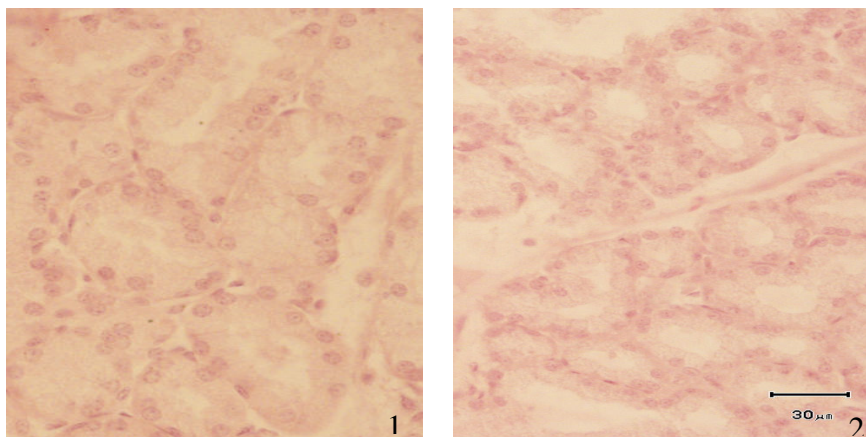
در این زمان که یک آلوئول در وضعیت ترشحي بسر می‌برد، آلوئول مجاور ممکن است در حالت آرامش باشد و سلول‌های حجیم شده آن دارای واکوئل‌های فراوان باشند. حال آنکه در آلوئول سومی، لومن بسیار عریض و خالی از مواد ترشحي بوده و سلول‌ها حجم کمی دارند. هر چند بطور میانگین، حجم تقریبی سلول‌ها در ماده‌ها

بنحو قابل توجهی بیشتر از نرهاست (طول سلول در نرها: $d \approx 13/2 \mu\text{m}$ و در ماده‌ها: $d \approx 19/4 \mu\text{m}$). این سه وضعیت سلولی در آلئول‌های متفاوت در مقطعی از غده هارد در بطور همزمان قابل مشاهده است.

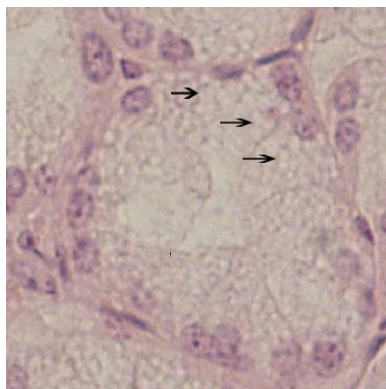
همچنین لومن‌ها بسیار عریض شده‌اند و حاوی تکه‌های جدا شده سیتوپلاسم و در بسیاری از موارد، هسته‌های سلولی می‌باشند. هر چند در مقایسه با لومن نرها، در ماده‌ها لومن‌ها تنگ‌ترند و حاوی مواد مترشحه بیشتری هستند (قطر لومن در نرها: $d \approx 24 \mu\text{m}$ ، در ماده‌ها $d \approx 11/8 \mu\text{m}$) و این به این معناست که فعالیت ترشحی و تخریب سلولی در ماده‌های ۱۵ روزه بیشتر از نرهای ۱۵ روزه است.

در مقاطع غدد هارد در نر و ماده‌های ۱۵ روزه، با توجه به اندازه‌های متفاوت واکوئل‌های لیپیدی، سه نوع سلول اپیتلیالی شناسایی شد. در این انواع سلولی، واکوئل‌های لیپیدی با سه اندازه متفاوت ۲/۵، ۱/۸ و ۰/۹۱ میکرونی تعیین گردیدند.

در برخی از موارد، دو نوع متفاوت واکوئل با دو اندازه متفاوت، در یک سلول مشاهده شد. همچنین در بسیاری از موارد، در یک توبولوآلئول و یا یک آلئول واحد، سه نوع متفاوت سلولی شناسایی شدند. سلول‌هایی که تصور می‌شود سلول‌های میوآپیتلیالی باشند و در اطراف توبولوآلئول‌ها قرار دارند، در غالب مواردی که توبولوآلئول‌ها در وضعیت ترشحی هستند، در حالت انقباضی و کشیده مشاهده شدند. همچون مقاطع قبلی، سلول‌های خونی که حاکی از وجود مویرگ‌های ظریف در منطقه است در حد فاصل توبول‌ها و آلئول‌ها در فضای بافت همبند مشاهده شدند.



شکل ۳-۶: مقطعی از غده هارد در موش خانگی
۱۵ روزه (۱) نر، (۲) ماده. $\times 400$.



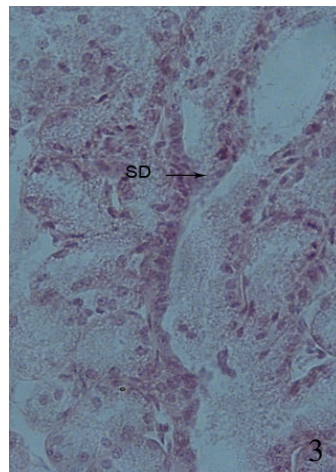
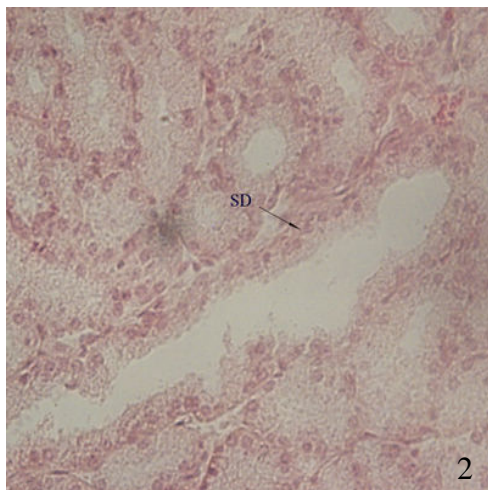
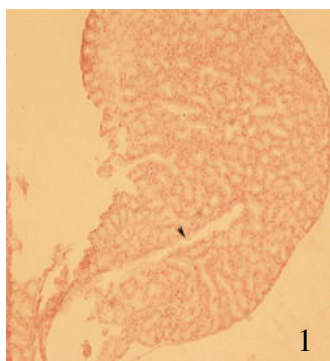
شکل ۳-۷: سه نوع سلول اپیتلیالی بر حسب اندازه واکوئل های
لیپیدی در غده هارد در موش خانگی. $\times 1000$.

در مطالعه مقطع غده هاردر در موش خانگی ۱۷ روزه نتایج ذیل بدست آمد:

در اینجا نیز، آلوئول‌ها در وضعیت‌های متفاوت ترشحی بسر می‌برند. اما بنظر می‌رسد حجم سلول‌ها در اغلب آلوئول‌ها بیشتر شده باشد (طول سلول: $d \approx 15/8 \mu m$)؛ هر چند این اندازه، نسبت به حجم سلول اپیتلیالی در غده هاردر ماده ۱۵ روزه، باز هم کمتر است. همچنین لومن‌ها نسبت به قبل، تنگتر شده‌اند ($d \approx 17/8 \mu m$).

در بسیاری از آلوئول‌ها فعالیت ترشحی دیده می‌شود. هسته‌های سلول‌های اپیتلیالی، گرد و در قاعده‌اند و دارای ۲ هسته می‌باشند. نواحی هتروکروماتینی در هسته‌ها بوضوح قابل رؤیت است.

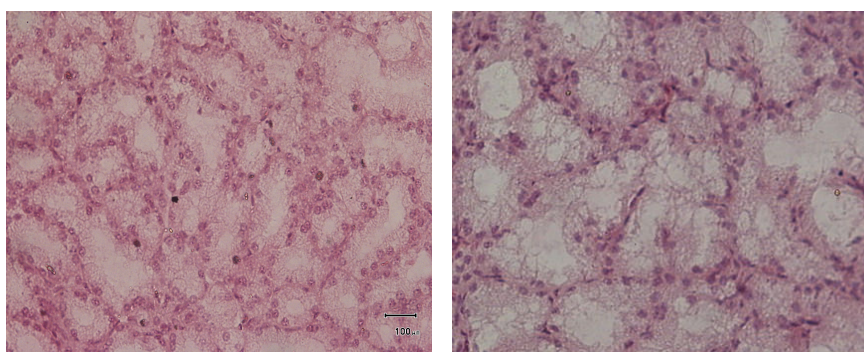
در این مقطع، مجرای ترشحی (secretory duct) غده بوضوح نمایان است. مجرای ترشحی مشاهده شده در محلی که غده را ترک میکند (ناف یا hilus) از بقیه قسمت‌های بافت غده‌ای، متمایز شده است. با این وجود در لامهای دیگر، تشخیص یک سیستم مجرای ترشحی در درون خود غده ممکن نشد. درون این مجرای ترشحی، قطعاتی از سلول‌های اپیتلیالی حاوی واکوئل، هسته‌های سلولی، همچنین واکوئل‌های لیپیدی در حال جدا شدن از قسمت رأسی سلول‌ها و آمدن به وسط مجرا، به فراوانی مشاهده شدند. بنظر می‌رسد سلول‌های اپیتلیالی دیواره مجرا به شکل سلول‌های مکعبی مژکدار (ciliated cuboidal cells) هستند.



شکل ۸-۳: مقاطع غده هارد در موش ۱۷ روزه نر. SD (secretory duct): مجرای ترشچی.
(۱) $\times 100$ (۲) و (۳) $\times 400$.

در مطالعه مقطع غده هارد در موش خانگی ۲۱ روزه نتایج ذیل بدست آمد:

در روز بیست و یکم، فعالیت ترشچی سلولهای غده ای همچنان در حال افزایش است. لومن ها وسیع تر شده اند (نرها: $d \approx 26/9 \mu m$ ، ماده ها $d \approx 18/2 \mu m$) و فرایند تخریب و ترشح سلولی، آرایش نامنظم و کم وضوحی را به آلوئول ها داده است. در بسیاری از موارد، تنها هسته در دیواره آلوئولی بر جای مانده است و در برخی دیگر، مرز سلول هایی که تا وسط لومن کشیده شده اند، واضح نیست.



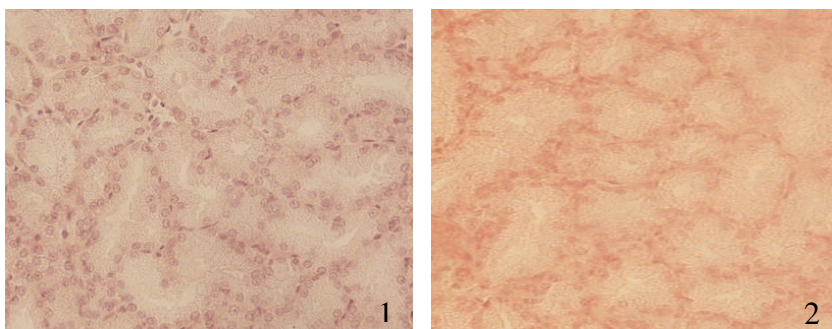
1

2

شکل ۹-۳: مقطعی از غده هارد در موش خانگی ۲۱ روزه (۱ نر ۲ ماده). $\times 400$.

در مطالعه مقطع غده هارد در موش خانگی ۳۵ روزه نتایج ذیل بدست آمد:

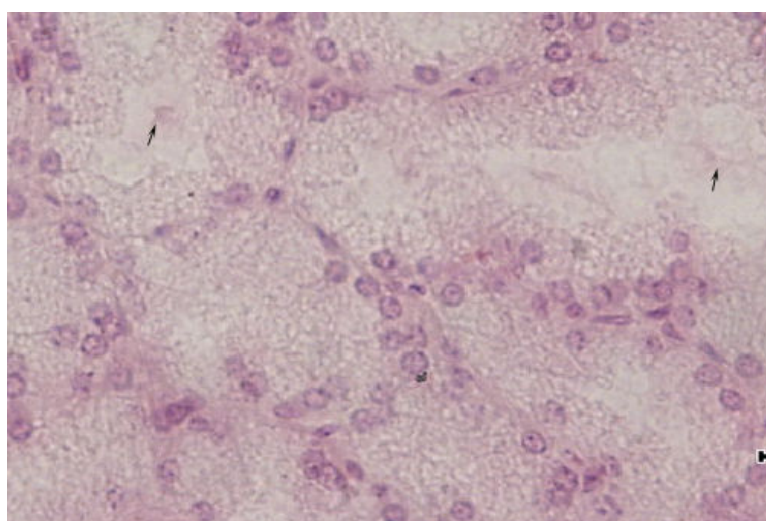
آلوئول‌ها بطور منظم در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند. سلول‌های اپیتلیالی غده‌ای در وضعیت آرامی بسر می‌برند و فرایند ترشح سلولی در بیشتر آلوئول‌ها متوقف شده است. در عوض، سلول‌ها حجیم‌تر شده‌اند (نرها: $d \approx 18 \mu m$ ، ماده‌ها: $d \approx 19/44 \mu m$) و همانند روز پانزدهم، پر از واکوئل‌های لیپیدی گرد هستند. با توجه به اینکه لومن‌ها کوچکتر هستند (نرها: $d \approx 13/44 \mu m$ ، ماده‌ها: $d \approx 9 \mu m$) و قطر آنها تقریباً به نصف کاهش یافته است، شاید بتوان گفت فعالیت سلولی و سنتز مواد لیپیدی در روز سی و پنجم نسبت به روز پانزدهم، بیشتر شده است.



شکل ۱۰-۳: مقطعی از غده هارد در موش خانگی ۳۵ روزه (۱ نر ۲ ماده).
×۴۰۰.

در مطالعه مقطع غده هارد در موش خانگی ۹۹ روزه ماده نتایج ذیل بدست آمد:

فعالیت ترشحی در بسیاری از قسمت‌ها مشاهده می‌شود. در لومن برخی از آلوئول‌ها اثراتی از مواد ترشحی دیده می‌شود که همانند رسوب در لومن بر جای مانده است. رأس سلول‌های پر از واکوئل، به حالت گنبدی برآمده است و رأس سلول‌های در وضعیت ترشحی، نائی همچون حل پاره شدگی دارد.

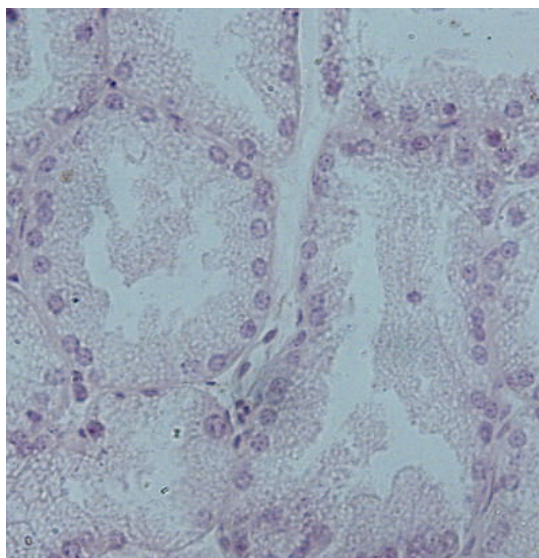


شکل ۱۱-۳: مقطعی از غده هارد در موش خانگی ۹۹ روزه ماده. به اثرات مواد ترشحی در لومن که همچون رسوب بنظر می‌رسند، توجه کنید (پیکانها). ×۴۰۰.

در مطالعه مقطع غده هارد در موش خانگی ۱۱۱ روزه ماده شیرده نتایج ذیل بدست آمد :

آلوئول‌ها و لومن‌ها نسبت به قبل بزرگتر هستند (آلوئول: $d \approx 74/2 \mu m$ ، لومن $d \approx 37 \mu m$) و وضعیت سلول‌های اپیتلیالی نسبت به سلول‌های ترشحي ۹۹ روزه تفاوت چندانی ندارد.

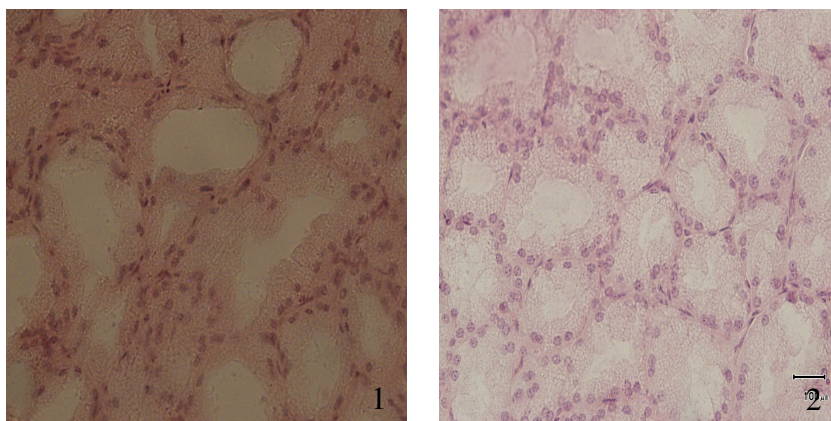
آلوئول‌ها در هر سه وضعیت حجیم شدن سلولی، ترشح سلولی و وضعیت نسبتاً آرام بعد از ترشح که رأس سلول‌ها غالباً صاف و یا دارای فرورفتگی است، مشاهده می‌شوند. همچنین مواد ترشحي و هسته‌ها بوفور در لومن دیده میشوند. استطاله‌های بافت همبند در بینابین آلوئول‌ها مشاهده می‌شوند که سلول‌های خونی و سلول‌های دیگری را در خود دارند.



شکل ۱۲-۳: مقطعی از غده هارد در موش خانگی ۱۱۱ روزه ماده شیرده. $\times 400$.

در مطالعه مقطع غده هاردر موش خانگی، در روزهای صد و پنجاهم و صد و شصت و پنجم نتایج ذیل بدست آمد:

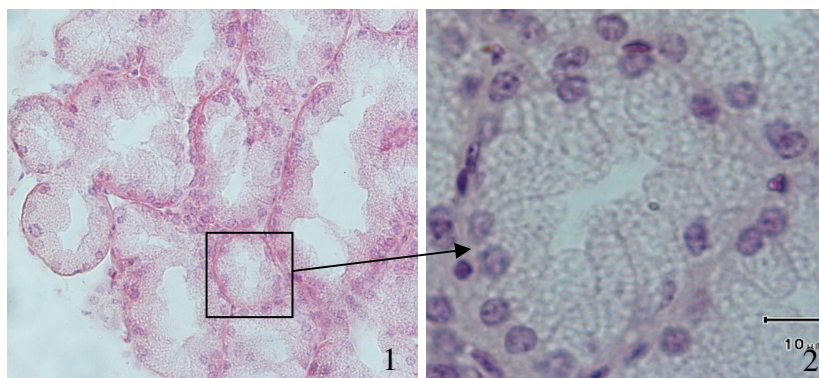
قطر آلوئولها در روزهای مذکور، نسبت به قبل کمتر می‌شود (در نر ۱۵۰ روزه $d \approx 67/2 \mu m$ ، نر ۱۶۵ روزه $d \approx 55 \mu m$) و قطر لومن‌ها بیشتر می‌شود (در نر ۱۵۰ روزه $d \approx 23 \mu m$ ، نر ۱۶۵ روزه $d \approx 35 \mu m$) در روز صد و پنجاهم، حجم سلولها و سنتز واکوئل‌های لیپیدی بیشتر می‌شود؛ در حالیکه در روز صد و شصت و پنجم، طول سلولها کاهش می‌یابد (در نر ۱۵۰ روزه: $d \approx 24/5 \mu m$ ، نر ۱۶۵ روزه: $d \approx 12/5 \mu m$) و لومن‌ها در اکثر موارد مشاهده شده، بزرگتر و خالی از مواد مترشحه هستند.



شکل ۱۳-۳: مقایسه مقطعی از غده هاردر موش خانگی نر ۱۵۰ روزه (1) و نر ۱۶۵ روزه (2). $\times 400$.

در مطالعه مقطع غده هاردر موش خانگی ۳۳۶ روزه نتایج ذیل بدست آمد:

فعالیت سنتز لیپید در سلول‌ها بسیار زیاد است؛ بطوریکه واکوئل‌های ذخیره شده در سلول‌ها، آنها را حجیم و رأسشان را برآمده نموده است. همچنین طویل شدن سلول‌ها، فضای لومنی را تنگ کرده است. فعالیت ترشحی سلول‌ها از قسمت رأسی، مشاهده می‌شود. در ماه پایانی سال اول زندگی، آلوئول‌ها و سلول‌ها به بیشترین اندازه خود رسیده‌اند (آلوئول: $d \approx 72/5 \mu m$ ، طول سلولی: $d \approx 27/5 \mu m$).



شکل ۱۴-۳: غده هاردر موش خانگی نر ۳۳۶ روزه.
(۱) $\times 400$ (۲) $\times 1000$.

جدول ۳-۳: داده های تخمینی از قطر آلوئول ها، لومن ها، هسته ها و طول سلول ها در غدد هاردر ۱۹ موش نر در روزهای مختلف سال اول زندگی

عمر (روز) در حیوان نر								
۳۳۶	۱۶۵	۱۵۰	۴۵	۳۵	۲۳	۱۷	۱۵	۱۰
۷۲/۵	۵۵	۶۷/۲	۴۸/۲	۴۲/۷	۴۹/۴	۴۳/۹	۴۵/۸	۴۳/۷
میانگین قطر آلوئول (μm)								
۳۳/۱	۳۵/۰	۲۳	۱۷/۸	۱۳/۴	۲۶/۹	۱۷/۸	۲۴	۱۱/۴
لومن (μm)								
۲۷/۵	۱۲/۵	۲۴/۵	۱۸/۵	۱۸	۱۵/۱	۱۵/۸	۱۳/۲	۱۶/۱
میانگین طول سلول (μm)								
۶/۲	۵/۰	۷/۷	۵/۸	۶/۲	۵/۵	۵/۰	۶/۴	۵/۷
میانگین قطر هسته (μm)								

* ارقام بدست آمده بر حسب بزرگنمایی ۴۰۰ در میکروسکوپ نوری محاسبه شده اند.

جدول ۴-۳: داده های تخمینی از قطر آلوئول ها، لومن ها، هسته ها و طول سلول ها در غدد هارد در ۸ موش ماده در روزهای مختلف سال اول زندگی

	عمر (روز) در حیوان ماده						
	۱۰	۱۵	۲۱	۳۵	۹۹	۱۱۱ (شیرده)	۱۶۵
میانگین قطر آلوئول (μm)	۳۳	۴۵/۷	۴۸	۴۰/۶	۷۰	۷۴/۲	۶۰
میانگین قطر لومن (μm)	۱۰/۵	۱۱/۸	۱۸/۲	۹/۰	۲۹/۵	۳۷/۰	۲۵/۷
میانگین طول سلول (μm)	۱۱/۳	۱۹/۴	۱۲/۷	۱۹/۴	۲۱/۴	۲۰/۹	۱۴/۹
میانگین قطر هسته (μm)	۵/۳	۶/۳	۶/۲	۵/۸	۶/۵	۶/۵	۵/۰

* ارقام بدست آمده بر حسب بزرگنمایی ۴۰۰ در میکروسکوپ نوری محاسبه شده اند.

د- مطالعه رفتار شناسی (Behavioural Study)

تا کنون عملکردهای احتمالی متعددی به غدد هارد نسبت داده شده است. در ارتباط با یکی از این عملکردهای احتمالی (نقش فرومونی)، به نقش غده هارد در ارتباط مابین زاده ها و مادر در هامستر اشاره میشود و فرضیه ای مبنی بر اینکه احتمالاً از غدد هارد مادر، سیگنال هایی همچون فرومون ایجاد و به زاده ها ارسال میگردد تا زاده ها بتوانند مادر را بشناسند، پیشنهاد میگردد.

بر این اساس، در بخشی از این تحقیق، به مطالعه رفتار زاده‌های موش خانگی پرداخته شد و واکنش زاده‌ها در روزهای آغازین، نسبت به تولید احتمالی یک ماده فرومونی از غدد هارد در مادر، طی ۹ مرتبه آزمایش بررسی گردید. این آزمایشات در سنین ۳، ۵-۶ و ۱۳ روز بعد از تولد انجام شدند.

در مشاهده رفتار زاده‌ها، معیار بررسی واکنش آنها به محتویات غدد هارد مادرشان، تکرار حرکات جستجوگرانه و چرخشی سر و توقف زاده‌ها بر روی غده یا اطراف آن در هر بار نزدیک شدن به غده، تغییر وضعیت حرکتی بدن از حالت سکون به تحرک، چرخش بدن به طرف لام حاوی غده و باز و بسته کردن دهان در اطراف غده بود.

هـ. نتایج مطالعه رفتار شناسی

در قفس تجربی حاوی زاده‌های ۳ روزه، واکنش نسبت به غدد هارد مادر، تنها در تعدادی از زاده‌ها مشاهده شد و تعداد حرکات به اندازه تعداد حرکات زاده‌های ۵-۶ روزه، زیاد نبود. بلکه حرکات به تعداد کمتر و آهسته‌تر صورت گرفت. همچنین در دو قفس شاهد، واکنش قابل بررسی مشاهده نگردید.

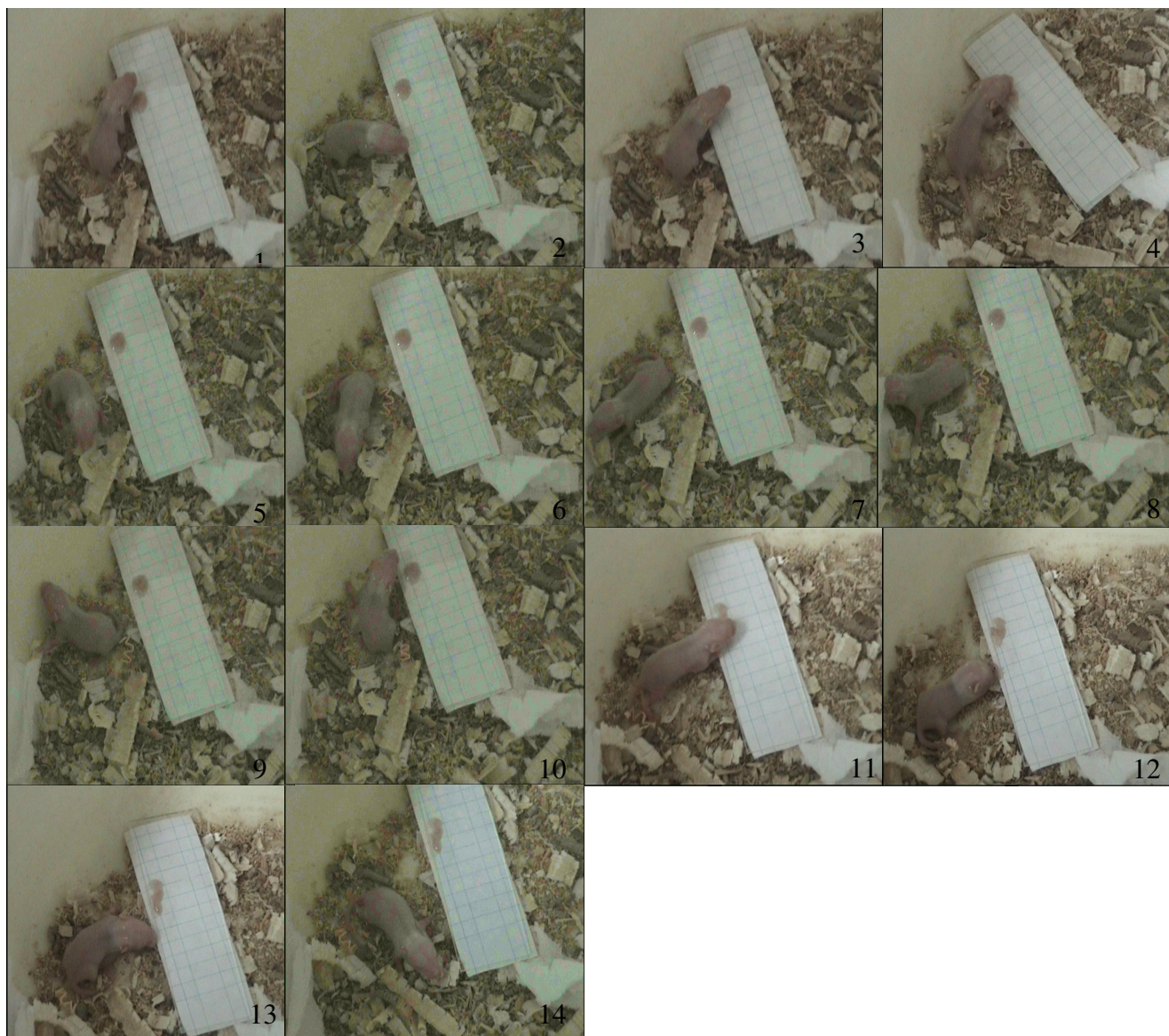
نتایج حاصله از انجام ۷ آزمایش بر روی موشهای ۵-۶ روزه بشرح زیر است:

در یک آزمایش، یکی از ۳ زاده بلافاصله بعد از قرار گرفتن در معرض غدد له شده بطرف آن جهت گیری کرد و دوتای دیگر با نشان دادن حرکات چرخشی، تغییر موقعیت داده یا دیرتر بطرف غده متمایل شدند. در آزمایش دیگر، ۵ زاده ۵-۶ روزه واکنش چندانی از خود نسبت به غده نشان ندادند. در مطالعه رفتار ۵ زاده ۶ روزه دیگر، واکنشها نسبت به غدد مادر به صورت حرکت به طرف لام حاوی غده، حرکات جستجوگر سر در اطراف لام و توقف بر روی غده و باز کردن دهان در اطراف غده بود.

در آزمایش بعدی، حرکت و جست خیز ۶ زاده ۵-۶ روزه، بعد از قرار دادن لام حاوی غدد له شده در مجاورت آنها مشاهده شد.

مشاهدات در ارتباط با گروه‌های شاهد در دو مورد بقرار ذیل بود: در قفس (۱) حرکت کند و بسیار محدود زاده‌ها ملاحظه شد؛ به این ترتیب که یکی از دو زاده موجود در این قفس بعد از تغییر موقعیت خود بطرف شش، تمایلی به تکرار حرکت نشان نداد و از آن دور شد و در قفس (۲) حرکت قابل بررسی در اطراف لام حاوی خز گوش مادر مشاهده نگردید.

در آزمایش‌های پنجم و ششم و هفتم، حرکات دورانی نزدیک به لام و توقف بر روی نسج غده هارد در دفعات و بوضوح مشاهده شد. همچنین حرکات چرخشی زاده‌ها حول یک نقطه نزدیک به لام و حرکت صورتی بصورت باز کردن دهان بر روی لام نیز قابل توجه بود. در قفس کنترل در اطراف لام حاوی خز گوش، حرکت به طرف لام به آن شکل که در تجربه با غده هارد مشاهده شد، صورت نگرفت و بالاخره در قفس‌های تجربی و شاهد حاوی ۷ زاده ۱۳ روزه، حرکت قابل توجه در هر مورد مشاهده نشد.



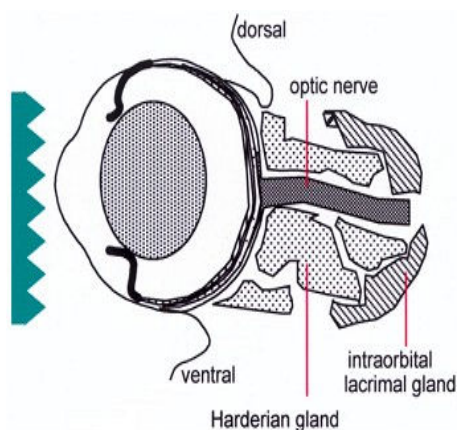
شکل ۱۵-۳: تصاویری از حرکات جستجوگر زاده در اطراف غده هارد. به حرکت دورانی (تصویر ۱-۱۴) زاده در اطراف لام حاوی غده توجه کنید.

بخش چهارم :
بحث و بررسی نتایج

(Discussion)

در سال ۱۶۹۴ میلادی، غده هاردر توسط آناتومیست سوئیسی Johan Jakob Harder در حدقه گوزن قرمز (fallow deer) کشف شد که از غدد نیکتیتنز (nictitans gland) متمایز بود. بعدها این غده در زاویه داخلی (inner canthus) چشم به عنوان غده هاردر شناسایی و نامگذاری شد.

غده هاردر یک غده چشمی است که قطعات انتهایی توبولی-آلوئولی (آلوئول‌های توبولی) دارد و توسط سیستم مروکیرین لیپید ترشح می‌کند. غده هاردر بخش قابل توجهی از حدقه را اشغال می‌کند و اطراف نیمه خلفی کره چشم را می‌گیرد. در اکثریت پستانداران، دو ارگان کوچک ترشحات ملتحمه‌ای را تأمین می‌کنند: غدد هاردر و غدد اشکی. به علاوه غدد meibomian که غدد سباسه (sebaceous glands) تخصص یافته‌ای بوده و حاشیه‌های پلک را نرم می‌کنند و تعداد بسیار زیادی غدد موکوسی که در سراسر ملتحمه پلک‌ها پراکنده‌اند، نیز در تولیدات ترشحاتی درون حدقه چشم مشارکت دارند. در برخی از گونه‌ها مانند رت و موش، دستگاه اشکی از دو بخش تشکیل می‌شود؛ یکی داخل حدقه‌ای و دیگری خارج حدقه‌ای. اولی معمولاً در پشت کره چشم قرار می‌گیرد؛ در حالیکه دومی نزدیک زاویه فکی و در ارتباط نزدیک با پاروتید است. غده هاردر در داخل حدقه و در ارتباط نزدیک با کره چشم است.



* شکل ۱-۴: چشم، عصب بینایی (optic nerve) و غده هاردر (Harderian gland).

در رت، بیشتر حجم اشک ناشی از غده اشکی اصلی (main lacrimal gland) است. منابع دیگر اشک، غدد هاردر، همچنین غدد داخل حذقه‌ای کوچک هستند که مانند غدد خارج حذقه‌ای، مایع اشکی تولید می‌کنند، اما با پروتئین کمتر. آنها در حذقه میانی (medial orbit)، مجاور استخوان اتموئید قرار دارند و عمدتاً مواد موکوئیدی ترشح می‌کنند.

در رت، موش خانگی، خرگوش و حیوانات دیگری که پرده نیکتیتنز یا پلک سوم دارند، این غده مشخص تر است و در بیشتر این گونه‌ها بزرگتر از غده اشکی داخل حذقه‌ای است.

بهرحال طبق نظر Buzzell (۱۹۹۶) بنظر نمی‌رسد بتوان تعریف کاملی برای این غده در حیوانات واجد آن، ارائه کرد.

اما می‌توان گفت غده هاردر یک غده اگزوکراین است که در بخش میانی حذقه قرار می‌گیرد. مهم‌تر آنکه بداخل کیسه ملتحمه در زاویه میانی پلک (medial canthus) تخلیه می‌شود. این تعریف غدد هاردر را از غدد اشکی حقیقی (true lacrimal gland) متمایز میکند؛ گرچه استثنائاتی نیز وجود دارند.

الف- فیلوژنی (Phylogeny) و آنتوژنی (Ontogeny) غدد هاردر

برای توضیح رشد تکاملی غده هاردر در موجودات زنده (Phylogeny) و تاریخچه کامل سیر تکاملی آن (ontogeny) هنوز به تئوری‌های قدیمی که تنها بر پایه مطالعات آناتومی مقایسه‌ای (comparative anatomical studies) است مراجعه می‌شود. در سال ۱۹۰۸ میلادی Wiedersheim نظریه «مهاجرت» (migration) یا «غده منفرد» (Single gland) را مطرح کرد. در آن نظریه گفته می‌شود که منشأ غده هاردر و غده اشکی، یک پیش ساز (precursor) منفرد که در پلک پایینی قرار گرفته، می‌باشد. منشأ غده هاردر، بخش نازال (nasal) این پیش ساز است، در حالیکه بخش باقیمانده به طرف پلک بالایی حرکت می‌کند و در آنجا غده اشکی را می‌سازد. این تئوری به موقعیت‌های

مختلف غده هاردر در میان مهره داران، که در نتیجه مهاجرت بوجود می‌آید توجه دارد، اما به تشابه بافت شناسی غدد اشکی و هاردر معتقد است و بنابراین وجود دو غده متمایز از نظر بافت شناسی، در خزندگان، پرندگان و پستانداران در آن نمی‌گنجد. نظریه دیگر که نظریه «دو غده» (two glands) نام دارد، وجود دو غده متمایز از نظر هیستولوژیکی را مطرح می‌کند که در آن غده اشکی در زاویه خارجی (outer canthus) پلک و غده هاردر در زاویه داخلی پلک بوجود می‌آیند.

در حقیقت تا دهه ۶۰، نوشتجات کم در مورد ارگانوژنز غده باعث شده است که این ارگان توجه کمی به خود جلب کند. ساکائی (Sakai, 1981) در مرور خود بر روی غده هاردر، این تئوریهای قدیمی را گزارش می‌دهد و نتیجه می‌گیرد که غده هاردر پستانداران ممکن است از نظر فیلوژنتیکی با غده هاردر مهره داران پست تر (lower vertebrate) هومولوگ نباشد. وی می‌گوید ساختار هیستولوژیکی این غده در پستانداران بنحو قابل توجهی متمایز است و احتمال دارد غده هاردر پستانداران از غده اشکی یک پستاندار اجدادی اولیه بوجود آمده باشد.

در سالهای اخیر، بسیاری از تحقیقات به منظور روشن شدن تکامل بعد از تولد غده هاردر، در پستانداران انجام شده اند. اطلاعات کمی در مورد ارگانوژنز غده وجود دارد. مایکل و همکارانش (۱۹۸۸) گزارش می‌دهند که غده هاردر موش خانگی بین روزهای شانزدهم و هجدهم حاملگی، هنگامیکه پلک سوم (third eyelid) به میزان رشد و تکامل خود در مرحله نئوناتال (neonatal) رسیده است، در بخش خلفی ناحیه چشمی به شکل توبولهای فاقد لومن (nonluminated tubule) ظاهر می‌شود.

در زمان تولد، غده هاردر هنوز به لحاظ بافت شناسی متمایز نشده است. تکامل بسیار سریعتر غده، پس از تولد و در طی دوره بسته بودن چشم ها که نهایتاً منجر به باز شدن پلکها

می گردد (eyelid disjunction) هم به شکل تمایز اپیتلیوم غده‌ای و هم تولید پورفیرین اتفاق می‌افتد.

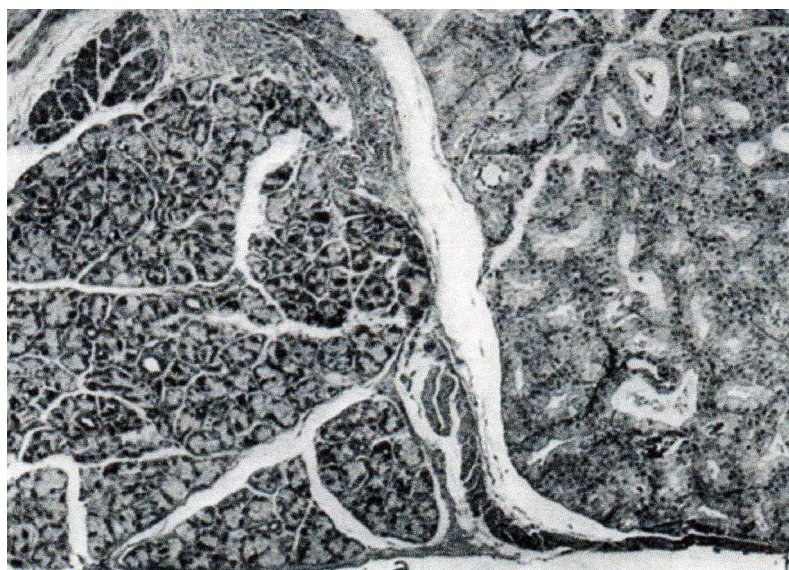
اگر عبارت «آنتوژنی تکرار فیلوژنی است» (Ontogeny repeats phylogeny) درست باشد، مطالعه تکامل غده هارد در طی زندگی جنینی می‌تواند به فهم تکامل فیلوژنتیکی این غده که در میان مهره داران، بسیار متفاوت می‌باشد، کمک کند. ظهور پیشتر غده هارد نسبت به غده اشکی در دوره جنینی در خزندگان، پرندگان و پستانداران منطبق با ظهور فیلوژنتیکی پیشتر آن است. در حقیقت غده هارد تنها غده حلقه‌ای دوزیستان و برخی از خزندگان است و همچنین در جانورانی که غده اشکی دارند نیز نوع غالب و برتر می‌باشد. نتایج حاصله از مشاهدات بر روی ارگانوژنز غدد حلقه‌ای در مارمولک (*Podarcis sicula*) حداقل در مورد منشأ غده هارد و غده اشکی ضمیمه (accessory lacrimal gland) قویاً از نظریه اشتراک منشأ یا «غده منفرد» حمایت می‌کند. بهر حال، اطلاعات بیشتری در مورد مکانیسم‌های القایی سلولی و مولکولی که منتج به تمایز غده هارد و غده اشکی از یک منشأ مشترک می‌شود، مورد نیاز است.

بعلاوه ارتباط نزدیک غدد هارد و اشکی و اندازه بزرگتر اولی، در مطالعات اولیه اشتباهاتی در تمایز ساختارهای غدد اشکی و هارد صورت گرفته است. برای رفع این اشتباه، در اینجا نیز، نخست به مقایسه ساختار میکروسکوپی دو غده هارد و اشکی پرداخته می‌شود.

با وجود اینکه هر دو غده آسینوسی-توبولی هستند و بنحو مشابه لبوله شده‌اند، لکن سلول‌های تشکیل دهنده آنها متفاوت می‌باشند. غدد اشکی از آسینوس‌های کوچکی تشکیل می‌شوند که حداقل با روش‌های جاری ثابت کردن بافتی دارای لومن کوچک و یا اصولاً فاقد آن می‌باشند. چروک شدگی بارز، بدون شک نتیجه خاصیت آبی بودن سلول‌هاست. اندازه هسته‌ها متفاوت از هم است و هسته‌ها غنی از کروماتین هستند. سیتوپلاسم، مانند سیتوپلاسم

سلولهای اپیتلیومی پانکراس، بازوفیل است. واکوئل‌ها بزرگ و متعدّدند. در غده هاردِر، آسینوس‌ها/آلوئول‌ها بزرگ‌ترند و سلول‌های دارای اندازه یکسان با هسته‌های نسبتاً کوچک و سیتوپلاسم ائوزینوفیل فراوان هستند. در برشهای حاصل از روش یخ زدگی (frozen sections) که توسط سودان III یا Sharlach R رنگ شده اند سیتوپلاسم پر از گرانول‌های متعدّد چربی است که دارای اندازه‌های متفاوت هستند. در برشهایی که از بلوکهای پارافینی بدست آمده‌اند، گرانول‌ها ماهیت پروتئینی دارند و واکوئل‌هایی که چربی آنها شسته شده است، متعدّد و فراوانند (Robert *et al.*, 1923).

شکل سلول‌ها و آسینوس در ذیل نشان داده شده است.



* شکل ۲-۴: (a) lacrimal gland، (b) Harderian gland، بسیاری از آسینوسهای غده اشکی فاقد لومن هستند در حالیکه لومنهای آسینوسهای غده هاردِر بسیار بزرگ می باشند.

* برگرفته از: (Robert *et al.*, 1923)

ب - آناتومی

مقدار بافت غدد هاردر و اشکی در رت بسیار بیشتر از مقدار بافت غدد هاردر و اشکی در انسان است. طبق گفته کاناوان (Canavan, 1922) میانگین اندازه غده اشکی در انسان بیشتر از $2 \times 1 \times 0.5$ سانتی متر نیست. وزن دو غده در انسان حدود ۲ گرم است و نسبت تقریبی وزن دو غده به وزن بدن حدود ۱:۲۵۰۰۰ است؛ در حالیکه در رت نسبت میانگین وزن دو غده به وزن بدن، بدون محاسبه غده اشکی خارج حلقه‌ای حدود ۱:۷۰۰ است. به عبارت دیگر، مقدار بافت غده‌ای که ترشحات ملتحمه‌ای را تأمین می‌کند در رت، حداقل ۳۰ برابر بیش از انسان است (Robert et al., 1923).

در تحقیق جاری، همچنانکه در بخش قبل نسبت‌های تقریبی اوزان غده هاردر به اوزان بدن آورده شده است، نسبت تقریبی وزن غده هاردر به وزن بدن در نرها و ماده‌ها، به طور میانگین و بدون محاسبه غده اشکی ۱:۲۵۰۰ است. همچنین با توجه به این که میانگین وزن بدن در سنین مختلف در نرها ۱۴/۶۳ گرم و در ماده‌ها ۱۳/۷۴ گرم است، اختلاف وزن متوسط دو جنس ۰/۸۹ گرم می‌باشد.

بعلاوه ظاهر ماکروسکوپی غده در نر و ماده مشابه است. غدد هاردر به شکل ساختارهای نعل اسبی مشاهده شدند. رنگ غدد در نر و ماده این نژاد به طور یکنواخت، خاکستری-سفید و یا خاکستری - صورتی با لوبولاسیون بنظر می‌رسیدند. اندازه غدد در نر و ماده یکسان می‌باشند.

ج- بافت شناسی

سازماندهی هیستولوژیکی غده هاردر در میان گونه‌های مختلف پستانداران متفاوت است. غده هاردر به اشکال لوله‌ای مرکب یا compound tubular (MacLeod, 1880; Paule, 1957)، لوله‌ای-آسینوسی/

لوله‌ای-آلوئولاری مرکب یا compound tubuloacinar/ tubuloalveolar (Aureli, 1957; Hoffman, 1971) می‌باشند. توبول‌ها / توبولوآسینوس‌های

غده توسط شبکه‌ای از سلول‌های میوآپیتلیالی احاطه می‌شوند. بافت بینابینی معمولاً پراکنده است که ممکن است دارای تجمعاتی از بافت لنفاوی باشد. عروق خونی غده شامل مویرگ‌های منفذدار و سینوزوئیدهاست.

در بسیاری از گونه‌ها، یکنواختی در غده ملاحظه می‌شود و بخش‌های خاص در آن‌ها قابل شناسایی نیست (Payne, 1994). در این تحقیق نیز، غده هارد در دارای بافت یکنواخت بود.

در بعضی از گونه‌ها مثل آرمادیلو، بافت مجرایی داخل غده‌ای وجود دارد (Weaker, ۱۹۸۱).

با این وجود در بیشتر غدد، بافت شناسی مجرای ترشحی فقط بعد از آنکه مجرا غده را ترک می‌کند امکان‌پذیر است، گرچه برخی از سلول‌های مجرای اکتوپیک (ectopic) نیز بندرت درون غده مشاهده می‌شود (Johnston, ۱۹۸۳). در مطالعه انجام شده در این تحقیق، بافت مجرایی در داخل غده مشاهده شد.

سلول‌های اپیتلیالی غده هارد در پستانداران

در جوندگان و لاگومورف‌ها فقط سلول‌های ترشح کننده لیپید را در این غدد تعریف کرده‌اند، اما در برخی دیگر از پستانداران مانند آرمادیلو (Weaker, 1981) و آپوسوم (Krause & McMenamin, 1992) آسینوس‌های سרוزی یا موکوسی نیز ذکر میشوند. انواع سلول‌های اپیتلیالی درون غده هارد در پستانداران از یک تا سه متغیر است و ویژگی‌های خاص داخل سلولی است که غده را در هر گونه، از انواع دیگر متمایز می‌کند (Payne, 1994). طبق مشاهدات انجام شده در این تحقیق، بنظر رسید که سلول‌های اپیتلیالی در غده هارد در موش خانگی فاقد ویژگی‌های سרוزی یا موکوسی هستند و یا حداقل چنین ویژگی‌هایی در آنها چندان مشخص نیست. ویژگی عمده آنها را میتوان وجود واکوئل‌های فراوانی دانست که تمام سیتوپلاسم را

فرا گرفته‌اند. ذیلاً انواع سلولهای اپیتلیالی غدد هاردنر پستانداران شرح داده می‌شود.

غدد هاردنر واجد یک نوع سلول اپیتلیالی

مشخصه عمده سیتوپلاسم سلولهای استوانه‌ای اپیتلیالی، تعداد زیاد واکوئل‌های حاوی مواد لیپیدی کوچک است که نیمه رأسی سلول را برجسته می‌کنند. هسته، بزرگ و کروی است و در قاعده سلول قرار دارد. غده هاردنر هامستر ماده سوریه‌ای فقط یک نوع سلول دارد (Payne, 1994).

غدد هاردنر واجد دو نوع یا انواع بیشتری از سلولهای اپیتلیالی

بسیاری از گونه‌ها دارای غدد هاردنری هستند که واجد دو نوع سلول است. تفاوت کلی مابین دو نوع، در اندازه واکوئل‌های لیپیدی و نتیجتاً حجم سیتوپلاسم سلولی است. این تفاوت این سوال را پیش می‌آورد که آیا این انواع، اشکال متفاوتی از یک سلول هستند (نشان دهنده مراحل مختلف فعالیت از یک سیکل ترشحی هستند) یا اینکه مستقل از هم می‌باشند. مثال این مورد، غده هاردنر در هامستر سوریه‌ای نر (*Mesocricetus auratus*) است. در اینجا، سلولهای تیپ I واکوئل‌های لیپیدی کوچک دارند، در حالیکه سلولهای تیپ II، واکوئل‌های بسیار بزرگ دارند، سلولهای تیپ I، دارای پوشش رأسی میکروویلوسی هستند که در بینابین آنها جایگاه‌های تاول مانند و بزرگ تخلیه واکوئل‌های لیپیدی یا حفرات حاصل از جایگاه‌های ترشح قبلی مشاهده شده‌اند. در حالیکه سلولهای تیپ II، سطح رأسی برآمده‌ای دارند که تعداد کمی میکروویلوس دارد. سلولهای تیپ I، میتوکندری‌های کوچک متعدد و یک سیتوپلاسم متراکم غنی از رتیکولوم آندوپلاسمی گرانولی دارند؛ سلولهای تیپ II، ارگانل‌های نسبتاً کم دارند، چون سیتوپلاسم دارای واکوئل‌های لیپیدی بزرگ است (Payne, 1994).

ساختار غیر عادی که در تعداد زیادی از سیتوپلاسم‌های سلولهای تیپ I وجود دارد و در سلولهای تیپ II پراکنده‌تر است، کمپلکس

پلی توبولار است. هر کمپلکس از تعدادی توبول تشکیل می‌شود که اغلب به اشکال عرضی و طولی درون کمپلکس قرار دارند. کمپلکس‌های مشابه در غدد هاردر جانوران دیگر، مثل غدد هاردر موش (*Apodemus sylvaticus*) نیز وجود دارند (Johnston *et al.*, 1987)؛ لکن عملکرد آنها ناشناخته است (Payne, 1994).

چندین گونه دیگر نیز ۲ نوع سلول دارند، مثل رت که سلول‌های دارای واکوئل‌های بزرگ، تیپ A و سلول‌های دارای واکوئل‌های کوچک، تیپ B هستند (Payne, 1994).

در موش خانگی، سلول‌های تیپ A و B دارای واکوئل‌های یک اندازه‌اند، اما محصولات ترش‌هی مختلف درون آنهاست. برای نامگذاری سلول‌ها گاهی از اصطلاحات سلول‌های "تیره" و "روشن" هم استفاده می‌شود؛ این اصطلاحات به تیپ‌های I / II (A, B) ربطی ندارد بلکه نشان دهنده مراحل مختلف یک سیکل فعالیت است (Payne, 1994).

در غدد هاردر این حیوان، اتصالات بین اپیتلیالی (interepithelial adhesions)، از نوع gap junction فقط مابین سلول‌های B و A ملاحظه شده و مابین سلول‌های مجاور هم A دیده نمی‌شود (Strum & Shear, ۱۹۸۲).

استروم و شر (Strum & Shear, 1982) پیشنهاد می‌کنند ممکن است سلول‌های A فعالیت سنتزی سلول‌های B را از طریق چنین تماس‌هایی تنظیم کنند. در موش خانگی ۲ یا ۳ نوع سلول در غده قابل شناسایی است (Sato *et al.*, 1996) همچنین بر طبق گفته گریل (Grill *et al.*, 1994) در غدد هاردر موش خانگی، دو نوع سلول وجود دارد که انواع B و A نامیده میشوند. با بهره‌گیری از تکنیک هیستوشیمیایی ZIO-mixture، به منظور تعیین ایندول مونوآمین‌ها، سلول‌های ترش‌هی نوع B بطور انتخابی رنگ گرفتند که تعداد آنها در جنس ماده بسیار بیشتر از جنس نر بود و این ممکن است مربوط به تأثیر هورمون‌های جنسی استروئیدی باشد درحالی که تعداد سلول‌های نوع A

که ZIO+ نبودند، بسیار بیشتر از سلول‌های نوع B بود (Grill et al., 1994).

در هامستر سوریه‌ای، کنترل هورمونی واضحی بر روی انواع سلولی وجود دارد. غدد ماده فقط سلول‌های واکوئل‌های لیپیدی کوچک را دارند؛ غدد نر سلول‌های با هر دو نوع واکوئل‌های لیپیدی کوچک (تیپ I) و بزرگ (تیپ II) را دارند. اخته کردن نرها منجر به این می‌شود که غدد هاردنر فقط یک نوع سلول (تیپ I) را داشته باشند، اما تزریق آندروژن، سلول‌های تیپ II را احیا می‌کند (Buzzell et al., 1995).

تزریق آندروژن به ماده‌ها، منجر به ظهور سلول‌های تیپ II می‌شود. این مطلب حاکی از آنست که ۲ نوع سلول مختلف وجود ندارد، بلکه فازهای مختلف فعالیت وجود دارند (Payne 1994).

بعلاوه، در مطالعات انجام شده در مورد تکامل غده به وجود ۲ سلول پیش ساز اشاره نشده است (Lopez et al., 1992a; Payne et al., 1992b).

در بیشتر گونه‌ها، این تصور که یک سلول اپیتلیالی وجود دارد که در موقعیت‌های مختلف فعالیت قرار می‌گیرد نیز صحیح است. بر اساس این باور، سلول‌های تیپ I و II معمولاً در غده بطور اتفاقی توزیع می‌شوند و هر توبول، ممکن است دارای چندین سلول از هر نوع باشد (Payne, 1994).

مثال غده دارای ۳ نوع متمایز سلولی در موش استرالیایی (*Pseudomys australis*) دیده شده است. سلول‌های تیپ I، دارای واکوئل‌های لیپیدی کوچک متعددند. اندازه این واکوئل‌ها یکسان است و در بخش رأسی سلول برجسته می‌شوند. در سلول‌های تیپ II بزحمات می‌توان واکوئل لیپیدی جست. آنها بخاطر آرایش منظم میتوکندری‌های خیلی بزرگشان قابل توجهند. سلول‌های تیپ III واکوئل‌های کمتری دارند، اما تعداد زیادی میتوکندری خیلی کوچک دارند. بنظر میرسد این سلول‌ها، نماینده مرحله استراحت احتمالی (resting stage) باشند (Johnston et al., 1985).

سیکل های فعالیت سلول های اپیتلیالی (activity cycles of epithelial cells)

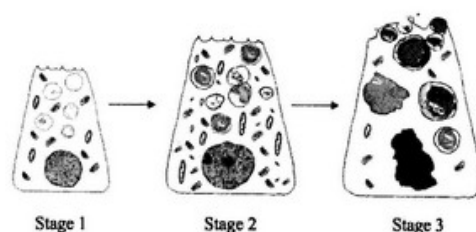
بیشتر محققین معتقدند که یک سیکل فعالیت سلولی درون غده هاردر وجود دارد که با خصوصیات مورفولوژیکی غده مرتبط است. در چند مورد این مسئله اثبات شده است. مثالی از مهمترین تغییرات مورفولوژیکی همبسته، در ارتباط با تغییر طول سلولی، خصوصیات رنگپذیری هسته و میزان تخلیه ترشحات، در غده قورباغه سبز (*Rana esculenta*) است. این سری تغییرات دارای ماهیت فصلی است و بنابراین ممکن است توسط عوامل محیطی یا هورمونی کنترل شود.

در بسیاری از پرندگان و پستانداران، غدد هاردر دارای بیش از یک نوع سلول هستند و این غالباً به این شکل تعبیر می‌شود که غده دارای یک نوع سلول است که در مراحل مختلف فعالیت می‌باشد. در واقع این مشاهدات که (۱) کنترل فیزیولوژیکی، غالباً می‌تواند منجر به ظهور یک نوع سلول شود و (۲) پیش سازهای جداگانه برای انواع مختلف سلولی شناسایی نشده‌اند، احتمال این مسئله را پیش می‌آورد.

کریر (Carriere, 1985) معتقد است که در رت، سلول‌های دارای واکوئل‌های بزرگ (سلول‌های تیپ B) آنگونه که او و دیگران توصیف می‌کنند، در حقیقت در حال مردن هستند و این یک مکانیسم هولوکراین را شکل می‌دهد که توسط آن، محصولات غده‌ای مانند پورفیرین ترشح می‌شوند. اما در موش خانگی، گفته می‌شود که هر یک از دو نوع سلول (A, B) از یک سیکل ۳ مرحله‌ای می‌گذرند که منجر به مشاهده سلول‌های "روشن" و "تیره" در میکروسکوپ نوری می‌شوند (Woodhouse & Rhodin, 1963).

مختصر آنکه، مرحله یک بلافاصله بعد از یک دوره تخلیه اگزوسیتوزی اتفاق می‌افتد. در این مرحله، سلول‌ها دارای واکوئل‌های لیپیدی کم و تعداد کمی میتوکندری متورم و هسته‌های قاعده‌ای هستند (شکل ۳-۴). در مرحله ۲، ترمیم (regeneration)، تکثیر میتوکندری‌های غیر متورم و تشکیل قطرات سیتوپلاسمی از اجسام متراکم (dense bodies) و واکوئل‌های ترشحی مشاهده می‌شود.

در مرحله ۳، پیش‌تخلیه / تخلیه (predischage/discharge) میتوکندریها متورم می‌شوند، سیتوپلاسم بغایت متراکم شده و ترشح اگزوسیتوزی قطرات اتفاق می‌افتد. در این طرح، سلول‌های "تیره" آنهایی هستند که در آخر سیکل فعالیت (مرحله ۳) هستند و سلول‌های "روشن" آنهایی هستند که در شروع (مرحله ۱ و ۲) هستند. احتمالاً تعداد و اندازه واکوئل‌های لیپیدی/قطرات لیپیدی در سراسر این ۳ مرحله رو به افزایش است (Woodhouse & Rhodin, 1963).



* شکل ۳-۴: تصویر شماتیکی از سیکل فعالیت سلول‌های غده هارد در رت. سلول‌های A و B از سیکل ترشحی ۳ مرحله‌ای می‌گذرند. در مرحله ۱ (سلول‌های B)، که بلافاصله بعد از مرحله تخلیه اگزوسیتوزی واقع می‌شود (مرحله ۳)، سلول‌ها تعداد کمی واکوئل لیپیدی دارند و هسته‌های یوکروماتیک در قاعده قرار گرفته‌اند. در مرحله ۲، واکوئل‌های لیپیدی تکثیر می‌شوند؛ هسته‌های بزرگ‌تری مشاهده می‌شوند. در مرحله ۳ (سلول‌های A) سیتوپلاسم از واکوئل‌های ترشحی بزرگ پر می‌شود و تخلیه اگزوسیتوزی روی می‌دهد؛ هسته‌ها پیکنوتیک هستند.

بر طبق گفته ساتو و همکارانش (۱۹۹۶)، تفاوت مورفولوژیکی در واکوئل‌های ترشحی سلول‌های غده‌ای نمایانگر محتویات مختلف لیپیدی است تا مراحل ترشحی مختلف.

* برگرفته از: (Chieffi Baccari et al., 2004)

بر طبق نظریه این محققین احتمالاً انواع گوناگون سلولی که تحت تأثیر عوامل هورمونی، ظاهر می‌شوند اشکال مختلف یک سلول واحدند (Sato *et al.*, 1996).

ملانوسیت‌ها

در پستانداران، ملانوسیت‌های غدد هاردر در برخی گونه‌های جونندگان مثل موش خانگی و *gerbil* مطالعه شده‌اند. در *gerbil*، ملانوسیت‌ها بقدری زیادند که رنگ خاکستری تیره به غده می‌دهند.

در موش خانگی، دو نوع ملانوسیت وجود دارد. نوع اول، سلول‌های دارای شکل نامنظم با انشعابات سیتوپلاسمی استتاله دار هستند که سیتوپلاسم متراکم آنها دارای رتیکولوم آندوپلاسمی خشن، مقدار کمی رتیکولوم آندوپلاسمی صاف، دستگاه گلژی، میتوکندری‌ها و گرانول‌های ملانین در مراحل مختلف تکاملی است.

نوع دوم، سلول‌های منظم‌تر فاقد انشعابات سیتوپلاسمی دارای گرانول‌های ملانین بالغ محدود به غشاء، یک سیتوپلاسم کمتر متراکم و تعداد کمی ارگانل هستند. نوع بینابینی هم وجود دارد که سیتوپلاسم، فاقد انشعابات استتاله دار است و دارای سیتوپلاسم متراکم می‌باشد. گرچه غده هاردر موش، تفاوت‌های جنسی متعددی نشان می‌دهد، در تعداد و تنوع ملانوسیت‌ها بین نر و ماده، تفاوتی نیست (Payne, 1994).

در مطالعه حاضر، بدلیل اینکه شبکیه فاقد رنگدانه ملانین است و موش، آلبینو (*albino*) است، شاید بتوان تراکم شدید ملانوسیت‌های عاری از ملانین در غده و ایجاد دانسیته زیاد سلولی در محل را دلیل نوعی تیرگی به حساب آورد. همچنین ممکن است ترشحات غده، رنگ خاکستری بسیار کم‌رنگی به غده بدهد. بهرحال شناسایی ملانوسیت‌ها با رنگ آمیزی جاری چندان سهل نیست.

شیراما و همکارانش (۱۹۸۸a) عملکرد احتمالی حفاظت چشم در برابر نور (photoprotection) را برای ملانوسیت‌ها پیشنهاد میکند؛ نقشی که دیگران نیز به غده هارد در نسبت داده اند.

سلول‌های میوآپیتلیالی

این سلول‌ها در غدد هارد در همه جانوران وجود دارند. آنها در حد فاصل بین سطح قاعده‌ای سلول‌های اپیتلیالی و غشای پایه که توبول‌ها را احاطه می‌کند قرار دارند. سلول‌های میوآپیتلیالی معمولاً ستاره‌ای شکلند و دارای زوائد سیتوپلاسمی واجد فیبریل‌های انقباضی و یک بخش مرکزی هستند که دارای هسته کشیده و طویل و بیشتر ارگانل‌ها می‌باشند.

بر طبق نظریه Abe و همکارانش (۱۹۸۱)، تعداد زوائد سیتوپلاسمی اولیه به ازای هر سلول، ۶-۹ عدد است و هر یک از زوائد، ۲ یا ۳ بار دو شاخه می‌شوند. هسته به موازات و نزدیک غشای پایه (basement membrane) قرار دارد، طول آن ۵-۸ میکرومتر و قطر آن ۲-۴ میکرومتر در مقطع عرضی است. طرفی از هسته که روبروی سلول اپیتلیالی است اغلب نامنظم است در حالیکه سطح دیگر، صاف است. فیبریل‌های انقباضی به اندازه های نازک (۶-۷ نانومتر) و ضخیم (۱۲-۱۷ نانومتر) هستند. فیبریل‌ها به موازات غشای پایه توبول، آرایش یافته‌اند. سلول‌های میوآپیتلیالی، کمپلکس‌های اتصال (دسموزوم‌ها) را با سلول‌های ترش‌جی ایجاد می‌نمایند. کمپلکس‌های مشابهی نیز ما بین سلول‌های میوآپیتلیالی مجاور هم وجود دارند.

Lopez (۱۹۹۲b) گزارش می‌دهد که تمایز بین سلول‌های اپیتلیالی و میوآپیتلیالی غده هارد در هامستر، تنها در روز پنجم و بر اساس موقعیت آنها امکان پذیر می‌شود. دستجات سازمان یافته میکروفیلان‌ها در درصد کمی از سلول‌های میوآپیتلیالی در روز هفتم ظاهر می‌شوند که با ظهور واکوئل‌های ترش‌جی در سلول‌های اپیتلیالی همزمان است. برخی از ویژگی‌های سلول‌های میوآپیتلیالی محدود به دوره نئوناتال (neonatal) هستند. مثلاً در این دوره، سلول‌های میوآپیتلیالی در فرورفتگی‌های سلول‌های اپیتلیالی بطور

عمیق فرو می‌روند. همینطور، اشکال میتوزی در سلول‌های میوآپیتلیالی در طی اولین هفته بعد از تولد مشاهده می‌شوند که این مشاهده بعد از روز ۱۰-۱۲ میسر نیست. بهرحال، سلول‌های میوآپیتلیالی، شبکه انقباضی اطراف سیستم توبولی غدد برون ریز را شکل می‌دهند و نقش اولیه آن‌ها دفع مواد ترشحی است (Nagata *et al.*, 1980).

ناگاتا و همکارانش پیشنهاد کردند که تفاوت در شکل سلول‌های میوآپیتلیالی (بویژه اندازه و شکل زوائد سیتوپلاسمی) ممکن است به ماهیت ترشح بستگی داشته باشد. در غددی که ترشحات آبکی تولید می‌کنند، مثل غده اشکی خارج حلقه‌ای سلول‌های میوآپیتلیالی با زواید سیتوپلاسمی ظریف هستند، در حالیکه مثلاً غده زیر زبانی با ترشحات لزج و چسبناک به سلول‌های میوآپیتلیالی با اجسام سلولی بزرگ و زواید سیتوپلاسمی عریض محتاج است. در غدد هاردر، اعصاب در تماس با سلول‌های میوآپیتلیالی هستند و این بیانگر آن است که فرایند دفع مواد ممکن است تحت کنترل خارجی (extrinsic) باشد (Payne, 1994).

بافت های بینابینی (the interstitial tissues)

بافت بینابینی غده هاردر نسبتاً پراکنده است. غیر از اجزای نرمال آن مانند فیبرهای کلاژن و فیبروبلاست‌ها، اجزای دیگری همچون ماست سل‌ها، ماکروفاژها، ملانوسیت‌ها و سلول‌های ایمنی (immunocompetent) در بافت بینابینی وجود دارند (Payne, 1994).

کیسول بافت همبند غده هاردر

کیسول بافت همبند غده هاردر در برخی از گونه‌ها مثل آرمادیلو انشعباتی به داخل بافت غده ای می‌فرستد که همچون دیواره‌هایی غده را به لبول‌ها تقسیم می‌کنند (Weaker, 1981).

در گونه‌های دیگر، کیسول وظیفه دوگانه‌ای دارد؛ در این ارتباط به عنوان دیواره سینوس سیاهرگی پشت حلقه‌ای (retro-orbital) که پشت

کره چشم کشیده می‌شود و عضلات خارج چشمی را احاطه می‌کند نیز ایفای نقش می‌کند. این سینوس در موش (Yamashita *et al.*, 1980)، خرگوش (Davis, 1929) و هامستر (Pansky *et al.*, 1961) وجود دارد، اما در رت نیست (Timm, 1979). در مواردی که سینوس وجود دارد لایه خارجی کپسول بافت همبند غده هاردنر از سلول‌های آندوتلیالی مسطح تشکیل می‌شود که یک لایه زیرین از فیبرهای کلاژن منظم دارد (Johnston *et al.*, 1983).

مجرای غده (the duct of the gland)

در اکثر موارد، مجرا در نقطه‌ای که غده را ترک می‌کند نمایان و متمایز می‌شود و هیچ مجرای متمایزی درون بافت غده ای وجود ندارد. در چنین مواردی تنوع قابل ملاحظه‌ای در ساختار، حتی در درون گروه مرتبطی از جوندگان مانند *plains mouse*، *woodmouse* و هامستر بوجود می‌آید. علی‌رغم این تنوع، چند مورد مشترک وجود دارد:

(۱) با وجود اینکه بافت مجرای متمایز از بافت غده‌ای است، سلول‌های اپیتلیالی غده‌ای اغلب در مجرا یافت می‌شوند. بافت مجرای بندرت به صورت جیب‌های کوچک درون غده واقع می‌شود (Johnston *et al.*, 1983).

(۲) سلول‌های ترشح‌کننده موکوس معمولاً درون مجرا و بخصوص در انتهای دیستال آن وجود دارند. این سلول‌ها ممکن است منفرد باشند یا در گروه‌هایی آرایش یافته باشند یا حتی به شکل کریپت‌های (crypts) عمیق متشکل از سلول‌های موکوسی باشند.

(۳) در بخش‌های دیستال مجرا سلول‌های اپیتلیالی سنگفرشی شکل می‌شوند.

(۴) ملانوسیت‌ها اغلب اطراف بخش دیستال مجرا، جاییکه مجرا روی پرده نیکتیتنز باز می‌شود، یافت می‌شوند.

ه) در هامستر سوریه‌ای، سلول‌های مژکدار شناسایی شده اند. وجود این سلول‌ها ممکن است به نیاز برای راندن مقادیر بسیار زیاد ذخایر پورفیرین داخل لومنی در این گونه‌ها مربوط باشد (Payne, 1994).

خونسازی و تخلیه لنفاوی غده (Blood supply and lymphatic drainage of the Gland)

بسیاری از مویرگ‌های درون غده منفذ دار هستند (مثلاً در موش *Apodemus sylvaticus*). این به این معنی است که مواد بین عروق خونی و سلول‌های اپیتلیالی به سهولت، جابجا میشوند؛ هر چند هنوز مشخص نشده است که آیا این جابجایی یک طرفه است یا دو طرفه یا چه موادی منتقل می‌شوند (Payne, 1994).

تخلیه سیاهرگی غده هاردر یا از طریق سیاهرگ‌های چشمی است (Slonaker, 1981) یا در گونه‌هایی که دارای سینوس سیاهرگی پشت حلقه‌ای هستند به داخل آن صورت می‌گیرد. سیستم لنفاوی غده کاملاً توسعه یافته است اما تا کنون موضوع تحت مطالعه‌ای نبوده است (Payne, 1994).

عصب رسانی غده هاردر (nerve supply of the Harderian gland)

عصب رسانی غده هاردر پرندگان از طریق انشعاب تحتانی عصب حرکتی چشم صورت می‌گیرد. در شتر، پایانه های عصبی با الگوی مشابه هامستر، بر روی سلول های اپیتلیالی و میوآپیتلیالی توزیع شده اند. در هامستر، فیبرهای کولینرژیک، اطراف عروق خونی غده و اطراف توبول ها توزیع شده اند. فیبرهای کولینرژیک در اطراف عروق خونی غده در هامستر توزیع غنی دارند و همچنین اطراف توبول‌ها هم ملاحظه شده اند.

اما توزیع توبولی در هامسترهای نر فراوان‌تر از ماده هاست. گرچه همیشه اینطور نیست. Bucana و Nadakavukaren (۱۹۷۲b)، به وجود پایانه روی هر دو سلول‌های میوآپیتلیالی و اپیتلیالی غده ای

اشاره کردند. طبق نظریه آنان، این الگوی عصب رسانی برای تطبیق با عمل کولینرژیک در قابلیت انقباضی غده میباشد.

تولیدات ترشحي غده

سه محصول توجه ویژه ای بخود جلب کرده است: لیپیدها، پورفرین‌ها و ایندول‌ها

۱- لیپیدها: عقیده بر اینست که لیپیدها ویژگی‌های باکتری کش و عایق حرارتی دارند.

۲- پورفرین‌ها: از دیگر ترشحات غدد هارد در جوندگان هستند. در مورد مکانیسمهای ترشحی‌شان از سلول‌های اپیتلیالی اطلاعات کمی در دست است. اما وقتی ترشح میشوند، اغلب به صورت تجمعات داخل لومنی جامد ذخیره میشوند. عملکرد آنها میتواند بعنوان مولکول‌های انتقال دهنده نور (phototransducing molecules)، پذیرش نور (photoreception) و حفاظت در برابر نور (photoprotection) باشد.

۳- غده هارد در تولید ایندول با غده صنوبری و شبکیه سهم است و این ممکن است بیانگر شمول غده در وقایع نوری باشد.

در مورد کنترل فیزیولوژیکی سنتز لیپید یا ترشح لیپید توسط غده هارد اطلاعات کمی در دست است؛ در مقابل، در مورد کنترل بیوسنتز پورفیرین و نقش هورمون‌های گونادی، تیروئیدی و هیپوفیزی در بیوسنتز پورفیرین اطلاعات بیشتری وجود دارد (Payne, 1994).

ترشح لیپید

در حال حاضر، توافق بر اینست که غده هارد ممکن است تنها مثال یک غده اگزوکرین باشد که در آن لیپید عمدتاً توسط اگزوسیتوز ترشح میشود (Wooding, 1980; Winterhager & Kühnel, 1983; Kühnel, 1992).

ممکن است مکانیسم‌های دیگری نیز برای ترشح لیپید وجود داشته باشند. برخی از محققین اظهار داشته‌اند مکانیسم نادرالوقوع ترشح لیپید، آپوکرین است (Tsutsumi *et al.*, 1966; Johnston *et al.*, 1985). در حالیکه حضور کل سلول‌ها و هسته‌ها در لومن غده بیانگر آنست که ترشح هولوکرین نیز ممکن است به ترشح غده‌ای کمک کند (Hoffman, 1921; Bucana & Nadakavukaren, 1973; Johnston *et al.*, 1983; Carriere, 1985).

همچنین طبق نظر ساتو و همکارانش، وجود بقایای سلولی دارای هسته در لومن غده‌ای در هامسترهای سوریه‌ای و *plainsmouse* که حتی در شرایط عدم تحریک فارماکولوژیک گزارش شده است، می‌تواند نشان دهنده مکانیسم هولوکرین در غده هاردر باشد (Sato *et al.*, 1996).

اما چون در غده هاردر پستانداران بالغ با اشکال میتوزی بندرت مواجه می‌شویم (Bucana & Nadakavukaren, 1972) بنابراین غیر محتمل است که مکانیسم هولوکرین، مکانیسم مشارکت کننده اصلی برای کل ترشح باشد (Payne, 1994).

Sato و همکارانش (۱۹۹۲) در مورد فعالیت‌های ترشحی غده هاردر رت نظریه‌ای داده‌اند. طبق این نظریه (۱) در حالت استراحت، فرایند اگزوسیتوز با یک سرعت پایه در کار است که به آن "constitutive secretion" می‌گویند.

(۲) یک ترشح منظم که *regulated secretion* نام دارد، توسط تحریکات خارجی شکل می‌گیرد که تحت کنترل عصب رسانی کولیزژیک است.

(۳) ترشح پاتولوژیک کنترل نشده (*uncontrolled pathological secretion*). ساتو پیشنهاد می‌کند که این ترشح مبین آن است که غده، قابلیت ترشح آپوکرین یا هولوکرین را دارد (Payne, 1994).

انواع لیپیدها (types of lipids)

بررسی‌های هیستولوژیکی نشان داده‌اند که واکوئل‌های ترشحی سلول‌های اپیتلیالی غده هارد در پستانداران نسبت به بسیاری از رنگهای لیپیدی مثل سودان IV و سودان بلک B، واکنش مثبت دارند (Cahán *et al.*, 1967). لیپید ترشحی اصلی در بسیاری از گونه‌ها (مثل خوکچه هندی، موش خانگی و هامستر)، ۱- آلکیل ۲ و ۳- دی آسیل گلیسرول است (Lin & Nadakavukaren, 1981; Yamazaki *et al.*, 1981; Tvrzicka, 1988) در حالیکه در رت لیپید ترشحی اصلی، استرهای واکسی (wax esters) هستند. همچنین در لوب صورتی غده هارد در خرگوش، مخلوطی از آلکیل- (و هیدروکسی آلکیل-) دی آسیل گلیسرول با ۱- (o- اسیل) هیدروکسی آلکیل- ۲ و ۳- دی آسیل-sn- گلیسرول وجود دارد، در حالیکه لیپید اصلی لوب سفید ۲-o- اسیل هیدروکسی اسید چرب آلکیل استر است. بعلاوه غده هارد دارای ۱) مقدار زیادی لیپید خنثی است که باور بر اینست که غیر ترشحی هستند مانند مونو-، دی- و تری آسیل گلیسرول‌ها و کلسترول ۲) فسفو لیپیدهایی مثل فسفاتیدیل کولین و فسفاتیدیل اتانول آمین و اسفنگومیلین و ۳) گلیکو لیپیدهایی مثل سربروزیدها (Payne, 1994). چندین نقش برای لیپیدهای مترشحه غده هارد پیشنهاد شده است. آنها ممکن است بعنوان نرم کننده (lubricant) بین پرده نیکتیتنز و چشم عمل کنند (Lin & Nadakavukaren, 1981) یا بعنوان یک حلال برای فرومون‌ها (Sakai, 1981) یا فاکتورهای رشد باشند (Yokoyama *et al.*, 1989). همچنین ممکن است نقش عمده‌ای در تنظیم حرارت بدن حیوان ایفا کنند (Thiessen, 1992).

پورفیرین‌ها

پورفیرین‌ها مولکول‌هایی هستند که هم در حیوانات (به عنوان پیش ساز هم (heme) و هم در گیاهان (مثل کلروفیل) وجود دارند. بنابراین آنها را مولکول‌های اصلی برای انتقال اکسیژن و فرایندهای اکسیداتیو در نظر می‌گیرند (Payne, 1994). در ابتدا تصوّر می‌شد که غده برای پورفیرین‌های حمل شده در خون که از نقاط مختلفه بدن آمده‌اند، یک جایگاه غیر فعال (یا حتی یک ارگان ترشحی) محسوب می‌شود (Derrien & Turchini, 1924; Grafflin, 1942). اکنون مشخص شده که خود غده هم آنزیم‌های ضروری برای سنتز پورفیرین را دارد (Thompson *et al.*, 1984). پورفیرین‌هایی که در لومن ذخیره می‌شوند، بطور قریب به یقین خالص نیستند و احتمالاً لیپیدها و پروتئین‌ها را هم با خود دارند (Payne, 1994).

غالباً در میزان پورفیرین نر و ماده تفاوت‌هایی وجود دارد؛ به این ترتیب که غدد ماده دارای پورفیرین بیشتری از غدد نر است (Payne *et al.*, 1992b; Spike *et al.*, 1992) و این نشان دهنده کنترل هورمونی مقدار پورفیرین در دو جنس می‌باشد (Payne, 1994).

پورفیرین به مقدار نور یا کیفیت نوری که به شبکه می‌رسد کمک می‌کند، زیرا جلوی چشم، مقدار زیادی از ترشحات واجد پورفیرین وجود دارد؛ همچنین پشت کره چشم تقریباً بطور کامل، توسط غده احاطه می‌شود که اگر در معرض نور ماورای بنفش (UV) قرار بگیرد، کاملاً فلورسانس می‌شود. بعلاوه، پورفیرین با جذب نور UV مضر، می‌تواند به عنوان حافظ چشم و ملتحمه عمل کند (Payne, 1994).

ترشح از قاعده سلول (basal release)

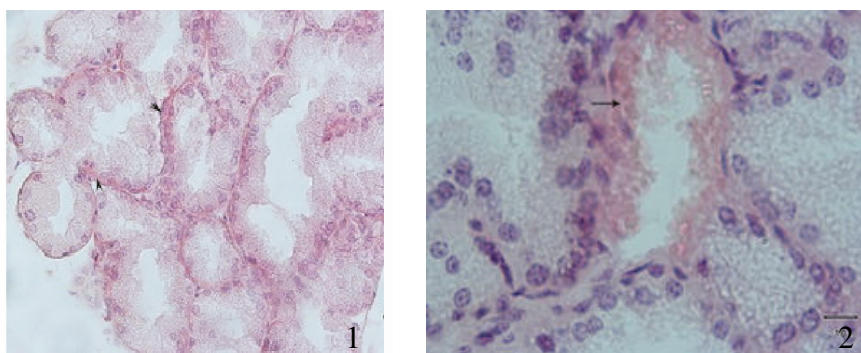
واضح است که لیپیدها و پورفیرین‌ها از قسمت رأسی سلولهای اپیتلیالی ترشح می‌شوند، زیرا آنها را در درون لومن غده مشاهده کرده‌اند. در این مطالعه نیز، حفرات واکوئلی بکرات در لومن مشاهده شده‌اند.

اما مطلبی که تا کنون حل نشده اینست که آیا سلولهای اپیتلیالی غده هارد در می‌توانند مواد را از قسمت قاعده و پایه خود ترشح کنند یا خیر. یعنی آیا غده هارد در می‌تواند بعنوان غده درون ریز و برون ریز هر دو، عمل کند یا خیر (Payne, 1994).

در تئوری، مدارکی دال بر ترشح از قاعده سلول وجود دارند:

۱- در برخی از غدد، برای مثال غده وزغ سبز ماده (di Matteo *et al.*, 1989) و بوقلمون (Maxwell *et al.*, 1986)، جمعیت‌های جداگانه واکوئل‌های ترش‌خی در درون یک سلول وجود دارند. یک جمعیت، جمعیت رأسی است و توسط مکانیسم‌های اگزوسیتوز ترشح می‌کنند و دیگری، جمعیت قاعده‌ای یا پایه‌ای است. در حال حاضر، مشخص نیست که آیا جمعیت پایه‌ای ترشح می‌کنند یا خیر و اگر ترشح می‌کنند از کجا و با چه مکانیسمی از سلول خارج می‌شوند.

در موش خانگی مورد تحقیق، واکوئل‌های لیپیدی، سراسر سیتوپلاسم را از قسمت‌های پایه‌ای تا رأسی در بسیاری از موارد فرا گرفته بودند. همچنین اطراف آلوئول‌ها، عروق خونی بوضوح قابل مشاهده شدند (شکل ۴-۴). اما مشخص نبود آیا مبادله مواد مترشح بین قسمت‌های پایه‌ای سلول‌های غده‌ای و عروق خونی، انجام می‌شود یا نه (Payne, 1994).



شکل ۴-۴: مقاطعی از غده هاردن موش نر ۳۳۶ روزه. به سلولهای خونی در فواصل آلئولها توجه کنید (سر پیکانهادر شکل ۱ و پیکان در شکل ۲). (۱ × ۴۰۰) (۲ × ۱۰۰۰).

۲- در برخی از غدد، قاعده سلول های اپیتلیومی بجای چین خورده است که ساختارهایی بسیار نازک شبیه به میکروویلوس ها را بوجود می آورد (برای مثال، در woodmouse و آرمادیلو) (Weaker, 1981). بعلاوه سلول های میو اپیتلیالی، هم در سطح مجاور سلول های اپیتلیالی و هم در سطح مقابل، واجد وزیکول های پینوسیتوزی هستند. این مشاهدات، بیانگر انتقال مواد بین سلول های بینابینی و سلول های اپیتلیالی است. هر چند در مورد جهت انتقال مواد، ابهام بسیار وجود دارد (Payne, 1994).

۳- بنظر می رسد عروق خونی، واسطه ای مابین جریان خون و سلول های اپیتلیالی/ بینابینی باشند. غده هاردن دارای مویرگ های منفذدار و سینوزوئیدهاست (Menéndez-Peláez *et al.*, 1990). مویرگ های منفذدار، غالباً متصل به سلول های اپیتلیالی که دارای چین خوردگی های بازالی هستند، میباشند. لازم به ذکر است که سینوزوئیدها، غالباً مشخصه ارگان هایی هستند که فعالیت های ترشحي درون ریز دارند (Payne, 1994).

۴- برخی محصولات مثل پورفیرین‌ها از طریق مهاجرت سلول‌های بینابینی می‌توانند به جریان خون منتقل شوند (Payne, 1994).

۵- بنظر می‌رسد برخی محصولات مثل ایندول‌ها در صورتیکه از رأس ترشح شوند نقش کمی ایفا کنند. اما ممکن است در صورتیکه به روش آندوکراین ترشح شوند، نقش بیشتری داشته باشند (Payne, 1994).

کنترل فیزیولوژیکی ساختار و فعالیت ترشحات غده

گیرنده‌های هورمون‌های گونادی

Vilchis و همکارانش (۱۹۹۲) اشاره کردند که گیرنده‌های آندروژنی در غدد هارد رت، خوکچه هندی و موش خانگی وجود دارد که با گیرنده آندروژنی غدد هارد رت هاستر خصوصیات اتصال شونده مشترک دارد. همچنین گیرنده‌های هورمونهای استروئیدی دیگری هم وجود دارند. آنها به وجود گیرنده‌های استروژنی در غدد رت، خوکچه هندی، موش خانگی و خرگوش (بخصوص در لوب صورتی رنگ غده هارد رت خرگوش) اشاره کردند. گیرنده‌های پروژسترونی در غدد هارد رت پستانداران یافت نشدند. بعلاوه ممکن است گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی نیز در غدد هارد رت جوندگان موجود باشند (Vilchis et al., 1992).

تأثیرات هورمونهای گونادی روی ساختار و فعالیت غده

در تحقیق حاضر، سلول‌های اپیتلیالی غده‌ای بر اساس اندازه واکوئل‌های لیپیدی (۲/۵، ۱/۸ و ۰/۹۱ میکرونی) منقسم شدند که گاه در یک آلئول از هر سه نوع موجود بودند. این سلول‌ها در نرها و ماده‌ها، هر دو مشاهده شدند؛ بر این اساس اختلافی در بین آنها نبود.

ولکن با تکنیک بکار گرفته شده مشخص نشد که آیا تیپ‌های متفاوت سلولی در هر دو جنس به یک میزان موجودند یا نه. بهر حال، پارامترهایی که در این تحقیق به آنها پرداخته شد، حجم

آلوئول‌ها و سلول‌ها و اندازه لومن‌ها می‌باشد که در روزهای مختلف زندگی مورد بررسی قرار گرفتند. مشاهدات نشان دادند که:

۱- در اغلب موارد، آلوئول‌های غده‌ای در ماده‌ها دارای سلول‌های حجیم‌تر و در نتیجه سلول‌ها دارای تراکم واکوئلی بیشتری نسبت به نرها هستند که این ممکن است تحت کنترل هورمونی باشد.

هر چند بررسی مقایسه‌ای غده هارد در روزهای مختلف زندگی نشان دهنده تغییرات غده‌ای در هر دو جنس است، همچنین کیفیت این تغییرات در دو جنس تقریباً یکسان است؛ به این معنی که در یک روز معین، تغییرات افزایشی یا کاهش‌ی حجم سلول‌ها، حجم آلوئول‌ها و قطر لومن‌ها در هر دو جنس مشاهده شده است، اما میزان وقوع تغییرات در دو جنس، متفاوت از هم مشاهده شد:

با توجه به اندازه‌های بدست آمده از طول سلول‌ها، حجم آلوئول‌ها و قطر لومن‌ها و همچنین مشاهده فعالیت ترشحی می‌توان نتیجه گرفت که فعالیت سلولی در سنتز واکوئل‌های لیپیدی در ماده‌ها بیش از نرهاست.

۲- با وجود اینکه در بسیاری از موارد، درون لوب‌های غده هارد می‌توان آلوئول‌های مختلف را در مراحل متفاوت ترشحی یافت، ولیکن طبق جداول ۳-۳ و ۳-۴ در بخش مشاهدات، و بطور میانگین احتمالاً هر یک از روزهای زندگی جانور، نماینده یکی از مراحل فعالیت سلولی است که بطور غالب بیش از دیگر مراحل مشهود است.

با مقایسه حجم‌های سلولی و قطر لومن، برای مثال در روز ۲۱ در مقایسه با روز ۱۵، بویژه در حیوان ماده فعالیت ترشحی، بیشتر مشاهده می‌شود یا با مقایسه میانگین طول سلول‌ها در روزهای ۲۱ و ۳۵، غده هارد در ۳۵ روزه، بیشتر نشان دهنده فعالیت سلولی در جهت سنتز لیپید است تا فعالیت ترشحی و یا آنکه در روز ۱۶۵ چه در حیوان نر و چه در حیوان ماده، فعالیت ترشحی، غالب است و به همین ترتیب. شاید بتوان گفت روزهای مختلف زندگی جانور، نماینده یکی از ۳ مرحله سیکل ترشحی است.

بعلاوه در هر یک از روزها، میزان فعالیت‌های سنتزی احتمالاً در

ماده‌ها بیشتر از نرها است. همچنین با محاسبه میزان تفاوت بین قطر لومن‌ها و یا تفاوت بین اندازه طول سلول‌ها در فاصله دو روز مشخص (مثلاً روزهای ۱۵ و ۲۱ و یا روزهای ۲۱ و ۳۵) در ماه اول زندگی، در نرها و ماده‌ها به نتایج متفاوتی دست می‌یابیم. در ماده‌ها حاصل تفاوت، عدد بزرگتری است تا در نرها و این می‌تواند نشان دهنده دامنه تغییرات بزرگتری در ویژگی‌های بافت شناسی غده در ماده‌ها نسبت به نرها، در ماه اول زندگی باشد. در حالیکه تقریباً از شروع ماه دوم، شدت این تحولات در غدد ماده کاهش می‌یابد.

۳- هر چند نوسانات افزایشی/کاهشی بطور مکرر در حجم سلول‌های غده‌ای و فعالیت آنها مشاهده شد که این، نتیجه سیکل متناوب فعالیت سلولی است، لکن با مشاهده تکامل و رشد غده از روزهای آغاز زندگی تا یک سالگی، این نتیجه حاصل می‌شود که در مجموع، اندازه آلئول‌ها و سلول‌های غدد هارد در نر و چه در ماده، با افزایش سن جانور، بیشتر می‌شود. اما در مشاهده مقایسه‌ای، می‌توان این نتیجه را گرفت که غدد نر در روزهای مختلف زندگی، آلئول‌های بزرگتری از آلئول‌های غدد هارد ماده دارند، همچنین قطر لومن‌ها در نرها در روزهای مختلف، بیشتر از ماده‌هاست. شاید بتوان گفت هورمون‌های گونادی در بروز این تفاوتها نقش دارند.

۴- در ماه سوم زندگی، در حیوان ماده شیرده، میانگین قطر آلئولی به $74/2$ میکرومتر می‌رسد که در مقایسه با موارد دیگر در این ماه و ماه‌های قبل و بعد، بیشترین مقدار خود را دارد. همچنین میانگین قطر لومن (37 میکرومتر)، در مقایسه با موارد دیگر در این ماه و ماه‌های قبل و بعد، به بیشترین اندازه رسیده است. این می‌تواند نشان دهنده فعالیت ترشحی افزایش یافته غده باشد که ممکن است حاصل تغییرات فیزیولوژیکی و تغییر ترشح هورمونهای جنسی مادر باشد.

همچنین ترشح افزایش یافته می‌تواند مدل بر نقش احتمالی لیپید غده هاردر در ارتباط بین مادر و زاده‌ها باشد که بعداً به آن پرداخته می‌شود.

مطالب فوق حاکی از آنند که دو شکلی جنسی (sexual dimorphism) به اندازه‌ای که در هامستر سوریه‌ای آشکار است در موش خانگی نوع آزمایشگاهی بارز نیست.

در هامستر سوریه‌ای، تأثیر آندروژن‌ها (یا نبود آنها) روی غده، «تأثیر قوی» (coarse tuning) است و آندروژن است که بر روی: (۱) مورفولوژی غده و (۲) میزان سنتز پورفیرین توسط غده، تأثیر قطعی می‌گذارد. در مقایسه، تأثیر تخمدان روی غده هاردر، «تأثیر ضعیف» (fine tuning) است (Payne, 1990) و هورمون‌های تخمدان احتمالاً حفظ‌کننده ساختار غده و تعیین‌کننده تولید‌کنندگی آن در فازهای تولید مثلی مختلف می‌باشند (Payne, 1994).

د- رفتار شناسی

روابط اجتماعی پستانداران بر روی سیگنال‌هایی که مابین افراد رد و بدل می‌شود، تکیه دارد. این سیگنال‌ها، اطلاعاتی مثل جنسیت، وضعیت تولید مثلی، هویت فردی، مالکیت، توانایی رقابت و وضعیت سلامتی را انتقال می‌دهند. بسیاری از این سیگنال‌ها به شکل کمپلکس‌های مولکولی هستند که توسط سیستم حسی شیمیایی (chemosensory system) احساس می‌شوند و اثرات مهمی بر این رفتارها و همچنین موفقیت‌های تولید مثلی، رابطه والد و زاده، انتخاب جفت و علامت‌گذاری قلمرو حیاتی (Brennan and Kendrick, 2006) دارند.

بسیاری از ترشحات تولید شده توسط پستانداران همچون سیگنال‌هایی عمل می‌کنند که تعیین‌کننده چگونگی روابط اجتماعی در بین آنان هستند. اغلب، این ترشحات در ادرار و مدفوع یا ترشحاتی که توسط واژن و غدد سرآلت تناسلی (preputial glands) یا غدد سباسه مانند غدد تارسال (tarsal glands)، غدد مقعدی و دمی تولید می‌شوند، وجود دارند (reviewed by: Adams, 1980; Albone, 1984; Drickamer, 1989) چنین نشانه‌هایی در علامت‌گذاری محیطی که حیوانات

در آن زندگی می‌کنند، دارای ارزش ویژه هستند (Payne, 1994). همچنین نشانه هایی در بخش قدامی بدن نیز وجود دارند که ممکن است در بر هم کنش‌های مستقیم بین جفت یا گروه‌های حیوانات مؤثر باشند. چندین جایگاه تولید بو در سر پستانداران مشخص شده که شامل غدد دهانی، غدد مجرای خارجی گوش و غدد گیجگاهی هستند (reviewed by: Albone, 1984).

غدد هاردر با اندازه بزرگ، کنترل هورمونی اعمال شده بر روی آن و تفاوت‌های جنسی، همچنین به عنوان جایگاه تولید بو برای برقراری روابط اجتماعی (social odours) عمل می‌کنند (Payne, 1994; Luo & katz, 2004).

سیگنال‌های غدد هاردر هامستر سوریه‌ای ماده در نمایش میل جنسی‌شان (sexual interest) مهم هستند (Payne, 1977, 1979).

Harriman و Thiessen (۱۹۸۶) مشاهده کردند جربیل‌های ماده گونه ی *Mongolian gerbil*، از نشانه های بویایی ساطعه از نرها استفاده می‌کنند تا نوع رفتارهای جنسی‌شان را تعیین کنند (proceptive behaviour) در این رابطه، ماده‌ها رفتارهای جنسی مستقیم کمتری بطرف نرهایی که غدد هاردر آنها توسط جراحی برداشته شده (Harderianectomised males) دارند.

در مورد شناخت عملکرد لیپید در فیزیولوژی غده، بسیار کم مطالعه شده است؛ هر چند بیوشیمی لیپیدهای غدد هاردر بطور مبسوط مورد مطالعه قرار گرفته است (Buzzell, 1996). لیپید اصلی مترشح از غدد هاردر در بسیاری از حیوانات، تری آسیل گلسیرول (TG) نیست، بلکه ۱-آلکیل ۲ و ۳-دی آسیل گلسیرول (ADG) است. بعلاوه عملکرد (TG) ذخیره کردن انرژی در سلول است اما عملکرد (ADG)، کار در خارج بدن (مثل ایفای نقش فرومونی و یا کمک به حفظ حرارت بدن)، بعد از ترشح از غده است (Seyama and Uchijima, 2007). بر این اساس، ماهیت شیمیایی لیپید غده هاردر میتواند مؤید نقش فرومونی ترشحات غده ای باشد. همچنین طبق نظر محققین (Payne, 1977; Thiessen, 1992) ترشحات لیپیدی در غدد هاردر ممکن است

نقش فرومونی داشته باشد. مطالعات رفتاری نشان می‌دهند که غدد هاردر در تهاجم و برهم کنش‌های اجتماعی نقش دارند. بسیاری از رفتارهای اجتماعی دیگر نیز ممکن است توسط سیگنال‌های شیمیایی غدد هاردر تعدیل شوند و یا با آن توأم گردند.

بر اساس نظر Seyama و همکارانش (۱۹۹۶) یکی از این رفتارها، رفتار جستجو کننده مادر توسط زاده‌های نابینا و ناشنوا در روزهای آغازین زندگی است که احتمال دارد ضامن بقای زاده و رشد و نمو آن باشد. آنها معتقدند ۱- آلکیل-۲ و ۳- دی آسیل گلسیرول که واجد آلکیل‌های زنجیره منشعب و اسیدهای چرب است، سیگنال‌هایی به زاده‌ها می‌فرستد که نشان می‌دهد جانور ماده، مادرشان است. برای رشد و نمو تدریجی زاده‌ها، رفتار مادری نسبت به زاده‌ها ضروری است. در جوندگان، مجموعه رفتارهایی که مادر نسبت به زاده‌ها نشان می‌دهد شناسایی شده است. این رفتارها شامل ساختن آشیانه، دسته کردن و گروه کردن زاده‌ها، لیسیدن ناحیه مقعدی-تناسلی و خم شدن مادر روی زاده‌ها در آشیانه برای فراهم کردن گرما و تغذیه می‌باشند (Lucas et al., 1998).

در این رابطه، ترشحات لیپیدی افزایش یافته غدد هاردر مادر، ممکن است یکی از منابع ارسال سیگنال‌های فرومونی به زاده‌ها باشد تا آنها بتوانند به کمک حس بویایی خود که تنها حسی است که در روزهای آغاز زندگی و تا روز پنجم، برای ادامه زندگی از آن بهره می‌گیرند، مادر خود را بیابند. مؤید این مطلب آنست که در بررسی‌های رفتارشناسی انجام شده در این تحقیق بر روی موش خانگی، مکرراً مشاهده شد که زاده‌ها پس از تماس مستقیم با غدد هاردر له شده مادر، پنجه‌های خود را به طرف منافذ بینی می‌بردند و دوباره در اطراف ناحیه غدد له شده هاردر، به حرکات جستجوگرانه سر می‌پرداختند.

در تأیید افزایش احتمالی ترشحات لیپیدی مشاهده شده در این تحقیق، یک مطالعه نشان داده است که در موش کور زیرزمینی، حجم لومن‌های آسینوسی غدد ماده که در طی تابستان مختصراً کمتر از نرهاست، در طی زمستان و در فصل زاد و ولد بطور قابل ملاحظه‌ای

بیشتر می شود. این تفاوت مرتبط با جنس، همچنین تغییرات فصلی آسینوس های غده ای می تواند نقش فرومونی غده را تأیید کند (Shanas *et al.*, 1996).

افزایش احتمالی ترشحات لیپیدی در دوره شیردهی مادر، شاید بتواند عملکردی برای آن، در رابطه با ارتباط مادر و زاده ها رقم بزند. شاید این عملکرد، فرستادن سیگنال های حسی شیمیایی باشد و یا آنکه ممکن است مادر برای گرم کردن زاده ها از ترشحات لیپیدی استفاده کند. طبق نظر Rehorek و همکارانش (۲۰۰۵)، این ترشحات از طریق مجرای بینی-اشکی (nasolacrimal) خارج می شوند.

این یافته در تطابق با یافته دیگری است که در آن، یکی از مسیرهای پیشنهادی خروج ترشحات لیپیدی، مجرای بینی-اشکی است که به حفره بینی خارجی (external nasal cavity) باز می شود (Shanas *et al.*, 1996). مطالعه بر روی جربیل (*Meriones unguiculatus*) نشان داده است که ترشحات غده هارد در که از منافذ بینی خارج می شود، از طریق تیمار که از صورت آغاز می شود و بطرف دم پیش می رود، از روی پنجه های حیوانات تیمار کننده برداشته می شود و روی خز بقیه بدن پخش می شود (Thiessen, 1992).

بدین ترتیب مادر می تواند با تیمار خود و پخش ترشحات افزایش یافته لیپیدی غدد هارد در در سراسر بدن به افزایش دمای بدن خود و در نتیجه تأمین گرمای مورد نیاز زاده ها کمک نماید. بعلاوه بر طبق یک نظریه بحث برانگیز، یکی دیگر از مسیرهای احتمالی خروج ترشحات غده هارد در، مسیری است که در آن، ترشحات از طریق مجرای دفعی واحدی در بخش قدامی میانی کیسه ملتحمه، وارد قسمت میانی پوست (درم) می شود و در قاعده فولیکول مو به بیرون راه می یابد (Shanas *et al.*, 1996). مؤید وجود ترشحات لیپیدی در خز حیوان، یافته ای است که در آن، تجزیه خز چیده شده از حیوانات نرمال و حیواناتی که غدد هارد در آنها برداشته شده، نشان می دهد که غده هارد در به میزان ۴۰٪ به افزایش لیپیدهای موجود در خز کمک می کند (Thiessen & Kittrell, 1980).

در ادامه، مطالبی که در توضیح سیستم های حسی شیمیایی آمده است نشان می دهد که در سیستم بویائی، VNO بیشتر دارای توانایی تشخیص ترکیبات فرومونی است. همچنین ارتباط دستگاه اشکی (و در نتیجه غده هاردور) با سیستم و مرونزال (VNO) و خاصیت ترشچی این سیستم (Rehorek et al., 2005) میتواند تأییدی بر عملکرد فرومونی غده هاردور باشد.

توانایی شناسایی افراد، در رفتار اجتماعی پستانداران نقش مهمی ایفا می کند. بنابراین برای یادگیری بویایی و شناخت حس شیمیایی، سیستم های نیرومندی رشد کرده اند که اغلب به وقایع مهم زندگی، همانند جفت گیری، زایمان یا تکامل زاده ها مربوطند.

پستانداران دارای ۲ سیستم حسی شیمیایی مستقل هستند که بالقوه، توانایی انتقال اطلاعات فرومونی را دارند: سیستم بویایی اصلی و سیستم و مرونزال (Luo and Katz, 2004).

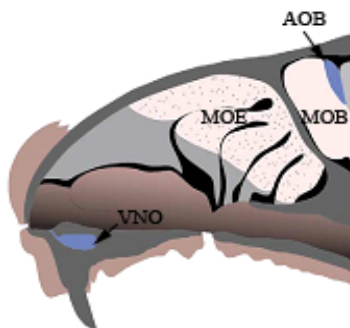
در مسافت های طولانی از سیگنال های شیمیایی با ویژگی فرار بودن نسبتاً سریع استفاده می شود که توسط سیستم بویایی اصلی احساس می شوند. بیشتر پستانداران، سیستم VNO نیز دارند که مختص بررسی نشانه های حسی شیمیایی نسبتاً غیر فرار است که بعد از تماس مستقیم حاصل می شود. در واقع، سیستم VNO می تواند بسیار گزینشی به لیگاندهای پتیدی غیر فرار پاسخ دهد (Brennan & Kendrick, 2006).

ارگانیزاسیون آناتومیکی سیستم VNO به تنظیم مستقیم رفتارهای تولید مثلی توسط فعالیت VNO، دلالت دارد. علاوه بر متمایز بودن آناتومیکی، این دو سیستم ارگانیزاسیون مولکولی متمایزی در محیط دارند. موشها حدود ۱۰۰۰ گیرنده بویایی (OR) و حدود ۳۰۰ گیرنده و مرونزال (VR) دارند. اما این دو گروه گیرنده ها، هومولوگی کمی دارند. همچنین مسیرهای سیگنالی آنها نیز متفاوت است.

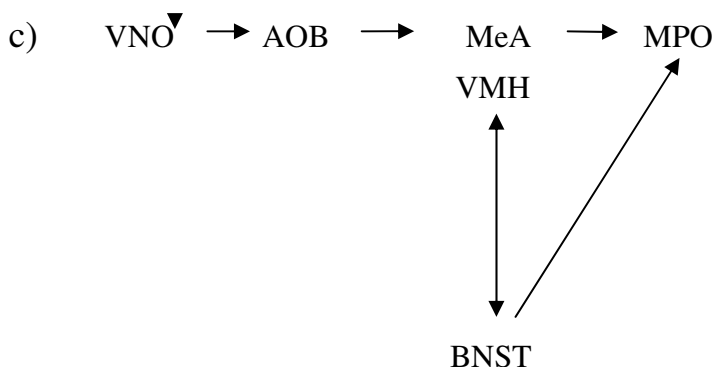
نورون های گیرنده بویایی در اپتیلیوم اصلی بویایی، زواید خود

را به پیاز اصلی بویایی می‌فرستند که آن هم، زواید خود را به کورتکس piriform می‌فرستد. نورون‌های گیرنده و مرونزال که درون VNO قرار دارد، زواید خود را به پیاز فرعی بویایی می‌فرستد که آن هم زواید خود را به آمیگدالای میانی (MeA) می‌فرستد. MeA با هسته bed nucleus of stria terminalis مرتبط است و از هر دوی اینها، زوایدی به نواحی از هیپوتالاموس می‌رود که در کنترل وقایع نورواندوکراین و تنظیم رفتارهای اجتماعی و تولید مثلی مانند جفت‌گیری و تهاجم مهم هستند.

a)



b) MOE → MOB → Piriform cortex → Insular, Orbitofrontal & Entorhinal cortex
Cortical amygdala



* شکل-۴: آناتومی سیستم های حسی شیمیایی تشخیص دهنده فرومون (a) تصویر شماتیک از موقعیت MOE و MOB در سیستم بویایی اصلی و VNO و AOB در سیستم و مرونزال (b) تصویر شماتیک از مسیر آناتومیک سیستم بویایی اصلی پستانداران (c) مسیر آناتومیک سیستم و مرونزال در پستانداران.

MPOA: medial preoptic area, VMH: Ventromedial hypothalamus

* برگرفته از: (Luo & Katz, 2004)

علاوه بر تمایز مولکولی و آناتومیکی، سیستم بویایی اصلی و سیستم و مرونزال اعمال متمایزی نیز دارند:

غیر فعال کردن نورون‌های گیرنده بویایی منجر به بیخوابی (insomnia) می‌شود. اما رفتار جفت‌گیری، بدون تغییر می‌ماند. در مقابل، جراحت VNO در جوندگان منجر به چندین نقص در رفتارهای تولید مثلی می‌شود. یکی از این نقایص که در نتیجه حذف یک گروه از ژن‌های VR۱۶ ناشی می‌شود منجر به نقص رفتار جفت‌گیری و تهاجم مادری می‌شود. این مطالعات قویاً ثابت می‌کند که VNO برای بررسی فرومونی و تنظیم رفتارهای تولید مثلی، حیاتی است اما مطالعات، نقش سیستم بویایی اصلی را در پردازش فرومونها کاملاً حذف نمی‌کند.

نتیجه گیری (Conclusion)

در مطالعه و بررسی غدد هاردر موش خانگی در روزهای مختلف سال اول زندگی، تغییرات ترشحي در اپیتلیوم غده ای، در هر دو جنس مشاهده شد. بعلاوه تفاوت هایی بین غدد هاردر نر و ماده در میزان فعالیت ترشحي مشاهده گردید. همچنین در آزمایشات رفتارشناسی برای بررسی نقش فرومونی ترشحات غده ای، به نقش احتمالی لیپید مترشح در ایجاد رابطه مابین مادر و زاده ها اشاره می شود. این ارتباط چه به شکل شناسایی مادر توسط زاده ها و چه به منظور تأمین گرمای مورد نیاز زاده ها توسط مادر، از طریق الگوی تیمار تنظیم کننده حرارت، برقراری رابطه با زاده ها و ارسال سیگنال های شیمیایی باشد، بهرحال رفتار غریزی است (Thiessen *et al.*, 1975) که مؤید رابطه فرومونی مادر و زاده هاست.

در تحقیقات آینده، می توان به بررسی تأثیر برخی از عوامل فیزیولوژیکی در هیستولوژی غده، چون مرحله ای از سیکل جنسی که حیوان ماده در آن بسر میبرد و یا تأثیر احتمالی زایمان های قبلی در فعالیت ترشحي غده نیز پرداخت.

منابع فارسي

- ۱ - بهادري ، مسلم. (۱۳۴۶) فن بافت شناسي و روشهاي رنگ آميزي . انتشارات دانشگاه تهران.
- ۲ - چرخ زرین، سمیلا. (۱۳۸۲-۱۳۸۳) پایان نامه با موضوع : «اثر محرک شیمیایی حس بویایی در تسريع بلوغ جنسی موش خانگی» BIHE.
- ۳ - محسني کوچصفهاني، هما. پريور، کاظم . (۱۳۷۸) روشهاي فني بافت شناسي، جنين شناسي و جانورشناسي . انتشارات الحسين (ع) .

منابع انگليسي

1. Bancroft, J.D., and Cook, H.C.(1984) Manual of histological techniques., pages 20-21.
2. Ben V. Burger. (2005) Mammalian Semiochemicals. Topics in Current Chemistry., 240: 231-278.
3. Brennan, P. A.,and Kendrick, K.M. (2006) Mammalian social odours: attraction and individual recognition. Philos. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci., 361:2061-2078 .
4. Bucana, C.D., and Nadakavukaren, M.J. (1972) Fine structure of the hamster harderian gland. Cell Tissue Res., (Historical Archive). 129(2): 178 – 187.
5. Buzzell, G.R., Blank, J.L., Vaughan, M.K., and Reiter, R.J.(1995) Control of secretory lipid droplets in the harderian gland by testosterone and the photoperiod: Comparison of two species of hamsters. Gen. Comp. Endocrinol., 99: 230 – 238.
6. Buzzell, G.R.(1996) The harderian gland: Perspectives., Microsc. Res. Tech., 34:2-5.

7. Cavagnari, BM., Sterin-Speziale, N., Affanni, JM., Knudsen, J., and Santomé, JA. Acyl-CoA-binding protein in the armadillo Harderian gland: its primary structure and possible role in lipid secretion. *Biochim Biophys Acta.*,1545(1-2):314-25.
8. Chieffi Baccari, G. (1996) Organogenesis of the harderian gland: A comparative survey. *Microscopy Research and Technique.*, 34: 6 – 15.
9. Chieffi Baccari, G., Chieffi , G., Di Matteo, L., Dafnis, D., De Rienzo, G., and Minucci, S.(2000) Morphology of the harderian gland of the Gecko, *Tarentola mauritanica*. *J. Morphol.*, 244:137 – 142.
10. Chieffi Baccari, G., Monteforte, R., De Lange, P., Raucci, F., Farina, P., and Lanni, A. (2004) Thyroid hormone affects secretory activity and uncoupling protein-3 expression in rat harderian gland. *Endocrinology.*,145(7) :3338 – 3345.
11. Coppola, D.M., Budde, J., and Millar, L.(1993) The vomeronasal duct has a protracted postnatal development in the mouse., 218:59-64.
12. Coto- Montes, A., Tomás- Zapico, C., Escames, G., León, J., Tolivia, D., Rodríguez-Colunga, J., and Acuña-Castroviejo, D. (2003) Characterization of melatonin high- affinity binding sites in purified cell nucleiof the hamster(*Mesocricetus auratus*) harderian gland. *J. Pineal Res.*, 34:202-207.
13. Djeridane, Y. (1996) Comparative histological and ultrastructural studies of the harderian glands of rodents. *Microscopy Research and Technique.*, 34: 28 – 38.
14. Djeridane, Y., and Touitou, Y. (2005) Lack of effect of ghrelin treatment on melatonin production in rat pineal and harderian glands . *Life Sci.*, 76: 2393 – 2401 .
15. Ferrara, D., Monteforte, R., Chieffi Baccari, G., Minucci, Sergio.,and Chieffi, G. (2004) Androgen and estrogen receptors expression in the rat exorbital lacrimal gland in relation to “ Harderianization”. *J. Exp. Zool.*, 301A:297-306.
16. Gesase, A.P.,and Satoh, Y. (2001) Sexual differences and effects of castration on secretory mode and intracellular calcium ion dynamics of golden hamster harderian gland. *Cell Tissue Res.*, 304:81- 90.

17. Gorchein, A. (2003) Characterizations of porphyrins of rat harderian gland by thin layer chromatography and mass spectrometry : no evidence for a tricarboxylic acid porphyrin. *Biomed. Chromatogr.*, 17: 526 – 529.
18. Grill, V., Zweyer, M., BASA, M., Bareggi, R., Martelli, AM., Bratina, F., and Narducci, P. (1994) Histochemical and ultrastructural investigation the cytotypes in the mouse harderian gland . *Boll Soc Ital Biol Spe r.*, 70(8 – 9) : 199 - 206.
19. Hongo, T., Hakuba, A., Shiota, K., and Naruse, I. (2000) Suckling dysfunction caused by defects in the olfactory system in genetic arhinencephaly mice. *Biol Neonate.*, 78(4): 293-299.
20. Huang, G., Zhang, J., Wang, D., Mason, R.T., and Halpern, M.(2006) Female Snake Sex Pheromone Induces Membrane Responses in Vomeronasal Sensory Neurons of Male Snakes. *Chemical Senses .*, 31(6):521-529.
21. Johnston, R.E. (2003) Chemical Communication in rodents: from pheromones to individual recognition. *Journal of Mammalogy.*,84:1141-1162.
22. Keverne, E.B.(1999) Review The Vomeronasal Organ. *Science.*, 286(5440):716 – 720.
23. Krause, W.J., and McMenamin, P.G. (1992) Morphological observations on the harderian gland of the North American opossum (*Didelphis virginiana*). *Anatomy and Embryology(Historical Archive).*,186(2):145-152.
24. Laukaitis, C., Dlouhy, S., Ponting, R., and Karn, R.(2005) Diverse, spatial, temporal, and sexual recently duplicated androgen –binding genes in *Mus musculus*. *BMC Evol Biol.*, 5:40.
25. Lin, W., and Nadakavukaren, M.J. (1979) The androgenic effect on the fine structure of the harderian gland in the male hamster. *Cell Tissue Res.*, 198(1): 119-127.
26. López,J.M., Tolivia, J., and Alvarez-Uría, M.(1991) Postnatal development of the harderian gland in the Syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus*): A light and electron microscopic study. *The Anatomical record.*, 233:597 – 616.

27. López, J.M., and Alvarez-Uriá, M.(1994) Effects of ovariectomy and ageing on the structure and ultrastructure of the female Syrian hamster harderian gland: a stereological analysis. *Anatomy and Embryology(Historical Archive)*.,189(5): 409-419.
28. Lucas, B., Kormandy, C. J., Binart, N., Bridges, R.S., and Kelly, P. A.(2007) Null mutation of the prolactin receptor gene produces a defect in maternal behavior. *Endocrinology*.,139(10): 4102-4107.
29. Luo, M., and Katz, L.C.(2004) Encoding pheromonal signals in the mammalian vomeronasal system. *Current Opinion in Neurobiology*., 14:428–434.
30. McClellan, K.A., Robertson, F.G., Kindblom, J., Wennbo, H., Törnell, J., Bouchard, B., Kelly, P.A., and Ormandy, C.J. (2001) Investigation of the role of prolactin in the development and function of the lacrimal and harderian glands using genetically modified mice. *J. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*,42: 23-30.
31. McMasters, KM., and Hoffman, RA. (1984) Harderian gland : regulation of sexual "type" by gonads and pineal gland. *Biol Reprod.*, 31(3): 579 – 585.
32. Morawietz G, Ruehl-Fehlert C, Kittel B, et al. (2004) Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice – Part 3. A joint publication of the RITA and NACAD groups., *Exp. Toxic. Pathol.* 55: 433–449.
33. Nemet, A., Belkin, M., and Rosner, M. (2007) Transplantation of Newborn Lacrimal Gland Cells in a Rat Model of Reduced Tear Secretion.*Imag.*, 9:94-98.
34. Ortiz, Velasco, F., Franco, F., Quintero,B., García, Rosales, Rizo,R., and Reiter (2001) Different patterns in the histology and autofluorescence of the harderian glands of the syrian hamster, rat, mouse, mongolian gerbil and guinea pig. *Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C.*, 30 (2): 107–115.
35. Ortraz, G., Bitzer – Quintero, Falcón, F., Reiter, R., et al. (1997) La glándula de Harder: un transductor neuroimmunoendocrino. *Arch. Neurocién.*, 2(4): 274 – 281.
36. Payne, AP., McGadey, J., Moore, M.R., and Thompson, G. (1977) Androgenic control of the harderian gland in the male golden hamster. *J. Endocrinol.*, 75(1): 73 – 82.

37. Payne, AP., (1994) The harderian gland: a tercentennial review. *J. Anat.*,185:1-49.
38. Payne, A.P., Shah, S.W., Marr, F.A., McGadey, J., Thompson, G.G., and Moore, M.R. (1996) Hormones and the control of porphyrin biosynthesis and structure in the hamster harderian gland. *Microscopy Research and Technique.*, 34:123 – 132.
39. Pradidarcheep, W., Asavapongpatana, S., Mingsakul, T., Poonkhum, R., Nilbunga, S., and Somana, R. (2003) Microscopic anatomy of the orbital harderian gland in the common tree shrew (*Tupaia glis*). *J. Morphol.*, 255:328 – 336.
- 40 . Raucci, F., Santillo, A., D'aniello, A., Chieffi, Paolo., and Chieffi Baccari, G. (2005) D-Aspartate modulates transcriptional activity in harderian gland of frog , *Rana esculenta* : morphological and molecular evidence. *J. Cell Physiol.*, 204: 445 – 454.
- 41.Rehorek, S.J. (1997) Squamate harderian gland: an overview. *The Anatomical Record.*, 248: 301 – 306.
42. Rehorek, S.J., Hillenius, W.J., Quan, W., and Halpern, M. Passage of the harderian gland secretions to the vomeronasal organ of *Thamnophis* sp. *Canadian Journal of Zoology*, in Press(2000).
43. Rehorek, S.J., Legenzoff, E.J., Carmody, K., Smith, T.D., and Sedlmayr, J.C.(2005) Alligator tears: a reevaluation of the lacrimal apparatus of the crocodilians. *J. Morphol.*,266: 298-308.
44. Reis, E.R., Nicola, E.M., and Nicola, J.H.(2005) Review: Harderian gland of wistar rats revised as a protoporphyrin IX producer. *J. Morphol. Sci.*, 22(1): 43 – 51.
45. Robert, A., Lambert, M.D., and Arthur, M.Yudkin, M.D.(1923) Changes in the paraocular glands accompanying the ocular lesions which result from a deficiency of vitamin A. *J. Exp. Med.*,38:25-32.
46. Rodríguez, C., Kotler, M., Antolín, I., Sainz, R.M., and Menéndez-Peláez A.(1996) Regulation of the Aminolevulinate Synthase gene in the Syrian hamster harderian gland: changes during development and circadian rhythm and role of some hormones. *Microsc. Res. Tech.*, 34: 65-70.

47. Roger A. Hoffman, Lucinda B. Johnson, Russel J. Reiter (1985) Harderian Glands of Golden Hamsters: Temporal and Sexual Differences in Immunoreactive Melatonin. *Journal of Pineal Research.*, 2 (2): 161–168.
48. Ruben, J.A., and Terry, D. J.(2000) Selective Factors Associated with the Origin of Fur and Feathers. *Amer. Zool.*, 40:585–596.
49. Sakai T. (1989) Major ocular glands (harderian gland and lacrimal gland) of the musk shrew (*Suncus murinus*) with a review on the comparative anatomy and histology of the mammalian lacrimal glands. *J Morphol.*, 201(1):39-57 .
- 50 . Satoh, Y., Gesase, A.P., Habara, Y., Ono, K., and Kanno, T. (1996) Lipid secretory mechanisms in the mammalian harderian gland. *Microscopy Research and Technique.*, 34: 104 – 110.
51. Schaal, B., Coureaud, G., Langlois, D., Giniès, C., Sémon, E., and Perrier, G. (2003) Chemical and behavioral characterization of the rabbit mammary pheromone. *Nature.*, 424: 68 – 72.
52. Serino, I., Izzo, G., Ferrara, D., d'Istria, M., and Minucci, S.(2007) A new sex dimorphism in the harderian gland of the frog *Rana esculenta*. *Can. J. Zool.*, 85:909-915.
53. Seyama, Y., Otsuka, H., Ohashi, K., Vivien-Roels, B., and Pevet, P.(1996) Sexual diversity of the lipid metabolism in the harderian gland of the golden hamster. *Microsc. Res. Tech.*,34:71-76.
54. Seyama, Y., and Uchijima, Y. (2007) Review Novel function of lipids as a pheromone from the harderian gland of golden hamster. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B.*,83(3): 77-96.
55. Shanas, U., Arensburg, B., Hammel, I., Hod, I., and Terkel, J.(1996) Quantitative histomorphology of the blind mole rat harderian gland. *J. Anat.* , 188(pt 2): 341-7.
56. Shanas, U., Gozlan, I., Murawski, U., and Terkel, J. (1998) Identification of main lipid components of mole rat harderian gland. *J. Chem. Ecol.*, 24(12): 2181 – 2193.
57. Shirama K, Hokano M.(1991) Electron-microscopic studies on the maturation of secretory cells in the mouse Harderian gland. *Acta Anat (Basel).*, 140(4):304-12.

58. Shirama, k., Ozawa, S., Seyama, Y., Kobayashi, M., Sawamura, S., and Yamada, J.(1997) Postnatal development of the harderian gland in the rabbit:light and electron microscopic observations. *Microsc. Res. Tech.*, 37:572-582.
59. Sun, C. Y., and Nadakavukaren, M. J. (1980) Effect of testosterone on the female hamster harderian gland pigmentation and ultrastructure. *Cell Tissue Res.*, 207(3): 511 – 517.
60. Thiessen, D., Clency, A., and Goodwin, M.(1976) Harderian gland pheromone in the Mongolian gerbil *Meriones unguiculatus* .*J. Chem. Ecol.*,2(2):231-238.
61. Tolivia, D., Uría, H., Mayo, J.C., Antolín, I., Rodríguez-Colunga, J., and Menéndez-Peláez A. (1996) Invasive processes in the normal harderian gland of Syrian hamster. *Microsc. Res. Tech.*, 34:55-64.
62. Tomás-Zapico, C., Caballero, B., Sierra, V., Vega-Naredo, I., Alvarez-García, O., Tolivia, D., Rodríguez-Colunga, MJ., and Coto-Montes, A.(2005) Survival mechanisms in a physiological oxidative stress model. *FASEB J.*, 19(14):2066-8.
63. Varriale, B., and Chieffi, p. (1997) Oestrogen control of the sexual dimorphism in the harderian gland of *Xenopus laevis*. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.*,62:455–460.
64. Varriale, B., and Esposito, T. (2005) The hamster androgen receptor promoter: A molecular analysis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*,94: 103 – 110.
65. Villapando, I., Ramirez, M., Zepedarodríguez, A., Castro, A.C., Cardenaz – Vazquez, R., and Vilchis, F. (2005) The harderian gland of the Mexican Volcano mouse *Neotomodon alastoni alastoni* : a morphological and biochemical approach. *J. Exp. Zool.*, 303A: 13 – 25.
66. <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Mus-musculus.html>.
67. [http:// www.bionet/biobooks_1_laboratory-mice%7Claboratory-rat.html](http://www.bionet/biobooks_1_laboratory-mice%7Claboratory-rat.html) - 20k
68. http://www.jhu.edu/animalcare/training_procedures_animal_numbers
69. <http://www.ratbehavior.org>

Baha'i Institute for Higher Education(BIHE)

Faculty of Basic Sciences

Department of Biology

B.sc. Dissertation in Biology

Entitled:

“ Histology and morphology of the Harderian gland in house mouse and its probable
role in relation between mother and littermates”

Supervisor:

Dr. Khaze'i

Author:

Niknaz Riazati

May 2008