

موسسه آموزش عالی علمی
دانشکده علوم پایه
گروه زیست شناسی
پایان نامه تحصیلی جهت اخذ مدرک لیسانس

موضوع :

اثر محرک شیمیایی مس بویائی در تسریع
بلوغ جنسی موش خانگی

استاد راهنما :

دکتر نعیم خاضعی

نگارنده :

سمیلا چرخ زرین

سال تحصیلی ۸۳ - ۱۳۸۲

بنام دوست یکتا

تقديم به پدر بزرگ
و مادر بزرگ عزيزم

تقدیر و سپاس فراوان خود را تقدیم استاد ارجمندم جناب

آقای دکتر نعیم خاضعی می نمایم.

استادی که زحمات خالصانه و مستمر ایشان در طی سالهای

کسب علم و ادب همچون چراغی فروزان فرا راه اینجانب و سایر

عزیزان دانش پژوه قرار گرفت.

بهترین آرزوها و احترامات تقدیم ایشان باد.

همچنین از محبت‌های بی دریغ عزیزانم: خانواده مهربانم، آقای فرشید محبوبی

(دایی بزرگوارم)، خانم گیتی چرخ زرین (عمه مهربانم)، استاد ارجمندم مهندس برهان

خلص و همکلاسی باوفایم خانم مهنوش دهقانی که جملگی در طی سالیان اخیر همواره

مشوق و یار و مددکار اینجانب بوده اند صمیمانه سپاسگزاری و قدردانی می نمایم و زحمات

همه استادان بزرگوار و محبت‌های تمام همکلاسیهایم را پاس می دارم.

فهرست

عنوان	صفحه
۱- مقدمه	۱
۲- بخش اول (بررسی مقالات و کتب)	۳
۳- بخش دوم (روشها و مواد)	۱۳
فصل اول (حیوان مورد استفاده)	۱۴
فصل دوم (روش مطالعه بافت)	۳۲
۴- بخش سوم (مشاهدات)	۶۸
۵- بخش چهارم (بحث)	۸۶
۶- بخش پنجم (نتیجه گیری)	۱۰۷
۷- خلاصه	۱۱۰
۸- بخش ششم (مراجع)	۱۱۱

مقدمه (Intorduction)

شناخت نقش محیط و نحوه تاثیر آن در نمو و تکامل موجود زنده از مسائل مورد توجه محققینی بوده که همواره محیط را به عنوان عاملی فعال و سازنده در نظر گرفته اند. در این میان شناخت عوامل مؤثر بر بلوغ و تولید مثل و مراکز کنترل کننده این پدیده ها، همچنین راههای عصبی دخیل از مباحث جالب و کاربردی محسوب می شود.

در این تحقیق که در ادامه رساله شهرزاد بازیار فارغ التحصیل رشته دارویی از مؤسسه آموزش عالی علمی با عنوان "تحریک شیمیایی حس بویایی و پیش رسی احتمالی بلوغ جنسی در موش خانگی" انجام شد، شواهدی جدید در تائید اثر استشمام اسانس گیاه آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) به عنوان یک محرک بویایی (olfactory stimulus) در تسریع بلوغ جنسی (precocious sexual development) موش خانگی (*mus musculus*) بدست آمد که ارائه می گردد.

در بیان علت انتخاب چنین موضوعی باید گفت که بررسیهای مورفولوژیک و آماری مطرح شده در رساله مزبور اثر استشمام مداوم اسانس این گیاه در تسریع بلوغ جنسی موشهای خانگی ماده را تایید کرد ولی در عین جالب بودن این نتایج، کمبود شواهد دقیقتر و جدیدتر بافت شناسی و بیوشیمیایی همچنان حس می شد. این ادعا محتاج اطلاعات بیشتری بود تا بتوان قاطعانه تر در تایید و یا رد آن اظهار نظر نمود. همچنین در این رساله نتایج آماری بیشتری بررسی و جمع آوری

گردید چرا که در رساله قبل، بازیار خود این نکته را یادآور می‌شود که نتایج آماری کافی نبوده است.

بهر حال همچنان تحقیقات بیوشیمیایی در این زمینه تکمیل نشده است و امید است در آینده با جمع آوری اطلاعات بیشتر بتوان از این منظر نیز به این مدعا پرداخت.

بخش اول

بررسی مقالات و کتب

Review of litretures

فی الواقع در بررسیها و مطالعات انجام شده در منابع مختلف کتابخانه ای، مجلات و منابع اینترنتی به تحقیقی مشابه این تجربه که تاثیر استشمام اسانس یک گیاه بر تسريع بلوغ یک پستاندار باشد برخورد نشد. در این قسمت سعی خواهد شد خلاصه ای از تجاربی که تأثیر مستقیم سیستم عصبی و محرکهای بویایی در بلوغ و تولید مثل دارند ذکر گردد.

با وجود آنکه تولید مثل اساساً تحت کنترل هورمونی است لکن وجود تناوب فصلی در این فرایند در بسیاری از انواع موجب شده است تا درباره عوامل و محرکهای محیطی مختلفی مانند نور، دما و مولکولهای موجود در هوای اطراف که ممکن است به منزله تنظیم کننده های چرخه تولید مثل عمل نمایند مطالعات متعددی صورت گیرد. لذا بتدریج اهمیت محرکهای دریافتی توسط حواس در فرایند بلوغ و تولید مثل مورد توجه قرار گرفته است. تاثیر افزایش نور بارها و بارها روی تجدید فعالیت بیضه های تعدادی از انواع پرندگان، خزندگان، ماهیها و پستانداران نتایج مشابهی را بدست داد. در حال حاضر عقیده بر این است که اثر نور از طریق عصب بینایی به هیپوتالاموس مغز می رود و به طریق موجب تحریک هیپوفیز و ترشح گنادوتروپینها (gonadotropins) یا هورمونهای محرک رشد غدد و اندامهای تولید مثلی میشود. این نتایج با مشاهداتی که همراه با بستن چشم مهره داران مورد آزمایش بود قطعیت یافت. (۶)

نه تنها نور بلکه گرما، بارندگی، فراوانی غذا و برخی عوامل دیگر برروی فعالیت های غدد تناسلی مؤثرند. بطوریکه بلوغ زودرس دختران در مناطق گرمسیری را نمی توان امری اتفاقی دانست و همچنین تحقیقات نشان دهنده آن است که انواع پوششهای اطراف ساندویچها، مواد

مورد استفاده در پر کردن دندان، حشره کشها، پلاستیک بکار برده شده در سر شیشه نوزادان و بعضی اسباب بازیها دارای ترکیباتی هستند که در صورت ورود به بدن دقیقاً مانند هورمون جنسی استروژن عمل کنند. این ترکیبات با نام A bisphenol یا (BPA) معروف هستند و ورودشان به بدن باعث بروز چاقی و بلوغ زودرس دختران می گردد. (۴۸، ۴۹)

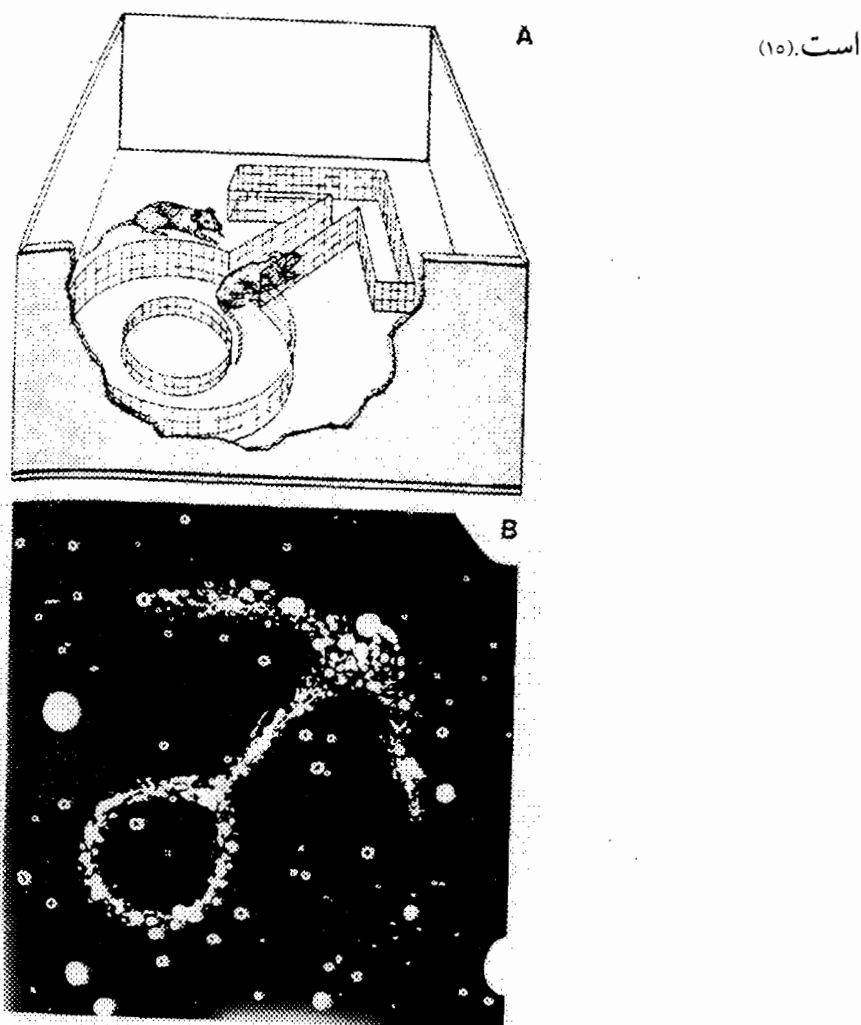
در بین پستانداران حس بویایی در تولید مثل و بلوغ نقش مهمی دارد.

اگر چه لوبهای بویایی (olfactory lobes) که مرکز انتقال، تجزیه و تحلیل اولیه در- یافتهای بویایی هستند در بسیاری از پستانداران به بزرگی لوبهای بویایی اغلب مهره داران پست نیست لکن این تظاهرات آناتومیکی دلیل بر بی اهمیت بودن حس بویایی در این موجودات نمی- باشد. بطوریکه بسیاری از رفتارهای فردی و اجتماعی پستانداران تحت کنترل علائم و محرکهای بویایی است؛ فی المثل یافتن افراد هم نوع، جفت، غذا، وجود دشمن و روابط مادر و زاده ها همگی متأثر از محرکهای بویایی است. در میان پستانداران، انواع دارای جثه کوچکتر مانند جوندگان در اکثر رفتارهایشان شدیداً تحت تاثیر این محرکها هستند و در میان جوندگان، موش خانگی بیشتر از هر حیوان دیگری اثرات قوی سیستم عصبی را بر مکانیسمهای بلوغ و تولید مثل نشان می دهد. مشاهداتی که این نظریه را تأیید می نمایند از این قرارند:

۱- وقتی یک موش خانگی در قفس جدید گذاشته می شود اولین کاری که انجام میدهد جستجوی قفس و علامت گذاری آن توسط ادرار است. در ادرار این حیوان موادی بنام فرومون (pheromone) وجود دارد که حاوی مولکولهای بسیار محرکی است. این

مولکولها بر بسیاری از رفتارهای فردی و اجتماعی موش تأثیرات شگرفی دارند. حیوان از طریق استشمام مرتب ادرار بجا مانده از خود یا حیوان دیگر و حتی نقاط مختلف بدن هم نوع خود، بخصوص ناحیه جنیتال (genital) رفتارهای مختلفی از خود بروز میدهد.

در یک آزمایش موش نر بالغی در قفسی به شکل علامت (♂) گذاشته شد و موش ماده بالغ در خارج این علامت قرار داشت. بعد از ۲۰ دقیقه توسط دوربین ماورا بنفش از قفس عکس برداری گردید. شکل (۱-۱) نقاط سفید رنگ نشانگر بقایای ادرار حیوان است. همانطور که از شکل برمی آید نر بالغ در علامت گذاری محیط زندگی خود بسیار فعالتر از جنس ماده

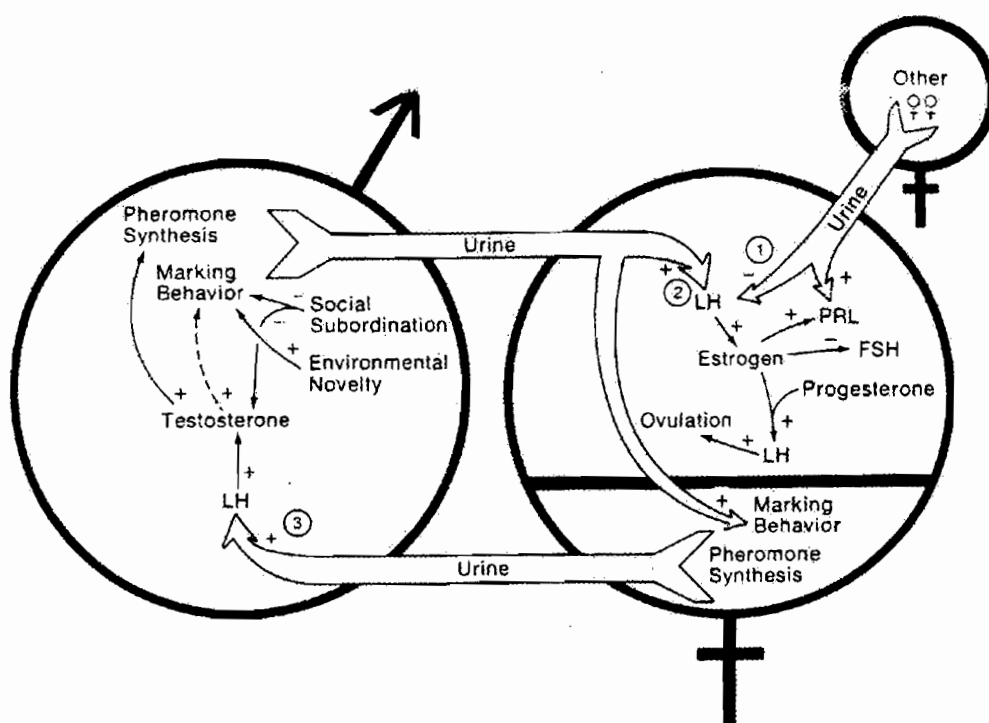


شکل (۱-۱) موش خانگی محیط زندگی خود را توسط ادرار علامت گذاری میکند.

۲- در حیوان ماده زمان تخمک گذاری بسیار وابسته به محرکهای بویایی در ادرار است. به

عبارت دیگر ادرار موش نر عامل مهم تحریکی جهت بلوغ، تخمک گذاری، جفت گیری

و آبستنی است و بر عکس. (۴۶) شکل (۱-۲)



شکل (۲-۲): فرومونهای موجود در ادرار موش خانگی نر و ماده عامل ایجاد هماهنگی در افعال تولید مثلی آنها هستند.

(Vandenbergh effect)

۳- اگر چندین حیوان ماده کنار هم باشند بقایای ادرار آنها از بلوغ سایر موشهای جوان ماده

جلوگیری می کند. البته اثرات اجتماعی این پدیده نیز جالب است، بدین معنی که وجود

تعداد زیادی ماده بالغ و آبستنی های متعدد مکان مناسب جهت زندگی و منابع غذایی را به

خطر می اندازد. (۴۶-۴۷)

۴-زاده هایی که مادرزادی و یا تحت آزمایش از حس بویایی محروم باشند (anosmia) قادر

به جهت یابی و یافتن سینه مادران خود نیستند. (۴)

۵-در موشهای نر بالغی که ژن سازنده پروتئینهای گیرنده های (receptors) فرومونهای آنها

از بین رفته است (gene knockout) حالت تهاجمی (aggression) دیده نمیشود. حالت

تهاجمی در بین نرهای بالغ طبیعی وجود دارد و برای تعیین محدوده زندگی و اعلام هشدار

به نرهای دیگر لازم است. (۴۷)

فی المثل وجود دو نر بالغ در یک قفس نزاع همیشگی و زخمی شدن آنها را به همراه

دارد. حتی در بعضی موارد این کشمکشها منجر به از بین رفتن یکی از آنها می گردد. این

حالت به علت وجود فرومونها در ادرار آنها اتفاق می افتد. چنانکه عدم وجود رستپورهای لازم

در یکی از نرها باعث عدم تحریک او توسط فرومونهای دیگری شده و حالت تهاجمی در او

از بین می رود. این حیوان حتی در جفت گیری دچار اشتباه می گردد و همواره در تلاش

برای جفتگیری با هر دو جنس هست. (۴۷)

۶-اگر حیوان نر عقیم شود و یا بالغ نباشد قادر به تحریک حیوان ماده جهت تخمک گذاری

نخواهد بود. (۴۶)

۷-چرخه تولید مثلی ماده های یک قفس بر اثر تأثیر فرمونها بر یکدیگر بتدریج کند شده و

سپس متوقف می گردد. اگر همین ماده ها به ناگهان با ادرار یک موش نر بالغ مواجه شوند

وارد چرخه تولید مثلی جدید می گردند. (Lee-Boot effect) (۴۶)

۸- اگر موش ماده ای که بیش از ۴۸ ساعت از بارداریش نگذشته است مواجه با ادرار موش

نری شود که با او جفت گیری نکرده است سقط جنین می کند. (۴۶)

۹- ادرار مصنوعی که بیشتر ترکیبات یونی وارگانیکی ادرار واقعی با غلظت بالا را دارا است

نمی تواند رستپورهای مخصوص فرومونها را تحریک کند. (۴۶)

۱۰- مولکولهای شناخته شده که نقش فرومونی در جنس نر را دارا هستند وقتی به ادرار موش

عقیم شده وارد شوند عملکرد خود را حفظ می کنند اما وقتی وارد آب می شوند عملکردی

ندارند. (۴۶)

لیگاندهای مختلفی که فعالیت فرومونی در موش ماده دارند عبارتند از: (۳۰)

- 1- 2,5-dimethylpyrazine
- 2- 2- sec- butyl- 4,5- dihydrothiazole
- 3- 2,3-dehydro-exo-brevicomuin
- 4- A mixture of E,E- fornesene and E -forn esene
- 5- 2- heptanone
- 6- hydroxy -6-methyl -3- heptanone

فرومونهایی که چرخه استروس و بلوغ زود رس را در موش خانگی بوجود می آورند عبارتند

از: (۵۲)

Brevicomins, dihydrothiazoles

فرومونهای لازم در ادرار موش نر برای تحریک تهاجم در موش نر دیگر: (۳۳)

- 1- dehydro-exo-brevicommin
- 2- 2- (sec-butyl)-dehydrothiazole

بررسی مقالات و کتب در مورد گیاه آویشن شیرازی

قبل از شروع مطلب لازم به ذکر است که چون بازیار در رساله خود تحت عنوان "تحریک شیمیایی حس بویایی و پیش رسی احتمالی بلوغ جنسی در موش خانگی" بررسی مفصلی از مقالات و مراجع مطالعاتی در مورد گیاه آویشن شیرازی کرده است، جهت جلوگیری از تکرار مطالب و تطویل کلام از نوشتن مجدد آنها خودداری می گردد و به مطالبی پرداخته می شود که سابقه ای از آن نیست.

دکتر لئونس کارلیه فرانسوی در کتاب گلها و گیاهان شفابخش از آویشن شیرازی تعریف کرده و ضمن ذکر اثرات مواد موجود در بخشهای مختلف این گیاه بر روی دستگاه گردش خون و مراکز عصبی به این نکته اشاره می کند که «اعمال اعضا جنسی و تناسلی را در بدن تحریک و تقویت می کند» خانمهایی که دچار قطع و فقدان قاعدگی شده اند برای معالجه می توانند از دم کرده آویشن استفاده نمایند.^(۲)

دکتر غیاث الدین جزایری در کتاب زبان خوراکیها می گوید: «آویشن شیرازی قاعده را باز می کند.»^(۳)

دامپزشکان قدیم برای معالجه تب برفکی از آویشن استفاده می کردند. محققان ثابت کرده- اند که استفاده از اسانس رقیق شده آویشن شیرازی در معالجه آفتهای دهانی بسیار موثر است.^(۴)

بخشهای مختلف این گیاه علاوه بر خواص درمانی مذکور اثرات ضد عفونی کننده و ضد تشنج دارد، عمل دستگاه هضم را تقویت کرده و برای رفع بیماری‌های مختلف دستگاه تنفسی مفید هستند. (۸)

بررسی کلینیکی تأثیر دهان شویه اسانس گیاه در بیماری آفت مکرر دهان (recurrent aphthous stomatitis, RAS) نشان داد که استفاده از دهان شویه ۰/۲٪ این گیاه در کنترل این بیماری بسیار موثر است. (۴۴)

تزریق غلظتهای معینی از اسانس رقیق شده این گیاه در درمان التهابهای مزمن بسیار مؤثر است. (۳۳)

در تحقیقی دیگر ترکیبات موجود در اسانس این گیاه از ۴ نقطه ایران جمع آوری گردید. که عبارت بودند از:

Carvacrol, Thymol, Linalool, P-cymene

سپس اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی این اسانس مورد بررسی قرار گرفت که ثابت شد وجود درصد بالای کارواکرل و تیمول چنین خاصیتی را به اسانس این گیاه می دهد. (۳۱)

در تحقیقی دیگر ترکیبات موجود در اسانس گیاه آویشن شیرازی استخراج گردید که به قرار ذیل هستند (۳۲)

- 1- P-cymene
- 2- Thymol
- 3- Thymol methyl – ether
- 4- Sitosterol

- 5- Stigmasterol
- 6- Oleanolic acid
- 7- Betulinic acid
- 8- Heuadecanoic acid
- 9- Carvacrol

۴۸-۵۲ درصد این اسانس از تیمول و ۱۲/۶ درصد آن از کارواکرول تشکیل شده است که هر دو اثر ضد میکروب و ضد فارچ دارند.

خصوصیات تیمول: فرمول شیمیایی آن $C_{10}H_{14}O$ و دارای وزن مولکولی ۱۵۰/۲۱ است. دارای اثر قوی ضد عفونی کننده و ضد باکتری است. در عین حال مصرف آن ممکن است حالت سمی نیز به همراه داشته باشد.

خصوصیات کارواکرول: نام دیگر آن ایزوتیمول (Isothymol) است. فرمول شیمیایی آن $C_{10}H_{14}O$ بوده و حالت مایع و بویی شبیه بوی تیمول دارد و همچنین دارای اثر قوی ضد عفونی کننده است. (۸)

بخش دوم
روشها و مواد

Methods and materials

فصل اول

حيوان مورد استفاده

الف- مختصری از زیست شناسی موش خانگی (*Mus musculus*)

در این تحقیق از موش خانگی (*House mouse* یا *Mus musculus*) استفاده شد.

جایگاه این حیوان در سلسله جانوری بقرار ذیل است:

Classification

Kingdon: Animalia

Phylum: Chordata

Class: Mammalia

Order: Rodentia

Suborder: Sciurognathia

Family: Muridae

Subfamily: Murinae

Genus: *Mus*

Species: *Mus Musculus*

نام علمی (*Mus Musculus*) : (Scientific name)

نام رایج (*House mouse*) : (Common name)

۱- پراکندگی جغرافیایی (*geographic range*)

Mus musculus یکی از گونه های پستانداران است که برای تحقیقات علمی بسیار مناسب

است. این حیوان شامل چندان نژاد و حدود ۳۰۰۰ نمونه جهش یافته (*mutant*) است. گفته میشود

منشأ این پستاندار چونده، منطقه شرقی مدیترانه (اطراف چین و هند) در قاره آسیا بوده و به تدریج

توسط انسان بطور خواسته و یا ناخواسته به آفریقا، ایالات متحده آمریکا و اروپا آورده شده

است. (۳۸)

۲- ریخت شناسی حیوان (morphology)

نوع بالغ این حیوان دارای خصوصیات زیر است.

۱- طول سر و بدن: ۱۵۰ تا ۱۹۰ میلی متر

۲- طول دم: ۷۰ تا ۹۵ میلی متر

۳- طول موهای روی بدن: ۷ میلی متر

۴- دارای یک جفت دندان پیشین (incisors) با عاج زرد رنگ در فک بالا و پایین

۵- وزن: ۱۰ تا ۲۵ گرم

۶- رنگ: در نوع وحشی (wild type) از خاکستری تیره تا قهوه ای (۳۷-۳۵)

۳- عادات غذایی (Food habits)

این حیوان در محیط آزاد از انواع مختلف سبزیجات مثل دانه های مختلف، ریشه ها، برگ و ساقه گیاهان مختلف تغذیه می کند. حشره ها چه در حالت لاروی و چه بالغ میتوانند منبع دیگر غذایی آن باشند. اگر در محیط زندگی انسان بسر می برد می توانند از هر نوع غذا یا وسایل مورد مصرف انسان استفاده نماید.

بیشتر این حیوانات برای خود ذخیره غذایی دارند و یا در انبار ذخیره غذایی انسان زندگی میکنند.

(۳۷-۳۵)

۴- تولید مثل (reproduction)

این پستاندار جونده قابلیت تولید مثلی بسیار دارد. یک ماده بالغ میتواند زایمانهای متعددی

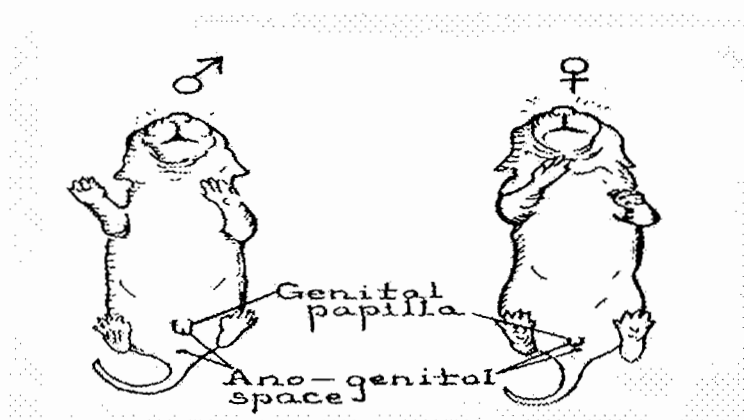
در طول یکسال داشته باشد (۸-۷ بار)، با وجود این حیوان وحشی در محیط آزاد دارای فصل

تولید مثل مخصوص بوده که از آپریل تا سپتامبر امتداد دارد. سیکل استروس* (oestrus cycle) در این حیوان ۴ تا ۶ روز است که استروس واقعی کمتر از یک روز طول می کشد. در هر زایمان ممکن است بین ۵ تا ۱۰ نوزاد بدنیا بیاورد ولی تا ۱۴ نوزاد هم دیده شده است. طول مدت حاملگی ۱۹ تا ۲۱ روز است که بر حسب نژاد دختران ممکن است تغییر یابد اما اگر مادر در حال شیر دادن نوزادان قبلی باشد این مدت طولانی تر می شود، به عبارت دیگر مادر شیرده دیرتر باردار می گردد. طول مدت زایمان متفاوت بوده و در ارتباط با سن، تعداد نوزادان و وضعیت فیزیکی مادر از چند دقیقه تا چند ساعت متغیر است. (معمولاً ۱ تا ۲ ساعت).

جفت توسط خود حیوان خورده می شود که یک عامل تحریکی برای شیردادن است. نوزادان در هنگام تولد صورتی پر رنگ، با چشمان بسته و بدون مو هستند. رشد مو در ۵ روزگی آغاز شده و در ۱۰ روزگی کاملاً سطح بدن پوشیده از آن می شود. مجرای گوش در هنگام تولد توسط لاله اطراف آن بسته است و با رشد نوزاد بتدریج لاله گوش بحالت اصلی بر می گردد. روند باز شدن مجرای گوش تا حدود ۵-۴ روزگی طول می کشد.

همچنین باز شدن چشمها در حدود ۱۴ روزگی اتفاق می افتد. نوزدان بعد از ۳ هفته می توانند بدون مادر به زندگی خود ادامه دهند و در ۷-۵ هفتگی بالغ می شوند. زمان تقریبی شروع روندی که در نهایت به بلوغ حیوان می انجامد از باز شدن دهانه واژن (vaginal orifice) قابل پیگیری است. در حیوان مورد استفاده در این رساله دهانه واژن بطور متوسط در ۴۱-۴۰ روزگی باز شد. در جنس نر زمان دقیق بلوغ همراه با علامت خاصی نیست، لذا

تعیین زمان دقیق کار مشکلی است؛ اما بررسی های هیستولوژیکی نشان دهنده این مطلب است که بطور آشکار از جنس ماده دیرتر بالغ می شود. اگر چه تولید اسپرم حدوداً در ۳۰ روزگی آغاز می گردد اما توان جفت گیری بعد از ۴۵ روزگی حاصل می شود. (چنانکه در بقیه پستانداران نیز اتفاق مشابهی می افتد.) لازم به ذکر است که جنسیت نوزادان را می توان در همان ساعات اولیه پس از تولد مشخص نمود. تفاوت فاصله بین غلاف آلت جنس نر و کلیتوریس جنس ماده با مقعد مشخص کننده جنسیت است. شکل (۱-۲)



شکل (۱-۲): اختلاف اندامهای تناسلی خارجی در نوزاد موش خانگی

اولین جفت گیری ۵-۶ روز بعد از باز شدن واژن صورت می گیرد علامت انجام جفت گیری وجود پلاک سفید یا شیری رنگی است (vaginal plaque) که بصورت توده ای در ابتدای واژن دیده می شود. این توده شیری رنگ در واقع بقایای مایع منی (semen fluid) حیوان نر است که در داخل واژن تخلیه شده است. این توده حدود ۲۴ ساعت پس از جفت گیری در دهانه واژن باقی مانده و آن را مسدود می کند. متعاقباً توسط آنزیم ها تجزیه و جذب می گردد. و بعد از یک شبانه روز اثری از آن دیده نمی شود.

متوسط عمر موش خانگی ۲ سال است اما تا ۶ سال هم ممکن است به درازا بکشد، بهر حال

در طبیعت عموماً بیشتر از ۱۲ تا ۱۸ ماه زنده نیست. (۶-۳۴)

۵- محیط زندگی (Habitat)

حیوان در محیط آزاد در شکافهای دیوارها، صخره ها و تونلهای زیر زمینی زندگی میکند، در حالیکه 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 جاندار بخوبی خود را با محیط اطراف وفق می دهد، لذا به راحتی می تواند در شرایط مختلف زندگی کرده و در نقاط مختلف دنیا پراکنده شود. (۳۵)

۶- رفتار (Behaviour)

حیوان بیشتر در شب فعال است. به سرعت می دود (تا ۸ مایل در ساعت). به خوبی میجهد، بالا می رود و شنا می کند. موشهای خانگی معمولاً بصورت کلنی زندگی میکنند. بدین معنی که معمولاً یک نر با چندین ماده و زاده ها در یک محل مشخص بسر می برند و از محل زندگی خود در مقابل بقیه نرها به شدت دفاع می کنند. این حالت تهاجمی بین نرها دیده می شود و ماده ها این حالت را کمتر دارند.

این جانداران دارای حواس بسیار قوی شنوایی، بویایی، چشایی و لامسه هستند و از این طرق

برای یافتن غذا، جفت و نوزادن و ... استفاده می کنند. (۳۷-۳۸)

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

۱- بوجود آورنده مشکلات بهداشتی؛ چرا که انواعی از آنها می توانند حامل عوامل بیماریزایی نظیر (نوعی تیفوس) Murine typhus، (آبله ریکتسیایی) Rickettsial pox، (تولارمی) Tularemia، (مسمومیت غذایی) Food poisoning، (نوعی طاعون) Bubonic plague باشند. (۳۴)

۲- آفات مهم کشاورزی هستند.

۳- اگر در محل‌های ذخیره غذای انسانی پیدا شوند مشکلات عظیم اقتصادی در پی دارند. (مثل انبار گندم)

۴- از بین برنده وسایل چوبی، لوازم منزل و لباس (۳۴)

۵- از بین برنده بعضی آفات مضرّ کشاورزی است (۳۴)

لازم به ذکر است که 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 میتوان از آنها نگهداری کرد.

ب - کار کردن با این حیوان آسان است.

ج - ژنوم این حیوان کاملاً شناخته شده است.

د - توانایی تولید مثل زیادی دارد.

هـ - طول عمر نسبتاً کوتاهی دارد.

ب- روشهای مراقبت و تکثیر، حیوان در این تحقیق

۱- محل نگهداری حیوان

۸۱/۹/۱۴ یک خانواده از حیوان مورد نظر شامل یک جفت والد و زاده هایشان از انستیتو پاستور خریداری شد. به گفته مسوول حیوانات در انستیتو پاستور این حیوانات به روش inbreeding تکثیر یافته اند. بدین معنی که آمیزش بین حیوانات بسیار قریب بوده و در هر خانواده خواهرها با برادرها آمیزش داده می شوند. مزیت این روش این است که ژنوم این حیوانات بسیار نزدیک بهم می شود و تا حدود زیادی هموزیگوسیتی پیش می آید. لازم به ذکر است که به دلیل پیش آمدن خلوص قابل ملاحظه و هموزیگوسیتی، این نژاد در مقایسه با دیگر موشهای هتروزیگوت در برابر عوامل بیماریزا مقاومت کمتری دارد. این روش در این تحقیق نیز ادامه یافت.

حیوانات به دو دسته شاهد (control) و تجربی (experimental) تقسیم شدند. این دو گروه در تمام شرایط محیطی یکسان بودند، تنها فاکتوری که اثر آن در این رساله بررسی شد اضافه نمودن اسانس آویشن شیرازی به جو هوای درون قفس گروه تجربی بود.

اتاق نگهداری حیوانات، (animal room)، برای دو گروه شامل ۲ اتاق مجزا از یکدیگر بود. جهت یکسان بودن تمام فاکتورهای محیطی سعی شد تا متوسط دما ۲۷-۲۵ درجه سانتیگراد باشد. زمان روشنایی و تاریکی حدود ۱۲ ساعت برای هر مرحله تنظیم شد و پنجره کوچکی در

هر دو اتاق همواره جهت تهویه هوا نیمه باز بود. به دلیل محدود بودن اتاق محل نگهداری گروه تجربی بنظر نمی رسد تأثیر فاکتور متغیر (اسانس آویشن شیرازی) بر گروه شاهد با اهمیت باشد.

۲- روشهای نگهداری، جابجایی و تکثیر حیوان

حیوانات در قفسهای مدور از جنس پلاستیک محکم به قطر دهانه ۲۶/۵ سانتیمتر و عمق ۱۲ سانتیمتر نگهداری شدند. در قفسها از جنس استنلس و با طراحی جدید جهت قرار دادن در ظروف مدور، همراه با سوراخهایی جهت تهویه مناسب و محل گذاشتن غذا و شیشه آب آنها بود.

ظرف آب مورد نیاز شیشه ای بوده و جهت دسترسی حیوانات به آب موجود در آن لوله ای شیشه ای که دهانه آن بکمک شعله باریکتر شده بود، به کمک درپوش پلاستیکی مناسب در دهانه شیشه قرار می گرفت. پس از پر نمودن شیشه از آب چند بار شیشه برعکس میشد تا از جاری شدن آب درون شیشه به درون لوله سر آن اطمینان حاصل گردد. آب درون شیشه هر ۳-۴ روز یکبار تعویض میگردد.

کف قفس از پوشال نرم چوب و مقداری دستمال کاغذی پوشیده می شد و هفته ای یکبار قفسها تمیز می شدند. بدین صورت که حیوانات به قفسهای تمیز منتقل شده و قفسهای آلوده با

دقت تمام توسط آب گرم، اسکاچ و مایع ظرفشویی (ریکا) شسته می شدند. سپس خشک شده و برای استفاده بعدی آماده بودند.

غذای حیوانات از کارخانه تولید کننده غذای دام و طیور بنام «خوراک دام پارس، شرکت سهامی عام» واقع در جاده مخصوص کرج تهیه می شد. به گفته مسئول آنجا این غذا شامل تمام مواد لازم و ویتامینها بوده است.

برای جابجا کردن حیوانات بالغ و یا معاینه آنها، این عمل به کمک دم آنها و به آرامی صورت می گرفت و حیوان جابجا می شد. اما برای جابجا کردن نوزادان خود نوزاد به آرامی در دست گرفته می شد. این جابجائیها بیشتر جهت تشخیص جنس نر از ماده و تشخیص باز یا بسته بودن واژن انجام می شد.

نحوه تشخیص حیوان ماده:

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

۲- فاصله کلیتوریس (قسمتی از اندام تناسلی که مشابه پنیس بوده لکن کوچک و بدون مو است و از سطح بدن کاملاً دیده می شود) تا مقعد کمتر از حیوان نر است.

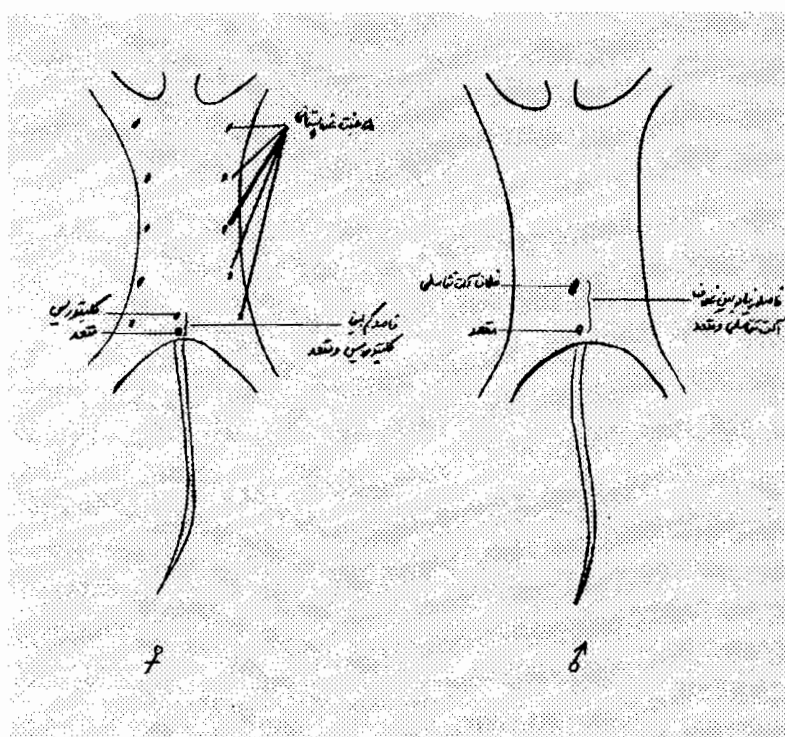
نحوه تشخیص حیوان نر:

۱- حیوان نر دارای کیسه اسکروتوم (کیسه محتوی ۱ جفت بیضه) در انتهای بدن و زیر دم

است که وقتی هوا گرم باشد بیضه ها کاملاً از داخل شکم خارج شده در درون این کیسه قرار می گیرند

و لذا تشخیص حیوان نر آسان می شود؛ اما اگر هوا سرد باشد توسط لیگامانی به داخل شکم کشیده می شوند.

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



شکل (۲-۲): تفاوت‌های اندام خارجی موش خانگی بالغ

لازم به ذکر است تمام قفس ها نام گذاری شده و شرح حال و تاریخ وقایع مشاهده شده در هر یک و برای هر یک از حیوانات داخل آن به دقت یادداشت می گردید.

در این رابطه تاریخ زایمانها، باز شدن گوشهها، باز شدن چشمها و باز شدن واژن از اهم تاریخ هایی بود که ثبت می گردید.

برای مشخص نمودن سن زاده ها اولین روز بعد از تولد روز اول در نظر گرفته شد و همواره

سعی گردید تاریخ دقیق زایمانها ثبت گردد.

حیوانات ماده از ۱۰ روزگی در هر دو گروه به فاصله ۲-۳ روز کشته می شدند تا بررسیهای هیستولوژیکی روی تخمدان آنها بعمل آید.

ج - روش تشریح و برداشت بافت از حیوان

قبل از بیهوش کردن و کشتن حیوان، آخرین بررسیهای لازم از نظر سن، جنس و بدقت انجام می گردید. درون ظرف شیشه ای در داری دستمال کاغذی آغشته به اتر (دی اتیل اتر، diethyl ether) که ماده بیهوش کننده است قرار داده می شد تا جو داخل ظرف مملو از این ماده گردد. سپس حیوان موردنظر به آرامی درون ظرف قرار می گرفت و درب ظرف گذارده می شد. پس از گذشت ۱ دقیقه حیوان کاملاً بیهوش و سپس خفه می شد. قبل از بیهوشی کامل حرکات و راه رفتن حیوان نامتعادل شده و در نهایت بطور کامل بیهوش میگردید. در خفگی نیز عضلات حیوان برای مدتی دچار اسپاسمهای مکرر می شد رنگ چشم از صورتی به قهوه ای می گرائید 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 بقیه کارها باید در نهایت سرعت انجام گیرد تا بافتها حداقل آسیب را ببینند.

وسایل و مواد لازم جهت تشریح و اتوسپی :

۱- سینی تشریح

۲- لوازم تشریح شامل قیچی، پنس و اسکالپل در سایزهای مختلف

۳- چند عدد سوزن ته گرد

۴- یک تکه مقوا که حیوان روی آن تشریح شود.

۵- چند تکه کوچک دستمال کاغذی و یا پنبه جهت پاک کردن خون اضافی هنگام تشریح

۶- زنبیل مخصوص حمل بافت (basket)، طرز تهیه زنبیل حمل بافت بدین طریق بود که

اطراف استوانه های کوچک شیشه ای قطعه ای توری نخی به کمک نخ محکم میگردید:

استوانه شیشه ای



یک تکه پارچه متخلخل



یک تکه نخ



۷- کاغذ آب خشک کن که روی آن مشخصات حیوان و بافت برداشته شده بدقت با مداد

نوشته می شد.

علت انتخاب آب خشک کن در بیشتر موارد جهت گذاشتن بافت برداشته شده روی آن،

حفظ شکل اصلی اندام بود. فی المثل یک تکه از کبد را می توان به راحتی در زنبیل قرار داد، اما

در مورد برداشت کل اندام تناسلی نر یا ماده به دلیل حجم زیاد آنها و حفظ شکل اصلی اندام باید

از کاغذ آب خشک کن استفاده می شد تا بافت به همان شکل و حالت اصلی خود در بدن ثابت

شود در اینجا کاغذ ضمن جذب خون اطراف بافت، آن را به خود می چسباند و به عنوان یک

نگاهدارنده یا پشتیبانی کننده خوب (holder) عمل می کند. لازم به یادآوری است که باید تمام

این اعمال بسرعت انجام گردد تا تخریب بافتی به حداقل برسد.

حیوان کشته شده به پشت روی مقوای داخل سینی تشریح قرار داده شده و جهت ثابت نمودن حیوان با کمک سوزن ته گرد دست ها و پاهاى حیوان روی مقوّا مهار می شد. سپس توسط پنس و قیچی به آرامی پوست شکم از قسمت بالای اندامهای تناسلی (در حیوان ماده از بالای کلیتوریس، در حیوان نر از بالای غلاف آلت تناسلی) شکافی طولی داده می شد، این شکاف تا زیر گردن ادامه می یافت. چهار برش عرضی هم در ناحیه پوست دست ها و پاها ایجاد می گردید تا پوست شکم به راحتی باز شود و قطعات پوست به کمک سنجاق به مقوای زیر ثابت می شدند.

متعاقباً عضلات شکم نیز توسط قیچی برش خورده و کنار زده می شدند تا محتویات شکم پدیدار گردد. $\frac{1}{3}$ بالای بدن را قفسه سینه اشغال می نماید که حاوی قلب و ریه است. در زیر قفسه سینه حفره شکمی قرار دارد که قسمت زیادی از آن را کبد چند قسمتی در بالا و روده ها در پایین اشغال می نمایند. سایر احشا مثل معده، کیسه صفرا، لوزالمعده، طحال و کلیه و بخشهایی از دستگاه تناسلی در زیر این قسمتها پنهان شده اند.

در این تحقیق بافتهای هدف، سیستم تناسلی بخصوص تخمدانها هستند. لذا با پنس و قیچی به آرامی بافتهای اضافی برداشته می شدند.

برداشت اندامهای تناسلی حیوان ماده:

اندامهای تناسلی حیوان ماده عبارتند از: ۱ جفت تخمدان (ovary)، کلاف پیچیده لوله های تخمک بر (oviduct)، ۱ رحم دو شاخه (uterus)، کانال زایمان (vagina) و کلیتوریس (clitoris).

تخمدانها زیر کلیه ها چسبیده اند و کلیه ها را می توان پس از برداشت بقیه اجزاء، چسبیده به دیواره پشتی شکم در دو طرف ستون مهره ها مشاهده نمود.

هنگام برداشت اندامهای تناسلی ماده نهایت دقت و ظرافت بکار گرفته می شد تا به بافتها آسیب نرسد. کل اندام تناسلی از ناحیه زیر کلیتوریس تا کلیه ها برداشته می شد و روی کاغذ آب خشک کن با همان شکل اصلی گسترده می گشت.

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. لذا برای نامگذاری بافت و نوشتن مشخصات آن امداد مشکی گرافیتی استفاده شد تا در حین ادامه کار مشخصات پاک نگردند استفاده از جوهر اغلب منجر به محو نوشتجات می گردد.

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 (fixative) قبل از کشتن حیوان آماده می گردید تا امور در اسرع وقت انجام پذیرد.

ج- گیاه آویشن شیرازی

۱-مختصری از زیست شناسی عمومی گیاه آویشن شیرازی

این گیاه که نام علمی آن *Zataria multiflora* است از خانواده *Labiatae* می باشد.

نام رایج این گیاه به چند زبان:^۱

انگلیسی : Garden thyme; pot- herb thyme

فرانسه : Thym; Thyme commun : Ser phyllum; Frigoule

آلمانی : Gartenquendel

عربی : العبس ، صعتر رسمی

فارسی: آویشن شیرازی

گیاهی است بوته مانند و دارای ساقه های متعدد، نازک، سخت و بسیار منشعب، گل‌های آن دارای کاسه غشایی با دندانه های مثلث شکل و حالت مجتمع با ظاهر مدور در کناره برگها جام گل سفید رنگ است.(۱۰)

این گیاه هم به صورت خودرو و هم در باغچه ها می روید و مصرف آن بصورت چاشنی بسیار متداول است.

^۱مرجع : واژه نامه گیاهی (نام علمی گیاه) ، اسمعیل زاهدی، مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، تابستان ۱۳۷۷.

در متون علمی فارسی نامهای متعددی برای این گیاه ذکر شده است. آفشن، آبشن شیراز، آویشم و آویشن. (۱۰)

محل رویش: این گیاه بومی نواحی جنوب ایران بوده و در اصفهان: یک کیلومتری شمال نجف آباد، شاهکوه، در ۲۶۰۰ متری لرستان، شهبازان در خوزستان: در ۶۰ کیلومتری شمال شرقی دزفول، کوه سیوند، کرمان، بلوچستان، یزد و فارس می روید.

لازم به ذکر است به دلیل تنوع محلّ رویش و زیر گونه های گیاه آویشن ممکن است آنچه که بنام «آویشن شیرازی» در بازار فروخته می شود. زیر گونه دیگری از این گیاه که بسیار مشابه *Zataria multiflora* است باشد. تعیین دقیق انواع آویشن از یکدیگر مستلزم بررسیهای ماکروسکوپی (خصوصیات گیاه شناسی) و میکروسکوپی (خورده نگاری) است. (۱۱)

۲- روش اسانس گیری

از جوشاندن این گیاه با آب و تقطیر بخار حاصله اسانسی بدست می آید که بوی تند اما معطر و مطبوعی دارد و رنگ آن زرد متمایل به سبز کم رنگ است.

اسانس این گیاه نامحلول در آب اما محلول در الکل و روغنها است. در مجاورت نور فاسد و اکسید می شود، لذا باید آن را در شیشه های در بسته و دور از نور نگهداری کرد. این ترکیب جزء گروه اسانسهای فنولی است. (۸)

دستگاه اسانس گیری شامل یک بالن ۴ لیتری شیشه ای (پیرکس) و لوله خنک کننده بخار حاصله از جوشاندن مواد بود. هر بار ۱۸۰-۱۵۰ گرم برگ آویشن وزن می گزیدید و داخل بالن

وارد می گردید و بعد از اضافه نمودن cc ۴۰۰۰ آب به آن لوله خنک کننده بر روی بالن سوار میگردید و کل دستگاه روی ۳ پایه و چراغ گاز قرار می گرفت. بعد از حدود ۴ ساعت تقطیر اسانس جمع آوری شده در لوله جمع کننده بوسیله باز کردن شیر موجود در انتهای لوله جمع آوری می شد. این اسانس نامحلول در آب بوده و در سطح بالایی آب قرار می گیرد. از این مقدار گیاه جوشانده شده ۵-۴/۵ ml اسانس خالص روغنی حاصل می شود. (۱۰)

تماس این اسانس با پوست بدن ایجاد سوزش، قرمزی و ریختن موی آن ناحیه می نماید که ممکن است چندین ساعت ادامه داشته باشد. البته بسته به ضخامت پوست میزان سوزش فرق میکند. تندی اسانس در مخاط لب و دهان غیر قابل تحمل است. در انجام این تحقیق سعی شد برای هر بار مصرف، از اسانس تازه تهیه شده استفاده گردد تا از تغییرات حاصله در نتیجه تابش نور و حضور اکسیژن جلوگیری شود.

رنگ اسانس با گذر زمان تا حدودی تغییر می یابد و متمایل به قهوه ای روشن میشود.

کل اسانس مصرف شده در این تحقیق ۴۴۱۰ ml بوده است.

برای اضافه کردن بوی این اسانس به جو قفس حیوانات تجربی بالشتکهایی از جنس دستمال کاغذی، آماده و بوسیله سیم مفتولی از درب قفسها آویزان می شد. مقدار مصرف اسانس، هر صبح و شب ۷-۶ قطره بود. با گذشت زمان بالشتک از اسانس اشباع می شد و به جهت جلوگیری از ریزش اسانس به داخل قفس هر از گاه بالشتک تعویض می گردید. دقت می شد تا بالشتک آغشته به اسانس در ارتفاعی قرار گیرد که با پوست حیوانات تماسی نداشته باشد.

فصل دوم

روش مطالعه بافت (Histology)

برای مطالعه بافت مورد نظر انجام مراحل زیر ضروری است تا برشهای برداشته شده آماده

مشاهده در زیر میکروسکوپ گردد: (۱۲-۱۳)

الف - مقطع کوچکی از بافت یا عضو مورد نظر در محلول ثابت کننده قرار داده میشود

تا ثابت گردد. (فیکسسیون ، Fixation) این اقدام تا حد ممکن از تغییرات بعد از مرگ

(postmortem changes) بافتها جلوگیری می نماید.

ب - توسط الکل ، آب بافت گرفته می شود (آب گیری ، Dehydration)

ج - سپس الکل موجود در بافت بوسیله گزلیل زدوده می گردد. (شفاف کردن،

(Clearing)

د- قطعه کوچک بافت برداشته شده بوسیله چندین عبور (پاساژ) به پارافین آغشته می گردد

(آغشتگی با پارافین ، -Wax impregnation) که ضمن آن هم گزلیل از لایه لای بافتها برداشته

می شود و هم بجای آن پارافین جانشین می گردد.

ر- با پارافین قالب گیری می شود. (قالب گیری با پارافین ، Wax embedding)

و- از این قالبهای پارافینی برش گیری می شود. (برش قالبهای پارافینی ، Sectioning)

ه- برشها بر روی لام چسبانده می شوند. (تثبیت برشها بر روی لام،

(Sections mounting)

ی- لامهای آماده توسط روشهای مختلف رنگ آمیزی می شوند (Staining) و توسط

لامل روی برشها پوشیده می گردد (چسباندن لامل ، Mounting)

گاهی ممکن است در ضمن تهیه مقاطع ، اجسام خارجی یا رسوب رنگ بر روی برشها باقی بماند و یابه هنگام برش گیری در بافت مورد نظر چین خوردگی ایجاد شود یا شکافی بوجود آید و لذا در بعضی از مناطق مناظر غیر طبیعی و اضافی دیده می شود که چنین عیوب، تصنعی و تکنیکی است (Artifact).

لازم به ذکر است که برشهای مختلفی می توان با دستگاه برش گیری گرفت.

۱- طولی (longitudinal section)

۲- عرضی (transverse or cross section)

۳- مایل (oblique section)

گاهی شکل آناتومیکی بافت به گونه ای است که به راحتی می توان نوع برش را تعیین نمود ولی گاهی دقیقاً نمی توان گفت که چه مقطعی از بافت در دسترس است. ذکر نوع مقطع در بافتهای نظیر غدد و بافتهای لوله ای شکل بسیار اهمیت دارد ولی در بعضی از اندامها مثل لوزالمعده و تخمدان به دلیل عدم وجود شکل متقارن، تعیین نوع مقطع دشوار می نماید.

الف _ ثابت کردن یا فیکساسیون (Fixation)

در این تحقیق ، از محلول بوئن (Bowin) جهت ثبوت بافتها استفاده شد.

روش تهیه محلول بوئن

۱- ۷۵ ml محلول اشباع شده اسیدپیکریک

۲- ۲۵ ml فرمالدهید

مدت زمان لازم : ۶-۲۴ ساعت

۳- ۵ ml اسید استیک گلاسیال

این محلول باید تازه به تازه تهیه شود و مقدار مایع فیکساتیو در ظرف باید ۲۵ تا ۵۰ برابر حجم بافت برداشت شده باشد. ظرف باید طوری باشد که بافت به آسانی در آن قرار گرفته و بعد از ثبوت به آسانی از آن خارج شود. بافتها باید حتی المقدور نازک باشند تا مایع فیکساتیو به مقدار کافی در آن نفوذ کند. بهر حال با توجه به ضخامت بافت می توان مدت زمان لازم برای فیکساسیون را تغییر داد. ضخامت متوسط بافت برای کارهای معمولی ۵-۳ میلیمتر است.

در عمل ثبوت نکات زیر مورد نظر بود.

۱- جلوگیری از اتولیز بافت، در این صورت حداکثر کوشش بعمل آمد تا بلافاصله پس از

برداشت بافت از بدن بخش مورد نظر در محلول بوئن قرار داده شود.

۲- پایداری بافت در وضعی که بافت در زمان حیات داشته و این عمل در ثبوت بی نهایت

مهم بود.

۳- عمل ثبوت، بافت را بوضع نگی می داشت که دستکاری بعدی بافت آن را

خراب نکند.

۴- جامد کردن مداد کلوئیدی

۵- کمک به رنگ آمیزی بهتر بافت

ب- آب گیری (Dehydration)

در این عمل با مواد جاذب آب، آب موجود در بافت برداشت شد حجم محلول آب گیری باید حداقل ۵۰ برابر بافت باشد.

معمولاً برای آب گیری از موارد زیر استفاده می کنند:

۱- استون ۲- الکل اتیلیک ۳- الکل متیلیک ۴- ایزوپروپیل یا الکل بوتیلیک

که در این تحقیق از الکل اتیلیک استفاده شد و بافتها در غلظتهای صعودی الکل پاساژ داده شدند. بدین معنی که نسوج از چند ظرف الکل اتیلیک که بتدریج غلظت الکل آنها زیاد می شد گذرانده شدند.

نحوه عمل بدین صورت بود که کاغذ آب خشک کن حاوی بافت پس از ۶ تا ۲۴ ساعت قرار گرفت در محلول ثابت کننده (بسته به ضخامت بافت) با پنس به آرامی از داخل ظرف حاوی محلول فیکساتیو خارج می گردید و به آرامی به دیواره ظرف کشیده می شد تا حتی الامکان مایع فیکساتیو از آن خارج شود و سپس بافت وارد اولین پاساژ صعودی الکل با غلظت ۷۰٪ می گردید. لازم به ذکر است که عمل عبور بافت از محلولهای مختلف به عنوان « پاساژ دادن» معروف است. پس از اتمام موعد مقرر بافت از ظرف مذکور خارج می شد و در ظرف الکل بعدی با غلظت بیشتر قرار می گرفت و به همین ترتیب روند کار ادامه می یافت.

بهتر است شروع پاساژهای صعودی آب گیری با الکل 70° - 50° باشد زیرا اگر بافت ناگهان در الکل غلیظتر قرار گیرد چروکیده می شود زیرا آب درون بافت خیلی سریع کشیده می شود. سپس غلظتها بتدریج زیاد می شود تا نهایتاً "نسج در الکل 100° قرار بگیرد.

غلظت الکل	70°	80°	85°	90°	96°	100°
تعداد پاساژ در این الکل	۳	۱	۱	۱	۱	۱
مدت زمان هر پاساژ	۲-۳ روز	۱ ساعت	۳۰ دقیقه	۳۰ دقیقه	۲۰ دقیقه	۲۰ دقیقه

نکات مهم :

۱- روش تهیه الکها با درجات مختلف:

الکل 96° بنام الکل طبی در بازار موجود است. به کمک الکل سنج و ریختن حجم متناسبی از آب مقطر الکل 96° را به الکهای رقیقتر با غلظتهای دلخواه تبدیل می کنیم. لازم به ذکر است الکل اتیلیک 100% را باید جداگانه خریداری نمود.

۲- در بیرون ^{آب} بافتها از یک ظرف به ظرف دیگر باید دقت شود تا تقریباً تمام محلول قبلی از زنبیل حاوی اسلایدها (لامها) یا کاغذ آب خشک زیر آن خارج شود. این عمل از مخلوط شدن الکل قبلی در داخل الکل غلیظتر جلوگیری می کند.

۳- چون الکل مطلق بسیار گران است برای صرفه جویی از سولفات مس II استفاده میشد $(Cu\ So_4)$. این ماده شیمیایی در مجاورت با الکل بی آنکه تاثیری بر آن داشته باشد آب آن را می گیرد. این ماده به دو صورت وجود دارد:

الف- نوع خالص و بدون آب که سفید رنگ است و خاصیت جذب آب داشته و از آن نیز در این تحقیق استفاده شد. (anhydrous copper sulphate)

ب - سولفات مس بلوری که دارای ۷ مولکول آب است. هرگاه سولفات مس بدون آب در مکان مرطوبی قرار بگیرد تبدیل به مس بلوری می شود. (crystal copper sulphate)

روش استفاده از این ماده :

مقدار کمی از سولفات مس بدون آب در کف ظرف الکل مطلق ریخته می شد و چند ورقه کاغذ صافی بر روی آن قرار می گرفت تا در تماس با بافت مورد نظر نباشد. سولفات مس بدون آب با جذب آب از الکل بر طول عمر الکل مطلق می افزاید. سولفات مس سفید رنگ با جذب آب رفته رفته آبی رنگ می شود و این تغییر رنگ نشان می دهد که باید سولفات مس را عوض کرد. لذا الکل را به آرامی برداشته و در ظرف دیگر که واحد سولفات مس بی آب است وارد می نمایند. البته بعد از ۳-۴ بار تعویض، کلاً الکل جدید جانشین الکل قبلی میگردد.

۴- می توان بعد از چند عبور صعودی الکلهای را تغییر مکان داد و الکلی مطلق را به الکلی ۹۶° و الکلی ۹۶° را به جای الکلهای پایینتر آورد و به این طریق صرفه جویی بیشتری در مصرف الکلی نمود و فقط الکلی اول را کنار گذاشت.

۵- برای سرعت در عمل آب گیری می توان ظرف را با دست تکان داد. حرارت نیز عمل آب گیری را تسریع می کند البته به طور معمول این کار انجام نمی شود.

ج - الکلی گیری و شفاف کردن (Clearing)

نمی توان در بافتی که دارای الکلی است پارافین را نفوذ داد. برای این منظور شفاف کردن انجام می گیرد. بهترین مواد برای این کار عبارتند از:

- | | | |
|------------|-------------|------------------|
| ۱- کلروفرم | ۲- بنزن | ۳- گزیل |
| ۴- تولوئن | ۵- روغن سدر | ۶- تتراکلور کربن |

در این تحقیق از گزیل (xylol) استفاده شد.

روش کار:

در ابتدا (برای جلوگیری از چروک خوردن و صدمه دیدن) بافت به مدت نیم ساعت در ظرفی محتوی الکلی مطلق - گزیل به نسبت حجمی ۵۰٪ - ۵۰٪ گذارده می شد. سپس بافت به گزیل خالص وارد می گردید (نیم ساعت).

محلول	الکل مطلق - گزلیل %۵۰ - %۵۰	گزلیل
تعداد پاساژها در این محلول	۱	۱
مدت زمان	نیم ساعت	نیم ساعت

د- آغشتگی با پارافین (Wax impregnation)

برای برش دادن بافت نیاز به وارد نمودن یک ماده مکمل و حفاظت کننده در لابلای بافت است که این ماده می تواند ماده ای مانند اپکسی (epoxy) که رزینی اختصاصی برای این منظور است باشد که معمولاً برای مطالعات با میکروسکوپ الکترونی استفاده می شود و پارافین جامد که اغلب در مطالعه یا بررسی های لازمه با میکروسکوپ نوری مورد استفاده قرار میگیرد.

پارافین:

پارافین جامد باید خالص، فاقد گرد و خاک، اجسام خارجی و بدون آب باشد. درجه ذوب پارافینها مختلف است اما جهت جلوگیری از تخریب بافتها باید نوعی از آن را مورد استفاده قرار داد که در حدود درجه حرارت ۵۸-۵۶ ذوب گردد.

روش کار:

جهت خارج نمودن حلال گزلیل از بافت و جایگزینی آن توسط پارافین، ۳ ظرف محتوی مقداری پارافین ذوب شده تهیه کرده و درانکوباتور با درجه ۵۸-۵۶ درجه سانتیگراد قرار داده می-.

شدند. ظروف محتوی پارافین ظروف شیشه ای سرباز و دارای برجستگی به شماره های I ، II ، III بودند.

قبل از وارد کردن بافت به اولین ظرف پارافین، آن را به جهت جلوگیری از بوجود آمدن تغییرات مورفولوژیک در ظرفی محتوی گزیل - پارافین با نسبت حجمی ۵۰-۵۰ وارد کرده و بافت به مدت نیم ساعت درون آن باقی می ماند. برای تهیه این مخلوط ابتدا مقداری پارافین ۵۸-۵۶ را ذوب نموده و سپس حجم مساوی گزیل به آن اضافه گردید سپس ادامه پاساژها در داخل ظروف پارافین انجام شد. لازم به ذکر است که برای جلوگیری از جامد شدن پارافین هر جابجایی باید درون انکوباتور با درجه حرارت 58°C انجام گیرد.

پارافین III	پارافین II	پارافین I	گزیل - پارافین	محلول
۱	۱	۱	۱	تعداد پاساژها
۲۰ دقیقه	۲۰ دقیقه	۲۰ دقیقه	۳۰ دقیقه	مدت زمان

پس از سه بار استفاده از پارافینها، ظروف حاوی پارافین یک درجه تنزل داده میشد بدین معنی که ظرف حاوی پارافین III به ظرف II و ظرف II به I مبدل می گردید. بهتر است همیشه پارافین III و پارافینی که برای قالب گیری استفاده می شود از نوع خالص باشد.

خلاصه مراحل آماده سازی بافت.

محلون	بوئن	الکل ۷۰°	الکل ۸۰°	الکل ۸۵°	الکل ۹۰°	الکل ۹۶°	الکل ۱۰۰°	الکل- گزریل	گزریل	گزریل- پارافین	پارافین I	پارافین II	پارافین III
تعداد پاساژ	۱	۳	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
مدت زمان	۶-۲۴ ساعت	۲-۳ روز	۱ ساعت	۳۰ دقیقه	۳۰ دقیقه	۲۰ دقیقه	۲۰ دقیقه	۳۰ دقیقه	۳۰ دقیقه	۳۰ دقیقه	۲۰ دقیقه	۲۰ دقیقه	۲۰ دقیقه

ر- قالب گیری با پارافین (Wax embedding)

برای قالب گیری بافت ابتدا باید قالب (mould) تهیه کرد. برای تهیه قالب روشهای متفاوتی

وجود دارد:

۱- قطعات L لوکهارت (Leukhardt) که از ۲ قطعه فلز برنجی مجزا که هر یک بشکل L

بوده و با قرار دادن در کنار یکدیگر می توان مکعبهای مختلف الحجم بوجود آورد.

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

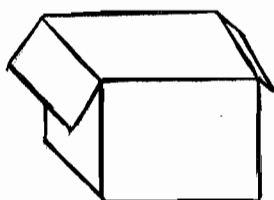
۳- ظروف فلزی پتری که از آلومینیم ساخته شده اند.

۴- قایقهای کاغذی (paper boats) که دستی و به کمک کاغذ ساخته می شوند لکن در

ساخت آن باید دقت نمود و درمقایسه ارزانتر می باشند.

روش کار:

کاغذ شطرنجی در قطع مناسبی بریده می شود و سپس با تا زدن کاغذ در مسیرهای مشخص جعبه کوچک مکعبی شکل به صورت شکل زیر حاصل می شود.



۵- قالبهای پلاستیکی :

الف - قالبهای پلاستیکی با پارافین

ب - قالبهای پلاستیکی با رزینهای پلاستیکی

بعد از آنکه قالب کاملاً آماده شد، ادامه کار بدین ترتیب است:

۱- پارافین ذوب شده خالص و جدید در قالب ریخته می شود (از پارافین III نیز می توان استفاده کرد.) بطوریکه یک ورقه نازک در کف ظروف درست کند و متعاقباً به حالت نیمه جامد در آید.

۲- به وسیله پنس گرم بافت را به آهستگی در آن قرار داده ، سعی می شود که حبابی در آن ایجاد نگردد. معمولاً بافت را در جهتی که از آن برش گرفته میشود می کارند.

۳- اگر مقطع گیری از نوک بافت مورد لزوم است آن قسمت را ابتدا داخل پارافین وارد می کنند و طوری بافت را می کارند که قسمت مورد نظر در کف قالب قرار گیرد. بنابراین

سطح برش در کف قالب است. کلیه این اقدامات باید با سرعت انجام گیرد در غیر این صورت پارافین بحالت جامد در می آید.

۴-بقیه پارافین مذاب روی بافت کاشته شده اضافه می شود تا کاملاً "روی بافت را بپوشاند. لازم به تذکر است که نوشتن مشخصات بافت روی قالب فراموش نمی شود. این قالبها را برای مدت زمان قابل ملاحظه ای می توان در ظرفهای در بسته نگهداری کرد.

خطاهای مهم تکنیکی در آماده سازی بافت جهت مقطع گیری:

۱-ثبوت ناکامل (incomplete fixation)

هر گاه ثابت کردن بافت کامل و خوب انجام نگیرد وسط قالب خراب می شود و بافت در داخل آن خشک و چروکیده می شود.

۲- آغشتگی ناکامل (incomplete impregnation)

وسط قالب نرم و بوی ماده شفاف کننده می دهد.

۳- آب گیری ناکامل (Incomplete dehydration)

هر گاه گزلیل یا بنزن برای شفاف کردن مصرف شده باشد این حالت بهتر دیده می شود زیرا بر اثر آب گیری ناکامل وسط قالب نمی تواند شفاف شود و لذا وسط برش نرم و آغشته به پارافین نمی گردد.

۴- متبلور شدن قالب (crystalization of the wax)

قالبهای پارافینی باید یکنواخت و شفاف باشند. اگر چین دار باشند پارافین یا موم متبلور شده است و این به علت آن است که ماده مصرفی برای قالب گیری ناخالص بوده و یا آنکه خیلی آهسته آنرا سرد کرده اند.

۵- سختی بی جهت قالب (unduly hard block)

ممکن است قالب آنقدر سخت باشد که نتوان آن را برید. نسوجی که معمولاً چنین میشوند عبارتند از نسج کلاژن ضخیم، استخوان، عدسی چشم. شایعترین علت آن عبارت است از: دکلسیفیکاسیون (خارج نمودن مواد معدنی از بافت) ناکامل، بدی ثبوت، عبور سریع بافت از آب به داخل الکل با درجه بالا، زیاد ماندن در گزلیل، بنزن، زیاد ماندن در پارافین و دراتوو و بالاخره بالابودن درجه اتوو (بالا تر از ۶۰-۵۸ درجه)

و- برش قالبهای پارافینی (Setion cutting)

۱- مرتب کردن قالب

قبل از شروع به بریدن، باید قالب را مرتب و تنظیم کرد (trimming) و پارافینهای زیادی اطراف بافت را با اسکالپل برید و خارج نمود به طوریکه پارافین فقط به ضخامت ۳ میلیمتر دور بافت را احاطه کند. باید دقت کرد به هیچ وجه نباید قسمتی از بافت از قالب بیرون بماند و سطوح قالب باید کاملاً موازی هم باشند. تا برشها بصورت نوار مستقیم و بدنبال یکدیگر در آیند. آن

قسمت که مقابل تیغه میکروتوم قرار می گیرد باید با چند حرکت بجلوی میکروتوم بریده شود تا سطح کامل بافت ظاهر شود.

توجه: باید در قالب گیری دقت نمود تا بافت بطور عمود قرار گیرد. مضافاً در بریدن پارافینهای زیادی اطراف بافت باید دقت بسیار نمود تا پارافین با قطعات کوچک از بافت جدا نشود و استفاده از اسکالپل کاملاً تمیز موجب می گردد تا از ترک خوردن یا شکسته شدن قالب جلوگیری شود. قالبهای ترک برداشته شده یا شکسته را باید دوباره ذوب و سپس قالب گیری نمود.

۲- ثابت کردن قالب روی پایه و سپس میکروتوم

برای ثابت کردن قالب روشهای مختلفی وجود دارد که برحسب میزان ورزیدگی افراد و میکروتوم بکار رفته فرق می کند:

الف- میکروتوم طوری است که قالب باید بر روی پایه های فلزی یا چوبی (holder) ثابت شود و سپس این پایه روی میکروتوم سوار گردد. با یک قطره چکان یک قطره پارافین 58° - 56° مذاب را روی سطح پایه چکانده و مدت کوتاهی تأمل نموده تا کمی سرد شود. سپس قالب را درون آن فرو برده تا سرد شود سپس با استفاده از اسکالپل و پارافین اطراف قالب را شکل داد تا قالب کاملاً در پارافین محاط گردد. سپس به جهت اتصال برشهای برداشته شده به یکدیگر در هنگام تهیه سری هایی از برشها (Serial sectioning) مقدار بسیار کمی پارافین 45° را با نوک

اسکالپل برداشته ذوب کرده و به دو سطح بالا و پایین بافت اضافه می شود. این نوع پارافین به جهت نرمی در هوای آزاد باعث چسباندن برشهای بافتی به یکدیگر می گردد.

ب - قالبگیر بعضی از میکروتومها به نحوی است که قالب به آسانی در شکاف تعبیه شده در میکروتوم قرار گرفته و بوسیله پیچی محکم میشود.

۳- دستگاه برش برداری ، میکروتوم ، (Microtome)

بریدن خوب بافت بستگی به نکات زیر دارد:

۱- اطلاع کامل از دستگاهی که بکار برده می شود.

۲- تجربه فراوان و ورزیدگی دست، که این عمل فقط بر اثر تمرین و مداومت زیاد بدست می آید.

۳- شناسایی نوع بافتی که بریده می شود.

۴- و بالاخره بافت باید قبل از برش برداری مراحل قبلی آماده سازی را بدرستی طی کرده باشد.

برای بریدن بافت از میکروتوم استفاده می شود.

میکروتوم (Microtome)

میکروتوم دستگاهی مکانیکی است که برای بریدن یکنواخت بافت و تهیه برش (section)

بکار می رود. اولین میکروتوم "cutting engine" نام گرفت که بوسیله Cumming در سال ۱۷۷۰

م. ساخته شد. سالهای بعد بتدریج انواع پیشرفته تر آن به بازار آمد و بعدها میکروتوم خوانده شد.

میکروتومها در انواع مختلفی هستند که بسته به شرایط بافت و نوع تحقیق از آنها استفاده می-شود. در اینجا به اختصار اسامی آنها ذکر می شود.

1-Standard rotatory microtome for paraffin sectioning.

2-Rustproof rotatory microtome.

3-Clinical freezing microtome.

4- Sliding microtome.

5-Ultrathin sectioning microtome.

6-The new JB-4 porter- Blum microtome.

در انجام این تحقیق از نوع اول یعنی Rotatory microtome استفاده شد.

حرکت دوار دسته ای که برای چرخاندن میکروتوم وجود دارد (مثل دسته دوار چرخ خیاطی)

این نام را به Rotatory microtome داده است. این میکروتوم ها بسیار سنگین بوده و باید در

جایجا کردن آن دقت کافی بکار برد. به دلیل ظرافت کار حتماً میز زیر این دستگاه باید سنگی

باشد تا از تکان خوردن دستگاه حین انجام کار جلوگیری شود.

میکروتومی که در انجام این تحقیق از آن استفاده شد دارای تیغه ثابت بود و با گرداندن

چرخ آن هر بار به میزانی معین بافت به جلو رانده می شد (برحسب میلیونوم متر یا میکرون) که

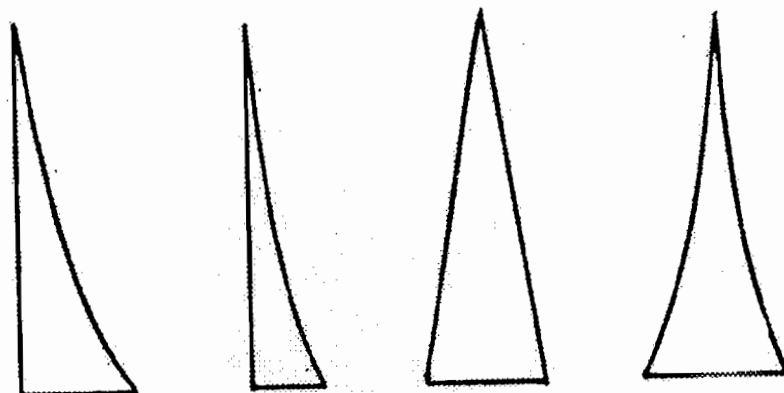
طبعاً توسط تیغه قطع می گردید.

تیغه میکروتوم

تیغه مهمترین عامل بعد از ورزیدگی دست در برش بافت است و خوبی و بدی برش

بستگی تام به تیغه میکروتوم دارد معمولاً تیغه ها را برحسب وضع قرارگیری آنها طبقه بندی

میکنند. شکل (۳-۲)



شکل (۲-۳): مقطع عرضی تیغه های میکروتوم

۱- مسطح - مقعر (plano - concave)

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

۳- مسطح - گوه ای (plano- wedy)

۴- مقعر الطرفین (biconcave)

استفاده از هر کدام از انواع این تیغه ها سلیقه ای است ولی برای کارهای معمولی مثل برش-گیری از قالبهای پارافینی بهتر است از تیغه های مسطح-گوه ای استفاده کرد، همان تیغه ای که از آن در برش گیری بافتها در این تحقیق استفاده شد.

میکروتوم در عین مکانیکی بودن وسیله ای ظریف است ولی با استفاده صحیح و مواظبتهای بموقع می توان به عمر مفید این دستگاه افزود:

۱- تیغ میکروتوم باید بعد از استفاده روزانه با گزلیل تمیز شده و با یک لایه از روغن پوشانده

شود تا از تماس آن با اکسیژن هوا و اکسید شدن جلوگیری به عمل آید.

۲- وقتی از دستگاه استفاده نمی شود باید با روکش مناسب روی آن پوشانده شود.

۳- روغن کاری دستگاه هر ۳ ماه یکبار.

۴- طرز برش گیری از قالبها

الف- قالب روی پایه ثابت قرار داده می شود.

ب- نگاهدارنده تیغه میکروتوم (بر حسب نوع میکروتوم) تا حداکثر ممکن به عقب برده میشود.

ج- تیغه مورد احتیاج در محل قرار داده می شود و درجه انحراف آن بدقت تعیین میگردد، مخصوصاً در مواردی که تیغه متحرک است باید آن را با دقت و محکم در جای خود قرار داد.

خ- با گرداندن چرخ دوار میکروتوم، قالب را به بالا و پایین حرکت می دهیم و بدین ترتیب تیغه بطرف بافت نزدیک شده تا سرانجام به مجاورت یکدیگر برسند. برای تسریع در کار می توان تیغه را با دست به نزدیک سطح برش رساند. سپس آن را ثابت کرد و بقیه فاصله را با دستگاه تنظیم کرد.

ر- تمام پیچ و مهره های مربوط به تیغه و قالب را باید محکم کرد.

د- برای مرتب کردن قالب باید آنقدر از سطح آن بریده شود تا تمام سطح بافت در برش ظاهر شده و قابل مقطع گیری باشد.

س- دستگاه تنظیم ضخامت برش را برحسب ضخامت دلخواه تنظیم کرد که معمولاً ۶-۴ میکرون برای بافتهای معمولی کافی است ولی برحسب نوع بافت ممکن است برشهای ضخیم تر و یا نازک تر نیز تهیه گردد.

و- معمولاً" با دست چپ برشها نگاه داشته می شود ولی ممکن است از پنس و یا سوزن هم استفاده شود. چون قبلاً از پارافین ۴۵ استفاده شده است برشها به صورت نوار و بدنبال یکدیگر (Serial sectioning) گرفته می شود.

ه- قبلاً ظرف مسطح تمیز و درداری را آماده کرده سپس با یک تکه مقوای مشکی مفروش می شود و با علامتی در گوشه ها آن شروع برش برداری مشخص می گردد سپس نوارها با ترتیب زیر یکدیگر قرار داده می شوند.

برش گیری معمولاً آنقدر ادامه می یابد تا به حد کافی بافت بریده شده باشد. برشهای گرفته شده ممکن است حدود ۳۰ سانتیمتر طول داشته باشد. پس از اتمام برش برداری در ظرف گذاشته می شود تا از نشستن گرد و خاک، بر روی برشها جلوگیری شود.

ه- چسباندن برشها بر روی لام (Sections mounting)

در حین برش گیری ، قطعات بریده شده پارافینی چپن خوردگی پیدا کرده روی هم جمع می شوند. این چپنها باید صاف شوند تا بافت قابل مطالعه باشد. برای این منظور:

۱- لامهای (Slides) شماره زده شده داخل ظرف اسید - الکل قرار داده می شوند تا چنانچه چربی بر روی آن باشد زدوده گردد. سپس لامها را خشک نموده، روی یک مقوای سیاه رنگ

به ترتیب شماره قرار داده می شوند. (معمولاً هر بار ۵ لام اینگونه زیر هم قرار داده میشوند.)
مشخصات بافت و شماره لام مربوط به آن و حیوان را در دفتر خود یادداشت نموده تا بعداً
بتوان آنها را مطابقت داد.

۲- روی هر لام یک قطره کوچک از چسب آلبومین بکمک یک میله شیشه ای گذاشته
می شود. این چسب به منظور چسبانیدن بافتها بر روی اسلاید بکار می رود. طرز تهیه چسب
آلبومین در بقرار ذیل است:

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

۳- با انگشت کوچک چسب را روی لام پخش کرده ، لذا لایه ای نازک از چسب بر روی
لام بوجود می آید.

۴- با قرار دادن یک قطره آب مقطر بر روی لام و با خم کردن اسلاید به اطراف آب را به
همه جای لام می رسانیم. نوار برشها را در چند قسمت بوسیله اسکالپل برش داده ، به آرامی و
به کمک پنس برشها را روی لام قرار می دهیم. بسته به اندازه برشها می توان ۲ الی ۳ ردیف از
برشها را زیر یکدیگر بر روی یک لام قرار داد. البته تقدّم و تأخر برشها حتماً در نظر گرفته می-
شود. سپس لام بر روی Hot plate با درجه حرارت حدود ۶۰ درجه گذاشته می شود. قطره

آب روی لام بتدریج گرم شده نتیجتاً پارافین نیز ذوب می شود و چین خوردگی هایی که در قبل به آن اشاره شد کاملاً باز شده و برش صاف می گردد. با استفاده از کاغذ آب خشک کن، آب اضافی روی لام برداشته شده بدین ترتیب بافتها به لام می چسبند. باید مواظب بود که بافت حباب نگیرد یا بیش از حد حرارت نبیند. لامها تا هنگام رنگ آمیزی در درون ظرف دردار مخصوص نگهداری می شوند.

ی- رنگ آمیزی (Staining)

مقصود از رنگ آمیزی متمایز نمودن اجزا و قسمتهای مختلف سلول یا بافت از یکدیگر است.

رنگ آمیزی به انواع زیر قابل تقسیم است.

۱- رنگ آمیزی حیاتی (vital staining): رنگ کردن با استفاده از رنگهایی که (dyes) موجب مرگ سلول نشود و بافت زنده بماند.

۲- رنگ آمیزی حیاتی با عمل بیگانه خواری (vital staining by phagocytosis): ذرات مواد رنگی را سلولهای بیگانه خوار برداشت می کنند در نتیجه این ذرات در داخل سیتوپلاسم سلولی دیده می شوند.

۳- واکنشهای هیستوشیمی (histochemical reaction): مثل واکنش فولگن برای اسید

نوکلئیک

۴- رنگ آمیزیهای غیر حیاتی (non vital staining): شامل رنگ کردن نسوج غیر زنده به وسیله مواد رنگی که در نتیجهٔ میل ترکیبی بخشهایی از بافت با رنگی خاص روی می دهد. اکثر روشهای رنگ آمیزی جزو این دسته محسوب می شوند.

رنگهای طبیعی: این نوع رنگها از طبیعت بدست می آیند. اهم این رنگها عبارتند از:

۱- ایندیگو (Indigo) ۲- کارمین (Carmin)

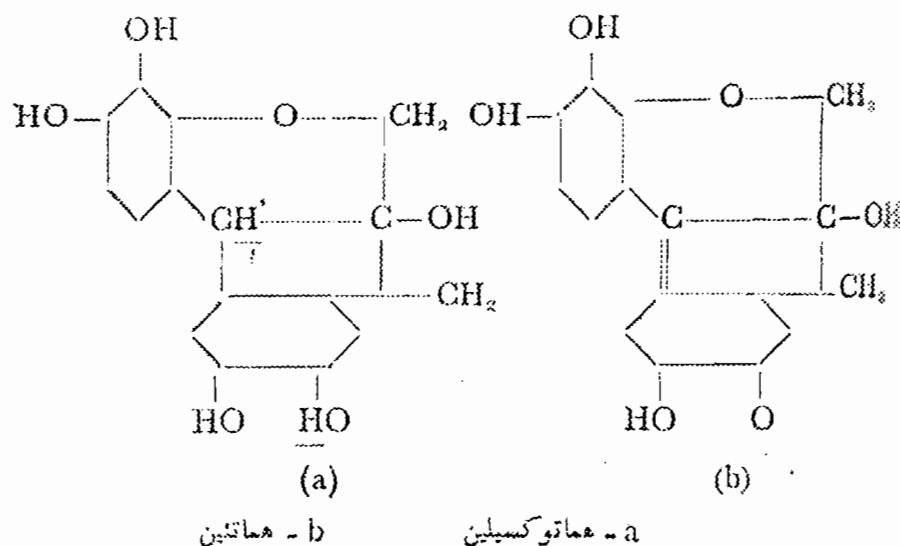
۳- اورسئین و لیتموس (Orcein & Litmus) ۴- هماتوکسیلین (Hematoxylin)

از این گروه هماتوکسیلین بیشترین کاربرد را دارد.

هماتوکسیلین (Hematoxylin)

مهمترین رنگ مورد استعمال در آزمایشگاههای 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 Campche مکزیکو می روید، بدست می آید. هماتوکسیلین 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 دوسدیم، پرمنگنات دوپتاس و اکسید مرکوریک به مدت ۶ تا ۸ هفته انجام می دهند. در این عمل هماتوکسیلین که فرمول آن $C_{16}H_{14}O_6$ است دو اتم هیدروژن خود را از دست داده تبدیل به هماتئین $C_{16}H_{12}O_6$ میشود

که دارای ترکیب کلینوئید در یکی از حلقه ها می باشد و اگر اکسیداسیون ادامه یابد هماتین تبدیل به یک ماده بی رنگ می شود. شکل (۴-۲)



شکل (۴-۲): فرمول ساختاری هماتوکسیلین و هماتین

حتی هماتوکسیلین 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 که قبل از استعمال رنگ یا به همراه رنگ آن را مصرف می کنند مثل آلومینیم ، املاح آهن ۳ ظرفیتی و زاج.

هماتوکسیلین یک رنگ بازیک بوده و از رنگ کننده های هسته و کروماتین است.

رنگهای هماتوکسیلین معروف عبارتند از:

- | | |
|---------------------------|----------------------------|
| ۱- هماتوکسیلین ارلیش | Ehrlich's Alum Hematoxylin |
| ۲- هماتوکسیلین الوم هاریس | Harris 's Alum Hematoxylin |
| ۳- همالوم می یر | Mayer's Hemalum |

۴- هماتو کسیلین الوم دلا فیلد Delafield 's Alum Hematoxylin

۵- هماتو کسیلین آهن وایگرت Weigert 's Iron Hematoxylin

۶- هماتو کسیلین الوم بوهمر Bohmer 's Alum Hematoxylin

۷- فسفو تنگستیک اسید هماتین مالوری

۸- هماتو کسیلین بولارد Bullard 's Hematoxylin

در انجام این تحقیق از هماتو کسیلین ارلیش استفاده شد.

طرز تهیه رنگ هماتو کسیلین ارلیش:

۶ (گرم)	gr	هماتو کسیلین کریستال
۳۰۰ (سانتیمتر مکعب)	Cm ³	الکل مطلق
۳۰۰ (سانتیمتر مکعب)	Cm ³	آب مقطر
۳۰۰ (سانتیمتر مکعب)	Cm ³	گلیسرین
۳۰ (سانتیمتر مکعب)	Cm ³	اسید استیک گلاسیال
۶ (گرم)	gr	زاج آلومینیم یا پتاس

هماتو کسیلین را در الکل مطلق حل کرده و بقیه مواد را بر حسب ترتیبی که ذکر شده اضافه میکنند. 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 (over oxidation) شود و رنگ تخمیر نمی گردد. عمل اکسیداسیون با قرار دادن رنگ در مقابل نور و هوا در ظرف ۲ هفته یا بیشتر انجام می-

گیرد ولی اگر ۰/۶ گرم یدور پتاسیم اضافه شود عمل اکسیداسیون سریعتر انجام می گیرد. همتوکسیلین ارلیش برای سالها رنگ خود را حفظ می کند.

از مواد متفاوتی برای افتراق رنگ در رنگ آمیزیهای همتوکسیلین استفاده می شود. مناسبترین این رنگها، رنگ اسیدی ائوزین (Eosin) نام دارد که از محلول آبی و یا محلول الکلی آن در رنگ آمیزی سیتوپلاسم استفاده می شود. ائوزین باید بصورت محلول تازه تهیه شود.

محلول یک درصد الکلی ائوزین ذخیره (استوک) (Stock 's 1% alcoholic eosin)

۱	gr	ائوزین ۱ محلول در آب
۲۰	Cm ³	آب مقطر

روش کار:

ائوزین را در آب مقطر حل کرده ، سپس:

الکل ۹۵ درجه به میزان ۸۰ Cm³ به آن اضافه می شود.

این رنگ بدین صورت قابل استفاده نیست و باید به محلول قابل استفاده

(working eosin solution) تبدیل شود.

روش کار:

۱ حجم	محلول استوک ائوزین
۳ حجم	الکل ۸۰ درجه

لذا محلول استوک ائوزین به نسبت $\frac{1}{4}$ بوسیله الکل ۸۰ درجه رقیق می شود و سپس آماده استفاده می گردد. با استفاده از این روش رنگ آمیزی افتراقی که به روش "هماتوکسیلین- ائوزین" معروف است بین اجزای مختلف سلول افتراق رنگ حاصل می شود، بدین معنی که هسته به رنگ بنفش و سیتوپلاسم صورتی رنگ می شود.

وسایل لازم جهت انجام رنگ آمیزی لامها:

- ۱- زنبیلهایی (holders) جهت حمل اسلایدها از ظرفی به ظرف دیگر. (اغلب استنلس)
- ۲- قطره چکان
- ۳- لام و لامل
- ۴- محلول تمیز کننده لام و لامل: این محلول محلولی از اسید و الکل است. ۱۰۰ CC الکل ۷۰ درجه را در ظرف شیشه ای ریخته و ۵-۴ قطره اسید کلرید کلریک (HCl) غلیظ به آن افزوده می شود.
- ۵- پارچه هایی با قطع مناسب برای تمیز کردن لام و لاملهایی که در داخل محلول اسید-الکل قرار داده شده اند. بهتر است جنس پارچه به گونه ای باشد که پرز ندهد.
- ۶- پنس، اسکالپل، سوزن ته گرد، سوزن تشریح و چراغ الکلی که در مراحل مختلف کار بکار می آیند.

روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین (Routine H. & E. Staining)

نکات اصلی در رنگ آمیزی و چسباندن اسلایدهای پارافینی به شرح زیر است :

الف- پاک کردن پارافین به وسیله گزلیل (Removal of wax)

ب- آب دهی با کمک درجات نزولی الکل (hydration)

ج- رنگ آمیزی (Staining)

د- دهیدراسیون از طریق استفاده از درجات صعودی الکل (Dehydration)

هـ- شفاف کردن در گزلیل (Clearing)

و- چسباندن لامل (Mounting)

الف - پاک کردن پارافین (Removal of wax)

در این عمل اسلایدها را به ترتیب از دو پاساژ گزلیل، هر کدام به مدت ۵ دقیقه عبور میدهند. بدین ترتیب پارافین موجود در لابلائی بافت حل شده و برش شفاف می گردد.

ب - آبدهی با کمک درجات نزولی الکل (Hydration)

اسلایدها را از گزلیل خارج کرده و برای اینکه بافت ها به یکباره تغییر محیط نیابند و تغییرات فیزیکی در آنها روی ندهد ابتدا آنها را وارد محلول ۵۰٪-۵۰٪ گزلیل-الکل مطلق، به مدت ۳-۵ نموده و سپس عبور نزولی الکل جهت آب دهی کامل برشها انجام می شود. مدت زمان لازم جهت هر پاساژ الکل ۳-۵ دقیقه است. بنابراین:

۱-الکل- گزلیل

۲-الکل مطلق

۳- الکل ۹۶ درجه

۴- الکل ۹۰ درجه

۵- الکل ۸۵ درجه

۶- الکل ۸۰ درجه

۷- الکل ۷۰ درجه

ج- رنگ آمیزی

سپس اسلایدها به مدت ۱ دقیقه در آب مقطر قرار داده می شوند و متعاقباً وارد هماتوکسیلین می گردند. مدت زمان لازم جهت رنگ آمیزی با هماتوکسیلین ۴۰-۳۰ دقیقه است. سپس اسلایدها به مدت ۱۰ دقیقه در آب جاری قرار می گیرند تا ضمن شستشو تمایز رنگ (differentiation) در بخشهای مختلف سلول رخ دهد. آنگاه آنها را به مدت ۷-۵ دقیقه وارد ظرف اسید-الکل کرده تا رنگ اضافی برشها گرفته شود. مزیت این روش آن است که رنگ آمیزی بخوبی و بطور انتخابی انجام می گیرد. سپس دوباره اسلایدها به مدت ۱۰ دقیقه در آب جاری قرار داده شده، بدین ترتیب بخشهای مناسب آبی رنگ می شوند. باید دقت کرد که پس از طی این مراحل خصوصاً وارد کردن برشها در ظرف اسید-الکل دیفرانسیه شدن رنگ بخوبی انجام شده باشد. بعد از این مرحله اسلایدها داخل محلول یک درصد الکی ائوزین به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه برده می شوند تا بخشهای اختصاصی برای این رنگ نیز رنگین گردند (سیتوپلاسم

سلولها). بعد از رنگ آمیزی با اتوزین اسلایدها را به مدت ۴-۳ دقیقه در آب روان شستشو میشوند.

د- دهیدراسیون (dehydration)

چون برشها مجدداً حاوی آب شده اند باید آب گیری شوند. لذا می بایست اسلایدها از الکلهای مختلف الدرجه صعودی عبور داده شوند. مدت زمان لازم جهت هر پاساژ الکل ۲ دقیقه است و معمولاً 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)

بافتهای را از الکل مطلق وارد محلول ۵۰٪-۵۰٪ الکل- گزلیل نموده و سپس وارد مرحله

عبور از گزلیل ها می شوند. مدت زمان لازم برای هر پاساژ ۲ دقیقه است.

و- چسباندن لامل (Mounting)

اسلاید های حاصل برشها را با کمک پنس یکی پس از دیگری از آخرین پاساژ گزینیل خارج کرده، با رعایت آنکه گزینیل اضافی اسلایدها گرفته شود و در عین حال برشها خشک نگردند، یک قطره چسب کانادا بالزام (Candana balsam) را توسط میله شیشه ای کنار آن گذارده می شود و بسرعت لامل (coverslip) روی لام طوری قرار داده می شود تا حباب هوایی باقی نماند، بعد اطراف لامل را تمیز نموده جهت خشک شدن، اسلایدها دور از گرد و غبار در جای مطمئنی قرار داده می شوند.

چسباندن لامل روی برشها به منظور نگهداری از بافت برای مدت طولانی است. ماده ای که برای چسباندن لامل روی لام بکار می رود بستگی به عوامل چندی دارد ولی بطور کلی به دو گروه طبقه بندی می شوند:

۱- مواد آبی (Aqueous Media)

۲- مواد صمغی (Resinous Media)

در اینجا به طور مختصر اسامی برخی از این مواد ذکر می گردد:

۱- دی . پی . اکس (D.P.X)

۲- کانادا بالزام (Canada balsam)

۳- ژله گلیسرین (Glycerin Jelly)

۴- ژله گلیسرین کروم دار (Chorome Glycerin Jelly)

۵- محیط صمغ (Farrant 's media)

۶- محیط دانه کارو (Corm syrup)

در تحقیق جاری از کانادا بالزام استفاده شد که از ترکیبات صمغی است.

روش تهیه:

کانادا بالزام ۵ gr

گزیل ۱۰ cc

پس از اضافه نمودن کانادا بالزام به گزیل ظرف حاوی آن آنقدر تکان داده می شود تا کانادا بالزام که حالت پودر دارد بخوبی در گزیل حل گردد. در این ظرف شیشه ای باید همواره بسته باشد تا از نفوذ گرد و غبار به داخل چسب و ایجاد مشکلات بعدی (Artifacts) در هنگام مطالعه اسلایدها جلوگیری گردد.

بطور خلاصه رنگ آمیزی معمولی هماتوئوکسیلین - ائوزین شامل مراحل زیر است:

- | | | |
|----|------------------|-----------|
| ۱- | محلول گزیل | ۳-۵ دقیقه |
| ۲- | محلول گزیل | ۳-۵ دقیقه |
| ۳- | الکل مطلق - گزیل | ۳-۵ دقیقه |
| ۴- | الکل مطلق | ۳-۵ دقیقه |
| ۵- | الکل ۹۶ درجه | ۳-۵ دقیقه |
| ۶- | الکل ۹۰ درجه | ۳-۵ دقیقه |
| ۷- | الکل ۸۵ درجه | ۳-۵ دقیقه |

۸-	الکل ۸۰ درجه	۳-۵ دقیقه
۹-	الکل ۷۰ درجه	۳-۵ دقیقه
۱۰-	آب مقطر	۳-۵ دقیقه
۱۱-	هماتو کسپیلین	۳۰-۴۰ دقیقه
۱۲-	شستشو در آب جاری	۱۰ دقیقه
۱۳-	اسید-الکل	۷-۱۰ دقیقه
۱۴-	شستشو در آب جاری	۱۰ دقیقه
۱۵-	اثوزین	۱۰-۱۵ دقیقه
۱۶-	الکل ۸۰ درجه	۲ دقیقه
۱۷-	الکل ۸۵ درجه	۲ دقیقه
۱۸-	الکل ۹۰ درجه	۲ دقیقه
۱۹-	الکل ۹۶ درجه	۲ دقیقه
۲۰-	الکل مطلق	۲ دقیقه
۲۱-	الکل مطلق- گزیل	۲ دقیقه
۲۲-	گزیل	۲ دقیقه
۲۳-	گزیل	۲ دقیقه
۲۴-	چسباندن با کانادا بالزام	

در مرحله آخر از میکروسکوپ دو چشمی (Binocular) از نوع Ziess برای مطالعه و عکس
برداری از اسلایدهای آماده شده استفاده شد.

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

- ۱- آب مقطر (تهیه شده در آزمایشگاه) Distilled water
- ۲- اتانول مطلق Ethanol, absolute and extra pure, C_2H_6OH , $M=46.07$ gr/mol, Merck
- ۳- اسید استیک گلاسیال Acetic acid glacial 100%, CH_3COOH , $M=60.5$ gr/mol, Merck
- ۴- الکل اتیلیک شرکت ایران-آرارات و شرکت سهامی خاص اصطکک C_2H_5OH 96%
- طبی
- ۵- ائوزین Y محلول در آب مقطر Eosin Y, $C_{20}H_6Br_4N_2O_5$, $M=691.86$ gr/mol, Merck
- ۶- پارافین Paraffin pastilles, Solidification point about 56° - 58° & 45° , Merck
- ۷- اسید پیکریک Picric acid, extra pure, $C_6H_3N_3O_7$, $M=229.11$ gr/mol, Merck
- ۸- تخم مرغ Egg
- ۹- تیمول Thymol Cryst, extra pure, $M=150.22$ gr/mol, Merck
- ۱۰- دی اتیل اتر Diethyl ether (Ethyl ether), $(C_2H_5)_2O$, $M=74.12$, Pars chemie
- ۱۱- زاج آلومینیم یا پتاسیم Aluminium potassium sulfate, $Alk(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$, Merck
- ۱۲- سولفات مس II Copper (II) sulfate, $M=159.60$ gr/mol, Merck

Formaldehyde Solution min. 37%, Merck

۱۳- فرمالدئید

Phenol, C_6H_5OH , $M=94.11$ gr/mol, Merck

۱۴- فنل

Canada balsam, Merck

۱۵- کانادا بالزام

Xylene, extra pure, C_8H_{10} , $M=106.17$ gr/mol,
Merck

۱۶- گزیل

Glycerin (Glycerol), $C_3H_8O_3$, Merck

۱۷- گلیسرین

Hematoxylin (monohydrate), $C_{16}H_{14}O_{60}H_2O$,
 $M=320.29$ gr/mol. Merck

۱۸- هماتوکسیلین کریستال

HCl, Hydrochloric acid fuming 37%, extra
pure. $M=36.46$ gr/mol, Merck

۱۹- هیدروکلریک اسید

بخش سوم
مشاهدات
Observations

۱- زمان ثبت تاریخ باز شدن دهانه واژن و اولین زایمان در حیوانات شاهد:

از اولین نشانه های بلوغ در حیوان ماده باز شدن منفذ واژن (Vaginal orifice) است. منفذ واژن که در خلف کلیتوریس واقع است در تمام مدت شیرخوارگی و چند هفته بعد از آن کاملاً بسته است و متعاقباً این منفذ باز می شود و حیوان ماده تدریجاً آماده برای پذیرش حیوان نر می گردد. برای ثبت زمان باز شدن دهانه واژن زاده های ماده هر دو گروه تحت تجربه و شاهد از حدود چهار هفتگی عمر به بعد روزانه مورد معاینه قرار گرفته و چنانچه نشانه ای از باز شدن واژن ملاحظه می گردید و یا واژن کاملاً باز شده بود موارد ثبت می گردید.

متذکر می گردد برای مشخص نمودن سن زاده ها اولین روز بعد از تولد روز یکم در نظر گرفته شد و همیشه سعی گردید تا در مواردیکه ثبت تاریخ دقیق تولد میسر نبوده است از حدس و گمان پرهیز شود و این قبیل زاده ها به کنار گذاشته شوند.

در ذیل سعی شده است با ثبت تاریخ تولد مادران، تاریخ باز شدن دهانه واژن و زمان اولین زایمان آنها به محاسبه سن مادر در زمانهای گفته شده پرداخته شود تا بطور غیر مستقیم بتوان به زمان اولین چرخه استروس آنها که زمان احتمالی بلوغ جنسی حیوانات ماده است دست یافت. مضافاً برای تسهیل محاسبه ضمن آنکه زمان دقیق به روز آورده شده است بر حسب هفته نیز ذکر می گردد:

سن حیوان در زمان باز شدن دهانه واژن به هفته	سن حیوان در زمان اولین زایمان به روز	سن حیوان در زمان باز شدن دهانه واژن به روز	تاریخ اولین زایمان	تاریخ باز شدن دهانه واژن	تاریخ تولد
۱۴	۷	۹۷	۸۲/۱/۲۱	۸۱/۱۱/۲۶	۸۱/۱۰/۱۳
۱۳	۷	۹۰	۸۲/۱/۱۴	۸۱/۱۱/۲۸	۸۱/۱۰/۱۳
۱۰	۷	۶۹	۸۲/۱/۷	۸۱/۱۲/۱۱	۸۱/۱۰/۲۷
۱۵	۶	۱۰۲	۸۲/۳/۱۷	۸۲/۱/۱۷	۸۱/۱۲/۶
۱۲	۶	۸۴	۸۲/۲/۳۰	۸۲/۱/۱۴	۸۱/۱۲/۶
۲۴	۶	۱۶۵	۸۲/۵/۲۳	۸۲/۱/۲۲	۸۱/۱۲/۱۱
۱۲	۶	۸۳	۸۲/۳/۳	۸۲/۱/۲۴	۸۱/۱۲/۱۱
۱۶	۶	۱۰۶	۸۲/۳/۲۶	۸۲/۱/۲۳	۸۱/۱۲/۱۱
۱۴	۶	۹۲	۸۲/۳/۳۰	۸۲/۲/۹	۸۱/۱۲/۲۹
۱۲	۶	۸۳	۸۲/۳/۲۱	۸۲/۲/۱۱	۸۱/۱۲/۲۹
۱۲	۶	۷۸	۸۲/۳/۱۶	۸۲/۲/۱۰	۸۱/۱۲/۲۹
۱۲	۶	۷۰	۸۲/۳/۸	۸۲/۲/۸	۸۱/۱۲/۲۹
۱۱	۶	۷۴	۸۲/۳/۱۸	۸۲/۲/۱۶	۸۲/۱/۶
۱۲	۶	۸۰	۸۲/۳/۳۱	۸۲/۲/۲۱	۸۲/۱/۱۳
۱۲	۶	۸۴	۸۲/۴/۱۵	۸۲/۳/۱	۸۲/۱/۲۴
۱۴	۵	۹۳	۸۲/۵/۱۷	۸۲/۳/۲۶	۸۲/۲/۱۷
۱۴	۶	۹۶	۸۲/۵/۲۰	۸۲/۳/۲۴	۸۲/۲/۱۷
۱۳	۶	۸۸	۸۲/۵/۱۲	۸۲/۳/۲۵	۸۲/۲/۱۷
۱۲	۶	۸۱	۸۲/۵/۱۷	۸۲/۴/۷	۸۲/۲/۲۹

۱۴	۶	۹۸	۳۹	۸۲/۶/۳	۸۲/۴/۶	۸۲/۲/۲۹
۱۱	۶	۷۱	۳۸	۸۲/۵/۲۳	۸۲/۴/۱۸	۸۲/۳/۱۱
۱۱	۶	۷۴	۴۲	۸۲/۵/۲۹	۸۲/۴/۲۷	۸۲/۳/۱۶
۱۲	۶	۸۳	۴۲	۸۲/۶/۶	۸۲/۴/۲۷	۸۲/۳/۱۶
۱۲	۶	۷۸	۴۱	۸۲/۶/۱	۸۲/۴/۲۶	۸۲/۳/۱۶
۱۳	۶	۸۶	۳۷	۸۲/۶/۱۴	۸۲/۴/۲۷	۸۲/۳/۲۱
۱۴	۶	۹۲	۳۸	۸۲/۶/۲۰	۸۲/۴/۲۸	۸۲/۳/۲۱
۱۶	۶	۱۱۲	۴۲	۸۲/۷/۱۶	۸۲/۵/۸	۸۲/۳/۲۸

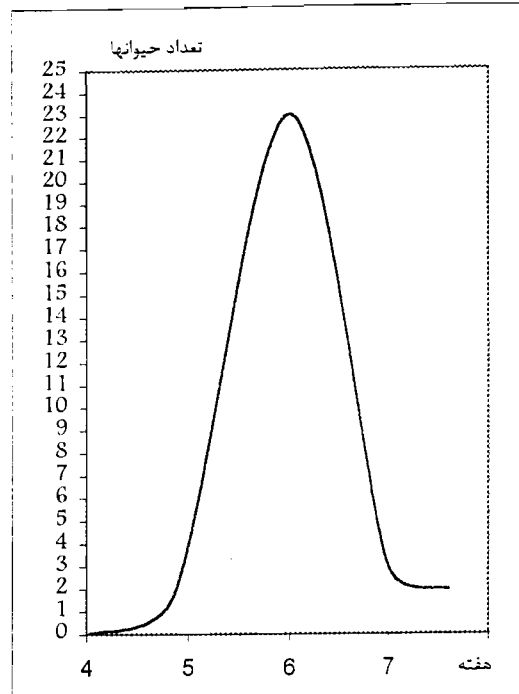
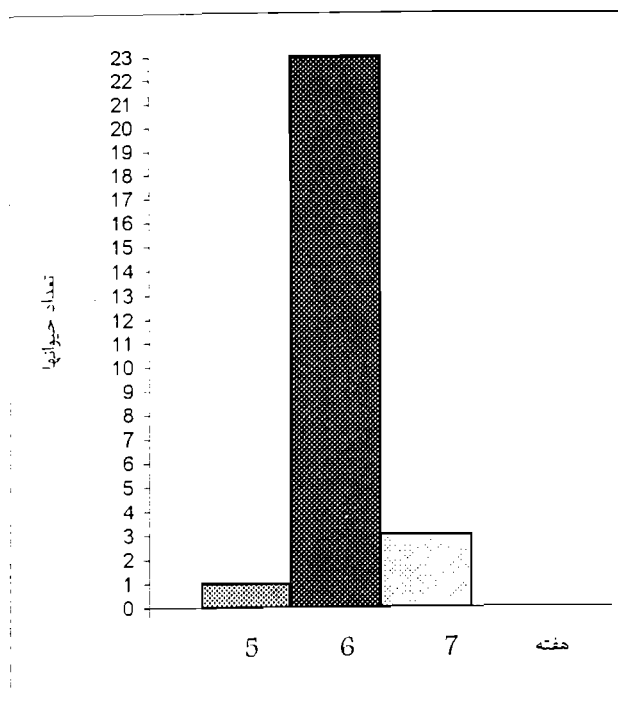
همانگونه که مشاهده می شود پایین ترین سن در باز شدن واژن حیوان شاهد ۵ هفتگی و بالاترین سن ۱۶ هفتگی است. در یک مورد باز شدن واژن ۲۴ هفتگی است که بنظر می رسد در این مورد با حیوانی خاص همراه با احتمالاً اختلالات تولید مثلی سروکار بوده است. نظر به آنکه اعداد حاصله از این حیوان مغایرت زیادی با آنچه که در دیگر حیوانات ملاحظه شد دارد، اطلاعات حاصله از این حیوان حذف گردید.

میانگین سن حیوان در زمان باز شدن دهانه واژن به روز: $40/34 \approx 40$

میانگین سن حیوان در زمان باز شدن دهانه واژن به هفته: $6/07 \approx 6$

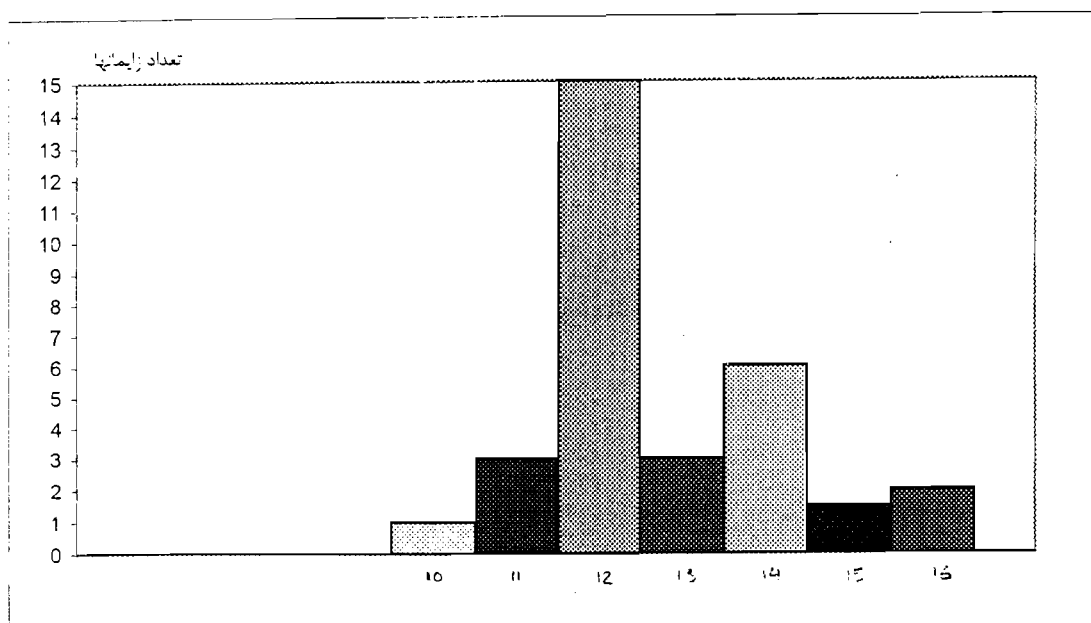
میانگین سن حیوان در زمان اولین زایمان به روز: $86/30 \approx 86$

میانگین سن حیوان در زمان اولین زایمان به هفته: $12/80 \approx 13$

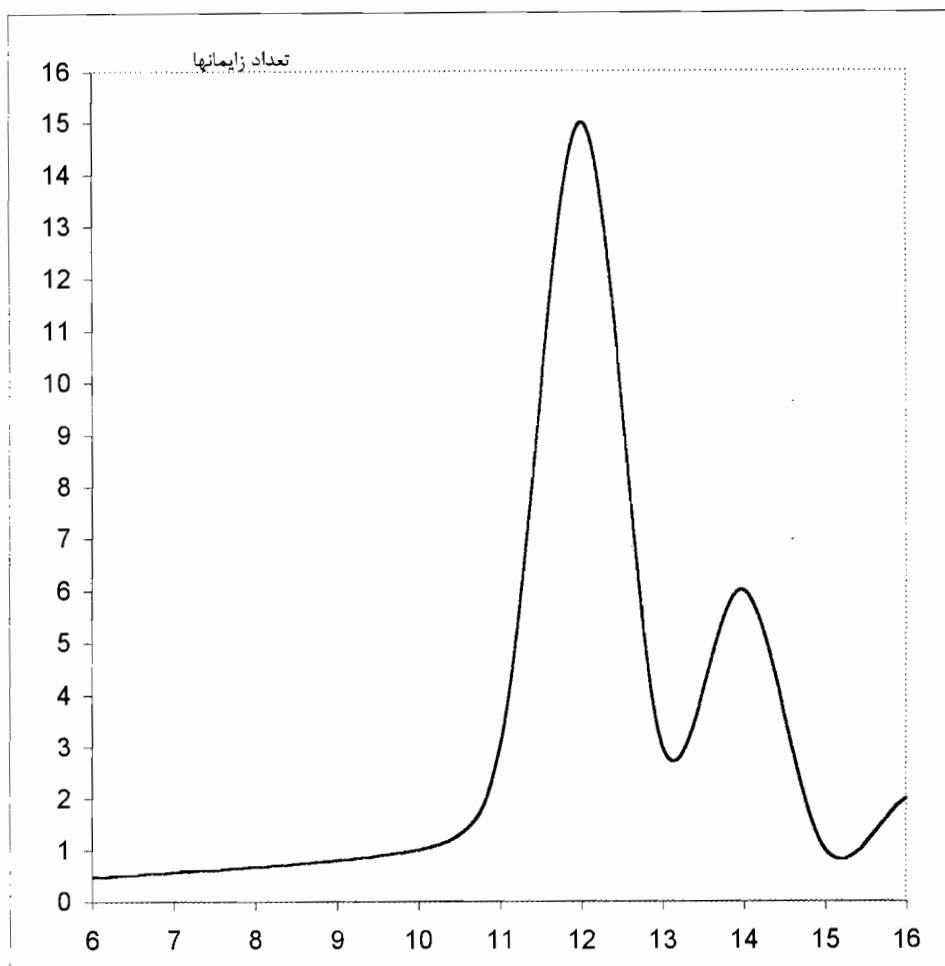


منحنی ۱-۱: منحنی رنگی سن حیوان شاهد در زمان باز شدن دهانه واژن به هفته

نمودار ۱-۱: نمودار ستونی سن حیوان شاهد در زمان باز شدن دهانه واژن به هفته



نمودار ۱-۲: نمودار ستونی سن حیوان شاهد در اولین زایمان به هفته



منحنی ۱-۲: منحنی زنگی سن حیوان شاهد در اولین زایمان به هفته

۲- زمان ثبت تاریخ باز شدن واژن و اولین زایمان در حیوانات تجربی:

سن حیوان در اولین زایمان به هفته	سن حیوان در زمان باز شدن دهانه واژن به هفته	سن حیوان در اولین زایمان به روز	سن حیوان در زمان باز شدن دهانه واژن به روز	تاریخ اولین زایمان	تاریخ باز شدن دهانه واژن	تاریخ تولد
۱۳	۶	۸۷	۳۹	۸۲/۶/۲۲	۸۲/۵/۵	۸۲/۳/۲۸
۱۱	۶	۷۴	۳۸	۸۲/۶/۹	۸۲/۵/۴	۸۲/۳/۲۸
۱۰	۶	۷۰	۳۶	۸۲/۶/۱۳	۸۲/۵/۱۰	۸۲/۴/۵
۱۱	۶	۷۴	۳۶	۸۲/۷/۱۴	۸۲/۶/۷	۸۲/۵/۲
۱۳	۶	۸۵	۳۶	۸۲/۷/۲۷	۸۲/۶/۹	۸۲/۵/۴
۱۱	۵	۷۵	۳۵	۸۲/۷/۱۷	۸۲/۶/۸	۸۲/۵/۴
۱۲	۶	۷۸	۳۶	۸۲/۸/۶	۸۲/۶/۱۵	۸۲/۵/۲۰
۱۲	۶	۷۹	۳۷	۸۲/۷/۳۷	۸۲/۶/۲۶	۸۲/۵/۲۰
۱۰	۵	۶۸	۳۵	۸۲/۷/۲۴	۸۲/۶/۲۲	۸۲/۵/۱۸
۱۰	۵	۷۰	۳۴	۸۲/۷/۲۶	۸۲/۶/۲۱	۸۲/۵/۱۸
۱۱	۶	۷۷	۴۰	۸۲/۸/۱۴	۸۲/۷/۷	۸۲/۵/۲۹
۱۲	۶	۷۸	۳۷	۸۲/۸/۹	۸۲/۶/۲۹	۸۲/۵/۲۳
۱۲	۶	۸۳	۳۶	۸۲/۹/۲۰	۸۲/۷/۳	۸۲/۵/۲۹

13	7	90	39	82/1/10	82/7/20	82/0/17
11	0	70	30	82/1/12	82/7/2	82/0/29
12	7	78	38	82/1/9	82/7/30	82/0/23
13	7	88	39	82/9/2	82/7/13	82/7/0
11	7	77	38	82/1/21	82/7/12	82/7/0
12	7	78	37	82/9/0	82/7/24	82/7/18
13	7	80	37	82/9/12	82/7/23	82/7/18
11	7	77	40	82/9/10	82/1/18	82/7/30
12	7	79	37	82/9/14	82/1/2	82/7/27
12	7	79	39	82/1/23	82/7/13	82/7/0
9	0	73	30	82/1/20	82/7/22	82/7/18
14	7	92	38	82/1/28	82/7/12	82/7/0
12	7	81	37	82/10/18	82/9/4	82/7/27
10	7	70	38	82/9/21	82/1/24	82/7/17
12	0	84	30	82/11/2	82/9/13	82/1/18
8	7	00	37	82/10/3	82/9/14	82/1/18

میانگین سن حیوان در زمان باز شدن دهانه واژن به روز: $37 \approx 36/96$

میانگین سن حیوان در زمان باز شدن دهانه واژن به هفته: $6 \approx 5/79$

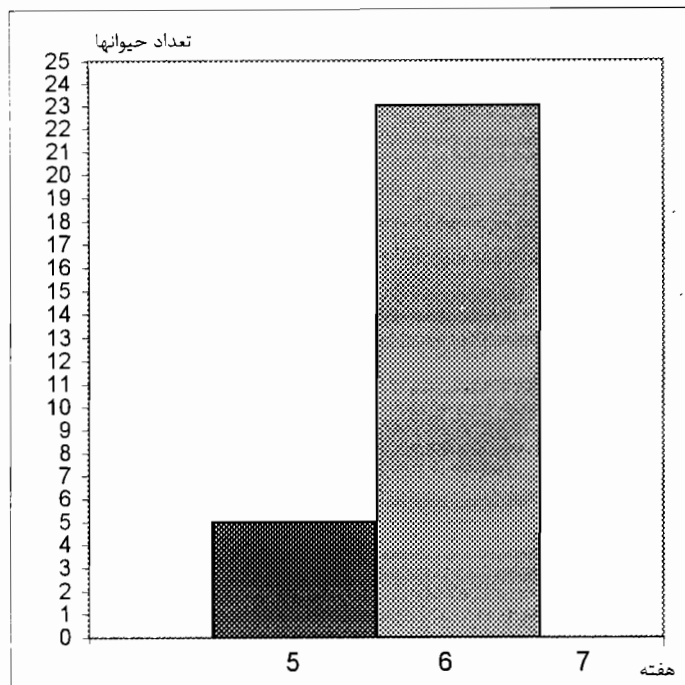
میانگین سن حیوان در زمان اولین زایمان به روز: $77 \approx 77/34$

میانگین سن حیوان در زمان اولین زایمان به هفته: $11 \approx 11/48$

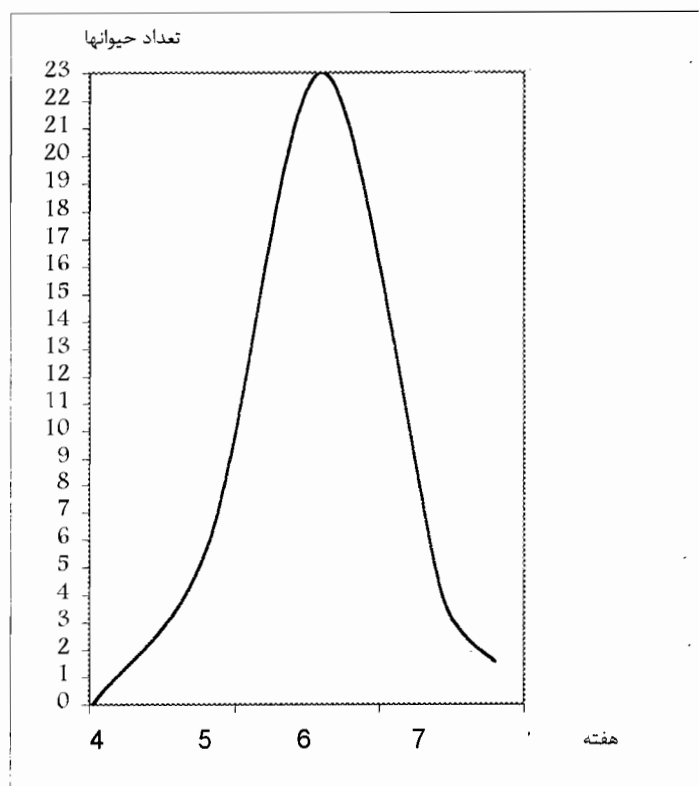
همانگونه که مشاهده می شود میانگین سن حیوان تجربی در زمان باز شدن دهانه واژن به

روز ۳۶-۳۷ و به هفته ۶ بود و میانگین سن حیوان تجربی در زمان اولین زایمان به روز ۷۷-۷۸ و به

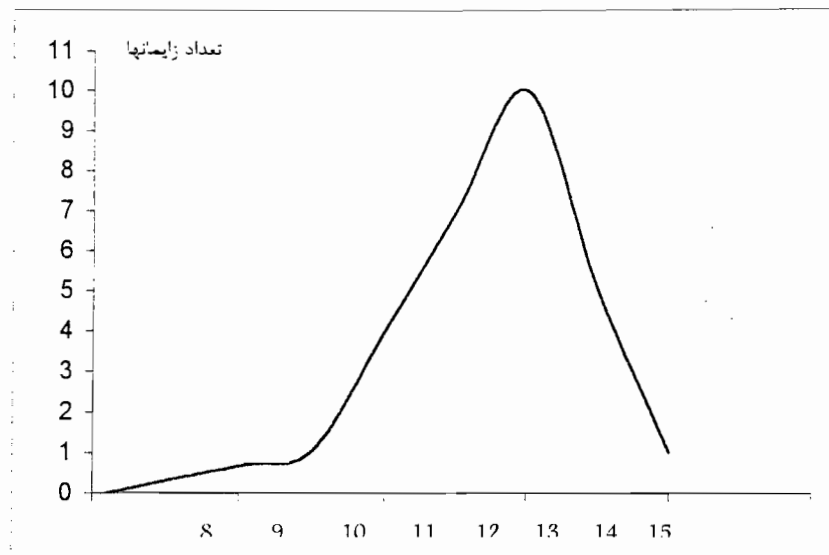
هفته ۱۱-۱۲ بوده است.



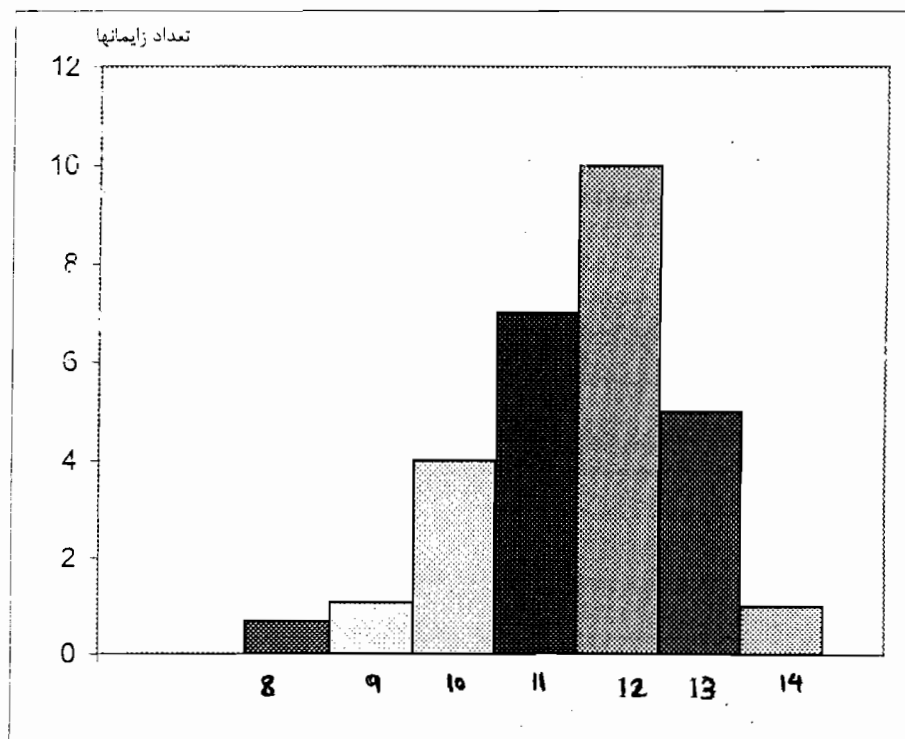
نمودار ۱-۳: نمودار ستونی سن حیوان تجربی در زمان باز شدن دهانه واژن به هفته



منحنی ۱-۳: منحنی زندگی سن حیوان تجربی در زمان باز شدن دهانه واژن به هفته



منحنی ۱-۴: منحنی زندگی سن حیوان تجربی در اولین زایمان به هفته



نمودار ستونی ۱-۴: نمودار سن حیوان تجربی در اولین زایمان به هفته

لازم است این نکته یادآوری شود که نتایج مذکور با نتایج بدست آمده در رساله شهرزاد بازیار تطابق دارد. ایشان در رساله خود اشاره می کنند که زمان اولین زایمان در حیوانات شاهد در فاصله هفته های ۱۴-۱۲ و در حیوانات تجربی در هفته ۱۱ بوده است.

۳- نتایج مطالعات بافت شناسی

شواهدی که در صفحات پیش آورده شد تکرار آزمایشاتی است که بازیار در قبل و ضمن انجام آنها در رساله خود بدان اشاره می نماید.

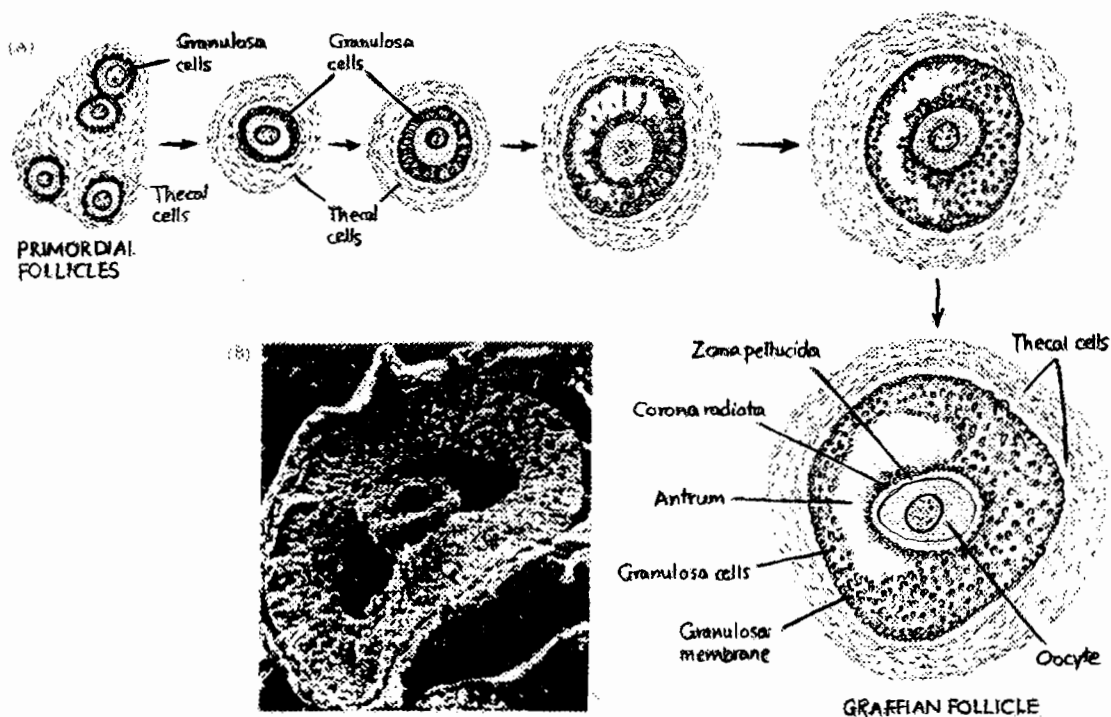
اما همانگونه که او نیز ذکر می نماید شواهد بیشتر در تأیید و یا رد تأثیر استشمام اسانس آویشن شیرازی در پیشرسی بلوغ می بایست با مطالعات بافت شناسی نیز همراه گردد.

برای به دست آوردن گناد حیوان ماده یا تخمدان، حیوانات کنترل و تجربی هر ۳-۴ روز یکبار کشته شدند و بافتهای مورد لزوم آنها طی مراحلی که در فصل روشها ذکر شد جدا، برش برداری، رنگ آمیزی و سرانجام آماده مطالعه گردید. در طی مطالعه سعی شد لامها بصورت مقایسه ای مطالعه گردند. بدین معنی که فی المثل لامهای تخمدان حیوان ۱۸ روزه (هم از گروه شاهد و هم از گروه تجربی) با هم مطالعه می شدند و مشاهدات مورد قیاس قرار می گرفتند.

برای توضیح بهتر مطلب لازم است ابتدا مختصری از آنچه که انتظار می رود در مقطعی از تخمدان یک پستاندار ماده دیده شود ذکر گردد: (۱-۲۱)

تخمدان نابالغ حاوی فولیکولهای پیش اولیه (primordial follicles) است. در طی روند تکامل و بلوغ تخمدان، فولیکولهای نابالغ و پیش اولیه که حاوی اووسیت (oocyte) و

یک لایه سلولهای گرانولوزا (granulosa cells) در اطراف آن هستند بتدریج رشد کرده که این رشد با تکثیر سلولهای گرانولوزا همراه می باشد. در ابتدا ۲-۳ لایه از این لایه سلولها اطراف هر اووسیت را احاطه کرده که فولیکول را به حالت فولیکول اولیه (primary Follicle) در می آورد. بتدریج لایه های بافت همبند تکای داخلی و خارجی (theca interna & theca externa) نیز تشکیل شده ، در اطراف سلولهای گرانولوزا که حال تکثیر بیشتری یافته اند مشخص می شوند. متعاقباً سلولهای گرانولوزا توسط مایع مترشح از خود، حفره آنتروم (antrum) را بوجود آورده که حاوی مایع آنتروم (antrum fluid or follicular fluid-) است. اووسیت به همراه ۲-۳ لایه سلولهای گرانولوزا در اطراف که تاج شعاع (corona radiata) را بوجود می آورند و توسط پایه ای از همان سلولهای گرانولوزا که اینک (comolus oophorus) نامیده می شوند در داخل آنتروم آویزان می گردد. سلولهای گرانولوزا در زیر تکای داخلی دیواره ای با ضخامت ۲-۳ سلول تشکیل می دهند که آنتروم را احاطه می نمایند. به این نوع فولیکول که حال کاملاً رسیده و بالغ تلقی می شود فولیکول دو گراف (graafian follicle) گفته می شود که اغلب در سطح تخمدان قرار گرفته و آماده رها کردن اووسیت به مجرای تخمراهه (oviduct) است. شکل (۱-۳)



شکل (۳-۱): فولیکولهای تخمدان پستانداران

با توجه به توضیحات فوق حال به بررسی نتایج حاصله از مطالعات اسلاید ها پرداخته می شود:

نتایج بررسی هیستولوژیک تخمدانهای حیوانات ماده شاهد:

متذکر می گردد که در هر سن یک حیوان ماده کشته شد و نتایج ذیل، حاصل از بررسیهای

هیستولوژیکی یکی از تخمدانهای حیوان مذکور می باشد.

سن به روز	نتایج بررسی
۸	اندازه تخمدان بسیار کوچک بوده فقط حاوی تعداد زیادی فولیکولهای پیش اولیه و تعدادی فولیکولهای اولیه است.
۱۲	تعداد فولیکولهای اولیه بیشتر شده است.
۱۸	فولیکولهای اولیه در حال رشد هستند. سلولهای گرانولوزا تکثیر یافته اند و مقداری مایع فولیکولی هم ترشح شده است.
۲۲	چندین فولیکول با حجم بزرگتر نسبت به بقیه فولیکولهای در حال رشد ملاحظه میگردند.
۲۵	دو فولیکول بسیار بزرگتر شده اند و بقیه فولیکولها کوچکتر و هر یک در مرحله ای از رشد هستند.
۲۸	دو فولیکول رشد بیشتری یافته اند بقیه نیز در مراحل مختلف رشد و به اندازه های متفاوت می باشند.
۳۰	دو فولیکول کاملاً بالغ هستند و فولیکولهای متعدد دیگر به اندازه های گوناگون نیز دیده می شوند.
۳۵	چندین فولیکول بالغ و فولیکولهای در حال بلوغ دیده میشوند.
۴۰	۳ فولیکول دو گرآف و فولیکولهای در حال بلوغ دیده میشوند.

لازم به ذکر است در روند رشد و تکامل حیوان ماده همواره می توان در تخمدان فولیکولهای

پرایمر دیال، فولیکولهای اولیه و در سنین بالاتر فولیکولهای در حال دشد را ملاحظه نمود؛ به همین

روی در توصیف سنین تحت مطالعه بالا به آنچه که جدیداً ملاحظه می گردید اشاره شده است و از تکرار مطالب خودداری گردیده است.

نتایج بررسی هیستولوژیک تخمدانهای حیوانات ماده تجربی

سن به روز	نتایج بررسی
۸	اندازه تخمدان بسیار کوچک بوده فقط حاوی تعداد زیادی فولیکولهای پیش اولیه و تعدادی فولیکولهای اولیه است. که قابل مقایسه با حیوان شاهد است.
۱۲	تعداد فولیکولهای اولیه بیشتر شده است. اما در مقایسه با نوع شاهد تعداد این فولیکولها زیادتر است. به عبارت دیگر رشد فولیکولهای پرایمر دیال سریعتر از نوع شاهد بوده و تعداد بیشتری از این فولیکولها به نوع اولیه تبدیل شده اند.
۱۸	تعدادی از فولیکولها در حال رشد هستند و یک فولیکول کاملاً در حال بالغ شدن است. که در مقایسه با نوع شاهد این حالت نشان دهنده تسریع روند بلوغ فولیکولها است.
۲۲	چندین فولیکول بزرگتر از بقیه شده اند.
۲۸	دوفولیکول بالغ مشاهده می شود.
۳۰	فولیکولهای بالغ مشاهده می شوند.
۳۵	فولیکولهای بالغ مشاهده می شوند.
۴۰	فولیکولهای دو گرآف مشاهده می شوند.

در حین انجام این تحقیق مشاهدات دیگری نیز ثبت شد که در ذیل خلاصه ای از آنها ذکر

می گردد:

۱- وقتی حیوان ماده یا نر به قفس جدیدی وارد می شد، موشهای بالغ (چه نر و چه ماده) موجود در قفس مرتباً به مدت حدوداً ۵ دقیقه سعی در بو کردن ناحیه جنتیال حیوان جدید داشتند و گاه در ضمن این تلاشها کشمکشهایی هم اتفاق می افتاد.

۲- در کل نرها نسبت به ماده ها تحرک و فعالیت بیشتری نشان می دادند. این وضع در قفسهای تحت تجربه با بالشتک حاوی اسانس گیاه به راحتی مشاهده میگردید. به نظر می رسد بوی تند این اسانس تحرک و فعالیت نرها را زیادتر میکرده لذا تماس پوست حیوان نر با بالشتک حاوی اسانس موجب سوزش و خارج پوست حیوان می گردید که در پی آن ریزش موی حیوان و ایجاد زخم در آن موضع دیده می شد. این وضعیت در تمام نرهای قفسهای تجربی مشاهده می گردید اما ماده های همان قفسها کاملاً سالم بودند.

۳- در تعداد نسبت زاده ها، همچنین وزن آنها در هر دو گروه تفاوتی مشاهده نشد.

۴- همانگونه که در بالا گفته شد. تمامی اسانس این گیاه با پوست بدن حیوانات باعث ریزش موی بدن و ایجاد زخمهای سطحی می گردید.

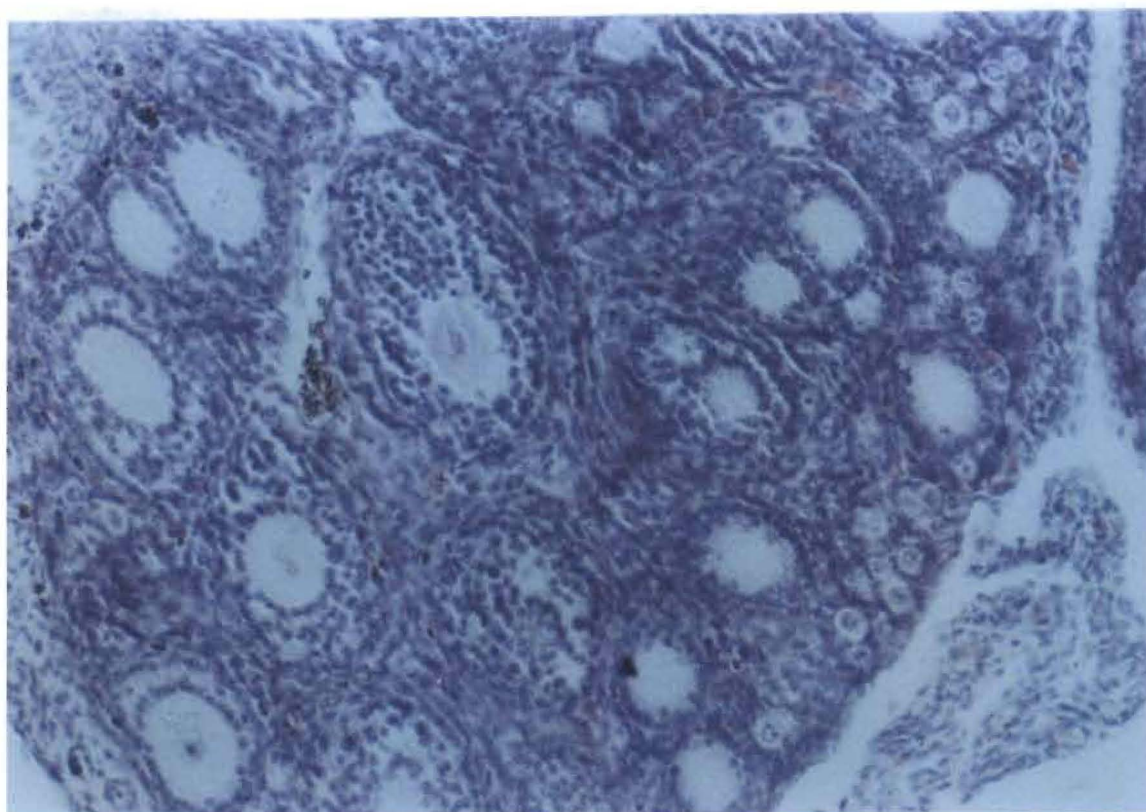
۵- ۳ حیوان ماده از گروه شاهد در هفته های ۲۹ و ۳۰ تولد خود به تومور بدخیم سینه مبتلا شدند و چون تومورها بسیار حجیم شدند حیوانها کشته شدند.

۶- گاه مشاهده می شد یکی از چشم ها در بعضی از زاده ها دیرتر از موعد مقرر (۱۵-۱۴ روزگی) باز می شوند و در ۲ مورد چشمی که بسته ماند تا پایان عمر هرگز باز نشد. بعد از کشتن

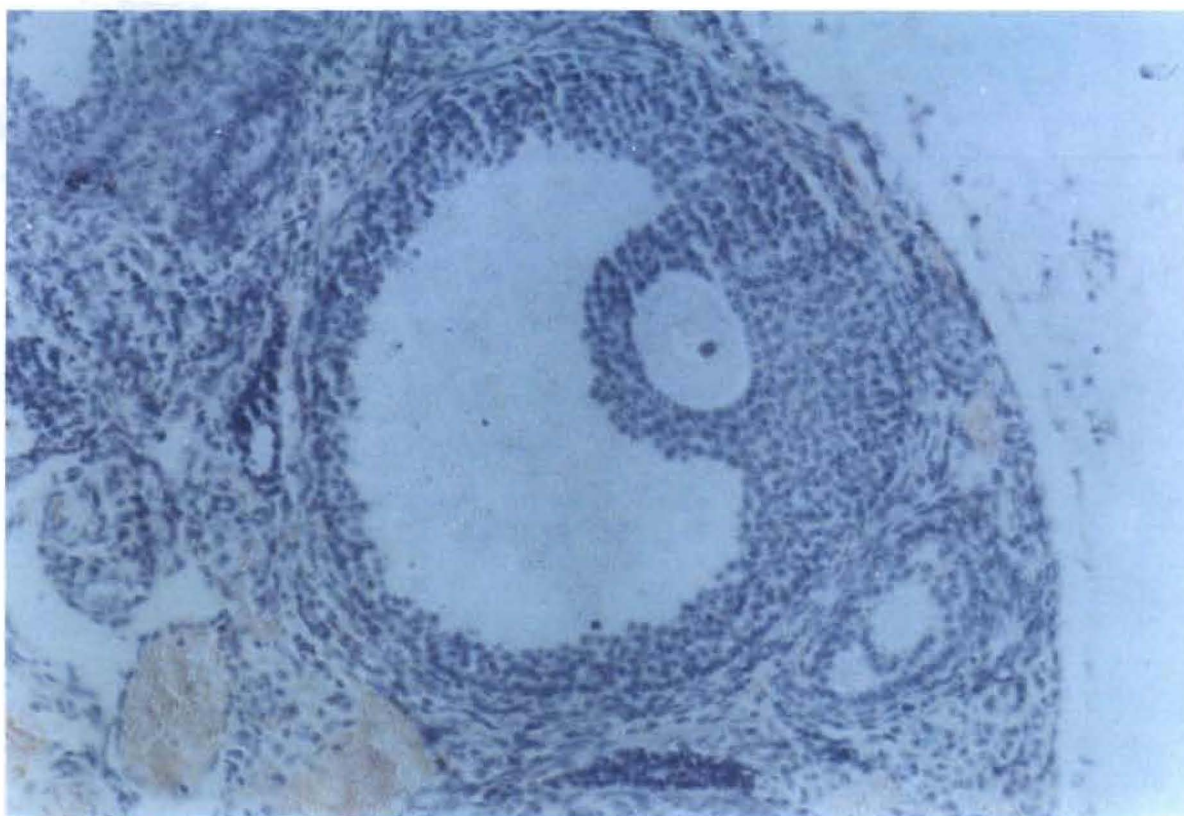
این حیوانات مشاهده گردید که آن چشم دچار آب مروارید (Cataract) بوده است. این روند گاه در چشم راست و گاه در چشم چپ مشاهده شد و در هر دو جنس ملاحظه گردید.

۷- چشم نوزادان گروه شاهد ۱۵-۱۴ روزگی باز می شد بدین صورت که پلکهای بهم چسبیده کم کم از هم جدا شده و بتدریج کره چشم نمایان می گردید. اما گاه در مشاهده نوزادان گروه تجربی چنین بنظر می رسید که پلکها تا ۲۵-۲۰ روزگی بسته باقی می مانند و همچنین زاده ها تحرک کمتری نسبت به هم سالان خود در گروه شاهد داشتند که علت آن مشخص نشد. به عبارت دیگر با وجود رشد خوب، زاده ها گوشه گیری می کردند. اما در زمان جابجایی زاده ها و با دور شدن آنها از جو تند اسانس پلکها باز می شد. لذا می توان نتیجه گرفت که احتمالاً پلکها در موعد مقرر باز شده اند اما به علت وجود جو تند این اسانس که باعث سوزش چشم حیوانات می گردید، آنها همواره سعی در بسته نگاهداشتن چشمان خود داشته اند.

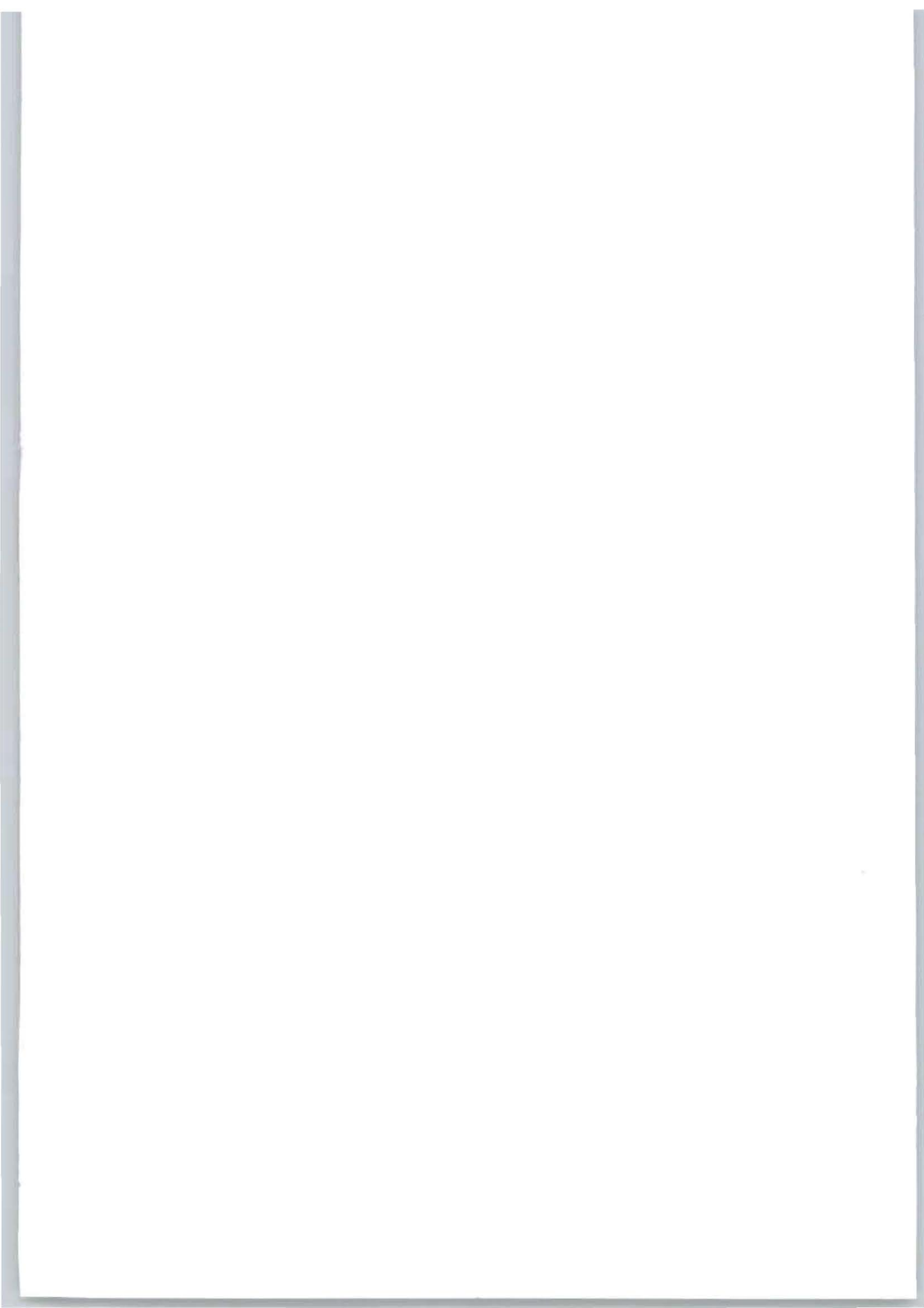
۸ - حیوانات تجربی همواره پوشالهای موجود در قفس را به گوشه ای دور از بالشتک اسانس دار رانده و خود را زیر آنها محفوظ می کردند همچنین مادران بچه دار روی نوزادان خود را توسط پوشال می پوشاندند تا از جو تند حاصل از این اسانس محفوظ بمانند.

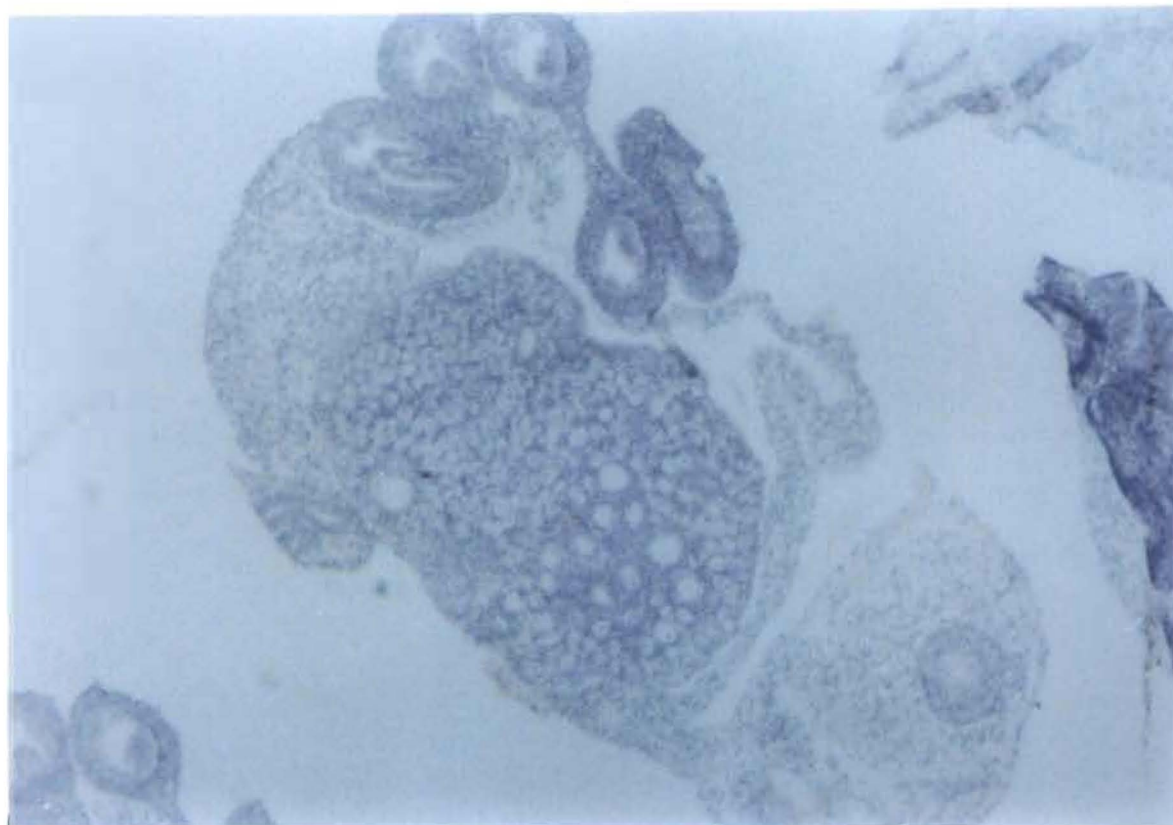


تخمدانی حاوی فولیکولهای پیش اولیه (Primordial f.)، اولیه (Primary f.) و فولیکولهای در حال نمو (growing f.)

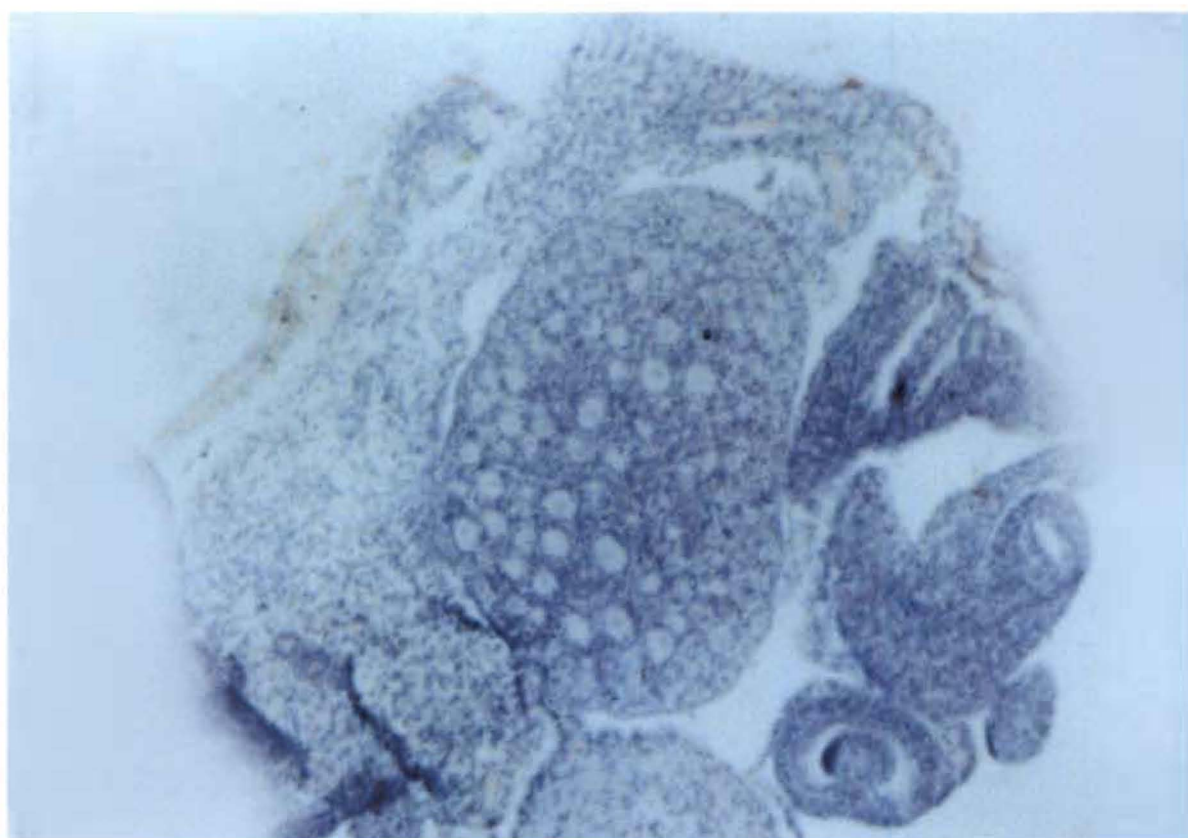


فولیکول دو گرآف (Graafian follicle)

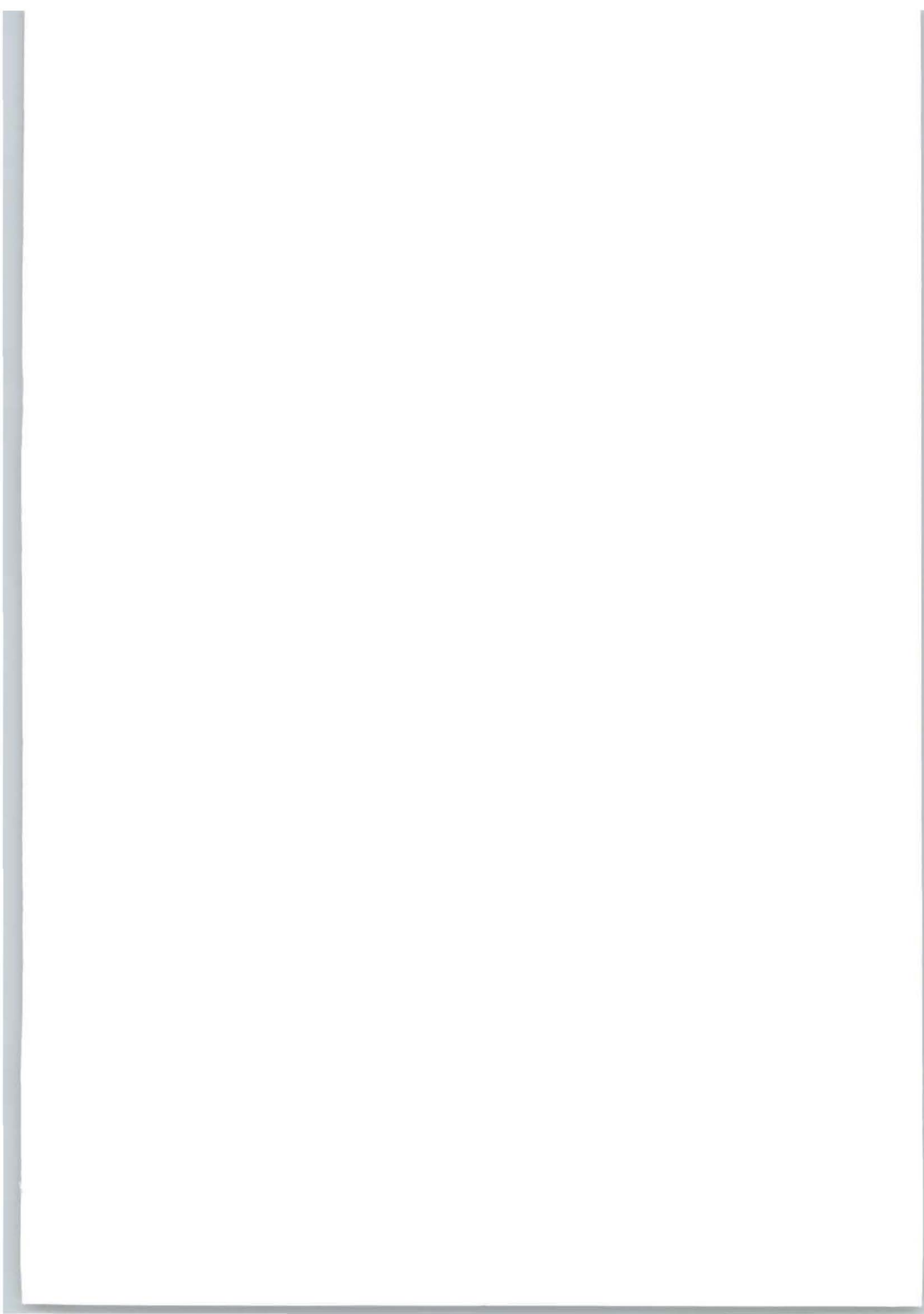


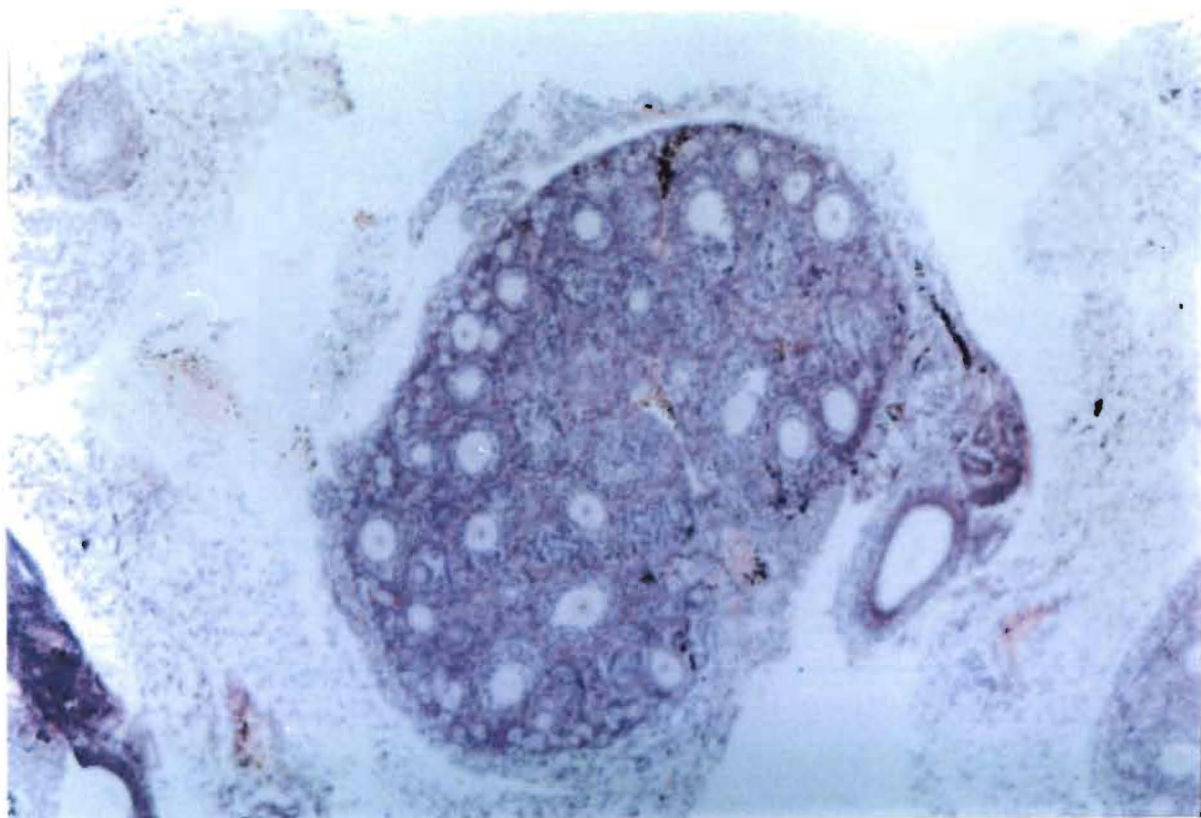


تخمدان حيوان شاهد ۸ روزه

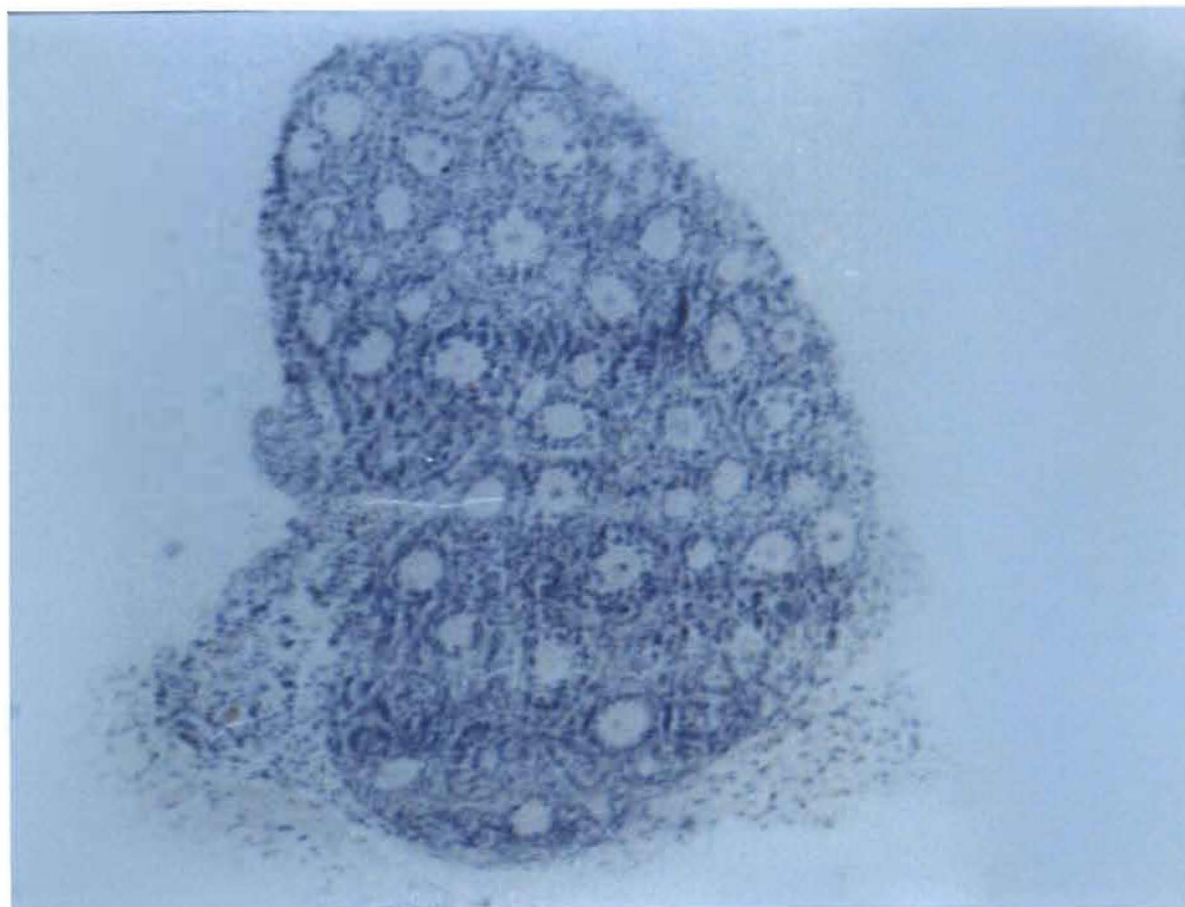


تخمدان حيوان تجربي ۸ روزه



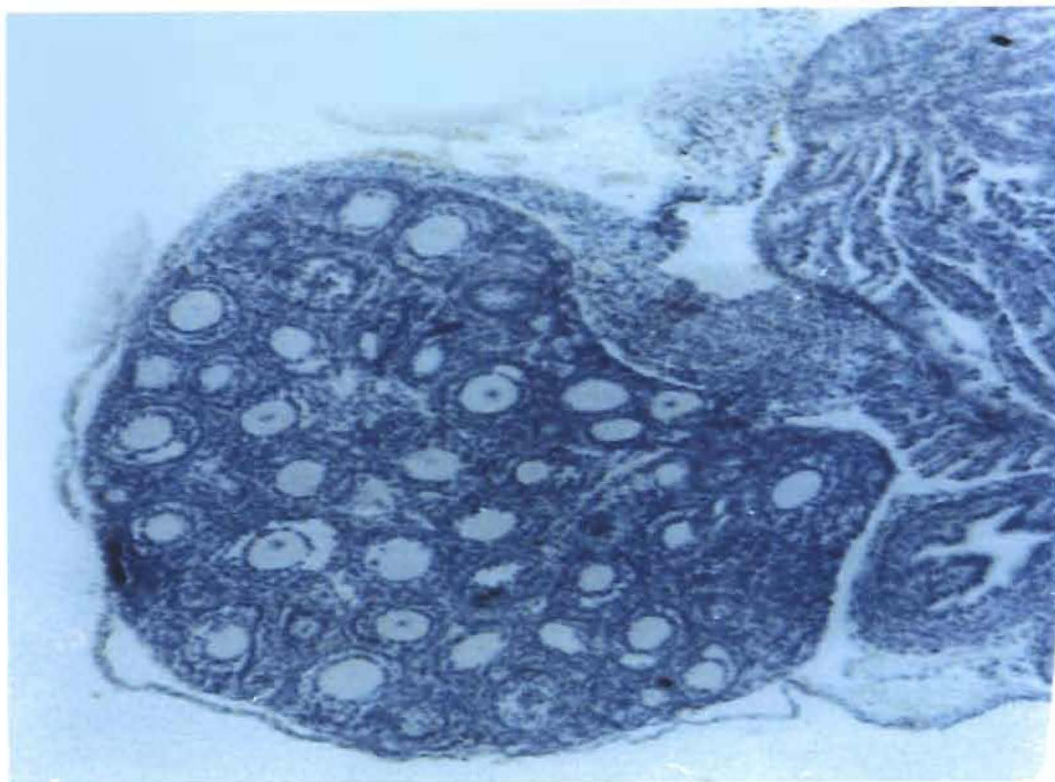


تخم‌دان حیوان شاهد ۱۲ روزه

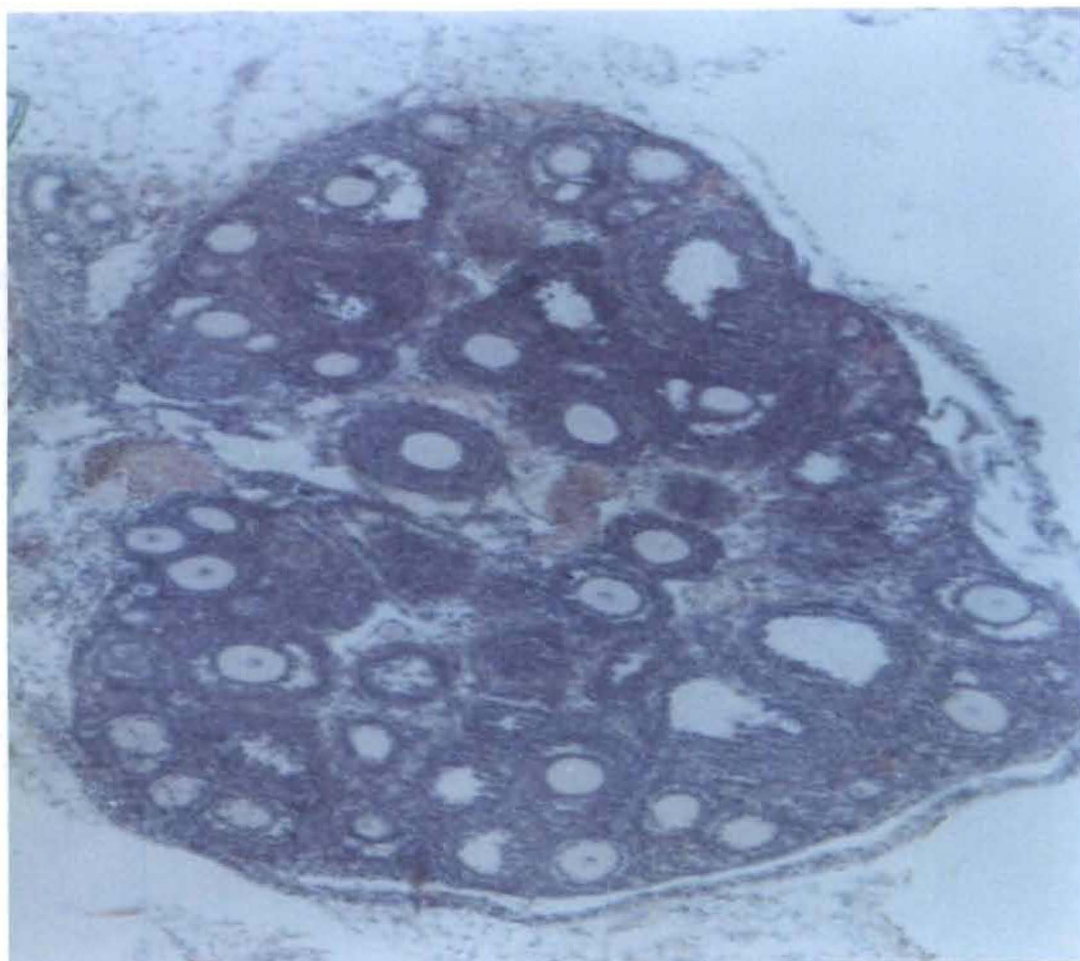


تخم‌دان حیوان تجربی ۱۲ روزه

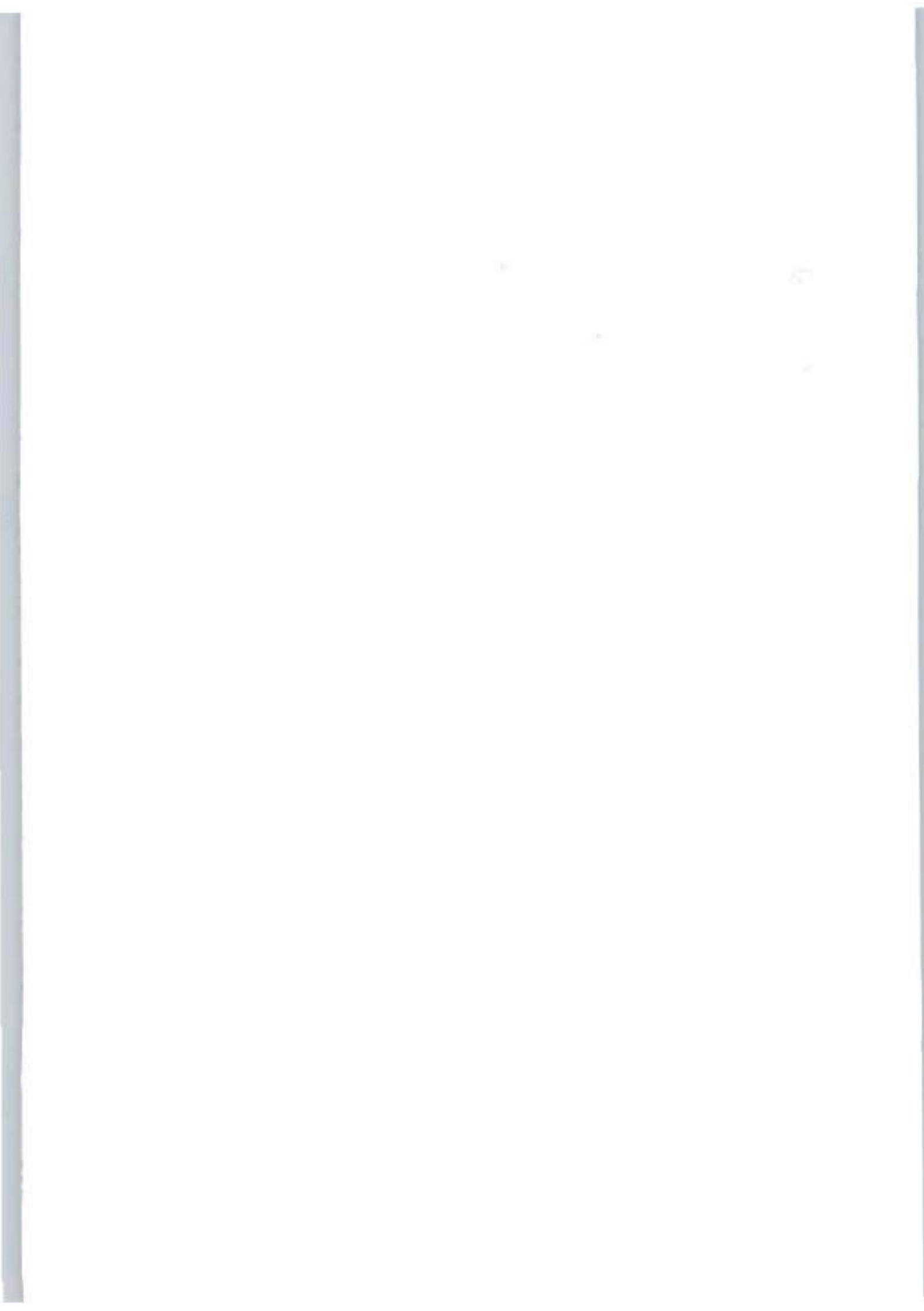
100

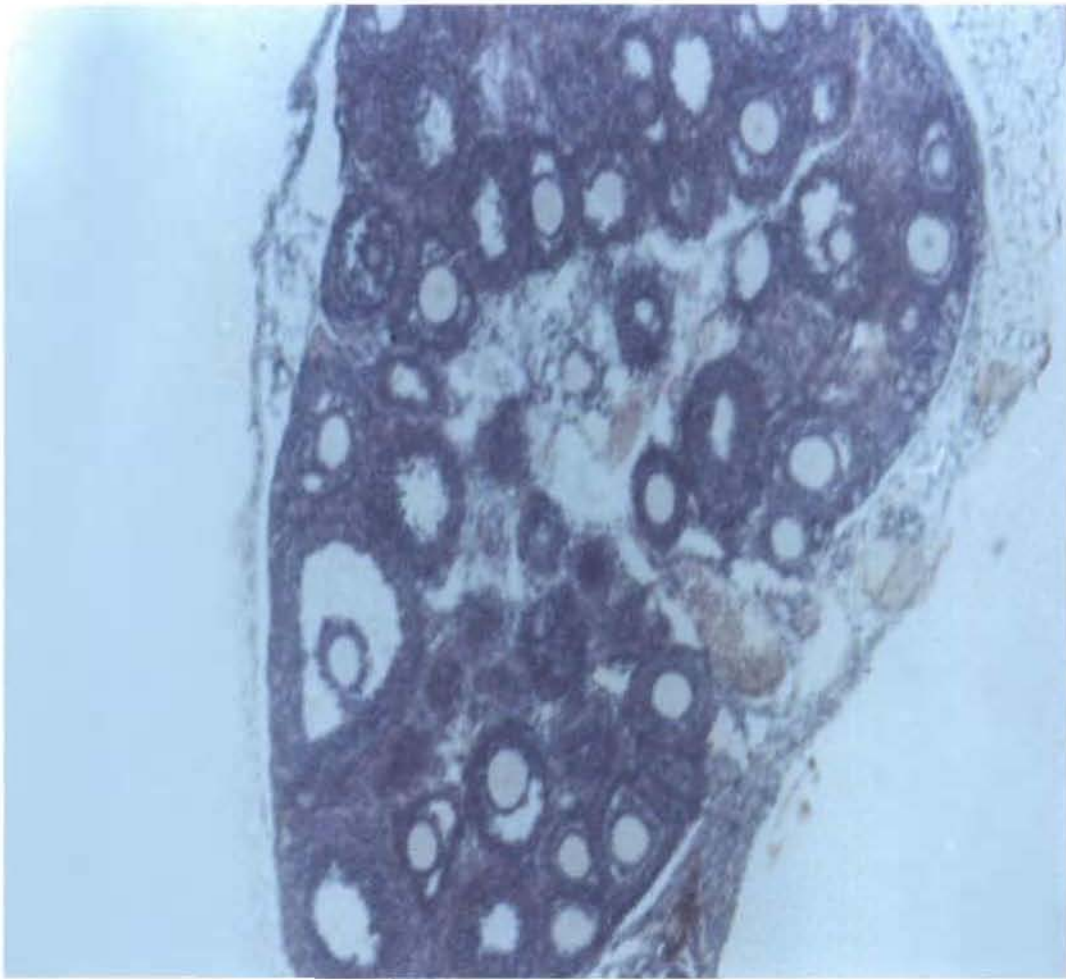


تخم‌دان حیوان شاهد ۱۸ روزه

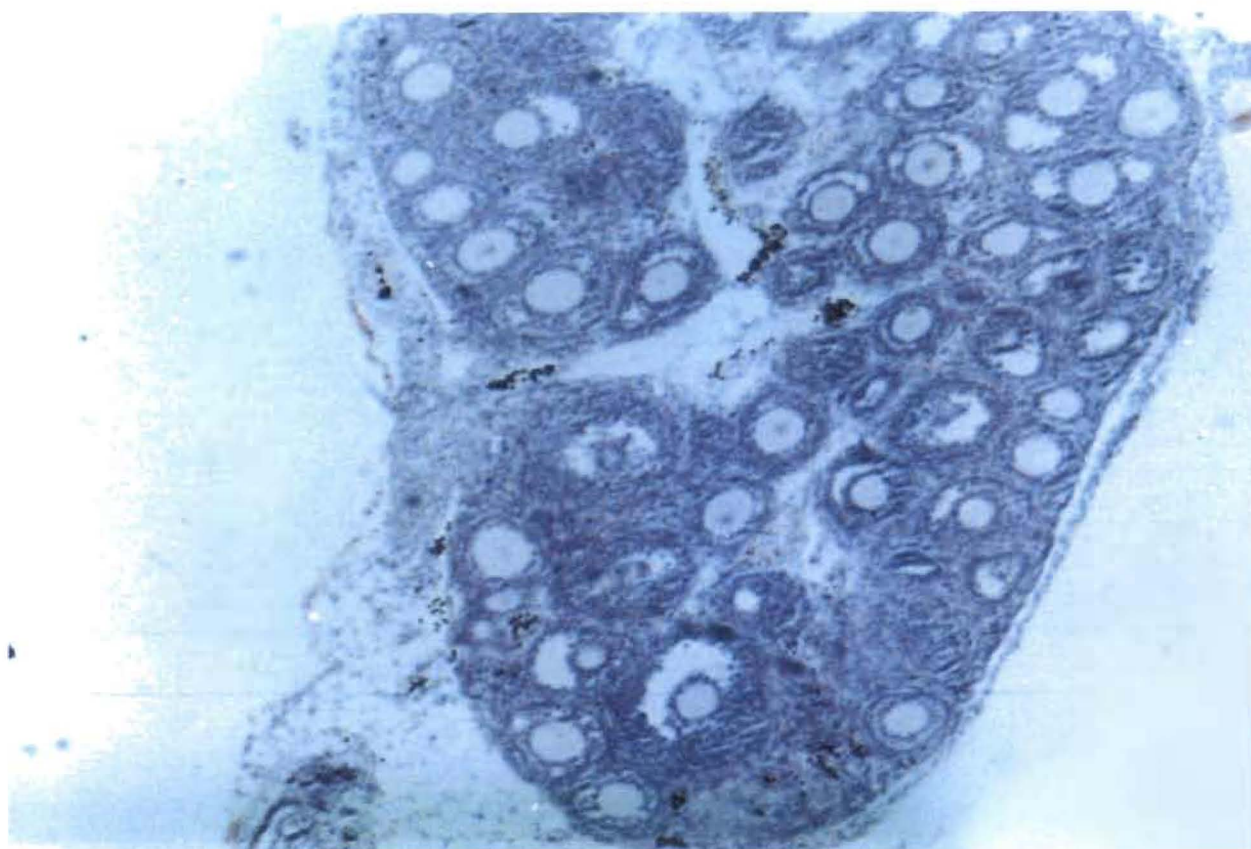


تخم‌دان حیوان تجربی ۱۸ روزه

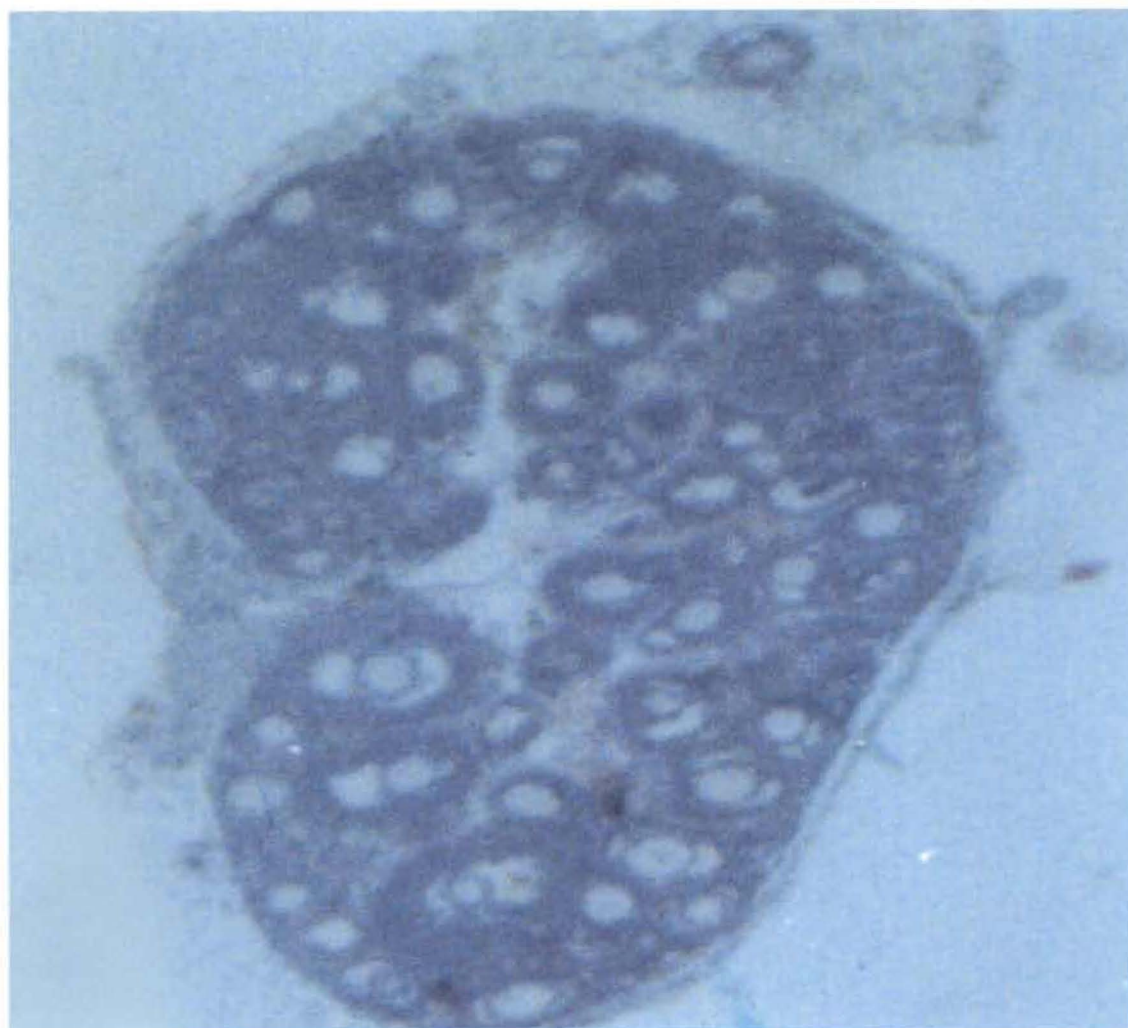




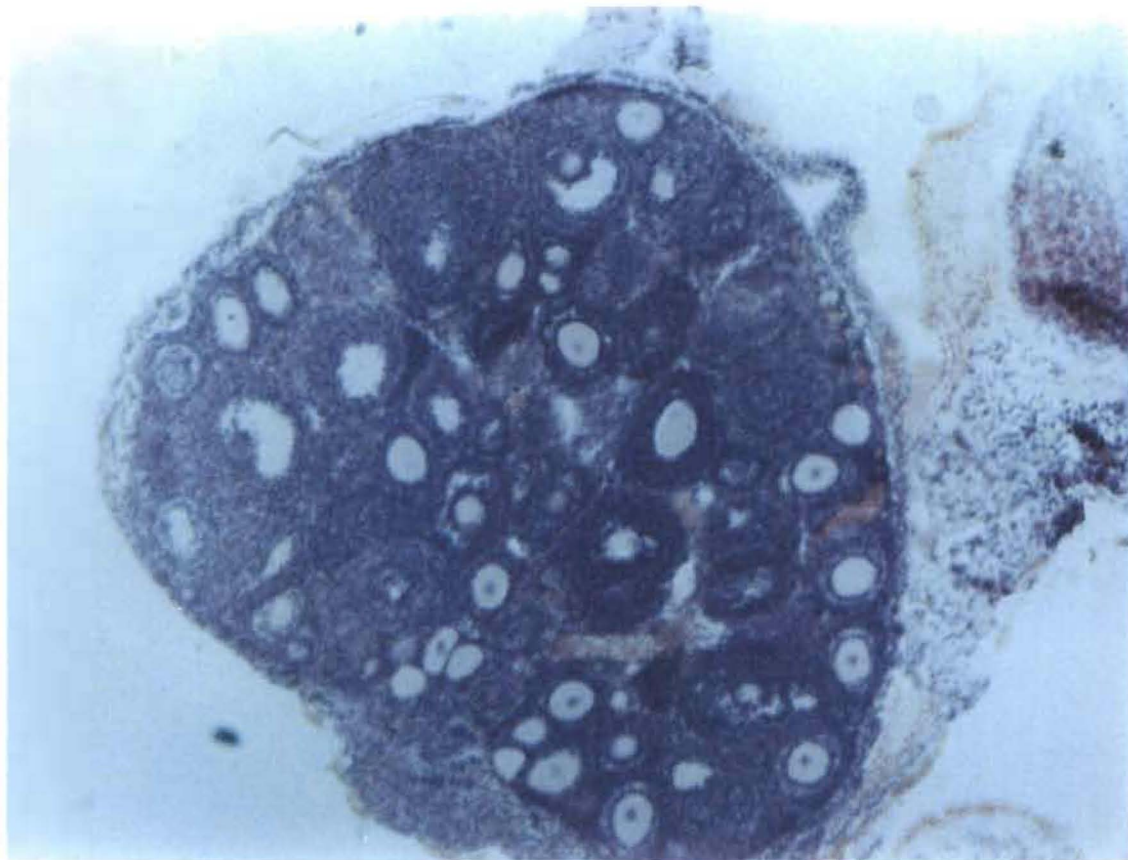
نمایی دیگر از تخمدان حیوان تجربی ۱۸ روزه



تخمندان حیوان شاهد ۲۲
روزه



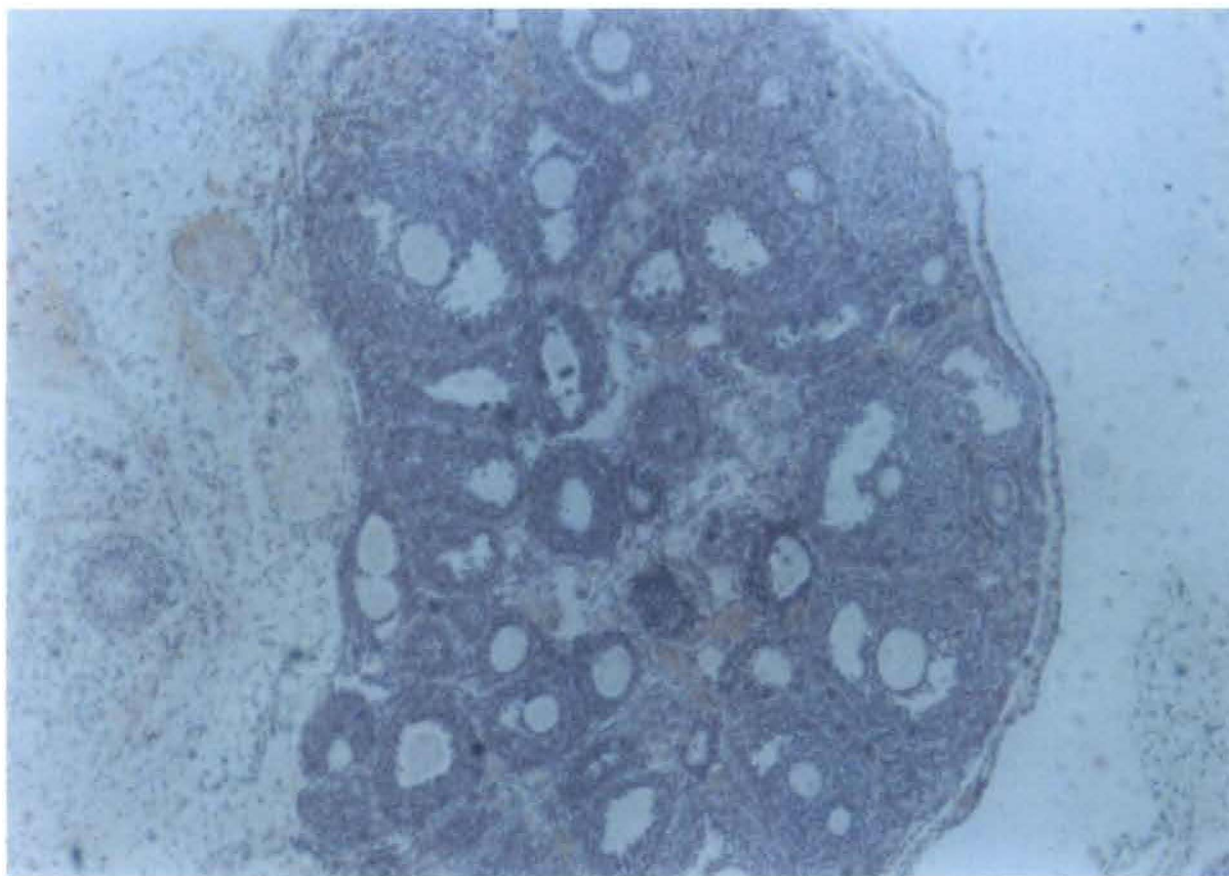
نمایی دیگر از همان تخمدان



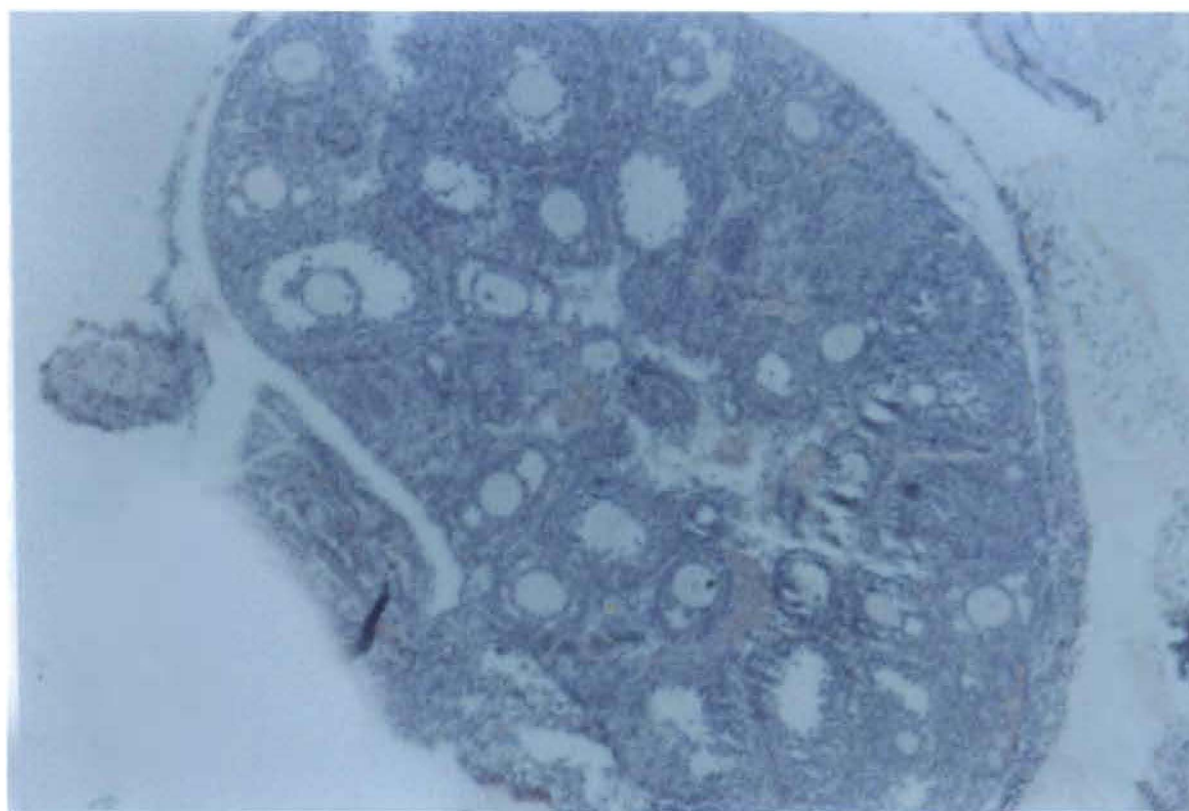
تخم‌دان حیوان تجربی ۲۲ روزه



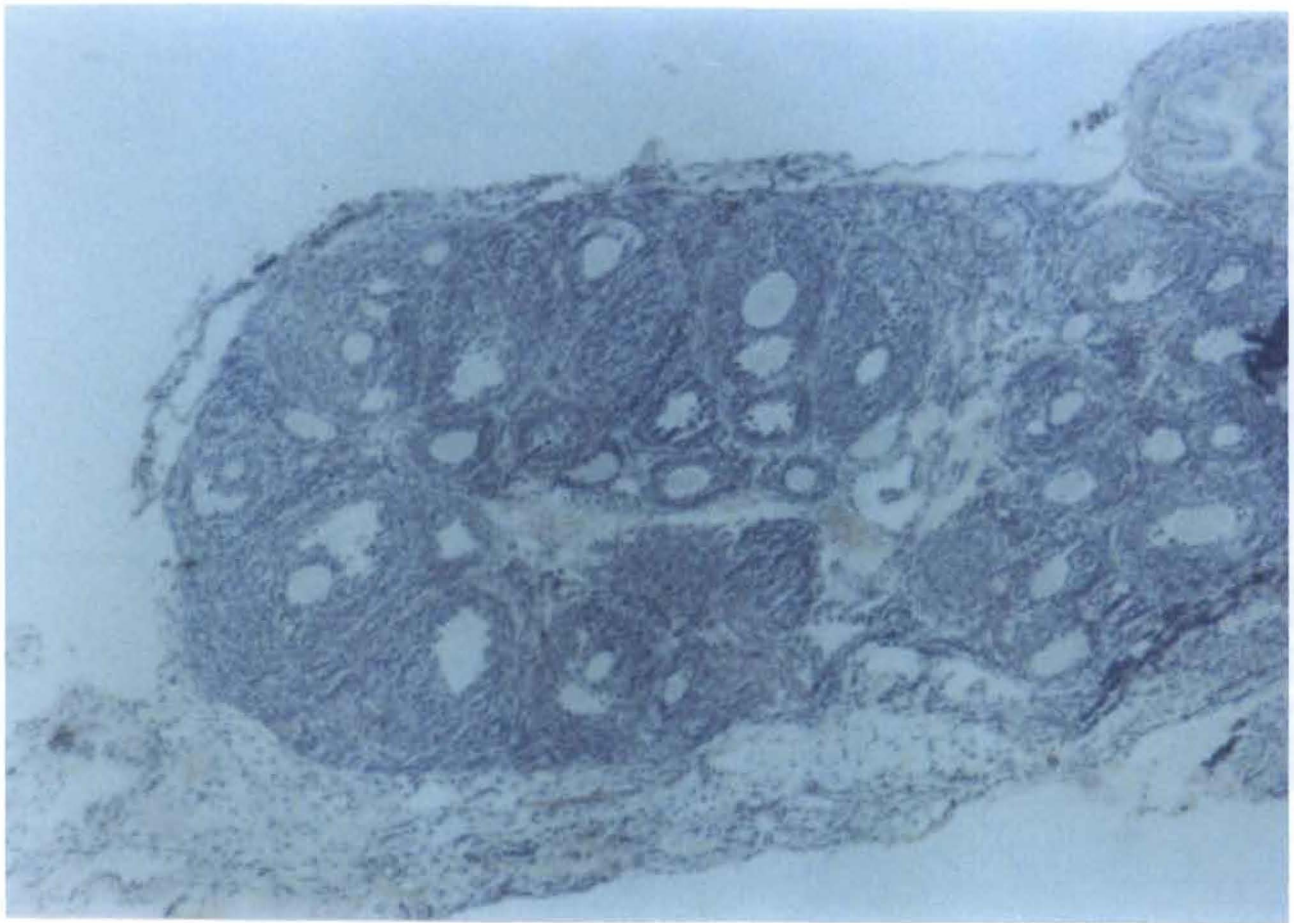
نمایی دیگر از همان تخمدان



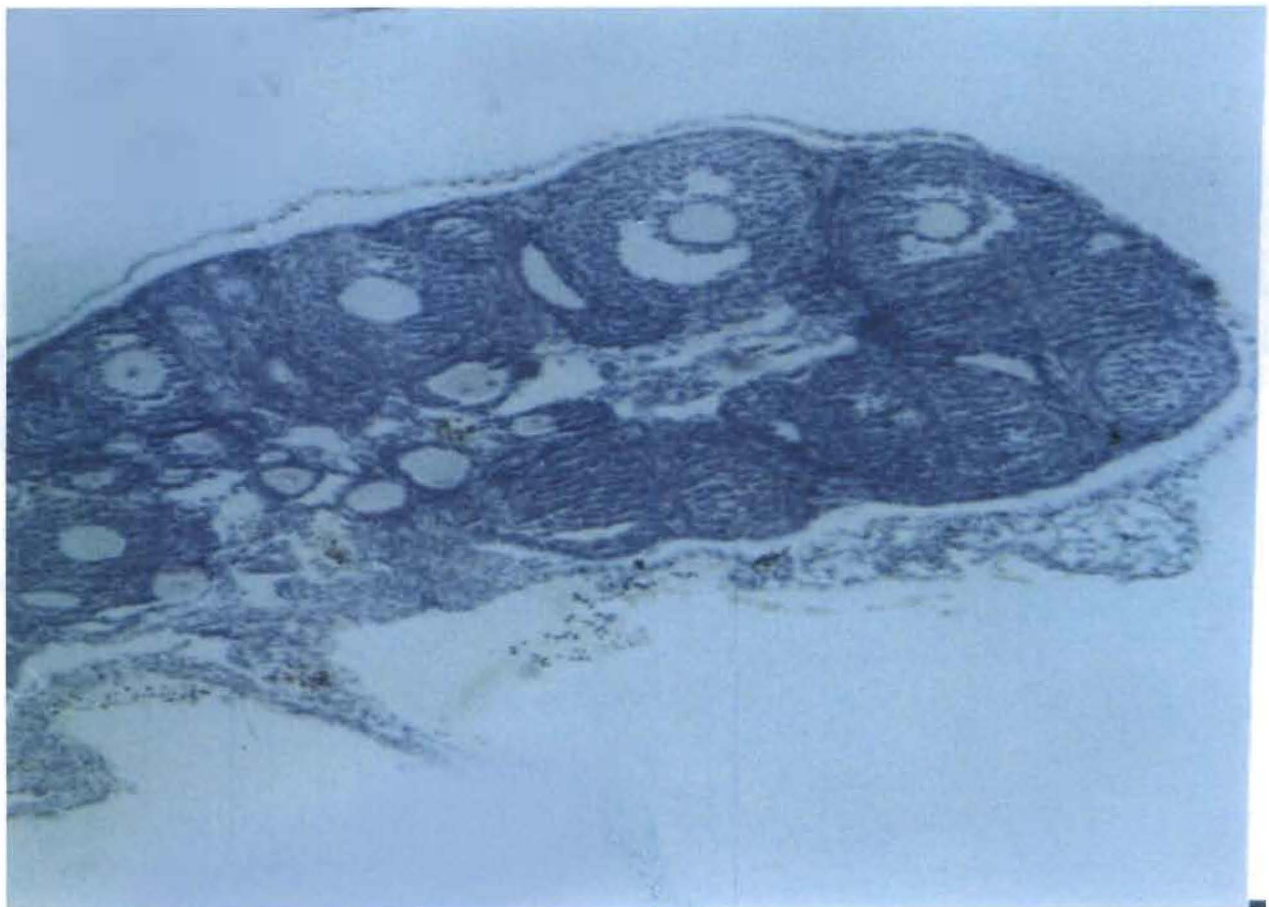
تخم‌دان حیوان شاهد ۲۵ روزه



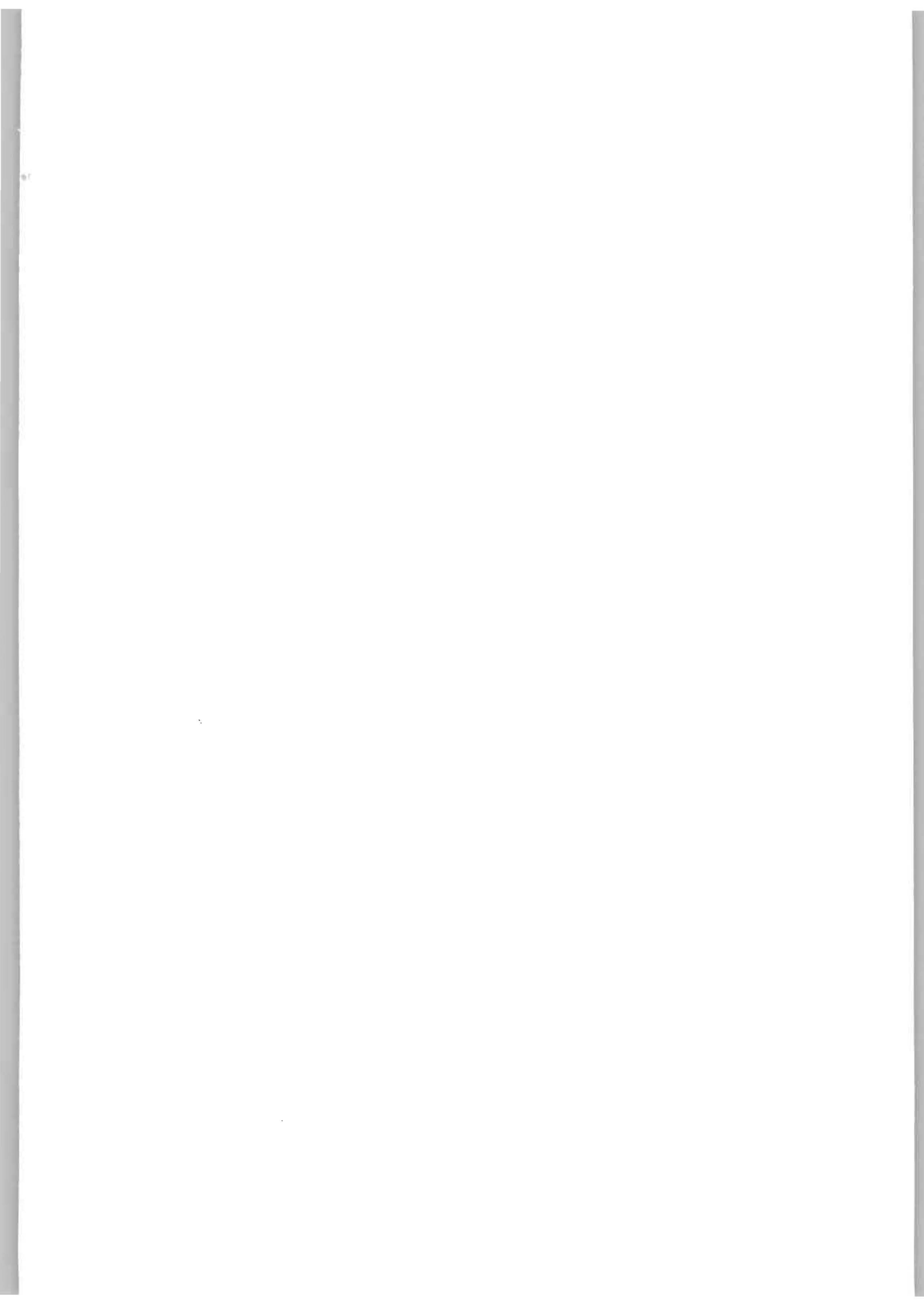
تخم‌دان حیوان تجربی ۲۵ روزه

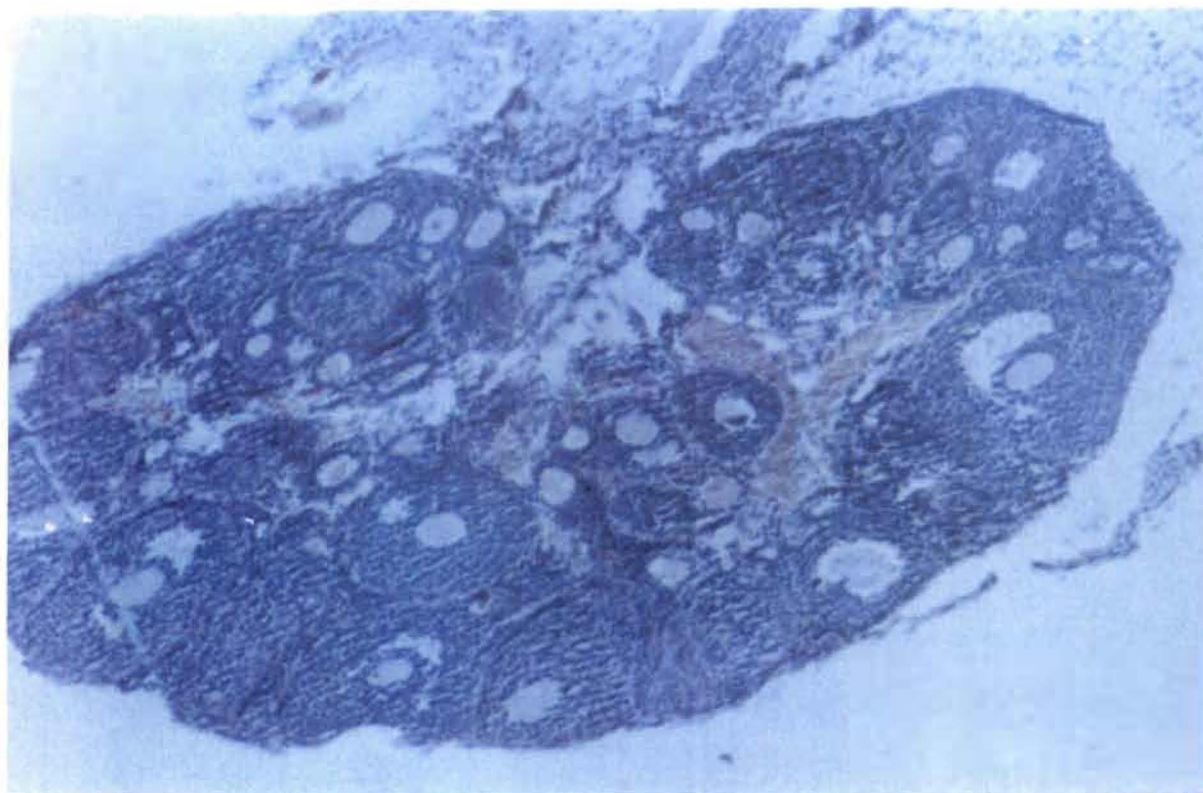


تخم‌دان حیوان شاهد ۲۸ روزه

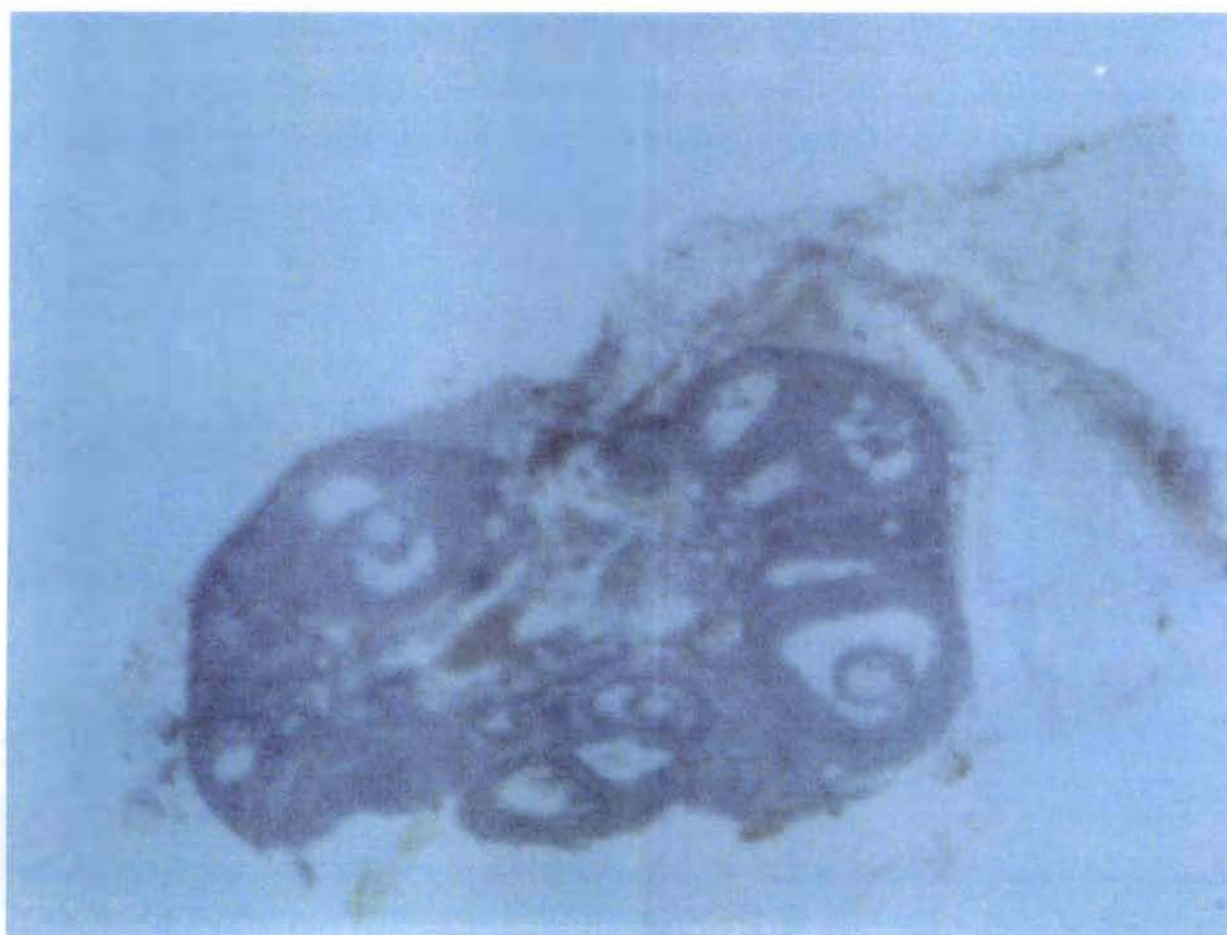


تخم‌دان حیوان تجربی ۲۸ روزه

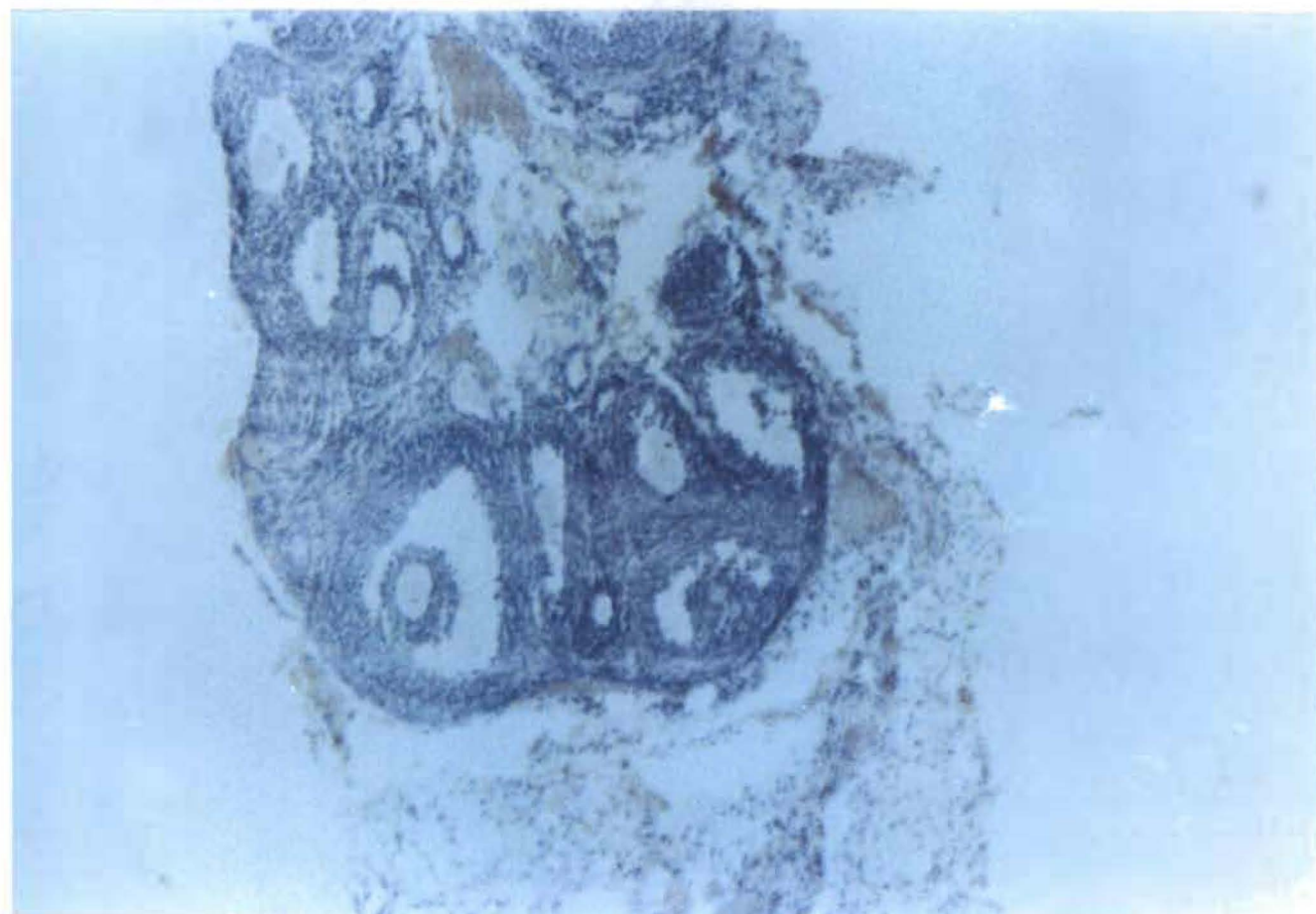
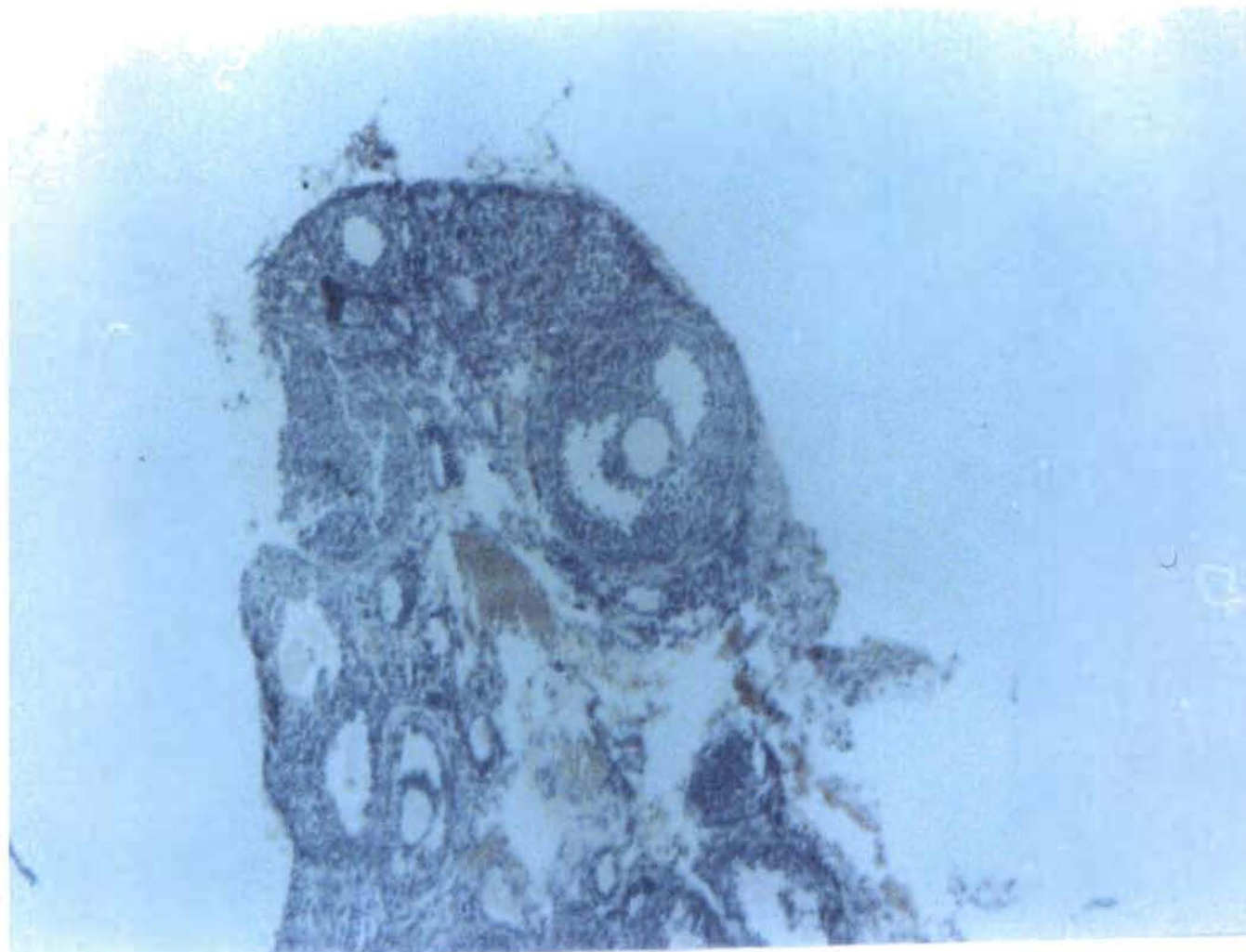




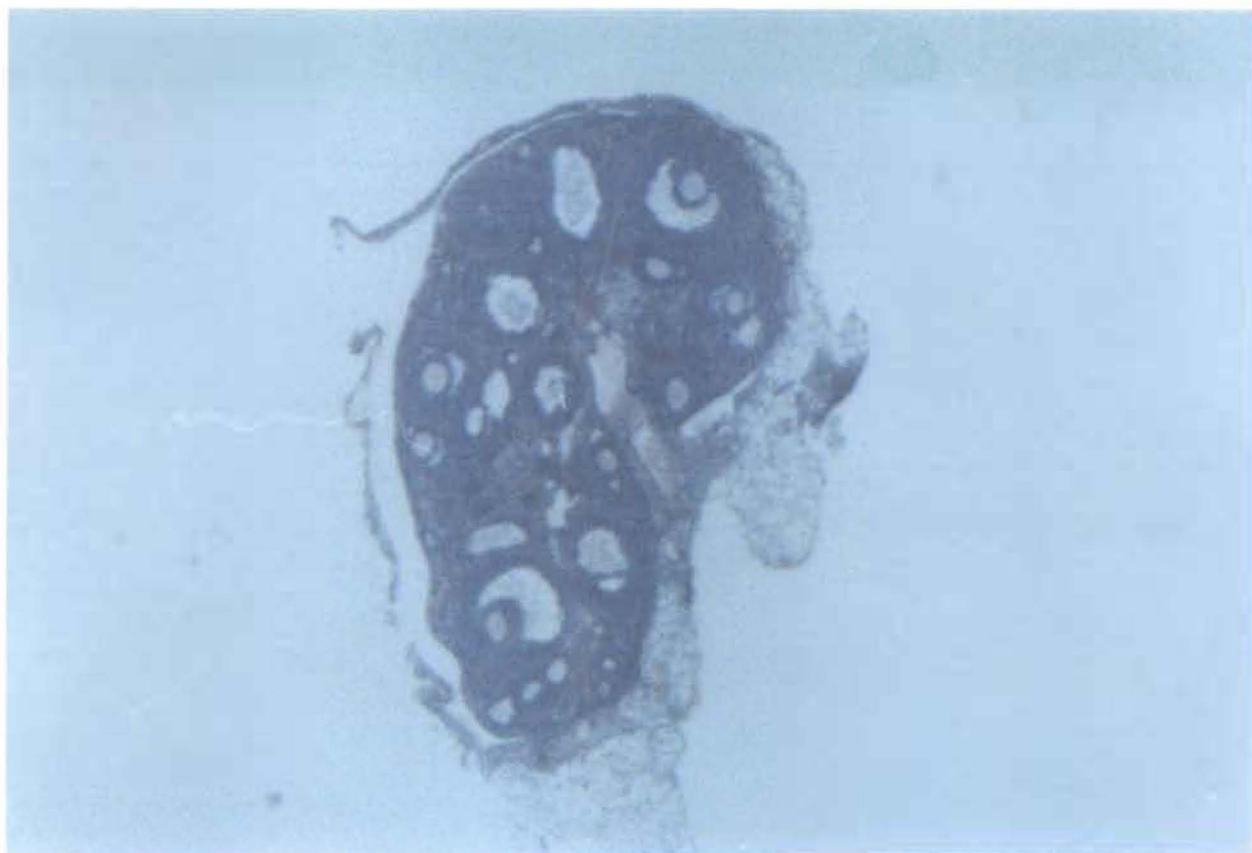
تخم‌دان حیوان شاهد ۳۰ روزه



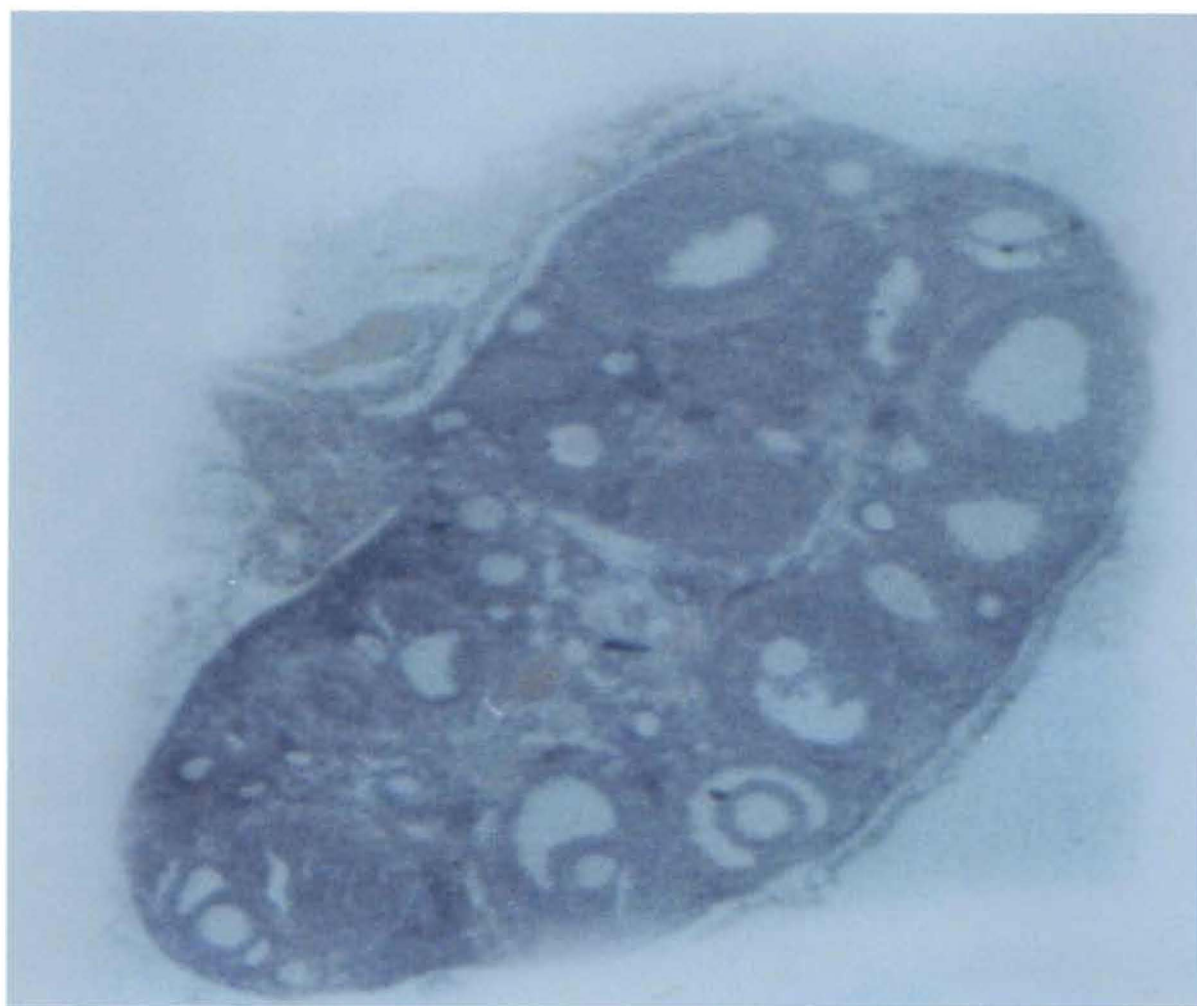
تخم‌دان حیوان تجربی ۳۰ روزه



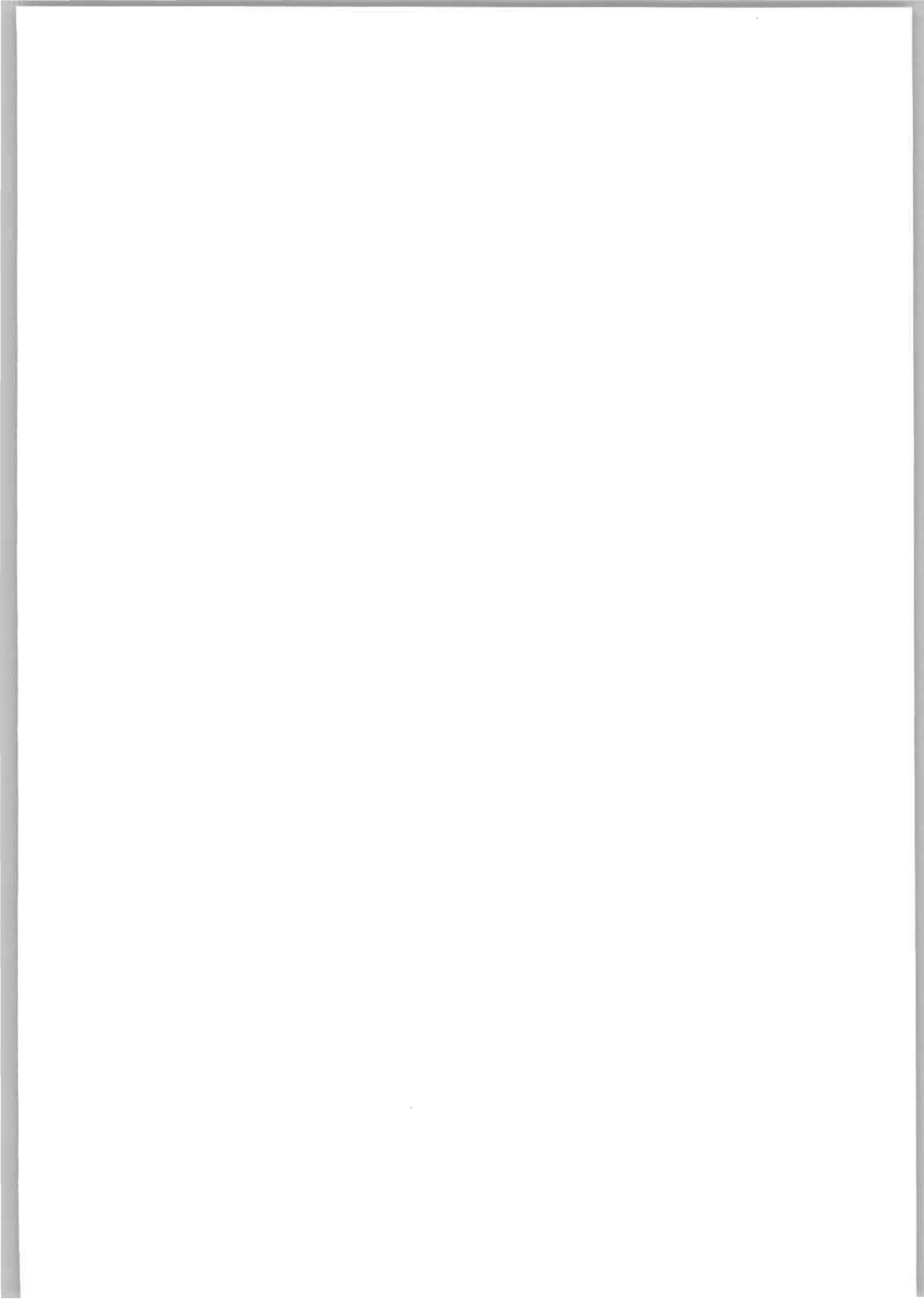
نمایی دیگر از تخمدان حیوان تجربی ۳۰ روزه

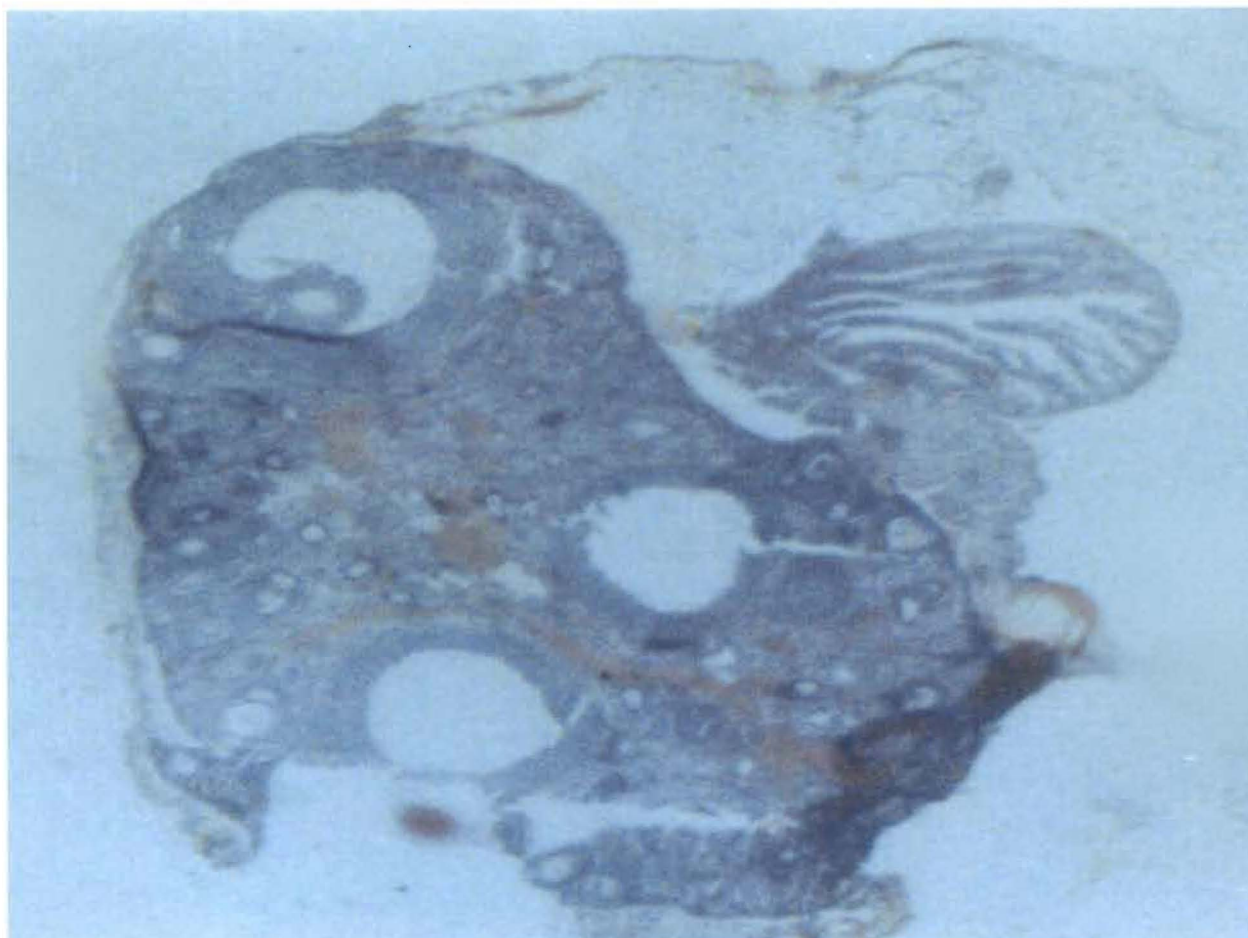


تخم‌دان حیوان شاهد ۳۵ روزه

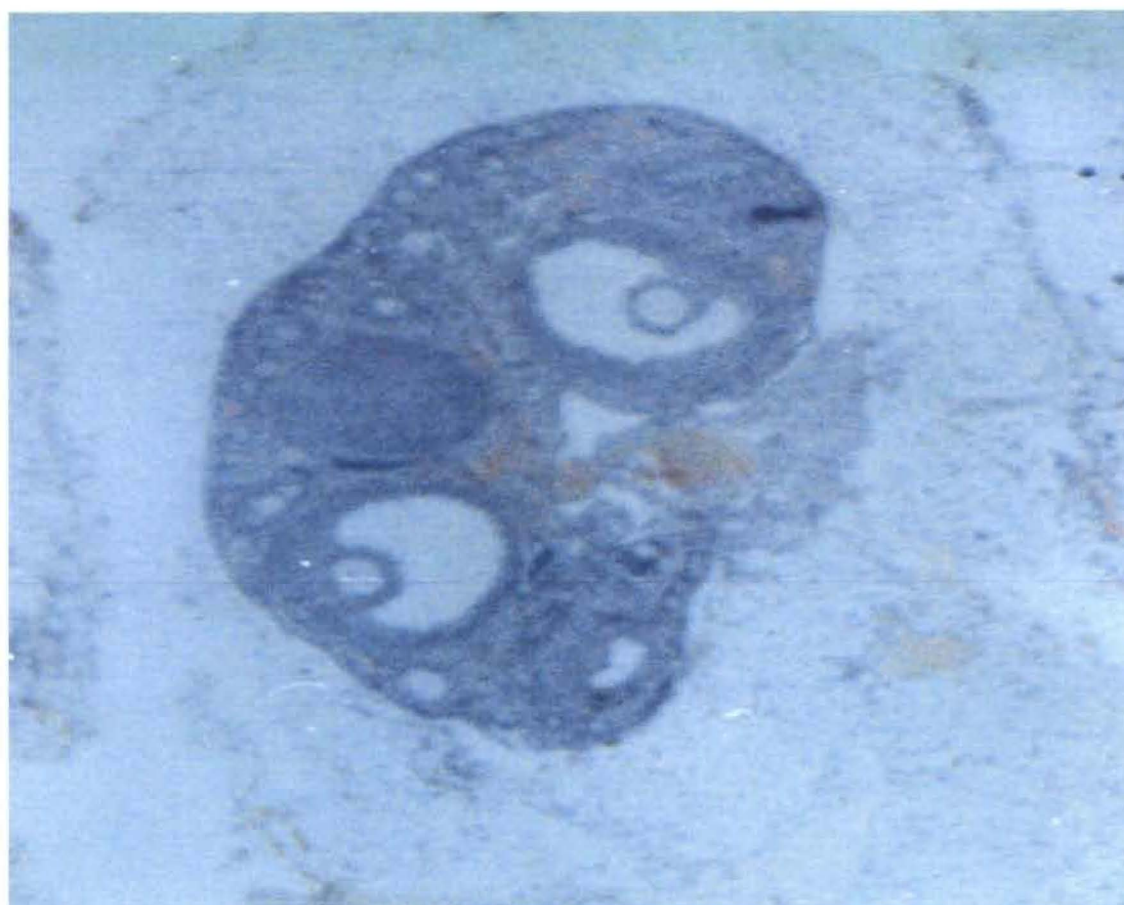


تخم‌دان حیوان تجربی ۳۵ روزه





تخم‌دان حیوان شاهد ۴۰ روزه



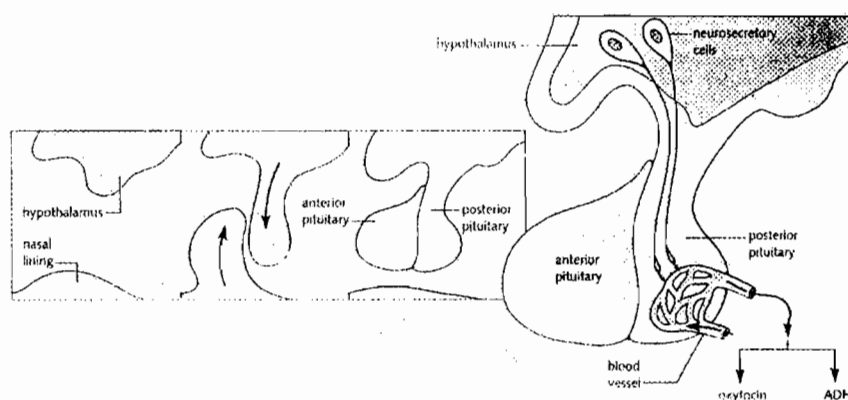
تخم‌دان حیوان تجربی ۴۰ روزه

بخش چهارم
بحث
Discussion

نقش غدد داخلی در فرایند بلوغ و تولید مثل :

در پستانداران غدد درون ریز (Endocrine glands) بسیاری از رفتارهای فردی و اجتماعی، خصوصیات مورفولوژیک و پدیده های تولید مثلی را تحریک و کنترل می نمایند. مهمترین آنها هیپوتالاموس (Hypothalamus) و هیپوفیز (Hypophysis) را میتوان نام برد. منشأ جنینی هیپوتالاموس از لایه اکتودرم است، بدین ترتیب که منشأ آن از نورال کرس (Neural crest) بوده در حالی که غده هیپوفیز منشأ جنینی دوگانه ای داراست. بدین ترتیب که لوب پسین آن از کف مغز بوجود می آید و لوب پیشین و بخش میانی از سقف شیار دهانی منشأ گرفته است. (۲۱)

(شکل ۱-۴)



شکل (۱-۴): منشأ جنینی هیپوتالاموس و هیپوفیز

هورمونهای مترشح از هیپوتالاموس هورمونهای محرک یا هورمونهای آزاد کننده (Releasing factors or releasing hormones) هستند که با ترشح این هورمونها غدد هدف تحریک شده و رشد و فعالیت طبیعی خود را ادامه میدهند. هورمونهای مترشح از هیپوتالاموس متعدد است اما هورمونی که به طور غیرمستقیم رشد و بلوغ غدد تناسلی و لذا فرایند های تولید

مثالی در پستانداران تحت کنترل آن است "هورمون آزاد کننده گنادوتروپین، (GnRH:Gonadotropin releasing hormone) نام دارد. بافت هدف این هورمون سلولهای مترشح هورمون گنادوتروپین در هیپوفیز پیشین (Anterior lobe) است که هورمونهای زیر را ترشح میکند: (۱،۵)

۱-هورمون محرک فولیکول (Follicle – Stimulating Hormone, FSH)

۲-هورمون جسم زرد (Luteinizing Hormone, L H)

ترشح هورمون محرک فولیکول یا FSH از غده هیپوفیز پیشین در جنس ماده موجب تحریک نمو تخمک و سلولهای گرانولوزای اطراف آن در تخمدان پستانداران جفت دار میشود. در اثنای نمو، خود فولیکول نیز استروژن (Estrogen) تولید و ترشح میکند. با بالا رفتن میزان استروژن خون ترشح FSH از غده هیپوفیز کم میشود و ترشح هورمون لوئینی یا LH افزایش می یابد و نقطه اوج ترشح LH باعث اوولاسیون یا تخمک گذاری میشود. جفت گیری چند ساعت بعد از پیک LH و چند ساعت قبل از تخمک گذاری انجام میشود.

ترشح هورمون LH در جنس نر سلولهای لیدیگ (Leydig cells) اطراف لوله های اسپرم ساز را وادار به ترشح هورمون جنسی نر که "تستوسترون" (Testosteron) نام دارد میکند و ترشح هورمون FSH سلولهای سرتولی (Sertoli cells) را که نقش تغذیه دهنده گامت های نابالغ در حال تقسیم را دارند تحریک میکند و اسپرماتیدها بدون عمل این هورمون به اسپرم تبدیل نخواهند شد. (۱)

پستانداران دارای فعالیتهای تولید مثلی چرخه ای هستند. دفعات چرخه سالیانه فعالیت جنسی در جنس ماده بسیار مشخص تر از جنس نر است. در اصطلاح این چرخه ها "استروس" (oestrus) خوانده میشود. بیشتر جوندگان کوچک مانند موش خانگی پلی استروس هستند. در این انواع چرخه های تولید مثلی به طور متوالی تکرار میشوند و در بین آنها هیچ گونه فاصله ای که حاکی از مرحله استراحت در فعالیت جنسی باشد وجود ندارد. در موش خانگی این چرخه در هر ۴-۵ روز یکبار موجب تخمک گذاری میشود مگر آنکه این امر بوسیله آبستنی متوقف شود.^(۶)

در حیوان ماده ظهور دو پدیده معرف آمادگی حیوان برای آمیزش است:

۱- باز شدن منفذ واژن (vaginal opening)

۲- ظهور سلولهای شاخی (Cornified cells) در گستره (smear) تهیه شده از محتویات

درون واژن که معرف شروع چرخه استروس حیوان است.^(۸)

جلو افتادن زمان باز شدن منفذ واژن که نشانه ای ظاهری از آمادگی حیوان ماده برای جفتگیری است در طی این تحقیق و همچنین پژوهش قبلی به اثبات رسید. اگر چه ممکن است اختلافات کوچکی بین زمانهای یادشده در دو رساله ملاحظه گردد اما به نظر می رسد این اختلافات ممکن است مربوط به نژاد حیوان مورد آزمایش باشد چرا که موشهای اجدادی در این دو تجربه از دو منبع متفاوت اکتیاع شدند.

اگر چه باز شدن واژن نشانه ای دال بر بلوغ تقریبی جنس ماده است اما حتی اگر جفت گیری در آن زمان روی دهد به لقاح (fertilization) و لانه گزینی (implantation) و یا تولید جنین زنده (viable embryo) منجر نخواهد شد و اولین جفت گیری موفقیت آمیز حدوداً یک هفته بعد از باز شدن دهانه واژن صورت می گیرد. در هر صورت باز شدن پیش از موعد دهانه واژن و زایمانهای زودرس این نتیجه را به دست می دهد که اوولاسیون زودتر از موعد مقرر رخ داده است. (چنانکه در نتایج هیستولوژیکی هم پیداست).

در حیوان نر نزدیک شدن به سن باروری به غیر از نشانه های رفتاری همراه با علائم مورفولوژیکی خاصی نیست مگر آنکه حیوان کشته شود و بیضه ها مورد مطالعه هیستولوژیکی قرار بگیرند.

مشاهده شده است که محرک اساسی در شروع مکانیسمهای تولیدمثل ترشح GnRH غده هیپوتالاموس است.

فاکتورهایی که ترشح RHs را تحریک میکند عبارتند از: (۱۵)

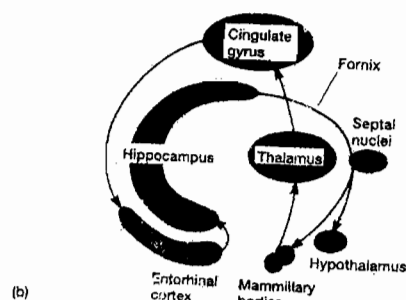
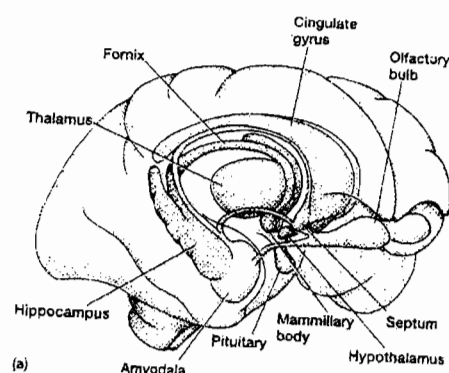
۱- هورمونهای جنسی خود اثر فیدبک منفی دادند. بدین معنی که بالارفتن مقدار هورمون، تولید هورمونهای آزاد کننده را از هیپوتالاموس باز می دارد.

۲- برداشت Suprachiasmatic nucleus (SCN) به عنوان بزرگترین رابط و انتقال دهنده پیامهای عصبی در مغز چرخه استروس را متوقف می کند.

نواحی گسترده ای در هیپوتالاموس و هیپوفیز نیز وجود دارند که در پدیده بلسوغ و سیکل استروس موثرند:

۱- در قلب این نواحی ناحیه ای است بنام Median eminence. این محل جایی است که RHs آزاد می شوند.

۲- نواحی سیستم لیمبیک (Limbic system) مثل thalamus, amygdala و hippocampus. شکل (۲-۴)



شکل (۲-۴): آناتومی سیستم لیمبیک و جریان اطلاعات بین اجزا آن

۳- راههای حسی مخصوص بویایی، لامسه و بینایی داده هایی به نقاط مختلف مغز میفرستند.

لذا میتوان گفت که هر کدام از این قسمت‌ها در کنترل نهایی ترشح RHs عملی مستقیم، حال کم یا زیاد دارند. در راسته‌هایی مانند جوندگان (Rodents) کنترل عصبی پدیده‌های تولیدمثل بسیار قدرتمند است به عکس نخستیان که در آنها کنترل هورمونی بسیار اهمیت دارد. به عبارت دیگر در جوندگان دریافتهای حسی مانند محرکهای بویایی در این پدیده‌ها بسیار مؤثرند چنانکه عدم وجود محرک بویایی (فرومون مناسب) پدیده بلوغ و مکانیسمهای تولید مثل موش خانگی ماده را به تعویق می‌اندازد، در حالیکه در پستانداران عالتر از جمله انسان تاکنون چنین چیزی به اثبات نرسیده است. لذا نمی‌توان تاثیرات نواحی ذکر شده برای فعالیت غده هیپوتالاموس را نادیده گرفت.

در ادامه مطلب مروری مختصر بر ارتباط بین راهها و مراکز بویایی با مراکز کنترل کننده ترشح Gn RH خواهد شد.

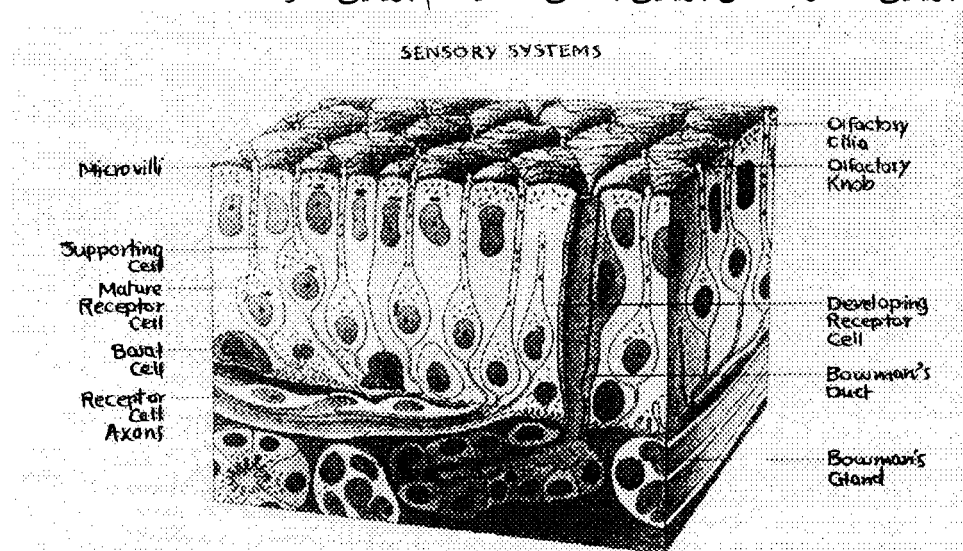
پستاندارانی نظیر سگ، خرگوش و علی‌الخصوص جوندگان (The Keenest Sniffers) حفره بینی بسیار پیچیده‌ای دارند. در این حیوانات هوای استشمام شده ابتدا از یک ساختار تهویه هوا که متشکل از چندین لایه موکوس دار است می‌گذرد و بدین ترتیب هوا گرم و مرطوب شده و سپس قبل از اینکه از حلق بگذرد داخل سیستم پیچیده‌ای از صفحات توربینی شکل که در پشت حفره بینی قرار دارد می‌شود و در آنجا چرخش میکند. این صفحات دارای نوروئهای گیرنده بویایی هستند. در این ناحیه اپتیلیوم بویایی واقع است این اپتیلیوم که برای اولین بار در سال ۱۸۵۹ توسط H. Schultse توصیف و تشریح شد دارای ۳ نوع سلول

است که به ترتیب سلولهای گیرنده دو قطبی، سلولهای محافظ و سلولهای پایه نامیده می شوند. ۲

نوع سلول آخر در فرایند بویایی نقش اساسی ندارند و بیشتر مسؤولیت نگهداری و حفاظت از نورونهای دو قطبی گیرنده را دارا هستند. این نورونها در انتهای دندریتی خود دارای مژه می باشند.

مژه های این قسمت در داخل موکوسی حرکت می کنند که مولکولهای معلق در هوا نیز در این موکوس حل شده و بدین ترتیب به مژه ها می رسند. این مژه ها که حکم دندریت ها را دارند دارای گیرنده های مختلف در سطح مولکولی هستند که هر کدام توانایی اتصال به ترکیب ویژه ای (ligand) را دارند (مانند کار قفل و کلید) شکل (۳-۴) و بدین ترتیب با اتصال یک لیگاند به گیرنده خود مکانیسم انتقال پیام به راه می افتد. اکسونهای سلولهای گیرنده بویایی به صورت دستجات موازی بنام Filia olfaction از منافذ استخوان غربالی گذشته و وارد قسمت جلویی جمجمه گردیده به بخش محیطی پیاز بویایی وارد میشوند و سپس به کورتکس بویایی می روند.

پیاز بویایی و کورتکس بویایی بخشی از سیستم بویایی مغزی هستند.



شکل (۳-۴): اپیتلیوم بویایی مهره داران

پياز بويایی اصلی (Main olfactory bulb, MOB)

به صورت يك جفت بر جستگي گلابی شكل است كه هر يك توسط پايه کوتاهی به انتهای

تلسفالون (Telencephalon) متصل می گردد.

در مقطع پياز بويایی به ترتيب از محیط به مرکز لایه های زیر مشخص است: (۴، ۱۵۱۸)

۱- لایه عصب بويایی (Olfactory nerve layer, on.)

۲- لایه گلومرولی (Glomerular layer, glom.)

۳- لایه مشبك خارجی (External plexiform layer, epl.)

۴- لایه میترا (Mitral layer, ml.)

۵- لایه مشبك داخلی (Internal plexiform layer ipl.)

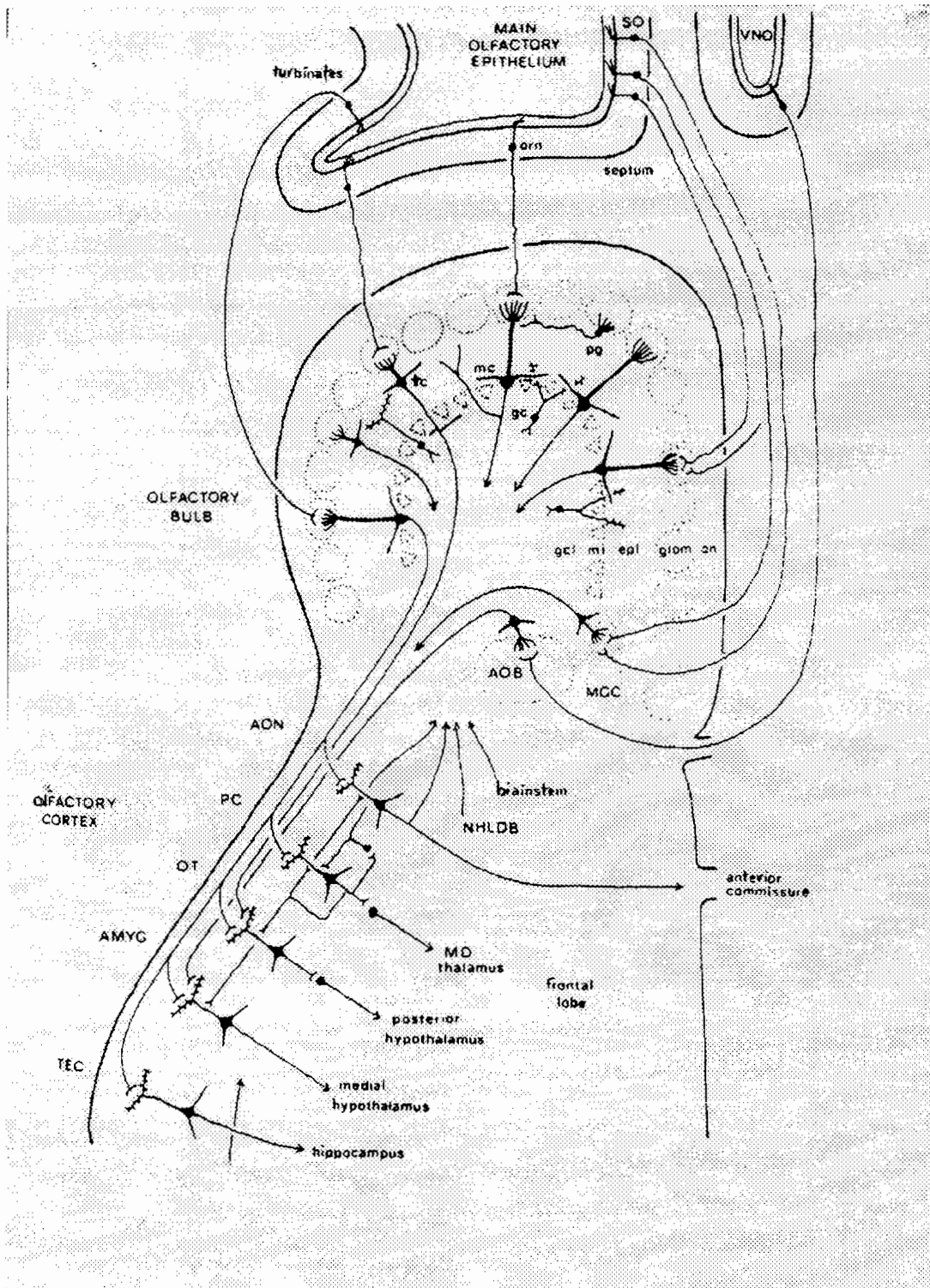
۶- لایه گرانولار داخلی (Internal granular layer)

۷- لایه دور بطني (Periventricular layer)

همانگونه كه در (شكل ۴-۴) پیداست آكسونهای برخواسته از رسپتورهای بويایی در

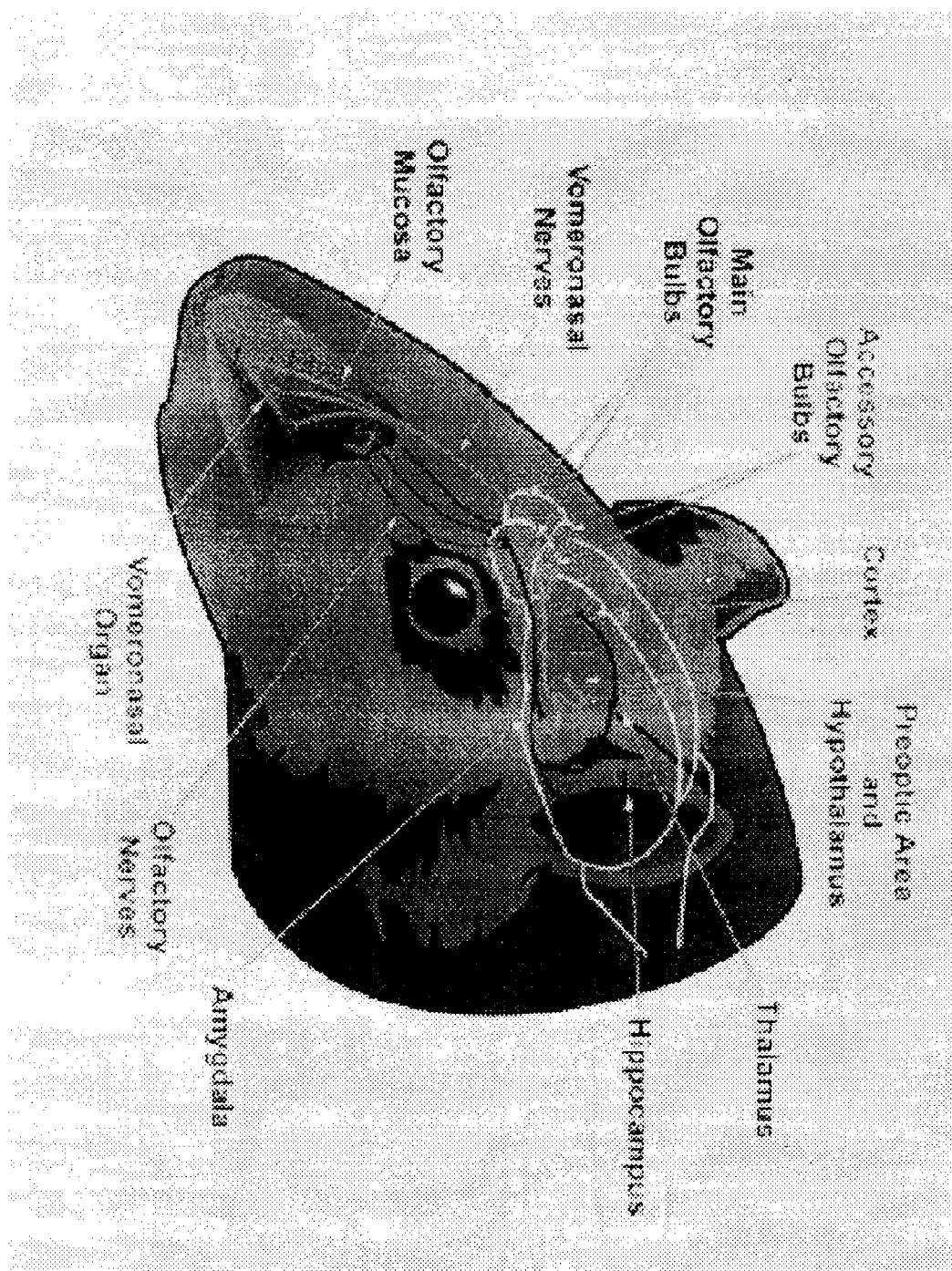
قسمت گرد مانند گرمرولی با دندریتهای سلولهای میترا (Mitral cells, mc.) و سلولهای تافتد

(Tufted cells. Tc.) سیناپس می دهند. سپس آكسون این سلولها به كورتكس بويایی می روند.



شکل (۴-۴): نمایی از ارتباطات عصبی بین اپیتلیوم بویایی و مراکز مغزی

محرکهای بویایی عادی و معمولی از این طریق دریافت می شوند. اما شواهد نشان داده است که فرومونها از طرق دیگری نقش خود را ایفا می کنند. با وجود آنکه ترکیبات موجود در فرومونها نیز همراه با هوای استشمام شده وارد حفره بینی می گردند اما مانند سایر مولکولها باعث تحریک رسپتورهای موجود در اپتیلیوم بویایی نمی گردند. آنها توسط ارگانی دیگر بنام وروننازال یا اندام فرعی بویایی (Accessory olfactory organ or vomeronasal organ, VNO) دریافت می شوند. این اندام برای اولین بار در سال ۱۸۱۱ م. توسط ژاکسون توصیف گردید لذا بنام Gucobson organ or Jacobson organ نیز نامیده می شود. شکل (۵-۴)



شکل (۴-۵): محل قرارگیری (VNO) در موش خانگی و ارتباطات این ارگان با دیگر مراکز

این ارگان برای برقراری ارتباط شیمیایی بین جانداران مختلف بسیار مهم است. این ارتباطات می تواند باعث برانگیختگی جنسی در جنس مخالف آن گونه شود و یا اطلاعاتی در زمینه مکان زندگی، مهاجم و ارائه دهد. (۴۵)

VNO به صورت لوله باریک به داخل حفره بینی (nasal cavity) موش خانگی باز میشود. مولکولهای فرومونها در موکوس موجود روی اپیتلیوم حسگر این ناحیه حل می شوند و نوروهای دو قطبی موجود در اپیتلیوم این ناحیه پیامهای شیمیایی را دریافت می کنند. فی المثل در هنگام جفتگیری جنس نر مرتباً "ناحیه جنیتال جنس ماده را بو می کشد، ترکیبات متصاعده از غدد این ناحیه در موکوس هر دو اپیتلیوم حل می شوند اما فقط توسط سلولهای گیرنده اپیتلیوم اندام و مرونزال دریافت می شوند.

رستورهای کاندید شده که مولکولهای فرومونها را شناسایی می کنند توسط ۲ سوپر فامیلی ژنهای مجزا که می شوند کد V1R و V2R نام دارند.

در پستاندارانی مانند گربه سانان کانال VNO در داخل کانال نازوپالاتین (Nasopalatine) باز می شود و بینی را به دهان مربوط می کند و لذا اپیتلیوم VNO می تواند توسط ترکیباتی که بوسیله رسیدن به این مجاری راه می یابند نیز تحریک شوند اما این مسأله درباره جوندگان صادق نمی باشد.

در اپیتلیوم این اندام سلولهای گیرنده دو قطبی وجود دارد که آکسونهای آنها به پیاز بویایی اصلی (Main olfactory loulb, MOB) که قبلاً توضیح داده شد نمی روند.

به نظر می آید مولکولهای تحریک کننده گیرنده های VNO مولکولهای بزرگی باشند. فی المثل در هامستر پروتئینی بنام Aphrodisin که به مولکولی لیپیدی اتصال دارد فرومون حیوان ماده است. تحقیقات نشان داده است که در یک نژاد غلظت بسیار کم ماکرو مولکولهای موجود در ادرار نورونهای VNO همان نژاد را بسیار تحریک می کند در صورتیکه همین نورونها به غلظت بسیار بالای فرومونهای نژاد نزدیک بخود بهیچ وجه حساس نیستند. (۴۵)

در انسانها هم ساختمان VNO موجود است اما تحقیقات اخیر نشان داده است که نورونهای مخصوص این ناحیه که در دیگر گونه ها یافت می شود در انسان وجود ندارد. اما تحریکات الکتریکی ضعیفی در انسان بیداری که در معرض بوی پوست دیگری بوده است دیده شده است. محققان نشان داده اند که استروئیدها (Steroids) مواد بسیار مؤثری هستند که می توانند نقش فرومونها را در انسان بازی کنند. بهر حال نمی توان ارتباطات شیمیایی بین انسانها از طریق حس بویایی را نادیده گرفت، فی المثل بروز قاعدگی همزمان در زنانی که با هم در یک مکان زندگی می کنند دلیلی بر این مدعاست. (۴۵)

در ادامه چند نکته در رابطه با خصوصیات نورونهای حسگر در اپیتلیوم VNO ذکر میگردد:

۱- این نورونها به اجزا درون ادرار توسط بالا رفتن میزان تحریک (Firing) پاسخ می دهند و برعکس بقیه نورونهای حسی هرگز در برابر تحریکات طولانی مدت (Prolonged stimulus exposure) سازش (adaptation) نمی یابند. (۲۳)

۲- این نورونها در حالت عادی یعنی در عدم حضور محرکی بطور پراکنده فعال هستند. (۲۳)

۳- VNO هر دو جنس نورونهای دارد که برای درک فرومونهای هر دو جنس اختصاص

یافته اند. (۲۳)

۴- تعداد نورونهای که به فرومونهای جنس ماده حساسند بسیار بیشتر است. (۲۳)

۵- هر نورون VNO ممکن است بوسیله یک مولکول فرمون بخصوص تحریک شود. فی-

المثل مولکول فرومون 2-heptanone یک لیگاند مناسب برای گیرنده V1rb2 است و هر

نورون واسطه در AOB داده های تحریک کننده از یک نوع نورون VNO را دریافت می

کند. (۳۰)

۶- هر کدام از آکسونهای VNO با چندین سلول glomeruli در AOB سیناپس میدهند

در حالیکه چندین آکسونی مشتق از چند نورون اپتیلیوم بویایی با یک سلول glomeruli در

MOB سیناپس می دهند. (۳۰)

۷- حساسیت نورونهای VNO به لیگاندهای محرکشان ۱۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ برابر نورونهای

موجود در اپتیلیوم بویایی است. (۴۷)

باید گفت که برداشت VNO نتایج شگفت انگیزی در حیوانات تحت آزمایش داشته است.

بعد از برداشت VNO از طریق جراحی و پس از بهبود کامل موش خانگی ماده ای که تا زمان آزمایش تجربه ای در زمینه رفتارهای جنسی نداشت تغییرات شگرفی در رفتارهای جنسی و بلوغ حیوان مورد آزمایش مشاهده شد. فقدان بلوغ در حیوان ماده نابالغ و فقدان تأثیرات همزیستی با دیگر ماده ها در یک محل، فی المثل کند شدن چرخه استروس و توقف آن از شواهدی بود که اهمیت VNO در تظاهر رفتارهای جنسی و بلوغ را اثبات کرد.

همچنین تحقیقات نشان داده است که آسیب دیدگی قسمت وسیعی از MOB تأثیری بر افعال تولید مثلی ندارد اما آسیب دیدگی یا غیرفعال شدن ژنتیکی VNO و پیاز بویایی فرعی به شدت رفتارهای جنسی و تولید مثلی و پردازش داده های مربوط به آنها را محدود میکند.

(۲۵-۴۵)

همانگونه که از ^(شکل ۴-۴) پیداست آکسونهای نورونهای VNO به MOB وارد نمی شوند بلکه در داخل پیاز بویایی دیگری به نام پیاز بویایی فرعی به (Accessory olfactory bulb; AOB) وارد می شوند. این ناحیه در قسمت پشتی و بالایی پیاز بویایی اصلی قرار دارد که در مقطع به شکل نیمکره است. سپس آکسونهای نورونهای AOB به صورت رشته های عصبی موازی با آکسوهای برخاسته از MOB و به همراه آنها با قسمتهای مختلف کورتکس بویایی سیناپس می دهند.

قسمتهای اصلی کورتکس بویایی: (۳، ۴)

۱- Anterior olfactory nucleus (AON): که وظیفه اتصال دو پیاز بویایی اصلی را دارد.

۲- Piriform cortex (PC): که محل تشخیص انواع بوها از یکدیگر است.

۳- Olfactory tubercle (OT): که دریافت کننده یکسری پیامها از مغز وسطی است

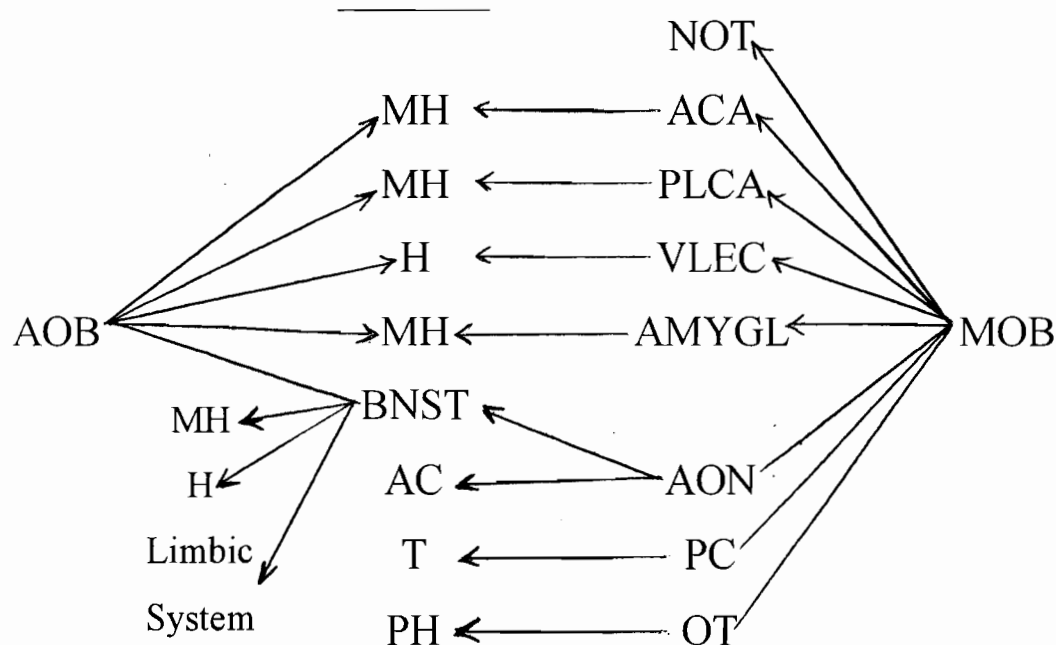
۴- Corticomedial parts of the Amygdala (AMYG): که دریافت کننده فیبرهای عصبی از پیاز بویایی است.

۵- A part of entorhinal cortex (TEC): که دریافت کننده بعضی از داده های بویایی

و انتقال آنها به هیپوکامپوس است.

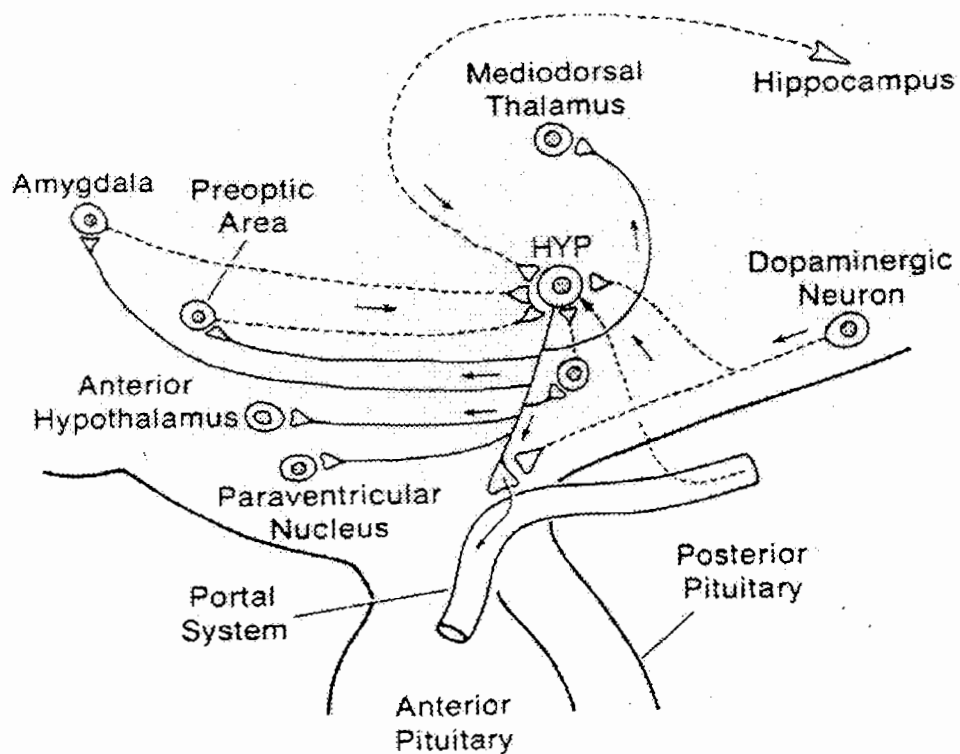
دیگر ارتباطات پیاز بویایی اصلی و فرعی با دیگر مراکز مغزی را می توان بدین ترتیب

خلاصه نمود. شکل (۴-۴) و (۴-۶) و (۴-۷)

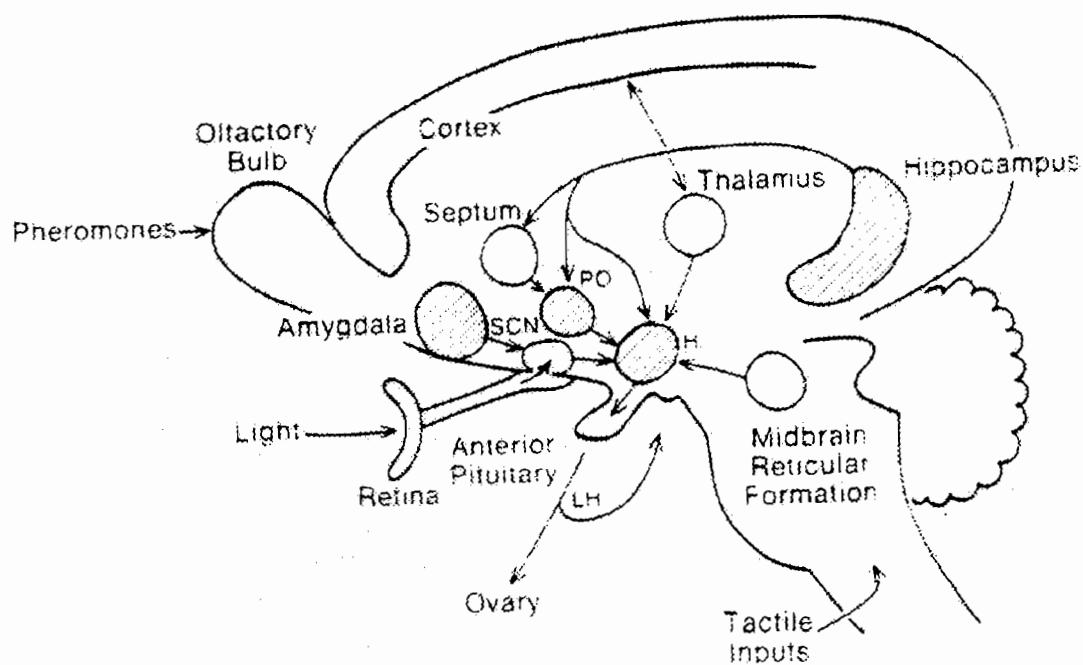


NOT: Nucleous of the olfactory Tract
ACA: Anterior Cortical Amygdala
PLCA: Posterolateral Cortical Amygdala
VLEC: Ventrohateral Entorhinal Cortex
H: hippocampus
PLHT: Posterolateral hypothalamus
T: Thalamus
AC: Anterior Commissure
AON: Anterior Olfactory Nucleous
PH: Posterior Hypothalamus
OT: Olfactory Tubercle
MH: Medial Hypothalamus
AMYG: Amygdala
BMST: Basal Nucleous of Stria terminalis

ارتباطات بین تمام مراکز مورد بحث یعنی MOB و AOB با دیگر مراکز عالی مغز در طی تحقیقات مختلف و با استفاده از محرومیت‌های حسی به عنوان روشی جهت مطالعه ساختمان و عمل نوروها، تاثیر آنها بر یکدیگر و تاثیر تحریکات حسی بر روند رشد و ارتباط آنها با یکدیگر مشخص شده است. این تحقیقات از قرن ۱۹ م آغاز گردید. با آزمایشات جونز و توماس (Jones & Thomas؛ ۱۹۶۲) و پاول (Powell؛ ۱۹۶۷) تکمیل گردید. در طی تحقیقات انجام شده مشخص گردید که محرومیت‌های حسی یا نرسیدن تحریکات حسی به مغز علاوه بر تغییرات مورفولوژیک در نوروها و سیناپسها، تغییرات بیوشیمیایی نیز به همراه دارد.



شکل (۶-۴): مراکز مغزی که در کنترل ترشحات هیپوتالاموس دخالت دارند.

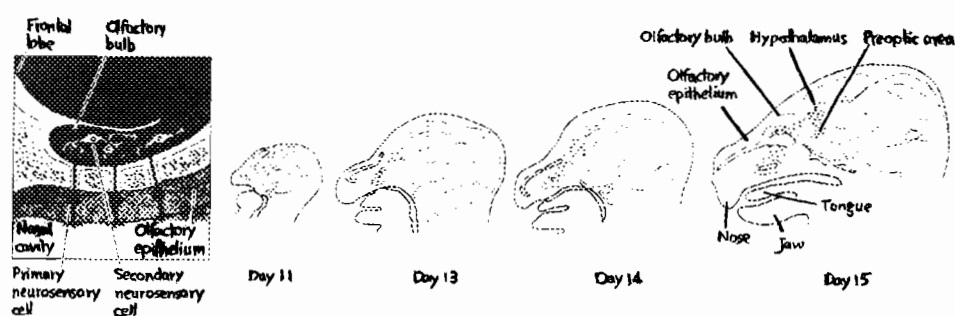


شکل (۷-۴): مراکز مغزی که در کنترل ترشح گنادوتروپینها دخالت دارند.

از طرف دیگر در اواخر قرن ۱۹ م جان مکنزی (John Mackenzie) محقق دانشگاه جان هاپکینز به این نتیجه رسید که شباهت جالبی بین رشد و نمو آلت تناسلی جنس نر پستانداران و ساختار حسگر موجود در بینی وجود دارد. این تحقیق ابتدا روی مردی با آلت تناسلی کوچکتر از حد نرمال که فاقد حس بویایی بود آغاز شد. فقدان حس بویایی بدین معنی است که اعصاب بویایی در مغز و نورونهای حسگر بویایی در اپیتلیوم بویایی وی یافت نشد. این بیماری مادرزادی بنام سندرم کالمن شناخته شد (Kallmann syndrom) که بیماری ژنتیکی وابسته به کروموزم X است و با علائمی مانند فقدان حس بویایی، اندامهای تناسلی کوچک و گندهای تکامل نیافته شناخته می شود. مکنزی در طی تحقیقات خود روی این فرد به این نتیجه رسید که عدم رشد اندامهای تناسلی و وجود گندهای تکامل نیافته درونی به دلیل عدم ترشح فاکتورهای آزاد کننده گنادوتروپینها از هیپوتالاموس بوده است. عدم ترشح GnRH عواقبی مانند عدم ترشح هورمونهای FSH و LH از هیپوفیز پیشین را در پی داشت که در رشد و بلوغ اندامهای تناسلی و گندها نقش اساسی دارند. در ادامه روند تحقیقات دانشمندان به این نتیجه رسیدند که نورونهای ترشح کننده GnRH منشأ هیپوتالاموسی ندارند بلکه آنها از اپیتلیوم بویایی واقع در VNO منشأ میگیرند این نورونها در زمان جنینی از اندام و مرونزال که در انسان بسیار کوچک است جدا شده و به تدریج به ناحیه هیپوتالاموس مهاجرت می کنند.

نورونهای حسگر بویایی هم از همین محل منشأ گرفته اند. لذا می توان نتیجه گرفت که عدم بوجود آمدن این گروه از نورونها در زمان جنینی باعث عدم بوجود آمدن نورونهای مترشحه

GnRH شد. بعدها معلوم شد که ابتدا آکسونهای نورونهای حسگر بویایی مسیر خود را به طرف مغز و پیازهای بویایی می یابند و سپس نورونهای مترشحه GnRH به دنبال آنها به مغز راه میابند. ژنی که فقدان آن یا وجود آنرمالی در آن باعث بروز این پدیده می گردد شناخته شده است. (۲۱) شکل (۸-۴)



شکل (۸-۴): مدلی برای علت یابی سندرم کالمن

در آزمایش دیگر وجود اعصابی به نام Terminal nerves یا Nerves Terminalis (NT) ثابت شد. این اعصاب و نورونها ارتباطات پیچیده ای را از حفره بینی تا مغز تشکیل می دهند. بدین ترتیب که از حفره بینی به طرف مغز گسترش یافته ، از AOB گذشته و در پشت آن با دیگر نورونهای حد واسط سیناپس می دهند بعدها پیشنهاد شد که سلولهای ترشح کننده GnRH از سلولهای پیش ساز این نورونها برخاسته باشند که از حفره بینی به هیپوتالاموس مهاجرت کرده اند. چنانکه در بعضی ماهیها مثل کوسه ها گانگلیونهایی از این نورونها و اعصاب در تمام مغز پراکنده اند که تجمع زیادی از نورونهای ترشح کننده GnRH در آنها دیده شد. (۴۵)

بخش پنجم

نتیجه گیری

Conclusion

نتایج بررسیهای آماری از باز شدن منفذ واژن و هیستولوژیکی از تخمدان حیوان ماده نشان میدهد که باز شدن زودرس دهانه واژن در جنس ماده صرفاً یک پدیده ظاهری و مورفولوژیکی نیست، چنانکه باز یار نیز در رساله خود به این نکته اشاره می کند. به عبارت دیگر این پدیده در ادامه وقوع یکسری تحولات زودرس در تخمدان و دیگر اندامهای مرتبط با پدیده تولید مثل است. بنظر می رسد که این تسریع و زود رسی در بلوغ در نتیجه تولید پیش از موعد و ترشح GnRH از هیپوتالاموس است که محرک اولیه و اساسی بقیه تحولات در اندامهای جنسی است.

با نتیجه گیری از مطالب ذکر شده قبلی می توان گفت که هیپوتالاموس شدیداً تحت تاثیر دریافت هایی از مناطق هیپوکامپوس، آمیگدالا، تالاموس و ناحیه پره اپتیک است. همچنین اتصالات و ارتباطات بین آمیگدالا و هیپوتالاموس در تجزیه و تحلیل جنبه احساسی و هیجانی تحریکات بویایی بسیار مؤثر هستند. از طرف دیگر در بین نورونهای مترشح کننده سایر فاکتورهای آزاد کننده در هیپوتالاموس فقط نورونهای ترشح کننده GnRH از نورونهای موجود در اپیتلیوم بویایی بخصوص از VNO منشأ گرفته اند لذا با وجود همه این مدارک می توان پیش نظریه های زیر را در جهت تقویت مشاهدات انجام شده در جنس ماده بیان نمود:

- ۱- در سانس این گیاه ترکیبی وجود دارد که همانند فرومونها عمل کرده و با تحریک گیرنده های VNO و سپس AOB باعث تحریک دیگر نواحی در ارتباط با راههای بویایی علی-الخصوص آمیگدالا می شود و چون هیپوتالاموس و نواحی ترشح کننده RH شدیداً تحت تاثیر

نواحی مذکور هستند و از طرف دیگر نورونهای ترشح کننده GnRH از اپیتلیوم بویایی واقع در VNO منشأ گرفته اند و در ارتباط کامل با نورونها NT و دیگر راههای بویایی نیز هستند، در اثر تحریکات حاصل از استشمام اسانس این گیاه تحریک شده و هورمون GnRH پیش از موعد مقرر ترشح می شود که اثرات دیگر را به دنبال دارد و در کل باعث تسریع در روند تکامل تخمدان می-شود.

۲- استشمام بوی تند اسانس باعث تحریک متوالی گیرنده های بویایی در اپیتلیوم بویایی و نورونهای حد واسط در MOB می شود. تحریک مداوم این نورونها باعث تحریک نورونهای سیستم لیمبیک شده و در ادامه نورونهای ترشح کننده GnRH در هیپوتالاموس تحریک میشوند. اما اینکه کدامیک از این پیش نظریه ها نزدیک به واقعیت است نیاز به تحقیقات پیچیده تر بیوشیمیایی - مولکولی و تجهیزات گسترده تر هست و به راحتی نمی توان درباره این مشاهدات قضاوت کرد. از این رو همچنان سؤالاتی از این قبیل باقی می ماند که آیا استشمام هر اسانسی با بوی تند این تأثیرات را خواهد داشت ؟ آیا این تسریع بلوغ در حیوانات نر هم قابل مشاهده است؟ استشمام مداوم این اسانس در انسان چه تأثیراتی دارد؟ آیا تسریع بلوغ در انسان هم دیده می شود؟ آیا می توان از طریق استشمام اسانس این گیاه مشکلات زنانی را که دچار عدم خونریزی ماهیانه هستند مرتفع نمود؟ (برخی شواهد نشان از این تاثیر دارند). چه ترکیبی در اسانس این گیاه وجود دارد که همانند فرومونهای پدید آورنده بلوغ عمل می کند ؟

امید است در آینده ای نزدیک بتوان به پاسخهای قاطعی برای این سوالات دست یافت.

خلاصه (Abstract)

در راسته چونندگان تأثیر دریافتهای حسی مانند محرکهای بویایی در پدیده های بلوغ و تولیدمثل ثابت شده است. همچنین اهمیت دستگاه نورواندوکرینی هیپوتالاموس و هیپوفیز در کنترل این پدیده ها مسلم است.

در این تحقیق سعی بر آن بود که اثر استشمام مداوم اسانس تند گیاه آویشن شیرازی به عنوان یک محرک شیمیایی بویایی در تسریع فرایند بلوغ موش خانگی ماده بررسی گردد. شواهد بافت شناسی و مورفولوژیکی نشان داد که استشمام مداوم این اسانس باعث تسریع فرایند بلوغ در حیوان ماده می گردد، لذا بنظر می رسد ارتباطات عصبی قابل ملاحظه ای بین مراکز بویایی و دستگاه مذکور باشد که نیاز به بررسیهای بیشتری دارد.

بخش ششم

مراجع

References

کتاب، مجلات و رساله های فارسی و انگلیسی

- ۱- احمد رضا نیاورانی، فیزیولوژی پزشکی گایتون، موسسه فرهنگی انتشاراتی تیمورزاده، نشر طبیب، تابستان ۷۵.
- ۲- اسماعیل اژدری، درمان بیماریها به روش سنتی، انتشارات یاس، زمستان ۷۴.
- ۳- اشرف شبانی، رساله با موضوع "مراحل بلوغ و تکامل پس از تولد سلولهای عصبی در پیاز بویایی موش صحرایی (Albinorat)"، دانشکده زیست شناسی دانشگاه تهران، ۵۹-۱۳۵۸.
- ۴- الهه نوش فر، رساله با موضوع "اثر محرومیت بویایی نوزادی بر سلولهای پیاز بویایی مغز موش"، دانشکده زیست شناسی دانشگاه تهران، ۵۹-۱۳۵۸.
- ۵- حسن ابراهیم زاده، زیست شناسی عمومی (گیاهی و جانوری)، مرکز نشر دانشگاهی تهران، چاپ اول ۱۳۷۹.
- ۶- روبرت توماس آر، زیست شناسی مهره داران، مرکز نشر دانشگاهی تهران، چاپ اول ۱۳۷۸.
- ۷- ژان شاتونه، آشنایی با گیاهان دارویی (روش شناخت، تهیه و مصرف)، ابراهیم ماکوئی، طهران، نشر روز، چاپ اول، ۱۳۷۸.
- ۸- شهرزاد بازیار، رساله با موضوع "تحریک شیمیایی حس بویایی و پیش رسی احتمالی بلوغ جنسی در موش خانگی"، موسسه آموزش عالی علمی، ۷۸-۱۳۷۷.
- ۹- شهلا امامیان، رساله با موضوع "بررسی کمی و کیفی ساختمان پیاز بویایی موش و تاثیر قطع عصب بویایی در آن"، دانشکده زیست شناسی دانشگاه تهران، خرداد ۱۳۵۹.
- ۱۰- علی زرگری، گیاهان دارویی، موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، چاپ ششم، پاییز ۱۳۷۶.
- ۱۱- محسن پویان، گیاهان دارویی جنوب خراسان، نشر دانش، مشهد، ۱۳۶۸.
- ۱۲- محمد صادق رجحان، اطلس بافت شناسی، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۶۸.
- ۱۳- مسلم بهادری، فن آسیب شناسی و روشهای رنگ آمیزی، انتشارات دانشگاه تهران، بهمن ماه ۱۳۶۹.

۱۴- معصومه فیروزی، رساله با موضوع "تاثیر قطع اعصاب بویایی، قطع پیاز بویایی یا انزوای کامل عصبی و فعالیت آنزیمهای استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز در پیاز بویایی موش در حال نمو"، دانشکده زیست شناسی دانشگاه تهران، ۵۹-۱۳۵۸.

15-Dale purves a , Neuroscience, Sinaure Associate/ inc.2001.

16-Gordon M. Shepherd, Neurobiology, oxrford university press,3rd. ed.

17-Muhammad shaiq Ali , H. E. J.Research instituteof chemistry,university of karachii, Pakistan,1999.

18-P.R.Wheater, Functional histology, Churchill Living stone, 1987.

19-R.A.B. Drury and ... , Carleton's histological technique, Oxford university press, 1967.

20-R.C.Palela, A text book of cytology ,cell biology and molecualr biology , Vai parkash Nath & co.

21- Scott . F. Gilbert, developmental biology, Sinauer Associate/ Inc.1997.

22-Sheehar and Dezna C, Theory and practice of histochrology The C.V. Mosby company , 1973.

23-Eric B. Kevernc,science286,5440(1999)

24-Kensaku Mori,science286,5440(1999)

25-J.comp.neural,141:331-344

26-L. B. Back and R. Axel,cell65,175(1991)

27-Science,vol284,5610

28-Science,vol299,5974

29-Science,vol284,5432

30-Trese Leinders,Nature,405,6788(2000)

منابع اینترنتی

- 31- <http://213.176.24.20/Issues/V18N1/Volatile.htm> .
- 32- <http://www.1.tumus.ac.ir/daru/DaruVolum10-No2-2002/zataria.htm>.
- 33- www.pubmed.com.
- 34- <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/mus/m.-musculus>.
- 35- <http://www.pestproducts.com/mico.htm>.
- 36- http://www.amonline.net.Au/factsheets/house_mouse.htm.
- 37- http://www.imp.ucdavis.edu/pmg/PESTNOTES/pn_483.html
- 38- http://www.digimorph.org/specimens/Mus_musculus/M.m.
- 39- <http://www.informatics.jax.org/silver/2.3.shtml>.
- 40- http://www.geocities.com/herbal_export/plants.htm
- 41- <http://www.Hahui.com/medic/medic9/tomillo.htm>
- 42- http://www.ecdc.net.cn/events/innovative07/innov_07-08.htm.
- 43- <http://213.176.24.20/Issues/V18N1/volatile.htm>.
- 44- http://www.1.Tumus.ac.ir/daru/Daruvolum10_No2_2002/zataria.htm.
- 45- <http://athena.neuro.fsu.edu/research/vomeronasal/briefTopicsBody.htm>.
- 46- <http://www.mocalester.edu/psych/whathap/diaries/diariesf96/kristi/diary3.htm>.
- 47- www.hhmior.org/news/dulac.htm.
- 48- <http://www.emagazine.com/november-december-1997/97g-health.html>.
- 49- <http://news.bbc.co.uk/1/hi/sci/tech/479363>
- 50- <http://alternative.com/Herbs2003/pageskavory0538.html>.
- 51- www.chemse.oupjournals.org.
- 52- <http://ibgwww.colorado.edu/ti-lab/publications/files/196.html>..