مطالعه اثر ZPA بر روی تکوین اندام حرکتی موتانت جوجه

● مریم شمس‌لاهیجانی ● الهام سلطانیان، گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه شهید بهشتی

مقدمه

یکی از زوایای مهم تکوینی اندام حرکتی تکوین سه محور مدیی - حدی[1] پشتی - شکمی[2] و قدامی خلفی[3] آن است.

قطبیت قدامی - خلفی اندام حرکتی، در حالت طبیعی، توسط نواری نازک از بافت در حاشیه خلفی صورت می‌گیرد (۷ و ۳۵). این ناحیه به نام ناحیه فعالیت قطبی[4] ZPA خوانده می‌شود. اگر به حاشیهٔ قدامی جوانه، دیگر پیوند زده شود، جوانه مضاعف[5] با تصویر آئینه‌ای ساخته می‌شود (۳۵). ویژگیهای انگشتان به فاصلهٔ پیوند از ZPA بستگی دارد. آزمایشهای اخیر نشان داده‌اند که ZPA می‌تواند قطبیت از بین رفته در سلولهای مزودرم جدا شدهٔ اندام حرکتی را به آنها برگرداند، و ثابت شده‌است که در واقع ZPA به صورت یک مرکز ریخت‌زا[6] عمل می‌کند تا ارزشهای موضعی[7] سلولها را در طول محور A-P بسازد، اینکار به وسیله انتشار یک ماده ریخت‌زا[8] صورت می‌گیرد.

اخیراً ثابت شده است که رتینوئیدها ممکن است نقش عمده‌ای در تشکیل فرم و الگو[9] داشته باشند (۹، ۲۵ و ۲۶)؛ یک نوع از رتینوئیدها، اسید رتینوئیک است که در تشکیل اندام حرکتی شرکت می‌کند؛ وقتی قطعهٔ کوچکی از آگار آغشته به RA[10] به حاشیهٔ قدامی جوانهٔ بال جوجه پیوند زده می‌شود، محور A-P مضاعف می‌شود زیرا از این قطعه RA آزاد می‌شود (۲۶). در اندام حرکتی جوجه، RA (یا پیوند سلولهای ZPA) باعث می‌شود تا سلولهای قدامی ساختارهای خلفی‌را بسازند زیرا که ژنهای کمپلکس HOX_4[11] فعال می‌شوند. ژنهای HOX_4 موقعیت سلولها را درطول محور A-P جوانه مشخص می‌کنند (۲۲، ۲۳، ۳۹ و ۴۸).

فاکتورهای رشدفیبروبلاستی[12] و ترانسفورمینگ[13] نیز در اوایل دوران جنینی بیان می‌شوند و می‌توانند بخشی از سیستم سیگنالی آندوژنوز[14] باشند (۲۶). فاکتورهای رشد نقش عمده‌ای در بر هم‌کنش[15] اکتودرم - مزودرم دارا هستند و سیگنالهایی راکه توسط AER[16]، PZ[17] و ZPA تولید می‌شوند، تنظیم می‌کنند (۶، ۹، ۱۰، ۱۵، ۲۵ و ۴۳).

جوانهٔ اندام حرکتی جوجه طبیعی و موتانت تالپید ۳ [18](شبیه تالپید ۲) دارای ZPA طبیعی هستند. برای اثبات این فرضیه ZPA طبیعی و تالپید ۳ به اندام حرکتی که سلولهای مزودرمی جدا شده، طبیعی (و یا تالپید ۳) دارد، اضافه شد تا اثرات ZPA تالپید ۳، در مقایسه با ZPA طبیعی در تکوین اندام حرکتی مطالعه و بررسی شود.

مواد و روشها

تخم مرغهای نژاد لگهورن[19] به مدت ۳-۲ روز در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد در ماشین جوجه‌کشی[20] گذاشته شده و چهار ساعت قبل از آزمایش پوسته و بخش پهن تخم مرغ جدا گردید تا جنینهای طبیعی و تالپید ۳ مشخص شوند (۱). سپس با چسب اسکاچ دهانه باز شده مهر و موم گردید و به ماشین جوجه‌کشی برگردانده شد تا به مرحله تکوینی مورد نیاز طبق مراحل Hamilton و Hamburger برسند.

دهنده‌های اکتودرمی (طبیعی) از مرحلهٔ ۲۳-۲۲ و مزودرمی (طبیعی و تالپید ۳) از مرحلهٔ ۲۱-۱۹ انتخاب شدند. جنین میزبان کمی جوانتر از مرحله ۲۳ انتخاب شد تا التیام بالهای آن پس از پیوند بهتر صورت بگیرد. برای آماده کردن کلاهک اکتودرمی، جنینهای طبیعی در محلول HS-T[21] (۴۶) سرد (۴ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شدند و جوانهٔ اندام حرکتی خلفی از ناحیه پهلو توسط دو پنس ظریف جداگردید. جوانه‌ها با محلول تریپسین[22] ۰/۵ در CMF[23] آغشته شده، در حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد (در یخچال) برای ۲ تا ۳ ساعت قرارداده شدند (۲).

برای تهیهٔ دهندهٔ مزودرم جنینهای طبیعی و تالپید ۳ (۱) به دو پتری دیش پر از Tyrode سرد منتقل شدند و جوانهٔ اندام حرکتی خلفی (یا) مثل جنینهای طبیعی قطع گردید و با تریپسین (در CMF) در لوله‌های جداگانه تیمار شده، برای ۳۰-۲۰ دقیقه در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس، روکش اکتودرمی جوانه پا توسط سوزن تنگستن نازکی جدا گردید و مزودرمها در CMF، درحرارت اطاق، برای ۱۰ دقیقه قرار داده شدند و بعداً با T-HS (۱:۲) برای ۵-۴ دفعه شستشو داده شدند تا اثرات تریپسین شسته شود و اثر آنزیمی آن متوقف گردد. مزودرم از پیپت ظریف[24] ۲۴ (۰/۷mm) گذرانده شد تا سوسپانسیون سلولی به دست آید. سپس پس از عبور از فیلتر نی تکس[25]، سلولهای مجزای منفرد تهیه گردید. تمام لوله‌ها باسرعت ۷۰۰ دور در دقیقه برای ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند، تا پلت[26] به دست آید. پلتهای مزودرم طبیعی و تالپید ۳ حرارت ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، برای یکساعت انکوبه شدند و در محیط T-HS تازه برای ۲ ساعت قرار داده شد. پلتها تا آماده شدن کلاهک اکتودرمی، در حرارت اطاق حفظ و نگهداری شدند.

دهنده‌های اکتودرمی نیز به پتری دیشهایی که محتوی T-HS (۱:۲) بوده و قبلاً سرد شده بودند منتقل و در زیر میکروسکوپ استریو M5 (X25) با صفحه و نور سرد، قرار داده شد. پلت و دهنده ZPA (طبیعی و تالپید ۳) در مجاور دهنده‌های اکتودرمی گذاشته شد و پلتها به اندازهٔ حجم کلاهکهای اکتودرمی تقسیم گردیدند، سپس کلاهکهای اکتودرمی از مزودرم جوانه دهنده جدا گردیدند و پلتهای مناسب با اندازهٔ کلاهکها به سرعت (برای جلوگیری از چروکیده شدن اکتودرم) در درون دهنده‌های اکتودرمی قرار گرفتند. سپس، یک قطعه از ZPA، که از ناحیه خلفی جوانه جدا شده بود، به مرز خلفی، در درون کلاهک اکتودرمی اضافه گردید.

مزودرمهای دهنده‌های اکتودرمی جداگردید و دور انداخته شدند و ترکیبات زیر در حرارت اطاق (۲۱-۲۵ درجه سانتی‌گراد) برای ۳-۲ ساعت نگهداری شدند:

۱- مزودرم طبیعی با ZPA طبیعی در کلاهک اکتودرمی طبیعی.
۲- مزودرم تالپید ۳ با ZPA تالپید ۳ در کلاهک اکتودرمی طبیعی.
۳- مزودرم طبیعی با ZPA تالپید ۳ در کلاهک اکتودرمی طبیعی.
۴- مزودرم تالپید ۳ با ZPA طبیعی در کلاهک اکتودرمی طبیعی

در تمام آزمایشها، ZPA در مکان مناسب خود، در مرز خلفی، قرار داده شد.

ترکیبات جدید برای ۳-۲ ساعت در حرارت اطاق ۲۱-۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. آنهایی که چروکیده شده بودند، استفاده نشد، ولی ترکیبات باقی مانده به سمت پشتی بال جنین میزبان (جوجه طبیعی) در طول محور P-D، درون یک شکاف، پیوند زده شد و برای ۱۱-۱۰ روز در ماشین جوجه‌کشی قرار داده شدند (۱).

۲۴ساعت پس از جراحی، جنینهای از بین رفته حذف گردیدند و باقیمانده ۱۱-۱۰ روز پس از پیوند ثابت و رنگ‌آمیزی شدند.

برای رنگ‌آمیزی استخوان و غضروف از مخلوط الکل (۹۵٪ - ۸۰ml)، اسید استیک گلاسیال (۲۰ ml)، آلسیان بلو[27]، ۸GX (۱۰mgr)، و سپس از KOH و آلیزارین قرمز[28] استفاده و نمونه‌ها در گلیسرین نگهداری گردید. با این روش، استخوان قرمز و غضروف آبی رنگ شد. سپس از نمونه‌ها عکس گرفته شد و با استفاده از دوربین آینه‌دار[29] ترسیم گردید.

چکیده
استفاده از موتانت یکی از روشهای متداول برای مطالعه زوایای مختلف تکوین جنین است. نتایج آزمایشهای انجام شده نشان می‌دهند که بین ZPA تالپید ۳ و جوجه طبیعی تفاوتهایی وجود دارد. ZPA تالپید ۳ توانایی ZPA طبیعی را برای ایجاد قطبیت در اندام حرکتی دارا نیست. در این تجربیات، ZPA اندام حرکتی طبیعی ظرفیت بیشتری به عنوان تشدیدکنندهٔ رشد و تعیین کننده قطبیت دارد. جالب اینکه، نه تنها در طول محور مبدیی - حدی، بلکه در طول محور قدامی - خلفی نیز رشد بیشتری دیده می‌شود. ZPA تالپید ۳ اثر تکوینی ندارد و اگر هم داشته باشد آنقدر ضعیف است که بر تمایز سلولها اثر نمی‌گذارد. در تمام تجربیات، ترتیب مبدیی - حدی اندامها حفظ شده‌است، اگر چه بعضی از اجزاء ساخته نمی‌شوند.

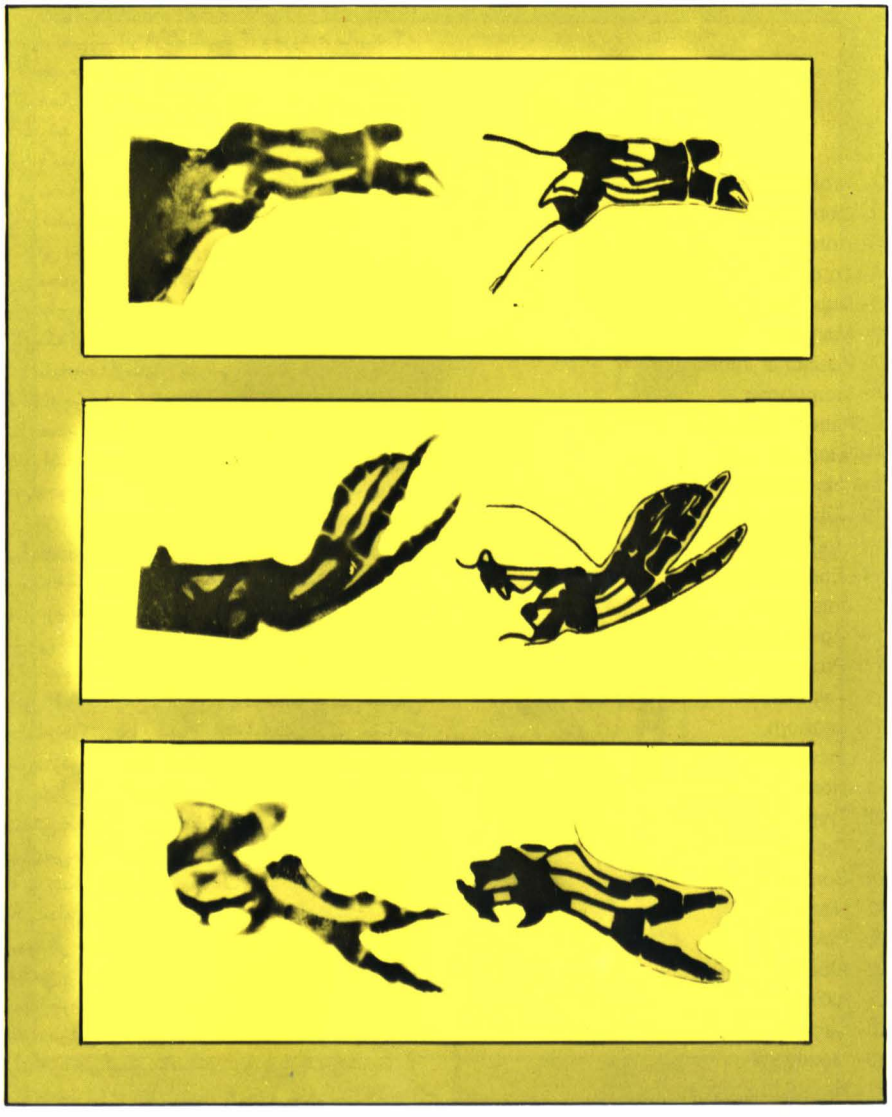
مشاهدات و نتایج

در مجموع، ۱۹ اندام حرکتی (پیوند) با مزودرم طبیعی و ZPA طبیعی بدست آمدند. از این تعداد، ۹ پیوند قابل تشخیص نبودند و فقط یک مورد اندامی شبیه ران ساخته شد. ۳-۲ متاتارسال ۳۰ در هر پا تشکیل گردید. در ۱۰ اندام حرکتی انگشت، درشت نی و نازک نی دیده می‌شد. ولی همگی انگشتان II یا III داشتند (شکل شماره ۱). به طور کلی، این پیوندها بیش از پیوندهایی که مزودرم جدا شدهٔ طبیعی بدون ZPA داشتند، در طول محور P-D به طور عام و در طول محور A-P به طور خاص، رشد کردند. در پیوندهایی که ZPA وجود داشتند، متاتارسال و انگشتان بیشتری رشد کرد (شکل شماره ۱).

تعداد پیوندهای شامل مزودرم طبیعی و ZPA تالپید ۳، پنج عدد بود. از این تعداد فقط یک اندام حرکتی با درشت‌نی، نازک‌نی، دو متاتارسال و دو انگشت I (؟) و II (؟) ساخته شدند (شکل شماره ۲). دو تا از پیوندها دو انگشت (یکی طبیعی و یکی شبیه تالپید ۳) داشتند. اختلاف فاحشی بین این نتایج و آنهایی که با مزودرم طبیعی و بدون ZPA بودند، دیده شد. تعداد پیوندهایی که مزودرم و ZPA تالپید ۳ داشتند، به ۴ اندام می‌رسید، همگی شبیه اندامهای تالپید ۳ و مشابه با آنهایی بودند که ZPA نداشتند، دو انگشت در همهٔ موارد ساخته شد (شکل شماره ۳).

تعداد پیوندهایی که مزودرم تالپید ۳ و ZPA طبیعی داشتند، به ۶ اندام حرکتی می‌رسید. همگی اندام حرکتی تالپید ۳ با دو انگشت ساختند (شکل شماره ۴). قطبیت بین متاتارسالها، در طول محور A-P، نسبت به آنهایی که فقط مزودرم تالپید ۳ داشتند، بیشتر بود.

به طور خلاصه، فقط یک گروه از آزمایشها (مزودرم طبیعی با ZPA طبیعی)، اندامها تحت تأثیر فاحش قرار گرفته بودند و اجزاء بیشتری در طول محورها ساخته شده بود ولی در طول محور A-P قطبیت دیده نمی‌شد (جدولهای شماره ۱، ۲ و ۳ و گرافهای شماره ۱ و ۲).



شکل شماره ۱
پیوندهای ۱۱-۱۰ روزهٔ ساخته شده از مزودرم جدا شده و تجمع یافتهٔ طبیعی به اضافه ZPA طبیعی در مرز خلفی، در کلاهک اکتودرمی طبیعی.

تصاویر سمت راست:
نواحی روشن = استخوان.

بحث

در تشکیل اندام حرکتی، سه ناحیهٔ رشد مؤثر دخالت دارد:
AER. ZPA, PZ, AER برای تشکیل محور P-D ضروری است و PZ سیگنالهایی برای تشکیل اجزاء اندام حرکتی از AER و ZPA دریافت می‌دارد(۶و ۲۰).
نتایج آزمایشهای بسیاری نشان داده‌اند که ZPA، بخشی از ناحیهٔ خلفی اندام حرکتی، اثر ریختزا بر

تکوین اندام حرکتی دارد (۶، ۷، ۱۰، ۱۴، ۱۹، ۲۵، ۲۶، ۲۸، ۲۹، ۳۶ و ۴۵). در تجربیات Summerbell وجود یک سد میلی‌پور در بین نیمه‌های قدامی و خلفی اندام حرکتی، در طول محور P-D، منتهی به ایجاد اندام حرکتی ناقص می‌شود. میزان نقص به مرحلهٔ آزمایش و محل سد بستگی دارد. وقتی سد فقط ZPA را جدا می‌کند، اندام حرکتی با نقص بیشتری شکل می‌گیرد و وقتی که ZPA را در بر می‌گیرد، اندام حرکتی ساخته شده طبیعی است. براساس تئوری Summerbell، یک مادهٔ ریخت‌زا از ناحیهٔ خلفی به سمت ناحیهٔ قدامی انتشار می‌یابد (۱۰). غلظت این ماده ارزش موضعی سلولها را در طول محور A-P تعیین می‌کند و باعث رشد نامتقارن اجزاء اندام حرکتی در طول این محور می‌شود (۱۹).

وقتی ZPA در ناحیهٔ قدامی، در زیر AER قرار می‌گیرد، اندام حرکتی مضاعف را القاء می‌کند و باعث ضخیمتر شدن AER و وسیعتر شدن PZ می‌شود (۳۶، ۳۷ و ۴۵) و اندامی با تقارن دو طرفه می‌سازد و به این ترتیب اکتودرم را القاء می‌کند تا AER بسازد. شواهد نشان داده‌اند که ZPA در طول تکوین اندام حرکتی فعال نیست، ولی پس از پیوند به نوک بال یا استقرار در جوار مزودرم جدا شده‌ای که در درون کلاهک اکتودرمی قرار گرفته است، فعال می‌شود (۶، ۷ و ۲۸)، زیرا تکثیر سلولهای مجاور ZPA افزایش می‌یابد (۱۰).

اندامهایی که مزودرم و ZPA اضافه و طبیعی دارند، در طول محور A-P بیشتر رشد می‌کنند (شکل ۱) و متاتارسال و انگشتان بیشتری می‌سازند، اما وقتی اندام حرکت فقط مزودرم طبیعی دارد، چنین نتیجه‌ای به دست نمی‌آید.

تعداد کمی از اندامهای حرکتی پولاریتهٔ نامتقارن در طول محور A-P نشان می‌دهند که احتمالاً به دلیل اختلافات در تعداد سلولها است. از طرف دیگر اگر سلولهای جدا شده به طریقی دوباره تشکیل شوند و اندامهایی با پولاریته در طول محور A-P بسازند، انتظار می‌رود که کلید اندامها این چنین باشند، همانطور که محور P-D در تمام اندامهای با سلولهای جدا شده به طور کامل حفظ شده است.

گر چه تعداد اندامهای حرکتی ساخته شده با مزودرم طبیعی ZPA اضافی طبیعی کمتر از اندامهایی با مزودرم طبیعی بدون ZPA اضافی بودند، تعداد اندامهایی که اجزاء بیشتری (بویژه انگشت) ساختند، در کل بیشتر بود. نتایج، قطبیت در طول محور A-P را به نمایش می‌گذارد ولی در طول این محور رشد بیشتر است (شکل شماره ۱). باید توجه داشت که در آزمایش با تالپید ۲، ۲۷ اندام از ۴۶ مورد به رشد اندام حرکتی دارای قطبیت انجامید.

ZPA در مراحل اولیهٔ ریخت‌زایی اندام حرکتی فعال نیست. در مرحلهٔ ۱۷ جنینی در حاشیهٔ خلفی، اندام حرکتی ظاهر می‌شود، و در طول تکوین اندام حرکتی به طرف انتهای حدی آن حرکت می‌کند و تا مرحلهٔ ۲۸ فعال باقی می‌ماند (۲۸).

می‌توان ZPA را با پیوند به نوک اندام حرکتی فعال کرد که باعث افزایش تعداد سلولها در آن محل و ضخیمتر شدن AER و وسیعتر شدن PZ می‌شود.

نتایج این آزمایش ثابت می‌کند که نقش ZPA نه تنها قطبیت دادن به محور A-P است، بلکه به عنوان فعال کنندهٔ رشد نیز عمل می‌کند. ظاهراً RA از ZPA آزاد می‌شود و سلولهای ناحیه قدامی به آن پاسخ می‌دهند. اگر RA از خارج تزریق شود، یک اندام مضاعف ساخته می‌شود (۱۰ و ۴۴). ممکن است RA مستقیماً (با تثبیت اطلاعات موضعی) بر سلولهای اندام حرکتی اثر بگذارد و یا اینکه با ایجاد ناحیه‌ای قطبی کننده، در انتهای حدی منبع RA، به طور غیر مستقیم عمل کند (۱۷). تولید سلولهای بیشتر احتمالاً به دلیل انتشار ماده ریخت‌زای بیشتر است که به تغییر ناگهانی غلظت آن در محیط می‌انجامد (۴، ۸ و ۹)، وقتی میزان آن به تعادل می‌رسد، رشد طبیعی ادامه می‌یابد. در واقع ممکن است به همین دلیل، اندام حرکتی با مزودرم طبیعی و ZPA طبیعی اندام حرکتی طبیعی‌تری نسبت به آنهایی که ZPA ندارد می‌سازد. با استفاده از نشانها ثابت شده است که می‌توان RA را یک ماده ریخت زا طبیعی به حساب آورد که توسط ZPA تولید می‌شود (۱۱ و ۱۲). RA در اندام حرکتی وجود دارد و ZPA غنی از رتینوئید است (۴۰ و ۴۱). علاوه بر این وقتی رتینول نشان دار به اندام حرکتی تزریق می‌شود به RA تبدیل می‌شود (۵، ۴۰، ۴۱ و ۴۲).

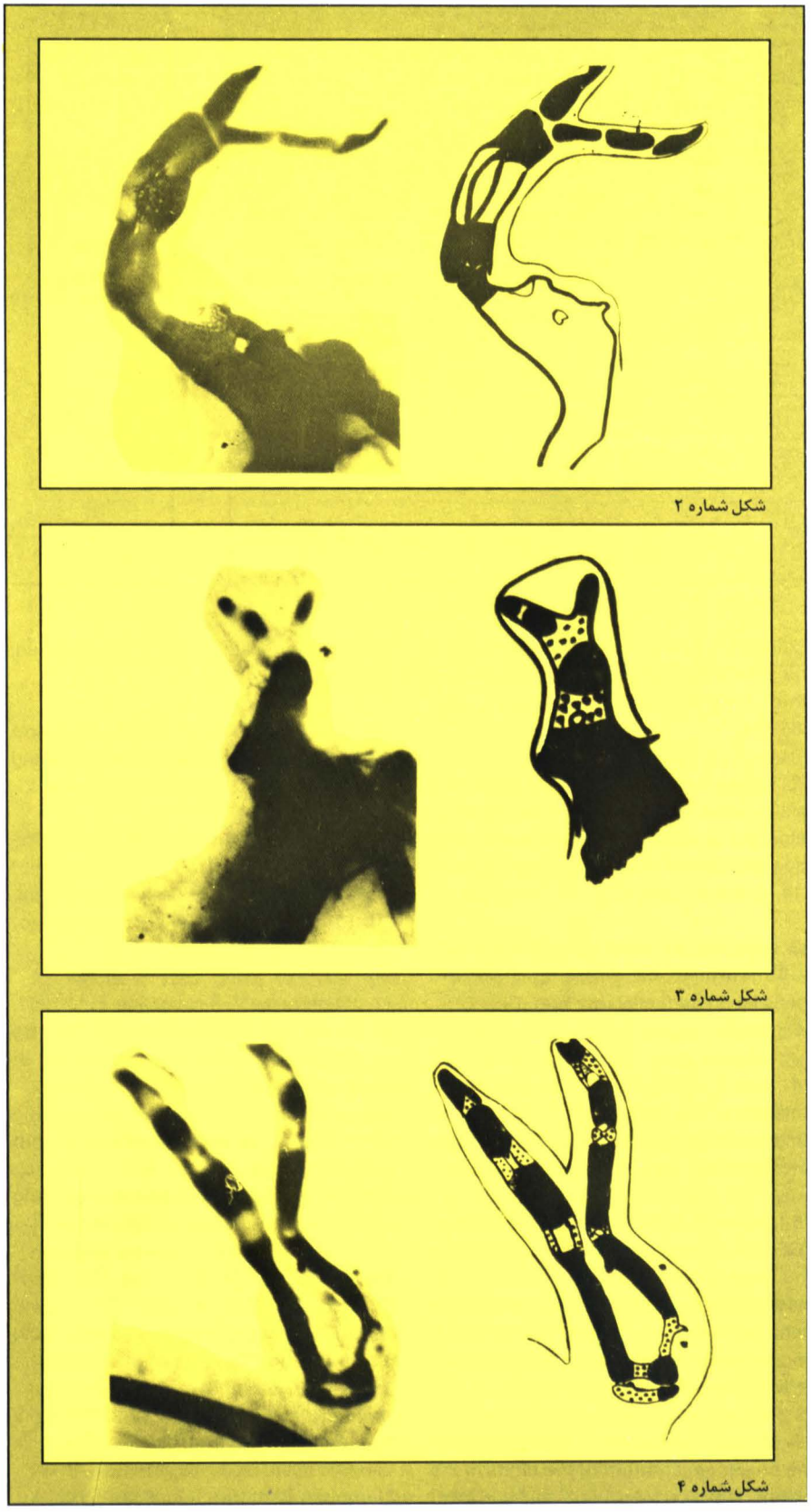
نتایج آزمایش با مزودرم طبیعی و ZPA تالپید ۳، مزودرم تالپید ۳ و ZPA تالپید ۳، و مزودرم تالپید ۳ و ZPA طبیعی، با نتایج بالا تفاوت دارد (شکلهای شماره ۲ و ۳). همگی مثل اندامهایی با مزودرم جدا شده و بدون ZPA رشد می‌کنند که مشابه اندامهای طبیعی حالات قبلی و اندامهای تالپید ۳ در دو حالت آخری بوده است. حتی مخلوطی از سلولهای طبیعی و تالپید ۳، اندامهایی دارای قطبیت در محور A-P نساختند. ممکن است که اختلافی بین اطلاعات موضعی سلولهای تالپید ۳ در طول محور A-P وجود نداشته باشد، چون غلظت مادهٔ ریخت‌زای تولید شده از ZPA برای انتشار بسیار کم است و یا اینکه انتشاری یکنواخت در طول محور A-P دارد. این نتیجه با آزمایش بررسی ژنهای هومیوباکس[31] (HOX) در تالپید ۳ مطابقت دارد، ژنهای HOX_4 در طول محور A-P اندام حرکتی تالپید ۳ بیان می‌شوند، بجای اینکه محدود به ناحیه خلفی آن باشد این نتیجه با عدم وجود قطبیت در انگشتان تالپید ۳ مطابقت دارد.

مزودرم طبیعی با ZPA اضافی تالپید ۳ اندامهایی می‌سازد که تفاوتی با اندامهای مزودرم طبیعی ندارند، درست مثل اینکه اثر ریخت‌زای ZPA وجود ندارد. مزودرم تالپید ۳ با ZPA تالپید ۳ اضافی یا با ZPA طبیعی اضافی، با اندام حرکتی که فقط مزودرم تالپید ۳ دارد، تفاوتی ندارد. پیوند نوک اندام حرکتی تالپید ۲ با محور A-P معکوس و یا پیوند نوک اندام حرکتی طبیعی به اندام حرکتی قطع شده تالپید ۲، اندام حرکتی مضاعف نمی‌سازد، در حالیکه چرخش نوک اندام حرکتی طبیعی و پیوند آن به اندام حرکتی طبیعی و پیوند آن به اندام حرکتی طبیعی یا تالپید ۲، باعث تشکیل اندام حرکتی دوبل می‌شود. بنابراین نتایج، تصور می‌شود که ZPA باعث تشکیل اندامهای مضاعف شده است و چون پیوند نوک اندام حرکتی که چرخش پیدا کرده است، چنین ساختار مضاعفی ساخته است، می‌بایستی دو ZPA طبیعی و تالپید ۲ وجود داشته باشد، که یکی در قدامی (نوک چرخش داده شده) و دیگری درخلفی (تالپید ۲) است. در این آزمایشها، ZPA تالپید ۳ توانایی زیادی برای متشکل کردن پولاریته، A-P و یا رشد بیشتر نشان نداده است. تنها دلیل این است که اندام حرکتی تالپید ۳ دارای نوعی ZPA است که بسیار ضعیف است و نمی‌تواند پیام خود را به سلولهای مجاور برساند.

اندام حرکتی مهره داران دستگاه و ابزار پیچیده مولکولی دارند که آنها را قادر می‌سازد تا به رتینوئیدها پاسخ دهند. یک نوع پروتئین سیتوپلاسمی که RA را متصل می‌کند، در نوک اندام حرکتی وجود دارد و می‌تواند میزان RA آزاد را در سلولها کنترل کند (۳۱). علاوه بر این یک نوع رتینوئید فعال ثانویه نیز در بال جوجه دیده شده است (۴۲). احتمالاً نوعی سیستم علامت دهنده متکی به رتینوئید در اندام حرکتی وجود دارد و البته پیشنهاد شده است که فعالیت قطبی در سلولهای حاشیهٔ قدامی اندام حرکتی (به سمت خلفی) توسط RA القاء می‌شود (۳۲).

پاورقی‌ها

1- Proximo-distal
2- Dorso-ventral
3- Antero-posterior
4- Zone of polarizing activity
5- Duplicate bud
6- Morphogenetic center
7- Positional information
8- Morphogen
9- Pattern formation
10- Retinoic acid
11- Homeobox complex
12- Fibroblastic growth factor
13- Transforming growth factor
14- Endogenous
15- Interaction
16- Apical ectodermal ridge
17- Progress zone
18- Talpid 3
19- Leghorn
20 -Incubation
21- Horse serum-tyrode
22- Trypsine
23- Calcium-magnesium free
24- Bore pipette
25- Nitex filter
26- Pelette
27- Alcean Blue 8GX
28- Alizarine red
29- Camera lucida
30- Metatarsal
31- Homeobox genes



شکل شماره ۲

شکل شماره ۳

شکل شماره ۴

منابع مورد استفاده

۱- شمس لاهیجانی، مریم، ۱۳۷۴، مطالعهٔ تکوین محورهای قدامی - خلفی ومبدائی - انتهایی دراندام حرکتی موتانت جوجه، مجلهٔ علوم پایهٔ دانشگاه الزاهرا.

۲- شمس لاهیجانی، مریم، ۱۳۷۵، بررسی تجربی تکوین اندام حرکتی موتانت جوجه با استفاده از مزودرم جدا شده و مخلوط شده (شیمر) واکتودرم طبیعی، مجلهٔ علوم پایهٔ دانشگاه الزاهرا.

3- Allen, F. et.al, 1990. The role of junctions in patterning of the chick limbgap bud. Development, 108, 623-604.

4- Alles A.J. and Sulik K.K, 1989. Retinoic Acid-Induced limb reduction defects: perturbation of zones of programmed cell death as a pathogenetic Mechanism. Teratology, 40, 163-171.

5- Anderson, R. et.al, 1994. Conversion of anterior limb bud cells to ZPA signalling cells in vitro and in vivo. Dev. Biol., 164, 241-257.

6- Aono H. and Ide H. 1988. A gradient of responsiveness to the growth promoting activity of ZPA in the chick limb bud. Dev. Biol., 128, 136-144.

شکل شماره ۲

ZPA تالپید ۳ در مرز خلفی، در پیوند ۱۱-۱۰ روزهٔ ساخته شده از مزودرم جدا شده و تجمع یافتهٔ طبیعی به اضافه کلاهک اکتودرمی طبیعی.

تصاویر سمت راست: نواحی روشن = استخوان

شکل شماره ۳

پیوند ۱۱-۱۰ روزهٔ ساخته شده از مزودرم جدا شده و تجمع یافته تالپید ۳ در مرز خلفی در کلاهک اکتودرمی طبیعی.

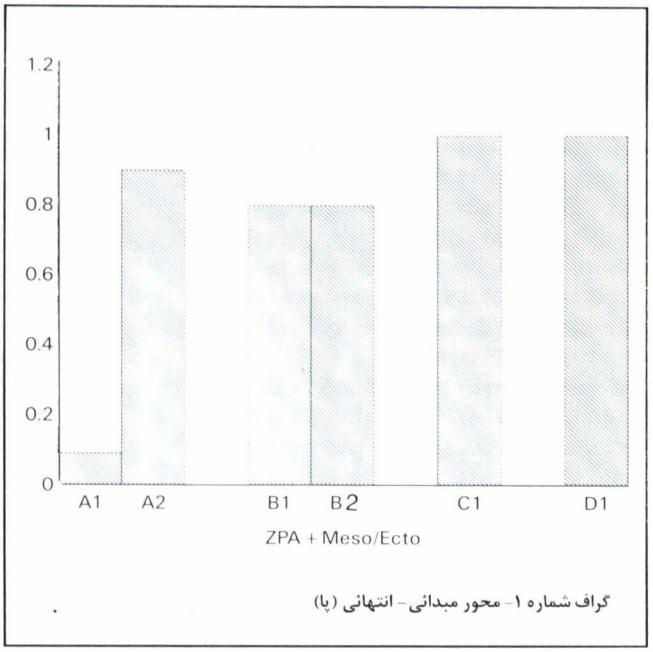
تصاویر سمت راست: نقطه چین: نواحی با ماتریکس کم

شکل شماره ۴

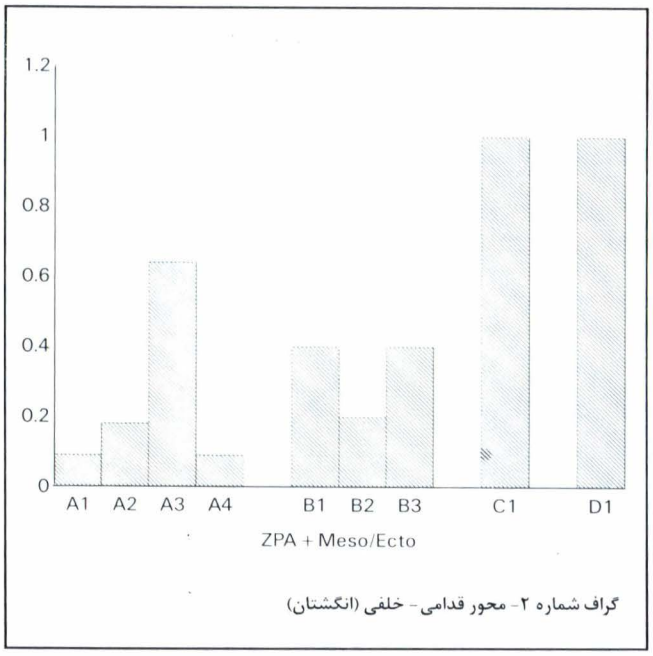
ZPA طبیعی در مرز خلفی، در پیوند ۱۱-۱۰ روزهٔ ساخته شده از مزودرم جدا شده و تجمع یافته تالپید ۳ به اضافه کلاهک اکتودرمی طبیعی.

تصاویر سمت راست: نقطه چین = نواحی با ماتریکس کم

7- Balcuns A., Gasseling M.T. & Saunders J.W. 1970. Spatio-temporal distribution of a zone that controls anteroposterior polarity in the limb bud of the chick and other bird embryos. Am. Zool., 10, 323.



گراف شماره ۱- محور مبدائی - انتهائی (پا)



گراف شماره ۲- محور قدامی - خلفی (انگشتان)

8- Bryant s.V. and Gardiner D.M. 1992. Retinoic acid, local cell interactions, and pattern formation in vertebrate limbs. Dev. Biol, 152, 1-25.

9- Cusella-De Angelis M.G. et.al. 1994. Differential response of embryonic and fetal myoblasts to TGF-B: a possible regulatory mechanism of skeletal muscle histogenesis. Development. 120, 925-933.

10- Dono R. and Zeller R. 1994. Cell-type - specific nuclear translocation of fibroblast growth factor - 2 isoforms during chicken kidney and limb morphogenesis. Dev. Biol., 163, 316-330.

11- Eichele, G. 1990. Pattern formation in vertebrate limbs. Curr. Opinion Cell Biol., 2, 475-981.

12- Eichele C. and Thaller C. 1987. Characterization of concentration gradients of a morphogenetically active retionoid in the limb bud. J. cell. BNiol., 1917-1923.

13- Fallon, J. F. & Crosby. G.M. 1995. Normal development of the chick wing following removal of zone of polarizing of activity. J. Exp. Zool., 193, 3, 449-455.

14- Fallon, J.F. & Crosby, G. M. 1975. The relationship of ZPA to supernumerary limb formation (twinning) in the chick wing bud. Dev. Biol, 42, 24-34.

15- Geduspan J.S. et.al. Coordination expression of IGF-I and its receptor during limb outgrowth. Developmental dynamics.

16- Hornbruch A. and Wolpert L. 1991. The spatial and temporal distribution of polarizing activity in the flank of the prelimb - bud stages in the chick embryo. Development, 111, 725-731.

17- Hamburger, V. & Hamiltion, H.L. 1951. A series on normal stages in the development of the chick embryo. J. Morph., 88, 46-92.

18- Hams, T. et.al. 1994. Relationship between retinoic acid and sonic hedgehog (shh), to polarizig signals in the chick wing bud. Development, 102, 1, 3267-3274.

19- Hayamizu T.F. et.al. 1991. Effects of localized application of transforming growth factor B1 on develping chick limbs. Dev. Biol., 145, 164-173.

20- Ide H. et.al. 1994. Sorting out of cells from different parts and stages of the chick limb bud. Dev. Biol., 162, 71-76.

21- Izpisua-Belmonte, J.E. et.al. 1991. Expression of Hox-4 homebox genes and the specification of positional information in chick limb development. Nature, 350, 585-594.

22- Izpisua-Belmonte, J. E. et.al. 1991. The mis-expression of posterior Hox_4 genes in talpid (ta3.) mutant wings correlates with the absence of A-P polarity. Development, 114, 4, 959-963.

23- Izpisua-Belmonte J.E. and Duboul D. 1995. Homeobox genes and pattern formation in the vertebrate limb. Dev. Biol., 152, 26-36.

24- Lee K.K. H. 1992. The regulative potential of the limb region in 11.5-day rat embryos following the amputation of the fore limb bud. Anat. Embryol., 186, 67-74.

25- Leonard C.M. et. al. 1991. Role of TGF-B in chondrogenic pattern formation in the embryonic limb: stimulation of mesenchymal condensation and fibronectin gene expression by exogenenous TGF-B and evidence for endogenous TGF-B- like activity. Dev. Biol., 145, 99-109.

26- Macias D. et.al. 1993. Modification of the phalangeal pattern of the digits in the chick embryo leg bud by local

جدول شماره ۱- مقایسه اثر ZPA اندام حرکتی جوجهٔ طبیعی با ZPA تالپید ۳ در تکوین اندام حرکتی

رشد محور قدامی- خلفی (انگشتان) / تعداد	رشد محور مبدیی انتهایی / تعداد	شمارهٔشکل	بال یا پا	مزودرم + /ZPA / اکتودرم
۱/۱۱۱ / ؟	ران،درشت‌نی / نازک نی	۱	پا	طبیعی + ZPA
۲/۱۱۱،۱۱۱:؟	(متاتارسال - انگشت)/ $\frac{۱}{۲۲}$	A, B, C		طبیعی / طبیعی
۷/۱۱۱،۱۱:؟	درشت نی/نازک‌نی،			
۱۰/۱۱۱/۱۱۱،؟،۱۱۱،۱۱۱	(متاتارسال-انگشت)/ $\frac{۱}{۲۲}$			
۲/۵/۱۱،؟	درشت نی / نازک‌نی،	۲	پا	طبیعی + ZPA
۱/۵/۱،۱۱	(متارسال - انگشت) $\frac{۴}{۵}$			تالپید ۳/ طبیعی
۲/۵ /۱۱ ،X	(متارسال - انگشت) $\frac{۴}{۵}$			
۴/۴/X-X	درشت نی / نازک نی،	۳	پا	تالپید ۳+ZPA
	(متاتارسال - انگشت) $\frac{۴}{۴}$			تالپید ۳/طبیعی
۶/۶/X-X	(متارتارسال - انگشت) $\frac{۶}{۶}$	۴	پا	تالپید ۳+ ZPA
				طبیعی / طبیعی

جدول شماره ۲- جدول آنالیز واریانس آزمایش فاکتوریل تأثیر ZPA اندام حرکتی (پا) جوجهٔ طبیعی با ZPA تالپید ۳

منبع تغییر	مجموع مربعات	درجهٔ آزادی	میانگین مربعات	توزیع F	P
گرایش	۰/۲۵۹	۳	۰/۰۸۶	۰/۵۲۶	۰/۷۰۷
باقیمانده	۰/۳۲۸	۲	۰/۱۴۶		
کل	۰/۵۸۷	۵	۰/۱۱۷		

جدول شماره ۳- جدول آنالیز واریانس فاکتوریل تأثیر ZPA اندام حرکتی (انگشتان) جوجهٔ طبیعی با ZPA تالپید ۳

منبع تغییر	مجموع مربعات	درجهٔ آزادی	میانگین مربعات	توزیع F	P
گرایش	۰/۸۰۶	۳	۰/۲۶۹	۵/۷۱۶	۰/۰۴۵
باقیمانده	۰/۲۳۵	۵	۰/۰۴۷		
کل	۱/۰۴۰	۸	۰/۱۳۰		

limbs. prog. Clin. Biol. Res., 110, 104-118.

38- Tabin C.J. 1991. Retinoids, Homeoboxes, and growth factors: Toward molecular models for limb development. Cell, 66, 199-217.

39- Thaller, C. & Eichelle, G. 1987. Identification and spatial distribution of retinoids in the developing chick limb bud. Nature, 327, 625-628.

40- Thaller, C. & Eichelle, G. 1987. Identification and spatial distribution of retinoids in the developing chick limb bud. Nature, 327, 625-628.

41- Thaller, C. & Eichelle, G. 1988. Characterization of retinoid metabolism in the developing chick limb bud. Develoment, 103, 473-483.

42- Thaller, C. & Eichelle, G. 1987. Isolation of 3,4-didehydroretinoic acid, a novel morphogenetic signal in the chick wing. Nature. 327, 625-628.

43- Thorp B.H. et.al. 1992. Transforming growth factor - B1, B2 and B3 in cartilage and bone cells during endochondral ossification in the chick. Developmen, 114, 907-911.

44- Tickle et.al. 1985. A quantitative analysis of the effect of all-trans- retinoic acid on the pattern of chick wing development. Dev. Biol., 109, 82.

45- Tickle. C., Summerbell, D. & Wolpert, L. 1975. Positional information and specification of digits in chick limb morphogenesis. Nature, 254, 199-202.

46- Tyrode. M.V. 1910. The mode of action of some purgative salts. Arch. Int pharmacology, 20, 205.

47- Week, D.L. & Melton, D.A. 1987. A maternal mRNA localized to the vegetal hemisphere in xenopus eggs codes for growth factor related to TGF-B. Cell, 51, 861-867.

48- Wulfsburg, E.A. et.al. 1993. Autosomal dominant tetramelic postaxial oligodactyly. Am. J. med. Genet., 46, 5, 579-583.

acid and vertebrate development. Dev. Biol., 2, 151-228.

32- Noji, S. et.al. 1991. Retinoic acid induces polarizing activity but is unlikely to be a morphogen in the chick limb bud. Nature, 350-83-86.

33- Riddle. R. 1993. Sonic hedgehog (shh) mediates the polarizing activity of ZPA. Cell, 75, 7, 1401-1401-1416.

34- Ruberte E. et.al. 1991. Retionoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. Development, 111, 45-60.

35- Saunders, J.W. & Gasseling, M.T. 1963. Transfilter propagation of apical ectoderm maintenance fator in the chick embryo wing bud. Eev. Biol., 7, 64-78.

36- Summerbell, D. 1979. The ZPA: Evidence for a role in normal chick limb morphogenesis. J. Embryol. Exp. Morph., 50, 217-233.

37- Summerbell, D. et.al. 1983b. Vitamin A and the control of pattern in developing

microinjection of RA, staurosporin & TGF-B.S. Anat. Embryol., 188, 201-208.

27- Maccabe, J. A. 1969. Morphenetic pattern determination in normal and mutant chick limbs. ph. D. thesis.

28- Maccabe, A.B., Gasseling, M.T. Saunders, J.W. 1973. Spatiotemporal distribution of mechanisms that contorl outgrowth and antero-posterior polarization of the limb bud in the chick embryo. Mech, Age. Dev., 2, 12.

29- Maccabe, J.A., Parker, B.W. 1975. The in vitro maintenance of the AER of the chick embryo wing bud: An assay for zone of polarizing Activity (ZPA). Dev. Biol., 45, 394-357.

30- Maccabe, J. A., Saunders. J.W. & Pickett. M. 1973. The control of the antero-posterior and dorso-ventral axis in embryonic chick limbs constructed of dissociated and reaggregated limb bud mesenchyme. Dev. Biol., 31, 323.

31- Maden, M. & Tickle, C. 1991. Retinoic