دانشگاه محقق اردبیلی
دانشکده : علوم
گروه : زیست شناسی

عنوان پایان نامه:
ارزیابی مقایسه‌ای اثرات سمی کاربوکسین و تیرام در جنین مرغ

استاد راهنما:
دکتر صابر زهری

استاد مشاور:
دکتر هوشنگ رفیعی دستجردی

توسط:
مهدی امیری‌کیا

زمستان، 1388

نام خانوادگي دانشجو: اميري كيا **نام:** مهدي
عنوان پايانامه: ارزيابي مقايسه اي اثرات سمي كاربوكسين و تيرام در جنين مرغ
استاد راهنما: دكتر صابر زهري **استاد مشاور:** دكتر هوشنگ رفيعي دستجردي
مقطع تحصيلي: كارشناسي ارشد **رشته:** زيست شناسي **گرايش:** علوم جانوري **دانشگاه:** محقق اردبيلي **دانشكده:** علوم **تاريخ فارغ التحصيلي:** 88/11/20 **تعداد صفحه:** 79
كليد واژه ها: تخم مرغ بارور، كاربوكسين، تيرام، ناهنجاري، سلول هاي كبدي و سيتوتوكسيسيتي.

چکیده: علاوه بر صنعت، کشاورزي هم به عنوان يك منبع آلاينده محسوب مي‌گردد. در اين تحقيق، تخم‌مرغ‌هاي بارور به طور جداگانه توسط ترکيبات کاربوکسين و تيرام در روز پيش از گرماگذاري با روش تزريق داخل زرده‌اي تيمار شدند. و در روز 19 گرماگذاري از پوسته خارج شده و توزين گرديدند سپس با استفاده از روش رنگ آميزي الايزرين براي تشخيص بررسي شدند. علاوه بر آن اثرات سيتوتوکسيسيتي اين ترکيبات بر سلول‌هاي کبدي جنين 12 روزه انجام گرديد. نتايج نشان داد غلظت‌هاي 20، 100، 200، و 400 ميکروگرم به‌ازاي هر تخم مرغ از کاربوکسين منجر به افزايش مرگ و مير در سطح معني‌داري در مقايسه با گروه کنترل مي‌گردد. در بررسي با استفاده از روش رنگ آميزي الايزرين نشان داد که غلظت‌هاي 100، 200 و 400 ميکروگرم به ازاي هر تخم مرغ باعث ايجاد ناهنجاري از نوع پا چنگکي، حذف و تاخير در کلسيفه شدن مهره‌هاي دمي و کجي استخوان‌هاي پا گرديد. به طور مشابه تزريق غلظت‌هاي 1، 2/5، 5 و 10 ميکرو گرم به ازاي هر تخم مرغ براي تيرام باعث افزايش مرگ و مير در مقايسه با گروه شاهد شد که تنها غلظت‌هاي 5 و 10 ميکروگرم، سطح معني داري را در مقايسه با گروه شاهد نشان دادند. بررسي با استفاده از روش رنگ آميزي الايزرين نشان داد که ناهنجاري تنها در غلظت‌هاي 2/5 و 5 ميکروگرم ايجاد شد و شامل تاخير در رشد و تاخير در کلسيفه شدن مهره دمي و پا چنگکي بود. نتايج حاصل از تست MTT در بررسي اثرات سايتوتوکسيسيتي غلظت‌هاي 0/25، 0/5، 1، 2/5 و 5 ميکروگرم گرم در ميلي ليتر تيرام و 5، 10، 25، 50 و 100 ميکروگرم در ميلي ليتر کاربوکسين نشان داد که اين ترکيبات منجر به کاهش حيات سلولي در سطح معني داري مي‌گردند. علاوه بر آن سلول‌ها از نظر مورفولوژيکي در مقايسه با شاهد تغييرات قابل ملاحضه نشان دادند.

فهرست مطالب:

فصل اول: مقدمه و تاريخچه

1- مقدمه 1

1-1- ناهنجاري 1

1-1-1- عوامل ناهنجاري-زا 3

1-2- جنين جوجه به عنوان يک مدل در مطالعات تراتوژني 5

1-3- تکوین جنین جوجه 6
1-3-1- مراحل اولیه تکوین جنین جوجه 6
1-3-2- خط اولیه 9
1-3-3- شکلگیري آندودرم و مزودرم 11
1-3-4- عقب نشیني خط اولیه 13
1-3-5- روخزیدگي اکتودرم 14
1-3-6- شکلگیري محورها در جنین جوجه 15
1-3-6-1- نقش PH در تعیین محور پشتي و شکمي 15
1-3-6-2- نقش جاذبه در شکلگیري محور عقبي-جلویي 15
1-3-6-3- شکلگیري محور چپ و راست 16
1-4- تکوین نهایي 17
1-4-1-تکوین اسکلت 17
1-4-1-1- ستون مهره 17

1-4-1-2- دنده-
ها.....
.....
19.....
1-4-1-3- استخوان جناغ
سينه.....
.....
21.....
1-4-1-4-كمربند سينه-
اي.....
.....
22.....
1-4-1-5- كمربند
لگني.....
.....
22.....
1-4-1-6- استخوان‌هاي بال و
پا.....
.....
23.....
1-4-1-7-
جمجمه.....
.....
24.....
1-5- قارچكش-
ها.....
.....
25.....
1-5-1- قارچكش
محافظتي.....
.....
25.....
1-5-2- قارچكش‌ها با اثرات ريشه-
كني.....
25.....
1-5-3- قارچكش
سيستميک.....
.....
25.....
1-5-4- قارچكش
آلي.....
.....
26.....
1-5-4-1- ديتيوكاباما ت-
ها.....
.....
26.....

1-5-4-1-1- دي‌متيل‌دي‌تيوكاربامات-ها 28
1-5-5- آريل كربوكسانيليدها 29
1-5-5-1- اگزاتين-ها 30
1-6- مروري بر تحقيقات گذشته 31

فصل دوم: مواد و روش‌ها

2- مواد و روش-ها 39
2-1- موادهاي مورد استفاده 39
2-1-1- طرز تهيه محلول‌هاي سمي 39
2-1-2- تهيه محلول رنگي اليزرين 39
2-1-3- طرز تهيه PBS 39
2-1-4- طرز تهيه محيط كشت RPMI 40
2-1-5- آنتي بيوتيک 40
2-1-6- تهيه بافر گلايسين 40

2-1-7- تهيه محلول آنزيمي..... 40
2-1-8- جعبه كندلينگ..... 41
2-1-9- تهيه تخم‌مرغ نطفه‌دار..... 41
2-1-10- MTT 41
2-2- روش‌ها..... 41
2-2-1- روش كندلينگ..... 41
2-2-2- روش تزريق..... 41
2-2-3- گرماگذاري..... 42
2-2-4- باز كردن جنين و رنگ آميزي اسكلت..... 43
2-2-5- جداسازي سلول‌هاي كبدي..... 44
2-2-6- تعويض محيط كشت..... 45
2-2-7- سنجش حيات سلولي با تست MTT..... 45
2-2-8- بررسي اثرات سيتوتوكسيسيتي تركيبات قارچ‌كش‌ها بر سلول‌هاي كبدي با تستMTT..... 46

2-2-9- محاسبه غلظت کشنده پنجاه درصد LD_{50} قارچکش-ها 46
2-2-10- روش آماري براي تحليل داده-ها 46

فصل سوم: نتايج

3- نتايج 47
3-1- بررسي اثرات سيتوتوکسيتي قارچکش‌ها بر سلول‌هاي استخراج شده کبد 47
3-1-1- نتايج حاصل از بررسي تست MTT قارچکش کاربوکسين بر روي سلول‌هاي کبدي جنين جوجه 47
3-1-2- بررسي تغييرات مورفولوژي سلول‌هاي کبدي تيمار شده با قاچکش کاربوکسين 50
3-1-3- نتاج حاصل از بررسي تاثير تيرام بر کسر ماندگاري سلول‌هاي کبدي جنين 51
3-1-4- بررسي تغييرات مورفولوژي سلول‌هاي کبدي تيمار شده با قارچکش تيرام 53
3-2- بررسي تاثيرات ترکيبات قارچکش بر جنين جوجه (in vivo) 54
3-2-1- بررسي تاثير کاربوکسين بر درصد تلفات جنين جوجه 54
3-2-2- بررسي تغييرات وزني کاربوکسين بر جنين جوجه 56
3-2-3- بررسي ناهنجاري جنين حاصل از کاربوکسين 57
3-2-4- بررسي تاثير تيرام بر درصد تلفات جنين جوجه 62

3-2-5- بررسي تغييرات وزني تيرام بر جنين جوجه..... 64
3-2-6- بررسي ناهنجاري جنين جوجه حاصل از تيرام..... 65
فصل: چهارم
4-
بحث..... 68
پيشنهادات..... 72
منابع..... 73.

فهرست اشكال:

شکل1-1: مراحل تکوین جنین جوجه 7
شکل 1-2: تصویر شماتیك از برش عرضي تخم‌مرغ در حال تکوین 8
شکل1-3: تصاویر A, B, C, D, E, F مراحل تشکیل خط اولیه و امتداد یافتن آن را به سمت جلو 10
شکل1-4: نفوذ سلول‌ها از لایه اپي‌بلاست به داخل بلاستوسل و نفوذ آن به هیپوبلاست و تشکیل دادن مزودرم و آندودرم 12
شکل 1-5: تصویر شماتیك از تشکیل زائده سري توسط حرکت مزودرم به سمت جلو 13
شکل1-6: عقب نشیني گره هنسن و شکل گیري نوتوکورد وسومیت 14
شکل 1-7: سومیت‌ها و نمایش شکاف ون‌ابنر بین آنها و همچنین قسمت هاي مختلف سومیت-ها 18

شکل1-8: آناتومي اسکلت يک پرنده ..... 20 .
شکل1-9: مراحل تشکيل و تکوين کمربندهاي سينه اي و لگني ..... 21.....
شکل 1-10- استخوا ن هاي مختلف از کمربند سينه اي..... 22 .....
شکل 1-11: اجزاي مختلف از استخوان هاي بال..... 24.....
شکل 1-12: دي تيو کاربامیک اسيد..... 27....
شکل 1-3: تفاوت بين دو گروه دي تيو کاربامات ها (الف) دي متيل کاربامات که گروه متيل جا يگزين اتم هيدروژن شده است (ب) اتيل بيس کاربامات که اتم هيدروژن مستقيما به اتم نيتروژن کاربامات متصل شده است..... 28.....
شکل 1-14: ساختار شيميايي تيرام ..... 29.....

شکل 1-15: شباهت ساختار کربوکسین (از گروه اگزاتیین‌ها) با قارچکش اولیه موسوم به سالیسیل آنیلید ..... 30 .
شکل 1-16: ساختار شیمیایی کاربوکسین 31
شکل 2- 1: روش تزریق داخل زرده توسط سرنگ هامیلتون 42
شکل 2-2: دستگاه به کار برده شده براي انکوبه کردن تخم مرغ ها 43
شکل 3-1: بررسي غلظت‌هاي 5، 10، 25، 50، و 100 میکروگرم در میلي لیتر کاربوکسین بر روي سلول‌هاي کبدي جنین جوجه (آزمون TT) 48
شکل 3-2: بررسي غلظت‌هاي 0، 5، 10، 25، 50، و 100 میکروگرم در میلي لیتر کاربوکسین بر روي سلول‌هاي کبدي جنین جوجه (آزمون MTT) 49

شکل 3-3: بررسي تصاوير مورفولوژيکي تاثير غلظتهاي مختلف کاربوکسين بر سلولهاي کبد جنين..... 50
شکل 3-4: بررسي غلظتهاي 0/25، 0/5، 1، 2/5 و 5 ميکروگرم در ميلي ليتر تيرام بر روي سلولهاي کبدي جنين جوجه (آزمون MTT)..... 51
شکل 3-5: بررسي غلظتهاي 0، 0/25، 0/5، 1، 2/5 و 5 ميکروگرم در ميلي‌ليتر تيرام بر روي سلولهاي کبدي جنين جوجه (آزمون MTT)..... 52
شکل 3-6: بررسي تصاوير مورفولوژيکي تاثيير غلظتهاي مختلف تيرام بر سلولهاي کبد جنين..... 53
شکل 3-7: منحني رگرسيون تاثير کاربوکسين بر درصد تلفات جنين جوجه..... 55
شکل3-8: تاثير غلظتهاي مختلف از کاربوکسين بر جنين جوجه (حروف مشترک، نشان دهنده معني‌دار نبودن است)..... 56

شکل 3-: مقایسه میانگین وزني حاصل از تاثیر کاربوکسین بر جنین جوجه.....57
شکل 3-10: ناهنجاري از نوع پا چنبري (فلش) در غلظت 200 میکروگرم به ازاي هر تخم‌مرغ.....59
شکل 3-11: تصاویر بدست آمده از غلظت 100 میکرو گرم به ازا هر تخم‌مرغ کاربوکسین.....60
شکل3-12: تصاویر بدست آمده از 200 میکروگرم به ازاي هر تخم‌مرغ کاربوکسین.....61
شکل 3-13: منحني رگرسیون تاثیر تیرام بر درصد تلفات جنین جوجه.....
62.
شکل3-14: تاثیر غلظت‌هاي مختلف از تیرام بر جنین جوجه (حروف مشترک، نشان دهنده معني‌دار نبودن است).....
.....
.....63
شکل 3-15: مقایسه میانگین وزني حاصل از تاثیر تیرام بر جنین جوجه.....
64
شکل 3-12: تصاویر حاصل از غلظت 2/5 میکروگرم به ازاي هر تخم‌مرغ از تیرام.....66
شکل 3-13: تصاویر حاصل از غلظت 5 میکروگرم به ازاي هر تخم مرغ از تیرام.....67

فهرست جداول:

جدول 3-1: نتايج حاصل از جذب نوري توسط تست MTT از سلول‌هاي تيمار شده با غلظت‌هاي كاربوكسين..... 49

جدول3-2: نتايج حاصل از جذب نوري توسط تست MTT از سلول-هاي تيمار شده با تيرام..... 52

جدول 3-3: تجزيه واريانس مربوط به اثرات قارچ كش بر درصد مرگ و مير جنين جوجه..... 55

جدول 3-4: تخمين دوز كشنده پنجاه درصد جهت بررسي اثرات كاربوكسين بر جنين جوجه..... 56

جدول 3-5: تجزيه واريانس مربوط به اثرات قارچ كش كاربوكسين بر ميانگين وزني جنين جوجه..... 57

جدول 3-6: ناهنجاري هاي مربوط به غلظت‌هاي مختلف كاربوكسين بر جنين جوجه..... 58

جدول 3-7: تخمين دوز كشنده پنجاه درصد جهت بررسي اثرات تيرام بر جنين جوجه..... 63

جدول 3-8: تجزیه واریانس مربوط به اثرات تیرام بر درصد مرگ و میر جنین جوجه.....63
جدول 3-9: تجزیه واریانس مربوط به اثرات قارچ کش تیرام بر میانگین وزني جنین جوجه.....64
جدول 3-10: ناهنجاري‌هاي مربوط به تاثیر غلظت‌هاي مختلف تیرام بر جنین جوجه.....65

فصل اول:

مقدمه و تاريخچه

1- مقدمه

امروزه طبيعت در معرض خطر آلاينده‌هاي زيادي كه از منابع مختلف انتشار مي‌يابند، قرار گرفته است. در اين ميان، كشاورزي يكي از بزرگ ترين منبع آلاينده‌ها محسوب مي‌گردد. طيف وسيعي از تركيبات شيميايي به منظور محافظت از محصولات كشاورزي توسط بشر ساخته شده است كه بسياري از آن‌ها با وجود داشتن اثرات سميت بالا براي موجودات زنده هدف گيري نشده (غير از آفت ها)، در حال استفاده مي باشند. علاوه بر آن، بخش عمده‌اي از اين تركيبات پايدار بوده و براي مدت طويلي در طبيعت باقي مي‌مانند و از راه‌هاي مختلف دهان، دستگاه تنفس و پوست وارد بدن شده و منجر به اختلالات در كاركرد طبيعي بدن مي‌شوند. علاوه بر آن، از طريق مادر به جنين انتقال يافته و باعث ناهنجاري در جنين مي‌گردند. لذا شناسايي اثرات جانبي اين تركيبات يک امر اجتناب‌ناپذير محسوب مي‌گردد. در اين تحقيق اثرات تركيبات كاربوكسين و تيرام كه به عنوان قارچكش در كشاورزي مصرف مي‌شوند، به طور جداگانه بر روي

جنين جوجه بررسي شدند. هدف از اين تحقيق اثبات اثرات تراتوژنيكي[1] به خصوص ناهنجاريهاي اسكلتي اين تركيبات در جنين جوجه بوده است.

1-1-ناهنجاري

به مجموعه اختلال ناشي از نقص ژنيتكي، ناهنجاري يا سندروم[2] گفته ميشود. براي مثال پيبالديسم[3] يک نوع سندروم است كه ناشي از جهش غالب ژن kit كه بر روي بازوي بزرگ كروموزوم چهار واقع شده است، ميباشد اين سندروم علايم خود را همزمان به صورت آنمي، عقيمي، ناحيه پيگمنته نشده پوست و مو، كري، اختلال شبكه عصبي كه باعث حذف حركت پريستالتيک روده ميشود نشان ميدهد. نقطه مشترک براي ناهنجاري در اين سندروم ناشي از نقص در بيان ژن kit در سلولهاي ستيغ عصبي، سلولهاي اوليه خون ساز، و سلولهاي جنسي است. پروتئين ناشي از اين ژن باعث تحريک تكثير اين سلولها ميشوند. بنابراين بدون اين پروتئين سلولهاي ستيغ عصبي (منشاء سلولهاي رنگدانه اي، سلولهاي خاص شنوايي و نورونهاي دستگاه گوارش) نمي-توانند تكثير شوند در نتيجه منجر به كري، ناهنجاري روده و بدون رنگدانه شدن پوست و مو ميگردند. و علاوه بر اين حذف اين پروتئين باعث تكثير نشدن سلولهاي خوني و سلولهاي جنسي ميشود كه باعث آنمي و عقيمي ميگردند (5).

زيست شناسان علوم تكوين و ژنتيكدانان پزشكي اغلب سندروم هاي انساني (و عامل آن) را با مطالعه بر روي حيوانات كه سندروم مشابه را نشان ميدهند مطالعه مي-كنند. اين عمل مطالعه مدل حيواني بيماري ناميده ميشود.

عوامل پيدايش اختلال (مواد شيميايي خاص، ويروس، اشعه و دماي زياد) را تراتوژن[4] ميگويند. و مطالعه اي كه براي كشف مكانيسم و نوع اختلال اين عوامل خارجي به كار ميرود تراتولوژي[5] مينامند. Mcbride و lens درسال 1961 شواهدي را جمع آوري كردند كه حاكي از تراتوژن بودن تاليدوميد[6] (دارويي مسكن براي زنان باردار) را

---

[1]- teratogenic effects [2]-syndrome [3]-piebaldism

نشان مي‌داد. قابل توجه‌ترين اثر اين دارو فوكوملیا[1] (بد شكلي يا ضعف استخوان‌هاي بلند) است (5).

مطالعات علمي نشان مي‌دهند كه بعضي از نقايص جنيني در خانواده‌ها به طور ارثي وجود دارند. اين نوع نقايص كه از طريق ژن‌ها انتقال مي‌يابند در حدود 10% از كل ناهنجاري‌هاي جنيني را شامل مي‌شود. در حدود 10% ديگر از بدشكلي‌ها به صورت‌هاي مختلف به وسيله عوامل طبيعي موجود در محيط ايجاد مي‌گردند. به عنوان مثال ناهنجاري سيكلوپي[2] (ايجاد يك چشم در وسط، بر اثر تركيب پيش فرم‌هاي چشم‌ها با يكديگر) بر اثر يون‌هاي ليتيوم القاء مي‌شود. در حالي كه يون‌هاي پتاسيم مي‌توانند در بعضي بي‌مهرگان نقايص قلبي ايجاد كنند. نمك‌هاي ليتيوم در توتياي دريايي باعث ايجاد گاسترولاسيون خارجي مي‌شوند كه در آن آندودرم و آركنترون در خارج جنين به وجود مي‌آيد. قرار دادن تخم‌هاي تريتون در محلول‌هاي نمك هيپرتونيك، نيز در اين جانوران گاسترولاسيون خارجي ايجاد مي‌گردد. در حدود 80% ديگر از انواع ناهنجاري‌هاي جنيني در اثر عمل متقابل يا بر هم كنش بين ژن‌ها و عوامل محيطي به وجود مي‌آيد (1).

1-1-1- عوامل نا هنجاري زا

عواملي كه باعث بروز ناهنجاري مي‌شوند به دو دسته تقسيم مي‌گردند شامل: عوامل فيزيكي و عوامل شيميايي.

گروه اول عوامل فيزيكي:

1- نيروي ثقل

2- نيروي الكترومغناطسي

3- دما (اين عامل به عنوان عامل جهش زا شناخته شده است)

4- امواج پر انرژي با طول موج كوتاه يا پرتوهاي يونيزه كننده مواد مانند پرتوهاي فرابنفش x، گاما، بتا، آلفا و ذرات راديواكتيو كه آن‌ها نيز جهش زا هستند.

5- رطوبت

6- نيروي گريز از مركز

---

[1]-teratogen [2]-teratology [3]-thalidomide [4]-phocomelia [2]-syclopia

7- فشار

در ميان عوامل فيزيكي ناهنجاريزا پرتوهاي يونيزه كننده تاثيرات بيشتري بر رشد و نمو جنين دارند. زيرا اكثراً باعث ايجاد جهش در ژنهاي جنين شده و مسيرهاي متابوليسمي غير عادي به وجود مي‌آورند. در صورتي كه اين عوامل بر روي ژنهاي سلولهاي جنسي اثر كند جهش منتقل مي‌گردد. صفت غير عادي در افراد مبتلا، چنانچه زنده ماند و زايا باشد موروثي خواهد شد. بيشترين مطالعات در زمينه پرتوهاي يونيزه كننده بر روي پرتوهاي x انجام گرفته است و نتايجي به طور تجربي در مورد جانوران آزمايشگاهي نظير موش به دست آمده اند (1).

گروه دوم از عوامل ناهنجاري زا عوامل شيميايي هستند كه عبارتند از:

1- غذا (كربوهيدرات، پروتينها و چربيها)

2- يونهاي فلزات سنگين مانند ليتيوم، كادميوم، سرب، آلومينيوم، روي.....

3- عوامل دارويي تراتوژنيك مانند داروهاي آرام بخش

4- تركيبات مخدر و الكل

5- سموم دفع آفات

6- ويتامينها

7- هورمونها

از ميان اين عوامل مهمترين آنها كه در جوامع بشري مورد توجه قرار گرفته و هدف اين پژوهش نيز بود، سموم دفع آفات و آلودگي ناشي از آن بود. علاوه بر صنعت كه همواره يك منبع بزرگ آلودگي در طبيعت است، كشاورزي هم اكنون به يك انتشار دهنده اصلي آلاينده‌ها تبديل گرديده است كه دليل اصلي آن استفاده از محصولات شيمي-كشاورزي[1] است. بعد از جنگ جهاني دوم كارخانه‌ها و كاربرد مواد شيميايي در كشاورزي افزايش چشمگيري داشته است. كه در اين ميان آفتكشها و علفكشها سهم بيشتري را به خود اختصاص داده اند. اين تركيبات نقش مهمي را در بازده و كيفيت محصولات كشاورزي بازي مي‌كنند. اما از طرف ديگر

---

[1]- Agrochemichal [2]- Carcinogenic

طيف وسيع از مصرف آن‌ها در مزارع باعث آلودگي محيط زيست گرديده و آلودگي محيط هم باعث آسيب به موجودات زنده و غير زنده و همچنين به انسان و حيوانات عالي‌تر مي‌گردد. بعضي از آفت‌كش‌ها بسيار مقاوم هستند. اين مواد تا ده‌ها سال در طبيعت مقاومت نشان مي‌دهند و وارد خاك شده و سپس از طريق ميكرو ارگانيسم‌ها، حشرات و كرمها در زنجيره غذايي نفوذ كرده و سرانجام به موجودات زنده عالي تر مثل پرنده ها، پستانداران و انسان‌ها (كه اين‌ها خود در حال تغذيه بر موجودات پست تر از خود هستند) مي‌رسند. سموم بعد از نفوذ به بافت در آنجا تجمع پيدا كرده و سميت آنها تشديد مي‌گردد. نخستين مثالي كه در اينجا مي-تواند مطرح شود مواد غذايي آلوده به سمي هستند كه توسط پرنده‌ها خورده مي‌شود و منجر به نازك شدن پوسته تخم‌ها مي‌شود تخم‌ها در چنين شرايط تفريغ نادري دارند. همچنين اين مواد مي‌توانند منجر به سرطان[1] مي‌شوند (3).

تحقيقات زيادي براي بررسي سميت آفت‌كش‌ها با توجه به نسل‌هاي آينده، حفاظت از جانوران و گياهان و همچنين جلوگيري از آلودگي هوا، خاك و آب انجام شده است. از مواد شيميايي كه وارد اكوسيستم مي‌شوند نبايد غفلت كرد چون هنوز آفت‌كش‌هاي زيادي وجود دارند كه تاثيرات زيان بار آن‌ها شناسايي نشده است (3).

اميد مي‌رود كه به طور همزمان با به قدرت رساندن فعاليت‌هاي محيط زيستي و تحقيقات در زمينه بررسي سموم انتشار يافته در اكوسيستم، بررسي كاملي از تاثيرات زيان بار طيف وسيعي از مواد شيميايي امكان پذير شود. چون اين يك امر اجتناب‌ناپذيري براي حفظ سلامت جامعه و محيط محسوب مي‌گردد. آفت‌كش‌ها يک نقش مهمي را در كشاورزي مدرن و توليد غذا ايفا مي‌كنند. با اين وجود مصرف آن‌ها به سرعت در حال افزايش است يا به عبارت ديگر مصرف بي رويه آن عامل آلودگي محيط مي‌باشد (4).

آفت كش موادي هستند كه از راه‌هايي مختلف مثل پوست، دستگاه تنفس، رژيم غذايي وارد بدن موجود زنده مي‌شوند و منجر به آسيب‌هاي كليوي، كبدي، ماهيچه اي، قلبي و سيستم

عصبي، دستگاه توليد مثلي و باعث تحريک و تورم پوست و مخاط مي‌گردند. بعضي از اين مواد آثار سوء بر روي جنين دارند که مي توان از مهمترين آن به جنين پرنده اشاره کرد که هميشه درمعرض اين مواد قرار مي‌گيرند. با اين حال اثرات جانبي اين ترکيبات هنوز بررسي نشده-اند (7 و3).

2-1- جنين جوجه به عنوان يك مدل در مطالعات تراتوژني

با وجود اينکه تکوين بسياري از موجودات مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است اما بيشترين اطلاعات موجود در مورد تکوين مربوط به تعداد کمي از جانوران مي‌باشد، که ما آنها را مي‌توانيم به عنوان مدل براي درک بهتر مکانيسم‌هاي تکوين درنظر بگيريم. به عنوان مثال توتياي دريايي و قورباغه به عنوان دو مدل مهم محسوب مي‌گردند که در ابتداي قرن حاضر براي تحقيقات در زمينه تکوين استفاده مي‌شدند. اصلي ترين دليل براي انتخاب آن‌ها به عنوان مدل قابل دسترسي، بزرگ و قابل دستکاري بودن جنين‌ها بود. هم اکنون در ميان مهره‌داران قورباغه زنوپس، موش، جوجه، گورخر ماهي، و در بين بي‌مهره-گان مگس سرکه درزوفيلا، کرم لوله‌اي الگانس از مدل‌هاي مهم به حساب مي‌آيند. براي مثال جنين جوجه براي مدت طولاني به عنوان يک مدل به نمايندگي از مهره‌داران مورد توجه قرار گرفته است. از جنبه‌هاي مهم آن به عنوان مدل مي توان، قابل دسترس بودن و سادگي در دستکاري آن را نام برد (6).

جنين پرنده از نظر پيچيدگي و مورفولوژيکي و مراحل عمومي تکوين، شباهت زيادي به جنين پستانداران دارد لذا به عنوان مکمل براي مطالعه تکوين پستانداران به کار مي‌رود. همچنين جنين جوجه را مي‌توان به راحتي کشت داد. اين عمل راه را براي بسياري از تحقيقات که نياز به ميکرو جراحي دارند و همچنين براي بررسي تاثير مواد شيميايي بر روي جنين را هموار کرده است (6).

علاوه بر آن، مطالعات نشان مي‌دهد، داده‌هايي که از تاثير مواد و سموم بر روي جنين جوجه بدست مي‌آيد تا حد زيادي منطبق بر داده‌هايي است که از مطالعه

پستانداران حاصل مي‌آيد. و همچنين به دليل جدا بودن جنين از مادر بسياري از متابوليت‌هاي مادر حذف شده و اين شرايط براي مطالعات تراتوژني بسيار ايده‌آل مي‌باشند. بخصوص اگر بخواهيم ماده شيميايي گران قيمت را بر روي جنين تست كنيم و يا نگراني سميت ماده بر روي مادر قابل توجه است، جنين جوجه از اهميت بالايي برخوردار مي‌شود (8).

3-1- تكوين جنين جوجه:

3-1- 1- مراحل اوليه تكوين جنين جوجه:

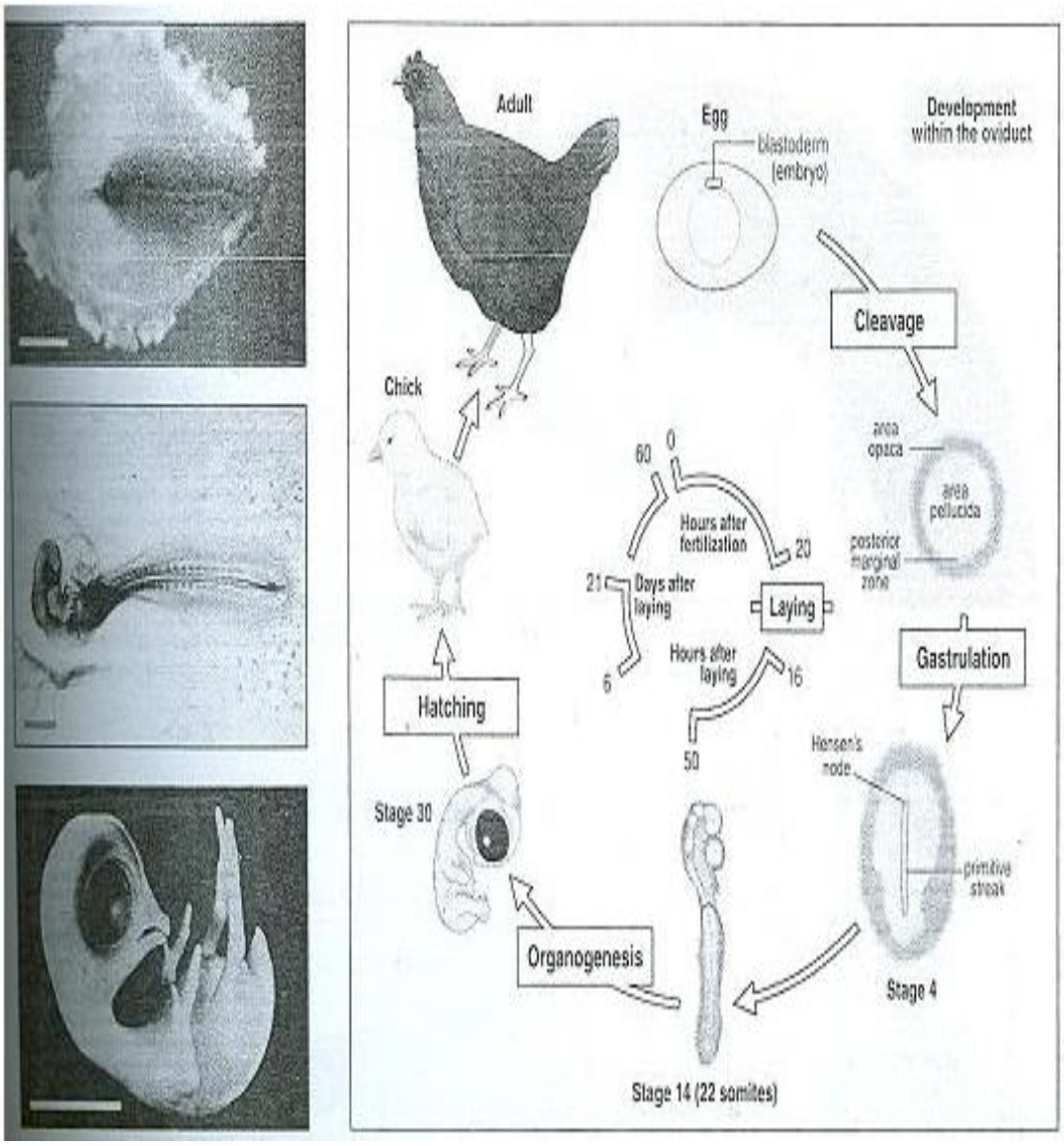
تخم‌مرغ در درون اويداكت[1] مرغ بارور و تقسيمات ابتدايي خود را شروع مي‌كند. سيتوپلاسم تخم‌مرغ و هسته آن بر روي زرده به صورت توده كوچكي كه به قطر چند ميليمتر است محدود شده است. تقسيماتي كه در مسير اويداكت صورت مي‌گيرد باعث تشكيل پلاستودرم يا پلاستوديسک مي‌شود. تخم به مدت بيست ساعت در اويداكت باقي مانده و باعث اضافه شدن سفيده تخم مرغ و غشاي پوسته‌اي و خود پوسته به آن مي‌گردد. در زمان تخم‌گذاري پلاستوديسک 60000 سلولي است كه اين مرحله معادل پلاستولاي دوزيستان است (6) (شكل1-1).

بعد از اينكه تخم‌گذاري صورت گرفت تقسيمات ادامه مي‌يابد شكافتگي كه براي تسهيم صورت مي‌گيرد به صورت شكاف[2] است. شكاف‌هاي اوليه از سطح غشايي سيتوپلاسمي شروع شده و به سمت پايين حركت مي‌كند اما اين شكافتگي سلول را كاملاً از هم جدا نمي‌كند به طوري كه قسمت شكمي به سمت زرده باز باقی می‌ماند. شكافتگي‌ها سرانجام به شكل يک دايره‌اي كه ضخامت چند سلولي دارد منتج مي‌شود. كه قسمت مركزي اين ناحيه (بر روي حفره‌اي قرار مي‌گيرد) شفاف است و ناحيه شفاف[3] ناميده مي‌شود و نواحي حاشيه اي را ناحيه كدر[4] گويند. بين ناحيه شفاف و زرده حفره‌اي وجود دارد كه فضاي زير لايه زايا ناميده[5] مي‌شود (6) (تصوير 1-2).

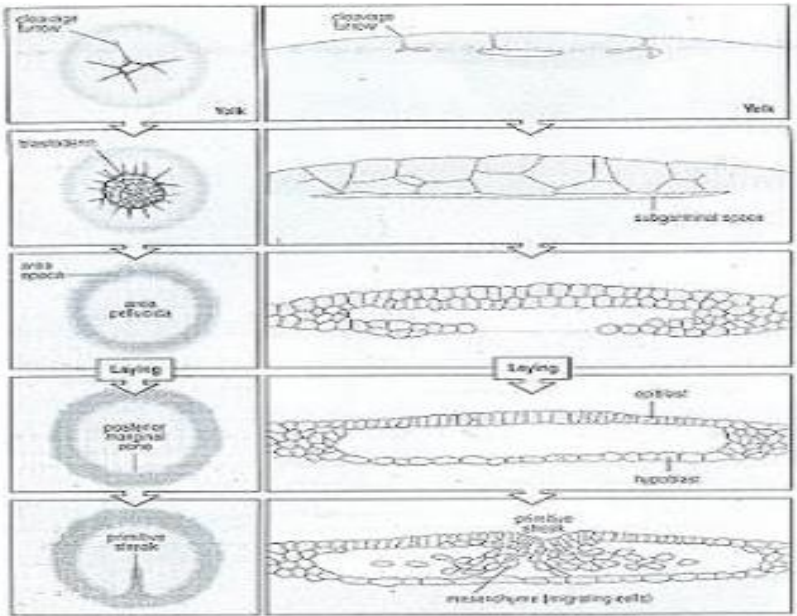
---

[1] -oviduct [2]-Furrows

[1]- Area Pellucida [2]-Area Opaca [3]-Subgerminal Space



(شكل 1-1): مراحل تكوين جنين جوجه (بخشي از تكوين جنين جوجه در اويداكت انجام مي شود) (6).



(شکل 1-2): تصویر شماتیك از برش عرضي تخم‌مرغ در حال تکوین (بالا، سمت راست) و نماي بالایي از تسهیم (پایین، سمت چپ). همچنین شکل سه بعدي از بلاستولا (پایین) (6).

در زمان تخم‌گذاري اکثر سلول‌هاي ناحیه شفاف در سطح قرار مي‌گیرند که منجر به تشکیل اپي‌پلاست مي‌شوند. در حالي که بقیه سلول‌هاي ناحیه شفاف لایه‌اي شده و از سطح مهاجرت کرده و به سمت حفره زیر لایه زایا ریخته مي‌شوند که منجر به تشکیل هیپوبلاست اولیه یا جزیره‌هاي اینواژینه شده[1] مي‌شوند. که هر کدام از این جزیره تقریباً داراي 20- 5 سلول است. در مدت کوتاهي پس از آن یک لایه از سلول که از حاشیه عقبي[2] (این ناحیه از حاشیه قسمت‌هاي دیگر به وسیله ضخیم شدگي و تشکیل توده سلولي که کولر سیکل[3] نامیده مي‌شود متمایز مي‌گردد) به قسمت جلو مهاجرت مي‌کند و در مسیرشان به جزایر که از اپي بلاست مشتق شده‌اند برخورد کرده و باعث ایجاد هیپوپلاست ثانویه[4] مي‌گردند. بلاستودرم دو لایه‌اي (اپي پلاست و هیپوپلاست) در ناحیه کدر به هم دیگر مي‌رسند و فضایي که بین لایه‌ها ایجاد شد بلاستوسل نامیده مي‌شود. اپي بلاست منشأ جنین در پرندگان است. هیپوبلاست در تشکیل خود جنین هیچ نقشي ندارد اما در تشکیل پرده‌هاي خارج رویاني به خصوص کیسه زرده و ساقه که کیسه زرده را به آندودرم دستگاه گوارش متصل مي‌کند نقش مهمي را ایفا مي‌کند. سه لایه زایا و جنین و مقداري از غشاي خارج رویاني از اپي بلاست مشتق مي‌شوند (5).

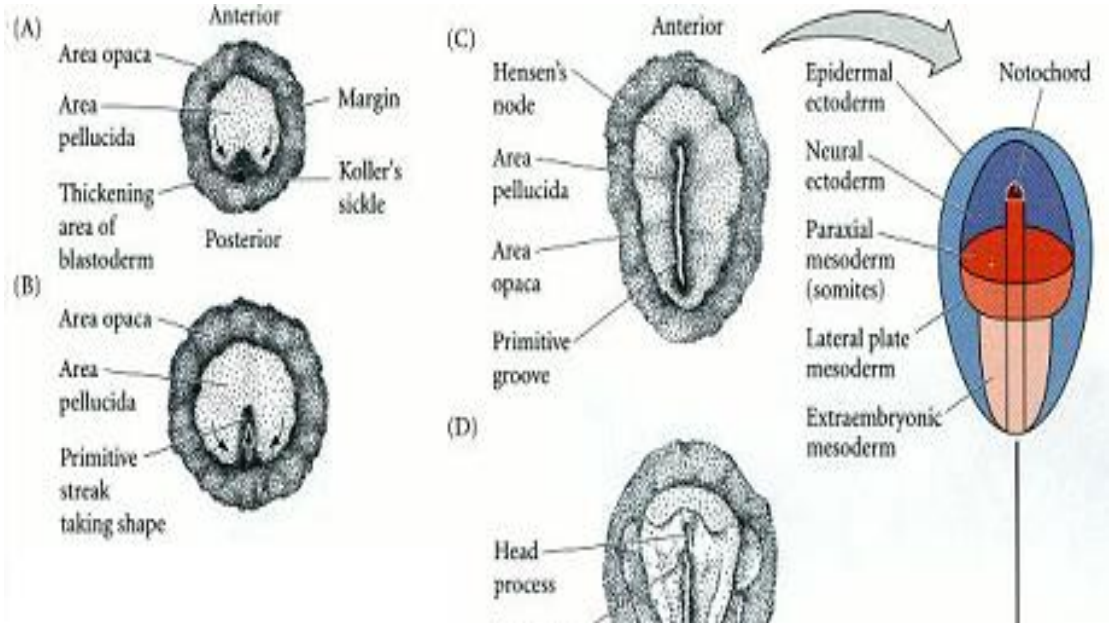
2-3-1- خط اولیه

---

[1]-Primary Hypoblast (polyinvagination island) [2]-Posterior margain [3]-Koller Sickle
[4] -Secondary Hypoblast

ويژگي ساختاري اصلي گاسترولاسيون پرندگان، خزندگان و پستاندارن خط اوليه است. اين خط ابتدا به صورت ضخيم شدگي در اپي بلاست ديده مي‌شود كه دقيقاً در سمت جلويي كولر سيكل واقع شده است. اين ضخيم شدگي به علت ريزش سلول‌هاي آندودرمي به داخل بلاستوسل و حركت سلول‌هاي اپي-بلاستي جانبي قسمت عقبي به سمت مركز مي‌باشد. همزمان با حركت سلول‌هاي كناري اپي‌بلاست به خط اوليه و حركت خط اوليه به سمت جلو، هيپو بلاست ثانويه نيز از ناحيه عقبي به سمت جلو حركت مي‌كند. بنابراين حركت خط اوليه و سلول‌هاي هيپوبلاست ثانويه به صورت هم زمان به سمت جلو ادامه مي‌يابد و سرانجام خط اوليه تقريباً 60-70% از طول ناحيه شفاف را طي مي‌كند (5) (شكل 1-3).

خط اوليه محور جنين را تعيين مي‌كند و منجر به مشخص شدن قسمت‌هاي چپ و راست جنين مي‌گردد. و از قسمت عقبي به سمت جلو يا سري گسترش پيدا مي‌كند. سلول‌هاي درحال مهاجرت به داخل آن از قسمت پشتي وارد و از سمت قسمت شكمي به حركتشان ادامه مي‌دهند. سلول‌هايي كه در نزديكي آن وجود دارند بعداً ساختار مياني (مركزي) جنين، در حالي سلول‌هايي كه در قسمت جانبي‌تر خط قرار مي-گيرند ساختارهاي طرفين جنين را تشكيل مي‌دهند. همزمان با همگرايي سلول‌ها براي تشكيل خط اوليه تورفتگي در آن ايجاد مي‌گردد كه شيار اوليه گويند. اين شيار باعث ايجاد مسير براي عبور سلول‌هاي در حال مهاجرت به داخل بلاستوسل مي‌گردد و بنابراين شيار اوليه معادل بلاستوپور در دوزيستان است.



(شکل1-3) : تصاویر A, B, C, D, E, F مراحل تشکیل خط اولیه و امتداد یافتن آن را به سمت جلو نشان می دهد (5).

در قسمت جلویی شیار اولیه سلول‌ها تجمع پیدا کرده و باعث ضخیم شدگی موضعی می‌گردد که گره اولیه یا گره هنسن[1] نامیده می‌شود. در مرکز این گره یک فرورفتگی به وجود می‌آید که قیفی شکل است (بعضی مواقع چاله اولیه نامیده می‌شود) و محل عبور سلول‌ها به داخل بلاستوسل است. گره هنسن معادل لبه پشتی بلاستوپور جنین دوزیستان است. به محض شکل‌گیری خط اولیه سلول‌ها شروع به مهاجرت به داخل بلاستوسل می‌کنند و شامل جمعیتی از سلول‌های درحال تغییر است. سلول‌های که از گره هنسن به داخل بلاستوسل مهاجرت می‌کنند تشکیل دهنده‌ی روده پیشین، مزودرم سری و نوتوکورد هستند. و سلول‌هایی که از بخش‌های جانبی خط اولیه به داخل بلاستوسل مهاجرت می‌کنند، بخش‌های اصلی آندودرم و بافت‌های مزودرمی را تشکیل می‌دهند.

[1]-Hensen node [2]-Ingression [3]-Scatter factor

برخلاف مزودرم زنوپس که به صورت لایه‌اي از سلول به داخل بلاستوسل حرکت مي‌کند، سلول‌ها به صورت منفرد با حرکت ریزش[1] و با یک تغییر ماهیت از سلول‌هاي اپي‌تلیالي به مزودرمي وارد مي‌شوند. در گره هنسن و خط اولیه، جدا شدن سلول‌ها از غشاي قاعده‌شان و آزاد شدن آن به داخل بلاستوسل به نظر مي‌رسد به خاطر فاکتور اسکاتر[2] باشد. این فاکتور یک پروتئین kda90 است. که به وسیله سلول‌ها ترشح مي‌شود و سلول‌هاي اپیتلیالي را به سلول‌هاي مزودرمي تبدیل مي‌کند. که این عمل از دو طریق یا به صورت سرکوب cadherine- E یا از طریق کاهش بیان ژن cadharine -E عمل مي‌کند (5) (شکل 1-4).

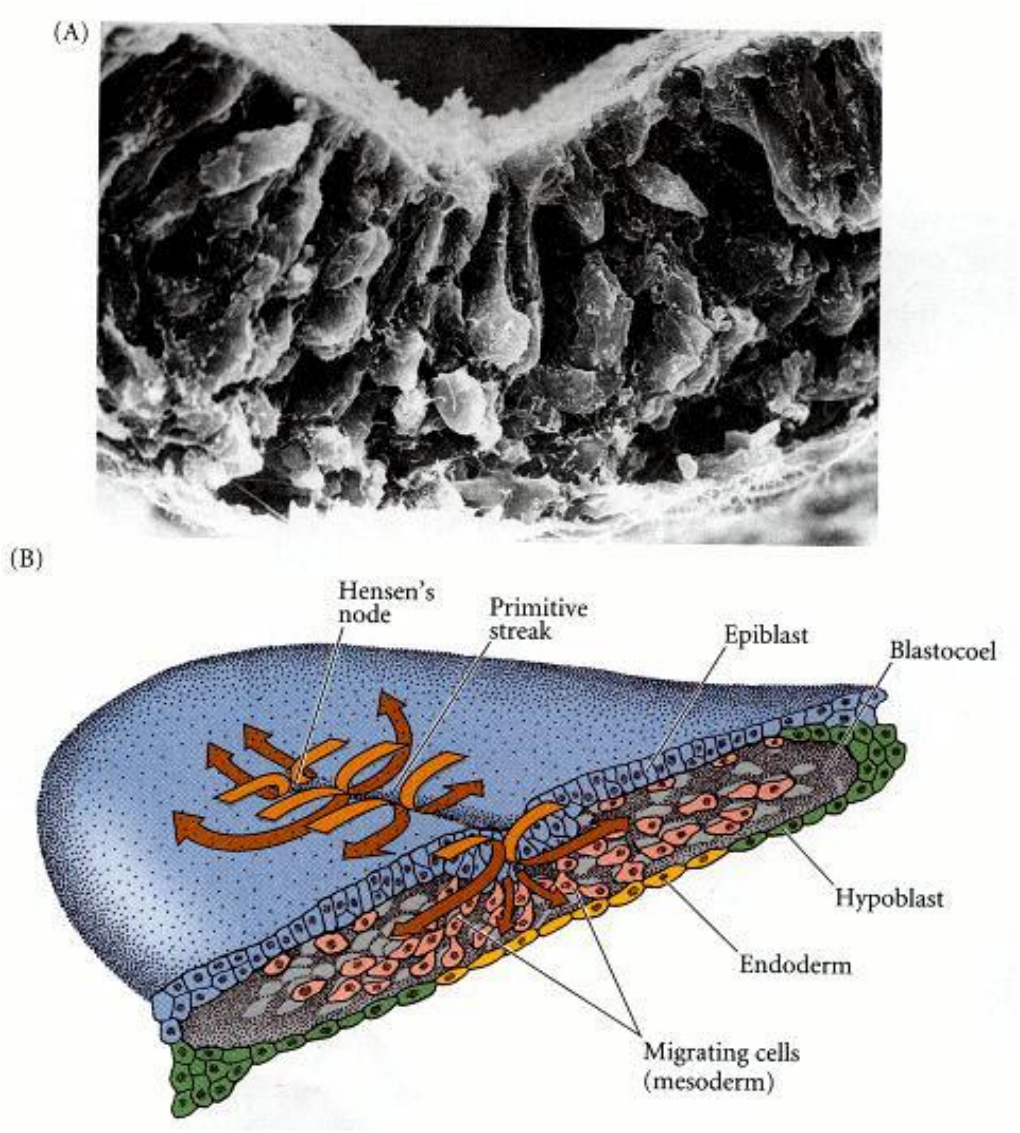
1-3-3- شکل گیري آندودرم و مزودرم

نخستین سلول‌هایي که از طریق گره هنسن وارد مي‌شوند به آندودرم حلقي روده پیشین تبدیل مي‌گردند. به محض ورود به بلاستوسل سلول‌هاي آندودرمي به قسمت جلویي مهاجرت کرده و سرانجام باعث جابجایي سلول‌هاي هیپوپلاست مي‌گردند که این فرآیند منجر به محدود شدن سلول‌هاي هیپوبلاست به قسمت جلویي ناحیه شفاف مي‌شود. که در مراحل بعدي به سلول‌هاي اجدادي سلول‌هاي جنسي تبدیل مي‌گردند. و از طریق رگ‌هاي خوني به گنادها (غده جنسي) مهاجرت مي-کنند (5).

سلول‌هاي بعدي که بعد از سلول‌هاي آندودرم حلقي از طریق گره هنسن وارد بلاستوسل مي‌شوند به سمت جلو حرکت کرده اما آن‌ها به اندازه سلول‌هاي آندودرم حلقي فرو نرفته بلکه ما بین آندودرم و اپي‌بلاست قرار مي‌گیرند و سلول‌هاي مزدرم سري[3] و مزودرم صفحه‌اي پروکوردال[4] را تشکیل مي‌دهند. این سلول‌ها ضمناً به سمت جلو حرکت کرده و به اپي بلاست قسمت جلوي درخط میانه فشار وارد کرده و منجر به تشکیل زائده سریي[5] مي-گردد. بنابراین سر پرنده یک قسمت بر آمده یا نوک داراي[6] است که در قسمت جلوي گره هنسن تشکیل مي‌شود. آخرین سلول‌هایي که از گره هنسن مي‌گذرند

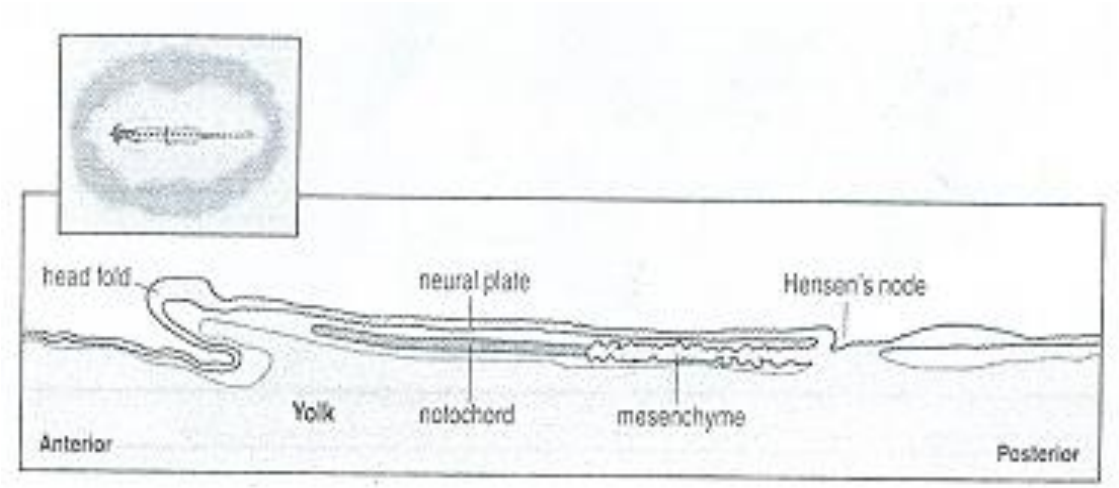
---

[3]-Head mesenchyme [2]-Prechordal Plate Mesoderm [3]-Head Process [4]-Rostral



(شکل 1-4): نفوذ سلولها از لایه اپي‌بلاست به داخل بلاستوسل و نفوذ آن به هیپوبلاست و تشکیل دادن مزودرم و آندودرم A- عکس میکروسکوپ الکترونیکیB- تصویر شماتیك (5).

سلول‌هایي هستند که نوتوکورد را تشکیل مي‌دهند این سلول‌ها از خط میانه‌اي فرضي جنین گسترش پیدا کرده و به مزودرم پروکوردال ملحق مي‌شوند (5) (شکل 1-5).



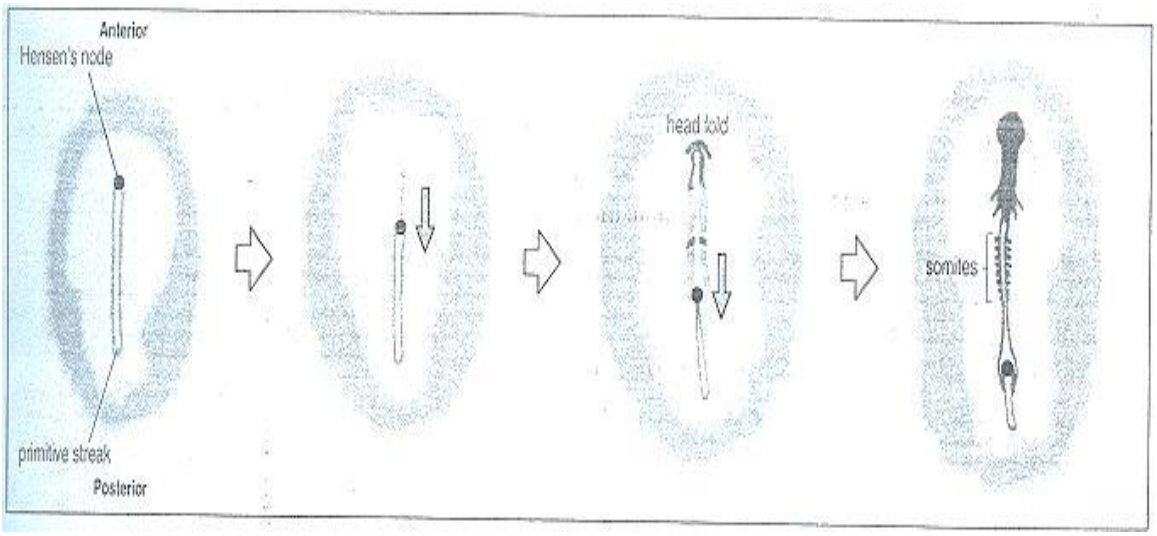
(شكل 1-5) : تصوير شماتيك از تشكيل زائده سري توسط حركت مزودرم به سمت جلو (6).

ضمن ريزش سلول‌ها از قسمت‌هاي جانبي خط اوليه به درون بلاستوسل، دو لايه شدن هم رخ مي‌دهد، بنابراين لايه‌اي كه در عمق فرو رفته به هيپو بلاست مي‌چسبند و باعث جابجايي آن شده و آن را به قسمت جانبي مي‌رانند. اين سلول‌ها، آندودرم اندام‌هاي جنين و همچنين بخش زيادي از غشاي خارج رويانی را تشكيل مي‌دهند. لايه دومي بين آندودرم و اپي‌بلاست قرار مي‌گيرد كه همان مزودرم شلي است كه رفته رفته به مزدرم خارج رويانی و مزودرم خود رويان تبديل مي‌گردد. بيشتر سلول‌هاي آندودرمي بعد از 22 ساعت گرماگزاري وارد جنين شده اما حركت سلول‌هاي مزودرم به داخل رويان براي مدت طولاني ادامه مي‌يابد (5).

1-3-4- عقب نشيني خط اوليه

در حالي كه نفوذ سلول‌هاي مزودرمي ادامه مي‌يابد خط اوليه عقب نشيني را شروع مي‌كند. عقب نشيني گره هنسن تقريباً از مركز ناحيه شفاف شروع شده و به قسمت عقب حركت مي‌كند. همزمان با عقب نشيني گره به سمت عقب، تشكيل ساختار نوتوكورد از مغز پسين شروع مي‌شود. با حركت گره به سمت عقب سلول‌هاي تشكيل دهنده نوتوكورد از طريق گره وارد بلاستوسل شده و منجر به شكل‌گيري آن (تا 17 سوميت) مي‌گردند. بقيه نوتوكورد با همگرايي

سلول‌ها به سمت خط اولیه و نفوذ آن‌ها به داخل بلاستوسل صورت می‌گیرد. سرانجام گره هنسن به حداکثر موقیعت عقبي خود می‌رسد. در این زمان اکثر سلول‌هاي فرضي مزودرمي و آندودرمي به داخل نفوذ می‌کنند. و تنها اپي‌بلاست شامل سلول‌هاي فرضي اکتودرم می‌باشد (5) (شکل 1-6).



شکل (6-1) : عقب نشیني گره هنسن و شکل گیري نوتوکورد وسومیت (6).

با توجه به شکل گیري مزودرم و نوتوکورد که از قسمت سري به دمي انجام می‌گردد جنین پرنده (جنین پستانداران) یک شیب از تکوین را از قسمت جلویي به سمت عقب نشان می‌دهد. به طوري که وقتي سلول‌هاي عقبي در حال نفوذ به داخل و گاسترولاسیون هستند سلول‌هاي قسمت جلویي در حال تشکیل دادن اندام‌ها هستند و در روزهاي آتي تکوین قسمت جلویي جنین کامل تر از قسمت عقبي جنین است (5).

5-3-1- روخزیدگي اکتودرم

همزمان با نفوذ مزودرم و آندودرم فرضي جنین به درون بلاستوسل، تکثیر سلول‌هاي اولیه اکتودرم
شروع می‌شود. علاوه بر آن سلول‌هاي اکتودرم براي احاطه کردن زرده به سمت آن مهاجرت می‌کنند. در بر گرفتن کیسیه

زرده به وسیله اکتودرم (به یاد آورنده رو خزیدیگي در دوزیستان) به مدت چهار روز طول میکشد. سلولهاي لبه خارجي ناحیه کدر به پوشش زرده میچسبند و ذاتاً متفاوت از سلولهاي بلاستودرم هستند. این سلولها زوائد پا مانند تشکیل داده که به عنوان دستگاه حرکتي عمل کرده و وارد پوشش زرده میشوند. این زائده پا مانند به فیبرونکتین و لایه پایه پوشش زرده اي میچسبد. (5).

1-3-6- شکل گیري محورها در جنین جوجه

شکل گیري محور جنین در زمان گاسترولاسیون صورت مي-گیرد اما مشخص شدن این محورها در مراحل اولیه شکافتگي است

1-3-6-1- نقش PH در تعیین محور پشتي و شکمي

محور شکمي و پشتي براي تشکیل شدن هیپوبلاست و همچنین براي پیشرفت تکوین نقش مهمي دارند. این محور زماني به وجود میآید که سلولهاي در حال تقسیم، سدي را بین آلومین (PH=9/5) و فضاي بین دیسک (PH=6/5) ایجاد میکند که قسمت پشتي دیسک قلیایي و قسمت شکمي دیسک اسیدي میباشد. آب و یونهاي سدیم از آلبومین وارد سلول و فضاي بین دیسک شده و منجر به اختلاف پتانسیل غشایي 25 میکرو ولتي میان لایه سلولي اپيبلاست میگردد (در قسمت شکمي سلولها مثبت میباشد). این فرایند منجر به شکلگیري طرفین اپي-بلاست میشود. یک طرف در تماس با آلبومین (منفي) است که قسمت پشتي جنین را تشکیل میدهد و طرف دیگر در تماس با فضاي زیر لایه ژرمینال (مثبت) است طرف شکمي جنین را تشکیل میدهد. این محور به طور تجربي از طریق برعکس کردن PH یا دخول یون سدیم تغییر داده میشود (5).

1-3-6-2- نقش جاذبه در شکل گیري محور عقبي - جلویي

تبدیل بلاستودرم متقارن شعاعي به ساختار متقارن دو طرفي به وسیله جاذبه تعیین میشود. تخممرغ از مسیر دستگاه تولید مثل مرغ حرکت کرده و به مدت 20 ساعت در آن میچرخد این چرخش با سرعت 12-10 بار در ساعت انجام میگیرد. این عمل منجر به تغییر وضعیت زرده شده و ترکیب روشنتر آن در زیر یک طرف بلاستودرم قرار مي-گیرند. این عمل قسمت عقبي بلاستودرم را بالا نگه داشته و

Surname: Amiri Kia **Name:** Mehdi

Tittle of thesis: Comparative evaluation of toxic effects of carboxin and thiram on chicken embryo

Supervisors: Dr. Zahri, Saber

Advisor: Dr. Rafie Dastjerdi, Hooshang

Graduate Degree: MSc **major:** Biology **specialty:** Animal science

University of Mohaghegh Ardabili **Faculty:** Science

Graduation date: 9. 2. 2010 **Number of pages: 79**

Keywords: Fertile eggs, carboxin, thiram, malformation, cytotoxicity, liver cells

Abstract: addition to industry agriculture (agro-chemical substance) is counted pollutant source. In this study fertile eggs were injected into yolk sac by Hamilton syringe prior to incubation. At day 19 of incubation, the embryos were harvested and weighed. in order to detect any skeletal malformation, alizarin red staining method was used. To study cytotoxicity effects of these compound, liver cell were cultured in RPMI medium and were exposed to different concentrations. Results showed carboxin injection into yolk sac prior to incubation at concentration of 20, 100, 200 and 400 µg/egg caused a significant increase in mortality. Examination of skeleton by alizarin red staining at 19 day of incubation showed skeletal malformation in leg bones, retardation of ossification and absence of caudal vertebrate and clubfoot. For evaluation of teratogenity and toxicity of thiram administration of 1, 2.5, 5 and 10 µg/egg were performanced via injection into yolk sac. The results showed that mortality of the embryos were increased as dose manner. also examination by alizarin red staining at 19 day of incubation only showed clubfoot, growth retardation and waved pubis. Moreover cytotoxicity of carboxin and thiram were evaluated on liver cell culture. the culture were treated using 5, 10, 25, 50 and 100 µg/ml of carboxin and 0.25, 0.5, 1, 2.5 and 5 µg/ml of thiram. Viability of the cells were measured by formazon reduction assay. The results showed that the viability of both thiram and carboxin treated liver cells significantly decreased in dose manner. Examination by invert microscope indicated considerably changes in cells shape and disruption of inter cellular-connection.

Faculty of Science
Department of biology

Title of thesis:

Comparative evaluation of toxic effects of carboxin and thiram on chicken embryo

Supervisor:
Dr. Saber Zahri

Advisor:
Dr. Hooshang Rafie Dastjerdi

By:
Mehdi Amiri Kia

University of Mohaghegh Ardabili

2010, February