

دور التعبير الجيني لـ *Sox17* في التحديد المبكر للقطب الأمامي في جنين الأرنب في المراحل المبكرة ما قبل المعيدية

مدرس د. روميا حسون

كلية الطب البشري-جامعة تشرين- اللاذقية- سوريا

استلام البحث 2016/4/24

قبول النشر 2016/10/4



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

الخلاصة:

يعد التلم الابتدائي و الحبل الظهرى و قبل ذلك الهلال الهامشي الأمامي (AMC) و الأديم الباطن الحشوي الأمامي (AVE) و الأرومة الباطنة الأمامية (AHB) مركبات جنينية تحدد محاور الجسم الرئيسية و من ثم فإنها تؤسس مخطط الجسم في مرحلة مبكرة من التطور الجنيني. لقد أطلق اختصاراً على مجموع مركبات التمايز الأمامي في المرحلة قبل المعيدية تسمية التمايز الأمامي قبل المعيدية (APD)، إن هذه المركبات محددة شكلياً و تسمى في الفأر (AVE) و في الأرنب (AMC) و في الخنزير (AHB). لقد لوحظ في دراسات سابقة أن الأرومة الباطنة في منطقة APD عالية و أكثر كثافة منها في القطب المقابل للمضغة، و أنها تشغل مساحة من المضغة تختلف من جنين إلى آخر و تأخذ شكلاً يختلف أيضاً من نوع إلى آخر عند الثدييات. في هذه الدراسة يوجد التعبير الجيني لـ *sox17* في القطب الأمامي في جنين الأرنب في مرحلة مبكرة من التطور الجنيني، يشير توضع الإشارات الموضعية لـ *sox17* في منطقة AMC قبل بدء ظهور علامات التمايز المورفولوجي في القطب الأمامي إلى أن التمايز الجنيني يسبق التمايز الشكلي مما يجعل *sox17* أحد الجينات المهمة في تحديد القطبية في أجنة الثدييات و ذلك قبل ظهور معالم شكلية أو محورية في المضغة.

الكلمات المفتاحية: *sox17*، التمايز المحوري، جنين الأرنب، الأرومة الباطنة، المعيدية.

المقدمة:

الباطنة الأمامية (Anterior hypoblast, AHB) [6]. تعد هذه التراكيب الشكلية مؤقتة كما في بقية التراكيب المحورية الموجودة في مرحلة المعيدية مثل عقدة هنسن الابتدائية، و الحبل الظهرى، و الخط الابتدائي، ولكنها تمتلك أهمية تطويرية للأسباب الآتية: (1) يحدد التأثير المتبادل بين النسيج الجنيني و النسيج خارج الجنيني محاور الجسم الأساسية (المحور العرضاني والمحور الطولاني) [7] و ذلك من خلال التراكيب الشكلية الأمامية (AHB, AMC, AVE) في القرص المضغي المستقطب محورياً قبل ظهور هذه التراكيب عن طريق المحور الظهرى البطني فقط [8, 9]، (2) يبدو أن الفعالية الكامنة في هذه التراكيب الأمامية تتجلى في الإشارات المتبادلة التي تقوم بتنشيط تشكل الأديم المتوسط في الجزء الأمامي للمضغة [10] وفي المقابل فهي تقوم بتحريض تمايز الأديم الظاهر العصبي في هذا الجزء من المضغة [11] و ضبط تشكيل الوريقة الجنينية المتوسطة في القطب الخلفي [12, 13]، (3) يبدو أن خلايا كل من الأديم الباطن

يحدد الجنين في مرحلة مبكرة جداً من التطور الجنيني العديد من السلاسل الخلوية كما يؤسس محاور الجسم المستقبلية و يبني هيكلية الجسم الأساسية [1]، و كل ذلك يتم وفق أنظمة جزئية عالية الحركة تضبط عملية الانقسام و التمايز الخلوي بدقة متناهية و أهمها منظومة Wnt signaling pathway التي تؤدي دوراً مهماً في تنظيم التطور الجنيني المبكر [2]. يعد التمايز الخلوي في القطب الأمامي للقرص المضغي في مرحلة ما قبل المعيدية أحد أهم التراكيب الشكلية المحورية التي تظهر باكراً لدى أجنة الثدييات حيث يعرف عند جنين الفأر بالأديم الباطن الحشوي الأمامي (Anterior visceral endoderm; AVE) [3, 4]، وعند الأرنب يعرف باسم الهلال الهامشي الأمامي (Anterior marginal crescent, AMC) [5]، وعند جنين الخنزير يكون بشكل معين يمتد جزؤه الأمامي خارج حدود المضغة ويشمل النسيج خارج الجنيني الواقع مباشرة أمام الحافة الأمامية للمضغة و يعرف باسم الأرومة

محددة خلال تكوين النطاف [27]، لوحظ التعبير الجيني لـ *sox17* في الأديم الباطن للضفدع [28] و السمك المخطط [29] و الفأر [30]، كما وجد بنموذج عالي الحركة في الأديم الباطن عند الفأر [31, 32] و الأرنب [33] و الخنزير [6] و في أنسجة أخرى مثل الخلايا الجذعية المولدة للدم [34, 35]. لقد بينت الدراسات الوظيفية (*sox17*- null cells) في جنين الفأر أن *sox17* يعد عاملاً منظماً عالي الدقة في سلسلة الإشارات التي تتدخل باكراً في التنظيم الجزيئي لنشوء طبقة الأديم الباطن [31] وتمايزها لاحقاً [33, 36].

أجرينا في هذه الدراسة تجارب التهجين الموضعي لـ *sox17* على جنين الأرنب و ذلك لمقارنتها بالنتائج السابقة عند الخنزير و غيره من الأنواع الحية بهدف اعتماد *sox17* بوصفه أحد الجينات المهمة في التحديد الجزيئي المبكر للقطب الأمامي لدى أجنة الثدييات. يهدف هذا البحث إلى إلقاء الضوء على أهمية التمايز الجزيئي المبكر في القطب الأمامي لمضغة الأرنب (من خلال نماذج التعبير الجيني لـ *sox17*) بوصفه خطوة مبكرة تسبق التمايز الشكلي، كما يقدم *sox17* بوصفه أحد الجينات المهمة في تحديد القطبية قبل ظهور أي معالم شكلية محورية في المضغة.

المواد و طرائق العمل:

- جنين الأرنب:

إن الأجنة المستعملة في هذا البحث (الذي أجري قسمه النسيجي في مخابر جامعة تشرين في سوريا و قسمه الجزيئي في معهد التشريح و الجنين في جامعة جورج أوغست بمدينة غوتنغن بألمانيا) التي يبلغ عددها 30 جنيناً جمعت في مراحل قبل و بداية تكون المعيدية، مأخوذة من أرانب بيض متزاوجة طبيعياً (Lammers, Euskirchen, Germany)، يتم استخراج أرحام هذه الأرانب بعمليات جراحية قيصرية و ذلك بعد حقن الأرنب بجرعة وريدية قاتلة من مادة الناركين (نحو 320 ملغ) (Merial, Halbergmoos, Germany)، بعد ذلك يتم تجريف الكيسات الأريمية من الرحم المستأصل من الأرنب بعمر 6.25 - 6.50 يوم بعد الإلقاح ثم تغسل بمحلول دارئ الفوسفات الملحي المعقم و الدافئ (phosphate buffered saline, PBS) عدة مرات لإزالة الدم و البقايا الخلوية، تثبت بعدها الأجنة في البارافورم ألدهيد 4% في محلول الفوسفات الملحي لمدة ساعة ضمن درجة حرارة الغرفة لتنقل بعدها إلى مرحلة التشريح المجهرية من أجل إزالة الأغلفة الجنينية الشفافة و معظم النسيج خارج الجنيني [37] باستعمال أدوات التشريح المجهرية العقيمة. يكون جنين الأرنب عبارة عن قرص منغرس في جدار الكيسة الأريمية التي تتألف -فضلاً عن القرص المضغى- من النسيج خارج الجنيني

الحشوي في الفأر و الهلال الهامشي الأمامي في الأرنب و الأرومة الباطنة الأمامية في الخنزير تنتمي إلى النسيج خارج الجنيني الذي يطرح بعد الولادة إلا أنها تؤسس في المرحلة الجنينية المبكرة كلاً من هيكل الجسم (body plane) و خلايا الخط الإنشائي (germ cells line) و ذلك من خلال نموذج دقيق من التعبير الجيني [14, 15, 16].

لقد توصل الباحثون من خلال الدراسات التي تناولت الخصائص الشكلية للجزء الأمامي من الأرومة الباطنة (Hypoblast) في المراحل المبكرة من التطور الجنيني لدى العديد من أنواع الثدييات إلى إطلاق تسمية التمايز الأمامي قبل المعيدية (Anterior pregastrulation differentiation; APD) [17, 6]. تبدي أجنة الثدييات العديد من الاختلافات فيما يتعلق بالترتيب الطبوغرافي للأنسجة الموجودة قبل و في بداية مرحلة المعيدية [8, 18]، فعلى سبيل المثال يتنوع حجم و مكان منطقة الاتصال المشتركة للأرومة الغذائية مع كل من الأرومة الظاهرة و الأرومة الباطنة بما يتناسب مع نموذج الانغراس الذي يبدأ قبل مرحلة المعيدية في الإنسان و الفأر أو يتأخر إلى نهاية مرحلة المعيدية كما في الأرنب أو يتأخر إلى المرحلة العصوية المتقدمة (late neurulation stages) كما في جنين الخنزير [19].

يعد جنين الأرنب أنموذجاً مخبرياً يستعمل مؤخراً لدراسة الصفات الشكلية و الفعالية الجينية في المراحل الجنينية المبكرة كونه يمثل هيكلياً طبوغرافية تتراوح بين الشكل الاسطواني الموجود لدى الفأر [20] و الشكل القرصي المسطح النموذجي لأجنة الثدييات و أهمها جنين الإنسان [21] فضلاً عن سهولة دراسته و التعامل معه خلال المراحل المبكرة من التطور الجنيني. لقد توصل الباحثون من خلال مقارنة النتائج لدى جنين الأرنب، و الفئران، و الإنسان إلى إن هناك قواعداً عامة تضبط مرحلة المعيدية، إلا أن المقاربة الدقيقة [22] أكدت أن النتائج الجزيئية و الشكلية يمكن ربطها جزئياً فقط بين الأنواع [23] مما يجعل اعتبار النتائج قاعدة عامة في كل أنواع الثدييات أمراً غير دقيق تماماً و ما تزال هناك ضرورة لمزيد من الأبحاث للتوصل إلى قواعد تطورية مشتركة.

يعد *sox17* عاملاً مفتاحياً يشارك في تشكيل الأديم الباطن حيث تبين أن خلايا الكتلة الخلوية الداخلية التي ستمتاز لاحقاً إلى أرومة باطنة تملك تعبيراً جينياً لـ *sox17* [24]. يعود *sox17* إلى مجموعة جينات تطورية مهمة تسمى عائلة جينات (sex- sry determining gene on Y chromosome) الجين المحدد للجنس المحمول على الصبغي Y وهو ينتمي إلى المجموعة الفرعية f من مجموعة *sox* [25, 26]. لقد تم التعرف على *sox17* لأول مرة عند الفأر بوصفه عاملاً منظماً للنسخ في مرحلة

Tween 20, 0.5% CHAPS and 50 µg/ml heparin) (Merck, Darmstadt, Germany) في مرحلة التهجين يتم الحضانة بدرجة 70 مئوية خلال الليل كاملاً (نحو 18 ساعة) و ذلك في محلول التهجين الملحي المضاف له 1 ميكرو لتر من مجس cRNA المعرض سابقاً لدرجة حرارة 95 مئوية لمدة 5 دقائق. من أجل إزالة cRNA probe غير المرتبط يتم غسل الأجنة بمحلول التهجين و بمحلول MABT الذي يتألف من المكونات الآتية و على وفق النسب المذكورة:

100 mM maleic acid, 150 mM NaCl,) (0.1% Tween 20, pH 7.5 MABT+2% العينات بمحاليل خاصة تتألف من: 20% heat-Roche blocking reagent+20% heat-inactivated goat serum) و ذلك لخصر المواقع غير النوعية المرتبطة بالأضداد. في المرحلة التالية يتم إظهار مواضع RNA الهجين بنقل الأجنة إلى أطباق بترى تحوي المركبات الآتية: anti-digoxigenin antibody+alkaline phosphatase+BM-purple (Roche, Mannheim, Germany) حيث توضع الأطباق في الظلام و ذلك في درجة حرارة الغرفة لتخريب إنزيم الفوسفاتاز القلوية، تبدأ التفاعلات اللونية بالظهور غالباً بعد يوم من إضافة المادة الملونة و تستمر 3-4 أيام.

- الدراسة الجزيئية بالمجهر الضوئي:

لدراسة توزع تفاعل التهجين الموضعي لـ *sox17* توضع الأجنة الموسومة في مادة تسمى 4-Mowiol 88 (Hoechst, Frankfurt, Germany) تحت ساترة زجاجية ويتم تصوير هذه الأجنة بوصفها كتلة كاملة أولاً، لاحقاً يُنزع منها الماء و توضع ضمن قوالب الـ Technovit 8100 (Heraeus, Kulzer, Werheim, Germany) المسطحة وذلك بدرجة حرارة 40° على وفق طريقة العمل المتبعة من قبل Idkowiak [39] بعد ذلك يتم تقطيع العينات المبلعمة باستعمال السكين الزجاجية تسلسلياً على وفق مستويات سهمية أو مستعرضة إلى مقاطع نسيجية سماكة كل منها 5µ.

بعد أن يتم تحديد مواضع توزع التعبير الجيني على المنظر العام للجنين بواسطة المجهر الضوئي و باستعمال العدسة منخفضة التكبير، تنتقل إلى التكبيرات العالية (Axioskop, Zeiss, Goettingen, Germany) لتحديد التوزع الدقيق لـ *sox17* في الخلايا و في الطبقات الجينية بشكل مفصل. لقد استخلصت عينات Sense cRNA الخاص بجينات *sox17* من cDNA الفأر (kind gift of dr. H. Lickert, Muenchen, Germany) و استعملت بالشروط نفسها التي طبقت على عينات Anti sense RNA كعينة شاهد سلبية في كل مرحلة تطورية.

وتحتوي بداخلها على سائل حر. بعد ذلك تخضع الأجنة لعملية نزع الماء من خلال تعريضها لتراكييز متدرجة من الكحول و تحفظ في وسط الإيثانول 100% بدرجة حرارة 20°- لتستعمل لاحقاً في تجارب التهجين الموضعي. باستعمال المجهر المجسم ثلاثي الأبعاد و بالمقارنة مع تصنيف Viebahn [38] يمكن تحديد مرحلتين منفصلتين قبل بدء مرحلة المعيدية التي يعلنها تشكل الخط الابتدائي و هما:

(1) المرحلة الأولى من مرحلة ما قبل المعيدية (6.25 يوم بعد الإلقاح) و تقسم إلى الطور المبكر الذي يكون فيه القرص الجنيني صغيراً ومدوراً و مغطى بالكامل من قبل الأرومة الغازية القطبية (طبقة راوبر)، و الطور المتأخر حيث تختفي الأرومة الغازية القطبية جزئياً أو كلياً.

(2) المرحلة الثانية من مرحلة ما قبل المعيدية (6.50 يوم بعد الإلقاح) و فيها يبدأ القرص الجنيني بالتطاوُل و من الممكن هنا تمييز القطبين الأمامي و الخلفي عن طريق دراسة المقاطع النسيجية مجهرياً و بالاعتماد على الخصائص الخلوية الشكلية أما المظهر الخارجي العام فلا يبدي علامات واضحة للتمايز القطبي في هذه المرحلة. الخط الابتدائي ما يزال هنا غير مرئي.

- التهجين الموضعي (In Situ Hybridization, ISH):

تم الحصول على جميع عينات mRNA *SOX17* (kind gift of dr. H. Lickert, Muenchen, Germany) الذي يتألف من 707 نكليوتيد و يغطي منطقة الترميز من النكليوتيد رقم 1102 إلى النكليوتيد رقم 1808 من cDNA *sox17* الفأر (GenBank accession No. NM_011441). لقد أُجري التهجين الموضعي في درجة حرارة 70° باستعمال بروتوكولات معيارية تناسب أجنة الأرنب قرصية الشكل في المراحل الجنينية المبكرة [39, 40]. في البدء توضع الأجنة في محافظ بلاستيكية ضمن شروط معقمة جداً ثم تعاد إمامتها، بعد ذلك تعالج جميع العينات بإنزيم البروتين كيناز في PBT (10 µg/ml proteinase K+ PBS+ 0.1% Tween 20) (Sigma, Muenchen, Germany) و ذلك في درجة حرارة الغرفة لمدة (1-2 دقيقة)، ثم يضاف للأجنة من أجل التثبيت محلول مزيج من الغلوتار ألدهيد 0.2% (Roche, Mannheim, Germany) مع PBT لمدة 20 دقيقة. في مرحلة ما قبل التهجين يتم حضانة الأجنة بدرجة حرارة 70° لمدة ساعة في محلول التهجين الذي يتألف من المكونات الكيميائية الآتية على وفق النسب المذكورة: 50% formamide, 1.4xSSC (pH 4.5), 0.5 mM EDTA, 50 µg/ml t-RNA, 0.2%

بالمنظر الخارجي للقرص المضغي على شكل منطقة عالية الكثافة الخلوية مقارنة بباقي أجزاء المضغة. يعد الهلال الهامشي الأمامي (AMC) العلامة الأولى للتمايز المحوري الأمامي الخلفي من الناحية المورفولوجية و يظهر في الطور المتأخر من المرحلة الأولى ما قبل المعيدية.

الخصائص النسيجية لجنين الأرنب في المرحلة الأولى قبل المعيدية

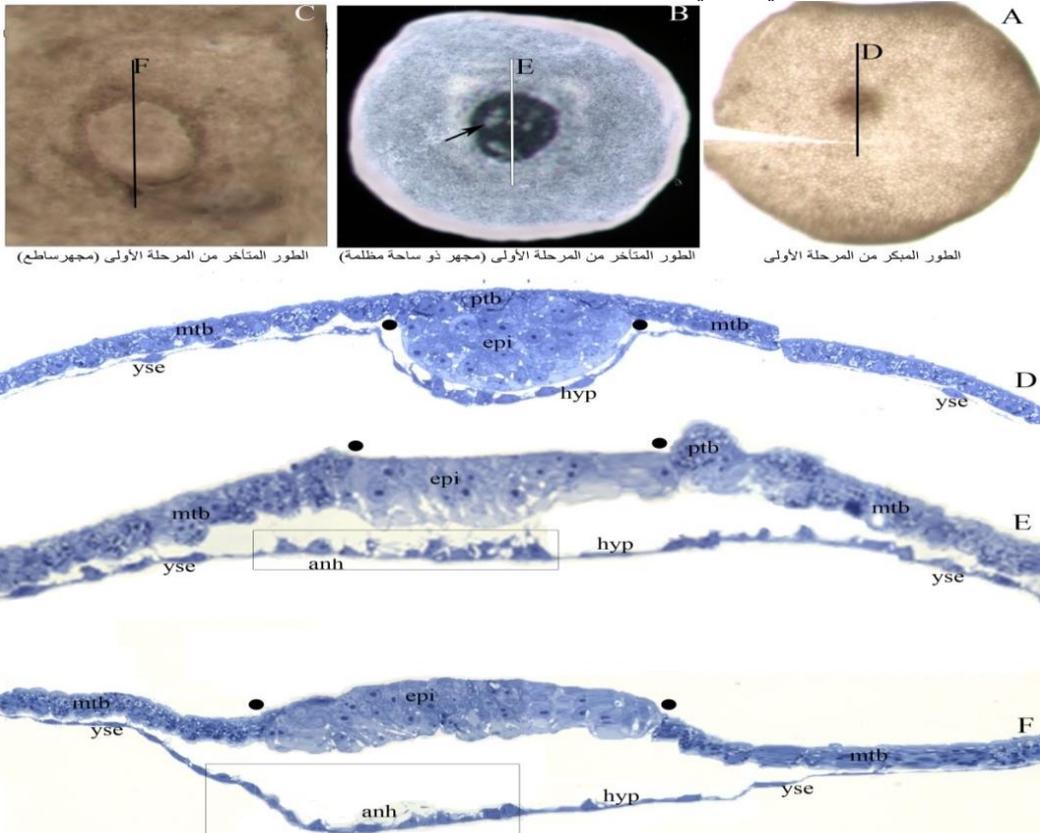
لقد أمكن ملاحظة التمايز المحوري في الطور المتأخر من المرحلة الأولى قبل المعيدية في الأجنة المثبتة برابع أكسيد الأوسميوم OsO₄، و هذا التمايز يعود بشكل خاص للخصائص الشكلية للأرومة الباطنة (الشكل-1). خلافاً للأرومة الظاهرة -التي لا تبدي في الطور الأول المبكر أو المتأخر علامات التمايز القطبي- تلاحظ بداية علامات التمايز في الأرومة الباطنة و ذلك في الطور المتأخر من المرحلة الأولى حيث تكون خلاياها في أحد جوانب المضغة عالية و مكعبة الشكل و كثيفة في حين تكون أقل كثافة على الجانب المقابل من المضغة. هذه الاختلافات الشكلية في الأرومة الباطنة تغطي منطقة هلالية الشكل تمتد من الحافة الأمامية للمضغة باتجاه الخلف إلى مسافة تقترب من منتصف المضغة و يطلق عليها مركب الهلال الهامشي الأمامي.

النتائج:

لأن إشارات التعبير الجيني تظهر في خلايا وأنسجة وأجهزة مختلفة ومتنوعة سنعرض النتائج في هذه الدراسة لكل مرحلة تطورية بشكل منفصل.

المظهر الخارجي لجنين الأرنب في المرحلة الأولى قبل المعيدية

تكون الكيسات الأريمية في هذه المرحلة ذات شكل كروي و بقطر يبلغ نحو 600 ميكرون. يبدو القرص الجنيني مجهرياً على شكل بقعة مدورة صغيرة الأبعاد عالية الكثافة منغرسه في جدار الكيسة الأريمية و محاطة بالنسيج خارج الجنيني الذي يكون أقل كثافة (الشكل-1). في الطور المبكر من المرحلة الأولى يغطي القرص المضغي بالأرومة الغذائية القطبية (طبقة خلايا راوبر) و من الممكن تحديد مكان القرص المضغي المبكر في جدار الكيسة الأريمية بعد التثبيت برابع أكسيد الأوسميوم (OsO₄) لكن من الصعب رسم حدوده الدقيقة مع النسيج خارج الجنيني، مع تراجع طبقة الأرومة الغذائية القطبية (أي في الطور المتأخر من المرحلة الأولى) يصبح من السهل رسم الحدود العامة للقرص المضغي في جدار الكيسة الأريمية. تبين من خلال دراسة المقاطع النسيجية المتسلسلة أن هذه الحافة المحددة تعود إلى الهلال الهامشي الأمامي (AMC) و هو عبارة عن مركب جنيني أمامي عابر و يبدو



شكل (1): أجنة أرنب في المرحلة قبل المعيدية. منظر ظهري للجنين في (A, B, C) ومقاطع نسيجية رقيقة بسماكة 1µm في (D, E, F). صور الأجنة A, C مأخوذة بمجهر ذي ضوء ساطع والجنين B بالمجهر ذي الساحة المظلمة. الأجنة A, B, C بعمر 6.25 يوم بعد الإلقاح. الخطوط العمودية في الأجنة A, B, C توضح مستوى المقاطع D, E, F على الترتيب. السهم في B يشير إلى بقايا الأرومة الغذائية القطبية. تشير النقاط إلى الحدود بين النسيج الجنيني (الأرومة الظاهرة) والنسيج خارج الجنيني (الأرومة الغذائية الجدارية). يشير المستطيل في E و F إلى منطقة الأرومة الباطنة الأمامية (ahb) حيث الخلايا المكعبة والكثيفة عددياً مقارنة بالجانب المقابل. الاختصارات: الأرومة الظاهرة: (Epi) epiblast، الأرومة الغذائية القطبية: (ptb) polar trophoblast، الأرومة الغذائية الجدارية: (mtb) molar trophoblast، الأرومة الباطنة الأمامية: (anh) anterior hypoblast، الخلايا الإبيثيالية للكيس المحي: (yse) yolk sac epithelium.

الأرومة الباطنة أقوى مما هي عليه في الجزء الخلفي، كما أظهرت المقاطع تعبيراً جينياً قوياً في منطقة صغيرة من الخلايا الظهارية للكيس المحي مجاورة للحدود الأمامية للمضغة، لا تبدي خلايا الأرومة الظاهرة عموماً تعبيراً جينياً قوياً لـ *sox17*. تمتلك الأرومة الغذائية الجدارية تعبيراً جينياً لـ *SOX 17* في توزيع مشابه لما هو عليه في طور المبكر من المرحلة الأولى قبل المعيدية.

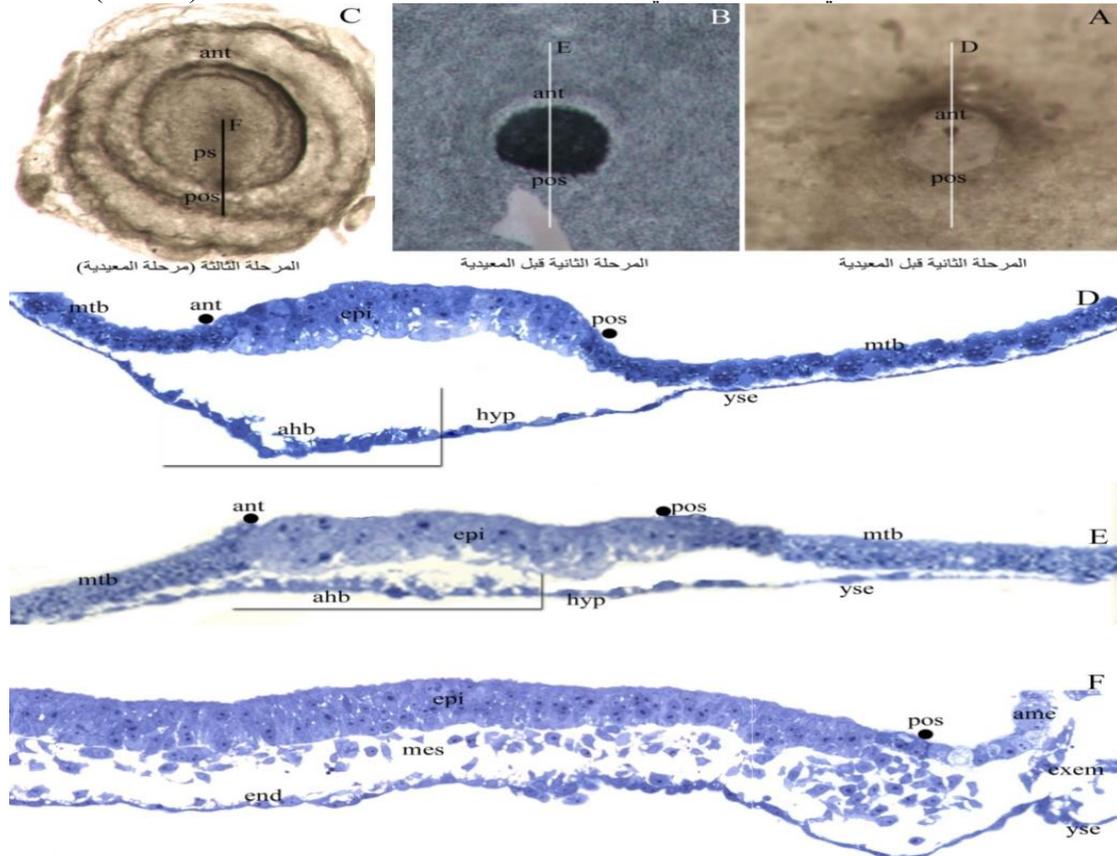
المظهر الخارجي لجنين الأرنب في المرحلة الثانية قبل المعيدية

في هذه المرحلة يتحول القرص الجنيني من الشكل المدور إلى الشكل البيضوي و يقاس حوالي 300 ميكرون طولاً. مجهرياً ترسم حدود القرص الجنيني بشكل واضح في جدار الكيسة الأريمية و يكون القطب الخلفي مميزاً. من جهة أخرى تختفي الأرومة الغذائية القطبية التي كانت تغطي سابقاً القرص الجنيني بشكل كامل. يؤدي غياب الدعم الهيكلي الذي توفره طبقة الأرومة الغذائية القطبية من جهة و استعمال الغلوتارألدهيد (مثبت كيميائي) من جهة أخرى إلى تقبب و ارتفاع طبقة الأرومة الظاهرة عن الأرومة الباطنة التي تتكمش مما يؤدي لانفصال الطبقتين و ابتعادهما عن بعضهما (الشكل-2).

التعبير الجيني لـ *Sox17* لدى جنين الأرنب في المرحلة الأولى قبل المعيدية

لا يبدي المظهر الخارجي للقرص المضغي في طور المبكر من المرحلة الأولى قبل المعيدية توزعاً مميزاً لإشارات التهجين الموضعي لـ *sox17* في أي من مناطق المضغة (الشكل-3)، بينما يمكن ملاحظة النموذج المنقط في النسيج خارج المضغي و يبدو أنه ناتج عن وجود علامات التعبير الجيني لـ *sox17* في طبقة الأرومة الغذائية الجدارية بشكل ضعيف بينما تغيب إشارات التهجين الموضعي في طبقة الخلايا الظهارية للكيس المحي. من جهة أخرى فقد أظهر التعبير الجيني لـ *sox17* اختلافاً في طور المتأخر من المرحلة الأولى قبل المعيدية حيث كان أقوى باتجاه أحد قطبي المضغة (الشكل-3)، حيث لوحظ على المنظر العام للمضغة وجود تجمع كثيف للإشارات الجينية في منطقة من المضغة توافق منطقة AMC و قد تم التأكد من ذلك بدراسة المقاطع النسيجية العرضية و السهمية، و في المقابل يكون *sox17* ضعيفاً أو حتى معدوماً في بقية مناطق القرص المضغي.

توضح المقاطع النسيجية أن التعبير الجيني لـ *sox17* يتركز بشكل أقوى في الأرومة الباطنة وليس في الأرومة الظاهرة و هو في الجزء الأمامي من



شكل (2): أجنة أرنب في مرحلة قبل وبداية المعيدية. منظر ظهري للجنين في (A, B, C) ومقاطع نسيجية رقيقة بسماكة $1\mu\text{m}$ في (D, E, F). الأجنة A, B بعمر 6.25 يوم بعد الإلقاح والجنين C بعمر 6.50 يوم بعد الإلقاح. تشير النقطة في المقطع F إلى الحدود بين الأديم الظاهر و خلايا الغشاء الأميني. منطقة الخط الابتدائي في المرحلة الثالثة (C في ps) تبدو بشكل منطقة عالية الكثافة الخلوية على الخط الناصف في الجزء الخلفي للمضغة. الخلايا الإيثيلالية الأمينوسية: (ame) amniotic epithelium، الأديم المتوسط: (mes) mesoderm، الأديم المتوسط خارج الجنيني: (exem) extra embryonic mesoderm، الخط الابتدائي: (ps) primitive streak، الأديم الباطن: (end) endoderm، النهاية الخلفية: (pos) posterior، النهاية الأمامية: (ant) anterior.

على التعبير الجيني لـ *sox17* في كل من الأرومة الباطنة الأمامية و الأرومة الظاهرة الخلفية.

المناقشة:

لقد ساعد التحليل النسيجي جنباً إلى جنب مع الدراسة الجزيئية لنماذج التعبير الجيني لجين *sox17* على تحديد مرحلتين قبل المعيدية عند الأرنب، إن المقارنة بأنواع الثدييات الأخرى الشائعة مخبرياً مثل الفأر، و الخنزير بينت أن هذه المراحل يمكن أن تنطبق على الثدييات بشكل عام. تبدأ مرحلة المعيدية عندما تنغمد الخلايا سليفة الأديم المتوسط بالاتجاه البطني مختزقة الغشاء القاعدي للأرومة الظاهرة [41] و يحدث ذلك في القطب الخلفي للمضغة معلنة تشكل الخط الابتدائي (المرحلة الثالثة للتطور) الذي يمثل التشكل الجيني الأول و الذي يحدد المحور الأمامي الخلفي للمضغة سواء عند الأرنب [38] أو عند الخنزير [20] أو عند الفأر [42].

يسبق تشكل الخط الابتدائي مرحلة مهمة يتم فيها تأسيس التمايز الأمامي من الناحية الشكلية عبر مركبات التمايز الأمامي قبل المعيدية (APD) و من الناحية الجينية من خلال نموذج التعبير الجيني لـ *sox17* حيث لوحظت فعالية عالية لـ *Sox17* في مركب التمايز الأمامي عند الخنزير [6] و عند الأرنب (الشكل 1- A, B, G [33])، و كذلك عند الفأر [20]، من جهة أخرى لوحظت الفعالية الجينية العالية لجينات كثيرة مثل *Hesx1*, *Hex*, *Cer1*, *Dkk1* في مرحلة تطورية مبكرة، أما *T-box gene* (*Eomesodermin*) *eomes* فيؤدي دوراً أساسياً في التنشيط المبكر لبرنامج التمايز المحوري الأمامي الخلفي من خلال التحريض المباشر للتعبير الجيني لـ *Lhx1* [7]. ينتج الشكل المميز لمنطقة التمايز الأمامي عن الحركة الخلفية الفعالة لخلايا الأرومة الظاهرة باتجاه الخط المتوسط الخلفي للمضغة لتأسيس ما يسمى الخط الابتدائي بعملية تسمى التمدد الخلفي للمضغة PGE [13].

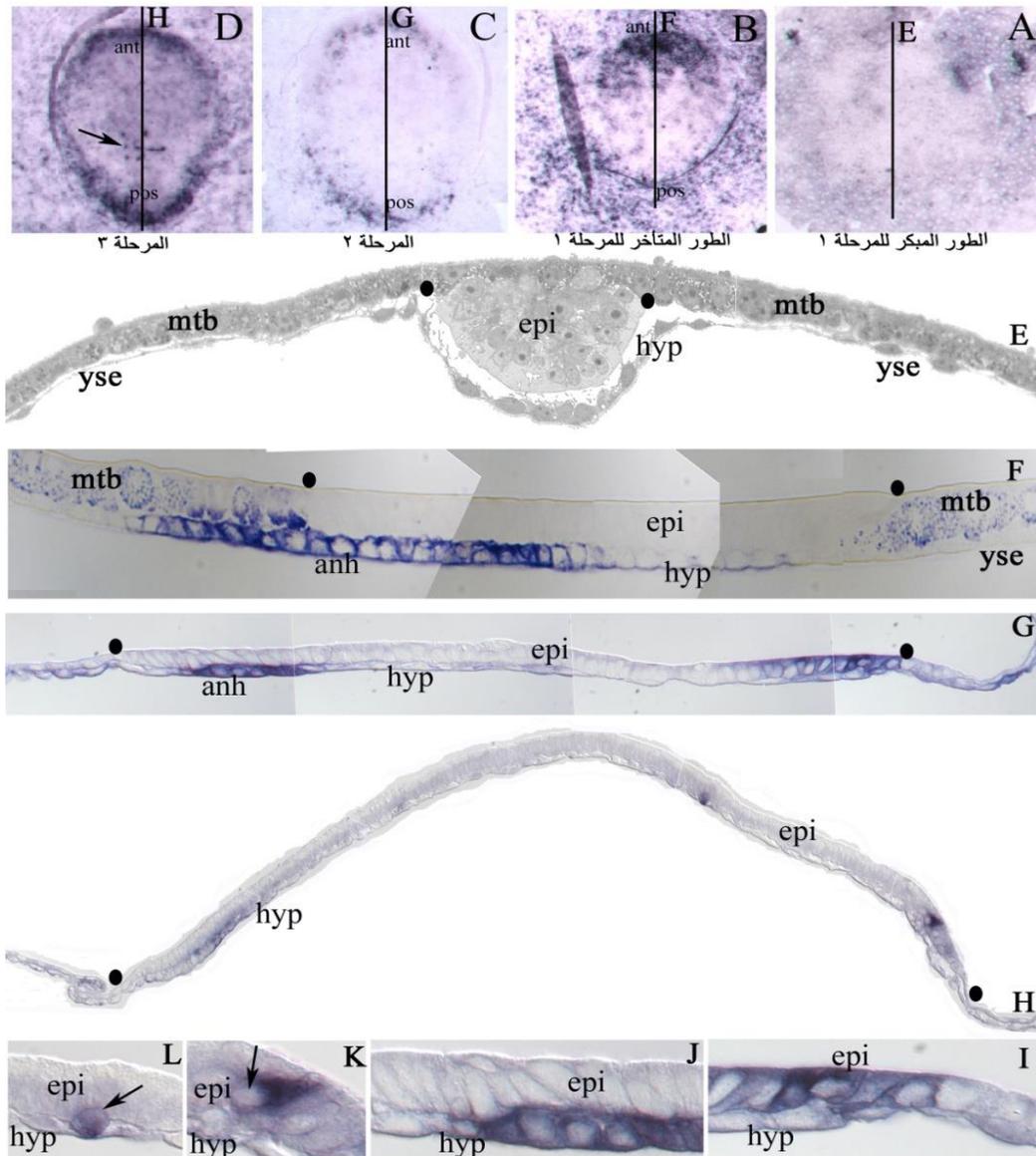
الخصائص النسيجية لجنين الأرنب في المرحلة الثانية قبل المعيدية

تعيب الأرومة الغذائية القطبية في هذه المرحلة كما تكون طبقة الأرومة الظاهرة مسطحة، أما الأرومة الباطنة الأمامية فهي عبارة عن خلايا ظهارية اسطوانية الشكل أكثر ارتفاعاً و عدداً من الأرومة الباطنة الخلفية (الشكل 2). لا يقتصر التمايز في هذه المرحلة على الأرومة الباطنة في القطب الأمامي بل يمتد للأرومة الظاهرة أيضاً التي تكون أقل ارتفاعاً و عدداً في القطب الخلفي.

التعبير الجيني لـ *Sox17* لدى جنين الأرنب في المرحلة الثانية قبل المعيدية

لقد لوحظ وجود التعبير الجيني لـ *sox17* في المنظر العام للأجنة المدروسة و هو يشمل كامل منطقة AMC. في النسيج خارج الجنيني يوافق التعبير الجيني لـ *sox17* بشكل خاص النموذج الملاحظ في المرحلة الأولى. يتوزع *sox17* في الأرومة الباطنة الأمامية حيث تكون الخلايا اسطوانية و عالية بينما يقل تعبيره باتجاه الأرومة الباطنة الخلفية (الشكل-3). من المثير للاهتمام وجود التعبير الجيني في الأرومة الظاهرة الخلفية و توضع نسيجياً في المنطقة الموافقة لـ PGE و ذلك قبل نشوء خلايا الأديم المتوسط التي تعلن بداية المرحلة الثالثة من التطور الجنيني (مرحلة تشكل الخط الابتدائي).

من أجل تأكيد و دعم دور *sox17* في تحديد القطبية قورنت النتائج بنموذج التعبير الجيني لـ *brachyury* (الجين الواسم لطلائع الأديم المتوسط)، و قد تبين وجوده في منطقة هلالية الشكل من القرص الجنيني تشغل القطب المعاكس لـ AMC في نفس هذه المرحلة أي قبل اندخال خلايا الأديم المتوسط الذي يحدث في المنطقة نفسها في المرحلة 3 من التطور الجنيني. لقد لوحظ التعبير الجيني لـ *sox17* في المرحلة الثالثة في الخلايا سليفة الأديم المتوسط التي تنغمد بطنياً في القرص المضغي معلنة بداية تشكل الوريقة الوسطى الجنينية. تحافظ هذه المرحلة



شكل (3): التعبير الجيني لـ *sox17* في جنين الأرنب قبل وفي بداية المعيدية. الأجنة A, B بعمر 6.25 يوم بعد الإلقاح، بينما الأجنة C و D بعمر 6.50 يوم بعد الإلقاح. يشير الجزء الخلفي في G (الموجود في يمين الصورة والموضح بالتكبير 40x في I) إلى منطقة الأرومة الظاهرة الخلفية التي تملك إشارات التهجين الموضعي لـ *sox17*، و الجزء الأمامي في G (الموجود في يسار الصورة والموضح بالتكبير 40x في J) يشير إلى منطقة الأرومة الباطنة الأمامية التي تملك أيضاً إشارات التعبير الجيني لـ *sox17*. نلاحظ في F في منطقة الأرومة الباطنة الأمامية (يسار الصورة) أن الخلايا عالية وكثيفة عددياً مقارنةً بالجانب المقابل كما تملك إشارات التعبير الجيني لـ *sox17* وهي توافقت منطقة AMC. السهم في مركز الجنين C يشير إلى الخلايا سليفة الأديم المتوسط والتي تملك أيضاً التعبير الجيني لـ *sox17*. يشير السهم في K و L إلى خلية من الأديم الظاهر تملك تعبيراً جينياً لـ *sox17* وهي في طور الانغماد لتشكيل خلايا الأديم المتوسط. بالنتيجة تكون إشارات التهجين الموضعي لـ *sox17* في جنين المرحلة الثانية قوية و محصورة بمنطقتين متقابلتين هما التمدد المعيدي الخلفي و الهلال الهامشي الأمامي.

المرحلة 1 قبل تشكل التلم الابتدائي على أنها ذات أرومة ظاهرة مكشوفة بشكل كامل (تتقنقذ إلى طبقة راوبر [41]) لكن دون وجود علامات للقبطية في حين أن فريق الدراسة التي نشرت عام 2009 [6] بيّن من خلال دراسة المقاطع النسيجية أنّ جميع الأجنة التي تفتقر إلى طبقة راوبر تظهر علامات واضحة على التمايز الشكلي في الأرومة الباطنة الأمامية مما يشير إلى الدور المهم للأرومة الباطنة في تحديد المحور الأمامي الخلفي قبل تشكل التلم الابتدائي من الناحية الشكلية [6] و قبل ذلك جزئياً عند الخنزير [6, 45] و هذه الدراسة عند الأرنب).

بالاستناد إلى نظام تقسيم مراحل التطور الجنيني قبل المعيدية في الفأر [18, 43] و في الدجاج [42] و في الخنزير [6, 44]، سنقسم مراحل التطور الجنيني قبل المعيدية عند الأرنب اعتماداً على نموذج التعبير الجيني لـ *sox17* إلى: (1) المرحلة الأولى قبل المعيدية (تنقسم بدورها إلى الطور المبكر و الطور المتأخر)، (2) المرحلة الثانية قبل المعيدية و يتوافق هذا التقسيم نسبياً مع ما حدده Viebahn شكلياً عند الأرنب في عام 2004 [38]، يتوافق هذا التقسيم عددياً مع المراحل الثلاث التي حددها Veglestad عام 2006 عند الخنزير [44]، و وصف فيها

الأخرى التي تملك تعبيراً مبكراً في القطب الأمامي لدى أجنة الثدييات.

الشكر

نقدم الشكر العميق لفريق البحث العلمي في جامعة جورج أوغست في مدينة غوتنغن بألمانيا بإشراف البروفيسور كريستوف فيبان الذي زودنا بعينات إضافية مهمة أغنت البحث و أكدت نتائج الدراسة التحليلية التي أجريت في جامعة تشرين في سوريا.

المصادر:

- [1]Katsuyoshi, T.; Hiroshi, H. 2012. Cell fate decisions and axis determination in the early mouse embryo. *Development*, 139: 3-14.
- [2]Hikasa, H.; Sokol, S. Y. 2013. *Wnt* Signaling in Vertebrate Axis Specification. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 5(1): 1-20.
- [3]Thomas, Q.; Beddington, R. S. P. 1996. Anterior primitive endoderm may be responsible for patterning the anterior neural plate in the mouse embryo. *Curr. Biol.*, 6: 1487-1496.
- [4]Rosenquist, T. A.; Martin, G. R. 1995. Visceral endoderm-1 (VE-1): an antigen marker that distinguishes anterior from posterior embryonic visceral endoderm in the early post-implantation mouse embryo. *Mech. Dev.*, 49: 117-121.
- [5]Viebahn, C. 1999. The anterior margin of the mammalian gastrula: comparative and phylogenetic aspects of its role in axis formation and head induction. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 46: 63-103.
- [6]Hassoun, R., Schwartz, P.; Feistel, K.; Blum, M.; Viebahn, C. 2009, Axial differentiation and early gastrulation stages of pig embryo. *Differentiation*, 78: 301-311.
- [7]Nowotschin, S. 2013. The T-box transcription factor Eomesodermin is essential for AVE induction in the mouse embryo. *Genes Dev.*, 27: 997-1002.
- [8]Blomberg, L.; Hashizume, K.; Viebahn, C. 2008. Blastocyst elongation, trophoblastic

إن تفسير الأشكال المختلفة للتعبير الجيني لـ *SOX17* عند الثدييات يكمن في اختلاف أنماط تغذية الجنين التي تتفاوت بشكل ملحوظ بين الثدييات وليس بين الخنزير [19] و الأرنب [38] و الفأر فقط [20] حيث تمكّن المساحة الواسعة لسطح الكيسة الأريمية عند الخنزير مثلاً من تأخير عملية الانغراس إلى مرحلة الفلقة المتأخرة (late somites stages) و لذلك تبقى الكيسة الأريمية حرة ضمن جوف الرحم لمدة طويلة نسبياً مما يتطلب حماية الجنين النامي من خلال تشكل السلى في مرحلة مبكرة كثيراً مقارنة بجنين الأرنب الذي ينغرس بإحكام ببطانة الرحم خلال مرحلة التكون المعيدي المبكر و ذلك بعد زوال المنطقة الشفافة مباشرة و هو بذلك يستطيع تأخير تشكل السلى إلى المرحلة العصبية المتأخرة (late neurulation stages).

يشترك الأديم المتوسط داخل الجنيني بتنظيم من الجينات المعبر عنها نموذجياً في القطب الأمامي [39, 4]. يبدو أن التعبير الجيني لـ *Sox17* في مركب التمايز الأمامي عند الخنزير يؤخر من جهة تشكل الأديم المتوسط داخل الجنيني في القطب الخلفي [46, 22] -من خلال تثبيط تفكك الغشاء القاعدي المطلوب لأجل عملية الانتقال الظهاري الميزانشيمي (epithelial-mesenchymal transition, EMT) -لمدة زمنية أطول مما هو عليه في الأنواع ذات التمايز الأمامي الأصغر حجماً مثل جنين الأرنب [9]. و من جهة أخرى يؤخر تشكل الأديم المتوسط داخل الجنيني في النصف الأمامي للمضغة [47]، إنّ التمايز الشكلي وقيله الجيني للأرومة الباطنة الأمامية يدعم الجزء الخلفي للمضغة الذي هو تحت تأثير جزئي مختلف عن النصف الأمامي [48] و يحصر تشكل الأديم المتوسط خارج الجنيني في القطب الخلفي للمضغة [50, 49].

يتبين من خلال دراسة نماذج التعبير الجيني و إشارات التهجين الموضعي لـ *sox17* أنّ القطب الأمامي في جنين الأرنب يتميز جينياً قبل أن يبدأ التمايز الشكلي مما يجعل *sox17* أحد أهم الجينات التي تؤدي دوراً منظماً لتمايز المراحل المبكرة من التطور الجنيني، و يشير مصطلح التمايز الأمامي قبل المعيدية (APD) إلى النماذج المختلفة لتمايز طبقة الأرومة الباطنة الأمامية حيث يكون بشكل هلال في جنين الأرنب. و يتطلب تأكيد أهمية *sox17* بوصفه عاملاً منظماً في سلسلة الإشارات التي تتدخل في تمايز القطب الأمامي و من ثم النسيج و الأجهزة المشتقة من هذا القطب المزيد من الدراسات والأبحاث التي تتناول تأثير الطفرات في هذا الجين على تمايز النسيج المحوري و النسيج خارج الجنيني، وذلك لتقديم الدليل الوظيفي على دور *sox17* في التطور المحوري المبكر و في مرحلة لاحقة يتعين دراسة علاقة هذا الجين مع الجينات

- fornormal embryonic anteroposterior axis development. *Development*, 133: 1059–1068.
- [16] Ang, S. L.; Constam, D. B. 2004. A gene network establishing polarity in the early mouse embryo. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 15: 555–561.
- [17] Morris, S. A.; Grewal, S.; Barrios, F.; Patankar, S. N.; Strauss, B.; Buttery, L.; Alexander, M.; Shakesheff, K. M.; Zernicka-Goetz, M. 2012. Dynamics of anterior–posterior axis formation in the developing mouse embryo. *Nat. Commun.*, 3: 673–683.
- [18] Tam, P. P. L.; Gad, J. M. 2004. *Gastrulation in the mouse*, Cold Spring Harbor, USA. PP 560.
- [19] Perry, J. S.; Rowlands, I. W. 1962. Early pregnancy in the pig. *J. Reprod. Fertil.*, 4: 175–188.
- [20] Pfister, S.; Steiner, K. A.; Tam, P. P. 2007. Gene expression pattern and progression of embryogenesis in the immediate post-implantation period of mouse development. *Gene Expr. Patterns*, 7: 558–573.
- [21] Halacheva, V.; Fuchs, M.; Dönitz, J.; Reupke, T.; Püschel, B.; Viebahn, C. 2011. Planar Cell Movements and Oriented Cell Division During Early Primitive Streak Formation in the Mammalian Embryo. *Developmental Dynamics*, 240: 1905–1916.
- [22] Flechon, J. E.; Degrouard, J.; Flechon, B. 2004. Gastrulation events in the prestreak pig embryo: ultrastructure and cellmarkers. *Genesis*, 38: 13–25.
- [23] Behringer, R. R.; Eakin, G. S.; Renfree, M. B. 2006. Mammalian diversity: gametes, embryos and reproduction. *Reprod. Fertil. Dev.*, 18: 99–107.
- [24] Morris, S. A.; Teo, R. T. Y.; Li, H.; Robson, P.; Glover, D. M.; Zernicka-Goetz, M. 2010. Origin and formation of the first two distinct cell types of the inner cell mass in the differentiation and embryonic pattern formation. *Reproduction*, 35: 181–195.
- [9] Viebahn, C.; Mayer, B.; Miething, A. 1995. Morphology of incipient mesoderm formation in the rabbit embryo: a light-and retrospective electron- microscopic study, *Acta Anat*, 154: 99–110.
- [10] Egea, J., Erlacher, C., Montaz, E., Burtscher, I., Yamagishi, S.; Hess, M., Hampel, F.; Sanchez, R.; Rodriguez, M. T.; Bosi, M. R.; Fassler, R.; Lickert, H.; Klein, R. 2008. Genetic ablation of FLRT3 reveals a novel morphogenetic function for the anterior visceral endoderm in suppressing mesoderm differentiation. *Genes Dev.*, 22: 3349–3362.
- [11] Kimura, C.; Yoshinaga, K.; Tian, E.; Suzuki, M.; Aizawa, S.; Matsuo, I. 2000. Visceral endoderm mediates forebrain development by suppressing posteriorizing signals. *Dev. Biol.*, 225: 304–321.
- [12] Perea-Gomez, A.; Camus, A.; Moreau, A.; Grieve, K.; Moneron, G.; Dubois, A.; Cibert, C.; Collignon, J. 2004. Initiation of gastrulation in the mouse embryo is preceded by an apparent shift in the orientation of the anterior–posterior axis. *Curr. Biol.*, 14: 197–207.
- [13] Viebahn, C.; Stortz, C.; Mitchell, S. M.; Blum, M. 2002. Low proliferative and high migratory activity in the area of Brachyury expressing mesoderm progenitor cells in the gastrulating rabbit embryo. *Development*, 129: 2355–2365.
- [14] Chuva, S. M.; Hayashi, K.; Surani, M. A. 2007. Proximal visceral endoderm and extraembryonic ectoderm regulate the formation of primordial germ cell precursors. *BMC Dev. Biol.*, 20: 140–149.
- [15] Georgiades, P.; Rossant, J. 2006. *Ets2* is necessary in trophoblast

- or Hnf3 beta activity. *Int. J. Dev. Biol.*, 45: 347–355.
- [33] Hassoun, R.; Puschel, B.; Viebahn, C. 2009. *Sox17* expression patterns during gastrulation and early neurulation in the rabbit suggest two sources of endoderm formation. *Cells Tissues Organs*, 191: 68-83.
- [34] Serrano, A. G.; Gandillet, A.; Pearson, S.; Lacaud, G. Kouskoff, V. 2010. Contrasting effects of *Sox17*- and *Sox18*-sustained expression at the onset of blood specification. *Blood*, 115: 3895–3898.
- [35] Raedun, L.; Amanda, D.; Yumi, Y.; Antoine, B.; Cedric, B.; Warren, S.; Nancy, A.; Gordon, K. 2013. The expression of *Sox17* identifies and regulates hemogenic endothelium. *Nature Cell Biol.*, 15: 502–510.
- [36] Engert, S.; Burtscher, I.; Perry, W.; Dulev, S.; Schotta, G.; Lickert, H. 2013. Wnt/ β -catenin signalling regulates *Sox17* expression and is essential for organizer and endoderm formation in the mouse. *Development*, 140: 3128-3138.
- [37] Denker, H. W. 2000. structural dynamics and unction of early embryonic coats. *Cells Tissues Organs*, 166: 180-207.
- [38] Viebahn, C. 2004. Gastrulation in the rabbit, Cold Spring Harbor, USA. PP 588.
- [39] Idkowiak, J.; Weisheit, G.; Plitzner, J.; Viebahn, C. 2004. Hypoblast controls mesoderm generation and axial patterning in the gastrulating rabbit embryo. *Dev. Genes Evol.*, 214: 591–605.
- [40] Weisheit, G.; Mertz, K. D.; Schilling, K.; Viebahn, C. 2002. An efficient *in situ* hybridization protocol for multiple tissues sections and probes on miniaturized slides. *Dev. Genes Evol.*, 212: 403-406.
- [41] Viebahn, C.; Mayer, B.; Miething, A. 1995. Morphology of incipient mesoderm formation in the rabbit embryo: a light-and retrospective mouse embryo. *PNAS*, 107(14): 6364-6369.
- [25] Woodland, H. R.; Zorn, A. M. 2008. The core endodermal gene network of vertebrates: combining development precision with evolutionary flexibility. *Bioessays*, 30(8): 757–765.
- [26] Lefebvre, V. B.; Dumitriu, A.; Mendez, Y.; Han, B.; Pallav, E. 2007. Control of cell fate and differentiation by Sry-related high mobility-group box (Sox) transcription factors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 39: 2195–2214.
- [27] Kanai, Y.; Kanai-Azuma, M. T.; Noce, T. C.; Saido, T.; Shiroishi, Y.; Hayashi, K.; Yazak, I. 1996. Identification of tow *sox17* messenger RNA isoforms, with and without the high mobility group box region, and their differential expression in mouse spermatogenesis. *J. Cell boil.*, 133: 667–681.
- [28] Hudson, C. D.; Clements, R. V.; Friday, D.; Stott, H. R.; Woodland, X. 1997. *sox17* alpha and beta mediate endoderm formation in *Xenopus*. *Cell*, 91: 397–405.
- [29] Alexander, J.; Stainier, D. Y. 1999. A molecular pathway leading to endoderm formation in zebrafish. *Curr. Biol.*, 9: 1147–1157.
- [30] Viotti, M.; Nowottschin, S.; Hadjantonakis, A. 2014. *SOX17* links gut endoderm morphogenesis and germ layer segregation. *Nature Cell Biol.*, 16: 1146-1156.
- [31] Kanai-Azuma, M. T.; Kanai, Y.; Gad, J. M.; Tajima, C.; Taya, M.; Kurohmaru, Y.; Sanai, H.; Yazaki, K.; Tam, P. P. 2002. Depletion of definitive gut endoderm in *sox17*-null mutant mice. *Development*, 129: 2367–2379.
- [32] Kinder, S. J.; Tsang, T. E.; Ang, S. L.; Behringer, R. R.; Tam, P. P. 2001. Defects of the body plan of mutant embryos lacking *Lim1*, *Otx2*

- porcine embryos suggests mesodermal differentiation from day 9 after conception. *Anat. Histol. Embryo*, 130: 339–344.
- [47] Yang, J.; Weinberg, R. A. 2008. Epithelial–mesenchymal transition at the cross-Roads of development and tumor metastasis. *Dev. Cell*, 14: 818–829.
- [48] Martin, B. L.; Kimelman, D. 2008. Regulation of canonical *Wnt* signaling by Brachyury is essential for posterior mesoderm formation. *Dev. Cell*, 15: 121–133.
- [49] Downs, K. M.; Inman, K. E.; Jin, D. X.; Enders, A. C. 2009. The Allantoic Core Domain: new insights into development of the murine allantois and its relation to the primitive streak. *Dev. Dyn.*, 238: 532–553.
- [50] Rivvera-Perez, J. A.; Magnuson, T. 2005. Primitive streak formation in mice is preceded by localized activation of Brachyury and Wnt3. *Dev. Biol.*, 288: 363–371.
- electron- microscopic study. *Acta Anat.*, 154: 99–110.
- [42] Hamburger, V.; Hamilton, H. L. 1992. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Dev. Dyn.*, 195: 231–272.
- [43] Kaufman, M. H. 1992. *The Atlas of Mouse Development*. Academic Press, London. PP 512.
- [44] Vejlested, M.; Du, Y.; Vajta, G.; Maddox-Hyttel, P. 2006. Post-hatching development of the porcine and bovine embryo-defining criteria for expected development in vivo and in vitro. *Theriogenology*, 65: 153–165.
- [45] YU, J. K.; Satou, Y.; Holland, N. D.; Shin, I. T.; Kohara, Y.; Satoh, N.; Bronner-Fraser, M.; Holland, L. Z. 2007. Axial patterning in cephalochordates and the evolution of the organizer. *Nature*, 445: 613–617.
- [46] Prella, K.; Holtz, W.; Osborn, M. 2001. Immuno cytochemical analysis of vimentin expression patterns in

The Role of *Sox17* Gene Expression in Early Definition of Anterior Pole of the Rabbit Embryo at Early Pre-Gastrulation Stages

Lecturer Dr. Romia Hassoun

Medicine faculty in Tishreen university- Syria

*MD, chief of department of anatomy and histology and embryology at Tishreen, University-latakia-syria.

E-mail: dr.med.hassoun@gmail.com

Received 24/4/2016

Accepted 4/10/2016

Abstract:

The primitive streak and notochord and previously the anterior marginal crescent (AMC), anterior visceral endoderm (AVE) and the anterior hypoblast (AHB) are embryonic entities which identify main body axes and thus establish body plan in the early stages of embryonic development. All of the anterior pre-gastrulation differentiation structures are addressed terminology as anterior pre-gastrulation differentiation (APD). These structures are defined morphologically and are called in mouse (AVE), in rabbit (AMC) and in the pig (AHB). The anterior hypoblast cells of APD are higher and denser than at the opposite pole of the embryo. Moreover, the APD stretches variously between species and has different shapes in the mammalian embryos, for example, it is crescent-like shape in the rabbit and disc-like shape in the pig. In this study, the *sox17* expression patterns show that the anterior pole of rabbit is differentiated genetically prior to morphological differentiation. *In Situ* hybridization signals of *sox17* are located in AMC area at early pre-gastrulation stages before appearance of first cellular differentiation signs. This study fixes *sox17* gene as one of the important genes in definition of the polarity of the mammalian embryo before appearance morphological or axial landmarks.

Key words: *Sox17*, Axial Differentiation, Rabbit Embryo, Hypoblast, Gastrulation