ISSN : ۲۰۰۸ - ۶۲۹x

فصلنامه علمی پژوهشی

زیست شناسی تکوینی

دانشگاه آزاد اسلامی
واحد تهران شمال

سال دوم، شماره ۵ ، زمستان ۱۳۸۸

عنوان مقالات

- بررسی اثر تابش فرا بنفش برفراساختار برگ و الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های برگ گلرنگ .Carthamus tinctorious L
  هما محمودزاده، طاهر نژاد ستاری، پگاه فرخ تهرانی ۱
- بررسی تاثیر سالیسیلیک اسید بر کال‌زایی، اندام‌زایی و مقاومت جداکشت‌های گیاه نخود .Cicer arietinum L
  سیده مهدخت مداح، احمد مجد، فیروزه چلبیان ۹
- مطالعه میکرومورفولوژی دانه گرده جنس‌های Atriplex و Salsola (Chenopodiaceae) در منطقه گرمسار
  علیرضا ایرانبخش، مه لقا قربانلی، نفیسه تنده ۲۵
- بررسی ویژگی‌های تشریحی و اثر چهار تنظیم‌کننده رشد بر روند کالوس‌زایی هیپوکوتیل‌های گیاه هویج. Daucuse carota L واریته ی α هلندی
  گلناز تجدد، احمد مجد، فهیمه سلیم پور، مهدیه ستاری پور ۳۳
- تاثیر ۱، ۳ـ بیس (۲ـ سیانوفنیل) تریازین بر تکثیر رده‌های سلولی PC۱۲ و B۱۶F۱۰
  محمد نبیونی، سمیه ابراهیمی، مریم علوی، امیر ربیعی، حسین بهبودی، الهام حویزی ۴۵
- استفاده از سیتوتکنیک در بررسی تمایز سلول‌های خونی در جنین جوجه Gallus gallus domesticus
  جینا خیاط زاده، ناصر مهدوی شهری، مسعود فریدونی، شیما مجیدی ۵۱
- بررسی پلی مورفیسم‌های نوکلئوتیدی منفرد SNPs در ژن‌های رسپتور اینترفرون (IFNAR۱ و IFNAR ۲) در بیماران مبتلا به هپاتیت C مزمن و ارتباط با پاسخ به درمان ترکیبی اینترفرون و ریباویرین
  زهره حیدری، شاهین مرات، محمدرضا رضوی، کیانا شاه‌زمانی ۶۳
- تاثیر داروی ایماتینیب برتکوین بافت رحم در موش‌های Rat ماده نابالغ نژاد Wistar
  پریچهر یغمایی، نسیم حیاتی رودباری، محمد کاظم خان محمدی خرمی ۷۱

تاییدیه درجه علمی

به استناد مصوبات کمیسیون بررسی و تایید مجلات علمی دانشگاه آزاد اسلامی و بر اساس رای شصت و نهمین جلسه کمیسیون مذکور مورخ ۱۳۸۹/۵/۱۱، مجله **زیست شناسی تکوینی** دانشگاه آزاد اسلامی **واحد تهران شمال** دارای شرایط دریافت درجه **علمی پژوهشی** شناخته شد.

این تأییدیه از تاریخ تصویب به مدت یک سال معتبر است.

دکتر فریدون رهنمای رودپشتی
معاون پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی

درج درجه علمی و شماره پروانه در داخل مجله الزامی است.

فصلنامه
زیست‌شناسی تکوینی
۵۱-۶۱ سال دوم، شماره ۵، زمستان ۱۳۸۸

استفاده از سیتوتکنیک در بررسی تمایز سلول‌های خونی در جنین جوجه*Gallus gallus domesticus*

جینا خیاط‌زاده[1*]، ناصر مهدوی شهری[2]، مسعود فریدونی[3]، شیما مجیدی[4]

۱ـ دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، دانشکده علوم، استادیار گروه زیست شناسی، مشهد، ایران. j.khayatzadeh@mshdiau.ac.ir
۲ـ دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، دانشکده علوم، استاد گروه زیست شناسی، مشهد، ایران.
۳ـ دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، استادیار گروه زیست شناسی، مشهد، ایران.
۴- دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، دانشکده علوم، استادیار گروه زیست شناسی، مشهد، ایران.

چکیده

از آن جا که بررسی سلول‌ها از مباحث مهم زیست شناسی و جنین شناسی است و جنین جوجه نیزاز مهم‌ترین مدل‌های آزمایشگاهی است و از طرفی در خصوص بررسی سیتولوژی و سیتوشیمی تکوین سلول‌های خونی جنین جوجه، تحقیق کمتری انجام گرفته، هدف ازانجام این پژوهش مطالعه سیر تکوین سلول‌های خونی جنین جوجه براساس تغییرات سیتولوژی و سیتوشیمی بود. امید است نتایج این تحقیق در ارائه یک مدل آزمایشگاهی مناسب جهت آموزش خون شناسی یا جنین شناسی حائز اهمیت قرار گیرد.

در انجام این تحقیق تعداد ۱۰۰ عدد تخم‌مرغ نطفه‌دار نژاد Gallus gallus domesticus رادردستگاه جوجه‌کشی(۳۸ درجه دما و ٤٤٪ رطوبت) قرار دادیم. از روز ۲ انکوباسیون تا زمان بلوغ (یکسالگی) از خون جنین توسط لوله مویین نمونه‌گیری و گسترش خونی انجام و پس از تثبیت نمونه‌ها با الکل، رنگ‌آمیزی گیمسا، P. A. Sو سودان سیاهB جهت مطالعات میکروسکوپی برای تعیین تعداد و نوع سلول‌ها در مسیر تکوین خون‌سازی صورت گرفت.

بر طبق مطالعات، در مراحل مختلف سیر تکوین سلول‌های خونی، اریتروسیت‌هااز نظراندازه و قطر به مرور کوچک‌تر و قطر هسته آن‌ها کم‌تر می‌گردد. تعداد اریتروسیت‌ها در مراحل اولیه جنینی بسیار کم ولی در روزهای پایانی جنینی و در جوجه تازه از تخم در آمده و جوجه بالغ بسیار زیاد می‌شوند.

در بررسی سیتوشیمیایی، تکنیک P. A. S نشان دادکه پاسخ همه سلول‌های خونی در تمام مراحل تمایز منفی بود. در رنگ‌آمیزی با سودان سیاه B فقط ائوزینوفیل‌ها و برخی اریتروسیت‌ها نتایج مثبت نشان دادند. لذا احتمالا سلول‌ها در مراحل مختلف تمایز، ویژگی‌های سیتوشیمیائی متفاوتی را دنبال می‌کنند.

کلمات کلیدی: خونسازی، سیتوشیمی، جنین جوجه، *Gallus gallus domesticus*

مقدمه

از مدل‌های بیولوژیکی مهم در جنین شناسی، جنین جوجه است که به دلایل متعدد حائز اهمیت است جنین جوجه سیستم حیاتی مهره‌داران خون گرم و آمنیون داران را به خوبی ارائه می‌دهد. وجوه تشابه زیادی در نمو جنینی انواع مهره داران بالاخص جنین جوجه با انواع پستانداران دیده می‌شود و به علاوه با تهیه سیستم آزمایشگاهی جهت رشد و نمو جنین این جانور مطالعه آن‌ها برای تحقیقات به سهولت با هزینه اندک میسر می‌گردد.

رشد و نمو جنین جوجه بر پایه رویدادهای مورفولوژیکی به ۴۶ مرحله مشخص تقسیم می‌شود. جوجه در ۲۰ تا ۲۱ روز بعد از قرار دادن در ماشین جوجه کشی از تخم بیرون می‌آید [۱].

مطالعه تمایز سلولی یکی از مباحث مهم زیست شناسی سلولی، بیولوژی رشد و نمو و جنین شناسی است و تلاش در جهت انتخاب و معرفی مدل‌های ساده و مناسب که مطالعه تکوین سلولی را برای کارهای آزمایشگاهی فراهم نماید یکی از اهداف متخصصین این رشته‌ها است. به این منظور ما با مطالعه سیر تکوین سلول‌های خونی جنین جوجه بر اساس مورفولوژی سلول ها، قطر هسته‌ها، تعداد سلول ها و خصوصیات رنگ‌پذیری آن‌ها در مراحل مختلف رشد و نمو جنینی پرداخته و نتایج حاصل را با یک دیگر مقایسه نمودیم.

مواد و روش ها

تعداد ۱۰۰ عدد تخم مرغ‌های نطفه‌دار را از شرکت جوجه کشی طوس در مشهد خریداری و پس از ضد عفونی با الکل در دستگاه جوجه‌کشی در دمای 38^0C و رطوبت ۴۰٪ قرار دادیم. از روز دوم انکوباسیون، روزانه وجود جنین را در یکی از تخم مرغ‌ها به وسیله عبور نور بررسی کرده، در صورت مشاهده لکه ای قرمز، تخم مرغ را باز کرده و از خون جنین توسط لوله مویین نمونه‌گیری و روی لام گسترش داده شد. رنگ‌آمیزی پس از نیمه خشک شدن و تثبیت نمونه‌ها انجام شد[۳،۲].

مراحل آماده‌سازی و رنگ‌آمیزی

الف ـ رنگ‌آمیزی گیمسا

مدت کوتاهی پس از خشک شدن گسترش‌های خونی، لام‌ها را جهت تثبیت کردن حدود ۵ـ۳ دقیقه داخل بوکال محتوی الکل میتلیک ٪۹۹/۵ قرار داده و در مرحله بعد با محلول گیمسا۴۰٪ به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند.

در رنگ‌آمیزی با گیمسا، سیتوپلاسم اریتروسیت‌ها به رنگ زرد و هسته آن‌ها به رنگ بنفش مایل به ارغوانی در می‌آید. هسته گلبول‌های سفید به رنگ بنفش مایل به ارغوانی، گرانول‌های هتروفیل قرمز مایل به نارنجی، گرانول‌های ائوزینوفیل نارنجی و گرانول‌های بازوفیل بنفش مایل به رنگ ارغوانی در می‌آید[۳،۲] .

ب) رنگ‌آمیزی سودان سیاه B: (Sudan Black B)

بعد از تهیه گسترش‌ها، آن‌ها را در حرارت اتاق و یا جریان هوا خشک کرده، در ظرف دربسته و به همراه کاغذ صافی اشباع شده با فرمل، بعد از ۵ الی ۱۰ دقیقه گسترش‌ها ثابت گردید.

گسترش‌ها به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه با جریان ملایم آب شیر شستشو داده شد. لام‌ها را به مدت یک ساعت در محلول رنگ سودان سیاه B غوطه‌ور کرده، با شستشو به مدت ۲ تا ۳ دقیقه با اتانول ۷۰٪ رنگ اضافی از سلول ها خارج گردید. به مدت ۲ دقیقه گسترش‌ها را با جریان آب شیر شستشو داده و پس از خشک شدن آن‌ها، به منظور رنگ زمینه لام‌ها با گیمسا ۷٪ رنگ شدند.

وجود گرانول‌های سیاه داخل سیتوپلاسمی و یا مشاهده رنگ سیاه منتشر در سیتوپلاسم سلول ها نشان دهنده واکنش مثبت و وجود گرانول‌های چربی در سلول ها است[۲، ۳] .

ج) روش رنگ‌آمیزی P. A. S (Periodic Asid Shiff)

برخی از گسترش‌ها را پس از خشک و تثبیت کردن و شستشو با آب جاری (مشابه روش قبل)، به مدت ۱۰ دقیقه در ظرف حاوی اسید پریودیک، قرار دادیم. مجدداً لام‌ها با آب جاری شستشو داده شده و گسترش‌ها در ظرف حاوی معرف شیف به مدت ۴۵ دقیقه غوطه‌ور گشتند. پس از آن به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه با شستشو در آب جاری، به خارج شدن معرف شیف مازاد از سلول ها سرعت بخشیده شد.

به منظور رنگ زمینه، گسترش‌ها به مدت ۵ تا ۲۰ دقیقه با رنگ هماتوکسیلین رنگ شدند. پس از شستشو با آب جاری، گسترش‌ها به ترتیب در الکل ۹۰ و ۹۶ درجه هر کدام برای ۲ دقیقه قرار داده شدند[۲] .

پس از تهیه لام‌های رنگ شده، کلیه لام‌ها مورد مطالعه میکروسکوپیک قرار گرفتند تا مورفولوژی سلول ها،

شمارش سلولی، خصوصیات رنگ پذیری آن‌ها در هر مرحله تعیین گردد. به علاوه محاسبه قطر سلول و قطر هسته و حجم سیتوپلاسم (بر حسب واحد μm^3) انجام شد.

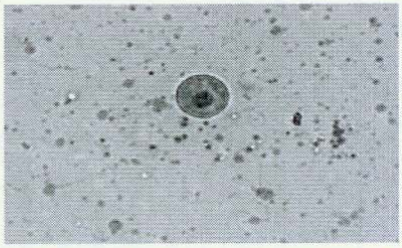
برای اندازه‌گیری قطر هسته و قطر سلول های اریتروسیت یکی از لنزهای چشمی میکروسکوپ را برداشته و به جای آن لنزی چشمی که میدان دید مدرج دارد (میکرومتر) را قرار دادیم. با حرکت صفحه اسلاید سلول ها را در مجاورت قسمت درجه بندی شده قرار داده و قطر آن‌ها را اندازه‌گیری کردیم[۴، ۵].

برای اندازه‌گیری حجم سیتوپلاسم سلول های اریتروسیت، با داشتن حجم هسته‌ها و حجم کل سلول، میزان حجم سیتوپلاسم را به دست آوردیم. (حجم هسته و سلول ها را به وسیله قطر آن‌ها که در مرحله قبل اندازه‌گیری کردیم، به دست آوردیم.) سپس جداول و نمودارهای مربوطه تنظیم شد.

نتایج

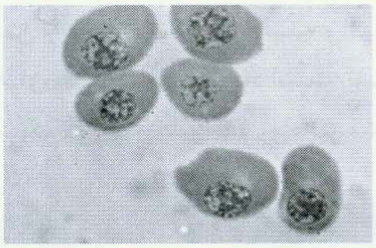
الف) نتایج مورفولوژیکی

روزهای دوم (stage18)، سوم(stage20) و چهارم (stage23) جنینی (پس از انکوباسیون): سلول های اریتروئیدی به صورت سلول هایی بزرگ و گرد با هسته تقریباً مدور بیش‌تر در موقعیت مرکزی سلول مشاهده شد (شکل ۱).

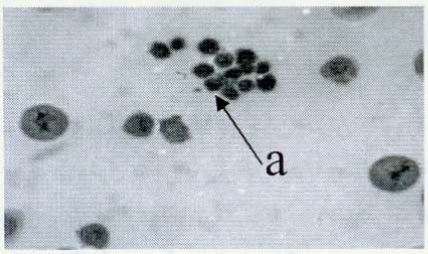


شکل ۱ـ سلول خونی در جنین ۳ روزه(stage 20): اریتروسیت ابتدایی بسیار بزرگ. رنگ‌آمیزی گیمسا، (320x)

روزهای پنجم(stage27) و ششم(stage29): تعداد سلول های اریتروسیت رو به افزایش است ولی از لحاظ ظاهری شبیه روزهای دوم و سوم می‌باشد (شکل ۲). پلاکت‌ها به صورت دستجات سلولی یا سلول های انفرادی با هسته متراکم و سیتوپلاسم کاهش یافته از روز پنجم دیده می‌شوند (شکل۳).

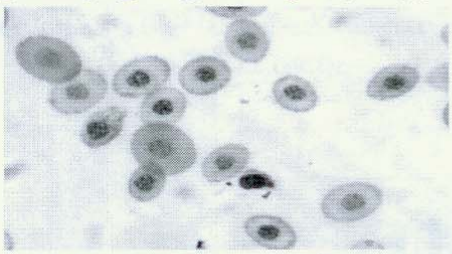


شکل۲ـ گسترش از خون جنین ۵ روزه (stage 27). سلول هایی با هسته کم رنگ و نقاط روشن پاراکروماتینی. رنگ‌آمیزی گیمسا، (800x)



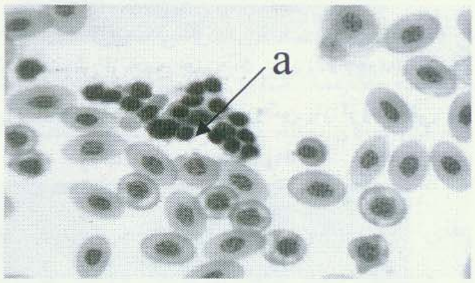
شکل ۳ـ سلول های اریتروسیت اولیه در خون جنین ۵ روزه (stage 27). a- تجمعی از پلاکت‌های خون به فرم سلول هایی با هسته متراکم و بنفش رنگ مایل به ارغوانی و سیتوپلاسم بسیار اندک، رنگ‌آمیزی گیمسا، (320x)

روزهای هفتم (stage31)، هشتم(stage34) و نهم(stage35): پیدایش لوکوسیت‌های هتروفیل و ائوزینوفیل از روز هفتم در خون محیطی مشاهده می‌شود. در این روزها به تدریج از تعداد اریتروسیت‌های ابتدایی کاسته می‌شود. بر تعداد اریتروسیت‌هایی که کوچک‌تر و بیضوی می‌باشند افزوده می گردد(شکل۴).



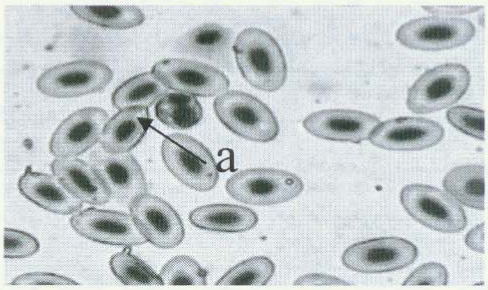
شکل ۴ـ گسترش از خون جنین ۸ روزه (stage 34). سلول های اریتروسیت کم کم به فرم بیضی در می آیند و حجم هسته به سیتوپلاسم نیز کاهش یافته است. رنگ‌آمیزی گیمسا(320x)

روزهای دهم(stage36)، یازدهم(stage37) و دوازدهم (stage38): روند تغییرات اریتروسیت‌های خون در جهت از بین رفتن اریتروسیت‌های اولیه و افزایش اریتروسیت‌های بالغ کاملاً مشهود است. پیدایش پلاکت‌های تیپیک در خون جنین ۱۲ روزه نیز مشاهده می‌شود(شکل۵).



شکل ۵ـ اجتماعی از پلاکت‌ها در خون جنین ۱۰ روزه (stage36)، به فرم سلول هایی بیضی یا گرد با هسته متراکم به رنگ بنفش مایل به ارغوانی و سیتوپلاسم بسیار اندک. رنگ‌آمیزی گیمسا، (320x)

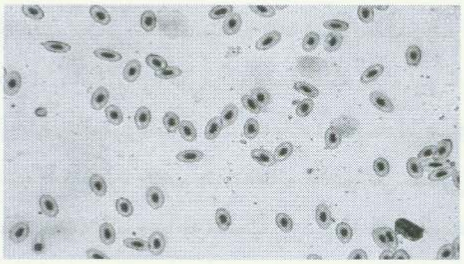
روزهای سیزدهم (stage39) و چهاردهم(stage40): پیدایش بازوفیل‌ها به صورت سلول هایی بزرگ با هسته لوبوله به رنگ بنفش مایل به ارغوانی(شکل ۶).



شکل۶ـ بازوفیل در خون جنین ۱۴ روزه (Stage 40)دارای هسته لوبوله ارغوانی در زمینه ای از سیتوپلاسم آبی روشن (a). رنگ‌آمیزی گیمسا، (320x)

روزهای پانزدهم (stage41) و شانزدهم(stage42): در این روزها تعداد اریتروسیت‌های اولیه بسیار کاهش یافته و سلول های بالغ به فرم بیضی شکل با هسته بیضوی دیده می‌شوند.

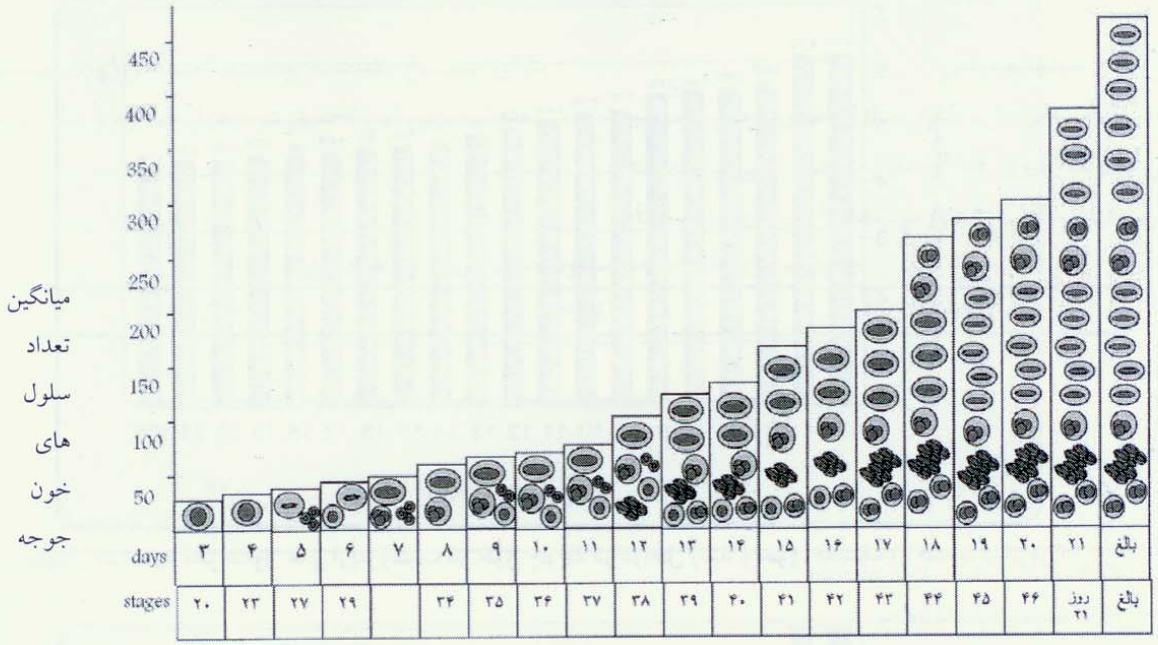
روزهای هفدهم(stage43) الی بیستم(stage46): شکل سلول های خونی تثبیت می‌شود. اریتروسیت‌های اولیه در خون دیده نمی‌شوند(شکل ۷).



شکل ۷ـ گسترشی از خون جنین ۱۸ روزه (stage 44). اریتروسیت اولیه دیده نمی‌شود و سلول های اریتروسیت بیضوی با هسته بیضی در مرکز سلول به رنگ بنفش تا حدی ارغوانی می‌باشند. رنگ‌آمیزی گیمسا، (80x)

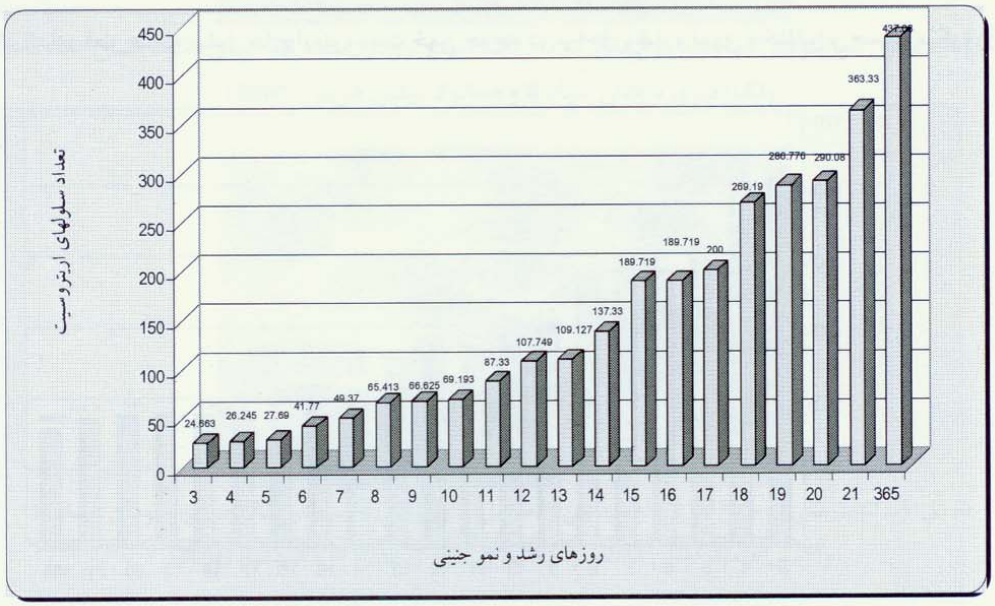
جانور بالغ (یک ساله): سلول های اریتروسیت کاملاً بیضوی (با هسته بیضی شکل) شده‌اند. پلاکت‌های تیپیک بیش‌تر به شکل بیضوی می‌باشند و تعداد آن‌ها افزایش یافته است.

تعداد سلول های اریتروسیت با افزایش سن جنین افزایش می‌یابد و در زمان بلوغ جانور به اوج خود می‌رسد(نمودار۱ و۲). و هم چنین قطر سلول اریتروسیت و هسته آن با افزایش سن کاهش می‌یابد (نمودار ۴و۳). کاهش قطر سلول اریتروسیت هم به دلیل کاهش قطر هسته آن و هم به دلیل کاهش حجم سیتوپلاسم می‌باشد (نمودار۵).

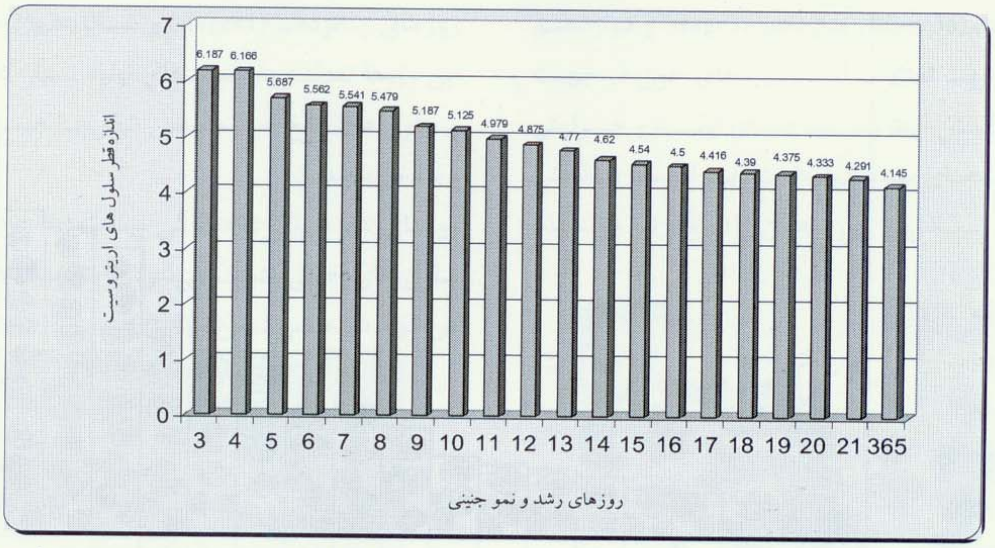


نمودار ۱ ـ سلول های خونی مشاهده شده در یک میدان دید میکروسکوپی در stageهای ۲۰ تا ۴۶ جنین جوجه تا مرحله بالغ.

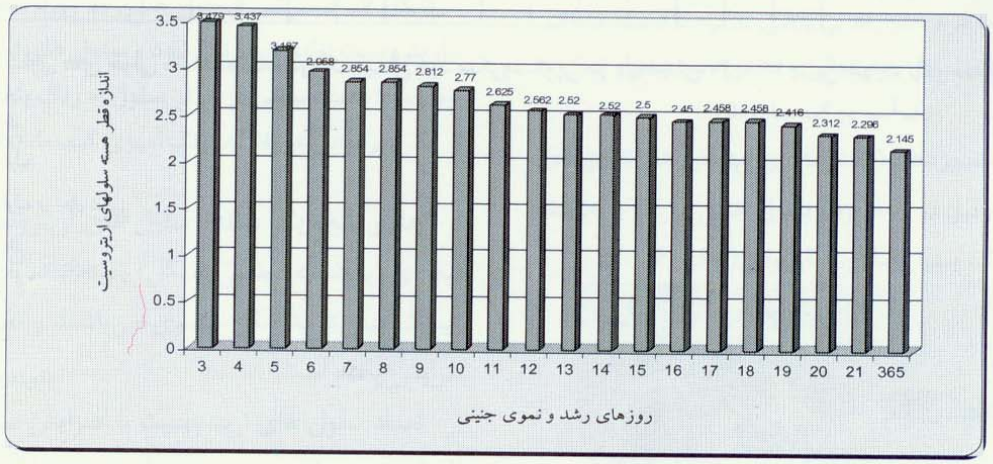
- سلول اجدادی
- اریتروسیت اولیه
- اریتروسیت اولیه در حال تقسیم
- اریتروسیت بالغ
- پلاکت اولیه
- پلاکت تیپیک
- ائوزینوفیل و هتروفیل
- بازوفیل



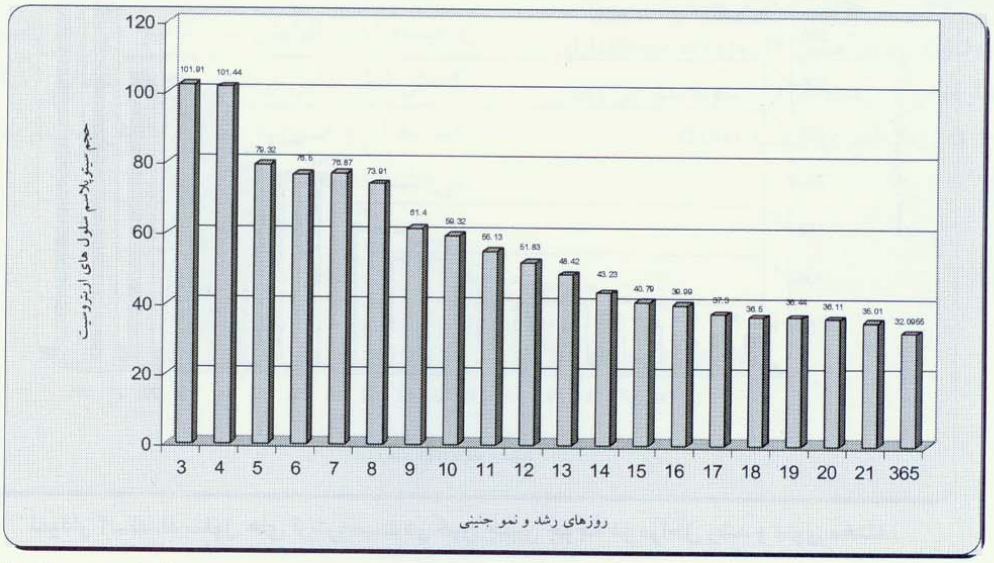
نمودار ۲ـ تعداد سلول های اریتروسیت در خون جنین جوجه در مراحل رشد و نموی مختلف



نمودار۳ـ اندازه قطر سلول های اریتروسیت در خون جوجه در مراحل رشد و نموی مختلف(بر حسب میکرون)



نمودار۴ـ اندازه قطر هسته سلول های اریتروسیت خون جوجه در مراحل رشد و نموی مختلف(بر حسب میکرون)



نمودار۵ـ حجم سیتوپلاسم سلول های خونی جنین جوجه در مراحل رشد و نموی مختلف(برحسب μm^3)

ب) نتایج سیتوشیمیایی

در تمامی مراحل، پاسخ سلول های قرمز و سفید خون به رنگ‌آمیزی PAS منفی و تعداد کمی از سلول ها (ائوزینوفیل و بعضی اریتروسیت‌ها) با رنگ‌آمیزی SBB دارای پاسخ مثبت بودند (شکل۹و۸). نتایج سیتوشیمیایی این تحقیق در جدول شماره ۱ بیان شده است.

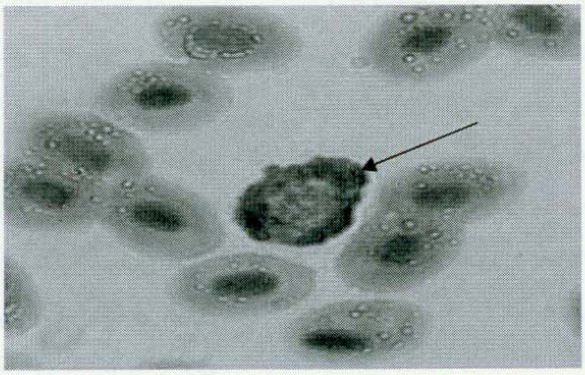
جدول۱ـ نتایج آزمایشات سیتوشیمی‌بر روی خون مرغ بالغ

نوع سلول	PAS	SBB
هتروفیل	-	-
ائوزینوفیل	-	+
بازوفیل	-	-
مونوسیت	NF	NF
RBC	-	−/±

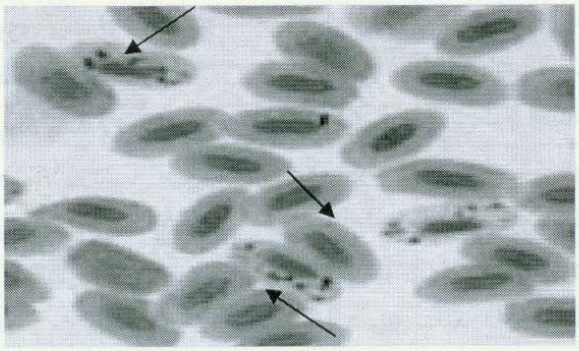
PAS مخفف periodic acid – Schiff

SBB مخفف sudan black B

NF پیدانشد



شکل ۸ـ سلول ائوزینوفیل در خون مرغ بالغ که به رنگ‌آمیزی سودان سیاه B واکنش مثبت نشان داده است. رنگ‌آمیزی سودان سیاه B و هماتوکسیلین هریس، (800x)



شکل ۹ـ گسترشی از خون مرغ بالغ. بعضی از سلول های اریتروسیت در رنگ‌آمیزی سودان سیاه B واکنش مثبت نشان دادند. رنگ‌آمیزی سودان سیاه B و گیمسا، (800x)

بحث و نتیجه‌گیری

این مطالعه در خصوص بررسی سیر تکوین سلول های خونی جنین جوجه نژاد *Gallus gallus domesticus* صورت پذیرفت.

بر اساس مطالعات Campbel در سال ۱۹۶۷ با میکروسکوپ نوری و الکترونی در مورد مورفولوژی سلول های خونی جنین جوجه اجدادی ترین سلول های اریتروئیدی بزرگ و به قطر ۱۲-۱۰ میکرومتر و دارای هسته بزرگ و سیتوپلاسم بازوفیلیک بودند [۶ و۷].

بررسی حاضر نیز مطابق با یافته Campbel نشان می‌دهد که سلول های خونی در طی مراحل جنینی متحمل تغییرات مورفولوژیکی می‌شوند. به طوری که در ابتدای مراحل جنینی در خون محیطی جنین هیچ اریتروسیتی به فرم بالغ (بیضی شکل با هسته بیضوی) دیده نمی‌شود و در مراحل انتهایی جنینی و در جوجه‌ها هیچ اریتروسیت ابتدایی (سلول بزرگ و گرد با هسته گرد) مشاهده نشد.

Brian در سال ۲۰۰۴ گزارش نمود که سلول های خونی جوجه در سیر تمایز و تکوین متحمل تغییرات زیادی در میزان حجم سیتوپلاسم، اندازه سلول ها و اندازه هسته می‌شوند[۸]. دربررسی حاضر سلول های اجدادی، بسیار بزرگ‌تر با حجم سیتوپلاسم بیشتری نسبت به سلول های بالغ می‌باشند (نمودار ۱). اندازه هسته سلول های اولیه به دلیل کروماتین گسترده و غیر متراکم آن‌ها و انجام تقسیمات میتوزی بیشتر از اندازه هسته سلول های بالغ است (نمودار۵و۱).

تعداد سلول های اریتروسیت در روند رشد و نمو جنین رو به افزایش بود (نمودار۲) که این احتمالاً به دلیل طول عمر ۲۸ تا ۳۵ روزه سلول های اریتروسیت است [۵و۶]. پس نه تن‌ها در طی دوره جنینی از بین نرفته، بلکه با سرعت و تعداد زیاد تقسیم شده و زیاد می گردند.

در این بررسی مراحل مختلف تقسیم سلولی میتوز در خون محیطی تا روز پانزدهم مشاهده شده است و با از بین رفتن اریتروسیت‌های اولیه، تقسیم سلولی نیز مشاهده نمی‌شود.

تفاوتی از نظر کروماتین هسته بین اریتروسیت‌های اولیه و اریتروسیت‌های بالغ وجود دارد. کروماتین هسته در اریتروسیت‌های اولیه به صورت دانه‌های ریزتر در زمینه قابل توجهی از پاراکروماتین روشن دیده می‌شود ولی در اریتروسیت‌های بالغ به صورت توده‌های متراکم تری به رنگ بنفش ارغوانی دیده می‌شود و به نظر می‌رسد این یافته با گزارش Brian مطابقت دارد.

Brian در سال ۲۰۰۴ در گزارش خود بیان داشت که سلول‌های قرمز خون جنین جوجه در طی تکوین و تمایز به دو فرم دیده می‌شوند: ۱- سلول‌هایی با کروماتین گسترده و غیر متراکم ۲- سلول‌هایی با هسته‌های متراکم. که در روزهای ابتدایی گروه اول بیش‌تر دیده می‌شوند و این به خاطر انجام تقسیمات مکرر سلولی است [۸].

در روزهای ابتدایی هسته سلول‌های پلاکتی گرد و کمی بازتر از حالت تیپیک آن است و از نظر اندازه سلول‌های پلاکتی در روزهای اول کمی بزرگترند که این احتمالاً به دلیل میزان تقسیمات سلولی زیادی است که انجام می‌دهند.

در گسترش‌های روز پنجم جنینی سلول‌هایی مشاهده شده‌اند که نظر به دلایل زیر از رده اریتروئیدی می‌باشند:

با پیشرفت روند رشد و تکوین جنین، نیاز به اکسیژن بیش‌تر می‌شود، پس تعداد سلول‌های خونی آن چنان تغییر می‌کنند تا امکان اکسیژن رسانی بیشتر باشد، در مقابل، جنین در داخل پوسته صدفی تخم در مایع آمنیونی غوطه ور است که خود یک عامل دفاعی می‌باشد، لذا جنین نیاز چندانی به افزایش سلول‌های لوکوسیت و تقویت سیستم ایمنی ندارد [۵].

بنابراین تا بعد از روز ششم احتمالاً هیچ سلولی جز رده اریتروئیدی وجود ندارد و از روز هفتم است که سلول‌های سفید خون با پیدایش هتروفیل‌ها و ائوزینوفیل‌ها ظاهر می‌شوند.

با رشد جنین و کم شدن فضای آمنیوتیک، جنین به سیستم دفاعی درونی نیاز دارد و همان گونه که نتایج

این پروژه نشان دادند این نیاز با پیدایش لوکوسیت‌ها از روز هفتم به بعد تأمین می‌شود.

هم چنین در این روزها سلول‌هایی هم اندازه با نورموبلاست‌های بازوفیلیک به شکل گرد با هسته گرد تا بیضوی دیده شد که سیتوپلاسم آن‌ها دارای دانه‌های بنفش رنگی بود. به نظر می‌رسد سلول‌های مشاهده شده بیشتر اجداد گرانولوسیت‌ها از جمله پرومیلوسیت باشد. با تکوین سیستم جنینی و نیاز به سلول‌های دفاعی به نظر می‌رسد در steam cell مغز استخوان تمایزاتی صورت گرفته که حاصل آن تشکیل گلبول سفید از جمله گرانولوسیت‌ها است. . O'Conner در سال ۱۹۹۷ بیان داشت: هتروفیل‌های جوجه معمولاً گرد می‌باشند و قطر آن‌ها ۱۵-۱۰میکرومتر و دارای تعدادی اجسام کریستالینی میله‌ای یا دوکی شکل در سیتوپلاسم می‌باشند[۹].

بررسی حاضر هم چنین نشان می‌دهد که هتروفیل و ائوزینوفیل‌ها از روز هفتم جنینی در خون محیطی مشاهده می‌شوند ولی لوکوسیت‌های بازوفیل تا چهاردهمین روز جنینی وجود ندارند. در رنگ‌آمیزی گیمسا هتروفیل‌ها با هسته آبی ارغوانی، واجد ۲ تا ۳ لوب با گرانول‌هایی دیده می‌شوند.

Barrett و Scheinberg در سال ۱۹۷۲ شکل تحول اریتروسیت‌های پرندگان را در کشت بافت مغز استخوان بررسی نمودند و نشان دادند که سلول‌های بالغ پرندگان از سلول‌های کروی اولیه ناشی می‌شوند که دارای هموگلوبین می‌باشند [۱۰].

در این بررسی، سلول‌های اریتروسیت روزهای اولیه نسبت به سلول‌های روزهای پایانی دوران جنینی رنگ پذیری کمتری نسبت به رنگ گیمسا داشتند که این با توجه به نتایج Barrett و Scheinberg احتمالاً به دلیل میزان هموگلوبین است. هرچه هموگلوبین در سلول‌ها بیشتر باشد، احتمالاً میزان رنگ پذیری این سلول‌ها با رنگ‌های اسیدی بیشتر است [۶].

Chaleow و همکاران در سال ۲۰۰۲ آزمایشات مشابهی در زمینه سیتوشیمی سلول‌های خون مار کبری بالغ گونه[*Ophiophagus hanna* ۱۱] و هم چنین در سال ۲۰۰۶ بر روی لک لک بالغ گونه *Mycteria leucocephala* انجام دادند[۱۲]. Clark در سال ۱۹۹۹ نیز بر روی دم جارویی بالغ گونه *Trichosurus vulpecula* آزمایشات مشابهی انجام داد[۱۳]. نتایج مقایسه ای بررسی این دانشمندان به بهراه نتایج طرح حاضر را در جدول ۲ به طور خلاصه مشاهده می‌کنید.

جدول۲ـ مقایسه نتایج این پژوهش با نتایج دیگر تحقیقات

	لک لک بالغ(۱۲)	مار کبری بالغ(۱۱)	دم جارویی بالغ(۱۳)	مرغ بالغ	رنگ‌آمیزی
هتروفیل	-	-		-	P. A. S
	+	+		-	SBB
ائوزینوفیل	-		-	-	P. A. S
	-		+	+	SBB
بازوفیل	-	+	NF	-	P. A. S
	-	+	NF	-	SBB
مونوسیت	NF		+	NF	P. A. S
	NF		-	NF	SBB
اریتروسیت	-	-	+	-	P. A. S
	±	±	+	±	SBB

Chaleow و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مقاله خود مشخص کردند هتروفیل‌ها، گرانولوسیت غالب برای لک لک‌ها [۱۲] و در سال ۲۰۰۲ بیان کردند لنفوسیت و گرانولوسیت غالب برای مار کبری است[۱۱]. در بررسی ما این یافته در مورد جنین جوجه نیز صدق می‌کند و هتروفیل‌ها به عنوان گرانولوسیت غالب مشاهده شدند (نمودار۱).

Chaleowو همکاران در سال ۲۰۰۶ اعلام کردند که هتروفیل لک لک‌های بالغ برای رنگ‌آمیزی PAS منفی و برای SBB مثبت است[۱۲] و هتروفیل مارکبری بالغ که بزرگ‌ترین WBC آن می‌باشد نیز برای PAS منفی و برای SBB مثبت است [۱۱]. اما آزمایشات انجام شده در این پژوهش نشان داد که هتروفیل جنین جوجه برای SBB منفی و برای PAS مطابق موارد ذکر شده نیز منفی است(جدول۲).

Chaleow و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مورد ائوزینوفیل لک لک بالغ اعلام کرد نسبت به PAS و SBB منفی است [۱۲] در سال ۱۹۹۹ در مورد ائوزینوفیل دم جارویی بیان کرد برای PAS منفی و برای SBB مثبت است [۱۳]. در بررسی حاضر نیز معلوم شد که ائوزینوفیل جنین جوجه برای PAS منفی و برای SBB مثبت است (جدول۲).

Chaleow و همکاران بیان کردند بازوفیل مار کبری برای هر دو مورد PAS وSBB مثبت است [۱۱] ولی بازوفیل لک لک‌ها در هر دو مورد منفی است [۱۲] و در دم جارویی بازوفیل مشاهده نشده بود [۱۳]. در مورد جنین جوجه مشابه لک لک در هر دو مورد نتایج منفی بود (جدول۲).

در لک لک مونوسیتی مشاهده نشده [۱۲] و در مورد جنین جوجه نیز همین گونه بود. ولی در دم جارویی مونوسیت نسبت به SBB منفی و در مورد PAS مثبت است [۱۳]و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مورد RBC لک لک‌ها [۱۲] و در سال ۲۰۰۲ در مورد RBC مار کبری [۱۱] بیان داشت که بعضی اریتروسیت‌ها با رنگ‌آمیزی SBB مثبت و بعضی منفی هستند.

Clark در سال ۱۹۹۹ در مورد RBC دم جارویی اعلام کرد که PAS و SBB مثبت است[۱۳].

در مورد جنین جوجه مشابه لک لک‌ها بعضی اریتروسیت‌ها با رنگ‌آمیزی SBB مثبت و بعضی منفی است(جدول۲).

تمام سلول‌های سفید خون جنین جوجه در مورد PAS منفی بودند. لذا بر اساس نتایج مطالعات انجام شده در این کار پژوهشی و مروری در مقالات دیگرمحقین از جمله Chaleow و همکاران در سال ۲۰۰۶ [۱۲] و در سال ۲۰۰۲[۱۱]، Clark در سال ۱۹۹۹[۱۳]، Barrett و Scheinberg در سال ۱۹۷۲[۱۰]، Tellو همکاران در ۲۰۰۵ [۱۴]، Stedman و همکاران در ۲۰۰۵ [۱۵]و غیره به نظر می‌رسد، مطالعه تکوین سلول‌های خونی جنین پرنده می تواند یک مدل مناسب آموزش آزمایشگاهی جهت نمایش تغییرات مورفولوژیک سلول‌ها، اندازه و شکل هسته‌ها، خصوصیات رنگ پذیری آن‌ها در مراحل مختلف سیر تکوین باشد. در دسترس بودن جنین پرنده و ارزان بودن این مدل از دیگر ویژگی‌های حائز اهمیت آن است. اما پژوهش‌های انجام شده در مورد خصوصیات سیتوشیمیایی سلول‌های خونی جنین پرنده در سیر تکوین این سلول‌ها نشان می‌دهد که این مورد، مدل مناسبی برای آزمایشگاه سیتوشیمی نیست.

زیرا بر اساس مطالعات انجام شده غالباً سلول‌های موجود در خون این جانوران ویژگی‌های سیتوشیمیایی خاص را نشان نمی‌دهند(جدول ۲). اگر چه در مدل‌های دیگری از جانوران نیز مشابه این خصوصیات گزارش شده است. از جمله در سال ۲۰۰۶ بر روی لک لک گونه *(Mycteria leucocephala)*[۱۲]، در سال ۲۰۰۲ بر روی مار کبری گونه *(Ophiophagus hannah)*[۱۱] و در سال ۱۹۹۹ نیز بر روی دم جارویی گونه *Trichosurus vulpecul* [۱۳]، با این وجود تفسیر دقیق خصوصیات سیتوشیمی سلول‌ها در سیر تکوین نیاز به اطلاعات همه جانبه ای دارد. که در بسیاری از موارد برای مهره داران پست این اطلاعات متأسفانه هنوز

تکمیل نشده است. ولی بدون شک، نوع جانور، اختصاصات ژنتیکی و عملکردهای فیزیولوژیکی جانور می تواند از عوامل مهم تأثیر گذار بر خصوصیات سیتوشیمی سلول‌های خون طی دوران جنینی جوجه و بعد از بلوغ این جانور باشد که باید مورد مطالعه قرار گیرد.

در صورت مطالعه دقیق سیتوشیمی سلول‌های خون در جانور بالغ شاید بتوان توجیهات دقیق تری از این تغییرات سیتوشیمی ارائه کرد.

منابع

۱ـ پریور ک. (۱۳۷۸)، جنین شناسی. انتشارات مبتکران.

۲ـ رجحان م. ص. (۱۳۸۱)، بافت شناسی پایه. انتشارات چهر.

۳ـ شیشه ئیان بیرونی ب. سعیدی ف، (۱۳۷۳)، خونشناسی پزشکی. انشارات دانشجو تهران.

۴ـ طالب آزرم فرآیند، (تألیف: براون ب)، (۱۳۷۰)، اصول هماتولوژی و روش‌های عملی. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان.

۵ـ طبرستانی م. (۱۳۶۴)، خونشناسی پزشکی، سازمان چاپ و نشر مشهد.

۶ـ گل افشان ح. (۱۳۳۵)، روش‌های آزمایشگاهی و کنترل کیفی در خونشناسی. شرکت تعاونی ناشران فارس.

۷ـ مدرس زاده رحمانی. ط. (۱۳۴۸)، جنین شناسی مهره داران. دانشگاه تهران.

8- Brian E, (2004), Developmental Biology (BIOL3530). Department Biology Memorial University of Newfoundland.

9- O'Connor R. J. (1997),Growth and differentiation in the red blood cells of the chicken embryo, Westminster School of Medicine, London.

10- Scheinberg E, Barrett T. (1972), Erythropoisis in Avian. Department of Avian medicin.

11- Chaleow S, Jarernsak S, Suntaree A,(2002)Hematology,morphplogy,cytochemical staining, and ultrastructuctural characteristics of blood cells in king cobra (Ophiophagus Hannah). Anderson Hospital & Tumor Institute, Houston 77030.

12- Chaleow S, Jarernsak S, Nual-Anong N (2006), Hematology,morphplogy,cytochemical staining, and ultrastructuctural of blood cells in PaintedStork (Mycteria leucocephala). Anderson Hospital & Tumor Institute, Houston 77030.

13- Clark P. (1999), Cytochemical staining characteristics of leukocytes of the common brushtail possum (Trichosurus vulpecula), Pathobiology sction,Institute of veterinary, Animal and biomedical sciences, Massey university, Private bag 11222, palmerston North, New Zealand. september.

14- Tell L. A., Kabbur M. B., Smith W. L., Dahl K. H. and Cullor J. S. (2005), A technique for isolating heterophils from blood of orange-winged Amazon parrots (Amazona amazonica amazonica), Department of Medicine and Epidemiology, School of Veterinary Medicine, University of California, 95616-8737 Davis, CA, USA.

15- Stedman N. L., Brown T. P., Brooks R. L. and Bounous D. I. (2005), Heterophil Function and Resistance to Staphylococcal Challenge in Broiler Chickens Naturally Infected with Avian Leukosis Virus Subgroup. Anderson Hospital & Tumor Institute, Houston 77030.