

مطالعه و شناسایی سلول‌های زایای اولیه در گناد جنین قرقاول ماده (*Phasianus colchicus*) با استفاده از تکنیک‌های مختلف بافت‌شناسی

زهرا خداپرست^۱ و ابوالقاسم نبی‌پور^{۲*}

^۱ دانشجوی دکتری تخصصی بافت‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۲ استاد گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۴/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۷/۹

چکیده

هدف از این تحقیق شناسایی و بررسی حضور سلول‌های زایای اولیه در سنین مختلف جنینی در بافت تخمدان قرقاول بود. این سلول‌ها تنها سلول‌های در حال رشد رویان هستند که توانایی انتقال اطلاعات ژنتیکی از طریق گامتوزیس به نسل بعدی را دارند. به منظور مطالعه در این خصوص، پرندگان به دلیل ویژگی‌های رشدی خود ارزش فوق‌العاده‌ای دارند. از طرفی قرقاول از جمله پرندگانی است که دارای خواص بسیار مفیدی است اما متأسفانه این گونه نادر در خطر انقراض قرار دارد. در این مطالعه، تعداد ۲۸ عدد تخم نطفه‌دار قرقاول مورد استفاده قرار گرفت و گندهای جنین ماده با توجه به عدم تقارن آن‌ها متمایز و در روزهای ۲۴-۹ جنینی استخراج شدند. مقاطع بافتی به صورت سریال سکشن تهیه شدند و شناسایی سلول‌های زایای اولیه با استفاده از رنگ‌آمیزی‌های هماتوکسیلین-اوتوزین، پریودیک اسید شیف و همچنین تهیه مقاطع نیمه نازک و رنگ‌آمیزی آن‌ها با تولوئیدین بلو انجام گرفت. سپس با استفاده از تکنیک‌های استریولوژی، تعداد، حجم سلول و حجم هسته سلول‌های زایای اولیه محاسبه گردید. سلول‌های زایای اولیه در برش‌های پارافینی و رزینی در روزهای ۹ تا ۱۴ جنینی به دلیل ویژگی‌های خاص شامل اندازه بزرگ هسته و سیتوپلاسم کم شناسایی شدند. ضمناً پاسخ این سلول‌ها در تمام سنین به رنگ‌آمیزی پاس منفی بود. با توجه به نتایج مربوط به مطالعه استریولوژی، مشخص شد با افزایش سن از تعداد سلول‌های زایای اولیه کاسته می‌شود به طوری که در ۱۸ روزگی این سلول‌ها مشاهده نشدند. در حالی که حجم سلول‌های زایای اولیه و حجم هسته این سلول‌ها با افزایش سن افزایش یافته بود. یافته‌های این مطالعه نشان داد که سلول‌های زایای اولیه در بافت تخمدان جنین‌های قرقاول در تمام سنین آزمایش شده به رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف پاسخ منفی دادند در حالی که مشخص شد رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و اوتوزین و استفاده از مقاطع نیمه نازک برای تشخیص میکروسکوپی این سلول‌ها مناسب هستند. از نظر مورفولوژی این سلول در قرقاول تفاوت خاصی با سایر پرندگان نداشت اما از نظر هیستوشیمی پاسخ این سلول به رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف منفی بود که با بعضی از گونه‌های پرندگان متفاوت است.

کلمات کلیدی: سلول‌های زایای اولیه، جنین قرقاول، گناد ماده، برش نیمه نازک، استریولوژی

مقدمه

تخمدان جنینی به طور نامتقارن رشد می‌کنند، در حالی که رشد غدد جنسی نر جنین پرندگان به یک مدل مطلوب در زیست‌شناسی تکوین و زیست‌شناسی سلول‌های بنیادی

جنین پرندگان به یک مدل مطلوب در زیست‌شناسی تکوین و زیست‌شناسی سلول‌های بنیادی تبدیل شده است (Intarapat and Stern, 2013). غدد جنسی ماده و مجرای

* نویسنده مسئول: ابوالقاسم نبی‌پور، استاد گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

E-mail: nabipour@um.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

تبدیل شده است (Intarapat and Stern, 2013). غدد جنسی ماده و مجرای تخمدان جنینی به طور نامتقارن رشد می‌کنند، در حالی که رشد غدد جنسی نر متقارن است (Smith and Sinclair, 2004).

قرقاول یک گونه شکاری و نادر می‌باشد که از اهمیت زیادی برخوردار است. گوشت قرقاول دارای ارزش بیولوژیکی فراوانی است، زیرا منبع غنی از پروتئین و ریز عناصر است و حاوی مقادیر کمی چربی با مقدار کمی اسیدهای چرب اشباع شده است. از این رو از نظر اقتصادی پرندهای با ارزش به حساب می‌آید (Adamski and Kuźniacka, 2006). فرآیند تولید غدد جنسی جنینی به عنوان "گنادوژنز" شناخته می‌شود. گنادوژنز در مهره‌داران با مهاجرت سلول‌های زایای اولیه (Primordial Germ Cells (PGCs) آغاز می‌شود. سلول‌های زایای اولیه در پستانداران از سلول‌های اندودرم کیسه زرده روده خلفی منشا می‌گیرند. در حالی که، سلول‌های زایای اولیه پرندگان، از ناحیه مرکزی بلاستودیسک شروع می‌شوند و از ناحیه قدامی به ناحیه خارج جنینی معروف به «هلال زایا» حرکت می‌کنند. سپس از ناحیه خارج جنینی جدا شده، به رگ‌های خونی وارد شده و از طریق حرکات آمیبی با استفاده از فرآیندهای شبه کاذب (Filopodia) به سمت ستیغ تناسلی (Genital ridge) رفته و در آن‌جا مستقر می‌شوند سپس در غدد جنسی در حال رشد، سلول‌های زایای اولیه با کمک اپیتلیوم سلومیک و مزونفروس انواع مختلف سلول‌ها را به وجود می‌آورند (Intarapat and Satayalai, 2014).

سلول‌های زایای اولیه و سلول‌های سوماتیک اطراف آن‌ها باعث ایجاد غدد جنسی بی‌تفاوت (Indifferent gonads) یا تمایز نیافته در غدد جنسی در حال رشد می‌شوند (Carlson and Stahl, 1985). در نهایت غدد جنسی تمایز یافته به عنوان غدد جنسی بالغ، گامت‌های عملکردی تولید می‌کنند (Clinton and Haines, 2001). سلول‌های زایای اولیه سلول‌های پایه‌گذار گامت‌های بالغ هستند، این سلول‌های جاودانه حاملی هستند که اطلاعات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی افراد را به نسل‌های بعدی منتقل

می‌کنند. از قرن نوزدهم، گونه‌های مختلف پرندگان از جمله جوجه (Kim and Han 2018, Meng et al, 2022)، شترمرغ (Hassanzadeh et al, 2019)، بولمون (Hosseini et al, 2020) و چند گونه دیگر به طور گسترده برای تحقیقات سلول‌های زایای اولیه مورد استفاده قرار گرفته‌اند. همچنین با توجه به این که این سلول‌ها نقش حیاتی در اصلاح ژنتیکی و درمان ناباروری دارند، می‌توانند یک سیستم ایده‌آل در زیست‌شناسی تکوینی ارائه دهند (Mathan et al, 2023). بنابراین، مطالعه و شناسایی سلول‌های زایای اولیه برای حفظ ذخایر ژنتیکی که در تحقیقات بیولوژیکی پایه مورد استفاده قرار می‌گیرد به عنوان یک هدف مهم در نظر گرفته می‌شود. از طرف دیگر سلول‌های زایای اولیه یکی از بهترین منابع سلول‌های پیش‌ساز هستند که می‌توانند برای حفظ و تکثیر نژادهای پرندگان در حال انقراض مورد استفاده قرار گیرند.

اگرچه سلول‌های زایای اولیه در پرندگان در برخی زمینه‌ها مورد مطالعه قرار گرفته‌اند اما مطالعه دقیقی از نظر تعداد و حجم سلول‌های زایای اولیه به روش استریولوژی در گناد ماده صورت نگرفته است. لذا در مطالعه حاضر از روش استریولوژیک بی‌طرفانه استفاده شد. مطالعه حاضر با هدف شناسایی و بررسی سلول‌های زایای اولیه در گناد ماده قرقاول در طی فرآیند رشد جنینی و همچنین تغییرات استریولوژیکی در تعداد و اندازه و حجم این سلول‌ها در سنین مختلف جنینی تا زمان هچ (جوجه ۱ روزه) انجام گرفت. نتایج این تحقیق اطلاعات جدیدی را در مورد تعداد و حجم سلول‌های زایای اولیه در مراحل جنینی تخمدان قرقاول ارائه می‌دهد که می‌تواند برای درک و شناخت بیشتر بیولوژی سلول‌های زایای اولیه موجود در گناد مورد استفاده محققان قرار گیرد. علاوه بر این، نتایج این پژوهش می‌تواند مبنایی برای مطالعات آینده به منظور تعیین مرحله مناسب جهت جداسازی سلول‌های زایای اولیه در گناد ماده قرقاول مورد استفاده متخصصین و دانش‌پژوهان ذیربط قرار گیرد.

مواد و روش کار

جداسازی جنین و تخمدان

تعداد ۲۸ عدد تخم نطفه‌دار قرقاول (*Phasianus colchicus*) از یک مزرعه تجاری در مشهد تهیه شد. تخم‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۰ درصد به مدت ۲۴ روز انکوبه شدند. یک دستگاه جوجه‌کشی هر ۶۰ دقیقه تخم‌ها را می‌چرخاند تا از چسبیدن جنین به پوسته آن جلوگیری کند. در همین راستا، هدف این تحقیق این بود که سلول‌های زایای اولیه در روزهای جنینی ۹، ۱۴، ۱۸ و ۲۴ شناسایی و ویژگی‌های آن‌ها بررسی شود. جنین‌ها در سنین فوق‌الذکر استخراج شدند و پس از جداسازی از زرده، در فیکساتور قرار گرفتند و با استفاده از استریومیکروسکوپ با دقت تشریح شدند و تخمدان خارج شد. سپس تخمدان‌های جدا شده در پارافرمالدئید ۴ درصد به مدت ۲۴ ساعت ثابت شدند و پس از آن مراحل آماده‌سازی بافت با استفاده از دستگاه اتوتکنیکون انجام گرفت. آب‌گیری نمونه‌ها با استفاده از غلظت‌های مختلف اتانول و شفاف‌سازی آن‌ها با استفاده از زایلن انجام شد. سپس قالب‌گیری نمونه‌ها با استفاده از پارافین مذاب (Merck، آلمان) انجام شد. برش نمونه‌ها به صورت سریال سکشن (ضخامت ۵ میکرومتر) نیز توسط میکروتوم چرخان (Leica RM 2145، آلمان) انجام گرفت. ضمناً در هر سن تعداد ۵ عدد گناد ماده چپ آماده‌سازی، قالب‌گیری و برش داده شد.

در خصوص تهیه مقاطع نیمه نازک رزینی در هر سن جنینی، نمونه‌گیری از ۲ تخمدان به عمل آمد و ثبوت اولیه این نمونه در گلو تار آلدئید ۲ درصد (انگلستان TAAB Laboratories Equipment Ltd، تهیه شده با بافر ۰/۱ مولار کاکودیلات با $\text{PH}=7/4$ و ثبوت ثانویه آن در محلول تروکسید اسمیموم ۱ درصد (انگلستان، TAAB) انجام شد. پس از آن با استفاده از فرآیند کاهش تدریجی دما و اتانول آبیگری شدند. شفاف‌سازی نمونه‌ها نیز توسط پروپیلن اکسید (Propylene oxide) (انگلستان، TAAB) انجام شد. سپس مراحل آغشته‌سازی و قالب‌گیری نمونه‌ها توسط

رزین اپوکسی (انگلستان، TAAB) انجام گرفت. پس از آن، با استفاده از دستگاه اولترامیکروتوم (Leica، اتریش) برش‌هایی نیمه نازک به ضخامت ۱ میکرومتر به وسیله تیغ شیشه‌ای تهیه شد و این مقاطع با رنگ تولوئیدین بلو رنگ‌آمیزی شدند.

تشخیص بافت‌شناسی

مقاطع پارافینی با رنگ‌های هماتوکسیلین و اتوزین Hematoxylin & Eosin (H&E) و پریودیک اسید شیف Periodic Acid Schiff (PAS) (Merck-آلمان) رنگ‌آمیزی شدند. رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف به منظور شناسایی وجود احتمالی گرانول‌های گلیکوژن در سیتوپلاسم سلول‌های زایای اولیه و شناسایی این سلول‌ها انجام گرفت (Suvarna et al, 2018). در نهایت از مقاطع پارافینه و مقاطع نیمه نازک توسط میکروسکوپ نوری (Olympus BX51، ژاپن) مجهز به دوربین (Olympus DP12، ژاپن) فتوگرافی به عمل آمد.

آماده‌سازی بافت‌ها جهت مطالعات استریولوژیک

جهت انجام مراحل استریولوژی، برای به دست آوردن مقاطع تصادفی یکنواخت سیستماتیک از روش جهت‌گیری (Orientation) بلوک‌ها استفاده شد (Howard and Reed, 2004). سپس از کل بافت تخمدان به صورت سریال و پشت سر هم برش‌گیری انجام شد. از برش‌های مذکور با استفاده از روش نمونه‌گیری سیستماتیک تصادفی یکنواخت از ابتدا تا انتهای بافت به صورت فیلد بای فیلد شمارش انجام شده است (SUR) Systematic Uniform Random (Neisy et al, 2023) در مجموع ۱۲ برش از تخمدان انتخاب و با هماتوکسیلین و اتوزین رنگ‌آمیزی شدند و سپس به وسیله میکروسکوپ نوری (Nikon E200، ژاپن) با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ مورد بررسی قرار گرفتند.

تخمین تعداد سلول‌های زایای اولیه

جهت شمارش تعداد سلول‌ها، از نرم‌افزار استریولوژی Unbiased Counting Frame استفاده شد. سپس با روش

اولیه و هسته آن می باشد (Dastghaib et al, 2022). $\pi = 3.14$ ، نشان دهنده حجم متوسط سلول زایای

نتایج

مطالعه حاضر نشان داد که تخمدانها در بخش فوقانی حفره شکمی و در تماس با سطح شکمی-میانی کلیه مزوفروس قرار دارند و عدم تقارن در تخمدان چپ و راست در جنینهای سنین ۲۴-۹ روزه به خوبی قابل مشاهده بود. به طوری که موقعیت تخمدان راست کمی مورب تر از تخمدان چپ نسبت به محور میانی بدن جنین بود. ویژگی عدم تقارن در همه سنین مورد مطالعه، مشاهده گردید و مشخص شد که در طی روند تکوین جنینی تخمدان سمت راست تحلیل رفته و اندازه آن بسیار کوچک می گردد (Figure 1A).

در این مطالعه مشخص شد سلولهای زایای اولیه در جنینهای ۹ تا ۱۴ روزه هم در مقاطع پارافینی رنگ آمیزی شده با H&E و هم در مقاطع نیمه نازک رزینی رنگ آمیزی شده با تولوئیدین بلو به دلیل موفولوژی خاص آنها به راحتی قابل شناسایی هستند (Figures 1B and 1C). سلولهای زایای اولیه به دلیل داشتن هسته بزرگتر و سیتوپلاسم شفافتر نسبت به سایر سلولها قابل تمایز بودند. به لحاظ هیستوشیمی، واکنش سلولهای زایای اولیه با رنگ PAS بسیار ضعیف بود (Figure 1D). لازم به ذکر است جهت مقایسه و راستی آزمایی واکنشهای رنگی انجام گرفته از نمونه بافتی رکتوم بلدرچین به عنوان کنترل مثبت برای رنگ آمیزی PAS استفاده شد (Figure 1E). تعداد سلولهای زایای اولیه در تخمدان جنین ۱۴ روزه نسبت به جنین ۹ روزه کاهش چشمگیری داشت (Figures 2A-2C). همچنین در مقاطع نیمه نازک رنگ آمیزی شده با تولوئیدین بلو در تخمدان جنین ۱۴ روزه مشخص شد هسته سلولهای زایای اولیه به صورت محدود در وضعیت تقسیم میتوزی فعال قرار دارند (Figure 2D).

اپتیکال دایسکتور (Optical dissector) تعداد سلولها محاسبه گردید. شاخص اندازه گیری تعداد سلول، هسته بود. برای جلوگیری از سوگیری، همه هستهها فارغ از شکل و اندازه شمارش شدند. برای اندازه گیری تعداد هستهها، برش Optical در محور Z به سمت پایین حرکت داده شد و برای پیش گیری از سوگیری شمارش، یک Guard zone در نظر گرفته می شد. هر هسته ای که در ارتفاع Dissector دیده شود و در قاب شمارش (Counting frame) یا در تماس با خطوط مجاز برای شمارش (Inclusion borders) باشد انتخاب گردید. سپس تراکم عددی در واحد حجم با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$Nv = \frac{\sum_{i=1}^n Q}{\sum_{i=1}^n P \times h \times \left(\frac{a}{f}\right)}$$

در فرمول ذکر شده، $\sum_{i=1}^n Q$ مجموع تعداد هسته های شمارش شده در ارتفاع dissector، $\sum_{i=1}^n P$ مجموع تعداد فریم های شمارش شده، a/f مساحت کل فرم در تمام فیله های میکروسکوپی و h ارتفاع dissector می باشد. برای محاسبه تعداد کل سلولها، تراکم عددی در واحد حجم در فرمول $N = NV \times V_{final}$ محاسبه شد (Neisy et al, 2023).

برآورد حجم سلولهای زایای اولیه

برای تخمین حجم سلولهای زایای اولیه و حجم هسته این سلولها از فرمول زیر و روش نوکلئیتور (Nucleator) استفاده شد.

$$V = \frac{4}{3} \pi L_n^{-3}$$

در این فرمول L بیانگر متوسط شعاعهای سلول زایای اولیه از مرکز هسته می باشد که با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$L_n^{-3} = \frac{L_1^3 + L_2^3 + L_3^3 + L_4^3 + \dots}{4}$$

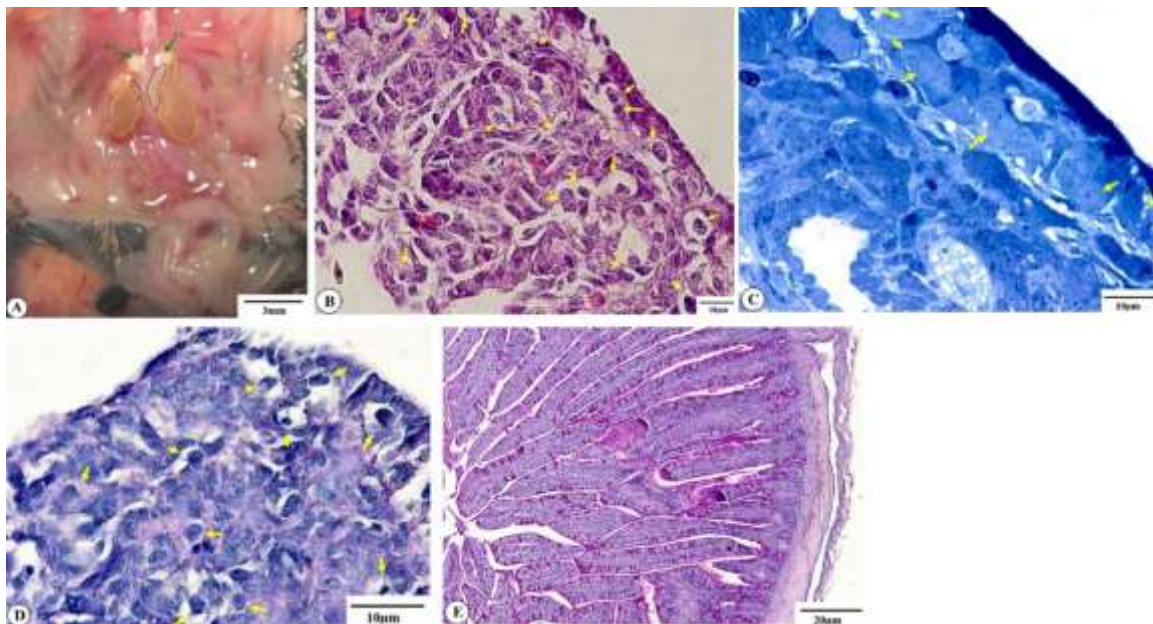


Figure 1: (A): Picture of a female pheasant embryo's abdominal cavity. The ovaries (dashed black line) are positioned on the ventral surface of the mesonephros kidney (dashed yellow line). Asymmetry can be detected in both the left and right ovaries. A green arrow denotes the right (RA) and left (LR) adrenal glands. (B) H&E staining identify pheasant PGCs in the ovarian tissue of a 9-day-old embryo (yellow arrow). (C) Identification of ovarian PGCs in semithin sections stained with toluidine blue (yellow arrow). (D) PAS staining identifies PGCs (yellow arrow). (E) Positive control sample for PAS staining was intestinal tissue. Images A-D have 100X magnification, whereas image E has 40X magnification.

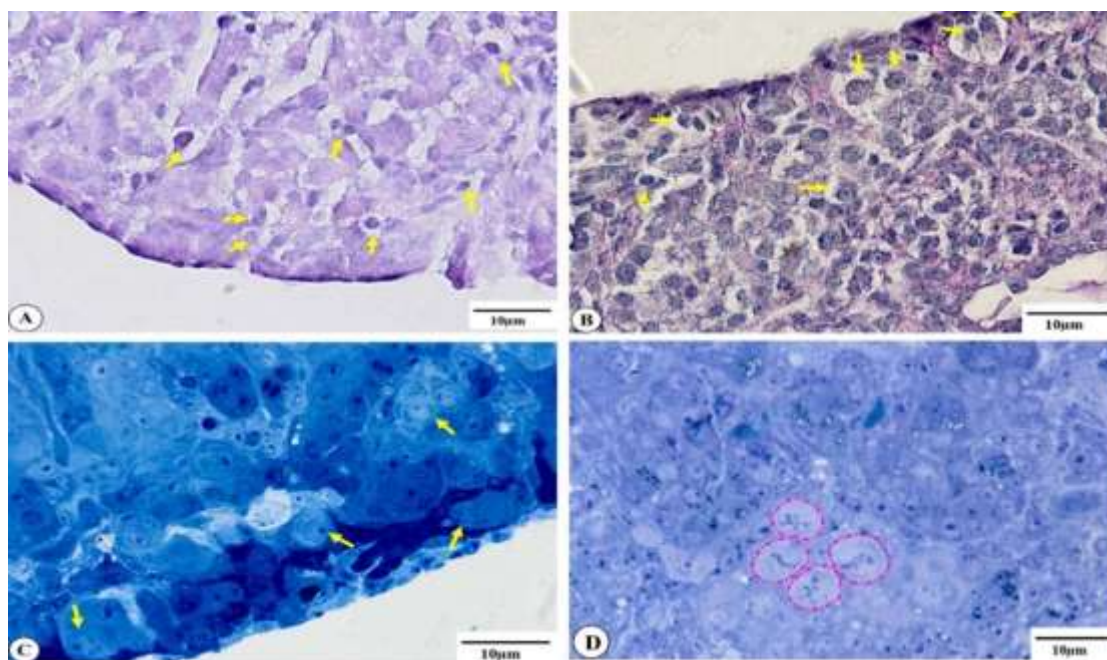


Figure 2: Ovarian tissue structure in a 14-day embryo, PGCs in pheasants (yellow arrow). (A): H&E staining, (B): PAS staining. (C): Toluidine blue staining. (D): Semithin section with toluidine blue staining, pay attention to the start of mitosis at this age. Images A-D have 100X magnification.

میتوز به سلول‌های زایا Germ Cell (GC) یا سلول‌های پیش‌ساز اووگونی و سلول‌های سوماتیک (که نسبت به

در مطالعه مقاطع پارافینی و رزینی در سن ۱۸ روزگی جنینی، مشخص شد سلول‌های زایای اولیه بر اثر تقسیم

در هر سه مرحله یا سن جنینی مورد مطالعه، سلول‌های زایای اولیه واکنش منفی نسبت به رنگ‌آمیزی PAS نشان دادند (Figure 3C).

سلول‌های زایا کوچک‌تر و هرمی شکل بوده و در اطراف سلول زایا قرار داشتند (متمايز شده بودند (Figures 3A) (and 3B).

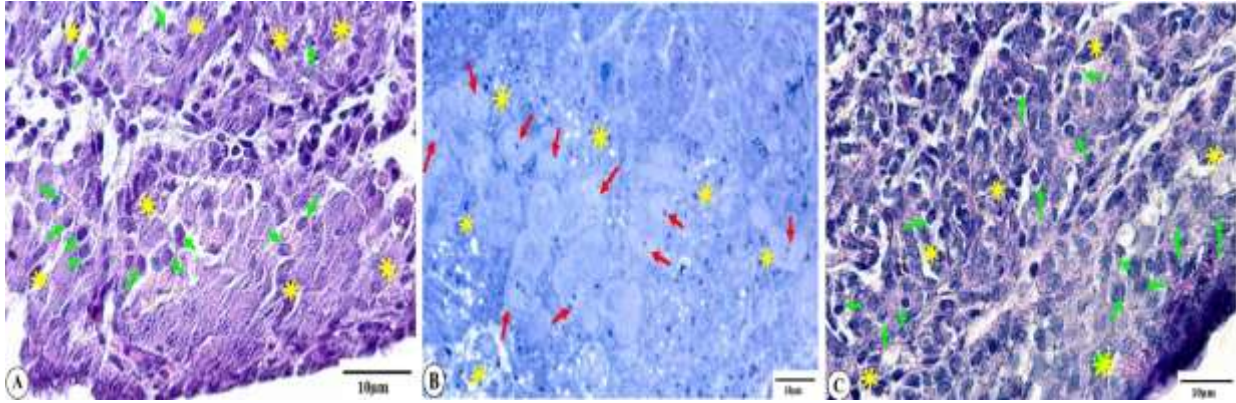


Figure 3: Pheasant embryo ovary tissue structure at 18 days, (A): Germ cells (green arrow) and somatic cells (yellow star), H&E staining. (B): Semithin section stained with toluidine blue; germ cells (red arrow) and somatic cells (yellow star) surround the germ cells. (C): Germ cells (green arrow) and somatic cells (yellow star) surround them, with PAS staining. Images A-C have 100X magnification.

با توجه به برآورد نتایج استریولوژیک، تعداد کل سلول‌های زایای اولیه در جنین ۹ روزه از ۹۴۴۳ به ۱۰۴۶ عدد در جنین ۱۴ روزه کاهش یافته بود که این نتیجه حکایت از کاهش ۹۰ درصدی تعداد این سلول‌ها داشت. همچنین بررسی نتایج حجم سلول‌های زایای اولیه و حجم هسته این سلول‌ها نشان از افزایش ۱/۵ برابری حجم سلول و افزایش ۱/۳ برابری حجم هسته سلول در جنین ۱۴ روزه نسبت به جنین ۹ روزه داشت (Table 1).

در ادامه روند مطالعه، مشخص شد تعداد سلول‌های زایای موجود در تخمدان در روز ۲۴ جنینی به طور چشم‌گیری افزایش یافته بود و گرانول‌های بیشتری در سیتوپلاسم آن‌ها وجود داشت (Figures 4A-4C). بنابر نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، سلول‌های زایای اولیه در بافت تخمدان در سنین ۹ و ۱۴ روز جنینی حضور داشتند اما با افزایش سن جنین و شروع تمایز سلولی این سلول‌ها در سن ۱۸ روزگی مشاهده نشدند.

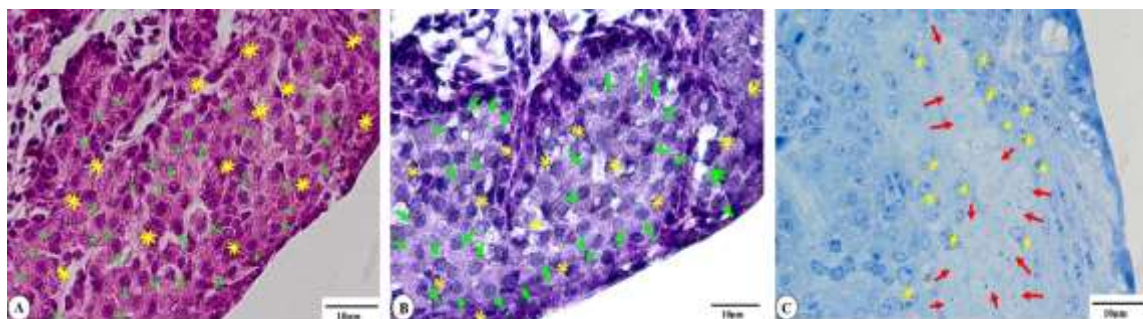


Figure 4: The histological structure of a 24-day-old pheasant embryo's ovary, (A): Germ cells (green arrow) and somatic cells (yellow star), H&E staining. (B): Germ cells (green arrow) and somatic cells (yellow star) surround them, PAS staining. (C): Semithin section with toluidine blue staining of germ cells (red arrow) and somatic cells (yellow star). Images have 100X magnification.

Table 1: In pheasant embryos, the results related to the number of primordial germ cells, the volume of these cells, and the volume of their nuclei

Time	Number of PGCs	Volume of the Nucleus of PGCs (μm^3)	Volume of the PGC (μm^3)
9 th day	9443	20.02	368.93
14 th day	1046	27.6	558.400
18 th day	0	0	0
24 th day	0	0	0

تکثیر سلولی و همچنین از دست دادن پاسخ به استروژن در تخمدان راست می‌شود (Intarapat and Stern, 2014; Mohamed et al, 2017; Guioli and Lovell-Badge, 2007; Johnson, 2015).

نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر نشان داد که سلول‌های زایای اولیه در تخمدان جنین ۹ روزه قرقاول با رنگ‌آمیزی‌های هماتوکسیلین و ائوزین و تولوئیدین‌بلو به دلیل مورفولوژی خاص آن‌ها به راحتی قابل تشخیص می‌باشند. این سلول‌ها بزرگ، کروی یا بیضی شکل بودند که دارای هسته بزرگ خارج مرکز و حاوی یک یا دو هستک مجزا بودند و سیتوپلاسم آن‌ها رنگ‌پذیری ضعیفی داشت. یافته‌های مشابهی توسط سایر محققان که بر روی جنین پرندگانی همچون جوجه (González-Morán, 2017; Sopiya et al, 2011)، جنین جوجه نژاد مصری (Mohamed Alsafy et al, 2017)، شترمرغ (Mohammadi et al, 2019) و قرقاول نر (Hassanzadeh et al, 2019) به ثبت رسیده است که با نتایج حاضر هم‌خوانی دارد.

برای مطالعه دقیق‌تر سلول‌های زایای اولیه، به رنگ‌ها یا آنتی‌بادی‌های خاصی برای شناسایی مطمئن‌تر این سلول‌ها نیاز می‌باشد. رنگ‌آمیزی PAS یک نشان‌گر هیستوشیمیایی برای تمایز سلول‌های زایای اولیه از سلول‌های سوماتیک مجاور است (Chojnacka-Puchta et al, 2012; Macdonald et al, 2010). Fujimoto و همکاران در سال (۱۹۷۶) گزارش کردند سلول‌های زایای اولیه جنین جوجه به دلیل گلیکوژن فراوان PAS مثبت هستند. Mohamed و همکاران (۲۰۱۷) اعلام کردند سلول‌های زایای اولیه با تکنیک رنگ‌آمیزی PAS به دلیل وجود گرانول‌های

بنابراین با توجه به نتایج مربوط به مطالعه استریولوژی می‌توان نتیجه گرفت که تعداد کل سلول‌های زایای اولیه شمارش شده در تخمدان، در ۹ روزگی بیش‌ترین افزایش را داشت اما در مراحل پیشرفته‌تر رشد، از تعداد این سلول‌ها کاسته شد به طوری که در ۱۸ روزگی این سلول‌ها وجود نداشتند. همچنین حجم سلول‌های زایای اولیه و حجم هسته این سلول‌ها از ۹ روزگی و با ازدیاد سن افزایش یافت به طوری که در ۱۴ روزگی به حداکثر افزایش خود رسید.

بحث

در مطالعه حاضر تفاوت در اندازه بین تخمدان چپ و راست در تمام سنین مورد بررسی به خوبی مشاهده شد که تخمدان راست بسیار کوچک‌تر از تخمدان چپ بود. نتایج مشابهی از عدم تقارن گناد در جنین‌های ماده توسط سایر پژوهشگران به ثبت رسیده است که گزارش شده که تنها گناد چپ تکوین می‌یابد و این گناد بسیار بزرگ‌تر از گناد سمت راست می‌باشد، زیرا گناد راست در طی روند تکوین پسرفت کرده یا تحلیل می‌رود. همچنین آن‌ها سلول‌های زایای جنین ماده را در تخمدان‌های در حال تکوین شناسایی کردند (Intarapat and Stern, 2014; Mohamed et al, 2017; Kheirabadi et al, 2015; Rosenthal et al, 2010). برخی از محققین گزارش کرده‌اند علت این رشد نامتقارن به بیان متفاوت ژن‌ها در تخمدان‌های چپ و راست مرتبط می‌باشد. در جنین مرغ، چندین گزارش الگوی نامتقارن بیان گیرنده استروژن آلفا (ESR1) و بیان ژن PITX2 در تخمدان سمت چپ گزارش شده است. در نتیجه این فرایند تفاوت ژنی، غدد جنسی منجر به مهار

در سیتوپلاسم سلول‌های زایای اولیه مشخص بودند. در مقاطع نیمه نازک تخمدان جنین‌های ۹ تا ۱۴ روزه قرقاول، سلول‌های زایای اولیه با توجه به اندازه بسیار بزرگ، هسته کروی بزرگ و سیتوپلاسم کم‌رنگ شناسایی شدند. چند مطالعه دیگر نتایج مشابهی در این خصوص گزارش کرده‌اند (Kheirabadi et al, 2015; Hassanzadeh et al, 2019;) (Mohammadi Gheshlagh et al, 2023). در مقاطع نیمه نازک در سن ۱۸ روزگی جنینی هیچ سلول زایای اولیه‌ای مشاهده نشد. دلیل آن این است که سلول‌های زایای اولیه بر اثر تقسیم میتوز به سلول‌های زایا یا سلول‌های پیش‌ساز اوگونیا متمایز می‌شوند. لازم به ذکر است اولین نشانه‌های تقسیم میتوز در ۱۴ روزگی به صورت محدود مشاهده شد. نتایج مشابهی با یافته‌های این مطالعه به ثبت رسیده است که این سلول‌ها در طول رشد دچار تقسیم میتوز می‌شوند (Mohamed et al, 2017).

تعداد سلول‌های زایای اولیه در تخمدان جنین‌های ۹ و ۱۴ روزه قرقاول با استفاده از تکنیک استریولوژی و به روش اپتیکال دایسکتور تخمین زده شد. تعداد این سلول‌ها در جنین ۹ روزه به طور آشکاری بیش‌تر از جنین ۱۴ روزه بود در صورتی که حجم سلول زایای اولیه و حجم هسته آن در جنین ۱۴ روزه بیش‌تر از جنین ۹ روزه بود. دلیل این افزایش حجم سلول و هسته می‌تواند در نتیجه شروع تقسیم میتوز و تبدیل سلول زایای اولیه به سلول زایا باشد. مطالعه استریولوژی چندانی در خصوص تعیین و برآورد تعداد سلول‌های زایای اولیه و تخمین حجم این سلول‌ها و حجم هسته آن‌ها در سنین جنینی در پرندگان انجام نشده است. اما بر اساس گزارش Mohamed Alsafy و همکاران تعداد سلول‌های زایای اولیه جوجه مصری با پیشرفت سن افزایش می‌یابد (Mohamed et al, 2017). همچنین طبق تحقیقی که Sopiya و همکاران (۲۰۱۷) بر روی جوجه اندونزیایی طی روزهای ۶ تا ۹ جنینی انجام دادند مشخص شد تعداد سلول زایای اولیه گناد در روز هفتم انکوباسیون به اوج خود رسیده و با افزایش سن جنین از تعداد سلول‌های مذکور کاسته می‌شود. تعدادی از

گلیکوژن در سیتوپلاسم واکنش مثبت نشان دادند. همچنین در پژوهشی در سال ۱۹۹۳ تأیید شد که سلول‌های زایای اولیه در جوجه در هلال زایا با استفاده از رنگ‌آمیزی PAS قابل شناسایی هستند. در این مطالعه مشخص شد رنگ‌آمیزی PAS تکنیکی مناسب برای تشخیص سلول‌های زایای اولیه در تخمدان جنین‌های ۹ روزه قرقاول می‌باشد. ولی به نظر می‌رسد محتوای گلیکوژنی سلول‌های زایای اولیه از روز ۹ تا ۱۴ جنینی روند نزولی چشم‌گیری پیدا می‌کند به طوری که در روزهای ۱۴، ۱۸ و ۲۴ جنینی هیچ واکنش مثبتی در سلول‌های زایای اولیه با این رنگ‌آمیزی مشاهده نشد. Hassanzadeh و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند رنگ‌آمیزی PAS تکنیک مناسبی برای تشخیص سلول‌های زایای اولیه در گناد جنین شترمرغ می‌باشد که با نتیجه این مطالعه مطابقت ندارد. Jung و همکاران (۲۰۰۵) سلول‌های زایای جوجه را با استفاده از رنگ‌آمیزی PAS شناسایی کردند که به رنگ‌آمیزی واکنش مثبت نشان دادند. طبق مشاهدات Fujimoto و همکاران (۱۹۷۶) و Pardanaud و همکاران (۱۹۸۷) سلول‌های زایای اولیه در جنین جوجه PAS مثبت بودند زیرا سلول‌های زایا دارای میزان بالای گلیکوژن هستند که با نتیجه مطالعه حاضر به دلیل محتوای پایین گلیکوژن در سیتوپلاسم سلول‌های زایای تخمدان قرقاول متفاوت است. یافته‌های این تحقیق با مطالعه Naeemipour و همکاران (۲۰۱۳) روی سلول‌های زایای اولیه جوجه، در تضاد است. در حالی که با نتایج Armengol و همکاران (۲۰۰۷) مشابه است که گزارش کردند که سلول‌های زایای اولیه بلدرچین به دلیل عدم وجود گلیکوژن در سیتوپلاسم به PAS واکنش منفی نشان دادند. همچنین نتایج این تحقیق با مطالعه Mohammadi و همکاران (۲۰۲۳) که روی سلول‌های زایای اولیه گناد نر قرقاول صورت گرفته است، همخوانی دارد.

در مطالعه حاضر با تهیه مقاطع نیمه نازک و رنگ‌آمیزی این مقاطع با رنگ تولوئیدن‌بلو جهت شناسایی دقیق‌تر سلول‌های زایای اولیه استفاده شد که گرانول‌های گلیکوژن

دلیل میزان کم ذخایر گرانول‌های گلیکوژن در سیتوپلاسم این سلول‌ها یا کمبود کربوهیدرات در سطح سلول می‌باشد. این مطالعه با توجه به اندازه بزرگ‌تر سلول‌های زایای اولیه و هسته آن‌ها نسبت به سایر سلول‌ها نشان داد که رنگ‌آمیزی روتین هماتوکسیلین و ائوزین و استفاده از تکنیک تهیه برش‌های نیمه نازک برای تشخیص بافتی این سلول‌ها مناسب هستند.

در مطالعه حاضر تعداد سلول‌های زایای اولیه، حجم این سلول‌ها و حجم هسته آن‌ها در جنین قرقاول برای اولین بار توسط تکنیک استریولوژی مورد ارزیابی قرار گرفت که بر اساس نتایج حاصله سلول‌های زایای اولیه در تخمدان جنین این پرنده تا سن ۱۴ روزگی قابل تشخیص هستند و پس از آن دچار تمایز سلولی و تقسیم میتوز می‌شوند و به سلول‌های زایا تبدیل می‌شوند.

محققین گزارش کرده‌اند غدد جنسی در مراحل اولیه تکوین حاوی تعداد کمی سلول زایای اولیه می‌باشند که با افزایش سن تعداد این سلول‌ها زیاد می‌شود و با ادامه روند رشد مجدداً از تعداد آن‌ها کاسته می‌شود که این نتایج با نتایج حاصل از این مطالعه مطابقت دارد (Mohamed et al, 2001; D'Costa et al, 2017). همچنین بر اساس تحقیقات انجام شده به نظر می‌رسد تعداد سلول‌های زایای اولیه گناد ماده تحت تأثیر سن رشد جنینی است که این نتایج نیز با داده‌های مطالعه حاضر همسو می‌باشد. علت کاهش تعداد سلول‌های زایای اولیه ممکن است به دلیل شروع تمایز سلولی این سلول‌ها و علت افزایش حجم این سلول‌ها به دلیل تقسیم میتوز در جنین ماده باشد (Mohamed et al, 2017; Sopiya et al, 2017). سلول‌های زایای اولیه تخمدان جنین قرقاول در تمام سنین مورد مطالعه به تکنیک هیستوشیمیایی PAS واکنش منفی نشان دادند که احتمالاً به

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از آقای قاسم پورادیبی تکنیسین محترم بخش بافت‌شناسی دانشکده دامپزشکی تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند.

کد اخلاق

تأییدیه اخلاقی این تحقیق توسط کمیته اخلاق دانشگاه فردوسی مشهد تصویب و با کد IR.UM.REC.1399.137 صادر گردیده و تمام آزمایش‌ها بر اساس دستورالعمل‌ها و مقررات مربوطه انجام شده است.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافی ندارند.

منابع مالی

منابع مالی این پژوهش در قالب رساله دکتری تخصصی و طی اعتبار تحقیقاتی شماره ۳/۵۵۷۶۴ توسط حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد تأمین شده است.

منابع

Adamski, M., & Kuźniacka, J. (2006). The effect of age and sex on slaughter traits of pheasants

(*Phasianus colchicus* L.). *Animal Science Papers and Reports*, 24(Supplement 2), 11-18.

- Armengol, C., Carretero, A., Nacher, V., Ruberte, J., & Navarro, M. (2007). Carbohydrate characterization of quail primordial germ cells during migration and gonadal differentiation. *Journal of Anatomy*, 210(1), 98-111
- Carlson, N. (1985). Origin of the somatic components of chick embryonic gonads. *Archives d'anatomie microscopique et de morphologie experimentale*, 74(1), 52-59.
- Chojnacka-Puchta, L., Kasperczyk, K., Plucienniczak, G., Sawicka, D., & Bednarczyk, M. (2012). Primordial germ cells (PGCs) as a tool for creating transgenic chickens. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 15(1), 181-188.
- Clinton, M., & Haines, L. C. (2001). An overview of factors influencing sex determination and gonadal development in birds. *Genes and Mechanisms in Vertebrate Sex Determination*, (91), 97-115.
- Dastghaib, S., Gholizadeh, F., Mokaram, P., & Noorafshan, A. (2022). Stevia aquatic extract protects the pancreas from streptozocin (STZ) induced damage: A stereological study. *Indian Journal of Experimental Biology (IJEB)*, 60(05), 299-307.
- D'Costa, S., Pardue, S. L., & Petite, J. N. (2001). Comparative development of avian primordial germ cells and production of germ line chimeras. *Avian and Poultry Biology Reviews*, 12(4), 151-168.
- England, M. A., & Matsumura, G. (1993). Primordial germ cells in the primitive streak stages chick embryo as studied by scanning electron microscopy. *Journal of anatomy*, 183(Pt 1), 67-73.
- Fujimoto, T., Ukeshima, A., & Kiyofuji, R. (1976). The origin, migration and morphology of the primordial germ cells in the chick embryo. *The Anatomical Record*, 185(2), 139-153.
- González-Morán, M. G. (2011). Histological and stereological changes in growing and regressing chicken ovaries during development. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 294(5), 893-904.
- Guioli, S., & Lovell-Badge, R. (2007). PITX2 controls asymmetric gonadal development in both sexes of the chick and can rescue the degeneration of the right ovary. *Development*, 134(23), 4199-4208.
- Hassanzadeh, B., Nabipour, A., & Dehghani, H. (2019). Ostrich (*Struthio camelus*) primordial germ cells in embryonic blood and presumptive gonad: characterization by PAS and immunohistochemistry. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 20(4), 299-303.
- Hosseini, A., Nabipour, A., & Dehghani, H. (2020). Characterizing Primordial Germ Cells in the Turkey (Meleagris Gallopavo) Embryo. *Anatomical Sciences Journal*, 17(2), 63-72.
- Howard, V., & Reed, M. (2004). *Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy*. Garland Science.
- Intarapat, S., & Stern, C. D. (2013). Chick stem cells: current progress and future prospects. *Stem Cell Research*, 11(3), 1378-1392.
- Intarapat, S., & Stern, C. D. (2014). Left-right asymmetry in chicken embryonic gonads. *The Journal of Poultry Science*, 51(4), 352-358.
- Intarapat, S., & Satayalai, O. (2014). Microanatomical study of embryonic gonadal development in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Anatomy Research International*, 2014(168614), 1-9.
- Jung, J. G., Kim, D. K., Park, T. S., Lee, S. D., Lim, J. M., & Han, J. Y. (2005). Development of novel markers for the characterization of chicken primordial germ cells. *Stem Cells*, 23(5), 689-698.
- Johnson, A. L. (2015). Reproduction in the female. In *Sturkie's avian physiology* (pp. 635-665). Academic Press.
- Kheirabadi, M., Nabipour, A., Behnam Rassouli, M., & Dehghani, H. (2015). Morphological development of ovaries in ostrich (*Struthio camelus*) embryo. *Comparative Clinical Pathology*, 24, 1185-1191.
- Kim, Y. M., & Han, J. Y. (2018). The early development of germ cells in chicken. *International Journal of Developmental Biology*, 62(1-2-3), 145-152.
- Macdonald, J., Glover, J. D., Taylor, L., Sang, H. M., & McGrew, M. J. (2010). Characterisation and germline transmission of cultured avian primordial germ cells. *PloS one*, 5(11), e15518.
- Mathan, Zaib, G., Jin, K., Zuo, Q., Habib, M., Zhang, Y., & Li, B. (2023). Formation, Application, and Significance of Chicken Primordial Germ Cells: A Review. *Animals*, 13(6), 1096.
- Meng, L., Wang, S., Jiang, H., Hua, Y., Yin, B., Huang, X., & Zhu, G. (2022). Oct4 dependent chromatin activation is required for chicken primordial germ cell migration. *Stem Cell Reviews and Reports*, 18(7), 2535-2546.

- Mohamed A.M. Alsafy, Samir A, El-Gendy, Ashraf A, Karkoura, Doha Shokry. (2017). Pre-Hatching Development of the Alexandria Chicken Ovaries. *Academia Anatomica International*, 3(2), 34-43.
- Mohamed, G. K., Selim, A. A., Abdelhafeez, H. H., & Mo-hamed, M. B. (2017). Histomorphological Developmental Studies of the Left Ovary in the Japanese quail (*Coturnix Coturnix Japonica*). *MJ Cyto*, 1 (1): 002.
- Mohammadi Gheshlagh, F., Hosseini, A., & Nabipour, A. (2023). The identification of the primordial germ cells in the male gonads of pheasant (*Phasianus colchicus*) embryos using histochemical and immunostaining techniques. *Iranian Veterinary Journal*, 19(1), 52-60.
- Naeemipour, M., & Bassami, M. (2013). Isolation, culture and characterization of chicken primordial germ cells. *Journal of Cell and Molecular Research*, 5(2), 48-53.
- Nakamura, Y., Kagami, H., & Tagami, T. (2013). Development, differentiation and manipulation of chicken germ cells. *Development, growth & differentiation*, 55(1), 20-40.
- Neisy, A., Koohpeyma, F., Khorchani, M. J., Karimi, F., & Zal, F. (2023). Quercetin modulates ovarian autophagy-related molecules and stereological parameters in a rat model of PCOS. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 13(1), 9.
- Pardanaud, L., Altmann, C., Kitos, P., Dieterlen-Lievre, F., & Buck, C. A. (1987). Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. *Development*, 100(2), 339-349.
- Rosenthal, N. F., Ellis, H., Shioda, K., Mahoney, C., Coser, K. R., & Shioda, T. (2010). High-throughput applicable genomic sex typing of chicken by TaqMan real-time quantitative polymerase chain reaction. *Poultry science*, 89(7), 1451-1456.
- Smith, C. A., & Sinclair, A. H. (2004). Sex determination: insights from the chicken. *Bioessays*, 26(2), 120-132.
- Sopiyana, S., Setiadi, M. A., Fahrudin, M., & Supriatna, I. (2017). Isolation and number of gonadal primordial germ cells (gonadal PGCs) on the stages of early embryonic development of KUB chicken. *Media Peternakan*, 40(1), 1-6.
- Suvarna, K. S., Layton, C., & Bancroft, J. D. (2018). *Bancroft's theory and practice of histological techniques*. Elsevier health sciences.
- Szczerba, A., Kuwana, T., & Bednarczyk, M. (2021). Concentration and total number of circulating primordial germ cells in Green-legged Partridge-like chicken embryos. *Poultry science*, 100(1), 319-324.

Received: 17.07.2023

Accepted: 01.10.2023

Study and identification of primordial germ cells in the gonad of female pheasant embryo (*Phasianus colchicus*) using various histological techniques

Zahra Khodaparast¹ and Abolghasem Nabipour^{2*}

¹ PhD Student of Histology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

² Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Received: 17.07.2023

Accepted: 01.10.2023

Abstract

The goal of this study was to detect and evaluate the presence of primordial germ cells in pheasant ovarian tissue at various embryonic ages. These are the only growing cells in the embryo capable of transmitting genetic information to the following generation via gametogenesis. Birds are quite useful for research in this area because of their growth features. On the other hand, the pheasant is one of the birds with very beneficial features, but this rare species is at risk of extinction. In this study, 28 fertilized pheasant eggs were used, and the gonads of female embryos were differentiated based on their asymmetry and retrieved between embryonic days 9 and 24. Tissue sections were prepared as serial sections and the identification of primordial germ cells was examined using hematoxylin-eosin and PAS staining, as well as semithin slice preparation and toluidine blue staining. The number of primordial germ cells, cell volume, and nucleus volume of primordial germ cells were then estimated using stereological techniques. Early germ cells were recognized in paraffin and resin sections from embryonic days 9 to 14 because of their unique properties, which comprised a big nucleus and little cytoplasm. Furthermore, the response of these cells to PAS staining was negative at all ages. According to the stereological results, the number of primordial germ cells was decreased at more advanced ages of development, so that it was not seen at 18 day embryo. Whereas, the volume of the primordial germ cells and nucleus of these cells have been increased with the increasing of the age. The findings of this study revealed that primordial germ cells in the ovarian tissue of pheasant embryos at all examined ages responded negatively to the PAS staining, whereas routine hematoxylin and eosin staining and the use of semithin sections are suitable for microscopic detection of these cells. Morphologically, this cell in pheasant was similar to other birds, whereas in terms of histochemistry, the reaction of these cells was negative to PAS staining which differs from some species of birds.

Key words: Primordial germ cells, Pheasant embryo, Female gonad, Semithin section, Streology

* **Corresponding Author:** Abolghasem Nabipour, Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
E-mail: nabipour@um.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).