Journal of Cell and Tissue
https://jct.araku.ac.ir
ISSN: 2345-3567

The study of the use of specific staining in the observation of neuronal cells and myelin fibers of the cerebellum in the stages of pheasant embryos to one-day-old chicks

Azizi M[a], Mohammadpour AA[b*]

[a] Ph.D Student, Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Postcode 9177948974, Iran
[b] Professor, Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Postcode 9177948974, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online

Citation: Azizi M, Mohammadpour AA. The study of the use of specific staining in the observation of neuronal cells and myelin fibers of the cerebellum in the stages of pheasant embryos to one-day-old chicks. Journal of Cell and Tissue. 2024; 15(2):113-129

https:// 10.61186/JCT.15.2.113

KEYWORDS

Histology
Pheasant
Cerebellum
Myelin fibers
Specialized staining
embryonic stages

ABSTRACT

Aim: Pheasant is a pleasant bird whose long and magnificent tail distinguishes it from other types of birds. The cerebellum is organized in the form of leaves that are located in a row in the rostrocaudal axis of the brain. Myelin is the twisting of the plasma membrane of the oligodendrocyte and Schwann cells around an axon, which insulates it and increases the speed of nerve current conduction. Due to the importance and fundamental role of the nervous system, many studies have been done on the nervous system of mammals and other birds, but no research has been done on the development of the pheasant's nervous system, therefore, this research is proposed.

Material and methods: In this study, sixty fertilized pheasant eggs were used. Healthy eggs were placed in the automatic incubator and head sampling was done on different days of the embryo from the 7th day and the one-day-old chick. The specimens were immediately fixed in 10% neutral buffered formalin solution for 24–48 hours and then submitted to the dehydration process by passing them through a series of ascending ethanol alcohol each for two hours (70, 80, 90 and 100%) and then specimens were cleared in xylene for one hour after that embedded in paraffin wax and then the blocks were sectioned by microtome at 5µm thickness. First, all tissue sections were stained with Hematoxylin and Eosin for histological structure, and then to identify myelin fibers and glial cells, sections were stained with special stain; Luxal Fast Blue Cresyl Etch Violet and Mallory's Phosphotungstic Acid-Hematoxylin dyes.

Results: In the cerebellum of a 7-day-old pheasant fetus, myelin fibers were seen in the form of very thin short strands among the primary nerve cells in an irregular and scattered manner. With increasing fetal age, the density, and probably the length of myelin fibers and the size of nerve cells increased also, the spatial arrangement of myelin fibers was seen in the form of regular thickness and almost from the 17-day embryo of the pheasant onwards, the regular arrangement of these fibers led to the recognition of the white and gray matter of the cerebellum.

* Corresponding author. Tel: 051 38805636 Fax: 051 38805636
E-mail address: mohammadpoor@um.ac.ir
DOI: https://doi.org/10.61186/JCT.15.2.113
Received: 17 Feb. 2024; Received in revised form: 8 Jul. 2024; Accepted: 13 Jul. 2024
Original Article

© Author

In 19-day-old pheasant embryo onwards, the regular arrangement of these fibers caused a clear recognition of the white and gray matter of the cerebellum, which until now from this age, they were not distinguishable, but empty spaces between myelin fibers were observed.

Conclusion: The results showed that myelin and glial cells start to form in the pheasant cerebellum from the age of 7 and as the embryo ages, these cells become bigger and completely fill the space between the neurons. Also, myelin fibers were first observed in the form of very thin and scattered threads at the age of 7 embryos and As the embryo ages, these fibers become denser and finally, in the white matter of the cerebellum of a day-old chick, they find a spatial arrangement in the form of very thick and regular bundles.

سلول و بافت، دوره ۱۵، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، صفحات ۱۱۳ تا ۱۲۹

سلول و بافت

شاپا الکترونیکی: ۳۵۶۷-۲۳۴۵

مطالعه‌ی استفاده از رنگ آمیزی‌های اختصاصی در مشاهده‌ی سلول های نروگلی و الیاف میلین مخچه در مراحل جنین قرقاول تا جوجه یک روزه

منصوره عزیزی[۱]، احمدعلی محمدپور[۲]

[۱]دانشجوی دکتری، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، کد پستی ۹۱۷۷۹۴۸۹۷۴، ایران. mansoure_azizi@yahoo.com

[۲]استاد، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی ، دانشگاه فردوسی، مشهد، کد پستی ۹۱۷۷۹۴۸۹۷۴، ایران. mohammadpoor@um.ac.ir

واژگان کلیدی

بافت شناسی
قرقاول
مخچه
الیاف میلین
رنگ آمیزی تخصصی
مراحل رویانی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۲۸

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۴/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۲۳

چکیده

هدف: قرقاول پرنده‌ای دلنشین است که دم بلند و باشکوهش آن را از سایر گونه‌های ماکیان متمایز می‌سازد. مخچه به شکل شاخ و برگ که پشت سر هم در محور سری- دمی مغز قرار دارد، سازماندهی شده است. میلین پیچ خوردگی غشای پلاسمایی سلول الیگودندروسیت و شوآن اطراف یک آکسون می‌باشد که موجب عایق شدن آن و افزایش سرعت هدایت جریان عصبی می‌شود. با توجه به اهمیت و نقش اساسی دستگاه عصبی، تاکنون مطالعات زیادی روی سیستم عصبی پستانداران و سایر پرندگان صورت گرفته، لیکن در مورد تکامل دستگاه عصبی قرقاول تحقیقاتی انجام نشده است به‌همین دلیل، این تحقیق پیشنهاد شده است. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه از ۶۰ عدد تخم نطفه دار قرقاول استفاده شد. تخم‌های سالم در دستگاه انکوباتور اتوماتیک قرار گرفتند و در روزهای مختلف فرد جنینی از روز ۷ و جوجه یک روزه نمونه برداری سر جنین، انجام شد و در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شدند، سپس مراحل آماده سازی بافتی انجام شد و با رنگ‌های تخصصی لوکسال فاست بلو کرسیل اچت ویوله و فسفوتنگستیک اسید-هماتوکسیلین مالوری رنگ‌آمیزی مقاطع انجام شد.در نهایت نمونه‌ها جهت مطالعه‌ی میکروسکوپی آماده شدند. **نتایج:** در مخچه‌ی جنین ۷ روزه قرقاول، الیاف میلین به‌صورت رشته‌های بسیار نازک کوتاه در بین سلول‌های اولیه عصبی به‌صورت نامنظم و پراکنده دیده شدند. با افزایش سن جنین تراکم، و احتمالا طول الیاف میلین و اندازه‌ی سلول‌های عصبی افزایش یافت و همچنین آرایش فضایی الیاف میلین به‌صورت دستجات قطور منظم، دیده شد و تقریبا از جنین ۱۷ روزه ی قرقاول به بعد، آرایش منظم این الیاف، باعث تشخیص ماده سفید و خاکستری مخچه شد. **نتیجه گیری:** نتایج نشان داد که میلین و سلول های گلیال از سن ۷ جنینی در مخچه‌ی قرقاول شروع به تشکیل می‌نمایند و با افزایش سن جنین، این سلول‌ها نیز بزرگ‌تر شده و کاملا فضای بین نورون‌ها را پر می‌نمایند. همچنین الیاف میلین ابتدا در سن ۷ جنینی به‌صورت رشته‌های بسیار نازک و پراکنده مشاهده شدند و با افزایش سن جنین، این الیاف متراکم تر شده و در نهایت در ماده‌ی سفید مخچه‌ی جوجه یک روزه، به‌صورت باندل های بسیار قطور و منظم، آرایش فضایی می‌یابند.

* نویسنده مسئول؛ تلفن: 051 38805636 فکس: 051-38805636

آدرس پست الکترونیک: mohammadpoor@um.ac.ir

۱- مقدمه

جنین تمام مهره داران مراحل مشابهی از تکامل را طی می‌کنند. بعد از لقاح، تخم وارد مرحله کلیواژ می‌شود که در طی آن، جنین به تعدادی سلول کوچک‌تر بدون افزایش توده کلی تقسیم می‌شود. سپس مراحل با گاسترولاسیون ادامه یافته که در نتیجه حرکات لایه‌های زاینده، سلول‌ها به مکان‌های اصلی شان برای رشد و نمو آینده مهاجرت می‌نمایند. در انتهای گاسترولاسیون، اکتودرم جنین را می‌پوشاند و مزودرم و آندودرم به‌داخل حرکت می‌کنند. یکی از اولین ساختارهای مزودرمی که تشخیص داده می‌شود، طناب پشتی میله ای شکل است که در طول محور قدامی-خلفی بدن شکل می‌گیرد که بعدها با ستون مهره‌ها متحد می‌شود. ستون مهره‌ها و ماهیچه‌های تنه و اندام‌ها از توده‌های بافت‌های مزودرمی رشد می‌نمایند. سومیت‌ها در یک توالی قدامی– خلفی روی هر طرف طناب پشتی شکل می‌گیرند. تمام مهره داران این ساختارها را شکل می‌دهند. گرچه جزئیات تکامل اولیه بین گروه‌های مهره‌دار متفاوت است ولی مغز و نخاع مستقیما از اکتودرم بالای طناب پشتی که لوله‌ی عصبی را شکل می‌دهد، مشتق می‌شوند (۱).

از زمانی‌که ارسطو برای اولین بار تکوین سه هفته ای جوجه را دنبال کرد، تا امروز این موجود نمونه مناسبی برای مطالعات جنین شناسی و بافت شناسی بوده است زیرا این موجود در تمام طول سال به مقدار زیاد در دسترس بوده و به‌راحتی می‌توان آن را پرورش داد (۲).

همچنین جنین پرندگان سیستمی دارند که به‌راحتی اجازه مداخله تجربی را می‌دهد و شباهت زیادی با دیگر مهره‌داران دارد، به این دلیل، نشان دهنده مکمل مهمی جهت موجوداتی نظیر موش می‌باشد و نتایج حاصل از تحقیقات را می‌توان در مهره داران دیگر نیز مورد استفاده قرار داد (۳).

قرقاول پرنده‌ای زیبا و دلنشین است که دم بلند و راه رفتن خرامان و باشکوهش آن را از سایر گونه‌های ماکیان متمایز می‌سازد. قرقاول از جمله پرندگان بومی و نادر ایران است که در مراتع و بوته زارها زندگی می‌کند. از نظر مشخصات ظاهری و فیزیولوژیکی کم و بیش تمام خصوصیات گروه ماکیان را دارد. بدن پوشیده از پر می‌باشد ولی پرهای دم در قرقاول رشد بسیار زیادی کرده، به‌طوری‌که در برخی از نژادها، درازای پرنده از سر تا دم به دو متر هم می‌رسد. پرورش قرقاول در سال‌های اخیر در بسیاری از کشورهای جهان به‌دلیل استفاده از گوشت، رهاسازی در شکارگاه‌ها و بهره برداری به‌صورت شکار یا نگه‌داری به‌عنوان پرندگان خانگی به یک شاخه مهم از پرورش پرندگان تبدیل شده است. قرقاول یکی از مهم‌ترین اعضای خانواده فازیانیده (Phasianides) می‌باشد. قرقاول‌ها نژادهای مختلفی دارند که از لحاظ رنگ متمایز می‌گردند (۴).

دستگاه عصبی پیچیده‌ترین دستگاه بدن موجود زنده است که اجزای آن در تمامی اعضای بدن دیده می‌شود. سیگنال‌هایی به‌وسیله تارهای محیطی این دستگاه به بخش مرکزی آن رفته، در آن‌جا بررسی شده و احساسات مختلف را به‌وجود آورده و از طرفی دیگر، فرمان‌هایی از قسمت مرکزی این دستگاه، به قسمت‌های محیطی بدن موجود زنده، فرستاده می‌شود که منجر به برانگیختن واکنش‌های مختلف زیادی می‌شود (۵). تکوین دستگاه عصبی، از خارجی‌ترین لایه رویان سه لایه (اکتودرم) شروع می‌شود. پیام هایی از ساختار محوری زیرین، یعنی طناب پشتی به اکتودرم ارسال شده و اکتودرم در سمت میانی-پشتی رویان ضخیم می‌شود و صفحه عصبی اپی‌تلیال (etalp larueN) را تشکیل می‌دهد. طرفین این صفحه به سمت بالا چین خورده و خم می شوند و چین عصبی (Neural fold) ایجاد می‌شود، سپس چین‌ها به‌سمت یکدیگر رشد کرده، به‌هم پیوسته و لوله عصبی (Neural tube) را تشکیل می‌دهند. سلول‌های این لوله، کل سیستم عصبی مرکزی که شامل مغز و نخاع می شود را ایجاد می‌کنند. در زمان به‌هم پیوستن چین‌ها و جدا شدن لوله عصبی، از اکتودرمی که در حال حاضر پوشاننده سطح بوده و اپیدرم را ایجاد خواهد کرد، جمعیت بزرگی از سلول‌های مهم تکوینی به‌نام ستیغ عصبی (Neural crest) در حد فاصل اکتودرم سطحی و لوله عصبی، از نورواپی‌تلیوم جدا شده و به سلول‌های مزانشیمی تمایز می‌یابند. سلول‌های ستیغ عصبی به‌طور گسترده، مهاجرت کرده و تمام سلول‌های سیستم عصبی محیطی و نیز تعدادی از انواع سلول‌های غیرعصبی را ایجاد می‌کنند (۶).

مخچه یک ساختار عصبی با سازمان کریستالی است که در تمام مهره داران وجود دارد. رشد تدریجی آن از ماهی‌ها تا پستانداران، و به‌ویژه در پستانداران، به‌دنبال تکرار یک طرح سلولی اولیه و اتصال صورت می‌گیرد. مخچه به شکل شاخ و برگ

که پشت سر هم در محور سری-دمی (roserocaudal axis) قرار دارد، سازماندهی شده است و به‌صورت عرضی روی ساقه مغز قرار می‌گیرد.

قشر مخچه دارای پنج نوع نورون است: سلول های پورکنژ (Purkinje cells)، ستاره ای (Stellate cells)، سبدی (Basket cells)، گلژی و سلول های گرانول (Granule cells). به‌غیر از سلول‌های گرانول، انواع دیگر سلول‌ها ماهیت مهاری دارند. فیبرهای آوران به قشر مخچه دو نوع (خزه ای و صعودی) هستند که اطلاعاتی را از منشا حسی، دهلیزی، صوتی و بینایی و همچنین از قشر مخ و سایر مراکز حرکتی ساقه مغز و نخاع حمل می‌کنند. تنها خروجی عصبی از قشر مخچه توسط آکسون‌های پورکنژ نمایش داده می‌شود که بر روی هسته‌های عمیق زیرین سیناپس می‌شوند. هسته های مخچه آکسون‌های خود را به سمت بسیاری از مراکز ساقه مغز می‌فرستند و توسط هسته‌های رله تالاموسی (Thalamic relay nuclei) روی نواحی مختلف قشر مغز عمل می‌کنند. مخچه در هماهنگی یا ادغام فرآیندهای حرکتی و شناختی نقش دارد. اگرچه ضایعه مخچه باعث فلج حرکتی شدید، از دست دادن ورودی‌های حسی یا نقص قطعی در عمل‌کردهای شناختی نمی‌شود، اما مطمئنا بر عمل‌کرد حرکتی و پدیده‌های ادراکی و شناختی خاص تاثیر می‌گذارد (۷).

مخچه از قسمت قدامی توسط پوشش قدامی بصل النخاع به مغزمیانی وصل می‌شود و از بخش خلفی از طریق پوشش خلفی بصل النخاعی به بصل النخاع متصل می‌شود. مخچه در حفره کوچکی به‌نام گودی سقف بطن چهارم مغز قرار دارد که این حفره از طریق شکاف کوچکی با بطن چهارم مغز در ارتباط است (۸).

میلین پیچ خوردگی غشای پلاسمایی گلیوسیت اطراف یک آکسون می‌باشد که موجب عایق شدن آن و افزایش سرعت هدایت جریان عصبی می‌شود. میلین در سیستم عصبی مرکزی توسط الیگودندروسیت و در سیستم عصبی محیطی توسط نورولموسیت یا سلول‌های شوآن تشکیل می‌شود. ورقه‌ی میلینی شامل تعداد زیادی لایه‌های غشای پلاسمایی نورولموسیت می‌باشد که داخل لایه بازال قرار دارد. زواید نورولموسیت تحت القای خود آکسون طویل شده و روی یکدیگر لغزیده و با پیچش پیرامون آکسون نورولموسیت چند لایه را به‌وجود می آورد. با پیچش نورولموسیت پیرامون آکسون سیتوپلاسم آن از ورقه های غشای پلاسمایی متحدالمرکز که ورقه ی میلینی را تشکیل می‌دهد، خارج می‌شود. در منظره طولی رشته‌های عصبی میلین دار، ورقه میلینی در محل تماس گلیوسیت‌های مجاور فواصل را نشان می‌دهد. هر کدام از این فواصل یک گره رانویه نامیده می‌شود. به‌خوبی مشخص شده که ورقه میلینی ایجاد عایق الکتریکی می‌کند، به این ترتیب پتانسیل‌های فعال به جای حرکت ممتد مانند آکسون های بدون میلین، از یک گره به گره رانویه بعدی پرش می‌نماید. روند پرشی هدایت جهشی نامیده می‌شود که از هدایت جریان عصبی در رشته‌های بدون میلین سریع‌تر است (۹).

میلین برای عمل‌کرد صحیح سیستم عصبی و یکی از پیچیده ترین فعل و انفعالات سلولی بدن بسیار مهم است. میلین‌سازی امکان هدایت سریع پتانسیل‌های عمل در امتداد رشته‌های آکسون را فراهم می‌کند و پشتیبانی فیزیکی و تغذیه‌ای را برای نورون‌ها فراهم می‌کند. میلین حاوی مقدار زیادی لیپید است و تشکیل غلاف میلین به سطوح بالایی از اسیدهای چرب و سنتز لیپیدها همراه با جذب اسیدهای چرب خارج سلولی نیاز دارد (۱۰).

با توجه به اهمیت و نقش اساسی دستگاه عصبی، تاکنون مطالعات زیادی روی سیستم عصبی پستانداران و سایر پرندگان صورت گرفته لیکن در مورد تکامل اندام های قرقاول، به‌ویژه دستگاه عصبی آن تحقیقات زیادی انجام نشده است، همچنین با توجه به اینکه امروزه پرورش قرقاول از نظر اقتصادی ارزشمند است، جهت ارتقای این صنعت در کشور، تحقیقات بنیادی، ضروری است، به‌همین دلیل و با توجه به این‌که تاکنون در قرقاول، مطالعه‌ای جامع صورت نگرفته است، این تحقیق پیشنهاد شده است. نتایج این تحقیق می تواند مورد استفاده سایر محققین، خصوصا افرادی که در علوم تکوینی تحقیق می‌کنند یا افرادی که در زمینه اصلاح نژاد این حیوان فعالیت دارند، قرار بگیرد. در این طرح سعی شده سیر تکوین سلول‌های نروگلی و الیاف میلین مخچه در رویان قرقاول تا زمان خروج از تخم، مورد بررسی قرار گیرد.

۲- مواد و روش‌ها

حیوانات: در این مطالعه از ۶۰ عدد تخم نطفه دار سالم قرقاول که از مراکز تکثیر و پرورش قرقاول تهیه شد، استفاده شد. تخم‌های نطفه‌دار در دستگاه انکوباتور اتوماتیک (دمای۳۶/۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۰ درصد) قرار گرفت و با علم به این‌که ظهور مغز در جنین جوجه قبل از روز ۵ انکوباسیون تخم ها اتفاق نمی افتد (۱۱).

نمونه برداری در این پرنده از روز ۷ انکوباسیون به بعد یعنی در روزهای ۷ ، ۹ ، ۱۱ ، ۱۳ ، ۱۵، ۱۷ ، ۱۹ ، ۲۱ ، ۲۳ و جوجه یک روزه صورت گرفت.

روش نمونه برداری: در روزهای تعیین شده و بعد از اطمینان از سلامتی تخم‌ها، از هر سن سه تخم را شکسته و جنین را از تخم خارج نموده، جهت آسان کشی جنین‌ها و همچنین رعایت حقوق حیوانات آزمایشگاهی، ابتدا جنین را به‌مدت چند دقیقه بر روی یخ خشک قرار داده و سپس آن را با آب شستشو دادیم. سپس سر هر جنین را جدا نموده و در محلول فیکساتیو بافر فرمالین ۱۰ درصد قرار داده، به‌دلیل نرمی بافت مغز، شکاف کوچکی در سطح پشتی جمجمه و پرده‌های مننژ ایجاد کرده تا فیکساتیو بتواند به‌آسانی در مغز اثر کند. در سنین بالاتر جنینی، بعد از ۲۴ ساعت که فیکس اولیه‌ی نمونه‌ها در بافر فرمالین ۱۰ درصد صورت گرفت، با تشریح سر و برداشتن استخوان های جمجمه، مغز به‌آرامی جهت بررسی مخچه خارج شد.

مراحل آماده سازی بافتی: مغز در سنین مختلف جنینی توسط دستگاه خودکار، حاوی ظروف نمونه در اولین ظرف دستگاه اتوماتیک آماده کننده بافت (دستگاه تیشوپروسسور مدل پویان طب خادم-ساخت ایران) قرار داده شد. این دستگاه دارای دوازده ظرف حاوی محلول های مختلف بود که به‌ترتیب در آن‌ها مراحل آبگیری، شفاف سازی و پارافینه شدن بافت صورت پذیرفت. سپس مرحله قالب گیری نمونه‌ها توسط قالب آلومینیومی لوکهارد با استفاده از پارافین مذاب، از نمونه‌ها بلوک پارافینی تهیه شد. برش زدن نمونه‌ها توسط میکروتوم چرخان (مدل لایکای آلمان) و با ضخامت ۶ میکرون انجام شد و از هر بلوک ۱۰ عدد لام تهیه شد. سپس برش‌ها با رنگ آمیزی‌های تخصصی سیستم عصبی شامل لوکسال فاست بلو کرسیل اچت ویوله و فسفوتنگستیک اسید-هماتوکسیلین مالوری و رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی شده و در نهایت توسط چسب انتلان مونته شدند و با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند.

لازم به ذکر است با توجه به تحریم‌های موجود در کشور و عدم وجود کیت‌های رنگ آمیزی تخصصی، مواد و پودر رنگ های با کیفیت، کلیه رنگ‌های استفاده شده در این تحقیق، توسط محقق ساخته شده است و با در نظر گرفتن شرایط تحقیق که بر روی سنین مختلف جنین قرقاول انجام شده، و در سنین پایین جنینی، بافت ها کامل نمی‌باشند، لذا رنگ پذیری کامل نبوده و با وجود چندین مرتبه تکرار رنگ آمیزی، ممکن است رنگ مورد انتظار در بافت، به وضوح مشاهده نشود، همچنین رنگ مشاهده شده در زیر میکروسکوپ با رنگی که در عکس ها ذخیره می گردد، کمی متفاوت است.

رنگ آمیزی تخصصی لوکسال فاست بلو کرسیل اچت ویوله(LFB): هدف از این رنگ آمیزی مشخص کردن الیاف میلین دور رشته های عصبی می‌باشد. در این رنگ آمیزی هسته سلول‌ها بنفش شده، نورون‌ها صورتی تا آبی یا بنفش و بخش‌های فسفولیپیدی آن شامل الیاف میلین آبی تا سبز می‌شود.

لازم به ذکر است در این تحقیق، تراکم الیاف میلین در جوجه یک روزه را کامل در نظر گرفته و تراکم این الیاف در سنین پایین تر جنینی را در مقایسه با جوجه یک روزه بررسی شد.

روش تهیه رنگ لوکسال فاست بلو: ۱ گرم لوکسال فاست بلو، ۲/۵ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال ۱۰ درصد را در ۱۰۰ میلی لیتر الکل ۹۵ درصد مخلوط نمایید و از کاغذ صافی عبور دهید .

روش تهیه محلول کربنات لیتیم: ۰/۰۵ گرم کربنات لیتیم را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل نمایید.

روش تهیه محلول رنگ کرسیل اچت ویوله: ۱ گرم رنگ کرسیل اچت ویوله را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل نمایید، سپس ۵ میلی گرم اسید اگزالیک به آن اضافه نمایید (۲۱).

روش رنگ آمیزی: اسلایدها را با ۳ ظرف زایلن پیاپی، جمعا به‌مدت ۳۰ دقیقه، پارافین زدایی کنید.

اسلایدها را در ۳ ظرف الکل نزولی از الکل مطلق، هر کدام به‌میزان ۳ تا ۵ دقیقه هیدراته نمایید.

برای مدت یک شب (۱۶ تا ۲۴ ساعت) در محلول لوکسال فاست بلو و در انکوباتور ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار دهید سپس ۲ تا ۳ مرتبه توسط الکل ۵۹ درصد شستشو دهید تا رنگ اضافه از بین رود.

تا زمانی که ماده سفید و خاکستری را از نظر ماکروسکوپی تشخیص دهید، در محلول کربنات لیتیم قرار دهید. در الکل ۷۰ درصد و با دو تکرار شستشو دهید سپس تمایز را با شستشو در آب مقطر متوقف کنید و رنگ آمیزی میلین را در زیر میکروسکوپ کنترل کنید.

۱۵دقیقه در محلول کرسیل اچت ویوله قرار داده و رنگ پذیری را بررسی نمایید، در صورت نیاز می‌توان مدت زمان رنگ آمیزی را افزایش داد. تا زمانی که رنگ پس زمینه حذف شود، در اتانول ۷۰ درصد شستشو دهید.

سریعا اسلایدها را در الکل‌های با درجات صعودی آب گیری نموده و در دمای اتاق خشک و سپس مونته نمایید.

رنگ آمیزی تخصصی فسفوتنگستیک اسید-هماتوکسیلین مالوری(PTAH): هدف از این رنگ آمیزی تشخیص سلول‌های گلیال است که سلول های گلیال آبی رنگ، هسته ها بنفش و زمینه تقریبا قرمز آجری تا قهوه‌ای می‌شود.

محلول لوگول: ۲۰ گرم یدید پتاسیم، ۱۰ گرم کریستال ید و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر را با هم مخلوط کرده و به‌مدت دو روز در محیطی تاریک می گذاریم تا کاملا در آب مقطر حل شوند.

محلول هیپو ۵ درصد (تیوسولفات سدیم):

۵ گرم تیوسولفات سدیم را در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل نمایید.

محلول رنگ فسفوتنگستیک اسید: ۵گرم فسفوتنگستیک اسید و ۰/۲۵ گرم رنگ هماتوکسیلین را در ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل نمایید.

محلول پرمنگنات پتاسیم: ۰/۵ گرم پرمنگنات پتاسیم را در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل نمایید. نکته قابل توجه این است که این محلول حتما باید تازه تهیه شود.

محلول اگزالیک اسید: ۵۰ گرم اگزالیک اسید در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل می‌شود.

محلول زنکر: ۲۵ گرم کلرید جیوه، ۱۲/۵ گرم دی کرومات پتاسیم و ۵ گرم سولفات سدیم را در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل نمایید.

توجه: قبل از استفاده، ۵۰ میلی لیتر محلول زنکر را با ۵ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال مخلوط نمایید (۱۳).

روش رنگ آمیزی: اسلایدها را در ۳ ظرف زایلن جمعا به‌مدت ۳۰ دقیقه پارافین زدایی نموده و سپس در درجات نزولی اتانول و آب مقطر هرکدام ۲ تا ۳ دقیقه آب دهی نمایید.

در فیکساتیو زنکر به‌مدت ۱ ساعت و در انکوباتور با درجه حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد و یا یک شب در دمای اتاق قرار دهید.

در آب جاری شستشو دهید.

در محلول لوگل به‌مدت ۵۱ دقیقه قرار دهید سپس حداقل ۱ ساعت در الکل ۵۱ درصد، و به مدت ۵ دقیقه در آب مقطر بشویید.

در محلول هیپو ۵ درصد به‌مدت ۱ تا ۲ دقیقه قرار دهید، سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در آب جاری شستشو دهید.

در محلول پرمنگنات پتاسیم به‌مدت ۵ دقیقه اکسیده نمایید و در آب جاری شستشو دهید.

در محلول اسید اگزالیک ۵ درصد تا سفید شدن، رنگ‌بری شوند، سپس در آب جاری شستشو دهید.

در محلول رنگ فسفوتنگستیک اسید- هماتوکسیلین مالوری به‌مدت ۲۱ تا ۴۲ ساعت و در دمای اتاق قرار دهید.

در دو ظرف الکل صعودی، با سرعت زیاد آب‌گیری و سپس اسلایدها را در زیر هود خشک نموده و مونته نمایید.

رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین(H&E)

روش تهیه ی رنگ هماتوکسیلین : در یک ارلن یک گرم پودر رنگ هماتوکسیلین را در ۱۰ میلی‌لیتر الکل اتیلیک مطلق حل کنید. در یک ارلن بزرگ ۲۰ گرم سولفات آلومنیوم-پتاسیم (آلوم دو پتاس) را در ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و تا نقطه جوش حرارت دهید، سپس بر روی حرارت کم، مخلوط رنگ را داخل ارلن بزرگ ریخته و هم می‌زنیم و باز تا نزدیک نقطه جوش حرارت دهید، در انتها ۰/۵ گرم اکسید جیوه را به ارلن اضافه کرده و هم می‌زنیم تا حل شود و بلافاصله شعله را خاموش کرده و محلول را داخل ظرف یخی که از قبل آماده کرده‌اید بگذارید تا سریعا سرد شود. سپس چند قطره اسید استیک اضافه کنید تا جلای فلزی از بین رفته و هنگام رنگ‌آمیزی بافت، ساختمان هسته ای روشن شود.

روش ساخت رنگ ائوزین : یک گرم پودر رنگ ائوزین را در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر الکل اتیلیک ۷۰ درصد حل کرده و روی شیکر قرار داده تا کامل حل گردد، سپس ۵ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال به آن اضافه شد .

طریقه ی رنگ آمیزی :اسلایدها در سبدهای رنگ آمیزی قرار گرفت، سپس سبدهای حاوی اسلاید، به‌ترتیب در ۲ ظرف زایلن به‌مدت ۵ دقیقه پارافین زدایی و با درجات نزولی الکل و آب مقطر، آب‌دهی شدند سپس با رنگ هماتوکسیلین به‌مدت ۶ دقیقه رنگ‌آمیزی شده و در آب جاری شستشو انجام شد، سپس رنگ آمیزی با ائوزین به‌مدت ۳ دقیقه انجام شد و در نهایت با درجات صعودی الکل جمعا به‌مدت ۱۰ دقیقه آب‌گیری انجام شد.

مرحله مونته کردن : در این مرحله برش‌های رنگ آمیزی شده توسط چسب انتلان با لامل پوشانده شدند تا برش‌های نمونه از خراشیدگی و آسیب بافتی برای مدت طولانی محافظت شوند.

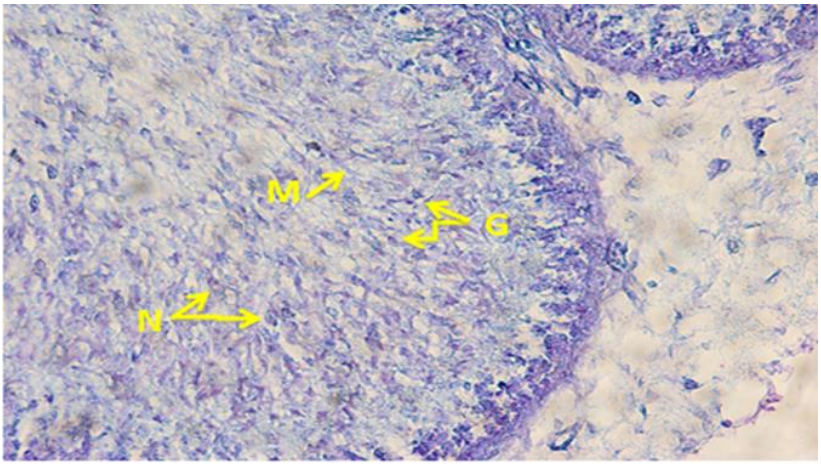
نتایج حاصل از رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین : در این رنگ آمیزی هسته‌ی سلول‌ها آبی تا بنفش شده و سیتوپلاسم و مواد داخل سیتوپلاسم سلول‌ها، الیاف میلین و سلول‌های عصبی قرمز روشن می‌شود. رشته‌های عصبی هم صورتی رنگ شدند (۱۴).

۳- نتایج

نتایج حاصل از رنگ آمیزی تخصصی لوکسال فاست بلو کرسیل اچت ویوله(LFB)

در مخچه‌ی جنین در روز ۷ انکوباسیون تخم های قرقاول، نورون‌ها و سلول های گلیال خیلی قابل تشخیص از هم نمی‌باشند و فقط برخی از سلول‌ها، کمی بزرگ‌تر از دیگر سلول‌ها مشاهده شدند که احتمالا نورون می‌باشند و الیاف میلین به‌صورت رشته‌های بسیار نازک و کوتاه در بین سلول‌ها، به‌صورت نامنظم و پراکنده دیده شدند که به‌علت رنگ پذیری محدود، خیلی قابل تشخیص نبودند.

در جنین ۹ روزه با بزرگتر شدن نورون‌ها که دارای هسته مرکزی اوکروماتیک می‌باشند، این سلول‌ها از سلول‌های گلیال قابل تشخیص‌تر شدند و الیاف میلین در بین سلول‌ها، متراکم‌تر و واضح‌تر از سن قبل، مشاهده شدند (شکل ۱).

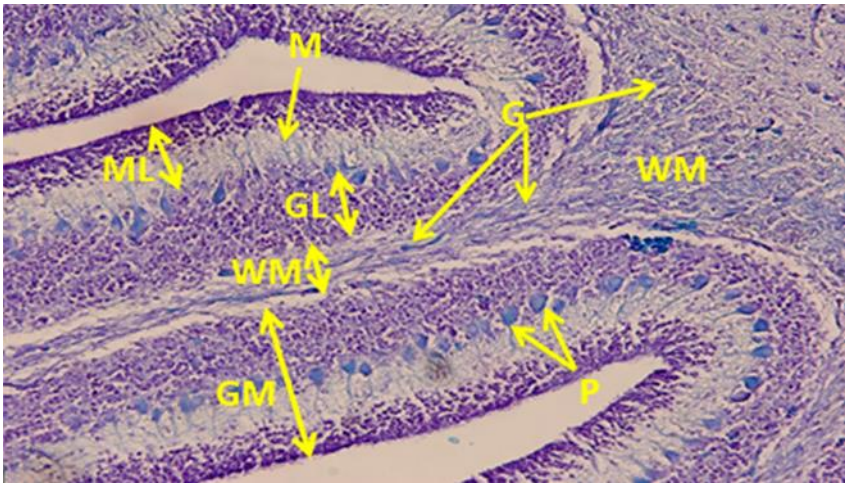


شکل ۱: مخچه در روز ۹ انکوباسیون تخم های قرقاول- رنگ آمیزی LFB (۴۰۰×). M:الیاف میلین، G: سلول گلیال، N: نرون

در طول دوره انکوباسیون تخم‌ها، با افزایش سن جنین، به‌دلیل رنگ پذیری بیشتر، تراکم و احتمالا طول الیاف میلین، افزایش یافت به‌طوری‌که ، با گذشت هر روز، تشخیص این الیاف به‌دلیل رنگ پذیری بیشتر، راحت‌تر شد. تا روز ۱۳ جنینی به‌دلیل عدم امکان تشخیص سلول‌های پورکنژ مخچه، تفکیکی بین لایه‌های ماده خاکستری مخچه و همچنین تشخیص ماده سفید از ماده خاکستری مقدور نمی‌باشد. در روز ۱۵ جنینی با ظهور ابتدایی سلول‌های گلابی شکل پورکنژ مخچه، می‌توان به‌صورت تقریبی، لایه‌ی مولکولار و لایه سلول‌های پورکنژ در ماده خاکستری مخچه را تشخیص داد اگرچه همچنان امکان تشخیص لایه گرانولار ماده خاکستری و همچنین ماده سفید از ماده خاکستری مخچه نمی‌باشد.

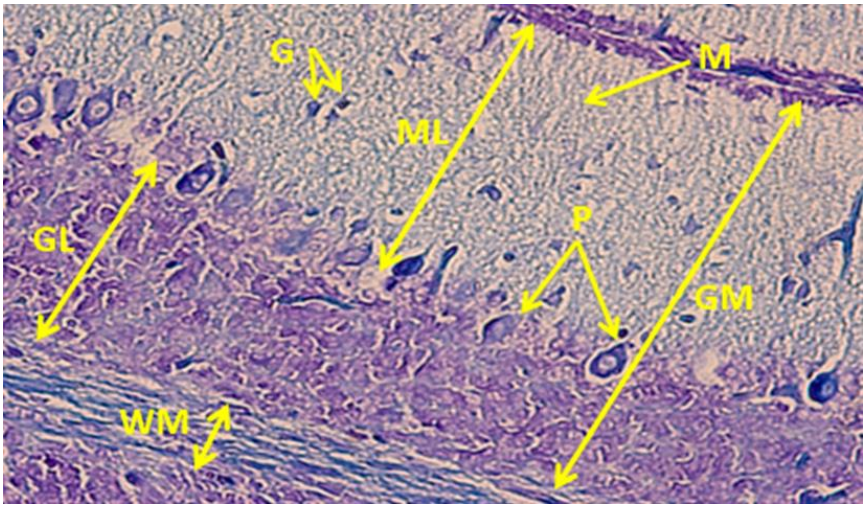
در جنین ۱۷ روزه تراکم الیاف میلین به‌صورت ناگهانی، به‌شدت افزایش نشان داد و تقریبا کل فضای خالی بین سلول‌ها را پر نمود. در این سن الیاف میلین در حال نظم یافتن به‌صورت باندل های منظم در مرکز مخچه و ابتدای فولیاهای مخچه مشاهده شدند. باز هم لایه‌های مولکولار و سلول‌های پورکنژ از ماده خاکستری مخچه قابل تشخیص است ولی همچنان ماده سفید و خاکستری مخچه و هسته‌ی سلول‌های پورکنژ قابل تمایز نمی‌باشد.

با افزایش سن جنین، آرایش فضایی الیاف میلین به‌صورت دستجات قطور منظم، دیده شد به‌صورتی‌که از جنین ۱۹ روزه‌ی قرقاول به بعد، آرایش منظم این الیاف، باعث تشخیص واضح ماده سفید و خاکستری مخچه گشد که تا پیش از این سن، قابل تشخیص نبودند، لیکن فضاهای خالی بین الیاف میلین مشاهده شد. در این سن، هسته‌ی گرد و هستک سلول‌های پورکنژ و سه لایه ماده خاکستری مخچه کاملا قابل تشخیص می‌باشند (شکل ۲).



شکل ۲: فولیا مخچه در جنین ۱۹ روزه قرقاول- رنگ آمیزی LFB(×۲۰۰). ML: لایه مولکولار،GL: لایه گرانولار،P: نرونهای پورکنژ، WM: ماده سفید، GM: ماده خاکستری، G: سلول گلیال، M: الیاف میلین

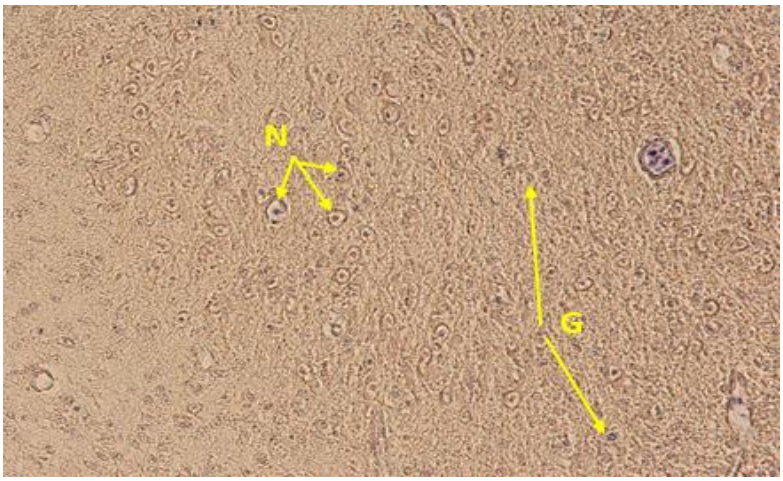
در جنین ۲۱ روزه باز هم تراکم الیاف میلین افزایش یافت به‌صورتی‌که فضاهای خالی بین این الیاف، کم‌تر مشاهده شد. از این سن به بعد، هسته‌ی سلول‌های پورکنژ کاملا بیضی شکل با یک یا دو هستک کاملا واضح دیده شدند. در جنین ۲۳ روزه باز هم تراکم الیاف میلین افزایش یافت، به‌صورتی‌که در ماده سفید مخچه مقدار فضای خالی کم‌تری مشاهده می‌شود. در جوجه یک روزه این الیاف، به بیش‌ترین تراکم رسیده و به‌شکل باندل‌های قطور منظم آرایش یافته و کاملا فضای بین نروگلیاها را فرا گرفته بود و مخصوصا در ماده سفید مخچه، به‌صورت باندل‌های متراکم بسیار منظم دیده شدند (شکل ۳).



شکل ۳: فولیا مخچه در جوجه یک روزه قرقاول- رنگ آمیزیLFB (×۲۰۰).ML: لایه مولکولار،GL: لایه گرانولار، P: سلول‌های پورکنژ، MW : ماده سفید،MG : ماده خاکستری،G : سلول گلیال،M : الیاف میلین

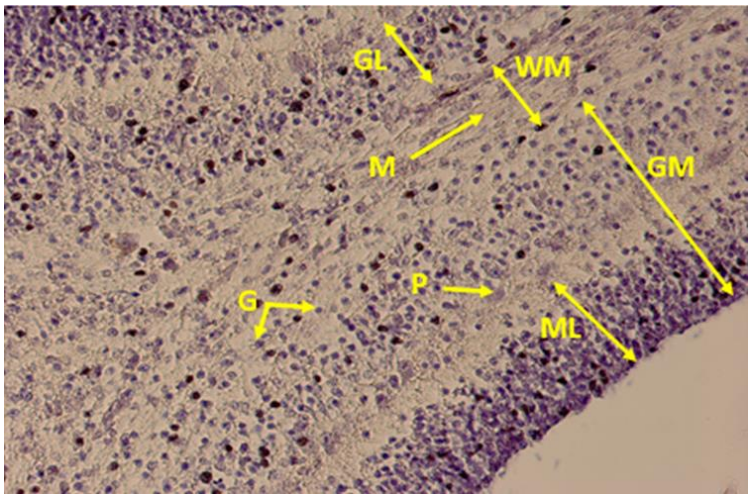
نتایج حاصل از رنگ آمیزی تخصصی فسفوتنگستیک اسید-هماتوکسیلین مالوری (PTAH)

در مخچه‌ی جنین ۷ روزه ی قرقاول انواع سلول‌ها مشاهده شدند که به‌علت کوچک بودن زیاد نورون‌ها در این سن، سلول‌های گلیال به‌خوبی قابل تشخیص از نورون‌ها نمی‌باشند لیکن به‌دلیل حضور الیاف میلین بسیار کوچک و نازک در بافت، قطعا سلول‌های گلیال نیز حضور دارند، در جنین ۹ روزه، به‌علت بزرگ‌تر شدن نورون‌های با هسته مرکزی، سلول‌های گلیال از نورون‌ها قابل تشخیص می‌باشند (شکل ۴).



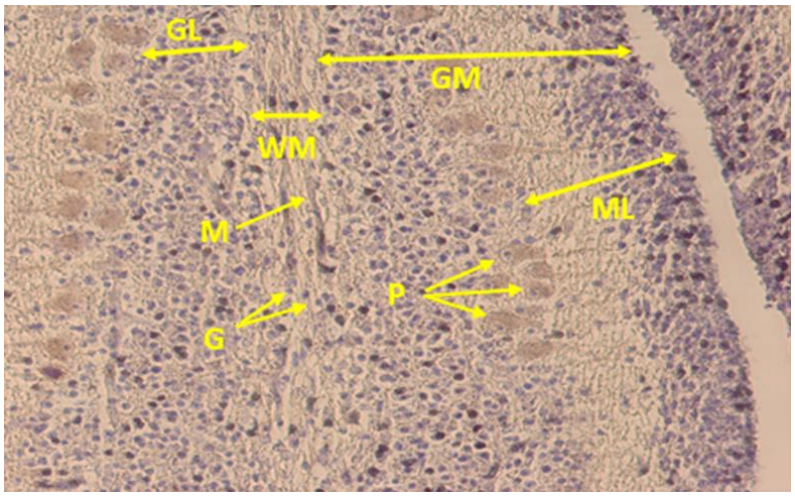
شکل ۴: مخچه در جنین ۹ روزه قرقاول- رنگ آمیزی PTAH (۴۰۰×). N: نورون، G: سلول گلیال

از سن ۱۱ جنینی به‌بعد، به‌علت بزرگ‌تر شدن نورون‌ها، سلول‌های گلیال به‌خوبی قابل تفکیک از نورون‌ها مشاهده شدند. در سن ۱۵ جنینی با این روش رنگ آمیزی می‌توان به‌صورت ابتدایی نورون‌های گلابی شکل پورکنژ کوچک را تشخیص داد. همچنین می‌توان به‌صورت تقریبی، لایه‌ی مولکولار و لایه سلول‌های پورکنژ در ماده خاکستری مخچه را مشخص کرد لیکن همچنان امکان تشخیص لایه گرانولار ماده خاکستری و همچنین ماده سفید از ماده خاکستری مخچه نمی‌باشد. لازم به ذکر است که با این روش رنگ‌آمیزی در جنین ۱۷ روزه، نظم یافتن الیاف میلین به‌صورت باندل‌های قطورتر منظم بهتر دیده می‌شود و تقریبا می توان سه لایه ماده خاکستری مخچه را از یکدیگر در این سن تشخیص داد (شکل ۵).



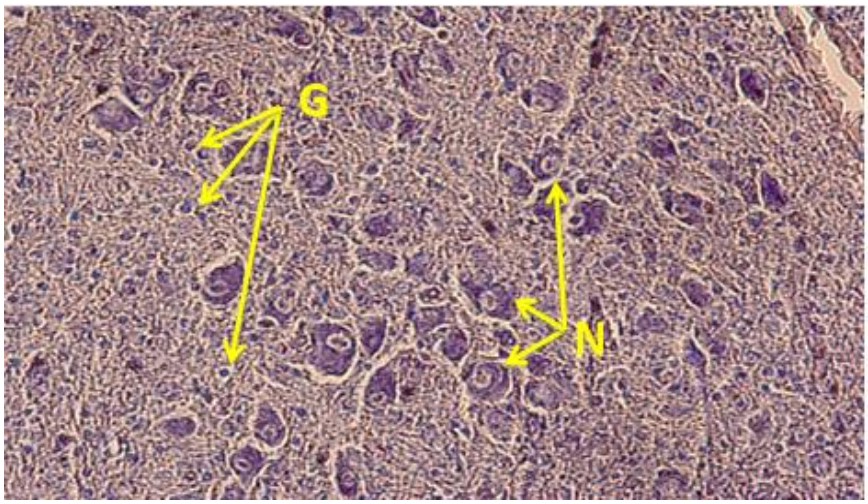
شکل ۵ : مخچه در جنین ۱۷ روزه قرقاول- رنگ آمیزی PTAH (×٤٠٠) . M: لایه مولکولار، GL: لایه گرانولار، P: سلول های پورکنژ، WM: ماده سفید، GM: ماده خاکستری، M: الیاف میلین، G: سلول گلیال

به‌نظر می‌رسد با افزایش سن جنین، تراکم و اندازه‌ی سلول‌های گلیال و نورون‌ها نیز در بافت مخچه، افزایش نشان می‌دهد لیکن با این رنگ آمیزی، انواع سلول‌های گلیال قابل تشخیص از یکدیگر نمی‌باشند و صرفا شاید بتوان هسته‌های بزرگ‌تر رنگ پریده‌ی بیضی شکل سلول‌های گلیالی را به آستروسیت‌ها نسبت داد. در این روش رنگ آمیزی نورون‌های پورکنژ، کاملا گلابی شکل با هسته‌ی بیضوی مشخص و یک یا دو هستک به‌وضوح دیده می‌شوند (شکل ۶).



شکل ۶: فولیا مخچه در جنین ۱۹ روزه قرقاول- رنگ آمیزی PTAH(×۴۰۰). لایه مولکولار،GL : لایه گرانولار،P : سلول های پورکنژ، WM : ماده سفید، GM: ماده خاکستری،M : الیاف میلین،G : سلول گلیال

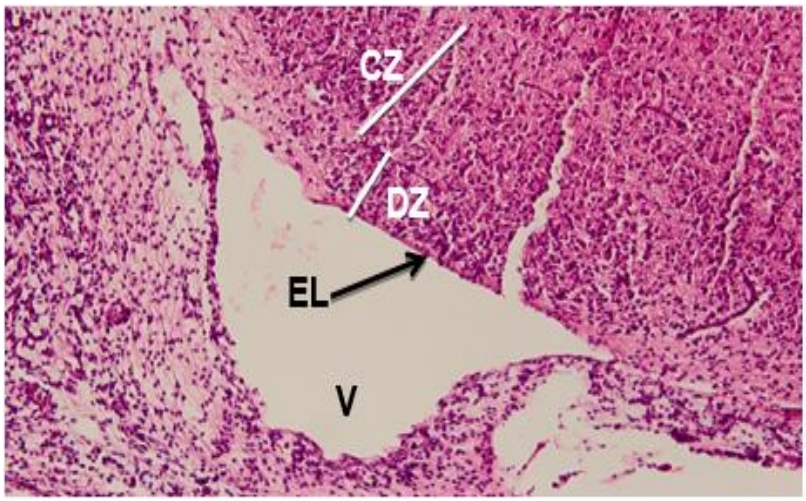
در جوجه یک روزه، انواع سلول های گلیال کاملا فضای بین نورون ها را پر نموده‌اند (شکل ۷).



شکل ۷: مخچه در جوجه یک روزه قرقاول- رنگ آمیزی PTAH (×۴۰۰). G: سلول گلیال، N: نرون

نتایج حاصل از رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین(H&E)

در روز ۷ انکوباسیون تخم‌ها، مخچه به‌صورت ابتدایی از رومبنسفال شروع به تشکیل می‌نماید. البته سلول‌های مختلف بافت مخچه قابل تمایز از یکدیگر نمی‌باشد (شکل ۸).



شکل ۸: مقطع مخچه در جنین ۷ روزه قرقاول رنگ آمیزی H&E (×۲۰۰).CZ: ناحیه زیر بطنی، DZ: ناحیه کنار بطنی، EL: لایه اپاندیم،V: بطن چهارم

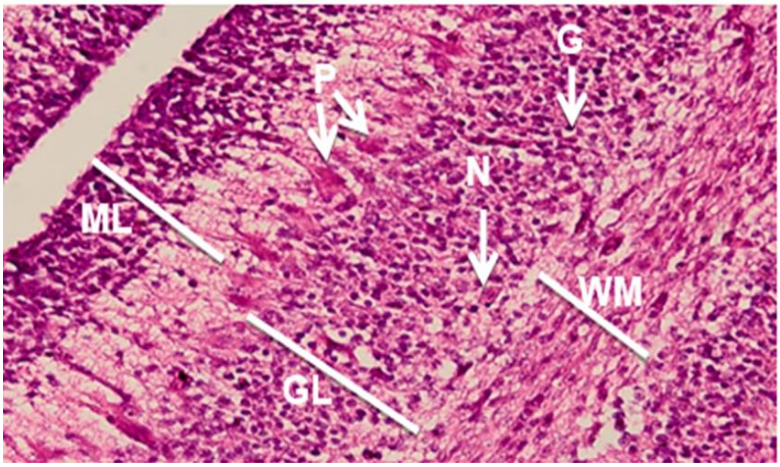
در جنین ۱۱ روزه مخچه به‌طور کامل تشکیل شده و با پیشرفت پیامتر (بافت همبند پر عروق) دارای ۷- ۸ عدد فولیای خیلی کوتاه می‌باشد. ماده سفید و خاکستری هنوز در بافت مخچه قابل تفکیک نمی‌باشد. لایه مولکولار از ماده خاکستری مخچه به‌صورت لایه ای با تراکم سلولی زیاد و تیره تر دیده شد و لایه گرانولار قابل تشخیص نمی‌باشد و همچنین تفکیکی بین سلول‌ها در بافت مخچه دیده نمی‌شود ولی یک سری سلول‌های بزرگتر در فولیاهای مخچه دیده شد که احتمالا سلول‌های پورکنژ می‌باشند.

در جنین ۱۳ روزه لایه مولکولار از ماده خاکستری مخچه با تراکم سلولی زیاد و تیره تر به‌صورت واضح قابل تشخیص است و تفکیک بین لایه مولکولار و گرانولار بیشتر شده است. همچنین اولین نشانه‌های تمایز سلولی در بافت مخچه در این سن مشاهده می‌شود. لایه مولکولار شامل تعداد زیادی سلول گلیال با هسته‌ی تیره رنگ و کوچک دیده شد. نورون‌ها با سایز بزرگ‌تر از سلول‌های گلیال و تعداد کمتر با هسته‌ی روشن و هستک تیره مشاهده شدند.

در جنین ۱۵ روزه اولین تفکیک بین لایه‌های مولکولار و گرانولار ماده خاکستری مخچه در این سن، با رویت سلول‌های پورکنژ کوچک واضح بین دو لایه دیده شد ولی باز هم تفکیکی بین ماده سفید و خاکستری مخچه نیست.

در جنین ۱۷ روزه سه لایه ماده خاکستری مخچه تقریبا با تفکیک جزئی مشاهده شدند. سلول های پورکنژ واضح و بزرگ‌تر با سیتوپلاسم فراوان روشن تر دیده شدند. باز هم تفکیکی بین ماده سفید و خاکستری وجود ندارد و فقط تجمع الیاف عصبی در بخش‌های داخلی هر فولیا مشاهده شد.

در جنین ۱۹ روزه تفکیک بین ماده سفید و خاکستری مخچه در فولیاها به‌صورت کامل دیده شد. سلول‌های پورکنژ بزرگ‌تر با هسته‌ی کشیده تر و تقریبا گرد و واضح‌تر دیده شدند. تفکیک سلول‌های مخچه در این سن واضح‌تر از سن قبل دیده شد (شکل ۹).

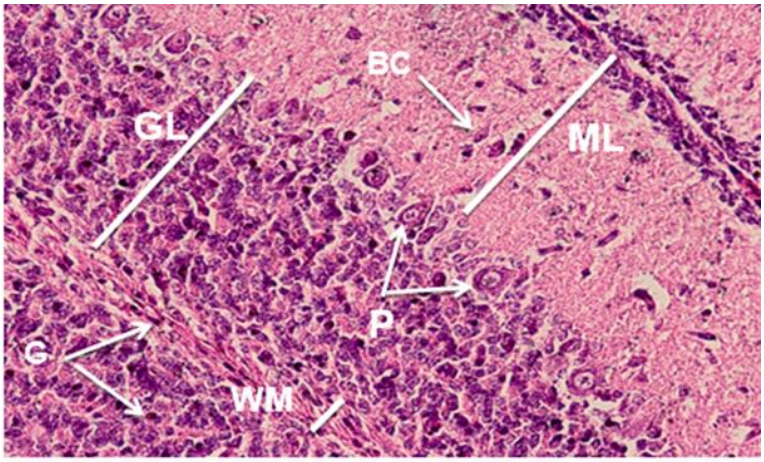


شکل ۹: مقطع فولیا مخچه در جنین ۱۹ روزه قرقاول رنگ آمیزی H&E (×۴۰۰). GL: لایه گرانولار،P: نورون پورکنژ، N: نورون، ML: لایه مولکولار، G: سلول گلیال، WM: ماده سفید

در جنین ۲۱ روزه سلول‌های پورکنژ کاملا واضح، بزرگ و گلابی شکل با انشعابات مشخص در یک ردیف بعد از لایه مولکولار با هسته‌ی بیضی شکل واضح قابل دیدن بود. در این سن بافت مخچه بسیار شبیه بافت بالغ مخچه مشاهده شد. ماده سفید به‌صورت کاملا واضح و منظم شامل الیاف عصبی و سلول‌های گلیال وجود داشت. در قسمت داخلی‌تر لایه‌ی مولکولار (نزدیک سلول‌های پورکنژ) تعداد اندکی سلول‌های عصبی مثلث شکل دیده شد که احتمالا سلول‌های سبدی می‌باشند.

در جنین ۲۳ روزه تفکیک سلول‌های مخچه و الیاف عصبی ماده سفید، بسیار واضح‌تر از سن قبل دیده شد. در سلول‌های پورکنژ هسته واضح با یک یا دو هستک مشخص مشاهده شدند.

در جوجه یک روزه تمایز سلول‌ها بیشتر شده و کاملا سلول‌ها از یکدیگر قابل تفکیک هستند. هسته سلول‌های پورکنژ بیضوی و بسیار واضح‌تر و تیره‌تر با سیتوپلاسم روشن تر و کشیده‌تر و سلول‌های سبدی مشاهده شدند (شکل ۱۰).



شکل ۱۰: مقطع فولیا مخچه در جنین یک روزه قرقاول رنگ آمیزی H&E (×۴۰۰). GL: لایه گرانولار،P: نورون پورکنژ، BC: سلول سبدی، ML:لایه مولکولار، G: سلول گلیال، WM: ماده سفید

۴- بحث

اکثر دانشمندان علوم اعصاب زیست پزشکی برای مطالعات تکاملی مغز اهمیت زیادی قائل می‌شوند زیرا به آن‌ها کمک می‌کند تا تفاوت‌ها و شباهت‌های بین مدل حیوانی انتخابی خود و مغز انسانی که در نهایت به آن علاقه دارند را به‌خوبی درک نمایند. بسیاری به تکامل به‌عنوان یک فرآیند خطی نگاه می‌کنند که از مغزهای ساده‌تر، مانند مغز موش‌ها، به مغزهای پیچیده‌تر، مانند مغز انسان، می‌رسد. با این‌حال، در واقعیت، مغز هر گونه موجود به اندازه مغز انسان، دوره تکاملی طولانی را پشت سر گذاشته، و هر مغز سازگاری‌های خاص خود را دارد. با درک تکامل انواع مغزهای موجودات، می‌توانیم مغز اجداد مشترک را با دقت بیشتری بازسازی شده و فهمید کدام ویژگی‌های مغزی (انسان و سایر گونه‌ها) مشتق شده و کدام اجدادی هستند. این مساله همچنین امکان می‌دهد تا ویژگی‌های تکامل یافته همگرا را که در فرمول بندی فرضیه‌هایی درباره روابط ساختار-عمل‌کرد در مغز بسیار مهم هستند شناسایی شود (۱۵). ما نیز در این مطالعه سعی نمودیم نشان دهیم که سلول‌های گلیال و الیاف میلین در مخچه ی جنین قرقاول در چه زمان‌هایی از انکوباسیون تخم‌ها، تشکیل می‌شوند و همچنین چگونه تمایز، رشد و تکامل می‌یابند.

بررسی‌های ما نشان داد که رشد سلول‌های گلیال و الیاف میلین در مخچه‌ی جنین قرقاول با افزایش سن جنین، افزایش می‌یابد و سلول‌های مختلف مخچه و الیاف میلین با افزایش زمان انکوباسیون تخم‌ها، بزرگ‌تر شده و سپس تمایز یافته و آرایش فضایی منظم می‌یابند به‌طوری‌که در جوجه یک روزه، سلول‌های گلیال کاملا بزرگ و الیاف میلین کاملا قطور و منظم در مخچه دیده شدند. این مساله در مطالعات گذشته نیز ثابت شده است که در مراحل اولیه و میانی رشد جنین جوجه، قشر مغز و ماده سفید نابالغ هستند و مغز حاوی مقدار زیادی مایع مغزی نخاعی است. نمودارهای رشد مغز در طول زمان تغییر می‌کند. حجم کل مغز، تلانسفال، مخچه و ساقه مغز جنین‌های جوجه به‌طور غیرخطی در طول زمان افزایش یافت. افزایش ضخامت قشر مغز عمدتاً در مراحل اولیه رشد (۵ تا ۱۳ روز اول انکوباسیون) و اواخر (۱۸ تا ۲۰ روز) رخ داد. وزیکول های تلانسفالیک در مراحل اولیه رشد، تشکیل شده‌اند. تلانسفال، مخچه و ساقه مغز را می‌توان در ۹ روز تشخیص داد و به‌تدریج در طی روزهای جوجه کشی بعدی فقط رشد کردند (۱۶).

همچنین Agoawal و همکاران (۱۷) توسعه و بلوغ میلین در سیستم عصبی مرکزی را بررسی کرده و نشان دادند که در طول دوره میلینه شدن فعال، فیبرها ظاهر واریسی (varicosities) مشخصی از خود نشان دادند و با پیشرفت میلین سازی، ضخامت غلاف میلین افزایش یافت و این واریس‌ها کمتر برجسته شدند و در نهایت به‌طور کامل ناپدید شدند.

بررسی‌های ما نشان داد که با افزایش سن جنین قرقاول، افزایش تراکم و بزرگ‌تر شدن سلول‌های گلیال و نورون‌ها در مخچه اتفاق می افتد.

این مساله توسط Cunha و همکاران (۱۸) مورد مطالعه قرار گرفته، مخچه تا حد زیادی در مدار خود حفظ شده است، اما اندازه و شکل آن در گونه‌ها بسیار متفاوت است. میزان تفاوت در مورفولوژی مخچه ناشی از تغییرات در تعداد نورون، اندازه نورون یا هر دو، تا حد زیادی ناشناخته باقی مانده است. برای تعیین این‌که چگونه تنوع گونه‌ها در اندازه و شکل مخچه منعکس‌کننده اندازه و تعداد نورون است، نیاز به توسعه یک مجموعه داده مقایسه‌ای مناسب و مجموعه‌ای دارد که بتواند به‌طور موثر جمعیت‌های عصبی مختلف را از هم جدا کند. در یک مطالعه بزرگ‌ترین مجموعه داده مقایسه‌ای را تا به امروز در مورد

تعداد نورون‌ها، اندازه‌ها، و حجم لایه‌های قشر مغز و سطح مخچه در ۵۴ گونه پرنده ایجاد کردیم. در اندازه‌های مختلف مخچه، لایه‌های قشری نسبت‌های نسبتا ثابتی را با یکدیگر حفظ کردند و تغییر در اندازه مخچه بیشتر به‌دلیل تعداد نورون‌ها بود تا اندازه‌های نورون. با این‌حال، سرعت افزایش تعداد نورون‌ها با اندازه مخچه در سلول‌های پورکنژ، سلول‌های گرانول و نورون‌های هسته مخچه متفاوت است. ما همچنین رابطه بین تعداد نورون، سطح مخچه و چین خوردگی مخچه را بررسی کردیم. برآورد ما از چین خوردگی مخچه، شاخص شاخ و برگ میانی ساجیتال، پیش بینی ضعیفی از سطح و تعداد سلول‌های پورکنژ بود، اما مساحت سطح بهترین پیش بینی کننده تعداد سلول‌های پورکنژ بود. میزان وقوع این روابط در سایر مهره‌داران نیازمند رویکرد مشابهی است و تعیین می‌کند که آیا اصول پوسته پوسته شدن یکسان در سراسر تکامل مخچه اعمال می شود یا خیر.

از سن ۱۷ جنینی به بعد و دقیقا از سن ۱۹ جنینی در قرقاول، با نظم یافتن الیاف میلین و رشد سلول‌های مختلف بافت عصبی، مخچه به‌صورت مشخص از دو بخش کاملا واضح تشکیل شده است: ماده خاکستری یا کورتکس مخچه که در خارج و ماده سفید یا مدولا که در بخش‌های داخلی‌تر قرار دارد. این مورد در مطالعات گذشته نیز گزارش شده است (۱۹ و ۲۰).

در این تحقیق مشابه تحقیقات گذشته، دیده شد که ماده سفید مخچه شامل دستجات متراکم الیاف عصبی همراه با سلول‌های گلیال می باشد که تقریبا از سن ۷۱ جنینی با نظم یافتن الیاف میلین در بافت مخچه، ایجاد می شود (۱۲ و ۲۲).
در این مطالعه مشخص شد که لایه گرانولار در بین لایه سلول‌های پورکنژ و ماده سفید مخچه ایجاد می‌شود که این مساله در تحقیقات پیشین در پرندگان نیز دیده شده است (۲۳).

۵- نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که الیاف میلین و سلول‌های گلیال از سن ۷ جنینی در مخچه ی قرقاول شروع به تشکیل می‌نمایند. در این سن فضاهای خالی زیادی در بین سلول‌ها دیده می‌شود که با افزایش سن جنین، تراکم سلول‌های گلیال و الیاف میلین نیز بیشتر شده و تقریبا فضای بین نورون‌ها را پر می نمایند.

همچنین الیاف میلین ابتدا در سن ۷ جنینی به‌صورت رشته‌های بسیار نازک و پراکنده که رنگ‌پذیری کمی دارند، مشاهده شدند و با افزایش سن جنین، تراکم این الیاف بیشتر شده و رنگ پذیری بیشتری را نشان دادند و در سن ۱۷ جنینی با رنگ‌آمیزی فسفوتنگستیک اسید هماتوکسیلین مالوری، می‌توان سه لایه‌ی ماده ی خاکستری را در مخچه تشخیص داد و از سن ۱۹ جنینی به بعد، نظم یافتن الیاف میلین، باعث تشخیص واضح ماده‌ی سفید از ماده خاکستری در مخچه می‌شود ولی باز هم فضاهای خالی در بین این الیاف دیده می‌شود و در سنین بالاتر جنینی با افزایش بیشتر تراکم این الیاف در ماده سفید مخچه، که باعث رنگ‌پذیری بیشتر می‌شود، این فضاهای خالی کاهش یافته و در نهایت در ماده‌ی سفید مخچه‌ی جوجه یک روزه، الیاف میلین به‌صورت باندل‌های بسیار متراکم و منظم، آرایش فضایی می‌یابند.

۶- تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد جهت تامین منابع مالی این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

۷- منابع

1. Parivar K, Kouchesfahani HM.Atlas of embryology and experimental embryology. Ostan Alborz(kharazmi): Jahad daneshgahi; 1993: 243-245

2. Stern CD. The chick embryo-past, present and future as a model system in Developmental biology. Mechanism of Development, 2004.121(9):1011-3.
3. Agudo D, Delcan J, Diaz-Gil G, Gomez-Esquer F, et al. Proteomic analysis of the Gallus Gallus embryo at stage-29 of Development. Proteomics, 2005.5(18):4946-57.
4. Moghaddas H. Parvaresh Negahdari va Bimarihaye gharghavol. Tehran: Nilobarg; 1341;1:13-18
5. Burish MJ, Kueh HY, Wang SSH. Brain architecture and social complexity in modern and ancient birds. Brain, Behaviore and Evolution, 2004;63(2):107-124.
6. Imgawa T, Kitagawa H, Uehara M, Yamamoto M. The organization of the spinocerebellar tract neurons in the chicken. Brain Research Bulletin,2000;52(6):537-546.
7. Delgado-García JM. Structure and function of the cerebellum. Revista de neurologia, 2001;33(7):635-42.
8. Bacha LM, Bacha WJ, Wood LM. Color Atlas of Vererinary Histology. Philadelphia, Lea & Febiger.1990, 9:65-67
9. Eurell JN, Frappier BL. Delmans textbook of veterinary histology. 2th ed. Urmia: Publications of Urmia University;1398, 1:205-212
10. Belin S, M Kopec A, Poitelon Y. Myelin Fat Facts: An Overview of Lipids and Fatty Acid Metabolism. Cells, 2020, 27;9(4):812.
11. Zhou Z, Chen Z, Shan J, Ma W, et al. Monitoring brain development of chick embryos in vivo using 3.0 T MRI: subdivision volume change and preliminary structural quantification using DTI. BMC developmental biology, 2015 Jul 25:15:29.
12. Carriel V, Campos A, Alaminos M, Raimondo S , et al. Staining Methods for Normal and Regenerative Myelin in the Nervous System. Methods in Molecular Biology. 2017:1560:207-218.
13. Howard W. Huntington MD. An improved phosphotungstic acid--hematoxylin stain for glial fibers. Annals Neurology. 1981 Sep;10(3):277.
14. Kouchesfahani H.M, Parivar K, General, Histological, Embryological and Zoological Microtechniques, 1378, 190-193
15. V Smulders T. The relevance of brain evolution for the biomedical sciences. Biol Lett, 2009 , 23;5(1):138-40.
16. Chen Z, Li L, Ma W, Shan J, et al. Monitoring brain development of chick embryos in vivo using 3.0 T MRI: subdivision volume change and preliminary structural quantification using DTI. BMC Developmental Biology, 2015, 25,15(29):12861-015
17. Agrawal D, Agrawal HC, Hartman BK, Kalmbach S. Development and maturation of central nervous system myelin: comparison of immunohistochemical localization of proteolipid protein and basic protein in myelin and oligodendrocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United Staes of America, 1982,79(13):4217-20.
18. Cunha F, Gutiérrez-Ibáñez C, N Iwaniuk A, Racicot K, et al. A quantitative analysis of cerebellar anatomy in birds. Brain Structure and Function, 2021 Nov;226(8):2561-2583.
19. Eurell JA, L Frappier B. Delmans textbook of veterinary histology.1392,2th,vol 1:229-231.
20. Anthony L, Mescher. 2010. Junqueiras Basic Histology.12th ed.183215.
21. Reiner A, Perkel D, Bruce LL, Butler AB. Revised nomenclature for avian telencephalon and some related brainstem nuclei. J.Comp.Neurol.2004,473:77-414.
22. Reiner A, Yamamoto K, Karten HJ. Organization and evolution of the avian forebrain. The anatomical record.part A, Molecular,cellular and evolutionary biology. 2005, Nov;287(1):1080-102.
23. Sur E, Oznurlu Y, Ozaydin T, Colakoglu F, et al. COMPARATIVE Histometrical study of the cerebellum and the determination of some agnor parametter in different avian species. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy (Online). 2011, april, 55, 261-265.