

مطالعه زمانی تکوین اسکلت بال و پا در جنین جوجه بکمک تکنیک رنگ آمیزی دوگانه آلیزارین قرمز- آلسین آبی

رضا رنجبر^۱، مهران وطنچیان^۲، بابک محمدیان^۳، منصور میاحی^۴

^۱ بخش آناتومی و جنین شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز

^۲ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

^۳ بخش پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز

^۴ بخش پرورش و بیماریهای طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز

چکیده

استفاده گسترده از جنین جوجه در آزمایشات جنین شناسی در سطوح مختلف، از اندام تا سلول و ملکول، بررسی هرچه بیشتر سیستمهای بدن را در شرایط طبیعی و غیر طبیعی ضروری می نماید. اطلاع از مراحل رشد نرمال سیستمهای مختلف بدن جنین بمنظور درک و فهم صحیح از پدیده های دوران جنینی و نیز انجام مطالعات کارآ و دقیق در زمینه ترانولوژی، امری مهم و ضروری می باشد. در این مطالعه، با بهره گیری از تکنیک رنگ آمیزی دوگانه آلیزارین قرمز - آلسین آبی، نمونه های جنین جوجه طی روزهای مختلف دوران جنینی، جهت مطالعه بخشهای مختلف اسکلت ناحیه بال و پا آماده گردید. در این روش ماتریکس غضروفی آبی رنگ و ماتریکس استخوانی قرمز رنگ می شود. مجموعاً ۱۳ قطعه در ناحیه اسکلت بال و ۲۲ قطعه در ناحیه اسکلت پا تشخیص داده شد و جدول زمانی تشکیل قالبهای اولیه غضروفی و تبدیل آنها به قطعات استخوانی استخراج گردید. تمامی این قطعات بروش داخل غضروفی مراحل استخوانی شدن را طی می نمایند، هر چند که در پایان دوران جنینی هنوز قطعاتی از اسکلت بصورت غضروفی باقی می ماند. بطور کلی از لحاظ روند تکوین اسکلت، پا نسبت به بال جلوتر می باشد. نخستین علائم تشکیل قالبهای غضروفی، روز ششم انکوباسیون در استخوانهای اصلی بال و پا مشاهده می شود. اولین مرکز استخوانی شدن، روز یازدهم انکوباسیون در ناحیه پا ظاهر می شود. مراحل نرمال تکوین اسکلت جنین جوجه نه تنها در مطالعات جنین شناسی تجربی و ترانولوژیک بعنوان کنترل استفاده دارد، بلکه جهت مقایسه در بدشکلیهای اسکلتی حاصل از موتانتها نیز می تواند مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: جنین جوجه، آلیزارین قرمز، آلسین آبی، اسکلت، غضروفی شدن، استخوانی شدن

مقدمه

مرحله بندی رشد جنین بر اساس اطلاعات بدست آمده از ویژگیهای خارجی و داخلی بدن (۲۷) گزارش کاملی از زمان بندی تکوین غضروفها و استخوانهای اسکلت بال و پای جنین جوجه به کمک تکنیک رنگ آمیزی دوگانه آلیزارین قرمز - آلسین آبی وجود ندارد.

جنین جوجه یکی از مدلهای آزمایشگاهی جانوری مناسب است که توسط محققین رشته های مختلف از جمله جنین شناسی، فارماکولوژی، فیزیولوژی و بیوشیمی به دفعات مورد استفاده قرار می گیرد. دلیل این امر راحتی تهیه آن به هرتعداد و کوتاهی طول دوران جنینی آن است. علیرغم مطالعاتی در زمینه تکوین اندامهای جنین جوجه و

metacarpus و انگشتان (digitss) می‌باشد. در پرندگان دوعدد استخوان میچ دستی شامل استخوانهای زندزیرینی - میچ دستی (radial carpal) و زند زیرینی - میچ دستی (ulnar carpal) وجود دارد. استخوانهای قلم دستی (متاکارپ) دو عدد هستند که در محل اپی‌فیزهایشان به یکدیگر جوش خورده‌اند، اما در محل دیافیز از هم جدا هستند. در بال ماکیان، سه عدد انگشت وجود دارد که شامل انگشت‌های ۲ و ۳ و ۴ که بترتیب دارای ۲ و ۲ و ۱ بند هستند (۱، ۲ و ۲۶).

اسکلت اندام خلفی شامل کمر بند لگنی (لگن و استخوان خاجی) و اسکلت پا (ران femur - درشت نی tibia - نازک نی fibula - متاتارس metatarsus و انگشتان toes) می‌باشد. در ناحیه میچ پا (Tarsus) در پرندگان، استخوانی وجود ندارد هر چند که در دوران جنینی بوجود می‌آیند اما بعداً به انتهای پایینی استخوان درشت نی و انتهای بالایی قلمهای پا متصل می‌شوند (۱، ۲ و ۲۶).

استخوان قلم پایی اول کوچک و رشد نیافته است، ولی استخوانهای قلم پایی ۲ و ۳ و ۴ قوی هستند و با بخشی از استخوانهای میچ پا یکپارچه می‌شوند. پا دارای ۴ انگشت ۱ و ۲ و ۳ و ۴ می‌باشد که بترتیب ۲ و ۳ و ۴ و ۵ بند دارند (۱، ۲ و ۲۶).

مواد و روشها

الف - تهیه جنین: برای این منظور ۲۰۰ عدد تخم مرغ نطفه دار نژاد لگهورن سفید تهیه و جهت ادامه رشد دوران جنینی در انکوباتور بادمای ۳۷-۳۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵۵-۶۵ درصد و ۴ بار چرخش اتوماتیک روزانه قرار داده شد. برداشت جنین از ابتدای روز دوم جنین ۲۴ ساعته آغاز گردید و تا روز دهم انکوباسیون، هر ۱۲ ساعت یک بار و از روز یازدهم تا زمان تفریخ، برداشت نمونه‌های جنینی، بصورت روزانه انجام شد. در هر مرحله ۴ عدد جنین خارج و در محلول سالین نرمال قرار داده

ناکانه در ۱۹۹۹، با توجه به اهمیت جنین بلدرچین ژاپنی در مطالعات آزمایشگاهی این کشور، مطالعه کاملی در مورد تکوین سیستم اسکلتی آن انجام داد (۱۷). مانگولا در ۲۰۰۱، نیز با استفاده از این تکنیک، اسکلت بدن موش صحرائی را هنگام تولد مطالعه نمود (۱۶).

یکی از راههای بسیار مناسب جهت بررسی تکوین نرمال و یا غیر نرمال سیستم اسکلتی جنین، استفاده از تکنیک رنگ آمیزی دوگانه آلزارین قرمز - آلسین آبی می‌باشد. برخی از محققین، تغییرات سیستم اسکلتی را از دیدگاه تکوینی (۶) مورد مطالعه قرار داده‌اند. برخی دیگر از نظر بررسی مکانیسم‌های تکوینی مسئول ایجاد شکل ظاهری موجود زنده و اندامهای حرکتی آن، رشد این اندامها را در دوران جنینی به کمک این تکنیک بررسی نموده‌اند (۲۳ و ۲۴ و ۲۵)، و برخی دیگر از سیستم اسکلتی بویژه اسکلت اندامها بعنوان یک سیستم حساس در تعیین اثرات تراژونیک عوامل مختلف شیمیایی و دارویی بهره‌جسته‌اند. که می‌توان از تحقیقات انجام شده در مورد اسکلت اندامهای حرکتی (۴، ۵ و ۸)، اسکلت محوری (۹، ۱۰، ۲۱ و ۲۲)، اسکلت صورت و جمجمه (۷ و ۱۳)، کمر بند لگنی و شانه‌ای (۳) و یا کل اسکلت (۱۲ و ۱۸) نام برد.

مقادیر بسیار اندک ماتریکس غضروف و استخوان در این روش، بخوبی رنگ گرفته و از یکدیگر قابل تشخیص می‌باشند، لذا جهت تعیین وجود ساختمانهای غضروفی و استخوانی مکرراً از این تکنیک استفاده شده است (۱۱، ۱۴ و ۱۵).

سیستم اسکلتی در پرندگان شامل دو بخش اسکلت محوری (Axial) (شامل سر - ستون مهره - دنده‌ها و جناغ) و اسکلت زائده ای (Appendicular) (اندام قدامی و اندام خلفی) می‌باشد. اسکلت اندام قدامی شامل کمر بند شانه ای (کتف scapula - غرابی coracoid و ترقوه clavicle) و اسکلت بال (بازو humerus زند زیرین radius زند- زیرین ulna استخوانهای میچ دست carpus متاکارپ

ج - مطالعه و عکسبرداری نمونه های آماده شده: که به کمک استریومیکروسکپ انجام شد.

نتایج

پس از مطالعه اسکلت در ناحیه بال و پا جمعاً ۱۳ قطعه در اسکلت بال و ۲۲ قطعه در اسکلت پا شناسایی شد که اسامی کامل آنها به همراه زمان تشکیل قالبهای غضروفی و نیز زمان استخوانی شدن آنها در بال و پا بترتیب در جدولهای شماره ۱ و ۲ آمده است. نتایج نشان می دهد که تمامی استخوانهای بال و پا بروش داخل غضروفی (Enchondral Ossification) استخوانی می شوند.

روز ششم جنینی (مرحله H.H ۲۹ از جدول رشد جنین جوجه): اولین زمانی است که قالبهای غضروفی در بال و پا مشاهده می شود. در این روز قطعات غضروفی بازو-زندزبرین - زند زیرین - قلم دست ۳ و ۴ در ناحیه بال و نیز قطعات غضروفی ران - درشت نی و نازک نی - و قلمهای ۲ و ۳ و ۴ در ناحیه پا تشکیل می شوند. در این مرحله بدلیل آغاز تشکیل ماتریکس غضروفی، محدوده دقیق قالبها واضح نمی باشد (تصاویر ۳ و ۴).

روز هفتم (مرحله ۳۱): در این روز بندهای انگشتان تنها بخشی از اسکلت بال هستند که فاقد قالب غضروفی هستند. اما در اسکلت پا علاوه بر قطعات مرحله قبل، بند اول انگشتان ۲ و ۳ و ۴ نیز تشکیل می شود. در این مرحله در ناحیه ساعد بال و ناحیه ساق پا، دو قالب غضروفی کشیده و تقریباً هم اندازه دیده می شود. در ناحیه بال زند زیرین از زند زیرین و در ناحیه پا درشت نی از نازک نی ضخیم تر است، اما در این مرحله از نظر طول تفاوت چندانی بین آنها وجود ندارد (تصاویر ۵ و ۶).

روز هشتم (مرحله ۳۴): در این مرحله اولین بند انگشت اول و بندهای دوم انگشتان ۲ و ۳ و ۴ در ناحیه پا تشکیل می شود. در ناحیه بال، بند دوم انگشت دوم، تنها قطعه ای است که قالب غضروفی آن تشکیل نشده است. این قطعه در روز

شده و به کمک استریومیکروسکوپ و براساس ویژگیهای خارجی بدن (۲۷) مرحله بندی شد.

ب- رنگ آمیزی نمونه ها: پس از شستشوی جنین در محلول سالین نرمال، پوست، احشاء داخلی و بافتهای اضافی تا حد امکان برداشته شد و ادامه مراحل رنگ آمیزی طبق روش Yong و بشرح ذیل ادامه یافت (۱۱).

۱- تثبیت: در اتانول ۷۰ درصد حداقل بمدت ۳ روز و حداکثر ۴ هفته

۲- رنگ آمیزی: بمدت ۳ روز نمونه ها در رنگ قرار داده شد. رنگ مخلوطی از رنگهای آلیزارین قرمز، آلسین آبی و پتاسیم هیدروژن فتالات است که با حل کردن آن محلولهای زیر به نسبت ذکر شده تهیه می گردد.

- محلول ۰/۱۵ درصد آلسین آبی در اتانول ۷۰ درصد (۱ قسمت)
- محلول: ۰/۱ درصد آلیزارین قرمز در اتانول ۹۵ درصد (۱ قسمت)
- محلول ۲ درصد پتاسیم هیدروژن فتالات در اتانول ۷۰ درصد (۱۸ قسمت)

۳- نرم کردن بافتهای باقیمانده در اطراف اسکلت: قرار دادن نمونه ها بمدت ۳ روز، در محلول ۰/۷۵ درصد پتاس در آب دوبار تقطیر

۴- شستشو: با آب دوبار تقطیر

۵- شفاف سازی نمونه ها: قرار دادن نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت در محلولی حاوی ۲ قسمت اتانول ۷۰ درصد - ۲ قسمت گلیسرین و یک قسمت بنزیل الکل خالص،

۶- نگهداری: نمونه ها را بمدت ۶ روز در محلول ۵۰ درصد گلیسرین در اتانول ۷۰ درصد قرار داده و سپس به گلیسرین خالص منتقل شدند.

جدول ۱: زمان غضروفی شدن و استخوانی شدن قطعات اسکلت بال

سن جنین	۶	۶/۵	۷	۷/۵	۸	۸/۵	۹	۹/۵	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰	۲۱
بازو	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	R	R	R	R	R	R	R	R
زند زیرین	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	R	R	R	R	R	R	R	R
زند زیرین	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	R	R	R	R	R	R	R	R
زند زیرینی - میچ دستی	X	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
زند زیرینی - میچ دستی	X	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
متاکارپ ۲	-	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
متاکارپ ۳	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	R
متاکارپ ۴	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	R
بند ۱ انگشت ۲	-	-	-	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	R
بند ۲ انگشت ۲	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B	B	B	B	B	R
بند ۱ انگشت ۳	-	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	R
بند ۲ انگشت ۳	-	-	-	-	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	R
بند ۱ انگشت ۴	-	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	R

X: غیر قابل تشخیص

R: استخوان

B: غضروف

روز نهم (مرحله ۳۵): در اسکلت بال بجز رشد تغییری صورت نگرفته است. در اسکلت پا بندهای ۳ انگشتان ۳ و ۴ نیز تشکیل شده اند. قالب غضروفی ظریف نازک نی در کنار درشت نی ضخیم بخوبی مشخص است (D) در تصویر ۱۱). با افزایش سرعت رشد درشت نی نسبت به نازک نی، این بخش به شکل میله ای باریک و کشیده و کوتاهتر از درشت نی، مشخص می شود (تصاویر ۹ و ۱۱).

یازدهم تشکیل خواهد شد. استخوانچه های ناحیه میچ دست (d,e,x) در تصویر ۹) و میچ پا (Z) در تصویر ۸) بطور مجزا مشخص می باشند و هنوز پیوستگی استخوانچه های میچ پا به انتهای پایینی درشت نی انجام نشده است، هرچند که پیوستگی تعداد دیگری از آنها به انتهای بالایی (پروگسیمال) متاتارسهای ۲ و ۳ و ۴ آغاز شده است (تصاویر ۷ و ۸).

جدول ۲: زمان غضروفی شدن و استخوانی شدن قطعات اسکلت پا

روز جنینی	۶	۶/۵	۷	۷/۵	۸	۸/۵	۹	۹/۵	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰	۲۱
ران	B	B	B	B	B	B	B	B	B	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
کشکک	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
درشت نی	B	B	B	B	B	B	B	B	B	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
نازک نی	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	R	R	R	R	R	R
متاتارس ۱	X	X	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	R	R	R	R	R	R
متاتارس ۲	B	B	B	B	B	B	B	B	B	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
متاتارس ۳	B	B	B	B	B	B	B	B	B	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
متاتارس ۴	B	B	B	B	B	B	B	B	B	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
بند ۱ انگشت ۱	-	-	-	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	R	R	R	R	R	R
بند ۲ انگشت ۱	-	-	-	-	-	-	-	-	B	B	B	B	B	B	B	R	R	R	R	R
بند ۱ انگشت ۲	-	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	R	R	R	R	R	R
بند ۲ انگشت ۲	-	-	-	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	R	R	R	R	R	R
بند ۳ انگشت ۲	-	-	-	-	-	-	-	-	B	B	B	B	B	B	R	R	R	R	R	R
بند ۱ انگشت ۳	-	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	R	R	R	R	R	R
بند ۲ انگشت ۳	-	-	-	-	-	-	-	-	B	B	B	B	B	B	R	R	R	R	R	R
بند ۳ انگشت ۳	-	-	-	-	-	-	-	-	B	B	B	B	B	B	R	R	R	R	R	R
بند ۴ انگشت ۳	-	-	-	-	-	-	-	-	B	B	B	B	B	B	R	R	R	R	R	R
بند ۱ انگشت ۴	-	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	R	R	R	R	R	R
بند ۲ انگشت ۴	-	-	-	-	-	-	-	-	B	B	B	B	B	B	R	R	R	R	R	R
بند ۳ انگشت ۴	-	-	-	-	-	-	-	-	B	B	B	B	B	B	R	R	R	R	R	R
بند ۴ انگشت ۴	-	-	-	-	-	-	-	-	B	B	B	B	B	B	R	R	R	R	R	R
بند ۵ انگشت ۴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	R	R	R	R

X: غیر قابل تشخیص

R: استخوان

B: غضروف

روز دهم (مرحله ۳۶): اسکلت بال کامل می شود. در اسکلت پا بند ۲ از انگشت ۱، بند ۳ از انگشت ۲، بند ۴ از انگشت ۳ و بند ۴ از انگشت ۴ ظاهر می شوند.

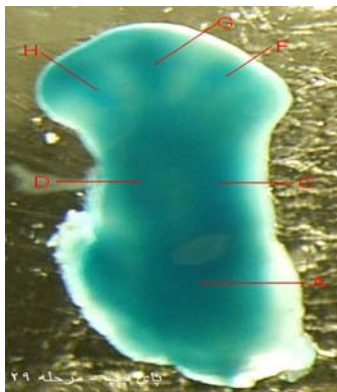
روز یازدهم (مرحله ۳۷): نخستین روزی است که علائم استخوانی شدن ظاهر می شود. اسکلت پا زودتر از

روز دهم (مرحله ۳۶): اسکلت بال کامل می شود. در اسکلت پا بند ۲ از انگشت ۱، بند ۳ از انگشت ۲، بند ۴ از انگشت ۳ و بند ۴ از انگشت ۴ ظاهر می شوند.

شوند. تا روز شانزدهم، متاتارسهای ۲ و ۳ و ۴ در طول از یکدیگر جدا هستند، هر چند که از انتهای پروگسیمال به یکدیگر متصل هستند. در روز نوزدهم، این سه در طول نیز به یکدیگر جوش خورده و استخوانی یکپارچه را بوجود می آورند (Tarsometatarsus) البته انتهای دیستان آنها همچنان از هم جداست و هر یک با بند اول انگشتان مربوط بخود مفصل می باشند (تصاویر ۱۷ الی ۴۳).

اسکلت بال استخوانی شدن را آغاز می کند. در ناحیه بال، استخوانی شدن دیده نمی شود، اما در پا، ران، درشت نی و متاتارسهای ۲ و ۳ و ۴ استخوانی شدن را آغاز نموده اند (تصاویر ۱۳-۱۶ و ۱۸).

روزهای ۱۲ الی ۲۱ (مراحل ۳۸ الی ۴۶): همگام با رشد اندامها بتدریج روند استخوانی شدن به قطعات انتهایی تر اندامها نیز کشیده می شود. در این میان برخی از قطعات غضروفی به همان شکل باقی می ماند و استخوانی نمی



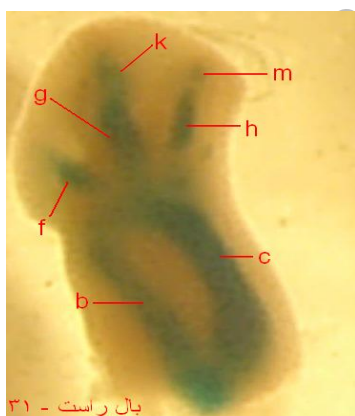
تصویر ۳- مرحله ۲۹ (x۴۰) نمای جانبی پای چپ: ظهور قالبهای غضروفی بازو، زند زیرین و زیرین و متاکارپها



تصویر ۲- مرحله ۲۷ (x۴۰) نمای جانبی بال چپ عدم تشکیل قطعه غضروفی



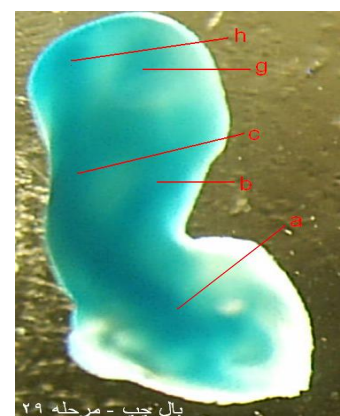
تصویر ۱- مرحله ۲۷ (x۴۰) نمای جانبی پای چپ عدم تشکیل قطعه غضروفی



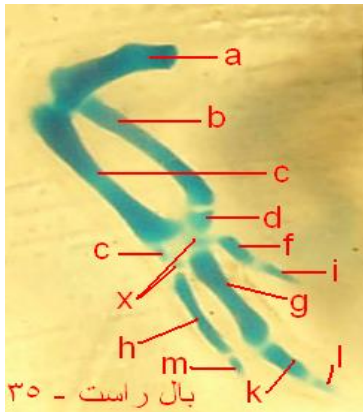
تصویر ۶- مرحله ۳۱ (x۲۰) نمای جانبی بال راست: زند زیرین و زیرین تقریباً هم طول هستند. تشکیل متاکارپها و بند اول انگشتان ۳ و ۴



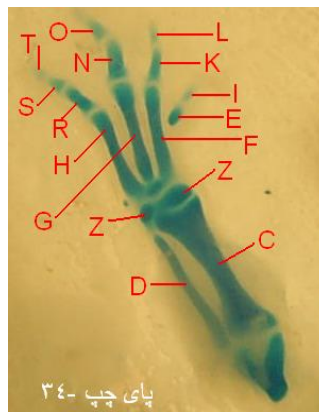
تصویر ۵- مرحله ۳۱ (x۲۰): نمای قدامی پای چپ: محدوده قالبهای غضروفی دقیق تر مشخص است. بند های اول انگشتان پا ظاهر شده است. نازک نی هم طول با درشت نی است.



تصویر ۴- مرحله ۲۹ (x۴۰) نمای جانبی بال چپ مرحله: ظهور قالبهای غضروفی ران، درشت نی، نازک نی و متاتارتاس

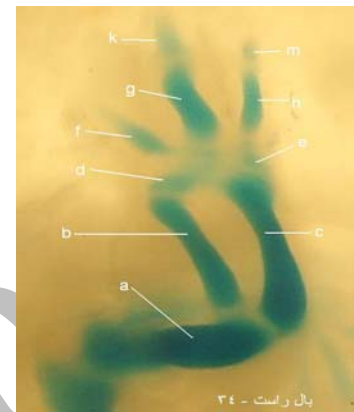


تصویر ۹ - مرحله ۳۵ (×۱۰): نمای جانبی بال راست: استخوانچه های کارپ مشخص شده اند. زند زیرین و زیرین از ناحیه اپی فیزها به یکدیگر نزدیک شده اند .

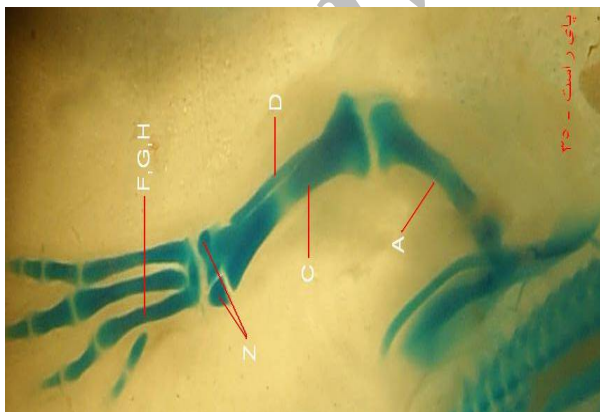


تصویر ۸ - مرحله ۳۴ (×۱۰): نمای قدامی پای چپ: قطعات غضروفی پا اکثراً تشکیل شده اند. نازک نی تقریباً هم طول ولی نازک تر از درشت نی است. استخوانچه های تارس Z مشخص می

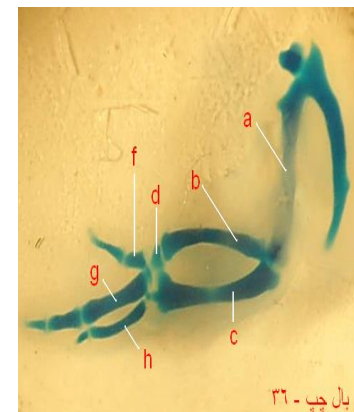
باشند



تصویر ۷ - مرحله ۳۴ (×۲۰): نمای جانبی بال راست: زند زیرین و زیرین در ناحیه دیافیز از هم فاصله دارند ولی از طرف اپی فیزها بویژه اپی فیز پروگسیمال به یکدیگر نزدیک شده اند.



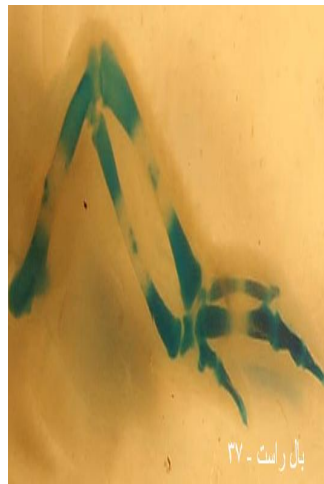
تصویر ۱۱ - مرحله ۳۵ (×۶) نمای فوقانی پای راست: اپی فیزهای پروگسیمال متاتارسهای ۲ و ۳ و نیز ردیف بالایی تارس بهم چسبیده اند.



تصویر ۱۰ - مرحله ۳۶ (×۶): اکثر قالبهای غضروفی بال تشکیل شده اند متاکارپهای ۳ و ۴ در ناحیه اپی فیز هایشان بهم چسبیده اند.



تصویر ۱۴ - مرحله ۳۷ (x۴۰): نمای جانبی
بال چپ: استخوانچه های کارپ به تفکیک
قابل مشاهده اند. (زند زیرینی - مچ دستی
e و زند زیرینی - مچ دستی d)



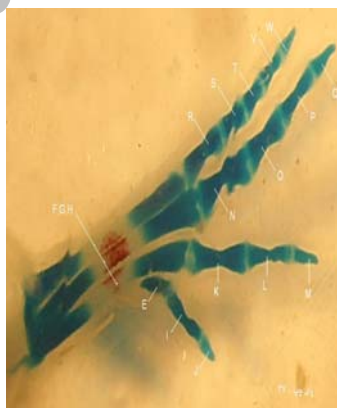
تصویر ۱۳ - نمای شکمی بال راست مرحله ۳۷ (x۶):
نواحی روشن و رنگ نگرفته در قالبهای بازو و زندهای
زیرین و زیرین نشان دهنده آغاز تغییرات در قالب
غضروفی است ولی هنوز استخوانی شدن آغاز نشده
است؛ زیرا رسوب رنگ آلیزارین مشاهده نمی شود



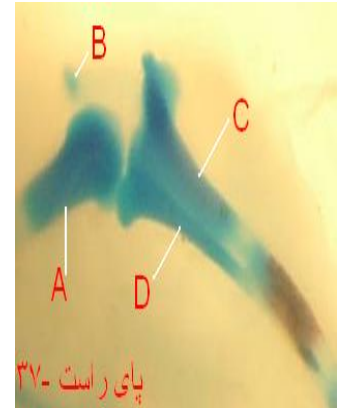
تصویر ۱۲ - مرحله ۳۶ (x۱۰): نمای
قدامی پای چپ مرحله: جزئیات بیشتری
از شکل ۱۱ مشخص است .



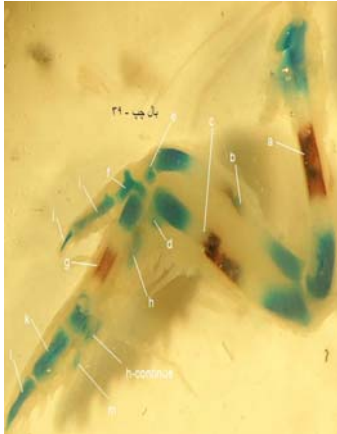
تصویر ۱۷ - مرحله ۳۸ (x۶): نمای
شکمی بال راست ظریف تر بودن قالب
غضروفی زند زیرین نسبت به زند زیرین
به خوبی مشخص است در بند اول
انگشت سوم ایجاد یک زائده نیم دایره
ای شکل به طرف بیرون



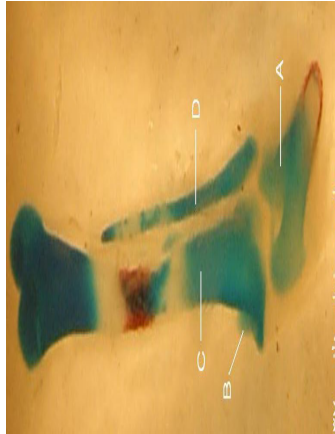
تصویر ۱۶ - مرحله ۳۸ (x۲۰): نمای
جانبی استخوانی شدن در متاتارس های
۲ و ۳ و ۴



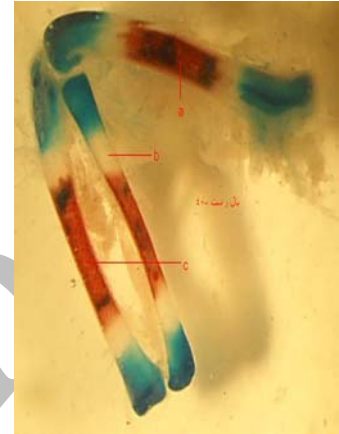
تصویر ۱۵ - مرحله ۳۷ (x۲۰): نمای
جانبی پای راست: تشکیل قالب
غضروفی کشکک و لزوم استخوانی شدن
در دیافیز درشت نی در C



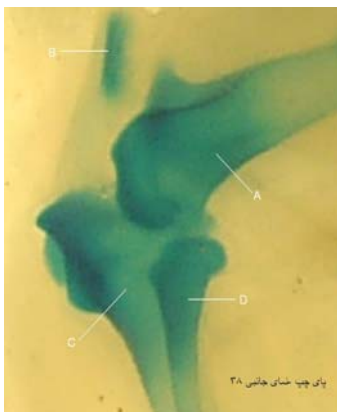
تصویر ۲۰ - مرحله ۳۹ (x100) نمای جانبی
بال چپ آغاز استخوانی شدن در متاکارپ
۳



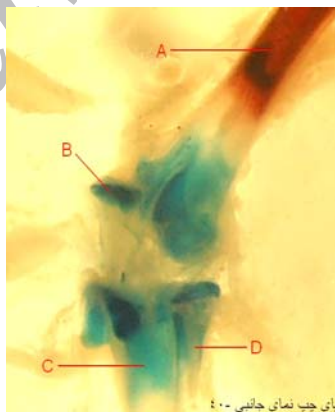
تصویر ۱۹ - مرحله ۴۰ (x100) نمای
جانبی بال راست: مراکز استخوانی شدن
اولیه در استخوانهای بازو و زند زیرین در
حال گسترش است.



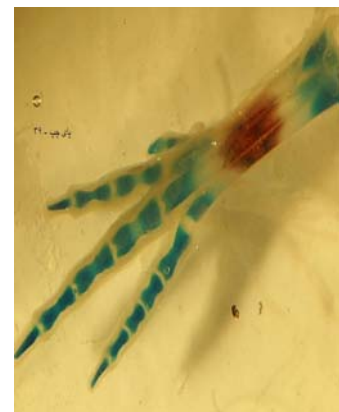
تصویر ۱۸ - مرحله ۳۷ (x100): نمای خلفی
پای چپ نازک نی کوتاهتر از درشت نی
مانده است



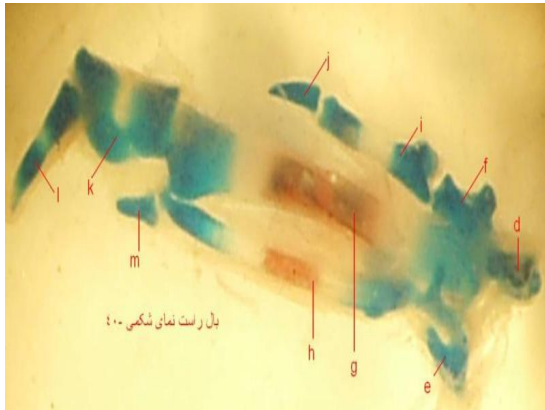
تصویر ۲۳ - مرحله ۳۸ (x200) نمای جانبی:
مشابه تصویر شماره ۲۲ با درشت نمایی
بیشتر



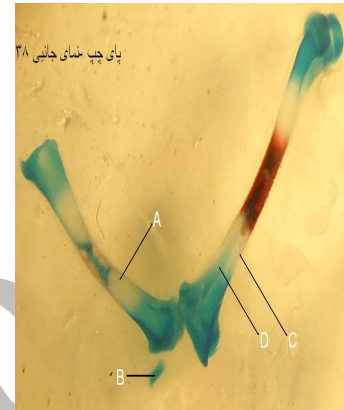
تصویر ۲۲ - مرحله ۴۰ (x100) نمای
جانبی: مشخص شدن قالب غضروفی
کشکک و اپی فیزهای پروگسیمال درشت
نی و دیستال ران پای چپ



تصویر ۲۱ - مرحله ۳۹ (x100) نمای
قدامی پای چپ گسترش مراکز استخوانی
شدن در متاتارسهای ۲ و ۳ اما به اپی
فیزها نرسیده



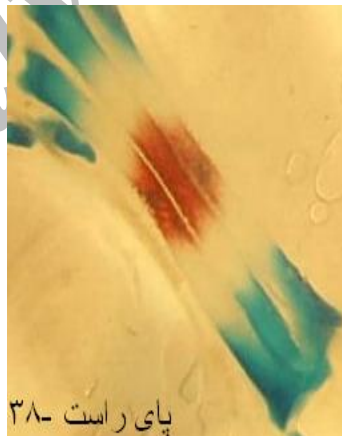
تصویر ۲۵ - مرحله ۴۰ (x10) اسکلت بال از کارپ به پائین زایده نیم دایره ای شکل بند اول انگشت سوم بخوبی مشخص است.



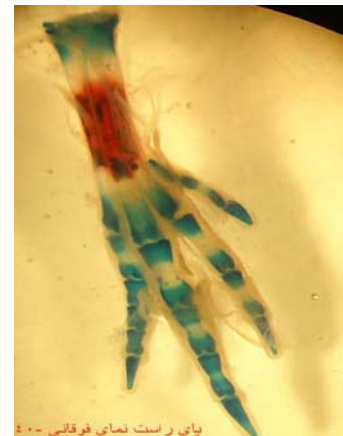
تصویر ۲۴ - مرحله ۳۸ (x6) نمای جانبی پای چپ طول درشت نی از ران بیشتر است. کشکک هنوز به شکل غضروفی است



تصویر ۲۸ - مرحله ۴۲ (x10): نمای داخلی پای چپ مفصل زانو را نشان می دهد. تکمیل تق مراکز اولیه استخوانی شدن دیافیز درشت نی و ران ریبی



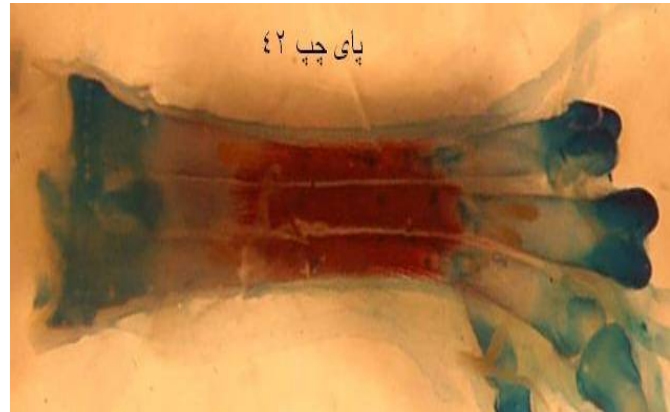
تصویر ۲۷ - ۳۸ (x20) نمای فوقانی پای راست آغاز بهم پیوستن دیافیز متاتارسهای ۲ و ۳ و ۴



تصویر ۲۶ - مرحله ۴۰ (x10) نمای فوقانی پای راست گسترش مراکز استخوانی شدن متاتارسهای ۲ و ۳ و ۴ و الحاق آنها



تصویر ۳۰- مرحله ۴۱ (x10) نمای جانبی پال راست گسترش مراکز استخوانی شدن ادر زند زیرین و متاکارپهای ۳ و ۴.



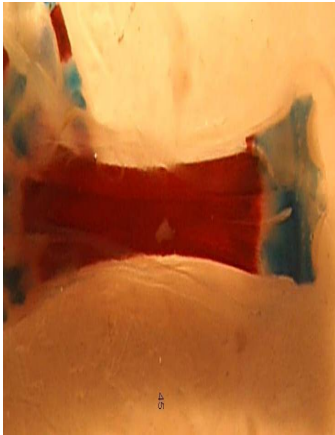
تصویر ۲۹- مرحله ۴۲ (x10) نمای فوقانی: پای چپ پیوستن دیافیز متاتارسهای ۲ و ۳ و ۴



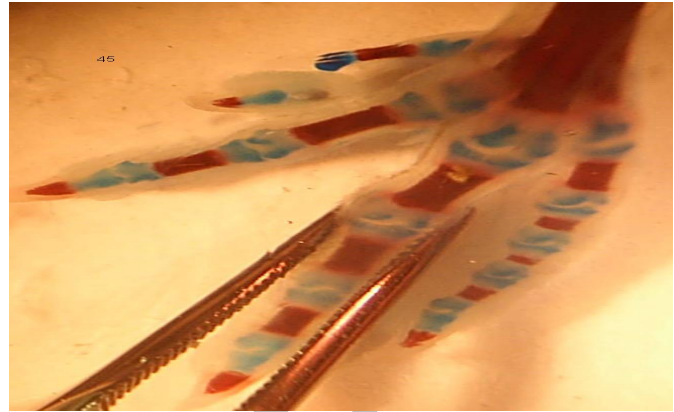
تصویر ۳۲- مرحله ۴۲ (x20) نمای شکمی پال راست مشابه تصویر ۳۰ با درشت نمایی بیشتری باشد



تصویر ۳۱- مرحله ۴۲ (x10) نمای خلفی پای راست نازک نی که از درشت نی کوتاهتر است بجز در ناحیه اپی فیز در بقیه قسمتها استخوانی شده است



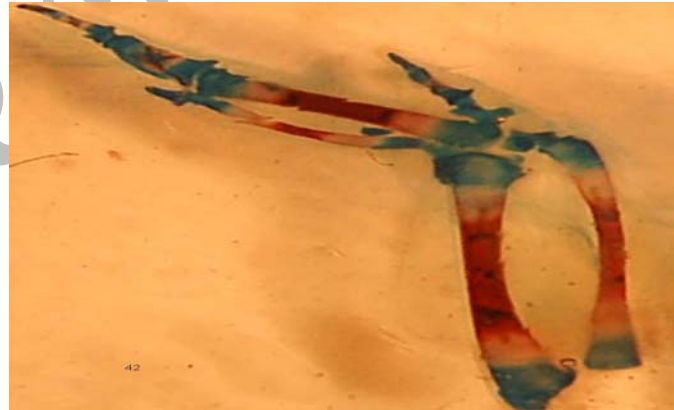
تصویر ۳۴- مرحله ۴۵ (x۱۰): نمای فوقانی پای چپ بهم پیوستن متاتارسهای استخوانی شده ۲ و ۳ و ۴ و یکپارچگی آنها



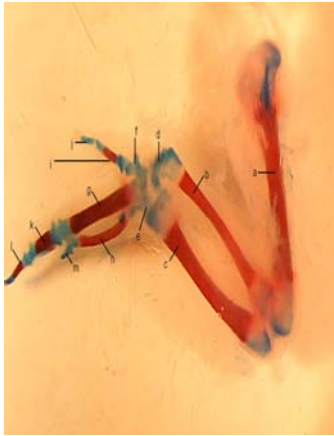
تصویر ۳۳- مرحله ۴۵ (x۱۰) نمای فوقانی: پای چپ استخوانی شدن بند های انگشتان پا



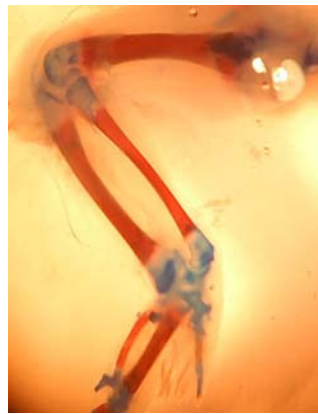
تصویر ۳۶- مرحله ۴۲ (x۴۰): نمای داخلی ران راست انتهایی پروگسیمال ران را نشان می دهد که هنوز غضروفی است. ناحیه سر ران که گردن کوتاهی دارد واضح است



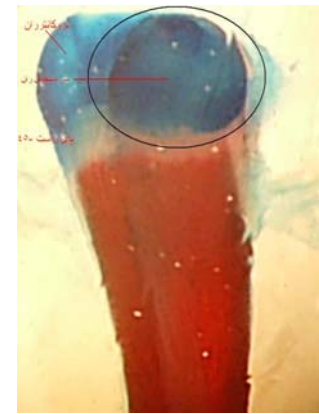
تصویر ۳۵- مرحله ۴۲ (x۱۰) نمای شکمی: بال راست نمای شکمی: پیشرفت استخوانی شدن قطعات اسکلت بال



تصویر ۳۹- نمای شکمی: مرحله ۴۵ (x۶)
بال راست مشابه تصویر ۳۸



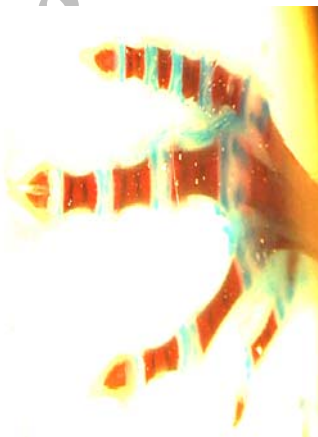
تصویر ۳۸ - نمای شکمی بال چپ
پیشرفت کامل استخوانی شدن در
قطعات مختلف اسکلت بال بخوبی کرده
، اما اپی فیزها غضروفی است



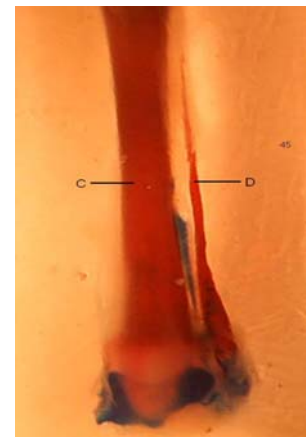
تصویر ۳۷- نمای تروکانتر و سر
ران در انتهای پروگسیمال مرحله
۴۵ (x۴۰): مشابه تصویر
شماره ۳۶ می باشد. سر ران در داخل
بیضی قرار داده شده است



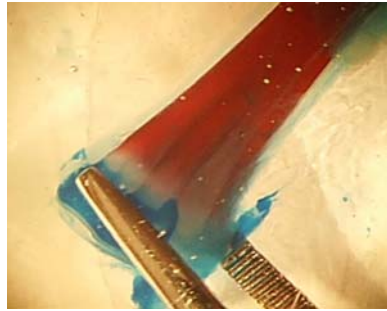
تصویر ۴۲ - مرحله ۴۵-۴۶ (x۴۰) پای
راست نمایش مفصل زانو و کشکک
غضروفی



تصویر ۴۱- مرحله ۴۵-۴۶ (x۲۰): نمای
فوقانی پای راست نمایش بند های
استخوانی شده انگشتان پا. بند آخر هر
انگشت تماما استخوانی شده



تصویر ۴۰- نمای خلفی مرحله
۴۵ (x۲۰): پای چپ نازک نی و
درشت نی استخوانی شده



تصویر ۴۳ - الحاق متاتارس های ۲ و ۳ و مرحله ۴۵-۴۶ (x۴۰): اپی فیز پروگسیمال استخوان یگپارچه متاتارس ۲ و ۳ و بوسیله پنس گرفته شده است.

بحث

استخوانی شدن از وسط دیافیز استخوانهای بلند آغاز می شود و بسمت اپی فیزها پیشروی می کند. تا زمان تفریخ در هیچ یک از استخوانها مراکز ثانویه استخوانسازی ظاهر نمی شود، لذا اپی فیزها بهمان شکل غضروفی باقی می ماند. بندهای آخر انگشتان پا برخلاف بقیه استخوانها از انتهای دیستال شروع به استخوانی شدن می کند و در زمان تفریخ کاملاً استخوانی می باشند.

در جنین بلدرچین ژاپنی تنها قطعه ای که در اسکلت بال و پا بهنگام تفریخ بهمان شکل غضروفی باقی می ماند کشکک است، هر چند که در لیست استخوانها، استخوانهای مچ دست پچشم نمی خورد. در این موجود دوران جنینی ۱۷ روز است و کشکک در روز ۹ جنینی تشکیل می شود. در جنین بلدرچین ژاپنی، روز چهارم جنینی، زمان آغاز ظهور قالبهای غضروفی است و از روز هفتم، مراکز استخوانی شدن ظاهر می شوند. مراکز اولیه استخوان سازی در جنین بلدرچین، در ناحیه وسط دیافیز ظاهر می شود. این امر در مورد شش قطعه استخوان شامل متاتارس ۱- بند ۲ انگشت ۲ بال - بند ۱ انگشت ۲، بند ۳ انگشت ۲، بند ۴ انگشت ۳ و بند ۵ انگشت ۴ در پا استثنائاً می باشد و مراکز استخوان سازی آنها در کل قالب غضروفی ظاهر می شود (۱۷).

بطور کلی براساس مطالعه انجام شده مشخص گردید که تشکیل قالبهای غضروفی در اسکلت پا و بال از روز ششم انکوباسیون آغاز می شود و بتدریج تا روز ۱۱ در بال و روز ۱۲ در پا کامل می شود. روز ۱۱ نخستین زمانی است که مراکز استخوان سازی در قطعات غضروفی نمایان می شوند. براساس مطالعه Shapiro (۱۹۹۲)، پیرامون تکوین ستون مهره در جنین جوجه و نیز نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر (ثبت نشده) ظهور قالبهای غضروفی روز ۵ جنینی ظاهر می شود و در روز سیزدهم، استخوانی شدن آنها آغاز می گردد (Scott, ۱۹۹۷). اولین زمان ظهور ماتریکس آلی و غیر آهکی (osteoid) ترشح شده توسط استئوبلاستها را در مرحله ۳۰ گزارش شده است اما زمان رسوب مواد معدنی را مشخص ننموده اند (۲۰). روند تکمیل قطعات غضروفی در اسکلت بال و پا از سمت پروگسیمال اندام بطرف ناحیه دیستال آن می باشد. کشکک تنها قطعه ای است که قالب غضروفی آن دیرتر از همه ظاهر می شود (روز ۱۲) و تا زمان تفریخ نیز استخوانی شدن آن آغاز نمی شود.

در اسکلت بال برخلاف پا چندین قطعه غضروفی باقی می ماند (متاکارپ ۲- زند زیرینی مچ دستی- زندزیرینی مچ دستی - بند ۲ انگشت ۲- بند ۱ انگشت ۴). معمولاً مراکز

منابع

- ۱- قاضی ، سیدرضا - تجلی ، مینا - غلامی ، صغری (۱۳۸۰).
آناتومی پرندگان اهلی، انتشارات دانشگاه شیراز صص ۳۹-۲۳
- ۲-رشیدی ، سید هدایت اله (۱۳۷۱). کالبد شناسی پرندگان اهلی ،
انتشارات دانشگاه شهید چمران ، صص ۳۲-۱۸
- 3-Yegor B.M. (2001). Sacrum and pelvic girdle development in lacertidae. *Russian Journal of Herpetology*,8(1) 1-16
- 4-Janina Z., Zalgericiene V. Rizgeliene R. (2003). The influence of azathioprine on the osteogenesis of the limbs. *Medicina* , 39(6) 379-382.
- 5-Rahman M.E., Hitoshi I., Yoshihiro W., Akira E., (1996). Carpal and tarsal bone development is highly sensitive to three antiproliferative teratogens in mice. *Reproductive Toxicology* , 10(6) 485-489.
- 6-Vioarsdottir U.S., Higgins P., Stringer C., (2002). A geometric morphometric study of regional Differences in the ontogeny of the modern. *Human facial skeleton. J. of Anatomy* ,201(3) 211-229
- 7-Roda Moreno J.A., Pascual Morenilla M.T., Roda Murillo O., Lopez Soler M., (2000). action of ethanol on different skull and brain parameters in the chick embryo. *J.Craniofac.Genet.Dev.Biol.*20(1) 44-48.
- 8-Illanes J., Fuenzalida M., Romeros, Gonzalez P., Lemus D. (1999) ethanol effect on the chick embryo ossification :A macroscopic and microscopic study. *Biology Research* ,32(2-3) 77-84.
- 9-Padmanabhan R., Ahmad I., Bener A., (2002). Effect of maternal methionine pre-treatment Alcohol induced exencephaly and axial skeletal dysmorphogenesis in mouse fetuses. *Drug and Alcohol Dependence*,65,263-281.
- 10-Padmanabhan R., Ijaz A., (1996). Sodium valproate augments spontaneous neural tube defects and axial skeletal malformations into mouse fetuses. *Reproductive Toxicology* , 10(5)345-363.
- 11-Young A.D., Phipps D.E., Astroff A.B., (2000). Large scale double - staining of rat fetal skeletons using alizarin red s and alcian blue. *Teratology*,61,273-276.
- 12-Koumoun D., Gagliardi F., Divanach P., Boglione C., Cataudella S., Kentouri M., (1997). Normal and abnormal osteological development of caudal fin in *sparus aurata* l.fry. *Aquaculture*:149,215-226.
- 13-Cobcroft J.M., Pankhurst P.M., Sadler J., Hart P.R., (2001). Jaw development and malformation in cultured striped trumpeter, *Latris Lineata* *Aquaculture*,199,267-282.
- 14-Hiranuma H., Jikko A., Iwamoto M., Fuchihata H., (1996). Effects of x-ray irradiation on terminal differentiation and cartilage matrix calcification of rabbit growth plate chondrocytes in culture, *Bone*,18(3) 233-238
- 15-Balint E., Szabo P., Marshall C.F., Sprague M., (2001). Glucose- induced inhibition of in vitro bone mineralization. *Bone*, 28(1) 21-28.
- 16-Elena M., Marisa L.B., Erminio G., (2001). Atlas of rat fetal skeleton double stained for bone and cartilage. *Teratology*:64,125-133.
- 17-Nakane Y., Tsodzuki M.. (1999). Development of the skeleton in japanese quail embryos. *Dev. Growth Differ.*:41(5) 523-534.
- 18-Burdan F., Madej B., Wojtowicz. (2000). The effect of short - time caffeine administration on skeleton development in wistar rats. *Folia Morpholol* , 59(2)91-95.
- 19-Shapiro F. (1992). Vertebral development of the chick embryo during days 3-19 of incubation, *J. Morphol* , 213(3)317-333.
- 20-Scott- Savage P., Hall B.K., (1979). The timing of the onset of osteogenesis in the tibia of the embryonic chick.,
J. Morphol,162(3)453-463.
- 21-Pageze L., Manesse M., Navarro M. (1996). The morphometric study of the 19-day chicken embryo skeleton (*gallus domesticus*). *Vet Hum Toxicol* , 38(4)299-301.
- 22-Baeriswyl F., (1980). Morphometric development of ossification in the chick leg from the 7th to the 17th day of incubation. *Bull Assoc Anat* , 64(185)183-198.
- 23-Scott B., (2000). Putting the finger on digit development. *BBS Bulletin* , 3(10) 241-245.
- 24-Frank R., Eckhard R., (2001). The developing bone : slave or master of its cells and molecules?reviwe article
Pediatric Research , 50(3) 309-314.
- 25-Renato B., Vittorio G., Marina Z., Maria A.S., Alberto M.M., Paola N., Antonino F., (1996). On the assessment of the growth patterns in human fetal limbs:longitudinal measurements and allometric analysis. *Early Human Development* , 45(1-2)11-25.
- 26-Dyce K.M., Sack W.O., Wensing C.J.G. (1995). *Textbook of veterinary Anatomy*,w.b.saunders company, pp:777-779.
- 27-Hamburger V., Hamilton H.L. (1951). A series o f normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.*, 88: 49-92.

Chronological study of chicken embryo wing and leg skeleton development by alizarin red-alcian blue double staining technique

Ranjbar R.¹, Vatanchian M.², Mohammadian B.³, Mayahi M.⁴

¹ Anatomy & Embryology dept. Veterinary Medicine Faculty, Chamran university, Ahwaz, I.R. of Iran

² Biology department, Basic sciences faculty, Bu-Ali Sina university, Hamedan, I.R. of Iran

³ Pathology department, Veterinary Medicine Faculty, Chamran university, Ahwaz, I.R. of Iran

⁴ Poultry Diseases department, Veterinary Medicine Faculty, Chamran university, Ahwaz, I.R. of Iran

Abstract

Normal and abnormal developmental studies on chicken embryo system are necessary, as the widespread use of chicken embryo model in embryological experiments, from organ to cell and molecule levels. A knowledge of normal embryonic development is important to understanding embryonic events and efficient performing of experimental and teratological tests. The present study was undertaken by double staining on chicken embryo from 1st to 21st day of incubation period by alizarin red – alcian blue double staining method, to investigate wing and leg skeleton development. In this method, cartilage and bone matrix stain blue and red, respectively. Totally 13 pieces bone in wing and 22 pieces in leg skeleton were determined. Then, the time of cartilage formation and their ossification, were detected. All of those become ossified

through bones, become ossified through enchondral ossification pathway, but some part of each bone remains cartilaginous. Results show that leg skeleton development is earlier than wing skeleton development. 6th day and 11th day of incubation period are first appearance cartilage and bone matrix, respectively. These skeletogenous stages of the chicken embryo wing and leg will be useful as a normal control not only in studies of experimental embryology and teratology, but also in the analysis of mutant embryos with skeletal abnormalities.

Keywords: chicken embryo, alizarin red-alcian blue, skeleton, chondroformation, ossification