



## Histogenetic and Histochemical Study of the Liver During the Embryonic Period of the Pheasant (*Phasianus colchicus*)

Hamid Khodadadi<sup>1</sup>, Abolghasem Nabipour<sup>1</sup>, Shadi Hashemnia<sup>2</sup>, Bahador Shojaei<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

<sup>2</sup>Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

doi [10.22059/jvr.2018.263371.2836](https://doi.org/10.22059/jvr.2018.263371.2836)

J Vet Res, 74(4), 564-572

### Abstract

**BACKGROUND:** The histogenetic study is a useful and practical laboratory method for obtaining basic and effective information in order to reveal the process of histogenesis and development of organs in different stages during the embryonic period. This applied method helps us to understand the formation time of each organ and its tissue structure.

**OBJECTIVES:** The aim of the present study was to study the histogenesis and histochemistry of the pheasant liver during the embryonic period.

**METHODS:** Sixty fertile eggs were placed in the incubator and sampling was performed from day 5 to the end of incubation period. The liver samples were fixed in 10% Buffered Formalin and the slides were stained with Hematoxylin and Eosin (H&E), Periodic Acid Schiff (PAS) and Masson Trichrome (MT).

**RESULTS:** In this study, liver parenchyma, changes in the hepatocytes and their glycogen storage, as well as the appearance time of canaliculi, biliary ducts, central veins and port spaces were investigated.

**CONCLUSIONS:** Differences in the time of the formation of the organs and structures in various birds relate to different incubation period or species variations. In this research, as the first study on the liver histogenesis of the pheasant, the formation of this organ from the fifth day to the end of the fetal period was examined and it was observed that the evolution and tissue development of the liver is completed until the eighteenth day of incubation period.

**Keywords:** Histogenesis, Histochemistry, Liver, Pheasant, Embryo

Copyright © 2019. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: [shadihashemnia@uk.ac.ir](mailto:shadihashemnia@uk.ac.ir) Tel/Fax: 034-3257447

### How to cite this article:

Khodadadi, H., Nabipour, A., Hashemnia, Sh., Shojaei, B. (2019). Histogenetic and Histochemical Study of the Liver During the Embryonic Period of the Pheasant (*Phasianus colchicus*). J Vet Res, 74(4), 564-572. <https://10.22059/jvr.2018.263371.2836>

### Figure Legends and Table Captions

**Figure 1.** Day 5, PAS, 400X. 1- Cuboidal mesothelial cells 2- Basement membrane 3- Light cells 4- PAS positive granules 5- Bile canaliculi 6- Irregular and large spaces 7- Immature blood cells.

**Figure 2.** Day 6, MT, 100X. 1- Squamous mesothelial cells 2- Cuboidal mesothelial cells.

**Figure 3.** Day 7, H&E, 400X. 1- Immature blood cells 2- Hepatocytes in acinar shape 3- Bile canaliculi 4- Cuboidal mesothelial cells 5- Light cells.

**Figure 4.** Day 8, H&E, 100X. 1- Central veins and the cords of hepatocytes around them 2- Kupffer cell 3- Endothelial cells.

**Figure 5.** Day 11, H&E, 400X. 1- Two-rowed cords of hepatocytes 2- Bile duct 3- Kupffer cell 4- Endothelial cells.

**Figure 6.** Day 14, H&E, 400X. 1- Glisson capsule 2- Two-rowed cords of hepatocytes 3- Portal space.

**Figure 7.** Day 16, H&E, 100X. 1- Portal spaces 2- Central veins.

**Figure 8.** Day 18, MT, 40X. 1- Liver parenchyma with mature sinusoids and hepatocytes 2- Central veins 3- portal space.



## مطالعه بافت‌زایی و هیستوشیمی کبد قرقاول در طول دوره جنینی

حمید خدادادی<sup>۱</sup>، ابوالقاسم نبی‌پور<sup>۱</sup>، شادی هاشم‌نیا<sup>۲</sup>، بهادر شجاعی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران  
<sup>۲</sup>گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

doi: [10.22059/ivr.2018.263371.2836](https://doi.org/10.22059/ivr.2018.263371.2836)

تاریخ دریافت: ۲۲ اردیبهشت ماه ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: ۵ تیر ماه ۱۳۹۸ تاریخ انتشار آنلاین: ۰۱ آذرماه ۱۳۹۸

## چکیده

**زمینه مطالعه:** مطالعه بافت‌زایی و بافت‌شناسی اندام‌های مختلف، یک روش آزمایشگاهی مفید و کاربردی جهت دستیابی به اطلاعات پایه و کارآمد در راستای آشنایی دقیق‌تر با روند رشد و نمو اندام‌ها در طول دوره جنینی، شکل و نوع ساختارهای آن در هر مرحله از این دوره و همچنین آشنایی با ساختار بافتی در گونه‌های مختلف جانوری بوده است. با توجه به قابلیت موجود در این دست مطالعات، ما می‌توانیم از آن به عنوان یک روش کاربردی دقیق برای به دست آوردن زمان‌بندی‌های حساس تشکیل هر اندام و شناخت بهتر ساختار بافتی آن استفاده نمائیم.

**هدف:** مطالعه روند بافت‌زایی کبد در جنین قرقاول بود.

**روش کار:** شصت تخم نطفه‌دار در دستگاه جوجه‌کشی قرار داده شد و از روز ۵ تا آخر دوره انکوباسیون نمونه‌گیری انجام شد. نمونه‌های کبد اخذ شده در محلول بافر فرمالین ۱۰ درصد فیکس و مقاطع بافتی تهیه شده به روش‌های هماتوکسیلین و ائوزین و پریودیگ اسید شیف و تری کروم ماسون رنگ آمیزی شدند.

**نتایج:** در این مطالعه پارانشیم کبد و تغییرات سلول‌های کبدی و ذخیره گلیکوژنی آن‌ها و نیز زمان ظهور کانالیکول‌ها، مجاری صفراوی، سیاهرگ‌های مرکزی و فضاهای پورت مورد بررسی قرار گرفت. کانالیکول‌های صفراوی در روز پنجم و سلول کوپفر در روز هشتم دوره انکوباسیون مشاهده شدند. واکنش مثبت به رنگ آمیزی پاس در روزهای اول دوره فقط در هپاتوسیت‌های مرکزی قابل رویت بود اما از روز نهم به بعد در تمام سلول‌های کبدی به چشم می‌خورد. این در حالی بود که تا آخر دوره دو بار کاهش در واکنش پاس ملاحظه گردید.

**نتیجه‌گیری نهایی:** اختلاف در روزهای شکل‌گیری اندام‌ها و ساختارهای مختلف در پرنده‌گان گوناگون، به اختلاف در طول دوره انکوباسیون و یا اختلافات گونه‌ای مربوط می‌شود. در این تحقیق به عنوان اولین مطالعه بر روی بافت‌زایی کبد قرقاول، شکل‌گیری این ارگان از روز پنجم تا آخر دوره جنینی بررسی شد و مشاهده گردید که روند تکامل و بافت‌زایی کبد تا روز هجدهم دوره به اتمام می‌رسد.

**کلمات کلیدی:** بافت‌زایی، هیستوشیمی، کبد، جنین، قرقاول

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: شادی هاشم‌نیا، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

پست الکترونیکی: [shadihashemnia@uk.ac.ir](mailto:shadihashemnia@uk.ac.ir)

## مقدمه

کبد را می‌سازد، پیشروی می‌کند (۳،۱۳). رشد جوانه کبدی به سمت تیغه عرضی و نفوذ به داخل آن موجب القا کبد توسط سلول‌های مزانشیمی آن ناحیه می‌شود. در نتیجه این القا، سایر اجزا کبد مثل بافت همبند، اندوتلیوم، کوپفر و سلول‌های خون ساز نیز به وجود می‌آیند. هپاتوسیت‌ها که با آرایش طنابی در کنار هم قرار می‌گیرند، از سلول‌های بزرگ اندودرمی جوانه کبدی متمایز می‌شوند (۲۱). جوانه به دو انشعاب جلویی و عقبی تقسیم می‌شود که به ترتیب در سمت چپ و راست داکتوس ونوزوس قرار می‌گیرد

کبد از جمله اندام‌هایی است که در دوره جنینی خیلی زود و بلافاصله بعد از قلب، شروع به شکل‌گیری می‌کند (۲۴). جوانه کبدی در سمت شکمی، از اندودرم روده جلویی جنینی در اثر القا سلول‌های مزودرمی ناحیه کبدی-قلبی بیرون می‌زند. این جوانه شامل سلول‌های زایایی است که طناب‌های سلولی هپاتوسیت‌ها ایجاد می‌کنند. کبد دو منشا اندودرمی و مزودرمی دارد (۳،۱۸،۲۱). در مرحله دوازده جنین جوجه، جوانه کبدی از روده پیشین جنینی به وجود می‌آید و در مرحله چهارده به سمت مزودرمی که ماتریکس

جنین‌های کوچک را به طور کامل در فرمالین بافر ۱۰ درصد قرار دادیم اما در مورد جنین‌های بزرگتر، پس از تشریح، کبد آن‌ها جدا شده و در فرمالین بافر ۱۰ درصد قرار گرفت. بعد از تثبیت بافت‌ها، آن‌ها را جهت پاساژ بافتی از فیکساتیو خارج کردیم. به جهت جلوگیری از آسیب نمونه‌های کوچک از پاساژ دستی بهره گرفتیم. پس از انجام پاساژ بافتی از نمونه‌ها توسط پارافین، بلوک تهیه و بعد از ثبت مشخصات آن‌ها، به کمک میکروتوم (مدل ام آر ۲۲۵، هیستولاین ایتالیا)، برش‌های ۵ میکرونی تهیه شد. در نهایت اسلایدهای مربوطه برای رنگ آمیزی آماده شدند. به منظور بررسی عمومی بافت کبد و سلول‌های آن از رنگ آمیزی معمول هماتوکسلین اتوزین (H&E)، جهت بررسی ذخایر گلیکوژنی و زمان ظهور آن‌ها از رنگ آمیزی پرئودیک اسید شیف (PAS) و برای مشاهده بهتر فضاهای پورت و بافت همبند از رنگ آمیزی تری کروم ماسون (TM) استفاده کردیم (۱۷ با تغییر). لازم به ذکر است به منظور پیدا کردن و رسیدن به کبد در نمونه‌های کوچک و نیز بالا بردن دقت کار در تشخیص واکنش PAS در همه نمونه‌ها، از تمام بلوک‌ها برش‌های سریالی تهیه گردید. در نهایت اسلایدهای به دست آمده توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند و از آنها به کمک دوربین تصاویر دیجیتال تهیه شد.

### نتایج

**روز ۵ انکوباسیون:** یک ردیف سلول مکعبی از خارج کبد را پوشانده بود. در زیر آن هیپاتوسیت‌ها با آرایش آسینی به چشم می‌خوردند. فضاهای بزرگ و بی قاعده‌ای در اطراف آن‌ها دیده می‌شد که دارای سلول‌های خونی نابالغ فراوان بودند. سلول‌های کبدی به دو شکل تیره و روشن وجود داشتند. سلول‌های تیره در نواحی مرکزی دارای هسته هتروکروماتین تر و سیتوپلاسم تیره‌تر بودند. هیپاتوسیت‌های روشن در تمام نواحی کبد قابل مشاهده بودند اما با تراکم بیشتری در محیط کبد و در زیر بافت مکعبی قرار گرفته بودند. هسته آن‌ها مراحل مختلف تقسیم میتوز را نشان می‌داد. کانالیکول‌های صفراوی در بین هیپاتوسیت‌های مجاور رویت شدند. در رنگ آمیزی تری کروم هیچ کلاژنی در پارانشیم و نواحی محیطی کبد ردیابی نشد. واکنش به رنگ PAS (پاس) مثبت بود اما در برش‌ها و قسمت‌های مختلف کبد شدت متفاوتی داشت و به صورت خفیف تا شدید مشاهده شد (تصویر ۱).

**روز ۶ انکوباسیون:** سلول‌های مزوتلیال اطراف کبد در برخی نقاط به صورت سنگفرشی درآمده بودند. کمی از مقدار فضاهای بزرگ و بی قاعده کاسته شده بود. در این روز هم هنوز اثری از رشته

(۱۰). قسمت جلویی این جوانه، کبد و درخت مجاری صفراوی داخل کبدی و بخش عقبی آن کیسه صفا و مجاری صفراوی خارج کبدی را به وجود می‌آورد (۱۸).

روند بافت‌زایی کبد در پستاندارانی مثل موش صحرایی، سگ و شتر یک کوهانه بررسی شده است (۱۹، ۱۲، ۱). این مطالعه در بین پرندگان در مرغ به روش‌های مختلف و تعداد فراوان انجام شده است (۲۶، ۲۵، ۱۶، ۵، ۷). کبد سایر پرندگان مانند بلدرچین (۸)، بوقلمون (۲۰)، بلدرچین ژاپنی (۴) و کبک (۱۴) نیز از نظر هیستولوژی مورد بررسی قرار گرفته‌اند، اما تا کنون مطالعه‌ای بر روی روند بافت‌زایی کبد قرقاول صورت نگرفته است.

مطالعه روند بافت‌زایی اندام‌های مختلف در دوره‌ی جنینی اطلاعات پایه‌ای در مورد زمان رخداد اتفاقات بافت‌زایی هر اندام در اختیار قرار می‌دهد. اطلاع از زمان دقیق رخدادهای بافت‌زایی به عنوان دانش ضروری برای مطالعاتی که در آن‌ها نقش ژن‌ها و مولکول‌های پروتئینی در هیستومورفوزیس هر اندام بررسی می‌شود، مطرح می‌باشند. به عبارت دیگر آگاهی از زمان دقیق دوره شکل‌گیری و تغییرات عملکردی یک اندام در زمان جنینی، که به دوره‌ی بحرانی معروف است، شرط اولیه برای بررسی نقش عوامل مولکولی ریخت‌زا می‌باشد. از طرف دیگر اثر مواد مختلف خارجی بر روی شکل‌گیری یک ارگان بایستی در دوره‌ی بحرانی آن اندام بررسی شود. چرا که یک ناهنجاری‌زا در صورتی بر روی اندام هدف خود جنین اثر می‌گذارد که در دوره‌ی بحرانی شکل‌گیری آن اندام به بدن جنین وارد شود (۲۰، ۱۳). به همین دلیل زمان، توالی و نحوه بافت‌زایی اندام‌های مختلف به طور جداگانه و در حیوانات مختلف بررسی شده است. این مطالعه که اولین پژوهش در تعیین روند بافت‌زایی کبد در قرقاول می‌باشد، مبنایی خواهد بود برای مطالعات آینده‌ای که در حوزه‌ی جنین‌شناسی تجربی بر روی مدل پرندگان انجام خواهد گرفت.

### مواد و روش کار

۶۰ قطعه تخم نطفه دار قرقاول از مزرعه تولید تخم قرقاول تهیه و در انکوباتور با درجه حرارت ۳۷/۵ درجه سانتیگراد و رطوبت ۵۸ تا ۶۲ درصد قرار داده شد. از روز ۵ تا آخر دوره انکوباسیون در هر روز تعداد ۳ قطعه جنین، پس از بررسی و اطمینان از زنده بودن آن‌ها، از انکوباتور خارج و از تخم‌های نطفه دار استخراج گردید. بدین منظور پوسته تخم‌ها، از سمت اتاقتک هوا به وسیله پنس جدا و پرده‌های جنینی کنار زده شد و جنین خارج گردید. جنین‌ها توسط سرم فیزیولوژی در شیشه ساعت شستشو داده شدند.

**روز ۱۰ انکوباسیون:** سلول‌های کبدی با آرایش طنابی ۲ ردیفه در اطراف سیاهرگ‌های مرکزی قرار گرفته بودند. فضای سینوزوئیدها باریک‌تر و منظم‌تر از روز قبل بود. میزان سلول‌های بالغ خونی نیز افزایش یافته بود. از تعداد سلول‌های روشن به شدت کاسته شده بود و اکثر سلول‌های مشاهده شده در پارانشیم کبد هپاتوسیت‌های تیره بودند. تعداد سیاهرگ‌های مرکزی و سلول‌های کوپفر افزایش داشت. کپسول گلیسون مشابه روز قبل در برخی قسمت‌های کبد قابل مشاهده بود. واکنش به PAS نیز همانند روز قبل به شکل قوی و یکنواخت، در تمام قسمت‌های حاشیه‌ای و مرکزی کبد مشاهده گردید.

**روز ۱۱ انکوباسیون:** در محیط کبد سلول‌های هپاتوسیت با آرایش آسینی مشاهده می‌شدند. برای اولین بار مجاری صفراوی در مجاورت فضای پورت مشاهده گردید. کپسول گلیسون نازکی، تقریباً به طور کامل بر روی سطح کبد تشکیل شده بود. در داخل پارانشیم کبد هم محل‌های تشکیل فضاهای پورت با رنگ آمیزی تری کروم قابل ردیابی بود. واکنش به PAS نیز مثبت بود و در تمام هپاتوسیت‌ها دیده می‌شد (تصویر ۵).

**روز ۱۲ انکوباسیون:** تمام مشاهدات همانند روز قبل بود و رخداد جدیدی دیده نشد.

**روز ۱۳ انکوباسیون:** سیاهرگ‌های مرکزی با طناب‌های دو ردیفه در اطراف آن‌ها در پارانشیم متراکم‌تر شده کبد، قابل مشاهده بودند. از تعداد سلول‌های روشن به شدت کاسته شده بود و به ندرت در حاشیه رویت می‌شدند و پارانشیم توسط سلول‌های تیره اشغال شده بود. تعداد سلول‌های کوپفر بیشتری در این روز به چشم خورد. واکنش به رنگ پرپودیک اسید شیف کاهش چشمگیری داشت به این ترتیب که از اندازه و تعداد گرانول‌های پاس مثبت در هپاتوسیت‌های تمام مناطق کبد، به شدت کاسته شده بود.

**روز ۱۴ انکوباسیون:** فضای پورت به صورت واضح‌تر و به تعداد بیشتر رویت شد و سینوزوئیدها باز هم باریک‌تر شده بودند. واکنش PAS، همانند روز قبل بسیار خفیف بود (تصویر ۶).

**روز ۱۵ انکوباسیون:** در این روز تغییر مشهودی به چشم نخورد و ساختارهایی مثل فضای پورت و سینوزوئیدهای باریک همانند روز قبل بود اما واکنش به PAS اندکی افزایش یافته بود.

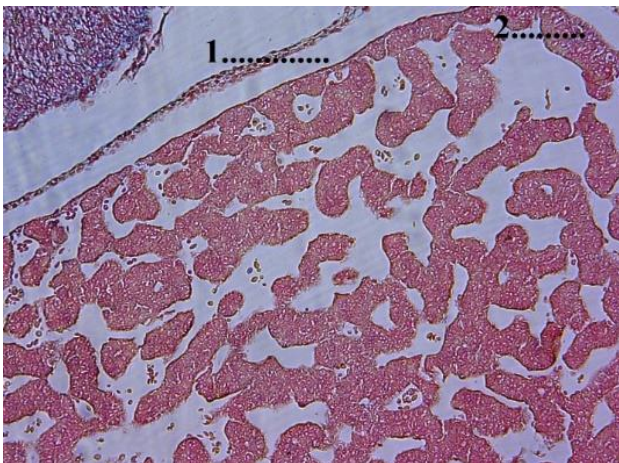
**روز ۱۶ انکوباسیون:** چیدمان سلول‌های کبدی منظم‌تر شده بود و تعداد سیاهرگ‌های مرکزی افزایش یافته و فضای پورت، مجاری صفراوی و کانالیکول‌ها واضح‌تر رویت گردید. واکنش PAS افزایش

کلاژن در زیر مزوتلیوم و پارانشیم کبد نبود. فقط معدودی از هپاتوسیت‌های نواحی مرکزی کبد واکنش PAS مثبت خفیفی نشان دادند و در بقیه قسمت‌ها این واکنش منفی بود (تصویر ۲).

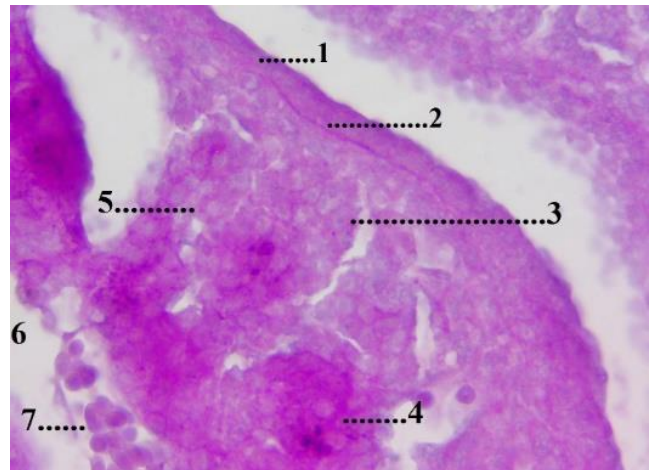
**روز ۷ انکوباسیون:** سلول‌های کبدی در دسته‌هایی به صورت آسینوسی در کنار هم قرار گرفته بودند و به تعداد کمتر طناب‌های سلولی به چشم می‌خورد. کانالیکول‌های صفراوی در بین این سلول‌ها به وضوح دیده می‌شدند. سلول‌های روشن و در حال تقسیم میتوز در بین سلول‌های تیره و با تراکم بیشتر در محیط کبد قابل مشاهده بودند. درون فضاهای بزرگ سینوزوئیدها، سلول‌های خونی نابالغ به وفور یافت می‌گردید. در دیواره سینوزوئیدها هسته سلول اندوتلیال رویت شد. واکنش به رنگ آمیزی پاس و تری کروم همانند روز قبل بود (تصویر ۳).

**روز ۸ انکوباسیون:** مزوتلیوم در بیش تر قسمت‌ها به صورت سنگفرشی مشاهده گردید و آرایش طنابی شکل هپاتوسیت‌ها نیز افزایش یافته بود. سینوزوئیدها به اندازه‌های بزرگ و کوچک به چشم می‌خورد. میزان گلبول‌های قرمز بالغ خون در حال افزایش بود. در این روز برای اولین بار تعداد کمی سلول کوپفر در دیواره سینوزوئیدها مشاهده شد. سیاهرگ‌های مرکزی نیز در حال تشکیل و رویت بودند. همچنین در قسمتی از کبد ناحیه‌ای به شکل فضای پورت در حال شکل‌گیری بود که با رنگ آمیزی تری کروم قابل تشخیص بود. در منطقه بسیار کوچکی از قشر کبد در زیر مزوتلیوم، الیاف کلاژن بسیار ظریفی مشاهده شد. سلول‌های روشن و در حال تقسیم در محدوده باریکی از محیط کبد به چشم می‌خوردند. در مرکز نیز به تعداد خیلی کم سلول روشن در لابه لای سلول‌های تیره قرار داشتند. در این روز نیز کانالیکول‌های صفراوی با وضوح زیادی دیده شدند و از نظر تعداد افزایش چشمگیری نشان دادند. واکنش پاس در روز هشتم نیز فقط در تعدادی از هپاتوسیت‌های نواحی مرکزی کبد اندکی مثبت بود و در بقیه قسمت‌ها هیچ گرانول قرمز رنگی مشاهده نشد (تصویر ۴).

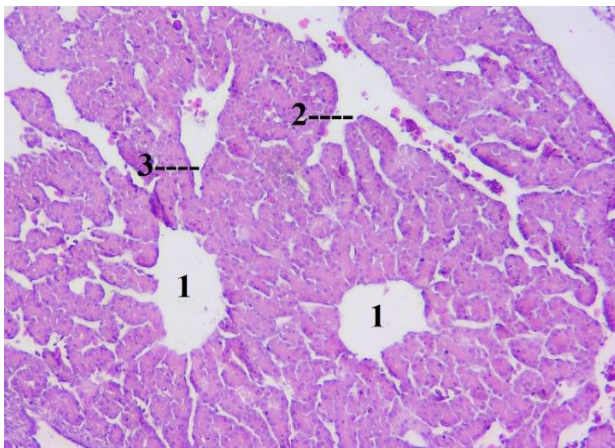
**روز ۹ انکوباسیون:** مزوتلیوم به طور کامل سنگفرشی شده بود. در رنگ آمیزی تری کروم، کپسول گلیسون در برخی قسمت‌های کبد دیده می‌شد. سلول‌های روشن در حاشیه کبد همچنان به چشم می‌خوردند. فضاهای پورت و سیاهرگ‌های مرکزی در حال کامل شدن و سینوزوئیدها در حال باریک‌تر شدن بودند. آرایش طنابی هپاتوسیت‌ها در اطراف سیاهرگ‌های مرکزی رو به افزایش بود. در این روز برای اولین بار در سیتوپلاسم هپاتوسیت‌های سراسر کبد، گرانول‌های PAS مثبت واضحی مشاهده شد.



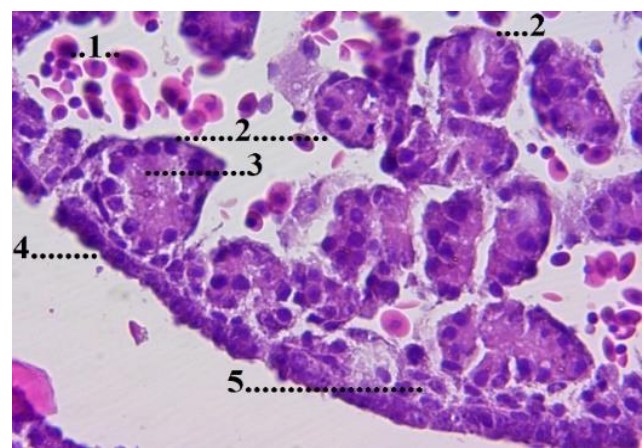
تصویر ۲. روز ششم جنینی، رنگ آمیزی تری کروم ماسون، بزرگنمایی 100X  
 ۱- سلولهای مزوتلیال سنگفرشی ۲- سلولهای مزوتلیال مکعبی.



تصویر ۱. روز پنجم جنینی، رنگ آمیزی PAS، بزرگنمایی 400X، ۱- سلولهای مکعبی، ۲- غشا پایه، ۳- سلولهای روشن، ۴- گرانولهای پاس مثبت، ۵- کانالیکول صفراوی، ۶- فضاهای بزرگ و بی قاعده، ۷- سلولهای خونی نابالغ.



تصویر ۴. روز هشتم جنینی، رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی 100X، ۱- سیاهرگهای مرکزی با آرایش طنابی شکل هپاتوسیتها در اطراف آنها ۲- سلول کوبفر ۳- سلول اندوتلیال.



تصویر ۳. روز هفتم جنینی، رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی 400X، ۱- سلولهای خونی نابالغ ۲- هپاتوسیتها با آرایش آسیننی ۳- کانالیکول صفراوی ۴- سلولهای مزوتلیال مکعبی ۵- سلولهای روشن.

قابل مشاهده بودند. مجاری صفراوی به وضوح در فضاهای پورت رویت می‌شدند. واکنش PAS هم همانند روز قبل قوی و مثبت بود و به صورت دانه‌های قرمز رنگی که در سیتوپلاسم اکثر هپاتوسیتها پراکنده بودند، مشاهده شد (تصویر ۸).

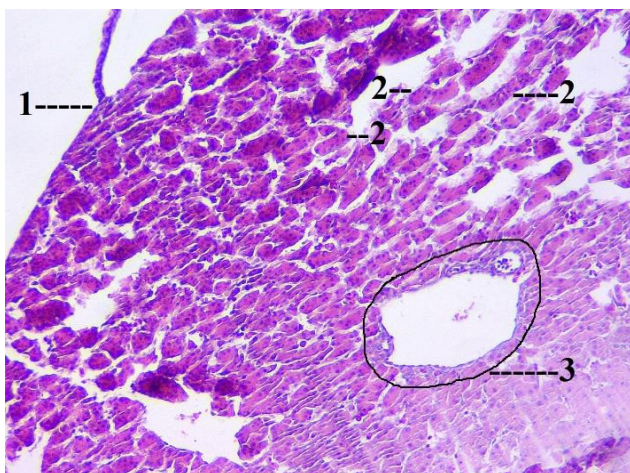
**روز ۱۹ انکوباسیون:** تمام مشاهدات همانند روز قبل بود و رخداد جدیدی دیده نشد.

**روز ۲۰ انکوباسیون:** سینوزوئیدها، سیاهرگهای مرکزی، فضاهای پورت و تمام اجزاء کبد به آرایش بالغ خود رسیده بودند.

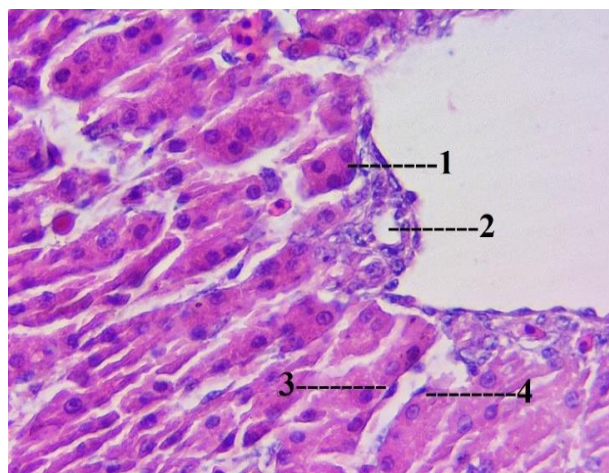
یافته و نسبتاً قوی مشاهده شد و گرانولهای قرمز رنگ PAS مثبت در اندازه‌های مختلف در اکثر هپاتوسیتها دیده شد (تصویر ۷).

**روز ۱۷ انکوباسیون:** تمام مشاهدات همانند روز قبل بود و رخداد جدیدی دیده نشد.

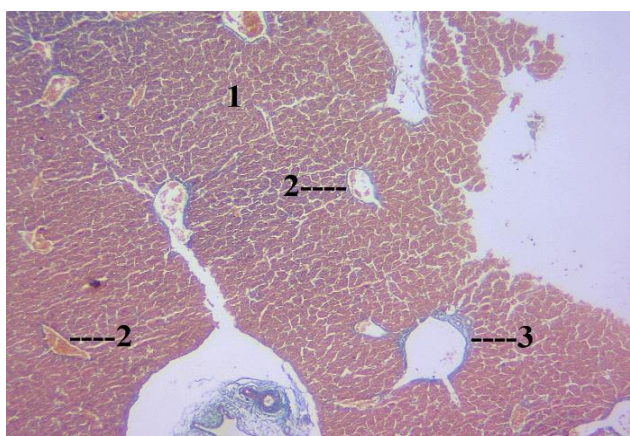
**روز ۱۸ انکوباسیون:** پارانشیم کبد متراکمتر و آرایش سینوزوئیدهای اطراف سیاهرگهای مرکزی منظمتر شده بود. همه ساختارهای کبد به شکل بالغ خود نزدیک شده بودند. کپسول گلیسون و فضاهای پورت به خوبی با رنگ آمیزی سبز تری کروم



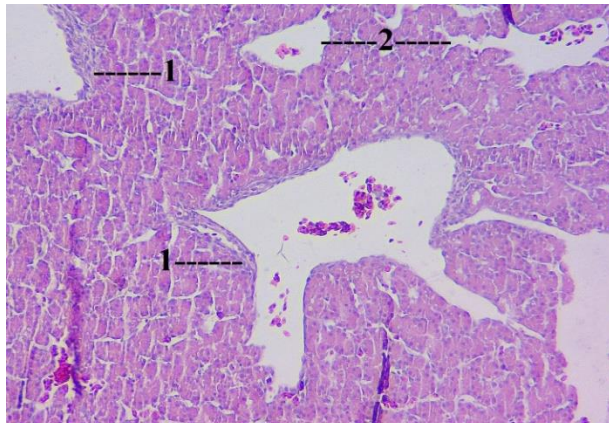
تصویر ۶. روز چهاردهم جنینی، رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی ۴۰۰. ۱- طناب‌های کپسول گلیسون ۲- طناب‌های دو ردیفه هیپاتوسیت‌ها ۳- فضای پورت.



تصویر ۵. روز یازدهم جنینی، رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی ۴۰۰. ۱- طناب‌های دو ردیفه هیپاتوسیت‌ها ۲- مجرای صفراوی ۳- سلول کوپفر ۴- سلول اندوتلیال.



تصویر ۸. روز هجدهم جنینی، رنگ آمیزی تری کروم ماسون، بزرگنمایی ۴۰. ۱- پارانشیم کبد با سینوزوئیدها و هیپاتوسیت‌های متراکمی که به شکل بالغ خود رسیده اند ۲- سیاهرگ‌های مرکزی ۳- فضای پورت.



تصویر ۷. روز شانزدهم جنینی، رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی ۱۰۰. ۱- فضاهای پورت ۲- سیاهرگ‌های مرکزی.

گرانول‌های ریز قرمز رنگ با پراکندگی یکنواخت، در تمام هیپاتوسیت‌ها مشاهده شد.

**روز ۲۳ انکوباسیون:** همه اجزاء کبد مانند روز قبل به شکل بالغ خود دیده می‌شدند و واکنش PAS هم مثبت قوی بود.

**روز ۲۴ انکوباسیون:** در آخرین روز دوره انکوباسیون هم اتفاق جدیدی مشاهده نشد. زیرا کبد در روزهای قبل به شکل بالغ خود رسیده بود. واکنش PAS هم مثبت بود.

در این روز تقریباً سلول نابالغ خونی به چشم نخورد. واکنش PAS در اکثر قسمت‌های کبد افت شدیدی داشت و در تعداد اندکی از هیپاتوسیت‌ها دیده می‌شد.

**روز ۲۱ انکوباسیون:** پارانشیم کبد بسیار متراکم بود و به ندرت عروق خونی با لومن بزرگ مشاهده شد. مثل روز قبل، واکنش به PAS بسیار خفیف بود.

**روز ۲۲ انکوباسیون:** همه قسمت‌های کبد در اوج تکامل خود بودند. تنها تفاوت نسبت به روز قبل افزایش واکنش PAS بود که

## بحث

غوطه‌وری هستند (۹). محققین دیگری بر این عقیده هستند که این دو نوع سلول به طور طبیعی در کبد وجود دارند اما جراحی و پاتوزن‌ها می‌تواند نسبت آن‌ها را تغییر دهد (۱۱، ۱۵، ۲۳)، هرچند که Cavey و Wong در سال ۱۹۹۳ گزارش کردند سلول‌های تیره و روشن در طول تکامل کبد وجود دارند اما همیشه تعداد سلول‌های تیره بیشتر است (۲۶). برخی نیز پیشنهاد کرده‌اند که سلول‌های روشن و تیره در مراحل متفاوتی از هیدراسیون قرار دارند (۱۵) و سیتوپلاسم تیره نشانه‌ای از مرگ سلولی قریب‌الوقوع است (۱۱). مطالعات فراساختاری این دو سلول در کبد پرندگان نشان داده است که سلول‌های روشن دارای سیتوپلاسمی رنگ پریده و بدون گرانول یا با گرانول اندک اما شبکه اندوپلاسمی صاف مشخص هستند (۲۶، ۲۲، ۶). حضور شبکه اندوپلاسمی صاف در سلول روشن و خشن در سلول تیره بیانگر عملکرد متفاوت این دو سلول است (۲۶، ۲).

کانالیکول‌های صفراوی کوچکترین جز سیستم صفراوی هستند که در بین دو هیپاتوسیت مجاور هم شکل می‌گیرند. صفرای موجود در این کانالیکول‌ها به مجراچه‌های صفراوی و سپس به مجاری بین لوبولی جریان می‌یابد (۲). در این مطالعه کانالیکول‌های صفراوی از روز ۵ شکل گرفته بودند و به تدریج بر وضوح و تعداد آن‌ها افزوده می‌شد. در کبد کبک چوکار نیز کانالیکول‌ها از روز ۵ قابل رویت بودند (۱۴). اما این اتفاق مخالف یافته‌های Karrer در سال ۱۹۶۱ و Doaa و همکاران در سال ۲۰۱۳ در جنین مرغ بود که در روز ۳ انکوباسیون کانالیکول‌ها را مشاهده کرده بودند (۵، ۱۶). هیپاتوبلاست‌هایی که در عمق پارانشیم کبد هستند تبدیل به هیپاتوسیت شده در حالی که هیپاتوبلاست‌های مجاور مزانشیم سپاهرگ پورت، تحت اثر القا به سلول‌های پوششی صفراوی تبدیل می‌شوند و مجاری صفراوی شکل می‌گیرند (۲۷). در کبد قرقاول مجاری صفراوی کوچک با اپیتلیوم مکعبی ساده در روز ۱۱ دوره انکوباسیون مشاهده شد. این اتفاق در کبد کبک چوکار در روز ۱۴ و در مرغ در روز ۱۵ گزارش شد (۵، ۱۴).

سلول‌های کوپفر برای اولین بار مشابه کبد کبک در روز ۸ دوره رویت شدند و در روز ۱۰ بر تعداد آن‌ها افزوده شد. Doaa و همکاران در سال ۲۰۱۳ سلول کوپفر را برای اولین بار در روز ۷ جنینی مرغ داندراوی گزارش کردند (۵).

ذخیره گلیکوژنی کبد توسط رنگ آمیزی پربودیک اسید شیف به صورت دانه‌های قرمز رنگ کاملاً واضحی درون سیتوپلاسم هیپاتوسیت‌ها، قابل مشاهده است. در تحقیقات مختلف برای زمان

تعداد مطالعاتی که به بررسی هیستوژنز کبد در پرندگان پرداخته‌اند زیاد نیست. در بین این مطالعات بیشترین بررسی مربوط به مرغ می‌باشد. Wong و Cavey، طی دو مطالعه جداگانه بر روی کبد جنین مرغ و با استفاده از میکروسکوپ نوری و الکترونی به بررسی نحوه شکل‌گیری و جزئیات سلولی کبد پرداخته‌اند. آن‌ها دریافتند که شکل‌گیری کبد از مرحله ۳۰ هامبرگر همیلتون شروع شده و در مرحله ۴۰ یا روز ۱۴ به پایان می‌رسد (۲۶، ۲۵). Doaa و همکاران در سال ۲۰۱۳ روند بافت‌زایی کبد مرغ داندراوی را مورد بررسی قرار دادند. نمونه‌ها در روزهای زوج دوره انکوباسیون جمع‌آوری و توسط میکروسکوپ نوری و الکترونی مطالعه شد. در این بررسی روند شکل‌گیری کبد از روز ۳ تا ۱۹ انکوباسیون مورد توجه قرار گرفت و عمده اتفاقات ریخت‌زایی کبد تا روز ۱۷ انکوباسیون به پایان رسید (۵). از معدود مطالعاتی که مراحل مختلف ریخت‌زایی کبد در سایر پرندگان بررسی شده است می‌توان به مطالعه Hashemnia و همکاران در سال ۲۰۱۵ اشاره کرد. در این مطالعه بافت‌زایی کبد کبک چوکار تا روز ۲۰ جنینی کامل شده بود (۱۴). اختلاف در روزهای شکل‌گیری در پرندگان مختلف به اختلاف در طول دوره انکوباسیون و یا اختلافات گونه‌ای مربوط می‌شود و این موضوع نشان می‌دهد که برای داشتن الگوی دقیق از شکل‌گیری اندام‌های مختلف در پرندگان، بررسی اختصاصی بر روی گونه‌های مختلف مورد نیاز است. در این تحقیق به عنوان اولین مطالعه بر روی بافت‌زایی کبد قرقاول، شکل‌گیری این ارگان از روز پنجم تا آخر دوره جنینی بررسی شد و مشاهده گردید که روند تکامل و بافت‌زایی کبد تا روز هجدهم دوره به اتمام می‌رسد.

در مطالعه حاضر، پارانشیم کبد جنین قرقاول در روزهای ابتدایی انکوباسیون دارای سلول‌های روشن فراوان بود. در این سلول‌ها مراحل مختلفی از تقسیمات میتوزی به خصوص در روز ۷ و ۸ دوره جنینی رویت شد. سپس در روز ۱۰ از مقدار سلول‌های روشن به شدت کاسته شد و تا روز ۱۲ به حداقل مقدار خود رسید. این نتایج دقیقاً مشابه مشاهدات Hashemnia و همکاران در سال ۲۰۱۵ در کبد کبک چوکار (۱۴) و همچنین همسو با نتایج مطالعه Doaa و همکاران در سال ۲۰۱۳ در کبد مرغ داندراوی بود که در آن از روز ۹ تا ۱۳ تعداد سلول‌های روشن کاهش یافت. این اتفاق را بیانگر تمایز سلول‌های تیره از روشن دانستند (۵). در حقیقت در مورد سلول‌های تیره و روشن در پارانشیم کبد نظریه‌های مختلفی وجود دارد. Ganot و Moses در سال ۱۹۶۸ اعلام کردند که سلول‌های روشن در واقع آرتیفکت‌های ناشی از فیکس به روش

جنین کبک کاهش واکنش PAS در روز ۱۴ در حد فاصل دو افزایش، یعنی روزهای ۱۳ و ۱۷ مشاهده شد (۱۴). علت دقیق این رویداد مشخص نیست. برخی محققین به ارتباط بین هماتوپوئز و تقسیم سلولی با ذخایر گلیکوژن اشار کرده‌اند (۲۶). به هر حال مطالعه حاضر نشان داد که برای اطمینان از صحت گزارش در مورد زمان شروع ذخیره گلیکوژن و همچنین کاهش یا افزایش آن در طول دوره باید تمام کبد در برش‌های سریالی مورد بررسی قرار گیرد.

به طور کلی در این تحقیق به عنوان اولین مطالعه بر روی روند بافت زایی کبد در جنین قرقاول، مشخص شد که زمان ظهور ساختارهای مختلف در آن با توجه به طول دوره انکوباسیون این پرنده، شباهت‌ها و تفاوت‌هایی با سایر پرندگان دارد. در طی این بررسی مشاهده گردید که روند تکامل و بافت‌زایی کبد قرقاول تا روز هجدهم دوره به اتمام می‌رسد.

### سپاسگزاری

بدین وسیله از حوزه پژوهشی دانشگاه‌های فردوسی و شهید باهنر کرمان که مشترکاً حمایت مالی این تحقیق را بر عهده گرفتند، سپاسگزاری می‌شود.

### تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

## References

1. Abdel-Moniem, M.E., Alam Edin, M.A., Abdel-Rahman, Y., El-Nady, F.A.M. (2000). Changes in the topography of the liver of one-humped camel during the prenatal life. *Assiut Vet Med J*, 44(87), 22-34.
2. Banks, W.L. (1993). *Applied Veterinary Histology*. (3<sup>rd</sup> ed.) Mosby Inc. Missouri, USA. p. 363-371.
3. Bellairs, R., Osmond, M. (2005). *The Atlas of Chick Development*. (2<sup>nd</sup> ed.) Elsevier Academic Press. London, UK.
4. Dadasheva, O.A., Gur'eva, T.S., Mednikova, E.I., Dadasheva, M.T., Sychev, V.N. (2011). Histogenesis of the liver of Japanese quail embryos developed in the conditions of microgravity. *Aviakosm Ekolog Med*, 45(2), 30-34. PMID: [21848212](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21848212/)
5. Doaa, M.M., Enas, A.E.H., Hassan, A.H.S., Fatma, A. (2013). Histogenesis of Liver of Dandarawi Chicken. *Am J Life Sci Res*, 1(2), 47-58.
6. Fancsi, T. (1982). Ultrastructural studies of the goose embryo liver. *Anat Histol Embryol*, 11(2), 138-146. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.1982.tb00929.x>
7. Fukuda, S. (1981). Hepatic induction in the avian embryo: Specificity of reactive endoderm and inductive mesoderm. *J Embryol Exp Morphol*, 63(1), 111-125.
8. Fukuda, S. (1979). The development of hepatogenic potency in the endoderm of quail embryos. *J Embryol Exp Morphol*, 52(1), 49-62.
9. Ganote, C.E., Moses, H.L. (1968). Light and dark cells as artifacts of liver fixation. *Lab Invest*, 18(6), 740-745. PMID: [4875607](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4875607/)
10. Gheri-Bryk, S., Gheri, G., Pacini, P. (1990). The development of the chick embryo gall bladder studied by scanning electron microscope. *Anat Anz*, 171(5), 297-305. PMID: [2088146](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2088146/)
11. Ghidoni, J.J. (1967). Light and electron microscopic study of primate liver 36 to 48 hours after high doses of 32-million-electron-volt protons. *Lab Invest*, 16(2), 268-286.
12. Godlweski, G., Gaubert-Gristol, R., Rowy, S. (1992). Liver development in rat during the embryonic period (Carnegie stages 11-14). *Acta Anat*, 144(1), 45-50. <https://doi.org/10.1159/000147284>
13. Hamburger, V., Hamilton, H.L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo, *J Morphol*, 88(1), 49-92. <https://doi.org/10.1002/jmor.1050880104>



14. Hashemnia, S., Shojaei, B. (2015). Liver Histogenesis in Chukar Partridge (*Alectoris Chukar*). *Anat Sci J*, 12(3), 129-135.
15. Herdson, P.B., Garvin, P.J., Jennings, R.B. (1964). Fine structural changes produced in rat liver by partial starvation. *Am J Pathol*, 45(2), 157-181. PMID: [14202518](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14202518/)
16. Karrer, H.E. (1961). Electron microscope observations on chick embryo liver: Glycogen, bile canaliculi, inclusion bodies and hematopoiesis. *J Ultrastructure Res*, 5(2), 116-141. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(61\)90009-0](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(61)90009-0)
17. Luna, L.G. (1968). *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. (3<sup>rd</sup> ed.) Mc Graw Hill Company, New York, USA.
18. McGeady, T.A., Quinn, P.J., FitzPatrick, E.S., Ryan, M.T. (2006). *Veterinary Embryology*. (1<sup>st</sup>ed.) Blackwell Publishing CO. Ames Iowa, USA.
19. Moustafa, M.N.K., Ahmed, M.G. (1995). Early embryonic development of the liver of dog. *J Anat*, 18(1), 35-53.
20. Richards, M.P., Poch, S.M., McMurtry, J.P. (2005). Expression of insulin-like growth factor system genes in liver and brain tissue during embryonic and post-hatch development of the turkey. *Comp Biochem Physiol A Physiol*, 141(1), 76-86. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.04.006>
21. Sadler, T. W. (2012). *Langman's medical embryology*. (12<sup>th</sup> ed.) Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.
22. Sandstrom, B., Westman, J. (1971). Ultrastructure of the developing chicken liver before hatching. *Z Zellforsch*, 117(4), 516-525.
23. Steiner, J.W., Baglio, C.M. (1963). Electron microscopy of the cytoplasm of parenchymal liver cells in  $\alpha$ -naphthylisothiocyanate induced cirrhosis. *Lab Invest*, 12, 765-790.
24. Van der Bie, G. (2001). *Embryology: early development from a phenomenological point of view*. Louis Bolk Institut. Netherlands. ISBN 90-74021-29-8.
25. Wong, G.K., Cavey, M.J. (1992). Development of the Liver in the Chicken Embryo: I. Hepatic cords and sinusoids. *Anat Rec*, 234(4), 555-567.
26. Wong, G.K., Cavey, M.J. (1993). Development of the Liver in the Chicken Embryo: II. Erythropoietic and granulopoietic cells. *Anat Rec*, 235(1), 131-143. <https://doi.org/10.1002/ar.1092350114>
27. Zorn, A.M., Wells, J.M. (2009). Vertebrate Endoderm Development and Organ Formation. *Ann Rev Cell Dev Biol*, 25, 221-251.