

دراسة نسجية للطرف الجناحي في جنين الدجاج بعمر عشرة أيام

زهراء صاحب الكعبي عبد الهادي صلال

كلية التربية للبنات، جامعة القادسية الكلية التقنية الطبية

حسين خضير

كلية التربية/جامعة القادسية

Gwama72@gmail.com

الخلاصة

أجريت الدراسة النسجية في مختبري التحضيرات النسجية في المعهد الفني/ الطبي/ كوفة ومستشفى الصدر التعليمي في النجف، تم استخدام ١٠ بيوض بعمر عشرة أيام المحضن في مفقس النجف الحديث (أبو صخير)، ثم أخرجت الأجنة لإخضاعها للإجراءات المخبرية، ثم لونت المقاطع النسجية

لوحظ في اليوم العاشر من العمر الجنيني أن عناصر هيكل الطرف البدائي قد استكملت ظهورها، وكانت أول هذه العناصر ظهوراً هو العضد Humerus ثم الزند Ulna والكعبرة Radius والمشط الرسغي Carpo-metacarpus والأصابع (الثاني، الثالث، الرابع). ظهرت منطقة التعظم Ossification zone الغنية بالأوعية الدموية وكانت الصفائح العظمية Bone lamellae مسطحة تحجز داخلها فجوات Lacunae تحوي الخلايا العظمية Osteocytes ولوحظ ان التعظم يبدأ في منطقة الغلاف الغضروفي Perichondrium، اصطففت الأنايبب العضلية Myotubes حول الغضروف الجنيني تعلوها الخلايا المولدة للعصلات كما لوحظ زيادة سمك الجلد وانتشار البراعم النامية باتجاه أمامي- خلفي Anterior-Posterior بشكل واسع في المنطقة الظهرية منه وقد انغمدت البشرة في معظمها عند قواعد البراعم مكونةً خندق دائري يعرف بالجريبات الريشية Feather follicles والتي تبدأ بشرتها بالتفالج مكونةً ما يسمى بحيود الاسلات Barb ridges.

الكلمات المفتاحية: الاطراف الاساسية، جنين الدجاج، مراحل التطور.

Histological Study of Wing Limb in Chick Embryos at Ten Days Age

Abstract

This study was investigated in the lab of histological preparations of technical institute / Kufa laboratory medical dept. and Al-Sadr hospital in Najaf., ten eggs of chicken were collected, from Al Najaf Alhadeeth hatchery (Abu Sakhir). Ten eggs were hatched for 10 days . Samples of embryos limbs were removed and subjected to histological procedures and used three different stains:

The results of current histological study showed that the embryonic limb at the age of the tenth days embryonic stage, that elements of rudiment skeletal in the limb has completed its appearance, and was the first of these is the Humerus then Ulna , Radius , Carpo-metacarpus and fingers (II, III, IV), ossification zone is rich in blood vessels and bone lamellae flat contains osteocytes within lacunae, it was noted that the ossified begins in perichondrium, and lined Myotubes surrounded the embryonic cartilage topped by myogenic cells, the skin increased of thickening in addition to distribution of large number of anterior- posterior orientation long feather buds where their bases begin to sink creating a circular moat. "Moat" becomes feather follicles. Epidermis of which forms ingrowing thickenings where barb ridges start to form.

Key words: Basic limbs, chicken embryo, stages of evolution.

المقدمة Introduction :

يُعدُّ أجنة الطيور من الحيوانات التي لها أهمية في دراسة علم الأجنة و في زراعة الانسجة و تطعيمها بين الأنواع و إنتاج مخلوقات الكايميرا Chimera (دمج الأجنة) والتي تعني خلط خلايا من أكثر من جنين واحد في اطوار مبكرة من النمو الجنيني. استفاد العلماء من خلالها في معرفة الخارطة المصيرية Fat map للقرص الاريمي (Wolpert *et al.*, 1998) .

حازت دراسة نشوء وتطور اطراف الأجنة على اهتمام الكثير من الباحثين في علم الأجنة ولاكثر من ستين عاما نفذت الكثير من الدراسات الجينية التجريبية التي أدت الى بروز اكتشافات حددت الخطوط العامة، والتي لاتزال أساسية لاجراء تجارب جديدة وبتقنية حديثة لاستيعاب الأسس الجزيئية لتطور الطرف، هذه التجارب وضعت دراسة تطور الطرف في مكان متميز شجع العلماء على البحث والنقصي وكشف الغموض عن أنماط نمو البرعم الطرفي أمثال جون ساندرز John Sanders، جون فالون John Fallon ولويس ولبرت Lewis Wolpert (Towers and Tickle, 2009). يبدأ تخلق الطرف الجناحي متأخراً نسبياً بالنسبة لنشأة باقي الأعضاء الداخلية وبالرغم من أنه يبدو تركيب بسيط ولكنه يحوي معلومات داخلية كافية لكي توجه نموه وتنظم تطوره، لذلك أصبح من الممكن نقل البرعم الجناحي وزرعه في أي منطقة أخرى من جسم الجنين أو نقله لكائن حي آخر، ويحدث ذلك بسبب ان معظم الإشارات الجزيئية molecular signals المهمة في نشأة تطور البرعم وتحفيز أنسجته على النمو والتمايز تكون موضعية ضمن البرعم الطرفي نفسه (Tickle,2004) ولذلك كان الهدف من الدراسة الحالية: متابعة نمو الطرف الجناحي وتطوره في اليوم العاشر من عمر الجنين نسجياً وقياس طول وسمك كل من الطرف الجناحي وعضده .

المواد والطرائق Materials and Methods

المواد Materials :

أجنة الدجاج Chicken embryos

تم جمع عشرة بيوض من دجاج الليكهورن الأبيض White Leghorn عمرها عشرة أيام من حاضنات مفقس النجف الحديث (أبو صخير)، أخرجت الأجنة لإخضاعها للإجراءات المختبرية، أجريت الدراسة النسجية في مختبر التحضيرات النسجية في المعهد الفني الطبي/ كوفة ومستشفى الصدر التعليمي واستغرقت مدة الدراسة أربعة اشهر من تاريخ ١٠/٩/٢٠١٥ ولغاية ١٠/١/٢٠١٦ .

الدراسة النسجية Histological Study :

اتبعت طريقة Al-hajj (١٩٩٨) لأغراض الدراسة النسجية، إذ غسلت عينات اجنحة الأجنة بالمحلول الملحي لكوريد الصوديوم (0.9%) بعد ان قطعت بواسطة مقص تشريح من الأجنة المتحصل عليها من البيوض، وضعت بعدها في مثبت الفورمالين (١٠%) لمدة ٤٨ ساعة بعدها غسلت في ماء الحنفية الجاري لمدة ١٢ ساعة بغية التخلص من المثبت، ثم نكزت العينات Dehydration وذلك بتمريرها بسلسلة من التراكيز المتصاعدة من الكحول الايثيلي (٧٠%، ٨٠%، ٩٠%، ٩٥%، ١٠٠%) ولمدة ساعتين في كل منها ثم روقت Clearing باستخدام الزايلين لمدة (1-1.5) ساعة ثم شربت Infiltration بشمع البرافين

المنصهر بدرجة (56 – 58 م) ولمدتين (1 – 1.5 ساعة/ مرة)، وأخيراً طمرت Embedding الأنسجة في شمع البرافين المنصهر وتركت لتتصلب، بعدها قطعت العينات بواسطة جهاز المشرح الدوراني Rotary Microtome وبسمك 5 مايكرومتر، سطحت المقاطع بدرجة حرارة (40- 45م) بحمام مائي وثبتت النماذج على شرائح زجاجية باستعمال لاصق آح ماير Meyer's albumin، قسمت الشرائح النسجية ثلاث مجاميع لغرض استخدام الطرق التلوينية التي اعتمدت في الدراسة الحالية لغرض الدراسة النسجية.

الطرق التلوينية المستخدمة:

أ- طريقة الهيماتوكسولين – ايوسين Harris Haematoxylin – Eosin method.

ب - طريقة ماسون ترايكروم Masson's Trichrome method

ج - طريقة التلوين المزدوج Double staining method .

أنجزت الطرائق التلوينية، حملت المقاطع Mounting بالـ DPX وغطيت بالغطاء الزجاجي Cover slip، وبعدها فحصت باستعمال المجهر الضوئي نوع Olympus تحت قوة تكبير (x10 ، x40) لتحديد التغيرات النسجية في نسيج البرعم الطرفي وصورت المقاطع باستخدام كاميرا سوني.

التحليل الإحصائي Statistical Analysis :

لدعم الدراسة النسجية في متابعة التطورات الجنينية في الطرف الجناحي لأجنة الدجاج في العمر الجنيني المحدد في الدراسة الحالية، أجريت دراسة احصائية لقياس طول البرعم الطرفي بواسطة القدمة Vernea وقياس سمك وطول العضد وذلك باستخدام المصغرين العيني والمسرحي Ocular and stage micrometer لمعايرة المجهر واخذ القياسات المطلوبة (Galigher and Kozloff, 1964).

أخذت القياسات لكل جنين حيث اختيرت عشرة أجنة، تم قياس طول كل الطرف الجناحي والعضد البدائي وسمكهما. حللت نتائج الدراسة الحالية باستخدام البرنامج الإحصائي SPS ، حيث استخدم اختبار T- (test) وطريقة تحليل التباين ذي الاتجاهين (Two way ANOVA) وتحليل الارتباط Correlation.

النتائج Results

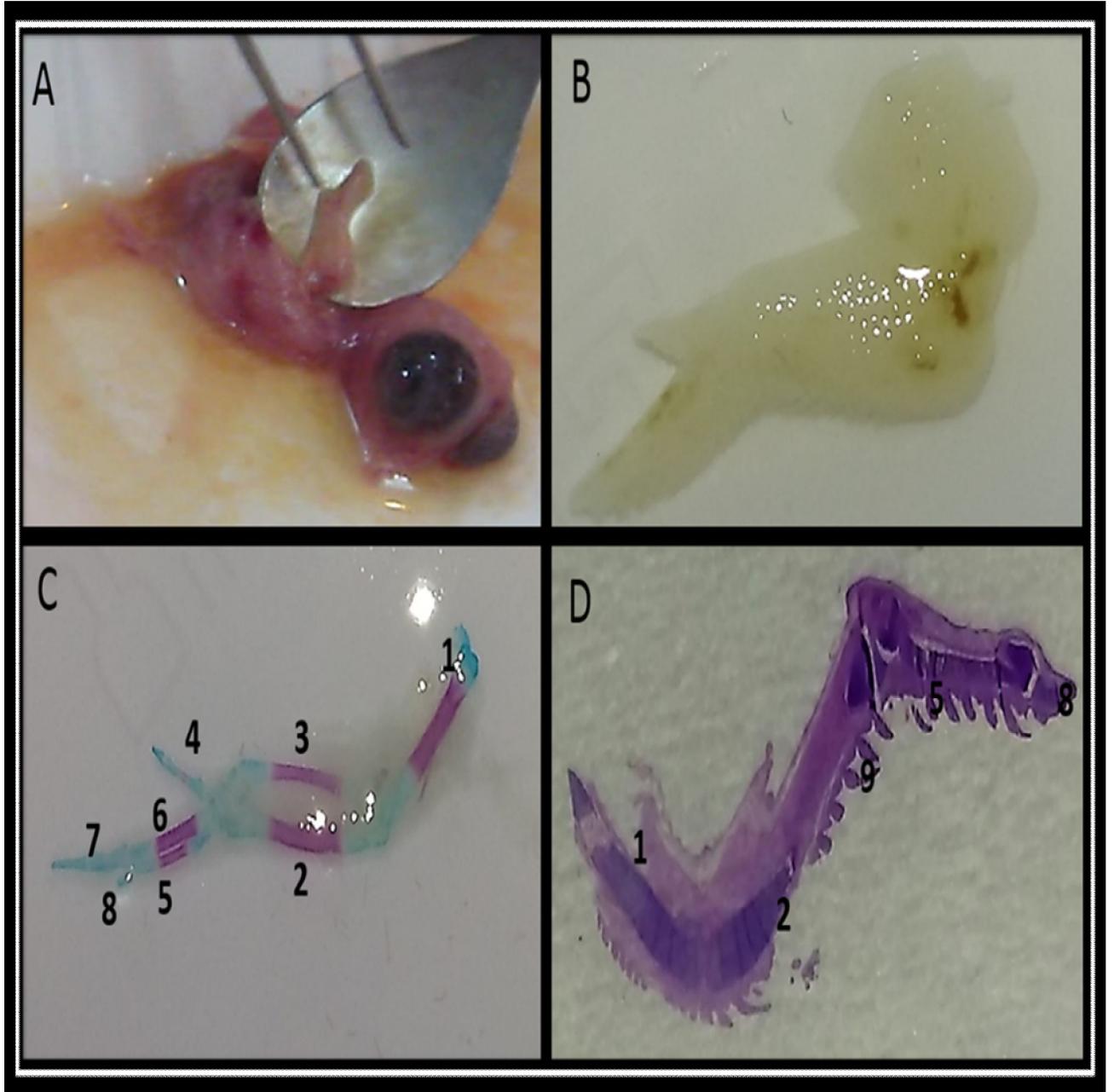
أوضح الفحص العياني للجنين في عمر عشرة أيام (اللوحة 1A,B)، أن طول وسمك الطرف الجناحي بلغ (10 ± 0.35) و (5 ± 0.5) ملليمتر على التوالي، (جدول ١)، ولوحظ أن الهيكل البدائي للطرف قد ظهر فيه التعظم بشكل واضح مع طريقة التلوين المزدوج (اللوحة 1C)، حيث ظهر باللون الأحمر في العضد الذي بلغ طوله وسمكه (5 ± 0) و (0.8 ± 0.12) ملليمتر على التوالي، ويظهر التعظم في عناصر الهيكل البدائي الأخرى (الزند، الكعبرة والمشط الرسغي) أما الأصابع (الثاني، الثالث، الرابع) فهي تقريباً خالية من التعظم في هذه المرحلة العمرية وكذلك يظهر التعظم في العضد بشكل منطوقه بيضاء في المقطع النسجي الكامل للطرف الجناحي مع ملونة الهيماتوكسولين – ايوسين (H&E)، ولوحظ وجود جريبات ريشية لم تكن ظاهرة بصورة واضحة في الفحص العياني للجنين (لوحة 1D) .

بينت نتائج الدراسة النسجية للطرف الجناحي ان منطقة التعظم كانت تقطع الغضروف الجنيني في عناصر الهيكل البدائي الى جزئين وتكون هذه المنطقة غنية بالأوعية الدموية، وتقتنع فراغاتها صفائح عظمية Bone lamellae مسطحة تحجز داخلها فجوات Lacunae تحوي الخلايا العظمية Osteocytes، ولوحظ أن التعظم يبدأ في منطقة الغلاف الغضروفي Perichondrium حيث تكون أكثر اتساعاً وتسطح (لوحة 1A،B)، تظهر اللوحة (2C)، اصطفاف الأنابيب العضلية Myotubes حول الغضروف الجنيني تغلونها الخلايا المولدة للعضلات التي تمايزت من الخلايا الميزنكيمياية ويظهر الجلد في المناطق غير المريشة مكوناً من بشرة وأدمة مستمرة بالنمو والانتساع، ولوحظ زيادة سمك الجلد وانتشار البراعم الريشية في المنطقة المريشة من الطرف الجنيني، وفي مقطع طولي لبرعم ريشي طويل (لوحة 2D)، ظهرت البشرة وقد ازدادت صفوف خلاياها بسبب سرعة تولدها وتحيط بالتكثف الأدمي الغني بالأوعية الدموية، ويبدو منحرف نحو الخلف بسبب النمو الامامي- الخلفي وفي الوقت نفسه انغمدت قاعدته داخل الأدمة لتدخل مرحلة الجريبة الريشية علاوة على ذلك ظهرت فيها البشرة وهي تعاني من انقسام في بعض المناطق مما يؤدي إلى تكوين ما يسمى بحيود الاسلات Barb ridges، ولوحظ غزارة التجهيز الدموي والكثافة العالية للألياف الميزنكيمياية والخلايا الميزنكيمياية في منطقة الأدمة تحت البراعم، في حين تكون الأدمة مفككة وقليلة المكونات في المناطق الخالية من البراعم الريشية (اللوحة 2C) .

ظهر الغلاف الغضروفي مع ملونة ماسون ترايكروم يحيط بالغضروف وقد تلون باللون البني الغامق تحيط به مجموعة كبيرة من الخلايا المولدة للعضلات والأنابيب العضلية الملتحمة مع بعضها (اللوحة 3A)، وتظهر اللوحة (3B)، غضروف جنيني طور التكوين وتظهر الخلايا الغضروفية كروية الشكل ذات نواة مركزية متلونة باللون الأحمر يحيط بها قالب غضروفي ذو لون اخضر براق، وكما هو ملاحظ يحيط به من الخارج خلايا متباعدة هي الخلايا المولدة للغضروف Chondroblasts تستعد للتمايز، تظهر اللوحة (3C)، برعم ريشي قصير تتوضح فيه البشرة تحيط بالتكثف الأدمي المزدهم بالخلايا الميزنكيمياية ذات لون احمر غامق ، ولوحظ امتداد أوعية دموية طويلة في الجلد بين البراعم الريشية يقوم بتجهيز البراعم الريشية بالدم اللازم لنموها وتطورها (اللوحة 3D) .

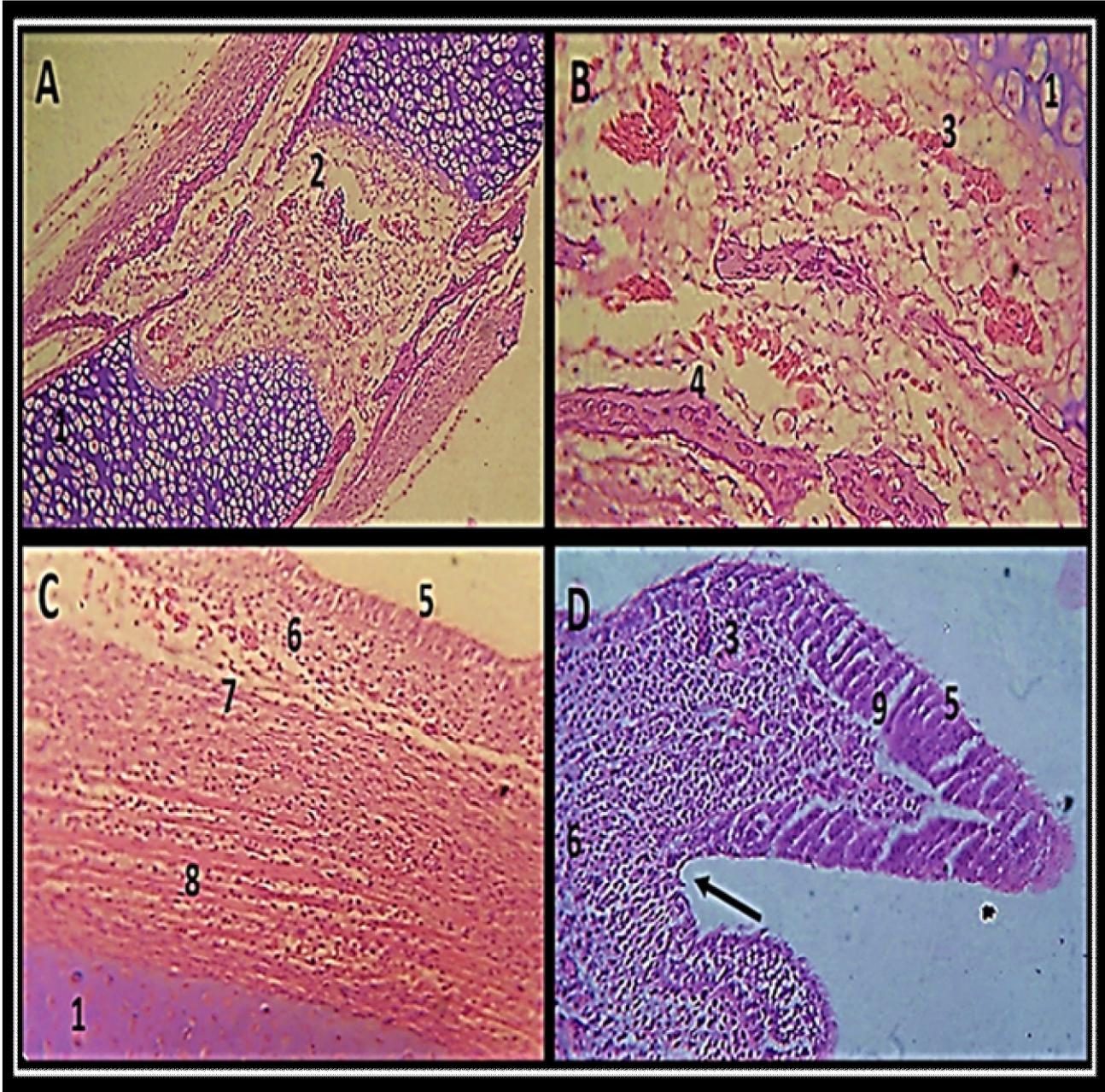
جدول (١) العلاقة بين معدلات الطول والسمك لكل من الطرف الجناحي والعضد البدائي

معدل الطول ± الانحراف القياسي (مليمتر)	معدل السمك ± الانحراف القياسي (مليمتر)	
10± 0.35	5±0.5	الطرف الجناحي
5±0	0.8±0.12	العضد البدائي



اللوحة (١) الطرف الجناحي في اليوم العاشر من عمر جنين الدجاج

- A - جنين دجاج عمره عشرة أيام .
B - طرف جناحي بعد التثبيت .
C - ١- العضد، ٢- الزند، ٣- الكعبرة، ٤- الاصبع الثاني، ٥، ٦- المشط الرسغي، ٧- الاصبع الثالث، ٨- الاصبع الرابع.
(Double stain)
D - مقطع نسجي للطرف الجناحي، ٩- جريبات ريشية . (H&E)



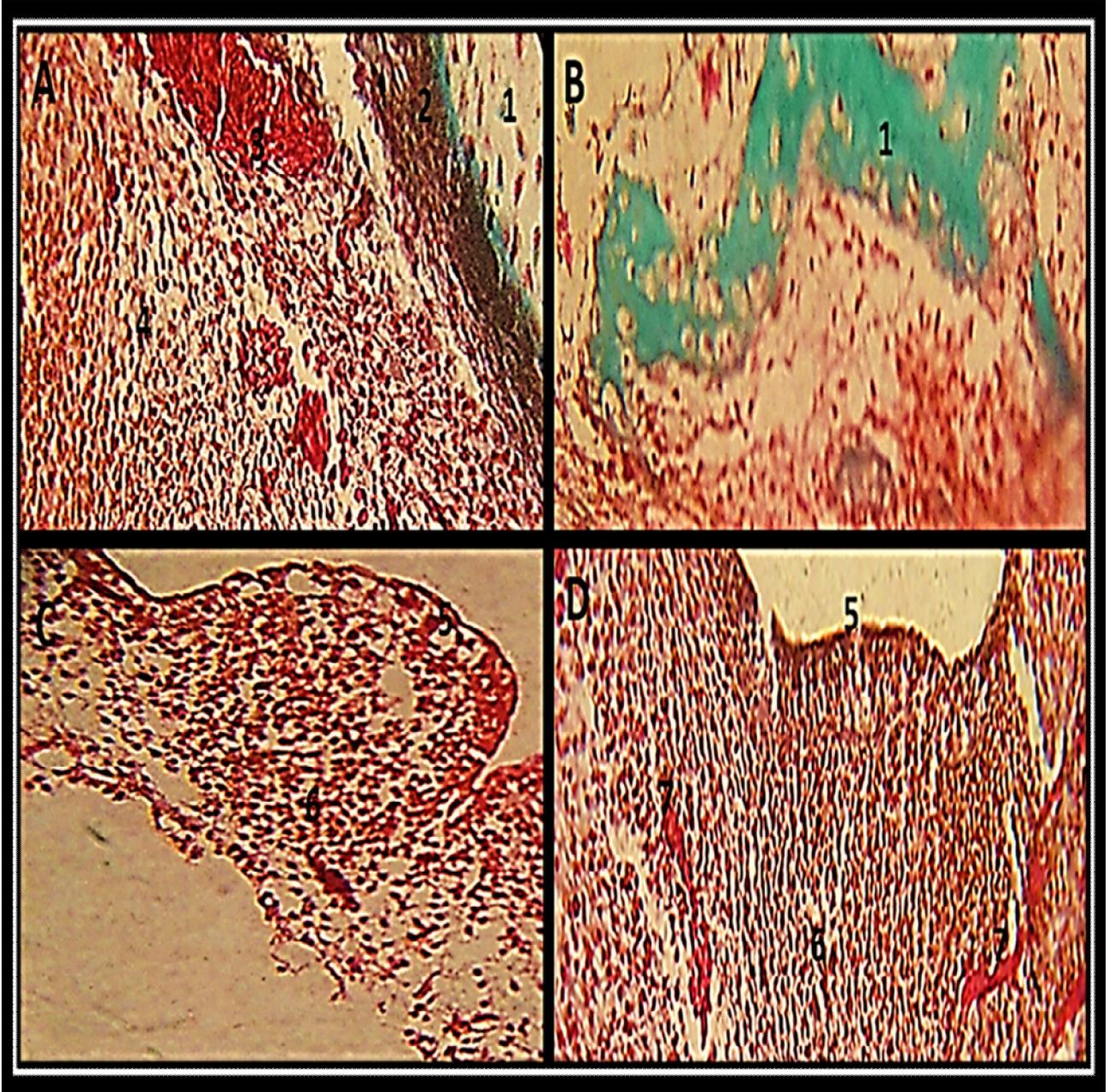
اللوحة (٢) الطرف الجناحي في اليوم العاشر من عمر جنين الدجاج (H&E)

A - ١- غضروف جنيني، ٢- منطقة التعظم . (X100)

B - ٣- وعاء دموي، ٤- صفيحة عظمية. (X400)

C - ٥- جلد غير مريش، ٦- البشرة، ٧- الأدمة، ٨- خلايا مولدة للعضلات، ٩- الأنابيب العضلية . (X400)

D - برعم ريشي طويل يظهر فيه الانغماد داخل الأدمة (السهم)، ٩- حيود الاسلات. (X400)



اللوحة (٣) الطرف الجناحي في اليوم العاشر من عمر جنين الدجاج (Massons Trichrome,X400)

- A - ١- غضروف جنيني، ٢- الغلاف الغضروفي، ٣- أنابيب عضلية، ٤- خلايا مولدة للعضلات .
B - غضروف جنيني في طور التكوين .
C - برعم ريشي قصير، ٥- البشرة، ٦- الأدمة.
D - جلد بين البراعم الريشية ، ٧- أوعية دموية.

المناقشة Discussion

بينت نتائج الدراسة في هذه المرحلة العمرية ظهور التعظم في عناصر الهيكل البدائي للطرف الجناحي، ويظهر التعظم بالعضد وفي عناصر الهيكل البدائي الأخرى (الزند، الكعبرة والمشط الرسغي)، أما الأصابع (الثاني، الثالث، الرابع) فهي تقريباً خالية من التعظم في هذه المرحلة العمرية وقد اتفقت الدراسة الحالية مع الكثير من الدراسات التي تشير إلى تجلي ظاهرتين على مستوى التطور النسيجي في هذا العمر الجنيني ناتجة عن الانقسامات السريعة والتمايز في خلايا عناصر الهيكل البدائي للبرعم الطرفي نتج عنه ظهور التعظم داخل العناصر الغضروفية عند منتصف العمد البدائي، والظاهرة الثانية هي تشكل سلاميات الأصابع الغضروفية (Suzuki, 2013; Sawad *et al.*, 2009; Tabin and McMahon, 2008)، وقد وصف الباحث Alder (٢٠٠٠) التعظم بدقة وذكر أن العظم في بداية تكوينه يكون نسيج غير ناضج، غير منظم يتألف من الياف غراوية، يحتوي كذلك على خلايا عظمية، وأن هذا النسيج يعد عظم مؤقت Temporary bone ويتحول أثناء التطور والنمو الجنيني إلى صفائح عظمية Lamellar bone، وأضاف Sawad *et al.* (٢٠٠٩) أن التعظم أو التكلس الذي يحصل في عظام أجنة الطيور خصوصاً عظام الأطراف هو من نوع التعظم داخل الغضروفي Intrachondral calcification، الذي يبدأ من مركز العظام ويمتد باتجاه النهايات الدانية و القاصية لعظام الأطراف، وتبقى هذه المناطق الغضروفية فاصلة ما بين عمد العظم واطراف العظام الذي يطلق عليه (متحول العظم Metaphysis)، أما نهايات العظام فتغطي بغضروف زجاجي تمفصلي Articular cartilage، وأشار الباحث Schepelmann (١٩٩٠) أن هيكل أجنة الطيور ناجم من تكوين الغضروف الذي يتعظم بالتعاقب خلال تقدم الجنين بالعمر أثناء المراحل التطورية، وفي هذه الحالة يطلق على هذا النوع من العظام بالعظام الغضروفية Cartilage bones، وعلى النقيض فان العظام المسطحة الغشائية تستمد تعظمها مباشرة من أنسجة الأديم المتوسط وقد جاء وصف الباحثين أعلاه متفقاً مع ما توصلت إليه الدراسة الحالية.

ظهر واضحاً في الفحص النسيجي للبراعم الريشية وقد وصفها الباحث Chuong *et al.* (1996) إنها تراكيب غير مستقرة وسرعان ما تتحول إلى نتوءات بارزة من الجلد وتعد بداية الريشة البدائية لتستمر بالنمو والارتفاع لتكوّن الجريبات الريشية وقد بين الباحث Wang *et al.* (1999) أنها تتحرف لتتخذ نمواً مختلفاً يسمى النمو الأمامي- الخلفي جاعلةً البرعم يتجه نحو الخلف بالإضافة إلى النمو الأدنى- الأقصى الذي يزيده طولاً، وقد ظهر حيد الأسلة المتكونة في البراعم التي إنغمدت إلى داخل الأدمة لتكوين الجريبات الريشية وهذا ما أكدته الكثير من الباحثين إذ أوضحوا أن هاتين الظاهرتين يتزامن حدوثهما في هذه المرحلة من النمو الجنيني للجلد (Harris *et al.*, 2002; Dhoully, 1975). كما أكد Sengel (١٩٧٦) خلايا البشرة للبراعم الريشية في عمر عشرة أيام يحصل فيها توالداً سريعاً يؤدي إلى زيادة كبيرة في سمك البشرة ولكنها سرعان ما تتشقق لتكوين حيود الاسلات .

References

- Al-hajj, H.,1998, Light microscopic techniques, theory and practice. 1st.Ed.Jordan book center, Amman- Jordan.
- Alder, C., 2000, Bone and bone tissue. Normal anatomy and histology in bone disease. Sp. Verlag. Berlin. Heidberg. NewYork. P:1-30
- Chuong, C., Widelitz, R., Ting-Berreth, S., and Jiang, T.,1996, Early events during avian skin appendage regeneration: Dependence on epithelial mesenchymal interaction and order of molecular reappearance. J. Invest. Dermatol. 107:639 – 646.
- Dhouailly, D., 1975, Formation of cutaneous appendages in dermal epidermal recombinations between reptiles, birds, and mammals. Wilhelm Roux. Arch. Dev. Biol., 177: 323 – 340 .
- Harris, M., Fallon, J., and Prum, R., 2002, Shh-Bmps signaling module and the evolutionary origin and diversification of feathers . J. EXP. Zool .294: 160 – 76.
- Galigher, A. and Kozloff, E., N.,1964, Essential practical micro-technique, Lea & Febiger. United states of America.
- Sawad, A., Balsam, A., and Anwar, N., 2009, Morphological study of the skeleton development in chick embryo (Gallus domesticus).International Journal of Poultry Science;8:710-714.
- Schepelmann, K .,1990, Erythropoietic bone marrow in the pigeon : development of its distribution . Comparative Hematology Inter.; 9:193-197.
- Sengel, P.,1976, Morphogenesis of skin . In Developmental and Cell Biology Series, Cambridge University. Press, Cambridge .second edition.
- Suzuki, T., 2013, How is digit identity determined during limb development? Dev Growth Differ. ; 55 :130-8.
- Tabin, C. J. and McMahon, A. P., 2008, Developmental biology. Grasping limb patterning. Science 321,350 -352.
- Tickle, C., 2004, The contribution of chicken embryology to the understanding of vertebrate limb development. Mechanisms of Development 121: 1019–1029.
- Towers, M., and Tickle, C., 2009, Growing models of vertebrate limb development. Development 136, 179-190 .
- Wang, W., Widelitz, R., Jiang, T., and Chuong, C. M.,1999, Msx-2 and the regulation of organ size: epidermal thickness and hair length. J. invest. Dermatol. Symp. Proc. 4(Suppl3): 79 – 82 .
- Wolpert, L., Beddington, R. Brockes, J., Jessell, T., Lawrence, P. and Meyerowitz, E., 1998, Principles of Development Oxford press .NY.