

دو فصلنامه هیستوبیولوژی دامپزشکی

دوره نهم شماره شش بهار و تابستان ۱۴۰۰

## مطالعه هیستوآناتومی و بیان ژن S-100 در بیضه بلدرچین ژاپنی

رامین جهانگیرفرد\*

۱. دانش آموخته دکترای تخصصی آناتومی و جنین‌شناسی مقایسه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

### چکیده:

بیضه یکی از مهمترین و حساس‌ترین بافت‌های بدن محسوب می‌شود. نقش اصلی بیضه تولید اسپرم و هورمون‌های جنسی از جمله تستوسترون است. تاکنون تحقیقاتی در زمینه رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی پروتئین S-100 در بافت بیضه بلدرچین نر ژاپنی انجام نشده است. هدف از این مطالعه بررسی توپوگرافی، ساختار بافت شناسی و استقرار پروتئین S-100 در بافت بیضه بلدرچین ژاپنی است. در این تحقیق، تعداد ۸ قطعه بلدرچین نر ژاپنی در سن ۳۶ روزگی با میانگین وزنی ۱۹۶ گرم با شرایط نگهداری و تغذیه یکسان، انتخاب شدند. بیضه‌ها از بدن خارج گشته و بعد از طی مراحل پاساژ بافتی جهت بررسی پروتئین S-100 و بافت شناسی در زیر میکروسکوپ نوری مطالعه شد. آنالیز داده‌ها در سطح ۵ درصد با استفاده از روش T-test استفاده شد. نتایج هیستوآناتومی نشان داد که بیضه سمت راست در بلدرچین ژاپنی کاملاً لوبیایی شکل بوده اما بیضه سمت چپ کروی شکل است. در نتایج بافت شناسی کاهش شدید بافت بینابینی بیضه در برخی از نمونه‌ها و همچنین وجود ۱۰-۱۲ لایه سلولی در دیواره لوله‌های اسپرم‌ساز مشاهده شد. در مطالعه حاضر، استقرار پروتئین S-100 در بافت بیضه بلدرچین ژاپنی مشاهده نگردید. نتایج این پژوهش نشان داد که ساختار بافت بیضه از نظر توپوگرافی و بافت‌شناسی در اساس مشابه با سایر پرندگان است با این تفاوت که بیضه سمت راست کاملاً لوبیایی شکل مشاهده گردید. در مطالعات بافت شناسی بیضه بافت همبندی بینابینی مشهود بود. در بررسی رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی بیضه پروتئین S-100 در ساختار لوله‌های اسپرم‌ساز، سلول‌های جنسی، سلول لیدینگ، بافت بینابینی، لوله‌های مستقیم و شبکه بیضه مشاهده نشد.

واژگان کلیدی: ایمونوهیستوشیمی، بلدرچین، بیضه، بیان ژن

مقدمه:

بلدرچین ژاپنی (*Coturnix Coturnix Japonica*) کوچکترین پرنده از خانواده قرقاول است. بلدرچین پرنده‌ای با ویژگی‌های عملکردی نظیر سرعت رشد نسبی زیاد، دومنظوره بودن (گوشت و تخم)، سن بلوغ جنسی پایین (نر: ۳۰-۳۵ روزگی و ماده: ۳۷-۴۲ روزگی)، میزان تخمگذاری بالا (۲۵۰ تا ۳۰۰ تخم در یک دوره تولید)، فاصله نسلی کم، دوره انکوباسیون کوتاه (جوجه‌کشی ۱۷ روزه)، تراکم بالای پرورش در واحد سطح (۸ تا ۱۰ بلدرچین معادل فضای لازم برای یک مرغ)، مقاوم به بیماری‌ها (هزینه کمتر واکسیناسیون و درمان)، کیفیت بالای محصولات (گوشت و تخم) و بازارپسندی مناسب، برگشت سریع سرمایه و راه‌اندازی تجاری آسان پرورش و تولید (زمین و سرمایه‌گذاری اولیه اندک) است (۲۷، ۳۰). پرنده نر دارای غدد جنسی به نام بیضه‌ها است. هر دو بیضه در جایگاه تکاملی خود در حفره شکمی زیر ستون فقرات قرار گرفته‌اند (۳۵). سطوح آناتومیکی بیضه‌ها و مجاری تناسلی خروس در مطالعات قبلی بیان شده‌اند (۴، ۱۹، ۲۱) و مطالعات میکروسکوپی آن نیز گزارش شده است (۳-۲). بیضه‌ها در کیسه‌ی احشایی- صفاقی در ارتباط با پیش معده، کبد و بخش‌هایی از روده قرار دارند. از سمت میانی نیز با آئورت و ورید اجوف خلفی تماس دارند (۲۹، ۳۲، ۳۴). بیضه‌ها به لوب‌های راست و چپ سطح احشایی کبد متصل بوده (۳۱، ۳۳) و با کیسه‌های هوایی سینه‌ای قدامی، خلفی و شکمی نیز در ارتباط هستند. این اعضاء از لبه میانی خود به وسیله چین صفاقی کوتاهی به نام مزورکیوم (که رگهای

خونی و عصب‌ها را حمل می‌کند)، به سستی به دیواره پشته‌ی شکم چسبیده‌اند (۱۳، ۱۸). تولیدمثل پرندگان تحت تأثیر عوامل خارجی مانند بارش باران، رطوبت، دما و خوک و همچنین عوامل داخلی دچار تغییرات می‌شود (۱۲، ۲۶). بیضه‌ها لوبیایی شکل و یا تخم مرغی شکل بوده و به ویژه در پرندگان وحشی و در گونه‌های اهلی شده از نظر اندازه، تابع تغییرات دوره‌ای با چرخه‌های جنسی هستند (۳۳). بیضه‌های خروس در خلال دوره‌ی جنسی ۳۵-۶۰ mm طول و ۲۵-۳۰ mm قطر دارد. بیضه راست در غاز نر در خلال دوره‌ی جنسی دارای ۱۱-۲۰ mm طول و ۸-۱۷ میلی متر قطر است. در حالی که بیضه چپ آن ۳۲-۱۶ mm طول و ۹-۲۱ mm قطر دارد. لازم به ذکر است که تغییرات فزاینده و پس رونده بر لوله‌های اسپرم ساز بیضه اثر می‌گذارند. رنگ بیضه‌ها در خلال مرحله استراحت زرد تا سفید مایل به خاکستری بوده و در مرحله فعالیت تقریباً سفید خالص است (۳۵). بیضه‌ها در لایه سپید پرده‌ی فیبروزی محصور شده و از خارج نیز این لایه با صفاق پوشیده شده است. رشته‌های ظریف بافت همبندی به داخل بیضه‌ها نفوذ کرده ولی تیغه حقیقی را تشکیل نمی‌دهند. در مطالعات آناتومیکی یک زائده فرعی کیسه مانندی مابین مجرای دفران و اپی‌دیدیم دیده شده است. این زائده از قسمت پایینی با اپی‌دیدیم و از سطح جانبی با کلیه‌ها در ارتباط است. لازم به ذکر است که این زائده در پرندگان معادل دم اپی‌دیدیم در پستانداران می باشد (۳۳). تحقیقات در اردک مسکویی نشان داده است که بعد از هج شدن

سلول‌های سرتولی لوله‌های منی ساز گاو وجود دارد (۵). لذا هدف از این مطالعه، بررسی ساختارهای آناتومیکی، موقعیت توپوگرافیکی و بافت‌شناسی بیضه همراه با استقرار پروتئین S-100 در بلدرچین نر ژاپنی است.

### مواد و روش کار

در این مطالعه ۸ قطعه بلدرچین ژاپنی نر بالغ ۳۶ روزه از مزرعه تحقیقاتی پرورش بلدرچین گروه علوم دامی دانشگاه ارومیه تهیه و به سالن تشریح دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه منتقل شدند. برای کالبدگشایی و انجام مطالعات ریخت‌شناسی، تمامی پرنده‌ها آسان کشی شدند و از سطح پشتی روی سینی کالبدشناسی قرار گرفتند. پس از کنار زدن پوست ناحیه بطنی، عضلات شکمی از جوانب بریده شدند تا اینکه تمامی امعاء و احشاء حفره بطنی نمایان شدند. پس از انجام کالبدگشایی، بررسی و ارزیابی اولیه کالبد شناسی از نظر اندازه، مجاورت با سایر اعضا، رنگ و شکل بیضه در محل اصلی خود در حفره بطنی صورت گرفت و تصاویر مورد نیاز گرفته شد. برای مطالعه بافتی، سه نمونه از بافت بیضه به صورت تصادفی انتخاب و جهت ثبوت، به مدت ۷۲ ساعت در داخل محلول فرمالین ۱۰٪ تازه تهیه شده قرار داده شدند. مراحل معمول پاساژ بافتی شامل مرحله آگیری نمونه‌ها بود که با استفاده از غلظت‌های صعودی اتانول (الکل‌های ۶۰٪، ۷۰٪، ۸۰٪، ۹۰٪ و الکل مطلق) صورت گرفت و شفاف کردن نمونه‌ها توسط روغن صدر و گزلیل انجام پذیرفت. برای مرحله آغشتگی، از پارافین سخت با درجه ذوب ۵۶ الی ۶۰ درجه سانتی گراد استفاده شد. بعد از اتمام مراحل مختلف پاساژ بافتی، قالب‌های پارافینی تهیه شده و توسط دستگاه میکروتوم

پرنده، دو نوع سلول در دیواره لوله‌های اسپرم ساز به نام سلول‌های سرتولی و سلول‌های اسپرماتوگونی وجود دارد (۸)، (۱۷). در اپی‌تلیوم لوله‌های اسپرم ساز به طور میانگین ۱۲-۱۰ لایه سلولی دیده شده است. در پستانداران عروق خونی و اعصاب بیضه از کپسول بیضوی وارد و سپس خارج می‌شوند. تیغه همبندی از لایه داخلی کپسول وارد بیضه شده و انشعاب پیدا می‌کند اما چنین تیغه همبندی در پرندگان وجود ندارد. همچنین، بافت همبند مخاطی در بیضه تمام پستانداران وجود دارد در حالی که در برخی از پرندگان دیده شده است (۶، ۲۵، ۲۶). شبکه نیلوفری یا درهم پیچیده وریدهای بیضوی در پستانداران واضح و مشخص است اما در پرندگان این شبکه وجود ندارد (۳۳). پروتئین S-100 یک پروتئین اسیدی که اولین بار از سلول‌های گلیال اعصاب مرکزی و سلول‌های شوان اعصاب محیطی مغز پستانداران جداسازی شده است (۲۰). این پروتئین متعلق به خانواده پروتئین‌های اتصالی Ca از جمله کالمودولین و تروپونین C است. Michetti و همکاران در سال ۱۹۸۵ وجود پروتئین S-100 در بافت بیضه از جمله سلول‌های لیدینگ و اندوتلیال لنفاوی را در موش صحرائی گزارش کردند. همچنین نشان دادند که پروتئین S-100 در بیضه از نظر ایمونولوژی مشابه با پروتئین S-100 مغز است. همچنین این محققان دریافتند که تخمدان موش‌های بالغ نیز به پروتئین S-100 واکنش منفی نشان می‌دهد و در نتیجه این پروتئین مخصوص ژن‌های جنس نر است (۲۸). Amselgruber و همکاران در سال ۱۹۹۲ گزارش کردند که واکنش ایمنی اختصاصی برای پروتئین S-100 در

شده‌اند و سپس برش‌های بافتی با بافر شستشو پاک شده و در حمام بافر قرار گرفتند. کروموزن DAB به برش‌های بافتی اضافه شده و ۵ دقیقه انکوبه شدند. پس از شسته شدن، به مدت ۵ ثانیه با هماتوکسیلین رنگ گرفتند. برش‌ها در آمونیاک ضعیفی (۱۰ M/L) قرار گرفتند، سپس، با آب مقطر شسته شده و با کاور پوشانده شدند. بررسی لام‌ها و عکسبرداری توسط میکروسکوپ نوری (Olympus Co, Germany) انجام پذیرفت (۲۲).

#### ارزیابی آماری

تمامی فراسنجه‌های کمی به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد (Mean $\pm$ SEM) ارائه شد. تحلیل آماری داده‌ها و بررسی وجود اختلاف بین سلول‌ها با استفاده از روش T-test و توسط نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ صورت پذیرفت. میانگین داده‌های آزمایشی در سطح ۵٪ مورد مقایسه قرار گرفتند.

#### نتایج

بیضه‌ها در پرندگان برخلاف پستانداران در داخل حفرهٔ بطنی درست زیر ستون فقرات و در مجاورت استخوان سینساکروم واقع می‌شوند (تصویر ۱). در این مطالعه، بیضهٔ سمت راست کاملاً لوبیایی شکل و دارای یک لبهٔ آزاد و محدب و یک لبهٔ متصل و مقعر است. در حالی که بیضهٔ سمت چپ به شکل گرد و کروی قابل مشاهده است (تصویر ۲). بیضه‌ها در سمت چپ و راست خط میانی در پشت بدن قرار داشتند. از لحاظ توپوگرافی، بیضه‌ها با سطح خلفی ریه‌ها، سطح شکمی لوب‌های کبد، پیش معده و بخش‌هایی از روده مجاورت داشتند (تصویر ۱).

برش‌هایی به ضخامت ۷-۵  $\mu\text{m}$  تهیه شدند. نمونه‌ها با استفاده از هماتوکسیلین- ائوزین رنگ‌آمیزی شده و در زیر میکروسکوپ نوری مدل نیکون (Eclipse E200). ساخت کشور آلمان) مورد مطالعه قرار گرفتند. شمارش تعداد سلول‌های لوله‌های اسپرم ساز، ضخامت متغیرها و طول بیضه به ترتیب با استفاده از عدسی مشبک، نرم افزار Image Pro insight version - 9 و کولیس انجام پذیرفت (۲۴،۲۶). جهت ارزیابی ایمنو هیستوشیمیایی پروتئین S-100 برش‌های بافتی در آن (Venti cell, MMM, Einrichtungen, Germany) به مدت ۲۵ دقیقه در دمای  $60^{\circ}\text{C}$  قرار داده شده‌اند. برش‌های بافتی در گزیرول پارافین‌زدایی شده و برای آنگیری در الکل‌های نزولی (۱۰۰، ۹۵، ۷۰ و ۵۰) قرار گرفتند. فرایند بازیابی آنتی‌ژن در بافر سدیم سترات ۱۰ میلی‌مولار انجام شد. رنگ‌آمیزی ایمنو هیستوشیمیایی بر اساس روش ارائه شده از کارخانه سازنده کیت (Biocare, USA) انجام شد. به طور خلاصه پراکسیداز اندوژن در یک محلول بلاک کننده پراکسیداز (هیدروژن پراکسید ۰/۰۳ درصد شامل سدیم آزید)، به مدت ۵ دقیقه بلاک شد. برش‌های بافتی به آرامی توسط بافر شستشو شسته شدند و سپس با آنتی‌بادی اولیه بیوتینیل شده S-100 برای ۱۵ دقیقه انکوبه شدند. برش‌ها به آرامی با بافر شستشو داده شدند و در حمامی از بافر قرار داده شدند. لام‌ها در یک محفظه مرطوب با مقدار کافی از streptavidin-HRP (streptavidin) کونژوگه شده با horseradish peroxidase در بافر فسفات سدیم (PBS) دارای یک ترکیب ضد میکروبی قرار داده شدند. لام‌ها ۱۵ دقیقه انکوبه

شاخص‌ها	میانگین	خطای استاندارد
وزن بدن	167.196	72.4
وزن بیضه راست	933.1	209.0
وزن بیضه چپ	083.2	21.0
طول بیضه راست	467.2	105.0
طول بیضه چپ	267.2	131.0

جدول ۱. مشخصات ریخت شناسی بیضه بلدرچین ژاپنی (گرم

و میلی متر)

در مطالعه حاضر، بند بیضه و شبکه درهم پیچیده بیضه مشاهده نشد. در مطالعه بافت شناسی، لوله‌های اسپرم ساز به صورت گرد تا بیضی در لابه‌لای بافت همبندی مشاهده شدند (تصویر ۳).

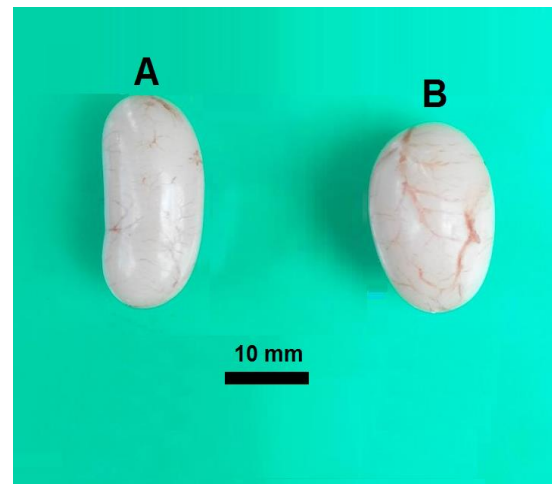


تصویر ۳. مقطع عرضی بیضه بلدرچین ژاپنی. بافت بینابینی

بیضه (۱)، حفره مرکزی لوله‌های اسپرم ساز (۲)، سلول‌های اسپرماتوگونی و شریان بیضی (۳)، اسپرماتوسیت‌ها (۴)، اسپرماتیدها (۵) و لوله‌های اسپرم‌ساز (\*). رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت نمائی  $\times 100$ .



تصویر ۱. نگاره ماکروسکوپی اندام‌ها. بیضه چپ (۱) و راست (۲)، قلب (۳)، پیش معده (۴)، قوس‌های روده‌ای (۵)، عضلات جدار شکم (۶)، ریه‌ها (۷) و حفره بطنی (۸).



تصویر ۲. نگاره ماکروسکوپی بیضه راست (A) و چپ (B) بلدرچین ژاپنی.

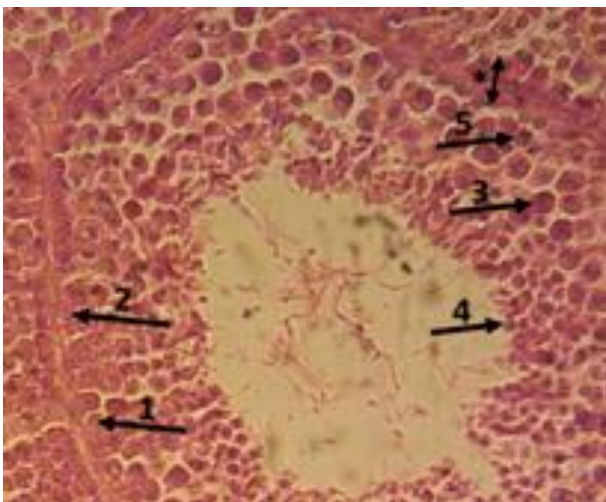
در این پژوهش، بیضه‌ها به رنگ زرد متمایل به خاکستری دیده شدند. این عضو در بلدرچین ژاپنی فاقد غده ضمیمه جنسی بود. همانطور که در جدول ۱ گزارش شده است، وزن بیضه سمت راست و چپ بدن به طور میانگین به ترتیب  $1.933 \pm 0.209$  و  $0.0832 \pm 0.021$  و همچنین طول بیضه راست و چپ به طور میانگین  $467.2 \pm 105.0$  و  $267.2 \pm 131.0$  اندازه گیری گردید (جدول ۱).

سلول‌های جنسی را تشکیل می‌دادند. این سلول‌ها با هسته‌ای روشن و با یک هستک نمایان می‌شدند که تعداد آنها به طور متوسط بیشتر از سلول‌های اسپرماتوگونی بود. در این پژوهش سلول‌های اسپرماتوسیت ثانویه واضح و قابل تشخیص نبود. سلول‌های اسپرماتید کوچک، کروی شکل و با هسته چروکیده مشاهده شدند. تعداد آنها از تمام سلول‌های لوله‌های اسپرم - ساز بیشتر بود (جدول ۲).

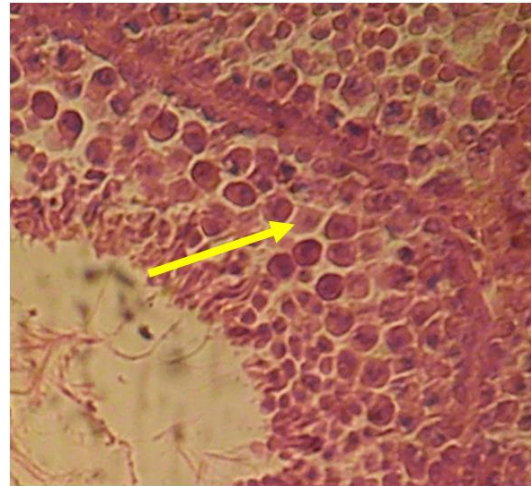
شاخص‌ها	میانگین	خطای استاندارد
اسپرماتوگونی تیره	14.63	1.55
اسپرماتوگونی روشن	12.63	1.50
اسپرماتوسیت اولیه	25.63	1.27
اسپرماتید	61.63	11.29
سلول‌های سرتولی	7.8	1.42
ضخامت تیغه همبندی	2.03	0.41
ضخامت سفید پرده	11.76	7.31
قطر لوله‌های اسپرم ساز	30.00	0.96
ضخامت اپیتلیوم لوله‌های اسپرم ساز	69.59	12.39

جدول ۲. مشخصات بافت شناسی لوله‌های اسپرم ساز بیضه بلدرچین ژاپنی (میکرومتر)

نهایتاً سلول‌های اخیر تغییر شکل داده و به سلول‌های اسپرماتوزوئید تبدیل می‌شوند (تصویر ۵).



در دیواره لوله‌های اسپرم ساز دو نوع سلول به نام سلول‌های سرتولی و سلول‌های جنسی دیده شدند. سلول‌های سرتولی مثلثی شکل بودند که با سیتوپلاسم روشن و یک هسته مشخص در مرکز مشاهده گردیدند (تصویر ۴).

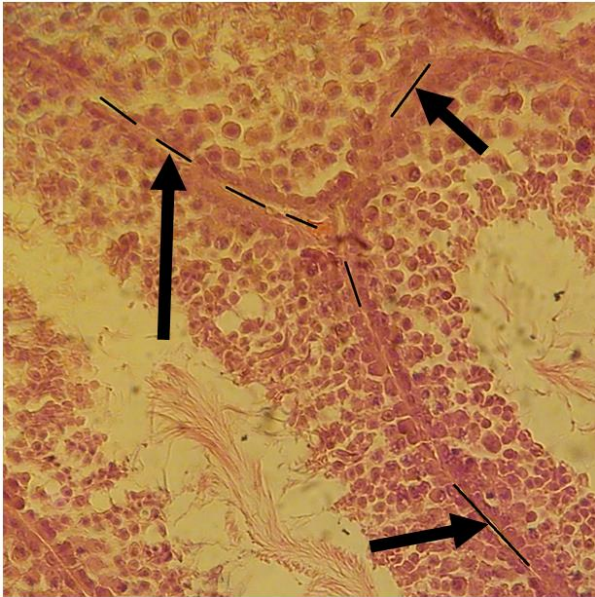


تصویر ۴. مقطع عرضی لوله اسپرم ساز بیضه بلدرچین ژاپنی. سلول‌های سرتولی (فلش) در دیواره لوله اسپرم ساز قابل مشاهده می‌باشند. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت نمائی ۴۰۰x.

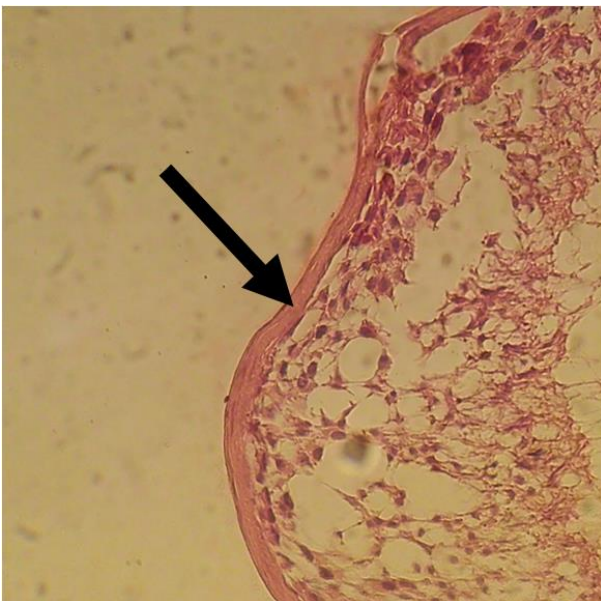
تعداد این سلول‌ها در لابه‌لای سلول‌های جنسی به طور میانگین در نمونه‌های اول، دوم و سوم به ترتیب  $0.7 \pm 0.7$ ،  $0.43 \pm 0.16$  و  $0.69 \pm 0.14$  شمارش شدند.

از مشخصات بافت شناسی لوله‌های اسپرم ساز بیضه در جدول ۲ چنین استنباط می‌شود که سلول‌های شمارش شده در بیشتر موارد نزدیک به لایه بازال لوله اسپرم ساز مشاهده گردیدند. سلول‌های اسپرماتوگونی در دو رده سلولی به نام سلول‌های تیره و روشن بودند. این سلول‌ها چسبیده به لایه بازال لوله اسپرم ساز هستند. تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی تیره بیشتر از روشن بود (جدول ۲).

مشاهده اسپرماتوسیت‌های اولیه نشان داد که این سلول‌ها در اغلب موارد گرد تا بیضی شکل بودند و بزرگترین رده‌ی



**تصویر ۶.** مقطع عرضی لوله‌های اسپرم ساز بیضه بلدراچین ژاپنی. تیغه همبندی نازک بینابینی (فلش‌ها) بین لوله‌های اسپرم ساز قابل رویت می باشد. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اُوزین، درشت نمائی ۴۰۰×.

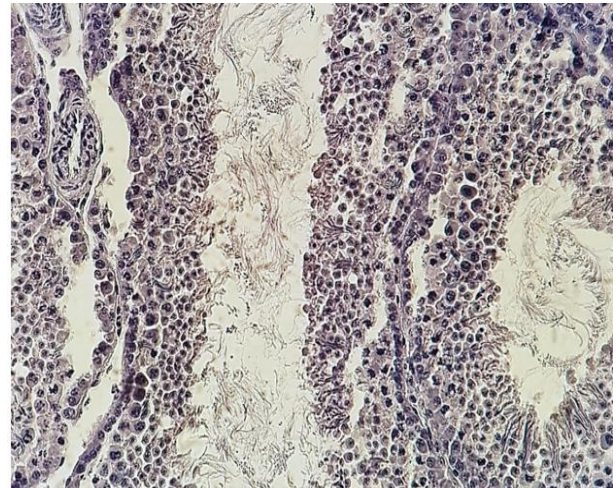


**تصویر ۷.** مقطع عرضی بیضه بلدراچین ژاپنی. کپسول بافت بیضه (فلش) به وضوح قابل مشاهده می باشد. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اُوزین، درشت نمائی ۴۰۰×.

**تصویر ۵.** مقطع عرضی لوله اسپرم ساز بیضه بلدراچین ژاپنی. اسپرماتوگونی A (۱)، اسپرماتوگونی B (۲)، اسپرماتوسیت (۳)، اسپرماتید (۴)، سلول سرتولی (۵) و تیغه همبندی (\*). رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اُوزین، درشت نمائی ۴۰۰×.

مشاهده کپسول بیضوی نشان داد که این کپسول غنی از عروق خونی و اعصاب دور تا دور بیضه بوده و رشته‌های باریک و نازکی از آن منشعب شده و به داخل پارانشیم بیضه نفوذ می‌کنند (تصویر ۶). درست در زیر کپسول بیضه فضای زیر کپسولی قرار می‌گرفت. در این تحقیق ضخامت کپسول بیضه بیشتر از ضخامت تیغه همبندی مشاهده شد (تصویر ۷). در مطالعه حاضر، ضخامت اپی‌تلیوم لوله‌های اسپرم ساز نیز بیشتر از قطر لوله‌های اسپرم ساز بود. شریان‌هایی از نوع متوسط، دیواره عضلانی و با مقطع گرد در بافت همبندی بافت بیضه دیده شد. لازم به ذکر است سلول‌های میوئید در اطراف لوله‌های اسپرم ساز وجود داشتند، این سلول‌ها موقع انقباض به رانده شدن اسپرم کمک می‌کنند. همچنین، سلول‌های ترشح کننده هورمون‌های جنسی نر به نام سلول‌های لیدیک نیز در بافت همبندی مشخص بودند. قابل ذکر است که در این مطالعه در برخی از نمونه‌ها لوله‌های اسپرم ساز کاملاً به هم چسبیده بودند که نشان دهنده‌ی کاهش شدید بافت بینابینی بیضه بود. همچنین بررسی استقرار پروتئین S-100 در لوله‌های اسپرم ساز بافت بیضه با استفاده از میکروسکوپ نوری نشان داد که سلول‌های رده اسپرماتوژنیک، سرتولی، لیدیک و بافت بینابینی نسبت به رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی واکنش منفی نشان دادند.

هستند (۲۴، ۲۵، ۳۳). طبق مطالعات صورت گرفته در کاکاتوها نشان داده‌اند که شکل بیضه‌ها برخلاف بلدرچین ژاپنی و سایر پرندگان، مستطیلی و یا استوانه‌ای شکل می‌باشد. سطح آن صاف و سفید خامه‌ای و همچنین سیاه رنگ دیده شده است. در این پژوهش، بیضه سمت راست لوبیایی شکل و بیضه سمت چپ کروی شکل مشاهده گردید. Seiferle و همکاران در سال ۱۹۹۶ نتیجه گرفتند که بیضه‌ها در خلال مرحله استراحت زرد تا سفید مایل به خاکستری و در خلال مرحله فعالیت تقریباً سفید خالص است (۳۵). رنگ بیضه‌ها در بلدرچین ژاپنی زرد متمایل به خاکستری دیده شد. پژوهش‌های انجام شده توسط Fange و Grove در سال ۱۹۷۹ و Flangian در سال ۱۹۷۲ نشان داد که تولیدمثل پرندگان به نور، بارش باران، رطوبت، دما و خوراک و همچنین برخی از عوامل داخلی بستگی دارد (۱۶-۱۵). بر اساس مطالعات انجام شده پیشین، کپسول سه لایه‌ای در بیضه وجود دارد که شامل رشته‌های کلاژن، الاستیک و سلول‌های فیبروبلاست می‌باشد (۳۶) که این مشاهدات با مطالعه حاضر مطابقت دارد. در پستانداران از لایه داخلی کپسول تیغه‌هایی وارد بافت بیضه می‌شوند، در حالی که در پرندگان تیغه بیضوی واضح و مشخصی وجود ندارد (۲) که در این پژوهش نیز تیغه همبندی باریک و نازکی دیده شد. از نتایج بافت شناسی چنین برمی‌آید که میزان سلول‌های اسپرماتوگونی در پرندگان مختلف متفاوت بوده و در ۱ الی ۳ ردیف قرار دارند. همچنین سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه، ثانویه و اسپرماتیدها به ترتیب ۲ ردیف، ۳ الی ۴ ردیف و ۳ الی ۵ ردیف قرار دارند (۳۳) که این نتایج با مطالعه حاضر مطابقت دارد. برخلاف



**تصویر ۸.** مطالعه ایمونوهیستوشیمیایی استقرار پروتئین S-100 در بافت بیضه بلدرچین ژاپنی، درشت نمایی ۸۰۰×.

#### بحث

با توجه به موقعیت آناتومیکی و بافت شناسی، هر دو بیضه در جایگاه تکاملی خود، در حفره بطنی درست زیر ستون مهره‌ها و در مجاورت استخوان سینساکروم قرار گرفته‌اند (۳۲، ۳۴). بیضه‌ها در کیسه‌ی احشایی- صفاقی در ارتباط با پیش معده و لوب‌های راست و چپ کبد می‌باشند (۲۳، ۳۳). مطالعات نشان داده‌اند که تغییرات فزاینده و پس رونده بر لوله‌های اسپرم ساز تأثیر می‌گذارند. بیضه‌ها در تولید اسپرم و هورمون‌های جنسی نر نقش دارند (۷). مطالعات انجام شده توسط Razi و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان داد که یک زائده‌ی فرعی جنسی کیسه مانندی مابین مجرای دفران و اپی‌دیدیم بیضه در خروس لاری سفید ایرانی وجود دارد (۳۳). در این تحقیق، زائده فرعی جنسی دیده نشد. در بررسی‌های صورت گرفته توسط Lake در سال ۱۹۵۷، شبکه نیلوفری بیضه در تمامی پستانداران واضح و مشخص است اما در پرندگان این شبکه پیچ در پیچ هرگز دیده نشده است (۲۴) که با این مطالعه همخوانی دارد. همچنین گزارش شده است که از نظر آناتومیکی هر دو بیضه تخم مرغی یا بیضی شکل



سایر پرندگان، در بافت بیضه برخی از بلدرچین‌های ژاپنی میزان بافت بینابینی به شدت کم شده و لوله‌های اسپرم ساز در تماس با یکدیگر قرار گرفته بودند. همچنین، سلول‌های میوئید در اطراف لوله‌های اسپرم ساز مشاهده شدند که موقع انقباض به رانده شدن اسپرم‌ها کمک می‌کنند. در این پژوهش، سلول‌های لیدینگ در داخل بافت بینابینی بیضه تشخیص داده شد که سلول‌های اخیر به مانند سایر حیوانات در ترشح هورمون تستوسترون نقش دارند. سفید پرده از بافت همبند متراکم نامنظمی تشکیل شده است که شامل رشته‌های کلاژن، مقدار کمی رشته‌های الاستیک و میوفیبروبلاست‌ها هستند و سلول‌های اخیر در طول شاخه‌های شریان بیضوی قرار می‌گیرند. یک شبکه‌ی وریدی آناستوموز یافته‌ای از لایه‌ی عروقی سفید پرده تشکیل شده است (۱۱، ۱۴). طبق مشاهدات، سفید پرده‌ی بلدرچین ژاپنی شامل رشته‌های کلاژن بیشتر از سلول‌های عضلانی صاف است. این تحقیق مشابه یافته‌های موجود در شترمرغ و شترمرغ استرالیایی است (۹). مطالعات بافت‌شناسی نشان داده است که تنه‌های عصبی نزدیک به شاخه‌های شریانچه‌ای در فضای زیر کپسول واقع می‌شوند که در مقایسه با سایر پرندگان تنه‌های عصبی زیاد بودند. لازم به ذکر است که فضای بین لوله‌ای شامل بافت همبند سست، عروق خونی و لنفاوی، فیبروسیت و سلول‌های تک هسته‌ای می‌باشد که در اساس مشابه با سایر پرندگان است. در یک بررسی انجام شده توسط Rezaian در سال ۲۰۱۱ گزارش شده است که تیغه همبندی در بیضه پرندگان

مشاهده نشده است (۳۴). در حالی که در مطالعه حاضر تیغه‌های همبندی یکی از ویژگی‌های بارز بافت بیضه بود. مطالعه ایمونوهیستوشیمیایی استقرار پروتئین S-100 در بافت بیضه بلدرچین ژاپنی چنین نشان داد که واکنش مثبتی به رنگ-آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی پروتئین S-100 در سلول‌های سرتولی، لیدینگ و اسپرماتوزئیک و نیز اندوتلیوم عروقی در بافت بیضه بلدرچین ژاپنی مشاهده نگردید. مطالعات پیشین یافته‌های مشابهی را در اردک مسکویی (*Cairina moschata*) و نیز گاو میش کوهان‌دار اروپایی (*Bison bonasus*) گزارش کرده‌اند (۱، ۱۰). این امر ممکن است ناشی از تفاوت‌های اختصاصی گونه‌ای باشد که با توجه به نقش پروتئین S-100 در ثبات استقرار اسکلت سلولی می‌تواند بازتابی از ویژگی‌های ریخت‌شناسی و فراساختاری متمایز بافت بیضه در گونه‌های فوق باشد. از نتایج بررسی حاضر چنین می‌توان نتیجه گرفت که از لحاظ آناتومیکی بیضه سمت راست کاملاً لوبیایی شکل می‌باشد اما بیضه سمت چپ به مانند سایر پرندگان نسبتاً کروی شکل است. نتایج بافت‌شناسی نیز در اساس مشابه با سایر پرندگان است با این تفاوت که قطر مجرای لوله‌های اسپرم ساز با توجه به گزارشات موجود در پرندگان بیشتر از ضخامت اپیتلیوم گزارش شده است (۳۴) در حالی که در مطالعه حاضر، ضخامت اپیتلیوم لوله‌های اسپرم ساز بیشتر از قطر مجرای آن مشاهده گردید. همچنین در این مطالعه استقرار پروتئین S-100 در بافت بیضه دیده نشد

## References:

1. Abd-Elmaksoud, A., Shoeib, MB., Mare, HES., 2014. Localization of S-100 proteins in the testis and epididymis of poultry and rabbits. *Anat Cell Biology*. pp. 180-187
2. Aire, T.A., Ayeni, J.S., Olowo-okoron, M.O., 1979. The structure of the excurrent ducts of the testis of the guinea-fowl (*Numida meleagnis*). *Anat Journal*. pp. 633-643
3. Aire, T.A., 1982. The rete testis of birds. *Anat Journal*. pp. 97-100
4. Amer, F.I., Shahin, M.A., 1975. The post-hatching development of the gonads in the fowl, *Gallus domesticus*. *Ann. Zoology*. pp. 1-25
5. Amselgruber, W., Sinowatz, F., Schams, D., Lehmann, M., 1992. S-100 Protein immunoreactivity in bovine testis. *Andrologia Journal*. pp. 231-235
6. Andrew, W., Hickman, C.P., 1974. *Histology of the Vertebrates, a comparative text*. AV. Mosby Company. pp. 157-173
7. Azimi Dabagh, F., Mirrazavi, F., Babapour, A., 2013. The effect of long-term use of ketoconazole on spermatogenesis and testicular tissue in mice. *Journal of Veterinary Research*. pp. 359-365 (In Persian)
8. Banks, W.J., 1993. *Applied veterinary Histology*. 3<sup>rd</sup> ed. mosby. pp. 417-419
9. Budras, K.D., Meier, U., 1981. The epididymis and its development in ratite birds (ostrich, emu and rhea). *Anatomy and embryology journal*, Springer-verlag Press. pp. 281-299
10. Czykier, E., Sawicki, B., Zabel, M., 1999. Immunocytochemical localization of S-100 protein in the European bison testis and epididymis. *Folia Histochem Cytobiology*. Pp. 83-84
11. Dellman, H.D., Eurell, J., 1998. *Cytology and microscopic anatomy*. 1<sup>st</sup> ed. Williams and Wilkins. pp. 205-218
12. Dyce, K.M, Sack, W.O., Wensing, C.J.G., 2009. *Textbook of veterinary anatomy*. Elsevier Health Sciences. pp. 171-173
13. Ebrahimi Saadatlu, M., 2011. *Basic Anatomy*. 1<sup>st</sup> ed. Sotude Press. Tehran, Iran. pp. 198-202 (In Persian)
14. Eurell, J.A., Frappier, B.L., 2013. *Dellmann's textbook of veterinary histology*. John Wiley & Sons. pp. 463-505
15. Fange, R., Grove, D., 1979. *Fish physiology*. Academic Press, New York. pp. 121-132
16. Flanigan, N.J., 1972. The central nervous system. In: *Mammals of the Sea, Biology and Medicine*. Ridgway, S.H. and Charles, C.(eds.). Thomas. Springer field, Illinois. pp. 215-245
17. Gerzilov, V., Bochukov, A., Penchev, V., Petrov, P., 2016. Testicular development in the Muscovy Duck (*Cairina Moschata*). *Bul. Journal of Veterinary Medicine*. pp. 8-18
18. Getty, R., 1975. *Sisson and Grossman's anatomy of the domestic animals*. W.B. Saunders company. Philadelphia, London. pp. 1927-1928
19. Gray, J.C., 1937. The anatomy of the male genital ducts in the fowl. *Journal of Morphology*. pp. 393-405
20. Iwanaga, T., Fujita, T., Takahashi, Y., Isobe, T., 1987. Immunohistochemical demonstration of S-100 protein in the endothelial cells of blood vessels in the pig and cattle. *Biomedical research* 8. pp. 329-334
21. Kaupp, B.F., 1915. Male reproductive organs of birds. *Am. Journal of Veterinary Medicine*. pp. 461-465
22. Khosravianian, H., Razi, M., Farokhi, F., Khosravianian N., 2015. Simultaneous Administration of Dexamethasone and Vitamin E Reversed Experimental Varicocele-induced Impact in testicular tissue in Rats; Correlation with Hsp70, 2 Chaperone Expression. pp. 773-790
23. Kumar shil, S., Abul Quasem, M.D., Lutfur Rahman, M., 2015. Histological and morphometric analysis of testes of adult quail (*Coturnix Coturnix Japonica*) of Bangladesh. *International Journal of Morphology*. pp. 100-104
24. Lake, P.E., 1957. The male reproductive tract of the fowl. *J. Anat*. pp. 16-29

25. Lake, P.E., 1971. The male in reproduction. In: Physiology and Biochemistry of the fowl. Bell, D.J. and Freeman, B.M.(eds.). Academic Press. New York. pp. 1411-1447
26. Lake, P.E., 1981. Male genital organs. Kim, A.S. and McLelland, J.(eds.). Form and function in birds. London. Academic Press. pp.1-61
27. Mahrugli, A., 2008. Practical breeding poultry from beginning to end. Shamloo Press. Tehran, Iran. pp. 431 (In Persian)
28. Michetti, F., Lauriola, L., Rende, M., Stolfi, V., Battaglia, F., Cocchia, D., 1985. An immunochemical and immunohistochemical study of S-100 protein in the testis. Cell and Tissue research, Springer-Verlag, pp. 137-142
29. Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E., 1979. The viscera of the domestic mammals. 2<sup>nd</sup> ed. verlag Parey, Berlin-Humburg, Clap.Digestsyst. pp. 23-203
30. Ohadi Nia, H., 2003. Breeding and poultry diseases. Elmo galam Press. Iran. pp. 63 (In Persian)
31. Pourhaji Motab, J., Abbaszadeh, P., Touni, S.R., 2017. Morphological and histological study of the liver, spleen and pancreas in Guinea fowl. Veterinary Journal (Saz & Paj). pp. 76-83 (In Persian)
32. Pusti, A., Adib Moradi, M., Fazili, E., 2008. comparative veterinary histology. 7<sup>th</sup> ed. Tehran University Press. Tehran, Iran. pp. 237 (In Persian)
33. Razi, M., Hassanzadeh, S.H., Najafi, G.R., Feyzi, S., Amin M., Moshtagion, M., Janbaz, H., Amin, M. 2010. Histological and anatomical study of the white rooster of testis, epididymis and ductus deferens. International Journal of Veterinary Research. pp. 229-236
34. Rezaian, M., 2011. Color Atlas of Veterinary Histology. 3<sup>th</sup> ed. Tehran University Press. Tehran, Iran. pp. 339-340 (In Persian)
35. Seiferle, E., Nickel, R., Schummer, A., 1996. Anatomy of domestic poultry. Ghazi, S. R., Tajali, M. and Gholami. S.(Trn.). Shiraz University Press. Shiraz, Iran. pp. 148-152 (In Persian)
36. Wheater, P.R., Burkitt, H.G., 1989. Functional Histology. Atlas and Colour Atlas. 2<sup>nd</sup> ed. Churchill Livinstone, London. pp. 95-100

**The study of histoanatomical and S-100 gene expression in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) testes**

**Short running: investigating of gene expression of Japanese quail testis**

**Ramin Jahangirfard<sup>1\*</sup>**

*<sup>1</sup>PhD graduated of Comparative Anatomy and Embryology, Faculty of Veterinary medicine, Urmia University, Urmia, Iran*

Corresponding author E-mail: r.jahangirfard@urmia.ac.ir

---

**Abstract:**

Testicular tissue is one of the most important and sensitive tissues of the body. The main role of testis is to produce sperm and testosterone. So far, research into immunohistochemical staining of S-100 protein has not been performed in Japanese testicular tissue. The aim of this study was to evaluate the topography, histoarchitecture and S-100 protein localization in Japanese quail testicles. 8 male Japanese quail were selected which weighing  $4.72 \pm 196.167$  g and had the identical feeding and breeding conditions. The testicles were studied after stages of the tissue passage to examine the S-100 protein and histology under light microscope. The T-test was used in order to analyze the data at significant level of  $P < 0.05$ . our results showed that the right testis of the Japanese quail was bean-shape and the left one was spherical. Histological results demonstrated that there was a severe decrease of interstitial tissue of testis in some of the samples as well as the existence of 10-12 cellular layers in the walls of the seminiferous tubules. S-100 protein was not observed in seminiferous tubules. obtained results exhibited the structure of testicular tissue was the same as the other birds topographically and histologically, although the right testis of the quail was completely bean-shaped. In histological studies of the quail's testis, the connective interstitial tissue was one of the significant properties. the evaluation of testis immunohistochemical staining S-100 protein was not observed in the structural of seminiferous tubules, sexual, leydig cell, interstitial tissue, straight tubules and rete testis.

**Key words:** Immunohistochemistry, quail, Testis, Gene Expression