بررسی ماکروسکوپیک و میکروسکوپیک روند استخوانی شدن داخل غضروفی در جنین جوجه

مهران وطنچیان[1*] ، رضا رنجبر[2] ، بابک محمدیان[3]

چکیده

مطالعه سیستم اسکلتی در دوران جنینی و نیز پس از تولد و بلوغ، از دیرباز مورد توجه محققین رشته‌های گوناگونی چون زیست شناسی، جنین شناسی و باستان شناسی بوده است، چراکه به عنوان مثال در شاخه جنین شناسی و ناهنجاری شناسی، اطلاع از تکوین طبیعی اسکلت در دوران جنینی منجر به پی‌ریزی مطالعات ناهنجاری شناسی تجربی خواهد شد. در پژوهش حاضر جهت روشن شدن نحوه بررسی استخوانی شدن داخل غضروفی در استخوان بلند جنین جوجه به عنوان یکی از مدل های آزمایشگاهی، مقاطع نازک میکروسکوپی از درشت نی تهیه گردید و با نمونه‌های تهیه شده به روش رنگ آمیزی دوگانه آلیزارین قرمز- آلسین آبی مقایسه گردید.نتایج نشان می‌دهد که در پرندگان بر خلاف پستانداران، تبدیل بافت غضروفی به استخوانی، طی چهار مرحله متوالی شامل: مرحله استراحت، تکثیر، هایپرتروفی و مرحله ی استخوانی شدن انجام می‌گیرد و لذا مرحله‌ی آهکی شدن در پرندگان وجود ندارد. در مطالعه ی نمونه‌های آماده شده به روش آلیزارین-آلسین، مشخص گردید که بخشهایی که حاوی ماتریکس غضروفی هستند، رنگ آبی را به خود می گیرند، در حالی که ماتریکس استخوانی قرمز رنگ می‌شود. اما نواحی در درشت نی مشاهده گردید که بی‌رنگ باقی می ماندند که بین ناحیه غضروفی و استخوانی بود و با ناحیه هایپرتروفی در مقاطع میکرسوکوپیک هماهنگ بود.

واژگان کلیدی: جنین جوجه، آلیزارین قرمز، آلسین آبی، استخوانی شدن داخل غضروفی

مقدمه

مطالعات مربوط به جنبه‌های گوناگون سیستم اسکلتی بدن در موجودات مختلف از دیرباز مورد توجه محققین رشته های مختلفی چون؛ زیست شناسی، پزشکی و دامپزشکی، تکامل، باستان شناسی و فسیل شناسی بوده است.با نگاهی به روند تشکیل طبیعی قطعات گوناگون اسکلت طی دوران جنینی ، می توان به بررسی عوامل ناهنجاری زای اسکلتی اعم از مواد شیمیایی و فیزیکی محیطی، داروها و سموم و نیز عوامل متابولیک دست یافت.در این پژوهش، ابتدا به کمک تکنیک رنگ آمیزی دوگانه آلیزارین قرمز- آلسین آبی در استخوان درشت نیی- مچ پایی جنین جوجه طی دوران

۱- گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
۲- بخش آناتومی و جنین شناسی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
۳- بخش پاتولوژی دانشکده دامپزشکی ، دانشگاه شهید چمران اهواز
* -mvat@basu.ac.ir

جنینی، به صورت ماکروسکوپیک تشکیل قالب غضروفی این استخوان‌ها و تبدیل آنها به یک ساختار استخوانی مطالعه شد و سپس با استفاده از تهیه مقاطع نازک و رنگ آمیزی هماتوکسیلین –ائوزین، بررسی روند سلولی استخوانی شدن داخل غضروفی به کمک میکروسکوپ نوری انجام گردید.

رشد تکاملی اسکلت در مهره داران با مهاجرت سلول ها از ناحیه ستیغ عصبی سری، سومیت‌ها و مزودرم صفحات جانبی، به محل تشکیل آینده استخوان‌ها آغاز می‌شود (در موش بین روزهای ۱۰/۵تا ۱۲/۵). در این محل مزانشیم متراکم می شود و شکل اولیه قسمتی از اسکلت آینده را بوجود می‌آورد(۲۳). انواع استخوان های بدن، بدون در نظر گرفتن محل آنها، از دو مسیر تشکیل می‌شوند. در مسیر استخوانی شدن داخل غشایی (Intramembranous Ossification)، معدنی شدن مستقیم ماتریکس ترشح شده از استئوبلاست‌ها، انجام می گیرد؛ اما در استخوانی شدن داخل غضروفی (Endochondral Ossification)، رسوب ماتریکس استخوانی روی ماتریکس غضروفی از پیش موجود انجام می گیرد (۳و۲۳).استخوانی شدن، مجموعه پیچیده ای از مراحل است که طی آن بافت استخوانی بوجود می‌آید. این بافت استخوانی ابتدا به صورت بافت استخوانی اولیه یا در هم بافته تشکیل می‌شود و سپس با بافت استخوانی ثانویه یا تیغه ای جایگزین می شود. این حالت هم در استخوان اسفنجی و هم در استخوان متراکم و در هر دو مسیر استخوانی شدن داخل غشایی و داخل غضروفی رخ می‌دهد (۲ و ۳و ۵). در مقابل واژه استخوانی شدن، معدنی شدن یا مینرالیزه شدن به معنی رسوب مواد معدنی روی ماتریکس آلی استخوان می باشد(۳).

استخوان‌های اندام حرکتی ،ستون مهره ، لگن و قاعده ی جمجمه ابتدا بشکل یک قالب غضروف شفاف تشکیل می شوند و سپس در جنین در حال رشد با استخوان جایگزین می شوند. اپی فیز استخوان‌های بلند، قطر بیشتری از دیافیز آنها دارد.استخوانی شدن داخل غضروفی که درون مراکز ثانویه استخوانی شدن انجام می گیرد در شکل و اندازه اپی فیز موثر است (۳).

زمانی که قالب غضروفی از عرض و از طول رشد می کند ، به مرحله ای می رسد که اکثر رشد آن در نقاط انتهائی قالب غضروفی انجام می‌گیرد. کندروسیت‌ها در ناحیه ی میانی قالب بالغ می شوند و بزرگ می‌شوند به نحوی که ماده‌ی بین سلولی که بین سلول‌های هایپرتروفی شده، قرار دارد شدیداً ظریف و باریک می‌شود. در همان زمان این کندروسیت‌ها وزیکول‌های ماتریکس را می‌سازند، که این امر شبیه به آن چیزی است که در مورد استئوبلاست‌ها در روند استخوانی شدن داخل غشائی انجام می‌گیرد. در نتیجه ی ساخت این وزیکول ها، کلسیفیه شدن ماتریکس غضروفی اطراف انجام می گیرد.در اثر این کلسیفیه شدن مواد غذایی کافی به کندروسیت های هایپر تروفی شده نمی رسد و لذا دژنره شده و می میرند.در این زمان مویرگ های خونی متعددی به پری کندریوم هجوم می آورند .در اثر این پدیده لایه‌ی کندروژنیک (Chondrogenic Layer) به یک لایه ی استئوژنیک (Osteogenic Layer) تبدیل می شود که در سطح قالب غضروفی قرار می گیرد.سلول های اجدادی استخوان در پرده‌ی پریوستئوم جدید، به استئوبلاست تبدیل می‌شوند و یک پوسته ی ظریف استخوانی اطراف بخش میانی قالب غضروفی ساخته می شود. نحوه‌ی ساخت این استخوان بروش داخل غشائی است و بنام استخوان یقه (Collar Bone Or Periosteal Band) یا نوار پریوستی شناخته می‌شود (۵). این روندبنام استخوانی شدن

اطراف غضروفی (Epichndrial Ossification) یا اپی کند ریال شناخته می‌شود (۳).عروق خونی در فعال سازی پتانسیل استئوژنیک لایه‌ی داخلی پری کندریوم و تبدیل آن به پریوستئوم نقش مهمی دارند. سلول های داخلی پری کندریوم در طول حیات توأماً تمایز به کندروبلاست و استئوبلاست، هردو را داراست.این توانائی بویژه در ترمیم شکستگی‌ها مهم است، چرا که طی آن در ناحیه‌ی دچار شکستگی ابتدا غضروفی تشکیل می‌شود که تقریبا خالی از مویرگ است، اما با شروع استخوانی شدن مویرگ ها به داخل آن رشد می‌نمایند(۵). پس از تشکیل یقه ی استخوانی در اطراف بخش میانی قالب غضروفی، عروق خونی از پریوستئوم به ناحیه ی کندروسیت های هایپرتروفی شده ی در حال مرگ هجوم می برند و لذا میزان اکسیژن در آن ناحیه افزایش می‌یابد. سلول های پریوستئوم اطراف مویرگ‌ها، سلول‌های اجدادی استخوان‌های حاصل از پریوستئوم و سلول‌های مزانشیمی متمایز نشده، همگی مویرگ های در حال هجوم را همراهی می‌کنند. این عروق خونی و سلول‌های اطراف آنها جوانه‌ی پریوستی (Periosteal Bud) نامیده می‌شوند.

وقتی که جوا نه‌ی پریوستی، بداخل بخش میانی قالب غضروفی می رسد مرکز اولیه ی استخوانی شدن شکل می گیرد. تحت تاثیر عوامل القایی تشکیل استخوان که در پلاسما وجود دارند، سلول‌های اجدادی استخوان به استئوبلاست‌ها تبدیل می‌شوند. این سلول ها در اطراف قطعات غضروفی کلسیفیه جمع می شوند و شروع به تولید و ترشح استئوئید می‌نمایند. پس از آن روند معدنی شدن نیز انجام می گیرد.این مرحله تا زمانی ادامه می یابد که ترابکول استخوانی که حاوی یک مغز از جنس غضروف کلسیفیه است، تشکیل شود. وقتی که مرکز اولیه ی استخوانی شدن تشکیل می‌شود، ساختار غضروفی در دو انتهای استخوان به رشد و تکثیر خود به روش بینابینی ادامه می‌دهد تا قالب غضروفی از طول بزرگتر شود. سپس مویرگ ها از مرکز اولیه استخوانی شدن به دو انتهای اپی فیزی قالب هجوم می‌برند تا استخوانی شدن در نواحی مرکزی(مدولاری) ادامه پیدا کند. کندروسیت ها شبیه به همان ناحیه‌ی آغاز شکل گیری استخوانی تغییر می یابند. یقه ی استخوانی ضخیم‌تر می شود و لذا نیازی به حضور استخوان اولیه در مرکز اولیه‌ی استخوانی شدن جهت حمایت از قالب نمی‌باشد. بنابراین اکثر استخوان تشکیل شده در آن ناحیه توسط استئوکلاست‌ها برداشته می شود و حفره‌ی مغز استخوان شکل می‌گیرد. این حفره از بافت خون‌ساز پر می‌شود. این بافت در اثر تغییر سلول‌های مزانشیمی تمایز نیافته که همراه مویرگ‌های خونی به این ناحیه می‌آیند، تشکیل می‌شود (۳و۵).

در ناحیه‌ی اپی فیز استخوان‌های بلند مراکز استخوانی شدن دیگری بنام مراکز ثانویه شکل می‌گیرد (۵). تعداد این مراکز ثانویه در استخوان های با اشکال نامنظم متعدد می‌باشد (مثل مهره ها)(۳). درون صفحه‌ی رشد طی وقایع شناخته شده ای ، استخوان جدید جایگزین غضروف می شود و بر طول استخوان افزوده می‌شود. در داخل صفحه ی رشد تکثیر کندروسیت از طریق آپوپتوز متعادل می شود و جایگزینی غضروف آهکی شده نیز با تشکیل استخوان جدید متعادل می شود.لذا ضخامت صفحه ی رشد طی رشد تکاملی حفظ می شود.این روند تا بلوغ ادامه می یابد و سپس کل صفحه ی رشد با استخوان جایگزین می گردد. پنج ناحیه یا منطقه در مقطع طولی صفحه ی رشد از سمت اپی فیز بطرف دیافیز قرار گرفته اند که عبارتند از (۵و۱۲و۱۷):

۱- ناحیه‌ی استراحت (Reserve Zone،Resting Zone)

(ناحیه‌ی ذخیره):ناحیه ای است که در مجاورت استخوان و حفره‌ی مغز استخوان ناحیه‌ی اپی فیز قرار دارد. کندروسیت‌های کوچک این ناحیه با الگوی نامنظمی پخش شده اند و از طریق عروق خونی اپی فیزی تغذیه می شوند. وزیکول‌های ماتریکس شبیه به استئوبلاست‌ها توسط کندروسیت‌های این ناحیه تولید می‌شوند، اما معدنی شدن ماتریکس انجام نمی گیرد.

۲- ناحیه ی تکثیر (Zone Of Proliferation): کندروسیت ها قدری بزرگتر می شوند و تمایل دارند ردیف‌ها و ستون هایی را عمود بر اپی فیز تشکیل دهند. سلول‌های جدیدی از طریق تقسیم میتوزی تشکیل می شوند که در ناحیه ی بالایی ستون‌ها قرار می گیرند.سلول ها تمامی اندامک‌های سیتوپلاسمی لازم جهت سنتز ماتریکس را دارامی باشند و هر سلول توسط لایه ای از ماتریکس از دیگری جدا می شود.

۳- ناحیه‌ی هایپرتروفی (Hypertrophic(Maturation) Zone) (ناحیه‌ی بلوغ) با پیشرفت بلوغ سلول‌ها، اندازه‌ی سلول‌ها بزرگتر می‌شود و شکل لاکونای آنها گرد می‌گردد(۳). بتدریج سلول‌ها کلسیم را درون خود انباشته می‌کنند. سپس کلسیم سلولی در بخش‌های عمقی ناحیه ی هایپرتروفیک بداخل ماتریکس رها می‌شود و وزیکول های ماتریکس جذب کلسیم را آغاز می‌کنند. فعالیت آلکالین فسفاتازی و پروتئازهای خنثی در این وزیکول ها باعث افزایش فسفات در ناحیه می‌شود. افزایش کلسیم در وزیکول‌ها و افزایش فسفات منجر به معدنی شدن ماتریکس می شود و لذا دو تا سه ردیف پایینی کندروسیت های هایپرتروفی شده با دیواره ای از ماتریکس کلسیفیه شده احاطه می‌شوند. دیواره‌های عرضی بین سلول‌ها کلسیفیه نمی‌شود. برخی از این کندروسیت های هیپرتروفی شده چروکیده شده و هسته‌ی آنها دچار پیکنوز می شود و بنظر می‌رسد که هسته به تیغه‌ی عرضی ماتریکس، متصل شده است (۵). ناحیه ی هیپرتروفی ضعیفترین بخش صفحه ی رشد است و براحتی از این ناحیه شکسته می شود(۳).

۴- ناحیه ی جذب (zone of resorption):در این ناحیه مویرگ‌های متافیزی قوس کاملا U شکلی را ایجاد می‌کنند. هر حلقه‌ی مویرگی و بافت همبند اطرافش به ناحیه‌ی خالی شده در اثر مرگ کندروسیت‌ها هجوم می‌آورد.

۵- ناحیه‌ی استخوانی شدن (ossification zone): استئوبلاست‌ها از سلول‌های همراه با مویرگ‌ها تمایز می‌یابند و رسوب ماتریکس استخوانی را روی ماتریکس غضروفی کلسیفیه شده آغاز می‌نمایند. ترابکول‌های استخوانی حاصل، بهمراه غضروف کلسیفیه شده‌اش مجموعه‌ی اسفنج اولیه نامیده می‌شوند (۲۱).

رشد پس از تولد اسکلت عمدتا از طریق تشکیل داخل غضروفی استخوان انجام می‌گیرد که از یکسری مراحل شدیداً تنظیم شده تشکیل می‌شود. در این مراحل پنج گانه سنتز پروتئین‌های ویژه‌ی ماتریکسی مثل پروتئوگلیکان‌های غضروف و کلاژن تیپ ۲ که توسط کندروسیت‌های بالغ ترشح می‌شوند و کلاژن تیپ ۱۰ که توسط کندروسیت‌های هایپرتروفیک ترشح می‌شوند. شکل سلول‌های غضروفی کاملا وابسته به کنش و واکنش آنها با ماتریکس اطرافشان دارد و اگر بیرون از ماتریکس بیایند، مورفولوژی و عملکردشان تغییر می‌نماید(۱۸).

مواد و روش کار

طرز تهیه نمونه های جنین ماکیان

جهت تهیه نمونه های جنینی در مراحل مختلف رشد ،تعداد ۳۰۰ عدد تخم مرغ نطفه دار نژاد لگهورن سفید تهیه گردید .پس از انتقال آنها به محل انکوباتور ، به مدت دو ساعت ، تخم مرغ ها خارج از دستگاه نگهداری شد تا در حالت سکون بتوانند وضعیت طبیعی اتاقک هوایی خود را بازیابند. انکوباتور قبل از استفاده به کمک گاز فرمالین ضدعفونی گردید و ۲۴ ساعت قبل از ورود تخم مرغ ها روشن گردید تا وضعیت مطلوب دما (۳۸-۳۷ درجه سانتیگراد) و رطوبت (۶۵-۵۵ درصد) تامین گردد. دما تا پایان دوره بین ۳۷ تا ۳۸ درجه و رطوبت بین ۵۵تا ۶۵ درصد طی ۱۸روز ابتدایی و ۶۵تا ۷۵ درصد در روزهای پایانی تنظیم گردید(۱). ۴ بار چرخش سینی‌های حاوی تخم مرغ بصورت اتوماتیک توسط دستگاه در هر ۲۴ ساعت انجام می‌گیرد. تخم‌مرغ‌ها از سمت انتهای باریک خود در داخل سینی‌های مخصوص دستگاه چیده شد و سپس درون دستگاه قرار گرفت. معمولاً پس از گذشت ۱الی ۲ ساعت که دمای تخم مرغ‌ها با دمای دستگاه یکسان گردید، رشد متوقف شده ی جنین پس از خروج از بدن مادر، مجدداً از سر گرفته می شود(۱و۸). برداشت نمونه‌های جنینی، از ابتدای روز دوم (پس از گذشت ۲۴ساعت از آغاز انکوباسیون با در نظر گرفتن ۲ ساعت زمان مورد نیاز جهت گرم شدن اولیه تخم مرغ ها) انجام گردیدطی ۱۰ روز اول رشد جنین ، نمونه برداری هر ۱۲ ساعت یک بار و طی ۱۱ روز باقی مانده ، به صورت روزانه انجام شد. نمونه های برداشت شده، در سالین نرمال شستشو می شوند .از هر مرحله ۴ نمونه جهت مطالعه‌ی استریومیکروسکوپی و ۲ نمونه جهت مطالعه‌ی میکروسکوپی، به ترتیب در محلول اتانول ۷۰ درصد (حداقل ۳روز و حداکثر ۴هفته) و فرمالین بافره ی ۱۰ درصد (حداقل ۲۴ساعت) ، قرار داده می شوند تا مرحله ی ثبوت انجام پذیرد(۲۲).

طرز تهیه و چگونگی مطالعه نمونه های ماکروسکوپی

جهت آماده شدن نمونه ها برای مطالع ی بخش‌های مختلف اسکلت در بدن، رنگ آمیزی دوگانه‌ی مخصوص اسکلت بنام رنگ آمیزی آلیزارین قرمز و آلسین آبی بر اساس روش یونگ (۲۲) روی نمونه‌ها انجام گرفت.پس از شستشوی جنین در محلول سالین نرمال و برداشت پوست، احشای داخلی و بافت‌های اضافه تاحد امکان، مراحل رنگ آمیزی به شرح ذیل ادامه یافت .

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

۲- رنگ آمیزی : بمدت ۳روز نمونه ها در رنگ قرار داده شدند.محلول رنگ مخلوطی از رنگ‌های آلیزارین قرمز، آلسین آبی و پتاسیم هیدروژن فتالات می‌باشد. تهیه‌ی مخلوط رنگ بدین شرح است :

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

۳- نرم کردن بافت های باقی مانده در اطراف اسکلت:قرار دادن نمونه ها به مدت ۳روز در محلول ۰/۷۵ درصد پتاس در آب دوبارتقطیر

۴- شستشو: با آب دوبار تقطیر

۵- شفاف سازی نمونه ها:نمونه ها بمدت ۲۴ ساعت در محلولی حاوی ۲قسمت اتانول ۷۰درصد-۲ قسمت گلیسیرین و یک قسمت بنزیل الکل خالص

قرارداده می شوند.

۶- نگهداری : ابتدا بمدت ۶روز در محلول ۵۰درصد گلیسیرین در اتانول ۷۰درصدقرارگرفته و سپس به گلیسیرین خالص منتقل می شوند.(۲۲).

نمونه ها ی آماده شده ، با استفاده از استریومیکروسکوپ دو چشمی مدل Leica مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت .

وجود مرکز غضروفی مربوط به یک قطعه از اسکلت ، با مشاهده ی رنگ آبی در ناحیه ی آناتومیک مورد نظر مشخص می شود . در مورد استخوان هایی که به روش داخل غشایی تشکیل می شوند ،قالب غضروفی تشکیل نخواهد شد و لذا ظهور کانون های قرمز رنگ در ناحیه‌ی آناتومیک مربوطه ، دلیل بر شروع تشکیل آن قطعه می‌باشد.

پس از مطالعه نمونه های هر مرحله،عکسبرداری با استفاده از دوربین دیجیتال و استریومیکروسکوپ انجام گرفت. برای تهیه عکس مناسب علاوه بر شفاف و تمیز بودن نمونه، تاباندن نور سفید هم از زیر نمونه و هم از بالا ، بهترین حالت را در عکس تهیه شده امکانپذیر می نماید؛ هرچند که مشاهده ی مستقیم از طریق استریومیکروسکوپ ،کیفیتی به مراتب بهتر و دقیق تر از عکس تهیه شده داراست .

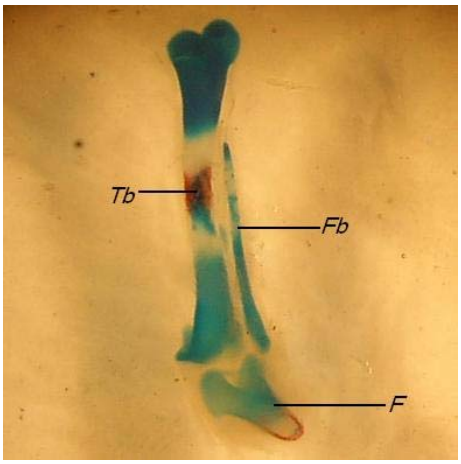
طرز تهیه و چگونگی مطالعه نمونه های میکروسکوپی

جهت بررسی مراحل مختلف تشکیل استخوان در روش داخل غضروفی و داخل غشایی ، نمونه های مختلفی از سنین ابتدایی (۵تا۸ روزه) ، میانی (۹تا۱۳روزه) و انتهایی (۱۹تا۲۱روزه) دوران جنینی برداشت گردید.سپس به کمک روش های معمول بافت شناسی، آماده سازی نمونه ها جهت مطالعه با میکروسکوپ نوری انجام گردید.

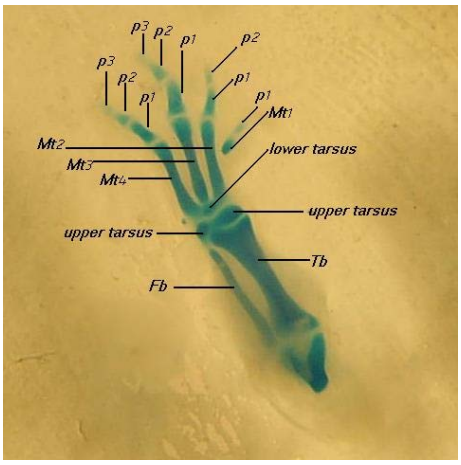
نتایج

نتایج ماکروسکوپیک

نخستین علامت تشکیل تجمع غضروفی در ناحیه درشت نی، در روز ششم جنینی بصورت یک تجمع آبی رنگ تشکیل می شود. به تدریج طی روزهای بعدی رشد جنین، قالب غضروفی درشت نی، مجزا از نازک نی و نیز مجزا از قطعات ناحیه مچ پا به رشد خود ادامه می‌دهد، به نحویکه در همان مرحله‌ی قالب غضروفی، برجسته شدن اپی فیزهای این قالب غضروفی قابل مشاهده است. در روز ۷/۵جنینی به دلیل الحاق یکی از قطعات مچ پا به انتهای پایینی درشت نی، قالب آن حجیم تر می‌شود. به تدریج قالب غضروفی درشت نیی– مچ پایی طویل تر می شود تا آن که در روز ۱۱ جنینی با ظهور یک ناحیه قرمز رنگ که به دلیل رسوب آلیزارین قرمز روی ماتریکس تازه تشکیل شده استخوانی در بخش میانی دیافیز قالب می باشد، استخوانی شدن آغاز می‌شود. یکی از نکات قابل توجه در مطالعه ماکروسکوپیک آن است که قبل از رسوب ماتریکس استخوانی و جذب رنگ آلیزارین قرمز ، در روز ۱۰جنینی در ناحیه هیپرتروفیک کندروسیت ها و آماده شدن آنها برای تبدیل به ناحیه استخوانی ، یک منطقه روشن و بی رنگ در ناحیه دیافیز ظاهر می شود که متعاقب آن در روز ۱۱، رسوب ماتریکس استخوانی انجام می گیرد.لذا در واقع مشاهده این ناحیه روشن که تابحال در منابع دیگر اشاره ای به آن نشده است ، به عنوان مرحله ابتدایی و زودرس استخوانی شدن در نظر گرفته می شود(تصاویر شماره ۱و۲).



تصویر شماره ۱:تصویر ماکروسکوپی اسکلت درشت نی ونازک نی
(Tb:درشت نی Fb: نازک نی F: ران Mt : قلم پا P: بند انگشتان)



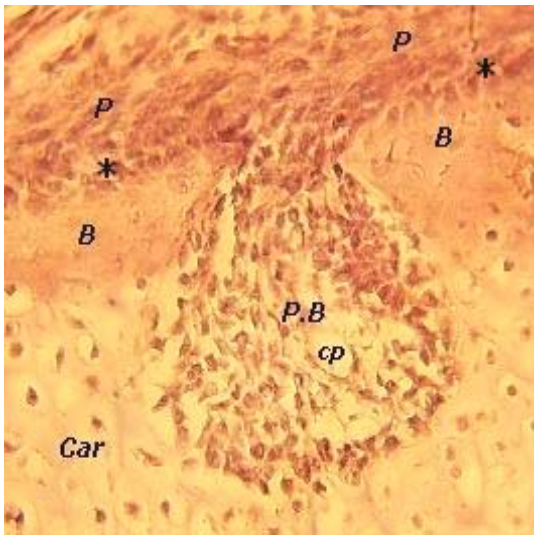
تصویر شماره ۲: تصویر ماکروسکوپی اسکلت ساق،مچ و کف پا

نتایج میکروسکوپیک

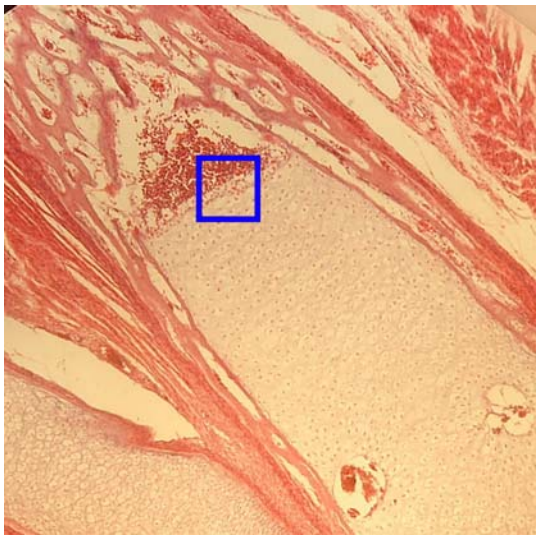
نحوه تشکیل اکثر استخوان های بدن شامل استخوان های بلند و کوتاه و نامنظم ،از طریق داخل غضروفی است. به این معنی که ابتدا، یک قالب غضروفی تشکیل می شود و رشد می کند و سپس در یک مرحله‌ای از دوران جنینی، شروع به استخوانی شدن می کند.در این گونه از استخوان‌ها نیز بطور مشابه با گروه قبلی تجمع سلول‌های مزانشیمی، گام نخست در تشکیل استخوان است .با تبدیل سلول های مزانشیمی به کندروبلاست‌ها و سپس کندروسیت‌ها تشکیل قالب غضروفی اولیه تامین می‌شود. شروع استخوانی شدن در این گروه از استخوان های بدن، با تشکیل استخوان یقه آغاز می شودو سپس بانفوذ جوانه های پریوستی (تصویر شماره۳)به داخل بافت غضروفی و تغییر کندروسیت های اطراف جوانه پریوستی همراه با هیپرترفی انجام می شودو نهایتابا مرگ آنها ،روند استخوانی شدن به عمق بافت غضروفی جابجا می‌شود. استخوانی شدن در مرکز استخوانی شدن اولیه ، ادامی می‌یابد و به طرف دوانتهای استخوان گسترده می شود.

پیشرفت مرکز اولیه استخوانی شدن همراه با از بین رفتن کندروسیت‌های هیپرترفی شده و قرار گرفتن استئوبلاست‌ها در این ناحیه و تشکیل استخوان‌های اولیه جدید انجام می گیرد.نکته قابل توجه در مورد استخوانی شدن داخل غضروفی در ماکیان ،آن است که، منطقه‌ای بنام منطقه آهکی شدن که در روند استخوانی شدن داخل غضروفی پستانداران وجود دارد، مشاهده نمی شود؛لذا منطقه هیپرتروفی درست در مجاورت منطقه استخوانی شدن وجود دارد(تصویر شماره۴و۵). با گسترش مرکز استخوانی شدن ،سیستم های هاورس جوان در ناحیه استخوان متراکم ،بویژه در ناحیه دیواره دیافیز استخوان های بلند تشکیل می شود.سیستم‌های هاورس جوان شامل تیغه های استخوانی دایره‌ای شکل اسیدوفیلی است که ضخامت چندانی ندارند و حاوی استئوسیت‌های درون لاکونا می باشند.فضای داخلی سیستم‌های هاورس بابافت همبند حاوی رگ های خونی پر شده است .سلول های استئوبلاست نیز سطح داخلی این فضاها را مفروش می کنند و با تشکیل تیغه‌های ظریف استخوانی جدید ،بر ضخامت سیستم های هاورس می افزایند.به هنگام مطالعه مقاطع میکروسکوپی مختلف در روند استخوانی شدن داخل غضروفی و نیز داخل غشایی، هیچ سلول استئوکلاست مشاهده نگردید.به اعتقاد برخی مولفین استئوکلاست ها در پرندگان از نوع تک هسته ای میباشن د و بر سطوح استخوانی قرار می‌گیرند. مقاطع میکروسکوپی ناحیه اپی

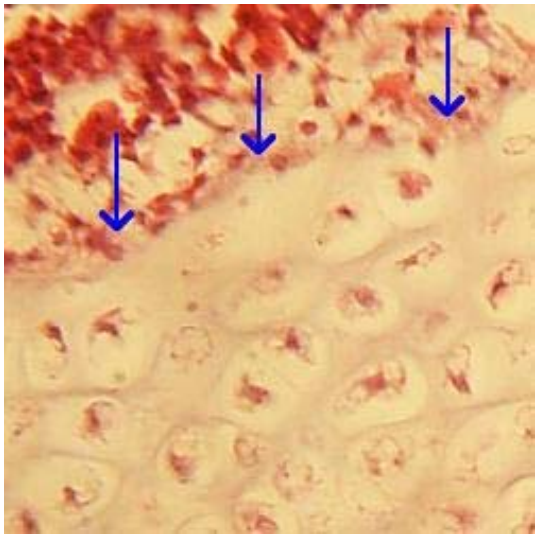
فیز استخوان های بلندی همچون ران و درشت نی، نشان می‌دهد که تا هنگام تولد هیچ اثری از استخوانی شدن آنها و تشکیل مرکز ثانویه استخوانی شدن ظاهر نمی‌شود، بلکه یکسری کانال های غضروفی در این نواحی غضروفی وجود دارند که حاوی رگ های خونی هستند و لابلای کندروسیت های ناحیه مذکور پراکنده شده اند.در هنگام تولد،در اطراف این کانال‌ها کندروسیت‌های هیپرتروفیه مشاهده می شوند که احتمالا دلیل بر نزدیک بودن استخوانی شدن این نواحی در روزهای ابتدایی پس از تولد می باشد.



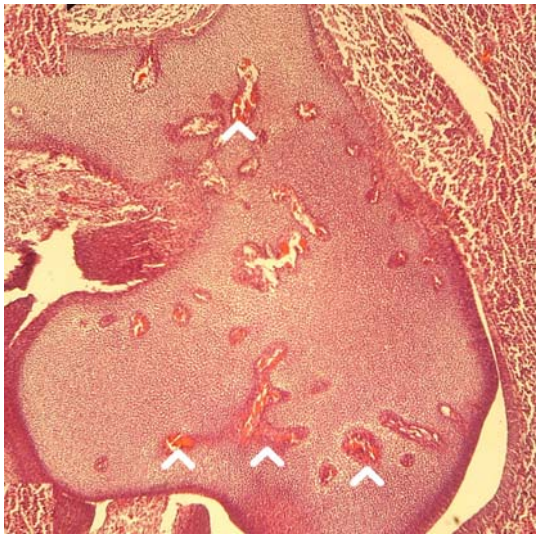
تصویر شماره ۳:تصویر میکروسکوپی تشکیل جوانه پریوستی (H&E) ۲۰ × (جوانه پریوستی: PB پریوست : P غضروف : Car مویرگ :cp استخوان یقه : B)



تصویر شماره ۴: تصویر میکروسکوپی تبدیل غضروف به استخوان (H&E) ×۴



تصویر شماره ۵: بخش داخل کادر در تصویر ۴.فلش ها مرزبین منطقه هیپرتروفی و استخوانی شدن را نشان می دهند(H&E) ۴۰ ×



تصویر شماره ۶ : نمایش کانال های غضروفی در اپی فیز(نوک پیکانها) (H&E) ۳/۲ ×

بحث

مقایسه نتایج حاصل از پژوهش حاضر با تحقیقات دیگر در این زمینه نشان می دهد که شباهت ها و اختلافاتی از لحاظ تغییرات رشد تکاملی اسکلت در سطح ماکروسکوپی و میکروسکوپی بین ماکیان با پرندگان دیگر(مثل بلدرچین ژاپنی) و همچنین رده های دیگر مهره داران مثل ماهی ها ،دوزیستان و پستانداران وجود دارد.

نکته قابل توجه و مهم در مورد نواحی از اسکلت ماکیان که به روش داخل غضروفی استخوانی می شوند،این است که ابتدا یک قالب غضروفی ساده و کوچک تشکیل می شودو به تدریج با شکل گیری بخش های جدید غضروفی که با غضروف اصلی و اولیه در ارتباط هستند ،شکل قالب غضروفی به شکل اصلی استخوان بالغ نزدیک می شود.سپس با گذشت زمان استخوانی شدن در این قالب غضروفی آغاز می شود و معمولا در زمان تولد بخش هایی از آن غضروفی باقی می‌ماند. بخشی از قالب غضروفی که استخوانی شدن را انجام می‌دهد، همان قسمت اولیه قالب غضروفی است و بقیه بخش ها که به آن اضافه شده اند،در زمان تولد به همان صورت غضروفی باقی می ماند.(۹و۱۳و۱۵).

در اندام‌های قدامی و خلفی موش بزرگ آزمایشگاهی شبیه به ماکیان و بلدرچین ،در استخوان‌های بلند استخوانی شدن در ناحیه دیافیز انجام شده است و ناحیه اپی فیز در زمان تولد غضروفی باقی می ماندتا تامین کننده بخشی از رشد استخوان پس از تولد باشند. در جنین ماکیان نیز هیچ مرکز استخوانی شدن ثانویه در ناحیه اپی فیز ها بهنگام تولد ظاهر نمی‌گردد(۱۳).

در مسیر داخل غضروفی ،پس از تشکیل قالب اولیه غضروفی از تجمع مزانشیمی اولیه ،مشابه با پستانداران، استخوان یقه از ناحیه میانی دیافیز شروع به تشکیل می‌نماید و بتدریج توسعه می‌یابد. سپس با نفوذ مویرگ‌های خونی به همراه جوانه پریوستی به داخل توده غضروفی ،مقدمه تشکیل بافت استخوانی اولیه در محل بافت غضروفی فراهم می‌شود. با تشکیل مرکز اولیه استخوانی شدن و توسعه آن به طرف اپی فیز ها ،بر وسعت منطقه استخوانی که در روش رنگ آمیزی دوگانه آلیزارین قرمز –آلسین آبی قرمز رنگ می شود، افزوده می شود.به هنگام تولد اثری از تشکیل مرکز ثانویه استخوانی شدن در انتها ها ی استخوان، دیده نمی شود (۶و۱۰و۱۱و۱۴و۱۶و۹). از اختلافات مراکز ثانویه و اولیه ی استخوانی شدن، علاوه بر محل آنها در داخل قالب غضروفی، مربوط به حضور کانال های غضروفی (Cartilage Canals) در مراکز ثانویه است.این کانال‌ها حاوی آرتریول، ونول و رشته های بدون میلین اعصاب است که همگی در یک بافت همبندی قرار گرفته اند. این کانال‌ها از پری کندریوم شروع می شوند و بطور یکنواخت در سطح اپی فیز پخش می شوند تا مواد غذایی را برای آن نواحی تامین کنند . عروق بداخل صفحه‌ی اپی فیزی یا غضروف مفصلی آینده نفوذ نمی‌کنند. آرتریول این کانال‌های غضروفی به یک کلافه‌ی مویرگی ختم می‌شوند. کانون‌های چندگانه ی استخوانی شدن در اطراف این کلافه تشکیل می‌شوند.زمانی که استخوانی شدن در مراکز ثانویه آغاز می‌شود کندروسیت های مجاور کلافه ی مویرگی هایپرتروفی می شوند و سپس می میرند و ماتریکس اطراف آن کلسیفیه می شود . لذا نحوه‌ی قرارگیری سلول‌ها در این مرکز استخوانی شدن شبیه به مراحل پنج گانه‌ی استخوانی شدن در صفحه ی رشد می باشد. از آنجایی که بافت همبند داخل کانال‌های غضروفی در امتداد پری کندریوم می باشد لذا سلول‌های درون آن

پتانسیل استئوژنیک دارند.نهایتا مراکز ثانویه ی کوچک در اپی فیز بهم پیوسته و استخوان اسفنجی در ناحیه ی اپی فیز شکل می گیرد. در اثر استخوانی شدن تمامی غضروف شفاف ناحیه ی اپی فیز با استخوان جایگزین نمی شود ، بلکه دردو ناحیه غضروف باقی می ماند .غضروف مفصلی و غضروف ناحیه ی صفحه ی رشد یا صفحه ی متافیزی که بشکل یک صفحه ی عرضی در مرز بین اپی فیز و دیافیز قرار می گیرند.حلقه ی پری کندری، صفحه ی رشد را از اطراف احاطه می کند و افزایش قطر آن را امکانپذیرمی نماید (۳).

در جنین موش بعنوان یک پستاندار ۵مرحله اصلی تبدیل غضروف به استخوان وجود دارد که پس از شکل گیری استخوان یقه ،با نفوذ جوانه پریوستی و هجوم عروق خونی به غضروف و سپس هیپرتروفی کندروسیت‌ها و مرگ آنها و بدنبال آن آهکی شدن ماتریکس اطراف کندروسیت های هیپرتروفی شده آغاز می شود(۶و۱۰و۱۱و۱۴و۱۶و۱۹و۲۰).درپرندگان نیز چنین مراحلی وجود دارد با این اختلاف که اگر در پستانداران هیپرتروفی کندروسیت ها نقش اساسی در افزایش حجم صفحه رشد و استخوان دارند اما در پرندگان ازجمله ماکیان ،تکثیر سلول ها در این رابطه دخالت می نماید.در دوزیستان نسبت متعادلی بین تکثیر و هیپرتروفی دیده می شودو سلول های کندروسیت بجای آنکه با ترتیب ستونی و عمود بر محور طولی استخوان قرار بگیرند ،نامنظم هستند ،این گونه بنظر می رسد که در دوزیستان تبدیل غضروف به استخوان احتمالا در رشد قطری استخوان دخالت دارد و در رشد طولی بی تاثیر است (۷).

در رابطه با منشا سلول‌های استئوبلاست در روند استخوانی شدن داخل غضروفی نیز بحث بسیاری وجود داردو مطالعات بسیار گوناگونی روی انواع استخوان‌ها، انجام گرفته است .هر چند که بطور عمومی این گونه پذیرفته شده است که با هیپرتروفی و مرگ کندروسیت‌ها سلول های استئوکلاستی، کندروسیت‌های مرده را برمی دارند و سلول های استخوان ساز به همراه رگ های خونی به این منطقه هجوم می آورند و ترشح ماتریکس استخوانی را روی ماتریکس آهکی شده غضروفی آغاز می نمایند اما مشاهده چند مورد بویژه در بافت شناسی استخوانی شدن داخل غضروفی ماکیان که در این تحقیق نیز در فصل نتایج به آنها اشاره گردید، نشان داد که احتمالا سلول‌های کندروسیت، خود شان به سلول‌های سازنده استخوان تبدیل می شوندو ساخت ماتریکس استخوانی را به عهده می‌گیرند(۴).

منابع

۱- پریور، کاظم ؛ محسنی کوچصفهانی، هما (۱۳۷۲) جنین شناسی و اطلس آزمایشگاهی، انتشارات دانشگاه تربیت معلم ،صص: ۴۰۴-۲۵۷

۲- منتظری، سیدمهدی ؛مولوی، نادر ؛ مختارانی، مسعود (۱۳۸۱)بافت شناسی پایه، انتشارات ارجمند، چاپ سوم صص ۱۹۷-۱۶۴

3- Banksw.j. (1993) **Appliedveterinary histology , 3th williams & wilkins**. pp: 107-141

4- Blumer ***m.***j.f, longato s, richter e, perez m.t, konakci k.z, fritschh.(2005) **The role of cartilage canals in endochondrial and perichondrial bone formation :are there similarities between these processes?**, journal anat,206; 359-372.

5- Dellmann , h. d. (1998) **Text book of veterinary histology ,5th ed. Williams and wilkins** ;:44-58

6- Doschak m. r, cooper d. m, huculak c.n,matyas , journal, r, hart d. a, bray r.c. (2003) **Angiogenesis in the distal**

femoral chondroepiphysis of the rabbit during development of the secondary center of ossification,journal of anatomy ,203(2);223-233

7- Felisbino s.l, carvalho, h. f. (1999) **The epiphysial cartilage and growth of long bones in rana cates beiana, tissue &cell** 31(3)301-307

8- Gilbert s. f. (2000) **constructing the organism, sinauer associated.inc**, pp:437-459

9- Grobmann m, marcelo r, maier w. (2002) **on the development of the shoulder girdle in crocidura,russula (soricidae) and other placental mammals, evolutionary and functionall aspects, journal of anatomy** , 201;371-381

10- Hall b.k, miyake t. (1992) **The memberanous skeleton:the role of cell condensations in vertebrate skeletogenesis, anat embryol** , 186; 107-124.

11- Helmtrud i. r.(1997) **New aspects of endochondrial ossification in the chick: chondrocyte apoptosis, bone formation by former chondrocytes ,and acid phosphatase activity in the endochondrial bone matrix.,journal of bone mineral research**, 12;795-805.

12- Karsenty g. (1999) **The genetic transformation of bone biology , genes and development**, 13;3037-3051.

13- Menegola e, baroccia m, giavini e.(2001) **Atlas of rat fetal skeleton double stained for bone and cartilage, teratology**: 64; 125-133

14- Nah h.d, pacifici m,gerstenfeld l.c,.adams s. L, kirsch t.(2000) **Transient chondrogenic phase in in the intramembranous pathway during normal skeleton development.** , jbmr, 15;522-533.

15- Nakane y, tsodzuki m. (1999) **Development of the skeleton in japanese quail embryos, dev. Growth differ**, 41(5); 523-534

16- Pechak d.g,kujawa m.g,caplan a.i.(1986) **Morphology of bone development and bone remodeling in embryonic chick limbs, bone**,7(6);459-472

17- Provot s, schipani e. (2005) **Molecular mechanism of endochondral bone development , biochemical and biophysical research communications** ,328; 658-665.

18- Reiter i,tzukerman m,maor g.(2002) **Spontaneous differentiation primary chondrocyte tissue culture: amodel for endochondrial ossification, bone**, 31; 2333-339

19- Scott- savage p.,hall bk.(1979) **The timing of the onset of osteogenesis in the tibia of theembryonic chick., ,journal morphol** ,162(3)453-463

20- Thompson t. j,owenes p. d, wilson d. j. (1989) **Intramembranous osteogenesis and angiogenesis in the chick embryo., journal of anatomy** ,166;55-65

21- White a, wallis g.(1998) **endochondral ossification: a delicate balance between growth and mineralization, current biology** , 11(15);589-591

22- 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

23- Zelzer e, mclean w,yin-shan ng, fukai n,.reginato a.m, lovejoy s.(2002) **skeletal defects in vegf120/120 mice reveal multiple roles for vegf in skeletogenesis ,development** ,129; 1893 -1904 **,** journal anat,206;359-372.