مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۰، دوره ۶۶، شماره ۳، ۲۰۱-۱۹۳

تأثیر مقادیر مختلف کادمیوم بر تغییرات آسیب شناسی و بروز آپوپتوز لنفوسیت‌ها در بورس فابریسیوس جوجه‌های گوشتی

عباس جواهری وایقان[1] محمد جواد قراگزلو[2*] غلامرضا نیکبخت بروجنی[2] جمیله سالار آملی[3] سعید بکائی[4] سعید حصارکی[5]

۱) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان - ایران.
۲) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۳) گروه فیزیولوژی، فارماکولوژی و سم شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۴) گروه اپیدمیولوژی و بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۵) گروه آسیب شناسی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۱۵ شهریور ماه ۱۳۸۹ ، پذیرش نهایی: ۲۹ آذر ماه ۱۳۸۹)

چکیده

مسمومیت با کادمیوم اثرات زیان‌آوری را بر ارگان‌های حیاتی بدن به‌جای می‌گذارد که می‌توان به نارسائی کلیوی، آسیب‌های کبدی، تضعیف سیستم ایمنی اشاره نمود. در این مطالعه به منظور نشان دادن برخی از تاثیرات این فلزسمی از جمله مداخله در میزان بروز اپوپتوز سلول‌های لنفوئیدی و ایجاد تغییر در ساختمان بافت لنفوئیدی، پرنده به‌عنوان مدل حیوانی انتخاب گردید. تعداد ۱۲۰ قطعه جوجه خروس گوشتی به ۴ گروه کنترل و گروه‌های ۱ و ۲ و ۳ تقسیم و کلرور کادمیوم به جیره غذایی آن‌ها افزوده شد به‌طوری که گروه کنترل ppm ۰، گروه ۱ ppm ۲۵، گروه ۲ ppm ۵۰ و گروه ۳ ppm ۱۰۰ کادمیوم دریافت داشتند. در روزهای ۱۴ و ۲۸ و ۴۲ از هر گروه ۷ قطعه جوجه به‌صورت تصادفی انتخاب و پس از وزنکشی و کشتار، بورس فابریسیوس آن‌ها جدا شده و بعد از پایدار کردن در فرمالین بافر ۱۰ درصد و آماده‌سازی نمونه‌های بافت، مقاطعی با ضخامت ۵ میکرون با هماتوکسیلین و ائوزین و مقاطع ۴-۳ میکرونی با تکنیک ایمونوهیستوشیمی TUNEL رنگ‌آمیزی و از نظر ضایعات و آسیب‌شناسی بورس فابریسیوس، تراکم سلول‌های لنفوئیدی در فولیکول‌ها و میزان سلول‌های آپوپتوتیک مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین میزان کادمیوم موجود در کبد هر یک از نمونه‌ها با روش جذب اتمی اندازه‌گیری شده و با وزن زنده جوجه‌ها و وزن بورس فابریسیوس و میزان آپوپتوز موجود در هر نمونه مورد مقایسه آماری قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که افزایش وزن جوجه‌ها و ارگان‌های مورد بررسی با افزایش میزان کادمیوم جیره نسبت معکوس داشته ($p<0/01$) و میزان کادمیوم تجمع یافته در کبد و میزان آپوپتوز ایجاد شده در بورس با افزایش کادمیوم جیره‌ها افزایش می‌یابد ($p<0/01$). همچنین با افزایش کادمیوم در جیره‌ها به میزان قابل توجهی کاهش جمعیت لنفوسیتی در فولیکول‌های لنفاوی و ادم در ساختار بورس‌های مورد مطالعه مشاهده گردید. در مقایسه با گروه کنترل در ۲۸ و ۴۲ روزگی افزایش تعداد و اندازه کیست‌های داخل اپی تلیالی در گروه‌های ۳ و ۲ مشاهده گردید و در ۴۲ روزگی در گروه ۳ آتروفی بافت اپیتلیوم بورس و افزایش سلول‌های دچار آپوپتوز در آن‌ها نیز مشهود بود. می‌توان نتیجه‌گیری نمود که تحت شرایط تجربی غلظت‌های بالای کادمیوم در جیره (۱۰۰ و ۵۰ ppm) اثرات زیان‌آوری بر بورس فابریسیوس دارد.

واژه‌های کلیدی: کادمیوم، بورس فابریسیوس، آپوپتوز، تست تانل (TUNEL).

مقدمه

کادمیوم با وزن اتمی ۱۱۲/۴۱ در سال ۱۸۱۷ به‌عنوان یکی از فلزات سنگین کشف شد ولی استفاده از آن به‌صورت گسترده در صنعت در حدود سال ۱۹۵۰ آغاز گردید (۱). این عنصر به‌عنوان یکی از مهمترین عوامل مسموم کنندهٔ محیطی و صنعتی شناخته شده و در موارد مواجهه با مقادیر زیاد، اختلالات حاد و در مقادیر کم و زمان طولانی عوارض مزمن در ارگان‌های مختلف ایجاد می‌کند (۱،۶،۹). اولین گزارش از اختلالات ناشی از مسمومیت با کادمیوم در سال ۱۹۳۸ منتشر شد و مربوط به ریهٔ کارگرانی بوده که با این فلز سروکار داشته‌اند (۱). بعد از آن در سال ۱۹۴۸ وقوع آمفیزم و پروتئینوری در کارگران شاغل در صنعت باتری‌سازی و همچنین پس از جنگ جهانی دوم در ژاپن وقوع شکستگی‌های پاتولوژیک استخوانی همراه با درد شدید مفاصل (بیماری Itai-Itai) ناشی از مسمومیت با کادمیوم گزارش گردید (۱،۸).

در حال حاضر کادمیوم به‌عنوان یک فلز صنعتی مهم مطرح بوده و همراه با استخراج سایر فلزات مانند سرب و روی و مس مقادیری از این فلز نیز به‌دست می‌آید. این فلز در محصولات صنعتی و خانگی مانند باطری‌ها و رنگ‌ها و پوشش روی فلزات و در صنایع پلاستیک کاربرد دارد (۱). جذب گوارشی این فلز ناچیز بوده و بیشترین جذب آن از طریق تنفس و در کارگاه‌های صنعتی انجام می‌گیرد. کادمیوم دارای نیمه عمر بیولوژیک بسیار طولانی در بدن بوده و به مرور زمان در بدن تجمع می‌یابد و با توجه به گسترش استفاده از آن در فرآیندهای صنعتی به‌نظر می‌رسد در آینده میزان موارد مسمومیت با این عنصر افزایش یابد (۱،۹). این فلز به‌عنوان یک عامل موتاژن، تراتوژن و کارسینوژن (۲،۳،۶) شناخته شده است و می‌تواند باعث پراکسیداسیون لیپیدها و شکستگی رشته‌های تک زنجیره‌ای DNA و اختلالات کروموزومی شود. اختلال در ترمیم DNA و

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۱۷۰۶۴، نمابر: ۰۲۱-۶۶۹۳۳۲۲۲ Email: mjavad@ut.ac.ir

ایجاد ضایعهٔ اکسیداتیو در آن باعث بروز عوارض توکسیک روی ژن‌ها می‌شود (۲،۶،۱۷). در تعدادی از مطالعات بر قابلیت کادمیوم در ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های آزاد به‌عنوان واسطه ایجاد ضایعات روی ژن‌ها تأکید شده است (۶،۱۲،۱۹،۲۰). این موضوع که گونه‌های فعال اکسیژن باعث ایجاد آپوپتوز می‌شود و از طرف دیگر این‌که کادمیوم به‌عنوان یکی از عوامل ایجاد آپوپتوز شناخته شده است به صحت نظریهٔ فوق قوت می‌بخشد.

تأثیر کادمیوم در ایجاد آپوپتوز و نکروز لنفوسیت‌های طحال رت در مطالعات آزمایشگاهی نشان داده شده است (۱۷) همچنین ایجاد آپوپتوز و نکروز در سلول‌های تک هسته‌ای خون انسان در نتیجهٔ تأثیر مقادیر مختلف کادمیوم گزارش شده است (۳).

نشان داده شده است که وجود مقادیر کم کادمیوم (۵ppm) در جیرهٔ غذایی جوجه‌های گوشتی بر روند رشد و نمو تأثیر منفی به جای نمی‌گذارد در حالی که وجود مقادیر بالا (۱۰۰ppm و ۵۰ppm) روند رشد را کند یا آن را متوقف می‌کند که این مسئله می‌تواند ناشی از بروز اختلالات رشد و نمو و ایجاد آپوپتوز در بافت‌های مختلف باشد (۲۲).

بورس فابریسیوس در طیور به‌عنوان تنها محل بلوغ و تمایز لنفوسیت‌های B مطرح است (۵،۱۱،۱۴). این عضو بین ۴ تا ۱۲ هفتگی به حداکثر رشد خود رسیده و تقریباً هم‌زمان با بلوغ جنسی که در حدود ۲۰ هفتگی شروع می‌شود تحلیل می‌رود و به تدریج با بافت هم‌بند جایگزین می‌شود (۲۱). آنتی ژن‌های خارجی در سیر رشد بورس از طریق مکانیسم نوشیدن (Drinking) توسط بورس به این بافت ارائه می‌شوند به این ترتیب که این آنتی ژن‌ها پس از عبور از سلول‌های اپی تلیال بورس فابریسیوس وارد پارانشیم آن شده و پاسخ ایمنی را القا می‌نمایند. بخش قشری بورس فابریسیوس محل تکامل و بلوغ سلول‌های لنفوئیدی بدون حضور آنتی ژن خارجی می‌باشد. در بورس فابریسیوس ژن‌های پذیرنده آنتی ژنی لنفوسیت‌های B باز آرایی شده و این پذیرنده‌ها در سطح سلول ظاهر می‌شوند و در نهایت سلول‌های لنفوئیدی بالغ به بخش مرکزی فولیکول‌ها مهاجرت می‌کنند. در برخورد با آنتی ژن‌های خارجی پاسخ ایمنی در بخش مرکزی شکل می‌گیرد (۹،۱۱). شمار قابل توجهی از سلول‌های پیش ساز لنفوسیت B در بخش مرکزی به‌طور طبیعی با مکانیسم آپوپتوزیس نابود می‌شوند، نشان داده شده است که تنها حدود ۵ درصد از سلول‌های لنفوئیدی تکثیر یافته در بورس به مرحله بلوغ رسیده و به ارگان‌های لنفوئیدی ثانویه از طریق گردش خون وارد می‌شوند (۹،۱۱).

به‌طور کلی آپوپتوز به‌عنوان یک فرآیند فعال و نیازمند به انرژی به واسطهٔ عوامل محرک (داخل سلولی یا خارج سلولی) آغاز می‌شود (۴،۱۲،۱۳) و مسمومیت با کادمیوم نیز به‌عنوان یکی از عوامل ایجاد این پدیده شناخته شده است (۲،۶،۷). مواجه شدن با مقادیر بالای کادمیوم می‌تواند منجر به جراحت و مرگ سلولی و ایجاد پدیده نکروز شود ولی مواجهه با مقادیر کم این عنصر باعث القا آپوپتوز در سلول‌ها می‌شود (۳،۷،۸).

برای تشخیص وقوع آپوپتوز بسته به هدف مطالعه و نوع نمونه از روش‌های مختلف استفاده می‌شود. در این تحقیق برای نشان دادن سلول‌های لنفوئید آپوپتوتیک در بورس فابریسیوس جوجه‌ها از روش TUNEL استفاده شده است که در طی آن نوکلئوتیدهای نشاندار شده با فلورسئین به بنیان '۳OH انتهایی قطعات شکسته شده DNA متشکل از ۲۰۰-۱۸۰ زوج باز نوکلئوتیدی متصل می‌شوند و این پیوندها را می‌توان با میکروسکوپ فلورسانس در طول موج ۵۶۵-۵۱۵ نانومتر به‌صورت نقاط سبز درخشان در داخل هسته سلول‌هایی که در مراحلی از آپوپتوز می‌باشند مشاهده کرد. متعاقب آن با استفاده از معرف آنتی بادی آنتی فلورسانس کنژوگه شده با پراکسیداز هورس رادیش (peroxidase Horse radish) و اضافه کردن دیآمینوبنزیدین میتوان پدیدار شدن رنگ قهوه‌ای را در هسته‌های آپوپتوتیک با میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار داد (۱۵،۱۶).

هدف از این تحقیق ارزیابی کمی تأثیر غلظت‌های مختلف کادمیوم در یک فاصله زمانی ۴۲ روزه بر روی تغییرات آسیب‌شناسی و افزایش القاء آپوپتوزیس در بورس فابریسیوس و ارتباط آن با میزان تجمع کادمیوم در کبد بوده است که برای اولین بار در ایران انجام گرفت.

مواد و روش کار

تعداد ۱۲۰ قطعه جوجه خروس یک روزه گوشتی با وزن ۲±۴۰ گرم از نژاد راس از شرکت زربال خریداری و به طور تصادفی در ۴ گروه شامل گروه کنترل و گروه‌های تحت تغذیه با کلرورکادمیوم شامل گروه ۱ (۲۵ppm)، گروه ۲ (۵۰ppm) و گروه ۳ (۱۰۰ppm) تقسیم شدند. هر گروه شامل ۳۰ قطعه جوجه بود. جوجه‌ها به‌مدت ۴۲ روز در قفس‌های فلزی و تحت شرایط استاندارد نگهداری شدند. این گروه‌ها به‌صورت آزاد به دان و آب شهری که کادمیوم آن زیر آستانهٔ جداسازی است دسترسی داشتند. از هر گروه در سنین ۴۲ و ۲۸ و ۱۴ روزگی ۷ قطعه جوجه به‌صورت تصادفی انتخاب گردیده و پس از وزن‌کشی و ذبح کالبدگشایی شدند. پس از بازرسی ظاهری و ثبت تغییرات احتمالی در اندام‌ها، کبد و بورس فابریسیوس این جوجه‌ها جدا شده و بعد از حذف بافت‌های اضافی وزن شدند. بخشی از بورس به ابعاد حدود ۰/۵ سانتیمتر در محلول فرمالین ۱۰ درصد پایدار گردید. به منظور اندازه‌گیری میزان کلرورکادمیوم تجمع یافته در کبد نمونه‌ای به وزن حدود دو گرم از بافت کبد جدا و در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد تا هنگام انجام آزمایشات بعدی نگهداری شد. بعد از جمع‌آوری همه نمونه‌های بورس اقدام به پاساژ نمونه‌ها و تهیه بلوک‌های پارافینی از آن‌ها گردید و برش‌هایی به ضخامت ۴-۳ میکرون برای رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی با تکنیک TUNEL تهیه شد. برای انجام رنگ‌آمیزی TUNEL پس از چسباندن برش‌ها روی لام ابتدا لام‌ها را تا ۶۰ درجه

سانتیگراد جهت ذوب شدن پارافین روی نمونه حرارت داده و سپس مراحل پارافین زدایی با گزیلل در ۳ مرحله و آبدهی با درجات نزولی الکل در ۴ مرحله به ترتیب با الکل مطلق و ۹۵ و ۸۰ و ۷۰ درجه انجام شد. برای ایجاد نفوذپذیری در غشای سلولی و هسته‌ها نسبت به ترکیبات به‌کار رفته در تکنیک TUNEL، ابتدا نمونه‌ها تحت تأثیر ترکیب پروتئیناز K با غلظت ۲۰µg/ml (شرکت Roch و .Cat. No ۰۳۱۱۵۸۳۶۰۰۱) به‌مدت ۴۵ دقیقه و در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و سپس مدت ۵ دقیقه در ظرف پلاستیکی حاوی ۲۰۰ میلی لیتر با فرسیترات ۰/۱M در دستگاه مایکروویو با قدرت ۳۵۰ وات قرار داده شدند. پس از آن با قرار دادن نمونه در ترکیب ۳ درصد پراکسید هیدروژن (H2O2) در متانول خالص به مدت ۱۰ دقیقه، پراکسیدازهای درون زاد که باعث ایجاد تداخل در آزمایش می‌شد حذف گردیدند.

برای کنترل صحت آزمایش یک نمونهٔ بافتی به‌عنوان کنترل مثبت درنظر گرفته شد و با قرار گرفتن در معرض داکسی ریبونوکلئاز-۱ (I Deoxribonuclease) (شرکت Cat. No. ۰۵۲۱, Ferments) با غلظت ۱۰۰u/ml به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد، DNA نمونه به قطعات کوچک شکسته شدند. در مرحلهٔ بعد ۵۰ میکرولیتر محلول واکنش TUNEL (شرکت Roch Cat. No. ۱۱۶۸۴۸۱۷۹۱۰)، شامل ۵ میکرولیترمحلول حاوی آنزیم (deoxy nucleotidyl Transferase Terminal) TdT و ۴۵ میکرولیتر محلول حاوی نوکلئوتیدهای نشاندار (Nucleotide mixture in reaction buffer یا Lable solution) روی هرکدام از نمونه‌ها ریخته و به‌مدت ۶۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد و در محیط مرطوب و تاریک نگهداری شدند. به‌عنوان کنترل منفی نیز روی یک نمونهٔ بافتی فقط ۵۰ میکرولیتر از محلول حاوی ماده نشان دار (Lable Solution) بدون حضور آنزیم (TdT) ریخته شده و در شرایط فوق همراه کنترل مثبت و نمونه‌های تست نگهداری شد. در پایان این مرحله و پس از شستشوی لام‌ها با محلول PBS، از میکروسکوپ فلورسانس و با طول موج ۵۰۰-۴۵۰ نانومتر برای مشاهده فلورسانس ناشی از پیوند نوکلئوتید نشاندار شده با فلورسئین به انتهای ۳'OH قطعات DNA شامل ۲۰۰-۱۸۰ جفت باز نوکلئوتیدی استفاده شد. در ادامه مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول Converter-POD شامل آنتی بادی آنتی فلورسئین کنژوگه شده با پراکسیداز هورس رادیش (Horse Radish Peroxidase) روی نمونه‌ها ریخته و مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد و در اتاقک تاریک و مرطوب نگهداری شدند. بعد از آن نمونه را با PBS شسته و با ریختن ۱۰۰ میکرولیتر از محلول دی آمینوبنزیدین (شرکت Roch Cat. No. ۱۱۷۱۸۰۹۶۰۰۱) مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری و پس از شستشو با محلول PBS، به‌عنوان رنگ‌آمیزی تفریقی هسته سلول‌ها، نمونه‌ها با رنگ هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی شده و مورد ارزیابی با میکروسکوپ نوری قرار گرفتند. در رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی TUNEL هسته سلول‌های دچار آپوپتوز و قطعات هستهٔ موجود در اجسام آپوپتوتیک به رنگ قهوه‌ای یا قهوه‌های تیره ظاهر شده و از سایر هسته‌ها قابل تفریق خواهند بود. برای ارزیابی میزان آپوپتوز ایجاد شده در هرکدام از نمونه‌های بورس، تعداد ۸ شان میکروسکوپی با بزرگنمایی ۱۰۰۰ به‌صورت تصادفی انتخاب و سلول‌های آپوپتوتیک در آن‌ها مورد شمارش قرار گرفت و با محاسبهٔ میانگین آن‌ها تعداد متوسط سلول‌های دچار آپوپتوز در بورس در هر نمونه مشخص گردید.

به موازات انجام آزمایشات پاتولوژی، میزان سم تجمع یافته در کبد هرکدام از نمونه‌ها با استفاده از روش جذب اتمی (Atomic Absorption) اندازه‌گیری شد. برای ارزیابی ساختار بافت‌شناسی و تغییرات آسیب‌شناسی نمونه‌ها مانند تراکم سلول‌های لنفوئیدی، ادم و نکروز و سایر تغییرات احتمالی پاتولوژیک از هریک از بلوک‌های پارافینی آماده شده از نمونه‌ها، برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرون تهیه و به روش هماتوکسیلین ائوزین رنگ‌آمیزی شده و مورد مطالعه قرار گرفتند.

سنجش ارتباط آماری بین وزن زنده جوجه‌ها، وزن بورس‌ها و میزان آپوپتوز ایجاد شده در سلول‌های لنفاوی و میزان کادمیوم تجمع یافته در کبد و مقایسهٔ آن‌ها در گروه‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS و آزمون ضریب همبستگی پیرسون انجام گرفت.

نتایج

جدول ۱ میانگین وزن زنده، میانگین حضور سلول‌های آپوپتوتیک در هر شان میکروسکوپی با بزرگنمایی ۱۰۰۰، میانگین غلظت کادمیوم در کبد جوجه‌های گروه‌های چهارگانه، میانگین وزن بورس و میزان درصد وزن بورس فابریسیوس به وزن بدن، را در سنین ۱۴، ۲۸ و ۴۲ روزگی نشان می‌دهد. براساس این نتایج درگروه۲ حضور ppm ۲۵ کلرور کادمیوم در جیره تا ۱۴ روزگی تأثیری در میزان رشد جوجه‌ها و میزان آپوپتوز لنفوسیت‌های بورس ندارد و مقدار کادمیوم تجمع یافته در کبد نیز مانند گروه کنترل کمتر از ppm ۱ است. در حالی که در ۲۸ روزگی در همین گروه نسبت به گروه کنترل کاهش رشد و کاهش وزن بورس و افزایش ناچیز آپوپتوز و تجمع حدود ppm ۳ کلرور کادمیوم در کبد ملاحظه می‌شود و در ۴۲ روزگی نیز این روند ادامه داشته است. در گروه‌های ۳ و ۲ با افزایش سن، کاهش رشد بدن، کاهش رشد بورس و افزایش میزان آپوپتوز و افزایش تجمع کادمیوم در کبد متناسب با افزایش میزان کادمیوم جیره دیده می‌شود. براساس نتایج آزمون ضریب همبستگی پیرسون بین افزایش غلظت کادمیوم در کبد و میزان آپوپتوز سلول‌های لنفاوی بورس فابریسیوس (r=0/902, p<0/01) و بین وزن زنده نمونه‌ها و وزن بورس‌ها (r=0/915, p<0/01) ارتباط معنی‌دار و مستقیم وجود دارد و نیز بین وزن زندهٔ نمونه‌ها و میزان آپوپتوز (r=-0/902, p<0/01) و بین وزن بورس‌ها و میزان آپوپتوز (r=-0/902, p<0/01) ارتباط معنی‌دار معکوس وجود دارد.

نمودار ۱ نشان می‌دهد که بین میزان آپوپتوز سلول‌های لنفوئیدی

جدول ۱- وزن بدن، وزن بورس فابریسیوس، تعداد سلول‌های آپوپتوتیک، غلظت کادمیوم در کبد و نسبت وزن بورس فابریسیوس به وزن بدن در گروه‌ها و سنین مختلف.

گروه	سن(روز)	وزن بدن (گرم)	وزن بورس (گرم)	میزان آپوپتوز در بورس	غلظت کادمیوم کبد ((ppm	.نسبت وزن بورس به وزن بدن
کنترل	۱۴	۲۲۸/۸۶±۷/۷۹	۰/۶۶±۰/۰۷	۱۱/۷۱±۰/۶۱	۰/۱±۰/۰۰	۰/۰۰۲۸
	۲۸	۹۸۰±۳۴/۰۱	۱/۹۶±۰/۱۱	۱۱/۰۹±۰/۶۴	۰/۱±۰/۰۰	۰/۰۰۲۰
	۴۲	۱۹۱۰±۱۵/۲۷	۲/۷۶±۰/۰۶	۱۳/۲۰±۰/۴۷	۰/۲۷±۰/۰۵	۰/۰۰۱۴
گروه۱(25ppm)	۱۴	۲۳۴/۷۱±۷/۴۹	۰/۵۳±۰/۰۴	۱۱/۸۵±۰/۳۵	۰/۶۶±۰/۰۲	۰/۰۰۲۳
	۲۸	۷۶۵/۷۱±۱۹/۲۵	۱/۶۴±۰/۰۵	۱۱/۸۳±۰/۵۶	۲/۹۸±۰/۲۳	۰/۰۰۲۱
	۴۲	۱۵۴۲/۸۵±۴۳/۰۸	۳/۴۲±۰/۱۶	۱۲/۹۳±۰/۳۲	۵/۷۱±۰/۳۹	۰/۰۰۲۲
گروه۲(50ppm)	۱۴	۱۵۶/۸۵±۳/۶۵	۰/۳۴±۰/۰۳	۱۴/۱۸±۰/۴۰	۶/۱۵±۰/۳۶	۰/۰۰۲۱
	۲۸	۴۰۸/۸۵±۷/۵۵	۱/۰۲±۰/۰۸	۱۵/۴۹±۰/۵۰	۱۱/۷۹±۰/۷۴	۰/۰۰۲۵
	۴۲	۸۴۳/۵۷±۴۰/۶۳	۱/۱۹±۰/۲۲	۱۵/۹۰±۰/۳۸	۱۵/۲۱±۰/۹۹	۰/۰۰۱۴
گروه۳ (100ppm)	۱۴	۸۸/۵۷±۲/۴۱	۰/۱۲±۰/۰۱	۱۷/۸۴±۰/۳۵	۱۱/۰۶±۰/۲۱	۰/۰۰۱۶
	۲۸	۲۸۵/۵۷±۳۰/۳۰	۰/۴۵±۰/۰۴	۱۹/۹۶±۰/۹۴	۲۱/۱۴±۲/۷۳	۰/۰۰۱۳
	۴۲	۵۶۶/۵۷±۷۶/۷۸	۰/۷۶±۰/۱۳	۱۹/۳۷±۰/۸۷	۲۵/۵۸±۱/۳۳	۰/۰۰۱۴

بورس در گروه کنترل وگروه۱ در همه سنین اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ولی میزان آپوپتوز در گروه۲ از گروه کنترل و گروه۱ ودر گروه ۳ از بقیه گروه‌ها به صورت معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) بیشتر است.

نمودار ۲ نشان می‌دهد که در ۱۴ روزگی با افزایش میزان کادمیوم جیره نسبت درصد وزن بورس به وزن زنده کاهش می‌یابد. این تفاوت بین گروه کنترل وگروه‌های دیگر معنی‌دار بوده ولی بین گروه ۱وگروه ۲ اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. همچنین این نسبت به صورت معنی‌داری درگروه۳ از سایر گروه‌ها کمتر است. در حالی که در ۲۸ روزگی نسبت درصد وزن بورس به وزن زنده در گروه ۲ با اختلاف معنی‌دار از سایر گروه‌ها بیشتر است($p<۰/۰۵$) ودر ۴۲ روزگی این نسبت در گروه ۱ به صورت معنی‌دار ($p<۰/۰۱$) از سایر گروه‌ها بیشتر است.

در ۱۴ روزگی وزن بورس فابریسیوس درگروه‌های ۲ و ۳ و در روزهای ۲۸ و ۴۲ وزن بورس فابریسیوس درگروه‌های ۱ و ۲ و ۳ کمتر از وزن بورس گروه کنترل بود.

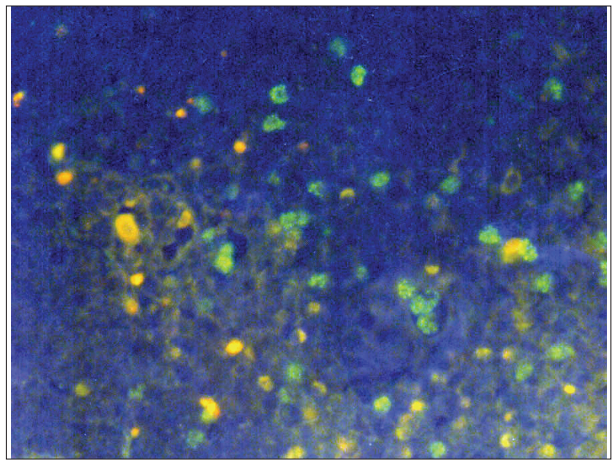
بررسی ماکروسکوپیک بورس نشان داد که با وجود کوچکتر بودن اندازه و وزن بورس فابریسیوس در گروه‌های ۲و۳ نسبت به گروه کنترل وگروه ۱، تعداد چین‌ها (پلیکاها) در همه گروه‌ها یکسان بوده واندازه چین‌ها با افزایش سن در هر گروه افزایش یافته ولی درسن مشخص با افزایش کادمیوم در جیره اندازه چین‌ها کوچک‌تر بودند.

مطالعه مقاطع رنگ‌آمیزی شده با H&E نشان داد که متناسب با کاهش اندازه چین‌های بورس در گروه‌های ۲ و به‌ویژه ۳، اندازه فولیکول‌های لنفاوی کاهش یافته و در تعدادی از پلیکاها آثار فولیکول‌های آتروفیک دیده می‌شد. در این گروه‌ها نسبت قطر بخش قشری فولیکول‌ها به قطر کلی فولیکول در مقایسه با گروه کنترل و گروه ۱ کمتر بود. همچنین در گروه‌های ۲و۳ در ۴۲ روزگی با وجود کوچکتر شدن اندازه چین‌ها، کیست‌های داخل اپی تلیالی بیشتری درون بافت اپی تلیال این چین‌ها دیده می‌شد. به نسبت افزایش مصرف کادمیوم تراکم سلول‌های لنفوئیدی در فولیکول‌های بورس فابریسیوس در گروه‌های ۱و۲و۳نسبت به گروه کنترل، کاهش پیدا کرده بود (تصویر۲،۳،۴). در هیچ‌کدام از نمونه‌های مورد مطالعه کانون‌های نکروز یا التهاب مشاهده نگردید. در بعضی از نمونه‌های گروه‌های ۲و۳ درجاتی از ادم در بین فولیکول‌ها قابل مشاهده بود ولی به‌طور کلی پراکندگی سلول‌های لنفاوی در بخش‌های مختلف از الگوی طبیعی که شامل فراوانی بالا در ناحیه کورتکس و تراکم کمتر در ناحیه مدولا بود پیروی می‌کرد و آپوپتوز در مناطق مرکزی فولیکول‌ها بیش از مناطق قشری دیده می‌شد.

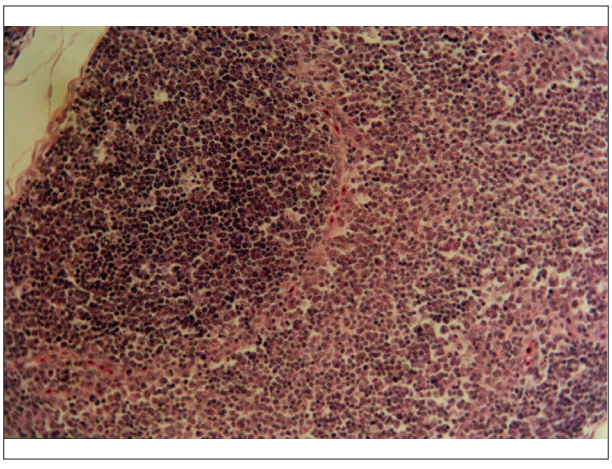
کاهش تراکم سلول‌های لنفوئیدی در کورتکس ومدولای فولیکول‌های بورس وکاهش ضخامت لایه کورتکس آن‌ها در گروه‌های ۲و۳ به خوبی قابل رویت بود. در همه نمونه‌ها در بخش قشری ومرکزی فولیکول‌های بورس، اجرام آپوپتوتیک به تعداد قابل توجه مشاهده شد اما در گروه‌های۲ و ۳ در مقایسه با گروه کنترل و گروه یک بیشتر بود(تصویر۱). در ۴۲ روزگی در گروه ۳، آتروفی بافت اپیتلیوم بورس وافزایش سلول‌های دچار آپوپتوز مشهود بود.

بحث

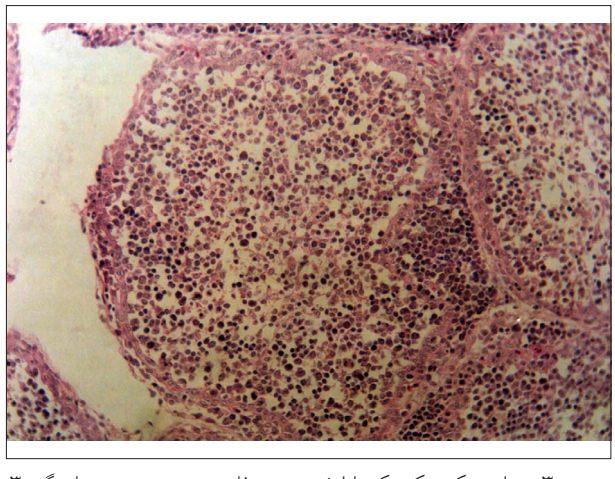
تأثیر کادمیوم در ایجاد آپوپتوز در سلول‌ها و بافت‌های مختلف در گونه‌های مختلف حیوانات نشان داده شده است (۱،۲،۳،۶،۱۰،۱۹،۲۰،۲۳) ولی در مرور مقالات ارائه شده در این زمینه گزارشی در مورد بررسی تأثیر این فلز سنگین بر بورس فابریسیوس طیور مشاهده نشد. غالب مطالعات در زمینهٔ تأثیر کادمیوم بر سلول‌های لنفاوی در شرایط کشت سلولی و در خارج از بدن (invitro) انجام گرفته است و عموماً به این موضوع اشاره می‌نمایند که مسمومیت با کادمیوم در غلظت‌های بالا میزان بروز آپوپتوز را در این سلول‌ها افزایش می‌دهد و در صورت مسمومیت با مقادیر بالاتر



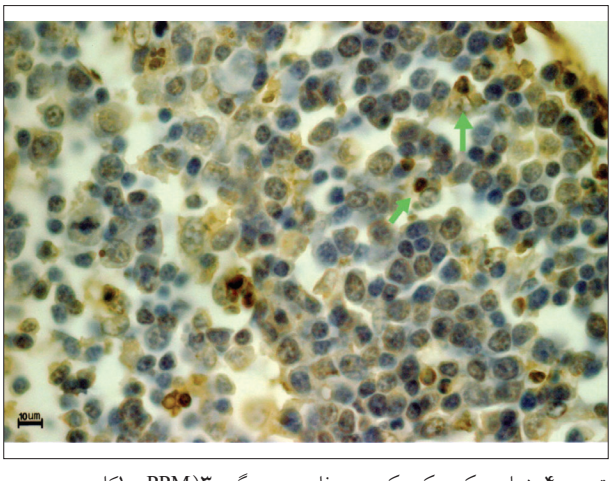
تصویر ۱ـ سلول‌های لنفاوی بورس فابریسیوس در مراحل مختلف آپوپتوز. هسته این سلول‌ها پس از اتصال نوکلئوتید نشان‌دار شده با فلورسئین ایزوتیوسیانات رنگ سبز درخشان را به خود گرفته است. (رنگ‌آمیزی TUNEL،میکروسکوپ UV. درشت نمایی ۱۰۰۰×).



تصویر ۲ - نمای میکروسکوپیک پارانشیم طبیعی بورس فابریسیوس در جوجه‌های گروه کنترل در ۴۲ روزگی، سلول‌های پیش ساز لنفوئیدی به‌صورت متراکم درکنار یکدیگر قرار گرفته‌اند. (رنگ‌آمیزی H&E، درشت‌نمایی ۱۰۰×).



تصویر ۳- نمای میکروسکوپیک پارانشیم بورس فابریسیوس در جوجه‌های گروه۳ (۱۰۰PPM کادمیوم در جیره غذایی)در ۴۲ روزگی، تراکم سلول‌های پیش سازلنفوئیدی در مقایسه با گروه کنترل بسیار کمتر می‌باشد. هسته تعدادی از سلول‌های پیش ساز لنفوئیدی دچار تراکم هسته (پیکنوز) شده‌اند. (رنگ‌آمیزی H&E. درشت‌نمایی ۴۰۰×).

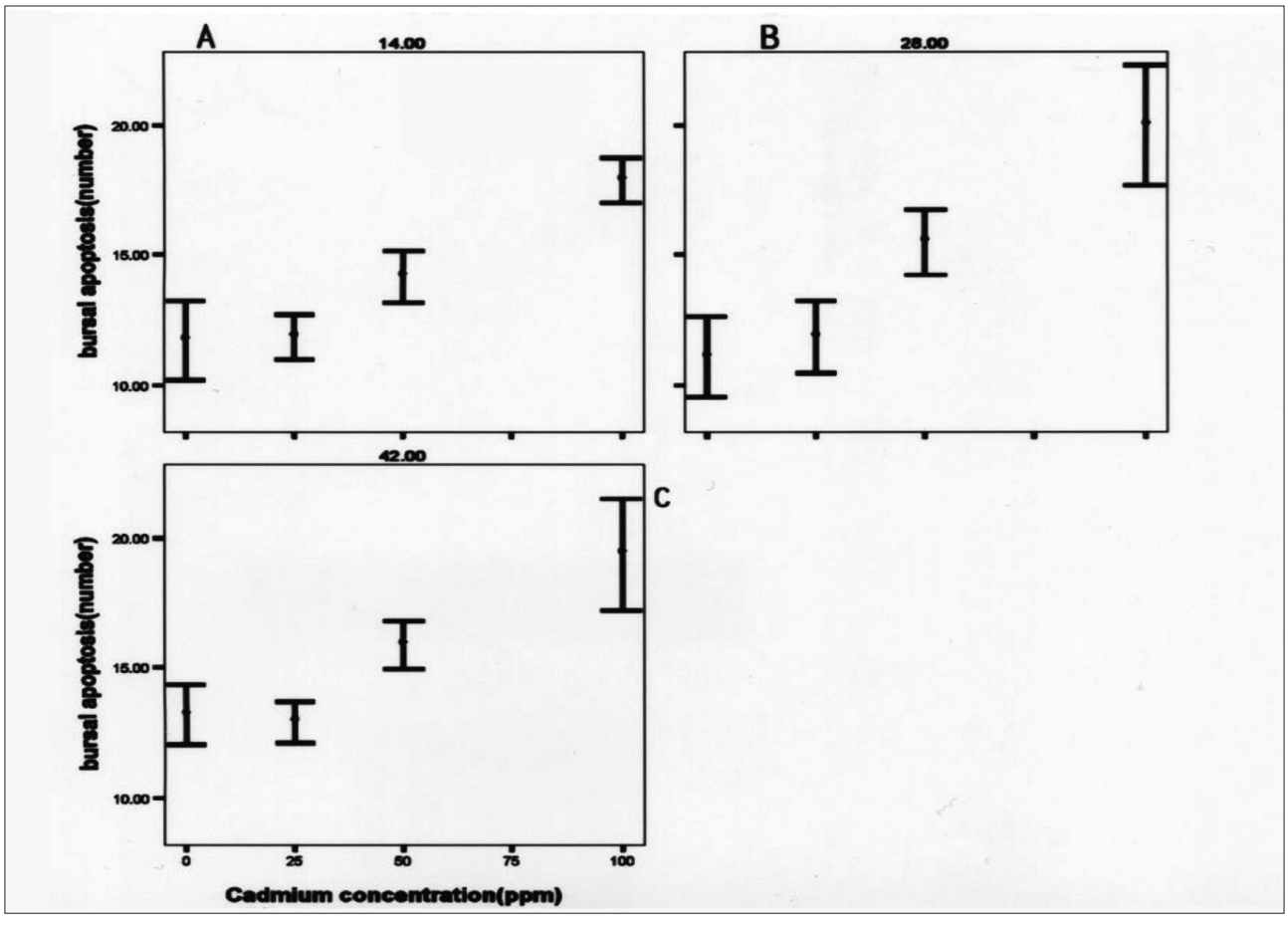


تصویر ۴- نمای میکروسکوپیک بورس فابریسیوس گروه ۳(۱۰۰ PPM کادمیوم در جیره غذایی) پس از رنگ‌آمیزی باTUNEL، شماری از سلول‌های پیش ساز لنفوئیدی که دچار آپوپتوز شده‌اند دیده می‌شوند. هسته این سلول‌ها متراکم شده و رنگ قهوه‌ای یا قهوه‌ای تیره به خود گرفته‌اند.برخی از اجرام آپوپتوتیک توسط سلول‌های فاگوسیتیک موجود در بورس بلعیده شده‌اند. (نوک پیکان) (رنگ‌آمیزی TUNEL، درشت‌نمایی ۱۰۰۰×).

کانون‌هایی از نکروز نیز دیده می‌شود. Azzouzi و همکاران درسال ۱۹۹۴ نشان دادند که کادمیوم در لنفوسیت‌های T انسان (CEM-C12) با میزان ۱۰ میکرومول باعث بروز تراکم کروماتین و خرد شدن هسته و آپوپتوز می‌شود در حالی که در مقدار ۵۰ میکرومول مرگ سلولی از طریق نکروز اتفاق می‌افتد (۲). Feng F و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که کاهش کارآیی طحال موش‌ها در مسمومیت با کادمیوم با میزان آپوپتوزایجاد شده در آن‌ها رابطهٔ مستقیم دارد (۷).

Deiafuente و همکاران در سال ۲۰۰۲، در مطالعه‌ای که برای نشان دادن تأثیر آرسنیک، کادمیوم و سرب روی سلول‌های ایمنی انسان انجام دادند گزارش کردند که کادمیوم در غلظت ۶۵µM در محیط کشت در سلول‌های تک هسته‌ای خون انسان باعث بروز آپوپتوز می‌شود که این موضوع از طریق الکتروفورز DNA و روش فلوسیتومتری (Cytometry Flow) نشان داده شد.

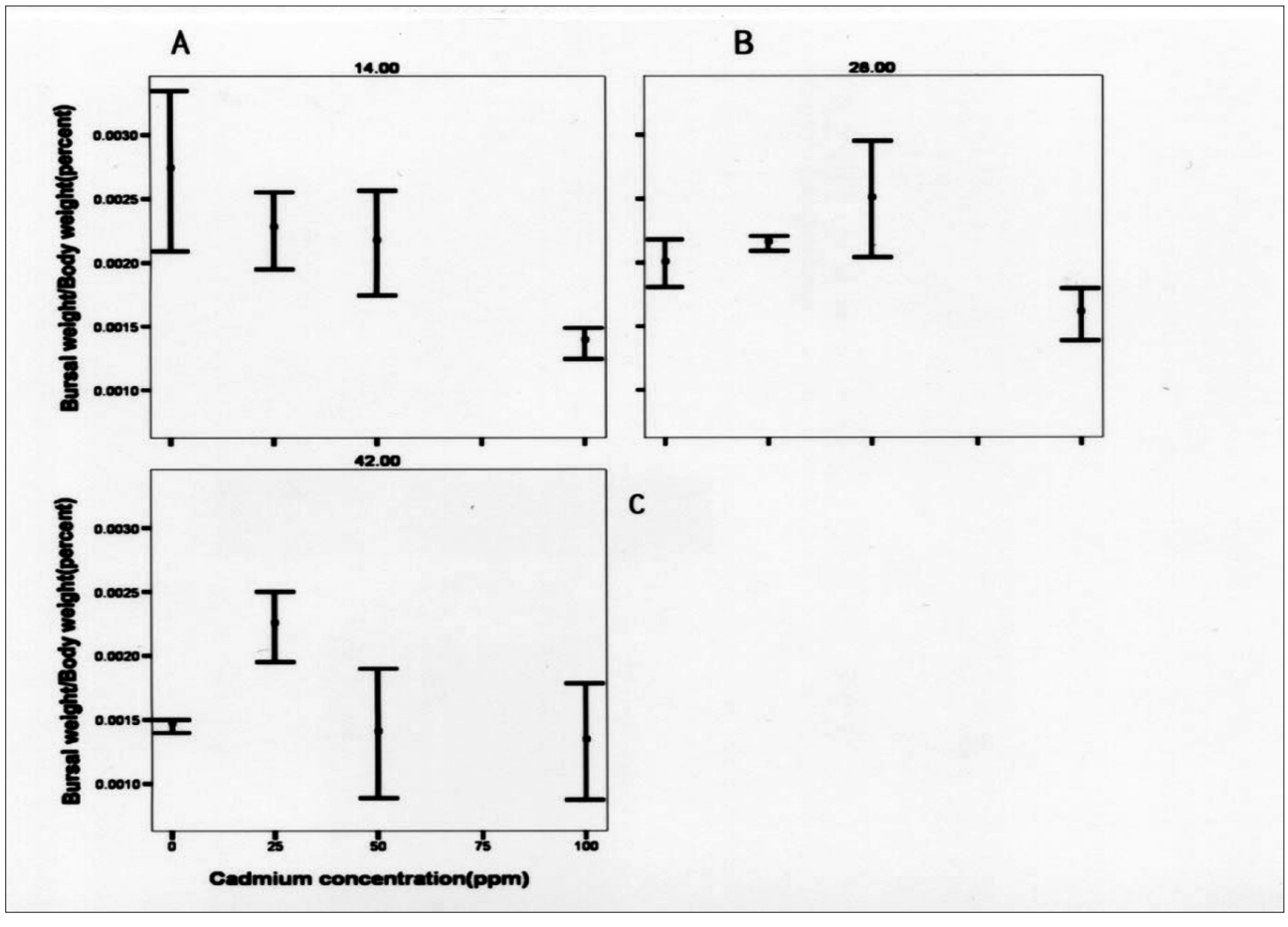
Pathak و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که مسمومیت با کادمیوم در موشها باعث آتروفی تیموس و بزرگی طحال (Splenomegaly) و کاهش قدرت ایمنی‌زایی هومورال و سلولی از طریق ایجاد آپوپتوز و استرس اکسیداتیو می‌شود. در این گزارش اظهارشده است که نسبت لنفوسیت‌های $CD4^+/CD8^+$ که به‌عنوان یک نشانگر حیاتی درارزیابی مسمومیت ایمنی‌زایی مورد استفاده قرار می‌گیرد بسته به مقدار و مدت مواجهه با کادمیوم کاهش می‌یابد که کاهش این نسبت ناشی از کاهش $CD4^+$ است (۱۹).



نمودار ۱- تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در بورس فابریسیوس در گروه‌ها و سنین مختلف در جوجه‌های دچار مسمومیت تجربی با کادمیوم: تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در همه سنین در غلظت ppm ۲۵ همانند گروه شاهد بوده اما با افزایش میزان کادمیوم (گروه‌های ۲،۳) در همه سنین شمار سلول‌های آپوپتوتیک به صورت معنی‌داری افزایش یافته است. (A =۱۴ روزگی، B=۲۸ روزگی، C= ۴۲ روزگی).

درمطالعه حاضر نیز آتروفی فولیکول‌های لنفاوی بورس فابریسیوس بخصوص در گروه‌های ۲و۳ به دنبال بروز آپوپتوز در سلول‌های لنفوئیدی دیده می‌شد و با افزایش مقدار کادمیوم در جیره و طولانی‌تر شدن مدت مصرف آن بر میزان بروز آپوپتوز در سلول‌های لنفوئیدی بورس فابریسیوس افزوده می‌شد.

در این تحقیق، به کار بردن روش‌های رنگ‌آمیزی H&E و TUNEL امکان مطالعه آسیب‌شناختی نمونه‌ها و ارزیابی کمی و شمارش سلول‌های دچار آپوپتوز در مقایسه با نمونه‌های کنترل را فراهم نمود. در مورد وقوع آپوپتوز در جوجه‌های کنترل در گزارش Higgins و همکاران در سال ۲۰۰۲ ذکر شده است که با وجود این‌که کلیه لنفوسیت‌های B بدن طیور در بورس فابریسیوس تکامل یافته و بالغ می‌شوند اما تنها ۵ درصد از لنفوسیت‌های B به خارج از این عضو راه یافته و مابقی لنفوسیت‌ها از طریق آپوپتوز از بین می‌روند. نامبردگان حضور بیش از ۱۷ لنفوسیت آپوپتوتیک، در مربعی به ابعاد ۱۰۰ میکرون را در بافت بورس گزارش نموده‌اند (۱۱،۱۸). در تحقیق حاضر نیز در گروه کنترل در سنین مختلف جوجه‌ها تعداد قابل توجهی سلول دچار آپوپتوز در هر شان میکروسکوپی با بزرگنمایی ۱۰۰ مشاهده شد (جدول ۱). براساس اطلاعات حاصل از این جدول با افزایش مقدار و مدت زمان مصرف کادمیوم، تعداد سلول‌های دچار آپوپتوز در هر شان میکروسکوپی افزایش می‌یافت که این مسئله با توجه به قابلیت تجمع کادمیوم در بدن کاملاً هم خوانی دارد. میزان متوسط کادمیوم موجود در کبد در هریک از گروه‌ها در سنین مختلف نیز بیانگر قابلیت تجمع کادمیوم بود. در گزارش Salar Amoli و همکاران در سال ۲۰۰۲ ذکر شده است که افزایش مقدار و مدت مصرف کادمیم در جوجه‌ها باعث کاهش رشد بدن و بعضی از ارگان‌ها می‌شود (۲۲) که در مطالعه حاضر نیز مسئله فوق بخصوص در گروه‌های ۲و۳ به‌خوبی نشان داده شد. ضمن این‌که علاوه بر کاهش رشد بدن، کاهش قابل توجهی در رشد بورس فابریسیوس دیده می‌شد. از طرف دیگر نسبت وزن بورس به وزن بدن در گروه ۳، در ۲۸ روزگی و در گروه‌های ۲،۱و۳، در ۱۴ روزگی نسبت به گروه کنترل کمتر بود (نمودار ۲) که این مسئله بیانگر تأثیر خاص کادمیوم بر بورس فابریسیوس در مقایسه با سایر ارگان‌ها می‌باشد. با توجه به این‌که در مطالعات قبلی جذب گوارشی کادمیوم ناچیز عنوان شده است (۳،۱۷) تأثیرات کادمیوم بر بافت بورس که در نتایج این تحقیق مشاهده می‌شود



نمودار ۲- نسبت درصد وزن بورس فابریسیوس به وزن بدن، در گروه‌ها و سنین مختلف در جوجه‌های دچار مسمومیت تجربی با کادمیوم: این نسبت تا سن ۱۴ روزگی با افزایش غلظت کادمیوم در جیره کاهش می‌یابد. در سنین ۲۸ و ۴۲ روزگی تغییرات این نسبت از قاعده خاصی پیروی نمی‌کند. (A =۱۴ روزگی، B=۲۸ روزگی، C= ۴۲ روزگی).

می‌تواند ناشی از تأثیر باقی مانده‌های کادمیوم موجود در مدفوع که از طریق Drinking توسط بورس به آن وارد می‌شود اتفاق افتد.

در گزارش‌های متعددی بر بروز آتروفی پیش از موعد طبیعی مانند ابتلا به ویروس برونشیت عفونی طیور (۱۴) یا ابتلا به ویروس گامبورو(۵) اشاره شده و اظهار شده است که در طی این آتروفی فولیکول‌ها دچار کاهش سلول‌های لنفوئیدی وادم در پارانشیم بورس و افزایش کیست‌های داخل اپی تلیالی حاوی ترشحات موسینی شده‌اند. در این تحقیق نیز کیست‌های اپی تلیالی با اندازه‌های بزرگ‌تر در داخل بافت اپیتلیوم چین‌ها بخصوص در گروه‌های ۲ و ۳ در ۲۸ و۴۲ روزگی وهمچنین تغییرات آتروفیک اپی تلیوم چین‌ها در ۴۲ روزگی در گروه‌های ۲ و ۳ نشان داد که مسمومیت با کادمیوم در مقادیر ppm ۵۰ و ۱۰۰ میتواند باعث بروز آتروفی در بورس گردد.

همچنین در مطالعه حاضر متناسب با میزان کادمیوم جیره در گروه‌های ۲ و ۳ کاهش قابل توجهی در جمعیت لنفوسیتی دیده شد. به‌نظر می‌رسد این تغییر علاوه بر آن‌که مربوط به ایجاد آپوپتوز در این سلول‌ها بوده بلکه ممکن است ناشی از کاهش تکثیر لنفوسیت‌ها نیز باشد. هم‌چنان‌که در گزارش Higgins و همکاران در سال ۲۰۰۲ عنوان شده است که در درمان با استروئیدها علاوه بر بروز آپوپتوز، کاهش پرولیفراسیون لنفوسیتی نیز در کاهش جمعیت سلولی در فولیکول‌های بورس فابریسیوس دخالت دارد (۱۱). همان‌طور که نمودار ۲ نشان می‌دهد علاوه بر کاهش رشد جوجه‌ها در گروه‌های ۱، ۲ و ۳ نسبت وزن بورس به وزن بدن در ۱۴ روزگی به صورت معنی‌داری کاهش یافته است که این مسئله ممکن است علاوه بر افزایش بروز آپوپتوز ناشی از کاهش پرولیفراسیون سلول‌های پیش ساز لنفوئیدی نیز باشد که به نوبه خود باید از طریق آزمون‌های ارزیابی پرولیفراسیون سلولی مانند (Assay-PCNA) مورد سنجش قرار گیرد.

نمودار ۲، در ۲۸ و۴۲ روزگی نشان می‌دهد که تغییرات نسبت درصد وزن بورس به وزن بدن در مقایسه با گروه کنترل و در مقایسه با ۱۴ روزگی از قاعده خاصی پیروی نمی‌کند . از آن جا که در مشاهدات میکروسکوپیک در ۲۸و۴۲ روزگی درجات شدید ادم در پارانشیم بافت بورس بسیاری از نمونه‌ها دیده می‌شد که می‌تواند توجیه کننده اضافه وزن کاذب بورس باشد. از طرف دیگر با توجه به اختلاف بین وزن زنده جوجه‌ها که ممکن است ناشی از اختلاف در مقاومت فردی در مقابل مسمومیت با کادمیوم باشد این عدم هم خوانی ارقام به دست آمده قابل توجیه است.

در مجموع نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که کادمیوم می‌تواند باعث افزایش بروز آپوپتوز در بورس فابریسیوس جوجه‌های گوشتی شود که این افزایش با مقدار و مدت مصرف رابطهٔ مستقیم دارد. بروز آپوپتوز همراه با تغییرات پاتولوژیک ذکر شده می‌تواند باعث آتروفی زود هنگام بورس فابریسیوس در جوجه‌های گوشتی گردد. از طرف دیگر با توجه به نیمه عمر بیولوژیک طولانی این عنصر در بدن، کادمیوم می‌تواند در کبد و احتمالاً سایر ارگان‌ها تجمع یافته و در نتیجه عوارض ناشی از آن برای مدت طولانی ادامه داشته و بر شدت آن افزوده شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران و معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران که هزینه انجام این طرح پژوهشی را در قالب پایان‌نامه تخصصی آسیب شناسی فراهم نمودند و همچنین از کارشناسان محترم آزمایشگاه آسیب شناسی آقایان بنی نجار و سامانی و آزمایشگاه مرکزی آقای طاهری و خانم احمدزاده و خانم یوسفی و آزمایشگاه سم شناسی خانم اصفهانی تشکر و قدردانی می‌نماید.

References

1. Armenta, M. M., Rios, C. (2007). Cadmium neurotoxicity. Environ. Toxicol. pharmacol. 23:350-35.
2. Azzouzi, B., Tsangaris, G. T., Pellegrini, O., Manuel, Y., Benveniste, J., Thomas, Y. (1994). Cadmium induces apoptosis in a human T cell line. J. Toxicol. 88:127-139.
3. Deiafuente, M. D., Portalez-Perez, L., Barriga. F. (2002). Effect of arsenic, cadmium and lead on the induction of apoptosis of normal human mononuclear cells. clin. Exp. Immunol. 129: 69-75.
4. Eimore, S. (2007). Apoptosis: A review of Programmed cell death. J. Toxicol. Pathol. 35: 495-516.
5. Elankumaran, S., Heckert, R. A., Moura, L. (2002). Pathogenesis tissue distribution of a variant strain of infectious bursal disease virus in commercial broiler chickens. J. Avian Dis. 46:169-176.
6. Faverney. C. R., Dvaux. A., Lafeuire. M., Girard. J. P., Bailly. B., Rahmany. R. (2001). Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow traut hepatocytes through generation of reactive oxygen species. J. Aquatic Toxicol. 53: 65-76.
7. Feng, F., Xue, B., Zhang X. (2001). The relationship between cadmium- induced inhibition of splenic lymphocyte function and cell apoptosis Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi. 35:44-47.
8. Friberg, L., Elinder, C. G., Kjellstrom, T., Nordberg, G. F. (1986). Cadmium and health A Toxicological and Epidemiological Appraisal. Volume II, Effect and Response. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida USA.
9. Glick, B. (1988). Bursa of fabricius: development, growth, modulation, endocrine function. J. Poult. Biol. 1:107-132.
10. Habeebu, S. S. M., Liu, J., Klaassen, C. D. (1998). Cadmium-induced apoptosis in mouse liver. J. Toxicol. Appl. Pharmacol. 149: 203-209.
11. Higgins, S. E., Berghman, L. R., Moore, R. W., Hargis, B. M. (2002). In situ detection and quantification of bursa of fabricius cellular proliferation or apoptosis in normal of steroid-treated neonatal chicks. Poult. Sci. 81: 1136-1141.
12. Haerta, S., Goulet, B. S., Yepez, S. H., Livingston, E. H. (2007). Screening and detection of apoptosis. J. Surg. Res. 139: 143-156.
13. Lockshin, R. A., Zakeri, Z. (2004). Apoptosis autophagy and more. J. Int. J. Biochem. cell Biol. 36: 2405-2419.
14. Macdonald, J. W., Mc Martin, D. A. (1976). Observations on the effect of the H52 and H120 vaccine strains of infectious bronchitis virus. J. Avian Pathol. 5:157-173.
15. Negoescu. A., lorimier. P., Azoti. L. (1997). TUNEL: improvement and evaluation of the method for in situ apoptotic cell identification. J. Biochem. 2: 12-17.
16. Negoescu. A., Guillermet. Ch., lorimier. Ph., Labat-Moleur. F. (1998). TUNEL apoptotic cell detection in archived paraffin-embedded tissues. J. Biochem. 3: 36-47.

17. Nordberg, F. G. (2004). Cadmium and health in the 21st century-historical remarks and trends for the future. J. Biometals. 17: 485-489.
18. Paramithiotis, E., Ratcliffe, M. J. (1994). Survivors of bursal B cell and emigration. J. Poult. Sci. 73:991-997.
19. Pathak, N., Khandelwal, S. (2007). Impact of cadmium in T lymphocyte subsets and eytokine expression: differential regulation by oxidative stress and apoptosis. J. Biometals. 21: 179-187.
20. Polihandri, A. H., Velardes, M. O., Cabilla, J. P., Bodo, C. C., Machiavelli, L. I., Quinteros, A. F., Duvilanski, B. H. (2004). Nitric oxide protects anterior pituitary cells from cadmium induced apoptosis. J. Free Radic. Biol. Med. 37:1463-1471.
21. Rhddell. C. (1987). Avian Histopathology. American Association of Avian Pathology. University of Pennsylvania. Pennsylvania, USA.
22. Salar amoli, J., Gharagozlou, M. J., Bokaei. S., Modirsanei, M., Khaki, Z. (2002). The effects of cadmium on growth pattern and feed conversion rate in broiler chicken. J. Vet. Res. 57: 913- 919.
23. Watjen, W., Cox, M. Biagioli, M., Beyersman, D. (2002). Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: mediation by caspase 9- activation. J. Biometals.15:89-9.

J.Vet.Res. 66,3:193-201, 2011

THE EFFECT OF DIFFERENT LEVELS OF CADMIUM ON THE HISTOPATHOLOGICAL CHANGES AND THE RATE OF LYMPHOID CELLS APOPTOSIS OF BURSA OF FABRICIUS IN BROILER CHICKENS

Javaheri Vayeghan, A.[1], Gharagozlou, M. J.[2*], Nikbakht Broujeni, Gh. R.[2], Salar Amoli, J.[3], Bokaee, S.[4], Hesaraki, S.[5]

[1]*Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Semnan, Semnan- Iran.*

[2]*Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran.*

[3]*Department of Physiology, Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran.*

[4]*Department of Epidemiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran.*

[5]*Department of Pathology, Faculty of Specialized Veterinary Science, Islamic Azad University, Science and Research campus of Tehran, Tehran- Iran.*

(Received 6 September 2010 , Accepted 20 December 2010)

Abstract:

Cadmium toxicity can cause kidney failure, liver damage and a weakened immune system in experimental and naturally occurring toxicities. This study was designed to investigate the effects of cadmium (Cd) on the histology and the rate of lymphoid apoptosis in the bursa of fabricius of chicken. One-hundred 20-day-old male Ross broilers were purchased and randomly divided into four groups. The control group (C) received no Cd, whereas groups 1, 2, and 3 had rations administered containing 25, 50 and 100 ppm cadmium as CdCl, respectively. At days 14, 28 and 42, seven chicks from each group were randomly selected and sacrificed. The bursa of Fabricius of each chick was removed, weighed, fixed in 10% buffered formalin and processed for histopathology and assessment of the rate of lymphoid cells apoptosis. The apoptotic cells were demonstrated in paraffin embedded tissue sections using the TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) method. The concentration of Cd in the liver samples was measured by atomic absorption. A reverse correlation between the levels of Cd in the rations and the body weight of the chickens ($p<0.01$) was found. The concentration of Cd in the liver showed a positive correlation with the levels of Cd in the rations ($p<p0.01$). The number of apoptotic lymphoid cells was significantly increased in those groups receiving higher levels of Cd (especially groups 2 and 3) ($p<0.01$). Morphologically, plicas and lymphoid follicles of groups 2 and 3 were smaller than of the control group. In the histological analysis they were found to be hypocellular and some of them were edematous. Compared to the control group, there was an increase in the number of intraepithelial cysts in groups 2 and 3 at days 28 and 42. In addition, atrophic changes of bursal paranchyma were observed in group 3 after 42 days. It can be concluded that under experimental conditions the higher concentrations of Cd in the rations (50 and 100 ppm) has detrimental effects on the bursa of Fabricius of chickens.

Key words: cadmium, bursa of Fabricius, apoptosis, TUNEL test.

***Corresponding author's email: mjavad@ut. ac. ir, Tel: 021-61117064 , Fax: 021-66933222**