Archive of SID

بررسی هیستومورفومتری بورس فابریسیوس و ردیابی ایمونوهیستوشیمیایی p53 و کاسپاز سه در جوجه های گوشتی متعاقب تنش فیزیولوژیک و ارزیابی اثر محافظتی مکمل کروم

رضا معینی‌مقدم[۱]، حسن مروتی[۲*]، مسعود ادیب‌مرادی[۳]، سید داوود شریفی[۴] و علی شالیزارجلالی[۵]

تاریخ دریافت: ۹۶/۷/۸ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱/۲۸

چکیده

هدف از این مطالعه، ارزیابی کارایی مکمل کروم در برابر آسیب‌های ناشی از تنش فیزیولوژیک و بررسی روند آپوپتوز در بافت لنفاوی بورس فابریسیوس جوجه‌های گوشتی به واسطه‌ی ارزیابی ایمونوهیستوشیمی پروتئین‌های p53 و کاسپاز ۳ بود. به همین منظور از ۳۲۰ قطعه جوجه‌ی نر سویه‌ی تجاری راس، در یک آزمایش فاکتوریل ۴×۲ با دو سطح تنش (بدون تنش و تنش) و چهار سطح کروم از منبع کروم- متیونین (صفر، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ میکروگرم در کیلوگرم جیره) در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و ۱۰ قطعه پرنده در هر تکرار استفاده شد. تنش فیزیولوژیک با افزودن دگزامتازون به جیره در دوره‌ی سنی ۲۴-۱۷ روزگی القاء گردید. در انتهای دوره پرورش، پرنده‌های گروه‌های مختلف آسان‌کشی شدند و از بورس فابریسیوس نمونه‌برداری گردید و نمونه‌ها مورد ارزیابی هیستوموفومتری و ایمونوهیستوشیمی قرار گرفت. القای تنش فیزیولوژیک، موجب تغییر در قطر کورتکس و مدولای فولیکول-های لنفاوی بورس فابریسیوس در گروه‌های آزمایشی گردید. بر اساس نتایج حاصل، افزایش سطح کروم جیره با استفاده از مکمل کروم- متیونین ، اثرات منفی تنش بر بافت لنفاوی بورس فابریسیوس جوجه‌های گوشتی را کاهش می‌دهد. همچنین تنش فیزیولوژیک میزان بیان پروتئین p53 و کاسپاز۳ را در بافت لنفاوی بورس فابریسیوس افزایش داد. با افزایش سطح کروم در جیره، میزان بروز این پروتئین‌ها کاهش یافت.

کلمات کلیدی: p53، کاسپاز ۳، بورس فابریسیوس، تنش فیزیولوژیک، کروم

مقدمه

در حال حاضر، صنعت گوشت و تخم‌مرغ بسیار گسترده شده است و به عنوان جایگزینی مناسب و ارزان برای گوشت قرمز و سایر منابع پروتئین می‌باشد. بنابراین با توجه به افزایش جمعیت و نیاز به منابع غذایی، پیشرفت این صنعت در حد مطلوب، الزامی می‌باشد. در پرورش طیور جهت پیش‌گیری از وقوع بیماری‌ها می-بایست اطمینان حاصل کرد که طیور از نظر عملکرد دستگاه ایمنی در حد مطلوبی قرار دارند و توانایی دفاع از خود را دارا می‌باشند. دستگاه ایمنی طیور در شرایط تنش دچار ضعف می‌شود و باید در مقابل بیماری‌ها ارتقا داده شود. تنش شرایط تهدید کننده‌ای است که می‌تواند شدید، حاد، اندکی حاد و یا مزمن باشد و بدن در یک محدوده‌ی زمانی به آن پاسخ می‌دهد. عامل تنش‌زا هر نوع عاملی است که پاسخ ایمنی را برمی‌انگیزد. پاسخ ایمنی بسیار پیچیده و متفاوت می‌باشد که می‌تواند به صورت واکنش رفتاری، فیزیولوژیکی، متابولیکی و

[۱] دانشجوی دکترای بافت‌شناسی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران
[۲*] استاد گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران
[۳] استاد گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران
[۴] دانشیار گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران
[۵] استادیارگروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
E-mail: hmorovvati@ut.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)

www.SID.ir

Archive of SID

ایمونولوژیکی باشد تا بدن بتواند با آن منطبق شود و زنده بماند. امروزه تنش یکی از عوامل مهم ایجادکننده‌ی اختلال در روند رشد، بازدهی و افزایش بهره‌وری در واحدهای پرورش طیور به ویژه در واحدهای متراکم و گله‌های بزرگ می‌باشد (Rosales 1994). تغییرات ناشی از تنش بر دستگاه ایمنی پرندگان در واحدهای پرورش طیور از نظر اقتصادی بسیار حایز اهمیت می‌باشد. بورس فابریسیوس یکی از اعضای مهم سیستم لنفاوی طیور می‌باشد که در بسیاری از بیماری‌ها تحت تأثیر قرار می‌گیرد و نقش محوری آن در ایمنی همورال توصیف می‌گردد. بورس‌فابریسیوس در انتهای کلواک و در سطح پشتی آن قرار دارد و در ساخت و رشد سلول‌های لنفوسیت‌های B نقش دارد. بورس اندامی گذرا می‌باشد که در ۶ هفتگی به حداکثر وزن خود می‌رسد، و در بلوغ جنسی نقش ایفا می‌کند. بورس فابریسیوس دارای نقش محافظتی در انتهای دستگاه گوارش می‌باشد زیرا آنتی‌ژن‌هایی که وارد فضای داخلی بورس فابریسیوس می‌شوند موجب تحریک قسمت میانی اپی‌تلیال فولیکولی می‌گردند.

تنش اثرات تعدیل کنندگی در دستگاه ایمنی دارد و در برخی شرایط دستگاه ایمنی را سرکوب می‌کند. کورتیکوسترون موجب تغییرات کمی و کیفی بسیاری در عملکرد دستگاه ایمنی می‌شود. بیش‌تر گزارش‌ها در این مورد نشان می‌دهد که تنش فیزیولوژیک موجب سرکوب اندام‌ها و سلول‌های ایمنی می‌گردد (Shini et al 2008). دگزامتازون آنالوگ سنتزی هیدروکورتیزون می‌باشد که مدت زمانی طولانی است در دامپزشکی و پزشکی برای بیماری‌های التهابی و متابولیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین این ترکیب در درمان شوک، التهاب و تنش بسیار مؤثر می‌باشد (Gropp et al. 1976, Tarantola et al. 2004).

روش‌های مختلفی جهت افزایش کارآیی دستگاه ایمنی وجود دارد و تحقیقات زیادی نیز در این زمینه صورت گرفته است. علاوه بر انتخاب ژنتیکی، برخی از عوامل غیرژنتیکی مانند غلظت مواد معدنی جیره نیز قادر است تظاهر ژن‌های مسئول پاسخ ایمنی را از طریق ایجاد تغییر در میزان بلوغ دستگاه ایمنی و همچنین میزان آنتی‌بادی‌های تولید شده در برابر عفونت‌ها تغییر دهد (Gheisari et al. 2011, Toghyani et al. 2012). عنصر کروم از عناصر ضروری برای بدن می‌باشد که در متابولیسم قند و چربی مورد نیاز می‌باشد. ضروری بودن کروم به عنوان یک ماده‌ی معدنی اولین بار در سال ۱۹۵۹ گزارش شده است (Schwarz and Mertz 1959). کروم فراوانترین ماده‌ی معدنی در پوسته‌ی زمین است و در بدن موجودات زنده یافت می‌شود (Pechova and Pavlata 2007).

به خوبی مشخص شده است که کروم در هنگام افزایش حساسیت گیرنده‌های انسولین در سلول، مانند انسولین عمل می‌کند (Muhittin Onderci et al. 2005). مطالعات نشان داده است در پرندگانی که تحت شرایط تنش پرورش یافته‌اند، انسولین افزایش و کورتیکوستروئیدها کاهش می‌یابند. در مطالعاتی که در این راستا انجام پذیرفته است افزایش کروم در سرم در هنگام کاهش کورتیکوستروئیدها و افزایش انسولین مشاهده شده است (Sahin et al. 2002) . در حیوانات جوانی که با کورتیکواسترون تیمار شده بودند، کاهش اولیه و آتروفی بافت تیموس و همچنین تغییر در ترکیب جمعیت و گردش لوکوسیت‌های تک هسته‌ای مشاهده گشته است (Shini et al. 2008). هدف از این مطالعه، بررسی کارایی عنصر کروم در کاهش آپوپتوز و جبران اثر سرکوب‌کنندگی دستگاه ایمنی کورتیکواستروئید در بافت لنفاوی بورس فابریسیوس جوجه‌های گوشتی متعاقب القای تنش فیزیولوژیک با دگزامتازون بود.

مواد و روش کار

برای انجام این مطالعه تجربی، ۳۲۰ قطعه جوجه‌ی نر سویه‌ی تجاری راس، از مرکز نگهداری و پرورش پردیس ابوریحان دانشگاه تهران تهیه شد. این پژوهش در یک آزمایش فاکتوریل ۴×۲ با دو سطح تنش (بدون تنش و

www.SID.ir

Archive of SID

تنش) و چهار سطح کروم از منبع کروم- متیونین (صفر، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ میکروگرم در کیلوگرم جیره) در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و ۱۰ قطعه پرنده در هر تکرار انجام شد. قبل از شروع آزمایش، پرندگان وزن کشی شدند و حیوانات با پراکندگی کم‌تر انتخاب شدند و تا سن ۱۷ روزگی با جیره‌های یکسان تغذیه شدند. مدت زمان پژوهش ۴۲ روز در نظر گرفته شد و با افزودن ۱/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم دگزامتازون به جیره در دوره‌ی سنی ۲۴-۱۷ روزگی (یک هفته) تنش فیزیولوژیک القا شد (Li et al. 2009). سپس دگزامتازون از جیره‌ها حذف گشت و آزمایش به مدت سه هفته دیگر ادامه یافت. جیره‌های آزمایشی از ابتدای دوره‌ی تنش تا انتهای دوره‌ی پرورش در اختیار پرندگان قرار داده شدند و در انتهای دوره‌ی پرورش، پرنده‌های گروه‌های مختلف با استفاده اوردوز داروی بیهوشی آسان‌کشی شدند و نمونه‌ها که شامل بورس فابریسیوس بود، برداشته شده و بلافاصله به محلول تثبیت کننده‌ی فرمالین ۱۰ درصد منتقل گردید.

برای بررسی‌های ایمنوهیستوشیمی، مقاطع بافتی ۵ میکرومتری حدود ۲۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در آون (Venticell, MMM, Einrichtungen, Germany) حرارت دید، سپس به وسیله‌ی گزیلول، پارافین‌زدایی و با استفاده از غلظت‌های نزولی الکل (۹۶ درصد، ۹۰ درصد، ۸۰ درصد، ۷۰ درصد و ۵۰ درصد) آب‌دهی شدند. جهت بازیابی آنتی‌ژن از بافر سیترات سدیم ۱۰ mM استفاده و در ادامه محلول بلاک کننده‌ی پراکسیداز (پراکسید هیدروژن ۰/۰۳ درصد با اسید سدیم) طی پنج دقیقه تماس، موجب بلوکه شدن پروکسیداز گردید. سپس مقاطع به آرامی به وسیله‌ی بافر شسته و در ادامه متعاقباً با آنتی‌بادی‌های p53 و کاسپاز سه (Biocare, USA) به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه، دوباره مقاطع با محلول بافر به آرامی آب‌کشی شدند. اسلایدها به مدت ۱۵ دقیقه در محفظه‌ی مرطوب با آنتی‌بادی آنتی‌پلی‌والان و پراکسیداز ترب کوهی قرار گرفت و نهایتاً مقاطع بافتی به آرامی در بافر شستشو، آب‌کشی و در حمام بافر قرار داده شدند. سپس اسلایدها با DAB[1] کروموژن به مدت پنج دقیقه انکوبه شده و متعاقباً شسته و پنج ثانیه با رنگ هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی گردیدند. مقاطع را در آمونیوم ۱۰ مرتبه فرو برده و با آب مقطر شستشو و با چسب پوشش داده شد. سلول‌های مثبت در رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی در زیر میکروسکوپ نوری با سیتوپلاسم قهوه‌ای دیده و با استفاده از عدسی مشبک در هر میلی‌متر مربع شمارش شدند.

نمونه‌های بافت لنفاوی بورس فابریسیوس پس از ثبوت و متعاقب آن طی مراحل معمول پاساژ بافتی، با استفاده از پارافین قالب‌گیری شدند. سپس، با استفاده از دستگاه میکروتوم برش‌هایی به ضخامت ۶-۵ میکرومتر از قالب‌های پارافینی تهیه گردید و در نهایت مورد رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین قرار گرفتند. جهت مطالعه‌ی هیستومورفومتری بورس فابریسیوس از نظر فراسنجه‌های بافتی ازمیکروسکوپ دیجیتال دینولیت[2] استفاده گشت. داده‌های این مطالعه با استفاده از بسته‌ی نرم‌افزاری SPSS (نسخه ۱۹) مورد ارزیابی آماری قرار گرفتند. جهت مقایسه‌ی بین گروه‌ها آنالیز واریانس یک‌طرفه و به دنبال آن آزمون‌های مقایسه‌ای چندگانه توکی مورد استفاده قرار گرفت. مقدار P<۰/۰۵ به منظور تعیین سطح معنی‌داری بین گروه‌ها در نظر گرفته شد.

نتایج

پس از القای تنش فیزیولوژیک، بررسی‌های هیستومورفومتری تغییر معنی‌داری در قطر فولیکول‌های لنفاوی گروه‌های آزمایشی که مکمل کروم را دریافت کرده یا نکرده بودند، مشاهده نشد، اما اندازه‌ی بخش مرکزی فولیکول‌ها در بافت لنفاوی بورس فابریسیوس

1- 3,3'-Diaminobenzidine
2- Dino-Lite (Dino-Lite Digital Microscope,AnMo Electronics Corporation,Taiwan

www.SID.ir

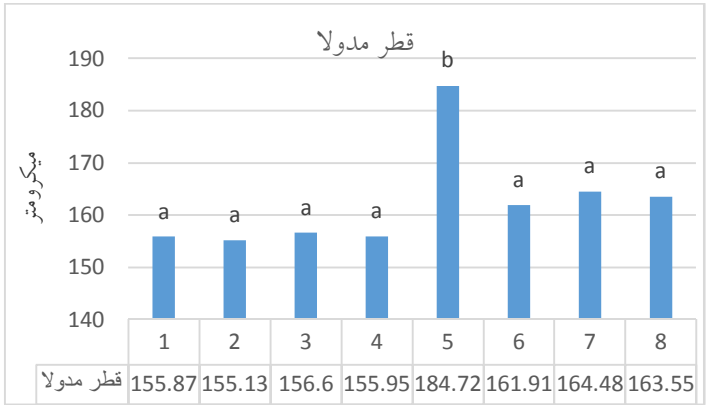
Archive of SID

جوجه‌های گوشتی در گروه تنش که مکمل کروم دریافت نکرده بودند، به طور معنی‌داری افزایش نشان داد (P<۰/۰۵). تغذیه‌ی پرندگان تحت تنش با سطوح مختلف کروم، کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۵) در اندازه‌ی بخش مرکزی فولیکول‌های لنفاوی در بورس گردید. همچنین اندازه‌ی کورتکس فولیکول‌های لنفاوی بورس فابریسیوس در گروهی که متحمل تنش شده بود به طور معنی‌داری کاهش و در گروه‌هایی که مکمل کروم دریافت کرده بودند افزایش معنی‌داری نشان دادند (نمودار ۱، ۲ و ۳) (شکل ۱).

نمودار ۱: اثر تنش فیزیولوژیک و مکمل کروم بر قطر فولیکول‌های لنفاوی (µm) (± انحراف معیار) بورس فابریسیوس جوجه‌های گوشتی

a-b: تفاوت میانگین‌ها با حروف غیرمشابه معنی دار است (P<۰/۰۵).

۱: گروه بدون تنش بدون افزودنی(کنترل)، ۲: گروه کروم ۱۰۰۰، ۳: گروه کروم ۲۰۰۰، ۴: گروه کروم ۳۰۰۰، ۵: گروه تنش، ۶: گروه تنش+کروم ۱۰۰۰، ۷: گروه تنش+کروم ۲۰۰۰، ۸: گروه تنش+کروم ۳۰۰۰.



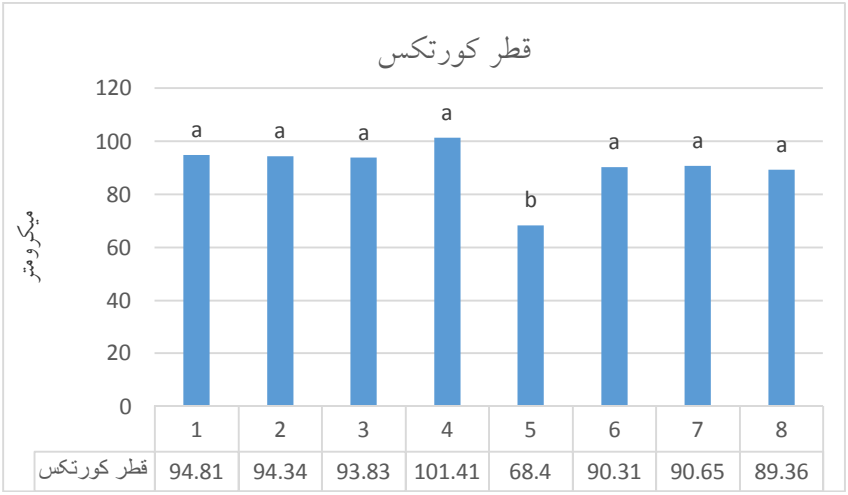
نمودار ۲: اثر تنش فیزیولوژیک و مکمل کروم بر قطر بخش مرکزی فولیکول‌های لنفاوی (µm) (± انحراف معیار) بورس فابریسیوس جوجه‌های گوشتی

a-b: تفاوت میانگین‌ها با حروف غیرمشابه معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

۱: گروه بدون تنش بدون افزودنی(کنترل)، ۲: گروه کروم ۱۰۰۰، ۳: گروه کروم ۲۰۰۰، ۴: گروه کروم ۳۰۰۰، ۵: گروه تنش، ۶: گروه تنش+کروم ۱۰۰۰، ۷: گروه تنش+کروم ۲۰۰۰، ۸: گروه تنش+کروم ۳۰۰۰.

www.SID.ir

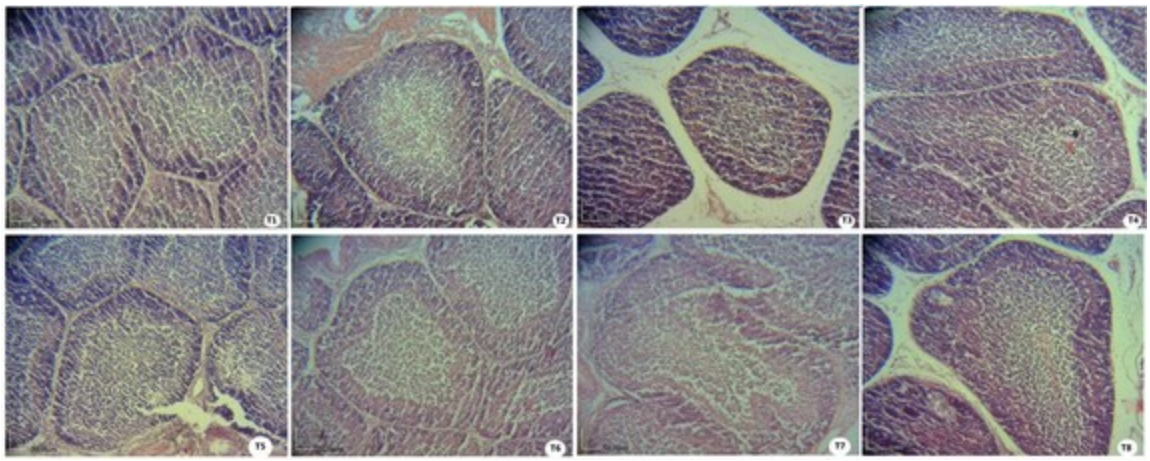
Archive of SID



نمودار ۳: اثر تنش فیزیولوژیک و مکمل کروم بر قطر و بخش خارجی فولیکول‌های لنفاوی (µm) (± انحراف معیار) بورس فابریسیوس جوجه‌های گوشتی

a-b: تفاوت میانگین‌ها با حروف غیرمشابه معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

۱: گروه بدون تنش بدون افزودنی (کنترل)، ۲: گروه کروم ۱۰۰۰، ۳: گروه کروم ۲۰۰۰، ۴: گروه کروم ۳۰۰۰، ۵: گروه تنش، ۶: گروه تنش+کروم ۱۰۰۰، ۷: گروه تنش+کروم ۲۰۰۰، ۸: گروه تنش+کروم ۳۰۰۰.



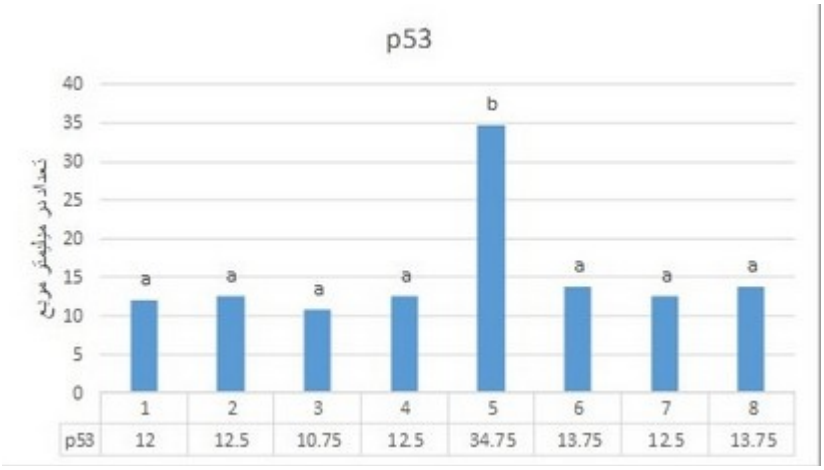
شکل ۱: تصاویر اثر تنش فیزیولوژیک و مکمل کروم بر هیستومورفومتری فولیکول لنفاوی در بورس فابریسیوس جوجه‌های گوشتی (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین)

t1: گروه بدون تنش بدون افزودنی (کنترل)، t2: گروه کروم ۱۰۰۰، t3: گروه کروم ۲۰۰۰، t4: گروه کروم ۳۰۰۰، t5: گروه تنش، t6: گروه تنش+کروم ۱۰۰۰، t7: گروه تنش+کروم ۲۰۰۰، t8: گروه تنش+کروم ۳۰۰۰.

بیان پروتئین p53 در بافت لنفاوی بورس فابریسیوس جوجه‌های گوشتی که تحت القای تنش فیزیولوژیک قرار گرفتند و مکمل کروم دریافت نکردند، بیش‌تر از پرندگان سایر گروه‌های آزمایشی بود (P<۰/۰۵). تغذیه‌ی پرندگان تحت تنش با سطوح مختلف کروم بیان پروتئین p53 را کاهش داد (P<۰/۰۵)؛ (نمودار ۴)؛ (شکل ۲).

www.SID.ir

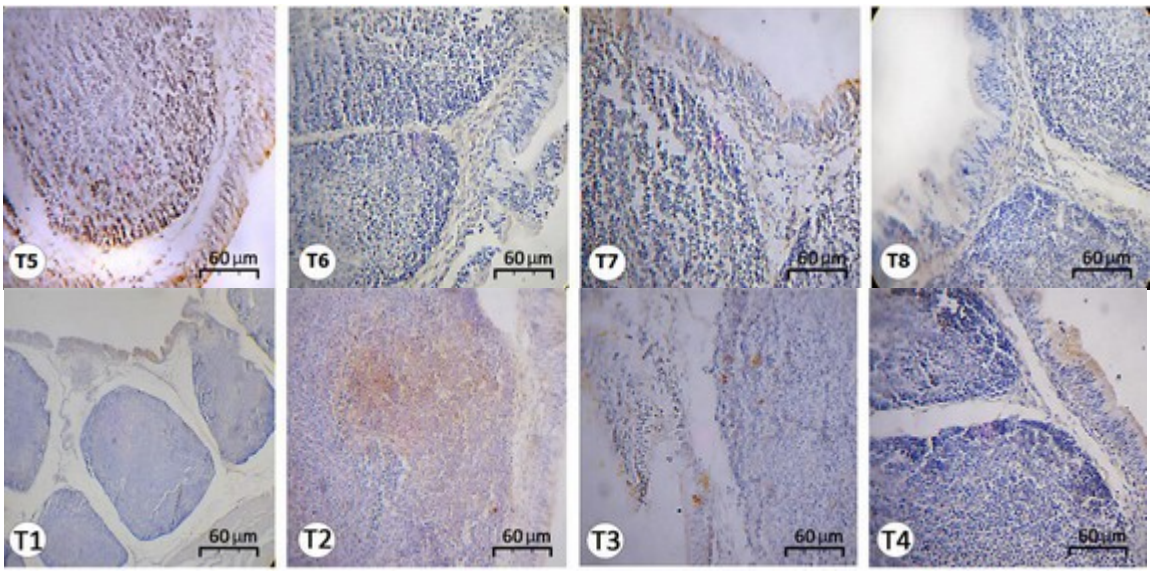
Archive of SID



نمودار ۴: اثر تنش فیزیولوژیک و مکمل کروم بر تعداد (± انحراف معیار) سلول‌های p53 مثبت بورس فابریسیوس جوجه‌های گوشتی (تعداد در میلی‌متر مربع)

a-b: تفاوت میانگین‌ها با حروف غیرمشابه معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

۱: گروه بدون تنش بدون افزودنی (کنترل)، ۲: گروه کروم ۱۰۰۰، ۳: گروه کروم ۲۰۰۰، ۴: گروه کروم ۳۰۰۰، ۵: گروه تنش، ۶: گروه تنش+کروم ۱۰۰۰، ۷: گروه تنش+کروم ۲۰۰۰، ۸: گروه تنش+کروم ۳۰۰۰.



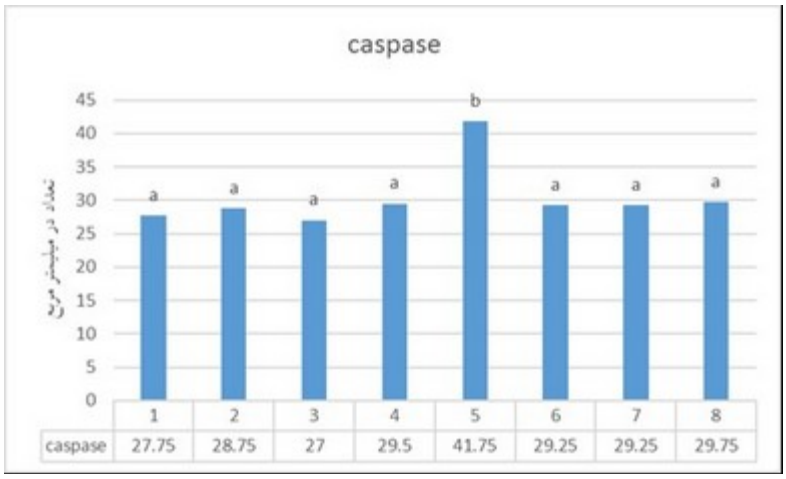
شکل ۲: تصاویر اثر تنش فیزیولوژیک و مکمل کروم بر سیتوپلاسم سلول‌های p53 مثبت بورس فابریسیوس جوجه‌های گوشتی (آنتی‌بادی آنتی‌پلی‌والان و پراکسیداز ترب کوهی)

t1: گروه بدون تنش بدون افزودنی (کنترل)، t2: گروه کروم ۱۰۰۰، t3: گروه کروم ۲۰۰۰، t4: گروه کروم ۳۰۰۰، t5: گروه تنش، t6: گروه تنش+کروم ۱۰۰۰، t7: گروه تنش+کروم ۲۰۰۰، t8: گروه تنش+کروم ۳۰۰۰.

القای تنش فیزیولوژیک، افزایش معنی‌داری در بیان پروتئین کاسپاز در سیتوپلاسم سلول‌های بافت لنفاوی بورس فابریسیوس جوجه‌های گوشتی که مکمل کروم دریافت نکردند، در مقایسه با سایر گروه‌های آزمایشی سبب گردید (P<۰/۰۵). تغذیه‌ی پرندگان تحت تنش با سطوح مختلف کروم، بیان پروتئین کاسپاز سه را کاهش داد (P<۰/۰۵)؛ (نمودار ۵)؛ (شکل ۳).

www.SID.ir

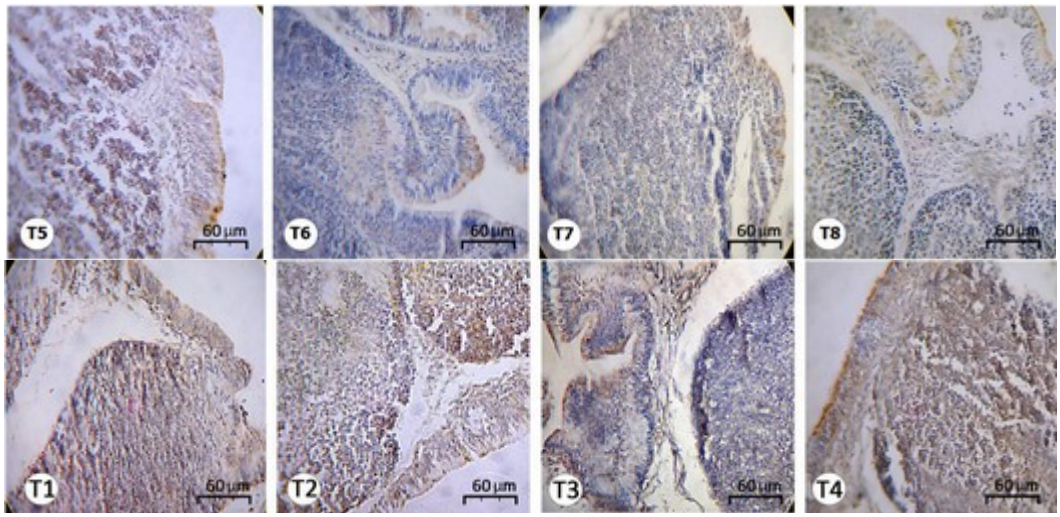
Archive of SID



نمودار ۵: اثر تنش فیزیولوژیک و مکمل کروم بر تعداد (± انحراف معیار) سلول‌های caspase مثبت بورس فابریسیوس جوجه‌های گوشتی (تعداد در میلی‌متر مربع)

a-b: تفاوت میانگین‌ها با حروف غیرمشابه معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

۱: گروه بدون تنش بدون افزودنی (کنترل)، ۲: گروه کروم ۱۰۰۰، ۳: گروه کروم ۲۰۰۰، ۴: گروه کروم ۳۰۰۰، ۵: گروه تنش، ۶: گروه تنش+کروم ۱۰۰۰، ۷: گروه تنش+کروم ۲۰۰۰، ۸: گروه تنش+کروم ۳۰۰۰.



شکل ۳: تصاویر اثر تنش فیزیولوژیک و مکمل کروم بر تعداد سیتوپلاسم سلول‌های کاسپاز مثبت در بورس فابریسیوس جوجه‌های گوشتی (آنتی‌بادی آنتی‌پلی‌والان و پراکسیداز ترب کوهی)

t1: گروه بدون تنش بدون افزودنی (کنترل)، t2: گروه کروم ۱۰۰۰، t3: گروه کروم ۲۰۰۰، t4: گروه کروم ۳۰۰۰، t5: گروه تنش، t6: گروه تنش+کروم ۱۰۰۰، t7: گروه تنش+کروم ۲۰۰۰، t8: گروه تنش+کروم ۳۰۰۰.

بحث

وقتی عامل تنش فیزیولوژیک بر سلول اثر می‌گذارد، موجب تغییر ساختار طبیعی پروتئین‌ها می‌گردد و این امر با شکل‌گیری پاسخ‌های ضدتنش سلولی همراه است. بدین ترتیب بیان ژن‌های معمول سلولی کاهش پیدا می‌کند و ژن‌های مربوط به تنش فعال می‌شوند (Macario and Conway de Macario 2005). آسیب DNA ناشی از عوامل سرطان‌زا، پیام‌های تکثیری غیرطبیعی، هیپوکسی، افزایش رادیکال‌های آزاد و نیز از دست دادن چسبندگی

www.SID.ir

Archive of SID

سلولی، مهم‌ترین عوامل فعال شدن ژن پروتئین p53 می‌باشند (Donehower et al. 1995). این پروتئین قادر به مهار رشد سلولی می‌باشد و این فعالیت، به طور دقیقی تنظیم می‌شود. اگر چه در برخی مدل‌ها آسیب شیمیایی DNA باعث افزایش نسخه‌برداری TP53 می‌شود ولی به طور کلی فعالیت این پروتئین، با میزان سطح آن در ارتباط می‌باشد و این امر نیز در ارتباط با تغییرات پس‌ترجمه‌ای، تنظیم میزان پایداری پروتئین p53 و استقرار درون سلولی آن می‌باشد (Friedman and Lowe 2003).

فعالیت عملکردی اصلی پروتئین p53 توقف چرخه‌ی سلولی و شروع روند آپوپتوز در پاسخ به صدمه‌ی DNA می‌باشد. متعاقب صدمه‌ی DNA، افزایش سریعی در مقادیر p53 به وجود می‌آید. همزمان کینازهایی مانند پروتئین کینازهای وابسته به DNA در پاسخ به صدمه‌ی DNA فعال می‌شوند. این آنزیم‌ها، پروتئین p53 را فسفریله می‌کنند، به طوری که ساختمان پروتئین از هم باز می‌شود و بنابراین قادر به اتصال به DNA می‌گردد و به صورت یک عامل رونویسی فعال در می‌آید. p53 باعث تحریک رونویسی چندین ژن می‌شود که توقف چرخه‌ی سلولی و آپوپتوز را در پی دارد (Donehower et al. 1995).

تنش‌های محیطی با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد همراه می‌باشند که موجب آسیب‌های سلولی و در نتیجه افزایش ابتلا به بیماری و مرگ پرندگان می‌شوند (Khan 2011) و همچنان که پیش‌تر نیز در پژوهش‌ها نشان داده شده است، تنش گرمایی زمینه‌ی تخلیه‌ی ذخیره‌ی آنتی‌اکسیدانی را فراهم می‌کند (Sahin et al. 2005). تجویز دگزامتازون به عنوان آنالوگ سنتزی هیدروکورتیکوسترون و عامل تنش فیزیولوژیک در این مطالعه، با سرکوب ایمنی عمومی و تشدید بیماری‌های عفونی همراه است (VanderWal et al. 1975). چنین به نظر می‌رسد که تنش فیزیولوژیک با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد همراه است و موجبات آسیب سلولی و افزایش میزان وقوع آپوپتوز را فراهم می‌آورد (Khan 2011).

بررسی سطح بیان پروتئین‌های p53 و کاسپاز ۳ در بورس فابریسیوس جوجه‌های گوشتی متعاقب القای تنش فیزیولوژیک با دگزامتازون، افزایش معنی‌داری را در میزان بیان این پروتئین‌ها در گروه‌های تحت تنش در این مطالعه نشان داد و این یافته‌ها احتمالاً نمایانگر افزایش میزان بروز آپوپتوز متعاقب القای تنش فیزیولوژیک توسط دگزامتازون می‌باشد، که این نتیجه در راستای نتایج مطالعات دیگر می‌باشد (Norrman, David, Sauter, Hammon, & Blum, 2003). مطالعات بافت‌شناسی و هیستومورفومتری در گروه‌های آزمایشی مختلف نشان داد که در گروه تنش در مقایسه با گروه‌های شاهد اندازه‌ی مرکز زایگر فولیکول‌های لنفاوی افزایش یافته که یکی از دلایل این امر می‌تواند آپپتوز در سلول‌های نابالغ مرکز زایگر باشد.

در مطالعه‌ی حاضر مشاهده گردید که افزودن مکمل کروم در جیره‌ی غذایی پرندگان، متعاقب القای تنش فیزیولوژیک با دگزامتازون، موجب کاهش میزان پروتئین‌های p53 و کاسپاز در گروه‌های تحت تنش و به دنبال آن کاهش میزان وقوع آپوپتوز در سلول‌های فولیکول‌های لنفاوی بورس فابریسیوس می‌شود، همچنین با افزودن مکمل کروم در گروه‌های تحت تنش، اندازه‌ی مرکز زایگر کاهش معنی‌داری با گروه تنش نشان دادند، که از منظر بافت‌شناسی تأیید کننده‌ی اثرات ذکر شده کروم در بالا می‌باشد. این اثرات احتمالاً به دلیل ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و شبه انسولینی کروم می‌باشد (Onderci et al. 2005). مطالعات نشان داده است که مکمل کروم وزن بدن و سطح پاسخ ایمنی را افزایش می‌دهد (Chang and Mowat 1992) و در حیواناتی که از مکمل کروم استفاده کرده‌اند، غلظت کورتیزول خون کاهش و در نتیجه پاسخ ایمنی ارتقا می‌یابد (Khansari et al. 1990). مکمل کروم به صورت یک ترکیب فعال در تحمل گلوکز عمل می‌کند و زمانی که به فاکتور تحمل گلوکز متصل شد، واکنش بین انسولین و گیرنده‌های انسولین را تسهیل می‌کند (Mooradian and Morle 1987). کروم به عنوان

www.SID.ir

Archive of SID

کوفاکتور انسولین عمل می‌کند بنابراین عملکرد کروم در سلول‌ها، همانند انسولین می‌باشد. بر خلاف عملکرد شبه انسولینی، کروم نمی‌تواند جانشین انسولین شود (Mertz 1993). پژوهش‌های بسیاری در ارتباط با اثر کروم بر سیستم ایمنی انجام گرفته و باور بر این است که کروم دارای اثرات مختلف هورمونی، ذاتی و سلولی در سیستم ایمنی است (Borgsand Mallard 1998). تنش فیزیولوژیک ممکن است سطح کروم را کاهش دهد، به این صورت که آسیب‌ها باعث افزایش متابولیسم گلوکز شده و در نهایت منجر به متابولیزه شدن و تخلیه کروم از طریق ادرار می‌گردند (Schwarz K 2008). بنابراین کروم ممکن است نقش بسیار حائز اهمیتی در جریان تنش ایفا کند. کروم سه ظرفیتی در ساختار و بیان اطلاعات ژنتیکی جانداران نقش دارد، بدین معنی که اتصال کروم با اسیدهای نوکلئیک نسبت به دیگر یون‌های فلزی قوی‌تر است (Okada et al. 1982). کروم در هسته‌ی سلول تجمع می‌کند و به دلیل پیوند با کروماتین و افزایش مناطق رونویسی، سنتز RNA را افزایش داده و بنابراین در بیان ژن نقش ایفا می‌کند (Okada et al. 1989).

نتایج این آزمایش نشان داد که تنش فیزیولوژیک به دلایل مختلف از جمله کاهش ذخیره‌ی کروم در بدن، افزایش رادیکال‌های آزاد و تضعیف دستگاه دفاع آنتی-اکسیدانی موجب آسیب سلول‌های بافت لنفوییدی و در نتیجه افزایش میزان روند آپوپتوز سلولی می‌شود. مکمل کروم به دلیل دارا بودن ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و نیز نقش مهمی که در متابولیسم انسولین و کربوهیدرات‌ها دارد موجب محافظت سلولی بافت لنفاوی در برابر اثرات ناشی از تنش فیزیولوژیک می‌شود.

منابع

Borgs, P. and Mallard, B.A. (1998). Immune-endocrine interactions in agricultural species: chromium and its effect on health and performance. Domesttic Animal Endocrinology, 15(5): 431-438.

Chang, X. and Mowat, D. (1992). Supplemental chromium for stressed and growing feeder calves. Journal of Animal Science,70(2): 559-565.

Donehower, L.A.; Godley, L.A.; Aldaz, C.M.; Pyle, R.; Shi, Y.P.; Pinkel, D. et al. (1995). Deficiency of p53 accelerates mammary tumorigenesis in Wnt-1 transgenic mice and promotes chromosomal instability. Genes and Development, 9(7): 882-895.

Fridman, J.S. and Lowe, S.W. (2003). Control of apoptosis by p53. Oncogene, 22(56): 9030-9040.

Gheisari, A.A.; Sanei, A.; Samie, A.; Gheisari, M.M. and Toghyani, M. (2011). Effect of diets supplemented with different levels of manganese, zinc, and copper from their organic or inorganic sources on egg production and quality characteristics in laying hens. Biological Trace Element Research, 142(3): 557-571. doi:10.1007/s12011-010-8779-x

Gropp, J.; Matzke, P.; Schulz, V.; Ferstl, R. and Peschke, W. (1976). [Effect of anabolic steroids on fattening and slaughter performance in calves (pilot experiment)]. Fortschr Tierphysiol Tierernahr, (6): 10-17.

Khan, R. (2011). Antioxidants and poultry semen quality. World's Poultry Science Journal, 67(02): 297-308.

Khansari, D.N.; Murgo, A.J. and Faith, R.E. (1990). Effects of stress on the immune system. Immunology today, 11(5): 170-175.

Li, Y.; Cai, H.; Liu, G.; Dong, X.; Chang, W.; Zhang, S. et al. (2009). Effects of stress simulated by dexamethasone on jejunal glucose transport in broilers. Poultry Science, 88(2): 330-337.

Macario, A.J. and Conway de Macario, E. (2005). Sick chaperones, cellular stress, and disease. The New England Journal of Medicine, 353(14): 1489-1501. doi:10.1056/NEJMra050111

Mertz, W. (1993). Chromium in human nutrition: a review. The Journal of Nutrition, 123(4): 626-633.

Mooradian, A.D. and Morley, J.E. (1987). Micronutrient status in diabetes mellitus. The American Journal of Clininal Nutrition, 45(5): 877-895.

www.SID.ir

Archive of SID

Norrman, J.; David, C.W.; Sauter, S.N.; Hammon, H.M. and Blum, J.W. (2003). Effects of dexamethasone on lymphoid tissue in the gut and thymus of neonatal calves fed with colostrum or milk replacer. Journal of Animal Science, 81(9): 2322-2332. doi:10.2527/2003.8192322x

Okada, S.; Tsukada, H. and Tezuka, M. (1989). Effect of chromium (III) on nucleolar RNA synthesis. Biological Trace Elements Research, 21(1): 35-39.

Okada, S.; Taniyama, M. and Ohba, H. (1982). Mode of enhancement in ribonucleic acid synthesis directed by chromium (III)-bound deoxyribonucleic acid. Journal of inorganic biochemistry, 17(1): 41-49. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0162-0134(00)80228-7

Onderci, M.; Sahin, K.; Sahin, N.; Cikim, G.; Vijaya, J. and Kucuk, O. (2005). Effects of dietary combination of chromium and biotin on growth performance, carcass characteristics, and oxidative stress markers in heat-distressed Japanese quail. Biological Trace Elements Research, 106(2): 165-176. doi:10.1385/BTER:106:2:165

Pechova, A. and Pavlata, L. (2007). Chromium as an essential nutrient: a review.

Rosales, A.G. (1994). Managing stress in broiler breeders: a review. The Journal of Applied Poultry Research, 3(2): 199-209.

Sahin, K.; Sahin, N.; Onderci, M.; Gursu, F. and Cikim, G. (2002). Optimal dietary concentration of chromium for alleviating the effect of heat stress on growth, carcass qualities, and some serum metabolites of broiler chickens. Biological Trace Elements Research, 89(1): 53-64. doi:10.1385/BTER:89:1:53.

Sahin, N.; Sahin, K.; Onderci, M.; Gursu, M.F.; Cikim, G.; Vijaya, J. and Kucuk, O. (2005). Chromium picolinate, rather than biotin, alleviates performance and metabolic parameters in heat-stressed quail. British Poultry Science, 46(4): 457-463. doi:10.1080/00071660500190918

Schwarz, K. and Mertz, W. (1959). Chromium(III) and the glucose tolerance factor. Archives of Biochemistry Biophysics, 85: 292-295.

Shini, S.; Kaiser, P.; Shini, A. and Bryden, W.L. (2008). Biological response of chickens (Gallus gallus domesticus) induced by corticosterone and a bacterial endotoxin. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 149(2): 324-333.

Tarantola, M.; Schiavone, A.; Preziuso, G.; Russo, C.; Biolatti, B. and Bergero, D. (2005). Effects of low doses of dexamethasone on productive traits and meat quality of veal calves. Animal Science-Glasgow Then Penicuik, 79(1): 93-98.

Toghyani, M.; Toghyani, M.; Shivazad, M.; Gheisari, A. and Bahadoran, R. (2012). Chromium supplementation can alleviate the negative effects of heat stress on growth performance, carcass traits, and meat lipid oxidation of broiler chicks without any adverse impacts on blood constituents. Biological Trace Elements Research, 146(2): 171-180.

VanderWal, P.; Berende, P.L.M. and Sprietsma, J.E. (1975). Effect of Anabolic Agents on Performance of Calves1. Journal of Animal Science, 41(3): 978-985. doi:10.2527/jas1975.413978x

www.SID.ir

Vol. 14, No. 4, Winter, 2019
Archive of SID

Histomorphometrical evaluation of Bursa of Fabricius and Immunohistochemistry Tracing of P53 and Caspase3 inbroiler following physiological stress and protective effect of chromium supplement

Moeini Moghadam, R.[1]; Morovvati, H.[2]; Adib Moradi, M.[2]; Sharifi, S.D.[3] and ShalizarJalali, A.[4]

Received: 30.09.2017 Accepted: 17.04.2018

Abstract

The purpose of present study was to examine the protective effect of chromium supplement against damages which is induced by physiological stress and evaluation of apoptosis in Bursa of Fabricius of broilers through Immunohistochemical tracing of p53 and caspase-3 proteins. in this experimental study, 320 male Ross broilers were used. This study was designed as a 2 x 4 factorial, with two stress levels (under stress and stress free) and four levels of chromium-methionine supplement (0, 1000, 2000 and 3000ppb) in diet, which distributed into 4 accidental repeated groups of 10 each. stress was induced by adding dexamethasone to the diet, during 17 to 24 days of age. At the end, broilers in all groups were euthanized and the samples that include Bursa of Fabricius were obtained then pathological and immunohistochemical parameters were evaluated. Physiological stress caused significant changes in medulla and cortex in the lymphatic follicle of Bursa of Fabricius. Based on this study, Chromium-methionine supplementation could ameliorate the effects of Physiological stress in Bursa of Fabricius. Physiological stress caused significant increases in p53 and caspase-3 expression levels in Bursa of Fabricius. Chromium-methionine administration markedly reduced the expression levels of p53 and caspase-3 after inducing physiological stress.

Keywords: P53, Caspase3, Bursa of Fabricius, Physiologic Stress, Chromium

1- PhD Student of Histology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
2- Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
3-Associate Professor, Department of Animal and Poultry Sciences, Abureyhan Campus, University of Tehran, Tehran, Iran
4- Assistance Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
Corresponding Author: Morovvati, H., E-mail: hmorovvati@ut.ac.ir

www.SID.ir