مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۱۷، شماره ۳، پاییز ۸۶، صفحات ۱۲۷ تا ۱۳۱

Original Article

مطالعه تجربی آپوپتوز سلول‌های توبولی کلیه جوجه‌های SPF متعاقب عفونت با ویروس آنفلوانزای سروتیپ H9N2

یوسف دوستار[۱]، رضا طروقی[۲]، مهرداد هاشمی[۳]، وحید حاجی آبالو[۴]

[۱] استادیار، گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز
[۲] استادیار، گروه بیماریهای طیور، مرکز تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، مشهد
[۳] استادیار، گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات
[۴] دستیار، گروه بیماریهای طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات

چکیده

سابقه و هدف: *ویروس آنفلوانزا عامل مرگ سلولی حیوانات و انسان می‌باشد. مرگ سلولی حاصل از این ویروس می‌تواند به دو صورت نکروز وآپوپتوز اتفاق بیفتد. در این تحقیق ما به ارزیابی نوع مرگ سلولی در بافت کلیه جوجه‌های عفونی شده با ویروس آنفلوانزای طیور سرو تیپ H_9N_2 (A/chicken/ Iran/ 772/2000) پرداختیم.*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی، ۶۰ قطعه جوجه(SPF) با سن ۳ هفته به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول با تیتر مشخص ویروس آنفلوانزا $EID50^{7/5}$ ۱۰ و گروه دوم با استفاده از سرم سالین به روش وریدی تلقیح گردیدند. پس از ۷۲ ساعت از بافت کلیه آنها نمونه-برداری و در محلول فرمالین ۱۰ درصد فیکس شد. مقاطع میکروسکوپی با ضخامت ۶-۵ میکرونی از آنها تهیه و سپس به روش تانل رنگ‌آمیزی شدند.*

یافته‌ها: *میانگین (± انحراف معیار) تعداد سلول‌های آپوپتوتیک شمارش شده برای گروه تیمار و شاهد به ترتیب ۱/۷۹±۱۸ و ۰/۵۶±۱ بود ($P<0/005$).*

نتیجه‌گیری: *این مطالعه نشان داد که ویروس آنفلوانزای سروتیپ H9N2 توانایی القاء آپوپتوز سلول‌های توبولی کلیه را دارا می‌باشد.*

واژگان کلیدی: *ویروس آنفلوانزای طیور، آپوپتوز، آپوپتوز کلیوی.*

مقدمه

بیماری آنفلوانزا به عنوان یک بیماری ویروسی از سال۱۹۰۱ میلادی شناخته شده است. درسال ۱۹۵۵ میلادی شکل خاصی از ویروس آنفلوانزا به عنوان عامل ایجاد کننده بیماری شناخته گردید که بعدها به علت تلفات زیاد طاعون مرغی نامیده شد. اهمیت ویروس‌های آنفلوانزا به عنوان یک پاتوژن با گستردگی جهانی در انسان‌ها، حیوانات خانگی وماکیان به خوبی شناخته شده است و گاهی عامل پاندمی در بین انسانها بوده است. ویروس آنفلوانزای پرندگان از خانواده ارتومیکسوویریده بوده و به جنس A تعلق دارد. از سال ۱۹۹۴ میلادی سویه H9N2 ویروس A آنفلوانزا باعث طغیان بیماری در ماکیان با مرگ و میر زیاد درکره و چین شده است و از سال ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۲ میلادی ویروس H9N2 به طورشایع از گوشت و مغز استخوان جوجه‌های وارد شده از چین در مرکز قرنطینه حیوانات یوکوهامای ژاپن جدا شده است. به طوری که در مارس ۱۹۹۹ میلادی دو مورد ویروس آنفلوانزا از دختران یک تا چهار ساله هنگ کنگی که از بیماری شبه آنفلوانزا بهبود یافته بودند، بدست آمد. در همین راستا پنج مورد ویروس H9N2 در انسان‌ها در آگوست سال ۱۹۹۸ به دست آمد (۱).

آدرس نویسنده مسئول: تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده دامپزشکی، یوسف دوستار
(E-mail: vetdoustar@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۶/۵/۷
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۶/۸/۲۳

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-09-14]

تشدید بیماری‌زایی سویه H9N2 ویروس A آنفلوانزا جدا شده از جوجه در چین توسط عفونت هم‌زمان با باکتری‌هایی نظیر استافیلوکوک طلایی و هموفیلوس پارا گالیناروم به اثبات رسیده است (۱). به خاطر خطر گسترش برخی سویه‌های بیماری‌زا در جمعیت انسانی به صورت یک بیماری زئونوتیک، آگاهی از اینکه چگونه ویروس‌های آنفلوانزا در سطوح سلولی با سلول‌های میزبان وارد کنش و عمل می‌شوند و این که چگونه و از چه مکانیسم‌ها و راه‌هایی مرگ سلولی را در سلول‌های میزبان القاء می‌کنند، درک ما را از روند بیماری‌زایی ویروس آسان‌تر کرده و ما را در برخورد مناسب با این بیماری یاری می‌کند. مرگ سلول‌های یوکاریوتیک می‌تواند در اثر نکروز یا آپوپتوز ایجاد گردد ونکروز در واکنش‌های پاتولوژیکی نظیر عفونت‌های ویروسی تخریب‌کننده اهمیت دارد. تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که بسیاری از ویروس‌ها از جمله ویروس آنفلوانزا باعث القاء آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های میزبان میگردد (۴-۲). ویروس آنفلوانزا در اعضای مختلف از جمله کلیه موجب تغییرات آسیب بافتی می‌گردد و بررسی تغییرات مرگ سلولی و آپوپتوز سلولی در بافت کلیه جوجه‌های SPF مبتلا به سروتیپ H9N2 از اهداف این مطالعه است. انجام این مطالعه می‌تواند در راستای مطالعات پاتوژنز بیماری آنفلوانزای طیور بسیار مفید باشد. با توجه به اهمیت بیماری آنفلوانزا و گسترش روزافزون بیماری در بین جمعیت دامی و انسانی نیاز است تا هر چه بهتر پاتوژنز بعضی از سویه‌های ویروسی نظیر سویه H9N2 از نظرآسیب‌های سلولی مورد ارزیابی قرار گیرد. امروزه مطالعات پایه‌ای می‌توانند راه‌گشای بسیار موثری در مشخص شدن پاتوژنز بیماری‌ها باشند. بنابراین سعی ما این است که با مطالعات تجربی و ارزیابی دقیق مسیرهای آسیب سلولی راه‌های درمانی موثرتری را به متخصصین بالینی پیشنهاد نمائیم.

مواد و روشها

در این مطالعه تجربی ویروس آنفلوانزای طیور تحت تیپ H9N2 (A/chicken/Iran/772/2000) کلیه ۲ بار در تخم‌مرغ‌های جنین‌دار کلون شده بود، به جوجه‌های SPF (Valo, Lohman, Germany) در سن ۳ هفتگی به روش وریدی تلقیح گردید. ابتدا جوجه‌های SPF به دو گروه ۳۰ تایی تیمار و شاهد تقسیم شدند. گروه تیمار به روش تزریق وریدی با ویروس آنفلوانزای تحت تیپ H9N2 آلوده شدند و دز تلقیحی ویروس در این مرحله EID50 $10^{7/5}$ بود. گروه شاهد نیز برابر حجم محلول تلقیحی ویروس، سرم سالین نرمال به روش تزریق وریدی دریافت نمودند. سه روز پس از تلقیح، جوجه‌های مورد نظر (گروه تیمار و گروه شاهد) کالبدگشایی و از کلیه آنها نمونه‌برداری به عمل آمد. پس از نمونه‌برداری، نمونه‌های مورد نظر در داخل فرمالین ۱۰ درصد جهت تهیه مقاطع ۶-۵ میکرونی به آزمایشگاه پاتولوژی دانشکده دامپزشکی تبریز ارسال شدند. نمونه‌ها پس از گذراندن مراحل آب‌گیری، شفاف‌سازی، آغشتگی با پارافین و قالب‌گیری به ضخامت‌های ۶-۵ میکرونی برش و به روش تانل رنگ‌آمیزی شدند.

برای اجرای تکنیک تشخیصی تانل (TUNEL) مراحل زیر انجام شد:

۱- ابتدا مقاطع تهیه شده پس از پارافین‌زدائی و آب‌دهی با پروتئیناز K مجاور و پس از انکوباسیون بمدت ۳۰ دقیقه دردمای ۳۷ درجه سانتی گراد با محلول فسفات بافر شستشو گردید.

۲- مقاطع بافتی با محلول واکنش‌گر تانل به میزان ۵۰ میکرولیتر به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مجاور گردید و با محلول فسفات بافر شستشو داده شد.

۳-در این مرحله مقاطع بافتی پس از انکوباسیون با محلول کانورتر POD (۵۰ میکرو لیتر) بمدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با محلول فسفات بافر شستشو و سپس با محلول دی‌آمینو بنزیدین تتراکلراید نیز مجاور گشته و بمدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۵ سانتی گراد مجددا انکوبه گردید.

۴- با فسفات بافر شستشو و سپس با تولوئیدین بلو رنگ‌آمیزی شد (۵،۶).

پس از تهیه مقاطع میکروسکوپی از بافت کلیه جوجه‌های SPF گروه تیمار (T) و شاهد (C)، این مقاطع از لحاظ وجود سلولهای آپوپتوتیک مورد بررسی قرار گرفتند. به این منظور، تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در ۵ میدان میکروسکوپیک با بزرگنمایی ۴۰× که بصورت تصادفی انتخاب شده بودند، شمارش گردیدند. تحلیل آماری با استفاده از نرم افزارSPSS نسخه ۱۳ و آزمون t test بود.

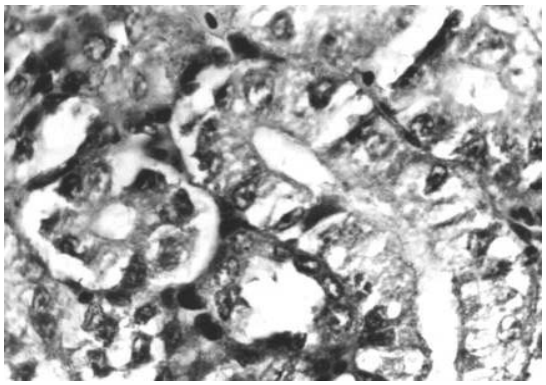
یافته‌ها

میانگین (± انحراف معیار) تعداد سلول‌های آپوپتوتیک شمارش شده برای گروه تیمار و شاهد به ترتیب ۱/۷۹±۱۸ و ۰/۵۶±۱ بود ($P<0/005$).

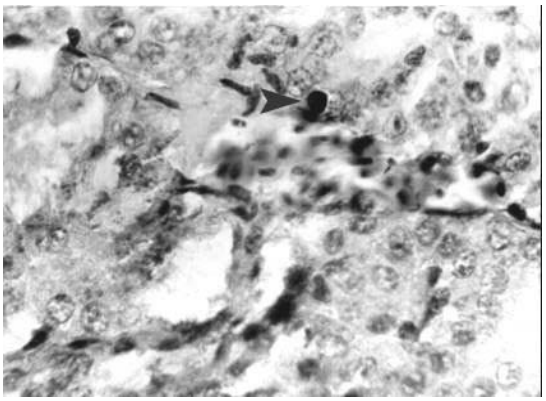
تصاویر میکروسکوپ نوری از بافت کلیه گروه‌های شاهد و تیمار در شکل ۱ تا ۳ آمده است.آورده شده است. همچنان‌که

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-09-14]

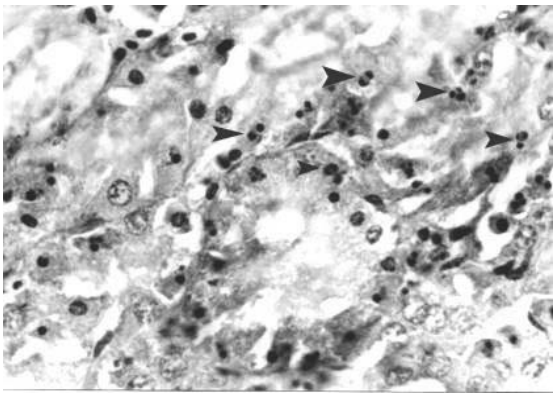
در این تصاویر نیز مشخص است، اشکال متعدد سلول‌های آپوپتوتیک تانل مثبت در مقاطع بافتی کلیه گروه تیمار قابل مشاهده می‌باشد.



شکل ۱- نمای ریزبینی مقطعی از کلیه گروه شاهد که در آن تغییرات آپوپتوز قابل مشاهده نمی‌باشد. (رنگ‌آمیزی تانل با بزرگنمایی ۱۰۰ x)



شکل ۲- نمای ریزبینی مقطعی از کلیه گروه تیمار، که اشکال متعدد سلول‌های آپوپتوتیک تانل مثبت(فلش) در آن قابل مشاهده می‌باشد. (رنگ‌آمیزی تانل با بزرگنمایی ۱۰۰ x)



شکل ۳- نمای ریزبینی مقطعی از کلیه تیمار، که تغییرات آپوپتوتیک متعددی در سلول‌های توبولی(فلش‌ها) قابل رویت می‌باشد. (رنگ‌آمیزی تانل با بزرگنمایی ۱۰۰ x)

سلول‌های آپوپتوتیک در مشاهده ریزبینی با پیکنوز و فراگمانتاسیون هسته قابل تشخیص می‌باشد که در رنگ آمیزی تانل هسته و قطعات فراگمانته آن به رنگ قهوه‌ای روشن تا تیره (شکل ۲ و ۳) مشاهده می‌گردند. در نمای ریزبینی تعداد سلول‌های آپوپتوتیک توبول‌های کلیوی گروه تیمار در مقایسه با گروه شاهد بیشتر است.

بحث

آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در حقیقت شامل یک سری از وقایع سلولی از قبل تعریف شده می‌باشد، که از بین بردن موثر سلول و محتویات آنرا با نهایت کارایی به انجام می‌رساند. تعریف اصلی آپوپتوز بیان می‌دارد که این نوع از انهدام سلول باعث ایجاد التهاب نمی‌شود. اما به هر حال اخیرا این نظریه مورد بازنگری قرار گرفته و آپوپتوز در بعضی شرایط مانند تهاجم عامل پاتوژن می‌تواند موجب القای پاسخ التهابی گردد که پاسخ ایمنی را شاید تشدید کند. همچنین اشاره شده که آپوپتوز، از طریق یکی از چندین راه ممکن برانگیخته می‌شود که بستگی به عامل محرک اولیه دارد. در بسیاری از این مسیرها، تحریک گیرنده فعال شدن پروتئین کیناز آبشار فسفاتازی (شامل تیروزین کیناز، سرین/ ترئونین‌کیناز، میتوژن کیناز MAP [Mitogene Activated Kinase] و پروتئین کیناز(PK) و نیز ترشح پیامبرهای ثانویه که به عنوان عامل مثبت یا منفی در ترجمه بعضی ژنهای خاص عمل می‌کنند، وجود دارد (۷،۵). بطوری‌که یک عامل مهم در بسیاری از این مسیرها فعال شدن یک سری از پروتئازهای سیستئینی (کاسپازی) می‌باشد که به دو گروه مهم تقسیم می‌گردند: کاسپازهای آغاز کننده و کاسپازهای موثر. کاسپازهای آغازکننده گیرنده‌های مربوط به مرگ سلول را در بر می‌گیرند و نیز بر سایر مولکول‌های تنظیم‌کننده سیتوپلاسمی تاثیر می‌گذارند و با تجزیه پروتئولیتیک فعال می‌شوند. این کاسپازهای فعال شده یک آبشارکاسپازی را به راه می‌اندازند که موجب فعال شدن کاسپازهای موثر می‌گردند. کاسپازهای موثر باعث فعال شدن پروتئازها و نوکلئازها می‌گردند که این وقایع باعث ایجاد تغییر مورفولوژیکی موجود در سلول‌های آپوپتوتیک می‌گردد. مطالعه حاضر با بررسی کمی تغییرات آپوپتوز (مرگ سلولی) در سلول‌های توبولی کلیه متعاقب تلقیح ویروس آنفلوانزای سویه H9N2 ، نقش فرآیند آپوپتوز در پاتوژنز ویروس آنفلوانزا و ایجاد ضایعات کلیوی در این بیماری را نشان می‌دهد (۸،۱). در این مطالعه اختلاف

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-09-14]

معنی‌داری از نظر تغییرات کمی سلول‌های آپوپتوتیک در بین گروه‌های شاهد و تیمار وجود داشت. ما فکر می‌کنیم که دلیل این اختلاف معنی‌دار، می‌تواند ناشی از مکانیسم‌ها و عوامل درگیر در آپوپتوز القایی ویروس آنفلوانزای سویه H9N2 در سلول‌های توبولی کلیه باشد. بر اساس مطالعات Raviو Wurzar احتمالاً القاء آپوپتوز توسط این ویروس از طریق فعال‌سازی کاسپاز ۳ صورت می‌گیرد که مراحل فعال‌سازی این آنزیم از طریق فعال شدن فاکتور NF-KB ناشی از القاء TRAIL و FAS/FASL و القاء رونویسی ژن‌های پروآپوپتوتیک مانند P53 و BAX می‌باشد که از این طریق موجب القاء فعالیت کاسپاز ۹ می گردد. فعال شدن آنزیم کاسپاز ۹ در ارتباط با نقش پروتئین‌های ویروسی نظیر NA در ایجاد استرس‌های اکسیداتیو مخصوصا در افزایش بیان ژن‌های مولد پروتئین‌های HA، NA و NP که همگی با فعال کردن مسیر استرس‌های اکسیداتیو منجر به تخریب غشاء میتوکندری و آزادسازی سیتوکروم C می گردند، انجام می‌گیرد. آنزیم کاسپاز ۹ یکی از آنزیم‌های اجرایی بسیار مهم در القاء آپوپتوز می‌باشد. هم‌چنین آنها بیان نمودند که پروتئین غیرساختاری NS1 از طریق مهار فعالیت PKR و افزایش بیان NF-KB و IFN.β باعث راه اندازی مسیر آپوپتوزیس می‌گردد و در این مسیر نیز توانستند نتایج معنی‌داری را بدست آورند که با یافته‌های ما هم‌خوانی دارد (۱۲-۹). ویروس آنفلوانزا با فعال کردن مسیرهای درونزاد آپوپتوز یعنی از طریق بیان بیش از حد پروتئین BAX و مهار BCL2 و تشکیل کانال‌های میتوکندریایی و خروج سیتوکروم C می‌تواند باعث القاء آپوپتوز گردد. اما باید نقش سیتوکاین‌ها را در این میان فراموش نکنیم که بدنبال فعالیت ویروس در سلول آلوده و راه‌اندازی فرآیندهای التهابی با حضور سیتوکاین‌هائی نظیر TNF-α می‌تواند از مسیر FAS/FASL باعث القاء آپوپتوز گردد. در این خصوص مطالعات Ito وSuarez با بررسی‌های ایمنولوژیکی و ارتباطات سیتوکاینی نتایج معنی‌داری را به همراه داشته است که بیان مکانیسم‌های دخیل در آپوپتوز سلول‌های توبولی کلیه متعاقب تلقیح ویروس آنفلوانزا با الهام از یافته‌های آنها می‌توان نتایج این کار تحقیقی را در بروز مرگ سلولی بافت کلیه در مطالعه حاضر را توجیح نمود (۳،۱۳،۱۴). Schultus، Zambou و Morris در پی مطالعات خودشان چنین بیان می‌دارند که ویروس آنفلوانزای سویه H9N2 شاید با فعال سازی تاخیری TGF-β توسط NA باعث فعال شدن مسیرهای مرگ سلولی می‌گردد. آنها با بیان مکانیسم‌های درونزاد آپوپتوز متعاقب عفونت ویروس ارتباط مشخصی بین ویروس آنفلوانزا و آپوپتوز یافتند که در بیان مسیرهای القاء آپوپتوز سلول‌های توبولی جوجه‌ها می‌توان به نقش موثر این موارد در بیان‌تغییرات مرگ سلولی و اختلاف معنی‌دار نتایج بدست آمده اشاره نمود (۱۶،۱۵،۸،۴). مکانیسم های متعددی در مطالعات سایر دانشمندان مطرح شده که هرکدام می‌تواند در بحث مکانیسم‌های آپوپتوز متعاقب تهاجم ویروس آنفلوانزا مطرح باشد. در مطالعه حاضر مشخص گردید، ویروس آنفلوانزای سویه H9N2 قادر به القای آپوپتوز در سلولهای توبولی و ایجاد ضایعات کلیوی می‌شود. این امر نشان می‌دهد که ویروس آنفلوانزای سویه H9N2 شاید بتواند به عنوان یک پاتوژن عمده در انسان مطرح باشد که بررسی و شناخت جنبه‌های مختلف بیماری‌زایی این ویروس در مطالعات آینده، ما را در برخورد مناسب و اصولی با بیماری آنفلوانزا یاری می‌کند.

قدردانی و تشکر

بدین وسیله از همکاران حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی کمال تشکر به عمل می‌آید.

REFERENCES

1. Liu J. H_9N_2 influenza viruses prevalent in poultry in china is phylogenetically distinct from A/quail/ Hong kong/G1/97prsumed to be the donor of the internal protein genes of the H_5N_1 Hong Kong/ 97virus. Avian Pathol. 2003;32:552-60.

2. Barber GN. Host defense viruses and apoptosis. Cell Death Differ 2001;8:113-26.

3. Ito T, Kobayashi Y, Morita T, Horimoto T, Kawaoka Y. Virulent influenza a viruses induces apoptosis in chickens. Virus Res. 2002;84:27-35.

4. Morris J, Nightingale S, Harry S, Clive S. Influenza A Virus induced apoptosis is a multifactorial process: Explating reverse genetics to elucidate the role of influenza A virus proteins in virus – induced apoptosis. Virol 2005;335:198-211.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-09-14]

۵. دوستاری م. مطالعه آزمایشی آپوپتوزیس القاء شده توسط ویروس عامل بیماری بورس عفونی جوجه‌ها با استفاده از متد تشخیصی TUNEL و میکروسکوپ الکترونی. پایان‌نامه جهت دریافت دکترای تخصصی دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، سال۱۳۸۳.

6. Frankfurt OS, Krishan A. Identification of apoptotic cells by formamide – induced DNA denaturation in condensed chromatin. Histochem cytochem 2001;49:369-78.

7. Hinshaw V, Olsen Ch, Dybdah1-Sissoko N, Evans D. Apoptosis mechanism of cell killing by influenza A and B viruse. J Virol. 1994;68:3667-73.

8. Zambon MC, Meduiro R. Pathogenesis of Influenza A and B in humans. Rev Med Virol. 2001;11:227-41.

9. Chai C, kuin X, Wang Y. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by smac / DIABLO. Nature 2000;466:855-62.

10. Keogh SA, Walczak H, Bouchier – Hayes L, Martin SJ. Failure of Bcl-2 to block Cytochrome C redistribution during TRAIL – induced apoptosis. FEBS Lett. 2000;471:93-98.

11. Ravi R, Bedi GC, Engstrom LW, Zeng W, Mookeriyee B, Gelinas C, et al. Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L- induced apoptosis by NF-KB. Nat cell Biol. 2001;3:409-16.

12. SchultzCherry S, Koci M, Thompson, E, Tumpey TM. Examining the cellular pathways involved in influenza virus induced apoptosis. Avian Dis 2003;23:968-71.

13. Brydon WA, Edward J, Morris S. Role of apptosis and cytokines in influenza Virus morbidity. Microbiol Rev. 2005;29:837-50.

14. Wurzer J, Walter E, Pleschka C, Berberich S. NF-KB- dependent induction of tumor necrosis factor – related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and (Fas / Fasl) is crucial for efficient influenza virus propagation. J Biol. 2004;30:30931-37.

15. Schultuz C, StaceyDS, Neumann N, Kawaoka G, Shaw H. Influenza virus NS1 protein induces apoptosis in cultured cells. Virginia. 2002;75:17-22.

16. Schultz R, Harrington J, William JR. Apoptosis: programmed cell death at a moleclar level. Semin Arthr Rheum. 2003;32:345-69.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-09-14]