

مطالعه تجربی آپوئتوز سلول‌های توبولی کلیه جوجه‌های SPF متعاقب عفونت با ویروس آنفلوآنزای 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 آنفلوآنزا عامل مرگ سلولی حیوانات و انسان می‌باشد. مرگ سلولی حاصل از این ویروس می‌تواند به دو صورت نکروز و آپوئتوز اتفاق بیفتد. در این تحقیق ما به ارزیابی نوع مرگ سلولی در بافت کلیه جوجه‌های عفونی شده با ویروس آنفلوآنزای طیور سروتیپ H₉N₂ (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 تیتیر مشخص ویروس آنفلوآنزا EID₅₀ ۱۰^{۷/۵} 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 ۵-۶ میکرونی از آنها تهیه و سپس به روش تانل رنگ آمیزی شدند.

یافته‌ها: میانگین ($\pm$ انحراف معیار) تعداد سلول‌های آپوئتوتیک شمارش شده برای گروه تیمار و شاهد به ترتیب $18 \pm 1/79$ و $1 \pm 0/56$ بود ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که ویروس آنفلوآنزای سروتیپ H9N2 توانایی القاء آپوئتوز سلول‌های توبولی کلیه را دارا می‌باشد.

واژگان کلیدی: ویروس آنفلوآنزای طیور، آپوئتوز، آپوئتوز کلیوی.

مقدمه

بیماری آنفلوآنزا به عنوان یک بیماری ویروسی از سال ۱۹۰۱ میلادی شناخته شده است. در سال ۱۹۵۵ میلادی شکل خاصی از ویروس آنفلوآنزا به عنوان عامل ایجاد کننده بیماری شناخته گردید که بعدها به علت تلفات زیاد طاعون مرغی نامیده شد. اهمیت ویروس‌های آنفلوآنزا به عنوان یک پاتوژن با گستردگی جهانی در انسان‌ها، حیوانات خانگی و ماکیان به خوبی شناخته شده است و گاهی عامل پاندمی در بین انسانها

بوده است. ویروس آنفلوآنزای پرندگان از خانواده ارتومیکسوویریده بوده و به جنس A تعلق دارد. از سال ۱۹۹۴ میلادی سویه H9N2 ویروس A آنفلوآنزا باعث طغیان بیماری در ماکیان با مرگ و میر زیاد در کره و چین شده است و از سال ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۲ میلادی ویروس H9N2 به طور شایع 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 آنفلوآنزا از دختران یک تا چهار ساله هنگ کنگی که از بیماری شبه آنفلوآنزا بهبود یافته بودند، بدست آمد. در همین راستا پنج مورد ویروس H9N2 در انسان‌ها در اگوست 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

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 و نکروز 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 (۲-۴). 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 پاتوژن 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 پاتوژن بعضی از سویه‌های ویروسی نظیر سویه H9N2 از نظر آسیب‌های سلولی مورد ارزیابی قرار گیرد. امروزه مطالعات پایه‌ای می‌توانند راه‌گشای بسیار موثری در مشخص شدن پاتوژن 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) که ۲ بار در تخم‌مرغ‌های جنین‌دار کلون شده بود، به جوجه‌های SPF (Valo, Lohman, Germany) در سن ۳ هفته‌گی 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 ۱۰^{۷/۵} 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 ۵-۶ میکرونی به آزمایشگاه پاتولوژی دانشکده دامپزشکی تبریز ارسال شدند. نمونه‌ها پس از گذراندن مراحل آب‌گیری، شفاف‌سازی، آغشتگی با پارافین و قالب‌گیری به ضخامت‌های ۵-۶ 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 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد با محلول فسفات بافر شستشو و سپس با محلول دی‌آمینو بنزیدین تتراکلراید نیز مجاور گشته و بمدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۵ سانتی‌گراد مجدداً 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 میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰× که بصورت تصادفی انتخاب شده بودند، شمارش گردیدند. تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۳ و آزمون t test بود.

یافته‌ها

میانگین ($\pm$ انحراف معیار) تعداد سلول‌های آپوپتوتیک شمارش شده برای گروه تیمار و شاهد به ترتیب $11/79 \pm 18$ و $10/56 \pm 1$ بود ($P < 0/05$).

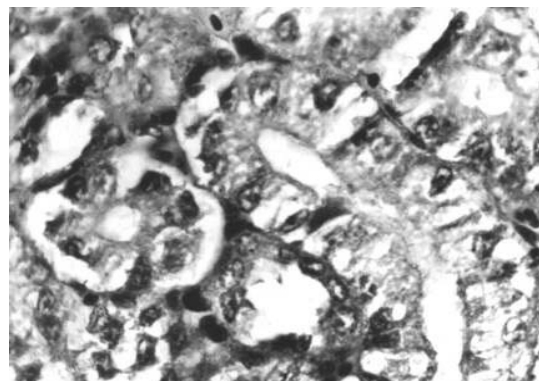
تصاویر میکروسکوپ نوری از بافت کلیه گروه‌های شاهد و تیمار در شکل ۱ تا ۳ آمده است. آورده شده است. همچنان‌که

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 توپول‌های کلیوی گروه تیمار در مقایسه با گروه شاهد بیشتر است.

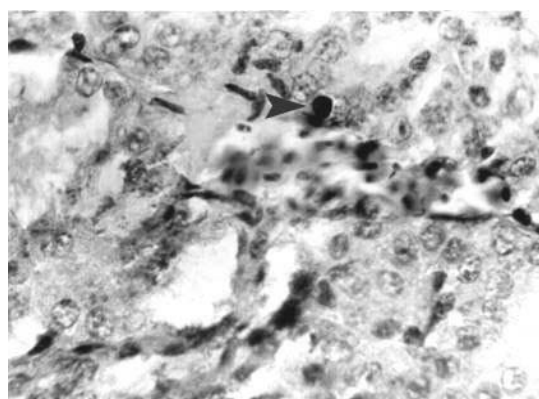
بحث

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 اخیراً 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/ترئونین کیناز، 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 (۵، ۷). بطوری که 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 آغاز کننده گیرنده‌های مربوط به مرگ سلول را در بر می‌گیرند و نیز بر سایر مولکول‌های تنظیم کننده سیتوپلاسمی تاثیر می‌گذارند و با تجزیه پروتئولیتیک فعال می‌شوند. این کاسپازهای فعال شده یک آبشار کاسپازی 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 توپولی کلیه متعاقب تلقیح ویروس آنفلوآنزای سویه H9N2، نقش فرآیند آپوپتوز در پاتوژن ویروس آنفلوآنزا و ایجاد ضایعات کلیوی در این بیماری را نشان می‌دهد (۸، ۱). در این مطالعه اختلاف

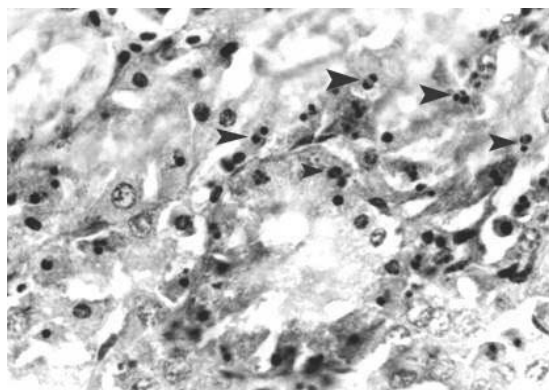
در این تصاویر نیز مشخص است، اشکال متعدد سلول‌های آپوپتوتیک تانل مثبت در مقاطع بافتی کلیه گروه تیمار قابل مشاهده می‌باشد.



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



شکل ۳- نمای ریزبینی مقطعی از کلیه تیمار، که تغییرات آپوپتوتیک متعددی در سلول‌های توپولی (فلش‌ها) قابل رویت می‌باشد. (رنگ آمیزی تانل با بزرگنمایی ۱۰۰ X)

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). Morris و Zambou، Schultus در پی مطالعات خودشان چنین بیان می‌دارند که ویروس آنفلوانزای سویه H9N2 شاید با فعال سازی تاخیری $\text{TGF-}\beta$ 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 بیان تغییرات مرگ سلولی و اختلاف معنی‌دار نتایج بدست آمده اشاره نمود (۱۶، ۱۵، ۸، ۴). مکانیسم‌های متعددی در مطالعات سایر دانشمندان مطرح شده که هر کدام 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.

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 Ravi و Wurzar احتمالاً القاء آپوپتوز توسط این ویروس از طریق فعال سازی کاسپاز ۳ صورت می‌گیرد که مراحل فعال سازی 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 می‌گردد. فعال شدن آنزیم کاسپاز ۹ در ارتباط با نقش پروتئین‌های ویروسی نظیر NA در ایجاد استرس‌های اکسیداتیو مخصوصاً 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 می‌گردند، 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 $\text{IFN-}\beta$ باعث راه اندازی مسیر آپوپتوزیس می‌گردد و در این مسیر نیز توانستند نتایج معنی‌داری را بدست آورند که با یافته‌های ما هم‌خوانی دارد (۹-۱۲). 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 بدنال فعالیت ویروس در سلول آلوده و راه‌اندازی فرآیندهای التهابی با حضور سیتوکاین‌های نظیر $\text{TNF-}\alpha$ می‌تواند از مسیر FAS/FASL باعث القاء آپوپتوز گردد. در این خصوص مطالعات Ito و Suarez با بررسی‌های

REFERENCES

1. Liu J. H₉N₂ influenza viruses prevalent in poultry in china is phylogenetically distinct from A/quail/ Hong kong/G1/97 presumed to be the donor of the internal protein genes of the H₅N₁ Hong Kong/ 97 virus. 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: Exploring reverse genetics to elucidate the role of influenza A virus proteins in virus – induced apoptosis. Virol 2005;335:198-211.

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، سال ۱۳۸۳.
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.