

بررسی فرآیند آپوپتوزیس در طحال و بورس فابریسیوس جوجه های آلوده به ویروس گامبورو با استفاده از تکنیک میکروسکوپ الکترونی

دکتر محمد حسن بزرگمهری فرد^{۱*}، دکتر افشین ذاکری^۲

چکیده

بیماری گامبورو یکی از بیماریهای مهم صنعت طیور جهان و ایران می باشد بطوریکه با واگیری بالا، تلفات، رشد ضعیف، تضعیف سیستم ایمنی که در جوجه ها بویژه در سنین ۳-۶ هفته ایجاد می کند، باعث خسارات اقتصادی فراوانی می گردد. ضایعات هیستوپاتولوژیک که در بورس، طحال و سایر اندام های لنفاوی ایجاد می گردد جدای از نکروز لمفوسیتها بویژه لمفوسیتهای B، آپوپتوز نیز در تخریب لمفوسیتهای آلوده به ویروس و سلولهای پیرامونی و تخلیه لمفوسیتی در بورس و طحال نقش مهمی دارد. هدف از انجام این مطالعه بررسی رخداد فرآیند آپوپتوزیس در سلولهای لمفوسیتی بورس و طحال می باشد. برای این کار ۵۰ جوجه ۲۸ روزه SPF انتخاب و به دو گروه ۲۵ تایی کنترل و آزمایش در دو اتاق جداگانه تقسیم بندی شدند. گروه آزمایش با ویروس سویه ۴۹۹ ایران (IR499) که از نوع vvIBDV است از راه دهانی و به شکل تجربی آلوده شدند و در گروه کنترل از سرم فیزیولوژی استفاده گردید. در روز چهارم بعد عفونت، با بالا رفتن تلفات در گروه آزمایش، تمام جوجه های هر دو گروه کالبدگشایی، طحال و بورس آنها برداشت و برای مطالعه میکروسکوپ نوری و الکترونی آماده شدند. در مطالعه میکروسکوپ نوری با شمارش تعداد سلولهای آپوپتوتیک در هر دو گروه مشخص گردید که اختلاف آماری بین این دو گروه وجود دارد ($P=0.000$) و در بررسی میکروسکوپ الکترونی در گروه آزمایش سلولهای لمفوسیتی آپوپتوتیک با فراگمانتاسیون و متراکم شدن کروماتین و تجمع در زیر غشاء هسته و در بعضی موارد تجمع هلالی آن در زیر غشاء مشخص بوده در حالیکه در گروه کنترل هیچ نشانه ای از آپوپتوز وجود نداشت. بطور کلی پدیده آپوپتوز بواسطه اتصال ویروس به گیرنده های IgM^+ سطح لمفوسیتهای B و وادار کردن سلولها به ترشح بعضی از سیتوکینها ایجاد میگردد. بطور کلی این پدیده به پروتئینهای VP2 و 17KD(NS) برمی گردد. با توجه به معنی دار بودن تعداد سلولهای آپوپتوتیک در جوجه های گروه آزمایش و مشاهده تغییرات شدید لمفوسیتهای B در اثر آپوپتوز در این مطالعه و نیز مطالعات قبلی که در این زمینه صورت گرفته، می توان نتیجه گرفت که ویروس گامبورو اثر تخریبی و تضعیف سیستم ایمنی خود را نه تنها با نکروز بلکه با القاء آپوپتوز نیز انجام می دهد.

واژه های کلیدی: گامبورو، آپوپتوز، بورس فابریسیوس، طحال

A study of apoptosis in spleen and bursa fabricius of infected chickens to infectious bursal disease virus by electronic microscope

Bozorgmehri Fard, M.H.¹, Zakeri, A.²

1-Department of Clinical Sciences, Faculty of Specialised Veterinary Sciences, Islamic Azad University, Science & Research Branch, Tehran, Iran.

2-Postgraduate Student of Poultry Diseases, Faculty of Specialised Veterinary Sciences, Islamic Azad University, Science & Research Branch, Tehran, Iran.

Gumboro disease is one of the important disease of poultry industry in all over the world and causes severe economical loss due to death, poor growth and immunosuppression, specially in 3-6 weeks chickens. Histopathologic lesions occurs in spleen, bursa and other lymphoid tissues.

Destruction of infected lymphocytes with virus and peripheral cells and depletion of lymphocytes in bursa and spleen are caused by necrosis and apoptosis. Studying of apoptosis in lymphocytes of bursa and spleen was purpose of this study. 50 SPF 28 days old chickens were divided in two groups (control and experimental) with 25 chickens in each group. The experimental group was infected orally by 10^6 EID₅₀ in 1 ml of IR499 virus (vvIBDV) and in control group physiological saline solution was used. Days after infection, all birds were culled and their bursa of fabricius and four spleen were taken out and prepared for EM assay and light microscopic studies. In light microscopic study, there was statistical difference in number of apoptotic cells ($P=0.000$) between control and experimental groups. By EM observations, apoptotic cells were distinguished by submargination of chromatin of nuclear membrane with chromatin condensation in experimental group but there was not any apoptotic cells in control group. Apoptosis is characterize by attachment of virus to IgM^+ receptors of LB surface and enforce the cells to secretion of some cytokines. VP2 and 17KD are major viral proteins induced apoptosis in bursa and spleen in infected chickens. In this study as well as previous studies, it is demonstrated that IBVDV can affect the cells chickens with both necrosis and apoptosis, event.

Key words: Gumboro, Apoptosis, Bursa Fabricius, Spleen

۱- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲- رزیدنت بیماریهای طیور دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

مقدمه

بیماری بورس عفونی یا گامبورو یک بیماری ویروسی حاد با واگیری بالا بویژه در جوجه های جوان ۳-۶ هفته می باشد. در این بیماری بافت لنفوئیدی بویژه بورس فابریسیوس به عنوان بافت هدف محسوب می شود ولی در دیگر اندام های لنفاوی مثل طحال، تیموس، غدد هاردیرین، لوزه های سکومی و در اندام های غیر لنفاوی مثل عضلات سینه و ران، غدد مخاطی مابین پیش معده و سنگدان، کلیه و مغز استخوان ضایعات ماکروسکوپی و میکروسکوپی ایجاد می کند (۱ و ۲ و ۳ و ۱۶ و ۱۸). عامل این بیماری ویروس RNA دو رشته ای از خانواده Birnaviridae و از جنس Avibirnavirus می باشد.

ژنوم ویروس دو قطعه ای است به نام قطعه A و B که قطعه B کوچکتر می باشد پروتئین vp₁ را کد می کند که به عنوان Viral RNA Polymerase است و پروتئین های کد شونده توسط قطعه A عبارتند از: vp₂ که آنتی بادی های خنثی کننده مربوط به این پروتئین می باشد و به عنوان serotype specificity مطرح است و تغییرات اپی توبی داشته که با تست VN می توان با توجه به این پروتئین سروتیپ ۱ و ۲ را از هم تمیز داد. vp₃ که تغییرات اپی توبی ندارد و به عنوان group specific antigen مطرح می باشد. vp₄ به عنوان viral protease عمل می کند. vp₅ که گفته می شود نقش تنظیمی در آزاد شدن ویروس و انتشار آن دارد. پروتئین دیگری هم به تازگی شناخته شده است به نام vp_x که اطلاعات زیادی از این پروتئین در دسترس نیست. این ویروس دارای دو سروتیپ ۱ و ۲ بوده که سروتیپ ۲ به عنوان سروتیپ غیر بیمارزا می تواند ماکیان و بوقلمون و ... را آلوده کند و حتی آنتی بادی های قابل ردیابی را ایجاد نماید ولی هیچ علائم کلینیکی یا کالبدگشایی و حتی هیستوپاتولوژیک ندارد. سروتیپ ۱ که

ماکیان را آلوده میکند از نظر ویروانس از very virulent strains تا apathogenic strains متغیر می باشد (۲ و ۳ و ۱۶).

مرگ سلولی به طور کلی به دو دسته Necrosis و Apoptosis تقسیم می شود گر چه دو نوع دیگر به نام های Autoshizis و Paraposis نیز وجود دارد. نکروز متداولترین مرگ سلولی را به دنبال استرسها و آسیب هایی نظیر ایسکمی، آنوکسی، هیپوکسی، رادیکالهای آزاد، آزارهای شیمیایی، مکانیکی، عوامل عفونی، واکنشهای ایمنولوژیک، اختلالات ژنتیکی و تغذیه ای را تشکیل می دهد. نکروز ابتدا با تورم شدید، پارگی سلول، دناتوره شدن پروتئین های سیتوپلاسم و تجزیه اجزای سلولی همراه است. بطور کلی چهار سیستم سلولی که بیشترین حساسیت را در برابر آزارها متحمل می شوند عبارتند از سیستم برقراری قوام و یکپارچگی غشاء سلول، سیستم تنفس هوازی سلول، سیستم سنتز پروتئین و سیستم ژنتیکی سلول. وقتی هر نوع آزاری به سلول وارد می شود سلول متورم شده و آسیب می بیند، سلول تا حدی این تغییرات و آسیب ها را می تواند تحمل کند ولی وقتی این تغییرات از آستانه تحمل و قدرت قابل برگشت سلول فراتر می رود سلول وارد فاز نکروز می شود و هسته، سیتوپلاسم و غشاء سلول لیز می شود (۳ و ۹ و ۱۲ و ۱۵ و ۱۷).

آپوپتوزیس یا مرگ برنامه ریزی شده سلول (Programmed Cell Death) عبارتست از مرگ سازمان یافته سلولی که طبق برنامه ریزی دقیق ژنتیکی و هدفدار رخ می دهد.

در بدن سالم آپوپتوز به کرات رخ می دهد. مرگ سلولی میلیونها سلول معیوب تولیدی در بدن، متامورفوز و ... نمونه ای از آپوپتوز هستند. از بین بردن سلولهای آلوده به ویروس از طریق تحریک و به راه اندازی آپوپتوز از طریق لنفوسیت های T سیتوتوکسیک نیز نمونه ای از این مرگ

جوجه های تلف شده و کلیه جوجه های گروه آزمایش و تمام جوجه های گروه کنترل کالبدگشایی و طحال و بورس آنها برداشت گردید و به منظور تهیه نمونه ها برای مطالعه میکروسکوپی نوری با رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین به آزمایشگاه پاتولوژی انتقال داده شدند. بلافاصله بعد از کالبدگشایی نمونه ها در فرمالین بافر ۱۰٪ قرار گرفت و نمونه ها به روش روتین قالبهای پارافینی و رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین تهیه گردید سپس با درشت نمایی ۱۰۰ در هر لام ۴ میدان انتخاب و سلولهای آپوپتوتیک در هر گروه کنترل و آزمایش شمرده و میانگین آنها تعیین گردید. سپس داده ها بر اساس T test و Mann-Whitney Test مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. قسمتی از نمونه های مورد نظر برای بررسی های میکروسکوپی الکترونی با ابعاد ۱ میلی متر و در مایع ثبوت که متشکل از ۸۶ میلی لیتر سرم فیزیولوژی، ۱۰ میلی لیتر فرمالدئید ۳٪، ۱/۱۶ گرم $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۲۷ گرم NaOH ، ۴ میلی لیتر گلوتر آلدئید ۲۵٪ قرار گرفتند جهت فیکس کردن ثانویه برای ایجاد برش های مناسب نمونه ها در محلول تتراکسید اسمیم برده شدند و سپس نمونه ها در الکل اتیلیک ۳۰، ۳۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۸۵ و ۹۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه و در الکل اتیلیک ۱۰۰، ۱۰۰ و ۱۰۰ درجه به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. بعد از این مراحل نمونه ها در داخل پرپیپلین اکسید به تعداد سه بار و هر بار ۱۰ دقیقه نگهداری شدند و بعد از خروج نمونه ها از این محلول آنها را وارد محلول اپون Epon کرده و بالاخره قالب گیری، برش و رنگ آمیزی گردیده (رنگ آمیزی اورانیل استات سترات سرب) و در بزرگ نمایی های لازم به بررسی میکروسکوپی الکترونی پرداخته شد.

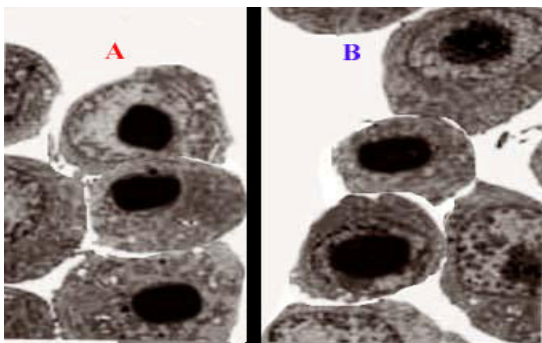
نتایج

سلولی می باشد. در جوجه های آلوده با ویروس گامبورو، میزان سلولهای آپوپتوتیک در بورس فابریسیوس رابطه مستقیم با زمان و میزان RNA ویروس دارد. یعنی افزایش میزان تکثیر RNA ویروس به عنوان القاءگر آپوپتوز عمل می کند. در مراحل نخست عفونت با ویروس گامبورو میزان RNA ویروسی کم می باشد در حالیکه میزان و درصد وقوع مرگ سلولی در طحال و بورس بالا می باشد. به نظر می رسد که افزایش میزان تولید سیتوتوکسینهایی از قبیل اینترلوکین ۳، فاکتور شبه TNF و انترفرون نقش مهمی در رخداد آپوپتوز در این عفونت باشد. با توجه به تحقیقات انجام شده در خلال ۲ تا ۶ روز بعد از ابتلاء به ویروس گامبورو لیز و کاهش تعداد کثیری از سلولهای میلوپیت هتروفیل بویژه در ۲ تا ۳ روز بعد از عفونت دیده می شود. با توجه به رنگ آمیزی تانل مشخص می شود که کاهش رده سلولی مذکور توسط آپوپتوز و نکروز رخ می دهد. مطالعات انجام شده حاکی از این است که جوجه ها در سطح سلولهای لمفوسیت B گیرنده هایی به نام Notch-1 دارند. تحریک این گیرنده ها باعث کاهش رشد سلولی و آپوپتوز میشود. تولیدات بیوشیمیایی حاصل از تحریک این گیرنده ها، Hairy-1 بوده که باعث القاء آپوپتوز می شود اما مثل Notch-1 توقفی در مرحله G1 رشد سلولی ایجاد نمی کند (۳، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۴، ۱۵، ۱۷).

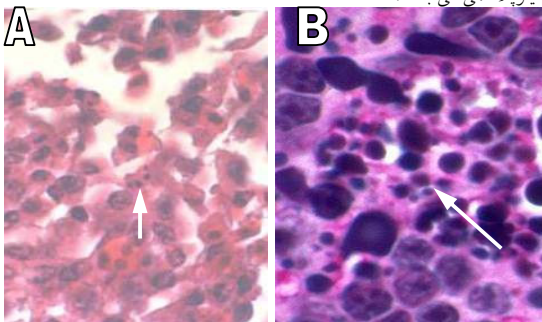
مواد و روش کار

در این تحقیق ۵۰ جوجه ۲۸ روزه SPF نژاد لگهورن انتخاب و به دو گروه ۲۵ تایی آزمایش و کنترل در دو اتاق جداگانه تقسیم بندی شدند. سپس گروه آزمایش با ویروس سویه ۴۹۹ ایران (IR499) که یک سویه بسیار پر حدت ویروس بیماری گامبورو است از راه دهانی و بطور تجربی به میزان ۱ میلی لیتر با تیتراژ 10^6 EID_{50} آلوده شدند در حالیکه برای گروه کنترل نیز از سرم فیزیولوژی استفاده گردید. در روز چهارم بعد از آلودگی و با شروع تلفات

۱۶	۱۴	۱	۱۴
۱۹	۱۵	۰	۱۵
۲۵	۱۶	۰	۱۶
۳۱	۱۷	۰	۱۷
۱۶	۱۸	۰	۱۸
۱۵	۱۹	۰	۱۹
۲۴	۲۰	۰	۲۰
۳۱	۲۱	۰	۲۱
۱۷	۲۲	۱	۲۲
۲۸	۲۳	۱	۲۳
۱۶	۲۴	۰	۲۴
۲۱	۲۵	۰	۲۵



نگاره ۱: A نشان دهنده سلولهای لمفوسیتی بورس فابریسیوس و B نشان دهنده سلولهای لمفوسیتی طحال می باشد. همانطوریکه مشخص است سلولهای لمفوسیتی در هر دو بافت کاملاً طبیعی بوده، هسته سلولها در موقعیت مرکزی و بدون تکه تکه شدن یا حاشیه نشینی کروماتین دیده می شوند. سیتوپلاسم سلولها نیز بدون تغییر و فارغ از تکه تکه شدن یا ایجاد حبابهای متعدد سیتوپلاسمی می باشد.



نگاره ۲: A نشان دهنده بافت طحال و B نشان دهنده بافت بورس فابریسیوس جوجه های آلوده می باشند. فتومیکروگراف مقطعی طحال و بورس فابریسیوس جوجه های آلوده به ویروس گایرو(گروه آزمایش). تعدادی از سلولهای آپوتوتیک با فراگمانتاسیون و تراکم مشخص کروماتین قابل مشاهده است (فلش ها). رنگ آمیزی هماتوکسیلین - اتوزین با بزرگنمایی ۱۰۰

نتایج حاصل از اثر ویروس گامبورو از ۳ جنبه یافته های کالبدگشایی، بررسی های میکروسکوپ الکترونی و میکروسکوپ نوری در جدول ۱ آمده است.

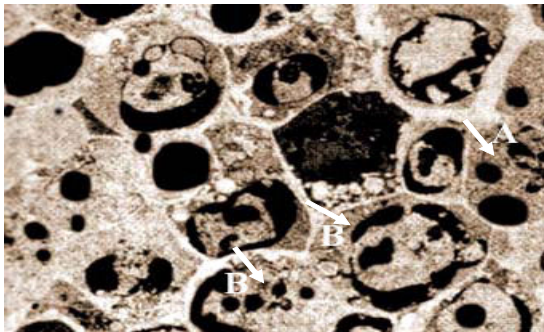
جدول ۱. یافته های کالبدگشایی و تغییرات ناشی از بیماری گامبورو در گروه آزمایش

فراوانی ضایعات کالبدگشایی	نوع ضایعات کالبدگشایی
۱۵	خونریزی در عضلات ران
۰	خونریزی در عضله سینه
۶	خونریزی در محل اتصال پیش معده و سنگدان
۰	تغییرات کلیوی
۱۸	تورم بورس بدون خونریزی (ژلاتینی با اکسودای زرد)
۷	تورم بورس با رگه های خونریزی
۰	بورس تحلیل رفته
۴	تغییرات طحال (تورم و خونریزی)
۲	خونریزی در لوزه های سکومی
۷	مرگ و میر

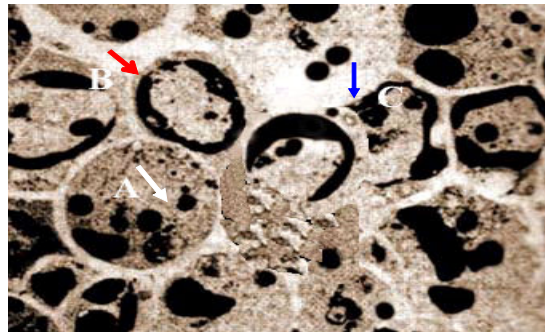
از نظر میکروسکوپ نوری بعد از شمارش تعداد سلولهای آپوتوتیک با بزرگنمایی ۱۰۰ (نگاره ۱) در ۴ میدان و اخذ میانگین آنها نتایج زیر بدست آمد (جدول ۲).

جدول ۲. تعداد سلولهای آپوتوتیک شمرده شده در گروه کنترل و آزمایش

تعداد سلولهای آپوتوتیک	گروه آزمایش	تعداد سلولهای آپوتوتیک	گروه کنترل
۴۲	۱	۰	۱
۲۰	۲	۰	۲
۱۵	۳	۰	۳
۱۰	۴	۰	۴
۳۰	۵	۲	۵
۳۲	۶	۱	۶
۲۷	۷	۱	۷
۳۴	۸	۱	۸
۱۷	۹	۰	۹
۱۹	۱۰	۰	۱۰
۲۳	۱۱	۲	۱۱
۲۹	۱۲	۱	۱۲
۳۱	۱۳	۱	۱۳



نگاره ۴: وجود سلولهای آپوتوتیک در طحال با تراکم کروماتین و تکه تکه شدن و تجمع آنها در زیر غشاء هسته و در بعضی موارد تجمع هلالی شکل کروماتین قابل مشاهده است (فلش ها A و B). رنگ آمیزی اورانیل استات سترات سرب با بزرگنمایی ۸۰۰۰



نگاره ۳: وجود سلولهای آپوتوتیک در بورس با تراکم کروماتین و تکه تکه شدن آنها و تجمع آنها در زیر غشاء هسته و در بعضی موارد تجمع هلالی شکل کروماتین قابل مشاهده است (فلش ها A، B و C). رنگ آمیزی اورانیل استات سترات سرب با بزرگنمایی ۸۰۰۰

سلولهای آپوتوتیک مربوط به سلولهای بورس با به هم ریختن سیتوپلاسم سلول، تکه تکه شدن هسته و متراکم شدن کروماتین و تجمع هلالی دیده می شوند بطوریکه فلش A سلول آپوتوتیک را با منظره تکه تکه شدن کروماتین و فشرده شدن آن و تاحدی مرز نشینی آن را در زیر غشاء هسته نشان می دهد. فلش B سلول آپوتوتیک را با حالت کامل مرز نشینی کروماتین هسته بصورت هلالی در زیر غشاء هسته نشان می دهد و نهایتاً فلش C سلول آپوتوتیکی را نشان می دهد که تکه تکه شدن و فشرده شدن کروماتین و تجمع هلالی آن را در زیر غشاء هسته با هم دارا می باشد (نگاره ۳).

در مورد تغییرات طحال، فلش A سلول آپوتوتیک را در وضعیت تکه تکه شدن و فراگماتاسیون کروماتین هسته نشان می دهد. فلش های B سلولهای آپوتوتیک را با تجمع هلالی کروماتین در زیر غشاء هسته همراه با تکه تکه شدن و فراگماتاسیون کروماتین نشان می دهد (نگاره ۴).

بطور کلی با بررسی های میکروسکوپ الکترونی که بر روی بورس و طحال گروه کنترل و آزمایش انجام گرفت مشخص گردید که در گروه کنترل که سرم فیزیولوژی دریافت کرده بودند تعداد بسیار کمی سلول آپوتوتیک که بطور معمول و فیزیولوژیک معمولاً مشاهده می گردد، دیده شد در حالیکه در جوجه های گروه آزمایش که ویروس

بعد از تجزیه و تحلیل آماری با T test و Mann-Whitney میانگین سلولهای آپوتوتیک مشاهده شده در گروه کنترل ۰/۶۵ ± ۰/۸۴ و در گروه آزمایش ۷/۹۷ ± ۹۲/۲۳ تعیین گردید که از نظر هردو تست این اختلاف بسیار معنی دار (P=۰/۰۰۰) می باشد.

از نظر بررسی های میکروسکوپ نوری و الکترونی در طحال و بورس فابریسیوس گروه کنترل تعداد بسیار کمی سلول آپوتوتیک که در حالت طبیعی و فیزیولوژیک وجود دارند، مشاهده گردید بطوریکه میکروگراف الکترونی مربوط به شکل B نشان دهنده سلولهای لمفوسیتی طحال و شکل A نشان دهنده سلولهای لمفوسیتی بورس می باشد. همانطوریکه مشخص است سلولهای لمفوسیتی هر دو بافت کاملاً طبیعی می باشند. هسته سلولها در موقعیت مرکزی و بدون تکه تکه شدن یا حاشیه نشینی دیده میشوند. سیتوپلاسم سلولها نیز در هر دو بافت بدون تغییر و فارغ از تکه تکه شدن یا ایجاد حبابهای متعدد سیتوپلاسمی می باشند (نگاره ۱).

فتو میکروگراف مقطعی بورس (نگاره B ۲) و طحال (نگاره A ۲) آلوده به ویروس گامبورو در میکروسکوپ نوری نشان دهنده سلولهای آپوتوتیک با فراگماتاسیون و تراکم مشخص کروماتین می باشد (نگاره ۲).

عفونی دریافت کرده بودند علاوه بر نکروز، سلولهای لمفوسیتی آپوپتوتیک بصورت کروماتین متراکم و فراگمانتاسیون کروماتین و در بعضی موارد هلال کروماتینی در زیر غشاء هسته سلول آپوپتوتیک دیده می شد که نشان از بروز پدیده آپوپتوز در سلولهای لمفوسیتی و سلولهای پیرامونی بورس و طحال داشت (نگاره ۳ و ۴). خود ویروس گامبور در میدان مورد مطالعه مشاهده نگردید ولی از نظر شدت آپوپتوز بورس بیشتر از طحال درگیر بود. در خود بورس ناحیه داخل فولیکول بویژه ناحیه بین قشر و مرکز فولیکولها بالاخص ناحیه *germinal center* بیشترین آپوپتوز را نشان می داد.

بحث

با توجه به مطالعات محققین آنچه که مشخص است این است که غیر از بروز نکروز در سلولهای لمفوسیتی بویژه لمفوسیتهای موجود در بورس، طحال و دیگر اندام های لمفاوی، آپوپتوز نیز یکی از فرآیندهای مهمی است که هنگام آلودگی با ویروس گامبور در این ارگان ها رخ می دهد بطوریکه ویروس بعد از آلوده کردن ماکروفاژها و سلولهای لنفوئیدی دوازده، ژرژنوم و سکوم به کبد رفته و سلولهای کوپفر کبدی را آلوده کرده و ویرمی داده و به بورس می رود و تکثیر اصلی خود را شروع می کند و تغییرات هیستوپاتولوژیک زیر را ایجاد می کند:

الف) از تبدیل *stem cell* به لمفوسیت *B* بالغ جلوگیری می کند.

ب) *cytolysis* سلولهای لمفوسیت *B* بعلت نکروز

ج) *apoptosis* سلولهای لمفاوی

در نتیجه کاهش لمفوسیت های *B* و در نتیجه تضعیف سیستم ایمنی هومورال و متعاقب آن حساس شدن گله به انواع عفونتها من الجمله عفونتهای باکتریایی و شکست در برنامه واکسیناسیون به علت کاهش آنتی بادی های تولیدی

ایجاد خواهد شد. همچنین در این تغییرات ناحیه مرکزی بورس دچار *cystic cavitation* شده که این به علت نکروز سلولهای لمفاوی فولیکولهای لنفوئیدی بورس می شود و تعداد *Plical fold* نیز کاهش می یابد. سلولهای لمفوسیتی *B* و *T* در بیماری گامبور از مستعدترین سلولها برای مرگ سلولی هستند بطوریکه آپوپتوز در این سلولها طی سه فرآیند انجام می گیرد. در مرحله نخست سیگنالهای آغازگر گر آپوپتوز در اثر گیرندهای *Fas(CD95)* شروع و در مرحله دوم سلول دچار تغییرات مورفولوژیک شده و تراکم کروماتین، واکوئل شدن سیتوپلاسم و آندونکلئاز داخلی فعال می شوند و در مرحله سوم اجسام آپوپتوتیک غشاء دار توسط ماکروفاژها هضم می شوند.

سلولهای لمفوسیت *B* نابالغ که دارای گیرنده های سطحی *Ig M⁺* هستند به عنوان هدف اصلی ویروس گامبور می باشند. طبق مطالعات محققین، ویروس گامبور بعد از اتصال به *IgM⁺* سطح *LB* با وجود پروتئینهای *VP₂* و *17 KD(NS)* با مهار عملکرد *Bcl 2* باعث ایجاد آپوپتوز در سلولهای لمفوسیتی میگردد بطوریکه سلولهای آلوده را وادار به تولید برخی از سیتوکینها مثل *TNF* آلفا، فاکتور شبیه اینترلوکین ۶ و ۸، *NOIF* و با آزاد سازی *NO* توسط ماکروفاژها آپوپتوز را ابتدا در سلولهای پیرامونی و با پیشرفت عفونت در خود سلولهای آلوده القاء می کند که این فرآیند با فراگمانتاسیون و متراکم شدن کروماتین و تجمع آن در زیر سطح غشاء هسته در نگاره های الکترون میکروگراف قابل مشاهده است. با توجه به مطالعات محققین مبنی بر تاثیر ویروس گامبور روی بورس و طحال و پیشبرد بیماری با استفاده از دو پدیده نکروز و القاء آپوپتوز و تولید سیتوکینها، نتایج معنی دار آماری بدست آمده از شمارش سلولهای آپوپتوتیک در طحال و بورس در این مطالعه مبین آن بود که اثرات تخریبی و تضعیف سیستم ایمنی نه تنها در اثر نکروز بوده بلکه آپوپتوز و تولید برخی

7-In-Jean Kim, Jagdev, M., Sharma.,(2000).IBDV-induced bursal T lymphocyte inhibit mitogenic response of normal splenocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 74: 47-57.

8-Inoue, M., Fujita, A.,(1999). Lysis of Myelocytes in chickens Infected with infectious Bursal Disease virus. *Vet Pathol*. 36: 146-151.

9-Jungmann, A., and et al.,(2001). Apoptosis is induced by infectious bursal disease virus replication in productively infected cells as well as in antigen-negative cells in their vicinity. *Journal of General Virology*, 82, 1107-1115.

10-Jungmann, A., Herman, N., Muller, H., (2001). Apoptosis is induced by infectious bursal disease virus replication in productively infected cells as well as in antigen-negative cells in their vicinity. *Journal of General Virology*. 82: 1107-1115.

11- Katarzyna , D., Gaele ,R., Krzysztof ,S., Didier,T., Zenon, M., Eterradosi, N., (2002). Antigenic characterization of Polish IBD virus strains . Department of poultry diseases, National veterinary research. Institute, 24-100 Pulawy, Poland . *Bull.Vet.Inst.Pulawy* 46, 45-52.

12-Kun, Y., Vikram, N., (2001).Induction of Apoptosis in Vitro by the 17-Kda Nonstructural Protein of Infectious bursal disease Virus : Possible Role in ?Viral Pathogenesis. *Virology*. 285: 50-58.

13- Saif,Y.M., Lukert, Phil.D.(2003). infectious bursal disease. *Diseases of Poultry*, Saif,Y.M., Barnes, H.J.,Glisson, J.R.,Fadly, A.M., McDougald, L.R.,Swayne,D.E. 11th edition. Ablackwell Publishing Company, Iowa State Press. pp: 161-179.

14- Sharma,J.M., Rauteuschlein,S., Yeuh Yeh, H.,(2002). The role of Tcells in protection by an inactivated infectious bursal disease virus vaccine. *Elsevier, Veterinary immunology and inmmunopathology* , 89: 159-167.

سیتوکینها نیز نقش بسیار مهمی در پیشبرد بیماری دارند (۲و۳و۴و۵و۶و۷و۸و۱۱و۱۲و۱۳و۱۴و۱۵و۱۶و۱۷).

تشکر و سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری مرکز تحقیقات پشمینه دانشگاه تبریز، موسسه تحقیقات و واکسن سازی راز ، آقای دکتر سلیمانی، آقای دکتر مهاجری، آقای دانش پژوهان و دوست و همکار محترم آقای دکتر میرزا احمدی صمیمانه تشکر و سپاسگزاری می گردد.

فهرست منابع

۱.بزرگمهری فرد، م.ح. فتوتی، ع. نیک نفس ، ف. مشفق، ح ر. و شجاعدوست ، ب.(۱۳۷۷): بیماریهای طیور ، انتشارات واحد آموزش و پژوهش معاونت کشاورزی سازمان اقتصادی کوثر، صفحه ۳۲۲ - ۳۱۵.

2- Baxendale, W. (2002). *Brinaviridae, Poultry Diseases*, Jordan, F., Pattison, M., Alexander, D., Faragder,T. 5th edition , W.B.SAUNDERS. pp: 319-323.

3 -Fernandez, A.A., Martinez, S., Podriguez, J.F., (1997). The Major antigenic Protein of Infectious Bursal Disease Virus, VP₂, Is an Apoptotic inducer. *Journal of Virology*, Oct., pp: 8014-8018.

4- Genova,K.,(2000). Influence of the Infectious Bursal Disease virus strains on the avian immune system. *Veterinary Institute of Immunology, LTD*, 1 Adam Mitzkewich str. , 1360 sofia, Bulgaria.

5-Hiari, K., Calnek, B.W., (1979). In vitro replication of infectious bursal disease virus in established lymphoid cell lines and chicken B lymphocytes. *Infect Immun.*, 25: 946-70.

6-Hiari, K., Funakoshi, T., (1987). Sequential changes in number of surface immunoglobulin bearing B lymphocyte in infectious bursal disease virus infected chickens. *Avian Dis.* , 25: 484-96.

- 15-Tanimura, N., Sharma, J.M., (1998). In-situ apoptosis in chicken infected with infectious bursal disease virus. *Journal of comparative pathology*. 118: 15-27.
- 16-Tanimura, N., Sharma, I.M., (1977). Appearance of T cells in the bursa of fabricius and cecal tonsils during the acute phase of infectious bursal disease virus infection in chickens. *Avian Dis.*, 41: 638-45.
- 17- Vasconcelos, A.C., Lam,K.M. (1994). Apoptosis in chicken embryo induced by the infectious bursal disease virus . *J Comp Pathol* 112: 327-338.
- 18- Vegad, J.L.(2004). Infectious bursal disease . *Poultry diseases A guide for farmers & poultry professionals*, Vegad, J.L. International Book Distribution Co. pp: 21-29.