مطالعه تجربی آسیب شناسی تاثیر ویروس آنفلوانزای سروتیپ H_9N_2 (A/chicken/ Iran/ 772/2000) بر بافت قلب جوجه های SPF.

یوسف دوستار[1*]، داریوش مهاجری[1]

۱- گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز - ایران.

*نویسنده مسئول: vetdoustar@yahoo.com

چکیده

ویروس آنفلوانزا عامل مرگسلولی درسلول های بافت های حیوانات وانسان می باشد. در این تحقیق به ارزیابی تجربی آسیب شناسی بافت قلب جوجه های عفونی شده با ویروس آنفلوانزای طیور سروتیپ H_9N_2 (A/chicken/ Iran/ 772/2000) پرداخته شده است. در بررسی حاضر تعداد ۲۰ قطعه جوجه SPF با سن ۳ هفته در دو گروه برابر توزیع گردید. گروه اول با ۰/۲ میلی لیتر با رقت ۱:۱۰ و تیتر $10^{7/5}$ EID50 ویروس آنفلوانزا وگروه دوم نیز با حجمی برابر توسط محلول سالین نرمال به روش داخل بینی تلقیح گردید. پس از ۷۲ ساعت، از بافت قلب جوجه ها نمونه برداری انجام شد و از نمونه های پایدارشده در محلول ۱۰ درصد فرمالین بافر، مقاطع میکروسکوپی با ضخامت ۵ میکرون و رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلین-ائوزین تهیه گردید. مطالعات ریزبینی حاکی از بروز آسیب بافتی شامل نکروز، میوکاردیت و خونریزی در قلب جوجه های گروه تیمار بود. شدت بروز این تغییرات در جوجه های آلوده در مقایسه با گروه شاهد معنی دار بود. نتایج بررسی حاضر نشان می دهد که ویروس آنفلوانزای طیور سروتیپ H_9N_2 توانایی القاء مرگسلولی و میوکاردیت را در بافت قلب جوجه دارد. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، ۱۳۸۷، دوره ۴، شماره ۴، ۱۷۵-۱۷۱.

واژه های کلیدی: ویروس آنفلوانزای طیور، نکروز، آنفلوانزای جوجه ها، قلب.

Experimental Pathologic Study of the Influenza Virus H9N2 (A/chicken/Iran/772/2000) Effects on Heart Tissue in SPF Chickens

Doustar, Y.[1], Mohajeri, D.[1]*

[1] *Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz, Iran*

Abstarct

Influenza virus induces cell death in tissues of animals and human. The main objective of this study is to evaluate the histopathologic changes of the heart in the chickens, which have been infected experimentally with H9N2 serotype of avian influenza virus, (A/chicken/Iran/772/2000). In this study, 20 SPF chickens 3- week old were divided equally into two groups. The first group was infected with 0.2ml of 1:10 dilution and 107.5EID50 titer of the virus intranasaly and the second group was treated with saline normal in the same manner. After 72 hours of experiment, tissue specimens of cardiac tissues were collected and fixed in 10% buffered formalin. The prepared microscopic sections with thickness of 6 microns were stained by H&E. Histological examinations indicated pathological changes including necrosis, hemorrahage and inflammatory reactions in the heart of treatment group. In comparison with control group, the severity of these damages was significant in infected chickens. The results of this study indicated that influenza virus H9N2 (A/chicken/Iran/772/2000) is able to induce cell death and myocarditis in cardiac tissue of chicken. ***Vet.J.of Islamic.Azad.Univ., Garmsar Branch. 4,4:171-175,2008.***

Keywords: Avian Influenza viruse; Necrosis; Chicken Influenza; Heart.

مقدمه

بیماری آنفلوانزا به عنوان یک بیماری ویروسی از سال ۱۹۰۱ میلادی شناخته شده است. درسال ۱۹۵۵ میلادی شکل خاصی از ویروس آنفلوانزا به عنوان عامل ایجاد کننده بیماری شناخته شد که بعدها به علت تلفات زیاد طاعون مرغی نامیده شد. اهمیت ویروسهای آنفلوانزا به عنوان یک پاتوژن با گستردگی جهانی در انسانها، حیوانات خانگی و ماکیان به خوبی شناخته شده است. ویروسهای آنفلوانزای پرندگان جزء اعضای خانواده ارتومیکسوویریده هستند و به جنس A تعلق دارند. از سال ۱۹۹۴ میلادی سویه H_9N_2 ویروس A آنفلوانزا باعث طغیان بیماری در ماکیان با مرگ و میر زیاد در کره و چین شده است. و از سال ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۲ میلادی ویروسهای H_9N_2 به طور گسترده از گوشت و مغز استخوان جوجه های وارد شده از چین در مرکز قرنطینه حیوانات

Proof

یوکوهاما در ژاپن جدا شده است، در مارس ۱۹۹۹ میلادی دو مورد از ویروس آنفلوانزا از دختران یک تا چهار ساله در هنگ کنگ که از بیماری شبیه آنفلوانزا بهبود یافته بودند، پنج مورد جداسازی ویروس H_9N_2 از انسان‌ها در آگوست سال 1998 منتشر شده است(۸).

تشدید بیماری‌زایی سویه H_9N_2 ویروس آنفلوانزا A جدا شده از جوجه در چین توسط عفونت هم زمان با عفونت‌های باکتری‌های نظیر استافیلوکوک طلایی و هموفیلوس پاراگالیناروم به اثبات رسیده است(۱۰). با 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 مسیرهایی مرگ سلولی را در سلول‌های میزبان القاء می‌کنند، یافتن راهکار مناسب در برخورد با این بیماری آسانتر شده است. با علم به این که مرگ سلول‌ها به صورت نکروز در موارد پاتولوژیک نظیر عفونتهای ویروسی تخریب کننده اهمیت دارد، لکن تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که بسیاری از ویروس‌ها از جمله ویروس آنفلوانزا از طریق القاء آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده باعث مرگ سلول‌های میزبان می‌گردند(۳،۵،۱۱). ویروس آنفلوانزا در بافت‌های مختلف موجب تغییرات آسیب بافتی می‌گردد که یکی از آنها بافت قلب می‌باشد و بررسی آسیب شناسی بافتی و نوع مرگ سلولی متعاقب تلقیح ویروس آنفلوانزای سروتیپ H_9N_2 یکی از اهداف این مطالعه می‌باشد. با توجه به اهمیت بیماری آنفلوانزای طیور و گسترش روزافزون بیماری در بین جمعیت دامی و انسانی نیاز است تا هر چه بهتر پاتوژنز بعضی از سویه‌های ویروسی نظیر سویه H_9N_2 از نظر آسیب‌های سلولی مورد ارزیابی قرار گیرند. لذا این مطالعه می‌تواند در راستای پاتوژنز بیماری آنفلوانزای طیور بسیار مفید واقع گردد.

مواد و روش کار

در این مطالعه ویروس آنفلوانزای طیور تحت تیپ H_9N_2 (A/chicken/Iran/772/2000) که برای ۲ بار در تخم مرغ‌های جنین دار کلون شده بوده، به جوجه‌های SPF(Germany, Valo Lohman) در سن ۳ هفتگی به روش قطره بینی تلقیح گردید. ابتدا جوجه‌های SPF به دو گروه ۱۰ تایی تقسیم گردید که یک گروه به عنوان گروه تیمار و گروه دیگر شاهد در نظر گرفته شد. سپس گروه تیمار به روش قطره بینی با ویروس آنفلوانزای تحت تیپ H_9N_2 با دز ۰/۲ میلی لیتر و رقت ۱ به ۱۰ و تیتر $10^{7/5}$ EID50 عفونی گردید. گروه شاهد نیز برابر حجم محلول تلقیحی ویروس، با همان روش و به طور هم زمان سرم نمکی نرمال دریافت نمود. سه روز پس از تلقیح، جوجه‌های مورد نظر (گروه تیمار و گروه شاهد) کالبدگشایی و از بافت قلب آن‌ها نمونه برداری به عمل آمد. نمونه‌های مورد نظر در داخل فرمالین بافری ۱۰ درصد جهت تهیه مقاطع آسیب شناسی بافتی به آزمایشگاه پاتولوژی دانشکده دامپزشکی تبریز ارسال گردیدند. نمونه‌های مورد نظر پس از گذراندن مراحل آب گیری، شفاف سازی، آغشتگی با پارافین و قالب گیری، با ضخامت‌های ۵ میکرونی برش داده شده و با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شدند. بررسی مقاطع آسیب شناسی توسط یک مقیاس نیمه کمّی (scale Semiquantitative) و به صورت دوسوکور جهت ارزیابی آسیب بافتی انجام شد. بدین ترتیب آسیب بر اساس شدت، از صفر تا ۴+ (طبق جدول ۱) درجه بندی شد. تصویر برداری از مقاطع بافتی با استفاده از میکروسکوپ نیکون مدل E200 و دوربین دیجیتال مدل Canon IXUS 960IS انجام و داده‌های هیستولوژیک توسط آزمون ناپارامتری یو من-وایتنی (Whitney U test-Mann) مورد آنالیز آماری قرار گرفت. $P<0/05$ معنی دار تلقی گردید(۱،۲،۴).

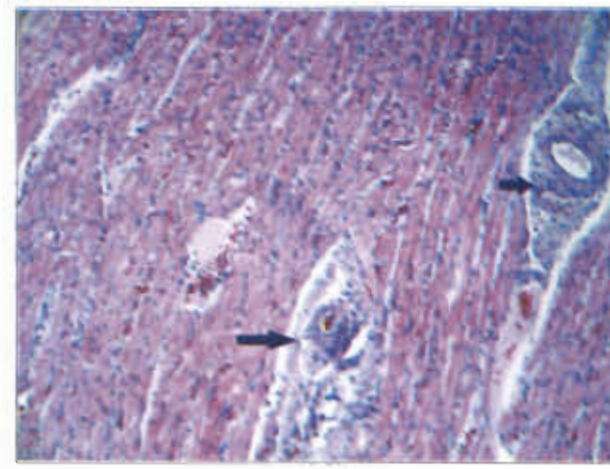
نتایج

در مشاهدات ریزبینی قلب جوجه‌های تیمار شده با ویروس آنفلوانزای سروتیپ H_9N_2 ، تارهای نکروتیک عضلانی به وفور قابل مشاهده بودند. همچنین خونریزی، ادم و ارتشاح سلول‌های آماسی تک هسته‌ای در فضای بینابینی تارهای عضلانی قلب قابل رویت بود (تصاویر ۱ تا ۵).

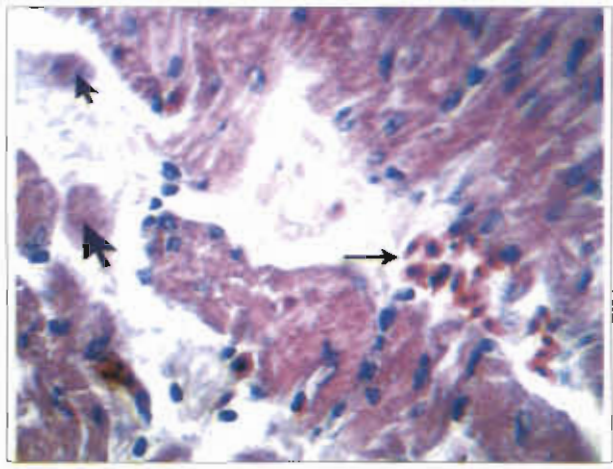
آنالیز آماری داده‌ها: در آنالیز آماری نتایج هیستولوژیک با آزمون ناپارامتری یو من-وایتنی (Mann-Whitney U test) تفاوت شدت آسیب بافتی در بافت قلب گروه تیمار با گروه کنترل معنی دار برآورد گردید (نمودار ۱).

جدول۱: درجه بندی شدت آسیب بر اساس ضایعات مشاهده شده.

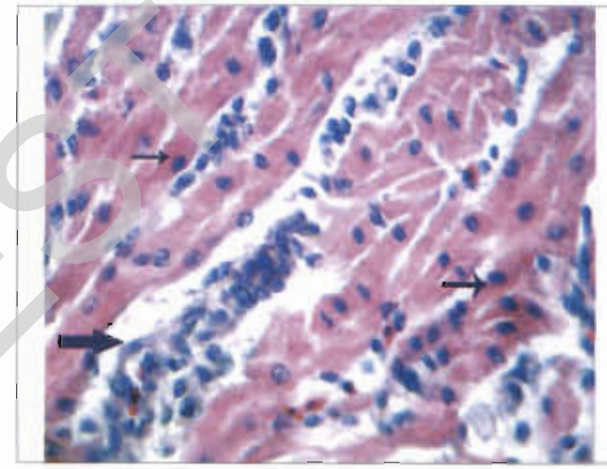
۰	سالم
۱+	ادم، پرخونی
۲+	ادم، پرخونی و خونریزی
۳+	ادم، پرخونی، خونریزی و ارتشاح سلول های تک هسته ای و نکروز خفیف (میوکاردیت ملایم)
۴+	ادم، پرخونی، خونریزی و ارتشاح سلول های تک هسته ای و نکروز شدید (میوکاردیت شدید)



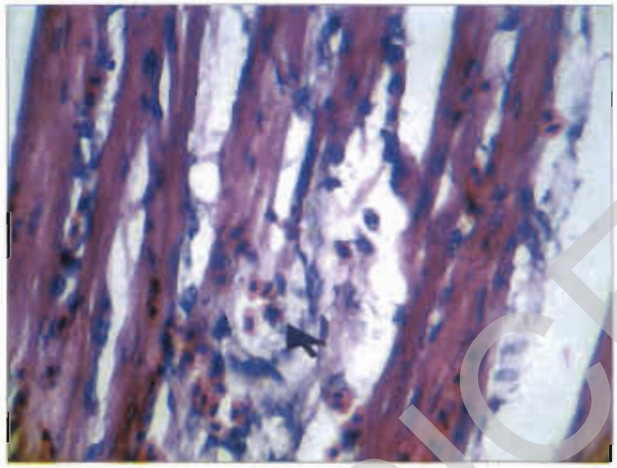
تصویر۱: نمای ریزبینی از قلب حوجه آلوده شده با ویروس آنفلوانزای سروتیپ H_9N_2 به طور تجربی. به اکسودای آماسی در پیرامون عروق (فلش ها) توجه فرمائید (هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگنمایی ۱۰۰×)



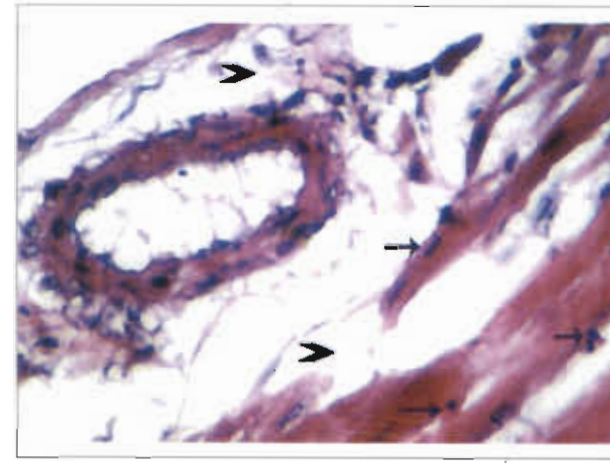
تصویر۲: نمای ریزبینی با درشتنمایی بیشتر از سلول های نکروتیک (فلش های ضخیم) و خونریزی (فلش نازک) در بافت قلب حوجه آلوده شده با ویروس آنفلوانزای سروتیپ H_9N_2 به طور تجربی (هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگنمایی ۴۰۰×).



تصویر۳: نمای ریزبینی با درشتنمایی بیشتر از تارهای عضلانی نکروتیک قلب (فلش های نازک) وتجمع سلول های تک هسته ای (فلش ضخیم) مابین تارها در جوجه آلوده شده با ویروس آنفلوانزای سروتیپ H_9N_2 به طور تجربی (هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگنمایی ۴۰۰×).

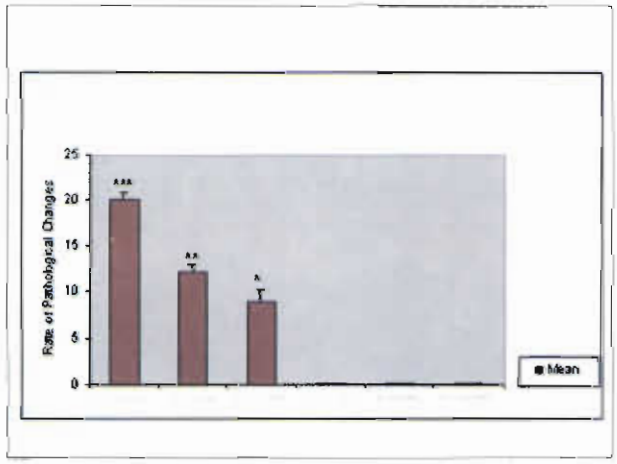


تصویر۴: نمای ریزبینی از بافت قلب حوجه آلوده شده با ویروس آنفلوانزای سروتیپ H_9N_2 به طور تجربی. تخریب کانونی به همراه ارتشاح سلول های آماسی و خونریزی (فلش) مابین فیبریل های عضلانی مشخص می باشد (هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگنمایی ۴۰۰×).



تصویر۵: نمای ریزبینی از بافت قلب در حوجه آلوده شده با ویروس آنفلوانزای سروتیپ H_9N_2 به طور تجربی. نکروز و گسیختگی تار های عضلانی قلب (فلش ها)، ادم و ارتشاح ملایم سلول های آماسی (نوک فلش‌ها) قابل مشاهده است (هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگنمایی ۴۰۰×).

نمودار۱: مقایسه شدت تغییرات نکرور، میوکاردیت و خونریزی در بافت قلب گروه های شاهد و تیمار.



داده ها بصورت mean±SEM در مقایسه با گروه کنترل نمایش داده شده‌اند (***P<۰/۰۰۱, **P<۰/۰۱,*P<۰/۰۵).

RICST

بحث و نتیجه‌گیری

Mehranpour و همکاران مطالعه‌ای بر روی تاثیر ویروس H_5N_1 در بوقلمون‌ها انجام داده و به این نتیجه رسیدند که بیشترین ضایعات در قلب، لوزالمعده و لوزه‌های سکوم رخداد داشته است(۱۰)، همچنین Kwon و همکاران در سال ۲۰۰۵ به تاثیر این سروتیپ ویروس آنفلوانزا در بافت‌های قلب اشاره و نتایج معنی‌داری را در مطالعات خودشان بدست آوردند، در مطالعه حاضر نیز اختلاف معنی‌داری از نظر آسیب سلولی بافت قلب وجود داشته است که در نتایج هیستو پاتولوژی مشاهده گردیده است(۶)، اما در سایر پرندگان نظیر Zebra Finches و Finches House نیز به گفته Perkins و همکاران در سال ۲۰۰۳ سروتیپ A/chicken/Hong Kong/220/97/H_5N_1 در تلقیح به شیوه داخل بینی ایجاد واگیری و تلفات بعد از ۱۰ روز بارز بوده و ضایعات بافتی به شکل نکروز کانونی، میوکاردیت و خونریزی مشاهده می‌گردد، که مطالعات ایشان از نظر نکروز کانونی بافتی با نتایج بررسی حاضر مشابه می‌باشد(۱۲). نکروز و تغییرات دژنراتیو کاردیومیوسیت‌ها از دیگر یافته‌ها در مطالعه حاضر می‌باشد که شاید با مکانیسم‌های متعددی همراه بوده است. Kunio و همکاران در مطالعه خود به نقش القاگر هماگلوتینین ویروس آنفلوانزا اشاره نموده و الحاق این عامل ویروسی به سیالوگلیکوپروتئین سطح سلولی و بیان سیتوکاین‌های آماسی نظیر IL-1β، IL-6، TNF-.γ[1]، INF-.β، INF-.α و GM-CSF[2] را از عوامل موثر در القاء مرگ سلولی دانسته اند(۱۶)، اما امروزه مهمترین مکانیسم پذیرفته شده نقش عامل نوآمینیداز با واسطه TGF-.β[3] می‌باشد. رادیکال‌های آزاد حاصله از استرس‌های اکسیداتیو نیز احتمالاً در بروز مرگ سلولی کاردیومیوسیتی موثر بوده است زیرا Kunio در نتایج مطالعه خود آورده است که در عفونت‌های ویروس آنفلوانزا میزان بیان mRNA وابسته به GST-Δ[4] و MN-SOD[5] کاهش یافته و بنابراین با افزایش استرس‌های اکسیداتیو سلولی و رادیکال‌های آزاد اکسیژن مرگ سلولی راه اندازی می‌گردد(۷،۱۵). با توجه به مطالب ارائه شده توجیح تغییرات مرگ سلولی متعاقب عفونت با ویروس آنفلوانزا سروتیپ H_9N_2 احتمالاً از این مسیر می‌باشد، اما آنچه که در مطالعه حاضر بیان شده است نمودی است از تاثیر ویروس آنفلوانزای سروتیپ H_9N_2 در مرگ سلول‌های قلب که با نتایج مطالعات سایر محققین تقریباً مشابه می‌باشد. بیان مکانیسم‌های دقیق ملکولی در مورد سروتیپ H_9N_2 نیاز به مطالعات تکمیلی دارد، اما در مطالعات مقایسه‌ای که Mo و همکاران در سال ۱۹۹۷ با سایر سروتیپ‌های مختلف ویروس آنفلوانزا (H5N9، H5N2، H4N8، H7N7) انجام داده اند، ضایعات ایجاد شده توسط سروتیپ‌های H_5N_2 و H_7N_7 در حد متوسطی بوده و ۴۵درصد ضایعات در بافت قلب و ۸۵درصد در بافت عروقی جوجه‌ها ایجاد شده است که به صورت تورم آبکی و نکروز انعقادی سلول‌های قلب بوده است(۱۱)، در حالی که در مطالعه ما علاوه بر نکروز سلولی نیز در ساول‌های قلب مشاهده شده است، با این اوصاف می‌توان به این نتیجه رسید که سروتیپ‌های متعدد ویروس آنفلوانزا در مرگ سلولی نقش داشته و سروتیپ H_9N_2 نیز از این قاعده مستثنی نیست(۹). نتایج بررسی Ito و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان داده است که رپلیکاسیون سروتیپ H_7N_7 در بافت قلب نسبت به سایر سروتیپ‌های H_5N_3 و H_5N_1 بیشتر بوده و ایشان به نقش پروتئین غیر ساختاری ویروس آنفلوانزا یا NS1 در القاء مرگ سلولی اشاره نموده اند(۵،۱۳). Morris, Schultz, Zambou و همکاران در سال‌های ۲۰۰۵ و ۲۰۰۱ در پی مطالعات خودشان چنین بیان می‌دارند که ویروس آنفلوانزای سویه H_9N_2 شاید با فعال سازی تاخیری β-TGF توسط NA باعث فعال شدن مسیرهای مرگ سلولی می‌گردد، آنها با بیان مکانیسم‌های درونزادمرگ سلولی متعاقب عفونت ویروس یک ارتباط مشخص بین ویروس آنفلوانزا و مرگ سلول‌های بافت قلب یافتند که در بیان مسیرهای القاء مرگ سلول‌های بافت قلب در جوجه‌ها می‌توان به نقش موثر این موارد در بیان تغییرات مرگ سلولی و اختلاف معنی دار نتایج بدست آمده اشاره نمود(۹،۱۴،۱۷).

1-Tumor Necrotizing Factor ±

2-Granulocyte Monocyte-Colony stimulating Factor.

3-Trnasforming Growth Factor-²

4-Glutatione S-Transferase-4

5-Mn-Superoxide Dismotase.

تشکر و قدردانی

با تشکر از همکاران حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز.

منابع:

۱ـ دوستار، ی. (۱۳۸۳) مطالعه آزمایشی آپوپتوزیس القاء شده توسط ویروس عامل بیماری بورس عفونی جوجه‌ها با استفاده از متد تشخیصی TUNEL و میکروسکوپ الکترونی. پایان نامه جهت دریافت دکترای تخصصی دانشگاه تهران، دانشکده

دامپزشکی.

۲- حبل الورید، م.، سهرابی حقدوست، ا.، پوربخش، س. ا.، غلامی، م.ر. (۱۳۸۲) مطالعه هیستوپاتولوژیک ضایعات ناشی از تزریق داخل وریدی تحت تیپ H_9N_2 ویروس آنفلوانزای تیپ A در جوجه، شماره ۵۵، صفحات: ۵۱-۴۱.

3-Barber, G.N. (2001) Host defense viruses and apoptosis. Cell Death Differ, **8**: 113-126.

4-Frankfurt, O.S., Krishan, A. (2001) Identification of apoptotic cells by formamide - induced DNA denaturation in condensed chromatin. Histochem cytochem, **49**: 369-378.

5-Ito, T., Kobayashi, Y., Morita, T., Horimoto, H., Kawaoka, Y. (2002) Virulent influenza a viruses induces apoptosis in chickens.Virus Research, **84**: 27-35.

6-Kwon, Y.K., Joh, S.J., Kim, M.C. (2005) Highly pathogenic avian influenza(H_5N_1) in the commercial domestic ducks of south korea. Avian Pathology, **34**:367-370.

7-Kunio, O., Manabu, N., Bo, Y., Toshio, B., Toshio, Y. (2003) Apoptosis induced by influenza virus-hemagglutin stimulation may be related to fluetuation of cellular oxidative condition.Biol. Pharma.Bull, **26**:141-147.

8-Liu, J. et al. (2003) H9N2 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 Pathology, **32**: 552-560.

9-Morris, J., Nightingale, S., Harry, S., Clive, S. (2005) 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.Virology, **335**: 198-211.

10-Mehranpour, M.J., Dadras, H., Khodakaram-Tafti, A., Rahimian, A., Toffan, A. (2007) Pathological finding of highly pathogenic avian influenza virus A/Duck/Vietnam/12/2005(H5N1) in turkey. International Journal of Poultry Science, 9: 679-683.

11-Mo, O.I., Brugh, M., Fletcher, J., Rowland, G.N., Swayne, N. (1997) Comparative pathology of chickens experimentally inoculated with avian influenza virus of low and high pathogenicity. Avian Disease, **41**:125-136.

12-Perkins, L.E.L., Swayne, D. (2003) Varied pathogenecity of a hong kong-origin H5N1 avian influenza virus in four passé ring species and budgerigars. Vet Pathol., **40**:14-24.

13-Schultuz, C., Stacey, D.S., Neumann, N., Kawaoka, G., Shaw, H. (2002) Influenza virus NS1 protein induces apoptosis in cultured cells. Uirginia, **75**: 17-22.

14-Schultz, C., Koci, M., Thompson, E., Tumpey, T.M. (2003) Examining the Cellular Pathways Involved In Influenza Viras Induced Apoptosis. Avian Diseases, PP:968-971.

15-Schultz, R., Harrington, J., William, J.R. (2003) Apoptosis: Programmed cell Death at a Moleclar level.Semin Arthritis Rheum, **32**:345-369.

16-Suarez, D.L., Schultz- Cherry, S. (2000) Immunology of avian influenza Virus.A Review of Avian Influenza Virus. **24**: 269-283.

17-Zambon, M.C., Meduiro, R. (2001) Pathogenesis of Influenza A and B in humans.Rev Med Virol, **11**: 227-41.

RICEST