

بررسی فراساختاری پانکراس در موشهای آلوده به ویروس تب برفکی

دکتر پژمان مرتضوی*^۱؛ دکتر ایرج سهرابی حقدوست^۲؛ دکتر تقی الطریحی^۲؛ دکتر عبدالمحمد طالب شوشتری^۳

Ultrastructural Study of Pancreas in Mice Infected with Foot and Mouth Disease Virus

Mortazavi.P¹, Sohrabi Haghdoost.I¹, Taki Al-Tiraihi², Taleb Shooshtari.A.M³

1-Department of Pathology, Faculty of Specialised Veterinary Sciences, Islamic Azad University, Science & Research Campus, Tehran, Iran

2-Department of Pathology & Anatomical Sciences, School of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

3-Razi Research Institute, Karaj, Iran

Foot-and-mouth disease (FMD) is a severe, clinically acute, vesicular disease of cloven-hoofed animals including domesticated ruminants and pigs and more than 70 different wildlife species. The aetiological agent, foot-and-mouth disease virus (FMDV), is classified within the Aphthovirus genus as a member of the Picornaviridae family. Seven distinct serotypes of FMDV, with indistinguishable clinical effects, have been defined, namely types O, A, C, SAT 1, SAT 2, SAT 3 and Asia 1 mountain gazelles. Synchronous diabetes mellitus and FMDV in cattle and mountain gazal is reported. This study was performed to study FMD virus effects on pancreas of infected animals. For this purpose, 14 male and 14 female mice Balb/Cj in two groups were selected. In each group, 10 mice were as experimental animals and the rest were control animals. Twelve of each group (10 mice of experimental group and 2 mice of control group) were treated by cyclophosphamide (as an immunosuppressive drug). Ten mice of experimental group were inoculated with FMD virus strain O1 intraperitoneally. The serum glucose were measured in all mice before and after virus inoculation up to 10 days. After 10 days, necropsy were carried out on all mice. Two samples of each pancreas were taken and referred to the pathological laboratory for light and electron microscopic studies. The results showed that in male group, there was a significant difference among glucose values at second day up to inoculation and seventh day to ninth day, and tenth day respectively. In female group, there was significant differences in glucose values of first day up to inoculation, first day to second and third day of inoculation and finally second day to third, fifth and eighth day of inoculation ($P < 0.05$). Histopathological investigation on islets of langerhance and exocrine region showed cellular vaculation, appoptosis in beta cells and acinar cells and degranulation of beta cells. It can be concluded that FMD virus is able to produce direct damage to beta cells, by apoptosis.

Key words: Pancrease, Mice, Foot and Mouth Disease Virus, Apoptosis

بیماری تب برفکی (FMD)، یک بیماری وزیکولار شدید و از نظر بالینی حاد، مختص حیوانات زوج سم شامل نشخوارکنندگان اهلی، خوک ها و بیش از ۷۰ گونه وحشی می باشد. عامل ایجاد کننده آن ویروس بیماری تب برفکی است که مربوط به جنس آفتوویروس متعلق به خانواده پیکورنا ویریده می باشد. هفت تحت تیپ مجزا از ویروس تب برفکی با اثرات بالینی غیر قابل تفکیک مشخص گردیده است. این تحت تیپ ها شامل SAT₁, SAT₂, SAT₃, O, A, C, Asia₁ می باشد. همزمانی وقوع دیابت ملیتوس و عفونت با ویروس تب برفکی در گاو و غزال کوهی گزارش شده است. هدف از این پژوهش بررسی اثرات ویروس تب برفکی بر روی پانکراس حیوانات آلوده بوده است. بدین منظور، تعداد ۱۴ سر موش Balb/CJ نر و ۱۴ سر موش Balb/CJ ماده انتخاب گردیدند. در هر گروه تعداد ۱۰ موش به عنوان تیمار و بقیه به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. در هر گروه ۱۲ سر از موشها به منظور تضعیف ایمنی تحت تزریق داروی سیکلوفسفامید قرار گرفتند (۱۰ عدد از موشهای تیمار و ۲ عدد از کنترلها). موشهای تیمار تحت تلفیح ویروس تب برفکی تحت تیپ O₁ به صورت داخل صفاقی قرار گرفتند. قبل و بعد از تزریق ویروس، گلوکز خون تمامی موشها تا ۱۰ روز بعد از تزریق ویروس اندازه گیری شد. بعد از ۱۰ روز موشها کالبد گشائی شدند. از هر پانکراس دو نمونه جهت میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی گرفته شد و به آزمایشگاه پاتولوژی ارسال گردید.

نتایج نشان دادند که گلوکز خون در گروه نرها قبل از تزریق؛ با گلوکز خون روز دوم بعد از تزریق و از طرفی روز هفتم بعد از تزریق با روز نهم و همچنین روز هفتم با روز دهم اختلافات معنی داری نشان دادند. در گروه موشهای ماده نیز گلوکز قبل از تزریق با گلوکز روز اول بعد از تزریق و گلوکز روز اول بعد از تزریق با گلوکز روزهای دوم و سوم؛ همچنین گلوکز روز دوم با روزهای پنجم تا هشتم دارای اختلافات معنی داری بود ($P < 0.05$). نتایج هیستوپاتولوژیک در جزایر لانگرهانس و قسمت اگزوکرین نشان دهنده واکنولاسیون سلولها بود. آپوپتوز هم در سلولهای بتا و هم در سلولهای آسینی و دگرانولاسیون سلولهای بتا مشاهده گردید. این مطالعه نشان داد که ویروس بیماری تب برفکی قادر به ایجاد ضایعه به صورت تخریب مستقیم سلولهای بتا از طریق آپوپتوز می باشد.

واژه های کلیدی: پانکراس؛ موش؛ ویروس تب برفکی؛ آپوپتوز

بیماری تب برفکی (Foot and Mouth Disease)، نوعی

بیماری وزیکولار شدید است که از نظر بالینی به صورت

حاد بوده و مختص حیوانات زوج سم شامل نشخوار

* گروه پاتولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران

۲- گروه پاتولوژی و علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- موسسه تحقیقات واکنس و سرم سازی رازی، کرج، ایران

✉ نویسنده مسئول مکاتبات (pejmanir2001@yahoo.com)

هستند. سطح خلفی کام نرم و سطح فوقانی حلق، فقط بالای کام نرم، نواحی ویژه و دارای اهمیت هستند. تکثیر ویروس ممکن است به سرعت طی ۲-۳ روز بعد از آلودگی به حداکثر خودش برسد. مطالعات اخیر مشخص کرده است که بعد از شروع تکثیر، ویروس از طریق عقده‌های لنفاوی ناحیه ای به داخل گردش خون وارد می‌شود. بخش عمده ای از تکثیر ویروس متعاقباً در داخل اپیتلیوم سنگفرشی شاخی پوست (شامل پاها و پستان) و دهان (شامل زبان) یا در میوکاردیوم حیوانات جوان اتفاق می‌افتد (۳،۴).

علائم بالینی در تب برفکی بصورت یک واکنش تب دار حاد و تشکیل وزیکولهای در اطراف دهان و روی پاها مشخص می‌شود. درد ایجاد شده باعث لنگش می‌شود که به صورت انحراف پاها در هنگام حرکت مشخص میگردد. حیوان در هنگام ایستادن خود را جمع می‌کند و در برابر ایستادن یا راه رفتن مقاومت می‌کند و بی‌اشتها می‌شود. در بررسی و معاینه، در پاها گرما و درد ممکن است برای ۱-۲ روز قبل از تشکیل جراحات وزیکولار تشخیص داده شود (۳،۴).

جراحات ابتدا به صورت بی‌رنگ و سفید مشاهده می‌شود که سپس به سوی تشکیل وزیکول گسترش می‌یابد. وزیکولها ممکن است روی پوزه، سر پستانکها، پستان، غلاف قضیب، فرج و نواحی دیگر پوست مشاهده شوند. هر چند در اطراف دهان و روی پاها بیشتر مشاهده می‌شوند. در بازرسی بعد از مرگ، جراحات ممکن است همچنین روی پیلاهای شکمبه هم دیده شود. جراحات پاها ممکن است منجر به افتادن پنجه (Thimbling) گردد و انگشتان فرعی (Accessory) ممکن است آلوده شده به طوریکه باعث فشار روی زانو و مفصل خرگوشی (Hock) گردند. درگاو ها، علائم بالینی که معمولاً آشکار است، شامل ریزش بزاق و جراحی دهانی که اغلب مشخص بوده و سریعاً گسترش پیدا می‌کنند و برخی اوقات جراحات پاها

کنندگان اهلی، خوک ها و بیش از ۷۰ گونه وحشی می‌باشد. عامل ایجاد کننده آن ویروس بیماری تب برفکی است که مربوط به جنس آفتوویروس متعلق به خانواده پیکورنا ویریده می‌باشد. این ویروس فاقد غشاء و دارای تقارن ۲۰ وجهی و قطر ۲۶nm و دارای RNA با سنس مثبت و در حدود ۸/۴ kb می‌باشد. در داخل سلول، تکثیر در سیتوپلاسم صورت گرفته و RNA ویروس به یک پلی پروتئین ترجمه می‌شود که از طریق پروتئولیز به ۱۲ پروتئین ساختمانی و غیر ساختمانی شکسته می‌شود. کپسید کامل ویروسی شامل ۶۰ کپی از هر کدام از چهار پروتئین های ساختمانی Vp1-4 با تعداد زیادی شاخص های ضروری برای ماهیت عفونی و ایمنی در ترکیبات مولکولی پروتئین Vp1 می‌باشد. هفت تحت تیپ مجزا از ویروس تب برفکی با اثرات بالینی غیر قابل تفکیک مشخص گردیده است. این تحت تیپ ها شامل SAT 1, SAT 2, SAT 3, O, A, C, Asia1 می‌باشد (۳،۴،۶).

چارپایان مستعد ممکن است توسط ویروس FMD در نتیجه تماس مستقیم یا غیر مستقیم با حیوانات آلوده یا با یک محیط آلوده هنگامی که یک حیوان آلوده و مستعد در نزدیکی هم نگهداری می‌شوند، آلوده شوند. انتقال از طریق قطرات کوچک معلق در هوا، شاید معمول ترین راه انتقال باشد. انتقال ویروس از طریق باد برای مدتی طولانی غیر معمول است اما منشأ مهم آلودگی است ولی در این زمینه بایستی عوامل مستعد کننده متعددی نقش داشته باشند. دوره کمون برای تب برفکی بسیار متغیر است و بستگی به گونه و دوز ویروس، راه انتقال، گونه حیوان و شرایط پرورشی دارد. ، تحت برخی از حالات آن ممکن است تا یک روز کاهش و یا تا ۱۴ روز هم افزایش یابد (۴).

شواهد زیادی نشان داده که به استثنای مواردی که ویروس از راه مستقیم وارد پوست یا مخاطات آسیب دیده می‌شود؛ نواحی حلقی به طور معمول، مکان استقرار عامل عفونت

اینکه در یک گروه همگون قرار نمی گیرند، شامل مجموعه ای هستند که با علائم و عوارض خاص بیماری خودنمایی می کنند و با اختلال در متابولیسم کربوهیدرات، چربی و پروتئین همراه می باشد.

از آنجائیکه دیابت یک بیماری مزمن می باشد و فرد یا حیوان را در طول سالیان دراز مورد تهاجم قرار می دهد، خسارات ناشی از آن در این مدت بسیار قابل توجه می باشد.

در مورد اتیولوژی دیابت در حیوانات مطالعات زیادی انجام شده است. در سگ بروز دیابت ملیتوس خودبخودی چه به صورت اولیه و یا ثانویه در اثر عوامل زیر گزارش شده است:

آتروفی پانکراس در اثر ضربه، آتروفی خود به خودی، آپلازی، دیسپلازی، هیپوپلازی پانکراس، سیکل جنسی، پانکراتیت، نفوذ آمیلوئید، تجمع گلیکوژن، کلاژن و بافت همبند در جزایر و اسکروز نامشخص آن، درمان با پردنیزون، تزریق مدروکسی پروژسترون استات و مرسترون استات، آدنومهای سلولهای اسیدوفیل هیپوفیز، چاقی، عفونت، هیپر آدرنوکورتیزیس (سندرم کوشینگ) گزارش شده است (۱).

در نشخوار کنندگان دیابت خودبخودی به شکل اولیه یا ثانویه در گاو، گوساله، گاو میش، گوسفند، بز و آهو دیده شده است. در گاو بروز بیماری دیابت بصورت خودبخودی بواسطه عفونت پایدار ویروس اسهال ویروسی گاو و بیماری مخاطی (BVD-MD)، بیماری تب برفکی، آدنوکارسینوم هیپوفیز، پانکراتیت مزمن و دژنراسانس جزایر پانکراس گزارش شده است. بعلاوه تونتیس (Tontis) و همکاران (۱۹۸۶) بروز دیابت ملیتوس خودبخودی در گوساله های ماده دوقلوی دی زیگوتی را گزارش کرده است (۱،۱۶).

در تحقیق تاجیما (Tajima) (۱۹۹۲) هیچ ارتباط ژنتیکی در بین گاوهای مبتلا به دیابت ملیتوس و عفونت اسهال ویروس گاوی وجود نداشت و با وجود اینکه امکان زایش

می باشد. در گوسفند و بز علائم ممکن است شدید باشد اما معمولاً خفیف تر از گاوها و خوکها است. در موارد خفیف جراحات سطحی و موقتی بوده و سریعاً التیام می یابند (۴). مرگ و میر در حیوانات بالغ معمولاً پائین است اما ممکن است در حیوانات جوان بالا باشد. (گوساله ها و بخصوص بره ها و بچه خوکها، که ناشی از میوکاردیت حاد است). معاینه ماکروسکوپی قلب در این موارد اغلب یک قلب نرم و شل با خطوط یا نقاط راه راه خاکستری یا سفید را مشخص می کند. به همین خاطر قلب ببری (Tiger Heart) نامیده می شود که اصولاً این حالت در دیواره بین دو بطن و بطن چپ بیشتر دیده می شود (۴).

ویروس بیماری تب برفکی می تواند باعث عفونت طولانی مدت شود (ابجد حیوانات حامل). بیشترین زمانی که در گونه های مختلف برای حامل بودن گزارش شده بدین صورت است: گاو ها ۳ تا ۵ سال، گوسفندان ۹ ماه، بز ۴ ماه، بوفالوی آفریقایی ۵ سال، بوفالوی آبی ۲ ماه. حلق، پستان و بیضه ها ممکن است که برای چند هفته بعد از آلودگی واجد ویروس باشند و اعتقاد بر این است که هیپوفیز، پانکراس و غده تیروئید مکانهایی هستند که علاوه بر مکانهای قبلی باعث ماندگاری ویروس می شوند. یافته های جدید مشخص کرده است که اندام هایی مانند کلیه ها و عقده های لنفاوی احتمالاً مکان هائی برای ماندگاری ویروس نیستند (۷،۸).

یکی از مسائلی که در مورد ویروس تب برفکی مطرح شده است، ارتباط این ویروس با بروز بیماری دیابت شیرین در حیوانات مبتلا می باشد. در این ارتباط، فقط دو مورد گزارش درمانگاهی یکی مربوط به گاو و دیگری مربوط به آهو و یک مقاله در رابطه با ارتباط ویروس تب برفکی با بروز دیابت در گاو وجود دارد (۵،۱۰،۱۱).

دیابت ملیتوس یکی از بیماریهای متابولیک مهم و شایع غدد اندوکرین در انسان و حیوانات است که به مجموع ناهنجاریهای آناتومیکی و بیوشیمیایی اطلاق می گردد که با

گرفت این موضوع ثابت گردید، جهت آلوده کردن موشها در ابتدا بایستی سامانه ایمنی آنها را تضعیف کرد. چون یکی از اهداف ما در این بررسی، سنجش گلوکز خون بود بنابراین کورتون ها داروی مناسبی جهت تضعیف سامانه ایمنی نبود.

پس از بررسی، بهترین داروی ممکن و در دسترس سیکلوفسفامید (Cyclophosphamide) انتخاب گردید. نوع سیکلوفسفامیدی که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. دارای مشخصات زیر بود:

Endoxan, ASTA, 200mg cyclophosphamide, ASTA pharma Ag, Frankfurt, Am, Germany
 که ویال ۲۰۰ میلی گرم آن مورد استفاده قرار گرفت. هر ویال آن با ۱۰۰cc سرم فیزیولوژی استریل مخلوط گردید و در یخچال نگهداری شد.

۳- ویروس

در این مطالعه از ویروس وحشی تب برفکی تحت تیپ O1 که از آزمایشگاه مرکز تشخیص اداره کل دامپزشکی استان تهران تهیه گردید، استفاده شد. جهت آماده سازی ویروس ابتدا شش پاساژ در سلولهای BHK-21 داده شد و سپس یک پاساژ در کشت نسوج گاو و بدنبال آن دو پاساژ دیگر در سلولهای BHK-21 داده شد. این ذخیره ویروسی دارای تیتري در حدود 10^{-1} SMLD 50ml⁻¹ بود (بود $10^{7.8}$ suckling mouse 50% lethal doses ml⁻¹) که در دمای 37°C - ۸۰- نگهداری گردید.

۴- اندازه گیری گلوکز خون و شمارش تفریقی گلبولهای سفید

جهت اندازه گیری گلوکز خون از دستگاه گلوکومتر با مشخصات زیر استفاده گردید:

Accu-Chek comfort, Roche Diagnostic GmbH, D-68298 Mannheim, Germany

که با استفاده از قطع انتهای دم یک قطره خون اخذ و بر روی نوار مربوطه قرار داده که بعد از ۳۰ ثانیه میزان گلوکز بر روی صفحه نمایشگر نشان داده می شد.

این حیوانات نیز جدا از یکدیگر بوده اما ویروس بیماری BVD-MD از گاوها جدا شد. علاوه بر این تانیاما (Taniyama) و همکاران (۱۹۹۵) آنتی ژن ویروس BVD را در سلولهای پوششی روده های کوچک گاوهای جوان مبتلا به دیابت ملیتوس و اسهال ویروسی گاوها تشخیص دادند. بنابراین محققین عنوان می کنند که ویروس اسهال ویروسی گاوها می تواند در بروز دیابت ملیتوس نقش داشته باشد (۱۴، ۱۵).

در بره ها بروز بیماری دیابت خودبخودی در ارتباط با برخوردی از کربوهیدرات و بیماری آنتروتوکسمی گزارش شده است. بعلاوه پرل (perl) و همکاران (۱۹۸۹) گزارش کرده اند که ایجاد بیماری تب برفکی در آهو سبب بروز دیابت شده است (۱، ۱۱).

با توجه به آنکه امکان کار بر روی میزبان طبیعی ویروس یعنی گاو و یا گوسفند امکانپذیر نبود، بر روی الگوی تجربی آن که موش آزمایشگاهی است، تحقیق حاضر انجام گرفت تا تاثیر ویروس تب برفکی بر روی پانکراس و به خصوص سلولهای بتا مشخص گردد.

مواد و روش کار

الف- مواد مورد استفاده

۱- حیوانات مورد مطالعه

جهت این بررسی از موشهای نژاد Balb/cj که از انستیتو پاستور تهیه شد؛ استفاده گردید. موشها به دو گروه نر و ماده تقسیم شدند. در هر گروه ۱۴ سر موش تهیه گردید. دامنه سنی تمامی موشها ۸۰-۶۰ روزه با میانگین وزن ۲۵-۲۲ گرم انتخاب گردید. هر گروه از موشها در قفس جداگانه ای نگهداری شدند. بر روی دم هر کدام از موشها توسط رنگ فوشین علامتهایی جهت تعیین شماره موش زده شد.

۲- تضعیف سیستم ایمنی

به علت آنکه موشهای بالغ به ویروس تب برفکی مقاوم هستند و در آزمایشات مقدماتی که قبل از شروع طرح انجام

سیکلوفسفامید و بعد از تضعیف سیستم ایمنی موشها، ویروس تب برفکی تحت تیپ OI به صورت داخل صفاقی به آنها تزریق گردیده در ابتدا ویروس ذخیره شده در ۰/۵ml از بافر فسفات (PBS) با PHV/۴ رقیق گردید و به میزان ۱cc به صورت داخل صفاقی به هر کدام از موشهای شماره های ۱ تا ۱۰ تزریق گردید. موشهای شماره های ۱۱ تا ۱۴ به همان میزان (۱cc) از بافر فسفات با PHV/۴ به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند.

لازم به ذکر است که قبل از تزریق ویروس، گلوکز خون تمامی موشها اندازه گیری شد. همچنین از روز بعد از تزریق ویروس تا زمان مرگ موشها به مدت ۱۰ روز و هر روز گلوکز خون تمامی موشها به روش فوق اندازه گیری گردید. تمامی داده های بدست آمده توسط نرم افزار آماری SPSS Ver.12 مورد آنالیز آماری قرار گرفت.

موشهایی که در طی مطالعه تلف می شدند مورد کالبد گشایی قرار گرفته و پانکراس آنها مورد بررسی قرار می گرفت. هر گونه ضایعه بر روی پانکراس ثبت می گردید. در پایان روز دهم نیز تمامی موشهایی که زنده ماندند بودند پس از ایجاد مرگ آرام با اتر اتیلیک؛ مورد کالبدگشایی قرار گرفته و پانکراس آنها مورد بررسی قرار گرفت.

از هر پانکراس دو نمونه گرفته می شد یکی برای انجام آزمایشات میکروسکوپ نوری که نمونه در داخل محلول فرمالین بافر ۱۰٪ قرار می گرفت و نمونه دیگر جهت انجام آزمایشات میکروسکوپ الکترونی در داخل گلو تار آلدئید ۲/۵ درصد قرار می گرفت. از تمامی نمونه ها با روش رایج هماتوکسیلین- ائوزین اسلایدهای هیستوپاتولوژی تهیه گردید. در مورد میکروسکوپ الکترونی نیز از نمونه ها؛ گریدهایی با روش معمول و با استفاده از رزین ایپون ۸۱۲ و رنگ آمیزی یورانیل استات و سترات سرب تهیه گردید.

۱- نتایج اندازه گیری گلوکز خون

جهت شمارش تفریقی گلبولهای سفید نیز از دستگاه اتوآنالایزر موجود در آزمایشگاه دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات استفاده گردید. قبل از انجام آزمایشات دستگاه با نمونه خون موش Balb/cj کالیبره گردید.

ب- روش کار

موشها به دو گروه نر و ماده تقسیم و هر کدام از گروهها شماره گذاری گردید. موشهای گروه ماده از F1 تا F14 و موشهای گروه نر از M1 تا M14 شماره گذاری گردیدند. در هر گروه شماره های ۱ تا ۱۰ به عنوان گروه تیمار و شماره های ۱۱ تا ۱۴ به عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

در ابتدا از طریق سینوس اربیتال، نمونه خونی از تمامی موشها تهیه گردید و با دستگاه اتوآنالایزر گلبولهای سفید آنها شمارش گردید. متوسط شمارش گلبولهای سفید خون در گروه نرها $1 \mu / 10^3 \pm 1/3$ و در گروه ماده ها $1 \mu / 10^3 \pm 1/6$ بود (میزان طبیعی شمارش گلبولهای سفید خون در موشها $1 \mu / 10^3 \pm 3/2$ است).

جهت سرکوب سیستم ایمنی در روزهای ۲ و ۵ قبل از تزریق ویروس، از داروی سیکلوفسفامید با دوز ۲۰۰mg/kg و به صورت داخل صفاقی استفاده گردید. تمامی موشها به استثنای شماره های ۱۳ و ۱۴ از هر گروه تحت تزریق دارو قرار گرفتند.

یک روز قبل از تزریق ویروس، نمونه خونی از تمامی موشها گرفته شد و توسط دستگاه اتوآنالایزر گلبولهای سفید خونی آنها مورد شمارش قرار گرفت. موشهای هر دو گروه به استثنای شماره های ۱۳ و ۱۴ که مورد تزریق دارو قرار نگرفته بودند لکوپنی و پن سیتوپنی را نشان می دادند. (متوسط شمارش گلبولهای سفید خون در گروه نرها $1 \mu / 10^3 \pm 1/4$ و در گروه ماده ها $1 \mu / 10^3 \pm 1/7$ بود). دو روز بعد از تزریق آخرین دوز داروی

مشاهده نمی گردید ولی در بقیه موشها که بعد از روز دهم مورد کالبد گشایی قرار گرفتند، تنها ضایعه قابل توجه دژنرسانس چربی در کبد موشهای نر و پر خونی پانکراس در تمامی موشهای مورد مطالعه بود. در موشهای گروه کنترل نیز ضایعه قابل توجهی دیده نشد. در میان موشهایی که در خلال آزمایش تلف گردیدند فقط پانکراس موشهای F1 و F3 و F9 دچار اتولیز نشده بودند ولی در بقیه اتولیز مشاهده شد.

۳- نتایج میکروسکوپ نوری

به طور کلی ضایعات هیستوپاتولوژی که در پانکراس موشهای تیمار مشاهده گردید شامل پرخونی، واکوئوله شدن و دژنرسانس آبکی سیتوپلاسم سلولهای بتا و سلولهای آسینی (نگاره های ۳، ۴، ۶)، هیالینه شدن سیتوپلاسم هم در سلولهای بتا و هم در سلولهای آسینی، آپوتوز هم در سلولهای جزایر لانگرهانس و هم در سلولهای آسینی لوزالمعده (نگاره های ۸، ۷، ۶، ۵). در کبد نیز ضایعات فقط در موشهای نر به صورت دژنرسانس چربی مشاهده گردید. بیشترین ضایعات مشاهده شده در موشهای ماده دیده شد و موشهای نر نسبت به موشهای ماده دارای ضایعات کمتری بودند (بر اساس میزان ضایعات مشاهده شده در هر فیلد میکروسکوپ). میزان آپوتوز در جزایر لانگرهانس به صورتی بود که به طور متوسط در هر جزیره حدود ۴ عدد سلول متحمل آپوتوز مشاهده گردید.

بیشترین اشکال آپوتوز شامل متراکم شدن و چروکیده شدن هسته و سیتوپلاسم و تراکم و مرز نشینی کروماتین هسته در اطراف غشاء هسته بود. سایر اشکال آپوتوزی که مشاهده گردید شامل اجسام آپوپتیک و ایجاد واکوئل در سیتوپلاسم سلولها بود (نگاره های ۶ و ۷)

از آن جایی که این تغییرات در هر فیلد از جزایر لانگرهانس و همچنین آسینی های لوزالمعده در بیش از یک سلول اتفاق افتاده بود و همچنین در مقایسه با گروه شاهد که هیچ

میزان گلوکز خون و نتایج آماری آن در هر گروه از موشهای نر و ماده در جداول ۱ تا ۴ آمده است.

با توجه به آنکه میزان طبیعی گلوکز خون موشهای نر ۳۸/۱ ± ۱۱۲ و میزان طبیعی گلوکز خون موشهای ماده ۳۹/۹ ± ۹۷ می باشد در هر دو گروه میزان گلوکز خون بعد از تزریق در دامنه طبیعی قرار دارد. نتایج نشان داد که اختلاف گلوکز های بدست آمده در $P < 0/05$ فقط در روزهای زیر معنی دار بوده است.

الف - در گروه موشهای نر :

- گلوکز قبل از تزریق با گلوکز روز دوم بعد از تزریق
- گلوکز روز هفتم بعد از تزریق با گلوکز روز نهم بعد از تزریق
- گلوکز روز هفتم بعد از تزریق با گلوکز روز دهم بعد از تزریق

ب - در گروه موشهای ماده :

- گلوکز قبل از تزریق با گلوکز روز اول بعد از تزریق
- گلوکز روز اول بعد از تزریق با گلوکز روز دوم بعد از تزریق
- گلوکز روز اول بعد از تزریق با گلوکز روز سوم بعد از تزریق
- گلوکز روز دوم بعد از تزریق با گلوکز روز چهارم بعد از تزریق
- گلوکز روز دوم بعد از تزریق با گلوکز روز پنجم بعد از تزریق
- گلوکز روز دوم بعد از تزریق با گلوکز روز ششم بعد از تزریق
- گلوکز روز دوم بعد از تزریق با گلوکز روز هفتم بعد از تزریق
- گلوکز روز دوم بعد از تزریق با گلوکز روز هشتم بعد از تزریق

۲- نتایج کالبد گشایی

علائم قبل از مرگ در تمامی موشها به صورت تحت بالینی بوده و شامل ضعف، خمودگی، عدم تحرک بود (نگاره ۱). در گروه موشهای نر، موشهای شماره های ۱۱۸، ۶، ۲ به ترتیب ۱، ۶، ۷، ۳، ۱ روز بعد از تزریق تلف شدند. در گروه موشهای ماده نیز موشهای شماره های ۱، ۳، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰ به ترتیب ۵، ۵، ۷، ۶، ۸، ۷، ۱ روز بعد از تزریق و ویروس تب برفکی تلف شدند. از آنجایی که در اکثر موارد این موشها در شب تلف می شدند در موقع کالبد گشایی جراحی قابل تشخیصی

در زیر غشاء هسته دیده شد که این ضایعه اخیر مربوط به شروع آپوپتوز بوده است (نگاره ۱۱ و ۱۲).

در سلولهای جزایر لانگرهانس تغییرات مشاهده شده به شرح زیر بوده است:

کوچک شدن و چروکیده شدن سیتوپلاسم و هسته، اتساع سیستم رتیکولو اندوپلاسمیک، دستگاه گلژی و میتوکندری ها، از دست دادن دانه های ریبوزوم در سیستم رتیکولو اندوپلاسمیک خشن، همچنین از بین رفتن گرانولهای ترشحی، تجمع کروماتین و مرز نشینی آن در زیر غشاء هسته و تشکیل تاولهایی که از سطح غشاء برجسته بوده و دارای تجمع کروماتینی به مقدار زیاد می باشد. همچنین از دست دادن گرانولهای سلولهای بتا که این سلولها کاملا از گرانولهای ترشح کننده انسولین تهی شده بودند (نگاره های ۱۰ تا ۱۳).

تمامی این تغییرات و همچنین عدم وجود سلولهای آماسی نشان دهنده وقوع آپوپتوز است که این روند در سلولهای بتا نسبت به دیگر سلولها و همچنین در سلولهای جزایر لانگرهانس نسبت به سلولهای بخش برون ریز (آسینی) مشهودتر بوده است.

به طور کلی بیشترین ضایعات در سلولهای آسینی در بخش برون ریز (آسینی ها)، واکوئوله شدن سیتوپلاسم و ارگانهای داخلی آن و در سلولهای جزایر لانگرهانس آپوپتوز بوده است.

نشانه ای مبنی بر آپوپتوز و دیگر جراحات را نشان نمی دادند ضایعات ایجاد شده در گروههای تیمار پاتولوژیک بوده و قابل استناد می باشد.

میزان واکوئوله شدن و تورم سلولی در سلولهای آسینی های لوزالمعده بیشتر از سلولهای جزایر بود. در داخل جزایر نیز آپوپتوز بیشتر در سلولهای بتا مشاهده گردید (سلولهای بتا بیشتر موقعیت مرکزی داشته و هسته آنها نسبتا کوچک و بازوفیلی می باشد). بررسی کبد در هر دو گروه نشان داد که کبد در موشهای نر متحمل دژنراسانس چربی شده که این ضایعه در موشهای کنترل هم دیده شد ولی در موشهای گروه ماده مشاهده نگردید.

۳- نتایج میکروسکوپ الکترونی

در بررسی با میکروسکوپ الکترونی هم قسمت آگزوکرین و هم قسمت اندوکرین پانکراس مورد بررسی قرار گرفت. از آنجایی که در قسمت جزائر سه نوع سلول عمده وجود دارد و هدف ما در این مطالعه بیشتر بر روی سلولهای بتا بوده است، در زیر میکروسکوپ الکترونی بایستی سلولهای آلفا و بتا را از هم تفکیک کرد که این کار بر این اساس صورت می گیرد که سلولهای بتا دارای گرانولهای متصل به غشا بوده که هر کدام دارای هسته ای تیره رنگ و اغلب مستطیلی شکل و یک هاله مشخص هستند. در صورتی که سلولهای آلفا دارای گرانولهایی با مرکز گرد و مدور بوده و فاقد هاله می باشند (۲) (نگاره ۹A و 9B).

در سلولهای آسینی یا قسمت برون ریز لوزالمعده ضایعاتی که مشاهده گردید به صورت اتساع شبکه اندوپلاسمیک خشن و از دست دادن دانه های ریبوزومی متصل به آن، همچنین اتساع دستگاه گلژی و میتوکندریها به صورتیکه تیغه های داخلی میتوکندری ها در پاره ای از موارد دچار تخریب شده بودند (نگاره ۱۰ و ۱۳). در هسته نیز تغییراتی به صورت چروکیده شدن هسته و مرز نشینی کروماتین هسته

= D (AI) (BI)

Glu AI										Glu BI	شماره
10AI	9AI	8AI	7AI	6AI	5AI	4AI	3AI	2AI	1AI		
۱۰۲	۱۰۰	۱۱۰	۱۲۰	۱۱۳	۸۰	۱۰۶	۱۰۰	۹۰	۷۶	۹۷	۱
--	--	--	--	--	--	--	D	۶۲	۶۳	۶۱	۲
۱۰۰	۹۱	۱۰۰	۱۲۰	۱۲۲	۸۷	۱۰۲	۱۱۰	۱۱۶	۱۲۴	۹۴	۳
۱۰۷	۱۱۵	۱۳۰	۱۲۷	۱۱۸	۱۲۱	۱۳۲	۱۲۷	۱۲۶	۱۲۴	۱۱۲	۴
۱۰۵	۱۰۳	۱۰۰	۱۱۵	۹۰	۹۵	۱۱۰	۱۰۲	۱۰۰	۹۰	۱۰۲	۵
--	--	--	D	۹۷	۱۱۲	۱۰۰	۱۰۲	۱۰۷	۱۰۴	۱۰۰	۶
۸۵	۷۹	۸۷	۸۳	۹۲	۱۰۰	۸۵	۸۳	۹۰	۹۵	۷۰	۷
--	--	--	--	D	۱۰۲	۹۵	۱۰۳	۱۱۶	۱۱۰	۱۰۴	۸
۱۰۰	۱۰۷	۱۰۲	۹۹	۸۵	۱۱۰	۱۰۴	۹۵	۱۰۲	۱۰۷	۱۰۵	۹
۱۰۷	۹۸	۱۱۷	۱۲۰	۱۱۵	۱۱۲	۱۳۰	۱۲۱	۱۲۰	۱۱۵	۱۱۰	۱۰
--	--	--	--	--	--	--	--	--	D	۳۰	۱۱
۱۰۰	۱۰۶	۱۱۵	۹۷	۱۱۲	۱۱۰	۹۸	۱۱۲	۱۰۲	۱۰۰	۹۵	۱۲
۱۰۹	۱۱۵	۱۲۷	۱۲۰	۱۰۷	۱۱۰	۱۰۳	۱۱۰	۹۵	۱۰۰	۱۱۵	۱۳
۱۱۵	۱۲۴	۱۳۰	۱۱۶	۱۲۶	۹۳	۱۰۷	۱۱۹	۱۲۵	۱۲۲	۱۲۰	۱۴

جدول ۲- میزان گلوکز خون در موشهای ماده قبل از تزریق ویروس تب برفکی (BI) و بعد از تزریق ویروس (AI) - D = موشهای تلف شده در دوره آزمایش

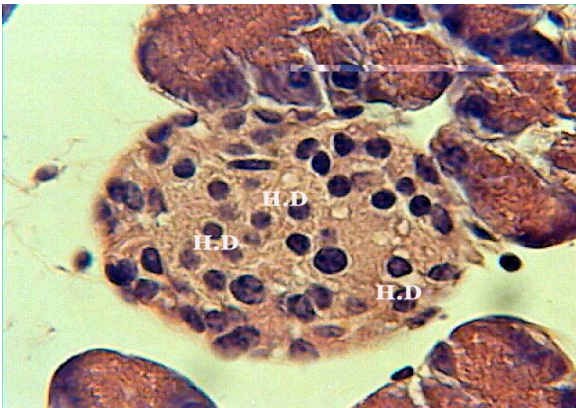
Glu AI										Glu BI	شماره
10AI	9AI	8AI	7AI	6AI	5AI	4AI	3AI	2AI	1AI		
--	--	--	--	--	D	۸۲	۸۰	۷۳	۶۷	۵۶	۱
۷۶	۷۳	۸۲	۷۸	۷۵	۹۷	۱۰۴	۱۰۰	۶۰	۱۱۴	۹۲	۲
--	--	--	--	--	D	۵۰	۶۰	۶۳	۱۰۰	۷۵	۳
۸۰	۷۸	۷۵	۸۰	۸۳	۱۱۲	۱۵	۸۰	۶۸	۱۰۰	۵۸	۴
۸۲	۷۶	۸۳	۸۰	۸۴	۷۹	۸۸	۷۵	۷۱	۱۰۳	۷۰	۵
--	--	--	D	۷۷	۸۳	۸۰	۷۹	۷۲	۶۴	۵۷	۶
--	--	--	--	D	۶۰	۵۸	۶۲	۶۴	۸۵	۷۲	۷
--	--	--	--	D	۸۸	۹۷	۹۰	۶۵	۱۰۰	۹۰	۸
--	--	D	۷۵	۸۱	۸۷	۸۰	۷۵	۷۰	۱۰۲	۶۰	۹
--	--	--	D	۸۲	۷۵	۸۰	۷۲	۷۳	۱۰۰	۷۴	۱۰
۷۳	۸۲	۷۶	۸۰	۸۷	۵۲	۷۰	۷۵	۸۰	۹۴	۵۵	۱۱
۶۷	۷۰	۶۷	۷۱	۷۵	۷۲	۷۰	۶۵	۷۲	۸۳	۶۰	۱۲
۷۲	۷۰	۷۶	۸۷	۸۳	۷۲	۶۵	۵۳	۷۱	۷۰	۶۳	۱۳
۷۲	۷۰	۷۶	۸۷	۹۰	۸۳	۷۸	۷۵	۸۰	۷۹	۷۰	۱۴

<i>pair</i>		<i>Mean</i>	<i>Std.Deviation</i>				
Pair 1	gbi - g1	-5.30000	15.12210	Pair 37	g4 - g7	-7.71429	14.51108
Pair 2	gbi - g2	-7.40000	9.93535	Pair 38	g4 - g8	-2.28571	13.09853
Pair 3	gbi - g3	-10.88889	23.04042	Pair 39	g4 - g9	5.28571	14.33776
Pair 4	gbi - g4	-13.22222	19.73435	Pair 40	g4 - g10	3.42857	14.03397
Pair 5	gbi - g5	-8.22222	17.97066	Pair 41	g5 - g6	-3.12500	20.25860
Pair 6	gbi - g6	-11.50000	25.11118	Pair 42	g5 - g7	-12.42857	23.12904
Pair 7	gbi - g7	-21.14286	28.40439	Pair 43	g5 - g8	-7.00000	16.76305
Pair 8	gbi - g8	-15.71429	25.29634	Pair 44	g5 - g9	.57143	16.67190
Pair 9	gbi - g9	-8.14286	19.70134	Pair 45	g5 - g10	-1.28571	16.79002
Pair 10	gbi - g10	-10.00000	21.29945	Pair 46	g6 - g7	-9.57143	16.26712
Pair 11	g1 - g2	-2.10000	6.99921	Pair 47	g6 - g8	-4.14286	17.51598
Pair 12	g1 - g3	-5.55556	22.55610	Pair 48	g6 - g9	3.42857	17.99868
Pair 13	g1 - g4	-7.88889	19.83333	Pair 49	g6 - g10	1.57143	16.46063
Pair 14	g1 - g5	-2.88889	15.57598	Pair 50	g7 - g8	5.42857	9.67569
Pair 15	g1 - g6	-5.75000	29.50908	Pair 51	g7 - g9	13.00000	12.31530
Pair 16	g1 - g7	-15.42857	26.79463	Pair 52	g7 - g10	11.14286	9.38844
Pair 17	g1 - g8	-10.00000	22.11334	Pair 53	g8 - g9	7.57143	8.79123
Pair 18	g1 - g9	-2.42857	18.16459	Pair 54	g8 - g10	5.71429	9.10521
Pair 19	g1 - g10	-4.28571	21.41428	Pair 55	g9 - g10	-1.85714	7.01020
Pair 20	g2 - g3	-3.77778	23.77908				
Pair 21	g2 - g4	-6.11111	20.82333				
Pair 22	g2 - g5	-1.11111	16.48063				
Pair 23	g2 - g6	-3.12500	28.31172				
Pair 24	g2 - g7	-13.28571	27.45733				
Pair 25	g2 - g8	-7.85714	23.11874				
Pair 26	g2 - g9	-.28571	18.14492				
Pair 27	g2 - g10	-2.14286	20.97958				
Pair 28	g3 - g4	-2.33333	6.83740				
Pair 29	g3 - g5	2.66667	14.34399				
Pair 30	g3 - g6	-1.25000	13.91556				
Pair 31	g3 - g7	-8.14286	13.60672				
Pair 32	g3 - g8	-2.71429	12.53946				
Pair 33	g3 - g9	4.85714	15.65704				
Pair 34	g3 - g10	3.00000	13.19091				
Pair 35	g4 - g5	5.00000	15.00000				
Pair 36	g4 - g6	.25000	13.75032				

(:gbi - :g)

<i>pair</i>		<i>Mean</i>	<i>Std. Deviation</i>
Pair 1	gbi - g1	-23.10000	12.93101
Pair 2	gbi - g2	2.50000	16.70163
Pair 3	gbi - g3	-6.90000	13.78768
Pair 4	gbi - g4	-13.00000	22.45489
Pair 5	gbi - g5	-13.87500	19.61368
Pair 6	gbi - g6	-12.33333	11.97776
Pair 7	gbi - g7	-8.00000	15.12173
Pair 8	gbi - g8	-5.66667	21.59475
Pair 9	gbi - g9	-1.33333	15.50269
Pair 10	gbi - g10	-5.00000	16.09348
Pair 11	g1 - g2	25.60000	19.14390
Pair 12	g1 - g3	16.20000	17.92453
Pair 13	g1 - g4	10.10000	21.42921
Pair 14	g1 - g5	6.50000	24.92847
Pair 15	g1 - g6	11.00000	19.45251
Pair 16	g1 - g7	17.00000	19.54482
Pair 17	g1 - g8	13.66667	27.15388
Pair 18	g1 - g9	18.00000	21.63331
Pair 19	g1 - g10	14.33333	21.73323
Pair 20	g2 - g3	-9.40000	13.49238
Pair 21	g2 - g4	-15.50000	19.87321
Pair 22	g2 - g5	-18.12500	17.48009
Pair 23	g2 - g6	-12.50000	7.96869
Pair 24	g2 - g7	-12.25000	7.36546
Pair 25	g2 - g8	-14.66667	5.50757
Pair 26	g2 - g9	-10.33333	9.29157
Pair 27	g2 - g10	-14.00000	9.53939

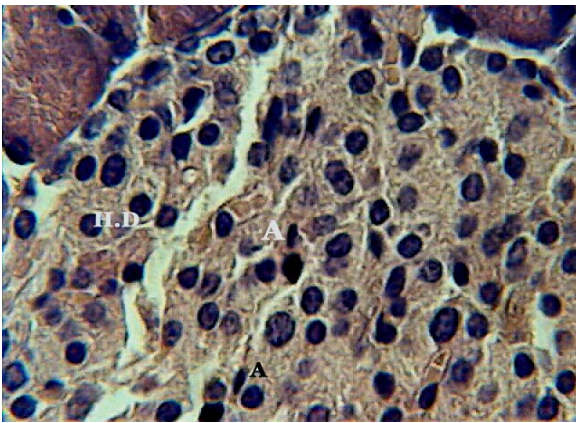
Pair 28	g3 - g4	-6.10000	12.00417
Pair 29	g3 - g5	-6.87500	15.02795
Pair 30	g3 - g6	-1.33333	13.66260
Pair 31	g3 - g7	1.75000	16.50000
Pair 32	g3 - g8	.00000	24.06242
Pair 33	g3 - g9	4.33333	19.13984
Pair 34	g3 - g10	.66667	21.19748
Pair 35	g4 - g5	-.87500	24.84488
Pair 36	g4 - g6	6.16667	24.14470
Pair 37	g4 - g7	9.50000	30.17173
Pair 38	g4 - g8	-1.33333	31.02150
Pair 39	g4 - g9	3.00000	26.51415
Pair 40	g4 - g10	-.66667	28.58904
Pair 41	g5 - g6	6.16667	18.08222
Pair 42	g5 - g7	14.50000	14.24781
Pair 43	g5 - g8	16.00000	20.51828
Pair 44	g5 - g9	20.33333	15.82193
Pair 45	g5 - g10	16.66667	17.89786
Pair 46	g6 - g7	1.50000	3.10913
Pair 47	g6 - g8	.66667	7.50555
Pair 48	g6 - g9	5.00000	3.00000
Pair 49	g6 - g10	1.33333	2.08167
Pair 50	g7 - g8	-.66667	4.93288
Pair 51	g7 - g9	3.66667	1.52753
Pair 52	g7 - g10	.00000	2.00000
Pair 53	g8 - g9	4.33333	6.42910
Pair 54	g8 - g10	.66667	5.50757
Pair 55	g9 - g10	-3.66667	2.08167



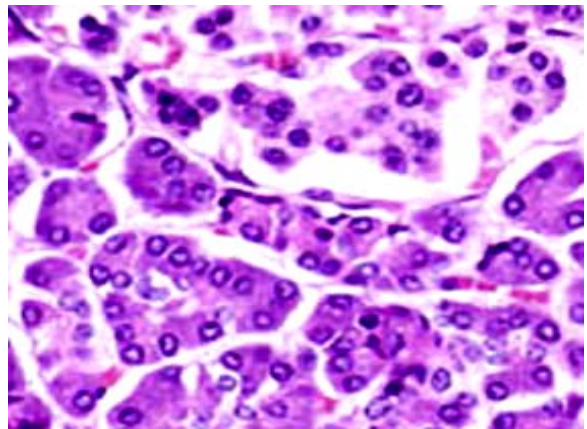
نگاره ۴- منظره ریز بینی جزیره لانگرهانس که در آن دژنراسانس آبکی (H.D) سلولهای بتا مشاهده می گردد. H&E ، ۴۰۰*



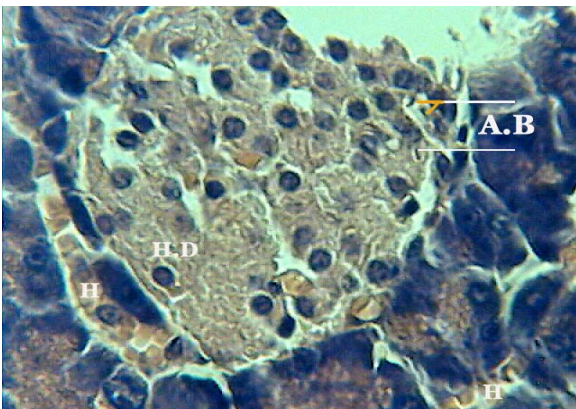
نگاره ۱- حالت ظاهری موش F1 چهار روز بعد از تزریق ویروس. موش کاملا افسرده و ضعیف شده است. این موش در روز پنجم بعد از تلقیح، تلف گردید.



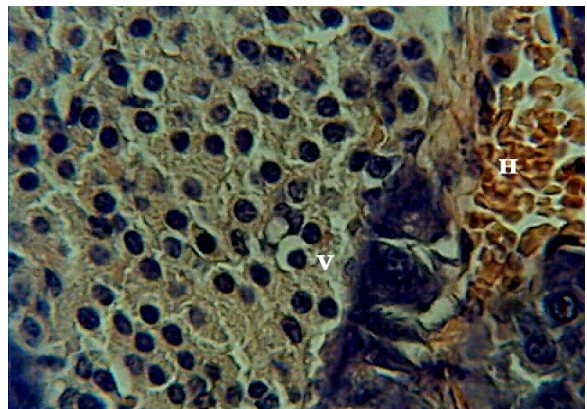
نگاره ۵- منظره ریز بینی از یک جزیره لانگرهانس که در آن آپوپتوز سلولهای بتا (A) به صورت متراکم شدن و چروکیدگی هسته به همراه اتوزینوفیلیک شدن سیتوپلاسم و همچنین دژنراسانس آبکی دیده می شود. H&E ، ۴۰۰*



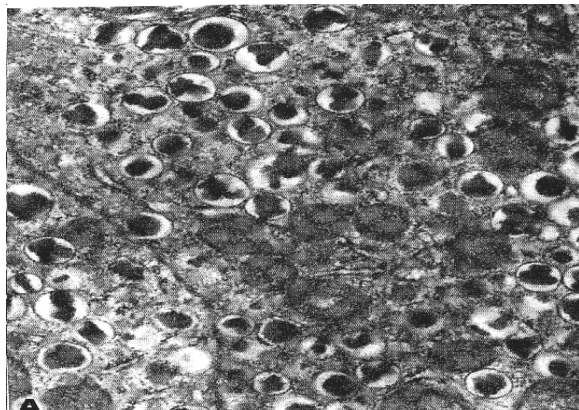
نگاره ۲- نمای ریز بینی مربوط به پانکراس موش F13 (کنترل)؛ H&E ، ۴۰۰*



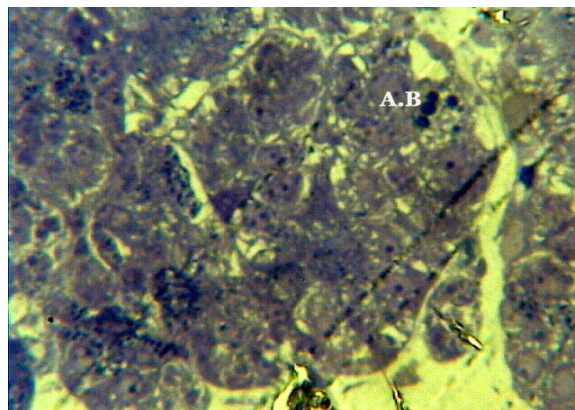
نگاره ۶- منظره ریز بینی از یک جزیره لانگرهانس که در آن آپوپتوز سلولهای بتا به صورت اجسام آپوپتیک (A.B) همرا با پر خونی (H) و دژنراسانس آبکی (H.D) و کاهش در تعداد سلولهای جزایر دیده می شود. H&E ، ۴۰۰*



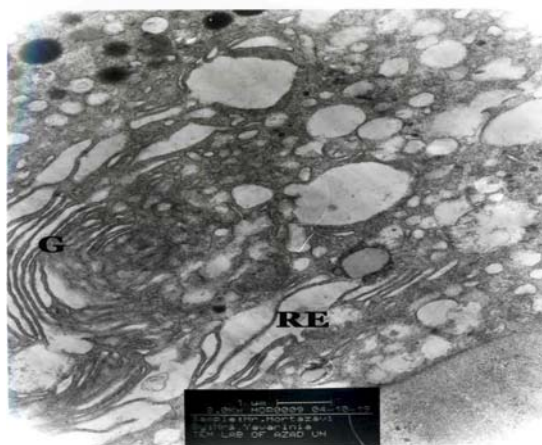
نگاره ۳- نمای ریز بینی پانکراس مربوط به موش F1. هایپر کروماتین شدن و واکونوله شدن سلول بتا (V) و پر خونی (H) مشاهده می شود. H&E ، ۴۰۰*



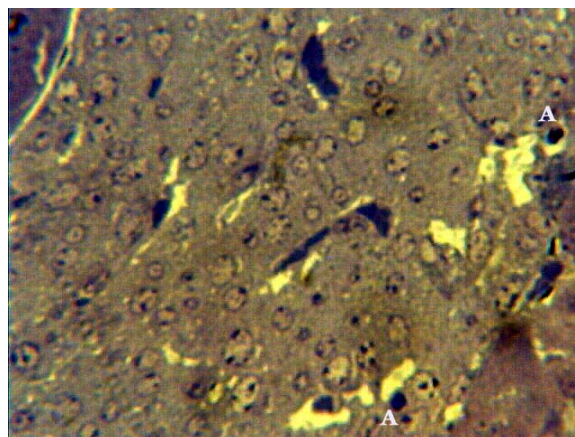
نگاره ۹- B - قسمتهایی از سلول آلفا (سمت چپ) و سلول دلتا (سمت راست) که حاوی گرانول هستند. سلولهای آلفا دارای گرانولهایی با مرکز گرد و مدور هستند (گروه کنترل)



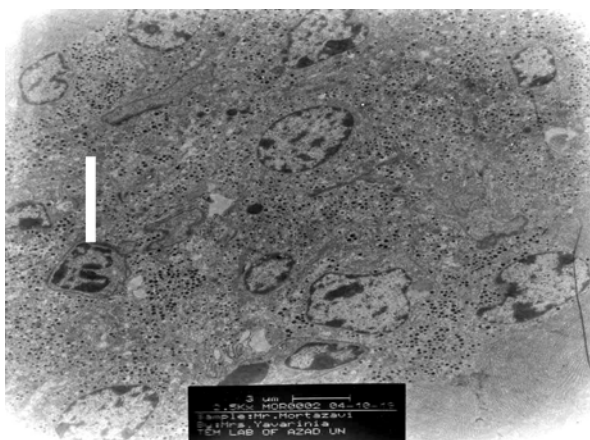
نگاره ۷- منظره ریز بینی مربوط به بخشی از ناحیه اگزوکراین. اجسام آپوینیک (AB) به صورت اجسام کاملا متراکم و تیره رنگ مشاهده می شوند Toloiden Blue ، *۱۰۰



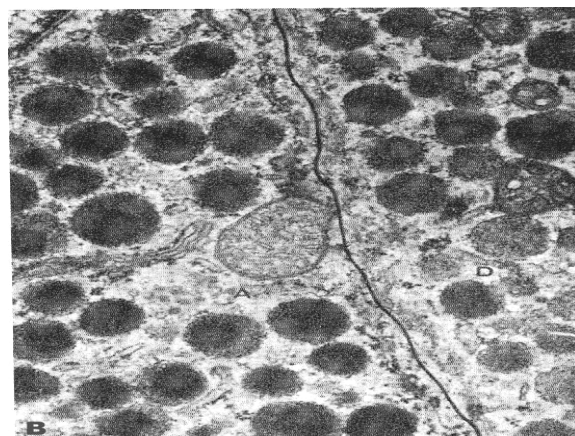
نگاره ۱۰ - میکرو گراف الکترونی از یک سلول آسینار. واکوئولاسیون شدید در تمامی ارگانها از جمله دستگاه گلژی (G) و رتیکیولانده و پلاسمیک (RE) مشاهده می شود. * ۸۰۰۰



نگاره ۸- منظره ریز بینی مربوط به بخشی از یک جزیره لانگرهانس که در آن آپوتوز (A) همراه با دژنراسانس آپکی سیتوپلاسم دیده می شود Toloiden Blue ، * ۴۰۰



نگاره ۱۱ - میکرو گراف الکترونی از یک جزیره لانگرهانس. چروکیده شدن هسته و سیتوپلاسم و مرز نشینی کروماتین در زیر غشاء هسته دیده می شود که مرحله اولیه آپوتوز است. * ۲۵۰۰



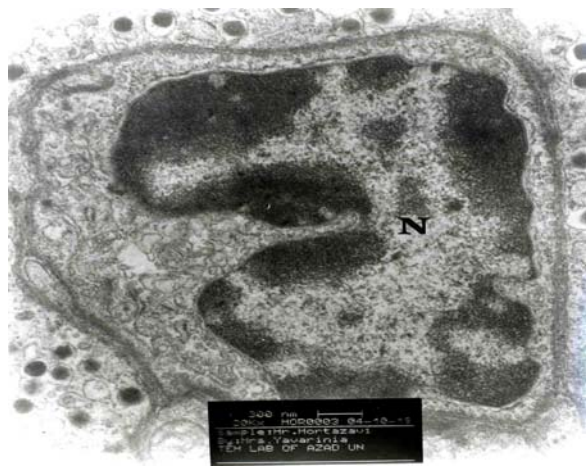
نگاره ۹- A - تصویر میکروسکوپ الکترونی از سلولهای بتا که گرانولهای متصل به غشا را نشان می دهد، که هر کدام حاوی هسته ای تیره رنگ و اغلب مستطیلی شکل و یک هاله مشخص هستند.

برفکی در موشها را به صورت پانکراتیت نکروزان در نواحی آگزوکراین همراه با پرخونی ، ادم و ارتشاح لکوسیت‌های چند هسته ای در فضای بینابینی ناحیه آسینار گزارش شده است. در این تحقیق مشاهده شد هنگامی که موشهای آلوده با مقادیر متغیری از لیدوکائین تحت درمان قرار گرفتند. از میزان نکروز و ارتشاح آماسی کاسته شد (۱۲،۱۳).

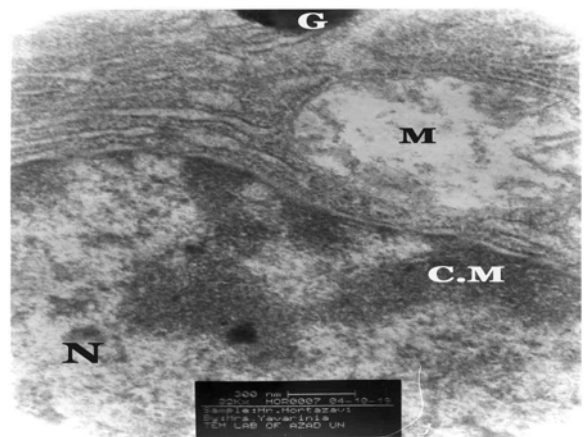
همچنین در یک بررسی که توسط فرناندز (Fernandez) و همکاران (۱۹۸۵) بر روی موشهای Balb/cj که به صورت تجربی با ویروسی بیماری تب برفکی آلوده شده بودند صورت گرفت، ضایعات پانکراس به صورت تورم پانکراس ۲۴ ساعت بعد از تزریق ویروس گزارش گردید. به طوری که وزن پانکراس به دو برابر میزان طبیعی خودش رسید ولی این حالت ۴۸ ساعت بعد از آلودگی تخفیف یافت. آنها پیشنهاد کردند که سلولهای آسینی از تکثیر ویروسی حمایت می کنند در صورتی که بافت اندوکراین به صورت غیر آلوده باقی می ماند (۹).

در بررسی که ما انجام دادیم همانطور که در قسمت نتایج نیز ذکر شده تغییرات پاتولوژیکی هم در قسمت اندوکراین و هم در قسمت آگزوکراین پانکراس مشاهده گردید. این جراحات به صورت آپوپتوز سلولهای جزایر لانگرهانس که در اکثر موارد از نوع سلولهای بتا بودند همچنین آپوپتوز سلولهای آسینار در قسمت آگزوکراین همراه با تورم سلولی و واکوئوله شدن سلولها چه در قسمت آگزوکراین و چه در قسمت اندوکراین همراه با پرخونی مشاهده گردید.

از آن جایی که هیچ پاسخ آماسی در این جراحات دیده نشد پس سلولهای تخریب شده دچار نکروز نشده اند و تماماً دچار آپوپتوز گردیده اند. چون یکی از تفاوت‌های اساسی بین نکروز و آپوپتوز در برانگیختن پاسخهای آماسی است. به طوریکه آپوپتوز باعث برانگیختن هیچگونه پاسخ آماسی نمی شود در حالیکه نکروز باعث برانگیختن



نگاره ۱۲- میکرو گراف الکترونی از همان سلول بتا که در شکل ۲۵ دیده می شد. مرز نشینی کروماتین هسته (N) همراه با واکوئولاسیون اندامکهای سیتوپلاسم و دگرانولاسیون گرانولهای ترشح کننده انسولین دیده می شود. در اطراف این سلول ، چند سلول بتای دیگر با گرانولهای بایک هسته و هاله روشن در اطراف آنها دیده می شود * ۲۰۰۰۰



نگاره ۱۳ - میکرو گراف الکترونی مربوط به یک سلول آسینی که در آن مرز نشینی کروماتین هسته (C.M) همراه با اتساع واز بین رفتن سبغ های میتوکندری (M) دیده می شود * ۳۲۰۰۰

تحقیقات خیلی کمی در مورد ارتباط ویروس تب برفکی با بروز دیابت صورت گرفته است. یک گزارش در مورد وقوع دیابت ملیتوس در گاوها ناشی از بیماری تب برفکی به صورت تجربی توسط باربونی (Barboni) و همکاران (۱۹۶۶) در ایتالیا وجود دارد (۵).

در تحقیق دیگری که توسط پورتیانسکی (Portiansky) و همکاران (۱۹۹۵) در آرژانتین انجام گرفت، ضایعات ایجاد شده در پانکراس توسط آلودگی تجربی با ویروس تب

تخریب سلولهای بتا بایستی به حدی باشد که سلولهای باقیمانده نتوانند جبران قسمتهای از دست رفته را بنمایند. همانطور که در قسمت نتایج هم ذکر گردید در برخی از روزهای بعد از آلودگی میزان افزایش گلوکز خون معنی دار بوده است بطوریکه میزان گلوکز خون در روزهای چهارم تا هشتم بعد از تزریق نسبت به روز دوم بعد از تزریق افزایش معنی داری داشته است. البته در گروه ماده ها گلوکز روز اول بعد از تزریق نسبت به گلوکز روز قبل از تزریق افزایش داشته و در گروه نرها گلوکز روز دوم بعد از تزریق نسبت به روز قبل تزریق افزایش معنی داری داشته است که احتمال دارد به علت استرس وارده در اثر تزریق باشد که باعث آزاد شدن گلوکوکورتیکوئیدها از جمله کورتیزون و بالا رفتن میزان گلوکز خون می شود. البته در تحقیقی که توسط فرناندز و همکاران (۱۹۸۵) صورت گرفت، تیترا بالای ویروس در خون و پانکراس موشهای Balb/cj آلوده به ویروس تب برفکی (استرین O) ۱۲-۲۴ ساعت بعد از آلودگی شناسایی شد که تا ۴۸ ساعت بعد از آلودگی این تیترا بالا باقی ماند. پس احتمال اینکه تخریب سلولهای بتا از همان ساعات اولیه بعد از آلودگی (۱۲-۲۴ ساعت) ایجاد شود وجود دارد.

همانطور که ذکر گردید در تحقیق پرل و همکاران (۱۹۸۹) با عفونت تجربی ویروس بیماری تب برفکی، دیابت ملیتوس مشاهده گردید. پرل و همکاران ویروس تب برفکی را به صورت تلقیح داخل پوستی بین سم و یا بوسیله تماس، در آهو، علائم برجسته بالینی مشاهده گردید. از ۸ آهو که مورد بررسی تجربی قرار گرفته بودند ۴ رأس در ظرف مدت ۱۵ روز و ۲ رأس با بروز بیماری مزمن در عرض ۱۱۴ تا ۱۱۷ روز مردند و ۲ رأس هنوز زنده بودند. از ۶ رأس آهوئی که مرده بودند ۲ رأس بیماری مزمن را نشان دادند و تغییرات قابل توجه در پانکراس آنها مشاهده شد که اشاره به مرگ حیوانات در اثر دیابت ملیتوس می نمود، زیرا هر دو بافت آگزوکراین و اندوکراین آتروفی شده

پاسخهای آماسی می شود. از طرف دیگر آپوپتوز به صورت انفرادی یا در دستجات کوچک سلولها ایجاد می شود ولی نکرور در گروه وسیعی از سلولها ایجاد می شود. سلولهای آپوپتیک بصورت توده های گرد یا بیضی، متشکل از سیتوپلاسم ائوزینوفیلیک و ایجاد اجسام آپوپتوتیک بسیار سریع روی می دهد و قطعات مزبور بسرعت فاگوسیتیه و تخریب می شوند، ممکن است آپوپتوز قابل ملاحظه ای در بافت رخ داده باشد قبل از اینکه تغییرات بافت در برشهای بافتی قابل مشاهده گردد. علاوه بر این چون آپوپتوز بر خلاف نکرور باعث برانگیختن آماس نمی شود، بنابراین یافتن آن را مشکلتر می سازد.

البته رنگ آمیزی اختصاصی برای مشاهده سلولهای آپوپتوتیک وجود دارد که (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase – Mediated duTP nik end labeling) نام دارد. البته در این تحقیق به علت محدودیتهای مالی قادر به استفاده از این روش نشدیم. به طور کلی مکانیسم هایی که باعث تخریب سلولهای بتا توسط ویروسها می شود به دو گروه عمده تقسیم می شوند. الف - اثر مستقیم عفونت ویروسی بر سلولهای بتا که یا با عث نکرور و یا آپوپتوز در سلولهای بتا می شود و از این طریق باعث ایجاد دیابت می شود.

ب - اثرات غیر مستقیم و با واسطه ایمنی به طور مثال مکانیسم پیشنهادی در ایجاد دیابت ملیتوس توسط BVD-MD در گاو را پاسخهای خود ایمنی نسبت به سلولهای بتا ذکر کرده اند (۱۰).

در رابطه با تخریب سلولهای بتا بایستی این نکته را یادآوری کرد که میزان این تخریب باید به میزانی باشد که سلولهای باقی مانده قادر به جبران قسمتهای از دست رفته نشوند.

در تحقیق حاضر با وجود آنکه سلولهای بتا در اثر آپوپتوز دچار تخریب شده بودند ولی علائم بالینی دیابت مشاهده نگردید یکی از دلایل آن این است که میزان این تخریب وسیع نبوده و همانطور که در بالا هم گفته شد میزان

باقی می ماند و نسبت به مواد محلول طبیعی داخل سلول نفوذ پذیر می شوند. این توصیف کلاسیک در مورد آپوپتوز در طی شرایط فیزیولوژیک مثل رویانسازی و حذف سلولهای ایمنی صدق می کند. با اینحال اشکال بینابینی مرگ سلولی با ویژگی هایی از نکروز و آپوپتوز بعد از محرکهای آزار رسان کمیاب نیستند. این اشکال توسط وایلی (Wyllie) بعنوان نکروز ثانویه (Secondary necrosis) توصیف شده اند. تحت چنین شرایطی شدت آزار است که شکل مرگ سلولی را تعیین می کند، تا نوع آزار. اگر ویژگی های نکروتیک غالب باشند، در مراحل زودرس صدمه غشایی رخ میدهد و متعاقب آن بیشتر تورم سلولی بروز می کند تا چروکیدگی سلول (۲).

در مورد ویروس تب برفکی نیز ممکن است این حالت صدق کند به صورتی که اگر حدت ویروس پائین باشد یا سلولها مقاومتی نسبت به ویروس داشته باشند سلولها متحمل آپوپتوز می شوند و در صورتی که حدت ویروس بالا بوده و سلولها به ویروس حساس باشند متحمل نکروز می شوند. چون موشهای بالغ در حالت عادی به ویروس تب برفکی مقاوم هستند و در این تحقیق ما توسط سیکلوفسفامید آنها را تضعیف ایمنی کرده و بعد آلوده کرده ایم امکان دارد که در موشها البته بسته به نوع استرین ویروس، جراحات از آپوپتوز تا نکروز متغیر باشد. البته تحقیقات بیشتری در این ارتباط لازم می باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می دانند از زحمات و همکاریهای آقایان محمد عابدی ؛ رضا عصاره و رضا محسنیان و سرکار خانمها پورحسین و مرید در مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات و همچنین آقایان حسن زاده و صادقی در آزمایشگاه مرکز تشخیص اداره کل دامپزشکی استان تهران تشکر و قدردانی نمایند.

بودند و به علاوه نکروز آسینی و فقدان گرانولهای زیموژن را نیز نشان می دادند ، همچنین یکی از حیوانات فاقد جزایر لانگرهانس بود (۱۱).

در بررسی حاضر که بر روی موشها صورت گرفت، مشاهدات میکروسکوپ الکترونی با یافته هایی که با میکروسکوپ نوری انجام گرفت هماهنگی داشت. این یافته ها شامل اتساع توری اندوپلاسمیک و میتوکندری ها، از هم گسیختگی تیغه های میتوکندری ها، مرز نشینی و تجمع کروماتین در امتداد غشاء هسته و تشکیل برجستگی ها یا تاولهایی از سطح غشاء هسته که در آن کروماتین به صورت دنس مشاهده می شد و همچنین چروکیدگی و آتروفی هسته ها و دگرانولیشن سلولهای بتا بود که تماماً نشان دهنده تورم سلولی، و اکوتوله شدن و آپوپتوز در سلولها بود.

با توجه به مطالبی که در بالا ذکر گردید و تحقیقات بسیار کمی که در رابطه با ارتباط ویروس تب برفکی با بروز دیابت در حیوانات وجود دارد می توان گفت که نتایجی که در این تحقیق بدست آمد به طور کامل با یافته های محققین دیگر هماهنگی ندارد. تنها موردی که در تمامی تحقیقات مشترک می باشد، اسیب سلولهای آسینی پانکراس به صورت دژنرانس آبکی و تورم سلولی می باشد. در تحقیقات فرناندز هیچگونه آثاری از نکروز در سلولهای جزایر لانگرهانس و سلولهای آسینی مشاهده نشد ولی در تحقیقات پورتیانسکی و همکاران (۱۹۹۵) و همچنین پرل و همکاران (۱۹۸۹) نکروز در سلولهای آسینی و جزایر لانگرهانس دیده شد. در تحقیق ما که بر روی موشها صورت گرفت نشانه ای از نکروز دیده نشد ولی آپوپتوز سلولهای بتا و سلولهای آسینی به طور کاملاً مشهود، مشاهده گردید (۹،۱۱،۱۲).

در مورد آپوپتوز بایستی این توضیح را داد که غشاهای پلاسمایی در هنگام آپوپتوز تا مراحل آخر دست نخورده

فهرست منابع

- (1993), Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered nonstructural viral antigens. *American Journal of Veterinary Research*, 54, pp. 825–831.
8. Cottral .G.E, (1969), Persistence of foot-and-mouth disease virus in animals, their products and the environment. *Bulletin de l'Office International des Épizooties* ,70, pp. 549–568
9. Fernandez . F.M ,Borca . MV, Sadir.AM,Fondevila.N,(1986),Foot and Mouth Disease Virus(FMDV) experimental infection:Susceptibility and immune response of adult mice,*Veterinary Microbiology* , 12,p.15-24
10. Jaeckel .E,Manns.M and Von Herrath.M,(2002),Virus and diabetes.*Ann.N.Y.Acad.Sci*,958,pp.7-25
11. Perl..S,Yadin.H,Yakobson.B,Zuckerman. E,Orgad.U,(1989),Pathological changes in mountain gazelles challenged with FMD virus ,with special reffrence to pancreatic lesions.*Revue scientifique et technique office international des epizootis*,8(3)pp.765-769
12. Portiansky.EL,DiGirolamo.WM,Laguens .RP, (1989),Protective and immunostimulating activity of a low dose of cyclophosphamide in the experimental infection of mice with foot-and-mouth disease virus. *Experientia*, 45(1),pp.110-112
13. Portiansky .EL, Gonzalez. PH,(1995), Protective effect of lidocaine in the experimental foot-and-mouth disease pancreatitis. *Experientia.*, 51(11),pp.1060-1062.
۱. جمشیدیان قلعه شاهی .ع. (۱۳۷۷) بررسی ضایعات هیستوپاتولوژیک دیابت ملیتوس ایجاد شده بوسیله آلوکسان در بز و کبوتر و ارزیابی حساسیت کبوتر دیابتی نسبت به بروز بیماری کریپتوکوکوزیس، پایان نامه جهت دریافت دکتری تخصصی پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره ثبت: ۶۳
۲. عبدی راد.ا.ا.احدی.ن.قاضی جهانی.ب.، مهدی.غ. (۱۳۷۸) رایبیز، پایه آسیب شناسی بیماریها، انتشارات چهر، جلد اول و دوم، چاپ ششم، ص ۲۷-۲۴ و ص ۱۳۱۸-۱۲۹۹
3. Alexandersen. S, Kitching .R.P, Mansley .L.M and Donaldson .A.I., (2003), Clinical and laboratory investigations of five outbreaks during the early stages of the 2001 foot-and-mouth disease epidemic in the United Kingdom. *Veterinary Record* 152, pp. 489–496.
4. Alexandersen. S, Zhang .Z, Donaldson.A.I and Garland . A.J.M, (2003), The pathogenesis and diagnosis of Foot and Mouth Disease , *Journal of Comparative Pathology* ,129, pp. 1–36.
5. Barboni. E, Manocchio. I, Asdrubali .G,(1966), Observations on diabetes in cattle due to experimental epizootic apthae (Preliminary note). *Nuovi Ann Ig Microbiol*, 17(3),pp.223-226.
6. Belsham .G.J, (1993), Distinctive features of foot-and-mouth disease virus, a member of the picornavirus family; aspects of virus protein synthesis, protein processing and structure. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* ,60, pp. 241–260.
7. Bergmann. I.E, de Mello P.A, Neitzert. E,

14.Tajima.M,Yazawa.T,Hagiwara.K,(1992),
Diabetes mellitus in cattle infected with
bovine viral diarrhoea mucosal disease
virus.Journal of Veterinary
Medicine,39(8),pp.616-620

15.Taniyama.H,Usiki.T, Tajima.M,(1995),
Spontaneous diabetes mellitus associated
with persistent bovine viral diarrhoea virus
infection in young cattle.Veterinary
Pathology,32(3),pp.221-229

16.Tontis.A,Wittwer.F, (1986), Spontaneous
diabetes mellitus in dizygous female twin
calves.Schweizer archive fur
tierheilkunde,128(9),pp.475-482