

مطالعه آزمایشی آپوپتوزیس القا شده توسط ویروس عامل بیماری بورس عفونی به روش تانل

دکتر یوسف دوستار^{۱*} دکتر رضا نقشینه^۲ دکتر رضا طروقی^۳ دکتر مهرداد هاشمی^۴ دکتر رضا رهبر قاضی جهانی^۵

دریافت مقاله: ۹ اسفندماه ۱۳۸۲
پذیرش نهایی: ۱۸ شهریور ۱۳۸۳

Experimental Study of Apoptosis Induced by Infectious Bursal Disease Virus, Using TUNEL Assay.

Doustar, Y.¹, Nahgshineh, R.², Toroghi, R.³, Hashemi, M.⁴, Rahbar, R.⁵

¹Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Azad University of Tabriz, Tabriz-Iran. ²Department of Pathobiology Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran -Iran. ³Department of Poultry Sciences, Razi Vaccine & Serum Research Institute, ⁴Department of Molecular & Cellular Genetics, Tehran Medical Unit and Research Campus, Unit of Islamic Azad University.

Objective: The purpose of the present *in vivo* study was to evaluate correlation of the virulence of the infectious bursal disease virus with the rate of apoptotic changes of the immature B lymphocytes in Bursa Fabricius (BF) and lymphoid cells of spleen.

Design: Experimental study.

Animals: 21-day-old SPF chicks of leghorn breed

Procedures: 90 chicks were divided into three groups (TEST-IBDV, TEST -VAC and Control) of 30 chicks each. inoculation of the TEST-IBDV, TEST -VAC and Control groups were done with IR-499 serotype of high-virulence infectious bursal disease Virus (VIBDV), D78 intermediate vaccine and normal saline, respectively. Furthermore, 20 chicks were categorized into two groups (Test and Control) of 10 chicks each. Test and Control groups were inoculated with VIBDV and normal saline, respectively. 3 days after inoculation, samples of BF and splenic tissues were sent to Pathology Lab for LM, H&E staining and TUNEL studies.

Statistical analysis: Kruskal-Wallis, ANOVA and Mann-Whitney test.

Results: LM and H&E staining showed many significant differences among groups. Furthermore, we showed VP2&VP5, INF-gamma and TNF-alpha were the major inductive factors for development of apoptosis in the immature B lymphocytes of BF and spleen.

Discussion: The present *in vivo* research showed that there is always a significant correlation between the virulence of the virus and the rate of apoptotic changes in the BF tissue. Moreover, apoptosis can be considered as a definite factor in the pathogenesis of infectious bursal disease (IBD).

J.Fac.Vet.Med. Univ. Tehran. 60,4:313-320,2005.

Key words: apoptosis, Gumboro disease, infectious bursal disease.

Corresponding author's email: vetmedoustar@yahoo.com

هدف: ارزیابی ارتباط میزان حدت ویروس عامل بیماری بورس عفونی با شدت تغییرات آپوپتوزیس لنفوسیت‌های B نابالغ در بافت بورس فابریسیوس و سلول‌های لنفوئیدی طحال. طرح: مطالعه تجربی.

حیوانات: خروس‌های ۲۱ روزه SPF لگهورن.

روش: جوجه‌ها به ۳ گروه مطالعاتی اول و دوم تقسیم شدند و با روش قطره چشمی -بینی تلقیح گردیدند. در گروه اول ۳ زیرگروه (TEST-VAC (n=30), TEST-IBDV (n=30) و CONTROL (n=30) مورد مطالعه قرار گرفت. زیرگروه‌ها به ترتیب با ویروس خیلی حاد عامل بیماری بورس عفونی (سویه ۴۹۹-IR)، واکسن اینترمدیت D ۷۸ و سرم نمکی تلقیح شدند. در گروه مطالعاتی دوم جوجه‌ها تحت تلقیح با سویه ۴۹۹-IR (n=10) و سرم نمکی (n=10) قرار گرفتند. سه روز پس از تلقیح و با بروز علائم بالینی از هر دو گروه به ترتیب از بورس فابریسیوس و طحال نمونه برداری بعمل آمد. نمونه‌ها با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - انوزین و روش تانل مورد مطالعه قرار گرفتند.

نتایج: مطالعات رنگ‌آمیزی و تانل حاکی از تغییرات آپوپتوزیس در سلول‌های لنفوسیتی بورس فابریسیوس و طحال در هر دو گروه در مقایسه با کنترل است. آزمون‌های غیر پارامتری اسمیرنوف کولموگروف و کروسکال والیس و آزمون‌های پارامتری تحلیل واریانس آنوا و تعقیبی اختلاف معنی داری را در میانگین تعداد سلول‌های آپوپتوتیک زیرگروه‌های درمانی گروه اول در مقایسه با کنترل نشان می‌دهد (P<0.05). علاوه بر گروه دوم آزمون پارامتری من-ویتنی اختلاف رتبه‌ای تعداد سلول‌ها را در مقایسه با کنترل نشان می‌دهد (P<0.001).

نتیجه‌گیری: در شرایط *in vivo* بین میزان حدت ویروس و شدت تغییرات آپوپتوزیس در بافت‌های بورس فابریسیوس و طحال ارتباط معنی داری وجود دارد. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۴، دوره ۶۰، شماره ۴، ۳۲۰-۳۱۳. واژه‌های کلیدی: آپوپتوزیس، بیماری گامبورو، بیماری بورس عفونی جوجه.

ویروس عامل بیماری بورس عفونی جوجه‌ها و آپوپتوزیس: ویروس عامل بیماری بورس عفونی با تأثیر بر سلول‌های لنفوسیتی B نابالغ در بورس فابریسیوس و طحال باعث تخریب سلولی بافت بورس و طحال در جوجه‌های مبتلا می‌گردد. در مواردی از تخریب بافتی، پاسخ‌های آماسی وجود نداشته و به نظر می‌رسد که در این موارد مکانیسم اساسی تخریب

(۱) گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز - ایران.

(۲) گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(۳) گروه پژوهشی و تشخیصی بیماری‌های طیور موسسه رازی کرج، کرج - ایران.

(۴) دانشکده پزشکی واحد پزشکی تهران و گروه ژنتیک مولکولی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی - ایران.

(۵) دانش آموزانه دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز - ایران.

* نویسنده مسؤول: vetdoustar@yahoo.com

بافتی از طریق آپوپتوزیس باشد (۲). رخداد آپوپتوزیس در سلول‌های آلوده به



جدول ۱- میانگین، انحراف معیار و خطای معیار بدست آمده در گروه‌های آزمایشی و کنترل.

Mean±SEM	Mean±SD	MEAN	Group
۱۴/۶±۰/۴۴۴	۱۴/۶±۲/۴۲۹	۱۴/۶	TEST-IBDV
۳/۶۷±۰/۳۱۸	۳/۶۷±۱/۷۴۰	۳/۶۷	TEST-VAC
۲۴/۲±۱/۷۱	۲۴/۲±۵/۴۷۳	۲۴/۲	TEST GROUP
۰/۵±۰/۱۶۶	۰/۵±۵/۲۷	۰/۵	CONTROL GROUP
۳/۳۷±۰/۲۹۵	۳/۳۷±۱/۶۱۷	۳/۳۷	CONTROL

سلولاریته و پرولیفراسیون سلولی بافت طحال کاسته می‌شود (۱،۳،۱۲،۲۴،۲۵). تداخل ویروس عامل بورس عفونی جوجه‌ها با سلول‌های ماکروفاژی بورس فابریسیوس بصورت ایجاد اثرات سیتوپاتیک می‌باشد که مورد فوق در ایجاد تضعیف سیستم ایمنی بسیار مهم و مؤثر می‌باشد. تغییرات سلول‌های هتروفیلی و ماکروفاژی در بیماری بورس عفونی جوجه‌ها بصورت کاهش توانایی فاگوسیتوز و مهاجرت سلولی است که مزید علت برای تغییرات سرکوب سیستم ایمنی در جوجه‌ها است. هدف این تحقیق عبارت بوده است از ارزیابی *In vivo* ارتباط میزان حدت ویروس عامل بیماری بورس عفونی با شدت تغییرات آپوپتوزیس لنفوسیت‌های B نابالغ در بافت بورس فابریسیوس و سلول‌های لنفوئیدی بافت طحال در جوجه‌های SPF است.

مواد و روش کار

خصوصیات کلی گروه‌های آزمایشی و کنترل عبارت‌اند از: جوجه‌های ۲۱ روزه SPF نژاد لگهورن با جنسیت نر جهت مطالعه انتخاب و همگی در شرایط یکسان نگهداری و تغذیه می‌شدند. جیره غذایی آنها روزانه در داخل فوراستریل شده و آب مصرفی آنها به صورت آب مقطر در اختیار آنها گذاشته می‌شد. تهویه و نور مناسب مشابه شرایط استاندارد نگهداری نیز به طور یکسان برای تمامی اعضای گروه‌های مورد تحقیق تأمین شده بود. فردی که روزانه جهت نگهداری و تغذیه با گروه‌های مورد تحقیق ارتباط داشت از لباس ویژه و استریل استفاده می‌نمود.

آزمایش اول- در مراحل اجرایی آزمایش اول با دو گروه آزمایشی و یک گروه کنترل کار شده است که عناوین آنها به شرح زیر می‌باشد:

۱- گروه اول جوجه‌های SPF بودند که توسط سویه خیلی حاد IR499 تهیه شده از انستیتورازی کرج با دز 10^3 EID50/0.1 c.c به شکل قطره چشمی و بینی به طور آزمایشی آلوده گردیدند. این گروه با عنوان TEST-IBDV نامگذاری شد.

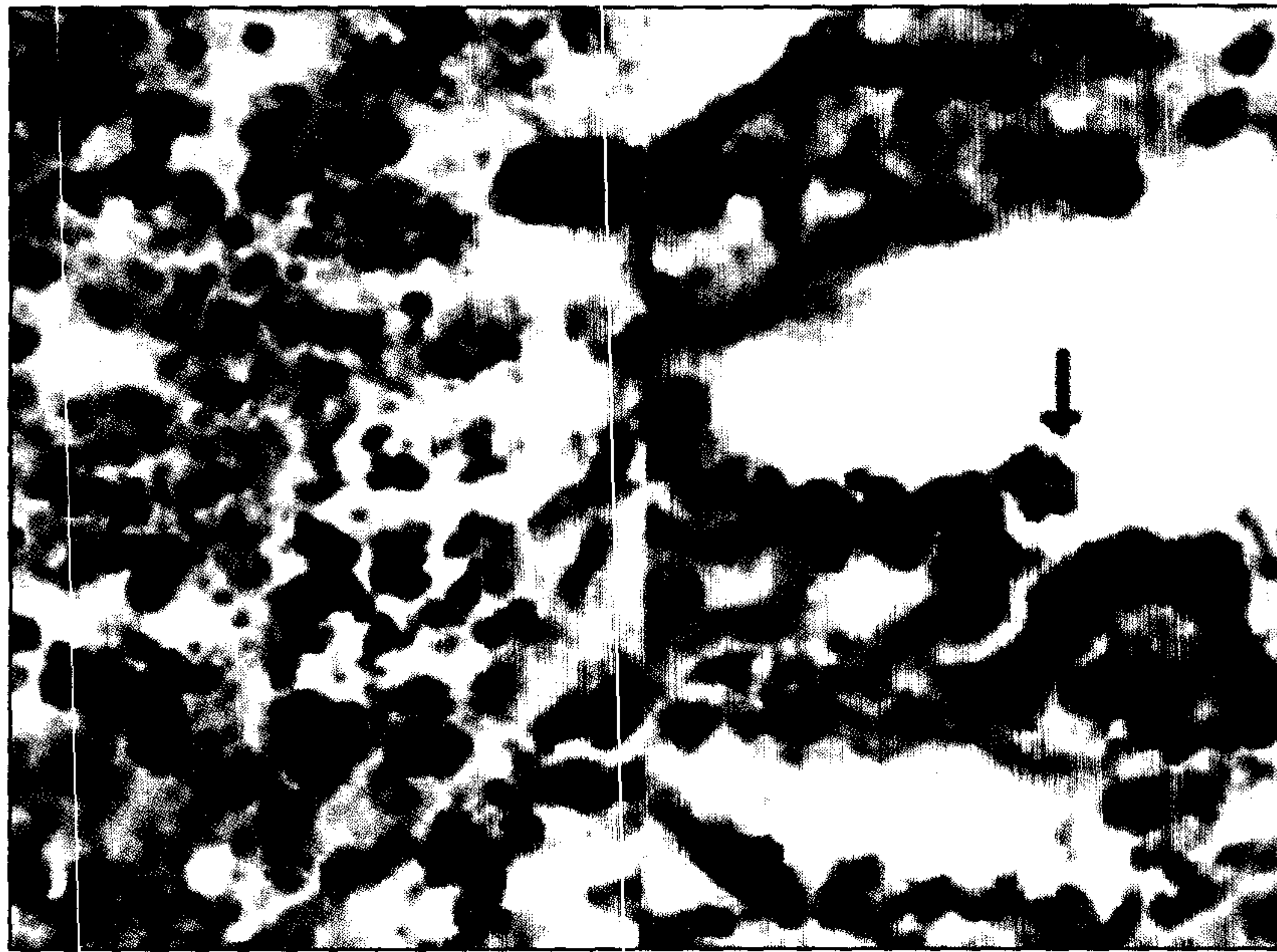
۲- گروه دوم جوجه‌های SPF بودند که تحت واکسیناسیون با واکسن D78 به شکل قطره چشمی و بینی قرار گرفتند. (نوع واکسن مورد استفاده، واکسن D78 اینترمدیت ساخت کشور هلند می‌باشد). این گروه با عنوان TEST-VAC نامگذاری شد.

۳- گروه سوم جوجه‌های SPF بودند که به عنوان گروه کنترل سرم

ویروس می‌تواند در بقاء ویروس و انتشار آن حائز اهمیت باشد زیرا که در سلول‌های آلوده به ویروس سیگنال‌های آپوپتوزیس زمانی آغاز می‌شود که ویروس در انتهای مراحل رپلیکاسیون خود بوده و به دنبال آپوپتوزیس سلول آلوده ذرات ویروسی منتشر و سایر سلول‌ها را آلوده می‌نماید (۲۳). فرآورده‌های ژنی ویروس عامل بیماری بورس عفونی در القای آپوپتوزیس پروتئین‌های VP2 و VP5 می‌باشند. پروتئین‌های یاد شده با مهار بیان ژن‌های خانواده bcl2 باعث القای آپوپتوزیس در سلول‌های آلوده به ویروس می‌شود. فاکتورهای دیگری که احتمال می‌دهند در آپوپتوزیس سلول‌های لنفوسیتی B نابالغ مؤثرند، سیتوکاین‌هایی نظیر $IFN-\gamma$ ، IL-2، TNF- α می‌باشند. این عوامل سیتوکاینی با هدف قرار دادن قابلیت نفوذپذیری میتوکندریایی و پتانسیل غشایی میتوکندری سبب تخلیه پروتئین‌های میتوکندری به سیتوزول می‌شوند که از آن جمله می‌توان به سیتوکروم C اشاره نمود. سیتوکروم C در حضور ATP یا Apaf-1 یا Apoptotic Protease Activating Factor-1 ترکیبی را حاصل می‌سازد که قادر است Pro-caspase-9 را فعال و بدین ترتیب پلی را مابین محرک‌های مختلف آپوپتوزیس و شروع آبشار کاسپازی برقرار کند (۳۲، ۳۵، ۳۶). معمولاً در راستای اثر سیتوکاین‌ها و عوامل پاتوژن عامل NF-KB یا Factor of immunoglobulin K locus in B cells به عنوان فاکتور فعال کننده رونوشت برداری برخی از ژن‌ها، نقش خود را در آپوپتوزیس سلول‌های لنفوسیتی B ایفا می‌کند، فعالیت و نقش این پروتئین در بیماری‌های ویروسی ثابت شده است (۲۷).

مطالعات دیگری نیز پیرامون پروتئین‌های ویروس عامل بیماری بورس عفونی جوجه‌ها توسط Fernandez در سال‌های اخیر صورت گرفته است که بیانگر اثرات القایی پروتئین VP2 در القای آپوپتوزیس می‌باشد، پروتئین VP2 احتمالاً از طریق مهار ژن BCL-2 اثرات القایی خود را ایفا می‌کند (۱۳، ۱۰، ۷، ۶، ۴، ۳، ۵). ویروس عامل بیماری بورس عفونی جوجه‌ها در فاز حاد بیماری با القای آپوپتوزیس لنفوسیت‌های B باعث کاهش تولید آنتی‌بادی و با کاهش پاسخ‌دهی لنفوسیت‌های T موجود در طحال نسبت به عوامل میتوژن منجر به تضعیف سیستم ایمنی می‌گردد (۱۶، ۱۵، ۱۴، ۱۲، ۹، ۸). بیان مارکرهای ژنتیکی مختلفی احتمالاً می‌تواند در بروز آپوپتوزیس سلول‌های لنفوسیتی مؤثر واقع گردد به طوری که از مطالعات نتیجه گرفته می‌شود علاوه بر عوامل ویروسی نظیر پروتئین‌های ویروسی حتی TGF-B نیز در القای آپوپتوزیس سلول‌های لنفوسیتی دخیل می‌باشد که جا دارد مورد بررسی دقیق قرار گیرند. اگر مطالعات در زمینه پروتئین VP2 ویروس عامل بیماری بورس عفونی بیشتر می‌باشد علت آن اینست که تحقیقات انجام شده حدس می‌زنند که شاخص‌های تروپیسم سلولی ویروس وابسته به پروتئین VP2 می‌باشد که در سایر سوابق تحقیقاتی نیز اشاره به اثرات این پروتئین ویروسی در القای آپوپتوزیس سلول‌های لنفوسیتی B در بورس فابریسیوس و طحال مبتلا به گامبوروا اشاره شده است. مرور مقالات نشان می‌دهد که ۳- روز بعد از عفونت بورس فابریسیوس به ویروس عامل بورس عفونی جوجه‌ها تعداد سلول‌های آپوپتوتیک رو به فزونی گذاشته و از میزان





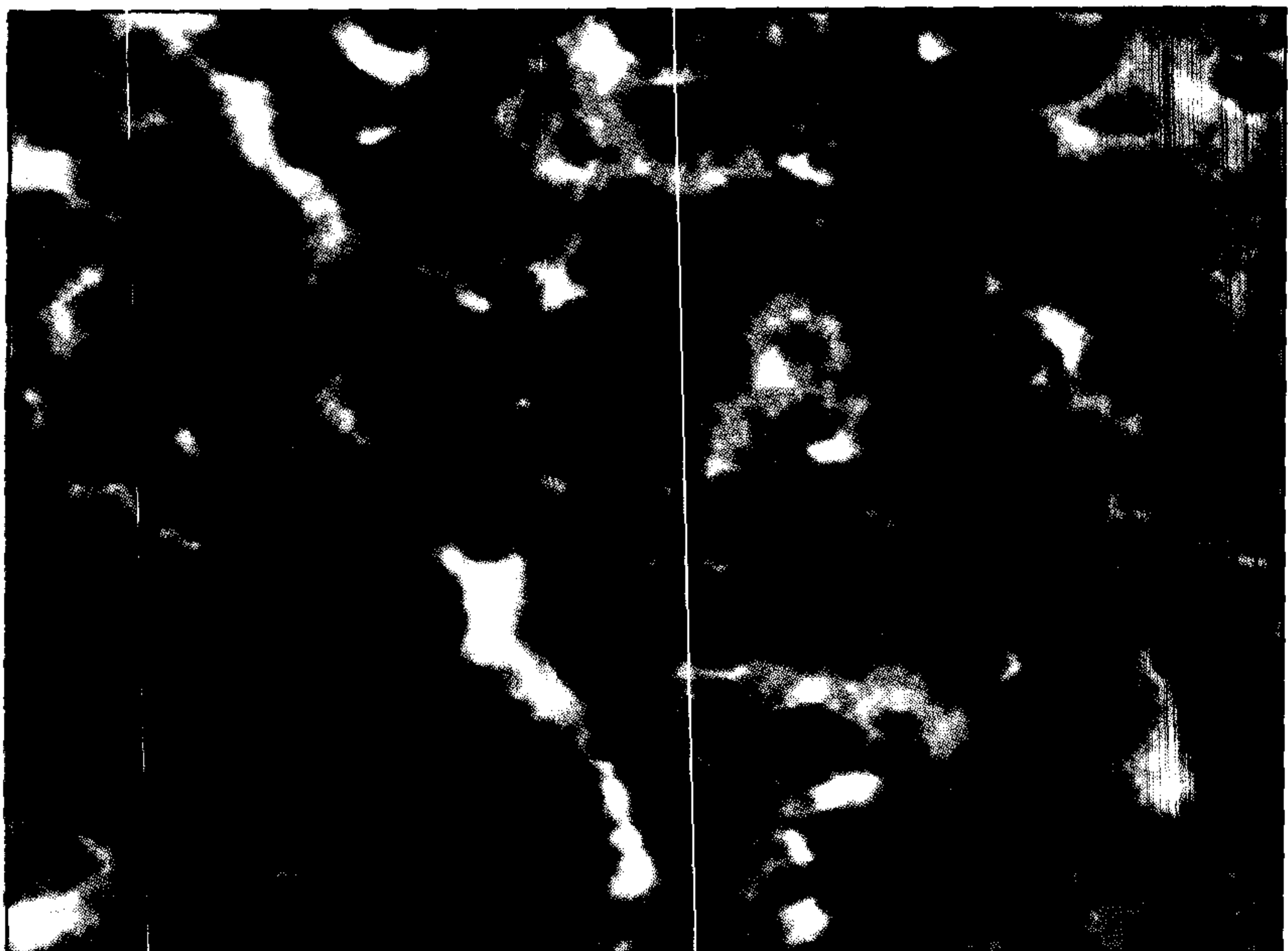
تصویر ۲- فتومیکروگراف دو تصویر از قسمتهای مختلف بافت بورس فابریسیوس گروه TEST-IBDV، در تصویر A سمت چپ (×۴۰) مقادیر متعددی از سلولهای آپوتوتیک به رنگ قهوه‌ای قابل مشاهده می‌باشد و در تصویر B نیز روبروی پیکان تعدادی سلول آپوتوتیک کاملاً تیپیک نمایان می‌باشد. بزرگنمایی ۱۰۰×، رنگ آمیزی TUNEL با زمینه تولوئیدن بلو.

در جوجه‌های کنترل سرم نمکی تلقیح شد و سپس مرحله اجرایی تهیه مقاطع بافتی و رنگ آمیزی هماتوکسیلان-ائوزین و تانل و بیان تغییرات کمی تعداد سلول‌های آپوتوتیک مشابه گروه آزمایش اول برای گروه فوق نیز اجرا شد.

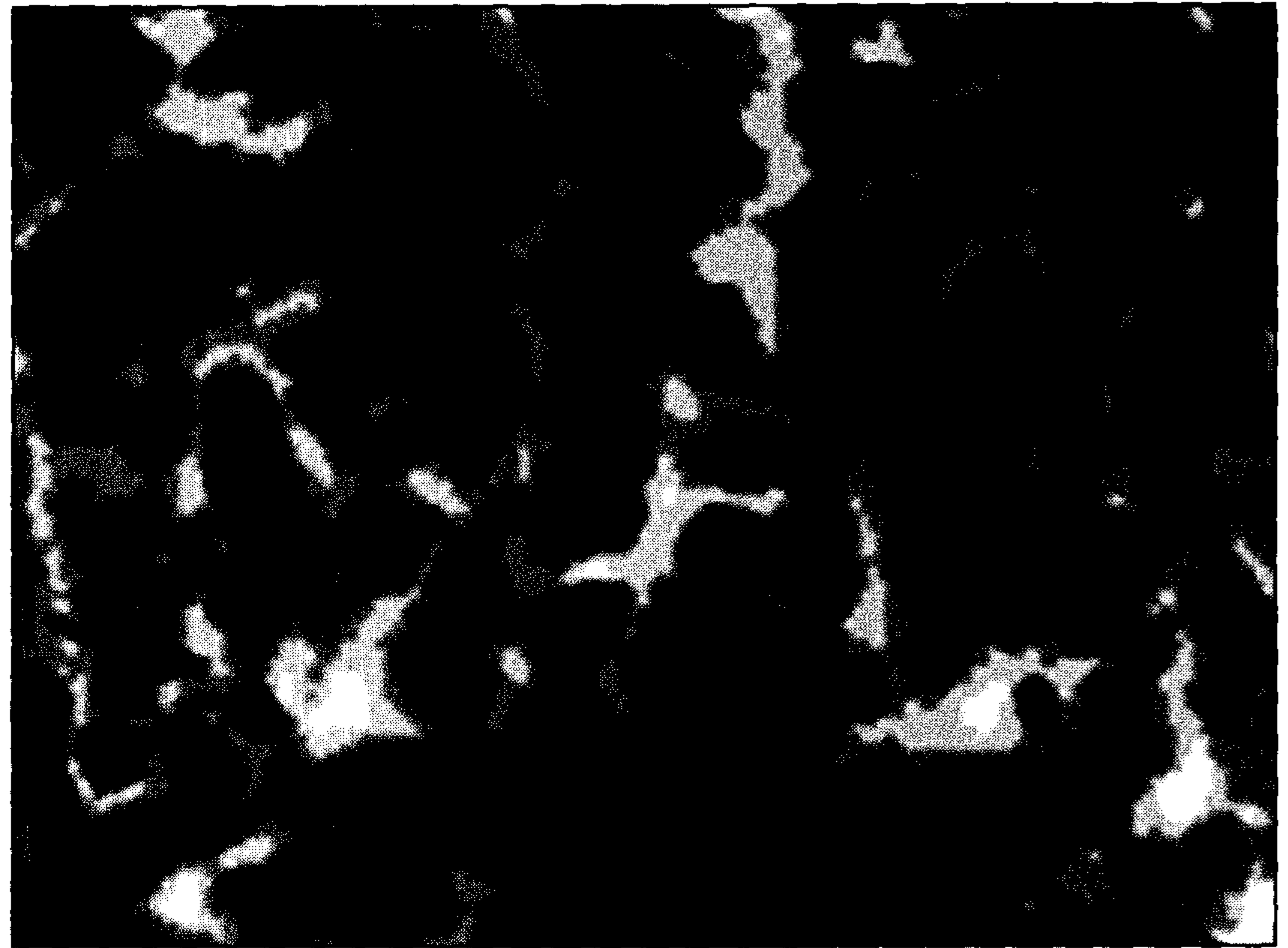
نحوه اجرای تکنیک تشخیصی TUNEL اجرای تکنیک (Method Execution) TUNEL

۱- ابتدا مقاطع تهیه شده پس از پارافین زدایی و آب‌دهی با آنزیم پروتئیناز K مجاور و پس از انکوباسیون بمدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با محلول PBS شستشومی‌گردند.

۲- مجاور کردن مقاطع بافتی با محلول REACTION MIXTURE TUNEL به میزان ۵۰ میکرو لیتر به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه



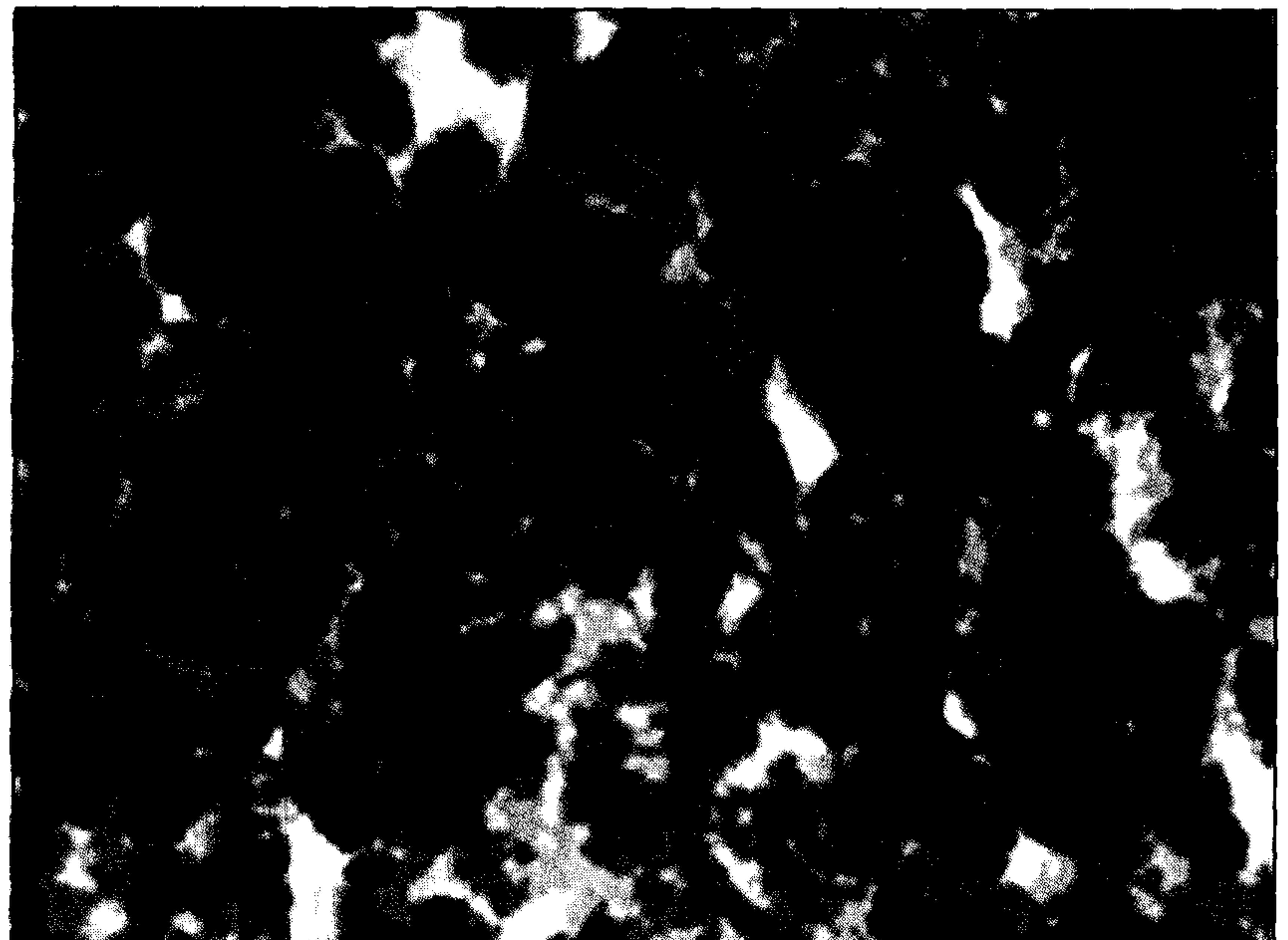
تصویر ۴- فتومیکروگراف تغییرات آپوتوزیس لئوسیتی بافت بورس فابریسیوس در گروه CONTROL با بزرگنمایی ۱۰۰× و رنگ، آمیزی TUNEL با زمینه H&E قابل مشاهده می‌باشد. همان طوری که مشخص است تعداد سلولهای آپوتوتیک در این گروه نسبت به گروههای TEST کاملاً اندک می‌باشد.



تصویر ۱- فتومیکروگراف تغییرات آپوتوزیس سلول‌های لئوسیتی بافت بورس فابریسیوس در گروه TEST-IBDV که در آن سلولهای آپوتوتیک با کروماتین متراکم، اشکال هلالی کروماتینی و فراگمانتاسیون هسته سلولی قابل مشاهده می‌باشد. با بزرگنمایی ۱۰۰× و رنگ آمیزی H&E.

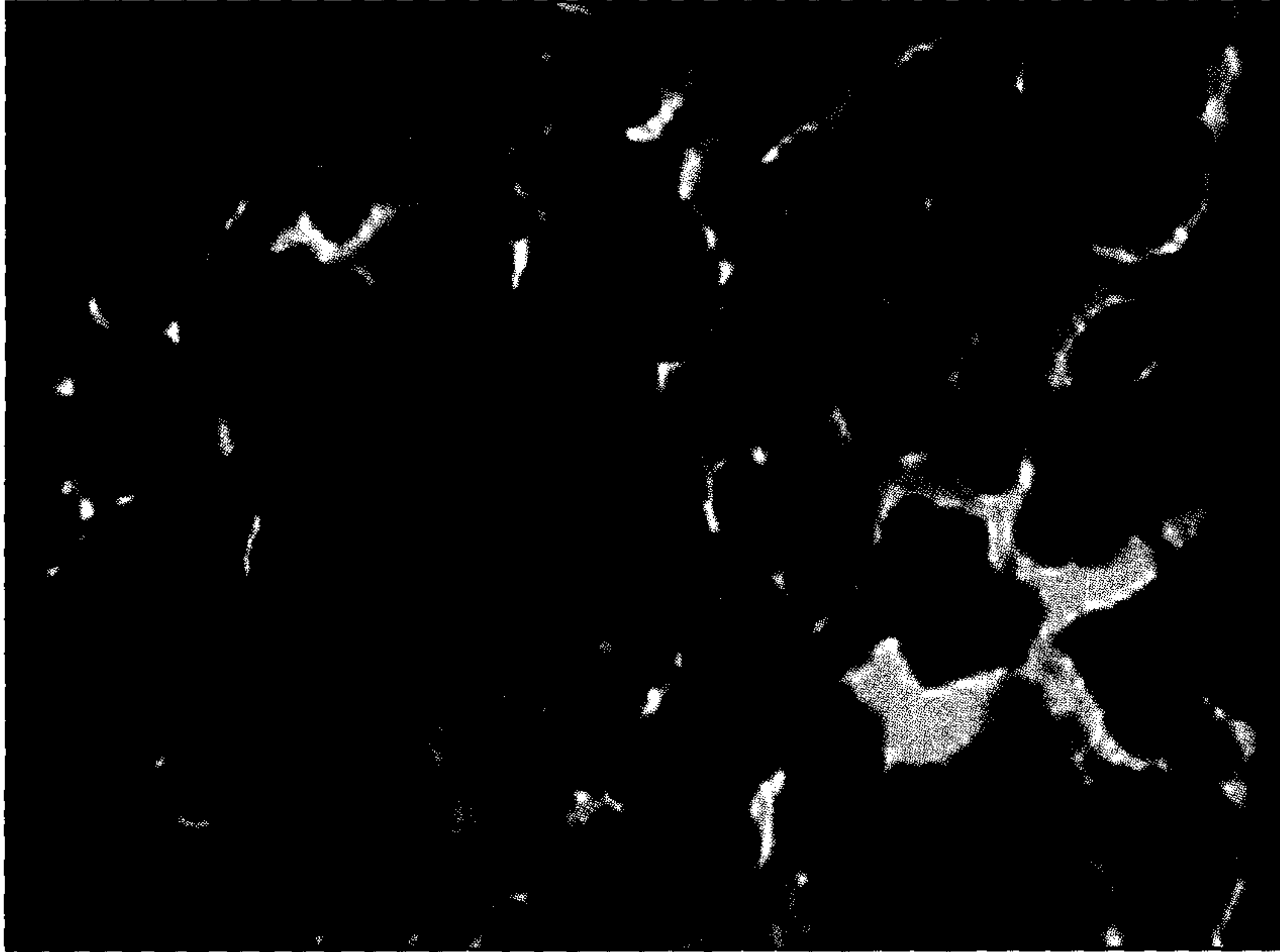
نمکی را به شکل قطره چشمی و بینی دریافت نمودند. سه روز بعد از تلقیح ویروس در گروههای آزمایشی و کنترل از بافت بورس فابریسیوس آنها جهت مراحل پاساژ بافتی برای میکروسکوپ نوری (LM) نمونه برداری و به آزمایشگاه پاتولوژی ارسال تا در مسیر تهیه مقاطع بافتی، رنگ آمیزی هماتوکسیلان-ائوزین و ایمنوهیستوشیمی (تانل) قرار گیرند. در مطالعات میکروسکوپی برای ارزیابی تغییرات کمی، سلول‌های آپوتوتیک را در پنج میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰ شمارش و میانگین آنها در نتایج آورده شد.

آزمایش دوم - در مراحل اجرایی گروه آزمایشی دوم، حدود ۲۰ جوجه SPF انتخاب و به دو گروه ۱۰ تایی کنترل و تیمار تقسیم بندی شدند. ویروس سویه ایران ۴۹۹ (IR499) که یک نوع سویه بسیار حاد است (VVIBDV) به جوجه‌های گروه تیمار مورد نظر از راه دهانی با دوز 10^2 c.c. EID50/0.1 تلقیح و

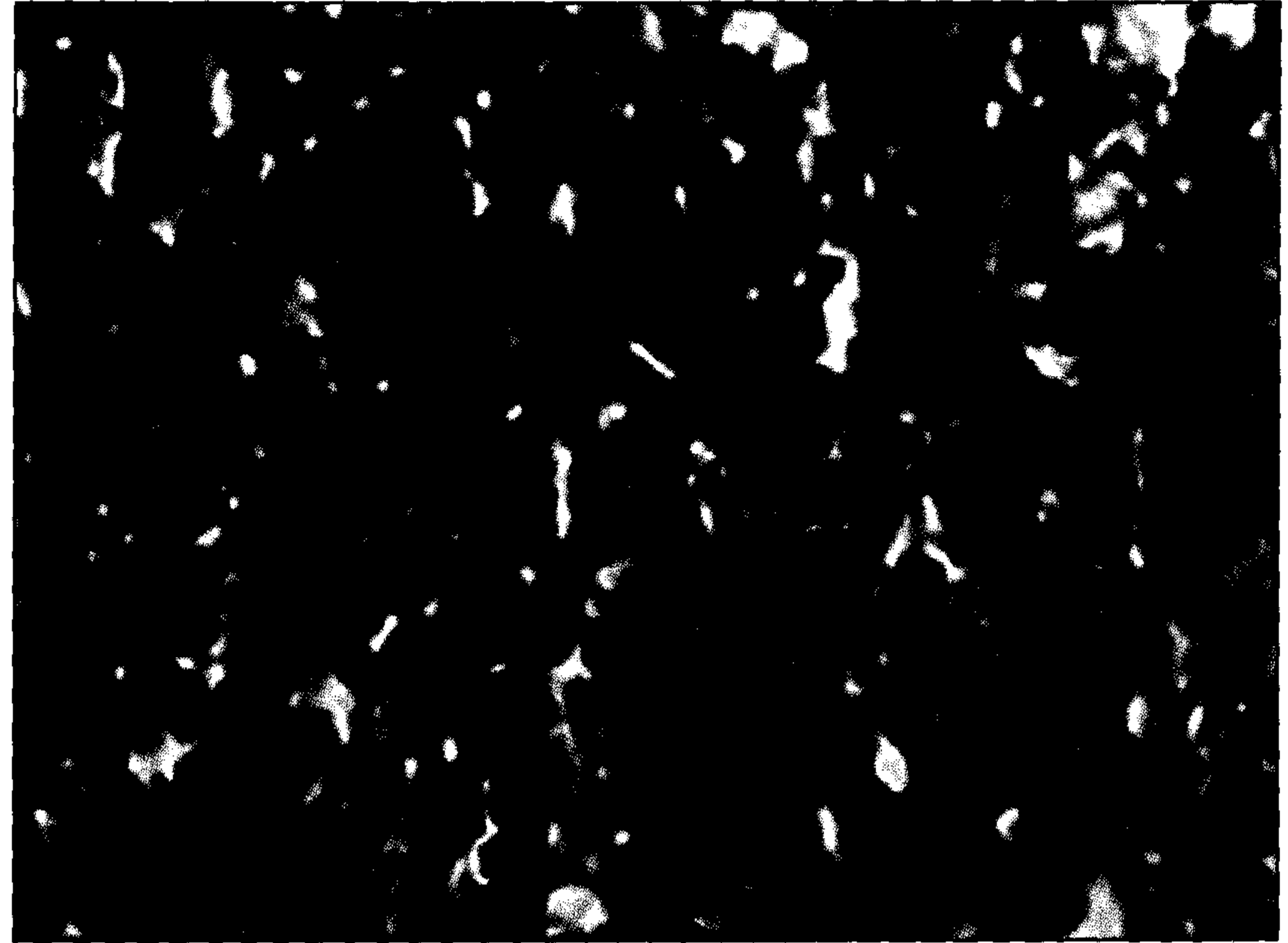


تصویر ۳- فتومیکروگراف مقطعی از بافت بورس فابریسیوس نشانگر تغییرات آپوتوزیس در گروه TEST-VAC با رنگ آمیزی TUNEL و زمینه H&E می‌باشد. سلولهای آپوتوتیک به رنگ قهوه‌ای قابل مشاهده می‌باشند، تعدد سلولها نسبت به گروه TEST-IBDV کمتر می‌باشد. بزرگنمایی تصاویر ۱۰۰× و بزرگنمایی برابر می‌باشد.





تصویر ۶- فتومیکروگراف مقطعی از طحال جوجه SPF گروه کنترل که تغییرات مشخصی از آپوپتوز سلولهای لنفوسیتی قابل مشاهده نمی باشد. رنگ آمیزی H&E و بزرگنمایی ۱۰۰× (عکس توسط نگارنده در دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز).

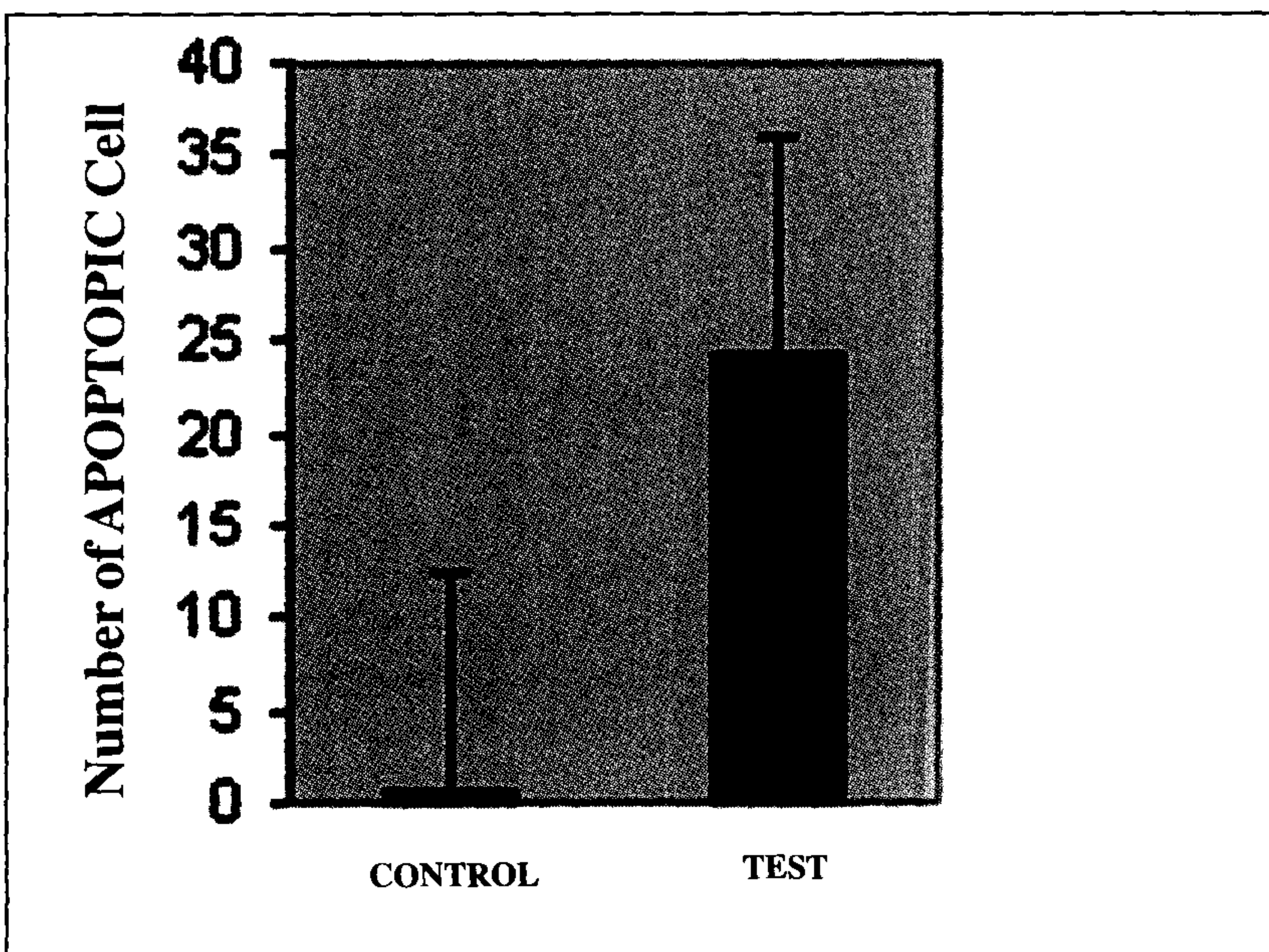


تصویر ۵- فتومیکروگراف مقطعی از بافت طحال جوجه SPF گروه تیمار که در آن تعداد کثیری از سلولهای آپوپتوتیک به رنگ قهوه‌ای روشن تا تیره قابل مشاهده می باشد. رنگ آمیزی TUNEL با زمینه تولوئیدین بلو و بزرگنمایی ۱۰۰× (عکس توسط نگارنده در دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز).

کروماتین متراکم و فراگمانته و در روش ایمنو هیستوشیمی (تانل) با رنگ پذیر قهوه‌ای روشن تا تیره مشاهده شدند. تعداد سلولهای آپوپتوتیک در گروه‌های آزمایشی و کنترل از موازنه زیر پیروی نمودند.

CONTROL < TEST-VAC < TEST-IBDV

آنالیز آماری داده‌ها: طبق آزمون کروسکال والیس اختلاف میانگین تعداد سلولهای آپوپتوتیک در سه گروه معنی دار بوده و بیشترین آن در گروه TEST-IBDV و کمترین تعداد در گروه کنترل بود. در نتایج حاصله از آزمون کروسکال والیس میانگین رتبه‌ای سلولهای آپوپتوتیک در گروه IBDV-TEST برابر ۷۵/۴۸، در گروه TEST-VAC ۴۲/۳۸ و در گروه CONTROL ۱۸/۶۳ و طبق آزمون آنوا اختلاف تعداد سلولهای آپوپتوتیک در سه گروه آزمایشی نشانگر اختلاف معنی دار $P > 0.05$ بود همچنین طبق آزمون تعقیبی LSD (حداقل تفاوت معنی دار) اختلاف بین گروهها نیز دو به دو



نمودار ۲- میانگین تعداد سلولهای آپوپتوتیک در پنج میدان میکروسکوپی بدست آمده بافت لنفوییدی طحال به روش تانل در جوجه‌های SPF (n=10) در یافت کننده و ویروس (TEST) و گروه کنترل داده‌ها بصورت Mean±SEM نمایش داده شده‌اند.

سانتیگراد و شستشو با محلول PBS.

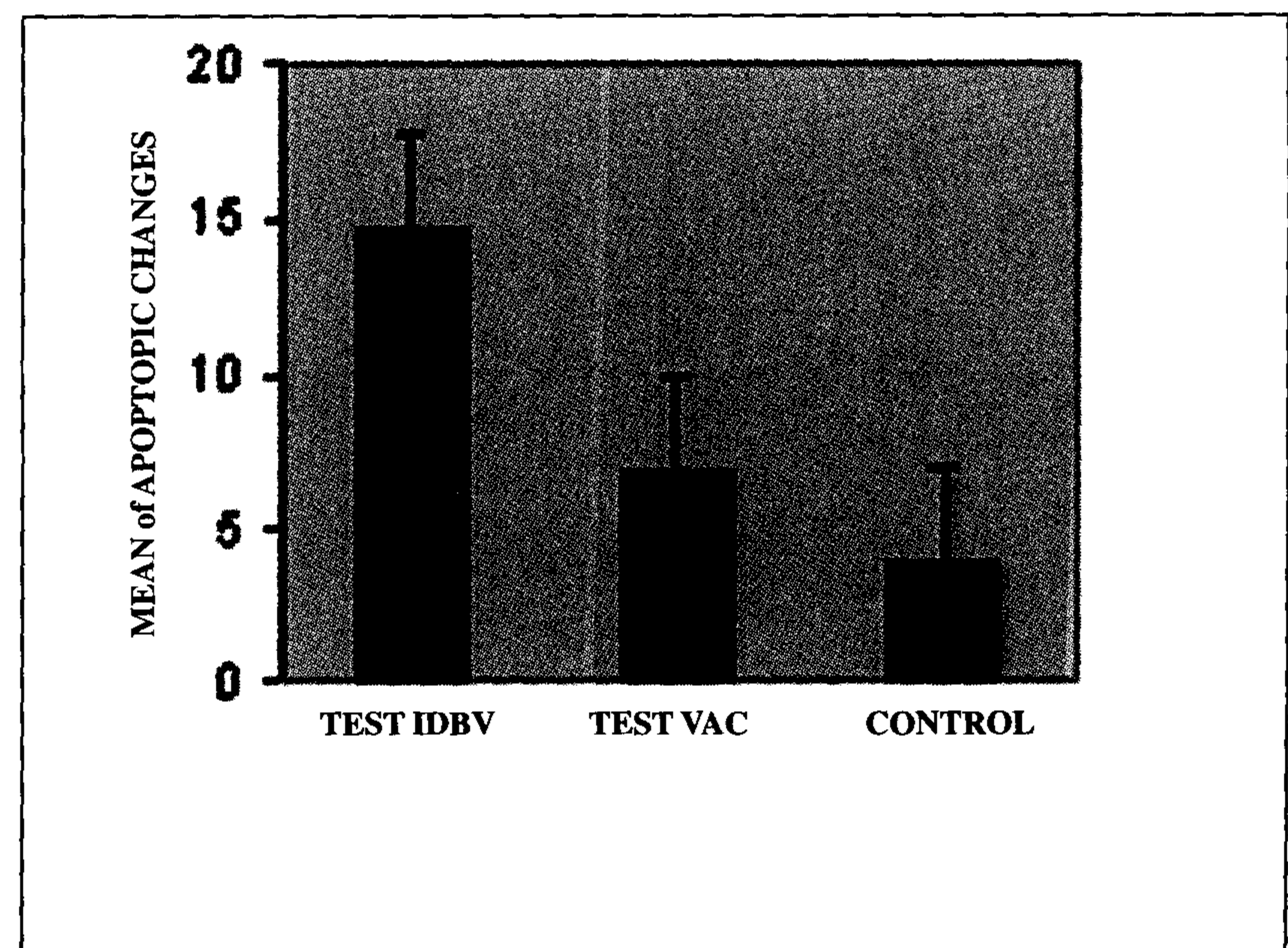
۳- در این مرحله مقاطع بافتی پس از انکوباسیون با محلول POD-CONVERTER (۵۰ میکرو لیتر) بمدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با محلول PBS شستشو و سپس با محلول DAB نیز مجاور گشته و بمدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۵ سانتیگراد مجدداً انکوبه می گردد.

۴- شستشو با PBS و انجام رنگ آمیزی تولوئیدین بلو (۴).

۵- نتایج گروه آزمایشی اول: مطالعه تغییرات کیفی (ریخت شناسی)

آپوپتوزیس با میکروسکوپ نوری.

مطالعات میکروسکوپی مقاطع بافتی در گروه‌های آزمایشی و کنترل نشانگر اشکال متعددی از سلولهای آپوپتوتیک در گروه دریافت کننده ویروس بود که این تغییرات به ترتیب در سایر گروه‌ها یعنی در TEST-VAC و CONTROL سیر نزولی داشتند. سلولها آپوپتوتیک در رنگ آمیزی H&E با



نمودار ۱- میانگین تعداد سلولهای آپوپتوتیک در پنج میدان میکروسکوپی بدست آمده از فولیکولهای لنفوییدی بورس به روش تانل در جوجه‌های SPF (n=30) در یافت کننده ویروس (TEST-IBDV)، واکسن اینترمدیت (TEST-VAC) D78 و گروه کنترل. داده‌ها بصورت Mean±SEM نمایش داده شده‌اند.



نکته بسیار مهم را در خصوص تفسیر دلایل آن می توان بیان نمود:

۱- نقش پروتئین های ویروسی VP2 و VP5 که اثرات القایی آنها در آپوتوزیس سلولهای لنفوسیتی B امری ثابت شده است به طوری که کاربرد *in vitro* بیان پروتئین VP2 توانسته است در سلولهای رده پستانداران نیز آپوتوزیس را القا نماید. همچنین احتمال می دهند که اثرات القاگری پروتئینهای ویروسی فوق با مهار بیان ژن Bcl-2 ارتباط دارد به طور کلی تا به حال مکانیسم دقیق نقش آپوتوتیک این دو پروتئین مشخص نگردیده است (۲۳، ۲).

۲- در بیماری بارس عفونی، مقادیر زیادی آنتی ژنهای ویروسی در فولیکولهای لنفی بارس فابریسیوس و سایر بافتهای لنفوئیدی محیطی نظیر لوزه های سکومی و طحال حضور داشته و سلولهای لنفوسیتی CD_4^+ و CD_4^+ در مجاورت محل رپلیکاسیون ویروسی تجمع می یابند، ویروس عامل بیماری باعث اکتیو و فعال شدن سلولهای لنفوسیتی T گردیده و موجب افزایش بیان ژنهای مولد سایتوکاین ها در سلولهای فوق می گردد. سایتوکاینهای آزاد شده از سلولهای لنفوسیتی T نظیر اینترفرون گاما ممکن است سلولهای ماکروفاژی را به تولید اکسید نیتریک و سایر سایتوکاینهای با نقش ضدپرولیفراتیوی نظیر TNF- α ، IL-6 و IL-2 تحریک نماید (۲۲). حالا بحث این است که چرا شدت تغییرات آپوتوزیس علاوه بر نقش پروتئینهای ویروسی می تواند در بافت بارس فابریسیوس گروه TEST-IBDV بیشتر از سایر گروهها باشد. جواب این است که سایتوکاینهای آزاد شده از سلولهای T و ماکروفاژها خودشان نقش القایی در آپوتوزیس دارند به طوری که با هدف قرار دادن نفوذپذیری میتوکندریها سبب تخلیه پروتئینهای میتوکندریایی به سیتوزول سلول شده که از آن جمله می توان سیتوکروم C را نام برد و سیتوکروم C نیز در حضور ATP با Apf-1 ترکیبی را حاصل می نماید که قادر است پروکاسپاز ۹ را فعال نماید. بنابراین پلی را مابین محرکهای مختلف آپوتوزیس و آغاز آبشار کاسپازی برقرار می کند (۱۷، ۱۸). معمولا به دنبال اثر سیتوکینها و آنتی ژنهای ویروسی عامل بسیار مهم به نام NF-kB به عنوان کوفاکتور فعال کننده رونوشت برداری برخی از ژنهای مولد آپوتوزیس در لنفوسیت های B نقش ایفا می کند نقش این پروتئینها در بیماریهای ویروسی ثابت شده است (۲۸). سیتوکینهای دیگری که از سلولهای ماکروفاژی در بیماری بارس عفونی جوجه ها آزاد می گردد TNF- α می باشد که این سیتوکین نیز با اتصال به رسپتورهای ویژه خود به نام TNF-R1 و TNF-R2 باعث تریمریزاسیون در گیرنده های فوق شده و جایگاهی ایجاد می گردد به نام جایگاه مرگ یا TRADD (TNFR-Associated Death Domain) که این جایگاه توانایی به کارگیری TRAFs (TNFR-Associated Factors) را در جهت فعال سازی NF-kB و مسیر JNK/AP1 را داراست. از طرف دیگر TRADD با FADD کمپلکسی را تشکیل می دهد که قادر است کاسپاز ۸ را به خدمت در آورد و به همراه آن گیرنده TNF-R1 قادر است آپوتوزیس را از طریق مولکول سازگار RAIDD (RIP Associated Ich-1/CED) و واکنش با جایگاه جایگاه مرگ RIP و واسطه CARD باعث فعال شدن کاسپاز ۲ و نهایتا

معنی دار بود. به طوری که اختلاف میانگین در تمامی موارد یعنی بین گروههای زیر همگی معنی دار بود ($P > 0.05$).

۶- نتایج گروه آزمایشی دوم: نتایج حاصله از مطالعات میکروسکوپی در گروه تیمار و کنترل نشانگر اشکال متعددی از سلول های آپوتوتیک در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل بود (تصاویر ۱ و ۲).

آنالیز آماری داده ها در گروه آزمایشی دوم: بعد از شمارش تعداد سلولهای آپوتوتیک در ۵ میدان با بزرگنمایی ۴۰ و محاسبه میانگین آنها نتایج زیر اخذ و سپس نتایج حاصله با استفاده از Mann-Whitney Test مورد ارزیابی قرار گرفت. متوسط تعداد سلولهای آپوتوتیک در گروه تیمار ۲۴/۲ و در گروه کنترل ۰/۵ است که طبق آزمون ناپارامتری من-ویتنی تست تفاوت رتبه ای تعداد سلولها در دو گروه معنی دار است ($P < 0.001$) یعنی در گروه تیمار تعداد سلولها بیشتر از کنترل است.

بحث

تفسیر نتایج گروه آزمایش اول - سلولهای لنفوسیتی B نابالغ در بارس فابریسیوس در حقیقت هدف اصلی ویروس عامل بیماری بارس عفونی است که نتیجه عفونت با چنین ویروسی تخریب بافت بارس فابریسیوس می باشد و این مورد به عنوان علت و پاتوژنز بیماری فوق مطرح می باشد. علاوه بر تغییرات نکروزیس، آتروفی مشخص بافت بارس فابریسیوس بدون وقوع فرآیندهای آماسی مشاهده گردیده است که بر اساس این یافته چنین برمی آید که آپوتوزیس می تواند در روند پاتوژنز بیماری دخالت داشته باشد (۴). با توجه به ساختار ژنومی عامل بارس عفونی، ژنهای مولد VP2 و VP5 در القای آپوتوزیس سلولهای لنفوسیتی B نابالغ نقش اساسی داشته و برای ایجاد آپوتوزیس در سلولهای یاد شده از طریق افزایش بیان ژنهای Bax و مهار ژن Bcl2 باعث ایجاد آپوتوزیس می گردند (۲). به هر حال عوامل مختلف نظیر پروتئین های ویروسی و به احتمال زیاد سیتوکاین ها در القای آپوتوزیس نقش دارند، اما حضور تغییرات آپوتوزیس در بیماری بارس عفونی جوجه ها می تواند سه نکته مهم در پاتوژنز بیماری بارس عفونی را مطرح نماید.

۱- القای آپوتوزیس در سلولهای آلوده در حقیقت ممکن است شکلی از مکانیسم های ضد ویروسی در بیماری بارس عفونی جوجه ها تلقی که مانع از گسترش بیماری می گردد.

۲- سلولهای آلوده به ویروس عامل بیماری بارس عفونی جوجه ها ابتدا به ساکن پس از بیان پروتئین های ویروسی از آپوتوزیس محافظت می شوند که این مورد در رشد و تکثیر ویروس عامل بارس عفونی جوجه ها عامل مساعد کننده محسوب می گردد.

۳- القای آپوتوزیس توسط ویروس عامل بارس عفونی جوجه ها در سلولهای لنفوسیتی با بیان پروتئین های ویروسی صورت می گیرد که راهی است برای خروج و آزاد شدن از سلولهای آلوده است. شدت تغییرات آپوتوزیس در گروه TEST-IBDV به مراتب بیشتر از سایر گروهها بوده و دو



فعالیت‌های بعدی مشخص و معین نمایند. تولید سیتوکین‌هایی از قبیل فاکتور $\text{TNF-}\alpha$ ، فاکتور شبه اینترلوکین ۸،۶ و NOIF در القای آپوپتوز اسپلینوسیت‌ها موثر هستند. به نحوی که لنفوسیت‌های T با تولید NOIF موجب می‌شوند تا ماکروفاژها شروع به تولید NO (نیتريت اکساید) کنند یعنی با تولید هر چه بیشتر نیتريت اکساید موجب القای آپوپتوز در خود سلول‌های لنفوسیت T می‌شوند. با توجه به مطالعات انجام یافته در کار پژوهشی فوق الذکر وجود اجسام ویروسی در طحال جوجه‌های SPF موجب القای آپوپتوز به مقادیر بسیار زیاد و برجسته در طحال جوجه‌های مذکور شد که احتمالاً علت آن اثرات القایی پروتئین‌های ویروسی در افزایش بیان ژن‌های مولد آپوپتوزیس نظیر BAX و برداشت اثرات پروتئین‌های مهار از روی NF-kB یا همان فاکتور رونوشت برداری هسته در سیتوپلاسم سلول‌های لنفوسیتی بافت طحال باشد، پس نتیجه می‌شود که این ویروس علاوه بر نکروز، با القای آپوپتوز و تولید سیتوکین‌ها در پیشبرد بیماری نقش مهمی ایفا می‌کند (۲۸). نتایج حاصل از تجزیه آماری سلول‌های آپوپتوتیک در طحال جوجه‌های SPF گروه تیمار و کنترل حاکی از معنی دار بودن تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در گروه تیمار است. امید است با افزایش هر چه بیشتر مطالعات در زمینه اثر ویروس بارس عفونی بر سایر ارگان‌های لنفوی و حتی اندام‌های دیگر اطلاعات هر چه مفیدتری در خصوص درک چهره واقعی بیماری حاصل گردد.

تشکر و قدردانی

باتشکر از استاد عزیز جناب آقای رضا ممیز که در راستای تکمیل این پروژه تحقیقاتی مرادلسوزانه یاری نمودند.

References

1. Annet, J., Hermann, N. and Hermann, M. (2001): Apoptosis induced by IBDV Replication in productively infected cells as well as in antigen-negative cells in their Vicinity. *Journal of virology*. 82, 1107-1115.
2. Armando, F.A., Siomara, M. and Jose, E. (1997): The major antigenic protein of IBDV, VP2, is an apoptotic inducer. *Journal of Virology*, oct. (1997): P. 8014-8018.
3. Azad, A.A., McKern, N.M., Macreadie, I. G., Failla, P., Heine, H. G., Chapman, A., Ward, C. W. and Fahey, K. J. (1991): Physicochemical and immunological Characterisation of recombinant host protection antigen (vp2) of infections Bursal disease virus vaccine. 9: 715-772.

آپوپتوزیس می‌گردد (۲۶، ۲۷). به طور خلاصه در تفسیر شدت تغییرات آپوپتوزیس گروه TEST-IBDV می‌توان گفت که حضور کافی پروتئین‌های ویروسی و سیتوکین‌ها می‌تواند در بروز آپوپتوزیس سلول‌های لنفوسیتی موثر واقع گردد. همچنین در تفسیر زمان حداکثر شدت تغییرات آپوپتوزیس در روز سوم آلودگی بورس جدیدترین اطلاعات چنین بیان می‌کنند که همواره در روز سوم آلودگی لنفوسیت‌های B موجود در بافت بورس فابریسیوس، میزان رپلیکاسیون ویروسی و RNA ویروسی در این سلول‌های به حداکثر خود می‌رسد (۲۷).

در تفسیر تغییرات آپوپتوزیس در گروه TEST-VAC باید چنین بیان نمود که در مرحله اول حضور ناکافی پروتئین‌های ویروسی VP2 و VP5 و خفیف بودن تولید و آزادسازی سیتوکین‌ها در بورس مبتلا باعث شده است که همواره شدت تغییرات آپوپتوزیس در این گروه نسبت به گروه IBDV-TEST کمتر باشد (۲۸). همان طوری که از نتایج کار تحقیقی فوق مشخص گردیده است گروه کنترل با توجه به عدم دریافت سوش خالص ویروس و اکسن تغییرات خفیفی از آپوپتوزیس را از خود نشان می‌دهند. در تفسیر تغییرات خفیف آپوپتوزیس گروه کنترل باید بیان نمود که بافت بورس فابریسیوس سالم از تعداد 10^4 فولیکول لنفی تشکیل شده است که هر یک از فولیکول‌ها با سلول‌های نابالغ B کلونیزه شده‌اند، تعدادی از این سلول‌های B قبل از اینکه وارد جریان خون محیطی شوند به طور طبیعی دچار آپوپتوزیس می‌گردند و این همان مکانیسم ناپدید و آتروفی شدن بورس فابریسیوس بعد از گذشت چند ماه از سن جوجه‌ها می‌باشد. در غشاء لنفوسیت‌های B بافت بورس فابریسیوس رسپتورهایی به نام Notch-1 شناخته شده است که نقش‌های مختلفی را در جهت تصمیمات نهایی و سرنوشت ساز رشد و توسعه ارگان‌ها دارند. اخیراً به این موضوع پی برده‌اند که شکل فعال گیرنده Notch-1 باعث تضعیف رشد سلول‌های B، توقف و مهار سیکل سلولی در فاز G1 و القای آپوپتوزیس می‌گردند. Notch-1 با اتصال به لیگاند ویژه خود بنام Serrate-2 موجب افزایش بیان ژن Hairy-1 گردیده که نتیجه آن تولید پروتئین‌هایی بنام Hes-1 و Hes-5 می‌باشد. پروتئین‌های فوق نقش القایی در آپوپتوزیس لنفوسیت‌های B بورس فابریسیوس را در شرایط نرمال دارند. بر اساس آنالیز داده‌های گردآوری شده و نتایج حاصله از آزمایش‌های آماری ناپارامتری و پارامتری همواره اختلاف میانگین تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در گروه‌های آزمایشی و کنترل معنی دار و برابر $P > 0.05$ بود، بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که همواره مابین حدت ویروس و شدت تغییرات آپوپتوزیس در بورس فابریسیوس ارتباط معنی داری وجود دارد زیرا که طبق آزمایش‌های تحلیل واریانس و تعقیبی اختلاف بین گروه‌ها دو به دو نیز معنی دار بود. پروتئین‌های ویروسی که به عنوان القای گر آپوپتوزیس مخصوصاً در رده سلول‌های لنفوسیتی مطرح هستند در اختلالات آپوپتوزیس لنفوسیتی با واسطه CD95 که باعث و مسبب بیماری‌های اتوایمیون محسوب می‌شوند در آینده می‌توانند در درمان بیماری‌های فوق پس از عملیات همسانه سازی یا کلونینگ و استخراج پروتئین‌های مربوطه و نقش آنها در آپوپتوزیس را برای



4. Azzam, A.H., Gabal, M.A. (1997): Interaction of aflatoxin in the feed and immunization against selected infectious disease; I. Infectious bursal disease avian path. 26: 317-325.
5. Bae, M. A., Rhee, H. and Song, B. J. (2003): Troglitazone but not rosiglitazone induces G1 cell cycle arrest and apoptosis in human and rat hepatoma cell lines. *Toxicol Lett.* 139(1):67-75. PMID: 12595159 [PubMed - in process].
6. Bauernhofer, T., Kuss, I., Henderson, B. and Baum, A.S. (2003): Whiteside TL. Preferential apoptosis of CD56dim natural killer cell subset in patients with cancer. *Eur J Immunol.* 33(1): 119-24. PMID: 12594840 [PubMed - in process].
7. Bellomo, G .F., Mirabelli, M., Vairetti, F. I. and Malorni, W. (1994): Morphological and biochemical investigations on plasma membrane blebbing during cell injury. In: *In vitro toxicity indicators, Methods in toxicology, part B: (C.A. Tyson and J.M. Frazier eds.)*, vol 1, pp. 58-71.
8. Belyavsky, M., Belyavskaya, E., Levy, G. A. and Leibowitz, J. L. (1998): Coronavirus MHV-3-induced apoptosis in macrophages. *Virology.* 250(1):41-9. PMID: 9770418 [PubMed - indexed for MEDLINE].
9. Belyavskiy, M., Levy, G. A. and Leibowitz, J. L. (1998): The pattern of induction of apoptosis during infection with MHV-3 correlates with strain variation in resistance and susceptibility to lethal hepatitis. *Adv Exp Med Biol.* 440:619-25. PMID: 9782337 [PubMed - indexed for MEDLINE].
10. Biffl, W. L., West, K. E., Moore, E. E., Gonzalez, R. J., Carnaggio, R., Offner, P. J. and Silliman, C. C. (2001): Neutrophil apoptosis is delayed by trauma patients' plasma via a mechanism involving proinflammatory phospholipids and protein kinase *Surg Infect (Larchmt).* 2(4):289-93; discussion 294-5. PMID: 12593704 [PubMed - in process].
11. Bonavita, F., Stefanelli, C., Giordano, E., Columbaro, M., Facchini, A., Bonafe, F., Caldarera, C.M. and Guarnieri, C. (2003): H9c2 cardiac myoblasts undergo apoptosis in a model of ischemia consisting of serum deprivation and hypoxia: inhibition by PMA. *FEBS Lett.* 536(1-3):85-91. PMID: 12586343 [PubMed - in process].
12. Bounous, D. I., Gooawin, M. A., Brooks, R. L., Lamichhane, C.M., Campagnoli, R.P., Brown, J. and Synder, D.B. (1995): Immunosuppressant and Intracellular Calcium 22-signaling in splenocytes from chicks Infected with chicken anemia Virus, CL-1 isolate. *Avian Dis.* 39: 135-140.
13. Bulloch, K., Lucito, R. (1988): The effects of cortisone on acetyl cholinesterase (AChE) in the neonatal and aged thymus. *Ann N Y Acad Sci.* 521:59-71
14. Carter, A.D., Sible, J.C. (2003): Loss of XChk1 function triggers apoptosis after the midblastula transition in *Xenopus laevis* embryos. *Mech Dev.* 120(3):315-23. PMID: 12591601 [PubMed - in process].
15. Castro-Galache, M.D., Ferragut, J. A., Barbera, V. M., Martin-Orozco, E., Gonzalez-Ros, J. M., Garcia-Morales, P. and Saceda, M. (2003): Susceptibility of multidrug resistance tumor cells to apoptosis induction by histone deacetylase inhibitors. *Int J Cancer.* 104(5):579-86. PMID: 12594812 [PubMed - in process].
16. Charton, B. R., Bermudez, A. J., Boulianne, M., Eckroade, R. J., Jeffrey, J. S., Chauhan, H. V. S., Singh, M. P. and Thakur, H. N. (1980): Outbreak of infectious bursal disease in poultry. *Indian J. Poul. Sci.* 15: 253-258.
17. Dallaporta, B., Marchetti, P., de Pablo, M. A., Maisse, C., Duc, H.T., Metivier, D., Zamzami, N., Geuskens, M. and Kroemer G. (1999): Plasma membrane potential in thymocyte apoptosis. *J Immunol.* 162(11):6534-42.
18. Durant, S. (1986): In vivo effects of catecholamines and glucocorticoids on mouse thymic cAMP content and thymolysis. *Cell Immunol.* 102(1):136-43.
19. Fernandez, A. A., Martinez, S. and Podriguez, J. F. (1997): The Major antigenic Protein of Infectious Bursal Disease Virus, VP2, Is an Apoptotic inducer. *Journal of Virology.* P.8014-8018.
20. 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.
21. Cascino, I., Taposs, T., Dmarya, R., Testi, R. and Ruberti, G. (1996): Fas/Apo1 (CD95) receptor Lacking the intracytoplasmic signaling domain Protects Tumor Cells from Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol*, 157: 13-17.
22. Jagdev, M. A., In-Jeong, K., Silke, R. and Hung-Yueh, Y. (2000): Infectious bursal disease virus of chickens: Pathogenesis and immunosuppression. *Developmental and Comparative Immunology*. 24:223-235.
23. Kuo, P.L., Lin, C.C. (2003): Green Tea Constituent (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Inhibits Hep G2 Cell Proliferation and Induces Apoptosis through p53-Dependent and Fas-Mediated Pathways. *J Biomed Sci*.10(2):219-27. PMID: 12595758 [PubMed - in process].
24. Lazebnik, Y.A., Cole, S., Cooke, C.A., Nelson, W.G. and Earnshaw, W.C. (1993): Nuclear Events of Apoptosis In vitro in Cell-Free Mitotic Extracts - A Model System for Analysis of the Active Phase of Apoptosis. *J. Cell Biol*. 123, 7-22.
25. Lihl, K., Abdul R.O. and Hair-ejo, M. (2004): Comparative analysis of viral RNA and apoptotic cells in bursa following infection with IBDV. *Comparative immunology*, 27(6):433-430.
26. Raff, M.C. (1992): Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356: 397-400.
27. Tong, L., Shen, J.G. and Qiu, X.S. (2002): [Study on preventive effect of buyang huanwu decoction on cardiomyocyte apoptosis induced by hypoxia-reoxygenation in rats] *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. Jul;22(7):522-4. Chinese. PMID: 12592688 [PubMed - in process].
28. Ye, X., Georgoff, I., Fleisher, S., Coffman, F.D., Cohen, S. and Fresa, K.L. (1993): The mechanism of epipodophyllotoxin-induced thymocyte apoptosis: possible role of a novel Ca(2+)-independent protein kinase. *Cell Immunol* .151(2):320-35.

