



القاء مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول‌های اپی‌تلیوم تنفسی انسان آلوده شده با ویروس آنفلوانزا

شهلا شاهسوندی^{۱*}، محمدمجید ابراهیمی^۲، شهین مسعودی^۳

چکیده

مقدمه: ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان تهدید جدی برای سلامت انسان و حیوان به شمار می‌روند. افزایش میزان بیان ژن‌های سایتوکاین‌های پیش التهابی و اینترفرون نوع I، و پاسخ‌های مرگ سلولی با آسیب‌زایی عفونت آنفلوانزا در ارتباط هستند. در این مطالعه پویایی رشد ویروس تحت حاد آنفلوانزا پرندگان در سلول‌های اپی‌تلیومی آلوئولار تنفسی انسان (A549) ارزیابی شده است. روش بررسی: کشت‌های سلولی A549 با ویروس H9N2 در MOI های ۰/۱ و ۲ در شرایط با و بدون افزودن تریپسین آلوده شدند. پویایی رشد ویروس به روش ارزیابی پلاک و میزان زنده بودن سلول‌ها با سنجش MTT در زمان‌های مختلف پس از آلودگی تعیین شدند. چگونگی القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلول با آزمایش قطعه قطعه شدن DNA ژنومی و نیز مسیر انتقال پیام مرگ با وسترن بلات ارزیابی شد.

نتایج: داده‌های این مطالعه نشان داد که اگرچه تکثیر ویروس H9N2 آسیب سلولی مشخص در سلول‌های اپی‌تلیوم تنفسی ایجاد کرده و سبب کاهش میزان سلول‌های زنده می‌شود، اما عیار آن افزایش می‌یابد. بیشینه عیار ویروس در دوز بالاتر پس از ۴۸ ساعت در حضور تریپسین، $4/42 \pm 0/33$ PFU/cell محاسبه شد. تکثیر ویروس در این سلول‌ها بیانگر سرکوب مکانیسم دفاعی و فعال شدن مسیر مرگ برنامه‌ریزی سلولی است. القاء آپوپتوز در سلول A549 با افزایش عیار و رونوشت‌های ویروس هم‌بسته است ($p < 0/05$). نتیجه‌گیری: این داده‌ها بیانگر این هستند که ویروس آنفلوانزا H9N2 پرندگان القاکننده آپوپتوز در سلول‌های اپی‌تلیوم تنفسی انسان از مسیر داخلی و به صورت وابسته به دوز است.

واژه‌های کلیدی: ویروس آنفلوانزا، پویایی رشد، سلول‌های اپی‌تلیوم تنفسی انسان، مرگ برنامه‌ریزی شده

۱- استادیار، عضو هیات علمی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج

۲- استادیار، دکترای تخصصی بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج

۳- دکترای تخصصی فرآورده‌های بیولوژیک، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۲۲۶۱۱۴۶۸، پست الکترونیکی: s.shahsavandi@rvsri.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۵/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۲/۱

مقدمه

آنفلوانزا، بیماری عفونی است که توسط ویروس‌های دارای RNA از خانواده ارتومیکسوویریده (*Orthomyxoviridae*) ایجاد شده، جنس‌های مختلف پرندگان و پستانداران را مبتلا می‌کند. عامل بیماری نخستین بار در سال ۱۹۰۲ از پرندگان مبتلا و در سال ۱۹۳۳ از انسان جدا گردید (۱). جهان‌گیری‌های اسپانیا، آسیا و هنگ‌کنگ که با تلفات انسانی گسترده همراه بودند در نتیجه پدیدار شدن گونه جدیدی از ویروس و پیامد انتقال آن از حیوان به انسان ظاهر شده‌اند. در دو دهه اخیر انتقال مستقیم برخی ویروس‌های آنفلوانزا پرندگان به انسان تهدیدی برای پیدایش سویه جدیدی است که در صورت کسب توان انتشار فرد به فرد سبب وقوع جهان‌گیری خواهد شد (۲،۳).

این ویروس‌ها از طریق گلیکوپروتئین‌ها (HA) با قندهای اسید سیالیک روی سطوح سلول‌های اپی‌تلیال مانند بینی، نای و شش‌های پستانداران و روده‌های پرندگان پیوند برقرار می‌کنند. پس از اتصال بخشی از پروتئین HA که دارای توالی غنی از اسید آمینه‌های بازی بوده و به تغییرات ساختاری در دستگاه گلژی بسیار حساس است توسط پروتئازهای سلولی شکسته می‌شود. پیامد فرآیند پروتئولیتیک میزبان بر روی مولکول HA، ویروس با اندوسیتوز وارد سلول می‌شود (۴،۵). تفاوت در حساسیت این پروتئین به پروتئازهای سلولی اندوژن و برش آن در شدت بیماری‌زایی ویروس نقش دارد به گونه‌ای که بیماری انسانی ناشی از آلودگی با ویروس‌های فوق‌حد پرندگان شدیدتر از آلودگی با ویروس‌های تحت‌حد است (۶).

به هنگام آلوده شدن سلول میزبان، ویروس آنفلوانزا سیستم‌ها و پروتئین‌های سلول را در خدمت خود می‌گیرد تا با کمک آن‌ها ذرات ویروسی جدیدی بسازد. در این حالت بقای میزبان به تشخیص سریع ویروس و علامت‌دهی سریع پاسخ دفاعی بستگی دارد. سلول‌های دندریتیک، عرضه‌کننده گیرنده‌های شناسایی عامل بیماری‌زا یا حس‌گر هستند که نشان‌گرهای مولکولی حفظ شده عامل بیماری‌زا را در سلول شناسایی می‌کنند. فعال شدن سیستم‌های گیرنده سبب القا پاسخ‌های ایمنی ضد ویروسی شامل تولید اینترفرون‌ها شده که

با جلوگیری از رونویسی ویروس به محدود شدن تکثیر آن‌ها، سبب افزایش مقاومت نسبت به عفونت آنفلوانزا می‌شود (۷). پاسخ‌های سلولی، ضد ویروسی یا مستقل از اینترفرون‌های نوع I هستند که طی آن فاکتورهای رونویسی که بیان ژن‌های ویروس را کنترل می‌کنند فعال می‌شوند و یا با تولید اینترفرون و بیان ژن‌های سایتوکاین همراه است که توسط ویروس در سلول‌های اپی‌تلیال و لکوسیت‌ها القا می‌شوند (۷-۱۰). علاوه بر تولید اینترفرون، مرگ سلولی پدیده‌ای است که سلول در پاسخ به آلودگی با عوامل بیماری‌زا نشان می‌دهد (۱۱). افزایش بیان ژن‌های القاکننده اینترفرون و سایتوکاین‌های پیش‌تهابی، و پاسخ مرگ برنامه‌ریزی شده (آپوپتوز) سلول میزبان با آسیب‌زایی یک عفونت ویروسی در ارتباط هستند. این پاسخ سلولی به شدت تنظیم شده با فعال شدن آبشارهای کاسپاز به تخریب و انهدام سلول میزبان طی یک‌سری واکنش‌های بیوشیمیایی منجر می‌شود. ویروس‌های آنفلوانزا از دو مسیر میتوکندریایی (داخلی) و گیرنده مرگ (خارجی) القا کننده آپوپتوز هستند که با فعال شدن آبشار پروتئین‌ها کیناز فسفاتاز و آزادسازی فاکتورهای رونویسی صورت می‌گیرد (۱۲). این پاسخ سلولی به شدت تنظیم شده و طبیعی به تخریب و انهدام سلول میزبان طی یک‌سری واکنش‌های بیوشیمیایی منجر می‌شود. سلول آلوده از طریق مسیر داخلی یا میتوکندری/سیتوکروم c و نیز مسیر خارجی یا تحریک گیرنده‌های مرگ از بین می‌رود (۱۳-۱۵).

برخلاف ویروس‌های فوق‌حد آنفلوانزا، مکانیسم پاسخ‌های سلول‌های انسانی علیه ویروس‌های تحت‌حد به خوبی شناخته شده نیست. درک آسیب‌زایی این ویروس‌ها در پیشگیری موثر و محدود کردن میزان آلودگی جمعیت انسانی اهمیت زیادی دارد. در این مطالعه، پویایی رشد ویروس آنفلوانزا تحت حد پرندگان H9N2 در اپی‌تلیوم تنفسی انسان به عنوان سلول هدف اولیه ویروس و پاسخ میزبان به شدت آلودگی مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

سلول و ویروس: برای انجام این پژوهش رده سلولی A549 (ATCC No CCL-185TM) از انستیتو پاستور ایران خریداری و در شرایط مناسب بدون ایجاد آلودگی، تکثیر و در ازت مایع ذخیره‌سازی شد. ویروس آنفلوانزا تحت حاد H9N2 جدایه JX456181 A/Chicken/Iran/SS7/2011 با شماره رهگیری مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی پویایی رشد ویروس آنفلوانزا در سلول‌های اپی‌تلیوم تنفسی: سلول‌های A549 با ویروس H9N2 در $MOI=0.1$ و $MOI=2$ در شرایط با و بدون افزودن تریپسین آلوده شدند. ظروف کشت برای مشاهده آثار آسیب‌زایی روزانه بررسی و با کنترل مقایسه می‌شدند. برای بررسی پویایی رشد ویروس در سلول‌های تنفسی، عیار آن به روش ارزیابی پلاک و با استفاده از رقت‌های متوالی 10^{-3} تا 10^{-8} در زمان‌های ۱۶، ۲۴، ۳۶، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از آلوده‌سازی (hpi) سنجیده و با واحد تشکیل دهنده پلاک در هر میلی‌لیتر ویروس (PFU/ml) محاسبه شد (۱۶).

بررسی پاسخ سلول‌های تنفسی به آلودگی با ویروس آنفلوانزا: برای ارزیابی میزان پاسخ سلول‌ها به عفونت ویروسی و میزان زنده بودن آن‌ها، از آزمایش MTT (dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) استفاده شد. این سنجش آنزیمی بر اساس احیاشدن و شکسته‌شدن کریستال‌های زردرنگ تترازولیوم به‌وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز که یکی از آنزیم‌های چرخه تنفسی میتوکندری‌هاست و تشکیل کریستال‌های آبی رنگ نامحلول فورمازان انجام می‌شود. میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول‌هایی که از نظر متابولیک فعال هستند رابطه مستقیم دارد. برای انجام این آزمایش، سلول‌های کشت داده شده در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای با تراکم تقریبی پنج هزار سلول در هر گوده سه بار با PBS شستشو داده شده و با مایع کشت ویروس در ساعات مختلف آلوده شدند. میکروپلیت‌ها مدت سه ساعت در دمای $37^{\circ}C$ قرار داده شدند. پس از شستشوی

سلول‌ها با محیط DMEM، به هر گوده $50 \mu l$ محلول MTT (5 mg/ml) افزوده شده و مدت سه ساعت در دمای $37^{\circ}C$ قرار داده شدند. با حذف محیط مقدار $200 \mu l$ اسید کلریدریک 0.4% نرمال به هر گوده اضافه شده و میکروپلیت‌ها به مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شدند. جذب نوری در طول موج 540 نانومتر خوانده شده و درصد زنده بودن سلول‌های آلوده شده با ویروس آنفلوانزا در مقایسه با سلول‌های کنترل برآورد شد.

بررسی مرگ سلولی: در ساعات ۸، ۱۶، ۲۴، ۴۸ و پس از آلودگی کشت‌های سلول A549 با ویروس H9N2 نمونه مایع کشت سلول‌ها برداشت شده و احتمال قطعه قطعه یا نردبانی شدن DNA بررسی شد.

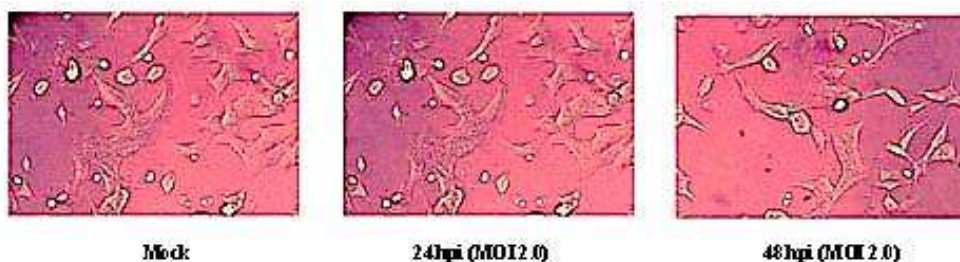
سپس DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (GeneAll، کره جنوبی) استخراج شد. نمونه‌ها روی ژل آگارز 2% با ولتاژ 50 به مدت دو ساعت الکتروفورز شده و ژل پس از رنگ‌آمیزی با نور UV مشاهده شد. فعالیت کاسپاز-۸ به‌عنوان آغازگر آبشار کاسپازی و نیز آزاد شدن سیتوکروم c به‌عنوان نشانگر مسیر انتقال پیام مرگ سلول با وسترن بلات و استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه آن‌ها (abcam، انگلستان) در مقایسه با ژن خانه‌زاد β -actin ارزیابی شد.

ارزیابی آماری: پردازش آماری با استفاده از آزمون t-test صورت گرفت. بیشینه خطای مورد پذیرش، با در نظر گرفتن ضریب اطمینان ۹۵ درصد، معادل 0.05 در نظر گرفته شد.

نتایج

پویایی رشد ویروس آنفلوانزا

تکثیر ویروس H9N2 در سلول A549 در شرایط با و بدون افزودن تریپسین بررسی شد. در هر دوی این شرایط ویروس رشد کرده و آثار آسیب سلولی به‌خوبی قابل مشاهده بودند. اگرچه بزرگ‌شدن و کنده‌شدن سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت در حضور تریپسین و در $MOI=2$ بسیار مشهود بود (شکل ۱).

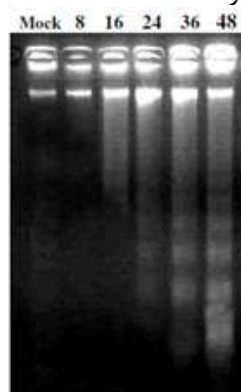


شکل ۱: سلول‌های A549 آلوده شده با ویروس آنفلوانزا H9N2 در غیاب تریپسین در $MOI=2$.
 علائم آسیب سلولی شامل بزرگ شدن و کنده شدن سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت مشاهده می‌شوند (بزرگنمایی X ۲۰۰).

سلول‌های زنده مشابه هم است، در حالی که در سلول‌های آلوده شده با دوز بالا و در حضور تریپسین درصد سلول‌های زنده به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) کاهش یافته بود.

بررسی مرگ سلولی

در غیاب تریپسین و در آلودگی سلول با دوز کم ویروس، پدیده قطعه قطعه شدن DNA بر روی ژل آگارز مشاهده نشد و DNA درون گوده باقی می‌ماند. در حالی که در $MOI=2$ از ساعت ۱۶ پس از آلودگی اسمیر زیاد و آثار نردبانی شدن DNA مشاهده شد که تا ساعت ۴۸ گسترش می‌یافت (شکل ۲).

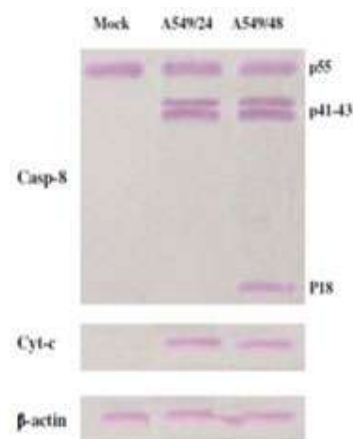


شکل ۲: ویروس آنفلوانزا H9N2 پرندگان القا کننده مرگ سلولی در سلول‌های A549 در $MOI=2$ است.
 قطعه قطعه شدن DNA در سلول‌های آلوده شده پس از رنگ‌آمیزی با اتی‌دیوم بروماید قابل مشاهده است.

ساعت کاسپاز-۸ فعال شده و قطعه $p41-43$ حاصل برش این پروتئین قابل مشاهده است. با کامل شدن فعالیت کاسپاز-۸ در ساعت ۴۸، قطعه $p18$ نیز دیده می‌شود (شکل ۳). وجود قطعه اختصاصی سیتوکروم c آزاد بیانگر القاء مرگ از مسیر داخلی یا میتوکندریایی است.

عیار ویروس در این سلول‌ها با روش ارزیابی پلاک تعیین شد. بیشینه عیار ویروس در دوز بالاتر پس از ۴۸ ساعت در حضور تریپسین، $4/42 \pm 0/33$ PFU/cell محاسبه شد که اختلاف اندکی با $MOI=0/1$ ($4/36 \pm 0/35$) داشت. این سلول بدون افزودن تریپسین نیز توانایی تکثیر ویروس H9N2 را دارد اما زمان به‌دست آمدن بیشینه عیار ۷۲-۹۶ ساعت بود. برای ارزیابی میزان زنده‌بودن سلول‌ها از سنجش آنزیمی MTT استفاده شد. نتیجه آزمایش نشان داد که رنگ زرد معرف در نمونه کنترل سلول‌ها، به رنگ بنفش ارغوانی در سلول‌های A549 آلوده به ویروس H9N2 تغییر کرده است. در $MOI=0/1$ میزان جذب در تمام ساعات تقریباً یکسان و درصد

این امر بیانگر آپوپتوز سلول‌های A549 در نتیجه آلودگی با دوز بالای ویروس است. نتیجه آزمایش وسترن بلات نشان داد که β -actin و کاسپاز-۸ غیرفعال ($p55$) در سلول‌های A549 کنترل و آلوده به ویروس بیان می‌شوند. در سلول‌های دستخوش مرگ در مقایسه با سلول‌های آلوده نشده، پس از ۲۴



شکل ۳: فعال شدن کاسپاز-۸ و آزاد سازی سیتوکروم C در سلول‌های A549 آلوده شده با ویروس آنفلوانزا H9N2 در مقایسه با سلول آلوده نشده بیان‌گر القا مرگ برنامه‌ریزی شده از مسیر میتوکندریایی است.

بحث

لازم است. بدین ترتیب رده سلولی A549 به دلیل وجود این پروتئازها (۱۷،۱۹)، سلول مجاز برای رشد ویروس H9N2 شناخته می‌شود که توانایی فعال کردن محل برش HA ویروس H9N2 را دارد. در حالی که این ویروس در سلول‌های تنفسی و فیبروبلاستی با منشاء جنین جوجه به علت فقدان آنزیم‌های لازم، به تریپسین با منشاء خارجی برای برش HA نیازمند است (۱۸).

افزودن تریپسین به سلول‌های فاقد سرین پروتئاز برای تکثیر سویه‌های تحت حاد ویروس آنفلوانزا ضروری است (۱۸). این آنزیم سبب آلودگی و تکثیر سریع ویروس شده که به فرار آن‌ها از مکانیسم‌های دفاعی میزبان منجر می‌شود. سلول A549 جزو سلول‌های صلاحیت‌دار اینترفرونی به‌شمار می‌آید و رشد ویروس H9N2 در آن بیانگر سرکوب مکانیسم دفاعی و فعال شدن مسیر مرگ سلولی توسط ویروس‌های تکثیر یافته است. برای تایید یافته‌های ارزیابی میزان پاسخ سلول‌ها به عفونت ویروسی، احتمال رخداد مرگ سلولی با آزمایش قطعه قطعه شدن DNA در ساعات مختلف پس از آلودگی بررسی شد. نتایج نشان داد که فقط در دوز عفونی‌کننده بالا آثار قطعه قطعه شدن DNA مشاهده می‌شود. آلودگی سلول‌های حساس به پاسخ‌های اینترفرونی با ویروس آنفلوانزا به القاء شدید تولید اینترفرون در ساعات اولیه عفونت منجر می‌شود. نشان داده شده است که آلودگی سلول‌های A549 و HeLa با ویروس H9N2 سبب افزایش میزان بیان پروتئین Mx به‌عنوان نشان‌گر

تکثیر ویروس‌های پوشش دار آنفلوانزا در سلول‌های میزبان فرآیند متکی به چندین مسیر ژنتیکی میزبان شامل مسیره‌های وابسته به اندوسیتوز سلول میزبان برای ورود و انتقال ژنوم ویروس به هسته سلول و فعال شدن سیستم انتقال پیام داخلی سلول‌های میزبان پیامد رونویسی از ژنوم ویروس است. در این مطالعه، چگونگی تکثیر ویروس آنفلوانزا تحت حاد پرندگان H9N2 در سلول اپی‌تلیوم تنفسی انسان، پاسخ سلول به شدت آلودگی ویروسی و پاسخ مرگ برنامه‌ریزی شده مورد بررسی قرار گرفت.

سلول‌های مژه‌دار تنفسی میزبان هدف اولیه برای اتصال ویروس‌های آنفلوانزا بوده (۱۷،۱۸) و دارای سرین پروتئازهایی مانند TMPRSS2 هستند که موتیف تک‌بازی پروتئین HA ویروس‌های آنفلوانزا را برش می‌دهند (۱۹،۲۰). محل برش پروتئین HA در سویه‌های تحت حاد ویروس آنفلوانزا فقط در مجاری تنفسی و روده‌ای فعال می‌شود، جایی که آنزیم‌های شبه تریپسین ترشح شده و یا تریپسین با منشاء خارجی اضافه شود. بنابراین افزایش عیار ویروس در سلول A549 در نبود تریپسین در هر دو دوز عفونی‌کننده، مربوط برش پروتئین HA است، که شرایط تکثیر اولیه این ویروس بدون نیاز به افزودن تریپسین را فراهم می‌کند. برش پس از ترجمه این پروتئین به زیرواحدهای HA₁ و HA₂ توسط پروتئازهای سلول میزبان، یک دمین اتصال در انتهای آمینی آن ایجاد می‌کند که واسطه هم‌جوشی بین پوشش ویروس و غشاء اندوزومی سلول میزبان بوده و برای عفونت‌زایی ویروس

القای اینترفرون و فعال‌شدن سیستم دفاع سلولی ضد ویروسی می‌شود (۲۱). این فعال‌سازی دفاع ضد ویروس و پاسخ اینترفرونی بیان‌گر وجود مقاومت نسبی میزبان در ساعات اولیه آلودگی با میزان دوز کم ویروس است که سبب کاهش میزان ویروس می‌شود اما بر روی عیار نهایی آن اثر چندانی ندارد. در این مطالعه، قطعه قطعه شدن DNA سلول در ساعات اولیه پس از آلودگی در دوز بالاتر ویروس با کاهش میزان سلول‌های زنده هم‌خوانی داشت. این بدان معناست که پدیده آپوپتوز در نتیجه آلودگی با میزان بالای ویروس H9N2 در سلول اپی‌تلیوم تنفسی رخ می‌دهد و مقدار دوز عفونی‌کننده ویروس و شدت آلودگی سلول در القای مرگ موثر است. ویروس‌ها برای مقابله با مرگ سلول میزبان از روش‌های مختلفی استفاده می‌کنند؛ شامل تکثیر سریع یا ایجاد آلودگی مجاز، در اختیار داشتن ژن‌های ضد آپوپتوز برای سرکوب این پدیده و ایجاد عفونت پایدار به‌گونه‌ای که فرآیند مرگ سلول فعال نشود (۱۱،۱۵). بررسی‌ها نشان داده است که dsRNA ویروس‌های آنفلوانزا، و دست کم سه پروتئین NA، NS1 و PB1-F2 آن‌ها به ترتیب با تسهیل برش TNF- β به شکل فعال، نفوذپذیرکردن غشا میتوکندری، و سرکوب تولید اینترفرون و پاسخ‌های آن با کنترل مسیر انتقال پیام در تنظیم پدیده آپوپتوز دخالت دارند (۲۲-۲۴). در مسیر خارجی آپوپتوز، پیام‌های مرگ توسط لیگاندهای گیرنده مرگ مانند TRAIL و FasL القا شده که سبب فعال‌سازی کاسپاز ۸ می‌شود. این امر به آغاز فعالیت آبشاری کاسپاز و پیامد آن فعال شدن سوبستراهای مرگ منجر خواهد شد. این کاسپاز همچنین بر روی میتوکندری اثر می‌گذارد که به رها سازی سیتوکروم c منجر می‌شود. آزاد شدن این مولکول که با همکاری پروتئین Apaf-1 اعضای خانواده کاسپاز ۹ را فعال می‌کند، سبب افزایش آبشار کاسپازی از آغازین به اجرایی می‌شود. فعال‌شدن پروتئین PKR توسط dsRNA ویروس می‌تواند کاسپاز ۸ را با ساز و کار مستقل از Fas فعال کند که به فعال‌سازی کاسپاز ۹ منجر می‌شود. علاوه بر این، PKR سبب فعال شدن NF-kB شده و این امر به تنظیم بالادست بیان ژن پیش از مرگ سلول منجر

می‌شود. این فاکتور رونویسی به‌طور غیرمستقیم ROS و رادیکال‌های آزاد تولیدشده طی آلودگی با ویروس را فعال می‌کند که می‌تواند با اثر بر روی میتوکندری سبب تغییر در پتانسیل غشا و آزاد شدن سیتوکروم c شوند (۲۵،۲۶). فعال شدن رادیکال‌های آزاد تولید شده طی آلودگی با ویروس با اثر بر روی میتوکندری سبب تغییر در پتانسیل غشا و آزاد شدن سیتوکروم c می‌شوند. نتیجه آزمایش وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی کاسپاز-۸ و سیتوکروم c نشان داد که القای مرگ برنامه‌ریزی شده توسط ویروس از مسیر داخلی یا میتوکندریایی صورت می‌گیرد. تاکسون PB1-F2 تنها پروتئین شناخته شده در تعدادی از ویروس‌های آنفلوانزا است که مرگ برنامه‌ریزی شده سلول را از این مسیر و با واسطه اعضا خانواده پروتئینی Bcl-2 و یا با تشکیل کمپلکس منفذ انتقال نفوذپذیر القا می‌کند. این کمپلکس متشکل از ANT3 در غشای داخلی میتوکندری و VDAC1 در غشای خارجی آن است. برهم کنش این دو پروتئین برای تشکیل این کمپلکس سبب نفوذ پذیری غشای میتوکندری می‌شود. بدین ترتیب مولکول‌های سیتوکروم c موجود در میتوکندری که آبشار کاسپاز را فعال می‌کنند به خارج از آن منتشر می‌شوند (۲۷). القای آپوپتوز توسط تحت تیپ‌های مختلف ویروس‌های آنفلوانزا در کشت‌های سلولی مختلف مطالعه شده است و به‌نظر می‌رسد فرآیندی اختصاصی نوع سلول و ویروس باشد که با میزان آسیب‌زایی ویروس رابطه دارد. در این مطالعه نشان داده شد ویروس آنفلوانزا H9N2 پرندگان القاکننده مرگ سلولی در سلول‌های اپی‌تلیوم تنفسی انسان بوده و بروز این نوع مرگ مستقل از تکثیر ویروس و با میزان ویروس‌های مهاجم مرتبط است.

سپاسگزاری

این پژوهش دستاورد بخشی از طرح تحقیقاتی با کد ۹۰۰۳۱-۱۸-۱۸-۲ می‌باشد که با حمایت موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی اجرا شده است. بدین‌وسیله از کلیه همکاران محترم که ما را در انجام این مطالعه یاری دادند صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

References:

- 1- Perroncito E. *Epizootia tifoide nei gallinacei*. Annali della Academia d'Agricoltura di Torino 1878; 21: 87-126.
- 2- Shahsavandi S. *Virus genetic variations and evade from immune system, the present influenza challenges: review article*. Tehran Uni Med J 2015; 73(7): 469-77.
- 3- Kilbourne ED. *Influenza pandemics of the 20th century*. Emer Infec Dis 2006; 12(1): 9-14.
- 4- Cross KJ, Burleigh LM, Steinhauer DA. *Mechanisms of cell entry by influenza virus*. Exp Rev Mol Med 2001; 3(21): 1-18.
- 5- Shelton H, Ayora-Talavera G, Ren J, Loureiro S, Pickles RJ, Barclay WS, et al. *Receptor binding profiles of avian influenza virus hemagglutinin subtypes on human cells as a predictor of pandemic potential*. J Virol 2011; 85(4): 1875-80.
- 6- Suzuki Y, Ito T, Suzuki T, Holland RE, Chambers TM, Kiso M, et al. *Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses*. J Virol 2000; 74(24): 11825-831.
- 7- Randall RE, Goodbourn S. *Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures*. J Gen Virol 2008; 89(1): 1-47.
- 8- Guillot L, Le Goffic R, Bloch S, Escriou N, Akira S, Chignard M, et al. *Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus*. J Biol Chem 2005; 280(7): 5571-80.
- 9- Le Goffic R, Pothlichet J, Vitour D, Fujita T, Meurs E, Chignard M, et al. *Cutting Edge: Influenza A virus activates TLR3-dependent inflammatory and RIG-I-dependent antiviral responses in human lung epithelial cells*. J Immunol 2007; 178(6): 3368-72.
- 10- Holzinger D, Jorns C, Stertz S, Boisson-Dupuis S, Thimme R, Weidmann M, et al. *Induction of MxA gene expression by influenza A virus requires type I or Type III interferon signaling*. J Virol 2007; 81(14): 7776-85.
- 11- Barber GN. *Host defense, viruses and apoptosis*. Cell Death Differ 2001; 8(2): 113-26.
- 12- Okumura Y, Takahashi E, Yano M, Ohuchi M, et al. *Role and pathological significance of apoptosis induced by influenza virus infection*. Open Antimicrob Agents J 2010; 2: 22-5.
- 13- Wurzer WJ, Ehrhardt C, Pleschka S, Berberich-Siebelt F, Wolff T, Walczak H, et al. *NF- κ B-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas/FasL is crucial for efficient influenza virus propagation*. J Biol Chem 2004; 279(30): 30931-937.
- 14- Ehrhardt C, Marjuki H, Wolff T, Nürnberg B, Planz O, Pleschka S, et al. *Bivalent role of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) during influenza virus infection and host cell defence*. Cell Microbiol 2006; 8(8): 1336-48.
- 15- Lowy RJ. *Influenza virus induction of apoptosis by intrinsic and extrinsic mechanisms*. Int Rev Immunol 2003; 22(5-6): 425-49.

- 16- Lebas NZ, Shahsavandi S, Mohammadi A, Ebrahimi MM, Bakhshesh M. *Replication efficiency of influenza A virus H9N2: A comparative analysis between different origin cell types*. Jundi J Microbiol 2013; 6(9): e8584.
- 17- Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. *Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium*. PNAS 2004; 101(13): 4620–24.
- 18- Shahsavandi S, Ebrahimi MM, Mohammadi A, Zarrin Lebas NZ. *Impact of chicken-origin cells on adaptation of a low pathogenic influenza virus*. Cytotechnol 2013; 65(3): 416-24.
- 19- Böttcher E, Matrosovich T, Beyerle M, Klenk HD, Garten W, Matrosovich, M. *Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium*. J Virol 2006; 80(19): 9896-98.
- 20- Shahsavandi S. *A review: evaluating the dynamics of influenza viruses replication and host cell- virus interactions*. Arak Uni Med Sci J 2015; 18: 1-20.
- 21- Shahsavandi S, Ebrahimi MM, Sadeghi K, Mosavi SZ, Mohammadi A. *Dose- and time-dependent apoptosis induced by avian H9N2 influenza virus in human cells*. BioMed Res Int 2013.
- 22- Schultz-Cherry S, Hinshaw VS. *Influenza virus neuraminidase activates latent transforming growth factor*. J Virol 1996; 70(12): 8624-29.
- 23- Ehrhardt C, Wolff T, Pleschka S, Planz O, Beermann W, Bode JG, et al. *Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses*. J Virol 2007; 81(7): 3058-67.
- 24- Zamarin D, García-Sastre A, Xiao X, Wang R, Palese P. *Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1*. PLoS Path 2005; 1: e4.
- 25- Boya P, Roumier T, Andreau K, Gonzalez-Polo RA, Zamzami N, Castedo M, et al. *Mitochondrion-targeted apoptosis regulators of viral origin*. Biochem Biophys Res Commun 2003; 304(3): 575–81.
- 26- Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. *Mitochondrial membrane permeabilization in cell death*. Physiol Rev 2007; 87(1): 99–163.
- 27- Chanturiya AN, Basanez G, Schubert U, Henklein P, Yewdell JW, Zimmerberg, J. *PB1-F2, an influenza A virus-encoded proapoptotic mitochondrial protein, creates variably sized pores in planar lipid membranes*. J Virol 2004; 78(12): 6304-312.

Induction of Programmed Cell Death in Human Alveolar Epithelial Cells Infected with Influenza Virus

Shahsavandi Sh(PhD)^{*1}, Ebrahimi MM (PhD)², Masoudi Sh (PhD)³

^{1,2,3} *Poultry Viral Vaccines Research and Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran*

Received: 21 Apr 2015

Accepted: 20 Aug 2015

Abstract

Introduction: Avian influenza viruses are considered as a serious threat to human and animal health. An increase in expression of proinflammatory cytokines and type I IFN genes, as well as host cell death responses contribute to the pathogenesis of influenza infection. Hence, this study aimed to evaluate the growth dynamics of subacute avian influenza virus in human respiratory alveolar epithelium cells (A549).

Methods: The A549 cell cultures were infected at MOIs 0.1 and 2.0 viral doses in the presence and absence of trypsin. The virus growth kinetics were elucidated by the plaque assay and the cell viability was determined by MTT at various times after the infection. The induction quality of programmed cell death as well as the signal transduction pathway of death were assessed by genomic DNA fragmentation and western blotting respectively.

Results: The study findings indicated that although the H9N2 virus replication did produce a marked cytopathic effect on the alveolar cells, which led to a reduction in the cell viability, the viral titers were increased in the infected cells. The virus replication of in these cells indicated repression of host defense mechanism as well as activation of cell death. The induction of apoptosis in A549 cells was correlated with the increased virus titers as well as virus replication ($p < 0.05$).

Conclusion: H9N2 avian influenza virus were demonstrated to induce apoptosis in human alveolar epithelial cells via the intrinsic pathway in a dose-dependent manner.

Keywords: Growth kinetic; Human alveolar epithelial cells; Influenza virus; Programmed cell death

This paper should be cited as:

Shahsavandi S, Ebrahimi MM, Masoudi Sh. ***Induction of programmed cell death in human alveolar epithelial cells infected with influenza virus.*** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2015; 23(8): 727-35.

****Corresponding author: Tel: 09122611468, Email: s.shahsavandi@rvsri.ac.ir***