Arak Medical University Journal (AMUJ)
2015; 18(98): 1-20

Review atricle

A Review: Evaluating the Dynamics of Influenza Viruses Replication and Host Cell- Virus Interactions

Shahla Shahsavandi[1*]

1- Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran.

Received: 26 Jan 2015, Accepted: 25 Feb 2015

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:07 +0330 on Tuesday January 16th 2018

Abstract

Background: Direct transmission of avian influenza viruses with human receptor binding specificity to humans is a serious risk of newly emerging virus responsible for pandemy. The analysis of recent avian influenza hemagglutinin sequences and their glycans show their affinities to the human sialic acid receptors. The upregulation of proinflammatory cytokines and type I IFN genes, and host cell death responses contribute to the pathogenesis of influenza infection. Understanding the host cell-virus interactions and replication dynamic of the viruses in different cells is an essential step in surveillance and controlling programs against influenza.

Keywords: Influenza viruse, Host cell-virus interaction, Replication dynamic

*Corresponding Author:
Address: Razi vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran.
Email: s.shahsavandi@rvsri.ac.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:07 +0330 on Tuesday January 16th 2018

مقاله مروری

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۱۸، شماره ۵ (شماره پیاپی ۹۸)، مرداد ۱۳۹۴، ۲۰-۱

مروری بر: ارزیابی پویایی تکثیر ویروس‌های آنفلوانزا و برهم کنش‌های میزبان-ویروس

شهلا شاهسوندی[1*]

۱- عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۶ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۶

چکیده

زمینه و هدف: آلودگی مستقیم انسان با ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان دارای گیرنده‌های اختصاصی ویروس‌های انسانی، تهدیدی برای پیدایش یک ویروس نوپدید است که می‌تواند مسوول بروز جهان‌گیری باشد. پردازش توالی هماگلوتینین ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان سال‌های اخیر و گلیکان‌های آن‌ها، بیان‌گر تمایل این ویروس‌ها به گیرنده‌های اسید سیالیکی انسانی است. تنظیم بالادست ژن‌های سایتوکاین‌های پیش التهابی و اینترفرون نوع I و پاسخ‌های مرگ سلولی با آسیب‌زایی عفونت آنفلوانزا در ارتباط هستند. درک چگونگی برهم کنش میزبان با ویروس و پویایی تکثیر این ویروس‌ها در سلول‌های مختلف یک گام اساسی در برنامه‌های پایش و کنترل آنفلوانزا است.

واژگان کلیدی: ویروس آنفلوانزا، برهم کنش میزبان-ویروس، پویایی تکثیر

***نویسنده مسئول:** کرج، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

Email: s.shahsavandi@rvsri.ac.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:07 +0330 on Tuesday January 16th 2018

مقدمه

نام آنفلوانزا از موضوع یک گردهمایی در قرن چهاردهم میلادی در شهر فلورانس ایتالیا گرفته شده است که در آن تأثیر ستارگان بر این بیماری مورد بحث قرار گرفت(۱). ویروس آنفلوانزا برای نخستین بار در سال ۱۹۰۲ از طیور مبتلا و در سال ۱۹۳۳ از انسان جدا شد(۲). تحت تیپ‌هایی که توان بیماری‌زایی آن‌ها در انسان تأیید شده و گاه سبب بروز جهان‌گیری‌های گسترده شده‌اند عبارت‌اند از: H1N1 (جهان‌گیری اسپانیایی ۱۹۱۸ و همه‌گیری ۲۰۰۹)، H2N2 (جهان‌گیری آسیایی ۱۹۵۷)، H3N2 (جهان‌گیری هنگ‌کنگ ۱۹۶۸)، H5N1 (همه‌گیری آسیا-اروپا ۲۰۰۵ و قابل تهدید در آفریقا)، H7N7 (همه‌گیری اروپا)، H1N2 (بومی انسان و خوک) و H9N2 (بومی انسان و پرندگان). تماس مستقیم و غیرمستقیم طیور اهلی با پرندگان آبزی وحشی و مهاجر که منبع این ویروس هستند، علت اصلی انتقال ویروس و انتشار بیماری است. عامل بیماری آنفلوانزای پرندگان ویروس‌های تیپ A هستند که از زیر واحدهای آن فقط ویروس‌های H5N1 و H7N3 موجب بیماری فوق حاد بسیار مسری و کشنده در پرندگان اهلی می‌شوند و ویروس H9N2 عامل آنفلوانزای تحت حاد پرندگان است. از سال ۱۹۹۷ ویروس‌های این سه تحت‌تیپ از سد محدودیت میزبان گذشته و به انسان منتقل شده‌اند که به مرگ تعدادی از مبتلایان منجر گشته‌اند(۳). ژنوم قطعه قطعه این ویروس‌ها سبب می‌شود که احتمال بروز خطا و به عبارتی تغییر در همانندسازی RNA بسیار زیاد شود و چون این ویروس‌ها مکانیسم تصحیح اشتباه ندارند نمی‌توانند خطاهای ایجاد شده را ترمیم کنند. این تغییرات کوچک و پیوسته همراه با جایگزینی اسیدآمینه در ژنوم ویروس به ظهور واریته‌ای با تنوع آنتی‌ژنی جدید به وجود می‌آیند. بازآرایی و جا به جایی قطعات ژنومی بین دو ویروس آنفلوانزا با ژنوتیپ‌های متفاوت که یک سلول واحد را آلوده می‌کنند، به تولید یک سویه و یا تحت تیپ جدیدی از ویروس منجر می‌شود که از نظر ایمنولوژی با گونه‌های در گردش قبلی متفاوت‌اند و سبب میزان درگیری بالایی در جمعیت فاقد ایمنی علیه آنتی‌ژن جدید می‌شود. این مساله از اهمیت زیادی برخوردار است، زیرا در صورت تطبیق سویه جدید با انسان، به عنوان یک عامل بالقوه بیماری‌زا برای جمعیت انسانی مطرح می‌گردد(۷-۴). وجود این نگرانی‌ها توجه سازمان‌های متولی بهداشت عمومی را به اتخاذ تصمیماتی برای پیش‌گیری و کنترل این بیماری با طراحی واکسن‌های توانمند معطوف کرده است که بتوانند در برابر تحت تیپ‌های ویروس آنفلوانزای پرندگان و دیگر پستانداران که توانایی آلوده کردن انسان را دارند ایمنی بخش باشند. ارایه چنین واکسنی مستلزم تحقیق در زمینه‌های ژنوم ویروس و چگونگی تکثیر آن، بیماری‌زایی ویروس و انتشار آن و القا ایمنی موثر با واکسیناسیون است. اکثر واکسن‌های دارای مجوز مصرف علیه آنفلوانزا، واکسن‌های غیرفعال تهیه شده از کل پیکره ویروس هستند که برای تحریک سامانه ایمنی میزبان و القا پاسخ‌های ایمنی به یاور نیاز دارند(۸، ۹). افزایش پاسخ‌های ایمنی با استفاده از یاورها به دلیل ایجاد پیام‌های کمک تحریکی برای هدایت لنفوسیت‌ها به سمت پاسخ ایمنی و ترشح فاکتورهای محرک مانند اینترلوکین است که بر روی تکثیر لنفوسیت‌ها تأثیر می‌گذارد. در سال‌های اخیر علاوه بر مشتقات باکتری‌ها، مطالعات گسترده‌ای بر روی اثر طیفی سایتوکاین‌ها در تقویت پتانسیل القای ایمنی و افزایش اثربخشی آن‌ها علیه ویروس آنفلوانزا صورت گرفته است. به عنوان مثال، مولکول‌هایی که پاسخ‌های ایمنی ذاتی را از مسیر STING-TBK1 فعال می‌کنند(۱۰)، IC31 که آگونیست TLR-9 است(۱۱) و هموکینین-۱ که تنظیم کننده سامانه ایمنی است و با تحریک آنتی‌بادی در تغییر مسیر ایمنی به سمت پاسخ‌های اینترفرونی نوع I موثر است(۱۲)، سبب افزایش پاسخ‌های ایمنی علیه عفونت‌های آنفلوانزا می‌شوند.

تکنولوژی‌های نوین برای رشد و تکثیر مناسب ویروس‌ها در کشت‌های سلولی، نوید دامنه‌های وسیع‌تر تشخیص و درمان را می‌دهند. از طرف دیگر، استفاده از روش‌های کشت سلولی سبب شده است که تکثیر ویروس، شمارش و تشخیص آن و نیز مطالعات گسترده بر روی جدایه‌های جدید و خصوصیات آن‌ها آسان شود. تشخیص اولیه بیماری آنفلوانزا با مشاهده علایم بالینی امکان‌پذیر است. اما تشخیص قطعی به یافته‌های آزمایشگاهی متکی بر

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:07 +0330 on Tuesday January 16th 2018

جداسازی ویروس نیاز دارد. جداسازی ویروس در تخم مرغ یا کشت سلول، روش بسیار حساس و ارزشمندی برای تشخیص عفونت ویروسی است، این در صورتی است که از نمونه‌های بالینی با کیفیت خوب استفاده شود. این روش همراه با انجام آزمایش‌های مولکولی و آزمایش‌های سرمی بر پایه پروتئین‌های داخلی NP و M1 ویروس که به شدت حفظ شده‌اند روش استانداردی برای تشخیص ویروس است. یکی از مزایای مهم روش جداسازی ویروس، موجود بودن ویروس برای تعیین خصوصیات آنتی‌ژنی و ژنتیکی، تهیه واکسن و انجام آزمایش‌های تعیین حساسیت دارویی است. عوامل متعددی استفاده از روش جداسازی ویروس به عنوان یک روش تشخیصی را محدود می‌کنند. هر یک از رده‌های سلولی پستانداران فقط برای تکثیر تعداد محدودی از ویروس‌های بیماری‌زا مهم هستند، بنابراین در یک آزمایشگاه باید رده‌های سلولی متعدد نگه‌داری شود. بیشتر ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان به آسانی در تخم مرغ جنین‌دار رشد می‌کنند، اما برخی از انواع ویروس‌های انسانی و خوکی رشد ضعیفی در تخم مرغ دارند، به ویژه اگر فقط از راه آلانتوییک تلقیح شوند. در چنین شرایطی، سلول‌هایی با منشاء پستانداران و یا پرندگان گزینه بهتری برای جداسازی ویروس هستند(۱۳). درک چگونگی برهم کنش میزبان با ویروس آنفلوانزا گامی اساسی در تکثیر مناسب ویروس است. در شرایط آزمایشگاهی استفاده از انواع سلول‌ها و توجه به نیازمندی‌های ویروس‌ها برای رشد و تکثیر، امکان مطالعه و ارزیابی برهم کنش‌های میزبان و ویروس و نقش هر یک از عوامل سلولی یا ویروسی را فراهم می‌کند.

مواد و روش ها

در این مطالعه، یافته‌های مقالات منتشر شده و کتاب‌های معتبر در مورد پویایی رشد ویروس آنفلوانزا و برهم کنش آن با میزبان‌های مختلف با در نظر گرفتن نقش هر یک از عوامل سلولی و ویروسی ارزیابی شده است.

یافته‌ها

ساختار و طبقه‌بندی ویروس آنفلوانزا

آنفلوانزا، RNA ویروس پوشش‌دار متعلق به خانواده ارتومیکسوویریده با قطبیت منفی و ژنوم هشت قطعه‌ای است که چندین پروتئین شامل نوکلئوپروتئین NP، پروتئین‌های داخلی پلیمرازی PB1، PB1-F2، PB2 و PA، گلیکوپروتئین‌های سطحی هماگلوتینین (HA) و نورآمینیداز (NA)، پروتئین‌های ماتریکس M1 و M2 و پروتئین‌های غیرساختمانی NS1 و NS2 را رمزدهی می‌کند(۱۴، ۱۵). خلاصه‌ای از عملکرد پروتئین‌های اصلی ویروس‌های آنفلوانزا تیپ A در جدول ۱ آمده است(۱۶).

جدول ۱. مشخصات قطعات ژنومی ویروس‌های آنفلوانزا تیپ A و عملکرد پروتئین‌های آن‌ها

عملکرد	وزن مولکولی (کیلودالتون)	پروتئین	طول نوکلئوتید	قطعه
زیرواحد پلیمراز وابسته به RNA، کلاهک‌گذاری	۸۷	BP2	۲۳۴۱	۱
زیرواحد کاتالتیک آنزیم RNA پلیمراز وابسته به RNA	۹۶	BP1	۲۳۴۱	۲
عامل بیماری‌زایی و مشارکت در مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی	۱۰/۵	PB1-F2		
طویل کردن زنجیره RNA	۸۵	PA	۲۲۳۳	۳
اتصال گیرنده، هم‌جوشی غشایی	۶۳	HA	۱۷۷۸	۴
ساخت کپسومرها برای احاطه کردن v/cRNA	۵۶	NP	۱۵۶۵	۵
تجزیه گیرنده، آزادسازی ویروس	۶۰	NA	۱۴۱۳	۶
فعالیت کانال یونی، شکل کروی یا رشته‌ای ویریون‌ها	۲۷	M1	۱۰۲۷	۷
حفظ تغییر شکل HA، هدف داروهای ضد ویروس	۱۴	M2		
تنظیم پس از رونوشت، ممانعت از پلی‌آدنیله شدن، مشارکت در مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی	۲۶	NS1	۸۹۰	۸
عامل خروج هسته‌ای	۱۴	NS2		

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:07 +0330 on Tuesday January 16th 2018

در سال‌های اخیر وجود دو پروتئین PA-X و N40 در تعدادی از ویروس‌های آنفلوانزا مشخص شده است. پروتئین PA-X که به مقدار بسیار کم در سلول بیان می‌شود قسمت انتهای آمینی پروتئینPA است و با ساز و کار تغییر قالب 1+ در توالی بسیار حفظ شده UCC UUU CGU موجود در انتهای ´۵ رمزدهی می‌شود. این پروتئین ممکن است در سرکوب کردن سلول میزبان با برش mRNA عمل کند. پروتئین N40 پس از PB1-F2 و با یک کدون آغازین متفاوت از قطعه PB1 رمزدهی می‌گردد و با ساز و کار غربال‌گری نشتی ریبوزومی بیان می‌شود. بیان هر یک از پروتئین‌های رمزدهی شده از طریق PB1 کاملا به هم وابسته بوده و در تکثیر ویروس نقش دارند. این پروتئین در ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان شناسایی شده و یافته‌هایی مبنی بر وجود این پروتئین در سویه H3N2 انسانی نیز وجود دارد(۱۷).

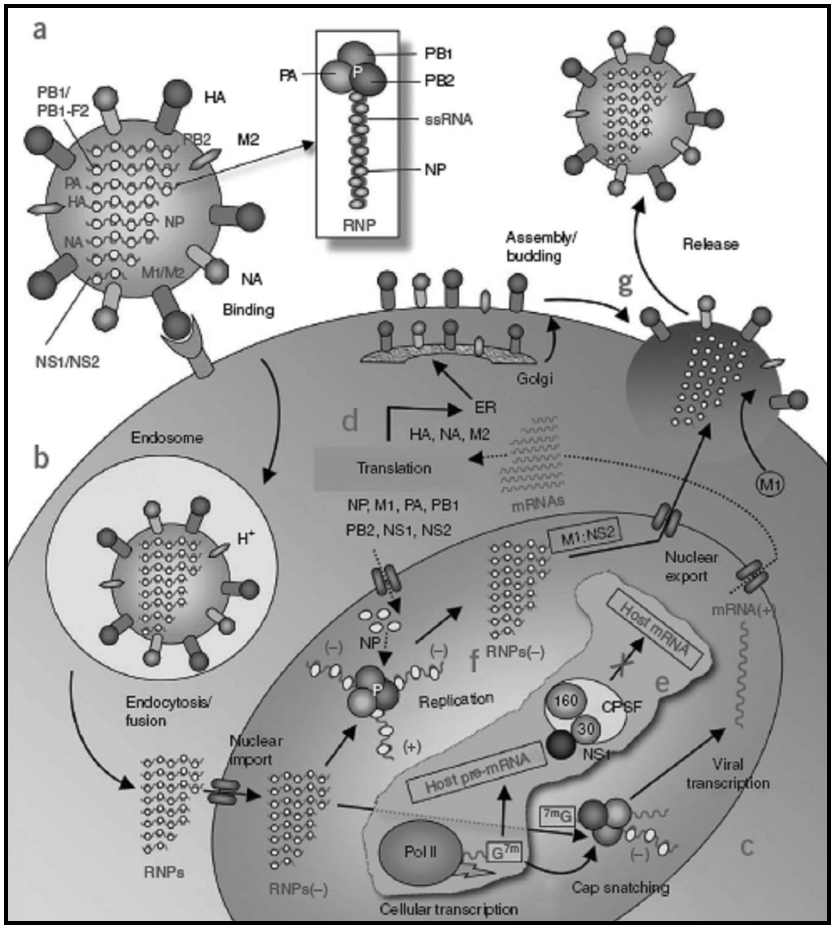
ویروس‌های آنفلوانزا براساس تفاوت آنتی‌ژنی در پروتئین‌های داخلی NP و M به تیپ‌های A، B و C و دو جنس توگاتوویروس و ایساویروس طبقه‌بندی می‌شوند. ویروس‌های گروه B و C از موارد بیماری انسان جدا می‌شوند و ویروس‌های تیپ A سبب بروز بیماری در پرندگان، انسان و پستانداران دیگر می‌گردند. تحت تیپ‌های ویروس‌های تیپ A براساس خاصیت آنتی‌ژنیسیته دو گلیکوپروتئین سطحی HA و NA تعیین می‌شوند. تاکنون ۱۸ زیرواحد HA و ۱۰ زیر واحد NA در ویروس‌های تیپ A شناسایی شده‌اند که تمامی تحت تیپ‌های آن در پرندگان یافت می‌شوند، اما تحت تیپ‌های آنتی‌ژنیک H5، H7 و H9 بیماری قابل انتقال به انسان ایجاد می‌کنند. ویروس‌های تیپ B به میزان دو تا سه برابر کندتر از ویروس‌های تیپ A تغییر می‌کنند و در نتیجه از نظر ژنتیکی کم‌تر دستخوش تغییر می‌شوند و یک نوع تحت تیپ دارند(۴، ۸).

تکثیر و عفونت‌زایی ویروس آنفلوانزا

همانندسازی ویروس آنفلوانزا یک فرآیند چند مرحله‌ای است که طی آن ویروس با سلول هدف پیوند برقرار کرده و وارد آن می‌شود. سپس ژنوم خود را به هسته می‌فرستد تا توان تولید نسخه‌های جدید از پروتئین و RNA ویروسی را داشته باشد. مرحله بعد تجمع این ترکیبات برای ایجاد ذرات ویروسی جدید و مرحله پایانی خروج از سلول میزبان است. سه پلی‌پپتید HA، NA و M به غشاء لیپیدی سلول میزبان تمایل داشته و سایر پروتئین‌ها در مورفوژنز ویرکون‌ها با جوانه زدن از غشاء پلاسمایی دخالت دارند(۱۸). ویروس‌های آنفلوانزا از طریق HA با قندهای اسید سیالیک روی سطوح سلول‌های اپی‌تلیال مانند بینی، نای و شش‌های پستانداران و روده‌های پرندگان پیوند برقرار می‌کنند.

شروع عفونت ویروسی (تصویر ۱)(۱۹) نتیجه اتصال HA به گیرنده‌های حاوی سیالیک اسید در زنجیره‌های جانبی کربوهیدراتی در سطح گلیکوپروتئینی و گلیکولیپیدی سلول است. پپتید اتصال که توالی غنی از اسیدآمینه گلایسین با انعطاف‌پذیری زیاد است، تنها بخشی از HA می‌باشد که به غشاء هدف وارد می‌شود و فقط در pH پایین (بین ۵ تا ۶ بسته به سویه ویروس) عمل می‌کند.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:07 +0330 on Tuesday January 16th 2018



تصویر ۱. چرخه آلوده شدن سلول میزبان و تکثیر ویروس آنفلوانزا. a) تصویر شماتیک پوشش دو لایه لیپیدی ویروس آنفلوانزا و هشت قطعه RNA ژنومی آن و چسبیدن ویروس به گیرنده‌های اسید سیالیک بر روی سطح سلول میزبان با واسطه HA. b) ویروس متصل شده از طریق اندوسیتوز وارد وزیکول‌های اندوزومی سلول می‌شود. کاهش pH سبب بروز تغییر شکل در پروتئین HA و هم‌جوشی غشا اندوزومی سلول و غشا ویروس با یکدیگر می‌شود. با اسیدی شدن محیط اندوزوم، پروتون‌ها از طریق کانال یونی M2 به درون ویروس جریان یافته و سبب جدا شدن vRNP ها از پروتئین M1 می‌شوند. ریبونوکلئوپروتئین‌های ویروس که درون سیتوپلاسم رها شده‌اند از طریق پیام‌های داخل سلولی موقعیت‌یابی هسته‌ای روی NP شناسایی شده و وارد هسته می‌شوند. c) در هسته RNA پلی‌مراز ویروس ساخت mRNA ویروس را از قطعات RNA کلاهک‌دار برش خورده از پیش-mRNA میزبان آغاز می‌کند. زیر واحد PB2 به پیش-mRNA های کلاهک‌دار میزبان متصل شده و دمین اندونوکلئازی در زیر واحد PA پیش-mRNA ها را به الیگونوکلئوتیدهایی به طول ۱۷-۹ نوکلئوتید برش می‌دهد که آغازگر ساخت mRNA های ویروسی هستند. رونویسی از mRNA های ویروسی از انتهای ′۳ قطعات RNA کلاهک‌دار برش خورده آغاز می‌شود. d) پروتئین‌های پلی‌مرازی و قطعات RNA در هسته به‌هم متصل شده و کمپلکس RNP را می‌سازند. کمپلکس‌های RNP جدید از هسته خارج شده و برای این که به پروتئین ترجمه شوند به سیتوپلاسم می‌روند و در غشاء سلولی همراه با دیگر پروتئین‌ها به صورت ویروس سرهم می‌شوند. e) پروتئین NS1 ویروس آنفلوانزا نقش مهمی در سرکوب تولید mRNA میزبان شامل mRNA اینترفرون β با پردازش انتهای ′۳ پیش-mRNA ها دارد. برخلاف پیش-mRNA های میزبان، mRNA های ویروس نیازی به پردازش انتهای ′۳ ندارند. بنابراین mRNA های ویروس به سیتوپلاسم می‌روند، در حالی که mRNA های میزبان متوقف می‌شوند. f) پلی‌مراز ویروس مسوول ساخت mRNA کلاهک‌دار به عنوان آغازگر برای ساخت mRNA ویروسی و نیز تکثیر RNA آن به روش غیر وابسته به آغازگر است. با میانجی‌گری کمپلکس M1-NS2 که به vRNP ها متصل می‌شود و برهم کنش NS2 با پروتئین میزبان، vRNP ها از هسته خارج شده و به طور پیوسته وارد سیتوپلاسم می‌شوند. g) vRNP ها به غشاء سلول آمده، در ویریون‌های جدید گنجانده شده و جوانه می‌زنند. ویریون‌ها در نتیجه‌ی برهم کنش HA و موتیف‌های اسید سیالیک سطح سلول به غشاء متصل می‌مانند. پروتئین NA با حذف بقایای اسید سیالیک، سبب رها سازی ویروس از سلول آلوده شده میزبان و ورود آن به سلول دیگر می‌شود.

علی‌رغم جهش‌هایی که در مولکول HA رخ می‌دهد، این توالی پپتیدی با ترادف اسید آمینه‌ای GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYG به طور نسبی در تمام تحت تیپ‌های ویروس آنفلوانزا A حفظ

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:07 +0330 on Tuesday January 16th 2018

شده‌اند. بروز جهش‌های نقطه‌ای در این پپتید می‌تواند عمل اتصال را متوقف نمایـد(۱۳). پس از اتصال و هم‌جوشی غشاها، پروتئین HA به وسیله یک پروتئاز شکسته شده و ویروس با اندوسیتوز وارد سلول می‌شود. ویروس‌های آنفلوانزا با روش اندوسیتوز با واسطه کلاترین به سلول میزبان وارد می‌شوند (۲۰، ۲۱). پروتئین‌های بار یا دارای محموله ترکیبات کلیدی در این نوع اندوسیتوز هستند که مولکول‌های بار را به سمت پوشش کلاترین هدایت کرده و مانند محور بین این پوشش و غشاء پلاسمایی عمل می‌کنند. پروتئین اپسین ۱ (EH domain-binding mitotic phosphoprotein 1) دارای موتیف‌های اختصاصی است که به طور مستقیم با کلاترین وارد واکنش شده و با واسطه‌ی کلاترین سبب اندوسیتوز در ویروس‌های آنفلوانزا می‌شود. مسیر فعال سازی PI3K (فسفواینوسیتید ۳- کیناز) با واسطه پروتئین Ras (Rat sarcoma) که در انتقال پیـام داخل سلولی نقش دارد، یکـی از تنظیم‌کننده‌های کلیدی در ورود ویروس به سلول میزبان است و بر روی اندوسیتوز مستقل از کلاترین و بلوغ اندوزومی اثر می‌گذارد(۱۳، ۲۲، ۲۳). هم‌جوشی غشایی وابسته به شرایط اسیدی بوده و برای روند پوشش برداری یا برهنه شدن ویروس لازم است. برش پس از ترجمه HA_0 به عنوان پیش ساز مولکول به زیرواحدهای ۱ و ۲ یک دمین اتصال از طریق پروتئازهای سلول میزبان در انتهای آمینی آن ایجاد می‌کند که واسطه هم‌جوشی بین پوشش ویروس و غشاء اندوزومی سلول میزبان است. کاهش pH اندوزومی موجب تغییر ساختاری HA، ناپایداری اتصال HA_1 در ناحیه سر و جدا شدن سر کروی می‌شود. در نتیجه مارپیچ HA_2 که پیش‌تر در زیر HA_1 قرار گرفته بود آشکار شده و باز می‌شود. در نتیجه‌ی این گسترش، بخش آب‌دوست انتهای آمینی آن در دسترس قرار می‌گیرد تا با لیپید دو لایه غشاء اندوزومی برهم کنش داشته باشد(۲۴). شرایط اسیدی داخل سلول در اندوزوم سبب می‌شود پروتئین HA پوشش ویروس را با غشاء واکوئول پیوند دهد. در عمل اتصال، پروتئین داخل غشایی M2 مانند یک کانال یونی انتخاب پروتون عمل می‌کند و می‌تواند میزان هم‌جوشی غشاها را در حد ثانیه تنظیم نماید(۲۵). کانال یونی M2 اجازه می‌دهد پروتون‌ها از میان غشا ویروس عبور کنند، این عمل سبب متلاشی شدن هسته و رهاسازی مولکول‌های RNA ویروسی (vRNA) و پروتئین‌های کمکی و RNA پلی‌مراز وابسته به‌RNA به داخل سیتوپلاسم می‌شود. با این راهبرد ویروس می‌تواند به غشا پلاسمایی و اسکلت سلولی وارد شود. در نتیجه داده‌های ژنتیکی و پروتئین‌های ویروس در لومن سلولی آزاد شده و ژنوم ویروس برای تولید RNA بینابینی (cRNA) قطعه کامل از vRNA، به روش غیر وابسته به آغازگر همانند سازی می‌شود. پروتئین M1 با غشاء پلاسمایی و NP در تشکیل کمپلکس ریبونوکلئوپروتئین (RNP) برهم کنش دارند. از آن‌جایی که تکثیر و رونویسی ژنوم ویروس درون هسته انجام می‌شود، انتقال vRNP به هسته سلـول میزبان به کمپلکس منفذ هسته‌ای سلول بستگی دارد. پس از مهاجرت RNP به هسته سلول میزبان، کمپلکس پلی‌مرازی، رونویسی اولیه از vRNA به mRNA را آغاز می‌کند که مستلزم مشارکت RNA پلی‌مراز II سلولی است. vRNA به صورت کمپلکس RNP با مشارکت NP و RNA پلی‌مراز وابسته به RNA خارج می‌شود که واحد اصلی برای همانند سازی و رونویسی از ژنوم ویروس است. پروتئین‌های هسته و vRNA کمپلکسی را تشکیل می‌دهند که به درون سلول منتقل می‌شود؛ جایی که RNA پلی‌مراز وابسته به RNA عمل نسخه برداری از vRNA با قطب مثبت را آغاز می‌کند. سپس RNA به داخل سیتوپلاسم فرستاده شده و ترجمه می‌شود یا در هسته باقی می‌ماند. vRNA تازه ساخته شده در هسته به عنوان الگویی برای رونویسی ثانویه از mRNA های ویروسی عمل می‌کند. محصول رونویسی، mRNA های ′۵- کلاهک‌دار و ′۳-پلی‌آدنیله هستند(۱۷، ۱۸، ۲۶). پس از اولین دور رونویسی از mRNA، cRNA هایی که کلاهک ندارند و پلی‌آدنیله نشده‌اند از روی vRNA رونویسی می‌شوند. RNA پلی‌مراز ویروس، یک دی نوکلئوتید در انتهای ′۳ پروموتر cRNA تشکیل می‌دهد که آغازگر طویل سازی زنجیره الیگونوکلئوتیدی است. هر

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:07 +0330 on Tuesday January 16th 2018

قطعه از ژنوم ویروس آنفلوانزا یک واحد رونویسی جداگانه است. در هر هشت قطعه، ۱۲ نوکلئوتید در انتهای ′۳ و دست کم ۱۳ نوکلئوتید در انتهای ′۵ کاملا حفظ شده و دارای فعالیت پروموتری هستند. فرآیند رونویسی ژنوم ویروس با استفاده از آغازگر الیگونوکلئوتیدی دارای ساختار کلاهک-۱ مشتق از mRNA سلولی و یک گوانین مکمل سیتوزین بر روی vRNA آغاز می‌شود. پلی‌مراز ویروس به انتهای ′۵ vRNA متصل شده و این اتصال تا زمانی که پلی‌مراز به پیام پلی (A) متشکل از ۵ تا ۷ واحد U در انتهای ′۵ vRNA برسد، ادامه می‌یابد. پلی‌مراز دنباله پلی (A) را در انتهای mRNA ویروس ایجاد کرده و سبب طویل شدن زنجیره می‌شود(۲۷، ۲۸). پروتئین‌های ویروسی تازه ساخته شده در دستگاه گلژی به صورت HA و NA روی سطح سلول قرار می‌گیرند یا برای پیوند با vRNA و تشکیل قطعات ژنومی ویروس به هسته برگردانده می‌شوند. vRNA های با قطب منفی که ژنوم ویروس‌های آینده را تشکیل می‌دهند، RNA پلی مراز وابسته به RNA و پروتئین‌های ویروسی همگی در داخل یک ویریون تجمع می‌یابند. پروتئین فسفریله NS2 میانجی خروج کمپلکس RNP از هسته است. این پروتئین که در هسته و سیتوپلاسم سلول‌های آلوده یافت می‌شود در ناحیه آمینی خود دارای پیام خروج هسته‌ای است و هدایت RNP از مسیر CRM1 (حفظ ناحیه کروموزومی ۱) را برعهده دارد. آرایش RNP در سیتوپلاسم انجام شده و همراه با پروتئین M1 و پروتئین‌های غشایی ویروس که در شبکه رتیکولوم اندوپلاسمی فرآوری و در دستگاه گلژی گلیکوزیله شده‌اند به محل سرهم شدن در غشاء پلاسمایی سلول‌های اپی‌تلیال میزبان هدایت می‌شوند. مولکول‌های HA و NA در یک قسمت برآمده در غشاء سلول جمع آوری می‌شوند. vRNA و پروتئین‌های مرکزی ویروس هسته را ترک کرده و وارد غشا می‌گردند(۲۹، ۳۰). به دنبال تکثیر ویروس، NA با شکستن پیوند α -کتوسیدیک بین انتهای اسید سیالیک و قند مجاور آن، مانع واکنش گیرنده HA می‌شود. در نتیجه‌ی فعالیت NA، ویروس‌های تازه ساخته شده با عمل جوانه زدن از سطح سلول‌های آلوده رها می‌شوند. برداشته شدن اسید سیالیک از قند برای جلوگیری از تجمع ویروس بعد از رهایی از سلول آلوده لازم است و از طرف دیگر سبب جلوگیری از غیرفعال شدن ویروس می‌شود. این امر به نفوذ ویروس به سلول‌های اپی‌تلیال دستگاه تنفسی منجر می‌گردد(۳۳-۳۱). چرخه آلودگی سلول میزبان با ویروس آنفلوانزا حدود هشت ساعت طول می‌کشد(۱۷).

دامنه میزبان‌های ویروس آنفلوانزا

تکثیر ویروس‌های پوشش دار آنفلوانزا در سلول‌های میزبان، فرآیندی است متکی به چندین مسیر ژنتیکی میزبان شامل مسیرهای 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. هردو عوامل مرتبط با ویروس آنفلوانزا و میزبان، دامنه میزبان را در آلودگی با ویروس مشخص می‌کنند(۳۴). در سال‌های اخیر، نقش مولکول‌های سلولی و ژن‌های ویروس آنفلوانزا در محدود سازی دامنه میزبان و گرایش سلولی به ویژه آن‌هایی که در همانندسازی و رونویسی از ژنوم ویروس، ایمنی طبیعی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول دخالت دارند، بیش‌تر مورد توجه قرار گرفته است.

عوامل مرتبط با ویروس

گلیکوپروتئین HA ویروس به دلیل نقشی که در شناسایی سلول دارد، نقش عمده‌ای در محدود سازی دامنه میزبان ایفا می‌کند. اولین مرحله در آلودگی با ویروس آنفلوانزا، بلوغ اندوزومی و جذب سیالید از طریق HA بر روی سطح سلول است. برهم کنش Ras-PI3K در اندوزوم‌های اولیه و فعال شدن مسیر انتقال پیام PI3K برای ورود ویروس به سلول و تنظیم فرودست گیرنده‌های اسید سیالیک سلول میزبان ضروری است. این اسید از طریق آنزیم سیالیل ترانسفراز به قند انتهایی گلیکوپروتئین HA ویروس مانند گالاکتوز و گالاکتوزامین متصل شده و آن را سیالید می‌کند. اختصاصی بودن گیرنده‌های ویروس بسته به نوع سیالید شدن پروتئین‌های سطحی سلول میزبانی که از آن

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:07 +0330 on Tuesday January 16th 2018

جدا شده است متفاوت می‌باشد(۳۵، ۳۶). در انسان، ویروس‌های آنفلوانزا ترجیحاً N-استیل سیالیک اسید متصل به گالاکتوز با پیوند 2,6α (NeuAcα2,6Gal) را شناسایی می‌کنند، در حالی که در گونه‌های پرندگان و اسب N-استیل سیالیک اسید متصل به گالاکتوز با پیوند 2,3α (NeuAcα2,3Gal) شناسایی می‌شود(۱۷). سلول‌های اپی‌تلیال غیر مژه‌دار دستگاه تنفسی انسان حاوی گیرنده‌های SAα2,6 Gal هستند که بخش اعظم دستگاه تنفسی را می‌پوشانند، اما گیرنده‌های SAα2,3 Gal به میزان کم درمحل اتصال برونشیول‌ها به آلوئول‌ها و در سلول‌های اپی‌تلیال مژه دار یافت می‌شوند(۴۰-۳۷). بخش اتصال HA تعیین کننده دامنه میزبان و ویژگی گیرنده سلولی است و جایگزینی اسیدهای آمینه در این محل ممکن است اتصال ویروس به گیرنده‌های سطح سلول و اختصاصی بودن آن را تحت تأثیر قرار دهد. در روند انتقال ویروس آنفلوانزا از پرندگان به انسان، چنین جهش‌هایی که به تغییر قسمت سر مولکول HA منجر می‌شود ویروس جهش یافته را به سازگاری با میزبان جدید وادار می‌کند؛ مانند آن چه که در جهان‌گیری ۱۹۶۸ هنگ‌کنگ رخ داد. نشان داده شده است که سویه‌های H9N2 جدا شده از طیور دارای ویژگی اتصال به گیرنده مشابه جدایه‌های انسانی هستند(۴۳-۴۱). نتایج مشابهی از قابلیت آلودگی سلول‌های اپی‌تلیال نای طیور با تحت تیپ‌های ویروس آنفلوانزا گزارش شده است و بیان‌گر این هستند که سلول‌های مژه دار دستگاه تنفس، توانایی بیش‌تری برای رشد این ویروس‌ها دارند(۴۴).

بین محل برش HA و بیماری‌زایی ویروس، ارتباط مهم و آشکاری وجود دارد(۴۵، ۴۶). پروتئین HA ویروس‌های فوق حاد دارای اسید آمینه‌های بازی در محل برش هستند که به وسیله‌ی پروتئازهای موجود درسلول میزبان از جمله فورین و PC6 شناسایی و بریده می‌شوند. این آنزیم‌ها وابسته به یون کلسیم بوده و در pH اسیدی بیش‌ترین اثر را دارند. توالی HA که از طریق این آنزیم‌ها بریده می‌شود، Q-R/K-X-R/K-R (X هر اسیدآمینه غیر بازی) است(۴۷، ۴۸). به علت حساسیت بیش‌تر HA ویروس‌های فوق حاد به آنزیم‌های پروتئازی، این پروتئین در طیف گسترده‌ای از سلول‌های میزبان برش می‌خورد و در نتیجه این ویروس‌ها می‌توانند بیماری منتشر و کشنده ایجاد نمایند. پروتئین HA سویه‌های تحت حاد که محل برش آن موتیف چهار اسیدآمینه‌ای B-X-B-R (B هر اسیدآمینه بازی) است نیز پتانسیل ایجاد بیماری را در نبود زنجیره کربوهیدراتی دارد. اما پروتئازهای باکتریایی مانند استافیلوکیناز و استرپتوکیناز و نیز سرین پروتئازهای TMPRSS و HAT اپی‌تلیوم تنفسی فقط در تعداد محدودی از سلول‌ها و از طریق پروتئازهای شبه تریپسینی دستگاه تنفس و دستگاه گوارش مانند پروتئاز شبه فاکتور انعقادی X که از غشا کوریوآلانتوییک جنین جوجه جدا شده است، برش می‌خورند. حساسیت این پروتئین به آنزیم‌های سرین پروتئاز مشخص کننده شدت آلودگی است، یعنی تفاوت در محل تکثیر ویروس بر آسیب‌زایی، بیماری‌زایی و میزان پاسخ ایمنی اثر می‌گذارد(۴۹).

عامل دیگری که در تعیین دامنه میزبانی و سازگاری ویروس آنفلوانزا با میزبان جدید نقش دارد، گلیکوزیله شدن مولکول HA به ویژه در نزدیکی محل اتصال گیرنده است که ممکن است ظرفیت اتصال را تحت تأثیر قرار دهد. مهم‌ترین هدف گلیکوزیله شدن HA کمک به تاخوردگی صحیح پروتئین و تشکیل تریمر آن است. اگرچه همه مولکول‌های HA گلیکوزیله می‌شوند، اما تعداد و موقعیت آن‌ها در تحت تیپ‌ها و حتی در واریته‌های آنتی‌ژنی با هم متفاوت است. این جایگاه‌ها عمدتاً در اطراف ناحیه آنتی‌ژنی HA_1 قرار دارند. در بین ویروس‌های آنفلوانزای انسانی و آنفلوانزای پرندگان که به طور مستقیم به انسان منتقل می‌شوند، تحت تیپ‌های H9 و H5 از پتاسیل نسبی بیش‌تری برای گلیکوزیله شدن برخوردارند. در بررسی ویروس‌های H9N2 تعداد هفت جایگاه N-گلیکوزیله در ژن HA مشخص شده که پنج‌تای آن‌ها در زیرواحد HA_1 قرار دارند(۴۳).

علاوه بر HA، پروتئین ویروس‌های آنفلوانزا A نیز اختصاصی بودن میزبان را تحت تأثیر قرار می‌دهد و در

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:07 +0330 on Tuesday January 16th 2018

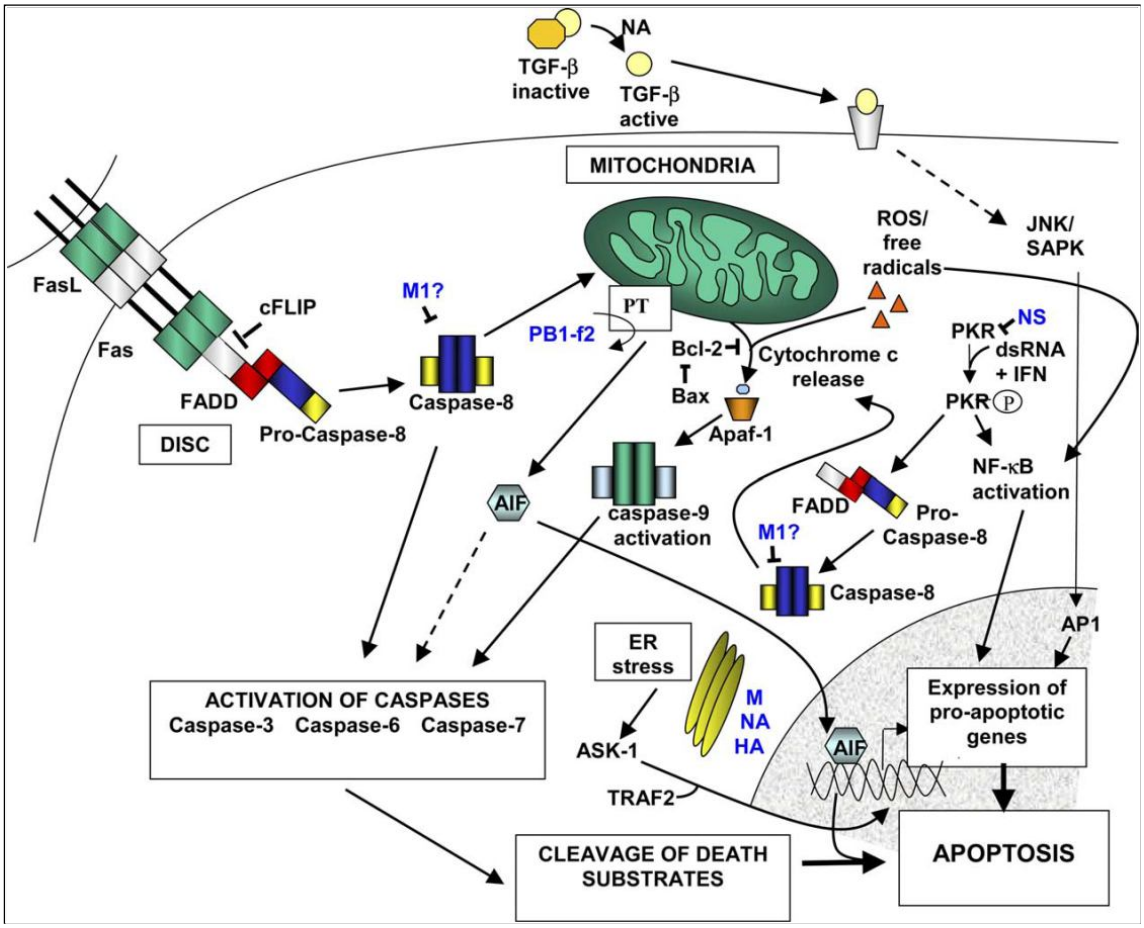
محدود کردن دامنه میزبان دخالت دارد. سلول‌های دندریتیک، عرضه کننده گیرنده‌های شناسایی عامل بیماری‌زا یا حس‌گر هستند که نشان‌گرهای مولکولی حفظ شده عامل بیماری‌زا را در سلول شناسایی می‌کنند. فعال شدن این گیرنده‌ها سبب القاء پاسخ‌های ایمنی ضد ویروسی از جمله تولید اینترفرون‌ها شده که با جلوگیری از رونویسی ویروس جهت محدود شدن تکثیر آن‌ها، سبب افزایش مقاومت نسبت به عفونت آنفلوانزا می‌شود(۵۰). عملکرد مهم پروتئین NS1، ممانعت از پاسخ ضد ویروسی میزبان با سرکوب تولید اینترفرون نوع I برای حصول اطمینان از تکثیر مناسب ویروس در سلول است(۵۱، ۵۲). اینترفرون‌های نوع I القاکنندگان قوی مکان‌های ضد ویروسی هستند و در واکنش‌های ایمنی بدن، حتی در غیاب ویروس‌ها نیز شرکت دارند. مقابله سلول با ویروس عامل بیماری را می‌توان به دو مرحله تقسیم کرد: مرحله اول آغاز پاسخ‌های سلولی ضد ویروسی مستقل از اینترفرون‌های نوع I است که طی آن فاکتورهای رونویسی که بیان ژن‌های ویروس را کنترل می‌کنند فعال می‌شوند. این فعال شدن که بدون میانجی‌گری اینترفرون‌ها است به ساخت پروتئین‌های ویروسی نیاز ندارد. مرحله دوم تولید اینترفرون و بیان ژن‌های سایتوکاین است که از طریق ویروس در سلول‌های اپی‌تلیال و لکوسیت‌ها القا می‌شوند(۵۰، ۵۳، ۵۴). تنظیم بالادست ژن‌های سایتوکاین‌های پیش التهابی و اینترفرون نوع I و پاسخ‌های مرگ سلولی با آسیب‌زایی عفونت آنفلوانزا در ارتباط هستند. علاوه بر این که پروتئین روی تولید اینترفرون اثر می‌گذارد، فعالیت ژن‌های القا کننده آن را نیز تحت تأآثیر قرار می‌دهد(۵۲). در سلول‌های آلوده به ویروس، dsRNA سبب فعال شدن فاکتورهای رونویسی NF-κB و ATF-2/c-jm، فاکتورهای تنظیمی اینترفرون و در نتیجه تولید IFN-β می‌شود. این پروتئین با فعال شدن فاکتورهای رونویسی تولید شده در اثر dsRNA تداخل پیدا می‌کند(۵۱، ۵۵) و از فعال شدن فاکتورهای ضد ویروسی القا شده ناشی از اینترفرون که یکی از اصلی‌ترین ساز و کارهای دفاعی میزبان است جلوگیری می‌کند(۵۶). ویروس‌ها برای افزایش کارایی تکثیر خود، پاسخ‌های اینترفرون میزبان را مهار می‌کنند. پروتئین NS1 با متوقف کردن عملکرد دو پروتئین سیتوپلاسمی ضد ویروس شامل OAS و PKR یک اثر بازدارنده بر روی تولید اینترفرون دارد. این پروتئین‌ها تنظیم کننده‌های کلیدی فرآیند رونویسی و ترجمه هستند و در روند دفاع طبیعی مانند القاء IFN-β و پاسخ مرگ برنامه‌ریزی شده سلول نیز نقش دارند(۱۳، ۵۱). سرکوب این ساز و کار دفاعی به وسیله NS1 و PB1-F2 ویروس نشان می‌دهد که شرایط ضد ویروسی بسته به سویه ویروس از رشد و تکثیر آن ممانعت می‌کند(۵۷، ۵۸). در سلول‌های حساس به پاسخ‌های اینترفرونی، آلودگی با ویروس آنفلوانزا به القا شدید تولید اینترفرون در ساعات اولیه عفونت منجر می‌شود. سلول آلوئولار تنفسی انسان (A549) جزو سلول‌های صلاحیت‌دار اینترفرونی به شمار می‌آید، بنابراین رشد ویروس‌های تحت حاد در آن بیان‌گر سرکوب مکانیسم دفاعی و فعال شدن مسیر مرگ سلولی از طریق ویروس‌های تکثیر یافته است(۵۹). برخلاف سلول‌های کبدی HepG2، آلودگی سلول‌های A549 و HeLa با ویروس H9N2 سبب افزایش میزان بیان پروتئین Mx به عنوان نشان‌گر القاء اینترفرون و فعال شدن سیستم دفاع سلولی ضد ویروسی می‌شود. این فعال‌سازی دفاع ضد ویروس و پاسخ اینترفرون بیان‌گر وجود مقاومت نسبی میزبان در ساعات اولیه آلودگی ویروسی است که سبب کاهش میزان ویروس می‌شود، اما بر روی عیار نهایی آن اثر چندانی ندارد(۵۹). این پروتئین علاوه بر نقش NS1 در تنظیم پاسخ اینترفرون سلولی، دارای فعالیت تنظیم موقت ساخت RNA ویروسی، کنترل خرد شدن و مهار پردازش mRNA ویروسی، افزایش ترجمه mRNA ویروسی، تنظیم مورفوژنز اجزا ویروس، بازدارندگی فرآوری پیش-mRNA سلولی، مداخله در آسیب‌زایی وابسته به سویه و سرکوب پاسخ مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده است(۵۱).

طی آلودگی میزبان با ویروس، سلول با روند مرگ برنامه‌ریزی شده از بین می‌رود، این وضعیت به کاهش میزان تکثیر ویروس و کاهش انتشار آن به سلول‌های دیگر منجر

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:07 +0330 on Tuesday January 16th 2018

می‌شود. اغلب به مرگ سلول در پاسخ به عوامل بیماری‌زا «آپوپتوز» گفته می‌شود که واژه‌ای یونانی به معنای ریزش برگ از درختان یا افتادن گلبرگ‌هاست. این پاسخ سلولی که به شدت تنظیم شده و طبیعی است، به تخریب و انهدام سلول میزبان طی یک سری واکنش‌های بیوشیمیایی منجر می‌شود. فرآیند آپوپتوز به واسطه‌ی دامنه‌ی وسیعی از پیام‌های سلولی کنترل می‌شود که ممکن است از محرک‌های داخل سلولی (انواع تنش‌ها مانند گرما، تشعشع، محرومیت از مواد غذایی، آلودگی ویروسی و هیپوکسی) یا از محرک‌های خارج سلولی (هورمون‌ها، فاکتورهای رشد، اکسید نیتروژن و سایتوکین‌ها) ناشی شوند. سلول با ابلاغ پیام مرگ، آماده مرگ برنامه‌ریزی شده از مسیر گیرنده و یا مسیر میتوکندریایی می‌شود(۶۰). مراحل آپوپتوز عبارت‌اند از: دایره‌ای شدن سلول از طریق پروتئازهای کاسپاز، فشرده و متراکم شدن کروماتین، انقباض و متراکم شدن هسته، قطعه قطعه شدن DNA و تبدیل آن به کروماتین‌های کوچک ۱۰۰ تا ۲۰۰ جفت بازی، ایجاد حالت نردبانی در ژل به عنوان مشخصه اصلی آپوپتوز، از بین رفتن چسبندگی سلول و تخریب اسکلت سلولی، انتقال فسفاتیدیل سرین از نیمه داخلی غشاء به نیمه خارجی غشاء، بالونی شدن سطح سلول، تبدیل شدن سلول به وزیکول‌ها و تشکیل اجسام آپوپتوتیک. این اجسام در بر گیرنده قسمتی از سیتوپلاسم و هسته در وزیکول‌های پلاسمایی و حاوی ریبوزوم هستند و به سرعت از طریق فاگوسیت‌ها یا سلول‌های اپی‌تلیال مجاور شناسایی شده و بدون آن که پاسخ التهابی ایجاد کنند هضم می‌شوند(۶۱، ۶۲). مسیر فعال‌سازی مرگ سلولی بسته به این که پیام مرگ با چه روشی ابلاغ شود متفاوت است. چنان‌چه پیام داخلی باشد، مرگ از طریق مسیر داخلی القا می‌شود و میتوکندری نخستین اندامک فعال شده خواهد بود که تغییرات رخ داده در آن سبب آزادسازی سیتوکروم c می‌گردد. اگر پیام مرگ از طریق گیرنده‌های سطح سلول بیان شود، آن‌گاه مسیر خارجی با تحریک گیرنده‌های مرگ مانند TNF (عامل نکروز تومور) و Fas طی اتصال به لیگاندها و با فعال شدن آبشارهای کاسپاز القا می‌شود(۶۳). دست کم سه پروتئین NA، NS1 و PB1-F2 این ویروس‌ها به ترتیب با تسهیل برش TGF-β به شکل فعال، نفوذپذیر کردن غشا میتوکندری و سرکوب تولید اینترفرون و پاسخ‌های آن در رخداد پدیده آپوپتوز از هر دو مسیر (تصویر ۲) دخالت دارند(۵۷، ۵۸، ۶۴).

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:07 +0330 on Tuesday January 16th 2018



تصویر۲. مسیر انتقال پیام مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی القا شده طی آلودگی با ویروس آنفلوانزا. در مسیر خارجی آپوپتوز، پیام‌های مرگ از طریق لیگاندهای گیرنده مرگ مانند TRAIL وFasL القا می‌شوند. در سلول‌های آلوده، dsRNA ویروس PKR را فعال می‌کند که به تنظیم بالادست FasL منجر می‌شود. پس از وارد شدن FasL در واکنش، یک پیام مرگ از طرف Fas با به‌کارگیری FADD طی برهم کنش دمین‌های مرگ آن‌ها فرستاده می‌شود. پروتئین FADD پیش-کاسپاز ۸ را در اختیار گرفته و کمپلکس القا پیـام مرگ (DISC) را تشکیل می‌دهد که سبب فعال‌سازی کاسپاز ۸ می‌شود. این امر به آغاز فعالیت آبشاری کاسپاز و متعاقب آن فعال شدن سوبستراهای مرگ منجر می‌گردد. کاسپاز ۸ هم‌چنین بر روی میتوکندری اثر گذاشته و منفذ انتقال نفوذپذیر (PT) را ایجاد می‌کند که به رها سازی سیتوکروم c منجر می‌شود. پروتئین Bcl-2 یک تنظیم کننده منفی و بازدارنده رها سازی سیتوکروم c از میتوکندری است، اما خود نیز به وسیله‌ی پروتئین‌های Bax و Bak بازداشته می‌شود. پیش از ارسال پیام مرگ، پروتئین Bax به غشاء رتیکولواندوپلاسمی متصل است و Bak در سیتوزول وجود دارد. پس از ابلاغ پیام مرگ، این دو پروتئین روی غشاء میتوکندری سلول به‌هم نزدیک شده و هترودایمری تشکیل می‌دهند که منافذ خروج را بر روی سطح غشاء ایجاد می‌کند. عامل القا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (AIF) نیز از میتوکندری ناکارآمد آزاد می‌شود. آزاد شدن سیتوکروم c که با همکاری پروتئین Apaf-1 اعضای خانواده کاسپاز ۹ را فعال می‌کند، سبب افزایش آبشار کاسپازی از آغازین به اجرایی می‌شود. فعال شدن کاسپاز ۹ به فعالیت کاسپاز ۳، ۶، و ۷ منجر می‌شود. فعال شدن پروتئین PKR از طریق dsRNA می‌تواند کاسپاز ۸ را با ساز و کار مستقل از Fas فعال کند که به فعال‌سازی کاسپاز ۹ منجر می‌گردد. علاوه بر این، PKR سبب فعال شدن NF-κB شده و این امر به تنظیم بالادست بیان ژن پیش از مرگ سلول منجر می‌شود. این فاکتور رونویسی به‌طور غیرمستقیم، ROS و رادیکال‌های آزاد تولید شده طی آلودگی با ویروس را فعال می‌کند که می‌توانند با اثر بر روی میتوکندری سبب تغییر در پتانسیل غشاء و آزاد شدن سیتوکروم c شوند. تنش‌های رتیکولوم اندوپلاسمی ناشی از تولید زیاد گلیکوپروتئین‌های ویروسی، ASK-1 را فعال می‌کنند که با مشارکت TRAF-2 به TNF متصل شده و سبب تنظیم بالادست بیان ژن پیش از مرگ می‌شوند. PKR ممکن است ASK-1 را به طور مستقیم فعال کند. روش دیگر با فعال شدن TGF-β انجام می‌گیرد که آغاز کننده آبشار انتقال پیام است و سبب فعال شدن مجدد پروتئین‌های JNK یا SAPK شده که به فعال‌سازی فاکتورهای رونویسی و تنظیم بالادست بیان ژن پیش - مرگ منجر می‌شود.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:07 +0330 on Tuesday January 16th 2018

القا آپوپتوز از طریق تحت تیپ‌های مختلف ویروس‌های آنفلوانزا و در کشت‌های سلولی مورد بررسی قرار گرفته است و به نظر می‌رسد فرآیندی اختصاصی برای نوع سلول و ویروس باشد که با میزان آسیب‌زایی ویروس رابطه دارد. به عنوان مثال، آلودگی ماکروفاژهای مشتق از مونوسیت انسان با ویروس‌های H3N2 و H1N1 مسیر انتقال پیام FasL را فعال می‌کند، در حالی که آلودگی این سلول‌ها با ویروس فوق حاد H5N1 سبب القا آپوپتوز از مسیر لیگاند TRAIL می‌شود(۶۷-۶۵). ویروس H9N2 پرندگان، القا کننده آپوپتوز در سلول‌های اپی‌تلیوم تنفسی انسان از مسیر داخلی است و وابسته به دوز می‌باشد، با این وجود اثری بر روی سلول HeLa ندارد(۵۹). از طرف دیگر، این ویروس‌ها با کنترل مسیر انتقال پیام و ایجاد توقف در چرخه سلولی میزبان به گونه‌ای که فرآیند مرگ سلول فعال نشود با مرگ سلول میزبان مقابله می‌کنند. بررسی‌ها نشان داده‌اند که dsRNA ویروس آنفلوانزا، پروتئین‌های NS1 وPB1-F2 آن با کنترل مسیر انتقال پیام در تنظیم این مرگ دخالت دارند. تاکنون PB1-F2 تنها پروتئین شناخته شده در تعدادی از ویروس‌های آنفلوانزا بوده که مرگ برنامه ریزی شده سلول را از این مسیر و با دو ساز و کار القا می‌کند: یکی با واسطه اعضای خانواده پروتئینیBcl-2 و یا از طریق تشکیل کمپلکس منفذ انتقال نفوذپذیر، این کمپلکس متشکل از ANT3 در غشاء داخلی میتوکندری و VDAC1 در غشاء خارجی آن است. برهم کنش ANT3 و VDAC1 برای تشکیل این کمپلکس سبب نفوذپذیری غشاء میتوکندری می‌شود. بدین ترتیب مولکول‌های سیتوکروم c موجود در میتوکندری که آبشار کاسپاز را فعال می‌کنند، به خارج از آن منتشر می‌شوند(۶۸، ۶۹)؛ ساز و کار دیگر تشکیل منافذ با خود-الیگومریزه شدن مولکول‌های PB1-F2 در غشاء میتوکندری سلول است. پروتئین PB1-F2 ممکن است به عنوان یک پل مولکولی بین مرگ سلولی از مسیر میتوکندری و تولید اینترفرون وابسته به MAVS عمل کند. این پروتئین برهم کنش بین MAVS و VDAC1 را برهم زده و سبب تنظیم منفی اثر MAVS بر روی VDAC1 می‌شود. در نبود این تنظیم منفی، VDAC1 برای تشکیل منافذ با پروتئین‌های دیگر مانند ANT3 در دسترس خواهد بود تا مولکول‌های دخیل در مرگ برنامه‌ریزی شده سلول را در سیتوپلاسم رها کنند. برهم کنش پروتئین PB1-F2 با MAVS دو اثر دارد، یکی پیش‌برد مرگ سلولی با میانجی‌گری VDAC1 و دیگری کاهش تولید اینترفرون. بدین ترتیب، ویروس می‌تواند با استفاده از یک پروتئین دو فرآیند سلولی نامطلوب میزبان را از بین ببرد(۵۸). به نظر می‌رسد آثار پیش از مرگ سلولی و ضد اینترفرونی PB1-F2 ویروس به سلول میزبان وابسته باشد، زیرا بیان این پروتئین و نیز الگوهای بیانی پروتئین‌های هدف آن در سلول‌های اپی‌تلیومی و سلول‌های ایمنی متفاوت است. بنابراین تعدادی از سلول‌ها ممکن است نسبت به آثار پیش از مرگ سلولی حساس‌تر باشند. فرآیند آپوپتوز ممکن است طی برهم کنش بین پروتئین‌های کنترل کننده چرخه سلولی مانند Rb، p53 وp21 و سایر پروتئین‌های سلولی رخ دهد. در بیش‌تر سلول‌ها دو نقطه بازرسی آسیب DNA در مراحل G_1 و G_2 وجود دارد. چنان‌چه DNA سلول دچار آسیب شده باشد، این نقاط اجازه ادامه چرخه سلولی را نمی‌دهند و سلول طی فعال شدن آبشار کاسپاز دستخوش مرگ برنامه‌ریزی شده قرار می‌گیرد. تاکنون بیش از یک صد نوع سوبستراهای کاسپاز شناخته شده است. تخریب این پروتئین‌ها به غیرفعال شدن آن‌ها و یا فعال شدن پروتئین‌های هدف مانند پروتئین‌های اسکلت سلولی نظیر لامین و اکتین، پروتئین‌های دخیل در ترمیم DNA و پروتئین‌های دخیل در چرخه سلولی منجر می‌شود(۷۰، ۷۱). ویروس‌های آنفلوانزا توانایی ایجاد توقف در مرحله G0/G1 چرخه سلولی میزبان را دارند(۷۲، ۷۳). این توقف و هم‌چنین ارسال پیام‌های آپوپتوزی از طریق ویروس در مراحل اولیه و میانی عفونت، بازدارنده مرگ سریع سلول است(۷۴). در این راهبرد حفاظتی، پروتئین NS1 ویروس با اثر گذاری بر آبشار انتقال پیام RhoA/pRb، شرایط را برای رونویسی و ترجمه مناسب ژنوم ویروس با ضریب عفونی

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:07 +0330 on Tuesday January 16th 2018

کم فراهم کرده و با ایجاد توقف در مرحله G1 به پایداری شرایط تکثیر ویروس در سلول کمک می‌کند(۷۳، ۷۵).

علاوه بر آپوپتوز، ویروس‌های آنفلوانزا سبب ایجاد نکروز در سلول‌های غیر هدف می‌شوند. نکروز نوعی پاسخ طبیعی سلول به آسیب‌های فیزیولوژیک به شمار می‌آید که با برهم خوردن توانایی سلول برای نگه‌داری هموستاز آغاز می‌شود. با نفوذ آب و یون‌های خارج سلولی، تمام اندامک‌های درون سلولی به خصوص میتوکندری متورم شده، سپس با از هم پاشیدگی غشاء و لیز سلولی تخریب می‌شوند. بدین ترتیب اجزای سیتوپلاسمی مانند آنزیم‌های لیزوزومی در مایع خارج سلولی رها می‌گردند. برخلاف آپوپتوز، مرگ سلولی از طریق نکروز با تخریب گسترده بافتی ناشی از بروز پاسخ‌های التهابی همراه است. تفاوت‌های بیوشیمیایی و ریخت‌شناسی بین دو پدیده نکروز و آپوپتوز وجود دارد، اما قطعه قطعه شدن DNA و متعاقب آن تشکیل اجسام آپوپتوتیک و تغییر قابل توجه در سطح انرژی سلولی با شاخص افزایش سطح آنزیم لاکتات دهیدروژناز، اصلی‌ترین تفاوت میان این دو پدیده است(۱۳، ۶۱). القاء نکروز ناشی از تحت تیپ‌های مختلف ویروس‌های آنفلوانزا مورد بررسی قرار گرفته و مشخص شده است که سویه‌های تحت حاد نیز در سلول‌های غیر هدف ویروس مانند سلول‌های کبدی توانایی ایجاد نکروز در ساعات اولیه آلودگی را دارند(۷۶).

عوامل مرتبط با میزبان

زمانی که ویروس سلول میزبان را آلوده می‌کند سامانه و پروتئین‌های سلول را در خدمت خود می‌گیرد تا با کمک آن‌ها ذرات ویروسی جدیدی بسازد. ازدیاد ویروس در کشت سلول به روش‌های مختلف مانند اثر آسیب سلولی، جذب گلبول‌های قرمز و هماگلوتینه شدن، کاوش آنتی‌ژن ویروس با استفاده از آنتی‌سرم‌های اختصاصی و روش‌های ایمونوفلورسنت تشخیص داده می‌شود. با استفاده از یک روش آنزیمی نیز می‌توان پاسخ سلول‌ها را نسبت به آلودگی با ویروس ارزیابی کرد. در این روش از نمک‌های محلول تترازولیوم مانند MTT به عنوان سوبسترای واکنش استفاده می‌شود. این آزمایش بر اساس شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز - یکی از آنزیم‌های چرخه تنفسی میتوکندری‌ها- 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(۷۷، ۷۸). ویروس‌های آنفلوانزا ابتدا در سلول‌های اپی‌تلیال ریه و روده تکثیر یافته سپس به ماکروفاژهای اطراف حمله کرده و مونوسیت‌های نوع II را آلوده می‌کنند(۱۷، ۷۹). بررسی‌ها بر روی نقش پروتئین‌های ویروس آنفلوانزا در محدود سازی دامنه میزبان و گرایش سلولی نشان می‌دهند که در نتیجه پراکندگی مناسب گیرنده‌های سیالیک اسید بر روی سطح سلول‌های مژه‌دار تنفسی مانند اپی‌تلیوم نای جوجه و نیز داشتن دو نوع گیرنده‌ی $\alpha 2,3$ و $\alpha 2,6$، گرایش ویروس آنفلوانزا نسبت به آن‌ها بیش‌تر است(۳۹، ۴۰، ۴۴). اگرچه سلول‌های مژه‌دار تنفسی میزبان هدف اولیه برای اتصال این ویروس‌ها هستند، اما انواعی از سلول‌ها برای شناسایی تنوع دامنه میزبانی ویروس‌های آنفلوانزا و برهم کنش بین سلول و ویروس بررسی شده‌اند. مطالعات پیشین نشان داده‌اند سلول‌های اپی‌تلیوم تنفسی انسان دارای سرین پروتئازهایی مانند TMPRSS2 هستند که موتیف تک بازی پروتئین HA ویروس‌های آنفلوانزای انسانی را برش داده و در نتیجه شرایط ورود و تکثیر اولیه این ویروس بدون نیاز به افزودن تریپسین را فراهم می‌کنند(۸۰، ۸۱). گزارشات حاکی است که chTMPRSS13 یک سرین پروتئاز جدید حاوی موتیف برش چند بازی برای ویروس آنفلوانزا فوق حاد H5N1 است(۸۲). زرین لباس و همکاران در بررسی خود برش پروتئین HA ویروس تحت حاد H9N2 در سلول A549 را که از طریق سرین پروتئازها صورت می‌گیرد و نیز تکثیر آن در نبود تریپسین را نشان داده‌اند(۸۳). این ویروس به علت فقدان آنزیم‌های لازم به تریپسین با منشاء خارجی برای برش HA در آغاز روند تکثیر در سلول‌های تنفسی و فیبروبلاستی با منشا جنین جوجه نیاز دارد(۴۴). براساس این مطالعه هر

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:07 +0330 on Tuesday January 16th 2018

دوی پروتئازهای TMPRSS2 و chTMPRSS13 در سلول بیان می‌شوند و ژن TMPRSS2در سلول فیبروبلاست جنین جوجه(CEF) بیان نمی‌شود. این بدان معنی است که ژن TMPRSS2 در سلول A549 احتمالا دارای فعالیت پروتئازی علیه پروتئین HA ویروس آنفلوانزا تحت حاد در سلول A549 است. اما chTMPRSS13 توانایی فعال کردن موتیف برش تک بازی پروتئین HA در ویروس‌های آنفلوانزای تحت حاد پرندگان و نیز حمایت از تکثیر این ویروس‌ها در کشت سلولی را ندارد. پدیدار شدن اثر آسیب سلولی در سلول‌های A549 آلوده به ویروس آنفلوانزا تحت حاد در نبود تریپسین، مربوط به شکسته شدن پروتئین HA است(۸۳). سلول‌های کبدی حاوی سرین پروتئاز پلاسمین دارای عملکردی مشابه تریپسین هستند که این سلول‌ها را نسبت به ورود و تکثیر ویروس‌های آنفلوانزا با اثر بر روی پروتئین HA آن‌ها مجاز می‌کند(۸۴، ۸۵). تکثیر مناسب ویروس تحت حاد آنفلوانزا در این سلول‌ها در نبود تریپسین بیان‌گر این است که پلاسمین نیز توانایی فعال کردن محل برش تک بازی ویروس H9N2 و حمایت از تکثیر آن در این کشت سلولی را دارد(۷۶).

در شرایط آزمایشگاهی، برای جدا سازی ویروس‌های آنفلوانزا از نمونه‌های بالینی و تکثیر آن بیشتر از سلول اپی‌تلیومی کلیه سگ سانان (MDCK) استفاده می‌شود. این بدان معنی است که هر دو نوع گیرنده‌ی α2,3 و α2,6 در سطح این سلول بیان می‌شوند. به دلیل پایین بودن سطح گیرنده‌های سیالیک اسید متصل به α2,6 سلول نسبت به سلول‌های تنفسی انسان، جدا سازی سویه‌های انسانی بر روی MDCK به دشواری صورت می‌گیرد. سلول تغییر یافته MDCK-SIAT1 دارای آنزیم گالاکتوزید α2,6 سیالیل ترانسفراز است که سیالیل شدن گالاکتوز با پیوند α2,6 بر روی گلیکوپروتئین‌ها یا گلیکولیپیدها را کاتالیز کرده و در مقایسه با MDCK، گیرنده‌های متصل به α2,6 بیش‌تری را بیان می‌کند(۸۶). افزایش بیان این گیرنده‌ها سبب افزایش تعداد برهم کنش‌های ویروس و سطح سلول شده و ظرفیت اتصال HA را بالا می‌برد. محل برش پروتئین HA سویه‌های تحت حاد آنفلوانزا فقط در حضور برخی پروتئازهای سلولی فعال می‌شود. برای رشد و تکثیر این ویروس‌ها افزودن تریپسین به انواع سلول‌های MDCK و سلول‌هایی با منشا پرندگان مانند CEF که فاقد این آنزیم‌ها هستند ضروری است. در غیاب تریپسین، ویروس نمی‌تواند بر روی سلول‌های فاقد سرین پروتئاز رشد کند(۴۴، ۸۳)، زیرا محل اثر تریپسین بر روی پیوندهای انتهای کربن اسیدهای آمینه آرژنین و لیزین است. برخی عوامل مانند افزودن تریپسین و سرم جنین گاوی به کشت سلول، بیان سیکلوفیلین A در سلول و ضریب عفونی ویروس در سازگاری سلول‌ها برای تکثیر ویروس آنفلوانزا و میزان عیار آن موثر هستند. تریپسین، اتصال و چسبندگی پروتئین‌ها و برهم کنش‌های سلول – سلول و سلول – ماتریکس را از بین می‌برد، به همین دلیل برای کنده شدن سلول‌ها از بستر افزوده می‌شود. چنان‌چه مقدار تریپسین و مدت زمان اثر دهی آن بر روی سلول زیاد شود از توان زنده بودن سلول‌ها و در نتیجه عیار ویروس‌های آلوده کننده کاسته می‌شود(۸۷). سیکلوفیلین A که به طور گسترده در انواعی از بافت‌های پرندگان وجود دارد، با تداخل در انتقال پروتئین M1 تازه ساخته شده به داخل هسته، سبب مهار تکثیر ویروس در مراحل اولیه عفونت می‌شود(۸۸). سرم جنین گاوی دارای انواعی از عناصر بازدارنده به نام مهارکننده‌های بتا است که به گلیکان‌های متصل به انتهای آمینی در روی HA و NA متصل شده و از اتصال به گیرنده، فعالیت هماگلوتیناسیون و عفونت‌زایی ویروس آنفلوانزا جلوگیری می‌کنند(۳۲) و در ضریب عفونی بالا ممکن است به ذرات ناقص مداخله‌گر ویروس تبدیل شود. این ذرات ویریون‌های غیر عفونی هستند که به دنبال پاساژهای متوالی با ضریب عفونی بالا از بذر اولیه ویروس عفونی حاصل می‌شوند. انتقال تعداد زیاد ذرات ناقص مداخله‌گر از یک نسل به نسل بعد سبب تجمع سریع‌تر آن‌ها شده و به همان نسبت اثر بازدارنده گسترده‌تری بر رشد ویروس پدیدار می‌شود(۸۹)، هر چند اثر ضریب عفونی بالا بر روی میزان تکثیر ویروس آنفلوانزا به سویه ویروس آلوده کننده سلول بستگی دارد(۸۷).

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:07 +0330 on Tuesday January 16th 2018

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، نقش متغیرهای خاص سلولی و ویروسی در پویایی تکثیر ویروس‌های آنفلوانزا و هم‌چنین گرایش ویروس به سلول‌هایی با منشا متفاوت بررسی شد. یافته‌ها این امکان را فراهم می‌آورد که شرایط کشت سلولی ویروس‌های آنفلوانزا استاندارد شده و مطالعه بر روی جدایه‌های جدید و خصوصیات آن‌ها آسان شود.

منابع

1. Perroncito E. Epizoozia tifoide nei gallinacei. Annual Academic of Agriculture. 1878;21:87-8.
2. Smith W, Andrewes C, Laidlaw P. A virus obtained from influenza patients. The Lancet. 1933; 222(5732): 66-8.
3. Cox NJ, Tamblyn SE, Tam T. Influenza pandemic planning. Vaccine. 2003; 21(16): 1801-3.
4. Kilbourne ED. Influenza pandemics of the 20th century. Emerging infectious diseases. 2006; 12(1):9-10.
5. Trifonov V, Khiabanian H, Rabadan R. Geographic dependence, surveillance, and origins of the 2009 influenza A (H1N1) virus. New England Journal of Medicine. 2009; 361(2): 115-9.
6. Ford SM, Grabenstein JD. Pandemics, avian influenza A (H5N1), and a strategy for pharmacists. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy. 2006; 26(3): 312-22.
7. Gendon I. [Influenza pandemic: hypotheses and facts]. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii. 2007(5): 109-18.
8. Munoz ET, Deem MW. Epitope analysis for influenza vaccine design. Vaccine. 2005; 23(9): 1144-8.
9. Lee Y-T, Kim K-H, Ko E-J, Lee Y-N, Kim M-C, Kwon Y-M, et al. New vaccines against influenza virus. Clinical and experimental vaccine research. 2014;3(1):12-28.
10. Desmet CJ, Ishii KJ. Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination. Nature Reviews Immunology. 2012;12(7):479-91.
11. Kobiyama K, Jounai N, Aoshi T, Tozuka M, Takeshita F, Coban C, et al. Innate immune signaling by, and genetic adjuvants for DNA vaccination. Vaccines. 2013;1(3):278-92.
12. Sadeghi K, Shahsavandi S, Ebrahimi MM, Mahravani H, Fazel H. Hemokinin-1 molecular adjuvant: an approach to enhance the efficacy of influenza vaccine. Arak Medical University Journal. 2015; 17(11):62-9.
13. Shahsavandi S, Ebrahimi MM. Influenza. Jehade Daneshgahi: Tehran. 2013.
14. Medina RA, García-Sastre A. Influenza A viruses: new research developments. Nature Reviews Microbiology. 2011; 9(8):590-603.
15. Noda T, Kawaoka Y. [Classification and virion structure of influenza virus]. Nihon rinsho Japanese journal of clinical medicine. 2006; 64(10):1766-9.
16. Baigent SJ, McCauley JW. Influenza type A in humans, mammals and birds: determinants of virus virulence, host-range and interspecies transmission. Bioessays. 2003; 25(7): 657-71.
17. Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y. Fields. 6th ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, USA. 2013.
18. Shapiro GI, Krug RM. Influenza virus RNA replication in vitro: synthesis of viral template RNAs and virion RNAs in the absence of an added primer. Journal of virology. 1988; 62(7): 2285-90.
19. Das K, Aramini JM, Ma L-C, Krug RM, Arnold E. Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. Nature structural & molecular biology. 2010;17(5):530-8.
20. Cross KJ, Burleigh LM, Steinhauer DA. Mechanisms of cell entry by influenza virus. Expert reviews in molecular medicine. 2001; 3(21): 1-18.
21. Lakadamyali M, Rust MJ, Zhuang X. Endocytosis of influenza viruses. Microbes and infection. 2004; 6(10):929-36.
22. Chen C, Zhuang X. Epsin 1 is a cargo-specific adaptor for the clathrin-mediated endocytosis of the influenza virus. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008; 105(33): 11790-5.
23. Fujioka Y, Tsuda M, Hattori T, Sasaki J, Sasaki T, Miyazaki T, et al. The Ras-PI3K signaling pathway is involved in clathrin-

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:07 +0330 on Tuesday January 16th 2018

independent endocytosis and the internalization of influenza viruses. PloS one. 2011; 6(1): e16324-5.
24. Korte T, Ludwig K, Herrmann A. pH-dependent hydrophobicity profile of hemagglutinin of influenza virus and its possible relevance in virus fusion. Bioscience reports. 1992;12(5):397-406.
25. Barman S, Ali A, Hui EK-W, Adhikary L, Nayak DP. Transport of viral proteins to the apical membranes and interaction of matrix protein with glycoproteins in the assembly of influenza viruses. Virus research. 2001; 77(1): 61-9.
26. Park CJ, Bae SH, Lee MK, Varani G, Choi BS. Solution structure of the influenza A virus cRNA promoter: implications for differential recognition of viral promoter structures by RNA-dependent RNA polymerase. Nucleic acids research. 2003;31(11): 2824-32.
27. Portela An, Digard P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. Journal of general virology. 2002; 83(4):723-34.
28. Plotch SJ, Bouloy M, Ulmanen I, Krug RM. A unique cap (m 7 GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. Cell. 1981;23(3):847-58.
29. Marsh GA, Hatami R, Palese P. Specific residues of the influenza A virus hemagglutinin viral RNA are important for efficient packaging into budding virions. Journal of virology. 2007; 81(18): 9727-36.
30. Nayak DP, Hui EK-W, Barman S. Assembly and budding of influenza virus. Virus research. 2004;106(2):147-65.
31. Gong J, Xu W, Zhang J. Structure and functions of influenza virus neuraminidase. Current medicinal chemistry. 2007;14(1):113-22.
32. Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk H-D. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. Journal of virology. 2004;78(22):12665-7.
33. Gamblin SJ, Skehel JJ. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. Journal of Biological Chemistry. 2010; 285(37):28403-9.
34. Neumann G, Kawaoka Y. Host range restriction and pathogenicity in the context of influenza pandemic. Emerg Infect Dis. 2006; 12(6): 881-6.
35. Nagata K, Kawaguchi A, Naito T. Host factors for replication and transcription of the influenza virus genome. Reviews in medical virology. 2008;18(4):247-60.
36. Suzuki Y. Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2005;28(3):399-408.
37. Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. Nature. 2006; 440(7083):435-6.
38. Zhang H. Tissue and host tropism of influenza viruses: importance of quantitative analysis. Science in China Series C: Life Sciences. 2009; 52(12):1101-10.
39. García-Sastre A. Influenza virus receptor specificity: disease and transmission. The American journal of pathology. 2010; 176(4): 1584-5.
40. Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk H-D. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004; 101(13): 4620-4.
41. Li C, Yu K, Tian G, Yu D, Liu L, Jing B, et al. Evolution of H9N2 influenza viruses from domestic poultry in Mainland China. Virology. 2005; 340(1):70-83.
42. Saito T, Lim W, Suzuki T, Suzuki Y, Kida H, Nishimura S-I, et al. Characterization of a human H9N2 influenza virus isolated in Hong Kong. Vaccine. 2001;20(1):125-33.
43. Shahsavandi S, Salmanian A-H, Ghorashi SA, Masoudi S, Ebrahimi MM. Evolutionary characterization of hemagglutinin gene of H9N2 influenza viruses isolated from Asia. Research in veterinary science. 2012;93(1):234-9.
44. Shahsavandi S, Ebrahimi MM, Mohammadi A, Lebas NZ. Impact of chicken-origin cells on adaptation of a low pathogenic influenza virus. Cytotechnology. 2013;65(3):419-24.
45. Shelton H, Ayora-Talavera G, Ren J, Loureiro S, Pickles RJ, Barclay WS, et al.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:07 +0330 on Tuesday January 16th 2018

Receptor binding profiles of avian influenza virus hemagglutinin subtypes on human cells as a predictor of pandemic potential. Journal of virology. 2011;85(4):1875-80.
46. Bradley KC, Galloway SE, Lasanajak Y, Song X, Heimburg-Molinaro J, Yu H, et al. Analysis of influenza virus hemagglutinin receptor binding mutants with limited receptor recognition properties and conditional replication characteristics. Journal of virology. 2011; 85(23):12387-98.
47. Bertram S, Glowacka I, Steffen I, Kühl A, Pöhlmann S. Novel insights into proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinin. Reviews in medical virology. 2010;20(5):298-310.
48. Kido H, Okumura Y, Takahashi E, Pan H-Y, Wang S, Yao D, et al. Role of host cellular proteases in the pathogenesis of influenza and influenza-induced multiple organ failure. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics. 2012;1824(1):186-94.
49. Kido H, Okumura Y, Takahashi E, Pan H-Y, Wang S, Chida J, et al. Host envelope glycoprotein processing proteases are indispensable for entry into human cells by seasonal and highly pathogenic avian influenza viruses. Journal of molecular and genetic medicine: an international journal of biomedical research. 2009;3(1):167-8.
50. Randall RE, Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. Journal of general virology. 2008; 89(1):1-47.
51. Hale BG, Randall RE, Ortín J, Jackson D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. Journal of general virology. 2008; 89(10): 2359-76.
52. Fernandez-Sesma A. The influenza virus NS1 protein: inhibitor of innate and adaptive immunity. Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders). 2007;7(4):336-43.
53. 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. Journal of Biological Chemistry. 2005; 280(7):5571-80.
54. 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. The Journal of Immunology. 2007;178(6):3368-72.
55. Min J-Y, Krug RM. The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2′-5′ oligo (A) synthetase/RNase L pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2006;103(18):7100-5.
56. Jackson D, Killip MJ, Galloway CS, Russell RJ, Randall RE. Loss of function of the influenza A virus NS1 protein promotes apoptosis but this is not due to a failure to activate phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). Virology. 2010;396(1):94-105.
57. 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. Journal of virology. 2007;81(7):3058-67.
58. 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 pathogens. 2005;1(1):e4-5.
59. 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 research international. 2013;2013.
60. Balachandran S, Roberts PC, Kipperman T, Bhalla KN, Compans RW, Archer DR, et al. Alpha/beta interferons potentiate virus-induced apoptosis through activation of the FADD/Caspase-8 death signaling pathway. Journal of virology. 2000;74(3):1513-23.
61. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? Hepatology. 2006;43(S1):S31-S44.
62. Saraste A. Morphologic criteria and detection of apoptosis. Herz. 1999;24(3):189-95.
63. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. Annual review of biochemistry. 1999; 68(1): 383-424.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:07 +0330 on Tuesday January 16th 2018

64. Schultz-Cherry S, Hinshaw VS. Influenza virus neuraminidase activates latent transforming growth factor beta. Journal of virology. 1996;70(12):8624-9.
65. Nichols JE, Niles JA, Roberts NJ. Human lymphocyte apoptosis after exposure to influenza A virus. Journal of virology. 2001; 75(13):5921-9.
66. Mok CK, Lee DC, Cheung C-Y, Peiris M, Lau AS. Differential onset of apoptosis in influenza A virus H5N1-and H1N1-infected human blood macrophages. Journal of general virology. 2007;88(4):1275-80.
67. Lam W, Tang JW, Yeung AC, Chiu LC, Sung JJ, Chan PK. Avian influenza virus A/HK/483/97 (H5N1) NS1 protein induces apoptosis in human airway epithelial cells. Journal of virology. 2008;82(6):2741-51.
68. Boya P, Roumier T, Andreau K, Gonzalez-Polo R-A, Zamzami N, Castedo M, et al. Mitochondrion-targeted apoptosis regulators of viral origin. Biochemical and biophysical research communications. 2003;304(3):575-81.
69. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. Physiological reviews. 2007; 87(1): 99-163.
70. Pietenpol J, Stewart Z. Cell cycle checkpoint signaling:: Cell cycle arrest versus apoptosis. Toxicology. 2002;181:475-81.
71. Alenzi FQ. Links between apoptosis, proliferation and the cell cycle. British journal of biomedical science. 2004;61(2):99-102.
72. He Y, Xu K, Keiner B, Zhou J, Czudai V, Li T, et al. Influenza A virus replication induces cell cycle arrest in G0/G1 phase. Journal of virology. 2010;84(24):12832-40.
73. Jiang W, Wang Q, Chen S, Gao S, Song L, Liu P, et al. Influenza A virus NS1 induces G0/G1 cell cycle arrest by inhibiting the expression and activity of RhoA protein. Journal of virology. 2013;87(6):3039-52.
74. Zhirnov OP, Klenk H-D. Control of apoptosis in influenza virus-infected cells by up-regulation of Akt and p53 signaling. Apoptosis. 2007;12(8):1419-32.
75. Hardwick J. Apoptosis in viral pathogenesis. Cell death and differentiation. 2001;8(2):109-10.
76. Mosavi SZ, Shahsavandi S, Ebrahimi MM, Hatami AR, Sadeghi K, Shahivandi H. Necrotic Response to Low Pathogenic H9N2 Influenza Virus in Chicken Hepatoma Cells. Jundishapur journal of microbiology. 2015;8(1): e13770-1.
77. Tobita K, Sugiura A, Enomoto C, Furuyama M. Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. Medical microbiology and immunology. 1975;162(1):9-14.
78. Watanabe W, Konno K, Ijichi K, Inoue H, Yokota T, Shigeta S. MTT colorimetric assay system for the screening of anti-orthomyxo-and anti-paramyxoviral agents. Journal of virological methods. 1994;48(2):257-65.
79. Suarez D, Schultz-Cherry S. Immunology of avian influenza virus: a review. Developmental & Comparative Immunology. 2000;24(2):269-83.
80. Hooper JD, Clements JA, Quigley JP, Antalis TM. Type II transmembrane serine proteases-insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes. Journal of Biological Chemistry. 2000; 276:857-60.
81. Böttcher E, Matrosovich T, Beyerle M, Klenk H-D, Garten W, Matrosovich M. Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. Journal of virology. 2006; 80(19):9896-8.
82. Okumura Y, Takahashi E, Yano M, Ohuchi M, Daidoji T, Nakaya T, et al. Novel type II transmembrane serine proteases, MSPL and TMPRSS13, proteolytically activate membrane fusion activity of the hemagglutinin of highly pathogenic avian influenza viruses and induce their multicycle replication. Journal of virology. 2010;84(10):5089-96.
83. 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. Jundishapur journal of microbiology. 2013;6(9) :e8584-5.
84. Ollier L, Caramella A, Giordanengo V, Lefebvre J-C. High permissivity of human HepG2 hepatoma cells for influenza viruses. Journal of clinical microbiology. 2004; 42(12): 5861-5.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:07 +0330 on Tuesday January 16th 2018

85. Chan FK-M, Moriwaki K, De Rosa MJ. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. Immune Homeostasis: Springer; 2013. p. 65-70.
86. Oh DY, Barr IG, Mosse JA, Laurie KL. MDCK-SIAT1 cells show improved isolation rates for recent human influenza viruses compared to conventional MDCK cells. Journal of clinical microbiology. 2008;46(7):2189-94.
87. Lohr V, Rath A, Genzel Y, Jordan I, Sandig V, Reichl U. New avian suspension cell lines provide production of influenza virus and MVA in serum-free media: studies on growth, metabolism and virus propagation. Vaccine. 2009; 27(36): 4975-82.
88. Xu C, Meng S, Liu X, Sun L, Liu W. Chicken cyclophilin A is an inhibitory factor to influenza virus replication. Virol J. 2010; 7(1): 372-3.
89. Thompson K, Yin J. Population dynamics of an RNA virus and its defective interfering particles in passage cultures. Virol J. 2010; 7(257).