

“Research article”

DOI: 10.71499/jvcp.2025.1123282

Investigation of myeloperoxidase activity, nitric oxide and vitamin C level in the serum of vaccinated and brucellosis-infected cattle and sheep

Shafie, M.¹, Kojouri, Gh.A.², Karimi, B.^{3*}, Kojouri, H.⁴

- 1- Graduate of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
2- Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
3- Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
4- Post Graduate Student of Pediatrics, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
*Corresponding author's Email: Karimibabaahmadi@sku.ac.ir
(Received: 2024/6/26 Accepted: 2024/12/18)

Abstract

Brucellosis is a zoonotic infectious disease that causes significant economic losses. This infection damages the oxidant and antioxidant balance of the body. This research was conducted to evaluate and compare the activity of myeloperoxidase (MPO), nitric oxide, and vitamin C concentration in vaccinated and brucellosis-infected cattle and sheep. For this purpose, 40 blood samples consisting of 5 ml were obtained from the jugular vein of vaccinated and brucellosis-infected cattle and sheep (10 samples from each group) and the activity of the MPO enzyme and the levels of nitric oxide and vitamin C in the serum of the animals were measured and compared. A significant increase in MPO enzyme activity was observed in brucellosis-infected cattle and sheep compared to vaccinated animals, which was associated with increased neutrophil recruitment and enhanced inflammatory response ($p<0.05$). The nitric oxide levels were found to be significantly higher in infected cows compared to vaccinated cows, which is probably related to macrophage-stimulating nitric oxide production by bacterial lipopolysaccharide ($p<0.05$). However, no significant difference was observed between vaccinated and infected sheep. Also, the vitamin C levels were significantly higher in vaccinated cattle than in infected cattle ($p<0.05$). The findings of the current research indicated that, probably due to brucellosis, the oxidative activity in the serum increases, while vaccination against brucellosis plays an important role in the body's antioxidant resistance. Although, it seems that, more extensive research and evaluation of other contributing factors are needed to make a definitive opinion in this regard.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Brucellosis cow and sheep, Myeloperoxidase, Nitric oxide, Vaccination, Vitamin C.

بررسی فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز، غلظت نیتریک اکسید و ویتامین C در سرم گاوها و گوسفندان واکسینه‌شده و مبتلا به بروسلوزیس

مجید شفیعی^۱، غلامعلی کجوری^۲، بهناز کریمی بابا احمدی^{۳*}، هومان کجوری^۴

۱- دانش‌آموخته دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۲- استاد بخش داخلی دام‌های بزرگ، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۳- استادیار بخش علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۴- دانشجوی دوره دستیاری اطفال، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: Behnazkarimi667@gmail.com

(دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۴/۶ پذیرش نهایی: ۱۴۰۳/۹/۲۱)

چکیده

بروسلوز یک بیماری عفونی مشترک بین انسان و حیوان است که خسارات اقتصادی زیادی را به دنبال دارد. این عفونت به تعادل اکسیدانی و آنتی‌اکسیدانی بدن آسیب می‌رساند. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی و مقایسه میزان فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز (MPO; Myeloperoxidase)، غلظت نیتریک اکسید و ویتامین C در سرم گاوان و گوسفندان واکسینه و مبتلا به بروسلوزیس انجام شد. بدین منظور، ۴۰ نمونه خون از ورید وادج گاوان و گوسفندان واکسینه و مبتلا به بروسلوز (تعداد ۱۰ نمونه از هر گروه) به مقدار ۵ میلی‌لیتر اخذ شد و میزان فعالیت آنزیم MPO و غلظت نیتریک اکسید و ویتامین C در سرم حیوانات مورد سنجش و مقایسه قرار گرفت. افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم MPO در گوسفندان و گاوان مبتلا به بروسلوز در مقایسه با دام‌های واکسینه مشاهده شد که با افزایش فراخوانی نوتروفیل‌ها و تقویت پاسخ التهابی مرتبط بود ($p < 0/05$). همچنین، غلظت نیتریک اکسید سرم در گاوان بیمار نسبت به گاوان واکسینه افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0/05$). اما بین گوسفندان واکسینه و مبتلا اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. غلظت ویتامین C سرم نیز در گاوان واکسینه‌شده به‌طور معنی‌داری بیشتر از گاوان مبتلا به بروسلوز بود ($p < 0/05$). یافته‌های پژوهش حاضر مشخص کرد که احتمالاً به‌دنبال ابتلا به بروسلوزیس، فعالیت اکسیداتیو در سرم افزایش می‌یابد و حال آنکه واکسیناسیون علیه آن، نقشی مهمی در تقابل آنتی‌اکسیدانی بدن ایجاد می‌کند. البته به نظر می‌رسد که برای اظهار نظر قطعی در این خصوص، به تحقیقات وسیع‌تر و ارزیابی دیگر فاکتورهای دخیل، نیاز می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: بروسلوز گاو و گوسفند، واکسیناسیون، میلوپراکسیداز، نیتریک اکسید، ویتامین C.

مقدمه

از سالیان دور بروسلوزیس (Brucellosis) به عنوان بیماری مشترک و اندمیک در ایران مطرح بوده که سلامت عمومی انسان و دامها را تحت تاثیر قرار داده و خسارات اقتصادی قابل توجهی را به دنبال داشته است. بیماری مذکور در گاو و گوسفند باعث کاهش بهره‌وری ۲۰ الی ۲۵ درصدی، کاهش تولید شیر، سقط جنین و تولید نوزادان ضعیف می‌شود. سالانه بیش از ۵۰۰۰۰۰ مورد جدید از این بیماری با توزیع نابرابر در سراسر جهان گزارش می‌شود (Adabi *et al.*, 2023; Skalsky *et al.*, 2008). گونه‌های بروسلا که عامل بروسلوزیس هستند، باکتری‌های گرم منفی و درون سلولی اختیاری هستند که قادرند در داخل ماکروفاژها به بقای خود ادامه داده و عفونت‌های مزمن ایجاد کنند (Pappas *et al.*, 2006). باکتری‌های مذکور معمولاً از طریق دستگاه گوارش، غشاء مخاطی، دستگاه تنفس و پوست وارد بدن شده و از طریق خون و سیستم لنفاوی به بافت‌های دیگر گسترش می‌یابند (Al Dahouk *et al.*, 2005). در واقع بروسلوزیس نوعی عفونت سیستمیک است که منجر به تحریک گویچه‌های سفید و تولید انواع گونه‌های فعال اکسیژن (reactive oxygen species; ROS) و نیتروژن (reactive nitrogen species; RNS) می‌شوند (Ndrepepa, 2019) و رادیکال‌های آزاد تولید شده بر این اساس، سبب اکسیداسیون لیپیدها، پروتئین‌ها و نیز آسیب‌رسانی به مولکول DNA می‌شوند. بنابراین غالب عفونت‌های بروسلائی با فعال کردن ماکروفاژها و افزایش تولید سایتوکاین‌ها، کموکاین‌ها، رادیکال‌های آزاد و نیتریک اکسید (NO) همراه هستند (Dündar,

2023). پژوهش‌ها نشان داده است که مکانیسم بیماری‌زایی عفونت مذکور با افزایش استرس اکسیداتیو و تخلیه ذخایر آنتی‌اکسیدانی مرتبط است (Gholami *et al.*, 2012). همچنین افزایش تولید رادیکال‌های آزاد به شکل ثانویه در بروسلوزیس، بر استروئیدوژنز، آپوپتوز، پراکسیداسیون لیپیدی و فولیکولوژنز تاثیر گذاشته و منجر به اختلالات قبل از لانه‌گذاری جنین و ناباروری در حیوانات می‌شود (Hussain *et al.*, 2022).

میلوپراکسیداز (MPO) یک آنزیم اکسیداتیو موجود در سلول‌های فاگوسیتیک است که در طول التهاب آزاد شده و در زمره اجزای سیستم ایمنی ذاتی محسوب می‌شود. این آنزیم با کاتالیز واکنش پراکسید هیدروژن و یون کلر و تشکیل یون هیپوکلرو اسید، در نابودی میکروب‌های موجود در کمپلکس فاگوزوم نقش مهمی دارد (Davies *et al.*, 2020). همچنین افزایش فعالیت آنزیم فوق با افزایش آسیب اکسیداتیو بافتی در محل التهاب و تشکیل ضایعات آترواسکلروتیک همراه است (Dündar, 2023).

نیتریک اکسید (NO) یک مولکول رادیکال آزاد است که توسط پروتئین القایی نیتریک اکساید سنتتاز (NOS2) در سیستم‌های بیولوژیکی تولید می‌شود. هرچه مقدار نیتریک اکسید بیشتر شود، امکان وقوع واکنش‌های اکسیداسیون تولید NO₂ در مایعات و NO₃ در حضور اکسی‌هموگلوبین بیشتر می‌شود. پیش از این تصور می‌شد که سلول‌های اندوتلیال یک عامل بسیار ناپایدار تولید می‌کنند که منجر به کاهش تونیسته عضلات صاف مجاور می‌شود. اما پس از آن، نشان داده شد که این عامل دارای رفتار اکسید نیتریک (NO)

است. این ماده به اندازه کافی از سلول‌های اندوتلیال آزاد و در کنترل قطر عروق شرکت می‌کند (Lei et al., 2023). تولید NO همچنین یک مکانیسم دفاعی در برابر پاتوژن‌های مختلف از جمله باکتری‌های جنس بروسلا است. نیتریک اکسید یک مولکول سیتوتوکسیک موثر است که با اتصال مستقیم به DNA دو رشته‌ای سبب القای دامیناسیون، شکستگی و اختلال در سنتز DNA شده و تکثیر باکتریایی را مهار می‌کند و از سوی دیگر سبب القای آپوپتوز در سلول‌های درگیر می‌شود (Bahnemiri et al., 2022). ویتامین C یا آسکوربیک اسید (ascorbic acid)، یکی از اجزای مهم سیستم آنتی‌اکسیدانی پستانداران است که پتانسیل بالایی در حفظ سلامتی بدن و مقابله با بیماری‌های عفونی دارد (Seifzadeh et al., 2022). ویتامین C نقش مهمی در ایمنی ذاتی و اکتسابی دارد و عملکرد سد اپیتلیال علیه پاتوژن‌ها را بهبود می‌بخشد. ویتامین C همچنین در سلول‌های فاگوسیتیک تجمع یافته و سبب افزایش کموتاکسی، فاگوسیتوز، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و در نهایت افزایش خواص میکروب‌کشی می‌شود. پژوهش‌ها آشکار کرده که کمبود ویتامین C منجر به تضعیف سیستم ایمنی و حساسیت بیشتر به عفونت‌ها می‌شود (Carr and Maggini, 2017). با توجه به این‌که اکثر اشکال ویتامین C به طور گسترده در شکمبه تجزیه می‌شوند، بنابراین نشخوارکنندگان به سنتز بافتی آن متکی هستند. ساخت آسکوربیک اسید در کبد نشخوارکنندگان با مصرف گلوکز و در مسیر گلوکوکروونیک اسید انجام می‌شود، بنابراین وقتی مقادیر کافی گلوکز در دسترس نباشد، ممکن است نشخوارکننده بیشتر از سایر

حیوانات اهلی در معرض کمبود ویتامین C باشد (Matsui, 2012). کاهش غلظت ویتامین C پلاسما، در گوساله‌های تحت استرس شرایط نگه‌داری، گاوهای شیرده مبتلا به ورم پستان و در معرض استرس گرمایی گزارش شده است (Padilla et al., 2007).

با توجه به موارد ذکر شده، به نظر می‌رسد که وقوع استرس اکسیداتیو و عملکرد متقابل آنتی‌اکسیدان‌های درون‌زا از عوامل حیاتی در شروع مکانیسم‌های مولکولی مقابله‌کننده با بیماری‌های عفونی از جمله بروسلوزیس محسوب می‌شوند و نظر بر این‌که پژوهش‌های کمی در ارتباط با وضعیت آنتی‌اکسیدانی و استرس اکسیداتیو گاوهای مبتلا به بروسلوز در دسترس است، پژوهش حاضر با هدف ارزیابی میزان فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز، غلظت نیتریک اکسید و ویتامین C در سرم گاوها و گوسفندان واکسینه شده و نیز مبتلا به بروسلوز، طراحی و انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

- جمع‌آوری نمونه‌ها: پژوهش مقطعی - توصیفی حاضر با همکاری اداره کل دامپزشکی استان چهارمحال و بختیاری انجام شد. نمونه‌های لازم از سطح واحدهای دامداری استان در بهار و تابستان سال ۱۴۰۲ جمع‌آوری شدند. بدین منظور و بر اساس دستورالعمل و گزارشات واحد مبارزه با سل و بروسلوز اداره کل دامپزشکی استان، شناسایی دام‌های جوان مبتلا به بروسلوز انجام و اقدام به خون‌گیری از ورید وداج تعداد ۱۰ رأس گاو ماده و ۱۰ رأس گوسفند ماده شد. در ادامه به همان تعداد نمونه خون هم از ورید وداج

گاوان ماده واکسینه شده با واکسن RB₅₁ و گوسفندان ماده واکسینه شده با واکسن Rev₁، به ترتیب در محدوده سنی ۱۲ و ۷ ماهه، اخذ گردید. لازم به ذکر است که به هنگام خون گیری از دام های مورد نظر، سعی بر آن بود که لااقل ۲ ماه از تاریخ تلقیح واکسن گذشته باشد. بلافاصله، نمونه های خون اخذ شده، در شرایط استاندارد دمایی به آزمایشگاه بیوشیمی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد منتقل و سرم ها پس از جداسازی در برودت ۲۰- درجه سلسیوس نگه داری شدند. در ادامه جهت شناسایی نمونه های مثبت مبتلا به عفونت بروسلائی، آزمایش های مرسوم شامل رزینگال، رایت کلاسیک و رایت ۲-مرکاپتواتانول، زیر نظر کارشناسان اداره کل دامپزشکی استان چهارمحال و بختیاری به انجام رسید و ابتلای دام های مورد آزمایش، تأیید شد.

- **سنجش پارامترهای بیوشیمیایی مورد نظر در سرم دام- های مورد مطالعه:** فعالیت آنزیم MPO با استفاده از کیت تجاری (کیازیس، همدان، ایران) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده تعیین شد. عملکرد این کیت براساس واکنش همزمان احیای پراکسید هیدروژن به آب و اکسیداسیون یون های کلرید به هیپوکلرو اسید (hypochlorous acid) است که به سرعت با تائورین (taurine) واکنش می دهد تا یک محصول کلرامین تائورین پایدار تولید کند. رنگ زرد تولید شده معرف میزان اتصال کمپلکس کلرامین تائورین به پروپ کروموژن TNB (5-thio-2-nitrobenzoic acid) می باشد که با کاهش آن، فعالیت بالاتر MPO گزارش می شود. میزان جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه-

گیری و فعالیت MPO به صورت mU/well گزارش شد.

سنجش میزان ویتامین C سرم نیز براساس دستورالعمل کیت تجاری (کیازیس، همدان، ایران) انجام شد. به شکل خلاصه، ابتدا آسکوربیک اسید موجود در نمونه به دی هیدروآسکوربیک اسید تبدیل شده و با کروموژن مخصوص واکنش داد تا در طول موج ۵۳۰ نانومتر جذب داشته باشد. پس از رسم منحنی استاندارد، میزان ویتامین C به صورت µg/mL گزارش شد.

همچنین سنجش میزان نیتریک اکسید سرم هم با استفاده از کیت رنگ سنجی شرکت زلیو آلمان (ZellBio, Germany) و بر مبنای واکنش اکسیداسیون NO⁻، تشکیل NO₂ و یک ترکیب آزو متمایل به قرمز انجام شد. در روش استفاده شده، غلظت NO به طور غیرمستقیم با سنجش مقدار جذب نوری در طول موج ۵۵۰ نانومتر محاسبه و براساس واحد µmol/L سرم گزارش شد.

- **تحلیل آماری داده ها:** داده های به دست آمده با بهره گیری از نرم افزار آماری سیگماپلات نسخه ۱۳، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. پس از تأیید توزیع نرمال داده ها با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف، برای واکاوی آماری و مقایسه میانگین گروه ها از آزمون آنالیز واریانس (one-way ANOVA) در سطح معنی داری ۰/۰۵ < p استفاده شد. همچنین از آزمون همبستگی پیرسون (Pearson correlation) برای بررسی ارتباط بین پارامترهای مورد سنجش در سطح معنی داری ۰/۰۵ < p استفاده شد.

یافته‌ها

- نتایج سنجش سرمی نیتریک اکسید: مطابق جدول ۱، مقادیر سرمی نیتریک اکسید در گوسفندان مبتلا به بروسلوز و واکسینه‌شده علیه آن به ترتیب معادل $14/2 \pm 81/85 \mu\text{mol/L}$ و $22/4 \pm 24/45 \mu\text{mol/L}$ برآورد شد که در مقایسه، تفاوت آماری معنی‌داری را بین دو گروه نشان نداد ($p > 0/05$) و این یافته بالاتر بودن نسبی و غیرمعنی‌دار مقدار نیتریک اکسید در سرم گوسفندان بیمار را آشکار کرد. همچنین، غلظت سرمی نیتریک اکسید در گاوان مبتلا و واکسینه‌شده علیه بروسلوز به ترتیب معادل $28/7 \pm 14/49 \mu\text{mol/L}$ و $10/1 \pm 076/2 \mu\text{mol/L}$ تعیین شد (جدول ۲)، که این یافته افزایش معنی‌دار میزان نیتریک اکسید در سرم گاوان بیمار نسبت به گاوان واکسینه را نشان داد ($p = 0/002$).

- نتایج سنجش سرمی ویتامین C: همچنین مطابق جدول ۱، غلظت سرمی ویتامین C در گوسفندان مبتلا به بروسلوز و واکسینه‌شده علیه بروسلوز به ترتیب معادل $37/4 \pm 5/65 \mu\text{g/mL}$ و $27/3 \pm 95/35 \mu\text{g/mL}$ تعیین شده که در مقایسه تفاوت آماری معنی‌داری را بین دو گروه نشان نداد ($p > 0/05$) و این یافته حکایت از بالاتر بودن نسبی و غیرمعنی‌دار مقدار ویتامین C در سرم گوسفندان واکسینه داشت. مطابق جدول ۲ هم، غلظت

سرمی ویتامین C در گاوان مبتلا و واکسینه‌شده علیه بروسلوز به ترتیب معادل $41/3 \pm 78/76 \mu\text{g/mL}$ و $24/3 \pm 07/73 \mu\text{g/mL}$ بود که این یافته نشانگر وجود اختلاف آماری معنی‌دار و بالاتر بودن غلظت سرمی ویتامین C در سرم گاوان واکسینه نسبت به گاوان بیمار بود ($p = 0/004$).

- نتایج سنجش فعالیت سرمی آنزیم میلوپراکسیداز (MPO): همان‌گونه که در جدول ۱ ارائه شده‌است، میزان فعالیت آنزیم MPO در سرم گوسفندان مبتلا به بروسلوز و واکسینه‌شده علیه آن، به ترتیب معادل $20/1 \pm 63/15 \text{ mU}$ و $14/1 \pm 77/37 \text{ mU}$ تعیین شده که در مقایسه، تفاوت آماری معنی‌دار را نشان داد ($p = 0/004$). همچنین در جدول ۲، میزان فعالیت آنزیم MPO در سرم گاوان مبتلا به بروسلوز و واکسینه‌شده علیه آن به ترتیب معادل $21/1 \pm 09/31 \text{ mU}$ و $12/1 \pm 23/72 \text{ mU}$ ثبت شده که افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم مذکور در سرم گاوهای بیمار را نسبت به گاوهای واکسینه، نشان می‌دهد ($p = 0/001$). اما به طور کلی، بررسی‌های آماری، تفاوت معنی‌داری بین غلظت سرمی نیتریک اکسید، ویتامین C و فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز در سرم گاوان و گوسفندان بیمار و واکسینه‌شده بروسلوز را نشان نداد ($p > 0/05$).

جدول ۱- مقایسه میانگین $\pm$ خطای استاندارد فعالیت فاکتورهای اکسیدانی و آنتی اکسیدانی سرم گوسفندان مبتلا و واکسینه‌شده علیه بروسلوز

فاکتور سنجیده شده	گروه گوسفندان واکسینه‌شده	گروه گوسفندان مبتلا	p- value
نیتریک اسید ($\mu\text{mol/L}$)	$14/2 \pm 81/85$	$22/4 \pm 24/45$	0/177
ویتامین C ($\mu\text{g/mL}$)	$37/4 \pm 5/65$	$27/3 \pm 95/35$	0/113
فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز (mU)	$14/1 \pm 77/37$	$20/1 \pm 63/15^*$	0/004

*: نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار نسبت به گروه دیگر است ($p < 0/05$).

جدول ۲- مقایسه میانگین $\pm$ خطای استاندارد فعالیت فاکتورهای اکسیدانی و آنتی اکسیدانی سرم گاوان مبتلا و واکسینه شده علیه بروسلوز

فاکتور سنجیده شده	گروه گاوها واکسینه شده	گروه گاوها مبتلا	p- value
نیتریک اسید ($\mu\text{mol/L}$)	$10/1 \pm 0.7/2$	$28/7 \pm 1.4/49^*$	0/002
ویتامین C ($\mu\text{g/mL}$)	$41/3 \pm 7.8/76$	$24/3 \pm 0.7/73^*$	0/004
فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز (mU)	$12/1 \pm 2.3/72$	$21/1 \pm 0.9/31^*$	0/001

* نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار نسبت به گروه دیگر است ($p < 0.05$).

بحث و نتیجه گیری

باکتری بروسلا پاتوزنی درون یاخته ای است که پس از ورود به بدن، در درون سلول های بیگانه خوار به بقای خود ادامه داده و به طریق مختلف خود را از دسترس سیستم ایمنی مخفی نگاه می دارد، به گونه ای که درجات متنوعی از بیماری حاد تا مزمن را ایجاد و در مواردی حیوان را ناقل می سازد. این رفتار مختص باکتری بروسلا است که در شرایط مختلف فیزیولوژیک در اندام های گوناگون جایگزین و شرایط را برای تزیاد، تکثیر و دفع خود فراهم می کند. برای مثال در حیوانات آبستن و به ویژه در یک سوم پایانی آبستنی منجر به آلودگی جفت و مایعات جنینی شده و پس از ایجاد سقط جنین، مقدمات را برای انتشار خود در محیط و انتقال به سایر حیوانات فراهم می کند. در حیوانات غیر آبستن بالغ نیز خود را در غدد پستانی و سایر اندام ها (طحال، مفاصل و...) جایگزین و از تمامی ترشحات بدن دفع می شود و یا در دام های نر بالغ منجر به تورم اپیدیدیم و بیضه شده و به مقدار قابل توجه در منی دفع می شود. شکل گیری چنین رفتارهایی را می توان به حضور فاکتورهای متعدد حدت زان نظیر اوهره آز، فاکتور شبیه به LPS، آدنین مونوفسفات و گوانین مونوفسفات مربوط دانست (Gopalakrishnan

et al., 2016). این فاکتورها به راحتی قادرند بر عملکرد سیستم ایمنی، فعالیت اکسیداتیو و توان آنتی اکسیدانی تأثیر گذاشته و سلامت بدن نشخوارکننده را با چالش های جدی روبرو سازند. از اینرو در تحقیق حاضر به مقایسه برخی فراسنجه ها در حیوانات مبتلا به بروسلا و واکسینه شده پرداخته است. در این پژوهش مشاهده شد فعالیت اکسیداتیو سرم در گاوان و گوسفندان مبتلا به بروسلوز به طور معنی داری بیشتر از حیوانات واکسینه شده است. به گونه ای که میزان فعالیت آنزیم MPO در گاوان و گوسفندان مبتلا و مقدار NO در گاوان مبتلا به شکل چشمگیری بیشتر از حیوانات واکسینه بود و در مقابل سطح ویتامین C سرم در گاوان واکسینه بیشتر از گاوان مبتلا برآورد شد. پرین و همکاران در سال ۲۰۱۷ نیز به افزایش فعالیت اکسیداتیو در گاوان مبتلا به بروسلا / بورتوس اشاره می نمایند و اظهاراتی مشابه با نتایج تحقیق حاضر که حکایت از افزایش میزان MPO در گاوان و گوسفندان مبتلا و NO در گوسفندان را بیان می دارند (Perin et al., 2017). نکته قابل توجه بالاتر بودن سطح ویتامین C سرم گاوان واکسینه شده در مقایسه با گاوان مبتلا بود که حکایت از افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی و اثرات مثبت واکسیناسیون دارد. دونداد و همکاران در

سال ۲۰۲۳ فعالیت بالای آنزیم MPO و کاهش فعالیت آنزیم پاراکسوناز (PON-1) را در عفونت حاد بروسلائی انسان گزارش نمودند و ضمن اشاره به برهم خوردن تعادل اکسیدانی-آنتی اکسیدانی، به نفع استرس اکسیداتیو، آنرا مسئول اختلال در عملکرد سلول‌های اندوتلیال دانستند (Dündar, 2023). چنین به نظر می‌رسد که میزان فعالیت سرمی آنزیم MPO، با پیشرفت و شدت بیماری‌ها مرتبط است (Siraki, 2021). بر این اساس افزایش فعالیت آنزیم MPO در گاوان و گوسفندان مبتلا به بروسلوز قابل توجه است، چراکه در زمان آلودگی به بروسلا یاخته‌های بیگانه‌خوار همچنان در روند میکروب‌کشی و مبارزه با آن به رهاسازی میلیوپرواکسیداز ادامه می‌دهند. از سوی دیگر فعالیت کمتر آنزیم MPO در حیوانات واکسینه شده را می‌توان به تلقیح جرم تخفیف حدت یافته مربوط دانست. پورنصرت و همکاران در سال ۲۰۱۴ چنین اعلام نمودند که آنزیم MPO در ایمنی ذاتی و مقابله با پاتوژن‌های مهاجم بسیار کارآمد است (Pournosrat et al., 2014). این آنزیم همچنین اثر فراهمی زیستی نیتریک اکسید را کاهش می‌دهد، اما در تحقیق حاضر ارتباطی منفی و معنی‌داری مابین عملکرد MPO و NO مشاهده نشد. سانتوس و همکاران در سال ۲۰۲۰ به ارزیابی پاسخ التهابی موش‌های مبتلا به عفونت بروسلا آبورتوس پرداختند و افزایش سطح سرمی فعالیت آنزیم MPO و ائوزینوفیلیک پراکسیداز (eosinophil peroxidase; EPO) را مشاهده کردند. این پژوهشگران چنین عنوان کردند که افزایش MPO و EPO به عنوان شاخص اندازه‌گیری غیرمستقیم نوتروفیل‌ها و ائوزینوفیل‌ها در روده موش‌های مبتلا به

بروسلوز ممکن است به تشکیل عفونت کمک کند (Santos et al., 2020). نیتریک اکسید نقش مهمی در تنظیم بستر عروقی، انتقال عصبی، پاسخ ایمنی و فعالیت سیتوتوکسیک با واسطه ماکروفاژها دارد. در حضور ایتترفرون گاما، فاکتور نکروز تومور آلفا و لیپوپلی ساکارید باکتری‌ها، بیان آنزیم نیتریک اکسید سنتتاز که مسئول تولید NO است، افزایش یافته و میزان NO افزایش می‌یابد (López-Urrutia et al, 2023; Lei et al 2000). نتایج پژوهش حاضر حکایت از افزایش سطح NO در گوسفندان مبتلا داشت اما اختلاف موجود از نظر آماری معنی‌دار نبود. آقایی و همکاران در سال ۲۰۰۲ به مقایسه میزان نیتریک اکسید موش‌های واکسینه شده با BCG و آلوده شده با سویه کشته شده مایکوباکتریوم توبرکولوزیس پرداختند و افزایش فعالیت NO در هر دو گروه اعلام داشتند (Aghaie et al., 2002). در همین ارتباط، نیست و همکاران در سال ۲۰۰۷ حضور لیپوپلی ساکاریدهای باکتری در ماکروفاژهای آلوده را مسئول افزایش سطح NO سرم گوساله‌های آلوده به بروسلا آبورتوس دانستند (Nisbet et al., 2007).

از دیگر یافته‌های تحقیق حاضر می‌توان به افزایش عملکرد آنتی اکسیدانی در حیوانات واکسینه اشاره نمود. به‌طوری‌که گاوان واکسینه شده سطح بالاتری از ویتامین C را در مقایسه با مبتلایان به بروسلوز تجربه نمودند. اصولاً بروسلا پاتوژنی است که برای مدت طولانی در ماکروفاژها زنده مانده و عفونتی مزمن را رقم می‌زند. این باکتری، پلاریزاسیون ماکروفاژها را از M1 به M2 تغییر می‌دهد و در ماکروفاژهای M2 به مدت طولانی باقی می‌ماند.

ماکروفاژها معمولاً با متابولیت‌هایی نظیر گلوکز و گلوتامین سر و کار دارند و به جذب آنها نیز می‌پردازند. بطوریکه در التهاب‌ها برداشت گلوکز توسط ماکروفاژها افزایش می‌یابد. در ماکروفاژهای M2، متابولیسم هوازی غالب است و جهت تامین انرژی به مسیرهای گلیکولیز و بتا اکسیداسیون متکی هستند. بنابراین مقدار زیادی گلوکز و اسیدهای چرب را تجزیه می‌کند تا ATP مورد نیاز خود را تولید کنند. پژوهش‌های گذشته نشان داده است که سطح گلوکز درون سلولی M2 بالاتر از ماکروفاژهای M1 است (Mirzaei et al., 2021). از سوی دیگر همانگونه که پیش از این بیان شد، تامین ویتامین C نشخوارکنندگان وابسته به گلوکز است (Matsui, 2012). پادیا و همکاران در سال ۲۰۰۷ کاهش سطح سرمی ویتامین C در اوایل دوران شیردهی گاو را به افزایش سرعت مصرف گلوکز ربط می‌دهند (Padilla et al., 2007). در پژوهش حاضر نیز سطح ویتامین C سرم گاوان واکسینه بطور معنی‌داری بیشتر از گاوان مبتلا به بروسلوز است، که از یک سو حکایت از نقش ویتامین C در ایمنی‌زایی اکتسابی به دنبال تلقیح واکسن دارد و از سوی دیگر نقش آنتی اکسیدانی بارز آن در مقابله با بروسلوز را بیان می‌دارد. ویتامین C با حمایت از عملکرد سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی نقشی مهم را در دفاع از بدن بر عهده داشته و با تقویت عملکرد بافت پوششی، بدن را در قبال استرس‌های اکسیداتیو محیطی ایمن می‌نماید. این ویتامین با تجمع در فاگوسیت‌هایی

نظیر نوتروفیل‌ها منجر به افزایش توان کموتاکسی و بیگانه‌خواری آنها شده و خواص ضد میکروبی قوی-تری را القاء می‌نماید (Carr and Maggini, 2017). تحت شرایط استرس اکسیداتیو و در روند مقابله با بسیاری از بیماری‌ها، ویتامین C یکی از اولین آنتی اکسیدان‌هایی است که در سرم مصرف می‌شود (Aycicek et al., 2011).

در مجموع چنین نتیجه‌گیری می‌شود که به دنبال ابتلا به بیماری بروسلوز بر فعالیت اکسیداتیو افزوده می‌شود و حال آنکه واکسیناسیون بر علیه بروسلا نقشی مهم در تقابل آنتی اکسیدانی بدن دارد که نمود آن را می‌توان در افزایش میزان ویتامین C جستجو نمود. نکته قابل تأمل آنکه برای اولین بار به بررسی میزان فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز (شاخصی برای سنجش غیرمستقیم هجوم نوتروفیل‌ها) در بیماری بروسلوز گاو و گوسفند پرداخته شد و افزایش آن به عنوان یک شاخص پیش آگهی در مبتلایان گزارش شد.

سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه شهرکرد به خاطر تامین هزینه اجرای این تحقیق قدردانی می‌کنند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافی ندارند.

منابع

- Adabi, M., Gharekhani, J., Alamian, S., Varasteh-Shams, M., Fathi-Sheikhi, M., Ghaderi, H., *et al.* (2023). Bovine Brucellosis: First Comprehensive Evaluation from Hamedan, an Endemic Area in Iran. *Indian Journal of Microbiology*, 64(4): 1518-1527.
- Aghaie, A., Zavaran Hosseini, A. and Moazzeni S.M. (2002). Nitric oxide production following vaccination with killed mycobacterium tuberculosis (H37Rv) and BCG. *The Journal of Qazvin University of Medical Science*, 6(3): 22-29. [In Persian]
- Al Dahouk, S., Nöckler, K., Hensel, A., Tomaso, H., Scholz, H.C., Hagen, R.M., *et al.* (2005). Human brucellosis in a nonendemic country: a report from Germany, 2002 and 2003. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 24(7): 450-456.
- Aycicek, A., Hakan, S. and Ozcan, Erel. (2011). Effect of acute brucellosis on total oxidant and antioxidant status in children. *Journal of Harran University Medical Faculty*, 8(2): 483-490.
- Bahnemiri, M. G., Mahjoub, S. and Hasanjani, M.R. (2022). Evaluation of antioxidants, nitrosative, and oxidative stress before & after acute brucellosis treatment. *Microbial Pathogenesis*, 167, 105551-105551.
- Carr, A.C. and Maggini, S. (2017). Vitamin C and immune function. *Nutrients*, 9(11): 1211-1211.
- Davies, M.J. and Hawkins, C.L. (2020). The role of myeloperoxidase in biomolecule modification, chronic inflammation, and disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 32(13): 957-981.
- Melek, I.M., Erdogan, S., Celik, S., Aslantas, O. and Duman, T. (2006). Evaluation of oxidative stress and inflammation in long-term *Brucella melitensis* infection. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 293(1-2): 203-209.
- Dündar, A. (2023). Investigation of serum ischemic-modified albumin, galectin-3, paraoxonase-1, and myeloperoxidase activity levels in patients with acute brucellosis. *Redox Report*, 28(1): 2289727-2289727.
- Gopalakrishnan, A., Dimri, U., Saminathan, M., Yatoo, M.I., Priya, G.B., Gopinath, D., *et al.* (2016). Virulence factors, intracellular survivability and mechanism of evasion from host immune response by *Brucella*: an overview. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 26(6): 1542-1555.
- Gholami, M., Roushan, M.H., Mahjoub, S. and Bijani, A. (2012). How is total antioxidant status in plasma of Patients with brucellosis? *Caspian Journal of Internal Medicine*, 3(1): 363-367.
- Hussain, R., Khan, I., Jamal, A., Mohamed, B.B. and Khan, A. (2022). Evaluation of hematological, oxidative stress, and antioxidant profile in cattle infected with brucellosis in Southern Punjab. *Pakistan. BioMedical Research International*, 2022(1): 7140909-7140909.
- Lei, L., Wang, X., Zhang, J., Yin, J., Xu, Q., Wang, T., *et al.* (2023). Lipopolysaccharides of *Brucella suis* S2 Impaired the Process of Decidualization in Early Pregnancy in Mice. *Toxins*, 15(11): 662-662.
- López-Urrutia, L., Alonso, A., Nieto, M.L., Bayón, Y., Orduña, A. and Sánchez Crespo, M. (2000). Lipopolysaccharides of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* induce nitric oxide synthesis in rat peritoneal macrophages. *Infection and Immunity*, 68(3): 1740-1745.
- Matsui, T. (2012). Vitamin C nutrition in cattle. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 25(5): 597-605.
- Mirzaei, R., Sholeh, M., Jalalifar, S., Zafari, E., Kazemi, S., Rasouli-Saravani., *et al.* (2021). Immunometabolism in human Brucellosis: an emerging field of investigation. *Microbial Pathogenesis*, 158: 105115-105115.
- Ndrepepa, G. (2019). Myeloperoxidase—A bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease. *International Journal of Clinical Chemistry*, 493: 36-51.
- Nisbet, C., Yarim, G.F., Ciftci, A., Çenesiz, S. and Ciftci, G. (2007). Investigation of serum nitric oxide and malondialdehyde levels in cattle infected with *Brucella abortus*. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 54(3): 159-163.

- Padilla, L., Matsui, T., Shibano, K.I., Katamoto, H. and Yano, H. (2007). Relationship between plasma vitamin C and serum diagnostic biochemical markers in lactating cows. *Journal of Veterinary Medical Science*, 69(9): 909-913.
- Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L. and Tsianos EV. (2006). The new global map of human brucellosis. *Lancet Infectious Diseases*, 6(2): 91-99.
- Perin, G., Fávero, J.F., Severo, D.R., Silva, A.D., Machado, G., Araújo, H.L., et al. (2017). Occurrence of oxidative stress in dairy cows seropositives for *Brucella abortus*. *Microbial Pathogenesis*, 110(6): 196-201.
- Pournosrat, K.K., Soleimannejad, K. and Yaghmaei P. (2014). The Inflammatory Role of Myeloperoxidase and Its Increased Level in Patients with Coronary Artery Disease. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 22(5): 168-178. [In Persian]
- Santos, R., Campos, P.C., Rungue, M., Rocha, V., Santos, D., Mendes, V. et al., (2020). The role of ST2 receptor in the regulation of *Brucella abortus* oral infection. *Pathogens*, 9(5): 328-328.
- Seifzadeh, S., Seifdavati, J., Abdi-Benemar, H., Salem, A.Z., Sharifi, R.S. and Elghandour, M.M. (2022). Dietary vitamin C in pre-parturient dairy cows and their calves: blood metabolites, copper, zinc, iron, and vitamin C concentrations, and calves' growth performance. *Tropical Animal Health and Production*, 54(1): 1-8.
- Siraki, A.G. (2021). The many roles of myeloperoxidase: From inflammation and immunity to biomarkers, drug metabolism and drug discovery. *Redox Biology*, 46: 102109-102109.
- Skalsky, K., Yahav, D., Bishara, J., Pitlik, S., Leibovici, L. and Paul, M. (2008). Treatment of human Brucellosis: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *The BMJ*, 336(7646): 701-704.