"Research article" DOI: 10.30495/JVCP.2021.1935390.1311

Effect of active vitamin D_3 on the expression of antimicrobial peptide genes in experimental calf pneumonia

Asgharpour, P.[1], Eftekhari, Z.[2], Nadealian, M.G.[3], Nikbakht Borojeni, G.R.[4], Mokhber Dezfouli, M.R.[3,5*]

1- D.V.S.C Graduate, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Assistant Professor of Quality Control Department, Research and Production Complex, Pasteur Institute of Iran, Alborz, Iran.
3- Professor, Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran.
4- Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran.
5- Institute of Biomedical Research, University of Tehran, Tehran, Iran.
*Corresponding author's email: mokhberd@ut.ac.ir.
(Received: 2021/07/18 Accepted: 2021/11/10)

Abstract

The outbreak of calf pneumonia in herds occurs due to different pathogens. Vitamin D3 displays a regulatory effect on different cells, especially its pro-differential biological function and stimulates antimicrobial peptides. In the present study, the effects of vitamin D3 on the expression of antimicrobial peptides in experimental pasteurellosis in calves were assessed. Ten Holstein calves (2-4 months old) were randomly divided into two groups. Prepared *Pasteurella multocida* (3×10^9 CFU/mL) was inoculated in the trachea of all calves and Vitamin D3 was injected only in the treatment group following confirmation of pneumonia. Blood samples and broncho-alveolar lavage fluids were obtained from both groups at different time intervals and the peripheral blood mononuclear cells were isolated to evaluate the antimicrobial peptides gene expression. The expression of CD4, Cathelicidin, and Defensins genes was measured in vitro conditions following the addition of 10^{-6}, 10^{-7} and 10^{-8} molar of vitamin D3. Defensins and CD4 gene expressions revealed a significant difference in the two groups, at the 48, 72, 96, and 120 hours after the challenge time, while the Cathelicidin gene was not expressed in both experimental groups. Surprisingly, increased expression of Cathelicidin, Defensins, and CD4 was observed at a concentration of 10^{-6} M of vitamin D_3. According to the results of this study, vitamin D3 had positive effects on the immune system which was observed as significant improvement in the clinical symptoms of treated calves. The expression of lung-related Defensins and CD4 in vivo and in vitro approved the immunomodulatory effects of vitamin D3 but the gene expression of Cathelicidin is probably related to prescribing higher doses of vitamin D3.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Antimicrobial peptides, *Pasteurella multocida*, Pneumonia, Vitamin D_3.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2021.1935390.1311

ارزیابی اثرات ویتامین D_3 فعال بر میزان بیان ژن‌های پپتیدهای ضدمیکروبی در پنومونی تجربی گوساله‌ها

پریسا اصغرپور[۱]، زهره افتخاری[۲]، محمدقلی نادعلیان[۳]، غلامرضا نیکبخت‌بروجنی[٤]، محمدرضا مخبردزفولی[۳و۵*]

۱- دانش‌آموخته دکترای تخصصی بیماری‌های داخلی دام‌های بزرگ، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- استادیار بخش کنترل کیفیت، مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، انستیتو پاستور ایران، البرز، ایران.

۳- استاد گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

٤- استاد گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۵- پژوهشکده تحقیقات زیست‌پزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: mokhberd@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱٤۰۰/٤/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/۸/۱۹)

چکیده

شیوع پنومونی در گله‌ها به دلیل عوامل بیماری‌زای مختلف رخ می‌دهد. ویتامین D_3 با اثر بر سلول‌های مختلف و تحریک عملکرد بیولوژیکی آن‌ها، پپتیدهای ضدمیکروبی را تحریک می‌کند. در مطالعه حاضر، اثرات ویتامین D_3 بر بیان ژن‌های پپتیدهای ضدمیکروبی در پاستورلوزیس تجربی در گوساله‌ها ارزیابی شد. بدین منظور، ۱۰ رأس گوساله نر نژاد هلشتاین (٤-۲ ماهه) به طور تصادفی به ۲ گروه تقسیم شدند. باکتری *پاستورلا مولتوسیدا* با رقت 3×10^9CFU/mL در نای همه گوساله‌ها تلقیح و بعد از تأیید پنومونی، ویتامین D_3 فقط به حیوانات گروه درمان تزریق شد. نمونه‌های خون از گوساله‌های هر ۲ گروه در فواصل زمانی مختلف اخذ و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی برای ارزیابی بیان ژن‌های پپتیدهای ضدمیکروبی شامل CD4 (cluster of differentiation 4)، دفنسین و کاتالیسیدین جداسازی شد. همچنین برای ارزیابی سلول‌های ریه، لاواژ برونکوآلوئولار انجام شد. در شرایط درون‌تنی، بیان ژن‌های دفنسین و CD4، تفاوت آماری معنی‌داری را در گروه‌های کنترل و درمان در ٤۸، ۷۲، ۹٦ و ۱۲۰ ساعت پس از زمان چالش نشان دادند ($p<۰/۰۵$). علاوه بر این در شرایط برون‌تنی، افزایش بیان ژن‌های کاتالیسیدین، دفنسین و CD4 در غلظت $۱۰^{-۷}$ مولار از ویتامین D_3 مشاهده شد. طبق نتایج مطالعه حاضر، مشخص شد که ویتامین D_3 دارای اثرات مثبتی بر سیستم ایمنی می‌باشد که بصورت بهبود علائم بالینی گوساله‌های تحت درمان مشهود بود. بیان ژن دفنسین و CD4، اثرات تعدیل‌کنندگی این ویتامین را برای سیستم ایمنی تأیید می‌کند، اما بیان ژن کاتالیسیدین، احتمالاً وابسته به تجویز دوزهای بیشتری از ویتامین D_3 می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: ویتامین D_3، پپتیدهای ضدمیکروبی، پنومونی، *پاستورلا مولتوسیدا*.

مقدمه

پنومونی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های تنفسی عفونی در گاوهای شیری می‌باشد که به‌عنوان یک مشکل اقتصادی، به‌ویژه در صنعت تولید گوساله در نظر گرفته می‌شود. عوامل عفونی مختلفی از جمله ویروس‌ها، باکتری‌ها به همراه تضعیف سیستم دفاعی میزبان و شرایط محیطی می‌توانند سبب بروز این بیماری در دستگاه تنفسی حیوان شوند (DeRosa *et al.*, 2000; Mohammadi *et al.*, 2004; Dabo *et al.*, 2008; Rezaie Saber, 2014; Smith, 2015). شیوع بیماری در گوساله‌های نژاد شیری در مقایسه با گوساله‌های نژاد گوشتی که در سیستم غیرمتراکم پرورش می‌یابند، بیشتر است (Smith, 2015). بیماری بیشتر در گوساله‌های ۱ تا ۵ ماهه اتفاق می‌افتد (Constable *et al.*, 2017). شیوع پنومونی در مناطق مختلف جهان بین ۱۰ تا ۷۰ درصد گزارش شده‌است (Gibbs, 2001; Mohammadi *et al.*, 2006). میزان مرگ و میر ناشی از بیماری‌های تنفسی در گاوهای شیری نیز بین ۹/٤-۲/۲ درصد گزارش شده است. تقریباً ۳ درصد از گوساله‌های متولدشده، در ۱۲ هفته اول زندگی خود به دلیل ابتلا به پنومونی تلف می‌شوند (Geraert, 2006; Mohammadi *et al.*, 2007; Constable *et al.*, 2017).

پاستورلوزیس یکی از مهم‌ترین بیماری‌های تنفسی واگیردار در جهان محسوب می‌شود. *Pasteurella multocida* و *Mannheimia haemolytica* به عنوان باکتری‌های گرم منفی و هم‌زیست در مجاری تنفسی فوقانی حیوانات در نظر گرفته می‌شوند، اما عواملی نظیر شرایط استرس‌زای محیطی و مدیریتی و یا عوامل عفونی، می‌توانند باعث رشد و گسترش باکتری‌های فوق به سمت مجاری تنفسی تحتانی شده و علائم بالینی خفیف تا شدیدی را ایجاد کنند (Mohammadi *et al.*, 2007; Selvaraj *et al.*, 2009; Karimkhani *et al.*, 2011; Shayegh *et al.*, 2014; Smith, 2015).

در سال‌های اخیر، وجود باقی‌مانده آنتی‌بیوتیکی در محصولات دامی، دانشمندان را به استفاده از گزینه‌های درمانی مناسب بجای آنتی‌بیوتیک‌ها سوق داده‌است. سیستم ایمنی بدن و برخی از سلول‌های اپیتلیال که در معرض برخورد با عوامل بیماری‌زا قرار دارند، توانایی تولید و ترشح پپتیدهای ضد میکروبی را دارند و از آنجا که پپتیدهای ضدمیکروبی قادر هستند در مکانیسم‌های دفاعی بدن شرکت کنند، می‌توان به عنوان جایگزینی برای مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها از آن‌ها استفاده کرد (Harder and Schroder, 2007) . طبق مطالعات انسانی انجام‌گرفته، ویتامین D_3 به عنوان یک تنظیم‌کننده مناسب در سیستم ایمنی، می‌تواند باعث افزایش مقاومت میزبان در برابر عفونت‌های داخل سلولی شود (Selvaraj *et al.*, 2009; Hewison, 2011). پس از ورود پاتوژن، اختلال در فعال‌سازی گیرنده‌های ویتامین D_3 و واکنش‌های سیستم ایمنی ممکن است رخ دهد، اما تزریق ویتامین مذکور در زمان لازم و به مقدار مناسب، می‌تواند مکانیسم‌های جبرانی را فعال سازد. براساس مطالعاتی که در مورد ورم پستان گاو و سل انسانی انجام شده‌است، استفاده از تعدیل‌کننده‌های سیستم ایمنی علاوه بر آنتی‌بیوتیک‌ها، می‌تواند مقاومت آنتی‌بیوتیکی را به مقدار بسیار زیادی کنترل کند (DiRosa *et al.*, 2011; Chirumbolo *et al.*, 2017). اخیراً، به دلیل شیوع عفونت‌های تنفسی، تأثیرات مثبت ویتامین D_3 بر سیستم ایمنی تنفسی تأیید و سبب شده

که این ویتامین، به عنوان یک ترکیب تأثیرگذار بر میزان بیان پپتیدهای ضد میکروبی ریه شناخته شود (Alva-Murillo *et al.*, 2014). گزارش شده که ویتامین D_3 می‌تواند ایمنی ذاتی و اکتسابی را در سیستم‌های تنفسی و قلبی عروقی تعدیل کند (Bikle, 2009; Guillot *et al.*, 2010) و تحریک سیستم ایمنی بدن به دلیل عفونت‌های باکتریایی، می‌تواند باعث تغییر فرم غیرفعال ویتامین D_3 به فرم فعال آن شود، که این تغییر می‌تواند بیان ژن‌های پپتیدهای ضدمیکروبی را القا نماید (White, 2010). همبستگی و ارتباط بین سطوح پایین ویتامین D_3 و افزایش خطر ابتلا به عفونت‌های دستگاه تنفسی در انسان، توسط محققان گزارش شده است (Pincikova *et al.*, 2007; Hewison, 2011; Ozkanlar, 2012). با توجه به نقش ویتامین D_3 به عنوان تعدیل‌کننده سیستم ایمنی در فعال‌سازی مقاومت میزبان در برابر عفونت‌های مختلف، استفاده از آن به عنوان درمان کمکی همراه با سایر عوامل درمانی، می‌تواند باعث کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در دام شود (DiRosa *et al.*, 2011). پپتیدهای ضدمیکروبی هم، بخش مهمی از ایمنی ذاتی و اکتسابی اکثر موجودات زنده به حساب می‌آیند که طیف گسترده‌ای از فعالیت را در برابر میکروارگانیسم‌هایی نظیر باکتری‌های گرم مثبت و منفی، ویروس‌ها، مخمرها، پروتوزوها و قارچ‌ها نشان می‌دهند (Reddy *et al.*, 2004; Beisswenger and Bals, 2005). این پپتیدها، فعالیت‌های ضد میکروبی با طیف وسیعی را دارند و به عنوان عوامل درمانی جدید شناخته می‌شوند؛ زیرا فعالیت سیستم ایمنی بدن را افزایش می‌دهند. امروزه مشخص شده‌است که این پپتیدها قادر به جذب سلول‌های التهابی و فعال‌کردن پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی هستند (Tecle *et al.*, 2010; Hazlett and Minhao, 2011). دفنسین به طور کلی در نوتروفیل‌ها، ماکروفاژهای آلوئولی، نای، روده بزرگ، روده کوچک، ریه و طحال یافت می‌شود (Tecle *et al.*, 2010; Hazlett and Minhao, 2011).

با توجه به شیوع بالای بیماری‌های تنفسی در گله‌ها، استفاده از ویتامین D_3 به عنوان یک درمان کمکی جهت فعال کردن پپتیدهای ضدمیکروبی که در تعامل با گیرنده‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی هستند، مفید به نظر می‌رسد. لذا، هدف از انجام مطالعه حاضر، ارزیابی اثرات مثبت ویتامین D_3 و همچنین تأثیر آن بر بیان ژن‌های پپتیدهای ضدمیکروبی در پنومونی تجربی در گوساله‌ها بود.

مواد و روش‌ها

- **طراحی مطالعه**: جهت انجام مطالعه تجربی حاضر (مطالعه از مرداد ماه سال ۱۳۹۸ آغاز و در آذر ماه سال ۱۳۹۹ به پایان رسید) در مزرعه تحقیقاتی و پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران واقع در امین‌آباد، تعداد ۱۰ رأس گوساله نر نژاد هلشتاین دو رگه در محدوده سنی ۲ تا ٤ ماهه که از شیر گرفته شده بودند، از گاوداری‌های صنعتی اطراف تهران به‌صورت تصادفی انتخاب شده و پس از معاینات بالینی اولیه و اطمینان از صحت و سلامتی آن‌ها (عدم وجود مشکل ریوی)، به محل انجام مطالعه منتقل شدند. گوساله‌های مورد آزمایش، به مدت ٢٤ تا ٤٨ ساعت دوره تطابق‌پذیری با محیط را طی کرده و سپس به صورت کاملاً تصادفی به دو گروه درمان و کنترل تقسیم شدند. لازم به ذکر است که در طول دوره مطالعه، گوساله‌ها به صورت جداگانه

در جایگاه‌هایی که برای دام‌های بزرگ طراحی شده بود، با بستر، دما، غذا و آب مناسب نگه‌داری شدند.

- **جداسازی باکتری *پاستورلا مولتوسیدا* و تائید مولکولی آن:** از ریه گوساله‌های مبتلا به پنومونی که در مطالعات قبلی استفاده شده بودند، *باکتری پاستورلا مولتوسیدا* جداسازی شد. بدین منظور ریه گوساله‌های مبتلا به پنومونی جداسازی و به آزمایشگاه منتقل شد. کشت با استفاده از روش‌های استاندارد باکتریولوژیکی انجام شد (Smith, 2015) و پس از شناسایی باکتری *Pasteurella multocida*، برای تأیید قطعی و اطمینان از صحت گونه باکتری‌های جداشده، پرایمرهای اختصاصی باکتری مورد نظر به کمک نرم‌افزار *Allele* ID (این نرم‌افزار، برای طراحی پرایمر استفاده می‌شود، که با استفاده از آن می‌توان پرایمر برای انواع PCR (polymerase chain reaction)، مانند Real Time PCR را طراحی کرد. همچنین این نرم‌افزار می‌تواند برای شناسایی گونه‌های زیستی مختلف مانند پاتوژن‌های باکتریایی از یکدیگر استفاده شود) طراحی شد (Abed *et al.*, 2020; Algammal *et al.*, 2020). در طی آزمایش PCR، ژن toxA مربوط به باکتری *P. multocida* با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده، تکثیر شد (جدول ۱) (Abed *et al.*, 2020; Algammal *et al.*, 2020).

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام آزمایش PCR به منظور تأیید مولکولی جدایه‌های باکتری *P. multocida*

	توالی پرایمر (´۳-´۵)	طول	دمای ذوب	درصد گوانین سیتوزین
پرایمر پیش‌برنده (فوروارد)	CTTAGATGAGCGACAAGG	۱۸	۵۲/۲۰	۵۰/۰۰
پرایمر معکوس (ریورز)	GAATGCCACACCTCTATAG	۱۹	۵۲/۱۹	٤٧/٣٧

- **تلقیح باکتری جهت ایجاد پنومونی تجربی:** گوساله‌ها کاملاً مقید شده، سپس دهان حیوان باز و لوله تراشه نایی (ایران، ساخت شرکت سوپا) از طریق دهان، به ملایمت به مدخل نای (اپی‌گلوت) هدایت و پس از اطمینان از ورود لوله به نای (با آزمایش ورود و خروج هوا از طریق لوله)، با پر نمودن کاف لوله و تثبیت آن در محل، اقدام به عبور لوله کاتتر مخصوص لاواژ از میان مجرای لوله تراشه به داخل نای و تقریباً تا محل دو شاخه شدن نای شد. سپس میزان ۱۰ میلی‌لیتر از رقت تهیه‌شده باکتری مورد نظر، که توسط مطالعه پایلوت به‌دست آمده بود، به منظور ایجاد پنومونی تجربی، به داخل نای تلقیح شد. لازم به ذکر است که با توجه به مطالعه‌ای که توسط مخبر دزفولی و همکاران انجام شده بود (Mokhber Dezfouli *et al.*, 2017)، میزان رقت باکتری *P. multocida* جهت ایجاد قطعی پنومونی تجربی، 3×10^9CFU/mL بدست آمده بود که در مطالعه حاضر هم از همین مقدار استفاده شد.

- **ارزیابی علائم بالینی گوساله‌های مورد مطالعه:** علائم بالینی، مانند درجه حرارت مقعدی، ترشحات چشم و بینی، سرفه، صداهای غیرطبیعی تنفسی در گوساله‌های مورد مطالعه، قبل از شروع مطالعه، پس از تلقیح باکتری و هر ٢٤ ساعت و به‌مدت شش روز، مورد ارزیابی قرار گرفت. گوساله‌های مورد مطالعه که حداقل دارای دو علامت از عفونت‌های تنفسی بودند، به‌عنوان

گوساله‌های مبتلا به پنومونی در نظر گرفته می‌شدند که نهایتاً با تأیید رادیولوژی (با استفاده از دستگاه پورتابل Soyee دامپزشکی در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران) نیز صحت امر، مورد تأیید قرار گرفت.

- **تزریق ویتامین D_3:** بعد از گذشت ۲٤ ساعت از تلقیح باکتری و تأیید پنومونی، در ۵ رأس از گوساله‌ها به‌صورت کاملاً تصادفی، به مقدار ۱۰ ویال از ویتامین D_3 (۳۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی) مربوط به شرکت داروپخش تزریق شد.

- **شستشوی برونکوآلوئولار (bronchoalveolar lavage; BAL):** شستشوی برونکوآلوئولار در گوساله‌های بیهوش‌شده با مقدار mg/kg ۵ پروپوفول (پرورویو ۱ درصد®) با استفاده از یک کاتتر استریل (ساخت شرکت سوپا) و انعطاف پذیر با کاف بالون ۵-۳ میلی‌لیتر (ساخت شرکت سوپا)، در زمان چالش، ۲٤ و ٤۸ ساعت بعد از تلقیح باکتری و در پایان مطالعه (ساعت ۱۲۰) انجام شد. کاتتر مخصوص شستشوی برونکوآلوئولار با استفاده از لوله تراشه نایی به داخل نای وارد شد و سپس کاف مخصوص، با ۳ میلی‌لیتر هوا باد شده و متعاقباً بخشی از محلول نمکی استریل از پیش گرم‌شده (۳۷ درجه سلسیوس) تزریق و بلافاصله، مایع لاواژ با فشار منفی آسپیره شده و مایع لاواژ به لوله‌های استریل منتقل شدند.

- **خونگیری و جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی** (peripheral blood mononuclear cell; PBMC): ابتدا نمونه‌های خون جمع‌آوری‌شده (۱۰ میلی‌لیتر از هر رأس دام) به لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد هپارین منتقل شده و توسط محلول فایکول (شرکت Biowest) به آرامی رقیق شده، سپس سانتریفیوژ شده و لایه سفید رنگ و ابر مانند حاوی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی که در حد فاصل بین دو فاز تشکیل شده بود، جداسازی و مراحل تکمیلی بر روی آن انجام شد.

- **انجام آزمایش Real Time PCR جهت سنجش میزان بیان ژن‌های پپتیدهای ضدمیکروبی در شرایط درون‌تنی:** ابتدا RNA مورد نظر از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی و با استفاده از کیت RNX-plus شرکت سیناکلون و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. کیفیت و کمیت تمامی RNAهای استخراج شده هم توسط دستگاه نانودراپ مدل ۲۰۰۰ (ساخت شرکت نانو مبنا ایرانیان) مورد ارزیابی قرار گرفت. همه پرایمرهای مورد نیاز، با مشخصات مناسب و با توجه به عدم امکان تشکیل ساختارهای ثانویه، به کمک نرم‌افزار *Allele* ID طراحی شده و سپس در سایت NCBI-BLAST تأیید شددند (جدول ۲). ژن های مورد نظر در مطالعه حاضر شامل کاتالیسیدین(BMAP34)، دفنسین (BNBD4) و CD4 بود. ژن مرجع در این مطالعه هم GAPDH در نظر گرفته شد.

جدول ۲- مشخصات پرایمرهای استفاده شده جهت سنجش بیان ژن‌های کاتالیسیدین، دفنسین و CD4

شماره	نام	توالی الیگونوکلئوتید	وزن مولکولی	جذب نوری	دمای ذوب	درصد گوانین سیتوزین	طول
۱	*CD4 F*	TCCCACTCACCTTCGAGTAT	۵۹۸۸	٤	۵۷/۳۰	۵۰	۲۰
۲	*CD4 R*	CACCTTCACCTCTCTGTTCTTC	٦۵۲۳	٤	٦۰/۲۵	۵۰	۲۲
۳	*BMAP34 F*	CCAACTGGGAACTGACATAGAG	٦۷۷۷	٤/۵	٦۰/۲۵	۵۰	۲۲
٤	*BMAP34 R*	CCCTGGAGGCTTTGTGAAA	۵۸٤٤	٤	۵٦/٦۷	۵۲/٦۳	۱۹
۵	*BNBD4 F*	CATGAGACAGATTGGCACCT	٦۱۲٦	٤/۵	۵۷/۳۰	۵۰	۲۰
٦	*BNBD4 R*	GCAGTTTCTGACTCCGCATT	٦۰۵۹	٤/۹	۵۷/۳۰	۵۰	۲۰
۷	*GAPDH F*	TGAGATCAAGAAGGTGGTGAAG	٦۹۱۳	۵	۵۸/۳۹	٤۵/٤۵	۲۲
۸	*GAPDH R*	GCATCGAAGGTAGAAGAGTGAG	٦۸۹۸	٤/۵	٦۰/۲۵	۵۰	۲۲

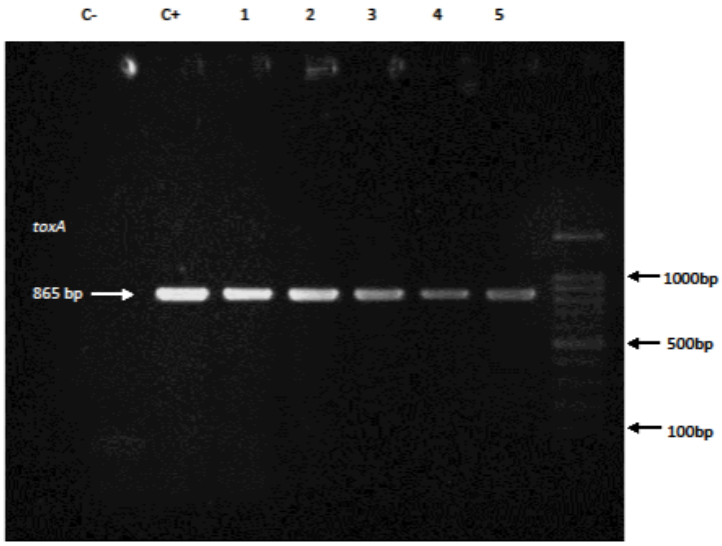
- انجام آزمایش Real-Time PCR جهت بررسی بیان ژن‌های پپتیدهای ضدمیکروبی در شرایط برون‌تنی: برای افزایش دقت مطالعه، بیان ژن‌های مورد نظر در شرایط برون‌تنی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور مقدار ۸۰ میلی‌لیتر نمونه خون با همان شرایطی که قبلاً در مورد آزمایش در شرایط درون‌تنی ارائه شده، در لوله‌های استریل هپارینه (شرکت بیوپارس آزما)، جهت جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی و ارزیابی میزان بیان ژن‌های هدف پس از تلقیح ویتامین D_3، اخذ شد. برای ارزیابی بیان ژن‌های BNBD4، BMAP34 و CD4 از سه غلظت مختلف 10^{-6}، 10^{-7} و 10^{-8} مولار ویتامین D_3 استفاده شد. تمامی مراحل آزمایش‌های برون‌تنی هم همانند آزمایش‌های درون‌تنی و با همان وسایل و تجهیزات انجام شد.

- ملاحظات اخلاقی در نظر گرفته شده برای انجام مطالعه: تمامی پروتکل‌های آزمایشی توسط کمیته اخلاق تحقیقات ملی ایران تأیید شده است (Ethical Code No: IR.IAU.SRB.REC.1397.137).

- تحلیل آماری داده‌ها: تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصله، با استفاده از نرم‌افزار SPSS 18 انجام شد. در همه آزمون‌های آماری انجام گرفته، ارزش *p*-value کمتر از ۰/۰۵، معنی‌دار درنظر گرفته شد. مقایسه میانگین میزان بیان ژن‌ها به روش T test در سطح احتمال پنج درصد بین دو رقم در هر زمان انجام شد. تجزیه داده‌ها بر اساس C_T Delta-Delta توسط نرم‌افزارREST2009 انجام شد. جهت نرمال‌سازی داده‌ها نیز از ژن رفرانس GAPDH استفاده شد.

یافته‌ها

- نتایج تأیید مولکولی باکتری *پاستورلا مولتوسیدا*، جداسازی‌شده از ریه گوساله‌ها: تصاویر به‌دست آمده از ژل الکتروفورز شده محصولات PCR انجام‌گرفته جهت تائید مولکولی گونه *P. multocida*، مطابق شکل ۱، باندی به اندازه ۸٦۵ جفت باز را نشان داد که تائیدکننده باکتری مذکور بود.

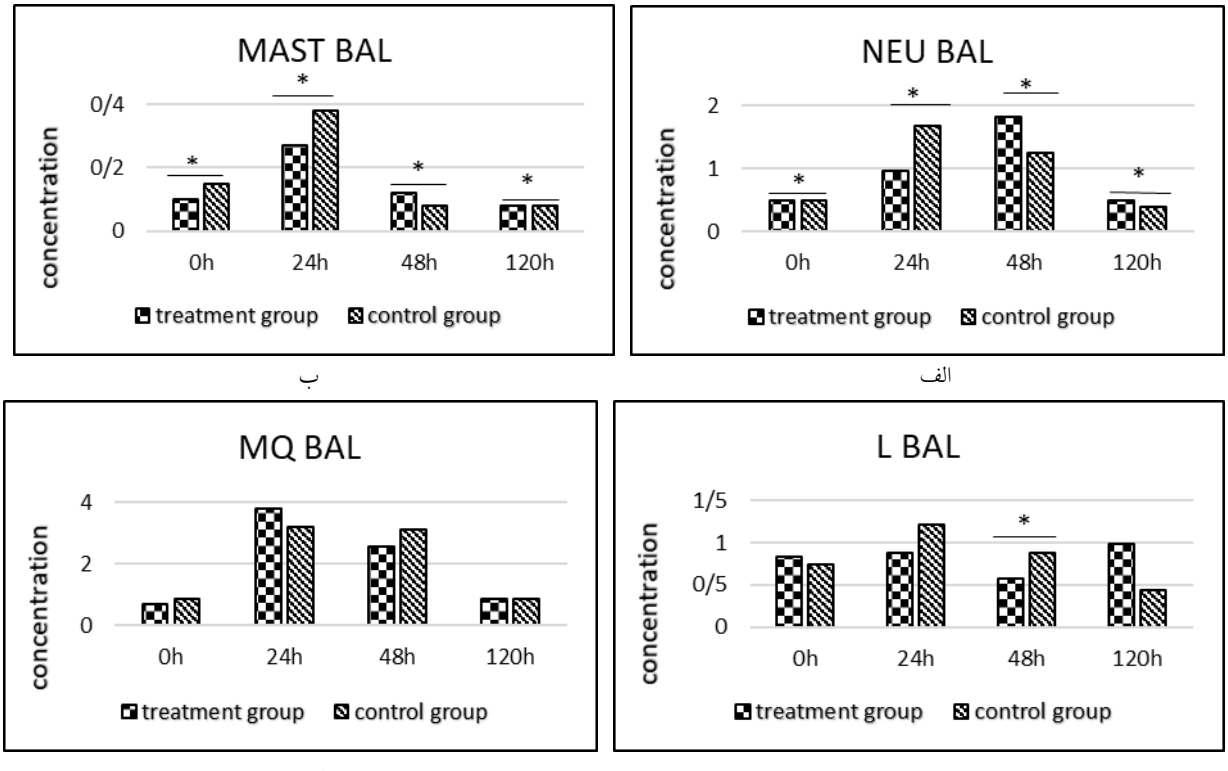


شکل ۱– PCR انجام‌گرفته بین ۵ رأس گوساله موجود در هر گروه، نشان‌دهنده *P. multocida* بر روی ژل آگارز بود که جهت تأیید قطعی گونه باکتری انجام گرفته است.

- نتایج ارزیابی علائم بالینی در گوساله‌های مورد آزمایش: علائم بالینی در اولین ساعت‌های پس از تلقیح باکتری کنترل شد، به طوری که افزایش دمای مقعدی، افزایش ترشحات بینی و چشم، سرفه و صداهای غیرطبیعی تنفسی در حیوانات هر دو گروه ثبت شد. در گوساله‌های گروه درمان، پس از تزریق ویتامین D_3، به‌طور کلی علائم بالینی در مقایسه با گوساله‌های گروه کنترل کاهش و در برخی از آن‌ها پس از ۱۲۰ ساعت از شروع درگیری، بهبودی کاملاً مشهود بود (شکل ۲).

شکل ۲– علائم بالینی ثبت‌شده در گوساله‌های مبتلا به پنومونی تجربی. ۱ و ۲ ترشحات چشمی. ۳ و ٤ ترشحات بینی.

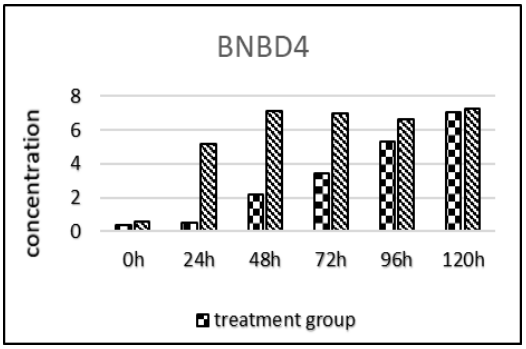
- نتـایج ارزیـابی مایعـات شستشـوی برونکوآلوئـولار (BAL): ارزیابی سلول‌های موجود در مایعات حاصله از شستشـوی BAL گوسـاله‌هـای گـروه کنتـرل و تیمـار، اخـتلاف آمـاری معنـی‌دار را نشـان داد (p=۰/۰۰۰۱) . تعداد نوتروفیل‌های موجود در مایعـات مـذکور هـم در زمـان چـالش و در آخـرین روز مطالعـه (سـاعت ۱۲۰ مطالعه) در مقایسه بـا قبـل از چـالش، اخـتلاف آمـاری معنی‌داری را نشان دادند (p=۰/۰۰۰۱) (شکل ۳- الف). تجزیه و تحلیل کمی و شمارش سلول‌هـای ماسـت‌سـل در ساعات مختلف هم نشان داد که تعداد این سـلول‌هـا در زمان تزریق ویتامین D_3 در مقایسه با تعداد آن‌هـا در سایر ساعات مطالعه، تفـاوت آمـاری معنـی‌داری داشـته (p=۰/۰۰۰۱) (شکل۳- ب). همچنین تعداد لنفوسیت‌ها در زمان چالش با محتوای آن‌ها در زمان تزریق ویتـامین D_3 و در ساعت ٤٨ مطالعه، تفـاوت آمـاری معنـی‌داری داشـته اسـت (p=۰/۰۰۰۱) (شـکل۳- ج). تعـداد ماکروفاژها در ساعت‌های ٢٤ و ٧٢ مطالعـه، در مقایسـه با سایر زمان‌ها، از اختلاف آماری معنی‌داری برخـوردار بوده اسـت (p=۰/۰۰۰۱) (شـکل ۳- د). بـا ایـن حـال، تعداد ائوزینوفیل‌ها از اخـتلاف آمـاری معنـی‌داری بـین نمونه‌های مربوط به گوسـاله‌هـای گـروه‌هـای کنتـرل و تیمار برخوردار نبودند.



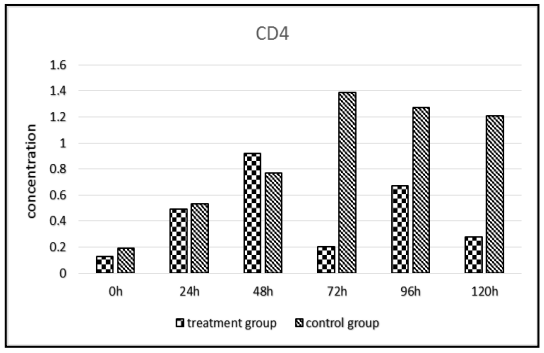
شکل ۳- الف) مقایسه تعداد نوتروفیل‌های موجود در مایع شستشوی برونکوآلوئولار لاواژ بین نمونه‌های گروه‌های کنترل و درمان در مقاطع زمانی مختلف. ب) تفاوت در ماست سل‌های موجود در مایع شستشوی برونکوآلوئولار لاواژ بین نمونه‌های گروه‌های کنترل و درمان در مقاطع زمانی مختلف. ج) تفاوت در تعداد لنفوسیت‌های موجود در مایع شستشوی برونکوآلوئولار لاواژ بین نمونه‌های گروه‌های کنترل و درمان در زمان‌های مختلف. د) تفاوت در تعداد ماکروفاژهای موجود در مایع شستشوی برونکوآلوئولار لاواژ بین نمونه‌های گروه‌های کنترل و درمان در مقاطع زمانی مختلف.

*: نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در هر ساعت می‌باشد (p<۰/۰۵).

- **بیان ژن‌های پپتیدهای ضدمیکروبی در حیوانات مبتلا به پنومونی تجربی(شرایط درون‌تنی)**: با توجه به اینکه بررسی بیان ژن BNBD4، برای بیان پپتید ضدمیکروبی دفنسین در نظر گرفته شده بود، بر اساس یافته‌های مطالعه، اختلاف آماری معنی‌داری در بیان این ژن در خون گوساله‌های گروه‌های کنترل و درمان در زمان تزریق ویتامین D_3 (۲٤ ساعت پس از زمان چالش) (p=۰/۰٤) و نیز ٤۸ ، ۷۲ ، ۹٦ و ۱۲۰ ساعت بعد از زمان چالش مشاهده شد (p<۰/۰۵) (شکل٤- الف). اما هیچ‌گونه تغییر و تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین خون حیوانات گروه‌های کنترل و درمان در بیان ژن کاتالیسیدین در ساعات مختلف مطالعه مشخص نشد. البته بیان ژن CD4 در ساعت‌های ٤۸ ، ۷۲ و ۱۲۰ پس از زمان چالش در خون گوساله‌های گروه‌های کنترل و درمان، پس از تزریق ویتامین D_3، نشان داد که اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده شده بود (p=۰/۰۰۰۱) (شکل ٤- ب).



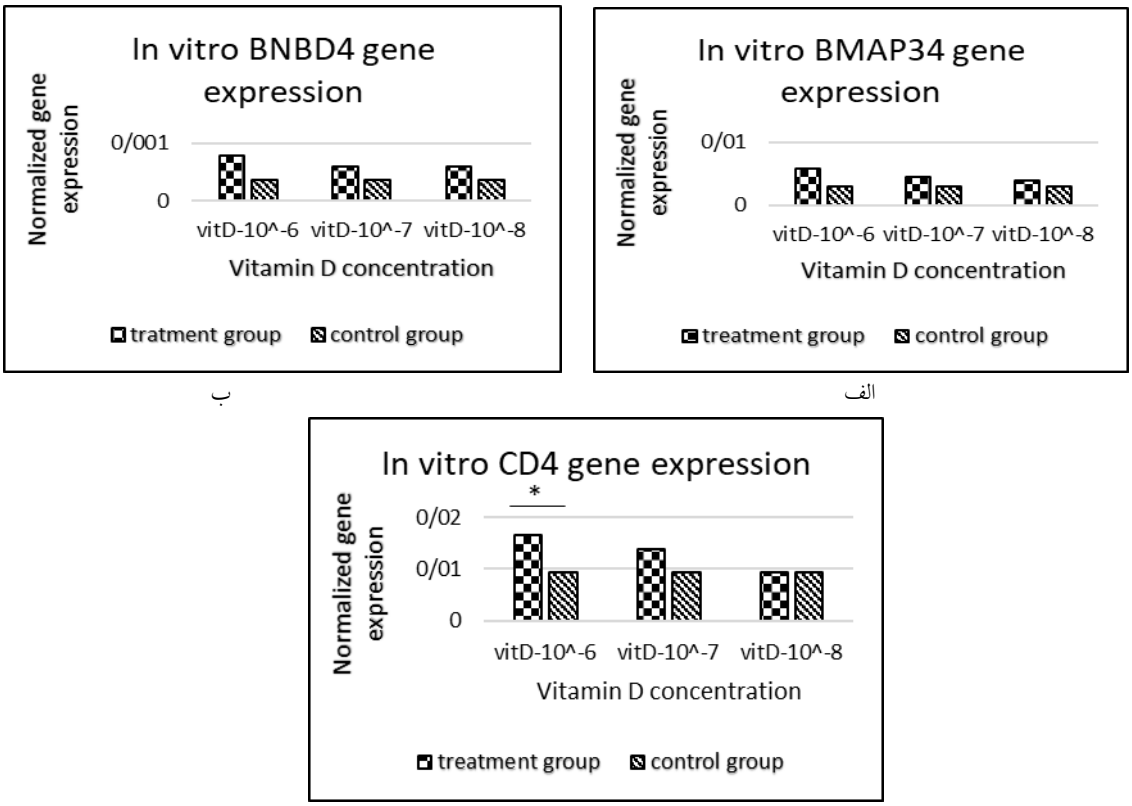
الف



ب

شکل ٤ الف) بیان ژن بتا-دفنسین (BNBD4) در گروه‌های کنترل و درمان در شرایط درون تنی، مطابق با آزمون LSD post hoc در زمان تزریق ویتامین D_3 (۲٤ ساعت پس از زمان چالش) و ٤۸ ، ۷۲ ، ۹٦ و ۱۲۰ ساعت پس از زمان چالش. ب) بیان ژن CD4 در گروه‌های کنترل و درمان در شرایط درون تنی، مطابق با آزمون LSD post hoc، در ساعت‌های ٤۸ ، ۷۲ ، ۹٦ و ۱۲۰ پس از زمان چالش.

- **بیان ژن‌های پپتیدهای ضدمیکروبی در سلول‌های جداسازی شده در شرایط برون‌تنی**: بالاترین غلظت ویتامین D_3 مورد استفاده در این مطالعه (10^{-6} مولار)، به طور قابل توجهی بیان ژن‌های کاتالیسیدین (BMAP34)، دفنسین (BNBD4) و CD4 را افزایش داد. ارزیابی نتایج هم حاکی از تفاوت آماری معنی‌داری در میزان بیان این ژن‌ها در نمونه‌های گروه‌های کنترل و تیمار بوده‌است (p<۰/۰۵). همچنین غلظت 10^{-7} مولار ویتامین D_3 هم تفاوت آماری معنی‌داری را در میزان بیان ژن CD4 بین نمونه‌های هر ۲ گروه مذکور نشان داد (اشکال ۵-الف تا ۵-ج).



الف ب ج

شکل ۵- مقایسه بیان ژن پپتیدهای ضدمیکروبی در شرایط برون تنی. الف) بیان ژن کاتالیسیدین (BMAP34) بین گروه‌های کنترل و درمان با غلظت‌های مختلف ویتامین D_3. ب) بیان ژن بتا-دفنسین (BNBD4) بین گروه‌های کنترل و درمان با غلظت‌های مختلف ویتامین D_3. ج) بیان ژن CD4، بین گروه‌های کنترل و درمان با غلظت‌های مختلف ویتامین D_3.

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، پنومونی تجربی در گوساله‌های مورد مطالعه، توسط سویه بومی *P. multocida* و با استناد به نتایج تحقیق مخبر دزفولی و همکاران (Mokhber Dezfouli *et al.*, 2017) انجام پذیرفت که باکتری مذکور به تنهایی قادر به ایجاد علائم بالینی مربوطه مانند تب، ترشحات موکوسی و موکوسی‌چرکی، سرفه، افزایش تعداد تنفس و صداهای تنفسی بوده است.

پس از تلقیح باکتریایی در مطالعه حاضر، افزایش قابل توجهی در غلظت دفنسین و CD4 در گوساله‌های مبتلا به پنومونی تجربی مشاهده شده است (شکل ٤) . لذا نتایج ما الگوی کلی تغییرات پپتیدهای ضدمیکروبی گزارش شده در مطالعات قبلی را تأیید می‌کند (Merriman *et al.*, 2015; Hayes *et al.*, 2015). بر اساس نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر، سطح بیان ژن‌های پپتیدهای ضدمیکروبی در شرایط برون‌تنی و CD4 کاملاً وابسته به دوز ویتامین D_3 بود، زیرا بیان ژن‌ها به دنبال افزایش میزان دوز مصرفی ویتامین D_3، افزایش پیدا کرده است. در حالی‌که در شرایط درون‌تنی،

بیان ژن‌های دفنسین و CD4 در گوساله‌های گروه درمان، حتی با وجود مقادیر کم ویتامین D_3 نیز افزایش یافته و عفونت و علائم بالینی بهبود یافته است (شکل ۵).

تأمین ویتامین D_3 با توجه به مقرون به صرفه بودن آن در صنعت دامپروری، نقش چشمگیر آن در تولیدات دامی، علاوه بر اثراتی که در بهبود پنومونی تجربی گوساله‌ها داشته است، می‌تواند به عنوان یک مکمل غذایی در کاهش شدت بیماری‌های عفونی معرفی شود (Afsal *et al.*, 2014; Smith, 2015). از این رو در مطالعه حاضر، استفاده از دوزهای مناسب ویتامین D_3 به عنوان یک مکمل درمانی مناسب، جهت بهبود عملکرد سیستم ایمنی بدن انجام شده است. همچنین مطالعه حاضر هم در راستای تأیید و موافقت با مطالعات انسانی که تاکنون صورت گرفته است، اثرات محافظتی و بهبوددهندگی ویتامین D_3، بر روی عفونت‌های تنفسی را نشان داده است که از طریق تنظیم ژن‌های پپتیدهای ضدمیکروبی، آن را اعمال می‌کند (Telcian *et al.*, 2016). در این ارتباط در بیماران مبتلا به سل و سیستیک فیبروزیس، اثرات درمانی ویتامین D_3 و اثرات تعدیل‌کنندگی آن بر سیستم ایمنی بررسی شده‌است (Hewison, 2011; Afsal *et al.*, 2014)، گزارش شده که مصرف مکمل‌های ویتامین D، بیان ژن کاتالیسیدین را افزایش داده و تکثیر باکتری *Mycobacterium tuberculosis* را در ماکروفاژهای انسان محدود می‌سازد (Hayes *et al.*, 2015). اما تأثیر پایدار و همیشگی این ویتامین بر پاکسازی دستگاه تنفسی از عواملی نظیر ویروس آنفلوانزا، ویروس سنسیشیال تنفسی و یا ویروس کرونا در دستگاه تنفسی انسان، به‌طور کامل مشخص نیست (Guillot *et al.*, 2010; Asgharpour *et al.*, 2020). نتایج یک مطالعه تجربی در گوسفندان نشان داده است که پس از تزریق ۰/۵ میلی‌گرم کاتالیسیدین، مقدار و حجم باکتریایی در بافت‌های ریوی و مایعات شستشوی برونکوآلوئولار کاهش پیدا می‌کند (Izadpanah and Gallo, 2005). در برخی از مطالعات هم که به تازگی در مورد ورم پستان گاو انجام گرفته‌است، افزایش سطح بیان ژن‌های بتا دفنسین، پس از استفاده از ویتامین D_3 مشاهده شده است (Merriman *et al.*, 2015). در مطالعات انسانی نیز اثرات ضدالتهابی دفنسین و سهم آنها در پاسخ‌های التهابی ریه، تأیید شده است (Tecle *et al.*, 2010). در مطالعه حاضر نیز مشخص شد که ویتامین D_3 می‌تواند در شرایط درون‌تنی، بیان ژن‌های دفنسین و CD4 را با دوز ۳۰۰۰۰۰۰ IU افزایش دهد (شکل ٤). همچنین با استفاده از دوزهای بالاتر از این ویتامین، بیان ژن‌های دفنسین، کاتالیسیدین و CD4 در شرایط برون‌تنی هم افزایش پیدا می‌کند (شکل ۵).

از طرف دیگر گزارش شده که الگو و محتوای سلول‌های مایع لاواژ در بیان ژن‌های پپتیدهای ضدمیکروبی، اثرات تعدیل‌کنندگی و خاصیت ضدمیکروبی بودن ویتامینD_3 را در پنومونی تجربی گوساله، تأیید می‌کنند (Mokhber Dezfouli *et al.*, 2017). نتایج به دست آمده از ارزیابی مایعات شستشوی برونکوآلوئولار حاکی از آن بوده که سطح نوتروفیل‌ها پس از پنومونی تجربی افزایش پیدا می‌کنند، در حالی‌که نتایج تحقیق حاضر، مشخص کرد که پس از تزریق ویتامین D_3، این مقدار رو به کاهش می‌رود (شکل ۳) و البته محتوای ماکروفاژهای موجود در

مایعات مذکور، پس از تزریق ویتامین D_3 در گروه درمانی، افزایش یافت (شکل ۳). لذا در مطالعه حاضر هم، ارتباط بین کاهش التهاب‌های ریوی که توسط ارزیابی تعداد سلول‌های مایعات شستشوی برونکوآلوئولار تعیین شده و افزایش بیان ژن‌های دفنسین و CD4 پس از مصرف ویتامین D_3، اثبات شد.

با توجه به اینکه طبق نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر، اثرات تعدیل کنندگی ویتامین D_3 بر سیستم ایمنی که به‌صورت بهبود قابل توجه در علائم بالینی مبتلایان و افزایش بیان ژن‌های کاتالیسیدین و CD4 در حیوانات مورد مطالعه خود را نشان داد و نظر به نقش اصلی ژن‌های کاتالیسیدین و دفنسین در بیماری‌های ریوی و ارتباط بین بیان این ژن‌ها و سطح ویتامینD_3، می‌توان اعلام کرد که افزایش سطح این ویتامین، بیان ژن‌های پپتیدهای ضدمیکروبی و همچنین عملکرد ریه‌ها را در طی دوره پنومونی، بهبود می‌بخشد. در نتیجه می‌توان احتمال داد که در طی شیوع ویروس کرونا، مصرف ویتامین D_3 ممکن است با بیان ژن‌های پپتیدهای ضدمیکروبی و تنظیم عملکردهای سلولی در ریه، اثرات مثبتی بر سیستم ایمنی بدن گذاشته و به موجب آن، عملکرد ریه را تا حدودی بهبود بخشیده و بتواند نقص‌های ریوی را تا حد قابل قبولی جبران کند. همچنین توصیه می‌شود که برای بهبود و کاهش تعداد دفعات ابتلا و همچنین کاهش شدت بیماری‌های تنفسی دام‌ها هم، از دوز مناسب ویتامینD_3 همراه با درمان‌های رایج آنتی‌بیوتیکی استفاده گردد.

سپاسگزاری

از پژوهشکده زیست پزشکی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، به خاطر در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

- Abed, A.H., El-Seedy, F.R., Hassan, H.M., Nabih, A.M., Khalifa, E., Salem, S.E., et al. (2020). Serotyping, genotyping and virulence gene characterization of Pasteurella multocida and Mannheimia haemolytica isolates recovered from pneumonic cattle calves in North Upper Egypt. Veterinary Science, 7(4): 174.
- Afsal, K., Hatishankar, M., Banurekha, V.V., Meenakshi, N., Parthasarathy, R.T. and Selvaraj, P. (2014). Effect of 1, 25-dihydroxy vitamin D3 on cathelicidin expression in patients with and without cavitary tuberculosis. Tuberculosis, 94(6): 599-605.
- Algammal, A.A.M., El-Sayed, M.E., Youssef, F.M., Saad, S.A., Elhaig, M.M., Batiha, G.E., et al. (2020). Prevalence, the antibiogram and the frequency of virulence genes of the most predominant bacterial pathogens incriminated in calf pneumonia. AMB Express, 10(99): 118-126.

- Alva-Murillo, N., Téllez-Pérez, A.D., Medina-Estrada, I., Alvarez-Aguilar, C., Ochoa-Zarzosa, A. and López-Meza, J.E. (2014). Modulation of the inflammatory response of bovine mammary epithelial cells by cholecalciferol (vitamin D) during Staphylococcus aureus internalization. Microbial Pathogenesis, 77(1): 24-30.
- Asgharpour, P., Mokhber Dezfouli, M.R., Nadealian, M.G., Eftekhari, Z. and Nikbakht Borojeni, G.R. (2020). Effects of 1, 25-dihydroxy vitamin D3 on clinical symptoms, pro-inflammatory and inflammatory cytokines in calves with experimental pneumonia. Research in Veterinary Science, 132(5): 186-193.
- Beisswenger, C. and Balsm R. (2005). Antimicrobial Peptides in Lung Inflammation. Chemical Immunology and Allergy, 86(6): 55-71.
- Bikle, D.D. (2009). Vitamin D and immune function: understanding common pathways. Current Osteoporosis Reports, 7(2): 58-63.
- Chirumbolo, S., Bjørklund, G., Sboarina, A. and Vella, A. (2017). The Role of Vitamin D in the Immune System as a Pro-survival Molecule. Clinical Therapeutics, 39(5): 894-916.
- Constable, P.D., Hinchcliff, K.W., Done, S.H. and Grunberg, W. (2017). Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 11th ed., Elsevier Health Sciences, pp: 786-840, 1278-1314.
- Dabo, S.M., Taylor, J.D. and Confer, A.W. (2008). Pasteurella multocida and bovine respiratory disease. Animal Health Research Reviews, 8(2): 129-150.
- DeRosa, D., Mechor, G., Staats, J., Chengappa, M. and Shryock, T. (2000). Comparison of Pasteurella spp. simultaneously isolated from nasal and transtracheal swabs from cattle with clinical signs of bovine respiratory disease. Journal of Clinical Microbiology, 38(1): 327-32.
- DiRosa, M., Malaguarnera, M., Nicoletti, F. and Malaguarena, L. (2011). Vitamin D3: a helpful immune-modulator. Immunology, 134(2): 123-139.
- Geraert, D. (2006). The importance of mycoplasma bovis in bovine respiratory Disease. Tijdschr Diergeneskd, 131(4): 124-126.
- Gibbs, A. (2001). Practical approach to the control of pneumonia in housed calves. In Practice, 23(1): 32-9.
- Guillot, X., Semerano, L., Saidenberg-Kermanac'h, N., Falgarone, G. and Boissier, M.C. (2010). Vitamin D and inflammation. Joint Bone Spine, 77(6): 552–557.
- Harder, J. and Schroder, J.M. (2007). Antimicrobial Peptides Role in Human Health and Disease. 1st ed., Springer International Publishing, pp: 25- 180.
- Hayes, C.E., Hubler, S.L., Moore, J.R., Barta, L.E., Praska, C. and Nashold, F.E. (2015). Vitamin D Actions on CD4+ T Cells in Autoimmune Disease. Frontiers in Immunology, 6(4): 100-109.
- Hazlett, L. and Minhao, W.U. (2011). Defensins in innate immunity. Cell and Tissue Research, 343(1): 175-188.
- Hewison, M. (2011). Antibacterial effects of vitamin D. Nature Reviews Endocrinology, 7(6): 337–345.
- Izadpanah, A. and Gallo, R.L. (2005). Antimicrobial peptides. Journal of the American Academy Dermatology, 52(3): 381-390.
- Karimkhani, H., Zahraie salehi, T., Sadeghi zali, M.H., Karimkhani. M. and Lameyi. R. (2011). Isolation of pasteurella multocida from cows and buffaloes in Urmia's Slaughter House. Archives of Razi Institute, 66(1): 37-41.
- Merriman, K.E., Kweh, M.F., Powell, J.L., Lippolis, J.D. and Nelson, C.D. (2015). Multiple b-defensin genes are upregulated by the vitamin D pathway in cattle. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 154(1): 120-129.
- Mohammadi, G.R., Sharifi, K. and Sepahi, S. (2004). Comparison of the therapeutic effects of florfenicol Tilmicosin in enzootic calf bronchopneumonia. Journal of the Faculty of Veterinary Medicine University of Tehran, 59(3): 277-282.

- Mohammadi, G.R., Ghazvini, K. and Panah, H.A. (2006). Antimicrobial susceptibility testing of Mannheimia haemolytica and Pasteurella multocida isolated from calves with dairy calf pneumonia. Archives of Razi Institute, 61(2): 91-96.
- Mohammadi, G.R., Nazifi, S., Rezakhani, A. and Esmailnejad, Z. (2007). Effect of transportation stress on blood and bronchoalveolar lavage fluid components in calves. Comparative Clinical Pathology, 16(4): 85-95.
- Mokhber Dezfouli, M.R., Dousti, M., Lotfollahzadeh, S., Eftekhari, Z. and Nikbakht Boroujeni, G.R. (2017). Detection of annexin I and annexin II in serum of calves affected by experimental pneumonia with Pasteurella multocida. Journal of Veterinary Research, 72(2): 261-268.
- Ozkanlar, Y., Aktas, M.S., Kaynar, O., Ozkanlar, S., Kirecci, E. and Yildiz, Y. (2012). Bovine respiratory disease in naturally infected calves: clinical signs, blood gases and cytokine response. Revue de Medicine Veterinaire, 163(3): 123-130.
- Pincikova, T., Paquin-Proulx, D., Sandberg, J.K., Flodström-Tullberg, M. and Hjelte, M. (2007). Vitamin D treatment modulates immune activation in cystic fibrosis. Clinical & Experimental Immunology, 189(3): 359-371.
- Reddy, K.V.R., Yedery, R.D. and Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. International Journal of Antimicrobial Agents, 24(6): 536-547.
- Rezaie Saber, A.P. (2014). Isolation of different bacteria from pneumonic lungs of cows slaughtered in Tabriz (IRAN) abattoir. Journal of Veterinary Clinical Phatology, 8(2): 481-491. [In Persian]
- Selvaraj, P., Prabhu Anand, S., Harishnkar, M. and Alagarasu, K. (2009). Plasma 1,25 dihydroxy vitamin D3 level and expression of vitamin D receptor and Cathelicidin in pulmonary tuberculosis. Journal of Clinical Immunology, 29(4): 470-478.
- Shayegh, J., Monadi, A.R. and Dolgari Sharaf, J. (2014). Molecular diversity of Pasteurella multocida isolated from cattle and buffaloes in Eaxt Azerbaijan province based on restriction endonuclease analysis. Journal of Veterinary Clinical Phatology, 8(1): 367-372. [In Persian]
- Smith, B.P. (2015). Large Animal Internal Medicine. 5th edition. Elsevier Health Sciences. pp: 680-745.
- Tecle, T., Tripathi, S.H. and Hartshorn, K.L. (2010). Defensins and cathelicidins in lung immunity. Innate Immunity, 16(3): 151-159.
- White, J.H. (2010). Vitamin D as an inducer of cathelicidin antimicrobial peptide expression: past, present and future. Journal of Steroid Biochemistry Molecular Biology, 121(1-2): 234-238.