تأثیر بتاهیدروکسی‌بوتیرات و استرادیول بر فرآیند فاگوسیتوز نوتروفیل‌های گوسفند (in vitro)

علی رضاپور[1*]، جعفر مجیدی[2]، مرتضی تهموزی[1]

۱. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران
۲. مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
* نویسنده مسئول مکاتبات: *a.rezapour@gmail.com*

(دریافت مقاله: ۸۷/۸/۹ ، پذیرش نهایی: ۸۷/۱۰/۳۰)

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی اثر مستقل غلظت‌های مختلف بتاهیدروکسی‌بوتیرات (*mmol/ml* ۲/٤ و ٤/۸) و استرادیول (*pg/ml* ۲۰ و ٤۰۰) بر فعالیت (فاگوسیتوز و آزمایش احیای نیتروبلوتترازولیوم (NBT) یا انفجار تنفسی) نوتروفیل‌های جداشده گوسفند به‌صورت *in vitro* بود. بدین‌منظور، ابتدا نوتروفیل‌های نمونه خون گوسفند جدا و سپس با هر یک از تیمارهای فوق به‌مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه انکوبه گردید. آزمایش دارای ۷ تیمار و ۵ تکرار بود و از آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای تجزیه آماری داده‌ها استفاده شد. هر دو آزمایش فاگوسیتوز و NBT در مورد هر تیمار اجرا شد. نتایج این تحقیق نشان داد که بتاهیدروکسی‌بوتیرات در هر دو غلظت *mmol/ml* ۲/٤ و ٤/۸ و استرادیول در دو غلظت *pg/ml* ۲۰ و ٤۰۰ موجب کاهش معنی‌دار درصد فاگوسیتوز و درصد احیای نیتروبلوتترازولیوم نوتروفیل گوسفند می‌گردد ($p<۰/۰۱$) که این امر می‌تواند توجیه‌گر تضعیف سیستم ایمنی در حوالی زایمان گوسفند باشد.

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۸۷، دوره ۲، شماره ۳، ۲۱۵-۲۰۹.

کلمات کلیدی: آزمایش احیای نیتروبلو تترازولیوم، استرادیول، بتاهیدروکسی‌بوتیرات، فاگوسیتوز

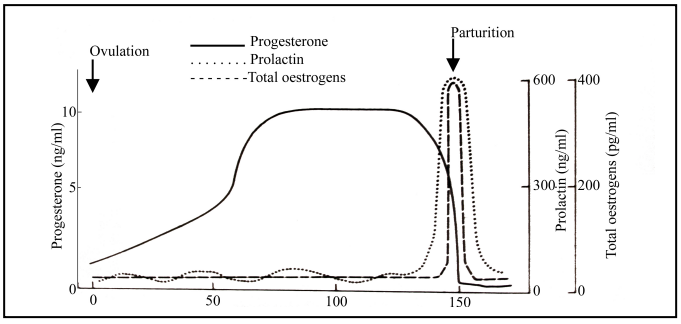
مقدمه

نوتروفیل از مهم‌ترین اجزای سیستم ایمنی میزبان است چرا که خط مقدم دفاع سلولی علیه ارگانیسم‌های مهاجم بدن را تشکیل می‌دهد (۷ و ۲۱). مهم‌ترین وظیفه نوتروفیل بلع و کشتن باکتری‌ها است ولی این سلول قدرت تهاجم و تخریب کپک، مخمر، جلبک، انگل و ویروس‌ها را نیز دارد (۷)، بنابراین می‌توان انتظار بالایی از نوتروفیل در پیشگیری از وقوع بیماری‌های عفونی داشت. در برخی حالات پارافیزیولوژیک نظیر حوالی زایمان، افزایش برخی پارامترهای سرمی نظیر بتاهیدروکسی بوتیرات به مقادیر بیش از معمول، می‌تواند بر فعالیت این سلول اثر مثبت یا منفی گذاشته، زمینه بروز عفونت‌های بالینی را فراهم کند.

هنگامی که مقدار گلوکز و کلاً انرژی مورد نیاز نشخوارکننده تأمین نشود (به‌ویژه در گاوهای شیری پرتولید و گوسفندان دوقلو آبستن)، اجسام کتونی افزایش می‌یابند و منجر

به عارضه‌ای به‌نام کتوز (در گاو) و یا مسمومیت آبستنی (در گوسفند) می‌شوند (۱۰). مهم‌ترین مشخصه مسمومیت آبستنی در گوسفند، افزایش اجسام کتونی در خون، ادرار و شیر است (۹ و ۱۱). مطالعات Sartorelli و همکاران (۱۹۹۹) نشان داد که بتاهیدروکسی بوتیرات در غلظت ۲/٤ mmol/ml و ٤/۸ موجب کاهش برخی از عملکردهای نوتروفیل از جمله درصد فاگوسیتوز اجسام استافیلوکوکوس ارئوس و میزان کموتاکسی نوتروفیل‌های گوسفند می‌شود (۱۸). از سوی دیگر، در گاوهایی که در تعادل منفی انرژی به سر می‌برند، سیستم دفاعی پستان دچار اختلال است. ظاهراً هیپرکتونمی عامل اصلی بروز این اختلال است چراکه اولاً، قدرت فاگوسیتوز سلول‌های با هسته چندشکلی یا پلی‌مورف (PMNs) و ماکروفاژها در تعادل منفی انرژی، کاهش می‌یابد، ثانیاً از قدرت باکتری‌کشی این سلول‌ها در حضور اجسام کتونی کاسته می‌شود. البته این‌که تأثیر اجسام کتونی بر قدرت فاگوسیتوز چیست، هنوز مشخص نیست (۲۳).

استروژن پارامتر دیگر مورد بررسی بود. این هورمون اشکال مختلفی دارد ولی مهم‌ترین آن عبارتست از: ۱۷–بتا استرادیول، استرون و استریول (۳). غلظت پایه‌ای استروژن تام خون در اوایل و اواسط آبستنی گوسفند (تا چند روز مانده به زایمان) کمتر از ۲۰pg/ml ولی در حوالی زایمان (حدود روز ۱۵۰ آبستنی) به ٤۰۰pg/ml می‌رسد (۲)، بنابراین ملاحظه می‌شود که غلظت استروژن تام در این هنگام بالغ بر ۲۰ برابر مقدار پایه آن می‌باشد (نگاره ۱). به‌نظر برخی محققان، عوامل هورمونی را تا حدودی می‌توان توجیه‌گر افزایش بروز اورام پستان در دوران حوالی زایمان گاو دانست (۷). غالب مطالعات به‌عمل آمده در انسان (۱۳) بر اثر تعدیل‌گر استرادیول بر فعالیت سیستم ایمنی و به‌ویژه بر ایمنی با واسطه سلولی تأکید دارند. لکن ضروری است اثر این هورمون بر فعالیت نوتروفیل‌های گوسفند نیز بررسی شود تا روشن گردد که آیا به‌راستی می‌توان بتااسترادیول را مسئول افت سیستم ایمنی در حوالی زایمان گوسفند دانست؟ اگرچه مطالعات بیشتری در خصوص پاسخ این سؤال در گاو انجام یافته است ولی اطلاعات موجود در مورد وضعیت مشابه در گوسفند بسیار محدود است. بنابراین در این مطالعه سعی شد به سؤال زیر پاسخ داده شود: الف: آیا هیپرکتونمی به‌تنهایی و یا همراه با بتااسترادیول می‌تواند موجب تضعیف فعالیت نوتروفیل‌های گوسفند گردد؟ برای پاسخ به این سؤال مطالعه‌ای in vitro طراحی شد تا اثر خالص هر یک از این مواد بررسی شود. انتخاب غلظت‌های مختلف برای بتاهیدروکسی بوتیرات بر اساس مقادیر اعلام شده به‌عنوان شاخص کتوز بالینی شدید و کتوز متوسط و نیز مقدار پایه‌ای و مقدار پارافیزیولوژیک هورمون استرادیول در گوسفند بود.



نگاره ۱– منحنی تغییرات غلظت پرولاکتین، استروژن تام و پروژسترون در طول آبستنی گوسفند (۲)

مواد و روش‌کار

دام مورد استفاده: نمونه خون هپارینه از گوسفندان ماده چندشکم زاییده غیرآبستن اخذ شد و بلافاصله جهت انجام مراحل جداسازی نوتروفیل به آزمایشگاه انتقال یافت. در هر بار مطالعه آزمایشگاهی در تیمارهای مختلف از نوتروفیل‌های تنها یک دام استفاده شد تا تفاوت‌های فردی گوسفندان عامل مخدوش‌گر مطالعه نباشد.

جداسازی نوتروفیل: جداسازی نوتروفیل بر اساس روش‌کار توصیه شده توسط شرکت سیگما و به‌طور خلاصه به‌صورت زیر انجام گرفت: از هیستوپک ۱۰۷۷ (d=۱/۰۷۷ g/ml) که وزن مخصوص آن بین نوتروفیل و سلول‌های تک‌هسته‌ای است استفاده شد. نمونه خون به آرامی روی هیستوپک افزوده گردید و ۱۵ دقیقه در ۵۰۰xg سانتریفوژ شد، تا لایه‌های مختلف تشکیل گردد. نوتروفیل‌های مورد نظر در کف لوله و همراه با گلبول‌های قرمز تجمع یافت. پس از لیز هیپوتونیک گلبول‌های قرمز با آب مقطر و کلرور سدیم 3X، سلول‌های جدا شده یک بار و به‌مدت ۵ دقیقه در ۲۰۰ xg با بافر فسفات سالین شستشو داده شدند. تعداد و درصد زنده‌مانی (Viability) نوتروفیل‌ها با آزمایش تریپان بلو مشخص شد. سپس با اضافه کردن بافر فسفات سالین در pH= ۷/٤ ، تعداد نوتروفیل در هر تیمار به میزان ml/ ۲×۱۰^{۶} تنظیم شد. برای آزمایش تریپان بلو، سلول‌ها به نسبت ۱:۱۰ با محلول تریپان بلو ۰/٤٪ رقیق گردید و سپس در دو سوی لام هموسیتومتر درصد سلول‌های زنده و تعداد تام آن‌ها تعیین و میانگین گرفته شد.

انکوباسیون: به لوله‌های مختلف با مقدار مشخصی سلول، غلظت‌های ۲/٤ و ٤/۸ میلی‌مول در لیتر بتاهیدروکسی‌بوتیرات و غلظت‌های ۲۰ و ٤۰۰ پیکوگرم در میلی‌لیتر بتااسترادیول و هم‌چنین لوله‌های شاهد بافرفسفات و حلال اتانل، به این ترتیب اضافه شد: دکستروز ۵٪، سرم فیزیولوژی، تیمار و تعلیق سلولی. سپس به‌مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه انکوبه گردید.

آزمایش فاگوسیتوز: بدین منظور از تعلیق سلولی هپارینه هر تیمار آزمایش (به‌شرح بند قبلی) و مخمر کاندیدا آلبیکنس (*Candida albicans*) طبق روش Brousseau و همکاران (۱۹۹۹) و Gooi و همکاران (۱۹۹۰) با اندک تغییرات استفاده گردید (٤ و ۸). این روش اساساً برای خون تام طراحی شده است ولی در آزمایش حاضر از نوتروفیل خالص استفاده شد. روش‌کار به‌طور خلاصه بدین صورت است: ابتدا کشت ۲٤ ساعته مخمر کاندیدا آلبیکنس در محیط آبگوشت مالتوز تهیّه و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ٤۰۰×g سانتریفوژ شد و مایع رویی دور ریخته شد. دوبار شستشوی مخمر با اضافه کردن سالین نرمال استریل به پلت مخمر و سپس سانتریفوژ ۵ دقیقه‌ای در ۷۰۰xg انجام گرفت. نهایتاً سوسپانسیون باید واجد ٤×۱۰^{۷} جسم مخمری در هر میلی‌لیتر می‌بود. به هر تیمار به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از تعلیق مخمر انکوبه شده با پلاسمای گوسفند (نیم ساعت) اضافه گردید و پس از نیم ساعت انکوباسیون در دمای آزمایشگاه، نمونه سانتریفوژ و از رسوب حاصله، چند گسترش شعله شمعی تهیه و به‌روش گیمسا رنگ‌آمیزی و مطالعه شد.

آزمایش احیای نیتروبلوتترازولیوم (NBT): براساس روش پیشنهادی موجود در منابع (۵ و ۸) و با اندکی تغییر به صورت زیر عمل گردید: انکوباسیون لوله‌های واجد تیمارهای مختلف سوسپانسیون سلولی با ۱۰۰ میکرولیتر محلول NBT {بافر فسفات سالین + NBT (٪ ۰/۳ در سوکروز ٪ ۰/۳٤) + فوربول۱۲- میریستات ۱۳- استات یا PMA (۲۰۰ng/ml) که هر کدام به‌مقدار یکسان مخلوط شده‌اند} و محلول شاهد (محلول NBT فاقد PMA) به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷^{oC} و سپس سانتریفوژ در ۲۰۰×g به مدت ۵ دقیقه و تهیه گسترش از رسوب حاصل و رنگ‌آمیزی به‌روش گیمسا و شمارش درصد نوتروفیل‌هایی که احیاء NBT در آن‌ها صورت‌گرفته است.

آنالیز آماری

داده‌های حاصل از آزمایش‌های فاگوسیتوز و NBT، با آزمون آماری دانکن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. با عنایت

به این‌که از اتانل برای حل کردن هورمون استفاده شده بود، برای حذف اثر حلال از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه به‌روش کوواریت استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصله از آزمایش‌های فاگوسیتوز و احیای نیتروبلوتترازولیوم (انفجار تنفسی) در جدول ۱ آورده شده است. بتاهیدروکسی‌بوتیرات (۲/٤ mmol/ml و ٤/۸) و استرادیول (۲۰ pg/ml و ٤۰۰) نسبت به گروه شاهد توانست به‌طور معنی‌داری ($p<$۰/۰۱) متوسط مقدار فاگوسیتوز را کاهش دهد. تفاوت آماری بین دو سطح بتاهیدروکسی‌بوتیرات نیز معنی‌دار بود ($p<$۰/۰۱). در آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه به‌روش کوواریت نیز متوسط درصد فاگوسیتوز سطوح استرادیول نسبت به شاهد معنی‌دار بود ($p<$۰/۰۵). بتاهیدروکسی‌بوتیرات در هر دو غلظت مورد بررسی (۲/٤ mmol/ml و ٤/۸) نسبت به گروه شاهد توانست به‌طور معنی‌داری ($p<$۰/۰۱) متوسط مقدار آزمایش احیای نیتروبلوتترازولیوم را کاهش دهد، هم‌چنین تفاوت آماری بین این دو تیمار معنی‌دار بود ($p<$۰/۰۱). متوسط درصد احیای نیتروبلوتترازولیوم در سطوح ۲۰ pg/ml و ٤۰۰ استرادیول نسبت به گروه شاهد در هر دو آزمون دانکن ($p<$۰/۰۱) و کوواریت ($p<$۰/۰۵) معنی‌دار بود.

جدول ۱- میانگین مقدار آزمایش فاگوسیتوز و احیای نیتروبلوتترازولیوم در تیمارهای مختلف همراه با نتیجه آنالیز دانکن در سطح $p<0.01$.

تیمارها	تعداد تکرار	فاگوسیتوز	احیای نیتروبلوتترازولیوم
		میانگین (±SD)	میانگین (±SD)
شاهد	۵	۲۸/٦۰± ۰/۵۱^{a}	٤۷/٦٤± ۰/۲۵^{a}
اتانل ۰/۰۰۱٪	۵	۱۵/٦۲± ۰/۱۹^{d}	۳۷/٤۲± ۰/۱۱^{c}
اتانل ۰/۰۰۰۰۵٪	۵	۲۳/۳۸± ۰/٦۷^{b}	۳٦/٤٦± ۰/۱۹^{d}
بتاهیدروکسی بوتیرات ۲/٤ mmol/ml	۵	۱۷/٦٤± ۰/۳۱^{c}	٤۰/۵۲± ۰/۲۱^{b}
بتاهیدروکسی بوتیرات ٤/۸ mmol/ml	۵	۱٤/٦٦± ۰/۲٤^{e}	۳٤/٦۸± ۰/۲۹^{e}
استرادیول ۲۰ pg/ml	۵	۱۸/۲٦± ۰/۲۲^{c}	۳۷/۱۸± ۰/۰۵^{cd}
استرادیول ٤۰۰ pg/ml	۵	۱۲/۵۰± ۰/٤۱^{f}	۳٦/٤۸± ۰/۱٤^{d}

$^{a,b,c, etc}$ حروف غیرهمنام به مفهوم وجود تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۱٪ می‌باشد.

جدول ۲- میانگین داده‌ها و نتایج آنالیز تجزیه واریانس یک‌طرفه به‌روش کوواریت در آزمایش‌های فاگوسیتوز و احیاء نیتروبلوتترازولیوم.

تیمارها	میانگین درصد فاگوسیتوز (±SD)	میانگین درصد احیای NBT (±SD)
شاهد	۲۸/٦۰±۲/٤۵ ^{a}	٤۷/٦٤±۱/۹۵^{a}
استرادیول ۲۰ pg/ml	۱۸/۲٦±۲/۰۱^{b}	۳۷/۱۸±۲/۵۸^{b}
استرادیول ٤۰۰ pg/ml	۱۲/۵۰±۲/۲۵^{b}	۳٦/٤۸±۲/۵۳^{b}

^{a,b} حروف غیرهمنام به مفهوم وجود تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات انجام شده در خصوص علت تضعیف سیستم ایمنی در گوسفندان حوالی زایمان بسیار محدود است ولی بررسی‌های گاوهایی که در شرایط مشابه زایمان به‌سر می‌بردند نشان می‌دهند که فعالیت سیستم ایمنی ذاتی گاو در دوران حوالی زایمان و به‌ویژه قبل از زایمان دچار تضعیف محسوسی می‌شود که زمینه‌ساز بروز عفونت‌های مختلف از جمله اورام پستان و اندومتریت می‌باشد (۱۵).

از جمله مهم‌ترین تغییرات در فاکتورهای بیوشیمیایی خون گاو و گوسفند در حوالی زایمان و به‌ویژه نشخوارکنندگانی که در تعادل منفی انرژی به‌سر می‌برند، عبارتند از: الف. افزایش غلظت بتاهیدروکسی‌بوتیرات (۲۳). ب. افزایش غلظت بتااسترادیول. ج. کاهش غلظت پروژسترون (۱۲). د. افزایش غلظت هورمون‌های کورتیکوستروئیدی (۲۵). در این مطالعه از فاکتورهای فوق، به بررسی موارد اول و دوم پرداخته شده است. با عنایت به اینکه فاگوسیتوز و متابولیسم انفجار تنفسی (respiratory burst) نوتروفیل برای تولید اشکال بیش‌واکنشگر اکسیژن (Reactive Oxygen Species) که تضمین کننده قدرت میکروب‌کشی این سلول‌هاست، از مهم‌ترین آزمایش‌های بررسی فعالیت نوتروفیل‌ها می‌باشد، بنابراین به منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف بتاهیدروکسی‌بوتیرات و بتااسترادیول بر فعالیت علمکردی نوتروفیل‌ها، از دو آزمایش فوق استفاده شد. انتخاب غلظت‌های بتاهیدروکسی‌بوتیرات بدین دلیل بود که بیشتر منابع غلظت ۲/٤ mmol/ml را شاخص کتوز بالینی و غلظت ٤/۸ mmol/ml را شاخص کتوز شدید و بالینی در گوسفند می‌دانند (۱۹). در طول دوره آبستنی گوسفند، غلظت استروژن کمتر از ۲۰ pg/ml و در هنگام زایمان تا ٤۰۰ pg/ml است (۲). بنابراین انتخاب مقادیر مورد مطالعه استرادیول نیز بر همین اساس انجام شد.

با توجه به این‌که میانگین درصد فاگوسیتوز نوتروفیل‌ها در هر دو غلظت بتاهیدروکسی‌بوتیرات ٤/۸ mmol/ml و ۲/٤ به‌صورت خیلی معنی‌دار ($p<۰/۰۱$) کمتر از گروه شاهد بود، می‌توان چنین اذعان داشت که مقادیر بالای بتاهیدروکسی‌بوتیرات موجب کاهش قدرت فاگوسیتوز نوترفیل‌ها می‌شود و لذا شاید بتوان پیش‌بینی نمود در کتوز بالینی و یا کتوز شدید گوسفند نیز کاهش قدرت فاگوسیتوز نوتروفیل‌ها می‌تواند از عوامل مستعده آن‌ها به کسب عفونت‌های بالینی باشد. نتایج این مطالعه در تطابق با یافته‌های سایر محققان نیز می‌باشد (۱۸، ۱۹ و ۲۳). در مطالعه اثر ۳-هیدروکسی‌بوتیرات بر نوتروفیل گاو به‌صورت in vitro نیز نتایج مشابهی به‌دست آمد (۱). متوسط مقدار فاگوسیتوز نوتروفیل‌ها بین دو غلظت یاد شده نیز معنی‌دار بود بنابراین افزایش غلظت ۳-هیدروکسی‌بوتیرات تأثیر شدیدی بر کاهش قدرت فاگوسیتوز نوتروفیل‌های گوسفند دارد.

طبق یافته‌های این مطالعه (in vitro) استرادیول در هر دو غلظت ۲۰ pg/ml و ٤۰۰ توانست به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) موجب کاهش قدرت فاگوسیتوز نوتروفیل‌های گوسفند نسبت به گروه شاهد گردد. لکن چون از اتانل در سطوح مختلف برای حل کردن این مواد استفاده شد، این امر نیز بایستی بررسی می‌گردید که آیا اثر کاهشی مشاهده شده مربوط به تیمار مورد مطالعه است یا در اثر حلال به‌کار رفته می‌باشد، بنابراین برای هر سطح هورمون یک شاهد الکل اتانل متناظر نیز در نظر گرفته شد که در آنالیز تجزیه واریانس یک-طرفه به روش کوواریت اختلاف آماری معنی‌دار بین سطوح استرادیول با گروه شاهد ملاحظه شد ($p<۰/۰۵$)، بنابراین به‌نظر می‌رسد که هورمون استرادیول به‌صورت in vitro موجب کاهش قدرت فاگوسیتوز نوتروفیل‌های گوسفند می‌گردند.

البته در مطالعه‌ای که توسط Roth و همکاران (۱٦ و ۱۷) به‌صورت in vivo برای درک اثر بتااسترادیول بر گاوهای اخته‌شده انجام گرفت، تزریق چند روزه بتااسترادیول به

گاوهای اخته شده، تأثیری بر متوسط درصد فاگوسیتوز نوتروفیل‌ها نداشت. در همین مطالعه اثر معنی‌داری بر مهاجرت تصادفی نوتروفیل‌ها ملاحظه گردید.

این در حالی است که در برخی مطالعات انسانی (۱۳) بر اثر تعدیل‌گر استرادیول بر فعالیت سیستم ایمنی و به‌ویژه بر ایمنی با واسطه سلولی تأکید شده است. مطالعاتی که در موش انجام گرفته است نیز، حاکی از اثر تضعیف‌گر سیستم ایمنی توسط بتااسترادیول به‌هنگام وجود بیماری‌های خودایمن است (۱۳). مطالعات Van Merris و همکاران (۲٤) نشان داد که به‌صورت in vitro حتی غلظت کمی از بتااسترادیول موجب مهار تکثیر سلول‌های پیش‌تاز تولیدکننده گرانولوسیت‌های گاو می‌شود.

نتایج به‌دست آمده در آزمایش NBT حاکی از آن است که بتاهیدروکسی‌بوتیرات در هر دو غلظت mmol/ml ٤/۸ و ۲/٤ در مقایسه با گروه شاهد به‌صورت خیلی معنی‌دار (p<۰/۰۱) موجب کاهش احیای NBT در نوتروفیل‌های گوسفند می‌شود. که در تطابق با یافته‌های Sato و همکاران (۲۰) می‌باشد. بنابراین به‌نظر می‌رسد ۳–هیدروکسی‌بوتیرات موجب کاهش میزان انفجار تنفسی نوتروفیل‌های گوسفند در شرایط آزمایشگاهی می‌شود.

با آزمایش دانکن هورمون مورد مطالعه اثر معنی‌داری بر آزمایش NBT داشت (p<۰/۰۱) ولی در آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه به‌روش کوواریت (نتایج این آنالیز آورده نشده است) استرادیول اثر معنی‌داری در سطح ۵٪ بر متوسط احیای نیتروبلوتترازولیوم نوتروفیل‌های گوسفند نداشت. بنابراین، آن‌چه به‌عنوان اثر معنی‌دار هورمون‌ها با آزمایش دانکن اشاره شد، عملاً مربوط به حلال هورمون‌ها یعنی الکل اتانل بوده است ولی هورمون مورد مطالعه فاقد اثر معنی‌دار بر آزمایش NBT می‌باشد.

تحقیقات Winters و همکاران (۲۰۰۳) در مطالعه‌ای که به‌منظور درک اثر هورمون‌های جنسی (استرادیول و پروژسترون) بر آزمایش NBT (البته به روش فلوسایتومتری) در گاو انجام دادند، نشان داد که این هورمون‌ها تأثیر معنی‌داری بر فعالیت احیای نیتروبلوتترازولیوم ندارند (۲٦) که با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی دارد. هم‌چنین Strzemienski و همکاران (۲۲) در مادیان‌های اواریکتومی شده ملاحظه نمودند که تزریق استرادیول و پروژسترون موجب تغییری در قدرت میکروب‌کشی نوتروفیل‌ها نمی‌شود ولی برخی مطالعات به‌عمل آمده در انسان حاکی از اثر مثبت هورمون‌های استرادیول و پروژسترون بر آزمایش NBT است طوری‌که این هورمون‌ها موجب افزایش قدرت تولید اشکال واکنش‌گر اکسیژن (ROS) درنوتروفیل‌های انسان می‌شود و این مورد را توجیهی بر فزونی قدرت زنان در مقابله با بیماری‌های میکروبی نسبت به مردان می‌دانند (۱٤)، هم‌چنین بتااسترادیول موجب افزایش تولید نیتریک اکساید می‌گردد که اثر محافظتی بر سیستم قلب و عروق زنان دارد (٦).

فهرست منابع

۱. رضاپور، ع.، صافی، ش.، مجیدی، ج. و سهرابی حقدوست، ا. (۱۳۸٦): تأثیر بتاهیدروکسی بوتیرات و استروژن بر فرآیند فاگوسیتوز نوتروفیل‌های گاو به‌صورت in-vitro، مجله علوم دامپزشکی ایران، سال چهار، دوره ۲، صفحات: ۱۰۲– ۹۵.

2. Arthur, G.H., Noakes, D.E., Pearson, H. and Parkinson, T.J. (1996): Veterinary Reproduction & Obstetrics. Saunders, London, pp: 73-98.
3. Booth, N.H. and McDonald, L.E. (1988): Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 6th ed., Iowa State University Press, USA, pp: 598-607.
4. Brousseau, P., Payette, Y. and Tryphonas, H. (1999): Manual of Immunological Methods. Taylor & Francis CRC Press, pp: 20-45.
5. Chanarian, I. (1989): Laboratory Hematology (an account of laboratory techniques). Churchill Livingstone, pp: 9-12 & 177-178.

6. Durán, M.G., Gálvez, G.G., de Frutos, T., Recaséns, J.D., Casado, S. and Farré, A.P. (2000): 17 Beta-estradiol-stimulated nitric oxide productions by neutrophils: effect on platelet activation. Obstetrics and gynecology, 95: 284-290.
7. Feldman, B.F., Zinkl, J.G. and Jain, N.C. (2000): Schalm's Veterinary Hematology. 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Chapters: 46, 52, 54 & 57.
8. Gooi, H.G. and Chapel, H. (1990): Clinical Immunology (a practical approach). Oxford University Press, pp: 51-80.
9. Grohn, Y., Lidberg, L.A., Bruss, M.L. and Farver, T.B. (1983): Fatty infiltration of liver in spontaneously ketotic dairy cows. J. Dairy Sci., 66: 2320–2328.
10. Kaneko, J.J., Harvey, J.W. and Bruss, M.L. (1997): Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 5th ed., Academic Press, San Diego, Chapter 3.
11. Kauppinen, K. (1983): Prevalence of bovine ketosis in relation to number and stage of lactation. Acta Vet. Scand., 24: 349–361.
12. Hafez, E.S.E. and Hafez, B. (2000): Immunology of Reproduction In: Reproduction in Farm Animals. 7th ed., Lippincott Williams & Wilkins, pp: 341-353.
13. McMurray, R.W. (2001): Estrogen, prolactin, and autoimmunity: actions and interactions (a review). International Immunopharmacology, 1: 995-1008.
14. Molloy, E.J., O'neill, A.J., Grantham, J.J., Sheridan-Pereira, M., Fitzpatrick, J.M., Webb, D.W. and Watson, R.W.G. (2003): Sex-specific alterations in neutrophil apoptosis: the role of estradiol and progesterone. Blood, 102 (7): 2653-2659.
15. Monfardini, E., Paape, M.J., Wang, Y., Capuco, A.V., Husheem, M., Wood, L. and Burvenich, C. (2002): Evaluation of L-selectin expression and assessment of protein tyrosine phosphorylation in bovine polymorphonuclear neutrophil leukocytes around parturition. Veterinary Research, 33: 271-281.
16. Roth, J.A., Kaeberle, M.L. and Hsu, W.H. (1982): Effect of estradiol and progesterone on lymphocyte and neutrophil functions in steers. Infection and Immunity, pp: 997-1002.
17. Roth, J.A. and Nachreiner, R.F. (1983): Association of increased estradiol and progesterone blood values with altered bovine polymorphonuclear leukocyte function. American Journal of Veterinary Medicine, 44 (2): 247-253.
18. Sartorelli, P., Paltrinieri, S. and Agnes, F. (1999): Non-specific immunity and ketone bodies. I: In vitro studies on chemotaxis and phagocytosis in ovine neutrophils. Am. J. Vet. Med., A, 46: 613–619.
19. Sartorelli, P., Paltrinieri, S. and Comazzi, S. (2000): Non-specific immunity and ketone bodies. II: In vitro studies on adherence and superoxide anion production in ovine neutrophils. Am. J. Vet. Med., A 47: 1–8.
20. Sato, N., Shimizu, H., Shimomura, Y., Suwa, K., Mori, M. and Kobayashi, I. (1992): Mechanism of inhibitory action of ketone bodies on the production of reactive oxygen intermediates (ROIS) by polymorphonuclear leukocytes. Life Sci., 51: 113–118.
21. Stockham, S.L. and Scott, M.A. (2004): Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology. Iowa State University Press, USA, pp: 50-80.
22. Strzemienski, P.J., Dyer, R.M. and Kenny, R.M. (1987): Effect of estradiol and progesterone on anti-staphylococal activity of neutrophils from ovariectomized mares. Am. J. Vet. Res., 48: 1638-1641.
23. Suriayasathaporn, W., Heuer, C., Noordhuizen-Stassen, E.N. and Schukken, Y.H. (2000): Hyperketonemia and the impairment of udder defense: a review. Vet. Res., 31: 397-412.
24. Van Merris, V., Meyer, E., Duchateau, L. and Burvenich, C. (2004): Differential effects of steroids and retinoids on bovine myelopoiesis in vitro. Journal of Dairy Science, 87: 1188–1195
25. Weber, P.S., Toelboell, T., Chang, L.C., Tirrell, J.D., Saama, P.M., Smith, G.W. and Burton, J.L. (2004): Mechanism of glucocorticoid-induced down-regulation of neutrophil L-selectin in cattle: evidence for effects at the gene-expression level and primarily on blood neutrophils. Journal of leukocyte biology, 75: 815-827.
26. Winters, K.R.H., Meyer, E., Van Merris, V.M., Van Den Broeck, W.L.M., Duchateau, L. and Burvenich, C. (2003): Sex steroid hormones do not influence the oxidative burst activity of polymorphonuclear leukocytes from ovariectomized cows in vitro. Steroids, 68: 397–406.

Vet. J. of Islamic Azad Uni. Tabriz Branch. 2, 3: 209-215, 2008

The effect of β–hydroxybutyrate and estradiol on the process of phagocytosis of ovine neutrophils in vitro

Rezapour, A.[1*], Majidi, J.[2], Tahmouzy, M.[1]

1-Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz, Iran.
2-Research Center of Infectious Disease, Tabriz University of Medical Science, Tabriz, Iran.

[*]***Corresponding author's email:*** *a.rezapour@gmail.com*

(Received: 30.10.2008**, Accepted**: 19.1.2009**)**

Abstract

The object of this study was to evaluate the independent effect different concentration of beta-hydroxybutyrate (2.4 & 4.8 mmol/ml) and estradiol (20&400 pg/ml) on the functions phagocytosis and Nitroblue tetrazolium reduction test or respiratory burst of isolated ovine neutrophils in vitro. Isolated neutrophils of sheep were incubated for one hour in room temperature with the previously treatments. The study consisted of 7 treatments in 5 replicates and both phagocytosis and NBT tests of tests were performed in every treatment. The Results of this study indicated that 2.4 & 4.8 mmol/ml concentrations of beta-hydroxybutyrate and estrodiol concentrations of 20 & 400 pg/ml significantly (p<0.01) reduced the percentage of phagocytosis and NBT reduction test of sheep neutrophils and this could be the reason for the suppression of the immune system in peripartureint sheep.

Keywords: Nitroblue tetrazolium reduction test, estradiol, beta-hydroxybutyrate, phagocytosis