تأثیر بتاهیدروکسی بوتیرات و استروژن بر فرایند فاگوسیتوز نوتروفیلهای گاوبصورت in vitro

دکترعلی‌کارگری‌رضاپور*[۱]، دکترشهاب‌الدین صافی[۲]، دکترجعفرمجیدی[۳]، دکترایرج‌سهرابی‌حقدوست[٤]

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی اثر غلظت‌های مختلف بتاهیدروکسی‌بوتیرات (۱/۲ mmol/ml، ۲/٤ mmol/ml و ٤/۸ mmol/ml) و بتااسترادیول (۱ ng/ml و ۱۰ ng/ml) بر متوسط مقدار فاگوسیتوز و انفجار تنفسی (آزمایش احیاء نیتروبلوتترازولیوم یا NBT) نوتروفیل‌های جداشده گاو بصورت *in vitro* بود. بدین منظور ابتدا نوتروفیل‌های نمونه خون گاو جدا شده و سپس با هر یک از تیمارهای فوق بمدت ۲ ساعت در دمای ^{oC} ۳۷ انکوبه گردید. هر دو آزمایش فاگوسیتوز و NBT در مورد هر تیمار اجرا شد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که غلظتهای ng/ml ۱ (مقدار پایه‌ای در سرم) و ng/ml ۱۰ (مقدار حوالی زایمان) بتااسترادیول اثری بر فاگوسیتوز و NBT نوتروفیل گاو ندارد ($p>۰/۰۵$). در حالیکه، بتاهیدروکسی‌بوتیرات با غلظت ٤/۸mmol/ml (معرف‌کتوزبالینی‌شدید) به صورت خیلی‌معنی‌دار ($P<۰/۰۱$) و غلظت mmol/ml ۲/٤ (معرف کتوز بالینی) بصورت معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) موجب تضعیف فاگوسیتوز وNBT آنها می‌گردد. بتاهیدروکسی‌بوتیرات با غلظت mmol/ml ۱/۲ (معرف کتوز تحت‌بالینی) اثر معنی‌داری ($p>۰/۰۵$) بر این آزمایش‌ها نداشت. بنابراین بتاهیدروکسی‌بوتیرات را می‌توان از عوامل ایجاد کننده تضعیف سیستم ایمنی در گاوهای کتوزی حوالی زایمان دانست.

واژگان کلیدی: *آزمایش فاگوسیتوز، آزمایش نیتروبلوتترازولیوم، بتااسترادیول، بتاهیدروکسی‌بوتیرات.*

مقدمه

نوتروفیل از مهمترین اجـزای سیـستم ایمنـی میزبـان اسـت چراکه خط مقدم دفاع سلولی علیه ارگانیـسم هـای مهـاجم بدن را تشکیل می دهد (۱٦ و۵). مهمترین وظیفه نوتروفیـل بلع و کشتن باکتری‌هاست ولی این سلول قـدرت تهـاجم و تخریب کپک‌ها، مخمرها، جلبک‌ها، انگل‌ها و ویـروس‌ها را نیـز دارد (۵). بنابراین می‌توان انتظار بالایی از نوتروفیـل در پیشگیری از وقوع بیماریهای عفونی داشت.

In vitro evaluatior of BHB and estrogen on Bovine neutrophil Phagocytosis process

Kargari Rezapoor, A.[1]* , Safi, Sh.[2] ,Majidi, G. [3], Sohrabi Haghdoost, I.[4]

1-Post graduated of Clinical Pathology,Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Islamic Azad University,Science & Research Branch, Tehran, Iran
2-Department of Clinical Pathology,Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Islamic Azad University,Science & Research Branch, Tehran, Iran
3- University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
4--Department of Pathology,Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Islamic Azad University,Science & Research Branch, Tehran, Iran

The objective of this study was in vitro evaluation of different levels of beta-hydroxybutyrate (1.2mmol/ml, 2.4mmol/ml, & 4.8mmol/ml) and beta-estradiol (1ng/ml and 10ng/ml) on mean value of phagocytosis and respiratory burst (Nitroblue tetrazolium reduction test or NBT) of isolated neutrophils in cows Isolated neutrophil cells were incubated for 2 hours in 37^{oC} using different treatments and both tests of phagocytosis and NBT were performed in every treatment. Results of this study showed that beta-estradiol as level of 1ng/ml (the basal level in serum) and 10ng/ml (the level around parturition) had no significant effect on phagocytosis and NBT tests of bovine neutrophils ($P>0.05$). However, beta-hydroxybutyrate (BHB) at concentration of 4.8mmol/ml (indicating sever clinical ketosis) and 2.4mmol/ml (indicating clinical ketosis) significantly ($P<0.05$) suppressed phagocytosis and NBT tests of bovine neutrophils. BHB in 1.2mmol/ml concentration (indicating sub-clinical ketosis) had no significant effect on these tests ($P>0.05$). Thus, BHB may be one of the causal factors of immune suppression in ketotic periparturient cows.

Key words*: Beta-estradiol, Beta-hydroxybutyrate, Nitroblue tetrazolium reduction test,Phagocytosis*

۱. دانش‌آموخته دکتری تخصصی کلینیکال پاتولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲. گروه کلینیکال پاتولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۳. دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
٤. گروه پاتولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

ولی در برخی حالات پارافیزیولوژیک نظیر حوالی زایمان، افزایش برخی پارامترهای سرمی به مقادیر بیش از معمول می‌تواند بر فعالیت این سلول اثر مثبت یا منفی گذاشته، زمینه بروز عفونتهای بالینی را فراهم کند. از جمله این مواد، استروژن و بتاهیدروکسی بوتیرات (شاخص طلایی ایجاد کتوز) است. غلظت پایه‌ای استروژن تام خون در اوایل و اواسط آبستنی گاو کمتر از ۱۰۰ng/ml است ولی در اواخر دوران آبستنی و به ویژه پس از ۲۵۰روز آبستنی گاو، این میزان به بیشترین حد خود می‌رسد (۱). به این نحو که ۵– ۲ روز قبل از زایمان، مقدار استرون سولفات به ۷ نانوگرم و مقدار استرون ۱/۲ng /ml است. بعبارت دیگر میزان استروژن تام خونحدوداً ۸/۲ ng/ml است. بنابراین ملاحظه می‌شود که غلظت استروژن تام در این هنگام بالغ بر ۸۰ برابر مقدار پایه آن می‌باشد (۱). استروژن‌ها اشکال مختلفی دارند ولی مهمترین آنها عبارتست از: ۱۷– بتا استرادیول، استرون و استریول (۲). به نظر برخی محققان، عوامل هورمونی را تا حدودی می‌توان توجیه‌گر افزایش بروز اورام پستان در دوران حوالی زایمان دانست (۵). غالب مطالعات به عمل آمده در انسان (۱۰) بر اثر تعدیل‌گر استرادیول بر فعالیت سیستم ایمنی و بویژه بر ایمنی با واسطه سلولی تأکید دارند. لکن ضروری است اثر این هورمون بر فعالیت نوتروفیلهای گاو نیز بررسی شود تا روشن گردد که آیا براستی می‌توان بتااسترادیول را مسئول افت سیستم ایمنی در حوالی زایمان گاو دانست؟ از سوی دیگر، در گاوهایی که در تعادل منفی انرژی به سر می‌برند نیز 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 (۱۷). سؤال این است که آیا هیپرکتونمی به تنهایی و یا در تعامل مثبت با بتااسترادیول می‌تواند موجب تضعیف فعالیت نوتروفیلهای گاو گردد؟ برای پاسخ به این سؤال مطالعه‌ای in vitro طراحی شد تا اثر خالص هر یک از این دو مواد و همچنین اثر تعاملی آنها بررسی شود. انتخاب غلظت‌ها برای هر کدام از این مواد به ترتیب بر اساس مقادیراعلام‌شده بعنوان شاخص کتوز بالینی و تحت بالینی و نیز مقدار پایه‌ای و مقدار پارافیزیولوژیک آنها می‌باشد.

مواد و روش کار

دام مورد استفاده: نمونه خون هپارینه از گاوهای چندشکم زاییده غیرآبستن اخذشد و بلافاصله جهت انجام مراحل جداسازی نوتروفیل به آزمایشگاه انتقال یافت. در هر سری آزمایش، از نوتروفیل‌های فقط یک دام در تیمارهای مختلف استفاده‌شد تا تفاوت‌های فردی گاوها عامل مخدوش‌گر مطالعه نباشد.

جداسازی نوتروفیل: جداسازی نوتروفیل بر اساس روش کارتوصیه شده توسط شرکت سیگما و بطور خلاصه بصورت زیر انجام گرفت. در این آزمایش از دو هیستوپک با چگالی‌های مختلف استفاده شد که وزن مخصوص هیستوپک ۱۱۱۹ (d=1.119 g/ml) بین گلبولهای قرمز و نوتروفیل، و وزن مخصوص هیستوپک ۱۰۷۷ (d=1.077 g/ml) بین نوتروفیل و سلولهای تک‌هسته‌ای می‌باشد. به میزان هم حجم و بترتیب از هیستوپک ۱۱۱۹ و هیستوپک ۱۰۷۷ در یک لوله آزمایش ریخته شد. سپس نمونه خون به آرامی به این گرادیان افزوده گردید. نمونه بمدت ۳۰ دقیقه در g× ۷۰۰ سانتریفوژ شد، تا دو لایه کدر تشکیل گردد. نوتروفیل‌های مورد نظر در سطح تقابل دو هیستوپک تجمع یافت. پس از لیز هیپوتونیک گلبولهای قرمز با آب مقطر و کلرور سدیم ۲.۵۵٪، سلولهای جدا شده دو بار بمدت ۵ دقیقه در g× ۲۰۰ با بافر فسفات سالین شستشو داده شدند.

تعداد و درصد زنده‌مانی (viability) نوتروفیلها با آزمایش تریپان بلو مشخص و سپس با اضافه کردن بافر فسفات سالین pH= ۷/٤ تعداد نوتروفیل بمیزان ۲×۱۰^{٦}/ml تنظیم می‌شود. برای آزمایش تریپان بلو، سلولها به نسبت ۱:۱۰ با محلول تریپان بلو ۰.٤٪ رقیق گردید و سپس در دو سوی لام هماسیتومتر درصد سلولهای زنده و تعداد تام آنها تعیین و میانگین گرفته شد.

انکوباسیون: به لوله‌های مختلف با مقدار مشخصی سلول، غلظتهای صفر،۱.۲، ۲.٤ و ٤.۸ میلی‌مول در لیتر بتاهیدروکسی بوتیرات و نیز غلظت ۱ و ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر بتااسترادیول و همچنین لوله‌های شاهد بافرفسفات و شاهد اتانل ۰.۰۰۵٪ (جمعاً ۱۳ نوع تیمار)، اضافه شد و سپس بمدت دوساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه گشت.

آزمایش فاگوسیتوز: بدین منظور از تعلیق سلولی هپارینه هر تیمار آزمایش (بشرح بند قبلی)و مخمر کاندیدا آلبیکنس(Candida albicans) طبق روش بروسئو وهمکاران (۳) و گوی و همکاران (٦) با اندک تغییرات استفاده گردید. چرا که روش اساساً برای خون تام طراحی شده است ولی در این آزمایش از نوتروفیل خالص استفاده شده است. روش کار بطور خلاصه بدین صورت است: ابتدا کشت ۲٤ ساعته مخمر کاندیدا آلبیکنس در محیط آبگوشت مالتوز تهیه و سپس بمدت ۱۰ دقیقه (٤۰۰×g) سانتریفوژ شد و مایع رویی دور ریخته شد. دو بار شستشوی مخمر با اضافه کردن سالین نرمال استریل به پلیت مخمر و سپس سانتریفوژ ۵ دقیقه‌ای در ۷۰۰×g انجام گرفت. نهایتاً سوسپانسیون باید واجد ٤×۱۰^{۷} جسم مخمری در هرمیلی-لیتر می‌بود. به هر تیمار به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از تعلیق مخمر انکوبه شده با پلاسمای گاو (نیم ساعت) اضافه گردید و پس از یکساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه، نمونه سانتریفوژ و از رسوب حاصله، چند گسترش شعله شمعی تهیه و بروش گیسما رنگ آمیزی و مطالعه شد.

آزمایش احیاء نیتروبلوتترازولیوم (NBT): براساس روش پیشنهادی موجود در منابع (٤ و ٦) و با اندکی تغییر بصورت 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/m*l*) که هر کدام به مقدار یکسان مخلوط شده‌اند} و محلول شاهد {محلولNBT فاقد PMA} بمدت ۳۰ دقیقه در $۳۷^{o}C$ و سپس سانتریفوژ در ۲۰۰×g بمدت ۵ دقیقه و تهیه گسترش از رسوب حاصل و رنگ آمیزی بروش گیمسا و شمارش درصد نوتروفیلهایی که احیاء NBT در آنها صورت‌گرفته است.

آنالیز آماری: داده‌های جمع‌آوری شده از آزمایشهای فاگوسیتوز و NBT، در قالب طرح آزمایشی بلوکهای کاملاً تصادفی (RCBD) یا چند مشاهده در دو واحد آزمایشی (Multi observational) و توسط نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. به نحوی که در این طرح دوره‌های تکرار آزمایش به عنوان بلوک (r=5) و تعداد نمونه داخل هر واحد آزمایش سه نمونه (S=3) منظور گردید. تعداد تیمار در هر بلوک سیزده تیمار به ترتیب ذکر شده در بندهای قبل بود. مقایسه میانگین تیمارها بر اساس آزمون Duncan صورت گرفت.

نتایج

میانگین درصد فاگوسیتوز نوترفیل‌ها و میانگین تعداد مخمر فاگوسیت‌شده توسط هر نوتروفیل در تیمارهای مختلف در جدول یک آورده شده است. میانگین درصد فاگوسیتوز نوترفیلها در تیمار سلولی انکوبه شده با ٤.۸ mmol کمتر از کلیه تیمارهای صفر (شاهد)، یک (۱.۲ mmol) و دو (۲/٤ mmol) بود. این اختلاف بین تیمار شاهد و تیمار سه (٤/۸ mmol) بصورت خیلی‌معنی‌دار (P<۰/۰۱) و بین

تیمارهـای یـک و دو بـا سـه نیـز در حـدمعنی‌دار بـود (P<۰/۰۵). از لحاظ آماری اختلاف معنـی‌داری بـین تیمـار شاهد و تیمارهای یک و دو، همچنین بین تیمار یک و تیمار دو وجود نداشت (P>۰/۰۵). هرچند اختلاف تیمـار شـاهد با تیمار دو نزدیـک بـه معنـی‌دار بـود (P=۰/۰٦). میـانگین تعـداد مخمـر فاگوسـیت شـده توسـط هـر نوتروفیـل در تیمارهای مختلف آزمایش اخـتلاف معنـی‌داری (P>۰/۰۵) نشان نداد. همچنانکه از اطلاعات مندرج در جدول یک نیـز روشن است، افزودن غلظتهای مختلـف بتااسـترادیول تـأثیر قابل توجه و معنی‌داری بر فعالیت نوتروفیلها نداشته است و در مواردی هم که ماده تیمار مخلوط بتاهیدروکسی‌بـوتیرات و بتااسـترادیول بـود، نیـز همـان نتـایجی کـه فقـط تیمـار بتاهیدروکسی بوتیرات اعمال شده بود دیده شد و بر اساس نتـایج حاصـله عمـلاً بتااسـترادیول بـر فعالیـت فاگوسـیتوز نوتروفیل ها بی‌اثر است.

میانگین درصد نوترفیلهای NBT^+ (NBT مثبت) در تیمارهای مختلف در جدول یک آورده شده است. میانگین درصد نوترفیل‌های NBT^+ در تیمار بتاهیدروکسی‌بوتیرات با غلظت mmol/ml ٤/٨ و همچنین در تیمارهای بتاهیدروکسی بوتیرات 4.8 mmol/ml همراه با استرادیول به غلظتهای ۱ و ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر کمتر از تیمارهای دیگر از جمله تیمار شاهد است (P<۰.۰۵).

جدول۱: میانگین درصد فاگوسیتوز نوترفیل‌ها و میانگین تعداد مخمر فاگوسیت‌شده توسط هر نوتروفیل در تیمارهای مختلف با ازمایش NBT مثبت در طی ۲ساعت انکوباسیون

Treatment ⇒ / Test ⇓	Control	Ethanol0.005%	BHB 1.2 mmol	BHB 2.4 mmol	BHB 4.8 mmol	E2 1 ng	E2 10 ng	BHB 1.2 mmol + E2 1 ng	BHB 1.2 mmol + E2 10 ng	BHB 2.4 mmol + E2 1 ng	BHB 2.4 mmol + E2 10 ng	BHB 4.8 mmol + E2 1 ng	BHB 4.8 mmol + E2 10 ng
# of Sample	٥	٥	٥	٥	٥	٥	٥	٥	٥	٥	٥	٥	٥
Mean % of Phagocytosis	٥٦/٦	٥٢/٨	٥٣/١	٤٥/٥	٣١/٥**	٤٦/٧	٥٣/٣	٥٤/٢	٥١/٢	٥١/٢	٤٣/٧	٢٦/٦**	٢٧/٥**
Mean value of phagocytized yeast per PMN	٢/٥٣	٢/٥	٢/٤٥	٢/٣	٢/٣٦	١/٩٧	٢/١٢	٢/٢٣	٢/١٣	٢/١٣	٢/٢٦	٢/١٦	٢/٤
Mean % of Positive NBT test	٨٠/٨٣	٨٤/٠١	٨١/٥	٧٩/٩٣	٥٦/٢٧*	٨٣/٢	٨٤	٨٢/٥	٨٠/٠٨	٨٠/٠٨	٧٧/٦٨	٥١/٠١*	٥٢/٢*

* means statistically significant (P<0.05), ** means statistically highly significant (P<0.01)

بحث

مطالعات گذشته نشان می‌دهد که فعالیت سیستم ایمنی ذاتی گاو در دوران حوالی زایمان و بویژه قبل از زایمان دچار تضعیف محسوسی می‌شود که زمینه‌ساز بروز عفونتهای مختلف از جمله اورام پستان و اندومتـریت می‌باشد (۱). از جمله مهمترین تغییرات در فاکتورهای بیوشیمیایی خون گاوهای حوالی زایمان و بویژه گاوهایی که در تعادل منفی انرژی بسر می‌برند، عبارتند از: ۱. افزایش غلظت بتاهیدروکسی‌بوتیرات (۱۷). ۲. افزایش غلظت بتااسترادیول (۷). ۳. کاهش غلظت پروژسترون (۷). ٤. افزایش غلظت هورمونهای کورتیکوستروئیدی (۱۹). 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

بیش‌فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species) که تضمین کننده قدرت میکروب‌کشی این سلولهاست، از مهمترین آزمایش‌های بررسی فعالیت نوتروفیل‌ها می‌باشد، بنابراین بمنظور بررسی اثر غلظتهای مختلف بتاهیدروکسی-بوتیرات و بتااسترادیول بر فعالیت علمکردی نوتروفیل‌ها، از دو آزمایش فوق استفاده شد. انتخاب غلظتهای بتاهیدروکسی‌بوتیرات بدین دلیل بود که بیشتر منابع غلظت ۱/۲ mmol را شاخص کتوز تحت بالینی، غلظت mmol ۲/٤ را شاخص کتوز بالینی، و غلظت ٤.۸ mmol را شاخص کتوز شدید و بالینی در گاو می‌دانند (١٤). همچنین در طول دوره آبستنی گاو، غلظت بتااسترادیول کمتر از ng/ml ۱ و در هنگام زایمان حدوداً ng/ml ۱۰ است (۱). با توجه به اینکه میانگین درصد فاگوسیتوز نوترفیلها در همه تیمارهای واجد بتاهیدروکسی‌بوتیرات با غلظت mmol ٤/۸ بصورت‌خیلی‌معنی‌دار ($P<۰/۰۱$) کمتر از سایر غلظتهای صفر، mmol ۱/۲ و mmol ۲/٤ بود، می‌توان چنین اذعان داشت که مقادیر بالای بتاهیدروکسی‌بوتیرات موجب کاهش قدرت فاگوسیتوز نوترفیل‌ها می‌شود که تأییدی بر فرضیه نخست این مطالعه است که می‌تواند توجیه‌گر یکی از علل بروز عفونت‌های بالینی متعدد در گاوان کتوزی باشد که در تطابق با یافته‌های سایر محققان نیز می‌باشد (١٤ و ١٥ و ١٧). با توجه به میانگین داده‌های حاصله می‌توان چنین استنباط نمود که با افزایش غلظت بتاهیدروکسی‌بوتیرات، قدرت فاگوسیتوز کم می‌شود. هر چند این کاهش گاه از لحاظ آماری معنی‌دار نیست. اختلاف بین تیمارهای mmol ۱/۲ و mmol ۲/٤ بتاهیدروکسی‌بوتیرات با تیمار mmol ٤/۸ تنها در حد $P<۰/۰۵$ معنی‌دار است. که شاید بیانگر نوعی آستانه تحمّل برای نوتروفیل‌ها از لحاظ مواجهـه با بتاهیدروکسی‌بوتیرات باشد. فقدان اختلاف آماری معنی‌دار ($P>۰/۰۵$) بین میانگین تعداد مخمر فاگوسیت شده توسط هر نوتروفیل در تیمارهای مختلف آزمایش، و وجود اختلاف معنی‌دار از لحاظ درصد فاگوسیتوز در همان تیمارها، حاکی از آن است که بتاهیدروکسی‌بوتیرات تنها بر میزان کمّی‌فاگوسیتوز مؤثراست و فاقد اثر کیفی بر فرایند فاگوسیتوز می‌باشد. طبق یافته‌های این مطالعه، بصورت in vitro، بتااسترادیول در غلظت‌های فوق، تأثیری بر متوسط درصد فاگوسیتوز نوتروفیلهای گاو نداشت ($P>۰/۰۵$). نتایج این تحقیق با نتایج سایر محققان بویژه راث و همکاران (۱۲و۱۳) که بصورت in vivo به مطالعه اثر بتااسترادیول پرداخته‌اند، همخوانی دارد. بر اساس مطالعات نگارندگان، اگرچه تزریق چند روزه بتااسترادیول به گاوهای اخته شده، تأثیری بر متوسط درصد فاگوسیتوز نوتروفیلها نداشت ولی اثر معنی‌داری بر مهاجرت تصادفی نوتروفیلها ملاحظه گردید. در ارتباط شخصی نگارنده با دکتر راث ایشان اذعان داشتند، صعوبت حل کردن بتااسترادیول در حلال مناسب، عامل اصلی مطالعه این مورد بصورت in vitro بوده است. لامت و همکاران (۲۰۰٤) نیز که به بررسی اثر بتااسترادیول بر فعالیت دیاپدز نوتروفیلها پرداخته‌اند، متوجه فقدان اثر معنی‌دار این ماده بر نوتروفیلها شدند. همچنین به اعتقاد ایشان، بتااسترادیول اثری بر زنده-مانی نوتروفیلهای ایزوله قبل و بعد از آزمایش دیاپدز ندارد. این در حالی است که در برخی مطالعات انسانی (۱۰) بر اثر تعدیل‌گر استرادیول بر فعالیت سیستم ایمنی و بویژه بر ایمنی با واسطه سلولی تأکید شده است. و مطالعاتی که در موش انجام گرفته است، حاکی از اثر تضعیف‌گر سیستم ایمنی توسط بتااسترادیول بهنگام وجود بیماری‌های خودایمنی است (۱۰). نگارنده بر همین اساس فرضیه دوم خود مبنی بر اثر افزایش سطح بر عملکرد نوتروفیل‌های گاو را ارائه داد که نهایتاً نتایج آزمایشات خلاف این فرضیه را حداقل در این مطالعه در مورد گاو مشخص نمود. شایان ذکر است که مطالعات فان مریس و همکاران (۱۸)، مشخص نموده‌اند که حتی غلظت کمی از بتااسترادیول نیز بصورت in vitro موجب مهار تکثیر سلولهای پیش‌تاز تولیدکننده گرانولوسیتهای گاو می‌شود. شایان ذکر اینکه، در

منابع مورد بررسی، به مکانیسم احتمالی عدم تأثیر بتااسترادیول بر فاگوسیتوز و انفجار تنفسی اشاره‌ای نشده است. نتایج بعمـل آمده در آزمایش NBT حاکی از آن است که بتاهیدروکسی‌بوتیرات با غلظت 4.8 mmol بصورت خیلی‌معنی‌دار (P<۰.۰۱) موجب کاهش احیاء سوبسترای نیتروبلوتترازولیوم در نوتروفیلهای گاو می‌شود که بیانگر کاهش میزان انفجار تنفسی در این سلول‌ها می‌باشد. در حالیکه بتااسترادیول در هر دو غلظت تأثیر معنی‌داری بر آزمایش NBT نداشت (P>۰/۰۵). وینتر و همکاران (۲۰۰۳) در مطالعه‌ای که بمنظور درک اثر هورمون‌های جنسی (استرادیول و پروژسترون) بر آزمایش NBT (البته بروش فلوسایتومتری) انجام دادند، نیز دریافتند که این هورمونها تأثیر معنی‌داری بر فعالیت احیاء نیتروبلوتترازولیوم ندارند که با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی دارد.از جمع نتایج مربوط به دو آزمایش فاگوسیتوز و NBT می‌توان چنین اظهارنظر نمود که بتاهیدروکسی‌بوتیرات با غلظت ٤/٨ mmol بصورت خیلی‌معنی‌دار مهمترین فعالیتهای عملکردی نوتروفیل را متأثّر و دچار افت محسوس می‌سازد که می‌تواند توجیه‌گر افت سیستم ایمنی در دوران حوالی زایمان و بویژه در تعادل منفی انرژی که غلظت سرمی بتاهیدروکسی‌بوتیرات افزایش می‌یابد، باشد. و بدین طریق فرضیه نخست این مطالعه مورد تأیید قرار می‌گیرد. ولی با توجه به فقدان اثر معنی‌دار بتااسترادیول بر فعالیت نوتروفیل حتی در سطح P<۰/۰۵می‌توان چنین اظهارنظر کرد که افزایش غلظت سرمی این ماده، اثری بر فعالیت فاگوسیتوز و انفجار تنفسی نوتروفیلهای گاو ندارد. هبن و همکاران (۸) که به مطالعه اثر اجسام کتونی بر قدرت تکثیر سلولهای اجداد رده میلوئیدی در مغزاستخوان پرداخته‌اند (مطالعه in vitro)، متوجه شدند که غلظتهای ۱ تا ۵ میلی‌مول در میلی‌لیتر بتاهیدروکسی‌بوتیرات، موجب مهار تکثیر این سلول‌ها می‌شوند (P<۰/۰۵). بنابراین می‌توان به این نتیجه رسید که از دیدگاه in vitro، بتاهیدروکسی‌بوتیرات هم بصورت محیطی و هم بصورت مرکزی، موجب تضعیف ایمنی ناشی از نوتروفیلهای گاو می‌شود.

فهرست منابع

1. Arthur, G.H., D.E., Noakes, H., Pearson, T.J., Parkinson, (1996): Veterinary reproduction & obstetrics, WB Saunders company Ltd., Pp: 73-98.
2. Booth N.H., L.E., McDonald, (1988): Veterinary pharmacology and therapeutics, Iowa state university press, 6th edition, Pp: 598-607.
3. Brousseau, P., Y., Payette, H., Tryphonas, (1999): Manual of immunological methods, CRC press, Pp: 20-45.
4. Chanarian, I., (1989): Laboratory hematology (an account of laboratory techniques), Churchill Livingstone, Pp: 9-12 & pp 177-178.
5. Feldman, B.F., J.G., Zinkl, N.C., Jain, (2000): Schalm's veterinary hematology, Lippincott Williams & Wilkins, 5th edition, chapters: 46, 52, 54, 57.
6. Gooi, H.G., H., Chapel, (1990): Clinical immunology (a practical approach), Oxford university press, Pp: 51-80.
7. Hafez, E.S.E., B., Hafez, (2000): Immunology of reproduction in: Reproduction in farm animals, Lippincott Williams & Wilkins, 7th edition, Pp: 341-353.
8. Hoeben, D., C., Burvenich, A.M., Massart-Leën, M., Lenjou, G., Nijs, D., VanBockstele, J.F., Beckers, (1999): In vitro effect of ketone bodies, glucocorticosteroides and bovine pregnancy-associated glycoprotein on cultures of bone marrow progenitor cells of cows and calves, Veterinary Immunology and Immunopathology, 68: 229–240.
9. Lamote, I., E., Meyer, L., Duchateau, C., Burvenich, (2004): Influence of 17ß-Estradiol, Progesterone, and Dexamethasone on Diapedesis and Viability of Bovine Blood Polymorphonuclear Leukocytes, Journal of Dairy Science, 87: 3340-3349.
10. McMurray, R.W., (2001): Estrogen, prolactin, and autoimmunity: actions and interactions (a review), international immunopharmacology, 1: 995-1008.

11. Roth, J.A., M.L., Kaeberle, W.H., Hsu, (1982): Effect of estradiol and progesterone on lymphocyte and neutrophil functions in steers, Infection and immunity, Pp: 997-1002.
12. Roth, J.A., R.F., Nachreiner, (1983): Association of increased estradiol and progesterone blood values with altered bovine polymorphonuclear leukocyte function, American journal of veterinary medicine, 44, No. 2, Pp: 247-253.
13. Sartorelli, P., S., Paltrinieri, F., Agnes, (1999): Non-specific immunity and ketone bodies. I: In vitro studies on chemotaxis and phagocytosis in ovine neutrophils, J. Vet. Med. A 46, Pp: 613–619.
14. Sartorelli, P., S., Paltrinieri, S., Comazzi, (2000): Non-specific Immunity and Ketone Bodies. II: In Vitro Studies on Adherence and Superoxide Anion Production in Ovine Neutrophils, J. Vet. Med. A 47: 1–8.
15. Stockham, S.L., M.A., Scott, (2004): Fundamentals of veterinary clinical pathology, Iowa state press (A Blackwell publishing company), Pp: 50-80.
16. Suriayasathaporn, W., C., Heuer, E.N., Noordhuizen-Stassen, Y.H., Schukken, (2000): Hyperketonemia and the impairment of udder defense: a review, Vet. Res. 31: 397-412.
17. Van Merris, V., E., Meyer, L., Duchateau, C., Burvenich, (2004): Differential effects of steroids and retinoids on bovine myelopoiesis in vitro, J. Dairy Sc. 87: 1188–1195
18. Weber, P.S., T., Toelboell, L.C., Chang, J.D., Tirrell, P.M., Saama, G.W., Smith, J.L., Burton, (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, J. Leuk. Biol. 75: 815-827.
19. Winters, K.R.H., E., Meyer, V.M., Van Merris, W.L.M., Van Den Broeck, L., Duchateau, C., Burvenich, (2003): Sex steroid hormones do not influence the oxidative burst activity of polymorphonuclear leukocytes from ovariectomized cows in vitro, Steroids, 68: 397–406