مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۶، دوره ۷۲، شماره ۲، ۲۶۱-۲۶۸
Journal of Veterinary Research. 72,2:261-268, 2017
Original Article

تعیین آنکسین۱،۲ A در سرم گوساله‌های مبتلا به پنومونی تجربی با باکتری پاستورلا مولتیسیدا

محمدرضا مخبردزفولی[۱] مسعود دوستی[۱*] صمد لطف‌اله‌زاده[۱] زهره افتخاری[۲] غلامرضا نیکبخت[۳]

۱) گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲) مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳) گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۲۵ دی ماه ۱۳۹۵، پذیرش نهایی: ۱۷ فروردین ماه ۱۳۹۶)

چکیده

زمینه مطالعه: آنکسین‌ها پروتئین‌های مهمی هستند که نقش‌هایی همانند هدایت سیگنال‌های داخل سلولی، اتصال اسکلت سلولی غشاء، تکثیر، تمایز و خصوصاً عملکرد ممانعتی در فرآیند التهاب در بدن موجودات زنده را برعهده دارند. پاستورلا مولتیسیدا به عنوان معمول ترین بیماریزای باکتریایی مطرح بوده و شیوع بالایی را در پنومونی‌ها به خود اختصاص می‌دهد. **هدف:** تعیین آنکسین آ-۱ و آنکسین آ-۲ در سرم گوساله‌های مبتلا به پنومونی به صورت تجربی با باکتری پاستورلا مولتیسیدا. **روش کار:** در تحقیق حاضر ۱۰ راس گوساله نر را در محدوده سنی دو تا چهار ماهه انتخاب و به دو گروه مساوی تقسیم نموده، به یک گروه به عنوان گروه تیمار باکتری پاستورلا مولتیسیدا به میزان ۳۰۰ ml در رقت ۲×۱۰^{۹} CFU/ml و به گروه شاهد ۳۰۰ ml نرمال سالین از راه دهان و توسط کاتتر مخصوص لاواژ در ناحیه نای تلقیح گردید. بر اساس جداول مخصوص، امتیازات بالینی ثبت گردید و حدود ۱۸ تا ۲۴ ساعت پس از تلقیح باکتری در گوساله‌های گروه تیمار و همزمان با بروز تغییرات بالینی در این گروه، شستشوی برونشی حبابچه‌ای جهت آزمایشات باکتری شناسی و سلول شناسی از مایعات حاصل از شستشو انجام و خون گیری از ورید وداج گوساله‌های هر دو گروه انجام شده و سرم آن‌ها با استفاده از کیت الایزای آنکسین مورد آزمایش قرار گرفتند. **نتایج:** میزان آنکسین آ-۱ و آنکسین آ-۲ در سرم خون گروه تیمار، افزایش معنی‌داری را (با استفاده از آزمون تی مستقل) نسبت به گروه کنترل نشان داد ($p<۰/۰۵$). **نتیجه گیری نهایی:** بنابراین به نظر می‌رسد آنکسین آ-۱ و آنکسین آ-۲ می‌توانند به عنوان یک بیومارکر مهم در سرم خون برای تشخیص فرآیندهای التهابی همچون پنومونی استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: آنکسین، پنومونی، پاستورلا مولتیسیدا، گوساله

مقدمه

آنکسین (annexin) ها عموماً پروتئین‌های سیتوسولیک (cytosolic) هستند که دارای ویژگی عمومی باند شدن با کلسیم و فسفولیپید می‌باشند (۱). اخیراً خانواده آنکسین آ در مهره داران بر اساس ساختار بیوشیمیایی به ۱۲ نوع تقسیم بندی شده است (آنکسین آ-۱ تا آنکسین آ-۱۳)(۲).

عملکرد آنکسین‌ها در بدن موجودات متنوع بوده از جمله آنکسین آ-۱ در بسیاری از فرآیندهای داخل سلولی همانند هدایت سیگنال‌های درون سلول، اتصال اسکلت سلولی غشاء و تکثیر و تمایز نقش دارد (۳). دیگر عملکردهای خارج سلولی فرض شده برای این پروتئین، خصوصاً عملکرد ممانعتی در فرآیند التهاب است (۴). اثر ضد التهابی آنکسین آ-۱ هم به توانائی مهار فسفولیپاز آ-۲ (۳) و هم به باند شدن رسپتورهای سطحی گرانولوسیت‌ها و ماکروفاژها که سبب ممانعت دیاپدز لکوسیت‌ها می‌شوند، مربوط می‌باشد (۴). آنکسین آ-۲ به مقدار زیادی در ماکروفاژها بیان شده، به عنوان یک تترامر در سطح سلول حضور دارد و در آنتی ژن‌های باکتریایی و ویروسی شناخته شده است (۵،۶). میزان آنکسین آ-۲ با عفونت افزایش می‌یابد (۷). همانند آنکسین آ-۱، آنکسین آ-۲ نیز نقش حیاتی در فاگوسیتوز لنفوسیت‌های آپوپتوز شده دارد و این مسئله نتیجه التهاب را با آزاد سازی سیتوکین‌های سرکوبگر ایمنی بهبود می‌بخشد (۸).

از طرفی اهمیت پنومونی در صنعت دام پروری امری بارز است و در این میان پاستورلا و به خصوص پاستورلا مولتیسیدا (Pasteurella multocida) به عنوان معمول ترین بیماریزای باکتریایی مطرح بوده و شیوع بالایی را در پنومونی‌ها به خود اختصاص می‌دهد. پاستورلا مولتی سیدا یکی از باکتری‌های بیماریزای مرتبط با سندرم‌های بالینی تعریف شده از مجموعه بیماری‌های تنفسی گاو شامل ذات الریه انزئوتیک گوساله نوزاد (enzootic calf pneumonia) و ذات الریه گاوهای گوشتی (تب حمل و نقل) است (۹،۱۱). اهمیت پاستورلا مولتیسیدا در ذات الریه گوساله نسبت به تب حمل و نقل آشکارتر است. چندین مطالعه در مورد درگیری گوساله‌های شیری، شیوع بالاتر پاستورلا مولتیسیدا را نسبت به منهمیا همولیتیکا (Mannheimia hemolytica) شناسایی کرده اند (۱۲).

نظر به اهمیت این باکتری در ایجاد پنومونی در گوساله‌ها (بخصوص در چند ماهه اول زندگی)، مطالعه حاضر با هدف تعیین آنکسین آ-۱ و آنکسین آ-۲ در سرم گوساله‌های ۲ تا ۴ ماهه مبتلا به پنومونی و گوساله‌های شاهد انجام شد تا بتوان آن‌ها را به عنوان شاخصی در ارزیابی این بیماری التهابی معرفی نمود. ضمن اینکه تاکنون در این مورد مطالعه‌ای در ایران انجام نشده است.

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۲۱-۶۶۹۲۳۵۱۰ نمابر: ۰۲۱-۶۶۹۳۳۲۲۲ Email: ma.doosti@yahoo.com

مواد و روش کار

این مطالعه به شکل تجربی بر روی ۱۰ راس گوساله نر ۲ تا ۴ ماهه که از شیر گرفته شده بودند، انجام شد. گوساله‌های مورد نظر از گاو داری‌های اطراف تهران به صورت تصادفی انتخاب شده و پس از معاینات بالینی اولیه و انجام آزمایش خون کامل و اطمینان از صحت و سلامتی آن‌ها، حدود ۱۰ روز دوره تطابق پذیری را طی کرده و پس از این دوره، وارد مطالعه گردیدند.

گوساله‌ها به شکل تصادفی در ۲ گروه مساوی (دو گروه ۵ تایی) تیمار و شاهد تقسیم و در جایگاه‌های انفرادی فلزی با کف پوش کاه در اتاقی با دمای ۲۵°C نگهداری شدند. در طول مدت مطالعه، آب و خوراک کافی و مناسب (خوراک گوساله‌ها شامل ترکیب کنسانتره به میزان ۱kg تا ۱/۵ و یونجه به میزان ۲kg تا ۳ در روز) در دو وعده روزانه در اختیارشان قرار می‌گرفت.

از زمان شروع پژوهش به فاصله زمانی هر ۶ ساعت از زمان صفر و قبل از تلقیح باکتری، معاینات طبقه بندی شده بر اساس جداول امتیاز بندی که شامل: درجه حرارت راست روده ای، تعداد حرکات تنفس، کیفیت صداهای تنفسی، ترشحات بینی، سرفه، وضعیت چشم و گوش و وضعیت عمومی حیوان بودند، ارزیابی و ثبت گردیدند. تشریح امتیاز بندی علائم بالینی پنومونی در گوساله‌ها بدین شرح بود که در مورد درجه حرارت بدن (برحسب سلیسیوس) : ۰(صفر): (۳۷/۸ تا ۳۸/۳)/ ۱: (۳۸/۳ تا ۳۸/۸)/ ۲: (۳۸/۹ تا ۳۹/۴) / ۳: (بیش از ۳۹/۴)؛ سرفه : ۰(صفر): (ندارد)/ ۱: (سرفه تکی ایجاد شده) / ۲: (سرفه‌های تکراری ایجاد شده) / ۳: (سرفه‌های خود به خودی تکرار شده)؛ ترشحات بینی: ۰(صفر): (ترشح سروزی طبیعی) / ۱: (مقدار کمی ترشح کدر یک طرفه) / ۲: (ترشح مخاطی زیاد یا کدر دو طرفه) / ۳: (ترشح مخاطی چرکی دوطرفه فراوان)؛ امتیازات چشمی : ۰(صفر): (طبیعی) / ۱: (مقدار کمی ترشحات چشمی) / ۲: (مقدار متوسط ترشحات دوطرفی چشمی) / ۳: (ترشحات شدید چشمی)؛ امتیازات گوش : ۰(صفر): (طبیعی) / ۱: (تکان دادن گوش یا تکان دادن سر) / ۲: (افتادگی یک طرفی جزیی) / ۳: (کج شدن سر یا افتادگی گوش به شکل دوطرفه).

تفسیرنتایج : (جمع امتیازات بالینی فوق) کمتر از چهار طبیعی، مساوی چهار مراقبت کردن یا چک کردن مجدد، بیش تر از چهار مورد درمان قرار دادن (۱۳).

قبل از تلقیح باکتری، خون گیری از ورید وداج گوساله‌ها به میزان ۲ میلی لیتر به همراه ماده ضد انعقاد EDTA جهت آزمایش خون کامل انجام شد. برای ایجاد پنومونی در گوساله‌ها، از باکتری پاستورلا مولتیسیدایی که از موسسه رازی حصارک کرج، که قبلاً از ریه گوساله مبتلا به پنومونی جدا شده بود، استفاده گردید.

در مورد گوساله‌های تیمار برای شروع کار، از دو داروی آرام بخش دیازپام با دوز ۰/۴ mg/kg و زایلازین با دوز ۰/۱ mg/kg به صورت داخل وریدی استفاده شد که پس از حدود چند دقیقه از تزریق، آرام بخشی در دام ایجاد شد. سپس حیوان را در وضعیت جناغی بر روی زمین قرار داده و با استفاده از لوله تراشه انسانی (شماره ۷/۵) که از طریق دهان در ناحیه حلق قرار داده، کاتتر مخصوص لاواژ از داخل آن عبور داده و به داخل نای هدایت شد (ترجیحاً این کار با توجه به طول لوله تا قبل از محل دو شاخه شدن نای صورت گرفت) و سپس رقت تهیه شده از باکتری پاستورلا مولتیسیدا (با میزان ۳۰۰ml در رقت ۲×۱۰^{۹} CFU/ml) از طریق کاتتر وارد شده به داخل نای تزریق گردید. از زمان تلقیح باکتری به داخل نای (زمان صفر) هر شش ساعت، دام مورد ارزیابی و معاینات بالینی قرار گرفته و پارامترهای بالینی فوق الذکر در جداول مربوطه ثبت گردیدند.

زمانی که گوساله‌ها علائم بالینی ذات الریه را (بر اساس جداول و امتیازات درج شده)، به صورت مشخص نشان دادند، خون گیری از ورید وداج به منظور: الف) آزمایش هماتولوژی (۲ml) در ماده ضد انعقاد EDTA، ب) ارزیابی میزان آنکسین‌های آ- ۱ و آ- ۲ (۱۰ml) بدون ماده ضد انعقاد جهت جدا نمودن سرم توسط سانتریفوژ، انجام شد.

در مورد گوساله‌های شاهد، مراحل فوق الذکر به همین صورت انجام گردید با این تفاوت که به جای تلقیح باکتری، نرمال سالین به میزان ۳۰۰ml به داخل نای تزریق و در ۱۸ تا ۲۴ ساعت بعد خون گیری انجام شد.

بعد از خون گیری، در هر دو گروه، شستشوی برونشی حبابچه‌ای (Broncho-alveolar lavage /BAL) انجام شد. برای این کار از طریق گذاشتن لوله تراشه شماره ۷/۵ از دهان به حلق و سپس با عبور کاتتر مخصوص لاواژ به داخل نای، نرمال سالین (تقریباً ۳۰۰ml) تزریق و سپس سریعاً اقدام به مکش آن از این لوله گردید. حداقل میزان۵۰ml از این مایعات در لوله‌های فالکون استریل جمع آوری و سریعاً در کنار یخ به آزمایشگاه طب تجربی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ارسال شد. از این مایعات میزان ۱ml جهت شمارش سلولی (از طریق دستگاه اتوسل کانتر) و ۲ml به منظور کشت باکتری به آزمایشگاه باکتری شناسی دانشکده فرستاده و بقیه جهت سلول شناسی سانتریفیوژ شد. این کار در ۳۰۰g × به مدت ۱۵ دقیقه انجام گردید و از رسوب بدست آمده لام تهیه شد (تهیه گسترش، خشک کردن کامل، تثبیت با الکل متانول ۷۰٪ به مدت ۱ تا ۳ دقیقه، خشک شدن کامل، استفاده از رنگ گیمسا با نسبت ۱ به ۵، به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه، خشک کردن لام) و نهایتاً لام آماده شده به آزمایشگاه دانشکده جهت سلول شناسی ارسال گردید.

ارزیابی آنکسین‌ها با استفاده از کیت مخصوص آنکسین آ-۱ و آنکسین آ-۲ شرکت "ایست بیوفارما" با روش استاندارد انجام شد.

برای بررسی آماری داده‌ها از نرم افزار spss ویرایش ۱۶/۰ استفاده گردید. آنالیز آماری آنکسین‌ها در دو گروه تیمار و شاهد با کمک آزمون تی مستقل (Independent t- test) و در قسمت هماتولوژی در هر گروه

جدول ۱. امتیازات بالینی گوساله های تیمار.

علائم بالینی / زمان	ساعت صفر	ساعت ۶	ساعت ۱۲	ساعت ۱۸	ساعت ۲۴	ساعت ۳۰ (BAL)	ساعت ۳۶ (درمان)	ساعت ۴۲	ساعت ۴۸
درجه حرارت بدن	۰	۲	۲	۳	۳	۲	۲	۱	۰
ترشحات بینی	۰	۱	۲	۱	۱	۱	۰	۰	۰
سرفه خود به خودی یا ایجاد شده	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
وضعیت چشم یا گوش	۰	۲	۲	۲	۲	۱	۰	۰	۰
جمع امتیازات	۱	۶	۷	۷	۷	۵	۳	۲	۱

جدول ۲. امتیازات بالینی گوساله های شاهد.

علائم بالینی / زمان	ساعت صفر	ساعت ۶	ساعت ۱۲	ساعت ۱۸	ساعت ۲۴	ساعت ۳۰ (BAL)	ساعت ۳۶ (درمان)	ساعت ۴۲	ساعت ۴۸
درجه حرارت بدن	۰	۲	۲	۱	۱	۱	۰	۰	۰
ترشحات بینی	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
سرفه خود به خودی یا ایجاد شده	۱	۱	۱	۰	۰	۱	۱	۱	۱
وضعیت چشم یا گوش	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
جمع امتیازات	۱	۳	۳	۱	۱	۲	۱	۱	۱

جدول ۳. مولفه های خونی گروه تیمار (N=۵) قبل و بعد از تلقیح باکتری پاستورلا مولتیسیدا.

مولفه های خون	قبل میانگین و انحراف معیار	بعد میانگین و انحراف معیار	p-value
گلبول سفید	۸/۷ ± ۲/۹	۱۴/۹ ±۱/۵	۰/۰۰۳
پروتئین کل	۵/۳ ± ۰/۲	۶/۵۶ ± ۰/۳	۰/۰۰۱
سلول های باند	۰/۸ ± ۰/۸	۸/۶ ± ۶/۷	۰/۰۵۸
ائوزینوفیل ها	۱/۲ ± ۰/۸	۱/۶+۳/۵	۰/۷۹
لنفوسیت ها	۶۴/۸ ± ۷/۴	۳۱/۲ ± ۱۷/۶	۰/۰۰۹
نوتروفیل سگمانته	۳۰/۸ ± ۷/۳	۶۵/۴ ± ۹/۷	۰/۰۰۲
پلاکت ها	۵۷۴/۰ ± ۱۹۰/۰	۴۱۰/۶ ± ۷۵/۱	۰/۰۹
PCV	۳۴/۹ ± ۳/۲	۳۲/۸ ± ۴/۲	۰/۰۵۴
هموگلوبین	۱۱/۲ ± ۱/۳	۱۱/۸ ± ۱/۷	۰/۱۵
گلبول های قرمز	۱۰/۷ ± ۱/۳	۱۱/۰ ± ۱/۲	۰/۲۰
MCH	۳۰/۰ ± ۱/۵	۳۰/۴ ± ۱/۸	۰/۷۴

مقایســه قبل و بعد نتایج با کمک تی زوجی (paired t- test) انجام شد. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ درنظر گرفته شد.

نتایج

در تحقیق انجام شــده در دو گروه تیمار و شاهد، به فواصل زمانی هر شــش ســاعت از زمان صفر، عدد میانــه (median) امتیازات بالینی ثبت شــده، محاســبه و در پایان مجموع این امتیازات آورده شده است. در گروه تیمار از زمان تلقیح باکتری پاستورلا مولتیسیدا (ساعت صفر) تا زمان درمان گوساله‌ها (ساعت ۳۶)، جمع امتیازات بالاتر از عدد ۴ بوده که نشان گر بروز پنومونی در این دام‌ها بود. در حالی که در گروه شــاهد از زمان تلقیح نرمال سالین (بعد از ساعت صفر) تا پایان تحقیق هیچ گاه جمع این امتیازات بالاتر از عدد ۴ نرفته و به عبارتی دیگر علائم مشــخصه‌ای از پنومونی بارز نشد (جداول ۱،۲).

در ابتدا مولفه‌های خونی که در هر یک از گروه‌های آزمایشــی (تیمار و شاهد) اندازه گیری شده بودند، قبل از تلقیح (در گروه تیمار قبل از تلقیح باکتری پاســتورلا مولتیسیدا و در گروه شــاهد قبل از تلقیح نرمال سالین) به کمک آزمون تی مســتقل مورد مقایســه قرار گرفتند. بین هیچ یک از مولفه‌های خونی دو گروه، قبل از مداخله (تلقیح)، تفاوت آماری معنی‌داری مشــاهده نشــد (p>۰/۰۵). ســپس این مولفه‌ها بعد از تلقیح نیز مجدداً با اســتفاده از آزمون تی مســتقل در دو گروه مقایسه شــدند. نتایج حاکی از آن بود که گلبول ســفید (p=۰/۰۰۳)، پروتئین کل (p=۰/۰۰۱)، لنفوسیت (p=۰/۰۰۵) و نوتروفیل سگمانته (p=۰/۰۰) در دو گروه بعد از تلقیح تفاوت معنی‌داری نشان دادند. به منظور مقایسه این مولفه‌ها در هر یک از گروه‌ها بطور جداگانه (یعنی قبل و بعد از تلقیح در گروه تیمار و نیز در گروه شاهد)

جدول ۴. مولفه های خونی گروه شاهد (N=۵) قبل و بعد از تلقیح نرمال سالین.

مولفه های خون	قبل میانگین و انحراف معیار	بعد میانگین و انحراف معیار	p-value
گلبول سفید	۹/۳ ± ۲/۵	۹/۹۰ ±۲/۰	۰/۶۶
پروتئین کل	۵/۳ ± ۰/۲	۵/۵ ± ۰/۱	۰/۱۸
سلول های باند	۱/۲ ± ۰/۸	۰/۶ ± ۰/۵	۰/۰۹
ائوزینوفیل ها	۱/۶ ± ۳/۵	۰/۶ ±۰/۸	۰/۲۰
لنفوسیت ها	۶۵/۸ ± ۷/۲	۶۹/۸ ± ۱۲/۰	۰/۴۷
نوتروفیل سگمانته	۲۸/۶ ± ۵/۲	۲۵/۸ ± ۱۱/۱	۰/۵۸
پلاکت ها	۶۴۷/۰ ± ۱۵۰/۲	۵۹۶/۶ ± ۱۳۸/۵	۰/۱۶
PCV	۳۸/۴ ± ۷/۸	۳۸/۴ ± ۴/۴	۰/۹۸
هموگلوبین	۱۰/۴ ± ۱/۲	۹/۷ ± ۱/۳	۰/۰۳
گلبول های قرمز	۱۰/۵ ± ۱/۰	۱۰/۱ ± ۱/۱	۰/۰۷
MCH	۳۰/۰ ± ۱/۴	۲۹/۸ ± ۱/۴	۰/۷۹

جدول ۵. توزیع مولفه های سلول شناسی مایع BAL بر حسب درصد در دو گروه مورد آزمون.

مولفه های سلول شناسی (٪)	p-value تیمار (n=۵)	 شاهد (n=۵)	گروه ها
سلول اپی تلیال	۱۱/۴	۱۳/۷	۰/۰۰
لنفوسیت	۱۰/۹	۱۵/۸	۰/۰۰۳
ماکروفاژ	۴۶/۸	۶۴/۱	۰/۰۰
نوتروفیل	۳۰/۳	۵/۶	۰/۰۰

جدول ۶. میزان آنکسین آ-۱ و آ-۲ در سرم خون و مقایسه آن ها در دو گروه تیمار و شاهد.

سرم خون	گروه ها (میانگین ± انحراف معیار) تیمار (n=۵)	 شاهد (n=۵)	p-value
آنکسین آ-۱	۱۱/۱±۰/۵	۸/۲ ±۰/۲۷	۰/۰۰
آنکسین آ-۲	۱۱/۸ ±۱/۲۳	۷/۳ ±۰/۲۹	۰/۰۰

از آزمون تی وابسته استفاده گردید (جداول ۴،۳). نتایج حاکی از آن بود که قبل و بعد از تلقیح باکتری در گروه تیمار تفاوت معنی‌داری در گلبول سفید (p=۰/۰۰۳)، پروتئین کل (p=۰/۰۰۱)، لنفوسیت (p=۰/۰۰۹) و نوتروفیل سگمانته (p=۰/۰۰۲) مشاهده شد، در حالی که در سایر مولفه‌های خونی در این گروه (تیمار) تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید (جدول ۳). این در حالی است که بین هیچکدام از اجزاء خونی (بجز هموگلوبین) در گروه شاهد قبل و بعد از تلقیح باکتری تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید (جدول ۴).

از طرفی، نتایج آزمایشات باکتری شناسی مایعات BAL در گوساله‌های تیمار و شاهد نشان داد که در همه گوساله‌های تیمار، باکتری پاستورلا مولتیسیدا جدا شد و در گروه شاهد هیچ باکتری جدا نگردید. نتایج حاصل از سلول شناسی مایعات BAL (ارزیابی سلول‌های این مایع یعنی نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها، لنفوسیت‌ها و سلول‌های اپیتلیال) در دو گروه تیمار و شاهد حاکی از آن بود که اختلاف معنی‌داری در تعداد نوتروفیل‌ها (p=۰/۰۰)، ماکروفاژها (p=۰/۰۰)، لنفوسیت‌ها (p=۰/۰۰۳) و سلول‌های اپی تلیال (p=۰/۰۰) گروه تیمار نسبت به گروه شاهد وجود داشته است (جدول ۵).

به علاوه، اندازه گیری میزان آنکسین‌ها (آ-۱ و آ-۲) در سرم خون در هر یک از گروه‌ها با استفاده از آزمون تی مستقل انجام گردید که طبق آن بین میزان آنکسین آ-۱ و آ-۲ در دو گروه تفاوت آماری معنی‌داری (p=۰/۰۵) مشاهده شد. به عبارتی میانگین آنکسین آ-۱ و آ-۲ در گروه تیمار نسبت به گروه شاهد افزایش نشان داد (جدول ۶).

بحث

ایجاد پنومونی ریوی به شکل تجربی از چندین روش مختلف امکان پذیر است. معمول ترین روش، استفاده مداوم از آئروسل آلوده کننده گوساله‌ها با ویروس پاراآنفلوانزا تیپ – ۳ (PI-۳) یا ویروس التهاب بینی نایی عفونی گاوان (IBR) است که به دنبال آن آئروسل حاوی منهمیا همولیتیکا استفاده شده باشد و بنابراین در فاصله ۳ تا ۱۳ روز بعد سبب یک ذات الریه برونشی چرکی می‌شود. ذات الریه پاستورلوزی که مشابه با رخداد طبیعی بیماری باشد، می‌تواند به صورت تجربی توسط تماس گوساله‌ها به صورت مداوم با هرپس ویروس-۱ گاوی (BHV-۱) و منهمیا همولیتیکا به صورت جداگانه در عرض ۴ روز ایجاد شود (۱۴). بطور معمول ایجاد پنومونی به استفاده از یک عامل تکی و با بکاربردن باکتری خاصی همچون پاستورلا مولتیسیدا، کمتر انجام شده ولی این امکان وجود دارد که با استفاده از این باکتری حتی پنومونی، مشابه با علائم دیده شده در فیلد ایجاد کرد (۱۵)، بنابراین همانند منهمیا همولیتیکا چالش تجربی گوساله‌ها با پاستورلا مولتیسیدا به تنهایی باعث ایجاد علائم بالینی و تغییر بیماریزایی در ریه شبیه به آن چه در رخداد طبیعی بیماری دیده شده است، می‌شود ولی تعداد زیادی از باکتری باید از روشی تجویز شود که از مجرای فوقانی تنفسی (عموماً از طریق تزریق داخل نایی) عبور کند. گوساله‌های مبتلا به پاستورلا مولتیسیدا به تنهایی علائم بالینی تب، تعداد تنفس افزایش یافته و گاهی اوقات افسردگی، سرفه و ترشحات مخاط و مخاطی چرکی را نشان

می‌دهند (۱۶).

در این تحقیق نیز این کار با استفاده از سویه‌های بومی این باکتری که از ریه یک راس گوساله مبتلا به پنومونی توسط موسسه رازی جدا شده بود برای اولین بار در ایران انجام شد. بررسی نتایج امتیازات بالینی در گروه تیمار نشـان داد که از سـاعات اولیه پس از تلقیح باکتری به داخل نای (حدود ۶ ساعت بعد) تغییرات بالینی در گوساله‌ها (درجه حرارت بدن، ترشحات بینی، سـرفه خود به خودی یا ایجاد شـده، وضعیت چشم و گوش) شروع شده و جمع امتیازات بالینی به بالاتر از عدد ۴ که نشانگر آغاز ذات الریه می‌باشد، رسـیده اند و این افزایش با توجه به تغییراتی که حاصل از حضور باکتری در مجاری تنفسـی تحتانی، عفونت و التهاب ناشـی از آن بروز کرده رو به وخامت نهاده که با توجه به جدول ۱ در حدود ساعات ۱۸ و ۲۴ به اوج خود رسیده بطوری که در این محدوده زمانی جمع امتیازات مذکور عدد ۷ را نشان می‌دهد که بر اساس تعریف ارائه شده (از جمع این امتیازات)، به خوبی نشان گر بروز ذات الریه در گروه تیمار اسـت. در تحقیق Dowling و همکاران در سال ۲۰۰۲ نیز که از باکتری پاستورلا مولتیسیدا بیوتیپ آ: ۳ استفاده و در نای گوساله‌های حدود ۸ هفتگی تلقیح کرده بودند در عرض ۴ تا ۶ ساعت پس از عفونت، ۱۲ گوساله از ۱۶ گوساله، افسرده شده، از پا افتاده، علائم سختی تنفسی و ترشحات خفیف بینی داشته، اشتهایشان کاهش یافته و به صداهای خفیف یا تحریکات بینایی پاسخی نشان نداده بودند. دمای مقعدی سـریعاً در تمام گروه‌ها بعد از عفونت افزایش یافته و در بالاترین حد خود ۵ ساعت پس از عفونت برای آن‌هایی که با ۶۰ml باکتری در دوز 10^9 CFU تلقیح شـده بودند رسـید و برای بقیه (با دوز 10^{10} CFU و دوز 10^9 CFU در حجم‌های ۶۰ml و ۳۰۰) در ۲۳ ساعت پس از عفونت، به بالاترین حد خود رسید (۱۵) که این نتایج با تحقیق انجام شده حاضر با سویه بومی باکتری پاستورلا مولتیسیدا بکار رفته و در دوز پیشنهادی به میزان ۳۰۰ml در رقت 2×10^9 CFU/ml از این باکتری مطابقت داشته و نتایج بدست آمده بروز پنومونی را بیان می‌کند. این در حالی است که با توجه به جدول ۲ در گوسـاله‌های گروه شاهد پس از تلقیح باکتری علی رغم افزایش جزئی در این امتیازات (حداکثر عدد ۳ که این عدد نیز در محدوده طبیعی تلقی شده) و می‌تواند به التهاب جزئی در اثر ورود حجم بالای نرمال سالین به ریه مرتبط باشـد، در هیچ زمانی پس از تلقیح نرمال سالین افزایش امتیازات بالاتر از عدد ۴ (که نشان گر ذات الریه است) دیده نشد و از این رو قاطعانه می‌توان ابراز نمود که در گروه شاهد که با همین حجم نرمال سالین تلقیح شده بود ذات الریه‌ای بروز ننموده است.

از طرفی با توجه به نتایج یافته‌های خون شناسی، در حالی که بین دو گروه تیمار و شاهد قبل از تلقیح در نای (باکتری به گروه تیمار و نرمال سالین به گروه شاهد)، هیچ تفاوت معنی‌داری در مولفه‌های خونی مشاهده نشده بـود، ولی پس از تلقیـح در برخی از اجزای خونی همانند تعداد گلبول‌های سـفید و نوتروفیل‌های سـگمانته و لنفوسـیت‌ها در گروه تیمار نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری مشـاهده گردید که این یافته می‌تواند به همراه نتایج آزمایشـات باکتری شناسی در BALF (در مایعات BAL) بدست آمده از گوسـاله‌های گـروه تیمار که در تمـام موارد در آن‌ها باکتری پاسـتورلا مولتیسیدا دیده شده بود، نشان دهنده بروز ذات الریه در گروه تیمار نسبت به گروه شاهد باشد.

هم چنین ارزیابی سلول شناسی BALF گوساله‌های تیمار و شاهد نشان می‌دهد که تمامی مولفه‌ها شامل نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های اپی تلیال در گروه تیمار نسـبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشته و این یافته‌ها نشان دهنده التهاب پارانشیم ریوی و پنومونی رخ داده در این گروه می‌باشد.

با توجه به نتایج حاصله از این تحقیق مشخص شد که تغییرات سرمی آنکسـین‌های آ-۱ و آ-۲ نیز در گوسـاله‌های تیمار نسبت به گوساله‌های شـاهد افزایش معنـی‌داری را نشـان داده انـد. التهاب، یکـی از بهترین مشخصه‌های فرآیندهای بیولوژیک است که توسط آنکسین‌ها تنظیم شده اسـت و آنکسـین آ-۱ قادر به ممانعت عمل آنزیم‌های مختلف درگیر در فرآیند التهاب شـامل فسـفو لیپاز آ-۲ و سیکلواکسیژناز۲ و از طرفی وادار نمودن سنتز نیتریک اکسید می‌باشد. به علاوه وقتی که آنکسین آ-۱ ترشح شـد، به گیرنده پپتید فورمیـل (formyl peptide receptor) متصل شده، جداسازی سلول را ارتقاء داده و با کاهش بعدی در پاسخ التهابی، مانع مهاجرت لکوسیت‌ها می‌شود. در مجموع آنکسین آ-۱ خارج سلولی با تأثیر در مهاجرت لکوسیت‌ها از طریق فعال‌سازی گیرنده پپتید فورمیل، در آپوپتوز دخیل است و می‌تواند پاسخ‌های پرو- آپوپتوتیک (pro-apoptotic) در نوتروفیل‌هـا به راه بیاندازد (۱۷). همچنین به نظر می‌رسـد آنکسـین آ-۱ درسطح سلول برای زدودن سلول‌های آپوپتوز شده احتیاج باشد که می‌تواند توسـط گیرنده‌های فسفاتیدیل سرین واقع بر سلول‌های غرق شده‌ای که احتمالاً آنکسـین آ-۱ یا کمپلکس‌های آ-۱- فسفاتیدیل سرین تشخیص می‌دهند، واسطه گردد (۱۸). بنابراین آنکسین آ-۱ و آ-۲ در فازهای التهابی در سطح موضعی یا عمومی حضور می‌یابند (۱۹) و افزایش این پروتئین‌ها در سـرم نیز مورد انتظار است. چندین مطالعه سنتز افزایش یافته آنکسین آ-۱ را در پاسـخ به گلوکوکورتیکوئیدها در انواع سلول‌های مختلف نشان داده‌اند (۲۰).

می‌تـوان به طور خلاصه گفـت که آنکسـین آ-۱ دارای اثرات ضد مهاجرتی و ضد التهابی بر روی نوتروفیل‌ها و منوسـیت‌ها در چندین مدل در محیط آزمایشـگاه (۲۱) و در بدن موجود زنده می‌باشـد (۲۲). از طرفی آنکسین آ-۱ دارای یک الگوی مجزای انتشار سلولی در لکوسیت‌ها می‌باشد (۲۳) و به میزان زیادی در سـلول‌های رده خون ساز (haematopoietic lineage) شـامل نوتروفیل‌ها، منوسـیت‌ها- ماکروفاژها و ماست سل‌ها بیان می‌شـود. سـلول‌های چنـد هسـته‌ای (Polymorphonuclear) گویچه‌های سفید، محتوی مقادیر زیادی از آنکسین آ-۱ هستند که ممکن

است به حدود ۴ درصد کل پروتئین‌های سیتوسولیک برسند (۲۴) موقعیت قرارگیری آنکسین آ-۱ بین انواع مختلف سلول‌ها متنوع می‌باشد. در بین نوتروفیل‌ها برای مثال این پروتئین به طور غالبی در گرانول‌های ژلاتینی قرار دارد (۲۱). در ماست سل‌ها، آنکسین آ-۱ در گرانول‌های- آلفا قرار می‌گیرد (۲۵) ولی در ماکروفاژها و اکثر سلول‌های دیگر بررسی شده، عمدتاً در سیتوپلاسم است، گرچه بسته به فعالیت سلولی، آنکسین آ-۱ هم چنین در ارتباط با غشاء، اسکلت سلولی و هسته نیز یافت شده است (۲۶،۲۸).

همان طور که قبلاً اشاره شد آنکسین آ-۲ به مقدار زیادی در ماکروفاژها بیان شده، به عنوان یک تترامر در سطح سلول حضور دارد و در آنتی ژن‌های باکتریایی و ویروسی شناخته شده است (۵،۶). میزان آنکسین آ-۲ با عفونت افزایش می‌یابد (۷). همانند آنکسین آ-۱، آنکسین آ-۲ نیز نقش حیاتی در فاگوسیتوز لنفوسیت‌های آپوپتوز شده دارد و این مسئله نتیجه التهاب را با آزاد سازی سیتوکین‌های سرکوبگر ایمنی بهبود می‌بخشد (۸). با عنایت به نتایج خون شناسی و امتیازات بالینی ثبت شده در گروه تیمار (حدود ۲۴ ساعت پس از تلقیح باکتری و در زمان بروز علائم مشخص ذات الریه در گوساله‌ها) و افزایش لکوسیت‌ها، نوتروفیل‌های سگمانته و تفاوت معنی‌دار لنفوسیت‌ها بین دو گروه پس از تلقیح باکتری، همگی افزایش این آنکسین‌ها در سرم را در بروز ذات الریه به عنوان یک بیماری التهابی با درگیری سیستمیک بدن توجیه می‌نمایند. این در حالی است که در پژوهش‌های محدودی که تا کنون بر روی گوساله‌ها جهت ارزیابی آنکسین‌ها انجام شده فقط آنکسین حاصل از شستشوی برونشی حبابچه‌ای ارزیابی شده و هیچ گاه آنکسین آ-۱ و یا آنکسین آ-۲ مربوط به سرم آن‌ها بررسی نشده است.

نتیجه گیری: با توجه به این تحقیق، بنظر می‌رسد که شناخت هر چه بیشتر نقش پروتئین‌های آنکسین آ-۱ و آنکسین آ-۲ در مایعات بدن دامهای مبتلا به بیماری‌های التهابی همچون ذات الریه در تشخیص روند بیماری و درمان کمک کننده باشد به گونه‌ای که بررسی این پروتئین به عنوان مارکر شناسایی بیماری‌ها و همچنین نقش درمانی این پروتئین‌ها در بیماری‌های عفونی میتواند راه گشای جدیدی در طب باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور و معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران در قالب پایان نامه دکتری تخصصی انجام شده است.

References

1. Gerke, V., Moss, S.E. (2002) Annexins: from structure to function. Physiology News. 82: 331-371.
2. Moss, S.E., Morgan. R.O. (2004) The annexins. Gen Bio. 5: 219.
3. Frey, B.M., Reber, B.F., Vishwanath, B.S., Escher, G., Frey, F.J. (1999) Annexin I modulates cell functions by controlling intracellular calcium release. FASEB. 13: 2235-2245.
4. Goulding,, N.J., Guyre, P.M. (1992) Regulation of inflammation by lipocortin 1. Immunol Today. 13: 295-297.
5. Kirschnek, S., Adams, C., Gulbins, E. (2005) Annexin II is a novel receptor for Pseudomonas aeruginosa. Biochem Biophys Res Commun. 327: 900-906.
6. Malhotra, R., Ward, M., Bright, H., Priest, R., Foster, M.R., Hurle, M., Blair, E, Bird, M. (2003) (Isolation and characterisation of potential respiratory syncytial virus receptoRs) on epithelial cells. Microb Infect. 5: 123–133.
7. Ulvestad, E., Kristoffersen, E.K., Jensen, T.S., Matre, R. (1994) Identification of a soluble Fc gamma-binding molecule (annexin II) in human serum using a competitive ELISA. APMIS J. Sep. 102: 667-673.
8. Swisher, J.F., Khatri, U., Feldman, G.M. (2007) Annexin A2 is a soluble mediator of macrophage activation. J Leuko Bio. 82: 1174-1184.
9. Lillie, L.E. (1974) The bovine respiratory disease complex. Can Vet J. 15: 233-242.
10. Fulton, R.W., Purdy, C.W., Confer, A.W., Saliki, J.T., Loan, R.W., Briggs, R.E., Burge, L.J. (2000) Bovine viral diarrhea viral infections in feeder calves with respiratory disease: interactions with Pasteurella spp., parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. Can J Vet Res. 64: 151-159.
11. Welsh, R.D., Dye, L.B., Payton, M.E., Confer, A.W. (2004) Isolation and antimicrobial susceptibilities of bacterial pathogens from bovine pneumonia: 1994--2002. J Vet Diag Invest: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. 16: 426-

431.
12. Nikunen, S., Hartel, H., Orro, T., Neuvonen, E., Tanskanen, R., Kivela, S.L., Sankari, S., Aho, P., Pyörälä, S., Saloniemi, H., Soveri, T. (2007) Association of bovine respiratory disease with clinical status and acute phase proteins in calves. Comp Immunol Mic Infec Dis J. 30: 143-51.
13. Lago, A., McGuirk, S.M., Bennett, T.B., Cook, N.B., Nordlund, K.V. (2006) Calf respiratory disease and pen microenvironments in naturally ventilated calf barns in winter. J Dairy Sci. 89: 4014-4025.
14. Radostits, O.C., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W., Constable, P.D. (2007) Veterinary medicine, a textbook of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs and horses. (10th ed.) London: Bailliere Tindal 2007. London, UK.
15. Dowling, A., Hodgson, J.C., Schock, A,. Donachie, W., Eckersall, P.D., McKendrick, I.J. (2002) Experimental induction of pneumonic pasteurellosis in calves by intratracheal infection with Pasteurella multocida biotype A:3. Res Vet Sci. 73: 37-44.
16. Wilkins, P.A., Woolums., A.R. (2015) Diseases of respiratory system. In: Large Animal Internal Medicine. Smith, B.P. (ed.). (5th ed.). New York, USA. p. 596, 597.
17. Solito, E., Kamal, A., Russo-Marie, F., Buckingham, J.C., Marullo, S., Perretti, M. (2003) A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils. FASEB J. 17: 1544-1546.
18. Arur, S., Uche, U.E., Rezaul, K., Fong, M., Scranton, V., Cowan, A.E., Mohler, W., Han, D.K.(2003) Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. Dev Cell. 4: 587-598.
19. Tarui, T., Majumdar, M., Miles, L.A., Ruf, W., Takada, Y. (2002) Plasmin-induced migration of endothelial cells. A potential target for the anti-angiogenic action of angiostatin. J Biol Chem. 277: 33564-33570.
20. McLeod, J.D., Goodall, A., Jelic, P., Bolton, C. (1995) Changes in the cellular distribution of lipocortin-1 (Annexin-1) in C6 glioma cells after exposure to dexamethasone. Bioch Pharma. 50: 1103-1107.
21. Perretti, M., Christian, H., Wheller, S.K., Aiello, I., Mugridge, K.G., Morris, J.F., Flower, R.J., Goulding, N.J. (2000) Annexin I is stored within gelatinase granules of human neutrophil and mobilized on the cell surface upon adhesion but not phagocytosis. Cell Bio Inter. 24: 163-174.
22. Getting. S.J., Flower, R.J., Perretti, M. (1997) Inhibition of neutrophil and monocyte recruitment by endogenous and exogenous lipocortin 1. Br J Pharmacol. 120: 1075-1082.
23. Dreier, R., Schmid, K.W., Gerke. V., Riehemann. K. (1998) Differential expression of annexins I, II and IV in human tissues: an immunohistochemical study. Histochem Cell Biol. 110: 137-48.
24. Ernst, J.D., Hoye, E., Blackwood, R.A., Jaye, D. (1990) Purification and characterization of an abundant cytosolic protein from human neutrophils that promotes Ca2(+)-dependent aggregation of isolated specific granules. J Clin Invest. 85: 1065-1071.
25. Oliani, S.M., Christian, H.C., Manston, J., Flower, R.J., Perretti, M. (2000) An immunocytochemical and in situ hybridization analysis of annexin 1 expression in rat mast cells: modulation by inflammation and dexamethasone. Lab Invest. 80: 1429-1438.
26. Bianchi, R., Giambanco, I., Arcuri, C., Donato, R. (2003) Subcellular localization of S100A11 (S100C) in LLC-PK1 renal cells: Calcium- and protein kinase c-dependent association of S100A11 with S100B and vimentin intermediate filaments. Microsc Res Tech. 60: 639-651.
27. Peers, S.H., Smillie, F., Elderfield, A.J., Flower, R.J. (1993) Glucocorticoid-and non-glucocorticoid induction of lipocortins (annexins) 1 and 2 in rat peritoneal leucocytes in vivo. Br J Pharmacol. 108: 66-72.
28. Seemann, J., Weber, K., Gerke, V. (1997) Annexin I targets S100C to early endosomes. FEBS L. 413: 185-190.

Detection of annexin I and annexin II in serum of calves affected by experimental pneumonia with *Pasteurella multocida*

Mokhber Dezfouli, M.R.[1], Doosti, M.[1], Lotfolahzadeh, S.[1], Eftekhari, Z.[2], Nikbakht Boroujeni, GH.R.[3]

[1]*Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[2]*Research and Production Complex, Pasteur Institute of Iran, Iran*
[3]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
(Received 14 January 2017, Accepted 6 April 2017)

Abstract:

BACKGROUND: Annexins (including annexin A1 and annexin A2) are important proteins which have some roles in organisms such as intracellular signal conduction, membrane cellular skeletal connection, cellular proliferation and differentiation, especially inhibitory function in inflammation processing. *Pasteurella multocida* is the most common bacterial pathogen and has high prevalence in pneumonia. **OBJECTIVES:** This study was aimed to determine experimentally annexin A1 and annexin A2 in the serum of calves affected by *Pasteurella multocida* pneumonia. **METHODS:** In this research, 10 male calves (2 - 4 months) were allocated to two equal groups, one group as the case: 300 ml in dilution 2×10^9 CFU *Pasteurella multocida* bacteria and the other as control group: 300 ml normal saline inoculated by special lavage catheter through oral to trachea. Clinical scores were recorded based on available tables. In treatment group, about 18 to 24 hours after inoculation and synchronous with observation clinical signs changes, bronchoalveolar lavage for cytology and bacteriology examination were done of fluids results from washing. Blood sampling was taken from calves jugular vein in both groups then blood serums were examined by using ELISA kits. **RESULTS:** The rates of annexin A1 and annexin A2 in blood serum of treatment group showed significant increase (using independent t test) compared to control group ($p<0.05$). **CONCLUSIONS:** It seems these annexins (annexin A1 and annexin A2) can be used as important biomarkers in blood serum to diagnose inflammation processes such as pneumonia.

Keyword: annexin, pneumonia, *Pasteurella multocida*, calves

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Clinical scores in experimental calves.

Table 2. Clinical scores in control calves.

Table 3. Hematological parameters in experimental group (N = 5) before and after inoculation of Pasteurella multicida.

Table 4. Hematological parameters in controll group (N = 5) before and after inoculation of NaCl solution.

Table 5. Distribution of BAL fluid cells in experimental and control groups.

Table 6. Comparison of serum Annexin A1 and A2 in experimental and control groups.

***Corresponding author's email: ma.doosti@yahoo.com, Tel: 021-66923510, Fax: 021-66933222**