نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران؛ ۱۳۹۹؛ ۱۴(۱): ۳-۱۱.

ارتباط بین پلی‌مورفیسم ژن بتا دیفنسین و تغییرات پروتئین‌های فاز حاد و لوکوگرام در گاوهای شیری مبتلا به اندومتریت بالینی

زهرا گروهی[۱]، حسن شریفی یزدی[۲*]، عبدالله میرزایی[۳]، سعید نظیفی[۲]، ابوالفضل حاجی بمانی[۴]

۱. دانشجوی دکترای تخصصی کلینیکال پاتولوژی، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز- ایران.
۲. استاد، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز- ایران.
۳. دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز- ایران.
۴. استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز- ایران.

دریافت: ۱۹ اسفندماه ۹۷ **پذیرش:** ۳۰ شهریورماه ۹۸

چکیده

بتا دیفنسین تولید شده در رحم، نقش مهمی در ایمنی ذاتی رحم گاو برای پاکسازی عفونت، رفع التهاب و کمک به جمع شدن طبیعی اندومتر پس از زایش دارد. این مطالعه به منظور بررسی تأثیر پلی‌مورفیسم ژن *بتا دیفنسین* بر تغییرات فاکتورهای مختلفی همچون پروتئین‌های فاز حاد و لوکوگرام پیش و پس از درمان در گاوهای شیری مبتلا به اندومتریت صورت گرفت. تعداد ۵۱ رأس گاو شیری مبتلا به اندومتریت بالینی در زمان انجام تست پاکیزگی رحم (۳۰ تا ۴۰ روز پس از زایش) انتخاب شدند. پس از تأیید اندومتریت بالینی، گاوها به دنبال اقدامات درمانی، مجدداً دو هفته بعد ارزیابی بالینی شدند. در هر دو زمان نمونه‌گیری شامل خون کامل (حاوی ماده ضد انعقاد) و خون بدون ماده ضد انعقاد به منظور جداسازی سرم، انجام شد. آزمایش‌های مربوط و همچنین ژنوتایپینگ گاوها بر اساس ژن *بتا دیفنسین* به روش PCR RFLP انجام گرفت، در نتیجه موتاسیون نقطه‌ای C به T در ناحیه ۲۲۳۹ ژن مورد نظر سه ژنوتیپ متفاوت CC، CT و TT مشاهده شد. با مقایسه تغییرات سرم آمیلوئید آ (قبل و پس از درمان) بر اساس حضور آلل T در ژن *β-defensin* مشاهده شد که پس از درمان، گاوهای دارای آلل T در مقایسه با گاوهای فاقد آلل T، افزایش سرم آمیلوئید آ را بیشتر نشان دادند، که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود (P=۰/۰۴). در مورد تغییرات سایر فاکتورهای هماتولوژیک، اختلاف آماری معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها و آلل‌های مختلف مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: اندومتریت، بتادیفنسین، پلی‌مورفیسم، پروتئین‌فازحاد، لوکوگرام.

مقدمه

دیفنسین به عنوان مولکولی کوچک، کاتیونی و با خاصیت ضد میکروبی گسترده علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی، قارچ‌ها و برخی ویروس‌ها، از مهم‌ترین پپتیدهای ضد میکروبی است. به طور طبیعی این مولکول‌ها در سلول‌های فاگوسیت کننده به‌ویژه نوتروفیل، سلول‌های اپیتلیال غشای مخاطی و پوست قرار دارند و نقش‌های مختلفی برای آن‌ها بیان شده است (۴ و ۷). خانواده دیفنسین در پستانداران به سه گروه شامل تحت گروه آلفا، بتا و تتا طبقه‌بندی می‌شود (۳و۶). بتا دیفنسین برای اولین بار در سال ۱۹۹۱ از سلول‌های اپیتلیال گاو جدا شد. دستگاه تناسلی جنس ماده جایگاه مهمی در تولید بتا دیفنسین است. در مطالعات پیشین نقش محافظتی این مولکول‌ها در برابر عفونت‌هایی که بر باروری اثر گذارند، مشخص شده است (۸). همچنین افزایش بیان ژن‌های *دیفنسین* و پاسخ فاز حاد برای مقابله با عفونت در رحم گاوهای پس از زایش گزارش شده است و این مولکول‌ها واسطه‌های کلیدی مهم ایمنی ذاتی برای پاکسازی عفونت، رفع التهاب و کمک به جمع شدن نرمال اندومتر هستند (۵). به دلیل نقش‌های متعدد یافت شده، به دیفنسین‌ها «پپتیدهای دفاعی میزبان» نیز اطلاق می‌شود (۸ و ۶).

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: sharifiy@shirazu.ac.ir

رحم ارگانی منحصر به فرد از جهت پاسخ به آسیب‌ها و واکنش‌های شدید فیزیولوژیک و پاتولوژیک از طریق مجموعه‌ی پیچیده‌ای از واکنش‌های سلولی و مولکولی است (۵). دفاع اولیه اندومتریوم علیه میکروب‌ها وابسته به سیستم ایمنی ذاتی است که این سیستم در بردارنده اعمال غیر اکتسابی و اجزای مختلف شامل سدهای فیزیکی، اجزای سلولی مقیم، پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs) و پاسخ‌های التهابی یا القایی از قبیل پروتئین‌های فاز حاد (APPs) است (۷).

پروتئین‌های فاز حاد از جمله هاپتوگلوبین و سرم آمیلوئید A دفاع غیر اختصاصی علیه میکروب‌ها ایجاد می‌کنند. این پروتئین‌ها معمولاً توسط کبد تولید می‌شوند، اما به صورت موضعی و تحت کنترل استروئیدهای جنسی در مجاری تناسلی نیز بیان می‌شوند. در اوایل دوره پس از زایمان فعال شدن بسیاری از مسیرهای ایمنی و پروتئین‌های فاز حاد مشخص شده است (۱۰). پروتئین‌های فاز حاد به همراه پپتیدهای ضد میکروبی واسطه‌های کلیدی ایمنی ذاتی - برای پاکسازی عفونت و التهاب که لازمه بازسازی نرمال اندومتریوم است- هستند، مثلا سرم آمیلوئید آ به طور عمده توسط کبد تولید می‌شود، اما در گاو توسط بافت‌های خارج کبدی از جمله اندومتریوم نیز، در حالت سلامت و التهاب تولید می‌شود (۵).

گلبول‌های سفید چند هسته‌ای اولین سلول‌های شرکت‌کننده در التهاب هستند که به میزان زیاد در خون یافت می‌شوند. پیام‌های التهابی، سلول‌های پایه‌ای خون‌ساز در مغز استخوان را فعال می‌کنند تا مونوسیت‌ها را تولید کنند. سلول‌های التهابی در اثر جاذبه شیمیایی به سمت محل التهاب مهاجرت می‌کنند. واسطه‌های کلیدی در پاسخ التهابی، نوتروفیل‌ها هستند که سبب فعال شدن سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن، برای فعال کردن لنفوسیت‌های T می‌شوند؛ همچنین نوتروفیل‌ها، واسطه‌های موضعی را به منظور فراخواندن مونوسیت‌ها و سلول‌های دندرتیک آزاد می‌کنند. بسیاری از فرآیندهای تولید مثلی طبیعی، نشانه‌هایی از التهاب را نشان می‌دهند که از جمله می‌توان به تخمک‌گذاری، لانه‌گزینی و زایمان اشاره کرد (۲ و ۱۱).

با توجه به آن که بیماری‌های تولید مثلی مسأله مهمی در بسیاری از گونه‌های پستانداران است، کسب اطلاعات دقیق‌تر از نقش سیستم ایمنی در حفاظت دستگاه تولید مثل در برابر عفونت‌ها و پاکسازی رحمی منجر به برنامه-ریزی بهتر و کاهش هزینه‌های بی‌شمار ناشی از درمان، کاهش باروری و حذف و جایگزینی به دلیل عفونت‌های رحمی می‌شود (۱۰ و ۱۴). برخی مطالعات پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی ژن‌های بتا دیفنسین را در گاو بررسی کرده‌اند. نشان داده شده است که ژن‌های بتا دیفنسین پلی‌مورفیسم بالایی را در توالی انسان و گاو ارئه می‌دهند و تعیین ژنوتیپ‌های مختلف گاو شیری بر اساس ژن *بتا دیفنسین*، می‌تواند به عنوان ابزار و شاخصه‌ای مهم در باروری و تولید مثل گاو، به منظور پیشبرد برنامه‌های اصلاح نژاد گاو، در آینده به کار رود (۱۳). تا به امروز نقش این پلی‌مورفیسم‌ها در ایمنی سیستم تولید مثلی جنس ماده علیه عفونت‌ها تا حد زیادی نادیده گرفته شده است.

بر اساس مطالعات قبلی می‌توان از پلی‌مورفیسم موجود در *بتا دیفنسین* در برنامه‌های اصلاح نژاد گاو به منظور افزایش بهره‌وری و تولید گاوهای مقاوم به عفونت‌ها از جمله ورم پستان بهره برد؛ اما اطلاعات کافی در خصوص ارتباط بین پلی‌مورفیسم ژن تولید کننده *بتا دیفنسین* و پاسخ پروتئین‌های فاز حاد اصلی و لکوگرام در روند بهبودی به دنبال اندومتریت بالینی در گاو شیری در دسترس نیست (۳).

مواد و روش کار

تعداد ۵۱ رأس گاو شیری مبتلا به اندومتریت بالینی در یکی از گاوداری‌های شیری صنعتی در اطراف شیراز در زمان انجام تست پاکیزگی رحم پس از زایش (۳۰ تا ۴۰ روز پس از زایش) انتخاب شدند. پس از تأیید اندومتریت بالینی و نیز بر اساس میزان وجود چرک در ترشحات درجه‌بندی (۰ تا ۳) انجام شد (۱ و ۹). گاوها به دنبال دریافت اقدامات درمانی معمول در گاوداری (درمان موضعی با آنتی‌بیوتیک به صورت تزریق داخل رحمی) مجدداً دو هفته بعد از معاینه اول و اقدامات درمانی، در مرحله دوم، مورد ارزیابی بالینی قرار گرفتند. نتیجه درمان

با بررسی درصد بهبود بالینی (عدم وجود ترشح چرکی مهبلی در معاینه مجدد که ۱۴ روز پس از درمان یا معاینه اول بود) و معاینه تولیدمثلی از طریق رکتوم با دستگاه سونوگرافی (CTS-900V, SIUI, China) انجام و نتیجه درمان ارزیابی شد. نمونه‌گیری شامل خون کامل، حاوی ماده ضد انعقاد EDTA و خون بدون ماده ضد انعقاد به منظور جداسازی سرم به دنبال سانتریفیوژ در دور ۲۷۵۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دو زمان مختلف (تشخیص اولیه اندومتریت و دو هفته بعد از اقدامات درمانی) بود. بخشی از نمونه خون کامل پس از انجام آزمایش‌های معمول هماتولوژیک و تهیه گسترش خونی به منظور شمارش تفریقی سلول‌های خونی با رنگ‌آمیزی گیمسا، به منظور استخراج DNA به فریزر ۲۰- انتقال داده شد. سرم‌ها (به دلیل محدودیت کیت الیزا، ۴۰ نمونه از هر زمان، مجموعاً ۸۰ نمونه سرم) به منظور ارزیابی و سنجش تغییرات پروتئین‌های فاز حاد (هاپتوگلوبین و سرم آمیلویید A) استفاده شدند، همچنین ژنوتایپینگ گاوها بر اساس ژن بتا دیفنسین به روش RFLP PCR انجام گرفت و ارتباط بین پلی‌مورفیسم ژنی و تغییرات فاکتورهای مختلف، پیش و پس از درمان در گاوهای مورد مطالعه، بررسی گردید. به منظور کاهش عوامل مداخله کننده، گاوهای انتخاب شده از شرایط محیطی، آب و هوایی، مدیریتی و نژادی یکسان بهره‌مند بودند. گاوها سه بار در روز با ماشین شیردوشی، دوشیده می‌شدند. تنها گاوهایی برای مطالعه انتخاب شدند که فاقد سخت‌زایی و بیماری‌های پیرامون زایمان (جفت ماندگی، جابجایی شیردان، هیپوکلسمی بالینی و کتوز) بودند. برای تعیین اندومتریت بالینی، بررسی ترشحات واژنی انجام شد. ترشحات حاوی موکوس با رگه‌های چرک، موکوسی_چرکی و چرک زیاد (بیش از ۵۰ درصد) به عنوان اندومتریت بالینی در نظر گرفته شد. (۹).

آزمایش‌های هماتولوژیک شامل اندازه‌گیری فاکتورهای مختلف خونی با دستگاه شمارش‌گر سلول اتوماتیک (Exigo, Stockholm, Sweden) انجام شد.

مراحل استخراج DNA از خون کامل (حاوی ضد انعقاد) در اتاق مخصوص استخراج در آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی شیراز انجام گرفت. پس از خروج نمونه‌ها از فریزر ۲۰- و ذوب در دمای محیط، هر نمونه به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس و حدود ۲۰۰μl از هر یک به میکروتیوب استریل ۱/۵ml منتقل شد. با کیت مخصوص استخراج DNA (*PrimePrep*™) شرکت (*GeNet* Bio) کشور کره جنوبی و بر اساس دستورالعمل کیت، استخراج انجام گرفت.

به منظور تکثیر ناحیه دارای پلی‌مورفیسم ژن *بتا دیفنسین* گاو، از پرایمرهای اختصاصی F و R بر اساس پیشنهاد Bagnicka و همکاران در سال ۲۰۰۷ استفاده شد (۳). سفارش ساخت از طریق شرکت تحقیقاتی ژن فناوران انجام شد. پرایمرهای اختصاصی استفاده شده در این مطالعه دارای طول ۲۰bp بوده و محصول نهایی PCR با استفاده از این پرایمر دارای طول ۳۹۳bp است. ترادف پرایمر F، 5′TGGCAGGAAGGAGGATGTAG3′ و پرایمر R، 5′ACGGCACAAGAACGGAATAC3′ است. غلظت پرایمر برای انجام PCR ۰/۴μM بود که بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده تهیه شد. پرایمر F قطعه اینترون بین نوکلئوتیدهای ۲۱۰۰ و ۲۱۱۹ را پوشش می‌دهد (بر اساس شماره دسترسی در بانک ژن AF008307)، در حالی که ناحیه قرارگیری پرایمر R مطابق توالی فوق، اگزون ۲ بین نوکلئوتیدهای ۲۴۷۳ و ۲۴۹۲ است.

پس از استخراج و خالص‌سازی DNA مرحله بعد انجام واکنش PCR به منظور تکثیر ترادف مورد هدف بود، به این منظور ابتدا حجم مورد نیاز از هر یک از اجزا مخلوط PCR برای حجم نهایی ۳۰μl محاسبه شد (Master mix 2x: ۱۵μl؛ پرایمر Forward: ۱/۲μl؛ پرایمر : ۱/۲μl؛ آب مقطر: ۸/۶μl؛ DNA: ۴μl). مخلوط اصلی در کنار یخ و شرایط استریل آماده شد، سپس در میکروتیوب‌های استریل مخصوص PCR به میزان ۴μl به ازای هر نمونه DNA به مخلوط اضافه گردید و واکنش PCR با حجم ۳۰μl آماده شد. برای انجام سیکل‌های مختلف، برنامه حرارتی PCR مربوط (واسرشت سازی اولیه: ۹۴^oC- ۵ دقیقه؛ واسرشت سازی: ۹۴^oC- ۱ دقیقه؛ الحاق: ۵۷^oC- ۴۵ ثانیه؛ گسترش: ۷۲^oC- ۴۵ ثانیه؛ گسترش نهایی: ۷۲^oC- ۵ دقیقه) به دستگاه ترموسایکلر Bio RAD (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) داده شد، سپس با افزودن یک قطره روغن معدنی، در میکروتیوب‌ها محکم بسته شد و نمونه‌ها در دستگاه ترمو

سایکلر قرار گرفت.

پس از اتمام سیکل‌های PCR، حضور و وزن مولکولی محصول به دست آمده از طریق الکتروفورز محصولات در ژل آگارز ۱/۵ درصد رنگ شده با رنگ Red Safe (Intron Biotechnology, Korea) و تحت تابش نور ماورابنفش دستگاه ترانس ایلومیناتور، بررسی شد.

به منظور بررسی پلی‌مورفیسم مورد مطالعه (C به T در ناحیه ۲۲۳۹ توالی ژن بتا دیفنسین)، محصولات PCR با طول ۳۹۳*bp*، با آنزیم اندونوکلئاز (*Hin*1II) *Nla*III هضم شد. پروسه هضم آنزیمی به این صورت است که در صورت تبدیل C به T (موتاسیون نقطه‌ای) در ناحیه مذکور با توالی 5′CATG3′، آنزیم برش‌گر یادشده قادر به تشخیص و برش این ناحیه می‌گردد؛ بنابراین در گاوهای با ژنوتیپ TT (هموزیگوت موتاسیون یافته)، توالی ۳۹۳ جفت بازی ژن بتا دیفنسین به دنبال هضم آنزیمی به دو قطعه ۲۵۳ و ۱۴۰ جفت بازی تبدیل می‌شود؛ این در حالی است که محصول PCR براساس توالی ژن در گاوهای با ژنوتیپ CC (هموزیگوت موتاسیون نیافته) دست نخورده و بدون هضم با وزن مولکولی ۳۹۳ باقی می‌ماند. از سویی دیگر محصول PCR در گاوهای با ژنوتیپ CT (هتروزیگوت) به دنبال هضم آنزیمی به سه قطعه ۳۹۳، ۲۵۳ و ۱۴۰ جفت بازی تبدیل می‌شود (جدول ۱).

جدول ۱- ویژگی‌های توالی هضم آنزیم (*Hin*1II) *Nla*III و سایز قطعات حاصل از هضم

موقعیت هضم آنزیم *Nla*III	سایز قطعه حاصل از هضم آنزیم در سه ژنوتیپ مختلف گاو		
	TT	CT	CC
5′-CATG-3′ 3′-GTAC-5′		۳۹۳	۳۹۳
	۲۵۳	۲۵۳	
	۱۴۰	۱۴۰	

خط زیر حرف نشان‌دهنده موقعیت موتاسیون است.

پروسه هضم آنزیمی طبق پروتکل آنزیم *Nla*III (*Hin*1II) و با استفاده از بافر مخصوص RFLP PCR انجام شد. محصول RFLP PCR روی ژل ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید.

به منظور اندازه‌گیری پروتئین‌های فاز حاد در سرم قبل و پس از درمان گاوها، از کیت‌های الایزای هاپتوگلوبین و سرم‌آمیلوئید آ گاوی (شرکت Bioassay Technology Laboratory) استفاده شد. سرم‌ها ابتدا سانترفیوژ گردید و پس از هم‌دما شدن کیت و سرم با دمای اتاق، بلافاصله طبق دستورالعمل کیت مقادیر پروتئین‌های مذکور بر اساس روش ساندویچ الایزا و با دستگاه الایزا ریدر سنجیده شدند. لازم به ذکر است با توجه به محدودیت کیت الیزا برای سنجش پرتئین‌های فاز حاد تعداد ۴۱ حیوان در دو زمان سنجش انجام شد.

با نرم‌افزار آماری SPSS (SPSS for Windows, Version 22, SPSS Inc., Chicago, Illinois) نتایج تجزیه و تحلیل شدند. فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌های مختلف *β-defensin* در گاوهای مبتلا به اندومتریت بالینی، بر اساس تغییرات فاکتورهایی از جمله سرم آمیلوئید آ و هاپتوگلوبین به صورت تعداد و درصد گزارش شد.

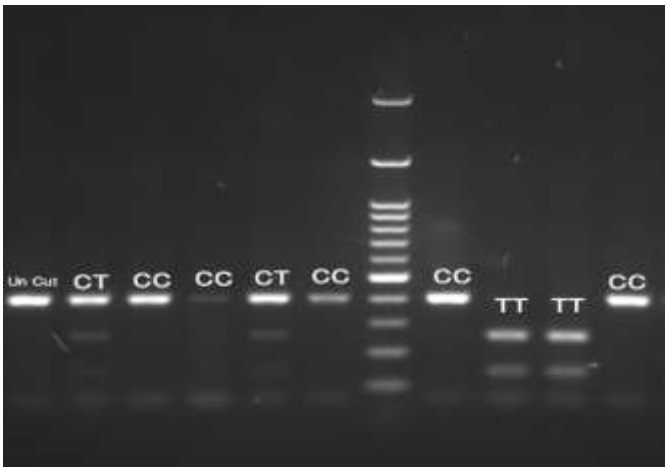
میزان شاخص‌های هماتولوژیک و پروتئین‌های فاز حاد (هاپتوگلوبین و سرم آمیلوئید آ) خون گاوهای بهبود یافته و بهبود نیافته از اندومتریت پس از درمان به صورت میانگین ± خطای معیار محاسبه گردید.

برای مقایسه نحوه‌ی تغییرات فاکتورهای هماتولوژیک و پروتئین‌های فاز حاد (سرم آمیلوئید آ و هاپتوگلوبین) با ژنوتیپ‌ها و آلل‌های مختلف از آزمون مربع کای استفاده شد. برای همه آزمون‌ها و مقایسه‌ها سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

در ابتدا با روش PCR ناحیه مورد نظر از ژن *β-defensin* در همه نمونه‌ها به صورت موفقیت‌آمیز تکثیر و محصولی با طول مشخص ۳۹۳ جفت بازی تولید شد. پس از اطمینان از تولید محصول PCR که دارای وزن مولکولی مورد نظر بود، در مرحله بعد با روش RFLP-PCR و هضم

آنزیمی توسط آنزیم (*Hin*1II) *Nla*III، بر اساس موتاسیون نقطه‌ای C به T در ناحیه ۲۲۳۹ ژن مورد نظر سه الگوی متفاوت CC، CT و TT در نمونه‌های هضم آنزیمی مشاهده شد؛ بنابراین همان‌گونه که در شکل ۱ مشخص است، در گاوهای با ژنوتیپ TT (هموزیگوت موتاسیون یافته)، محصول ۳۹۳ جفت بازی ژن *بتا دیفنسین* به دنبال هضم آنزیمی به دو قطعه ۲۵۳ و ۱۴۰ جفت بازی تبدیل شد؛ این در حالی است که محصول PCR در گاوهای با ژنوتیپ CC (هموزیگوت موتاسیون نیافته) دست نخورده و بدون هضم با وزن مولکولی ۳۹۳ جفت باز، باقی ماند. از سویی دیگر محصول PCR در گاوهای با ژنوتیپ CT (هتروزیگوت) به دنبال هضم آنزیمی به سه قطعه ۳۹۳، ۲۵۳ و ۱۴۰ جفت بازی تبدیل شد.



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن *بتا دیفنسین* با وزن مولکولی ۳۹۳ جفت باز، قبل از هضم آنزیمی توسط آنزیم *Nla*III (*Hin*1II) (چاهک Un Cut) و الگوهای متفاوت الکتروفورز محصولات به دست آمده از ژنوتیپ‌های مختلف ژن *بتا دیفنسین* (CC, CT, TT) در مقایسه با مارکر ۱۰۰ جفت بازی پس از هضم آنزیمی توسط آنزیم *Nla*III (*Hin*1II)

با مقایسه تغییرات سرم آمیلوئید آ (قبل و پس از درمان) بر اساس حضور آلل T در ژن *β-defensin* در گاوهای مبتلا به اندومتریت مشاهده شد که بین گاوهای دارای آلل T و گاوهای فاقد آلل T اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد (*P*=۰/۰۴)؛ به این صورت که گاوهای دارای آلل T افزایش سرم آمیلوئید آ را نسبت به کاهش آن پس از درمان، به ترتیب با فراوانی ۷۲/۷۳ درصد و ۲۷/۲۷ درصد، بیشتر نشان دادند، در حالی که در مورد گاوهای فاقد آلل T افزایش و کاهش سرم آمیلوئید آ به ترتیب ۳۶/۶۷ درصد و ۶۳/۳۳ درصد بود (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه تغییرات سرم آمیلوئید آ (قبل و پس از درمان) بر اساس حضور آلل T در ژن *β-defensin* در گاوهای مبتلا به اندومتریت بالینی

تغییرات سرم آمیلوئید آ	دارای آلل T (TT,CT)	بدون آلل T (CC)
تعداد افزایش (درصد)	۸ (۷۲/۷۳) [a]	۱۱ (۳۶/۶۷) [b]
تعداد کاهش (درصد)	۳ (۲۷/۲۷) [a]	۱۹ (۶۳/۳۳) [b]
تعداد کل (درصد)*	۱۱ (۱۰۰)	۳۰ (۱۰۰)

حروف لاتین نامتشابه (a,b) نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در هر ردیف است (*P*=۰/۰۴)-Chi Square test

* با توجه به محدودیت کیت الیزا تعداد ۴۱ حیوان برای سنجش تغییرات سرم آمیلوئید آ بر اساس دو بار نمونه‌گیری مورد استفاده قرار گرفت.

اختلاف آماری معنی‌داری بین تغییرات هاپتوگلوبین با ژنوتیپ‌ها (P=۰/۶۸۷) و نیز آلل‌های (P=۰/۶۱۳) مختلف ژن *β-defensin* وجود نداشت، همچنین افزایش WBC در گاوهای دارای آلل T با فراوانی ۶۹/۲۳ درصد و در گاوهای فاقد آلل T افزایش و کاهش WBC با فراوانی برابر ۵۰ درصد مشاهده شد که اختلاف آماری معنی‌داری در ارتباط با این فاکتور با ژنوتیپ‌ها (P=۰/۳۰۹) و نیز آلل‌های (P=۰/۱۹۰) مختلف ژن *β-defensin* دیده نشد (جدول ۳ و ۴). در مورد سایر فاکتورهای هماتولوژیک شامل؛ لنفوسیت، مونوسیت، ائوزینوفیل، باند، هموگلوبین، هماتوکریت، گلبول قرمز، MCV، MCH، MCHC، RDW، پلاکت و MPV نیز اختلاف آماری معنی‌داری بین تغییرات این فاکتورها با ژنوتیپ‌ها و آلل‌های مختلف ژن *β-defensin* مشاهده نشد.

جدول ۳- مقایسه تغییرات WBC در ژنوتیپ های مختلف گاو بر اساس ژن *β-defensin* قبل و پس از درمان

تغییرات WBC	CC	CT	TT
تعداد افزایش (درصد)	۱۹ (۵۰)	۷ (۷۵)	۲ (۱۰۰)
تعداد کاهش (درصد)	۱۹ (۵۰)	۴ (۲۵)	۰ (۰)
تعداد کل (درصد)	۳۸ (۱۰۰)	۱۱ (۱۰۰)	۲ (۱۰۰)

Chi Square test-(P=۰/۳۰۹)

جدول ۴- مقایسه تغییرات WBC در ژنوتیپ‌های مختلف گاو بر اساس حضور آلل T در ژن *β-defensin* قبل و پس از درمان

تغییرات WBC	دارای آلل T (TT,CT)	بدون آلل T (CC)
تعداد افزایش (درصد)	۹ (۶۹/۲۳)	۱۹ (۵۰/۰۰)
تعداد کاهش (درصد)	۴ (۳۰/۷۷)	۱۹ (۵۰/۰۰)
تعداد کل (درصد)	۱۳ (۱۰۰)	۳۸ (۱۰۰)

Chi Square test-(P=۰/۱۹۰)

بحث

عفونت میکروبی دستگاه تناسلی جنس ماده دلیل مهمی برای بیماری و ناباروری در پستانداران ازجمله گاو است. دفاع اولیه اندومتریوم علیه میکروب‌ها به سیستم ایمنی ذاتی شامل گیرنده‌های TLR، پپتیدهای ضد میکروبی از جمله دیفنسین‌ها و پروتئین‌های فاز حاد وابسته است.

تلاش ما در این مطالعه بر این بود که ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های مختلف *بتا دیفنسین* نوتروفیلی گاو و تغییرات پروتئین‌های فاز حاد (هاپتوگلوبین و سرم آمیلویید A) و لوکوگرام قبل و پس از درمان در گاو شیری مبتلا به اندومتریت به منظور شناسایی ژنوتیپ ارجح، بررسی کنیم. بر اساس مطالعات قبلی، به نظر می‌رسد این ژن‌ها به عنوان شاخص‌های حساسیت و مقاومت بیماری‌های عفونی مختلف حائز اهمیت هستند (۴). در پژوهش حاضر موتاسیون C→T در موقعیت اینترونی ۲۲۳۹ مطالعه و بررسی شد که این جابجایی یک محل برش و هضم اندونوکلئاز جدید را به وجود می‌آورد. از این رو بر اساس این پلی‌مورفیسم موجود در ژن بتا دیفنسین نوتروفیلی گاو، با روش RFLP PCR و آنزیم اندونوکلئاز (*Hin*1II) *Nla*III تعیین ژنوتیپ گاوها انجام شد (۳). گفته شده، موتاسیون در ژن‌های *بتا دیفنسین* اهداف تولیدی و عملکردی، ظرفیت تولید مثلی و مقاومت در برابر بیماری‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در حقیقت، پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) ابزارهای انتخابی خیلی مفیدی به منظور بهبود اهداف اصلاح نژادی هستند (۱۳). گزارش‌های متعددی در خصوص پلی‌مورفیسم‌های ژن *بتا دیفنسین* و استعداد ابتلا به بیماری‌های مختلف وجود دارد، از جمله می‌توان به دیابت، کارسینوماهای مختلف، بیماری کرون، درماتیت،

بیماری‌های عفونی از جمله HIV و بسیاری دیگر در انسان اشاره کرد (۴)، همچنین ارتباطی بین پلی‌مورفیسم ژن *بتا دیفنسین* و باروری کمتر در انسان گزارش شده است (۱۶)، به علاوه ارتباطاتی بین پلی‌مورفیسم‌های بتا دیفنسین و ایمنی ذاتی در خوک و گوسفند نشان داده شده است (۱۵و ۱۷). لازم به ذکر است که چنین پژوهش‌هایی در حیوانات مزرعه همچنان یک قدم عقب‌تر از مطالعات در انسان یا حیوانات آزمایشگاهی قرار دارند.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که گاوهای دارای آلل T افزایش سرم آمیلوئید آ را بیشتر از گاوهای فاقد آلل T پس از درمان نشان دادند، در حالی که روند کاهشی سرم آمیلوئید آ به دنبال درمان در گاوهای دارای آلل T کمتر از گاوهای فاقد آلل T بود که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود (P=۰/۰۴). این نتایج می‌تواند حاکی از آن باشد که گاوهای دارای آلل T پاسخ فاز حاد بهتری را نسبت به گاوهای فاقد آلل T نشان دهند و شاید بتوان گفت موتاسیون نقطه‌ای C به T و در نتیجه حضور آلل T از نظر پاسخ فاز حاد و افزایش پروتئین فاز حاد (سرم آمیلوئید آ) دارای ارجحیت باشد، همچنین اگرچه تغییرات گلبول‌های سفید خون در گاوهای دارای آلل T در مقایسه با گاوهای فاقد آلل T از نظر آماری معنی‌دار نبود (P=۰/۱۹۰)، اما روند افزایشی شمارش گلبول‌های سفید خون (به عنوان یک سد دفاعی غیر اختصاصی) در گاوهای دارای آلل T با فراوانی ۶۹/۲۳ درصد بیشتر از روند کاهشی آن (۳۰/۷۷ درصد) طی زمان‌های نمونه‌گیری همراه بود، اما در گاوهای فاقد آلل T روند افزایشی و کاهشی گلبول‌های دفاعی خون با فراوانی برابری (۵۰ درصد) تأمل‌برانگیز بود. این نتایج نشان می‌دهد مغز استخوان گاوهای دارای آلل T در پاسخ جبران‌پذیری به عفونت رخ داده در اندومتر، در مجموع پاسخ جبران‌پذیری مناسب‌تری را دارد و شاید دلیل عدم معنی‌داری در این مطالعه، حضور کمتر آلل T به دلیل حذف‌های ژنتیکی و یا اصولاً ابتلای کمتر این گاوها به اندومتریت بوده است. در مطالعات دیگر، پژوهشگران ارتباط قوی بین دیفنسین‌های نوتروفیلی و اندومتریت را نشان داده‌اند و این ارتباط نزدیک بیان‌گر این است که دیفنسین‌های نوتروفیلی اجزای مهم دفاع میزبان علیه عفونت‌های بالارونده لگن هستند. علاوه بر این، دیفنسین‌های نوتروفیلی انسان می‌توانند تولید IL_8 را نیز القا کنند. IL_8 یک جاذب شیمیایی نوتروفیلی قوی است و موجب افزایش فراخوانی نوتروفیل‌ها به محل عفونت می‌شود، همچنین نشان داده شد که سطوح دیفنسین‌های نوتروفیلی واژنی در زنان مبتلا به اندومتریت افزایش یافته است (۱۹).

با توجه به نقش‌های متعدد بیولوژیکی پپتیدهای ضد میکروبی بتا دیفنسین در پاسخ ایمنی، شناسایی و بررسی موتاسیون‌های تک نوکلئوتیدی مختلف در ژن کد کننده این پپتید می‌تواند به درک بیشتر و بهتر به منظور به‌گزینی ژنتیکی حیوانات کمک کند. در نهایت بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر شاید بتوان گفت ژنوتیپ برتر به منظور انتخاب حیوانات با پاسخ‌های التهابی و دفاعی مناسب‌تر برای مبارزه با عفونت رحمی، ژنوتیپ‌های حاوی آلل T (TT و CT) هستند؛ هرچند مطالعات تجربی وسیع‌تری با استفاده از جمعیت بیشتری از گاوها در دامداری‌های مناطق مختلف آب و هوایی، به منظور درک بهتر نقش دقیق موتاسیون‌های شناسایی شده در پپتیدهای ضد میکروبی، مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

هزینه این پژوهش از محل اعتبارات معاونت پژوهشی دانشگاه شیراز تأمین شده‌است که بدین‌وسیله نویسندگان مراتب قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

منابع

1- Ahmadi, M; Tafti, A.K; Nazifi, S.and Ghaisari, H; The comparative evaluation of uterine and cervical mucosa cytology with endometrial histopathology in cows. Comp Clin Path; 2005; 14:90-94.

2- Aloé, S; Weber, F; Behr, B; Sauter-Louis, C. and Zerbe, H; Modulatory effects of bovine seminal plasma on uterine inflammatory processes. Reprod Domest Anim; 2012; 47(1):12-19.

3- Bagnicka, E; Strzałkowska, N; Flisikowski, K; Szreder, T; Jóźwik, A; Prusak, B; Krzyżewski, J. and Zwierzchowski, L; The polymorphism in the β4-defensin gene and its association with production and somatic cell count in Holstein-Friesian cows. J Anim Breed Genet; 2007; 124(3):150-156.

4- Bagnicka, E; Strzalkowska, N; Józwik, A; Krzyzewski, J; Horbanczuk, J. and Zwierzchowski, L; Expression and polymorphism of defensins in farm animals. Acta Biochim Pol; 2010; 57(4):487-497.

5- Chapwanya, A; Meade, K. G; Foley, C; Narciandi, F; Evans, A. C; Doherty, M. L; Callanan, J.J. and O'Farrelly, C; The postpartum endometrial inflammatory response: a normal physiological event with potential implications for bovine fertility. Reprod Fertil Dev; 2012; 24(8):1028-1039.

6- Choi, M.K; Le, M.T; Nguyen, D.T; Choi, H; Kim, W; Kim, J.H; Chun, J; Hyeon, J; Seo, K. and Park, C; Genome-level identification, gene expression, and comparative analysis of porcine ss-defensin genes. BMC Genet; 2012; 13(1):1-10.

7- Davies, D; Meade, K.G; Herath, S; Eckersall, P.D; Gonzalez, D; White, J.O; Conlan, R.S; O'Farrelly C. and Sheldon, I. M; Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium. Reprod Biol Endocrinol; 2008; 6:53.

8- Dorin, J.R; McHugh, B.J; Cox, S.L. and Davidson, D.J; Mammalian Antimicrobial Peptides; Defensins and Cathelicidins; Molecular Medical Microbiology; 2nd Ed.; Elsevier; 2015; pp:539-565.

9- Dubuc, J; Duffield, T; Leslie, K; Walton, J. and LeBlanc, S; Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. J Dairy Sci; 2010; 93(11):5225-5233.

10- Foley, C; Chapwanya, A; Creevey, C.J; Narciandi, F; Morris, D; Kenny, E.M; Cormican, P; Callanan, J.J; O'Farrelly, C. and Meade, K.G; Global endometrial transcriptomic profiling: transient immune activation precedes tissue proliferation and repair in healthy beef cows. BMC genomics; 2012; 13:489.

11- Katila, T; Post-mating inflammatory responses of the uterus. Reprod Domest Anim; 2012; 47:31-41.

12- Monteleone, G; Calascibetta, D; Scaturro, M; Galluzzo, P; Palmeri, M; Riggio, V. and Portolano, B; Polymorphisms of beta-defensin genes in Valle del Belice dairy sheep. Mol Biol Rep; 2011; 38(8):5405-5412.

13- Narciandi, F; Lloyd, A.T; Chapwanya, A; Cliona, O.F. and Meade, K.G; Reproductive tissue-specific expression profiling and genetic variation across a 19 gene bovine beta-defensin cluster. Immunogenetics; 2011; 63(10):641-651.

14- Narciandi, F; Lloyd, A; Meade, K.G; O'Farrelly, C; A novel subclass of bovine beta-defensins links reproduction and immunology. Reprod Fertil Dev; 2013; 26(6):769-777.

15- Pruthviraj, D.R; Usha, A.P. and Venkatachalapathy, R.T; Identification

16- of a Novel Single Nucleotide Polymorphism in Porcine Beta-Defensin-1 Gene. Asian-Australas J Anim Sci; 2016; 29(3):315-320.

17- Tollner, T.L; Venners, S.A; Hollox, E.J; Yudin, A.I; Liu, X; Tang, G; Xing, H; Kays, R.J; Lau, T. and Overstreet, J.W; A common mutation in the defensin DEFB126 causes impaired sperm function and subfertility. Sci Transl Med; 2011; 3(92):92-115.

18- Tolone, M; Mastrangelo, S; Di Gerlando, R; Sutera, A.M; Monteleone, G; Sardina, M.T. and Portolano, B; Association study between β-defensin gene polymorphisms and mastitis resistance in Valle del Belice dairy sheep breed. Small Rumin Res; 2016; 136:18-21.

19- Wiesenfeld, H.C; Heine, R.P; Krohn, M.A; Hillier, S.L; Amortegui, A.A; Nicolazzo, M. and Sweet, R.L; Association between elevated neutrophil defensin levels and endometritis. J Infect Dis; 2002;186 (6):792-797.

Vol.14/No.1
Spring-Summer 2020

Iran. J. Vet. Clin. Sci.; 2020; 14(1): 3-11.

Association between *beta defensin* gene polymorphism and alterations in acute phase proteins and leukogram in dairy cows with endometritis

Goroohi, Z.[1]; Sharifiyazdi, H.[2*]; Mirzaei, A.[3]; Nazifi, S.[2]; Hajibemani A.[4]

1. PhD student, Department of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz- Iran.
2. Professor, Department of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz- Iran.
3. Associate Professor, Department of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz- Iran.
4. Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz- Iran.

Received: 9 March 2019 ***Accepted:*** 21 September 2019

Summary

Uterine beta defensin plays an important role in innate immunity of dairy cows' in order to clear the infection and resolve the inflammation and helps for a normal uterine involution after calving. This study was conducted to investigate the effect of different beta defensin genotypes on acute phase proteins and leukogram alterations pre and post-treatment in dairy cows with endometritis, in order to identify the best genotype. Fifty one Iranian dairy Holstein cows with clinical endometritis were chosen at cleaning test time (30-40 days after parturition). Cows were taken usual herd treatment and examined again two next weeks. Blood samples including whole blood (containing anticoagulant) and blood without anticoagulant (in order to separate serum) were taken from cows with clinical endometritis at both times (n=102). Hematological tests and genotyping with PCR-RFLP (on the basis of *beta defensin* gene) were done. Based on a SNP (C/T) at position 2239, three different genotype patterns CC, CT and TT were observed. Alterations of serum amyloid A (SAA) concentrations before and after treatment were significantly different between cows with and without Allele T (P=0.04). Cows with Allele T significantly showed increased SAA concentrations compare to cows without Allele T. Other factors showed no significant differences between different genotypes.

***Keywords*:** Endometritis, Beta defensin, Polymorphism, Acute phase protein, Leukogram.

* Corresponding Author E-mail:sharifiy@shirazu.ac.ir