بسم الله الرحمن الرحيم

١٠٩٠٨٩

۸۷/۱/۱۰۶۶۱۳
۸۷/۱۲/۲۱

دانشگاه ارومیه

دانشکده دامپزشکی

سال تحصیلی : ۱۳۸۷-۱۳۸۶ شماره پایان نامه : ۳٤-۱

پایان‌نامه :

جهت اخذ درجه دکتری تخصصی دامپزشکی در رشته مامایی و بیماریهای تولید مثل دام

عنوان :

تغییرات پروتئینهای فاز حاد در شیر و سرم گاوهای مبتلا به ورم پستان باکتریایی

نگارنده :

۱۳۸۷/۱۲/۲۱

افشین دواساز تبریزی

دکتر روزعلی باتوانی استاد راهنمای اول و رئیس هیئت داوران (دانشیار)

دکتر سیامک عصری رضایی استاد راهنمای دوم (استادیار)

دکتر ملاحت احمدی استاد مشاور (استادیار)

دکتر محمد حسن خادم انصاری (دانشیار)

دکتر مهدی وجگانی (دانشیار)

دکتر سیدمرتضی علوی شوشتری (دانشیار)

دکتر سیدمهدی رضوی روحانی (استاد)

۱۰۹۰۸۹

تقدیم به پدر

مظهر شجاعت، صلابت و صداقت

تقدیم به مادر

مظهر نجابت، محبت و عصمت

تقدیم به خواهرانم

آنان که مایه دلگرمی و شادی کانون خانواده هستند.

تقدیر و تشکر از :

جناب آقای دکتر روزعلی باتوانی

که از چشمه دانش ایشان بهره بردم و با سعه صدر بنده را در به ثمر رساندن این پایان‌نامه یاری فرمودند.

جناب آقای دکتر سیامک عصری رضایی

که از هیچ کمکی در انجام پایان‌نامه دریغ نفرمودند و همواره با رویی گشاده یاریگر بنده بودند.

سرکار خانم دکتر احمدی

که در امر مشاوره پایان‌نامه مرا یاری فرمودند و محبت‌های ایشان را هیچگاه فراموش نخواهم کرد.

تقدیر و تشکر از :

جناب آقای دکتر سیدمرتضی علوی شوشتری

که سالهاست از محضر علم و ادب ایشان بهره‌مندم و قلم را یارای بیان منزلت ایشان نیست.

جناب آقای دکتر سید مهدی رضوی روحانی

که بر من منت نهاده و با قبول زحمت داوری پایان‌نامه مایه افتخار بنده گردیدند.

جناب آقای دکتر محمدحسن خادم انصاری

که قبول زحمت فرموده داوری پایان‌نامه را پذیرفتند و آشنایی با ایشان را لطف الهی می‌دانم.

جناب آقای دکتر مهدی وجگانی

که از نشریات علمی ایشان بهره فراوان برده‌ام و از بابت داوری پایان‌نامه اینجانب توسط ایشان برخود می‌بالم.

با تقدیر و تشکر از :

جناب آقای دکتر تاجیک ریاست محترم دانشکده دامپزشکی
جناب آقای دکتر عزیزی معاونت محترم آموزشی دانشکده دامپزشکی
جناب آقای دکتر فرشید معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی
جناب آقای دکتر جوادی سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده دامپزشکی
کلیه کادر محترم و دلسوز دانشکده دامپزشکی

با تشکر و سپاس از دوستان دوران تحصیل در دورهٔ دکترای تخصصی، دکتر محمدی، دکتر صفوی، دکتر زارع، دکتر نجاتی، دکتر اقبالی، دکتر آبشناس، دکتر طباطبایی و دکتر دستمالچی و سایر عزیزان که لطف و محبت آنها همیشه در یاد من باقی خواهد ماند.

با تشکر از دوست و همکار گرامی آقای فرهاد فرهنگ پژوه که در طول انجام کارهای عملی پایان‌نامه همواره یاور من بودند.

با تشکر از آقایان سیدرضی بهاورنیا و ابراهیم شرقی همکاران محترم اینجانب در دانشگاه آزاد اسلامی تبریز

و با تشکر ویژه از سرکار خانم عبدی مسئول تایپ نگین سبز که با صبر و بردباری زحمات فراوانی در مورد تایپ و آماده‌سازی پایان‌نامه تقبل فرمودند.

فهرست مطالب

فصل اول : مقدمه	۳
فصل دوم : کلیات	۵
پاسخ مرحله حاد	۵
پروتئین‌های مرحله حاد	۵
اعمال زیستی پاسخ مرحله حاد	۷
تأثیر استرس بر پاسخ مرحله حاد	۸
اهمیت پروتئین‌های مرحله حاد در دامپزشکی	۸
فیبرینوژن	۹
ماهیت فیبرینوژن	۹
اعمال زیستی فیبرینوژن	۹
سرولوپلاسمین	۱۰
ماهیت سرولوپلاسمین	۱۰
اعمال زیستی سرولوپلاسمین	۱۰
فاکتورهای موثر بر غلظت سرولوپلاسمین سرم	۱۱
آلبومین	۱۲
ماهیت آلبومین	۱۲
اعمال زیستی آلبومین	۱۳
فاکتورهای موثر بر غلظت آلبومین سرم	۱۳
کاربرد پروتئین‌های مرحله حاد در تشخیص وضعیت سلامت دامهای اهلی بزرگ	۱٤
پروتئینهای شیر	۱٤
۱- کازئینها :	۱٤
۲- پروتئینهای محلول در سرم شیر	۱٤
β - لاکتوگلوبولین	۱۵
α - لاکتالبومین	۱۵
سرم آلبومین	۱٦
ایمونوگلوبولینها	۱٦
پروتئوز پپتون	۱٦

لاکتوفرین	۱۶
کاربرد سرم آمیلوئید A و هاپتوگلوبین در تشخیص ورم پستان گاو	۱۶
ورم پستان	۱۸
انواع ورم پستان	۱۸
شاخصهای تشخیص ورم پستان	۱۹
تعداد سلولهای سوماتیک شیر	۲۰
آزمایش ورم پستان کالیفرنیایی (CMT)	۲۲
تغییر میزان آنزیم‌های شیر	۲۳
NAGase	۲۳
ارزیابی سنجش دیگر آنزیم‌های شیر در تشخیص ورم پستان	۲۵
پلاسمینوژن	۲۵
لاکتوز	۲۵
جریان الکتریکی شیر	۲۶
آدنوزین تری فسفات	۲۷
پروتئین‌های مرحله حاد	۲۸
فصل سوم : روش کار و مواد مورد نیاز	**۳۰**
روش تهیه نمونه‌های خون وشیر	۳۰
روش اندازه‌گیری فیبرینوژن	۳۲
روش اندازه‌گیری سرولوپلاسمین	۳۲
مواد و وسایل موردنیاز	۳۳
روش تهیه پارافنیلن دی آمین	۳۳
روش کار	۳۴
مواد و لوازم مورد نیاز جهت الکتروفورز پروتئینهای پلاسما و سرم شیر	۳۴
لوازم مورد نیاز	۳۵
مواد و محلولها	۳۵
روش کار	۳۵
روش اندازه‌گیری هماتوکریت	۳۶
تعیین میزان گلبولهای سفید	۳۷
بررسی مورفولوژیک و تشخیص تفریقی گلبولهای سفید	۳۷

روش جداسازی باکتریهای پاتوژن ۳۸
آزمونهای افتراقی ۳۸
۱- تست O -F (Oxidative - Fermentative) ۳۸
۲- تست کاتالاز ۳۸
۳- تست کواگولاز ۳۹
٤- کشت در محیط بایل- اسکولین آگار (Bile Esculin Agar) ۳۹
٥- تست CAMP ۳۹
٦- کشت در محیطهای قندی مایع (Carbohydrate broth) ٤۰
۷- کشت در محیط شیر تورنسل دار ٤۰
آزمونهای افتراقی مورد استفاده بر روی باکتریهای گرم منفی ٤۱
۱-محیط کشت TSI ٤۱
۲-محیط کشت SIM ٤۱
۳- محیط کشت سیمون سیترات ٤۱
٤- محیط کشت اوره مایع ٤۲
٥- محیط کشت MR-VP ٤۲
روش آنالیز آماری ٤۲

فصل چهارم : نتایج ٤۳
۱- گروههای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی ٤۷
۲- گروههای مبتلا به ورم پستان بالینی ٤۸
فصل پنجم : بحث ٤۹
فصل ششم : منابع ٥۷
ضمائم
خلاصه انگلیسی

فهرست جداول و نمودارها

جدول ۱- مقایسه میانگین فیبرینوژن و سرولوپلاسمین پلاسما و تعداد سلولهای سوماتیک در گروههای مختلف ٦٨

جدول ۲- مقایسه میانگین میزان تعداد گلبولهای سفید و هماتوکریت در گروههای مختلف ٦٩

جدول ۳- مقایسه میانگین میزان انواع لکوسیتها در گروههای مختلف ۷۰

جدول ٤- مقایسه میانگین میزان باندهای پروتئینی پلاسما در گروههای مختلف ۷۱

جدول ٥- مقایسه میانگین میزان فیبرینوژن شیر در گروه‌های تحت مطالعه و کارتیه‌های سالم سمت مقابل مربوط به هر گروه ۷۲

جدول ٦- مقایسه میانگین میزان سروپلاسمین شیر در گروههای تحت مطالعه و کارتیه‌های سالم سمت مقابل مربوط به هر گروه ۷۳

جدول ۷- مقایسه میانگین میزان آلبومین شیر در گروه‌های تحت مطالعه و کارتیه‌های سالم سمت مقابل مربوط به هر گروه ۷٤

جدول ۸- مقایسه میانگین میزان بتالاکتوگلوبولین شیر در گروههای تحت مطالعه و کارتیه‌های سالم سمت مقابل مربوط به هر گروه ۷٥

جدول ۹- مقایسه میانگین میزان آلفالاکتالبومین شیر در گروههای تحت مطالعه و کارتیه‌های سالم سمت مقابل مربوط به هر گروه ۷٦

جدول ۱۰- مقایسه میانگین مجموع آلفا و بتاگلوبولین شیر در گروه‌های تحت مطالعه و کارتیه‌های سالم سمت مقابل مربوط به هر گروه ۷۷

جدول ۱۱- مقایسه میانگین میزان گاما گلوبولین شیر در گروههای تحت مطالعه و کارتیه‌های سالم سمت مقابل مربوط به هر گروه ۷۸

جدول ۱۲- مقایسه میانگین میزان کل پروتئین سرم شیر در گروههای تحت مطالعه و کارتیه‌های سالم سمت مقابل مربوط به هر گروه ۷۹

جدول شماره ۱۳- ضرایب همبستگی بین پروتئینهای مرحله حاد پلاسما و شیر در گروههای مبتلا به ورم پستان ۸۰

جدول شماره ۱٤- ارزیابی تشخیصی پروتئینهای مرحله حاد پلاسما و شیر در گروه تحت بالینی CMT دو مثبت بر حسب درصد ۸۱

جدول شماره ۱۵- ارزیابی تشخیصی پروتئینهای مرحله حاد پلاسما و شیر در گروه تحت بـالینی CMT سه مثبت بر حسب درصد ۸۱
جدول شماره ۱٦- ارزیابی تشخیصی پروتئینهای مرحله حاد پلاسما و شیر در گروه بالینی تحت حـاد بـر حسب درصد ۸۲
جدول شماره ۱۷- ارزیابی تشخیصی پروتئینهای مرحله حاد پلاسما و شیر در گروه بالینی حاد بر حسب درصد ۸۲
جدول شماره ۱۸- مقایسه میانگین فیبرینوژن و سرولوپلاسمین در پلاسـما و شـیر گـاوان مبـتلا بـه ورم پستان تحت بالینی در ارتباط با نتایج عمده کشت باکتریایی(Mean ± SD) ۸۳
جدول شماره ۱۹- مقایسه میانگین فیبرینوژن و سرولوپلاسمین در پلاسـما و شـیر گـاوان مبـتلا بـه ورم پستان بالینی در ارتباط با نتایج عمده کشت باکتریایی(Mean ± SD) ۸٤
جدول شماره ۲۰- نتایج کشت باکتریایی موارد ورم پستان تحت بالینی ۸۵
جدول شماره ۲۱ - نتایج کشت باکتریایی موارد ورم پستان بالینی ۸٦

نمودار شماره ۱ : نمونه اسکن پروتئینهای سرم گـــروه شاهد ۸۷
نمودار شماره ۲ : نمونه اسکن پروتئینـهای سرم گروه تحـت بالـینی CMT دو مثبت ۸۷
نمودار شماره ۳ : نمونه اسکن پروتئینهای سرم گروه تحت بالینیCMT سه مثبت ۸۸
نمودار شماره ٤ : نمونه اسکن پروتئینهای سرم گروه بالینی تحت حاد ۸۸
نمودار شماره ۵ : نمـونه اسکن پروتئینهای سـرم گروه بالینی حاد ۸۹
نمودار شماره ٦ : نمونه اسکـن پروتئینهای سـرم شیر گـروه شاهد ۹۰
نمودار شماره ۷ : نمونه اسکن پروتئینهای سرم شیر گروه تحت بالینی CMT دو مثبت ۹۰
نمودار شماره ۸ : نمونه اسکن پروتئینهای سرم شیر گروه تحت بالینی CMT سه مثبت ۹۱
نمودار شماره ۹ : نمونه اسکن پروتئینهای سرم شیر گروه بالینی تحت حاد ۹۱
نمودار شماره ۱۰ : نمونه اسکن پروتئینهای سرم شیر گروه بالینی حاد ۹۲

خلاصه فارسی

تغییرات پروتئینهای فاز حاد در شیر و سرم گاوهای مبتلا به ورم پستان باکتریایی

شماره پایان‌نامه : ۳٤-۱

سال تحصیلی ۸۷-۸٦

نگارنده : افشین دواساز تبریزی

پتانسیل استفاده از پروتئینهای فاز حاد به منظور ارزیابی سلامتی غدد پستانی با اندازه‌گیری فیبرینوژن و سرولوپلاسمین در خون و شیر گاوهای شیری مبتلا به درجات مختلف ورم پستان انجام گردید. به منظور انجام این تحقیق نمونه خون و شیر از ۱۲۵ رأس گاو متعلق به دو گاوداری بزرگ صنعتی واقع در اطراف تبریز جمع‌آوری شد. گاوهای مورد مطالعه همگی از نژاد هولشتاین بوده در دوره شیرواری بسر می‌بردند و سه مرتبه در روز مورد دوشش قرار می‌گرفتند. هیچ یک از گاوها در زمان نمونه‌گیری آبستنی بالا نداشته یا تازه‌زا نبودند. گاوهای مورد مطالعه به دیگر بیماریهای التهابی یا انگلهای خونی آلوده نبودند و از لحاظ بالینی و آزمایشگاهی مورد معاینه کامل قرار گرفتند. تغذیه این گاوها شامل سیلوی ذرت،کنسانتره و یونجه بود. در این مطالعه ۵ گروه گاو مورد بررسی قرار گرفت که تعداد در هر گروه ۲۵ رأس در نظر گرفته شد. این گروه‌ها شامل گروه شاهد با تست ورم پستان کالیفرنیایی منفی و کشت منفی، گروه تحت بالینی با CMT دو مثبت، گروه تحت بالینی با CMT سه مثبت ، گروه بالینی تحت حاد و گروه بالینی حاد بود. ضمناً از کارتیه‌های سالم سمت مقابل در تمام گروهها نمونه برداری و آزمایش انجام شد تا بعنوان کنترل داخل حیوانی محسوب گردند. اعمالی که در مورد نمونه‌های شیر انجام شد شامل کشت باکتریایی، شمارش سلولهای سوماتیک توسط دستگاه شمارشگر خودکار و اندازه‌گیری پروتئینهای فاز حاد در سرم شیر بود. از ورید وداج تمام گاوها نمونه خون با استفاده از لوله خلاءدار اخذ گردید. نتایج این تحقیق نشان داد تعداد سلولهای سوماتیک در تمام گروههای مبتلا با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار داشت($P< ۰/۰۱$).

میزان فیبرینوژن خون در هر چهار گروه مبتلا با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار داشت و در بین گروههای مبتلا گروه بالینی حاد با سایر گروههای مبتلا تفاوت واضح داشت ($P< ۰/۰۱$).

در مورد سرولوپلاسمین خون دو گروه مبتلا به ورم پستان تحت بالینی تفاوت واضحی با گروه شاهد نداشتند($P> ۰/۰۵$) ولی هر دو گروه بالینی با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند ($P<۰/۰۵$). تعداد کل گلبولهای سفید خون فقط در مورد گروه بالینی حاد با گروه شاهد تفاوت نشان داد($P< ۰/۰۵$).

بررسی میزان انواع گلبولهای سفید نشان داد که در مورد لنفوسیت و نوتروفیل دو گروه تحت بالینی دو مثبت و بالینی حاد و در مورد ائوزینوفیل فقط گروه بالینی حاد با گروه شاهد تفاوت معنی‌دار نشان دادند (P< ۰/۰۵). در مورد مونوسیت بغیر از گروه بالینی تحت حاد سایر گروه ها با گروه شاهد اختلاف واضح داشتند(P< ۰/۰۵).

نتایج حاصل از الکتروفورز پروتئین های خون به روش ژل آگاروز نشان داد میزان آلبومین علیرغم کاهش نسبی در تمام گروههای مبتلا اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد نشان نداد(P>۰/۰۵).در باند آلفا- یک گروه تحت بالینی دو مثبت و در باند آلفا- دو هر دو گروه بالینی تفاوت واضح با گروه شاهد داشتند (P< ۰/۰۵).

باند بتا – یک در گروه بالینی حاد و باند گاما- یک در مورد گروه تحت بالینی سه مثبت با گروه شاهد اختلاف واضح نشان دادند(P< ۰/۰۵). در باند بتا – دو و گاما- دو تفاوتی بین گروههای مبتلا و شاهد دیده نشد. نتایج الکتروفورز سرم شیر به روش ژل آگارز نشان داد میزان آلبومین بغیر از گروه تحت بالینی دو مثبت تفاوت بسیار واضح با گروه کنترل نشان داد(P<۰/۰۱). در حالیکه میزان بتالاکتوگلوبولین و آلفالاکتالبومین هیچ تفاوتی با گروه شاهد نشان ندادند(P>۰/۰۵) .

میزان مجموع آلفا و بتاگلوبولین در دو گروه مبتلا به ورم پستان بالینی اختلاف بسیار معنی‌دار با گروه کنترل نشان دادولی در دو گروه تحت بالینی این تفاوت واضح نبود(P> ۰/۰۵). در ضمن میزان گاماگلوبولین‌ها در تمام گروههای مبتلا با گروه شاهد اختلاف بسیار معنی‌دار داشت(P<۰/۰۱).

نتایج ارزیابی تشخیصی پروتئینهای مرحله حاد در پلاسما و شیر نشان داد در میزان پلاسما فیبرینوژن (بجز حالت بالینی حاد) و سرولوپلاسمین نمی‌تواند در تشخیص ورم پستان کاربرد عملی و مؤثر داشته باشد ولی فیبرینوژن و سرولوپلاسمین شیر در هر دو حالت تحت بالینی و بالینی بعنوان شاخصهای هشدار دهنده در تشخیص ورم پستان برای پیشگیری از خسارات این بیماری، در صنعت پرورش گاو شیری قابل توصیه می‌باشند.

فصل اول : مقدمه

ورم پستان به التهاب غده پستانی بدون توجه به علت آن اطلاق و با تغییرات فیزیکی، شیمیایی و معمولاً میکروبی شیر و همچنین تغییرات حاصل از بیماری در بافت غده پستانی مشخص می‌شود. این بیماری بخصوص در گاوهای شیری حائز اهمیت است. یکی از انواع ورم پستان، نوع تحت بالینی است که تشخیص به موقع آن به دو دلیل عمده دارای اهمیت اقتصادی می‌باشد:

۱- مشکل بودن تشخیص این بیماری زیرا در این نوع ورم پستان، وضع ظاهری شیر سالم و عادی (در شیر لخته وجود ندارد) به نظر می‌رسد در دام نیز هیچگونه علائم بیماری (تب، کاهش مصرف غذا، تورم و درد پستان) به صورت ظاهری دیده نمی‌شود.

۲- کاهش کمیت و کیفیت شیر و گسترش بیماری در بین گاوها

ورم پستان تحت بالینی باعث کاهش کمیت و کیفیت شیر می‌شود و خطر انتقال بیماری به گاوهای سالم نیز وجود دارد که عدم تشخیص به موقع این بیماری منجر به اپیدمی وسیع بیماری در گله و افزایش هزینه درمانی نیز می‌شود، بطوری که در بسیاری از گله‌های گاوهای شیری از هر ۱۰۰ راس، ۳۰ تا ٤٠ راس گاو مبتلا به بیماری ورم پستان تحت بالینی می‌باشد. در مقابل تشخیص ورم پستان بالینی مشکل نیست و گرچه شیوع آن کمتر از نوع تحت بالینی می‌باشد به هر حال خسارات اقتصادی آن نیز قابل توجه است.

سلولهای سوماتیک شامل گلبول‌های سفید و سلولهای اپی تلیال شیر و افزایش آنها در شیر بیانگر التهاب غدد پستانی است، بنابراین، از شمارش این سلول‌ها می توان به عنوان آزمایش غربالگری تشخیص ورم پستان استفاده کرد. اما تشخیص تغییرات تعداد سلولهای سوماتیک نیازمند انتقال سریع نمونه شیر به آزمایشگاه میباشد چرا که روش‌های سنجش سلولهای سوماتیک به گونه‌ای نیست که بتوان در محل نمونه‌گیری از آن‌ها استفاده کرد. در مقابل تست ورم پستان کالیفرنیایی[1] (CMT) به خوبی با انجام در محل گاوداری سازگاری دارد و درجه‌ای از ابتلا یا عدم ابتلا را معلوم می‌سازد که معمولاً با تعداد سلولهای سوماتیک شیر همبستگی دارد (Radostits et al., ۲۰۰۷).

با وجود بیش از ۳۰ سال تحقیق در مورد ورم پستان از تغییر تعداد سلولهای سوماتیک در تشخیص مبتلایان به ورم پستان تحت بالینی تجربی و عملی استفاده می‌شود.

1- California mastitis test

پاسخ مرحله حاد به وسیله ترکیباتی پروتئینی که سیتوکین نامیده می‌شوند بوجود می‌آیند این سیتوکین‌ها به عنوان پیام‌آور بین موضع آسیب دیده و سلولهای کبدی تولید کننده پروتئین‌های مرحله حاد عمل می‌کنند. غلظت سرمی سیتوکین‌ها طی چند ساعت پس از تحریک افزایش یافته و معمولاً پس از ساعات کوتاهی از گردش خون پاک می‌شوند. طی پاسخ مرحله حاد غلظت سرمی پروتئین‌های مرحله حاد بطور قابل توجهی تغییر می‌کند.

۲٤ تا ٤۸ ساعت پس از آغاز تحریک، غلظت پروتئین‌های مرحله حاد در سرم به طور مشخص به حداکثر میزان خود می‌رسد و همزمان با بهبود عفونت کاهش می‌یابند.

به دلیل نیمه عمر نسبتاً کوتاه سرمی پروتئین‌های مرحله حاد و پاسخ قابل ملاحظه مرحله حاد در حیوانات بیمار اندازه‌گیری پروتئین‌های مرحله حاد شاخص قابل اعتمادی برای پی بردن به پاسخ سیستمیک بدن نسبت به عامل ایجاد کننده می‌باشد. پروتئین‌های مرحله حاد سرم متعاقب التهاب، عفونت یا وارد شدن ضربه تغییرات قابل توجهی پیدا می‌کنند(Petersen et al., ۲۰۰٤).

با در نظر گرفتن این نکته که بررسی‌های دهه اخیر نشان داده است که تعیین غلظت پروتئین‌های مرحله حاد سرم یا پلاسما می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در تشخیص، پیش‌آگهی و روند بیماری بدهد [و نیز اینکه امروزه سنجش پروتئینهای مرحله حاد از آزمایش‌های مهم مورد بحث تشخیص بیماریهای مختلف در دنیا به شمار می‌رود] این تحقیق بر آن است تا تغییرات غلظت پروتئینهای مرحله حاد پلاسما و شیر (فیبرینوژن ، سرولوپلاسمین و آلبومین) را در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی و بالینی بررسی نماید.

تحقیق حاضر به منظور رسیدن به اهداف زیر انجام گرفته است:

۱- اندازه‌گیری غلظت بعضی از پروتئینهای فاز حاد درخون و شیر در گاوان مبتلا به ورم پستان تحت بالینی و بالینی

۲- تعیین ارتباط تغییرات غلظت پروتئینهای فاز حاد خون و شیر در گاوان مبتلا به ورم پستان تحت بالینی و بالینی

۳- تعیین تغییرات باندهای پروتئینی در سرم و شیر گاوان مبتلا به ورم پستان بالینی و تحت بالینی

٤- ارزیابی کارایی تشخیصی پروتئینهای فاز حاد در خون و شیر به عنوان وسیله ای برای تشخیص اشکال مختلف ورم پستان و عوامل باکتریایی مولد آن

فصل دوم : کلیات

پاسخ مرحله حاد

پاسخ مرحله حاد به وسیله هورمونهای پروتئینی که سیتوکین نامیده می‌شوند بوجود می‌آید. این سیتوکین‌ها به عنوان پیام‌آور بین موضع آسیب دیده و سلولهای کبدی تولید کننده پروتئینهای مرحله حاد عمل می‌کنند. بیشتر سیتوکین‌ها دارای منابع، اهداف و اعمال چندگانه می‌باشند و در گونه‌های حیوانی زیادی (پستانداران، پرندگان، ماهی‌ها، ستاره دریایی و خزندگان) وجود دارند(Murata et al., ۲۰۰٤).

مونوسیت‌هایی که به وسیله سموم باکتریها و یا در پاسخ به آسیب موضعی بافت فعال شده‌اند، سیتوکین های پیش التهابی (اینترلوکین یک، اینترلوکین شش و تومور نکروزیز فاکتور آلفا) را تولید می‌کنند. این سیتوکین‌ها به صورت چندگانه با هم از طریق راههای مشترک بر سلولهای اطراف محل آسیب دیده تاثیر موضعی و از طریق گردش خون بر ارگانهای هدف مختلف تاثیر سیستمیک می‌گذارند. غلظت سرمی سیتوکین‌ها در خلال چند ساعت پس از تحریک افزایش و معمولاً پس از ساعات کوتاهی از گردش خون پاک می‌شوند. با توجه به تاثیر سیتوکین‌های پیش التهابی بر پروتئینهای مرحله حاد، سیتوکین ها به دودسته تقسیم می‌شوند:

۱- سیتوکین‌های نوع اینترلوکین یک (اینترلوکین یک و عامل نکروز دهنده تومور)

۲- سیتوکین‌های نوع اینترلوکین شش این سیتوکین‌ها از طریق گیرنده‌های مختلفی که بر روی غشاء سلولهای کبدی قرار دارند، عمل می‌کنند(Hulten et al., ۲۰۰۲). سیتوکین های نوع اینترلوکین یک، پیام اولیه خود تحریک کننده‌ای بیرون می‌فرستد که پیام ثانویه سیتوکین که همان سیتوکین‌های نوع شش می‌باشد را از سلولهای مختلف آزاد می‌سازند. به نظر می‌رسد که سیتوکین‌های نوع اینترلوکین شش بر تولید سیتوکینهای نوع اینترلوکین یک تاثیر بازخوردی منفی دارند(Petersen et al., ۲۰۰٤).

پروتئین‌های مرحله حاد

طی پاسخ مرحله حاد، غلظت سرمی پروتئینهای مرحله حاد بطور قابل توجهی تغییر می‌کند. پروتئینهای مرحله حاد همگی به وسیله سلولهای کبدی تولید می‌شوند، اما غلظت آنها در خون متفاوت می‌باشد. پروتئینهای مرحله حاد به دو دسته تقسیم می‌شوند:

۱- پروتئینهای مرحله حاد مثبت که در خلال مرحله حاد غلظت سرمی اینها افزایش می‌یابد و شامل هاپتوگلوبین، سرم آمیلوئید A، پروتئین واکنش دهنده C فیبرینوژن، سرولوپلاسمین و ... می‌باشد(Horadagoda et al., ۱۹۹۹).

۲- پروتئینهای مرحله حاد منفی که در خلال مرحله حاد میزان آنها کاهش می‌یابد مانند آلبومین.در التهاب معمولاً پاسخ هاپتوگلوبین نسبت به سرم آمیلوئید A و پروتئین واکنش دهنده C حساسیت کمتری دارد بطوری که افزایش هاپتوگلوبین نسبت به میزان پایه، کمتر از سرم آمیلوئید A و پروتئین واکنش دهنده C می‌باشد. اغلب میزان طبیعی سرم آمیلوئید A و پروتئین واکنش دهنده C در مرز غیرقابل اندازه‌گیری قرار دارد به همین دلیل علی‌رغم افزایش غلظت سرم آمیلوئید A و پروتئین واکنش دهنده C در حین واکنش مرحله حاد، نسبت به هاپتوگلوبین و دیگر پروتئینهای مرحله حاد که غلظت طبیعی آنها زیاد است، اهمیت کمتری دارند. به جز یافته‌هایی که در مورد غلظت آلبومین سرم وجود دارد و بیانگر کاهش ۱۰ تا ۳۰ درصدی آلبومین در همه پستانداران می‌باشد، در دیگر موارد نحوه واکنش مرحله حاد مختص گونه می‌باشد (Hulten et al., ۲۰۰۲).

برخی از نویسندگان پروتئین‌های مرحله حاد را به دو گروه شامل نوع یک و نوع دو تقسیم می‌کنند.پروتئین‌های مرحله حاد نوع یک به وسیله اینترلوکین یک (و نیز به وسیله عامل نکروز دهنده آلفا) و پروتئین‌های مرحله حاد تیپ دو به وسیله اینترلوکین شش و سیتوکین های نوع شش بوجود می‌آیند.

غلظت اولین گروه پروتئین‌های مرحله حاد پاسخ دهنده سریع در سرم (مانند سرم آمیلوئید A و پروتئین واکنش دهنده C) طی چهار ساعت افزایش می‌یابد(Eckersall et al., ۲۰۰۱).

این پروتئین‌ها ابتدا به وسیله سیتوکینهای نوع یک بوجود می‌آیند و این خصوصیت را دارند که بعد از تحریک التهابی غلظت آنها در سرم افزایش قابل توجه داشته باشد و سپس غلظت سرمی آنها سریع به میزان اولیه برگردد.

دومین گروه پروتئین‌های مرحله حاد (مانند هاپتوگلوبین در اکثر گونه‌ها) بطور اولیه به وسیله سیتوکین‌های نوع اینترلوکین شش بوجود می‌آیند و این خصوصیت را دارند که افزایش غلظت آنها در سرم با تاخیر انجام شود، اما افزایش غلظت آنها به مدت دو هفته باقی خواهد ماند. پاسخ مرحله حاد چندین روز پس از تحریک قابل تشخیص می‌باشد، اما میزان پاسخ به گونه حیوان و وسعت آسیب بافتی بستگی دارد(Eckersall, ۱۹۹۵).

۲٤ تا ٤٨ ساعت پس از آغاز تحریک، غلظت پروتئین‌های مرحله حاد در سرم به طور مشخص به حداکثر میزان خود می‌رسد و همزمان با بهبود عفونت، کاهش پروتئین‌های مرحله حاد دیده می‌شود معمولاً اگر تحریکات بعدی اتفاق نیفتد، تنظیمات بازخوردی، پاسخ مرحله حاد را چهار تا هفت روز پس از تحریک اولیه محدود خواهد کرد.

التهاب مزمن (به عنوان مثال آرتریت) می‌تواند به صورت گروه‌های محرک‌های التهابی متوالی و جداگانه مشاهده شود و معمولاً در برخی موارد منجر به افزایش غلظت پروتئین‌های مرحله حاد در سرم خواهد شد. اما افزایش غلظت آنها نسبت به ضایعات مهم التهابی یا عفونت کمتر می‌باشد. همچنین شاخص هایی وجود دارد که پاسخ مرحله حاد یک پروتئین را با پروتئین دیگر در خلال التهاب مزمن و حاد مقایسه می‌کند(Gruys et al., ۱۹۹٤).

اعمال زیستی پاسخ مرحله حاد

به نظر می‌رسد که واکنش مرحله حاد بخشی از پاسخ دفاعی عمومی بدن به آسیب بافتی باشد که منجر به تب نیز می‌شود(Hirvonen, ۲۰۰۰). احتمالاً تعدادی از پروتئینهای مرحله حاد عمومی (آنهایی که پروتئین مرحله حاد اغلب گونه‌ها می‌باشند) مستقیماً در دفاع میزبان شرکت می‌کنند. به عنوان مثال هاپتوگلوبین به هموگلوبین آزاد شده از گلبولهای قرمز آسیب دیده متصل می‌شود و همراه با هموپکسین و ترانسفرین در کاهش تاثیرات آهن آزاد بر بدن و محدود کردن دسترسی آهن آزاد بر بدن و محدود کردن فراهم بودن آهن برای باکتریهای مهاجم کمک می‌کند(Lee et al., ۲۰۰۳).

پروتئین واکنش دهنده C به باکتریهای آزاد یا DNA میزبان متصل می‌شود. برای دیگر پروتئین‌های مرحله حاد غالب مانند آمیلوئید A سرم تا کنون فعالیت بیولوژی قاطعی گزارش نشده است.

اخیراً گزارش شده که برخی از پروتئین‌های مرحله حاد عمومی در تولید سیتوکین‌های پیش التهابی (که تنظیم آن‌ها جزئی می‌باشد) و فعالیت سلولهای مونوسیتی که پتانسیل مکانیسم بازخوردی دارند، شرکت می‌کنند(Hamann et al., ۱۹۹۷).

ارتباط ژنتیکی بین بیان بیشتر MHC کلاس یک در سلولهای کبدی با تزریق لیپوپلی ساکاریدی ثابت شده است و بعنوان شاخص برای امکان ارتباط بین ایمنی ذاتی و اکتسابی در نظر گرفته شده است(Gruys et al., ۲۰۰۵).

تأثیر استرس بر پاسخ مرحله حاد

معلوم شده که در خوک درجه حرارت بدن تحت تاثیر استرس قرار دارد (Molennar et al., ۱۹۸۸). اما به دلیل مشکل بودن تشخیص تاثیر استرس از تاثیر آسیب یا عفونت تحت بالینی، در مورد تاثیر استرس بر غلظت سرمی پروتئین مرحله حاد اختلاف نظر وجود دارد.

به دنبال تجویز هورمون آدرنوکورتیکوتروپین یا پردنیزولون غلظت سرمی پروتئین واکنش دهنده c افزایش می‌یابد. استرس چهار ساعت سرما، گرما و حمل و نقل بر غلظت هاپتوگلوبین در سرم خوک تاثیر ندارد(Hicks et al., ۱۹۹۸). خونگیری روزانه از سیاهرگ وداج خوک به مدت ۵ روز نشان داده که بین غلظت هاپتوگلوبین سرم در روزهای مختلف اختلاف کمی وجود دارد.

در صورتی که کف محل نگهداری گاو لغزنده باشد، استرس حاصل از این وضعیت بستر بر روی غلظت هاپتوگلوبین پلاسما تاثیر ندارد اما باعث افزایش غلظت سرم آمیلوئید A در پلاسما می‌شود استرس حمل و نقل بر روی پاسخ مرحله حاد گاوهای مبتلا به آسیب خفیف تاثیر ندارد(Ganheim et al., ۲۰۰۳). گوساله‌های پرواری که تحت تاثیر استرس حمل و نقل (۱۴۰۰ کیلومتر در بیش از دو روز) قرار گرفته‌اند، افزایش غلظت هاپتوگلوبین سرم را نشان می‌دهند و یک روز پس از حمل و نقل افزایش بیشتری در غلظت هاپتوگلوبین سرم مشاهده می‌شود (Eckersall et al., ۱۹۹۵).

اهمیت پروتئین‌های مرحله حاد در دامپزشکی

پروتئین‌های مرحله حاد می‌توانند در بررسی و مدیریت سلامت حیوان کاربرد داشته باشند. اخیراً کاربرد پروتئین‌های مرحله حاد مورد توجه فراوان قرار گرفته است (Petersen et al., ۲۰۰٤). به دلیل نیمه عمر نسبتاً کوتاه پروتئین‌های مرحله حاد سرم و پاسخ شدید مرحله حاد در حیوانات بیمار، اندازه‌گیری پروتئین‌های مرحله حاد، شاخص قابل اعتمادی برای پاسخ سیستمیک بدن به شروع تحریک در زمان نمونه‌گیری می‌باشد (Eckersall et al., ۱۹۹۵). اندازه‌گیری پروتئین‌های مرحله حاد نیز، همچون اندازه‌گیری درجه حرارت بدن جهت تشخیص قطعی بیماری مناسب نمی‌باشد، اما می‌تواند اطلاعات ارزشمندی درباره وسعت آسیب در حال پیشرفت و ارزیابی درمانی بدهد. در گله اندازه‌گیری

پروتئین‌های مرحله حاد می‌تواند برای تشخیص میزان شیوع بیماری در گروه مورد نظر (گروه سنی، بخشی از سیستم تولید و ...) مفید باشد.

با استفاده از اطلاعات بدست آمده از بالا بودن غلظت سرمی پروتئین‌های مرحله حاد، در موارد شیوع عفونتهای بالینی وتحت بالینی در حال پیشرفت، بسته به شدت و مدت پاسخ مرحله حاد، شدت عفونت را می‌توان پیش‌بینی کرد(Hirvonen et al., ۱۹۹۹ ؛ Skinner et al., ۲۰۰۱).

تنوع فردی فراوانی در میزان پروتئین‌های مرحله حاد انسان مشاهده شده است همچنین ممکن است سن و جنس و نژاد بر میزان پاسخ مرحله حاد انسان تاثیر بگذارد (شبیه اطلاعات بدست آمده از حیوانهای آزمایشگاهی)(Gruys et al., ۲۰۰۵).

فیبرینوژن

ماهیت فیبرینوژن

فیبرینوژن فراوان‌ترین فاکتور انعقادی خون است و لخته فیبرین را می‌سازد. فیبرینوژن دارای وزن مولکولی ٤٣٠٠٠٠ دالتون و یک دیمر است که از سه جفت رشته پپتیدی تشکیل شده است که بوسیله پیوندهای مختلف دی سولفیدی نزدیک انتهای آمینی خود به هم اتصال دارند. این قسمت از مولکول به ناحیه E (Domain) یا گروه دی سولفید (Dsk) معروف است. رشته‌ها تا دو ناحیه یکسان دیگر(D) در انتهای کربوکسیل خود محلی که هر سه رشته به هم می‌پیچند، امتداد می‌یابند(Eckesall et al., ۱۹۹۸).

اعمال زیستی فیبرینوژن

فیبرینوژن بعنوان یکی از پروتئین های اصلی پلاسما در هموستاز، در فراهم نمودن ماده ای برای تشکیل فیبرین و در ترمیم بافتی و ایجاد زمینه برای مهاجرت سلولهای مرتبط با التهاب شرکت می‌نماید(Thomas ۲۰۰۰). فیبرینوژن مخصوصاً به اجزای CD11 و CD18 در سطح سلولهای فاگوسیتی مهاجر منتقل می‌شود. وبدین وسیله یک موج سیگنالهای داخل سلولی راه می‌اندازد که منجر به افزایش دگرانولاسیون، فاگوسیتوز، فعالیت سایتوتوکسیک سلولی وابسته به آنتی‌بادی و تأخیر در آپوپتوزیس می‌شود(Rubel et al., ۲۰۰۱ ; Sitrin et al., ۱۹۹۸).

فیبرینوژن در گاو و گوسفند بعنوان یک نشانگر در دسترس وجود التهاب، عفونت باکتریایی یا آسیب جراحی استفاده می‌شود. در شرایط التهاب مختلفی مانند پریتونیت، آندوکاردیت،