

## مطالعه اثرات سرکوب‌گری باکتری پاستورلا مولتی‌سیدا B:۲ بر روی لنفوسیت‌های گوساله (*Pasteurella multocida*)

• سعید عطایی کچوئی (نویسنده مسئول)

استادیار بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های باکتریایی طیور،  
مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و  
ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

• محمد مهدی رنجبر

استادیار بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های باکتریایی طیور،  
مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و  
ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

• صبا عطایی کچوئی

دانشجوی سال آخر رشته سلولی مولکولی، دانشکده علوم زیستی،  
دانشگاه خوارزمی، کرج، ایران.  
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵-۰۳-۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵-۰۶-۱۶

Email: s.ataei@rvsri.ac.ir



### چکیده

سپتی سمی هموراژیک، بیماری حاد گاو و گاومیش در کشورهای گرمسیری است که به وسیله کوکوباسیل گرم منفی به نام پاستورلا مولتی‌سیدا سروتایپ B:2 ایجاد می‌شود. شواهد آزمایش پیشین بر روی گاو، دال بر سرکوب پاسخ ایمنی پس از چالش بوده و در مطالعه حاضر جهت بررسی مقدماتی یافته مذکور، آزمایش‌های in-vitro با استفاده از عصاره پاستورلا و سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) گاو طراحی گردید تا آثار احتمالی سرکوب‌گری جزء یا اجزائی از باکتری بر لنفوسیت‌های گاو بررسی شود. از آزمایش سنجش تحریک تکثیر لنفوسیتی به منظور ارزیابی آثار عصاره عاری از سلول (CFE) پاستورلا بر روی PBMC استفاده شد. سپس ماده ConA به کشت سلول‌های مورد نظر اضافه و پاسخ تکثیری آن‌ها با استفاده از روش شمارش آشکارسازی به وسیله ارزیابی فعالیت تایمیدین رادیواکتیو استفاده گردید. به علاوه جهت شناسایی اولیه عامل سرکوب‌گر موجود در عصاره از روش‌های حرارت دادن، دیالیز، و تهیه پروتئین غشای خارجی (OMP) استفاده گردید. نتایج نشان داد افزودن عصاره CFE با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر باعث کاهش پنج برابری پاسخ تکثیری سلول‌های PBMC به ConA می‌شود. حرارت دادن عصاره CFE در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه فعالیت سرکوب‌گری آن را به طور کامل از بین برد. OMP فعالیت سرکوب‌گری مشابه با عصاره نشان داد. این مطالعه حاکی از وجود اثر سرکوب‌گری جزء یا اجزائی از باکتری پاستورلا مولتی‌سیدا بر پاسخ تکثیری PBMC به ConA بود. این جزء از باکتری دست کم در بخشی از ساختمان پروتئینی است و جزو پروتئین‌های غشای خارجی است.

کلمات کلیدی: پاستورلا مولتی‌سیدا، سپتی سمی هموراژیک، سرکوب، PBMC، گاو

- Veterinary Researches & Biological Products No 116 pp: 53-62

### The Study of Suppressive Effects of *Pasteurella multocida* B:2 on Calf Lymphocytes

By: *Ataei Kachoei, S.*, (Corresponding Author) Assistant Professor, Department of Poultry Bacterial Diseases, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organisation (AREEO), Tehran, Iran; *Ranjbar, M. M.*, Assistant Professor, Department of Poultry Bacterial Diseases, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organisation (AREEO), Tehran Iran; *Ataei Kachoei, S.*, Student BSc, Scientific Biology Faculty, Kharzmi University, Karaj, Iran.

Received: 2016-06-01 Accepted: 2016-09-06

Email: s.ataei@rvsri.ac.ir

Haemorrhagic Septicaemia (HS) is an acute disease of cattle and buffaloes in tropical countries, caused by *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) serotype B:2, a Gram-negative coccobacillus. Some evidences of immunosuppression have been observed after a challenge with a virulent strain on vaccinated calves. To further investigate the observed suppressive effect, the present study was set up using a cell-free extract and calf PBMCs, for in vitro experiments. A lymphocyte stimulation assay was used to assess the effects of a cell-free extract (CFE) of *P. multocida* on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), isolated from calves. To assess the proliferative response of PBMCs obtained from calf, ConA was added to the PBMCs culture, and the proliferation was quantified by assessment of radioactivity of absorbed <sup>3</sup>H-Thymidine. In order to characterize the agent(s), the CFE extract suppressive activity was assessed after heating and dialyzing and also by using an outer-membrane protein (OMP) preparation in experiments. Results indicated that addition of CFE at 50 µg/ml caused a five fold decrease in the proliferative response to ConA. Heating at 80°C for five min completely destroyed the suppressive properties. An outer membrane protein (OMP) preparation of *P. multocida* B:2 markedly suppressed the proliferative response of PBMCs to ConA. The study was indicative of a suppressive component(s) of *P. multocida* B:2 on proliferative response of calf PBMCs to ConA. The active part of the suppressive agent(s) was likely to be at least in some part of protein, and is of OMPs.

**Key words:** *Pasteurella multocida*, Hemorrhagic septicaemia, Suppression, PBMC, Cattle

باکتری‌های پاتوژن دامی به حساب می‌آید (۵). سروتایپ‌های مختلف *پاستورلا مولتی‌سیدا* سبب گستره وسیعی از بیماری‌های مختلف در دام‌های اهلی و طیور می‌شوند (۶). سپتی سمی هموراژیک یک بیماری حاد در گاو و گاومیش در کشورهای گرمسیری است که با توانایی ایجاد سپتی سمی پیشرفته *پاستورلا مولتی‌سیدا* تیپ B<sub>2</sub> شناخته می‌شود (۷). اثرات تعدیل‌گری ایمنی *پاستورلا مولتی‌سیدا* B<sub>2</sub> تا به حال به طور مناسبی مورد مطالعه قرار نگرفته است (۸) و مشخص شده است که پروتئین‌های غشایی خارجی (OMP) *پاستورلا مولتی‌سیدا* B<sub>2</sub> دارای فعالیت ضد فاگوسیتی است، زیرا قادر به اختلال در فرآیند فاگوسیتوز *کاندیدیا آلبیکنس* اپسونیزه شده توسط سلول‌های صفاقی موشی در *in vivo* بوده است. گفته شده که مکانیسم‌های ضدفاگوسیتی وابسته به OMP باعث افزایش حدت اورگانیزم می‌شود (۹).

پس از انجام مطالعات ارزیابی ایمنی زایی واکسن آزمایشی *پاستورلا مولتی‌سیدا* بر روی گوساله شواهدی دال بر سرکوب پاسخ ایمنی پس از چالش مشاهده گردید (۱۰). از این رو در مطالعه حاضر جهت بررسی مقدماتی یافته مذکور، آزمایش‌های *in vivo* با استفاده از عصاره *پاستورلا*

#### مقدمه

پاتوژن‌های باکتریایی واجد توانایی اکتسابی جهت غلبه بر مکانیسم‌های دفاعی میزبان خود می‌باشند (۱). پاتوژن‌های گوناگون باکتریایی استراتژی‌های متفاوتی جهت مداخله در مکانیسم‌های سیستم ایمنی ذاتی و اختصاصی به کار گرفته‌اند (۲). عناصر و محصولات مختلف باکتریایی نقش‌های متفاوتی را در تعدیل واکنش‌های ایمنی میزبان بازی می‌کنند که اکثر آن‌ها این عمل را از طریق اثرات تحریکی خود انجام داده و بخش کوچکی نیز به واسطه اثرات مهارشان بدین هدف نائل می‌آیند (۳). از سوی دیگر، از گذشته بیان شده است اگر هر بخشی از باکتری در صورتی که به طور مناسب از نظر زمان، دوز مصرفی و انتخاب آنتی‌ژنی به کار گرفته شود، می‌تواند اثرات سرکوب‌گری بر روی سیستم ایمنی را اعمال کند (۴). باکتری‌های گرم منفی بیماری‌زا (نظیر سالمونلا، شیگلا، سودوموناس/تروژینوزا) قادر به ایجاد سپتی سمی و اندوتوکسمی در میزبان خود هستند و به واسطه سرکوب فاگوسیتوز و ایمنی سلولی بر روی سیستم ایمنی اثرات سرکوبی دارند. *پاستورلا مولتی‌سیدا* یک کوکوباسیل گرم منفی است که از مهم‌ترین

شده و محیط کشت برای ۱۶ تا ۱۸ ساعت در ۳۷ سانتی‌گراد نگهداری گردید. CFE از پاستورلا مولتی‌سیدا با سونیکاسیون سوسپانسیون غلیظ باکتری در PBS (Phosphate Buffered Saline) به همراه سرد کردن متناوب بر روی یخ به دست آمد. لیزات حاصل در ۳۰۰۰g برای ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شده و مایع رویی از طریق غشای منفذ دار ۰/۲ میکرومتر ( Sartorius Co ) پالایش گردید. غلظت پروتئین با استفاده از روش تغییر یافته لوری (Modified Lowry procedure) تعیین گردید.

آماده‌سازی پروتئین غشایی OMP به وسیله روش استخراج سارکوزیل (Sarkosyl) بر اساس روش کار دیویس و همکاران انجام گردید (۱۱). سپس کپسول پلی‌ساکاریدی جدا گردیده و تغلیظ به واسطه روش کارتر (۱۲) انجام شد.

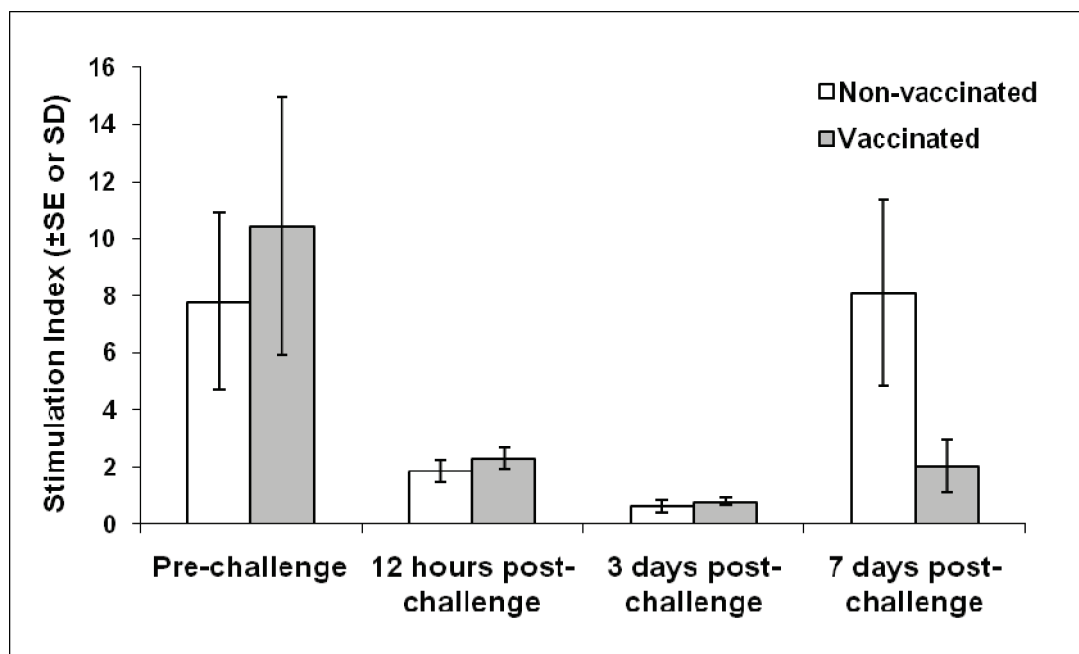
PBMC های جدا شده به روش شیب جداسازی فایکول در فواصل منظم از گوساله‌های کنترل و واکسینه شده با سویه JMRT<sub>۱۲</sub> پاستورلا مولتی‌سیدا در سن چهار هفتگی (۱۰۸ واحد کلنی‌ساز (CFU) که به صورت عضلانی تزریق شده بود) و بعد از چالش از هر دو گروه پنج راسی گوساله‌های ۲۸ روزه با سویه حاد (۱۰۹ واحد کلنی‌ساز که به صورت زیرپوستی تزریق شده بود) اخذ گردید.

سلول‌ها با روش بوش (۱۳) با برخی تغییرات جداسازی شد و با

مولتی‌سیدا و لنفوسیت‌های PBMC گاوی طراحی گردید تا آثار احتمالی سرکوبگری جزء یا اجزائی از باکتری بر لنفوسیت‌های گاوی بررسی شود. مطالعات اولیه بر روی ارزیابی ایمنی‌زایی یک واکسن زنده آزمایشی پاستورلا بر روی گوساله نشان داد که ارگانیزم پاستورلا مولتی‌سیدا مقاومت کامل در برابر سیستم عامل کمپلمان گوساله و خوکچه هندی دارد، به طوری که عوامل فعال سیستم کمپلمان موجود در سرم گوساله این با وجود توانایی کشتن اشرشیا کلی قادر به کشتن و یا مهار رشد پاستورلا مولتی‌سیدا نبود. بر این اساس احتمال توانایی پاستورلا مولتی‌سیدا در مهار پاسخ ایمنی اختصاصی از طریق کاهش توان پاسخگویی لنفوسیت‌ها در نظر گرفته شد. به منظور ارزیابی این اثر احتمالی پاستورلا مولتی‌سیدا/آزمایش in vitro طراحی گردید، تا به وسیله آن تاثیر احتمالی پاستورلا بر روی توان پاسخگویی لنفوسیت‌های گوساله به محرک‌های شیمیایی نظیر کونکاناوالین A (Concanavalin A) مورد ارزیابی قرار گیرد.

### مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتری این مطالعه از مجموعه کشت‌های بخش عفونی و ایمنی دانشگاه گلاسکو انگلستان و انستیتو تحقیقات موردون تهیه گردید. سروتایپ B<sub>۲</sub> پاستورلا مولتی‌سیدا یک جدایه مزرعه‌ای است. برای رشد پاستورلا مولتی‌سیدا از محیط عصاره قلب و مغز (BHI, Oxoid) استفاده



شکل ۱- پاسخ تکثیر لنفوسیت‌ها به ConA پس از چالش با پاستورلا مولتی‌سیدا B:2. نتایج نشان دهنده میانگین شاخص‌های تحریک (SI) گوساله‌ها در گروه‌های مختلف است. میله‌های خطا (Error bar) نشان دهنده میانگین خطای استاندارد (SEM یا standard error of the mean) یا میانگین خطای انحراف (SDM یا of the mean standard deviation) است.

گوساله‌های سالم پیش از تحریک با ConA، توسط عصاره‌ی CFE تیمار می‌شد. آزمایش‌های اولیه نشان داد که غلظت مناسب عصاره در هر گوده میزان ۱۰ میکروگرم پروتئین است که در آن PBMCها رشدی مشابه PBMCهای تیمار نشده نشان دادند (شکل A ۲). غلظت‌های پایین‌تر عصاره، احتمالاً به دلیل مواد غذایی موجود در آن‌ها، میزان تکثیر را افزایش داد. از سوی دیگر، عصاره در غلظت‌های بسیار بالا اثرات نامطلوب بر روی رشد PBMCها گذاشت.

استفاده از غلظت‌های مختلف ConA نشان داد که غلظت‌های بین ۰/۵ تا دو میکروگرم در هر گوده برای تحریک قوی PBMC مناسب بود (شکل B ۲). شکل ۲ همچنین نشان می‌دهد که افزودن عصاره در تمامی غلظت‌ها (پنج، ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در گوده) یک ساعت پیش از افزودن ConA، اثر تحریکی ConA را در غلظت یک میکروگرم در گوده سرکوب کرد. همچنین آزمایشات بعدی نشان داد که عصاره CFE پاسخ تکثیری PBMC به ConA ( $SI = 1.01/9 \pm 3/6$ ) را به شدت سرکوب کرد ( $SI = 2.9/3$ ) (شکل ۳). این فعالیت سرکوب‌گری در شرایط آزمایشگاهی به این شرح رخ داد که سلول‌ها یک ساعت پیش از افزودن ConA، به مدت یک ساعت با غلظت ۱۰ میکروگرم در گوده عصاره CFE نگهداری شدند (کاهش سه تا پنج برابر). مجاورت PBMCها با عصاره CFE (۱۰ میکروگرم برای هر گوده) باعث ایجاد  $SI = 1/5$  گردید که این امر نشان‌گر عاری‌بودن عصاره‌ی تهیه شده از هر نوع آثار سرکوبی بر روی رشد PBMC است. برای انجام تمامی آزمایش‌های بعدی، شرایط بررسی شده‌ی آزمایش به صورت غلظت ۱۰ میکروگرم در گوده عصاره CFE، یک میکروگرم در گوده غلظت ConA و انکوباسیون یک ساعته سلول‌ها در مجاورت عصاره پیش از افزودن ConA در نظر گرفته شد.

#### ویژگی آثار سرکوب‌گری عصاره CFE پاستورلا مولتی سیدا بر قدرت تکثیر PBMC

به منظور نشان دادن اختصاصی بودن اثر سرکوب‌گری پاستورلا مولتی سیدا، از تعدادی از گونه‌های دیگر باکتری‌ها نیز عصاره تهیه و در آزمایش‌های مشابه استفاده گردید (شکل ۴). همه عصاره به صورت مشابهی تهیه و غلظت پروتئین آن‌ها به میزان ۱۰ میکروگرم در گوده تنظیم شد. عصاره تهیه شده از استافیلوکوکوس ارئوس (شکل A ۴) و سروتیپ‌های A۱ و A۲ منهمیا همولیتیکا (*Mannheimia haemolytica*) (شکل B ۴) تأثیری بر روی پاسخ تکثیری PBMC به ConA نداشت. عصاره تهیه شده از ارشیا کلی (شکل A ۴) به میزان ناچیزی پاسخ تکثیری به ConA را افزایش داد.

عصاره تهیه شده از پاستورلا مولتی سیدا سروتیپ D (جدایه خوبی) (شکل A ۴) پاسخ تکثیری PBMC گوساله‌ها به ConA را به شدت سرکوب کرد. عصاره پاستورلا مولتی سیدا سروتیپ A۳ (جدایه ریوی گاو) (شکل A ۴) و پاستورلا مولتی سیدا A (جدایه ریوی گوسفند) (شکل B ۴) اثر سرکوب‌گری به نسبت ناچیزتری در مقایسه با پاستورلا مولتی سیدا B۲ نشان داد. پاستورلا مولتی سیدا سروتیپ A (جدایه مرغی) (شکل B ۴) هیچ‌گونه اثر سرکوب‌گری نشان نداد.

روی هم رفته، از بین گونه‌های مختلف تحت آزمایش فقط در برخی از جدایه‌های پاستورلایی قدری اثر سرکوب‌گری مشاهده گردید و در سایر

غلظت نهایی  $10^6 \times 1$  سلول در میلی‌لیتر در محیط مکمل RPMI با ۱۰ درصد سرم جنین گاو با حرارت غیر فعال شده، و دو میلی مولار از ال-گلوتامین (Gibco Co)، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی سیلین، ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۰/۵ درصد (w/v) نیستاتین، یک درصد (w/v) جنتامایسین و ۳۰ میلی‌مولار بافر هپس (Sigma Co.) وارد شد.

تست سنجش تحریک لنفوسیت بر اساس روش بهبودیافته بوش (۱۴) انجام شد. نمونه در سه تکرار حاوی  $10^5 \times 2$  سلول PBMCs در یک پلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف با ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آنتی‌ژن یا پنج میکروگرم در میلی‌لیتر ConA (Sigma Co.) مخلوط شدند و یا به عنوان کشت‌های کنترل در حجم کلی ۲۰۰ میکرولیتر تهیه شدند. پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در فضای مرطوب انکوباتور ( $CO_2$  ۷/۷) پنج درصد و ۹۵ درصد هوا برای سه روز نگهداری گردیدند. در روز سوم نگهداری، با افزودن ۳۷ کیلو بکولر (Amersham Co-Methyl  $^3H$  thymidine) به هر گوده در ۲۰ میکرولیتر از محیط RPMI، و انکوباسیون برای ۱۸ ساعت قبل از برداشت جهت شمارش آشکارسازی (Scintillation counting) نگهداری شدند. شاخص تحریک (Stimulation index-SI) به صورت شمارش در هر دقیقه (cpm) سلول‌های تیمار شده تقسیم بر cpm سلول‌های تیمار نشده محاسبه گردید. جهت بررسی اثرات مهارتی پاستورلا مولتی سیدا B۲ بر روی پاسخ تکثیری PBMCها به ConA، غلظت مورد نیاز از عصاره CFE ابتدا به چاهک‌ها اضافه گردید و به دنبال آن، نگهداری PBMCها برای یک ساعت در انکوباتور  $CO_2$  قبل از اضافه کردن ConA انجام شد. سپس بررسی پاسخ تکثیری PBMCها به روش ذکر شده در بالا انجام گرفت.

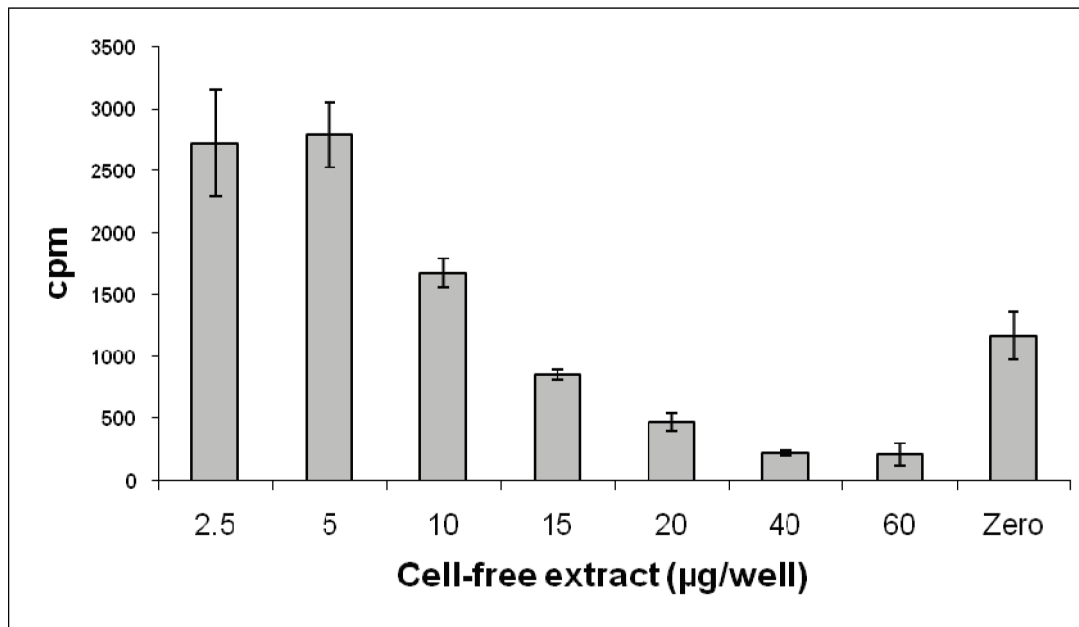
#### نتایج

##### تحریک لنفوسیت‌های جداسازی شده با CFE و ConA در گوساله‌های تحت چالش

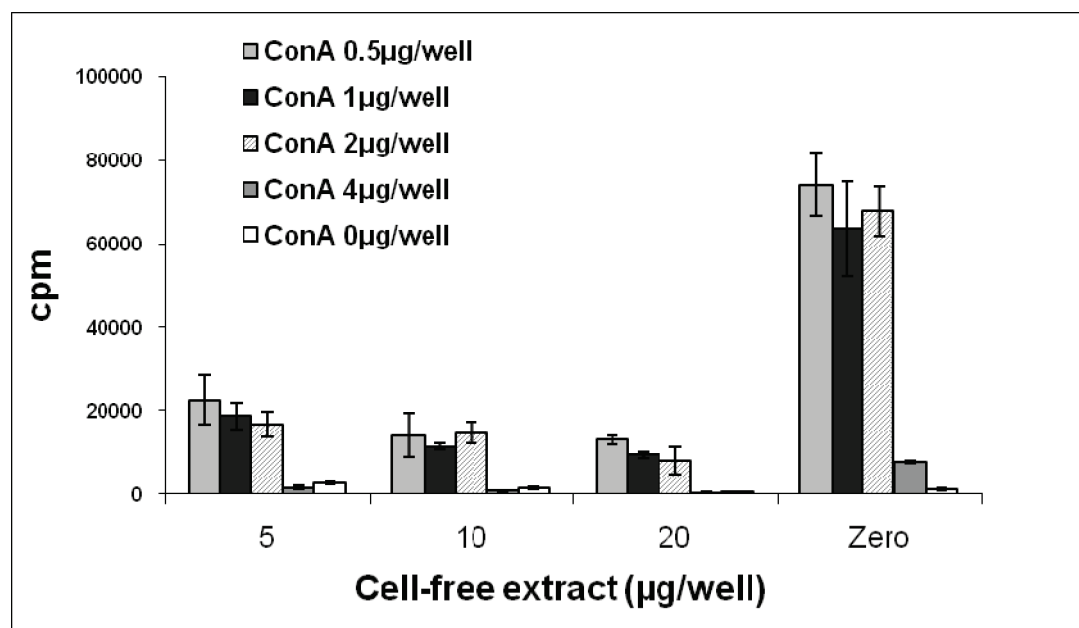
عصاره CFE پاستورلا مولتوسیدا هیچ تأثیر تحریکی روی تکثیر PBMCهای جداسازی از گوساله‌ها پس از مراحل مختلف واکنش‌های نشان نداد. عصاره CFE اثر تحریکی ناچیزی بر روی PBMC به دست آمده از گوساله‌ها پیش و پس از چالش نشان داد. PBMCهای به دست آمده از گروه‌های واکنش و گروه شاهد پاسخ‌های مشابهی به عصاره CFE نشان دادند (داده‌ها نشان داده نشده است). PBMCهای جداسازی شده از گوساله‌های واکنش و گوساله‌های غیر واکنش (گروه شاهد) که پیش از چالش نمونه‌برداری شدند، در پاسخ به ConA تکثیر پیدا کردند. میانگین شاخص تحریک (SI) در گروه شاهد  $3/1 \pm 7/8$  و در گروه واکنش  $4/52 \pm 10/45$  محاسبه شد (شکل ۱). در هر دو گروه واکنش و کنترل، شاخص تحریک در زمان ۱۲ ساعت پس از چالش به شدت کاهش یافت و در زمان سه روز پس از چالش، کاهش از این نیز بیشتر شد. در حیوانات کنترل، هفت روز پس از چالش میانگین شاخص تحریک به مقادیر پیش از چالش افزایش یافته بود (میانگین  $SI = 8/1 \pm 3/52$ )، اما در حیوانات واکنش فقط به میزان خیلی جزئی افزایش یافته بود ( $SI = 2/05 \pm 0/92$ ).

##### سرکوب آزمایشگاهی تکثیر PBMCها

به منظور ارزیابی فعالیت مهارکنندگی عصاره CFE، سیستم آزمایشگاهی راه‌اندازی شد که در آن، PBMC به‌دست آمده از



شکل (A) ۲- اثر غلظت‌های مختلف عصاره CFE پاستورلا مولتی‌سیدا بر روی PBMC‌های گوساله. میله‌ها نشان دهنده میانگین مقادیر (Mean values) گوده‌های سه تایی و میله‌های خطا نشان دهنده انحراف استاندارد (SD یا Standard deviation) می‌باشند.



شکل (B) ۲- اثر سرکوب‌گر غلظت‌های مختلف عصاره CFE پاستورلا مولتی‌سیدا بر قدرت تکثیر غلظت‌های مختلف ConA بر PBMC‌های گوساله

تکثیر PBMC هنگام استفاده‌ی همزمان با ConA از خود نشان داد (شکل A۵). LPS در غلظت ۲۰۰ واحد در گوده هیچ‌گونه تأثیری بر پاسخ تکثیری PBMC به ConA نشان نداد (شکل B۵). در مقادیر بالاتر، LPS باعث افزایش پاسخ تکثیری PBMC به ConA گردید که این اثر تحریکی در غلظت ۲۰۰ هزار واحد در گوده به بالاترین میزان  $۱۵/۳۹ \pm ۲۶۷/۰۷$  (افزایش ۲/۸ برابری) رسید.

در این غلظت LPS به تنهایی نیز افزایش ۲/۸ برابری را ایجاد کرد، ولی در غلظت‌های پایین‌تر، اثر قابل توجهی بر روی PBMC از خود نشان نداد. این نتایج نشان داد که LPS، حداقل نوع استخراج شده از اشرشیا کلی، هیچ نوع اثر تحریکی بر روی پاسخ تکثیری PBMC به ConA ندارد.

### بحث

نقش و نسبت مشارکت ایمنی سلولی و همورال در حفاظت طولانی مدت علیه سپتی سمی هموراژیک گاو و گاومیش تا به حال روشن نشده است. عموماً اعتقاد بر این است که پاسخ‌های همورال، عنصر اصلی در ایجاد محافظت ایمنی است و نقش ایمنی با واسطه سلولی نیز از طریق کنترل ایمنی همورال بخشی مهم از این محافظت به حساب می‌آید (۱۵). در مطالعه حاضر، پاسخ‌های سلولی گروه‌های واکسینه و شاهد گوساله‌ها بعد از چالش مورد ارزیابی قرار گرفت. از روش سنجش تحریک لنفوسیتی جهت تخمین تأثیر عصاره CFE به دست آمده از پاستورلا مولتی سیدا

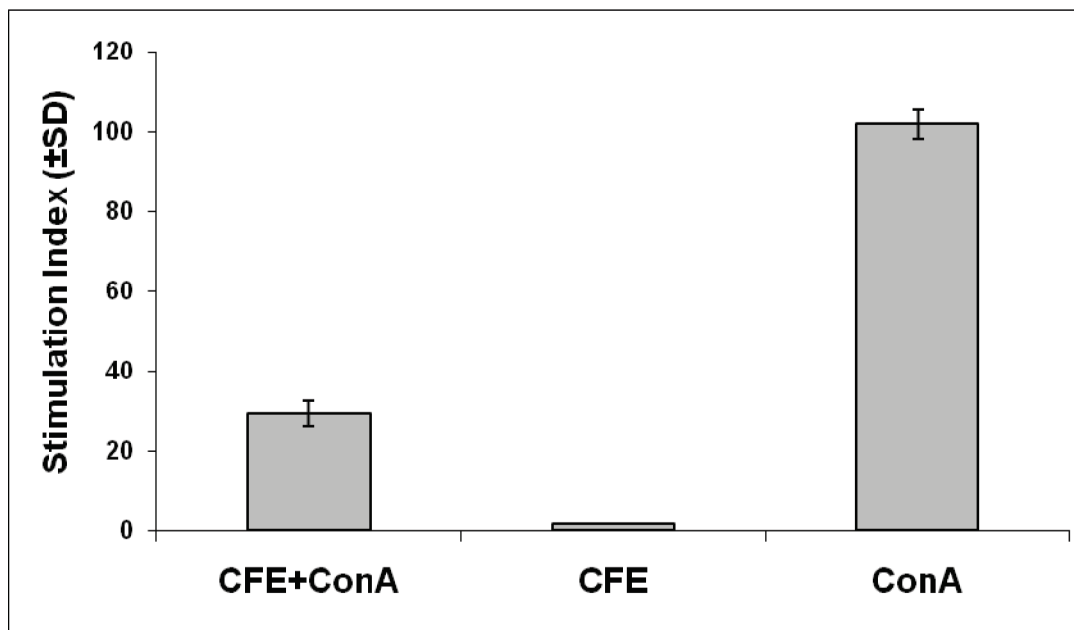
گونه‌ها این پدیده مشاهده نشد. تنها سوبه‌ای که دارای اثر سرکوب‌گری مشابهی بر روی PBMC بود، پاستورلا مولتی‌سیدا/سروتایپ D بود.

### مشخصات اجزای سرکوب‌گر پاستورلا مولتی سیدا

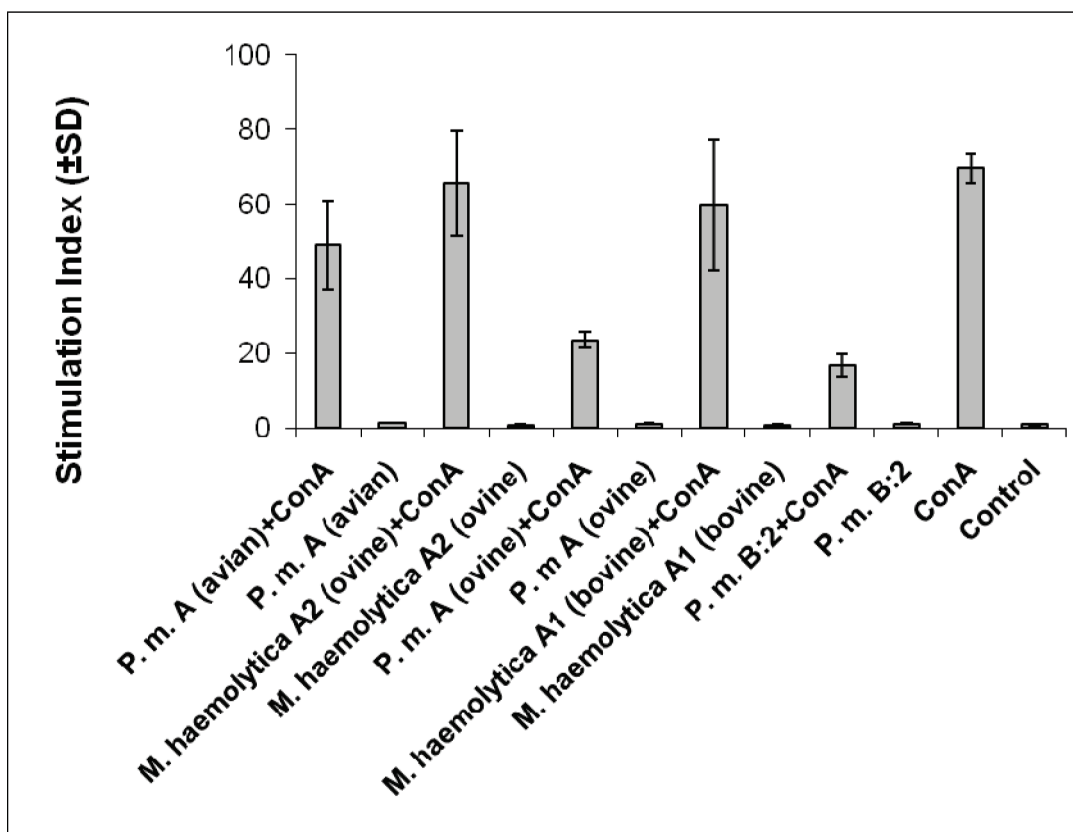
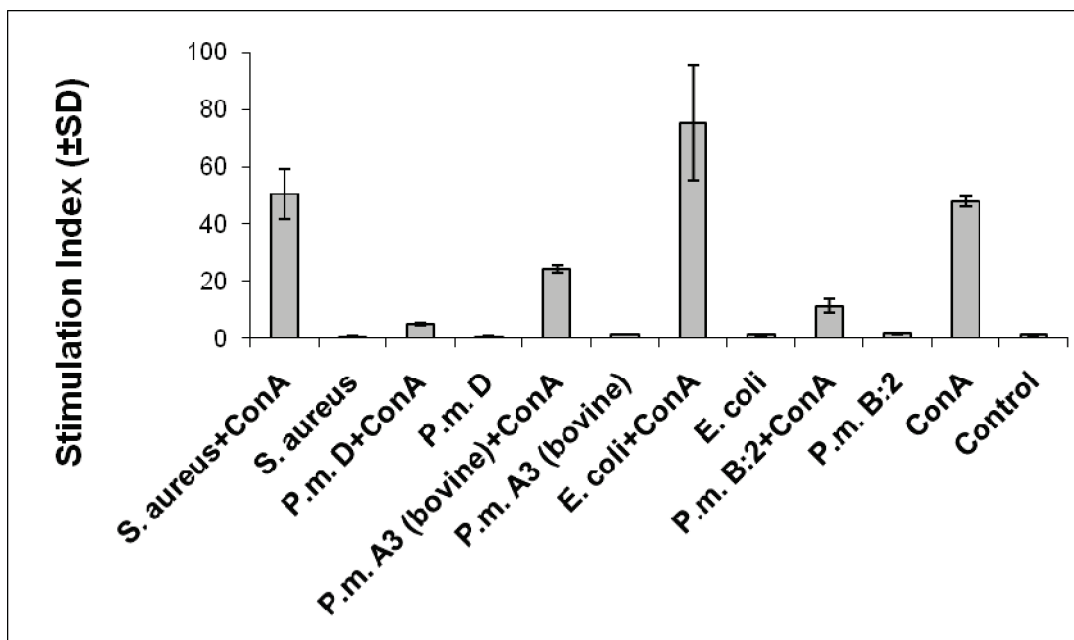
به منظور شناسایی بیشتر عوامل سرکوب‌گر موجود در عصاره CFE، تیمارهای متفاوتی بر روی عصاره انجام شد و آثار سرکوب‌گری مطالعه گردید (شکل ۵). دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه آثار سرکوب‌گری عصاره را به طور کامل از بین برد. پروتئین‌های غشایی خارجی (OMP) تهیه شده از پاستورلا مولتی سیدا B۲ به شدت پاسخ تکثیری PBMC به ConA را سرکوب کرد (شکل A۵). بخش قابل توجهی از اثر سرکوب‌گری OMP تهیه شده از پاستورلا نیز توسط حرارت از بین رفت (شکل A۵). دیالیز عصاره با آستانه ۱۰ کیلودالتون تأثیری بر اثر سرکوب‌گری آن نداشت (شکل A۵). کپسول پلی- ساکارییدی تهیه شده از پاستورلا هیچ‌گونه اثر سرکوب‌گری بر روی پاسخ تکثیر PBMC به ConA نشان نداد. مایع رویی کشت ۱۸ ساعته پاستورلا در محیط مایع باعث افزایش پاسخ تکثیری PBMC به ConA گردید (شکل A۵).

### اثر LPS بر روی پاسخ تکثیری PBMC به ConA

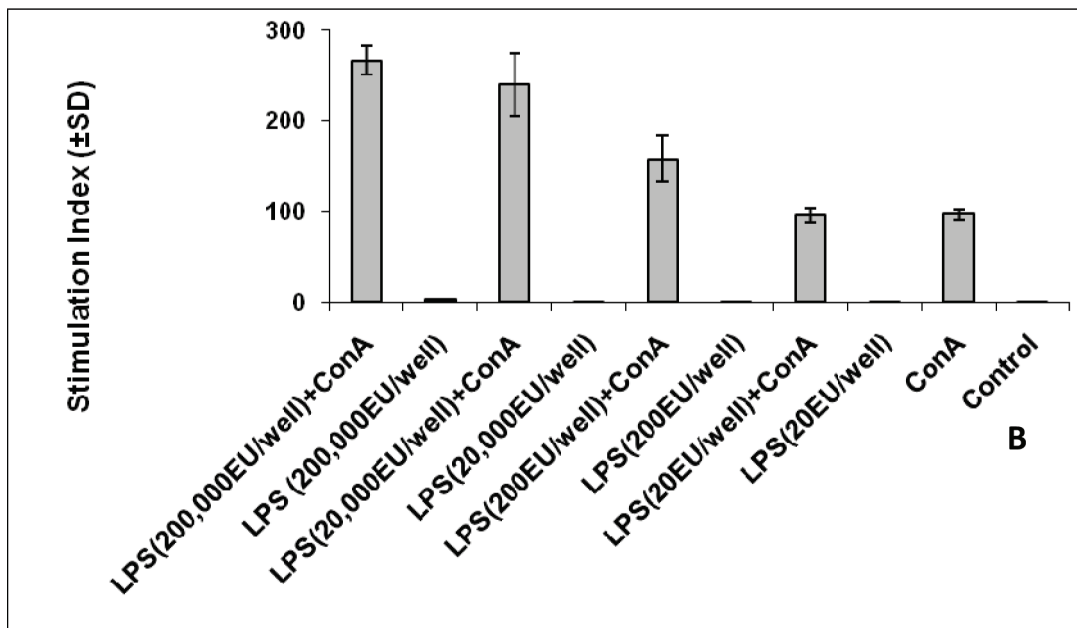
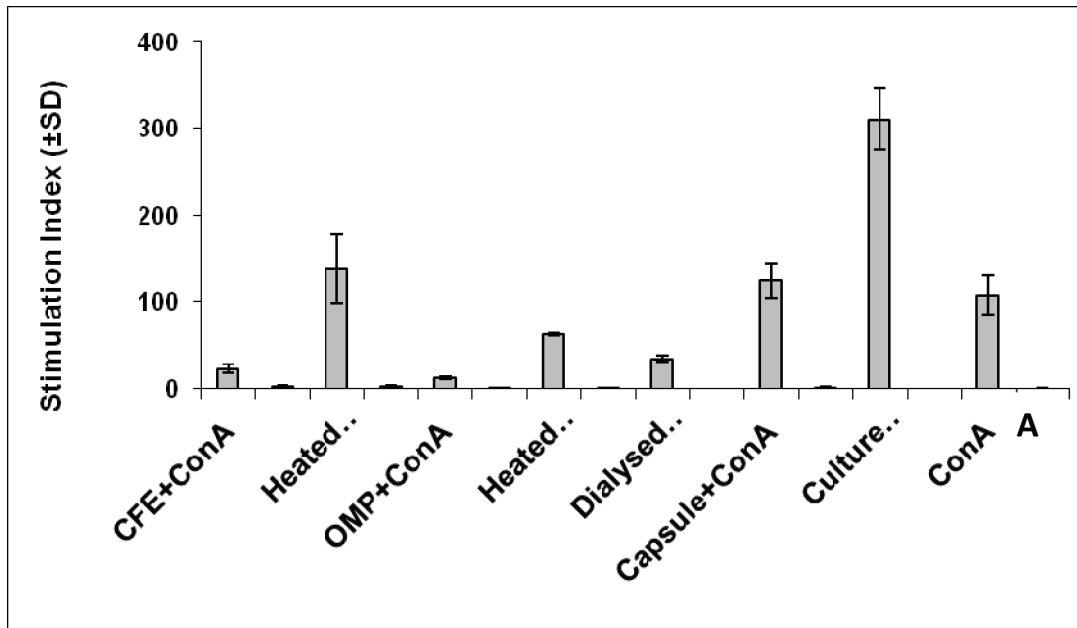
به منظور بررسی اثر PBMC، LPS‌های تهیه شده در آزمایش با LPS خالص شده‌ای از اشرشیا کلی نیز تیمار شد. LPS آثار هم‌افزایی در تحریک



شکل ۳- اثر عصاره CFE پاستورلا مولتی سیدا بر پاسخ تکثیری PBMC به ConA. میله‌ها نشان دهنده میانگین مقادیر کشت‌های سلول سه تایی و میله‌های خطا نشان‌گر انحراف استاندارد است.



شکل ۴- اثر عصاره CFE گونه‌های باکتریایی مختلف بر پاسخ تکثیر PBMC ها به ConA. میله‌ها نماینده پاسخ تکثیری در حضور (سلول‌های تیمار شده) (FA) و عدم وجود (سلول‌های تیمار نشده) (FB) عصاره CFE تهیه شده از گونه‌های باکتریایی مختلف است. کشت‌های سلول به تعداد سه گوده برای هر تیمار تهیه و نتایج نمایش داده شده میانگین سه گوده است.



شکل ۵. اثر تیمارهای مختلف باستورلا مولتی‌سیدا (A) و LPS (B) بر روی پاسخ تکثیری PBMC ها به ConA. میله‌ها نماینده میانگین نتیجه آزمایش بر روی سه گوده کشت سلول و میله خطا نمایشگر میانگین انحراف خطا است.



(۱۷). هر چند مطالعه اخیر نشان داده است که توکسین PMT بر تمایز T cell اثر گذاشته و آن را به سوی Th<sub>17</sub> سوق می‌دهد که این امر از طریق فعال‌سازی مکانیسم فاکتورهای نسخه‌برداری STAT انجام می‌شود (۱۸). به منظور شناسایی اولیه عامل یا عوامل سرکوب‌گر موجود عصاره CFE پاستورلا مولتی‌سیدا، تیمارهای متفاوتی بر روی عصاره انجام شد. آزمایشات نشان داد که حرارت دادن عصاره تا دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه اثر سرکوب‌گری را به طور کامل از بین می‌برد. این امر نشان‌دهنده پروتئینی بودن عامل فعال سرکوب‌گر موجود در عصاره یا وجود حداقل بخشی پروتئینی در ساختار آن می‌باشد، به طوری که آن را به حرارت حساس نموده است. آزمایش دیگر با استخراج پروتئین غشاء خارجی (OMP) از پاستورلا مولتی‌سیدا ۲: B نشان داد که این جزء از عصاره نیز با شدت بیشتری ویژگی سرکوب‌گری را دارا می‌باشد. اثر سرکوب‌گری این جزء از عصاره که جزء پروتئین‌های غشاء خارجی است نیز به حرارت حساس می‌باشد. دیالیز عصاره با غشای ۱۰ کیلودالتون تأثیری بر اثر سرکوب‌گری عصاره نشان نداد. این بدین معنی است که جزء یا اجزای سرکوب‌گر موجود در عصاره از اندازه‌های بزرگتر از ۱۰ کیلودالتون برخوردار می‌باشند. از اجزای مهم سلولی پاستورلا مولتی‌سیدا کپسول پلی‌ساکاریدی آن می‌باشد. در ادامه آزمایش‌ها، کپسول پلی‌ساکاریدی تهیه شده از ارگانیسیم هیچ‌گونه اثر سرکوب‌گری از خود نشان نداد. مایع رویی کشت پاستورلا در محیط مایع هیچ‌گونه اثر سرکوب‌گری از خود نشان نداد. این امر نشان‌دهنده این واقعیت است که ماده یا مواد سرکوب‌گر موجود در عصاره در محیط کشت ترشح یا آزاد نمی‌شوند و جزئی از اجزای باکتری هستند.

بسیار محتمل است که عصاره CFE تهیه شده حاوی مقادیری هر چند جزئی از LPS باشد. در ادامه برای نشان دادن نقش احتمالی این جزء از سلول در اثر سرکوب‌گری، LPS خالصی از باکتری گرم منفی اشرشیا کلی تهیه و اثر آن بر روی سلول‌های PBMC آزمایش گردید. آزمایش‌ها نشان داد LPS به کار رفته نه تنها قادر به کاهش پاسخ تکثیری سلول‌ها نیست، بلکه غلظت‌های بالای آن باعث افزایش اثر تکثیری ConA می‌باشد. به منظور توجیه این اثر تکثیری بایستی به این نکته توجه داشت که LPS به عنوان عاملی با ویژگی تکثیرکنندگی لنفوسیت B شناخته می‌شود. از طرف دیگر، به لحاظ خواص سمی، LPS ممکن است به برخی از سلول‌های PBMC آسیب برساند. بعید به نظر می‌رسد که LPS احتمالی موجود در عصاره اثر سوئی بر PBMC گوساله داشته باشد، زیرا عصاره CFE به تنهایی در غلظت به کار رفته هیچ‌گونه اثر سوئی نشان نداد. در مطالعه دیگری بر روی LPS به دست آمده از اشرشیاکلی نشان داده شده است که این ماده قادر به ایجاد تکثیر در PBMC گاوی است (۱۹). همچنین مطالعه مشابه دیگری نشان داد که LPS به دست آمده از پاستورلا مولتی‌سیدا، سروتیپ A۳ اثر تکثیری بر روی لنفوسیت‌های B موش دارد (۲۰). مطالعه مشابه بر روی یرسینیا (*Yersinia pseudotuberculosis*) (عامل گاستروانتریت و لنفادنوپاتی انسان) نشان‌دهنده اثر مهارتی بر روی لنفوسیت T بود (۲۱). مطالعات بعدی نشان داد که پروتئین خارجی YopH عامل این سرکوب می‌باشد (۲۲). مطالعات بعدی بر روی یرسینیا نشان داد که مکانیسم این سرکوب از طریق هدف قرار دادن مولکول‌های LAT (Linker for activation of T cells) می‌باشد (۲۳).

سروتیپ ۲: B بر روی PBMC‌های جداسازی شده از گوساله‌ها در زمان‌های مختلف پس از چالش استفاده شد.

عصاره CFE پاستورلا مولتی‌سیدا هیچ اثر تحریکی بر روی PBMC‌های جداسازی شده از گوساله‌های واکسینه و کنترل در مراحل مختلف بعد از چالش نشان نداد. فقدان تحریک‌پذیری PBMC‌ها در اثر تماس با عصاره CFE ممکن است به سبب فقدان پاسخ سلولی باشد. به عبارت دیگر، اگر در حیوانات آلوده شده با پاستورلا مولتی‌سیدا یک پاسخ سلولی (تحریک سلولی) در طی هفته بعد از چالش وجود داشته باشد، PBMC‌های جداسازی شده می‌بایست در حضور CFE (به عنوان آنتی‌ژن) تکثیر شوند. هم‌چنین شاید قابل انتظار باشد که PBMC‌ها از گوساله‌های واکسینه می‌بایست به حضور CFE پاسخ دهند، اما در عمل این امر مشاهده نگردید.

به دلیل عدم امکان ادامه آزمایش‌ها بر روی دام، به منظور ادامه آزمایشات بر روی اثر سرکوب‌گری پاستورلا مولتی‌سیدا بر روی پاسخ PBMC، تصمیم گرفته شد که آزمایش *in vitro* با به کارگیری عصاره پاستورلا که حاوی تمامی اجزای اورگانیسیم باشد، ادامه یابد. برای این منظور، سیستم آزمایش *in vitro* طراحی شد که در آن PBMC به دست آمده از گوساله سالم پیش از اضافه کردن ConA به آن، با عصاره CFE تیمار گردید. آزمایش‌های مقدماتی با به کارگیری غلظت‌های مختلف عصاره نشان داد که میزان ۱۰ میکروگرم در هر گوده غلظت مناسبی از عصاره است که در آن سلول‌های PBMC ( $2 \times 10^6$  در هر گوده) به طور طبیعی رشد کرده و از طرف دیگر پاسخ تکثیری آن‌ها به ConA سرکوب گردید.

برای یافتن غلظت مناسب ConA در آزمایش‌های *in vitro*، آزمایش‌های بیشتر با استفاده از غلظت‌های مختلف ConA نشان داد که میزان یک میکروگرم در گوده غلظت مناسبی از ConA است که در آن PBMC قادر به تکثیر و سرکوب می‌باشد. در آزمایش‌های *in vitro* نشان داده شد که پاسخ تکثیری PBMC‌ها به میزان ۶۰ تا ۱۰۰ برابر سلول‌های تیمار نشده می‌باشد. این قدرت افزایش تکثیر پس از تماس این سلول‌ها با عصاره CFE تهیه شده از پاستورلا مولتی‌سیدا به مدت یک ساعت سرکوب می‌شود. شرایط ذکر شده در این آزمایش‌های *in vitro* به عنوان روش استاندارد برای ادامه مطالعات بر روی PBMC سازگار شده است. پس از مشاهده فعالیت سرکوبی عصاره CFE در آزمایش‌های *in vitro*، ادامه آزمایش‌ها بر روی شناسایی اولیه عامل یا عوامل سرکوب‌گر موجود در عصاره متمرکز گردید. برای تعیین اختصاصیت این اثر سرکوب‌گر به پاستورلا مولتی‌سیدا ۲: B، عصاره خام بدون سلول (CFE) برخی از اورگانیسیم‌های مشابه و غیر مشابه دیگر نیز تحت آزمایش قرار گرفتند. از مجموعه ارگانیسیم‌های استافیلوکوکوس ارئوس، اشرشیا کلی، مانهمیا همولتیکا و پاستورلا مولتی‌سیدا سروتیپ D خونی، فقط مورد اخیر خواص سرکوب‌گری از خود نشان داد. خواص سرکوب‌گری ایمنی پاستورلا مولتی‌سیدا سروتیپ D خونی در مطالعه‌ای دیگر بر روی چالش خوک و موش بر کاهش پاسخ آنتی‌بادی IgG این حیوانات نشان داده شد (۱۶). مطالعه‌ای بر روی آثار سرکوبی توکسین همین سروتیپ (PMT) بر پاسخ ایمنی نشان داده است که این توکسین قادر به کاهش فعالیت لنفوسیت‌های (T cell) از طریق اثر سرکوب‌گری بر مونوسیت‌ها است

*Pasteurella haemolytica* serotype A1 under different growth conditions. *Journal of General Microbiology*. 138: 909-922.

12. OIE, 2012. Haemorrhagic septicaemia. In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2.4.12, 7th edition, 2012: OIE.

13. Vanden Bush, T. J., Rosenbusch, R. F. 2002. *Mycoplasma bovis* induces apoptosis of bovine lymphocytes. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 32: 97-103.

14. Vanden Bush, T. J. & Rosenbusch, R. F. (2004). Characterization of a lympho-inhibitory peptide produced by *Mycoplasma bovis*. *Biochemistry and Biophysics Research Communications* 315, 336-341.

15. De Alwis, M.C.L. (1999). Haemorrhagic Septicaemia. In Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR) Monograph No 57, pp. 141. Canberra Australia.

16. Jordan, R. W., Hamilton, T. D., Hayes, C. M., Patel, D., Jones, P. H., Roe, J. M. & Williams, N. A. 2003. Modulation of the humoral immune response of swine and mice mediated by toxigenic *Pasteurella multocida*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 39: 51-59.

17. Hildebrand, D., Sahr, A., Wolfle, S. J., Heeg, K., and Kubatzky, K. F. 2012. Regulation of Toll-like receptor 4-mediated immune responses through *Pasteurella multocida* toxin-induced G protein signalling. *Cell Communication and Signaling*. 10: 22.

18. Hildebrand, D., Heeg, K., and Kubatzky, K. F. 2015. *Pasteurella multocida* Toxin Manipulates T Cell Differentiation. *Frontiers in Microbiology*. 6: 1273.

19. Stevens, M. G., Olsen, S. C., Chevillie, N. F. 1997. Comparative effects of bovine cytokines on cattle and bison peripheral blood mononuclear cell proliferation. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 20: 155-162.

20. Ryu, H. I., Kim, C. J. 2000. Immunologic reactivity of a lipopolysaccharide-protein complex of type A *Pasteurella multocida* in mice. *Journal of Veterinary Science*. 1: 87-95.

21. Yao, T., Mecsas, J., Healy, J. I., Falkow, S. & Chien, Y. 1999. Suppression of T and B lymphocyte activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* virulence factor, yopH. *The Journal of Experimental Medicine*. 190: 1343-1350.

22. Sing, A., Roggenkamp, A., Geiger, A. M. & Heesemann, J. 2002. *Yersinia enterocolitica* evasion of the host innate immune response by V antigen-induced IL-10 production of macrophages is abrogated in IL-10-deficient mice. *Journal of Immunology*. 168: 1315-1321.

23. Gerke, C., Falkow, S., Chien, Y. H. 2005. The adaptor molecules LAT and SLP-76 are specifically targeted by *Yersinia* to inhibit T cell activation. *The Journal of Experimental Medicine*. 201: 361-371.

در مجموع، نتایج نشان داد که عامل یا عوامل سرکوب‌گر موجود در عصاره CFE پروتئینی یا دست کم بخشی از آن پروتئینی است و جزء پروتئین‌های غشاء خارج سلولی OMP است. این مواد سرکوب‌گر جزء املاح یا مواد شیمیایی نیست، زیرا پس از دیالیز با غشاء آستانه‌ای ۱۰ کیلو دالتون همچنان اثر سرکوب‌گری باقی ماند. این مطالعه شواهد ابتدایی از آثار سرکوب‌گری *پاستورلا مولتی‌سیدا* / سروتایپ B:۲ را ارائه می‌دهد. بی شک مستندات و شواهد آزمایشگاهی بیشتری برای تایید این آثار از یک سو و مکانیسم این سرکوب از سوی دیگر پیشنهاد می‌شود

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان لازم می‌دانند از حمایت‌های مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی برای تامین امکانات این مطالعه تشکر نمایند.

### منابع مورد استفاده

1. Brunham, R. C., Plummer, F. A. & Stephens, R. S. 1993. Bacterial antigenic variation, host immune response, and pathogen-host co-evolution. *Infectious Immunity*. 61: 2273-2276.
2. Hornef, M. W., Wick, M. J., Rhen, M. & Normark, S. 2002. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nature Immunology*. 3: 1033-1040.
3. Tizard, I.R., 2013. *Veterinary Immunology*, in: *Immunity to Bacteria and Fungi*, 9th ed. USA, Philadelphia, Saunders-Elsevier, pp. 283-295.
4. Schwab, J. H. 1975. Suppression of the immune response by microorganisms. *Bacteriological Reviews*. 39: 121-143.
5. Aktories, K., Orth, J. H.C., Adler, B. 2012. *Pasteurella multocida*, Molecular biology, Toxins and Infection, 1ed. Germany, Berlin Heidelberg, Springer-Verlang, pp. pp. 63-72.
6. Jacques, M. 2002. Virulence factors of Pasteurellaceae, formidable animal pathogens. *ASM News*. 68: 175-179.
7. Benkirane, A., DE Alwis, M.C.L. 2002. Haemorrhagic septicaemia, its significance, prevention and control in Asia. *Veterinary Medicine – Czech*. 47: 234-240.
8. Kubatzky, K. F., Kloos, B., and Hildebrand, D. 2013. Signaling cascades of *Pasteurella multocida* toxin in immune evasion. *Toxins (Basel)*. 5: 1664-1681.
9. Srivastava, S. K. 1998. Outer membrane protein of *Pasteurella multocida* serotype B:2 is immunogenic and antiphagocytic. *Indian Journal of Experimental Biology*. 36: 530-532.
10. Ataei, S., Burchmore, R., Hodgson, J., Finucane, A., Parton, R., Coote, J.G. 2009. Identification of immunogenic proteins associated with protection against haemorrhagic septicaemia after vaccination of calves with a live-attenuated aroA derivative of *Pasteurella multocida* B:2. *Research in Veterinary Science*. 87(2):207-10.
11. Davies, R. L., Parton, R., Coote, J. G., Gibbs, H. A., Freer, J. H. 1992. Outer-membrane protein and lipopolysaccharide variation in