JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

دوره سوم، شماره اول، بهار ۱۳۹۱
صفحات ۱۶-۱۱

تعیین شاخص استرس اکسیداتیو در گاوهای شیری مبتلا به ورم پستان تحت بالینی

ام البنین قاسمیان کریک[۱]، شهاب الدین صافی [۲*]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بهبهان، باشگاه پژوهشگران جوان، بهبهان، ایران.

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، گروه کلینیکال پاتولوژی، تهران، ایران

** نویسنده مسئول:* s.safi@srbiau.ac.ir

چکیده

ورم پستان شایع ترین بیماری تولید و از نظر اقتصادی بزرگترین مشکل و مهمترین بیماری در صنعت پرورش گاو شیری به شمار می آید. استرس اکسیداتیو ایجاد شده توسط گونه های فعال اکسیژن، فاکتور اساسی در ایجاد بیماریهای مختلف در گاو به خصوص ورم پستان به شمار می آید. مطالعات اندکی در زمینه نقش گونه های فعال اکسیژن در ایجاد ورم پستان تحت بالینی وجود دارد. این مطالعه به منظور بررسی تغییرات سطح مالون دی آلدئید پلاسما به عنوان شاخص هیدروپراکسید لیپیدی گلبول‌های قرمز و تغییرات سلولهای سوماتیک در شیر به عنوان شاخص التهاب پستان در گاوهای مبتلا به تورم پستان تحت بالینی، انجام گرفت. نمونه های شیر و خون هپارینه از ۴۵ گاو سالم و ۴۵ گاو شیری مبتلا به تورم پستان تحت بالینی در استان تهران جمع آوری شد. بین میزان مالون دی آلدئید در گروه های مورد مطالعه اختلاف آماری معنی داری مشاهده نشد ($P> 0.05$). بین میزان سلولهای سوماتیک درگاوهای سالم و مبتلا به تورم پستان تحت بالینی اختلاف معنی داری وجود داشت ($P< 0.001$). میزان مالون دی آلدئید در گروه مبتلایان افزایش نشان داد. این افزایش نشان دهنده افزایش تولید گونه های فعال اکسیژن در سطح متوسط جهت بهبود التهاب ناشی از میکروارگانیسم های مهاجم می باشد.

واژه های کلیدی: ورم پستان تحت بالینی، استرس اکسیداتیو، سلول های سوماتیک، مالون دی آلدئید

Archive of SID

www.SID.ir

JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

J.Vet.Clin.Res 3(1)11-16, 2012

Determination of oxidative stress indicator in dairy cattle with subclinical mastitis

Ghasemian Karyak, O.1, Safi, S.2*

1. Young researchers club, Behbahan Branch, Islamic Azad University, Behbahan, Iran.

2- Department of Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

**** Corresponding author:*** s.safi@srbiau.ac.ir

Abstract

The most important and common disease among dairy cows is mastitis and it is still a big challenge for the dairy industry all over the world. Oxidative stress induced by reactive oxygen species (ROS) is a major cause of different diseases especially mastitis in cattle. There are few studies on the role of ROS in occurrence of subclinical mastitis. The objective of the present study was to evaluate the changes in plasma malondialdehyde concentrations as a marker of lipid peroxidation of red blood cells and its relationship with somatic cell count (SCC) in milk as the marker of mammary inflammation in cattle. Heparinized blood and milk samples were collected from 45 healthy cows and 45 cows with subclinical mastitis from dairy farms in Tehran province, Iran. No significant difference ($P > 0.05$) was seen between concentrations of malondialdehyde in the studied groups. There was a significant difference ($P < 0.001$) between SCCs in the healthy cows and cows with subclinical mastitis. The concentration of plasma malondialdehyde was higher in cows with subclinical mastitis which indicates mild increase in production of ROS in response to invading pathogens.

Key words: subclinical mastitis, oxidative stress, somatic cells, malon dialdehyde

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

بر اساس بسیاری از منابع غربی، ورم پستان شایع ترین بیماری تولید و از نظر اقتصادی بزرگترین مشکل و مهمترین بیماری در صنعت پرورش گاو شیری به شمار می آید (۱۱و۱۲). در زمینهٔ میزان شیوع ورم پستان تحت بالینی، میانگین ملی سل کانت شیر گاوها در ایران (شاخصی که در همهٔ انواع ورم پستان بالا می رود و اصلی ترین علامتِ شکلِ مخفیِ ورم پستان است) در سال ۸۵ در حدود ۴۵۰ هزار سلول در میلی لیتر تخمین زده شده است و تقریباً ۸۸% گله ها سل کانت بیش از ۲۰۰ هزار داشته اند (سل کانت بیش از ۲۰۰ هزار= مشکل ورم پستان مخفی در گله) (۱). تورم‌پستان با هجوم باکتریهای مختلف به غدد پستانی و مهاجرت سلولهای نوتروفیل از خون تحت تأثیر مواد جاذب شیمیایی به کارتیه‌های عفونی و افزایش سلولهای سوماتیک در شیر (SCC) تشخیص داده می‌شود(۳). گونه‌های فعال اکسیژن (ROS: Reactive Oxygen Species) از قبیل رادیکالهای آزاد سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و هیدروکسیل در نوتروفیل‌ها وابسته به سیستم NADPH- Oxidase جهت از بین بردن میکروارگانیسم های مهاجم تولید می‌شود. اگرچه این فرایند در جهت بهبود التهاب ضروری به نظر می‌رسد، ولی افزایش نامناسب واکنشهای اکسیداتیو در فرایندهای باکتریوسیدال، نقش مهمی را در تخریب و دژنراسیون بافتی و حتی التهاب بافتی ایفاء می‌نماید (۴و۱۴). رادیکال‌های آزاد، اتم یا ملکول‌هایی هستند که به خاطر داشتن الکترون منفرد یا جفت نشده در آخر خود، بسیار ناپایدار بوده و به سرعت با ماکروملکولهای بدن جانداران مانند لیپیدها، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و DNA، واکنش و سبب آسیب به آنها می‌شود. سیستم‌های خاصی برای مقابله با آسیب حاصل از رادیکالهای آزاد در بدن وجود دارد، که سیستم آنتی‌اکسیدانی نامیده می‌شود (۲).

یکی از مهمترین اثرات رادیکال‌های آزاد پراکسیداسیون لیپیدی بوده که، به تخریب غشای سلولی منجر می‌شود. مالون دی‌آلدئید (Malondialdehyde MDA) یکی از محصولات نهایی پراکسیداسیون لیپیدی بوده که، در سطح گسترده به عنوان شاخص ارزیابی استرس اکسیداتیو مورد بررسی قرار می‌گیرد (۷). تورم‌پستان یکی از عفونت‌های مهم در مزارع پرورشی گاو می باشد که با استرس اکسیداتیو حاصل از رادیکال‌های آزاد مشتق از اکسیژن که به عنوان آسیب پذیری بافت غدد پستانی شناخته شده‌اند، در ارتباط می‌باشد (۱۴).

در چند سال اخیر توجه بسیاری از محققان به فرایندهای استرس اکسیداتیو در پاتوژنز بسیاری از بیماریها در گاو جلب شده است. استرس اکسیداتیو ایجاد شده توسط گونه های فعال اکسیژن، فاکتور اساسی در ایجاد بیماریهای مختلف در گاو به خصوص ورم پستان به شمار می آید.

تا کنون مطالعات اندکی در زمینه تعیین میزان مالون دی آلدئید پلاسما به عنوان شاخص پراکسیداسون لیپیدی گلبول‌های قرمز مرتبط با وضعیت التهابی غدد پستانی در گاو و سایر نشخوار کنندگان صورت گرفته است. لذا در تحقیق حاضر نمونه‌های شیر در گاوهای سالم و مبتلا به تورم پستان تحت بالینی از لحاظ شمارش سلولهای سوماتیک شیر (SCC) بررسی و مقایسه شد. همچنین میزان تأثیر استرس اکسیداتیو در افزایش SCC با توجه به سطح فعالیت مالون دی آلدئید پلاسما به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی غشای گلبولهای قرمز در گاوهای بیمار در مقایسه با گاوهای سالم در ایران ارزیابی گردید.

مواد و روش کار

نمونه های شیر و خون هپارینه از ورید دمی ۴۵ گاو سالم و ۴۵ گاو مبتلا به تورم پستان تحت بالینی نژاد هولشتاین به ظاهر سالم از گاوداریهای صنعتی اطراف تهران جمع آوری شد. بر روی هر گاو معاینات بالینی کامل، از لحاظ ضربان قلب، درجه حرارت بدن، تعداد تنفس، سلامت ظاهری پستان و شیر انجام شد. گاوهایی در این مطالعه انتخاب

Archive of SID

www.SID.ir

که، فاقد هر گونه علایم بالینی دال بر بیماری بوده و در ملامسه پستان هیچ گونه اختلالی را نشان ندادند، به علاوه گاوهایی که در اواخر آبستنی و اوایل دوران شیرواری هستند، از مطالعه حذف شدند.شمارش سلولهای سوماتیک موجود در شیر هر دو گروه، با استفاده از دستگاه شمارشگر الکترونیکی فوزوماتیک (Fossomatic 90, FOSS Electric Hillerod, Denmark 90) انجام و میزان SCC بیش از ۲۰۰۰۰۰ سلول در هر میلی لیتر به عنوان شاخص تشخیص تورم پستان تحت بالینی در نظر گرفته شد. نمونه های خون هپارینه در دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و نمونه های پلاسمای جهت اندازه گیری مالون دی آلدئید هر کدام به صورت جداگانه در میکروتیوپ جمع آوری شدند. مالون دی آلدئید به عنوان محصول نهایی پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع به شمار می آید.

برای اندازه گیری سطح مالون دی آلدئید پلاسما بر حسب nmol/ml، به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی از روش دستی که همان روشِ TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substance) یا ترکیبات واکنش دهنده با تیوباربیتوریک اسید می باشند، استفاده شد. طبق این روش که به روش ساتو (Satoh) معروف است، مالون دی آلدئید پلاسما با اسید تیوباربیتوریک ترکیب شده و در طول موج ۵۳۲ نانومتر جذب نوری ترکیب حاصل اندازه گیری می شود (۱۰). نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS تحت ویندوز ویرایش ۱۳ و انجام آزمون آماری T-test برای مقایسه میانگین پارامترها در دو گروه، آنالیز همبستگی و آنالیز رگرسیون برای بررسی شدت ارتباط شاخص استرس اکسیداتیو با سلولهای سوماتیک در شیر مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت.

نتایج

میانگین، انحراف معیار و نتایج آزمون آماری T-test مالون دی آلدئید پلاسما و سلولهای سوماتیک در گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی در جدول (۱) آورده شده است. ضریب همبستگی پیرسون بین مالون دی آلدئید و سلولهای سوماتیک در جدول (۲) آورده شده است.

نتایج تحقیق نشان می دهد که بین تعداد سلول‌های سوماتیک در گاوهای بیمار و سالم اختلاف آماری معنی داری وجود دارد ($p <$ ۰/۰۰۱). از دیگر نتایج تحقیق، عدم وجود اختلاف آماری معنی دار در میزان فعالیت مالون دی آلدئید پلاسمای خون در بین گاوهای سالم و مبتلایان به ورم پستان تحت بالینی می باشد ($p >$ ۰/۰۵). همبستگی بین سلولهای سوماتیک و مالون دی آلدئید از نظر آماری معنی دار نمی باشد ($p >$ ۰/۰۵).

جدول ۱- میانگین وانحراف معیار و نتایج آزمون آماری T-test مالون دی آلدئید پلاسما و تعداد سلولهای سوماتیک در گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی

پارامتر	واحد	سالم n=۴۵	مبتلا به ورم پستان تحت بالینی n=۴۵	P value
مالون دی آلدئید	nmol/ml	۱/۵۲±۰/۱۸	۲/۵۶±۰/۹۲	p=۰/۶۲
سلولهای سوماتیک در شیر	Cells×10^3/ml	۲۶/۳۸±۲۰/۸۲	۸۳۴/۷۳ ±۸۸۰/۱۹	p<۰/۰۰۱

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲- ضریب همبستگی پیرسون بین سلولهای سوماتیک در شیر و مالون دی آلدئید در پلاسما(n=۹۰)

پارامتر	مالون دی آلدئید	سلولهای سوماتیک
سلولهای سوماتیک	۰/۰۹۵	۱
مالون دی آلدئید	۱	۰/۰۹۵

بحث و نتیجه گیری

بین تعداد سلولهای سوماتیک شیر در گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی اختلاف آماری معنی دار وجود داشت ($p<۰/۰۰۱$). میانگین تعداد سلولهای سوماتیک شیر در مبتلایان بیشتر از تعداد سلولهای سوماتیک شیر در گاوهای سالم می باشد که این یافته با نتایج تحقیقات Middleton وهمکاران در ۲۰۰۴، که بیان می کنند، در شیر کارتیه های گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی تعداد سلولهای سوماتیک افزایش می یابد، هماهنگی دارد (۵).

در این مطالعه میزان مالون دی آلدئید پلاسما در گاوهای سالم و مبتلا به تورم پستان تحت بالینی اختلاف آماری معنی داری نشان نداد ($p>۰/۰۵$). این عدم اختلاف آماری معنی دار به دلیل شدت التهاب کم، در غدد پستانی درگیر می باشد. ولی میزان مالون دی آلدئید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی در نتیجه استرس اکسیداتیو در گروه مبتلایان افزایش نشان داد. این افزایش نشان دهنده افزایش تولید گونه های فعال اکسیژن در سطح متوسط جهت بهبود التهاب ناشی از میکروارگانیسم های مهاجم می باشد.

این یافته با تحقیقات Musal و همکاران در سال ۲۰۰۷ و Ranjan و همکاران در ۲۰۰۵، که بیان می کنند، غلظت MDA در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی، افزایش نشان می دهد و با گروه کنترل اختلاف معنا داری نشان نمی‌دهد، هماهنگی دارد (۸و ۹).

مالون دی آلدئید (MDA) یکی از مهم ترین و خطرناکترین ترکیبات متابولیکی تولید شده در روند پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از گونه های فعال اکسیژن می باشد. از این ترکیب به عنوان شاخص استرس اکسیداتیو یاد شده و جهت بررسی وضعیت استرس اکسیداتیو، از اندازه گیری و ارزیابی این ترکیب استفاده می شود (۲).

در مطالعه ای که Cetin و همکاران در سال ۲۰۰۵، بر روی میش های مبتلا به ورم پستان قانقاریایی انجام دادند، با افزایش معنی داری در میزان MDA پلاسما، به دلیل صدمات شدید التهابی در طول ورم پستان ناشی از استرس اکسیداتیو، مواجهه شدند (۳). همین نتایج را Mohamed در سال ۲۰۰۷، در شترهای مبتلا به ورم پستان بالینی وتحت بالینی مشاهده کرد (۶).

ارتباط معناداری بین یاخته های پیکری در شیر و مالون دی آلدئید (MDA) به دلیل حضور سلولهای نوتروفیل و آپوپتوز چشمگیر این سلولها و متعاقب آن تخریب بافت اپیتلیال پستان در پیک و اواخر شیردهی ناشی از وضعیت التهابی موجود در کارتیه های عفونی گزارش شده است (۱۳ و۱۴). در حالی که در تحقیق حاضر هیچ گونه همبستگی بین SCC و MDA مشاهده نشد. تخریب و دژنراسیون بافتی در غدد پستانی دچار التهاب در طول ورم پستان تحت بالینی به دلیل استرس اکسیداتیو در سطح متوسط، با افزایش سطح MDA پلاسما ایجاد می گردد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بهبهان به انجام رسیده است. از زحمات آقایان علی بهزادی و دکتر سید حامد شیرازی بهشتی ها در انجام مراحل طرح تشکر و قدر دانی می گردد.

Archive of SID
www.SID.ir

References

1- Bolourchi, M., Mokhber Dezfouli, M. R., Kasravi, R., Moghimi Esfandabadi, A., Hovareshti, P. (2008) An estimation of national average of milk somatic cell count and production losses due to subclinical mastitis in commercial dairy herds in Iran. J. Vet. Res. 63(4) 263-266.

2- Bohr, V.A., Dianov, G.L. (1999) Oxidative DNA damage processing in nuclear and mitochondorial DNA. Biochemistry, 81: 155-160.

3- Cetin, H., Guroze,Y. S., Keskin, O., Korkamaz, O. (2005) Investigation of antioxidant enzymes and some biochemical parameters in ewes with gangrenous mastitis. Turk. J. Vet. Animal science, 29:303-308.

4- Erisir, M., A., kar, Y., Gorgoze, S.Y., Yuksel, M. (2006) Changes in plasma malondialdehyde concentration and some erythrocyte antioxidant enzymes in cows with prolapsus uteri caesarean section and retained placenta. Review Med. Vet.157(2) 80-83.

5- Middleton, R. J., Luby, C. D., Viera, L., Tylier, J. W., Casteel, D. (2004) Short communication: Influence of staphylococcus aureus intra mammary infection on serum copper, zinc, and iron concentration, J. Dairy Science, 87:976-979.

6- Mohamed, H. E. (2007) Antioxidant status and degree of oxidative stress in mastitic and healthy camel *(Camelus dromedaries)*. Research Journal of Animal Science. 1(3)92-94.

7- Moore, K., Roberts, L. (1998) Measurement of lipid peroxidation. Free Radical Research. 28: 659–671.

8- Musal, B., Ultas, P. R., Turkylmaz, S. (2007) Blood vitamin C, vitamin A, β- caroten, ceruloplasmin, glutathione and malondealdehyde concentrations in cows with subclinical mastitis treated with intramammary antibiotic. Revue. Med. Vet. 158(12) 633-240.

9- Ranjan, R., Swarp, D., Naresh, R., Patra, C., (2005) Enhanced erythrocytic lipid- peroxidase and reduced plasma acid ascorbic and alternation in blood trace element level in dairy cow with mastitis. Veterinary Research Communication. 29(1) 27-34.

10- Satoh, K., (1978) Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by new colorimetric method. Clinical Chemistry Act., 90:37-43.

11- Seegers, H., Fourichon, C., Beaudeau, F. (2003) Production Effects Related to Mastitis & Mastitis Economics in Dairy Cattle Herds. Vet. Res. 34: 475-491.

12- Smith, K.L., Hogan, J.S. (2001) The World of Mastitis. In Proceeding of the National Mastitis Council's 2nd International Symposium on Mastitis & Milk Quality, Vancouver, BC, Canada. Madison, WI, USA*:* National Mastitis Council; Inc. PP: 1-12.

13- Sreteovic', L. J., Aleksic', S., Petrovic', M.P., Mis's'evic, B. (2007) Nutritional factors influencing improvement as well as productive and reproductive parameters of cattle. Biotechnology in Animal Husbandary. 23(5-6) 217-226.

14- Suriyasathaporn, W., Vinitketkumnuen, U., Chewonarian, T., Boonyayatra, S., (2006) Higher somatic cell counts resulted in higher malondialdehyde concentration in row cow's milk. International Dairy Journal. 16:1088-1091.

Archive of SID

www.SID.ir