Archive of SID

پاتوبیولوژی مقایسه‌ای، علمی ـ پژوهشی، سال هفدهم، بهار، شماره ۱، ۱۳۹۹، ۳۰۳۲-۳۰۲۱

تعیین ارزش تشخیصی فعالیت وضعیت کل آنتی اکسیدانی و مالون دی آلدئید موجود در شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی

مسعود شکاری[۱]، سید فضل اله موسوی نسب[۲]، سیده ام البنین قاسمیان[۳*]

چکیده

حساسیت و ویژگی شمارش سلول های سوماتیک و کشت باکتریایی شیر به عنوان استاندارد طلایی در تشخیص ورم پستان تحت بالینی گاو پایین است. ورم پستان سبب افزایش رادیکال های آزاد، استرس اکسیداتیو و نیتروزاتیو در شیر و کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی می گردد. هدف از مطالعه تعیین ارزش تشخیصی فعالیت وضعیت کل آنتی اکسیدانی و مالون دی آلدئید شیر در تشخیص ورم پستان تحت بالینی است. ۹۰ راس گاو نژاد هلشتاین که از لحاظ بالینی سالم بودند به طور تصادفی از گاوداری های صنعتی استان تهران انتخاب شدند. از این تعداد ۵۵ راس گاو نژاد هلشتاین بر اساس بالاتر بودن تعداد سلول های سوماتیک شیر از ۱۳۰×۱۰۰۰cells/mL به عنوان گاوهای بیمار قرار گرفتند. مالون دی آلدئید و وضعیت کل آنتی‌اکسیدانی شیر با استفاده از روش تیوباربیتوریک اسید و کیت شرکت رنداکس انگلستان تعیین، حساسیت، ویژگی و نقطه برش پارامترها با استفاده از آنالیز راک محاسبه گردیدند.. میانگین و میانه مالون دی آلدئید و وضعیت کل آنتی‌اکسیدانی شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی به طور بسیار معناداری نسبت به گاوهای سالم بالاتر و پایین تربود. میزان مالون دی آلدئید در نقطه برش۴۴/۵ nmol/ml دارای بالاترین درستی بالینی در تشخیص ورم پستان تحت بالینی بود. نتایج نشان داد که حساسیت و ویژگی میزان مالون دی آلدئید شیر در تشخیص ورم پستان تحت بالینی بالا و ۱۰۰٪ است، اندازه گیری این بیومارکر می تواند جایگزین شمارش سلول های سوماتیک شود.

واژگان کلیدی: *بیومارکر، شیر، مالون دی آلدئید، ورم پستان تحت بالینی، وضعیت کل آنتی‌اکسیدانی*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۶/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۱۹

مقدمه

ورم پستان تحت بالینی یکی از بیماری‌های مهم گاوداری-های شیری جهان بوده، که منجربه رکود اقتصادی در صنعت شیر می گردد. (۱). با هجوم باکتریهای مختلف و کلونیزه شدن آن ها در غدد پستانی و پاسخ ماکروفاژها، فرایند التهابی آغاز و باعث مهاجرت و جذب سلول های نوتروفیل جهت از بین بردن باکتری ها به بافت پستانی و افزایش سلولهای سوماتیک در شیر می گردند. بیش از ۹۰٪ سلول های سوماتیک در غدد پستانی عفونی نوتروفیل ها هستند. بنابراین این فعالیت باکتری کشی نوتروفیل ها منجر به افزایش تولید گونه های واکنشی اکسیژن می شوند (۲)، اگرچه این افزایش واکنش های اکسیداتیو علیه عفونت های باکتریایی برای بدن در جهت بهبود التهاب ضروری به نظر می‌رسند، ولی می تواند نقش مهمی را در تخریب و دژنراسیون بافتی و حتی التهاب بافتی ایفاء می‌نمایند (۳). در حالت طبیعی در بدن بین تولید رادیکال‌های آزاد و این سیستم توازن برقرار است، اما اگر به هر دلیلی این توازن بهم بخورد، حالتی پیش می‌آید که به آن استرس اکسیداتیو می‌گویند (٤). تورم پستان بالینی و تحت بالینی در گاو یکی ازعفونت‌های مهم بوده، که با استرس اکسیداتیو حاصل از رادیکال‌های آزاد مشتق از اکسیژن و نیتروزاتیو استرس حاصل از رادیکالهای فعال نیتروژن از جمله نیتریک اکساید که به عنوان آسیب پذیری بافت غدد پستانی شناخته شده‌اند، در ارتباط می‌باشد (٦و٥).

۱- گروه دامپزشکی، واحد بهبهان، دانشگاه آزاد اسلامی، بهبهان، ایران.
۲- گروه دامپزشکی، واحد بهبهان، دانشگاه آزاد اسلامی، بهبهان، ایران.
۳*- گروه دامپزشکی، واحد بهبهان، دانشگاه آزاد اسلامی، بهبهان، ایران (ghasemian1249@yahoo.com)

www.SID.ir

Archive of SID

در سطح سلولی، اثرات ترکیبات نیتریک اکساید تحت تاثیر فاکتورهای مختلفی از قبیل تولید و پخش نیتریک اکساید و غلظت کافی گونه های واکنشی اکسیژن مانند رادیکال آنیون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن به وسیله سیستم آنتی اکسیدانی آنزیمی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز، سیستم تیوردوکسین-تیوررودوکسین ردوکتاز هموآکسیژناز، لاکتوپراکسیداز و سیستم آنتی اکسیدانی غیر آنزیمی شامل ویتامین ها (A, E, C)، کارتینوئیدها، گلوتاتیون، اوریک اسید، بیلی روبین، پروتئین هایی که با یون های آهن و مس باند می شوند (ترانسفرین، فریتین و سرولوپلاسمین) عناصر کمیاب مختلف (مس، روی، سلنیوم) که برای فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان ضروری هستند قرار گرفته و خنثی می گردند(۷، ۵). فعالیت آنتی اکسیدان های شیر نیز منوط به حضور این قبیل آنتی اکسیدان هاست (۸).

ورم پستان می تواند باعث افزایش تولید رادیکالهای آزاد در شیر و باعث استرس اکسیداتیو شود، ورم پستان بالینی و تحت بالینی با سرازیر شدن رادیکالهای آزاد، افزایش ظرفیت کل اکسیدانی و کاهش ظرفیت کل آنتی اکسیدانی در شیر همراه است (۱۰-۹). متداولترین و معمولترین ترکیب در جهت بررسی وقوع استرس اکسیداتیو بر اساس تعیین غلظت محصولات پراکسیداسیون لیپیدی در مایعات بدن می باشد (۱۱). بنابراین یکی از مهمترین این شاخص‌ها MDA بوده، که در سطح وسیعی از آن در جهت ارزیابی استفاده می‌کنند. با توجه به اینکه، در شیر خام گاوهای مبتلا به تورم پستان MDA همزمان با SCC افزایش یافته، بنابراین به‌نظر می‌رسد که استرس اکسیداتیو با وضعیت التهابی موجود در کارتیه‌های پستانی مرتبط باشد (۱۳و۱۲). بر اساس توصیه فدراسیون بین المللی شیر و موسسه ملی ورم پستان، شمارش سلول های سوماتیک به عنوان استاندارد طلایی در تشخیص ورم پستان تحت بالینی بیان شده است، اما امروزه مشخص شده که ویژگی این آزمایش در تشخیص کارتیه های مبتلا به ورم پستان تحت بالینی پایین است زیرا مقادیر بالای آن لزوما بیانگر ورم پستان نمی باشد. به عبارت دیگر تعداد سلول های سوماتیک علاوه بر التهاب پستان تحت تاثیر بسیاری عوامل دیگر نظیر تعداد دوره های شیرواری گاو، مرحله شیرواری، میزان تولید شیر، فصل، سن، نژاد گاو نیز قرار دارد (۱٤). از سوی دیگر برای اینکه این آزمایش به عنوان یک تست غربالگر در تشخیص کارتیه های آلوده در گله گاوهای شیری استفاده شود حساسیت کافی نیز ندارد زیرا در مراحل ابتدایی التهاب پستان ممکن است هنوز تعداد سلول های سوماتیک افزایش نیافته باشد. امروزه روش های رایج تشخیصی نظیر شمارش سلول های سوماتیک و آزمون های میکروبی در تشخیص ورم پستان به خصوص فرم تحت بالینی کارایی کافی ندارند (۱۵)، از طرفی آزمایش های باکتریولوژیک به عنوان یک تست روتین در تشخیص ورم پستان تحت بالینی به دلیل پرهزینه و وقت گیر بودن مناسب نیستند. بنابراین در تشخیص ورم پستان تحت بالینی نیاز به بیومارکرهای جدید است. تست های غیر مستقیم ورم پستان در انتخاب و تشخیص گاوهای مبتلا به عفونت های داخل پستانی مناسب تر هستند. ورم پستان بر ترکیب شیر تاثیرگذار است به طوری که التهاب غده پستان موجب بروز تغییرات متنوعی در ترکیبات شیر می شود. این امر به دلیل تاثیرات موضعی، نشت برخی ترکیبات از خون به داخل شیر و خروج برخی از ترکیبات طبیعی شیر از فضای (لومن) آلوئولی و ورود آنها به فضای اطراف عروقی است (۱۵). شدت این تغییرات به عامل عفونی و پاسخ التهابی بستگی دارد. پارامترهای بررسی استرس اکسیداتیو، کاندید های مناسبی برای تشخیص و پایش ورم پستان هستند(۱۳، ۹). با توجه به افزایش میزان سلول های سوماتیک شیر در طی عفونت باکتریایی، این افزایش نشان دهنده افزایش مقادیر قابل توجهی از سلول‌های نوتروفیل در طی تورم پستان بالینی و تحت بالینی بوده، که منجر به افزایش سطح مالون دی‌آلدئید و کاهش کیفیت شیر و بازارپسندی آن می‌شود

www.SID.ir

Archive of SID

(١٦). بنابراین شمارش سلول های سوماتیک می تواند به عنوان شاخص ارزیابی کیفیت بهداشتی شیر استفاده شود (١٧). اخیرا تلاش های زیادی به منظور پیدا کردن روش های جایگزین مناسب برای شمارش سلول های سوماتیک (استاندارد طلایی تشخیص ورم پستان تحت بالینی) صورت پذیرفته است، از این رو اندازه گیری فعالیت وضعیت کل آنتی اکسیدان ها و شاخص استرس اکسیداتیو موجود در شیر در بررسی و مدیریت سلامت حیوان مورد توجه فراوان قرار گرفته است. هدف از این مطالعه، بررسی ارزش تشخیصی(نقطه برش، حساسیت، ویژگی، درستی بالینی) میزان فعالیت وضعیت کل آنتی‌اکسیدانی و میزان پراکسیداسیون لیپیدی موجود در شیر (که سطح آن به صورت مالون دی‌آلدئید بیان می‌شود)، در تشخیص بیماری تورم پستان تحت بالینی در گاو و ارتباط بین این پارامتر ها و بیماری تورم پستان تحت بالینی در گاو می باشد.

مواد و روش‌کار

جامعه آماری و روش تهیه نمونه های شیر: تعداد ٩٠ راس گاو شیری نژاد هولشتاین به طور تصادفی از ٤ گاوداری صنعتی اطراف تهران انتخاب شدند.گاوهای مورد مطالعه، در دوره شیرواری بسر می بردند و سه مرتبه در روز (٤ صبح، ١٢ ظهر و ٧ شب) با استفاده از ماشین شیردوشی مورد دوشش قرار می گرفتند، قبل از نمونه گیری بر روی هر گاو معاینات بالینی کامل، از لحاظ ضربان قلب، درجه حرارت بدن، تعداد تنفس، سلامت ظاهری پستان و شیر به عمل آمد. گاوهایی در این پژوهش انتخاب شدند که، فاقد هر گونه علایم بالینی دال بر بیماری عفونی و انگلی بوده و در ملامسه پستان هیچ گونه اختلالی را نشان ندادند، به علاوه گاوهایی که در اواخر آبستنی و اوایل دوران شیرواری هستند، حذف شدند. اطلاعات مربوط به سن، وزن، تعداد زایش، وضعیت تغذیه و میزان تولید شیر گاوهای نمونه گیری شده ثبت شد. این گاوها از سیلوی ذرت، کنسانتره و کاه و یونجه تغذیه می شدند. قبل از دوشش ظهر، از هرگاو پس از ضدعفونی کردن سر پستانک ها چند مرتبه با الکل ٧٠ درصد و دور ریختن سه دوشش اولیه، ٤ نمونه شیر (از هر کارتیه یک نمونه) گرفته شد و تحت آزمایش ورم پستان کالیفرنیایی(CMT) قرار گرفت. آزمایشCMT در مزرعه با استفاده از معرف های آماده تجاری Shirazma Co., Noor, (Iran) انجام شد. گاوهایی که CMT هر ٤ کارتیه منفی بود در گروه گاوهای احتمالا سالم هستند و گاوهایی که CMT یکی از کارتیه ها مثبت بود در گروه گاوهایی که احتمالا مبتلا به ورم پستان تحت بالینی، قرار گرفتند. در گاوهایی که CMT شیر هر چهار کارتیه آنها منفی بود، شیر هر ٤ کارتیه و در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی شیر کارتیه مبتلا تحت شرایط استریل اخد گردید. بنابراین، از ٣٤ گاو سالم و ٥٦ گاو مبتلا به تورم پستان تحت بالینی نمونه های شیر(١٠ میلی لیتر) قبل از دوشش ظهر به طریق استریل در فالکون جمع آوری شد. این نمونه ها تا زمان رسیدن به آزمایشگاه در مجاورت کیسه یخ در ظرف یونولیتی سر بسته نگهداری می شدند و حداکثر ظرف مدت یک ساعت به آزمایشگاه جهت شمارش سلول های سوماتیک منتقل شدند. شمارش سلول های سوماتیک موجود در شیر هر دو گروه، با استفاده از دستگاه شمارشگر الکترونیکی Fossomatic 90, FOSS Electric Hillerod, Denmark انجام شد. در نهایت گاوهایی که میزان سلول های سوماتیک شیر هر ٤ کارتیه کمتر از ١٣٠٠٠٠ سلول در هر میلی لیتر شیر بودند، به عنوان نمونه های سالم (گروه شاهد) و گاوهایی که میزان سلول های سوماتیک حداقل یک کارتیه بیش از ١٣٠٠٠٠ سلول در هر میلی لیتر شیر داشتند، به عنوان گاوهای مبتلا به تورم پستان تحت بالینی در نظر گرفته شدند. صافی و همکاران در سال ٢٠٠٩، نقطه برش١٠٠٠ ×١٣٠ سلول در هر میلی لیتر شیر، برای سلول های سوماتیک شیر به منظور تفکیک

www.SID.ir

Archive of SID

گاوهای سالم از گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی پیشنهاد کردند که در مطالعه حاضر نیز نقطه برش مذکور در نظر گرفته شد (۱۸). در گاوهای سالم، شیر هر ٤ کارتیه با یکدیگر مخلوط(Composite milk) و به عنوان یک نمونه در نظر گرفته شد. نمونه های شیر کامل گاوهای سالم و بیمار بر اساس روش یانگ و همکاران (۲۰۱۱) به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور و دمای ٤ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ و لایه چربی رویی شیر دور ریخته شد و شیر بدون چربی (Skimmed milk) برای اندازه گیری میزان فعالیت مالون دی آلدئید و ظرفیت کل آنتی اکسیدانی مورد استفاده قرار گرفت (۱۱).

اندازه گیری وضعیت کل آنتی اکسیدانی شیر: وضعیت کل آنتی اکسیدانی به روش اسپکتروفوتومتری و بر اساس دستورالعمل کیت تجاری شرکت رنداکس انگلستان (Cat. No. NX 2332; Randox Lablatories Ltd., Crumlin, Uk, England) و بر اساس روش آندره و همکاران ۲۰۱٦ اندازه گیری گردید (۱). جهت تولید رادیکال کاتیون $ABTS^{\bullet+}$ (2,2'- Azino- di-[3- ethylbenzthiazoline sulphate] radical cation) بایستی ABTS 2,2'- Azino- di-[3- ethylbenzthiazoline sulphate]) با پراکسیداز (مت میوگلوبین) و پراکسید هیدروژن (H202) انکوبه شده، میزان فعالیت آنتی اکسیدان با ایجاد رنگ نسبتاً پایدار سبز-آبی در طول موج ٦۰۰ نانومتر برحسبmmol/lit توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری مدل (Chemistry analyzer HERA, REF 1803050, spain version 1.1 e) اندازه گیری شد.

اندازه گیری میزان مالون دی آلدئید در شیر: مالون دی آلدئید به عنوان محصول نهایی پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع به شمار می آید. برای اندازه گیری سطح مالون دی آلدئید شیر بر حسب nmol/ml ، به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی از روش اسپکتروفوتومتری بر اساس واکنش با تیوباربیتوریک اسید (Thiobarbituric Acid) (TBA) استفاده شد. طبق این روش مالون دی آلدئید شیر با اسید تیوباربیتوریک ترکیب شده و در طول موج ۵۳۲ نانومتر جذب نوری ترکیب حاصل اندازه گیری شد.(۱۳، ۸) **آنالیز آماری**: بعد از جمع آوری اطلاعات، آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۲۰ انجام شد. با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف یک نمونه ای (One t)(K-S) sample Kolmogorov Smirnov tesمشخص شد که توزیع داده های مربوط به متغیر های سلول های سوماتیک، میزان فعالیت وضعیت کل آنتی‌اکسیدانی و میزان فعالیت مالون‌دی‌آلدئید موجود در شیر نرمال نمی باشد. بنابراین به منظور مقایسه میانگین هرکدام از این سه متغیر در دو گروه گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی از آزمون یومن ویتنی(Mann-Whitney U test) استفاده شد. از آنالیز همبستگی پیرسون و آنالیز رگرسیون خطی برای بررسی شدت ارتباط شاخص پراکسیداسیون لیپیدی و وضعیت کل آنتی اکسیدانی موجود در شیر با سلولهای سوماتیک استفاده شد. از آنالیز راک نیز به منظور تعیین کارایی تست شمارش سلولهای سوماتیک و همچنین متغیرهای وضعیت کل آنتی‌اکسیدانی و میزان فعالیت مالون‌دی‌آلدئید موجود در شیر در تشخیص ورم پستان تحت بالینی استفاده شد. منحنی راک، مقادیر مثبت حقیقی (حساسیت) و مثبت کاذب (۱- ویژگی) را در تمام نقاط برش ممکن نشان داد. سطح زیر منحنی به منظور ارزیابی کارایی تست مورد استفاده قرار گرفت. سطح زیر منحنی بین ۰/۵-۰/۷ بیانگر درستی بالینی پایین، سطح زیر منحنی بین ۰/۷-۰/۹ بیانگر درستی بالینی متوسط و سطح زیر منحنی بالاتر از ۰/۹ نشان دهنده درستی بالینی بالا برای هر تست تشخیصی بود.

نتایج

تعداد دام های مورد مطالعه شامل ۳۵ گاو سالم (۳۸/۹٪) و ۵۵ گاو مبتلا به ورم پستان تحت بالینی (٦۱/۱٪) بودند. تحلیل آماری تفاوت و مقایسه بین میانگین، انحراف معیار و میانه دو گروه مبتلا به ورم پستان تحت بالینی و گاوهای

www.SID.ir

Archive of SID

سالم برای سه متغیر شمارش سلولهای سوماتیک، میزان فعالیت وضعیت کل آنتی‌اکسیدانی و میزان فعالیت مالوندی‌آلدئید موجود در شیر در جدول (۱) نشان داده شده اند. میانگین تعداد سلول های سوماتیک شیر در دو گروه گاوهای بیمار و سالم با یکدیگر دارای اختلاف آماری معنی داری بوده اند (P=۰). از دیگر نتایج تحقیق، وجود اختلاف آماری معنی دار در میزان فعالیت وضعیت کل آنتی‌اکسیدانی و میزان فعالیت مالوندی‌آلدئید موجود در شیر در بین گاوهای سالم و مبتلایان به ورم پستان تحت بالینی می باشد (P=۰). میانگین و میانه میزان فعالیت مالون دی آلدئید موجود در شیر و وضعیت کل آنتی‌اکسیدانی و گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی بطور معناداری نسبت به گاوهای سالم به ترتیب بالاتر و پایین تر بود (P=۰) (جدول۱).

جدول ۱. میانگین، انحراف معیار و نتایج آزمون آماری شمارش سلولهای سوماتیک، مالون دی آلدئید و وضعیت کل آنتی اکسیدانی شیر در گاوهای هلشتاین سالم (n=۳۵) و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی(n=۵۵).

آنالیت	میانگین		انحراف معیار		میانه		P-value
	سالم	مبتلا	سالم	مبتلا	سالم	مبتلا	
شمارش سلولهای سوماتیک (cells×1000/ml)	۱۱۱/۷۵	۲۴۲/۸۲	۹/۷۳	۱۱۹/۷۶	۱۱۰	۱۸۹	۰
وضعیت کل آنتی‌اکسیدانی (mmol/L)	۱۶/۰۴	۱۱/۴۸	۲/۲۴	۲/۷۳	۱۶/۴	۱۲/۳۰	۰
مالوندی‌آلدئید (nmol/ml)	۲۹/۶۱	۷۰/۰۱	۶/۲۸	۸۱/۸۰	۲۸/۳	۵۵/۱	۰

آزمون همبستگی پیرسون بین سه متغیر وضعیت کل آنتی‌اکسیدانی و میزان فعالیت مالوندی‌آلدئید موجود در شیر و شمارش سلولهای سوماتیک شیر در گاوهای سالم و بیمارجدول (۲) نشان داده شده است. نتایج نشان داد بین متغیرهای شمارش سل ولهای سوماتیک و فعالیت مالون دی آلدئید همبستگی معنی دار (P=۰/۰۱) و مثبت است (۰/۲۵۱ = r) و در خصوص ارتباط متغیر شمارش سلول های سوماتیک و ضعیت کل آنتی اکسیدانی همبستگی بین آنها معنی دار (P=۰) و منفی می باشد(r=-۰/۸۷۶). ضریب همبستگی بین میزان مالوندی‌آلدئید موجود در شیر و وضعیت کل آنتی اکسیدانی در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی(r =-۰/۲۸٤) بوده که از نظر آماری منفی و

www.SID.ir

Archive of SID

معنی دار است(P=۰/۰۰۷). (جدول شماره ۲). مدل رگرسیون خطی زمانی که فقط MDA وارد معادله شود با r^2=۰/۰۶۳ و P=۰/۰۱ معنی دار می باشد. r^2=۰/۰۶۳ به این معنی است که ٦ درصد از تغییرات مربوط به شمارش سلولهای سوماتیک را می توان به میزان فعالیت MDA موجود در شیر نسبت داد.

جدول شماره ۲. **نتایج** آزمون همبستگی پیرسون بین مالون دی آلدئید، وضعیت کل آنتی‌اکسیدانی و شمارش سلولهای سوماتیک در شیر گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی (n=۹۰)

آنالیت	شمارش سلول های سوماتیک	وضعیت کل آنتی‌اکسیدانی	مالون دی آلدئید
شمارش سلول های سوماتیک	۱	-۰/۸۷٦**	۰/۲۵۱*
وضعیت کل آنتی‌اکسیدانی	-۰/۸۷٦**	۱	-۰/۲۸٤**
مالون دی آلدئید	۰/۲۵۱*	-۰/۲۸٤**	۱

* وجود همبستگی معنی دار بین میزان پارامترهای مورد سنجش P<۰/۰۵

** وجود همبستگی بسیار معنی دار بین میزان پارامترهای مورد سنجش P<۰/۰۱

مدل رگرسیون خطی زمانی که فقط TAS در دسترس باشد با r^2=۰/۷٦ و P=۰/۰ معنی دار می باشد. r^2=۰/۷٦ به این معنی است که ۷٦ درصد از تغییرات مربوط به شمارش سلولهای سوماتیک را می توان به میزان فعالیت TAS نسبت داد. این مدل جهت پیش بینی تغییرات متغیر وابسته (SCC) از روی تغییرات متغیر مستقل (TAS) مدل مناسبی می باشد. حساسیت و ویژگی، درستی بالینی (سطح زیر منحنی) و نقطه برش مالون دی آلدئید و وضعیت کل آنتی‌اکسیدانی شیر در تشخیص ورم پستان تحت بالینی در جدول (۳) نشان داده شده است. نتایج نشان داد سطح زیر منحنی جهت ارزیابی ارزش تشخیص برای متغیر فعالیت مالون دی آلدئید شیر برابر یک می‌باشد و مقدار ٤٤/٥ nmol/ml برای متغیر فعالیت مالون دی آلدئید شیر به عنوان بهترین نقطه برش با بیشترین میزان حساسیت و کمترین میزان مثبت کاذب، جهت تشخیص نوع ورم پستان بکار برد. با در نظر گرفتن متغیر شمارش سلولهای سوماتیک به عنوان استاندارد طلایی، در خصوص متغیر فعالیت مالون دی آلدئید شیر با توجه به اینکه میانگین و میانه در دو گروه مبتلا و سالم تفاوت معنی دار دارند و در آنالیز منحنی راک نیز سطح زیر منحنی برای آن ۱ محاسبه شد، لذا این تست درستی بالینی بالا داشته و بنابراین این متغیر مانند پارامتر شمارش سلول های سوماتیک دارای ارزش تشخیصی است (جدول ۳).

بحث

اخیرا تلاش های زیادی به منظور پیدا کردن روش های جایگزین مناسب برای شمارش سلول های سوماتیک (استاندارد طلایی تشخیص ورم پستان تحت بالینی) صورت پذیرفته است از این رو اندازه گیری غلظت پارامترهای استرس اکسیداتیو در بررسی و مدیریت سلامت حیوان مورد توجه فراوان قرار گرفته است. ارزیابی پارامترهای استرس اکسیداتیو شاخص های سریع و حساسی بوده و می توانند اطلاعات ارزشمندی را در خصوص وسعت آسیب در حال پیشرفت و ارزیابی درمانی بدهد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۳. نقطات برش پیشنهادی، حساسیت، ویژگی و درستی بالینی(سطح زیر منحنی) مالون دی آلدئید و وضعیت کل آنتی‌اکسیدانی شیر در تشخیص ورم پستان تحت بالینی گاو بر پایه نتایج شمارش سلول های سوماتیک (نقطه برش سلول های سوماتیک ۱۳۰× ۱۰۰۰ cells/mL در نظر گرفته شد)

آنالیت	نقطه برش	حساسیت (با محدوده اطمینان ۹۵٪)	ویژگی (با محدوده اطمینان ۹۵٪)	درستی بالینی یا سطح زیر منحنی (با محدوده اطمینان ۹۵٪)
فعالیت مالون‌دی‌آلدئید شیر	٤٤/٥	٪ ۱۰۰	٪ ۱۰۰	۱
وضعیت کل آنتی‌اکسیدانی شیر	١٤/٨٥	٪ ۱۰۰	٪ ٧٤/٣	۰/۹

با استفاده از اطلاعات به دست آمده از بالا بودن پارامترهای استرس اکسیداتیو در موارد شیوع عفونت های بالینی و تحت بالینی در حال پیشرفت بسته به شدت و مدت پاسخ مرحله حاد می توان شدت عفونت را پیش بینی کرد (۱۵، ۱۳، ۱۱، ۹). در این مطالعه بین تعداد سلول های سوماتیک شیر گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی اختلاف آماری معنی داراشت (P=۰). به این صورت که نقطه برش سلول های سوماتیک cells/ml ۱۳۰۰۰۰ به دست آمد. بر این اساس میانگین تعداد سلول های سوماتیک شیر در مبتلایان بیشتر از تعداد سلول های سوماتیک شیر در گاوهای سالم می باشد که این یافته با نتایج تحقیقات صافی و همکاران ۲۰۰۹ که بیان می کنند، در شیر کارتیه های گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی تعداد سلول های سوماتیک افزایش می یابد، افزایش آنها که، بیانگر التهاب داخل پستانی است، هماهنگی دارد (۱۷). در این تحقیق میانگین و میانه میزان مالون دی آلدئید شیر با نقطه برش ٤٤/٥ nmol/ml، حساسیت و ویژگی ۱۰۰٪ و درستی بالینی یک در گاوهای سالم و مبتلا به تورم پستان تحت بالینی افزایش معنا داری نشان دادند (P=۰). این افزایش معنادار میزان مالون دی آلدئید شیر می تواند، نشان دهنده افزایش تولید گونه های فعال اکسیژن در سطح زیاد جهت بهبود التهاب ناشی از میکروارگانیسم های مهاجم باشد. این امر با گزارش های سایر محققین همخوانی داشت (۱۹، ۱۳، ۱۱، ۱).

Yang و همکاران (۲۰۱۱) افزایش و کاهش معناداری را در میزان MDA وآنزیم GSH-Px شیر ۳۳ راس گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی منطقه نانینگ چین مشاهده کردند. (۱۱). ضریب همبستگی پیرسون میان سلول های سوماتیک و مالون‌دی‌آلدئید موجود در شیر گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی (r =۰/۲۵۱) بدست آمده است، که از نظر آماری مثبت و معنی دار است (P=۰/۰۱). بطوری که افزایش سلول های سوماتیک در شیر گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی، میزان مالون‌دی‌آلدئید موجود در شیر نیز افزایش می یابد. این همبستگی معنادار بین SCC وMDA تحقیق حاضر می تواند در نتیجه افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدی در نتیجه استرس اکسیداتیو ناشی از وضعیت التهابی موجود در کارتیه‌های عفونی و متعاقب آن افزایش سلول های سوماتیک در شیر باشد. نتایج حاصل از تحقیقات پیشین نشان می دهد که تعیین وضعیت آنتی اکسیدانی با تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدی و تجزیه اکسیداتیو پروتئینی مرتبط است (۱). MDA یکی از مهم

www.SID.ir

Archive of SID

ترین و خطرناکترین ترکیبات تشکیل شده بوسیله پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع است که بطور وسیعی به عنوان شاخص پراکسیداسیون استفاده می شود (۱۹)، این نکته بیان کننده این است که میانگین غلظت MDA در نمونه های شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی نسبت به گاوهای سالم افزایش می یابد (۱۹،۱).

در بررسی که بر روی گاوهای مبتلا به تورم‌پستان بالینی و تحت بالینی در مقایسه با گروه کنترل، توسط Kizil و همکاران، در سال ۲۰۰۷ انجام شد، افزایش بیشتر و معناداری در میزان MDA پلاسما در گاوهای مبتلا به تورم پستان بالینی نسبت به گاوهای مبتلا به تورم پستان تحت بالینی در مقایسه با گاوهای سالم دیده شد. همچنین همبستگی مثبت بین میزان MDA و درجات CMT در گاوهای بیمار، بیانگر افزایش واضح میزان پراکسیداسیون لیپیدی که منجر به تشدید استرس اکسیداتیو و افزایش CMT می باشد (۱٦). Suriyasathaporn در سال ۲۰۱۰ در بررسی میزان ترکیبات، مالون دی آلدئید و سلولهای سوماتیک بر روی ۱۳۳ نمونه شیر تانک مخزن گاوهای شبری تایلند، نشان دادند که میزان MDA شیر با میزان سلول های سوماتیک شیر ارتباط مثبت و معنی داری دارد، بطوری که با افزایش میزان سلول های سوماتیک در شیر میزان MDA در شیر نیز افزایش می یابد (۱۲).

روش های مختلفی برای ارزیابی فعالیت کل آنتی اکسیدانی در شیر بر اساس روش اسپکتروفوتومتری بنا شده است که می توان به روش ABTS، روش FRAP (Ferric Reducing antioxidant Power) و ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) و Cupric Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC) اشاره کرد (۲۰)، نتایج سنجش ظرفیت کل آنتی اکسیدانی در شیر بستگی به روش مورد استفاده و شرایط آزمایش دارد. روش ABTS ظرفیت کل آنتی اکسیدانی را هم در کل شیر و هم در قسمت آب پنیر ارزیابی می کند و همچنین نسبت به بررسی کازئین شیر حساس تر است. در حالی که روش FRAP فقط برای قسمت آب پنیر مناسب بوده، ولی برای ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدان پروتئینی کمتر مناسب است. در مطالعه حاضر برای ارزیابی وضعیت کل آنتی اکسیدانی در نمونه های شیر از روش ABTS استفاده شده است. در این مطالعه کاهش معنادار و قابل ملاحظه میانگین و میانه میزان TAS شیر با نقطه برش١٤/٨٥ mmol/L و درستی بالینی متوسط ۰/۹، در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی به دلیل افزایش تقاضای آنتی اکسیدانی پستان جهت به حداقل رساندن اثرات تحریکی سلول های نوتروفیل در کارتیه‌های عفونی، افزایش تولید متابولیت های فعال اکسیژن و به موازات افزایش سطح MDA شیر می باشد (P=۰). فعالیت کل آنتی اکسیدانی شیر مربوط به حضور آنتی اکسیدان های آنزیمی در شیر از قبیل کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز، لاکتوپراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز و مولکول های آنتی اکسیدانی غیر آنزیمی مانند گلوتاتیون، پلی پپتیدها، پروتئین ها، ویتامین های آنتی اکسیدانی است (۵). این یافته با تحقیقات Atakisi و همکاران (۲۰۱۰) بر روی گاوها و Silaniko و همکاران (b۲۰۱٤)، در بزها و Andreh و همکاران (۲۰۱٦) در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی که بیان می کنند، میزان TAS شیر در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی، کاهش معناداری نشان می دهد، هماهنگی دارد (۹، ٦، ۱). بر اساس مطالعات پیشین، شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی دارای یک فعالیت کم آنتی اکسیدانی بوده و بیان کننده ارتباط مستقیم بین وضعیت کل آنتی اکسیدانی و حدت عفونت که منعکس کننده میزان تعداد سلول های سوماتیک در شیر است (۹، ٦، ۱).

در بررسی Andreh و همکاران (۲۰۱۰)، افزایش میزان سلول های سوماتیک در شیر دارای همبستگی با میزان MDA و فرایندهای پراکسیداسیون لیپیدی در شیر و خون

www.SID.ir

Archive of SID

دام های بیمار است. بنابراین افزایش فعالیت آنزیم های انتی اکسیدان در خون و شیر دام های بیمار تحت تاثیر افزایش فرایندهای استرس اکسیداتیو و افزایش MDA در شیر و خون است (۸). Andreh و همکاران (۲۰۱٦) ، طی مطالعه ای بر روی شیر گاو نشان دادند که میزان TAS در شیرهای با SCC زیاد (بین ۵۰۰-۱۰۰ هزار در هر میلی لیتر) در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی کاهش معناداری نسبت به شیرهای سالم نشان داد و میانگین آنµmol/ml ۱/۳٤۳±۷/۳٤۸ بود ولی میزان MDA در شیرهای گاوهای بیمار افزایش معنادار و میانگین آن nmol/ml ۲/۰٦۰±۷۰/٤٦۵ بود. همچنین میزان فعالیت این پارامترها در شیر با افزایش میزان سلول های سوماتیک در شیر دارای همبستگی مستقیم بود که نشان دهنده وقوع استرس اکسیداتیو و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی در غدد پستانی آلوده و شیر گاوهای بیمار می باشد (۱). کاهش غلظت آنتی اکسیدان های زنجیره ای (ویتامین C و بتا- کاروتن) و افزایش غلظت GSH و MDA نشان دهنده وقوع استرس اکسیداتیو درسطح متوسط در التهاب غدد پستانی در طی بیماری ورم پستان بالینی و تحت بالینی است. بنابراین این شرایط ممکن است فاکتور تشدید کننده ی ورم پستان باشد (۱٦). ورم پستان بالینی و تحت بالینی در گاو با سرازیر شدن رادیکال های آزاد و افزایش ظرفیت اکسیداسیون و کاهش ظرفیت آنتی اکسیدان در شیر مرتبط است و تغییرات میزان نیتریک اکسید و ظرفیت کل اکسیداسیون در شیر می تواند ابزار تشخیصی جایگزین برای غربالگری ورم پستان تحت بالینی باشد (۹)، این تفاوت و تنوع در گزارش های مختلف می تواند به دلیل تفاوت های بیولوژیک گاوها، تفاوت در شدت (پاتوژنیسیته) و نوع عامل مسبب ورم پستان تحت بالینی، تفاوت در روش های اندازه گیری و در نظر گرفتن نقاط برش مختلف برای تعداد سلول های سوماتیک (استاندارد طلایی تشخیص ورم پستان تحت بالینی) در مطالعات مختلف باشد. در مطالعه حاضر درستی بالینی میزان فعالیت مالوندی‌آلدئید موجود در شیر در تشخیص ورم پستان تحت بالینی با در نظر گرفتن شمارش سلول های سوماتیک به عنوان استاندارد طلایی تشخیص این بیماری تعیین گردید. در تشخیص گاوهای سالم از گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی بر اساس شمارش سلول های سوماتیک، تعیین میزان مالون دی آلدئید دارای حساسیت (Se=٪۱۰۰) و ویژگی (Sp=٪۱۰۰) و درستی بالینی بالایی بودند. با توجه به اطلاعات نویسندگان این مطالعه، تاکنون در خصوص حساسیت، ویژگی، درستی بالینی و نقطه برش شاخص های استرس اکسیداتیو و ظرفیت کل آنتی اکسیدانی شیر در تشخیص ورم پستان تحت بالینی گاو تحقیقی در دنیا صورت نگرفته است و تحقیق حاضر از این نظر منحصر به فرد است. Akerstedt در سال ۲۰۰۸ گزارش کرد شمارش سلول های سوماتیک در تشخیص کوارترهای آلوده فاقد حساسیت و ویژگی کافی است، بنابراین در تشخیص ورم پستان تحت بالینی نیاز به بیومارکرهای جدیدتری است (۱٤). تنها مشکل استفاده از پارامترهای استرس اکسیداتیو در تشخیص ورم پستان تحت بالینی هزینه بر بودن آنها است که امروزه مطالعاتی بر روی طراحی روش های ساده، سریع و حساس و دقیق جهت انتخاب مهمترین بیومارکرهای استرس اکسیداتیو در شیر گاو در حال انجام است تا بتوان این اندازه گیری را با هزینه بسیار پایین در سطح فارم نیز انجام داد.

تخریب و دژنراسیون بافتی در غدد پستانی دچار التهاب در طول ورم پستان تحت بالینی به دلیل استرس اکسیداتیو در سطح بالا، افزایش سطح MDA شیر و افزایش ظرفیت کل آنتی اکسیدانی شیر ایجاد می گردد. با توجه به حساسیت و ویژگی بالای میزان مالون دی آلدئید شیر در تشخیص ورم پستان تحت بالینی امکان دارد اندازه گیری این بیومارکر در آینده ای نزدیک جایگزین شمارش سلول های سوماتیک

www.SID.ir

Archive of SID

شود یا به عنوان یک آزمایش مکمل در کنار آن به کار رود تا با تشخیص زود هنگام از خسارت های هنگفتی که این بیماری به صنعت گاو شیری که یکی از ارکان مهم اقتـصاد هر کشور است می زند تا حد زیادی کاسته شود. البـته برای اثبات این موضوع نیاز است تحقیقات بیشتری بر روی پتانـسیل پارامترهای استرس اکسیداتیو شیر در تشخیص ورم پستان تحت بالینی صورت پذیرد.

تشکر و سپاسگزاری:
نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از حوزه پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد بهبهان و همکاری های دکتر علی بهزادی و مهندس بابک جهت انجام نمونه گیری و دکتر مهرداد عامری در زمینه مشاوره در مراحل اجرای تحقیق اعلام می نمایند.

فهرست منابع

1- Andrei S, Matei S, Rugină D, Bogdan L, Ştefănuţ C. Interrelationships between the content of oxidative markers, antioxidative status, and somatic cell count in cow's milk. Czech Journal of Animal Science. 2016; 61(9):407-13.
2- Rinaldi M, Moroni P, Paape MJ, Bannerman DD. Evaluation of assays for the measurement of bovine neutrophil reactive oxygen species. Veterinary immunology and immunopathology. 2007; 115(1-2):107-25.
3- Andrei S, Pintea A, Bunea A, Groza I, Bogdan L, Ciupe S, Matei S, Crainic D. Non-enzymatic antioxidants concentration and lipids peroxidation level in milk from cows with subclinical mastitis. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine. 2009; 66(1):196-202.
4- Zhong S, Ma C, Lin YC, Luo Y. Antioxidant properties of peptide fractions from silver carp (Hypophthalmichthys molitrix) processing by-product protein hydrolysates evaluated by electron spin resonance spectrometry. Food chemistry. 2011;126(4):1636-42.
5- Silanikove N, Merin U, Leitner G. Nitrite and catalase levels rule oxidative stability and safety properties of milk: a review. RSC Advances. 2014a; 4(50):26476-86.
6- Silanikove N, Merin U, Shapiro F, Leitner G. Subclinical mastitis in goats is associated with upregulation of nitric oxide-derived oxidative stress that causes reduction of milk antioxidative properties and impairment of its quality. Journal of dairy science. 2014b; 97(6):3449-55.
7- Matei ST, Groza I, Bogdan L, Ciupe S, Nicodim FI, Andrei S. Correlation between mastitis pathogenic bacteria and Glutathione peroxidase activity in cows milk. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca Veterinary Medicine. 2011; 1(68): 221–25.
8- Andrei S. Matei S, Zinveliu D, Pintea A, Bunea A, Ciupe S, Groza IS. Correlations between antioxidant enzymes activity and lipids peroxidation level in blood and milk from cows with subclinical mastitis. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine. 2010; 67(1): 6-11.

www.SID.ir

Archive of SID

9- Atakisi O, Oral H, Atakisi E, Merhan O, Pancarci SM, Ozcan A, Marasli S, Polat B, Colak A, Kaya S. Subclinical mastitis causes alterations in nitric oxide, total oxidant and antioxidant capacity in cow milk. Research in Veterinary Science. 2010; 89 (1):10-3.

10- Yang FL, Li XS. Role of antioxidant vitamins and trace elements in mastitis in dairy cows. Journal of Advanced Veterinary and Animal Research. 2015; 2(1):1-9. Available from:DOI: 10.5455/javar.2015.b48

11- Yang FL, Li XS, He BX, Yang ZL, Li GH, Liu P, Huang QH, Pan XM, Li J. Malondialdehyde level and some enzymatic activities in subclinical mastitis milk. African Journal of Biotechnology. 2011; 10 (28):5534-8.

12- Suriyasathaporn W, Vinitketkumnuen U, Chewonarin T. Relationships among malondialdehyde, milk compositions, and somatic cell count in milk from bulk tank. Sonklanakarin Journal of Science and Technology. 2010; 32(1):23-6.

13- Suriyasathaporn W, Chewonarin T, Vinitketkumnuen U. Differences in severity of mastitis and the pathogens causing various oxidative product levels. Advances in Bioscience and Biotechnology. 2012; 3(04):454. Available from:http://dx.doi.org/10.4236/abb.2012.324064

14- Åkerstedt M, Waller KP, Larsen LB, Forsbäck L, Sternesjö Å. Relationship between haptoglobin and serum amyloid A in milk and milk quality. International dairy journal. 2008; 18(6):669-74.

15- Pyörälä S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. Veterinary research. 2003; 34(5):565-78. Available from:DOI: 10.1051/vetres:2003026

16- Kizil O, Akar Y, Saat N, Kizil M, Yuksel M. The plasma lipid peroxidation intensity (MDA) and chain-breaking antioxidant concentrations in the cows with clinic or subclinic mastitis. Revue de Médécine Vétérinaire. 2007;158(11):529-33.

17- Andrei S, Matei S, Fit N, Cernea C, Ciupe S, Bogdan S, Groza IS. Glutathione peroxidase activity and its relationship with somatic cell count, number of colony forming units and protein content in subclinical mastitis cows milk. Romanian Biotechnological Letters. 2011; 16(3):6209-17.

18- Safi S, Khoshvaghti A, Jafarzadeh SR, Bolourchi M, Nowrouzian I. Acute phase proteins in the diagnosis of bovine subclinical mastitis. Veterinary clinical pathology. 2009; 38(4):471-6.

19- Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases. 2005; 15(4):316-28.

20- Çekiç SD, Demir A, Başkan KS, Tütem E, Apak R. Determination of total antioxidant capacity of milk by CUPRAC and ABTS methods with separate characterisation of milk protein fractions. Journal of Dairy Research. 2015; 82(2):177-84.

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir