تعیین ظرفیت کل آنتی اکسیدانی پلاسما درگاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی

قاسمیان، ا.*[۱]، سلیمی بجستانی، م.ر.[۲]

دریافت: ۱۳۹۰/۰۸/۲۱ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۰/۱۰

خلاصه

ورم پستان، واکنش التهابی غدد پستانی در نتیجهٔ هجوم پاتوژن هاست، که با تغییرات پاتولوژیکی در بافت پستان، افزایش سلول های سوماتیک و تغییرات فیزیکی، شیمیایی و میکروبی در شیر مشخص می شود. هدف از مطالعهٔ حاضر تعیین وضعیت کل آنتی اکسیدان پلاسما درگاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی در مقایسه با گاوهای سالم است. نمونه های شیر و خون هپارینه از ۴۵ گاو سالم و ۴۵ گاو شیری مبتلا به تورم پستان تحت بالینی شهرستان بهبهان جمع آوری شد. نتایج نشان داد که بیشترین باکتری جدا شده از موارد ورم پستان تحت بالینی *استافیلوکوکوس ارئوس* است. بین میزان وضعیت کل آنتی اکسیدان پلاسما در گروه های مورد مطالعه، اختلاف معنی داری مشاهده نشد($P>0.05$). همبستگی بین تعداد سلول های سوماتیک و وضعیت کل آنتی اکسیدان منفی و معنی دار است ($P<0.001$). با دریافت آنتی اکسیدان به میزان لازم در جیرهٔ غذایی افزایش مقاومت علیه ورم پستان تحت بالینی امکان پذیر است.

واژه های کلیدی: آنتی اکسیدان، پلاسما، ورم پستان تحت بالینی، گاو.

۱. گروه دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بهبهان، بهبهان، ایران.

۲.گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

*نویسنده مسؤول: ghasemian1249@yahoo.com

مقدمه

ورم پستان به التهاب غدهٔ پستانی بدون توجه به علت آن اطلاق می گردد و با تغییرات فیزیکی، شیمیایی و معمولاً میکروبی شیر و همچنین تغییرات حاصل از بیماری در بافت غدهٔ پستانی مشخص می شود. این بیماری، بخصوص در گاوهای شیری، حائز اهمیت است. یکی از انواع ورم پستان، نوع تحت بالینی است که تشخیص به موقع آن اهمیت اقتصادی بسیاری دارد (Erskine و همکاران، ۱۹۹۳؛ Brad ford، ۱۹۹۶). ورم پستان تحت بالینی باعث کاهش کمیت و کیفیت شیر می شود 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 می شود؛ به طوری که در بسیاری از گله های گاوهای شیری به ازای هر ۱۰۰ رأس گاو ۳۰ تا ۴۰ رأس گاو مبتلا به بیماری ورم پستان تحت بالینی است (Åkerstedt و همکاران، ۲۰۰۸؛ Bolourchi و همکاران، ۲۰۰۸؛ Pyörälä، ۲۰۰۳ ; Safi و همکاران، ۲۰۰۹). در امریکا کاهش تولید ناشی از ورم پستان تحت بالینی، سالیانه در حدود یک میلیارد دلار (۱۱۰دلار به ازای هر گاو) خسارت به صنعت شیری این کشور وارد می کند و طبق آمار دیگری، ۷۰ درصد از موارد کاهش تولید شیر در گله مربوط به ورم پستان تحت بالینی است (Bolourchi و همکاران، ۲۰۰۸؛ Seegers و همکاران، ۲۰۰۳). در ایران نیز هر چند آمار دقیقی در رتبه بندی و مقایسهٔ خسارات ناشی از بیماری ها تاکنون منتشر نشده، ولی به نظر می رسد که ورم پستان تحت بالینی در کنار بیماری های تولید مثل، لنگش و احتمالاً برخی بیماری های شایع دیگر نظیر لوکوز و یون از مهمترین و خسارت بارترین بیماری هایی باشد که گله های شیری ما را تهدید می کند. اطلاعات ۹ سال اخیر (۱۳۷۹–۱۳۸۷) در بیش از ۳۴ گلهٔ صنعتی بزرگ، متوسط و کوچک در ایران نشان می دهد که میزان بروز ورم پستان بین ۰/۵–۲۵ درصد در هر ماه بوده است .افت تولید شیر تنها از ناحیهٔ ورم پستان تحت بالینی در سال ۱۳۸۵ تقریباً ۱۵۰ هزار تن در سطح ملی تخمین زده شده است (تقریباً ۴۲۰ کیلوگرم در هر دوره شیرواری)، که بر پایهٔ بهای خرید هر کیلوگرم شیر در سال ۱۳۸۵ (۲۸۰۰ریال) تقریباً ۴۲۰ میلیارد ریال تخمین زده شده است (Bolourchi و همکاران، ۲۰۰۸).

در شرایط نرمال متابولیکی، طی روند فسفوریلاسیون اکسیداتیو که در داخل میتوکندری انجام می شود و در طی بیماری های وابسته به رادیکال های آزاد از قبیل دیابت، بیماری های عصبی و بیماری های التهابی، مقادیر قابل توجهی از ترکیبات شیمیایی به نام رادیکال آزاد اعم از گونه های فعال و واکنشی اکسیژن (سوپراکسید، هیدورکسید، پراکسید، پراکسید هیدروژن) تولید می شود. در صورتی که این ترکیبات فعال، حذف و مهار نشوند، باعث آسیب و تخریب سلولی و صدمات جبران ناپذیری خواهند شد (Diplock، ۱۹۹۵؛ Halliwell و Gutteridge، ۱۹۸۶؛ Hogan و همکاران،۱۹۹۳).

در حالت طبیعی در بدن، بین تولید رادیکال های آزاد و حذف آنها، تعادلی وجود دارد، هرگاه این تعادل به هم بخورد، استرس اکسیداتیو حاصل می شود. در واقع استرس اکسیداتیو به انحراف (شیفت) تعادل واکنش های اکسیداسیون احیا (Redoxء) به طرف افزایش اکسیداسیون سلولی و کاهش واکنش های احیا گفته می شود که در این حالت، افزایش شدید تولید مولکول ها و یون های فعال اکسیژن رخ می دهد. در بیماری ورم پستان، افزایش تولید رادیکال های آزاد و به طبع آن، افزایش روند استرس اکسیداتیو به وجود می آید که این روند بتدریج باعث اثرات سوء و مخرب در مبتلایان به ورم پستان می شود؛ بنابراین سیستم بیولوژیک برای محافظت و جلوگیری از آسیب و تخریب سلولی از ترکیباتی استفاده می کند که باعث نابودی و مهار رادیکال های آزاد شوند. به این ترکیبات، آنتی رادیکال ها یا عوامل آنتی اکسیدانی گفته می شود (Niki، ۱۹۸۷؛ Halliwell و Gutteridge، ۱۹۹۰؛ Tatorocha و همکاران، ۱۹۹۴؛ Lykkesfeldt و Svendsen، ۲۰۰۷). پارامتر ظرفیت کل آنتی اکسیدانی در برگیرندهٔ فعالیت کل آنتی اکسیدان ها و آنزیم های آنتی اکسیدان است. تخلیه ظرفیت کل آنتی اکسیدان با سرازیر شدن مخزن کل آنتی اکسیدان، بخصوص از ارگان های کبد و بافت چربی و فعال شدن آنزیم های آنتی اکسیدان جهت حذف و از میان برداشتن استرس اکسیداتیو رخ می دهد. در فاز بعدی استرس اکسیداتیو، میزان فعالیت ظرفیت کل آنتی اکسیدان به دلیل تخلیه آنتی اکسیدان ها کاهش می یابد. ملکول های آنتی اکسیدان با وزن ملکولی

پایین به جایگاهای خاصی از سلول که استرس اکسیداتیو به وقوع پیوسته، نفوذ کرده و از هرگونه صدمات گروه های واکنشی اکسیژن محافظت به عمل می آورند. هدف بالینی از تعیین ظرفیت کل آنتی اکسیدانی، بررسی میزان افزایش در معرض خطر بودن بیماران فوق در زمان کاهش مصرف مواد مغذی است، همچنین جهت نظارت و بهینه بودن درمان آنتی اکسیدانی به کار می رود (Berry و همکاران، ۱۹۹۵; Castillo و همکاران، ۲۰۰۸ ; Ghiselli و همکاران، ۲۰۰۰ ; Zima و همکاران، ۱۹۹۶). ارزیابی وضعیت آنتی اکسیدانی بدن به عنوان شاخص استرس اکسیداتیو توسط سه رهیافت صورت می گیرد:
۱.تعیین غلظت کل یا تک تک آنتی اکسیدان ها در پلاسما یا سرم بدن.
۲.تعیین فعالیت آنزیم های خاص انتخاب شده.
۳. ارزیابی شاخص های استرس اکسیداتیو از قبیل ۸- هیدروکسی گوانوزین یا محصولات لیپو پراکسیداسیون LDL در بدن (Psotova و همکاران، ۲۰۰۱).

تعیین ظرفیت کل آنتی اکسیدانی بر اساس ارزیابی کاهش تأثیر کلی تک تک آنتی اکسیدان های با وزن ملکولی پایین بدن، که دارای خصوصیت هیدروفوبیک و هیدروفیلیک هستند، انجام می گیرد (Cao و Prior، ۱۹۹۸). بنابراین اندازه گیری ظرفیت کل آنتی اکسیدان اطلاعات بیولوژیکی بیشتری نسبت به اندازه گیری غلظت هر کدام از آنتی اکسیدان ها می دهد. به علاوه، ظرفیت کل آنتی اکسیدانی سلول به طور اساسی به سیستم آنزیمی نسبت داده شده، که پلاسمای خون بیشتر این آنتی اکسیدان های با منشاء غذایی را در بر می گیرد. این قبیل ترکیبات مهم و ارزشمند برای حذف رادیکال های آزاد مصرف شده، بنابراین جایگزین آنها باید از طریق جیرهٔ غذایی تأمین شود. ظرفیت کل آنتی اکسیدانی پلاسما، می تواند هم به وسیلهٔ افزایش رادیکال ها و هم به وسیلهٔ دریافت آنتی اکسیدان ها تغییر کند؛ در واقع افزایش معنی دار ظرفیت کل آنتی اکسیدان پس از مصرف ویتامین های C، E، بتاکاروتن و مکمل های مواد معدنی رخ می دهد (Castillo و همکاران، ۲۰۰۸ ; Ghiselli و همکاران، ۲۰۰۰). ظرفیت کل آنتی اکسیدانی پلاسما نیز می تواند حاصل ترکیب تمام آنتی اکسیدان های با زنجیرهٔ منقطع از قبیل گروه های تیول پروتئین و اسید اوریک باشد (Sahlin و همکاران، ۱۹۹۱). بنابراین می توان بهترین تعریف مفهومی ظرفیت کل آنتی اکسیدانی پلاسما را، حاصل حضور همزمان بسیاری از پرو اکسیدان ضعیف تعریف شده با ترکیبات آنتی اکسیدانی دانست. ظرفیت کل آنتی اکسیدانی، شاخص حساس و معتبر جهت شناسایی تغییرات استرس اکسیداتیو در بدن بوده، در حالی که تنها از طریق اندازه گیری یک آنتی اکسیدان خاص، قابل بررسی نیست (Castillo و همکاران، ۲۰۰۸ ; Ghiselli و همکاران، ۲۰۰۰).

بیشترین ارزش بررسی آزمایشگاهی میزان ظرفیت کل آنتی اکسیدانی در واکنش های التهابی پستان در این است که، می‌توان اثر هرگونه سیاست درمانی را در برطرف کردن تورم پستان مورد ارزیابی قرار داد. مطالعات اندکی در زمینهٔ بررسی ظرفیت کل آنتی اکسیدان در بیماری ورم پستان تحت بالینی در گاو وجود دارد. هدف از این مطالعه، ارزیابی وضعیت کل آنتی‌اکسیدانی پلاسما به عنوان شاخص بالینی استرس اکسیداتیو در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی در مقایسه با گاوهای سالم در شهرستان بهبهان، می باشد.

مواد و روش کار:

تعداد ۹۰ رأس گاو شیری، نژاد هولشتاین خالص به ظاهر سالم به طور تصادفی از ۴ گاوداری صنعتی اطراف بهبهان، جهت نمونه گیری انتخاب شدند. گاوهای مورد مطالعه در دورهٔ شیرواری به سر می بردند و سه مرتبه در روز با استفاده از ماشین شیردوشی، دوشیده می شدند. قبل از نمونه گیری بر روی هر گاو معاینات بالینی کامل، از لحاظ ضربان قلب، درجهٔ حرارت بدن، تعداد تنفس، سلامت ظاهری پستان و شیر انجام شد. گاوهایی که در این مطالعه انتخاب شدند، فاقد هرگونه علایم بالینی دال بر بیماری بودند و در ملامسهٔ پستان هیچ گونه اختلالی را نشان ندادند، به علاوه، گاوهایی که در اواخر آبستنی و اوایل دوران شیرواری هستند، از مطالعه حذف شدند. اطلاعات مربوط به سن، وزن، تعداد زایش، وضعیت تغذیه و میزان تولید شیر گاوهای نمونه گیری شده ثبت شد. همچنین این گاوها از سیلوی ذرت، کنسانتره و کاه و یونجه تغذیه می شدند. در این تحقیق، دو گروه گاو مورد بررسی قرار گرفت. گروه اول، گروه بیمار که در واقع گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی و در عین حال به ظاهر سالم

از لحاظ ابتلا به دیگر بیماری های التهابی بودند و گروه دوم، گروه شاهد، گاوهایی بودند که به ورم پستان تحت بالینی و دیگر بیماری های التهابی مبتلا نبودند. از این رو به منظور دستیابی به دو گروه فوق در ابتدا نمونه های شیر گاوها بررسی شد. بنابراین، از ۴۵ گاو سالم و ۴۵ گاو مبتلا به تورم پستان تحت بالینی، نمونه های شیر قبل از دوشش ظهر به طریق استریل از هر کارتیه یک نمونه جمع آوری (قبل از نمونه گیری سه دوشش اولیه شیر دور ریخته می شد) و تحت آزمایش ورم پستان کالیفرنیایی (CMT) قرار گرفت. گاوهایی که CMT هر ۴ کارتیه آنها منفی بود در گروه گاوهایی که احتمالاً سالم هستند و گاوهایی کهCMT یکی از کارتیه های آنها مثبت بود، در گروه گاوهایی که احتمالاً مبتلا به ورم پستان تحت بالینی هستند، قرار گرفتند. در گاوهایی که CMT شیر هر ۴ کارتیه آنها منفی بود، شیر هر ۴ کارتیه و در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی شیر کارتیه مبتلا تحت شرایط استریل اخذ گردید و بسرعت مورد آنالیز شمارش سلول های سوماتیک و کشت باکتریایی قرار گرفت. گاوهایی که شمارش سلول های سوماتیک شیر هر ۴ کارتیه آنها کمتر از۲۰۰۰۰۰ سلول در هر میلی لیتر و کشت باکتریایی آنها منفی بود به عنوان گاوهای سالم و گاوهایی که شمارش سلول های سوماتیک شیر حداقل یک کارتیهٔ آنها بیشتر از ۲۰۰۰۰۰ سلول در هر میلی لیتر و کشت باکتریایی آن مثبت بود به عنوان گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی در نظر گرفته شدند. آزمایشCMT در فارم با استفاده از معرف های آمادهٔ تجاری (Shirazma Co., Noor, Iran) و شمارش سلول های سوماتیک موجود در شیر هر دو گروه، با استفاده از دستگاه شمارشگر الکترونیکی Fossomatic 90 analyzer (FOSS Electric., Hillerod., Denmark) انجام شد. برای جداسازی باکتری ها هر نمونه، بلافاصله پس از انتقال به آزمایشگاه باکتری شناسی روی محیط آگارخون دار برای رشد باکتری های گرم مثبت و منفی و محیط مک کانکی آگار برای رشد باکتری های گرم منفی کشت داده می شد. این محیط ها برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه می شدند. پس از این پرگنه های تک جدا شده از این کشت اولیه روی محیط آگارخون دار و در صورت نیاز مک کانکی آگار، کشت مجدد داده شده و برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه می شدند، تا کشت خالصی از این باکتر ها حاصل شود. در ادامه از نمونه های خالص تهیه شده در مرحلهٔ اول تشخیص، اسمیر تهیه و با رنگ آمیزی گرم رنگ آمیزی می شد و در زیر میکروسکوپ نوری شکل ظاهری و نحوهٔ رنگ گرفتن باکتری مورد ارزیابی قرار می گرفت و محیط های کشت افتراقی مربوطه بر طبق استانداردهای مؤسسه ملی ورم پستان انجام گرفت (National Mastitis Council، ۱۹۹۰).

بنابراین پس از انجام کارهای باکتریولوژی و تأیید ورم پستان تحت بالینی بر اساس کشت باکتریایی و شمارش تعداد سلول های سوماتیک، از ۴۵ گاو سالم و۴۵ گاو مبتلا به ورم پستان تحت بالینی، نمونه های خون هپارینه از ورید دمی گاوها، جمع آوری شد. نمونه های خون هپارینه در دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و نمونه های پلاسمای جهت اندازه گیری ظرفیت کل آنتی اکسیدانی پلاسما هر کدام به صورت جداگانه در میکروتیوپ جمع آوری شدند.

وضعیت کل آنتی اکسیدان پلاسما برحسب mmol/lit بر اساس دستورالعمل کیت های شرکت رنداکس ساخت انگلستان (Randox Lablatoris, Crumlin, Uk) اندازه گیری شد. وضعیت کل آنتی اکسیدان (Total Antioxidant Status) (TAS پلاسما بر اساس روش میلر اندازه گیری گردید (Miller و همکاران،۱۹۹۳). جهت تولید رادیکال کاتیون $ABTS^{+}$ [1] ، $ABTS^{2}$ با پراکسیداز (مت میوگلوبین) و پراکسید هیدروژن (H202) انکوبه شد. میزان فعالیت آنتی اکسیدان با ایجاد رنگ نسبتاً پایدار سبز–آبی در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه سپکتروفوتومتری مدل[3] در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد اندازه گیری شد.

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 ظرفیت کل آنتی اکسیدانی پلاسما با سلول های سوماتیک در شیر مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

1- 2,2'- Azino- di-[3- ethylbenzthiazoline sulphate] radical cation

2- 2,2'- Azino- di-[3- ethylbenzthiazoline sulphate]

3-Chemistry analyzer HERA, REF 1803050, spain version 1.1 e

نتایج:

نتایج تحقیق نشان می دهد که بین تعداد سلول های سوماتیک در گاوهای بیمار و سالم، اختلاف آماری معنی داری وجود دارد ($p <۰/۰۰۱$) (جدول ۱). از دیگر نتایج تحقیق، عدم وجود اختلاف آماری معنی دار در میزان وضعیت کل آنتی اکسیدانی پلاسمای خون در بین گاوهای سالم و مبتلایان به ورم پستان تحت بالینی است ($p>۰/۰۵$). (جدول ۱). ضریب همبستگی پیرسون میان سلول های سوماتیک و وضعیت کل آنتی اکسیدانی پلاسما $r= -۰/۳۳۴$ به دست آمده است (جدول۲). در هیچ یک از نمونه های کنترل باکتری رشد نکرده است. باکتری های مختلفی از شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی جدا شد و بیشترین باکتری جداشده، *استافیلوکوکوس ارئوس* (۱۷ مورد) بود. بعد از آن *استافیلوکوکوس هایکوس* (۱۱ مورد)، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (۸ مورد)، *استافیلوکوکوس های کو آگولاز منفی* (۸ مورد)، *استرپتوکوکوس دیس آگالاکتیه* (۵ مورد)، *گونه های استرپتوکوکوس* (۵ مورد)، *استرپتوکوکوس یوبریس* (۲ مورد)، *استافیلوکوکوس های کو آگولاز مثبت* (۲مورد) و *استافیلوکوکوس اینترمدیوس* (۱ مورد) بود.

کورینه باکتریوم، رودوکوکوس، انتروباکتر و اشرشیا کولی، نیز دیگر باکتری های جداشده هستند. در ۵ مورد (۵/۸۸٪) از موارد ورم پستان تحت بالینی هیچ گونه باکتری رشد نکرد (جدول۳).

پارامتر	واحد	سالم n=٤٥	مبتلا به ورم پستان تحت بالینی n=٤٥	P value
وضعیت کل آنتی اکسیدانی پلاسما	mmol/l	۱/۶۹ ± ۰/۲۵	۰/۸۸ ± ۰/۱۷	p =۰/۱
سلولهای سوماتیک در شیر	Cells×10^3/ml	۲۶/۳۸±۲۰/۸۲	۸۳۴/۷۳ ±۸۸۰/۱۹	p <۰/۰۰۱

جدول ۱. میانگین و انحراف معیار و نتایج آزمون آماری T-test وضعیت کل آنتی اکسیدانی پلاسما و تعداد سلول های سوماتیک در گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی

پارامتر	TAS	SCC
SCC	-۰/۳۳۴**	۱
TAS	۱	-۰/۳۳۴**

جدول ۲. ضریب همبستگی پیرسون بین سلول های سوماتیک در شیر و وضعیت کل آنتی اکسیدانی در پلاسما (n=۹۰)

بحث :

در این مطالعه از مجموع نمونه های اخذ شده، برای جداسازی باکتری های عامل ورم پستان تحت بالینی ۱۶ گونهٔ مختلف باکتری جداسازی شد (۸۵/۹٪) و ۵/۸۸٪ از نمونه ها بعد از کشت هیچ گونه رشد باکتریایی نشان ندادند. ورم پستان واگیردار، عمدتاً توسط چهار باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*، *کورینه باکتریوم بوویس* و *مایکوپلاسما بوویس* رخ می دهد و چهرهٔ غالب آن عمدتاً تحت بالینی است (Bolourchi و همکاران، ۲۰۰۸). در مطالعهٔ حاضر شاخص ترین باکتری جداشده از نمونه های ورم پستان تحت بالینی، *استافیلوکوکوس اورئوس* بود که مهمترین عامل

نوع باکتری	تعداد	درصد از کل باکتریهای جدا شده
Staphylococcus aureus	۱۷	۲۰
Staphylococcus hyicus	۱۱	۱۲/۹۴
Staphylococcus epidermidis	۸	۹/۴۱
Staphylococcus coagulase negative	۸	۹/۴۱
Staphylococcus coagulase positive	۲	۲/۳۵
Staphylococcus intermedius	۱	۱/۱۸
Streptococcus dysagalactiae	۵	۵/۸۸
Streptococcus uberis	۲	۲/۳۵
.Streptococcus spp	۵	۵/۸۸
Corynebacterium bovis	۳	۳/۵۳
Corynebacterium renale	۱	۱/۱۸
Corynebacterium psudotubercolosis	۱	۱/۱۸
Rhodococcus equi	۷	۸/۲۳
.Enterobacter spp	۱	۱/۱۸
Escherichia coli	۱	۱/۱۸

جدول ۳. نوع، تعداد و درصد باکتری های جداشده از شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی

باکتریایی ورم پستان گاو است (۲۰٪). بر طبق گزارش Bolourchi و همکاران در سال ۲۰۰۸، شیوع ورم پستان تحت بالینی در یک گله گاو شیری ایران دارای۶۸۰ رأس گاو نژاد هلشتاین، ٪ ۲۳/۷۶ و پاتوژن غالب گله، *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. باتوجه به گزارش های متعدد بلورچی و کسروی (Bolourchi و Kasravi، ۲۰۰۳ ; Bolourchi و همکاران، ۲۰۰۴; Kasravi، ۲۰۰۸)، هر ۴ پاتوژن مسبب ورم پستان واگیردار در گله های شیری کشور حضور دارند. نتایج به دست آمده ای توسط Shitandi و Kihumbu در سال ۲۰۰۴، روی ۲۳۹ شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی نشان دهندۀ غالب بودن فراوانی *استافیلوکوکوس ارئوس* در ایجاد ورم پستان در گاو است. مطالعۀ دیگری روی عوامل ایجادکنندۀ ورم پستان تحت بالینی انجام شده است. این مطالعه بر روی ۱۹۰۷ گاو شیری مربوط به ۱۵۲ فارم انجام شده و نتایج باکتری شناسی آن به شرح زیر است: ۱۱/۷٪ *استافیلوکوکوس ارئوس*، ۵۱٪ *استافیلوکوکوس های کواگولاز منفی*، ۱۴٪ *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*، ۱۷/۵٪ گونه های *استرپتوکوکوس های محیطی*، ۰/۷٪ *اشرشیا کولی* و ۳۵/۵٪ *کورینه باکتریوم بویس* (Busato و همکاران،۲۰۰۰). پس باتوجه به شرایط آب و هوایی نوع عامل ایجادکننده تا حدی متفاوت است. در این مطالعه بین تعداد سلول های سوماتیک شیر گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی اختلاف آماری معنی دار وجود داشت ($p<0/001$). بر این اساس میانگین تعداد سلول های سوماتیک شیر در مبتلایان بیشتر از تعداد سلول های سوماتیک شیر در گاوهای سالم بود که این یافته با نتایج تحقیقات Andrei 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 و نیز با تعریف John و همکاران (۲۰۰۴)، از سلول های سوماتیک، به این صورت که سلول های سوماتیک شامل WBC و سلول های اپتیلیال شیر می باشد و فزایش آنها که، بیانگر التهاب داخل پستانی است، هماهنگی دارد. در این مطالعه ظرفیت کل آنتی اکسیدان پلاسما در نقطۀ

ابرش mmol/ l ۰/۷۵، با حساسیت ۸۰ درصد و ویژگی ۸۶/۷ درصد 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 کم التهاب، در غدد پستانی درگیر است (Safi و همکاران، ۲۰۰۹). از آنجاکه بیماری مورد مطالعه از نوع حاد و شدید نبوده، بنابراین کاهش قابل ملاحظه ای در میزان ظرفیت کل آنتی اکسیدان پلاسما ایجاد نشده است؛ از این رو بین میزان ظرفیت کل آنتی اکسیدان پلاسما در گروه سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی اختلاف آماری معنی داری مشاهده نشد (p>۰/۰۵). کاهش TASدر این بیماری ممکن است در نتیجهٔ تخلیه آنتی اکسیدان های قابل حل در چربی و یا قابل حل در آب، متعاقب التهاب باشد. Åkerstedt و همکاران، در سال (۲۰۰۸) گزارش کردند که شمارش سلول های سوماتیک در تشخیص کوارترهای آلوده فاقد حساسیت و ویژگی کافی است. بنابراین در تشخیص ورم پستان تحت بالینی نیاز به بیومارکرهای جدید است. ظرفیت کل آنتی اکسیدانی، می تواند به عنوان شاخص حساس و معتبر برای شناسایی تغییرات استرس اکسیداتیو در بدن باشد، در حالی که تنها از طریق اندازه گیری یک آنتی اکسیدان خاص، قابل بررسی نیست. شرایط بالینی، متابولیکی و فیزیولوژیکی مختلف که الزاماً مرتبط با استرس اکسیداتیو نیستند، نیز ممکن است منجر به نتایج مختلف در میزان ظرفیت کل آنتی اکسیدانی پلاسما شوند (Castillo و همکاران، ۲۰۰۸ ; Ghiselli و همکاران، ۲۰۰۰). با توجه به حساسیت و ویژگی بالای ظرفیت کل آنتی اکسیدانی پلاسما در تشخیص ورم پستان تحت بالینی و بررسی بهینه بودن اثر هرگونه سیاست های درمانی از آنتی اکسیدان ها (درستی بالینی پارامتر مذکور از استاندارد طلایی تشخیص این بیماری یعنی شمارش سلول های سوماتیک نیز به مراتب بالاتر است) امکان دارد اندازه گیری این بیومارکرها در آینده ای نزدیک، جایگزین شمارش سلول های سوماتیک شود یا به عنوان یک آزمایش مکمل در کنار آن به کار رود تا با تشخیص زودهنگام از خسارت های هنگفتی که این بیماری به صنعت گاو شیری، که یکی از ارکان مهم اقتصاد هر کشور است، می زند تا حد زیادی کاسته شود. البته برای اثبات این موضوع نیاز است تحقیقات بیشتری بر روی پتانسیل ظرفیت کل آنتی اکسیدان پلاسما در تشخیص ورم پستان تحت بالینی صورت پذیرد.

کاهش میزان فعالیت کل آنتی اکسیدان در گاوهای مبتلا به ورم پستان، نشان دهندهٔ وقوع بالای صدمات اکسیداسیون به دلیل واکنش التهابی ایجادی در پستان، توسط Furll و Goressa، در سال (۲۰۰۳)، به اثبات رسید. کاهش وضعیت کل آنتی اکسیدان پلاسما نیز در شترهای مبتلا به ورم پستان بالینی و تحت بالینی به دلیل به حداقل رساندن اثرات تحریکی متابولیت های فعال اکسیژن مشاهده شد (Mohamed، ۲۰۰۷).

از دیگر نتایج تحقیق حاضر، وجود همبستگی معکوس بین تعداد سلول های سوماتیک و میزان ظرفیت کل آنتی اکسیدان است (p<۰/۰۰۱). با افزایش تعداد سلول های سوماتیک در شیر متعاقب ورم پستان، کاهش سطح فعالیت کل آنتی اکسیدان، قابل پیش بینی است تا از استرس اکسیداتیو در طول فرایندهای التهابی وابسته به عوامل اتیولوژیکی واسطه های التهابی مختلف ممانعت به عمل آورده، سبب افزایش کارایی دفاع بدن دام علیه ورم پستان گردد. تحقیق حاضر نشان می دهد که، عفونت سبب تحریک فرایند التهاب و آزاد شدن رادیکال های آزاد اکسیژن در طی فرایند استرس اکسیداتیو شده، که خود منجر به تخلیه منبع کل آنتی اکسیدانی بدن می شود. صدمات شدید در غدد پستانی ملتهب در طی ورم پستان تحت بالینی به دلیل کاهش ظرفیت کل آنتی اکسیدان ایجاد می گردد. نتیجه گیری می شود که، همکاری بین آنتی اکسیدان ها سبب محافظت بدن در مقابل حملات رادیکال های فعال اکسیژن تولیدی در طی التهاب ناشی از ورم پستان تحت بالینی می شود.

تشکر و قدردانی:

این تحقیق با پشتیبانی و حمایت مالی حوزهٔ معاونت پژوهشی و فناوری اطلاعات دانشگاه آزاد اسلامی واحد بهبهان انجام گرفته است. از آقای مهندس علی بهزادی و دکتر سید حامد شیرازی بهشتی ها جهت انجام نمونه گیری و تمامی مراحل این پژوهش، همچنین از همکاری های مهندس محمد علی پسندیده و خانم جوهری در حوزهٔ پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد بهبهان کمال تشکر و قدردانی می گردد.

Journal of Veterinary Medicine & Laboratory 3 (2011) 125-134

Determination of plasma Total Antioxidant Capacity (TAC) in cows with sub clinical mastitis

Ghasemian, O.[1]*, Salimi-Bejestani, M.R.[2]

Received: 12.11.2011 Accepted: 31.12.2011

Abstract

Mastitis is the inflammatory reaction of the udder to invading pathogens, characterized by pathological changes in the mammary tissue, an increase in the number of somatic cells, physical, chemical and microbiological changes in the milk. The objective of the present study was to determine plasma, total antioxidant status in the cows with subclinical mastitis and healthy cows. Milk and heparinized blood samples were collected from 45 normal cows and 45 cows with subclinical mastitis from dairy cattle in khouzestan province, Behbahan, Iran. The result showed that the most dominant isolated bacterium from subclinical mastitis samples was *staphylococcus aureus* (N=17). No significant difference (P>0.05) was shown between plasma TAS concentrations in the studied groups. The correlation between SCC and total antioxidant status was negative and significant (P<0.001).

Optimum antioxidant intake in the feed may enhance the resistance against subclinical mastitis.

Key words: Antioxidant, Plasma, Subclinical mastitis, Cattle.

1. Department of Veterinary, Behbahan Branch, Islamic Azad University, Behbahan, Iran.

2.Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.

*Corresponding author: ghasemian1249@yahoo.com

منابع

Åkerstedt, M., Persson Waller, K., Bach Larsen, L., Forsbäck, L., Sternesjö, Å. 2008. Relationship between haptoglobin and serum amyloid A in milk and milk quality. International Dairy Journal. **18**, 669-674.

Andrei, S., Pintea, A., Bunea, A., Groza, I., Bogdan, L., Ciupe, S., Matei, S., Crainic, D. 2009. Non-Enzymatic antioxidants concentration and lipids peroxidation level in milk from cows with subclinical mastitis. Bulletin University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine. **66(1)**, 196-201.

Berry, E. M and Kohen, R. 1995. Is the biological antioxidant system integrated and regulated? Medical Hypotheses. **53**, 397-401.

Bolourchi, M., Kasravi, R. 2003. A comparison of cow and bulk tank cultures for Streptococcus agalactiae in two herds in Iran. 36th annual Convention Proceedings, American Association of Bovine Practitioners, Columbus, Ohio, USA, September 18-20, p 244.

Bolourchi, M., Kasravi, R., Hovareshti, P., Farzaneh, N., Gorjidoz, M. 2004. High prevalence of subclinical and clinical mastitis caused by environmental and minor pathogens in a large dairy herd in Iran. 23rd World Buiatrics Congress. Quebec, Canada, July 11-16, p 50.

Bolourchi, M., Kasravi, R., A.H. Tabatabayi, A.H., Hovareshti, P. 2004. The effect of a mastitis control program on some udder health and milk quality indices in a large dairy herd in Tehran Province. Journal of Faculty of Veterinary Medicine of University of Tehran. **59(2)**, 115-124.

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. Journal of Veterinary Research. **63**, 263-266.

Brad ford, P. S. 1996. Large animal internal medecine. Disease of horse, cattle, sheep and goats, 2nd ed, 1181- 1195.

Busato, A., Trasches, P., Schallibaum, M and Blum, J.W. 2000. Udder health and risk factors for subclinical mastitis in organic dairy farm in Switzerland. Preventive Veterinary Medicine. **44**, 205-220.

Cao, G., Prior, R. L. 1998. Comparison of different analytical methods for antioxidant capacity of human serum. Clinical Chemistry. **44(6)**, 1309- 1315.

Castillo, C., Hernandez, J., Valverde, I., Pereira, V. 2008. Plasma mlondi adehyde (MDA) and total antioxidant status (TAS) during lactation in dairy health. Research in Veterinary Science. **80**,133-139.

Diplock, A. 1995. Antioxidant nutrient – efficacy in disease prevention and safety. Biochemistry. **17**, 16-18.

Erskine, R.J., Kirk, J.H., Tyler, J.W., Degraves, F.J. 1993. Advances in the therapy for mastitis. Veterinary Clinics of North America. **9**, 499-517.

Furll, M., Goressa, A. 2003. Antioxidant in comman ruminant disease, Vitamin and additives in nutrition of man and animal, Jena /Thuringia, 2th symposium, pp 24.

Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., Scaccini, C. 2000. Total antioxidant capacity as a tool to asses redox status: critical view and experimental data. Free Radical Biology and Medicine. **29**, 1106-1114.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. 1986. Role of free radical and catalytic metal ion in human disease. A Overview Method in Enzymology. **186**, 1-181.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. 1990. Archives of Biochemistry and Biophysics. The antioxidant extracellular fluid **280**, 1-8.

Hogan, J. S., Weiss, W.P., Smith, K. L. 1993. Role of vitamin E and selenium in host defense against mastitis. Journal of Dairy Science. **76**, 2795-2803.

Kasravi, R. 2008. Troubleshooting contagious mastitis in dairy herds. Invited speakers' Proceedings of 15th Iranian Veterinary Convention, Tehran, Iran, April 26 -28, p 33-37.

Lykkesfeldt, J., Svendsen O. 2007. Review. Oxidants and antioxidant in disease: oxidative stress in farm animals. Veterinary Journal. **173**, 502-511.

Miller, J. K., E. Brzezinska- Slebodzinska, and F. C. Madson 1993. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. Journal of Dairy Science. **76**, 2812-2823.

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.

National Mastitis Council Inc. 1990. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. 3rd Ed. National Mastitis Council, Inc., Wilson Boulevard, Arlington V.A. USA.

Niki, E. 1987. Antioxidant in relation to lipid peroxidation. Chemistry and Physics of Lipids. **44**, 227-253.

Pyörälä, S. 2003. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. Veterinary Research. **34**, 565-578.

Psotova, J., Zahalkova, J., Hrabac, J., Simaneck, V., Bartek, J. 2001. Determination of total antioxidant capacity in plasma by cyclic voltametry: Two case report. Biomedical Papers. **145(2)**, 81-83.

Safi, S., Khoshvaghti, A., Jafarzadeh, S.R., Bolourchi,M., Nowrouzian, I. 2009. Acute phase proteins in the diagnosis of subclinical mastitis. Veterinary Clinical Pathology. **38**, 471-476.

Sahlin, K., Ekberg, K., Cizinsky, S. 1991. Changes in plasma hypoxanthine and free radical markers during exercise in man. Acta Physiologica Scandinavica. **142**, 275-281.

Seegers, H., Fourichon, C., Beaudeau, F. 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. Veterinary Research. **34**, 475-491.

Shitandi, A and Kihumbu, G. 2004. Assessment of the California mastitis test usage in small holder dairy herds and risk of violative antimicrobial residues. Journal of Veterinary Science. **5(1)**, 5-9.