

## بررسی میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتایون پراکسیداز) در شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی

فرشاد کایدی<sup>۱</sup>، سیده‌ام‌البین قاسمیان<sup>۲\*</sup>

۱. گروه دامپزشکی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر-ایران.
۲. گروه دامپزشکی، واحد بهبهان، دانشگاه آزاد اسلامی، بهبهان-ایران.

پذیرش: ۲۳ اسفندماه ۱۴۰۰

دریافت: ۸ دی‌ماه ۱۴۰۰

### چکیده

امروزه شمارش سلول‌های سوماتیک و کشت باکتریایی شیر، به عنوان استانداردهای طلایی در تشخیص ورم پستان تحت بالینی گاو در نظر گرفته می‌شوند، اما دقت تشخیصی این آزمایش‌ها پایین است. برای شناسایی مبتلایان، نیاز به بیومارکرهای جدیدی با درصد صحت بالینی بالایی است. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در التهاب پستان تغییر می‌یابند؛ بنابراین در این پژوهش، تعیین ارزش تشخیصی گلوکاتایون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز شیر، در تشخیص ورم پستان تحت بالینی گاوهای شیری به عنوان هدف مطالعه مد نظر قرار گرفتند. تعداد ۹۰ رأس گاو شیری نژاد هلشتاین که از لحاظ بالینی سالم بودند، به طور تصادفی از گاوداری صنعتی اطراف یاسوج انتخاب شدند. از این تعداد، ۵۵ رأس گاو، بر اساس بالاتر بودن تعداد سلول‌های سوماتیک شیر از  $10^3 \times 10^3$  cells/ml و مثبت شدن تست ورم پستان کالیفرنایی حداقل یک کارته آن‌ها، در گروه گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی قرار گرفتند. فعالیت آنزیم‌های گلوکاتایون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز شیر با کیت‌های تجاری شرکت رنداکس انگلستان تعیین گردیدند. حساسیت، ویژگی تشخیصی و نقطه برش هر تست با منحنی راک محاسبه شد. براساس نتایج به دست آمده میانگین فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت‌بالینی به طورمعنی‌داری نسبت به گاوهای سالم به ترتیب بالاتر و پایین‌تر بود ( $P < 0.05$ ،  $P < 0.001$ ) و گلوکاتایون پراکسیداز شیر، دقیق‌ترین تست با حساسیت تشخیصی و ویژگی ۱۰۰ درصد در نقطه برش ۳VIU/ml بود ( $P < 0.001$ ). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تعیین شاخص‌های استرس اکسیداتیو از جمله تعیین فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز در شیر، می‌تواند به عنوان یک بیومارکر قابل اعتماد در تشخیص ورم پستان تحت بالینی در گاو باشد.

**واژه‌های کلیدی:** گلوکاتایون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، بیومارکر، ورم پستان تحت بالینی، گاو.

### مقدمه

جذب پلی‌مورفونوکلوئر در شیر به منظور از بین بردن باکتری‌ها پاسخ می‌دهند. بیشتر از ۹۰ درصد از سلول‌های سوماتیک در غدد پستانی را نوتروفیل‌ها تشکیل می‌دهند (۳ و ۲۲) که فعالیت ضد باکتریایی آن‌ها با گونه‌های واکنشی اکسیژن مرتبط است (۳۳). استرس اکسیداتیو با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی که در نتیجه عدم تعادل بین مکانیسم‌های اکسیدان و آنتی‌اکسیدان است، شناخته می‌شود (۴ و ۳۹). ورم پستان بالینی و تحت بالینی در گاو با استرس اکسیداتیو و نیتروزاتیو در شیر مرتبط است (۷ و ۳۶). فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های شیر نیز منوط به حضور آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از قبیل کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز (GPx)، لاکتوپراکسیداز، گزانتین

ورم پستان یکی از مهم‌ترین بیماری‌ها در گاوهای شیری است که با توجه به کاهش تولید شیر و در معرض خطر قرار دادن سلامت و بهداشت عمومی با مصرف شیر آلوده، دارای پیامدهای اقتصادی فراوانی است (۱۵). عفونت‌های تورم پستان تحت بالینی با کاهش ترشح شیر و تغییرات در ترکیبات شیر، تشخیص داده می‌شوند. چند ساعت پس از عفونت غدد پستانی با میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا، در پاسخ به فرایندهای التهابی تعداد سلول‌های سوماتیک در شیر افزایش می‌یابد. ماکروفاژها، نقش مهمی در نظارت غدد پستانی آلوده ایفا می‌کنند. هنگامی که باکتری‌ها به غدد پستانی حمله می‌کنند و در این بافت کلونیزه می‌شوند، ماکروفاژها با شروع فرایند التهابی با



اکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، پلی‌پپتیدها، پروتئین‌ها، ویتامین و پرو ویتامین‌هایی از قبیل ویتامین A، کارتینوئید، ویتامین E و ویتامین C است (۴، ۲۸ و ۳۶). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شیر نشان دهنده افزایش نسبت سلول‌های پلی مرفونوکلوئر در غدد پستانی است. این فرایند نشان دهنده این است که سلول‌های PMN سبب تغییرات در وضعیت آنتی‌اکسیداتیو و به دنبال آن صدمات اکسیداتیو در غدد پستانی می‌شوند (۱۷). گلوکاتینون پراکسیداز در سیتوپلاسم سلول‌های حیوانی گسترش یافته و بخشی از عملکرد آن در سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی، محافظت سلول‌ها علیه تأثیرات صدمات حاصل از پراکسیدها است. شیر دارای سطوح کمی از این آنزیم است، ولی بیش از ۹۰ درصد آن به صورت خارج سلولی وجود دارد. عملکرد این آنزیم در شیر هنوز به طور کامل شناخته نشده است، لیکن مشخص شده که ۳۰ درصد از این آنزیم به عنصر سلنیوم متصل است. همچنین مشخص شده که میزان آنزیم گلوکاتینون پراکسیداز شیر بر حسب گونه و جیره غذایی متفاوت است (۱۹ و ۴۱). در خصوص آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نیز مشخص شده است که میزان آن در شیر بسیار کم و در حدود ۱۵۰ بار کمتر از خون می‌باشد. این آنزیم در شیر گاو، دارای ساختمانی مشابه با سوپراکسید دیسموتاز اریتروسیته‌ی گاو است (۱۹). حضور این آنزیم در حفظ پایداری آنتی‌اکسیدان در شیر مهم است. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که اضافه کردن سوپراکسید دیسموتاز خارجی سبب کاهش فرایندهای پراکسیداسیون لیپیدی و فراهم آوردن پایداری بیشتر در شیر می‌شود (۱۹). Hicks و Holbrook در سال ۱۹۸۷، میزان SOD را در شیر گاو اندازه‌گیری کردند و نشان دادند که این آنزیم از نظر ویژگی‌های الکتروفوریتیک با SOD اریتروسیته‌ی همان گاوها یکسان است، ولی هیچ شواهدی مبنی بر مشتق شدن SOD از باکتری‌ها یا سلول‌های سوماتیک شیر وجود ندارد (۲۴). برخی مطالعات افزایش فعالیت GPx را در شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان در مقایسه با گاوهای سالم گزارش و ارتباط معنی‌دار آن را با سلول‌های سوماتیک در شیر بیان کردند (۵، ۲۳ و ۲۷). در مطالعه‌ی افزایش و کاهش معنی‌داری به ترتیب در میزان GPx و SOD در شیر بزهای مبتلا به

ورم پستان مشاهده و هم‌بستگی آن‌ها را با تغییر تعداد سلول‌های سوماتیک در شیر بررسی کردند و مشاهده کردند که سن، تعداد زایش و تعداد نوزادان با این الگوی تغییراتی مرتبط نیست (۱۲).

به‌کارگیری فنون کارآمدی که بیماری را در مراحل ابتدایی آن تشخیص دهد، اهمیت خاصی دارد (۸ و ۳۲) و اگرچه برای تشخیص ورم پستان تحت بالینی آزمایش‌های مختلفی در شیر از جمله شمارش سلول‌های سوماتیک، آزمایش ورم پستان کالفرنیایی، آزمایش‌های باکتری‌شناسی، اندازه‌گیری هدایت الکتریکی، اندازه‌گیری لاکتوز و پلاسمین، اندازه‌گیری پروتئین‌های فاز حاد و سنجش فعالیت آنزیم‌های شیر پیشنهاد شده‌است (۱۷، ۳۵ و ۳۸)، لیکن غالباً شمارش سلول‌های سوماتیک شیر برای تشخیص استفاده می‌شود (۸ و ۱۱). در آزمایشگاه‌های مرجع شیر، از روش الکترونیک فلورواپتیکال یا روش شمارشگر فوزوماتیک در سطح وسیعی برای شمارش سلول‌های سوماتیک استفاده می‌شود که هزینه‌بر بوده و تجهیزات پیشرفته آن، همه جا در دسترس نیست (۳۰). شمارش سلول‌های سوماتیک به عنوان استاندارد طلایی در تشخیص ورم پستان تحت بالینی بیان شده است، اما امروزه مشخص شده که ویژگی این آزمایش در تشخیص کارتی‌های مبتلا به ورم پستان تحت بالینی پایین است؛ زیرا مقادیر بالای آن لزوماً بیانگر ورم پستان نیست. (۱). از سویی تعداد سلول‌های سوماتیک علاوه بر التهاب پستان تحت تأثیر بسیاری عوامل دیگر نظیر مدیریت، تعداد دوره‌های شیرواری گاو، مرحله شیرواری، میزان تولید شیر، فصل، سن و نژاد گاو نیز قرار دارد (۱ و ۱۱). از سوی دیگر، برای این که این آزمایش به عنوان یک تست غربالگر در تشخیص کارتی‌های آلوده در گله گاوهای شیری استفاده شود، حساسیت کافی نیز ندارد؛ زیرا در مراحل ابتدایی التهاب پستان ممکن است هنوز تعداد سلول‌های سوماتیک افزایش نیافته باشد. Pyörälä در سال ۲۰۰۳ بیان کرد که امروزه روش‌های رایج تشخیصی نظیر شمارش سلول‌های سوماتیک و آزمون‌های میکروبی در تشخیص ورم پستان به خصوص فرم تحت بالینی، کارایی کافی ندارند (۳۲). از سویی دیگر آزمایش‌های باکتریولوژیک به عنوان یک تست معمول در تشخیص ورم پستان تحت بالینی، به دلیل پر



### مواد و روش کار

این مطالعه از نوع مشاهده‌ای بود و در یک بازه زمانی ۳ ماهه، در پاییز سال ۱۴۰۰ روی ۹۰ رأس گاوهای شیری نژاد هلستاین ۳ تا ۵ شکم زایش با میانگین سن  $5/6 \pm$  ۷۸/۶۳ ماه در گاوداری صنعتی شرکت گسترش کشاورزی دامپروری فردوس پارس (سهامی خاص) و واحد تجاری نهایی گروه، بنیاد مستضعفان انقلاب اسلامی یاسوج - استان کهگیلویه و بویر احمد) به طور تصادفی انجام شد. میانگین تولید شیر  $35/49 \pm 16/1$  کیلوگرم برای هر گاو در روز بود. تغذیه در این گاوداری به روش (TMR Total mixed ration) و سه بار در روز انجام می‌شد. این گاوها از سیلوی ذرت، کنسانتره و کاه و یونجه تغذیه می‌شدند.

گاوهای مورد مطالعه، در دوره شیرواری و پیک تولید شیر (۷۰ تا ۱۰۰ روز پس از زایمان) به سر می‌بردند و سه مرتبه در روز (۴ صبح، ۱۲ ظهر و ۷ شب) با ماشین شیردوشی، دوشیده می‌شدند. قبل از نمونه‌گیری، معاینات بالینی کامل روی هر گاو 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 علائم بالینی دال بر بیماری عفونی و انگلی بودند و در ملامسه پستان هیچ‌گونه اختلالی را نشان ندادند. به علاوه گاوهایی که در اواخر آبستنی و اوایل دوران شیرواری بودند، حذف شدند. اطلاعات مربوط به سن، وزن، تعداد زایش، وضعیت تغذیه و میزان تولید شیر گاوهای نمونه‌گیری شده ثبت شد. ابتدا به منظور نمونه‌گیری قبل از دوشش ظهر، کارتیته‌های هر گاو با آب ولرم به طور کامل شست و شو داده شد و خشک گردید. از هر گاو پس از ضدعفونی کردن سر پستانک‌ها با الکل ۷۰ درصد و دور ریختن سه دوشش اولیه، ۴ نمونه شیر (از هر کارتیته یک نمونه) گرفته شد و تحت آزمایش ورم پستان کالیفرنایی (CMT) قرار گرفت. آزمایش CMT در مزرعه با معرف‌های آماده تجاری (Shirazma Co., Noor, Iran) انجام شد. گاوهایی که CMT در هر ۴ کارتیته آن‌ها منفی بود، در گروه گاوهای احتمالاً سالم و گاوهایی که CMT یکی از کارتیته‌ها مثبت بود، در گروه گاوهایی که احتمالاً مبتلا به ورم پستان تحت بالینی هستند، قرار گرفتند. در گاوهایی که CMT شیر هر چهار کارتیته آن‌ها منفی بود،

هزینه و وقت گیر بودن مناسب نیستند؛ بنابراین در تشخیص ورم پستان تحت بالینی نیاز به بیومارکرهای جدید است. در حال حاضر در فارم تست ورم پستان کالیفرنایی به طور غیر مستقیم به منظور تشخیص ورم پستان تحت بالینی در گاوهای شیری استفاده می‌شود، اما ارزش تشخیصی پایینی برای پایش کارتیته‌های درگیر ورم پستان تحت بالینی دارد (۳۲ و ۴۲). تست‌های غیرمستقیم ورم پستان در انتخاب و تشخیص گاوهای مبتلا به عفونت‌های داخل پستانی مناسب‌تر هستند.

ورم پستان بر ترکیب شیر تأثیرگذار است، به طوری که التهاب غده پستان موجب بروز تغییرات متنوعی در ترکیبات شیر می‌شود؛ این امر به دلیل تأثیرات موضعی، نشت برخی ترکیبات از خون به داخل شیر و خروج برخی از ترکیبات طبیعی شیر از فضای (لومن) آلئولی و ورود آن‌ها به فضای اطراف عروقی است. شدت این تغییرات به عامل عفونی و پاسخ التهابی بستگی دارد (۳۲). اخیراً تلاش‌های زیادی به منظور پیدا کردن روش‌های جایگزین مناسب برای شمارش سلول‌های سوماتیک (استاندارد طلایی تشخیص ورم پستان تحت بالینی) صورت پذیرفته است، از این رو اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی موجود در شیر، در بررسی و مدیریت سلامت حیوان توجه فراوانی داشته‌است. شاخص‌های بررسی استرس اکسیداتیو، کاندیداهای مناسبی برای تشخیص و پایش ورم پستان هستند (۵، ۶، ۷، ۱۱، ۲۸ و ۴۲). بررسی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی GSH-PX و SOD موجود در شیر در بیماری ورم پستان تحت بالینی، جنبه عملی پیدا نکرده؛ بنابراین بررسی آزمایشگاهی شاخص‌های استرس اکسیداتیو و فعالیت برخی آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی می‌تواند در هرگونه سیاست درمانی به منظور برطرف کردن بیماری ورم پستان تحت بالینی و درمان موفقیت‌آمیز آن مفید باشد (۲۳، ۳۸ و ۴۳)؛ بنابراین این پژوهش به منظور بررسی ارزش تشخیصی (نقطه برش، حساسیت، ویژگی و میزان صحت بالینی) اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-PX) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در نمونه‌های شیر گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت‌بالینی در گاوهای ایران، انجام شد.



فعالیت ویژه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در شیر به روش اسپکتروفوتومتری، طبق دستورالعمل کیت تجاری رانسود ساخت شرکت رنداکس انگلستان (RANSOD Kit; Cat. No. 125; Randox Laboratories, ) (Crumlin, Uk) و بر اساس روش مک کورد و فریدوویچ در سال ۱۹۶۹، Andrei و همکاران در سال‌های ۲۰۱۶ و ۲۰۱۰، بر حسب U/ml اندازه‌گیری گردید (۴ و ۶). نقش SOD خنثی کردن رادیکال‌های سمی سوپراکسید تولید شده طی واکنش‌های انرژی زای اکسیداتیو و تبدیل آن‌ها به هیدروژن پراکسید و اکسیژن مولکولی است. در این روش از زانتین و زانتین اکسیداز (XOD) برای تولید رادیکال‌های سوپر اکسید استفاده می‌شود. این رادیکال‌های تولید شده با ماده‌ای موسوم به آی.ان.تی، (۲-۴-یدوفنیل - ۳-۴-نیتروفنول - ۵-فنیل تترازولیوم کلراید) (2- (4- iodophenyl)- 3- (4- nitrophenol) - 5- (INT)(phenyltetrazolium chloride) که در کیت موجود است، واکنش می‌دهد و ماده قرمز رنگی به نام فرمازان تولید می‌کند، سپس میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از طریق اندازه‌گیری درصد مهار انجام واکنش، تعیین می‌گردد.

فعالیت ویژه آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-Px) در شیر، به روش اسپکتروفوتومتری و بر اساس دستورالعمل کیت تجاری رانسول ساخت شرکت رنداکس انگلستان (RANSEL Kit; Cat. No. RS 504, RS 505; ) (Randox Laboratories, crumlin, Uk) و همکاران در سال‌های ۲۰۱۶ و ۲۰۱۱، پاگلیا و والنترین، بر حسب (U/mL) اندازه‌گیری شد (۴ و ۵). آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-Px)، واکنش اکسیداسیون گلوتاتیون (GSH) به وسیله کیومن هیدروپراکسید (Cumene Hydroperoxide) را کاتالیز می‌کند. در حضور آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز (GR-az)، NADPH، گلوتاتیون اکسیده شده (GSSG) به فرم احیا شده (GSH) و هم‌زمان NADPH به  $NADP^+$  تبدیل می‌شود. به منظور سنجش فعالیت GSH-Px، کاهش جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

بعد از جمع آوری اطلاعات، نتایج با نرم افزار SPSS تحت ویندوز ویرایش ۲۰ و انجام آزمون t-student برای مقایسه میانگین‌های میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید

شیر هر ۴ کارتیبه و در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی، شیر کارتیبه مبتلا، تحت شرایط استریل اخذ گردید؛ بنابراین از ۳۵ گاو سالم و ۵۵ گاو مبتلا به تورم پستان تحت‌بالینی نمونه‌های شیر (۱۰ میلی‌لیتر) قبل از دوشش ظهر به طریق استریل در لوله‌های فالکون جمع آوری شد. این نمونه‌ها تا زمان رسیدن به آزمایشگاه در مجاورت کیسه یخ در ظرف یونولیتی سر بسته نگه‌داری می‌شدند و حداکثر ظرف مدت یک ساعت به منظور شمارش سلول‌های سوماتیک به آزمایشگاه منتقل شدند. شمارش سلول‌های سوماتیک موجود در شیر هر دو گروه، با دستگاه شمارشگر الکترونیکی (Fossomatic 90, FOSS Electric Hillerod, Denmark) انجام شد. اساس این دستگاه رنگ کردن DNA یاخته‌های پیکری به وسیله رنگ اتیدیوم بروماید است.

در نهایت گاوهایی که میزان سلول‌های سوماتیک شیر هر ۴ کارتیبه آن‌ها کمتر از ۱۳۰۰۰۰ سلول در هر میلی‌لیتر شیر بود، به عنوان نمونه‌های سالم (گروه شاهد) و گاوهایی که میزان سلول‌های سوماتیک شیر در حداقل یک کارتیبه آن‌ها بیش از ۱۳۰۰۰۰ سلول در هر میلی‌لیتر شیر بود، به عنوان گاوهای مبتلا به تورم پستان تحت بالینی در نظر گرفته شدند.

Shirazi-Beheshtiha و همکاران در سال ۲۰۱۱، نقطه برش  $1000 \times 130$  سلول در هر میلی‌لیتر شیر را برای سلول‌های سوماتیک به منظور تفکیک گاوهای سالم از گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی پیشنهاد کردند که در پژوهش حاضر نیز نقطه برش مذکور در نظر گرفته شد (۳۵).

در گاوهای سالم، شیر هر ۴ کارتیبه با یکدیگر مخلوط (Composite milk) و به عنوان یک نمونه در نظر گرفته شد. به منظور برداشت سلول‌ها و عدم تداخل و تاثیر احتمالی مواد داخل سلولی در نتایج، نمونه‌های شیر گاوهای سالم و بیمار بر اساس روش Yang و همکاران در سال ۲۰۱۱، به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید و لایه چربی رویی شیر دور ریخته شد و شیر بدون چربی (Skimmed milk) برای اندازه‌گیری میزان فعالیت ویژه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و فعالیت ویژه آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز استفاده شد (۴۲).



در حداقل یکی از کارتی‌ها، به‌عنوان دام مبتلا به ورم پستان تحت بالینی (۶۱/۱ درصد) و ۳۵ رأس گاو با سلول‌های سوماتیک شیر هر ۴ کارتی‌ه پایین‌تر از  $1000 \times$ ، به‌عنوان دام سالم (۳۸/۹ درصد) در نظر گرفته شدند.

تفاوت و مقایسه بین میانگین  $\pm$  انحراف معیار، حداقل، حداکثر و دامنه دو گروه مبتلا به ورم پستان تحت بالینی و گاوهای سالم برای شاخص‌های مطالعه شده در شیر در جدول ۱ نشان داده شده‌است. میانگین‌های شمارش سلول‌های سوماتیک شیر در دو گروه گاوهای بیمار و سالم با یکدیگر اختلاف آماری معنی‌داری داشتند ( $P < 0.0001$ )؛ همچنین اختلاف آماری معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز شیر ( $P < 0.05$ ) و فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز شیر در بین گاوهای سالم و مبتلایان به ورم پستان تحت بالینی مشاهده شد ( $P < 0.0001$ ). میانگین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و میزان فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز موجود در شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی به‌طور بسیار معنی‌داری نسبت به گاوهای سالم بالاتر بود ( $P < 0.05$ ) و ( $P < 0.0001$ ) (جدول ۱).

دیسموتاز و گلوکاتایون پراکسیداز و سلول‌های سوماتیک در شیر هر دو گروه مورد مطالعه، از آنالیز هم‌بستگی پیرسون و آنالیز رگرسیون خطی، برای تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگوروف - اسمیرنوف یک نمونه‌ای (One sample Kolmogorov Smirnov test)، استفاده شد. نقطه برش مطلوب برای فعالیت آنزیم‌های گلوکاتایون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در شیر به نحوی که بالاترین حساسیت و ویژگی را پیشنهاد دهند، با منحنی راک و با در نظر گرفتن شمارش سلول‌های سوماتیک به‌عنوان استاندارد طلایی، انجام پذیرفت. منحنی راک، مقادیر مثبت حقیقی (حساسیت) و منفی حقیقی (ویژگی) را در تمام نقاط برش ممکن، نشان داد. سطح زیر منحنی به منظور ارزیابی کارایی تست، استفاده شد. سطح زیر منحنی بین  $0.05 - 0.07$  بیانگر صحت بالینی پایین، سطح زیر منحنی بین  $0.07 - 0.09$  بیانگر صحت بالینی متوسط و سطح زیر منحنی بالاتر از  $0.09$  نشان دهنده صحت بالینی بالا برای هر تست تشخیصی بود (۲۰).

## نتایج

از ۹۰ رأس گاو انتخاب شده در این پژوهش، تعداد ۵۵ رأس گاو با سلول‌های سوماتیک بالاتر از  $1000 \times 130$

**جدول ۱- میانگین  $\pm$  انحراف معیار، حداقل و دامنه سلول‌های سوماتیک، آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز شیر در گاوهای شیری هلشتاین سالم ( $n=35$ ) و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی ( $n=55$ ).**

*P-value	دامنه	حداقل- حداکثر	میانگین $\pm$ انحراف معیار	ابتلا به ورم پستان تحت بالینی	فراسنجه‌های بیوشیمیایی
$0.0001$	۴۳	۸۷-۱۳۰	$111/71 \pm 9/84$	سالم	تعداد سلول‌های سوماتیک در شیر $10^3/ml$ Cells
<	۴۷۰	۱۳۲-۶۰۲	$182 \pm 119/76$ ۲۴۲	مبتلا	تعداد سلول‌های سوماتیک در شیر $10^3/ml$ Cells
$< 0.05$	۶	۱-۷	$3/43 \pm 1/73$	سالم	آنزیم سوپراکسید دیسموتاز شیر (U/ml)
	۲	۰-۲	$1/22 \pm 0/33$	مبتلا	آنزیم سوپراکسید دیسموتاز شیر (U/ml)
$0.0001$	۱۸	۱۷-۳۵	$27/81 \pm 5/164$	سالم	آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز شیر (U/ml)
<	۱۲۶	۳۹-۱۶۵	$85/47 \pm 42/52$	مبتلا	آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز شیر (U/ml)

\*آزمون t-student بین گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی

در شیر و شمارش سلول‌های سوماتیک شیر در جدول ۲ درج شده‌است. بین متغیرهای شمارش سلول‌های

ضرایب هم‌بستگی پیرسون، بین سه متغیر آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز موجود



سوماتیک و آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، هم‌بستگی بین متغیرها معنی‌دار ( $P < 0/001$ ) و از نوع متوسط و منفی است ( $r = -0/55$ ) (جدول شماره ۲).

سوماتیک و فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز شیر هم‌بستگی معنی‌دار ( $P < 0/001$ ) و قوی وجود دارد ( $r = 0/95$ ). در خصوص ارتباط متغیر شمارش سلول‌های

**جدول ۲-** ضرایب هم‌بستگی پیرسون بین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز شیر و تعداد سلول‌های سوماتیک شیر ( $n=90$ ).

سلول‌های سوماتیک در شیر	گلوکاتاتیون پراکسیداز	سوپراکسید دیسموتاز	فراسنجه‌های بیوشیمیایی
۱	$0/95^*$	$-0/55^*$	سلول‌های سوماتیک در شیر
$0/95^*$	۱	$-0/60^*$	گلوکاتاتیون پراکسیداز
$-0/55^*$	$-0/60^*$	۱	سوپراکسید دیسموتاز

\* هم‌بستگی معنی‌دار بین میزان شاخص‌های مورد سنجش  $P < 0/001$

تشخیص نوع ورم پستان  $10^3 \times 131$  و  $37$  بود. با در نظر گرفتن متغیر شمارش سلول‌های سوماتیک به عنوان استاندارد طلایی، متغیر GSH-px شیر با توجه به این‌که در دو گروه مبتلا و سالم تفاوت معنی‌دار، داشتند و در آنالیز منحنی راک نیز سطح زیر منحنی برای آن ۱ محاسبه شد؛ بنابراین این تست صحت بالینی بالایی داشته و مانند متغیر شمارش سلول‌های سوماتیک دارای ارزش تشخیصی است (جدول ۳).

حساسیت و ویژگی، صحت بالینی (سطح زیر منحنی) و نقطه برش آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتاتیون پراکسیداز شیر در تشخیص ورم پستان تحت بالینی در جدول ۳ درج شده‌است. نتایج نشان داد سطح زیر منحنی، برای ارزیابی ارزش تشخیص برای هر دو متغیر شمارش سلول‌های سوماتیک و GSH-px برابر یک است و مقدار آن به ترتیب برای متغیرهای شمارش سلول‌های سوماتیک و GSH-px، به عنوان بهترین نقاط با بیشترین میزان حساسیت و کمترین میزان مثبت کاذب، به منظور

**جدول ۳-** نقاط برش پیشنهادی، حساسیت، ویژگی و صحت بالینی (سطح زیر منحنی) آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتاتیون پراکسیداز شیر در تشخیص ورم پستان تحت بالینی گاو بر پایه نتایج شمارش سلول‌های سوماتیک.

SOD (U/ml)	GSH-px (U/ml)	SCC (cells/mL)	فراسنجه‌های بیوشیمیایی
-	۳۷	$131 \times 10^3$	نقطه برش
-	۱۰۰٪	۱۰۰٪	حساسیت (با محدوده اطمینان ۰/۹۵)
۱۰۰٪	۱۰۰٪	۱۰۰٪	ویژگی (با محدوده اطمینان ۰/۹۵)
۰/۰۵	۱	۱	صحت بالینی یا سطح زیر منحنی (با محدوده اطمینان ۰/۹۵)

نقطه برش سلول‌های سوماتیک  $131 \times 1000$  cells/mL در نظر گرفته شد.

آنالیزهای پروتئومیک که به تنهایی یا همراه همدیگر می‌توانند استفاده شوند، برجسته شده‌اند. (۱۰). به هر حال بیشتر این روش‌ها هنوز در سطح وسیعی استفاده نشده‌است و امکان دسترسی به آن‌ها مشکل است و علاوه بر آن نیاز به نیروی متخصص و هزینه بالایی هم دارند (۳۴ و ۳۷).

#### بحث

در چند سال اخیر، چندین شناساگر یا بیومارکرها برای تشخیص ورم پستان مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. در میان آن‌ها، اندازه گیری pH، سطوح آنزیمی، پروتئین‌ها، پپتیدها، ترکیبات و اجزای شیر و شمارش سلول‌های سوماتیک و همچنین آزمایش‌ها مولکولی، ژنومی و

پراکسیداسیون لیپیدی گزارش کردند (۲۵). اندازه‌گیری میزان آنزیم آنتی‌اکسیدان گلوتاتیون پراکسیداز شیر، روش و شاخص مناسب تشخیصی برای تعیین و تشخیص گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی در گاوهای شیری است (۱۱، ۲۸ و ۴۲).

در پژوهش Andrei و همکاران در سال ۲۰۱۱، میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز شیر با میزان سلول‌های سوماتیک در شیر دارای هم‌بستگی مثبت و معنی‌داری بود که ممکن است، دلیلی بر توانایی آنزیم به منظور تشخیص بیماری ورم پستان تحت بالینی باشد (۵ و ۲۸). در این مطالعه هم‌بستگی مثبت و معنی‌داری بین میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز شیر و سلول‌های سوماتیک شیر مخزن، به‌ویژه سلول‌های نوتروفیل بود. افزایش هم‌زمان فعالیت این آنزیم با افزایش حضور رادیکال‌های پراکسید هیدروژن در شیر همراه است (۵ و ۲۳) و با پژوهش ذکر شده در این زمینه هم‌خوانی و تطابق دارد. گلوتاتیون پراکسیداز یکی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کلیدی در شیر است که کاهش پراکسیدهای مختلف را با کمک گلوتاتیون و دیگر سوبستراهای احیا کننده به‌همراه دارد و در حفاظت علیه صدمات اکسیداتیو ایفای نقش می‌کند (۵).

میانگین میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز شیر در گاوهای مبتلا به تورم پستان تحت‌بالینی کمتر از گاوهای سالم است، این کاهش در حدی بوده که باعث اختلاف آماری معنی‌داری بین این دو گروه شد ( $p < 0.05$ ). این کاهش می‌تواند به دلیل افزایش تولید رادیکال‌های آزاد فعال اکسیژن در طی واکنش‌های التهابی پستان و افزایش تقاضای آنتی‌اکسیدانی بدن در طول پراکسیداسیون لیپیدی باشد. این یافته با پژوهش‌های برخی پژوهشگران هم‌خوانی دارد (۱۶، ۲۴ و ۲۷). نتایج این پژوهش با پژوهش Yang و همکاران در سال ۲۰۱۱ در گاوها و Andrei و همکاران در سال ۲۰۱۰، در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی - که بیان می‌کنند، میزان فعالیت آنزیم SOD شیر گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی، اختلاف آماری معنی‌داری وجود ندارد - هماهنگی ندارد (۴ و ۴۲). در بررسی Andrei و همکاران در سال ۲۰۱۰، افزایش سلول‌های سوماتیک، سبب تغییرات افزایشی میزان فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی

به هر حال ترکیب روش‌های تشخیصی دارای دقت بیشتری برای تشخیص ورم پستان هستند و استفاده از روش‌های اقتصادی قابل دسترس و قابل اجرا در اوایل بیماری، دقت تشخیصی سریع‌تر و بیشتری برای این بیماری دارند (۱۳ و ۱۸).

در این پژوهش بین تعداد سلول‌های سوماتیک شیر گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان تحت‌بالینی با نقطه برش  $131000 \text{ cells/ml}$  اختلاف آماری معنی‌دار وجود داشت ( $P < 0.001$ ).

میانگین میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز شیر به عنوان آنتی‌اکسیدان آنزیمی در نتیجه استرس اکسیداتیو در گروه مبتلایان، دارای افزایش معنی‌داری ( $85/47 \pm 42/52 \text{ IU/ml}$ ) نسبت به گاوهای سالم ( $164/81 \pm 5/27 \text{ IU/ml}$ ) بود ( $P < 0.001$ ). این افزایش نشان دهنده افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن در سطح زیاد است؛ این امر با گزارش‌های سایر پژوهشگران هم‌خوانی نداشت (۱۶، ۴۲)، در حالی که Andrei و همکاران در سال ۲۰۱۱، طی پژوهشی در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی نشان دادند که میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز شیر گاوهای بیمار نسبت به گاوهای سالم دارای افزایش معنی‌دار بوده است که با یافته‌های ما در این پژوهش و پژوهش Lindmark-Månsson در سال ۲۰۰۰، مطابقت دارد (۵ و ۲۷). Yang و همکاران در سال ۲۰۱۱، کاهش معنی‌داری را در میزان آنزیم GPx شیر ۳۳ رأس گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی منطقه نانینگ چین مشاهده کردند، که با پژوهش ما هم‌خوانی ندارد (۴۲). در پژوهش آن‌ها میانگین فعالیت GPx در شیر گاوهای سالم، دارای افزایش معنی‌داری نسبت به گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی بود، بنابراین شیرهای نرمال و سالم با میزان گلوتاتیون پراکسیداز بیشتر به عنوان منبع محصولات و فرآورده‌های شیر نسبت به شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت‌بالینی با میزان پایینی از آنزیم GPx ممکن است بهتر باشد؛ زیرا آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز دارای عملکرد دفاعی سلولی علیه تجمع رادیکال‌های پراکسید هیدروژن است (۴۲).

Kizil و همکاران در سال ۲۰۰۷، کاهش اساسی میزان فعالیت GSH-PX خون در بزهای مبتلا به ورم پستان ناشی از میکوپلازما آگلاکتیه را به دلیل افزایش

SOD می‌شود (۴).

Yang و همکاران در سال ۲۰۱۱ با مطالعه بر روی ۳۳

نمونه شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی از ۲ هفته تا ده هفته پس از زایمان، دریافتند که هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین الگوی توزیع میزان فعالیت‌های آنزیم SOD شیر گاوهای سالم و بیمار وجود ندارد (۴۲).

در پژوهش Eslam و همکاران در سال ۲۰۱۵ روی رت‌های مبتلا به ورم پستان تجربی ناشی از/شیریشیا کولی، میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در شیر، خون و بافت پستان به طور چشم‌گیری کاهش یافت (۱۶).

در بررسی Karyak - Ghasemian و همکاران در سال ۲۰۱۱، نقطه برش سلول‌های سوماتیک حدود ۲۰۰۰۰۰ سلول در هر میلی‌لیتر شیر در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی و سالم در نظر گرفته شد و اختلاف معنی‌داری در میزان آنزیم GPx و SOD خون مشاهده نگردید (۲۱). در پژوهش حاضر یک ارتباط معنی‌دار متوسط و منفی ( $r = -0.55$  و  $P < 0.01$ ) بین آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و سلول‌های سوماتیک در شیر بود.

هم‌بستگی ضعیفی بین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و میزان کل سلول‌های سوماتیک و تفریقی مخزن شیر وجود داشت، بنابراین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تحت تاثیر میزان کلی سلول‌های سوماتیک و شمارش تفریقی سلول‌های سوماتیک مخزن شیر نمی‌باشد (۲۳). در بررسی Andrei و همکاران در سال ۲۰۱۰، افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی با تغییرات این آنزیم در خون دارای هم‌بستگی است. افزایش میزان سلول‌های سوماتیک در شیر، دارای هم‌بستگی با میزان MDA و فرایندهای پراکسیداسیون لیپیدی در شیر و خون دام‌های بیمار است، بنابراین افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در خون و سایر مایعات بیولوژیکی از جمله شیر، در نتیجه صدمات ساختاری سلول است (۹). سطح آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز در شیر گونه‌های مختلف اعم از انسان، بز، گاو به ترتیب کاهش می‌یابد و تحت تأثیر جیره غذایی قرار می‌گیرد (۱۹).

میانگین فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز شیر در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت‌بالینی در مقایسه با گاوهای سالم به طور معنی‌داری افزایش نشان داد و نتیجه‌گیری شد که شاخص‌های آنزیمی در این مطالعه، می‌توانند به عنوان شاخص تشخیصی بهتر و قابل قبول ورم پستان تحت‌بالینی در مراحل تشخیص اولیه و غربالگری گله‌های بزرگ استفاده شوند (۴۴).

طی ارزیابی پروفایل آنتی‌اکسیدانی از سوی Mir و همکاران در سال ۲۰۱۷، میانگین فعالیت آنزیم SOD و GPx در گاوهای شیری مبتلا به ورم پستان بالینی و تحت‌بالینی در مقایسه با گاوهای سالم، کاهش معنی‌داری نشان داد و تجویز مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی به همراه آنتی‌بیوتیک‌های مناسب در طول ورم پستان امری ضروری است (۳۱). پژوهش‌های مختلف نیز سوپراکسید دیسموتاز را در شیر گاو بررسی و پیشنهاد کرده‌اند که این آنزیم نقش مهمی را در پایداری شرایط اکسیداتیو در شیر ایفا می‌کند (۳، ۱۸ و ۳۵). این تفاوت و تنوع در گزارش‌های مختلف می‌تواند به دلیل تفاوت‌های بیولوژیکی گاوها، تفاوت در شدت (پاتوژنیسیته) و نوع عامل مسبب ورم پستان تحت بالینی، تفاوت در روش‌های اندازه‌گیری و در نظر گرفتن نقاط برش مختلف برای تعداد سلول‌های سوماتیک (استاندارد طلایی تشخیص ورم پستان تحت بالینی)، در پژوهش‌های مختلف باشد. یکی از مشکلات پیش رو در حرفه‌ی دامپزشکی تشخیص به موقع و سریع بیماری‌ها پیش از بروز علائم بالینی است، به همین دلیل بهره‌گیری از بیومارکرهای مختلف با حساسیت و ویژگی بالا در تشخیص دام‌های سالم از بیمار بسیار حائز اهمیت است. در این خصوص استفاده از شاخص‌های استرس اکسیداتیو اعم از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی و بررسی تغییرات میزان آن‌ها تحت تاثیر پاسخ سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن - ناشی از بیماری‌های مختلف - از جمله ورم پستان تحت‌بالینی، اهمیت به‌سزایی دارد.

منحنی راک، بیانگر ترکیب کلی حساسیت و ویژگی برای تست‌های تشخیصی هستند و مزیت بزرگی در ارائه جامع‌ترین توصیف صحت تست‌های کاربردی دارد (۱۴) و (۳۲).

براساس یافته‌های پژوهش حاضر، متدلوژی منحنی راک، در زمان استفاده از شاخص‌های اکسیداتیو استرس به

است برای تشخیص عفونت در گاو مفید باشد؛ البته برای اثبات این موضوع نیاز به انجام پژوهش‌های بیشتری روی توانایی شاخص‌های استرس اکسیداتیو شیر در تشخیص ورم پستان تحت‌بالینی است.

#### منابع

1. Åkerstedt, M; Waller, K. P; Larsen, L. B; Forsbäck, L; Sternesjö, Å; Relationship between haptoglobin and serum amyloid A in milk and milk quality. *Int Dairy J*; 2008; 18(6): 669-674.
2. Amiri, P; Rad, A. H. F; Heidarpour, M; Azizzadeh, M; Khoramian, B; Diagnostic accuracy of milk oxidation markers for detection of subclinical mastitis in early lactation dairy cows. 2020; *Comp Clin Path*; 29(1): 95-101
3. Andrei, S; Pintea, A; Bunea, A; Groza, I; Bogdan, L; Ciupe, S; Crainic, D; Non-enzymatic antioxidants concentration and lipids peroxidation level in milk from cows with subclinical mastitis. *Bul Univ Agric Sci Vet Med Cluj-Napoca, Vet Med*; 2009; 66(1): 196-202.
4. Andrei, S; Matei, S; Zinveliu, D; Pintea, A; Bunea, A; Ciupe, S; Groza, I; Correlations between antioxidant enzymes activity and lipids peroxidation level in blood and milk from cows with subclinical mastitis. *Bul Univ Agric Sci Vet Med Cluj-Napoca, Vet Med*; 2010; 67(1): 6-11.
5. Andrei, S; Matei, S; Fit, N; Cernea, C; Ciupe, S; Bogdan, S; Groza, I. S; Glutathione peroxidase activity and its relationship with somatic cell count, number of colony forming units and protein content in subclinical mastitis cows milk. *Rom Biotechnol. Lett*; 2011; 16(3):6209-6217
6. Andrei, S; Matei, S; Rugină, D; Bogdan, L; Ștefănuț, C; Inter relationships between the content of oxidative markers, antioxidative status, and somatic cell count in cow's milk. *Czech J Anim Sci*; 2016; 61(9): 407-413.
7. Atakisi, O; Oral, H; Atakisi, E., Merhan, O; Pancarci, S. M; 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. *Res Vet Sci*; 2010; 89(1): 10-13.
8. Babaei, H; Mansouri-Najand, L; Molaei, M. M; Kheradmand, A; Sharifan, M; Assessment of lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase activities in cow's milk as an indicator of subclinical mastitis. *Vet Res Commun*; 2007; 31(4): 419-

عنوان معیار تشخیصی ورم پستان تحت بالینی، هرگز به کار نرفته است. عملکرد مطلوبی از تست‌های تشخیصی در مطالعه Amiri و همکاران در سال ۲۰۲۰، مشاهده نشد (۲) که ممکن است به روش منحنی راک بر اساس صحت نتایج باکتریولوژیکی مرتبط باشد؛ به خصوص در مطالعات در مزرعه هیچ توجیهی برای به کارگیری نتایج کشت باکتریایی که شاخص مطمئنی برای التهاب داخل پستانی است، وجود ندارد.

استفاده از Real-time PCR با حساسیت و ویژگی ۱۰۰ درصد می‌تواند به عنوان یک استاندارد طلایی، در ارزیابی سایر تست‌های تشخیصی برای تشخیص ورم پستان به کار رود (۲۶).

نتایج نشان می‌دهد که اندازه‌گیری کالری متریک آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز شیر با حساسیت (Se=/.۱۰۰) و ویژگی (Sp=/.۱۰۰) و صحت بالینی بالا به عنوان شاخص تشخیص ورم پستان تحت‌بالینی می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز شیر ارزش تشخیصی بالاتری نسبت به SOD در مقایسه با SCC بالا داشت. به طور قاطع استفاده از تست آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز شیر برای تشخیص ورم پستان تحت‌بالینی، یک روش ارزان قیمت با معرف و محلول‌های قابل دسترس است؛ هرچند مطالعات بیشتری در راستای ارزیابی میزان آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز شیر و سایر شاخص‌های استرس اکسیداتیو راجع به عملکرد و تعداد نوتروفیل‌ها حوالی زایمان و قبل از زایمان نیاز است. بررسی میزان فعالیت این آنزیم در شیر، می‌تواند مانند شمارش سلول‌های سوماتیک به عنوان شاخص زود هنگام هشدار دهنده در تشخیص ورم پستان تحت‌بالینی به شمار آید. بررسی شمارش سلول‌های سوماتیک در شیر، زمان‌بر است و به تجهیزات پیشرفته آزمایشگاهی نیاز دارد. بنابراین فنون ساده‌تر برای تشخیص ورم پستان در گاو پیشنهاد می‌گردد. معمولاً تلاش شده که این روش‌ها تا حد امکان ساده گردند تا قابلیت انجام از سوی دامداران را در گله‌های شیری داشته باشند (۲۹).

پژوهش حاضر نشان داد که ورم پستان تحت بالینی در گاو می‌تواند سبب ایجاد تغییرات قابل توجهی در سطوح آنتی اکسیدان‌های آنزیمی شیر گردد که ممکن

- 425.
9. Bogin, E; Ziv, G; Avidar, J; Rivetz, B; Gordin, S; Saran, A; Distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in normal and inflamed bovine udders and milk. *Res Vet Sci*; 1977; 22(2): 198-200.
  10. Chakraborty, S; Dhama, K; Tiwari, R; Yattoo, M. I; Khurana, S. K; Khandia, R; et al. Technological interventions and advances in the diagnosis of intramammary infections in animals with emphasis on bovine population – a review. *Vet Q*; 2019; 39, 76–94.
  11. Colakoglu, H. E; Kuplulu, O; Vural, M. R; Kuplulu, S; Yazlik, M. O; Polat, I. M; Bayramoglu, R; Evaluation of the relationship between milk glutathione peroxidase activity, milk composition and various parameters of subclinical mastitis under seasonal variations. *Vet Arh*; 2017; 87(5): 557-570.
  12. Darbaz, I; Salar, S; Sayiner, S; BAŞTAN, İ; Ergene, O; BAŞTAN, A; Evaluation of milk glutathione peroxidase and superoxide dismutase levels in subclinical mastitis in Damascus goats. *Turk J Vet Anim Sci*; 2019; 43(2): 259-263.
  13. Dasohari, A; Somasani, A; Nagaraj, P; Gopala, R. A; Comparative studies for efficacy of different diagnostic tests of sub-clinical mastitis in cows. 2018; *J Pharm Innov*; 7: 149–152.
  14. Detilleux, J; Arendt, J; Lomba, F; Leroy, P; Methods for estimating areas under receiver-operating characteristic curves: illustration with somatic-cell scores in subclinical intramammary infections. 1999; *Prev Vet Med*; 41(2):75–88
  15. Duralhoğlu, A; Baştan, A; Salar, S; Cengiz, M; Akan, M; The effects of pre-milking and post-milking teat disinfection in goats on udder health and milk quality. *Ank Univ Vet Fak Derg*; 2014; 61: 107-110.
  16. Eslami, H; Batavani, R. A; and Asri- Rezaei, S; Changes of stress oxidative enzymes in rat mammary tissue, blood and milk after experimental mastitis induced by *E. coli* lipopolysaccharide. *Vet Res Forum*; 2015; 6 (2): 131 – 136.
  17. Farzaneh, M; Haghkhah, M; Nazifi, S; Lari, M. A; Fani, M. M; Evaluation of milk adenosine deaminase activities in dairy cattle with subclinical mastitis and their correlation with milk quality. *Iran J Vet Clin Sci*; 2018; 12(1):13-22.
  18. Ferronato, J. A; Ferronato, T. C; Schneider, M; Pessoa, L. P; Blagitz, M. G; Heinemann, M. B; Souza, F. N; Diagnosing mastitis in early lactation: Use of Somaticell®, California mastitis test and somatic cell count. *Ital J Anim Sci*; 2018; 17: 723–729.
  19. Fox, P. F. and Kelly, A. L; Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects—Part 2. *Int Dairy J*; 2006; 16(6): 517-532.
  20. Gardner I.A and Greiner, M; Receiver-operating characteristic curves and likelihood ratios: Improvements over traditional methods for the evaluation and application of veterinary clinical pathology tests. *Vet Clin Pathol*; 2006; 35(1): 8-17.
  21. Ghasemian –Karyak, O; Safi, S; Rahimi Froushani, A; Bolourchi, M; Study of the relationship between oxidative stress and subclinical mastitis in dairy cattle. *Iran J Vet Res, Shiraz University*; 2011; 12(4): 350-353.
  22. Groza, I; Muntean, M; Bogdan, L. M; Morar, I; Ciupe, S; Ciuperescu, D; Stegeran, B., Ginecologie, andrologie și obstetrică veterinară. Compendiu, Ed. Academiei Române, București; 2006.
  23. Hamed, H; El Feki, A. and Gargouri, A; Total and differential bulk cow milk somatic cell counts and their relation with antioxidant factors. *C R Biol*; 2008; 331(2): 144-151.
  24. Holbrook, J. and Hicks, C. L; Variation of superoxide dismutase in bovine milk. *J Dairy Sci*; 1978; 61(8): 1072-1077.
  25. 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. *Rev méd vét*; 2007; 158 (11): 529-533.
  26. Koskinen, M; Holopainen, J; Pyörälä, S; Bredbacka, P; Pitkälä, A; Barkema, H; Bexiga R, Roberson JL, Piccinini, R; Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. 2009; *J Dairy Sci*; 92(3):952– 959.
  27. Lindmark-Månsson, H; and Åkesson, B; Antioxidative factors in milk. *Br J Nutr*; 2000; 84(S1): 103-110.
  28. Matei, S. T; Groza, I; Bogdan, L; Ciupe, S; Nicodim, F. I. Ț; Andrei, S; Correlation between mastitis pathogenic bacteria and Glutathione peroxidase activity in cows milk. *Bul Univ Agric Sci Vet Med Cluj-Napoca, Vet Med*; 2011; 1(68):221-225.
  29. McCarron, J; Keefe, G; McKenna, S; Dohoo, I; Poole, D; Laboratory evaluation of 3M Petrifilms and University of Minnesota Biplates as potential on-farm tests for clinical mastitis. 2009; *J Dairy Sci*; 92: 2297-2305.
  30. Middleton, J. R; Hardin, D; Steevens, B; Randle, R; Tyler, J. W; Use of somatic cell counts and California mastitis test results from

- individual quarter milk samples to detect subclinical intramammary infection in dairy cattle from a herd with a high bulk tank somatic cell count. 2004; *J Am Vet Med Assoc*; 224(3): 419-423.
31. Mir, B. A; Razak, R; Ali, A; Muzamil, S; Mir, M. U. R; Khaliq, T; Rashid, S. M; Assessment of antioxidant profile in subclinical and clinical mastitis in dairy cattle. 2017; *J Entomol Zool Stud*; 5(6); 1022-1025.
32. Pyörälä, S; Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet Res*; 2003; 34:565-578.
33. Rinaldi, M; Moroni, P; Paape, M.J and Bannerman, D.D; Evaluation of assays for the measurement of bovine neutrophil reactive oxygen species. *Vet Immunol Immunopathol*; 2007; 115(1-2): 107-125.
34. Sharifi, S; Pakdel, A; Ebrahimi, M; Reecy, J. M; Farsani, S. F; Ebrahimi, E; Integration of machine learning and meta-analysis identifies the transcriptomic biosignature of mastitis disease in cattle. *PloS one*; 2018; 22:3(2); 1-18.
35. Shirazi-Beheshtiha, S. H; Safi, S; Rabbani, V; Bolourchi, M; Ameri, M; Khansari, M. R; The diagnostic value of determination of positive and negative acute phase proteins in milk from dairy cows with subclinical mastitis. *Com Clin Path*; 2012; 21(5): 999-1003.
36. Silanikove, N; Merin, U; Leitner, G; Nitrite and catalase levels rule oxidative stability and safety properties of milk: a review. *RSC Adv*; 2014; 4(50): 26476-26486.
37. Singhal, N; Kumar, M; Kanaujia, P. K; Viridi, J. S; MALDI-TOF mass spectrometry: ANemerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol*; 2015; 6: 791-807.
38. Sloth, K. H. M. N; Friggens, N. C; Løvendahl, P; Andersen, P. H; Jensen, J; Ingvarsen, K. L; Potential for improving description of bovine udder health status by combined analysis of milk parameters. *J Dairy Sci*; 2003; 86(4): 1221-1232.
39. Sordillo, L. M; Symposium review: Oxylipids and the regulation of bovine mammary inflammatory responses. *J Dairy sci*; 2018; 101(6): 5629-5641.
40. Sreteovic, L. J; Aleksic' S; Petrovic' M. P; Mis's'evic, B; Nutritional factors influencing improvement as well as productive and reproductive parameters of cattle. *Biotechnol Anim Husb*; 2007; 23(5-6): 217-226.
41. Steinbrenner, H. and Sies, H; Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*; 2009; 1790(11): 1478-1485.
42. Yang, F. L; Li, X. S; He, B. X; Yang, Z. L; Li, G. H; Liu, P; Qin, H.H; Xi, M. P; Li, J; Malondialdehyde level and some enzymatic activities in subclinical mastitis milk. *African J Biotech*; 2011; 10(28), 5534-5538.
43. Yang, F. L and Li, X. S; Role of antioxidant vitamins and trace elements in mastitis in dairy cows. *J Adv Vet Anim Res*; 2015; 2(1): 1-9.
44. Zeinhom, M. M. A; Abed, A. H; and Hashem, K. S; A contribution towards milk enzymes, somatic cell count and bacterial pathogens associated with subclinical mastitis cows milk; 2013; *Assiut Vet Med J*; 59(138): 38-48

## Evaluation of Antioxidant Enzymes Activity (SOD and GSH-Px) in the Milk of Cows with Subclinical Mastitis

Farshad Kayedi<sup>1</sup>; Seyedeh Ommolbanin Ghasemian<sup>2\*</sup>

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

### Summary

*Received:* 29 December 2021

*Accepted:* 14 March 2022

Currently, somatic cell count (SCCs) and bacterial culture are considered as the golden standard of detecting bovine subclinical mastitis. However, the above- mentioned tests have a low diagnostic accuracy. For identification of infected animals, new biomarkers with high diagnostic accuracy are needed. The activities of antioxidant enzymes change during mastitis. The objective of this study was to determine the diagnostic value of the milk GSH-PX and SOD for the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows. A total of 90 clinically healthy cows were randomly selected from dairy farms in Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad province, Yasouj. Of these, 55 cows were considered to be affected by subclinical mastitis based on a SCC higher than  $130 \times 10^3$  cells/mL of milk and positive CMT results of milk samples obtained from at least one of the quarters. Milk GSH-PX and SOD activities were measured using commercial kits (Randox Laboratories). Diagnostic sensitivity and specificity and cut-off points for each test were determined via receiver-operating characteristics curve (ROC) analysis. Significant increase and decrease in the mean activities of GSH-PX ( $P < 0.0001$ ) and SOD ( $P < 0.05$ ) were found in the milk samples collected from cows with subclinical mastitis respectively. Milk GSH-PX was the most accurate test with 100% sensitivity and 100% specificity at cutoff point of  $> 37$  IU/ml. The results of present study showed that the measurement of oxidative stress indexes such as GSH-PX activity in milk sample can be as reliable biomarker for detection of bovine subclinical mastitis.

**Keywords:** Glutathion peroxidase (GSH-px), Superoxide dismutase (SOD), Biomarker, Subclinical mastitis, Bovine.

\*Corresponding Author Email: [ghasemian1249@yahoo.com](mailto:ghasemian1249@yahoo.com)