

## ارزیابی روش FRAP (قدرت آنتی اکسیدانی/قدرت احیا آهن) جهت تعیین پتانسیل آنتی اکسیدانی تام در نمونه های شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی

نیلوفر تشکری<sup>۱</sup>، دکتر بابک خرمیان طوسی<sup>۱</sup>، دکتر مهراں فرهودی<sup>۲</sup>، دکتر محمد

حیدرپور<sup>۱</sup>، دکتر نیما فرزانه<sup>۱</sup>، دکتر کامیل مشایخی<sup>۳</sup>

۱- دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد

۲- دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

۳- دامپزشک بخش خصوصی

### چکیده

استرس اکسیداتیو به عنوان عدم تعادل بین اکسیدان ها و آنتی اکسیدان ها تعریف می شود و آسیب اکسیداتیو نتیجه ای است از این عدم تعادل که شامل تغییر اکسیداتیو ماکرومولکول های سلول، مرگ سلولی (آپوپتوز یا نکروز) و همچنین تخریب بافتی است. گستره ی وسیع و متفاوت از ترکیبات آنتی اکسیدانی در سرم و بافت ها، اندازه گیری تک تک آنها را مشکل می سازد. علاوه بر این، از آنجایی که بین فعالیت آنتی اکسیدان های مختلف هم پوشانی وجود دارد، اندازه گیری جداگانه ی فعالیت آنها نمی تواند گویای عملکرد کامل آنها باشد. بنابراین اندازه گیری ظرفیت تام آنتی اکسیدانی سرم می تواند پارامتر مناسبی برای ارزیابی وضعیت کل آنتی اکسیدانی باشد. روش های متعددی برای ارزیابی ظرفیت تام آنتی اکسیدانی سرم بنا شده است که از جمله این روش ها می توان به FRAP (Ferric reducing ability of plasma) اشاره کرد.

**واژه های کلیدی:** استرس اکسیداتیو - اکسیدان - تخریب بافتی

### مقدمه

استرس اکسیداتیو به عنوان عدم تعادل بین اکسیدان ها و آنتی اکسیدان ها تعریف می شود و آسیب اکسیداتیو نتیجه ای از این عدم تعادل است و شامل تغییر اکسیداتیو ماکرومولکول های سلول، مرگ سلولی (آپوپتوز یا نکروز) و همچنین تخریب بافتی است (۱). گستره ی وسیع و متفاوت از ترکیبات آنتی اکسیدانی در سرم و بافت ها، اندازه گیری تک تک آنها را مشکل می سازد. علاوه بر این، از آنجایی که بین فعالیت آنتی اکسیدان های مختلف هم پوشانی وجود دارد، اندازه گیری جداگانه ی فعالیت آنها نمی تواند گویای عملکرد کامل آنها باشد. بنابراین اندازه گیری ظرفیت تام آنتی اکسیدانی سرم می تواند پارامتر مناسبی برای ارزیابی وضعیت کل آنتی اکسیدانی باشد. وضعیتی که حاصل مصرف آنتی اکسیدان ها و یا تولید و مصرف آنهاست که منجر به استرس اکسیداتیو می شود (۲). روش های متعددی برای ارزیابی ظرفیت تام آنتی اکسیدانی سرم بنا شده است که از جمله این روش ها می توان به FRAP ( Ferric reducing ability of plasma)، ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) و TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) اشاره کرد که در این مطالعه از تست FRAP برای ارزیابی ظرفیت تام آنتی اکسیدانی استفاده می شود.

### اهداف

هدف از انجام این مطالعه تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی تام از طریق اندازه گیری قدرت احیا کنندگی سرم توسط FRAP است.



## روش کار

تعداد ۱۵۰ نمونه شیر از گاوهای شیری نژاد هولشتاین در یکی از گاوداری های صنعتی اطراف مشهد جمع آوری گردید. قبل از نمونه گیری ابتدا سر پستان های کارته های مورد نظر با آب گرم شسته می شود و سپس با محلول Predip ضد عفونی می شوند و بعد از ۳۰ ثانیه انتظار با دستمال کاغذی جداگانه خشک می شوند و در مرحله بعد نوک سر پستان با دستمال آغشته به الکل ۷۰٪ مالش داده می شود و بعد از ۳۰ ثانیه، سه دوشش اولیه تخلیه و ۱۵ میلی لیتر شیر از کارته ها در ظرف استریل برای کشت باکتریولوژیک اخذ می شود. علاوه بر این، اطلاعات هر دام از لحاظ روزهای شیرواری، تعداد زایمان، تعداد سلولهای سوماتیک، آزمایش ورم پستان کالیفرنایی (CMT) و میزان تولید شیر بصورت کامل ثبت گردید.

مقدار FRAP با اندازه گیری پتانسیل احیای آهن بر اساس روش Benzi, Strain مشخص می شود (۴). جهت انجام این تست کمپلکس فریک تری پیریدل تری آزینتوسولفات آهن اکسیدان های موجود در نمونه احیا شده و به شکل فروز  $Fe^{+2}$  تبدیل می گردد که به رنگ آبی تیره است. شدت رنگ ایجاد شده در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۳ نانومتر اندازه گیری می شود. شدت رنگ ایجاد شده با قدرت تام احیاکنندگی آهنی اکسیدان های موجود در مخلوط واکنش ارتباط مستقیم دارد. محلول سولفات آهن که دارای  $Fe^{+2}$  است بعنوان استاندارد است و واکنش  $Fe^{+2}$  با معرف FRAP بیانگر یک تعویض الکترونی می باشد.

محلول استاندارد سولفات آهن با غلظت ۱ میلی مولار آماده شد. از آن رقت های ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲٫۵ میکرومولار تهیه گردید. معرف FRAP از سه محلول تشکیل میشود. بافر استات سدیم (۰٫۳۱ میلی گرم استات سدیم + ۱۶۰ میکرولیتر استیک اسید که به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده میشود). و محلول TPTZ (۳۱ میلی گرم TPTZ + ۳۳ میکرولیتر هیدروکلریک اسید که به حجم ۱۰ میلی لیتر میرسد). و محلول کلرید آهن (۵٫۴ میلی گرم کلرید آهن + ۱۰ سی سی آب مقطر).

در لوله های آزمایش ۵۰ میکرو لیتر نمونه سرم شیر ریخته و به آنها ۱٫۵ میلی لیتر از معرف تازه FRAP اضافه گردید. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد دور از نور انکوبه شد و در مرحله بعد شدت رنگ حاصله در مقابل بلانک (۱٫۵ میلی لیتر معرف + ۵۰ میکرو لیتر آب مقطر) در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۳ نانومتر خوانده شد و منحنی استاندارد را برای محلول استاندارد در رقت های مختلف رسم گردید. نتایج FRAP به صورت ارزش  $Fe^{2+}$  (FRAP Value) گزارش میشود. داده های حاصل از نمونه گیری های مختلف با نرم افزار SPSS (SPSS Inc., 22) بررسی شده و میانگین و انحراف معیار محاسبه شدند. سپس جهت مقایسه این میانگین بین گروه های دوگانه از آزمون Independent Samples T-Test استفاده گردید. جهت بررسی ارتباط SCC و FRAP از آزمون Pearson's correlation استفاده گردید. سطح معنی داری ۵ درصد در نظر گرفته شد.

## نتایج و بحث

نتایج این بررسی نشان داد که ورم پستان تحت بالینی نمی تواند به صورت معنی داری سبب افزایش میزان پتانسیل آهنی اکسیدانی تام شیر گردد. همچنین مقایسه نتایج بدست آمده از SCC و FRAP اختلاف معنی داری بین آنها نشان نداد. هم چنین اختلاف معنی داری بین ورم پستان و میزان FRAP وجود نداشت. ( $p > 0.05$ ). بررسی جداگانه باکتری های گرم منفی و گرم مثبت جدا شده از ورم پستان نیز هیچ ارتباطی با FRAP نداشتند. جزئیات نتایج در جدول شماره (۱) آمده است.



جدول ۱- مقایسه اطلاعات در دو گروه گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان							
میانگین CMT	مانگین روزهای شیردهی	میانگین تعداد سلول سوماتیک	میانگین تولید	میانگین تعداد زایمان	میانگین FRAP	تعداد	
3	۳۶۱	۱۲۰۰۰۰	۱۱۵۵۶	2.3	0.51	82	گاو سالم
4	331	169000	10918	2.5	۰,۴۲	26	گاو مبتلا به ورم پستان

در سال ۲۰۱۰، SZCZUBIAL و همکاران بر روی فعالیت های آنتی اکسیداتیو لاکتوفیرین و لاکتوپراکسیداز در شیر گاوهایی با انواع مختلف ورم پستان مطالعه کردند. میانگین فعالیت لاکتوفیرین در شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان از ۸,۹ تا ۱۲,۱ mU/g بود که به شکل معنی داری از میانگین فعالیت لاکتوفیرین در شیر گاوهای سالم کمتر بود. در گروه گاوهای مبتلا به ورم پستان، بالاترین فعالیت لاکتوفیرین در گاوهایی با ورم پستان مزمن یافت شد و کمترین آن در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی بود. فعالیت کمتر لاکتوفیرین در گاوهای مبتلا به ورم پستان نسبت به گاوهای سالم، ممکن است منجر به کاهش سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی در گاوهای مبتلا به ورم پستان شود. (5)

#### منابع

1. Lykkesfeldt J, Svendsen O. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal*. 2007 May 31;173(3):502-11.
2. Cao G, Prior RL. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical chemistry*. 1998 Jun 1;44(6):1309-15.
3. Szeto YT, Tomlinson B, Benzie IF. Total antioxidant and ascorbic acid content of fresh fruits and vegetables: implications for dietary planning and food preservation. *British journal of nutrition*. 2002;87(01):55-9.
4. Benzie IF, Strain JJ. [2] Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in enzymology*. 1999 Dec 31;299:15-27.
5. SZCZUBIAL M, Kankofer M, DĄBROWSKI R. ANTIOXIDATIVE-RELATED ACTIVITIES OF LACTOFERRIN AND LACTOPEROXIDASE IN MILK FROM COWS WITH DIFFERENT FORMS OF MASTITIS. *Bull Vet Inst Pulawy*. 2011;55:77-81.