تحقیقات تولیدات دامی

سال دهم/شماره دوم/تابستان ۱۴۰۰ (۹۸-۸۷)

Animal Production Research

دانشگاه گیلان

مقاله پژوهشی

اثر چالش پستانی لیپوپلی‌ساکارید بر بیان mRNA ژن‌های آنتی‌اکسیدانی مرتبط با اریتروئید هسته‌ای ۲ در بافت پستانی گاوهای شیری در زمان تغییر متابولیت‌ها و هورمون‌ها

موسی زرین[1*]، امیر احمدپور[1]

۱- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۸/۰۶ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۹/۲۶)

چکیده

از ۲۴ رأس گاو شیری به منظور بررسی تغییرات بیان mRNA ژن‌های آنتی‌اکسیدانی کدشونده به وسیله اریتروئید هسته‌ای ۲ (Nrf2) در بافت پستان، پس از تزریق لیپوپلی‌ساکارید (LPS) همزمان با تغییر متابولیت‌ها و انسولین خون استفاده شد. تیمارها شامل تزریق انسولین (HypoG ؛n = ۶)، انسولین و گلوکز (EuG ؛n = ۵)، بتاهیدروکسی‌بوتیرات (HyperB ؛n = ۵) و سرم فیزیولوژی (n = ۸، شاهد) به مدت ۵۶ ساعت بود. در ساعت ۴۸ آزمایش، ۲۰۰ میکروگرم LPS به دو کارتیه و سرم فیزیولوژی به دو کارتیه دیگر تزریق شد. نمونه بافت پستان قبل و بعد از تزریق LPS گرفته شد. بیان mRNA ژن‌ها با روش qPCR بررسی شد. در کارتیه LPS، بیان mRNA ژن‌های متالوتیونین ۱آ، ۲آ، و ۱ای در همه گروه‌ها، بیان mRNA گلوتاتیون پراکسیداز ۳ در HyperB و شاهد، و هم‌اکسیژناز ۲ در HyperB افزایش یافت. بیان mRNA ژن‌های گلوتاتیون‌اس‌ترانسفراز ۳ میکروزومی و سوپراکسیدازدیسموتاز ۱ در همه گروه‌ها به‌جز EuG، و NAD(P)Hدهیدروژنازکوئینون ۱ تنها در HypoG مشاهده شد. در کارتیه شاهد، بیان mRNA ژن‌های متالوتیونین ۱آ و ۲آ افزایش یافت. بیان mRNA ژن متالوتیونین ۱ای در همه گروه‌ها به‌جز HypoG، گلوتاتیون‌پراکسیداز ۳ در EuG و شاهد، و UDPگلوکورونوزیل‌ترانسفراز در EuG افزایش یافت. بیان mRNA گلوتاتیون‌اس‌ترانسفراز ۳ میکروزومی، NAD(P)H دهیدروژنازکوئینون ۱، و سوپراکسیدازدیسموتاز ۱ در HypoG کاهش یافت. چالش پستانی LPS بر بیان mRNA ژن‌های هدف در هر دو کارتیه تأثیر گذاشت که شاخصی از واکنش موضعی و سیستمیک به عوامل عفونت‌زا است. استفاده از راهبردهای مناسب مدیریتی سبب کاهش تنش‌های اکسیداتیو و حساسیت به بیماری‌ها شده و رفاه و عملکرد بهتر دام را به همراه خواهد داشت.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، بیان mRNA، غده پستانی، لیپوپلی‌ساکارید، ورم پستان

* نویسندهٔ مسئول: mzarin@yu.ac.ir

doi: 10.22124/AR.2021.18033.1571

مقدمه

عفونت غدد پستانی در دام‌های شیری عمدتاً با کاهش میزان تولید شیر، کاهش مصرف خوراک و تغییر ترکیبات شیر همراه است. عموماً دام‌های پرتولید در زمان شروع شیردهی با کاهش ناگهانی انرژی و مواد مغذی مواجه می‌شوند (Drackley, 1999; Bruckmaier and Gross, 2017; Gross and Bruckmaier, 2019). گاوهای شیری به منظور حفظ تولید شیر اقدام به فراخوانی بافت‌های ذخیره‌ای نموده که منجر به بروز التهاب و افزایش حساسیت دام‌ها به بیماری‌های متابولیکی و عفونت‌ها در اوایل شیردهی می‌شود (Drackley, 1999; Trevisi *et al.*, 2012; Ingvartsen and Moyes, 2015; Aleri *et al.*, 2016). تراز منفی انرژی[1] (NEB) ایجاد شده در دام‌های پرتولید با کاهش غلظت گلوکز، افزایش غلظت اسیدهای چرب غیر استریفیه[2] (NEFA) و سپس اجسام کتونی در خون شناخته می‌شود (van Dorland *et al.*, 2009; Zarrin *et al.*, 2017). این متابولیت‌ها در غلظت‌های بالا و خارج از دامنه فیزیولوژیک ممکن است خطر شیوع ورم پستان را که اغلب به عنوان یک مسئله جدی برای اقتصاد صنایع لبنی شناخته می‌شود، افزایش دهند (Van Knegsel *et al.*, 2014). اگر چه ساز و کار سرکوب ایمنی در گاوهای شیری تا حدود زیادی ناشناخته است، ولی دگرگونی‌های متابولیکی وابسته به آغاز شیردهی از عوامل دخیل در آن محسوب می‌شود (Goff, 2006). القای ورم پستان با چالش لیپوپلی‌ساکارید درون پستانی[3] (LPS) که از باکتری‌های گوناگونی از جمله *E.coli* به‌دست می‌آید، به عنوان یک الگوی قابل اطمینان برای ارزیابی سیستم دفاعی پستان بنا نهاده شده است (Bruckmaier *et al.*, 1993; Schmitz *et al.*, 2004) و در تعدادی از پژوهش‌ها جهت بررسی وضعیت عمومی، پاسخ‌های سیستمیک و موضعی پستان در ارتباط با سوخت و ساز و سیستم ایمنی در گاوهای شیری استفاده شده است (Bruckmaier *et al.*, 1993; Vernay *et al.*, 2012; Zarrin *et al.*, 2014 a, b).

از جمله نشانه‌های چالش پستان با LPS، بروز پاسخ‌های موضعی و سیستمی است. آثار سیستمی چالش LPS در بر گیرنده بروز پاسخ‌هایی التهابی مانند افزایش دمای رکتومی، نرخ تپش قلب، دم و بازدم، و افزایش غلظت کورتیزول پلاسما است (Waldron *et al.*, 2006; Vernay *et al.*, 2012; Wellnitz and Bruckmaier, 2012).

حضور سموم ناشی از عوامل عفونت‌زا سبب فعال شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از راه تولید ترکیبات اکسیدکننده می‌شود (Aitken *et al.*, 2009). عامل مربوط به اریتروئید هسته‌ای[4] ۲ (Nrf2) به عنوان یک عامل تنظیم‌کننده و فعال‌کننده ژن‌های کدکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و سم‌زدای نوع II در شرایط تنش شناسایی شده است (Motohashi and Yamamoto, 2004). عامل Nrf2 یک عامل رونویسی است که در شرایط بروز تنش از سیتوزول به هسته منتقل شده و به ایفای نقش می‌پردازد. از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مهم می‌توان به گلوتاتیون ترانسفراز، NADPH دهیدروژناز کینون-۱ (NQO1)، هم‌اکسیژناز ۲ (HMOX2) و UDP-گلوکورونوزیل ترانسفراز (UGT) اشاره نمود که تولید و فعال‌سازی این آنزیم‌ها به وسیله سامانه Nrf2 کنترل می‌شود (Kensler *et al.*, 2007). تعداد بسیار زیادی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بدن وجود دارند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به CAT، SOD ها و GPX ها اشاره نمود. کاتالاز از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی با عملکرد بالا بوده که در غلظت‌های بالای H_2O_2 اشباع نشده و با ترکیب شدن با H_2O_2، آن‌را به آب متابولیکی تبدیل می‌نماید (Lledías *et al.*, 1998). سوپراکسیدازدیسموتازها که دارای چندین زیر واحد مختلف هستند با از بین بردن رادیکال‌های آزاد و تبدیل آن‌ها به پراکسید، آثار مخرب آن‌ها را در بدن کاهش داده و از تخریب آنزیم‌های هیدراتاز به وسیله رادیکال‌های آزاد ممانعت می‌نمایند (Fridovich and Benov, 1998). دسته گلوتاتیون‌پراکسیدازها با کاتالیز کردن واکنش احیاء هیدروپراکسیدازها از سلول‌های مختلف پستانداران در برابر آسیب رادیکال‌های آزاد محافظت می‌نمایند (Matés and Sánchez-Jiménez, 1999).

گزارشات قبلی محققین نشان داده است که تغییر متابولیت‌ها و هورمون‌ها چه در اثر تغییرات فیزیولوژیکی دوره انتقال در دام‌های مختلف (Gessner *et al.*, 2012; Zarrin *et al.*, 2019a, b, c) و چه از راه تزریق متابولیت‌ها

1. Negative Energy Balance
2. Non-Esterified Fatty Acids
3. Intra-mammary LPS challenge
4. Nuclear erythroid 2-related factor 2: Nrf2

و هورمون‌ها بر بیان mRNA ژن‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت‌های کبدی (Zarrin *et al.*, 2019d) و پستانی (زرین و همکاران، ۱۳۹۷) تأثیرگذار بوده است. تاکنون مطالعه جامعی در ارتباط با بررسی بیان mRNA ژن آنزیم‌های مرتبط با Nrf2 در بافت پستان در پی تغییر متابولیت‌های خونی و هورمونی در زمان بروز ورم پستان در گاوهای شیری انجام نشده است. ارزیابی پاسخ آنتی‌اکسیدانی دام‌ها در شرایط مختلف تغییر متابولیت‌ها و هورمون‌ها و همچنین بروز بیماری‌های مختلف، به محققین کمک می‌کند تا با درک بهتر از نحوه پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی، مانع از بروز عوامل تنش‌زا شده و همچنین مدیریت دوره انتقال در دام‌ها سبب حفظ سلامتی و افزایش بهره‌وری آن‌ها شود. هدف از انجام این مطالعه، بررسی آثار همزمان ورم پستان القاء شده با استفاده از تزریق LPS درون بافت پستانی و دستکاری هورمون‌ها و متابولیت‌ها خونی بر بیان ژن‌های آنتی اکسیدانی کد شده به وسیله ساز و کار Nrf2 در بافت پستانی گاوهای شیری بود.

مواد و روش‌ها

مدیریت دام‌ها و تیمارهای آزمایشی: این آزمایش در مرکز تحقیقاتی گروه فیزیولوژی دامپزشکی دانشگاه برن در کشور سوئیس انجام شد. این آزمایش در دو بخش انجام شد: در بخش اول، آثار تزریق متابولیت‌ها در ۴۸ ساعت اول و در بخش دوم و در هشت ساعت پایانی آزمایش، هم‌زمان با تزریق متابولیت‌ها، اثر ورم پستان القاء شده با LPS بر بیان mRNA ژن‌های آنتی اکسیدانی بافت پستان که به وسیله عامل Nrf2 تنظیم می‌شوند بررسی شد. نحوه آماده‌سازی دام‌ها و تیمارها به خصوص در ۴۸ ساعت ابتدایی مطابق روش زرین و همکاران (۱۳۹۷) انجام شد. تعداد ۲۴ رأس گاو هلشتاین با شکم زایش ۰/۱ ± ۳/۵ (انحراف‌معیار ± میانگین) در ۰/۳± ۲۸ هفته پس از زایش انتخاب شدند. دو هفته پیش از آغاز آزمایش، دام‌ها برای سازگاری با شرایط نگهداری و خوراک، به جایگاه‌های انفرادی منتقل شدند. جیره و اجزای خوراکی مورد استفاده دام‌ها به همراه تجزیه شیمیایی آن‌ها مطابق تحقیق Zarrin *et al.* (2014) بود.

یک روز پیش از آغاز آزمایش، کاتاترهای درون رگی (Cavafix® Certo with Splittocan®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) به طول ۳۲ سانتی‌متر و قطر G ۱۶ در سیاهرگ گردنی دو طرف گردن تعبیه شد که برای پیشگیری از تداخل نمونه‌برداری و تزریق متابولیت‌ها، از آن‌ها به‌صورت جداگانه استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل تزریق انسولین برای کاهش غلظت گلوکز خون (هایپوگلایسمی) کمتر از mmol/L ۲/۵ (n=۶؛ HypoG)، تزریق انسولین (mU/kg of BW ۰/۱ ± ۰/۶) به همراه گلوکز جهت افزایش غلظت انسولین و پایدار نگه‌داشتن غلظت گلوکز خون در حد فیزیولوژیک (هایپرانسولین یوگلایسمیک) (n=۵؛ EuG)، تزریق بتاهیدروکسی‌بوتیرات (BHB) برای افزایش غلظت BHB (هایپرکتونومیا) (mmol/L ۱/۵ تا۲/۰) بالاتر از مقدار مشخص شده هنگام وقوع کتوز تحت بالینی (mmol/L ۱/۲) (n=۵؛ HyperB)، و تزریق سرم فیزیولوژی (NaCl ۰/۹٪) به عنوان گروه شاهد (n=۸؛ Control) بودند که برای زمانی برابر ۵۶ ساعت (از ساعت ۹ صبح نخستین روز تا ساعت ۱۷ روز سوم آزمایش) به وسیله پمپ خودکار (Perfuser, B. Braun Melsungen AG) به‌صورت کنترل شده تزریق شدند. به منظور تنظیم تراز متابولیت‌های تزریقی در دو ساعت آغازین آزمایش، هر پنج دقیقه یک‌بار و هنگام آزمایش، هر ۳۰ دقیقه یک‌بار، متابولیت‌های هدف (گلوکز و BHB) اندازه‌گیری و بر اساس آن، نرخ تزریق متابولیت‌ها تنظیم شد.

القای ورم پستان با LPS: دام‌ها پیش از القای ورم پستان از نظر ابتلا به ورم پستان معاینه شده و عاری از ورم پستان بودند. برای این منظور، شمار یاخته‌های بدنی شیر با دستگاه ویژه (DeLaval International AB, Tumba, Sweden) اندازه‌گیری شد. چنانچه این شمار کمتر از ۱۵۰۰۰۰ در هر میلی‌لیتر شیر بود، پستان به عنوان عاری از ورم شناخته می‌شد. چهل و هشت ساعت پس از آغاز تزریق متابولیت‌ها، با استفاده از سوند ویژه، به درون یکی از کارتیه‌های پیشین و یکی از کارتیه‌های پسین به عنوان کارتیه LPS، پس از ضدعفونی، مقدار ۲۰۰ میکروگرم از سروتایپ 026:B6 لیپوپلی‌ساکارید (#L8274; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) که با ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی رقیق شده بود تزریق شد. به دو کارتیه دیگر به عنوان کارتیه‌های شاهد، به همان میزان (۱۰ میلی‌لیتر)، سرم فیزیولوژی ۰/۹٪ تزریق شد.

بیوپسی بافت پستان: نمونه‌برداری از بافت پستان، یک هفته پیش از آغاز آزمایش، ۴۸ ساعت پس از شروع تزریق

متابولیت‌ها یعنی پیش از القای ورم پستان با LPS و ۵۶ ساعت پس از شروع تزریق متابولیت‌ها (هشت ساعت پس از تزریق LPS) از کارتیه‌های پشتی (Schmitz *et al.*, 2004) انجام شد. در این روش، محل دارای کمترین عروق پستانی با استفاده از دستگاه اولتراسوند تعیین و پس از ضدعفونی، بی‌حسی عمومی با استفاده از داروی زایلازین (Xylazine Streuli ad us. vet.; G. Streuli & Co. AG, Uznach, Switzerland) و بی‌حسی موضعی با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر لیدوکائین ۲ درصد (Streuli Pharma AG, Uznach, Switzerland) ایجاد شد. از بافت پستانی (۳۰ تا ۶۰ میلی‌گرم) با استفاده از سوزن بیوپسی با قطر ۱۲G و طول ۱۰ سانتی‌متر (Bard Magnum Core Tissue Biopsy Needle, Turkenfeld, Germany)، نمونه‌برداری انجام شد و بلافاصله در محلول پایدارکننده RNA (RNAlater, Ambion/Applied Biosystems, Austin, TX) قرار داده شد. نمونه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شد و سپس تا زمان استخراج RNA در دمای ۸۰- درجه سلسیوس ذخیره شد.

استخراج RNA و ساخت cDNA و بررسی ژن‌ها: پس از نمونه‌برداری از بافت پستانی، استخراج RNA از بافت پستانی و ساخت cDNA انجام شد (زرین و همکاران، ۱۳۹۷؛ Zarrin *et al.*, 2014a, b). به‌طور خلاصه، RNA کل با استفاده از GOLD TriFast (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) استخراج شد. غلظت و خلوص RNA استخراجی با استفاده از دستگاه نانودراپ (ND-2000; NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA) در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

جهت ساخت cDNA از یک میکروگرم RNA کل به همراه آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس ویروس کم‌خونی موش (MMLV-RT; Promega Corp., Madison, WI) و آغازگرهای تصادفی هگزامر (Invitrogen, Leek, the Netherland) استفاده شد. بیان ژن‌های مرجع (GAPDH و Ubiquitin) و همچنین ژن‌های مرتبط با Nrf2 با تکنیک qPCR و با استفاده از دستگاه مرتبط (Rotor-Gene 6000 rotary analyzer, Corbett Research, Sydney, Australia) اندازه‌گیری شد. ویژگی‌های آغازگر ژن‌های پایه و ژن‌های هدف در جدول ۱ نشان داده شده است. به همین منظور از یک ترکیب شامل ۰/۸ میکرولیتر آب فاقد نوکلئاز، یک میکرولیتر آغازگر پیشران (Forward)، یک میکرولیتر آغازگر پسران (Reverse) و ۵/۲ میکرولیتر سایبرگرین به همراه دو میکرولیتر از cDNA استفاده شد. مقدار Ct[1] به‌دست‌آمده برای ژن‌های هدف بر اساس میانگین Ct ژن‌های مرجع تنظیم شد (ΔCt). در پایان، تفاوت در بیان mRNA ژن‌های هدف قبل و پس از تزریق درون پستانی LPS (ΔΔCt) بر اساس رابطه زیر به‌دست آمد:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct\ [56\ h] - \Delta Ct\ [48\ h]$$

تجزیه آماری: آزمایش در قالب یک طرح دو عاملی بر پایه مفروضات طرح‌های کاملاً تصادفی انجام شد. برای هر یک از فراسنجه‌ها، میزان تغییرات پس از چالش LPS نسبت به پیش از آن محاسبه شد و بر اساس رویه GLM نرم‌افزار آماری SAS مورد ارزیابی قرار گرفت. تفاوت میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی مقایسه شد. داده‌ها به‌صورت Mean ± SEM بیان شده و $P<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری و $P<۰/۱۰$ به عنوان گرایش به معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج

تأثیر LPS بر بیان mRNA ژن‌های هدف در کارتیه LPS: تأثیر تزریق درون پستانی LPS بر بیان mRNA ژن‌های هدف در کارتیه LPS به‌صورت تغییرات پس از تزریق نسبت به پیش از آن (ΔΔCT) در گروه‌های مختلف در شکل ۱ نشان داده شده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده، بعد از تزریق درون پستانی LPS، بیان ژن‌های MT1A، MT2A، و MT1E کارتیه LPS در همه گروه‌ها نسبت به زمان قبل از تزریق LPS افزایش یافت ($P<۰/۰۵$). افزایش بیان mRNA ژن GPX3 در گروه‌های HyperB و شاهد ($P<۰/۰۵$) و تمایل به افزایش آن در گروه EuG پس از تزریق LPS مشاهده شد ($P=۰/۰۸$). بیان mRNA ژن HMOX2 در گروه HyperB نسبت به زمان قبل از تزریق LPS افزایش نشان داد ($P<۰/۰۵$) و تمایل به افزایش برای گروه EuG مشاهده شد ($P=۰/۰۷$). در تمام گروه‌ها به استثنای گروه EuG، تزریق LPS سبب کاهش بیان mRNA ژن‌های MGST3 و SOD1 شد ($P<۰/۰۵$). کاهش بیان mRNA ژن NQO1 پس از تزریق داخل پستانی LPS تنها در گروه HypoG

1. Cycle threshold: CT

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای واکنش زنجیره پلیمراز (پیشرو= for، پس‌رو= rev)، دمای واسرشتگی و طول محصول واکنش زنجیره پلیمراز

Table 1. Polymerase chain reaction primer information (for = forward, rev = reverse), annealing temperature and the PCR product length

Gene[#]	Sequence 5´-3´	Gene Bank accession no.	Annealing temperature, (°C)	Length, bp
[¥]GAPDH for	GTC TTC ACT ACC ATG GAG AAG G	NM_001034034	60	197
[¥]GAPDH rev	TCA TGG ATG ACC TTG GCC AG			
[¥]Ubiquitin for	AGA TCC AGG ATA AGG AAG GCA T	NM_174133	62	198
[¥]Ubiquitin rev	GCT CCA CCT CCA GGG TGA T			
CAT for	TGG GAC CCA ACT ATC TCC AG	NM_00103586.1	61	178
CAT rev	AAG TGG GTC CTG TGT TCC AG			
CRP for	GGC CAG ACA GAC TTG CAT AAG AAG G	NM_001144097.1	61	142
CRP rev	GGG TTC GGG CCA GCT CTG TG			
GPX3 for	ACC ACC GCA CCA CGG TCA AC	NM_174077.3	61	127
GPX3 rev	GCC CGT GTG GTG GAC TTG GG			
HMOX2 for	GCC ACC ACC GCG CTG TAC TT	NM_001032087.2	61	108
HMOX2 rev	CCG GTG TAG CTC CGT GGG GA			
MGST3 for	GGG CTT GGC CTG GAT CGT TGG	NM_001035046.1	61	124
MGST3 rev	CAC AGT GGT GCC CAT CAG GCC			
MT1A for	ATC CGA CCA GTG GAT CTG CTT TGC C	NM_001040492.2	61	209
MT1A rev	AGA CAC AGC CCT GGG CAC ACT			
MT1E for	ACG ACC ACA CTT CGT CTC CGA A	NM_001114857.1	61	261
MT1E rev	ATG CAG GTT GGC CCA CGT TCC			
MT2A for	GAC CCC AGC CTC CAG TTC AGC TC	NM_001075140.1	61	93
MT2A rev	CTT TGC ATT TGC AGG AGC CGG C			
NQO1 for	AAC CAA CAG ACC AGC CAA TC	NM_001034535.1	61	146
NQO1 rev	CCT CCC ATC CTT TCC TCT TC			
SOD1 for	TGT TGC CAT CGT GGA TAT TG	NM_174615.2	61	143
SOD1 rev	CAG CGT TGC CAG TCT TTG TA			
UGT1A1 for	GCT CGT CAA GTG GCT GCC CCA	NM_001105636.1	61	175
UGT1A1 rev	TCC CCG GGT CTC CAT GCG CT			

[#]GAPDH = glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; CAT = catalase; CRP = C-reactive protein; GPX3 = glutathione peroxidase 3; HMOX2 = heme oxygenase 2; MGST3 = microsomal glutathione S-transferase 3; MT1A = metallothionein 1A; MT1E = metallothionein 1E; MT2A = metallothionein 2A; NQO1 = NAD (P) H dehydrogenase, quinone 1; SOD1 = superoxide dismutase 1; UGT1A1 = UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1.

[¥] GAPDH and Ubiquitin were used as reference genes.

مشاهده شد (P<۰/۰۵). تیمارهای مختلف تزریقی بر بیان mRNA ژن‌های هدف تأثیری نداشته و نتایج یکسانی را نشان دادند (P>۰/۰۵).

تأثیر LPS بر بیان ژن‌های هدف در کارتیه شاهد: در گروه‌های مختلف (شکل ۲)، تغییرات بیان mRNA ژن‌های هدف در کارتیه‌های شاهد پس از تزریق LPS نسبت به پیش از آن (ΔΔCT) نشان داد بیان mRNA ژن‌های MT1A و MT2A نسبت به قبل از تزریق LPS افزایش یافته است (P<۰/۰۵) و این افزایش در گروه EuG نسبت به گروه HypoG بیشتر بود (P<۰/۰۵). همچنین، تزریق LPS به استثنای HypoG سبب افزایش بیان mRNA ژن MT1E در کارتیه شاهد همه گروه‌ها شد (P<۰/۰۵). پس از تزریق LPS، افزایش بیان mRNA ژن‌های GPX3 در گروه‌های EuG و شاهد، و UGT1A1 در گروه EuG مشاهده شد (P<۰/۰۵؛ شکل ۲). تزریق LPS سبب کاهش بیان mRNA ژن‌های MGST3، NQO1، و SOD1 در گروه HypoG شد (P<۰/۰۵)، و بیان mRNA ژن MGST3 در گروه HyperB تمایل به کاهش نسبت به قبل از تزریق LPS نشان داد (P=۰/۰۹).

مقایسه بیان mRNA ژن‌های هدف در دو کارتیه LPS و شاهد: تزریق داخل پستانی LPS آثار مشابهی بر ژن‌های هدف در هر دو کارتیه داشت. نتایج به‌دست آمده نشان داد که تزریق داخل کارتیه‌ای LPS، بیان mRNA ژن‌های MT1A، MT2A، MT1E و GPX3 را در نمونه‌های گرفته

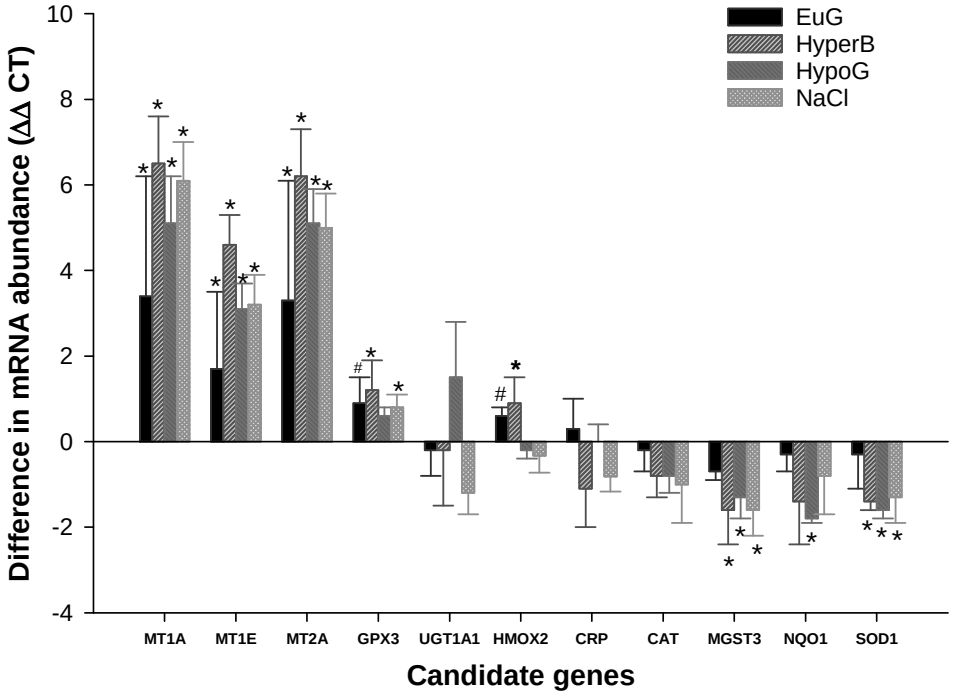

Fig. 1. Differences in mRNA abundance (ΔΔCt) of udder selected genes related to Nrf2 in LPS quarters in cows infusions with insulin and glucose (hyperinsulinemic euglycemic; EuG, n=6), beta-hydroxybutyrate (BHB) (hyper beta-hydroxybutyrate; HyperB, n=5), insulin (hyperinsulinemic hypoglycemic; HypoG, n=5), and NaCl (Control, n=8)

شکل ۱- تغییرات بیان mRNA (ΔΔCT) ژن‌های مرتبط با Nrf2 در کارتیه LPS بافت پستانی گاوهایی که تزریق انسولین و گلوکز (هایپرانسولین‌یوگلایسمیک) (EuG ؛ n = ۵)، بتاهیدروکسی‌بوتیرات (HyperB ؛n = ۵)، انسولین (HypoG ؛ n = ۶)، و محلول نمکی ۰/۹٪ (Control ؛n = ۸) انجام شد

شده از هر دو کارتیه افزایش داد (*P*<۰/۰۵؛ شکل ۳). بیان mRNA ژن SOD1 در هر دو کارتیه تحت تأثیر قرار گرفته و کاهش معنی‌داری را نشان داد (*P*<۰/۰۵). بر اساس نتایج به‌دست آمده (شکل ۳)، اثر تزریق داخل پستانی سبب کاهش بیان mRNA ژن‌های CAT، MGST3 و NQO1 در هر دو کارتیه شد، ولی این کاهش تنها در کارتیه‌های LPS از نظر آماری معنی‌دار بود (*P*<۰/۰۵).

بحث

بر اساس دانش نویسندگان، تاکنون مطالعه‌ای به منظور بررسی بیان mRNA ژن‌های مرتبط با Nrf2 در بافت پستانی گاوهای شیری در زمان بروز ورم پستان و حتی چالش پستانی با استفاده LPS صورت نگرفته است. بافت پستانی به خصوص در دام‌های شیری پرتولید به علت نقش آن در ساخت و ترشح شیر تحت تأثیر تغییرات هورمونی و فراسنجه‌ای قرار دارد که شدت این تغییرات در دوره انتقال بسیار زیاد است. مطالعات پیشین نشان دادند که تزریق داخل پستانی LPS در هنگام تغییر متابولیت‌ها و هورمون‌ها سبب افزایش دمای رکتومی دام‌ها و همچنین افزایش شمار سلول‌های پستانی شیر شده که از نشانه‌های التهاب پستان است (Vernay *et al.*, 2012; Zarrin *et al.*, 2014a). همچنین ایجاد چالش پستانی با استفاده از LPS سبب افزایش غلظت سرمی پروتئین‌های فاز حاد[1] نظیر SAA[2]، هاپتوگلوبین[3] (Hb) و سایتوکین‌ها (De Matteis *et al.*, 2017) و تزریق داخل پستانی LPS سبب افزایش بیان mRNA ژن‌های سایتوکینی و التهابی مختلفی نظیر IL-1β، IL-6، SAA، Hb، iNOS[4] و TNFα[5] در بافت پستانی شد (Vernay *et al.*, 2012)، که همه موارد یاد شده در زمان بروز ورم پستان نیز شایع بوده و نشان‌دهنده تحریک سیستم ایمنی است.

1. Acute phase protein
2. Serum amyloid A: SAA
3. Haptoglobin: Hb
4. Induced nitric oxide synthase: iNOS
5. Tumor necrosis factor alpha: TNFα

تولید گونه‌های فعال اکسیژن[1] (ROS) به وسیله باکتری‌های گرم منفی، که از عوامل اصلی تولید ورم پستان هستند، به واسطه اثر متقابل سموم و TLR4[2] افزایش می‌یابد (Sordillo *et al.*, 2009). فعال شدن سامانه ایمنی اولیه به وسیله LPS و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و ROS از مسیر TLR4 در زمان حضور باکتری‌های گرم منفی به وسیله محققین دیگر گزارش شده است (Akira and Takeda, 2004). شواهد زیادی نشان داده است که ROS از راه فعال‌سازی NF-kB، سبب افزایش تولید سیتوکین‌های فاز حاد و مولکول‌های چسبنده عروقی[3] می‌شود (Bannerman *et al.*, 2003). این محققین گزارش کرده‌اند که این عناصر در بروز عفونت-های گرم منفی باکتریایی مانند ورم پستان نقش دارند. تولید سیتوکین‌ها به عنوان یک عامل مهم در پاسخ غدد پستانی به ورم پستان ناشی از عوامل عفونت‌زای مختلف نقش دارد. چندین مطالعه ارتباط بین تولید IL-8، IL-6، IL-1β و TNFα و شدت ورم پستان در گاوهای شیری که در طول دوره قبل از زایمان در معرض تنش اکسیداتیو قرار گرفته‌اند را نشان می‌دهد (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). به منظور حفظ تولید و مقاومت بافت پستانی در برابر تغییرات متابولیسمی و التهابات ناشی از عوامل عفونت‌زا نظیر عوامل ایجادکننده ورم پستان، این بافت از روش‌های متفاوتی برای مقابله با عوامل التهاب‌زا استفاده می‌کند. از جمله این روش‌ها که در بسیاری از بافت‌های حساس بدن به عنوان یک سامانه دفاعی قوی عمل می‌نماید ساز و کار Nrf2 و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی وابسته به آن است (Motohashi and Yamamoto, 2004; Kensler *et al.*, 2007). انتظار می‌رود که در زمان بروز التهابات و بیماری‌های عفونی نظیر بیماری ورم پستان، فعالیت این سامانه دفاعی تشدید شود. در حالت فیزیولوژیکی طبیعی (بدون تنش)، غلظت هسته‌ای Nrf2 بسیار کم است. متناوباً، در هنگام تنش اکسیداتیو، این عامل در هسته جابجا می‌شود. در نتیجه، سطح بالایی از Nfr2 در هسته فعال و ژن‌های هدف را برای پاسخ‌های ایمنی مناسب تنظیم می‌کند (Motohashi and Yamamoto, 2004). تنظیم گلوتاتیون سلولی و همچنین سایر آنتی اکسیدان‌ها به وسیله Nrf2، برای NF-kB[4] بهینه و فعال شده در پاسخ به LPS و TNFα بسیار مهم است. محققان با استفاده از موش‌هایی که سیستم فاقد و دارای سیستم Nrf2 (Nrf2-/-, Nrf2+/+) داشتند به این نتیجه رسیدند که وجود سیستم Nrf2 در بدن به عنوان یک ساز و کار دفاعی اولیه ضروری است. بنابراین چنین ساز و کار دفاعی در اوج التهاب و بیماری‌های عفونی مانند ورم پستان ضرورت بیشتری دارد (Thimmulappa *et al.*, 2006).

علاوه بر بروز التهابات ناشی از تزریق LPS، تغییر متابولیت‌ها و هورمون‌ها نیز به عنوان یک عامل تأثیرگذار بر بیان mRNA ژن‌های مرتبط Nrf2 می‌تواند ایفای نقش نمایند. مطالعه اخیر نشان داد که تزریق مداوم (۴۸ ساعت) متابولیت‌ها و انسولین در گاوهای شیری سبب تغییر بیان ژن‌های کبدی مرتبط با Nrf2 شد که بیشترین تغییرات مربوط به گروه EuG بود و در این گروه، کاهش بیان mRNA بیشتر ژن‌ها (MGST3, MT1E, MT2A, NQO1, SOD1) مشاهده شد (Zarrin *et al.*, 2019d). همچنین نتایج مطالعه قبلی نشان داد که تغییر متابولیت‌ها و هورمون‌ها از راه تزریق طولانی‌مدت (۴۸ ساعت) سبب تغییراتی در بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی کد شده به وسیله Nrf2 در بافت پستانی گاوهای شیرده شد (زرین و همکاران، ۱۳۹۷). این محققین نشان دادند که تغییر متابولیتی و حتی هورمونی سبب واکنش‌های متفاوت این ژن‌ها در بافت پستانی شده‌اند، به‌طوری که تزریق انسولین سبب کاهش بیان mRNA ژن‌های CAT، HMOX2، MGST3، NQO1، وSOD1 در بافت پستانی گروه EuG شد. همچنین طی تحقیقی، تأثیر تغییرات متابولیت‌های خونی بر عملکرد سیستم دفاعی اثبات شده است (Heiss *et al.*, 2013).

اگر چه نویسندگان پیش‌بینی افزایش بیان mRNA ژن‌های مورد مطالعه را در پاسخ به LPS داشتند، ولی نتایج نشان داد برخی ژن‌ها، واکنشی به آن نشان نداده و بیان mRNA برخی از ژن‌ها نیز به‌صورت کاهشی مشاهده شد. آزمایش قبلی، کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، CAT و GPX را در موش‌های Sprague Dawley پس از قرار گرفتن در معرض

1. Reactive oxygen species: ROS
2. Toll-like receptor: TLR4
3. Vascular adhesion molecules
4. Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells: NF-κB

اندوتوکسین نشان داد (Watson *et al.*, 1990). سم ناشی از باکتری‌ها به عنوان عامل محرکی در پاسخ فاز حاد و مهارکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان عمل می‌نماید و همچنین سموم اندوتوکسین، مشابه استرس اکسیداتیو، با افزایش تولید سیتوکین‌ها، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و ظرفیت آن‌ها برای حفظ بدن میزبان را سرکوب می‌کنند. مطالعه پیشین کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را در زمان افزایش اکسید نیتریک ناشی از تجویز اندوتوکسین گزارش نمود (Watson *et al.*, 1990). این اثر از طریق کاهش بیان mRNA ژن‌های مرتبط با آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مطرح گردید. این گزارشات نتایج قبل را که افزایش قابل توجه سنتز iNOS پس از تزریق داخل پستانی LPS را گزارش نمودند تأیید می‌نماید (Vernay *et al.*, 2012).

در مطالعه حاضر، انتظار می‌رفت بیان mRNA همه ژن‌ها تحت تأثیر LPS قرار گرفته و افزایش نشان دهند، در حالی که برخی از ژن‌های تعیین شده تحت تأثیر قرار نگرفته و یا بر خلاف آنچه انتظار می‌رفت واکنش نشان داده و بیان mRNA آن‌ها نسبت به قبل از تزریق داخل پستانی LPS کاهش معنی‌داری نشان داد. نتایج منتشر شده از این مطالعه نشان داده است که تزریق داخل پستانی LPS سبب بروز التهابات و همچنین علائمی نظیر تب و افزایش شمار سلول‌های پستانی شده و منجر به تحریک سیستم دفاعی و ایمنی این دام‌ها چه به‌صورت عمومی و چه به‌صورت موضعی شد (Vernay *et al.*, 2012; Zarrin *et al.*, 2014a).

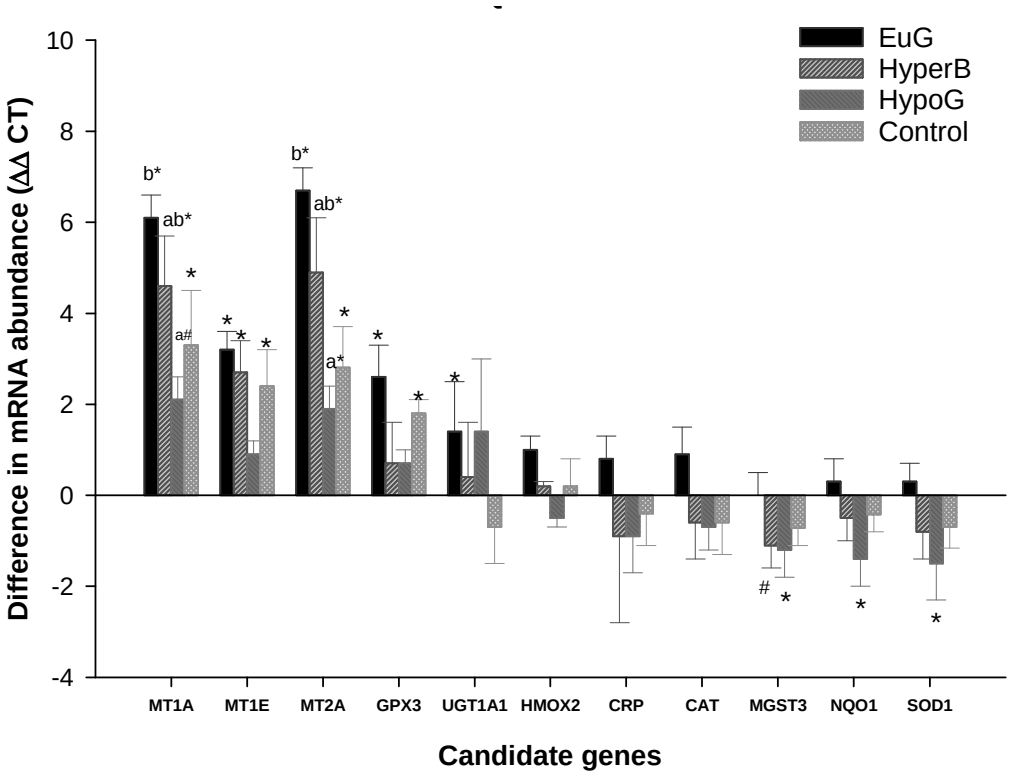

Fig. 2. Differences in mRNA abundance (ΔΔCt) of udder selected genes related to Nrf2 in Control quarters in cows infusions with insulin and glucose (hyperinsulinemic euglycemic; EuG, n=6), beta-hydroxybutyrate (BHB) (hyper beta-hydroxybutyrate; HyperB, n=5), insulin (hyperinsulinemic hypoglycemic; HypoG, n=5), and NaCl (Control, n=8)

شکل ۲- تغییرات بیان mRNA (ΔΔCT) ژن‌های مرتبط با Nrf2 در کارتیه کنترل بافت پستانی گاوهایی که تزریق انسولین و گلوکز (هایپرانسولین‌یوگلایسمیک) (EuG ؛ n = ۵)، بتاهیدروکسی‌بوتیرات (HyperB ؛n = ۵)، انسولین (HypoG ؛ n = ۶) و محلول نمکی ۰/۹٪ (Control ؛n = ۸) انجام شد

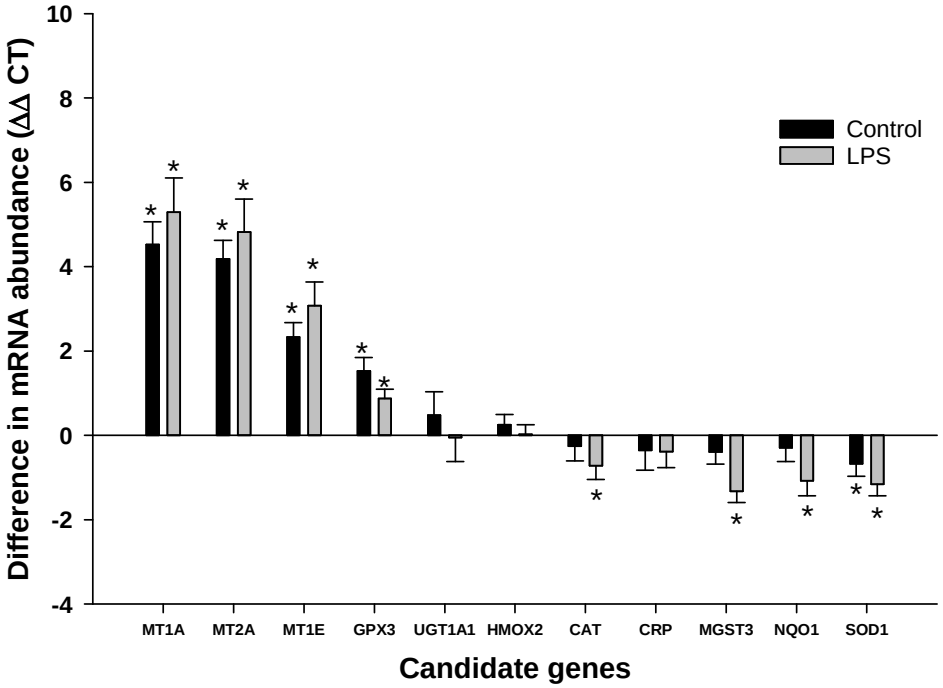

Fig. 3. Differences in mRNA abundance (ΔΔCt) of udder candidate genes related to Nrf2 in both LPS and control quarters

شکل ۳- مقایسه تغییرات بیان mRNA (ΔΔCT) ژن‌های کاندیدای مرتبط با Nrf2 در هر دو کارتیه LPS و شاهد بافت پستانی

همچنین، همین محققین گزارش نمودند که متعاقب تأثیرپذیری سامانه ایمنی، سامانه سوخت و ساز به‌صورت عمومی و موضعی تحت تأثیر قرار گرفته که می‌تواند به عنوان یکی از عوامل تأثیرگذار بر توانایی دام‌ها در پاسخ‌های سامانه ایمنی به بروز التهابات و عوامل عفونت‌زای خارجی باشد (Vernay *et al.*, 2012; Zarrin *et al.*, 2014a, b; De Matties *et al.*, 2017).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد اگر چه تزریق LPS به داخل کارتیه‌های جداگانه‌ای که از نظر کالبدشناسی تنها از راه سیستم گردش خون به هم‌دیگر ارتباط دارند صورت گرفت، ولی تشابه نتایج به‌دست آمده از هر دو کارتیه پستانی (شاهد و LPS) ناشی از بروز پاسخ‌های ایمنی به‌صورت سیستمی بوده و علاوه بر بروز پاسخ‌های موضعی، باعث فعال شدن ساز و کار دفاعی کل بدن در زمان بروز عوامل عفونت‌زا می‌شود. همچنین با توجه به واکنش‌های متفاوتی که برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در برابر التهابات از خود بروز دادند چنین استنباط می‌شود که افزایش خطر ابتلا به بیماری‌هایی نظیر ورم پستان، به خصوص در دوره انتقال دام‌های شیری، می‌تواند به دلیل اختلال در ساز و کار تنظیم بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی مرتبط با Nrf2 باشد که در این صورت، نقش محافظتی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از بافت‌های حساس مانند پستان مختل خواهد شد. بر اساس این نتایج چنین نتیجه‌گیری می‌شود که به دلیل اختلال در بیان mRNA ژن‌های آنتی‌اکسیدانی در زمان بروز عوامل التهابی و همچنین تغییر متابولیت‌ها و هورمون‌ها، سیستم دفاعی بدن به‌صورت عمومی تحت تأثیر قرار گرفته که می‌تواند بر سلامت و عملکرد دام تأثیرگذار باشد. لذا، استفاده از راهبردهای تغذیه‌ای و مدیریتی مناسب به خصوص در دوره انتقال گاوهای شیری، سبب کاهش اختلالات فراسنجه‌ای و هورمونی شده و ضمن تقویت سیستم ایمنی از بروز تنش‌های اکسیداتیو نیز ممانعت به عمل خواهد آورد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از مجموعه گروه فیزیولوژی دامپزشکی دانشگاه برن سوئیس به خصوص پروفسور روپرت بروکمایر که در امر انجام آزمایش و آماده‌سازی داده‌ها با نویسندگان همکاری داشتند کمال تشکر و سپاس را به عمل آورند.

فهرست منابع

زرین م.، احمدپور ا.، و بروکمایر ر. ۱۳۹۸. اثر متقابل تزریق انسولین و القای ورم پستان با لیپوپلی‌ساکارید بر سوخت و ساز گلوکز و ترشح هورمون گلوکاگون در گاوهای شیری. تحقیقات تولیدات دامی، ۲: ۹۳-۱۰۳.

زرین م.، بروکمایر ر.، و احمدپور ا. ۱۳۹۷. اثر دستکاری متابولیت‌ها و هورمون‌ها بر بیان mRNA ژن‌های آنتی‌اکسیدانی مرتبط با Nrf2 در بافت پستانی گاوهای شیری. تحقیقات تولیدات دامی، ۳: ۱-۱۲.

Aitken S. L., Karcher E. L., Rezamand P., Gandy J. C., Vande Haar M. J., Capuco A. V. and Sordillo L. M. 2009. Evaluation of antioxidant and proinflammatory gene expression in bovine mammary tissue during the periparturient period. Journal of Dairy Science, 92: 589-598.

Akira S. and Takeda K. 2004. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. Nature Reviews Immunology, 4: 499-511.

Aleri J. W., Hine B. C., Pyman M. F., Mansell P. D., Wales W. J., Mallard B. and Fisher A. D. 2016. Periparturient immunosuppression and strategies to improve dairy cow health during the periparturient period. Research in Veterinary Science, 108: 8-17.

Bannerman D. D., Paape M. J., Hare W. R. and Sohn E. J. 2003: Increased levels of LPS-binding protein in bovine blood and milk following bacterial lipopolysaccharide challenge. Journal of Dairy Science, 86: 3128-3137.

Benov L. and Fridovich I. 1998. Growth in iron-enriched medium partially compensates *Escherichia coli* for the lack of manganese and iron superoxide dismutase. Journal of Biological Chemistry, 273(17): 10313-10316.

Bruckmaier R. M. and Gross J. J. 2017. Lactational challenges in transition dairy cows. Animal Production Science, 57(7): 1471-1481.

Bruckmaier R. M., Schällibaum M. and Blum J. W. 1993. *Escherichia coli* endotoxin-induced mastitis in dairy cows: Changes and importance of insulin-like growth factor I and oxytocin. Milchwissenschaft, 48: 374-378.

De Matteis L., Bertoni G., Lombardelli R., Wellnitz O., Van Dorland H. A., Vernay M. C. M. B., Bruckmaier R. M. and Trevisi E. 2017. Acute phase response in lactating dairy cows during hyperinsulinemic hypoglycaemic and hyperinsulinemic euglycaemic clamps and after intramammary LPS challenge. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 101: 511-520.

Drackley J. K. 1999. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? Journal of Dairy Science, 82(11): 2259-2273.

Gessner D. K., Schlegel G., Keller J., Schwarz F. J., Ringseis R. and Eder K. 2013. Expression of target genes of nuclear factor E2-related factor 2 in the liver of dairy cows in the transition period and at different stages of lactation. Journal of Dairy Science, 96: 1038-1043.

Goff J. P. 2006. Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health. Journal of Dairy Science, 89(4): 1292-1301.

Gross J. J. and Bruckmaier R. M. 2019. Invited review: Metabolic challenges and adaptation during different functional stages of the mammary gland in dairy cows: Perspectives for sustainable milk production. Journal of Dairy Science, 102(4): 2828-2843.

Heiss E. H., Schachner D., Zimmermann K. and Dirsch V. M. 2013. Glucose availability is a decisive factor for Nrf2-mediated gene expression. Redox Biology, 1: 359-365.

Ingvartsen K. L. and Moyes K. M. 2015. Factors contributing to immunosuppression in the dairy cow during the periparturient period. Japanese Journal of Veterinary Research, 63(Suppl. 1): S15-S24.

Kensler T. W., Wakabayashi N. and Biswal S. 2007. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 47: 89-116.

Kreipe L., Vernay M. C. M. B., Oppliger A., Wellnitz O., Bruckmaier R. M. and van Dorland H. A. 2011. Induced hypoglycemia for 48 hours indicates differential glucose and insulin effects on liver metabolism in dairy cows. Journal of Dairy Science, 94: 5435-5448.

Lledías F., Rangel P. and Hansberg W. 1998. Oxidation of catalase by singlet oxygen. Journal of Biological Chemistry, 273(17): 10630-10637.

Matés J. M. and Sánchez-Jiménez F. 1999. "Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes." Front Bioscience, 4: D339-D345.

Motohashi H. and Yamamoto M. 2004. Nrf2–Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. Trends in Molecular Medicine, 10(11): 549-557.

Oviedo-Boyso J., Valdez-Alarcón J. J., Cajero-Juárez M., Ochoa-Zarzosa A., López-Meza J. E., Bravo-Patiño A. and Baizabal-Aguirre V. M. 2007. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. Journal of Infection, 54: 399-409.

Schmitz S., Pfaffl M. W., Meyer H. H. D. and Bruckmaier R. M. 2004. Short-term changes of mRNA abundance of various inflammatory factors and milk proteins in mammary tissue during LPS-induced mastitis. Domestic Animal Endocrinology, 26: 111-126.

Sordillo L. M., Contreras G. A. and Aitken S. L. 2009. Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. Animal Health Research Reviews, 10: 53-63.

Thimmulappa R. K., Scollick C., Traore K., Yates M., Trush M. A., Liby K. T., Sporn M. B., Yamamoto M., Kensler T. W. and Biswal S. 2006. Nrf2-dependent protection from LPS induced inflammatory response and mortality by CDDO-Imidazolide. Biochemical and Biophysical Research Communications, 351: 883-889.

Trevisi E. R. M. I. N. I. O., Amadori M., Cogrossi S. I. M. O. N. E., Razzuoli E. and Bertoni G. 2012. Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows. Research in Veterinary Science, 93: 695-704.

van Dorland H. A., Richter S., Morel I., Doherr M. G., Castro N. and Bruckmaier R. M. 2009. Variation in hepatic regulation of metabolism during the dry period and in early lactation in dairy cows. Journal of Dairy Science, 92: 1924-1940.

Van Knegsel A. T., Hammon H. M., Bernabucci U., Bertoni G., Bruckmaier R. M., Goselink R. M., Gross J. J., Kuhla B., Metges C. C., Parmentier H. K. and Trevisi E. 2014. Metabolic adaptation during early lactation: key to cow health, longevity and a sustainable dairy production chain. CAB Reviews, 9(002): 1-15.

Vernay M. C. M. B., Wellnitz O., Kreipe L., van Dorland H. A. and Bruckmaier R. M. 2012. Local and systemic response to intramammary lipopolysaccharide challenge during long-term manipulated plasma glucose and insulin concentrations in dairy cows. Journal of Dairy Science, 95: 2540-2549.

Waldron M. R., Kulick A. E., Bell A. W. and Overton T. R. 2006. Acute experimental mastitis is not causal toward the development of energy-related metabolic disorders in early postpartum dairy cows. Journal of Dairy Science, 89: 596-610.

Watson A. M., Warren G., Howard G., Shedlofsky S. I. and Blouin R. A. 1999. Activities of conjugating and antioxidant enzymes following endotoxin exposure. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 13: 63-69.

Wellnitz O. and Bruckmaier R. M. 2012. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. The Veterinary Journal, 192: 148-152.

Zarrin M., Christensen R., DoostMohammadi S. K., Ahmadpour A. and Ahmadpour A. 2019a. The inflammatory response in cellular level changes during the transition period in dromedary camel. Journal of Animal Science, 97(Suppl. 3): 369.

Zarrin M., Christensen R., DoostMohammadi S. K., Ahmadpour A. and Ahmadpour A., 2019b. Hepatic reducing factors expression changes in dromedary camel during late gestation and early lactation. Journal of Animal Science, 97(Suppl. 3): 366-367.

Zarrin M., Christensen R., DoostMohammadi S. K., Ahmadpour A. and Ahmadpour A. 2019c. Alteration of mRNA abundance of the oxidizing factors-related genes during the transition period in dromedary camel. Journal of Animal Science, 97(Suppl. 3): 366.

Zarrin M., De Matteis L., Vernay M. C. M. B., Wellnitz O., van Dorland H. A. and Bruckmaier R. M. 2013. Long-term elevation of β-hydroxybutyrate in dairy cows through infusion: Effects on feed intake, milk production, and metabolism. Journal of Dairy Science, 96: 2960-2972.

Zarrin M., Grossen-Rösti L., Bruckmaier R. M. and Gross J. J. 2017. Elevation of blood β-hydroxybutyrate concentration affects glucose metabolism in dairy cows before and after parturition. Journal of Dairy Science, 100: 2323-2333.

Zarrin M., Wellnitz O., van Dorland H. A. and Bruckmaier R. M. 2014a. Induced hyperketonemia affects the mammary immune response during lipopolysaccharide challenge in dairy cows. Journal of Dairy Science, 97: 330-339.

Zarrin M., Wellnitz O., van Dorland H. A., Gross J. J. and Bruckmaier R. M. 2014b. Hyperketonemia during lipopolysaccharide-induced mastitis affects systemic and local intramammary metabolism in dairy cows. Journal of Dairy Science, 97(6): 3531-3541.

Zarrin M., Wellnitz O., van Dorland H. A. and Bruckmaier R. M. 2019d. Hepatic mRNA abundance of genes related to nuclear erythroid 2-related factor 2 changes in response to 48 h manipulated plasma metabolites and insulin in dairy cows: Metabolites and insulin infusion effects in cows. Livestock Science, 227: 189-194.

Animal Production Research

Vol. 10, No. 2, 2021 (87-98)

University of Guilan

Research paper

Effect of intramammary lipopolysaccharide challenge on mRNA abundance of antioxidant genes associated with nuclear erythroid 2-related factor 2 in mammary tissue of dairy cows during change of metabolites and hormones

M. Zarrin[1*], A. Ahmadpour[1]

1. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran

(Received: 27-10-2020 – Accepted: 16-12-2020)

Abstract

To study the reaction of udder mRNA abundance of genes related to nuclear erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) to an intramammary lipopolysaccharide (LPS) challenge with changes in blood insulin and metabolites levels, 24 dairy cows were used. Treatments included insulin infusion (HypoG, n=5), insulin and glucose (EuG, n=6), β-hydroxybutyrate (HyperB, n= 5), and saline (Control, n=8) for 56 h. At 48 h of infusions, two quarters were treated with 200µg LPS, and two control quarters were treated with physiological serum. Mammary tissue biopsies were obtained before and after the LPS challenge. The mRNA abundance of the genes was measured by the qPCR approach. In the LPS quarters, the mRNA abundance of MT1A, MT2A, and MT1E increased in all treatments. The mRNA abundance of GPX3 increased in HyperB and Control. The mRNA abundance of MGST3 and SOD1 decreased in all groups lacking EuG. Decreased mRNA abundance of NQO1 observed in HypoG. In the control quarters, the mRNA abundance of MT1A and MT2A was raised in all groups. Similarly, MT1E is up-regulated in all groups except for the HypoG. The increase of mRNA abundance of GPX3 was observed in the Control and EuG groups, and UGT1A1 in EuG. LPS decreased the mRNA abundance of MGT3, NQO1, and SOD1 in HypoG. In conclusion, LPS influenced the mRNA quantity of the investigated genes in both quarters, which indicate local and systemic reactions to endotoxin. Applying appropriate management strategies will reduce oxidative stress and susceptibility to diseases and will lead to better welfare and performance of the animal.

Keywords: Antioxidant, Abundance of mRNA, Mammary gland, Lipopolysaccharide, Mastitis

[*]Corresponding author: mzarin@yu.ac.ir

doi: 10.22124/AR.2021.18033.1571