Archi of SID

نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان
جلد ششم، شماره دوم، ۱۳۹۷
http://ejrr.gau.ac.ir

تاثیر مصرف اسید لینولئیک کونژوگه بر بیان ژن سایتوکین‌های التهاب‌زا در بافت‌های پستان، رحم و چربی گاوهای شیری

علی رضایی رودباری[۱]، *آرمین توحیدی[۲]، مهدی ژندی[۳]، کامران رضایزدی[۳]، قدرت رحیمی میانجی[۴] و فرج اله ادیب‌هاشمی[۵]

[۱]دانش‌آموخته دکتری، [۲]استاد و [۳]دانشیار گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، [۴]استاد گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، [۵]دانشیار دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران.

تاریخ دریافت: ۹۷/۲/۱۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/٤/۲۷

چکیده

سابقه و هدف: سایتوکین‌های پیش‌التهابی مولکول‌های کوچک پروتئینی هستند که توسط سلول‌های مختلف تراوش می‌شوند و بدن را وارد وضعیت التهابی می‌کنند. اسید لینولئیک کونژوگه[۲] نام عمومی اسیدهای چرب ۱۸ کربنی است که دارای باند دوگانه کونژوگه هستند. اسیدلینولئیک کونژوگه بر تولید سایتوکین‌های التهاب‌زا تاثیر دارد. با توجه به نقش سایتوکین‌های التهاب‌زا در فرآیندهای فیزیولوژیک مختلف، در این پژوهش تاثیر مصرف مکمل اسیدلینولئیک کونژوگه در دوره انتقال بر بیان ژن‌های سایتوکین‌های التهاب‌زا در بافت‌های پستان، رحم و چربی زیرپوستی مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: تعداد ٢٤ راس گاو با نمره وضعیت بدنی ۳/۲۰±۰/۳ (خطای استاندارد±میانگین) و نوبت زایش ۳/۲±۱/۸ انتخاب و به‌صورت تصادفی در بین چهار گروه آزمایشی قرار گرفتند (در هر گروه آزمایشی ٦ راس): ۱- ۷۵ گرم در روز چربی پالم از ۲۱ روز پیش از زایش تا ۲۱ روز پس از زایش (C21)؛ ۲- ۷۵ گرم در روز چربی پالم از ۲۱ روز پیش از زایش تا ٤۲ روز پس از زایش (C42)؛ ۳- ۷۵ گرم در روز اسیدلینولئیک کونژوگه پوشش‌دار از ۲۱ روز پیش از زایش تا ۲۱ روز پس از زایش (CLA21)؛ ٤- ۷۵ گرم در روز اسیدلینولئیک کونژوگه پوشش‌دار از ۲۱ روز پیش از زایش تا ٤۲ روز پس از زایش (CLA42). مکمل اسیدلینولئیک کونژوگه پوشش‌دار دارای ۱۰ درصد از هر یک از ایزومرهای ۱۰-ترانس، ۱۲-سیس و ۹-سیس،۱۱-ترانس بود. در روزهای ۲۱ و ٤۲ پس از زایش از بافت‌های، پستان، رحم و چربی زیرپوست نمونه‌برداری شد. نمونه بافت پستان از ناحیه‌ی عقبی با فاصله تقریبی ۸-٦ سانتی‌متر پایین‌تر از محل اتصال پستان به پوست و سه سانتی‌متر در سمت راست از شکاف میانی پستان و توسط یک گان بیوپسی نیمه‌خودکار با قطر سوزن ١٤ گرفته شد. نمونه رحم با عبور یک پنس سر سوسماری از گردن رحم گرفته شد. نمونه چربی زیرپوستی با ایجاد یک شکاف در ناحیه پین، گرفته شد. بیان ژن‌های آنزیم سیکلواکسی‌ژناز-۲، فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا و گیرنده شبه‌ناقوس-چهار با واکنش Real time-PCR سنجش شد.

یافته‌ها: تغذیه مکمل اسیدلینولئیک کونژوگه پوشش‌دار در دوره انتقال بیان ژن فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا را در بافت پستان به‌صورت معنی‌داری کاهش داد (P<۰/۰۵). اثر زمان و برهمکنش زمان بر تیمار برای این ژن در بافت پستان معنی‌دار نبود. مکمل اسیدلینولئیک کونژوگه سبب افزایش بیان ژن آنزیم سیکلواکسی‌ژناز-۲ در بافت رحم گاوهای گروه CLA42 شد (P<۰/۰۱). همچنین اثر زمان برای بیان ژن آنزیم سیکلواکسی‌ژناز-۲ در بافت رحم معنی‌دار بود (P=۰/۰۵). تغذیه اسیدلینولئیک کونژوگه در

*نویسنده مسئول: atowhidi@ut.ac.ir

2- Conjugated linoleic acids (CLA)

www.SID.ir

Archive of SID

دوره انتقال سبب افزایش معنی‌داری بیان ژن آنزیم سیکلواکسی‌ژناز-۲ در بافت چربی زیر پوستی شد، ولی بر بیان ژن‌های فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا و گیرنده شبه‌ناقوس- چهار اثر نداشت.

نتیجه‌گیری: نتایج پژوهش حاضر نشان داد افزودن اسیدلینولئیک کونژوگه به جیره گاوها طی دوره انتقال می‌تواند بیان برخی از ژن‌های سایتوکین‌های التهاب‌زا را در بافت‌های پستان، رحم و چربی زیرپوستی تغییر دهد. نتایج پژوهش حاضر اطلاعات اولیه‌ای برای پژوهش‌های آینده به‌منظور بررسی سازوکارهای اثرات فیزیولوژیک اسیدلینولئیک کونژوگه بر بافت‌های مختلف گاوهای شیری فراهم نمود.

واژه‌های کلیدی: گاو شیری، اسید لینولئیک کونژوگه، آنزیم سیکلواکسی‌ژناز-۲، فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا، گیرنده شبه‌ناقوس- چهار

مقدمه

دوره انتقال مهمترین دوره چرخه شیردهی گاو شیری است و مدیریت بهینه این دوره، موفقیت عملکرد تولیدمثل و تولید شیر را تضمین خواهد کرد. بزرگترین چالش گاو در این دوره افزایش سریع و ناگهانی نیاز به مواد مغذی برای تولید شیر و از طرفی به طور هم‌زمان کاهش مصرف ماده خشک است؛ در این حالت گاو دچار وضعیتی به نام توازن منفی انرژی می‌شود که از مهمترین ویژگی‌های دوره انتقال است (۷). افزایش مقدار انرژی در جیره با افزایش سطح کنسانتره و یا چربی‌ها به عنوان یکی از راهکارهای اولیه برای بهبود توازن منفی انرژی در این دوره پیشنهاد شده‌اند که به‌طور عمده به علت افزایش خطر ابتلا به اسیدوز و کاهش ماده خشک مصرفی ناموفق بوده‌اند (۱۰). کاهش خروج انرژی از بدن از طریق کاهش خروج چربی از شیر به‌عنوان منبع اصلی انرژی شیر راهکاری جدید و مناسب برای بهبود توازن منفی انرژی در این دوره معرفی شده است (۳۲ و ۳۸).

اسیدلینولئیک کونژوگه نام عمومی برای گروهی از اسیدهای چرب دارای ۱۸ کربن و دو پیوند دوگانه کونژوگه است که اثرات فیزیولوژیک مختلفی در مدل‌های حیوانی داشته است (۲٤، ۲٦ و ۲۷). نشان داده شده است ایزومر ۱۰-ترانس،۱۲-سیس اسید لینولئیک کونژوگه سبب مهار ساخت چربی در بافت پستان و کاهش چربی شیر در گاوهای شیری و سایر نشخوارکنندگان شده است (۱۵ و ۳۲). بنابراین، امروزه از اسیدلینولئیک کونژوگه به‌عنوان یک افزودنی برای مدیریت توازن منفی انرژی در جیره دوره انتقال گاوهای شیری استفاده می‌شود (٤۰).

سایتوکین‌ها مولکول‌های کوچک پروتئینی هستند که توسط سلول‌های بدن تراوش می‌شوند و در اثرات متقابل سلول‌ها و ارتباط‌های بین سلولی نقش مهمی دارند (۲۰). سایتوکین‌هایی که بدن را وارد شرایط التهابی می‌کنند به سایتوکین‌های التهاب‌زا[3]، و آنهایی که التهاب را کاهش داده و سبب بهبود زخم‌ها می‌شوند به سایتوکین‌های ضدالتهاب[4] معروف هستند (٤). در مطالعات مختلف در انسان و حیوانات آزمایشگاهی نشان داده شده است که اسید لینولئیک کونژوگه واکنش‌های التهابی و تولید سایتوکین‌های التهاب‌زا را کاهش می‌دهد (۵). به‌عنوان مثال، اسید لینولئیک کونژوگه با اسید لینولئیک برای ساخت اسید آراکیدونیک رقابت می کند. اسید آراکیدونیک خود پیش‌ساز پروستاگلندین E_2 است، و بدین‌ترتیب اسیدلینولئیک کونژوگه با تاثیر بر بیان آنزیم سیکلواکسی‌ژناز-۲[5] تولید سایتوکین‌های التهاب‌زا مثل آیکوزانوئیدها و پروستاگلندین‌ها را می‌کاهد (۲۹).

3. Proinflammatory cytokines
4. Anti-inflammatory cytokines
5. Cyclooxygenase-2 (COX-2)

www.SID.ir

Archive of SID

همچنین، اثر اسید لینولئیک کونژوگه بر تولید سایتوکین التهاب‌زای فاکتور نکروزکننده تومور- آلفا[6] و کاهش التهاب در موش‌های صحرایی بزرگ[7] گزارش شده است (۱۲). سایتوکین‌های التهاب‌زا در فرآیندهای فیزیولوژیک مختلف دخالت دارند. به‌عنوان مثال نشان داده شده است که افزایش تولید آیکوزانوئیدهایی مثل پروستاگلندین- اف ۲ آلفا[8] عفونت رحمی را در گاوهای شیری دوره انتقال کاهش داد (۳٦). همچنین نقش فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا در فرآیندهای مقاومت به انسولین و نیز آپوپتوز سلول‌های پستانی در مطالعات مختلف گزارش شده است (۸ و ۱۳). با توجه به آثار شناخته شده سایتوکین‌های التهاب‌زا در فرآیندهای فیزیولوژیک و نیز نقش اسیدلینولئیک کونژوگه بر تولید این سایتوکین‌ها در حیوانات مختلف، تا کنون این جنبه از استفاده از اسیدلینولئیک کونژوگه در جیره دوره انتقال گاوهای شیری مورد توجه و بررسی قرار نگرفته است. بنابراین در این آزمایش بیان ژن‌های آنزیم سیکلواکسی‌ژناز- ۲ و فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا در بافت‌های رحم، چربی و پستان گاوهای شیری در دوره انتقال در اثر تغذیه اسیدلینولئیک کونژوگه و چربی مورد مطالعه قرار گرفت.

از طرفی، گیرنده شبه‌ناقوس- چهار[9] یک گیرنده سلولی است که اندوتوکسین باکتری‌ها و سایر فرسته‌ها را شناسایی می‌کند. نشان داده شده است که فعال شدن گیرنده شبه‌ناقوس- چهار تولید فاکتور نکروزکننده تومور- آلفا و سایر سایتوکین‌های التهاب‌زا را می‌افزاید (۲۱). با توجه به وجود شواهدی مبنی بر اتصال اسیدهای چرب به گیرنده شبه ناقوس چهار و آغاز واکنش‌های التهاب‌زا، در این آزمایش بیان ژن گیرنده شبه‌ناقوس- چهار نیز در بافت‌های رحم، چربی زیرپوست و پستان مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش کار

این پژوهش در گاوداری مهدشت با ظرفیت ۵۵۰۰ راس گاو شیری در شمال ایران انجام شده است. گاوها در جایگاه باز با ابعاد ۱٦×۳۰ متر و به‌صورت گروهی نگهداری شدند. تعداد ۲٤ راس گاو با نمره وضعیت بدنی[10] ۳/۲۰±۰/۳ (خطای استاندارد ± میانگین) و نوبت زایش ۳/۲±۱/۸ (خطای استاندارد ± میانگین) به‌صورت تصادفی در چهار تیمار قرار گرفتند (در هر تیمار ٦ راس). ۱) از روز ۲۱ پیش از زایش تا ۲۱ روز پس از زایش با ۷۵ گرم در روز مکمل چربی پالم (انرجایزر-آر پی ۱۰؛ ایفکو، جوهور باهور، مالزی[11])، (C21)؛ ۲) از روز ۲۱ پیش از زایش تا ٤۲ روز پس از زایش با ۷۵ گرم در روز مکمل چربی پالم، (C42) ؛ ۳) از روز ۲۱ پیش از زایش تا ۲۱ روز پس از زایش با ۷۵ گرم در روز مکمل محافظت شده اسیدلینولئیک کونژوگه (لوترل پیور، بی اِی اس اف، لودویگشافن، آلمان[12]) (CLA21)؛ و ٤) از روز ۲۱ پیش از زایش تا ٤۲ روز پس از زایش با ۷۵ گرم در روز مکمل محافظت شده اسیدلینولئیک کونژوگه (CLA42). فرمول جیره و ترکیب شیمیایی آن در جدول ۱ آمده است. جیره‌ها دارای انرژی و پروتئین یکسان بودند و مقدار مکمل چربی پالم یا اسید لینولئیک کونژوگه مصرفی روزانه با ۱۲۵ گرم کنسانتره مخلوط و به‌صورت سرک در وعده تغذیه صبحگاهی به گاوها خورانده شد. به‌منظور اطمینان از مصرف کامل مکمل توسط هر گاو، در هنگام پخش

6. Tumor necrosis factor-α (TNF-α)
7. Rats
8. Prostaglandin F2α (PGF2α)
9. Toll-like receptor-4 (TLR-4)
10. Body condition score (BCS)
11. Energizer-RP10; Iffco, Johor Bahru Johor, Malaysia
12. Lutrell Pure, BASF, Ludwigshafen, Germany

www.SID.ir

Archive of SID

سرک در آخور گردن‌قفلی آخور در حالت بسته قرار داده شد. مکمل محافظت شده اسیدلینولئیک کونژوگه که توسط هر گاو دریافت شد دارای ۷/۵ گرم از هریک از ایزومرهای ۹- سیس، ۱۱- ترانس و ۱۰- ترانس، ۱۲- سیس اسیدلینولئیک کونژوگه بود. چگونگی شناسایی مقدار ماده خشک مصرفی هر گروه، در مقاله پیشین این پژوهش اشاره شده است (۳۲).

جدول ۱: اجزای تشکیل دهنده و ترکیب شیمیایی جیره پایه (برحسب درصد در ماده خشک)

Table 1. Ingredient (% of dry matter) and chemical composition of basal diets.

پس از زایش Postpartum	قبل از زایش Prepartum	ماده خوراکی Ingredient	
22.8	24.4	(alfalfa hay)	یونجه
22	28.8	(corn silage)	ذرت سیلوشده
4.1	-	(beet pulp)	تفاله چغندر قند
-	9.6	(wheat straw)	کاه گندم
14.5	14.1	(barley grain)	جو
16.4	8.5	(corn grain)	ذرت
14.5	7	(soybean meal)	کنجاله سویا
0.8	-	(full fat soy)	فولفت سویا
-	1	(cottonseed)	پنبه‌دانه
-	2.1	(wheat grain)	گندم
0.9	-	(sodium bicarbonate)	بی‌کربنات‌سدیم
0.4	-	(salt)	نمک
0.3	-	(dicalcium phosphate)	دی‌کلسیم‌فسفات
0.3	-	(magnesium oxide)	اکسیدمنیزیوم
1.3	2	(glucosa)	گلوکزا
0.4	0.8	(choline chloride)	کولین‌کلراید
1	1.2	(mineral-vitamin premix)*	مکمل معدنی-ویتامینی
0.3	0.5	(palm fat/CLA)	چربی پالم/ اسیدلینولئیک کونژوگه
		Chemical composition	ترکیب شیمیایی
1.76	1.6	(Nel Mcal/kg)	انرژی خالص شیردهی (مگاکالری در کیلوگرم)
17.1	13.4	(crude protein, %)	پروتئین خام (٪)
4.1	3.3	(ether extract, %)	عصاره اتری (٪)
22.3	23.1	(acid detergent fiber, %)	فیبر محلول در شوینده اسیدی(٪)
32	36.8	(neutral detergent fiber, %)	فیبر محلول در شوینده خنثی(٪)
40.4	36.5	(non fibrous carbohydrate, %)	کربوهیدرات غیرفیبری (٪)

*هر کیلوگرم از این مکمل دارای ۵۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۱۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D، ۱۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین E، ۹۰۰۰ میلی‌گرم فسفر، ۱۹۵۰۰۰ میلی‌گرم کلسیم، ۲۰۰۰ میلی‌گرم منگنز، ۵۵۰۰۰ میلی‌گرم سدیم، ۲۰۰۰ میلی‌گرم روی، ۲۸۰ میلی‌گرم مس، ۱۰۰ میلی‌گرم‌کبالت، ۱ میلی‌گرم سلنیوم و ۳۰۰۰ میلی‌گرم آنتی‌اکسیدانت بود.

در روزهای ۲۱ و ٤٢ پس از زایش از بافت‌های، پستان، رحم و چربی زیرپوستی نمونه‌برداری شد. پیش از آن، با تزریق اپی‌دورال (وتاکائین ۲ درصد+آدرنالین، داروسازی ابوریحان، تهران، ایران) بی‌حسی موضعی در این بافت‌ها ایجاد شد. پس از نمونه‌گیری از هر بافت که جزئیات آن در زیر توضیح داده شده است، نمونه به‌دست آمده ابتدا در آب مقطر شستشو داده شد، سپس خشک شده و در میکروتیوب

www.SID.ir

Archive of SID

قرار داده شد. میکروتیوب حاوی نمونه بلافاصله وارد ازت مایع شده و سپس به آزمایشگاه منتقل و تا انجام آزمایشات بعدی برای بیان ژن در دمای ۸۰- درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شد. بلافاصله پس از نمونه‌برداری، به‌منظور پیشگیری از عفونت در ناحیه نمونه‌گیری ٦٥٠ میلی‌گرم آنتی‌بیوتیک سفتی‌فور پنج درصد (سفتی‌فور پنج درصد، شرکت صنعتی بین‌المللی کوزیما، شیکاگو، آمریکا[13]) تجویز شد.

نمونه‌برداری بافت پستان: برای نمونه‌گیری بافت پستان از روش صفایی و همکاران (٣٤) استفاده شد. به‌منظور خالی شدن پستان و نمونه‌گیری بهتر، گاوها قبل از نمونه‌گیری دوشیده شدند. موقعیت نمونه‌گیری به‌گونه‌ای انتخاب شد تا از پاره‌گی رگ‌های سطح پستان جلوگیری شود. بدین‌منظور در ابتدا موی ناحیه عقبی پستان[14] با فاصله تقریبی ٨-٦ سانتی‌متر پایین‌تر از محل اتصال پستان به پوست و سه سانتی‌متر در سمت راست شکاف میانی پستان[15] تراشیده شد. سپس ناحیه نمونه‌گیری ابتدا با ترکیبات ضدعفونی-کننده، یده و سپس با الکل، ضدعفونی شد. برای نمونه‌گیری از یک گان بیوپسی نیمه‌خودکار با قطر سوزن ١٤ (تی‌اس‌کا، آزمایشگاه تی‌اس‌کا، سوجا، ژاپن[16]) استفاده شد. سوزن به‌میزان تقریبی پنج سانتی-متر در محل نمونه‌گیری به بافت پستان وارد و نمونه-برداری انجام شد. پس از نمونه‌گیری به منظور پیشگیری از خونریزی کمپرس یخ در محل نمونه-گیری انجام شد. سپس محل نمونه‌گیری با ترکیب ضدعفونی کننده یده و در نهایت اسپری اکسی-تتراسایکلین، ضدعفونی شد.

نمونه‌برداری بافت رحم: یک هفته پیش از روز نمونه‌برداری برای باز شدن گردن رحم به گاوها پروستاگلندین-اف ٢ آلفا تزریق شد. به‌منظور پیشگیری از عفونت رحم در دوره پس از نمونه گیری، از ٣ روز پیش از نمونه‌گیری به گاوها پنی‌سیلین تزریق شد. در روز نمونه‌برداری ابتدا اطراف واژن ضدعفونی شد. با دست چپ و از راه راست روده، گردن رحم در اختیار قرار گرفته شد. با دست راست پنس نمونه‌گیری سرسوساری از گردن رحم عبور داده و به بدنه رحم رسانده شد. با دست چپ بدنه رحم به سمت دهانه نمونه‌گیری پنس هدایت شد؛ سپس با قفل شدن دهانه، نمونه از بدنه رحم جدا و بیرون آورده شد. بلافاصله پس از نمونه‌برداری به‌منظور پیشگیری از عفونت رحم، آنتی‌بیوتیک درون‌رحمی (متریکیور، اینتروت، برای، ویکلو، ایرلند[17]) تجویز شد.

نمونه‌برداری بافت چربی زیرپوستی: بافت چربی از چربی زیرپوستی ناحیه پین[18] با روش زاچوت و همکاران (٤٢) نمونه‌گیری شد. در مساحتی برابر با ٤ سانتی‌مترمربع (١/٥×٢/٥) در ناحیه مورد نظر موی پوست تراشیده شد و با ضدعفونی‌کننده‌های دارای ترکیب ید ضدعفونی شد. با اسکالپل[19] شکافی به طول ٢/٥ سانتی‌متر در پوست ایجاد شد و نمونه چربی زیر پوست با پنس جراحی و به‌صورت کاملا بهداشتی برداشته شد.

13. Ceftiofur 5%, Cosima international Industrial Co. Chicago, USA
14. Rear udder
15. Udder cleft
16. TSK Biopsy Needle, TSK Laboratory, Soja, Japan
17. Metricure, Intervet, Bray Co, Wicklow, Ireland
18. Pin
19. Scalpel

www.SID.ir

Archive of SID

بیان ژن: برای استخراج RNA و ساخت cDNA به ترتیب از کیت شرکت جنا بیوساینس[20] و کیت اکیوپاور[21] (مربوط به شرکت بایونیر[22] استفاده شد. روش کار برای استخراج RNA و ساخت cDNA بر اساس دستورالعمل کیت بود. برای انجام واکنش Real-Time PCR از آغازگرهای اختصاصی کوآنتی‌نوا[23] شرکت کیاژن[24] استفاده شد. با استفاده از اطلاعات موجود در بانک ژن مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی[25]، توالی و طول قطعه‌های مورد نظر بررسی شدند. توالی آغازگرها در جدول ٢ آمده است.

برای عملکرد بهتر، واکنش Real-Time PCR در حجم ١٥ میکرولیتر دارای ٧/٥ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین[26]، یک میکرولیتر cDNA، یک میکرولیتر آغازگر اختصاصی رفت، یک میکرولیتر آغازگر اختصاصی برگشت و ٤/٥ میکرولیتر آب بدون RNA تنظیم شدند. در این پژوهش به منظور رسم منحنی استاندارد چهار رقت مختلف از cDNA تهیه شد. رقیق‌سازی براساس ضریب ٠/١ انجام شد، به این صورت که غلظت استاندارد شماره چهار یک ده هزارم (10^{-4}) استاندارد شماره یک بود. تیوب‌های ژن هدف، ژن مرجع[27] یوبیکویتین و چهار استاندارد در دستگاه روتورژن ٣٠٠٠[28] از شرکت کوربت[29] قرار داده شدند. در این پژوهش چرخه‌ی حرارتی واکنش‌ها در دستگاه Real-Time PCR بر اساس جدول ٣ تنظیم شد.

در این پژوهش سطوح ژن‌های بررسی شده با روش لیواک و اسکمیتگن (٢٣) محاسبه شدند. در این روش ابتدا میانگین C_T ژن‌های هدف و ژن یوبیکویتین توسط نرم افزار دستگاه Real-Time PCR محاسبه شد. سپس در نرم افزار اکسل ΔC_T ($\Delta C_{T\ (test)}$) از تفاوت C_T ژن‌های هدف از C_T ژن یوبیکویتین به دست آمد. تیمار یک (تغذیه نشده با اسید لینولئیک کونژوگه) در دو زمان ٢١+ و ٤٢+ به‌عنوان کالیبره‌کننده[30] در نظر گرفته شد و مقدار $\Delta\Delta C_T$ از کسر مقدار ΔC_T مربوط به این تیمار از ΔC_T تیمار دو به دست آمد. سپس بیان نسبی ژن‌های نام برده شده در بالا با فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد.

طرح آماری مورد استفاده طرح کاملاً تصادفی بود. داده‌های مربوط به بیان ژن با استفاده از رویه procMixed نرم‌افزار SAS نسخه ٩/١ تجزیه و تحلیل شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و سطح معنی‌داری ٥ درصد انجام شد. مدل ریاضی طرح به‌صورت زیر بود:

$$Y_{ijk}=\mu+T_i+A_{(i)j}+S_k+TS_{jk}+\varepsilon_{ijk}$$

که در آن Y_{ijk}=متغیر وابسته؛ μ= میانگین کل؛ T_i= اثر تیمار؛ $A_{(i)j}$= اثر تصادفی حیوان در تیمار؛ S_k= زمان نمونه‌گیری، TS_{jk}=اثر متقابل تیمار در زمان نمونه‌گیری و ε_{ijk}= اثرات باقی‌مانده می‌باشند.

20. Jena Bioscience
21. AccuPower® CycleScript RT PreMix (dN6)
22. Bioneer
23. QuantiNovaTM SYBR®Green PCR
24. QIAGEN
25. National Center for Biotechnology Information (NCBI)
26. 2x SYBR Green PCR Master Mix
27. Housekeeping
28. RotorGene 3000
29. Corbett
30. Calibrator

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: توالی آغازگرهای مورد استفاده در Real-Time PCR.

Table 2. Sequence of primers used in Real-Time PCR.

ژن Gene	رو به جلو Forward	معکوس Reverse
آنزیم سیکلواکسی‌ژناز-۲ COX-2	TTT TGG TAG GTC TTC TGG TG	GCA TGG CCT GTA CAA CCT CAA
فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا TNF-α	CGC ATT GCA GTC TCC TAC CA	GGG CTC TTG ATG GCA GAC A
گیرنده شبه‌ناقوس-٤ TLR-4	AAC CAC CTC TCC ACC TTG ATA CTG	CCA GCC AGA CCT TGA ATA CAGG

جدول ۳: چرخه دمایی به کار رفته در مراحل مختلف Real-Time PCR

Table 3. The temperature cycle used in different stages of the Real-Time PCR

گامه Stage	تکرار چرخه Cycle repeat	شرح گامه Stage describe	دما (درجه سانتی‌گراد) Temperature (Centigrade degrees)	زمان Time
چرخه ۱ Cycle 1	1	فعال‌سازی حرارتی اولیه Initial thermal activation	95	5 دقیقه Minute
چرخه ۲ Cycle 2	40	باز شدن رشته‌ها Denaturation	95	15 ثانیه Second
		چسبیدن آغازگرها و تکثیر Combined annealing/extension	60	40 ثانیه Second
منحنی ذوب Melting curve			افزایش تدریجی دما از ۵۵ به ۹۵ Gradual increase of temperature from 55 to 95	

نتایج

افزودن اسید لینولئیک کونژوگه به جیره گاوهای شیری اثر معنی‌داری بر ماده خشک مصرفی نداشت. جزئیات مصرف ماده خشک گروه‌های مختلف در گزارش اولیه این پژوهش آمده است (۳۲).

بیان ژن فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا در بافت پستان در گاوهای دریافت‌کننده اسیدلینولئیک کونژوگه کمتر از گاوهای دریافت‌کننده روغن پالم بود (P<۰/۰۵). بیان ژن‌های گیرنده شبه‌ناقوس-چهار و فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا در بافت پستان در گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری نداشت.

در آزمایش حاضر افزودن اسیدلینولئیک کونژوگه به جیره گاوهای شیری در دوره انتقال سبب افزایش (P<۰/۰۱) بیان ژن آنزیم سیکلواکسی‌ژناز-۲ در بافت رحم گاوهای گروه CLA42 شد، ولی بیان این ژن را در بافت رحم گاوهای CLA21 افزایش نداد (جدول ٤). اثر زمان برای این ژن در بافت رحم معنی‌دار نبود، ولی برهمکنش زمان در تیمار برای بیان ژن آنزیم سیکلواکسی‌ژناز-۲ در بافت رحم معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). بیان این ژن در نمونه‌گیری روز ۲۱ پس از زایش در بین تیمارهای مختلف یکسان بود، ولی در نمونه‌گیری روز ٤۲ پس از زایش بیان ژن آنزیم سیکلواکسی‌ژناز-۲ در گاوهای گروه CLA42 بیش از سایر گروه‌ها بود (شکل ۱). بیان ژن‌های گیرنده شبه ناقوس- چهار و فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا در بافت رحم تحت تاثیر تیمارهای مختلف قرار نگرفت.

بیان ژن آنزیم سیکلواکسی‌ژناز-۲ در بافت چربی زیرپوستی تمایل به معنی داری نشان داد و در

www.SID.ir

Archive of SID

گروه‌های دریافت‌کننده اسید لینولئیک کونژوگه نسبت به پالم بیشتر بود. بیان ژن گیرنده شبه‌ناقوس-چهار و فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا در بافت چربی زیرپوستی در گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری نداشت.

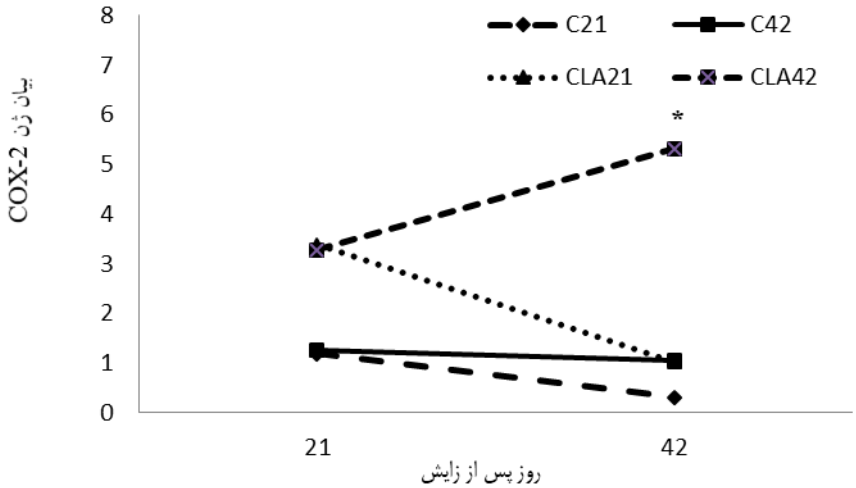
جدول ٤: میانگین میزان بیان ژن‌های آنزیم سیکلواکسی‌ژناز-٢، گیرنده شبه‌ناقوس-٤ و فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا در بافت‌های پستان، رحم و چربی زیرپوستی در دوره پس از زایش در گاوهایی که از ٢١ روز قبل از زایش تا ٢١ یا ٤٢ روز پس از زایش با چربی پالم (C21 و C42) یا اسیدلینولئیک کونژوگه (CLA21 و CLA42) تغذیه شدند.

Table 4. Least square means of COX-2, TLR-4 and TNF-α gene expression in udder, uterine and subcutaneous fat tissues of postpartum cows fed palm oil (C1 and C2) or conjugated linoleic acid (CLA1 and CLA2) from 21 days prepartum to 21 or 42 days postpartum.

سطح احتمال معنی‌داری P-value			خطای استاندارد	تیمار Treatment				ژن
زمان×تیمار Treatment×Time	زمان Time	تیمار Treatment	SEM	CLA42	CLA21	C42	C21	Gene
				بافت پستان Udder tissue				
0.79	0.77	0.30	0.82	2.10	1.03	2.37	1.05	آنزیم سیکلواکسی‌ژناز-٢ COX-2
0.78	0.97	0.37	0.95	4.42	5.13	2.70	2.37	گیرنده شبه‌ناقوس-٤ TLR-4
0.95	0.61	<0.05	0.55	0.99^{b}	1.94^{b}	3.80^{a}	4.35^{a}	فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا TNF-α
				بافت رحم Uterine tissue				
0.05	0.51	<0.01	0.59	4.29^{b}	2.20^{a}	1.15^{a}	0.76^{a}	آنزیم سیکلواکسی‌ژناز-٢ COX-2
0.94	0.06	0.75	0.73	1.58	1.57	2.51	2.16	گیرنده شبه‌ناقوس-٤ TLR-4
0.64	0.05	0.18	0.24	1.77	1.14	1.09	1.01	فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا TNF-α
				بافت چربی زیرپوستی Subcutaneous fat tissue				
0.72	0.27	0.06	2.31	8.56^{b}	7.91^{b}	2.09^{a}	3.64^{ab}	آنزیم سیکلواکسی‌ژناز-٢ COX-2
0.61	0.25	0.40	1.55	2.1	5.64	1.73	3.65	گیرنده شبه‌ناقوس-٤ TLR-4
0.95	0.89	0.11	1.07	1.53	1.83	3.98	4.06	فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا TNF-α

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱: نمودار زمانی بیان ژن آنزیم سیکلواکسی‌ژناز-۲ در بافت رحم گاوهایی که از ۲۱ روز قبل از زایش تا ۲۱ یا ٤۲ روز پس از زایش با چربی پالم (C21 و C42) یا اسیدلینولئیک کونژوگه (CLA21 و CLA42) تغذیه شدند. خطای استاندارد برای بیان ژن آنزیم سیکلواکسی‌ژناز-۲ در بافت رحم ۰/۵۹بود.

Figure 1. Timeline of COX-2 gene expression in uterine tissue of postpartum cows fed palm oil (C1 and C2) or conjugated linoleic acid (CLA1 and CLA2) from 21 days prepartum to 21 or 42 days postpartum. SEM of COX-2 gene expression in uterine tissue was 0.59.

بحث

در پژوهش حاضر تغذیه اسیدلینولئیک کونژوگه سبب کاهش بیان ژن فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا در بافت پستان شد. افزایش دوره مصرف اسیدلینولئیک کونژوگه از ۲۱ روز پس از زایش تا ٤۲ روز پس از زایش تاثیری بر بیان ژن فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا در بافت پستان نداشت. تاکنون گزارشی در رابطه با اثر اسیدلینولئیک کونژوگه بر بیان ژن‌های موثر بر سایتوکین‌های التهاب‌زا در پستان گاو منتشر نشده است. بر خلاف نتایج پژوهش حاضر، در برخی از پژوهش‌ها در جوندگان گزارش شده است که تغذیه اسید لینولئیک کونژوگه با افزایش بیان ژن فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا، سبب ایجاد التهاب در پستان شده (۳۰) و رشد و نمو پستان را تحریک کرده است (۳۱ و ۳۵). آثار مختلف فیزیولوژیک اسیدلینولئیک کونژوگه در بدن به نوع ایزومر مورد استفاده و نیز مقدار مصرف آن در پژوهش بستگی دارد. به نظر می‌رسد اثر متناقص استفاده از اسیدلینولئیک کونژوگه در جوندگان با اثر مشاهده شده در این پژوهش به علت استفاده از مقدار زیاد این اسید چرب در جوندگان در مقایسه با مقدار استفاده شده در پژوهش حاضر می‌باشد.

جواهری (۱٦) با مقایسه تاثیر افزودن دو درصد (ماده خشک) روغن ماهی و چربی پالم به جیره گاوهای شیری در دوره انتقال، گزارش کرد بیان ژن فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا در بافت پستان گاوهای دریافت‌کننده روغن ماهی تمایل به کاهش داشت. فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا در پستان یک فاکتور موثر بر آپوپتوز محسوب می‌شود و هورمون‌هایی مثل هورمون رشد شبه انسولین-۱[31]، سلول‌های پستان را در برابر اثر فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا محافظت می‌کنند (۱۸). به همین علت در پژوهش جواهری (۱٦)، کاهش بیان ژن فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا با افزایش درصد سلول‌های اپی‌تلیال در بافت پستان ارتباط داده شد. ابوغزاله و همکاران (۱) گزارش کردند با تغذیه روغن ماهی به گاوهای شیری درصد ایزومر۹-سیس،۱۱-ترانس اسیدلینولئیک کونژوگه در

31. Insulin like growth factor-1

www.SID.ir

Archive of SID

چربی شیر به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت. هر چند در پژوهش جواهری به نقش اسیدلینولئیک کونژوگه در کاهش بیان ژن فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا اشاره نشد ولی، نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که نتایج به دست آمده در آن پژوهش به علت اثر اسیدلینولئیک کونژوگه بوده است. پژوهش‌های بیشتری لازم است تا سایر جنبه‌های اثر اسیدلینولئیک کونژوگه بر بیان ژن‌های مختلف و نیز رشد و توسعه بافت پستان در گاو شیری مشخص شود.

با توجه به نقش اسیدلینولئیک کونژوگه در تولید سایتوکین‌های التهاب‌زا (٥) و از طرفی نقش این سایتوکین‌ها در سلامت رحم (٢٢)، در پژوهش حاضر بیان سه ژن آنزیم سیکلواکسی‌ژناز-٢، فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا و گیرنده شبه‌ناقوس-چهار در بافت رحم مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد تداوم مصرف اسیدلینولئیک کونژوگه از ٢١ روز پس از زایش تا ٤٢ روز پس از زایش سبب افزایش بیان ژن آنزیم سیکلواکسی‌ژناز-٢ در رحم گاوهای CLA42 شد. اثر افزاینده اسیدلینولئیک کونژوگه بر بیان ژن آنزیم سیکلواکسی‌ژناز-٢ در رحم گاوهای شیری در پژوهش حاضر با اثر کاهنده این اسید چرب بر بیان این ژن در بافت رحم موش‌های صحرایی بزرگ (٩)، سلول‌های ماکروفاژ موش (٤١) و سلول‌های لوتیال گاو در محیط برون‌تنی (٢٥) متناقض است. با این حال، هروی موسوی و همکاران (١١) با تغذیه روغن ماهی به گاوهای شیری اوایل دوره شیردهی مشاهده کردند غلظت اسیدلینولئیک کونژوگه در چربی بافت اندومتریوم رحم افزایش یافت، ولی اثر مهارکننده بر پروتئین آنزیم سیکلواکسی‌ژناز-٢ و ترشح پروستاگلندین-اف ٢ آلفا مشاهده نشد. براساس مرور پژوهش‌های انجام شده، پژوهش حاضر اولین مطالعه‌ای است که در آن افزایش بیان ژن آنزیم سیکلواکسی‌ژناز-٢ در رحم گاوهای شیری در اثر تغذیه اسیدلینولئیک کونژوگه گزارش شده است. علت چنین پاسخ متفاوتی در بیان ژن آنزیم سیکلواکسی‌ژناز-٢ در اثر اسیدلینولئیک کونژوگه در پژوهش حاضر مشخص نیست و زمینه‌ای برای پژوهش بیشتر در این رابطه فراهم می‌کند.

بیان ژن آنزیم سیکلواکسی‌ژناز-٢ در روز ٢١ پس از زایش در گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری نداشت، ولی در روز ٤٢ پس از زایش در گروه CLA42 بیشتر از سایر گروه‌ها بود. در حالت طبیعی، بیان ژن آنزیم سیکلواکسی‌ژناز-٢ در اندومتریوم رحم گاو بستگی به مرحله‌ی چرخه فحلی دارد (٢). به‌نظر می‌رسد تفاوت پاسخ اندومتریوم رحم گاوهای CLA21 و CLA42 به اسیدلینولئیک کونژوگه ناشی از برهمکنش مرحله‌ی چرخه فحلی با اثر فیزیولوژیک اسیدلینولئیک کونژوگه باشد.

گیرنده شبه‌ناقوس-چهار یک گیرنده سلولی است که اندوتوکسین باکتری‌ها و سایر فرسته‌ها را شناسایی می‌کند و در تنظیم پاسخ‌های ایمنی نقش مهمی دارد. گزارش شد بیان گیرنده شبه‌ناقوس-چهار در اندومتریوم مادیان‌های حساس به اندومتریت بیش از مادیان‌های مقاوم به اندومتریت بود و نتیجه‌گیری شد که احتمالاً گیرنده شبه‌ناقوس-چهار در توسعه التهاب مزمن در مادیان‌های حساس به اندومتریت نقش دارد (٣). فعال شدن TLR-4 تولید فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا و سایر سایتوکین‌های التهاب‌زا را می‌افزاید. با توجه به وجود شواهدی مبنی بر اتصال اسیدهای چرب به گیرنده شبه‌ناقوس-چهار و آغاز واکنش‌های التهاب‌زا (٢١)، در این آزمایش بیان دو ژن TLR-4 و فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا در بافت رحم مورد مطالعه قرار گرفت، اما تفاوتی در بین گروه‌های مختلف مشاهده نشد.

در پژوهش حاضر بیان ژن آنزیم سیکلواکسی‌ژناز-٢ در چربی زیر پوستی در گروه‌های

www.SID.ir

Archive of SID

دریافت کننده اسید لینولئیک کونژوگه نسبت به پالم، بیشتر بود. این یافته مشابه با نتایج به‌دست آمده در مورد بافت رحم است و تایید کننده اثر التهاب‌زای اسید لینولئیک کونژوگه بر بافت‌های رحم و چربی زیرپوستی است، اما بیان سایر ژن‌های مورد مطالعه در بافت چربی زیر پوستی در بین گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری نداشت. گزارش شده است بیان ژن‌های موثر بر تولید سایتوکین‌های التهاب‌زا در بافت چربی با ایجاد مقاومت به انسولین ارتباط دارد. سایتوکین‌های التهاب‌زا مثل فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا با فسفریلاسیون باقی‌مانده سرین پروتئین گیرنده انسولین، مقاومت به انسولین را زیاد می‌کنند (٦ و ١٤). در گوساله‌های پرواری، فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا نوترکیب سبب تحریک مقاومت به انسولین شد (١٩). همچنین، یک جهش در ژن گیرنده شبه‌ناقوس-چهار در انسان توانایی تحریک التهاب و نیز خطر ابتلا به دیابت را کاهش داد (١٧ و ٣٩). سامانه ایمنی بدن با فعال‌سازی بیان گیرنده شبه ناقوس-چهار به‌عنوان یک حس‌گر تغذیه‌ای عمل می‌کند و اسیدهای چرب بدین صورت بر مقاومت به انسولین تاثیر می‌گذارند (٣٧). در راستای تایید نتایج پژوهش حاضر، در مطالعه دیگری (٣٣) که توسط پژوهش‌گران این مطالعه گزارش شد تغذیه مقدار مشابه اسیدلینولئیک کونژوگه در دوره انتقال تاثیر معنی‌داری بر تست تحمل گلوکز- به عنوان برآوردی از وضعیت مقاومت به انسولین در گاوهای شیری نداشت. با توجه به نقش ضدالتهابی اسیدلینولئیک کونژوگه در سطح بافت چربی (٢٨) و عدم تغییر بیان ژن‌های مورد بررسی در پژوهش حاضر، نتایج نشان داد که تغذیه روزانه ٧/٥ گرم از هر یک از ایزومرهای ٩-سیس،١١-ترانس و ١٠-ترانس،١٢-سیس اسیدلینولئیک کونژوگه در دوره انتقال گاوهای شیری تاثیری بر بیان ژن‌های موثر بر سایتوکین‌های التهاب‌زا و مقاومت به انسولین نداشت.

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر اثر تغذیه اسیدلینولئیک کونژوگه در دوره انتقال بر بیان سه ژن موثر بر سایتوکین التهاب‌زا در بافت‌های پستان، رحم و چربی زیرپوستی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج پژوهش حاضر برای اولین بار نشان داد تغذیه مکمل اسیدلینولئیک کونژوگه در دوره انتقال بیان ژن فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا را در بافت پستان گاوهای شیری کاهش داد. همچنین استفاده از مکمل اسیدلینولئیک کونژوگه در جیره گاوهای شیری پس از زایش سبب افزایش بیان ژن آنزیم سیکلواکسی‌ژناز-٢ در رحم و چربی زیرپوستی شد. پژوهش‌های بیشتری لازم است تا آثار فیزیولوژیک تغییر بیان ژن‌های حاضر شناسایی شود. پیشنهاد می‌شود در پژوهشی دیگر نمونه‌گیری‌های بیشتر و با فواصل زمانی کمتر از ابتدای دوره خشک از بافت پستان انجام و سازوکارهای بیان ژن فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا و آثار آن مورد بررسی قرار گیرد. همچنین، می‌توان در پژوهشی دیگر برای شناسایی سازوکار اثر اسید لینوئیک کونژوگه در بافت چربی با تعداد بیشتری ژن.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر در قالب رساله دکتری تخصصی توسط دانشگاه تهران با شماره ٧١٠٨٠١٧/٦/٢٨ مورد حمایت مالی قرار گرفت که از این بابت قدردانی می شود. نویسندگان مقاله از حمایت‌های شرکت BASF آلمان و گلبار نوید بهار به دلیل حمایت از این پروژه در قالب طرح تحقیقاتی کاربردی دانشگاه تهران تشکر می‌نمایند. از زحمات مدیران و کارشناسان شرکت شیر و گوشت مهدشت به‌ویژه آقایان سیدرضا

www.SID.ir

Archive of SID

حسینیان، مهندس محمدعلی رودباری، دکتر علیرضا زارع‌نژاد و مهندس محسن کاظمی قدردانی می شود. همچنین نویسندگان مقاله مراتب سپاسگزاری خود از مدیر عامل محترم شرکت گسترش کشاورزی و دامپروری فردوس پارس جناب آقای مهندس رجایی و اعضای محترم کمیته فنی این شرکت ابراز می‌دارند که در مراحل مختلف انجام این آزمایش کمک و حمایت نموده‌اند.

منابع

1. Abu-Ghazaleh, A.A., and Holmes, L.D. 2007. Diet supplementation with fish oil and sunflower oil to increase conjugated linoleic acid levels in milk fat of partially grazing dairy cows. J. Dairy Sci. 90: 2897-2904.
2. Arosh, J.A., Parent, J., Chapdelaine, P., Sirois, J., and Fortier, M.A. 2002. Expression of cyclooxygenases 1 and 2 and prostaglandin E synthase in bovine endometrial tissue during the estrous cycle. Biol. Reprod. 67: 161–169.
3. Cuervo-Arango, G., Worgan, H., Macias, B., and Nash, D. 2008. Endometrial Toll-like receptor 4 (TLR4) and interleukin- 8 (IL-8) expression in mares resistant (RM) or susceptible (SM) to endometritis. Reprod. Dom. Anim. 43: (Suppl.5) 43–108.
4. Dinarello, C.A. 2000. Proinflammatory cytokines. Chest. 118: 503-508.
5. Dipasquale, D., Basiricò, L., Morera, P., Primi, R., Tröscher, A., and Bernabucci, U. 2018. Anti-inflammatory effects of conjugated linoleic acid isomers and essential fatty acids in bovine mammary epithelial cells. Anim. 9: 1-7.
6. Emanuelli, B., Peraldi, P., Filloux, C., Chavey, C., Freidinger, K., Hilton, D.J., Hotamisligil, G.S., and Van Obberghen, E. 2001. SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor-alpha in the adipose tissue of obese mice. J. Biol. Chem. 276: 51.47944–47949.
7. Esposito, J., Irons, P.C., Webb, E.C., and Chapwanya, A. 2014. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows Anim. Reprod. Sci. 144: 60–71.
8. Guillemette, L., Lacroix, M., Battista, M., Doyon, M., Perron, P., and Hivert, M. 2013. Higher levels of tumor necrosis factor alpha are associated with insulin resistance during pregnancy and increased risk of gestational diabetes. Can. J. Diabetes. 37: 60.
9. Harris, M.A., Hansen, R.A., Vidsudhiphan, P., Koslo, J.L., Thomas, J.B., Watkins, B.A. and Allen, K.G. 2001. Effects of conjugated linoleic acids and docosahexaenoic acid on rat liver and reproductive tissue fatty acids, prostaglandins and matrix metallo-proteinase production. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. 65: 23–29.
10. Hayirli, A., and Grummer, R.R. 2004. Factors affecting dry matter intake prepartum in relationship to etiology of per partum lipid related metabolic disorders: A review. Can. J. Anim. Sci. 84: 337–347.
11. Heravi Moussavi, A.R., Gilbert, R.O., Overton, T.R., Bauman, D.E., and Butler, W.R. 2007. Effects of feeding fish meal and n-3 fatty acids on ovarian and uterine responses in early lactating dairy cows. J. Dairy. Sci. 90: 145–154.
12. HernándezDíaz, G., AlexanderAguilera, A., ArzabaVillalba, A., SotoRodríguez, I., and García, H.S. 2010. Effect of conjugated linoleic acid on body fat, tumor necrosis factor alpha and resistin secretion in spontaneously hypertensive rats. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. 82: 105-109.
13. Hojilla, C.V., Jackson, H.W., and Khokha, R. 2011. TIMP3 regulates mammary epithelial apoptosis with immune cell recruitment through differential TNF dependence. PLoS One. 6: e26718.
14. Hotamisligil, G.S. 2004. Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. 24: (Suppl.4). S23-S27.
15. Hussein, M., Harvatine, K.H., Weerasinghe, W.M., Sinclair, L.A., and Bauman, D.E. 2013. Conjugated linoleic

www.SID.ir

Archive of SID

acid-induced milk fat depression in lactating ewes is accompanied by reduced expression of mammary genes involved in lipid synthesis. J. Dairy. Sci. 96: 3825-3834.

16. Javaheri Barfourooshi, H. 2014. Effect of feeding n-3 fatty acids on mammogenesis and lactation performance in Holstein cows. Thesis submitted to the Graduate Studies Office in partial fulfillment of the requirement for the degree of Doctor of Philosophy in Animal Growth Physiology. University of Tehran. (In Persian)
17. Kolek, M.J., Carlquist, J.F., Muhlestein, J.B., Whiting, B.M., Horne, B.D., Bair, T.L., and Anderson, J.L. 2004. Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism is associated with reductions in vascular inflammation, angiographic coronary artery disease, and clinical diabetes. Am. Heart J. 148: 1034-1040.
18. Kurmasheva, R.T., and Houghton, P.J. 2006. IGF-I mediated survival pathways in normal and malignant cells. Biochim. Biophys. Acta, 1766: 1–22.
19. Kushibiki, S., Hodate, K., Shingu, H., Ueda, Y., Mori, Y., Itoh, T., and Yokomizo, Y. 2001. Effects of long-term administration of recombinant bovine tumor necrosis factor alpha on glucos metabolism and growth hormone secretion in steers. Am. J. Vet. Res. 62: 794-798.
20. Lawrence, M.G., Steinke, J.W., and Borish, L. 2018. Cytokine-targeting biologics for allergic diseases. Ann. Allergy Asthma Immunol. 120: 376-381.
21. LeBlanc, S.J., Osawa, T., and Dubuc, J. 2011. Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows. Theriogenology, 76: 1610–1618.
22. Lessard, M., Gagnon, N., and Petit, H.V. 2003. Immune responses of postpartum dairy cows fed flaxseed. J. Dairy. Sci. 86: 2647-2657.
23. Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT Method. Methods, 25: 402–408.
24. Marques, T.M., Wall, R., O'Sullivan, O., Fitzgerald, G.F., Shanahan, F., Quigley, E.M., Cotter, P.D., Cryan, J.F., Dinan, T.G., Ross, R.P., and Stanton, C. 2015. Dietary trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid alters fatty acid metabolism and microbiota composition in mice. Brit. J. Nutr. 113: 728-738.
25. May, K.C., Bobe, G., Mueller, C.J., and Cannon, M.J. 2011. Conjugated linoleic acid decreases prostaglandin synthesis in bovine luteal cells in vitro. Mol. Reprod. Dev. 78: 328-336.
26. McCrorie, T.A., Keaveney, E.M., Wallace, J.M., Binns, N., and Livingstone, M.B. 2011. Human health effects of conjugated linoleic acid from milk and supplements. Nut. Res. Rev. 24: 206-227.
27. Mohankumar, S.K., Taylor, C.G., Siemens, L., and Zahradka, P. 2013. Activation of phosphatidylinositol-3 kinase, AMP-activated kinase and Akt substrate-160 kDa by trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid mediates skeletal muscle glucose uptake. J. Nutr. Biochem. 24: 445-456.
28. Noto, A., Zahradka, P., Ryz, N.R., Yurkova, N., Xie, X., and Taylor, C.G. 2007. Dietary conjugated linoleic acid preserves pancreatic function and reduces inflammatory markers in obese, insulin-resistant rats. Metabolism. 56: 142-151.
29. O'Shea, M., Bassaganya-Riera, J., and Mohede, I.C. 2004. Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid. Am. J. Clin. Nutr. 79: 1199S–1206S.
30. Poirier, H., Rouault, C., Clément, L., Niot, I., Monot, M.C., GuerreMillo, M., and Bsnard, P. 2005. Hyperinsulinaemia triggered by dietary conjugated linoleic acid is associated with a decrease in leptin and adiponectin plasma levels and pancreatic beta cell hyperplasia in the mouse. Diabetologia. 48: 1059-1065.
31. Purushotham, A., Wendel, A.A., Liu, L.F., and Belury, M. 2007. Maintenance of adiponectin attenuates insulin resistance induced by dietary conjugated linoleic acid in mice. J. Lipid Res. 48: 444– 452.

www.SID.ir

Archive of SID

ovulation in postpartum lactating dairy cows. Anim. Reprod. Sci. 116: 196-212.
37. Sinclair, K.D. 2010. Declining fertility, insulin resistance and fatty acid metabolism in dairy cows Developmental consequences for the oocyte and preimplantation embryo. Acta Scie. Veter. 38: 2. s545-s557.
38. Tyrrell, H.F., and Reid, J.T. 1965. Prediction of the energy value of cow's milk. J. Dairy. Sci. 48: 1215–1223.
39. Vogel, S.N., Awomoyi, A.A., Rallabhandi, P., and Medvedev, A.E. 2005. Mutations in TLR4 signaling that lead to increased susceptibility to infection in humans: an overview. J. Endotoxin. Res. 11: 333-339.
40. von Soosten, D., Meyer, U., Piechotta, M., Flachowsky, G., and Dänicke, S. 2012. Effect of conjugated linoleic acid supplementation on body composition, body fat mobilization, protein accretion, and energy utilization in early lactation dairy cows. J. Dairy Sci. 95: 1222-1239.
41. Yu, Y., Correll, P., and Vanden Heuvel, J. 2002. Conjugated linoleic acid decreases production proinflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR gamma-dependent mechanism. Biochim. Biophys. Acta. 1581: 89-99.
42. Zachut, M., Honig, H., Striem, S., Zick, Y., Boura-Halfon, S., and Moallem, U. 2013. Periparturient dairy cows do not exhibit hepatic insulin resistance, yet adipose-specific insulin resistance occurs in cows prone to high weight loss. J. Dairy Sci. 96: 5656–5669.
32. RezaeiRoodbari, A., Towhidi, A., Zhandi, M., Rezayazdi, K., Rahimi Mianji, G., Dirandeh, E., and Colazo, M. 2016. Effect of conjugated linoleic acid supplementation during thetransition period on plasma metabolites and productive andreproductiv performances in dairy cows. Anim. Feed Sci. Tech. 219: 294-303.
33. RezaeiRoodbari, A., Towhidi, A., Zhandi, M., RezaYazdi, K., Rahimi Mianji, G., and Khalilvandi-Behroozyar, H. 2016. Effects of conjugated linoleic acid on glucose tolerance test and blood glucose changes of Holstein cows during transition period. J. Ruminant Research. 3: 4.39-57.
34. Safayi, S., Theil, P.K., Elbrond, V.S., Hou, L., Engbaek, M., Norgaard, J.V., Sejrsen, K., and Nielsen, M.O. 2010. Mammary remodeling in primiparous and multiparous dairy goats during lactation. J. Dairy. Sci. 93: 1478-1490.
35. Shen, W., Chuang, C.C., Martinez, K., Reid, T., Brown, J.M., Xi, L., Hixson, L., Hopkins, R., Starnes, J., and McIntosh, M. 2013. Conjugated linoleic acid reduces adiposity and increases markers of browning and inflammation in white adipose tissue of mice. J. Lipid. Res. 54: 909–922.
36. Silvestre, F.T., Risco, C.A., Lopes, M., de Sa, M.J.S. Bilby, T. and Thatcher, W.W. 2009. Use of a degradable deslorelin implant (DESL, 2.1 mg) enhanced uterine involution and delayed

www.SID.ir

Archive of SID

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Ruminant Research, Vol. 6(2), 2018
http://ejrr.gau.ac.ir

Effects of conjugated linoleic acid on gene expression of pro-inflammatory cytokines in mammary gland, uterus and subcutaneous fat tissues of dairy cows

A. Rezaei Roodbari[1], A. Towhidi[2], M. Zhandi[3], K. Rezayazdi[3], G. Rahimi Mianji[4] and F. Adib Hashemi[5]

[1]Ph.D. graduated, [2]Professor, and [3]Associate Prof., Dept. of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran, [4]Professor, Dept. of Animal Science, Sari Agricultural Sciences & Natural Resources University, Sari, Iran, [5]Associate Prof., Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 30/4/2018; Accepted: 18/7/2018

Abstract

Background and objectives: Pro-inflammatory cytokines are small proteins that are released by different tissues and cause an inflammatory condition in body. Conjugated linoleic acid (CLA) is a common name for fatty acids with 18-carbon and a conjugated double bond. Conjugated linoleic acid can affect pro-inflammatory cytokines production. Since pro-inflammatory cytokines can affect different physiological processes, this study investigated effects of conjugated linoleic acid supplementation during transition period on gene expression of pro-inflammatory cytokines in mammary gland, uterus and subcutaneous fat of Holstein cows.

Materials and methods: Twenty-four cows with body condition scores of 3.2±0.3 (SEM±mean) and lactation number of 3.2±1.80 were allocated to four treatments (six heads per treatment): feeding palm oil (75g/d) from -21 d to +21 d (C21) or +42 d (C42) relative to parturition, feeding rumen protected CLA (75g/d) from -21 d to +21 d (CLA21) or +42 d (CLA42) relative to parturition. Rumen protected CLA provided 7.5 g/d each of *trans*-10, *cis*-12 CLA and *cis*-9, *trans*-11 isomers. Tissue samples were taken from mammary gland, uterus and subcutaneous fat at 21 and 42 days postpartum. Mammary gland samples were taken from the sampling site in rear udder, 6-8 cm bottom to udder and skin junction and 3 cm of udder cleft using a medical semi-automatic sampling device. Uterus samples were taken by passing a sampling device through cervix and conducting uterus body via rectum. By making an incision through the skin of around pin, subcutaneous fat samples were taken. Relative expression of tumor necrosis factor-α (TNF-α), cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme and toll like receptor-4 (TLR-4) genes were measured by real time-PCR.

Results: Feeding rumen protected CLA during transition period decreased TNF-α gene expression in mammary gland ($P<0.05$). In mammary gland, effect of time and interaction of time in treatment were nonsignificant for TNF-α. Conjugated linoleic acid increased expression of COX-2 gene in uterus of CLA42 cows ($P<0.01$). In uterus, effect of time was significant for COX-2 ($P=0.05$). Feeding rumen protected CLA during transition period significantly increased COX-2 gene expression, but had no effects on gene expression of TNF-α and TLR-4 in subcutaneous fat.

Conclusion: Results of this experiment showed that adding CLA supplementation to dairy cow's ration during transition period can alter expression of some pro-inflammatory cytokine

*Corresponding author; atowhidi@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

genes in mammary gland uterus and subcutaneous fat. Results of this study provide preliminary findings that can be used in ongoing mechanistic studies investigating CLA effects on some tissues in dairy cows.

Keywords: Dairy cow, Conjugated linoleic acid, COX-2, TNF-α, TLR-4

www.SID.ir