

## Relationship between some blood metabolites and gene expression of nuclear factor-kappa B with subclinical ketosis in Holstein dairy cows during the transition period

Moradi, S.<sup>1</sup>, Moghaddam, Gh.<sup>2\*</sup>, Iotfollahzade, S.<sup>3</sup>, Jafari, R.<sup>4</sup>, Rafat, A.<sup>2</sup>

1- Ph.D. Student of Animal Physiology, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

2- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Tabriz, Iran.

3- Associate Professor, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

4- Associate Professor, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

\*Corresponding author's email: ghmoghaddam@tabrizu.ac.ir

(Received: 2022/4/20 Accepted: 2022/8/13)

### Abstract

Subclinical ketosis causes detrimental economic effects on the dairy industry. Dairy cows become clinically more susceptible to subclinical ketosis with increased oxidative injury. Since the nuclear transcription factor kappa (NF- $\kappa$ B) acts as a cellular response factor to a variety of stresses with internal origin, in the present study, the relationship between some blood metabolites and NF- $\kappa$ B gene expression with subclinical ketosis was investigated in Holstein cows during the transition period in a 2000-head dairy farm with 900 milking cows. Blood samples (5 mL) were obtained from the tail vein of 100 cows after the fourth and fifth calving a week before and after parturition. In the pre-parturition week, a positive correlation was observed between non-esterified fatty acids (NEFA) and beta-hydroxybutyrate (BHBA), malondialdehyde, gamma-glutamyl transferase, NF- $\kappa$ B and a negative correlation with high-density lipoprotein. In the post-parturition week, a positive correlation was observed between BHBA and NEFA, malondialdehyde, gamma-glutamyl transferase, alkaline phosphatase, and NF- $\kappa$ B and a negative correlation with high-density lipoprotein. The cut-off point of BHBA  $\leq$  1.2 mM/L was designated for healthy cows and BHBA  $>$  1.2 mM/L for cows suffering from subclinical ketosis after calving. Also, it was observed that the levels of NEFA ( $p < 0.0001$ ), BHBA ( $p < 0.0001$ ), MDA ( $p < 0.0001$ ), GGT ( $p < 0.0001$ ) and ALP ( $p = 0.03$ ) were gradually increased and HDL ( $p < 0.0001$ ) and NF- $\kappa$ B ( $p < 0.0001$ ) gradually decreased in the diseased cows. The results of this study indicated that the increase of NEFAs and BHBA predisposes dairy cattle to ketosis through activation of the NF- $\kappa$ B pathway and oxidative stress.

**Conflict of interest:** None declared.

**Keywords:** Blood metabolites, Holstein dairy cows, Nuclear factor kappaB, Oxidative stress, Subclinical ketosis.

## ارتباط برخی از متابولیت‌های خون و بیان ژن فاکتور هسته‌ای رونویسی کاپا B (Nuclear factor kappa B) با کتوز تحت‌بالینی در گاوهای هلشتاین در طول دوره انتقال

سعیده مرادی<sup>۱</sup>، غلامعلی مقدم<sup>۲\*</sup>، صمد لطف‌اله‌زاده<sup>۳</sup>، رضی‌اله جعفری<sup>۴</sup>، سیدعباس رافت<sup>۲</sup>

۱- دانشجوی دکترای گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۲- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۳- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۴- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

\*نویسنده مسئول مکاتبات: ghmoghaddam@tabrizu.ac.ir

(دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۱/۳۱ پذیرش نهایی: ۱۴۰۱/۵/۲۲)

### چکیده

کتوز تحت‌بالینی اثرات اقتصادی بر صنعت گاو شیری تحمیل کرده و گاوها با افزایش استرس اکسیداتیو، مستعد ابتلا به این نوع کتوز می‌شوند. از آنجایی که فاکتور هسته‌ای رونویسی کاپا B (Nuclear factor kappa B; NF-κB) به‌عنوان فاکتور پاسخ سلولی به انواع استرس با منشأ درونی می‌باشد، در تحقیق حاضر، ارتباط برخی از متابولیت‌های خون و بیان ژن NF-κB با کتوز تحت‌بالینی در گاوهای هلشتاین در طول دوره انتقال، در یک گاوداری ۲۰۰۰ رأسی با ۹۰۰ رأس گاو دوشا بررسی گردید. بدین منظور ۵ میلی‌لیتر خون از ۱۰۰ رأس گاو شکم چهارم و شکم پنجم زایش، یک هفته قبل و نیز یک هفته بعد از زایش، از ورید دمی اخذ شد. بر اساس یافته‌ها، در هفته قبل از زایش همبستگی مثبتی بین اسیدهای چرب غیراستریفیه (Non-esterified fatty acids; NEFAs) و بتا‌هیدروکسی بوتیرات (Beta-hydroxybutyrate; BHBA)، مالون دی‌آلدئید، گاما گلوتامیل ترانسفراز و NF-κB و نیز همبستگی منفی با لیپوپروتئین با تراکم بالا مشاهده شد. در هفته بعد از زایش همبستگی مثبتی بین NEFA، BHBA، مالون دی‌آلدئید، گاما گلوتامیل ترانسفراز، آلکالین فسفاتاز و NF-κB و نیز همبستگی منفی با لیپوپروتئین با تراکم بالا مشاهده شد. نقطه برش mM/L BHBA ≤ ۱/۲ برای گاوهای سالم و BHBA > ۱/۲ mM/L برای گاوهای مبتلا به کتوز تحت‌بالینی در بعد از زایش تعیین شد. همچنین در گاوهای درگیر، مقادیر NEFA، BHBA، گاما گلوتامیل ترانسفراز (p < ۰/۰۰۱) و آلکالین فسفاتاز (p = ۰/۰۳) افزایش و لیپوپروتئین با تراکم بالا و NF-κB (p < ۰/۰۰۱) کاهش داشت. نتایج تحقیق حاضر مشخص کرد که افزایش NEFAs و BHBA با فعال‌سازی مسیر NF-κB و استرس اکسیداتیو، دام را مستعد ابتلا به بیماری کتوز می‌کند.

کلیدواژه‌ها: کتوز تحت‌بالینی، استرس اکسیداتیو، فاکتور هسته‌ای رونویسی کاپا B، متابولیت‌های خون، گاو هلشتاین.

## مقدمه

گاوهای شیری در دوره انتقال از اواخر بارداری تا اوایل شیردهی، مستعد ابتلا به بیماری‌های کبد چرب، کتوز بالینی و کتوز تحت‌بالینی هستند (Sordillo and Raphae, 2013; Sadeghi-nasab et al., 2011). در طول دوره انتقال، به دلیل مصرف کمتر ماده خشک و افزایش تقاضای انرژی برای حمایت از تولید شیر در گاوهای شیری، تعادل منفی انرژی (Negative Energy Balance; NEB) در بدن رخ می‌دهد (Mezzetti et al., 2021). گاوهای شیری با NEB شدید در طول دوره انتقال، شروع به تحرک چربی کرده و در نتیجه باعث تولید غلظت بالایی از اسیدهای چرب غیراسترئریفیه و  $\beta$ -هیدروکسی بوتیرات در سرم می‌شوند. به عبارت دیگر، این عوامل، القاءکننده مهم بیماری‌های متابولیک، به‌ویژه کتوز تحت‌بالینی در دوره انتقال هستند (Li et al., 2013; Pedernera et al., 2010; Amouoghli Tabrizi et al., 2007; Herdt et al., 2000). مقدار اسیدهای چرب غیراسترئریفیه و BHBA، به‌عنوان شاخص‌هایی برای آگاهی از وضعیت انرژی و خطر بروز بیماری، اندازه‌گیری و بررسی می‌شود. در این خصوص، گزارش شده که غلظت بالای NEFA (بیشتر از ۰/۴ میلی‌مول بر لیتر) در ۷ تا ۱۰ روز قبل از زایش، باعث افزایش خطر جابه‌جایی شیردان، جفت ماندگی، کبد چرب و تولید شیر کمتر در ۴ ماه اول شیردهی می‌شود. کتوز تحت‌بالینی هم با مقدار BHBA < ۱/۲ میلی‌مول بر لیتر در هفته اول یا دوم پس از زایش، با افزایش خطر جابه‌جایی شیردان، کتوز بالینی، آندومتريت، تخمک‌گذاری تأخیری و افزایش ورم پستان همراه است (Asri Rezaee, et al., 2008). NF- $\kappa$ B عامل هسته‌ای مسیر سیگنالینگ

استرس اکسیداتیو در دوره انتقال ارتباطی تنگاتنگ دارد (Senoh et al., 2019; Du et al., 2017). استرس‌های اکسایشی به دلیل ناهماهنگی درون‌سلولی و افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (reactive oxygen species; ROS) و کاهش آنتی‌اکسیدان‌ها پدیدار می‌شوند. رادیکال‌های آزاد اکسیژن، مولکول‌های بسیار فعالی هستند که موجب برهم زدن هومئوستاز سلولی و آسیب به ماکرومولکول‌های موجود در پراکسیداسیون می‌شوند که از جمله می‌توان به شکسته شدن رشته DNA و غشاء لیپیدی سلولی، صدمه به پروتئین‌های ناقل در غشاء و آسیب به آنزیم‌های داخل سلولی اشاره کرد. این رادیکال‌ها می‌توانند صدمات خطرناک و غیرقابل برگشتی در ساختمان ماکرومولکول‌های حیاتی ایجاد نمایند. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که آسیب اکسیداتیو با ایجاد تغییرات دائمی در ماده ژنتیکی، اولین مرحله در شروع جهش، سرطان و پیری است (Liguori et al., 2018). استرس اکسیداتیو مسیرهای پیام‌رسان ویژه‌ای از جمله AMP فعال‌کننده پروتئین کیناز و فاکتور هسته‌ای-کاپا را فعال می‌سازد. مسیرهای فعال‌شده باعث کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی و آزادسازی سایتوکین‌های پیش‌التهابی شده و در نتیجه التهاب ایجادشده باعث افزایش بیشتر رادیکال‌های آزاد از سلول‌های مرتبط با کانون التهابی، مانند نوتروفیل‌ها می‌شود. مسیر سیگنالینگ NF- $\kappa$ B نقشی حیاتی در القای ایمنی و پاسخ‌های التهابی دارد که از طریق انواع فرایندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک ظاهر می‌شود (Morgan and Liu, 2011; Hayden and Ghosh, 2008).

مورد تأثیر سطوح بالای NEFA و BHBA بر بیان این ژن و فاکتورهای التهابی وجود دارد (Shi *et al.*, 2015). به همین منظور در مطالعه حاضر، به بررسی وجود رابطه بین برخی از متابولیت‌های خون و بیان ژن NF-kB در گاوهای درگیر با کتوز تحت‌بالینی و نیز با هدف فرعی بررسی سطوح بالای NEFA و اثرات BHBA در ایجاد استرس اکسیداتیو و تغییرات بیان ژن NF-kB، پرداخته شد.

### مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی از خرداد سال ۱۳۹۷ تا شهریور سال ۱۳۹۹، در دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز واقع در جاده باسمنج انجام گردید. البته نمونه‌گیری‌های لازم در تحقیق، در گاوداری شرکت تلیسه نمونه (سهامی عام) واقع در شهرستان شهریار استان تهران با جمعیت دامی ۲۰۰۰ راسی و با ۹۰۰ راس گاو دوشا، انجام گرفت که بدین منظور مقدار ۵ میلی‌لیتر خون از ورید دمی ۱۰۰ راس گاو شکم چهارم و شکم پنجم زایش با وزن ۶۵۰ تا ۷۰۰ کیلوگرم که با جیره یکسان تغذیه شده بودند (جدول ۱)، یک هفته قبل و نیز یک هفته بعد از زایش، اخذ شد.

پیش‌التهابی بوده که بیان این ژن سبب بیان فاکتورهای پیش‌التهابی شامل سیتوکین‌ها و کموکین‌ها می‌شود. همچنین پویایی سیگنالینگ NF-kB در نوتروفیل‌ها و سلول‌های دندریتیک گزارش شده است (Dorrington and Fraser, 2019; Hayden *et al.*, 2006). از طرف دیگر، NF-kB یکی از مهم‌ترین عوامل رونویسی در زمان تعادل منفی انرژی (NEB) است. علاوه بر این، NF-kB نقش اساسی در تمام جنبه‌های تنظیم سلولی، پاسخ‌های ایمنی و تکثیر سلولی دارد. اسیدهای چرب آزاد هم، پاسخ‌های التهابی را، به‌ویژه با فعال‌سازی مسیر NF-kB افزایش می‌دهند. یافته‌ها نشان‌دهنده اهمیت بسیار بالا و غیرقابل انکار NF-kB به‌عنوان واسطه استرس سلولی می‌باشد (Shoelson *et al.*, 2003) و مشخص نیست که آیا فاکتور رونویسی NF-kB نیز در فرآیندهای فیزیولوژیکی کبد گاوهای شیری که از کتوز تحت‌بالینی در دوره انتقال رنج می‌برند، نقش مهمی داشته باشد (Morgan and Liu, 2011; Czaja, 2007; Ji *et al.*, 2006). غلظت بالای NEFA با فعال کردن مسیر سیگنالینگ NF-kB به دلیل استرس اکسیداتیو، پاسخ التهابی را در سلول‌های کبدی ایجاد می‌کند، اما تأثیر کتوز تحت‌بالینی بر بیان ژن NF-kB به‌وضوح مشخص نبوده و مطالعات بسیار محدودی در

جدول ۱- ترکیب جیره غذایی گاوهای مورد آزمایش در دوره خشکی (close-up) (برحسب درصد ماده خشک)

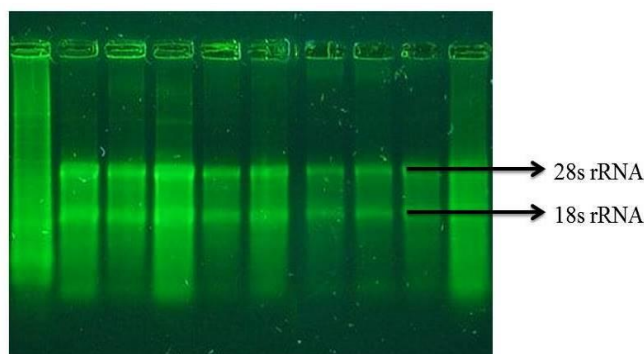
گرم/کیلوگرم ماده خشک	اجزای جیره
۲۲۸/۹	یونجه
۳۰۹/۴	سیلاژ
۹۲/۰۲	جو (آسیاب‌شده)
۱۴۴/۹۲	ذرت (آسیاب‌شده)
۱۳/۷۶	پودر ماهی
۷۷/۵۳	کنجاله سویا
۱۸/۱۱	پودر کانولا (درشت)
۱۳/۷۶	پنبه‌دانه
۲۱/۷۳	سویا اکستروودشده
۶/۵	انرژی بوستر
۲/۱۷	اکسید منیزیم
۴/۳۴	کربنات کلسیم
۲/۷۵	کولین محافظت‌شده
۸/۶۹	مواد معدنی مخلوط با ویتامین A
۵۱/۱	ماده خشک جیره
۱۳/۳	پروتئین خام (درصد ماده خشک)
۰/۹	کلسیم (درصد ماده خشک)
۰/۳	فسفر (درصد ماده خشک)
۲/۶۶	انرژی قابل متابولیسم (مگاکالری/کیلوگرم)
۳۶/۵	Neutral detergent- fiber (درصد ماده خشک)
۲۸/۳	Acid detergent- fiber (درصد ماده خشک)

هر نیم کیلوگرم ترکیب کنسانتره جیره غذایی حاوی ۵۰۰/۰۰۰U/kg ویتامین E، ۱۵/۰۰۰/۰۰۰U/kg ویتامین A و نیز ویتامین D3 به میزان ۴۰/۰۰۰U/kg بود.

می‌تواند به‌طور کاذب غلظت BHBA را افزایش دهد (Stokol and Nydam, 2006).

- استخراج RNA کل و تولید cDNA (complementary DNA): با توجه به این‌که در تحقیق حاضر برای تعیین میزان بیان mRNA (messenger ribonucleic acid) و بررسی کمی بیان ژن، از روش Real Time PCR استفاده گردید، لذا ابتدا استخراج RNA کل لازم، با استفاده از محلول تریزول (NEB, England) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. کیفیت RNAهای استخراج‌شده هم بر روی ژل آگارز (شرکت یکتا تجهیز آزما، ایران) مورد بررسی قرار گرفت که در صورت صحت استخراج، باندهای مربوط به RNAهای ریبوزومی ۲۸S و ۱۸S به عنوان اندیکاتورهای سلول حیوانی قابل تشخیص بودند (Niu et al., 2019). لازم به ذکر است که RNAهای استخراج‌شده، برای استفاده در مراحل بعدی تحقیق، در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس (Germany, GFL) نگه‌داری گردید.

- نمونه‌گیری: نمونه‌های خون (به میزان ۵ میلی‌لیتر)، توسط لوله‌های جمع‌آوری خون در خلأ بدون ماده ضد انعقاد (Austria, GREINER) از رگ دمی تمام گاوهای تحت‌مطالعه یک هفته قبل و نیز یک هفته پس از زایش جمع‌آوری شد. در ادامه برای جدا کردن سرم، نمونه‌های خون در شتاب ۳۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (به‌داد- ایران) شد. نمونه‌های سرمی سپس در دمای ۲۰- درجه سلسیوس در فریزر (سامسونگ، کره جنوبی) برای استفاده در آزمایشات بیوشیمیایی ذخیره شدند. همچنین به میزان ۵ میلی‌لیتر خون در زمان‌های اشاره‌شده در لوله‌های خلأ حاوی ماده ضد انعقاد (Austria, GREINER) به منظور استفاده در بیان ژن اخذ شد. در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس (Germany, GFL) برای استخراج RNA کل ذخیره شد. لازم به ذکر است که نمونه‌های خونی همولیز شده، از چرخه تحقیق کنار گذاشته شدند، چرا که همولیز



شکل ۱- RNAهای استخراجی بر روی ژل آگارز نشان می‌دهد تمامی چاهک‌ها حاوی باندهای مربوط به RNAهای ریبوزومی ۲۸S و ۱۸S هستند.

(dT اضافه شد و طبق دستورالعمل کیت ساخت cDNA به مدت یک ساعت در ۴۲ درجه

در ادامه، برای ساخت cDNA، میزان ۱۹ مایکرولیتر RNA استخراج‌شده به کیت cDNA (BiONEER, South Korea) به همراه ۱ مایکرولیتر پرایمر (oligo-

با دمای ۹۵ درجه سلسیوس و ۱۵ ثانیه با ۶۰ درجه سلسیوس، انجام گردید. در پایان، نتایج واکنش‌ها براساس روش Pfaffl و با استفاده از راندمان پرایمر تصحیح شده، مورد بررسی قرار گرفتند (Pfaffl, 2001). راندمان پرایمر هر یک از واکنش‌ها به‌طور اختصاصی و با استفاده از نرم‌افزار LinReg محاسبه و در معادله مورد استفاده قرار گرفت. همچنین در واکنش Real Time PCR انجام‌گرفته، از ژن بتا اکتین ( $\beta$ -Actin) به‌عنوان ژن رفرنس استفاده شد، زیرا این ژن در تمامی سلول‌های شاهد و تیمار شده بیان یکسان و بدون واریانس دارد و از طرفی پرایمر آن (۱۱۰ bp) نزدیک به محصول هدف (۱۳۶ bp) می‌باشد. همچنین لازم به ذکر است که طراحی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر، در دانشگاه تبریز انجام گرفت. به این صورت که ابتدا توالی ژن‌ها از سایت NCBI اخذ گردید و سپس برای طراحی پرایمرهای مناسب مربوطه، از نرم افزار الیگو۷ (Oligo7) استفاده شده و در نهایت هم، از طریق سفارش به شرکت BiONEER کره جنوبی، پرایمرهای لازم برای تحقیق، ساخته شدند.

سلسیوس در دستگاه PCR (Biometra, Germany) انکوبه شد.

- واکنش Real Time PCR: بدین منظور، محلول حاوی ۱۲/۵ مایکرولیتر از SYBR Green (BiONEER, South Korea) به همراه ۱ مایکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (جدول ۲) با غلظت ۱۰ میلی‌مول، توسط محلول nuclease-free water به حجم ۲۲ ماکرولیتر رسانده شد و در نهایت هم ۳ مایکرولیتر از cDNA ساخته شده به آن اضافه شد. این فرایند روی تمام پرایمرها انجام گرفت. تمامی واکنش‌ها در دستگاه (Germany, QIAGEN) Rotor-Gene Q- QIAGEN سه تکرار برای هر نمونه تحت شرایط، یک مرحله pre denaturation جهت فعال شدن آنزیم polymerase Taq DNA به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و در ادامه انجام ۴۵ سیکل که هر کدام با سه مرحله، شامل دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۹ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و مرحله رونوشت‌برداری طی چهار الگوی دمائی شامل ۱۵ ثانیه با دمای ۹۵ درجه سلسیوس، ۱ دقیقه با دمای ۶۰ درجه سلسیوس، ۱۵ ثانیه

جدول ۲- مشخصات ژن‌های هدف و توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش Real Time PCR

اندازه محصول PCR (جفت باز)	توالی آغازگرهای استفاده شده	نام ژن‌های هدف
۱۳۶	F: CTCATGTTTACAGCTTTCCTTC R: CTGTCCTGTCCATTCTACTAT	فاکتور هسته‌ای رونویسی کاپا B (Nuclear Factor-kappa B)
۱۰۱	F: GCCCTGAGGCTCTCTTCCA R: GCGGATGTCGACGTCACA	بتا اکتین (Beta-Actin)

مایع رویی حاصله، در طول موج ۵۳۲ نانومتر سنجش می‌گردید.

- تحلیل آماری داده‌ها: تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS ویرایش ۹/۲ با سطح معنی‌داری  $p < 0/05$  با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه و استفاده از آزمون GLM (generalized linear model) انجام شد. همچنین از ضریب همبستگی دومتغیره پیرسون برای تعیین ارتباط بین NEFA، BHBA، VLDL، HDL، تری‌گلیسیرید، آلكالین فسفاتاز، گاما-گلوتامیل ترانسفراز، NF-kB و MDA استفاده شد.

لازم به یادآوری است که برای تجزیه و تحلیل داده‌ها در مطالعه حاضر، برای بعد از زایش نقطه برش میلی‌مول بر لیتر  $BHBA \leq 1/2$  برای گاوهای سالم و میلی‌مول بر لیتر  $BHBA > 1/2$  برای گاوهای مبتلا به کتوز تحت‌بالینی در نظر گرفته شد (Puppel *et al.*, 2019; Wankhade *et al.*, 2017).

#### یافته‌ها

براساس داده‌های ارائه شده در جدول ۳، در هفته قبل از زایش همبستگی مثبتی بین اسیدهای چرب غیراستریفیه (NEFA)، BHBA و MDA ( $p < 0/0001$ )، گاما گلوتامین ترانسفراز ( $r = 0/51$ )،  $p < 0/0001$ )، NF-kB ( $r = 0/52$ ) و  $p = 0/003$ ) و همبستگی منفی با HDL مشاهده شد (جدول ۳).

- اندازه‌گیری متابولیت‌های خونی: بدین منظور نمونه‌های سرمی تهیه‌شده، به آزمایشگاه فیزیولوژی دام دانشگاه تبریز انتقال یافته و غلظت سرمی BHBA و NEFA بر اساس دستورالعمل‌های سازنده کیت‌های مربوطه، اندازه‌گیری شد (Randox Laboratories Kit, Kingdom United). همچنین پارامترهای بیوشیمیایی خون شامل غلظت تری‌گلیسیرید (triglyceride)، لیپوپروتئین با چگالی بسیار پایین (very-low-density lipoprotein; VLDL)، لیپوپروتئین با چگالی بالا (high-density lipoprotein; HDL)، آلكالین فسفاتاز و گاما-گلوتامیل ترانسفراز توسط کیت‌های مربوطه پارس‌آزمون (ساخت ایران)، بر اساس روش جذب نوری و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Geneus20, USA) اندازه‌گیری شد. اما اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید سرم با استفاده از تیوباربیتوریک اسید (Merck, Germany) صورت گرفت. که برای انجام این کار، در روش دستی ۱۰۰ مایکرولیتر از نمونه سرمی داخل لوله‌آزمایش ریخته شد، سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول حاوی تیوباربیتوریک اسید ۱۵ درصد، اسید هیدروکلریک ۰/۲۵ نرمال و تیوباربیتوریک ۰/۳۷ درصد (به نسبت حجمی ۱:۱:۱) به لوله‌آزمایش مذکور، اضافه می‌گردید. در ادامه ۱۵ دقیقه این لوله‌ها در بن ماری آب جوش قرار داده می‌شدند. در نهایت محتویات لوله‌آزمایش به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتیفریوژ (به‌داد، ایران) شده و جذب نوری



جدول ۳- همبستگی (عدد بالایی) و سطح احتمال معنی‌داری (عدد پایینی) بین پارامترهای اندازه‌گیری شده در یک هفته قبل از زایش

پارامتر	بتاهیدروکسی بوتیرات	لیپوپروتئین با چگالی بالا	تری‌گلیسرید	لیپوپروتئین با چگالی بسیار پایین	آلکالین فسفاتاز	گاماگلوبولین ترانسفراز	مالون-دی‌آلدئید	فاکتور هسته‌ای رونویسی کاپا
اسیدهای چرب غیراستریفیه (میلی مول بر لیتر)	r=۰/۵۶ <۰/۰۰۰۱	-۰/۵۲ <۰/۰۰۰۱	۰/۱۳ ns	۰/۱۳ ns	۰/۱۶ ns	۰/۵۲ <۰/۰۰۰۱	۰/۵۱ <۰/۰۰۰۱	۰/۳۴ ۰/۰۰۳
بتاهیدروکسی بوتیرات (میلی مول بر لیتر)	-۰/۲۴ ۰/۰۲	۰/۱۳ ns	۰/۱۱ ns	۰/۳ ns	۰/۳ ns	۰/۳ ۰/۰۰۵	۰/۵۵ <۰/۰۰۰۱	-۰/۱۰ ns
لیپوپروتئین با چگالی بالا (میلی گرم بر دسی لیتر)	-۰/۲۴ ۰/۰۲	-۰/۲۴ ۰/۰۲	-۰/۳۶ ۰/۰۰۰۷	-۰/۳۹ ۰/۰۰۰۲	-۰/۳۱ ۰/۰۰۳	-۰/۳۲ ۰/۰۰۲۳	-۰/۳۱ ۰/۰۰۳	-۰/۳۲ ۰/۰۰۲۳
تری‌گلیسرید (میلی گرم بر دسی لیتر)	۰/۹۹ ۰/۰۰۰۱	۰/۱۷ ns	۰/۱۹ ns	۰/۲۸ ۰/۰۰۹	۰/۱۹ ns	۰/۱۹ ns	۰/۲۸ ۰/۰۰۹	۰/۱۹ ns
لیپوپروتئین با چگالی بسیار پایین (میلی گرم بر دسی لیتر)	۰/۱۷ ns	۰/۱۸ ns	۰/۱۷ ns	۰/۱۸ ns	۰/۱۸ ns	۰/۱۸ ns	۰/۱۸ ns	۰/۰۸ ns
آلکالین فسفاتاز (میکرومول بر لیتر)	۰/۱۱ ns	۰/۱۱ ns	۰/۱۱ ns	۰/۱۱ ns	۰/۱۱ ns	۰/۱۱ ns	۰/۱۱ ns	۰/۱۰ ns
گاماگلوبولین ترانسفراز (میکرومول بر لیتر)	۰/۰۷ ns	۰/۰۷ ns	۰/۰۷ ns	۰/۰۷ ns	۰/۰۷ ns	۰/۰۷ ns	۰/۰۷ ns	۰/۰۹ ns
مالون‌دی‌آلدئید (میلی گرم بر دسی لیتر)	۰/۰۳ ns	۰/۰۳ ns	۰/۰۳ ns	۰/۰۳ ns	۰/۰۳ ns	۰/۰۳ ns	۰/۰۳ ns	۰/۰۳ ns

حداقل اختلاف معنی‌دار در سطح  $p \leq 0.05$  در نظر گرفته شد.

ns: همبستگی بین پارامترها معنی‌دار نیست.

همچنین، در هفته بعد از زایش همبستگی مثبتی بین MDA و BHBA ( $r=0.54$ ,  $p<0.0001$ )، گاماگلوبولین ترانسفراز ( $r=0.42$ ,  $p<0.008$ )، آلکالین فسفاتاز ( $r=0.25$ ,  $p=0.02$ ) و NF- $\kappa$ B ( $r=0.65$ ,  $p<0.0001$ ) و همبستگی منفی با HDL ( $r=0.61$ ,  $p<0.0001$ ) مشاهده شد (جدول ۴).

همچنین، در هفته بعد از زایش همبستگی مثبتی بین MDA و BHBA ( $r=0.54$ ,  $p<0.0001$ )، گاماگلوبولین ترانسفراز ( $r=0.42$ ,  $p<0.008$ )، آلکالین فسفاتاز ( $r=0.25$ ,  $p=0.02$ ) و NF- $\kappa$ B ( $r=0.65$ ,  $p<0.0001$ ) و همبستگی منفی با HDL ( $r=0.61$ ,  $p<0.0001$ ) مشاهده شد (جدول ۴).

جدول ۴- همبستگی (عدد بالایی) و سطح احتمال معنی‌داری (عدد پایینی) بین پارامترهای اندازه‌گیری شده در یک هفته بعد از زایش

پارامتر	بتاهیدروکسی بوتیرات	لیپوپروتئین با چگالی بالا	تری گلیسرید	لیپوپروتئین با چگالی بسیار پایین	آلکالین فسفاتاز	گاما گلوتامین ترانسفراز	مالون‌دی‌آلدئید	فاکتور هسته‌ای رونویسی کاپا
اسیدهای چرب غیراستریفیه (میلی مول بر لیتر)	r=۰/۵۴ <۰/۰۰۰۱	-۰/۴۲ <۰/۰۰۰۱	۰/۲۱ ۰/۰۵	۰/۲۴ ۰/۰۴	۰/۰۵ ns	۰/۰۵ ns	۰/۳۷ ۰/۰۰۴	۰/۵۵ <۰/۰۰۰۱
بتاهیدروکسی بوتیرات (میلی مول بر لیتر)		-۰/۶۱ <۰/۰۰۰۱	۰/۱۳ ns	۰/۱۰ ns	۰/۲۲ ۰/۰۴	۰/۲۵ ۰/۰۲	۰/۳۹ ۰/۰۰۳	۰/۶۵ <۰/۰۰۰۱
لیپوپروتئین با چگالی بالا (میلی گرم بر دسی لیتر)			-۰/۱۵ ns	-۰/۲۴ ns	۰/۱۷ ns	۰/۱۹ ns	-۰/۴۲ <۰/۰۰۰۱	۰/۱۹ ns
تری گلیسرید (میلی گرم بر دسی لیتر)				۰/۹۹ <۰/۰۰۰۱	۰/۱۷ ns	۰/۱۹Ns	۰/۲۸ ۰/۰۱	۰/۱۹ ns
لیپوپروتئین با چگالی بسیار پایین (میلی گرم بر دسی لیتر)					۰/۱۴ ns	۰/۰۳ ns	۰/۲۶ ۰/۰۱	۰/۰۵ ns
آلکالین فسفاتاز (میکرومول بر لیتر)						۰/۶۵ <۰/۰۰۰۱	۰/۰۳ ns	۰/۳۵ <۰/۰۰۰۱
گاما گلوتامین ترانسفراز (میکرومول بر لیتر)							۰/۲۱ ۰/۰۵	۰/۵۳ <۰/۰۰۰۱
مالون‌دی‌آلدئید (میلی گرم بر دسی لیتر)								۰/۴۲ ۰/۰۰۸

ns همبستگی بین پارامترها معنی‌دار نیست. حداقل اختلاف معنی‌دار در سطح  $p \leq 0.05$  در نظر گرفته شد.

فسفاتاز ( $p=0.03$ ) به تدریج افزایش و HDL ( $p<0.0001$ ) به تدریج و به طور معنی‌داری کاهش یافت، همچنین NF- $\kappa$ B ( $p<0.0001$ ) به تدریج در گروه گاوهای مبتلا به کتوز تحت‌بالینی به‌طور معنی‌داری افزایش داشت (جدول ۵).

همچنین بعد از زایش نقطه برش  $BHBA \leq 1/2$  برای گاوهای سالم و  $BHBA > 1/2$  برای گاوهای مبتلا به کتوز تحت‌بالینی تعیین شد. NEFA ( $p<0.0001$ )، BHBA ( $p<0.0001$ )، گاما گلوتامین ترانسفراز ( $p<0.0001$ )، MDA ( $p<0.0001$ ) و آلکالین

جدول ۵- سطح معنی‌داری پارامترهای مورد نظر بعد از زایش و با نقطه برش بتاهدروکسی بوتیرات  $\geq 1/2$  میلی‌مول بر لیتر برای گاوهای سالم و بتاهدروکسی بوتیرات  $< 1/2$  میلی‌مول بر لیتر برای گاوهای مبتلا به کتوز تحت‌بالینی

سطح معنی‌داری	بتاهدروکسی بوتیرات $< 1/2$ (میلی‌مول بر لیتر)	بتاهدروکسی بوتیرات $\geq 1/2$ (میلی‌مول بر لیتر)	
$< 0/0001$	$1/55^b$	$1/05^a$	اسیدهای چرب غیراستریفیه (میلی‌مول بر لیتر)
$< 0/0001$	$1/52^b$	$0/95^a$	بتاهدروکسی بوتیرات (میلی‌مول بر لیتر)
$0/0002$	$27/97^a$	$38/40^b$	لیپوپروتئین با چگالی بالا (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)
$0/06$	$16/44$	$11/53$	تری‌گلیسرید (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)
$0/06$	$3/27$	$2/29$	لیپوپروتئین با چگالی بسیار پایین (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)
$0/41$	$202/25$	$185/74$	آلکالین فسفاتاز (میکرومول بر لیتر)
$0/0004$	$143/83^b$	$114/46^a$	گاما گلوتامین ترانسفراز (میکرومول بر لیتر)
$< 0/0001$	$0/26^b$	$0/11^a$	مالون‌دی‌آلدئید (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)
$< 0/0001$	$1/32^b$	$0/88^a$	فاکتور هسته‌ای رونویسی کاپا

a, b, ... : حروف متفاوت در هر ستون نشانه اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد ( $p \leq 0/05$ ).

## بحث و نتیجه‌گیری

اکسیداتیو در نظر گرفته می‌شود که با کتوز با استرس اکسیداتیو در دوره انتقال گاوهای شیری ارتباط دارد و با نکته نظرات برخی محققین همسو می‌باشد (Tsuchiya et al., 2020; Senoh et al., 2019; Du et al., 2016; Li et al., 2017). رادیکال‌های آزاد اکسیژن، مولکول‌های بسیار فعالی هستند که موجب برهم زدن هومئوستاز سلولی و آسیب به ماکرومولکول‌های موجود در پراکسیداسیون می‌شوند. پاسخ بیولوژیک موجودات به استرس و تنش از سطح سلولی و مولکولی شروع شده و با افزایش زمان قرار گرفتن در شرایط تنش منجر به تغییرات در سطح بیوشیمیایی، سلولی، بافت، دستگاه و کل موجود می‌شود. بر این اساس فاکتور رونویسی هسته‌ای کاپا (NF- $\kappa$ B) به‌عنوان پاسخ سریع سلولی به انواع استرس با منشأ درونی بوده و با فعال‌سازی در پاسخ به عوامل مختلف موجب بروز التهاب می‌شود. با عنایت به جدول ۳ مقادیر NEFA در دوره قبل از زایش با NF- $\kappa$ B ارتباط مثبت داشت. به

در مطالعه حاضر، NEFA در دوره قبل از زایش با BHBA ارتباط مثبت داشت (جدول ۳). این نتایج حاکی از آن است که غلظت بالای NEFA با آسیب کبدی ارتباط دارد. این یافته‌ها با نتایج سایر پژوهش‌ها نیز همخوانی داشت (Wang et al., 2021; Xu and Wang, 2008). غلظت زیاد NEFA (بیشتر از  $0/4$  میلی‌مول بر لیتر) در ۷ تا ۱۰ روز قبل از زایش باعث افزایش خطر جابه‌جایی شیردان، جفت ماندگی، کبد چرب و تولید شیر کمتر در ۴ ماه اول شیردهی می‌شود (Mezzetti et al., 2021). قبل از ایجاد کتوز تحت‌بالینی، گلوکز خون به‌سرعت کاهش می‌یابد و چربی بدن تحریک می‌شود. بنابراین، غلظت NEFA در خون متعاقباً افزایش می‌یابد. همچنین NEFA در دوره قبل از زایش با MDA ارتباط مثبت داشت (جدول ۳)، این داده‌ها نشان می‌دهد که سطح بالای NEFA باعث افزایش MDA شده که به‌عنوان شاخص استرس

تولیدمثل، افزایش ورم پستان و تولید شیر کمتر همراه است (Sordillo *et al.*, 2013; Asri Rezaee, *et al.*, 2012; Chapinal *et al.*, 2011; Ospina *et al.*, 2010; Suriyasathaporn *et al.*, 2000). در مطالعه حاضر، سطح NF-κB به‌طور قابل توجهی در گاوهای درگیر با کتوز تحت بالینی افزایش داشت (جدول ۵) و مشخص شد که پاسخ التهابی با غلظت بالای BHBA تحریک می‌شود. این محققان تأثیر مثبت ناشی از افزایش غلظت BHBA بر التهاب در اندومتريت و ورم پستان در گاوهای شیری را گزارش کردند (LeBlanc *et al.*, 2011; Galvão *et al.*, 2010; Hammon *et al.*, 2006). این گزارش‌ها، نتایج ما که افزایش BHBA می‌تواند عوامل پیش‌التهابی را افزایش دهد را تأیید می‌کند. یافته‌های ما نشان داد که افزایش غلظت BHBA مسیر NF-κB را فعال کرده و باعث پاسخ‌های التهابی می‌شود. مسیر NF-κB برای پاسخ‌های التهابی و ایمنی بسیار مهم است. این نتایج نشان داد که BHBA می‌تواند بیان mRNA عوامل التهابی را با فعال کردن NF-κB به‌طور قابل توجهی تنظیم کرده و انتشار عوامل پیش‌التهابی را افزایش دهد.

از طرف دیگر، NF-κB با مالون‌دی‌آلدئید در دوره پس از زایش رابطه مثبت داشت (جدول ۴). مالون‌دی‌آلدئید که یکی از محصولات نهایی پراکسیداسیون چربی و ناشی از افزایش سطح ROS می‌باشد، به‌طور کلی به‌عنوان یک نشانگر مفید برای آسیب اکسیداتیو شناخته می‌شود. گزارش شده که فعال‌سازی NF-κB به‌شدت وابسته به استرس‌های اکسیداتیو مرتبط با پاسخ ایمنی است (Shi *et al.*, 2014; Hybertson *et al.*, 2011; Romagnoli *et al.*, 2010). استرس اکسیداتیو یکی از اصول اولیه تشخیص بیماری کتوز تحت‌بالینی است.

همین علت با افزایش NEFA و این ارتباط مثبت، کتوز تحت‌بالینی بروز کرده است (Contreras *et al.*, 2012; LeBlanc *et al.*, 2011). NF-κB یک عامل رونویسی القایی است که پس از فعال‌شدن، می‌تواند رونویسی ژن‌های مختلف را فعال کرده و علاوه بر افزایش تولید سایتوکاین‌های التهابی، کموکین‌ها و نوتروفیل‌ها، با تنظیم تکثیر سلولی، آپوپتوز، مورفوژنز و تمایز را هدف قرار می‌دهد (Denk *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2017). در مطالعه حاضر، به‌نظر می‌رسد که سطح بالای بیان ژن NF-κB توسط NEFA تنظیم می‌شود. همچنین نشان داده شد که غلظت زیاد NEFA می‌تواند NF-κB را که به آسیب سلول‌های کبدی گاو منجر می‌شود، فعال کند.

علاوه بر این، NEFA در دوره قبل از زایش با گاماگلوتامین ترانسفراز ارتباط مثبت داشت (جدول ۳)، که با گزارشات (Shi *et al.*, 2014; Wree *et al.*, 2004; Feldstein *et al.*, 2014) همسو می‌باشد. به‌طور معمول، گاماگلوتامین ترانسفراز در مقادیر کم در خون وجود دارد، اما وقتی کبد آسیب می‌بیند، معمولاً اولین آنزیم کبدی است که در خون افزایش می‌یابد. علاوه بر این، بسیاری از مطالعات *in vivo* و *in vitro* نشان داده که افزایش سطح NEFA سرم با اختلالات متابولیکی همراه بوده و باعث آزاد شدن واسطه‌های پیش‌التهابی شده و بنابراین آسیب‌پذیری سلول‌های کبدی را در برداشته و باعث مرگ سلول‌های کبدی می‌شود. افزایش میزان BHBA (<math>1/2</math> BHBA) میلی‌مول بر لیتر) در هفته اول یا دوم پس از زایش با افزایش خطر جابه‌جایی شیردان، متريت، کتوز بالینی، آندومتريت، تخمک‌گذاری تأخیری، کاهش کارایی

کبد اشاره دارد، یافته‌های مشابهی نیز توسط تورک و همکاران در سال ۲۰۰۸ (Turk *et al.*, 2008) و لی و همکاران در سال ۲۰۱۶ (Li *et al.*, 2016) مشاهده شده است، که نامبردگان احتمال دادند این وقایع به دلیل استئاتوز کبدی است.

در تحقیق حاضر، سطح گاما گلوتامین ترانسفراز به‌طور قابل توجهی در گروه کتوز تحت‌بالینی افزایش یافت (جدول ۵). گاما گلوتامین ترانسفراز یک آنزیم مخصوص کبد است و یک نشانگر حساس انسداد مجاری صفراوی است (González *et al.*, 2011). افزایش فعالیت گاما گلوتامین ترانسفراز در گاوهای مبتلا به کتوز تحت‌بالینی ناشی از استرس اکسیداتیو بوده که باعث اختلالات چربی شده و فعالیت گاما گلوتامین ترانسفراز را تغییر می‌دهد. یک مطالعه که بر روی گاوهای مبتلا به کتوز تحت‌بالینی در دوره انتقال انجام شده، افزایش آنزیم کبدی گاما گلوتامین ترانسفراز را نشان داده است (El-Deeb and El-Bahr, 2017). علاوه بر این، در تحقیق حاضر، یک رابطه مثبت بین گاما گلوتامین ترانسفراز و مالون‌دی‌آلدئید پلاسما در دوره پس از زایش مشاهده شد (جدول ۵). مطالعات اخیر نشان داده است که گاما گلوتامین ترانسفراز سرم ممکن است به‌عنوان نشانگر استرس اکسیداتیو نیز استفاده شود (Leopold and Loscalzo, 2009).

در این تحقیق، تری‌گلیسیرید و VLDL بین دوگروه سالم و درگیر به کتوز تحت‌بالینی تفاوت معنی‌دار نداشتند، (جدول ۵). سطح تری‌گلیسیرید و VLDL بعد از زایش در طول کتوز، به دلیل، به دلیل فراخوانی چربی‌ها از ذخایر بدن و عدم گلوکز پلاسما افزایش می‌یابد. این چربی‌ها در درون سلول ممکن

گاوهای شیری مبتلا به کتوز بالینی و کتوز تحت‌بالینی، استرس اکسیداتیو را تجربه می‌کنند که می‌تواند از طریق مایعات و بافت‌های بیولوژیکی اندازه‌گیری شود (Fiore *et al.*, 2019; Sordillo and Aitken 2009). یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد که در گروه گاوهای مبتلا به کتوز تحت‌بالینی، میزان مالون‌دی‌آلدئید به‌طور قابل توجهی افزایش یافت ( $p < 0.001$ ) (جدول ۵). نتایج حاصله نشان می‌دهد که افزایش BHBA می‌تواند باعث افزایش اکسیدان‌ها شود. در واقع، همان‌طور که نشان داده شد، غلظت بیشتر BHBA می‌تواند منجر به تولید سطوح بالاتری از شاخص‌های اکسیداتیو شود که شامل متابولیت‌های ROS و مواد واکنشی اسید تیوباربتوریک (TBARS) و سطوح پایین‌تر آنتی‌اکسیدان‌ها در پلاسماهای گاوهای شیری شود (Fiore *et al.*, 2019). از طرف دیگر همبستگی مثبت بین غلظت BHBA، آلکالین فسفاتاز، گاما گلوتامین ترانسفراز و مالون‌دی‌آلدئید در دوره پس از زایش مشاهده شد (جدول ۴). این نتایج ممکن است به دلیل بسیج چربی و اکسیداسیون کتون بادی‌ها و پاسخ‌های التهابی باشد. تحقیقات تورک و همکاران در سال ۲۰۰۵، یافته‌های به‌دست آمده را تأیید می‌کند که سطح بالایی از BHBA می‌تواند استرس اکسیداتیو در سلول‌های کبدی گاو شیری را با افزایش میزان آلکالین فسفاتاز و گاما گلوتامین ترانسفراز نشان دهد (Turk *et al.*, 2005).

همچنین در مطالعه حاضر، سطح HDL به‌طور قابل توجهی در گروه گاوهای مبتلا به کتوز تحت‌بالینی کاهش یافت (جدول ۵) که سطوح پایین HLD به تعداد نسبتاً کم سلول‌های مولد کبدی به دلیل آسیب به

کتور تحت‌بالیته مفید واقع شود. همچنین پیشنهاد می‌گردد برای اخذ نتیجه بهتر و بیشتر، روند بیماری در مدت سه هفته بعد از زایمان بررسی گردد.

### سپاسگزاری

این مطالعه از پایان‌نامه خانم سعیده مرادی دانشجوی دکتری فیزیولوژی دام استخراج شده است و نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه تبریز به خاطر فراهم نمودن منابع مالی آن سپاسگزارند.

### تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

است به عملکرد کبد آسیب برساند ( Grummer, 1995).

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که سطوح بالای NEFA و BHBA می‌توانند پاسخ التهابی و مسیر مکانیسم مولکولی مرتبط با NF- $\kappa$ B را در دوره انتقال (یک هفته قبل و بعد از گوساله‌زایی) القاء کنند و داده‌های بدست آمده می‌تواند به آشکارشدن هرچه بیشتر پاتوژنز کتوز کمک نماید، به طوری که با افزایش BHBA واکنش التهابی ناشی از استرس اکسیداتیو فعال شده و متعاقب آن آسیب کبدی در گاوهای شیری مبتلا به کتوز تحت‌بالیته تشدید گردید.

با توجه به نتایج به‌دست آمده، استفاده از پارامترهای آزمایشگاهی بررسی شده در این مطالعه می‌تواند در شناسایی گاوهای مستعد به درگیرشدن به

### منابع

- Adias, T.C., Egerton, E. and Erhabor, O. (2013). Evaluation of coagulation parameters and liver enzymes among alcohol drinkers in Port Harcourt, Nigeria. *International Journal of General Medicine*, 6(1): 489-94.
- Amouoghli Tabrizi, B., Safi, S., Asri Rezaee, S. and Abdie Nojamehr. (2007). Study of the levels of betahydroxy butyrate, glucose, protein and albumin in Holstein cows with subclinical ketosis. *Journal of Veterinary Clinical Pathology*, 2(2): 125-132. [In Persian]
- Asri Rezaee, S., Amouoghli Tabrizi, B. and Saber Marouf, B. (2012). Evaluation of the levels of Leptin, Beta hydroxyl butyrate, Glucose, Cholesterol and Triglyceride in serum of Holstein cows with sub clinical ketosis. *Journal of Veterinary Clinical pathology*, 6(3): 1647-1656. [In Persian]
- Baker, R.G., Hayden, M.S. and Ghosh, S. (2011). NF- $\kappa$ B, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metabolism*, 13(1): 11-22.
- Bernabucci, U., Ronchi, B., Lacetera, N. and Nardone, A. (2005). Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 88(6): 2017-2026.
- Chapinal, N., Carson, M., Duffield, T.F., Capel, M., Godden, S., Overton, M., *et al.* (2011). The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. *Journal of Dairy Science*, 94(10): 897-903.

- Contreras, G.A., Raphael, W., Mattmiller, S.A., Gandy, J. and Sordilo, L.M. (2012). Nonesterified fatty acids modify inflammatory response and eicosanoid biosynthesis in bovine endothelial cells. *Journal of Dairy Science*, 95(9): 5011-5023.
- Czaja, M.J. (2007). Cell signaling in oxidative stress-induced liver injury. In *Seminars in Liver Disease*, 27(4) : 378-389.
- Dann, H.M. and Drackley, J.K. (2005). Carnitine palmitoyltransferase I in liver of periparturient dairy cows: effects of prepartum intake, postpartum induction of ketosis, and periparturient disorders. *Journal of Dairy Science*, 88(11): 3851-3859.
- Denk, A., Wirth, T. and Baumann, B. (2000). NF- $\kappa$ B transcription factors: critical regulators of hematopoiesis and neuronal survival. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 11(4): 303-320.
- Dorrington, M.G. and Fraser, I.D. (2019). NF- $\kappa$ B signaling in macrophages: dynamics, crosstalk, and signal integration. *Frontiers in Immunology*, 10(1): 705-708.
- Drackley, J. K. (1999). Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier?. *Journal of Dairy Science*, 82(11): 2259-2273.
- Du, X., Chen, L., Huang, D., Peng, Z., Zhao, C., Zhang, Y., *et al.* (2017). Elevated apoptosis in the liver of dairy cows with ketosis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 43(2): 568-578.
- El-Bahr, S.M. and El-Deeb, W.M. (2017). Oxidative stress and cardiac biomarkers in lambs affected with enzootic ataxia: the diagnostic and prognostic significance. *Veterinarski Arhiv*, 87(3): 259-271.
- El-Deeb, W.M. and Younis, E.E. (2009). Clinical and biochemical studies on *Theileria annulata* in Egyptian buffaloes (*Bubalus bubalis*) with particular orientation to oxidative stress and ketosis relationship. *Veterinary Parasitology*, 164(2-4): 301-305.
- Feldstein, A.E., Werneburg, N.W., Canbay, A., Guicciardi, M.E., Bronk, S.F., Rydzewski, R., *et al.* (2004). Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF $\alpha$  expression via a lysosomal pathway. *Hepatology*, 40(1): 185-194.
- Fiore, F., Spissu, N., Sechi, S. and Coccom, R. (2019). Evaluation of oxidative stress in dairy cows with left displacement of abomasum. *Animal*, 9(11): 966.
- Galvão, K.N., Flaminio, M.J.B.F., Brittin, S.B., Sper, R., Fraga, M., Caixeta, L., *et al.* (2010). Association between uterine disease and indicators of neutrophil and systemic energy status in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 93(7): 2926-2937.
- González, F.D., Muiño, R., Pereira, V., Campos, R. and Benedito, J.L. (2011). Relationship among blood indicators of lipomobilization and hepatic function during early lactation in high-yielding dairy cows. *Journal of Veterinary Science*, 12(3): 251-255.
- Grummer, R.R. (1995). Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *Journal of Animal Science*, 73(9): 2820-2833.
- Hammon, D., Evjen, I.M., Dhiman, T.R., Goff, J.P. and Walters, L.J. (2006). Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 113(1-2): 21-29.
- Hayden, M.S. and Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF- $\kappa$ B signaling. *Cell*, 132(3): 344-362.
- Hayden, M.S., West, A.P. and Ghosh, S. (2006). NF- $\kappa$ B and the immune response. *Oncogene*, 25(51): 6758-6780.
- Herdt, T.H. (2000). Ruminant adaptation to negative energy balance: Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16(2): 215-230.
- Hybertson, B.M., Gao, B., Bose, S.K. and McCord, J.M. (2011). Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Molecular Aspects of Medicine*, 32(4-6): 234-246.
- Ji, L.L., Gomez-Cabera, M.C. and Vina, J. (2006). Exercise and hormesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1067(1): 425-435.
- LeBlanc, S.J., Osawa, T. and Dubuc, J. (2011). Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 76(9): 1610-1618.

- Leopold, J. A. and Loscalzo, J. (2009). Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(12): 1673-1706.
- Li, X., Chen, H., Lei, L., Liu, J., Guan, Y., Liu, Z., *et al.* (2013). Non-esterified fatty acids activate the AMP-activated protein kinase signaling pathway to regulate lipid metabolism in bovine hepatocytes. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 67(3): 1157-1169.
- Li, Y., Ding, H.Y., Wang, X.C., Feng, S.B., Li, X.B., Wang, Z., *et al.* (2016). An association between the level of oxidative stress and the concentrations of NEFA and BHBA in the plasma of ketotic dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 100(5): 844-851.
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., *et al.* (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, 13: 757-772.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D. and Sun, S.C. (2017). NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2: 17023.
- Mezzetti, M., Cattaneo, L., Maria Passamonti, M., Lopreiato, V., Minuti, A. and Trevisi, E. (2021). The Transition Period Updated: A Review of the New Insights into the Adaptation of Dairy Cows to the New Lactation. *Dairy*, 2(4): 617-636.
- Morgan, M.J. and Liu, Z.G. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling. *Cell Research*, 21(1): 103-115.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. and Lehninger, A.L. (2005). *Principles of biochemistry*. 4th ed., USA: New York, Freeman, pp: 600-622.
- Niu, Q., Cao, M., Chen, S., Zhao, Y., Li, C. and Zhou, X. (2019). Effective and economical column-based method for RNA isolation from animal cells. *Biotechnology Letters*, 41(8-9): 915-920.
- Ospina, P.A., Nydam, D.V., Stokol, T. and Overton, T.R. (2010). Evaluation of nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: critical thresholds for prediction of clinical diseases. *Journal of Dairy Science*, 93(4): 546-554.
- Pedernera, M., Celi, P., García, S.C., Salvin, E.H., Barchia, I. and Fulkerson, W.J. (2010). Effect of diet, energy balance and milk production on oxidative stress in early-lactating dairy cows grazing pasture. *The Veterinary Journal*, 186(3): 352-357.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids Research*, 29(9): 45-49.
- Puchalska, P. and Crawford, P.A. (2017). Multi-dimensional roles of ketone bodies in fuel metabolism, signaling, and therapeutics. *Cell Metabolism*, 25(2): 262-284.
- Puppel, K., Gołębiewski, M., Solarczyk, P., Grodkowski, G., Słószarz, J., Kunowska-Słószarz, M., *et al.* (2019). The relationship between plasma  $\beta$ -hydroxybutyric acid and conjugated linoleic acid in milk as a biomarker for early diagnosis of ketosis in postpartum Polish Holstein-Friesian cows. *BMC Veterinary Research*, 15(1): 367.
- Romagnoli, M., Gomez-Cabrera, M.C., Perrelli, M.G., Biasi, F., Pallardo, V.F., Sastre, J., *et al.* (2010). Xanthine oxidase-induced oxidative stress causes activation of NF- $\kappa$ B and inflammation in the liver of type I diabetic rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(2): 171-177.
- Sadeghi-nasab, A., Hassanpour, A., Sabaghsaray, H. and Amiri-Sadeghan, S. (2011). Assessment of thyroid hormones, insulin and magnesium in dairy cattle with subclinical ketosis. *Journal of Veterinary Clinical Pathology*, 5(2): 1149-1159. [In Persian]
- Senoh, T., Oikawa, S., Nakada, K., Tagami, T. and Iwasaki, T. (2019). Increased serum malondialdehyde concentration in cows with subclinical ketosis. *Journal of Veterinary Medical Science*. 81: 817-820.
- Shi, X., Li, D., Deng, Q., Li, Y., Sun, G., Yuan, X., *et al.* (2015). NEFAs activate the oxidative stress-mediated NF- $\kappa$ B signaling pathway to induce inflammatory response in calf hepatocytes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 145(8): 103-112.
- Sordillo, L.M. and Aitken, S.L. (2009). Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128(1-3): 104-109.



- Sordillo, L.M. and Raphael, W. (2013). Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 29(2): 267-278.
- Stokol, T. and Nydam, D.V. (2006). Effect of hemolysis on nonesterified fatty acid and beta-hydroxybutyrate concentrations in bovine blood. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18(5): 466-469.
- Suriyasathaporn, W.S., Heuer, C.H., Noordhuizen-Stassen, E.N. and Schukken, Y.H.S. (2000). Hyperketonemia and the impairment of udder defense: a review. *Veterinary Research*, 31(4): 397-412.
- Turk, R., Juretić, D., Gereš, D., Svetina, A., Turk, N. and Flegar-Mestric, Z. (2008). Influence of oxidative stress and metabolic adaptation on PON1 activity and MDA level in transition dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 108(1-2): 98-106.
- Turk, R., Juretić, D., Gereš, D., Turk, N., Simeon-Rudolf, V., Rekić, B., *et al.* (2005). Oxidative stress in dairy cows—serum paraoxonase activity related to hepatomegaly. *Croatica Chemica Acta*, 78(3): 375-378.
- Wang, D., Yu, D., Zhao, C., Xia, C., Xu, C. and Wu, L. (2021). Subclinical ketosis risk prediction in dairy cows based on prepartum metabolic indices. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 73(1): 11-17.
- Wankhade, P.R., Manimaran, A., Kumaresan, A., Jeyakumar, S., Ramesha, K.P., Sejian, V., *et al.* (2017). Metabolic and immunological changes in transition dairy cows: A review. *Veterinary World*, 10(11): 1367-1377.
- Weisberg, S.P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K., *et al.* (2006). CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *Journal of Clinical Investigation*, 116(1): 115-124.
- Wree, A., Schlattjan, M., Bechmann, L.P., Claudel, T., Sowa, J.P., Stojakovic, T., *et al.* (2014). Adipocyte cell size, free fatty acids and apolipoproteins are associated with non-alcoholic liver injury progression in severely obese patients. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 63(12): 1542-1552.