DOI: 10.22055/IVJ.2020.219105.2230
DOR: 20.1001.1.17356873.1400.17.4.10.7

تأثیر فعالیت سرمی کاتالاز و سوپراکسید دسموتاز بر کتوز تحت بالینی و نرخ آبستنی در اولین تلقیح در گاوهای شیری هلشتاین

نسرین موسوی‌تاشار[۱]، مریم کریمی‌دهکردی[۲*] و محمدرضا ناظم[۲]

[۱] دانش‌آموخته دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
[۲] استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

دریافت:۱۳۹۸/۱۱/۲۳ پذیرش: ۱۳۹۹/۴/۳

چکیده

یکی از ناهنجاری‌های متابولیکی که در اثر اختلال در متابولیسم انرژی در اوایل دوره‌ی شیردهی به وجود می‌آید، بیماری کتوز است. جمعیت مورد مطالعه، ۴۵ رأس گاو شیری پر تولید نژاد هلشتاین بین ۳ تا ۵ شکم زایش از مزارع پرورش گاوهای شیری در توابع استان اصفهان می‌باشد. نمونه خون هر گاو ۲۱-۷ روز بعد از زایمان اخذ و نمونه‌های سرمی تهیه گردید. اندازه‌گیری بتاهیدروکسی بوتیرات (β- hydroxybutyrate; BHBA) توسط کیت رندوکس، فعالیت سوپراکسید دسموتاز به روش nitroblue tetrazolium (NBT) و فعالیت کاتالاز سرم به کمک شیوه‌ی پیشنهادی Goth (۱۹۹۱) انجام شد. پس از انجام تست کلین و تایید سلامت دستگاه تناسلی به روش اولترا سونوگرافی، برنامه‌ی همزمانی تخمک‌گذاری برای همه‌ی گاوها اجرا شد. در ۴۵ تا ۵۰ روز بعد از زایمان، اولین تلقیح انجام و در همین زمان با استفاده از دستگاه سونوگرافی تونیسیته رحم و وضعیت تخمدان‌ها از نظر قطر فولیکولی ارزیابی گردید. همچنین حضور یا عدم حضور علایم فحلی هم در تمامی گاوها ثبت شد. در ۳۲ روز پس از تلقیح نیز وضعیت آبستنی گاوها توسط دستگاه اولترا سونوگرافی تشخیص و ثبت گردید. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که غلظت سوپراکسید دسموتاز (P= ۰/۰۴) و کاتالاز (P= ۰/۰۸) در گاوهای شیری مبتلا به کتوز تحت بالینی نسبت به گاوهای سالم کاهش داشته است، همچنین میزان BHBA در گاوهای آبستن با اولین تلقیح به طور معنی‌داری کمتر از گاوهای غیر آبستن بود. به طور کلی می‌توان چنین نتیجه گرفت که شاخص‌های استرس اکسیداتیو می‌تواند به عنوان بیومارکرهای امیدوار کننده‌ای برای پیشگویی کتوز تحت بالینی در گاوهای شیری در دوره‌ی پس از زایمان باشد.

کلمات کلیدی: کتوز، گاو شیری، آنتی اکسیدان، استرس اکسیداتیو

مقدمه

رادیکال‌ها و متابولیت‌های فعال اکسیژن در حالت طبیعی و شرایط فیزیولوژیک در بدن تولید می‌شوند که اولین سطح دفاعی بدن در برابر این ترکیبات، وجود یک شبکه‌ی آنتی-اکسیدانی قوی در بدن می‌باشد. آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند الکترون مورد نیاز برای رادیکال‌های فعال اکسیژن را فراهم نموده و واکنش‌پذیری آن‌ها را در شرایط کنترل شده خنثی نمایند (Birben et al, 2012). به کمک آنتی‌اکسیدان‌ها و واکنش‌های بیوشیمیایی سیستم آنتی‌اکسیدانی، اکسیدان‌ها به ماکرو مولکول‌های سلولی بی‌ضرر برای سلول و بدن تبدیل می‌گردند. در این روند، آنتی‌اکسیدان‌ها به ناچار اکسید شده

*نویسنده مسئول : مریم کریمی‌دهکردی، استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
E-mail: ma_karimivet58@yahoo.com

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

و سپس به واسطه‌ی یک سری از واکنش‌ها و فرآیندهای سلولی خاص تبدیل به فرم غیرفعال (فرم سکون) می‌شوند. این قدرت دریافت، ملاک اصلی ارزش‌گذاری یک آنتی-اکسیدان و تعیین کننده‌ی قدرت شبکه آنتی‌اکسیدانی بدن می‌باشد (Marnett, 1999; Valko et al, 2006). در شرایطی که وضعیت سلامت بدن طبیعی می‌باشد، یک توازن بسیار مهمی بین میزان تولید متابولیت‌های فعال اکسیژن با فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن وجود دارد. بدن به منظور مقابله با رادیکال‌های آزاد تولید شده و جلوگیری از بروز آسیب‌های اکسیداتیو، مجهز به یک سیستم قوی و پیچیده‌ی آنتی‌اکسیدانی شامل سیستم دفاع آنزیمی (شامل آنتی-اکسیدان‌های با وزن مولکولی بالا نظیر کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز، دهیدرو آسکوربیک اسید ردوکتاز، گلوتاتیون ردوکتاز، سوپراکسید دسموتاز) و سیستم دفاعی غیرآنزیمی (آنتی‌اکسیدان‌های با وزن مولکولی پایین مانند آلبومین، سرولوپلاسمین و فریتین و نیز میکرو مولکول‌هایی مانند اسیدآسکوربیک (ویتامین C). آلفاتوکوفرول، بتاکاروتن، کاروتنوئید، گلوتاتیون أحیا شده، ملاتونین، پلی فنول‌ها، اسید اوریک، بیلی‌روبین، تیوردوکسین و سایر ریز مغذی‌های کمیاب) می‌باشد (Kinnula and Crapo, 2003; Castilo et al, 2003; Zelko et al, 2002). وجود مقدار کافی از هر یک از آنتی‌اکسیدان‌ها به منظور حفظ عملکرد طبیعی بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی بدن و جلوگیری از آسیب‌های وارده توسط رادیکال‌های آزاد به بافت‌ها و سلول‌های بدن ضروری می‌باشد.

علی‌رغم وجود سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی قوی در بدن و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد تولید شده، در برخی موارد تعادل بین میزان تولید رادیکال‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (Reactive Oxygen Species; ROS) و فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن به هم خورده و بالانس منفی انرژی ایجاد می‌شود که به دنبال به هم خوردن این تعادل مهم و سازنده، صدمات زیادی ناشی از آسیب‌های اکسیداتیو در سلول‌ها (آپوپتوز یا نکروز سلولی) و بافت‌های بدن (آسیب ساختاری بافت) ایجاد می‌شوند (Birben et al, 2012).

بررسی‌های مختلف نشان داده است که افزایش متابولیت‌های فعال اکسیژن در بدن می‌تواند منجر به بروز بیماری‌های متابولیکی مختلف، بیماری‌های تولید مثلی، التهاب‌ها، مسمومیت‌ها و سایر اختلالات بیولوژی گردد و ارتباط آماری مستقیم و معنی‌داری بین میزان بروز بیماری‌های متابولیکی و تولید اکسیدان‌ها یا ROS در بدن وجود دارد (Roche et al, 2006; Walsh et al, 2007; Mellado et al, 2018; Garro et al, 2014). یکی از مهمترین ناهنجاری‌های متابولیکی که در اثر اختلال در متابولیسم انرژی در اوایل دوره‌ی شیردهی به ویژه در گاوهای پرتولید، آبستنی‌های دوقلو و یا گرسنگی‌های شدید به وجود می‌آید بیماری کتوز می‌باشد. مبنای بروز این عارضه اختلال در روند سوخت و ساز بدن بوده که عمدتاً به دلیل کاهش سطح گلوکز خون، کاهش گلیکوژن کبدی و افزایش تولید اجسام کتونی به وجود می‌آید. این بیماری می‌تواند باعث کاهش تولید شیر، بی‌اشتهایی، کاهش میزان پروتئین شیر، کاهش وزن بدن، افزایش ناباروری و نیز جابجایی شیردان شود. در این بیماری، کاهش میزان قند خون و تغییرات هورمونی ایجاد شده به خصوص کمبود انسولین موجب بروز اختلالات متابولیسمی نظیر گلیکوژنولیز، لیپولیز، بتا اکسیداسیون چربی‌ها، گلوکونئوژنز و کتوژنز شده و در نهایت موجب جابجایی چربی‌ها و افزایش تولید اجسام کتونی (مانند اسیداستواستیک، استون و BHBA) در بدن می‌گردد (Duffield, 2006; Epperson, 2005; Radostits and Blood Henderson, 2000).

با توجه به این که هنوز مقیاس دقیق و مطمئنی برای اندازه‌گیری میزان رفاه و سطح سلامتی حیوانات تعریف نشده است، استفاده از پارامترهای سیستم دفاع آنتی-اکسیدانی می‌تواند یک رهیافت دقیق برای تعیین وضعیت سلامتی دام و تعیین میزان استرس اکسیداتیو در آنها باشد. امروزه توجه پژوهشگران و متولیان بهداشت جامعه معطوف به شناسایی مکانیسم‌های ژنتیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ایجاد کننده بیماری‌های متابولیک گردیده و به دنبال شناسایی علل اصلی ایجاد کننده و بالانس منفی

انرژی، تشخیص منابع داخلی و خارجی ROS در بدن، تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن، تعدیل تاثیرات منفی استرس اکسیداتیو در مسیرهای سیگنالینگ سلولی و ماکرو مولکول‌های مهم بدن (DNA، پروتئین‌ها و لیپیدها) می‌باشند. به نظر می‌رسد که با تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن و متعادل نگه داشتن بالانس انرژی به ویژه در دوره‌ی خشکی و دوره‌ی ابتدایی پس از زایمان بتوان شیوع بیماری‌های متابولیکی در گاوهای شیری را کاهش داد و از وارد شدن آسیب‌های اقتصادی به صنعت دامداری و پیکره-ی سیستم دامپزشکی جلوگیری نمود. این مطالعه به بررسی مقادیر سرمی آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز و ارتباط آنها با میزان شیوع کتوز تحت بالینی و نرخ آبستنی در اولین تلقیح در گاوهای شیری هلشتاین پرداخته است. در صورت تعیین مقادیر دقیق این ترکیبات و تأمین عناصر مورد نیاز برای دام می‌توان سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن را تقویت نمود و از استرس اکسیداتیو و متعاقب آن بروز بسیاری از بیماری‌های متابولیکی و تولید مثلی در گاوهای شیری پیشگیری نمود.

مواد و روش کار

جمعیت مورد مطالعه

جمعیت مورد مطالعه ۴۵ رأس گاو شیری هلشتاین ۳ تا ۵ شکم زایش و پر تولید با رکورد شیر ۳۸ کیلوگرم در روز از مزارع پرورش گاوهای شیری توابع استان اصفهان که تغذیه‌ی آن‌ها به روش TMR بوده، می‌باشد.

اندازه‌گیری پارامترهای مختلف در سرم

نمونه خون هر گاو ۷-۲۱ روز بعد از زایمان اخذ گردید و در لوله‌های آزمایش بدون EDTA و در مجاورت یخ نگهداری و جهت جداسازی سرم، سانترفیوژ شدند (با دور ۱۷۰۰به مدت ۵ دقیقه). نمونه‌های سرمی تا زمان اندازه‌گیری فاکتورها در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. سرم حاصل در کنار یخ به آزمایشگاه دامپزشکی رویان‌پژوه شهرکرد برای اندازه‌گیری BHBA، کاتالاز و سوپراکسید دسموتاز منتقل و در آزمایشگاه با استفاده از کیت‌های تجاری موجود در بازار و به کمک دستگاه اتوآنالایزر اندازه‌گیری شدند.

بیماری کتوز تحت‌بالینی نیز با اندازه‌گیری سطح بتاهیدروکسی‌بوتیرات در سرم شناسایی و تایید شد. غلظت ترکیب مذکور با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر BT-3000 (Biotechnica, Biotecnica Instruments, Italy) و به کمک کیت رندوکس (Randox, Randox Laboratories Ltd, United Kingdom) اندازه‌گیری شد.

فعالیت سوپراکسید دسموتاز با استفاده از کیت بیورکس پارس (Pars Biorex, Iran) و دستگاه اسپکتروفوتومتر (UNICO 2150-UV Spectrophotometer, China)، به روش nitroblue tetrazolium (NBT) اندازه‌گیری شد. در این روش رادیکال‌های سوپراکسید موجب تبدیل NBT به NBTH2 آبی رنگ می‌شوند. با افزودن سرم به محیط آزمایشگاه تولید رنگ آبی به وسیله‌ی سوپراکسید دسموتاز مهار می‌شود. با سنجش تغییر رنگ ایجاد شده در طول موج ۵۶۰ نانومتر، فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز بر حسب درصد مهار تولید NBTH2 گزارش گردید (Sun et a, 1988).

فعالیت آنزیم کاتالاز نمونه‌ها توسط شیوه پیشنهادی Goth (۱۹۹۱) مورد سنجش قرار گرفت. در این شیوه آنزیم کاتالاز در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و pH= ۷/۴ سوبسترای خود آب اکسیژنه را تجزیه می‌کند. باقی‌مانده‌ی آب اکسیژنه موجود در محیط با آمونیوم‌مولیبدات واکنش داده و کمپلکسی زرد رنگ تولید می‌کند که جذب آن در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده می‌شود. یک واحد فعالیت آنزیم در این روش میزانی از آنزیم است که بتواند در مدت زمان یک دقیقه یک میکرومول از آب اکسیژنه را در شرایط گفته شده تجزیه کند (Goth 1991).

مدیریت تولید مثلی

پس از انجام تست کلین (۳۲ روز پس از زایمان) و تایید سلامت دستگاه تناسلی به روش اولترا سونوگرافی B-mode

(بارین، یکتا صنعت ناجی، اصفهان، ایران)، برنامه‌ی همزمانی تخمک گذاری به روش Ovsynch (Ovulation Synchronization) برای همه‌ی گاوها اجرا شد. در این روش، روز صفر تزریق GnRh (Gonadotropin Release Hormone)، روز ۷ تزریق PGF2α (Prostaglandin F2α)، روز ۹ تزریق GnRH و ۲۰-۱۲ ساعت بعد، تلقیح اجباری صورت گرفت. طبق برنامه همزمان سازی ذکر شده، در ۴۵ تا ۵۰ روز بعد از زایمان اولین تلقیح انجام شد و در زمان تلقیح، تونیسیته رحم از طریق رکتال بررسی شد و همچنین وضعیت تخمدان‌ها از نظر قطر فولیکولی با دستگاه اولتراسونوگرافی ارزیابی گردید. همچنین حضور یا عدم حضور علایم فحلی هم در تمامی گاوها ثبت شد. در ۳۲ روز پس از تلقیح نیز وضعیت آبستنی گاوها توسط دستگاه اولترا سونوگرافی به روش B-mode تشخیص و ثبت گردید.

آنالیز آماری

داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. به منظور مقایسه‌ی میانگین پارامترها (کاتالاز و سوپراکسید دسموتاز) در دو گروه گاوهایی با مقادیر متفاوت BHBA و همچنین مقایسه‌ی میانگین پارامترها (BHBA، کاتالاز و سوپراکسید دسموتاز) در دو گروه گاوهای آبستن و غیر آبستن با اولین تلقیح، از مدل‌های آماری T-test استفاده گردید. نرمالیته‌ی توزیع داده‌ها توسط آزمون کولموگرو اسمیرنف ارزیابی گردید. برای مقایسه‌ی میانگین دو گروه با توزیع نرمال از آزمون independent Sample T-test استفاده شد. در مواردی که توزیع داده‌ها نرمال نبود از آزمون Mann-Whitney U-Test استفاده شد. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار محسوب می‌شود.

نتایج

شیوع کتوز تحت بالینی

با توجه به گزارش محققین، تعیین نقطه برش غلظت سرمی BHBA برای کتوز تحت بالینی بسته به شرایط محیطی و فیزیولوژیکی مختلف متفاوت بوده و نقطه برش ۷۰۰-۱۷۰۰ میکرومول در لیتر برای کتوز تحت بالینی مطرح شده است. Rook در سال ۲۰۰۰ برش۸۰۰، Whitaker و همکاران در سال ۱۹۹۳ آستانه ۱۰۰۰، Geishauser و همکاران در سال ۲۰۰۰، Padilla و همکاران در سال ۲۰۰۵ مرز ۱۲۰۰، Duffield در سال ۲۰۰۴ برش ۱۴۰۰، Al-Rawashdeh در سال ۱۹۹۱ و Radostits و همکاران در سال ۲۰۰۷ آستانه ۱۷۰۰ میکرومول در لیتر را به عنوان کتوز تحت بالینی ثبت کرده‌اند.

در مطالعه‌ی ما شیوع کتوز تحت بالینی با در نظر گرفتن حد آستانه‌ی ۱۲۰۰ میکرومول بر لیتر برای BHBA، فقط ۴/۴ درصد بود (۲ مورد در ۴۵ رأس گاو) که پایین‌تر از رنجی است که در منابع منتشر شده است (Oetzel, 2004). شیوع‌های بالاتر معمولا مربوط به گله‌های شیری پرتولید یا با تولید شیر بالاتر هستند، این حیوانات ممکن است توان ژنتیکی بیشتری برای تولید شیر بالا داشته باشند که می‌تواند بالانس منفی انرژی را تشدید کند و منجر به کتوز تحت بالینی در اوایل شیرواری شود. تعدادی مطالعات همچنین حد آستانه‌ی پایین‌تری برای BHBA خون به منظور تعیین کتوز تحت بالینی در نظر می‌گیرند و می‌توانند شیوع کتوز تحت بالینی را بالاتر تخمین بزنند (Walsh et al, 2007; Goldhawk et al, 2009). همچنان که در مطالعه‌ی ما هم با در نظر گرفتن حد آستانه ۱۰۰۰ میکرومول بر لیتر برای BHBA شیوع کتوز تحت بالینی ۲۴/۴ درصد (۱۱ مورد در ۴۵ رأس گاو) تعیین گردید که می‌تواند معقول باشد. بر همین اساس در مطالعه‌ی حاضر آستانه‌ی ۱۰۰۰ برای تفریق گاوهای مبتلا به کتوز تحت بالینی از گاوهای سالم در نظر گرفته شد.

میانگین پارامترهای مورد مطالعه در ۴۵ گاو

میانگین غلظت‌های BHBA، سوپراکسید دسموتاز و کاتالاز در ۴۵ گاو مورد مطالعه در Table 1 نمایش یافته است.

Table 1. Mean±SD concentration of different parameters in the studied cows (n = 45)

Parameter	Mean±SD
BHBA (µmol/L)	880±0.33
SOD (%)	36.4±3.8
Katalase (U/L)	12.07±1.1

ارتباط کتون بادی‌ها (BHBA) با آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دسموتاز

در این مطالعه‌ی گاوها بر اساس مقدار BHBA به دو گروه بیشتر یا مساوی ۱۰۰۰ (گروه اول) و کمتر از ۱۰۰۰ (گروه دوم) تقسیم شدند و میانگین کاتالاز و سوپراکسید دسموتاز دراین دو گروه مقایسه گردید. میزان سوپراکسید دسموتاز در گاوهای بیمار به طور معنی‌داری کمتر از گاوهای سالم بود (P=۰/۰۴). کاتالاز نیز در گاوهای بیمار کمتر از گاوهای سالم بود هر چند این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نگردید (P=۰/۰۸) (Table 2).

Table 2. Mean±SD of different parameters in cows with different BHBA (µmol/L) values

BHBA (µmol/L)	≥1000 (n=11)	<1000 (n=34)	P-Value
SOD (%)	34.4±4.3	37.1±3.53	0.04
Katalase (U/L)	11.5±1.3	12.2±1.08	0.08

ارتباط کتون بادی‌ها و آنزیم‌های مورد مطالعه با آبستنی در اولین تلقیح

گاوهای مورد مطالعه بر اساس آبستنی در اولین تلقیح به دو گروه آبستن (n=۱۷) و غیر آبستن (n=۲۸) تقسیم شدند (Table 3). از بین ۴۵ گاو مورد مطالعه، ۱۷ گاو با اولین تلقیح آبستن شدند، میزان آبستنی در اولین تلقیح ۳۷/۷ درصد بود. مقدار BHBA در گاوهای آبستن به طور معنی‌داری کمتر از گاوهای غیر آبستن بود (P=۰/۰۰۸). سوپراکسید دیسموتاز در گاوهای آبستن بالاتر از گاوهای غیر آبستن بوده، هر چند این اختلاف معنی دار نیست (P =۰/۱). کاتالاز در هر دو گروه مشابه و اختلاف معنی-داری دیده نشد.

Table 3. Mean±SD concentrations of different parameters in pregnant and non-pregnant cows at first insemination

Parameter	Conceived (n=17)	Non conceived (n=28)	P-Value
BHBA (µmol/L)	780±0.15	940±0.28	0.008
SOD (%)	37.5±3.6	35.8±3.8	0.1
Katalase (U/L)	12.2±1.2	12±1.08	0.5

ارتباط بین آنزیم‌های مورد مطالعه و بروز علائم فحلی در زمان تلقیح

گاوها بر اساس نشان دادن علائم فحلی در زمان تلقیح به دو گروه ۱ (حضور علائم فحلی) و ۲ (عدم حضور علائم فحلی) تقسیم و میانگین و انحراف معیار آبستنی در اولین تلقیح در دو گروه مذکور محاسبه و در جدول Table 4 ثبت گردید.

Table 4. Mean±SD concentration of studied parameters based on incidence (group 1) or lack of estrus symptoms (group 2) at insemination time

Parameter	Group 1 (n=24)	Group 2 (n=21)	P-Value
SOD (%)	37.8±3.06	34.9±4.1	0.007
Katalase (U/L)	11.8±1.1	12.3±1.1	0.1
First Service Conception Rate	0.38±0.4	0.38±0.4	0.9
BHBA (µmol/L)	830±0.23	940±0.24	0.1

میزان سوپراکسید دسموتاز در گروهی که علائم فحلی را نشان دادند به طور معنی‌داری بیشتر از گروه دیگر بود. در مورد کاتالاز و BHBA اختلاف معنی‌داری بین دو گروه مشاهده نشد. همچنین میزان آبستنی با اولین تلقیح در دو گروه تفاوت معنی‌داری نداشتند (Table 4).

ارتباط بین آنزیم‌های مورد مطالعه با سایز فولیکول تخمدان در گاوهای مورد مطالعه

گاوها بر اساس قطر فولیکول‌های تخمدانی در زمان تلقیح به دو گروه بیشتر یا مساوی ۱/۷ سانتی‌متر و کمتر از

۱/۷ سانتی‌متر تقسیم شدند. مقادیر BHBA و آنزیم‌های مورد مطالعه در دو گروه بالا اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند (Table 5).

Table 5. Mean±SD concentration of different parameters in cows with different follicular size

Follicular size	≥1.7 cm (n=30)	<1.7 cm (n=15)	P-value
SOD (%)	36.9±3.5	35.5±4.3	0.07
Katalase (U/L)	12.1±1.2	12.01±0.96	0.7
BHBA (µmol/L)	860±0.26	910±0.17	0.5

بحث

مطالعات زیادی تاثیرات منفی افزایش این متابولیت یا هایپرکتونمی پس از زایمان را بر عملکرد تولید مثلی نشان داده‌اند. مشخص شده است که کتوز تحت بالینی در اوایل شیرواری با تأخیر در اوولاسیون و افزایش فاصله بین زایش تا آبستنی بعدی، منجر به نقص کارایی تولید مثلی در ۵۰ تا ۱۰۰ روز بعدی می‌شود (Reist et al, 2003). Oikonomou و همکاران در سال ۲۰۰۸ همبستگی منفی بین BHBA خون و کارایی تولید مثلی گاوهای هلشتاین مشاهده شده و همچنین غلظت BHBA خون با میزان آبستنی، شروع مجدد سیکل تخمدانی در ۳۰ روزگی شیرواری و آبستنی در فاصله ۸۰ روزگی از زایمان دارای همبستگی منفی و معنی‌دار بوده است (Oikonomou et al, 2008). نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر همسو و موافق با دو مطالعه‌ی فوق می‌باشد.

مطالعه‌ی Walsh و همکاران در سال ۲۰۰۷ یکی از مطالعاتی است که ارتباط بین غلظت این متابولیت در خون با احتمال آبستنی در اولین تلقیح در آن مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعه غلظت BHBA از سه هفته قبل تا ۹ هفته پس از زایمان (در هفته‌های اول، دوم، سوم، ششم، نهم) اندازه‌گیری شده و نشان دادند که گاوهای غیر آبستن نسبت به گاوهای آبستن از غلظت BHBA بالاتری در قبل از زایمان تا سه هفته بعد از زایمان برخوردار هستند. در این مطالعه اظهار داشتند که بالاتر رفتن BHBA خون به بیش از ۱۰۰۰ میکرومول بر لیتر در هفته‌ی اول پس از زایمان، احتمال آبستنی گاو در اولین تلقیح را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد (Walsh et al, 2007). چنین ارتباطی در مطالعه‌ی حاضر هم مشاهده گردید.

در این مطالعه، گاوهای مبتلا به کتوز (بالا بودن BHBA) در مقایسه با گاوهای سالم، از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پایین‌تری برخوردار بودند. زمانی که گاو در بالانس منفی انرژی قرار می‌گیرد (بالا بودن BHBA خون) به دلیل کاهش اشتها، منابع روی، آهن و مس در بدن که عناصری مهم در ساختار آنزیم‌های آنتی اکسیدانی هستند، کاهش می‌یابد، لذا آنزیم‌های مورد مطالعه (SOD و کاتالاز) نیز کاهش یافته و در اثر بهم خوردن تعادل رادیکال‌های آزاد و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، استرس اکسیداتیو رخ می‌دهد. از طرفی کاهش ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC) به طور اختصاصی، کاتالاز و SOD ممکن است مربوط به تخلیه‌ی آنتی‌اکسیدان‌های محلول در چربی از طریق شیر باشد که در گاوهای پر تولید که بیشتر در معرض بالانس منفی انرژی هستند رخ می‌دهد. همچنین کتون بادی‌ها که در کتوز تحت بالینی افزایش می‌یابند نیز می‌توانند در افزایش تولید رادیکال‌های آزاد یا کاهش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نقش داشته باشند (Castillo et al, 2006).

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که غلظت سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در گاوهای شیری مبتلا به کتوز تحت بالینی نسبت به گاوهای سالم کاهش داشته است، هر چند این افزایش در مورد کاتالاز معنی‌دار نبود (p=۰/۰۸). در تأیید نتایج مطالعه‌ی حاضر افزایش غلظت سرمی مالون دی آلدهید در بیماری هایپر کتونمی در انسان (Shen et al, 2009) و در گاو (Sahoo et al, 2009)، بوفالو (Youssef et al, 2010) و میش (Al-Qudah, 2011) نشان داده شده است.

در مطالعه‌ی دیگری Li و همکاران در سال ۲۰۱۶ تایید نمودند که ارتباط مستقیم و معنی‌داری بین استرس اکسیداتیو با غلظت NEFA و BHBA در گاوهای شیری مبتلا به کتوز وجود دارد. نتایج این مطالعه نشان داد که

گاوهای مبتلا به کتوز دچار کاهش معنی‌دار در کاتالاز و افزایش MDA می‌باشند (Li et al, 2016). آنها اظهار داشتند که بیومارکرهای استرس اکسیداتیو می‌تواند به عنوان بیومارکرهای امیدوار کننده‌ای برای پیش‌گیری کتوز تحت بالینی در گاوهای شیری در دوره‌ی پس از زایمان باشد.

در مطالعه‌ی Karimi و همکاران در سال ۲۰۱۶ مشخص شد که مقادیر سرمی ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در گاوهای مبتلا به کتوز تحت بالینی به طور معنی‌داری نسبت به گاوهای سالم کاهش داشته که در تأیید نتایج مطالعه‌ی حاضر می‌باشد (Karimi et al, 2016).

در دوره‌ی پس از زایمان گاوها وارد مرحله‌ای از بالانس منفی انرژی می‌شوند که باعث ایجاد مسیرهای متابولیک در سطح سلول می‌گردد به طوری که تولید رادیکال‌های آزاد را افزایش داده و شرایط استرس اکسیداتیو به وجود می‌آید (Celi, 2011b; Pedernera et al, 2010). به نظر می‌رسد استرس اکسیداتیو در ایجاد و پیشرفت تعدادی از رویدادهای تولید مثلی هم در انسان و هم در حیوان مثل لقاح و مرحله‌ی اولیه‌ی رشد و توسعه‌ی جنین نقش داشته باشد (Al-Gubory et al, 2010)، علاوه بر این احتمالا استرس اکسیداتیو مسئول برخی آسیب‌های رویانی است که حتی منجر به مرگ رویان می‌شود (Agarwal et al, 2005; Guerin et al, 2001). تولید پیشرونده‌ی ROS می‌تواند غشاهای سلولی جسم زرد را که برای حفظ آبستنی ضروری است، آسیب برساند و بر تولید پروژسترون اثر بگذارد (Kato et al, 1997). این شرایط ممکن است منجر به نارسایی در رشد رویان، جنین، افزایش روزهای باز و افزایش فواصل بین زایمان‌ها شود. اخیراً نقش استرس اکسیداتیو در پیامدهای آبستنی در انسان به میزان زیادی مورد توجه قرار گرفته است (Agarwal et al, 2005; Al-Gubory et al, 2010)، اما رابطه‌ی بین استرس اکسیداتیو و آبستنی در گاوهای شیری کمتر مورد توجه محققین بوده است (Celi, 2011a). با این وجود استرس اکسیداتیو در نشخوار کنندگان به نظر می‌رسد که در تنظیم چندین عملکرد فیزیولوژیکی از جمله تولید مثل نقش داشته باشد (Celi, 2011b).

نتایج این مطالعه نشان داده که غلظت سرمی کاتالاز و SOD هیچ ارتباطی با آبستنی در اولین تلقیح ندارد که این مسأله مشابه با مشاهدات قبلی است (Celi, 2010). تغییرات بیومارکرهای استرس اکسیداتیو در سرم ممکن است به طور کمی، اصلاحات یا تعدیل اکسیداتیو بافت‌های تولید مثلی را منعکس نکند، مثلا سیستم آنتی‌اکسیدانی اصلی که یک رویان را از تولید فزاینده‌ی رادیکال‌های آزاد حمایت و محافظت می‌کند، ممکن است در خود رویان باشد و یا در محیط لوله‌های رحمی (Castilo et al, 2005). این احتمال وجود دارد که وضعیت آنتی‌اکسیدانی سیستمیک مادر نشان دهنده‌ی وضعیت اکسیداتیو رویان نباشد. با توجه به این که حفظ هموستاز بدن یک مسأله کاملا پیچیده است جهت روشن سازی نقش وضعیت اکسیداتیو بدن بر روی باروری گاوهای شیری تحقیقات بیشتری لازم است.

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان دهنده‌ی نقش استرس اکسیداتیو در بروز کتوز تحت بالینی بوده به طوری که مشاهده شد گاوهای سالم در مقایسه با گاوهای مبتلا به کتوز تحت بالینی از مقادیر بالاتری از آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی برخوردار بودند. همچنین احتمال آبستنی با اولین تلقیح به طور معنی‌داری در گاوهای سالم در مقایسه با گاوهای مبتلا به کتوز تحت بالینی، بالاتر می‌باشد که حاکی از کاهش آبستنی در اولین تلقیح در اثر بروز کتوز تحت بالینی است. از طرفی وضعیت اکسیداتیو (مقادیر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی) گاوهای شیری بر باروری پس از زایمان تأثیر نمی‌گذارد ولی می‌توان گفت در بروز علایم فحلی در زمان تلقیح تأثیرگذار است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از آقای دکتر محمد قاسمی، مدیر محترم آزمایشگاه رویان پژوه شهرکرد، به جهت همکاری در انجام آزمایشات تحقیق حاضر، تقدیر و تشکر می‌نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله هیچ گونه تعارض منافعی ندارند.

منابع مالی

منابع مالی این مقاله در قالب پایان نامه و توسط نویسندگان تامین شده است.

منابع

Agarwal, A., Gupta, S., and Sharma, R. K. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive biology and endocrinology*, 3 (1): 28.

Al-Gubory, K. H., Fowler, P. A., and Garrel, C. (2010). The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42 (10): 1634-1650.

Al-Qudah, K. M. (2011). Oxidant and antioxidant profile of hyperketonemic ewes affected by pregnancy toxemia. *Veterinary clinical pathology*, 40 (1): 60-65.

Al-Rawashdeh, O.F. (1999). Prevalence of ketonemia and associations with herd size, lactation stage, parity, and postparturient diseases in Jordanian dairy cattle. *Preventive veterinary medicine*, 40 (2): 117-125.

Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., and Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5 (1): 9-19.

Castillo, C. R. I. S. T. I. N. A., Hernández, J. O. A. Q. U. Í. N., López-Alonso, M. A. R. T. A., Miranda, M. A. R. T. A., and Luís, J. (2003). Values of plasma lipid hydroperoxides and total antioxidant status in healthy dairy cows: preliminary observations. *Archives Animal Breeding*, 46 (3): 227-233.

Castillo, C., Hernandez, J., Bravo, A., Lopez-Alonso, M., Pereira, V., and Benedito, J. L. (2005). Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *The Veterinary Journal*, 169 (2): 286-292.

Castillo, C., Hernandez, J., Valverde, I., Pereira, V., Sotillo, J., Alonso, M. L., and Benedito, J. L. (2006). Plasma malonaldehyde (MDA) and total antioxidant status (TAS) during lactation in dairy cows. *Research in veterinary Science*, 80 (2): 133-139.

Celi, P. (2010). The role of oxidative stress in small ruminants' health and production. Revista *Brasileira de Zootecnia*, 39: 348-363.

Celi, P. (2011a). Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 33 (2): 233-240.

Celi, P. (2011b). Oxidative stress in ruminants. In: Mandelker, L., Vajdovich, P. (Eds.), Studies on Veterinary Medicine: Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice, vol. 5. *Humana Press*, 191–231.

Duffield, T. F. (2006). Minimizing subclinical metabolic diseases in dairy cows. Adv. *Dairy Technology*, 18: 43-55.

Duffield, T. (2004). Monitoring strategies for metabolic disease in transition dairy cows. *Medecin Veterinaire Du Quebec*., 34: 34-35.

Epperson, W. B. (2005). Risk factors for metabolic disease. *Tri-State Dairy Nutrition Conference*, 31-35

Garro, C. J., Mian, L., and Cobos Roldán, M. (2014). Subclinical ketosis in dairy cows: prevalence and risk factors in grazing production system. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 98 (5): 838-844.

Geishauser, T., Leslie, K., Tenhag, J. and Bashiri, A. (2000). Evaluation of eight cow-side ketone tests in milk for detection of subclinical ketosis in dairy cows. *Journal of dairy science*, 83(2): 296-299.

Goth, L. (1991). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica chimica acta*, 196 (2-3): 143-151.

Guerin, P., El Mouatassim, S., and Menezo, Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human reproduction update*, 7 (2): 175-189.

Karimi, N., Mohri, M., Azizzadeh, M., Seifi, H. A., and Heidarpour, M. (2016). Relationships between trace elements, oxidative stress and subclinical ketosis during transition period in dairy cows. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*, 7 (2): 46-56.

Kato, H., Sugino, N., Takiguchi, S., Kashida, S., and Nakamura, Y. (1997). Roles of reactive oxygen species in the regulation of luteal function. *Reviews of reproduction*, 2 (2): 81-83.

Kinnula, V. L., and Crapo, J. D. (2003). Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 167 (12): 1600-1619.

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.

Marnett, L. J. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424 (1-2): 83-95.

Mellado, M., García, J. E., Véliz Deras, F. G., de Santiago, M. D. L. Á., Mellado, J., Gaytán, L. R., and Ángel-García, O. (2018). The effects of periparturient events, mastitis, lameness and ketosis on reproductive performance of Holstein cows in a hot environment. *Austral journal of veterinary sciences*, 50 (1): 1-8.

Oikonomou, G., Arsenos, G., Valergakis, G. E., Tsiaras, A., Zygoyiannis, D., and Banos, G. (2008). Genetic relationship of body energy and blood metabolites with reproduction in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 91 (11): 4323-4332.

Padilla, L., Shibano, K.I., Inoue, J., Matsui, T. and Yano, H. (2005). Plasma vitamin C concentration is not related to the incidence of ketosis in dairy cows during the early lactation period. *Journal of veterinary medical science*, 67(9): 883-886.

Pedernera, M., Celi, P., García, S. C., Salvin, H. E., 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.

Radostits, O. and Blood Henderson, J. A. (2000). *Veterinary Medicine. 9th ed. Baillertindall, Philadelphia*, 1452-1462.

Radostits, O.M., Gay, C., Hinchcliff, K.W. and Constable, P.D. (2007). A textbook of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs and horses. *Veterinary Medicine 10th edition Bailliere, Tindall, London*, UK, 1576-80.

Reist, M., Erdin, D. K., von Euw, D., Tschümperlin, K. M., Leuenberger, H., Hammon, H. M. et al. (2003). Postpartum reproductive function: association with energy, metabolic and endocrine status in high yielding dairy cows. *Theriogenology*, 59 (8): 1707-1723.

Roche, J. F. (2006). The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Animal reproduction science*, 96 (3-4): 282-296.

Rook, J.S. (2000). Pregnancy toxemia of ewes, does, and beef cows. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16 (2): 293-317.

Sahoo, S. S., Patra, R. C., Behera, P. C., and Swarup, D. (2009). Oxidative stress indices in the erythrocytes from lactating cows after treatment for subclinical ketosis with antioxidant incorporated in the therapeutic regime. *Veterinary research communications*, 33 (3): 281-290.

Shen, X. P., Zou, S. B., Wu, H. J., and Zhang, Y. (2009). The relationship between serum level of leptin and oxidative stress in patients with hyperglycemia crisis. *Zhongguo wei zhong bing ji jiu yi xue= Chinese critical care medicine= Zhongguo weizhongbing jijiuyixue*, 21 (6): 353-356.

Sun, Y.I., Oberley, L.W. and Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*, 34 (3):.497-500.

Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. M., and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160 (1): 1-40.

Walsh, R. B., Walton, J. S., Kelton, D. F., LeBlanc, S. J., Leslie, K. E., and Duffield, T. F. (2007). The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance of postpartum dairy cows. *Journal of dairy science*, 90 (6): 2788-2796.

Whitaker, D.A., Smith, E.J. and Kelly, J.M. (1993). Some effects of nutrition and management on the fertility of dairy cattle. *The Veterinary Record*, 133(3): 61-64.

Youssef, M. A., El-Khodery, S. A., El-deeb, W. M., and El-Amaiem, W. E. A. (2010). Ketosis in buffalo (Bubalus bubalis): clinical findings and the associated oxidative stress level. *Tropical animal health and production*, 42 (8): 1771-1777.

Zelko, I. N., Mariani, T. J., and Folz, R. J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 33 (3): 337-349.

Received:12.02.2020
Accepted:23.06.2020

Vol. 17, No. 4, Winter, 2022 **Original Article**

DOI: 10.22055/IVJ.2020.219105.2230
DOR: 20.1001.1.17356873.1400.17.4.10.7

The effect of serum catalase and superoxide dismutase activity on subclinical ketosis and conception rate at first service in Holstein dairy cows

Nasrin Mousavi Tashar[1], Maryam Karimi-Dehkordi[2*] and Mohammad Reza Nazem[2]

[1] DVM Graduate, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
[2] Assistant Professor, Department of clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Received:12.02.2020 Accepted:23.06.2020

Abstract

Today, the most important factor in the occurrence of metabolic and reproductive diseases in dairy cattle is the disturbance of natural process in the body's cellular-molecular events that occurs after increasing of oxidants and the formation of oxidative stress. Ketosis is one of the most important metabolic abnormalities caused by disruption of energy metabolism early in lactation. This study was carried out on 45 Holstein dairy cows (between 3 and 5) and high-yielding dairy farms of Isfahan province. Blood samples of each cow were taken 21-27 days after Parturition and serum samples were obtained. BHBA, catalase and superoxide dismutase, were measured. Ovulation synchronization protocol was performed for all cows after the Clean Test and confirmation of genital health by B-mode ultrasound. The first Artificial Insemination was performed at 45-50 days postpartum and at the same time, follicular diameter, ovarian status, and uterine tonicity were assessed by using rectal ultrasonography. Also, the presence or absence of estrus was recorded in all cows. At 32 days after artificial insemination, the cows were pregnancy diagnosed by rectal ultrasound. The results of the present study showed that the concentration of superoxide dismutase (P=0.04) and catalase (P=0.08) decreased in subclinical ketosis dairy cows compared to healthy cows, Also, BHBA concentration was lower significantly in pregnant cows than nonpregnant (P = 0.008). Finally, the results of this study confirm that oxidative stress biomarkers can be promising biomarkers for the prediction of subclinical ketosis in postpartum dairy cows.

Keyword: Ketosis, Dairy cow, Antioxidant, Oxidative Stress

* **Corresponding Author**: Maryam Karimi-Dehkordi, Assistant Professor, Department of clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
E-mail: ma_karimivet58@yahoo.com

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).