



اثر متقابل تزریق انسولین و القای ورم پستان با لیپوپلی ساکارید بر سوخت و ساز گلوکز و ترشح هورمون گلوکاگون در گاوهای شیری

موسی زرین^{۱*}، امیر احمدپور^۲، روپرت بروکمایر^۳

۱- استادیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج

۲- محقق گروه علوم دامی، گاو شیری و دامپزشکی دانشگاه ایالتی یوتا آمریکا

۳- استاد گروه فیزیولوژی دامپزشکی دانشگاه برن سوئیس

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۸/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۰۷)

چکیده

انسولین و گلوکاگون هورمون‌های تنظیم‌کننده سوخت و ساز گلوکز هستند که هنگام بروز التهاب، ترشح آن‌ها برای تنظیم گلوکز خون تغییر می‌نماید. چالش داخل پستانی لیپوپلی ساکارید (LPS) سبب بروز پاسخ‌های سیستم ایمنی می‌شود که با تغییر فراسنجه‌های خونی و تغییر در سیستم هورمونی همراه است. هدف از این پژوهش، بررسی اثر چالش داخل پستانی LPS به همراه افزایش غلظت انسولین در دو وضعیت هایپوگلیسمی و یوگلیسمی بر غلظت هورمون گلوکاگون در گاوهای شیری بود. تعداد ۱۹ رأس گاو هلشتاین با شکم زایش 0.1 ± 3.0 (انحراف معیار \pm میانگین) به سه گروه تیماری شامل تزریق انسولین (هایپوگلیسمی) (HypoG; n=6)، تزریق انسولین همراه گلوکز (EuG; n=5)، و تزریق سرم فیزیولوژی (NaCl 0.9%) به عنوان گروه شاهد (Control; n=8) اختصاص یافتند. تزریق‌ها به مدت ۵۶ ساعت انجام گرفت. در ساعت ۴۸ ام تزریق متابولیت‌ها، LPS به دو کارتیبه پستانی تزریق شد. در پاسخ به چالش LPS، غلظت انسولین و گلوکز پلاسما افزایش داشت. چالش داخل پستانی LPS غلظت هورمون گلوکاگون را در گروه‌های HypoG و شاهد نسبت به گروه EuG و همچنین نسبت به پیش از شروع تزریقات و قبل از چالش LPS افزایش داد. به طور کلی چالش داخل پستانی LPS سبب افزایش غلظت گلوکز، انسولین و گلوکاگون شد. نتایج حاصل نشان داد که غلظت گلوکاگون هنگام تحریک سیستم ایمنی حتی با افزایش غلظت انسولین افزایش یافته و نقش آن در هموستازی سوخت و ساز گلوکز هنگام بروز التهابات در گاو شیری اهمیت دارد.

واژه‌های کلیدی: التهاب، انسولین، گلوکاگون، گلوکز، لیپوپلی ساکارید

* نویسنده مسئول: m.zarrin@yu.ac.ir

مقدمه

داده است که در زمان بروز ورم پستان یا القای ورم پستان با چالش لیپوپلی ساکارید درون پستانی (Intra-mammary Lipopolysaccharide Challenge: LPS challenge فراسنجه‌های خونی و سیستم هورمونی دستخوش تغییرات فراوانی شده که این تغییرات بیانگر تلاش بدن برای تأمین انرژی مورد نیاز برای پاسخ‌های ایمنی به تحریکات و التهابات است (Waldron *et al.*, 2006; Vernay *et al.*, 2012; Zarrin *et al.*, 2014 a).

القای ورم پستان با LPS که از باکتری‌های گوناگونی از جمله *E. coli* به دست می‌آید، به عنوان یک الگوی ایمن برای ارزیابی سیستم دفاعی پستان بنا نهاده شده (Bruckmaier *et al.*, 1993; Hoeben *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 2004) و در چند پژوهش برای بررسی وضعیت عمومی، پاسخ‌های سیستمیک و موضعی پستان در ارتباط با سوخت و ساز و سیستم ایمنی در گاوهای شیری به کار رفته است (Waldron *et al.*, 2006; Bruckmaier *et al.*, 1993; Vernay *et al.*, 2012; Zarrin *et al.*, 2014 a, b). از شاخصه‌های زمان چالش پستان با LPS بروز پاسخ‌های موضعی و سیستمی است. اثرات سیستمی چالش LPS در برگیرنده بروز پاسخ‌های التهابی مانند افزایش دمای رکتومی، افزایش نرخ تپش قلب و تهویه ریوی و افزایش غلظت کورتیزول پلاسما است (Vernay *et al.*, 2012; Waldron *et al.*, 2006; Wellnitz *et al.*, 2012).

مطالعات زیادی اثرات چالش LPS بر سوخت و ساز و بیان ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی و متابولیسمی را نشان داده‌اند (Waldron *et al.*, 2006; Bruckmaier *et al.*, 1993; Vernay *et al.*, 2012; Zarrin *et al.*, 2014 a, b).

گلوکز به عنوان سوخت اصلی رشد جنین، تولید شیر و همچنین پایه سوخت و ساز انرژی در دام‌ها به خصوص دام‌های شیری مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است. مصرف گلوکز به عنوان پیش‌ساز قند شیر یا لاکتوز، در بافت پستانی دام‌های شیری پس از زایمان و شروع شیردهی به میزان زیادی افزایش یافته (Bell, 1995). به طوری که در این زمان، بخش اعظم گلوکز بدن برای ساخت لاکتوز و در نهایت تولید شیر مصرف می‌شود (Hanigan *et al.*, 2001). گلوکز به عنوان عامل تعیین‌کننده حجم شیر تولیدی در دام‌های شیری محسوب می‌شود (Danfaer, 1994). در نسخوارکنندگان بر خلاف تک‌معدده‌ای‌ها سهم مواد غذایی در تأمین گلوکز مورد نیاز بدن

به دلیل عدم تأمین نیاز انرژی و مواد مغذی برای تولید شیر در گاوهای پرتولید، متابولیت‌ها و هورمون‌ها دستخوش تغییراتی می‌شوند که سبب به وجود آمدن توازن منفی انرژی (Negative Energy Balance: NEB) می‌شود. این تغییرات شامل کاهش سطح گلوکز، افزایش سطح اسیدهای چرب غیر استریفیه (Non-esterified Fatty Acid: NEFA) و به تبع آن افزایش سطوح اجسام کتون به خصوص بتا‌هیدروکسی‌بوتیرات است (Dorland *et al.*, 2009; Gross *et al.*, 2011). در این دام‌ها، به دلیل فعالیت‌های شدید کبد برای تأمین مایحتاج انرژی و مواد مغذی برای تولید شیر، متابولیت‌ها و هورمون‌ها دچار تغییرات گسترده‌ای می‌شوند (Drackley *et al.*, 2001; van Dorland *et al.*, 2009; Zarrin *et al.*, 2017).

گاوهای پرتولید در دو هفته آغازین شیردهی دچار ضعف سیستم ایمنی شده و نسبت به بروز بیماری‌های عفونی حساسیت بیشتری پیدا می‌کنند که برخی از پژوهشگران این ضعف سیستم ایمنی را مرتبط با دگرگونی‌های متابولیسمی بدن به واسطه NEB می‌دانند (Suriyasathaporn *et al.*, 2000; van Dorland *et al.*, 2009; Zarrin *et al.*, 2017). سرکوب ایمنی در دوره انتقال، متأثر از NEB شدت گرفته که به نوبه خود قادر خواهد بود سلامت سیستم پستان را نیز به مخاطره بکشد (Burton and Erskin, 2003; Trevisi *et al.*, 2016; Aleri *et al.*, 2012). در دراز مدت این پیامدها قادر خواهند بود خطر ابتلا به ورم پستان و یا ناهنجاری متابولیسمی را افزایش دهند که در حال حاضر از عمده دلایل ضرر اقتصادی مزارع پرورش گاو شیری به‌شمار می‌رود (Kaneene *et al.*, 1997; Van Kneegsel *et al.*, 2014). اگرچه ساز و کار سرکوب ایمنی در گاوهای شیری تا حدود زیادی ناشناخته است، لیکن دگرگونی‌های متابولیسمی وابسته به آغاز شیردهی از عوامل دخیل در آن محسوب شده است (Goff, 2006). از دیگر عوامل، می‌توان به افزایش محتوای NEFA و بتا‌هیدروکسی‌بوتیرات (Beta-hydroxybutyrate: BHB) در خون (Drackley *et al.*, 2001; Zarrin *et al.*, 2017) و کاهش سطح آنتی‌بادی‌های متصل به آنتی‌ژن هنگام NEB در دوره انتقال (Van Kneegsel *et al.*, 2007) اشاره نمود. مطالعات پیشین نشان

گلوکز خون در حد فیزیولوژیک (هایپرانسولین یوگلاسمیک) ($n=6$; EuG)، و تزریق سرم فیزیولوژی ($NaCl$ ۰/۹٪) به عنوان گروه شاهد ($n=8$; Control) بودند و به مدت ۵۶ ساعت (از ساعت ۹ صبح نخستین روز آزمایش تا ساعت ۱۷ روز سوم) به وسیله پمپ خودکار (Perfuser, B. Braun Melsungen AG) به صورت کنترل شده تزریق شدند. به منظور تنظیم تراز متابولیت‌های تزریقی در دو ساعت آغازین آزمایش، گلوکز هر پنج دقیقه یک بار و هنگام آزمایش هر ۳۰ دقیقه یک‌بار اندازه‌گیری شد و بر اساس آن نرخ تزریق انسولین و گلوکز تصحیح شد.

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

نمونه‌گیری و اندازه‌گیری هورمون‌ها و گلوکز: خون‌گیری برای اندازه‌گیری گلوکز و هورمون‌های انسولین و گلوکاگون قبل از شروع آزمایش به عنوان غلظت‌های پایه و هر یک ساعت در طول مدت زمان آزمایش از راه کاتاتر نصب شده در طرف دیگر گردن انجام گرفت. برای خون‌گیری از لوله‌های حاوی K_3EDTA استفاده شد. بلافاصله پس از خون‌گیری، لوله‌ها روی یخ نگه‌داری و سپس به آزمایشگاه منتقل شد و پلاسمای آن با استفاده از سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور $\times g$ ۳۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه جدا شد و برای انجام آزمایش‌های بعدی در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره‌سازی شد.

اندک بوده و قسمت عمده گلوکز مورد نیاز بدن از راه مسیرهای متابولیکی نظیر گلوکونئوزنر تأمین می‌شود (Danfaer, 1994).

هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر همزمان القای ورم پستان با استفاده از LPS و تغییر متابولیت‌ها و هورمون انسولین با استفاده از تزریق مداوم (۸ ساعت) بر واکنش بدن در آزادسازی هورمون گلوکاگون به عنوان یکی از هورمون‌های مهم در تنظیم سوخت و ساز گلوکز بود. به منظور جلوگیری از تداخل تغییرات ناشی از NEB و هم‌چنین دگرگونی فراسنجه‌ها در دوران انتقال، دام‌های غیر آبستنی که در اواخر دوره شیردهی بودند انتخاب شدند.

مواد و روش‌ها

مدیریت دام‌ها و تیمارهای آزمایشی: اطلاعات مربوط به انجام آزمایش پیشتر به وسیله زرین و همکاران (۱۳۹۷) بیان شده است، ولی به‌طور کلی تعداد ۱۹ رأس گاو هلشتاین با شکم زایش $0/1 \pm 3/0$ (انحراف معیار \pm میانگین)، $0/2 \pm 28$ هفته پس از زایمان انتخاب شدند. دو هفته پیش از آغاز آزمایش، دام‌ها به منظور سازگاری با شرایط نگهداری و خوراک، به جایگاه‌های انفرادی منتقل شدند. جیره و اجزای خوراکی مورد استفاده دام‌ها به همراه تجزیه شیمیایی آن‌ها پیشتر به وسیله Zarrin *et al.* (2014) بیان شده است.

شیوه آماده‌سازی و تزریق متابولیت‌ها مفصلاً در انتشارات پیشین گزارش شده است (Kreipe *et al.*, 2011; Zarrin *et al.*, 2013). به‌طور گزیده: یک روز پیش از آغاز آزمایش کاتاترهای درون رگی (Cavafix® Certo with Splittocan®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) به طول ۳۲ سانتی‌متر و قطر ۱۶ G در سیاهرگ گردنی دو طرف گردن تعبیه شدند که برای پیشگیری از تداخل نمونه‌برداری و تزریق متابولیت‌ها از آن‌ها به‌صورت جداگانه استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل تزریق انسولین (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, # I4011) برای کاهش غلظت گلوکز خون (هایپوگلاسمی) کمتر از $2/5$ mMol/L ($n=5$; HypoG)، تزریق انسولین ($0/6 \pm 0/1$ mU/kg of BW) به همراه گلوکز (Dr. G. Bichsel AG, Interlaken, Switzerland) برای افزایش غلظت انسولین و پایدار نگه داشتن غلظت

تزریق LPS؛ β_j ، اثر گروه‌ها؛ $\alpha\beta_{ij}$ اثر متقابل زمان و گروه‌ها؛ و ϵ_{ijk} اثر باقی‌مانده یا خطای آزمایش است. در مدل آزمایشی فرض شد که داده‌ها از توزیع نرمال پیروی می‌کنند.

نتایج

تزریق انسولین در ۴۸ ساعت اول سبب افزایش غلظت انسولین به میزان $8/10 \pm 41/90$ mU/L و کاهش غلظت گلوکز به میزان $0/10 \pm 2/25$ mmol/L در دام‌های گروه HypoG شد. در صورتی که در گروه EuG، تزریق انسولین به همراه گلوکز اگر چه باعث افزایش غلظت انسولین به میزان $7/80 \pm 57$ mU/L شد ولی غلظت گلوکز خون را در حد فیزیولوژیک ($3/80 \pm 0/20$ mmol/L) نگه داشت. در گروه شاهد، غلظت انسولین و گلوکز در مدت ۴۸ ساعت ابتدای آزمایش تغییری نداشته و به ترتیب برابر با $1/10 \pm 13/90$ mU/L و $0/10 \pm 4/10$ mmol/L بود.

غلظت انسولین در دو گروه HypoG و EuG هنگام چالش LPS با زمان پیش از آن (۴۸ ساعت تزریق متابولیت‌ها) تفاوت داشته، به طوری که در مدت ۸ ساعت چالش LPS تزریق انسولین در هر دو گروه HypoG و EuG سبب افزایش غلظت انسولین در EuG نسبت به گروه شاهد شد، ولی مقدار انسولین در گروه هایپوگلاسمی با میزان انسولین گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۱). این نتیجه به معنای کاهش غلظت انسولین در هنگام چالش LPS نبوده، بلکه تزریق LPS سبب افزایش معنی‌دار غلظت انسولین در تمام گروه‌ها نسبت به زمان پیش از تزریق LPS شد (Vernay et al., 2012). همان طور که قبلاً گزارش شد القای ورم پستان با LPS سبب افزایش غلظت گلوکز شد، ولی این افزایش در گروه‌های مختلف متفاوت بود (Vernay et al., 2012) (شکل ۲).

بر اساس داده‌های بدست آمده، تحریک سیستم ایمنی با چالش درون پستانی LPS و همچنین تزریق انسولین و گلوکز سبب واکنش‌های متفاوتی در هر سه گروه از دام‌های مورد آزمایش شد، به طوری که تا ۱۵۰ دقیقه بعد از تزریق LPS در هر سه گروه، غلظت هورمون گلوکاگون تغییر چندانی نسبت به پیش از LPS نداشته و در حد مقدار قبل از LPS باقی ماند (شکل ۳).

غلظت گلوکز خون به روش آنزیمی به وسیله دستگاه اتو آنالایزر (Cobas Mira 2, Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland) با استفاده از کیت (BioMerieux no. 61270, Marcy l'Etoile, France) بر اساس دستورالعمل سازنده تعیین شد. برای اندازه‌گیری انسولین از روش پرتو ایمن آزمایشی (Radio Immune Assay: RIA) با ضریب تغییرات^۱ درون‌سنجی (Intra assay) و برون‌سنجی (Inter assay) به ترتیب برابر $8/2\%$ و $15/5\%$ مطابق با روش شرح داده شده به وسیله Vicari et al. (2008) استفاده شد. غلظت هورمون گلوکاگون خون با استفاده از کیت تجاری (cat. # GL-32K, MILLIPORE, Zug, Switzerland) با ضریب تغییرات^۲ درون‌سنجی (Intra assay) و برون‌سنجی (Inter assay) به ترتیب برابر $4/0\%$ و $12/5\%$ با روش RIA اندازه‌گیری شد.

تجزیه آماری: آزمایش در قالب یک طرح دو عاملی بر پایه مفروضات طرح‌های کاملاً تصادفی انجام شد. برای هر کدام از پارامترها، سطح زیر منحنی در طول دوره آزمایش (۸ ساعت) با استفاده از قانون تراپیزویدال^۳ (مجموع مناطق مستطیلی و مثلثی شکل زیر منحنی) محاسبه شد و بر اساس رویه GLM نرم‌افزار آماری SAS مورد ارزیابی قرار گرفت. تفاوت میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی مقایسه شد. تفاوت بین غلظت متابولیت‌ها و هورمون‌ها بین زمان‌های مختلف نمونه‌برداری در داخل هر یک از گروه‌ها و بین تیمارهای مختلف با استفاده از رویه Mixed نرم‌افزار آماری SAS ارزیابی آماری شد که در این رویه دام‌ها به عنوان اثرات تکرار شونده در نظر گرفته شد و زمان (ساعات نمونه‌برداری) و تیمارها به عنوان اثرات ثابت در نظر گرفته شدند. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای معیار میانگین بیان شده و $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری و $P \leq 0/10$ به عنوان تمایل به معنی‌داری در نظر گرفته شد. مدل آماری مورد استفاده در این آزمایش به شکل زیر بود:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Y_{ijk} ، صفت اندازه‌گیری شده پس از تزریق LPS؛ μ ، میانگین صفت؛ α_i ، اثر زمان (صفر و هشت ساعت پس از

1. Intra- and inter-assay CV were 8.2% and 15.5%, respectively

2. Intra- and inter-assay CV were 4.0% and 12.5%, respectively

3. Trapezoidal Rule

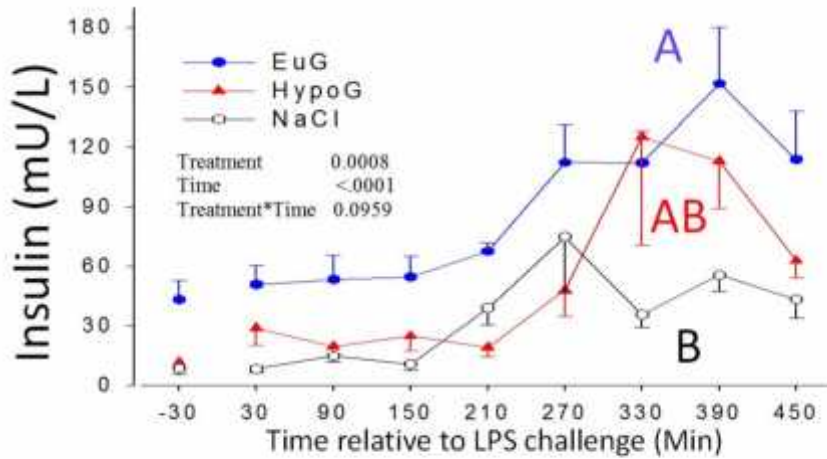


Fig. 1. Blood insulin concentration in infusion groups during LPS challenge (8 h) in dairy cows
 شکل ۱- غلظت انسولین خون در گروه‌های تزریقی در مدت زمان چالش LPS (۸ ساعت) در گاوهای شیری

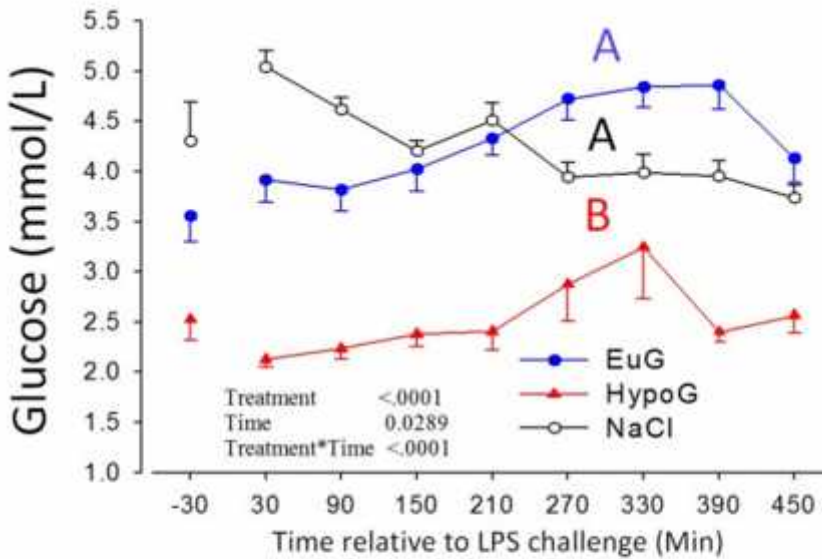


Fig. 2. Blood glucose concentration in infusion groups during LPS challenge (8 h) in dairy cows
 شکل ۲- غلظت گلوکز خون در گروه‌های تزریقی در مدت زمان چالش LPS (۸ ساعت) در گاوهای شیری

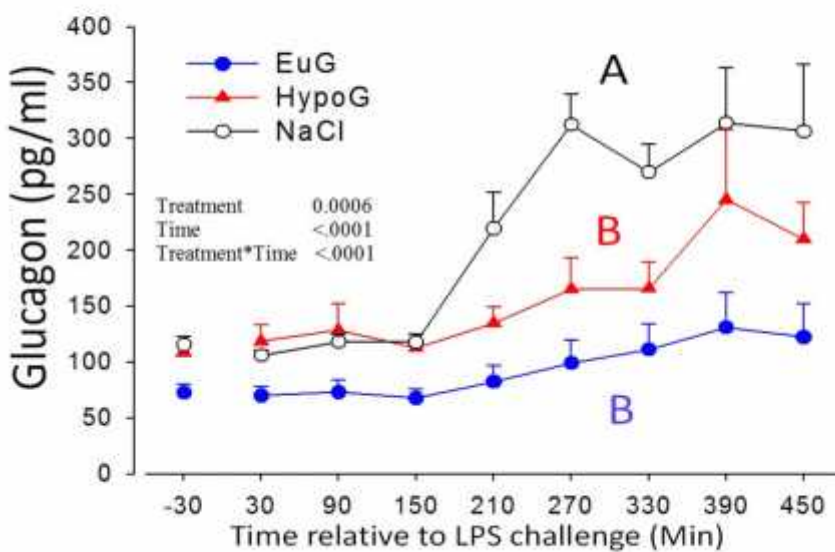


Fig. 3. Blood glucagon concentration in infusion groups during LPS challenge (8 h) in dairy cows
 شکل ۳- غلظت گلوکاگون خون در گروه‌های تزریقی در مدت زمان چالش LPS (۸ ساعت) در گاوهای شیری

بحث

بر اساس نتایج این پژوهش، چالش داخل پستانی LPS سبب تغییر در غلظت گلوکز خون و هورمون‌های دخیل در تنظیم هموستازی آن شد، به طوری که افزایش غلظت گلوکز به همراه افزایش غلظت هورمون‌های گلوکاگون و انسولین - به عنوان تنظیم‌کننده‌های متناقض گلوکز خون مشاهده شد. هر چند که مطالعه قبلی (Vernay *et al.*, 2012) به بررسی اثر القای ورم پستان با استفاده از چالش داخل پستانی LPS پرداخته بود، ولی ارتباط هورمون‌های انسولین و گلوکاگون و اثرات متقابل آن‌ها مورد بررسی قرار نگرفته بود. همان‌طور که در نتایج منتشر شده این مطالعه نشان داده شده است تغییر متابولیت‌های خونی و هورمون‌ها بر وضعیت پاسخ ایمنی عمومی و موضعی اثر گذاشته است (Vernay *et al.*, 2012; Zarrin *et al.*, 2014).

تنظیم هموستازی گلوکز تحت تأثیر هورمون‌های مختلفی بوده که از این میان دو هورمون گلوکاگون و انسولین که از سلول‌های α و β جزایر لانگرهانس لوزالمعده ترشح می‌شوند نقش مهمی را بر عهده دارند (Unger and Orci, 1976). تنظیم هموستازی گلوکز خون به واسطه هورمون انسولین در زمان هایپرگلاسمیا از راه افزایش ورود گلوکز به سلول‌های ماهیچه‌ای و بافت چربی، افزایش تولید گلیکوژن کبدی و جلوگیری از فعالیت مسیر گلوکونئوزنز صورت می‌پذیرد (Ferrannini *et al.*, 1999; Saltiel and Kahn, 2001).

گلوکاگون بر خلاف هورمون انسولین در زمان کاهش سطح گلوکز خون وارد عمل شده و با افزایش تجزیه گلیکوژن، افزایش ساخت گلوکز از مسیر گلوکونئوزنز و کاهش ساخت گلیکوژن، سطح گلوکز خون را در حد فیزیولوژیک حفظ می‌کند (Jiang and Zhang, 2003).

مطالعات مختلفی افزایش غلظت گلوکز را در پی چالش با LPS نشان داده‌اند (Waldron *et al.*, 2006; Vernay *et al.*, 2012; Zarrin *et al.*, 2014, Gross *et al.*, 2017). این نویسندگان دلیل افزایش غلظت گلوکز را نیاز سیستم ایمنی به یک منبع انرژی و در نتیجه افزایش غلظت هورمون کورتیزول و افزایش مقاومت انسولینی بیان کرده‌اند. پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند که چالش پستانی با LPS باعث ایجاد مقاومت انسولینی در گاوهای

بعد از این زمان، افزایش غلظت هورمون گلوکاگون مشاهده شد ولی این افزایش غلظت در گروه‌های تزریقی مختلف متفاوت بود، به طوری که در کنترل افزایش ناگهانی غلظت گلوکاگون مشاهده شد. در دقیقه ۲۱۰ بعد از تزریق LPS، غلظت گلوکاگون به میزان دو برابر غلظت آن پیش از LPS افزایش یافت. این افزایش غلظت در ساعت بعد (۲۷۰ دقیقه) نیز ادامه داشت، به طوری که به بالاترین مقدار خود پس از تزریق LPS رسید و افزایش حدوداً سه برابری نسبت به زمان پیش از تزریق نشان داد. روند غلظت گلوکاگون در ۳۳۰ دقیقه بعد از تزریق LPS اندکی کاهش یافته بود و در ادامه در زمان‌های ۳۹۰ و ۴۵۰ دقیقه پس از تزریق LPS نیز به بالاترین میزان خود یعنی در حدود سه برابر قبل از تزریق LPS رسید. روند افزایش غلظت گلوکاگون ۱۵۰ دقیقه بعد از تزریق LPS در دو گروه تزریقی دیگر نیز مشاهده شد، به طوری که در گروه HypoG، این افزایش غلظت با شیب ملایم‌تری شروع شد ولی در ۳۹۰ دقیقه پس از تزریق LPS به بالاترین میزان خود (۲/۵ برابر) نسبت به مقدار قبل از تزریق LPS رسید و در ساعت بعد سیر نزولی از خود نشان داد.

در گروه هایپرانسولین یوگلاسمیک نیز روند افزایش غلظت گلوکاگون مشاهده شد با این تفاوت که شیب افزایش غلظت این هورمون در این گروه از دام‌ها کمتر از دو گروه دیگر بوده و مقدار افزایش غلظت کمتری مشاهده شد. در این گروه، افزایش غلظت از ۱۵۰ دقیقه پس از تزریق داخل کاردیه‌ای LPS مشاهده شد و در ۳۹۰ دقیقه پس از تزریق LPS به بالاترین میزان خود که حدود ۶۰ درصد بیش از زمان قبل از تزریق بود رسید (۱۲۵ pg/ml در مقابل ۷۵ pg/ml) و در ساعت پس از آن نیز روند نزولی خود را آغاز نمود.

بر اساس محاسبه سطح زیر منحنی برای مدت ۸ ساعت (AUC**h*) که در جدول ۱ نشان داده شده است میزان غلظت گلوکاگون بین تیمارهای مختلف متفاوت بود (۰/۱ $P <$ و بیشترین مقدار سطح زیر منحنی مربوط به گروه شاهد بوده که از نظر آماری با هر دو گروه دیگر اختلاف معنی‌دار داشت. سطح گلوکاگون در گروه هایپرانسولین هایپوگلاسمی (۱۵۹/۶+۲۱/۹ pg/mL/**h*) نسبت به گروه هایپرانسولین یوگلاسمی (۹۳/۸+۲۰/۰ pg/mL**h*) از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشت.

جدول ۱- سطح زیر منحنی گلوکز، انسولین، و گلوکاگون پلازما در گاوهایی که تزریق انسولین (HypoG; n=5)، انسولین و گلوکز (EuG; n=6)، و محلول نمکی ۰/۹٪ (Control, n=8) در مدت زمان چالش پستانی با LPS (۸ ساعت) صورت گرفت. داده‌ها به صورت $LSMeans \pm SE$ محدوده زیر منحنی در مدت ۴۸ ساعت نشان داده شده‌اند

Table 1. Plasma variable AUC/h in hyperinsulinemic euglycemic (EuG, n=6), hyperinsulinemic hypoglycemic (HypoG, n=5), and NaCl infused dairy cows during intramammary LPS challenge (8 h). Data are presented as least squares means \pm SEM of area under the curve (AUC/h) during 48 h

Variable	AUC/h LS Mean \pm SE LPS challenge, Group ¹			P-value
	EuG	HypoG	NaCl	
Glucose, mmol/L*h	4.4 \pm 0.1 ^a	2.6 \pm 0.1 ^b	4.2 \pm 0.1 ^a	< 0.01
Insulin, mU/L*h	89.6 \pm 9.3 ^b	58.5 \pm 10.2 ^{ab}	36.3 \pm 8.0 ^a	< 0.01
Glucagon, pg/ml*h	93.8 \pm 20.0 ^b	159.6 \pm 21.9 ^b	219.7 \pm 17.3 ^a	< 0.01

¹ EuG = Hyperinsulinemic euglycemic group; HypoG = Hyperinsulinemic hypoglycemic group; NaCl = Group of cows receiving physiological saline solution. ² a,b: Treatment groups without common letters are significantly different ($P < 0.05$).

et al., 2015; Gustarson *et al.*, 1999; Hope *et al.*, 2004)، که مشخص می‌کند در حضور غلظت طبیعی گلوکز، انسولین اثر ممانعت‌کنندگی بر ترشح گلوکاگون دارد. البته این اثر در زمانی محقق می‌شود که غلظت گلوکز خون بیشتر از حد فیزیولوژیک باشد (Banarar *et al.*, 2002; Zarrin *et al.*, 2015). محققین مختلف ممانعت‌کننده‌های زیادی برای جلوگیری از ترشح گلوکاگون معرفی نموده‌اند که از آن جمله می‌توان به انسولین (Banarar *et al.*, 2002)، پلی‌پپتید آمیلونید، ATP، Zn²⁺ و گاما آمینوبوتیریک اسید (Gama Amino Butyric Acid; GABA) (Bansal and Wang, 2008) اشاره کرد، ولی در این بین اثر بخش‌ترین آن‌ها هورمون انسولین است (Maruyama *et al.*, 1984; Saltiel and Khan, 2004).

مطالعات متعددی نشان داده‌اند که فعالیت هورمون‌های انسولین و گلوکاگون در شرایط عادی بر همدیگر اثر محدودکنندگی دارند، به طوری که افزایش ترشح هورمون انسولین سبب کاهش ترشح هورمون گلوکاگون به واسطه جلوگیری از بیان ژن تولید گلوکاگون، فعال شدن نوروترانسمیتر GABA و گیرنده آن و تغییر فعالیت کانال K-ATP می‌شود (Bansal and Wang, 2008). مطالعه قبلی نشان داد که این اثر همیشگی نبود و مقدار گلوکز خون به عنوان یک عامل تعیین‌کننده اثر بازدارندگی هورمون انسولین بر گلوکاگون است، به طوری که اگر گلوکز خون از حد مشخص فیزیولوژیکی پایین‌تر باشد اثر ممانعت‌کنندگی انسولین بر ترشح گلوکاگون تأثیری نداشته و سیستم هموستازی بدن در تلاش برای جبران گلوکز مورد نیاز بدن ترشح گلوکاگون را علیرغم افزایش

شیری می‌شود (Vernay *et al.*, 2012; Waldron *et al.*, 2006; Zarrin *et al.*, 2014 b). بنابراین افزایش غلظت گلوکز در هر دو گروه تزریق انسولین علی‌رغم افزایش غلظت انسولین خون می‌تواند بیانگر مقاومت بافت‌های بدن به انسولین پس از بروز پاسخ‌های ایمنی باشد. افزایش غلظت هورمون کورتیزول در زمان چالش پستانی با LPS به عنوان یکی از نشانه‌های پاسخ سیستمی به التهابات است (Waldron *et al.*, 2006; Wellnitz and Bruckmaier, 2012; Zarrin *et al.*, 2014 b). پس از اعمال چالش LPS، افزایش ترشح گلوکوکورتیکوئیدها سبب افزایش تجزیه گلیکوزن و افزایش تولید گلوکز از راه مسیر گلوکونئوزنز کبدی شده (Vernay *et al.*, 2012) و از طرف دیگر مصرف گلوکز به وسیله بافت‌های محیطی تغییر کرده و کاهش می‌یابد (Ingvarstsen and Moyes, 2013).

عمده‌ترین سوخت‌های مورد استفاده سیستم ایمنی گلوکز، اسیدهای چرب و BHB هستند (Ingvarstsen and Moyes, 2013). از میان این سوخت‌ها، گلوکز به وسیله سلول‌های ایمنی در زمان بروز التهابات ترجیح داده می‌شود و کاهش غلظت آن در دوره انتقال توجیه‌کننده افزایش حساسیت دام‌ها به بیماری‌ها و هم‌چنین سرکوب سیستم ایمنی در این دوره است (Ingvarstsen and Moyes, 2015). هر چند که مطالعه اخیر نشان داد BHB نیز می‌تواند به عنوان یک منبع انرژی در زمان بروز التهاب مورد استفاده سلول‌های ایمنی قرار گیرد (Zarrin *et al.*, 2014 a).

نتایج بدست آمده در ارتباط با کاهش گلوکاگون خون در نتیجه افزایش غلظت انسولین به وسیله مطالعات قبلی تأیید شده است (Burcelin and Thorens, 2001; Zarrin

ایمنی با تزریق داخل پستانی LPS در گاوهای شیری اوایل شیردهی نیز گزارش شده است (Grosse *et al.*, 2017).

نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج بدست آمده این امر مشخص می شود که در شرایط التهاب و بروز بیماری های عفونی همه فرآیندها و مکانیسم های مختلف به نحوی در تأمین انرژی مورد نیاز سلول های ایمنی بدن دخیل شده تا بتوانند در برابر التهابات ایفای نقش نمایند. در این بین می توان به افزایش غلظت هورمون گلوکاگون به عنوان هورمون افزایش دهنده گلوکز خون از راه مسیرهای متابولیکی متفاوت در گروه هایی که غلظت انسولین به واسطه تزریق انسولین (HypoG and EuG) و یا از راه افزایش ترشحات داخلی (شاهد) در زمان چالش پستانی LPS بالا رفته بود اشاره کرد. بنابراین می توان چنین استنباط نمود که تأثیر بازدارندگی هورمون ها بر همدیگر همیشگی نبوده و تابع شرایط فیزیولوژیکی پیش آمده برای سلول های بدن میزبان است.

غلظت انسولین از راه تزریق مداوم انسولین (۴۸ ساعت) افزایش می دهد (Zarrin *et al.*, 2015).

نتایج مطالعه پیشین، افزایش غلظت گلوکز خون علیرغم افزایش میزان تزریق انسولین برای حفظ هایپوگلاسمی در گروه HypoG و کاهش میزان تزریق گلوکز در گروه EuG همزمان با افزایش غلظت انسولین خون در همه گروه ها را در زمان چالش پستانی با LPS نشان داد که ناشی از افزایش مقاومت انسولینی به صورت سیستمی در زمان چالش LPS و همچنین افزایش تجزیه گلیکوژن کبدی و افزایش ساخت گلوکز از مسیر گلوکونئوز در این دام ها تلقی شده اند (Vernay *et al.*, 2012). اگر چه این محققین افزایش غلظت گلوکز از مسیرهای مختلف را در نتیجه افزایش هورمون کورتیزول بیان کرده اند، اما نتایج این مطالعه نشان داد که افزایش غلظت هورمون گلوکاگون به عنوان یکی از مهم ترین هورمون های ناظم گلوکز خون در زمان چالش پستانی LPS می تواند نقش بسیار مهمی در تأمین گلوکز مورد نیاز سلول های ایمنی برای پاسخ مناسب به التهابات فراهم نماید. در راستای نتایج این مطالعه، افزایش غلظت گلوکاگون در پی تحریک سیستم

فهرست منابع

- زرین م، بروکمایر ر، و احمدپور ا. ۱۳۹۷. اثر دستکاری متابولیت ها و هورمون ها بر بیان mRNA ژن های آنتی اکسیدانی مرتبط با Nrf2 در بافت پستانی گاوهای شیری. تحقیقات تولیدات دامی. ۷(۳): ۱-۱۲.
- Aleri J. W., Hine B. C., Pyman M. F., Mansell P. D., Wales W. J., Mallard B. and Fisher A. D. 2016. Periparturient immunosuppression and strategies to improve dairy cow health during the periparturient period. *Research in Veterinary Science*, 108: 8-17.
- Banarer S., McGregor V. P. and Cryer P. E. 2002. Intraileet hyperinsulinemia prevents the glucagon response to hypoglycemia despite an intact autonomic response. *Diabetes*, 51: 958-965.
- Bansal P. and Wang Q. 2008. Insulin as a physiological modulator of glucagon secretion. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 295: E751-E761.
- Bell A. W. 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science*, 73: 2804-2819.
- Bruckmaier R. M., Schällibaum M. and Blum J. W. 1993. Escherichia coli endotoxin-induced mastitis in dairy cows: Changes and importance of insulin-like growth factor I and oxytocin. *Milchwissenschaft*, 48: 374-378.
- Burcelin R. and Thorens B. 2001. Evidence that extrapancreatic GLUT2-dependent glucose sensors control glucagon secretion. *Diabetes*, 50: 1282-1289.
- Burton J. L. and Erskine R. J. 2003. Immunity and mastitis. Some new ideas for an old disease. *The Veterinary Clinics Food Animal Practice*, 19: 1-45.
- Danfaer A. 1994. Nutrient metabolism and utilization in the liver. *Livestock Production Science*, 34: 115-127.
- Drackley J. K., Overton T. R. and Douglas G. N. 2001. Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *Journal of Dairy Science*, 84: E100-E112.
- Ferrannini E., Galvan A. Q., Gastaldelli A., Camastra S., Sironi A. M., Toschi E. and Nannipieri M. 1999. Insulin: new roles for an ancient hormone. *European Journal of Clinical Investigation*, 29(10): 842-852.
- Goff J. P. 2006. Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health. *Journal of Dairy Science*, 89(4): 1292-1301.

- Gross J. J., Grossen-Rösti L., Héritier R., Tröscher A. and Bruckmaier R. M. 2018. Inflammatory and metabolic responses to an intramammary lipopolysaccharide challenge in early lactating cows supplemented with conjugated linoleic acid. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(2): e838-e848.
- Gross J., van Dorland H. A., Bruckmaier R. M. and Schwarz F. J. 2011. Performance and metabolic profile of dairy cows during a lactational and deliberately induced negative energy balance with subsequent realimentation. *Journal of Dairy Science*, 94: 1820-1830.
- Gustavson S. M., Nishizawa M., Farmer B., Neal D., Brissova M., Powers A. C. and Cherrington A. D. 2003. A fall in portal vein insulin does not cause the alpha-cell response to mild, non-insulin-induced hypoglycemia in conscious dogs. *Metabolism*, 52(11): 1418-1425.
- Hanigan M. D., Crompton L. A., Metcalf J. A. and France J. 2001. Modelling mammary metabolism in the dairy cow to predict milk constituent yield, with emphasis on amino acid metabolism and milk protein production: Model construction. *Journal of Theoretical Biology*, 213: 223-239.
- Hoeben D., Burvenich C., Trevisi E., Bertoni G., Hamann J., Bruckmaier R. M. and Blum J. W. 2000. Role of endotoxin and TNF-alpha in the pathogenesis of experimentally induced coliform mastitis in periparturient cows. *Journal of Dairy Research*, 67: 503-551.
- Hope K. M., Tran P. O. T., Zhou H., Oseid E., Leroy E. and Robertson R. P. 2004. Regulation of α -cell function by the β -Cell in isolated human and rat islets deprived of glucose: the "Switch-off" hypothesis. *Diabetes*, 53: 1488-1495.
- Ingvartsen K. L. and Moyes K. 2013. Nutrition, immune function and health of dairy cattle. *Animal*, 7(Suppl 1): 112-122.
- Ingvartsen K. L. and Moyes K. M. 2015. Factors contributing to immunosuppression in the dairy cow during the periparturient period. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 63(Suppl. 1): S15-S24.
- Jiang G. and Zhang B. B. 2003. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 284: E671-E678.
- Kaneene J. B., Miller R., Herdt T. H. and Gardiner J. C. 1997. The association of serum nonesterified fatty acids and cholesterol, management and feeding practices with peripartum disease in dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, 31: 59-72.
- Kreipe L., Vernay M. C. M. B., Oppliger A., Wellnitz O., Bruckmaier R. M. and van Dorland H. A. 2011. Induced hypoglycemia for 48 hours indicates differential glucose and insulin effects on liver metabolism in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94: 5435-5448.
- Maruyama H., Hisatomi A., Orci L., Grodsky G. M. and Unger R. H. 1984. Insulin within islets is a physiologic glucagon release inhibitor. *Journal of Clinical Investigation*, 74: 2296-2299.
- Saltiel A. R. and Kahn C. R. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414: 799-806.
- Schmitz S., Pfaffl M. W., Meyer H. H. D. and Bruckmaier R. M. 2004. Short-term changes of mRNA abundance of various inflammatory factors and milk proteins in mammary tissue during LPS-induced mastitis. *Domestic Animal Endocrinology*, 26: 111-126.
- Trevisi E. R. M. I. N. I. O., Amadori M., Cogrossi S. I. M. O. N. E., Razzuoli E. and Bertoni G. 2012. Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows. *Research in Veterinary Science*, 93: 695-704.
- Unger R. H. and Orci L. 1976. Physiology and pathophysiology of glucagon. *Physiological Reviews*, 56: 778-826.
- van Dorland H. A., Richter S., Morel I., Doherr M. G., Castro N. and Bruckmaier R. M. 2009. Variation in hepatic regulation of metabolism during the dry period and in early lactation in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92: 1924-1940.
- Van Knegsel A. T., Hammon H. M., Bernabucci U., Bertoni G., Bruckmaier R. M., Goselink R. M., Gross J. J., Kuhla B., Metges C. C., Parmentier H. K. and Trevisi E. 2014. Metabolic adaptation during early lactation: key to cow health, longevity and a sustainable dairy production chain. *CAB Reviews*, 9(002): 1-15.
- Vernay M. C. M. B., Wellnitz O., Kreipe L., van Dorland H. A. and Bruckmaier R. M. 2012. Local and systemic response to intramammary lipopolysaccharide challenge during long-term manipulated plasma glucose and insulin concentrations in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95: 2540-2549.
- Vicari T., Van den Borne J. J. G. C., Gerrits W. J. J., Zbinden Y. and Blum J. W. 2008. Postprandial blood hormone and metabolite concentrations influenced by feeding frequency and feeding level in veal calves. *Domestic Animal Endocrinology*, 34(1): 74-88.
- Waldron M. R., Kulick A. E., Bell A. W. and Overton T. R. 2006. Acute experimental mastitis is not causal toward the development of energy-related metabolic disorders in early postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89: 596-610.
- Wellnitz O. and Bruckmaier R. M. 2012. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *The Veterinary Journal*, 192: 148-152.

- Zarrin M., De Matteis L., Vernay M. C. M. B., Wellnitz O., van Dorland H. A. and Bruckmaier R. M. 2013. Long-term elevation of β -hydroxybutyrate in dairy cows through infusion: Effects on feed intake, milk production, and metabolism. *Journal of Dairy Science*, 96: 2960-2972.
- Zarrin M., Gossen-Rösti L., Bruckmaier R. M. and Gross J. J. 2017. Elevation of blood β -hydroxybutyrate concentration affects glucose metabolism in dairy cows before and after parturition. *Journal of Dairy Science*, 100: 2323-2333.
- Zarrin M., Wellnitz O. and Bruckmaier R. M. 2015. Conjoint regulation of glucagon concentrations via plasma insulin and glucose in dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology*, 51: 74-77.
- Zarrin M., Wellnitz O., van Dorland H. A. and Bruckmaier R. M. 2014. Induced hyperketonemia affects the mammary immune response during lipopolysaccharide challenge in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97: 330-339.
- Zarrin M., Wellnitz O., van Dorland H. A., Gross J. J. and Bruckmaier R. M. 2014. Hyperketonemia during lipopolysaccharide-induced mastitis affects systemic and local intramammary metabolism in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97(6): 3531-3541.



Interaction effect of insulin infusion and induced mastitis by lipopolysaccharide on glucose metabolism and glucagon hormone secretion in dairy cows

M. Zarrin^{1*}, A. Ahmadpour², R. M. Bruckmaier³

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

2. Researcher in Department of Animal, Dairy and Veterinary Sciences, Utah State University, UT 84322, USA

3. Professor, Veterinary Physiology, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Bern, Switzerland

(Received: 12-11-2018 – Accepted: 28-12-2018)

Abstract

Insulin and glucagon are gluco-regulatory hormones which their secretions are critical for glucose hemostasis during inflammations. Intra-mammary LPS (lipopolysaccharide) challenge causes an immune reaction which is accompanied by metabolic and endocrine changes. The objective of the present study was to investigate the effects of intra-mammary LPS challenge concomitantly with elevated insulin concentrations on glucagon concentration during simultaneous hypoglycemia or euglycemia in dairy cows. Nineteen Holstein dairy cows with body weight of 3.0 ± 0.1 (mean \pm SD) were randomly assigned to three treatment groups: an intravenous insulin infusion (Hypoglycemia; HypoG, n=5), insulin and glucose infusion (EuG, n=6), and a 0.9 % saline solution infusion (Control, n=8). At 48 h of metabolites infusions, LPS injected to two quarters of mammary glands. In response to LPS challenge, plasma insulin and glucose concentration increased. Intra-mammary LPS challenge caused an increase in plasma glucagon concentrations in HypoG and control compared to EuG group, pre infusion level, and pre LPS challenge. In conclusion, intra-mammary LPS challenge induced increases of glucose, insulin, and glucagon concentrations. The results showed that glucagon concentrations increased during immune system stimulation despite the increase of insulin concentrations, and its role is important in glucose metabolism hemostasis during inflammation.

Keywords: Inflammation, Insulin, Glucagon, Glucose, Lipopolysaccharide

*Corresponding author: m.zarrin@yu.ac.ir