

## ارزیابی بیان ژن‌های مؤثر بر رشد و نمو غده پستان گاو با مصرف روغن ماهی

هدی جواهری بارفروشی<sup>۱</sup>، آرمین توحیدی<sup>۲\*</sup>، حسن صادقی پناه<sup>۳</sup>، مهدی ژندی<sup>۴</sup>، سعید زین الدینی<sup>۴</sup> و محمدحسین بنابازی<sup>۳</sup>  
۱. دانشجوی سابق دکتری، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران و اسنادیاری، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران  
۲ و ۴. استاد و دانشیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران  
۳. استادیاری، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران  
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۸)

### چکیده

این مطالعه به منظور ارزیابی تأثیر مصرف روغن ماهی در مقایسه با روغن پالم بر بیان ژن‌های مؤثر بر رشد بافت پستان گاوهای هلشتاین انجام شد. ده رأس گاو با دست کم یک شکم زایش به طور تصادفی از ۴۲ روز پیش از تاریخ احتمالی زایش تا ۶۳ روز پس از آن به دو گروه روغن ماهی (FO) و گروه روغن پالم (PO) اختصاص یافتند. خون‌گیری با فاصله ۲۱ روز و نمونه‌گیری از بافت پستان با فاصله دو ماهه (روزهای ۷ و ۶۳ پس از زایش) انجام شد. تفاوت معنی‌داری بین دو گروه از نظر غلظت استرادیول و پروژسترون سرم خون وجود نداشت. نتایج بررسی بیان ژن نشان داد، بیان نسبی ژن IGF-I در گروه روغن ماهی کاهش ( $P < 0.05$ ) و بیان نسبی ژن  $TNF-\alpha$  تمایل به کاهش داشت ( $P = 0.06$ ). بیان ژن Bcl-2 در گروه روغن ماهی در طول زمان تمایل به افزایش داشت ( $P = 0.10$ ). نسبت بیان ژن BCL-2/BAX با نزدیک شدن به اوج تولید شیر، برای گروه روغن پالم روندی کاهشی نشان داد، اما برای گروه روغن ماهی روندی افزایشی داشت که نشانه کاهش خودکشی یاخته‌ای یا پسرقت (آپوپتوزیس) در بافت پستان است. بنابراین، احتمال می‌رود که مصرف روغن ماهی در جیره گاوهای شیری هلشتاین از نیمه‌های دوره خشکی تا اوج شیردهی، سبب به تعویق انداختن روند آپوپتوزیس پستان شود.

واژه‌های کلیدی: اسیدهای چرب امگا-۳، بیان ژن، غده پستان، گاو هلشتاین.

## Evaluation of genes expression affecting mammary gland growth and development in cows fed fish oil

Hoda Javaheri Barfourooshi<sup>1</sup>, Armin Towhidi<sup>2\*</sup>, Hassan Sadeghipanah<sup>3</sup>, Mehdi Zhandi<sup>4</sup>, Saeed Zeioaldini<sup>4</sup> and Mohammad Hossein Banabazi<sup>3</sup>

1. Former Ph. D. Student, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran and Assistant Professor, Animal Science Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

2, 4. Professor and Associate Professor, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3. Assistant Professor, Animal Science Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

(Received: Oct. 2, 2017 - Accepted: Apr. 28, 2018)

### ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the effects of feeding fish oil on the expression of genes affecting the mammary gland growth and development in Holstein cows compared to palm oil. Ten cows with at least one parturition were randomly assigned to fish oil (FO) or palm oil (PO) groups. Experiment period started from 42 days before expected parturition date and finished at day 63 of lactation. Blood samples were taken at 21 days intervals and mammary tissue sampling were taken in two-month intervals (seven and 63 days after parturition). There was no significant difference in serum estradiol and progesterone concentration between two groups. The result of gene expression analysis showed that the relative expression of IGF-I gene in the fish oil group decreased ( $P < 0.05$ ) and the relative expression of  $TNF-\alpha$  gene in this group tended to decrease ( $P = 0.06$ ). Expression of Bcl-2 in fish oil group tended to increase over time ( $P = 0.10$ ). The ratio of BCL-2/BAX gene expression with approaching to lactation peak, showed a decreasing trend for the PO group but, for the FO group, an increase was observed indicating that apoptosis in mammary gland tissue was decreased. In conclusion, it is probable that the consumption of fish oil from mid dry period to lactation peak can postpone the apoptosis process in Holstein cow's mammary gland.

**Keywords:** Gene expression, Holstein cow, mammary gland, n-3 fatty acids.

\* Corresponding author E-mail: atowhidi@ut.ac.ir

### مقدمه

دوره خشکی که بازسازی غده پستان در فرایند آن رخ می‌دهد، یکی از مراحل بحرانی در رشد پستان به شمار می‌رود. این دوره دربرگیرنده مراحل پسرفت (آپوتوزیس)، افزایش و تمایز یاخته‌های پستانی است. لذا، هرگونه تغییر در روند بازسازی غده پستان که منجر به افزایش زنده‌مانی یاخته‌های پستانی در طول دوره خشکی شود، می‌تواند میزان شیر تولیدی را در دوره شیردهی آتی افزایش دهد (Wall *et al.*, 2005). شمار یاخته‌های بافت پوششی (اپیتلیال) پستان و فعالیت ترشحی آن‌ها، شکل منحنی شیردهی را تعیین می‌کند. بسته به گونه حیوان، افزایش در شمار و یا فعالیت یاخته‌های ترشحی پستان موجب افزایش تولید شیر تا اوج شیردهی شده و در مقابل کاهش آن‌ها سبب کاهش تولید شیر پس از اوج شیردهی است (Capuco *et al.*, 2003). اگرچه، افزایش در میزان فعالیت یاخته‌ای ممکن است به‌طور موقت میزان تولید شیر را افزایش دهد، اما افزایش جمعیت یاخته‌ای پستان تأثیر بیشتر و پیوسته‌ای بر تولید شیر خواهد داشت (Wall & McFadden, 2010).

عامل‌های رشد ویژه‌ای که از بافت پستان منشأ می‌گیرند، افزون بر استروژن و هورمون رشد- که نقش اصلی را در تحریک رشد پستان بر عهده دارند- در تنظیم رشد غده پستان اهمیت دارند. این عامل‌های رشد می‌توانند به‌عنوان میانجی تأثیر استروژن و هورمون رشد عمل کرده و یا به‌طور اختصاصی تأثیر خود را اعمال کنند. عامل‌های رشد شبه انسولینی (IGF-I و IGF-II)، عامل رشد روپوستی یا اپیدرمی (EGF)، عامل‌های رشد یاخته بافت همبند یا فیبروبلاستی (aFGF و bFGF)، عامل‌های رشد تغییردهنده ( $TGF\alpha$  و  $TGF\beta$ )، عامل رشد مشتق از پلاکت (PDGF) و عامل رشد مشتق از پستان-1 (MDGF-1) که بسته به نوع بافت یا یاخته، میزان حساسیت گیرنده‌ها و نیز مسیرهای انتقال سیگنال، اثرگذاری‌های گوناگونی را ایجاد می‌کنند، در این خانواده جای دارند (Weber *et al.*, 2000; Purup *et al.*, 2000).

اسیدهای چرب بلند زنجیر با چند پیوند غیراشباع، به‌عنوان کلیدهای میانجی یاخته‌ای در التهاب، حساسیت، ایمنی، تنش اکسایشی (اکسیداتیو)، انقباض نایژه‌ها، پاسخ‌های عروقی و ترومبوز عمل می‌کنند. همچنین، مستندات فزاینده‌ای وجود دارند که این اسیدهای چرب، می‌توانند بر بیان ژن‌هایی که تمایز و رشد یاخته‌ای را تنظیم می‌کنند، اثر بگذارند (Dangour & Uauy, 2008). باوجود آنکه در رابطه با تأثیر اسیدهای چرب بلند زنجیر بر فعالیت‌های ژن‌های آنزیم‌های لیپوژنیک بافت پستان در گاو و بز (Bernard *et al.*, 2017) و همچنین میش (Carreno *et al.*, 2016; Frutos *et al.*, 2017; Toral *et al.*, 2017) بررسی‌های چندی انجام شده، ولی بررسی‌های کمی در زمینه تأثیر این ترکیب‌ها بر رشد و نمو غده پستان در دام‌های شیرده وجود دارد. رشد یاخته‌های بافت پوششی پستان توسط اسیدهای چرب غیراشباع و مشتقات آن‌ها تحریک می‌شود. اسیدهای چرب ناشی از تجزیه بافت چربی استرومای پستان، می‌توانند با سازوکارهای مستقیم و غیرمستقیم، رشد اپیتلیوم پستان و به‌احتمال ریختزایی<sup>۱</sup> آن را تنظیم کنند (Hovey *et al.*, 1999). Mach *et al.* (2011) در نتایج بررسی‌های خود با تغذیه منابع مختلف اسیدهای چرب غیراشباع به گاوهای شیرده و نمونه‌گیری از بافت پستان در مراحل مختلف رشد پستان، گزارش کردند، نسخه‌برداری از ژن‌های چندی تحت تأثیر مصرف مکمل چربی قرار می‌گیرد. به‌این‌ترتیب، مجموعه ژن‌های مرتبط با رشد یاخته‌ای، چرخه یاخته، بازسازی و مرحله پسرفت و نیز مسیرهای سیگنالینگ mTOR (کنترل‌کننده سوخت‌وساز، رشد و افزایش یاخته) و JAK/STAT (سازوکار سیگنالینگ اصلی برای شمار زیادی از سایتوکین‌ها و عامل‌های رشد که موجب افزایش، تمایز، مهاجرت و پسرفت یاخته می‌شوند) تنظیم کاهشی یافتند. این موضوع به‌احتمال نشان‌دهنده تغییر در ویژگی‌های بافت غده پستان با مصرف جیره‌های غنی از اسیدهای چرب غیراشباع است. پژوهش‌هایی که در رابطه با

اشباع از روغن پالم هیدروژنه و برای تأمین مکمل چربی حاوی اسیدهای چرب با چند پیوند غیراشباع امگا-۳ از روغن ماهی (اپتومگا-۵۰، شرکت اپتوویت، انگلستان) استفاده شد. بنابراین، جیره‌های مورد استفاده عبارت بودند از: (۱) جیره حاوی مکمل روغن پالم و (۲) جیره حاوی مکمل چربی روغن ماهی. این جیره‌ها از ۴۲ روز پیش از زایش احتمالی تا ۶۳ روز پس از زایش در اختیار گاوهای هر دو گروه قرار گرفتند. جیره‌های غذایی در دوره پیش و پس از زایش بر پایه نیازمندی‌های گاو شیری ۲۰۰۸ NRC تنظیم و با استفاده از نرم‌افزار Aminocow NRC متوازن شدند. جیره‌های آزمایشی و ترکیب شیمیایی آن‌ها در جدول ۱ نشان داده شده‌اند. ترکیب اسیدهای چرب موجود در مکمل‌های چربی مورد استفاده نیز در جدول ۲ نشان داده شده‌اند. لازم به یادآوری است که تنها نیمی از ترکیب اپتومگا-۵۰ را روغن ماهی تشکیل داده و مابقی آن از مواد حامل مانند زئولیت تشکیل شده است.

بر پایه تاریخ تلقیح و محاسبه تاریخ احتمالی زایش برای هر دام، فاصله بین خون‌گیری‌ها هر ۲۱ روز یکبار تعیین شد. به این ترتیب، تاریخ خون‌گیری برای هر دام، روزهای  $(42 \pm 9/2)$  و  $(21 \pm 5/8)$  و ۲۱ روز پیش از تاریخ احتمالی زایش، روز زایش، ۲۱ و ۴۲ روز پس از زایش در نظر گرفته شد. چرخه تخمدانی گاوها با استفاده از دو تزریق متوالی پروستاگلاندین  $F_{2\alpha}$  به فاصله ۱۴ روز پس از تأیید فعال بودن تخمدان، همزمان شد. خون‌گیری در صبح، پیش از عرضه خوراک و وعده صبح به حیوان، از طریق سیاهرگ دمی و با استفاده از ونوجکت‌های تحت خلأ انجام شد. پس از جداسازی سرم خون، مقادیر هورمون‌های استرادیول و پروژسترون خون با استفاده از کیت‌های تجاری (Diaplus inc., USA) و به روش الیزا تعیین شد. حساسیت کیت و درصد ضریب تغییرپذیری داخل محاسبه شده، به ترتیب برای استرادیول برابر  $6/5$  پیکوگرم در میلی‌لیتر و  $11/26$  درصد و برای پروژسترون برابر  $0/1$  نانوگرم در میلی‌لیتر و  $8/73$  درصد بودند.

تأثیر اسیدهای چرب غیراشباع با چند اتصال دوگانه بر بافت پستان انجام شده‌اند، به‌طور عمده شامل بررسی‌ها روی انسان یا جوندگان آزمایشگاهی و یا کشت یاخته/ بافت بوده‌اند که به ارزیابی تأثیر این اسیدهای چرب بر غده (تومور)زایی یا مهار رشد و گسترش یاخته‌های سرطانی پرداخته‌اند (Gabor et al., 1985; Welsch, 1992; McLennan & Ma, 2010, Liu & Ma, 2014). نتایج بررسی‌های انجام شده روی نشخوارکنندگان نیز بیشتر روی جنبه‌های رشدی بافت پستان در حوالی بلوغ و در دام‌های نابالغ صورت پذیرفته‌اند و تکیه بیشتر این بررسی‌ها بر میزان انرژی دریافتی و تأثیر منفی ازدیاد آن بر رشد و نمو بافت پستان بوده است (Hovey et al., 1999; Sejrsen et al., 2000). به این ترتیب ملاحظه می‌شود که در ارتباط با نقش زیستی این اسیدهای چرب کنشی در مراحل بحرانی رشد پستان (به‌ویژه دوره خشکی) و تأثیر آن بر رشد و تکامل پستان در گاو شیری، اطلاعات بسیار محدود است. هدف این مطالعه، ارزیابی روند تغییرپذیری ژن‌های درگیر در رشد و نمو بافت پستان با مصرف مکمل چربی غیراشباع و اشباع بود.

### مواد و روش‌ها

این آزمایش در مزرعه آموزشی پژوهشی گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران به مدت شش ماه انجام شد. از بین گاوهای موجود در مزرعه، شمار ده رأس گاو شیری هلشتاین با دست‌کم یکبار زایش انتخاب شدند. تولید شیر دوره پیشین این گاوها با هم همسان بوده و در اوایل دوره خشکی خود قرار داشتند. دام‌ها بر پایه شمار زایش و تولید شیر پیشین، به دو گروه یکسان تقسیم شده و پس از آن در جایگاه‌های انفرادی جای داده شدند. وزن‌کشی و تعیین نمره وضعیت بدنی پیش از آغاز آزمایش انجام شده و در طول آزمایش به‌صورت هفتگی ادامه یافت. جیره‌های استفاده شده در این آزمایش تنها از نظر منبع مکمل چربی با یکدیگر تفاوت داشتند و از نظر انرژی و نیتروژن یکسان بودند. به‌منظور تأمین مکمل چربی حاوی اسیدهای چرب

جدول ۱. اجزاء تشکیل دهنده و ترکیب شیمیایی جیره‌ها  
Table 1. Ingredient and chemical composition of diets

	Close up diets		Fresh diets		Early Lactation diets	
	PO	FO	PO	FO	PO	FO
Ingredient composition (% of DM)						
Alfalfa hay	32.1	32.1	28.6	28.6	19.5	19.5
Corn silage 10% grain	28.2	28.2	15.9	15.9	24.0	24.0
Beet pulp	-	-	6.57	6.57	4.33	4.33
Barley grain	11.9	11.9	14.0	14.0	14.6	14.6
Corn grain	5.95	4.27	8.00	7.75	5.22	4.96
Soybean meal	7.52	7.52	13.5	13.5	9.39	9.39
Corn gluten meal	-	-	1.50	1.50	1.04	1.04
Meat meal	-	-	0.50	0.50	1.04	1.04
Cottonseed whole	-	-	3.75	3.50	2.61	2.61
Wheat grain	3.96	4.36	2.50	2.50	5.22	5.22
Sunflower meal	-	-	-	-	6.78	6.78
Optomega 50	-	0.80	-	2.00	-	2.08
Palm oil hydro.	0.40	-	1.00	-	1.04	-
Wheat barn	5.94	6.14	-	-	0.89	0.63
Vit. & Min. supplement	0.47	0.47	0.50	0.50	0.73	0.73
Sodium bicarbonate	-	-	0.75	0.75	0.83	0.83
Salt	0.08	0.08	0.15	0.15	0.21	0.21
Limestone	0.55	0.55	0.10	0.10	0.41	0.41
Dicalcium phosphate	0.16	0.16	0.55	0.55	0.31	0.31
Anionic salt	1.52	1.52	-	-	-	-
Zeolit	-	-	0.90	0.40	1.56	1.04
Biotin vit.	-	-	0.07	0.07	0.08	0.08
Glycoline	1.19	1.19	1.00	1.00	-	-
Micozorb	0.08	0.08	0.07	0.07	0.05	0.05
Magnesium oxide	-	-	0.15	0.15	0.17	0.17
Chemical composition (g/Kg)						
NE <sub>i</sub> (Mcal/ Kg)	1.50	1.50	1.64	1.64	1.60	1.60
NDF	37.0	37.2	32.2	32.0	31.8	32.0
NFC	37.3	37.0	37.2	37.0	36.9	37.0
CP	15.0	15.0	17.4	17.3	17.1	17.2
Fat	3.10	3.10	4.10	4.10	3.98	4.01
Ca	0.84	0.87	0.83	0.82	0.91	0.92
P	0.43	0.44	0.44	0.44	0.49	0.50

\* PO: Palm oil group; FO: Fish oil group.

\* PO: گروه دریافت‌کننده چربی اشباع پالم؛ FO: گروه دریافت‌کننده روغن ماهی.

سوزن بافت‌برداری (بیوپسی) با درجه ۱۴ و طول سوزن ۱۳ سانتی‌متر نمونه‌هایی از بافت پستان برداشته شدند. محل بافت‌برداری، کارتیۀ عقبی سمت راست حدود ۶ سانتی‌متر پایین‌تر از قاعده پستان و در خط میانی کارتیۀ (در فاصله ۳-۴ سانتی‌متری از خط وسط پستان) در نظر گرفته شد تا احتمال آسیب به رگ‌های بزرگ پستان به کمترین میزان برسد. پس از پایان کار، محل بافت‌برداری دوباره با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی شد. سپس به‌منظور قطع سریع‌تر خونریزی، کیسه یخ روی موضع قرار گرفته و با پاشش (اسپری) تتراسیکلین پوشانده شد. کارتیۀ با دست دوشیده شد تا لخته‌های خون تشکیل شده، از راه نوک پستان خارج شوند و لخته‌ای در پستان باقی نماند. هر نمونه بافت حدود ۱۰ الی ۲۰ میلی‌گرم وزن، حدود ۲ سانتی‌متر طول و در حدود ۰/۲ میلی‌متر قطر داشت. نمونه‌ها پس از شستشو در سرم فیزیولوژیک در کرایوتیوپ‌های بدون DNase و RNase قرار گرفته و بی‌درنگ در نیتروژن مایع انداخته شدند. نمونه‌های بافت

جدول ۲. پروفیل اسیدهای چرب مکمل‌های چربی

Table 2. Fatty acids profile of fat supplements

Index	Palm oil (%)	Fish oil (%)
C16:0	71-76	-
C18:0	4-6	-
C18:1	13-17	-
C18:2	2-4	4
C18:3	-	2
C18:4	-	2
C20:4	-	2
C20:5	-	6-8
C22:5	-	3
C22:6	-	9-11

نمونه‌گیری از بافت پستان در دو نوبت به فاصله دو ماه (روزهای ۷ و ۶۳ پس از زایش) به روش Safayi *et al.* (2010) با اندکی تغییر انجام شد. روش کار به این صورت بود که پس از دوشش وعده شیر صبحگاهی، دام مقید شده و پستان در آغاز با آب گرم و پس‌از آن با بتادین اسکراب کامل شسته شد. موهای کارتیۀ‌های عقب کامل تراشیده شد. پس از شستشو با میزان کافی بتادین با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی شد. سپس با تزریق لیدوکائین بیحسی موضعی انجام شد و با استفاده از

دستگاه ABI 7500 ساخت کشور امریکا استفاده شد. جدول ۳ توالی آغازگرهای مورد استفاده را نشان می‌دهد. در مورد هر یک از نمونه‌ها و برای هر ۱۱ ژن مورد نظر، چرخه آستانه (CT) از روی نمودار تعیین شد و با توجه به بیان ژن مرجع (رفرنس) GAPDH و روش Pfaffl بیان ژن‌های هدف اندازه‌گیری شدند.

طرح آماری مورد استفاده، طرح کامل تصادفی بود. مقادیر به‌دست‌آمده از مطالعات بیان ژن با استفاده از Proc MIXED در نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ تحلیل شدند. مدل آماری شامل اثر ثابت جیره، زمان نمونه‌گیری و اثر متقابل آن‌ها و اثر تصادفی گاو درون جیره‌ها و ساختار مدل خود برگشتی بود. در جدول‌های نتایج حداقل مربعات میانگین‌ها به همراه خطای استاندارد میانگین گزارش شده‌اند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی انجام و سطح معنی‌داری ۵ درصد در نظر گرفته شد. مدل ریاضی طرح به‌صورت زیر است:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + A(j) + Sk + (T \times S)_{jk} + \varepsilon_{ijkl}$$

که در آن:

$Y_{ijk}$  = هر مشاهده از آزمایش؛  $\mu$  = میانگین جامعه؛  $T_i$  = اثر تیمار؛  $A(j)$  = اثر تصادفی حیوان در تیمار؛  $Sk$  = زمان نمونه‌گیری؛  $(T \times S)_{jk}$  = اثر متقابل تیمار در زمان نمونه‌گیری و  $\varepsilon_{ijkl}$  = اثر باقی‌مانده یا خطای آزمایش هستند.

تا زمان تجزیه در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. از این نمونه‌های بافت، برای سنجش بیان ژن‌های Bcl-2, Bax, TGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$ , bFGF, aFGF, IGF-I, Cox-2, TNF- $\alpha$ ، پلاسمینوژن و فیبرونکتین استفاده شد. همزمان، شماری از نمونه‌های بافت در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شده و به آزمایشگاه بافت‌شناسی برای تهیه اسلاید ارسال شدند. جداسازی RNA از بافت پستان با کمک کیت استخراج RNA تولیدی شرکت Roche آلمان با نام TriPure Isolation Reagent صورت پذیرفت. مراحل کار بر پایه روش کار یادشده در بروشور کیت استخراج RNA انجام شد. غلظت نمونه RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (Nanodrop, ND1000, USA) آزمون شد. مراحل ساخت cDNA بر پایه دستورکار کیت مربوطه انجام شد. برای اطمینان از ساخت cDNA و کیفیت آن، غلظت cDNA با دستگاه نانودراپ خوانده شده و آنگاه شماری از نمونه‌ها روی ژل برده شدند تا از کیفیت cDNA تولیدی اطمینان به دست آید. برای انجام واکنش‌های Real-time PCR، از آغازگرهای ویژه bFGF, aFGF, IGF-I, GAPDH, TNF- $\alpha$ , Cox-2, Bcl-2, Bax, TGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$  پلاسمینوژن و فیبرونکتین ویژه گاو ساخت شرکت Generay Biotech و کیت axima SYBR Green و Thermo Scientific ساخت شرکت ROXq PCR

جدول ۳. توالی رفت و برگشت آغازگرهای مورد استفاده در واکنش‌های Real-time PCR

Table 3. Forward and Reverse primers used in Real time PCR analysis

Gene Symbol	Length	Primers (5' to 3')	Accession No.
GAPDH	177 bp	Forward: gggTCATCATCTCTgCACCT Reverse: ggTCATAAgtCCCTCCACgA	XM001252479
IGF-I	195 bp	Forward: TCTCATAATACCCACCCTgACC Reverse: ACTggAgAgCATCCACCAAC	AY277406
TGF- $\alpha$	135bp	Forward: gCTgTgAACACgCAgACCTC Reverse: CCTCgCAGCAGTgTATCAgC	XM_593710
TGF- $\beta$ 1	118bp	Forward: ggTggAATACggCAACAAAATC Reverse: CCgAgAgAgCAACACAggTTC	M36271
aFGF (FGF-1)	104bp	Forward: gACACCAATgAggAATgTTTg Reverse: TgAgACCAACgAACCAATgC	NM_174055.2
bFGF (FGF-2)	199 bp	Forward: gCAGAAgAgAgAggggTTgTg Reverse: gCCAgTTCgTTTCAGTgC	NM_174056.3
Bax	120 bp	Forward: TTTgCTTCAgggTTTCATCC Reverse: CgCTTCAgACACTCgCTCAg	NM_173894.1
Bcl-2	69 bp	Forward: ACgCCITTTgTggAgCTgTATg Reverse: CCTTCAGAgACAgCCAaggAgA	U92434
TNF $\alpha$	114 bp	Forward: CCAGAgggAAGAgCAGTCCC Reverse: TCggCTACAACgTgggCTAC	NM_173966.3
COX-2	109 bp	Forward: TgATTgACAgTCCACCAACTT Reverse: CAgTCATCAggCACAggAgg	AF004944
Fibronectin1(FN1)	135 bp	Forward: TTTACCACCACCgCACgAg Reverse: gACCCAggAAACCACAAAgC	NM_001163778.1
Plasminogen	203 bp	Forward: gCggTggTgTTCCTACTTCTC Reverse: TgTTgCTCTTACTgTggTACTgg	NM_173951

## نتایج و بحث

می‌شود. این یاخته‌ها شامل یاخته‌های چربی و یاخته‌های عضلانی هستند که منابع تولید و هدف‌های سایتوکین‌ها هستند. نتایج بسیاری از بررسی‌ها گزارش داده‌اند، فعال‌کننده‌های PPAR $\gamma$  (مانند اسید لینولنیک، اسید لینولئیک، اسید اولئیک و پروستاگلاندین J2 و غیره)، بازدارنده فعال‌سازی ژن‌های التهابی شامل TNF- $\alpha$  می‌شوند. بررسی‌های کشت یاخته‌های نشان داده‌اند، EPA و DHA می‌توانند تولید سایتوکین‌های التهابی مانند TNF- $\alpha$ ، IL-1b، IL-6، و IL-8 تولیدشده از مونوسیت‌ها، درشت‌خوارها و یاخته‌های پوششی (اندوتلیالی) را مهار کنند. مصرف روغن ماهی، تولید خارج از بدن موجود زنده TNF- $\alpha$ ، IL-1b و IL-6 توسط درشت‌خوارهای جوندگان را کاهش داد (Calder, 2008). بر پایه این نتایج مصرف اسیدهای چرب امگا-3 به احتمال توانسته است سبب کاهش التهاب در غده پستان شود.

تأثیر زمان تنها برای ژن Bcl-2 معنی‌دار شد ( $P < 0.05$ ). تغییر بیان نسبی ژن BCL-2 در بافت پستان در نگاره ۱ (C) نشان داده شده است. مشاهده می‌شود، بین گروه‌های آزمایشی در هیچ‌یک از دوره‌های نمونه‌گیری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ( $P > 0.05$ ). اما بیان ژن با گذشت زمان در هر دو گروه آزمایشی افزایش یافت ( $P = 0.09$ ) که میزان این افزایش در گروه دریافت‌کننده روغن ماهی به لحاظ عددی از گروه دریافت‌کننده روغن پالم بیشتر بود، اما این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نشد.

نتایج به‌دست‌آمده از بیان ژن در جدول ۴ و روند تغییرپذیری برخی از آن‌ها در نگاره ۱ نشان داده شده‌اند. با مراجعه به جدول ۴ مشاهده می‌شود که بیان ژن TNF- $\alpha$  در گروه دریافت‌کننده روغن پالم تمایل به افزایش داشت ( $P = 0.06$ ) ولی اثر زمان و اثر متقابل تیمار و زمان معنی‌دار نشد ( $P > 0.05$ ). با توجه به نگاره ۱ (B) ملاحظه می‌شود، میزان بیان این ژن در هر دو نوبت نمونه‌گیری از بافت پستان در گروه دریافت‌کننده روغن پالم بیشتر از گروه دریافت‌کننده روغن ماهی بوده و با گذشت زمان در هر دو گروه روند افزایشی داشت، ولیکن شدت این افزایش در گروه دریافت‌کننده روغن پالم بیشتر از گروه دریافت‌کننده روغن ماهی بود. عامل بافت مردگی (نکروز) غده آلفا (TNF- $\alpha$ ) سایتوکینی است که در ایجاد التهاب، پسرفت، سوخت‌وساز چربی و مقاومت به انسولین نقش دارد (Fernyhough *et al.*, 2007; Flachs *et al.*, 2009). اسیدهای چرب امگا-3 با چند پیوند غیراشباع در گونه‌های حیوانی مختلف قادر به کاهش تولید TNF- $\alpha$  هستند. این اسیدهای چرب احتمال دارد بیان TNF- $\alpha$  را با فعال‌سازی یک یا چند عامل رونویسی مانند PPAR $\gamma$  تنظیم کنند (Huang *et al.*, 2008). اگرچه TNF- $\alpha$  بیشتر از لنفوسیت‌ها و درشت‌خوار (ماکروفاژ)‌ها منشأ می‌گیرد، اکنون روشن شده است که سایتوکین‌ها، توسط یاخته‌هایی که به‌طور معمول بخشی از سامانه ایمنی به شمار نمی‌آیند نیز تولید

جدول ۴. بیان ژن‌های بافت پستان در دو گروه آزمایشی در طول هشت هفته پس از زایش

Table 4. Mammary gland genes expression in two experimental groups during 8 weeks after parturition

Gene Symbol	PO	FO	SEM	P Value		
				Treatment	Time	Treatment $\times$ Time
BAX	1.62	1.59	0.08	0.75	0.38	0.89
BCL-2	1.67	1.70	0.02	0.29	0.05	0.67
BCL-2/BAX	1.04	1.07	0.06	0.58	0.58	0.66
COX-2	1.45	1.44	0.05	0.87	0.27	0.26
TNF- $\alpha$	1.69	1.60	0.04	0.06	0.17	0.64
FGF-1(aFGF)	1.58	1.54	0.10	0.68	0.26	0.69
FGF-2(bFGF)	1.49	1.58	0.14	0.52	0.97	0.52
IGF-1	1.86	1.80	0.02	0.03	0.33	0.89
TGF - $\alpha$	1.51	1.56	0.06	0.46	0.23	0.95
TGF - $\beta$	1.67	1.64	0.04	0.54	0.11	0.37
Fibronectin1(FN1)	1.37	1.62	0.24	0.34	0.69	0.86
Plasminogen	1.65	1.25	0.21	0.13	0.12	0.29

1. Expressions of genes are based on the logarithm in Section 10.

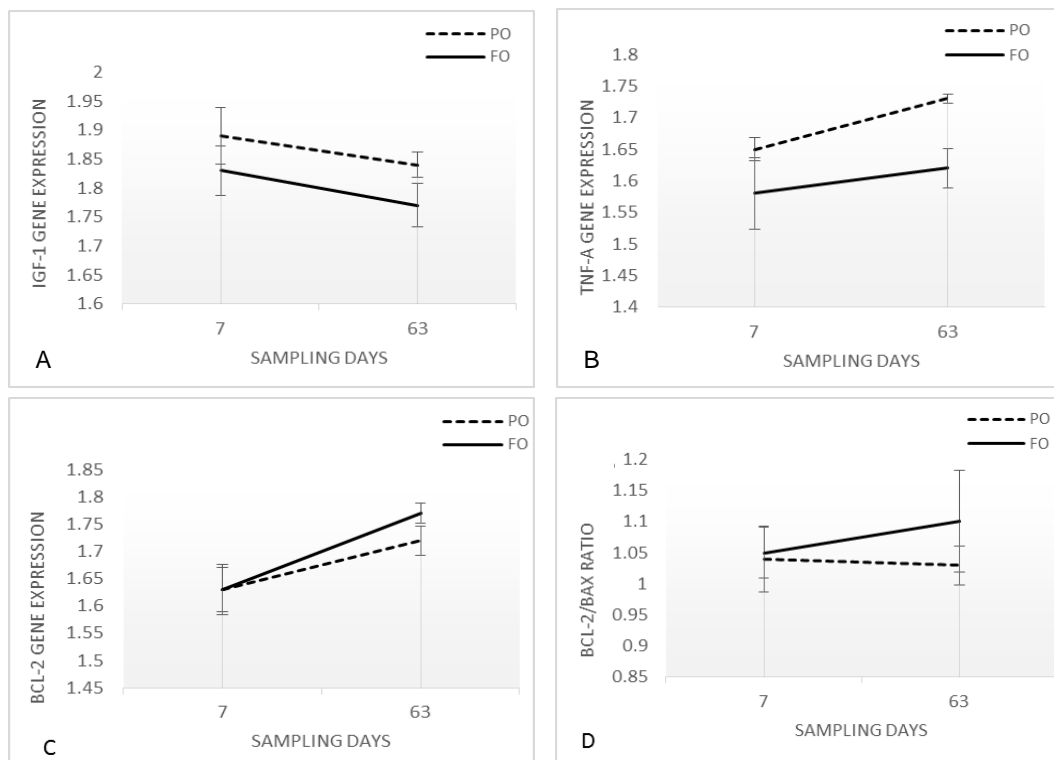
۱. مقادیر بیان ژن‌ها بر اساس لگاریتم در مبنای ۱۰ ذکر شده‌اند.

PO: Palm oil group; FO: Fish oil group.

PO: گروه دریافت‌کننده چربی اشباع پالم؛ FO: گروه دریافت‌کننده روغن ماهی.

Significantly differences is considered at  $P < 0.05$ .

سطح معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) در نظر گرفته شده است.



نگاره ۱. تغییرات بیان نسبی ژن IGF-1 (A)، TNF- $\alpha$  (B)، BCL-2 (C) و نسبت بیان دو ژن BCL-2 و BAX (D) در بافت پستان دو گروه آزمایشی طی هشت هفته پس از زایش. PO: گروه دریافت کننده چربی پالم؛ FO: گروه دریافت کننده روغن ماهی. سطح معنی داری ( $P < 0.05$ ) در نظر گرفته شده است.

Figure 1. Changes in genes expression of IGF-1 (A), TNF- $\alpha$  (B), BCL-2 (C) and BCL-2/BAX ratio (D) in mammary gland tissue of two experimental groups during 8 weeks after parturition. PO: Palm oil group; FO: Fish oil group. Significant level considered  $P < 0.05$ .

مرحلهٔ پسرقت موجب سرکوب انحطاط گیرنده‌های نوری در شبکیهٔ چشم موش‌های آزمایشگاهی بزرگ می‌شود. همچنین DHA بیان پروتئین ضد پسرقت BCL-2 را تحریک می‌کند. این اسید چرب همانند دیگر عامل‌های تغذیه‌ای یک یا چندین مسیر داخل یاخته‌ای را فعال کرده و تنظیم افزایشی بیان BCL-2 احتمال دارد در میان نخستین مراحل تأثیر ضد پسرقتی آن قرار داشته باشد (Politi *et al.*, 2001). بیان ژن‌های خانوادهٔ Bcl-2 و COX-2 می‌توانند پسرقت را مهار کنند تا یاخته‌ها در زمان نامناسب از بین نروند. اسیدهای چرب امگا-۳ با تنظیم کاهشی NF $\kappa$ B که به نوبهٔ خود موجب تنظیم کاهشی بیان COX2 می‌شود و نیز با تنظیم افزایشی بیان ژن‌های خانوادهٔ BCL-2، می‌توانند موجب بازیابی عملکرد پسرقت و کاهش آن شوند (Hardman, 2004). اگرچه تغییرپذیری دو ژن BCL-2 و BAX و نسبت BCL-2/BAX در این پژوهش به لحاظ آماری معنی‌دار نشد، ولیکن با توجه به جدول ۴ و نگارهٔ ۱ (C و D)

بیان نسبت ژن BCL-2 (به‌عنوان عامل ضدپسرقت یا آنتی آپوپتوتیک) به ژن BAX (به‌عنوان عامل آغاز پسرقت یا پروآپوپتوتیک) با گذشت زمان و نزدیک شدن به اوج تولید در گروه روغن ماهی افزایش یافت. نسبت BCL-2/BAX برای گروه دریافت کنندهٔ روغن پالم در همین دوره کاهش یافت. Colliti & Farinacci (2009) در نتایج بررسی‌های خود نشان دادند، پروتئین‌های خانوادهٔ BCL-2 بر مرحلهٔ پسرقت یاخته‌های بافت پوششی پستان در فرایند پسرقت و شیردهی اثر می‌گذارند. مهار (کنترل) تعادل بین مرگ و افزایش یاخته در چرخهٔ رشد یاخته در بافت پستان می‌تواند کاربرد عملی در تنظیم نمو غدهٔ پستان، شیردهی موفق و تولید شیر داشته باشد. Norgaard *et al.* (2008) در نتایج بررسی‌های خود مشاهده کردند، در غدهٔ پستان بز، سطح پروتئین BAX در اوج شیردهی پایین بوده و در اواخر شیردهی و در فرایند زمان خشکی افزایش یافت. همچنین مشاهده شده است، DHA با جلوگیری از

رشد و اثر افزایشی آن‌ها بر پروتئین‌های مرتبط با تنظیم منفی بر مسیر IGF مانند IGF-3 مانند IGF-3 تأکید داشته‌اند (Calviello & Serini, 2010). اما Plath-Gabler *et al.* (2001) با بررسی روند بیان ژن‌های خانواده IGF در مراحل مختلف رشد پستان در گاو چنین فرض کردند که IGF-I در غده پستان به‌طور عمده توسط یاخته‌های چربی بیان می‌شود و به همین دلیل میزان بیان آن در بافت پستان تلیسه‌ها در اواخر آبستنی بالاتر بوده و طی شیردهی (لاکتوز) و استمرار شیردهی (گالاکتوپوز) به پایین‌ترین میزان بیان خود می‌رسد.

شایان یادآوری است در بررسی‌های بافت شناختی (نتایج در حال انتشار) نشان داده شد، در گروه روغن ماهی در هر دو نوبت نمونه‌گیری نسبت به گروه روغن پالم، درصد یاخته‌های بافت پوششی بیشتر، درحالی‌که درصد بافت استرومایی کمتر بود. با توجه به نتایج بررسی‌های بیان‌شده و این آزمایش احتمال می‌رود بافت استرومای بیشتر در گروه دریافت‌کننده روغن پالم، عامل تولید بالاتر IGF-I باشد. شاید بتوان چنین گفت که روغن ماهی به دلیل غنی بودن از اسیدهای چرب غیراشباع با چند اتصال دوگانه امگا-۳، به‌احتمال موجب پیشبرد بیان و تولید زودهنگام IGF-I در بافت شده و بدین‌وسیله افزایش و نمو یاخته‌های بافت پوششی پستان را شتاب بخشیده است. همچنین بالا بودن IGF-I در کل دوره برای گروه دریافت‌کننده روغن پالم می‌تواند به‌حتم دلیل بر بالاتر بودن تأثیر آن بر بافت پستان نباشد، چراکه پروتئین‌های اتصال‌یادی (IGFBPs) بر اثر IGF-I تأثیر می‌گذارند. به دلیل محدودیت منابع بررسی‌هایی که تأثیر این اسیدهای چرب را بر بافت سالم پستان گاوهای آبستن و شیرده بررسی کرده باشند، اظهارنظر در این زمینه و بیان دقیق سازوکارهای دخیل در این امر مشکل است و نیاز به تحقیقات بیشتر دارد. برهمکنش تیمار و زمان برای دیگر ژن‌های باقی‌مانده *aFGF*, *bFGF*, *TGF-α*, *TGF-β*, *COX-2*, *BAX* پلاسمینوژن و فیبرونکتین - معنی‌دار نبود.

با سنجش هورمون‌های سرم خون مشخص شد که مقادیر استرادیول و پروژسترون بین دو گروه آزمایشی تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ( $P > 0.05$ )، جدول ۵ و نگاره ۲).

می‌توان روند افزایشی را برای ژن‌های ضدپسرفت و روند کاهش‌ی بیان ژن‌های آغاز پسرفت را در گروه مصرف‌کننده روغن ماهی مشاهده کرد. بنابراین می‌توان احتمال داد که با مصرف روغن ماهی و به تعویق افتادن روند پسرفت که به‌طور طبیعی در یاخته‌های بافت پوششی پستان با نزدیک شدن به اوج شیردهی رخ می‌دهد، ساختارهای آلونولی تولیدکننده شیر حفظ شده و در نتیجه برای مدت زمان طولانی‌تری تولید شیر بالاتری را برای گروه مصرف‌کننده روغن ماهی (Javaheri *et al.*, 2014) شاهد خواهیم بود.

بیان ژن IGF-I تحت تأثیر مصرف روغن ماهی کاهش معنی‌داری را در مقایسه با گروه دریافت‌کننده روغن پالم نشان داد ( $P < 0.05$ ). نگاره ۱ (A) روند تغییرپذیری این ژن را نشان می‌دهد. بیان نسبی این ژن در گروه دریافت‌کننده روغن پالم در هر دو نوبت نمونه‌گیری از بافت پستان نسبت به گروه مصرف‌کننده روغن ماهی بالاتر بود و با گذشت زمان (دو ماه پس از زایش) در هر دو گروه کاهش یافت، ولیکن این تغییر به لحاظ آماری معنی‌دار نبودند ( $P > 0.05$ ). اگرچه غلظت‌های در گردش IGF-I ممکن است بر غده پستان اثر اندوکرینی داشته باشند، مدارک زیادی مبنی بر اثر پاراکرین یا اتوکرینی IGF-I بر رشد غده پستان وجود دارد. به‌نظر می‌رسد قسمت‌های استرومایی غده پستان مسئول ساخت (سنتز) موضعی IGF-I باشند (Cohick, 1998; Flint *et al.*, 2005). برهمکنش بخش‌های استرومایی و بافت پوششی غده پستان اثرهای چشمگیری بر رشد و ریخت‌زایی یاخته‌ای دارد، لذا پیشنهاد شده است که اپیتلیوم در حال افزایش، احتمال دارد با آزادسازی موضعی عامل‌های قابل انتشار، بازخورد مثبتی بر استرومای احاطه‌کننده‌اش اعمال کند تا بیان IGF-I و IGF-II را افزایش دهد (Hovey *et al.*, 1999).

اسیدهای چرب غیراشباع رشد یاخته‌های بافت پوششی پستان را تحریک کرده و می‌توانند تأثیر برون‌تنی دیگر عامل‌های رشد مانند IGF-I و EGF را افزایش دهند (Hurley & Ford, 2002). بررسی‌های اندکی به بررسی تأثیر اسیدهای چرب امگا-۳ بر پروتئین‌های مسیر IGF پرداخته‌اند و همگی بر تأثیر کاهش‌ی این اسیدهای چرب بر پروتئین‌های مرتبط با سرطان‌زایی و



جدول ۵. غلظت استرادیول و پروژسترون سرم خون بین دو گروه آزمایشی (۴۲ روز پیش از زایش تا ۴۲ روز پس از زایش)  
Table 5. Serum Estradiol and Progesterone concentration between two experimental groups (-42 to 42 days of parturition)

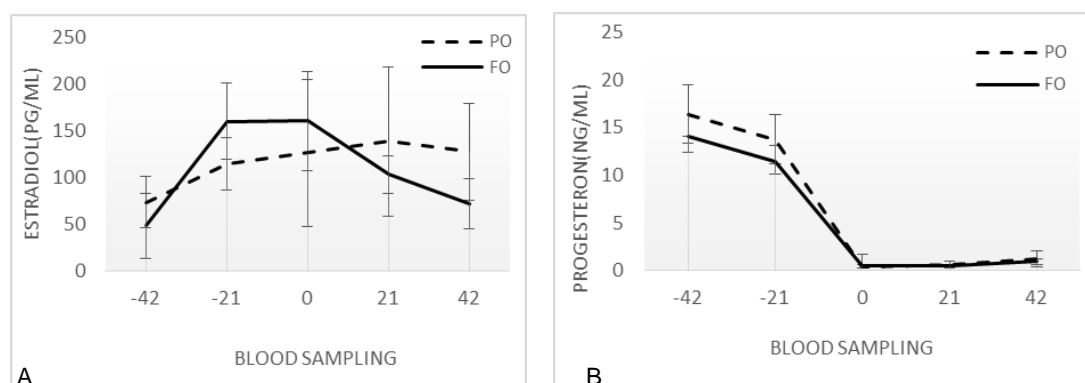
Hormones	PO	FO	SEM	P Value		
				Treatment	Time	Treatment× Time
Estradiol (pg/ml)	116.35	108.95	32.25	0.69	0.43	0.79
Progesterone (ng/ml)	6.50	5.47	1.52	0.53	<0.01	0.78

PO: Palm oil group; FO: Fish oil group.

PO: گروه دریافت کننده چربی اشباع پالم؛ FO: گروه دریافت کننده روغن ماهی.

Significantly differences is considered at  $P<0.05$ .

سطح معنی داری ( $P<0.05$ ) در نظر گرفته شده است.



نگاره ۲. روند تغییرات غلظت استرادیول (A) و پروژسترون (B) سرم دو گروه آزمایشی طی شش نوبت خونگیری (۴۲ روز پیش از زایش تا ۴۲ روز پس از زایش). معنی داری در سطح پنج درصد در نظر گرفته شده است ( $P<0.05$ )

Figure 2. Changes in serum Estradiol and Progesterone concentration in two experimental groups during six blood samplings (-42 to 42 days of parturition). Significant level considered  $P<0.05$ .

### نتیجه‌گیری

بر پایه نتایج به دست آمده، افزودن روغن ماهی توانست با افزایش نسبت ژن‌های عامل ضدپسرفت در اوج شیردهی، سبب به تعویق انداختن روند طبیعی مرحلهٔ پسرفت و بهبود شرایط شیردهی در بافت پستان شود. همچنین کاهش بیان ژن  $TNF-\alpha$  در پستان گروه دریافت کننده روغن ماهی نشانه‌ای از کاهش التهاب در این دام‌ها است.

### سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت‌های مالی دانشگاه تهران در قالب طرح نوع ششم به شماره ۷۱۰۸۰۱۷/۶/۱۸ انجام شده است. بدینوسیله از مسئولان مربوط، تشکر و قدردانی می‌گردد.

نتایج مربوط به تولید و ترکیب‌های شیر که در بررسی Javaheri Barfouroushi *et al.* (2014) گزارش شده، نشان داد مصرف روغن ماهی موجب افزایش معنی‌دار تولید شیر از هفتهٔ ششم شیردهی به بعد شد، اما درصد و میزان چربی شیر با مصرف روغن ماهی کاهش یافت ( $P<0.05$ ) و تأثیر مصرف روغن ماهی بر شمار یاخته‌های بدنی (سوماتیک) شیر نیز به صورت کاهشی نمایان شد ( $P<0.05$ ). این نتایج همراه با داده‌های ارائه شده در این مقاله بیانگر آن است که تأثیر سودمند اسیدهای چرب امگا-۳ روغن ماهی بر تولید شیر در گاو ممکن است با تأثیر بر بیان ژن‌های درگیر در رشد و تکامل و مرحلهٔ پسرفت غدهٔ پستان میانجی‌گری شود.

### REFERENCES

- Bernard, L., Toral, P. G. & Chilliard, Y. (2017). Comparison of mammary lipid metabolism in dairy cows and goats fed diets supplemented with starch, plant oil, or fish oil. *Journal of Dairy Science*, 100, 9338-9351.
- Calviello, G. & Serini, S. (2010). *Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids and cancer*. 261pp. Springer Science+Business Media. New York, USA.
- Capuco, A. V., Ellis, S. E., Hale, S. A., Long, E., Erdman, R. A., Zhao, X. & Paape, M. J. (2003). Lactation persistency: Insights from mammary cell proliferation studies. *Journal of Animal Science*, 81(Suppl.3), 18-31.

4. Carreno, D., Hervás, G., Toral, P. G., Castro-Carrera, T. & Frutos, P. (2016). Fish oil – induced milk fat depression and associated downregulation of mammary lipogenic genes in dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 99, 7971-7981.
5. Cohick, W. S. (1998). Role of the insulin-like growth factors and their binding proteins in lactation. Symposium: Growth hormone and insulin-like growth factors. *Journal of Dairy Science*, 81, 1769-1777.
6. Colliti, M. & Farinacci, M. (2009). Cell turnover and gene activities in sheep mammary glands prior to lambing to involution. *Tissue Cell*, 41, 326-333.
7. Dangour, A. D. & Uauy, R. (2008). n-3 long chain polyunsaturated fatty acids for optimal function during brain development and ageing. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 17, 185-188.
8. Fernyhough, M. E., Okine, E., Hausman, G., Vierck, J. L. & Dodson, M. V. (2007). PPAR $\gamma$  and GLUT-4 expression as developmental regulators/ markers for preadipocyte differentiation into an adipocyte. *Domestic Animal Endocrinology*, 33, 367-378.
9. Flachs, P., Rossmeisl, M., Bryhn, M. & Kopecky, J. (2009). Cellular and molecular effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on adipose tissue biology and metabolism. *Clinical Science*, 116, 1-16.
10. Flint, D. J., Boutinaud, M., Tonner, E., Wilde, C. J., Hurley, W., Accorsi, P. A., Kolb, A. F., Whitelaw, C. B. A., Beattie, J. & Allan, G. J. (2005). Insulin-Like growth factor binding proteins initiate cell death and extracellular matrix remodeling in the mammary gland. *Domestic Animal Endocrinology*, 29, 274-282.
11. Frutos, P., Toral, P. G. & Hervás, G. (2017). Individual variation of the extent of milk fat depression in dairy ewe fed fish oil: milk fatty acid profile and mRNA abundance of candidate genes involved in mammary lipogenesis. *Journal of Dairy Science*, 100, 9611-9622.
12. Gabor H., Hillyard L.A. & Abraham S. (1985). Effect of dietary fat on growth kinetics of transplantable mammary adenocarcinoma in BALB/c Mice. *Journal of the National Cancer Institute*. 74: 1299-1305.
13. Hardman, W. E. (2004). (n-3) Fatty acids and cancer therapy. *The Journal of Nutrition*, 134, 3427S-3430S.
14. Hovey, R. C., McFadden, T. B. & Akers, R. M. (1999). Regulation of mammary gland growth and morphogenesis by the mammary fat pad: A species comparison. *Journal of Mammary gland Biology and Neoplasia*, 4, 53-68.
15. Huang, F. R., Zhan, Z. P., Luo, J., Jian, S. W. & Peng, J. (2008). Duration of feeding linseed diet influences peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and tumor necrosis factor gene expression, and muscle mass of growing–finishing barrows. *Livestock Science*, 119, 194-201.
16. Hurley, W. L. & Ford Jr, J. A. (2002). *Growth, Development, Involution. Mammary gland*. Elsevier Science Ltd. USA.
17. Javaheri Barfourooshi, H., Towhidi, A., Sadeghipanah, H., Zhandi, M. & Zeinoaldini, S. (2014.) Effect of supplemental n-3 fatty acids during pre- and postpartum diets on health and production of Holstein dairy cows. *Iranian Journal of Animal Science*, 45(3), 245-255. (in Farsi)
18. Liu J. & Ma D.W.L. (2014). The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention and treatment of breast cancer. *Nutrients*, 6, 5184-5223.
19. Mach, N., Jacobs, A. A. A., Kruijt, L., van Baal, J. & Smits, M. A. (2011). Alteration of gene expression in mammary gland tissue of dietary cows in response to dietary unsaturated fatty acids. *Animal*, 5, 1217-1230.
20. McLennan, M. & Ma, D.W.L. (2010). Role of dietary fatty acids in mammary gland development and breast cancer. *Breast Cancer Research*, 12, 211-220.
21. Norgaard, J. V., Nielsen, M. O., Theil, P. K., Sorensen, M. T., Safayi S. & Sejrsen, K. (2008). Development of mammary glands of fat sheep submitted to restrict feeding during late pregnancy. *Small Ruminant Research*, 76, 155-165.
22. Plath-Gabler, A., Gabler, C., Sinowatz, F., Berisha, B. & Schams, D. (2001). The expression of the IGF family and GH receptor in the bovine mammary gland. *Journal of Endocrinology*, 168, 39-48.
23. Politi, L., Rotstein, N. & Carri, N. (2001). Effects of docosahexaenoic acid on retinal development: Cellular and molecular aspects. *Lipids*, 36(9), 927-935.
24. Purup, S., Vestergaard, M., Weber, M. S., Plaut, K., Akers, R. M. & Sejrsen, K. (2000). Local regulation of pubertal mammary growth in heifers. *Journal of Animal Science*, 78(Suppl.3), 36-47.
25. Safayi, S. Theil, P. K., Elbrond, V. S., Hou, L., Engbaek, M., Norgaard, J. V., Sejrsen, K. & Nielsen, M. O. (2010). Mammary remodeling in primiparous and multiparous dairy goats during lactation. *Journal of Dairy Science*, 93, 1478-1490.
26. Sejrsen, K., Purup, S., Vestergaard, M. & Foldager, J. (2000). High body weight gain and reduced bovine mammary growth: physiological basis and implications for milk yield potential. *Domestic Animal Endocrinology*, 19, 93-104.

27. Toral, P.G., Hervas, G., Belenguer, A. Carreno, D. & Frutos, P. (2017). mRNA abundance of genes involved in mammary lipogenesis during fish oil-or *trans*- 10, *cis*-12 CLA- induced milk fat depression in dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 100, 3182-3192.
28. Wall, E. H., Auchtung, T. L., Dahl, G. E., Ellis, S. E. & MacFadden, T. B. (2005). Exposure to short day photoperiod during the dry period enhances mammary growth in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 88, 1994-2003.
29. Wall, E. H. & McFadden, T. B. (2010). The effects of milk removal or four-times-daily milking on mammary expression of genes involved in the insulin-like growth factor-I axis. *Journal of Dairy Science*, 93, 4062-4070.
30. Weber, M. S., Purup, S., Vestergaard, M., Akers, R. M. & Sejersen, K. (2000). Nutritional and somatotropin regulation of mitogenic response of mammary cells to mammary tissue extracts. *Domestic Animal Endocrinology*, 18, 159-164.
31. Welsch, C. W. (1992). Dietary fat, calories, and mammary gland tumorigenesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 332, 203-222.