The University of Tehran Press

Iranian Journal of Animal Science

Online ISNN: 2008-4773

Homepage: http:// ijas.ut.ac.ir/

# Effect of dietary magnesium on reproductive parameters and expression of matrix metalloproteinase 2 and 9 and tissue inhibitor 2 in the placenta of Holstein cows

**Forood Ehsanbakhsh[1], Hamid Amanlou[2]✉, Mohammad Hossein Shahir [3]**

1. Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran. Email: forood.ehsanbakhsh@znu.ac.ir
2. Corresponding author, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran. Email: amanlou@znu.ac.ir
3. Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran. Email: shahir_m@znu.ac.ir

**Article Info**

**Article type:**

Research Article

**Article history:**

Received: 15 March 2022

Received: 16 August 2022

Accepted: 20 August 2022

Published online: 22 June 2023

**Keywords**:

*Magnesium,*

*Gene expression,*

*Retained placenta,*

*Pregnancy*.

**ABSTRACT**

The aim of this experiment was to evaluate the effect of dietary Mg on reproduction performance and expression of MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 genes in the placenta. 50 cows in each treatments, from 3 weeks to calving were randomly assigned to four experimental treatments. Treatments included control treatment (magnesium at the level of NRC recommendations), magnesium sulfate, magnesium carbonate and magnesium oxide treatments (magnesium 0.6% of DM). Placenta samples were taken after calving and mRNA expression were investigated. Blood samples were collected pre and postpartum and plasma metabolites were measured. Relative mRNA expression of MMP-9 in magnesium oxide and magnesium sulfate treatments was higher and the percent of retained placenta in this treatments was lower than control group. Experimental treatments had no significant effect on the expression of MMP-2 and TIMP-2. Experimental diets had no effect on uterine involution score, first estrus and AI/conception. Treatments improved plasma Mg and insulin concentrations and reduced NEFA significantly. Magnesium oxide treatment improved pregnancy at first AI and pregnancy by 210 days postpartum. Cows in the experimental diets had fewer open days than the control group. The results showed that increasing dietary Mg compared to NRC (2001) recommendations could reduce retained placenta and improve fertility.

**Cite this article:** Ehsanbakhsh, F., Amanlou, H., & Shahir, M. H. (2023). Effect of dietary magnesium on reproductive parameters and expression of matrix metalloproteinase 2 and 9 and tissue inhibitor 2 in the placenta of Holstein cows. *Iranian Journal of Animal Science*, 54 (2), 117-128. DOI: http//doi.org10.22059/IJAS.2022.340508.653881

© The Author(s).

DOI: http//doi.org10.22059/IJAS.2022.340508.653881

**Publisher:** The University of Tehran Press.

## Extended Abstract

### Introduction

Maintaining health and production during transition period is an important challenge in dairy herds. Reproduction and performance of dairy cows are influenced by several factors. Metabolic diseases such as ketosis and retained placenta can have a negative effect on reproduction and cause economic losses in dairy farms. Magnesium is an important mineral in the diet. Lack of magnesium in the diet can have negative consequences on animal reproduction and health. Several studies have shown that increasing plasma magnesium reduces retained placenta and reduces first ovulation time. Higher plasma magnesium can improved conception rate. The purpose of this study was to investigate the effect of dietary magnesium and plasma magnesium level on reproductive performance and the expression of genes related to retained placenta.

**Materials and Methods**

200 multiparous Holstein cows with body weight 726± 31.2, body condition score 3.35± 0.32 were enrolled in a completely randomized design at 21 d before expected calving. Dietary treatments were control diet (CO; Mg at the level of conventional diets), magnesium sulfate diet (MgS; Mg= 0.6% of DM), magnesium carbonate diet (MgC; Mg= 0.6% of DM), and magnesium oxide diet (MgO; Mg= 0.6% of DM). All cows received the same postpartum diet. Blood samples were collected 4 h after morning feeding from the on −21, −14, −7, −3, 1, 3, 7, 14 and 21 d relative to expected calving date. After calving, blood samples were taken weekly. Magnesium, insulin and NEFA of plasma were analyzed pre and postpartum. After calving, placenta samples were taken from cows and placed in liquid nitrogen to investigate MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 genes expression. Uterine involution score, number of services per conception (AI/conception), first estrus time and days open were recorded for all of 200 cows.

**Results and discussion**

The results showed that pre and postpartum plasma magnesium and insulin were increased with supplementation of magnesium treatments. Magnesium oxide decreased plasma NEFA ($P \leq 0.05$). Magnesium oxide decreased the percentage of retained placenta and increased the percentage of pregnancy at first AI and pregnancy up to 210 days after calving ($P \leq 0.05$). Uterine involution score was not different between treatments. Experimental treatments had no significant effect on relative expression of genes MMP-2 and TIMP-2. Relative expression of MMP-9 was significantly higher in the magnesium oxide and sulfate diets than in the control group ($P \leq 0.05$).

**Conclusion**

The results of this study showed that higher magnesium in diet and plasma increases magnesium and insulin of plasma and reduces blood NEFA. Also, magnesium treatments, especially magnesium oxide, reduce retained placenta and improve reproduction performance.

انتشارات دانشگاه تهران

نشریه علوم دامی ایران، دوره ۵۴، شماره ۲

شاپا الکترونیکی: ۷۹۴۹-۲۴۲۳

Homepage: http://ijas.ut.ac.ir//

# اثر منیزیم جیره بر پارامترهای تولیدمثلی و بیان ژن‌های ماتریکس متالوپروتئیناز ۲ و ۹ و مهارکننده بافتی ۲ در جفت گاوهای هلشتاین

فرود احسان بخش[۱] | حمید امانلو[۲]✉ | محمدحسین شهیر[۳]

۱. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران. رایانامه: forood.ehsanbakhsh@znu.ac.ir

۲. نویسنده مسئول، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران. رایانامه: amanlou@znu.ac.ir

۳. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران. رایانامه: shahir_m@znu.ac.ir

**اطلاعات مقاله**

**نوع مقاله:**

مقالهٔ پژوهشی

**تاریخ دریافت:** ۱۴۰۰/۱۲/۲۴

**تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۱/۰۵/۲۵

**تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۱/۰۵/۲۹

**تاریخ انتشار:** ۱۴۰۲/۰۴/۰۱

**کلیدواژه‌ها:**

*منیزیم، بیان ژن، جفت ماندگی، آبستنی.*

**چکیده**

هدف از انجام این آزمایش بررسی اثر منیزیم جیره بر عملکرد تولیدمثلی و بیان ژن‌های متالوپروتئیناز ۲ (MMP-2)، متالوپروتئیناز ۹ (MMP-9) و مهارکننده بافتی ۲ (TIMP-2)در جفت بود. تعداد ۵۰ راس گاو در هر تیمار از ۳ هفته مانده به زایش به طور تصادفی به چهار تیمار آزمایشی اختصاص یافتند. تیمارها شامل تیمار شاهد (منیزیم در سطح توصیه‌های (NRC)، تیمار سولفات منیزیم، تیمار کربنات منیزیم و تیمار اکسید منیزیم (منیزیم ۰/۶ درصد ماده خشک جیره) بود. پس از زایش از جفت هر گاو نمونه‌برداری انجام شده و بیان نسبی ژن ها مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌گیری از خون پیش و پس از زایش انجام شده و متابولیت‌های پلاسما اندازه‌گیری شد. در تیمار اکسید منیزیم و سولفات منیزیم بیان ژن MMP-9 بالاتر بود و درصد جفت ماندگی در تیمارهای آزمایشی پائین‌تر از گروه شاهد بود (P <۰/۰۵) تیمارهای آزمایشی تاثیر معنی‌داری بر بیان ژن‌هایMMP-2 و TIMP-2 نداشتند. جیره‌های آزمایشی باعث بهبود وضعیت منیزیم و انسولین پلاسما و کاهش معنی‌دار NEFA شدند (P<۰/۰۵) تیمارها تاثیری بر امتیاز برگشت رحمی، اولین فحلی و تعداد تلقیح نداشتند. تیمار اکسید منیزیم آبستنی در اولین تلقیح و آبستنی تا روز ۲۱۰ پس از زایش را بهبود داد. دام ها در تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد روزهای باز کمتری داشتند (P<۰/۰۵ ) نتایج نشان داد که افزایش منیزیم جیره در مقایسه با توصیه های NRC (2001) می تواند منجر به کاهش جفت ماندگی و بهبود باروری شود.

**استناد:** احسان بخش، فرود؛ امانلو، حمید؛ و شهیر، محمدحسین (۱۴۰۲). اثر منیزیم جیره بر پارامترهای تولیدمثلی و بیان ژن‌های ماتریکس متالوپروتئیناز ۲ و ۹ و مهارکننده بافتی ۲ در جفت گاوهای هلشتاین. *نشریه علوم دامی ایران*، ۵۴ (۲)، ۱۲۸-۱۱۷. DOI: http//doi.org10.22059/IJAS.2022.340508.653881

**ناشر:** مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: http//doi.org10.22059/IJAS.2022.340508.653881

## مقدمه

حفظ سلامتی، تولید و باروری از چالش‌های پیش رو در گله‌های گاو شیری است. معمولاً گاوهای پرتولید از نظر باروری دچار مشکل هستند. باروری پایین در این گاوها یک مشکل چندعاملی بوده و فقط به تولید بالا مرتبط نمی‌شود (Thatcher *et al*., 2014). گزارش شده‌است که بیماری‌هایی مثل جفت‌ماندگی و کتوز در مقایسه با تولید شیر و امتیاز شرایط‌بدنی تاثیر بیشتری بر کاهش باروری دارند (Lucy, 2001). بازده تولیدمثلی در گاوهای پرشیر با برگشت رحمی، اولین تلقیح و نرخ گیرایی ارتباط دارد (Aungier *et al*., 2014). بروز فحلی پایین، عدم تخمک ریزی در زمان طولانی پس از زایش و نرخ گیرایی پایین منجر به کاهش نرخ آبستنی در گله خواهد شد (Thatcher *et al*., 2014). جفت‌ماندگی می‌تواند عملکرد تولیدمثلی را کاهش و منجر به خسارات اقتصادی در سطح گله شود (Dilly *et al*., 2011). مطالعات متعددی ارتباط بین جفت‌ماندگی و کاهش بازده تولیدمثلی را گزارش داده‌اند (Grohn & Rajala-Schultz., 2000; Thatcher *et al*., 2014). مواد معدنی بخش کوچکی از جیره‌های خوراکی هستند اما کمبود آنها پیامدهای بزرگی بر سلامت و تولیدمثل حیوانات دارد. منیزیم یک ماده معدنی ضروری با فعالیت‌های سلولی بسیار در جیره دام می‌باشد (Goff, 2014). مطالعات نشان داده است که منیزیم پایین پلاسما باعث کاهش گیرایی در اولین تلقیح می‌شود (Tillard *et al*., 2008) و بالا بودن منیزیم پلاسما در چهار هفته پس از زایش با کاهش زمان اولین تخمک ریزی مرتبط است (Aungier *et al*., 2014). همچنین مطالعات متعددی گزارش کرده‌اند که غلظت بالای منیزیم خون با کاهش جفت‌ماندگی ارتباط دارد (Qu *et al*., 2014; Tsiamadis *et al*., 2016; Jeong *et al*., 2018). متالوپروتئینازها آنزیم‌هایی هستند که در تجزیه ماتریکس خارج سلولی مشارکت می‌کنند. این آنزیم‌ها در فضای بین سلولی با آنزیم‌های مختلف یا سیتوکین‌ها فعال شده و توسط مهارکننده‌های بافتی کاهش می‌یابند (Woessner, 1991; Visse & Nagase, 2003). عدم توازن بین متالوپروتئینازها و مهارکننده‌های آن‌ها در دوره آبستنی می‌تواند منجر به پرولاپس اندام‌های لگنی و جفت‌ماندگی شود (Geng *et al*., 2016). متالوپروتئیناز-۲[1] (MMP-2)، متالوپروتئیناز-۹[2] (MMP-9) و مهارکننده بافتی متالوپروتئیناز-۲[3] (TIMP-2) در جفت گاو شناسائی شده است (Walter & Boos, 2001; Kizaki et al., 2008). انقباضات رحمی و فرآیند زایش طی مراحلی منجر به فعال شدن متالوپروتئینازها شده، که این آنزیم‌ها منجر به تجزیه کلاژن شده و برای گسستن ارتباط بین کارانکول‌های رحمی و کوتیلدون‌های جفت برای خروج جفت پس از زایش اهمیت دارند (Beagley *et al*., 2010).

در گاوهای مبتلا به جفت‌ماندگی فعالیت MMP-9 کاهش یافته و برخی شکل‌های MMP-2 کمتر بوده است (Maj & Kankofer, 1997). استفاده از سولفات منیزیم از ۰ تا ۳ میلی مول در لیتر در سلول‌های فیبروبلاست قلبی باعث کاهش تولید MMP-2 شد (Yue *et al*., 2004). ولی در یک مطالعه انسانی تیمار سولفات منیزیم بیان پروتئین MMP-9 در جفت را افزایش داد (Li *et al*., 2016). منیزیم با تاثیر بر آنزیم تیروزین‌کیناز باعث تغییر در تولید MMP در بافت‌ها می شود (Yue *et al*., 2004). بنابراین، هدف از انجام این مطالعه بررسی تاثیر منیزیم جیره و سطح منیزیم پلاسما بر بیان ژن‌های مرتبط با جفت‌ماندگی و فاکتورهای تولید مثلی بود.

## مواد و روش ها

این تحقیق در گاوداری کوهسار استان اصفهان و از مرداد تا آذر ماه ۱۳۹۹ انجام شد. تعداد ۲۰۰ راس گاو هلشتاین ۲ بار زایش و بالاتر(۰/۷±۲/۹) با میانگین وزن ۳۱/۲±۷۲۶ کیلوگرم و امتیاز شرایط بدنی ۰/۳۲±۳/۳۵ در ۲۱ روز مانده به زایش مورد انتظار، در قالب طرح کاملا تصادفی و به صورت گروهی به جیره‌های آزمایشی اختصاص یافتند. جیره‌ها شامل ۱- جیره شاهد: CON (مقدار منیزیم در سطح توصیه‌های NRC ، سطح منیزیم در جیره شاهد ۰/۳۹ ماده خشک بود)، ۲-جیره سولفات

1- Matrix Metalloproteinases-2
2- Matrix Metalloproteinases-9
3- Tissue inhibitors of metalloproteinase- 2

منیزیم (MgS)، ۳-جیره کربنات منیزیم (MgC) و ۴- جیره اکسید منیزیم (MgO) بود، که سطح منیزیم در تیمارهای آزمایشی ۰/۶ درصد ماده خشک جیره بود. خوراک مصرفی به صورت گروهی به شکل کاملا مخلوط در ساعت ۹/۰۰ صبح در اختیار دام‌ها قرار گرفت و ماده خشک مصرفی به طور روزانه (کسر کردن خوراک داده شده از باقیمانده خوراک در آخور) ثبت شد. پس از زایش دام‌ها با جیره یکسان تغذیه شدند (جدول۱).

**جدول ۱.** اجزای تشکیل‌دهنده جیره‌های آزمایشی

| ا | پیش از زایش[1] | | | | پس از زایش |
|---|---|---|---|---|---|
| | CON | MgS | MgC | MgO | |
| اجزای جیره (درصد ماده خشک) | | | | | |
| یونجه خشک | ۲۰/۵۹ | ۲۰/۵۹ | ۲۰/۵۹ | ۲۰/۵۹ | ۲۰/۴۷ |
| سیلاژ ذرت | ۴۵/۶۴ | ۴۵/۶۴ | ۴۵/۶۴ | ۴۵/۶۴ | ۳۳/۳۵ |
| کاه گندم | ۷/۵۲ | ۷/۵۲ | ۷/۵۲ | ۷/۵۲ | ۲/۶۱ |
| جو آسیاب شده | ۲/۲۴ | ۲/۲۴ | ۲/۲۴ | ۲/۲۴ | ۵/۶۴ |
| ذرت آسیاب شده | ۸/۵۹ | ۸/۵۹ | ۸/۵۹ | ۸/۵۹ | ۱۷/۶۹ |
| سبوس گندم | ۱/۹ | ۰/۴ | ۱/۱۶ | ۱/۷ | - |
| پنبه دانه | ۰/۸۸ | ۰/۸۸ | ۰/۸۸ | ۰/۸۸ | ۴/۳۹ |
| کنجاله سویا | ۵/۵ | ۵/۵ | ۵/۵ | ۵/۵ | ۶/۱۳ |
| کنجاله کلزا | ۱/۱۷ | ۱/۱۷ | ۱/۱۷ | ۱/۱۷ | ۱/۷۴ |
| دانه سویا فول فت | ۲/۳۷ | ۲/۳۷ | ۲/۳۷ | ۲/۳۷ | ۵/۳۶ |
| کربنات کلسیم | ۰/۶۹ | ۰/۶۹ | ۰/۶۹ | ۰/۶۹ | ۰/۳۳ |
| دی کلسیم فسفات | ۰/۴۵ | ۰/۴۵ | ۰/۴۵ | ۰/۴۵ | ۰/۲ |
| کلرید کلسیم | ۰/۴۵ | - | ۰/۶۵ | ۰/۶۵ | - |
| سولفات منیزیم | ۰/۴۲ | ۲/۳۷ | - | - | - |
| اکسید منیزیم | ۰/۲۸ | ۰/۲۸ | - | ۰/۷ | ۰/۲۸ |
| کربنات منیزیم | - | - | ۱/۲۴ | - | - |
| نمک طعام | - | - | - | - | ۰/۱۴ |
| بی‌کربنات سدیم | - | - | - | - | ۰/۹۷ |
| مکمل معدنی ویتامینه[2] | ۱/۳۱ | ۱/۳۱ | ۱/۳۱ | ۱/۳۱ | ۰/۷ |
| ترکیبات شیمیائی | | | | | |
| انرژی (مگا کالری در کیلوگرم) | ۱/۵۶ | ۱/۵۴ | ۱/۵۵ | ۱/۵۵ | ۱/۷۲ |
| پروتئین (درصد ماده خشک) | ۱۴ | ۱۳/۹ | ۱۳/۹ | ۱۴ | ۱۶/۴ |
| کربوهیدرات غیر فیبری (درصد ماده خشک) | ۳۷/۷ | ۳۷ | ۳۷/۴ | ۳۷/۶ | ۴۱/۷ |
| الیاف نامحلول در شوینده خنثی (درصد ماده خشک) | ۳۸/۸ | ۳۸/۲ | ۳۸/۵ | ۳۸/۸ | ۳۳/۱ |
| عصاره اتری (درصد ماده خشک) | ۳/۶ | ۳/۶ | ۳/۶ | ۳/۶ | ۴/۳ |
| منیزیم (درصد ماده خشک) | ۰/۳۹ | ۰/۶ | ۰/۶ | ۰/۶ | ۰/۷ |
| کلسیم (درصد ماده خشک) | ۱/۰۳ | ۱/۰۳ | ۱/۰۳ | ۱/۱۲ | ۰/۶۷ |
| فسفر (درصد ماده خشک) | ۰/۴۱ | ۰/۴ | ۰/۴ | ۰/۴۱ | ۰/۳۵ |
| تفاوت کاتیون و آنیون جیره (میلی‌اکی‌والان در کیلوگرم) | ۷۴ | -۲۱ | ۸۵ | ۸۶ | ۲۷۶ |

۱- تیمارهای آزمایشی شامل شاهد(CON)، تیمار سولفات منیزیم (MgS)، کربنات منیزیم (MgC) و اکسید منیزیم (MgO) بود.

۲- شامل (به ازای هر کیلوگرم): مخلوط پیش از زایش۳۲۰۰ میلی گرم روی، ۱۸۰۰ میلی گرم مس، ۴۵ میلی گرم سلنیوم، ۲۴۰۰ میلی گرم منگنز، ۶۰ میلی گرم ید،۲۰ میلی گرم کبالت، ۸۱۰۰۰۰، میلی گرم ویتامین A، ۲۲۰۰۰۰ میلی گرم ویتامین D3 و ۱۲۰۰۰ میلی گرم ویتامین E؛ مخلوط پس از زایش ۱۹۸۰۰ میلی گرم روی، ۵۴۰۰ میلی گرم مس، ۱۰۰ میلی گرم سلنیوم، ۱۹۸۰۰ میلی گرم منگنز، ۲۲۰ میلی گرم ید،۱۲۰ میلی گرم کبالت، ۲۰۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۳۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D3، ۱۰۰۰۰ میلی گرم ویتامین E و ۱۰۰ میلی گرم ویتامین بیوتین.

پیش از زایش نمونه‌گیری از خون (۱۵ راس دام از هر تیمار) در روزهای ۲۱-، ۱۴-، ۷-، ۳-،۱- و ۰ نسبت به زمان زایش، سه ساعت پس از خوراک‌دهی به وسیله لوله‌های هپارین‌دار *تحت خلأ* از سیاهرگ دمی انجام گرفت. پس از زایش نمونه‌گیری از خون به صورت هفتگی تا هفته چهارم انجام شد. نمونه‌های خون ۱۵ دقیقه در۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و پلاسمای حاصله در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

غلظت منیزیم پیش و پس از زایش با استفاده ازکیت پارس آزمون، غلظت NEFA پس از زایش توسط کیت رنداکس (Randox Laboratories Ltd.,Ardmore, UK) و انسولین پس از زایش توسط کیت مونوبایند (Monobind Inc., CA, USA) اندازه‌گیری شد. پس از زایش موارد جفت‌ماندگی ثبت گردید. گاوهایی که جفت خود را در ۲۴ ساعت پس از زایش دفع نکرده بودند، به عنوان جفت مانده در نظر گرفته شدند(Jeong *et al*., 2018).

امتیاز برگشت رحمی در روز ۲۰ پس از زایش از طریق لمس رکتوم بر اساس سیستم ۳ امتیازی ثبت شد (۳= رحم شل و بزرگتر از کف دست، ۲= رحم با حالت ارتجاعی متوسط و اندازه کوچکتر از یک دست و ۱= رحم با حالت ارتجاعی بالا و کوچکتر از سه انگشت ، Zemjanis, 1970). در دوره پس از زایش اولین فحلی، روزهای باز و تعداد تلقیح به ازاء آبستنی برای دام‌ها ثبت گردید.

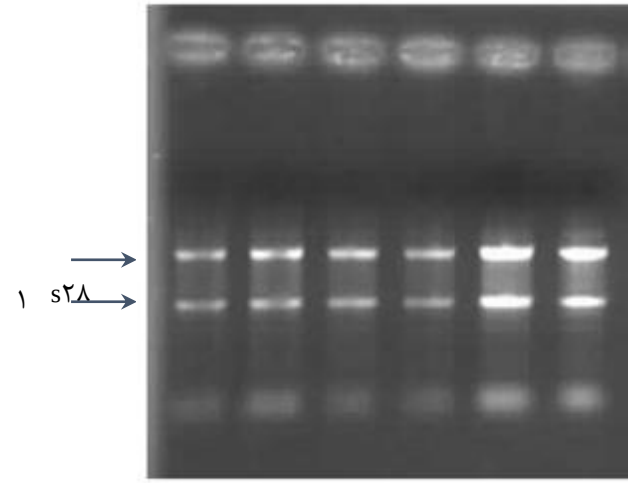
## بیان ژن

پس از زایش و خروج جفت به صورت تصادفی از جفت نمونه (۶ راس دام در هر گروه) برداشته شده و پس از شستشو در محلول PBS، نمونه‌ها در ازت مایع قرار گرفتند. استخراج RNA با استفاده از کیت شرکت سیناکلون و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. RNA استخراج شده بوسیله دستگاه نانودراپ بررسی شد. نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ برای همه نمونه‌ها بالاتر از ۱/۹ بود. کیفیت RNA استخراج شده بوسیله الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد (شکل۱). حضور باندهای RNA ریبوزومی s ۱۸ و s ۲۸ بیانگر سالم بودن RNA است. پس از تایید کیفیت نمونه‌ها، cDNA تمام نمونه‌ها با استفاده از کیت سیناکلون و طبق دستورالعمل سنتز شد. برای طراحی پرایمرهای اختصاصی ژن های MMP-2 ، MMP-9 ، TIMP-2 و ژن مرجع GADHP (گلیسرآلدئید ۳ فسفات دهیدروژناز) اطلاعات مربوط به توالی این ژن ها از سایت NCBI جمع آوری شد و پرایمرهای اختصاصی هر ژن با استفاده از نرم افزار primer3 طراحی شد (جدول۲).

برای انجام واکنش‌های Real time PCR از دستگاه Rotor Gene استفاده شد. بر اساس دستورالعمل کیت شرکت سازنده، تهیه مخلوط واکنش با استفاده از مستر میکس سایبر گرین، پرایمر آغازگر رفت و برگشت، cDNA و آب عاری از RNA تا حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. فراوانی ژن‌های اصلی نسبت به بیان ژن کنترل داخلی (GAPDH) محاسبه گردید. مقایسه بین ژن‌ها بر اساس اختلاف CT بین ژن‌های اصلی و کنترل داخلی انجام شد (Pfaffl, 2001).

**جدول۲.** توالی پرایمرهای مورد استفاده در real-time PCR

| ژن | توالی پرایمرها | دمای ذوب ($^0$C) | اندازه قطعه (bp) | کد دست یابی |
|---|---|---|---|---|
| GADPH | F: 5′- GGGTCATCATCTCTGCACCT -3′<br>R: 5′- GGTCATAAGTCCCTCCACGA- 3′ | ۵۹/۹ | ۱۷۶ | NM_001034034 |
| MMP-2 | F: 5′- ACCCTGGGAGAAGGACAAGT- 3′<br>R: 5′- TGCAGCTGGTGTACTCCTTG- 3′ | ۶۰ | ۱۳۳ | NM_174745 |
| MMP-9 | F: 5′- TAGCACGCACGACATCTTTC- 3′<br>R: 5′- GAAGGTCACGTAGCCCACAT- 3′ | ۵۹/۵ | ۱۴۱ | NM_174744 |
| TIMP-2 | F: 5′- CCAAGCAGGAGTTTCTGGAC- 3′<br>R: 5′- TGTTTCCAGGAAGGGATGTC- 3′ | ۵۸/۸ | ۱۲۸ | NM_174472 |




**شکل ۱**- RNA استخراج شده در ژل آگارز ۱ درصد

## تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های بدست آمده توسط نرم افزار SAS (۹/۴) و با رویه MIXED مورد آنالیز قرار گرفت. در این آزمایش، P <۰/۰۵ به عنوان معنی‌داری و ۰/۱ > P>۰/۰۵ تمایل به معنی‌داری در نظر گرفته شد. مقادیر متابولیت های خون در شروع آزمایش به عنوان کوواریت در مدل وارد شده و در صورت معنی دار نبودن از مدل خارج شدند. برای داده های تکرار شده اثر زمان و اثر تیمار در زمان در مدل آماری لحاظ گردید. مدل آماری داده‌های تکرار شونده به صورت زیر بود:

$$Y_{ijkl}=\mu+T_i+Time_k+ C_{(i)l} + (T_i\times Time_k)+\beta(x_{ij}-x..)+e_{ijkl}$$

که در آن $Y_{ijk}$= متغییر وابسته، μ= میانگین، $T_i$= اثر تیمار، $Time_k$= اثر زمان نمونه‌گیری، $C_{(i)l}$ = اثر تصادفی حیوان در داخل تیمار، $(T \times Time)_{ik}$ = اثر متقابل تیمار و زمان نمونه گیری، $\beta (x_{ij} - x..)$ = اثر کوواریت، $e_{ijkl}$= خطا بودند. آنالیز پارامترهای تولیدمثلی با بهره گیری از رگرسیون لجستیک و رویه GLIMMIX انجام شد. مقادیر Odds ratio با استفاده از رگرسیون لجستیک و با نرم افزار SPSS بدست آمد.

## نتایج و بحث

ماده خشک مصرفی پیش از زایش در تیمار شاهد، سولفات منیزیم، کربنات منیزیم و اکسید منیزیم به ترتیب ۱۱/۷۶، ۱۱/۴۵، ۱۱/۹۰ و ۱۲/۱۷ کیلوگرم در روز بود. اثر تیمارهای آزمایشی بر متابولیت‌های پلاسما و عملکرد تولید مثلی در جدول ۳ گزارش شده است. تیمارهای آزمایشی منیزیم پلاسما پیش و پس از زایش را افزایش دادند (P<۰/۰۱). با افزایش مصرف منیزیم از ۳/۸ به ۱۷/۳ گرم در کیلوگرم در گاوهای خشک با استفاده از اکسید منیزیم، منیزیم پلاسما افزایش معنی‌داری داشت (Jittakhot *et al*., 2004). در تیمارهای آزمایشی (P=۰/۰۲) و سطح مطلوب و بالای منیزیم پلاسما (P=۰/۰۴) انسولین پلاسما افزایش داشت. گزارش شده است که غلظت منیزیم خون در دوره انتقال می تواند یک نشانگر زیستی مفید برای سلامت و عملکرد تولیدمثلی دام ها باشد (Jeong *et al*., 2018). منیزیم با تاثیر بر تیروزین کیناز در گیرنده‌های انسولین بر هموستاز گلوکز و انسولین نقش دارد. کاهش منیزیم خون منجر به کاهش فعالیت تیروزین کیناز و کاهش سیگنال انسولین خواهد شد.

کاهش منیزیم سلولی به عنوان پیام رسان ثانویه در فعالیت انسولین نقش داشته و می تواند منجر به مقاومت به انسولین شود (Barbagallo *et al*., 2003; Grober *et al*., 2015).

**جدول ۳.** اثر تیمارها بر متابولیت‌های پلاسما و پارامترهای تولیدمثلی

| جیره‌های آزمایشی | | | | | سطح احتمال | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | CON | MgS | MgC | MgO | SEM | جیره | زمان | جیره× زمان |
| منیزیم پیش از زایش (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) | $^{b}$۱/۹۲ | $^{a}$۲/۲۴ | $^{a}$۲/۱۹ | $^{a}$۲/۲۴ | ۰/۰۴ | <۰/۰۱ | <۰/۰۱ | ۰/۳۲ |
| منیزیم پس از زایش (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) | $^{b}$۲/۰۱ | $^{a}$۲/۱۵ | $^{ab}$۲/۱ | $^{a}$۲/۱۸ | ۰/۰۳ | <۰/۰۱ | ۰/۰۲ | ۰/۲۲ |
| انسولین ( میکرویونیت در میلی‌لیتر) | $^{b}$۱۱/۳۶ | $^{a}$۱۲/۳۴ | $^{a}$۱۲/۲۲ | $^{a}$۱۲/۶۴ | ۰/۲۷ | ۰/۰۲ | <۰/۰۱ | ۰/۲۵ |
| اسیدهای چرب غیر استریفه (میلی‌مول در لیتر) | $^{a}$۰/۷۸ | $^{ab}$۰/۷۱ | $^{ab}$۰/۷۲ | $^{b}$۰/۶۳ | ۰/۰۳ | <۰/۰۱ | <۰/۰۱ | ۰/۱۷ |
| امتیاز برگشت رحمی | ۱/۶۸ | ۱/۶۶ | ۱/۷ | ۱/۶۲ | ۰/۰۶ | ۰/۹۴ | – | – |
| اولین فحلی (روز) | ۶۹/۷۳ | ۷۰/۹۱ | ۷۱/۱۲ | ۶۸/۲۲ | ۳/۷۲ | ۰/۵۸ | – | – |
| روزهای باز (روز) | $^{a}$۱۳۴/۶ | $^{ab}$۱۱۵/۸ | $^{ab}$۱۱۰/۶ | $^{b}$۱۰۶/۴ | ۶/۵۹ | ۰/۰۳ | – | – |
| تعداد تلقیح به ازاء آبستنی | ۲/۲۲ | ۲/۱۴ | ۲/۱۶ | ۲/۰۸ | ۰/۰۷ | ۰/۱۹ | – | – |

جیره‌های آزمایشی شامل شاهد(CON)، تیمار سولفات منیزیم (MgS)، کربنات منیزیم (MgC) و اکسید منیزیم (MgO) بود.
b،a: در هر ردیف اعداد دارای حروف غیرمشترک با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند ($P \leq 0.05$).

تیمار اکسید منیزیم منجر به کاهش معنی‌دار NEFA پلاسما پس از زایش شد (P<۰/۰۱). احتمالا به دلیل بهبود وضعیت انسولین و لیپولیز کمتر، NEFA خون کاهش یافته است. اسیدهای چرب سوخت اصلی اکسید شده در کبد هستند و ورود آنها به خون و کبد با انسولین پلاسما همبستگی منفی دارد. NEFA پس از زایش بیش از ۰/۷ میلی مول بر لیتر یکی از عواملی است که تاثیر منفی بر تولید شیر، سلامت و تولید مثل دام دارد (Van Saun, 2014).

امتیاز بازگشت رحمی، اولین فحلی و تعداد تلقیح با ازاء آبستنی در بین تیمارها تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). تیمار اکسید منیزیم به صورت معنی‌دار روزهای باز را کاهش داد (P=۰/۰۳ ). تاثیر تیمارهای منیزیم بر احتمال آبستنی در جدول ۴ گزارش شده است. درصد آبستنی با اولین تلقیح در بین تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی داری نداشت ولی آبستنی تا ۲۱۰ روز پس از زایش در بین تیمارها تمایل به معنی داری (P=۰/۰۸ ) را نشان داد. در تیمار اکسید منیزیم احتمال آبستنی (Odds ratio) نسبت به گروه کنترل در اولین تلقیح ۱/۹۱ (P=۰/۰۵) و در ۲۱۰ روز پس از زایش ۱/۸۶ (P=۰/۰۳) بود. مطالعات متعددی ارتباط مثبت بین افزایش منیزیم خون و بهبود عملکرد تولیدمثلی را گزارش کرده اند.

در یک مطالعه ارتباط مثبت بالایی بین غلظت بالای منیزیم سرم در دوره انتقال با گیرایی اولین تلقیح، سیکلیک بودن گاوها و میزان آبستنی گزارش شد، همچنین کاهش ناهنجاری‌های سلامتی در گاوهای با منیزیم خون بالا تاثیر مطلوبی بر عملکرد تولید مثلی داشت (Jeong *et al*., 2018).

**جدول ۴.** درصد و شانس (Odds ratio) جفت ماندگی و وقوع آبستنی در جیره‌های آزمایشی

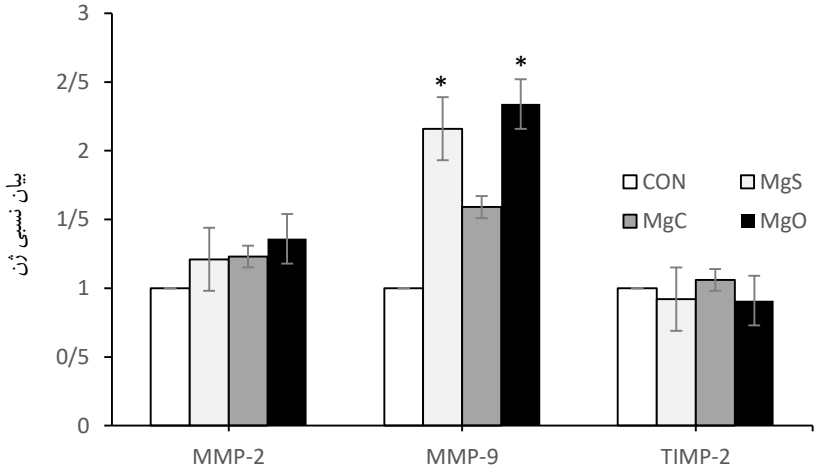
| | جیره‌های آزمایشی | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **CON** | **MgS** | **MgC** | **MgO** |
| درصد جفت ماندگی (تعداد از کل) | [a] ۲۰(۱۰/۵۰) | [b] ۶(۳/۵۰) | [b] ۶(۳/۵۰) | [b] ۴(۲/۵۰) |
| نسبت شانس (۹۵ درصد فاصله اطمینان CI) | مرجع | *۳/۹(۱/۴-۶۵/۲۳) | *۳/۹(۱/۴-۸۷/۴۷) | *۶(۳/۷-۵۴/۴۷) |
| درصد آبستنی در اولین تلقیح (تعداد از کل) | ۲۲(۱۱/۵۰) | ۳۰(۱۵/۵۰) | ۲۸(۱۴/۵۰) | ۳۸(۲۰/۵۰) |
| نسبت شانس آبستنی (۹۵ درصد فاصله اطمینان CI) | مرجع | ۱/۵۲ (۰/۳-۸۷/۴۷) | ۱/۳۷ (۰/۳-۸۷/۴۷) | *۲/۳۶ (۰/۴-۹۸/۲۴) |
| درصد آبستنی تا روز ۲۱۰ (تعداد از کل) | ۶۸(۳۴/۵۰) | ۸۰(۳۸/۵۰) | ۷۸(۳۷/۵۰) | ۸۸(۴۴/۵۰) |
| نسبت شانس آبستنی (۹۵ درصد فاصله اطمینان CI) | مرجع | ۱/۴۹ (۱/۳-۴۲/۷۳) | ۱/۳۴ (۱/۲-۱۱/۴۵) | *۳/۴۵ (۱/۵-۳۳/۶۳) |

جیره‌های آزمایشی شامل شاهد(CON)، تیمار سولفات منیزیم (MgS)، کربنات منیزیم (MgC) و اکسید منیزیم (MgO) بود.

*= اختلاف معنی دار تیمارها نسبت به گروه شاهد را نشان می دهد ($P<0.05$).

b،a: در هر ردیف اعداد دارای حروف غیرمشترک با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند ($P \leq 0.05$).

در بررسی عوامل موثر بر گیرایی تلقیح، جفت ماندگی و منیزیم پلاسما کمتر از ۰/۹ میلی مول در لیتر منجر به کاهش گیرایی در اولین تلقیح شدند (Tillard *et al*., 2008). همچنین انسولین پس از زایش بالاتر در جیره‌های منیزیم می تواند با سنتز استروئیدهای تخمدانی، تکثیر سلول های گرانولوزا و رشد فولیکول ها و در نتیجه بهبود وضعیت تولیدمثلی مرتبط باشد (De Koster and Opsomer, 2013). NEFA بالاتر پلاسما باعث کاهش ۱۶ درصدی آبستنی (Ospina et al., 2010) و کاهش نرخ آبستنی در اولین تلقیح شد (Chapinal *et al*., 2012). در مطالعه دیگری گزارش شده است که غلظت بالاتر NEFA سرم در پیش و پس از زایش یکی از عواملی است که باعث عدم تخمک ریزی گاوها در دو ماه پس از زایش و حتی پس از آن می شود (Dubuc *et al*., 2012). در پژوهشی که به بررسی عوامل خطر مرتبط با تولید مثل پرداخته بود، اشاره شده‌است که کاهش NEFA در هفته اول پس از زایش و افزایش منیزیم خون در ۴ هفته پس از زایش تاثیر مثبت بر بهبود تولید مثل دارد (Aungier *et al*., 2014). بر اساس نتایج مطالعات به نظر می‌رسد بهبود وضعیت تولید مثلی در تیمارهای منیزیم با منیزیم بالاتر پلاسما، کاهش NEFA پلاسما و کاهش جفت ماندگی مرتبط باشد. تاثیر تیمارهای آزمایشی بر بیان ژن‌های MMP-2 ، MMP-9 ، TIMP-2 در شکل ۲ ارائه شده است.




**شکل۲**- اثر تیمارهای آزمایشی بر بیان ژن های MMP-2، MMP-9 و TIMP-2
(*= اختلاف معنی دار تیمارها نسبت به گروه شاهد را نشان می دهد ($P \leq 0.05$))

تیمارهای آزمایشی تاثیری بر بیان نسبی ژن MMP-2 نداشتند (P>۰/۰۵). بیان نسبی ژن MMP-9 برای تیمارهای CON، MgS، MgC و MgO به ترتیب ۱، ۲/۱۶، ۱/۵۹ و ۲/۳۴ بود. که بیان نسبی ژن در تیمارهای MgS و MgO به صورت معنی‌داری بالاتر بود (P<۰/۰۵).

تیمارهای آزمایشی تاثیر معنی‌داری بر بیان نسبی ژن TIMP-2 نداشتند (P>۰/۰۵). اثر تیمارهای آزمایشی بر جفت ماندگی به ترتیب در جداول ۵ و ۶ گزارش شده است. جفت‌ماندگی در تیمارهای CON، MgS، MgC و MgO به ترتیب ۲۰، ۶، ۶ و ۴ درصد بود (P=۰/۰۴). Odds ratio جفت ماندگی در تیمارهای MgS، MgC و MgO نسبت به تیمار CON به ترتیب ۳/۵۲ (P=۰/۰۳)، ۳/۵۲ (P=۰/۰۳) و ۴/۲۳ (P=۰/۰۲) بود. تیمارهای آزمایشی به صورت معنی‌دار جفت‌ماندگی را کاهش دادند.

کاهش جفت ماندگی با افزایش منیزیم پلاسما در تیمارهای آزمایشی با مطالعات دیگر همسو بود. گزارش شده‌است که بالاتر بودن منیزیم خون در هفته قبل از زایش (Qu *et al*., 2014) و یا یک ماه مانده به زایش (Jeong *et al*., 2018) منجر به کاهش بروز جفت‌ماندگی می شود. کمبود منیزیم می تواند با تحریک پذیری بیش از حد ناشی از کاهش پتانسیل استراحت غشاء سلول های عصبی منجر به جفت ماندگی بیشتر شود (Jeong *et al*., 2018). کاهش جفت‌ماندگی در مطالعه حاضر علاوه بر تاثیر منیزیم خون بالاتر در تیمارهای آزمایشی، می تواند به دلیل افزایش معنی‌دار بیان ژن MMP-9 نیز باشد. کاهش پروژسترون و افزایش ترشح ریلاکسین در زمان زایش منجر به تحریک فعالیت متالوپروتئینازها، تجزیه کلاژن و افتادن جفت می شود (Beagley *et al*., 2010). تاثیر منیزیم بر بیان ژن های متالوپروتئیناز در بافت های مختلف متفاوت گزارش شده است. استفاده از مکمل های منیزیم منجر به کاهش تولید متالوپروتئینازها در عضلات قلبی می شود (Yue *et al*., 2004)، ولی در مطالعه دیگری استفاده از سولفات منیزیم توانست بیان پروتئین MMP-9 را در جفت انسان افزایش دهد (Li *et al*., 2016). به نظر می‌رسد تاثیر منیزیم بر متالوپروتئینازها از مسیر تیروزین کیناز اتفاق می افتد (Yue *et al*., 2003; Yue *et al*., 2004). همچنین مطالعه بر روی موش‌ها نشان داد که کمبود منیزیم اندازه و عملکرد جفت را مختل می‌نماید. کمبود منیزیم باعث کاهش بیان ژن‌های انتقال‌دهنده گلوکز و اسید آمینه در بافت جفت موش نیز می‌شود (Rosner *et al*., 2016).

## نتیجه گیری

استفاده از منابع منیزیم به ویژه اکسید منیزیم به میزان بالاتر از توصیه های NRC (۲۰۰۱) می تواند باعث کاهش روزهای باز، بهبود وضعیت آبستنی در اولین تلقیح و افزایش آبستنی در گاوهای شیرده می‌شود. تیمار اکسید منیزیم می‌تواند با افزایش دادن متالوپروتئینازها باعث کاهش جفت‌ماندگی در گاوها شود.

## REFERENCES


AOAC. (1990). *Official Methods of Analysis*. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.

Aungier, S. P., Roche, J. F., Diskin, M. G., Crowe, M. A. (2014). Risk factors that affect reproductive target achievement in fertile dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97, 3472– 3487.

Barbagallo, M., Dominguez, L. J., Galioto, A., Ferlisi, A., Cani, C., Pineo, M. A., Busardo, A & Paolisso, G. (2003). Role of magnesium in insulin action, diabetes and cardio-metabolic syndrome X. *Molecular Aspects of Medicine*, 24, 39-52.

Beagley, J. C., Whitman, K. J., Baptiste, K. E & Scherzer, J. (2010). Physiology and treatment of retained fetal membranes in cattle. *J Vet Intern Med,* 24, 261–268.

Chapinal, N., Carson, M. E., LeBlanc, S. J., Leslie, K. E., Godden, S., Capel, M., Santos, J. E., Overton, M. W. & Duffield, T. F. (2012). The association of serum metabolites in the transition period with milk production and early-lactation reproductive performance. *Journal of Dairy Science*, 95, 1301–1309.

De Koster, J. D. & Opsomer, G. (2013). Insulin resistance in dairy cows. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 29, 299-322.

Dilly, M., Hambruch, N., Shenavai, S., Schuler, G., Froehlich, R., Haeger, J. D., Ozalp, G. R & Pfarrer, C. (2011). Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-14 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP)-2 during bovine placentation and at term with or without placental retention. *Theriogenology*, 75, 1104–1114.

Dubuc, J., Duffield, T. F, Leslie, K. E, Walton, J. S & S. J. LeBlanc, S. J. (2012). Risk factors and effects of postpartum anovulation in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95, 1845–1854.

Geng, J., Huang, C & Jiang, S. (2016). Roles and Regulation of the Matrix Metalloproteinase System in Parturition. Mol. Reprod. Dev. DOI 10.1002/mrd.22626.

Grober, U., Schmidt, J. & Kisters, K. (2015). Magnesium in prevention and therapy. *Nutrients*, 7, 8199-8226.

Grohn, Y. T & Rajala-Schultz, P. J. (2000). Epidemiology of reproductive performance in dairy Cows. *Animal Reproduction Science*, 61, 605- 614.

Goff, J. P. (2014). Calcium and magnesium disorders. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 30, 359–381.

Jeong, J. K., Choi, I. S., Moon, S. H., Kang, H. G. & Kim I. H. (2018). Relationship between serum magnesium concentration during the transition period, peri- and postpartum disorders, and reproductive performance in dairy cows. *Livestock Science*, 213, 1-6.

Jittakhot S., Schonewille, J.T., Wouterse, H., Uijttewaal, A.W.J., Yuangklang, C. & Beynen, A.C. (2004). Increasing magnesium intakes in relation to magnesium absorption in dry cows. *Journal of Dairy Research*, 71, 297–303.

Kizaki, K., Ushizawa, K., Takahashi, T., Yamada, O., Todorok, J., Sato, T., Ito, A & Hashizume, K. (2008). Gelatinase (MMP-2 and -9) expression profiles during gestation in the bovine endometrium. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 6, 1-11.

Li, J. Y., Zhang, W. Y., Wang, X., & Zou, L.Y. (2016). Effect of magnesium sulfate on MMP-9 and AQP-9 protein in placenta of patients with hypertensive disorders complicating pregnancy. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 96, 2421-2423.

Leroy, J. L. M. R., Vanholder, T., Mateusen, B., Christophe, A., Opsomer, G., De Kruif, A., Genicot, G. & Van Soom, A. (2005). Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. *Reproduction*, 130, 485–495.

Lucy, M. C. (2001). Reproductive Loss in High-Producing Dairy Cattle: Where Will It End?. *Journal of Dairy Science*, 84, 1277- 1293.

Maj, J.G, & Kankofer. M. (1997). Activity of 72-kDa and 92-kDa matrix metalloproteinases in placental tissues of cows with and without retained fetal membranes. *Placenta*, 18, 683–687.

Ospina, P. A., Nydam, D. V., Stokol, T. & Overton, T. R. (2010). Associations of elevated nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the Northeastern United States. *Journal of Dairy Science*, 93, 1596–1603.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 2002- 2007.

Qu, Y., Fadden, A. N., Traber, M. G. & Bobe, G. (2014). Potential risk indicators of retained placenta and other diseases in multiparous cows. *Journal of Dairy Science*, 97, 4151-65.

Rosner, J. Y., Gupta, M., McGill, M., Xue, X., Chatterjee, P. K., Yoshida-Hay, M., Robeson, W & Metz, C. N. (2016). Magnesium deficiency during pregnancy in mice impairs placental size and function. *Placenta*, 39, 87–93.

Thatcher, W. W., Bilby, T. R., Bartolome, J. A., Silvestre, F., Staples, C. R & Santos, J. E. P. (2006). Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology*, 65, 30–44.

Tsiamadis, V., Banos, G., Panousis, N., Kritsepi-Konstantinou, M., Arsenos, G & Valergakis, G.E. (2016). Genetic parameters of subclinical macromineral disorders and major clinical diseases in postparturient Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 99, 8901- 8914.

Tillard, E., Humblot, P., Faye, B., Lecomte, P., Dohoo, I & Bocquier, F. (2008). Postcalving factors affecting conception risk in Holstein dairy cows in tropical and sub-tropical conditions. *Theriogenology*, 69, 443–457.

Van Saun, R.J. (2014). Dairy nutrition. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 30, 115-337.

Visse, R & Nagase, H. (2003). Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Circulation Research*, 92, 827-839.

Walter, I & Boos, A. (2001). Matrix Metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and Tissue Inhibitor-2 of Matrix Metalloproteinases (TIMP-2) in the Placenta and Interplacental Uterine Wall in Normal Cows and in Cattle with retention of Fetal Membranes. *Placenta*, 22, 473- 483.

Yue, H., Lee, J. D., Shimizu, H., Uzui, H., Mitsuke, Y & Ueda, T. (2003). Effects of magnesium on the production of extracellular matrix metalloproteinases in cultured rat vascular smooth muscle cells. Atherosclerosis, 166, 271-/277.

Yue, H., Uzui, H., Lee, J. D., Shimizu, H. & Ueda, T. (2004). Effects of magnesium on matrix metalloproteinase-2 production in cultured rat cardiac fibroblasts. *Basic Res Cardiol*, 99, 257- 263.