



اثر دست‌کاری متابولیت‌ها و هورمون‌ها بر بیان mRNA ژن‌های آنتی‌اکسیدانی مرتبط با Nrf2 در بافت پستانی گاوهای شیری

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

۱- استادیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج

۲- استاد گروه فیزیولوژی دامپزشکی دانشگاه برن سوئیس

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

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۱/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۴/۱۳)

چکیده

در گاوهای شیری پر تولید به دلیل تغییرات گسترده فراسنجه‌های خونی و سیستم هورمونی پس از زایمان، سرکوب سیستم ایمنی پستانی مشاهده می‌شود. به منظور بررسی تأثیر طولانی‌مدت (۴۸ ساعت) دست‌کاری متابولیت‌ها و هورمون‌ها بر بیان mRNA ژن‌های آنتی‌اکسیدانی کد شده به وسیله Nuclear erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) در بافت پستانی از تعداد ۲۴ رأس گاو هلشتاین که در اواخر شیردهی بودند استفاده شد. تیمارها شامل ۴۸ ساعت تزریق مداوم انسولین (n=۶)؛ HypoG، انسولین و گلوکز (EuG؛ n=۵)، بتاهیدروکسی‌بوتیرات (HyperB؛ n=۵) و محلول نمکی ۰/۹٪ (Control؛ n=۸) بود. یک هفته قبل و ۴۸ ساعت بعد از شروع آزمایش از دو کارتیه عقبی بافت پستانی نمونه‌برداری شد. RNA کل، استخراج و پس از اندازه‌گیری بیان mRNA ژن‌های مرجع و ژن‌های مرتبط با Nrf2 به وسیله روش qPCR، تفاوت تغییر بیان mRNA ژن‌های منتخب ارزیابی شد. ایجاد هایپرانسولین‌یوگلاسمیک سبب کاهش بیان mRNA ژن‌های کاتالاز، هم‌اکسیژناز ۲، گلوکاتایون اس ترانسفراز ۳ میکروزومی، NAD (P) H دهیدروژناز کوئینون ۱، سوپراکسید دیسموتاز ۱ در گروه EuG نسبت به قبل از شروع تزریق متابولیت‌ها شد ($P < 0/05$). هایپرانسولین‌یوگلاسمیک سبب کاهش بیان mRNA ژن گلوکاتایون پراکسیداز ۳ در مقایسه با تیمار بتاهیدروکسی‌بوتیرات به میزان دو برابر شد ($P < 0/05$). با توجه به این نتایج می‌توان نتیجه گرفت که کاهش گلوکاگون همراه افزایش انسولین و گلوکز نرمال موجب کاهش بیان mRNA برخی از ژن‌های آنتی‌اکسیدانی مرتبط با Nrf2 شده که این امر می‌تواند افزایش حساسیت پستان و خطر ابتلا به بیماری‌های دیگر نظیر ورم پستان را در پی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: انسولین، ایمنی، بتاهیدروکسی‌بوتیرات، گلوکز

مقدمه

نظیر لیپیدها و پروتئین‌ها را تخریب نموده و با آسیب رساندن به آنزیم‌ها و پروتئین‌های ناقل موجب تغییر ساختار، کاهش عملکرد و نهایتاً مرگ سلولی می‌شوند (Scherer and Deamer, 1986; Stewart, 1994). یکی از مکانیسم‌های مهم دفاعی بدن هنگام ازدیاد رادیکال‌های آزاد در بدن مجموعه‌ای از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است که تحت عنوان Nrf2^۲ فعالیت می‌کند. این عامل، تنظیم‌کننده بسیاری از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است و به صورت یک عامل رونویسی زیپ شده است که در شرایط عادی و بدون تنش در سیتوزول باقی می‌ماند. هنگام بروز تنش و یا ازدیاد رادیکال‌های آزاد، این عامل با انتقال به هسته سلول در ساخت و تنظیم بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و سم‌زدای فاز II، از بافت‌های مختلف محافظت می‌کند. از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی که به وسیله فاکتور Nrf2 در زمان بروز تنش‌ها تنظیم و تولید می‌شوند می‌توان به هم‌اکسیژناز (HO-1)، گلوکوتاتیون ترانسفراز، NAD (P) H دهیدروژناز کوئینون^۳ و UDP گلوکورونوزیل ترانسفراز^۴ اشاره کرد (Motohashi and Yamamoto, 2004; Kensler et al., 2007).

بر پایه دانش کنونی نویسندگان تاکنون مطالعه‌ای در مورد اثرات تغییر متابولیت‌های خونی و هورمونی بر بیان mRNA آنزیم‌های کد شده به وسیله عامل Nrf2 در بافت پستانی گاوهای شیری در اواسط شیردهی صورت نگرفته است. به منظور جلوگیری از تداخل تغییرات ناشی از تعادل منفی انرژی و همچنین تغییر متابولیت در دوران انتقال، دام‌های غیر آبستنی که در اواسط دوره شیردهی بودند انتخاب شدند. هدف از انجام این آزمایش بررسی تأثیر طولانی‌مدت (۴۸ ساعت) دست‌کاری متابولیت‌ها و هورمون‌ها از راه تزریق، بر بیان mRNA ژن‌های آنتی‌اکسیدانی کد شده به وسیله مکانیسم Nrf2 در بافت پستانی گاوهای شیری بود.

مواد و روش‌ها

مدیریت دام‌ها، تیمارهای آزمایشی: به منظور انجام این آزمایش تعداد ۲۴ رأس گاو هلستاین با شکم زایش $0/1 \pm$ و $3/5$ و $28 \pm 0/3$ (Mean \pm SD) هفته بعد از زایمان انتخاب شدند. این آزمایش در مرکز تحقیقاتی گروه

دوره انتقال در گاوهای شیری به دلیل تغییر در الگوی توزیع مواد مغذی برای هماهنگی متابولیسم و حفظ عملکرد سیستم ایمنی، با تغییرات گسترده‌ای در فراسنجه‌های خونی و سیستم هورمونی همراه است (Bruckmaier and Gross, 2017). شواهدی مبنی بر سرکوب سیستم ایمنی در این زمان وجود دارد که می‌تواند سیستم پستانی را نیز تحت تأثیر قرار دهد (Burton and Erskin, 2003; Trevisi et al., 2012;) (Aleri et al., 2016). افزایش نیاز به انرژی و بخصوص گلوکز موردنیاز برای تولید شیر در اوایل شیردهی و عدم تکافوی خوراک مصرفی دام‌ها در این بازه زمانی منجر به بروز و تشدید تراز منفی انرژی در این دام‌ها شده که معمولاً با کاهش غلظت گلوکز، افزایش غلظت اسیدهای چرب و نهایتاً افزایش غلظت اجسام کتون و بخصوص بتا‌هیدروکسی‌بوتیرات در خون همراه است (van Dorland et al., 2009; Gross et al., 2011; Zarrin et al., 2017). پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند که تغییر متابولیت‌های مختلف از راه تزریق آن‌ها سبب ایجاد تغییرات وسیعی در متابولیت‌های خونی و هورمون‌ها شد و سیستم ایمنی عمومی و سیستم ایمنی موضعی به ویژه کبد و پستان را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Kreipe et al., 2011; Vernay et al., 2012; Zarrin et al., 2013, 2014 a, b, 2015). سرکوب سیستم ایمنی و بروز التهاب در نتیجه تغییر در متابولیت‌ها و سیستم هورمونی (Trevisi et al., 2012;) (Zarrin et al., 2014a)، التهاب و اختلال در فعالیت کبدی در نتیجه تراز منفی انرژی در اوایل شیردهی گزارش شده است (Bertoni et al., 2008). تغییر فراسنجه‌های خونی و هورمون‌ها هنگام زایمان منجر به افزایش تولید ترکیبات اکسیدکننده از قبیل رادیکال‌های اکسیژن و برخی ترکیبات غیر رادیکالی نظیر گونه‌های فعال اکسیژن^۱ می‌شوند (Halliwell, 1996; Bionaz et al., 2007). همچنین سبب فعال نمودن و تنظیم آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به وسیله بدن شده که به عنوان یک سد دفاعی محکم در مقابل آسیب‌ها عمل کرده و محافظت از اندام‌های مختلف و حساس را بر عهده دارد (Aitken et al., 2009). گونه‌های اکسیژن فعال، مولکول‌های زیستی

2. Nuclear erythroid 2-related factor 2; Nrf2
3. NAD (P) H dehydrogenase, quinone 1; NQO1
4. UDP-glucuronosyl transferases; UGT

1. Reactive Oxygen Species; ROS

نحوه آماده‌سازی و تزریق متابولیت‌ها به‌طور مفصل در گزارش‌های پیشین شرح داده‌شده است (Kreipe *et al.*, 2011; Zarrin *et al.*, 2013).

نمونه‌برداری: یک هفته قبل از شروع آزمایش، ۴۸ ساعت بعد از شروع تزریق متابولیت‌ها، از دو کارتیبه عقبی بافت پستانی بر اساس روشی که پیشتر شرح داده شد (Schmitz *et al.*, 2004) نمونه‌برداری شد. با استفاده از دستگاه اولتراسوند، محلی که دارای کمترین شریان پستانی باشد مشخص شده و پس از استریل کردن، با استفاده از داروی زایلازین (16 µg/kg of BW; Xylazine Streuli ad us. vet.; G. Streuli & Co. AG, Uznach, Switzerland) بی‌حسی عمومی و با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر لیدوکائین ۲٪ (Streuli Pharma AG, Uznach) بی‌حسی موضعی ایجاد شد. با استفاده از سوزن نمونه‌برداری با قطر ۱۲G و طول ۱۰ سانتی‌متر (Bard Magnum Core Tissue Biopsy Needle, Turkenfeld, Germany) از بافت پستانی (۳۰ تا ۶۰ میلی‌گرم) نمونه‌برداری شد و بلافاصله در محلول پایدارکننده RNA (RNAlater, Ambion/Applied Biosystems, Austin, TX) قرار داده شد. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سپس تا زمان استخراج RNA در دمای منهای ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA: جزئیات کامل استخراج RNA از بافت پستانی و ساخت cDNA به‌طور کامل در گزارش‌های پیشین توضیح داده شده است (Zarrin *et al.*, 2014 a, b). به‌طور خلاصه با استفاده از GOLD TriFast (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) و بر اساس پروتکل پیشنهادی کارخانه سازنده، کل RNA از بافت پستانی استخراج شد. غلظت و خلوص RNA استخراجی با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر نانودراپ (ND-2000; NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE) در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

cDNA با رونویسی معکوس با استفاده از یک میکروگرم از کل RNA با استفاده از Moloney murine leukemia virus Reverse Transcriptase RNAase H Minus, Point Mutant (Promega Corp., Madison, WI) و پرایمرهای تصادفی هم‌گام (Invitrogen, Leek, the Netherland) ساخته شد.

فیزیولوژی دامپزشکی دانشگاه برن کشور سوئیس انجام شد. برای جلوگیری از تداخل تغییرات ناشی از تعادل منفی انرژی در دوران انتقال، دام‌هایی که در اواخر دوره شیردهی بودند انتخاب شدند. دو هفته قبل از شروع آزمایش به منظور سازگاری با شرایط نگهداری و تغذیه‌ای، دام‌ها به جایگاه‌های انفرادی انتقال داده شدند. دام‌ها علاوه بر دسترسی آزاد به علوفه خشک مرغوب، متناسب با تولید شیر روزانه از کنسانتره دارای انرژی و پروتئین بالا استفاده نمودند. آب شرب بهداشتی به صورت آزاد در اختیار دام‌ها قرار داشت و روزانه ۵۰ گرم مکمل معدنی به ازای هر گاو در اختیار آن‌ها قرار داده شد. گاوها بر اساس وزن و مقدار شیر تولیدی در دوره شیردهی به‌طور تصادفی به چهار گروه اختصاص داده شدند که عبارتند از: تزریق انسولین به منظور کاهش غلظت گلوکز خون به کمتر از ۲/۵ mmol/L (HypoG n=۶)، تزریق انسولین (۰/۱ ± ۰/۶ mU/kg of BW) به همراه گلوکز جهت افزایش غلظت انسولین و ثابت نگه داشتن غلظت گلوکز خون در حد فیزیولوژیک (EuG n=۵)، تزریق بتا‌هیدروکسی‌بوتیرات (Beta-hydroxybutyrate; BHB) به منظور افزایش غلظت BHB (۱/۵mmol/L تا ۲/۰) بالاتر از مقدار مشخص‌شده در زمان وقوع کتوز تحت بالینی (۱/۲ mmol/L) (HyperB n=۵) و تزریق سرم فیزیولوژی (۰/۹ NaCl) به عنوان گروه شاهد (n=۸). برای نمونه‌گیری و تزریق متابولیت‌ها یک روز قبل از شروع آزمایش، کاتترهای داخل رگی (Cavafix®) (Certo® Splittocan®, B. Braun Melsung AG, Germany) به طول ۳۲ سانتی‌متر و قطر ۱۶ G در وریدهای دو طرف گردن تعبیه شد. یکی از کاتترها به منظور تزریق و از کاتتر دیگر برای خون‌گیری استفاده شد. تزریق متابولیت‌ها از ساعت ۹ صبح روز اول شروع و تا ساعت ۹ صبح روز سوم به مدت ۴۸ ساعت انجام شد. برای تزریق کنترل شده متابولیت‌ها از پمپ خودکار (Perfuser, B. Braun Melsungen AG) استفاده شد. به منظور تنظیم میزان متابولیت‌های تزریقی در ۲ ساعت اول آزمایش هر ۵ دقیقه یک‌بار و در طول آزمایش هر ۳۰ دقیقه یک‌بار متابولیت‌های موردنظر (گلوکز و BHB) اندازه‌گیری شد و بر اساس آن نرخ تزریق متابولیت‌ها تنظیم شد.

نتایج

غلظت متابولیت‌ها و هورمون‌ها و همچنین نرخ تزریق متابولیت‌ها و هورمون‌ها در این مطالعه که بر اساس آن بیان mRNA ژن‌های آنتی‌اکسیدانی مرتبط با Nrf2 اندازه‌گیری شده در مقالات پیشین گزارش شده است (Kreipe *et al.*, 2011; Zarrin *et al.*, 2013; Zarrin *et al.*, 2015).

بیان mRNA ژن‌های هدف در بافت پستانی در ۴۸ ساعت اول: مقدار ΔCT ژن‌های هدف قبل از شروع تزریق (ساعت صفر) و همچنین میزان تغییرات آن‌ها در نتیجه تزریق متابولیت‌ها پس از ۴۸ ساعت ($\Delta\Delta CT$) در جدول ۲ ارائه شده است. بر اساس داده‌های بدست‌آمده، تزریق انسولین به همراه گلوکز سبب کاهش بیان mRNA ژن‌های CAT، HMOX2، MGST3، NQO1، SOD1 در گروه EuG نسبت به قبل از شروع تزریق متابولیت‌ها شد ($P < 0.05$ ؛ جدول ۳). تفاوت بیان mRNA ژن MGST3 در مدت ۴۸ ساعت تزریق بین دو گروه EuG و HyperB در بافت پستانی به لحاظ آماری معنی‌دار بود؛ به‌طوری‌که هایپرانسولین‌یوگلاسمیک سبب کاهش بیان ژن موردنظر نسبت به تزریق BHB به میزان دو برابر شد ($P < 0.05$).

بحث

تاکنون دلیل سرکوب سیستم ایمنی در گاوهای دوره انتقال به خوبی روشن نشده است، اما مشخص است که تغییرات متابولیکی آغاز شیردهی از جمله عوامل مؤثر بر عملکرد سیستم ایمنی هستند (Goff, 2006). افزایش غلظت FFA و BHB (Drackly, 2001; Zarrin *et al.*, 2017) به همراه کاهش غلظت آنتی‌بادی‌های متصل به آنتی‌ژن (Van knegsel *et al.*, 2007) در زمان تراز منفی انرژی دوره انتقال، می‌توانند در سرکوب سیستم ایمنی نقش داشته باشند (Goff, 2006). پژوهش‌های پیشتر ما نشان دادند که ۴۸ ساعت تزریق مداوم انسولین، انسولین همراه با گلوکز و همچنین بتا‌هیدروکسی‌بوتیرات سبب تغییر متابولیت‌ها و هورمون‌ها در گاوهای شیری می‌شود (Kreipe *et al.*, 2011; Zarrin *et al.*, 2013). بر اساس مطالعات صورت گرفته مشخص شده است که تغییر فراسنجه‌های خونی و تغییر در ترشحات هورمونی در اوایل شیردهی موجب بروز التهاب و سرکوب سیستم ایمنی شده و دام را مستعد ابتلا به دیگر بیماری‌ها و ناهنجاری‌ها

بیان mRNA ژن‌های مرجع (ubiquitin و GAPDH) و همچنین ژن‌های مرتبط با Nrf2 با روش qPCR استفاده از دستگاه مربوطه (Rotor-Gene 6000 rotary analyzer, Corbett Research, Sydney, Australia) اندازه‌گیری شد. مشخصات پرایمر ژن‌های مرجع و ژن‌های انتخابی (Gessner *et al.*, 2013) در جدول ۱ نشان داده شده است. به همین منظور از یک ترکیب شامل ۰/۸ میکرو لیتر آب PCR، ۱ میکرو لیتر آغازگر پیشرو (Forward)، ۱ میکرو لیتر آغازگر پس‌رو (Reverse) و ۵/۲ میکرو لیتر سایبر گرین به همراه ۲ میکرو لیتر از cDNA استفاده شد. مقدار CT بدست آمده برای ژن‌های هدف بر اساس میانگین CT ژن‌های مرجع تنظیم شد (ΔCT) و تفاوت در بیان mRNA ژن‌های هدف در مدت ۴۸ ساعت اول آزمایش بر اساس معادله زیر بدست آمد (Vernay *et al.*, 2012):

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT [48 h] - \Delta CT [0 h]$$

تجزیه آماری: آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی بر اساس مفروضات طرح‌های کاملاً تصادفی انجام شد. برای متابولیت‌ها و هورمون‌های مورد بررسی در مدت تزریق (۴۸ ساعت)، سطح زیر منحنی^۱ با استفاده از قانون تراپیزوئیدال^۲ (مجموع مناطق مستطیلی و مثلثی شکل زیر منحنی) محاسبه شد. برای هر کدام از پارامترها میزان تغییرات (قبل از تزریق - بعد از تزریق = میزان تغییرات) در مدت ۴۸ محاسبه شد و بر اساس رویه GLM نرم‌افزار SAS مورد ارزیابی آماری قرار گرفت و تفاوت میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی مقایسه شد. داده‌ها به صورت Mean \pm SEM بیان شده و $P \leq 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری، در نظر گرفته شد. مدل آماری مورد استفاده در این آزمایش به شرح زیر بود:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Y_{ij} ، صفت اندازه‌گیری شده در ۴۸ ساعت اول؛ μ ، میانگین صفت؛ α_i ، اثر گروه‌ها و ε_{ij} ، خطای آزمایش است. در مدل آزمایشی فرض شد که داده‌ها از توزیع نرمال با پیروی می‌کنند.

1. Area under the curve (AUC)
2. Trapezoidal Rule

پاسخ‌های التهابی نظیر هاپتوگلوبین^۳ و سرم آمیلوئید A^۴ همراه بوده که این اثرات نیز در بررسی‌های پیشین مرتبط با این آزمایش مشاهده شدند (Kreipe *et al.*, 2011; Vernay *et al.*, 2012; Zarrin *et al.*, 2014a). این مشاهدات بیانگر بروز پاسخ‌های ایمنی در بافت پستانی در نتیجه تغییر متابولیت‌ها هستند. برخی از نتایج بدست آمده برای ژن‌های مرتبط با Nrf2 در این آزمایش با نتایج گزارش شده به وسیله Gessner *et al.* (2013) مبنی بر افزایش بیان mRNA ژن‌های آنتی‌اکسیدانی تنظیم شده به وسیله فاکتور Nrf2 همخوانی داشته و از نظر عددی نسبت به قبل از شروع تزریق افزایش داشته، ولی از نظر آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. از طرف دیگر بر اساس نتایج جدول ۳ بیان mRNA ژن‌هایی نظیر CAT, HMOX2, MGST3, NQO1, SOD1 و تمایل به کاهش بیان mRNA ژن GPX3 در گروه EuG شد. دلیل تفاوت نتایج در مطالعه حاضر نسبت به مطالعه Gessner *et al.* (2013) می‌تواند به دلیل موارد مختلفی باشد که از جمله آن‌ها می‌توان به غلظت انسولین و گلوکز اشاره نمود که مقدار آن‌ها در زمان دوره انتقال پایین است؛ این در حالی است که در پژوهش پیش‌رو دام‌ها در میانه شیردهی بوده و میزان انسولین و گلوکز در تیمارهای مختلف متفاوت بودند. به طور خاص در گروه EuG مقدار انسولین بالاتر از حد نرمال ولی گلوکز در حد فیزیولوژیک نگه داشته شد. تفاوت میان نتایج این دو آزمایش نیز ممکن است به دلیل ماهیت آزمایش بوده که در آزمایش حاضر، دام‌ها در شرایط تراز منفی انرژی نبوده و یا کمبود گلوکز در گروه EuG وجود نداشته یا اگر در گروه HypoG کمبود گلوکزی مشاهده شد در نتیجه افزایش غلظت انسولین است که خود انسولین علاوه بر اثر کاهش‌دهندگی گلوکز در بسیاری از موارد دیگر نیز به عنوان یک عامل ضدالتهابی، به عنوان یک ضد استرس اکسیداتیو نیز ایفای نقش می‌کند (Dandona *et al.*, 2009). نتایج بدست آمده برای بافت پستانی در مدت زمان ۴۸ ساعت اول آزمایش با نتایجی منتشر نشده‌ای که برای بافت کبدی بدست آمد کاملاً مطابقت دارد. این امر نشان دهنده تأثیر هماهنگ هاپیرانسولین‌یوگلاسیمی در هر دو بافت کبدی و بافت پستانی است، ولی میزان تأثیرگذاری این تغییرات

خواهد نمود (Bertoni *et al.*, 2008; Trevisi *et al.*, 2012; Zarrin *et al.*, 2014 a).

با توجه به اهمیت بافت پستانی به خصوص در دام‌های شیری پر تولید و نقش آن در ساخت و ترشح شیر انتظار می‌رود که این بافت نیز تحت تأثیر تغییرات هورمونی و فراسنجه‌ای قرار گرفته و به منظور حفظ تولید و مقاومت در برابر تغییرات متابولیسمی و التهابات ناشی از آن روش‌های مختلفی را برای محافظت از خود بکار گیرد. از جمله این روش‌ها که در بسیاری از بافت‌های حساس بدن به عنوان یک سامانه دفاعی قوی عمل می‌نماید مکانیسم Nrf2 و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی وابسته به آن است. انتظار می‌رود که در زمان بروز التهابات و بیماری‌های عفونی نظیر بیماری ورم پستان که بافت پستانی را بخصوص در دام‌های پر تولید درگیر می‌نماید، فعالیت این سامانه دفاعی بیشتر شود. از طرف دیگر با توجه به تغییر فراسنجه‌های خونی و سیستم هورمونی بدن، فعالیت این سامانه دفاعی ممکن است دست‌خوش تغییراتی شود. نتایج حاصل از این آزمایش نشان می‌دهد ۴۸ ساعت تزریق مداوم این متابولیت‌ها سبب تغییر در بیان ژن برخی از این آنزیم‌ها شد که عمده تغییرات مشاهده شده مربوط به بیان ژن‌های منتخب مربوطه به گروه هاپیرانسولین‌یوگلاسیمیک (افزایش انسولین - غلظت نرمال گلوکز) است.

از همین مطالعه اخیراً نتایجی در ارتباط با اثرات تزریق متابولیت‌ها بر پاسخ‌های فاز حاد^۱ منتشر شده است (De Matteis *et al.*, 2017). بر اساس این نتایج، افزایش غلظت انسولین زمانی که گلوکز خون در سطح فیزیولوژیکی حفظ شد سبب کاهش پاسخ‌های التهابی به ویژه کاهش پروتئین‌های فاز حاد منفی پلاسما^۲ در گروه هاپیرانسولین‌یوگلاسیمی (EuG) شد که نتایج بدست آمده از مطالعه ذکر شده در ارتباط با تأثیر منفی هاپیرانسولین-یوگلاسیمی بر پاسخ‌های ایمنی تأیید کننده نتایج بدست آمده در ارتباط با کاهش بیان mRNA برخی از ژن‌های هدف در گروه EuG است.

طبق یافته‌های (Gessner *et al.*, 2013)، دوره انتقال و اوایل شیردهی با افزایش بیان mRNA ژن‌های مرتبط با

3. Haptoglobin; Hp
4. Serum Amyloid A; SAA

1. Acute Phase Response
2. Plasma Negative Acute Phase Proteins

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی بنا به نتایج بدست‌آمده از این مطالعه و دیگر نتایج منتشر شده از این آزمایش چنین می‌توان نتیجه گرفت که کاهش آزادسازی هورمون گلوکاکون به همراه افزایش غلظت انسولین در زمانی که غلظت گلوکز خون در حد فیزیولوژیک نگه داشته شود می‌تواند موجب کاهش بیان mRNA برخی از ژن‌های آنتی‌اکسیدانی تنظیم شده به وسیله مکانیسم Nrf2 شده که این کاهش بیان می‌تواند افزایش حساسیت بافت پستانی و افزایش خطر ابتلا به دیگر بیماری‌های نظیر ورم پستان را در پی داشته باشد.

هورمونی و متابولیتی در بافت کبدی با توجه به نقش بی‌بدیل کبد در هموستازی فعالیت‌های متابولیسمی شدیدتر بوده است. به طوری که کاهش بیان ژن‌های هدف در نتیجه افزایش انسولین همزمان با غلظت نرمال گلوکز در بافت کبد محسوس‌تر بوده و باعث تفاوت معنی‌دار بیان mRNA اغلب ژن‌های هدف در گروه EuG نسبت به دیگر گروه‌ها شد.

اگرچه مکانیسم اثر کاهش بیان ژن آنزیم‌های مرتبط با Nrf2 تاکنون مشخص نشده است، ولی مطالعات برون‌تنی اخیر نشان داده که ایجاد هایپرانسولین‌یوگلاسمیک سبب کاهش بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی مرتبط با Nrf2 در سلول‌های کلیوی موش شده است (Ghosh *et al.*, 2017) که نشان‌دهنده اثر ممانعت‌کنندگی انسولین بر فعالیت Nrf2 و ژن‌های وابسته به آن است. این پژوهشگران همچنین نشان دادند که انسولین سبب کاهش بیان Nrf2 هسته‌ای و فسفریله شدن Nrf2 در سلول‌های کلیوی موش‌های Akita شد. انسولین سبب کاهش فعالیت پروموتور آنژیوتنسین و Nrf2 در سلول‌های لوله پروکسیمال کلیه موش می‌شود که این اثر ممانعت‌کنندگی انسولین بر Nrf2 از راه ریبونوکلوپروتئین هسته‌ای ناهمگن F¹ و K¹ اعمال می‌شود که این عامل وقتی که با DNA-RE در پروموتور ژن Nrf2 باند می‌شود سبب کاهش بیان ژن آن می‌شود (Ghosh *et al.*, 2017). مدارک متقنی از آزمایش‌های درون و برون‌تنی موجود است که نشان می‌دهند اثر ممانعت‌کنندگی انسولین به وسیله عنصر پاسخگوی انسولین^۲ میانجی‌گری می‌شود که در پروموتور ژن Nrf2 وجود دارد و با hnRNP F/K باند می‌شود و احتمالاً اثر کاهش‌دهندگی انسولین مربوط به فعال شدن جایگاه P44/42 MAPK است که در زمان اتصال انسولین به گیرنده انسولین و فسفریله شدن Nrf2، فعالیت آن کاهش پیدا می‌کند (Sun *et al.*, 2009; Ghosh *et al.*, 2017). نتایج مشاهده شده به وسیله Ghosh *et al.* (2017) ایده توانایی اتصال ریبونوکلوپروتئین هسته‌ای ناهمگن F و K به عنصر پاسخگوی DNA^۳ و کاهش تنظیم رونویسی ژن‌های Nrf2 را تقویت می‌نماید.

1. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F and K (hnRNP F/K)
2. Insulin-responsive element (IRE)
3. DNA responsive element (DNA-RE)

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای واکنش زنجیره پلیمرز (پیشرو = for، پسرو = rev)، دمای واسرشتگی و طول محصول واکنش زنجیره پلیمرز

Table 1. Polymerase chain reaction primer information (for = forward, rev = reverse), annealing temperature and the PCR product length

Gene [#]	Sequence 5'-3'	Gene Bank accession no.	Annealing temperature (°C)	Length, bp
GAPDH for	GTCTTCACTACCATGGAGAAGG	NM001034034	60	197
GAPDH rev	TCATGGATGACCTTGGCCAG			
Ubiquitin for	AGATCCAGGATAAGGAAGGCAT	NM174133	62	198
Ubiquitin rev	GCTCCACCTCCAGGGTGAT			
CAT for	TGGGACCCAACATCTCCAG	NM_00103586.1	61	178
CAT rev	AAGTGGGTCTGTGTTCAG			
CRP for	GGCCAGACAGACTTGCATAAGAAGG	NM_001144097.1	61	142
CRP rev	GGGTTCGGGCCAGCTCTGTG			
GPX3 for	ACCACCGCACCGGTCAAC	NM_174077.3	61	127
GPX3 rev	GCCCGTGTGGTGGACTTGGG			
HMOX2 for	GCCACCACCGCGCTGTACTT	NM_001032087.2	61	108
HMOX2 rev	CCGGTGTAGCTCCGTGGGGA			
MGST3 for	GGGCTTGGCCTGGATCGTTGG	NM_001035046.1	61	124
MGST3 rev	CACAGTGGTGCCCATCAGGCC			
MT1A for	ATCCGACCAGTGGATCTGCTTTGCC	NM_001040492.2	61	209
MT1A rev	AGACACAGCCCTGGGCACACT			
MT1E for	ACGACCACACTTCGTCTCCGAA	NM_001114857.1	61	261
MT1E rev	ATGCAGGTTGGCCCACGTTCC			
MT2A for	GACCCAGCCTCCAGTTCAGCTC	NM_001075140.1	61	93
MT2A rev	CTTTGCATTTGCAGGAGCCGGC			
NQO1 for	AACCAACAGACCAGCCAATC	NM_001034535.1	61	146
NQO1 rev	CCTCCATCCTTTCCTCTTC			
SOD1 for	TGTTGCCATCGTGGATATTG	NM_174615.2	61	143
SOD1 rev	CAGCGTTGCCAGTCTTTGTA			
UGT1A1 for	GCTCGTCAAGTGGCTGCCCA	NM_001105636.1	61	175
UGT1A1 rev	TCCCCGGGTCTCCATGCGCT			

[#]GAPDH = glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; CAT = catalase; CRP = C-reactive protein; GPX3 = glutathione peroxidase 3; HMOX2 = heme oxygenase 2; MGST3 = microsomal glutathione S-transferase 3; MT1A = metallothionein 1A; MT1E = metallothionein 1E; MT2A = metallothionein 2A; NQO1 = NAD (P) H dehydrogenase, quinone 1; SOD1 = superoxide dismutase 1; UGT1A1 = UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1.

جدول ۲- غلظت متغیرهای پلاسما در گاوهایی که تزریق انسولین (HypoG, n=5)، انسولین و گلوکز (EuG, n=6)، بتا‌هیدروکسی‌بوتیرات (HyperB, n=5) و محلول نمکی ۰/۹٪ (Control, n=8) صورت گرفت. داده‌ها به صورت $LSMeans \pm SEM$ محدوده زیر منحنی در مدت ۴۸ ساعت نشان داده شده‌اند

Table 2. Concentrations of plasma variables in insulin (HypoG, n=5), insulin and glucose (hyperinsulinemic euglycemic) (EuG, n=6), beta-hydroxybutyrate (HyperB, n=5), and 0.9% NaCl (Control, n=8) infusion dairy cows. Data are presented as least square means \pm SEM of area under the curve (AUC) during 48 h

Variable	Group [#]	LSMeans \pm SEM day 2*	ANOVA (P value, group)
Glucose, mmol/L	EuG	3.8 \pm 0.2 ^{ab}	< 0.01
	HyperB	3.5 \pm 0.1 ^b	
	HypoG	2.3 \pm 0.1 ^c	
	Control	4.1 \pm 0.1 ^a	
Insulin, mU/L	EuG	57.8 \pm 7.8 ^b	< 0.01
	HyperB	12.7 \pm 1.4 ^a	
	HypoG	41.9 \pm 8.1 ^b	
	Control	13.9 \pm 1.1 ^a	
Glucagon, pg/ml	EuG	84.0 \pm 6.3 ^a	< 0.01
	HyperB	97.4 \pm 3.3 ^b	
	HypoG	129.0 \pm 7.0 ^c	
	Control	106.1 \pm 5.4 ^b	

#EuG = insulin and glucose infusion (hyperinsulinemic euglycemic) group; HyperB = Hyper BHB group; HypoG = Hyperinsulinemic hypoglycemic group; Control = group of cows receiving physiological saline solution (0.9% NaCl).
 *^{a,b,c} Treatment groups without common letters are significantly different ($P < 0.05$).

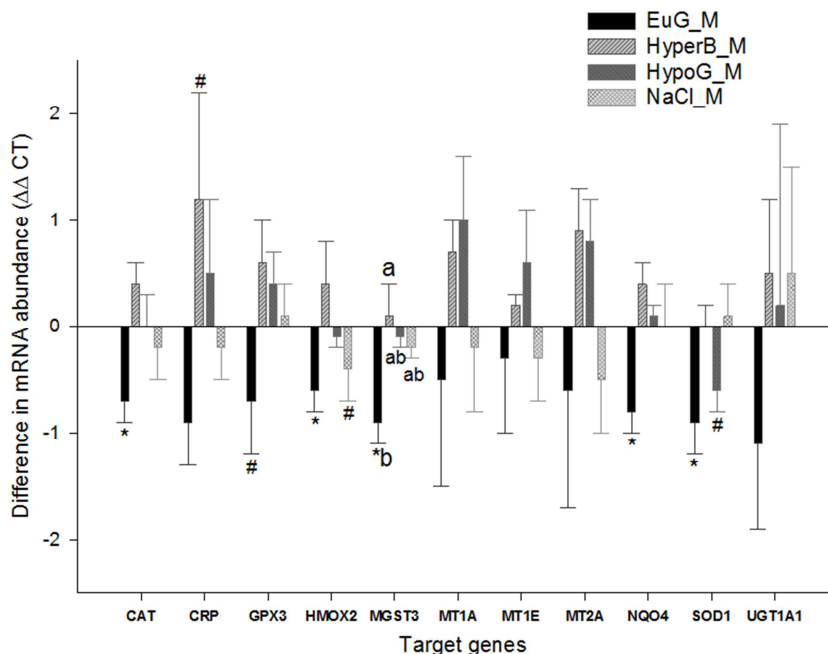


Fig. 1. Variation in mRNA expression of genes related to Nrf2 in mammary tissue in cows which injected by insulin (HypoG, n=5), insulin and glucose (hyperinsulinemic euglycemic) (EuG, n=6), beta-hydroxybutyrate (HyperB, n=5), and 0.9% NaCl (Control, n=8) during 48 h

شکل ۱- تغییرات بیان mRNA ژن‌های مرتبط با Nrf2 بافت پستانی در گاوهایی که به مدت ۴۸ ساعت تزریق انسولین (HypoG, n=5)، انسولین و گلوکز (EuG, n=6)، بتا‌هیدروکسی‌بوتیرات (HyperB, n=5) و محلول نمکی ۰/۹ درصد (Control, n=8) به آنها صورت گرفت

جدول ۳- تغییرات بیان mRNA ژن‌های مرتبط با Nrf2 بافت پستانی در گاوهایی که به مدت ۴۸ ساعت تزریق انسولین (HypoG, n=5)، انسولین و گلوکز (EuG, n=6)، بتا‌هیدروکسی‌بوتیرات (HyperB, n=5) و محلول نمکی ۰/۹٪ (Control, n=8) صورت گرفت. دلتا (تفاوت بین قبل و ۴۸ ساعت بعد از شروع تزریق). داده‌ها به صورت Mean ± SEM نشان داده شده است

Table 3. Changes of mRNA abundance of genes related to Nrf2 in mammary gland during 48 h infusion in insulin (HypoG, n=5), insulin and glucose (EuG, n=6), beta-hydroxybutyrate (HyperB, n=5), and 0.9% NaCl (Control, n=8) infused dairy cows. Delta (differences between before and 48 h after the start of infusions).

Parameter ¹	Group ²	Time zero (before the start of metabolites infusion)		Delta	ANOVA (P Value, group)
		Mean	SEM		
CAT	EuG	18.8	± 0.1	-0.7 ± 0.2*	0.12
	HyperB	16.0	± 0.3	0.4 ± 0.2	
	HypoG	19.7	± 0.1	0.0 ± 0.3	
	NaCl	17.9	± 0.8	-0.2 ± 0.3	
CRP	EuG	11.5	± 0.4	-0.9 ± 0.4	0.11
	HyperB	13.3	± 0.3	1.2 ± 1.0	
	HypoG	11.6	± 0.6	0.5 ± 0.7	
	NaCl	13.5	± 1.0	-0.2 ± 0.3	
GPX3	EuG	16.6	± 0.3	-0.7 ± 0.5	0.15
	HyperB	15.4	± 0.2	0.6 ± 0.4	
	HypoG	18.0	± 0.6	0.4 ± 0.3	
	NaCl	18.5	± 0.4	0.1 ± 0.3	
HMOX2	EuG	17.5	± 0.2	-0.6 ± 0.2*	0.09
	HyperB	14.6	± 0.4	0.4 ± 0.4	
	HypoG	17.8	± 0.1	-0.1 ± 0.1	
	NaCl	17.6	± 0.1	-0.4 ± 0.3	
MGST3	EuG	17.9	± 0.2	-0.9 ± 0.2 ^{b*}	0.02
	HyperB	14.2	± 0.1	0.1 ± 0.3 ^a	
	HypoG	18.3	± 0.1	-0.1 ± 0.1 ^{ab}	
	NaCl	17.0	± 0.7	-0.2 ± 0.1 ^{ab}	
MT1A	EuG	15.6	± 0.6	-0.5 ± 1.0	0.42
	HyperB	13.8	± 0.6	0.7 ± 0.3	
	HypoG	15.5	± 0.8	1.0 ± 0.6	
	NaCl	15.3	± 0.9	-0.2 ± 0.6	
MT1E	EuG	13.6	± 0.4	-0.3 ± 0.7	0.61
	HyperB	12.0	± 0.4	0.2 ± 0.1	
	HypoG	13.7	± 0.8	0.6 ± 0.5	
	NaCl	13.5	± 0.7	-0.3 ± 0.4	
MT2A	EuG	16.2	± 0.6	-0.6 ± 1.1	0.30
	HyperB	14.6	± 0.7	0.9 ± 0.4	
	HypoG	16.3	± 0.7	0.8 ± 0.4	
	NaCl	17.1	± 0.5	-0.5 ± 0.5	
NQO4	EuG	17.1	± 0.1	-0.8 ± 0.2*	0.07
	HyperB	13.1	± 0.3	0.4 ± 0.2	
	HypoG	16.9	± 0.4	0.1 ± 0.1	
	NaCl	16.0	± 0.9	0.0 ± 0.4	
SOD1	EuG	19.1	± 0.3	-0.9 ± 0.3*	0.06
	HyperB	16.2	± 0.3	0.0 ± 0.2	
	HypoG	20.0	± 0.3	-0.6 ± 0.2	
	NaCl	18.7	± 0.7	0.1 ± 0.3	
UGT1A1	EuG	10.6	± 0.5	-1.1 ± 0.8	0.68
	HyperB	13.4	± 0.5	0.5 ± 0.7	
	HypoG	9.0	± 1.5	0.2 ± 1.7	
	NaCl	12.1	± 1.7	0.5 ± 1.0	

¹CAT = catalase; CRP = C-reactive protein; GPX3 = glutathione peroxidase 3; HMOX2 = heme oxygenase 2; MGST3 = microsomal glutathione S-transferase 3; MT1A = metallothionein 1A; MT1E = metallothionein 1E; MT2A = metallothionein 2A; NQO1 = NAD (P) H dehydrogenase, quinone 1; SOD1 = superoxide dismutase 1; UGT1A1 = UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1.

²EuG = hyperinsulinemic Euglycemic group (n=6); HyperB = Hyper beta-hydroxybutyrate group; HypoG = hyperinsulinemic hypoglycemia (n=5); NaCl = group of cows receiving physiological saline solution.

*Delta is different from 0 (P<0.05).

فهرست منابع

- Aitken S. L., Karcher E. L., Rezamand P., Gandy J. C., Vande Haar M. J., Capuco A. V. and Sordillo L. M. 2009. Evaluation of antioxidant and proinflammatory gene expression in bovine mammary tissue during the periparturient period. *Journal of Dairy Science*, 92: 589–598.
- 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.
- Bertoni G., Trevisi E. R. M. I. N. I. O., Han X. and Bionaz M. 2008. Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91: 3300-3310.
- Bionaz M., Trevisi E., Calamari L., Librandi F., Ferrari A. and Bertoni. G. 2007. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90: 1740–1750.
- Bruckmaier R. M. and Gross J. J. 2017. Lactational challenges in transition dairy cows. *Animal Production Science*, 57(7): 1471-1481.
- 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.
- Dandona P., Chaudhuri A., Ghanim H. and Mohanty P. 2009. Insulin as an anti-inflammatory and antiatherogenic modulator. *Journal of the American College of Cardiology*, 53(5): S14-S20.
- De Matteis L., Bertoni G., Lombardelli R., Wellnitz O., Van Dorland H. A., Vernay M. C. M. B., Bruckmaier R. M. and Trevisi E. 2017. Acute phase response in lactating dairy cows during hyperinsulinemic hypoglycaemic and hyperinsulinemic euglycaemic clamps and after intramammary LPS challenge. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101: 511-520.
- 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.
- Gessner D. K., Schlegel G., Keller J., Schwarz F. J., Ringseis R. and Eder K. 2013. Expression of target genes of nuclear factor E2-related factor 2 in the liver of dairy cows in the transition period and at different stages of lactation. *Journal of Dairy Science*, 96: 1038-1043.
- Ghosh A., Abdo S., Zhao S., Wu C. H., Shi Y., Lo C. S., Chenier I., Alquier T., Filep J. G., Ingelfinger J. R. and Zhang S. L. 2017. Insulin inhibits Nrf2 gene expression via heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F/K in diabetic mice. *Endocrinology*, 158: 903-919.
- 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., 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.
- Halliwell B. 1996. Commentary: Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radical Research*, 25: 57–74.
- Kensler T. W., Wakabayashi N. and Biswal S. 2007. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47: 89-116.
- 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.
- Motohashi H. and Yamamoto M. 2004. Nrf2–Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends in Molecular Medicine*, 10(11): 549-557.
- Scherer N. M. and Deamer D. W. 1986. Oxidative stress impairs the function of sarcoplasmic reticulum by oxidation of sulfhydryl groups in the Ca²⁺-ATPase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 246: 589–601.
- 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.
- Stewart B. W. 1994. Mechanisms of apoptosis: Integration of genetic, biochemical, and cellular indicators. *Journal of the National Cancer Institute*, 86: 1286–1296.
- Sun Z., Huang Z. and Zhang D. D. 2009. Phosphorylation of Nrf2 at multiple sites by MAP kinases has a limited contribution in modulating the Nrf2-dependent antioxidant response. *PLoS One*, 4: e6588.

- 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.
- 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 Review*, 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.
- 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., Grosse-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.



Metabolites and hormones manipulated effect on mRNA abundance of antioxidant genes related to Nrf2 in mammary tissue of dairy cows

M. Zarrin^{1*}, R. M. Bruckmaier², A. Ahmadpour³

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

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

3. Researcher, Department of Animal, Dairy, and Veterinary Sciences, Utah State University, USA

(Received: 05-04-2018 – Accepted: 04-07-2018)

Abstract

Mammary immune suppression has been observed in high yielding dairy cows due to metabolites and endocrine changing after parturition. Twenty four Holstein dairy cows at the late stage of lactation were used to study the effects of long term (48 h) manipulating metabolites and hormones on mammary antioxidant genes that encode by nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2). Treatments include 48 h intravenous infusion of insulin (HypoG, n=5), insulin and glucose (hyperinsulinemic euglycemic) (EuG, n=6), BHB (HyperB, n= 5), and 0.9 % NaCl (Control, n=8). Mammary tissue samples were taken from two rare quarters one week before and 48 h after the start of infusions. Following total RNA extraction, mRNA abundance of housekeeping and candidate genes related to Nrf2 measured by qPCR method. Hyperinsulinemic euglycemic down-regulated mRNA abundance of catalase (CAT), heme oxygenase 2 (HMOX2), microsomal glutathione S-transferase 3 (MGST3), NAD (P) H dehydrogenase, quinone 1 (NQO1), superoxide dismutase 1 (SOD1) ($P<0.05$), compared to pre-infusion in EuG group. Hyperinsulinemic euglycemic down-regulated GPX3 mRNA abundance in EuG group compared to HyperB group ($P<0.05$). Therefore, increased susceptibility and disease in mammary gland may be related to reduction in the mRNA abundance of antioxidant genes during metabolites and hormones changing.

Keywords: Insulin, Immunity, Beta-hydroxybutyrate, Glucose

*Corresponding author: mzarini@yu.ac.ir