Iranian Journal of Biological Sciences.2022; 17(3):29-39

Original Article

Iranian Journal of Biological Sciences

https://zisti.iauvaramin.ac.ir

The effect of zinc-methionine supplementation on antioxidant status and expression of interleukin-4 and interleukin-6 genes in female rats under heat stress

Matin Jamei[1], Ali Asghar Sadeghi[2], Mohammad Chamani[3]*

1. Ph.D. Student, Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Full Professor, Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

place of research: Razi Labratory, Science and Reseach Branch, Islamic Azad University

Article Info

Article History:
Recived 11.23.2022
Revised 12.25.2022
Accept 2.13..2023
Online 2.13..2023

KeyWords:
Antioxidant capacity
Glutathione peroxidase
Liver enzymes
Malondialdehyde
Superoxide dismutase
Female rat

***Corresponding author:**
E-mail address

jm.mtn20@yahoo.com
a.sadeghi@srbiau.ac.ir
aasdghi@gmail.com
m.chamani@srbiau.ac.ir

Abstract

Introduction: During heat stress, the animal body requires more antioxidant compounds and activity of antioxidant enzymes. Zinc plays a role in the structure and activity of antioxidant enzymes. One of the ways to supply the zinc requirement, is to use organic zinc supplements, which zinc combined with methionine, and have more intestinal absorption.

Aim: This study was done to evaluate the effects of different doses of zinc-methionine supplementation on the blood antioxidant status and the expression of interleukin 4 and 6 genes in rats exposed to heat stress.

Materials and methods: : In a completely random design, 20 female rats were divided into four treatment groups with five replicates. Rats were kept at a temperature of 31±2 °C for 20 hours and at a temperature of 38±2 °C for 4 hours per day (to create heat stress). The rats in the control group were fed standard pellets without additives, and the three experimental groups were fed standard pellets plus 15, 30 and 45 mg zinc-methionine supplement per kilogram of dry matter for 30 days. At the end of the experiment, a blood sample was collected from the inferior vena cava. Total antioxidant capacity, malondialdehyde concentration, antioxidant enzymes, liver enzymes in the serum and the expression of interleukin-4 and interleukin-6 genes were measured.

Results: Serum zinc concentration increased linearly with increasing zinc dose in the diet ($P<0.05$). The serum activity of two enzymes, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase decreased linearly with increasing zinc-methionine dose in the diet ($P<0.01$). The highest activity of glutathione reductase and glutathione peroxidase was observed in the group receiving 30 mg/kg, and the lowest activity of these enzymes was observed in the control group. In general, the relative expression of the interleukin-4 gene was increased, and the relative expression of the interleukin-6 gene was decreased ($P<0.05$). The highest expression of interleukin-4 gene belonged to the group receiving 30 mg, and the highest relative expression of interleukin-6 gene belonged to the control group and the group receiving 15 mg/kg..

Conclusion: The results of this study showed that the dose of up to 30 mg of zinc-methionine per kg of diet used in this study increases the activity of superoxide dismutase enzyme and glutathione peroxidase enzyme activity, decreases the activity of liver enzymes in the serum, increases the expression of the anti-inflammatory gene (Interleukin-4) and decreases the expression of inflammatory gene (Interleukin-6), which indicates the reduction of oxidative stress and the reduction of the effects of heat stress in the body of the rat.

Cite this article: Jamei M.,Sadeghi A.A., Chamani M. The effect of zinc-methionine supplementation on antioxidant status and expression of interleukin-4 and interleukin-6 genes in female rats under heat stress. Iranian Journal of Biological Sciences. 2022; 17(3):29-39

10.30495/zisti.2023.1973380.1144 DOR 20.1001.1.17354226.1401.17.3.3.7
Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch Print ISSN: 1735-4226 Online ISSN: 1727-459X
This is an open access article under the: https://creativecommons.org/license/by-nc/4.0/

مقاله تحقیقی
دانش زیستی ایران
https://zisti.iauvaramin.ac.ir

اثر مکمل روی – متیونین بر وضعیت آنتی اکسیدانی و بیان ژن های اینترلوکین-٤ و اینترلوکین-٦ در خون موش های صحرایی ماده در معرض تنش گرمایی

متین جامعی[1]، علی اصغر صادقی[2*]، محمد چمنی[3]
۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم دامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامي، تهران، ایران
۱- دانشیار، گروه علوم دامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامي، تهران، ایران
۱- استاد، گروه علوم دامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامي، تهران، ایران
محل انجام تحقیق :آزمایشگاه رازی، دانشگاه علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
ارسال ۱۴۰۱/۰۹/۰۱
بازنگری ۱۴۰۱/۱۰/۰۴
پذیرش ۱۴۰۱/۱۱/ ۲۴
نمایه ۱۴۰۱/۱۱/۲۴

کلمات کلیدی
آنزیم های کبدی
سوپراکسید دیسموتاز
ظرفیت آنتی اکسیدانی
گلوتاتیون پراکسیداز
مالون دی آلدئید
موش صحرایی ماده

* نویسنده مسؤل
jm.mtn20@yahoo.com
a.sadeghi@srbiau.ac.ir
aasdghi@gmail.com
m.chamani@srbiau.ac.ir

چکیده

مقدمه: بدن حیوانات طی تنش گرمایی نیاز بیشتری به ترکیبات آنتی اکسیدانی و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی دارد. عنصر روی در ساختار و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی نقش دارد. یکی از راه های تامین روی مورد نیاز حیوانات، استفاده از مکمل روی به شکل آلی است که روی با اسیدآمینه متیونین ترکیب و جذب روده ای بیشتری دارد.

هدف: این مطالعه به منظور بررسی اثرات مکمل روی-متیونین بر وضعیت آنتی اکسیدانی خون و بیان ژن های اینترلوکین ٤ و ٦ در موش های صحرایی در معرض تنش گرمایی انجام شد.

مواد و روش ها: تعداد ۲۰ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار در قالب طرح کاملا تصادفی به چهار گروه پنج تایی شامل یک گروه شاهد و سه گروه تجربی تقسیم شدند. موش ها در دمای۲±۳۱ درجه طی ۲۰ ساعت و دمای ۲±۳۸ درجه سانتی گراد به مدت ٤ ساعت در روز (جهت ایجاد تنش گرمایی) نگهداری شدند. موش های گروه شاهد با پلت استاندارد بدون افزودنی و سه گروه تجربی به ترتیب پلت استاندارد به اضافه ۱۵، ۳۰ و ٤٥ میلی گرم بر کیلوگرم ماده خشک مکمل روی متیونین به مدت ۳۰ روز تغذیه شدند. در پایان آزمایش از بزرگ سیاهرگ زیرین موش ها خون گیری به عمل آمد. ظرفیت انتی اکسیدانی کل، غلظت مالون دی آلدئید، آنزیم های آنتی اکسیدانی، آنزیم های کبدی در سرم خون و بیان ژن های اینترلوکین ٤ و اینترلوکین-٦ در مونوسیت های خون اندازه گیری شد.

نتایج: غلظت روی در سرم به صورت وابسته به دوز با افزایش دوز روی در جیره افزایش یافت ($P<0.05$). فعالیت سرمی دو آنزیم آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز به صورت وابسته به دوز با افزایش دوز روی-متیونین در جیره کاهش یافت ($P<0.01$). بیشترین فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در گروه دریافت کننده ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم و کمترین فعالیت این آنزیم ها در گروه شاهد مشاهده شد. در کل بیان نسبی ژن اینترلوکین-٤ افزایشی و بیان نسبی ژن اینترلوکین-٦ کاهشی بود ($P<0.05$). بیشترین بیان ژن اینترلوکین-٤ به گروه دریافت¬کننده ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم، بیشترین بیان نسبی ژن اینترلوکین-٦ به گروه شاهد و گروه دریافت¬کننده ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم تعلق داشت.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد، روی-متیونین در دوز ۳۰ میلی¬گرم در کیلوگرم سبب افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز، کاهش فعالیت آنزیم های کبدی در سرم و افزایش بیان ژن های ضدالتهابی را سبب می شود که نشاندهنده کاهش تنش اکسیداتیو و کاهش اثرات تنش گرمایی در بدن موش ها می باشد.

شیوه آدرس‌دهی این مقاله : جامعی م.، صادقی ع.الف.، چمنی م. اثر مکمل روی – متیونین بر وضعیت آنتی اکسیدانی و بیان ژن های اینترلوکین-٤ و اینترلوکین-٦ در خون موش های صحرایی ماده در معرض تنش گرمایی مجله دانش زیستی ایران. ۱٤۰۱ ؛ ۱۷(۳):۲۹-۳۹

DOR 20.1001.1.17354226.1401.17.3.3.7
doi 10.30495/zisti.2023.1973380.1144

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا شاپا چاپی: ۱۷۳۵-٤۲۲٦ شاپا الکترونیکی: ۲۷۱۷-٤٥۹X
نویسندگان: © حق مؤلف

مقدمه:

روی یک ماده معدنی کمیاب و ضروری برای بدن است و در ساختار بیش از ۳۰۰ متالوپروتئین بویژه در متالوآنزیم ها و عوامل موثر بر رونویسی از ژن ها و ترجمه آنها وجود دارد (۱). آنزیم‌هاي حاوی عنصر روي در ساخت و یا تجزیه کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها، پروتئین‌ها و همین¬طور اسیدهاي نوکلئیک نقش دارند. نقش این عنصر در همه گروه های آنزیمی شناخته شده، از جمله آنزیم کربونیك آنهیدراز، پروتئازها، فسفاتازها و سایر آنزیم‌هاي موثر در هضم و جذب غذا حائز اهمیت است (۲). علاوه بر این، عنصر روی بر عملکرد طبیعي سیستم ایمني از طریق افزایش تکثیر و کاهش آپوپتوز در لنفوسیتها و بیان ژن های سیتوکینی نقش دارد (۳). روي براي فعالیت آنزیم‌هاي سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز ضروری مي‌باشد و کمبود آن سبب افزایش تنش اکسیداتیو می شود (٤).

این عنصر باید به صورت مکمل به جیره‌هاي غذایی انسان و حیوانات اضافه شود تا احتیاجات به این عنصر برآورده شود. مشکلی که وجود دارد این است که زیست¬فراهمی این عنصر در مواد خوراکی با منشأ گیاهی بسیار کم است، زیرا عنصر روي به وسیله فیتات به دام افتاده و قابلیت جذب آن کم است (٥). تامین عنصر روی به شکل معدنی یکی از روش های تامین این عنصر است ولیکن در مطالعات مختلف در مورد میزان جذب و اثرات آن نتایج ضد و نقیضی گزارش شده داده است (٦، ٧). یکی از معایب روی معدنی قابلیت انحلال و قابلیت جذب کم و امکان ایجاد کمپلکس با مواد کلیت کننده است (٨). روش دیگر استفاده از مکمل روی به شکل آلی است که در ترکیب با اسیدآمینه متیونین می تواند جذب روده ای را بهبود و تداخل عواملی از قبیل تشکیل کمپلکس را کاهش دهد (٩). Souza و همکاران (١٠) گزارش کردند اسیدهای آمینه توانایی تشکیل کمپلکس پایدار با مواد معدنی دارند و با توجه به قابلیت زیست فراهمی زیاد می توان از این ترکیبات برای تامین مواد معدنی کم نیاز در تغذیه حیوانات استفاده کرد. بعنوان مثال در مکمل روی-متیونین که حاوی حدود ۲۲-۱۹٪ عنصر روی است، روی به گوگرد اسید آمینه ضروری متیونین متصل می شود. این مکمل محلول در آب و به آسانی قابل جذب بوده و به دلیل زیست فراهمی زیاد، روی مورد نیاز حیوان را تامین می کند (١٠).

امروزه نقش روی در حیوانات پرورشی به‌عنوان تقویت‌کننده سیستم ایمنی اهمیت دارد، زیرا محدودیت‌هایی برای استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در جیره غذایی توسط بسیاری از کشورها اعمال می‌شود. بنابراین لازم است سیستم ایمنی بدن تقویت شود تا نبود آنتی بیوتیک ها سبب ایجاد مشکلاتی در پرورش حیوانات نشود (١١). بیان ژن های سیتوکینی و مقدار آنتی بادی در زمینه تقویت سیستم ایمنی اهمیت زیادی دارد. در این رابطه گزارش هایی وجود دارد (١٣، ١٢، ٣) که نشان می دهد روی می تواند بر بیان ژن های سیتوکینی و مقدار آنتی بادی اثر بگذارد.

از طرفی طی فصل گرما، واکنش‌های متابولیکی سلول‌ها و بافت‌ها افزایش می‌یابد و در نتیجه نیاز به اکسیژن افزایش می‌یابد که منجر به افزیش تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود و استرس گرمایی یا استرس اکسیداتیو در بدن ایجاد می شود (١٤). در این شرایط نیاز بدن به ترکیبات آنتی اکسیدانی و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی افزایش می یابد. عنصر روی در ساختار و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی مانند گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز نقش دارد. نیاز حیوانات به عناصر کمیاب به ویژه روی در شرایط تنش و بدون تنش یکسان نیست و بنابراین تعیین سطوح بهینه در شرایط مختلف امری ضروری است (٤).

در منابع در دسترس و منتشر شده، گزارشی در زمینه دوز مناسب روی-متیونین و اثر این مکمل بر وضعیت آنتی اکسیدانی و بیان ژن های مرتبط با سیستم ایمنی در حیوانات در معرض تنش یافت نشد. بنابراین، هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثرات دوزهای مختلف مکمل روی-متیونین بر وضعیت آنتی اکسیدانی خون و بیان ژن های اینترلوکین ٤ و ٦ در موش های صحرایی ماده در معرض تنش گرمایی بود. در این مطالعه از موش صحرایی به عنوان مدل برای مطالعه اثرات مکمل روی-متیونین در حیوانات تک معده ای استفاده شد.

مواد و روش ها:

حیوانات مورد استفاده

تعداد ۲۵ سر موش صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار (۱۵ ± ۱۸۰ گرم) از مرکز پرورش حیوانات انستیتو رازی کرج خریداری شد و در قفس های بزرگ به صورت ۵ حیوان در یک قفس بزرگ با بستر خاک اره نگهداری شدند. در دوره سازگاری و کل دوره آزمایش، همه موش های صحرایی به طور آزادانه به غذای پلت استاندارد و آب آشامیدنی دسترسی داشتند و در شرایط رطوبت (۵۰٪)، نور (سیکل۱۲ساعت نور و ۱۲ساعت تاریکی) و دمای۲±۳۱ درجه سانتی گراد طی ۲۰ ساعت و دمای ۲±۳۸ درجه سانتی گراد به مدت ٤ ساعت در روز (جهت ایجاد تنش گرمایی) قرار داده شدند. کلیه ملاحظات اخلاقی در مورد کار با حیوانات طبق دستورالعمل معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات و آزمایشگاه رازی صورت گرفت. قبل از شروع مطالعه حیوانات به مدت یک هفته جهت سازگاری با محیط و نیز رسیدن به وزن مطالعه در محل حیوان خانه مجتمع رازی واحد علوم و تحقیقات نگهداری شدند.

گروه های آزمایشی

تعداد ۲۰ سر موش صحرایی پس از یک هفته سازگاری و نیز رسیدن به وزن مناسب (۱۰ ± ۲۰۰ گرم) انتخاب و در طرح کاملا تصادفی به چهار گروه پنج تایی شامل یک گروه شاهد و سه گروه تجربی تقسیم شدند. موش های گروه شاهد پلت استاندارد بدون افزودنی و سه گروه تجربی به ترتیب پلت استاندارد به اضافه ۱۵، ۳۰ و ٤٥ میلی گرم بر کیلوگرم مکمل روی-متیونین به مدت ۳۰ روز دریافت کردند. پلت استاندارد حاوی ۲۸/٤ میلی گرم عنصر روی در هر کیلوگرم ماده خشک بود. برای تهیه پلت حاوی مکمل روی-متیونین، ابتدا پلت های استاندارد آسیاب شد و پس از محاسبه ماده خشک، مقدار لازم از مکمل روی-متیونین به مقدار مشخصی از آن اضافه و مجدد با دستگاه پلت ساز سرد، پلت گردید. برای گروه شاهد نیز پلت ها مجددا به همین شیوه آسیاب و از نو تهیه شد تا اثرات احتمالی عمل آوری بر بافت فیزیکی و ترکیب شیمیایی یکسان سازی شود.

نمونه گیری خون

در پایان مطالعه از بزرگ سیاهرگ زیرین موش های صحرایی خون گیری به عمل آمد. پس از بیهوش کردن با تزریق ۱/۵ میلی گرم کتامین به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و پس از باز نمودن شکم، از بزرگ سیاهرگ زیرین با استفاده از سرنگ ۱۰ میلی لیتر نمونه خون تهیه شد. مقدار ۵ میلی لیتر خون در لوله عاری از ماده ضد انعقاد ریخته و سرم آن با سانتریفیوژ (g ×۱۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه) جدا شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا شروع آزمایش های بیوشیمیایی نگهداری گردید. باقیمانده نمونه خون در لوله استریل حاوی هپارین ریخته شد و در نیتروژن مایع قرار داده شد و تا آزمایش های بیان ژن های اینترلوکین در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد .

روش اندازه گیری پارامترهای خونی

فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز به روش Paglia and Valentine (۱۵) و سوپراکسید دیسموتاز در سرم به روش Marklund and Marklund (۱٦) با استفاده از کیت های تجاری (Randox Laboratories Ltd. Ardmore, Crumlin, UK) و مطابق دستورالعمل سازنده اندازه گیری شد. فعالیت آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز سرم با استفاده از دستگاه آنالایزر فوتومتریک (شرکت پارس آزمون، تهران، ایران) اندازه گیری شد. سطوح سرمی مالون دی آلدئید به عنوان محصول پراکسیداسیون لیپیدی بر اساس روش تیوباربیتوریک اسید اندازه گیری شد (۱۷). ظرفیت آنتی اکسیدانی کل سرم بر اساس روش FRAP اندازه گیری شد (۱۸). گلوتاتیون ردوکتاز به روش Mannervik (۱۹) اندازه گیری شد.

آنالیز بیان ژن¬های اینترلوکین-٤ و -٦

از نمونه‌های خون جمع‌آوری‌شده از موش‌های صحرایی، استخراج mRNA کل با استفاده از کیت (RNeasy® Mini Qiagen، Hilden، Germany) انجام شد و سپس cDNA مطابق دستورالعمل کیت تولید شده توسط شرکت BioNeer (سئول، کره جنوبی) سنتز شد. توالی ژن¬های اینترلوکین-٤ و -٦ و GADPH با استفاده از پایگاه داده های ژنی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) تهیه شد. از ژن GADPH به عنوان ژن خانه دار و کنترل داخلی یا ژن مرجع استفاده شد. پس از تهیه توالی ژن ها، پرایمرهای اختصاصی ژن توسط نرم افزار primer express

طراحی و توسط شرکت BioNeer (سئول، کره جنوبی) سنتز شدند. مشخصات پرایمر سیتوکین ها و ژن مرجع در جدول ۱ توضیح داده شده است. تجزیه و تحلیل تولید و منحنی ذوب با استفاده از یک سیستم Real-Time PCR (Applied Bio systems, Foster City, CA)) انجام شد. شرایط چرخه حرارتی شامل فعال سازی آنزیم در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه، به دنبال آن ۴۰ چرخه واسرشتی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۱۵ ثانیه و در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد برای ۲۰ ثانیه ذوب پرایمری و گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسوس برای ۳۰ ثانیه انجام شد (۲۱، ۲۰). برای نرمال سازی، GADPH به عنوان ژن خانه دار و از بیان ژن هدف در گروه شاهد به عنوان کنترل خارجی استفاده شد. نسبت بیان نسبی ژن های اینترلوکین-۴ و -۶ به عنوان ژن های هدف به ژن GADPH بر اساس روش Livak and Schmittgen (۲۲) نرمال شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای ژن های هدف و خانه دار

Target gene	Primer Sequence (5′ - 3′)	Amplicon size (bp)	Optimal primer concentration (nm)
IL-4	F-CCCACCTTGCTGTCACCCTGTTC R-TTCTCCGTGGTGTTCCTTGTTGC	۹۲	۳۰۰ ۳۰۰
IL-6	F - ACAGCCACTCACCTCTTCAG R - CCATCTTTTTCAGCCATCTTT	۱۶۸	۳۰۰ ۳۰۰
GADPH	F–ATCTCGCTCCTGGAAGATG R-TCGGAGTGAACGGATTCG	۲۲۷	۶۰۰ ۳۰۰

F=Forward, R=Reverse, GADPH=Glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase, IL-6=Interleukin-6, IL-4=Interleukin-4

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC) در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. برای ارزیابی نرمال بودن داده ها قبل از آنالیز واریانس از آزمون Shaapiro-Wilk استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده ازآزمون توکی با سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. تفاوت بین تیمارها با استفاده از کنتراست های متعامد چند جمله ای برای تعیین پاسخ های خطی و درجه دوم مشخص شد (۲۳).

نتایج:

نتایج مربوط به وضعیت آنتی¬اکسیدانی سرم موش های دریافت کننده دوزهای مختلف مکمل روی-متیونین در جدول ۲ گزارش شده است. غلظت روی در سرم به صورت وابسته به دوز با افزایش دوز روی در جیره افزایش یافت (P<0.05). فعالیت سرمی دو آنزیم آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز به صورت وابسته به دوز با افزایش دوز روی-متیونین در جیره کاهش یافت (P<0.01). تفاوت معنی داری بین گروه شاهد وگروه دریافت کننده ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم روی-متیونین از نظر غلظت مالون دی آلدئید مشاهده نشد ولی دو دوز بالاتر سبب کاهش معنی دار غلظت مالون دی الدئید شدند (P<0.05). بیشترین غلظت گلوتاتیون در سرم موش های دریافت کننده ۴۵ میلی گرم بر کیلوگرم و کمترین مقدار در دو گروه شاهد و دریافت کننده ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم مشاهده شد (P<0.001). بیشترین فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز وگلوتاتیون پراکسیداز در گروه دریافت کننده ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم و کمترین فعالیت این آنزیم ها در گروه شاهد مشاهده شد. بیشترین فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در گروه دریافت کننده ۳۰ میلی گرم

بـر کیلوگـرم و کمتریـن فعالیـت ایـن آنزیـم در گـروه دریافـت کننـده ٤٥ میلـی گـرم بـر کیلوگـرم مشـاهده شـد. ظرفیـت آنتـی اکسـیدانی کل در گروه دریافـت کننـده ۳۰ میلـی گـرم بـر کیلوگـرم بیشـترین و در گـروه شـاهد وگـروه دریافـت کننـده ۱۵ میلـی گـرم بـر کیلوگـرم کمتریـن مقـدار بـود.

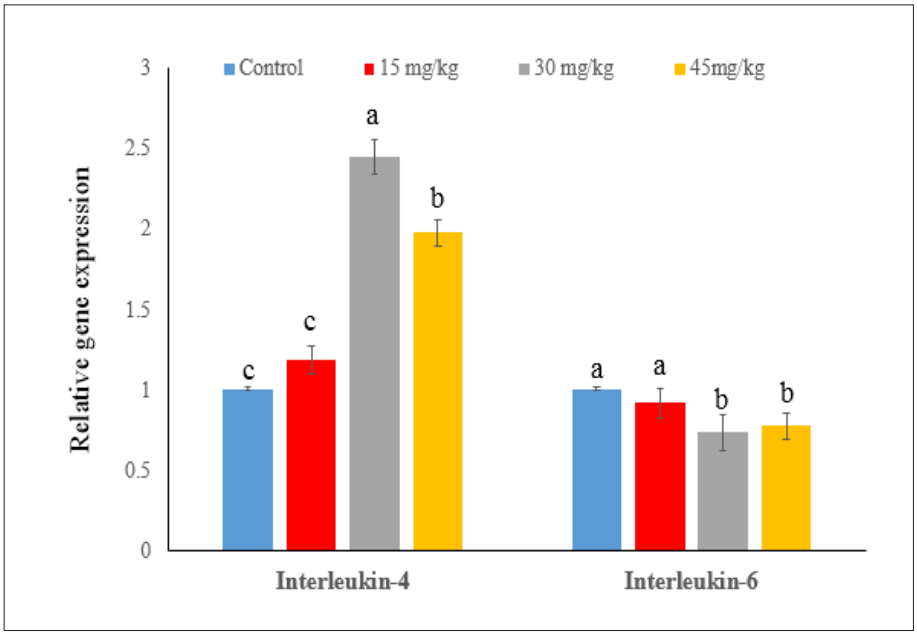
جدول ۲: فعالیت آنزیم‌های کبدی و فراسنجه¬های آنتی‌اکسیدانی موش‌های صحرایی دریافت¬کننده دوزهای مختلف روی از مکمل روی-متیونین

Parameters	Control	Zinc-Methionine (mg zinc/kg dry matter)			SEM	Contrasts	
		15	30	45		L	Q
Zn, µg/dl	124.0^{c}	126.2^{c}	130.4^{b}	137.6^{a}	3.21	*	NS
Alanine aminotransferase (ALT), U/L	56.1^{a}	52.4^{b}	45.2^{d}	48.4^{c}	1.89	**	*
Aspartate aminotransferase (AST), U/L	92.7^{a}	78.6^{b}	55.7^{d}	69.3^{c}	2.41	**	*
Malondialdehyde (MDA), nmol/mL	30.8^{a}	29.4^{a}	19.3^{b}	19.5^{b}	0.71	*	NS
Glutathione nmol/mL	0.08^{c}	0.08^{c}	0.12^{b}	0.14^{a}	0.005	***	***
Glutathione reductase, ng/mL	84.5^{d}	94.2^{c}	107.3^{a}	102.4^{b}	1.80	***	**
Glutathione peroxidase, U/mL	158.1^{d}	176.3^{c}	192.9^{a}	185.7^{b}	3.54	*	**
Superoxide dismutase, U/mL	13.95^{b}	13.06^{b}	15.25^{a}	11.80^{c}	0.12	***	***
Total Antioxidant Capacity, mmol Trolox equivalent/L	1.85^{c}	1.91^{c}	2.45^{a}	2.31^{b}	0.09	*	NS

SEM, standard error of the means; L, linear contrast; Q, quadratic contrast;

Significance: NS, not significant; * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001

در هر ردیف تفاوت میانگین¬های با حروف غیر مشابه معنی¬دار است (P<0.05).



شکل ۱: بیان نسبی ژن های اینترلوکین-٤ و اینترلوکین-٦ موش های صحرایی دریافت کننده دوزهای مختلف روی از مکمل روی-متیونین

در شـــکل ۱ بیان نسبی ژن های اینترلوکین ٤ و اینترلوکین-٦ نشان داده شـــده است. در کل بیان نســـبی ژن اینترلوکین-٤ افزایشی و بیان نســـبی ژن اینترلوکین-٦ کاهشـــی بود (P<0.05). بیشترین بیان ژن اینترلوکیـــن-٤ به گروه دریافت کننـــده ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم و کمترین مقدار به گروه شـــاهد وگـــروه دریافت کننده ۱۵ میلـــی گرم بر کیلوگـــرم تعلق داشـــت. در گـــروه دریافت کننـــده ٤۵ میلی گرم بـــر کیلوگرم بیـــان ژن اینترلوکین-٤ کمتر از گـــروه دریافت کننـــده ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم بود. بیشـــترین (P<0.05) بیان نســـبی ژن اینترلوکین-٦ به گروه شـــاهد و گروه دریافـــت کننده ۱۵ میلی گـــرم بر کیلوگرم وکمتریـــن (P<0.05) مقـــدار به دوگـــروه دریافـــت کننـــده ۳۰ و ٤۵ میلـــی گرم بر کیلوگرم روی-متیونین تعلق داشـــت.

بحث:

در بدن انســـان و حیوانات ۵۱ آنزیم شناســـایی شـــده است که بـــرای انجام فعالیت و عملکرد طبیعی نیاز بـــه عنصر روی دارند. عنصر روی یک مـــاده معدنی کم نیاز ولـــی ضروری برای بدن و دومیـــن عنصر کمیاب بدن بعـــد از آهن اســـت. از آنجا که بدن نمی توانـــد مقادیر زیـــادی از این عنصر را ذخیـــره کند، مصرف روزانـــه آن در جیره غذایی ضروری اســـت و لازم اســـت به طور روزانه در جیره غذایی انســـان و حیوانات اســـتفاده گردد (۷-۵). در شرایـــط تنـــش گرمایی نیاز بـــه این عنصر افزایـــش می یابد، زیـــرا فعالیـــت آنزیم های آنتی اکســـیدانی بدن کـــه حاوی این عنصر اســـت، برای مقابله با عوامل اکســـیدکننده و مخرب باید افزایش یابـــد (۲٤). تامین این عنصر از منابـــع گیاهی و معدنی با مشـــکلاتی رو به رو اســـت، بنابراین تامین این عنصر از طریق شـــکل های آلـــی آن باید مـــورد توجه قـــرار گیرد. هـــدف این آزمایش مطالعه وضعیت سرمی غلظـــت روی و آنزیم های آنتی اکســـیدانی و بیـــان ژن های مرتبط با التهـــاب در بدن در شرایط در تنش گرمایی بـــود. همان طور که در جدول ۲ مشـــاهده می شـــود، با افزایش دوز روی-متیونین در جیـــره غلظت سرمی روی افزایش خطی داشـــت. این افزایش خطـــی در غلظت سرمی روی بـــا افزایش دوز روی در جیره در شرایط تنش گرمایی ایجاد شـــده اســـت. نخســـتین بار Wilkins و همکاران (۲۵) نشان دادند که غلظت پلاســـمایی روی شـــاخصی از وضعیت مصرف روی است. در توافق بـــا یافته مطالعه حـــاضر، Moazenzadeh و همکاران (۲٦) بـــا افزایـــش دوز روی در جیره ماهـــی افزایش در غلظت سرمی روی مشـــاهده شد.

مالـــون دی آلدئیـــد به عنوان محصـــول نهایی پراکسیداســـیون لیپیدی تشـــکیل می شـــود و بنابرایـــن، میزان پراکسیداســـیون لیپیـــدی توســـط رادیکال هـــای آزاد را مـــی توان بـــا توجه به ســـطوح مالون دی آلدئیـــد تعیین کرد (۱۷). کاهـــش مالون دی آلدئیـــد یا افزایش ظرفیت آنتی اکســـیدانی کل شـــاخص کاهش اســـترس اکســـیداتیو یا افزایش دفاع آنتی اکســـیدانی است. در مطالعه حاضر، ســـطح مالـــون دی آلدئید به صـــورت خطی با مصرف مکمل روی-متیونیـــن و افزایش غلظت روی در سرم خون موش هـــا کاهش یافـــت. در توافق بـــا یافتـــه مطالعه حاضر، Anderson و همـــکاران (۲۷) گـــزارش کردنـــد کـــه موش‌های دریافـــت کننده مکمـــل روی، کاهش قابل توجهی در ســـطوح مالون دی‌آلدئید در سرم و بافت‌ها داشـــتند. عنصر روی بخشـــی از سیســـتم آنتی اکسیدانی بدن اســـت و کمبود آن سبب اختلال در سیســـتم دفاعی آنتی اکســـیدانی بـــدن و افزایش اســـترس اکســـیداتیو می گردد (٤). تنش اکســـیداتیو در نتیجه عدم تعادل بین تولید رادیکال های آزاد و گونه های فعال اکســـیژن (شـــامل آنیون سوپراکســـید، رادیکال آزاد هیدروکسیل، هیدروژن پراکسید و ...) از یـــک طرف و سیســـتم دفاع آنتی اکســـیدانی از طرفی دیگـــر ایجاد می گـــردد. در سیســـتم های بیولوژیکـــی هوازی، بـــرای مقابله با رادیکال هـــای آزاد و گونه های فعال اکســـیژن، مکانیســـم های دفاعی طراحی شـــده اســـت تا اثرات زیان بار این عوامـــل مهاجم را خنثی نمـــوه یا به حداقل برســـانند. روي براي حفظ ســـاختار و فعالیت آنزیم‌هاي سوپراکســـید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکســـیداز عنصر لازم و ضروری اســـت (٤).

ظرفیت آنتی اکســـیدانی کل بـــا افزایـــش دوز روی-متیونین و افزایـــش غلظـــت روی در سرم خون موش ها افزایش و ســـپس در دوز ٤۵ میلـــی گرم بر کیلوگرم کاهـــش یافت. افزایش ظرفیت آنتی اکســـیدانی تـــا دوز ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم نشـــان دهنده این اســـت که روی-متیونین تـــا این دوز ســـبب بهبود فعالیت آنزیم های آنتی اکســـیدانی شـــده اســـت و در دوز بالاتر سبب بهبود شرایط آنتی اکســـیدانی نشـــده اســـت. هنـــوز به خوبی مکانیســـمی کـــه روی با آن اثر آنتی اکســـیدانی خـــود را اعمال

می کند به خوبی شناخته نشده است و مطالعات نشان داده است روی در ساختن متالوتیونین نقش دارد (۲۸). متالوتیونین یک پروتئین غنی از سیستئین است که به عنوان جمع کننده رادیکال های آزاد عمل می کند (۲۹). مکانیسم عمل دیگری که برای روی به عنوان یک آنتی اکسیدان پیشنهاد شده است، تعامل آن با ویتامین E است، زیرا وضعیت وکارکرد ویتامین E در حیوانات دارای کمبود روی مختل می شود. روی می تواند با آهن و مس رقابت کند تا به غشای سلولی متصل شود و تولید رادیکال های آزاد را کاهش دهد، بنابراین یک اثر آنتی اکسیدانی مستقیم اعمال می کند (۲۸).

هر چند گزارش شده است عنصر روی در دوز کم هم می تواند سبب تولید عوامل اکسیدکننده و رادیکال های آزاد شود ولیکن اثری که بر تولید مواد آنتی اکسیدانی و همچنین بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی دارد خیلی بیشتر از اثرات منفی آن است. در دوز زیادتر اثرات منفی عنصر روی از اثرات مثبت آن پیشی می گیرد و سبب افزایش سطح رادیکال های آزاد در بدن و کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی و افزایش مالون دی آلدئید می شود (۳۰،٤). همچنین در مطالعه حاضر سطح فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز در گروه شاهد زیاد بود و با مصرف مکمل روی-متیونین به صورت خطی کاهش یافته است که نشان می دهد کبد حیوانات در اثر تنش گرمایی آسیب دیده و مکمل روی به عنوان یک عامل آنتی اکسیدانی عمل می کند. مطابق با یافته های ما، Mohammad و همکاران (۳۱) گزارش کردند که در بیمارانی که غلظت روی کمتری در سرم داشتند، با مصرف مکمل روی فعالیت آنزیم های کبدی کمتری در سرم نشان دادند. در توافق با یافته ما، Nagalakshmi و همکاران (۳۲) گزارش کردند که فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در بره‌هایی که مکمل‌های روی آلی دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه کنترل بیشتر بود. بر خلاف نتیجه ما، یافته های Hu و همکاران. (۳۳) نشان داد که روی باعث افزایش فعالیت آلانین آمینوترانسفراز می شود. اختلاف بین مطالعات ممکن است مربوط به تفاوت در مدت زمان مصرف مکمل روی آلی، دوز مورد استفاده، شرایط محیطی، نوع و سن حیوان مورد استفاده باشد.

فعالیت بیشتر سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در سرم میش های دریافت کننده مکمل روی-متیونین در مقایسه با گروه شاهد نشان داد که این مکمل سبب بهبود فعالیت آنتی اکسیدانی سرم می شود. فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان با مکمل روی-متیونین افزایش یافته و به معنای بهبود ظرفیت بدن موش برای مهار آسیب رادیکال های آزاد است. روی یک کوفاکتور CuZn- سوپراکسید دیسموتاز است که آنزیم اصلی آنتی اکسیدانی است و نقش کلیدی در سرکوب رادیکال های آزاد دارد. همچنین، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز می تواند پراکسیداسیون لیپیدی را از طریق افزایش سطح گلوتاتیون مهار کند (۲۸). مطابق با این یافته، مطالعه ای (۳٤) نشان داد که با تغذیه مکمل روی-متیونین فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز افزایش و غلظت مالون دی آلدئید کاهش یافته است. دوز-پاسخ روی-متیونین برای سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز درجه دوم بود و بین دوزهای ۳۰ و ٤۵ میلی گرم بر کیلوگرم تفاوت معنی دار وجود داشت. با افزایش دوز روی به ٤۵ میلی گرم بر کیلوگرم فعالیت آنزیم های مذکور کاهش یافت. به نظر می رسد دوز زیاد روی با افزایش ایجاد رادیکال آزاد و تشدید تنش اکسیداتیو اثر منفی بر فعالیت این آنزیم ها داشته است.

در مطالعه حاضر، روی-متیونین تا دوز ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم بیان ژن اینترلوکین-٤ افزایش و در دوز ٤۵ میلی گرم بر کیلوگرم بیان ژن اینترلوکین-٤ کاهش یافت. برخلاف یافته مطالعه حاضر، Wong و همکاران (۱۳) تفاوت معنی‌داری بین بیان ژن اینترلوکین-٤ در موش‌های دریافت کننده دوزهای مختلف روی نیافتند. مطالعه ای نشان داد که کمبود روی بیان ژن اینترلوکین-٤ را کاهش می دهد و تغذیه جیره حاوی روی سبب افزایش بین ژن اینترلوکین-٤ می شود (۳۵). اینترلوکین-٤ یک سایتوکین است که سبب تمایز سلول های T کمک کننده ساده (سلول های Th۰) به سلول های Th۲ می شود. سلول های Th۲ پس از فعال شدن توسط اینترلوکین-٤، خودشان در یک حلقه بازخورد مثبت اینترلوکین-٤ تولید می کنند. اینترلوکین-٤ عمدتاً توسط ماست سل ها، سلول های Th۲، ائوزینوفیل ها و بازوفیل ها تولید می شود (۳٦) و به عنوان سایتوکین ضد التهابی شناخته می شود. تحقیقی (۲۸) نشان داد که کمبود روی منجر به کاهش متیلاسیون DNA در ژن اینترلوکین ها و افزایش بیان آن ها می شود. بنابراین،

هنگامی که روی کافی تامین شـــود، ممکن اســـت بر متیلاسیون DNA تأثیـــر بگذارد و بیـــان ژن اینترلوکیـــن-٤ را همان طور که در مطالعه حاضر مشـــاهده می‌شـــود، کاهش دهد. مطالعات نشـــان داده اســـت که کمبود روی بیان ژن اینترلوکیـــن-٦ را در مقایســـه با رژیم غذایی اســـتاندارد افزایش می دهـــد (۳۷). در توافق با یافته تحقیـــق حاضر، مطالعه دیگری (۱۲) نشـــان داد که مکمل روی می تواند ســـطح بیـــان ژن اینترلوکین-٦ را کاهش دهد. پاســـخ ســـیتوکین های پیش التهابی و ضـــد التهابی با در دســـترس بودن یون روی کنترل می شـــود و انتقال درون سلولی روی توســـط متالوتیونین ها تنظیم می شـــود.

نتیجه گیری:

نتایـج ایـن مطالعـه نشـان داد، روی-متیونیـن تـا دوز ۳۰ میلـی گـرم بـر کیلوگـرم سـبب افزایـش فعالیـت آنزیـم سوپراکسـید دیسـموتاز و فعالیـت آنزیـم گلوتاتیـون پراکسـیداز، کاهـش فعالیـت آنزیـم هـای کبـدی در سرم و افزایـش بیـان ژن ضدالتهابـی (اینترلوکیـن-٤) وکاهـش بیـان ژن پیـش التهابـی (اینترلوکیـن-٦) را سـبب مـی شـود کـه نشـاندهنده کاهـش تنـش اکسـیداتیو و کاهـش اثـرات تنـش گرمایـی در بـدن مـوش هـای صحرایـی مـی باشـد.

تقدیر و تشکر:

از معاونـت محـترم پژوهـش و فنـاوری واحـد علـوم و تحقیقـات بـه جهـت تصویـب و در اختیـار قـراردادن امکانـات آزمایشـگاه رازی بـرای انجـام ایـن تحقیـق تشـکر مـی شـود. از خانـم دکـتر پرویـن شـورنگ بـه جهـت راهنمایـی هـای ارزنـده و کمـک در آنالیـز بیـان ژن تشـکر مـی شـود.

مصوبات و کمیته پژوهشی

ایـن مقالـه مسـتخرج از رسـاله دانشـجوی دوره دکـتری تخصصـی واحـد علـوم و تحقیقـات (خانـم متیـن جامعـی) مـی باشـد. در کمیتـه پژوهشـی مربـوط بـه بررسـی پروپـوزال دانشـجویان دکـتری واحـد علـوم و تحقیقـات بـه تصویـب رسـیده اسـت و کلیـه مقـررات مربـوط بـه رفتـار و کار بـا بـا حیوانـات آزمایشـگاهی بنابـر دسـتورالعمل آزمایشـگاه رازی واحـد علـوم و تحقیقـات رعایـت شـده اسـت.

تعارض منافع:

نویسندگان این مقاله عنوان می کنند که هیچ تعارضی وجود ندارد.

References

1. Livingstone C. Zinc: physiology, deficiency, and parenteral nutrition. Nutrition in Clinical Practice. 2015; 30(3):371-82. **DOI: 10.1177/0884533615570376.**

2. Hou R, He Y, Yan G, Hou S, Xie Z, Liao C. Zinc enzymes in medicinal chemistry. European Journal of Medicinal Chemistry. 2021; 226:113877. **DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113877.**

3. Haase H, Rink L. Zinc signals and immune function. Biofactors. 2014 Jan;40(1):27-40. **DOI: 10.1002/biof.1114.**

4. Marreiro DD, Cruz KJ, Morais JB, Beserra JB, Severo JS, De Oliveira AR. Zinc and oxidative stress: current mechanisms. Antioxidants. 2017; 6(2): 24-8. **DOI: 10.3390/antiox6020024.**

5. Della Lucia CM, Santos LL, Rodrigues KC, Rodrigues VC, Martino HS, Pinheiro Sant'Ana HM. Bioavailability of zinc in Wistar rats fed with rice fortified with zinc oxide. Nutrients. 2014; 6(6):2279-89. **DOI: 10.3390/nu6062279.**

6. Wang X, Zhou B. Dietary zinc absorption: A play of Zips and ZnTs in the gut. IUBMB life. 2010; 62(3):176-82. **DOI: 10.1002/iub.291.**

7. Ishihara K, Yamanami K, Takano M, Suzumura A, Mita Y, Oka T, Juneja LR, Yasumoto K. Zinc bioavailability is improved by the micronised dispersion of zinc oxide with the addition of L-histidine in zinc-deficient rats. Journal of nutritional science and vitaminology. 2008; 54(1): 54-60. **DOI: 10.3177/jnsv.54.54.**

8. Lazarte CE, Vargas M, Granfeldt Y. Zinc bioavailability in rats fed a plant-based diet: a study of fermentation and zinc supplementation. Food & Nutrition Research. 2015; 59(1): 27796. **DOI: 10.3402/fnr.v59.27796.**

9. Sheikh AA, Aggarwal A, Indu B, Aarif O. Inorganic zinc supplementation modulates heat shock and immune response in heat stressed peripheral blood mononuclear cells of periparturient dairy cows. Theriogenology. 2017; 95:75-82. **DOI: 10.1016/j.theriogenology.2017.02.024.**

10. Souza AR, Martins LP, Faria LC, Martins ME, Ferreira RN, Silva AM, Gil ED, Conceição EC. Studies on the bioavailability of zinc in rats supplementated with two different zinc-methionine compounds. Latin American Journal of Pharmacy. 2007; 26 (6): 825-830

11. Shankar AH, Prasad AS. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. The American journal of clinical nutrition. 1998; 68(2): 447S-63S. **DOI: 10.1093/ajcn/68.2.447S.**

12. Faghfouri AH, Baradaran B, Khabbazi A, Bishak YK, Zarezadeh M, Tavakoli-Rouzbehani OM, Faghfuri E, Payahoo L, Alipour M, Alipour B. Profiling inflammatory cytokines following zinc supplementation: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. British Journal of Nutrition. 2021; 28:1-0. **DOI: 10.1017/S0007114521000192.**

13. Wong CP, Rinaldi NA, Ho E. Zinc deficiency enhanced inflammatory response by increasing immune cell activation and inducing IL6 promoter demethylation. Molecular nutrition & food research. 2015; 59(5): 991-9. **DOI: 10.1002/mnfr.201400761.**

14. Belhadj Slimen I, Najar T, Ghram A, Abdrrabba M. Heat stress effects on livestock: molecular, cellular and metabolic aspects, a review. Journal of animal physiology and animal nutrition. 2016; 100(3):401-12. **DOI: 10.1111/jpn.12379.**

15. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. The Journal of laboratory and clinical medicine. 1967; 70(1):158-69.

16. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. European journal of biochemistry. 1974; 47(3):469-74. **DOI: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x.**

17. Draper HH, Hadley M. [43] Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. InMethods in enzymology 1990 Jan 1 (Vol. 186, pp. 421-431). Academic press. **DOI: 10.1016/0076-6879(90)86135-i.**

18. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical biochemistry. 1996; 239(1):70-6. **DOI: 10.1006/abio.1996.0292.**

19. Mannervik B. Measurement of glutathione reductase activity. Current protocols in toxicology. 1999; 12(1):7-12. **DOI: 10.1002/0471140856.tx0702s00.**

20. Gillespie KM, Qasim FJ, Tibbatts LM, Thiru S, Oliveira DB, Mathieson PW. Interleukin-4 gene expression in mercury-nduced autoimmunity. Scandinavian journal of immunology. 1995; 41(3):268-72. **DOI: 10.1111/j.1365-3083.1995.tb03563.x.**

21. Schöbitz B, Van Den Dobbelsteen M, Holsboer F, Sutanto W, De Kloet ER. Regulation of interleukin 6 gene expression in rat. Endocrinology. 1993; 132(4):1569-76. **DOI: 10.1210/endo.132.4.8462455.**

22. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene

expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. methods. 2001; 25(4):402-8. **DOI: 10.1006/meth.2001.1262.**

23. Steel RG, Torrie JH. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. New York, NY, USA: McGraw-Hill; 1986.

24. Malyar RM, Tanha J, Ziauddin Z, Ismail KS, Ibrahimi M, Khalid AU, Hanifullah B, Banuree SA, Vistro WA. 54. Amelioration of heat stress-induced hepatic injury in wistar rats by zinc-enriched probiotics: Role of hepatic antioxidant status and serum enzymes activity. Pure and Applied Biology (PAB). 2021; 10(4):1494-503.

25. Wilkins PJ, Grey PC, Dreosti IE. Plasma zinc as an indicator of zinc status in rats. British Journal of Nutrition. 1972; 27(1):113-20. **DOI: 10.1079/bjn19720075.**

26. Moazenzadeh K, Rajabi Islami H, Zamini A, Soltani M. Effects of dietary zinc level on performance, zinc status, tissue composition and enzyme activities of juvenile Siberian sturgeon, Acipenser baerii (Brandt 1869). Aquaculture Nutrition. 2018; 24(4):1330-9.

27. Anderson RA, Roussel AM, Zouari N, Mahjoub S, Matheau JM, Kerkeni A. Potential antioxidant effects of zinc and chromium supplementation in people with type 2 diabetes mellitus. Journal of the American College of Nutrition. 2001; 20(3): 212-218.

28. Salgueiro MJ, Zubillaga M, Lysionek A, Sarabia MI, Caro R, De Paoli T, Hager A, Weill R, Boccio J. Zinc as an essential micronutrient: a review. Nutrition Research. 2000; 20(5):737-55.

29. Powell SR. The antioxidant properties of zinc. The Journal of nutrition. 2000; 130(5):1447S-54S. **DOI: 10.1093/jn/130.5.1447S.**

30. Bishop GM, Dringen R, Robinson SR. Zinc stimulates the production of toxic reactive oxygen species (ROS) and inhibits glutathione reductase in astrocytes. Free Radical Biology and Medicine. 2007; 42(8):1222-30. **DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.022.**

31. Mohammad MK, Zhou Z, Cave M, Barve A, McClain CJ. Zinc and liver disease. Nutrition in Clinical Practice. 2012; 27(1):8-20. **DOI: 10.1177/0884533611433534.**

32. Nagalakshmi D, Dhanalakshmi K, Himabindu D. Effect of dose and source of supplemental zinc on immune response and oxidative enzymes in lambs. Veterinary research communications. 2009; 33(7):631-44. **DOI: 10.1007/s11259-009-9212-9.**

33. Hu J, Cai X, Li J, Zheng N, Zhang J. Associations between serum zinc levels and alanine aminotransferase elevation in adults. Biological Trace Element Research. 2021; 199(6):2077-84. **DOI: 10.1007/s12011-020-02318-1.**

34. Nagalakshmi D, Dhanalakshmi K, Himabindu D. Effect of dose and source of supplemental zinc on immune response and oxidative enzymes in lambs. Veterinary research communications. 2009; 33(7):631-44. **DOI: 10.1007/s11259-009-9212-9.**

35. Gruber K, Maywald M, Rosenkranz E, Haase H, Plumakers B, Rink L. Zinc deficiency adversely influences interleukin-4 and interleukin-6 signaling. Journal of biological regulators and homeostatic agents. 2013; 27(3):661-71.

36. Sachin P, Gadani S, Cronk J, Norris G, Kipnis J. Interleukin-4: a cytokine to remember. J Immunol. 2012; 189:4213-421. DOI: 10.4049/jimmunol.1202246.

37. Kido T, Ishiwata K, Suka M, Yanagisawa H. Inflammatory response under zinc deficiency is exacerbated by dysfunction of the T helper type 2 lymphocyte–M2 macrophage pathway. Immunology. 2019; 156(4):356-72. **DOI: 10.1111/imm.13033.**