



The effects of zinc-methionine supplementation on antioxidant indices and liver enzymes in plasma of Friesian horses under heat stress

Ahmad Miri¹, Ali Asghar Sadeghi^{2*}, Mohammad Chamani³ Asa Ebrahimi⁴

¹PhD student, Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Associate professor, Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

³Full professor, Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

⁴Associate professor, Department of Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Place of Research: Science and Research Branch, Islamic Azad University

Article Info

Abstract

Article History:

Received 2024.6.26

Revised 2024. 8. 17

Accepted 2024.9.18

KeyWords:

antioxidant enzymes
heat stress
horse
liver enzymes
zinc-methionine

*Corresponding author:

E-mail address:

aasdgghi@gmail.com

Introduction: In the hot seasons and in tropical regions, supplements that increase horses' tolerance to heat stress are necessary. Due to its active role in the structure and activity of enzymes, zinc has positive effects on heat tolerance. There are different types of zinc supplements; the bioavailability of the organic form is higher than that of other forms.

This study aimed to evaluate the effects of dietary zinc-methionine supplementation in horses exposed to heat stress on blood antioxidant indices, antioxidant enzyme activity, and liver enzyme activity.

Materials and Methods: In a factorial trial based on a completely randomized design, 30 Friesian horses were applied to two levels of heat stress and three levels of zinc-methionine supplementation. Stress levels included; 1) no stress; 2) exposed to heat stress. Three levels of zinc-methionine supplementation were used, including; 1) no supplementation, 2) 67 mg of zinc-methionine per kg of diet, and 3) 120 mg of zinc-methionine per kg of diet. Blood samples were taken from horses and antioxidant indices and liver enzyme activity were measured.

Results: Heat stress increased and zinc-methionine supplementation decreased significantly the concentration of malondialdehyde. An increase in the dose of zinc-methionine had no significant effect on the concentration of malondialdehyde. The interaction effect of stress and supplementation on the activity of superoxide dismutase enzyme tended to be significant and also on the activity of glutathione peroxidase enzyme. The activity of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and alkaline phosphatase enzymes increased in horses exposed to heat stress and showed a significant decrease with zinc-methionine supplementation.

Conclusion: The zinc-methionine supplementation at a dose of 67 mg/kg can eliminate the negative effects of heat stress on antioxidant indices and liver enzymes in Friesian horses.

Cite this article: Miri A, Sadeghi AA, Chamani M, Ebrahimi A. The effects of zinc-methionine supplementation on antioxidant indices and liver enzymes in plasma of Friesian horses under heat stress. Iranian Journal of Biological Sciences. 2024; 19 (1): 43-54

doi 10.71631/zisti.2024.1123760

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/licenses/by-nc/4.0/>



اثرات مکمل روی-متیونین بر شاخص های آنتی اکسیدانی و فعالیت آنزیم های کبدی در پلاسمای خون اسب فریزین در شرایط تنش گرمایی

احمد میری^۱، علی اصغر صادقی^{۲*}، محمد چمنی^۳، آسا ابراهیمی^۴

^۱ دانشجوی دوره دکتری، گروه علوم دامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ دانشیار، گروه علوم دامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۳ استاد، گروه علوم دامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۴ دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و به نژادی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

محل انجام تحقیق: پژوهشکده تحقیقات کشاورزی هسته ای کرج و آزمایشگاه رازی واحد علوم و تحقیقات تهران

چکیده

اطلاعات مقاله

مقدمه: در فصول گرم سال و در مناطق گرمسیری لازم است به اسب مکمل هایی داده شود که مقاومت بدن آنها را به تنش گرمایی افزایش دهد. روی به دلیل داشتن نقش فعال در ساختمان و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی می تواند در این زمینه موثر عمل کند. انواع مکمل روی وجود دارد که فرم آلی آن زیست فراهمی بهتری دارد

مواد و روش ها: هدف از انجام پژوهش حاضر مطالعه اثرات افزودن مکمل روی-متیونین به جیره اسب در معرض تنش گرمایی بر شاخص های آنتی اکسیدانی خون، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و فعالیت آنزیم های کبدی بود

نتایج: در قالب آزمون فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی، ۳۰ راس اسب فریزین در دو سطح تنش گرمایی و سه سطح مکمل روی-متیونین اعمال شد. سطوح تنش شامل (۱) بدون تنش و (۲) با تنش گرمایی بود. سه سطح مکمل روی-متیونین شامل (۱) بدون مکمل، (۲) مقدار ۶۷ میلی گرم روی-متیونین در کیلوگرم جیره و (۳) مقدار ۱۲۰ میلی گرم روی-متیونین در کیلوگرم جیره استفاده شد. از اسب ها نمونه های خون اخذ شد و شاخص های آنتی اکسیدانی و فعالیت آنزیم های کبدی اندازه گیری شد نتایج: تنش گرمایی سبب افزایش معنی دار ($P < 0.001$) غلظت مالون دی آلدئید و افزودن مکمل روی-متیونین سبب کاهش معنی دار ($P < 0.001$) غلظت این ماده در خون شد. افزایش دوز روی-متیونین تغییر معنی داری بر غلظت مالون دی آلدئید نداشت. اثر متقابل تنش و مکمل بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تمایل به معنی داری و بر فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز معنی دار ($P < 0.015$) بود. فعالیت آنزیم های آلانین آمینوترانسفراز، آسپارات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز تحت تاثیر تنش گرمایی افزایش ($P < 0.001$) و با افزودن مکمل روی-متیونین کاهش معنی داری ($P < 0.001$) نشان داد

نتیجه گیری: افزودن مکمل روی-متیونین بر غلظت آنزیم های کبدی در پلازما موثر بود و در دوز ۶۷ میلی گرم در کیلوگرم سبب کاهش غلظت آنزیم های کبدی در پلاسمای خون اسب های فریزین در شرایط تنش گرمایی شد

تاریخچه مقاله

ارسال ۱۴۰۳/۰۴/۰۶

بازنگری ۱۴۰۳/۰۵/۲۷

پذیرش ۱۴۰۳/۰۶/۲۸

کلمات کلیدی

اسب

مکمل روی-متیونین

آنزیم های آنتی اکسیدانی

آنزیم های کبدی

تنش گرمایی

* مسئول مکاتبات:

علی اصغر صادقی

aasdghi@gmail.com

شیوه آدرس دهی این مقاله: میری، ا، صادقی، ع، ا، چمنی، م، ابراهیمی، آ. اثرات مکمل روی-متیونین بر شاخص های آنتی اکسیدانی و فعالیت آنزیم های کبدی در پلاسمای خون اسب فریزین در شرایط تنش گرمایی. مجله دانش زیستی ایران. ۱۹:۱۴۰۳ (۱): ۴۳-۵۴

doi 10.71631/zisti.2024.1123760

نویسندگان: حق مؤلف ©

شاپا الکترونیکی: X ۴۵۹ - ۲۷۱۷

شاپا چاپی: ۱۷۳۵-۴۲۲۶

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا

مقدمه

در فصول گرم سال و در مناطق گرمسیری، اسب با تنش گرمایی مواجه می شود و طی تنش به دلیل افزایش سرعت متابولیسم، غلظت رادیکال-های آزاد در سلول ها و بافت های بدن افزایش می یابد (۱). غلظت زیاد این مواد مضر است و سبب آسیب به بافت ها بویژه بافت عضلانی بدن اسب می شود و عملکرد اسب را در مسابقات کاهش می دهد (۲). تنش مسابقه یا فعالیت شدید بویژه در شرایطی که دمای هوا زیاد است اثر منفی مضاعفی بر سلامتی و عملکرد اسب دارد و ممکن است به بافت-های بدن بویژه کبد آسیب برساند (۳). محققان به این نتیجه رسیده اند که رقابت در مسابقات و تنش گرمایی دارای اثرات نامطلوب فیزیولوژیکی است و سبب افزایش غلظت کورتیزول خون می شود که می تواند اسب را مستعد بیماری های عفونی کند (۴). در شرایط تنش گرمایی غلظت آنزیم های آمینوترانسفراز کبدی در خون حیوانات افزایش می یابد که بیانگر آسیب های کبدی است. همچنین غلظت کراتینین خون در شرایط تنش گرمایی افزایش می یابد که شاخص آسیب به بافت های ماهیچه ای است (۵). بنابراین شناخت اثرات تنش گرمایی و یافتن راهکاری برای کاهش اثرات مضر این تنش ها می تواند به پرورش دهندگان اسب کمک زیادی کند

یکی از راهکارهای کاهش اثرات نامطلوب فعالیت-های عضلانی بویژه در شرایط دمایی نامناسب، استفاده از مواد آنتی اکسیدان در جیره حیوانات است (۶). عنصر روی به دلیل نقشی که در ساختار و فعالیت آنزیم-های آنتی اکسیدانی ایفا می کند و اثراتی که در بیان ژن های آنزیم های مذکور دارد مورد توجه محققان تغذیه دام قرار گرفته است (۷). روی همچنین در پیشگیری از تشکیل رادیکال های آزاد و حفاظت ساختارهای بیولوژیک و همچنین در بهبود عملکرد سیستم ایمنی موثر است (۸). انجمن تحقیقات ملی امریکا حداقل نیاز اسب ها را به روی ۴ میلی گرم در کیلوگرم وزن بدن متابولیکی در روز پیشنهاد کرده است (۹). عامل مهم تعیین کننده مقدار نیاز به افزودن مکمل روی، وضعیت خاک و غلظت روی در گیاهان منطقه است (۱۰). کشور ما در منطقه ای از

زمین قرار گرفته است که بیشتر خاک های آن از لحاظ روی کمبود شدید دارند (۱۱) و گیاهانی که در این خاک ها رشد کرده و به عنوان خوراک دام مصرف می-شوند، با کمبود این عنصر مواجه می باشند. در همین راستا ملکوتی (۲۰۰۷) گزارش کرد که مقدار روی در خاک-های ایران به طور معمول کمتر از ۰/۸ میلی گرم در کیلوگرم خاک می باشد درحالی که در شرایط مطلوب، مقدار آن باید بیش از یک میلی گرم در کیلوگرم خاک باشد (۱۲). به همین دلیل افزودن مکمل های روی به جیره حیوانات ضروری است و با افزودن این مکمل ها به جیره حیوانات مختلف اثرات مطلوبی بر تولید و تولید مثل گزارش شده است (۱۳، ۱۴)

یکی از مکمل های روی مورد استفاده، فرم معدنی روی، مانند سولفات روی است. ولیکن دسترسی حیاتی و جذب روی آن کم می-باشد (۱۵). امروزه گرایش به استفاده از فرم آلی روی مانند مکمل روی-متیونین افزایش یافته است (۱۶). در سایر حیوانات مطالعات زیادی درباره اثرات افزودن روی آلی در شرایط با و بدون تنش بر شاخص های آنتی اکسیدانی، فراسنجه های تولید مثل و فعالیت سیستم ایمنی انجام شده است (۷، ۹). در تحقیقات گذشته از مکمل روی-متیونین برای بهبود وضعیت سم و بهبود ضایعات سمی اسب استفاده شده است (۱۷). تاکنون در زمینه اثرات افزودن مکمل روی آلی به جیره بر شاخص های آنتی اکسیدانی و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در اسب ها بویژه در شرایط تنش گرمایی گزارشی منتشر نشده است. با توجه به اثرات منفی تنش گرمایی بر سلامتی و فعالیت های بدنی اسب (۵، ۲) و اثراتی که روی بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی دارد (۷)، لازم است پژوهش هایی در این زمینه برای روشن شدن اثرات این عنصر به فرم آلی (مکمل روی-متیونین) بر شاخص های آنتی-اکسیدانی انجام شود. بنابراین هدف از انجام پژوهش حاضر مطالعه اثرات افزودن مکمل روی-متیونین به جیره اسب در معرض تنش گرمایی بر شاخص های آنتی اکسیدانی خون، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و فعالیت آنزیم های کبدی بود

مواد و روش ها

این تحقیق در تابستان ۱۴۰۲ در دو بخش مزرعه-ای (مجموعه پرورش اسب فریزین در محمد شهر کرج) و آزمایشگاهی (آزمایشگاه رازی و آزمایشگاه دامپزشکی دامگستر شهریار) انجام شد. مجموعه اسب فریزین دارای ۸۷ راس اسب فریزین بود که از بین آنها تعداد ۳۰ راس اسب با سن (۵±۱/۳ سال) و وزن 600 ± 40 کیلوگرم) انتخاب شدند. محل نگهداری اسب ها آفتابگیر و دارای فضای کافی برای گردش و استراحت بود. جایگاه دارای آخور و کف قابل شستشو بود. در طی تابستان حداقل به مدت ۴ ساعت دمای هوا از ساعت ۱۱ تا ۳ بعد از ظهر بالای ۳۸ درجه سلسیوس و به دلیل وجود کشتزار زیاد در اطراف، رطوبت جایگاه به بالای ۵۵ درصد می رسید و اسب هایی که در محوطه باز یا بهار بند نگهداری می شدند در معرض شاخص دما-رطوبت ۵۲ درجه قرار داشتند که تنش گرمایی رخ داده است (۲). باشگاه دارای جایگاه های بسته با هواکش های قوی و مه پاش بود و امکان تامین دمای ۲۸ درجه سلسیوس طی اوج گرما مهیا بود که گروه کنترل منفی در این شرایط نگهداری شدند. در طی آزمایش شاخصه های ایجاد تنش گرمایی شامل رکورد های دمای مقعد، تعداد ضربان قلب و تعداد تنفس در دقیقه ثبت شدند. مکمل روی-متیونین (Zinpro, Edina, MN, USA) مورد استفاده در این پژوهش از شرکت سنلدام پارس تهیه شد. این مکمل حاوی ۱۰ درصد روی و ۲۰ درصد متیونین بود و مقدار مورد نیاز برای هر گروه با محاسبه تعیین شد. برای کاهش خطای احتمالی به گروه شاهد و گروهی که مکمل روی-متیونین کمتری دریافت کردند به جیره مکمل متیونین اضافه شد و همه گروه ها مقدار متیونین یکسانی دریافت کردند در قالب آزمون فاکتوریل 2×3 و بر پایه طرح کاملاً تصادفی، از ۳۰ راس اسب فریزین استفاده شد. دو سطح تنش اعمال شد، ۱) بدون تنش گرمایی: تعداد ۱۵ اسب در سالن بسته با دمای ۲۸ درجه سلسیوس؛ ۲) با تنش گرمایی: تعداد ۱۵ اسب در محوطه باز به مدت ۴ ساعت در شبانه روز در دمای ۳۸ درجه سلسیوس و مابقی ساعات در سالن بسته نگهداری شدند. سه سطح مکمل روی-متیونین استفاده شد، ۱) بدون مکمل، ۲) مقدار ۶۷ میلی

گرم روی-متیونین در کیلوگرم جیره و ۳) مقدار ۱۲۰ میلی گرم روی-متیونین در کیلوگرم جیره. مقادیر روی-متیونین مورد استفاده در این پژوهش بر اساس NRC (۱۸) بود در مرحله اول دو هفته برای عادت دهی اسب ها به شرایط در نظر گرفته شد و خونگیری از اسب های سالن بسته تهویه دار و در سالن با محوطه باز برای تعیین اثربخشی شرایط دمایی و ایجاد تنش گرمایی انجام شد. با طی شدن دوره عادت دهی و در روزهای ۱۵ و ۱۶ دمای مقعد، شدت ضربان قلب و تعداد تنفس در دقیقه اسب ها اندازه گیری و مقایسه بین اسب های سالن بسته و محوطه باز انجام شد. از اسب ها در روز یک نمونه خون گرفته شد تا سطح پایه صفات مورد بررسی در خون مشخص شود. در مرحله دوم به مدت سه هفته تغذیه اسب ها با یا بدون مکمل روی-متیونین انجام شد و در روز ۳۷ خونگیری از ورید وداج به عمل آمد. نمونه خون به مقدار ۱۰ میلی لیتر، با سرنگ ۲۰ میلی لیتر و سوزن گیج ۲۹ گرفته در لوله استریل حاوی هپارین نگهداری شد تا پلاسما جدا شود. پلاسما هر نمونه با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه، جدا شد

سنجش مقدار مالون دی آلدئید به روش Nielsen و همکاران (۱۹۹۷)، ظرفیت آنتی اکسیدانی تام با استفاده از روش احیای رادیکال آزاد ۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل و براساس روش Brand-Williams و همکاران (۱۹۹۵)، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز به روش Misra و همکاران (۱۹۹۷) با سنجش اتواکسیداسیون اپی نفرین به آدرنوکروم انجام شدند (۱۹-۲۱). همچنین اندازه گیری فعالیت گلوکوتاتیون پراکسیداز به روش Paglia and Valentine (۱۹۶۷)، سنجش آلانین ترانس آمیناز با استفاده از کیت سنجش شرکت پارس آزمون برای این آنزیم انجام گرفت. فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز با روش Ohkubo و همکاران (۱۹۷۴) و از طریق اندازه گیری آزاد شدن پارا-نیتروفنیل از پارا-نیتروفنیل فسفات در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و pH ۱۰ در اسپکتروفتومتر تعیین شد. فعالیت آنزیم آسپارات آمینو ترانسفراز با روش Nisselbaum و همکاران (۱۹۶۹) اندازه گیری شد (۲۴-۲۲).

آنالیز آماری

قبل از آنالیز واریانس از آزمون Shapiro-Wilk استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی با سطح احتمال ۵ درصد انجام شد (۲۵)

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC) در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. برای ارزیابی نرمال بودن داده‌ها

نتایج

کاهش معنی داری نشان داد و افزودن مکمل روی-متیونین اثری بر این شاخص نداشت. اثر متقابل تنش و مکمل بر ظرفیت آنتی اکسیدانی کل معنی دار نبود. اثر اصلی تنش گرمایی بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتایون پراکسیداز معنی دار اما اثر اصلی روی-متیونین بر فعالیت این دو آنزیم معنی دار نبود. اثر متقابل تنش و مکمل بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تمایل به معنی داری داشت و فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز هم معنی دار بود

اثر تنش گرمایی و مکمل روی-متیونین بر شاخص های آنتی اکسیدانی و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در جدول ۲ گزارش شده است. اثرات اصلی تنش و مکمل بر غلظت مالون دی آلدئید معنی دار و اثر متقابل این دو عامل بر غلظت مالون دی آلدئید معنی دار نبود. تنش گرمایی سبب افزایش معنی دار غلظت مالون دی آلدئید و افزودن مکمل روی-متیونین سبب کاهش معنی دار غلظت این ماده در خون شد. افزایش دوز روی-متیونین تغییر معنی داری بر غلظت مالون دی آلدئید نداشت. ظرفیت آنتی اکسیدانی کل تحت تاثیر تنش گرمایی

جدول ۱. اثرات اصلی و متقابل تنش گرمایی و مکمل روی-متیونین بر غلظت شاخص های آنتی اکسیدانی پلاسمای خون اسب ها

Parameters	Factors					SEM	p values		
	Heat stress		Zinc-methionine				Stress	Supplement	Interaction
	No	Yes	0	67 mg/kg	120 mg/kg				
Malondialdehyde (nmol/ml)	4.19 ^b	7.65 ^a	6.33 ^a	5.83 ^b	5.60 ^b	0.159	0.001	0.001	0.201
Total antioxidant capacity (mmol/ml)	223.5 ^a	184.3 ^b	198.5	204.9	208.4	8.17	0.001	0.386	0.352
Superoxide dismutase (U/mg protein)	3.53 ^b	5.74 ^a	4.55	4.57	4.79	0.072	0.001	0.287	0.062
Glutathione peroxidase (U/mg protein)	2.43 ^b	39.5 ^a	3.13	3.12	3.15	0.058	0.001	0.956	0.015

^{a, b} Means within a row with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$)

اثر متقابل تنش و مکمل بر ظرفیت آنتی اکسیدانی کل معنی دار نبود. اثر اصلی تنش گرمایی بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتایون پراکسیداز معنی دار بود و اثر اصلی روی-متیونین بر فعالیت این دو آنزیم معنی دار نبود. اثر متقابل تنش و مکمل بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تمایل به معنی داری داشت و فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز معنی دار بود

اثرات اصلی تنش و مکمل بر غلظت مالون دی آلدئید معنی دار و اثر متقابل این دو عامل بر غلظت مالون دی آلدئید معنی دار نبود. تنش گرمایی سبب افزایش معنی دار غلظت مالون دی آلدئید و افزودن مکمل روی-متیونین سبب کاهش معنی دار غلظت این ماده در خون شد. افزایش دوز روی-متیونین تغییر معنی داری بر غلظت مالون دی آلدئید نداشت. ظرفیت آنتی اکسیدانی کل تحت تاثیر تنش گرمایی، کاهش معنی داری نشان داد و افزودن مکمل روی-متیونین اثری بر این شاخص نداشت.

مکمل تغییر معنی داری در غلظت این آنزیم ایجاد نکرد. تحت تاثیر تنش گرمایی غلظت آلکالین فسفاتاز افزایش یافت. اثر اصلی مکمل و اثر متقابل تنش و مکمل بر غلظت این آنزیم معنی دار بود. افزودن مکمل روی-متیونین سبب کاهش غلظت این آنزیم شد. کراتین کیناز تحت تاثیر اثر اصلی تنش گرمایی قرار گرفت و افزودن مکمل بر غلظت این آنزیم اثر معنی داری نداشت. اثر متقابل تنش و مکمل معنی دار نبود.

اثرات اصلی تنش گرمایی و مکمل روی-متیونین بر آنزیم های کبدی و کلیوی در جدول ۱ گزارش شده است. آنزیم آلانین آمینوترانسفراز تحت تاثیر تنش گرمایی افزایش و با افزودن مکمل روی-متیونین کاهش معنی داری نشان داد. اثر متقابل تنش و مکمل بر غلظت این آنزیم معنی دار بود. اثرات اصلی تنش و مکمل بر غلظت آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز معنی دار بود و اثرات متقابل تنش و مکمل بر غلظت این آنزیم معنی دار نبود. تنش گرمایی سبب افزایش و افزودن مکمل سبب کاهش غلظت این آنزیم شد. دوز

جدول ۲. اثرات اصلی و متقابل تنش گرمایی و مکمل روی-متیونین بر غلظت آنزیم های کبدی و ماهیچه ای پلاسمای خون اسب ها

Parameters	Factors					SEM	p values		
	Heat stress		Zinc-methionine				Stress	Supplement	Interaction
	No	Yes	0	67 mg/kg	120 mg/kg				
Alanine- Aminotransferase (U/ml)	3.93 ^b	4.45 ^a	4.22 ^a	3.84 ^b	3.70 ^b	0.08	0.001	0.001	0.031
Aspartate- Aminotransferase (U/ml)	150.4 ^b	177.5 ^a	175.5 ^a	159.2 ^b	157.3 ^b	5.94	0.001	0.002	0.823
Alkaline Phosphatase (U/ml)	79.7 ^b	111.0 ^a	109.5 ^a	89.15 ^b	88.05 ^b	3.50	0.001	0.001	0.024
Creatin kinase IU/L	177.3 ^b	215.9 ^a	199.5	195.6	194.0	5.29	0.001	0.532	0.115

a, b Means within a row with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$)

بحث

و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی خون اسب در شرایط تنش گرمایی بود. مالون دی آلدئید شاخص اثبات شده پراکسیداسیون لیپیدی است که با مواد واکنش دهنده با اسید تیوباربیتوریک (محصولات پراکسیداسیون لیپیدی) اندازه گیری می شود (۲۸). مالون دی آلدئید به عنوان محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدی تشکیل می شود و بنابراین، میزان پراکسیداسیون لیپیدی توسط رادیکال های آزاد را می توان با توجه به سطوح مالون دی آلدئید تعیین کرد (۲۹). کاهش مالون دی آلدئید یا افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل شاخص کاهش استرس اکسیداتیو یا افزایش دفاع آنتی اکسیدانی است. در اسب های در معرض تنش گرمایی، غلظت مالون دی آلدئید افزایش یافت که نشان دهنده شرایط تنش اکسیداتیو است

در بدن موجودات زنده ۵۱ نوع آنزیم شناسایی شده است که برای انجام فعالیت و عملکرد طبیعی نیاز به عنصر روی دارند (۳۶). عنصر روی یک ماده معدنی کم نیاز ولی ضروری برای بدن و دومین عنصر کمیاب بدن بعد از آهن است. از آنجا که بدن نمی تواند این عنصر را به مقدار زیاد ذخیره کند، مصرف روزانه آن در جیره غذایی ضروری است و لازم است به طور روزانه در جیره غذایی حیوانات استفاده شود (۳۷). در شرایط تنش نیاز به این عنصر افزایش می یابد، زیرا فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی بدن که حاوی این عنصر است، برای مقابله با عوامل اکسیدکننده و مخرب باید افزایش یابد (۸). تامین این عنصر از منابع گیاهی و معدنی با مشکلاتی رو به رو است، بنابراین تامین این عنصر از طریق شکل های آلی آن باید مورد توجه قرار گیرد (۱۵). هدف این آزمایش مطالعه اثر افزودن مکمل روی-متیونین به جیره بر شاخص های آنتی اکسیدانی

افزودن مکمل روی-متیونین سبب کاهش غلظت مالون دی آلدئید شد و افزایش دوز بر این روند، بی تاثیر بود. در توافق با یافته مطالعه حاضر، سالیم و الشریف (۲۰۱۵) گزارش کردند که اسب های دریافت کننده مکمل روی، کاهش قابل توجهی در سطوح مالون دی آلدئید در سرم و بافت ها داشتند (۳۰). عنصر روی بخشی از سیستم آنتی اکسیدانی بدن است و کمبود آن سبب اختلال در سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی بدن و افزایش استرس اکسیداتیو می گردد (۳۱). تنش اکسیداتیو در نتیجه عدم تعادل بین تولید رادیکال های آزاد و گونه های فعال اکسیژن (شامل آنیون سوپراکسید، رادیکال آزاد هیدروکسیل، هیدروژن پراکسید و ...) از یک طرف و سیستم دفاع آنتی اکسیدانی از طرفی دیگر ایجاد می گردد. در سیستم های بیولوژیکی هوازی، برای مقابله با رادیکال های آزاد و گونه های فعال اکسیژن، مکانیسم های دفاعی طراحی شده است تا اثرات زیان بار این عوامل مهاجم را خنثی نموده یا به حداقل برسانند. روی برای حفظ ساختار و فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز عنصر لازم و ضروری است (۳۱). کاهش سطوح مالون دی آلدئید در گروه های تحت تنش که مکمل روی-متیونین دریافت کردند، به نقش آنتی اکسیدانی روی نسبت داده می شود. روی می تواند تشکیل رادیکال های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدی را با مکانیسم دفاعی آنتی اکسیدانی ذاتی خود با کمک گلوتاتیون پراکسیداز و تیوردوکسین ردوکتاز کاهش دهد (۲۸، ۳۱).

ظرفیت آنتی اکسیدانی کل در اسب های تحت تنش گرمایی کاهش یافت و افزودن مکمل روی-متیونین در دوز ۱۲۰ میلی گرم در کیلوگرم بر این فراسنجه تمایل به افزایش داشت. کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی در اسب های تحت تنش نشان دهنده این است که ترکیبات آنتی اکسیدانی بدن طی تنش مصرف شده است (۲۹، ۳۰). تنش سبب افزایش غلظت رادیکال های آزاد در سلول ها می شود و مواد آنتی اکسیدانی صرف خنثی کردن این عوامل مضر می شوند (۳۱). به نظر می رسد تنش گرمایی نیاز به روی را به شدت افزایش داده و دوزهای مکمل مورد استفاده در این مطالعه در حدی نبوده که بتواند سبب افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل در این شرایط شود. دوز ۱۲۰ میلی گرم در کیلوگرم تمایل به افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی داشت و شایان ذکر است افزایش بیشتر

دوز مکمل روی می تواند اثرات منفی داشته باشد. 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 زیاده تر 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 (۸) فعالیت بیشتر سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در پلاسمای اسب های تحت تنش نشان داد که غلظت رادیکال های آزاد افزایش یافته و سبب شده است آنزیم های آنتی اکسیدانی با سرعت بیشتری فعالیت کنند. نتایج ژانگ و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد در طی تنش، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی افزایش می یابد که با یافته های این پژوهش مطابقت دارد (۳۲). افزودن مکمل روی-متیونین تاثیری بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز نداشت. این یافته برخلاف یافته جامعی و همکاران (۲۰۲۳) بود که دریافتند با افزودن مکمل روی-متیونین به جیره موش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز افزایش می یابد (۳۳)

اثر متقابل تنش و مکمل بر فعالیت این دو آنزیم به ترتیب تمایل به معنی داری و معنی دار بود. این موضوع به این معنا است که در شرایط تنش گرمایی افزودن مکمل روی-متیونین سبب بهبود فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی شده 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 (۳۴). آنزیم های آلانین ترانسفراز و آسپارات ترانسفراز به طور عمده در کبد یافت می شوند، اما مقداری از آن ها نیز در کلیه ها، قلب، ماهیچه های اسکلتی، سلول های قرمز خون و مغز وجود دارد (۳۵)

غلظت آلانین ترانسفراز و آسپاراتات ترانسفراز برای بررسی وضعیت کبد اندازه‌گیری می‌شوند. دو آنزیم آلانین ترانسفراز و آسپاراتات ترانسفراز در داخل سلول کبدی قرار دارند. زمانی که کبد آسیب دیده است، معمولاً قبل از آن که علائم بارزتر آسیب کبدی رخ دهد، غلظت آلانین ترانسفراز و آسپاراتات ترانسفراز افزایش می‌یابد (۳۶). تابرینو و همکاران (۱۹۹۶) گزارش کردند افزایش آنزیم‌های کبدی ناشی از عدم پایداری غشای پلاسمایی، همچنین آسیب به بافت کبد می‌باشد (۳۷). در صدمات کبدی عملکرد ترانسپورت‌های هیپاتوسیت‌ها مختل می‌شود که نتیجه آن ایجاد نشت از غشای پلاسمایی است. بنابراین این نشت منجر به رها شدن این آنزیم‌ها در سرم می‌شود (۳۸). لذا افزایش سطح این دو آنزیم می‌تواند نشانه‌ای از تخریب سلول‌های کبد باشد. فعالیت آنزیم‌های آسپاراتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز در پلاسمای خون اسب‌های تحت تنش افزایش یافت. این موضوع نشان می‌دهد کبد حیوانات در اثر تنش گرمایی آسیب دیده و مکمل روی-متیونین به عنوان یک عامل آنتی اکسیدانی عمل می‌کند. ژانگ و همکاران (۲۰۱۸) افزایش فعالیت آنزیم آلانین ترانس آمیناز را در موش‌های صحرایی در پاسخ به تنش گرمایی گزارش کردند (۳۹). به طور مشابه، Li و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که محیط گرم و مرطوب سبب آسیب کبدی به موش‌ها می‌شود (۴۰). سطح بالای فعالیت آنزیم آلانین ترانس آمیناز ممکن است نتیجه آسیب اکسیداتیو ناشی از

تنش گرمایی به سلول‌های کبدی باشد. سلول‌های کبدی به طور مداوم فرآیندهای متابولیکی مختلفی را انجام می‌دهند و سرعت متابولیسم بالایی که دارند، آنها را مستعد آسیب اکسیداتیو می‌کند (۴۱).

با افزودن مکمل روی-متیونین به جیره فعالیت آنزیم‌های کبدی به طور معنی داری کاهش یافت. کاهش سطح فعالیت آنزیم آلانین ترانس آمیناز با افزودن مکمل روی-متیونین به جیره غذایی در اسب‌های در معرض تنش گرمایی ممکن است ناشی از کاهش تنش اکسیداتیو باشد که با سطوح کم مالون دی آلدئید مشهود است که با یافته‌های ملیار و همکاران (۲۰۲۰) مطابقت دارد (۴۱). مطابق با یافته‌های این پژوهش، محمد و همکاران (۲۰۱۲) مشاهده کردند، در بیمارانی که غلظت روی کمتری در سرم داشتند، مصرف مکمل روی، موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های کبدی در سرم شده بود (۴۲). در همین راستا، ناگالاکشمی و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در بره‌هایی که مکمل‌های روی آلی دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه کنترل بیشتر بود (۴۳). در تناقض با نتایج این تحقیق، یافته‌های هو و همکاران (۲۰۲۱) نشان داد که روی باعث افزایش فعالیت آلانین آمینوترانسفراز شده است (۴۴). 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

نتیجه گیری

با توجه به یافته‌های پژوهش حاضر، تنش گرمایی سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و آنزیم‌های کبدی می‌شود و تخلیه ظرفیت آنتی اکسیدانی پلاسمای خون را در پی دارد. استفاده از مکمل روی-متیونین هر چند سبب کاهش غلظت مالون-دی آلدئید در اسب‌های تحت تنش گرمایی شد ولی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی

اکسیدانی اثری نداشت. افزودن مکمل روی-متیونین بر غلظت آنزیم‌های کبدی در پلاسمای موثر بود و در دوز ۶۷ میلی گرم در کیلوگرم سبب کاهش غلظت آنزیم‌های کبدی در پلاسمای خون اسب‌های فریزین در شرایط تنش گرمایی شد

تشکر و قدردانی

آنالیز آنزیم های کبدی و آنزیم های آنتی اکسیدانی همکاری کردند، تشکر می شود. این مقاله مستخرج از رساله دانشجوی دوره دکتری تخصصی واحد علوم و تحقیقات (آقای احمد میری) می باشد

از معاونت محترم پژوهش و فناوری واحد علوم و تحقیقات به جهت تصویب و در اختیار قراردادن امکانات آزمایشگاه رازی برای انجام این تحقیق تشکر می شود. از مجموعه پرورش اسب فریزین برای در اختیار گذاشتن امکانات فارمی و آزمایشگاه دامپزشکی دامگستر که در

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می دارند که هیچ تضاد منافی در رابطه با نویسندگی و یا انتشار این مقاله ندارند.

References

- Budzyńska M. Stress reactivity and coping in horse adaptation to environment. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2014;34(8):935-41. DOI:10.1016/j.jevs.2014.05.010.
- Kang H, Zsoldos RR, Sole-Guitart A, Narayan E, Cawdell-Smith AJ, Gaughan JB. Heat stress in horses: a literature review. *International journal of biometeorology*. 2023;67(6):957-73. DOI:10.1007/s00484-023-02467-7.
- Geor RJ, McCutcheon LJ. Hydration effects on physiological strain of horses during exercise-heat stress. *Journal of Applied Physiology*. 1998;84(6):2042-51. DOI:10.1152/jap.1998.84.6.2042.
- Zandoná Meleiro MC, de Carvalho HJ, Ribeiro RR, da Silva MD, Salles Gomes CM, Miglino MA, de Santis Prada IL. Immune functions alterations due to racing stress in Thoroughbred horses. *Animals*. 2022;12(9):1203. DOI:10.3390/ani12091203.
- Gonzalez-Rivas PA, Chauhan SS, Ha M, Fegan N, Dunshea FR, Warner RD. Effects of heat stress on animal physiology, metabolism, and meat quality: A review. *Meat science*. 2020; 162: 108025. DOI:10.1016/j.meat sci. 2019.108025.
- Garcia EI, Elghandour MM, Khusro A, Alcalá-Canto Y, Tirado-González DN, Barbabosa-Pliego A, Salem AZ. Dietary supplements of vitamins E, C, and β -carotene to reduce oxidative stress in horses: an overview. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2022; 110:103863. DOI: 10.1016/j.jevs.2022.103863.
- Deride C, Chihuailaf R, Arnés V, Morán G, Uberti B. Relationship Between Selenium, Copper, Zinc and Their Biomarkers in Blood and Skeletal Muscle Tissue in Adult Horses from Southern Chile. *J Equine Vet Sci*. 2023 Sep; 128:104881. DOI:10.1016/j.jevs. 2023.104881.
- van Bömmel-Wegmann S, Gehlen H, Barton AK, Büttner K, Zentek J, Paßlack N. Zinc Status of Horses and Ponies: Relevance of Health, Horse Type, Sex, Age, and Test Material. *Veterinary Sciences*. 2023;10(4):295. DOI:10.3390/vetsci10040295.
- Pagan JD. Micromineral requirements in horses. *World Equine Veterinary*. 2000; 5:15-21.
- Hill GM, Shannon MC. Copper and zinc nutritional issues for agricultural animal production. *Biological trace element research*. 2019; 188:148-59. DOI: 10.1007/s12011-018-1578-5.
- Karimian N, Moafpouryan GR. Zinc adsorption characteristics of selected calcareous soils of Iran and their relationship with soil properties. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 1999;30(11-12):1721-31. DOI: 10.1080/00103629909370325
- Malakouti MJ. Zinc is a neglected element in the life cycle of plants. *Middle Eastern and Russian Journal of Plant Science and Biotechnology*. 2007;1(1):1-2.
- Angeles-Hernandez JC, Miranda M, Muñoz-Benitez AL, Vieyra-Alberto R, Morales-Aguilar N, Paz EA, Gonzalez-Ronquillo M. Zinc supplementation improves growth performance in small ruminants: A systematic review and meta-regression analysis. *Animal Production Science*. 2021; 61(7) 621-629. DOI:10. 1071/AN20628.
- Wagner EL, Potter GD, Gibbs PG, Eller EM, Scott BD, Vogelsang MM, Walzem RL. Copper and zinc balance in exercising horses fed 2 forms of mineral supplements. *J Anim Sci*. 2011 Mar;89(3): 722-8. DOI:10.2527/jas. 2010-2871.
- Paßlack N, van Bömmel-Wegmann S, Vahjen W, Zentek J. Impact of dietary zinc chloride hydroxide and zinc methionine on the faecal microbiota of healthy adult horses and ponies. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2022; 110:103804. DOI: 10.1016/j.jevs.2021.103804.
- Stanek M, Jaworski Z, Sobotka W, Lipinski K, Olenkowicz R. Influence of an organic supplement of copper, zinc and manganese in feed rations on concentrations of these elements in the coat of Polish Konik horses. *Journal of Elementology*. 2016; 21:2, 12-18. DOI: 10.5601/jelem.2015.20.1.914.
- Noormohammady Z, Chamani M, Khodae HR. Effect of zinc on integrity of horse hoof. *Res. Agric. Vet. Sci*. 2018; 2:17-23.
- National Research Council, 2007. Nutrient requirements of horses: 6th ed. Washington, D.C.: The National Academies Press.
- Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin Chem*. 1997 Jul;43(7):1209-14.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset CL. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*. 1995;28(1):25-30.

DOI:10.1016/S0023-6438(95)80008-5.

21. Misra HP, Fridovich I. Superoxide dismutase: a photochemical augmentation assay. Arch Biochem Biophys. 1977 May;181(1):308-12. DOI: 10.1016/0003-9861(77)90509-4.

22. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med. 1967 Jul;70(1):158-69.

23. Ohkubo A, Langerman N, Kaplan MM. Rat liver alkaline phosphatase: Purification and properties. Journal of Biological Chemistry. 1974;249(22):7174-80.

24. Nisselbaum JS, Green S. A simple ultramicro method for determination of pyridine nucleotides in tissues. Analytical biochemistry. 1969;27(2):212-7. DOI:10.1016/0003-2697(69)90025-6.

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

26. Lipscomb WN, Sträter N. Recent advances in zinc enzymology. Chemical Reviews. 1996;96(7):2375-434. DOI: 10.1021/cr950042j.

27. Sloup V, Jankovská I, Nechybová S, Peřínková P, Langrová I. Zinc in the animal organism: a review. Sci. Agric. Bohem. 2017;48(1):13-21. DOI:10.1515/sab-2017-0003.

28. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. Methods Enzymol. 1990; 186:421-31. DOI: 10.1016/0076-6879(90)86135-i.

29. Brkljača Bottegaro N, Gotić J, Šuran J, Brozić D, Klobučar K, Bojanić K, Vrbanac Z. Effect of prolonged submaximal exercise on serum oxidative stress biomarkers (d-ROMs, MDA, BAP) and oxidative stress index in endurance horses. BMC veterinary research. 2018; 14:1-9. DOI:10.1186/s12917-018-1540-y.

30. Salem NY, El-Sherif MA. Malondialdehyde status, trace minerals and hematologic results of anemic-T. equi infected Egyptian horses. Internaytional journal of veterinary science.2015; 4(3): 118-123.

31. Marreiro DD, Cruz KJ, Morais JB, Beserra JB, Severo JS, De Oliveira AR. Zinc and oxidative stress: current mechanisms. Antioxidants (Basel).2017;29;6(2):24. DOI:10.3390/

antiox6020024.

32. Zeng T, Li JJ, Wang DQ, Li GQ, Wang GL, Lu LZ. Effects of heat stress on antioxidant defense system, inflammatory injury, and heat shock proteins of Muscovy and Pekin ducks: evidence for differential thermal sensitivities. Cell Stress Chaperones. 2014 Nov;19(6):895-901. DOI: 10.1007/s12192-014-0514-7

33. Jamei M, Sadeghi AA, Chamani M. Dose-responses of zinc as zinc-methionine supplements on antioxidant status, hematological parameters, immune response and the expression of IL-4 and IL-6 genes of ewes in the hot season. Anim Biotechnol. 2023; Dec;34(9):4860-4868. DOI: 10.1080/10495398.2023.2200428.

34. 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. DOI: org/10.1016/s0271-5317(00)00163-9

35. van Beek JH, de Moor MH, de Geus EJ, Lubke GH, Vink JM, Willemsen G, Boomsma DI. The genetic architecture of liver enzyme levels: GGT, ALT and AST. Behav Genet. 2013 Jul;43(4):329-39. DOI: 10. 1007/s10519-013-9593-y.

36. McGill MR. The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers. EXCLI J. 2016 Dec 15; 15:817-828. DOI: 10.17179/excli2016-800.

37. Thabrew MI, Hughes RD. Phytogetic agents in the therapy of liver disease. Phytotherapy Research. 1996;10(6):461-7. DOI:10.1002/(SICI)1099-1573(199609)10:6<461::AID-PTR899>3.0.CO;2-V

38. Rajesh MG, Latha MS. Hepatoprotective Activity of Glycyrrhiza glabra Linn. on Experimental Liver Damage in Albino Rats. Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2010;2(4):313-6.

39. Zhang X, Chen Y, Tang L, Zhang Y, Duan P, Su L, Tong H. The liver sinusoidal endothelial cell damage in rats caused by heatstroke. European Journal of Inflammation. 28-520; 17; 2018. DOI:10.1177/2058739218794328.

40. Li D, Wang X, Liu B, Liu Y, Zeng Z, Lu L, Zheng Z, Li B, Zheng Z. Exercises in hot and humid environment caused liver injury in a rat model. PLoS One. e111741: 9; 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0111741.

41. Malyar RM, Li H, Liu D, Abdulrahim Y, Farid RA, Gan F, Ali W, Enayatullah H, Banuree SA, Huang K, Chen X. Selenium/Zinc-Enriched probiotics improve serum enzyme activity, antioxidant ability, inflammatory factors and related gene expression of Wistar rats inflated under heat stress. *Life Sci.* 2020 1; 248:117464. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117464.
42. 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.
43. 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.

44. 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.