



Original Article

Iranian Journal of Biological Sciences

h t t p s : / / z i s t i . i a u v a r a m i n . a c . i r



The effect of zinc-methionine supplementation on physiological responses, oxidative stress, and the relative expression of *IL-6*, *IL-10*, and *HSP70* genes in sanjabi sheep under heat stress conditions

Hamid Ashrafi*

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

Article Info

Abstract

Article History:

Received 2025.12.06
Revised 2025.12.17
Accepted 2025.12.20

KeyWords:

Heat stress
Zinc-methionine
Sanjabi sheep
Gene expression
Oxidative stress
Antioxidant capacity

*Corresponding author:

E-mail address:
ashrafihamid1071395@gmail.com

Introduction: Heat stress is one of the most significant limiting factors in sheep production. By disrupting physiological homeostasis, increasing reactive oxygen species (ROS), and impairing immune regulation, it leads to reduced performance and systemic inflammation. This study investigated the effect of zinc-methionine supplementation on physiological responses, oxidative stress indicators, and the expression of *IL-6*, *IL-10*, and *HSP70* genes in non-pregnant Sangsari ewes under severe heat stress conditions.

Methods: This research was conducted on 25 Sanjabi ewes in a completely randomized design, involving different heat stress groups and zinc-methionine treatment, over a period of 40 days. Subsequently, physiological parameters and gene expression were evaluated across the groups.

Results: Heat stress caused a significant increase in heart rate, respiratory rate, and rectal temperature, and decreased GPx, SOD, and TAC activity alongside elevated MDA levels ($P<0.05$). Furthermore, the expression of *IL-6* and *HSP70* genes increased by 2.83 and 2.52-fold, respectively, while *IL-10* gene expression decreased to 0.63-fold ($P<0.05$). The addition of zinc-methionine supplement, particularly at levels of 30 and 45 mg, significantly improved physiological and antioxidant indices, reduced MDA levels, and modulated the expression of *IL-6* and *HSP70* genes while increasing *IL-10* gene expression ($P<0.05$).

Conclusion: Adding zinc-methionine supplement to the diet can be an effective nutritional strategy to reduce physiological stress, improve oxidative status, and modulate inflammatory responses in Sanjabi sheep under heat stress. The use of a 30 mg/kg of diet level is recommended due to its highest efficacy.

Cite this article: H Ashrafi. The effect of zinc-methionine supplementation on physiological responses, oxidative stress, and the relative expression of *IL-6*, *IL-10*, and *HSP70* genes in Sanjabi sheep under heat stress conditions Iranian Journal of Biological Sciences. 2025; 20 (2): 61-72



Authors retain the copyright and full publishing rights.
Published by Islamic Azad University, Varamin.
This article is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0)

Print ISSN: 1735-4226

Online ISSN: 1727-459X



تأثیر مکمل روی-متیونین بر پاسخ‌های فیزیولوژیکی، استرس اکسیداتیو و بیان نسبی ژن‌های *IL-6*، *IL-10* و *HSP70* در گوسفندان نژاد سنجابی تحت شرایط تنش گرمایی

حمید اشرفی*

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

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

ارسال ۱۴۰۴/۰۹/۱۰
بازنگری ۱۴۰۴/۰۹/۲۶
پذیرش ۱۴۰۴/۰۹/۲۹

کلمات کلیدی

تنش گرمایی
روی-متیونین
گوسفند سنجابی

بیان ژن

استرس اکسیداتیو
ظرفیت آنتی اکسیدانی

* مسئول مکاتبات:

ashrafihamid1071395@gmail.com

مقدمه: تنش گرمایی یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید در گوسفندان است که با ایجاد عدم تعادل در هموستازی فیزیولوژیکی، افزایش گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر و اختلال در تنظیم ایمنی، سبب کاهش عملکرد و بروز التهاب سیستمیک می‌شود. در این مطالعه اثر مکمل روی-متیونین بر پاسخ‌های فیزیولوژیکی، شاخص‌های استرس اکسیداتیو و بیان ژن‌های *IL-6*، *IL-10* و *HSP70* در میش‌های نژاد سنجابی غیرآبست تحت تنش گرمایی شدید بررسی شد.

مواد و روش‌ها: این تحقیق بر روی ۲۵ رأس میش نژاد سنجابی در قالب طرح کاملاً تصادفی در گروه‌های مختلف تنش گرمایی و با تیمار مکمل روی-متیونین به مدت ۴۰ روز انجام پذیرفت. سپس پارامترهای فیزیولوژیکی و بیان ژن در گروه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: تنش گرمایی باعث افزایش معنی‌دار ضربان قلب، نرخ تنفس و دمای مقعد و کاهش فعالیت GPX، SOD و TAC همراه با افزایش سطح MDA شد ($P < 0.05$). همچنین، بیان ژن *IL-6* و *HSP70* به ترتیب ۲/۸۳ و ۲/۵۲ برابر افزایش و بیان ژن *IL-10* به ۰/۶۳ برابر کاهش یافت ($P < 0.05$). افزودن مکمل روی-متیونین به‌ویژه در سطوح ۳۰ و ۴۵ میلی‌گرم، به طور معنی‌داری شاخص‌های فیزیولوژیکی و آنتی‌اکسیدانی را بهبود بخشید، سطح MDA را کاهش داد و بیان ژن‌های *IL-6* و *HSP70* را تعدیل و بیان ژن *IL-10* را افزایش داد ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: افزودن مکمل روی-متیونین به جیره می‌تواند راهکار تغذیه‌ای مؤثری برای کاهش استرس فیزیولوژیک، بهبود وضعیت اکسیداتیو و تعدیل پاسخ‌های التهابی در گوسفندان سنجابی تحت تنش گرمایی باشد. استفاده از سطح ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم جیره به دلیل بیشترین اثربخشی توصیه می‌شود.

شیوه آدرس‌دهی این مقاله: ح اشرفی. تأثیر مکمل روی-متیونین بر پاسخ‌های فیزیولوژیکی، استرس اکسیداتیو و بیان نسبی ژن‌های *IL-6*، *IL-10* و *HSP70* در گوسفندان نژاد سنجابی تحت شرایط تنش گرمایی مجله دانش زیستی ایران. ۲۰۱۴۰۴ (۲): ۷۲-۶۱



مقدمه

و فیبرهای شکمبه‌ای شایع است و تنش گرمایی این کمبود را تشدید می‌کند (۸). مکمل روی-متیونین به‌عنوان یک کمپلکس آلی، با فراهمی زیستی بالاتر (تا ۲۰۰ درصد بیشتر از سولفات روی) و مقاومت به اتصال با آنتاگونیست‌های گوارشی، اثرات محافظتی برتری نشان می‌دهد (۹). مطالعات نشان داده‌اند که روی-متیونین با فعال‌سازی مسیر Nrf2، بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی مانند SOD1 و GPX1 را افزایش می‌دهد، سطح مالون‌دی‌آلدید را کاهش می‌دهد و مسیرهای التهابی مانند NF- κ B را مهار می‌کند؛ این فرایند منجر به تعدیل سایتوکین‌های پیش‌التهابی (IL-6) و افزایش سایتوکین‌های ضدالتهابی (IL-10) می‌شود (۱۰، ۱۱). همچنین، روی در تنظیم بیان HSP70 از طریق تعامل با فاکتور HSF1 نقش دارد و از آپوپتوز سلولی ناشی از استرس جلوگیری می‌کند (۱۲). با وجود این پیشرفت‌ها، شکاف‌های پژوهشی قابل‌توجهی باقی مانده است. بیشتر مطالعات بر نژادهای غیربومی یا گونه‌های دیگر متمرکز بوده و اثرات روی-متیونین بر نژادهای بومی مانند سنجابی، به‌ویژه در میش‌های غیرآبستن تحت تنش گرمایی طولانی‌مدت، بررسی نشده است. همچنین، مکانیسم‌های وابسته به دوز مکمل‌یاری روی-متیونین بر تعادل اکسیدانی-آنتی‌اکسیدانی و تنظیم بیان ژن‌های التهابی در شرایط تنش گرمایی در نشخوارکنندگان هنوز به‌طور جامع تحلیل نشده است، در حالی‌که متابولیسم شکمبه‌ای و برهم‌کنش‌های معدنی می‌توانند به‌طور معنی‌داری فراهمی زیستی و الگوی جذب روی را تغییر دهند (۱۳). این مطالعه با هدف پر کردن بخشی از این خلأ دانشی، به ارزیابی اثرات سطوح مختلف روی-متیونین بر پاسخ‌های فیزیولوژیکی، نشانگرهای استرس اکسیداتیو و بیان ژن‌های IL-6، IL-10 و HSP70 در میش‌های سنجابی غیرآبستن تحت تنش گرمایی پرداخت

تنش گرمایی یکی از اصلی‌ترین عوامل محدودکننده در صنعت دامپروری جهانی، به‌ویژه در اقلیم‌های گرمسیری و نیمه‌گرمسیری مانند ایران، است (۱). این پدیده با اختلال در هموستازی فیزیولوژیکی و افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال از طریق مسیرهای متابولیکی مانند زنجیره انتقال الکترون میتوکندریایی و فعالیت NADPH اکسیداز، منجر به آسیب اکسیداتیو سلولی، پراکسیداسیون لیپیدی غشاهای التهاب سیستمیک و تغییرات اپی‌ژنتیکی در بیان ژن‌های مرتبط با پاسخ‌های استرسی می‌شود (۱، ۲). در نشخوارکنندگان، تنش گرمایی نه‌تنها مصرف خوراک و آب را کاهش می‌دهد، بلکه با فعال‌سازی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال، سطح کورتیزول را افزایش داده و سیستم ایمنی را سرکوب می‌کند؛ این امر خطر ابتلا به بیماری‌ها را افزایش می‌دهد (۳). گوسفندان سنجابی، نژادی بومی ایران با ویژگی‌های ژنتیکی منحصربه‌فرد مانند مقاومت نسبی به بیماری‌ها و تولید گوشت باکیفیت، از اهمیت اقتصادی ویژه‌ای برخوردارند؛ با این حال، حساسیت بالای این نژاد به تنش گرمایی منجر به کاهش نرخ رشد، افت کیفیت لاشه، اختلالات تولیدمثلی و افزایش هزینه‌های تولید می‌شود (۴). در شرایط تنش گرمایی، حیوانات برای حفظ دمای بدن، مکانیسم‌های تنظیم حرارتی مانند افزایش نرخ تنفس (پانتینگ) و ضربان قلب را به کار می‌گیرند. این پاسخ‌ها با افزایش متابولیسم پایه و کاهش بهره‌وری انرژی همراه است و می‌تواند عملکرد تولیدی را ۳۰ تا ۵۰ درصد کاهش دهد (۵). روی، عنصری کلیدی در متابولیسم سلولی، با ایفای نقش کوفاکتوری در آنزیم‌های کلیدی مانند RNA پلیمرز، سوپراکسید دیسموتاز و متالوپروتئینازها، در تنظیم پاسخ‌های ایمنی، آنتی‌اکسیدانی و بیان ژن‌های مرتبط با استرس مشارکت دارد (۶، ۷). کمبود روی در جیره غذایی نشخوارکنندگان به دلیل تداخل با فیتات‌ها

مواد و روش‌ها

حیوانات و شرایط نگهداری

تمامی مراحل انجام آزمایش بر اساس دستورالعمل شورای مراقبت از حیوانات صورت گرفت (۱۴). آزمایش در ایستگاه تحقیقات کشاورزی و دامپروری مهرگان واقع در شهرستان کرمانشاه استان کرمانشاه در تابستان سال ۱۴۰۴ انجام شد که میانگین دمای آن حدود ۳۸ درجه سلسیوس بود. مکمل روی آلی مورد استفاده حاوی ۱۵ درصد روی، محصول شرکت (Zinpro Corporation, USA) به جیره پایه اضافه شد. این مطالعه بر روی ۲۵ رأس میش سنجابی غیرآبستن سالم با سن تقریبی ۱۶-۱۸ ماه و وزن

متوسط 20 ± 5 کیلوگرم انجام شد. جیره غذایی پایه بر اساس نیازهای NRC (۲۰۰۷) برای گوسفندان تنظیم شد (۱۵). ترکیب مواد تشکیل‌دهنده و شیمیایی جیره پایه در جدول ۱ ارائه شده است. جیره به گونه‌ای طراحی شد که نیازهای انرژی، پروتئین خام و مواد معدنی را تأمین کند. آب تازه و غذا به صورت آزاد (ad libitum) در اختیار حیوانات قرار گرفت. تمام حیوانات از نظر سلامتی توسط دامپزشک بررسی شدند و هیچ نشانه‌ای از بیماری نداشتند.

جدول ۱. اجزا و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی (بر اساس ماده خشک)

Ingredients	%
Alfalfa hay	46.7
Barley	35.0
Wheat straw	7.70
Wheat bran	6.04
Soybean meal, 45% CP	3.69
Calcium phosphate	0.30
Mineral and vitamin premix	0.20
Salt	0.37
Chemical composition, % of DM	
Dry Matter, %	91.0
Organic Matter, % of DM	92.8
Metabolizable energy, Mcal/kg	2.48
Neutral Detergent Fiber, % of DM	38.0
Crude Protein, % of DM	13.7
Lipid, % of DM	2.90
Calcium, % of DM	0.73
Phosphorus, % of DM	0.35
Zn, mg/kg	5.00

هر کیلوگرم از مکمل ویتامینه و معدنی حاوی: ۴۰ میلی‌گرم منگنز به صورت $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ، ۱ میلی‌گرم ید به صورت KI، ۱ میلی‌گرم کبالت به صورت $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ، ۴۵ میلی‌گرم آهن به صورت $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۲۰ میلی‌گرم مس به صورت $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ، ۲۵۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۴۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D و ۲۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین E

طراحی آزمایش

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و ۵ تکرار برای هر تیمار (هر تکرار شامل یک میش) به مدت ۴۰ روز اجرا شد. تخصیص حیوانات به تیمارها به صورت تصادفی انجام شد تا توزیع وزن و سن یکنواخت باشد. میش‌ها در آغل‌های انفرادی به ابعاد $1 \times 1/7$ متر مجهز به آبخوری نگهداری شدند و در دو شرایط دمایی متفاوت قرار گرفتند. پنج رأس میش در اتاقی با تهویه مطبوع و دمای میانگین ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری و جیره پایه دریافت کردند (گروه شاهد منفی). ۲۰ رأس دیگر در سالی با دمای ۳۸ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۴۵ درصد به مدت ۶ ساعت در روز نگهداری شدند. این میش‌ها به‌طور تصادفی به یکی از چهار تیمار غذایی (تعداد ۵ رأس گوسفند به ازای هر تیمار) شامل (۱) جیره پایه بدون افزودن مکمل روی آلی به عنوان گروه شاهد مثبت، (۲) جیره پایه به اضافه ۱۵ میلی‌گرم روی در هر کیلوگرم ماده خشک جیره از مکمل Zin-pro، (۳) جیره پایه به اضافه ۳۰ میلی‌گرم روی در هر کیلوگرم ماده خشک جیره از مکمل Zin-pro و (۴) جیره پایه به اضافه ۴۵ میلی‌گرم روی در هر کیلوگرم ماده خشک جیره از مکمل Zin-pro اختصاص داده شدند. طبق NRC، نیاز روی برای گوسفندان بالغ حدود ۲۰ تا ۳۳ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک است، در حالی که جیره پایه این مطالعه حاوی ۵ میلی‌گرم روی در کیلوگرم ماده خشک بود (جدول ۱). بنابراین،

این سطوح به منظور تأمین مکمل‌یاری نزدیک به نیاز، سطح بهینه و سطح بالاتر جهت بررسی پاسخ وابسته به دوز تحت شرایط تنش گرمایی در نظر گرفته شدند. شاخص دما-رطوبت (THI) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۱۶).

$$THI = (0.8 * Tdb) + \left(\left(\frac{RH}{100} \right) * (Tdb - 14.4) \right) + 46.4$$

که در این فرمول Tdb دمای محیط بر حسب درجه سلسیوس و RH رطوبت نسبی بر حسب درصد است. طی مدت تنش گرمایی شاخص دما-رطوبت ۸۷/۴۲ بود که نشان‌دهنده تنش گرمایی شدید است.

اندازه‌گیری‌های فیزیولوژیکی

در روز ۴۰، پاسخ‌های فیزیولوژیکی اندازه‌گیری شد. ضربان قلب با استتوسکوپ دیجیتال (مدل 3M[™] Littmann[®] ساخت کشور ایالات متحده آمریکا) و شمارش ضربه‌ها در شریان کاروتید برای ۶۰ ثانیه ثبت شد. نرخ تنفس با شمارش حرکات قفسه سینه و شکم برای ۶۰ ثانیه و دمای مقعد با ترمومتر دیجیتال رکتال (مدل Omron MC-343F ساخت کشور ژاپن) اندازه‌گیری شد (۱۷). تمام اندازه‌گیری‌ها در ساعت ۴ بعدازظهر توسط یک فرد آموزش‌دیده انجام شد و میانگین سه نوبت ثبت گردید

نمونه‌برداری و اندازه‌گیری نشانگرهای استرس اکسیداتیو

در روز ۴۰، نمونه‌های خون (۱۰ میلی‌لیتر) از ورید وداچ گردنی گرفته شد. جهت جداسازی سرم، خون‌گیری در لوله‌های وکیوم بدون ماده ضد انعقاد انجام گرفت. سرم با سانتریفیوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه، ۱۵ دقیقه، ۴ درجه سلسیوس) جدا و در ۸۰ - درجه سلسیوس نگهداری شد (۱۸). غلظت روی سرم با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اقی در طول موج ۲۱۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. جهت آماده‌سازی نمونه‌ها، سرم با نسبت ۱ به ۵ با آب دیونیزه رقیق‌سازی گردید تا غلظت نمونه در دامنه منحنی استاندارد قرار گیرد (۹). فعالیت گلوکوتاتیون پراکسیداز به روش Paglia and Valentine (۱۹۶۷) و سوپراکسید دیسموتاز در سرم به روش Marklund and Marklund (۱۹۷۴) با استفاده از کیت‌های تجاری (Randox Laboratories Ltd. Ardmore) ساخت کشور انگلستان و مطابق دستورالعمل سازنده اندازه‌گیری شد (۱۹، ۲۰). سطوح سرمی مالون دی آلدئید به عنوان محصول پراکسیداسیون لیپیدی بر اساس روش تیوباربیتریک اسید اندازه‌گیری شد (۲۱). ظرفیت آنتی اکسیدانی کل سرم بر اساس روش FRAP اندازه‌گیری شد (۲۲).

ارزیابی بیان ژن‌ها

از نمونه‌های خون جمع‌آوری شده از می‌ش‌ها، 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 ژن‌های اینترلوکین ۱۰، ۶، پروتئین شوک حرارتی و β -actin با استفاده از پایگاه داده‌های ژنی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) و توالی‌های گزارش شده قبلی تهیه شد (۲۳). از ژن β -actin به عنوان ژن مرجع استفاده شد. پس از تهیه توالی ژن‌ها، پرایمرهای اختصاصی ژن توسط نرم افزار primer express طراحی و توسط شرکت BioNeer (سئول، کره جنوبی) سنتز شدند. مشخصات پرایمرها در جدول ۲ نشان داده شده است. تجزیه و تحلیل تولید و منحنی ذوب با استفاده از یک سیستم Applied Bio systems, Foster City, CA (Real-Time PCR) انجام شد. شرایط چرخه حرارتی شامل فعال‌سازی آنزیم در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه، به دنبال آن ۴۰ چرخه واسرشتی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس برای ۱۵ ثانیه و در دمای ۵۶ درجه سلسیوس برای ۲۰ ثانیه ذوب پرایمری و گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه انجام شد (۲۳-۲۵). نسبت بیان نسبی ژن‌های اینترلوکین ۱۰، ۶ و HSP70 به عنوان ژن‌های هدف به ژن β -actin بر اساس روش لیواک و اشمیگتن (۲۰۰۱) نرمال‌سازی شد (۲۶).

جدول ۲. پرایمرهای استفاده‌شده برای qRT-PCR

Genes	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon size (bp)
<i>IL-6</i>	TGAACCTCAGCCAGAACCTC	GGTCTGGTCTTAGCCACTC	150
<i>IL-10</i>	CCTGAGAAGTGTCTGCTGG	GTCCAGCTGGTCCTTTGTTG	140
<i>HSP70</i>	AAGGTGCTGGACAAGTGCCA	CCTTGTCTCTGCTTGGTCTG	160
<i>β-actin</i>	CCAGCACAATGAAGATCAAGATC	ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	120

Tm: Melting temperature of primers (°C)

آنالیز آماری

Wilks بررسی شد و در صورت نیاز، برای نرمال‌سازی توزیع، تبدیل لگاریتمی اعمال گردید. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چندمرحله‌ای دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد انجام شد تا تفاوت‌های بین تیمارها شناسایی

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹.۴ (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) و آزمون تجزیه واریانس (ANOVA) در قالب طرح کاملاً تصادفی تحلیل شدند. ارزیابی نرمال بودن داده‌ها با آزمون Shapiro-

نتایج

آنزیم‌های SOD، GPX و TAC را کاهش و سطح MDA را در مقایسه با گروه شاهد منفی افزایش داد ($P<0.05$). مکمل روی-متیونین در دوزهای ۳۰ و ۴۵ میلی‌گرم به طور معنی‌داری این اثرات را تعدیل کرد ($P<0.05$). دوز ۱۵ میلی‌گرم بهبود نسبی در GPX، SOD و TAC ایجاد کرد، اما اثر آن کمتر بود

غلظت روی و فراسنجه‌های آنتی‌اکسیدانی سرم نتایج غلظت روی سرم و فراسنجه‌های آنتی‌اکسیدانی سرم در جدول ۳ ارائه شده است. غلظت روی در سرم به صورت وابسته به دوز با افزایش دوز روی در جیره افزایش یافت ($P<0.05$). تنش گرمایی در گروه شاهد مثبت به طور معنی‌داری فعالیت

جدول ۳. غلظت روی و فراسنجه‌های آنتی‌اکسیدانی سرم میش‌های دریافت‌کننده سطوح مختلف مکمل روی-متیونین

Parameters	Negative Control	Positive control	Zinc Supplement (mg/kg DM)			P value ¹		
			15	30	45	Total	NC vs PC	PC vs Zn
Zinc concentration (µg/dL)	71.05 ^c	68.76 ^c	93.79 ^b	98.25 ^a	100.14 ^a	0.001	0.001	0.008
Glutathione peroxidase, (U/mL)	129 ^a	85 ^d	91 ^c	127 ^{ab}	125 ^a	0.001	0.001	0.001
Superoxide dismutase, (U/mL)	153 ^a	99 ^d	117 ^c	127 ^b	118 ^c	0.001	0.011	0.001
Total antioxidant capacity, mmol Trolox equivalent/L	2.94 ^a	1.43 ^c	2.20 ^d	2.58 ^b	2.45 ^c	0.001	0.001	0.001
Malondialdehyde (MDA), (nmol/dL)	2.13 ^d	3.91 ^a	3.09 ^b	2.34 ^c	2.28 ^c	0.001	0.001	0.006

^{a-c} Within rows, mean values with common letter(s) are not different ($P>0.05$)

¹Contrast analysis (p value): total: all treatments; NC versus PC: Negative control versus Positive control; PC versus Zn: Positive control versus Zinc Supplement groups

داد ($P<0.05$). مکمل روی-متیونین در سطوح ۳۰ و ۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به طور معنی‌داری این پارامترها را کاهش داد. سطح ۱۵ میلی‌گرم اثر کمتری داشت و تنها ضربان قلب و نرخ تنفس را به طور جزئی بهبود داد

پاسخ‌های فیزیولوژیکی

اثر تیمارها بر پاسخ‌های فیزیولوژیکی (ضربان قلب، نرخ تنفس و دمای مقعد) در جدول ۴ ارائه شده است. تنش گرمایی در گروه شاهد مثبت به طور معنی‌داری ضربان قلب، نرخ تنفس و دمای مقعد را در مقایسه با گروه شاهد منفی افزایش

جدول ۴. پاسخ‌های فیزیولوژیکی میش‌های دریافت‌کننده سطوح مختلف مکمل روی-متیونین

Parameters	Negative Control	Positive control	Zinc Supplement (mg/kg DM)			P value ¹		
			15	30	45	Total	NC vs PC	PC vs Zn
Heart rate (beats per minute)	72	94	87	78	77	0.001	0.001	0.001
Respiratory rate (breaths per minute)	40	75	63	53	51	0.001	0.008	0.001
Rectal temperature (°C)	38.83	40.37	40.07	39.40	39.37	0.001	0.001	0.001

¹Contrast analysis (p value): total: all treatments; NC versus PC: Negative control versus Positive control; PC versus Zn: Positive control versus Zinc Supplement groups

منفی افزایش داد ($P<0.05$). مکمل روی-متیونین در دوزهای ۳۰ و ۴۵ میلی‌گرم به طور معنی‌داری این تغییرات را تعدیل کرد ($P<0.05$). دوز ۱۵ میلی‌گرم اثر محدودی داشت و تنها بیان IL-6 و HSP70 را به طور جزئی کاهش داد

بیان ژن‌های التهابی و شوک حرارتی

نتایج بیان نسبی ژن‌ها در جدول ۴ ارائه شده است. تنش گرمایی در گروه شاهد مثبت بیان ژن IL-10 را به 63/0 کاهش و بیان IL-6 و HSP70 را به ترتیب به ۲/۸۳ و ۲/۵۲ برابر نسبت به شاهد

جدول ۵. بیان ژن‌های التهابی و شوک حرارتی میش های دریافت کننده سطوح مختلف مکمل روی-متیونین

Relative gene expression	Negative Control	Positive control	Zinc Supplement (mg/kg DM)			P value ¹		
			15	30	45	Total	NC vs PC	PC vs Zn
<i>interleukin-10</i>	1	0.63	0.72	0.91	0.87	0.001	0.001	0.001
<i>interleukin-6</i>	1	2.83	2.33	1.66	1.68	0.001	0.001	0.001
<i>HSP70</i>	1	2.52	2.17	1.53	1.59	0.001	0.009	0.001

¹Contrast analysis (p value): total: all treatments; NC versus PC: Negative control versus Positive control; PC versus Zn: Positive control versus Zinc Supplement groups

بحث

۳۰ و ۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به طور معنی‌داری این اثرات را تعدیل کرد و سطوح SOD، GPX و TAC را به مقادیر نزدیک به گروه شاهد منفی بازگرداند. این بهبود به نقش روی به عنوان کوفاکتور ساختاری در SOD جهت تبدیل سوپراکسید به پرکسید هیدروژن و اثر غیرمستقیم آن بر سنتز گلوکاتیون برای GPX جهت تبدیل پرکسید هیدروژن به آب نسبت داده می‌شود (۳۶، ۳۷). مکانیسم مولکولی احتمالی شامل فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ Nrf2 است که بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی مانند SOD، GPX و کاتالاز را القا می‌کند (۳۸). یافته‌های این تحقیق با مطالعه Mandal و همکاران (۳۹) مطابقت دارد که نشان دادند مکمل‌یاری با روی در گوساله‌های نر دورگ باعث بهبود پاسخ ایمنی و وضعیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود، که این امر به نقش روی به عنوان کوفاکتور آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نسبت داده شد. مطالعات قبلی در گاوهای شیری افزایش قابل توجهی در TAC را با مکمل‌یابی روی-متیونین گزارش کرده‌اند (۴۰)، در حالی که در مطالعه حاضر TAC در دوز ۳۰ میلی‌گرم افزایش بیشتری نشان داد، که می‌تواند به دلیل تفاوت در گونه، شدت تنش گرمایی یا متابولیسم شکمبه‌ای باشد (۴۱). سطح ۳۰ میلی‌گرم در مقایسه با ۴۵ میلی‌گرم اثربخشی بیشتری نشان داد. این تفاوت احتمالاً به جذب بهینه روی در سطح پایین‌تر مربوط می‌شود، زیرا در این سطح سیستم‌های انتقال مانند ZIP4 و ZnT1 به حالت اشباع نمی‌رسند. در سطوح بالاتر، کارایی جذب کاهش می‌یابد و احتمال تداخل با جذب سایر عناصر کم‌مصرف افزایش می‌یابد (۴۲، ۴۳). در مقایسه با مطالعه Pearce و همکاران (۴۴) که در خوک‌ها دوزهای بالاتر روی (۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) اثرات بهتری نشان داد، در نشخوارکنندگان فرم آلی روی-متیونین به دلیل مقاومت به تجزیه شکمبه‌ای و فراهمی زیستی بالاتر، امکان دستیابی به اثرات مشابه را در دوزهای پایین‌تر (۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) فراهم می‌کند. علاوه بر این، در میش‌های غیرآبستن به دلیل عدم وجود فشار متابولیکی ناشی از بارداری، این اثرات محافظتی ممکن است برجسته‌تر باشد (۴۵، ۴۶).

تنش گرمایی با ایجاد اختلال در هموستازی فیزیولوژیکی، افزایش تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر از منابع میتوکندریایی و غیرمیتوکندریایی مانند NADPH اکسیداز، منجر به پراکسیداسیون لیپیدی، آسیب سلولی و التهاب سیستمیک می‌شود (۲۷). همان‌گونه که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، افزایش سطح مکمل روی در جیره موجب افزایش خطی غلظت سرمی روی شد. این روند نشان می‌دهد که حتی تحت شرایط تنش گرمایی نیز با افزایش سطح روی جیره، جذب و تجمع آن در سرم به‌طور مؤثری بهبود یافته است. این نتیجه با گزارش Jamei و همکاران (۲۸) همخوانی دارد که نشان دادند افزودن روی به جیره میش‌های آبستن موجب افزایش غلظت سرمی روی پس از یک هفته شد. همچنین با توجه به اینکه غلظت روی سرم یک شاخص معتبر برای ارزیابی وضعیت دریافت و تغذیه روی است، افزایش مشاهده شده در بره‌های دریافت‌کننده مکمل نسبت به گروه شاهد مثبت، بیانگر بهبود وضعیت روی در شرایط تنش گرمایی است (۲۹). در این مطالعه، افزایش معنی‌دار سطوح مالون‌دی‌آلدئید در گروه کنترل مثبت به میزان در مقایسه با گروه کنترل منفی نشان‌دهنده شدت پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از تنش گرمایی است (۲۷، ۳۰). کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتیون پراکسیداز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در گروه شاهد مثبت، حاکی از تضعیف دفاع آنتی‌اکسیدانی در برابر گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر است (۳۱، ۳۲). این یافته‌ها با نتایج مطالعات پیشین همخوانی دارد که نشان دادند تنش گرمایی در گوسفندان مریوس فعالیت SOD و GPX را تا ۵۰ درصد کاهش و MDA را تا ۷۰ درصد افزایش می‌دهد، نتیجه‌ای که به افزایش تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر و مصرف بیش از حد آنتی‌اکسیدان‌ها نسبت داده می‌شود (۳۳، ۳۴). Chauhan و همکاران (۲۰۱۴) نیز در نشخوارکنندگان کاهش TAC را به عنوان نشانه‌ای از آسیب اکسیداتیو ناشی از تنش گرمایی تأیید کردند، که با نتایج این مطالعه هم‌راستا است (۳۵). مکمل روی-متیونین در دوزهای

در سطح مولکولی، تنش گرمایی بیان ژن التهابی *IL-6* را به $2/83$ برابر و *HSP70* را به $2/52$ برابر افزایش و بیان ژن ضد التهابی *IL-10* را به $0/63$ کاهش داد، که نشان‌دهنده فعال‌سازی مسیر NF- K B توسط گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر و التهاب سیستمیک است (۴۷، ۴۸). افزودن مکمل روی-متیونین به جیره می‌ش‌ها باعث کاهش معنی‌دار بیان ژن‌های پیش التهابی (*IL-6* و *HSP70*) و افزایش معنی‌دار ژن ضد التهابی (*IL-10*) نسبت به می‌ش‌های گروه شاهد مثبت شد. این اثرات تعدیل‌کننده به مهار فسفوریلاسیون زیر واحد *p65* در مسیر NF- K B و فعال‌سازی هم‌زمان مسیری‌های STAT3 و PPAR γ نسبت داده می‌شود که بیان سایتوکین‌های ضد التهابی را تقویت می‌کند (۴۸، ۴۹، ۵۰). مکانیسم دقیق این فرآیند شامل اتصال روی به پروتئین A20 است که به‌عنوان مهارکننده NF- K B عمل کرده و التهاب را سرکوب می‌کند (۵۱). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که مکمل‌یاری روی آلی در گاوها منجر به کاهش ۴۰ تا ۴۵ درصدی بیان ژن *IL-6* می‌شود. این یافته‌ها با کاهش ۴۱ درصدی مشاهده‌شده در مطالعه حاضر (از $2/83$ به $1/66$ در سطح ۳۰ میلی‌گرم) مطابقت دارد (۵۲). مطالعات نشان داده‌اند که فرم‌های آلی روی در مقایسه با فرم‌های معدنی، اثرات مطلوب‌تری بر افزایش بیان ژن *IL-10* دارند؛ یافته‌ای که برتری مکمل روی-متیونین را تأیید می‌کند (۵۳). افزایش بیان ژن *HSP70* در گروه شاهد مثبت، اگرچه یک پاسخ حفاظتی برای جلوگیری از دنا توره شدن پروتئین‌ها محسوب می‌شود، اما بیان بیش‌ازحد آن نشانگر استرس مزمن است (۵۴). در همین راستا، محققان افزایش سه برابری این پروتئین را در گاوه‌های تحت تنش گرمایی گزارش کرده‌اند (۵۵). کاهش سطح *HSP70* در تیمارهای دریافت‌کننده روی-متیونین به کاهش رادیکال‌های آزاد و افزایش سنتز متالوتیونین‌ها نسبت داده می‌شود؛ پروتئین‌هایی که می‌توانند به‌عنوان شپرون‌های جایگزین عمل کنند (۵۴). مکانیسم مولکولی این اثر شامل تعامل روی با فاکتور شوک حرارتی ۱ (HSF1) است که به‌عنوان فاکتور رونویسی ژن *HSP70* عمل می‌کند (۵۵، ۵۶). افزایش ضربان قلب، نرخ تنفس و دمای مقعد در گروه شاهد مثبت نشان‌دهنده تلاش برای دفع گرما از طریق مکانیسم‌های تنظیم دمای بدن مانند تنفس سریع و افزایش گردش خون است که با افزایش متابولیسم پایه و کاهش بهره‌وری انرژی همراه است (۳۳). این یافته‌ها با گزارش‌های قبلی همخوانی دارد که افزایش ۲۰ تا ۳۰ درصدی در ضربان قلب و نرخ تنفس را در گوسفندان تحت تنش گرمایی توصیف

کرده‌اند و آن را به فعال‌سازی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال و افزایش کورتیزول نسبت داده‌اند که منجر به اختلال در تعادل هورمونی و کاهش مصرف خوراک تا ۳۰ درصد می‌شود (۳۳). علاوه بر این، مطالعات قبلی در گوسفندان نشان داده‌اند که افزایش نرخ تنفس به عنوان شاخص اصلی تنش گرمایی با آسیب اکسیداتیو و التهاب عروقی مرتبط است (۵۷). در مطالعه حاضر، دمای مقعد در گروه شاهد مثبت بیش از $1/6$ درجه سلسیوس بالاتر از گروه شاهد منفی بود که با شاخص دما-رطوبت (THI) بالای ۸۴ همخوانی دارد و نشان‌دهنده تنش گرمایی شدید است (۵۸). مکمل روی-متیونین در دوزهای ۳۰ و ۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم این پارامترها را به طور معنی‌داری کاهش داد که نشان‌دهنده بهبود تنظیم دمای بدن و کارایی مکانیسم‌های تنظیم حرارتی است. این اثرات به تقویت دفاع آنتی‌اکسیدانی، کاهش التهاب و بهبود عملکرد میتوکندریایی نسبت داده می‌شود، زیرا کاهش گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر اجازه می‌دهد تا سیستم‌های عروقی و تنفسی کارآمدتر عمل کنند (۵۹، ۶۰). مطالعات قبلی در گوسفندان تحت تنش گرمایی کاهش ۲۰ تا ۳۰ درصدی در نرخ تنفس را با مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی حاوی روی گزارش کرده‌اند (۳۴) که با کاهش ۳۰ درصدی مشاهده‌شده در نرخ تنفس (از ۷۵ به ۵۳ تنفس در دقیقه) در دوز ۳۰ میلی‌گرم در این مطالعه همخوانی دارد و به افزایش فعالیت SOD و GPX نسبت داده شد. همچنین گزارش شده است که مکمل‌یاری ترکیبی آنتی‌اکسیدان‌ها شامل سلنیوم، ویتامین E و روی اثر هم‌افزایی داشته و کاهش بیشتری در ضربان قلب و نرخ تنفس ایجاد می‌کند که پیشنهاد می‌کند مکمل روی-متیونین می‌تواند به عنوان بخشی از استراتژی‌های ترکیبی مورد استفاده قرار گیرد (۶۱). مکانیسم احتمالی شامل تنظیم کانال‌های یونی مانند ZnT1 در سلول‌های عضلانی قلب و عروق است که حساسیت به کورتیزول را کاهش می‌دهد (۶۲). در مقایسه با مطالعات انجام‌شده بر روی طیور که کاهش ۱۵ تا ۲۰ درصدی نرخ تنفس را با مکمل‌یاری روی و ویتامین A در جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی نشان دادند (۶۳)، اثرات در نشخوارکنندگان مانند گوسفند سنجابی ممکن است به دلیل متابولیسم شکمبه‌ای متفاوت و فراهمی زیستی بالاتر فرم‌های آلی روی قوی‌تر باشد (۵۳). کاهش نرخ تنفس در این مطالعه می‌تواند به بهبود مصرف خوراک و آب منجر شود، زیرا تنش گرمایی اغلب ماده خشک مصرفی را تا ۳۰ درصد کاهش می‌دهد و این امر بهره‌وری کلی را افزایش می‌دهد (۶۴).

با این حال، سطح ۱۵ میلی‌گرم اثر کمتری داشت که بر اهمیت تعیین سطح بهینه تأکید می‌کند. در این مطالعه از میش‌های غیرآبستن با هدف حذف تداخلات فیزیولوژیکی و هورمونی مرتبط با آبستنی و شیردهی و تمرکز بر اثرات خالص تنش گرمایی و مکمل روی-متیونین استفاده شد. هرچند نتایج حاصل، نقش مؤثر روی را در کاهش استرس اکسیداتیو و تعدیل پاسخ‌های ایمنی نشان می‌دهد، تعمیم این یافته‌ها به میش‌های آبستن یا دام‌های نر باید با احتیاط انجام شود؛ زیرا در دوره آبستنی نیاز متابولیکی به روی افزایش یافته و در جنس نر نیز تفاوت‌های هورمونی می‌تواند بر مسیرهای اکسیداتیو و پاسخ به مکمل‌ها تأثیرگذار باشد (۶۵). ازاین‌رو، بررسی اثرات وابسته به دوز روی-متیونین در مراحل

مختلف فیزیولوژیکی (آبستنی و شیردهی) و در هر دو جنس در مطالعات آتی پیشنهاد می‌شود. از سوی دیگر، جیره پایه مورد استفاده حاوی حدود ۲۵۰۰ میلی‌گرم متیونین در هر کیلوگرم ماده خشک بود، در حالی‌که متیونین تأمین‌شده از طریق مکمل روی-متیونین در بالاترین سطح تیمار تنها ۹۰ میلی‌گرم در کیلوگرم (کمتر از ۴ درصد متیونین کل جیره) را شامل می‌شد. ازاین‌رو، سهم تغذیه‌ای متیونین همراه مکمل ناچیز ارزیابی شده و تغییرات مشاهده‌شده در شاخص‌های فیزیولوژیک، وضعیت اکسیداتیو و بیان ژن‌های مرتبط با تنش گرمایی، عمدتاً به فراهمی زیستی بالای عنصر روی نسبت داده می‌شود

نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های این پژوهش، می‌توان نتیجه گرفت که مکمل روی-متیونین با مکانیسم‌های مختلفی از جمله تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی، مهار مسیرهای التهابی و تنظیم پاسخ پروتئین‌های شوک حرارتی، یک راهکار تغذیه‌ای مؤثر و عملی برای کاهش پیامدهای زیانبار تنش گرمایی در

گوسفندان سنجابی است. استفاده از این مکمل در سطح ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم جیره می‌تواند به عنوان بخشی از یک استراتژی مدیریتی جامع برای بهبود رفاه، سلامت و بهره‌وری این دام‌های بارز در مناطق گرمسیر و نیمه‌گرمسیر توصیه شود

تقدیر و تشکر

از ریاست محترم مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه به جهت در اختیار قرار دادن امکانات ایستگاه کشاورزی و دامپروری مهرگان تشکر و قدردانی می‌شود

در دسترس بودن

داده‌ها به‌صورت عمومی در دسترس نیستند، اما در صورت درخواست معقول، از طریق نویسنده مسئول قابل دریافت می‌باشند.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع در انجام این پژوهش وجود ندارد.

حمایت مالی

این پژوهش هیچ‌گونه حمایت مالی دریافت نکرده است.

مشارکت نویسندگان

تمام مراحل این پژوهش از جمله طراحی مطالعه انجام فرایند و نوشتن مقاله توسط نویسنده مسئول انجام شده است.

References

1. Habeeb AA, Osman SF, Teama FE, Gad AE. The detrimental impact of high environmental temperature on physiological response, growth, milk production, and reproductive efficiency of ruminants. *Trop Anim Health Prod.* 2023;55(6):388. <https://doi.org/10.1007/s11250-023-03805-y>
2. Aryal B, Kwakye J, Ariyo OW, Ghareeb AF, Milfort MC, Fuller AL, et al. Major oxidative and antioxidant mechanisms during heat stress-induced oxidative stress in chickens. *Antioxidants.* 2025;14(4):471. <https://doi.org/10.3390/antiox14040471>
3. Bernabucci U, Lacetera N, Baumgard LH, Rhoads RP, Ronchi B, Nardone A. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. *Animal.* 2010;4(7):1167-83. <https://doi.org/10.1017/S175173111000090X>
4. Patiabadi Z, Razmkabir M, Esmailizadeh Koshkoiyeh A, Moradi MH, Rashidi A, Mahmoudi P. Whole-genome scan for selection signature associated with temperature adaptation in Iranian sheep breeds. *PLoS One.* 2024;19(8):e0309023. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0309023>
5. Renaudeau D, Collin A, Yahav S, De Basilio V, Gourdine JL, Collier RJ. Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. *Animal.* 2012;6(5):707-28. <https://doi.org/10.1017/S1751731111002448>
6. Masters DG, Fels HE. Zinc supplements and reproduction in grazing ewes. *Biol Trace Elem Res.* 1985;7(2):89-93. <https://doi.org/10.1007/BF02916567>
7. Nagalakshmi D, Dhanalakshmi K, Himabindu D. Effect of dose and source of supplemental zinc on immune response and oxidative enzymes in lambs. *Vet Res Commun.* 2009;33(7):631-44. <https://doi.org/10.1007/s11259-009-9212-9>
8. Oconitrillo M, Wickramasinghe J, Omale S, Beitz D, Appuhamy R. Effects of elevating zinc supplementation on the health and production parameters of high-producing dairy cows. *Animals.* 2024;14(3):395. <https://doi.org/10.3390/ani14030395>
9. Spears JW. Trace mineral bioavailability in ruminants. *J Nutr.* 2003;133(5):1506S-9S. <https://doi.org/10.1093/jn/133.5.1506S>
10. Pang X, Miao Z, Dong Y, Cheng H, Xin X, Wu Y, et al. Dietary methionine restriction alleviates oxidative stress and inflammatory responses in lipopolysaccharide-challenged broilers at early age. *Front Pharmacol.* 2023;14:1120718. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1120718>
11. Yang F, Smith MJ, Siow RC, Aarsland D, Maret W, Mann GE. Interactions between zinc and NRF2 in vascular redox signalling. *Biochem Soc Trans.* 2024;52(1):269-78. <https://doi.org/10.1042/BST20230490>
12. Peng-Winkler Y, Büttgenbach A, Rink L, Wessels I. Zinc supplementation prior to heat shock enhances HSP70 synthesis through HSF1 phosphorylation at serine 326 in human peripheral mononuclear cells. *Food Funct.* 2022;13(17):9143-52. <https://doi.org/10.1039/d2fo01406h>
13. Rabiee AR, Lean IJ, Stevenson MA, Socha MT. Effects of feeding organic trace minerals on milk production and reproductive performance in lactating dairy cows: a meta-analysis. *J Dairy Sci.* 2010;93(9):4239-51. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3058>
14. Iranian Council of Animal Care. Guide to the care and use of experimental animals. Vol 1. Isfahan: Isfahan University of Technology; 1995.
15. National Research Council. Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and New World camelids. Washington, DC: National Academies Press; 2007.
16. Mader TL, Davis MS, Brown-Brandl T. Environmental factors influencing heat stress in feedlot cattle. *J Anim Sci.* 2006;84(3):712-9. <https://doi.org/10.2527/2006.843712x>
17. Marai IF, El-Darawany AA, Fadiel A, Abdel-Hafez MA. Physiological traits as affected by heat stress in sheep—a review. *Small Rumin Res.* 2007;71(1-3):1-12. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.10.003>
18. Danesh Mesgaran M, Kargar H, Janssen R, Danesh Mesgaran S, Ghesmati A, Vatankhah A. Rumen-protected zinc-methionine dietary inclusion alters dairy cow performances, and oxidative and inflammatory status under long-term environmental heat stress. *Front Vet Sci.* 2022;9:935939. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.935939>
19. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967;70(1):158-69.
20. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* 1974;47(3):469-74. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>

21. Draper HH, Hadley M. [43] Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. In: Packer L, editor. *Methods in Enzymology*. Vol 186. Academic Press; 1990. p. 421-31. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86135-I](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86135-I)
22. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996;239(1):70-6. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
23. Rawash RA, Sharaby MA, Hassan GE, Elkomy AE, Hafez EE, Hafsa SH, et al. Expression profiling of HSP 70 and interleukins 2, 6 and 12 genes of Barki sheep during summer and winter seasons in two different locations. *Int J Biometeorol*. 2022;66(10):2047-53. <https://doi.org/10.1007/s00484-022-02339-6>
24. Dangi SS, Gupta M, Maurya D, Yadav VP, Panda RP, Singh G, et al. Expression profile of HSP genes during different seasons in goats (*Capra hircus*). *Trop Anim Health Prod*. 2012;44(8):1905-12. <https://doi.org/10.1007/s11250-012-0155-8>
25. Bharati J, Dangi SS, Chouhan VS, Mishra SR, Bharti MK, Verma V, et al. Expression dynamics of HSP70 during chronic heat stress in Tharparkar cattle. *Int J Biometeorol*. 2017;61(6):1017-27. <https://doi.org/10.1007/s00484-016-1281-1>
26. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *Methods*. 2001;25(4):402-8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
27. Belhadj Slimen I, Najar T, Ghram A, Abdrrabba MJ. Heat stress effects on livestock: molecular, cellular and metabolic aspects, a review. *J Anim Physiol Anim Nutr*. 2016;100(3):401-12. <https://doi.org/10.1111/jpn.12379>
28. 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;34(9):4860-8. <https://doi.org/10.1080/10495398.2022.2151346>
29. Tórtora-Pérez JL. The importance of selenium and the effects of its deficiency in animal health. *Small Rumin Res*. 2010;89(2-3):185-92. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.12.042>
30. Sivakumar AV, Singh G, Varshney VP. Antioxidants supplementation on acid base balance during heat stress in goats. *Asian-Australas J Anim Sci*. 2010;23(11):1462-8. <https://doi.org/10.5713/ajas.2010.90471>
31. Sejian V, Maurya VP, Naqvi SM. Adaptive capability as indicated by endocrine and biochemical responses of Malpura ewes subjected to combined stresses (thermal and nutritional) in a semi-arid tropical environment. *Int J Biometeorol*. 2010;54(6):653-61. <https://doi.org/10.1007/s00484-010-0341-1>
32. Ashrafi H, Sadeghi AA, Chamani M. Effect of selenium supplementation on antioxidant indices and metabolism-related hormones in rats exposed to heat stress. *Iran J Biol Sci*. 2023;17(4):35-47. <https://doi.org/10.30495/zisti.2023.1974656.1147>
33. Sejian V, Bhatta R, Gaughan JB, Dunshea FR, Lacetera N. Adaptation of animals to heat stress. *Animal*. 2018;12(s2):s431-44. <https://doi.org/10.1017/S1751731118001945>
34. Mahjoubi E, Amanlou H, Mirzaei-Alamouti HR, Aghaziarati N, Yazdi MH, Noori GR, et al. The effect of cyclical and mild heat stress on productivity and metabolism in Afshari lambs. *J Anim Sci*. 2014;92(3):1007-14. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-7153>
35. Chauhan SS, Celi P, Leury BJ, Clarke IJ, Dunshea FR. Dietary antioxidants at supranutritional doses improve oxidative status and reduce the negative effects of heat stress in sheep. *J Anim Sci*. 2014;92(8):3364-74. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-7714>
36. Marreiro DD, Cruz KJ, Morais JB, Beserra JB, Severo JS, De Oliveira AR. Zinc and oxidative stress: current mechanisms. *Antioxidants*. 2017;6(2):24. <https://doi.org/10.3390/antiox6020024>
37. Jamei M, Sadeghi AA, 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. *Iran J Biol Sci*. 2022;17(3):29-39. <https://doi.org/10.30495/zisti.2023.1973380.1144>
38. Gawel M, Olbert M, Wyszogrodzka G, Młyniec K, Librowski T. Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc: zinc-dependent NF-κB signaling. *Inflammopharmacology*. 2017;25(1):11-24. <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0309-4>
39. Mandal GP, Dass RS, Isore DP, Garg AK, Ram GC. Effect of zinc supplementation from two sources on growth, nutrient utilization and immune response in male crossbred cattle (*Bos indicus* × *Bos taurus*) bulls. *Anim Feed Sci Technol*. 2007;138(1-2):1-12. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.09.014>
40. Cope CM, Mackenzie AM, Wilde D, Sinclair LA. Effects of level and form of dietary zinc on dairy cow performance and health. *J Dairy Sci*. 2009;92(5):2128-35. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1232>
41. Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, Itsumura N. The physiological, biochemical, and molecular roles of zinc transporters in zinc homeostasis and metabolism. *Physiol Rev*. 2015;95(3):749-84.

<https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2014>

42. Liuzzi JB, Cousins RJ. Mammalian zinc transporters. *Annu Rev Nutr.* 2004;24(1):151-72. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.24.012003.132402>

43. Fosmire GJ. Zinc toxicity. *Am J Clin Nutr.* 1990;51(2):225-7. <https://doi.org/10.1093/ajcn/51.2.225>

44. Pearce SC, Gabler NK, Ross JW, Escobar J, Patience JE, Rhoads RP, et al. The effects of heat stress and plane of nutrition on metabolism in growing pigs. *J Anim Sci.* 2013;91(5):2108-18. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5738>

45. Cao J, Henry PR, Guo R, Holwerda RA, Toth JP, Littell RC, et al. Chemical characteristics and relative bioavailability of supplemental organic zinc sources for poultry and ruminants. *J Anim Sci.* 2000;78(8):2039-54. <https://doi.org/10.2527/2000.7882039x>

46. Spears JW. Zinc methionine for ruminants: relative bioavailability of zinc in lambs and effects of growth and performance of growing heifers. *J Anim Sci.* 1989;67(3):835-43. <https://doi.org/10.2527/jas1989.673835x>

47. Wasti S, Sah N, Mishra B. Impact of heat stress on poultry health and performances, and potential mitigation strategies. *Animals.* 2020;10(8):1266. <https://doi.org/10.3390/ani10081266>

48. Kloubert V, Rink L. Zinc as a micronutrient and its preventive role of oxidative damage in cells. *Food Funct.* 2015;6(10):3195-204. <https://doi.org/10.1039/c5fo00630a>

49. Bonaventura P, Benedetti G, Albarède F, Miossec P. Zinc and its role in immunity and inflammation. *Autoimmun Rev.* 2015;14(4):277-85. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.11.008>

50. Ashrafi H. Effects of Dietary Organic Selenium Levels on Immunoglobulin G Concentration and Expression of INF- γ , IL-2, and IL-6 Genes in Female Wistar Rats. *Iran J Biol Sci.* 2023; [Volume/Issue]:71-84. <https://doi.org/10.71631/zisti.2023.1123716>

51. Prasad AS. Zinc: an antioxidant and anti-inflammatory agent: role of zinc in degenerative disorders of aging. *J Trace Elem Med Biol.* 2014;28(4):364-71. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.07.019>

52. Nayeri A, Upah NC, Sucu EK, Sanz-Fernandez MV, DeFrain JM, Gorden PJ, et al. Effect of the ratio of zinc amino acid complex to zinc sulfate on the performance of Holstein cows. *J Dairy Sci.* 2014;97(7):4392-404. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7541>

53. Spears JW, Kegley EB. Effect of zinc source (zinc oxide vs zinc proteinate) and level on performance, carcass characteristics, and immune response of growing and finishing steers. *J Anim Sci.* 2002;80(10):2747-52. <https://doi.org/10.2527/2002.80102747x>

doi.org/10.2527/2002.80102747x

54. Collier RJ, Collier JL, Rhoads RP, Baumgard LH. Invited review: genes involved in the bovine heat stress response. *J Dairy Sci.* 2008;91(2):445-54. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0540>

55. Kapila N, Kishore A, Sodhi M, Sharma A, Mohanty AK, Kumar P, et al. Temporal changes in mRNA expression of heat shock protein genes in mammary epithelial cells of riverine buffalo in response to heat stress in vitro. *Int J Anim Biotechnol.* 2013;3(1):3-9.

56. Krężel A, Maret W. The biological inorganic chemistry of zinc ions. *Arch Biochem Biophys.* 2016;611:3-19. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.04.010>

57. Al-Dawood A. Towards heat stress management in small ruminants-a review. *Ann Anim Sci.* 2017;17(1):59-88. <https://doi.org/10.1515/aoas-2016-0068>

58. Armstrong DV. Heat stress interaction with shade and cooling. *J Dairy Sci.* 1994;77(7):2044-50. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77149-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77149-6)

59. Kumar BV, Singh G, Meur SK. Effects of addition of electrolyte and ascorbic acid in feed during heat stress in buffaloes. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2010;23(7):880-8. <https://doi.org/10.5713/ajas.2010.90053>

60. Ganaie AH, Ghasura RS, Mir NA, Bumla NA, Sankar G, Wani SA. Biochemical and physiological changes during thermal stress in bovines: A review. *J Vet Sci Technol.* 2013;4(1):1-6.

61. Sgorlon S, Stradaoli G, Zanin D, Stefanon B. Biochemical and molecular responses to antioxidant supplementation in sheep. *Small Rumin Res.* 2006;64(1-2):143-51. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.04.009>

62. Maywald M, Wessels I, Rink L. Zinc signals and immunity. *Int J Mol Sci.* 2017;18(10):2222. <https://doi.org/10.3390/ijms18102222>

63. Sahin K, Orhan C, Tuzcu M, Sahin N, Hayirli A, Bilgili S, et al. Lycopene activates antioxidant enzymes and nuclear transcription factor systems in heat-stressed broilers. *Poult Sci.* 2016;95(5):1088-95. <https://doi.org/10.3382/ps/pew012>

64. Bernabucci U, Lacetera N, Baumgard LH, Rhoads RP, Ronchi B, Nardone A. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. *Animal.* 2010;4(7):1167-83. <https://doi.org/10.1017/S175173111000090X>

65. Celi P. Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2011;33(2):233-40. <https://doi.org/10.3109/08923973.2010.514917>