Iranian Journal of Biological Sciences.2023; 17(4):35-47

Original Article

Iranian Journal of Biological Sciences

https://zisti.iauvaramin.ac.ir

Effect of selenium supplementation on antioxidant indices and metabolism-related hormones in rats exposed to heat stress

Hamid Ashrafi1, Ali Asghar Sadeghi2,, Mohammad Chamani3*

1- Ph.D. Student, Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Associate ProfessorDepartment of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3- full ProfesorDepartment of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

research of place :Razi Laboratory, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Article Info

Article History:
received 12.09.2022
revised 02.16.2023*9*
accepted 06.11.2023
online 06.11.2023

KeyWords:
creatinine
cortisol
glutathione peroxidase
hemoglobin
Insulin
malondialdehyde

***Corresponding author:**
E-mail address
ashrafihamid1071395@gmail.com
aasdghi@gmail.com &
a.sadeghi@srbiau.ac.ir
m.chamani@srbiau.ac.ir

Abstract

Introduction : High temperature causes oxidative stress in the body of animals. Selenium is a trace mineral that affects the health and performance of the body in stressful conditions. There are limited studies on the effects of different doses of selenium in long-term heat stress conditions on physiological parameters and health indicators

Aim: This study was conducted to determine the effects of different doses of selenium from selenium-methionine supplement on the antioxidant status (glutathione concentration, activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase), liver and kidney health index (the activity of transferase enzymes and creatinine concentration) and concentration of metabolism-related hormones (insulin, cortisol, triiodothyronine and tetra-iodothyronine).

Materials and methods: In a completely randomized design, 25 female rats (4 weeks old, 70±1.56 g body weight) were randomly divided into five groups and five replicates. Five rats were placed at standard temperature during the experiment period and the rest of the rats were placed under heat stress (38 ± 2 °C for 6 hours/day). Rats in the negative control group (without heat stress) and positive control (heat stress) were fed with standard pellets without additive and the other three groups were fed with standard pellets plus 0.15, 0.30 and 0.45 mg selenium/kg as a selenium-methionine supplement for 30 days.

Results: Rats receiving selenium had more hemoglobin and alanine transaminase enzyme activity (P=0.001) compared to the positive control group. Cortisol concentration in the positive control group was higher than the negative control group (P=0.001). Adding selenium to the diet of rats under heat stress decreased (P=0.001) the concentration of cortisol, and increased the concentration of insulin and triiodothyronine compared to the positive control group. The serum malondialdehyde of the positive control was higher than the negative control and other experimental groups (P=0.001).

Conclusion: According to the results of this study, heat stress causes oxidative stress in the body and causes changes in the hormonal concentration and the activity of the body's enzymes. In overall, it can be concluded that higher selenium supplementation (0.45 mg/kg) is optimal for improving the liver and kidney indices, hormone concentration and antioxidant response in rats under heat stress conditions.

Cite this article:Ashrafi H., Sadeghi A.A*, Chamani M. Effect of selenium supplementation on antioxidant indices and metabolism-related hormones in rats exposed to heat stress.Iranian Journal of Biological Sciences. 2023; 17(4): 35-47

doi 10.30495/zisti.2023.1974656.1147 DOR 20.1001.1.17354226.1402.17.4.3.3
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 سلنیوم بر شاخص های آنتی اکسیدانی و غلظت هورمون های موثر بر متابولیسم در موش صحرایی در معرض تنش گرمایی

حمید اشرفی۱، علی اصغر صادقی ۲،*، محمد چمنی ۳

۱ دانشجوی دکتری،گروه علوم دامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامي، تهران، ایران

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

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

محل انجام تحقیق : آزمایشگاه رازی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامي، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
ارسال ۱۴۰۱/۰۹/۱۸
بازنگری ۱۴۰۱/۱۱/۲۷
پذیرش ۱۴۰۲/۰۳/۲۱
نمایه ۱۴۰۲/۰۳/۲۱

کلمات کلیدی
انسولین
کراتینین
کورتیزول
گلوتاتیون پراکسیداز
مالون دی آلدئید
هموگلوبین

* نویسنده مسؤل

ashrafihamid1071395@gmail.com
aasdghi@gmail.com &
a.sadeghi@srbiau.ac.ir
m.chamani@srbiau.ac.ir

چکیده

مقدمه: دمای محیطی بالا سبب ایجاد تنش اکسیداتیو در بدن حیوانات می شود. سلنیوم ماده معدنی کمیابی است که در شرایط تنش بر سلامتی و عملکرد بدن اثر دارد. مطالعات محدودی در زمینه اثر دوزهای مختلف سلنیوم در شرایط تنش گرمایی طولانی مدت بر فراسنجه های فیزیولوژیکی و شاخص های سلامتی وجود دارد.

هدف: پژوهش کنونی به منظور تعیین اثرات دوزهای مختلف سلنیوم از مکمل سلنیوم-متیونین بر وضعیت آنتی‌اکسیدانی)غلظت گلوتاتیون، فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز)، شاخص سلامتی کبد و کلیه (فعالیت آنزیم های ترانسفرازی و غلظت کراتینین) و غلظت هورمون‌های موثر بر متابولیسم (انسولین، کورتیزول، تری یدوتیرونین و تترا-یدوتیرون) انجام شد.

مواد و روش ها: در طرح کاملا تصادفی، ۲۵ سر موش صحرایی ماده (سن ٤ هفته، وزن بدن ۱/۵٦ ± ۷۰ گرم) نژاد ویستار به طور تصادفی به پنج گروه و هر گروه پنج سر موش صحرایی تقسیم شدند. تعداد ۵ سر موش صحرایی در کل دوره آزمایش در دمای استاندارد و بقیه موش های صحرایی در تنش گرمایی (دمای ۳۸±۲ درجه سلسیوس به مدت ٦ ساعت در روز) قرار داده شدند. موش های صحرایی گروه کنترل منفی (بدون تنش گرمایی) و کنترل مثبت (تنش گرمایی) پلت استاندارد بدون افزودنی و سه گروه دیگر به ترتیب پلت استاندارد به اضافه ۰/۱۵، ۰/۳۰ و ۰/٤۵ میلی گرم بر کیلوگرم سلنیوم از مکمل سلنیوم-متیونین به مدت ۳۰ روز دریافت کردند.

نتایج: موش‌های صحرایی تحت تنش گرمایی و دریافت کننده سلنیوم به طور معنی داری هموگلوبین و فعالیت آنزیم آلانین ترانس آمیناز بیشتری در مقایسه با گروه کنترل مثبت داشتند (P=۰/۰۰۱). غلظت کورتیزول در موش های گروه کنترل مثبت نسبت به کنترل منفی بیشتر بود (P=۰/۰۰۱). افزودن سلنیوم به جیره موش های تحت تنش گرمایی سبب کاهش غلظت کورتیزول، افزایش غلظت انسولین و تری یدو تیرونین در مقایسه با گروه کنترل مثبت شد (P=۰/۰۰۱). مالون دی آلدئید سرم موش های کنترل مثبت به طور معنی داری بیشتر از کنترل منفی و سایر گروه های آزمایشی بود (P=۰/۰۰۱). افزودن سلنیوم به جیره سبب کاهش معنی دار غلظت مالون دی آلدئید شد و موش های دریافت کننده سلنیوم در دوز ۰/٤۵ میلی گرم بر کیلوگرم کمترین غلظت مالون دی آلدئید داشتند. بیشترین غلظت گلوتاتیون و گلوتاتیون پراکسیداز به گروه دریافت کننده سلنیوم در دوز ۰/٤۵ میلی گرم تعلق داشت.

نتیجه گیری: بنابر نتایج این پژوهش تنش گرمایی سبب ایجاد تنش اکسیداتیو در بدن می شود و تغییراتی را در غلظت هورمون ها و فعالیت آنزیم های بدن ایجاد می کند. به طور کلی، می توان نتیجه گرفت که مکمل سلنیوم با غلظت ۰/٤۵ میلی گرم بر کیلوگرم موجب بهبود شاخص های کبدی وکلیوی، غلظت هورمون ها و پاسخ آنتی اکسیدانی در موش های صحرایی تحت شرایط تنش گرمایی می-شود.

شیوه آدرس‌دهی این مقاله : اشرفی ح.، صادقی ع.الف*، چمنی م.اثر سلنیوم بر شاخص های آنتی اکسیدانی و غلظت هورمون های موثر بر متابولیسم در موش صحرایی در معرض تنش گرمایی.مجله دانش زیستی ایران. ۱۴۰۱ ؛ ۱۷(٤):۳۵-٤۷

DOR 20.1001.1.17354226.1402.17.4.3.3
doi 10.30495/zisti.2023.1974656.1147

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا شاپا چاپی: ۱۷۳۵-٤۲۲٦ شاپا الکترونیکی: ۲۷۱۷-٤۵۹X نویسندگان: © حق مؤلف

مقدمه:

سلنیوم عنصر کمیاب ضروری برای عملکرد طبیعی فرآیندهای مختلف بدن ازجمله ایمنی (۱،۲)، دفاع آنتی‌اکسیدانی (۳،٤) و متابولیسم بدن از طریق هورمون‌های تیروئید (۵) است. گلوتاتیون پراکسیداز، سلنوپروتئین‌ها، یدوتیرونین دیودینازها، و تیوردوکسین ردوکتاز پروتئین‌های مسئول انجام فرآیندهای مذکور در بدن هستند که در ساختار، پایداری و عملکرد آن‌ها سلنیوم نقش دارد (٤،۵).سلنوپروتئین‌های آنتی‌اکسیدانی مسئول محافظت از غشاءهای بیولوژیکی در برابر آسیب اکسیداتیو می‌باشند. علاوه بر این، سلنیوم بر پاسخ ایمنی از طریق ساخت بیومارکرهای التهابی تأثیر می‌گذارد (٦). به دلیل کمبود سلنیوم در خاک و قابلیت جذب کم آن در گیاهان، مواد غذایی حاوی مقدار کافی سلنیوم نبوده و کمبود سلنیوم در انسان و حیوانات شایع است (۷) در فصول گرم سال در مناطق معتدل و بویژه در مناطق گرمسیری، دمای بالای محیط عامل اصلی تنش است که بر مصرف غذا، دریافت انرژی، دفع حرارت اضافی از بدن، مصرف آب، نظام هورمونی، وضعیت آنتی اکسیدانی و تعادل مواد معدنی در انسان و حیوانات تأثیر می‌گذارد (۸). تنش گرمایی سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و در نتیجه کاهش غلظت مواد معدنی کمیاب سرم درگیر در دفاع آنتی اکسیدانی در بدن می‌شود (۹).

علاوه بر این، تنش گرمایی متابولیسم بدن را افزایش می‌دهد که منجر به افزایش نیاز به مواد آنتی اکسیدانی می‌شود (۸).با توجه به تغییرات اقلیمی و گرمایش جهانی دمای زمین پیش‌بینی می‌شود در دهه‌های آینده شرایط تنش گرمایی شدیدتری در بیشتر نقاط ایجاد شود (۱۰).

همچنین پیش‌بینی شده است که تغییر آب و هوا و محتوی کربن آلی خاک سبب کاهش مقدار سلنیوم قابل جذب توسط گیاهان در خاک‌های کشاورزی شود که می‌تواند سبب شدیدتر شدن کمبود سلنیوم در بدن حیوانات و انسان شود (۱۱).بنابراین انجام پژوهش برای کاهش تنش ناشی از دمای بالای محیطی ضروری است تا در آینده بتوان بر مشکلات غلبه کرد. برای کاهش تنش گرمایی در حیوانات به رویکردهای چند جانبه شامل بهبود شرایط جیره، جایگاه نگهداری، بهداشت و مدیریت نیاز دارد. دستکاری در جیره غذایی راحت‌ترین و اقتصادی‌ترین رویکرد در مقایسه با تغییر در سایر عوامل برای مقابله با اثرات نامطلوب تنش گرمایی است (۸). با توجه به نقش مهم سلنیوم در متابولیسم، بهینه‌سازی مقدار آن در جیره غذایی برای افزایش پاسخ‌های ایمنی و وضعیت آنتی‌اکسیدانی بدن می‌تواند به کاهش اثرات نامطلوب تنش گرمایی در حیوانات کمک کند. در مطالعات متعددی اثرات منابع مختلف سلنیوم بر پاسخ‌های ایمنی و آنتی اکسیدانی در پرندگان و سایر دام‌ها گزارش شده است (٦-۲). حداقل مقدار سلنیوم توصیه شده توسط انجمن تحقیقات ملی (۱۲)

برای موش صحرایی ۰/۱ میلی گرم بر کیلوگرم است. این عدد حداقل مقدار سلنیوم مورد نیاز موش صحرایی در شرایط طبیعی است. در شرایط تنش مقدار نیاز به مواد آنتی اکسیدانی افزایش می یابد و نیاز به این مواد با حالت طبیعی فرق دارد. با توجه به مقدار کم سلنیوم در مواد خوراکی، در این پژوهش مقادیر سلنیوم با منشاء آلی در مقادیر ۰/۱۵ تا ۰/٤۵ میلی گرم مورد ارزیابی قرار گرفت. در منابع علمی منتشر شده و در دسترس، در باره اثر افزودن دوزهای مختلف سلنیوم از مکمل سلنیوم-متیونین بر فراسنجه‌های ایمنی و آنتی اکسیدانی در شرایط تنش گرمایی به مدت طولانی مطالعات محدودی انجام شده است (۱۳).موش صحرایی با توجه به شرایط متابولیکی بدن مدل مناسبی برای حیوانات تک معده‌ای جهت بررسی اثرات تغذیه‌ای و فیزیولوژیکی مواد معدنی است. بنابر این پژوهش کنونی به منظور تعیین اثرات دوزهای مختلف سلنیوم از مکمل سلنیوم-متیونین بر وضعیت آنتی‌اکسیدانی، شاخص سلامتی کبد و کلیه و غلظت هورمون‌های موثر بر متابولیسم موش صحرایی در معرض تنش گرمایی به مدت یک ماه انجام شد.

این مطالعه در حیوانخانه آزمایشگاه رازی واحد علوم و تحقیقات انجام شد. رویه‌های مربوط به جابجایی حیوانات، مراقبت، کار و جمع‌آوری نمونه‌ها کاملاً طبق دستورالعمل‌ها و نظارت آزمایشگاه رازی و با تصویب موضوع در معاونت پژوهشی واحد علوم و تحقیقات انجام شد.

مواد و روش‌ها:

این مطالعه در حیوانخانه آزمایشگاه رازی واحد علوم و تحقیقات انجام شد. رویه‌های مربوط به جابجایی حیوانات، مراقبت، کار و جمع‌آوری نمونه‌ها کاملاً طبق دستورالعمل‌ها و نظارت آزمایشگاه رازی و با تصویب موضوع در معاونت پژوهشی واحد علوم و تحقیقات انجام شد.

حیوانات مورد استفاده

این مطالعه به صورت تجربی و بر روی مدل حیوانی (موش صحرایی) انجام شد. موش‌های صحرایی ماده تازه از شیرگرفته شده نژاد ویستار از موسسه سرم‌سازی کرج خریداری و در قفس‌های بزرگ به صورت ۵ حیوان در یک قفس بزرگ با بستر پوسته برنج اتوکلاو شده نگهداری شدند. موش‌ها برای سازگاری با شرایط محیط به مدت یک هفته در حیوانخانه نگهداری و به طور آزادانه به غذای پلت استاندارد و آب آشامیدنی دسترسی داشتند. شرایط محیطی طی دوره سازگاری رطوبت (۵۰٪)، نور (سیکل۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی) و دمای۲±۳۱ درجه سلسیوس بود. در طرح کاملا تصادفی، ۲۵ سر موش صحرایی ماده با سن ٤ هفته و وزن بدن ۱/۵٦ ± ۷۰ گرم به طور تصادفی به پنج گروه و هر گروه پنج سر موش تقسیم شدند. تعداد ۵ سر موش صحرایی در کل دوره آزمایش در دمای استاندارد نگهداری شدند و به عنوان گروه کنترل منفی در این آزمایش برچسب زده شدند. بقیه موش‌های صحرایی در شرایط رطوبت (۵۰٪)، نور (سیکل۱۲ساعت نور و ۱۲ساعت تاریکی) و دمای۲±۳۱ درجه سلسیوس طی ۱۸ ساعت و دمای ۲±۳۸ درجه سلسیوس به مدت ٦ ساعت در روز (جهت ایجاد تنش گرمایی) قرار داده شدند. طی مدت تنش گرمایی شاخص دما-رطوبت ۵۲ درجه سلسیوس بود. یکی از گروه‌ها در موش‌های صحرایی تحت تنش گرمایی به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد و برچسب کنترل مثبت زده شد.

گروه های آزمایشی

موش‌های صحرایی گروه کنترل منفی و کنترل مثبت پلت استاندارد بدون افزودنی و چهار گروه دیگر به ترتیب پلت استاندارد به اضافه ۰/۱۵، ۰/۳۰ و ۰/٤۵ میلی گرم بر کیلوگرم سلنیوم از مکمل سلنیوم-متیونین به مدت ۳۰ روز دریافت کردند. پلت استاندارد حاوی ۰/۰۵ میلی گرم عنصر سلنیوم در هر کیلوگرم ماده خشک بود. برای تهیه پلت حاوی مکمل سلنیوم-متیونین، ابتدا پلت‌های استاندارد آسیاب شد و پس از محاسبه ماده خشک، مقدار لازم از مکمل سلنیوم-متیونین افزوده و مجدد با دستگاه پلت ساز سرد، پلت گردید. برای هر دو گروه کنترل نیز پلت‌ها مجددا به همین شیوه آسیاب و از نو تهیه شد تا اثرات احتمالی عمل آوری بر بافت فیزیکی و ترکیب شیمیایی یکسان‌سازی شود.

نمونه گیری خون

در پایان مطالعه از بزرگ سیاهرگ زیرین موش‌های صحرایی خون‌گیری 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 سلسیوس تا شروع آزمایش‌های بیوشیمیایی نگهداری گردید.

اندازه گیری فراسنجه های بیوشیمیایی خون

مقدار هموگلوبین خون با روش سیانومتمیوگلوبین توصیف شده توسط Drabkin و Austin (١٤) انجام شد. فعالیت آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز سرم و مقدار کراتینین با استفاده بنابر دستورالعمل سازنده توسط کیت‌های شرکت پارس آزمون (تهران، ایران) و دستگاه آنالایزر فوتومتریک اندازه‌گیری شد. فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز به روش Paglia and Valentine (۱۵) و سوپراکسید دیسموتاز در سرم به روش Marklund و Marklund (١٦) با استفاده از کیت‌های تجاری (Randox Laboratories Ltd. Ardmore، Crumlin، UK) و مطابق دستورالعمل سازنده اندازه‌گیری شد. سطوح سرمی مالون دی آلدئید به عنوان محصول پراکسیداسیون لیپیدی بر اساس روش تیوباربیتوریک اسید اندازه‌گیری شد (۱۷). ظرفیت آنتی اکسیدانی کل سرم بر اساس روش FRAP

(۱۸) و سطح گلوتاتیون ردوکتاز به روش Mannervik (۱۹) اندازه‌گیری شد.

هورمون های سرم

هورمون های کورتیزول (Catalogue No-MSE-۵۰۰۰)، انسولین (Catalogue No-MEE-۰۹۰۰)، تری یدوتیرونین (Catalogue No-TFE-۲۳۰۰) و ترا-یدوتیرون (Catalogue No-TFE-۲٤۰۰) در سرم موش صحرایی با استفاده از کیت های الایزا (LDN, Nordhorn, Germany) و مطابق با دستورالعمل سازنده آنالیز شد.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار (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 Shapiro-Wilk استفاده شد. مقایسه میانگین ها بین همه گروه های آزمایشی با استفاده از آزمون توکی با سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. بین کنترل منفی و کنترل مثبت مقایسه میانگین با استفاده از آزمون t-student انجام شد و P-value در جداول گزارش شد. بین گروه کنترل مثبت و گروه های دریافت کننده سلنیوم نیز مقایسه میانگین با استفاده از آزمون توکی انجام شد و P-value در جداول گزارش شد (۲۰).

نتایج:

غلظت هموگلوبین خون و شاخص های سلامتی کبد وکلیه

تفاوت معنی داری بین غلظت هموگلوبین خون موش‌های صحرایی در گروه های آزمایشی مختلف مشاهده شد (جدول ۱). غلظت هموگلوبین خون موش های کنترل مثبت به طور معنی داری کمتر از کنترل منفی بود (۰۰۳/ P =۰). موش‌های تحت تنش گرمایی و دریافت کننده سلنیوم به طور معنی داری هموگلوبین بیشتری (P=۰/۰۰۱). در مقایسه با گروه کنترل مثبت داشتند. غلظت کراتنین در سرم موش های کنترل مثبت بیشتر از کنترل منفی بود (P=۰/۰۲۵۰). تفاوت معنی داری بین دوزهای مختلف سلنیوم در غلظت کراتنین مشاهده نشد، ولی تفاوت معنی داری بین غلظت کراتنین این موش ها با کنترل مثبت مشاهده شد (۰۱٤/ ۰ =P). فعالیت آنزیم آلانین ترانس آمیناز موش های گروه کنترل مثبت به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل منفی افزایش یافت (P=۰/۰۰۱). فعالیت آنزیم آلانین ترانس آمیناز سرم در موش های تحت تنش گرمایی و دریافت کننده سلنیوم به طور معنی داری کمتر از گروه کنترل مثبت بود (P=۰/۰۰۱). فعالیت آنزیم آسپارتات ترانس آمیناز تحت تأثیر شرایط دمایی و دوز سلنیوم جیره غذایی قرار نگرفت (P<۰/۰۵).

هورمون های سرم

داده‌های مربوط به غلظت هورمون‌های سرم موش‌های صحرایی در جدول ۲ گزارش شده است. غلظت کورتیزول در موش های صحرایی گروه کنترل مثبت نسبت به کنترل منفی بیشتر بود (P=۰/۰۰۱). افزودن سلنیوم به جیره موش های صحرایی تحت تنش گرمایی سبب کاهش (P=۰/۰۰۱) غلظت کورتیزول در مقایسه با گروه کنترل مثبت شد. تفاوت معنی داری بین غلظت انسولین سرم موش های صحرایی کنترل منفی با کنترل مثبت مشاهده نشد. موش های کنترل مثبت کمترین غلظت انسولین را داشتند و افزودن سلنیوم به جیره سبب افزایش غلظت انسولین سرم خون شد (P=۰/۰۰۸). بیشترین غلظت تری یدوتیرونین به گروه دریافت کننده سلنیوم در دوز ۰/٤۵ میلی گرم بر کیلوگرم وکمترین غلظت به گروه کنترل منفی تعلق داشت. تفاوت معنی داری بین کنترل منفی با کنترل مثبت برای غلظت تری یدوتیرونین مشاهده نشد (P<۰/۰۵). غلظت ترا یدوتیرونین تحت تأثیر شرایط دمایی و دوز سلنیوم جیره غذایی قرار نگرفت (P<۰/۰۵).

جدول۱-غلظت هموگلوبین خون، کراتینین سرم و فعالیت آنزیم‌های کبدی موش‌های صحرایی در شرایط دمایی مختلف و دریافت کننده دوزهای مختلف سلنیوم

Temperature condition	Treatments	Blood hemoglobin, g%	Creatinine mg/dL	Alanine aminotransferase, U/mL	Aspartate aminotransferase, U/mL
No heat stress	Negative control	11.9[a]	0.321[b]	82.7[b]	22.9
Heat stress	Positive control	9.11[b]	0.389[a]	114.1[a]	26.1
	15 mg Se/kg	12.2[a]	0.354[ab]	81.3[b]	25.4
	30 mg Se/kg	12.4[a]	0.323[b]	84.7[b]	24.2
	45 mg Se/kg	12.6[a]	0.302[b]	82.4[b]	23.4
	SEM	0.28	0.0135	2.20	0.67
	P-value	0.005	0.009	0.001	0.163
Contrast analysis P-value	NC vs PC	0.003	0.025	0.001	0.08
	PC vs Se	0.001	0.014	0.001	0.093

در هر ستون تفاوت میانگین‌های با حروف غیر مشابه معنی‌دار است (P<0.05).

شاخص های آنتی اکسیدانی

در جدول ۳ غلظت مالون دی آلدئید، گلوتاتیون، گلوتاتیون پراکسیداز و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز گزارش شده است. غلظت مالون دی آلدئید سرم موش های صحرایی کنترل مثبت به طور معنی داری بیشتر از کنترل منفی و سایر گروه های آزمایشی بود (P=۰/۰۰۱). افزودن سلنیوم به جیره سبب کاهش معنی دار غلظت مالون دی آلدئید شد و موش های دریافت کننده سلنیوم در دوز ۰/٤٥ میلی گرم بر کیلوگرم کمترین غلظت مالون دی آلدئید داشتند. بیشترین غلظت گلوتاتیون و گلوتاتیون پراکسیداز به گروه دریافت کننده سلنیوم در دوز ۰/٤٥ میلی گرم تعلق داشت. تفاوت معنی داری بین کنترل منفی با کنترل مثبت برای غلظت گلوتاتیون و گلوتاتیون پراکسیداز مشاهده نشد (P<۰/۰۵). تفاوت معنی داری بین فعالیت سوپراکسید دیسموتاز گروه کنترل مثبت با کنترل منفی مشاهده نشد. بین گروه کنترل مثبت و گروه های دریافت کننده سلنیوم تفاوت مشاهده شد. موش های صحرایی دریافت کننده سلنیوم در دوز ۰/۳ میلی گرم بر کیلوگرم بیشترین فعالیت سوپراکسید دیسموتاز را داشتند (P=۰/۰۰٦).

جدول۱- هورمون های موثر بر متابولیسم در موش‌های صحرایی در شرایط دمایی مختلف و دریافت کننده دوزهای مختلف سلنیوم

Temperature condition	Treatments	Cortisol ng/mL	Insulin IU/mL	T3 ng/mL	T4 nmol/mL
No heat stress	Negative control	780^{b}	5.8^{bc}	3.4^{d}	45.6
Heat stress	Positive control	891^{a}	5.6^{c}	3.6^{cd}	46.1
	15 mg Se/kg	756^{b}	6.2^{ab}	3.9^{bc}	45.4
	30 mg Se/kg	762^{b}	6.4^{a}	4.2^{ab}	44.2
	45 mg Se/kg	754^{b}	6.6^{a}	4.4^{a}	46.4
	SEM	9.24	0.106	0.085	0.722
	P-value	0.001	0.003	0.001	0.304
Contrast analysis P-value	NC vs PC	0.001	0.287	0.196	0.413
	PC vs Se	0.001	0.008	0.001	0.234

در هر ستون تفاوت میانگین‌های با حروف غیر مشابه معنی‌دار است ($P<0.05$).

جدول۱-غلظت هموگلوبین خون، کراتینین سرم و فعالیت آنزیم‌های کبدی موش‌های صحرایی در شرایط دمایی مختلف و دریافت¬کننده دوزهای مختلف سلنیوم

Temperature condition	Treatments	Malondialdehyde, nmol/dL	Glutathione mg/g protein	Glutathione peroxidase, pg/mL	Superoxide dismutase, U/mL
No heat stress	Negative control	3.4^{b}	3.3^{c}	11.7^{b}	0.035^{c}
Heat stress	Positive control	4.2^{a}	3.2^{c}	11.1^{b}	0.038^{bc}
	0.15 mg Se/kg	3.5^{bc}	5.2^{b}	12.3^{b}	0.042^{ab}
	0.30 mg Se/kg	3.1^{bc}	5.8^{ab}	14.7^{a}	0.045^{a}
	0.45 mg Se/kg	2.9^{c}	6.2^{a}	16.4^{a}	0.41^{bc}
	SEM	0.112	0.130	0.491	0.001
	P-value	0.001	0.001	0.001	0.001
Contrast analysis P-value	NC vs PC	0.003	0.274	0.044	0.223
	PC vs Se	0.003	0.001	0.005	0.006

در هر ستون تفاوت میانگین‌های با حروف غیر مشابه معنی‌دار است ($P<0.05$).

بحث:

در پژوهش کنونی، متغیرهای محیطی در شرایط ٦ ساعت تنش در روز سبب شاخص دما-رطوبت ۵۲ درجه سلسیوس شد که گزارش شده است تنش متوسط تا شدیدی را در بدن موش‌های صحرایی ایجاد می‌کند (۲۱). تنش گرمایی در موش‌ها از طریق تغییرات رفتاری مانند افزایش تنفس شکمی و دراز کشیدن در وضعیت خوابیده مشهود بود. در حالی که موش‌های در شرایط دمای استاندارد، شاخص دما-رطوبت ۳۵ درجه سلسیوس داشتند و موش‌های صحرایی رفتار غیر طبیعی که نشان دهنده تنش یا شرایط نامناسب باشد نشان ندادند. غلظت کورتیزول سرم در موش‌های کنترل مثبت به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل منفی بود که این یافته نشان می دهد موش‌ها به تنش گرمایی پاسخ داده‌اند.

گروه کنترل مثبت غلظت هموگلوبین خون کمتری نسبت به سایر گروه‌ها داشتند که نشان می‌دهد تنش گرمایی دارای اثر منفی بر غلظت هموگلوبین خون است. غلظت هموگلوبین خون موش‌های دریافت‌کننده سلنیوم نسبت به کنترل مثبت افزاش داشت و این یافته بیانگر این است که افزودن سلنیوم به جیره برای حفظ غلظت هموگلوبین در شرایط تنش گرمایی، موثر است. افزایش یافتن غلظت هموگلوبین خون در گروه‌های دریافت‌کننده سلنیوم ممکن است به دلیل نقش آنتی اکسیدانی سلنیوم باشد که هموگلوبین خون را از آسیب اکسیداتیو ناشی از تنش گرمایی محافظت کرده است (۲۲). سطوح بالاتر قابل توجه آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و گلوتاتیون و سطوح پایین‌تر مالون دی آلدئید در گروه‌های دریافت‌کننده سلنیوم در پژوهش کنونی، اثر محافظتی سلنیوم بر غلظت هموگلوبین خون را بیشتر به اثبات رساند. برخلاف یافته‌های ما، Shi و همکاران (۳) تغییر معنی داری در غلظت هموگلوبین خون با مکمل سلنیوم-متیونین مشاهده نکردند که ممکن است به دلیل عدم ایجاد تنش در پژوهش این محققان باشد.

نتایج شاخص‌های عملکرد کبد و کلیه نشان داد که سلنیوم در دوز ۰/۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم ممکن است برای محافظت از عملکرد کلیه‌ها در دمای محیطی بالا کافی نباشد وغلظت کراتینین در موش‌های دریافت‌کننده این دوز تفاوت معنی داری با گروه کنترل مثبت نداشت. با این حال، مکمل سلنیوم در دوز ۰/۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم و دوزهای بیشتر، اثر محافظتی کبدی و کلیوی را تحت شرایط تنش گرمایی از طریق کاهش فعالیت آنزیم آلانین ترانس آمیناز نشان داد. Zhang و همکاران (۲۳) افزایش فعالیت آنزیم آلانین ترانس آمیناز را در موش‌های صحرایی در پاسخ به تنش گرمایی گزارش کردند. به طور مشابه، Li و همکاران (۲٤) گزارش کردند که محیط گرم و مرطوب سبب آسیب کبدی به موش‌ها می‌شود. 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 می دهند و سرعت متابولیسم بالایی که دارند، آنها را مستعد آسیب اکسیداتیو می‌کند. گزارش شده است که مکمل سلنیوم-متیونین سبب افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و کاهش فعالیت آنزیم آلانین ترانس آمیناز در موش‌های در معرض تنش می‌شود (۲۵). در پژوهش کنونی، افزایشی در فعالیت سوپراکسید دیسموتاز سرم در موش‌های دریافت‌کننده سلنیوم بویژه دوز ۰/۳ میلی گرم بر کیلوگرم مشاهده شد. سوپراکسید دیسموتاز آنزیم اصلی و در پی آن آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز مسئول محافظت از سلول‌های کبدی در برابر آسیب اکسیداتیو است (٦). بنابراین، کاهش سطح فعالیت آنزیم آلانین ترانس آمیناز با افزودن سلنیوم زیادتر به جیره غذایی در موش‌های در معرض تنش گرمایی ممکن است ناشی از کاهش تنش اکسیداتیو باشد که با سطوح کم مالون‌دی آلدئید و فعالیت زیادتر سوپراکسید دیسموتاز، مقدار زیادتر گلوتاتیون احیا شده و فعالیت زیادتر گلوتاتیون پراکسیداز در سرم مشهود است که با یافته‌های Malyar و همکاران مطابقت دارد (۲۵).

نتایج پژوهش کنونی نشان داد که افزودن سلنیوم به جیره سبب کاهش غلظت هورمون کورتیزول سرم موش‌های تحت تنش گرمایی می‌شود. دلیل کاهش یافتن سطح کورتیزول در سرم خون موش‌های دریافت‌کننده سلنیوم به اثرات آنتی اکسیدانی سلنیوم و نقش آن در سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز مربوط می‌شود (۳، ٦). دوزهای بالاتر سلنیوم سبب کاهش بیشتر هورمون کورتیزول نشد و بنابراین غلظت ۰/۱۵ میلی گرم سلنیوم بر کیلوگرم در کاهش تنش موثر می باشد. هر چند تنش گرمایی اثر معنی داری بر غلظت انسولین سرم موش‌ها نداشت، ولی افزودن سلنیوم سبب افزایش غلظت انسولین سرم شد. بنابر این یافته می توان از مکمل سلنیوم-متیونین به عنوان عامل پیشگیری‌کننده در برابر بروز دیابت نوع یک (که در آن سنتز انسولین به دلایل متعدد مختل می‌شود) استفاده نمود. خواص آنتی‌اکسیدانی سلنیوم ممکن است از سلول‌های بتای پانکراس که مسئول سنتز انسولین هستند محافظت کند (٦) و در نتیجه سطح انسولین سرم را در موش‌هایی که از جیره‌های غذایی حاوی سلنیوم تغذیه کردند در مقایسه با موش‌های گروه کنترل، افزایش داده است. افزودن سلنیوم از منبع سلنیوم-متیونین در دوزهای ۰/۳ و ۰/٤٥ میلی¬گرم بر کیلوگرم به طور معنی داری سبب افزایش غلظت‌تری یدو تیرونین سرم در مقایسه با کنترل منفی و کنترل مثبت شد. هر چند افزودن سلنیوم بر غلظت تترایدوتیرونین سرم تغییر معنی داری ایجاد نکرد. افزایش غلظت هورمون‌های تیروئیدی سرم با افزایش دوز سلنیوم ممکن است به دلیل افزایش فعالیت آنزیم‌های دیودیناز (که سلنیوم یکی از اجزای اصلی آن است) باشد که مسئول افزایش برون ده هورمون تیروئید است (٢٦). این نتایج با یافته‌های Qureshi و همکاران همخوانی دارد (۲۷)که افزایش هورمون تیروئید را در گوسفندان دریافت‌کننده مکمل سلنیوم در طی تنش گرمایی گزارش کردند. یافته این پژوهش با یاقته Shi و همکاران (۳) مغایرت دارد که افزایش سطح سرمی تترایدوتیرونین را در بزهای آبستن با مکمل سلنیوم گزارش کردند.

مالون دی آلدئید شاخص اثبات شده پراکسیداسیون لیپیدی است که با مواد واکنش دهنده با اسید تیوباربیتوریک (محصولات پراکسیداسیون لیپیدی) اندازه‌گیری می‌شود (۳، ۱۷). در موش‌های صحرایی کنترل مثبت که در معرض تنش گرمایی بودند غلظت مالون دی آلدئید افزایش یافت که نشان دهنده شرایط تنش اکسیداتیو است. این یافته با گزارش Xu و همکاران مطابقت دارد (۲۸). کاهش سطوح مالون دی آلدئید در گروه‌های تحت تنش که مکمل سلنیوم دریافت کردند نسبت به کنترل مثبت، به نقش آنتی اکسیدانی سلنیوم نسبت داده می‌شود. سلنیوم می‌تواند تشکیل رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدی را با مکانیسم دفاعی آنتی اکسیدانی ذاتی خود با کمک گلوتاتیون پراکسیداز، تیوردوکسین ردوکتاز و سلنوپروتئین‌ها کاهش دهد (۵-۱). فعالیت سرمی گلوتاتیون پراکسیداز به طور گسترده‌ای به عنوان نشانگری برای ارزیابی وضعیت سلنیوم بدن استفاده می‌شود. سطوح بالاتر گلوتاتیون احیا شده و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در گروه‌های دریافت‌کننده سلنیوم در دوزهای ۰/۳و ۰/٤٥ میلی گرم بر کیلوگرم در مقایسه با کنترل مثبت با یافته‌های Shi و همکاران (۳) همخوانی دارد. افزایش فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز در موش‌های دریافت‌کننده سلنیوم در دوزهای ۰/۳و ۰/٤٥ میلی گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه کنترل منفی و مثبت به این دلیل است که سلنیوم بخشی جدایی‌ناپذیر از ساختار گلوتاتیون پراکسیداز است (۱، ٦) و برای فعالیت آن وجود مقادیر کافی سلنیوم در بدن ضروری است. علاوه بر این، گلوتاتیون پراکسیداز سلنوآنزیمی است که مسئول حذف پراکسید هیدروژن و هیدروپراکسید آلی است (٤). بیشتر بودن مقدار گلوتاتیون پراکسیداز در بدن موش‌های دریافت‌کننده دوزهای بالاتر سلنیوم به کاهش تنش اکسیداتیو منجر شده که این موضوع با کاهش سطح مالون دی آلدئید مشهود است.

نتیجه گیری

بنابر نتایج این پژوهش تنش گرمایی سبب ایجاد تنش اکسیداتیو در بدن می‌شود و تغییراتی را در غلظت هورمون ها و فعالیت آنزیم‌های بدن ایجاد می‌کند. برای مقابله با تنش اکسیداتیو ناشی از تنش گرمایی، افزودن سلنیوم از مکمل سلنیوم-متیونین می‌تواند سبب بهبود شرایط آنتی اکسیدانی و غلظت هورمون های بدن در جهت مقاومت بدن در شرایط نامساعد شود.

به طور کلی، می‌توان نتیجه گرفت که مکمل سلنیوم با غلظت ۰/٤٥میلی گرم بر کیلوگرم موجب بهبود شاخص‌های کبدی وکلیوی، غلظت هورمون‌ها و پاسخ آنتی اکسیدانی در موش‌های صحرایی تحت شرایط تنش گرمایی می شود.

تشکر و قدردانی

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 خانم دکتر پروین شورنگ به جهت راهنمایی های ارزنده و کمک در آنالیز بیان ژن تشکر می شود.

تعارض منافع

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

مصوبات و کمیته پژوهشی

این مقاله مستخرج از رساله دانشجوی دوره دکتری تخصصی واحد علوم و تحقیقات (آقای حمید اشرفی) می باشد. در کمیته پژوهشی مربوط به بررسی پروپوزال دانشجویان دکتری واحد علوم و تحقیقات به تصویب رسیده است و کلیه مقررات مربوط به رفتار و کار با با حیوانات آزمایشگاهی بنابر دستورالعمل آزمایشگاه رازی واحد علوم و تحقیقات رعایت شده است.

References

1. Huang Z, Rose AH, Hoffmann PR. The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. Antioxidants & Redox Signaling. 43-705 ;2012. **DOI: 10.1089/ars.2011.4145.**

2. Wang C, Wang H, Luo J, Hu Y, Wei L, Duan M, He H. Selenium deficiency impairs host innate immune response and induces susceptibility to Listeria monocytogenes infection. BMC Immunology. ;2009 2-1. **DOI: 55-10-2172-1471/10.1186.**

3. Shi L, Ren Y, Zhang C, Yue W, Lei F. Effects of organic selenium (Se-enriched yeast) supplementation in gestation diet on antioxidant status, hormone profile and haemato-biochemical parameters in Taihang Black Goats. Animal Feed Science and Technology. 62-57;2018. **DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2018.02.004.**

4. Meng T, Liu YL, Xie CY, Zhang B, Huang YQ, Zhang YW, Yao Y, Huang R, Wu X. Effects of different selenium sources on laying performance, egg selenium concentration, and antioxidant capacity in laying hens. Biological Trace Element Research. -548 ;2019 55. **DOI: 10.1007/s-1490-018-12011z.**

5. Surai PF. Selenium in poultry nutrition 1. Antioxidant properties, deficiency and toxicity. World›s Poultry Science Journal. 47-333 ;2002. **DOI: 10.1079/WPS20020026.**

6. Hariharan S, Dharmaraj S. Selenium and selenoproteins: It's role in regulation of inflammation. Inflammopharmacology. 95-667 ;2020. **DOI: 10.1007/s-00690-020-10787x.**

7. Nazemi L, Nazmara S, Eshraghyan MR, Nasseri S, Djafarian K, Yunesian M, Sereshti H, Moameni A, Shahtaheri SJ. Selenium status in soil, water and essential crops of Iran. Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering. ;2012 8-1. **DOI: 11-9-2746-1735/10.1186.**

8. 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. 12-401 ;2016. **DOI: 10.1111/jpn.12379.**

9. Tórtora-Pérez JL. The importance of selenium and the effects of its deficiency in animal health. Small Ruminant Research. 185-92 ;2010. **DOI: 10.1016/j.etap.2020.103553.**

10. IPCC, Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. ;2014 5-1.

11. Jones GD, Droz B, Greve P, Gottschalk P, Poffet D, McGrath SP, Seneviratne SI, Smith P, Winkel LH. Selenium deficiency risk predicted to increase under future climate change. Proceedings of the National Academy of Sciences. 53-2848 ;2017. **DOI: 10.1073/pnas.1611576114.**

12. NRC, Nutrient requirements of laboratory animals. 4th rev. edn. The National Academies Press, Washington, DC, USA, 1995.

13. Gu X, Gao CQ. New horizons for selenium in animal nutrition and functional foods. Animal Nutrition. 86-80 ;2022. **DOI: 10.1016/j.aninu.2022.06.013.**

14. Drabkin DL, Austin JH. Spectrophotometric studies: V. A technique for the analysis of undiluted blood and concentrated hemoglobin solutions. Journal of Biological Chemistry. 15-105;1935. **DOI: 10.1016/S5-74968(18)9258-0021.**

15. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 69-158 ;1967.

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 74-49. **DOI: 10.1111/j.1033.1974-1432.tb03714.x.**

17. Draper HH, Hadley M. [43] Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. Methods in Enzymology. 31-421;1990. **DOI: -0076/10.1016-86135(90)6879i.**

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

19. Mannervik B. Measurement of glutathione reductase activity. Current Protocols in Toxicology. 12-7 ;1999. **DOI: 0471140856/10.1002.tx0702s00.**

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

21. Moran J. Tropical dairy farming: feeding management for small holder dairy farmers in the humid tropics. Csiro publishing; 2005.

22. Saigo K, Takenokuchi M, Hiramatsu Y, Tada H, Hishita T, Takata M, Misawa M, Imoto S, Imashuku S. Oxidative stress levels in myelodysplastic syndrome patients: their relationship to serum ferritin and haemoglobin values. Journal of International Medical Research. 5-1941 ;2011. **DOI: /10.1177 147323001103900539.**

23. 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 ;2018. **DOI: 2058739218794328/10.1177.**

24. 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. 2014; e111741. **DOI: 10.1371/journal.pone.0111741.**

25. 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 Sciences. ;2020 117464. **DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117464.**

26. Beckett GJ, Arthur JR. Selenium and endocrine systems. Journal of Eendocrinology. 65-455 ;2005. **DOI: 10.1677/joe.1.05971.**

27. Qureshi MS, Akhtar S, Khan RU. The effect of vitamin E and selenium on physiological, hormonal and antioxidant status of Damani and Balkhi sheep submitted to heat stress. Applied Biological Chemistry. 90-585 ;2017. **DOI: 10.1007/s9-0313-017-13765.**

28. Xu D, Li W, Huang Y, He J, Tian Y. The effect of selenium and polysaccharide of Atractylodes macrocephala Koidz.(PAMK) on immune response in chicken spleen under heat stress. Biological Trace Element Research. 7-232 ;2014. **DOI: 10.1039/ C6RA27730F.**