Journal of Animal Biology, Winter 2025; 17(2):239-248

ISSN: 1735-9724

Research Article

The Effect of Different Doses of Organic Selenium on the Expression of Interleukin-10, Tumor Necrosis Factor-Alpha Genes, and Antioxidant Status in Male Wistar Rats Under Heat Stress

Hamid Ashrafi*

Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
*Corresponding author: ashrafihamid1071395@gmail.com

Received: 16 December 2024 Accepted: 6 February 2025

DOI:

Abstract

Heat stress is one of the most significant environmental stressors negatively affecting the health and immune system performance of living organisms. Selenium, an essential nutrient, acts as a cofactor for antioxidant enzymes, providing protective effects on cells. This study aimed to investigate the effects of organic selenium on the expression of interleukin-10 (IL-10) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) genes, as well as oxidative stress markers, including malondialdehyde (MDA) and total antioxidant capacity (TAC), in laboratory rats under heat stress. In a completely randomized design, 30 male Wistar rats were randomly divided into five groups, with six rats per group. Six rats were kept at a standard temperature throughout the experiment, while the remaining rats were subjected to heat stress (38 ± 2°C for 6 hours daily). The negative control group (no heat stress) and positive control group (heat stress) received a standard pellet diet without additives, while the other three groups received a standard pellet diet supplemented with 0.15, 0.30, and 0.45 mg/kg of selenium from selenium-methionine for 30 days. The results showed that heat stress significantly reduced IL-10 and TAC levels and significantly increased TNF-α and MDA levels ($p < 0.05$). Selenium supplementation significantly increased IL-10 and decreased TNF-α levels ($p < 0.05$). Additionally, selenium supplementation significantly increased TAC and reduced MDA concentrations ($p < 0.05$). Selenium doses of 0.30 and 0.45 mg/kg effectively enhanced anti-inflammatory responses by increasing IL-10 gene expression and reducing TNF-α gene expression. These doses also reduced oxidative stress by decreasing MDA concentrations and increasing TAC, thereby improving antioxidant defense. Based on these findings, selenium doses of 0.30 to 0.45 mg/kg appear optimal for improving inflammatory and antioxidant status in rats under heat stress.

Keywords: Selenium, Interleukin-10, Tumor Necrosis Factor-alpha, Malon dialdehyde, Total antioxidant capacity.

زیست‌شناسی جانوری، سال هفدهم، شماره دوم، زمستان ۱۴۰۳، صفحات ۲۴۸-۲۳۹

ISSN:۱۷۳۵-۹۷۲۴

مقاله پژوهشی

اثر دوزهای مختلف سلنیوم آلی بر بیان ژن‌های اینترلوکین۱۰، فاکتور نکروز تومور آلفا و وضعیت آنتی‌اکسیدانی در موش‌های نر نژاد ویستار تحت تنش گرمایی

حمید اشرفی*

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

*مسئول مکاتبات: ashrafihamid1071395@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۱۸

DOI:

چکیده

تنش گرمایی یکی از مهم‌ترین عوامل استرس‌زای محیطی است که تأثیرات منفی بر سلامت و عملکرد سیستم ایمنی در موجودات زنده دارد. سلنیوم یکی از عناصر ضروری در تغذیه است که به عنوان کوفاکتور آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی عمل کرده و از این طریق می‌تواند اثرات محافظتی بر سلول‌ها داشته باشد. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر سلنیوم آلی بر بیان ژن‌های IL-10، TNF-α، شاخص‌های استرس اکسیداتیو شامل مالون‌دی‌آلدئید (MDA) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC) در موش‌های آزمایشگاهی تحت تنش گرمایی بود. در طرح کاملا تصادفی، ۳۰ سر موش نر نژاد ویستار به طور تصادفی به پنج گروه شش‌تایی تقسیم شدند. تعداد ۶ سر موش در دمای استاندارد و بقیه موش‌ها در تنش گرمایی (دمای ۲ ± ۳۸ درجه سلسیوس به مدت ۶ ساعت در روز) قرار داده شدند. موش‌های 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 ۰/۴۵ میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیوم از مکمل سلنیوم-متیونین به مدت ۳۰ روز دریافت کردند. نتایج نشان داد که تنش گرمایی باعث کاهش معنی‌دار IL-10 و TAC و افزایش معنی‌دار TNF-α و MDA شد (p <۰/۰۵). تیمار جیره‌ها با سلنیوم به ترتیب موجب افزایش و کاهش معنی‌دار IL-10 و TNF-α شد (p <۰/۰۵). همچنین افزودن مکمل سلنیوم به جیره‌ها موجب افزایش معنی‌دار TAC و کاهش معنی‌دار غلظت MDAشد (p <۰/۰۵). مکمل سلنیوم در دوزهای ۰/۳۰ و ۰/۴۵ میلی‌گرم به‌طور موثری پاسخ‌های ضدالتهابی را از طریق افزایش بیان ژن IL-10 و کاهش بیان ژن TNF-α تقویت می‌کند. همچنین، این دوزها با کاهش غلظت MDA و افزایش TAC، استرس اکسیداتیو را کاهش داده و دفاع آنتی‌اکسیدانی را بهبود می‌بخشند. بنابر نتایج، دوزهای ۰/۳۰ تا ۰/۴۵ میلی‌گرم سلنیوم برای بهبود وضعیت التهابی و آنتی‌اکسیدانی در موش‌های تحت تنش گرمایی بهینه به نظر می‌رسد.

کلمات کلیدی: سلنیوم، اینترلوکین-۱۰، فاکتور نکروز تومور آلفا، مالون‌دی‌آلدئید، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل.

مقدمه

تنش گرمایی یکی از مهم‌ترین چالش‌های محیطی است که می‌تواند تأثیرات منفی قابل‌توجهی بر سلامت و عملکرد حیوانات داشته باشد. این شرایط نه‌تنها موجب کاهش کارایی سیستم ایمنی و افزایش التهاب می‌شود، بلکه با ایجاد استرس اکسیداتیو، آسیب‌های سلولی را نیز به دنبال دارد (۲۲). در شرایط تنش گرمایی، تولید رادیکال‌های آزاد افزایش یافته و سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن تحت فشار قرار می‌گیرد. این

وضعیت می‌تواند منجر به آسیب به DNA، پروتئین‌ها و لیپیدهای غشایی شود که در نهایت عملکرد طبیعی سلول‌ها و بافت‌ها را مختل می‌کند (۲۶). در این میان، اینترلوکین-۱۰ (IL-10) و فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF-α) دو سیتوکین کلیدی هستند که نقش مهمی در تنظیم پاسخ‌های التهابی ایفا می‌کنند. IL-10 به‌عنوان یک سیتوکین ضدالتهابی، موجب کاهش التهاب و تعدیل پاسخ ایمنی می‌شود، در حالی که TNF-α یک سیتوکین پیش‌التهابی است که در شرایط استرس‌زا، مانند تنش گرمایی، افزایش می‌یابد و می‌تواند به آسیب‌های بافتی و التهاب سیستمیک منجر شود. تعادل میان این دو سیتوکین برای حفظ سلامت و عملکرد طبیعی بدن حیاتی است (۷). از سوی دیگر، سلنیوم یک عنصر کمیاب ضروری است که نقش مهمی در عملکرد سیستم آنتی‌اکسیدانی و تنظیم بیان ژن‌ها ایفا می‌کند. سلنیوم به‌عنوان یکی از اجزای کلیدی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر گلوتاتیون پراکسیداز و تیوردوکسین ردوکتاز، به خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و کاهش استرس اکسیداتیو کمک می‌نماید (۱۸). افزون بر این، سلنیوم از طریق تعدیل مسیرهای سیگنالینگ التهابی نظیر NF-κB و MAPK قادر به تنظیم بیان ژن‌های التهابی است (۱٤). با توجه به نقش سلنیوم در تعدیل التهاب و کاهش استرس اکسیداتیو، این مطالعه به بررسی تأثیر سلنیوم آلی بر بیان ژن‌های IL-10 و TNF-α و نیز وضعیت آنتی‌اکسیدانی در موش‌های تحت تنش گرمایی پرداخته است. هدف اصلی این تحقیق، ارزیابی توانایی سلنیوم آلی در کاهش التهاب و بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در شرایط تنش گرمایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در حیوان‌خانه آزمایشگاه رازی، واقع در واحد علوم و تحقیقات، انجام شد. تمامی مراحل جابجایی، مراقبت، آزمایش و نمونه‌برداری از حیوانات مطابق با دستورالعمل‌های آزمایشگاه رازی و با تأیید معاونت پژوهشی واحد علوم و تحقیقات صورت گرفت.

حیوانات مورد استفاده: این مطالعه به‌صورت تجربی و با استفاده از مدل حیوانی (موش صحرایی) انجام شد. موش‌های نر نژاد ویستار از مؤسسه سرم‌سازی کرج تهیه شدند و در قفس‌های بزرگ (٦ موش در هر قفس) با بستر پوسته برنج اتوکلاوشده نگهداری شدند. برای سازگاری با محیط، موش‌ها به‌مدت یک هفته در حیوان‌خانه نگهداری شدند و دسترسی آزاد به غذای پلت استاندارد و آب آشامیدنی داشتند. شرایط محیطی در دوره سازگاری شامل دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۰ درصد و چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود.

در یک طرح کاملاً تصادفی، ۳۰ سر موش نر نژاد ویستار ۸ هفته‌ای با وزن ۲۲±۲٤۰ گرم به‌صورت تصادفی به پنج گروه ٦ تایی تقسیم شدند. گروه اول (شاهد منفی) در شرایط طبیعی و بدون تنش گرمایی نگهداری شد. گروه دوم (شاهد مثبت) تحت تنش گرمایی (دمای ۲±۳۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٦ ساعت در روز) قرار گرفت، اما مکمل سلنیوم دریافت نکرد. سه گروه دیگر، علاوه بر تنش گرمایی، به‌ترتیب دوزهای ۰/۱۵، ۰/۳۰ و ۰/٤۵ میلی‌گرم سلنیوم آلی از طریق خوراک دریافت کردند. شاخص دما-رطوبت با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (٤).

$$THI=T-(0.55-0.0055\times RH)\times(T-14.5)$$

که در این فرمول T دما بر حسب درجه سلسیوس و RH رطوبت نسبی بر حسب درصد است. طی مدت تنش گرمایی شاخص دما-رطوبت ۳۱/۵٤ بود که نشان دهنده شرایط تنش گرمایی شدید بود.

گروه‌های آزمایشی: موش‌های گروه کنترل منفی و کنترل مثبت، پلت استاندارد بدون افزودنی دریافت

کردند و سه گروه دیگر، به‌ترتیب پلت استاندارد همراه با ۰/۱۵، ۰/۳۰ و ۰/۴۵ میلی‌گرم سلنیوم به ازای هر کیلوگرم ماده خشک از مکمل سلنیوم-متیونین را به مدت ۳۰ روز دریافت نمودند. پلت استاندارد حاوی ۰/۰۵ میلی‌گرم عنصر سلنیوم در هر کیلوگرم ماده خشک بود. برای تهیه پلت حاوی مکمل سلنیوم-متیونین، ابتدا پلت‌های استاندارد آسیاب شد و پس از تعیین مقدار ماده خشک، مقدار مورد نیاز از مکمل سلنیوم-متیونین به آن افزوده شد. سپس مخلوط به‌وسیله دستگاه پلت‌ساز سرد، مجدداً به شکل پلت درآمد. برای دو گروه کنترل نیز پلت‌ها به همان روش آسیاب و دوباره تهیه شدند تا اثرات احتمالی فرآیند تهیه خوراک بر بافت فیزیکی و ترکیب شیمیایی، در بین تمام گروه‌ها یکنواخت باشد (۲).

نمونه‌گیری خون: در پایان مطالعه، نمونه‌گیری خون از بزرگ سیاهرگ زیرین موش‌های صحرایی انجام شد. موش‌ها با تزریق داخل‌صفاقی کتامین (۱/۵ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند. پس از باز کردن حفره شکمی، ۱۰ میلی‌لیتر خون از بزرگ سیاهرگ زیرین با استفاده از سرنگ استریل جمع‌آوری شد. از این مقدار، ۵ میلی‌لیتر در لوله‌های بدون ماده ضد انعقاد ریخته شد و سرم آن با سانتریفیوژ (g × ۱۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه) جدا شد. سرم‌های حاصل در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی نگهداری شدند. باقیمانده نمونه خون (۵ میلی‌لیتر) در لوله‌های استریل حاوی هپارین جمع‌آوری و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شد، سپس تا زمان انجام آزمایش‌های بیان ژن در دمای ۷۰- درجه سلسیوس ذخیره شد (۱۶).

اندازه‌گیری فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون: سطوح سرمی مالون‌دی‌آلدئید (MDA) به عنوان محصول پراکسیداسیون لیپیدی با استفاده از روش تیوباربیتوریک اسید اندازه‌گیری شد (۸). ظرفیت آنتی اکسیدانی کل سرم نیز به روش FRAP تعیین گردید (۶).

آنالیز بیان ژن‌های اینترلوکین۱۰ و فاکتور نکروز تومور آلفا: نمونه‌های خون جمع‌آوری‌شده از موش‌های صحرایی بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و تا زمان استخراج mRNA کل در دمای ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. استخراج mRNA کل با استفاده از کیت (Qiagen RNeasy® Mini، Germany،Hilden) و مطابق دستورالعمل سازنده انجام شد. تمامی مراحل مولکولی در شرایط استریل و زیر هود بیولوژیک صورت گرفت. mRNA استخراج‌شده در دمای ۷۵- درجه سلسیوس ذخیره شد تا برای سنتز cDNA استفاده شود. سنتز cDNA با بهره‌گیری از کیت سنتز cDNA شرکت BioNeer (سئول، کره جنوبی) و طبق پروتکل ارائه‌شده توسط سازنده انجام شد. این کیت شامل تمام مواد لازم برای سنتز cDNA بود. توالی ژن‌های IL-10، TNF-α و GAPDH از پایگاه داده‌های ژنی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) و با استناد به توالی‌های گزارش‌شده قبلی استخراج شد (۲۵). ژن GAPDHبه‌عنوان ژن مرجع (خانه‌دار) برای نرمال‌سازی استفاده شد. پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های مورد نظر با استفاده از نرم‌افزار Primer Expressطراحی و توسط شرکت BioNeer (سئول، کره جنوبی) سنتز شدند. مشخصات پرایمرهای سیتوکین‌ها و ژن مرجع در جدول ۱ ارائه شده است. تجزیه و تحلیل تولید و منحنی ذوب با استفاده از یک سیستم Real-Time PCR (Applied Bio systems, Foster City, CA) انجام شد. شرایط چرخه حرارتی شامل فعال سازی آنزیم در دمای ۹۵ درجه 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. برای نرمال سازی، GADPH به عنوان ژن خانه دار و از بیان ژن هدف در گروه شاهد به عنوان شاهد خارجی استفاده شد. نسبت بیان نسبی ژن‌های IL-10 و TNF-α به عنوان ژن‌های هدف به ژن GADPH بر اساس روش Livak and Schmittgen (2001) نرمال شد (۱۵).

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از رویه مدل خطی تعمیم‌یافته در نرم‌افزار SAS برای ویندوز، نسخه ۹/٤ (SAS Institute Inc., Cary, NC) انجام شد. پیش از آنالیز واریانس، برای ارزیابی نرمال بودن داده‌ها از آزمون شاپیرو-ویلک استفاده گردید. در صورت لزوم، نرمال‌سازی داده‌ها با استفاده از تبدیل Box-Cox انجام شد. داده‌های نرمال‌شده در قالب طرح کاملاً تصادفی، با استفاده از آنالیز واریانس مناسب جهت تعیین اثر تیمارها بر متغیرهای مورد بررسی، تحلیل شدند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن صورت گرفت. تفاوت‌ها در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار تلقی شدند.

جدول ۱- مشخصات پرایمر سیتوکین‌ها و ژن مرجع برای Real-time PCR در موش‌ها

Table 1. Primer characteristics of cytokines and reference gene for real-time PCR amplification

Genes	Primer Sequence (5′ - 3′)	Amplicon size (bp)
Interleukin-10	F: ATGGGAAGGAATTTTTGGGC R: TCAGCGTTTATGTCTCTGAG	150
Tumor necrosis factor alpha	F: AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC R: TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC	180
GADPH	F: ATCACTGCCACCCAGAAGACT R: CATGCCAGTGAGCTTCCCGTT	140

F=Forward, R=Reverse, GADPH=Glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase

نتایج

بیان ژن اینترلوکین-۱۰: داده‌های مربوط به بیان ژن IL-10 در جدول ۲ ارائه شده است. تحلیل آماری نشان داد که بین تیمارهای مختلف از نظر بیان ژن IL-10 تفاوت معنی‌داری وجود دارد (p <۰/۰۵). بیان IL-10 در گروه شاهد مثبت به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد منفی بود (p <۰/۰۵). افزودن مکمل سلنیوم باعث افزایش بیان این ژن شد، به‌طوری که دوزهای ۰/۳۰ و ۰/٤۵ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم خوراک بیشترین افزایش را نشان دادند. بیان ژن IL-10 در موش‌های تغذیه‌شده با سطوح مختلف مکمل سلنیوم به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد مثبت و پایین‌تر از گروه شاهد منفی بود (p <۰/۰۵). همچنین، بین تیمارهای حاوی مکمل سلنیوم تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (p <۰/۰۵)، به‌گونه‌ای که بالاترین بیان ژن در تیمار حاوی ۳۰/ میلی‌گرم سلنیوم و کمترین بیان در تیمار حاوی ۰/۱۵ میلی‌گرم سلنیوم ثبت شد. به‌طور کلی، نتایج نشان‌دهنده روند افزایشی بیان ژن IL-10 با افزایش سطح مکمل سلنیوم بود.

بیان ژن فاکتور نکروز تومور آلفا: داده‌های مربوط به بیان ژن TNF-α در جدول ۲ ارائه شده است. تحلیل آماری نشان داد که بین تیمارهای مختلف از نظر بیان این ژن تفاوت معنی‌داری وجود دارد (p <۰/۰۵). بیان ژن TNF-α در گروه شاهد مثبت به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد منفی بود (p <۰/۰۵). موش‌های دریافت‌کننده مکمل سلنیوم در مقایسه با گروه شاهد مثبت، بیان پایین‌تری از این ژن و در مقایسه با گروه شاهد منفی، بیان بالاتری داشتند (p <۰/۰۵). همچنین، بین تیمارهای حاوی مکمل سلنیوم تفاوت معنی‌داری در بیان ژن TNF-α مشاهده شد (p <۰/۰۵). بالاترین میزان بیان این ژن در تیمار حاوی ۰/۱۵ میلی‌گرم

سلنیوم و کمترین میزان در تیمار حاوی ۰/۴۵ میلی‌گرم سلنیوم ثبت شد. به‌طور کلی، نتایج نشان‌دهنده روند کاهشی بیان ژن TNF-α با افزایش سطح مکمل سلنیوم بود.

غلظت مالون‌دی‌آلدئید سرم: داده‌های مربوط به غلظت MDA سرم در جدول ۳ ارائه شده است. تحلیل آماری نشان داد که غلظت MDA در گروه شاهد مثبت به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد منفی و سایر تیمارهای آزمایشی بود (p <۰/۰۵). در میان تیمارهای دریافت‌کننده سلنیوم، موش‌های تیمار ۰/۱۵ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم خوراک، غلظت MDAسرم بالاتری نسبت به تیمارهای ۰/۳۰ و ۰/۴۵ میلی‌گرم داشتند (p <۰/۰۵). به‌طور کلی، افزودن مکمل سلنیوم به جیره باعث کاهش معنی‌دار غلظت MDA شد، به‌گونه‌ای که کمترین غلظت MDA در تیمار حاوی ۰/۴۵ میلی‌گرم مشاهده شد.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل: داده‌های مربوط به TAC سرم در جدول ۳ ارائه شده است. تحلیل آماری نشان داد که بین تیمارهای مختلف از نظر ظرفیتTAC تفاوت معنی‌داری وجود دارد (p <۰/۰۵). بالاترین ظرفیتTAC در گروه شاهد منفی و پایین‌ترین آن در گروه شاهد مثبت مشاهده شد. موش‌های دریافت‌کننده مکمل سلنیوم ظرفیت TAC بالاتری نسبت به گروه شاهد مثبت داشتند (p <۰/۰۵)، به‌طوری که تیمار حاوی ۰/۴۵ میلی‌گرم سلنیوم بالاترین ظرفیت را نشان داد. به‌طور کلی، نتایج حاکی از روند افزایشی TAC با افزایش سطح مکمل سلنیوم بود.

جدول ۲- بیان نسبی ژن‌های IL-10 و TNF-α در موش‌های دریافت کننده دوزهای مختلف سلنیوم

Table 2. The relative gene expression of IL-10 and TNF-α of Mice receiving different doses of selenium

Parameters	Negative control	Positive control	Selenium supplement (mg/kg diet dry matter)			SEM
			0.15	0.30	0.45	
Relative gene expression of IL-10	1^{b}	0.61^{d}	0.88^{c}	1.29^{a}	1.23^{a}	0.024
Relative gene expression of TNF-α	1^{d}	2.56^{a}	2.04^{b}	1.47^{c}	1.38^{c}	0.029

$^{a-d}$ در هر سطر، مقادیر میانگین که دارای حروف مشترک هستند، تفاوت معنی‌داری ندارند (p > ۰/۰۵)

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

جدول ۳- غلظت مالون‌دی‌آلدئید سرم و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل موش‌های دریافت کننده دوزهای مختلف سلنیوم

Table 3. The concentration of malondialdehyde and total antioxidant capacity in mice receiving different doses of selenium.

Parameters	Negative control	Positive control	Selenium supplement (mg/kg diet dry matter)			SEM
			0.15	0.30	0.45	
Malondialdehyde, nmol/dL	2.33^{d}	3.89^{a}	3.33^{b}	2.79^{c}	2.71^{c}	0.031
Total antioxidant capacity, mmol Trolox equivalent/L	2.71^{a}	1.31^{d}	2.06^{c}	2.43^{b}	2.49^{b}	0.025

$^{a-d}$ در هر سطر، مقادیر میانگین که دارای حروف مشترک هستند، تفاوت معنی‌داری ندارند (p > ۰/۰۵)

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

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که سلنیوم آلی به‌طور معنی‌داری موجب افزایش بیان ژن IL-10 در موش‌های تحت تنش گرمایی شد.IL-10 یک سیتوکین ضدالتهابی است که نقش کلیدی در تعدیل پاسخ‌های التهابی و پیشگیری از آسیب‌های ناشی از التهاب ایفا می‌کند (۱). افزایش بیان این ژن در گروه‌های دریافت‌کننده سلنیوم احتمالاً به دلیل توانایی سلنیوم در فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ

ضدالتهابی، به‌ویژه مسیر JAK-STAT است (۱۰). در این مسیر، فسفریلاسیون STAT3 منجر به افزایش رونویسی ژن IL-10 می‌شود (۲۳). بنابراین، این مکانیسم می‌تواند توضیح دهد که چرا مصرف سلنیوم آلی سبب افزایش بیان این ژن در شرایط تنش گرمایی شده است. Liu و همکاران (۲۰۲۰) نیز گزارش کردند که سلنیوم آلی باعث افزایش بیان IL-10 در موش‌های تحت تنش گرمایی می‌شود (۱٤). نتایج مطالعه‌ی حاضر با یافته‌های آنان هم‌راستا بوده و بیانگر آن است که سلنیوم می‌تواند به‌عنوان یک عامل ضدالتهابی مؤثر عمل کند. عملکرد ضدالتهابی سلنیوم ممکن است به واسطه‌ی وجود سلنوپروتئین‌هایی نظیر گلوتاتیون پراکسیداز باشد که با کاهش فرآیندهای اکسیداتیو ناشی از التهاب در بافت کبد، از بروز آسیب‌های التهابی جلوگیری می‌کنند (۱۸). از سوی دیگر، نتایج این مطالعه نشان داد که سلنیوم آلی به‌طور معناداری موجب کاهش بیان ژن TNF-α در موش‌های تحت تنش گرمایی شد. TNF-α یک سیتوکین پیش‌التهابی است که در شرایط تنش گرمایی افزایش می‌یابد و می‌تواند منجر به بروز التهاب سیستمیک و آسیب‌های بافتی شود (۹). افزایش بیان این ژن در گروه شاهد مثبت احتمالاً به دلیل قرار گرفتن موش‌ها در شرایط تنش گرمایی و نبود مکمل سلنیوم در جیره غذایی آن‌ها بوده است. در این شرایط، وقوع تنش اکسیداتیو، بیان سیتوکین‌های پیش‌التهابی مانند TNF-α را تحریک می‌کند (۲۰، ۱). در گروه‌هایی که جیره آن‌ها با سلنیوم آلی مکمل شده بود، بیان ژن TNF-α کاهش یافت. این کاهش می‌تواند ناشی از توانایی سلنیوم در مهار مسیرهای سیگنال‌دهی التهابی نظیر مسیر NF-κB باشد (۱٤). سلنیوم با مهار فعال‌سازی NF-κB از افزایش بیان ژن TNF-α جلوگیری می‌کند. NF-κB یک فاکتور رونویسی کلیدی است که در پاسخ به محرک‌های التهابی فعال شده و موجب افزایش بیان ژن‌های التهابی از جمله TNF-α می‌شود (۱۱). در شرایط طبیعی این فاکتور توسط پروتئینی به نام IκB مهار می‌شود. اما در پاسخ به سیگنال‌های التهابی، IκB فسفریله شده و تخریب می‌شود و در نتیجه NF-κB آزاد شده و به هسته سلول منتقل می‌شود. سلنیوم با مهار فسفریلاسیون و تخریب IκB از انتقال NF-κB به هسته ممانعت کرده و در نتیجه بیان TNF-α کاهش می‌یابد (۹). Liu و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند که سلنیوم آلی با مهار فعال‌سازی مسیرهای سیگنال‌دهی MAPK و NF-κB از افزایش بیان TNF-α در موش‌های تحت تنش گرمایی جلوگیری می‌کند (۱۳). همچنین Zheng و همکاران (۲۰۲۲) نیز کاهش بیان TNF-α را در پاسخ به سلنیوم آلی در شرایط تنش گرمایی گزارش کردند (۲٤). یافته‌های حاضر با این نتایج هم‌راستا بوده و مؤید آن است که سلنیوم می‌تواند نقش مؤثری در مهار پاسخ‌های التهابی ایفا کند. به‌طور کلی، نتایج این تحقیق نشان داد که مصرف مکمل سلنیوم موجب کاهش سیتوکین‌های پیش‌التهابی TNF-αو افزایش سیتوکین‌های ضدالتهابی نظیر IL-10 در موش‌های تحت تنش گرمایی می‌شود. نتایج مشابهی توسط Tsuji و همکاران (۲۰۱۵) نیز گزارش شد؛ آن‌ها دریافتند که افزایش سطوح مکمل سلنیوم در جیره غذایی باعث کاهش TNF-α و افزایش بیان IL-10 می‌شود (۲۱). این اثرات احتمالاً ناشی از نقش سلنیوم در پیشگیری از آسیب اکسیداتیو به سلول‌های ایمنی است. تنش گرمایی با تحریک سلول‌های ایمنی، موجب افزایش تولید TNF-α می‌شود که بر عملکرد ایمنی تأثیر منفی می‌گذارد (۱). مطالعات همچنین نشان داده‌اند که مکمل سلنیوم آلی می‌تواند به‌طور قابل‌توجهی بیان ژن سلنوفسفات‌سنتتاز۲ را در بخش‌های مختلف روده‌ی خوک افزایش دهد. این سلنوپروتئین عمدتاً در سنتز

سلنیوم فسفات نقش داشته و در ساخت سایر سلنوپروتئین‌ها مشارکت دارد. در نتیجه، بیان سایر سلنوپروتئین‌ها نیز افزایش یافته، که این امر منجر به کاهش سطح التهاب سیستمیک و بهبود عملکرد ایمنی می‌شود (۱۲). نتایج این مطالعه نشان داد که سطح MDA به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی در گروه شاهد مثبت به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است که نشان‌دهنده وقوع تنش اکسیداتیو در این گروه می‌باشد. در مقابل، میزان MDA در گروه‌های دریافت‌کننده سلنیوم آلی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. MDA محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها است و افزایش آن نشان‌دهنده آسیب به غشای سلولی ناشی از رادیکال‌های آزاد می‌باشد (۲۴). کاهش سطح این ترکیب در گروه‌های مکمل‌شده با سلنیوم احتمالاً ناشی از افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز بوده است (۱۷). سلنیوم به‌عنوان یک عنصر ضروری در ساختار گلوتاتیون پراکسیداز، نقش کلیدی در خنثی‌سازی پراکسید هیدروژن و پراکسیدهای لیپیدی ایفا می‌کند. همچنین، این عنصر با افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز موجب تبدیل سوپراکسید به پراکسید هیدروژن و سپس بی‌اثر شدن آن توسط گلوتاتیون پراکسیداز می‌گردد (۲۰). مطالعات قبلی از جمله تحقیق Staneviciene و همکاران (۲۰۲۲) نیز کاهش سطح MDA در پاسخ به سلنیوم آلی در شرایط تنش گرمایی را تأیید کرده‌اند (۱۹). این نتایج هم‌راستا با یافته‌های ما نشان می‌دهند که سلنیوم می‌تواند با تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در برابر تنش اکسیداتیو از سلول‌ها محافظت کند. همچنین، در این مطالعه، میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (FRAP) در گروه‌های دریافت‌کننده سلنیوم به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. FRAP به‌عنوان شاخصی برای ارزیابی توانایی کلی بدن در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد مطرح است (۲۴). افزایش FRAP می‌تواند نشان‌دهنده بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی بدن در نتیجه مصرف سلنیوم باشد. این افزایش احتمالاً به دلیل بالا رفتن سطح گلوتاتیون و سایر آنتی‌اکسیدان‌های درون‌سلولی در اثر تحریک آنزیم‌های سنتزکننده آن‌ها توسط سلنیوم می‌باشد (۳). گلوتاتیون یکی از مهم‌ترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی داخل سلولی است که نقش حیاتی در حفظ تعادل اکسیداتیو دارد. سلنیوم با فعال‌سازی آنزیم‌هایی مانند گلوتاتیون پراکسیداز، تیوردوکسین ردوکتاز و سایر سلنوپروتئین‌ها، از طریق مکانیسم‌های دفاعی ذاتی تشکیل رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدی را مهار می‌کند (۱۸). مطالعه Aderaو همکاران (۲۰۲۳) نیز نشان داد که مصرف سلنیوم آلی موجب افزایش معنی‌دار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در موش‌های تحت تنش گرمایی می‌شود (۱). این یافته‌ها نیز با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی داشته و بر نقش محافظتی سلنیوم به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان مؤثر تأکید دارند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که تنش گرمایی با کاهش معنی‌دار بیان ژن اینترلوکین-۱۰ و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، و افزایش بیان ژن فاکتور نکروز تومور آلفا و غلظت مالون‌دی‌آلدئید، موجب بروز پاسخ‌های التهابی و استرس اکسیداتیو در موش‌های نر نژاد ویستار شد. استفاده از سلنیوم آلی در دوزهای ۰/۳۰ و ۰/۴۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم ماده خشک جیره، با افزایش بیان ژن اینترلوکین-۱۰ و کاهش بیان فاکتور نکروز تومور آلفا ، به‌طور مؤثری پاسخ‌های ضدالتهابی را تقویت نمود. همچنین، این دوزها با کاهش سطح مالون‌دی‌آلدئید و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به تعدیل استرس اکسیداتیو و بهبود توان دفاع آنتی‌اکسیدانی کمک کردند. بر این

اساس، مکمل‌یاری با سلنیوم آلی در دوزهای ۰/۳۰ تا ۰/۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌عنوان یک راهکار تغذیه‌ای مؤثر برای کاهش اثرات منفی تنش گرمایی و ارتقاء عملکرد سیستم ایمنی و آنتی‌اکسیدانی در شرایط تنش‌زا پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، به پاس تصویب طرح پژوهشی و فراهم نمودن امکانات آزمایشگاه رازی برای انجام این تحقیق، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Aderao, G.N., Jadhav, S.E., Pattanaik, A.K., Gupta, S.K., Ramakrishnan, S., Lokesha, E., Chaudhary, P., Vaswani, S., Singh, A., Panigrahi, M., Dutta, N., Singh, G., 2023. Dietary selenium levels modulates antioxidant, cytokine and immune response and selenoproteins mRNA expression in rats under heat stress condition. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 75:127105.

2. Almeida, L.M., Bassi, L.S., Santos, R.O., Orlando, U.A., Maiorka, A., Oliveira, S.G., 2021. Effect of feed form and heat processing on the growth performance of growing and finishing pigs. *Livestock Science*, 245:104430.

3. Antunović, Z., Novoselec, J., Klir Šalavardić, Ž., Steiner, Z., Šperanda, M., Jakobek Barron, L., Ronta, M., Pavić, V., 2022. Influence of red corn rich in anthocyanins on productive traits, blood metabolic profile, and antioxidative status of fattening lambs. *Animals*, 12(5):612.

4. Asghari, M., Ghalhari, G.F., Pirposhteh, E.A., Dehghan, S.F., 2022. Spatio-temporal evolution of the thermo-hygrometric index (THI) during cold seasons: A trend analysis study in Iran. *Sustainability*, 14(24):16774.

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

6. Benzie, I.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1):70-76.

7. Boshtam, M., Asgary, S., Kouhpayeh, S., Shariati, L., Khanahmad, H., 2017. Aptamers against pro- and anti-inflammatory cytokines: A review. *Inflammation*, 40(1):340-349.

8. Draper, H.H., Hadley, M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 186:421-431.

9. Guo, H., Li, M., Liu, H., 2022. Selenium-rich yeast peptide fraction ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis in mice by inhibiting inflammation via MAPK and NF-κB signaling pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4):2112.

10. He, K., Tang, Q., Gong, M., Yang, S., Chen, X., Zhu, H., Liu, D., Huang, B., 2020. A transcriptomic study of selenium against liver injury induced by beta-cypermethrin in mice by RNA-seq. *Functional and Integrative Genomics*, 20(3):343-353.

11. Komáromyová, M., Mravčáková, D., Petrič, D., Kucková, K., Babják, M., Dolinská, M.U., Königová, A., Maďarová, M., Pruszyńska-Oszmałek, E., Cieslak, A., Čobanová, K., Váradyová, Z., Várady, M., 2021. Effects of medicinal plants and organic selenium against ovine haemonchosis. *Animals*, 11(5):1319.

12. Li, Z., Dong, Y., Chen, S., Jia, X., Jiang, X., Che, L., Lin, Y., Li, J., Feng, B., Fang, Z., Zhuo, Y., Wang, J., Xu, H., Wu, D., Xu, S., 2021. Organic selenium increased gilts antioxidant capacity,

20. Surai, P.F., 2021. Organic selenium vs. its combination with sodium selenite in poultry nutrition: Food for thoughts. *Poultry Science*, 100(10):101311.

21. Tsuji, P.A., Carlson, B.A., Anderson, C.B., Seifried, H.E., Hatfield, D.L., Howard, M.T., 2015. Dietary selenium levels affect selenoprotein expression and support the interferon-γ and IL-6 immune response pathways in mice. *Nutrients*, 7(8):6529-6549.

22. Wang, W., Kang, R., Liu, M., Wang, Z., Zhao, L., Zhang, J., Huang, S., Ma, Q., 2022. Effects of different selenium sources on the laying performance, egg quality, antioxidant, and immune responses of laying hens under normal and cyclic high temperatures. *Animals*, 12(8):1006.

23. Yang, J., Li, H., Hao, Z., Jing, X., Zhao, Y., Cheng, X., Ma, H., Wang, J., Wang, J., 2022. Mitigation effects of selenium nanoparticles on depression-like behavior induced by fluoride in mice via the JAK2-STAT3 pathway. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 14(3):3685-3700.

24. Zheng, Y., Zhao, Y., He, W., Wang, Y., Cao, Z., Yang, H., Wang, W., Li, S., 2022. Novel organic selenium source hydroxy-selenomethionine counteracts the blood-milk barrier disruption and inflammatory response of mice under heat stress., *Frontiers in Immunology*, 13:1054128.

25. Zhu, X., Liu, Y., Xu, N., Ai, X., Yang, Y., 2023. Molecular characterization and expression analysis of IL-10 and IL-6 in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Pathogens*, 12(7):886.

26. Zoidis, E., Seremelis, I., Kontopoulos, N., Danezis, G.P., 2018. Selenium-dependent antioxidant enzymes: Actions and properties of selenoproteins. *Antioxidants*, 7(5):66.

immune function, and changed intestinal microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 12:723190.

13. Liu, J., Wang, S., Zhang, Q., Li, X., Xu, S., 2020. Selenomethionine alleviates LPS-induced chicken myocardial inflammation by regulating the miR-128-3p-p38 MAPK axis and oxidative stress. *Metallomics*, 12(1):54-64.

14. Liu, K., Ding, T., Fang, L., Cui, L., Li, J., Meng, X., Zhu, G., Qian, C., Wang, H., Li, J., 2020. Organic selenium ameliorates *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in rats by inhibiting the activation of NF-κB and MAPK signaling pathways. *Frontiers in Veterinary Science*, 7:443.

15. Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2−ΔΔCT method. *Methods*, 25(4):402–408.

16. Luan, Y., Zhao, J., Yao, H., Zhao, X., Fan, R., Zhao, W., Zhang, Z., Xu, S., 2016. Selenium deficiency influences the mRNA expression of selenoproteins and cytokines in chicken erythrocytes. *Biological Trace Element Research*, 171(2):427-436.

17. Meng, T., Liu, Y.L., Xie, C.Y., Zhang, B., Huang, Y.Q., Zhang, Y.W., Yao, Y., Huang, R., Wu, X., 2019. Effects of different selenium sources on laying performance, egg selenium concentration, and antioxidant capacity in laying hens. *Biological Trace Element Research*, 189(2):548-555.

18. Pecoraro, B.M., Leal, D.F., Frias-De-Diego, A., Browning, M., Odle, J., Crisci, E., 2022. The health benefits of selenium in food animals: A review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 13(1):58.

19. Staneviciene, I., Sulinskiene, J., Sadauskiene, I., Liekis, A., Ruzgaite, A., Naginiene, R., Baranauskiene, D., Simakauskiene, V., Krusnauskas, R., Viezeliene, D., 2022. Effect of selenium on the iron homeostasis and oxidative damage in brain and liver of mice. *Antioxidants*, 11(7):1216.