Iranian Journal Of Biological Science. 2024; 19(1):43-54

Original Article

Iranian Journal of Biological Sciences

https://zisti.iauvaramin.ac.ir

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

Ahmad Miri[1], Ali Asghar Sadeghi[2*], Mohammad Chamani[3] Asa Ebrahimi[4]

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

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

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

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

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

Article Info

Article History:
Recived 2024.6.26
Revised 2024. 8. 17
Accepted 2024.9.18

KeyWords:

antioxidant enzymes
heat stress
horse
liver enzymes
zinc-methionine

*Corresponding author:
E-mail address:

aasdghi@gmail.com

Abstract

Introduction:In the hot seasons and in tropical regions, supplements that increase horses' tolerance to heat stress are necessary. Due to its active role in the structure and activity of enzymes, zinc has positive effects on heat tolerance. There are different types of zinc supplements; the bioavailability of the organic form is higher than that of other forms.
This study aimed to evaluate the effects of dietary zinc-methionine supplementation in horses exposed to heat stress on blood antioxidant indices, antioxidant enzyme activity, and liver enzyme activity.

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

Results: Heat stress increased and zinc-methionine supplementation decreased significantly the concentration of malondialdehyde. An increase in the dose of zinc-methionine had no significant effect on the concentration of malondialdehyde. The interaction effect of stress and supplementation on the activity of superoxide dismutase enzyme tended to be significant and also on the activity of glutathione peroxidase enzyme. The activity of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and alkaline phosphatase enzymes increased in horses exposed to heat stress and showed a significant decrease with zinc-methionine supplementation.
Conclusion: The zinc-methionine supplementation at a dose of 67 mg/kg can eliminate the negative effects of heat stress on antioxidant indices and liver enzymes in Friesian horses.

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

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.iaubaramin.ac.ir

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

احمد میری[۱]، علی اصغر صادقی[۲*]، محمد چمنی[۳]، آسا ابراهیمی[۴]

[۱] دانشجوی دوره دکتری، گروه علوم دامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد 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
[۴] دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و به نژادی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامي، تهران، ایران

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

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
ارسال ۱۴۰۳/۰۴/۰۶
بازنگری ۱۴۰۳/۰۵/۲۷
پذیرش ۱۴۰۳/۰۶/۲۸

کلمات کلیدی
اسب
مکمل روی-متیونین
آنزیم های آنتی اکسیدانی
آنزیم های کبدی
تنش گرمایی

* **مسئول مکاتبات:**
علی اصغر صادقی
aasdghi@gmail.com

چکیده

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

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

نتایج: در قالب آزمون فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی، ۳۰ راس اسب فریزین در دو سطح تنش گرمایی و سه سطح مکمل روی-متیونین اعمال شد. سطوح تنش شامل ۱) بدون تنش و ۲) با تنش گرمایی بود. سه سطح مکمل روی-متیونین شامل : ۱) بدون مکمل، ۲) مقدار ٦٧ میلی گرم روی-متیونین در کیلوگرم جیره و ۳) مقدار ۱۲۰ میلی گرم روی-متیونین در کیلوگرم جیره استفاده شد. از اسب ها نمونه های خون اخذ شد و شاخص های آنتی اکسیدانی و فعالیت آنزیم های کبدی اندازه گیری شد نتایج: تنش گرمایی سبب افزایش معنی دار (P< ۰,۰۰۱)غلظت مالون دی آلدئید و افزودن مکمل روی-متیونین سبب کاهش معنی دار (P< ۰,۰۰۱) غلظت این ماده در خون شد. افزایش دوز روی-متیونین تغییر معنی داری بر غلظت مالون دی آلدئید نداشت. اثر متقابل تنش و مکمل بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تمایل به معنی داری و بر فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز معنی دار (P< ۰,۰۱۵) بود. فعالیت آنزیم های آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز تحت تاثیر تنش گرمایی افزایش (P< ۰,۰۰۱)و با افزودن مکمل روی-متیونین کاهش معنی داری (P< ۰,۰۰۱) نشان داد

نتیجه گیری: افزودن مکمل روی-متیونین بر غلظت آنزیم های کبدی در پلاسما موثر بود و در دوز ٦٧ میلی گرم در کیلوگرم سبب کاهش غلظت آنزیم های کبدی در پلاسمای خون اسب های فریزین در شرایط تنش گرمایی شد

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

ناشر: دانشگاه آزاد اسامی واحد ورامین - پیشوا شاپا چاپی: ۱۷۳۵-۴۲۲٦ شاپا الکترونیکی: ۴۵۹ X - ۲۷۱۷
نویسندگان: حق مؤلف©

مقدمه

در فصول گرم سال و در مناطق گرمسیری، اسب با تنش گرمایی مواجه می شود و طی تنش به دلیل افزایش سرعت متابولیسم، غلظت رادیکال¬های آزاد در سلول ها و بافت های بدن افزایش می یابد (۱). غلظت زیاد این مواد مضر است و سبب آسیب به بافت ها بویژه بافت عضلانی بدن اسب می شود و عملکرد اسب را در مسابقات کاهش می دهد (۲). تنش مسابقه یا فعالیت شدید بویژه در شرایطی که دمای هوا زیاد است اثر منفی مضاعفی بر سلامتی و عملکرد اسب دارد و ممکن است به بافت¬های بدن بویژه کبد آسیب برساند (۳). محققان به این نتیجه رسیده اند که رقابت در مسابقات و تنش گرمایی دارای اثرات نامطلوب فیزیولوژیکی است و سبب افزایش غلظت کورتیزول خون می شود که می تواند اسب را مستعد بیماری های عفونی کند (٤). در شرایط تنش گرمایی غلظت آنزیم های آمینوترانسفراز کبدی در خون حیوانات افزایش می یابد که بیانگر آسیب های کبدی است. همچنین غلظت کراتینین خون در شرایط تنش گرمایی افزایش می یابد که شاخص آسیب به بافت های ماهیچه ای است (٥). بنابراین شناخت اثرات تنش گرمایی و یافتن راهکاری برای کاهش اثرات مضر این تنش ها می تواند به پرورش دهندگان اسب کمک زیادی کند

یکی از راهکارهای کاهش اثرات نامطلوب فعالیت¬های عضلانی بویژه در شرایط دمایی نامناسب، استفاده از مواد آنتی اکسیدان در جیره حیوانات است (٦). عنصر روی به دلیل نقشی که در ساختار و فعالیت آنزیم¬های آنتی اکسیدانی ایفا می کند و اثراتی که در بیان ژن های آنزیم های مذکور دارد مورد توجه محققان تغذیه دام قرار گرفته است (۷). روی همچنین در پیشگیری از تشکیل رادیکال های آزاد و حفاظت ساختارهای بیولوژیک و همچنین در بهبود عملکرد سیستم ایمنی موثر است (۸). انجمن تحقیقات ملي امریکا حداقل نیاز اسب ها را به روي ٤ میلی گرم در کیلوگرم وزن بدن متابولیکی در روز پیشنهاد کرده است (۹). عامل مهم تعیین کننده مقدار نیاز به افزودن مکمل روی، وضعیت خاك و غلظت روي در گیاهان منطقه است (۱۰). کشور ما در منطقه اي از زمین قرار گرفته است که بیشتر خاك هاي آن از لحاظ روي کمبود شدید دارند (۱۱) و گیاهانی که در این خاك ها رشد کرده و به عنوان خوراك دام مصرف می¬شوند، با کمبود این عنصر مواجه می باشند. در همین راستا ملکوتي (۲۰۰۷) گزارش کرد که مقدار روي در خاك¬هاي ایران به طور معمول کمتر از ۰/۸ میلي گرم در کیلوگرم خاك مي باشد درحالي که در شرایط مطلوب، مقدار آن باید بیش از یك میلي گرم در کیلوگرم خاك باشد(۱۲). به همین دلیل افزودن مکمل های روی به جیره حیوانات ضروری است و با افزودن این مکمل ها به جیره حیوانات مختلف اثرات مطلوبی بر تولید و تولید مثل گزارش شده است (۱۳، ١٤)

یکی از مکمل های روی مورد استفاده، فرم معدنی روی، مانند سولفات روی است. ولیکن دسترسی حیاتی و جذب روی آن کم می-باشد (۱۵). امروزه گرایش به استفاده از فرم آلی روی مانند مکمل روی-متیونین افزایش یافته است (١٦). در سایر حیوانات مطالعات زیادی درباره اثرات افزودن روی آلی در شرایط با و بدون تنش بر شاخص های آنتی اکسیدانی، فراسنجه های تولید مثلی و فعالیت سیستم ایمنی انجام شده است (۹، ۷). در تحقیقات گذشته از مکمل روی-متیونین برای بهبود وضعیت سم و بهبود ضایعات سمی اسب استفاده شده است (۱۷). تاکنون در زمینه اثرات افزودن مکمل روی آلی به جیره بر شاخص های آنتی اکسیدانی و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در اسب ها بویژه در شرایط تنش گرمایی گزارشی منتشر نشده است. با توجه به اثرات منفی تنش گرمایی بر سلامتی و فعالیت های بدنی اسب (۵، ۲) و اثراتی که روی بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی دارد (۷)، لازم است پژوهش هایی در این زمینه برای روشن شدن اثرات این عنصر به فرم آلی (مکمل روی-متیونین) بر شاخص های آنتی-اکسیدانی انجام شود. بنابراین هدف از انجام پژوهش حاضر مطالعه اثرات افزودن مکمل روی-متیونین به جیره اسب در معرض تنش گرمایی بر شاخص های آنتی اکسیدانی خون، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و فعالیت آنزیم های کبدی بود

مواد و روش ها

ایـن تحقیـق در تابسـتان ۱۴۰۲ در دو بخـش مزرعه¬ای (مجموعـه پرورش اسـب فریزیـن در محمد شـهر کرج) و آزمایشـگاهی (آزمایشـگاه رازی و آزمایشـگاه دامپزشکی دامگستر شـهریار) انجام شد. مجموعه اسـب فریزین دارای ۸۷ راس اسـب فریزین بود کـه از بین انها تعـداد ۳۰ راس اسب با سن (۱/۳±۵ سـال) و وزن ۴۰±۶۰۰ کیلوگرم) انتخاب شـدند. محل نگهداری اسـب هـا آفتابـگیر و دارای فضای کافی بـرای گردش و استراحـت بود. جایـگاه دارای آخور و کف قابل شستشـو بـود. در طی تابسـتان حداقل به مدت ٤ سـاعت دمای هوا از سـاعت ۱۱ تا ۳ بعد از ظهر بالای ۳۸ درجه سلسـیوس و به دلیل وجود کشـتزار زیـاد در اطراف، رطوبـت جایـگاه به بـالای ۵۵ درصد می رسـید و اسـب هایـی کـه در محوطه باز یـا بهاربند نگهداری می شـدند در معـرض شـاخص دما-رطوبت ۵۲ درجه قرار داشـتند که تنش گرمایی رخ داده است (۲). باشـگاه دارای جایگاه¬های بسـته با هواکش¬هـای قوی و مه پاش بـود و امکان تامین دمـای ۲۸ درجـه سلسـیوس طـی اوج گرما مهیـا بود که گـروه کنترل منفی در ایـن شرایط نگهداری شـدند. در طی آزمایش شـاخصه هـای ایجاد تنـش گرمایی شـامل رکورد های دمـای مقعد، تعـداد ضربان قلب و تعـداد تنفس در دقیقه ثبت شـدند. مکمل روی-متیونیـن (Zinpro, Edina, MN, USA) مـورد اسـتفاده در ایـن پژوهـش از شرکت سـنادام پارس تهیه شـد. این مکمل حـاوی ۱۰ درصد روی و ۲۰ درصـد متیونیـن بـود و مقـدار مورد نیـاز برای هر گروه با محاسـبه تعیین شـد. برای کاهش خطـای احتمالی به گروه شـاهد و گروهـی که مکمـل روی-متیونین کمتری دریافـت کردند به جیـره مکمل متیونین اضافه شـد و همه گروه هـا مقدار متیونین یکسـانی دریافـت کردند

در قالـب آزمـون فاکتوریـل ۳×۲ و بـر پایه طـرح کاملا تصادفی، از ۳۰ راس اسـب فریزین اسـتفاده شـد. دو سطح تنش اعمال شـد، ۱) بـدون تنش گرمایی: تعداد ۱۵ اسـب در سـالن بسـته با دمـای ۲۸ درجه سلسـیوس؛ ۲) با تنش گرمایی: تعداد ۱۵ اسـب در محوطه باز به مدت ٤ سـاعت در شـبانه روز در دمای ۳۸ درجه سلسـیوس و مابقی ساعات در سـالن بسـته نگهداری شـدند. سه سـطح مکمل روی-متیونین اسـتفاده شـد ، ۱) بدون مکمل، ۲) مقدار ٦٧ میلی گرم روی-متیونیـن در کیلوگرم جیـره و ۳) مقدار ۱۲۰ میلی گرم روی-متیونیـن در کیلوگرم جیره. مقادیـر روی-متیونین مورد اسـتفاده در ایـن پژوهش بر اسـاس NRC (۱۸) بود در مرحلـه اول دو هفتـه برای عـادت دهی اسـب ها به شرایط در نظر گرفته شـد و خونگیری از اسـب های سـالن بسـته تهویه دار و در سـالن بـا محوطه باز بـرای تعیین اثربخشـی شرایط دمایـی و ایجاد تنش گرمایی انجام شـد. با طی شـدن دوره عـادت دهـی و در روزهـای ۱۵ و ۱٦ دمای مقعد، شـدت ضربـان قلب و تعداد تنفـس در دقیقه اسـب ها انـدازه گیری و مقایسـه بین اسـب های سـالن بسـته و محوطه باز انجام شـد. از اسـب ها در روز ۱٦ یک نمونـه خون گرفته شـد تا سـطح پایه صفات مورد بررسـی در خون مشـخص شـود. در مرحله دوم به مدت سـه هفته تغذیه اسـب ها با یـا بدون مکمـل روی-متیونیـن انجام شـد و در روز ۳۷ خونگیـری از وریـد وداج بـه عمل آمد. نمونه خـون به مقـدار ۱۰ میلی لـیتر، با سرنـگ ۲۰ میلی لیتر و سـوزن گیـج ۲۹ گرفته در لوله استریـل حاوی هپارین نگهداری شـد تـا پلاسما جـدا شـود. پلاسما هـر نمونه با اسـتفاده از دسـتگاه سـانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه، جدا شـد

سـنجش مقـدار مالون‌دی‌آلدئیـد بـه روش Nielsen و همکاران (۱۹۹۷)، ظرفیت آنتی اکسـیدانی تام با اسـتفاده از روش احیای رادیـکال آزاد ۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل و براساس روشBrand-Williams و همکاران (۱۹۹۵) ، فعالیت سوپراکسـید دیسـموتاز به روشMisra و همکاران (۱۹۹۷) با سـنجش اتواکسیداسـیون اپی نفرین بـه آدرنوکروم انجام شـدند(۲۱-۱۹). همچنیـن اندازه¬گیري فعالیـت گلوتاتیون پراکسـیداز به روش Paglia and Valentine (۱۹٦۷)، سنجش آلانیـن ترانس‌آمینـاز با اسـتفاده از کیت سـنجش شرکت پارس آزمـون برای این آنزیـم انجام گرفـت. فعالیت آنزیم آلکالین فسـفاتاز بـا روش Ohkubo و همـکاران (۱۹۷٤) و از طریـق اندازه‌گیـری آزاد شـدن پارا-نیتروفنیـل از پارا-نیتروفنیل فسـفات در دمای ۳۰ درجه سیلسیوس و pH/۲ ۱۰ در اسـپکتروفتومتر تعییـن شـد. فعالیت آنزیم آسـپارتات آمینو¬ترانسـفراز بـا روش Nisselbaum و همکاران (۱۹٦۹) اندازه گیری شـد(۲٤-۲۲).

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 با استفاده ازآزمون توکی با سطح احتمال ۵ درصد انجام شد (۲۵)

نتایج

اثر تنش گرمایی و مکمل روی-متیونین بر شاخص های آنتی اکسیدانی و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در جدول ۲ گزارش شده است. اثرات اصلی تنش و مکمل بر غلظت مالون دی آلدئید معنی دار و اثر متقابل این دو عامل بر غلظت مالون دی آلدئید معنی دار نبود. تنش گرمایی سبب افزایش معنی دار غلظت مالون دی آلدئید و افزودن مکمل روی-متیونین سبب کاهش معنی دار غلظت این ماده در خون شد. افزایش دوز روی-متیونین تغییر معنی داری بر غلظت مالون دی آلدئید نداشت. ظرفیت آنتی اکسیدانی کل تحت تاثیر تنش گرمایی کاهش معنی داری نشان داد و افزودن مکمل روی-متیونین اثری بر این شاخص نداشت. اثر متقابل تنش و مکمل بر ظرفیت آنتی اکسیدانی کل معنی دار نبود. اثر اصلی تنش گرمایی بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز معنی دار اما اثر اصلی روی-متیونین بر فعالیت این دو آنزیم معنی دار نبود. اثر متقابل تنش و مکمل بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تمایل به معنی داری داشت و فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز هم معنی دار بود

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

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

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

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

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

اثرات اصلی تنش گرمایی و مکمل روی-متیونین بر آنزیم های کبدی و کلیوی در جدول ۱ گزارش شده است. آنزیم آلانین آمینوترانسفراز تحت تاثیر تنش گرمایی افزایش و با افزودن مکمل روی-متیونین کاهش معنی داری نشان داد. اثر متقابل تنش و مکمل بر غلظت این آنزیم معنی دار بود. اثرات اصلی تنش و مکمل بر غلظت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز معنی دار بود و اثرات متقابل تنش و مکمل بر غلظت این آنزیم معنی دار نبود. تنش گرمایی سبب افزایش و افزودن مکمل سبب کاهش غلظت این آنزیم شد. دوز مکمل تغییر معنی داری در غلظت این آنزیم ایجاد نکرد. تحت تاثیر تنش گرمایی غلظت آلکالین فسفاتاز افزایش یافت. اثر اصلی مکمل و اثر متقابل تنش و مکمل بر غلظت این آنزیم معنی دار بود. افزودن مکمل روی-متیونین سبب کاهش غلظت این آنزیم شد. کراتین کیناز تحت تاثیر اثر اصلی تنش گرمایی قرار گرفت و افزودن مکمل بر غلظت این آنزیم اثر معنی داری نداشت. اثر متقابل تنش و مکمل معنی دار نبود.

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

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

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

بحث

در بدن موجودات زنده ۵۱ نوع آنزیم شناسایی شده است که برای انجام فعالیت و عملکرد طبیعی نیاز به عنصر روی دارند (۲۶). عنصر روی یک ماده معدنی کم نیاز ولی ضروری برای بدن و دومین عنصر کمیاب بدن بعد از آهن است. از آنجا که بدن نمی تواند این عنصر را به مقدار زیاد ذخیره کند، مصرف روزانه آن در جیره غذایی ضروری است و لازم است به طور روزانه در جیره غذایی حیوانات استفاده شود (۲۷). در شرایط تنش نیاز به این عنصر افزایش می یابد، زیرا فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی بدن که حاوی این عنصر است، برای مقابله با عوامل اکسیدکننده و مخرب باید افزایش یابد (۸). تامین این عنصر از منابع گیاهی و معدنی با مشکلاتی رو به رو است، بنابراین تامین این عنصر از طریق شکل های آلی آن باید مورد توجه قرار گیرد (۱۵). هدف این آزمایش مطالعه اثر افزودن مکمل روی-متیونین به جیره بر شاخص های آنتی اکسیدانی و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی خون اسب در شرایط تنش گرمایی بود. مالون دی آلدئید شاخص اثبات شده پراکسیداسیون لیپیدی است که با مواد واکنش دهنده با اسید تیوباربیتوریک (محصولات پراکسیداسیون لیپیدی) اندازه‌گیری می‌شود (۲۸). مالون دی آلدئید به عنوان محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدی تشکیل می شود و بنابراین، میزان پراکسیداسیون لیپیدی توسط رادیکال های آزاد را می توان با توجه به سطوح مالون دی آلدئید تعیین کرد (۲۹). کاهش مالون دی آلدئید یا افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل شاخص کاهش استرس اکسیداتیو یا افزایش دفاع آنتی اکسیدانی است. در اسب های در معرض تنش گرمایی، غلظت مالون دی آلدئید افزایش یافت که نشان دهنده شرایط تنش اکسیداتیو ا ست

افـــزودن مکمل روی-متیونین ســـبب کاهـــش غلظت مالون دی آلدئید شـــد و افزایـــش دوز بر این روند، بـــی تاثیر بود. در توافـــق با یافته مطالعه حاضر، ســـالیم و الشریف (۲۰۱۵) گزارش کردند که اســـب هـــای دریافت کننـــده مکمل روی، کاهش قابل توجهی در ســـطوح مالـــون دی‌آلدئید در سرم و بافت‌ها داشـــتند(۳۰). عنصر روی بخشـــی از سیســـتم آنتی اکســـیدانی بدن است و کمبود آن ســـبب اختلال در سیستم دفاعی آنتی اکســـیدانی بـــدن و افزایش استرس اکســـیداتیو می گـــردد (۳۱). تنـــش اکســـیداتیو در نتیجه عـــدم تعادل بیـــن تولیـــد رادیکال هـــای آزاد و گونه های فعال اکســـیژن (شـــامل آنیون سوپراکســـید، رادیـــکال آزاد هیدروکســـیل، هیدروژن پراکســـید و ...) از یک طرف و سیســـتم دفاع آنتی اکســـیدانی از طرفی دیگر ایجاد می گردد. در سیســـتم های بیولوژیکـــی هـــوازی، برای مقابله بـــا رادیکال هـــای آزاد و گونه های فعال اکســـیژن، مکانیســـم هـــای دفاعی طراحی شـــده اســـت تا اثرات زیان بار این عوامل مهاجـــم را خنثی نمـــوده یا به حداقـــل برســـانند. روي براي حفظ ســـاختار و فعالیـــت آنزیم‌هـــاي سوپراکســـید دیســـموتاز و گلوتاتیون پراکســـیداز عنصر لازم و ضروری اســـت (۳۱). کاهش سطوح مالـــون دی آلدئید در گروه‌های تحت تنـــش که مکمل روی-متیونیـــن دریافـــت کردند، به نقـــش آنتی اکســـیدانی روی نســـبت داده می‌شـــود. روی می‌تواند تشـــکیل رادیکال‌های آزاد و پراکسیداســـیون لیپیـــدی را با مکانیســـم دفاعی آنتی اکســـیدانی ذاتی خود بـــا کمـــک گلوتاتیون پراکســـیداز و تیوردوکســـین ردوکتاز کاهش دهـــد (۳۱، ۲۸).

ظرفیـــت آنتی اکســـیدانی کل در اســـب هـــای تحت تنش گرمایی کاهـــش یافت و افـــزودن مکمـــل روی-متیونین در دوز ۱۲۰ میلـــی گـــرم در کیلوگرم بر این فراســـنجه تمایل به افزایش داشـــت. کاهش ظرفیت آنتی اکســـیدانی در اســـب های تحت تنش نشـــان دهنده این اســـت کـــه ترکیبات آنتی اکســـیدانی بدن طی تنش مصرف شده اســـت (۳۰، ۲۹). تنش ســـبب افزایش غلظت رادیـــکال های آزاد در ســـلول ها می شـــود و مواد آنتی اکســـیدانی صرف خنثی کردن این عوامل مضر می شـــوند (۳۱). به نظر می رســـد تنـــش گرمایی نیاز به روی را به شـــدت افزایـــش داده و دوزهـــای مکمل مورد اســـتفاده در این مطالعـــه در حدی نبوده که بتواند ســـبب افزایـــش ظرفیت آنتی اکســـیدانی کل در این شرایط شـــود. دوز ۱۲۰ میلـــی گـــرم در کیلوگرم تمایل بـــه افزایش ظرفیت آنتی اکســـیدانی داشت و شـــایان ذکر اســـت افزایش بیشتر دوز مکمـــل روی مـــی توانـــد اثرات منفی داشـــته باشـــد. گزارش شـــده اســـت عـــنصر روی در دوز کم هـــم می تواند ســـبب تولید عوامل اکســـیدکننده و رادیکال های آزاد شـــود ولیکـــن اثری که بر تولیـــد مواد آنتی اکســـیدانی و همچنین بر فعالیـــت آنزیم های آنتـــی اکســـیدانی دارد خیلی بیشتر از اثرات منفی آن اســـت. در دوز زیادتـــر اثرات منفی عنصر روی از اثـــرات مثبـــت آن پیشـــی می گیرد و ســـبب افزایش ســـطح رادیـــکال هـــای آزاد در بدن و کاهـــش ظرفیت آنتی اکســـیدانی و افزایـــش مالون دی آلدئید می شـــود (۸)

فعالیت بیشتر سوپراکسید دیســـموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در پلاسمای اســـب های تحـــت تنش نشـــان داد که غلظت رادیکال های آزاد افزایش یافته و ســـبب شـــده اســـت آنزیم های آنتـــی اکســـیدانی با سرعت بیـــشتری فعالیـــت کنند. نتایـــج ژانگ و همـــکاران (۲۰۱۴) نشـــان داد در طی تنش، فعالیـــت آنزیـــم های آنتی اکســـیدانی افزایش مـــی یابد که با یافتـــه های ایـــن پژوهـــش مطابقـــت دارد(۳۲). افزودن مکمـــل روی-متیونیـــن تاثیری بر فعالیت آنزیم سوپراکســـید دیســـموتاز و آنزیم گلوتاتیون پراکســـیداز نداشت. این یافته بـــرخلاف یافته جامعی و همـــکاران (۲۰۲۳) بود که دریافتند با افـــزودن مکمـــل روی-متیونیـــن به جیره مـــوش فعالیت سوپراکسید دیســـموتاز و گلوتاتیون پراکســـیداز افزایش می یابد(۳۳)

اثـــر متقابـــل تنـــش و مکمل بـــر فعالیـــت ایـــن دو آنزیم بـــه ترتیب تمایـــل بـــه معنـــی داری و معنی دار بـــود. این موضوع بـــه این معنا اســـت کـــه در شرایط تنـــش گرمایی افزودن مکمـــل روی-متیونین ســـبب بهبـــود فعالیت آنزیم هـــای آنتی اکســـیدانی شـــده اســـت. روی یـــک کوفاکتور CuZn-سوپراکســـید دیســـموتاز اســـت که آنزیم اصلی آنتی اکســـیدانی اســـت و نقش کلیدی در سرکـــوب رادیکال های آزاد دارد. همچنیـــن، فعالیت سوپراکســـید دیســـموتاز می توانـــد پراکسیداســـیون لیپیـــدی را از طریق افزایش ســـطح گلوتاتیـــون مهار کنـــد (۳۴). آنزیم های آلانین ترانســـفراز و آســـپارتات ترانســـفراز به طور عمده در کبد یافت می‌شوند، امـــا مقـــداری از آن ها نیـــز در کلیه‌ها، قلـــب، ماهیچه‌های اســـکلتی، ســـلول های قرمز خون و مغز وجـــود دارد (۳۵)

غلظت آلانین ترانسفراز و آسپارتات ترانسفراز برای بررسی وضعیت کبد اندازه‌گیری می‌شوند. دو آنزیم آلانین ترانسفراز و آسپارتات ترانسفراز در داخل سلول کبدی قرار دارند. زمانی که کبد آسیب دیده است، معمولاً قبل از آن که علائم بارزتر آسیب کبدی رخ دهد، غلظت آلانین ترانسفراز و آسپارتات ترانسفراز افزایش می¬یابد (۳۶). تابریو و همکاران (۱۹۹۶) گزارش کردند افزایش آنزیم-های کبدی ناشی از عدم پایداری غشای پلاسمایی، همچنین آسیب به بافت کبد می باشد(۳۷). در صدمات کبدی عملکرد ترانسپورت های هپاتوسیت ها مختل می شود که نتیجه آن ایجاد نشت از غشای پلاسمایی است. بنابراین این نشت منجر به رها شدن این آنزیم ها در سرم می شود (۳۸). لذا افزایش سطح این دو آنزیم می تواند نشانه ای از تخریب سلول-های کبد باشد. فعالیت آنزیم های آسپارتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز در پلاسمای خون اسب های تحت تنش افزایش یافت. این موضوع نشان می دهد کبد حیوانات در اثر تنش گرمایی آسیب دیده و مکمل روی-متیونین به عنوان یک عامل آنتی اکسیدانی عمل می کند. ژانگ و همکاران (۲۰۱۸) افزایش فعالیت آنزیم آلانین ترانس آمیناز را در موش‌های صحرایی در پاسخ به تنش گرمایی گزارش کردند(۳۹). به طور مشابه، Li و همکاران (۲۰۱٤) گزارش کردند که محیط گرم و مرطوب سبب آسیب کبدی به موش‌ها می‌شود(٤۰). 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 (٤۱).

با افزودن مکمل روی-متیونین به جیره فعالیت آنزیم های کبدی به طور معنی داری کاهش یافت. کاهش سطح فعالیت آنزیم آلانین ترانس آمیناز با افزودن مکمل روی-متیونین به جیره غذایی در اسب های در معرض تنش گرمایی ممکن است ناشی از کاهش تنش اکسیداتیو باشد که با سطوح کم مالون دی آلدئید مشهود است که با یافته‌های ملیار و همکاران (۲۰۲۰) مطابقت دارد(٤۱). مطابق با یافته های این پژوهش، محمد و همکاران (۲۰۱۲) مشاهده کردند، در بیمارانی که غلظت روی کمتری در سرم داشتند، مصرف مکمل روی، موجب کاهش فعالیت آنزیم های کبدی در سرم شده بود(٤۲). در همین راستا، ناگالاکشمی و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در بره‌هایی که مکمل‌های روی آلی دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه کنترل بیشتر بود(٤۳). در تناقض با نتایج این تحقیق، یافته های هو و همکاران (۲۰۲۱) نشان داد که روی باعث افزایش فعالیت آلانین آمینوترانسفراز شده است(٤٤). اختلاف بین مطالعات ممکن است مربوط به تفاوت در مدت زمان مصرف مکمل روی آلی، دوز مورد استفاده، شرایط محیطی، نوع و سن حیوان مورد استفاده باشد

نتیجه گیری

با توجه به یافته های پژوهش حاضر، تنش گرمایی سبب افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و آنزیم های کبدی می شود و تخلیه ظرفیت آنتی اکسیدانی پلاسمای خون را در پی دارد. استفاده از مکمل روی-متیونین هر چند سبب کاهش غلظت مالون-دی آلدئید در اسب های تحت تنش گرمایی شد ولی بر فعالیت آنزیم های آنتی کسیدانی اثری نداشت. افزودن مکمل روی-متیونین بر غلظت آنزیم های کبدی در پلاسما موثر بود و در دوز ٦۷ میلی گرم در کیلوگرم سبب کاهش غلظت آنزیم های کبدی در پلاسمای خون اسب های فریزین در شرایط تنش گرمایی شد

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 مجموعه پرورش اسب فریزین برای در اختیار گذاشتن امکانات فارمی و آزمایشگاه دامپزشکی دامگستر که در آنالیز آنزیم های کبدی و آنزیم های آنتی اکسیدانی همکاری کردند، تشکر می شود. این مقاله مستخرج از رساله دانشجوی دوره دکتری تخصصی واحد علوم و تحقیقات (آقای احمد میری) می باشد

تعارض منافع

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

References

1. Budzyńska M. Stress reactivity and coping in horse adaptation to environment. Journal of Equine Veterinary Science. 2014;34(8):935-41. **DOI:10.1016/j.jevs.2014.05.010.**

2. Kang H, Zsoldos RR, Sole-Guitart A, Narayan E, Cawdell-Smith AJ, Gaughan JB. Heat stress in horses: a literature review. International journal of biometeorology. 2023;67(6):957-73. **DOI:10.1007/s00484-023-02467-7.**

3. Geor RJ, McCutcheon LJ. Hydration effects on physiological strain of horses during exercise-heat stress. Journal of Applied Physiology. 1998;84(6):2042-51. **DOI:10.1152/jappl.1998.84.6.2042.**

4. Zandoná Meleiro MC, de Carvalho HJ, Ribeiro RR, da Silva MD, Salles Gomes CM, Miglino MA, de Santis Prada IL. Immune functions alterations due to racing stress in Thoroughbred horses. Animals. 2022;12(9):1203. **DOI:10.3390/ani12091203.**

5. Gonzalez-Rivas PA, Chauhan SS, Ha M, Fegan N, Dunshea FR, Warner RD. Effects of heat stress on animal physiology, metabolism, and meat quality: A review. Meat science.2020; 162: 108025. **DOI:10.1016/j.meat sci. 2019.108025.**

6. Garcia EI, Elghandour MM, Khusro A, Alcala-Canto Y, Tirado-González DN, Barbabosa-Pliego A, Salem AZ. Dietary supplements of vitamins E, C, and β-carotene to reduce oxidative stress in horses: an overview. Journal of Equine Veterinary Science. 2022; 110:103863. **DOI: 10.1016/j. jevs.2022.103863.**

7. Deride C, Chihuailaf R, Arnés V, Morán G, Uberti B. Relationship Between Selenium, Copper, Zinc and Their Biomarkers in Blood and Skeletal Muscle Tissue in Adult Horses from Southern Chile. J Equine Vet Sci. 2023 Sep; 128:104881.**DOI:10.1016/j. jevs. 2023.104881.**

8. van Bömmel-Wegmann S, Gehlen H, Barton AK, Büttner K, Zentek J, Paßlack N. Zinc Status of Horses and Ponies: Relevance of Health, Horse Type, Sex, Age, and Test Material. Veterinary Sciences. 2023;10(4):295. **DOI:10.3390/vetsci10040295.**

9. Pagan JD. Micromineral requirements in horses. World Equine Veterinary. 2000; 5:15-21.

10. Hill GM, Shannon MC. Copper and zinc nutritional issues for agricultural animal production. Biological trace element research. 2019; 188:148-59. **DOI: 10.1007/s12011-018-1578-5.**

11. Karimian N, Moafpouryan GR. Zinc adsorption characteristics of selected calcareous soils of Iran and their relationship with soil properties. Communications in Soil Science and Plant Analysis. 1999;30(11-12):1721-31. **DOI: 10.1080/00103629909370325**

12. Malakouti MJ. Zinc is a neglected element in the life cycle of plants. Middle Eastern and Russian Journal of Plant Science and Biotechnology. 2007;1(1):1-2.

13. Angeles-Hernandez JC, Miranda M, Muñoz-Benitez AL, Vieyra-Alberto R, Morales-Aguilar N, Paz EA, Gonzalez-Ronquillo M. Zinc supplementation improves growth performance in small ruminants: A systematic review and meta-regression analysis. Animal Production Science.2021; 61(7) 621-629. **DOI:10. 1071/AN20628.**

14. Wagner EL, Potter GD, Gibbs PG, Eller EM, Scott BD, Vogelsang MM, Walzem RL. Copper and zinc balance in exercising horses fed 2 forms of mineral supplements. J Anim Sci.2011 Mar;89(3): 722-8. **DOI:10.2527/jas. 2010-2871.**

15. Paßlack N, van Bömmel-Wegmann S, Vahjen W, Zentek J. Impact of dietary zinc chloride hydroxide and zinc methionine on the faecal microbiota of healthy adult horses and ponies. Journal of Equine Veterinary Science. 2022; 110:103804. **DOI: 10.1016/j.jevs.2021.103804.**

16. Stanek M, Jaworski Z, Sobotka W, Lipinski K, Olenkowicz R. Influence of an organic supplement of copper, zinc and manganese in feed rations on concentrations of these elements in the coat of Polish Konik horses. Journal of Elementology. 2016; 21:2, 12-18. **DOI: 10.5601/jelem.2015.20.1.914.**

17. Noormohammady Z, Chamani M, Khodae HR. Effect of zinc on integrity of horse hoof. Res. Agric. Vet. Sci. 2018; 2:17-23.

18. National Research Council, 2007. Nutrient requirements of horses: 6th ed. Washington, D.C.: The National Academies Press.

19. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. Clin Chem. 1997 Jul;43(7):1209-14.

20. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset CL. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food science and Technology. 1995;28(1):25-30.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

31. Marreiro DD, Cruz KJ, Morais JB, Beserra JB, Severo JS, De Oliveira AR. Zinc and oxidative stress: current mechanisms. Antioxidants (Basel).2017;29;6(2):24. **DOI:10.3390/antiox6020024.**

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

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

34. Salgueiro MJ, Zubillaga M, Lysionek A, Sarabia MI, Caro R, De Paoli T, Hager A, Weill R, Boccio J. Zinc as an essential micronutrient: a review. Nutrition Research. 2000; 20(5):737-55. **DOI: org/10.1016/s0271-5317(00)00163-9**

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

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

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

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

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

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

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

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

43. Nagalakshmi D, Dhanalakshmi K, Himabindu D. Effect of dose and source of supplemental zinc on immune response and oxidative enzymes in lambs. Veterinary research communications. 2009; 33(7):631-44. **DOI: 10. 1007/ s11259-009-9212-9.**

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