

Study of Leptin Gene Expression in Muscle and Liver Tissue of Fattening Lambs under the Influence of Dietary Zinc-Methionine Organic Supplement and Calcium Salt of Flaxseed Oil

Mahmoud Nazari^{1*}, Seyedeh Zahra Badvi², Sepideh Rostami³

¹ Associate Professor, ²M.Sc student & ³Ph.D graduate of Animal genetic and Breeding, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

Article Info	ABSTRACT
Article type: Research Full Paper	Background and Objective: Sheep production, as a fundamental component of the livestock industry, plays a vital role in supplying animal protein worldwide. Growth efficiency and productive performance are key factors determining profitability in this sector. The leptin–melanocortin system acts as a major regulatory pathway that governs energy balance, appetite, and body metabolism. The leptin gene, a central element of this system, influences feed intake, energy homeostasis, and lipid metabolism, thereby affecting growth and nutritional status in animals. Recent studies have demonstrated that supplementing diets with unsaturated fatty acid sources such as calcium salt of flaxseed oil can enhance energy utilization and modulate the expression of growth-related genes, ultimately improving animal performance. Moreover, the organic zinc–methionine complex plays a significant role in protein metabolism, enzyme activity, and the regulation of growth and energy-associated hormones, contributing to improved daily weight gain and feed efficiency in ruminants. Therefore, this study aims to evaluate the combined effects of dietary supplementation with calcium salt of flaxseed oil and organic zinc-methionine on leptin gene expression in the liver and muscle tissues of sheep
Article history: Received: 07/11/2025 Revised: 05/01/2026 Accepted: 25/01/2026	Materials and Methods: In this study, 44 male Arabian lambs aged 2 to 3 months with an average initial weight of 14.6 kg were used in a 2 × 2 factorial design. The factors studied included organic zinc-methionine supplement at two levels (0 and 0.083% of the diet dry matter; equivalent to 100 mg of zinc element per kg of dry matter) and calcium salt of flaxseed oil at two levels (0 and 3% of the diet dry matter). The combination of these two factors formed four treatments, each treatment containing 11 replications. The diets were formulated in such a way that the difference in metabolizable energy between treatments was as minimal as possible and within the NRC recommended range so that the observed effects were not due to differences in diet energy. At the end of the 94-day feeding trial, three lambs from each treatment were slaughtered, and liver and muscle samples were collected for leptin gene expression analysis. The collected tissues were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C until further molecular assays. Total RNA
Keywords: flaxseed oil Leptin Liver Muscle Zinc-methionine	

extraction and cDNA synthesis were performed according to the manufacturer's protocols of commercial kits. Leptin gene expression was quantified using quantitative real-time PCR (qPCR), with GAPDH used as the reference gene. Relative gene expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. The obtained data were statistically analyzed using SAS software (version 9.4), and treatment means were compared by the LSD test.

Results: The results indicated that dietary supplementation with calcium salts of flaxseed oil significantly reduced leptin gene expression in the liver ($P < 0.01$), while no significant effect was observed in muscle tissue ($P > 0.05$). In contrast, the inclusion of zinc-methionine significantly increased leptin gene expression in both liver and muscle tissues ($P < 0.01$). Moreover, the combined supplementation of zinc-methionine and calcium salts of flaxseed oil did not cause any significant change in leptin gene expression compared with the control group ($P > 0.05$).

Conclusions: Overall, the results of this study demonstrated that the type and combination of dietary supplements can significantly influence the regulation of genes associated with energy metabolism in sheep. A reduction in leptin gene expression following supplementation with calcium salts of flaxseed oil (containing omega-3 fatty acids), along with an increase in expression induced by zinc-methionine supplementation, highlights the importance of nutrient balance and its impact on molecular pathways involved in growth and metabolism.

Cite this article: Nazari, M., Badvi, S.Z., Rostami, S. (2026). Study of Leptin Gene Expression in Muscle and Liver Tissue of Fattening Lambs under the Influence of Dietary Zinc-Methionine Organic Supplement and Calcium Salt of Flaxseed Oil. *Journal of Ruminant Research*, 14(2), 55-70.



© The Author(s)



10.22069/ejrr.2026.24262.2028

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

بررسی بیان ژن لپتین بافت ماهیچه و کبد بره پرواری تحت تأثیر مکمل آلی روی-متیونین و نمک کلسیمی روغن کتان جیره

محمود نظری^{۱*}، سیده زهرا بدوی^۲، سیده رستمی^۳

^۱دانشیار، ^۲دانشجوی کارشناسی ارشد، ^۳دانش آموخته دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله:	هدف: تولید گوسفند به عنوان یکی از ارکان اصلی بخش دامپروری، نقشی مهم در تأمین پروتئین حیوانی در جهان دارد. بازده رشد و عملکرد تولیدی از عوامل کلیدی تأثیرگذار بر بهره‌وری در این صنعت هستند. سیستم لپتین-ملانوکورتین به عنوان یکی از مسیرهای تنظیمی اصلی در کنترل تعادل انرژی، اشتها و متابولیسم بدن نقش دارد. ژن لپتین از عناصر کلیدی این مسیر است که با تنظیم مصرف خوراک، تعادل انرژی و متابولیسم چربی، رشد و وضعیت تغذیه‌ای دام را تحت تأثیر قرار می‌دهد. پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند که استفاده از منابع غنی از اسیدهای چرب غیراشباع مانند نمک کلسیمی روغن کتان می‌تواند از طریق بهبود بازده انرژی و تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با رشد، در افزایش عملکرد حیوان مؤثر باشد. علاوه بر این، مکمل آلی روی-متیونین به دلیل نقش آن در متابولیسم پروتئین، فعالیت آنزیم‌های رشد و تنظیم ترشح هورمون‌های مرتبط با انرژی، توانایی بهبود افزایش وزن روزانه و کارایی خوراک در نشخوارکنندگان را دارد. لذا، هدف از این پژوهش بررسی بیان ژن لپتین در بافت‌های کبد و ماهیچه بره‌های پرواری تحت تأثیر مکمل آلی روی-متیونین و نمک کلسیمی روغن کتان جیره غذایی بود.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۸/۱۷	
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۴/۱۰/۱۵	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۵	
واژه‌های کلیدی:	روش پژوهش: در این پژوهش، ۴۴ رأس بره نر نژاد عربی در سن ۲ تا ۳ ماهگی با میانگین وزن اولیه ۱۴/۶ کیلوگرم در قالب طرح فاکتوریل ۲×۲ مورد استفاده قرار گرفتند. عوامل مورد بررسی شامل مکمل آلی روی-متیونین در دو سطح (صفر و ۰/۰۸۳ درصد ماده خشک جیره؛ معادل ۱۰۰ میلی گرم عنصر روی در هر کیلوگرم ماده خشک) و نمک کلسیمی روغن کتان در دو سطح (صفر و ۳ درصد ماده خشک جیره) بودند. ترکیب این دو عامل چهار تیمار را تشکیل داد که هر تیمار شامل ۱۱ تکرار بود. جیره‌ها به گونه‌ای فرموله شدند که اختلاف انرژی قابل متابولیسم بین تیمارها در حداقل ممکن و در دامنه توصیه شده NRC باشد تا اثرات مشاهده شده ناشی از تفاوت انرژی جیره‌ها نباشد. پس از پایان دوره، سه بره از هر تیمار کشتار و نمونه‌های بافت کبد و ماهیچه جهت بررسی بیان ژن لپتین تهیه گردیدند. نمونه‌ها بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و در دمای -۸۰ درجه سانتی گراد ذخیره شدند. استخراج RNA و سنتز cDNA طبق دستورالعمل کیت‌های تجاری انجام شد و بیان ژن لپتین با روش Real-Time qPCR ارزیابی گردید. میزان بیان نسبی ژن لپتین با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ و با نرمال‌سازی بر
روغن بذر کتان	
روی-متیونین	
کبد	
لپتین	
ماهیچه	

اساس ژن مرجع GAPDH محاسبه شد. داده‌های به‌دست‌آمده با نرم‌افزار SAS (9.4) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مقایسه میانگین تیمارها با آزمون LSD انجام شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد، افزودن نمک کلسیمی روغن کتان منجر به کاهش معنی‌دار بیان ژن لپتین در کبد شد ($P < 0/01$)، اما بر بیان آن در ماهیچه اثر معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0/05$). علاوه بر این استفاده از مکمل روی-متیونین باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن لپتین در کبد و ماهیچه شد ($P < 0/01$)، همچنین افزودن هم‌زمان مکمل روی-متیونین و مکمل چربی نمک کلسیمی روغن کتان منجر به تغییر معنی‌دار در بیان ژن موردنظر نشد ($P > 0/05$).

نتیجه‌گیری: نتایج کلی این پژوهش نشان داد که نوع و ترکیب مکمل‌های تغذیه‌ای می‌تواند به‌طور معنی‌داری بر تنظیم ژنی مرتبط با متابولیسم انرژی در گوسفند اثر بگذارد. کاهش بیان ژن لپتین در اثر مصرف نمک کلسیمی روغن کتان (حاوی اسیدهای چرب امگا-۳) و افزایش آن در نتیجه افزودن مکمل روی-متیونین، اهمیت تعادل عناصر غذایی و تأثیر آن‌ها بر مسیرهای مولکولی رشد و متابولیسم را نشان می‌دهد.

استناد: نظری، محمود؛ بدوی، سیده زهرا؛ رستمی، سپیده. (۱۴۰۵). بررسی بیان ژن لپتین بافت ماهیچه و کبد بره پرواری تحت تأثیر مکمل آلی روی-متیونین و نمک کلسیمی روغن کتان جیره. پژوهش در نشخوارکنندگان، ۱۴(۲)، ۷۰-۵۵.



10.22069/ejrr.2026.24262.2028

© نویسندگان

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان



مقدمه

پرورش گوسفند یکی از اجزای مهم صنعت کشاورزی جهانی است و بازده لاشه و نرخ رشد دو ویژگی حیاتی مؤثر بر سودآوری آن هستند. سیستم لپتین-ملانوکورتین^۱ (LMS) تنظیم کننده کلیدی اشتها و متابولیسم انرژی است و ژن های آن با رشد و راندمان خوراک در چندین گونه، از جمله گوسفند، مرتبط هستند (Zaidem و همکاران، ۲۰۱۹). این سیستم شامل چندین ژن، مانند لپتین که در تنظیم متابولیسم انرژی و وزن بدن نقش دارد و گیرنده های ملانوکورتین که در تنظیم اشتها و مصرف انرژی نقش دارند، می باشد. اختلال در تنظیم سیستم لپتین-ملانوکورتین می تواند منجر به اختلالات متابولیکی مانند چاقی شود که می تواند بر سلامت و بهره وری حیوان تأثیر منفی بگذارد (Chong و همکاران، ۲۰۲۱). لپتین که توسط ژن LEP کد می شود، هورمونی است که عمدتاً توسط بافت چربی ترشح می شود و نقش کلیدی در تنظیم اشتها و متابولیسم انرژی دارد. این هورمون از طریق گیرنده های لپتین در هیپوتالاموس عمل کرده و با مهار نورون های محرک اشتها و تحریک نورون های ضد اشتها، مصرف انرژی و تعادل انرژی بدن را کنترل می کند. بیان لپتین می تواند تحت تأثیر رژیم غذایی و ترکیب مواد مغذی قرار گیرد و به همین دلیل، تنظیم آن از طریق مداخلات تغذیه ای می تواند تأثیر قابل توجهی بر رشد، بهره وری و ترکیب بافتی گوشت گوسفند داشته باشد (Chilliard و همکاران، ۲۰۰۵).

برای افزایش بهره وری و کیفیت گوشت گوسفند، درک مکانیسم های ژنتیکی حاکم بر رشد و ویژگی های لاشه بسیار مهم است (Abdelhamid و همکاران، ۲۰۲۱). از آنجا که ژن های سیستم لپتین-ملانوکورتین به عنوان تنظیم کننده های مهم این

فرآیندها شناخته می شوند، در حال حاضر توجه زیادی را در زمینه انتخاب ژنومی و اصلاح نژاد گوسفند به خود جلب کرده اند (Girmay و همکاران، ۲۰۲۳). با وجود اهمیت این مسیر، تعدیل بیان لپتین از طریق مداخله های تغذیه ای می تواند رویکردی مؤثر در بهبود رشد و ترکیب بافتی گوشت گوسفند باشد.

مطالعات و تحقیقات جدید بر بهبود تولید گوسفند متمرکز شده است که از طریق به کارگیری تکنیک های نوین در تغذیه، از جمله استفاده از گیاهان دارویی به عنوان مکمل های خوراکی امکان پذیر است (Rabieh و همکاران، ۲۰۲۰). در این تحقیق، از نمک کلسیمی روغن کتان به عنوان منبع اسیدهای چرب غیراشباع استفاده گردید. نشان داده شده است که تغذیه نشخوارکنندگان با روغن های گیاهی غنی از اسیدهای چرب چند غیراشباع (PUFA) یا دانه های روغنی فرآوری شده فیزیکی، باعث افزایش غلظت اسیدهای چرب چند غیراشباع در عضلات می شود (Bolte و همکاران، ۲۰۰۲). اسیدهای چرب چند غیراشباع، به ویژه آلفا لینولنیک اسید موجود در روغن یا بذر کتان، قادرند مسیرهای متابولیسم چربی را از طریق کاهش لیپوژنز، افزایش β -اکسیداسیون و تغییر بیان ژن های وابسته به هورمون ها و فاکتورهای متابولیکی تحت تأثیر قرار دهند؛ بنابراین انتظار می رود استفاده از نمک کلسیمی روغن کتان بتواند بیان لپتین را در بافت های متابولیکی مانند کبد و عضله تعدیل نماید (Urrutia و همکاران، ۲۰۱۵).

افزودنی دیگر روی بوده که یک جزء ضروری در جیره غذایی نشخوارکنندگان است. این عنصر در متابولیسم کربوهیدرات ها، لیپیدها، پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک نقش دارد (Vierboom و همکاران، ۲۰۰۳) و به دلیل اثر لیپوژنیک خود، از طریق سیگنالینگ انسولین در فرآیندهای لیپوژنز و مهار

1. leptin-melanocortin system

لیپولیز نقش دارد (Park و همکاران، ۲۰۰۳). عنصر روی که به صورت ترکیبات آلی و غیر آلی وجود دارد جزء بیش از ۳۰۰ آنزیم درگیر در ایمنی، متابولیسم، رشد و عملکردهای تولیدمثلی است. عنصر روی با دخالت در تعادل الکترولیت‌ها و اسید و باز در بدن و بخصوص در زمان استرس نقش ایفا می‌کند (Nazari و همکاران ۲۰۲۰). کمبود روی می‌تواند بر عملکرد حیوانات از طریق کاهش اشتها و کاهش رشد تأثیر بگذارد. در نشخوارکنندگان، مکمل روی باعث بهبود افزایش وزن روزانه (Rodríguez-Gaxiola و همکاران، ۲۰۱۵)، عملکرد تولیدی و همچنین کیفیت لاشه می‌شود که عمدتاً به دلیل افزایش رسوب چربی درون عضلانی و تجمع لیپید در سلول و به دنبال آن افزایش کیفیت گوشت است (Huang و همکاران، ۲۰۱۸). گزارش شده است که روی متیونین (Zn-Met) باعث افزایش رشد و راندمان خوراک در حیوانات نشخوارکننده می‌شود (Hergenreder و همکاران، ۲۰۱۶). عنصر روی نقش اساسی در تولید و ترشح انسولین، فاکتور رشد شبه انسولین ۱ (IGF1) و هورمون‌های رشد دارد (Chen و همکاران، ۲۰۰۰).

تأمین روی-متیونین توانسته است منجر به افزایش بیان IGF1 (Nazari و همکاران ۲۰۲۵a) و IGF2 (Nazari و همکاران ۲۰۲۵b) در کبد بره‌های پرواری شود؛ بنابراین، مکمل سازی با روی-متیونین ممکن است سبب تعدیل بیان لپتین و بهبود کارایی رشد شود. گرچه مطالعات متعددی اثر اسیدهای چرب غیراشباع و مکمل‌های روی را بر عملکرد رشد، متابولیسم و کیفیت لاشه نشخوارکنندگان بررسی کرده‌اند، اما اطلاعات کمی درباره نقش این ترکیبات بر تنظیم ژنتیکی مسیرهای متابولیک، به ویژه ژن‌های مرتبط با سیستم لپتین-ملانوکورتین در بافت‌های پستانداران اهلی وجود دارد. در گوسفند پرواری، هنوز مشخص نیست که تغییرات تغذیه‌ای مبتنی بر

اسیدهای چرب چند غیراشباع و منابع آلی روی چگونه بر بیان ژن لپتین در بافت‌های دخیل در کنترل انرژی مانند کبد و عضله اثر می‌گذارند. با این حال، هدف این پژوهش آن است که اثر افزودن نمک کلسیمی روغن کتان و مکمل آلی روی-متیونین به جیره غذایی دام بر میزان بیان ژن لپتین در بافت‌های کبد و ماهیچه را مورد بررسی قرار دهد.

روش پژوهش

در این پژوهش، ۴۴ رأس بره نر نژاد عربی در سن ۲ تا ۳ ماهگی با میانگین وزن اولیه ۱۴/۶ کیلوگرم در قالب طرح فاکتوریل ۲×۲ مورد استفاده قرار گرفتند. عوامل مورد بررسی شامل مکمل آلی روی-متیونین در دو سطح (صفر و ۰/۰۸۳ درصد ماده خشک جیره؛ معادل ۱۰۰ میلی گرم عنصر روی در هر کیلوگرم ماده خشک) و نمک کلسیمی روغن کتان در دو سطح (صفر و ۳ درصد ماده خشک جیره) بودند. ترکیب این دو عامل چهار تیمار را تشکیل داد که هر تیمار شامل ۱۱ تکرار بود. در طول دوره آزمایش، بره‌ها در قفس‌های انفرادی نگهداری شدند و به آب آشامیدنی و خوراک تازه دسترسی آزاد داشتند. مقدار خوراک روزانه به نحوی تنظیم شد که حدود ۱۰ درصد از خوراک در آخور باقی بماند تا از دریافت کافی مواد مغذی اطمینان حاصل شود. دوره مطالعه به مدت ۹۴ روز ادامه داشت که شامل ۱۰ روز مرحله عادت‌پذیری و ۸۴ روز دوره اصلی تغذیه بود. طی این مدت، حیوانات با جیره‌های آزمایشی حاوی ۸۵ درصد کنسانتره تغذیه شدند. در پایان دوره، به منظور بررسی بیان ژن لپتین، سه بره نر از هر تیمار با میانگین وزن ۱۴/۶ کیلوگرم به طور تصادفی انتخاب و کشتار شدند. طبق توصیه‌های استاندارد برای نمونه برداری ژنتیکی متابولیک، حیوانات پیش از کشتار تحت ناشتایی ۱۲ ساعته قرار گرفتند (Benedé-Ubieto و همکاران،

۲۰۲۰) تا تأثیر مصرف خوراک بر بیان ژن‌های مرتبط با متابولیسم، از جمله لپتین، حذف گردد. توجه به نیمه‌عمر کوتاه RNA در این مطالعات اهمیت دارد، زیرا تأخیر در نمونه‌برداری می‌تواند باعث تغییر مصنوعی در میزان mRNA و نتایج بیان ژن شود. بدین منظور، بلافاصله پس از کشتار، نمونه‌های کوچکی از بافت کبد و ماهیچه جدا و فوراً در تانک نیتروژن مایع منجمد و سپس در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش‌های مولکولی نگهداری شدند.

جدول ۱. اجزای تشکیل‌دهنده (در ماده خشک) و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی بره‌های پرواری

Table 1. Constituent components (percentage in dry matter) and chemical composition of experimental diets for fattening lambs

Treatments ¹ تیمارها				اجزای جیره	
Fat-free بدون چربی		With fat حاوی چربی		Diet components (Kg)	
Without zinc بدون روی	With zinc حاوی روی	Without zinc بدون روی	With zinc حاوی روی		
15.00	15.00	15.00	15.00	Alfalfa	یونجه
44.00	44.00	44.00	44.00	Barley	جو
14.80	14.72	12.50	12.42	Corn	ذرت
9.00	9.00	9.00	9.00	Soybean meal	کنجاله سویا
15.00	15.00	15.00	15.00	Bran	سبوس
0.00	0.00	3.00	3.00	Calcium salt of flaxseed oil ²	نمک کلسیمی روغن کتان ²
1.40	1.40	0.70	0.70	Calcium carbonate	کلسیم کربنات
0.00	0.083	0.00	0.083	Zinc-methionine supplement ³	مکمل روی-متیونین ³
0.30	0.30	0.30	0.30	Salt	نمک
0.50	0.50	0.50	0.50	Vitamin-mineral supplement ⁴	مکمل ویتامینی معدنی ⁴

ترکیب شیمیایی (درصد در ماده خشک)

Chemical composition (percentage in dry matter)

88.80	88.80	89.00	89.00	Dry matter	ماده خشک
16.10	16.10	15.90	15.90	Crude protein	پروتئین خام
3.00	3.00	5.80	5.80	Crude fat	چربی خام
24.70	24.70	24.40	24.40	Insoluble fibers in neutral detergent	الیاف نامحلول در شوینده خنثی
13.30	13.30	13.20	13.20	Acid detergent insoluble fibers	الیاف نامحلول در شوینده اسیدی
49.50	49.50	46.90	46.90	Non-fiber carbohydrates	کربوهیدرات‌های غیر الیافی
0.88	0.88	0.93	0.93	Calcium	کلسیم
0.54	0.54	0.57	0.57	Phosphorus	فسفر
31.40	130.90	30.50	129.00	Zinc (mg/kg dry matter)	روی (میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک)
3.14	3.14	3.25	3.25	Metabolizable energy (megacalories per kg of dry matter) ⁵	انرژی قابل متابولیسم (مگا کالری در کیلوگرم ماده خشک) ⁵

۱- جیره‌های آزمایشی به‌ترتیب شامل: جیره بدون مکمل نمک کلسیمی روغن کتان و مکمل روی-متیونین، جیره بدون مکمل چربی نمک کلسیمی روغن کتان حاوی ۰/۰۸۳ درصد مکمل روی-متیونین، جیره با ۳ درصد مکمل چربی نمک کلسیمی روغن کتان، بدون مکمل روی-متیونین، جیره با ۳ درصد مکمل

نمک کلسیمی روغن کتان بعلاوه ۰/۰۸۳ درصد مکمل روی-متیونین.

۲- نمک کلسیمی روغن کتان، پرشالین، شرکت کیمیا دانش الوند، ایران. حاوی ۸۵ درصد چربی و ۸ درصد کلسیم (۱۰ درصد C۱۶:۰، ۷ درصد C۱۸:۰، ۲۱ درصد C۱۸:۱، ۱۸ درصد C۱۸:۲ و ۴۲ درصد C۱۸:۳).

۳- کمپلکس آلی روی-متیونین، شرکت زینپرو، آمریکا، حاوی ۱۲۰ گرم عنصر روی در کیلوگرم ماده خشک.

۴- هر کیلوگرم مکمل حاوی ۸۰۰ هزار واحد بین‌المللی ویتامین A، ۱۵۰ هزار واحد بین‌المللی ویتامین D، ۲ هزار واحد بین‌المللی ویتامین E، ۲ گرم آنتی-اکسیدان، ۱۶۰ گرم کلسیم، ۲۰ گرم فسفر، ۴۰ گرم منیزیم، ۴ گرم منگنز، ۳ گرم آهن، ۳ گرم مس، ۳ گرم روی، ۸۰ میلی‌گرم ید، ۵۰ میلی‌گرم کبالت و ۶۰ میلی‌گرم سلنیوم.

۵- محاسبه شده با NRC (۲۰۰۷).

1. The experimental diets included, respectively: diet without calcium salt of flaxseed oil supplement and zinc-methionine supplement, diet without calcium salt of flaxseed oil fat supplement containing 0.083% zinc-methionine supplement, diet with 3% calcium salt of flaxseed oil fat supplement, without zinc-methionine supplement, diet with 3% calcium salt of flaxseed oil supplement plus 0.083% zinc-methionine supplement.
2. Calcium salt of flaxseed oil, Persialin, Danesh Alvand Chemical Company, Iran. Contains 85% fat and 8% calcium (10% C16:0, 7% C18:0, 21% C18:1, 18% C18:2 and 42% C18:3).
3. Organic zinc-methionine complex, Zinpro Company, USA, containing 120 g of zinc element per kilogram of dry matter.
4. Each kilogram of the supplement contains 800,000 IU of vitamin A, 150,000 IU of vitamin D, 2,000 IU of vitamin E, 2 g of antioxidants, 160 g of calcium, 20 g of phosphorus, 40 g of magnesium, 4 g of manganese, 3 g of iron, 3 g of copper, 3 g of zinc, 80 milligrams of iodine, 50 milligrams of cobalt, and 60 milligrams of selenium.

Calculated with NRC (2007)

GAPDH به‌عنوان ژن مرجع (Bagatoli و همکاران ۲۰۱۳) در جدول ۲ ارائه شده است.

جهت انجام واکنش Real Time PCR از کیت Real IQ plus Master Mix Green High Rox (ساخت شرکت آمپلیکون دانمارک) استفاده شد. واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix Green، ۱ میکرولیتر از هریک از آغازگرهای رفت و برگشت (غلظت ۱۰۰ ng)، ۲ میکرولیتر cDNA الگو (غلظت ۵۰ ng) و ۸/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر بود. در ادامه کار، نمونه‌ها در دستگاه Real Time PCR Step one Plus (System، کشور آمریکا) طبق برنامه حرارتی: واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، فرآیند تکثیر شامل ۳۰ چرخه واسرشت در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت یک سیکل گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه انجام شد و به‌منظور تأیید صحت اختصاصیت واکنش، منحنی ذوب ترسیم

استخراج RNA کل از بافت‌های کبد و ماهیچه به‌صورت جداگانه با استفاده از کیت ستونی استخراج RNA از بافت جانوری Animal Tissue RNA Isolation Kit (دنازیست، ایران، Cat. No.: S-1023-1) انجام شد. ارزیابی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد و با استفاده از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific NanOdrOp, 2000C, USA صورت گرفت. در ادامه تهیه cDNA با استفاده از کیت First strand cDNA synthesis (سیناکلون، ایران، Cat. No.: RT5201) انجام گرفت و تا زمان انجام Real time-PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

به‌منظور تأیید تکثیر اختصاصی ژن‌های موردنظر در این مطالعه با استفاده از پرایمرهای سنتز شده، ابتدا واکنش PCR انجام شد. در صورت تأیید تکثیر ژن‌های موردنظر، به‌منظور بررسی مقایسه‌ای بیان ژن‌ها از تکنیک Real time PCR استفاده شد. لیست و مشخصات پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های لپتین (Tsiplakou و همکاران ۲۰۰۹) و

شد. در این مطالعه، میزان بیان نسبی ژن‌ها پس از $\Delta\Delta CT$ به روش Pfaffl و همکاران در سال ۲۰۰۲ نرمال‌سازی نسبت به ژن مرجع GAPDH با فرمول ۲ محاسبه گردید.

جدول ۲. لیست توالی و خصوصیات پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

Table 2. List of sequences and properties of primers used in this study

نام ژن Gene name	توالی Sequence	طول قطعه (جفت باز) Piece length (bp)	دمای اتصال Annealing temperature
Leptin	F: 5'- ATGGACCAGACATTGGCAATCT -3' R: 5'- GGATCATTTCTGGAAGGCAG -3'	64	60
GAPDH	F: 5'- CCAGGCAGAGAACGGGAAG -3' R: 5'- GGATCATTTCTGGAAGGCAG -3'	144	60

$(CT)_{ij}$ اثر متقابل مکمل روی- متیونین و مکمل چربی و e_{ijk} اثر خطای آزمایش است.

یافته‌های پژوهش

نتایج ارزیابی کیفیت و کمیت RNA استخراج شده نشان داد که فرآیند خالص سازی با موفقیت انجام شده است. مشاهده نمونه‌ها روی ژل آگارز ۲ درصد، دو باند واضح و متمایز مربوط به RNA ریبوزومی 18S و 28S را نشان داد که نشان‌دهنده سلامت، یکپارچگی و عدم تخریب RNA در طی استخراج است. عدم مشاهده کشیدگی یا شکست ساختار نوکلئیک اسیدها در ژل تأییدی بر کیفیت مناسب نمونه‌ها بود. علاوه بر این، نتایج حاصل از سنجش با دستگاه نانودراپ نیز کیفیت RNA را به طور دقیق تأیید کرد. میانگین نسبت جذب A260/A280 و A260/A230 در محدوده ۱/۸ تا ۲/۲ قرار داشت که این مقادیر نشان‌دهنده خلوص بالا، عدم آلودگی نمونه‌ها به پروتئین‌ها و ترکیبات فنولی و مناسب بودن آن‌ها برای مراحل بعدی سنتز cDNA و انجام واکنش Real-Time PCR بود.

نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز نیز تکثیر اختصاصی ژن‌های موردنظر را نشان داد (شکل ۱). به گونه‌ای که برای ژن Leptin

بیان ژن‌های موردنظر با استفاده از تکنیک Real-time qPCR ارزیابی شد. جهت اطمینان از صحت استفاده از روش $\Delta\Delta CT$ ، کارایی تکثیر پرایمرهای ژن هدف و ژن مرجع بر اساس شیب منحنی رقت‌های متوالی تعیین گردید. کارایی پرایمرها با استفاده از رابطه زیر: رابطه (۱)

$$E = 10^{-[1/\text{slope}]}$$

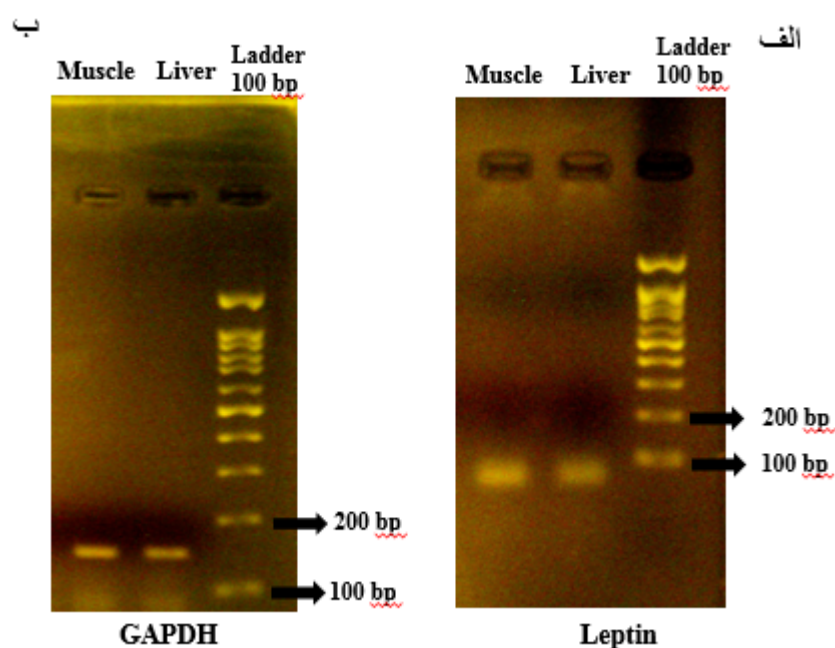
محاسبه شد و نتایج نشان داد که کارایی تکثیر پرایمرهای Leptin و GAPDH به ترتیب برابر با ۹۴ و ۱۰۵ درصد بوده و در محدوده قابل پذیرش (۹۰-۱۱۰ درصد) قرار داشتند؛ بنابراین، استفاده از روش $\Delta\Delta CT$ برای مقایسه نسبی بیان ژن‌ها در این مطالعه معتبر بود.

پس از محاسبه Fold Change، تمامی داده‌های جمع‌آوری شده از واکنش qPCR Real-time در نرم افزار Excel ثبت شد و جهت آنالیز آماری داده‌ها، از رویه GLM نرم افزار SAS (v. 9.4) استفاده شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون LSD استفاده شد. رابطه (۲)

$$y_{ijk} = \mu + C_i + T_j + (CT)_{ij} + e_{ijk}$$

در این رابطه: y_{ijk} مقدار هر مشاهده، μ میانگین کل، C_i اثر مکمل روی- متیونین، T_j اثر مکمل چربی،

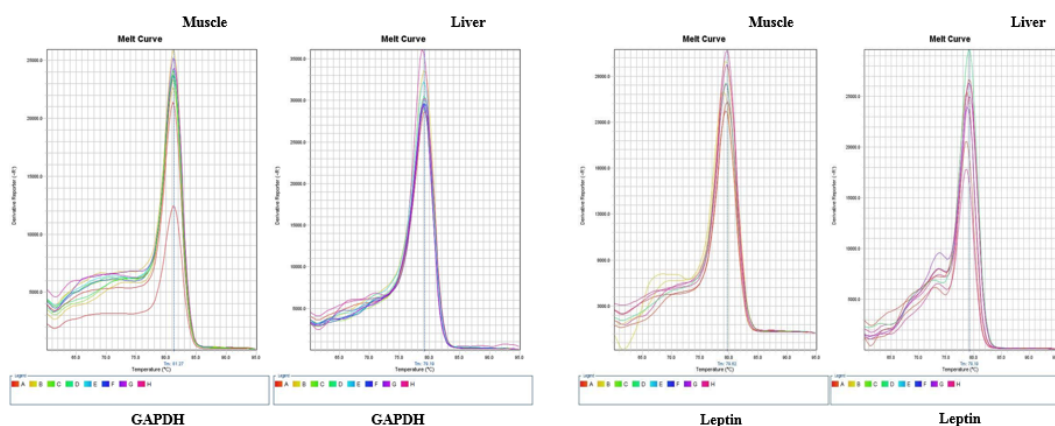
در بافت کبد و ماهیچه باند در محدوده ۶۴ bp و نشان داد. برای GAPDH نیز باند مشخص در محدوده ۱۴۴ bp را



شکل ۱، نتایج تکثیر اختصاصی ژنهای Leptin و GAPDH در بافت کبد و ماهیچه روی ژل آگارز ۲ درصد

خلوص بالای محصولات حاصل از واکنش Real-time PCR نبود. نبود پیکهای اضافی یا چندگانه نشان می‌دهد که در ژن لپتین در کبد هیچ‌گونه محصول غیراختصاصی یا دایمر پرایمری تشکیل نشده است.

از جمله مراحل کلیدی دیگر در تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از واکنش Real-time PCR، بررسی منحنی ذوب است که نمایانگر ویژگی‌های محصول تکثیرشده می‌باشد. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، وجود پیک‌های یگانه و مشخص را برای هر ژن هدف بیانگر اختصاصی بودن تکثیر و



شکل ۲. نمودارهای ذوب برای ژنهای Leptin و GAPDH در بافت ماهیچه و کبد

در ماهیچه اثر معنی‌داری مشاهده نشد ($P>0/05$). علاوه بر این استفاده از مکمل روی-متیونین باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن لپتین در کبد و ماهیچه شد ($P<0/01$)، همچنین افزودن هم‌زمان مکمل روی-متیونین و مکمل چربی نمک کلسیمی روغن کتان منجر به تغییر معنی‌دار در بیان ژن موردنظر نشد ($P>0/05$).

اثر افزودن نمک کلسیمی روغن کتان و مکمل آلی روی-متیونین بر بیان ژن Leptin در بافت کبد و ماهیچه: نتایج اثر افزودن نمک کلسیمی روغن کتان و مکمل آلی روی-متیونین بر بیان ژن لپتین در دو بافت کبد و ماهیچه در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد، افزودن مکمل چربی نمک کلسیمی روغن کتان منجر به کاهش معنی‌دار بیان ژن Leptin در گردید ($P<0/01$)، اما بر بیان آن

جدول ۳. اثر افزودن نمک کلسیمی روغن کتان و مکمل آلی روی-متیونین بر بیان ژن Leptin در بافت کبد و ماهیچه

Table 3. Effect of adding flaxseed oil calcium salts and organic zinc-methionine supplement on Leptin gene expression in liver and muscle tissues.

Leptin(M)	Leptin(L)	اثرات اصلی (Main effects)		تیمار (Treatment)
1.44 ^b	0.72 ^b	0	0	جیره پایه + مکمل روی - متیونین
5.79 ^a	4.66 ^a	0.083	0	Basal diet + Zinc-methionine
0.58	0.45			SEM
3.20 ^a	3.71 ^a	0	0	جیره پایه + مکمل چربی نمک کلسیمی روغن کتان
4.03 ^a	1.67 ^b	3	0	Base diet + Calcium salt of flaxseed oil
0.58	0.45			SEM
				اثرات متقابل (Interaction)
1	1	0	0	Basal diet (control) جیره پایه (کنترل)
5.40	6.43	0	0.083	جیره پایه + ۰/۰۸۳ درصد مکمل روی - متیونین
				Basal diet + Zinc-methionine
1.89	0.45	3	0	جیره پایه + ۳ مکمل چربی نمک کلسیمی روغن کتان
				Base diet + Calcium salt of flaxseed oil
6.18	2.89	3	0.083	جیره پایه + ۰/۰۸۳ درصد مکمل روی - متیونین + ۳ درصد مکمل چربی نمک کلسیمی روغن کتان
				Basal diet + Zinc-methionine + Calcium salt of flaxseed oil
0.83	0.64			SEM
				سطح احتمال (P-value)
0.34	0.01			جیره پایه + ۳ مکمل چربی نمک کلسیمی روغن کتان
				Base diet + Calcium salt of flaxseed oil
0.00	0.00			جیره پایه + ۰/۰۸۳ درصد مکمل روی - متیونین
				Basal diet + Zinc-methionine
0.94	0.06			جیره پایه + ۰/۰۸۳ درصد مکمل روی - متیونین + ۳ درصد مکمل چربی نمک کلسیمی روغن کتان
				Basal diet + Zinc-methionine + Calcium salt of flaxseed oil

نتایج پژوهش Karamnejad و همکاران (۲۰۲۶) نشان داد، استفاده از مکمل روی-متیونین و نمک کلسیم روغن دانه کتان بر افزایش وزن روزانه و ضریب تبدیل خوراک بره‌های پرواری تأثیر نداشت. در حالیکه وزن نهایی و افزایش وزن روزانه در تیمارهای حاوی نمک کلسیمی روغن دانه کتان افزایش معنی‌داری داشت. همچنین، اثر متقابل نمک کلسیمی روغن دانه کتان و مکمل روی-متیونین تأثیری بر عملکرد رشد و مصرف خوراک بره‌ها نداشت. به نظر می‌رسد تغذیه نمک کلسیم روغن دانه کتان با سطوح بالای اسیدهای چرب غیراشباع بر سلامت و عملکرد بره‌ها تأثیر مثبت داشته و با بهبود محتوای انرژی جیره و افزایش مصرف ماده خشک موجب وزن پایانی بالاتر در دوره پرواری شده است. لپتین، یک هورمون پروتئینی با نقش اصلی در تنظیم تعادل انرژی، متابولیسم و اشتها است (Meier و Gressner، ۲۰۰۴). اگرچه این هورمون عمدتاً توسط بافت چربی تولید می‌شود، اما مطالعات اخیر نشان داده‌اند که ژن لپتین در بافت‌های دیگری مانند کبد و عضلات اسکلتی نیز بیان می‌شود و نقش‌های پاراکرین و اتوکرین مهمی در متابولیسم محلی این بافت‌ها ایفا می‌کند (Wein و همکاران، ۲۰۰۷). نتایج این پژوهش نشان داد که مداخلات تغذیه‌ای با استفاده از نمک کلسیمی روغن کتان (منبع اسیدهای چرب غیراشباع) و روی-متیونین (منبع آلی از عنصر کم مصرف روی) می‌تواند بیان این ژن را در کبد و ماهیچه به‌طور متفاوتی تعدیل کند.

همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که مکمل روی-متیونین منجر به افزایش معنی‌دار بیان ژن لپتین در هر دو بافت کبد و ماهیچه شد. مطالعات نشان داده است بیش از ۳۰۰ آنزیم و ۱۰۰۰ فاکتور رونویسی برای فعالیت خود به روی وابسته هستند (Prasad، ۲۰۱۳)؛ بنابراین، روی یکی از ریزمغذی‌های

ضروری است که نقش مهمی در چندین فرآیند بیولوژیکی مانند عملکردهای آنزیمی، پاسخ ایمنی، بیان ژن و متابولیسم سلولی دارد (Costa و همکاران، ۲۰۲۳). همچنین مسئول تنظیم چندین مسیر هورمونی است که به نوبه خود بر سلامت متابولیک تأثیر می‌گذارد. در میان تمام آن هورمون‌ها، لپتین یک هورمون اساسی است که سیری، وزن بدن و تعادل انرژی را از طریق تعامل با گیرنده‌های نورون‌های هیپوتالاموس تنظیم می‌کند (Halaas و Friedman، ۱۹۹۸). همچنین، روی به‌طور مستقیم در عملکرد سیستم ایمنی و پاسخ‌های التهابی دخیل است (Kim و Lee، ۲۰۲۱). کمبود روی با کاهش سطح لپتین مرتبط است. مکانیسم احتمالی این است که روی می‌تواند باعث افزایش تولید سیتوکین‌های پیش‌التهابی شود که خود یک محرک قوی برای بیان لپتین در شرایط خاص است. اگرچه این موضوع متناقض با اثر ضدالتهابی امگا-۳ به نظر می‌رسد، اما نشان می‌دهد که روی ممکن است از یک مسیر مستقل و عمدتاً پیش‌التهابی، بیان لپتین را تحریک کند (Huang و همکاران، ۲۰۱۷).

مطالعات اخیر رابطه پیچیده بین روی و تنظیم لپتین را برجسته کرده‌اند که نشان می‌دهد عنصر روی هم در ترشح و هم در عملکرد لپتین نقش دارد (Chen و همکاران، ۲۰۰۰؛ Baltaci و همکاران، ۲۰۰۵). مطالعه Das و همکاران (۲۰۲۴) تأثیر وابسته به دوز روی را بر بیان گیرنده لپتین برجسته می‌کند که دوزهای بالای روی منجر به افزایش قابل توجهی در سطوح mRNA گیرنده لپتین در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. این با تحقیقات قبلی که نشان می‌داد روی در تعدیل تولید لپتین و سیگنال دهی نقش دارد، مطابقت دارد (Chen و همکاران، ۲۰۰۰؛ Baltaci و همکاران، ۲۰۰۵؛ Vasselli و همکاران، ۲۰۲۴). این نتیجه یک تعامل پیچیده بین مصرف روی و تنظیم لپتین را نشان

شد، آن‌ها این اثر را به فعال شدن $PPAR\alpha$ و کاهش وضعیت التهابی نسبت دادند.

به منظور جلوگیری از تأثیر اختلاف انرژی بر نتایج عملکردی و بیان ژنی، باوجود اینکه افزودن ۳ درصد نمک کلسیمی روغن کتان موجب افزایش چربی جیره می‌گردد، ترکیب مواد خوراکی در تیمارها به نحوی تنظیم شد که سطح انرژی قابل متابولیسم تمامی جیره‌ها در دامنه توصیه‌شده NRC قرار گیرد و اختلاف نهایی انرژی بین جیره‌ها کمتر از ۰/۱۲ مگاکالری بر کیلوگرم ماده خشک باشد. بر اساس گزارش (2007) NRC و نیز مطالعه Cannas و همکاران (۲۰۱۳)، اختلاف کمتر از ۰/۲ مگاکالری در انرژی قابل متابولیسم، تأثیر معنی‌داری بر مصرف خوراک، رشد و متابولیسم بره‌های پرواری ندارد. بنابراین، اختلاف اندک موجود در مقادیر انرژی جیره‌ها در این تحقیق در محدوده‌ای قرار دارد که انتظار نمی‌رود باعث تغییر فیزیولوژیکی قابل توجه یا ایجاد سوگیری در نتایج شود.

نتایج ارائه شده در جدول ۳ نشان‌دهنده عدم معنی‌داری بیان ژن لپتین در بافت ماهیچه تحت تأثیر افزودن مکمل چربی نمک کلسیمی روغن کتان است. این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده آن باشد که تنظیم بیان لپتین در بافت‌های مختلف، احتمالاً تحت مکانیسم‌های اختصاصی هر بافت قرار دارد. بر اساس یافته‌های پیشین، ممکن است سطح بیان پایه لپتین در ماهیچه بسیار پایین‌تر از کبد باشد و یا گیرنده‌ها و مسیرهای سیگنال‌دهی مرتبط با اسیدهای چرب (مانند خانواده‌ی $PPAR$ ها) در میوبلاست‌ها به شکلی متفاوت عمل کنند؛ با این حال لازم به ذکر است که فعال‌سازی $PPAR\alpha$ در مطالعه حاضر به‌طور مستقیم اندازه‌گیری نشده و تفسیر مذکور صرفاً در چارچوب گزارش‌های پیشین مطرح می‌شود. به‌طور کلی، گزارش شده است که خودتنظیمی لپتین در بافت‌های

می‌دهد که نقش بالقوه روی را در تقویت مقاومت به لپتین در هنگام مصرف بیش از حد برجسته می‌کند. تنظیم مثبت ژن گیرنده لپتین مشاهده شده در مطالعه ما این احتمال را افزایش می‌دهد که مصرف بیش از حد روی می‌تواند به ایجاد مقاومت به لپتین کمک کند، شرایطی که در آن سطوح بالا لپتین نمی‌تواند اثرات فیزیولوژیکی مورد انتظار خود را بر سرکوب اشتها و مصرف انرژی ایجاد کند (Chen و همکاران، ۲۰۰۰؛ Vasselli و همکاران، ۲۰۲۴). این نتایج، یافته‌های Ott و Shay (۲۰۰۱) را تأیید می‌کند که نشان داد هم کمبود روی و هم دریافت روی اضافی، پویایی لپتین را تغییر می‌دهند و بر نقش آن در هموستاز انرژی تأثیر می‌گذارند.

یافته دیگر این مطالعه، کاهش معنی‌دار بیان ژن لپتین در کبد در پاسخ به افزودن مکمل کلسیمی روغن کتان است. این نتیجه را می‌توان عمدتاً به میزان بالای اسیدهای چرب امگا-۳، به ویژه اسید آلفا-لینولنیک (ALA) در روغن کتان نسبت داد. اسیدهای چرب امگا-۳ به‌عنوان لیگاندهای طبیعی برای گیرنده‌های فعال‌شونده با تکثیرکننده‌های پراکسیزوم (PPARs)، به‌ویژه $PPAR\alpha$ عمل می‌کنند (Majou، ۲۰۲۱). فعال شدن $PPAR\alpha$ در کبد منجر به مهار انتقال سیگنال‌های پیش التهابی مانند فاکتور هسته‌ای کاپا-بی ($NF-\kappa B$) می‌شود (Todisco و همکاران، ۲۰۲۲). از آنجایی که بیان ژن لپتین تحت تأثیر مسیرهای التهابی و به‌ویژه سیتوکین‌هایی مانند $TNF-\alpha$ و $IL-6$ قرار دارد که خود توسط $NF-\kappa B$ القا می‌شوند، فعال شدن $PPAR\alpha$ توسط امگا-۳ می‌تواند منجر به سرکوب بیان لپتین گردد. این یافته با تحقیق Bouwens و همکاران (۲۰۰۹) همسو است که گزارش کردند رژیم غذایی غنی از روغن ماهی (منبع EPA و DHA) باعث کاهش بیان لپتین در کبد انسان

ریزمغذی‌ها نشان دهنده اهمیت در نظر گرفتن کل فرمولاسیون جیره و نه تنها یک ماده مغذی منفرد است.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که بیان ژن لپتین در بافت‌های کبد و ماهیچه به ترکیب جیره وابسته است. مکمل نمک کلسیمی روغن کتان (منبع اسیدهای چرب امگا-۳) موجب کاهش بیان لپتین در کبد شد، درحالی‌که مکمل آلی روی-متیونین باعث افزایش معنی‌دار بیان این ژن در هر دو بافت گردید. علاوه‌براین، مصرف هم‌زمان دو مکمل اثر مشخصی بر بیان لپتین نداشت که نشان‌دهنده خنثی‌سازی احتمالی اثرات یکدیگر است. با توجه به هدف تولید بره‌های پروراری و ارتقای کارایی متابولیک، پیشنهاد می‌شود مکمل آلی روی-متیونین به‌صورت منفرد در جیره استفاده گردد؛ زیرا بیشترین افزایش بیان لپتین را در بافت‌های متابولیک نشان داد و می‌تواند با بهبود وضعیت انرژی به رشد بهتر کمک کند. برای روشن شدن مکانیزم دقیق اثرات متقابل این مکمل‌ها، بررسی‌های بیشتر در سطوح سیگنالینگ و پروتئومیکس پیشنهاد می‌شود.

مختلف می‌تواند متفاوت باشد؛ برای مثال، افزایش سطح لپتین می‌تواند بیان آن را در بافت چربی کاهش دهد، درحالی‌که همین افزایش احتمالاً موجب القای بیان لپتین در عضله‌ی اسکلتی شود. این ارتباط متقابل، بیانگر تعامل پیچیده‌ی بین بافت‌ها در مدیریت هموستاز انرژی و تنظیم پاسخ‌های متابولیکی است (Wang و همکاران، ۱۹۹۹).

نکته جالب توجه در این پژوهش، عدم مشاهده تغییر معنی‌دار در بیان ژن لپتین هنگام استفاده هم‌زمان از دو مکمل است. این پدیده نشان می‌دهد که اثرات این دو مکمل بر بیان لپتین احتمالاً در مقابل یکدیگر عمل کرده و یکدیگر را خنثی می‌کنند. با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای مبنی بر اثر هم‌زمانی این دو انجام نشده است، به نظر می‌رسد نمک کلسیمی روغن کتان از طریق فعال کردن مسیرهای ضدالتهابی (مانند *PPARα*) و روی-متیونین از طریق تحریک مسیرهای پیش‌التهابی یا ایمنی (مانند القای IL-6) بر بیان لپتین تأثیر می‌گذارند. هنگامی‌که این دو مکمل به‌صورت هم‌زمان استفاده می‌شوند، این سیگنال‌های متضاد ممکن است یکدیگر را خنثی کرده و در نهایت سیستم را به حالت تعادل یا حالت پایه نزدیک کنند. این برهمکنش پیچیده بین اسیدهای چرب و

منابع

- Abdelhamid, M., VI, V., ML, L., & Dyab, A. K. (2021). Combined effect of monieziosis and hypomicroelementosis on some hematological, biochemical and hormonal parameters in merino sheep. *Pakistan Veterinary Journal*, 41(1):107-111.
- Bagatoli, A., Gasparino, E., Soares, M. A. M., Amaral, R. M., Macedo, F. A. F., Voltolini, D. M., & Del Vesco, A. P. (2013). Expression of calpastatin and myostatin genes associated with lamb meat quality. *Genetics and Molecular Research*, 12(4), 6168-6175.
- Baltaci, A. K., Mogulkoc, R., & Halifeoglu, I. (2005). Effects of zinc deficiency and supplementation on plasma leptin levels in rats. *Biological Trace Element Research*, 104: 41-46.
- Benedé-Ubieto, R., Estévez-Vázquez, O., Ramadori, P., Cubero, F. J., & Nevzorova, Y. A. (2020). Guidelines and considerations for metabolic tolerance tests in mice. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*, 439-450.
- Bhatt, N. (2015). Herbs and herbal supplements, a Novel Nutritional Approach in Animal Nutrition. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 5(3): 497-51
- Bole, M. R., Hess, B. W., Means, W. J., Moss, G. E., & Rule, D. C. (2002). Feeding lambs high-oleate or high-linoleate safflower seeds differentially influences carcass fatty acid composition. *Journal of Animal Science*, 80(3): 609-616.

- Bouwens, M., Van De Rest, O., Dellschaft, N., Bromhaar, M. G., De Groot, L. C., Geleijnse, J. M. & Afman, L. A. (2009). Fish-oil supplementation induces antiinflammatory gene expression profiles in human blood mononuclear cells. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90(2):415-424.
- Cannas, A., Cabiddu, A., Bomboi, G., Ligios, S., Floris, B., & Molle, G. (2013). Decreasing dietary NFC concentration during mid-lactation of dairy ewes: Does it result in higher milk production?. *Small Ruminant Research*, 111(1-3): 41-49.
- Chen, M. D., Song, Y. M., & Lin, P. Y. (2000). Zinc may be a mediator of leptin production in humans. *Life Sciences*, 66(22): 2143-2149.
- Chilliard, Y., Delavaud, C., & Bonnet, M. (2005). Leptin expression in ruminants: nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domestic Animal Endocrinology*, 29(1): 3-22.
- Chong, Y., Liu, G., Girmay, S., & Jiang, X. (2021). Novel mutations in the signal transducer and activator of transcription 3 gene are associated with sheep body weight and fatness traits. *Mammalian Genome*, 32(1): 38-49.
- Chvapil, M. (1973). New aspects in the biological role of zinc: a stabilizer of macromolecules and biological membranes. *Life Sciences*, 13(8): 1041-1049.
- Costa, M. I., Sarmiento-Ribeiro, A. B., & Gonçalves, A. C. (2023). Zinc: from biological functions to therapeutic potential. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5): 4822.
- Das, T., Ahongshangbam, R., Chabungbam, R., Haobam, B., Singh, O. I., & Singh, K. B. (2024). Assessment of the impact of high zinc intake on leptin receptor gene expression in wistar rats. *Molecular & Cellular Biomechanics*, 21(3): 471-471.
- Friedman, J. M., & Halaas, J. L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395(6704), 763-770.
- Girmay, S., Ijaz, N., Hashmi, N., Ullah, M. I., Afzal, G., Nasir, A. & Ahmad, H. I. (2023). Functional genomics analysis of Leptin-Melanocortin system genes reveals candidate genes associated rapid growth and high carcass yield in sheep. *Journal of King Saud University-Science*, 35(8): 102853.
- Hergenreder, J. E., Legako, J. F., Dinh, T. T. N., Spivey, K. S., Baggerman, J. O., Broadway, P. R. & Johnson, B. J. (2016). Zinc methionine supplementation impacts gene and protein expression in calf-fed Holstein steers with minimal impact on feedlot performance. *Biological Trace Element Research*, 171(2): 315-327.
- Huang, L., Tapaamorndech, S., Kirschke, C. P., Newman, J. W., Keyes, W. R., Pedersen, T. L., & Dumnit, J. (2018). Aberrant fatty acid metabolism in skeletal muscle contributes to insulin resistance in zinc transporter 7 (znt7)-knockout mice. *Journal of Biological Chemistry*, 293(20): 7549-7563.
- Huang, X., Jiang, D., Zhu, Y., Fang, Z., Che, L., Lin, Y., & Feng, B. (2017). Chronic high dose zinc supplementation induces visceral adipose tissue hypertrophy without altering body weight in mice. *Nutrients*, 9(10): 1138.
- Karamnejad, K., Sari, M., Dehghan-Banadaky, M., & Rafiee, H. (2026). Effect of calcium salt of flaxseed oil and zinc-methionine supplementation on growth performance, digestibility, feeding behavior, and rumen and blood parameters of fattening lambs. *Tropical Animal Health and Production*, 58(1): 10.
- Kim, B., & Lee, W. W. (2021). Regulatory role of zinc in immune cell signaling. *Molecules and Cells*, 44(5): 335-341.
- Majou, D. (2021). Synthesis of DHA (omega-3 fatty acid): FADS2 gene polymorphisms and regulation by PPAR α . *OCL*, 28, 43.
- Meier, U., & Gressner, A. M. (2004). Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clinical Chemistry*, 50(9): 1511-1525.
- National Research Council (US). Committee on Nutrient Requirements of Small Ruminants. (2007). *Nutrient Requirements of Small Ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids*.

- Nazari, M., Alipoor, Z., Rostami, S. & Mohamadi Ahvazi, G. (2025b). Effect of zinc-methionine organic and Ca-salt of flaxseed oil supplement on IGF-1 gene expression in liver tissue of fattening male lambs. *Agricultural Biotechnology Journal*, 17(1): 121-140. (In Persian).
- Nazari, M., Alipoor, Z., Rostami, S. & Mohammadi Ahvazi, G. (2025a). IGF-2 gene expression in liver and muscle tissue of fattening lambs under the influence of organic zinc-methionine supplement and calcium salt of flaxseed oil supplement in the diet. *Animal Production Research*, 14(2): 19-29. (In Persian).
- Nazari, M., Sallari S., & Ghorbani, M.R. (2020) Effect of Zinc supplementation and Betaine substitution to methionine on performance and blood parameters of laying hens under heat stress. *Veterinary Research & Biological Products*, 33(1): 61-70 (In Persian).
- Ott, E. S., & Shay, N. F. (2001). Zinc deficiency reduces leptin gene expression and leptin secretion in rat adipocytes. *Experimental Biology and Medicine*, 226(9): 841-846.
- Park, K. S., Lee, N. G., Lee, K. H., Seo, J. T., & Choi, K. Y. (2003). The ERK pathway involves positive and negative regulations of HT-29 colorectal cancer cell growth by extracellular zinc. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 285(6), G1181-G1188.
- Prasad, A. S. (2013). Discovery of human zinc deficiency: its impact on human health and disease. *Advances in Nutrition*, 4(2): 176-190.
- Rabieh, M.H., Rooshanfekr, M., Nazari, M., & Ghorbani, M.R. (2020) Gene expression of antioxidant enzymes fed wild pistachio (*Pistachio atlantica*), purslane (*portulaca oleracea*) extract and vitamin E under in broiler chickens under heat stress condition. *Iranian Veterinary Journal*, 17(2): 51-60 (In Persian).
- Rodríguez-Maya, M. A., Domínguez-Vara, I. A., Trujillo-Gutiérrez, D., Morales-Almaráz, E., Sánchez-Torres, J. E., Bórquez-Gastelum, J. L., & Rodríguez-Carpena, J. G. (2019). Growth performance parameters, carcass traits, and meat quality of lambs supplemented with zinc methionine and (or) zinc oxide in feedlot system. *Canadian Journal of Animal Science*, 99(3):585-595.
- Todisco, S., Santarsiero, A., Convertini, P., De Stefano, G., Gilio, M., Iacobazzi, V., & Infantino, V. (2022). PPAR alpha as a metabolic modulator of the liver: role in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Biology*, 11(5): 792.
- Tsiplakou E, Flemetakis E, Kalloniati C, Papadomichelakis G, Katinakis P, Zervas G (2009) Sheep and goats differences in CLA and fatty acids milk fat content in relation with mRNA stearyl-CoA desaturase and lipogenic genes expression in their mammary gland. *Journal of Dairy Research*, 76(4): 392-401.
- Urrutia, O., Mendizabal, J. A., Insausti, K., Soret, B., Purroy, A., & Arana, A. (2015). Effect of linseed dietary supplementation on adipose tissue development, fatty acid composition, and lipogenic gene expression in lambs. *Livestock Science*, 178: 345-356.
- Vasselli, J. R., Scarpace, P. J., Harris, R. B., & Banks, W. A. (2013). Dietary components in the development of leptin resistance. *Advances in Nutrition*, 4(2): 164-175.
- Vierboom, M. M., Engle, T. E., & Kimberling, C. V. (2003). Effects of gestational status on apparent absorption and retention of copper and zinc in mature Angus cows and Suffolk ewes. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 16(4):515-518.
- Wang, J., Liu, R., Liu, L., Chowdhury, R., Barzilai, N., Tan, J., & Rossetti, L. (1999). The effect of leptin on Lep expression is tissue-specific and nutritionally regulated. *Nature Medicine*, 5(8):895-899.
- Wein, S., Ukropec, J., Gašperíková, D., Klimeš, I., & Šeböková, E. (2007). Concerted action of leptin in regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle and liver. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 115(04):244-251.
- Zaidem, M. L., Groen, S. C., & Purugganan, M. D. (2019). Evolutionary and ecological functional genomics, from lab to the wild. *The Plant Journal*, 97(1), 40-55.