Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Ruminant Research

Print ISSN: 2345 - 4261
Online ISSN: 2345 - 4253

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 Badvi[2], Sepideh Rostami[3]

[1]Associate, [2]M.sc student & [3]Ph.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

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received:
Revised:
Accepted:

Keywords:
flaxseed oil
Zinc-methionine
Leptin
Liver

ABSTRACT

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

.

Method: 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 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.

muscle

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),

© The Author(s)

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

پژوهش در نشخوارکنندگان
شاپا چاپی: ۴۲۶۱-۲۳۴۵
شاپا الکترونیکی: ۴۲۵۳-۲۳۴۵

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

محمود نظری[1*]، سیده زهرا بدوی[2]، سپیده رستمی [3]

[1]دانشیار، [2]دانشجوی کارشناسی‌ارشد، [3] دانش آموخته دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت:
تاریخ ویرایش:
تاریخ پذیرش:

واژه‌های کلیدی:
روغن بذر کتان
روی-متیونین
لپتین
کبد
ماهیچه

چکیده

هدف: تولید گوسفند به‌عنوان 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 به‌عنوان 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 به‌دلیل 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 تاثیر مکمل آلی روی-متیونین و نمک کلسیمی روغن کتان جیره غذایی بود.

روش پژوهش: در این پژوهش، ٤٤ رأس بره نر نژاد عربی در سن ۲ تا ۳ ماهگی با میانگین وزن اولیه ١٤/٦ 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 میلی‌گرم 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 به‌گونه‌ای فرموله شدند که اختلاف انرژی قابل متابولیسم بین تیمارها در حداقل ممکن و در دامنه توصیه‌شده NRC باشد تا اثرات مشاهده‌شده 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 سانتی‌گراد 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 $۲^{-\Delta\Delta CT}$ و با نرمال‌سازی بر 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< ۰/۰۱)، اما بر بیان آن در ماهیچه اثر معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). علاوه بر این استفاده از مکمل روی- متیونین باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن لپتین در کبد و ماهیچه شد (P< ۰/۰۱)، همچنین افزودن همزمان مکمل روی- متیونین و مکمل چربی نمک کلسیمی روغن کتان منجر به تغییر معنی‌دار در بیان ژن مورد نظر نشد (P>۰/۰۵).

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. (۱٤۰۵). بررسی بیان ژن لپتین بافت ماهیچه و کبد بره پرواری تحت تاثیر مکمل آلی روی–متیونین و نمک کلسیمی روغن کتان جیره. *پژوهش در نشخوارکنندگان*، ۱٤(۲)،

© 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 (LMS)[1] تنظیم کننده کلیدی اشتها و متابولیسم انرژی است و ژن‌های آن با رشد و رانـدمان خـوراک در چنـدین گونـه، از جملـه گوسفند،مرتبط هستند (Zaidem و همکاران، ۲۰۱۹). سیستم لپتین–ملانوکورتین یک سیستم تنظیمی پیچیده است که در کنترل اشتها و تعادل انرژی در بسیاری از موجودات زنده، از جمله گوسفند، نقش دارد. 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، می‌باشد. اختلال در تنظیم سیستم لپتین–ملانوکورتین می تواند منجر به اختلالات متابولیکی مانند چاقی شود که می تواند بر سلامت و بهره‌وری حیوان تأثیر منفی بگذارد (Chong و همکاران، ۲۰۲۱). لپتین، که توسط ژن LEP کد می‌شود، هورمونی است که عمدتاً توسط بافت چربی ترشح می‌شود و نقش کلیدی در تنظیم اشتها و متابولیسم انرژی دارد. این هورمون از طریق گیرنده‌های لپتین در هیپوتالاموس عمل کرده و با مهار نورون‌های محرک اشتها و تحریک نورون‌های ضد اشتها، مصرف انرژی و تعادل انرژی بدن را کنترل می‌کند. بیان لپتین می‌تواند تحت تأثیر رژیم غذایی و ترکیب مواد مغذی قرار گیرد و به همین دلیل، تنظیم آن از طریق مداخلات تغذیه‌ای می‌تواند تأثیر قابل‌توجهی بر رشد، بهره‌وری و ترکیب بافتی گوشت گوسفند داشته باشد (Chilliard و همکاران، ۲۰۰۵).

برای افزایش بهره‌وری و کیفیت گوشت گوسفند، درک مکانیسم‌های ژنتیکی حاکم بر رشد و ویژگی های لاشه بسیار مهم است (Abdelhamid و همکاران، ۲۰۲۱). از آنجا که ژن های سیستم لپتین–ملانوکورتین به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های مهم این فرآیندها شناخته می‌شوند، در حال حاضر توجه زیادی را در زمینه انتخاب ژنومی و اصلاح نژاد گوسفند به خود جلب کرده‌اند (Girmay و همکاران، ۲۰۲۳). با وجود اهمیت این مسیر ، تعدیل بیان لپتین از طریق مداخله‌های تغذیه‌ای می‌تواند 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 به‌کارگیری تکنیک‌های نوین در تغذیه، از جمله استفاده از گیاهان دارویی به‌عنوان مکمل‌های خوراکی امکان‌پذیر است (Bhatt، ۲۰۱۵ ; Rabieh و همکاران ۲۰۲۰). در این تحقیق، از نمک کلسیمی روغن کتان به‌عنوان منبع اسیدهای چرب غیر اشباع استفاده گردید. نشان داده شده است که تغذیه نشخوارکنندگان با روغن‌های گیاهی غنی از اسیدهای چرب چندپلی‌غیراشباع (PUFA) یا دانه‌های روغنی فرآوری‌شده فیزیکی، باعث افزایش غلظت اسیدهای چرب چندپلی‌غیراشباع در عضلات می‌شود (Bolte و همکاران، ۲۰۰۲). اسیدهای چرب چندغیراشباع، به‌ویژه آلفا لینولنیک اسید موجود در روغن یا بذر کتان، قادرند مسیرهای متابولیسم چربی را از طریق کاهش لیپوژنز، افزایش β–اکسیداسیون و تغییر بیان ژن‌های وابسته به هورمون‌ها و فاکتورهای متابولیکی تحت تأثیر قرار دهند. بنابراین انتظار می‌رود استفاده از نمک کلسیمی روغن کتان بتواند بیان لپتین را در بافت‌های 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 کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، پروتئین‌ها و

1. leptin–melanocortin system

اسیدهای نوکلئیک نقش دارد (Vierboom و همکاران، ۲۰۰۳) و به‌دلیل اثر لیپوژنیک خود، از طریق سیگنالینگ انسولین در فرآیندهای لیپوژنز و مهار لیپولیز نقش دارد (Park و همکاران، ۲۰۰۳). عنصر روی که به‌صورت ترکیبات آلی و غیر آلی وجود دارد جزء بیش از ۳۰۰ آنزیم درگیر در ایمنی، متابولیسم، رشد و عملکردهای تولید مثلی است. عنصر روی با دخالت در تعادل الکترولیت‌ها و اسید و باز در بدن و مخصوصا در زمان استرس نقش ایفا می‌کند (Nazari و همکاران ۲۰۲۰) . کمبود روی می‌تواند بر عملکرد حیوانات از طریق کاهش اشتها و کاهش رشد تاثیر بگذارد. در نشخوارکنندگان، مکمل روی باعث بهبود افزایش وزن روزانه (Rodríguez-Gaxiola و همکاران، ۲۰۱۵)، عملکرد تولیدی و همچنین کیفیت لاشه می شود که عمدتاً به‌دلیل افزایش رسوب چربی درون عضلانی و تجمع لیپید در سلول و به‌دنبال 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، ۲۰۱٦). 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، مکمل‌سازی 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، به‌ویژه 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 چندپلی‌غیراشباع 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، ٤٤ رأس بره نر نژاد عربی در سن ۲ تا ۳ ماهگی با میانگین وزن اولیه ۱٤/٦ 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 میلی‌گرم 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 به‌نحوی تنظیم شد که حدود ۱۰ درصد از خوراک در آخور باقی بماند تا از دریافت کافی مواد مغذی اطمینان حاصل شود. دوره مطالعه به‌مدت ۹٤ روز ادامه داشت که شامل ۱۰ روز مرحله عادت‌پذیری و ۸٤ روز دوره اصلی تغذیه بود. طی این مدت، حیوانات با جیره‌های آزمایشی حاوی ۸۵ درصد کنسانتره تغذیه شدند. در پایان دوره، به‌منظور بررسی بیان ژن Leptin، سه بره نر از هر تیمار با میانگین وزن ۱٤/٦ کیلوگرم به‌طور تصادفی انتخاب و کشتار شدند.

طبق توصیه‌های استاندارد برای نمونه‌برداری 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.

جدول۱. اجزای تشکیل دهنده (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

تیمارها[1] Treatments				اجزای جیره Diet components (Kg)
بدون چربی Fat-free		حاوی چربی With fat		
Without zinc بدون روی	With zinc حاوی روی	Without zinc بدون روی	With zinc حاوی روی	
15	15	15	15	یونجه Alfalfa
44	44	44	44	جو Barley
14.80	14.72	12.50	12.42	ذرت Corn
9	9	9	9	کنجاله سویا Soybean meal
15	15	15	15	سبوس Bran
0	0	3	3	نمک کلسیمی روغن کتان[2] Calcium salt of flaxseed oil[2]
1.4	1.4	0.7	0.7	کلسیم کربنات Calcium carbonate
0	0.083	0	0.083	مکمل روی- متیونین[3] Zinc-methionine supplement[3]
0.3	0.3	0.3	0.3	نمک Salt
0.5	0.5	0.5	0.5	مکمل ویتامینی معدنی[4] Vitamin-mineral supplement[4]
				ترکیب شیمیایی (درصد در ماده خشک) Chemical composition (percentage in dry matter)
88.8	88.8	89.0	89.0	ماده خشک Dry matter
16.1	16.1	15.9	15.9	پروتئین خام Crude protein
3.0	3.0	5.8	5.8	چربی خام Crude fat
24.7	24.7	24.4	24.4	الیاف نامحلول در شوینده خنثی Insoluble fibers in neutral detergent
13.3	13.3	13.2	13.2	الیاف نامحلول در شوینده اسیدی Acid detergent insoluble fibers
49.5	49.5	46.9	46.9	کربوهیدرات‌های غیر الیافی Non-fiber carbohydrates
0.88	0.88	0.93	0.93	کلسیم Calcium
0.54	0.54	0.57	0.57	فسفر Phosphorus
31.4	130.9	30.5	129.0	روی (میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک) Zinc (mg/kg dry matter)
3.14	3.14	3.25	3.25	انرژی قابل متابولیسم (مگاکالری در کیلوگرم ماده خشک)[5] Metabolizable energy (megacalories per kg of dry matter)[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، پرشیالین، 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، ۱۸درصد 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 و یتامین 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)

استخراج RNA کل از بافت‌های کبد و ماهیچه بصورت جداگانه با استفاده از کیت ستونی استخراجRNA 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 مورد نظر در این مطالعه با استفاده از پرایمرهای سنتز شده، ابتدا واکنش PCR انجام شد. در صورت تأیید تکثیر ژن‌های مورد نظر، به‌منظور بررسی مقایسه‌ای بیان ژن ها از تکنیک Real time PCR استفاده شد.

لیست و مشخصات پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های Lptin (Tsiplakouو همکاران ۲۰۰۹) و 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 ng ۱۰۰)، ۲ میکرولیتر cDNA الگو (غلظت ng ۵۰) 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 به‌مدت ۵ دقیقه، فرآیند تکثیر شامل ۳۰ چرخه واسرشت در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و مرحله گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت 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 شد. در این مطالعه، میزان بیان نسبی ژن‌ها پس از نرمال‌سازی نسبت به ژن مرجع GAPDH با فرمول $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ به روش Pfaffl و همکاران در سال ۲۰۰۲ 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

بیان ژن‌های مورد نظر با استفاده از تکنیک Real-time qPCR ارزیابی شد. جهت اطمینان از صحت استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$، 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)

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

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 $2^{-\Delta\Delta CT}$ برای مقایسه نسبی بیان ژن‌ها در این مطالعه معتبر بود.

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

رابطه ۲)

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

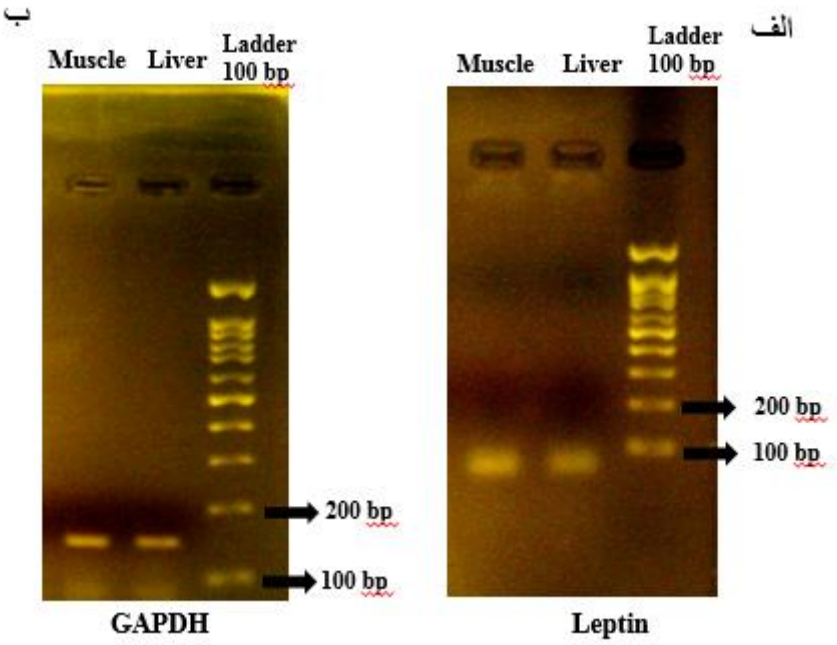
در این رابطه: y_{ijk} مقدار هر مشاهد، μ میانگین کل، C_i اثر مکمل روی- متیونین، T_j اثر مکمل چربی، $(CT)_{ij}$ اثر متقابل مکمل روی- متیونین و مکمل چربی و e_{ijk} اثر خطای آزمایش است.

یافته‌های پژوهش

نتایج ارزیابی کیفیت و کمیت RNA استخراج‌شده نشان داد که فرآیند خالص‌سازی 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 نوکلئیک‌اسیدها در ژل تأییدی بر کیفیت مناسب نمونه‌ها بود. علاوه‌بر این، نتایج حاصل از سنجش با دستگاه نانودراپ نیز کیفیت RNA را به‌طور 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

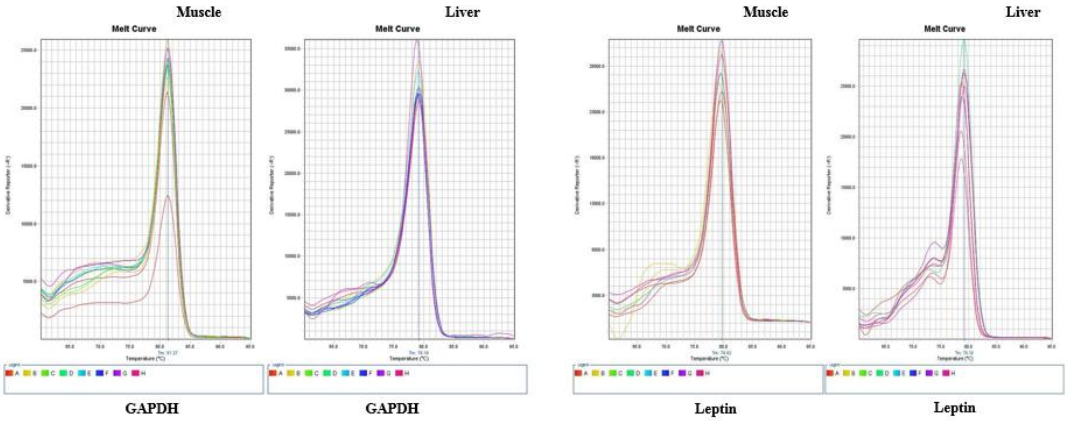
فنولی و مناسب بودن آن‌ها برای مراحل بعدی سنتز cDNA و انجام واکنش Real-Time PCR بود.

نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز نیز تکثیر اختصاصی ژن‌های مورد نظر را نشان داد (شکل ۱). به گونه‌ای که برای ژن Leptin در بافت کبد و ماهیچه باند در محدوده bp ٦٤ و برای GPDH نیز باند مشخص در محدوده bp ۱٤٤ را نشان داد.



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

از جمله مراحل کلیدی دیگر در تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از واکنش Real-time PCR، بررسی منحنی ذوب است که نمایانگر ویژگی‌های محصول تکثیر شده 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 خلوص بالای محصولات حاصل از واکنش Real-time PCR بود. نبود پیک‌های اضافی یا چندگانه نشان می‌دهد که در ژن لپتین در کبد هیچ‌گونه محصول غیراختصاصی یا دایمر پرایمری تشکیل نشده است.



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

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 ($P< ۰/۰۱$)، اما بر بیان آن در ماهیچه اثر معنی‌داری مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). علاوه‌بر این استفاده از مکمل روی- متیونین باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن لپتین در کبد و ماهیچه شد ($P< ۰/۰۱$)، همچنین افزودن همزمان مکمل روی- متیونین و مکمل چربی نمک کلسیمی روغن کتان منجر به تغییر معنی‌دار در بیان ژن مورد نظر نشد ($P>۰/۰۵$).

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

Leptin(M)	Leptin(L)	اثرات اصلی (Main effects)		تیمار (Treatment)
1.44^{b}	0.72^{b}	0		جیره پایه+ مکمل روی- متیونین
5.79^{a}	4.66^{a}	0.083		Basal diet + Zinc-methionine
0.58	0.45			SEM
3.20^{a}	3.71^{a}	0		جیره پایه+ مکمل چربی نمک کلسیمی روغن کتان
4.03^{a}	1.67^{b}	3		Base diet + Calcium salt of flaxseed oil
0.58	0.45			SEM
				اثرات متقابل (Interaction)
1	1	0	0	جیره پایه (کنترل) Basal diet (control)
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 کرم‌نژاد 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 تاثیر 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 تاثیری بر عملکرد رشد و مصرف خوراک بره‌ها نداشت. به‌نظر می‌رسد تغذیه نمک کلسیم روغن دانه کتان با سطوح بالای اسیدهای چرب غیراشباع بر سلامت و عملکرد بره‌ها تاثیر 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 می شود، 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 تغذیه ای با استفاده از نمک کلسیمی روغن کتان (منبع اسیدهای چرب غیراشباع) و روی-متیونین (منبع آلی از عنصر کم‌مصرف 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 معنی دار 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 (Friedman و Halaas، 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 می تواند 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 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، ۲۰۲٤). 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 نمک 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)، بویژه PPARα عمل می‌کنند (Majou، ۲۰۲۱). فعال شدن PPARα در کبد منجر به مهار انتقال سیگنال‌های پیش‌التهابی مانند فاکتور هسته‌ای کاپا-بی (NF-κB) می‌شود (Todisco و همکاران، ۲۰۲۲). از آنجایی که بیان ژن لپتین تحت تأثیر مسیرهای التهابی و بویژه سیتوکین‌هایی مانند TNF-α و IL-6 قرار دارد که خود توسط NF-κB القا می‌شوند، فعال شدن PPARα توسط امگا-۳ می‌تواند منجر به سرکوب بیان لپتین گردد. این یافته با تحقیق Bouwensو همکاران (۲۰۰۹) همسو است که گزارش کردند رژیم غذایی غنی از روغن ماهی (منبع EPA و DHA) باعث کاهش بیان لپتین در کبد انسان شد، آن‌ها این اثر را به فعال شدن PPARα و کاهش وضعیت التهابی نسبت دادند.

به‌منظور جلوگیری از تأثیر اختلاف انرژی بر نتایج عملکردی و بیان ژنی، با وجود اینکه افزودن ۳ درصد نمک کلسیمی روغن کتان موجب افزایش چربی جیره می‌گردد، ترکیب مواد خوراکی در تیمارها به‌نحوی 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 NRC (2007) 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 نشان دهنده 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 مکانیسم های 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 PPARها) در میوبلاست‌ها به شکلی متفاوت عمل کنند؛ با این حال لازم به ذکر است که فعال‌سازی PPARα در مطالعه حاضر به‌طور مستقیم اندازه گیری نشده و تفسیر مذکور صرفاً در چارچوب گزارش‌های پیشین مطرح می‌شود. به‌طور کلی، گزارش شده است که خودتنظیمی لپتین در بافت‌های مختلف می تواند متفاوت باشد؛ برای مثال، افزایش سطح لپتین می‌تواند بیان آن را در بافت چربی کاهش دهد، در حالی که 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 پاسخ های متابولیکی است (Wang و همکاران، ۱۹۹۹).

نکته جالب توجه در این پژوهش، عدم مشاهده تغییر معنی دار در بیان ژن لپتین هنگام استفاده همزمان از دو مکمل است. این پدیده نشان می دهد 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 این‌دو انجام نشده است، بنظر 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 می گذارند. هنگامی که این دو مکمل بصورت 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 ریزمغذی ها 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، در حالی که 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 پرواری 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.

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).

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*.

Bolte, 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., Sarmento-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., Tepaamorndech, S., Kirschke, C. P., Newman, J. W., Keyes, W. R., Pedersen, T. L., & Dumnil, 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 PPARα. *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.

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. *Vet Res & Bio Prod 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 Vetenary 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 stearoyl–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.