

اثر سطوح مختلف اسانس نعناع، لیمو، آویشن و زنیان بر عملکرد، فراسنجه‌های خونی و بیان ژن‌های لیپوژنیک کبدی در جوجه‌های گوشتی

فرهاد صمدیان^{*1} - محمد امیر کریمی ترشیزی² - زربخت انصاری پیراسرای³ - حسین واثقی⁴ - فهیمه محمد نژاد⁵ - وحید واحدی⁶

تاریخ دریافت: 1392/10/09

تاریخ پذیرش: 1394/07/07

چکیده

این آزمایش برای ارزیابی اثرات سطوح مختلف چهار اسانس گیاهی نعناع، لیمو، آویشن و زنیان بر عملکرد و فراسنجه‌های خونی جوجه‌های گوشتی انجام شد. بدین منظور 312 قطعه جوجه گوشتی نر سویه‌ی آرین در قالب طرح کاملاً تصادفی به 13 گروه مختلف با شش تکرار اختصاص یافت. جیره‌های آزمایشی بر پایه ذرت و سویا و اسیدهای آمینه سنتتیک تهیه شدند. بعد از دو روز عادت پذیری با جیره پایه، هر یک از اسانس‌ها در سه سطح 50، 100 و 150 پی‌پی‌ام مکمل خوراک پایه شدند. وزن کشتی به صورت هفتگی انجام گرفت و ضریب تبدیل غذایی و مصرف خوراک محاسبه شد. در روز 42 قبل از کشتار خون‌گیری به عمل آمد و برخی از فراسنجه‌های خونی از قبیل پروتئین کل، کلسترول، تری‌گلیسرید، HDL-C و LDL-C توسط کیت‌های تجاری مورد سنجش قرار گرفت. بیان نسبی ژن‌های فتی‌اسید سنتاز و مالیک آنزیم کبدی نیز با استفاده از RT-PCR صورت گرفت. نتایج نشان داد که دوز بالای اسانس نعناع موجب کاهش افزایش وزن روزانه پرنده‌ها در دوره رشد گردید. مکمل نمودن اسانس‌های گیاهی در مقایسه با شاهد، تأثیر معنی‌داری بر بیان ژن فتی‌اسید سنتاز کبدی، و متابولیت‌های خونی مورد سنجش نداشته است، در حالی که بیان نسبی ژن مالیک آنزیم کبدی در گروهی از پرنده‌گان که از یک جیره مکمل شده با اسانس نعناع در سطح 150 پی‌پی‌ام تغذیه کرده بودند در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. بنابراین اسانس نعناع در سطح 150 پی‌پی‌ام می‌تواند بر بیان ژن مالیک تأثیر گذاشته و همچنین بر عملکرد پرنده‌ها تأثیر سویی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: اسانس‌های گیاهی، بیان ژن، جوجه‌های گوشتی، عملکرد، متابولیت‌های شیمیایی خون.

مقدمه

برای مثال در مورد تأثیر اسانس‌های مختلفی گیاهی بر عملکرد یا افزایش وزن بدن جوجه‌های گوشتی گزارش‌های ضد و نقیضی وجود دارد و نتایج مطالعات مختلف از مثبت (1)، بی‌تأثیر (4) تا منفی (21) متغیر است. در مورد بررسی اثر اسانس‌های مختلف بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم در جوجه‌های گوشتی نیز تنها مطالعات معدودی وجود دارد (33). زنیان (منبع تیمول و گاماترپینن)، آویشن (منبع تیمول و پی‌سایمن)، نعناع (منبع کاروون و منتول) و لیمو (منبع لیمونن و ژرانیول) از جمله گیاهانی می‌باشند که به دلیل مواد مؤثره خود مورد توجه صنعت طیور قرار گرفته‌اند. خواص کاهنده کلسترول خون و افزایش کارایی کبدی برای زنیان (11) و سایر ترکیب‌های خالص از اسانس‌های فرار گیاهی (5) گزارش شده است. در گونه‌های طیور تولید چربی عمدتاً در کبد رخ می‌دهد و کبد 95 درصد از ساخت دنوایی اسیدهای چرب را در بر می‌گیرد (6، 24). آنزیم فتی‌اسید سنتاز (FAS) یک آنزیم محدود کننده در بیوسنتز اسیدهای چرب

امروزه گیاهان دارویی مختلف به دلیل داشتن اثرات سودمند بر خوش طعمی و کنش‌های روده (15)، اثرات ضد میکروبی (29) و همچنین فعالیت‌های گسترده‌ی آنتی‌اکسیدانی (39) به جیره‌ی دام‌های اهلی افزوده می‌شوند. دانش کنونی ما در مورد شیوه‌ی عمل و جنبه‌های کاربرد مواد فیتوژنیک در دامپروری کمابیش محدود است.

- 1- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج،
 - 2- دانشیار گروه پرورش و مدیریت طیور، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس،
 - 3- دانشیار گروه علوم دامی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری،
 - 4- دانشجوی دکتری فیزیولوژی دام، دانشگاه تبریز،
 - 5- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری،
 - 6- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی مغان، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل.
- (*) نویسنده مسئول: fsamadian@yu.ac.ir

تبدیل غذایی و مصرف خوراک محاسبه شد.

در 42 روزگی (روز کشتار) یک پرنده که وزن آن نزدیک به میانگین وزنی قفس مربوطه بود از هر قفس خارج و خون‌گیری از ورید بال آن به عمل آمد. کلسترول کل، کلسترول-HDL، کلسترول-LDL، پروتئین کل و تری‌گلیسریدهای پلاسمایی با استفاده از کیت‌های آزمایشی خریداری شده از شرکت پارس آزمون در نمونه‌های مختلف پلازما اندازه‌گیری شدند.

نمونه‌های کبد در روز کشتار در داخل تیوب‌های سر بسته جمع‌آوری شدند و بلافاصله در داخل ازت مایع قرار داده شدند. استخراج RNA نمونه‌های جگر با استفاده از کیت AccuZol™ شرکت Korea BIONEER و با توجه به دستور کار کیت انجام گرفت. سپس RNA های استخراج شده در 50 میکرولیتر آب RNase-free حل شده، با سمپلر تیپ زرد چند بار مخلوط گشته و به مدت 10 دقیقه در دمای °C 60 نگه داشته شدند و سپس نمونه‌های RNA در سرمای °C 80- نگه‌داری شدند. جهت ساخت cDNA از کیت RT PreMix™ RocketScript® Accupower™ شرکت Korea BIONEER استفاده شد که همه اجزاء مورد نیاز جهت سنتز cDNA تک رشته‌ای را دارا می‌باشد.

ابتدا نمونه‌های RNA از فریزر خارج و یخ‌گشایی شدند. اجزای کیت هم در دمای آزمایشگاه (25-20 درجه سلسیوس) قرار گرفتند. سپس در تیوب‌های ویژه کیت، اجزاء کیت و RNA افزوده شده تا به حجم 20 میکرولیتر برسد. پس از آن برنامه PCR (ذوب پرایمر °C 30 به مدت 5 دقیقه، سنتز cDNA در دمای °C 60 به مدت یک ساعت، دمای غیرفعال‌سازی °C 95 به مدت 5 دقیقه) اجرا شد. پس از اتمام مرحله PCR، cDNA سنتز شده در فریزر °C 80- قرار گرفت تا در ادامه برای انجام واکنش‌های Real-Time PCR مورد استفاده قرار گیرد. برای واکنش Real-Time PCR از کیت Master Mix QuantiFast SYBER Green PCR شرکت کیژن با شماره کاتالوگ 204052 استفاده شد. ژن β -actin به عنوان ژن کنترل انتخاب شد. آغازگرهای ویژه ژن بتا‌اکتین و ژن‌های FAS (EC 2.3.1.85)، و آنزیم مالیک (EC 1.1.1.40) از شرکت متابیون آلمان تهیه شدند. اطلاعات آغازگرهای استفاده شده در جدول 2 آورده شده است. به منظور کشیدن منحنی استاندارد برای هر یک از ژن‌ها، شش رقت مختلف از cDNA نمونه تهیه شد. رقیق‌سازی بر اساس ضریب 0/1 انجام شد، به شیوه‌ای که غلظت نهایی در استاندارد شماره 6 یک میلیونیم استاندارد شماره یک بود. برای هر نمونه مجهول، یک نمونه با بتا اکتین در نظر گرفته شد. دستگاه مورد استفاده، 3000 RotorGene از شرکت Corbett بود که دارای روتور 36 و 72 خانه بود. چرخه حرارتی در Real-Time PCR دارای مراحل فعال‌سازی اولیه (°C 95 به مدت 5 دقیقه)، جداسازی رشته‌ها (°C 95 به مدت 10 ثانیه) و تکثیر (°C 60 به مدت 30 ثانیه) بود. در

کبدی می‌باشد (18) و آنزیم مالیک نیز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌ها در مسیر سنتز اسیدهای چرب می‌باشد. میزان سنتز اسیدهای چرب، درصد چربی بدن و درصد چربی حفره شکمی با فعالیت آنزیم مالیک کبدی در طیور ارتباط مستقیمی دارد (24). اسانس‌ها حاوی مخلوطی از فلاونوئیدهای مختلف گیاهی می‌باشند. گزارش شده است که فلاونوئیدهای گیاهی با اثر بر تنظیم افزایشی ژن‌های بتا‌کسی‌داسیون کبدی (2، 17) و تنظیم کاهشی ژن‌های دخیل در سنتز چربی (17)، اثرات کاهنده چربی در خون جوجه‌های گوشتی را سبب می‌شوند. تاکنون مطالعه‌ای در مورد بررسی اثرات اسانس‌های گیاهی مذکور بر روی بیان ژن‌های کبدی گزارش نشده است. بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر چهار اسانس گیاهی نعناع، آویشن، لیمو و زنیان بر عملکرد و برخی خصوصیات بیوشیمیایی سرم و بیان نسبی ژن‌های دخیل در لیپوژنز کبدی در جوجه گوشتی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این طرح از تعداد 312 جوجهی نر یک‌روزه‌ی سویه‌ی آرین استفاده شد. جوجه‌ها به 12 گروه تیماری و یک گروه شاهد (در کل 13 گروه) تقسیم شدند. هر کدام از اسانس‌های گیاهی زنیان، آویشن، نعناع و لیمو در سه سطح 50، 100 و 150 پی‌پی‌ام به صورت مخلوط در روغن جیره مکمل خوراک جوجه‌ها شدند. بنابراین گروه‌های آزمایشی عبارت بودند از (1) شاهد (جیره پایه) (2) آویشن-50 (افزودن 50 پی‌پی‌ام اسانس آویشن به جیره پایه) (3) آویشن-100 (افزودن 100 پی‌پی‌ام اسانس آویشن به جیره پایه) (4) آویشن-150 (افزودن 150 پی‌پی‌ام اسانس آویشن به جیره پایه) (5) لیمو-50 (افزودن 50 پی‌پی‌ام اسانس لیمو به جیره پایه) (6) لیمو-100 (افزودن 100 پی‌پی‌ام اسانس لیمو به جیره پایه) (7) لیمو-150 (افزودن 150 پی‌پی‌ام اسانس لیمو به جیره پایه) (8) نعناع-50 (افزودن 50 پی‌پی‌ام اسانس نعناع به جیره پایه) (9) نعناع-100 (افزودن 100 پی‌پی‌ام اسانس نعناع به جیره پایه) (10) نعناع-150 (افزودن 150 پی‌پی‌ام اسانس نعناع به جیره پایه) (11) زنیان-50 (افزودن 50 پی‌پی‌ام اسانس زنیان به جیره پایه) (12) زنیان-100 (افزودن 100 پی‌پی‌ام اسانس زنیان به جیره پایه) (13) زنیان-150 (افزودن 150 پی‌پی‌ام اسانس زنیان به جیره پایه). تعداد شش تکرار برای هر تیمار و چهار جوجه در هر واحد آزمایشی (قفس) در نظر گرفته شد. جوجه‌ها به طور تصادفی به یکی از گروه‌های تیماری وارد شدند. جیره‌های غذایی بر پایه‌ی ذرت و سویا و روغن گیاهی و اسیدهای آمینه‌ی سنتتیک مطابق راهنمای جوجه گوشتی برای سویه آرین تنظیم شدند. ترکیب و مواد مغذی جیره‌ی پایه در سنین مختلف جوجه‌های گوشتی در جدول 1 نشان داده شده است. سیستم نور دهی به صورت 24 ساعت روشنایی اعمال گردید. وزن کشی به طور هفتگی صورت گرفت و ضریب

پایان محصول Real-Time PCR روی ژل آگارز 1/3 درصد بارگذاری شد

جدول 1- ترکیب و مواد مغذی جیره‌ی پایه

Table 1- Composition and ingredients of the basal diet

اجزای جیره Diet ingredients (g/Kg)	1-8 روزگی 1-8 days	9-17 روزگی 9-17 days	18-26 روزگی 18-26 days	27-36 روزگی 27-36 days	37-49 روزگی 37-49 days
ذرت Corn	538	529	635	652	680
کنجاله سویا Soybean meal	400	355	306	288	260
روغن سویا Soybean oil	17.50	13.00	18.50	22.00	22.00
دی - ال - متیونین DL-Methionine	2.90	2.80	2.45	2.30	2.05
ال - لیزین - هیدروکلراید L-Lysine hydrochloride	1.00	1.15	1.30	1.05	1.10
ترئونین Threonine	0.55	0.65	0.60	0.50	0.45
دی کلسیم فسفات Dicalcium phosphate	18.40	16.00	16.80	15.50	15.80
کربنات کلسیم Calcium carbonate	11.60	10.00	10.00	9.60	9.60
نمک NaCl	3.20	3.00	2.80	2.80	2.80
جوش شیرین Sodium bicarbonate	1.50	1.40	1.00	1.00	1.00
مکمل ویتامینی Vitamin Premix	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
مکمل معدنی Mineral Premix	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
ترکیب محاسباتی Calculated composition					
انرژی قابل متابولیسم Metabolizable energy (kcal/kg)	2910	2950	3025	3070	3100
پروتئین Protein (%)	22.00	20.70	18.90	18.20	17.10
کلسیم Calcium (%)	1.03	0.90	0.90	0.85	0.85
فسفر قابل دسترس Available phosphorous (%)	0.50	0.45	0.45	0.42	0.42
لیزین Lysine (%)	1.31	1.21	1.10	1.03	0.97
متیونین Methionine (%)	0.61	0.58	0.52	0.50	0.46
متیونین + سیستئین Methionin+cysteine (%)	0.97	0.92	0.84	0.81	0.75
ترئونین Threonone (%)	0.90	0.85	0.77	0.73	0.69
سدیم Sodium (%)	0.19	0.18	0.16	0.16	0.16
پتاسیم Potassium (%)	0.95	0.88	0.79	0.76	0.72

جدول 2- آغازگرهای مختص ژن آنزیم‌های مرتبط با سوخت و ساز لیپیدی و بتا‌کتین
Table 2- Gene specific primers of lipid metabolism related enzymes and β -actin

ژن	شماره بانک ژن	اندازه ملکول	جهت	توالی آغازگرها
Gene	GeneBank accession no.	Product size (bp)	Orientation	Primers sequences (5' -3')
بتا‌کتین β -Actin	L08165	300	Forward Reverse	TGCGTGACATCAAGGAGAAG TGCCAGGGTACATTGTGGTA
فتی‌اسیدسینتاز FAS ¹	J04485	423	Forward Reverse	GGAGTCAAAGTATCCATGGCC AAAGGAGATTCCAGCATCGTGCAGC
مالیک‌آنزیم ME ²	AF408407	470	Forward Reverse	ATGAAGAGGGGCTACGAGGT CCCATTCCATAACAGCCAAG

¹ Fatty acid synthase

² Malic enzyme

اسانس نعناع در مطالعه‌ای (16) نشان داده شده است که افزودن اسانس نعناع به جیره جوجه‌ها در سطح 200 پی‌پی‌ام (و نه در سطح 400 پی‌پی‌ام) موجب بهبود ضریب تبدیل غذایی شده است که با نتایج مطالعه حاضر متناقض است. در مطالعه‌ای دیگر (38) با افزودن 4 یا 5 گرم بر کیلوگرم جیره پودر خشک شده نعناع به جیره جوجه‌های گوشتی، بهبودی در عملکرد پرنده‌ها در کل دوره پرورشی مشاهده نگردید، در حالی که در همان مطالعه در سطح مکمل‌سازی 4g/kg، وزن بدن در 28 روزگی به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد بالاتر بود (38). نتایج مطالعه حاضر در تضاد با یافته‌های مطالعاتی است که گزارش نموده‌اند که مکمل نمودن اسانس‌ها، عصاره‌ها یا قسمت‌های خشک شده گیاهان دارویی می‌تواند بر روی وزن بدن، مصرف خوراک یا ضریب تبدیل غذایی در جوجه‌های گوشتی اثرات مثبتی داشته باشند (1، 40). این ناهمخوانی ممکن است به اختلافات در سطح افزودن اسانس‌های گیاهی به جیره و یا تفاوت در اجزای اصلی تشکیل دهنده اسانس و ترکیب تریپنی اسانس‌ها (کاروون در مقابل منتول در مورد اسانس نعناع) و شکل مکمل‌سازی (به شکل پودر خشک، عصاره و یا اسانس) در مطالعات مختلف نسبت داده شود (7). عوامل مختلف دیگری از جمله قدرت میکروبی‌کشی، ترکیب شیمیایی (7) و روش استفاده شده برای استخراج اسانس از گیاه (۱۲،۲۰)، ممکن است نتیجه یک آزمایش را تحت تأثیر قرار دهند، از این رو مقایسه نتایج با کارهای قبلی مشکل بوده و نمی‌تواند دقیق باشد. عدم مشاهده اثر مفید مورد انتظار از مکمل‌های اسانسی، ممکن است به دوز مورد استفاده، شرایط پرورشی و ترکیب جیره‌ی پایه بستگی داشته باشد. گفته شده است که اسانس‌ها به عنوان عوامل ضد میکروبی، هنگامی ممکن است تأثیر بیشتری داشته باشند که جیره مورد استفاده قابلیت هضم پایینی داشته باشد (21).

نتایج مربوط به بیان نسبی ژن‌های مالیک آنزیم و فتی‌اسیدسینتاز کبدی در جدول 4 نشان داده شده است. متأسفانه داده‌های مربوط به سطح 50ppm اسانس زنیان، قابل گزارش نگردید. تفاوت معنی‌داری بین بیان ژن FAS در بین گروه‌هایی که اسانس گیاهی را دریافت

Ct‌های (Cycle Thershold) به دست آمده از آنالیز real-time PCR برای ژن‌های هدف و ژن بتا‌کتین، در روش محاسباتی (27) که به صورت $2^{-\Delta\Delta CT}$ است قرار داده شد و بیان نسبی ژن‌ها بر طبق آن محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و با مدل $Y = \mu + A_i + e_{ij}$ صورت گرفت که μ میانگین و A_i اثر تیمار و e_{ij} اثرات باقی‌مانده می‌باشد.

نتایج

نتایج مربوط به اثر افزودن سطوح مختلف اسانس‌های گیاهی بر روی افزایش وزن بدن، مصرف خوراک و ضریب تبدیل غذایی جوجه‌های گوشتی در دوره‌های پرورشی در جدول 3 نشان داده شده است. در دوره رشد (22 تا 42 روزگی)، افزودن دوز بالاتر اسانس نعناع به جیره (گروه نعناع-150) موجب کاهش اضافه وزن روزانه هر پرنده نسبت به گروه شاهد شده است ($P < 0/05$). همچنین مشاهده می‌شود که در دوره پیش‌رشد (1 تا 21 روزگی) بالا بردن سطح افزودن اسانس نعناع به جیره (از 100 به 150 پی‌پی‌ام) بر ضریب تبدیل غذایی پرندگان تأثیر منفی داشته است ($P < 0/05$).

در این مطالعه با افزودن اسانس‌های آویشن، لیمو و زنیان به جیره جوجه‌های گوشتی، بر عملکرد پرنده‌ها تأثیر معنی‌داری مشاهده نگردید که با نتایج برخی از مطالعات دیگر (4، 12) سازگار است که بر بی‌تأثیر بودن این افزودنی‌ها بر روی عملکرد جوجه‌های گوشتی اشاره نموده‌اند. افزودن اسانس نعناع در سطح بالاتر خود به جیره جوجه‌های گوشتی، بر افزایش وزن پرنده‌ها در دوره رشد تأثیرات منفی دربرداشته است. لی و همکاران (21) نشان دادند که افزودن کارواکرول به جیره بر خلاف تیمول (دو ماده مؤثره غالب در اسانس‌های مختلف) در غلظت 200 پی‌پی‌ام، وزن‌گیری و مصرف دان را در دوره رشد کاهش داده است (21). همچنین کیرکپینار و همکاران (19) گزارش کردند که افزودن اسانس پونه کوهی (300 mg/kg) به جیره به طور معنی‌داری وزن بدن 42 روزگی جوجه‌ها را کاسته ولی مصرف خوراک را تنها در دوره‌ی 32-42 روزگی می‌کاهد. در مورد

کرده بودند در مقایسه با شاهد وجود نداشت، ولی در گروه زنبان-150 بیان ژن FAS نسبت به

جدول ۳- مقایسه‌ی صفات عملکردی در دوره‌های مختلف پرورش برای تیمارهای آزمایشی^۱
Table 3- Comparisons of performance traits among treatment groups in different rearing periods¹

تیمارها Treatments	شاهد Control	زنبان Ajwain		نعناع Peppermint		لیمو Lemon		آویشن Thyme		SEM				
		150	100	50	150	100	50	150	100		50			
Dose (ppm)	-	150	100	50	150	100	50	150	100	50				
افزایش وزن روزانه Daily weight gain (gr/d/bird)														
1-21 d	38.3	38.3	37.8	37.9	34.9	38.4	38.4	37.5	39.2	38.2	35.8	38.4	1.38	
22-42 d	78.2 ^a	75.7 ^{ab}	76.7 ^{ab}	79.5 ^a	72.5 ^b	77.3 ^a	80.0 ^a	79.4 ^a	77.5 ^a	79.6 ^a	76.9 ^{ab}	78.5 ^a	1.54	
1-42 d	56.9	55.6	55.9	57.3	54.8	56.4	58.0	56.3	57.0	57.6	56.9	55.5	1.40	
خوراک مصرفی روزانه توسط هر پرنده Daily feed intake (gr/d/bird)														
1-21 d	55.0	54.8	53.4	52.7	50.5	52.7	53.6	53.0	54.9	54.5	53.5	51.9	1.52	
22-42 d	162.1	158.1	167.8	163.9	154.9	159.2	165.1	162.2	161.1	165.4	163.4	157.8	3.72	
1-42 d	105.8	103.8	108.1	105.7	102.1	103.4	106.6	106.7	105.3	107.3	105.9	102.3	2.20	
ضریب تبدیل غذایی FCR														
1-21 d	1.43 ^{ab}	1.43 ^{ab}	1.41 ^{ab}	1.39 ^{ab}	1.48 ^b	1.37 ^a	1.39 ^{ab}	1.41 ^{ab}	1.40 ^{ab}	1.42 ^{ab}	1.42 ^{ab}	1.45 ^{ab}	1.38 ^a	0.03
22-42 d	2.07	2.09	2.17	2.06	2.14	2.06	2.05	2.04	2.07	2.08	2.07	2.14	2.03	0.06
1-42 d	1.86	1.87	1.85	1.85	1.87	1.83	1.84	1.86	1.85	1.86	1.86	1.86	1.85	0.04

^۱میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<0.05).

^۱Means within same row with different superscripts differ (P<0.05)

جدول ۴- تأثیر اسانس آویشن، لیمو، نعناع و زنیان بر روی بیان ژن آنزیم‌های لیپوژنیک در کبد جوجه گوشتی^۱
Table 4- The effects of thyme, lemon, mint and ajwain essential oils on lipogenic gene expression in broiler liver¹

بیان ژن آنزیم‌های لیپوژنیک	شاهد		زنیان		نعناع		لیمو		آویشن		SEM	
	Control	Ajwain	150ppm	100ppm	150ppm	100ppm	50ppm	150 ppm	100ppm	150 ppm		100ppm
lipogenic gene expression	-	150ppm	100ppm	150ppm	100ppm	50ppm	150 ppm	100ppm	50 ppm	150 ppm	100ppm	50 ppm
فتی‌اسیدسینتاز FAS	1.01 ^{abc}	2.06 ^a	0.43 ^{bc}	0.48 ^{bc}	0.18 ^c	1.18 ^{abc}	1.90 ^{abc}	1.81 ^{ab}	0.60 ^{abc}	0.43 ^{bc}	0.76 ^{abc}	0.57 ^{abc}
مالیک‌آنزیم ME	1.00 ^b	8.20 ^{ab}	10.06 ^{ab}	13.28 ^a	6.49 ^{ab}	4.96 ^{ab}	6.59 ^{ab}	3.90 ^{ab}	4.74 ^{ab}	4.99 ^{ab}	9.48 ^{ab}	9.66 ^{ab}

^۱Means within same row with different superscripts differ (P<0.05) in Duncan's comparisons.

میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P<0.05) که مقایسات دانکن صورت گرفته است.

جدول ۵- اثر سطوح مختلف افزودن اسانس‌های گیاهی بر روی برخی از فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون^۱
Table 5- Effects of different levels of supplemented essential oils on some biochemical blood parameters¹

تیمارها Treatments	شاهد Control	زنبان Ajwain			نعناع Peppermint			لیمو Lemon			آویشن Thyme		
		50	100	150	50	100	150	50	100	150	50	100	150
		Dose (ppm)											
پروتئین کل Total protein	2.59 (±0.31)	2.55 (±0.31)	2.93 (±0.34)	2.66 (±0.34)	2.68 (±0.31)	3.01 (±0.31)	2.91 (±0.34)	3.22 (±0.31)	2.57 (±0.31)	2.66 (±0.31)	2.87 (±0.31)	2.10 (±0.38)	2.61 (±0.31)
کلسترول LDL-cholesterol	33.66 (±3.60)	31.12 (±3.60)	22.62 (±4.10)	24.68 (±3.60)	37.51 (±3.60)	39.32 (±3.60)	26.82 (±4.10)	36.66 (±3.20)	28.17 (±3.60)	36.67 (±3.20)	32.21 (±3.60)	22.06 (±4.10)	33.16 (±3.60)
کلسترول HDL-cholesterol	68.38 (±3.56)	70.45 (±3.25)	65.89 (±3.56)	72.41 (±3.56)	71.09 (±3.25)	65.47 (±3.98)	68.02 (±3.56)	67.98 (±3.25)	67.36 (±3.25)	70.80 (±3.25)	71.92 (±3.25)	63.10 (±3.98)	72.43 (±3.56)
تری گلیسرید Triglyceride	125.80 (±3.21)	125.46 (±3.51)	132.75 (±3.51)	130.67 (±3.51)	128.79 (±3.21)	132.65 (±3.21)	131.17 (±3.51)	129.77 (±3.21)	131.77 (±3.92)	130.61 (±3.21)	131.71 (±3.21)	126.68 (±3.92)	132.39 (±3.21)
کلسترول Cholesterol	127.20 (±7.92)	129.79 (±8.68)	113.57 (±8.68)	119.31 (±8.68)	125.83 (±7.92)	122.67 (±7.92)	120.75 (±8.68)	130.63 (±7.92)	122.33 (±7.92)	133.62 (±7.92)	124.46 (±7.92)	102.99 (±8.68)	130.54 (±7.92)

^۱ اعداد داخل پرانتز پارامتر خطای استاندارد (SE) مربوط به هر گروه آزمایشی را نشان می‌دهد.

¹Standard error (SE) of each experimental group has been shown in bracket.

است به تفاوت در نوع ترکیبات موجود در اسانس‌های مورد استفاده با مواد موجود در عصاره آبی شاه‌توت مربوط باشد. در مطالعه‌ای اثر سه فیتونوترینت مشتق شده از گیاهان دارویی (کارواکرول، سینامالدید و کپسایسین اولئورزین) بر روی تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی، فیزیولوژی و سوخت و ساز، با استفاده از آنالیز ریزآرایه‌ای با توان عملیاتی بالا و مدل چالش درون‌تنی بیماری کوکسیدیوز مرغی مورد مطالعه قرار گرفت (25). آنالیز ریزآرایه‌ای نشان داد که تغییرات نسخه‌برداری میانجی‌گری شده با فیتونوترینت‌ها، با سوخت و ساز و ایمنی سلولی مرتبط بوده است. نمای وسیع ژنومی بیان متمایزی را به وسیله سه تیمار خوراکی نشان داد و آنالیز بیوانفورماتیک، مسیرها و شبکه‌هایی از ژن‌ها را مشخص نمود که به وسیله کارواکرول، سینامالدید و کپسایسین اولئورزین تحریک می‌شدند. در کل چنین گفته شده است که فیتونوترینت‌ها از طریق تنظیم بیان ژن در روده جوجه‌ها بر روی سامانه ایمنی و شرایط متابولیسی حیوان میزبان اثرات سودمندی را سبب می‌شوند (25). پاسخ سلول‌ها به ترکیبات فیتوژنیک ممکن است از طریق واکنش مستقیم متابولیت‌های اسانسی با گیرنده‌های سلولی یا آنزیم‌های دخیل در انتقال پیام و یا از طریق تغییر در بیان ژنی باشد (41). شواهد روز افزونی وجود دارند که فلاونوئیدهای گیاهی ممکن است نقش مهمی در فرایندهای مولکولی به ویژه به عنوان تعدیل‌کننده‌های آبخارهای پیام‌رسانی درون سلولی داشته باشند که برای کنش‌های سلول حیاتی هستند (41). در مطالعه‌ای مشخص گردید که کورکومین (ماده مؤثره در زردچوبه) موجب حذف آبخارهای پیام‌رسانی از قبیل NF-KB می‌شود و منجر به کاهش بیان پروتئین‌های دخیل در تکثیر سلولی و آپوپتوزیس می‌شود (28). در کل به منظور بررسی ساز و کار اسانس‌های گیاهی بر روی سوخت و ساز چربی‌ها و یا سایر مسیرهای سلولی در طیور، مطالعات گسترده‌تری باید بر روی بیان ژن‌های مختلف سلولی صورت گیرد.

نتایج مربوط به فراسنجه‌های خونی در جدول 5 نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود هیچ تفاوت معنی‌داری بین سطوح مختلف متغیرهای بیوشیمیایی سرم در بین تیمارهای مختلف آزمایشی وجود ندارد. پایین‌ترین مقدار کلسترول خونی به اسانس زنیان و سطح 100 پی‌پی‌ام آن مربوط می‌شود. نتایج مطالعه حاضر در تضاد با مطالعاتی است که گزارش کرده‌اند تغذیه‌ی ترپنوئیدها و عصاره‌های گیاهان دارویی توانسته است سطوح کلسترول (10، 32، 34) و تری‌گلیسریدهای پلاسما (33، 36) و یا لیپیدهای کل پلاسما (35) را در طیور کاهش دهند. در مطالعه‌ای (21) نشان داده شده است که این کارواکرول و نه تیمول خوراکی است که فسفولیپیدها و تری‌گلیسریدهای پلاسما را کاهش می‌دهد. از سویی گزارش شده است که اسانس آویشن به صورت خوراکی، سطح

برخی از گروه‌های تیماری بالاتر بود. اسانس نعناع در سطح 150 پی‌پی‌ام موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن مالیک‌آنزیم کبدی در مقایسه با شاهد گردید ($P < 0/05$).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اسانس‌های نعناع و زنیان در سطوح بالاتر خود، بر روی بیان ژن‌های دخیل در سنتز چربی (به ترتیب ژن‌های ME و FAS) تأثیرات افزایش‌دهنده‌ای بر جای گذاشته است. دلیل این افزایش برای ما ناشناخته است. فرضیه اول این است که این تأثیرات ممکن است به اثرات تنش‌زای و سمیتی دوز بالاتر این اسانس‌ها (دوز 150 پی‌پی‌ام)، تحریک چالش ایمنی و یا برانگیختن محور تنش (محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال) در پرنده نسبت داده شود، به طوری که در مطالعات قبلی گزارش بر این شده است که تحریک محور تنش یا تحریک چالش ایمنی، موجب افزایش بیان ژنی و فعالیت آنزیم‌های FAS و ME کبدی شده است (30، 31، 42). همچنین ممکن است چنین تفسیر شود که اسانس‌ها با اثر تحریک‌کنندگی احتمالی‌ها بر قابلیت هضم چربی‌ها (همانند لسیتین سویا در منبع 14) و افزایش بخشیدن به سوخت و ساز چربی در چرخه زندگی جوجه‌ها، موجب تنظیم افزایشی بیان ژن‌های لیپوژنیک کبدی (مالیک‌آنزیم، فتی‌اسیدسینتاز) شده باشند. در صورتی که چنین تصور نماییم که اسانس نعناع در سطح 150 پی‌پی‌ام با افزایش هضم و سرعت بخشیدن به سوخت و ساز چربی‌ها موجب افزایش بیان FAS شده باشد، در این حالت نباید بر افزایش وزن پرنده‌ها تأثیر سویی بر جای می‌گذاشت، بنابراین در مورد این گروه تیماری فرضیه اول محتمل‌تر به نظر می‌رسد. ممکن است ترکیبات موجود در اسانس نعناع (کاروون و منتول) در دوز بالای مکمل‌سازی بر روی کبد پرنده اثر سویی داشته و یا به متابولیت‌هایی تبدیل شود که موجب ایجاد اختلال متابولیسی در حیوان شوند، به عبارتی یک تنش متابولیسی در بدن پرنده ایجاد نمایند. پیشنهاد می‌شود برای روشن شدن بیشتر اثر این ترکیبات اسانسی مطالعات بیشتری صورت گیرد. در مورد تأثیر فیتونوترینت‌ها و گیاهان دارویی بر روی بیان ژن‌های مرتبط با سامانه ایمنی (8)، سامانه ردوکس (5، 22، 23) و سوخت‌وساز چربی (25) و کیفیت گوشت (43)، مطالعات معدودی وجود دارد، ولی در مورد تأثیر اسانس‌های گیاهی بر روی بیان ژن مطالعات به مراتب اندک است. هنگامی که خروس‌ها در سطوح 25 تا 100 پی‌پی‌ام برای 26 روز از لیمون خوراکی تغذیه می‌کردند، فعالیت فتی‌اسیدسینتاز (FAS) کبدی متأثر نشده بود (34). گزارش شده است که عصاره آبی شاه‌توت (منبع آنتوسیانین‌ها) با تنظیم کاهشی بین ژن‌های دخیل در بیوسنتز چربی (SREBP-1c، FAS و گلیسرول-3-فسفات آسیل ترانسفراز) و بیوسنتز کلسترول (HMG-CoA) سطوح تری‌گلیسرید و کلسترول پلاسما و کبدی را می‌کاهد (26). در مطالعه حاضر اسانس‌ها در مقایسه با گروه شاهد تأثیری بر بیان FAS نشان ندادند که ممکن

اسانس‌ها در بین گونه‌ها، غلظت، ترکیب اصلی سازنده‌ی اسانس (کیفیت و مشخصات شیمیایی)، ژنتیک حیوانی، جنس، نژاد و همچنین ترکیب خوراک باشد، این عوامل در مجموع اثربخشی اسانس در کاهش کلسترول سرم را مشخص می‌نمایند. بنابراین برای روشن شدن ساز و کار اثرات هایپولیپیدمیک اسانس‌های گیاهی مطالعات بیشتری مورد نیاز است.

نتیجه‌گیری کلی

افزودن سطوح مختلفی از اسانس‌های لیمو، آویشن و زنیان و نعناع به جیره جوجه‌های گوشتی آرین بر روی فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون و عملکرد پرنده‌ها اثر مثبتی دربر نداشته است. افزودن 150 پی‌پی‌ام اسانس نعناع به جیره موجب کاهش اضافه وزن روزانه جوجه‌های گوشتی در دوره رشد گردید، همچنین بیان نسبی آنزیم مالیک کبدی را نسبت به گروه شاهد، به طور معنی‌داری افزایش داد. ممکن است بتوان چنین تفسیر نمود که افزودن این سطح از اسانس نعناع به جیره موجب تنش متابولیکی در بدن جوجه‌ها شده باشد و در اثر این تنش، بر عملکرد و بیان ژن‌های لیپوژنیک کبدی اعمال اثر نموده باشد.

پلاسمایی تری‌گلیسرید، کلسترول-LDL و کلسترول-HDL سرمی را در جوجه‌های گوشتی بالا می‌برد (3). نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعه‌ای منطبق است که گزارش کرده است خوردن ترکیبات مختلف اسانسی به صورت روزانه و به مدت پنج هفته، هیچ گونه اثر هایپولیپیدمیک در پرندگان نشان نداده است (13). این محققین این اثر غیرمعنی‌دار ترکیبات اسانسی را به تجزیه سریع آن‌ها در کبد و یا ممانعت غیر مؤثر از فعالیت آنزیم HMG-CoA ردوکتاز (یک آنزیم محدود کننده در سنتز کلسترول) نسبت دادند. مشخص شده است که وجود یا عدم وجود اثرات کلسترولمیک اسانس‌ها در یک حیوان به جنسیت، نژاد، سن و ترکیب خوراک بستگی دارد (20). اثرات هایپولیپیدمیک گیاهان دارویی ممکن است به جلوگیری از جذب چربی‌ها از دستگاه گوارشی (37) و اثر ممانعت‌کننده بر روی آنزیم «هیدروکسی‌متیل‌گلو‌تاریل‌کوآنزیم A ردوکتاز» (HMG-CoA) نسبت داده شود (20). همچنین چنین پنداشته شده است که افزایش دکنژوگه شدن و دفع اسیدهای صفراوی شده و به تبع آن تحریک جایگزینی این اسیدها از کلسترول پلاسمایی ممکن است موجب کاهش سطوح کلسترول خونی می‌شود (9). ناهمخوانی بین آزمایش‌های مختلف در تعیین فراسنجه‌های مختلف بیوشیمیایی سرم می‌تواند ناشی از یک تعداد از عوامل شامل: اختلافات در اثربخشی

منابع

- Alçiçek, A., M. Bozkurt, and M. Çabuk. 2004. The effects of a mixture of herbal essential oil, an organic acid or a probiotic on broiler performance. *South African Journal of Animal Science*, 34:217-222.
- Aoki, F., S. Honda, H. Kishida, M. Kitano, N. Arai, H. Tanaka, S. Yokota, K. Nakagawa, T. Asakura, Y. Nakai, and T. Mae. 2007. Suppression by licorice flavonoids of abdominal fat accumulation and body weight gain in high-fat diet-induced obese C57BL/6Jmice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71:206-214.
- Bulukbası, C., M. K. Erhan, and A. Özkan. 2006. Effect of dietary thyme oil and vitamin E on growth, lipid oxidation, meat fatty acid composition and serum lipoproteins of broilers. *South African Journal of Animal Science*, 36:189-196.
- Botsoglou, N. A., E. Christaki, P. Florou-Paneri, I. Giannenas, G. Papageorgiou, and A. B. Spais. 2004. The effect of a mixture of herbal essential oils or alpha-tocopheryl acetate on performance parameters and oxidation of body lipid in broilers. *South African Journal of Animal Science*, 34:52-61.
- Charles, A.L., and T.C. Huang. 2009. Sweet cassava polysaccharide extracts protects against CCl4 liver injury in Wistar rats. *Food Hydrocolloids*, 23:1494-1500.
- Bedu, E., Chainier, F., Sibille, B., Meister, R., Dallevet, G., Garin, D., Duchamp, C., 2002. Increased lipogenesis in isolated hepatocytes from cold-acclimated ducklings. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 283: 1245-1253.
- Cross D. E., R. M. McDevitt, K. Hillman, T. Acamovic. 2007. The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. *British Poultry Science*, 48:496-506.
- Deng, Z-Y., J-W. Zhang, G-Y. Wu, Y. Yin, Z. Ruan, T-J. Li, W-Y. Chu, X-F. Kong, Y-M. Zhang, Y-W. Fan, R. Liu, and R-L. Huang. 2007. Dietary supplementation with polysaccharides from Semen cassia enhances immunoglobulin production and interleukin gene expression in early-weaned piglets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87:1868-1873.
- De Rodas, B. Z., S. E. Gilliland, and C. V. Maxwell. 1996. Hypocholesterolemic action of lactobacillus acidophilus AT CC 43121 and calcium in swine with hypercholesterolemia induced by diet. *Journal of Dairy Science*, 79:2121-2128.
- Elson, C. E., and S. G. Yu. 1994. The Chemoprevention of Cancer by Vevalonate derived Constituents of Fruits and Vegetables. *Journal of Nutrition*, 124:607-14.

11. Gilani, A. H., Q. Jabeen, M. N. Ghayur, K. H. Janbaz, and M. S. Akhtar. 2005. Studies on the antihypertensive, antispasmodic, bronchodilator and hepatoprotective activities of the *Carum copticum* seed extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 98:127-135.
12. Hernandez, F., J. Madrid, V. Garcia, J. Orengo, and M. D. Megias. 2004. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. *Poultry Science*, 83:169-174.
13. Hood, R. L., W. M. Bailey, and D. Svoronos, 1978. The effect of dietary monoterpenes on the cholesterol level of eggs. *Poultry Science*, 57:304-306.
14. Huang, J., D. Yang, S. Gao, and T. Wang. 2008. Effects of soy-lecithin on lipid metabolism and hepatic expression of lipogenic genes in broiler chickens. *Livestock Science*, 118:53-60.
15. Jugl-Chizzola, M., E. Ungerhofer, C. Gabler, W. Hagemüller, R. Chizzola, K. Zitterl-Eglseer, and C. Franz. 2006. Testing of the palatability of *Thymus vulgaris* L. and *Origanum vulgare* L. as flavouring feed additive for weaner pigs on the basis of a choice experiment. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, 119:238-243.
16. Khodambashi Emami, N., A. Samiea, H. R. Rahmani, and C.A. Ruiz-Feria. 2012. The effect of peppermint essential oil and fructooligosaccharides, as alternatives to virginiamycin, on growth performance, digestibility, gut morphology and immune response of male broilers. *Animal Feed Science and Technology*, 175:57-64.
17. Khovidhunkit, W., M. Kim, R. A. Memon, J. K. Shigenaga, A. H. Moser, K. R. Feinfol and C. Grunfeld. 2004. Thematic Review Series; the Pathogenesis of Atherosclerosis. Effects of Infection and Inflammation on Lipid and Lipoprotein Metabolism Mechanism. *Journal of Lipid Research*, 49:788-795.
18. Kim, J. B., and B. M. Spiegelman. 1996. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes & Development*, 10:1096-1107.
19. Kirkpinar, F., H. B. Unlu, and G. Ozdemir. 2011. Effects of oregano and garlic essential oils on performance, carcass, organ and blood characteristics and intestinal microflora of broilers. *Livestock Science*, 137:219-225.
20. Lee, K. W., H. Everts, H. J. Kappert, M. Frehner, R. Losa, A. C. Beynen. 2003a. Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. *British Poultry Science*, 44:450-457.
21. Lee, K. W., H. Everts, H. J. Kappert, K. H. Yeom, and A. C. Beynen. 2003b. Dietary carvacrol lowers body weight gain but improves feed conversion in female broiler chickens. *Applied Poultry Research*, 12: 394-399.
22. Lee, S. H., H. S. Lillehoj, S. M. Cho, D. W. Park, Y. H. Hong, E. P. Lillehoj, R. A. Heckert, H. J. Park, and H. K. Chun. 2009. Protective effects of dietary safflower (*Carthamus tinctorius*) on experimental coccidiosis. *Journal of Poultry Science*, 46:155-162.
23. Lee, S. H., H. S. Lillehoj, Y. H. Hong, S. I. Jang, E. P. Lillehoj, C. Ionescu, L. Mazuranok, and D. Bravo. 2010a. In vitro effects of plant and mushroom extracts on immunological function of chicken lymphocytes and macrophages. *British Poultry Science*, 51:213-221.
24. Leveille, G. A., D. R. Romsos, Y. Y. Yeh, and E. K. O'Hea. 1975. Lipid biosynthesis in the chick. A consideration of site of synthesis, influence of diet and possible regulating mechanisms. *Poultry Science*, 54:1075-1093.
25. Lillehoj, H. S., D. K. Kim, D. M. Bravo, and S. H Lee. 2010. Effects of dietary plant-derived phytonutrients on the genome-wide profiles and coccidiosis resistance in the broiler chickens. *International Symposium on Animal Genomics for Animal Health (AGAH 2010) Paris, France. 31 May–2 June.*
26. Liu, L-K., F-P. Chou, H-H. Ho, Y-C. Chen, C-C. Chyau., and C-J. Wang. 2009. Effects of Mulberry (*Morus alba* L.) Extracts on Lipid Homeostasis in Vitro and in Vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:7605-7611.
27. Livak K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25:402-408.
28. Mackenzie, G. G., N. Queisser, M. L. Wolfson, C. G. Fraga, A. M. Adamo, and P. I. Oteiza. 2008. Curcumin induces cell-arrest and apoptosis in association with the inhibition of constitutively active NF-kappaB and STAT3 pathways in Hodgkin's lymphoma cells. *International Journal of Cancer*, 123:56-65.
29. özer, H., M. Sökme, M. Güllüce, A. Adigüzel, F. Sahin, A. Sökmen, H. Kilic, and O. Baris. 2007. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of *Hippomarathum microcarpum* (Bieb.) from Turkey. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 55:937-942.
30. Puvadolpirod, S., and J. P. Thaxton. 2000a. Model of physiological stress in chickens 1. Response parameters. *Poultry Science*, 79:363-369.
31. Puvadolpirod, S., and J. P. Thaxton. 2000b. Model of physiological stress in chickens 2. Dosimetry of adrenocorticotropin. *Poultry Science*, 79: 370-376.
32. Pearce, B. C., R. A. Parker, M. E. Deason, A. A. Qureshi, and J. J. Wright. 1992. Hypocholesterolemic Activity of Synthetic and Natural Tocotrienols. *Journal of Medicinal Chemistry*, 35:3595-606.
33. Polat, U., D. Yesilbag, and M. Eren. 2011. Serum Biochemical Profile of Broiler Chickens Fed Diets Containing Rosemary and Rosemary Volatile Oil. *Journal of Biodiversity and Environmental Science*, 5: 23-30
34. Qureshi, A.A., Z. Z. Din, N. Abuirmeileh, W. C. Burger, Y. Ahmad, and C. E. Elson. 1983. Suppression of avian hepatic lipid metabolism by solvent extracts of garlic: Impact on serum lipids. *Journal of Nutrition*, 113:1746-

- 1755.
35. Radwan, N.L., R. A. Hassan, E. M. Qota, and H. M. Fayek. 2008. Effect of Natural Antioxidant on Oxidative Stability of Eggs and Productive and Reproductive Performance of Laying Hens. *International Journal of Poultry Science*, 7:134-150.
 36. Sakine, Y., E. Ebru, Z. Reisli, Y. Suzan. 2006. Effect of Garlic Powder on the Performance, Egg Traits and Blood Parameters of Laying hens. *Journal of Food Science*, 86:1336-1339.
 37. Saito, A., K. Nakamura, Y. Hori, and M. Yamamoto, 1999. Effects of capsaicin on serum triglycerides and free fatty acid in olive oil treated rats. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research*, 69:337-340.
 38. Toghyani, M., M. Toghyani, A. Gheisari, G. Ghalamkari, and M. Mohammadrezaei. 2010. Growth performance, serum biochemistry and blood hematology of broiler chicks fed different levels of black seed (*Nigella sativa*) and peppermint (*Mentha piperita*). *Livestock Science*, 129:173-178.
 39. Wei, A., and T. Shibamoto. 2007. Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 55:1737-1742.
 40. Williams, P., R. Losa. 2001. The use of essential oils and their compounds in poultry nutrition. *Worlds Poultry Science Journal*, 17:14-15.
 41. Williams, R. J., J.P. E. Spencer and C. Rice-Evans. 2004. Flavonoids: Antioxidants or signaling molecules? *Free Radical Biology and Medicine*, 36:838-849.
 42. Yuanli Cai, Y., Z. Song, X. Zhang, X. Wang, H. Jiao, and H. Lin. 2009. Increased de novo lipogenesis in liver contributes to the augmented fat deposition in dexamethasone exposed broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 150:164-169.
 43. Zhao, W., X. Chen, C. Yan, H. Liu, Z. Zhang, P. Wang, J. Su, and Y. Li. 2012. Effect of Sea Buckthorn Leaves on Inosine Monophosphate and Adenylosuccinatelyase Gene Expression in Broilers during Heat Stress. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 25(1):92-97.