

بررسی اثر پودر گیاهان پونه و آویشن شیرازی بر فراسنجه‌های خونی، شاخص‌های استرس اکسیداتیو و عیار حاصل از واکسن‌های ویروسی نیوکاسل و گامبورو در جوجه‌های گوشتی

• فروغ محمدی (نویسنده مسئول)

کلینیکال پاتولوژی، دانشکده کشاورزی، گروه دامپزشکی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران

• نسرین چوبکار

شیلات و آبزیان، دانشکده کشاورزی، گروه شیلات، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران

• مسعود گودرزی

مهندسی شیمی-مواد غذایی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸-۰۳-۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸-۰۴-۲۲

Email: forogh_mo58@yahoo.com



چکیده

اخیراً، استفاده از مکمل‌های گیاهی به دلیل مزایای زیاد جایگزین مکمل‌های مصنوعی در صنعت طیور شده است. این پژوهش به منظور بررسی اثرات خوراکی پودر قسمت‌های هوایی گیاهان پونه و آویشن شیرازی بر روی برخی از فراسنجه‌های خونی، شاخص‌های استرس اکسیداتیو و عیار حاصل از واکسن‌های ویروسی نیوکاسل و گامبورو انجام گردید. بدین منظور، تعداد ۱۲۰ قطعه جوجه‌گوشتی یک‌روزه سویه راس ۳۰۸ در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار، سه تکرار و ۲۰ قطعه جوجه در هر تکرار توزیع و تا سن ۴۲ روزگی نگهداری شدند. تیمارها شامل: (۱) تیمار شاهد (فقط جیره پایه)، (۲) تیمار پونه (جیره پایه + ۲۰۰ mg/kg پونه)، (۳) تیمار آویشن شیرازی (جیره پایه + ۲۰۰ mg/kg پودر آویشن)، (۴) تیمار ترکیبی (ترکیبی از هر دو گیاه ۲۰۰ mg/kg + ۲۰۰ جیره پایه) بودند. برخی فراسنجه‌های خونی، شاخص‌های استرس اکسیداتیو و همچنین عیار پادتن‌های اولیه و ثانویه ضد واکسن‌های نیوکاسل و گامبورو به ترتیب به روش HI و الایز، ۱۰ روز پس از آخرین واکسیناسیون اندازه‌گیری شد. نتایج حاصله حاکی از وجود انواع ترکیبات شیمیایی فعال در روغن اسانسی هر دو گیاه بود. بعلاوه، فراسنجه‌های خونی و شاخص‌های استرس اکسیداتیو دچار تغییرات معنی‌داری شدند. به طور کلی، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز افزایش و کاتالاز کاهش یافت، اما فعالیت گلوکوتاتیون پراکسیداز به دنبال دریافت مکمل تغییری نکرد. همچنین، مقادیر مالون دی آلدئید کاهش و اما مقادیر ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت. عیار ثانویه پادتن‌های اندازه‌گیری شده نیز افزایش معنی‌داری را نشان دادند. نتایج مطالعه حاضر مشخص کرد که، پودر هر دو گیاه پونه و آویشن، اثرات مطلوبی را بر روی فراسنجه‌های خونی، شاخص‌های استرس اکسیداتیو و پاسخ ایمنی دارند، اما به نظر می‌رسد که ترکیبی از دو گیاه دارای اثرات هم‌افزایی بوده و می‌توانند اثرات زیستی یکدیگر را تقویت نمایند.

کلمات کلیدی: جوجه گوشتی، پونه، آویشن شیرازی، فراسنجه‌های خونی، استرس اکسیداتیو

- Veterinary Researches & Biological Products No 128 PP: 116-129

Effects of *Mentha Pulegium L* and *Zataria multiflora* on Hematological Parameters, Oxidative Stress Biomarkers and Antibody Titer Resulted from Newcastle and Gumboro Vaccines in Broiler Chickens

By: Mohammadi, F., (Corresponding Author) Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran. Choobkar, N., Department of Natural Resources, Faculty of Agriculture, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran. and Goudarzi, M., Chemistry Engineering, Food Material, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran.

Received: 2019-05-28

Accepted: 2019-07-13

Email: forogh_mo58@yahoo.com

Recently, herbal supplements have replaced the synthetic ones, due to several advantages. This study was conducted to investigate the effects of dried powders of aerial parts of *Mentha pulegium L* and *Zataria multiflora* on hematological parameters, oxidative stress biomarkers and antibody titer resulted from Newcastle and Gumboro vaccines. One hundred and twenty 1-day ROSS (308) chickens with 4 treatments and 3 replicates containing 20 birds in each were kept for 42 days. The treatments were: 1) Control (basal diet); 2) Pennyroyal (200 mg/kg Pennyroyal + basal diet); 3) Thyme (200 mg/kg thyme + basal diet), 4) the combination (200 mg/kg+200 mg/kg of both herbal supplements + basal diet). The following hematological parameters were measured in the serum samples using standard assay kits: total protein, albumin, globulin, glucose, urea, triglyceride, cholesterol, high, low and very low density lipoprotein. The activities of 3 key antioxidant enzymes including superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase as well as malondialdehyde content and total antioxidant capacity were measured as biomarkers of oxidative stress. Vaccination was done based on the regional standards and primary and secondary antibody titers were measured against Newcastle and Gumboro using HI and ELISA methods, respectively, 10 days after the last vaccination. The obtained results showed that the essential oils of the plants contain numerous active biocompounds and herbal supplements could alter biochemical parameters and oxidative stress biomarkers. Generally, the activities of superoxide dismutase was increased but catalase was decreased. Moreover, the activity of glutathione peroxidase remained constant. In addition, malondialdehyde content was declined but total antioxidant capacity was elevated. Furthermore, the secondary titers of the antibodies were significantly increased. The results of this study showed that supplementation with pennyroyal and dill dried powders can improve hematological parameters, enhance the antioxidant potency and immune system of broiler chickens. However, apparently the combination of the both plants has synergistic effects.

Keyword: Broiler, *Mentha pulegium L*, *Zataria multiflora*, Oxidative stress, hematological parameters

بوده اند، چراکه کاملاً ایمن و سالم، طبیعی، ارزان و در دسترس هستند و اخیراً در انواع طیور با اهداف مختلف مانند ارتقاء رشد، مقابله با استرس اکسیداتیو و اثرات ضد میکروبی مورد آزمایش قرار گرفته‌اند (۱۷، ۳۶). بسیاری از ترکیبات گیاهی این مزیت را دارند که پس از تجویز، می‌توانند به طور همزمان چندین اثر متفاوت را بر جای بگذارند. به عنوان مثال، Zhang و همکاران (۲۰۰۹) نشان داده‌اند که پودر خشک شده ریشه زنجبیل (*Zingiber officinale*) به طور همزمان توانایی ارتقا سیستم آنتی‌اکسیدانی و همچنین بهبود رشد در جوجه‌های گوشتی را دارد (۳۶). استرس اکسیداتیو ناشی از مقادیر زیاد ریشه‌های فعال اکسیژن مانند

مقدمه

افزودنی‌های خوراکی متنوعی نظیر آنتی‌بیوتیک‌ها به منظور تغییر عملکرد دستگاه گوارش، بهبود تغذیه و رشد حیوانات به طور گسترده در صنعت طیور مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۲۵). با این وجود در سال‌های اخیر، گزارشات متعدد درباره مقاومت‌های ضد میکروبی و بقایای آنتی‌بیوتیکی در غذای انسان‌ها، به یک بحران و تهدید جهانی تبدیل شده است (۳۴). در نتیجه، جستجو به دنبال ترکیبات نوین، طبیعی، ایمن و کم‌خطر جهت جایگزین سازی با افزودنی‌های کنونی نیازی بدیهی و مرم قلمداد می‌شود. مکمل‌های گیاهی همواره مورد توجه دانشمندان

ریز صورتی یا آبی است که برگ‌هایی شبیه نعنا، بیضی اما کوچک‌تر و نوک تیزتر دارد (۱۴). مصرف مقادیر زیاد پونه (در جیره غذایی طیور، به ویژه در اوایل دوره رشد آن‌ها)، از رشد و نمو میکروب‌ها و باکتری‌ها و در نتیجه مرگ‌ومیر جوجه‌ها جلوگیری می‌کند (۹). عصاره این گیاه خاصیت ضد باکتریایی دارد و در کنترل انواع باکتری‌ها نقش دارد، علاوه بر این، عصاره این گیاه باعث خوش طعم شدن گوشت جوجه‌ها و نیز اثرات مثبتی بر عملکرد جوجه‌های گوشتی و مرغ‌های تخم‌گذار می‌گذارد (۲۴). در همین راستا، Paraskeuas و همکاران (۲۰۱۷) نشان داده‌اند که استفاده از جیره غذایی مبنی بر مکمل‌های گیاهی (شامل پونه) باعث افزایش هضم و جذب املاح معدنی و همچنین ارتقاء ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی پلازما در جوجه‌های گوشتی می‌شود (۲۳). Khempaka و همکاران (۲۰۱۳) نیز گزارش کرده‌اند که استفاده از گیاهان هم خانواده پونه، باعث کاهش میزان پراکسیداسیون چربی‌ها می‌شود (۱۵). با توجه به نیاز مبرم و ضروری به افزودنی‌های طبیعی و مزایای بی‌شمار مکمل‌های گیاهی، مطالعه کنونی با هدف ارزیابی اثرات مفید احتمالی پودر قسمت‌های هوایی دو گیاه رایج و مرسوم ایرانی طراحی و اجرا گردید. طی این مطالعه اثرات مطلوب هردو گیاه به طور مجزا و تومان با یکدیگر با تاکید بر خواص آنتی‌اکسیدانی بررسی شد. همچنین شاخص‌های استرس اکسیداتیو به خصوص فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به طور گسترده و جامع ارزیابی شدند. این در حالی است که مطالعات قبلی به شکل محدود و جزئی به مطالعه برخی از این شاخص‌ها پرداخته‌اند. همچنین، ترکیبات شیمیایی تشکیل‌دهنده این گیاهان به طور دقیق بررسی و مطالعه شد تا مشخص گردد، هر نوع اثر سودمند به دلیل وجود کدام ترکیبات در پودرهای گیاهی است.

رادیکال‌های سوپراکسید، هیدروکسیل و هیدروژن پراکسید که تحت شرایط استرس‌زا مانند گرم‌زدگی و یا آلودگی با کوکسیدیا به وجود می‌آیند، باعث کاهش رشد و عملکرد پرندگان تحت شرایط فشرده مرغداری می‌شوند. تحت شرایط عادی سپر آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی باعث حذف رادیکال‌های آزاد و حفاظت از بافت‌ها و سلول‌ها در مقابل استرس اکسیداتیو می‌گردند. وضعیت استرس اکسیداتیو در داخل بدن اغلب از طریق اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوکاتایون پراکسیداز (GSH-Px) و همچنین مقادیر مالون دی‌آلدئید (MDA) و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی نایل می‌شود (۳۵).

آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) گیاهی است علفی، دارای شاخه‌های زیاد و چوبی به ارتفاع تا ۳۰ سانتی‌متر که در نواحی کوهستانی در بین تخته سنگ و به‌ویژه در کشورهای اروپایی می‌روید. مصرف آویشن به صورت پودر در بعضی ادویه‌جات و ترشی‌ها بسیار رایج است، همچنین به طور مستقیم و یا همراه با دیگر گیاهان، به عنوان بو، مزه و ضد نفخ در صنایع غذایی مصرف زیادی دارد. در طب سنتی ایرانی-اسلامی، اکثراً به دلیل اثرات مسکن، ضد اسپاسم و ضد نفخ، از این گیاه استفاده می‌کنند (۱۸). طبق گزارشات موجود، اسانس آویشن شیرازی باعث بهبود عملکرد جوجه‌های گوشتی، خصوصاً ارتقاء سیستم ایمنی علیه ویروس آنفولانزا شده است (۲۸). ترکیبات فعال گیاهی از طریق بهبود قابلیت هضم، تعادل اکوسیستم میکروبی و ایمنی بهتر و تحریک ترشح آنزیم‌های هضمی اندوژن (درون‌زاد) می‌تواند عملکرد طیور را تحت تأثیر قرار دهد (۶). پونه با نام علمی (*Mentha pulegium* L) از گیاهان خانواده نعنائیان است. پونه، گیاهی علفی با ساقه‌ای راست و کوتاه به رنگ سبز تند با گل‌های

جدول ۱- ترکیبات جیره غذایی استفاده شده طی مطالعه کنونی بر حسب کیلوگرم

سن گله به روز				ترکیبات جیره غذایی
کشتار-۴۲	۲۵-۳۸	۱۱-۲۴	۰-۱۰	
۳۰۹۰	۳۰۳۰	۲۹۷۵	۲۹۱۰	انرژی قابل متابولیسم (kg)
۱۷/۷۵	۱۹/۱۵	۲۰/۶۰	۲۲/۴۵	پروتئین خام (kg)
۶۹۲/۵	۶۵۱/۵	۶۱۱/۵	۵۵۹/۵	ذرت (kg)
۲۶۰	۳۰۰	۳۴۰	۳۹۰	سویا (kg)
۲۳	۲۵	۲۷	۳۰	کنسانتره (kg)
۱۰	۱۱	۱۱	۱۲	صدف (kg)
۱۴	۱۲	۱۰	۸	روغن (kg)
۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	تمک (kg)
۱۰۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰	جمع کیلوگرم

مواد و روش کار

پرنده‌ها و تیمارهای آزمایشی

پروژه مذکور در مرغداری با ظرفیت ۴۰۰۰۰ قطعه‌ای در ۴ سالن به مساحت ۲۰۰۰ متر مربع واقع در ۱۰ کیلومتری بخش اشترینان شهرستان بروجرد، در سال ۹۶ اجرا گردید. یک صد و بیست (۱۲۰) قطعه جوجه

یک‌روزه نر گوشتی (راس ۳۰۸) یک‌دست با میانگین وزنی ۴۱٫۶۵ گرم از عامل توزیع محلی خریداری گردید. کلیه حیوانات دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. طول دوره پژوهش نیز ۴۲ روز در نظر گرفته شد. احتیاجات غذایی جوجه‌های گوشتی با استفاده از ۴ نوع جیره مختلف مبنی بر ذرت و سویا، بر اساس رهنمودهای NRC تامین گردید (۲۲). پرمیکس

جدول ۲- آنالیز مواد مغذی تشکیل دهنده کنسانتره گوشتی ۲/۵ درصد تک مرحله‌ای ویژه

مقادیر در هر کیلوگرم	مواد مغذی
۷۰۰ کیلو کالری	انرژی قابل متابولیسم
٪۹/۷	پروتئین خام
٪۷/۴	متیونین
٪۶/۷	لیزین
٪۷/۸	متیونین + سیستین
٪۹/۵	فسفر قابل دسترس
٪۱۶/۱	کلسیم
٪۳/۰۴	سدیم
٪۴/۵۶	کلر
٪۱/۵۴	پتاسیم
٪۲/۴	ترئونین
۴۴۰/۰۰۰ IU	ویتامین A
۱۶۰/۰۰۰ IU	ویتامین D۳
۱/۵۰۰ IU	ویتامین E
۱۲۸ Mg	ویتامین K۳
۷۴ Mg	ویتامین B۱
۲۶۰ Mg	ویتامین B۲
۴۹۰ Mg	ویتامین B۳
۱/۶۰۰ Mg	ویتامین B۵
۱۲۰ Mg	ویتامین B۶
۶۰ Mg	ویتامین B۹
۰/۶ Mg	ویتامین B۱۲
۴ Mg	H ₂ O
۲۰/۰۰۰ Mg	کولین کلراید
۲۵۰ Mg	آنتی اکسیدان (ویتامین E)

جدول ۳- آنالیز ترکیبات شیمیایی روغن اسانسی گیاه پونه

Components	Retention time	(%)
α -myrcene	24.01	1.02
α -terpineol	23.25	7.79
Pulegone	25.37	14.82
Cadinene	26.56	0.01
Menthol	33.82	3.28
Limonene	9.56	3.02
Sabinene	20.22	0.82
Camphene	22.51	0.61
Piperitenone	28.50	9.17
Neomenthol	29.50	2.82
Piperitone	30.43	12.12
Menthyl acetate	25.00	0.72
β - caryophyllene	31.01	0.42
Trans-ocimene	31.31	0.14
Isomenthone	32.02	1.56
Menthofuran	32.50	3.21
1-Octen-3-ol	34.50	0.09
Germacrene D	35.90	1.89
Geranyl acetate	36.30	2.06
Terpinolene	37.20	1.54
Piperitone oxide	39.03	3.06
α -Terpinene	40.01	0.05
Carvone	45.00	1.13
1,8-cineole	46.50	18.46
Linalool	51.09	3.03
Linalyl acetate	40.03	0.02
Menthone	42.56	2.89
Terpinen-4-ol	44.12	0.02
Total		95.76

* ترکیبات اصلی با فونت پررنگ مشخص شده اند.

جدل ۴- آنالیز ترکیبات شیمیایی روغن اسانسی گیاه آویشن شیرازی

Components	Retention time	(%)
α -pinene	935.34	2.00
α -thujene	924.17	0.08
Campheline	947.42	0.09
3-octanone	962.89	0.17
β -pinene	975.03	0.16
Mycerene	981.94	0.67
P-cymene	1014.2	5.23
Ledene	1502.8	1.06
Spathulenol	1577.2	1.08
Linalool	1082.5	1.25
Thymol	1271.2	12.31
Carvacrol	1287.4	48.61
β -terpineol	1226.1	0.9
γ -terpinen	1050.8	2.09
α -humulene	1452.8	0.2
Thymyl acetate	1323.5	0.71
Carvacryl acetate	1349.5	2.83
Cyclosativene	1475.1	0.13
P-menth-1-en-4-ol	1173.1	1.08
P-menth-1-en-8-ol	1190.3	1.09
Carvacrol methyl ether	1217.6	1.44
Trans-caryophyllene	1392.4	3.25
Caryophyllene oxide	1496.3	1.28
Monoterpene hydrocarbons		1.75
Oxygenated monoterpenes		3.12
Sesquiterpene hydrocarbons		2.05
Oxygenated Sesquiterpenes		1.49
Total content		96.12

* ترکیبات اصلی با فونت پررنگ مشخص شده اند.

واکسن (نیوکاسل-آنفلوآنزا) به صورت تزریق زیر پوستی و در ۱۲ روزگی واکسن (نیوکاسل) به صورت آشامیدنی دریافت کردند. در سن ۱۶ روزگی و متعاقباً در ۲۲ روزگی واکسن گامبورو به پرندگان موجود در همه تکرارها خورانده شد. ۱۰ روز بعد از آخرین واکسیناسیون از هر تکرار به صورت تصادفی ۴ قطعه جوجه انتخاب و خون‌گیری از ورید بال انجام شد.

تهیه و آماده‌سازی مواد گیاهی

هر دو گونه گیاهی پونه (*Mentha pulegium* L) و آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) در اواسط تابستان سال ۱۳۹۶ از باز محلی به صورت کاملاً تازه خریداری شد. تایید اصالت جنس و گونه گیاهان خریداری شده با کمک گروه گیاه شناسی و گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کرمانشاه صورت پذیرفت.

اسانس‌گیری از گیاهان

کلیه قسمت‌های هوایی هر دو گیاه جداسازی شده و در هوای آزاد و تحت سایه خشک گردید. نمونه‌های خشک شده به خوبی آسیاب شدند. ذراتی که از الک مش ۲۰ عبور کردند، برای اسانس‌گیری آماده شدند. ۲۰۰ گرم از پودر گیاهی، وارد بالون یک لیتری شد. پس از افزودن آب مقطر و چند عدد سنگ جوش، بالن به دستگاه کلونجر متصل گردید. عمل عصاره‌گیری برای هر نمونه تا ۳ ساعت طول کشید. اسانس به دست

تجاری مواد معدنی و ویتامین‌ها به جیره پایه افزوده گردید. جزئیات بیشتر در مورد جیره‌های مصرفی در جداول ۱ و ۲ آورده شده است. پرندگان مذکور به طور کاملاً تصادفی به چهار تیمار اصلی با ۳ تکرار و تعداد ۱۰ قطعه جوجه در هر یک از تیمارها تقسیم‌بندی شدند: تیمار (۱) بدون مکمل گیاهی و مشتمل بر جیره پایه و استاندارد (شاهد)، تیمار (۲) جیره استاندارد به همراه ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پودر قسمت‌های هوایی پونه، تیمار (۳) جیره استاندارد به همراه ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پودر قسمت‌های هوایی آویشن شیرازی، تیمار (۴) جیره استاندارد به همراه ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پودر آویشن شیرازی و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پودر پونه (با استفاده از قسمت هوایی هر دو گیاه). پرندها در تمام تیمارها به طور معمول و به یک شکل زیر نظر دامپزشک و بر طبق مقررات منطقه واکسینه شدند و هیچ‌گونه داروی خاصی در تمام تیمارها مصرف نشد.

برنامه واکسیناسیون

برنامه واکسیناسیون بر علیه بیماری‌های نیوکاسل، برونشیت، آنفلوآنزا و گامبورو طبق توصیه اداره کل دامپزشکی استان لرستان انجام شد. واکسیناسیون بر علیه برونشیت روزهای ۵ و ۱۳ از طریق آب آشامیدنی صورت گرفت. به منظور بررسی واکنش ایمنی جوجه‌ها، علیه بیماری‌های نیوکاسل و گامبورو، همه جوجه‌ها بر اساس سطح تیترا مادری در ۷ روزگی

جدول ۵- اثر پودر قسمت‌های هوایی دو گیاه پونه و آویشن شیرازی بر فراسنج‌های خونی در جوجه‌های گوشتی (تمامی شاخص‌ها بر حسب میلی‌گرم در دسی لیتر بیان شده‌اند).

متغیر	تیمار ۱ (شاهد)	تیمار ۲ (آویشن ۰.۲)	تیمار ۳ (پونه ۰.۲)	تیمار ۴ (پونه و آویشن)
پروتئین تام	۲/۵۳±۰/۰۷ ^a	۲/۶۴±۰/۰۲ ^b	۲/۶۹±۰/۰۵ ^b	۲/۹۸±۰/۰۹ ^c
آلبومین	۱/۳۵±۰/۰۶ ^a	۱/۴۹±۰/۰۲ ^b	۱/۵۲±۰/۰۲ ^b	۱/۶۴±۰/۰۵ ^c
گلوبولین	۱/۴۱±۰/۰۱ ^a	۱/۴۷±۰/۰۱ ^b	۱/۵۱±۰/۰۴ ^b	۱/۹۸±۰/۰۲ ^b
گلوکز	۲۰۷/۸۲±۱۳/۱۱ ^a	۲۰۵/۵۷±۱۲/۶۱ ^a	۱۹۱/۰۶±۱۰/۷۷ ^b	۲۰۲/۱۶±۱۱/۱۴ ^a
اوره	۱/۳۳±۰/۰۲ ^a	۱/۲۴±۰/۰۲ ^b	۱/۲۸±۰/۰۱ ^c	۱/۱۹±۰/۰۱ ^d
تری‌گلیسرید	۸۳/۱۵±۵/۲۵ ^a	۶۶/۳۱±۲/۷۵ ^b	۵۹/۱۱±۴/۷۵ ^c	۵۱/۳۷±۲/۷۵ ^d
کلسترول	۱۲۸/۷۱±۱/۳۵ ^a	۱۲۱/۴۱±۱/۶۲ ^b	۱۱۷/۷۱±۲/۱۲ ^c	۱۰۸/۴۱±۱/۳۴ ^d
VLDL	۱۶/۸۳±۱/۸ ^a	۱۴/۲۱±۰/۹ ^b	۱۵/۱۷±۰/۰۳ ^c	۱۲/۳۸±۰/۰۷ ^d
HDL	۲۶/۱۳±۱/۹ ^a	۳۱/۷۹±۱/۷ ^b	۳۴/۱۹±۱/۱۱ ^c	۳۵/۱۴±۱/۲ ^c
LDL	۵۴/۱۷±۱/۲۵ ^a	۴۰/۶۱±۱/۰۵ ^b	۳۷/۵۴±۲/۷۵ ^c	۳۲/۶۱±۱/۵۶ ^d

a-b-c-d: در هر سطر نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار در سطح $P < 0.05$ می باشد.

VLDL= لیپوپروتئین با چگالی بسیار اندک، HDL= لیپوپروتئین با چگالی زیاد، LDL= لیپوپروتئین با چگالی اندک

ویژگی‌های دستگاه کروماتوگراف گازی- طیف سنج جرمی

کروماتوگراف گازی از نوع Agilent technologies مدل A ۷۸۹۰، با ستون از نوع ۵MS-HP به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۳۲ میلی متر و ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرون، با برنامه‌ریزی دمایی ستون از ۶۰ به ۲۱۰ درجه سلسیوس با شیب دمایی ۳ درجه سلسیوس در دقیقه و ۲۱۰ تا ۲۴۰ درجه سلسیوس با شیب دمایی ۲۰ درجه سلسیوس در دقیقه و توقف در این دما به مدت ۸ دقیقه و ۳۰ ثانیه، مدت زمان اجرای برنامه ۶۰ دقیقه، نوع آشکار ساز FID با دمای ۲۹۰ درجه سلسیوس، گاز حامل نیتروژن با سرعت جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه و دمای محفظه تزریق ۲۸۰ درجه سلسیوس بود (۱). کروماتوگراف گازی متصل به طیف سنج جرمی از نوع Agilent technologies، مدل C۵۹۷۵، با ستون از نوع ۵MS-HP به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵

آمده با استفاده از مقدار مناسب سولفات سدیم (یک دهم وزن اسانس به دست آمده) خشک شده و سپس در داخل یک ظرف درب‌دار قرار گرفته و تا زمان آغاز آزمایش در یخچال نگهداری شد.

تجزیه اسانس

برای بررسی اجزای تشکیل‌دهنده اسانس، نمونه‌های به دست آمده به دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) تزریق شدند. مناسب‌ترین برنامه دمایی برای جداسازی کامل ترکیب‌های اسانس به دست آمده و درصد ترکیب‌های تشکیل‌دهنده هر نمونه اسانس محاسبه شد. سپس اسانس‌ها به دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل و به طیف سنج جرمی (GC/MS) نیز تزریق شدند و طیف جرمی ترکیب‌ها به دست آمد (۱۷).

جدول ۶- اثر پودر قسمت‌های هوایی دو گیاه پونه و آویشن شیرازی بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو در جوجه‌های گوشتی.

متغیر	تیمار ۱ (شاهد)	تیمار ۲ (آویشن ۰,۲)	تیمار ۳ (پونه ۰,۲)	تیمار ۴ (پونه و آویشن)
SOD	۱۰۰/۷۱±۳/۸۵ ^a	۱۱۹/۴۹±۶/۹۱ ^b	۱۱۲/۲۸±۲/۹۴ ^b	۱۳۴/۶۱±۹/۴۸ ^c
GSH-Px	۱۴۹/۲۶±۸/۹۴ ^a	۱۵۳/۴۶±۹/۸۶ ^a	۱۵۰/۴۹±۸/۵۹ ^a	۱۸۷/۶۸±۳/۴۹ ^a
CAT	۵۸/۳۱±۱/۳۳ ^a	۵۳/۳۲±۱/۱۹ ^b	۵۲/۱۶±۱/۴۱ ^b	۴۱/۲۷±۲/۸۵ ^c
MDA	۹/۲۳±۰/۴۱ ^c	۵/۹۱±۰/۶۹ ^b	۶/۳۹±۰/۱۲ ^b	۳/۱۹±۰/۱۲ ^a
TAC	۱۸/۳۷±۰/۳۱ ^a	۲۱/۹۱±۰/۵۲ ^b	۲۴/۵۸±۰/۵۳ ^c	۲۸/۵۹±۰/۲۸ ^d

a-b-c-d: در هر سطر نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار در سطح $P > 0.05$ می باشد.

SOD = سوپراکسید دیسموتاز، GSH-Px = گلوکوتاتیون پراکسیداز، CAT = کاتالاز، MDA = مالون دی آلدئید، TAC = ظرفیت تام آنتی اکسیدانی. فعالیت آنزیمی (SOD، GSH-Px، CAT) = U/L، MDA = nmol/L، TAC = Milli mol/L

جدول ۷- اثر پودر قسمت‌های هوایی دو گیاه پونه و آویشن شیرازی بر عیار حاصل از واکسن‌های نیوکاسل و گامبورو در جوجه‌های گوشتی (log ۲).

متغیر	تیمار ۱ (شاهد)	تیمار ۲ (آویشن ۰,۲)	تیمار ۳ (پونه ۰,۲)	تیمار ۴ (پونه و آویشن)
نیوکاسل	تیترا اولیه	۵/۴۰±۰/۲۹	۵/۶۱±۰/۴۷	۵/۵۰±۰/۲۴
	تیترا ثانویه	۴/۷۰±۰/۱۹ ^a	۵/۸۳±۰/۲۶ ^b	۶/۲۸±۰/۱۵ ^c
گامبورو	تیترا اولیه	۹/۸۴±۰/۳۸	۱۰/۴۰±۰/۴۱	۱۰/۶۳±۰/۵۱
	تیترا ثانویه	۸/۶۶±۰/۲۵ ^a	۹/۵۱±۰/۳۷ ^b	۹/۸۷±۰/۱۷ ^c

a-b-c: در هر سطر نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار در سطح $P > 0.05$ می باشد.

مقادیر مالون‌دی‌آلدئید بر اساس ماده واکنش‌زای تیوباریتوریک اسید (TBARS) بر اساس روش قبلی با اندکی تغییر اندازه‌گیری شد و مقادیر آن بر اساس نانومول بر لیتر اعلام گردید. ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی با استفاده از کیت استاندارد (Randox Laboratories Ltd., UK) ارزیابی شده و بر اساس میلی-مول بر لیتر گزارش گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۲ (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) تجزیه و تحلیل شدند. تمامی فراسنجه‌های بیوشیمیایی، شاخص‌های استرس اکسیداتیو و عیار پادتن‌های مورد مطالعه بین گروه‌های کنترل و تیمار با استفاده از تحلیل یکطرفه واریانس (ANOVA) و تست تعقیبی بون فرونی (Bonferroni) مقایسه شدند. داده‌های پردازش شده به شکل میانگین \pm انحراف معیار نمایش داده شده است. همچنین داده‌ها در سطح احتمال ۵ درصد ($P < 0.05$) مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها

ترکیب شیمیایی اسانس‌های گیاهی

ترکیبات شیمیایی بسیار مختلفی در اسانس روغنی هردو گیاه پونه و آویشن شیرازی شناسایی شد که جزئیات مربوطه برای هر گیاه به ترتیب در جدول ۳ و ۴ درج شده‌اند. همان‌طور که از جدول ۳ قابل مشاهده است، ۲۸ ترکیب شیمیایی مختلف در اسانس روغنی پونه شناسایی شد که در مجموع ۹۵/۷۶٪ ترکیب گیاه را تشکیل می‌دهد. به ترتیب ۱،۸ سینئول (۱۸/۴۶٪)، پولگون (۱۴/۸۲٪) و پیریتون (۱۲/۱۲٪) بیشترین ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس روغنی پونه بودند. همان‌طور که در جدول ۴ ترسیم شده است، کارواکول به طور قابل ملاحظه‌ای در اسانس روغنی آویشن شیرازی فراوان است، به طوری که این ترکیب شیمیایی تقریباً نیمی از اسانس (۴۸/۶۱٪) را تشکیل می‌دهد. تیمول (۱۲/۳۱٪) و ترنس-کاروفیلین (۳/۲۵٪) در جایگاه بعدی قرار دارند. در مجموع ۲۷ ترکیب شیمیایی گوناگون شناسایی گردید که ۹۶/۱۲٪ از اسانس را تشکیل می‌دهند.

فراسنجه‌های خونی

اثرات خوراکی پودر قسمت‌های هوایی گیاهان پونه و آویشن بر فراسنجه‌های خونی اندازه‌گیری شده طی مطالعه کنونی در جدول ۵ آورده شده است. همان‌طور که قابل مشاهده است، هر سه فراسنجه پروتئین تام، آل‌بومین و گلوبولین سرم به دنبال دریافت مکمل‌های گیاهی در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری یافته‌اند. مقادیر گلوکز به دنبال دریافت پودر قسمت‌های هوایی پونه کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد نشان می‌دهد، این در حالی است که پودر آویشن هیچ تاثیری را در بر نداشته است. همچنین ترکیبی از هردو پودر گیاهی، مقدار گلوکز را کاهش داده است، اما این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار نیست. مقدار اوره به دنبال تجویز خوراکی پودرهای گیاهی کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل داشته‌اند، البته تجویز توامان هر دو گیاه مقادیر اوره را به میزان بیشتری کاهش داده است. الگوی مشابه

میکرون، با برنامه‌ریزی دمایی ستون از ۶۰ به ۲۱۰ درجه سلسیوس با شیب دمایی ۳ درجه سلسیوس در دقیقه و ۲۱۰ تا ۲۴۰ درجه سلسیوس با شیب دمایی ۲۰ درجه سلسیوس در دقیقه و توقف در این دما به مدت ۸ دقیقه و ۳۰ ثانیه، مدت زمان اجرای برنامه ۶۰ دقیقه، ولتاژ یونی‌زاسیون ۷۰ الکترون‌ولت، روش یونی‌زاسیون الکترونی (EI)، دمای منبع یونی‌زاسیون ۲۳۰ درجه سلسیوس، دمای محفظه تزریق ۲۸۰ درجه سلسیوس و گاز حامل هلیوم با سرعت یک میلی‌لیتر در دقیقه بود.

مؤنه‌گیری

در روز ۴۲، تمامی پرندگان به صورت انسانی آسان‌کشی شده و نمونه‌های خون مستقیماً از قلب اخذ گردید (تقریباً ۶ میلی‌لیتر) و به داخل لوله‌های حاوی هپارین و حاوی ژل تفکیک‌کننده ریخته شد. نمونه‌های سرم از لوله‌های ژل دار به دنبال سانتریفیوژ در ۱۴۰۰g در دمای ۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه جداسازی شده و به لوله‌های اپندورف منتقل شدند و در مای ۲۰- سانتی‌گراد تا زمان آغاز آزمایشات، نگهداری شدند.

آنالیزهای بیوشیمیایی و اندازه‌گیری عیار پادتن‌های علیه نیوکاسل و گامبرو

تمامی آزمایشات بیوشیمیایی با استفاده دستگاه آنالیزور بیوشیمیایی خودکار (BT1۵۰۰) در آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی (دانشگاه آزاد اسلامی-واحد کرمانشاه) انجام گرفت. تمامی شاخص‌های سرمی شامل: پروتئین تام، آل‌بومین، گلوبولین، گلوکز، اوره، تری‌گلیسرید، کلسترول، لیپوپروتئین با چگالی‌زیاد، لیپوپروتئین با چگالی‌اندک، لیپوپروتئین با چگالی بسیار اندک با استفاده از کیت استاندارد و اختصاصی شرکت پارس آزمون-تهران و بر اساس دفترچه راهنمای داخل جعبه کیت اندازه‌گیری شدند. عیار پادتن علیه گامبرو با استفاده از کیت‌های الیزا استاندارد تجاری (IDEXX-USA) و علیه نیوکاسل به روش سنجش هم‌آگلوتیناسیون (HI) اندازه‌گیری شد (۵).

اندازه‌گیری شاخص‌های استرس اکسیداتیو

انواع شاخص‌های استرس اکسیداتیو شامل فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلووتاتیو پراکسیداز و همچنین مقادیر مالون‌دی‌آلدئید به عنوان شاخص پراکسیداسیون چربی‌ها و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی طبق شیوه و پروتکل‌های قبلی در نمونه‌های سرمی اندازه‌گیری گردید (۲۰).

به طور کلی، فعالیت‌های آنزیمی بر اساس روش اسپکتروفتومتری و رنگ‌سنجی ارزیابی شد. به طور مختصر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر اساس واکنش زانتین-زانتین اکسیداز با استفاده از کیت تجاری موجود (RanSod, Randox Co., UK) اندازه‌گیری شد. فعالیت کاتالاز از طریق پایش حذف هیدروژن پراکسید اندازه‌گیری شد. تغییر جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۳۰ ثانیه در مقایسه با نمونه بلانک پایش گردید. فعالیت آنزیم گلووتاتیو پراکسیداز نیز با استفاده از کیت اختصاصی (Ransel, Randox Co., UK) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده ارزیابی گردید. فعالیت هر سه آنزیم فوق‌الذکر بر اساس واحد بین‌المللی بر لیتر (U/L) بیان شد.

۵۳٪، ۱۳٪، ۶۷٪، ۵۳٪، ۳۹٪ و ۲۷٪ افزایش یافته است (۲۷). این رشد چشم‌گیر در سطح جهانی منجر به رقابت فشرده میان تولیدکنندگان طیور و فرآورده‌های مرتبط شده است. آنها مقادیر مختلفی از انواع افزودنی‌های خوراکی را استفاده می‌کنند تا عملکرد رشد و کیفیت لاشه را بهبود ببخشند و حساسیت به انواع بیماری را بکاهند. با این وجود، برخی قوانین سفت و سختی وجود دارند که استفاده از این افزودنی‌ها را به شدت محدود می‌سازد. بنابراین، پژوهش و تحقیق به دنبال ترکیبات جدید، ایمن، مقرون به صرفه، طبیعی و در دسترس مطلقاً ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به این مسئله حیاتی، ما مطالعه جامع و دقیق کنونی را طراحی نمودیم تا اثرات احتمالی مفید دو گیاه کاملاً رایج ایرانی را بر روی جوجه‌های گوشتی ارزیابی نماییم. بدین منظور، تعداد زیادی از فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون را اندازه‌گیری کردیم. ما همچنین، ترکیبات شیمیایی فعال موجود در روغن اسانس گیاه پونه و آویشن را مطالعه نمودیم. کارایی این دو مکمل گیاهی به طور مجزا و توأمان با یکدیگر مطالعه شد.

یافته‌های مطالعه کنونی نشان می‌دهد که ۲۸ ترکیب شیمیایی مختلف در روغن اسانس پونه وجود دارد که بیشترین آنها ۱،۸ سینئول (۱۸،۴۶٪)، پولژئون (۱۴،۸۲٪) و پیپریتون (۱۲،۱۲٪) است. همچنین ۲۷ ترکیب شیمیایی گوناگون از روغن اسانس گیاه آویشن شیرازی جداسازی شد که کارواکرول نزدیک به نیمی از ساختار اسانس را تشکیل می‌دهد.

عوامل زیادی می‌تواند ترکیب شیمیایی و درصد فیتوفنل‌ها را تحت تأثیر قرار دهد که محل جغرافیایی و فصل برداشت از آن جمله‌اند (۱۷). نتایج حاصل از مطالعه کنونی با یافته‌های محققان دیگر در مورد گیاهان بومی مناطق مختلف اندکی تفاوت داشت. از جمله ساعی-دهکردی و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که بیشترین ترکیب موجود در روغن اسانس آویشن شیرازی جمع‌آوری شده از نقاط مختلف ایران، تیمول می‌باشد و کارواکرول تا ۱۰٪ ساختمان اسانس را تشکیل می‌دهد (۲۶).

همچنین در مورد پونه نیز به تفاوت‌های جزئی در ترکیب شیمیایی در مقایسه با مطالعات قبلی پی‌برده شد. به طوری که طبق گزارشات پیشین پولگون ترکیب عمده شیمیایی در اسانس روغنی پونه بوده است (۳-۴). طی پژوهش کنونی، پودر خشک شده قسمت‌های هوایی گیاهان به دلیل سهولت استفاده و تهیه آسان استعمال گردید. گزارش شده است که مکمل‌های گیاهی در اشکال اسانسی و یا پودر گیاهی اثرات متفاوتی را بر جای می‌گذارند (۷). با این وجود، تعداد بسیار اندکی مطالعه در زمینه استفاده از پودر خشک شده گیاهان در جیره طیور گوشتی صورت گرفته است. بنابراین در این پژوهش این رهیافت در نظر گرفته شد تا نتایج حاصله کاربردی باشد.

پولگون یک ترکیب طبیعی است که در گروه مونوترپن‌ها قرار می‌گیرد. این ترکیب شیمیایی عامل بوی خوش آیند پونه می‌باشد. گزارش شده است که ترکیب عمده و اصلی گیاه *Satureja macrostema* همین ماده می‌باشد که به این گیاه خاصیت آنتی‌اکسیدانی بسیار قدرتمندی می‌دهد (۳۲). کارواکرول یک ترکیب مونوترپنی پلی فنولیک است که در روغن اسانس بسیاری از گیاهان دارویی یافت می‌شود (۲). پژوهش‌های صورت گرفته نشان می‌دهد که، این ماده دارای اثرات ضد میکروبی قدرتمندی است که باعث از بین رفتن باکتری‌های مضر و بیماری‌زا می‌شود

برای مقادیر تری‌گلیسرید ثبت شده است. کلاسترول خون نیز دستخوش تغییراتی همراستا با تری‌گلیسرید گردید. لیپوپروتئین با چگالی‌اندک و بسیار-اندک نیز به دنبال دریافت پودرهای گیاهی کاهش یافتند و ترکیبی از هردو گیاه بیشترین اثر را در برداشت. در نقطه مقابل، پودرهای گیاهی باعث افزایش معنی‌دار لیپوپروتئین با چگالی‌بالا شدند، با این وجود، تجویز توأمان هردو پودر گیاهی اثرات مشابه با پودر پونه به تنهایی داشت.

شاخص‌های استرس اکسیداتیو

نتایج حاصل از اندازه‌گیری شاخص‌های مختلف استرس اکسیداتیو در جدول ۶ درج شده است. به طور کلی می‌توان ادعا کرد که هر دو مکمل گیاهی توانسته‌اند شاخص‌های استرس اکسیداتیو به جز فعالیت آنزیم گلوکاتیون پراکسیداز را در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری تغییر ندهند. همچنین، ترکیبی از هر دو پودر گیاهی در مقایسه با حالت مجزا، اثرات چشم‌گیرتری را بر جا گذاشته است. همانطور که در جدول ۶ درج شده است، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز به دنبال تیمار با انواع پودر گیاهی افزایش یافته است. در مقابل، مکمل‌های گیاهی باعث کاهش چشمگیر فعالیت کاتالاز شده‌اند. همچنین، هیچ یک از مکمل‌های گیاهی نتوانسته‌اند به تنهایی باعث تغییر در فعالیت آنزیم گلوکاتیون پراکسیداز بشوند، اما در حالت توأمان توانسته‌اند فعالیت آنزیم را به طور معنی‌داری افزایش دهند. مقادیر مالون‌دی‌آلدئید در نمونه‌های سرمی اندازه‌گیری گردید تا وضعیت پراکسیداسیون چربی‌ها مشخص گردد. نتایج حاصله، حاکی از این امر است که محتوای مالون‌دی‌آلدئید به دنبال دریافت پودرهای گیاهی، کاهش چشمگیری داشته‌اند. همان‌طور که در جدول ۶ ترسیم شده است، در گروه ۴، مقادیر مالون‌دی‌آلدئید تا دو برابر در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته است. همچنین، مکمل‌های گیاهی نتوانسته‌اند تا ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی را به طور قابل توجهی در جوجه‌های گوشتی افزایش دهند.

عیار پادتن‌های نیوکاسل و گامبورو

مقایسه میانگین عیار پادتن‌های نیوکاسل و گامبورو طی روزهای ۱۰ و ۲۰ پس از آخرین واکسیناسیون در جدول ۷ درج شده است. نتایج حاصله حاکی از این است که ۱۰ روز بعد از واکسیناسیون تفاوت معنی‌داری بین هیچ از یک از تیمارهای آزمایشی برای هر دو بیماری نیوکاسل و گامبورو وجود ندارد. اما ۲۰ روز پس از واکسیناسیون، هر دو مکمل گیاهی نتوانسته‌اند در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری، عیار پادتن‌ها را افزایش دهند. اگر چه هر دو گیاه به تنهایی اثرات برابری بر روی عیار پادتن‌ها گذاشته‌اند، اما مصرف توأمان این دو گیاه، باعث افزایش هرچه بیشتر عیار پادتن‌های نیوکاسل و گامبورو شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

در سطح جهانی، تولید محصولات پایه و اولیه طیور (گوشت و تخم مرغ) با سرعت بسیار زیاد رشد کرده است. به طوری که در طول مدت ۱۰ سال مابین سال‌های ۱۹۹۵ تا ۲۰۰۵، مصرف و متعاقباً تولید جهانی برای گوشت مرغ، بوقلمون، مرغابی، گاز، تخم‌مرغ و سایر تخم‌ها به ترتیب

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را دارند. این آنزیم بیشترین کارایی کاتالیتیک در میان آنزیم‌های شناخته شده را دارد (۲۰). بنابراین، احتمالاً فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به این دلیل زیاد شده است که با رادیکال‌های آزاد مقابله کند. همراستا با یافته‌های این مطالعه، افزودن پودر خشک شده *Curcuma longa L* به جیره جوجه‌های گوشتی که حاوی آفلاتوکسین B₁ بود، توانست فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را افزایش دهد (۱۲). همچنین، مشاهده شد که فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز به دنبال دریافت مکمل‌های گیاهی هیچ تغییر نکرد، اما دریافت توامان هر دو مکمل (گروه ۴) باعث افزایش فعالیت آنزیم شد. توجه احتمالی می‌تواند این امر باشد که مکمل‌های گیاهی می‌توانند بیوسنز گلوکاتایون، سوبسترای آنزیم را افزایش دهند و یا اینکه منجر به کاهش استرس اکسیداتیو شوند که به کاهش تخریب گلوکاتایون منتهی می‌گردد (۳۳). مطابق با یافته‌های پژوهش کنونی، Wang و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که افزودن عصاره *Forsythia suspense* به جیره جوجه‌های گوشتی تحت استرس گرمایی می‌تواند فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز را بازیابی کند (۳۵). به دنبال تجویز خوراکی پودرهای گیاهی، مشاهده شد که فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش یافته است و ترکیبی از هر دو گیاه باعث کاهش هرچه بیشتر فعالیت آنزیم گردید. این یافته را می‌توان به ماهیت آنتی‌اکسیدانی پودرهای گیاهی ارتباط داد که باعث حذف سوبسترای آنزیم (هیدروژن پراکسید) می‌شوند و یا باعث حفظ لیپیدها در مقابل پراکسیداسیون می‌گردند و بدین طریق فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد.

اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون چربی‌ها، یک ابزار سودمند برای شناسایی ضایعات ایجاد شده توسط گونه‌های فعال اکسیژن است و سنجش میزان مالون‌دی‌آلدئید یک روش مطمئن برای دستیابی به این هدف می‌باشد (۲۰). بعلاوه، پتانسیل ایجاد استرس اکسیداتیو در بدن می‌تواند از طریق اندازه‌گیری ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی بافت‌ها و ارگان‌ها مشخص گردد. در حقیقت، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی‌های شناخته شده و نشده و اثرات هم افزایی آنها اندازه‌گیری شده و بدین ترتیب یک دید کلی در مورد تعادل میان اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها در اختیار قرار می‌گیرد (۱۱). نتایج مطالعه حاصله حاکی از این امر است که هر دو پودر گیاهی توانسته‌اند به خوبی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی جوجه‌های گوشتی را تقویت نموده و از پراکسیداسیون چربی‌ها به طور چشمگیری بکاهند. این یافته‌ها به وضوح بیان می‌کنند که هر دو مکمل گیاهی می‌توانند سپر آنتی‌اکسیدانی بدن را ارتقاء داده و از تولید رادیکال‌های آزاد جلوگیری کنند. این یافته‌ها با گزارشات قبلی همخوانی کامل دارد (۳۸).

نتایج به دست آمده از مطالعه کنونی به خوبی نشان می‌دهد که هر دو گیاه پونه و آویشن شیرازی می‌تواند باعث افزایش قابل توجه عیار پادتن ضد واکسن نیوکاسل و گامبورو بشوند. از طرفی، طبق نتایج حاصله، مصرف توامان این دو گیاه اثرات هم‌افزایی داشته و باعث بهبود هر چه بهتر سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی می‌گردد. احتمالاً این یافته‌ها به دلیل اثرات ضد ویروسی و ضد باکتریایی مستقیم ناشی از مصرف این دو گیاه می‌تواند باشد. در همین راستا Mosleh و همکاران (۲۰۱۳) به مطالعه اثرات اسانس آویشن شیرازی بر پاسخ‌های ایمنی در جوجه‌های

و خطر ابتلا به اسهال، استفراغ و حتی نارسایی کلیه را کاهش می‌دهد (۱۶). گزارشاتی در دسترس است که نشان می‌دهد، افزودن ۲۰۰ یا ۳۰۰ میلی‌گرم کارواکرول به جیره جوجه‌های گوشتی باعث بهبود افزایش وزن و همچنین بهبود عملکرد رشد در پرندگان می‌شود (۷). همچنین Du و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند تجویز خوراکی تیمول و کارواکرول به جیره غذایی جوجه‌های آلوده به کلستری‌دیوم، باعث التیام آسیب‌های روده‌ای از طریق افزایش استحکام ساختارهای روده و بهبود سیستم ایمنی می‌شود (۸). در همین راستا، هاشمی‌پور و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که تجویز خوراکی تیمول و کارواکرول باعث بهبود عملکرد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، کاهش چربی‌ها، افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی و ارتقاء سیستم ایمنی در جوجه‌های گوشتی می‌شود (۱۳).

فراسنجه‌های خونی سرم یک سیستم و شاخص قابل اطمینان است که می‌تواند دید کلی در مورد شرایط ارگان‌های داخلی تحت عواملی داخلی و خارجی در اختیار بگذارند (۳۰). یکی از نشانه‌های بهبود عملکرد جوجه‌های گوشتی به دنبال دریافت مکمل‌های گیاهی می‌تواند کاهش آسیب‌های کلیوی باشد. به طوری که داده‌های به دست آمده نشان می‌دهد که مقادیر اوره سرمی کاهش یافته است. یافته‌های مطالعه کنونی پیشنهاد می‌کند که هر دو مکمل گیاهی توانایی افزایش انواع پروتئین‌های سرمی (آلبومین و گلوبولین) و پروتئین تام را دارد. این حالت برای ترکیبی از هر دو گیاه بیشتر است که حاکی از اثر هم‌افزایی می‌باشد. این یافته‌ها با مطالعه قبلی که طی آن اثرات گیاهان خار مریم و آویشن بر جوجه‌های گوشتی، ارزیابی گردید، تطابق کامل دارد (۳۹). مکانسیم دقیق دخیل در فرآیند افزایش پروتئین‌های سرمی هنوز به خوبی روشن نشده است. وجود باکتری و میکروارگانیسم‌های خطرناک در دستگاه گوارش و همچنین اکسیداسیون مولکول‌های پروتئینی باعث تخریب آمینواسیدها و متعاقباً کاهش جذب آنها می‌گردد (۲۱). بنابراین خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی این دو گیاه می‌تواند جمعیت باکتری‌های مضر را کاهش داده و مانع از اکسیداسیون مولکول‌های پروتئینی شوند و بدین طریق جذب آمینواسیدها را بهبود بخشند.

بر اساس آزمایشات صورت گرفته طی مطالعه کنونی، هر دو پودر گیاهی توانایی کاهش مقادیر کلسترول، تری‌گلیسرید، لیپوپروتئین با چگالی اندک و بسیار اندک را دارند که این اثرات در حالت استفاده توامان از هر دو گیاه بسیار بیشتر است. مکانسیم احتمالی می‌تواند این امر باشد که ترکیبات گیاهی از طریق اتصال به اسیدهای صفراوی در طول روده توانایی کاهش جذب لیپیدها را دارند (۳۱). بعلاوه، گروهی از محققان بر این باور هستند که وجود ترکیباتی نظیر کارواکرول و تیمول در آویشن از طریق کاهش فعالیت آنزیم‌های دخیل در سنتز و جذب کلسترول و سایر لیپیدها می‌تواند دلیل احتمالی کاهش چربی‌های خون باشند (۳۹). بافت‌ها و سلول‌های بدن توسط فعالیت هماهنگ سه آنزیم کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در مقابله اثرات مخرب گونه‌های فعال اکسیژن محافظت می‌گردند. از این جهت، غلظت فیزیولوژیک این سه آنزیم به دقت کنترل می‌گردد. تغییر جزئی در غلظت این آنزیم‌ها می‌تواند به اختلال در عملکرد سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن و تخریب مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها گردد (۲۰). نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهند که هر دو پودر گیاهی توانایی افزایش

anticarcinogenicity and genotoxicity studies. *Cytotechnology* 66: 149-157. PMID: 23553016.

3- Bouyahya, A., A. Et-Touys, Y. Bakri, A. Talbaui, H. Fellah, J. Abrini, N. Dakka. 2017. Chemical composition of *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. *Microbial pathogenesis* 111: 41-49. doi: 10.1016/j.micpath.

4- Brahmi, F., A. Abdenour, M. Bruno, P. Silvia, P. Alessandra, F. Danilo, Y.-G. Drifa, E. M. Fahmi, M. Khodir, C. Mohamed. 2016. Chemical composition and in vitro antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of the essential oils of *Mentha pulegium* L. and *Mentha rotundifolia* (L.) Huds growing in Algeria. *Industrial Crops and Products* 88: 96-105. doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.002.

5- Cadman, H., P. Kelly, N. De Angelis, C. Rohde, N. Collins, T. Zulu. 1997. Comparison of enzyme linked immunosorbent assay and haemagglutination inhibition test for the detection of antibodies against Newcastle disease virus in ostriches (*Struthio camelus*). *Avian Pathology* 26: 357-363. doi.org/10.1080/03079459708419218

6- Chen, H. Y., C. H. Ma, K.-J. Cao, J. Chung-Man Ho, E. Ziea, V. T. Wong, Z.-J. Zhang. 2014. A Systematic Review and Meta-Analysis of Herbal Medicine on Chronic Obstructive Pulmonary Diseases. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014: 11. doi: 10.1155/2014/925069.

7- Cross, D., R. 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. DOI: 10.1080/00071660701463221.

8- Du, E., W. Wang, L. Gan, Z. Li, S. Guo, Y. Guo. 2016. Effects of thymol and carvacrol supplementation on intestinal integrity and immune responses of broiler chickens challenged with *Clostridium Perfringens*. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 7: 19. doi: 10.1186/s40104-016-0079-7.

9- Ghalamkari, G., M. Toghyani, N. Landy, E. Tavalaeian. 2012. Investigation the effects using different levels of *Mentha pulegium* L. (pennyroyal) in comparison with an antibiotic growth promoter on performance, carcass traits and immune responses in broiler chickens. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2: S1396-S1399. doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60424-9.

10- Ghazvinian, K., A. Araghi, M. Abouhosseini Tabari. 2017. Performance, immunity, and serum biochemical parameters in broiler chickens fed diet supplemented with *Zataria multiflora* essential oil. *Advanced Herbal Medicine* 3: 23-30.

11- Ghiselli, A., M. Serafini, F. Natella, C. Scaccini. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and ex-

گوشی پرداختند و دریافتند که اسانس مذکور به شکل وابسته به دز باعث افزایش عیار پادتن ضد واکسن زنده نیوکاسل می‌شود که با یافته‌های مطالعه حاضر تطابق کامل دارد. آنها همچنین پی بردند که دفع ویروس از طریق مدفوع به شکل چشمگیری کاهش می‌یابد (۱۹). قزوینی و همکاران (۲۰۱۷) نیز به نتایج مشابهی دست یافتند که نشان دهنده بهبود ایمنی همورال در جوجه‌های گوشتی دریافت‌کننده اسانس آویشن شیرازی بود (۱۰). آزمایشات صورت گرفته بر روی موش‌های سوری، نشان می‌دهند که تزریق داخل صفاقی اسانس آویشن شیرازی باعث افزایش فاگوستیوز و ترشح فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا (TNF- α) می‌شود (۲۹). این در حالی است که برخی از پژوهشگران به نتایج مغایر دست یافته‌اند. پورحسابی و همکاران (۱۳۹۶) در مطالعه خود پی بردند که تجویز اسانس آویشن باغی در سطوح مختلف هیچ تاثیری بر روی عیار پادتن ناشی از واکسن نیوکاسل در جوجه‌های گوشتی ندارد (۳۷). فرامرزی و خاکی (۱۳۹۶) نیز به نتایج مشابه دست یافته‌اند (۴۰). داده‌های حاصل از این مطالعه به وضوح نشان می‌دهد که اسانس‌های روغنی به دست آمده از گیاهان پونه و آویشن شیرازی دارای مقادیر متفاوتی از انواع ترکیبات شیمیایی فعال است. همچنین، تجویز خوراکی پودر قسمت‌های هوایی این گیاهان می‌تواند فراسنجه‌های بیوشیمیایی را در جهت مثبت تغییر دهد. بعلاوه، پی برده شد که هر دو پودر گیاهی این توانایی را دارند که مانع از تولید رادیکال‌های آزاد شوند و همزمان سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن را تقویت نمایند. پاسخ ایمنی علیه دو بیماری بسیار مهم نیوکاسل و گامبورو به دنبال مصرف مکمل‌های گیاهی نیز بهبود پیدا کرد. یافته مهم دیگر این است که این دو گیاه می‌توانند اثرات زیستی یکدیگر را تقویت نمایند. محدودیت و کاستی اصلی طی مطالعه کنونی، طراحی آن مبنی بر مطالعات تک‌نقطه‌ای است. با این وجود، مطالعات چند نقطه‌ای که در طول مدت مطالعه چندین بار نمونه‌گیری صورت می‌پذیرد، می‌تواند دانش و آگاهی را در مورد روند تغییر عوامل اندازه‌گیری شده افزایش دهند. همچنین سایر عوامل نیز مانند کیفیت لاشه و عملکرد رشد باید اندازه‌گیری شود تا کفایت این دو پودر گیاهی به خوبی روشن شود. چنین ارزیابی‌هایی باید در مطالعات آتی صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

قسمتی از این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشجوی مهندسی شیمی-صنایع غذایی با کد دفاع ۱۹۲۴۰۲۰۱۹۵۲۰۰۵ می‌باشد که بدینوسیله از گروه مربوطه و مسئولین پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه تشکر می‌گردد.

منابع مورد استفاده

1- Adams, R. P., O. D. Sparkman. 2007. Review of Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 18: 803-806. ISBN: 9781932633214.

2- Aydın, E., H. Türkez, M. S. Keleş. 2014. The effect of carvacrol on healthy neurons and N2a cancer cells: some biochemical,

- perimental data. *Bio-Assays for Oxidative Stress Status*: Elsevier; 2001. P. 219-227. PMID: 11121717
- 12- Gowda, N. K., D. R. Ledoux, G. E. Rottinghaus, A. J. Bermudez, Y. C. Chen. 2009. Antioxidant efficacy of curcuminoids from turmeric (*Curcuma longa* L.) powder in broiler chickens fed diets containing aflatoxin B 1. *British Journal of Nutrition* 102: 1629-1634. doi: 10.1017/S0007114509990869.
- 13- Hashemipour, H., H. Kermanshahi, A. Golian, T. Veldkam P. 2013. Effect of thymol and carvacrol feed supplementation on performance, antioxidant enzyme activities, fatty acid composition, digestive enzyme activities, and immune response in broiler chickens. *Poultry science* 92: 2059-2069. doi: 10.3382/Ps.2012-02685.
- 14-Jazani, N., H. Ghasemnejad-Berenji, S. Sadegpoor. 2009. Antibacterial effects of Iranian *Mentha pulegium* essential oil on isolates of *Klebsiella* sp. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 12: 183-185. PMID: 19579942.
- 15-Khempaka, S., U. Pudpila, W. Molee. 2013. Effect of dried peppermint (*Mentha cordifolia*) on growth performance, nutrient digestibility, carcass traits, antioxidant properties, and ammonia production in broilers. *The Journal of Applied Poultry Research* 22: 904-912. doi.org/10.3382/japr.2013-00813
- 16-Magi, G., E. Marini, B. Facinelli. 2015. Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A *Streptococci*. *Frontiers in Microbiology* 6: 165. doi: 10.3389/fmicb.2015.00165.
- 17-Mehdzadeh, T., M. Hashemzadeh, A. Nazarizadeh, M. Neyriz-Naghadehi, M. Tat, M. Ghalavand, R. Dorostkar. 2016. Chemical composition and antibacterial properties of *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* and *Trachyspermum ammi* essential oils alone and in combination with nisin. *Research Journal of Pharmacognosy* 3: 51-58.
- 18-Mehdzadeh, T., R. Narimani, A. Mojaddar Langroodi, E. Moghaddas Kia, M. Neyriz Naghadehi. 2018. Antimicrobial effects of *Zataria multiflora* essential oil and *Lactobacillus acidophilus* on *Escherichia coli* O157 stability in the Iranian probiotic white brined cheese. *Journal of Food Safety*: e12476. doi.org/10.1111/jfs.12476
- 19-Mosleh, N., T. Shomali, H. Aghapour Kazemi. 2013. Effect of *Zataria multiflora* essential oil on immune responses and faecal virus shedding period in broilers immunized with live Newcastle disease vaccines. *Iranian Journal of Veterinary Research* 14: 220-225. DOI: 10.22099/IJVR.2013.1684
- 20-Nazarizadeh, A., S. Asri-Rezaie. 2016. Comparative study of antidiabetic activity and oxidative stress induced by zinc oxide nanoparticles and zinc sulfate in diabetic rats. *AAPS PharmSciTech* 17: 834-843. doi: 10.1208/s12249-015-0405-y.
- 21-Nobakht, A., J. Norani, A. Safamehr. 2011. The effects of different amounts of *Mentha Pulegium* L.(Pennyroyal) on Performance, carcass traits, hematological and blood biochemical Parameters of broilers. *Journal of Medicinal Plants Research* 5: 3763-3768.
- 22-NRC. Nutrient Requirements of Poultry. 9th ed: National Academy Press, Washington DC.; 1994.
- 23-Paraskeuas, V., K. Fegeros, I. Palamidi, C. Hunger, K. C. Mountzouris. 2017. Growth Performance, nutrient digestibility, antioxidant capacity, blood biochemical biomarkers and cytokines expression in broiler chickens fed different PhytoGenic levels. *Animal Nutrition* 3: 114-120. doi.org/10.1016/j.aninu.2017.01.005
- 24-Pirmohammadi, A., M. Daneshyar, P. Farhoomand, J. Aliakbarlu, F. Hamian. 2016. Effects of *Thymus vulgaris* and *Mentha Pulegium* on colour, nutrients and Peroxidation of meat in heat-stressed broilers. *South African Journal of Animal Science* 46: 278-284. dx.doi.org/10.4314/sajas.v46i3.7
- 25-Rahimi, S., Z. Teymori Zadeh, K. Torshizi, R. Omidbaigi, H. Rokni. 2011. Effect of the three herbal extracts on growth Performance, immune system, blood factors and intestinal selected bacterial Population in broiler chickens. *Journal of Agricultural Science and Technology* 13: 527-539.
- 26-Saei-Dehkordi, S. S., H. Tajik, M. Moradi, F. Khalighi-Sigaroodi. 2010. Chemical composition of essential oils in *Zataria multiflora* Boiss. from different Parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology* 48: 1562-1567. doi: 10.1016/j.fct.2010.03.025.
- 27-Scanes, C. G. 2007. The Global Importance of Poultry. *Poultry science* 86: 1057-1058. doi.org/10.1093/Ps/86.6.1057
- 28-Shayeganmehr, A., M. Vasfi Marandi, V. Karimi, A. Barin, A. Ghalyanchi-Langeroudi. 2018. *Zataria multiflora* essential oil reduces replication rate of avian influenza virus (H9N2 subtype) in challenged broiler chicks. *British Poultry science*. doi: 10.1080/00071668.2018.1478064.
- 29-Shokri, H., F. Asadi, A. R. Bahonar, A. R. Khosravi. 2006. The role of *Zataria multiflora* essence (Iranian herb) on innate immunity of animal model. *Iranian Journal of Immunology* 3: 164-168.
- 30-Toghyani, M., M. Tohidi, A. A. Gheisari, S. A. Tabeidian. 2010. Performance, immunity, serum biochemical and hematological Parameters in broiler chicks fed dietary thyme as alternative for an antibiotic growth Promoter. *African Journal of Biotechnology* 9: 6819-6825. PMID: 18685176.
- 31-Torki, M., S. Sedgh-Gooya, H. Mohammadi. 2018. Effects of adding essential oils of rosemary, dill and chicory extract to diets on Performance, egg quality and some blood Parameters of laying

- hens subjected to heat stress. *Journal of Applied Animal Research* 46: 1118-1126. doi.org/10.1080/09712119.2018.1473254.
- 32-Torres-Martínez, R., Y. M. García-Rodríguez, P. Ríos-Chávez, A. Saavedra-Molina, J. E. López-Meza, A. Ochoa-Zarzosa, R. S. Garciglia. 2017. Antioxidant Activity of the Essential Oil and its Major Terpenes of *Satureja macrostema* (Moc. and Sessé ex Benth.) Briq. *Pharmacognosy Magazine* 13: S875-S880 doi: 10.4103/pm.pm_316_17.
- 33-Ukperoro, J. U., N. Offiah, T. Idris, D. Awogoke. 2010. Antioxidant effect of zinc, selenium and their combination on the liver and kidney of alloxan-induced diabetes in rats. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism* 3: 25-30. DOI 10.1007/s12349-009-0069-9.
- 34-Ventola, C. L. 2015. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics* 40: 277-283. PMID: 25859123.
- 35-Wang, L., X. Piao, S. Kim, X. Piao, Y. Shen, H. Lee. 2008. Effects of *Forsythia suspensa* extract on growth performance, nutrient digestibility, and antioxidant activities in broiler chickens under high ambient temperature. *Poultry science* 87: 1287-1294. doi: 10.3382/ps.2008-00023.
- 36-Zhang, G., Z. Yang, Y. Wang, W. Yang, S. Jiang, G. Gai. 2009. Effects of ginger root (*Zingiber officinale*) processed to different particle sizes on growth performance, antioxidant status, and serum metabolites of broiler chickens. *Poultry science* 88: 2159-2166. doi: 10.3382/ps.2009-00165.
- ۳۷-پورحسابی، ق.، ش. قاضی، ب. چهارآئین، س. ع. حسینی. ۲۰۱۷. اثرات سطوح مختلف اسانس گیاه آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) و سولفات روی بر عملکرد، سیستم ایمنی و برخی فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون در جوجه‌های گوشتی. علوم دامی (پژوهش و سازندگی) ۳۰: ۱۳۷-۱۵۲.
- ۳۸-رئیدی، م.، ع. صفامهر، ص. خدایی آشان، ر. حبیبی. ۲۰۱۵. اسانس های آویشن و پونه کوهی در جیره جوجه های گوشتی: اثرات بر عملکرد، شاخص های آنتی اکسیدانی و فراسنجه های بیوشیمیایی خون. علوم دامی (پژوهش و سازندگی) ۲۷: ۱۰۳-۱۲۰.
- ۳۹-فانی مکی، ا.، ا. ابراهیم زاده، ح. انصاری نیک، م. قزاقی. ۲۰۱۳. اثر گیاهان دارویی خار مریم (*Silybummarianum*L.) و آویشن (*Thymus vulgaris* L.) بر سیستم ایمنی و برخی از فراسنجه‌های خونی در جوجه‌های گوشتی. آسیب‌شناسی درمانگاهی دامپزشکی ۷: ۱۸۳۶-۱۸۴۳.
- ۴۰-فرامرزی، س.، آ. خاکی. ۲۰۱۵. بررسی تاثیرات اسانس آویشن بعد از تجویز واکسن لاسوتا بر آسیب‌شناسی بافتی نای، ایمنی هومورال و عملکرد جوجه‌های گوشتی. آسیب‌شناسی درمانگاهی دامپزشکی ۹: ۱۹۱-۲۰۴.

