14(1) 129-136, Spring 2022

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

The effect of purslane seed (*Portulaca oleracea*) extract on performance, blood lipid parameters and genes affecting the appetite in broiler cockerels

Reza Vakili *

Department of Animal Sciences, Kashmar branch, Islamic Azad University, Kashmar, Iran

Key Words

Appetite
Purslane seed extract
Triglyceride
Feed intake
Expression of gene

Abstract

Introduction: An experiment was conducted to investigate the effects of using different levels of *Portulaca oleracea* extract on growth performance, blood lipids and expression of genes affecting appetite control in broilers.

Materials & Methods: A total of 250 one-day-old male Ross-308 broilers were randomly divided into five food treatments with five replications and 10 chickens per replication. Dietary treatments included 5 control treatments: (base diet without *Portulaca oleracea* extract), base diet with 50, 100, 150 and 200 mg of *Portulaca oleracea* extract per g of feed from 1 to 42 days. Feed intake, body weight, feed conversion ratio and mortality percentage were measured during the experimental period.

Results: The effect of dietary treatments on feed intake, body weight and feed conversion ratio from 1 to 42 days was not significant, although the highest feed intake was observed at the levels of 150 and 200 mg of *Portulaca oleracea* extract. At 42 days of age, the effect of treatments on LDL and triglyceride levels was significant ($P<0.05$). The expression of NPY gene in treatments containing *Portulaca oleracea* extract was not statistically significant compared to the control treatment, although it was higher in the treatment containing 200 mg of *Portulaca oleracea* extract. PNOC gene expression in the treatment containing 200 mg of *Portulaca oleracea* was higher than the control ($P<0.01$).

Conclusion: *Portulaca oleracea* extract can be considered effective on some blood lipids and increasing the expression of appetite-enhancing neuropeptide genes.

* Corresponding Author's email: vakili@iaukashmar.ac.ir
Received: 21 March 2021; Reviewed: 25 April 2021; Revised: 22 June 2021; Accepted: 25 July 2021
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.290419.2559

مقاله پژوهشی

اثرات سطوح مختلف عصاره الکلی گیاه دارویی خرفه (*Portulaca oleracea L.*) بر شاخصه‌های عملکردی، لیپیدهای خون و ژن‌های موثر بر اشتها در جوجه‌های گوشتی

*رضا وکیلی**

گروه علوم دامی، واحد کاشمر، دانشگاه آزاد اسلامی، کاشمر، ایران

کلمات کلیدی

اشتها
عصاره خرفه
تری‌گلیسرید
مصرف خوراک
بیان ژن

چکیده

مقدمه: آزمایشی به‌منظور بررسی اثرات استفاده از سطوح مختلف عصاره گیاه خرفه بر عملکرد رشد، لیپیدهای خون و بیان ژن‌های موثر بر کنترل اشتها در جوجه‌های گوشتی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: تعداد ۲۵۰ قطعه جوجه گوشتی نر یک‌روزه راس ۳۰۸ به‌صورت تصادفی به پنج تیمار غذایی با پنج تکرار و ۱۰ قطعه جوجه در هر تکرار تقسیم شدند. تیمارهای غذایی شامل ۵ تیمار: شاهد (جیره پایه بدون عصاره خرفه)، جیره پایه همراه ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره گیاه خرفه درگرم خوراک مصرفی از۱ تا ۴۲ روزگی بودند. مصرف خوراک، وزن بدن، ضریب تبدیل خوراک و درصد تلفات طی دوره آزمایش مورد اندازه‌گیری قرارگرفت.

نتایج: اثر تیمارهای غذایی بر مقدارمصرف خوراک، وزن بدن و ضریب تبدیل خوراک از ۱ تا ۴۲ روزگی معنی‌دار نبود، اگرچه بیش‌ترین مقدار مصرف خوراک در سطوح ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره خرفه مشاهده شد. در ۴۲ روزگی اثر تیمارها بر مقادیر LDL و تری‌گلیسرید معنی‌دار بود($P<۰/۰۵$)، بیان ژن NPY در تیمارهای‌حاوی عصاره‌خرفه نسبت به تیمار شاهد ازنظر آماری‌تفاوت معنی‌داری نداشت، اگرچه در تیمار حاوی۲۰۰ میلی‌گرم عصاره خرفه بیش‌تر بود. بیان ژن PNOC در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم خرفه بیش‌تر از شاهد بود ($P<۰/۰۱$).

بحث و نتیجه‌گیری: می‌توان عصاره خرفه را بر برخی لیپیدهای خون و افزایش بیان ژن‌های نوروپپتیدهای افزاینده اشتها موثر دانست.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: vakili@iaukashmar.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱ فروردین ۱۴۰۰؛ تاریخ داوری: ۵ اردیبهشت ۱۴۰۰؛ تاریخ اصلاح: ۱ تیر ۱۴۰۰؛ تاریخ پذیرش: ۳ مرداد ۱۴۰۰
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.290419.2559

مقدمه

گیاهان دارویی و فرآورده‌های آن‌ها به‌منظور بهبود عملکرد و ایمنی‌زایی در تغذیه دام و طیور استفاده می‌شوند. در حال حاضر استفاده از ترکیبات گیاهی در تغذیه حیوانات به‌منظور حذف آنتی‌بیوتیک‌ها رو به گسترش است. بررسی‌ها نشان می‌دهد استفاده از ترکیبات گیاهی در تغذیه دام و طیور باعث افزایش ترشح شیرابه گوارشی، شیرابه معده، صفرا، پانکراس، افزایش ترشح و ترشحات روده، بهبود عملکرد دستگاه گوارش، بهبود عملکرد رشد، افزایش وزن و بهبود ضریب تبدیل، افزایش تولید، کاهش تلفات، بهبود کیفیت تولید (طعم، رنگ، بافت، ماندگاری، خواص زیستی)، بهبود شرایط محیطی می‌شود (۱). تحقیقات انجام گرفته در مورد ساز و کارهای کنترل اشتهای پرندگان از سه دهه قبل آغاز شده است، ولی هنوز موارد بسیاری در این زمینه ناشناخته باقی‌مانده است. خرفه با نام علمی *Portulaca oleracea* L.، گیاهی علفی و گوشتی است که در همه مناطق دنیا به‌خصوص در مناطق استوایی و نیمه استوایی به‌صورت خودرو قابل رویش است و به‌عنوان سبزی خوراکی مورد مصرف قرار می‌گیرد. این گیاه دارای ترکیب مواد مختلف از قبیل اسیدهای چرب امگا ۳ و مواد آنتی‌اکسیدان فراوان است. خرفه به‌عنوان ضد تب، ضد اسپاسم، مدر، ضد تب، ضد اسهال، شل کننده عضلانی، تقویت کننده سیستم ایمنی، رفع تشنگی و افزاینده اشتها کاربرد درمانی دارد (۲). هیچ نشانه سمی قابل توجهی هنوز در ارتباط با این گیاه گزارش نشده است. با توجه به این‌که تحریک گیرنده‌های اوپیوئیدی موجود در دستگاه عصبی مرکزی سبب افزایش اشتها می‌شود، لذا به‌نظر می‌رسد اثرات ضد دردی و افزاینده اشتهای عصاره خرفه از طریق تداخل با گیرنده‌های اوپیوئیدی باشد (۳). در مطالعه‌ای آمده است که عصاره آبی برگ‌ها و ساقه خرفه ایجاد شلی عضلات در فوندوس و تنیاکولی خوکچه هندی و ژوژنوم خرگوش به صورت وابسته به دوز نموده است (۴). در گزارشی دیگر اشاره شد که فلاونوییدها و آلکالوییدهای موجود در عصاره گیاهان دارویی با افزایش جذب آب و الکترولیت و مهار حرکات روده‌ای در درمان اسهال موثر هستند. هم چنین موسیلاژ موجود در داروهای گیاه اثرات سودمندی بر اسهال و اسهال خونی و التهاب داخلی و خارجی دارند (۲). بنابراین، احتمال می‌رود که با توجه به ترکیبات موجود در عصاره گیاه خرفه مثل فلاونوییدها و موسیلاژو نیز اثر شل کنندگی آن بر عضلات روده (۵، ۶) موجب کاهش اسهال، بهبود عملکرد دستگاه گوارش و افزایش اخذ غذا شود. یافته‌های پژوهش قبلی نشان داد که عصاره تخم خرفه در دوزهای بالاتر اسهال ایجاد می‌کند که احتمالاً به‌دلیل وجود ترکیبات ملین زیاد در دوزهای بالا است. از آن‌جایی‌که این گیاه مصارف داروئی فراوان داشته، سازمان بهداشت جهانی از آن به‌عنوان نوش داروی جهانی یاد می‌کند. نتایج بررسی‌ها فارماکولوژی نشان داد که عصاره این گیاه دارای اثرات مختلفی بر روی سیستم عصبی است که شامل اثرات ضدتشنجی، مهار انقباضات عصبی عضلانی و فعالیت شل‌کنندگی عضلات می‌باشد. بررسی‌های بافت‌شناسی نشان داد که عصاره گیاه خرفه موجب کاهش آسیب التهابی مغز می‌شود. آزمایش‌های فیتوشیمیایی عصاره خرفه نشان داده است که این گیاه یک منبع غنی از اسیدهای چرب امگا ۳، ویتامین A و B1 ترکیبات آدرنرژیک نورآدرنالین و سایر کاتکول آمین‌ها مثل دوپامین می‌باشد (۷). محققان نشان داده است که ترکیبات آدرنرژیک و دوپامین نقش مهمی در فرایند کنترل اخذ غذا برعهده دارند. بنابراین براساس اثرات ضد دردی و ضد اضطرابی این گیاه و نیز مواد موثره مختلف موجود در آن مانند ترکیبات آدرنرژیک و سایر کاتکول آمین‌ها مثل دوپامین، احتمالاً تجویز عصاره آبی تخم خرفه می‌تواند بر فرآیند اخذ غذا در جوجه خروس‌های گوشتی اثر داشته باشد. به‌دلیل ارتباط بین مصرف تری‌گلیسیرید و کلسترول و بیماری کرونر قلب، کاهش تری‌گلیسیرید و کلسترول در محصولات گوشت طیور با کاهش خطر ابتلا به بیماری ایسکمیک قلب برای مصرف کنندگان مفید است. تعدادی از مطالعات اثرات عصاره گیاه خرفه را بر روی متابولیسم لیپید و کلسترول بررسی کرده‌اند (۸، ۹، ۱۰). کاهش میزان تری‌گلیسیرید و کلسترول توسط عصاره رژیم غذایی خرفه در موش صحرایی توسط Kim و همکاران نشان داده شده است (۸). مطالعات قبلی نشان داده است که عصاره آبی و متانولی ساقه و برگ خرفه به‌صورت داخل صفاقی و تجویز خوراکی در موش صحرایی ایجاد شلی عضلات اسکلتی نموده است (۵). هم چنین در مطالعه‌ای دیگر عصاره این گیاه از طریق مهار بین غشایی جریان کلسیم موجب کاهش موثر انقباضات ایجاد شده به‌دنبال آگونیست نیکوتینی استیل کولین، کارباکول و نیکوتین بر روی عضله راست شکمی قورباغه گردید (۱۱). نتایج مطالعات دیگر نشان داده‌اند که عصاره اتانلی خرفه با اثر بر سیستم اعصاب مرکزی و محیطی موجب افزایش اشتها، فعالیت ضدتشنجی، مهار انقباضات عصبی عضلانی ناشی از تحریک الکتریکی فعالیت شل‌کنندگی عضلانی و فعالیت ضد دردی می‌شود از طریق گیرنده اوپیوییدی باشد (۹). اما هیچ تحقیق قبلی در مورد جوجه‌های گوشتی انجام نشده است. در این مطالعه اثر عصاره خرفه با سطوح مختلف در مدل تجربی بر فراسنجه‌های متابولیکی خون و اخذ غذای خروس‌های گوشتی بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها

آزمایش عملکرد و تعیین فراسنجه‌های خونی: در روز اول برای انجام این آزمایش تعداد ۲۵۰ قطعه جوجه نر گوشتی یک‌روزه

سویه تجاری رأس ۳۰۸ که از نظر وزنی تقریباً یکسان بودن، پس از ورود به سالن پرورش مرغداری و توزین به ۲۵ گروه ۱۰ قطعه‌ای با میانگین وزن گروهی مشابه تقسیم و داخل قفس‌ها مستقر شدند. جهت تغذیه جوجه‌ها به‌ترتیب از جیره آغازین، رشد و پایانی در فاصله روزهای ۱۰-۱ و ۲۴-۱۱ و ۴۲-۲۵ روزگی استفاده شد. احتیاجات غذایی جوجه‌های گوشتی براساس توصیه‌های شرکت راس تأمین گردید. ترکیب اقلام خوراکی مورداستفاده از NRC به‌دست آمد (۱۲).

جدول ۱: ترکیب جیره‌های غذایی مورد استفاده جوجه‌های گوشتی دردوره‌های مختلف ازمایش

اجزاء تشکیل‌دهنده	۱-۱۰ روزگی	۱۱-۲۴ روزگی	۲۵-۴۲ روزگی
ذرت	۵۹/۳	۵۷/۹	۶۲/۲
کنجاله سویا	۳۵/۵	۳۵/۴	۳۱
روغن آفتابگردان	۱/۱	۲/۲	۲/۷
دی‌کلسیم فسفات	۱/۵	۱/۴۵	۱/۲
سنگ آهک	۱/۷	۱/۷	۱/۵۳
نمک	۰/۲۴	۰/۳	۰/۳۵
متیونین	۰/۱۲	۰/۳۱	۰/۳۲
لایزین	۰	۰/۱	۰/۱
مکمل معدنی[۱]	۰/۳	۰/۳	۰/۳
مکمل ویتامینی[۲]	۰/۳	۰/۳	۰/۳
جمع کل	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
انرژی قابل سوخت و ساز (کیلوکالری/کیلوگرم)	۲۹۵۳	۳۰۰۴	۳۰۸۰
پروتئین خام (٪)	۲۱	۲۱/۰۲	۱۹/۴۷
لایزین (٪)	۱/۱۵	۱/۲۲	۱/۱
متیونین (٪)	۰/۴۷	۰/۶۳	۰/۴۱
کلسیم (٪)	۰/۹۸	۰/۹۷	۰/۸۵
فسفر فراهم (٪)	۰/۴۹	۰/۴۸	۰/۴۲

[۱] ترکیب مکمل ویتامینه در هر کیلوگرم به‌ترتیب شامل: IU ۴۴۰۰۰۰، ۸۰۰۰۰، ۹۶۰۰، ۲۰۰ ویتامین A، ویتامین D_3، ویتامین E و ویتامین K_3 بود و دارای ۷۲۰ میلی‌گرم ویتامین B_1، ۲۶۴۰ میلی‌گرم ویتامین B_2، ۴۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین B_3، ۱۲۰۰۰ میلی‌گرم نیاسین، ۱۲۰۰ میلی‌گرم ویتامین B_6، ۴۰۰ میلی‌گرم فولیک اسید، ۶۴ میلی‌گرم ویتامین B_{12}، ۲ میلی‌گرم بیوتین، ۴۴۰۰۰۰ میلی‌گرم کولین کلراید و ۱۶۰ میلی‌گرم آنتی‌اکسیدانت می‌باشد.

[۲] ترکیب مکمل معدنی در هر کیلوگرم شامل: ۶۱۲۰۰۰ میلی‌گرم منگنز، ۱۰۰۰۰ میلی‌گرم آهن، ۳۳۸۰۰ میلی‌گرم روی، ۸۰۰۰، میلی‌گرم مس، ۶۴۰ میلی‌گرم ید و ۸۰ میلی‌گرم سلنیوم.

جیره‌های غذایی مورد استفاده فاقد هر گونه داروی ضدکوکسیدیوز و آنتی‌بیوتیک بودند. عصاره مورد نیاز به‌روش خیساندن در نسبت مشخص الکل در آزمایشگاه استخراج شد و در شرایط استاندارد خشک شد. تیمارهای غذایی شامل ۵ تیمار شاهد (جیره پایه بدون عصاره خرفه)، جیره پایه همراه ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره خرفه به‌ازای گرم خوراک مصرفی بودند و طول مدت آزمایش ۴۲ روز بود. سطح انرژی و پروتئین تمامی تیمارها یکسان بود. اقلام غذایی و ترکیبات شیمیایی جیره‌های غذایی در جداول ۱، ۲ و ۳ آورده شده است. در طول دوره آزمایش، میانگین خوراک مصرفی روزانه (وزن کردن) و ضریب تبدیل خوراک در هر مرتبه مورد ارزیابی قرار گرفتند. در سن ۴۲ روزگی از دو قطعه پرنده از هر تکرار (واحد آزمایشی) نمونه خون به‌منظور تهیه سرم تهیه شد. سپس نمونه‌های خون به‌مدت ۴ تا ۶ ساعت در دمای اتاق برای جدا شدن سرم از لخته، نگه‌داری و سرم در داخل میکروتیوب ریخته شد. سپس در آزمایشگاه برای اطمینان از عدم باقی‌ماندن لخته در پلاسما در دور ۳۰۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه عمل سانتریفیوژ صورت گرفت (۱۳). سپس با استفاده از کیت‌های تشخیصی پارس آزمون در طول موج‌های مشخص شده در بروشور مقدار هریک توسط دستگاه اتوآنالایزر (مدل A15 Biosystems کشور اسپانیا) تری‌گلیسرید، کلسترول، لیپوپروتئین با دانسیته بالا، لیپو پروتئین با دانسیته پائین اندازه‌گیری گردید (۱۴). طرح آزمایشی مورد استفاده در این تحقیق یک طرح کاملاً تصادفی بود و داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (۱۵)، با استفاده از رویه خطی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (۱۶). از آزمون دانکن برای مقایسه میانگین تیمارهای مختلف آزمایش، استفاده شد.

$$Y_{ij}= \mu + T_i + E_{ij}$$

در این مدل، Y_{ij} مشاهده مربوط به تکرار j از تیمار i است. μ میانگین صفت، Ti اثر تیمار آزمایشی و E_{ij} اثر خطای آزمایشی می‌باشد.

آزمایش تعیین میزان بیان ژن GAPDH, prepronociceptin (POMC), neuropeptide Y(NPY): در پایان دوره پرورش دو پرنده از هر تکرار جدا و نمونه‌های بافت ساقه مغز در برگیرنده هیپوتالاموس، با محلول PBS ۱۰% شستشو داده شد و به مخزن ازت مایع منتقل گردید. نمونه بافت‌ها تازمان استخراج RNA در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. برای استخراج RNA ابتدا نمونه‌های هر تکرار به‌طور جداگانه هموژن گردید. بدین‌منظور مقداری از بافت مورد نظر را خرد کرده در هاون ریخته و با کمک نیتروژن مایع پودر یکنواختی از آن تهیه گردید RNA با استفاده از کیت RNeasy Mini Kit (Qiagen، آلمان) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج و کمیت و کیفیت آن توسط دستگاه اسپکتوفتومتر نانودراپ ND2000 تعیین شد و عمل تیمار RNA استخراجی با DNase و ساخت cDNA با استفاده از کیت فرمنتاز لیتوانی انجام شد. ساخت cDNA تک رشته‌ای با استفاده از میکروگرم یک از RNA کل تیمار شده با DNase، آغازگرهای هگزامر و آنزیم ترانس کریپتاز معکوس Revertaid

H Minus M-Mulvi در حجم ۲۰ میکروگرم طبق دستورالعمل شرکت‌سازنده انجام شد. ابتدا توالی‌های مربوط به ژن‌های GAPDH prepronociceptin (PNOC), neuropeptide Y(NPY) و ژنوتیپ‌های احتمالی به‌طور جداگانه از بانک اطلاعات ژنی (NCBI) گرفته شدند. بااستفاده‌ازنرم‌افزار primer premier-5 نسبت به طراحی آغازگرهای اختصاصی اقدام گردید و با استفاده از ابزار Blast از یکتا بودن محل اتصال جفت آغازگرها اطمینان حاصل شد. سنتز آغازگرها توسط شرکت Bionir انجام گردید.

جدول۲: مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در واکنش‌های Real-Time PCR

شماره‌دستیابی	طول قطعه تکثیرشده (bp)	پرایمر	توضیحات
NM_205473	176	5`CAGGCAGAGATATGGAAAGAG 3` :F 5` CAGAGGAGTGGAGAATGAATTG 3`:R	نوروپتیدوای Neuropeptide Y
NM_001185051	113	5`CGGAAGTGGAACAACCAGAAG 3`:F 5` ATCTCGTTGTGCTCGCTGAG 3`:R	پریپرونوسیسپتین Prepronociceptin
NM_204305.1	108	5' GCTGCTAAGGCTGTGGGGAA 3':F ACGGCAGGTCAGGTCAACAAC 3 5':R	گلیسرآلدئید -۳- فسفات دهیدروژناز GPDH

سنتز cDNA: Rna استخراج‌شده از بافت‌مغز جوجه بلافاصله برای انجام مرحله نسخه‌برداری معکوس وسنتز cDna توسط کیت Gene Pak RTUniversal شرکت فرمنتاز مورد استفاده قرارگرفت. لازم به‌ذکر است که در سنتز cDNA از آغازگر اختصاص‌revers و پرایمر تصادفی هگزانوکلئوتیدی استفاده گردید. مجموعه کیت Gene Pak RT Universal به‌صورت مخلوط خشک لیوفیلیزه و در داخل میکروتیوب‌ها معرفی و برای انجام واکنش RT آماده شد. هر میکروتیوب با مخلوط آماده، حاوی ۱۰۰ U/µl M-MLV Reverse Transcriptase، U/µl ۲۰ Rnasin promega، پرایمر تصادفی هگزانوکلئوتیدی، dNTP (۴) بعد از استخراج RNA از بافت مغز PCR کیفی انجام شد. واکنش PCR در حضور یک مخلوط اصلی شامل بافر ۱۰X آغازگرهای اختصاصی با غلظت غلظت ۱/۵ µM dNTP و $MgCl_2$ و آنزیم Taq طبق برنامه زیر برای سه ژن GAPDH, prepronociceptin (PNOC), neuropeptide Y(NPY) و شش آغازگر انجام گرفت. تعیین کمیت نسبی در Real time RT-PCR به‌وسیله اندازه‌گیری افزایش تشعشع فلورسنس در نتیجه اتصال رنگ Green SYBR (۹) با استفاده از دستگاه 7300 ABI (Applied Biosystems) انجام گرفت. جهت آغاز به‌کار دستگاه از برنامه حرارتی شبیه برنامه RT-Pcr کیفی که انجام شده بود، استفاده گردید و مقدار مواد واکنش به‌علت نداشتن الگوی از پیش منتشر نشده، از مقادیر استاندارد آورده‌شده در کیت فرمنتاز استفاده گردید. پس از تهیه مسترمیکس، آن را ورتکس کرده تا مواد کاملاً با هم مخلوط شوند. سپس مقدار ۲۳ میکرولیتر از مسترمیکس به هر استریب افزوده می‌شد. پس از اضافه کردن cDna (کنترل مثبت) یا آب مقطر (کنترل منفی) درب استریپ‌ها را بسته و استریپ‌ها را با دور ۴۰۰g سانتریفوژ شدند. سپس نمونه‌ها به دستگاه انتقال داده شدند.

چرخه‌های حرارتی واکنش P برای ۳ ژن Gapdh, prepronociceptin (Pomc)\ neuropeptide Y(NPY) به‌طور یکسان استفاده شد.

جدول ۳: مراحل واکنش PCR

مرحله	دما	مدت زمان	تعداد چرخه
واسرشته سازی	c ۹۵	۳۰s	۱
اتصال آغازگرها	c ۶۰	۳۰s	۴۰
بسط آغازگرها	c ۷۲	۳۰s	
بسط نهایی آغازگرها	c ۷۲	۱۰min	۱

اجزای واکنش استاندارد کیت به‌صورت زیر بهینه‌سازی گردید:

جدول ۴: اجزای واکنش PCR

مواد واکنش	حجم یک نمونه (µl)
مستر میکس سایبرگرین	۱۲/۵
ROX	۰/۰۴
آغازگر رفت	۰/۱۵
آغازگر برگشت	۰/۱۵
نمونه cDNA	۲
آب دو بار تقطیر	۱۰/۲
حجم کل	۲۵

آنالیز داده‌ها و کمی‌نمودن بیان ژن‌ها: با پایان انجام واکنش PCR، نرم‌افزار دستگاه به‌طور اتوماتیک خط آستانه را رسم می‌کند. تحلیل و تجزیه اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار Abi 7300 sequence detection system و نرم‌افزار۱/۴ Applied Biosystems) sds Ver. آمریکا) انجام‌شد. داده‌های اولیه توسط نرم‌افزار Excel تجزیه و تحلیل شدند. برای تعیین میزان بیان ژن‌های GAPDH, prepronociceptin (POMC), neuropeptide Y(NPY) از روش پفافل استفاده شد. در

این روش فرض بر این است که بازده نمونه و کنترل داخلی برابر و ۱۰۰٪ است و از فرمول $2^{\triangle\triangle CT}$ به‌منظور تعیین بیان ژن استفاده گردید (۱۷):

$$amount\ of\ target = 2^{\triangle\triangle CT}$$

$$R = 2^{-[\triangle C_T\ sampl\ -\ \triangle C_T\ control]}$$

$$\triangle CT_{target} = (CT_{sampl} - CT_{Ref})$$

$$\triangle CT_{Control} = (CT_{Control} - CT_{Ref})$$

$$\triangle\triangle CT = \triangle CT_{target} - \triangle CT_{control}$$

$\triangle\triangle CT$ نمونه‌های بررسی شده و شاهد توسط برنامه Excle آنالیز آماری شدند. معنی‌داری تفاوت بین $\triangle\triangle CT$ نمونه‌ها توسط آزمون T-test در سطح معنی‌داری α=۰/۰۱ آزمون شد.

جدول ۵: سیکل‌های حرارتی واکنش PCR

	سیکل‌ها	درجه حرارت ^{0}C	مرحله	زمان نگه‌داری
قبل از تکثیر	۱	۹۵	---	۱۰min
تکثیر	۴۵	۹۵	واسرشت سازی	۱۵Sec
		۶۰	اتصال	۳۰Sec
		۷۲	بسط	۳۰Sec
منحنی ذوب	۱	۹۵	واسرشت سازی	۱۵Sec
		۶۰	اتصال	۱min
		۹۵	بسط	۱۵Sec
		۶۰	ذوب	۱۵Sec

نتایج

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که اثر تیمارهای آزمایشی بر خوراک مصرفی، افزایش وزن و ضریب تبدیل خوراک معنی‌دار نبود (جدول ۶). میانگین خوراک مصرفی در جدول ۷ نشان داده شده است. از نظر عددی بیش‌ترین مصرف خوراک در سطوح ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره خرفه مشاهده شد. نتایج تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به مقادیر LDL، HDL، تری‌گلیسیرید و کلسترول در جدول ۸ آمده است (P<۰/۰۵).

نتایج کمی نمودن بیان ژن‌ها

نتایج بیان ژن POMC: بیان ژن prepronociceptin در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم خرفه کم‌تر بود. دریافت و پردازش سیگنال‌های مربوط به اشتها در دو گروه نورونی هیپوتالاموس صورت می‌گیرد. یکی از این گروه‌ها اشتها را کم می‌کند و این کار را از طریق بیان ژن "pro-opiomelanocortin" (POMC) صورت می‌گیرد. در مطالعه حاضر افزایش خرفه باعث کاهش اشتها در جوجه‌های گوشتی نشد.

نتایج بیان ژن NPY: بیان ژن NPY در تیمارهای حاوی خرفه نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت اما در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم خرفه بیان ژن بیش‌تر بود که نشان می‌دهد تجویز مقادیر بالای عصاره خرفه می‌تواند سبب افزایش اشتها و در نتیجه افزایش دریافت غذا گردد.

جدول ۶: عملکرد جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با سطوح مختلف خرفه در دوره‌های مختلف دوره آزمایش (۱ تا ۴۲ روزگی)

متغیر	بدون عصاره خرفه	۵۰ میلی‌گرم عصاره خرفه	۱۰۰ میلی‌گرم عصاره خرفه	۱۵۰ میلی‌گرم عصاره خرفه	۲۰۰ میلی‌گرم عصاره خرفه	احتمال معنی‌دار	خطای معیار
مصرف خوراک (گرم)	۳۱۴۹/۶۴	۳۱۴۷/۹۲	۳۱۴۰/۶	۳۱۶۳/۱۸	۳۲۹۹/۲۲	۰/۳۲۴۶	۶۰/۱۶۱
ضریب تبدیل خوراک	۱/۸۷	۱/۷۳۱	۱/۸۳۴	۱/۷۷۴	۱/۸۴۲	۰/۱۳۶۴	۰/۰۴۱۶
افزایش وزن (گرم)	۱۶۸	۱۸۲۳	۱۷۱۳	۱۷۹۱	۱۷۹۳	۰/۲۸۲۷	۵۲۱/۳۱۳

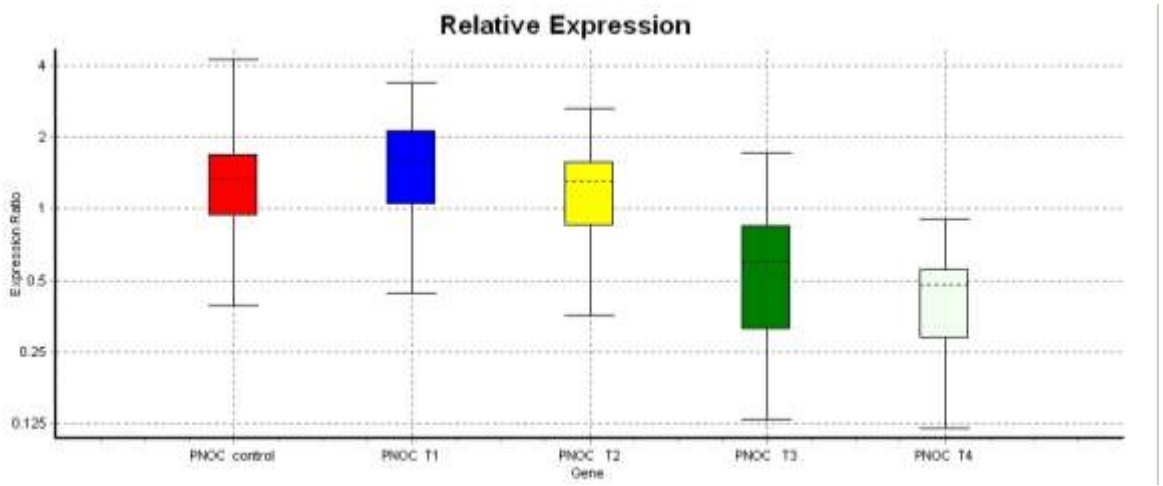
جدول ۷: خوراک مصرفی جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با سطوح مختلف خرفه (گرم/روز)

	بدون عصاره خرفه	۵۰ میلی گرم عصاره خرفه	۱۰۰ میلی گرم عصاره خرفه	۱۵۰ میلی گرم عصاره خرفه	۲۰۰ میلی گرم عصاره خرفه	احتمال معنی دارشدن	خطای معیار
۱-۷ روزگی	۱۰/۶۵	۱۰/۸۶	۱۱/۶۸	۱۱/۶۲	۱۱/۹۲	۰/۱۴۸	۰/۴۰۲۱
۸-۱۴ روزگی	۳۳/۹۲	۳۵/۵۱	۳۷/۴۹	۳۷/۰۲	۳۶/۹۲	۰/۰۷۱۵	۰/۹۱۵
۱۵-۲۱ روزگی	۵۷/۹۱	۵۹/۹۱	۶۴/۳۶	۶۲/۲۹	۶۵/۲۸	۰/۳۲۱	۲/۷۳۵
۲۲-۲۸ روزگی	۸۵/۰۶	۹۲/۴۶	۸۴/۳۹	۸۸/۶۴	۹۶/۷۴	۰/۱۹۵۳	۴/۰۱۲۴
۲۹-۳۵ روزگی	۱۴۱/۷۱	۱۳۲/۱۳	۱۳۶/۲۴	۱۳۸/۸۱	۱۳۶/۵۶	۰/۸۰۹	۳/۵۲۵
۳۶-۴۲ روزگی	۱۲۰/۷	۱۱۱/۸۳	۱۱۴/۵	۱۱۳/۵۰	۱۲۳/۹	۰/۳۷۹۶	۴/۸۶۸
۱-۴۲روزگی	۳۱۴۹/۶۴	۳۱۴۷/۹۲	۳۱۴۰/۶	۳۱۶۳/۱۸	۳۲۹۹/۲۲	۰/۳۲۴۶	۶۰/۱۶۱

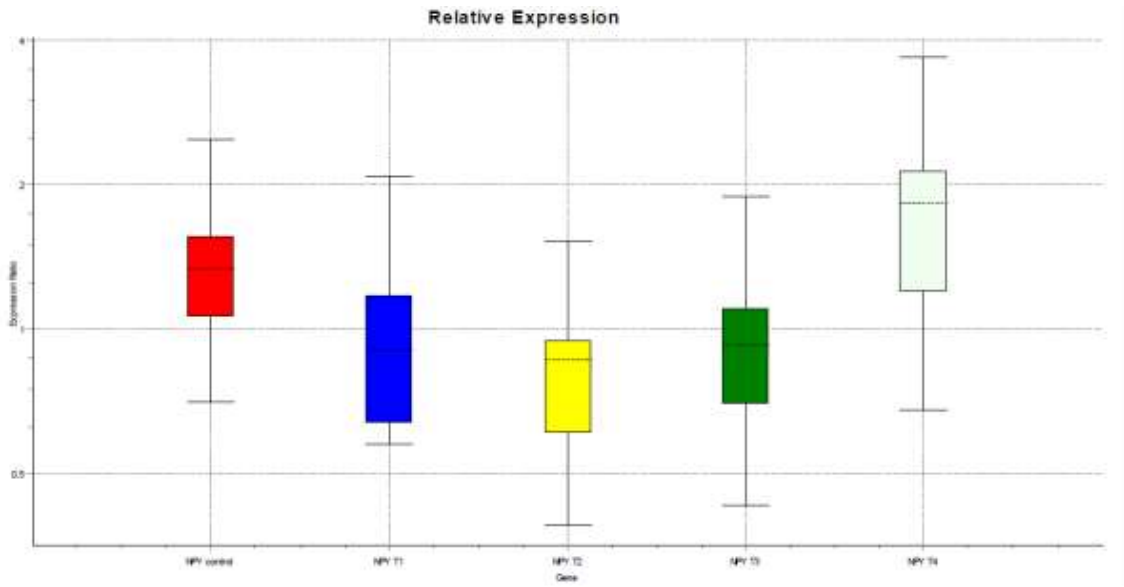
جدول ۸ : تغییرات مقادیر فراسنجه‌های خونی در تیمارهای آزمایشی

تیمار	HDL	LDL	تری‌گلیسرید	کلسترول
بدون عصاره خرفه	۱۸۵/۸	۶۰/۸^{a}	۷۷/۴^{a}	۱۶۴/۸۳
۵۰ میلی‌گرم عصاره خرفه	۲۳۶/۴	۵۷/۸^{ab}	۷۹/۲^{a}	۱۶۲/۴۵
۱۰۰ میلی‌گرم عصاره خرفه	۱۷۹/۷	۵۵/۶^{ab}	۷۵/۴^{a}	۱۵۲/۱۸
۱۵۰میلی‌گرم عصاره خرفه	۳۸۵/۵۸	۵۳/۶^{ab}	۶۵/۸^{ab}	۱۶۸/۰۶
۲۰۰ میلی‌گرم عصاره خرفه	۲۰۹/۲۶	۴۹/۲^{b}	۵۷^{b}	۱۶۵/۶۴
احتمال معنی‌دار شدن	۰/۱۹۷۲	۰/۰۰۹۵	۰/۴۴	۰/۹۴۹۱
خطای معیار	۶۵/۶۴	۲/۰۶۵	۴/۴	۱۵/۳۶۸۷

a,b: میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده است تفاوت معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵).



شکل۱: نتایج بیان ژن POMC



شکل۲: نتایج بیان ژن NPY

بحث

بیش‌ترین مصرف خوراک در سطوح ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره خرفه مشاهده شد. عصاره اتانلی ساقه و برگ خرفه با اثر بر سیستم اعصاب مرکزی و محیطی موجب افزایش اشتها می‌شود (۹). بعد از ۶ هفته از مصرف عصاره خرفه، سطح چربی سرم جوجه‌های گوشتی که با ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره خرفه تغذیه شدند کاهش نشان داد. LDL در مقایسه با گروه شاهد، اختلاف معنی‌داری در اثر افزودن ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم عصاره خرفه مشاهده نداشت. سطح کلسترول تام در گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از تیمارها نبود. برای سطح HDL سرم، جوجه‌هایی که از ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره خرفه تغذیه می‌کردند، رقمی در حدود ۲/۰۸ برابر بیش‌تر از گروه شاهد بود. افزایش HDL با سایر مطالعات مطابقت دارد (۹). کاهش قابل توجه LDL و تری‌گلیسیرید یک مزیت بالینی از عصاره خرفه دارد. محتوای بالای فلاونوئیدها، ترکیبات فنلی، ملاتونین و اسیدهای چرب امگا ۳ موجود در عصاره اتانولیک را می‌توان موثر دانست. ترکیبات پلی فنول گیاهان سطح کلسترول سرم را کاهش می‌دهند و ارتباط بیش‌تری با کاهش سطح تری‌گلیسیرید نشان می‌دهد (۵). وقتی عصاره خرفه داده می‌شود، کلسترول سرم در مقایسه با گروه شاهد کاهش قابل توجهی نشان می‌دهد. هم‌چنین گزارش شده است که خرفه مانع جذب مجدد اسید صفراوی شده و ایجاد کلسترول درون‌زا را مهار می‌کند (۳). کاهش کلسترول سرم نشان داده شده در این مطالعه مشابه آزمایش Li و همکاران است که نشان‌دهنده کاهش سطح کلسترول تام است (۱۸). در حقیقت، کاهش LDL برای درمان چربی خون بیش‌تر تأکید می‌شود. Hoyos و همکاران نشان دادند که افزایش کلسترول تام و LDL ناشی از رژیم غذایی پرچرب با تجویز ملاتونین به‌طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. ملاتونین موجود در عصاره خرفه ممکن است در اثرات ضدچاقی و ضددیابت مشاهده شود. گزارش شده است که برخی از فلاونوئیدها، اسیدهای چرب امگا ۳ و ملاتونین دارای خواص ضدچربی خون هستند (۱۹). ملاتونین اخیراً در برگ‌های تازه خرفه شناسایی شده است. مشخص شد که غلظت ملاتونین در خرفه بیش از حد گزارش شده در تعداد دیگری از میوه‌ها و سبزیجات است (۱۰). ملاتونین دارای عملکردهای مهم مختلفی از جمله مهار مستقیم رادیکال‌های آزاد و خاصیت ضدالتهابی است (۱۴). Hoyos و همکاران نشان می‌دهند که افزایش کلسترول تام و LDL-C ناشی از رژیم غذایی غنی شده با کلسترول با تجویز ملاتونین به‌طور قابل توجهی کاهش می‌یابد (۲۰). وجود این ترکیبات در خرفه ممکن است در اثرات هیپوکلسترولمیک مشاهده شده نقش داشته باشد. هیپوتالاموس نقش مهمی را در دریافت و پردازش سیگنال‌های مربوط به اشتها برعهده دارد و از دو گروه نورونی تشکیل شده است. یکی از این گروه‌ها اشتها را کم می‌کند و این کار را از طریق بیان ژن "pro-opiomelanocortin"(POMC) و پپتید تنظیم‌کننده نسخه‌برداری کوکائین و آمفتامین (CART) انجام می‌دهد. گروه دیگر دریافت غذا را از طریق تنظیم بیان ژن نوروپپتید وای (NPY) و پپتید مرتبط با ژن آگوتی (AgRP) تحریک می‌کند. NPY یکی از فراوان‌ترین میانجی‌های مغز است. میزان NPY در هیپوتالاموس تابعی از وضعیت تغذیه‌ای بدن است، به‌طوری‌که در طی گرسنگی میزان آن افزایش و پس از تغذیه کاهش می‌یابد. مهم‌ترین بخش هیپوتالاموس که در آن NPY بیان می‌گردد، هسته کمانی است. نورون‌های حاوی NPY در هسته کمانی به هسته مجاور بطنی (PVN) کشیده می‌شوند و تزریق مکرر درون بطن مغزی (ICV) NPY به درون PVN پرخوری و چاقی ایجاد می‌کند. تزریق مرکزی NPY مصرف انرژی را نیز کاهش می‌دهد که منجر به کاهش میزان چربی قهوه‌ای، تضعیف فعالیت سمپاتیک و مهار محور هیپوتالاموس ـ هیپوفیز قدامی ـ تیروئید می‌گردد (۲۱، ۲۰). اگرچه به‌نظر می‌رسد که NPY یک سیگنال مهم افزایش‌دهنده اشتها است، اما احتمالاً در صورت فقدان این سیستم به‌علت وجود مکانیسم‌های جبرانی و یا دیگر مسیرهای افزایش‌دهنده اشتها مانند سیگنال‌های پپتید مرتبط با آگوتی AgRP، وزن بدن و میزان چاقی دستخوش تغییر چندانی نمی‌شود. گیرنده‌های Y_1 ، Y_2 ، Y_4 و Y_5 نوروپپتید Y که همگی در هیپوتالاموس وجود دارند و اثرات تغذیه‌ای NPY را وساطت می‌کنند (۴). دریافت و پردازش سیگنال‌های مربوط به اشتها در دو گروه نورونی هیپوتالاموس صورت می‌گیرد. یکی از این گروه‌ها اشتها را کم می‌کند و این کار را از طریق بیان ژن "pro-opiomelanocortin" (POMC) و پپتید تنظیم‌کننده نسخه‌برداری کوکائین و آمفتامین (CART) انجام می‌دهد (۲۱). در مطالعه حاضر بیان ژن prepronociceptin در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم خرفه کم‌تر بود، که نشان می‌دهد افزایش خرفه باعث کاهش اشتها در جوجه‌های گوشتی نمی‌شود. مطالعات زیادی در مورد اثر NPY بر اشتها انجام شده‌است. به‌نظر می‌رسد که این نوروترانسمیتر اثرات افزاینده اشتهای خود را با اثر بر ناحیه هسته کمانی در هیپوتالاموس اعمال می‌کند (۲۲). افزایش نوروپپتید Y (NPY) در هسته کمانی (Actuate nucleus) هیپوتالاموس سبب پرخوری حیوان می‌شود. یک منبع مهم NPY در مغز هسته کمانی می‌باشد (۱۷). در مطالعه انجام‌شده بیان ژن NPY در تیمارهای حاوی خرفه نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت اما در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم خرفه بیان ژن بیش‌تر بود، که نشان می‌دهد تجویز مقادیر بالای عصاره خرفه می‌تواند سبب افزایش اشتها و در نتیجه افزایش دریافت غذا گردد. Nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) آگونیست گیرنده‌های ORL1 است (۳). مطالعات اخیر نشان داده است

که تزریق داخل بطن مغزی این ماده سبب افزایش اشتها می‌گردد (۲، ۱۷). تزریق درون بطنی مغزی Nociceptin/OrphaninFQ به‌عنوان لیگاندآندوژن گیرنده‌های شبه گیرنده‌های اپیوئیدی، مثل اپیوئیدهای کلاسیک، موجب افزایش اخذ غذا در جوجه‌های گوشتی می‌گردد (۲۳). در تحقیق حاضر استفاده از خرفه سبب افزایش خوراک مصرفی در سطوح ۱۵۰ میلی‌گرم و ۲۰۰ میلی‌گرم گردید. اثر تیمارها بر مقادیر LDL و تری‌گلیسرید در ۴۲ روزگی معنی‌دار بود. بیان ژن prepronociceptin در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم خرفه بیش‌تر بود که نشان می‌دهد عصاره خرفه می‌تواند باعث افزایش اشتها در جوجه‌های گوشتی شود. هم‌چنین بیان ژن NPY در تیمارهای حاوی خرفه نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت، اگرچه در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم خرفه بیان ژن بیش‌تر بود. مطالعات زیادی در مورد اثر NPY بر اشتها انجام شده است. افزایش نوروپپتید Y (NPY) در هسته کمانی (Actuate nucleus) هیپوتالاموس سبب پرخوری حیوان می‌شود. یک منبع مهم NPY در مغز هسته کمانی می‌باشد. به‌نظر می‌رسد که این نوروترانمسمیتر اثرات افزاینده اشتهای خود را با اثر بر ناحیه هسته کمانی در هیپوتلاموس اعمال نموده است. به‌طورکلی عصاره خرفه را می‌توان موثر بر بیان ژن‌های نوروپپتیدهای افزاینده اشتها و در نتیجه افزایش دریافت خوراک دانست. عصاره خرفه باعث تحریک جابجایی لیپیدها در جوجه‌های گوشتی می‌شود. این اثر هیپولیپیدمیک خرفه می‌تواند رشد جوجه‌های گوشتی را مختل کند و توضیح دهد که چرا خرفه علی‌رغم اثر افزایشی بر مصرف خوراک نمی‌تواند بازده خوراک جوجه‌های گوشتی را بهبود بخشد.

تشکر و قدردانی

این پروژه به‌عنوان طرح پژوهشی در دانشگاه آزاد اسلامی (واحد کاشمر) انجام شد. از تمام عزیزانی که به‌نحوی نگارندگان را در این طرح یاری نمودند، سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

1. **Zeng, Z., Zhang, S. Wang, H. and Piao, X., 2015.** Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: a review. Journal of Animal Science and Biotechnology. 6:7.
2. **Elias, C.F., Aschkenasi, C., Lee, C., Kelly, J., Ahima, R.S., Bjorbæk, C., Flier, J.S., Saper, C.B. and Elmquist, J.K., 1999.** Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. Neuron. 23(4): 775-786.
3. **Ahmed, M.H. and Byrne, C.D., 2007.** Modulation of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) as potential treatments for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Drug discovery today. 12(17-18): 740-747.
4. **Parry, O., Okwuasaba, F. and Ejike, C., 1988.** Effect of an aqueous extract of *Portulaca oleracea* leaves on smooth muscle and rat blood pressure. Journal of Ethno pharmacology. 22(1): 33-44.
5. **Olszewski, P.K., Grace, M.K., Fard, S.S., Le Grevès, M., Klockars, A., Massi, M., Schiöth, H.B. and Levine, A.S., 2010.** Central nociceptin/orphanin FQ system elevates food consumption by both increasing energy intake and reducing aversive responsiveness. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 299(2): R655-R663.
6. **Kemp, J.A. and Leeson, P.D., 1993.** The glycine site of the NMDA receptor-five years on. Trends in Pharmacological Sciences. 14(1): 20-25.
7. **Malinen, E., Kassinen, A., Rinttilä, T. and Palva, A., 2003.** Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5′-nuclease assaysand dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantificationof selected faecal bacteria. Microbiology. 149(1): 269-277.
8. **Kim, S.H. and Won, H.R., 2010.** Effect of *Portulaca oleracea* Linne ethanol extract on lipid metabolism in rats fed high fat diet. J of Life and Natural Sciences. 17: 51-60.
9. **Movahedian, A., Ghannadi, A. and Vashirnia, M., 2007.** Hypocholesterolemic effects of purslane extract on serum lipids in rabbits fed with high cholesterol levels. International Journal Pharmacology. 3(3): 285-289.
10. **Wynne, K., Stanley, S., McGowan, B. and Bloom, S. 2005.** Appetite control. J of Endocrinology. 184(2):291-318.
11. **Palumbo, A., Bringhen, S., Caravita, T., Merla, E., Capparella, V., Callea, V., Cangialosi, C., Grasso, M., Rossini, F., Galli, M. and Catalano, L., 2006.** Oral melphalan and prednisone chemotherapy plus thalidomide compared with melphalan and prednisone alone in elderly patients with multiple myeloma: randomised controlled trial. The Lancet. 367(9513): 825-831.
12. **National Research Council (NRC). 1994.** Nutrient requirements of poultry (9th rev. ed). National Academy Press, Washington, DC.
13. **Yahyazadeh, B. and Vakili, R., 2021.** Influence of different Lighting Programs on Growth and Immunity indices in Broilers. Journal of Animal Environment. 13: 231-236.
14. **Rodriguez, C., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Antolín, I., Herrera, F., Martín, V. and Reiter, R.J., 2004.** Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. Journal of pineal research. 36(1): 1-9.
15. **SAS. 1995.** Procedures Guide, Version 6, 3rd ed. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina.
16. **Taghipour, S. and Vakili, R., 2021.** Effects of silver nanoparticles on quantity and quality characteristics of Japanese quail sperm. Journal of Animal Environment. 12: 245-250.
17. **Kiris, G.A., Kumlu, M.E.T.İ.N. and Dikel, S.U.A.T., 2007.** Stimulatory effects of neuropeptide Y on food intake and growth of *Oreochromis niloticus*. Aquaculture. 264 (1-4): 383-389.
18. **Li, L.L., Wang, N.Y.H., Zhang, Y.X., Li, X. and Chen, X., 2006.** Effect of Extraction Reagents on the Content of Phenolics and Antioxidant Activity of *Portulaca oleracea* L; XXVII International Horticultural Congress-IHC2006: International Symposium on Plants as Food and Medicine: The Utilization.
19. **Yazici, I., Türkan, I., Sekmen, A.H. and Demiral, T., 2007.** Salinity tolerance of purslane (*Portulaca oleracea* L.) is achieved by enhanced antioxidative system, lower level of lipid peroxidation and proline accumulation. Environmental and Experimental Botany. 61(1): 49-57.
20. **Hoyos, M., Guerrero, J.M., Perez-Cano, R., Olivan, J. and Fabiani, F., Garcia-Pergañeda, A. and Osuna, C., 2000.** Serum cholesterol and lipid peroxidation are decreased by melatonin in diet-induced hypercholestero lemic rats. Journal of pineal research. 28(3): 150-155.
21. **Dorak, M.T., 2006.** Real-time PCR. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Taylor & Francis Group. Abingdon.
22. **Pfaffle, M.W., 2001.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research. 29(9): e45.
23. **Abbasnejad, M., Jonaidi, H., Denbow, D.M. and Rahimi, A.P., 2005.** Feeding and locomotion responses to centrally injected nociceptin/orphanin FQ in chicks. Physiology & behavior. 85(4): 383-386.