

Deneysel Olarak Sıcaklık Stresi Oluşturulan Broilerde Farklı Oranlarda Kullanılan Bazı Bitkisel Ekstrelerin Serum Demir Seviyesine Etkisinin İncelenmesi

Investigation of the Effect of Some Herbal Extracts Used in Different Ratios on Serum Iron Level in Experimentally Heat Stress Created in Broiler

^{1b} Bülent BAYRAKTAR,^a
^{1b} Emre TEKCE^b

^aFizyoterapi ve Rehabilitasyon Bölümü,
Bayburt Üniversitesi,
Sağlık Bilimleri Fakültesi,
^bBayburt Üniversitesi,
Uygulamalı Bilimler Yüksekokulu,
Bayburt

Received: 26.05.2018
Received in revised form: 02.07.2018
Accepted: 03.07.2018
Available online: 28.09.2018

Correspondence:
Bülent BAYRAKTAR
Bayburt Üniversitesi,
Sağlık Bilimleri Fakültesi,
Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Bölümü,
Bayburt,
TÜRKİYE/TURKEY
bulentbayraktar@bayburt.edu.tr

ÖZET Amaç: Demir, yaşam için kritik bir öneme sahip dokulara oksijen taşıyan hemoglobinin yapısında bulunmaktadır. Hemoglobin, demirin bağlanması ve transportunda görevli bir protein olup; eskiliği, bağışıklık sisteminde baskılanma ve enfeksiyonlara karşı direncin azalmasına, ayrıca beyin ve motor fonksiyonların bozulmasına yol açarak önemli bir morbidite nedeni olabilmektedir. **Gereç ve Yöntemler:** Vücuttaki demir seviyesinin, demir içeriğine sahip yiyeceklerin tüketilmesine, bazı hormon ve ilaçların kullanılmasına ve strese bağlı olarak etkilendiğini gösteren çalışmalara rastlanılmıştır. Diğer yandan, sığınlarda deneysel olarak uygulanan psikolojik ve ısı stresi çalışmalarında seviyenin azalma gösterdiği bildirilmektedir. Bu çalışmada; sahip strese en duyarlı hayvan olan tavuklarda 22°C ve 36°C sıcaklık stresinde antioksidan etkilere sahip uçucu yağ karışımı (EOM)'nın içme suyuna ilave edilmesiyle serum demir seviyesindeki değişimin belirlenmesi amaçlanmıştır. Araştırmada hayvan materyali olarak bir günlük yaşta 400 Ross-308 erkek etlik civciv kullanılmıştır. Her grupta 50 hayvan olacak şekilde sekiz farklı grup, kendi içerisinde her bölmede 10 adet olacak şekilde yedinci günden 42. güne kadar 22°C stressiz ve 36°C stresli gruplara [Kontrol, EOM (uçucu yağ karışımı)] 250, EOM-500, EOM-750 uygulanacak şekilde beş alt gruba ayrılarak araştırma 42 gün sürmüştür. **Bulgular:** Deneysel gruplarındaki serum demir düzeyleri sırasıyla 22°C'de 88,2, 82,2, 103,4, 98,4 µg/dL iken, 36°C stres uygulanan broiler gruplarında sırasıyla 88, 78,2, 84,8, 85 g/L bulunmuştur. **Sonuç:** Çalışma sonucunda, içme suyuna ilave edilen esansiyel yağ asidi karışımından (EOM) serum demir düzeyinin etkilenmediği (p>0,05) saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Bitki ekstresi; serum demir; sıcaklık stresi; broiler

ABSTRACT Objective: Iron is found in the structure of hemoglobin, which carries oxygen to tissues with a critical prescription for life. Hemoglobin is a protein involved in iron binding and transport, which can lead to significant morbidity, leading to impaired suppression of the immune system and resistance to infections, as well as impaired brain and motor function. **Material and Methods:** Iron level in body; there were studies showing that consumption of iron-containing foods, use of certain hormones and medicines, and stress-related effects have been seen. On the other hand, in psychological and heat stress studies that experimentally applied in rats, it has been reported that levels the level was decreasing. In this study, it was aimed to determine the change in serum iron levels by adding essential oil mixture (EOM) with antioxidant effect to drinking water in 22°C and 36°C heat stress in chickens which are the most sensitive animals to stress. In this study, 400 pcs and 1 day old Ross-308 male broiler chicks were used. There are 8 different groups with 50 animals in each group, it will be divided into 10 pcs in each section and the study was carried out from the 15th day to the 42nd day. The study lasted for 42 days, for 22°C stress-free and 36°C stressed groups with 5 subgroups separated (Control, EOM (essential oil mixture)-250, EOM-500, EOM-750. **Results:** Serum iron levels in the experimental groups were 88.2, 82.2, 103.4, and 98.4 µg/dL at 22°C, respectively, and 88, 78.2, 84.8, and 85 g/L respectively at 36°C stressed broiler groups. **Conclusion:** It has been determined as a result of this study, serum iron levels not affected by the EOM added to drinking water (p>0.05).

Keywords: Plant extract; serum iron; heat stres; broiler

Son zamanlarda kanser, Alzheimer gibi birçok nörodejeneratif hastalığın patogeneğinde rolü bulunan, yaşam için vazgeçilmez bir öneme sahip olan demir; eritropoietik fonksiyon, oksidatif metabolizma ve hücrel immünite için gerekli olması nedeni ile esansiyel bir elementtir. Portal sirkülasyonda demir, transferrin ferrik demir (Fe+3)'e yüksek afinitesi nedeni ile hızlıca bağlanmaktadır.¹ Hücrelerin çoğu demiri plazmadan transferrin aracılığı ile almasında önemli rol oynamaktadır.^{2,3} Transferrin, demirle tam doyurulduğunda plazmaya demir salınımı sonucu prooksidan olabilmektedir.⁴

Serbest radikaller, metabolik süreç ve çeşitli dış etmenlere bağlı olarak oluşan kısa ömürlü reaktif moleküllerdir.⁵ Serbest radikaller, canlı organizmada oksidan ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin oksidan lehine değişip artış göstermesi neticesinde oksidatif stres oluşmaktadır. Demir metabolizmasının bozulması oksidatif stres hasarına açık hâle getirmektedir. Oksidatif stres şekillendiğinde ve demir gibi metal iyonlarının varlığında serbest radikallerin oluşumu artmaktadır.⁶

Son zamanlarda yapılan araştırmalarda, sıçanlarda gerçekleştirilen ısıya maruz kalma stresi ve tekrarlanan psikolojik stres uygulamalarında serum demir miktarının önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir.^{7,8} Sıcaklık stresi kanatlılarda fizyolojik, hormonal, davranışsal ve moleküler değişikliklere yol açarak büyümeyi yavaşlatma, ölüm oranını artırma ve immünsüpresif etkisi nedeni ile önemli bir stres faktörüdür.^{9,10} Bu etkileri sebebi ile önemli ekonomik ve fizyolojik problemlere yol açmaktadır.

Kanatlı yemlerinde stabilitenin sağlanması ürünlerde oksidatif bozulmanın önlenmesi ve oksidatif stresin etkisinin azaltılması amacıyla, bu hayvanların yemlerine birtakım antioksidan bileşikler veya endojen antioksidan savunma sistemini destekleyen bazı yem katkı maddeleri katılabilmektedir.

Yapılan araştırma sonuçlarında, birçok bitkiye ait uçucu yağların ve ekstraktların antioksidan, antimikrobiyal, antiülseratif, antifungal vb. biyolojik etkilere sahip olduğu bildirilmektedir. Biyokimyasal parametrelerin değişmesinde de stres önemli bir etmen olarak gösterilmektedir.⁵ Biyokimyasal pa-

rametrelerin değişmesinde de stres önemli bir etmen olarak gösterilmektedir.¹¹ Gerçekleştirilen bu çalışmanın ana materyalini uçucu yağ karışımı (EOM) oluşturmuştur. Sıcaklık stresi altında içme sularına EOM ilave edilerek beslenen broilerde serum demir düzeyi üzerine etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

DEMİR

Portal sirkülasyonda demir, transferrin ferrik demir (Fe+3)'e yüksek afinitesi nedeni ile hızlıca bağlanmaktadır.¹ Hücrelerin çoğu demiri plazmadan transferrin aracılığı ile almasında önemli rol oynamaktadır.^{2,3} Transferrin, demirle tam doyurulduğunda plazmaya demir salınımı sonucu prooksidan olabilmektedir.⁴ Vücutta demir miktarı az miktarda kaybolmasına rağmen, özellikle hücrelerin deskuamasyonu yoluyla, herhangi bir düzenlenmiş demir atılımı yoktur. Şekil 1'de görüldüğü gibi demir metabolizması, vücudun yakaladığı demirin yeniden kullanıldığı bir döngü şeklinde gerçekleşmektedir.¹²

AMAÇ

Demir, yaşam için kritik bir öneme sahip dokulara oksijen taşıyan hemoglobinin yapısında bulunmaktadır. Hemoglobin demirin bağlanması ve transportunda görevli bir protein olup; eskiliği, bağışıklık sisteminde baskılanma ve enfeksiyonlara karşı direncin azalmasına, ayrıca beyin ve motor fonksiyonların bozulmasına yol açarak önemli bir morbidite nedeni olabilmektedir. Vücuttaki serum demirinin tamamına yakın bölümü transferrine bağlı olarak taşınmakta olup, gün içinde ve birçok etmene bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda, sıçanlarda ısıya maruz kalma stresinin serum demir miktarının önemli ölçüde azalmasına yol açtığı bildirilmiştir. Ancak, tavuklarda serum demir seviyesinin sıcaklık stresi ile indüklenmesinde ve bitkisel ekstre uygulamasında da nasıl etkilendiğine yönelik olarak araştırma bulunmadığı görülmüştür.

Bu çalışmada, sıcaklık stresi ile indüklenen broilerde serum demir düzeylerinin karşılaştırılmasının yanında, eşzamanlı olarak içme sularına ilave edilen stresin olumsuz etkilerini azaltmaya

yardımcı olan antioksidan özelliklere sahip *Eucalyptus globulus labill* (Okaliptus), *Thymus vulgaris* (Kekik), *Cymbopogon nardus* (Limon otu) ve *Syzygium aromaticum* (Karanfil) bitkilerinden oluşan karışımının (EOM) serum demir düzeyi üzerine olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

GEREÇ

Hayvan Materyali

Mevcut çalışmaya başlamadan önce, çalışma ile ilgili olarak, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı alınmıştır (Karar tarihi ve sayısı: 22 Şubat 2018-2/24). Çalışma, hayvan refahı ve hakları korunarak etik ilke ve kurallar doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Araştırmada hayvan materyali olarak bir günlük yaşta 400 Ross-308 etlik civciv kullanılmıştır. Broiler civcivleri deneme boyunca, hayvanlar, yedi günlük alıştırma ve 35 günlük besi dönemi boyunca Bayburt Üniversitesi Gıda, Tarım ve Hayvancılık Uygulama ve Araştırma Merkezi Birimi'nde kanatlı ünitesinde 110x110x100 cm ebatlarında her grupta 10 hayvan olacak şekilde oluşturulmuştur.

Broiler civcivlerin önlerinde her zaman içebilecekleri, günlük olarak tazelenen su bulundurulmuştur. Deneme kümesinde uygulanan ısıtma ve aydınlatma deneme kümesinin genel ısısı ilk iki gün 32-33°C ve daha sonraki beş günde 27-28°C'de sabit tutulmuştur. Denemede tüm gruplara deneme süresince 24 saat aydınlık (60 W) uygulanmıştır. Denemede kullanılan uçucu yağ karışımı Bio Market Yem Tarım ve Hayvancılık Firması'ndan temin edilmiştir. Temin edilen karışım Bayburt Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarları'nda GC (Gaz kromatografisi) cihazı (İrdest, GCMS QP2010, İngiltere) ile analiz ettirilmiştir. Esansiyel yağ karışımının içeriğinde %26,70 durenol, %23,89 eugenol, %16,49 gamma terpinene, %8,35 hieptaethylene glycol, %6,42 hexaethylene glycol, %3,31 cymene, %3,08 pentaethylene glycol, %2,87 caryophyllene, % 2,30 D-Limonene, %2,18 betapinene, %0,95 eucalyptol bulunmuştur.

Denemenin yedinci gününde gruplara canlı ağırlıkları eşit, her birinde 50 hayvan olacak şekilde sekiz gruba [Kontrol, EOM (uçucu yağ karışımı)-250, EOM-500, EOM-750, SK (Stres uygulanan kontrol), SEOM (Stres uygulanan uçucu yağ karışımı)-250, SEOM-500, SEOM-750] ayrılmıştır. Her grupta kendi içerisinde her bölmede 10 hayvan olacak şekilde beş alt gruba ayrılmıştır. Araştırma süreci boyunca kontrol, EOM-250, EOM-500 ve EOM-750 gruplarına 22°C ile SK, SEOM-250, SEOM-500 ve SEOM-750 gruplarına 36°C uygulanmıştır. Her grupta 50 hayvan olacak şekilde sekiz farklı gruba ayrılmıştır.

Serum Örneklerinin Toplanması

Deneme sonunda, her gruptan rastgele olarak seçilen 10 hayvan ve toplamda 80 hayvandan servikal dislokasyon yöntemi sırasında biyokimyasal kan analizlerinin yapılması için akan kandan 10 mL tüplere alınarak numaralandırılmıştır. Hayvanlardan alınan kanlar soğutmalı santrifüjde (NF 1200R, NÜVE, Ankara, TÜRKİYE) +4°C'de 12 dk santrifüj edilmiş, elde edilen serumlar epondorf tüplerine alınmıştır.

Serum Demir Tayini

Serum demir düzeyi Roche (Roche Diagnostics, North America) kitleri kullanılarak kapalı sistem olan Cobas-8000 otoanalizörde spektrofotometrik yöntem ile tayin edilmiştir.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Araştırmanın sonucunda elde edilen tüm sayısal veriler IBM SPSS 20.0 istatistik programında General Linear Model Univariate'de Duncan testi ile istatistiksel olarak analiz edildi. Verilerin ortalamaları standart hatalarıyla ifade edilerek (\pm) Repeated measures testi kullanıldı. Tüm anlamlı farklılıklar $p < 0,05$ seviyesinde test edilerek değerlendirildi.

BULGULAR

Yirmi iki °C stressiz ve 36°C stresli broiler gruplarında [Kontrol, EOM-250 ml/L, EOM-500 mL/L, EOM-750 mL/L] içme suyuna ilave edilen karışımın serum demir düzeyini etkilemediği ($p > 0,05$)

TABLO 1: Sıcaklık stresi altında beslenen broiler kanda demir (Fe) verileri.

	Fe	
	22°C	36°C
Kontrol	88,2	88,0
EOM 250 mL/L	82,2	76,2
EOM 500 mL/L	103,4	76,0
EOM 750 mL/L	98,4	85,0
Source of variation (P values)		
Diet	0,06	
Temperature	0,10	
Temperature x Diet	0,09	
Main Effect Means Diet		
Kontrol	88,1	
EOM 250 mL/L	80,2	
EOM 500 mL/L	89,7	
EOM 750mL/L	91,7	
Temperature		
22 °C	93,1	
36 °C	81,8	
SEM	4,03	

EOM: Uçucu yağ karışımı.

saptanmıştır. Yirmi iki °C stressiz ve 36°C stresli broiler gruplarına ait serum demir düzeyleri Tablo 1'de görülmektedir.

Yirmi iki °C stressiz broiler gruplarında en yüksek serum demir düzeyi EOM-500 mL/L (103,4 µg/dL) bulunur iken, en düşük demir düzeyi ise EOM-250 mL/L (82,2 µg/dL) dozundan saptanmıştır. Otuz altı

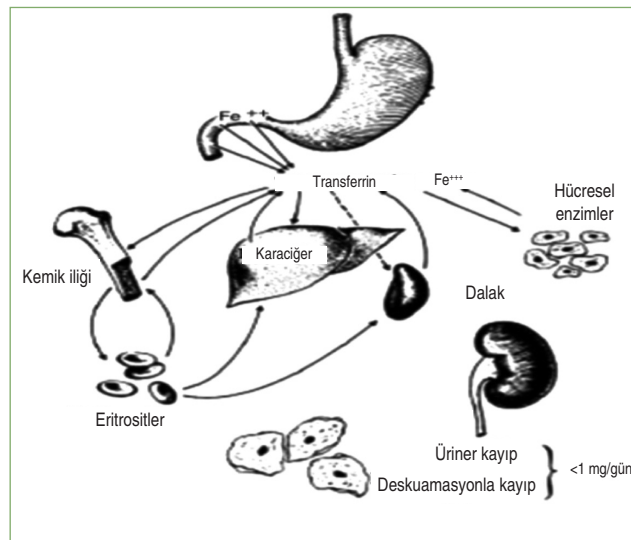
°C stres uygulanan broiler gruplarında en yüksek serum demir düzeyi kontrol (88 µg/dL) grubunda bulunur iken, en düşük demir düzeyi ise EOM-250 mL/L (78,2 µg/dL) dozundan belirlenmiştir.

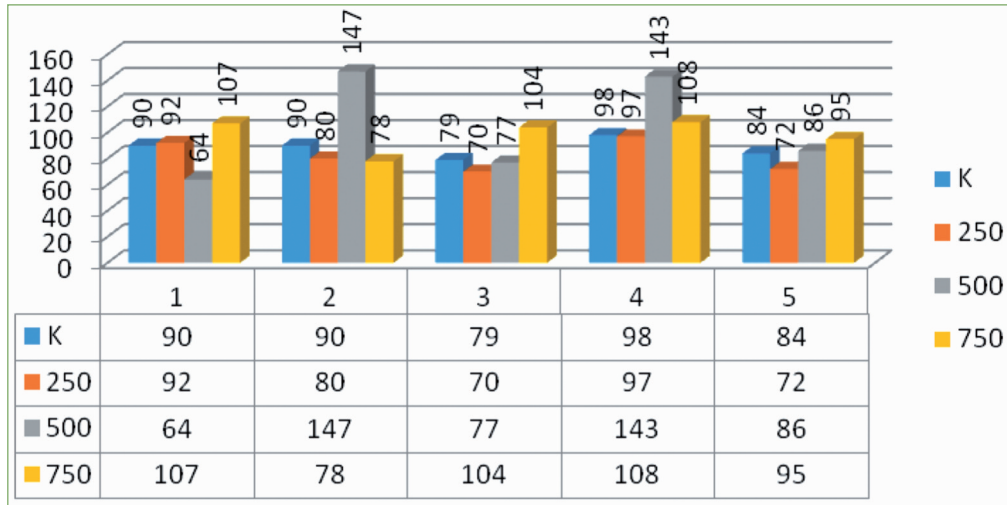
Şekil 2'de görüldüğü gibi, stressiz gruplarda bitki ekstraktı dozlarındaki artışa bağlı olarak EOM-500 mL/L dozuna ait iki ve dördüncü gruplardaki serum demir düzeyleri sırasıyla 147, 143 µg/dl normal referans değerlerinin üzerinde anlamlı olarak saptanmış olmasına rağmen istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (p>0,05). Bu duruma göre, uygulanan düşük ısı uygulamasına karşı kazanılan epigenetik adaptasyon ve vücudun ısı düzenleme sisteminin düşük ısıya karşı savunma yeteneği kazanabilmesi ile ilgili olabileceği kanaatine varılmıştır.

Şekil 3'te görüldüğü gibi, hayvanların 36°C stres koşullarında farklı dozlarda uygulanan uçucu yağ oranlarına bakıldığında, serum demir düzeyleri EOM-750 mL/L dozuna ait iki ve üçüncü gruplarda sırasıyla 104, 102 µg/dL saptanmasına rağmen istatistiksel olarak (p>0,05). önemli bulunmamıştır. Bu durumun, uygulanan yüksek ısı uygulamasına karşı kazanılan epigenetik adaptasyon kazanabilmesi ile ilgili olabileceği kanaatine varılmıştır.

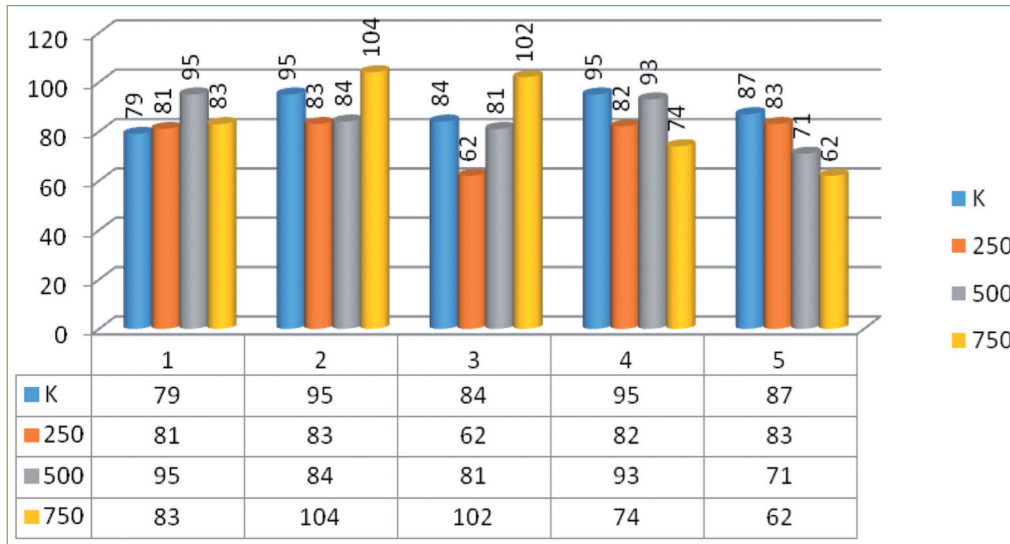
TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllarda tüm dünyada günden güne giderek artış gösteren birçok hastalığın patofizyolojisinde

**ŞEKİL 1:** Demir döngüsü.¹²



ŞEKİL 2: 22°C sıcaklık stresi uygulanan deney grubuna ait serum demir düzeyi (µg/dL).



ŞEKİL 3: 36°C sıcaklık stresi uygulanan deney grubuna ait serum demir düzeyi (µg/dL).

önemli rolü bulunan stres; kanser, diyabet gibi birçok hastalığa karşı bitkiler ve bitkisel kaynaklardan elde edilen ekstre eldeleri, birçok hastalığa karşı gerek önleyici gerekse tedavi edici etkilerinin belirlenmesiyle birlikte geleneksel ve tamamlayıcı tıp uygulamalarında giderek önem kazanmaya başlamıştır.

Sıcaklık stresi kanatlılarda fizyolojik, hormonal, davranışsal ve moleküler değişikliklere yol açmaktadır.⁹ Bloomer ve ark. (2014); tarafından ısı stresi, yaşlı kemirgen karaciğerinde hepidin mRNA

ekspresyonunun ve C/EBPa protein ekspresyonunu uyarılmasının değerlendirmek amacıyla yaptıkları araştırmada, ısı stresi ile indüklemesine bağlı olarak serum demir (Fe) konsantrasyonlarının azaldığını bildirilmişlerdir. Wei ve ark. (2008) tarafından psikolojik stres grubu uygulanan 7. ve 14. günlerde analiz edilen sıçanlarda serum demir oranı %28,6'sında önemli ölçüde azalttığını belirtmişlerdir.

Sıçanlarda demir seviyesinin psikolojik, ısı stresine bağlı olarak serumda azalma gösterdiğini

bildiren çalışmalar mevcut iken, broilerde sıcaklık stresinde ve içme suyuna ilave edilen EOM'nin serum demir seviyesinin nasıl değiştiğine yönelik bir araştırma bulunmamaktadır. Mevcut çalışma gruplarımızda, 22 ve 36°C sıcaklık stresi uygulamasının 42. gününde belirlenen serum demir düzeyleri açısından karşılaştırıldığında, 22°C sıcaklık stresi uygulanan gruplarda kontrol (K) grubuna göre kısmen artma eğilimi gösterse de bu artış en fazla içme suyuna ilave edilen karışımın oranı EOM-500 mL/L olan ikinci ve dördüncü grupta olmakla birlikte, istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Şekil 2). Bu çalışmadaki sonuçlar, sıcaklık stresinde broilerde serum demir seviyesi üzerinde içme suyuna ilave edilen karışımın (EOM) klinik açıdan önemli bir etkisinin bulunmadığını göstermektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada gözlenen serum demir düzeyi üzerine bitkisel ekstratlarının etkisinin bulunmaması, araştırma süresince uygulanan düşük veya yüksek ısı uygulamasına karşı kazanılan epigenetik adaptasyon ve vücudun ısı düzenleme sisteminin düşük veya yüksek ısıya karşı savunma yeteneği kazanabilmesi ile ilgili olabileceği kanaatine varılmıştır. Ancak, bu alanda yapılan çalışmaların kısıtlı olmasından dolayı daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Teşekkür

Bu araştırma, Bayburt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiş olup, 04-05 Mayıs 2018 tarihleri arasında düzenlenen II. Uluslararası Multidisipliner Çalışmaları Kongresi'nde Sözel Bildiri olarak sunulmuştur.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Bülent Bayraktar, Emre Tekce; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Bülent Bayraktar, Emre Tekce; **Analiz ve/veya Yorum:** Bülent Bayraktar, Emre Tekce; **Kaynak Taraması:** Bülent Bayraktar; **Makalenin Yazımı:** Bülent Bayraktar; **Eleştirel İnceleme:** Bülent Bayraktar, Emre Tekce; **Kaynaklar ve Fon Sağlama:** Bayburt Üniversitesi BAP Proje Birimi; **Malzemeler:** Bülent Bayraktar, Emre Tekce.

KAYNAKLAR

- Atanasiu V, Manolescu B, Stoian I. Hcpicidin-central regulator of iron metabolism. *Eur J Haematol* 2007;78(1):1-10.
- Crichton R. *Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism: From Molecular Mechanisms to Clinical Consequences*. 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2001. p.326.
- Umbreit J. Iron deficiency: a concise review. *Am J Hematol* 2005;78(3):225-31.
- Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994;74(1):139-62.
- McCormick M, Denning GM, Reszka KJ, Bilski P, Buettner GR, Rasmussen GT, et al. Biological effects of menadione photochemistry: effects of menadione on biological systems may not involve classical oxidant production. *Biochem J* 2000;350 Pt 3:797-804.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(1):44-84.
- Bloomer SA, Kregel KC, Brown KE. Heat stress stimulates hepcidin mRNA expression and C/EBP α protein expression in aged rodent liver. *Arch Gerontol Geriatr* 2014;58(1):145-52.
- Wei C, Zhou J, Huang X, Li M. Effects of psychological stress on serum iron and erythropoiesis. *Int J Hematol* 2008;88(1):52-6.
- Moraesa VMB, Malheiros RD, Bruggeman V, Collinc A, Tonab K, Van Asb P, et al. Effect of thermal conditioning during embryonic development on aspects of physiological responses of broilers to heat stress. *J Thermal Biol* 2003;28(2):133-40.
- St-Pierre NR, Cobanov B, Schnitkey G. Economic losses from heat stress by US livestock industries. *J Dairy Sci* 2003;86 Suppl:E52-E77.
- Daneshyar M, Kermanshahi H, Golian A. Changes of biochemical parameters and enzyme activities in broiler chickens with cold-induced ascites. *Poult Sci* 2009;88(1):106-10.
- Beutler E. Iron storage disease: facts, fiction and progress. *Blood Cells Mol Dis* 2007;39(2):140-7.