تحقیقات تولیدات دامی

سال پنجم/شماره چهارم/زمستان ۱۳۹۵ (۵۷-۴۵)

Animal Production Research

دانشگاه گیلان

اثر مقادیر مختلف عصاره هیدروالکلی برگ توت سفید (*Morus alba L.*) بر پاسخ‌های ایمنی، پراکسیداسیون چربی سرم و گوشت جوجه‌های گوشتی

مریم صید اصلی[۱]، محمد روستایی علی مهر[۲*]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۲- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۹ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۱۲)

چکیده

این آزمایش برای تعیین اثر عصاره هیدروالکلی برگ توت بر پاسخ‌های ایمنی و پراکسیداسیون چربی با استفاده از ۲۰۰ قطعه جوجه گوشتی انجام شد. جوجه‌ها به پنج گروه و هر گروه به ۴ دسته ۱۰ قطعه‌ای تقسیم شدند. مقادیر صفر، ۲، ۴، ۶ و ۸ درصد عصاره هیدروالکلی برگ توت در دو دوره سه روزه (روزهای ۱۴ تا ۱۷ و ۲۱ تا ۲۴) به جیره تیمارها اضافه شد. در روز ۱۶، به منظور بررسی پاسخ‌های ایمنی سلولی از تزریق داخل پوستی فیتوهماگلوتنین استفاده شد. در روزهای ۱۶ و ۲۳ مقدار ۰/۱ میلی لیتر محلول ۲۵ درصد گلبول قرمز گوسفند (SRBC) به صورت عضلانی تزریق شد و عیار پادتن IgG و IgM ضد-SRBC از طریق آزمایش هماگلوتیناسیون در روزهای ۱۹و ۲۶ تعیین شد. غلظت مالون دی‌آلدئید سرم (روزهای ۲۹ و ۴۲) و عضله ران (روز ۴۲) خام و پخته بعد از ذبح پرنده و ذخیره‌سازی (۶ ماه) در دمای ۲۰- درجه سلسیوس اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد تیتر پادتن IgG تیمار ۸ درصد عصاره برگ توت (۵/۷) در روز ۲۶ بیشتر از شاهد (۴/۱) بود ($P<۰/۰۵$). در روز ۴۲، غلظت مالون دی‌آلدئید سرم (میلی‌لیتر/ نانو مول) تیمار ۸ درصد عصار برگ توت (۷/۶) کمتر از شاهد (۷/۸) بود ($P<۰/۰۵$). غلظت مالون دی‌آلدئید گوشت خام (گرم/ نانومول) تیمار ۸ (۳)، ۶ (۳/۱) و ۴ درصد عصار برگ توت (۳/۵) کمتر از شاهد (۴/۷) بود ($P<۰/۰۵$). بنابراین افزودن کوتاه مدت عصاره برگ توت به جیره سبب بهبود پاسخ ایمنی هومورال و کیفیت لاشه جوجه‌های گوشتی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: ایمنی هومورال، پراکسیداسیون چربی، توت سفید، جوجه گوشتی

مسئول نویسنده: roostaei@guilan.ac.ir

مقدمه

امروزه گوشت مرغ به دلیل میزان پایین چربی‌های مضر و قیمت مناسب در سبد غذایی جوامع انسانی از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. لذا تولید گوشت با کیفیت که امکان ذخیره سازی و نگهداری بلند مدت را داشته باشد واجد اهمیت زیادی است. جوجه‌های گوشتی در طی دوره پرورش به طور ناخواسته تحت تنش‌های مختلف همچون آلودگی خوراک با سموم قارچی (Frankič *et al*., 2008) ، تنش گرمایی (Lin *et al*., 2006)، شرایط گوناگون آسیب نظیر افزایش فعالیت سیستم ایمنی هنگام واکسیناسیون و مقابله با عفونت‌ها، آسیت و کوکسیدیوز قرار دارند (Georgieva *et al*., 2006). در شرایط تنش به دلیل افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن احتمال وقوع واکنش-های اکسیداسیون در بافت‌های پرنده افزایش می‌یابد (Voljc *et al*., 2011). این عوامل ضمن تضعیف سیستم ایمنی پرنده سبب کاهش کیفیت گوشت مرغ می‌شوند. پراکسیداسیون چربی‌ها منجر به تخریب اکسیداتیو غشای سلولی می‌شود (Grundy, 1991) . این تخریب منجر به مرگ سلول و تولید متابولیت‌های سمی نظیر مالون‌دی-آلدئید که از مهمترین آن‌ها است شده که از آن برای توصیف آسیب اکسیداتیو استفاده می‌شود (Grundy, 1991). پراکسیداسیون چربی‌ها مهمترین علت کاهش کیفیت گوشت است به طوری که علاوه بر اثر نامطبوع بر بو و مزه آن (Gray *et al*., 1996)، موجب کاهش ماندگاری گوشت پس از کشتار می‌شوند (Brenes *et al*., 2008). تعادل پرواکسیداسیون و آنتی‌اکسیدان‌ها موجود در گوشت بعد از کشتار در شروع اکسید شدن گوشت موثر است. گوشت ران در مقایسه با سینه حاوی میزان زیاد اسید چرب غیراشباع و عوامل پرواکسیداسیون از قبیل میوگلوبین و پروتئین‌های حاوی آهن است لذا حساسیت بیشتری را به واکنش‌های اکسیداسیون در زمان ذخیره‌سازی نشان داده است (Gon *et al*., 2007).

تحقیقات در دهه‌های اخیر نشان داده است که عوامل مختلفی از قبیل واکسیناسیون ناموفق، بیماری‌های عفونی تضعیف کننده سیستم ایمنی، کوکسیدیوز و استفاده نامتعارف از آنتی‌بیوتیک‌ها باعث کاهش پاسخ ایمنی می-شوند (Chen *et al*., 2003). امروزه به منظور افزایش کمی و کیفی گوشت تولیدی تلاش بسیاری جهت افزایش ایمنی جوجه‌های گوشتی با استفاده بلند مدت از داروها و ترکیبات گیاهی در طول دوره پرورش انجام شده است (روستائی علی‌مهر و همکاران ۱۳۹۱؛ Dash *et al*., 2006) اگر چه مصرف بلند مدت این ترکیبات با نتایج رضایت بخشی همراه بوده است ولی به دلیل افزایش هزینه تولید، پرورش دهنده‌های جوجه‌های گوشتی تمایلی به استفاده از مواد محرک ایمنی برای مدت طولانی ندارند. در چنین شرایط روش‌هایی قابلیت کاربرد را پیدا می‌کنند که ضمن بهبود تولید، هزینه‌ها را زیاد افزایش ندهند. از آنجایی که در طیور گوشتی بیشتر واکسن‌ها در زیر یک ماه تلقیح می‌شود لذا مصرف کوتاه مدت ترکیبات محرک ایمنی ممکن است سبب بهبود تولید شود (Barbara *et al*., 2009).

افزودنی‌های گیاهی و فرآورده‌های آنها شامل عصاره‌های گیاهی، اسانس‌ها و یا مواد تشکیل دهنده آنها از جمله محرک‌های رشد جایگزین هستند که به علت خصوصیات ضدباکتری، ضدکوکسیدیوز، ضدقارچ، ضدویروس، ضدتومور، بهبود رشد و عملکرد سیستم ایمنی در صنعت خوراک دام وطیور استفاده می‌شوند (Cook and Samman, 1999). توت سفید (White mulberry) از خانواده Moraceae، جنس Morus L. و گونه غالب (*Morus alba L.*) از میان ۱۵۰ گونه از جنس توت Mulberry است (Srivastava *et al*., 2006). درختی برگ‌ریز با اندازه متوسط، در سراسر آسیا، آفریقا، اروپا، جنوب و شمال آمریکا نیز وجود دارد. توت سفید به دلیل فعالیت درمانی خوب و سمیت کم به عنوان دارو در طب سنتی استفاده می‌شود (Li, 1998). برگ توت سفید به دلیل وجود ترکیبات شیمیایی فراوان و موثر مانند فلاونول گلیکوزیدهای روتین، کوئرستین، ایزوکوئرستین، آستراگالین، کامفرول، و همچنین ترکیباتی چون اسید-کافئیک رزواترول، اکسی‌رزواترول، اسید آسکوربیک، بتا کاروتن، زینک و آهن، ظرفیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی دارد (Katsube *et al*., 2006). از خواص درمانی برگ توت می‌توان پایین آورنده قندخون، چاق کننده، رفع سرفه، آسم، موثر در روماتیسم (Chen *et al*., 1995)، باکتری‌کشی، ویروس‌کشی (Chu *et al*., 2006)، ضدسرطان، ضدالتهاب، ضد استرس، تعدیل کننده سیستم ایمنی و فعالیت‌های کبدی نام برد (Yang *et al*., 2011) .

استفاده از برگ توت در تغذیه کرم ابریشم رایج بوده و به دلیل قابلیت هضم زیاد برای نشخوارکنندگان نیز قابل استفاده است (Saddul *et al.*, 2005). تحقیقات اخیر نشان داده است که استفاده از برگ توت در جیره جوجه-های گوشتی موجب بهبود عملکرد ، کاهش کلسترول و تری‌گلیسرید خون می‌شود (Islam *et al.*, 2014). بنابراین هدف این تحقیق بررسی اثر مصرف کوتاه مدت عصاره هیدروالکلی برگ توت سفید (*Morus alba L.*) بر پاسخ-های ایمنی، پراکسیداسیون سرم و گوشت جوجه‌های گوشتی است.

مواد و روش‌ها

عصاره هیدروالکلی برگ توت سفید بر اساس روش ژانگ و همکاران (۲۰۰۵) تهیه شد. ابتدا برگ توت تازه جمع‌آوری و جهت زدودن خاک و مواد خارجی، برگ‌ها شسته و آسیاب شدند. یک قسمت برگ آسیاب شده و پنج قسمت اتانول ۷۰ درصد به مدت سه روز در یخچال و بعد ۲۴ ساعت در دمای محیط ذخیره شده و در آخر به کمک کاغذ صافی واتمن ۲ صاف گردید. مقدار کوئرستین موجود در عصاره، ۳۵/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره بود که به‌وسیله روش High- performance liquid chromatography تعیین شد (Luo *et al.*, 2003).

تعداد ۲۰۰ قطعه جوجه یکروزه گوشتی (مخلوط نر و ماده) از سویه راس ۳۰۸ پرورش داده شدند. در روز اول جوجه‌ها وزن‌کشی شده و به پنج گروه (تیمار) و هر گروه به چهار زیر گروه (تکرار) ۱۰ قطعه‌ای با میانگین وزنی ۳۹/۴ گرم تقسیم شدند. نوردهی به صورت ۲۳ ساعت روشنایی و یک ساعت خاموشی انجام گرفت. جیره آغازین، رشد و پایانی بر اساس کاتالوگ تهیه و به ترتیب از صفر تا ۱۰ روزگی، ۱۱ تا ۲۴ روزگی و ۲۵ تا ۴۲ روزگی به جوجه‌ها داده شد. دسترسی به آب و خوراک در طی دوره آزمایش آزادانه بود. مقدار صفر (شاهد)، ۲، ۴، ۶ و ۸ درصد وزنی (Sun *et al.*, 2005) عصاره هیدروالکلی برگ توت سفید در ۲ دوره، ۳ روزه (روزهای ۱۴، ۱۵، ۱۶ و ۲۱، ۲۲، ۲۳) به جیره جوجه‌های گوشتی اضافه شد (شکل ۱). افزودن عصاره به جیره بر اساس روش هرس و همکاران (۲۰۰۴) صورت گرفت. بطور خلاصه مقادیر ۱۶۰، ۱۲۰، ۸۰، ۴۰ میلی‌لیتر عصاره با چگالی g/ml ۰/۵ به هر کیلو دان به صورت اسپری افزوده شد.

به منظور ارزیابی پاسخ‌های ایمنی سلولی در روز ۱۶ پرورش ۳ جوجه از هر قفس با میانگین وزنی مشابه انتخاب و مقدار ۰/۱ سی‌سی از محلول فیتوهماگلوتنین ۰/۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در بافر فسفات، به صورت داخل جلدی در چین پوستی بال سمت راست جوجه‌ها و ۰/۱ سی‌سی بافر فسفات به بال چپ تزریق شد. قبل از تزریق و همچنین ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تزریق ضخامت پوست به وسیله کولیس اندازه‌گیری شد. افزایش ضخامت (ضخامت پوست قبل از تزریق - ضخامت پوست بعد از تزریق) پوست بال چپ (A) و پوست بال راست (B) در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت تعیین شد. سپس بر اساس معادله زیر شاخص تحریک پوست به تزریق فیتوهماگلوتنین مشخص شد.

شاخص تحریک = A − B

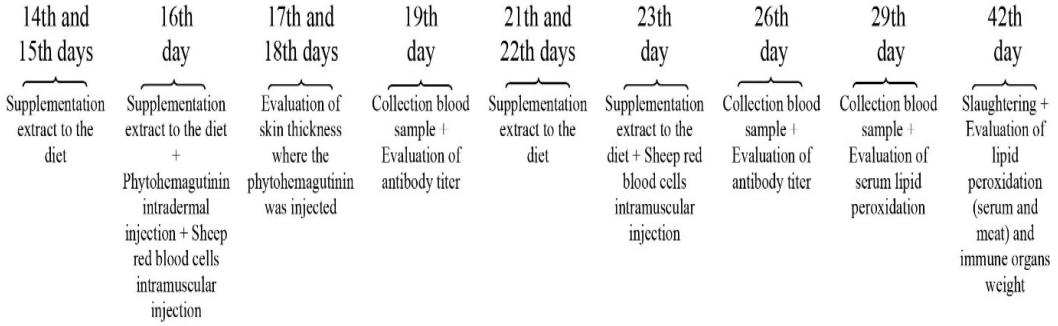

Fig 1. Experimental design

شکل ۱- طرح آزمایش

برای ارزیابی پاسخ‌های ایمنی هومورال از تزریق گلبول قرمز گوسفند و انجام آزمایش هماگلوتیناسیون جهت تعیین عیار پادتن IgG و IgM ضد گلبول قرمز گوسفند استفاده شد. به طور خلاصه ۵۰ میلی‌لیتر خون به وسیله سرنگ حاوی ۳ میلی‌لیتر محلول ۳ درصد اتیلین دی آمین ترا استیک اسید[11] در بافر کلرید سدیم ۰/۷ درصد از ورید وداج گوسفند تهیه شد (Schrank *et al*., 1990). نمونه خون در آزمایشگاه به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰ دور دقیقه سانتریفوژ شد و بخش مایع آن حذف و هم حجم رسوب باقی‌مانده بافر فسفات به آن اضافه و با همان شرایط سانتریفوژ شد. شستشوی گلبول قرمز ۳ بار تکرار شد. در روزهای ۱۶ و ۲۳ دوره پرورش به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول ۲۵ درصد گلبول قرمز گوسفند به عضله سینه تمام جوجه‌ها تزریق شد. نمونه خون از ورید بال دو قطعه جوجه گوشتی در هر تکرار با فاصله سه روز بعد از دوره اول مصرف عصار برگ توت (روز ۱۹) و دوره دوم مصرف عصاره توت (روز ۲۶) جمع‌آوری شد. در آزمایشگاه نمونه خون بعد از لخته شدن به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سرم بدست آمده تا انجام آزمایش هماگلوتیناسیون در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از یخ‌گشایی جهت غیر فعال کردن عوامل کمپلمان نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها به دو بخش تقسیم شدند. بخش اول جهت تعیین عیار پادتن تام و بخش دوم جهت تعیین عیار IgG مورد استفاده قرار گرفت. به منظور غیر فعال کردن IgM و تعیین عیار IgG میزان ۱/۴ درصد از محلول ۲- مرکاپتواتانول به بخش دوم اضافه شد و برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند و بر اساس روش شرانک و همکاران (۱۹۹۰) آزمایش هماگلوتیناسیون انجام شد. عیار پادتن IgG از عیار پادتن تام کسر شد تا عیار پادتن IgM به‌دست آید. عیار پادتن ضد گلبول قرمز بر اساس لگاریتم بر پایه ۲ گزارش شد.

برای اندازه‌گیری پراکسیداسیون چربی‌های سرم خون در روز ۲۹ و ۴۲ پرورش نمونه خون از ورید بال دو پرنده از هر تکرار جمع‌آوری شد. نمونه‌های سرم به‌دست آمده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس منجمد و نگه‌داری شد. برای اندازه‌گیری پراکسیداسیون چربی‌های سرم غلظت مالون‌دی‌آلدئید تعیین شد (Lovrić *et al*., 2008). در ابتدا ۲۵۰ میکرولیتر از سرم هر نمونه به همراه ۲۵ میکرولیتر هیدروکسی‌تولوئن بوتیله ۰/۲ درصد و یک میلی‌لیتر اسید تری‌کلرواستیک محلول ۱۵ درصد مخلوط و ۱۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰×g در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفوژ شد. سپس یک میلی‌لیتر اسیدتیوباربیوتیک ۰/۳۷۵ درصد در اسید هیدروکلریک ۰/۲۵ مولار به ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی اضافه شد و برای ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. بلافاصله نمونه‌ها در حمام آب یخ سرد شدند و به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب نوری نمونه در ۵۳۵ نانومتر خوانده شد. برای تعیین غلظت مالون‌دی‌الدهید منحنی استاندارد با استفاده از تترامتوکسی‌پروپان تهیه شد.

در پایان دوره از هر تکرار یک قطعه جوجه که وزن آن نزدیک به میانگین وزن جوجه‌های همان قفس بود انتخاب و شماره‌گذاری شد. پس از ۳ ساعت گرسنگی، وزن زنده ثبت، پرنده ذبح و بلافاصله پرکنی شد. طحال، بورس و تیموس با ترازو دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه‌گیری شد و درصد وزنی اندام‌های داخلی (وزن زنده/ وزن اندام) محاسبه شد. به منظور بررسی پراکسیداسیون چربی لاشه، از قسمت بالای عضله ران نمونه برداری شد و بعد در دمای ۲۰- درجه سلسیوس به مدت ۶ ماه ذخیره گردید. بعد از یخ‌گشایی غلظت مالون دی‌آلدئید درگوشت خام و پخته (در دمای ۸۵ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ دقیقه) اندازه‌گیری شد (Botsoglou *et al*., 2002). به طور خلاصه یک گرم از نمونه گوشت در داخل لوله آزمایش ۲۵ میلی‌لیتری درپوش‌دار توزین شد، ۲/۵ میلی-لیتر محلول ۰/۸ درصد بوتیل‌هیدروکسی‌تولوئن در هگزان اضافه شد، بلافاصله قبل از همگن کردن ۴ میلی‌لیتر از محلول آبی ۵ درصد اسید تری‌کلرواستیک اضافه شد، مخلوط حاصل با هموژنایزر یکنواخت و سپس به مدت ۴۰ ثانیه ورتکس شد، لایه فوقانی هگزان را دور ریخته و لایه آبی زیرین توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شد، حجم مخلوط توسط اسیدتری‌کلرواستیک به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد، مقدار ۳ میلی‌لیتر اسید تیوباربیوتیک ۰/۸ درصد به مخلوط اضافه شد، مخلوط فوق به مدت ۳۰

[11] -Ethylenediaminetetraacetic acid

دقیقه در حمام آب گرم ۷۰ درجه سلسیوس انکوبه شد و سپس در حمام آب یخ به مدت ۷ دقیقه خنک شد، لوله‌ها برای مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند و جذب نوری مخلوط واکنش توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در ۵۳۰ نانومتر خوانده شد. غلظت مالون‌دی‌آلدئید بر اساس منحنی استاندارد تعیین شد. نتایج در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از رویه GLM نرم افزار SAS (نسخه ۹/۲) تجزیه شدند. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون توکی با سطح ۵ درصد استفاده شد.

نتایج

نتایج پاسخ پوست به تزریق فیتوهماگلوتینین نشان داد که مصرف عصاره هیدروالکلی برگ توت اثری بر واکنش-های التهابی پوست نداشت (جدول۱، $P>$ ۰/۰۵).

نتایج پاسخ‌های ایمنی هومورال در جدول ۲ نشان داده شده است. در ۱۹ روزگی تیمار ۸ درصد عصاره هیدروالکلی برگ توت افزایش معنی‌داری در عیار پادتن IgM نسبت به تیمار شاهد و ۲ درصد عصاره هیدروالکلی برگ توت داشت (P<۰/۰۵). بالاترین عیار پادتن تام در ۲۶ روزگی مربوط به تیمار ۶ و ۸ درصد عصاره هیدروالکلی برگ توت بود (P<۰/۰۵). در ۲۶ روزگی عیار پادتن IgG تیمار ۸ درصد عصاره هیدروالکلی برگ توت بالاتر از تیمار شاهد و ۲ درصد عصاره هیدروالکلی برگ توت بود (P<۰/۰۵).

جدول ۱- اثر مصرف کوتاه مدت (در روزهای ۱۴، ۱۵ و ۱۶) عصاره هیدروالکلی برگ توت سفید بر پاسخ پوست بال به تزریق فیتوهماگلوتینین در روز ۱۶ پرورش (خطا معیار ± میانگین)

Table 1. Effect of short-term (days 14, 15 and 16) using hydro-alcoholic extract of mulberry leaves on skin responses to injection of phytohemagglutinin on day 16 (Mean ± SE)

Variable		After 24 hours (mm)	After 48 hours (mm)
Alcoholic extract of mulberry leaves (%)	0	1.4±0.11	1.3±0.10
	2	1.0±0.19	1.0±0.16
	4	1.2±0.14	1.2±0.11
	6	1.2±0.14	1.2±0.13
	8	1.3±0.08	1.4±0.10

جدول ۲- اثر مصرف کوتاه مدت (در روزهای ۱۴، ۱۵، ۱۶ و ۲۱، ۲۲، ۲۳ پرورش) عصاره هیدروالکلی برگ توت سفید در جیره جوجه‌های گوشتی بر عیار پادتن علیه SRBC (خطا معیار ± میانگین)

Table 2. Effect of short-term (14, 15, 16 and 21, 22, 23 days) using hydro-alcoholic extract of mulberry leaves to broiler diet on anti-SRBC antibody titer (Mean ± SE)

Variable		Alcoholic extract of mulberry leaves (%)				
		0	2	4	6	8
19 days	Total	2.7±0.19	2.7±0.27	3.3±0.25	3.5±0.31	3.7±0.21
	IgG	1.1±0.09	1.1±0.08	1.2±0.13	1.2±0.16	1.1±0.06
	IgM	1.6^{b}±0.24	1.6^{b}±0.29	2.1^{ab}±0.26	2.2^{ab}0.27	2.7^{a}±0.23
26 days	Total	7.1^{c}±0.15	7.5^{c}±0.23	8.1^{b}±0.18	9.1^{a}±0.26	9.4^{a}±0.23
	IgG	4.1^{b}±0.20	4.3^{b}±0.19	4.6^{ab}±0.24	5.2^{ab}±0.25	5.6^{a}±0.18
	IgM	3.0±0.34	3.2±0.33	3.6±0.38	3.9±0.37	3.7±0.35

[a,c] Values with different superscripts within a row are significantly different (P<0.05).

جدول ۳ - اثر مصرف کوتاه مدت (در روزهای ۱۴، ۱۵، ۱۶ و ۲۱، ۲۲، ۲۳ پرورش) عصاره هیدروالکلی برگ توت سفید در جیره بر درصد وزنی (وزن زنده/ وزن اندام) اندام‌های داخلی جوجه‌های گوشتی (خطا معیار ± میانگین)

Table 3. Effect of short-term (14, 15, 16 and 21, 22, 23 days) using hydro-alcoholic extract of mulberry leaves to diet on percentage weight (organ weight/ body weight) of internal organs of broiler (Mean ± SE)

Organ (%)	Alcoholic extract of mulberry leaves (%)				
	0	2	4	6	8
Thymus	$0.028^{b}\pm0.040$	$0.33^{ab}\pm0.053$	$0.40^{ab}\pm0.043$	$0.46^{a}\pm0.034$	$0.46^{a}\pm0.034$
Bursa of Fabricius	$0.08^{b}\pm0.016$	$0.08^{b}\pm0.010$	$0.09^{b}\pm0.013$	$0.14^{a}\pm0.016$	$0.14^{a}\pm0.009$
Spleen	0.09±0.004	0.10±0.007	0.11±0.010	0.11±0.012	0.11±0.008

[a,b] Values with different superscripts within a row are significantly different (P<0.05).

جدول۴ - اثر مصرف کوتاه مدت (در روزهای ۱۴، ۱۵، ۱۶ و ۲۱، ۲۲، ۲۳ پرورش) عصاره هیدروالکلی برگ توت سفید درجیره بر پراکسیداسیون چربی سرم جوجه‌های گوشتی (خطا معیار ± میانگین)

Table 4. Effect of short-term (14, 15, 16 and 21, 22, 23 days) using hydro-alcoholic extract of mulberry leaves to diet on serum lipid peroxidation of broiler (Mean ± SE)

Treatments		The concentration of serum malondialdehyde (nM/mL)	
		29 days	42 days
Alcoholic extract of white mulberry leaves (%)	0	$7.79^{a}\pm0.020$	$7.84^{a}\pm0.014$
	2	$7.75^{ab}\pm0.023$	$7.77^{ab}\pm0.018$
	4	$7.68^{bc}\pm0.013$	$7.73^{b}\pm0.025$
	6	$7.62^{c}\pm0.018$	$7.69^{b}\pm0.018$
	8	$7.61^{c}\pm0.018$	$7.68^{b}\pm0.018$

[a,c] Values with different superscripts within a column are significantly different (P<0.05).

جدول ۵- اثر مصرف کوتاه مدت (در روزهای ۱۴، ۱۵، ۱۶ و ۲۱، ۲۲، ۲۳ پرورش) عصاره هیدروالکلی برگ توت سفید در جیره بر پراکسیداسیون چربی گوشت لاشه جوجه‌های گوشتی پس از ۶ ماه ذخیره سازی در ۲۰-℃ (خطا معیار ± میانگین)

Table 5. Effect of short-term (14, 15, 16 and 21, 22, 23 days) using hydro-alcoholic extract of mulberry leaves to diet on carcass lipid peroxidation of broiler after 6-month storage at -20 ℃ (Mean ± SE)

Treatments		The concentration of meat malondialdehyde (nM/g)	
		Raw meat	Cooked meat
Alcoholic extract of white mulberry leaves (%)	0	$4.7^{a}\pm0.15$	16.1±0.54
	2	$4.0^{ab}\pm0.20$	16.0±0.84
	4	$3.5^{bc}\pm0.13$	15.2±0.56
	6	$3.1^{c}\pm0.16$	14.0±0.72
	8	$2.1^{c}\pm0.11$	13.1±0.54

[a,c] Values with different superscripts within a column are significantly different (P<0.05).

وزن نسبی طحال تحت تاثیر مصرف سطوح مختلف عصاره هیدروالکلی برگ توت سفید قرار نگرفت (جدول۳، $P>0/05$). وزن نسبی بورس و تیموس تحت تاثیر مصرف سطوح مختلف عصاره قرار گرفت ($P<0/05$). به طوری‌که بیشترین وزن نسبی بورس در تیمارهای ۶ و ۸ درصد عصاره مشاهده شده و تیمارهای دیگر تفاوتی با شاهد نداشتند. وزن نسبی تیموس در گروه ۶ و ۸ درصد عصاره نسبت به شاهد بیشتر بوده است ($P<0/05$).

نتایج پراکسیداسیون سرم جوجه‌های گوشتی نشان داد که در ۲۹ روزگی اختلاف معنی‌داری بین تیمار شاهد با تیمار ۴، ۶ و ۸ درصد عصاره هیدروالکلی برگ توت وجود دارد (جدول۴، $P<0/05$). شاهد دارای بیشترین مقدار مالون‌دی‌آلدئید سرم در روز ۴۲ بود ($P<0/05$).

نتایج نشان داد که غلظت مالون دی‌آلدئید گوشت خام تیمار شاهد در روز ۴۲ پرورش بعد از شش ماه ذخیره-سازی به صورت منجمد بیشتر از تیمار ۴، ۶ و ۸ درصد عصاره بود (جدول۵، $P<0/05$). بین تیمارهای آزمایشی گوشت پخته اختلافی مشاهده نشد ($P>0/05$).

بحث

یافته‌ها نشان داد مصرف سه روز عصاره هیدروالکلی برگ توت در جیره جوجه‌های گوشتی قبل از تزریق داخل جلدی فیتوهماگلوتینین اثری بر پاسخ التهابی نداشت. فیتوهماگلوتینین از طریق القای واکنش‌های التهابی سبب بروز ازدیاد حساسیت و تورم پوست در موضع تزریق می‌شود (Grasman, 2010). بیان شده است که اتیل استات جدا شده از ریشه توت سفید خاصیت ضد التهابی داشته و اثر تحریک لیپوپلی‌ساکارید میکروبی بر ترشح اکسید نیتروژن (NO) و پروستاگلاندین E2 از ماکروفاژ-های صفاقی موش را کاهش می‌دهد (Chao *et al*., 2009). به علاوه، برگ توت سفید حاوی میزان قابل توجهی ترکیبات ضد التهابی چون کوئرستین، رزواترول، اکسی‌رزواترول، اسیدکافئیک و کامفرول است (Katsube *et al*., 2006). مطالعات نشان داد که فلاونوئیدها تولید سایتوکین التهابی مانند اینترلوکین ۲ را در پاسخ به تحریک فیتوهماگلوتینین در شرایط آزمایشگاهی کاهش می‌دهد (Pandey *et al*., 2005). کوئرستین رادیکال‌های بوجود آمده توسط سلول‌های فاگوسیت‌کننده را خنثی، از دگرانوله شدن ماست‌سل‌ها و بازوفیل‌ها ممانعت و از تشکیل لکوترین‌های التهابی جلوگیری می‌کند (Middleton, 1984). تغذیه مداوم جوجه‌های گوشتی با جیره حاوی یک درصد کوئرستین و در تزریق داخل جلدی فیتوهماگلوتینین در روز ۱۵ پرورش به چین پوستی پا، اثری بر پاسخ التهابی نداشته است (Hager-Theodorides *et al*., 2014). بیان شده است که اکسی-رزواترول و رزواترول از طریق مهار کموتاکسی لکوسیت‌ها، منجر به سرکوب التهاب می‌شوند (Shen *et al*., 2011). اسیدکافئیک بیوسنتز واسط التهابی لکوترین را مهار می-کند (Koshihara *et al*., 1984). عصاره الکلی توت سفید سبب مهار تولید میانجی‌های التهاب مانند اکسید نیتریک و فاکتور نکروز توموری در ماکروفاژها می‌شود (Choi and Hwang, 2005). همچنین مشخص شده است که آنتی-اکسیدان‌های موجود در برگ توت از طریق مهار بیان آنزیم سیکلواکسیژنار، تولید پروستاگلاندین E2 را مهار می‌کند (Chung *et al*., 2009; Chao *et al*., 2003). بنابراین به نظر می‌رسد خاصیت ضد التهابی ترکیبات عمده موجود در عصاره هیدروالکلی برگ توت سفید مانع پاسخ التهابی به تزریق فیتوهماگلوتینین در پوست بال جوجه‌های گوشتی شده است.

در این تحقیق نتایج نشان داد که مصرف کوتاه مدت (سه روز) ۶ و ۸ درصد عصاره برگ توت قبل از تزریق آنتی‌ژن سبب بهبود پاسخ‌های ایمنی هومورال در جوجه-های گوشتی شد. گزارش شده است که افزودن عصاره متانولی برگ توت سفید به جیره موش‌ها برای مدت یک ماه سبب افزایش سطح ایمنوگلوبولین سرم می‌شود (Bahrami *et al*., 2010). ترکیبات فنولی گیاهان دارویی مانند یوکا (رنجبر و همکاران، ۱۳۹۳)، گلپر و سیر با افزایش کارآیی آنزیم‌های دخیل در سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن همانند گلوتاتیون ردوکتاز با حذف رادیکال‌های آزاد و ممانعت از آسیب‌های اکسیداتیو سلولهای سیستم ایمنی می‌توانند سبب افزایش پاسخ‌های ایمنی هومورال شوند (Dash *et al*., 2006; Bahrami *et al*., 2010). کوئرستین موجود در برگ توت دارای اثر تقویت کنندگی سیستم ایمنی هومورال است (Williamson *et al*., 1996). کوئرستین سبب افزایش عملکرد لنفوسیت B می‌شود

(Sharififar *et al*., 2009). افزودن کوئرستین به جیره جوجه‌های گوشتی سبب افزایش عیار پادتن IgG شده است (Hager-Theodorides *et al*., 2014). به علاوه بیان شده است که فلاونوئیدهای باعث افزایش اینترلوکین ۴ می‌شوند (Middleton *et al*., 2000). اینترلوکین ۴ با اثر دوگانه- متضاد[12] سبب هدایت پاسخ‌های ایمنی از سلولی به هومورال می‌شوند (Messaoudene *et al*., 2011). از طرفی، برگ توت سفید حاوی ۰/۲۲-۱/۱۲میلی گرم عنصر روی در هر ۱۰۰ گرم برگ تازه است (Katsube *et al*., 2006). مشخص شده است که افزودن روی به جیره سبب تحریک پاسخ ایمنی هومورال جوجه‌های گوشتی در برابر واکسیناسیون نیوکاسل می‌شود (Ezzati *et al*., 2013). عنصر روی سبب حفظ فعالیت آنزیم سوپردسموتاز می‌شود و این آنزیم نقش مهمی در بقا سلولهای ماکروفاژ و هتروفیل دارد (Virden *et al*., 2004). به علاوه، عنصر روی سبب افزایش تولید اینتروفرون‌ها می‌شود (Kidd *et al*., 1996). لذا یافته ها نشان می‌دهد که مصرف کوتاه مدت عصاره هیدروالکلی برگ توت سبب بهبود پاسخ‌های ایمنی هومورال جوجه‌های گوشتی شده است.

نتایج نشان داد که مصرف ۶ تا ۸ درصد عصاره هیدرو-الکلی برگ توت سفید باعث افزایش وزن نسبی بورس و تیموس شد. بورس فابریسیوس و تیموس از جمله اندامهای اصلی سیستم ایمنی طیور هستند که بلوغ سلولهای لنفوسیت درآنجا اتفاق می‌افتد (Maiorka *et al*., 2006). به‌خوبی روشن شده است که افزایش وزن نسبی بورس با افزایش توان تولید پادتن و بزرگ شدن نسبت سلول‌های لنفوسیت CD4/CD8 T همراه است (Erf and Bottje, 1996). افزودن آنتی‌اکسیدان به جیره جوجه‌های گوشتی سبب بهبود بلوغ لنفوسیت های T-CD4 بخصوص T کمکی و تنظیمی در تیموس می‌شود (Erf *et al*., 1998). تزریق درون صفاقی عصاره برگ توت در موش سبب افزایش فعالیت لنفوسیت‌های T شده است (Chung *et al*., 2003). مصرف مکمل خوراکی کوئرستین سبب افزایش وزن تیموس و بورس فابریسیوس شد (Pandey *et al*., 2005). افزودن پلی‌ساکاریدهای گیاهی به جیره جوجه‌های گوشتی ضمن افزایش وزن نسبی بورس و تیموس سبب افزایش عملکرد هومورال سیستم ایمنی در پاسخ به واکسن‌های نیوکاسل و گامبورو شده است (Zafar *et al*., 2011). استفاده از سایر ترکیبات گیاهی مانند سرخارگل سبب افزایش وزن تیموس و بورس فابریسیوس شده است (روستائی علی مهر و همکاران ۱۳۹۲؛ Habibian Dehkordi *et al*., 2011). به نظر می-رسد عصاره هیدروالکلی برگ توت اثر حفاظتی بر اندام-های اصلی سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی داشته باشد.

نتایج نشان داد که مقدار۴ تا ۸ درصد عصاره هیدرو-الکلی برگ توت سبب کاهش مالون‌دی‌آلدئید سرم جوجه‌های گوشتی شده است. برگ توت حاوی مواد آنتی-اکسیدان از جمله کوئرستین است (Katsube *et al*., 2006). گزارش شده است که افزودن مقدار ۱۵ میلی‌گرم کوئرستین به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش صحرایی به غذا به مدت ۱۵ روز سبب کاهش پراکسیداسیون چربی‌های سرم شده است (مهاجری و همکاران ۱۳۹۴). کوئرستین عملکرد آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون‌پراکسیداز سرم را بهبود می‌بخشد (Edremitlioglu *et al*., 2012). مطالعات انجام شده پراکسیداسیون چربی‌های سرم با استفاده از شاه توت و ترکیبات آن با نتایج مشابه‌ای همراه بوده است (Wu *et al*., 2016; Volpatoa *et al*., 2011). مطالعات نشان داده-اند که عنصر روی ممکن است با اثر آنتی‌اکسیدانی خود منجر به کاهش پراکسیداسیون چربی و بهبود آنتی-اکسیدانی شود (Roussel *et al.,* 2003). روی یکی از آنتی‌اکسیدان‌های قوی است و کمبود آن منجر به افزایش آسیب‌های اکسیداتیو در اندام‌های مختلف می‌شود (Prasad *et al.,* 2004). همچنین روی فعالیت شلاته کنندگی دارد و منجر به ثبات غشای سلول می‌شود و از پراکسیداسیون چربی‌ها جلوگیری می‌کند (Prasad *et al.,* 2004). بنابراین مصرف کوتاه مدت عصاره برگ توت احتمالا سبب بهبود شرایط اکسیداسیون و احیا سرم جوجه‌های گوشتی می‌شود.

نتایج نشان داد که مقدار ۴ تا ۸ درصد عصاره هیدرو-الکلی برگ توت سبب کاهش مالون‌دی‌آلدئید گوشت خام جوجه‌های گوشتی شده است. عوامل زیادی در پیشرفت اکسیداسیون گوشت پس از کشتار موثر است که از این عوامل می‌توان به مقدار اکسیدان‌های گوشت (میوگلوبین،

[12] reciprocal antagonistic mechanisms

آهن و فلزات دیگر)، سطوح آنتی‌اکسیدان‌های گوشت (آلفاتوکوفرول، آنزیم‌هایی مانند گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز)، مقدار چربی گوشت، نحوه عمل‌آوری گوشت و شرایط بسته‌بندی اشاره کرد (Anadón, 2002). حساسیت بافت‌ها به پرواکسیداسیون چربی، بستگی به بالانس آنتی‌اکسیدان به پرواکسیدان دارد (Anadón, 2002). با افزایش زمان ذخیره سازی لاشه حتی به صورت منجمد، میزان پراکسیداسیون چربی‌های لاشه افزایش می‌یابد (محمد امینی، ۱۳۹۱). گزارش شده است که افزودن یک گرم کوئرستین بر کیلوگرم جیره به طور مستمر سبب پایداری اکسیداتیو گوشت جوجه‌های گوشتی پس از ۹ روز ذخیره سازی در یخچال شده است (Goliomytis *et al.,* 2014 ۲۰۱۴). به علاوه استفاده از ترکیبات گیاهی مانند تفاله انگور (Kara *et al.,* 2016)، عصاره پوست انار (صالح و همکاران ۱۳۹۴)، اسانس آویشن شیرازی (همدیه و همکاران ۱۳۹۲)، رزماری و مریم گلی (Lopez-Bote *et al.,* 1998) پودر برگ چای (Tang *et al.,* 2001) اسانس پونه (Botsoglou et al., 2002) در جیره جوجه‌های گوشتی سبب کاهش پراکسیداسیون چربی لاشه در زمان ذخیره سازی می‌شود. حضور فلاونوئیدها از جمله کوئرسیتن در پلاسما، کبد، ران و سینه جوجه‌های گوشتی متعاقب مصرف آن در جیره نشان داد که بقایای این مواد آنتی اکسیدان در لاشه توانایی مهار رادیکال‌های آزاد را در دروان ذخیره‌سازی دارند (Bahrami *et al.,* 2010). نقش محافظتی ترکیبات گیاهی در برابر پراکسیداسیون چربی های لاشه ممکن است مربوط به مکانیسم آنتی‌اکسیدانی از طریق القاء فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی باشد (Hsu and Liu, 2004).

نتایج نشان داد که استفاده از عصار برگ توت اثری بر پراکسیداسیون چربی‌های لاشه جوجه‌های گوشتی بعد از ذخیره سازی (در منفی ۲۰ درجه سلسیوس) و طبخ ندارد. مطالعات نشان داده‌اند میزان پراکسیداسیون چربی-های گوشت با افزایش درجه حرارت افزایش می‌یابد و حتی مشخص شده است که پخت و پز سبب افزایش اکسیداسیون گوشت مرغ ۴ تا ۱۰ برابر می‌شود (Sheehy *et al.,* 1993; Anadón, 2002).

نتیجه‌گیری

افزودن کوتاه مدت عصار برگ توت به جیره جوجه‌های گوشتی سبب بهبود پاسخ ایمنی هومورال و کیفیت لاشه می‌شود.

فهرست منابع

رنجبر ز.، شریعتمداری ف. و کریمی ترشیزی م. ۱۳۹۳. اثر سطوح مختلف عصاره یوکا و آنتی بیوتیک بر بعضی از عملکردهای سیستم ایمنی و فاکتورهای خونی در جوجه‌های گوشتی. دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. ۳۰: ۶۸۱-۶۷۵.

روستائی علی مهر م.، قهرمانی زهرائی ب. و حقیقیان رودسری م.۱۳۹۲. اثر عصاره گیاه سرخارگل (Echinacea purpurea) بر عملکرد، پاسخ های ایمنی سلولی و هومورال جوجه های گوشتی. مجله دامپزشکی ایران، ۹: ۶۰-۷۰.

روستائی علی‌مهر م.، حقیقیان رودسری م.، منصوری ب. و نیکبخت بروجنی غ.۱۳۹۱. اثر هیدروکلراید لوامیزول آشامیدنی بر پاسخ های ایمنی سلولی و هومورال در جوجه های گوشتی. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۶۷: ۲۴۱-۲۳۵.

صالح ح.، گلیان ا.، کرمانشاهی ح.، فرهوش ر. و ابریشمچی پ. ۱۳۹۴. فرول استات، پوست و عصاره پوست انار در جیرههای حاوی α- اثرات آنتیاکسیدانی روغن ماهی بر کیفیت گوشت ران و سینه جوجه‌های گوشتی نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران ، ۷: ۳۱۷-۳۰۵.

محمد امینی م. ۱۳۹۰. بررسی و مقایسه اثر سه گیاه دارویی بر عملکرد، خصوصیات لاشه و فراسنجه‌های مرتبط با آسیت در جوجه گوشتی. پایان نامه کارشناسی ارشد علوم دامی ، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس.

مهاجری د.، منادی ع .، کفاشی الهی ر. و نشاط قراملکی م. ۱۳۹۴. مطالعه اثرات محافظتی کوئرستین بر آسیب روده باریک، ناشی از متوترکسات در موش صحرایی. پاتوبیولوژی مقایسه ای، علمی پژوهشی، ۱۲: ۱۶۳۷-۱۶۴۸.

همدیه م.، حسینی ع.، لطف الهیان ه.، محیطی اصلی م، و غلام کرکانی ع. ۱۳۹۲.اثر اسانس آویشن شیرازی بر عملکرد، خصوصیات لاشه و ثبات اکسیداتیو گوشت در جوجه‌های گوشتی . تحقیقات تولیدات دامی، ۲: ۴۳-۵۳.

Anadón H. L. S. 2002. Biological, nutritional, and processing factors affecting breast meat quality of broilers. PhD Thesis. Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University. USA.

Bahrami M., Shariatmadari F. and Karimitarshizi M. A. 2010. Effect of dietary extract of *Tymuse Vulgarise* and *Mentha Piperita* and vitamin E supplementation on immune responce of laying hen in heat stress and content of peroxideation egg during storage. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 27: 326-337.

Barbara M., Böhmer H., Brigitte R. and Paulicks F. X. 2009. Echinacea purpurea as a potential immunostimulatory feed additive in laying hens and fattening pigs by intermittent application. Livestock Science, 122: 81–85.

Botsoglou N. A, Christaki E., Fletouris D.J., Florou-Paneri P. and Spais A. B. 2002.The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage .Meat Science, 62 :259–265.

Brenes A., Viveros A., Goni I., Centeno C., Sayago-Ayerdy S. G, Arija I. and Saura-Calixto F. 2008. Effect of grape pomace concentrate and vitamin E on digestibility of polyphenols and antioxidant activity in chickens. Poultry Science, 87: 307–316.

Chao W. W., Kuo Y. H., Li W. C. and Lin B.F. 2009. The production of nitric oxide and prostaglandin E2 in peritoneal macrophages is inhibited by *Andrographis paniculata*, *Angelica sinensis* and *Morus alba* ethyl acetate fractions. Journal of Ethnopharmacology, 122: 68–75.

Chen F. J., Nakashima N., Kimura I. and Kimura M. 1995. Hypoglycemic activity and mechanisms of extracts from mulberry leaves and Cortex mory radicis in streptozotocin-diabetic mice. Yakugaku Zasshi, 115: 374-375.

Chen H. L., Li D. F., Chang B. Y., Cong L. M., Dai J.G. and Yi G. F. 2003. Effects of Chinese herbal on the polysaccharids immunity and growth performance of young broiler. Poultry Science 82: 364- 370.

Choi E. M. and Hwang J. K. 2005. Effects of *Morus alba* leaf extract on the production of nitric oxide prostaglandin E2 and cytokines in RAW2647 macrophages. Fitoterapia, 76: 608–613.

Chu Q., Lin M., Tian X. and Ye J. 2006. Study on capillary electrophoresis amperometric detection profiles of different parts of *Morus alba* L. Journal of Chromatography A, 1116: 286-290.

Chung K. O., Kim B. Y., Lee M.H., Kim Y.R., Chung H. Y., Park J. H. and Moon J. O. 2003. In-vitro and in-vivo anti-inflammatory effect of oxyresveratrol from *Morus alba L*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 55: 1695–1700.

Cook N. C. and Samman S. 1999. Flavonoids-Chemistry Metabolism, cardio perfective effects and dietary sources. The Journal of Nutrient and Biochemistry, 7: 66-76.

Dash S., Nath L. K., Bhise J., Kar P. and Bhattacharya S. 2006. Stimulation of immune function activity by the alcoholic root extract of *Heracleum nepalence*. Indian Journal of Pharmacology, 38: 336-340.

Edremitlioglu M., Andi M. F. and Korkut O.2012. Quercetin, a powerful antioxidant bioflavonoid, prevents oxidative damage in different tissues of long-term diabetic rats. Balkan Medical Journal, 29:49-53.

Erf G. F. and Bottje W. G. 1996. Nutrition and immune function in chickens: Benefits of dietary vitamin E supplementation. Proceedings of the Arkansas Nutrition Conference, 24: 113-130.

Erf G. F., Bottje W. G., Bersi T. K., Headrick M. D. and Fritts C. A.1998. Effects of dietary vitamin E on the immune system in broilers: altered proportions of CD4 T cells in the thymus and spleen. Poultry Science, 77: 529-537.

Ezzati M. S., Bozorgmehrifard M. H., Bijanzad P., Rasoulinezhad S., Faramarzi S., Ghaedi A., Ghabel H. and Stabraghi E. 2013. Effects of different levels of zinc supplementation on broilers performance and immunity response to Newcastle disease vaccine. European Journal of Experimental Biology, 3: 497-501.

Frankič T., Salobir J. and Rezar V. 2008. The effect of vitamin E supplementation on reduction of lymphocyte DNA damage induced by T-2 toxin and deoxynivalenol in weaned pigs. Animal Feed Science and Technology, 141: 274–286.

Georgieva N. V., Koinarski . and Gadjeva . 2006. Antioxidant status during the course of Eimeria tenella infection in broiler chickens. Veterinary Journal, 172: 488–492.

Goliomytis M ., Tsoureki D. , Simitzis P. E., Charismiadou M.A., Hager-Theodorides A. L. and Deligeorgis S. G. 2014. The effects of quercetin dietary supplementation on broiler growth performance, meat quality, and oxidative stability. Poultry Science, 93 :1957–1962.

Gon I., Brenes A., Centeno C., Viveros A., Saura-Calixto F., Rebole A., Arija I. and Estevez R. 2007. Effect of Dietary Grape Pomace and Vitamin E on Growth Performance, nutrient Digestibility, and Susceptibility to Meat Lipid Oxidation in Chickens. Poultry Science, 86:508–516

Gray J. I., Gomaa E. A. and Buckley D. J. 1996. Oxidative quality and shelf life of meats. Meat Science, 43: 111–123.

Grundy S. M. 1991. George Lyman Duff Memorial Lecture. Multifactorial etiology of hypercholesterolemia. Implications for prevention of coronary heart disease. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, 11: 1619–1635.

Habibian Dehkordi S., Fallah V. and Habibian Dehkordi S. 2011. Enhancement of broiler performance and immune response by *Echinacea purpurea* supplemented in diet. African Journal of Biotechnology, 10:11280-11286.

Hager-Theodorides A. L., Goliomytis M. S. and Delis S. 2014. Effects of dietary supplementation with quercetin on broiler immunological characteristics. *Animal Feed Science and Technology,* 198: 224–230.

Heres L., Engel B., Urlings H. A. P., Wagenaar J. A. and Van knapen F. 2004. Effect of acidified feed on susceptibility of broiler chickens to intestinal infection by campylobacter and salmonella. Veterinary Microbiology, 99: 259-267.

Hsu D. Z. and Liu M. Y. 2004. Sesame oil protects against lipopolysaccharide-stimulated oxidative stress in rats. Critical Care Medicine, 32: 227-231.

Islam M.R., Siddiqui M.N., Khatun A., Siddiky M.N.A., Rahman M.Z., Bostami A.B.M.R. and Selim A.S.M. 2014. Dietary effect of mulberry leaf (Morus alba) meal on growth performance and serum cholesterol level of broiler chickens. SAARC Journal of Agriculture, 12: 79-89.

Kara K., Kocaoğlu Güçlüa B., Baytoka E. and Şentürk M. 2016. Effects of grape pomace supplementation to laying hen diet on performance, egg quality, egg lipid peroxidation and some biochemical parameters. Journal of Applied Animal Research, 44: 303–310.

Katsube t., Imawaka N., Kawano Y., Yamazaki Y., Shiwaku K. and Yammane Y. 2006. Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. Food Chemistry, 97:25-31.

Kidd M. T., Ferket P. R. and Quresh M. A. 1996. Zinc metabolism with special reference to its role in immunity. World's Poultry Science Journal, 52:309.

KoshiharaY., Neichi T., Murota S., Lao A., Fujimoto Y. and Tatsuno T. 1984. Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotriene synthesis. Biochimica et Biophysica Acta, 792: 92–97.

Li L. N. 1998. Biologically active components from traditional Chinese medicines. Pure and Applied Chemistry, 70: 547–554.

Lin H,, Decuypere E, and Buyse J. 2006. Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens. Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular and Integrative Physiology, 144: 11–17.

Lopez-Bote C. J., Gray J. I., Gomaa E.A. and Flegal C. J. 1998. Effect of dietary administration of oil extracts from rosemary and sage on lipid oxidation in broiler meat. British Poultry Science, 39: 235–240.

Lovrić J., Mesić M., Macan M., Koprivanac M., Kelava M. and Bradamante V. 2008. Measurement of malondialdehyde (MDA) level in rat plasma after simvastatin treatment using two different analytical methods. Periodicum Biologorum, 110: 63–68.

Luo X. B, Chen B. O., Yao S. Z. and Zeng J. G. 2003. Simultaneous analysis of caffeic acid derivatives and alkamides in roots and extracts of *Echinacea purpurea* by high-performance liquid chromatography–photodiode array detection–electrospray mass spectrometry. Journal of Chromatography, 986: 73-81.

Maiorka A., Dahlke F., Furquim S. M and Morgulis A. 2006. Broiler adaptation to post-hatching period. Ciência Rural.Santa Maria, 36:701-708.

Messaoudene D., Belguendouz H., Ahmedi M. L., Benabdelkader T., Otmani F. and Terahi M. 2011. Ex vivo effects of flavonoids extracted from Artemisia herba alba on cytokines and nitric oxide production in Algerian patients with adamantiades-behcet's disease. Journal of Inflammation, 8: 2-9.

Middleton E. 1984. The flavonoids. Trends in Pharmalogical Sciences, 5: 335-338

Middleton E. J. R., Kandaswami C. and Theoharides T. C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacological Reviews, 52: 673-751.

Pandey R., Maurya R., Singh G., Sathiamoorthy B. and Naik S. 2005. Immunosuppressive properties of flavonoids isolated from Boerhaavia diffusa Linn. International Immunopharmacology, 5: 541–553.

Prasad A. S., Bao B., Beck F. W., Kucuk O. and Sarkar F. H. 2004. Antioxidant effect of zinc in humans. Free Radical Biology and Medicine, 37: 1182-90.

Roussel A. M., Kerkeni A., Zouari N., Mahjoub S., Matheau J. M. and Anderson R. A. 2003. Antioxidant Effects of Zinc Supplementation in Tunisians with Type 2 Diabetes Mellitus. Journal of the American College of Nutrition, 22:316-21.

Saddul D., Jelan Z.A., Liang J.B. and Halim R.A. 2005. Evaluation of mulberry (Morus alba) as potential feed supplement for ruminants: The effect of plant maturity on in situ disappearance and in vitro intestinal digestibility of plant fractions. Asian- Australasian Journal of Animal Science, 18: 1569- 1574.

Schrank C. S., CooK M. E. and Hansen W. R., 1990. Immune response of mallard ducks treated with immuno-suppressive agents: antibody response to erythrocytes and *in vivo* response to phytohemagglutinin-p. Journal of Wildlife Diseases, 26: 307-315.

Sharififar F., Pournourmohammadi S. and Arabnejad M. 2009, Immunomodulatory activity of aqueous extract of Heracleum persicum Desf. In mice. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 8: 287-292.

Sheehy P. J. A., Morrissey P. A. and Fynn A. 1993. Increased storage stability of chicken muscle by dietary a-tocopherol supplementation. Irish Journal of Agricultural and Food Research, 32: 67–73.

Shen M. Y., Liu Y. J., Don M. J., Liu H. Y., Chen Z. W., Mettling C., Corbeau P., Chiang C. K., Jang Y. S. and Li T. H. 2011. Combined phytochemistry and chemotaxis assays for identification and mechanistic analysis of anti-inflammatory phytochemicals in Fallopia japonica. PLoS One, 6: 274-280.

Srivastava S., Kapoor R., Thathola A. and Srivastava R. P. 2006. Nutritional quality of leaves of some genotypes of mulberry (*Morus alba*). International Journal of Food Sciences and Nutrition, 57: 305–313.

Sun X., Elroy A., Webb J. K. E., Sefton A. E. and Novak C. 2005.Broiler performance and intestinal alterations when fed drug-free diets. Poultry Science, 84:1294–1302.

Tang S., Sheehan D., Buckley D. J., Morrissey P. A. and Kerry J. P. 2001. Antioxidant activity of added tea catechins on lipid oxidation of raw minced red meat, poultry and fish muscle. International Journal Food Science & Technology, 36: 685-692.

Vasantha Rupasinghe H. P., Clinton M. R., Rathgeberb B. and Robin A. R., 2010. Absorption and tissue distribution of dietary quercetin and quercetin glycosides of apple skin in broiler chickens. Journal of Science of Food and Agriclture, 90: 1172–1178.

Virden W. S., Yeatman J. B., Barber S. J., Willeford K. O., Ward T. L., Fakler T. M., Wideman R. F. J. and Kidd M. T. 2004. Immune system and cardiac functions of progeny chicks from dams fed diets differing in zinc and manganese level and source. Poultry Science, 83:344.

Voljc M., Frankic T., Levart A., Nemec M. and Salobir J. 2011. Evaluation of different vitamin E recommendations and bioactivity of α-tocopherol isomers in broiler nutrition by measuring oxidative stress in vivo and the oxidative stability of meat. Poultry Science, 90: 1478–1488.

Volpatoa G. T., Calderona B. I. M. P., Sinzatoa S., Camposa K. E., Rudgea M. V. C. and Damascenoa D. C. 2011. Effect of Morus nigra aqueous extract treatment on the maternal–fetal outcome, oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats Journal of Ethnopharmacology, 138: 691– 696.

Williamson G., Plumb G. W., Uda Y., Price K. R. and Rhodes M. J. 1996. Dietary quercetin glycosides: antioxidant activity and induction of the anticarcinogenic phase II marker enzyme quinone reductase in HepaIcIc7 cells. Journal of Carcinogensis, 17: 2385- 2387.

Wu T., Yin J., Zhang G., Long H. and Zheng X. 2016. Mulberry and cherry anthocyanin consumption prevents oxidative stress and inflammation in diet-induced obese mice. Molecular Nutrition & Food Research, 60: 687-94.

Yang Z. G., Matsuzaki K., Takamatsu S., Kitanaka S. 2011. Inhibitory effects of constituents from Morus alba var. multicaulis on differentiation of 3T3-L1 cells and nitric oxide production in RAW264.7 cells. Molecules, 16: 6010–6022.

Zafar M., Anjum A. A., Qamar M. F., Najeeb M. I. and Maqbool A. 2011. Role of herbal polysaccharides as growth promoters in broilers. Science International, 23:157-159.

Zhang F., Chen B., Xiao S. and Yao S. 2005. Optimization and comparison of different extraction techniques for sanguinarine and chelerythrine in fruits of *Macleaya cordata* (Willd) R.Br. Separat Purif. Technol, 42:283–290.

Animal Production Research

Vol. 5, No. 4, 2017 (45-57)

University of Guilan

The effect of different levels of alcoholic extract of white mulberry leaves (*Morus alba l.*) on immune responses and lipid peroxidation of serum and muscle of broiler

M. Seid Asli[1], M. Roostaei-Ali Mehr[2*]

[1]Graduate Master of Animal Physiology, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
[2]Associate Prof., Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

(Received: 8-30-2015 – Accepted: 1-31-2017)

Abstract

This experiment was conducted to determine the effect of hydro-alcoholic extract of mulberry leaves on immune responses and lipid peroxidation by using 200 broiler chicks. Chickens were assigned to five groups and each group was divided into four categories with 10 birds. Diets were supplemented with 0, 2, 4, 6 and 8 % hydro-alcoholic extract of mulberry leaves in two periods of three-days (14-17 and 21-24 days). To evaluate cellular immune responses were evaluated by intra-dermal injection of at day16. Sheep red blood cells (SRBC) 25% (0.1 ml) was injected intramuscularly at days 16 and 23 and anti-SRBC IgM and IgG antibody titer were determined by hemagglutination test at days 19 and 26. Concentration of malondialdehyde was measured in serum (days 29 and 42) and muscle of raw and cooked thigh (day 42) after slaughtering birds and storage of thighs at -20 ℃ for six mouth. Results showed that, titer IgG was higher in 8 % blackberry leaf extract (5.7) than control (4.1) on day 26 ($P<0.05$). Concentration of malodialdehyde (nM/mL) in serum was lower in 8 % berry leaf extract (7.6) than control (7.8) on day 42 ($P<0.05$). Concentrations of malodialdehyde (nM/g) in raw meat were lower in treatments 8 (3), 6 (3.1) and 4 % (3.5) white mulberry leaf extract than control (4.7; $P<0.05$). Therefore, supplementation of diet with white mulberry leaf extract for short period of time improve humoral immune responses and quality of carcasses in broiler chicken.

Key word: Broilers, Humoral immunity, Mulberry, Lipid peroxidation

* Corresponding author: roostaei@guilan.ac.ir