دراسة فاعلية مستخلص ورق الزيتون
على الأداء المناعي والإنتاجي في فروج اللحم

أطروحة تقدمت بها

مهى داؤد ناصر داؤد قاقو

إلى

مجلس كلية الطب البيطري في جامعة الموصل في اختصاص

الطب البيطري / الأمراض البيطرية

وهي جزء من متطلبات شهادة دكتوراه فلسفة

بإشراف

الأستاذ المساعد الدكتور

صلاح مهدي حسن

صَفَر 1427 هـ آذار 2006 م

الخلاصـة

الهدف من الدراسة هو التعرف على تأثير المستخلص المائي لورق الزيتون بالجرعة 500 ملغم/كغم من وزن الجسم على الأداء الإنتاجي والكفاءة المناعية فضلاً عن تأثيراته المحتملة كمضاد للأكسدة في أفراخ فروج اللحم . شملت هذه الدراسة على خمس تجارب علمية:

تناولت التجربة الأولى كفاءة مستخلص ورق الزيتون عند استخدامه في فترات زمنية مختلفة (يوم ، ويومان ، وثلاثة ، ويومياً / من كل أسبوع) ولفترة ستة أسابيع ، وتم استخدام المعايير الآتية لتحديد كفاءة الأداء الإنتاجي : معدل الزيادة الوزنية الأسبوعية ، ومعدل كفاءة التحويل الغذائي ، فضلاً عن معامل الكرب Stress factor (معدل خلايا الهيتروفيل / معدل خلايا اللمفوسايت) .

أشارت النتائج إلى عدم وجود تأثير معنوي ($P>0.05$) للمستخلص عند جميع الفترات على الزيادة الوزنية مع أنه أبدى بعض التحسن في معدل معامل التحويل الغذائي ، وبالنسبة لمعامل الكرب ، فقد بينت المجموعة المعاملة بالمستخلص يومياً فقط انخفاضاً معنوياً عند الفترات ثلاثة وستة أسابيع من المعاملة .

أشارت النتائج إلى عدم وجود تغيرات معنوية ($P>0.05$) لكل من وزن الأعضاء اللمفية وصورتها النسجية عند مجاميع التجربة كافة . وأشارت قياسات معيار الـH.I إلى زيادة معنوية عند المجاميع المعاملة يومان وثلاثة أيام ويومياً / أسبوع منذ الأسبوع الثالث من موعد التلقيح الأول (7 أيام) ، بينما أظهر مؤشر اختبار الإيلايزا إلى تأثيرات موجبة فقط عند المجموعتين المعاملتين ثلاثة أيام ويومياً / أسبوع ولكن عند الأسبوع الرابع من موعد التلقيح الأول . لم تلاحظ تأثيرات تحسس مناعي عند استخدام لقاح BCG ، بينما كان هناك استجابة مناعية للقاح النيوكاسل المقتول وعند المجموعتين المعاملتين ثلاثة أيام ويومياً / أسبوع . وبينت نتائج معامل البلعمة إلى وجود فروقات معنوية فقط عند المجموعة المعاملة يومياً بعد مرور 21 يوماً من المعاملة .

أما الجانب الآخر لهذه الدراسة فتناول تقييماً لفاعلية مستخلص ورق الزيتون بالجرعة 500 ملغم/كغم وزن الجسم يومياً كمضاد أكسدة في التقليل من التأثيرات السلبية للموديل التجريبي للإجهاد التأكسدي التجريبي في الدجاج والناتج من استخدام بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 0.5% في ماء الشرب . شمل التقييم استخدام المستخلص بثلاثة محاور ، المحور الأول متزامناً مع بيروكسيد الهيدروجين بعمر أسبوعين ، وفي المحور الثاني استخدم المستخلص وقائياً (مستخلص ورق الزيتون بعمر أسبوعين + بيروكسيد الهيدروجين بعمر أربعة أسابيع) ، وعمل المحور الثالث على اختبار المستخلص علاجياً (بيروكسيد الهيدروجين بعمر أسبوعين + مستخلص ورق الزيتون بعمر ستة أسابيع) ، وشمل التقييم على ما يأتي :

قياس معدل الزيادة الوزنية للأفراخ المعاملة ، وصورة الشحوم ، والتحري عن تراكيز كل من المالونداياالديهايد Malondialdehyde (MDA) والكلوتاثيون Glutathione (GSH) لأنسجة الكبد والقلب والأبهر ، فضلاً عن متابعة التغيرات النسجية في تلك الأعضاء .

أكدت نتائج هذه الدراسة على قابلية بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 0.5% على إحداث الإجهاد التأكسدي في أفراخ دجاج اللحم بعمر أسبوعين والذي تميز بعدم ارتفاع مستوى الكولسترول الكلي والارتفاع غير المعنوي في مستوى الشحوم البروتينية LDL-c فضلاً عن الارتفاع المعنوي في مستويات الكليسيريدات الثلاثية والشحوم الكلية والشحوم البروتينية VLDL-c ومعامل التعصد ، بينما أشرت الشحوم البروتينية HDL-c انخفاضاً معنوياً . وبينما كان هناك ارتفاع معنوي في مستويات MDA أنسجة الكبد والقلب والأبهر ، لم تلاحظ تغيرات في مستويات GSH تلك الأنسجة باستثناء الهبوط المعنوي في مستوى GSH نسيج الأبهر . وأظهرت الصورة النسجية للأبهر نشوء الآفات الأولية للتصلب العصيدي والمتمثلة بالآفات الشحومية التكاثرية ، وتميزت هذه الآفات بكونها غير رجعية (Irreversible) وذلك خلال فترة أسبوعين بعد إيقاف المعاملة .

بينت النتائج أن مستخلص ورق الزيتون المستخدم بصورة منفردة في الأفراخ بعمر أسبوعين أدى إلى انخفاض معنوي في كل من الكولستيرول الكلي والشحوم البروتينية HDL-c ، بينما لوحظ ارتفاع معنوي في مستوى الشحوم الكلية ومعامل التعصد . لم يؤدِّ المستخلص إلى تأثيرات في مستويات GSH أنسجة الكبد والقلب والأبهر ، بينما أدى إلى ارتفاع معنوي في مستوى MDA نسيج الكبد وانخفاض معنوي في مستواه عند نسيج القلب . وأظهرت المقاطع النسجية للأبهر وجود الآفات الأولية للتصلب العصيدي .

أظهرت النتائج عدم كفاءة مستخلص ورق الزيتون المستخدم بالجرعة والفترة الزمنية المحددتين في هذه التجارب في الحد من تأثيرات بيروكسيد الهيدروجين عند جميع المحاور حيث استمر ظهور الآفات الأولية للتصلب العصيدي في نسيج الأبهر. وبالنسبة لصورة الشحوم أظهرت جميع المحاور وجود زيادة معنوية عند كل المعايير باستثناء الدهون الكلية (المحوران الوقائي والعلاجي فقط) ، والشحوم البروتينية LDL-c (المحور التزامني) والشحوم البروتينية VLDL-c (المحور العلاجي) ، في حين أظهرت قياسات MDA الأنسجة ارتفاعاً في أنسجة الكبد والقلب (جميع المحاور) والأبهر (المحور العلاجي فقط) وانخفاضاً في نسيج الأبهر (المحور الوقائي) . وفي حين لم يبدِ المحوران التزامني والعلاجي أي تأثيرات في مستوى GSH الأنسجة أظهر المحور الوقائي هبوطاً في مستوياته عند الأنسجة المفحوصة كافة .

كما تم تقييم المستحضر الدوائي الحاوي على مستخلص ورق الزيتون الذي تم اختبار قابليته في تخفيف التأثيرات السلبية لموديل الإجهاد التأكسدي المستخدم في هذه الدراسة ولكن

بعمر أربعة أسابيع ولفترة تعرض أمدها أربعة أسابيع . تميز الاجهاد التأكسدي المحدث ببيروكسيد الهيدروجين بتركيز 0.5% ولأفراخ فروج اللحم كوب بعمر 4 أسابيع بهبوط معنوي في إوزان الأفراخ المعاملة ، فضلاً عن عدم تأثر مستوى الكولستيرول الكلي. تميزت صورة الشحوم بارتفاع معنوي في مستويات الكليسيريدات الثلاثية والشحوم الكلية والشحوم البروتينية LDL-c و VLDL-c فضلاً عن معامل التعصد ، وأشرت الشحوم البروتينية HDL-c انخفاضاً معنوياً . وعمل الاجهاد التأكسدي هذا على رفع مستويات MDA وخفض مستويات GSH أنسجة الكبد والقلب والأبهر . كما أشرت المقاطع النسجية للأبهر حدوث الآفات الأولية للتصلب العصيدي المشابهة لتلك المحدثة بعمر أسبوعين . وعمل المستحضر التجاري المستخدم وحده أيضاً على رفع مستويات معايير صورة الشحوم كافة باستثناء الشحوم البروتينية HDL-c ، مسبباً ارتفاعاً معنوياً في مستويات MDA وانخفاضاً معنوياً لمستوى GSH نسيجي الكبد والأبهر . وبينت المقاطع النسجية للأبهر والشرايين التاجية للقلب للأفراخ المعاملة بهذا المستحضر على نشوء الآفات الأولية للتصلب العصيدي . لم يبدِ هذا المستحضر المعطى بالجرعة المحددة تحسناً موجباً في تأثيرات بيروكسيد الهيدروجين وبالتالي استمر ظهور الآفات النسجية للتصلب العصيدي ، كما لوحظ ارتفاع معنوي في مستوى الدهون الكلية والشحوم البروتينية LDL-c ، وهبوط معنوي في مستوى الشحوم البروتينية HDL-c ، وارتفاع معنوي في مستوى MDA الكبد والقلب والأبهر ، فضلاً عن هبوط معنوي في تركيز GSH نسيجي الكبد والقلب فقط .

يستنتج من هذه الدراسة أن لمستخلص ورق الزيتون تأثيرات إيجابية على الاستجابة المناعية للأفراخ المعاملة مما يشجع على اعتماده كمعدل مناعي فضلاً عن تأثيراته الايجابية على أوزان وكفاءة التحويل الغذائي لفروج اللحم . وتشير هذه الدراسة إلى إمكانية حدوث آفات التصلب العصيدي دون تأثر مستوى الكولسترول الكلي . وربما كانت الجرعة المستخدمة في هذه الدراسة تدرج ضمن الجرع العالية لمستخلص ورق الزيتون والمستحضر التجاري لورق الزيتون والتي ربما ساهمت في حدوث الحالة المهيأة للإجهاد (Prooxidant) مما أدت إلى فعل تأزري مع بيروكسيد الهيدروجين وبالتالي لم تعمل على تحسين آثاره السلبية . ومن مراجعة المصادر العلمية يبدو أن هذه الدراسة هي الأولى المتعلقة بدراسة تأثير ورق الزيتون على الاستجابة المناعية في فروج اللحم فضلاً عن كونها الدراسة الأولى المتعلقة بتأثيرات الجرع العالية لمستخلص ورق الزيتون في الدجاج .

Study of The Effectivity of Olive Leaves Extract On The Immunity and Productivity of Broilers

A Dissertation Submitted

By

Maha Daoud Nasir Daoud Kako

To

The Council of The College of Veterinary Medicine

University of Mosul

In The Partial Fulfillment of the Requirement for the

Degree of Philosophy

In

Veterinary Pathology

Supervised by

Assistant Professor

Dr. Salah Mahdi Hassan

Safar 1427 A.H. **March 2006 A.D.**

Summary

The aim of this study was performed on the evaluation of the effect of aqueous extract of olive leaf extract (OLE) at the dose equal to 500 mg/kg body weight, performance, immunological status, and the antioxidant properties in broiler chickens. So, this study constitute five scientific experiments.

The first experiment, OLE was used in different periods (one day, two days, three days, and daily per week) for six weeks periods. In order to evaluate performance, the following parameters have been used, average increase in body weights, feed convertion ratio (FC), and the estimation of stress index (heterophils/lymphocytes ratio). Results revealed no significant effect on body weight ratio, although, there was some ameliorating effects on FC ratio. Moreover, only the group that treated daily showed significant depression in stress index ratio since the 3rd week of treatment.

Parameters were followed for evaluation of immunological status included weight and histology of the some lymphatic organs, namely; bursa of Fabricious, thymus and spleen; the humeral immune response (hemagglutination inhibition (H.I.) titers and ELISA index) for the Newcastle disease La Sota vaccine; cellular immune response using nonspecific antigen (BCG vaccine) and specific antigen (La Sota killed vaccine); and estimation of phagocytic index. Results revealed no effect on body weight nor histological changes have been seen in tissue sections from all experimental groups. Although there was significant elevation in H.I. titer at the 3rd week post 1st exposure to vaccine (PV) at the groups treated twice, three days and daily/week, ELISA index revealed the positive effect at the fourth week P.V. in three days and daily treated groups only. No immunological sensation towards the BCG vaccine in all

treated groups, however groups treated three days and daily/week expressed sensation towards La Sota killed vaccine. Furthermore, only the group treated daily showed positive phagocytic index since 21 day during treatment.

On the other side, this study testing the antioxidant properties of OLE at the dose 500 mg/kg b. wt provided daily to reduce the drastic effects of H_2O_2 induced oxidative stress models in chikens at 2 weeks old-broiler chick, secondly OLE used as a protective agent (OLE at 2 wks + H_2O_2 at 4 wks), and lastly OLE used as curative agent (H_2O_2 at 2 wks + OLE at 4 wks). The parameters used for this evaluation include body weight ratio of the treated chickens, lipid profile; inspection for malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) concentration at liver, heart and aorta tissues. Moreover, histological changes at these tissues have been followed, too.

This study confirmed the capability of 0.5% H_2O_2 in drinking water to induce oxidative stress status in 2-wks-old Cobb-broiler chickens. This status characterized by; severe depression in body weight of treated birds, no change in total cholesterol (TC) and non-significant elevation in LDL-c ratio, significant elevation in TG, TL, VLDL-c and atherogenic index as well as significant depression in HDL-c ratio, significant elevation in liver, heart and aortic MDA levels in contrast to no changes in GSH ratio of that tissues except the significant depression in aortic GSH concentration, and the histological sections of aorta revealed the initiation of atherosclerotic lesions. Later lesions seems to be irreversible as it inspected 2-wks post last treatment.

Results showed that OLE when used alone significant depression in both of TG and HDL-c as well as significant elevation in total lipids and the atherogenic index. Also OLE had variable effects on tissue MDA it was elevated significantly in liver tissues, depressed significantly in

heart tissue and with no effects on aortic tissues. For GSH concentration, OLE induce no effects in all tissues examined. However, the aortic sections revealed the initiation of atherosclerotic lesion.

The main fact obtained from the results of this study was that OLE used according to the dosage and duration, were inefficient in protection from the effects of H_2O_2 in all directions that been used, so the primarily lesion of atherosclerosis still persisted in aorta, and in view of lipid profile ratio, all direction revealed significant elevation in all parameters except: total lipid (preventive and curative direction), LDL-c (concomitant direction) and VLDL-c (curative direction). In addition, MDA in tissues only show significant elevation in liver and heart (all direction) and aorta (curative direction) as well as depression in aorta (preventive direction). For, GSH ratio, only the prophylactic direction revealed depression in its concentration at all inspected tissues.

For instance, this study deal with the testing of the antioxidantal properties of an commercial product of OLE against the H_2O_2-oxidative status model, at the 4 wks-old chicken and for 4 wks period. The oxidative stress induced in 4-wks-old Cobb-broiler characterized by: significant depression in body weight of treated birds, no change in TC ratio, lipid profile revealed significant elevation of TG, TL, LDL-c, VLDL-c and atherogenic index as well as significant elevation in MDA and depression of GSH concentration of liver, heart and aorta tissues. Moreover, this study revealed the initiation of aortic atherosclerotic lesions. This product revealed significant elevation in all parameters of lipid profile except HDL-c and induce significant elevation in MDA level in hepatic and aortic tissues as well as significant depression at that tissues, too. Moreover, the pathological changes of aortic and heart tissues revealed atherosclerotic lesions in aortic and coronary arteries. As far as, the antioxidant properties of this product had no positive effect to

ameliorate the effects of H_2O_2. So persistance of atherosclotic lesions still seen; significant elevation in TL and LDL-c; depression in HDL-c; significant elevation in liver, heart and aortic MDA ratio concomitant with depression in hepatic and heart GSH ratio.

It was concluded, this study suggested the positive effects of OLE on the immune response of the treated Cobb-broilers, this properties may recommend OLE to be used as immunomodulators in chickens, 2nd, this study remarks the initiation of atherosclotic lesion without change in TC level, and lastly, the dosage of OLE that used in this study may be high that lead to induce pro-oxidant status that lead to a synergic action with H_2O_2, so, no ameliorating effects achieved.

In reviewing the available literature, this study could be the first deal with the effects of OLE on immune response in chicken as well as the first deal with high doses of OLE in chicken.