

ИЗПОЛЗВАНЕ НА ПОЛИБАКТЕРИАЛЕН ИМУНОСТИМУЛАТОР (НАТСТИМ) ПРИ ОТГЛЕЖДАНЕ НА КОКОШКИ НОСАЧКИ. II. ЛИПИДНИ КОМПОНЕНТИ НА ЯЙЧНИЯ ЖЪЛТЪК

ДИМИТЪР ЧОТИНСКИ, ГЮРГА МИХАЙЛОВА*, ДЕСИСЛАВА АБАДЖИЕВА**
ЕВГЕНИ ПЕТКОВ, ИВАН ДЕНЕВ***

Институт по животновъдни науки - Костинброд

*Тракийски университет, Аграрен факултет - Стара Загора

**Институт по биология и имунология на размножаването - София

*** НАТСТИМ ЕООД - СОФИЯ

Имунната система може да се активира не само при заразяване, но и чрез инжектиране с липополизахариди. Продължителната инфузия на бактериални липополизахариди е известен модел на Грам отрицателна бактериална инфекция.

Липополизахаридите са намерени на външната клетъчна стена на Грам отрицателните бактерии, особено в *Escherichia coli* и *Salmonella typhimurium*. Състоят се от вътрешни олигозахариди, О-специфични полизахариди и липид А, който е главният токсин в бактериите (Raetz, 1990).

При третирането с липополизахариди се намалява поемането на фуража и настъпват определени метаболитни промени в организма на животните и птиците (Klasing et al., 1987; Benson et al., 1993; Takahichi et al., 1997; Webel et al., 1998; Humphrey and Klasing, 2004). Метаболитният ефект на липополизахаридите е еднакъв при преживните и непреживните животни, които се използват в такива експерименти. Някои от метаболитните промени в организма на животните протичат в две фази: първата наподобява стресов отговор с увеличение на глюкозата и кортизола в кръвната плазма, а втората отразява началото на започващ енергиен дефицит с ниско ниво на глюкоза и повишена липолиза (Webel et al., 1997a; Steiger et al., 1999).

Проучванията показват, че този метаболитен ефект при третирането с липополизахариди и хронични инфекции се опосредства от цитокините, произведени от макрофагите и други клетки на имунната система. Според Jonson (1997) interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) и Tumor necrosis factor- α (TNF- α) са най-важните цитокини, отговорни за метаболитните промени. При гризачите цитокините предизвикват хиперлипидемия чрез намаляване на липопротеин липазната активност в мускулите и мастната тъкан и чрез увеличаване на мастните киселини в черния дроб и тяхното последващо включване в липопротеините с ниска плътност (Hardardottir et al., 1994). Kawakami and Cerami (1981) също така отбелязват, че интраперитонеалното инжектиране с *E. coli* токсин при плъхове предизвиква много от симптомите на хроничната инфекция, включително хиперлипидемия и потискане на тъканната липопротеин липаза.

За разлика от бозайниците, при птиците липидите се отлагат в мастната тъкан и се вземат чрез липопротеин липазата. Третирането на пилетата *in vivo* с липополизахариди води до значително намаление на липопротеин липазата в сърцето, скелетните мускули и мастната тъкан (Griffin and Butterwith, 1988). Допуска се, че TNF- α е главният цитокин, отговорен за инхибиране синтеза на липопротеин

теин липазата (**Butterwith and Griffin**, 1989).

Активирането на хуморалния имунен отговор при растящи пилета от яйценосно направление стимулира отлагането на мазнини, но няма ефект върху другите метаболитни показатели (**Parmentier et al.**, 2002). Неотдавна беше установено също така, че имунният отговор при кокошки носачки Легхорн на 40-седмична възраст при инжектиране с липополизахариди от *Salmonella typhimurium* се появява първо в серума и след това в яйчния жълтък (**Sunwoo et al.**, 1996).

В литературата няма данни за влиянието на липополизахаридите върху липидните показатели и мастнокиселинния състав на яйчния жълтък.

Целта на настоящото изследване беше да се установи ефектът от включването на НАТ-СТИМ® 40 plus във водата за пиене върху съдържанието на общите липиди, фосфолипиди, холестерол и мастнокиселинния състав на яйчния жълтък.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Опитът беше проведен с 180 броя кокошки носачки Ну Line Brown и 24 броя петли, разделени в две групи: контролна и опитна. Във всяка група имаше по 90 броя кокошки носачки и 12 броя петли.

На кокошките носачки от опитната група в продължение на 30 дни беше добавяно във водата за пиене предварително претеглено по 0.4 mg/kg живо тегло НАТСТИМ® 40 plus. НАТСТИМ® 40 plus съдържа суха субстанция липополизахариди, пептидгликани, тайхоеви киселини, мюреин и N-Ацетил-D-глюкозамин от специално селектирани Грам отрицателни бактерии. Той е обогатен с антиоксиданти : провитамин А 2 mg, витамин Е 20 mg, витамин С 80 mg, цинков сулфид 7 mg, магнезиев окис 15 mg и селен 10 µg.

Птиците и от двете групи се хранеха с еднаква по състав смеска, която съдържа 17.68% протеин и 2720 kcal/kg обменна енергия.

В края на опита от жълтъка на яйцата бяха екстрахирани липидите и определено съдър-

жанието на общите и неутралните липиди, холестеролът, фосфолипидите и мастнокиселинният състав.

Екстракцията на липидите беше извършена по метода на **Blight and Dyer** (1959) със смес от метанол и хлороформ в съотношение 2: 1. Съдържанието на холестерола в липидния екстракт беше определено по метода на **Sperry and Webb** (1950), на фосфолипидите - по метода на **Chen et al.**, (1956), а количеството на неутралните липиди - от разликата между общите липиди и сумата на холестерола и фосфолипидите.

Мастнокиселинният състав беше определен чрез газова хроматография. Използван беше газов хроматограф Ray Unicam 304 с пламъчно-йонизационен детектор.

Получените резултати бяха изразени в g/100 жълтък и в g/на едно яйце.

За статистическа оценка на получените резултати беше използван *t*-критерият на Стюдънт.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Получените резултати за съдържанието на холестерола, фосфолипидите, неутралните и общите липиди в яйчния жълтък в g/100 g жълтък при включването на имуностимулатор във водата за пиене на кокошките носачки са дадени в табл. 1. От анализа им се вижда, че при включването на имуностимулатор във водата за пиене на кокошките носачки не настъпват значителни промени в количеството на общите липиди, неутралните липиди, холестерола и фосфолипидите, когато са изразени в g/100 g жълтък. Наблюдава се обаче известна тенденция за увеличение количеството и на четирите липидни фракции. Най-голямо е увеличението на холестерола, а най-ниско - на фосфолипидите.

В съдържанието на холестерола, фосфолипидите, неутралните и общите липиди, изразени в g/на едно яйце също не настъпват така значителни промени (табл. 2).

И четирите липидни фракции се повишават, като най-голямо е увеличението на холес-

Таблица 1. Липидни фракции на яйчния жълтък (g/100 жълтък)
Table 1. Lipids fractions of egg yolk (g/100 g yolk)

Липидни фракции Lipids fractions	Контролна група Control group	Опитна група Experimental group
Холестерол Cholesterol	2.57 ± 0.33	2.97 ± 0.15
Фосфолипиди Phospholipids	8.29 ± 1.06	8.51 ± 0.47
Неутрални липиди Neutral lipids	20.95 ± 3.31	21.68 ± 2.37
Общи липиди Total lipids	31.79 ± 4.64	33.16 ± 2.41

Таблица 2. Липидни фракции на яйчния жълтък (g/1 яйце)
Table 2. Lipid fraction of egg yolk (g/1 egg)

Липидни фракции Lipids fractions	Контролна група Control group	Опитна група Experimental group
Холестерол Cholesterol	0.43 ± 0.014	0.50 ± 0.015
Фосфолипиди Phospholipids	1.38 ± 0.093	1.42 ± 0.097
Неутрални липиди Neutral lipids	3.49 ± 0.21	3.61 ± 0.19
Общи липиди Total lipids	5.30 ± 0.28	5.53 ± 0.31

терола, а най-ниско - на фосфолипидите.

Мастнокиселинният състав на жълтъка на двете групи е представен в табл. 3. Главните наситени мастни киселини в жълтъка са палмитиновата и стеариновата киселина, главната мононенаситена мастна киселина е олеиновата, а от полиненаситените мастни киселини са линоловата и арахидонова. При включването на имуностимулатор във водата за пиене настъпва известно понижение в нивото на палмитиновата и стеариновата киселина в жълтъка, но се наблюдава известна тенденция за повишаване нивото на линоловата, олеиновата, арахидоновата, 22:6 n-6 мастни киселини, докозохексановата (22: 6 n-3) и съдържанието на n-3 полиненаситени мастни

киселини (ПНМК). Съотношението на n-6 : n-3 от 15.6 намалява на 14.76.

Kawakami and Cerami (1981) също така при интраперитонеално инжектиране с *E. coli* токсин установяват увеличение на липидите и потискане на активността на тъканната липопротеин липаза. При бозайниците след инжектирането с бактериален ендотоксин се увеличава нивото на свободните мастни киселини обикновено в първите 2 h и това е последвано от голямо увеличение в концентрацията на триглицеридите, фосфолипидите и холестерола в плазмата (**Hirsch et al.**, 1964; **Kaufmann et al.**, 1976). Тези промени авторите приписват на увеличената липолиза и инхибиране на липопротеин липазата. При инжек-

Таблица 3. **Мастнокиселинен състав на липидите в яйчния жълтък (mol %)**Table 3. **Fatty acids composition of egg yolk (mol %)**

Мастни киселини Fatty acids	Контролна група Control group	Опитна група Experimental group
14:00	0.29 ± 0.10	0.30 ± 0.06
15:00	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.03
16:00	26.22 ± 1.04	25.77 ± 1.17
16:01	4.42 ± 0.40	4.57 ± 0.56
17:00	0.12 ± 0.04	0.12 ± 0.04
17:01	0.13 ± 0.03	0.14 ± 0.04
18:00	8.46 ± 0.54	8.06 ± 0.33
18:01	46.45 ± 2.42	46.76 ± 1.43
18:02	10.63 ± 0.57	10.83 ± 0.49
18:03	0.19 ± 0.04	0.19 ± 0.04
20:03	0.16 ± 0.03	0.18 ± 0.03
20:04	1.77 ± 0.33	1.85 ± 0.30
22 : 4 n- 6 (w- 6)	0.43 ± 0.16	0.49 ± 0.15
22 : 6 n- 3 (w - 3)	0.63 ± 0.19	0.71 ± 0.20
МНМК (MUFA)	51.00 ± 0.78	51.47 ± 0.81
ПНМК (PUFA)	13.65 ± 0.89	14.15 ± 0.85
n - 3 (w - 3)	0.82 ± 0.046	0.89 ± 0.089
n - 6 (w - 6)	12.80 ± 0.76	13.14 ± 0.80
n - 6 : n - 3	15.6	14.76

тирането на пилета бройлери с липополизахариди се увеличава също така концентрацията на триглицеридите в плазмата (**Benson et al., 1993**). Увеличение на свободните мастни киселини настъпва и при пилета като израз на стресовия отговор към *Escherichia coli* 078 ендотоксин (**Butler et al., 1977**). Обратно, при интравенозното инжектиране на *E. coli* ендотоксин при гладуващи пилета по-скоро се потиска, отколкото повишава концентрацията на плазмените липиди. Неуспехът на липополизахаридите да увеличат плазмените триглицериди при непрехивните животни се приписва на TNF-а опосредстваното инхибиране на липопротеин липазата и стимулиране синтеза на триглицеридите в черния дроб (**Feingold and Grunfeld, 1987**).

В достъпната литература не намерихме данни за промените в липидните фракции и мастните киселини в яйчния жълтък при сти-

мулиране на имунната система с липополизахариди за сравнение.

Липидният състав на яйчния жълтък се влияе от много фактори: линията, породата, типа на дажбата, мазнините, микрофлората в червата, стреса и др. (**Edwardsq, 1964; Cherian and Sim, 1991; Furuse et al., 1992; Ahn et al., 1995; Shapira et al., 2009**).

При включването на имуностимулатор във водата за пиене на кокошките носачки не се наблюдава отрицателен ефект върху мастнокиселинния състав на яйчния жълтък, но се повишава съдържанието на n-3 мастните киселини и се подобрява съотношението между n-6 : n-3 полиненаситени мастни киселини. Консумацията на n-3 полиненаситени мастни киселини е свързано с намаляване на сърдечно-съдовите заболявания (**Kinsella et al, 1990; Shapira et al., 2009**).

ИЗВОДИ

При включването на имуностимулатора НАТСТИМ® 40 plus във водата за пиене на кошките носачки се наблюдава известна тенденция за увеличаване на холестерола, фосфолипидите, неутралните и общите липиди в яйчния жълтък.

В мастнокиселинния състав на яйчния жълтък също не настъпват така значителни промени при включването на Натсим във водата за пиене на кошките носачки.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Ahn, D., H. Sunwoo, F. Walf, J. Sim**, 1995. Effects of dietary alpha linolenic acid and strains of hen on fatty acids composition, storage stability, and flavor characteristics of chicken eggs, *Poultry Science*, 74, 1540- 1547.
2. **Benson, B., C. Calvert, E. Roura, K. Klasing**, 1993. Dietary energy source and density modulate the expression of immunologic stress in chicks, *J. Nutrition*, 123, 1714-1723.
3. **Blight, F. and W. Dyer**, 1959. A rapid methods of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911- 917.
4. **Butler, E., M. Curtis, F. Harvey**, 1977. Escherichia coli endotoxin as a stressor in domestic fowl, *Research .in Veterinary Science*, 23, 20-23.
5. **Butterwith, S., H.Griffin**, 1989. The effects of macrophages derived cytokines on lipid metabolism in chicken (*Gallus domesticus*) hepatocytes and adipocytes. *Comp.Biochem. Physiol.*, 94A, 721-724.
6. **Cherian, G. and Sim**, 1991. Effect of feeding full fat flax and canola seeds to laying hens on the fatty acid composition of eggs, embryos, and newly hatched chicks, *Poultry Science*, 70, 917-922.
7. **Curtis, M., B. Scott, E. Butler**, 1980. Effect of Escherichia coli 078 endotoxin on plasma lipids in the domestic fowl, 29, 133- 134.
8. **Edwards, H.**, 1964. The influence of breed and or strain on the fatty acid composition of egg lipids, *Poultry Science*, 43, 751- 754.
9. **Feingold, K. and Grunfeld**, 1987. Tumor necrosis factor alpha stimulates hepatic lipogenesis in the rat in vivo, *J. Clin. Invest.*, 80, 184- 190.
10. **Griffin, H. and S. Butterwith**, 1988. Effects of Escherichia coli endotoxin on tissue lipoprotein lipase activities in chickens, *Br.Poul.Sci.*, 29, 371-378.
11. **Hardardottir, I., C. Grundfeld, K. Feingold**, 1994. Effects of endotoxin and cytokines on lipid metabolism, *Curr.Opin.Lipidol.*, 5, 207- 215.
12. **Hirsch, R., D. Mc Kay, R. Travers, R. Skraly**, 1964. Hyperlipidemia fatty liver, and bromsulphoptalein retention in rabbits injected intravenously with bacterial endotoxins, *J. Lipid research*, 5, 563-568.
13. **Humphry, B. and K. Klasing**, 2004. Modulation of nutrient metabolism and homeostasis by the immune system, *World Poul.Sci.J.*, 60, 90-
14. **Johnson, R.**, 1997. Inhibition of growth by proinflammatory cytokines. An integrated view, *J.Anim. Sci.*, 75, 1244- 1255.
15. **Kaufmann, R., C. Matson, W. Beisel**, 1976. Hypertriglyceridemia produced by endotoxin . Role of impaired triglyceride disposal mechanisms , *J. Infec. Dis.* 133, 548- 555.
16. **Kawakami, M. and A.Cerami**, 1981. Studies of endotoxin induced decrease in lipoprotein lipase activity, *J. Exp. Med.*, 154, 631-639.
17. **Kinsella, J., B. Lokesh, R. Stone**, 1990. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease : possible mechanisms, *Amer.J. Clin. Nutr.*, 52, 1- 28.
18. **Klasing, K., D. Lauring, R. Peng, M. Fray**, 1987. Immunologically mediated growth depression in chicks : influence of feed intake , corticosterone and interleukin-1, *J. Nutrition*, 117, 1629-1637.
19. **Parmentier H., S. Bronhost, M. Nieuwland, G. de Vries Reiling, J. Linden, M. Heetkamp, B. Kemp, J. Sharma, M.Verstegen, H.van den Linden**, 2002. Increased fat deposition after repeated immunization in growing chickens, *Poultry Science*, 81, 1308- 1316.
20. **Raetz, C.**, 1990. Biochemistry of endotoxins , *Annu Rev.Biochem.*, 59, 129- 170.
21. **Shapira, N., P. Weill, R. Loewenbach**, 2009.

- A high n-3 fatty acid egg vs. a high n-6 fatty acid diet : the significance of health- oriented agriculture, World Poultry Science Association. XVIII European Symposium on the quality of Poultry Meat and XII European Symposium on the Quality of Eggs and Eggs products of WPSA.
22. **Shivaprasad, H. and R. Jaap**, 1977. Egg and yolk production as influenced by liver weight , liver lipid and plasma lipid in three strains of small bodied chickens, Poultry Science, 56, 1384-1390.
23. **Sperry, W., and M. Webb**, 1950. A revision of the Shoenheimer- Sperry method for cholesterol determination, J. Biol.Chem., 187, 97-101.
24. **Steiger, M., M. Senn, G. Altruther, D. Weiling, F. Sutter, M. Kreuzer, W. Langhans**, 1999. Effect of a prolong low -dose lipopolysaccharide infusion on feed intake and metabolism in heifers, J. Anim.Sci., 77, 2523- 2532.
25. **Sunwoo, H., T. Nakano, W. Dixon, J. Sim.**, 1996. Immune responses in chickens against lipopolysaccharide of Escherichia coli and Salmonella typhimurium , Poultry Science, 75, 342-345.
26. **Takahishi, K., N. Ohta, Y. Akiba**, 1997. Influences of dietary methionine and cysteine on metabolic responses to immunological stress by Escherichia coli lipopolysaccharide injection , and mitogenic response in broiler chickens, Br. J. Nutr., 78, 815-821.
27. **Webel, D., B. Finck, D. Baker, R. Johnson**, 1997. Time course of increased plasma cytokines, cortisol, and urea nitrogen in pigs following intraperitoneal injection of lipopolysaccharide, 75, 1514- 1520.
28. **Webel, D., R. Johnson, D. Baker**, 1998. Lipopolysaccharide induced reductions in food intake. Do not decrease the efficiency of lysine and threonine utilization for protein accretion in chickens, J. Nutrition, 128, 1760- 1766.

THE USE OF POLYBACTERIAL IMMUNOSTIMULATOR
(NATSTIM® PLUS) IN BREEDING OF LAYING HENS
II. EGG YOLK LIPIDS OF LAYING HENCE

D. Chotinsky, G. Mihailova, D. Abadjieva**, E. Petkov, I. Denev****

Institute of Animal Science - Kostinbrod

** Thrakia University, Faculty of Agriculture - Stara Zagora*

*** Institute of Biology and Immunology of Reproduction - Sofia*

****NATSTIM Ltd - Sofia*

SUMMARY

An experiment was carried out with 180 laying hens and 24 cocks Hy Line divided in two groups. The birds from the experimental group received for 30 days water supplemented by 0,4 mg per kg live weight polybacterial immunostimulator Natstim® plus. The total lipids, phospholipids, neutral lipids, cholesterol content and fatty acids composition in the egg yolk were determined at the end of the experiment.

The inclusion of polybacterial immunostimulator in water of laying hens insignificantly increased cholesterol, phospholipids, neutral and total lipids contents in egg yolk.

The inclusion of polybacterial immunostimulator in the water for layers did not change significantly the content of fatty acids in egg yolk.

Key words: *Natstim® plus, laying hens, eggs, lipid fraction, fatty acids*