

# INULĪNA IETEKME UZ BROILERCĀĻU GREMOŠANAS TRAKTA MORFOFUNKCIONĀLO STATUSU

## IMPACT OF PREBIOTIC ON CHICKEN DIGESTIVE TRACT MORPHOFUNCTIONAL STATUS

Aleksandrs Jemeljanovs<sup>1</sup>, Inese Zītare<sup>1</sup>, Anda Valdovska<sup>2</sup>, Vera Krastiņa<sup>1</sup>,  
Māra Pilmane<sup>3</sup>, Līga Proškina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>LLU, Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātniskais institūts, „Sīgra”, Latvija

<sup>2</sup>LLU, Veterinārmedicīnas fakultāte, Latvija

<sup>3</sup>Rīgas Stradiņa Universitātes Anatomijas un antropoloģijas institūts, Latvija

<sup>1</sup>LUA, Research Institute of Biotechnology and Veterinary Medicine “Sīgra”, Latvia

<sup>2</sup>LUA, Faculty of Veterinary Medicine, Latvia

<sup>3</sup>Institute of Anatomy and Anthropology, Riga Stradins University, Latvia

Anda.Valdovska@llu.lv

### ABSTRACT

A study was conducted to test the effect of Jerusalem artichoke (JA) in dry form on digestive tract. The trial involved 60 cross ROSS 308 broiler chickens divided in three groups. All chickens were fed with commercial basic feed, nutrition value conforms cross ROSS 308 regalement. Feed ration of the first group chickens was supplemented with additive - JA in dry form in 0.5% concentration, the second group- with the same JA dry form in 1% concentration, the third group – without supplement. Two birds from each group were slaughtered at trial beginning in 7<sup>th</sup>, further - 28<sup>th</sup> and 42<sup>nd</sup> days of age. Tissue samples from the duodenum and ileum of each chicken were histo-morphologically examined to determine the villi heights, thickness of *lamina propria* and epithelium, crypt depths. Supplement of JA dry form inclusion in basic feed did not change the broiler chicken performance in first and second groups compared with control. An increase of villi height was observed in duodenum and small intestine of birds at 28<sup>th</sup> day of age to which was given 1% supplement of JA. At the same time in villi mucosa of ileum of these chickens inflammation was observed starting from 28<sup>th</sup> day of age and continued to till 42<sup>th</sup> day. These results confirm that feed supplemented with JA in dry form in 0.5 % concentration had not an effect on microstructure and mucosa of small intestine in comparison with additive in 1% concentration.

**KEY WORDS:** prebiotic, Jerusalem artichoke, chickens.

### IEVADS

Pēdējos gadu desmitos kā barības piedevas tiek lietoti probiotiķi, prebiotiķi, fermenti, barības paskābinātāji, antioksidanti un dažādas augu piedevas (Ertas et al., 2005; Cross et al., 2007). Prebiotiķi ir barības sastāvdaļa, kas kuņģa-zarnu traktā netiek sagremoti, bet tos savai augšanai un attīstībai izmanto gremošanas traktā noteikta kolonizējoša mikroflora, pozitīvi ietekmējot saimnieka organismu (Gibson, Roberfroid, 1995). Lielākās prebiotiku grupas pārstāvji putnu barības devās ir oligosaharīdi: frukto – oligosaharīdi (Biggs et al., 2007; Li et al., 2008; Yang et al., 2009), gliko – oligosaharīdi un mannān – oligosaharīdi (Roch, 1998; Newman, 1999; Žikić et al., 2008), kuri veicina gremošanas traktā kolonizējošās mikrofloras atsevišķu mikroorganismu pārstāvju vairošanos un sekmē to spēju piemēroties vides apstākļiem

(Yang et al., 2009). Vissvarīgākā ir to antagonistiskā, konkurējošā darbība attiecībā uz patogēnajiem mikroorganismiem, fermentu darbības veicināšana, amonjaka un fenola produktu reducēšana, kā arī kolonizācijas rezistences paaugstināšana. Viens no plašāk lietotajiem prebiotikiem ir inulīns (Dzelzenne et al., 2002; Hajati, Razeaei, 2010), ko satur arī topinambūrs.

Pētījuma uzdevums bija noskaidrot optimālo topinambūra sausā pulvera piedevas devu broileru cāļu ēdināšanā, pētot gremošanas trakta morfofunkcionālo statusu un antimikrobiālā peptīda – defensīna ekspresiju.

## MATERIĀLS UN METODIKA

Izmēģinājumā iekļautie 60 krosa ROSS 308 broileru cāļi tika sadalīti 3 grupās (n=20). Visi putni kā pamatbarību (PB) saņēma vecumam atbilstošu SIA „Rīgas kombinētās lopbarības rūpnīcas” ražoto komerciālo barību. 1. grupa bija kontroles grupa (GK). Izmēģinājuma laikā, no 7. līdz 42. cāļu dzīvības dienai, 2. grupas broileri (G2) papildus saņēma topinambūra sauso koncentrātu 0.5% no PB devas, bet 3. grupa (G3) - 1% no PB devas. Topinambūra sausais koncentrāts (ar inulīna saturu 50% no oligosaharīdiem) iegādāts SIA Herbe (sertifikāts Nr. 157).

Katrā izmēģinājuma grupā pieciem cāļiem 7, 28 un 42 dienu vecumā tika veikta kontrolkaušana gremošanas trakta histoloģisko izmeklējumu veikšanai. Kontrolkaušana atbilda barības maiņas periodam cāļu ātras augšanas un attīstības nodrošinājumam.

**Histoloģiskie izmeklējumi.** Histoloģiskajiem izmeklējumiem paraugi tika ņemti no *duodenum* un *ileum* vidusdaļas. Katrs paraugs pirms ievietošanas fiksatorā skalots ar vāju silta 0,9% NaCl šķīduma strūklu gļotādas atbrīvošanai no lūmena satura. Paraugi fiksēti 10% neitrālā formalīnā, dehidratēti audu procesorā (TISSUE-TEK II), ieslēgti parafīna blokos, izmantojot standartizētu audu histoloģiskās sagatavošanas procedūru (Carson, 1997; Kiernan, 2008). Zarnu audu vispārējai morfoloģiskai izpētei izmantoja plaši lietoto hematoksilīna/eozīna metodi. Attēli iegūti, izmantojot *Image Pro Plus* versiju 6.3.0.512 (Media Cybernetics, Inc.).

**Imūnhistokīmija.** Antimikrobā proteīna klātbūtni gremošanas trakta audos konstatēja ar biotīna–streptavidīna imūnhistokīmiskās metodes palīdzību (Hsu et al., 1981). Paraugus diennakti fiksēja 2% formaldehīda un 0.2% pikrīnskābes 0.1 M fosfātbufera (pH 7.2) maisījumā. Pēc tam audu gabaliņus 12 h skaloja tiroīdbuferī ar 10% saharozi, ieguldīja parafīnā un ar mikrotomu sagatavoja 8 μm plānus griezumus. Nespecifisko antivielu saistīšanai 10 min lietoja serumu (100 ml destilēta H<sub>2</sub>O un 0.03 g vērša sausā seruma) un pēc tam paraugus 2 h inkubēja ar primārajām antivielām β-defensīns 3 (BD3, kods LS-BP86/8279, 1:100, LifeSpan Bioscience).

**Audu paraugu morfometriskā analīze.** Mērītas tika 10 blakus esošās, vertikāli orientētās bārkstiņas un kriptas. Morfometriskajā analīzē tika ietverti bārkstiņu augstuma (no bārkstiņas galotnes līdz kriptas savienojumam), gļotādas un zemgļotādas biezuma (bārkstiņu un *lamina propria*) un kriptu dziļuma (invaginācijas dziļums starp blakus bārkstiņām) mērījuma rezultāti, kas iegūti pēc Bird un līdzautoru (1994) aprakstītās metodikas.

**Statistiskā analīze.** Neparametriskās datu salīdzināšanas metodes - Vilksoksona (Wilcoxon) T kritērija un Mann-Vitneja (Mann-Whitney) U-kritērija testi tika izmantoti izmēģinājuma grupu rezultātu savstarpējai salīdzināšanai ar ticamības līmeni 95% ( $\alpha=0.05$ ) (Sheskin, 2011). Datu apstrāde veikta, izmantojot programmas Microsoft Excel un SPSS 17.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA).

## REZULTĀTI

Izmēģinājuma grupu G2 un G3 28 dienu veciem broileriem, kuriem pamatbarībai tika pievienots prebiotīks - sausais topinambūra pulvera koncentrāts, attiecīgi 0.5% un 1%

koncentrācijā, bārktiņu epitēlijā *duodenum* gļotādā tika konstatēta perēkļveida limfocītu infiltrācija. Četrdesmit divu dienu veciem cāļiem perēkļveida iekaisuma šūnu infiltrāciju *lamina propria* saistaudos vērojām kā *duodenum*, tā *ileum* daļā tikai G3 grupas dzīvniekiem. Kontroles grupas (GK) putniem 42 dienu vecumā konstatējām iekaisuma procesu *ileum* bārktiņu epitēlijā.

Morfometriskajos mērījumos GK grupas broileriem *duodenum* bārktiņu garums mainījās no  $613.4 \pm 30.72 \mu\text{m}$  7 dienu vecumā līdz  $1864 \pm 330.40 \mu\text{m}$  42 dienu vecumā. *Duodenum* bārktiņu garums kontrolgrupā 42 dienu vecumā bija garākas ( $U=15 < U_{0.01;10;10}=19$ ) nekā G2 un G3 grupu dzīvniekiem. Būtiskas atšķirības zarnu bārktiņu garumos 28 un 42 dienu vecumā starp izmēģinājuma grupu (G2 un G3) putniem nenovērojām. Būtiski 42 dienu vecumā G2 un G3 grupu putniem atšķīrās kriptu dziļums ( $U=15 < U_{0.01;10;10}=19$ ). Būtiski *ileum* daļā bārktiņu garums atšķīrās 28 dienu vecumā, salīdzinot to garumu kontroles grupā un izmēģinājumu (G2 un G3) putnu grupās ( $U=0 < U_{0.01;10;10}=19$ ;). Gremošanas trakta *ileum* bārktiņu garums kontroles (GK) grupas putnu mainījās no  $434.69 \pm 102.94 \mu\text{m}$  7 dienu vecumā līdz  $820.13 \pm 81.11 \mu\text{m}$  42 dienu vecumā, G2 grupas putniem - no  $38.95 \pm 6.36 \mu\text{m}$  28 dienu vecumā līdz  $64.16 \pm 10.30 \mu\text{m}$  42 dienu vecumā ( $p=0.027$ ). Būtiska kriptu dziļuma samazināšanās tika atklāta putnu gremošanas trakta *ileum* daļā 42 dienu vecumā izmēģinājuma G2 un G3 grupu putniem ( $U=4 < U_{0.01;10;10}=19$ ).

B-defensīna 3 (BD3) ekspresija gremošanas trakta *duodenum* un *ileum* daļās tika novērota perēkļveidīgi. BD3 ekspresija *duodenum* epitēlijā GK cāļu gremošanas traktā 28.dienā būtiski samazinās, salīdzinot ar 7.dienu (attiecīgi  $2.67 \pm 0.52$  un  $5.33 \pm 1.37$ ;  $p=0.027$ ), taču 42.dzīvības dienā tas ievērojami pieauga (attiecīgi  $10.33 \pm 1.37$  un  $2.67 \pm 0.52$ ;  $p=0.023$ ). Salīdzinot BD3 ekspresiju GK gremošanas trakta *ileum* epitēlijā 7. dienā ( $2.50 \pm 1.38$ ), 28. dienā ( $4.50 \pm 1.52$ ) un 42. dienā ( $5.17 \pm 2.40$ ), tā pieauga (attiecīgi 7. un 28.dienā  $p=0.026$  un 28.un 42. dienā  $p=0.041$ ).

Izmēģinājuma grupās G2 un G3, defensīna ekspresija *duodenum* epitēlijā 28. dzīvības dienā salīdzinot ar 7. dienu būtiski pieauga (attiecīgi G2 grupā  $p=0.028 < \alpha=0.05$ , bet G3 grupā  $p=0.042 < \alpha=0.05$ ), savukārt, 42. dzīvības dienā, salīdzinot ar 28. dienu, abās grupās BD3 ekspresija ievērojami samazinājās (G2 –  $p=0.035 < \alpha=0.05$ , bet G3 -  $p=0.014 < \alpha=0.05$ ). Salīdzinot defensīna ekspresiju gremošanas trakta *ileum* daļas epitēlijā putnu grupā, kas barības piedevā saņēma 0.5% topinambūra pulvera koncentrātu (G2), tā būtiski pieauga 28. dienā salīdzinot ar 7. dienu ( $p=0.035 < \alpha=0.05$ ) un 42. dzīvības dienā, salīdzinot ar 28. dienu ( $p=0.042 < \alpha=0.05$ ). Izvērtējot defensīna ekspresiju gremošanas trakta *ileum* daļas epitēlijā putnu grupā, kas barības piedevā saņēma 1% topinambūra pulvera koncentrātu (G3) 28. dzīvības dienā salīdzinot ar 7. dienu, ekspresija pieauga ievērojami ( $p=0.026$ ), bet 42. dienā - salīdzinot ar 28.dzīvības dienu, strauji samazinājās (attiecīgi  $p=0.035$ ).

## DISKUSIJA

Inulīns kā prebiotīķis broileru ēdināšanā pielietots Latvijā pirmo reizi. Izēdinot topinambūra pulvera koncentrātu 0.5% un 1% lielā koncentrācijā, novērojām gremošanas trakta *duodenum* un *ileum* epitēlijā limfocītu infiltrāciju, tomēr process bija pārejošs, jo putniem 42 dienu vecumā tas vairs netika konstatēts. Saņemot ilgstoši (līdz 42. dzīvības dienai) 1% lielā koncentrācijā sauso topinambūra pulvera koncentrātu piedevu, iekaisums tika konstatēts gremošanas trakta saistaudos kā *duodenum*, tā *ileum* daļā. Kā norāda Bar-Shira un Friedman (2006), limfocītu infiltrācija broilercāļu zarnu epitēlijā un saistaudos (*lamina propria*) notiek pēc zarnu imūnsistēmas saskares ar komensālo mikrofloru un fizioloģiski raksturojas ar nelielu, pārejošu iekaisumu.

Izēdinot topinambūra piedevu, uzsūkšanās virsma zarnās neizmainījās, jo *duodenum* daļas bārkstiņu garums būtiski neatšķīrās starp eksperimentā iekļautiem dzīvniekiem dažādajos kontroles vecumos, taču 0.5% topinambūra piedevas izēdināšana radīja broileriem atsevišķu kriptu dziļuma pieaugumu, kas norāda uz augstām zarnu trakta gļotādas darbības uzturēšanas prasībām, kad dzīvais organisms patērē daudz enerģijas un proteīna (Schneeman, 1982). Īsākas bārkstiņas un dziļākas kriptas liecina par intensīvu gremošanas trakta gļotādas epitēlija maiņu (Miles et al., 2006). Dibner un Rishards (2004) norāda, ka putnu kuņģa zarnu trakta epitēlijs ir augsti specializēti audi ar ļoti intensīvu šūnu maiņu un īsu šūnu dzīves laiku.

Zarnu epitēlija šūnas regulē zarnu imūno atbildi (Hase, Ohno, 2006) un defensīni ir vieni no antimikrobiālo peptīdu lielākajām grupām (Lehrer, Ganz, 1999). Pielietojot sauso topinambūra pulvera koncentrātu devās gan 0.5%, gan 1% no 7. līdz 28. dienai, konstatējām defensīna ekspresijas pieaugumu *duodenum* un *ileum* daļas epitēlijā, kas norāda uz gļotādas virsmas nepietiekamu antimikrobiālās barjeras funkciju (Zilbauer, 2005). Turpinot inulīna izēdināšanu līdz 42.dienai,  $\beta$ -defensīna 3 (BD3) ekspresija samazinājās, kas liecina par gremošanas trakta aizsargfunkciju palielināšanos, jo gremošanas trakta veselos audos BD3 klātbūtni parasti nenovēro (Zilbauer, 2005).

## SECINĀJUMS

Pētījums parādīja, ka labvēlīgāk zarnu homeostāzi nodrošina pamatbarībai pievienotais topinambūra sausais pulveris 0.5% lielā koncentrācijā.

## LITERATŪRA

1. Bar-Shira, E., Friedman, A.: Development and adaptations of innate immunity in the gastrointestinal tract of the newly hatched chick. *Dev. Comp. Immunol.*, 2006; 30:930-941.
2. Biggs, P., Parsons, C.M., Fahey, G.C. Effect of several oligosaharides on growth performance nutrient digestibilities and caecal microbial populations in young chicks. *Poultry Science*, 2007; 86: 2327 – 2336.
3. Bird, A.R., Croom, W.J., Fan, Y.K., Daniel, I.R., Black, B.L., McBride B., W., Eisen, E.J., Bull, L.S., Taylor, I.L. Jejunal glucose absorption enhanced by epidermal growth factor in mice. *J.Nutr.*, 1994; 124:231-240.
4. Carson, F.L., Hladik, Ch. *Histotechnology, A Self-Instructional Text*, 3<sup>rd</sup> Edition, Chicago: ASCP Press, 2009; 404.
5. Cross, D.E., McDevitt, R.M., Hillman, K., Acamovic, T. The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary, digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. *British Poultry Science*, 2007; 48:496-506.
6. Dibner, J.J., Richards, J.D. The digestive system: Challenges and opportunities. *J.Appl.Poult.Res.*, 2004; 13:86-93.
7. Dzelzenne, N.M., Darebioul, C., Neyrinck, A., Lasa, M., Taper, H.S. Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animals: Review of biochemical events and future prospects. *British J. of Nutr.*, 2002; 87 (2): 255-259.
8. Ertas, O.N., Güler, T., Çiftçi, M., Dalkiliç, B., Simsek, Ü.G. The effect of an essential oil mix derived from oregano, clove and anise on broiler performance. *International Journal of Poultry Science*, 2005; 4: 879-884.
9. Gibson, G.R., Roberfroid, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 1995; 125:1401 – 1412.

10. Hajati, H., Razeaei, M. The Application of Prebiotics in Poultry Production. *International Journal of Poultry Science*, 2010; 9 (3):298-304.
11. Hase, K., Ohno, H., Epithelial cells as sentials in mucosal immune barrier. *Japanese Journal of Clinical Immunology*, 2006, 29: 16-26.
12. Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, H. The use 5. of antiavidin antibody and biotin-streptavidin peroxydase complex in immunoperoxidase technics. *American Journal of clinical pathology*, 1981; 75, 6, 816-821.
13. Kiernan J.A. *Histological and histochemical methods*. 4.th ed. Scion Publishing Ltd. 2008; 606.
14. Lehrer, R.I.; Ganz, T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defense. *Curr Opin Immunol*, 1999; 11: 23 – 27.
15. Li, X., Qiang, L., Lin Hu, C.H. Effect of supplementation of fructooligosacchsride and/or *Bacillus subtilis* to diets on performance and on intestinal microflora in broilers. *Archiv für Tierzucht*, 2008; 51,1: 64 -70.
16. Miles, R.D., Butcher, G.D., Henry, P.R., Littell, R.C. Effect of antibiotic growth promoters on broiler performance, intestinal growth parameters, and quantative morphology. *Poultry Sci*, 2006; 85:476-485.
17. Newman, E.K. Feeds with antibiotic growth promoters. The oligosaharide alternative. *Biotechnology responds*. Altech's 1999 European, Middle Eastern and African Lecture Tour, 1999.
18. Roch, C. Effect of BIO-MOS and Flavomycin on commercial broiler performance. In *Biotechnology in the Feed Industry*. Proc.Altech's 14<sup>th</sup> Annual Symposium.(Lyons TP.,ed), Nicholasville Kentucky, Enclosure code, 1998; 52: 163.
19. Schneemann, B.O., Richter, B. D., Jacobs, L. R Response to dietary wheat bran in the exocrine pancreas and intestine of rats. *Journal of Nutrition*, 1982; 112: 283-286.
20. Sheskin, D.J. *Handbook of Parametric and Nonparametric Statistical Procedures*, Fifth Edition. Chapman and Hall/CRC. 2011; 1026.
21. Zilbauer, M., Dorrell, N., Boughan, P.K. et al. Intestinal innate immunity to *Campylobacter jejuni* results in induction of bactericidal humans beta-defensins 2 and 3. *Infection and Immunity*, 2005; 73, 11: 7281-7289.
22. Žikić, D., Perić, L., Ušćebrka, G., Stojanovićs., Milić, D., Nollet, L. Effect of probiotics in broiler breeder and broiler diets on performance and jejunum morphology of broiler chickens. 1<sup>st</sup> Mediterranean Summit WPSA, *Book of Proceedings*, Porto Carras, Greece, 2008; 879 – 882.
23. Yang, Y., Iji, P.A., Chot ,M. Dietary modulation of gut microflora in broiler chicken: a rewier of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. *Worlds Poultry Science Journal*, 2009; 65: 97 – 114.