

# Animal welfare, etológia és tartástechnológia



## Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 5

Issue 4

Különszám

Gödöllő  
2009



## XANTOFILLOK HATÁSA A HUMORÁLIS IMMUNVÁLASZÁRA JAPÁN FÜRJBEN

*Jung Ivett, Szabó Csaba, Kerti Annamária, Migályné Lakner Hajnalka,  
Bárdos László*

SZIE-MKK, Állattudományi Alapok Intézet, Állatélettani és Állat-egészségtani Tanszék  
2103 Gödöllő, Páter Károly u. 1.

[Jung.Ivett@mkk.szie.hu](mailto:Jung.Ivett@mkk.szie.hu)

### Összefoglaló

Kifejlett japán fürj tojókat immunizáltunk kecskevörösvérsejt és bovin serum albumin kombinációjával (100µg/állat/i.m). A kontroll csoportot (C) kereskedelmi tojótáppal takarmányoztuk, a másik csoport (X) ugyanahhoz a takarmányhoz keverve természetes oxikarotinoidokat (1000 ppm Capsantal EBS 40 NT: Tagetes erecta kivonata; aktív anyagok: 40 g/kg sárga xantofill: 0,8 % β-karotin, 1,5 % kriptoxanthin, 82,0 % trans-lutein, 4,0 % trans-zeaxanthin, 11.7 % egyéb karotinoidok) is tartalmazó takarmányt kapott. A vizsgálat 6 hete alatt gyűjtöttük vér és tojás mintákat, valamint elvégeztetést követően a petefészektüszők analíziséhez is mintát vettünk. A minták retinoid és karotinoid spektrumát HPLC analízissel állapítottuk meg, az immunválaszkészséget madár immunglobulin (IgY) titer ELISA-mérésével, valamint HAG-teszttel határoztuk meg. A tojássárgája és a bőr színét CIELab módszerrel értékeltük (Micromatchs™ Sheen Ltd). A xantofill koncentráció folyamatosan nőtt az X csoport vérében, miközben a retinoid koncentráció nem változott. A tojássárgája színintenzitása emelkedett a xantofill kiegészítéssel takarmányozott madarakban, az átlagos színezetnél sötétebb volt ( $p < 0,05$ ) egészen a kísérlet végéig. A bőr színének CIELab értékelése alapján a kontroll csoportban  $L^*$ : 65,8;  $a^*$ : 4,1;  $b^*$ : 26, és a xantofillal kezelt csoportban  $L^*$ : 59,3;  $a^*$ : 7,8;  $b^*$ : 41,7 értékeket mértünk. A  $b^*$  paraméter estében szignifikáns ( $p < 0,05$ ) különbség tapasztalható. A vér IgY és HAG titere emelkedett mindkét csoportban, de az oxikarotinoid kiegészítésben részesült fürjek estében magasabb értékeket kaptunk. A természetes oxikarotinoidok szerepével kapcsolatos jelen kutatások bizonyítják, hogy nemcsak a tojás és a bőr színét színezik, hanem fokozzák az immunválasz készséget is.

**Kulcsszavak:** xantofill, CIELab, IgY, ELISA, japán fürj



## Effects of xanthophylls on humoral immune response of Japanese quails

### Abstract

Adult Japanese quail layers were immunized by combination of goat red blood cell and bovine serum albumin (100 µg/animal/i.m.). The control group (C) was fed with commercial layer food the other group (X) with the same food but supplemented with mixture of natural xanthophylls (1000ppm Capsantal EBS 40 NT: extraction of *Tagetes erecta*; active substances: 40 g/kg yellow xanthophyll: 0.8 % β-carotene, 1.5 % cryptoxanthin, 82.0 % trans-lutein, 4.0 % trans-zeaxanthin, 11.7 % other carotenoids). Blood and egg samples were collected in two weeks intervals for six weeks. The samples were analyzed for retinoid and carotenoid spectrum by HPLC and for the avian immunoglobulin-Y (IgY) titres by ELISA and haemagglutination inhibition test (HAI) as well. The colours of egg yolk and skin were characterized by CIELab values (Micromatchs™ Sheen Ltd). The concentrations of oxycarotenoids were increased continuously in the blood of group X. Between the retinoid concentrations of blood there were no differences. The yolk colour intensity increased in the 2nd w. in xanthophylls fed birds and the average coloration was higher ( $p < 0.05$ ) throughout the experiment. The skin CIELab values were in controls  $L^*$ : 65.8;  $a^*$ : 4.1;  $b^*$ : 26; and in the xanthophylls treated group  $L^*$ : 59.3;  $a^*$ : 7.8;  $b^*$ : 41.7 respectively. The differences were significant ( $p < 0.05$ ) in the case of  $b^*$  values. The blood IgY and HAI titres were raised in both groups and the values were higher of xanthophylls supplemented birds. Recent studies on the roles of natural oxycarotenoids have demonstrated that beside the coloration of egg yolk and skin they enhance immune function as well in Japanese quail.

**Keywords:** xanthophyll, CIELab, IgY, ELISA, Japanese quail

### Bevezető

A karotinoidok mikroorganizmusokban, gombákban és növényekben szintetizálódó közel 600 féle természetes színezőanyag. Közülük általában 20-féle megtalálható az élelmiszerekben és a takarmányokban. Ezek a bizonyítottan antioxidáns tulajdonságú vegyületek segítenek megvédeni az immunrendszert az oxidatív károsodásokkal szemben, ezáltal segítik az immunválaszt (Hughes, 1999), és így növelik a fertőzésekkel szembeni ellenállóképességet (Chandra, 1992).

Az immunválaszt kialakulásának bevezetőjekor az antigént bemutató sejtek a T-limfocitákat serkentik (Unanue and Cerottini, 1989). Az antigén bemutató sejt egyik jellemzője a membránján elhelyezkedő, fő hisztokompatibilitási génkomplex (MHC) molekula kifejeződése. Lehetséges, hogy az a mechanizmus, amivel a karotinoidok, mint helyi citoprotektív anyagok növelik a sejt közvetített



immunválaszt, kihat e molekulák sejt felszíni expressziójára (Hughes et al., 2000). A humorális immunválasz az érett, aktivált B-sejt ellenanyag szekretáló plazmasejtté alakulásától függ. A karotinoidok szerepe a B-sejt mediált folyamatokban még nem tisztázott.

A takarmányozási technológiák főleg a baromfi egyes testrészeinek színezésére használják a karotinoidokat, de ezek az anyagok részt vesznek a szárnyasok metabolizmusában és a szaporodási folyamatokban is. Számos karotinoid az A-vitamin szintézis prekursoraként szolgál (Sklan et al., 1989), és több természetes antioxidánsként viselkedik (Miller et al., 1996), így növelve az immunválaszkésztséget (Sklan et al., 1989). Úgy mint az állatok általában a baromfi sem tudja szintetizálni ezeket a molekulákat, ezért a karotinoidokhoz a táplálékukból kell hozzájutniuk (Perez-Vendrell et al., 2001).

Jelen kísérletben a bársonyvirágból (*Tagetes erecta*) származó xantofill komplex (Capsantal EBS 40 NT) takarmányba történő adagolását követően, mint színező, és mint esetleges immunmoduláns tulajdonságú anyag hatását vizsgáltuk japán fürjekben.

## Anyag és módszer

### *Kísérleti állatok és elrendezés*

Kifejlett japán fürj tojóból (n=10) két csoportot alakítottunk ki. A kontroll csoport egyedeit (K csoport) kereskedelmi tojótáppal takarmányoztuk. A másik csoportot (X csoport) ugyanahhoz a táphoz kevert természetes 1000 ppm xantofill kiegészítést tartalmazó takarmánnyal etettük (Capsantal EBS 40 NT, Copharm; hatóanyaga 40g/kg xantofill, aminek 82 %-a lutein). A madarak itatása és takarmányozása *ad libitum* történt a 6 hétig taró kísérlet alatt.

### *Antigén*

Tisztított kecske vörösvérsejt (gRBC) élettani sóoldattal készített 5%-os szuszpenziójához 1:125 000 hígítású csersavat adtunk. Az így kapott elegybe annyi BSA-t oldottunk, hogy 100 µg/állat koncentrációt érjünk el.

### *Immunizálás*

A kecske vörösvérsejt és BSA kombinációjával mellizomba (i.m.) oltva immunizáltuk a fürjeket a kísérlet kezdetekor és a 4. héten.

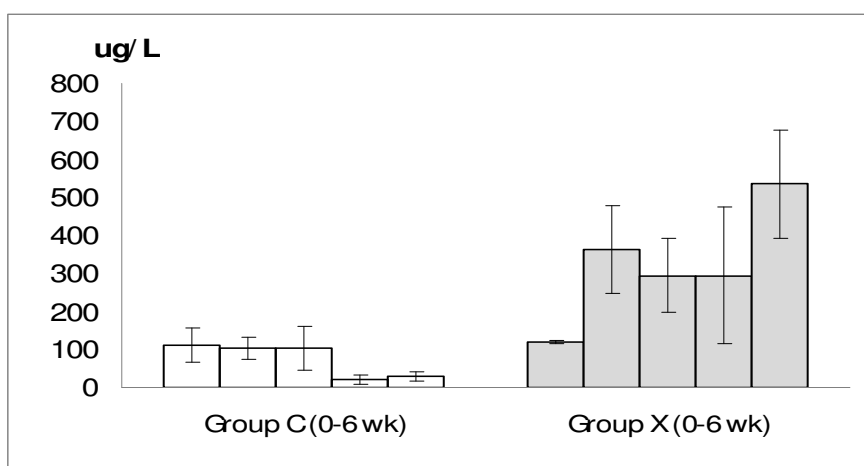
### Analitikai módszerek

A vér retinoid és karotinoid koncentrációját reverz fázisú izokratikus HPLC módszerrel mértük (Kerti és Bárdos, 2006). A keringésben lévő madár immunglobulint (IgY) ELISA módszerrel analizáltuk (Losonczy et al., 1999). Hemagglutinációs próbát mikromódszerrel végeztük el (Allan and Gough, 1974) 10 % (w/v) PBS oldatban, mivel madarak esetében minimum 8% feletti sókoncentráció esetében jön létre a teljes precipitáció (Goodman et al., 1951). A tojások színét YolK Colour Fan-nel (YCF) hasonlítottuk össze. A bőrfelszín színének értékelését kolorimetriás módszerrel a CIELab skálához viszonyító kézi reflexiós célfotométerrel határoztuk meg (Micromatch™ Plus, Sheen Ltd., United Kingdom).

### Eredmények és megbeszélés

A xantofill színezékek az állati szövetek festékanyagának tekinthetők. A karotinoidok esetében gyakorta használt pigment és a festékanyag között jellemző különbség van. A pigmentek organikus, vagy nem organikus színyanyagok, melyek gyakorlatilag oldhatatlanok a szöveti közegben, amiben eloszanak. Ezeknek részecskéik vannak, melyek a közeg színét eredményezik. A festékek viszont feloldódva oszlanak el a közegben, tehát részecskéik nem láthatók.

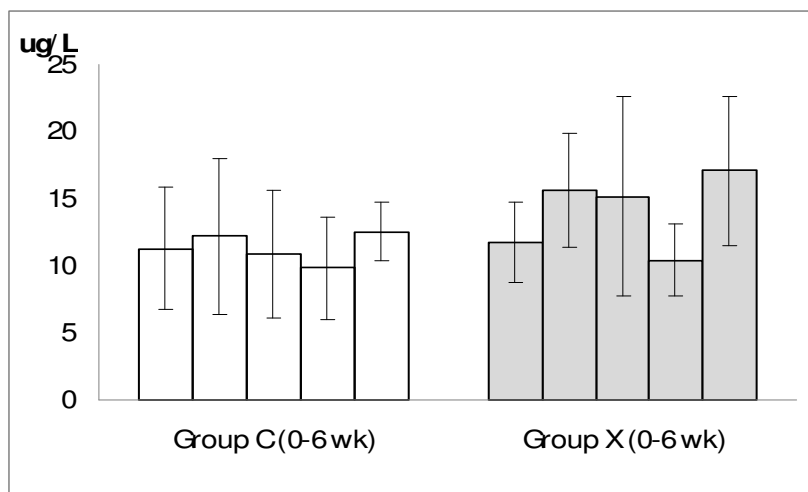
A xantofill (oxikarotinoid) adalék (Capsantal, Copharm) legfőbb komponense a lutein. A lutein koncentráció, a japán fürj szérumában folyamatosan növekedett a X csoportban (1. ábra).



**1. ábra: A vér lutein koncentrációja a japán fürjek szérumában**

*Fig. 1: Lutein concentration in the blood of Japanese quails*

A vér retinoid koncentrációja nem mutat különbséget a két csoport között (2. ábra). Ez jelzi, hogy a xantofilloknak nincs A-provitamin aktivitásuk, mert a terminális gyűrűjükben oxocsoport (substituens) helyezkedik el. A  $\beta$ -jonon gyűrűs szerkezet a retinoidok, így az A-provitamin karotinoidok esetében is esszenciális.



**2. ábra: A vér retinol koncentrációja japán fürjek szérumban**

*Fig. 2: Retinol concentration in the blood of Japanese quails*

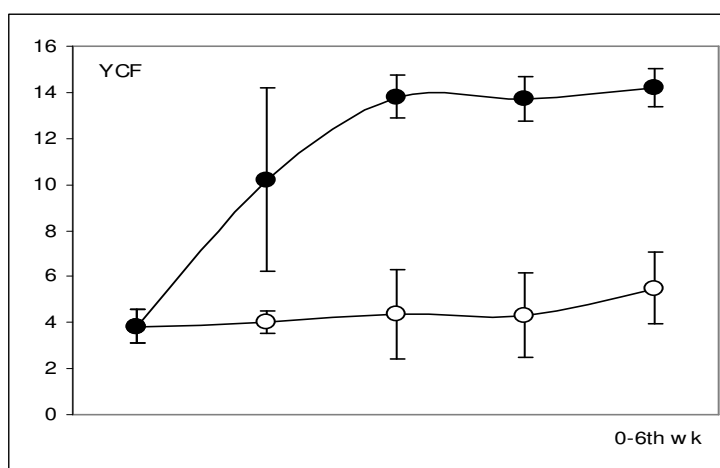
A kísérlet végén a madarakat *lege artis* elvégeztettük. A bőrt a mellrészről lenyúztuk. A bőrszín intenzitását a bőr belső, sík felületén mértük (1. táblázat). Perez-Vendrell és mtsai (2001) szerint a CIELab b\* koordinátája a mellrész bőrén mérve jó indikátora a takarmányban lévő a xantofill jelenlétének, míg az a\* koordináta a lábszáron mérve egyenes arányban áll a takarmány cantaxantin mennyiségével. A bársonyvirágban található xantofillok közül a cantaxantin nem található. Kísérletünkben szignifikáns különbséget találtunk a b\* értékek között.

**1. táblázat: A bőr belső felületének CIELab értékei (x±s)**

	L	a*	b*
K csoport	65,8±0,9	4,0±3,5	25,9±8,7
X csoport	59,3±3,1	7,8±1,9	41,7±6,7
p<	0,01	0,08	0,01

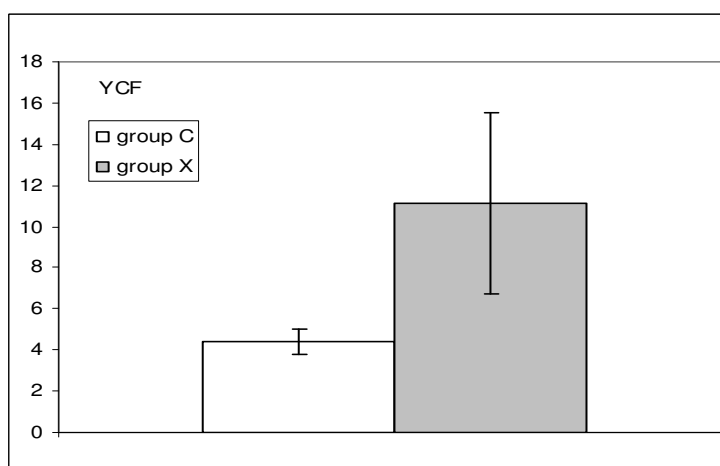
*Table 1: CIELab values of inner skin surface (x±s)*

A tojássárgájának YCF-nel mért színintenzitása már a második hétre fokozódott a xantofill kiegészítésben részesülő madarakban (3. ábra) és az átlagos színértékek magasabbak (p<0.05) a kísérlet teljes ideje alatt (4. ábra). Mindezen eredmények azt jelzik, hogy az alkalmazott természetes xantofill származék jól abszorbeálódik, metabolizálódik és deponálódik a szervezetben (tojás, bőralatti zsír) a japán fürjekben.



**3. ábra: A tojás színének összehasonlítása a K (o) és az X (●) csoportban.**

Fig. 3: Comparison of yolk colour between group K (o) and group X (●)



**4. ábra: A tojások színe közti különbség a kísérlet ideje alatt**

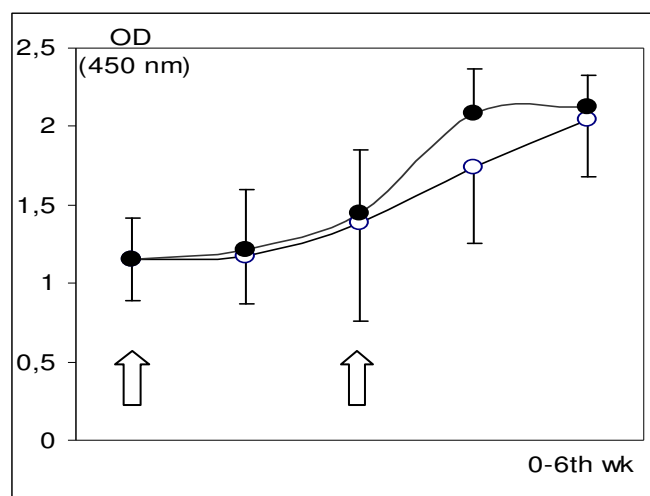
Fig. 4: Differences of yolk colour through the experiment

Toyoda és mtsai (2002) hasonló eredményt kaptak madár szérumban, májban, zsírban és retinában is. Tehát ez a festék intenzív színezőanyagként viselkedik. Karotinoidok közül leginkább a xantofilok a madarak természetes színezőanyagai. Színező hatásuk eredménye a tojás, a bőr, a toll, a csőr és a lábszár jellegzetes színe függ a madár táplálékának tényleges karotinoid tartalmától. A szín részben koncentráció függően a világossárgától egészen a narancsvörösig terjedhet.

A tyúkok tojása átlagosan 0,3 – 0,5 mg total xantofillt tartalmaz, amiből több mint a fele lutein. Mint a legtöbb zsír és zsírban oldódó vegyület, a tojás összetétele érzékeny a tojó takarmány zsírjainak összetételére (Leeson and Caston, 2004).

A vér IgY és HAG titere megnövekedett mindkét csoportban. Az IgY átlag titere a vérben magasabb volt az X csoportban, mint a K csoportban. A legnagyobb különbség a második immunizálás

(booster) antigén-komplex bejuttatását követően volt mérhető (5. ábra). Hasonló tendenciát a HAG-próba nem mutatott.



**5.ábra: Szérum IgY titere a kontroll (K csoport, o) és a xantofill kiegészítést kapó (X csoport, ●) japán fürjekben**

*Fig. 5: Serum titers of IgY in control (group K, o) and xanthophyll supplemented (group X, ●) Japanese quails*

A lutein tehát nemcsak színező (bőr, tojássárgája) de fontos élettani hatása is van. Védi a sejteket és a szöveteket az oxidatív károsodástól (Miller et al., 1996; Ribaya-Mercado et al. 2004) és stimulálja az immunrendszert is. Kimutatták, hogy a xantofilloknak immunmoduláns és a rákos sejtek proliferációt mérséklő hatása van emberekben (Ribaya-Mercado et al., 2004). A szérum IgG titer karakterisztikus emelkedését mutatták ki macskáknak (Hong et al., 2000a) és kutyákban is (Hong et al., 2000b) lutein kiegészítéses étrend alkalmazása mellett.

Kevin és mtsai. (2004) lutein és zeaxantin kiegészítésben részesített hím zebra-pintyekben a fitohemagglutinin (PHA) fokozódó sejtmediált immunválaszt találtak.

Kísérletünkben mi is mérsékelt növekedését tapasztaltuk a humorális immunválaszban, a xantofill kiegészítésben részesülő japán fürjek vérében, mivel vörösvérsejt-BSA-antigén komplexszel szemben nagyobb IgY és HAG értékeket mértünk.

## Következtetés

Jelen vizsgálatok bebizonyították, hogy a bársonyvirágból származó oxikarotinoidok többségét adó lutein a tojás sárgájának és a bőrszínének sárgára színezése mellett, fokozhatja az immunválaszképességet japán fürjben.





## Irodalomjegyzék

- Allan, W. H., Gough, R. E. (1974): A standard haemagglutination inhibition test for Newcastle disease. A comparison of macro and micro methods. *Vet Rec.*, 95.120-123.
- Chandra, R. K. (1992): Effect of vitamin and trace element supplementation on immune responses and infection in elderly subjects. *Lancet* 340. 1124–1127.
- Goodman, M., Wolfe, H. R. , Norton, D. (1951): Precipitin Production in Chickens. VI. The effect of varying concentrations of NaCl on precipitate formation. *J. Immunol.*, 66. 225-236.
- Hong, W. K., Chew, B. P., Wong, T. S., Park, J. S., Weng, B. B. C., Byrne K. M., Hayek, M. G. , Reinhart, G. A. (2000a): Modulation of humoral and cell-mediated immune responses by dietary lutein in cats. *Vet. Immunol. Immunopath.*, 73. 331-341.
- Hong, W. K., Chew, B. P., Wong, T. S., Park, J. S., Weng, B. B. C., Byrne K. M., Hayek, M. G., Reinhart, G. A. (2000b): Dietary lutein stimulates immune response in the canine. *Vet. Immunol. Immunopath.*, 74. 315-327.
- Hughes, D. A. (1999): Effects of dietary antioxidants on the immune function of middle - aged adults. *Proc. Nutr. Soc.*, 58.79–84.
- Hughes, D.A., Wright, A. J. A., Finglas, P. M., Polley, A. C.J., Bailey, A. L., Astley, S. B. ,Southon, S. (2000): Effects of lycopene and lutein supplementation on the expression of functionally associated surface molecules on blood monocytes from healthy male nonsmokers. *J. Infect. Diseases* 182, 2000. S11–S15.
- Kerti, A., Bárdos, L. (2006): Simultaneous determination of retinoids (retinol, retinyl-palmitate) carotenoids (lutein, zeaxanthin,  $\beta$ -crypoxanthin, lycopene,  $\beta$ -carotene) and vitamin E by RP-HPLC. *Clin. Exper.Lab.Med.*, 32. 106.
- Kevin J., McGraw K. J., Ardia D. R. (2004): Immunoregulatory activity of different dietary carotenoids in male zebra finches. *Chemoecology*, 14. 25-29.
- Leeson, S., Caston, L. (2004): Enrichment of eggs with lutein. *Poultry Sci.*, 83, 2004.1709–1712.
- Losonczy, S., Szabó, Cs., Kiss, Zs., Bárdos, L. (1999): Application of an anti-HQIgY antibody for the measurement of IgY concentration of hen's and quail's serum and yolk. *Acta Physiol. Hung.*, 86. 253-258.
- Miller, N. J., Sampson, J., Candeias, L. P., Bramley, P. M., Rice-Evans. C. A. (1996): Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett.*, 384. 240-242
- Park, J. S., Chew, B.P., Wong, T. S. (1998): Dietary lutein absorption from Marigold extract is rapid in BALB/c mice. *J. Nutrition* 128. 1802-1806.



- Perez-Vendrell, A. M., Hernandez, M., Llaurodo, L., Schierle, J., J Brufau, J. (2001): Influence of source and ratio of xanthophyll pigments on broiler chicken pigmentation and performance. *Poultry Sci.*, 80. 320-326.
- Ribaya-Mercado, J. D., Blumberg, J. B. (2004): Lutein and zeaxanthin and their potential roles in disease prevention. *J. Am. Coll Nutr.*, 23. 567–587.
- Sklan, D., Yosefov, T., Friedman, A. (1989): The effects of vitamin A,  $\beta$ -carotene and canthaxanthin on vitamin A metabolism and immune responses in the chick. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 59. 245–249.
- Toyoda, Y., Thomson, L. R., Langner, A., Craft, N. E., Garnett, K. M., Nichols, C. R., Kimberly M., Cheng, K. M., Dorey C. K. (2002): Effect of dietary zeaxanthin on tissue distribution of zeaxanthin and lutein in quail. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.*, 43, 2002.1210-1221.
- Unanue, E. R., Cerottini, J. C. (1989): Antigen presentation. *FASEB J.*, 3. 2496–2502.