



**SZENT ISTVÁN EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG- ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR**

**IMMUNGLOBULIN (IGY) ÉS INDUKTÍV VITAMINJAINAK (A-, E-VITAMIN,
KAROTINOIDOK) SZIKBE ÉPÜLÉSÉNEK DINAMIKÁJA**

Doktori (PhD) értekezés

Jung Ivett

**Gödöllő
2015**

A doktori iskola

megnevezése: ÁLLATTENYÉSZTÉS-TUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

tudományága: Állattenyésztés-tudomány

Vezetője: Dr. Mézes Miklós

egyetemi tanár, az MTA levelező tagja

Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,

Állattudományi Alapok Intézet, Takarmányozástani Tanszék

Témavezető: Dr. Bárdos László

professor emeritus, az állatorvos-tudomány kandidátusa

Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,

Állattudományi Alapok Intézet, Állatélettani és Állat-egészségtani Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS, A TÉMA AKTUALITÁSA, JELENTŐSÉGE	6
2. A KUTATÁS IRODALMI HÁTTERE	8
2.1. A tojásszík	8
2.2. A karotinoid transzport, a zsírmétabolizmus és a tojásképződés kapcsolata	10
2.3. Karotinoidok	11
2.4. E-vitamin (tokoferol)	14
2.5. Karotinoidok (β -karotin, lutein, likopin) és E-vitamin a madarak szervezetében és a tojásban	15
2.6. Karotinoid és E vitamin kölcsönhatás	18
2.7. Szikimmunitás	19
2.8. Karotinoidok és az E-vitamin (kölcsön)hatása a madarak immunválaszára	24
2.9. Karotinoidok és az E-vitamin hatása a szikimmunitásra	27
3. A VIZSGÁLATOK CÉLJA, CÉLKITŰZÉSEK	30
4. ANYAG ÉS MÓDSZER	32
4.1. Kísérleti állatok	32
4.2. Vizsgálatok	32
4.2.1 Az IgY transzport vizsgálata: alapállapot felvételezése kereskedelmi takarmányok etetésével (1. kísérlet)	32
4.2.2 Karotinoid kiegészítés hatásának vizsgálata az IgY transzportra	34
4.3. Alkalmazott keltetéstechnológia	36
4.4. Alkalmazott analitikai módszerek	36
4.4.1. A specifikus IgY vizsgálata	36
4.4.2. Karotinoidok, retinoidok és tokoferol vizsgálata	37
4.4.3. A tojás és a bőrfelszín vizsgálata CIELab módszer	38
4.5. Alkalmazott statisztikai módszerek	38
5. EREDMÉNYEK	39
5.1. Az IgY transzport vizsgálata: alapállapot felvételezése kereskedelmi takarmányok etetése mellett (1. kísérlet)	39
5.1.1. A tüszők fejlődése alatt végzett vizsgálatok japán fürjben	39
5.1.2. Keltetett tyúktojásban lévő embrió és napos csibében történő vizsgálatok	43

5.2. Xantofill kiegészítés hatásának vizsgálata (2. kísérlet)	48
5.3. Karotinoid-mentes takarmányhoz adagolt likopin, lutein β -karotin és A-vitamin kiegészítés hatásának vizsgálata (3. kísérlet)	57
6. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK	69
6.1. Az IgY transzport vizsgálata: alapállapot felvételezése kereskedelmi takarmányok etetése mellett (1. kísérlet).....	69
6.1.1. kísérlet: A tüszők fejlődése alatt végzett vizsgálatok japán fürjben	69
6.1.2. Keltetett tyúktojásban lévő embrió és napos csibében történő vizsgálatok	70
6.2. Karotinoid kiegészítés hatásának vizsgálata az IgY transzportra.....	71
6.2.1. Xantofill kiegészítés hatásának vizsgálata (2. kísérlet)	71
6.2.2. Karotinoid-mentes takarmányhoz adagolt likopin, lutein β -karotin és A-vitamin kiegészítés hatásának vizsgálata (3. kísérlet).....	72
7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	75
8. ÖSSZEFOGLALÓ	76
MELLÉKLETEK	78
M1. Irodalomjegyzék	78
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK.....	89
Tudományos közlemények folyóiratban	89
Hazai konferenciák	89
Nemzetközi konferenciák	90
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	91

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AMD	időskori makula-degeneráció (age related macular degeneration)
BC	béta-karotin
BCDO	β -karotin-15,15'-dioxigenáz
BSA	szarvasmarha szérum albumin (bovine serum albumin)
CIELab	A CIE (Commission Internationale de la Éclairgie) szervezet által kialakított, a fényességet (luminozitást; L) ill. vörös-zöld (a) és a sárga-kék (b) tartományokat elkülönítő színrendszer.
Ch	koleszterin
ChE	koleszterin-észter
CRABP	celluláris retinsavkötő fehérje (cellular retinoic acid-binding protein)
CRBP	celluláris retinolkötő fehérje (cellular retinol-binding protein)
ELISA	enzimhez kötött ellenanyag-vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay)
FFA	szabad zsírsav (free fatty acid)
FSH	folliculus-stimuláló hormon
GH	növekedési hormon
HDL	nagy sűrűségű lipoprotein
HPLC	nagyérzékenységű/nyomású folyadékkromatográfia (high pressure/performance liquid chromatography)
Ig	immunglobulin
IgY	a madarakra jellemző immunglobulin frakció
LDL	kis sűrűségű lipoprotein
LI	likopin
LU	lutein
MDA	malondialdehid
NEFA	nem észterifikált zsírsav (non-esterified fatty acid)
NRC	National Research Council
OPD	o-phenylenediamine dihydrochloride (ELISA kromogén szubsztrát)
PUFA	többszörösen telítetlen zsírsav (poly-unsaturated fatty acid)
RAL	retinal
RAR	retinsav receptor (retinoid acid receptor)
RBP	retinol kötőfehérje (retinol binding protein)
ROL	retinol (A-vitamin alkohol)
RP	retinil-palmitát (A-vitamin palmitinsavas észtere)

rpHPLC	fordított fázisú (revers phase) HPLC
STH	szomatotrop hormon
TAP	tokoferol asszociált protein
T ₃ R	tırjódıtironin receptor
TF	tokoferol (E-vitamin)
T ₄	tiroxin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (ELISA kromogén szubsztrát)
TTR	tiroxinkötő fehérje (transthyretin)
VLDL	nagyon kis sűrűségű lipoprotein
VLDLy	a tojásképződés időszakában szekretálódó nagyon kissűrűségű lipoprotein
YCF	yolok colour fan – a sárga szín árnyalatait tartalmazó 1-14-ig terjedő legyező

1. BEVEZETÉS, A TÉMA AKTUALITÁSA, JELENTŐSÉGE

A tojással szaporodó állatok esetében az anyag, energia és információ anya-utód transzportja a sokszikú petesejt és burkainak kialakulása igen rövid idő alatt történik meg. Tojótyúk esetében a szik (sárgája) képződés (feltöltődés) néhány nap. Az ovulációkor levált szik burkainak (fehérje, héjhártya, méshéj) kialakulása kicsivel több, mint 24 óra. Ezalatt annyi anyag, energia és információ átadás és tárolás történik, amennyi elegendő az *in ovo* fejlődés (ez tojótyúkban 21 nap, japán fűrjben 16-18 nap), sőt bizonyos anyagok esetében első *postnatalis* napok igényének a fedezéséhez is.

Különösen fontosak ezek a tényezők az ún. szikimmunitást adó immunglobulinoknál, aminek fő frakcióját az emlősökétől részben eltérő szerkezete és funkciója miatt megkülönböztetésül IgY-nak nevezik és nemcsak az embrionális, de a korai posztembrionális fejlődés, az egész további élet során fontos funkciókat betöltő vizsgálandó vitaminok esetében. Ilyenek pl. A-vitamin család tagjai a retinoidok, amelyek a differenciálódás, hámos épen tartása, az ellenálló képesség fenntartása szempontjából, az E-vitamin hatású tokoferolok, amik az antioxidáns védelem, a membrán stabilitás biztosításának tényezői és a karotinoidok közül is több vegyület, amelyek egyrészt provitamin tulajdonságúak (β -jonon gyűrűsek), másrészt szerkezetükből fakadóan antioxidáns tulajdonságúak.

A tojómadarakban a tüszőérést, akárcsak emlősben az agyalapi mirigy tüszőérést serkentő hormonja (FSH) indítja be. Az egyetlen (baloldali) petefészkek igen apró ősi tüszői az ivarérettséget követően, ill. a szaporodási időszakokban bizonyos egymásutániságot mutató módon növekedésnek indulnak. Ez részben a tüsző falának rétegeiben történő sejtosztódással jár. A madarak tüszőjében nem alakul ki folyadékkal telt üreg, mint az emlősök esetében. Ezzel szemben a számfelező osztódáson átesett petesejt (*oocyta*) mellé az ún. szikanyag összetett

lipoproteinjei raktározódnak be. Így alakul ki a tojássárgája. A sárga színét karotinoidok, főleg az oxikarotinoidok (lutein, zeaxantin) eredményezik. Mennyiségüktől függően szabad szemmel is eltérő intenzitású lehet a sárgája színe. Ezeknek a festékeknek a megjelenése a tüszőfejlődésben jól elkülöníthető kis fehér, illetve kis sárga tüsző állapotokban nyilvánulnak meg.

Természetesen a karotinoid és egyéb lipoidok beépülésének a folyamata alapvetően függ a takarmányozástól. Ez főleg azokra a lipoidokra érvényes, amelyek nem a madár zsírsavcseréjének a folyamataiban alakulnak ki. Ilyenek a karotinoidok, részben az A-, és E-vitamin is. Az A-vitamin hatású retinoidokra ez csak részben érvényes, hiszen a β -jonon gyűrűs karotinoidokból ez a szervezetben is kialakulhat, de ez ismételten a karotinoid ellátottság szerepére hívja fel a figyelmet.

A másik fontos tényező, ami nem hagyható figyelmen kívül, hogy a tojásba kerülő anyagok a tojás részeinek kialakulása alatt juthatnak be csak a tojásba. Így a sárgája anyagai, tüszőérés kezdetétől az ovulációig eltelt idő alatt, ami nem több mint 15-17 nap. A másik nagy mennyiségű anyag a tojásfehérje a magnumban eltöltött kb. 3 óra alatt képződik. Tehát a fejlődés alatt mindenhol limitált idő áll a tojó rendelkezésére, hogy az utódja számára az embrionális fejlődés anyag energia igényét biztosítsa. Vannak olyan anyagok is a tojásban, amelyek nemcsak az embrionális időszakban *in ovo* fontosak, de a kikelést követő időszakban van a csibének szüksége rájuk. Ezek közé tartoznak az általam vizsgált immunglobulinok, karotinoidok és egyéb zsírban oldódó, ún. induktív vitaminok (A-, E-) is.

2. A KUTATÁS IRODALMI HÁTTERE

2.1. A tojásszik

A tojássárgája, más néven szik, a madár petefészkeben alakul ki, a tojást alkotó többi alkotóelem a petevezetőben adódik hozzá.

A legtöbb madár szervezetében csak a bal oldali petefészkek található meg, a jobb oldali az embrionális fejlődés során elsorvad. Néhány sólyomalkatú fajban és a barna kiviben mindkét oldali petefészkek és petevezető funkcionál (Kinsky 1971). A petefészket kezdetben apró gombostűfejnyi tüszők alkotják, majd az ivaréérés során kb. 11 nappal az első tojás lerakása előtt működésbe lépnek az ivari hormonok. Az FSH hatására növekedni kezdenek a tüszők. Az aktivizálódó petefészkek ösztrogént, progeszteront és tesztoszteront kezd el termelni. Ekkorra a petefészket különböző méretű tüszők alkotják. A vérplazmában megnövekedett ösztrogén hatására a májban megkezdődik egy specifikus lipoprotein a foszfovitellin szintézise, ami a tüszők anyagának alapját adja. Megváltozik a petevezető mérete is, az adott szakaszai alkalmassá válnak a tojásfehérje (*magnum*), a héjhártyák (*ishmus*) valamint a tojáshéjat alkotó kalcium-karbonát (*uterus*) termelésére. A tüszők folyamatosan érnek, érésükhöz kb. 11 napra van szükség. Az éretlen tüszők kezdetben aprók, fehér színűek. Az érés során a tüszőben lévő pete növekedni kezd, s a lipid, illetve lipidoldható anyagok – a xantofill karotinoidok - beépülésének köszönhetően sárga színűvé válik. A 6 mm-es átmérőt elérve felgyorsul a kezdeti lassú növekedés, s átmérőjében naponta 4 mm-t is gyarapodhat egy-egy tüsző (Etches 1996., Bogenfurst 2004).

A tojást alkotó anyagok fokozatosan használódnak fel az embrió testének felépítésére. A szikfelhasználás üteme az inkubáció ideje alatt az embrió növekedési erélyének megfelelően növekvő, s az utolsó 5 napban ez tovább fokozódik, azonban a szik 25-35%-a felhasználatlan marad, s a kikelő csibe testébe záródik. A tojásban található anyagok megoszlását az 1. táblázat mutatja be.

1. táblázat: A tojás összetétele baromfi fajok szerint

%	Víz	SzA	Fehérje	Zsír	NMx	Hamu
Házityúk	72,5	27,5	13,3	11,6	1,5	1,1
Pulyka	72,6	27,4	13,2	11,7	1,7	0,8
Gyöngytyúk	72,8	27,2	13,5	12,0	0,8	0,9
Kacsa	70,1	29,9	13,0	14,5	1,4	1,0
Lúd	70,4	29,6	13,9	13,3	1,3	1,1
Japán fürj	74,0	26,0	12,5	10,8	1,7	1,0
átlag:	72,07	27,93	13,23	12,32	1,40	0,98
szórás (+/-)	1,38	1,38	0,43	1,23	0,31	0,11

(Bárdos 2015)

A keltetés első hetében a szénhidrát vegyületek felhasználása történik, majd azt követően a máj glikogén raktárat hoz létre. A keltetés 10. napjáig nő a tojás teljes szénhidrát tartalma, ami jelzi az intenzív glikoneogenetikus történéseket. Ez a keltetés végéig egyenletesen használódik fel. A protein (csaknem azonos mennyiségben oszlik meg a szikben és a tojásfehérjében) felhasználása a keltetés 7-9. napján kezd előtérbe kerülni. Az aminosavak mennyisége a szikben és a fehérjében csökkenni kezd, s az embrióban ezzel szemben a keltetés utolsó 5 napjában növekedik. A keltetés első felében kevés zsírt használ fel az embrió fejlődése során. A 11. naptól kezdődően azonban a zsírfelhasználás felgyorsul. A zsíralkotórészek kb. 28%-a beépül az embrió szöveteibe, kb. 40,5 % elég, és a kb. 31,5 % a sziktömlőben marad, ami a kelést követő első napokban kerül felhasználásra (Bogenfürst 2004).

A tojás egyes összetevői takarmányozás által módosíthatóak, így például a lipoidok, zsírolható vitaminok, mikroelemek, speciális fehérjék és az immunglobulin (IgY) (Bárdos és mtsai. 2011).

A tojásszínét a tyúk faj, illetve fajtája mellett nagyban befolyásolja a felvett táplálék is. A táplálékban található xantofill és származékai határozzák meg a tojássárgája színét. Oxikarotinoidok etetésével pl. kukoricaglutén liszt, lucernaliszt, kukorica, algaliszt, illetve szintetikus oxikarotinok, karotenalok, a madarak takarmányába keverésével elegendő mennyiségű színezőanyag épülhet be a szikbe, így alakítva ki a tojás sárgájának világossárgától egészen a pirosas narancsig terjedő színét.

2.2. A karotinoid transzport, a zsírmetabolizmus és a tojásképződés kapcsolata

A karotinoidokat gyakorta pigment anyagokként említik. A pigmentek nem oldódnak a közegben, hanem attól elkülönült részekben halmozódnak fel. Tehát a tojásban lévő karotinoidok sem tekinthetők annak, hiszen azokban a karotinoidok egyenletesen oldódnak fel, egyrészt a transzport lipoprotein részecskében, másrészt a szöveti tárolás helyén, a lipoidokban (Gregosits és mtsai. 2009).

A karotinoidok a lipoproteinek által transzportálódnak a vérben. A madarak bélbolyhaiban nincsenek központi nyirokerek, így a lipidek felszívódása, majd transzport folyamatai is eltérnek az emlősökben lejátszódó folyamatoktól. A lipoid transzportjában a felszívódásból származó lipoprotein komplexet, mivel azok közvetlenül a portalis keringésbe jutnak portomikronoknak nevezik. Ezek metabolizálódnak majd elsődlegesen a májban. Az egyre kevesebb lipid, ezáltal több fehérje részt tartalmazó lipoproteinek: a nagyon kis sűrűségű lipoprotein (very-low-density lipoprotein VLDL), a kis sűrűségű lipoprotein (low-density lipoprotein LDL) majd a nagy sűrűségű lipoprotein (high-density lipoprotein, HDL). A szabad zsírsavak az albuminhoz kapcsolódó részt, a nem észterifikált / szabad zsírsavak (non-esterified fatty acid, NEFA, free fatty acid, FFA) frakcióját adják.

A portomikron-frakció a *v. portae*-n keresztül a májba jut. Azt a szerv kiszűri és a komponensek átrendeződnek. A felszívódásból származók mellé beépülnek a *de novo* szintetizált lipidek és apoprotein elemek is. Az így kialakult VLDL jut vissza a keringésbe. Az apoprotein receptort viselő perifériás szövetekben (izom és zsírszövet) a VLDL a triglicerid-tartalmának jelentős részét leadja, mivel ezen a szövetek kapillárisainak falában nagy a lipoprotein-lipáz aktivitás is. A lipoprotein-lipáz aktivitás tápanyagfelvételt követően a zsírszövetben igen nagy. Éhezés során viszont szinte csak az izomban aktív az enzim. Ilyenkor az ún. hormon - glukagon, STH/GH és az adrenalin - szenzitív lipáz hidrolizálja a raktározott zsírt, ezáltal nő a vér albuminhoz kötött FFA-tartalma. A triglicerid tartalom csökkenése miatt a lipoprotein-komplex sűrűsége csökken, vagyis kialakul belőle az LDL, ami viszont koleszterinben (Ch) és annak észtereiben (ChE) dús. Más perifériás szövetek LDL receptoruk révén megkötik a lipoproteint, amiből átjut beléjük a Ch, így kialakul a HDL, amit ismét a májszövet képes metabolizálni (Klasing 1998).

A tojásképződési időszakban a szexuáliszteroidok (ösztrogének, progeszteron) által szabályozott ütemben képződnek a májban azok az összetevők (lipidek, fehérjék), amelyek a véráram útján majd a folliculusba jutnak. Ebben az időszakban a májbeli lipoprotein szintézis mértéke nagyobb, mint a leadás. A máj ilyenkor átmeneti élettani elzsírosodás állapotában van: tömege és zsírtartalma nő, színe a jellegzetes barnászörösről sárgásbarnára változik.

A májban ilyenkor speciális VLDL frakcióba [VLDLy; y=yolk (angol)] épülnek a lipidek (triglicerid, foszfolipid) és a lipoproteinek. A VLDLy kisebb (25-30 nm), mint az egyébként szintetizált lipoprotein, ami 50-60 nm-es. A VLDLy csak ilyenkor jellemző II-apoproteint is visel a felszínén. Ezáltal az izom- és a zsírszövet lipoprotein-lipáza számára már szubsztrátként nem felel meg. A follikulusok granulóza rétegén viszont átjuthat és ezáltal az oolemma apoprotein receptorához képes kapcsolódni. Ezután következik be az endocitózis, azaz a szikbe ágyazódás. A granulózasejtek alaphártyája kiszűri a táplálékból származó lipideket, azaz a portomikronokat. A májbeli reszintézis és acil-transzferáz aktivitás miatt - főleg a PUFA esetében - a táplálék lipidösszetétele a szik (tojássárgája) zsírsavösszetételében szintén tükröződik. Az ovárium sem képes a májból ürülő VLDLy teljes mennyiségének a kiszűrésére (ovarialis clearance) ezért, valamint a folyamatos májbeli szintézis miatt a tojómadár vérére a kifejezett lipaemia a jellemző (Walzem et al 1999).

2.3. Karotinoidok

A karotinoidok a legelterjedtebb természetesen előforduló növényi festékanyagok, amelyek igen sok mikroorganizmusban (baktériumban), gombában, valamint gyümölcsben és zöldségfélében jelen vannak. Egy adott karotinoid színét a szénhidrogén-láncon található konjugált kettős kötések száma határozza meg, ami az abszorpciós fény spektrumát határozza meg. Ez az esetek többségében 400-500 nm hullámhossz sávba esik (Armstrong 1997, Rodriguez-Amaya 2001). A madarak esetében a bőr, szaruképletek és nem utolsósorban a tojóssárgája színezésében a karotinoidok a jellemzők¹.

A karotinoidoknak két csoportja ismert, a karotinok és xantofilok más néven oxikarotinoidok. A xantofilok terminális ciklohexán gyűrűjén található alkohol-, észter- és ketocsoportok elhelyezkedése, a szénlánc kettőskötései mellett lényegesen befolyásolja az adott xantofill színét. Proteinhez kötődésükkor különböző színárnyalatok jöhetnek létre (Rodriguez-Amaya 2001).

Egyes karotinoidok A-vitamin prekursoraként ismertek, természetben előforduló karotinoidok közül, csak a β -jonon gyűrűvel rendelkezőknek van provitamin aktivitása. A β -jonon gyűrűt tartalmazó karotinoidok képesek A-vitaminná alakulni a szervezetben. A korábban csak provitaminként számon tartott β -karotinnak több saját, a retinoid aktivitástól független hatása is bizonyítást nyert. Legelterjedtebb a β -karotin, az α -karotin, és a β -kriptoxantin. Ezek a vegyületek általában az A-vitamin hatásmechanizmusába kapcsolódnak be, melynek révén

¹ A természetben a karotinoidok mellett, a színező anyagok három másik csoportja fordul elő, amelyek részt vesznek az állatok, így a madarak színének kialakításában. Ezek a melanin, ami valóban pigment (fekete, szürke és barna árnyalatok), a porfirin származékok (pl.: a tojóshéj szín), és a pteridlin (piros és sárga színű halak, kételtűek és hüllők) (Hudon 1994).

kémiai szerkezetük is megváltozik. Bár a különböző karotinoidok hasonlítanak egymáshoz, mindegyik hatása kissé eltérő. Jelentős karotinoidok továbbá a likopin, a lutein és a zeaxantin.

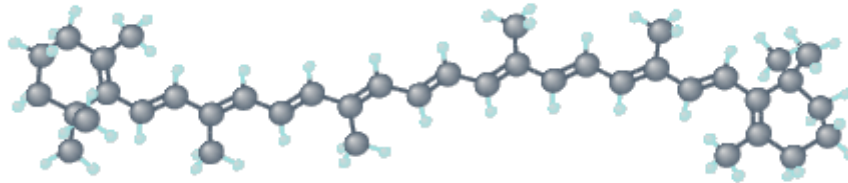
A karotinok nem csupán az A-vitamin előanyagai, hanem természetes antioxidánsok, és sokoldalú betegségmegelőző hatással is rendelkeznek. A karotinoidok szerkezetéből következik, hogy elektronbefogó tulajdonságuk van. Azaz a különböző pro-oxidatív hatásokra (gyulladásos folyamatokra, UV sugárzásra, oxidatív stresszre) keletkező páratlan elektronjaik miatt igen reaktív szabad gyököket képesek neutralizálni, így a tokoferolok mellett a szervezet legjelentősebb lipofil antioxidánsainak tekinthetők (Lawlor és O'Brien 1995). Számos vizsgálat szerint a lipoid oldható faktorok között az antioxidáns rangsor a következő likopin > α -tokoferol > α -karotin > β -kriptoxantin > zeaxantin = β -karotin > lutein. Nem meglepő, hogy ezek keveréke, amint az a természetes előfordulásukra is jellemző, még hatékonyabbnak bizonyul (Heber és Yi-Lu 2002). Az antioxidáns vegyületek fő funkciója az oxidatív anyagcsere során keletkező szabad gyökök eltávolítása, illetve mennyiségük élettani szinten tartása, ami az immunrendszer támogatásában is megnyilvánul (Kiss és mtsai. 2003., Britton 1995, Chew 2004., Bárdos és mtsai. 2011). A labilis immunrendszer a morbiditás és mortalitás növekedését, ezáltal a termelőképeség csökkenését okozza (Chew 1987, 1996), tehát az immunrendszer tagjainak védelme igen lényeges karotinoid funkciónak tekinthető.

A karotinoidok a táplálékban vagy szabad formában vagy zsírsavakkal észterifikálva fordulnak elő. A gyümölcsökben és a magvakban az észterifikált forma jellemző, a növényi szárban és levelekben pedig szabad formában találhatóak meg. A szabad formában előforduló karotinoidok jobban, gyorsabban szívódnak fel, mint az észterezett formában előfordulók. A karotinoid-észterek először specifikus intestinális észterázok segítségével hidrolizálódnak az abszorpciót megelőzően. Kutatások azt bizonyítják, hogy az észterezett formában felvett karotinoid később szabad formában kerül raktározásra a tojásban. A csirkék számára az észterifikált karotinoidok emészthetősége kisebb, ami az észterifikáló zsírsav lánchosszúságával tovább nehezedik (Klasing 1998).

Európában leggyakrabban a kukoricát, lucernát, körömvirágot és a paprikát használják karotinoid forrásként a tojótyúk takarmányozása során.

β-karotin

A β-karotin a természetben az állatok táplálékában előforduló vegyület, természetes színező anyag, melyet azonban az állatok *de novo* nem képesek szintetizálni.

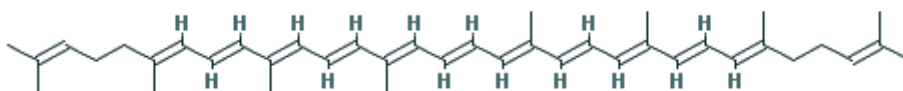


1. kép: A β-karotin (C₄₀H₅₆) szerkezeti képlete
(forrás: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/beta-carotene#section=Top>)

A β-karotin számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik. Azon túl, hogy provitamin (A-vitamin előanyaga) aktivitása van (Olson 1989), antioxidáns (Burton 1989., Sies és Stahl 1995., Stahl és Sies 2003) valamint rákmegelőző, antikarcinogén és immunstimulatív (Bendich és Shapiro 1986

) hatással is bír. A β-karotin magasabb rendű növényekben, algákban, baktériumokban szintetizálódik likopinből két lépésben (Armstrong és Hearst 1996). A β-karotin-15,15-dioxigenáz által retinallá metabolizálódik állatokban. Az enzimet kódoló gént csirkében is azonosították (Wyss et al 2000). A β-karotin az oxidatív szövetkárosító hatások elleni sejtvédő funkciót lát el, szerkezetéből adódó elektronbefogó és antioxidáns tulajdonságai miatt (Bárdos 2000).

Likopin



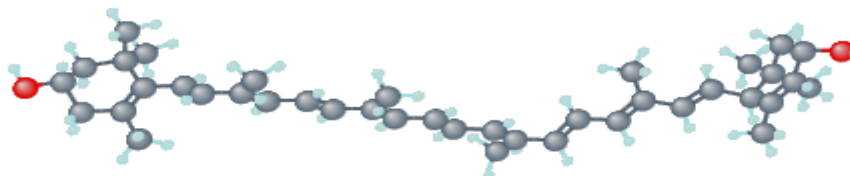
2. kép: A likopin (C₄₀H₅₆O₂) szerkezeti képlete
(forrás: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/446925#section=Top>)

A likopin négy deszaturációs lépést követően fitoénből képződik magasabb rendű növényekben két, membránhoz kötött deszaturáz enzim segítségével.

A likopin színező hatása mellett bizonyítottan egészségjavító és/vagy megőrző tulajdonsággal rendelkezik, a karotinoidok között az egyik legerősebb antioxidáns (Agarwal és Rao 1998), valamint a sejtek közötti egyik réskapcsolat (gap junction) típus kialakulásában

játszik fontos szerepet (Bertram 2004), valamint immunstimulatív hatása is ismert (Bárdos és mtsai. 2005).

Lutein



3. kép: A lutein (C₄₀H₅₆O₂) szerkezeti képlete
(forrás: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281243#section=Top>)

A xantofilok csoportjába tartozó antioxidáns vegyület, mely antioxidáns képessége a β -karotinnál és a likopinnál erősebb. A lutein a növényekben észterezett, a tojásokban szabad alkohol formában fordul elő (Lai et al 1996). A lutein színező hatása ismeretes, valamint fontos szerepet játszik az időskori maculadegeneráció (AMD, age related macular degeneration) megelőzésében.

2.4. E-vitamin (tokoferol)

Az E-vitamin kifejezés a tokoferolok és tokotrienolok csoportjára használatos elnevezés, a természetben előforduló nyolc izomerje közül az α -tokoferolnak van a legnagyobb biológiai aktivitása. Az E-vitamin sejten belüli megoszlása nem egyenletes. Az E-vitamin metabolizmus szabályozásában a májnak van nagy szerepe, ahol az α -tokoferol szelektíven megtalálható, mivel az egyéb tokoferol formák degradálódnak. A tokoferol transfer protein (TAP) révén a májból az α -tokoferol a keringő lipoproteinekbe szekretálódik, mellyel a célszövetekhez szállítódik.

Az E-vitamin zsírolédkony növényi eredetű vitamin, mely nélkülözhetetlen a reprodukció, az izomrendszer, a keringés, az ideg- és az immunrendszer optimális működéséhez, szabályozásához. A tokoferolok megtalálhatóak a zöld növények leveleiben és a magtermések csíraolajában ahol, mint antioxidánsok játszanak szerepet az avasodás megelőzésében. Az állati szervezetben leginkább az α -tokoferol fordul elő, mivel a többi formájú nehezen szívódik fel a vékonybélből.

2.5. Karotinoidok (β -karotin, lutein, likopin) és E-vitamin a madarak szervezetében és a tojásban

A madarak sem képesek szervezetükben előállítani karotinoidokat, ezért ezekhez az értékes vegyületekhez táplálékukból kell hozzájutniuk. Mivel nincsen jól mobilizálható raktározás a szervezetben, akkor a karotinoidok utánpótlás hiányában 10 nap múlva eltűnnek a csirke szervezetéből (Na és mtsai. 2004). Egyes karotinoidok A-vitaminná alakulnak, ezért azok jelentős szerepet töltenek be a madarak szervezetének vitaminellátottságában, mely nemcsak gazdasági, hanem vadon élő madarak esetében is fontos tényező. A felvett karotinoidok mennyisége befolyással van a szervezetükben lejátszódó vitamin metabolizmusokra, s befolyással van az immunállapotukra is (Klasing 1998).

A karotinoidok metabolizációjának feltétele azok felszívódása, amelyet több tényező is befolyásol. Hatással van rá az elfogyasztott karotinod mennyisége, különböző karotinoidok közti kölcsönhatások. A folyamatok függenek az elfogyasztott zsír mennyiségétől, a tápláló anyag feldolgozottságának mértékétől és attól a mátrixtól, amiben a karotinoidok vannak (West és Castenmiller 1998, Van Het Hof és mtsai. 2000). A táplálékból történő százalékos arányú karotinoid felvétel a bevitt karotinoid mennyiségének növelésével, valamint már magasabb plazmabéli karotinoid szint esetében is csökken (Diwadkar-Navsariwala 2003).

A karotinoidok a duodenumból szívódnak fel más lipidekkel együtt, majd a provitamin tulajdonságúak a mucosa sejtekben alakulnak át A-vitaminná (pl. β -karotin). A bélhámsejt intracelluláris terébe jutott β -karotint a β -karotin-15,15'-dioxigenáz (BCDO) két molekula retinallá (RAL) hasítja. A retinallát egy kevésbé szubsztrátspecifikus aldehyd-reduktáz retinollá alakítja, ami észterifikálódva jut a portomikron frakcióba. A centrális hasítást végző dioxigenázon kívül egy β -oxidációs enzimrendszer is működik a bélhámsejtek citoplazmájában, ami β -apo-karotinalokat és karotinsavakat is képez. A táplálék retinoidját (retinil-észter, ill. retinol), és a még át nem alakult karotinoidokat a vérkeringésből a máj felveszi és a lipidok tárolására specializálódott sejtjeiben elraktározza. A perifériás szövetek igényének megfelelő mértékben a májszövet a raktározott retinil-észtert retinollá hidrolizálja, ami azután egy szintén a májban képződő specifikus szállítófehérjével (retinolkötő fehérje: RBP) kapcsolódik, és a vérkeringésbe jut. Ahol a keringő tiroxinkötő fehérje (TTR) is hozzá kapcsolódik, ez a vitamin-fehérje komplex. Ez a ROL-RBP-TTR-tiroxin (T_4) együttes teszi mintegy "vízoldhatóvá", azaz a vér vizes közegében szállíthatóvá a lipid karakterű vitamint, egyben a méreténél fogva megakadályozza ezen fontos hatóanyagok (retinol és tiroxin) glomeruláris filtrátumba kerülését. A működésükben szerepet játszó retinoid-függő szövetek retinol-kötőfehérjét felismerő receptoruk révén veszik fel a keringésből a vitamint. A retinolt a szövetekben egy újabb kötő fehérje (CRBP: celluláris retinolkötő fehérje) veszi át és a sejtmagba juttatja. A citoplazmában a retinol retinsavvá is oxidálódhat, amit szintén kötő fehérje (CRABP) juttat a magba. A

sejtmagban magreceptorok (RAR) veszik át a kötőfunkciót. Ez a komplexum (aktív RAR) a megfelelő DNS-szakaszokat aktiválva fejti ki hatását. Egyes génszakaszok csak az aktív RAR és tiroid-receptor (T_3R) együttes kötődése esetén válnak transzkripcióra alkalmassá, ami a tiroid-retinoid kölcsönhatás génszintű magyarázatát adja (Bárdos 1989., 2000).

A karotin-koncentráció a madár vérplazmában jelentősen függ az étrendi karotinoid mennyiségétől. A nagyobb plazma koncentráció nem mindig nyilvánul meg külső elszíneződésben is, aminek a karotinoid metabolizmust érintő fajspecifikus eltérés a magyarázata. Színes tollruhájú madarakban (pintyek) végzett kísérletben arra a következtetésre jutottak, hogy a karotinoidok színező hatás nélkül is immunrendszert erősítő hatással rendelkeznek (McGraw és mtsai. 2006).

A tojó étrendjében lévő karotinoidok nagyban meghatározzák a tojás karotinoid profilját (Surai és mtsai. 1998). Ugyanakkor a tojás karotinoid tartalmát az is befolyásolja, hogy a felszívódás mennyire hatékony, illetve az esetlegesen vitaminná alakítás milyen mértékű a bélben és a májban. A máj tekinthető a karotinoidok legfőbb raktározó helyének. A madarak képesek a lábszár kültakarójában is karotinoidokat deponálni, itt főként lutein lehet jelen észterezett formában (Tyczkowski és Hamilton 1986). Ebből a kültakaró „raktárból” a madarak képesek a karotinoidokat a nemi érés során a petefészekbe juttatni. Így a lábszár és a csőr színezetének fokozatos elvesztése a tojástermelés alatt azt bizonyíthatja, hogy a karotinoidokat ezekből a raktárakból mozgósítva a tojó azokat a tojássárgájába építi (Surai és Speake 2001).

Több vadon élő madárfajon is végzett vizsgálatból kiderült, hogy a szabad tartású gyöngytyúk (*Numida meleagris*), a fácán (*Phasianus colchicus*) és a tőkés réce (*Anas platyrhynchos*) tojás karotinoid koncentrációja hasonló volt (61.3-79.2 $\mu\text{g/g}$), míg a legkisebb karotinoid koncentrációjú (11,2-14,8 $\mu\text{g/g}$) tojás a házi kacsára és házi tyúkra (*Gallus domesticus*) volt jellemző. A különböző fajok májának karotinoid koncentrációját vizsgálva a következő sorrend állítható fel: vadon élő fácán > szabad tartású gyöngytyúk > szabad tartású tyúk > intenzíven tartott tyúk > vadon élő tőkés réce > házi kacska. A karotinoidok koncentrációja más szövetekben a szabad tartású gyöngytyúk és a fácán esetében lényegesen nagyobb volt, mint a többi vizsgált fajnál (Karadas és mtsai. 2005a). Mindez arra hívja fel a figyelmet, hogy a karotinoidok akkumulációjára feltehetően szüksége van a tojóknak. Így amennyiben nem az ember által biztosított takarmányt fogyasztják, akkor is törekednek az optimum elérésére. Mivel minden tojásalkotórész a tyúk szervezetéből származik, a tyúk táplálékának összetevői metabolizmus révén válnak megfelelően elérhetővé az utódok számára az inkubáció alatti embrionális fejlődés alatt, valamint a kelést követő kezdeti életszakasz idejére, így biztosítva az utódok életképességét (Vieira 2007).

Surai és mtsai (1998) tojótyúkokon végzett vizsgálataiban a karotinoid kiegészítésben részesített tojótyúkok tojásának karotinoid koncentrációja 41,1 mg/g volt, a kontroll 13,3 mg/g. Az ezekből a tojásokból kikelt naposcsibék szik membránjában, májában és a plazmában a karotinoid szint közel 3-szor nagyobb a kontroll csoporthoz képest. A lutein jóval kisebb

arányban volt jelen a májban, mint a tojássárgájában, azonban egyéb szövetekben magasabb lutein hányadot mértek a tojássárgájához képest. Ez arra utal, hogy az embrióban a különböző karotinoidok metabolizmusa szelektíven történik, azaz feltételezhető a „karotinoid diszkrimináció”.

A karotinoid a tojó takarmányából felszívódva kisebb-nagyobb mértékben akkumulálódik a madár szerveiben, így a tojássárgájában, a májban és más szövetekben (bőr, csőr, stb.) majd a tojásból a fejlődő embrió szervezetébe jut.

Koutsos és mtsai (2003) a fejlődő csibék immunszöveteinek karotinoidjait vizsgálták a tojók ellátottságának összefüggésében. A kikelő csibék bőr, a máj, a *thymus*, a *bursa Fabricii* és a vérplazma karotinoid koncentrációja függ a tojás sárgájának karotinoid expozíciójától. Leghorn csibéket keltettek karotinoiddal dúsított (C+), illetve karotinoid-hiányos (C-) tojásokból. A kelést követő 4. héten a csibéket eltérő mennyiségű karotinoid (lutein+kantaxantin) kiegészítéssel etették, amely 0-38 mg/kg összes karotinoidot tartalmazott. A kikelt C+ csibékben szignifikánsan több volt a szöveti lutein, zeaxantin és/vagy kantaxantin, mint a C- tojásból kikelt csibékben. Megfigyeléseik szerint csak a bursában tárolt karotinoidok nem függnek a takarmányforrástól. A C+ csibék minden más szöve (thymus, máj, plazma) dóziszfüggően tükrözte a táplálék karotinoid tartalmát. A C- csibékben nem valósult meg hasonló jellegű karotinoid beépülés (Koutsos és mtsai. 2003).

A karotinoidokban gazdag lucerna kivonat kiegészítésben részesülő tojók tojásai akár 22-szer több karotinoidot tartalmaztak, mint a kontroll csoportban. Az ilyen tojásokból kelt csibék májának karotinoid koncentrációja a keléskor 29-szer nagyobb a kontrollhoz képest. A májuk karotinoid koncentrációja még a kelést követő 7. napon is magasabb volt annak ellenére, hogy kelést követően nem részesültek a lucerna kivonat kiegészítésben (kontroll csoport). A kontroll csoport tojásaiból kikelt csibék májának karotinoid koncentrációja kisebb, mint ugyanezen időszakban karotinoid kiegészítés mellett. Azonban a kelést követő 14. napon a kiegészítésben részesült csoport máj karotinoid koncentrációjának szintje meghaladta a kontroll csoportét. Ezek alapján megállapítható, hogy az első hétben még az anyai hatások érvényesülnek, míg a 2. héttől kezdődően már takarmányozási hatások veszik át a moduláló szerepet. Mivel az antioxidáns és immunmoduláns hatás különösen fontos a kelést követően az utódok számára, ezért fontos a tojók karotinoid-ellátottsága az utódok életképességének fokozása érdekében (Karadas és mtsai 2005b).

Japán fűj tojók takarmányának karotinoid kiegészítése szignifikánsan megemelte a vérplazma karotinoidjainak szintjét és az adaptív immunválasz készséget is. Azonban a takarmány-kiegészítésben részesülő madarak tojásaiból kikelő csibékben az adaptív immunválasz készsége nem emelkedett (Peluc és mtsai. 2012).

2.6. Karotinoid és E vitamin kölcsönhatás

Woodall és mtsai (1996) azt tapasztalták, hogy csirkében a β -karotin kiegészítés szignifikánsan, 50%-kal csökkentette a plazma α -tokoferol tartalmát, azonban a szöveti α -tokoferol szint esetében nem tapasztalták ezt a hatást. Humán vonatkozásban szintén megfigyelték azt, hogy a β -karotin csökkenti az α -tokoferol koncentrációt a plazmában (Xu és mtsai. 1992). Az még nem ismert, hogy ezt az α -tokoferol csökkenést a vérplazmában közvetlenül a β -karotin okozza-e (Woodall és mtsai. 1996).

Borjakban, patkányokban és csirkékben végzett kísérletek alapján elmondható, hogy a nagy dózisú A-vitamin kiegészítés alkalmazása a szöveti és a plazma tokoferol alacsony szintjét eredményezi. Sklan és Donoghue (1982), akik nagy dózisú A-vitamin és kis dózisban etetett E-vitamin kölcsönhatását vizsgálták csirkékben, azt tapasztalták, hogy az A-vitamin csökkenti a tokoferol szintet azáltal, hogy fokozza az étrendi tokoferol oxidációját, mielőtt az eljutna a felszívódás helyére, továbbá fokozza a tokoferol glükuronid formában való kiürülését.

Nagy A-vitamin dózis (40 000 IU/kg) alkalmazásakor azt tapasztalták, hogy az α -tokoferol tojásba történő depozíciójának hatékonysága csökkent. Ennek lehetséges magyarázata az, hogy az A- és E-vitamin között versengés alakul ki a felszívódáskor és a takarmányban lévő nagy A-vitamin koncentrációjának hatására csökken az E-vitamin abszorpció hatékonysága, s ezt követően a szöveti koncentrációja (Grobas és mtsai. 2002).

A karotinoidok biológiai hasznosulását befolyásoló kölcsönhatások elviekben több szinten valósulhatnak meg: a bélrendszerben az ún. kevertmicellákba épülés során, a felszívódáskor az enterocytákba történő felvételkor, a felvételt követően a β -karotin a dioxigenáz aktivitásakor, valamint a kilomikronokba történő beépüléskor.

A karotinoid interakcióval kapcsolatos kutatások eredményei alapján a különböző karotinoidok eltérő mértékben hatnak és befolyásolják a másik karotinoid felszívódását. Humán vonatkozásban vizsgálva a karotinoid interakciókat a kutatások β -karotin és likopin kombinált alkalmazásakor azt tapasztalták, hogy a likopin reszorpciója megnövekedett, javult, azonban a β -karotin reszorpciója nem változott (Johnson és mtsai. 1997). A β -karotin luteinnel történő kombinált alkalmazása a β -karotin felszívódását csökkentette, azonban a likopinnal történő alkalmazás nem volt befolyással erre a folyamatra (van den Berg és van Vliet 1998). Egy másik kísérletben a β -karotin lutein együttes alkalmazása a lutein felszívódásnak csökkenését eredményezte, ezzel szemben néhány kísérleti alanynál a β -karotin felszívódásnak növekedését, míg másoknál csökkenését figyelték meg (Kostic és mtsai. 1995).

Paradicsom por kiegészítést (25 g, illetve 50 g) alkalmazva (0,8 mg likopin/g paradicsom por) azt tapasztalták, hogy a likopin kiegészítés szignifikánsan csökkentette a leiomyomák² számát, valamint a szérum likopin, lutein, zeaxantin, valamint C-, E és A-vitamin tartalmát növelte, miközben az MDA koncentrációja csökkent (Sahin és mtsai. 2007).

Vadászgörényeken végzett kísérletekben azt tapasztalták, hogy a β -karotin felszívódása likopinnal történő együttes kiegészítésének hatására a β -karotin felszívódása csökken (White és mtsai. 1993).

2.7. Szikimmunitás

A fő immunglobulin farakciót madarakban Leslie és Clem (1969) IgY-nak nevezte el, mivel a tojássárgájában (yolk) jelentős mennyiségben fordul elő. Filogenetikai vizsgálatok kimutatták, hogy a madaraknak ez a speciális immunglobulinja az emlős IgG-vel analóg és részben homológ. A madár szérumban előforduló IgY az elsődleges immunválasz során termelődött IgM megjelenését követően termelődik. A legnagyobb különbség az IgY és az IgG között, hogy a madár immunglobulin hosszabb H-lánccal rendelkezik, s hiányzik róla a kapocs régió. Szerkezetéből adódóan az IgG-től eltérő biokémiai és fizikokémiai tulajdonságokkal is rendelkezik.

A három fő immunglobulin madarakban az IgM, IgA és IgY. Az IgM bursa sejtek általi szintézise azonnal megindul amint a bursában limfociták jelennek meg, ez az embrionális fejlődés kb. 14. napja (Leslie and Clem, 1969). IgY-t termelő limfocitákból differenciálódott specifikus (plazma) sejtek csak később jelennek meg a bursa folliculusaiban ez körülbelül a kelés időpontja (21. nap) körül következik be. IgM-t tartalmazó sejtek az embrionális fejlődés 17. napjától a bursán kívül is fellelhetőek, míg az IgY-t tartalmazó sejtek ekkor még nem kimutathatóak az extrabursális részeken (thymus, lép) csak a kelést követő 4. napon jelennek meg. Az IgM és IgY tartamú sejtek száma a kelést követő 3. és 8. nap között gyorsan növekedni kezd. Bursectomizált csirkéken végzett kísérletekből kiderült, hogy az IgM képző sejtek direkt prekursorai az IgY és IgA képző sejteknek (Fellah és mtsai. 2008)

Az IgY a tojássárgája fő immunglobulin alkotója, az IgA és az IgM pedig, a tojás fehérjében dominánsan előforduló immunglobulinok. Utóbbiak elsősorban a magnumban szekretálódnak, és az albumenben 0,15-0,7 mg/ml mennyiségben fordul elő az IgA és IgM (Hamal és mtsai. 2006, Davison és mtsai. 2008).

² Benignus monoklonális tumor, ami egyetlen izomsejtből indul ki.

A szikzacskóban nagy mennyiségben fordulnak elő ezek az immunglobulinok egy nappal a kelést megelőzően. Úgy vélik, hogy mind a tojás fehérjéből származnak nem pedig az embrió által szintetizáltak. Mindemellett az IgA és az IgM nem kerül a magzati keringésbe, hanem az embrionális bélbe jutnak. Azt az időpontot, amikor a kikelt csibe elkezd antitesteket szintetizálni az határozza meg, hogy milyen antitestről van szó. IgY szekretáló B-sejtek a kelést követő 6. napon jelennek meg a plazmában az IgM és IgA szintézisét 3-4 napos, illetve 12 napos csibében detektálták (Hamal és mtsai. 2006).

A kacsák és a ludak szervezetében az IgY kétféle izoformája fordul elő. Az egyik a tyúk IgY -nal teljesen analóg, míg a másikban a H-lánc annál rövidebb. Ez az ún. truncated forma, melynek az evolúciós megjelenése ismeretlen, de a lúdalakúakon túl a hullókben is előfordul. Más fajokban is megtalálható az IgY truncated formája pl. tündős halakban, dajkacápában és a rájákban. Azonban ezekben a fajokban található immunglobulinok nem valódi IgY-ok, amely azt jelezi, hogy az evolúció során többször megjelent ez a csonka immunglobulin-Y szerkezet (Davison és mtsai. 2008).

A Fabricius-féle tömlő (*bursa cloacalis Fabricii*) a madarak lymphoepithelialis szerve, ami a *cloaca* a dorsalis falán helyezkedik el. Az embriogenezis során a bursa-ba belépő őssejtek a megfelelő érési folyamat után B-lymphocytákká, majd antigén ingerek hatására ellenanyag termelésre (IgY, IgM, IgA) képes plazmasejteké differenciálódnak. A B-sejtek képezik a humorális immunválasz prekursor sejtjeit, melyek a véráramban akár 25-30 %-ot képviselnek.

A *bursa Fabricii* működése egyedülálló a madarakban és elengedhetetlen a B-típusú lymphoid őssejtek amplifikációjához és differenciálódásához. A *bursa Fabricii* 8-10 hetes korban éri el maximális méretét ezt követően hanyatlik. 6-7 hónapos korban már csak csökevényes állapotban található meg. Viszonylag rövid idő alatt az embrionális fejlődés 8. és 14. napja között megindul a bursába belépő őssejtek inváziója. A B-sejt antitest diverzifikációja a bursa folliculosokban történik. Keléskor a bursa körülbelül 10 000 folliculust tartalmaz. Minden folliculusban 100 000 – 150 000 B-limfocita található. A *bursa Fabricii* a fejlődés korai első 60 órájában történő kiirtásakor a kikelt csibék kizárólag a nem specifikus IgM termelésre képesek, s a tipikus antitestes válaszok megnyilvánulása, vagy az IgA és IgG-ekvivalens immunglobulin-Y (IgY) előállítás nem valósul meg szervezetükben. Abban az esetben, ha a bursát később, de még a kelést 18 nappal megelőzően távolítják el, amikor a B limfociták a bursából a perifériás szövetekbe kezdenek vándorolni, akkor romlik a humorális immunválasz, a keringő B-limfociták száma jelentősen alacsony lesz és az antigén ingerek hatására nem termelődnek ellenanyagok (Oláh és Vervelde 2008, Fella és mtsai. 2008).

Az első felszíni IgM pozitív sejtek az embrionális fejlődés 12. napjától detektálhatóak és a keléskor bursa sejtek 90%-a érett B-sejt. A bursa korlátozott számú prekursor B-sejtet kolonizál. A pre-bursális őssejtek az inkubáció 8. és 14. napja között lépnek a bursába, amikor feltehetően az embrionális lépben és csontvelőben Ig-gén átrendeződésen mentek keresztül, hogy majd IgM expresszálódjon a felszínükön. A bursa nélkülözhetetlen szerv a B-sejtek

proliferációjához és differenciálódásához. Azok a sejtek, melyek felszínén nem fejeződik ki Ig azt apoptotikus folyamat eltávolítja. Csak azok a B-sejt prekurzorok kerülnek a bursa folliculusaiba, amelyek az Ig-gént újrendezik és a sejtfelszínükön Ig-t expresszálnak. Ezt követően az Ig specifikusságért felelős régió szomatikus diverzifikáció történik, az ún. intrakromoszomális génkonverzió során. Ennek a diverzifikációnak eredményeként 1011 különböző ellenanyag molekula jöhet létre (Oláh és Vervelde 2008).

Az anyai ellenanyagok különösen a kikelt csibe életének első három hetében töltenek be fontos szerepet. A csibe életkorával egyre inkább elveszíti a jelentőségét. Az ellenanyagok átadásának feltétele, hogy a tyúk vérében azok nagy koncentrációban forduljanak elő. Az ellenanyagok minőségét az befolyásolja, hogy milyen antigénnel találkozott a tyúk a tojásrakás, illetve az azt megelőző időszakban (Smith és Beal 2008).

A csibe ellenanyag készlete a késői embrionális fejlődés szakaszában alakul ki, s a kelést követő rövid időszakra biztosít a madár számára védettséget. Az idő teltével a B-sejtek további szomatikus génkonverzió átmenve tovább bővítik az antitest repertoárt. A kelést követő 5-7 hét körül a bursa a teljes antitest készlete kifejlődik (Davison 2008, Fella és mtsai. 2008).

Az eritrociták termelése mellett a szikzacskó feladata a makrofágok első generációjának termelése is (Fella és mtsai. 2008).

Régóta ismert a maternális immunitásnak a madarakban való megnyilvánulása, amit szikimmunitásnak neveznek. Szikimmunitás olyan módon alakul ki, hogy az anyai keringésből a petefészek tüszőhámsejtjein át IgY jut a szik anyagának fehérje livetin frakciójába. Mennyisége a tojó szérum IgY koncentrációjától függően akár 8 mg/ml mennyiséget is elérhet. Pulykában, illetve galamb esetében 5,1 and 5,4 mg/ml IgY értéket írtak le (Davison és mtsai. 2008).

A termékenyülés után ebből az 1-14. nap között kb. 25 µg/nap, ezt követően kb. 100 µg/nap, majd a keltetés utolsó napjaiban mintegy 600 µg mennyiség szívódik fel az embrió keringésébe. A kikelő csibe kb. 1-2 mg/ml szérum IgY koncentrációval rendelkezik. A petevezető szekréciós sejtjei által termelt IgY-, IgM- és IgA-molekulák bejutnak a tojás fehérjébe, de ezek nem jutnak a vérkeringésbe. Az IgY felezési ideje viszonylag rövid (4-6 nap), általában a 2-4. hét között eliminálódik a csirke vérkeringéséből. Egyes vírusfertőzésekkel szembeni szikimmunitás magasabb szinten váltható ki olyan módon, hogy a csirkék attenuált vakcinával történő oltását a tojószezon előtt ugyanannak a vakcinának előlt változatával megismételjük. A szikimmunitás alapvetően fontos a naposcsibék fertőző betegségekkel szembeni védelmében. Ez a passzív immunitás mindazon kórokozókra kiterjed, amelyekkel szemben a tojók aktív immunitást szereztek, akár természetes, akár mesterséges úton és a védettség addig tart, amíg a maternális ellenanyagok a vérpályában perzisztálnak (Tuboly 2002).

Az IgY a tojó szérumából az utódokba történő transzportja két lépésben történik. Az első lépésben a tojómadár vérből a molekula a szikbe jut, majd a második lépésben a szikból a

fejlődő embrió szervezetébe kerül az IgY. Brierley és Hemmings (1956) demonstrálták az ellenanyagok szelektív transzportját a szikzacskóból az embrió, illetve a kikelt csibe szervezetébe. Ezen s más vizsgálatokra alapozva Brambell (1970) leírta elméletét, miszerint a madárban a maternális ellenanyagok a tojásban deponálódnak, s azután az embrionális fejlődés során felszívódnak az embrió szervezetében.

Az IgY szelektíven szekretálódik a tojó keringéséből a tojásba. A tüsző ephitéliumán keresztül a szikbe szállítódó IgY mennyisége arányos az anyai szérumban található IgY koncentrációjával, ahonnan aktív transzport révén jut a tojásba. Az IgY tojásban akkumulálódó mennyisége arányosan változik a fejlődő oocyta növekvő tömegével és kb. 45mg/nap értéket is elérheti 2 nappal a tojásrakást megelőzően. Az IgY receptor mediált transzport révén jut a tojásba, kacsán végzett vizsgálatok továbbá arra utalnak, hogy a funkcionális Fc-rész részt vesz az IgY szekrécióban, mivel a kacsá vérkeringésében természetes módon előforduló ún. truncated IgY, csak csekély mennyiségben szállítódik a szikbe. Antigén specifikus IgY antitestek a szérumban található ellenanyag koncentrációhoz viszonyítva 5-6 napos késéssel jelennek meg a tojásban. Ennek az a magyarázata, hogy bizonyos idő telik el a tüsző fejlődése, valamint a tojásrakás között. A maternális ellenanyagok ezután a szikmembránon keresztül az embrionális vérkeringésbe jutnak. Ez a folyamat a keltetés 7. napja körül kezdődik és fokozódik a kelést megelőző 3 napban (19-21. nap), s 600 µg/nap maximumot ér el. Ebben az Fc-receptor mediált folyamatban a szikmembránhoz való kötődés pH függő (Davison és mtsai. 2008).

West és munkatársai (2004) sikeresen klónozták a folyamatban résztvevő FcRY receptort, mely meglepő módon nem homológ az emlősök placentán át történő IgG felszívódásában szerepet játszó FcRn receptorral, hanem a mannóz receptorok családjába tartozik. A szikben található IgY csupán csak 10%-a lelhető fel a kikelt csibe keringésében, a fennmaradó 90% feltehetően metabolizálódik az embrionális fejlődés során. Ez magyarázza azt, hogy napos csibében az antigénspecifikus ellenanyag titer akár nyolcszor kisebb lehet, mint a tojásban. Az összes szérum IgY szint a kelést követően emelkedik, majd a második napon eléri a maximumát 1–5 mg/ml-t. Ezt követően csökkenni kezd, míg az IgY *de novo* szintézise el nem kezdődik (Davison és mtsai. 2008). Liu és Higgins (1990) kacsában hasonlókat írtak le, ahol a csúcst a kelést követő 5., a minimumot a 14. napon éri el az IgY szintje.

Az IgY koncentrációja alapvetően ugyanakkora az oocyta érés során és az érettség elérésekor, a szik körülbelül 10-20 mg/ml IgY-t tartalmaz. Az IgY kizárólag a tojás sárgájában található, a tojás fehérjében nem. Így a szikanyagba körülbelül 100-400 mg IgY kerül becsomagolásra a fejlődő embrió számára. A 7. naptól kezdődően egészen a 18. napig a jelölt IgY specifikusan kötődik a szikhártyához. Ez a kötés telíthető, Fc-specifikus, pH függő és reverzibilis. Az alacsony affinitású IgY kötő receptorok, ($K_d 3.4 \times 10^{-7}$) a nyolcadik naptól már jelen vannak, míg a nagy affinitású IgY kötő receptorok ($K_d 3.0 \times 10^{-8}$) a 18. nap körül detektálhatóak az oocytán. A szérumból a szikbe történő IgY transzport során nem történik szelekció, destrukció, valamint koncentrációja sem változik jelentősen. A szikben található IgY

koncentrációja 1,23 szorosa szérum koncentrációjának, s a tojás mérete nem befolyásolja azt (Carlander 2002).

Becslések szerint a szik 100-400 mg IgY tartalmához képest szinte elenyésző mennyiségű csupán 2-3 mg IgY található a kikelt csibében, ami 1-1,5 (2mg) mg/ml keringésben lévő IgY-t jelent. Tekintettel arra, hogy ez a mennyiség 36 óránként feleződik, s a kikelt csibe szervezetében csak a kelést követő hatodik napon jelennek meg a saját IgY-t szekretáló sejtek (Carlander 2002) különösen nagy jelentősége van az utód szempontjából a tojómadár szervezetéből a csibébe jutó IgY-nak.

A kikelt csibe immunrendszere csak részben érett és ezért nem képes a kelést követően teljes körű védelmet nyújtani minden a környezetében előforduló kórokozóval szemben. A veleszületett immun mechanizmusok jól működnek a csibe szervezetében, azonban az adaptív immunválaszok a kelést követő néhány hét alatt alakulnak ki. A B-limfociták először kivándorolnak a bursából, s három nappal a kelést megelőzően a másodlagos limfoid szervekbe jutnak, mialatt a T-sejtek első populációja elhagyja a *thymust* ez az inkubáció 6. napján következik be. A sejtmigráció második és harmadik hulláma a 12. nap és a kelés időpontja körül zajlik (Davison és mtsai. 2008).

A fejlődő madár embrió és a kikelt csibe átmenetileg védett a bakteriális toxinokkal, baktériumokkal, parazitákkal és vírusokkal szemben a tojásszikbe transzportált anyai immunglobulinok által. A maternális antitestek akár egy hónappal a kelést követően is fellelhetőek a csibe szervezetében (Hamal és mtsai. 2006). A csibe az embrionális fejlődés alatt elkezd kifejleszteni a saját védekezési mechanizmusát, azonban immunkompetenciája csak néhány nappal a kelést követően jelenik meg (Mast and Goddeeris 1999). Immunológiai szempontból a kelést követő időszak nagy jelentőséggel bír, hiszen a kikelt csibe hirtelen érintkezik a környezetben található számos antigénnel és már nem jutnak a szervezetébe további anyai ellenanyagok, ellentétben az újszülött emlősökkel, akik a kolosztrum révén további ellenanyagokhoz jutnak. Egy nappal a kelést követően történő immunizálás nem idéz elő ellenanyag termelést, ami feltehetően a másodlagos lymphoid szövetek hiányos strukturális felépítéséből adódik. Azonban egy héttel a kelést követően történő immunizáció, pl.: bovin szérum albumin (BSA) befecskendezésével, már hatékony specifikus ellenanyag termelést kiváltó humorális immunválasz tapasztalható (Mast és Goddeeris 1999).

A madarak ellenanyagai a tojómadár véréből a tojássárgájába transzportálódnak és ott a vérbeli titerhez (kb 10 mg/ml) hasonló nagyságrendben található. Tehát 20 tyúktojás kb. 300 ml szérummal azonos mennyiségű ellenanyagot tartalmazhat, míg az ellenanyag termelésre leggyakrabban használt nyúlból csak havi 40-50 ml specifikus IgG-tartalmú savót lehet nyerni (Losonczy és Batke 1997). A petefészekben fejlődő folliculusok hierarchiája ellenére a karotin koncentrációjuk közel azonos, ami a folyamatos transzportot (beépülését) jelzi (Kerti és Bárdos 1999). A szikben (*follikulus*) halmozódik fel az anyai vérből származó ellenanyag (IgY) is. A retinoid adagolás esetén viszont a szövetek β -karotin tartalma szignifikánsan csökken. A retinoid

– β -karotin kompetíciónak a magyarázata (transzport, kötő fehérje, receptor függőség) még nem tisztázott (Pusztai és Bárdos 1995, Kerti és Bárdos 1999).

A tokoferol/retinoid/karotinoid/ hatás szikimmunitásban való érvényesülésének és magának az immunválasz készséget kifejező IgY-titer közötti összefüggés jellege még nem tisztázott. Így ezen vizsgálati terület a baromfityenyésztés biológiai alapjainak feltárása mellett, belátható időn belüli gyakorlati (gazdasági) jelentőségű eredményeket is hozhat. A csirke és egyéb madárfajok IgY precipitációs vizsgálata magas só koncentráció és alacsony pH-jú környezetben játszódik le optimálisan. A különböző madárfajok esetében a humorális immunválasz készség tekintetében az alábbi sorrend állítható fel: tyúk > fácán/fogoly > pulyka > galamb > fürj > kacska (Davison és mtsai. 2008).

A szikimmunitás mellett egyes madárfajok, mint például a galamb, a pingvin és a flamingó kiegészítésként begytejjel táplálja kikelt fiókáit. A begytej termelődését a prolaktin hormon szabályozza. Ez a zsírban, fehérjében, levált hámsejtekben gazdag anyag 1,5 mg/ml koncentrációban tartalmaz IgA és kis mennyiségben IgY-t is (Davison és mtsai. 2008).

2.8. Karotinoidok és az E-vitamin (kölsön)hatása a madarak immunválaszára

A karotinoidok a tojásszik színezése mellett fokozzák az immunrendszer működését, mellyel számos kutatás foglalkozik. A karotinoid vegyületek, bizonyítottan rendelkeznek immunrendszert segítő hatással, fenntartják az immunrendszer szerkezetének állandóságát. A táplálékban található bizonyos tápanyagösszetevők bizonyítottan szabályozzák és hatással vannak az immunrendszerre. Erős immunmoduláns hatással rendelkeznek hosszú láncú többszörösen telítetlen zsírsavak, karotinoidok, izoflavonoidok, valamint az A-, C-, D-, és E-vitaminok

Közismert, hogy a retinoidok fokozzák a szervezet ellenállóképességét (Sporn és mtsai. 1984). Újabb megfigyelések szerint a szervezet egyes - fertőző illetve daganatos - betegségek elleni specifikus védekezésének alkalmával is tapasztalható kedvező hatásuk (Genler és Hollanday 1990). A szervezet immunválasz képessége és a retinoid ellátottság szintje között kölcsönhatás fedezhető fel. A karotinoidok immunválaszra gyakorolt hatásáról először Bendich és Shapiro (1986) patkányokban végzett kísérleteik kapcsán számoltak be. Későbbi, állatokon és embereken végzett vizsgálatok bizonyítják, hogy a nem A-provitamin aktivitású karotinoidok, mint például a lutein, kantaxantin, a likopin és astaxantin is jelentősen és olykor még aktívabban segítik a sejt-mediált és humorális immunválaszt, mint a β -karotin (Chew 2004).

A β -karotin fokozza a T- és B-limfocita aktivitást laboratóriumi állatokban (Sirisinha és mtsai. 1980), valamint csirkékben is (Sklan és mtsai. 1989, Tengerdy és mtsai. 1990).

Csirkékben az A-vitamin hiány csökkenti a T-lymphocytá prolifrációt (Sijtsma és mtsai. 1990). A késői immunválasz csökkenése tapasztalható mind az A-vitamin hiány, mind a túlادagolás esetén (Friedman és mtsai. 1991) mivel a retinoidok e sejtfunkciókban regulátor szerepet töltenek be (Katz és mtsai. 1987). Több vizsgálat szerint a baromfipestis vírusával fertőzött csirkék mortalitását és specifikus immunválaszképességét az A-vitamin ellátottság szintje befolyásolja.

Az NRC által javasolt A-vitamin mennyiség háromszorosa eredményez optimális immunválaszt (IgY-titer, fagocitózis, T-sejt funkció) (Friedman és Sklan 1997).

A β -karotin és likopin esetében mind *in vitro*, mind *in vivo* vizsgálatokban bizonyították, hogy a celluláris és humorális immunválaszt is fokozzák. Így igen fontos tényezők az állomány-egészségügynek, hiszen a nem kellően reagáló immunrendszer eredményeképpen csökken a teljesítmény, fokozódik a betegségek iránti fogékonyság (Chew 1995).

Koutsos és munkatársai (2007) vizsgálatából kiderül, hogy mind az étrendi mind pedig az embrionális karotinoid (lutein) befolyásolja az antigénre adott bőrválaszt házityúkban. A munkacsoport korábbi adatai arra utalnak, hogy a hiányos karotinoid ellátás, akár már *in ovo* vagy a kelést követően növeli a szisztémás gyulladás paramétereinek értékeit (Koutsos és mtsai. 2006).

Élő IBV vakcinázást követően azt tapasztalták, hogy a takarmány lutein tartalma jótékony hatást fejt ki a tojó immunrendszerére, azaz a lutein jelentősen növelte az antitest választ. Azon kívül, hogy a megemelt lutein tartalom a funkcionális élelmiszernek minősíthető tojások termelésében, mint nutraceuticum is szerepet játszik, egyben kedvező hatással van a tojótyúkok immunválasz készségére (Bédécarrats és Leeson, 2006).

Olson és munkatársai (2008) likopinnal végzett kutatásukban azt bizonyították, hogy a likopint be lehet építeni étkezési tojásba. Az elért koncentráció 3,5 mg / kg tojássárgája volt. Úgy tapasztalták, hogy a tojó likopinnal és α -tokoferollal kiegészített étrendje nem befolyásolta más karotinoidok koncentrációját a tojássárgájában, és az immunrendszer aktivitására, gyulladós reakciókra, és a bőr basophil érzékenységi vizsgálatára sem volt hatással.

Bárdos és munkatársai (2005) által végzett vizsgálatban a likopin kiegészítésben részesített japán fürjek és házityúk esetében is mind a kontroll, mind a kiegészítéssel takarmányozott csoportban BSA antigénnel történő immunizálást követően megemelkedett szérum IgY titert tapasztaltak. A likopinnal kiegészített csoportban szignifikánsan nagyobb volt az IgY titer a vizsgálat második hetében. A humorális immunválasz növekedéséből arra következtettek, hogy a folyamatos likopin bevitel képes növelni az immunkompetens sejtek és szövetek működését.

Japán fűrjekben végzett kutatási eredmények arra utalnak, hogy a tojók környezetében lévő betegség mindenekelőtt a reprodukciós időszakban jelentős mértékben befolyásolja az anyai antitest transzportot. Ezek a maternális ellenanyagok biztosítják az utódok számára, hogy részleges fertőzés alatt is fejlődni tudjanak, valamint gondoskodnak a passzív humorális immunvédelemről (Grindstaff 2008).

Tehát a különböző állatfajokon végzett kísérletek alapján megállapítható, hogy a karotinoidok pozitív hatást gyakorolnak a humorális immunválaszra. Mind *in vitro*, mind *in vivo* megfigyelhető a megnövekedett antitesttermelés az antigén expozíció követően. Mindemellett az antitesttermelő sejtek száma megemelkedett a karotinoidok hatására (Nitschke 2005).

Az E-vitamin valószínű, hogy hasonlóan más táplálkozási tényezőkhöz többféle funkción keresztül hat az immunrendszer fejlődésére, működésének fenntartására, közvetlenül hatva az immunsejtekre vagy közvetetten megváltoztatva a metabolikus és endokrin paramétereket, melyek hatással vannak az immunrendszerre. Antioxidáns vegyületként csökkenti a szabadgyökök által indukált elváltozások megelőzését. A tokoferol a sejtmembránban lévő elsődleges antioxidáns vegyületeként különösen fontos a lipidperoxidáció megelőzésében. A zsírsavak immunmoduláns hatást fejthetnek ki azáltal, hogy befolyással vannak a sejtek közti kommunikációra, a membrán fluiditására és a másodlagos hírvivők működésére is. Az E-vitamin zsírsavak stabilitására gyakorolt hatása az immunrendszer működésére ilyen módon kihat. Egy másik lehetséges immunszabályozó mechanizmusa az arachidonsav metabolizmusának szabályozása ciklooxygenáz és lipoxigenáz metabolikus pályákon keresztül, mely a prosztaglandinok és leukotriének szintéziséhez vezet (Leshchinsky és Klasing 2001).

Az E-vitamin megemelt dózisban etetve a madarakkal immunmoduláns hatással bír. Befolyással van a sejtmediált és humorális immunválaszra, a makrofágok működésére és a fagocitózisra így a betegségek megelőzésére. Az E-vitamin a csibe immunrendszerének fejlődésében is szerepet játszik, hiánya csökkenti a limfoid szervek növekedését és a keringő limfociták számát. E-vitamin kiegészítés hatására fokozódik az ellenanyag termelés, makrofág aktivitás és fagocitózis, növekszik e betegségekkel szembeni ellenállóképesség (Woodall és mtsai. 1996). Az 50 illetve 75 IU/kg dózisban adagolt E-vitamin megemelte az antitest válaszokat, valamint javította a limfociták mitogénekre adott proliferatív válaszát. Azonban a mérsékeltebb dózisú E-vitamin (50 IU/kg) C-vitamin kombináció még hatékonyabban befolyásolja az immunválaszt, mint a magasabb dózisú kiegészítések (Nameghia és mtsai. 2007).

A tokoferolok (E-vitamin hatású vegyületek) immunmoduláns hatásáról egymásnak ellentmondó eredmények láttak napvilágot. Emberben több hónapig tartó 60, 200 ill. 800 mg/nap dózisú E-vitamin kiegészítés közül a középső dózis volt a leghatékonyabb a T-sejt mediált immunválaszok (antigén által kiváltott IgG-titer, bőrreakciók) tekintetében (Meydani és mtsai. 1997).

Az 10 mg/kg-nál nagyobb E-vitamin szint a takarmányban károsítja a vírus antigénekre adott immunválaszt csirkékben és pulykákban (Friedman és mtsai. 1998).

A magasabb étrendi E-vitamin növelte a heterophil:limfocita arányt (Boa-Amponsem és mtsai. 2000).

Különböző dózisban etetett α -tokoferol intestinális immunitásra gyakorolt hatását vizsgálták tetanus toxoiddal immunizált csirkéken. Szignifikánsan magasabb IgA titeret mértek az 5000mg/kg tokoferol dózist kapó csirkék bélkaparékában és jelentősen megemelkedett ez a titer a 250 mg/kg tokoferol kiegészítésben részesülő csirkék esetében is. Az utóbbi csoport esetében a T-helper sejtek megnövekedését tapasztalták a perifériás vérben (Muirw és mtsai. 2002).

Leshchinsky és Klasing (2001) kimutatta, hogy broiler csirkében a 25–50 NE/ kg E-vitamin kiegészítés leginkább immunmoduláns hatású és az ennél nagyobb dózisban 100-200 NE/kg etetett E-vitamin kevésbé van hatással az immunrendszerre.

Az E-vitamin koncentrációja hatással van az eicosanoid profilra. Az eicosanoidok több szinten is szabályozzák az immunválaszt és a tokoferol ezáltal közvetlen hatással bír az immunrendszerre. Ez a hatás megnyilvánulhat különböző immunválasszal összefüggő funkcióban. Nagy mennyiségű étrendi tokoferol bevitele növekvő mennyiségű szöveti tokoferol jelenlétét eredményezte csirkékben és pulykában is, mely növelte a hús oxidatív stabilitását azonban az antitest termelés szempontjából hátrányos volt. Kis tokoferol kiegészítés fokozta a szervezet oxidációs folyamatok elleni küzdelmét és növekedett az antitesttermelés. A koncentráció növekedése viszont prooxidációt indít be, s az antitestek csökkenni kezdenek. Ilyen módon az E-vitamin közvetlenül befolyással hat az immunrendszerre (Friedman és mtsai. 1998).

2.9. Karotinoidok és az E-vitamin hatása a szikimmunitásra

A tojómadarak takarmányát emelt szintű retinil-acetáttal, illetve 2x-es-10x-es dózisu retinoid ekvivalens β -karotinnal kiegészítve javultak a keltethetőségi paraméterek (termékenység, kelési %, transzformáció) (Kerti és Bárdos 1997).

Heringsirályokban (*Larus fuscus*) végzett vizsgálatokból is kiderül, hogy a β -karotinnal és xantofillal táplált tojóknál a kültakaró pigmentációja fokozódott, valamint nagyobb plazma karotinoid koncentráció és antioxidáns aktivitás volt tapasztalható. Az immunglobulinok plazma koncentrációja, viszont meglepően kisebb volt a kontroll egyedekhez képest. Ezt jelezte az is, hogy a karotinnal kiegészített tojók nagyobb karotinoid koncentrációjú, de kisebb immunglobulin tartamú (azaz szikimmunitást képviselő) tojásokat tojtak, míg a kontroll tojók tojásaiban kisebb karotinoid, de nagyobb Ig koncentráció volt tapasztalható. Ezek az eredmények

is bizonyítják, hogy a karotinoidok befolyásolják a tojás minőségét, valamint a maternális hatásokat (Blount és mtsai. 2002).

Saino és munkatársai (2003) füsti fecskén (*Hirundo rustica*) végzett vizsgálataikban bizonyították, hogy a karotinoidok (lutein) fontos szerepet töltenek be az embrionális fejlődés során az immunitásban és az oxidatív stressz elleni védelemben. A luteinben gazdag tojásból kelt fiókáknál nagyobb T-sejtmediált immunválaszt tapasztaltak a kontroll csoportokhoz képest. A lutein kiegészítés azonban nem befolyásolta a mért növekedési jellemzőket (testtömeg, tarsus hosszúság, tollazat fejlődés). Ezzel alátámasztották korábbi megfigyeléseiket, miszerint a karotinoidok maternális transzportja hatással van az utód fejlődésére és immunrendszerére.

Kék cinegékben (*Parus caeruleus*) viszont az anyai hatás (azaz a tojók karotinoid ellátottsága) mind az embrionális fejlődés alatt, mind kelés után befolyásolta a sejtes immunválasz gyorsaságát, mely során a karotinoid kiegészítésben részesülő tojók fiókái előnyt élveztek (Biard és mtsai. 2006).

Cucco és munkatársai (2006) kísérletüben fogoly tojókkal β -karotinnal dúsított és karotin hiányos takarmányt etettek, illetve a kikelő csibéket takarmányozták β -karotinnal dúsított illetve hiányos takarmánnyal. Az első kísérleti elrendezésben úgy találták, hogy a β -karotinnal dúsított takarmányt fogyasztó tojók semmilyen fiziológiai hatással nem voltak a csibéikre. A második kísérletben viszont a β -karotin kiegészítésben részesülő csibékben a β -karotin pozitív hatással volt növekedésükre és immunválasz készségükre. Ezek az eredmények ugyan ellent mondanak a maternális karotinoid transzport hatékonyságának, de megerősítik, hogy ez a színanyag szerepet játszik a madarak immunválasz-készség kialakításában.

Mindebből megállapítható, hogy a környezeti (pl.: táplálkozási) és a maternális hatások együttesen befolyásolják az utódok immunválasz készségét (Soler és mtsai. 2003).

Szarkákban (*Pica pica*) végzett kísérletben azt találták, hogy az utódok immunglobulin szintje függ a tojók táplálékának karotinoid tartalmától. Az extra tápanyag kijuttatása a tojópárok fészkének közelébe kétnaponta kihelyezett 5-5 tyúktojással történt. Ezt a szarkák elfogyasztva a napi energia igényük 70%-ának felvétele mellett jelentős karotinoid (lutein, zeaxantin) ellátásban is részesültek. A fészkekben kikelt utódok maternális eredetű immunglobulin szintje a kelési sorrenddel pozitív összefüggésben állt a csibék 10. napos kori immunglobulin szintjével. A fiókák 8-10 napos korában kezdődik meg az immunglobulin termelése. A maternális immunglobulin titer nem befolyásolta a fiókák növekedését, de negatív kapcsolat volt megfigyelhető a saját immunglobulin termelés és a növekedés között életük első időszakában (Pihlaja és mtsai. 2006).

A karotinoid kiegészítést fogyasztó tojók fiókáinál az immunrendszer gyorsabb fejlődése a vérben leukocita-szám által jól kimutatható, azonban nem okoz jelentős különbségeket

testtömegben, plazma-antioxidánsokban, vagy tollazatszín-színárnyalatban (Biard és mtsai. 2005).

A tojás karotinoidjainak manipulálása (lutein tartalom növelése) az antioxidáns hatás növelése révén a kikelő fiókák életképességét és immunválaszképességét is fokozza (Saino és mtsai. 2003).

Vadmadarakon végzett karotinoid ellátottság és az immunválasz közötti összefüggésre vonatkozó kutatások eredményei olykor egymásnak ellentmondóak.

Sármányok (*Emberiza sp.*) esetében lutein és zeaxantin kiegészítést alkalmazva azt tapasztalták, hogy ezek az oxikarotinoidok jelentős hatással vannak a tollazat és a csőr színére, de az immunkompetenciára nem. A sejt-mediált és humorális immunválasz vizsgálatokor megfigyelték, hogy nincs jelentős hatása az étrendi karotinoidnak az immunválaszra, vagy a betegségekkel szembeni ellenállóságra. Így nem találtak összefüggést a színezet és az immunválasz között sem (Navara és Hill 2003).

A karotinoid kiegészítésben részesült hím pintyek esetében a vérben keringő karotinoidok szintje 2 hét után szignifikánsan megemelkedet, és támogatta az immunrendszert is (McGraw és mtsai. 2006).

Szürke fogollyal (*Perdix perdix*) végzett kutatások bizonyítják, hogy a β -karotin jótékony hatással van a tojók immunválaszának mértékére, de a kakasok esetében nem volt ilyen változás tapasztalható. Egyik ivarban sem volt összefüggés a táplálék β -karotin és a plazma karotinoid koncentrációja között. Ebben a fajban meglepő módon azt tapasztalták, hogy a vér és a tojás sárgája karotinoid szintje független a tápláléktól (Cucco és mtsai. 2007).

3. A VIZSGÁLATOK CÉLJA, CÉLKITŰZÉSEK

A szervezet immunműködésében mind a karotinoidok, mind az A-, és E-vitamin szerepének már több vonatkozása is ismert. A szakirodalomban található ellentmondó adatok tisztázása azonban jelenleg is folyik. A madarakban nagyon sok a specialitás az anyagok felvételének, beépülésének és felhasználódás folyamatainak a terén a tyúk-tojás-utód tengelyben.

Baromfiban a szervezet immunrendszerének is több az emlősökétől eltérő sajátossága és az immunfolyamatokat befolyásoló vitaminok kölcsönhatásának tisztázása is cél. Alapvető cél lehet az immunglobulinok tojásszíkbe épülési dinamikájának a megismerése különböző vitaminellátottság esetében.

Vizsgálatainkban a tokoferol/retinoid és néhány karotinoid, valamint az immunválaszkészség összefüggését kívánjuk feltárni modell és gazdasági állatként egyaránt alkalmazható madárfajban, a japán fűrjben, valamint házityúkban.

Vizsgálandó kérdések:

- Specifikus ellenanyag kimutatható-e a “fehér” tüzőben is, vagy csak a “sárga” tüző tartalmaz specifikus ellenanyagot?
- Jól definiált antigénnel immunizált fűrjekben az egyidejűleg emelt szintű E-vitamin, karotinoid (β -karotin, lutein, likopin) egyedileg, illetve kombinációban alkalmazva, befolyásolja-e az E-, illetve az A-vitamin, és a karotinoidok tojássárgájába történő depozícióját?
- A kialakuló szikimmunitás szintjét és tartósságát mennyiben befolyásolja E-vitamin, karotinoid (β -karotin lutein, likopin) egyedileg, illetve kombinációban a takarmányban történő adagolása?
- Ezek a kezelések hogyan befolyásolják a keltethetőséget, valamint a kikelő csibék szikimmunitásának a szintjét?

Ennek a sokrétű kölcsönhatás együttes vizsgálatának kiindulási területe a fejlődő tüzők IgY és vitamin tartalmát jelentő alapállapotok felvétele. Ezt és az irodalmi adatokkal történő összevetését követően különböző vitamin dózisosoknak a szikben történő akkumulációja, valamint a közöttük és az IgY titerek közötti viszonyok felmérése, egyrészt a zsírolldható faktorok közötti kompetíció, másrészt az immunmoduláns hatás, megállapítása a cél.

Másik terület az immunizálást követően megemelkedő szérum IgY szíkbe épülésének a dinamizmusát és annak a vizsgált vitaminok depozíciójával való kölcsönhatás leírását jelenti.

A vizsgálatból nyert adatok hasznosíthatóak lehetnek a baromfi ágazatban a termelésben, mivel ezek a feltárt összefüggések elősegíthetik a gazdasági haszonállatok optimális immunbiológiai állapotának kialakítását.

A kísérletsorozatot mintegy modellként kívánom elvégezni annak érdekében, hogy az abban nyert eredmények gazdasági állatok (elsősorban baromfi fajok) immunizálási programjához is adatokat szolgáltatassanak. A módszerek más fajokra történő adaptálása elősegítheti a nagy termelőképeségű haszonállatok optimális immunbiológiai állapotának kialakítását.

Az immunizálás hatékonyságát nagyban befolyásolják a megfelelő tartási és takarmányozási körülmények, a szervezet kielégítő alap egészségi állapota, ennek egyik tényezője a megfelelő energia, azaz takarmányellátottság, valamint a kiegyensúlyozott antioxidáns ellátottság, aminek hatékony tényezői a karotinoidok, az A-, és E-vitamin. Immunizálás előtt a felsoroltakra kell fokozottan tekintettel lenni.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Kísérleti állatok

A japán fürjeket (*Coturnix japonica*) több mint 50 évvel ezelőtt kezdték el modell állatként alkalmazni. A szárnyasok tenyésztése terén folyó tudományos munkában a japán fürj sok területen tölti be a modell szerepét (Wilson és mtsai. 1961). Ezt elsősorban szaporaságának, gyors nemzedékváltásának köszönheti. A házi tyúkkal való közeli rokonsága elsősorban a baromfikutatás területén teszi alkalmassá kísérleti célokra. Kis testmérete és takarmányigénye, valamint nem nagy helyszükséglete minden más madárfajnál olcsóbb kísérleti alannyá teszi. Különböző életkorfüggő, szemészeti, immunológiai, endokrinológiai, valamint örökletes humán betegségek kutatásával kapcsolatos kísérletben is szerepel modell állatként. Az egyes betegségek vizsgálatához különböző genetikai vonalakat hoztak létre a kutatók, akik ezáltal még pontosabb eredményeket nyerhettek kutatásaikból humán vonatkozás tekintetében is. A fürjeket gyakran használják takarmányozási, genetikai, fiziológiai, embriológiai, endokrinológiai, patológiai, farmakológiai és toxikológiai kísérletekben (Czibulyás és Kovács 1976).

Kísérleteink többségét mi is japán fürjekeken végeztük. Az *in ovo* lejátszódó karotinoid és IgY transzport vizsgálatához azonban tyúktojásokat használtunk második kísérletünkben.

A fürjek tartására természetes megvilágítású állatházban elhelyezett külső etetővel és önitatókkal felszerelt faforgáccsal almozott állattartó dobozokat használtunk.

4.2. Vizsgálatok

4.2.1 Az IgY transzport vizsgálata: alapállapot felvételezése kereskedelmi takarmányok etetésével (1. kísérlet)

A tojótyúk esetében a hatékony szik képződése néhány nap, ez a rövid idő igen meghatározó az utód *in ovo*, illetve az első *postnatalis* napok fejlődéshez szükséges anyagok felhalmozása, raktározása szempontjából. Ugyanis az anyagok anya-utód transzportja különösen fontos szerepet játszik az ún. szikimmunitásban, melyet a tojóasságában jelentős mennyiségben jelen levő, emlős IgG-analóg, az IgY biztosít. Ezért az immunizálást követően ez a poliklonális ellenanyag a teljes tojóciklus alatt termeltethető a tojómadárral. Így véreztetés nélkül relatív egyszerű technikával kivonható a tojásból, ami az IgY felhasználhatóságának egyik legnagyobb

előnye. Emellett több előnye is ismert, így: relatív hő és pH stabilitás, elhanyagolható az Fc-receptorokkal és a komplement rendszerrel való kölcsönhatás, stb.

Az IgY transzport két jól elkülöníthető történésre osztható. Az első az, amikor az ellenanyag a termelődési helyétől (IgY-termelő klónok) a véráram útján a petefészek tüszőibe jut. A másik eset a sziktömlőből a fejlődő embrióba jutás. Vizsgálatinkat e rendszer szerint végeztük.

4.2.1.1. A tüszők fejlődése alatt végzett vizsgálatok japán fűrjben

Kísérletünkben először az IgY tüszőkbe történő transzportját követtük nyomon. A folliculáris hierarchia különböző állapotában lévő (nagyságú, érettségű) tüszők (kis fehér, kis sárga, nagy sárga és ovuláció előtti) IgY és karotinoid tartalmát határoztuk meg. A kísérletben felhasznált japán fűrjeket egy tenyésztőtől („Tápiófűrj”, Tápiógyörgye) vásároltuk. A tenyésztés helyén az állatokat normál kereskedelmi tojótáppal takarmányozták, melyhez *ad libitum* hozzáférhettek. Az ivóvízzel történő ellátásuk folyamatos volt. Célunk a tüszőérési folyamat normál kereskedelmi takarmánnyal történő etetés esetén fennálló alap állapotának felmérése volt.

Aktív japán fűrj tojók (4 állat) *lege artis* exterminálását követően a kipreparált petefészektüszők átmérőjét és súlyát lemértük. A tüszőkből készített homogenátumból reverz fázisú HPLC módszerrel karotinoid, retinoid és tokoferol, valamint ELISA módszerrel IgY analíziseket végeztünk.

4.2.1.2. Keltetett tyúktojásban lévő embrió és napos csibében történő vizsgálatok

Az *in ovo* lejátszódó karotinoid, retinoid, illetve tokoferol, valamint IgY transzportot inkubált tyúktojásban követtük nyomon. A tyúktojások a Haszonállat-génmegőrzési Központ (Gödöllő) származó erdélyi kopasznyakú tyúk tenyésztőjásai voltak. Ebben az esetben is transzport folyamat normál takarmányozás mellett fennálló folyamatának felvételezése volt.

Asztali keltetőben inkubált tyúktojásokból a 0., 7., 14. és 19. napon 5-5, a kikelt csibék közül szintén 5 egyedből a kelést követő 5. napon történt mintavétel. Lemértük a tojások, az embriók, a szikzacskó és a *lege artis* exterminálást követően az embrionális, illetve a napos csibe szervek közül a máj súlyát.

A vérből (szérum), illetve a fiziológiás sóoldattal végzett szervhomogenátumokból reverz fázisú HPLC módszerrel karotinoid és retinoid, valamint ELISA módszerrel IgY meghatározásokat végeztünk.

4.2.2. Karotinoid kiegészítés hatásának vizsgálata az IgY transzportra

4.2.2.1. Xantofill kiegészítés hatásának vizsgálata (2. kísérlet)

Kísérletünkben kifejlett japán fűrj tojából két csoportot (n=10-10) alakítottunk ki. A kontroll csoport egyedeit kereskedelmi tojótáppal takarmányoztuk. A másik csoportot (Capsantal kieg. 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 tartó kísérlet alatt.

Mindkét csoport állatait immunizáltuk. A kísérlet során alkalmazott 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. A kecske vörösvérsejt és BSA kombinációjával (gRBC-BSA) mellizomba (i.m.) oltva immunizáltuk a fűrjeket a kísérlet kezdetekor és a 4. héten.

Hetente került sor vérvételre, mely minden alkalommal a szárny vénájából (*vena subcutanea ulnaris*) történt. A kísérlet időtartama alatt a második immunizálás időpontjától kezdődően a tojások minden nap begyűjtésre kerültek. Aktív japán fűrj tojók *lege artis* exterminálását követően kiperarált petefészektüszők átmérőjét és súlyát lemértük. A vér, illetve tüszők, a tojások retinoid és karotinoid koncentrációját reverz fázisú izokratikus HPLC módszerrel mértük, valamint a tüszőkben, szikben, illetve a keringésben lévő madár immunglobulint (IgY) ELISA módszerrel analizáltuk. A tojássárgája, valamint a bőrfelszín színét is mértük. A tojások színét Yolk Colour Fan-nel (YCF) hasonlítottuk össze. A tojás, valamint a bőrfelszín színének értékelését kolorimetriás módszerrel a CIELab skálához viszonyító kézi reflexiós célfotométerrel határoztuk meg (MicromatchTM Plus, Sheen Ltd., United Kingdom).

4.2.2.2. Karotinoid-mentes takarmányhoz adagolt likopin, lutein, β-karotin és A-vitamin kiegészítés hatásának vizsgálata (3. kísérlet)

Nyolchetas fűrjeből 7 csoportot alakítottunk ki, csoportonként 5-5 állattal. Minden csoportba egy kakas is került, ezzel biztosítva a termékeny tojásokat.

Az 1. csoportot kereskedelmi tojó táppal takarmányoztuk. A további csoportok a kutatócsoport korábbi vizsgálataiban kimunkált (Réthy és mtsai. 2005) rizs alapú karotinoid-mentes takarmányhoz keverve 15 000 NE retinol/tak.kg ekvivalens β-karotin (BC; 2. csoport), lutein (LU; 3.cs.), likopin (LI; 4.cs.), illetve mindhárom karotinoid (BC+LU+LY; 6.cs.),

valamint A-vitamin (7.cs.) kiegészítésben részesültek. Kiegészítés nélkül a karotinoid-mentes alaptakarmányt az 5. csoport fogyasztotta. (4.2.1. és 4.2.2. táblázat)

A takarmánykeverés kis tételben (néhány) napi adagokban történt elkerülendő a kiegészítésként alkalmazott karotinoidok károsodását. Az adalékokat a csomagoláson feltüntetett módon (légmentesen lezárva, sötétben, hűtőben tartottuk).

4.2.1. táblázat

A kísérleti takarmányban alkalmazott kiegészítések

	gyártó	hatóanyag koncentráció	g/tak kg
Beta-karotin	DSM	10%	0,4
Lutein	DSM	5%	0,8
Likopin	DSM	10%	0,4
A-vitamin	Vitafort		0,3268

4.2.2. táblázat

A 3. kísérletben kialakított csoportok

csoport	alaptakarmány	kiegészítés	bemért mennyiség
1	normál tojó táp	-	-
2	rizsalapú tojó táp	BC	0,4 g/ kg
3	rizsalapú tojó táp	LU	0,8 g/kg
4	rizsalapú tojó táp	LI	0,4 g/ kg
5	rizsalapú tojó táp	-	
6	rizsalapú tojó táp	BC LU LI	0,12 + 0,24 + 0,12 g/kg
7	rizsalapú tojó táp	A-vitamin	0,6556 g/2 kg

A kísérlet ideje alatt a madarak *ad libitum* takarmányozásban és itatásban részesültek.

A fürjeket mellizomba (i.m.) oltva immunizáltuk. A korábbi kísérletek immunizálási protokollját alkalmazva. Antigénként tisztított kecskevérősvérsejt (gRBC) és Bovin serum albumin (BSA) kombinációját alkalmaztuk 100 µg/állat koncentrációban. A felnőtt állatokból a kísérlet időtartama alatt hetente vettünk vért, valamint a tojásaik begyűjtésre kerültek. A 14-21 napok között tojt tojások keltetésre kerültek.

Asztali keltetőben inkubált tojásokból a 14. napon történt mintavétel (csoportonként 3-3 db). Lemértük a tojások, embriók, szikzacskó és az embrionális, illetve napos csibe szervek közül a máj súlyát.

A vérből (szérum), illetve a fiziológias sóoldattal végzett szervhomogenátumokból karotinoid és retinoid, valamint IgY meghatározásokat végeztünk.

4.3. Alkalmazott keltetéstechnológia

Az inkubációkat egy ME3M (MainoEnrico-Ariano Di Maino Roberto C.S.N.C.) típusú asztali keltetőgépben végeztük. A tyúktojás keltetését Bogenfürst (1994) leírása, a fürjtojások keltetésénél alapjaiban Sinkovicsné (1973), illetve a kutatóhely korábbi tapasztalatai (Kerti és Bárdos 1997) szerint jártunk el.

4.4. Alkalmazott analitikai módszerek

4.4.1. A specifikus IgY vizsgálata

A specifikus ellenanyagok kvalitatív és kvantitatív kimutatása vérből (szérum), szikból, szikzacskóból, valamint májból ELISA módszerrel (Losonczy és mtsai. 1999) történt. A fotometriát megelőző színekifejlesztést az eredeti leírás OPD (*o-phenylenediamine dihydrochloride*) kromogén szubsztrátja helyett egy általunk végzett módszertani előkísérlet eredményeként már TMB-t (*3,3',5,5'-tetramethylbenzidine*) használtunk (Jung és mtsai. 2009).

Vér (szérum) minták

A vizsgálatainkban szérumot használtunk. A vérvételt követően szobahőmérsékleten állni hagyjuk a levett vért a teljes alvadásig (max. 1-2 ó). Az alvadékot túvel, vagy mandrinnal finoman leválasztottuk a kémcső faláról, majd centrifugáljuk. Az így kinyert vérszérum-mintákat fagyasztva (-20°C) tároltuk a felhasználásig.

Szikminták

A tojások fehérje és sárgája frakcióját különválasztottuk, majd a tojások sárgájából egyenként 1 g került mintavételre, ezt követően 1 ml fiziológias vízzel hígítottuk és így került szintén fagyasztásos (-20°C) tárolásra.

Májminták

Az elvéreztetett fürjek boncolása során kiemeltük a májat, lemértük a tömegét, majd lefagyasztottuk (-20°C).

A soklebensű fajokban (pl.: sertés, kutya) jelentős eltérések lehetnek lebenyek között pl. az A-vitamin koncentrációkban. Ezt az intralobuláris érellátás magyarázhatja. A baromfiban csak

két (ritkán három) májlebeny van. Ezeknek közös törzsből származnak az erei, kevesebb az érelosztódás, így a vérellátás is sokkal egyenletesebb (Bárdos 1991). A méréseket az általában nagyobb jobb májlebenyből végeztük el. Az analízisek előtt a kiolvasztott szövetből 1 gramm mennyiséget fiziológiás oldatban potter készülékkel homogenizáltunk, majd centrifugáltunk (4 °C, 20 min). A felülúszóból végeztük az ELISA méréseket.

4.4.2. Karotinoidok, retinoidok és tokoferol vizsgálata

A meghatározásokat vérből (szérum), szikból, májból végeztük el. A tojássárgája, szik, máj és a szérum minták karotinoid és retinoid összetételét minden kísérletben reverz fázisú izokratikus nagyérzékenységű folyadékkromatográfiás (rpHPLC) módszerrel mértük (Kerti és Bárdos 2006).

A mintákat azok jellegének megfelelően készítettük elő.

Szérum minta előkészítése

A vérvételt követően a 4.4.1. vérmintáknál leírt módon az alvadást követően centrifugálással leválasztott szérumot analízisig -20°C-on tároltuk. A lefagyasztott mintákból felolvasztás után 250 µl-t mértünk 4 ml-es centrifugacsőbe, majd ehhez 250 µl 10%-os aszkorbinsavat és 500 µl etanolt adtunk, 30 másodperces örvénykeverés után 1000 µl hexánt mértünk hozzá, majd ismét 30 másodpercig örvénykevertettük. 10 perces centrifugálást követően a tiszta felülúszóból a rpHPLC analízishez 400µl-t Eppendorf-csőbe pipettáztunk, és N-gáz áramoltatással kb 4-5 perc alatt bepároltunk. A HPLC-oszlopra történő injektálás előtt 100 µl etanol-dioxán 1:1 arányú keverékben felvettük, és rövid ideig tartó örvénykeverés után 150 µl acetonitrilt adtunk hozzá.

Egyéb állati szövetek (szik, máj) előkészítése –karotinoid és retinoid analízishez

Boncolás során kiemelt máj és szikzacskó tömegét lemértük, majd felhasználásig -20°C-on tároltuk. A tojásmintákból 0,5 grammot kimértünk, ehhez 1 ml 10%-os aszkorbinsavat adtunk s további felhasználásig -20°C-on tároltuk. Az analízishez felengedett mintát örvénykeverés közben üvegbottal homogenizáltuk, és 3 ml extraháló keveréket (10:6:6:7: hexán: acetone: abszolút etanol: toluol) adtunk hozzá. 10 perces centrifugálást követően a tiszta felülúszóból rpHPLC analízishez 200µl-t Eppendorf-csőbe pipettáztunk és továbbiakban úgy jártunk el, ahogy a szérum esetében.

A lefagyasztott májmintákból 0,3 g-ot kimértünk és 3 ml extraháló keveréket, valamint 1 ml etanolt adtunk hozzá. 10 perces centrifugálást követően a tiszta felülúszóból rpHPLC analízishez 200µl-t Eppendorf-csőbe pipettáztunk és továbbiakban úgy jártunk el, ahogy a

szérum esetében. A HPLC-oszlopra történő injektálás előtt 200 µl etanol-dioxán 1:1 arányú keverékben felvettük, és rövid ideig tartó örvénykeverés után 300 µl acetonitrilt adtunk hozzá

Az előzőekben leírt előkészítést követően a tiszta kivonatból 20 µl-t C18 Rocket Platinum oszlopra injektáltuk (100A 3µ 53 mm x 7 mm) (Alltech, USA). Az alkalmazott HPLC rendszer PU-980-as pumpából és UV-2077; 4 csatornás detektorból (Jasco, Japan) állt. A mozgó fázist (acetonitril : tetrahidrofurán : metanol : ammónium-acetát 1%-os - 684:220:68:28) 1 ml/perc sebességgel pumpáltuk. A detektált csúcsokat standardok alapján azonosítottuk (tokoferol 290 nm; retinoid 325 nm; karotinoidok 450 nm, likopin 505 nm) a hígítások figyelembe vételével ChromPass (Chromatography Data System, JASCO HPLC, Japan) programmal történt a koncentrációk kiszámítása.

4.4.3. A tojás és a bőrfelszín vizsgálata CIELab módszer

A friss tojások sárgájának a színét Yolk Colour Fan-nel (YCF - DSM), illetve kolorimetriás módszerrel a CIELab skálához viszonyító kézi reflexiós célfotométerrel határoztuk meg (Micromatch™ Plus, Sheen Ltd., United Kingdom).

A bőrfelszín színváltozásainak mérését kolorimetriás módszer a CIELab skálához viszonyító kézi reflexiós célfotométerrel határoztuk meg (Micromatch™ Plus, Sheen Ltd., United Kingdom)(Szabó és mtsai. 2007).

Ez a rendszer 3D-szintérben elhelyezett koordinátákkal (L^* , a^* , b^*) jellemzi a vizsgált felületről visszaverődő aktuális színt. A színeket két vízszintes, egymásra merőleges tengelyen ábrázolja, ahol a vörös ($a^* = 0 - +100$) – zöld ($a^* = 0 - -100$), valamint a sárga ($b^* = 0 - +100$) – kék ($b^* = 0 - -100$) közötti értékben helyezi el azokat. Az ezekre merőleges függőleges tengelyen a világosság (L^* - lightness) számértéke, ami 0 (fekete) és 100 (fehér) között változik.

A belső bőrfelszínen a bőralfában lerakódott zsírréteg karotinoidjainak a színét tudtuk mérni. A külső bőrfelszínen történő méréshez a fürjeken a mellizom feletti kis tolltűsző nélküli felülete miatt nem elégséges, mivel a műszer apertúráját nem lehet kellő sík felületre helyezni.

4.5. Alkalmazott statisztikai módszerek

A mérések (pl.: súly, abszorbancia, koncentráció egység) egyedi értékeiből elvégzett átlag (\bar{x}) számítás és szórás ($\pm s$) becslést követően az eredményeket párosított, illetve kétmintás t -próbaival), adatsorok közötti összefüggéseket Pearson-féle korrelációs együttható (r) kiszámításával minősítettük (MS Office 2010 Excel).

Azokban az esetekben ahol a csoportátlagok értékeit elemeztük a varianciaanalízis (ANOVA) Tukey-féle tesztjét, valamint Dunett-féle tesztet (GraphPad Prism ver. 5.0 for Windows) alkalmaztuk.

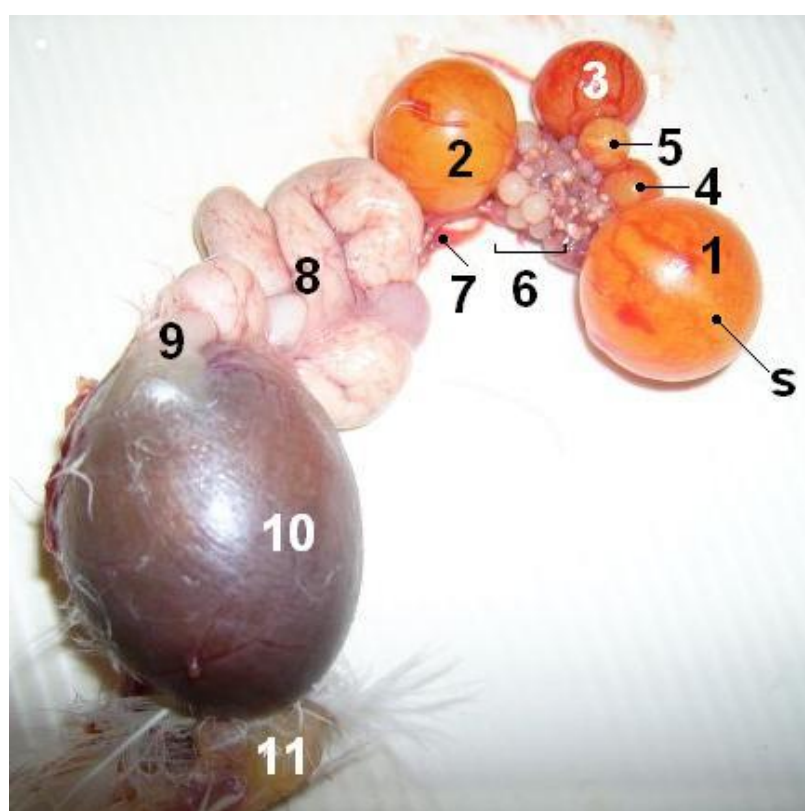
Szignifikánsnak a $p < 0,05$ (5%-nál) kisebb értéket tekintettük.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Az IgY transzport vizsgálata: alapállapot felvételezése kereskedelmi takarmányok etetése mellett (1. kísérlet)

5.1.1. A tüszők fejlődése alatt végzett vizsgálatok japán fürjben

Az első képen egy aktív japán fürj tojó kipreparált petefészke és petevezetője látható.



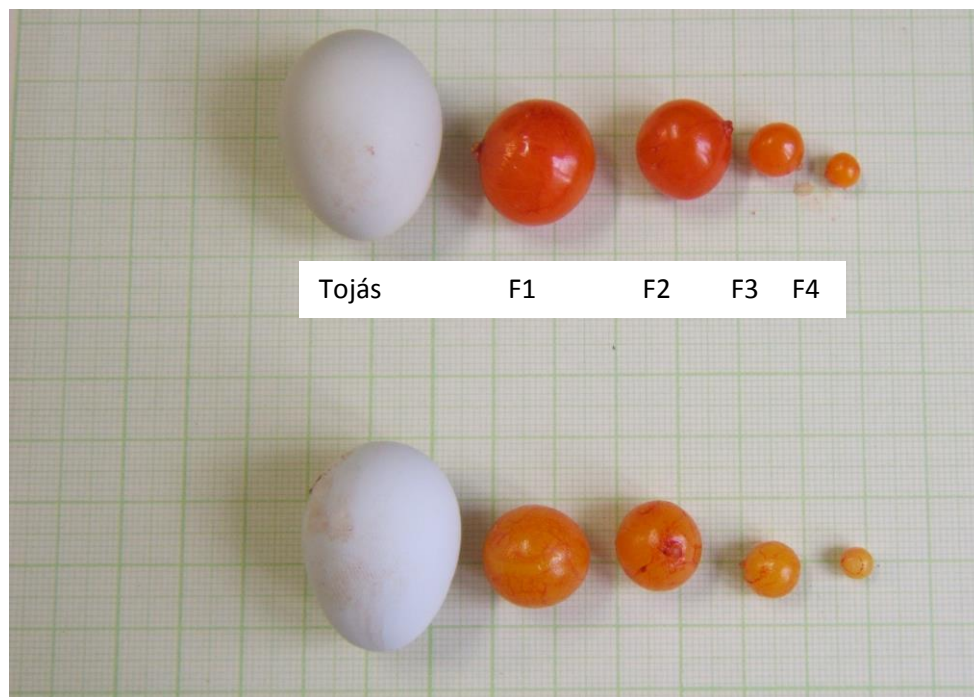
1. kép

Japán fürj kipreparált petefészke és petevezetője

(Bárdos 2008)

1-5 nagy sárga F1-F5 tüszők; 6. kis fehér tüszők, 7. a petevezető tölcsére (*infundibulum*); 8. fehérje termelő szakasz (*magnum*), 9. szoros (*isthmus*), 10. héjmirigy (*uterus*), ami meszesedő tojást tartalmaz, hüvely (*vagina*), s: a tüszőrepedés helye (*stigma*)

A tüszőket átmérőjük és tömegük szerint hierarchikus sorrendbe rendeztük (2. kép).

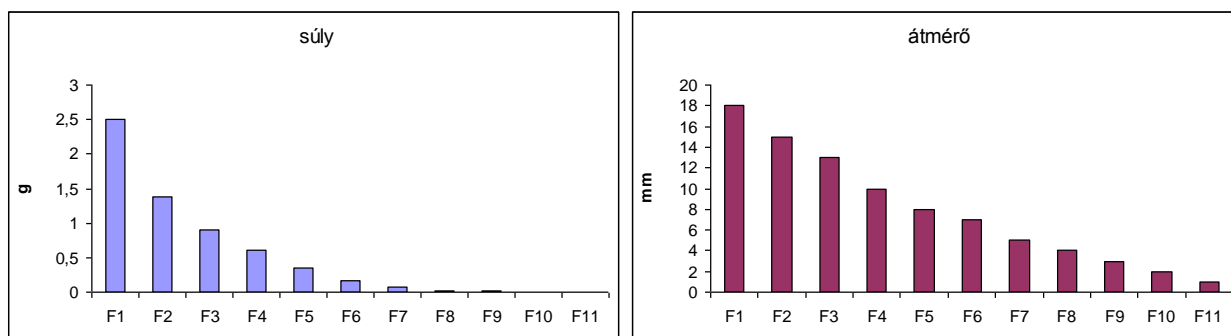


2. kép

Japán fürj tojás és kiperarált tüszői (F1-F4)

(Készítette: Jung Ivett)

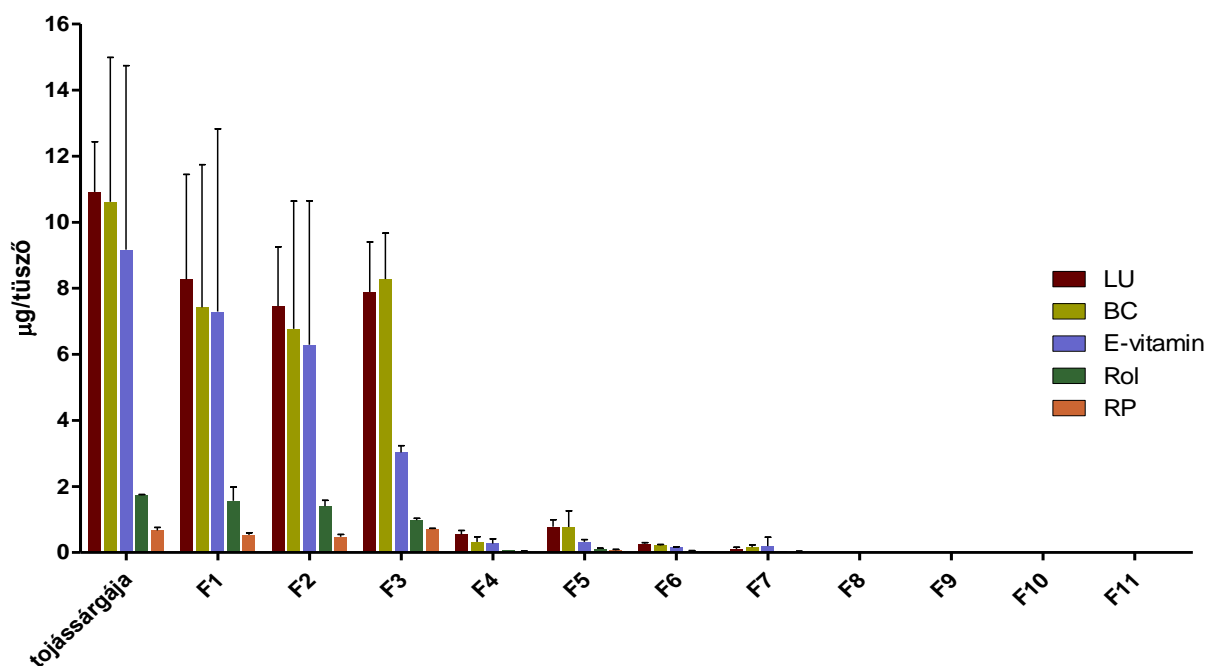
A tüszőket tömeg és átmérő szerint hierarchikus sorrendbe rendeztük, tüszők átmérő és tömeg szerinti alakulását az 5.1.1. ábra szemlélteti a legnagyobb F1 jelölt legkisebb (még lemérhető!) F11 tüsző felé. Az ábrán látható, hogy az F7 tüsző mérettől kezdődően a tüszők súlya ugrásszerűen, átmérőjük is fokozatosan növekedik.



5.1.1. ábra Japán fürj tojók petefészkéből kiperarált tüszők súlya (g) és átmérője (mm)

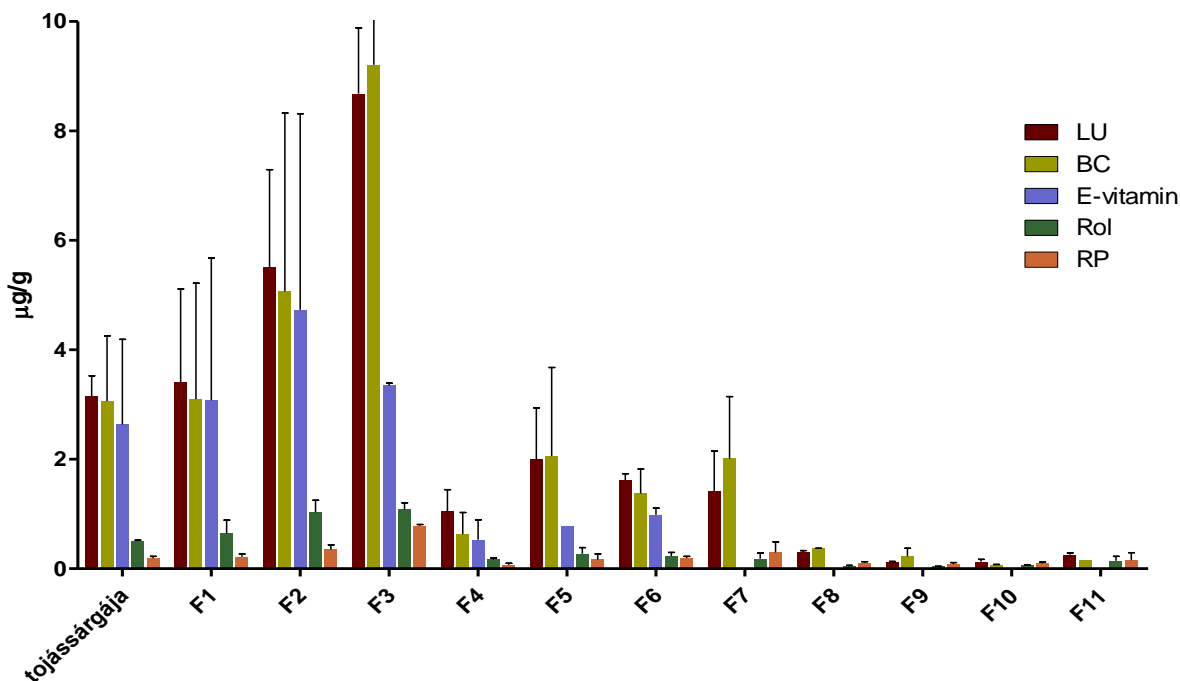
A karotinoid (lutein LU, és BC), retinoid (retinol ROL, és retinil plamitár RP) és tokoferol (TF) analízis során mért értékek (5.1.2A. és 5.1.2B ábra) azt szemléltetik, hogy

ezeknek a biológiailag aktív anyagoknak a szikbe történő betárolása is az F7-el jelzett időszakban válik igen jelentős mértékűvé. A BC és a LU, valamint a retinoidok (ROL és RP) az F3 tüzöméret esetében éri el a legmagasabb koncentrációt. A vizsgált retinoidok a BC, LU és E-vitaminhoz képest jóval kisebb koncentrációban, illetve mennyiségben voltak detektálhatóak a fejlettebb F3 méretű tüzőben is. Az 5.1.2A. és 5.1.2B ábrán jól látszik, hogy az E-vitamin mennyiségének és koncentrációjának növekedése követi a karotinoidok, retinoidok tüzőbeli változását, a tüzőben történő depozíció során nem állapítható meg versengés az E-vitamin, valamint a BC, LU között aktív japán fűj tojók tüzőiben normál kereskedelmi tojótakarmánnyal történő takarmányozás mellett.



5.1.2A. ábra A tüzők karotinoid, retinoid és tokoferol mennyisége

Lu: lutein és zeaxantin; BC: β -karotin; E-vitamin: tokoferol; Rol: retinol; RP: retinil palmitát



5.1.2B. ábra A tüszők karotinoid, retinoid és tokoferol koncentrációja

Lu: lutein és zeaxantin; BC: β -karotin; E-vitamin: tokoferol; Rol: retinol; RP: retinil palmitát

A kereskedelmi tojótáppal takarmányozott japán fürjek petefészek tüszőinek tokoferol, valamint a karotinoidok (BC, LU), valamint retinol szintje között szoros összefüggés ($r > 0,7$) mutatható ki. Ezek az összefüggések mind szignifikánsnak ($p < 0,05$) bizonyultak (5.1.1. táblázat).

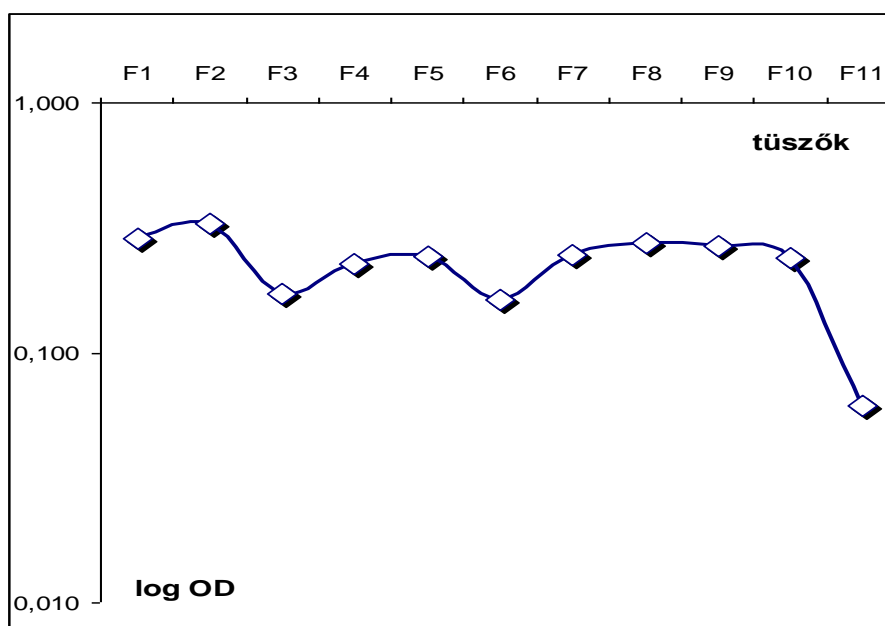
5.1.1. táblázat

Japán fürj petefészektüszők tokoferol, retinoid és karotinoid koncentrációinak összefüggése

		BC	LU	Rol	RP
Tokoferol	r	0,8039	0,8597	0,9523	0,6142
	p	0,0016	0,0003	0,0001	0,0336

A tüsző homogenátumok 1000-szeres hígításából végzett ELISA meghatározással nyert össz-IgY titer értékeit 10-es alapú logaritmikus skálán szemlélteti az 5.1.3. ábra. Az F10-es – még kis fehér - tüszőkben ugrásszerűen megnő az IgY-titer, ami azután kisebb-nagyobb ingadozást mutatva, de gyakorlatilag szinten marad az ovulációig. A vizsgált karotinoid,

retinoidok, valamint az E-vitamin koncentrációjának változása (5.1.2B. ábra), valamint az immunglobulin titer változása az egyes tüszőméretek vizsgálatának tekintetében nem mutat egyidejűséget.



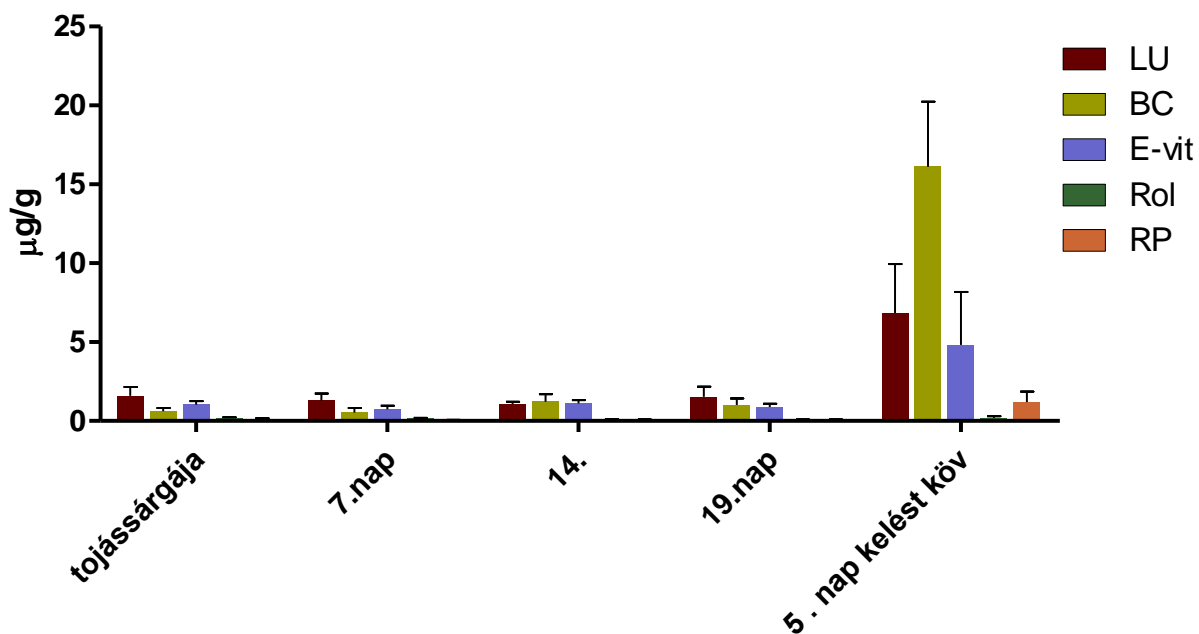
5.1.3. ábra Japán fürj tojók petefészek tüszőiben mért IgY-titerek

5.1.2. Keltetett tyúktojásban lévő embrió és naps csibében történő vizsgálatok

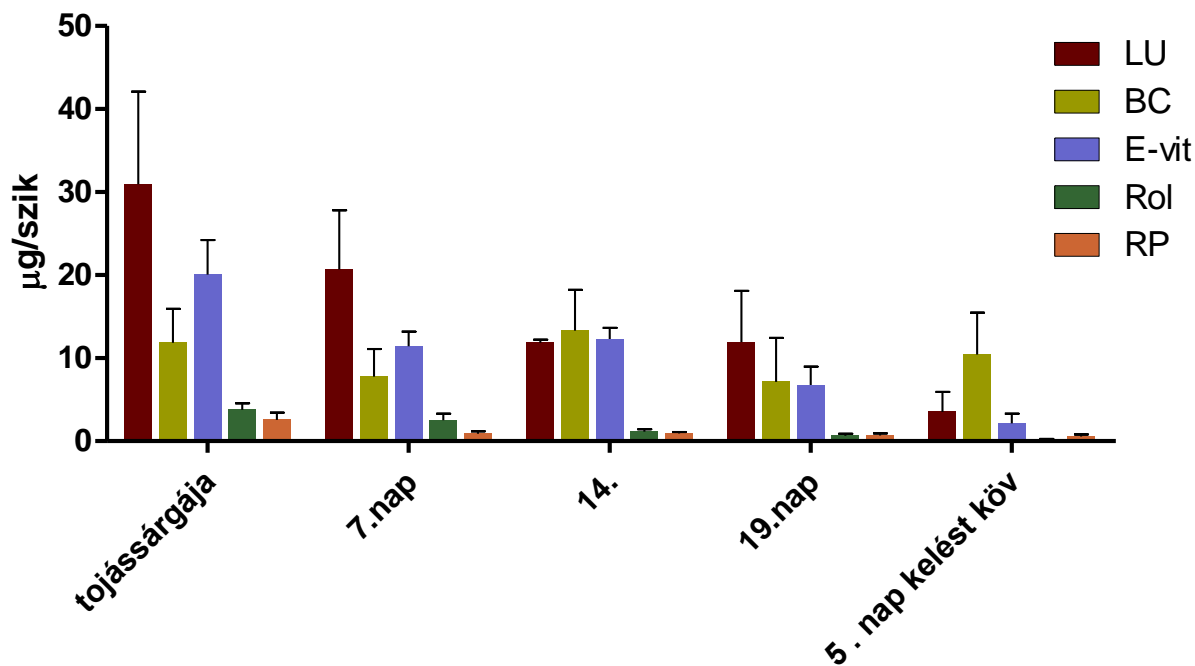
Vizsgálataink során rpHPLC-t alkalmazó módszerrel meghatároztuk a tojás szikanyagában található karotinoid, retinoid és tokoferol tartalmat (5.1.4A. és -B. ábrák).

A fejlődés különböző szakaszaiból (0. 7. 14. és 19. nap, kelést követő 5. nap) származó mintákban a szikanyag felszívódásával párhuzamosan a vizsgált anyagok (BC, LU, ROL, RP, tokoferol) mennyisége csökken. A legnagyobb mennyiségben a keltetés előtt vett tojássárgájában találhatóak ezek az anyagok, míg a kelést követő 5. napra mennyiségük csökken (5.1.4B. ábra), ugyanakkor koncentrációjuk ekkor a legmagasabb a felszívódás állapotában lévő szikzacskóban (5.1.4A. ábra). A BC esetében a vizsgált időszakban nem tapasztalható jelentős mennyiségbeli eltérés a szikanyagban. A vizsgált karotinoidok, retinoidok és tokoferol keltetés alatti szikanyagbeli koncentrációjának változása tekintetében azonban nem figyelhető meg egyértelműen ez a csökkenő tendencia. A szikanyag fokozatos felszívódásával egy időben az 5 naps csibében érik el a vizsgált anyagok a legmagasabb koncentrációt (5.1.4A. ábra). A kelést

követően a szikanyag felszívódási folyamata során egyre több folyadékot veszít, ezért tapasztalható a kelést követő 5. napon koncentráció növekedés.



5.1.4A. ábra A keltetett tyúktojás szik és az 5-napos csibe szikzacskójának karotinoid, retinoid és tokoferol koncentrációja

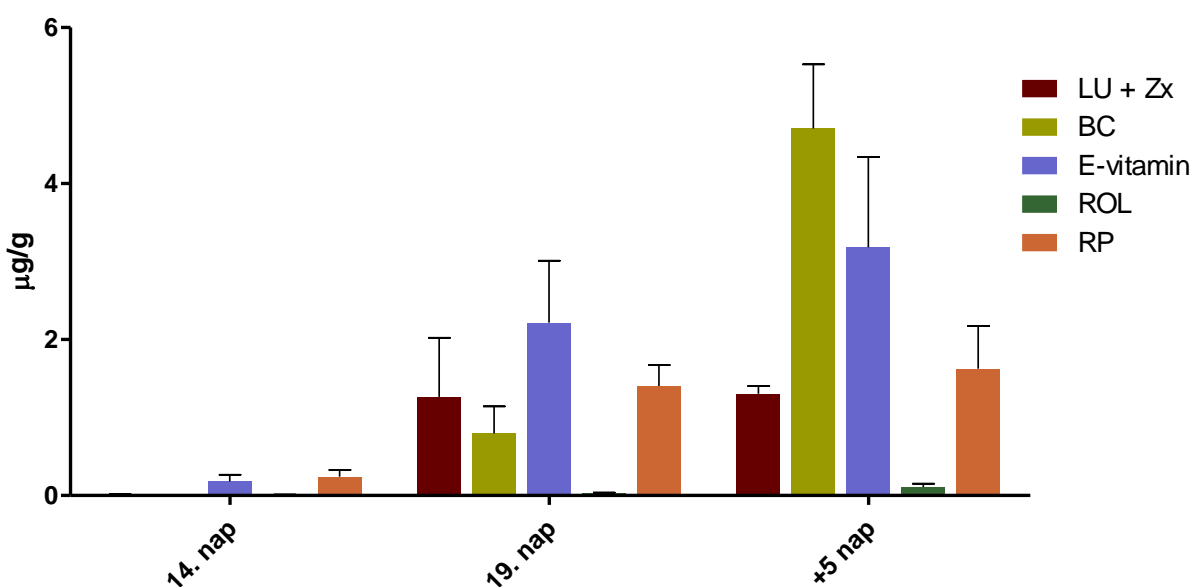


5.1.4B. ábra A keltetett tyúktojás szik és az 5-napos csibe szikzacskójának karotinoid, retinoid és tokoferol mennyisége

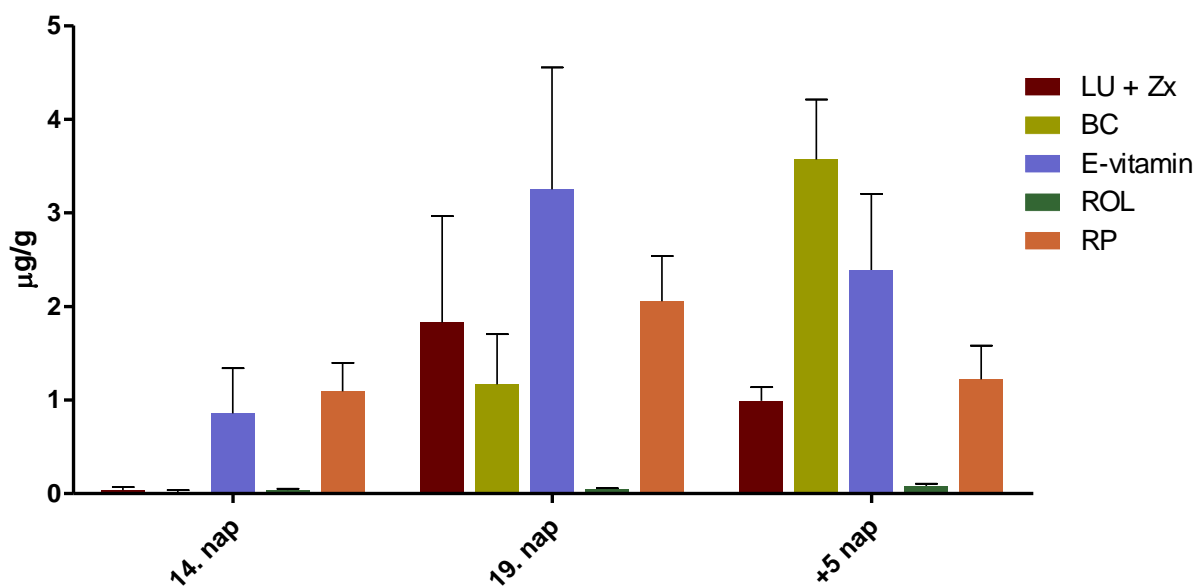
A karotinoid, retinoid és tokoferol mennyisége szikben fokozatosan csökken, ez a folyamat jelzi a madár szervezetébe történő transzportjukat. Ezt jól szemléltetik a raktározó szervből, a májból származó minták értékei (5.1.5A és B. ábra), mely szoros összefüggést ($r=-0,9$) mutatott a szikben található ROL, RP, és E-vitamin mennyiségének változása között, azonban a karotinoidok esetében nem mutatható ki ez a szoros összefüggés.

A keltetés 14. napjára az embrió mája már könnyen preparálható méretű. Az ebből az időszakból származó mintákban csekély mértékben volt kimutatható retinoid (RP) és tokoferol jelenléte. Ugyanekkor a karotinoidok (BC, LU) még nem voltak detektálhatók. A kikelés előtti napokban, a fejlődés 19. napjára a májban már a retinoid (RP) és a tokoferol mellett a karotinoidok (BC, LU) is kimutatható mennyiségben jelentek meg, hasonlóan a retinoid (RP) és a tokoferol mennyiségéhez (5.1.5A). Az 5.1.5A ábrán látható, hogy a ROL, az A-vitamin aktív formája alig detektálható mennyiségben van jelen a májban, mint raktározó szervben azonban a későbbi mobilizálhatóság céljából RP formájában raktározódik. Ezek a biológiailag aktív anyagok legnagyobb koncentrációban a perinatalis korban található a májban (5.1.5B).

A LU és RP mennyisége (5.1.5A ábra) közel állandó ebben az időszakban azonban koncentrációjuk csökken (5.1.5B ábra). A kelés idején megemelkedett E-vitamin koncentráció csökken a kelést követő 5. napon (5.1.5B ábra), ugyanakkor a mennyisége éppen ellenkezően növekedni kezd (5.1.5A ábra). A BC mennyisége és koncentrációja is növekedik (5.1.5A és B. ábra), ami ennek a biológiailag aktív anyagnak a jelentős raktározására utal a többi vizsgált anyaghoz (LU, E-vitamin, ROL, RP) képest.

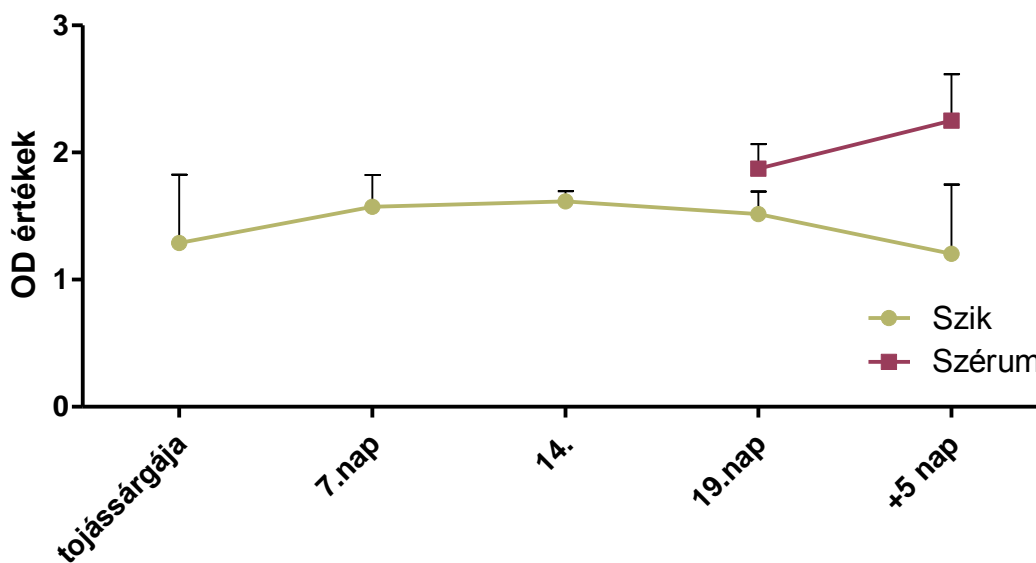


5.1.5A. ábra A májban található karotinoid, retinoid és tokoferol mennyisége



5.1.5B. ábra A májban található karotinoid, retinoid és tokoferol koncentrációja

A szikanyagban az IgY jelenlétének ELISA-val történő vizsgálata során megállapítható, hogy a tojássárgájában mért mennyiség fokozatosan növekszik (5.1.6. ábra). A 19. napon vett mintákban ez a koncentrációs tendencia átfordul, és a mért mennyiség csökken. Ezzel párhuzamosan a szérumban mért IgY szint növekedése figyelhető meg, mely az ellenanyag transzportjára utal.



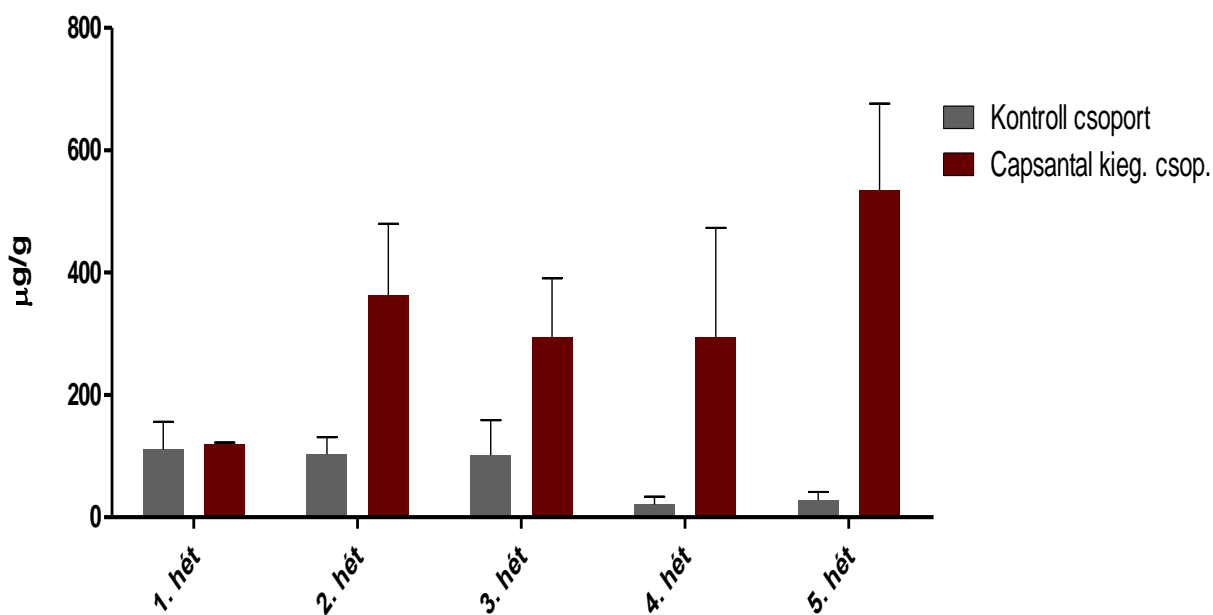
5.1.6. ábra A szikben és a szérumban mért IgY

A keltetés során a tojássárgájában tárolt karotinoidok (LU, BC) retinoidok (ROL, RP), valamint az E-vitamin koncentrációja közel állandó, s fokozatosan kerülnek felhasználásra a fejlődő embrióban. A szikból fokozatosan ürülnek és az idő előrehaladtával egyre nagyobb mennyiségben jelennek meg az embrió májában, ahol a vizsgált vegyületek közül a BC fordul elő a legnagyobb mennyiségben és koncentrációban a többi, vizsgálatunk tárgyát képező anyaghoz képest. Ez azt jelzi, hogy az utódok szempontjából későbbi életük során felhasználható BC raktár képződik.

5.2. Xantofill kiegészítés hatásának vizsgálata (2. kísérlet)

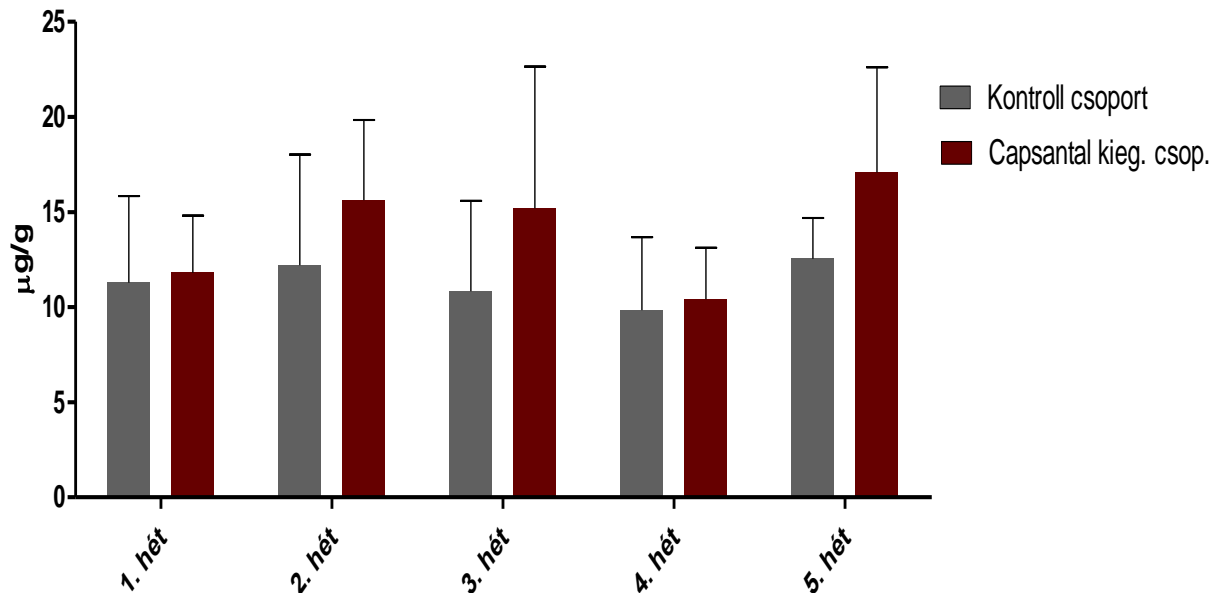
A kísérletben a nagybársonyvirágból (*Tagetes erecta L.*) származó xantofill komplex (Capsantal EBS 40 NT) takarmányba történő adagolását követően, mint színező, és mint az esetleges immunmoduláns tulajdonságú anyag hatását vizsgáltuk japán fürjekben.

A Capsantal (*Copharm, Gr*) adalék legfőbb komponense (82%) egy xantofill (oxi-karotinoid), a lutein. A kísérlet időtartama alatt a lutein koncentráció, a japán fürjek szérumában a kontroll csoport egyedeihez viszonyítva folyamatosan magasabb a Capsantal kiegészítésben részesült csoportban (5.2.1. ábra). A két csoport között szignifikáns különbség tapasztalható ($p < 0,05$ *).



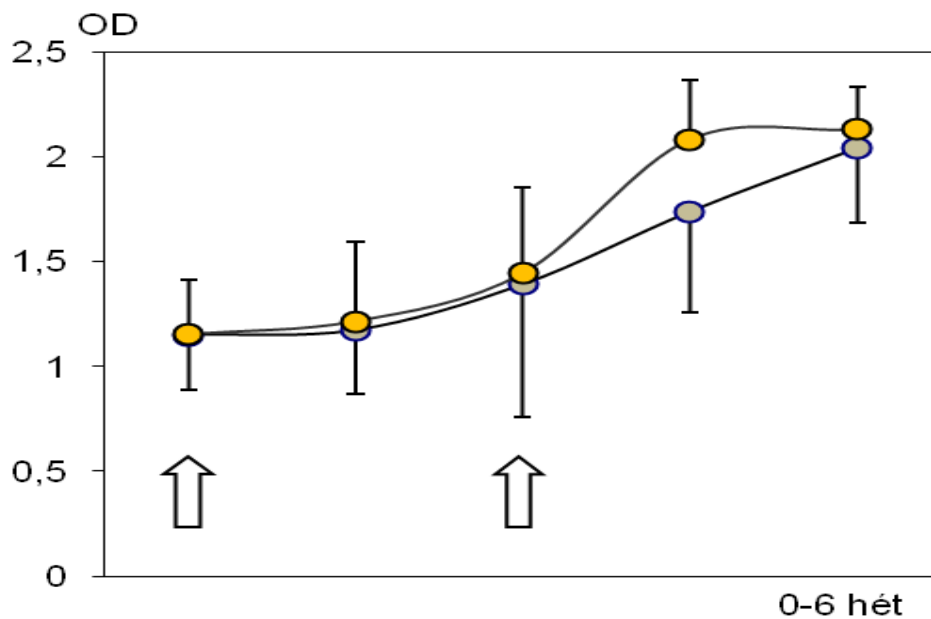
5.2.1. ábra A szérum retinol koncentrációja japán fürjekben

A szérumban retinoid (ROL) koncentrációja nem mutat különbséget a két csoport között ($p > 0,05$) (5.2.2. ábra). Ez azt jelzi, hogy a xantofilloknak nincs A-provitamin aktivitásuk, mert a terminális gyűrűjükben oxo-csoport (substituens) helyezkedik el. A β -jonon gyűrűs szerkezet a retinoidok, így az A-provitamin karotinoidok esetében is esszenciális.



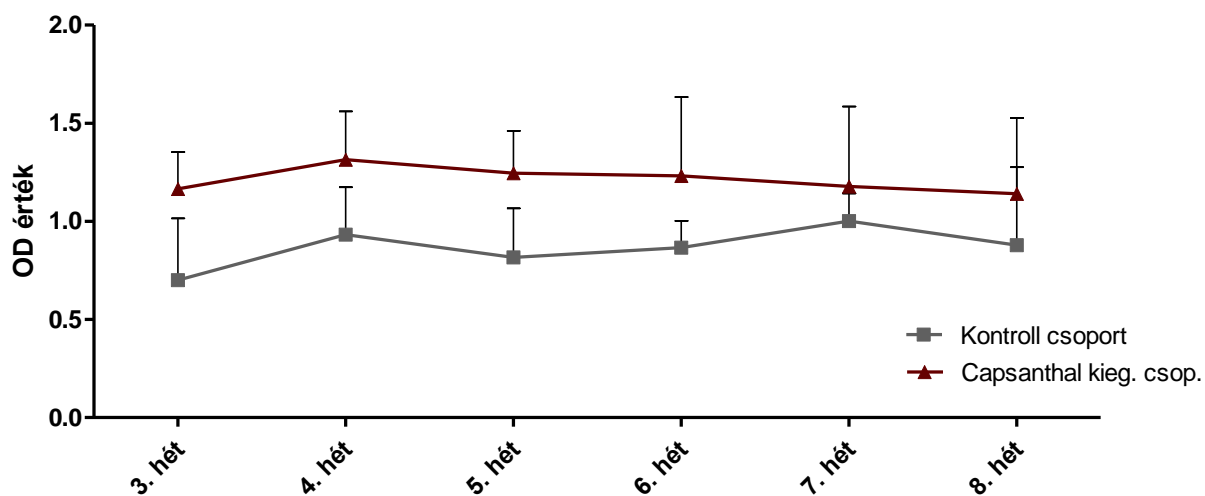
5.2.2. ábra A szérumban lutein koncentrációja a japán fürjekben

Az IgY átlag títere a szérumban magasabb volt a kiegészítésben részesült csoportban a kontroll csoporthoz képest. A legnagyobb különbség a második (booster) immunizálás antigén-komplex bejuttatását követően volt mérhető (5.2.3. ábra). A 3. mintvételtől a kiinduláshoz képest szignifikáns ($p < 0,05$) különbség mérhető a booster után (az 5.2.3. ábrán a második nyíl) a Capsantal-os csoport és a kontroll csoport között.



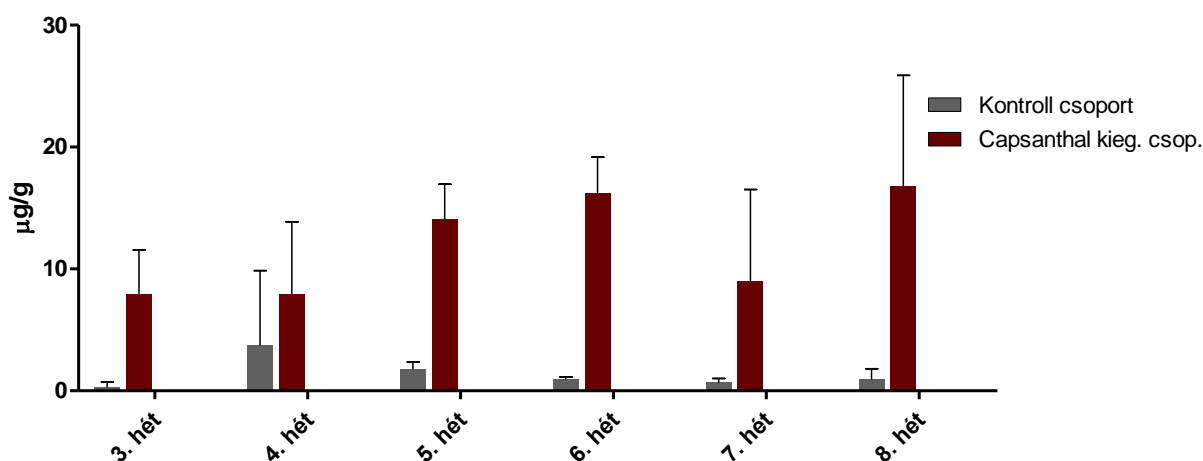
5.2.3. ábra Szérum IgY títtere a kontroll (● jelölt) és a lutein (Capsantal) kiegészítésben (● jelölt) részesült japán fürjekben

A Capsantal kiegészítésben részesült csoportból származó tojásokban az IgY titer szignifikánsan ($p < 0,05^{***}$) nagyobbak a kontroll csoporthoz viszonyítva (5.2.4. ábra). A tojásokban lévő immunglobulin koncentrációja a kísérlet 3. hetétől a booster oltást követően is állandó szinten van jelen.



5.2.4. ábra A tojás IgY títtere a kontroll és a lutein (Capsantal) kiegészítésben részesült japán fürjekben

A tojásokban a lutein koncentráció emelkedik, majd telítődik, a kontroll csoporthoz viszonyítva szignifikáns ($p < 0,05^{**}$) különbség állapítható meg minden mintavétel idején (5.2.5. ábra). A tojásban lévő lutein és az immunglobulin kísérlet ideje alatti változása között nem mutatható ki szoros korreláció.



5.2.5. ábra Japán fűrj tojás lutein koncentrációja

A tojásokban mért β -karotin magasabb ($p < 0,05^{**}$) koncentrációban van jelen a Capsantal kiegészítésben részesült csoportban (5.2.6. ábra).

A Capsantal összetétele a gyártó honlapján található információk alapján:

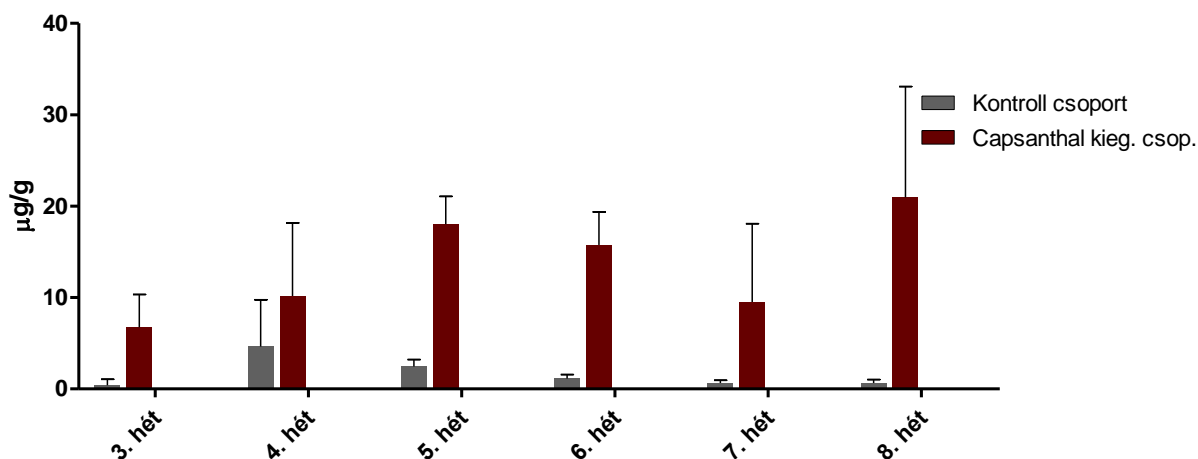
HPLC PARTITION	β -Carotene	0,8% \pm 0,2%
(typical)	Cryptoxanthin	1,5% \pm 0,3%
	trans-Lutein	82,0% \pm 4,0%
	trans-Zeaxanthin	4,0% \pm 1,0%
	Other Carotenoids	11,7% \pm 4,0%

Forrás: <http://www.copharm.gr>

A fenti adatok alapján látszik, hogy a lutein kiegészítés mellett további β -karotin forrást is jelentett a Capsantal takarmányhoz adagolása.

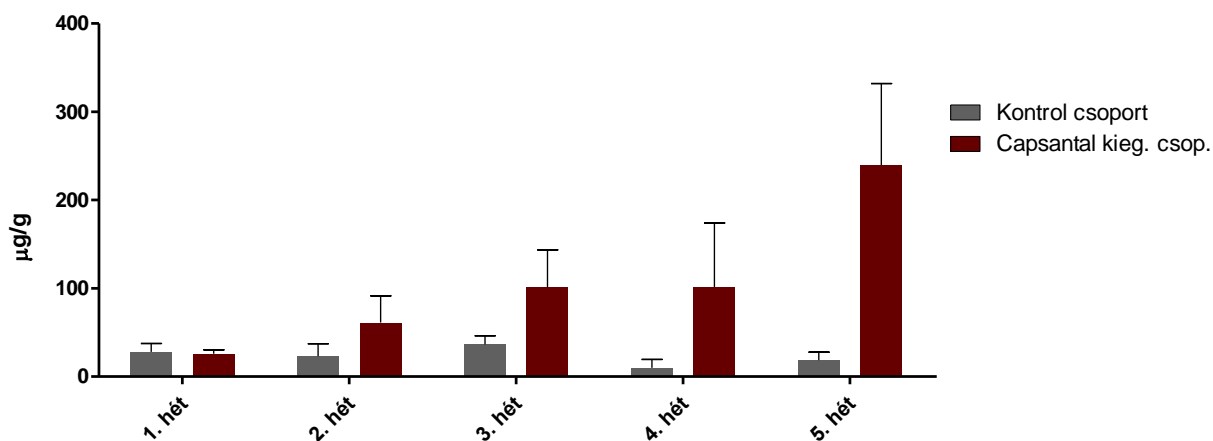
A két karotinoid (LU-BC) kapcsolatát vizsgálva szoros korreláció mutatható ki ($r = 0,9301$, $p < 0,05^{**}$) ki. A takarmányban jelenlévő BC tojásszíkbe történő beépülésére pozitív kölcsönhatással van a lutein (Capsantal) kiegészítés. A normál kereskedelmi takarmányban

természetes módon előforduló BC, valamint a kiegészítésként alkalmazott Capsantal fő (82%) alkotója a lutein koncentrációja hasonló (5.2.5. ábra és 5.2.6. ábra) a tojásszíkben ($p>0,05$). A fentiek alapján arra lehet következtetni, hogy a BC limitáló hatással van a LU tojásba történő akkumulációjára figyelembe véve, hogy a LU koncentrációja a többlet kiegészítés hatására sem haladja meg a BC koncentrációját.



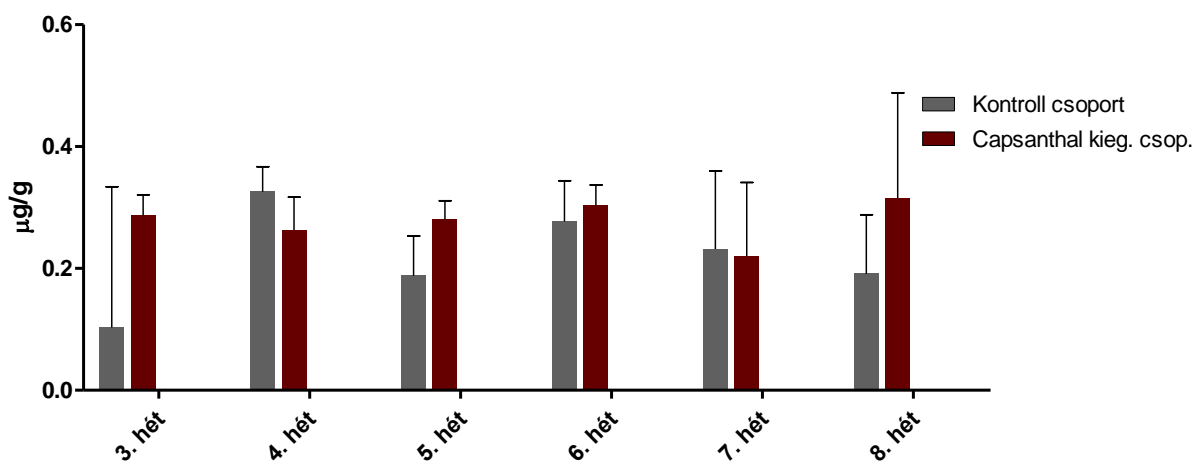
5.2.6. ábra Japán fürj tojás β-karotin koncentrációja

A szérumban mért β-karotin a Capsantal kiegészítésben részesült csoportban a kísérlet ideje alatt megemelkedett, azonban a két csoport között nem mutatható ki szignifikáns különbség (5.2.6. ábra). A szérumban a LU magasabb koncentrációban van jelen, mint a BC ($p<0,05^*$). A szérumban nem érvényesül a fent leírt limitáló hatás.



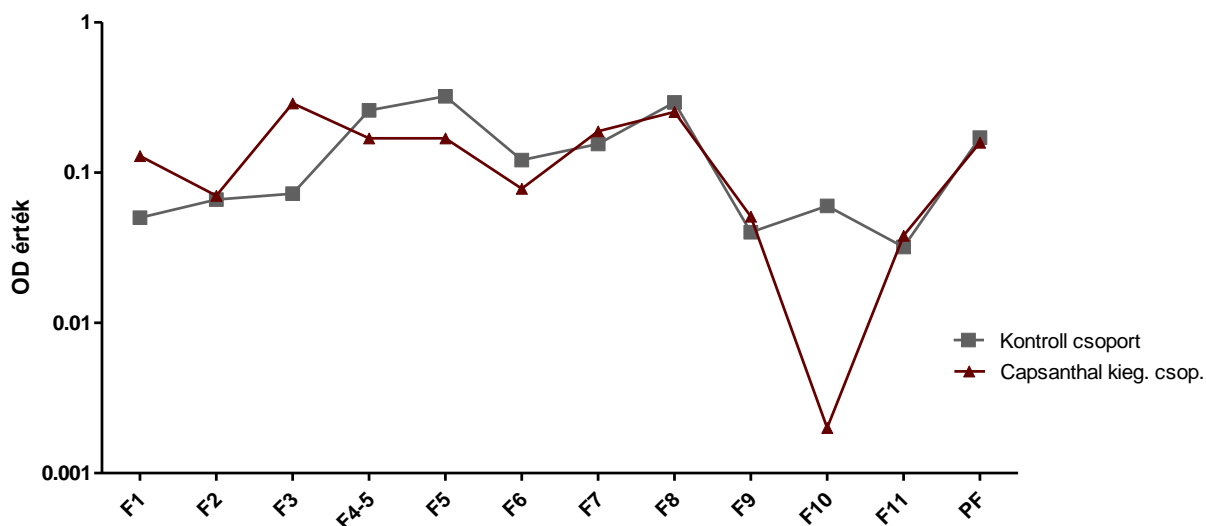
5.2.7. ábra A szérumban mért β-karotin koncentrációja a japán fürjekben

A tojásban mért ROL koncentráció a két csoportban szignifikánsan nem különbözik (5.2.8. ábra) hasonlóan a szérumban tapasztaltakhoz (5.2.2. ábra). A kontroll és Capsantal kieg. csoport tojásmintáiban tapasztalható gyakorlatilag azonos ROL koncentráció magyarázatát adhatja, hogy a lutein nem rendelkezik provitamin aktivitással.



5.2.8. ábra Japán fűj tojás retinol koncentrációja

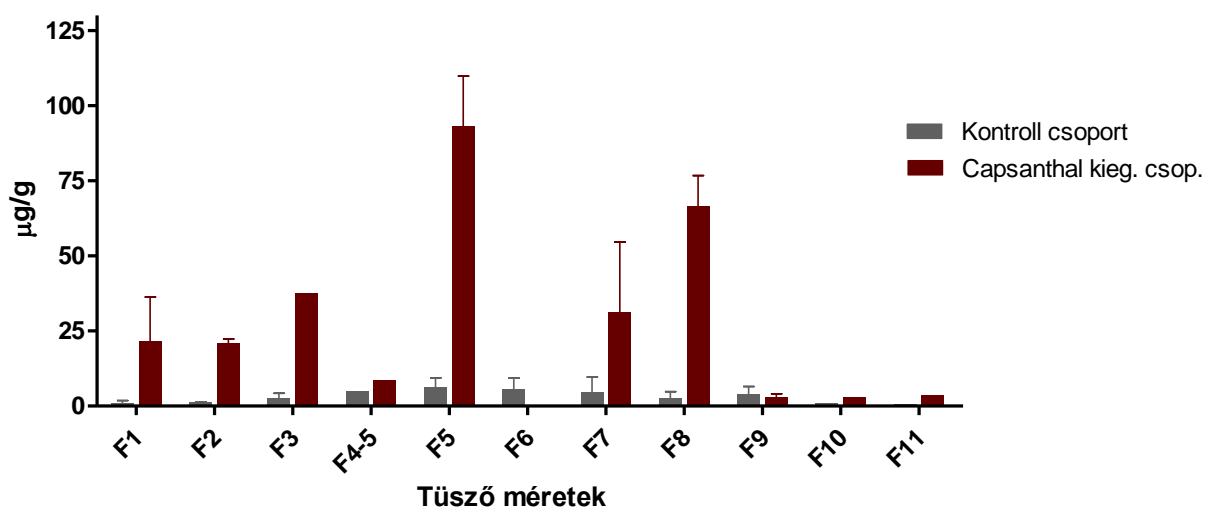
A tüszőkben mért IgY titerek között szignifikáns különbség nem volt kimutatható a két csoport között. Mindkét csoport esetén az F8 tüszőmérettől ugrásszerű IgY titer megemelkedése tapasztalható, mely kisebb nagyobb ingadozásokkal szinten marad. A Capsantal (lutein) kiegészítésben részesült csoportban mért IgY-titer emelkedő tendenciát mutat az F11 tüszőktől az F1 tüszőig (5.2.9. ábra).



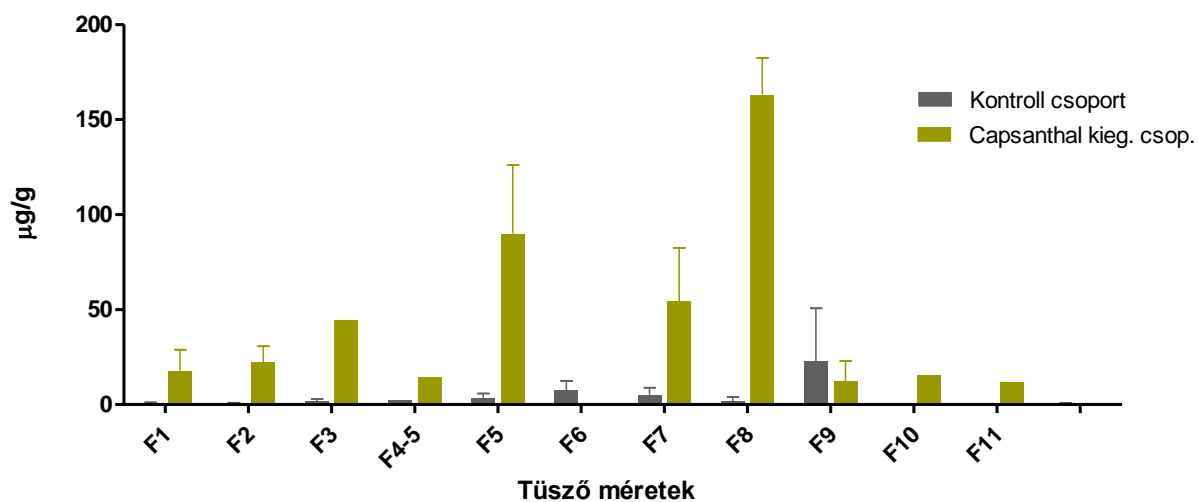
5.2.9. ábra Japán fűrj tüszőkben mért IgY koncentrációja

A tüszőkben mért karotinoidok (LU, BC) koncentrációja az F8-as tüszőkben jelentős ($p < 0,05^*$) mértékben megemelkedett (5.2.10. ábra és 5.2.11. ábra) a kontroll csoportéhoz képest. A két karotinoid között szoros ($r = 0,8895$, $p < 0,05^{***}$) kapcsolat mutatható ki. A LU és BC koncentrációja a takarmány kiegészítésben részesült csoportok madarainak tüszőiben hasonlóan alakult ($p > 0,05$), a tojásban tapasztaltakhoz hasonlóan, a tüszőkben sem haladja meg a LU koncentrációja a BC koncentrációját (5.2.10. ábra és 5.2.11. ábra).

A Capsanthal kiegészítés hatással van a tüszők immunglobulin szintjére is. $r_{LU} = 0,6240$ (ns), $r_{BC} = 0,6356$ ($p = 0,0483^*$), $r_{RP} = 0,5203$ (ns).

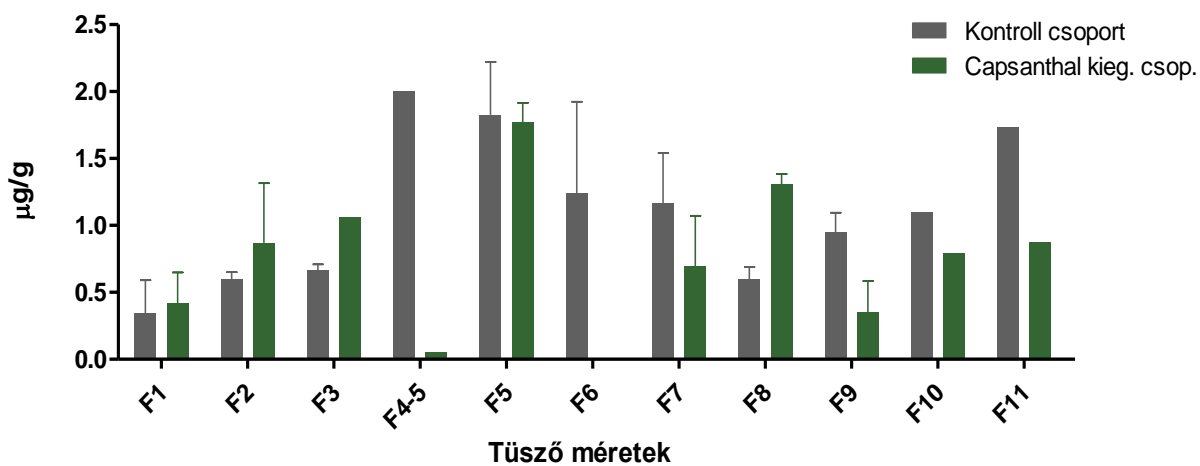


5.2.10. ábra Tüszők lutein koncentrációja



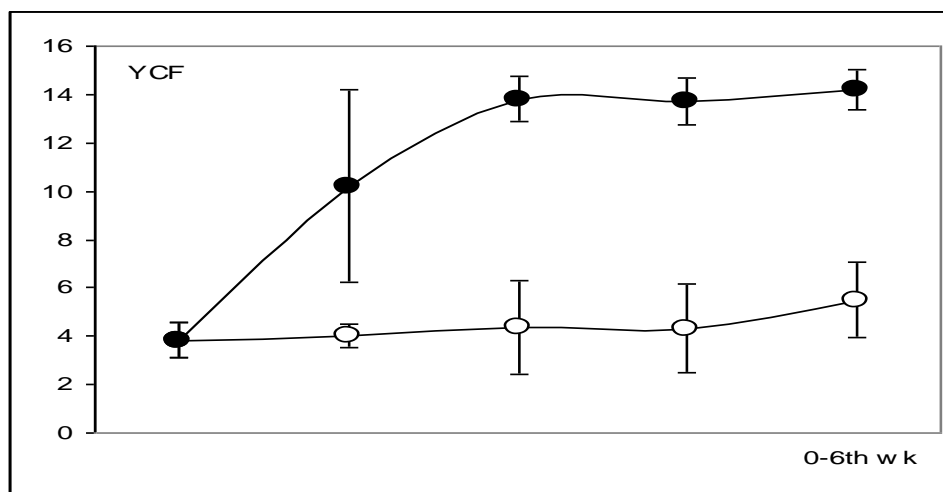
5.2.11. ábra A tüszők β -karotin koncentrációja

A tüszők ROL koncentrációja közel ($p > 0,05$) azonos a két csoportban (5.2.12. ábra) hasonlóan a szérumban (5.2.2. ábra) és a tojásszékben (5.2.8. ábra) tapasztaltakhoz.



5.2.12. ábra Tüszők retinol koncentrációja

A tojássárgája YCF-nel mért színintenzitása már a második hétre fokozódott a Capsantal (lutein) kiegészítésben részesült tojókban (5.2.13. ábra) és az átlagos színértékek szignifikánsan nagyobbak ($p < 0,05$) a kísérlet teljes ideje alatt.



5.2.13. ábra A tojássárgája színének összehasonlítása a kontroll (o) és a Capsantal (●) csoportban.

A madarak bőrének színintenzitását a mellcsonti tájéknak a combtájék felé néző tollhiányos felületén (*apteria*) mértük (5.2.1. táblázat). Kísérletünkben az L^* és a^* b^* értékek esetében szignifikáns különbséget találtunk, az a^* érték esetében nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget

5.2.1. táblázat

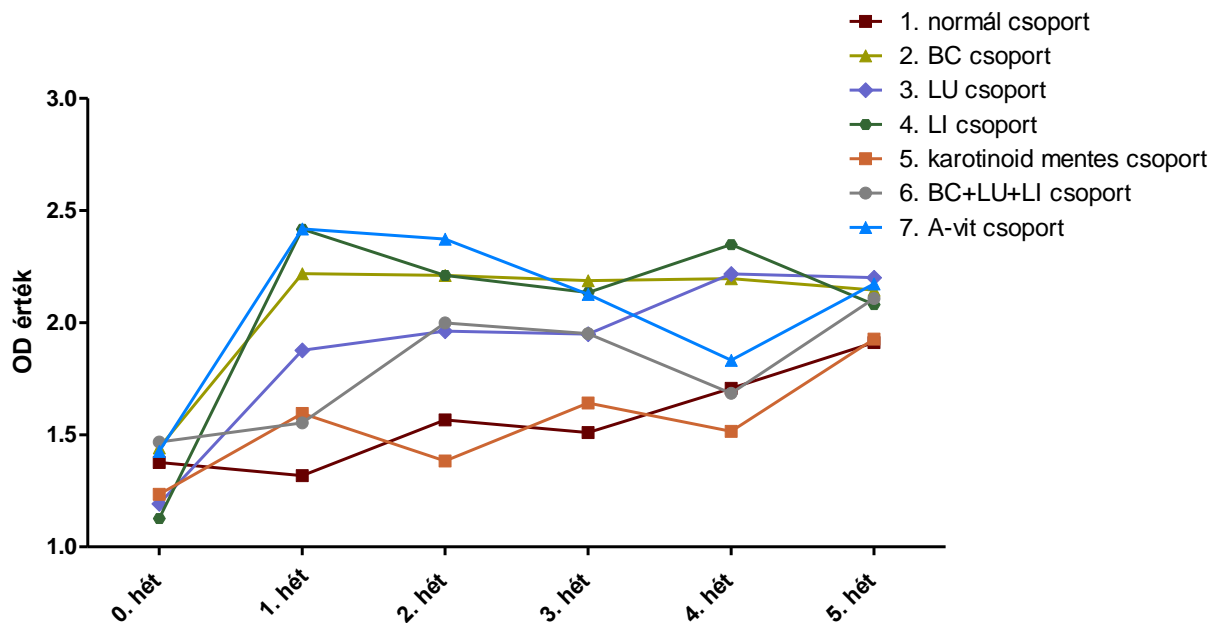
A bőr belső felületének CIELab értékei ($x \pm s$)

	L^*	a^*	b^*
Kontroll csoport	65,8±0,9	4,0±3,5	25,9±8,7
Capsantal csoport	59,3±3,1	7,8±1,9	41,7±6,7
p	0,01	0,08	0,01

5.3. Karotinoid-mentes takarmányhoz adagolt likopin, lutein β -karotin és A-vitamin kiegészítés hatásának vizsgálata (3. kísérlet)

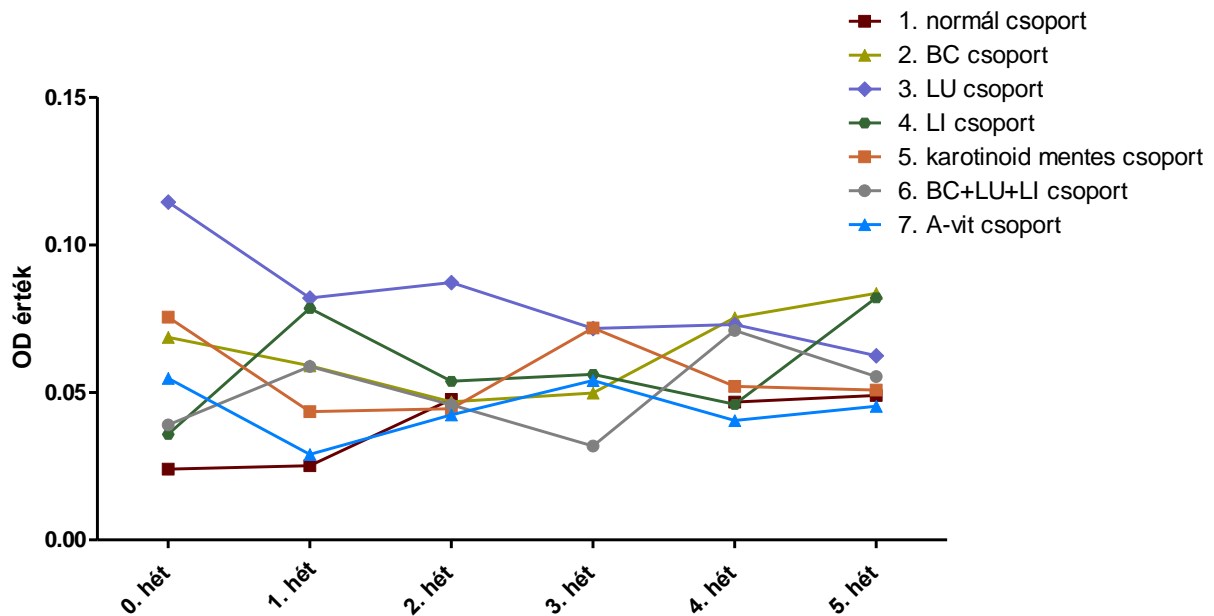
Ebben a kísérletben a különböző karotinoidok (BC, LI, LU) és a preformált A-vitamin IgY transzportra történő hatását vizsgáltuk.

A japán fürj szérumban, szik, valamint tüszőkben mért immunglobulin titerek láthatóak a következő ábrákon. (5.3.1. ábra, 5.3.2. ábra). A szérumban az 1. (kereskedelmi tojótápot fogyasztó) csoporthoz viszonyítva a 2. (BC) csoport **, a 3. (LU) csoport*, 4. (LI) csoport **, 7 (A-vitamin) csoport** között szignifikáns ($p < 0,05$) különbség mutatható ki.



5.3.1. ábra A szérumban mért IgY titer

A tojások esetében az 1. csoporthoz viszonyítva szignifikáns ($p < 0,05$) különbség tapasztalható a 2. (BC) csoport**, 3. (LU) csoport***, valamint a 4. (LI) csoportok* immunglobulin titerei között.

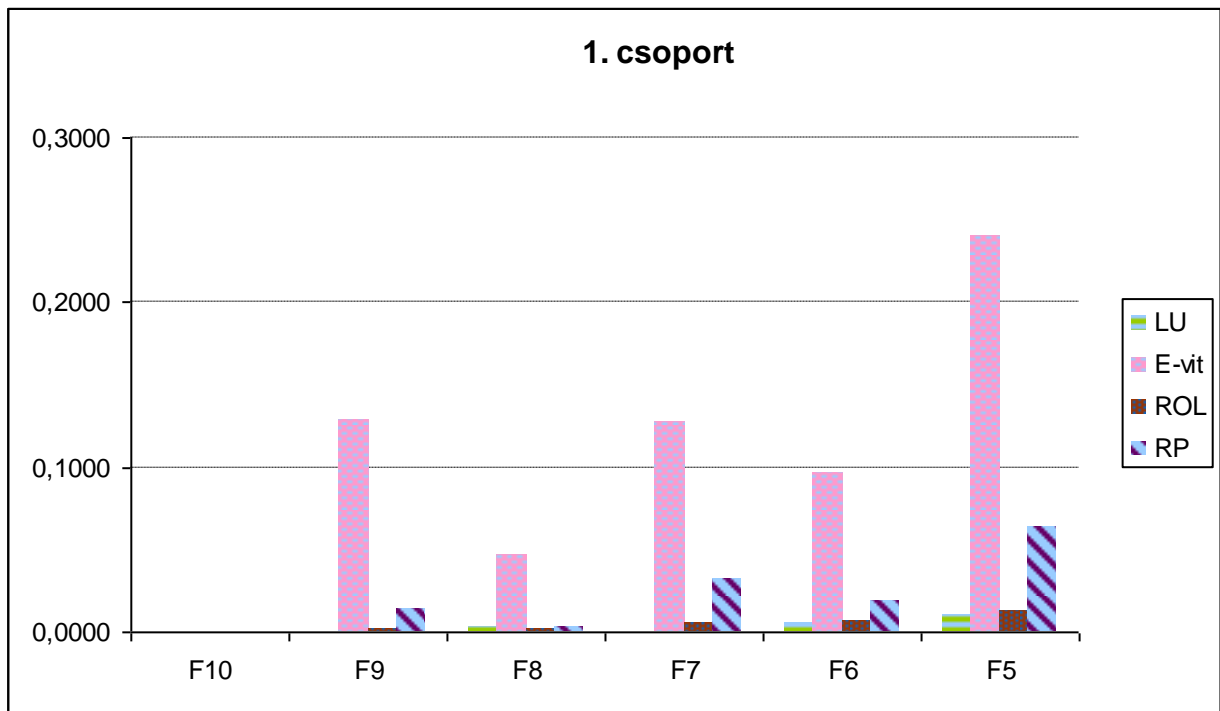


5.3.2. ábra A tojásban mért IgY titer

A tüzőök karotinoid (BC, LU, LI), retinoid (ROL, RP), és tokoferol analíziseinek eredményeit az 5.3.3-5.3.9. ábrák tartalmazzák. A vizsgált anyagok tüzőbe történő betárolása az F7 nagyságú ($\varnothing=5$ mm, 0,07g) tüzőméret elérésekor válik jelentőssé.

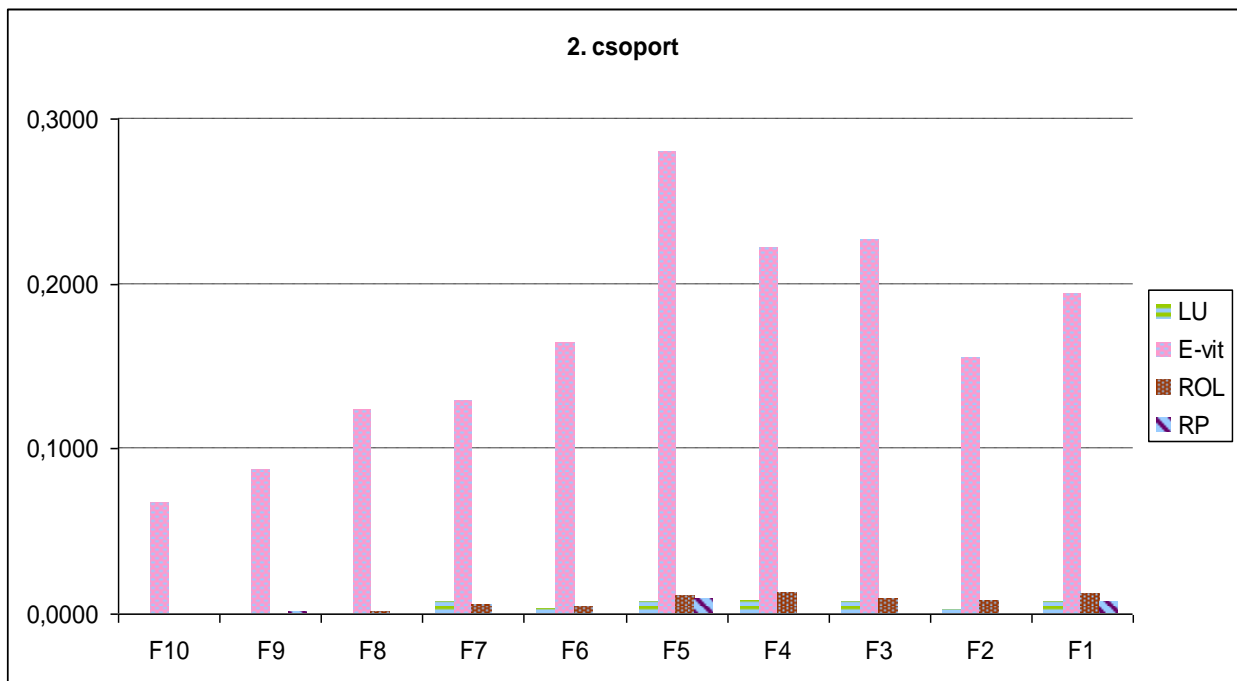
A 2. csoportban („rizsalapú” takarmány + BC) lévő egyedekből származó tüzőkben a karotinoid analízis során a kiegészítésként adagolt BC nem volt detektálható (5.3.4. ábra), hasonlóan a 6. csoporthoz, melynek egyedei a karotinoid-mentes tojótáphoz BC+LU+LI kombinált kiegészítését kapták (5.3.8. ábra). Ezekben a csoportokban a ROL, valamint a RP magasabb koncentrációban volt jelen. A 7. csoport (karotinoid-mentes takarmány+A vitamin) egyedjeinek tüzőiben érte el a legmagasabb koncentrációt a ROL és a RP (5.3.9. ábra), utóbbi vegyület a szignifikánsan ($p < 0,05^{***}$) magasabb volt a többi csoportban detektálható koncentrációhoz képest.

A LU kiegészítésben részesült 3. csoport, valamint a LI kiegészítésben részesült 4. csoport egyedjeinek tüzőiben a takarmány-kiegészítésként alkalmazott karotinoid detektálható volt (5.3.5. ábra, 5.3.6. ábra). Az E- vitamint vizsgálva a 6. csoport E vitamin koncentrációja szignifikánsan ($p < 0,05^*$) különbözik a többi csoportban mérhető E-vitamin koncentrációtól.

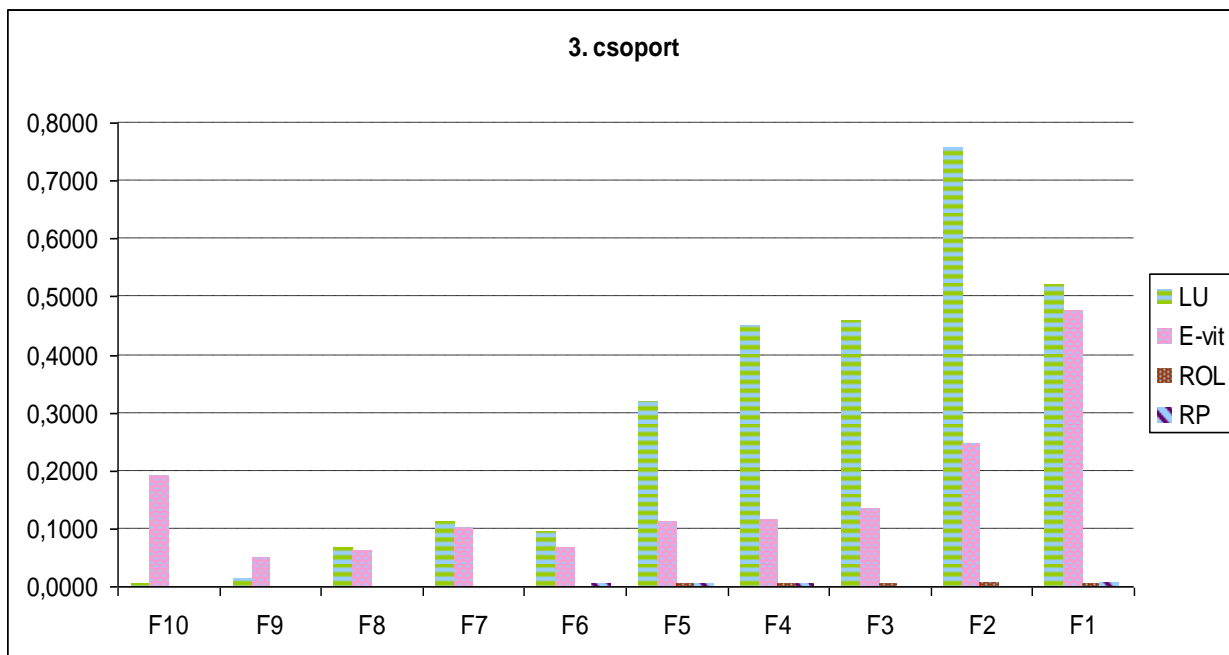


5.3.3. ábra: 1. csoport (normál tojó táp) tüszők karotinoid, retinoid és tokoferol koncentrációja

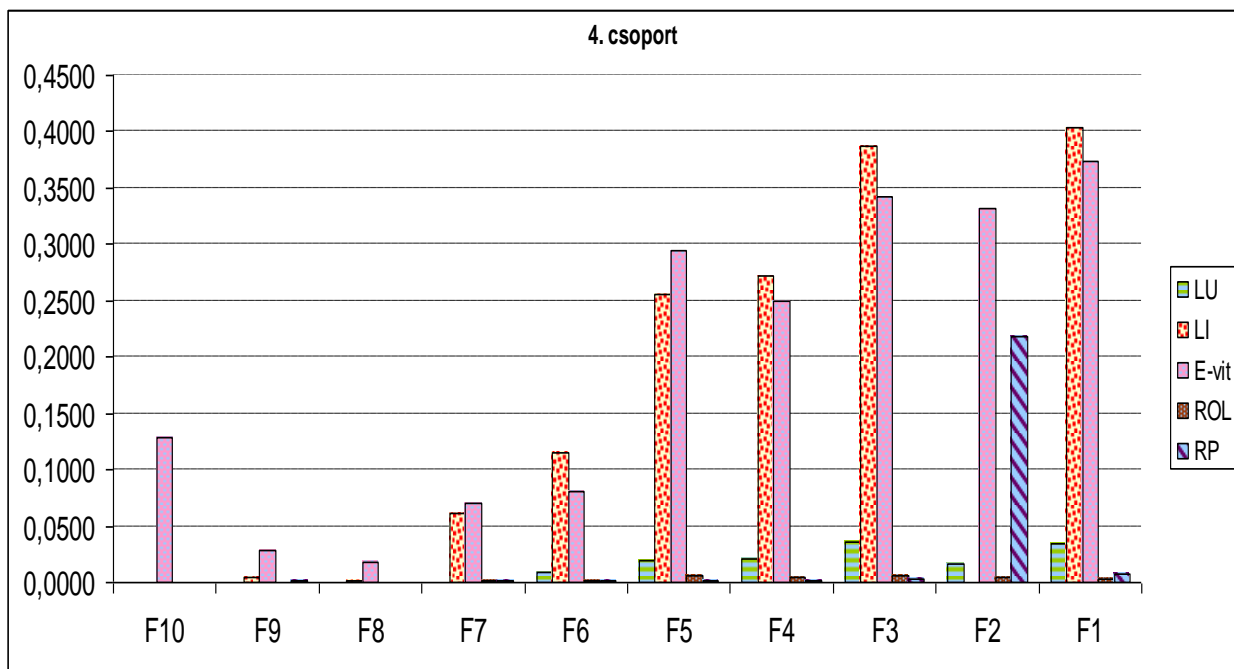
Lu: lutein és zeaxantin; BC: β -karotin; E-vitamin: tokoferol; Rol: retinol; RP: retinil palmitát



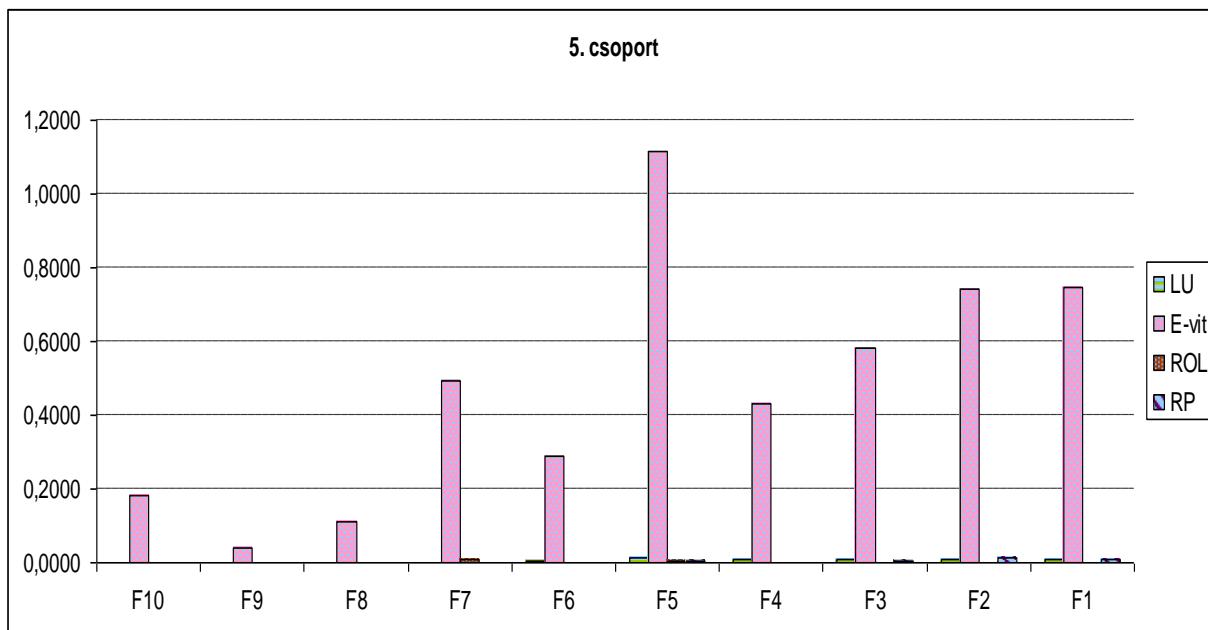
5.3.4. ábra: 2. csoport (rizsalapú tojótáp + BC kieg) tüsző karotinoid, retinoid és tokoferol koncentrációja



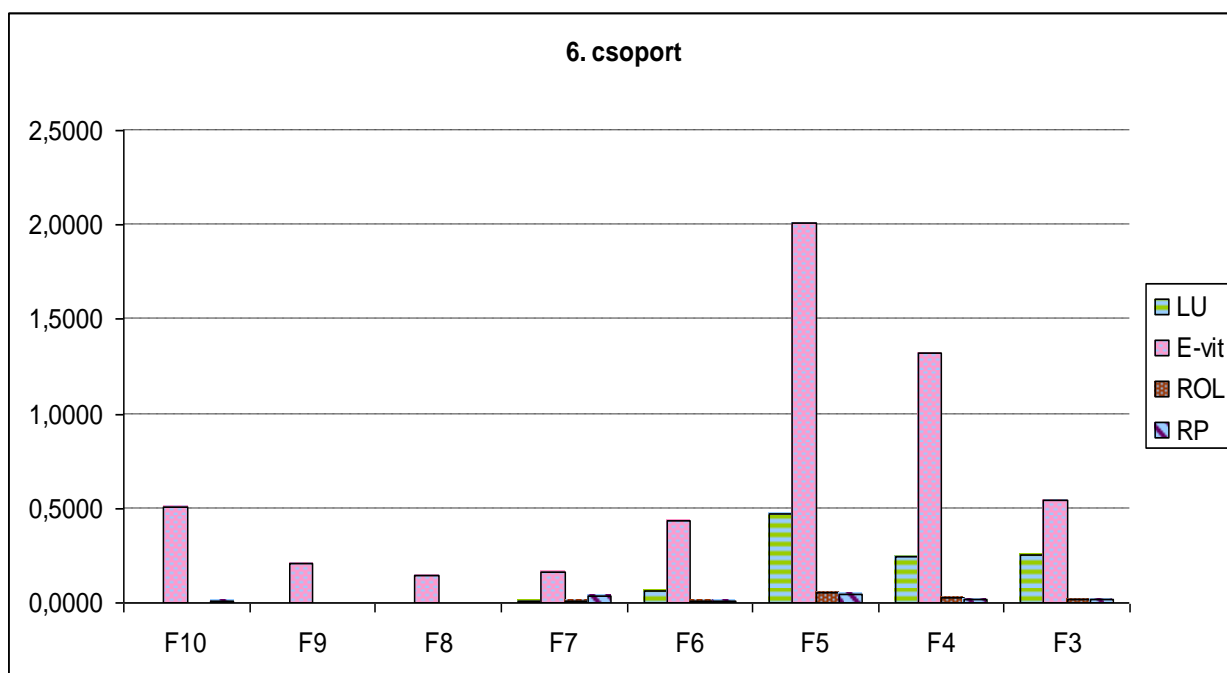
5.3.5. ábra: 3. csoport (rizsalapú tojótáp + LU kiegészítés) tiszta karotinoid, retinoid és tokoferol koncentrációja



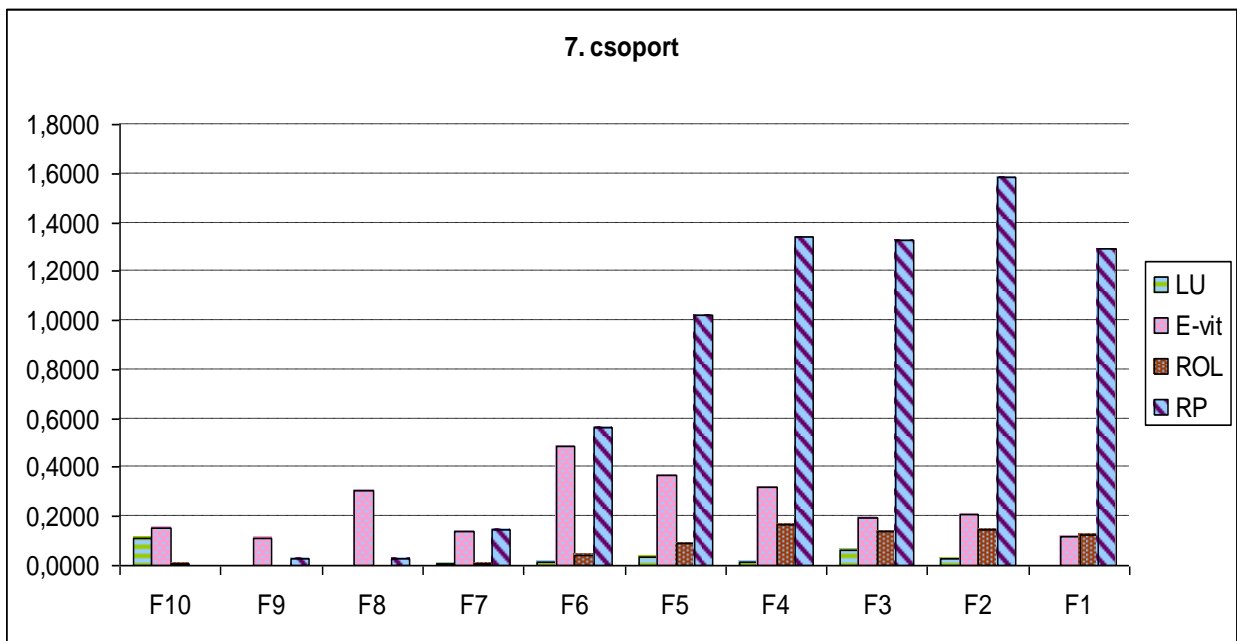
5.3.6. ábra: 4. csoport (rizsalapú tojótáp + LI kiegészítés) tiszta karotinoid, retinoid és tokoferol koncentrációja



5.3.7. ábra: 5. csoport (rizsalapú tojótáp) tüző karotinoid, retinoid és tokoferol koncentrációja

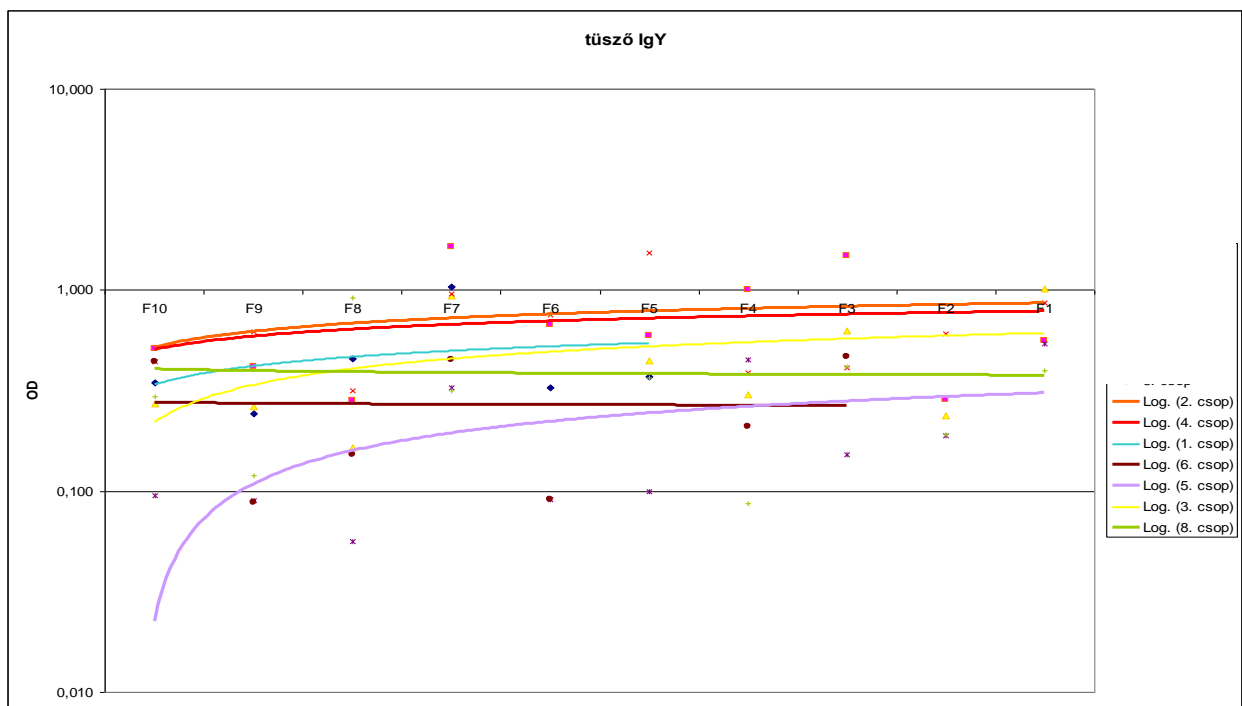


5.3.8. ábra: 6. csoport (rizsalapú tojótáp+ {BC+LU+LI}) tüző karotinoid, retinoid és tokoferol koncentrációja



5.3.9. ábra: 7. csoport (rizsalapú tojótáp+ A-vitamin) tüsző karotinoid, retinoid és tokoferol koncentrációja

A különböző csoportokból származó tüszők immunglobulin titere között nem mutatható ki szignifikáns különbség.



5.3.10. ábra A tüszőkben mért IgY titer

Megvizsgáltuk tüszőkben a karotinoidok és az immunglobulin termelés közötti összefüggést, melyet az 5.3.1. táblázat szemléltet. Kiegészítésként alkalmazott BC, LU, LI, BC+LU+LI és A-vitamin, valamint az ezekben a csoportokban mér IgY titer között nem mutatható ki korreláció illetve szoros összefüggés a tüszőkben.

5.3.1. táblázat IgY és karotinoid koncentráció közti összefüggés a tüszőkben

csoportok		1.csop	2.csop	3.csop	4.csop	5.csop	6.csop	7.csop
tüsző IgY karotinoid, összefüggés r értékek	BC	---	---	---	---	---	---	---
	LU	-0,2843	---	0,1682	---	---	-0,2956	---
	LI	---	---	---	0,2194	---	---	---
	Rol	0,1003	0,2065	---	---	---	-0,3221	-0,3875
	RP	0,2025	-0,1787	---	---	---	0,06090	-0,3283

A szérumban és tojásban vizsgált különböző karotinoidok, valamint az immunglobulin koncentráció közötti összefüggést az 5.3.2. táblázatban foglaltuk össze.

Az általunk adagolt karotinoidok mindegyike szoros kapcsolatban áll az immunglobulin termeléssel, azonban jól látszik, hogy ezek az összefüggések eltérőek pl. a 6. csoportban (BC+LU+LI kiegészítés) szorosabb korrelációt tapasztaltunk, mint azokban a csoportokban ahol külön-külön csak az egyik karotinoidot kapták kiegészítésként az állatok.

5.3.2. táblázat

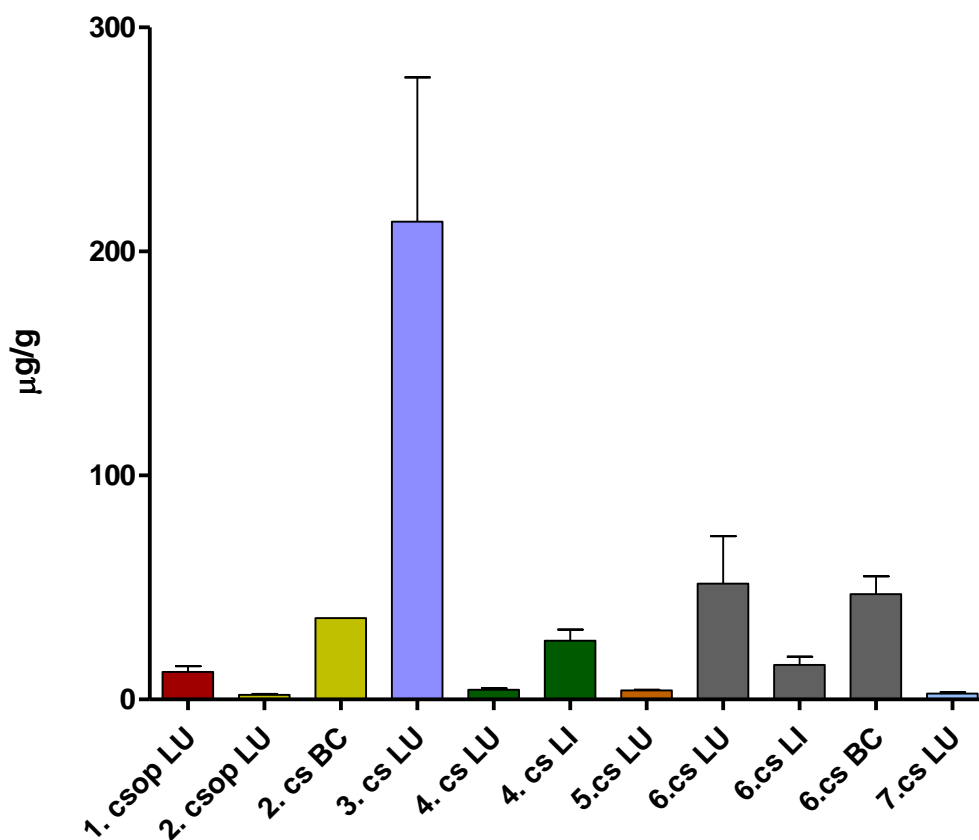
A szérum, illetve a tojásszik IgY és karotinoid koncentráció közti összefüggés

csoportok		1.csop	2.csop	3.csop	4.csop	5.csop	6.csop	7.csop
tojó szérum IgY karotinoid összefüggés r értékek	BC	---	0,4625	---	---	---	0,7033	---
	LU	-	---	---	---	---	---	---
	LI	0,01005	---	0,3732	---	---	0,7671	---
	Rol	---	---	---	0,7620	---	-0,2826	---
	RP	0,5148	0,6623	---	---	---	0,7207	0,6500
tojás szik IgY karotinoid összefüggés r értékek	BC	---	-0,3476	---	---	---	0,6468	---
	LU	0,8766	---	-0,6106	---	---	0,3573	---
	LI	---	---	---	-0,2814	---	0,2691	---
	Rol	0,9505*	---	---	---	---	0,7813	0,08294
	RP	0,9522*	---	---	---	---	0,7813	0,03409

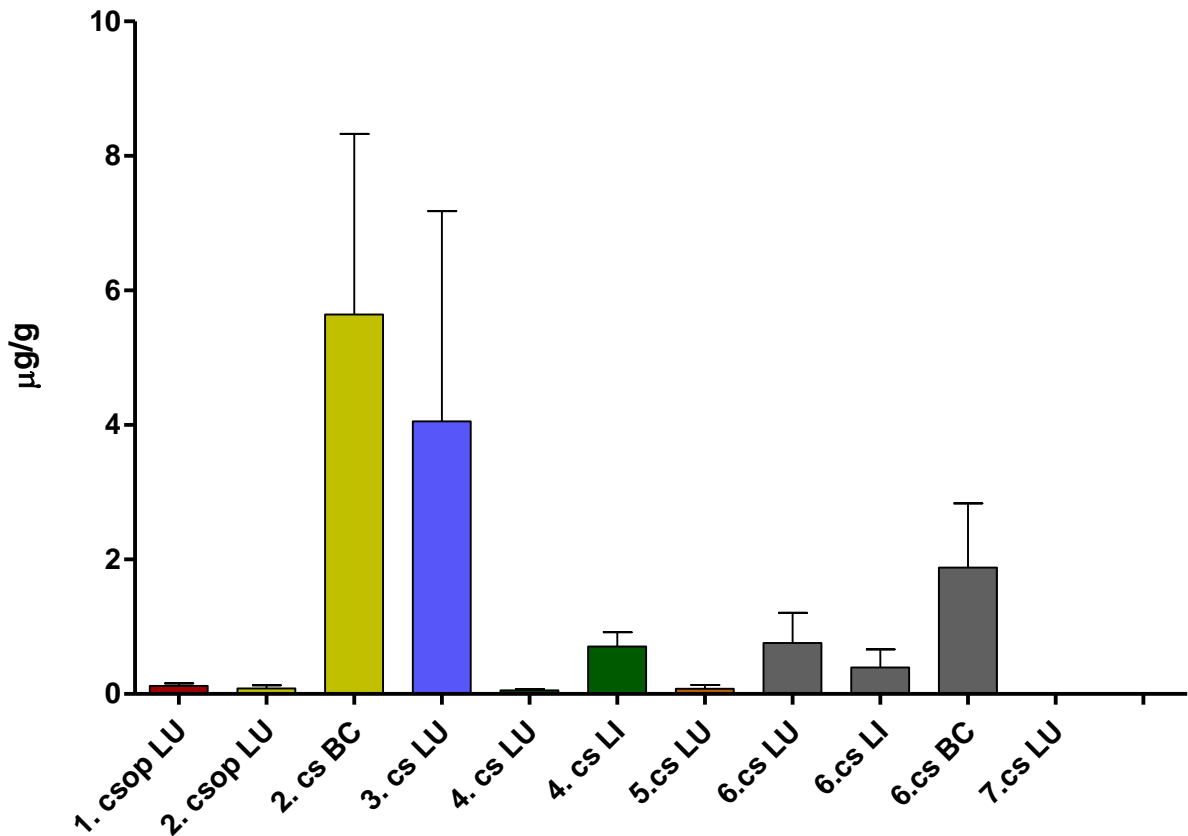
A szérumban és a tojás karotinoid (BC, LU, LI), retinoid (ROL, RP), és tokoferol analíziseinek eredményeit az 5.3.11-5.3.16. ábrák tartalmazzák.

Az egyes csoportokban detektálhatóak voltak a kiegészítésként alkalmazott karotinoidok mind a szérumban, mind tojássárgájában (5.3.11 és 5.3.12. ábra).

csoport	alaptakarmány	kiegészítés
1	normál tojó táp	-
2	rizsalapú tojótáp	BC
3	rizsalapú tojótáp	LU
4	rizsalapú tojótáp	LI
5	rizsalapú tojótáp	-
6	rizsalapú tojótáp	BC LU LI
7	rizsalapú tojótáp	A-vitamin

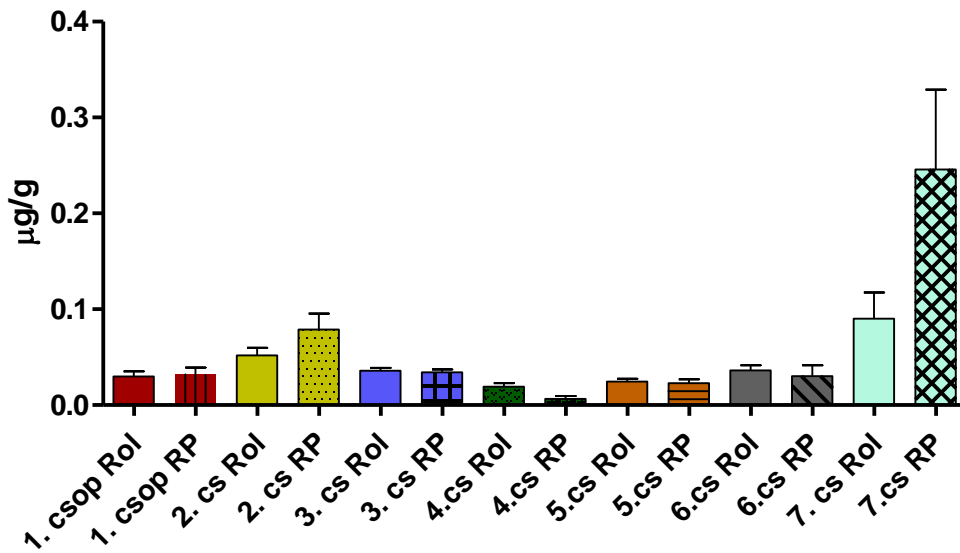


5.3.11. ábra Szérumban karotinoid koncentrációk

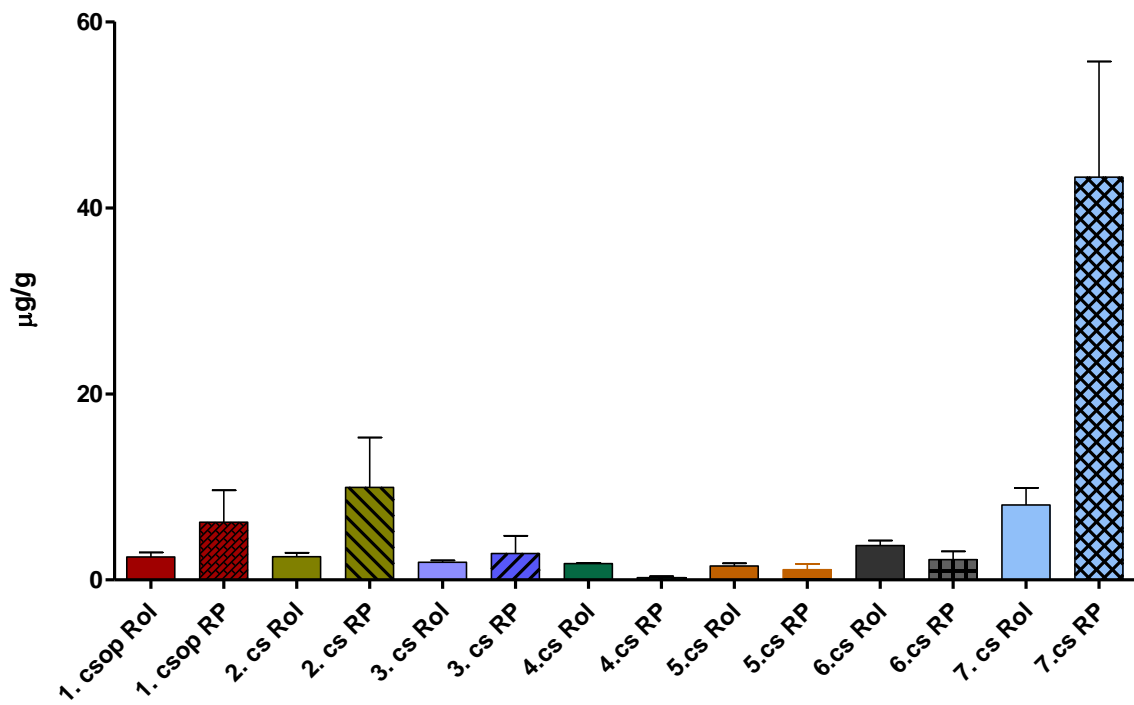


5.3.12. ábra Tojásban mért karotinoid koncentráció

Tojásban és szérumban mért ROL és RP koncentrációk alakulását az 5.3.13. és 5.3.14. ábra szemléltet. Mind a tojásban (5.3.13. ábra), mind a szérumban (5.3.14. ábra) az egyes csoportokban a retinoidok koncentrációja közel azonos, a BC-kiegészítésben részesült 2. csoport, a BC+LU+LI kiegészítést kapó 6. csoport, illetve az A-vitamin kiegészítésben részesült 7. csoport esetében mérhetünk magasabb retinoid koncentrációt. A 7. csoport RP koncentrációja szignifikánsan ($p < 0,05^{***}$) magasabb a többi csoporthoz viszonyítva. Ezzel is alátámasztva, hogy a BC az A-vitamin provitaminjának tekinthető.

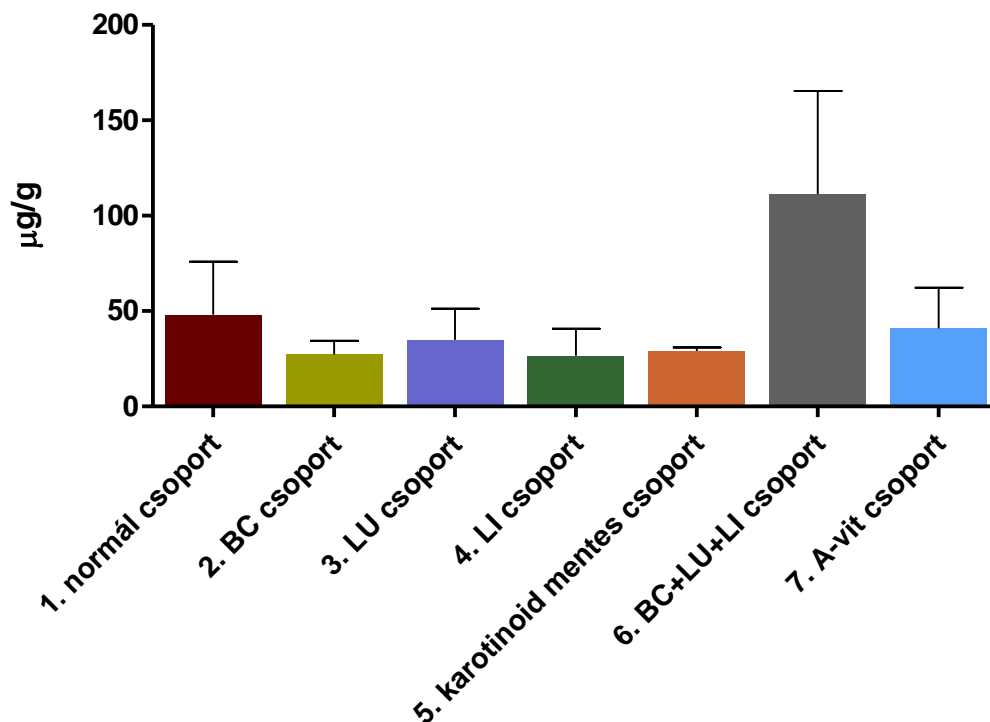


5.3.13. ábra Tojásszékben mért retinoid koncentráció



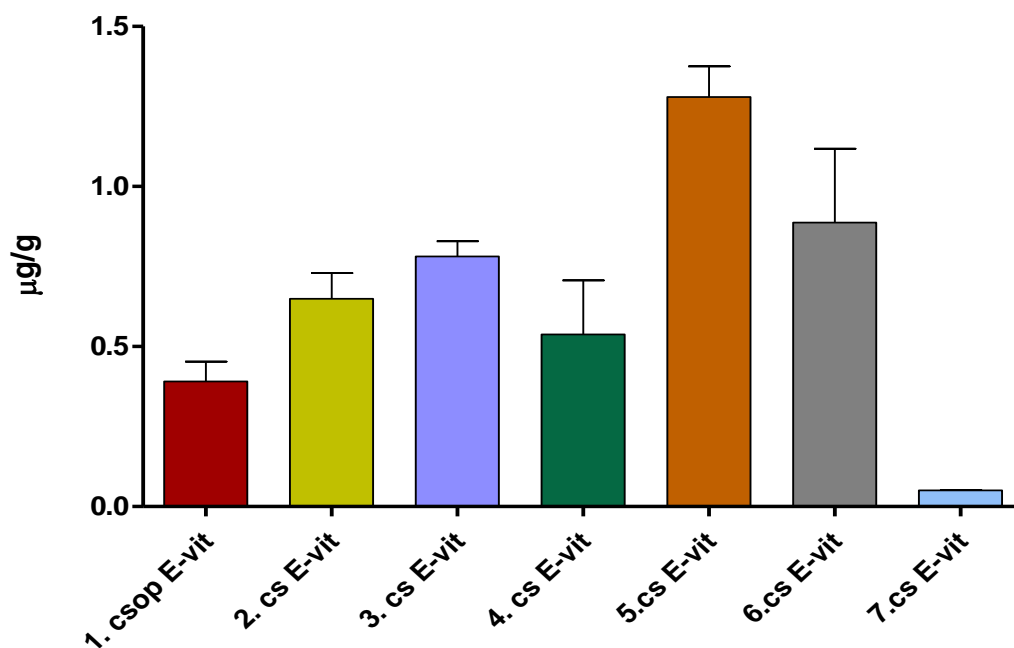
5.3.14. ábra Szérumban mért retinoid koncentráció

A szérumban, valamint a tojásban jelen lévő tokoferol (E-vitamin) változását is figyelemmel kísértük. Az 5.3.15. ábrán a szérumban a 6. csoportban magasabb E-vitamin koncentráció mérhető, azonban a csoportok között szignifikáns különbség nem mutatható ki.



5.3.15. ábra Az E-vitamin koncentrációjának alakulása különböző karotinoid kiegészítés hatására szérumban

A tojásban mért E-vitamin koncentrációk csoportonkénti alakulását az 5.3.16. ábra szemlélteti. Az 5. csoport szignifikáns ($p < 0,05$) különbséget mutat az 1. 2. és 4. és 7. csoporthoz képest.



5.3.16. ábra Az E-vitamin koncentrációjának alakulása különböző karotinoid kiegészítés hatására tojásban

Az E-vitamin illetve a karotinoidok összefüggését vizsgálva kevésbé szoros, a retinoidokkal szorosabb összefüggés tapasztalható (5.3.3. táblázat). A kombinált BC+LU+LI kiegészítés eredményezi az legszorosabb korrelációt a vizsgált karotinoidok tekintetében

5.3.3. táblázat. A szérumban, illetve a tojásszék tokoferol és karotinoid közti összefüggése

	csoportok	1.csop	2.csop	3.csop	4.csop	5.csop	6.csop	7.csop	
tojó szérumban	BC	---	-0,2234	---	---	---	0,1647	---	
	E-vitamin	LU	-0,5080	---	-0,2720	---	---	-0,2492	---
karotinoid	LI	---	---	---	-0,2234	---	-0,8412	---	
	Rol	-0,5435	-0,5122	---	---	---	-0,4989	-0,6846	
összefüggés	r értékek	RP	-0,2808	-0,1765	---	---	---	-0,06087	-0,6259
	tojás szék	BC	---	0,7774	---	---	---	0,9925**	---
E-vitamin		LU	0,7280	---	-0,1766	---	---	0,9818*	---
karotinoid	LI	---	---	---	0,5983	---	0,9428	---	
	Rol	---	---	---	---	---	0,8968	-0,2234	
összefüggés	r értékek	RP	---	---	---	---	0,8968	0,06831	

6. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

6.1. Az IgY transzport vizsgálata: alapállapot felvételezése kereskedelmi takarmányok etetése mellett (1. kísérlet)

6.1.1. kísérlet: A tüszők fejlődése alatt végzett vizsgálatok japán fürjben

A tüszőkbe irányuló lipidanyag-transzport egy csak a tojásrakás időszakában ösztrogén hatásra a májban termelődő kisméretű, nagyon kis sűrűségű lipoprotein frakció (VLDLy) segítségével megy végbe (Walzem et al 1999). Az „y” index a nagyon kis sűrűségű lipoprotein (VLDL) mellett a szikbe/tojás sárgájába (yolk) irányuló transzportra utaló jelzés. Ez a transzport ugyan folyamatos, de tüszők méretbeli növekedése, azaz a tüsző tok átjárhatósága bizonyos határig kisebb, majd nagyobb szikanyag tárolódást tesz lehetővé. Ezt szemlélteti az 5.1.1. ábra, ahol az ún. nagy sárga tüszők megjelenése egyben a méret ugrásszerű változásával járt együtt.

Japán fürjekkel végzett karotinoid transzport vizsgálatból kiderül, hogy a jelentős mértékű karotinoid, retinoid és tokoferol koncentráció emelkedés a $x = 0,09$ g, $\emptyset = 5$ mm-es (F7) tüszők esetében tapasztalható (5.1.1. ábra). Mivel a VLDLy lipidjei közé a táplálékból felszívódó lipoldható karotinoidok, retinoidok és az E-vitamin beépülnek, így érthető, hogy ezeknek az anyagoknak a jelentős mennyisége csak az F7-es tüsző mérettől kezdődően volt kimutatható (5.1.2. ábrák). A BC és a LU, valamint a retinoidok (ROL és RP) és a tokoferol F3 tüszőméret esetében éri el a legmagasabb koncentrációt, azonban a vizsgált retinoidok a BC, LU és E-vitaminhoz képest alacsonyabb koncentrációban, illetve mennyiségben voltak jelen a tüszőkben.

Az E-vitamin mennyiségének és koncentrációjának növekedése követi a karotinoidok, retinoidok tüszőbeli változását (5.1.2A. és 5.1.2B ábra), szoros összefüggés ($r > 0,7$) mutatható ki. A tüszőben történő depozíció során nem állapítható meg versengés az E-vitamin, valamint a BC, LU között aktív japán fürj tojók tüszőiben normál kereskedelmi tojótakarmánnyal történő takarmányozás mellett.

Mivel az IgY-transzport nem függ össze a lipoidok VLDLy-ban történő szállításával érthetően nem mutatható ki egyidejűség a tüszőkből történő kimutatásukban. Eredményeink szerint az IgY titer már kisebb tüszők ($x = 0,006$ g; $\emptyset = 2$ mm) esetében indul szignifikáns emelkedésnek (5.1.3. ábra).

Tehát a jelentős mértékű immunglobulin transzport napokkal megelőzi a tüszők karotinoidokkal való feltöltődésének a kezdetét. Annak ismeretében, hogy a primordális

tüszőnek ovulációra kész (F1) tüszővé való fejlődéséhez 15-17 napra van szükség (Perry és mtsai. 1983) ez 3-4 napot jelenthet.

Az, hogy az F10-es tüszőkben mért IgY-titer az F1-ig gyakorlatilag nem változik, azt jelzi, hogy a tömeg növekedéssel párhuzamosan történik az IgY beépülés. A karotinoidok retinoidok és tokoferol esetében kifejezett mennyiségi és kisebb mértékű koncentrációnövekedés tapasztalható (5.1.2 ábrák).

Ez a két tény kizárja a korreláció matematikai igazolását, ami a két anyag típus (lipoidok, ill. fehérjék) vérbeli szállításának (transzport) és tüszőbe történő beépülés (mediált depozíció) különbsége miatt biológiailag érthető.

6.1.2. Keltetett tyúktojásban lévő embrió és napos csibében történő vizsgálatok

A tojássárgájában tárolt karotinoidok, retinoid és tokoferol a keltetés folyamán fokozatosan kerülnek felhasználásra a fejlődő embrióban. A szikból fokozatosan ürülnek, mennyiségük ezáltal csökken a szikben (5.1.4B. ábra), és az idő előrehaladtával egyre nagyobb mennyiségben jelennek meg az embrió májában (5.1.5A. ábra).

A keltetés ideje alatt szikben lévő koncentrációjuk alig változik, csupán a kikelt madárban a még fel nem szívódott szikben tapasztalhatók ugrásszerűen nagy koncentrációk, további hasznos forrást biztosítva a napos csibe számára. Ez a koncentráció növekedés a szik besűrűsödése miatt jelentkezik, és nem az anyag beépülés az oka (Gregosits és mtsai. 2009).

Vizsgálatainkban azt tapasztaltuk, hogy a májban a peri- és a korai postnatis időszakban volt nagy mennyiségben jelen és mutatott emelkedő tendenciát a retinoid (RP) és a tokoferol mellett a karotinoidok (BC, LU) (5.1.5A ábra).

Az A vitamin aktív formája a ROL alig detektálható mennyiségben van jelen (5.1.5A ábra), a májban, mint raktározó szervben, azonban RP formájában raktározódik a későbbi mobilizálhatóság céljából. Ezek a biológiailag aktív anyagok, a retinoid (RP), a tokoferol és a karotinoidok (BC, LU) legnagyobb koncentrációban a perinatalis korban található a májban (5.1.5B ábra).

A vizsgált időszakban a BC mennyisége és koncentrációja is növekedik a májban (5.1.5A és B. ábra), ami ennek a biológiailag aktív anyagnak a jelentős raktározására utal a többi vizsgált anyaghoz (LU, E-vitamin, ROL, RP) képest. Ezáltal az utódok szempontjából későbbi életük során felhasználható BC raktár képződik.

A napos csibékben a még teljesen fel nem szívódott szikból tehát az IgY további transzportja történik. A tojássárgájában az IgY mennyisége fokozatosan növekszik (5.1.6. ábra). A 19. napon vett mintákban ez a koncentrációs tendencia átfordul, és az immunglobulin szint csökkenni kezd. Ezzel párhuzamosan a szérumban mért IgY szint növekedése figyelhető meg, mely az ellenanyag transzportjára utal (5.1.6. ábra). Ezáltal, mivel a keringésbe kerülnek az ellenanyagok a passzív immunitás révén a párnapos szervezet képes olyan antigének elleni humorális reakciókra, amelyekre specifikus az IgY készlete.

6.2. Karotinoid kiegészítés hatásának vizsgálata az IgY transzportra

6.2.1. Xantofill kiegészítés hatásának vizsgálata (2. kísérlet)

Azt tapasztaltuk, hogy tojásokban a LU koncentráció telítődik (5.2.7 ábra). Ezt a jelenséget, azaz >350 ppm felett már nem nő a sárgájába történő depozíció, ezt tapasztalta Leeson et al (2004) is. A mi vizsgálatainkban alkalmazott 1000 ppm-es Capsantal kiegészítés, figyelembe véve a kivonat 82%-os LU tartalmát a telítődési érték több, mint kétszerese volt.

A Capsantal kiegészítésben részesülő csoportban a BC koncentráció szignifikánsan nagyobb. A két karotinoid (LU-BC) kapcsolatát vizsgálva szoros korreláció mutatható ki ($r=0,9301$, $p<0,05^{**}$) ki.. A lutein tojásszikben 5.25. ábra és 5.2.6. ábra), illetve tüsszében (5.2.10. ábra és 5.2.11. ábra) mért koncentrációja nem haladja meg β -karotin koncentrációját, közel azonosak ($p>0,05$) a Capsantal kiegészítést fogyasztó csoportban.

A takarmányban jelenlévő BC tojásszikbe történő beépülésére pozitív kölcsönhatással van a lutein (Capsantal) kiegészítés. A fentiek alapján arra lehet következtetni, hogy a BC limitáló hatással van a LU tojásba történő akkumulációjára figyelembe véve, hogy a LU koncentrációja a többlet kiegészítés hatására sem haladja meg a BC koncentrációját. Ez azzal magyarázható, hogy a *Tagetes erecta* természetes kivonata a Capsantal kb. 1%-ban tartalmaz természetes β -karotint is (<http://www.copharm.gr>). Az, hogy a kontrollhoz viszonyítva az 1000 ppm 1%-os tartalma szignifikáns növekedést jelent érthető. Ezen kívül nem kizárt, hogy a poláros xantofill mellett az apoláros BC tárolását is kedvezően befolyásolja, ahogy ez pl. a membránokba történő beépülés esetében is érvényesül (Bárdos és mtsai 2011).

A lutein jelentősen növelte az antitest választ a kifejlett tojótyúkokban (Bédécarrats és Leeson, 2006). Kísérletünkben mérsékelt növekedését tapasztaltuk a humorális immunválaszban, a lutein kiegészítésben részesülő japán fürjek szérumában (5.2.3. ábra) és a tojásban (5.2.4. ábra), mivel a vörösvérsejt-BSA-antigén komplexszel szemben nagyobb IgY titereket mértünk. A tüsszökben nem volt kimutatható szignifikáns különbség a két csoport között.

Perez-Vendrell és munkatársai (2001) szerint a CIELab rendszerrel történő mérésekor a színskála b^* koordinátája a mellrész bőrén mérve jó indikátora a takarmányban lévő xantofill jelenlétének, míg az a^* koordináta a lábszáron mérve egyenes arányban áll a takarmány kantaxantin, ami szintén egy oxi-karotinoid, mennyiségével. A bársonyvirág xantofilljai között nincs kantaxantin. A mellrész tollpásztától mentes, kopasz mező (*apteria*) bőrszínének értékelésekor kísérletünkben szignifikáns különbséget találtunk a b^* értékek között a japán fürjekben végzett kísérletünkben. Ebben a kísérletben a tojássárgájának a YCF-nel rangsorolt átlagos színértékei is nagyobbak ($p < 0,05$) a kísérlet teljes ideje alatt. Míg a kontroll állatok által tojt tojások sárgájának színe 4-6 YCF sávban mozgott, addig a xantofillal kiegészített csoport állatai, az etetés 2. hetétől 12-14-es sávba illeszthető sárgájú tojásokat tojtak. Ezek azt jelzik, hogy az alkalmazott természetes xantofill származék jól abszorbeálódik, metabolizálódik és deponálódik a szervekben japán fürjek esetében. A tojásszík rPHPLC-vel mért β -karotin, illetve retinoid koncentrációk a luteines kiegészítésben részesülő csoportban magasabbak. A β -karotin, valamint a lutein ilyen jellegű interakciójára vonatkozóan nem találtunk irodalmat. Humán vizsgálatban a β -karotin és lutein összefüggését elemezve azt tapasztalták, hogy β -karotin-lutein együttes alkalmazása esetén a β -karotin szintje csökken (van den Berg 1999).

Jelen vizsgálatok bebizonyították, hogy a bársonyvirágból származó oxi-karotinoidok többségét adó lutein a tojás sárgájának és a bőrszínének sárgára színezése mellett, fokozhatja az immunválasz készséget is japán fürjben.

6.2.2. Karotinoid-mentes takarmányhoz adagolt likopin, lutein β -karotin és A-vitamin kiegészítés hatásának vizsgálata (3. kísérlet)

A tyúkokban vizsgált karotinoidok közti interakciók tekintetében a kutatások eredményeiből megállapítható, hogy lutein zeaxantin, β -karotin magasabb étrendi jelenléte kedvezőtlenül hat a többi karotinoid akkumulációjára. (van den Berg 1999, Wang és mtsai. 2010).

Kísérletünkben a 6. csoportban alkalmazott BC+LU+LI együttes kiegészítés alkalmazásakor mindhárom karotinid kimutatható volt a szérumban és a tojásban.

A β -karotin egyedi (2. csoport: rizsalapú tojótáp+BC), vagy kombináltan (6. csoport: rizsalapú tojótáp+BC+LU+LI) történt takarmány kiegészítése esetén a tüszőkben a karotinoid analízis során a kiegészítésként adagolt BC nem volt detektálható (5.3.4. ábra és 5.3.8. ábra). Ezekben a csoportokban a ROL, valamint a RP nagyobb koncentrációban volt jelen. Feltételezhető, hogy karotinoid-mentes takarmányozás mellett a β -karotin provitamin aktivitása érvényesült elsősorban, és a ROL, RP-tá alakul a tüszőbe történő depozíció során, ami A-vitamin forrást biztosít az inkubáció ideje alatt a fejlődő csibe számára. Azonban a szérum (5.3.11. ábra)

és a tojásszík (5.3.12. *ábra*) esetében nem figyelhető meg ez a jelenség a BC detektálható a 2. és a 6. csoportban is.

A tojásban (5.3.13. *ábra*) és a szérumban (5.3.14. *ábra*) a BC-kiegészítésben részesült 2. csoport, a BC+LU+LI kiegészítést kapó 6. csoport, illetve az A-vitamin kiegészítésben részesült 7. csoport esetében tapasztaltunk magasabb retinoid (ROL, RP) koncentrációt. A 7. csoport RP koncentrációja szignifikánsan ($p < 0,05^{***}$) magasabb a többi csoporthoz viszonyítva. Ezzel is alátámasztva, hogy a BC az A-vitamin provitaminjának tekinthető.

Kísérletünkben az E-vitamin és a karotinoidok között nem tapasztaltunk szoros összefüggést, azonban a tokoferol és a retinoidok között szoros korreláció volt kimutatható. A tüszőkben a BC+LU+LI kiegészített takarmányt fogyasztó csoport tojóinak tüszőiben mért E-vitamin koncentráció szignifikánsan ($p < 0,05^*$) nagyobb volt a többi csoporthoz viszonyítva. A szérumban (5.3.15. *ábra*) a 6. csoport E-vitamin koncentrációja magasabb azonban szignifikáns különbség nem volt kimutatható. Ezzel szemben a tojásszíkben (5.3.16. *ábra*) az 5. csoport (karotinoid-mentes takarmány) szignifikáns ($p < 0,05$) különbséget mutat a 1. 2 és 4. és 7. csoporthoz képest. Ugyanakkor a 6. csoport esetében is magasabb E-vitamin koncentráció mérhető a többi karotinoid kiegészített csoporthoz képest, azonban nem szignifikáns a különbség.

A β -karotin immunszabályozó hatása a leginkább kutatott és ismert (Chew 1995). A lutein, valamint a likopin immunstimulatív hatása szintén ismert tojóttyúkokban (Bárdos és mtsai. 2005, Bédécarrats és Leeson 2006, Koutsos és mtsai. 2007). Kísérletünkben a karotinoidok immunstimulatív hatását jól mutatja, hogy a karotinoid-mentes takarmányhoz adagolt β -karotin, lutein illetve likopin kiegészítésben részesült csoportokban, a szérumban (5.3.1. *ábra*), illetve a tojásszíkben (5.3.2. *ábra*) mért immunglobulin titer nagyobb volt a kereskedelmi tojótakarmányt fogyasztó csoporthoz viszonyítva. A különböző csoportokból származó tüszők immunglobulin szintje esetében elmondható, hogy bár a karotinoid-mentes takarmányozásban részesült 5. csoporthoz képest a normál kereskedelmi, illetve az általunk kiegészítésként egyedileg vagy kombinációban adagolt karotinoid kiegészített takarmányt fogyasztó csoportokban tendenciózusan nagyobb IgY titer volt mérhető, azonban szignifikáns különbség nem mutatható ki. Megállapítható, hogy a vizsgált anyagok karotinoid (BC, LU, LI), retinoid (ROL, RP), és tokoferol tüszőbe történő betárolása az F7 nagyságú ($\varnothing = 5$ mm, 0,07g) tüszőméret elérésekor válik jelentőssé (5.3.3. és 5.3.9. *ábrák*).

A karotinoidok és az immunglobulin titer közti összefüggés tekintetében szorosabb korreláció mutatható ki a mindhárom karotinoidot (BC+LU+LI) együttesen fogyasztó csoportban, a többi csak egy-egy karotinoid kiegészítésben részesült csoporthoz viszonyítva. Az együttes karotinoid kiegészítés ezek szerint erősebb hatást gyakorolt az immunkompetens sejtek IgY termelésére. A tüszőkben az előző kísérletünkhöz hasonlóan itt sem volt kimutatható szignifikáns különbség az IgY titerekben az egyes csoportok között, ami a tüszőbe történő

beépülés egyfajta szabályozását sejteti. Ennek magyarázata jelen vizsgálati adataink alapján nem adható meg. Amint az 1. kísérletben nyert alapadatokból is megállapítható volt, a karotinoidok és az immunglobulin titerek között nem volt szoros korreláció kimutatható.

Általánosságban elmondható, hogy az immunizálás hatékonyságát nagyban befolyásolják a megfelelő tartási és takarmányozási körülmények, a szervezet kielégítő alap egészségi állapota, ennek egyik tényezője a megfelelő energia, azaz takarmányellátottság, valamint a kiegyensúlyozott antioxidáns ellátottság, aminek hatékony tényezői a karotinoidok, az A- és E-vitamin. Immunizálás előtt a fent felsoroltakat kell fokozottan tekintetbe venni.

Egyéb baromfi fajok és azon belül a fajták, hibridek eltérnek a növekedési erélyükben, ami fokozottan megköveteli a biológiai igények kielégítését. Ezt támogatják a takarmányban adagolt biológiai hatással bíró anyagok (karotinoidok, vitaminok). Az antigén hatások folyamatosan érik a szervezetet. Ezek elleni védekezésnek van anyag, energia igénye. Az immunizálások (netalántán patogén kórokozók) elleni védekezés fokozott igényeket támaszt a szervezettel szemben. Ezért, amennyiben hatékonyan akarunk immunizálni jó, ha a karotinoidokkal, A-, E-vitaminnal előzetesen feltöltjük a szervezetet. Az ilyen szervezet immunválasz készsége hatékonyabb. Amennyiben az élet során egy korokozó általi antigénhatás éri a szervezetet, akkor az már az immunizálás révén bejáratott válaszreakcióval könnyebben eliminálhatóvá válik.

7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1.

A kereskedelmi tojótáppal takarmányozott japán fürjek petefészek tüszőiben a tokoferol, valamint a karotinoidok (BC, LU) valamint retinol szintje között szignifikáns szoros pozitív összefüggés mutatható ki.

2.

Japán fürjekkel végzett karotinoid transzport vizsgálatból kiderül, hogy a tüszőkbe irányuló jelentős karotinoid beépülés az F7 jelű ($x=5$ mm, 0,07-0,09 g) méretű tüszőktől kezdődően figyelhető meg, ugyanakkor az IgY és a karotinoidok akkumulációja között nem mutatható ki egyidejűség, mely az eltérő transzportmechanizmusokkal magyarázható.

3.

Az IgY tüszőbe történő akkumulációja időben korábban (3-4 nap) bekövetkezik a tüszőkbe történő karotinoid depozíció kezdetéhez képest. Az IgY titer már a kisebb F10 tüszők ($x=0,05$ g; $\varnothing=2$ mm) esetében szignifikáns emelkedésnek indul.

4.

A japán fürjek takarmányának természetes eredetű xantofill kivonattal történő kiegészítése hatással van a tüszők immunglobulin szintjére. $r_{LU}=0,6240$ (ns), $r_{BC}=0,6356$ ($p=0,0483^*$), $r_{RP}=0,5203$ (ns). A legerősebb és szignifikáns korreláció a β -karotin esetében volt kimutatható.

5.

A kísérletünkben adagolt karotinoidok (BC, LU, LI) mindegyike szoros pozitív korrelációban áll a gRBC-BSA antigénnel immunizált japán fürjek IgY immunglobulin termelésével. A legkifejezettebb összefüggés az együttes (BC+LU+LI) kiegészítés esetében volt tapasztalható.

8. ÖSSZEFOGLALÓ

IMMUNGLOBULIN (IGY) ÉS INDUKTÍV VITAMINJAINAK (A-, E-VITAMIN, KAROTINOIDOK) SZIKBE ÉPÜLÉSÉNEK DINAMIKÁJA

Kísérletünk során japán fűrjek immunológiai állapotát vizsgáltuk a takarmány különböző karotinoidokkal (β -karotin, lutein, likopin), valamint A-vitaminnal történő kiegészítése mellett. Aktív tojó fűrjekből vérmintákat, tüszőmintákat vettünk, valamint tojásmintákat gyűjtöttünk. ELISA módszerrel mértük a minták IgY titerét, valamint HPLC módszerrel meghatároztuk a szérumban, a tüszők és a szik karotinoid, retinoid koncentrációját.

Vizsgálataink során először a kereskedelmi takarmány alkalmazása mellett fennálló alapállapotot határoztuk meg, majd következő kísérletünkben szintén kereskedelmi takarmányhoz adagolt xantofill kiegészítést kaptak az állatok. A harmadik kísérletben a karotinoid-mentes takarmányhoz adagolt β -karotin, lutein, likopin, valamint A-vitamin kiegészítés immunstimulatív hatását illetve akkumulációját vizsgáltuk szérumban, szikben, valamint tüszőkben.

A karotinoid transzport vizsgálatból kiderült, hogy a tüszőkbe irányuló karotinoid beépülés a várható ovuláció sorrendjét figyelembe véve F7-nek jelölt 5 mm-es méretű tüszőktől kezdődően figyelhető meg.

A karotinoidok immunstimulatív hatásának vizsgálata során megállapítható volt, hogy a xantofillok jelentősebb hatással lehetnek az immunválasz készségre, azonban az általunk vizsgált karotinoidok (β -karotin, lutein, likopin) együttes adagolása fokozza leginkább az immunválasz-készséget japán fűrjben.

SUMMARY

THE DYNAMICS OF INFILTRATION OF IMMUNOGLOBULIN (IGY) AND ITS INDUCTIVE VITAMINS (VITAMINS A AND E, CAROTENOIDS) INTO YOLK

During our experiment, we examined the immunological condition of *Japanese quails* while adding different carotenoids (β -carotene, lutein, lycopene) as well as vitamin A to their feed. We took blood and follicle samples from active quail hens while collecting egg samples, too. We measured the IgY titer of the samples using ELISA method and we determined the carotenoid and retinoid concentration of the blood, follicles and yolk using HPLC method.

First we defined the basic condition while giving commercial layer's feed and then in the next experiment the quails were given xanthophyll supplement added to the commercial feed. In the third experiment we examined the immunostimulative effects and accumulation of β -carotene, lutein, lycopene and Vitamin A supplementation added to carotenoid-free feed in blood, yolk and follicles.

From the examination of the carotenoid transport it emerged that the accumulation of carotenoids into yolk can be observed from the 5 mm follicles that we marked as F7, taken the expected order of ovulation.

Examination of the immunostimulative effects of carotenoids it could be established that xanthophylls might have a more significant effect on the immune response, however, it is the supplementation of all the carotenoids examined (β -carotene, lutein, lycopene) at the same time which most increases the ability of immune response in Japanese quails.

MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

- AGARWAL, S., RAO, A.V. (1998): Tomato lycopene and low density lipoprotein oxidation: a human dietary intervention study. *Lipids*, 33:981-984.
- 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.
- ANDERSSON, S., PRAGER, M. (2006): Quantifying colors. In: Hill, G.E., McGraw, K.J. (Eds.), *Bird Coloration. Mechanisms and Measurements*, vol. 1. Harvard Univ. Press, Cambridge, MA.
- ARMSTRONG G.A. (1997): Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colourful tale. *Annual Review of Microbiology*, 51: 629-659.
- ARMSTRONG, G. A., AND HEARST, J. E. (1996): Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis *Faseb J.* 10:228-237.
- AVRAMEAS S. (1969). Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. *Immunochemistry* 6:43-52.
- BÁRDOS L. (1989): Plasma vitamin A composition and retinol-binding protein concentration during egg formation in laying hens. *Internat J. Vit. Nutr. Res.*, 59:251-254.
- BÁRDOS L. (1991): Az A-vitamin-tartalom lebenyenkénti megoszlása ló, szarvasmarha, sertés, kutya, házinyúl és tyúk májában, *Magy. Áo. Lapja*, (46. évf.) 3. sz. 167-173.
- BÁRDOS L. (2008): A tojások színe. *Madártávlat*. XV. 16-18
- BÁRDOS L. (2015): *Termelésélettan*. Szent István Egyetemi Kiadó, Gödöllő, p.59.
- BÁRDOS L. (Szerk. Husvéth, F.) (2000): A vitaminok anyagcseréje. In: *A gazdasági állatok élettana az anatómia alapjaival*. Mezőgazda Kiadó Budapest, 464-478. p.
- BARDOS L., JUNG I., KERTI A., SZABO CS., KISS ZS., LAKNER H. (2011): Carotenoids and body defense in accordance with experiences on poultry *Risk Factors and Biological Systems*. Volume I, eds.: Lukac N and Massanyi P. Slovak Univ. of Agriculture in Nitra, 114-124.
- BÁRDOS L., KISS ZS., GREGOSITS B., RÉTHY K., KERTI A., SZABÓ CS. (2005): Studies on the effects of Lycopene in poultry (hen and quail) *ISAH Proceedings Book 2*: 65-68.
- BÉDÉCARRATS G.Y. AND LEESON S. (2006): Dietary Lutein Influences Immune Response in Laying Hens *J. Appl. Poult. Res.* 15:183–189.
- BENDICH, A., SHAPIRO, S.S. (1986): Effect of beta-carotene and canthaxanthin on the immune responses of the rat *J. Nutr.* 116:2254-2262.
- BERTRAM, J. S. (2004): Induction of connexin 43 by carotenoids: functional consequences. *Arch. Bioch. Biophys.*, 430: 120-126.

- BIARD, C., SURAI P.F. AND MØLLER A.P. (2005): Effects of carotenoid availability during laying on reproduction in the blue tit *Oecologia*, 144:32-44.
- BIARD, C., SURAI P.F. AND MØLLER A.P. (2006): Carotenoid availability in diet and phenotype of blue and great tit nestlings *J Exp Biol* 209:1004-1015.
- BIARD C., SURAI P.F. AND MØLLER A.P. (2007): An analysis of pre- and post-hatching maternal effects mediated by carotenoids in the blue tit 20:326-339 .
- BLOUNT J.D., SURAI P.F., NAGER R.G., HOUSTON D.C., MØLLER A.P., TREWBY M.L. AND KENNEDY M.W. (2002): Carotenoids and egg quality in the lesser blackbacked gull *Larus fuscus*: a supplemental feeding study of maternal effects *Proc. R. Soc. Lond. B* 269:29–36.
- BOA-AMPONSEM K., PRICE S.E.H., PICARD M., GERAERT P. A., SIEGEL P. B. (2000): Vitamin E and Immune Responses of Broiler Pureline Chickens, *Poultry Science* 79:466–470.
- BOGENFÜRST F. (2004): A keltetés kézikönyve, Gazda Kiadó, Budapest ISBN 963 7445 50 1
- BOGENFÜRST F. (1994): Keltetés, Gazda Kiadó, Budapest
- BRAMBELL, F.W.R. (1970): *The Transmission of Immunity in Birds*, Vol. 18. Elsevier, New York
- BRIERLEY, J. AND HEMMINGS, W.A. (1956): The selective transport of antibodies from yolk to the circulation of the chicken. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 4:34–41.
- BRITTON, G. (1995): Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*, 9:1551-1558.
- BURTON, G. W. (1989): Antioxidant action of carotenoids. *J Nutr.* 119:109-111
- CARLANDER, D. (2002): Avian IgY Antibody. In vitro and in vivo. *Acta Univ. Upsaliensis* 1119. 53 pp. Uppsala.
- CHANDRA, R. K. (1992): Effect of vitamin and trace element supplementation on immune responses and infection in elderly subjects. *Lancet* 340:1124–1127.
- CHEW, B.P. (1987): Vitamin A and β -Carotene on Host Defense. *J. Dairy Sci.* 70:2732-2743.
- CHEW, B.P. (1993): Role of Carotenoids in the Immune Response. *Journal of Dairy Science* 76:2804-2811
- CHEW, B.P. (1995): Antioxidant Vitamins Affect Food Animal Immunity and Health. *J. Nutr.* 125: 1804S-1808S.
- CHEW, B.P. (1996): Importance of antioxidant vitamins in immunity and health in animals. *Animal Feed Science and Technology* 59:103-114 .
- CHEW, B.P. AND PARK J.S. (2004): Carotenoid Action on the Immune Response. *J. Nutr.* 134:257S–261S.
- CHUNG, H-Y., RASSMUSSEN H.M., JOHNSON E.J. (2004): Lutein bioavailability is higher from lutein enriched eggs than from supplements and spinach in men. *J. Nutr.*, 134: 1887-1893.

- CUCCO M., GUASCO B., MALACARNE G., OTTONELLI R. (2006): Effects of β -carotene supplementation on chick growth, immune status and behaviour in the grey partridge, *Perdix perdix Behavioural Processes* 73:325–332.
- CUCCO M., GUASCO B., MALACARNE G., OTTONELLI R. (2007): Effects of β -carotene on adult immune condition and antibacterial activity in the eggs of the Grey Partridge, *Perdix perdix Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 147 :1038–1046.
- CZIBULYÁS J.- KOVÁCS J. (1976): A japán fűrj tenyésztése és hasznosítása,
- DAVISON A. ROUSSEAU E. AND DUNN B. (1993): Putative anticancerogenic actions of carotenoids: nutritional implications. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 71: 732-745.
- DAVISON F. (2008) The importance of the avian immunessystem and its unique features edit: Davison F., Kaspers B., Schat K.A. in *Avian immunology* p5
- DAVISON F., MAGOR K.E. KASPERS B. (2008): Structure and evolution of avian immunoglobulins edit: Davison F., Kaspers B., Schat K.A. in *Avian immunology* p.116
- DIWADKAR-NAVSARIWALA, V. (2003): A physiological pharmacokinetic model describing the disposition of lycopene in healthy men. *J. Lipid Res.* 44:1927-1939.
- ENGVALL E., PERLMAN P. (1971). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G". *Immunochemistry* 8: 871–874
- ETCHES, R. J. (1996). *Reproduction in Poultry* CAB International Wallingford, UK.
- FELLAH J.S., JAFFREDO T., DUNON D. (2008): Development of avian immune system (edit: Davison F., Kaspers B., Schat K.A. in *Avian immunology*) p. 51.
- FRIEDMAN A., MEIDOVSKY A., LEITNER G., SKLAN D. (1991): Decreased Resistance and Immune Response to *Escherichia coli* Infection in Chicks with Low or High Intakes of Vitamin A. *J. Nutr.* 121:395-400.
- FRIEDMAN, A., BARTOV I., SKLAN, D. (1998): Humoral Immune Response Impairment Following Excess Vitamin E Nutrition in the Chick and Turkey, *Poultry Sci.* 77:956-962.
- FRIEDMAN, A., SKLAN, D. (1997): Effects of retinoids on immune responses in birds, *World's Poultry Sci.* 53:185-195.
- GÄRTNER, C., STAHL, W., AND SIES, H. (1997): Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes *Am J Clin Nutr.* 66:116-22.
- GENLER, H. L., HOLLANDAY, K. (1990): Cancer metabolism of retinol - In: *The Retinoids (I.-II.)*
- GIOVANNUCCI, E., RIMM, E.B., LIU, Y., STAMPFER, M. J. AND WILLETT, W. C. (2002): A Prospective Study of Tomato Products, Lycopene, and Prostate Cancer Risk., *JNCL*, 94: 391-398.
- 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.

- GOODROW, E.F., WILSON, T.A., CROCKER HOUDE, S., VISHWANATHAN, R., SCOLLIN P.A., HANDELMAN, G., AND NICOLOSI R.J. (2006): Consumption of One Egg Per Day Increases Serum Lutein and Zeaxanthin Concentrations in Older Adults without Altering Serum Lipid and Lipoprotein Cholesterol Concentrations *J. Nutr.* 136:2519–2524,
- GREGOSITS B., KERTI A., SZABÓ CS., LAKNER H., JUNG I. ÉS BÁRDOS L. (2009): A likopinkiegészítés hatása a tojótyúkrok karotinoid- és lipidanyagcserejére és a tojásba történő beépülésre. *Magyar Állatorvosok Lapja* 131:594-600.
- GRINDSTAFF J.L. (2008): Maternal antibodies reduce costs of an immune response during development. *The Journal of Experimental Biology* 211:654-660.
- GROBAS S., MÉNDEZ J., LOPEZ BOTE C., DE BLAS C., MATEOS G.G. (2002): Effect of Vitamin E and A Supplementation on Egg Yolk α -Tocopherol Concentration. *Poultry Science* 81:376–381.
- HAMAL K. R., BURGESS S. C., PEVZNER I. Y, ERF G. F. 2006. Maternal Antibody Transfer from Dams to Their Egg Yolks, Egg Whites, and Chicks in Meat Lines of Chickens. *Poultry Science* 85:1364–1372
- HANDELMAN, G.J, NIGHTINGALE, Z.D., LICHTENSTEIN, A.H., SCHAEFER, E.J., AND BLUMBERG, J.B (1999): Lutein and zeaxanthin concentrations in plasma after dietary supplementation with egg yolk *Am J Clin Nutr.*, 70: 247–251.
- HASLER C.M. (2000): The Changing Face of Functional Foods. *J. Am. Coll. Nutr.*, 19: 499S–506S
- HEBER, D. AND LU, Q-Y. (2002): Overview of Mechanisms of Action of Lycopene. *Exper. Biol. Med.*, 227: 920-923.
- 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.
- 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.
- HOSODA, H., TAKASAKI, W., OE, T., TSUKAMOTO, R., NAMBARA, T. (1986): *Chem. Pharm. Bull.* 34: 4177-4182
- HUDON J. (1994): Biotechnological applications of research on animal pigmentation. *Biotechnol. Adv.* 12: 49-69.
- 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.

- JIMMY L. SPEAROW, J.L., TROST, B.A. (1987): Development of a Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Cattle, Sheep, Rat, and Mouse Luteinizing Hormone. *Biol. Repr.* 37, 595-605
- JOHNSON, E.J., QIN, J., KRINSKY, N.I., RUSSELL, R.M. (1997): Ingestion by men of a combined dose of beta-carotene and lycopene does not affect the absorption of beta-carotene but improves that of lycopene. *J Nutr*, 127, 1833-1837.
- JUNG I., KERTI A., BÁRDOS L. (2008): IgY transzport jellege a tüszőérés valamint az inkubáció alatt 50. *Georgikon Napok 2008 09.25-26. Keszthely ISBN 978-963-9639-32-4 CD.*
- JUNG I., SZABÓ CS., KERT A., BÁRDOS L. (2009): Effects of natural oxycarotenoids on the immune function of Japanese quails *Slovak Journal of Animal Science* 42 21-24.
- KARADAS F., WOOD N.A.R., SURAI P.F., SPARKS N.H.C (2005a): Tissue-specific distribution of carotenoids and vitamin E in tissues of newly hatched chicks from various avian species *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 140: 506 – 511.
- KARADAS F., PAPPAS A.C., SURAI P.F., SPEAKE B.K. (2005b): Embryonic development within carotenoid-enriched eggs influences the post-hatch carotenoid status of the chicken. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 141:244 – 251.
- KARADAS, F., GRAMMENIDIS, E., SUARI, P.F.; ACAMOVIC, T. AND SPARKS, N.H.C. (2006): Effects of carotenoids from lucerne, marigold and tomato on egg yolk pigmentation and carotenoid composition. *Br. Poultry Sci.*, 47: 561-566.
- KATZ, D.R., MUKHERJEE, S., MAISEY J., MILLER K.(1987): Vitamin A acetate as a regulator of accessory cell function in delayed-type hypersensitivity responses. *Int. Arch. Allergy appl. Immun.* 82: 53–56.
- KERTI A., BÁRDOS L., SINKOVICSNÉ H.I. (1997): Tenyésztőjas termelést megelőző retinil-acetáttal történő takarmánykiegészítés hatása japánfürjtojások keltethetőségre *Magy. Áo. Lapja*, 119. p. 234-238.
- KERTI, A., BÁRDOS, L. (1997): β -karotin kiegészítés fürjtojások keltethetőségére, *Állattenyésztés és Takarmányozás*, 46. (6) 515-524.
- KERTI A., BÁRDOS L. (1999): Storage of retinoids and beta-carotene in the genital organs of japanese quail. *ACTA Vet. Hung.* 47. p. 95-101.
- KERTI, A., BÁRDOS, L. (2006): Simultaneous determination of retinoids (retinol, retinyl-palmitate) carotenoids (lutein, zeaxanthin, β -crypoxanthin, lycopene, β -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.
- KHACHIK F., BEECHER G.R., SMITH J.C. (1995): Lutein, lycopene, and their oxidative metabolites in chemoprevention of cancer. *J Cell Biochem Suppl*, 22:236-246.
- KHACHIK F., SPANGLER C.J., SMITH J.C., JR., CANFIELD L.M., STECK A., PFANDER H. (1997): Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *Anal Chem*, 69:1873-1881.

- KINSKY F. C. (1971): The consistent presence of paired ovaries in the Kiwi(*Apteryx*) with some discussion of this condition in other birds. *J. Ornithologie*, 112: 334-357.
- KISS ZS. és mtsai. (2003): Effect of β -carotene supplementation on plasma and yolk IgY levels induced by NDV vaccination in Japanese quail. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 73. p. 285-289.
- KITAGUCHI K., OSADA K., HORIO F., MURAI A. (2008): Exclusion of polymeric immunoglobulins and selective immunoglobulin Y transport that recognizes its Fc region in avian ovarian follicles. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 121:290-299.
- KLASING K.C. (1998): *Comparative avian nutrition*, Cab International ISBN 0-85199-219-6
- KOSTIC, D., WHITE, W.S., OLSON, J.A. (1995): Intestinal absorption, serum clearance, and interactions between lutein and beta-carotene when administered to human adults in separate or combined oral doses. *Am J Clin Nutr*, 62: 604-610.
- KOUTSOS E.A., CLIFFORD A.J., CALVERT C.C. AND KLASING K.C. (2003): Maternal Carotenoid Status Modifies the Incorporation of Dietary Carotenoids into Immune Tissues of Growing Chickens (*Gallus gallus domesticus*). *J. Nutr.* 133: 1132–1138.
- KOUTSOS E.A., LÓPEZ J.C.G, AND KLASING K.C (2007): Maternal and dietary carotenoids interactively affect cutaneous basophil responses in growing chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 147:87–92.
- KOUTSOS E.A., LÓPEZ J.C.G, AND KLASING K.C. (2006): Carotenoids from In Ovo or Dietary Sources Blunt Systemic Indices of the Inflammatory Response in Growing Chicks (*Gallus gallus domesticus*). *J. Nutr.* 136: 1027–1031, .
- KUMAR, A., DAHIYA. G. (2004): Comparison of O-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) and tetramethylbenzidine (TMB) as horseradish peroxidase substrate systems for ELISA. *Journal of Immunology and Immunopathology* 6:67-71.
- LAI, S.M., GRAY, J.I., FLEGAL, C.J., COOPER, T. (1996): Deposition of carotenoids in eggs from hens fed diets containing saponified and unsaponified oleoresin paprika. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 72: 166-170. LAWLOR S. M., O'BRIEN N.M. (1995): Astaxanthin: Antioxidant effects in chicken embryo fibroblasts . *Nutr. Res.* 15: 1695-1704.
- LEESON, S., CASTON, L. (2004): Enrichment of eggs with lutein. *Poultry Sci.*, 83:1709–1712.
- LEQUIN R (2005): "Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)". *Clin. Chem.* 51 : 2415–2418.
- LESHCHINSKY T.V. AND. KLASING K. C (2001): Relationship Between the Level of Dietary Vitamin E and the Immune Response of Broiler Chickens *Poultry Science* 80:1590–1599

- LESLIE G., CLEM L.W (1969): Phylogeny of Immunoglobulin structure and Function. JEM 130:1337-1352
- LIU, S.S. AND HIGGINS, D.A. (1990). Yolk-sac transmission and post-hatching ontogeny of serum immunoglobulins in the duck (*Anas platyrhynchos*). Comp. Biochem. Physiol. 97B: 637–644.
- LOSONCZY S., BATKE J. (1997): Madarak tojásszik eredető, specifikus immunglobulinjainak felhasználása az állatorvosi immundiagnostikában és immunterápiában. Magy.Állatorv. Lapja, 119. 339-343.
- 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. p. 253-258.
- MAGOR, K.E., HIGGINS, D.A., MIDDLETON, D.L., WARR, G.W. (1994): One gene encodes the heavy chains for three different forms of IgY in the duck. The Journal of Immunol. 153: 5549-5555
- MAST, J. AND GODDEERIS, B.M. (1999). Development of immunocompetence of broiler chickens. Vet. Immunol. Immunopathol. 70: 245–256.
- MCGRAW, K.J., CRINO O.L., MEDINA-JEREZ W., NOLAN M.P. (2006): Effect of Dietary Carotenoid Supplementation on Food Intake and Immune Function in a Songbird with no Carotenoid Coloration Ethology 112: 1209–1216 .
- MEYDANI, S.N., MEYDANI, M., , BLUMBERG J.B., , LEKA L.S, G., SIBER, R., LOSZEWSKI, C., THOMPSON, M. C., PEDROSA, R., DIAMOND, D. AND STOLLAR, B. D. (1997): JAMA 277:1380-1386 .
- 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.
- MUIRW.I., HUSBAND A.J., BRYDEN W.L. (2002) Dietary supplementation with vitamin E modulates avian intestinal immunity British Journal of Nutrition, 87:579–585
- NA J. C., SONG J. Y., LEE B. D., LEE S. J., LEE C. Y. AND AN G. H. (2004): Effect of polarity on absorption and accumulation of carotenoids by laying hens. Animal Feed Science and Technology. 117: 305–315.
- NAKANE PK, PIERCE GB. (1967) Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. J Cell Biol 33:307-318.
- NAMEGHIA. H., MOGHADDAM H.N., AFSHARI J.T., KERMANSHAHI H. (2007): Effects of Vitamin E and C Supplementation on Performance and Immune Response of Broiler Clucks. Journal of Animal and Veterinary Advances 6(9): 1060-1069.
- NAVARA K.J. AND HILL G.E. (2003): Dietary carotenoid pigments and immune function in a songbird with extensive carotenoid-based plumage coloration. Behav Ecol 14:909–916.
- NITSCHKE, N. M. (2005): Der Einfluss der Carotinoide Lycopin und Lutein auf den antioxidativen Status des Hundes, dissertation, München

- OLÁH I. VERVELDE L. (2008): Structure of the Avian Immunsystem ed: Davison F., Kaspers B., Schat K.A. in Avian immunology Elsevier Ltd p.13-50.
- OLSON J.B., WARD N.E., AND KOUTSOS E.A. (2008): Lycopene Incorporation into Egg Yolk and Effects on Laying Hen Immune Function. Poultry Science 87:2573–2580.
- OLSON, J. A. Provitamin (1989): A function of carotenoids: the conversion of beta-carotene into vitamin. A J Nutr. 119 p. 105-108.
- ONG A.S.H. AND TEE E.S. (1992): Natural sources of carotenoids from plants and oils. In: Methods in Enzymology. Vol.213, Carotenoids: Part A. Chemistry, Separation, Quantitation and Antioxidation. (Packer L ed.). pp.142-167. Academic Press, New York.
- PABLO FANJUL-BOLADO, P., BEGON, C.M., GARCIA, G. COSTA-GARCIA, A. (2005): Amperometric detection in TMB/HRP-based assays. Anal Bioanal Chem 382: 297–302
- 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.
- PELUC S. I., REED W. L., MCGRAW K. J., GIBBS P. (2012): Carotenoid supplementation and GnRH challenges influence female endocrine physiology, immune function, and egg-yolk characteristics in Japanese quail (*Coturnix japonica*). Journal of Comparative Physiology B 182:687-702
- PEREZ-VENDRELL, A. M., HERNANDEZ, M., LLAURADO, 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.
- PERRY MM, WADDINGTON D, GILBERT AB & HARDIE MA (1983): Growth rates of the small yolky follicles in the ovary of the domestic fowl. IRCS Medical Science 11: 979–980.
- PFANDER H. (1992): Carotenoids: An overview. In: Methods in Enzymology. Carotenoids: Part A. Chemistry, Separation, Quantitation and Antioxidation. (Packer L ed.). 213:3-13. Academic Press, New York.
- PIHLAJA M., SIITARI H. AND ALATALO R.V. (2006): Maternal antibodies in a wild altricial bird: effects on offspring immunity, growth and survival Journal of Animal Ecology 75:1154–1164.
- PUSZTAI A., BÁRDOS L. (1995): Béta-karotin- és retinil-ecetát-kezelés hatása a vérplazma retinoid- és béta-karotin-szintjére, valamint a petefészek in vitro progeszteronszekréciójára japán fűrjben. Magy. Áo. Lapja 50. p. 353-355.
- RÉTHY K., PAPÓCSI P., BÁRDOS L. ÉS KISS ZS. (2005): Karotinoidmentes takarmány alkalmazása a tyúkfélék karotinoid-anyagcseréjének vizsgálatához. Állattenyésztés és takarmányozás, 54, 379-386.
- RIBAYA-MERCADO, J. D., BLUMBERG, J. B. (2004): Lutein and zeaxanthin and their potential roles in disease prevention. J. Am. Col.l Nutr., 23:567–587.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. (2001): A guide to carotenoid analysis in foods. Washington. ILSI Press. 1, 2-9 p

- SAHIN K., OZERCAN R., ONDERCI M., SAHIN N., KHACHIK F., SEREN S., KUCUK O. (2007):, Dietary Tomato Powder Supplementation in the Prevention of Leiomyoma of the Oviduct in the Japanese Quail. *Nutrition and Cancer* 59: 70-75,
- SAINO N., BERTACCHE V., FERRARI R.P., MARTINELLI R., MØLLER A.P. AND STRADI R. (2002): Carotenoid concentration in barn swallow eggs is influenced by laying order, maternal infection and paternal ornamentation *Proc. R. Soc. Lond. B* 269: 1729–1733.
- SAINO N., FERRARI R., ROMANO M., MARTINELLI R. AND MØLLER A.P. (2003): Experimental manipulation of egg carotenoids affects immunity of barn swallow nestlings *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: 2485–2489.
- SCOCCIA, A. E., MOLINUEVO, M. S., MCCARTHY, A. D., CORTIZO, A. M. (2001): simple method to assess the oxidative susceptibility of low density lipoproteins. *BMC Clin. Pathol.* 10.: 1472.
- SIES H, STAHL W. (1995): Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr*:62:1315S-1321S
- SIJTSAMA S. R., ROMBOUT, J.H.W.M., WEST C.E., VAN DER ZIJPP A.J: (1990): Vitamin A deficiency impairs cytotoxic T lymphocyte activity in Newcastle disease virus-infected chickens *Veterinary Immunology and Immunopathology* 26: 191–201
- SINKOVITSNÉ, H.I. (1973): Fürjtojások keltetése., *Természet világa* 8: 353-354.
- SIRISINHA, S., DARIP, M. MOONGKARNDI P, ONGSAKUL M, LAMB AJ. (1980): Impaired local immune response in vitamin A-deficient rats. *Clin.exp. Immunol.* 40: 127-35.
- 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.: 245-250.
- SKLAN D., DONOGHUE S. (1982): Vitamin E Response to High Dietary Vitamin A in the Chick *J. Nutr.* 112: 759-765.
- SMITH A.L., BEAL R.(2008) The avian enteric immune System in health and disease edit:DAVISON F., KASPERS B., SCHAT K.A. in *Avian immunology* p 243
- SMITH, I. D., PERDUE, H.S. (1966): Isolation and tentative identification of the carotenoid present in chicken skin and egg yolk. *Poultry Sci.*, 45:577–581.
- SOLER J.J., MORENO J. AND POTTI J. (2003): Environmental, genetic and maternal components of immunocompetence of nestling pied flycatchers from a cross-fostering study *Evolutionary Ecology Research*, , 5: 259–272.
- SOWELL, A.L., HUFF, D.L., YEAGER, P.R., CAUDILL, S.P., GUNTER, E.W. (1994): Retinol, α -tocopherol, lutein/zeaxanthin, β -cryptoxanthin, lycopene, α -carotene, trans- β -carotene, and four retinyl esters in serum determined simultaneously by reversed-phase HPLC with multiwavelength detection. In *Clin. Chem.*, 40, : 411-416.
- SPORN, M. B., ROBERTS, A. B., GOODMAN D. S. (1984): *The Retinoids (I-II.)* Academic Press.

- STAHL W., SIES H (2003): Antioxidant activity of carotenoids *Molecular Aspects of Medicine* 24: 345–351
- SURAI P.F. AND SPEAKE B.K. (2001): Distribution of carotenoids from the yolk to the tissues of the chick embryo. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 9: 645-651. .
- SURAI P.F., SPEAKE B.K. AND SPARKS N.H.C. (1998): Carotenoids in Avian Nutrition and Embryonic Development. 1. Absorption, Availability and Levels in Plasma and Egg Yolk *Journal of Poultry Science*, 38: 1-27.
- SZABO, CS., KERTI A., BÁRDOS, L. (2007): A tojássárgája színének objektív értékelése CEIELAB módszerrel *Baromfiágazat* 2. 7. évf. p.2-4.
- SZABO, CS.; BARDOS, L.; LOSONCZY, S.; KARCHESZ, K. (1998): Isolation of Antibodies from Chicken and Quail Eggs. - www.mcmaster.ca/inabis98/immunology/szabo0509/index.html
- TENGERTY, R.P., LACETERA, N.G., NOCKELS C.F. (1990): Effect of beta carotene on disease protection and humoral immunity in chickens. *Avian Diseases* 34. :848.
- THOMAS, P.R., EARL, R. (eds) (1994): Committee on Opportunities in the Nutrition and Food Sciences, Institute of Medicine. *Opportunities in the nutrition and food sciences: research challenges and the next generation of investigators*. Natl. Acad. Press. Washington, 109-120.
- TOMFÖRDE H.: *Funktionalität von Lycopin und Lutein*, Würzburg 2002.
- 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, :1210-1221.
- TSWETT M. (1911): Über den makro- und mikrochemischen Nachweis des Carotins. *Bert. Dtsch. Bot. Ges.* 29: 630-636.
- TUBOLY S. (2002): A baromfi immunrendszer, p. 50-57.
- TYCZKOWSKI J.K. AND HAMILTON P.B. (1986): Absorption, transport, and deposition in chickens of lutein diester, a carotenoid extracted from marigold (*Tagetes erecta*) petals. *Poultry Science*, 65: 1526-1531.
- UNANUE, E. R., CEROTTINI, J. C. (1989): Antigen presentation. *FASEB J.*, 3:2496–2502.
- UNLU, N.Z., BOHN, T., FRANCIS, D.M., NAGARAJA, H.N., CLINTON, S.K. AND SCHWARTZ, S.J. (2007): Lycopene from heat-induced cis-isomer-rich tomato sauce is more bioavailable than from all-trans-rich tomato sauce in human subjects *British Journal of Nutr.*, 98: 140–146
- VAN DEN BERG (1999): Carotenoid Interactions. *Nutrition Reviews*, Vol. 57, No. 1
- VAN DEN BERG, H., VAN VLIET, T. (1998): Effect of simultaneous, single oral doses of betacarotene with lutein or lycopene on the beta-carotene and retinyl ester responses in the triacylglycerol-rich lipoprotein fraction of men. *Am J Clin Nutr*, 68:82-89.
- VAN HET HOF, K.H., WEST, C.E., WESTSTRATE J.A., HAUTVAST J.G.A.J. (2000): Dietary Factors That Affect the Bioavailability of Carotenoids. *J. Nutr.* 130: 503-506.

- VAN WEEMEN BK, SCHUURS AH (1971). "Immunoassay using antigen-enzyme conjugates.". FEBS Letters 15 (3): 232–6.
- VIEIRA S.L. (2007): Chicken Embryo Utilization of Egg Micronutrients Brazilian Journal of Poultry Science 9 1 / 01 – 08.
- WALZEM R.L., HANSEN R.J., WILLIAMS D.L., HAMILTON R.L. (1999): Estrogen induction of VLDL_y assembly in egg-laying hens. J Nutr. 129(2S Suppl):467S-472S.
- WANG Y, ROGER ILLINGWORTH D, CONNOR SL, BARTON DUELL P, CONNOR WE (2010): Competitive inhibition of carotenoid transport and tissue concentrations by high dose supplements of lutein, zeaxanthin and beta-carotene. Eur J Nutr. 49(6):327-336.
- WENZEL, A.J., GERWECK, C., BARBATO, D., NICOLOSI, R.J., HANDELMAN, G.J. AND CURRAN-CELENTANO J. (2006): A 12-Wk Egg Intervention Increases Serum Zeaxanthin and Macular Pigment Optical Density in Women J. Nutr., 136 : 2568–2573,
- WEST C.E, CASTENMILLER J.J.M. (1998) Bioavailability and Bioconversion of carotenoids. Annual Review of Nutrition 18: 19-38
- WEST, A.P., HERR, A.B. AND BJORKMAN, P.J. (2004): The chicken yolk sac IgY receptor, a functional equivalent of the mammalian MHC-related Fc receptor, is a phospholipase A2 receptor homolog. Immunity 20:601–610.
- WHITE, W.S., PECK, K.M., BIERER, T.L., GUGGER, E.T., ERDMAN, J.W., JR. (1993): Interactions of oral beta-carotene and canthaxanthin in ferrets. J Nutr, 123:1405-1413.
- WILSON, W.O.-ABBOTT, U.K.- ABPLANALP, H. (1961): Evaluation of coturnix (Japanese quail) as pilot animal for poultry. Poultry Sci. 40:651-657.
- WOODALL AA, BRITTON G., JACKSON MJ. (1996):Dietary supplementation with carotenoids: effects on a-tocopherol levels and susceptibility of tissues to oxidative stress, British Journal of Nutrition 76:307-317
- www.nobelprize.org
- WYSS A, WIRTZ G, WOGGON W, BRUGGER R, WYSS M, FRIEDLEIN A, BACHMANN H, HUNZIKER W (2000): Cloning and expression of beta,beta-carotene 15,15'-dioxygenase Biochem Biophys Res Commun., 271(2):334-6
- XU, M. J., PLEZIA, P. M., ALBERTS, D. S., EMERSON, S. S., PENG, Y. M., SAYERS, S. M., LIU, Y., RITTENBAUGH, C. , GENDER, H. L. (1992): Reduction in plasma or skin alpha-tocopherol concentrations with long-term oral administration of beta-carotene in humans and mice. Journal of the National Cancer Institute 84:1559-1565.
- YALOW, RS, BERSON, SA. (1960): Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. J Clin Invest 39:1157-116

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK

Tudományos közlemények folyóiratban

- Kerti A., Szabó Cs., Gregosits B., **Jung I.** és Bárdos L. (2008): A tojásminőség fontos festékanyagai. - AWETH 4: 773-780.
- Szabó Cs., Lakner H., **Jung I.**, Kiss Zs., Bárdos L. (2008): A baromfi immunrendszerének támogatása természetes eredetű karotinoidokkal. AWETH 4: 809-816.
- Gregosits B., Kerti A., Szabó Cs., Lakner H., **Jung I.** és Bárdos L. (2009): A likopinkiegészítés hatása a tojótyúkوك karotinoid- és lipidanyagcseréjére és a tojásba történő beépülésre. Magyar Állatorvosok Lapja 131:594-600.
- **Jung I.**, Szabó Cs., Kerti A. és Bárdos L. (2009): Effects of natural oxy-carotenoids on the immune function of Japanese quails. Slovak J. Animal Sci., 42: 21-24.
- Bárdos L., **Jung I.**, Kerti A., Szabó Cs., Kiss Zs., Lakner H. (2011): Carotenoids and body defense in accordance with experiences on poultry. in.: Risk Factors and Biological Systems (Eds.:Lukac, N., & Massanyi, P.) Slovak Univ. of Agric. in Nitra,. ISBN 978-80-552-0567-0

Hazai konferenciák

- **Jung I.** (2008): Immunglobulin (IgY) és induktív vitaminjainak (A-, E-, karotinoidok) szikbe épülésének dinamikája ÁTDI Fórum 2008 Gödöllő
- Kerti A., Szabó Cs., Gregosits B., **Jung I.** és Bárdos L. (2008): A tojásminőség fontos festékanyagai. I. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok. 2008. április 11-12. Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Gödöllő.
- Szabó Cs., Lakner H., **Jung I.**, Kiss Zs. és Bárdos L. (2008): A baromfi immunrendszerének támogatása természetes eredetű karotinoidokkal. I. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok. 2008. április 11-12. Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Gödöllő.
- **Jung I.**, Kerti A. és Bárdos L. (2008): IgY transzport jellege a tüszőérés valamint az inkubáció alatt - 50. Jubileumi Georgikon Napok, Keszthely PE-Georgikon kar 2008. szeptember 25-26. Összefoglaló kötet (ISBN 978-936-9639-31-7) Állattenyésztés és Halbiológia p. 58
- **Jung I.**, Kerti A., és Bárdos L. (2008): IgY transzport jellege a tüszőérés valamint az inkubáció alatt 50. Georgikon Napok 2008 09.25-26. Keszthely ISBN 978-963-9639-32-4 CD
- Kiss Zs., Bordán J., Szabó Cs., **Jung I.** (2009): IgY kimutatása újszülött kérődzök vérében. II. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok, 2009. október 16-17. Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Gödöllő.
- **Jung I.**, Szabó Cs., Kerti A., Lakner H., Bárdos L. (2009): Xantofillok hatása a humorális immunválaszra japánfűrjben. II. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok, 2009.

október 16-17. Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Gödöllő.

- **Jung Ivett** (2009): Immunglobulin (IgY) és induktív vitaminok (A-, E-, karotinoidok) szikbe épülésének dinamikája. Karotinoid és IgY hasznosulás jellege a tüszőérés alatt. SzIE állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola (ÁTDI) V. fórum Gödöllő
- **Jung I.** (2009): Házityúk, japánfűrj, lúd és kacska tojás IgY mérése különböző kromogént használó ELISA módszerrel. XV. Ifjúsági Tudományos Fórum 2009.04.16. Keszthely ISBN 978-963-9639-33-1 CD

Nemzetközi konferenciák

- **Jung I., Szabó Cs., Kerti A., Bárdos L.** (2009): Effects of natural oxycarotenoids on the immune function of Japanese quails, 8th International Slovak Conference of Animal Physiology, 2009, 16-18. Sept. Rackova Dolina, Slovakia
- Szabó, Cs., **Jung, I., Bárdos, L.** (2010): The Effect of Dietary Carotenoids on Immunostimulation and Antioxidant Status in Japanese Quail. Proceeding Book of X International Scientific Conference. 13-14 September, 2010. Nitra, Slovakia. ISBN 978-80-552-0437-6
- **Jung I., Szabó Cs., Kerti A., Bárdos L.** (2010) Effect of dietary supplementation with β -carotene, lutein and lycopene on the immune function of Japanese quails Proceedings of the Society of Nutrition Physiology (2010) 19 p50 ISBN 978-3-7690-4103-3
- **Jung I., Szabó Cs., Kerti A., Bárdos L.** (2010) Evaluation of yolk and skin color by CIELab values proceed to different carotenoid supplementation in hens and Japanese quails 6th International Congress on Pigment in Food 20-24. June 2010 Budapest, CD ROM + Proceeding Book p 214-216. ISBN 978-963-9970-04-5
- **Jung I., Szabó Cs., Kerti A., Bárdos L.**(2010): Poultry products in the food chain as a source of carotenoids X. Risk Factor of Food Chain 13.-14. September 2010 Proceeding Book of X International Scientific Conference. 13-14 September, 2010. Nitra, Slovakia. ISBN 978-80-552-0437-6 (előadás anyaga)
- Szabó Cs., **Jung I., Bárdos L.** (2011): A kantaxantin hatása a japán fűrj immunválaszára III.Gödöllői Állattenyésztési Napok, 2011. október 13-15, . Előadások és poszterek összefoglaló kötete. p. 110.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Bárdos László professor emeritusnak, a Szent István Egyetem Állatélettani és Állat-egészségtani Tanszék korábbi vezetőjének, hogy lehetőséget biztosított számomra a disszertációm elkészítéséhez, és akinek aktív segítsége nélkül ez a munka nem készülhetett volna el.

Szintén köszönettel tartozom Dr. Kiss Zsuzsanna ny. egyetemi docensnek, aki segítséget nyújtott kísérleteim megvalósításában és tanácsokkal segítette disszertációm elkészítését.

Köszönet illeti a Szent István Egyetem Állatélettani és Állat-egészségtani Tanszék valamennyi dolgozóját, külön kiemelve Dr. Kerti Annamáriát és Szabó Csabát a kísérletek és analízisek végzésénél nyújtott segítségükért, valamint Migályné Lakner Hajnalka egyetemi tanársegédet számos hasznos tanácsukért, segítségükért.

Külön köszönettel tartozom szüleimnek, családomnak és Török Gergelynek, akik végig mellettem álltak és nyugodt háttérrel teremtettek.