



**SZENT ISTVÁN  
EGYETEM**

**GÖDÖLLŐ**

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

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

**Doktori értekezés tézisei**

**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

## 1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI KITŰZÖTT CÉLOK

A tojással szaporodó állatok esetében az anyag, energia és információ anya-utód transzportja a sokszikű 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, mézhéj) kialakulása kicsivel több, mint 24 óra. Ez alatt annyi anyag, energia és információ átadás és tárolás történik, amennyi elegendő az *in ovo* fejlődés (ez tojótyúkban 21 nap, japán fürjben 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, hámok 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 ( $\beta$ -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) petefészek 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 szik 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 nyilvánul meg.

Természetesen a karotinoid és egyéb lipidok beépülésének a folyamata alapvetően függ a takarmányozástól. Ez főleg azokra a lipidokra érvényes, amelyek nem a madár zsírsavcserejének 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  $\beta$ -jonon gyűrűs karotinoidokból ez a szervezetben is kialakulhat, de ez ismételtén 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 magnumba 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.

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 tojásszikbe épülési dinamikájának a megismerése különböző vitaminellátottság esetében.

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

Vizsgálendő 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 ( $\beta$ -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 ( $\beta$ -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 dózisoknak a szikben történő akkumulációja, valamint a közöttük és az IgY titerek közötti viszonyok felmérése, egyrészt a zsíroltható faktorok közötti kompetíció, másrészt az immunmoduláns hatás, megállapítása a cél.

Másik terület az immunizálást követően megemelkedő szérum IgY szikbe 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.

## 2. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 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 tojássárgájában 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.

#### 2.1.1. A tüszők fejlődése alatt végzett vizsgálatok japán fürjben

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 fürjeket egy tenyésztőtől („Tápiófürj”, Tápiógyörgye) vásároltuk. A tenyésztés helyén az állatokat normál kereskedelmi tojótáppal takarmányozták, melyhez *ad libitum* hozzáférhettek. Az ivóvízzel történő ellátásuk folyamatos volt. Célunk a tüszőérés folyamat normál kereskedelmi takarmánnyal történő etetés esetén fennálló alap állapotának felmérése volt.

Aktív japán fürj 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.

#### 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.

## **2.2. Karotinoid kiegészítés hatásának vizsgálata az IgY transzportra**

### **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 kipreparált 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 Yolc Colour Fan-nel (YCF) hasonlítottuk össze. A tojás, valamint a bőrfelszín színének értékelését kolorimetriás módszerrel a CIELab skálához viszonyító kézi reflexiós célfotométerrel határoztuk meg (Micromatch<sup>TM</sup> Plus, Sheen Ltd., United Kingdom).

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

Nyolchetes 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  $\beta$ -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.

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).

### 2.1. táblázat

#### A kísérleti takarmányban alkalmazott kiegészítések

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

### 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  $\mu$ g/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 tojásokról 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

### **3. Alkalmazott keltetéstechnológia**

Az inkubációkat egy ME3M (Maino Enrico-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. Alkalmazott analitikai módszerek**

#### **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 szinkifejlesztést 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 tüvel, 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 érrellátás 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 májlebenyéből 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.

#### **4.2. Karotinoidok, retinoidok és tokoferol vizsgálata**

A meghatározások 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 az analízisig -20°C-on tároltuk. A lefagyasztott mintákból felolvasztás és 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 a 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.

#### **4.3. 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<sup>TM</sup> Plus, Sheen Ltd., United Kingdom).

A bőrfelszín színváltozásainak mérését kolorimetriás módszer a CIELab skálához viszonyító kézi reflexiós célfotométerrel határoztuk meg (Micromatch<sup>TM</sup> 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 bőraljában lerakodott zsírréteg karotinoidjainak a színét tudtuk mérni. A külső bőrfelszínen történő méréshez a fürjeken a mellizom feletti kis tolltűző nélküli felülete miatt nem elégséges, mivel a műszer apertúráját nem lehet kellő sík felületre helyezni.

#### **5. Alkalmazott statisztikai módszerek**

A mérések (pl.: súly, abszorbancia, koncentráció egység) egyedi értékeiből elvégzett átlag ( $\bar{x}$ ) számítást 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.

### **3. EREDMÉNYEK**

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

##### **3.1.1. A tüszők fejlődése alatt végzett vizsgálatok japán fürjben**

Az F7 tüsző mérettől kezdődően a tüszők súlya ugrásszerűen, átmérőjük is fokozatosan növekedik.

A karotinoid (lutein LU, és BC), retinoid (retinol ROL, és retinil plamitár RP) és tokoferol (TF) 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 tüszőméret esetében éri el a legmagasabb koncentrációt. A kereskedelmi tojótáppal takarmányozott japán fürjek petefészkek 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.

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, valamint az immunglobulin titer változása az egyes tüszőméretek vizsgálatának tekintetében nem mutat egyidejűséget.

##### **3.1.2. Keltetett tyúktojásban lévő embrió és napos csibében történő vizsgálatok**

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, ugyanakkor koncentrációjuk ekkor a legmagasabb a felszívódás állapotában lévő szikzacskóban. 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 napos csibében érik el a vizsgált anyagok a legmagasabb koncentrációt. A kelést követően a szikanyag felszívódási folyamata során egyre több folyadékot veszít, ezért tapasztalható a kelést követő 5. napon koncentráció növekedés.

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. 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 találhatók a májban.

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

A szikanyagban az IgY jelenlétének ELISA-val történő vizsgálata során megállapítható, hogy a tojássárgájában mért mennyiség fokozatosan növekszik. 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.

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.

### **3.2. Xantofill kiegészítés hatásának vizsgálata (2. kísérlet)**

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

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

A *Tagetes erecta* természetes kivonata a Capsantal kb. 1%-ban tartalmaz természetes  $\beta$ -karotint is (<http://www.copharm.gr>), ezért a lutein kiegészítés mellett további  $\beta$ -karotin forrást is jelentett a Capsantal takarmányhoz adagolása. A takarmányban jelenlévő BC tojássárgájába történő beépülésére pozitív kölcsönhatással van a lutein (Capsantal) kiegészítés. Ezért a tojásokban magasabb  $\beta$ -karotin ( $p < 0,05$ \*\*) koncentráció volt mérhető a Capsantal

kiegészítésben részesült csoportban. A normál kereskedelmi takarmányban természetes módon előforduló BC, valamint a kiegészítésként alkalmazott Capsantal fő (82%) alkotója a lutein koncentrációja hasonló a tojásszikben ( $p > 0,05$ ). 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.

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. A 3. mintvételtől a kiinduláshoz képest szignifikáns ( $p < 0,05$ ) különbség mérhető a booster után a Capsantal-os csoport és a kontroll csoport között.

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

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 tüszőkben mért karotinoidok (LU, BC) koncentrációja az F8-as tüszőkben jelentős ( $p < 0,05^*$ ) mértékben megemelkedett a kontroll csoporthoz képest. 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. A Capsantal kiegészítés a hatással van a tüszők immunglobulin szintjére is.  $r_{LU} = 0,6240$  (ns),  $r_{BC} = 0,6356$  ( $p = 0,0483^*$ ),  $r_{RP} = 0,5203$  (ns).

A tojássárgája YCF-nel mért színintenzitása már a második hétre fokozódott a Capsantal (lutein) kiegészítésben részesült tojókban és az átlagos színértékek szignifikánsan nagyobbak ( $p < 0,05$ ) a kísérlet teljes ideje alatt. A madarak bőrének színintenzitását a mellsonti tájéknak a combtájék felé néző tollhiányos felületén (*apteria*) mértük. Kísérletünkben A CIELab értékei esetén az L és a b\* értékek esetében szignifikáns különbséget találtunk.

### **3.3. Karotinoid-mentes takarmányhoz adagolt likopin, lutein $\beta$ -karotin és A-vitamin kiegészítés hatásának vizsgálata (3. kísérlet)**

A szérum IgY titerei esetében 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. 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.

A karotinoid (BC, LU, LI), retinoid (ROL, RP), és tokoferol tüszőbe történő betárolása az F7 nagyságú ( $\varnothing = 5$  mm, 0,07g) tüszőméret elérésekor válik jelentőssé.

A 2. csoportban („rizsalapú” takarmány + BC) lévő egyedekből származó tüszőkben a karotinoid analízis során a kiegészítésként adagolt BC nem volt detektálható, hasonlóan a 6. csoporthoz, melynek egyedei a karotinoid-mentes tojótáphoz BC+LU+LI kombinált kiegészítést kapták. Ezekben a csoportokban a ROL, valamint a RP magasabb koncentrációban volt jelen. A LU kiegészítésben részesült 3. csoport, valamint a LI kiegészítésben részesült 4. csoport egyedeinek tüszőiben a takarmány-kiegészítésként alkalmazott karotinoid detektálható volt.

A különböző csoportokból származó tüszők immunglobulin titere között nem mutatható ki szignifikáns különbség. Tüszőkben a kiegészítésként alkalmazott BC, LU, LI, BC+LU+LI és A-vitamin, valamint az ezekben a csoportokban mér IgY titer között nem mutatható ki szoros összefüggés.

Szérumban, valamint a tojásszékben azonban az általunk adagolt karotinoidok mindegyike szoros kapcsolatban áll az immunglobulin termeléssel, azonban 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.

Mind a tojásban, mind a szérumban 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.

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

#### 4. 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  $\beta$ -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.



## 5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

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

#### 5.1.1. 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. A nagy sárga tüszők megjelenése egyben a méret ugrásszerű változásával járt együtt.

Japán fürjekkel végzett karotinoid transzport vizsgálatunkból kiderül, hogy a jelentős mértékű karotinoid, retinoid és tokoferol koncentráció emelkedés a  $x = 0,4$  g,  $\emptyset = 5$  mm-es (F7) tüszők esetében tapasztalható. 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. 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, 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 lipidok VLDLy-ban történő szállításával érhetően 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.

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.

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.

### **5.1.2. 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, és az idő előrehaladtával egyre nagyobb mennyiségben jelennek meg az embrió májában.

A keltetés ideje alatt szikben lévő koncentrációjuk alig változik, csupán a kikelt madárban a még fel nem szívódott szikben tapasztalható 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).

Az A vitamin aktív formája a ROL alig detektálható mennyiségben van jelen, 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.

A vizsgált időszakban a BC mennyisége és koncentrációja is növekedik a májban, 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. 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. 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.

## **5.2. Karotinoid kiegészítés hatásának vizsgálata az IgY transzportra**

### **5.2.1. Xantofill kiegészítés hatásának vizsgálata (2. kísérlet)**

Azt tapasztaltuk, hogy tojásokban a LU koncentráció telítődik. Ezt a jelenséget, azaz >350 ppm felett már nem nő a sárgájába történő depozíció, ezt tapasztalta Leason és munkacsoportja (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 tojásszékben, illetve tüsszőben mért koncentrációja nem haladja meg  $\beta$ -karotin koncentrációját, közel azonosak ( $p>0,05$ ) a Capsantal kiegészítést fogyasztó csoportban.

A takarmányban jelenlévő BC tojásszékbe 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  $\beta$ -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).

Kísérletünkben mérsékelt növekedését tapasztaltuk a humorális immunválaszban, a lutein kiegészítésben részesülő japán fürjek szérumában és a tojásban, mivel a vörösvérsejt-BSA-antigén komplexszel szemben nagyobb IgY titereket mértünk. A tüsszőkben 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 tojásszék rphPLC-vel mért  $\beta$ -karotin, illetve retinoid koncentrációk a luteines kiegészítésben részesülő csoportban magasabbak. A  $\beta$ -karotin, valamint a lutein ilyen jellegű interakciójára vonatkozóan nem találtunk irodalmat. Humán vizsgálatban a  $\beta$ -karotin és lutein összefüggését elemezve azt tapasztalták, hogy  $\beta$ -karotin-lutein együttes alkalmazása esetén a  $\beta$ -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 fűjben.

### **5.2.2. Karotinoid-mentes takarmányhoz adagolt likopin, lutein $\beta$ -karotin és A-vitamin kiegészítés hatásának vizsgálata (3. kísérlet)**

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

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

A  $\beta$ -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. Ezekben a csoportokban a ROL, valamint a RP nagyobb koncentrációban volt jelen. Feltételezhető, hogy karotinoid-mentes takarmányozás mellett a  $\beta$ -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 és a tojásszék esetében nem figyelhető meg ez a jelenség a BC detektálható a 2. és a 6. csoportban is.

A tojásban és a szérumban 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 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 a 6. csoport E-vitamin koncentrációja magasabb azonban szignifikáns különbség nem volt kimutatható. Ezzel szemben a tojásszékben 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.

Kísérletünkben a karotinoidok immunstimulatív hatását jól mutatja, hogy a karotinoid-mentes takarmányhoz adagolt  $\beta$ -karotin, lutein illetve likopin kiegészítésben részesült csoportokban, a szérumban, illetve a tojásszékben 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.

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 tüszőkbe 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 kórokozó általi antigénhatás éri a szervezetet, akkor az már az immunizálás révén bejáratott válaszreakcióval könnyebben eliminálhatóvá válik.

## 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 kérődzők 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): Xantofilok 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 kacsá 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  $\beta$ -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.