A vérglükóz és a glikált fehérjék vizsgálata házinyúlban

Doktori értekezés

Temesváry Kriszta

GÖDÖLLŐ

2003

A doktori program

Címe: Az állattenyésztés biológiai alapjai

Tudományága: Mezőgazdaság-tudomány

Vezetője: Dr. Horváth László
egyetemi tanár, az MTA doktora
SZIE Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Halgazdálkodási Tanszék

Témavezető: Dr. Oppel Klára
egyetemi docens, az állatorvostudomány kandidátusa
SZIE Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Állatélettani és Állategészségtani tanszék

Az iskolavezető jóváhagyása

A témavezető jóváhagyása

1. TUDOMÁNYOS ELŐZMÉNYEK

1.1. Glikált fehérjék vizsgálatának jelentősége

A humán cukorbetegség vizsgálatában már körülbelül 15 éve rutinszerűen alkalmazzák a glikált fehérjék mérését [glikált hemoglobin (GHb) és szérum fruktózamin (SeFa)], ugyanakkor a gazdasági haszonállatokban még kevéssé terjedt el ezeknek a paramétereknek a vizsgálata.
Társállatokban főleg a cukorbetegség kezelésének ellenőrzésére használják a glikált fehérjék mérését.

A vérben a plazma fehérjéihez (SeFa), valamint a hemoglobin fehérje részéhez (GHb) tartósan kötődik a vérglükóz, a vérbeli koncentrációjának arányában (SUHONEN et al., 1989, GEBHART et al., 1995).
Ez a kapcsolat mindaddig fennmarad, amíg a fehérje (3-20 nap) vagy a vörösvértest (fajtól függően 60-145 nap) el nem bomlik. Éppen ezért tartós és megbízható képet nyerhetünk a vérvételt megelőző néhány hét vérglükóz szintjéről, míg az aktuálisan mért vércukorszintet az állat pillanatnyi szimpatoadrenális rendszer izgalma a hiteles érték fölé emelheti, ezért önmagában a vérglükóz nem alkalmas az állat glükózellátottságának jellemzésére (BISSÉ, 2003, GOPALKRISHNAPILLAI et al., 2003).
A glikált paraméterek (GHb, SeFa) tökéletesen megfelelnek a vizsgált állatok szénhidrát háztartásának nyomon követésére.
Segítségükkel bizonyos takarmányozási hibákat korrigálni lehet , káros következményük később egészségügyi problémát ne okozzon..

Mivel az anyagforgalmi betegségek az egészségügyi vonatkozáson túl gazdasági kártétellel is járhatnak, fontos lenne a laboratóriumi-anyagforgalmi analízisekben eddig vizsgált szénhidrát és zsíranyagcsere mutatók kiegészítése a glikált fehérjék mérésével (JAKAB, 1983, JERMENDY, 1988, LAKNER és mtsai., 1997).

1.1.1. Szérum fruktózamin (SeFa)

A szérum fruktózamin posztranszlációs, nem enzimatikus glikálódással jön létre úgy, hogy két lépésben glükóz kapcsolódik a vérplazma fehérjéihez. A két anyag először vízkilépéssel, reverzibilis módon aldiminné alakul, majd az úgynevezett Amadori-féle átrendeződést követően kialakul a stabil ketoamin forma, a fruktózamin (BAYNES et al, 1984).
A SeFa mennyisége cukorbetegség esetén szignifikánsan megnövekszik, valamint egészséges emberekben az életkorral párhuzamosan történő kisebb mértékű növekedés is kimutatható (TAS és ZEIN el DIN, 1990). Mivel állatorvosi vonalon a SeFa meghatározása még nem terjedt el széles körben, leginkább a humán alapértékeket tekintik mértékadónak, mely egészséges egyedekben 2,8 mmol/l-ig terjedhet (JENSEN, 1992, BERGAMINI, 1993, THORESEN és BREDAL, 1999).

1.1.2. Glikált hemoglobin (GHb)

A hemoglobin poszttranszlációs, nem enzimatikus úton történő glikálódása emberben a hemoglobin két béta láncának N terminális valinján keresztül történik, a SeFa kialakulásával egyező két lépésben (MIEDEMA és CASPARIE, 1984).
E folyamatnak az a jelentősége, hogy a vörösvértestek membránja, amely egyes ionokkal szemben szelektíve permeábilis, a glükózt jelenlétének arányában átengedi. Így annak vérbeli megoszlása emberben megegyezik (illetve állatfajtól függően arányos) a plazmabeli glükózmegoszlással (BELL, 1971).
A diabetes-szel való összefüggésre évekkel később RAHBAR (1968) figyelt föl. A HbA kationcserélő oszlopkromatográfiájakor a HbA_0 –nak nevezett „lassú" vagy főfrakció előtt egy kisebb (az összesnek 6-8%-át alkotó) „gyors" HbA_1 található (ZIMMERMANN, 1989).
Ez utóbbi felosztása az elválás sorrendjében: HbA_{1a} és HbA_{1b} (amelyek különböző cukrokkal, és más molekulákkal, pl. karbamiddal való kötődésből keletkeznek. A harmadik alfrakció, a HbA_{1c} a hemoglobin és a glükóz nem enzimatikus kapcsolódásából származó GHb (BÁRDOS és OPPEL, 1988, PETERSON és mtsai., 1998, BÁRDOS et al., 1990, OPPEL és mtsai., 2000 a).
Az első állatokra vonatkozó $HbA1_c$ mérést KOENIG és CERAMI (1975) végezte a humán GHb meghatározás modelljeként, egészséges és diabetes-es egereken.
Emberben a GHb normál értéke 4,5-6,5%, állatokban fajtól függően 1,9-6,5% az elfogadott alapérték (HASEGAWA, 1991, HARTL és FERRAND, 1993,).

1.1.3. A nyulak glikált fehérje értékei

A glikált paraméterek fajonkénti felvétele azért is fontos, mert a különböző fajok vörösvértestjeinek élettartama illetve a vörösvértestek permeábilitása a glükózzal szemben is különböző (BELL, 1971).
Az általunk vizsgált nyúlfajban a vörösvértestek membrán permeábilitása például alacsonyabb, mint emberben (HIGGINS és mtsai., 1982).
A tanszékünkön felvett alapértékek a nyúl fajra vonatkozóan a következőek: GHb (%)=3,42±0,69, SeFa (mmol/l)=3,69±0,15, glükóz (mmol/l)=5,84±0,15 (OPPEL, 1993).

1.2. A glükózhomeosztázis egészséges egyedekben

Egészséges egyedekben a vércukorszint különböző szabályozó mechanizmusok révén viszonylag szűk határok közt mozog. A normál vércukorszint fajonként változó, de emlősöknél átlagban 2,6 és 8,1 mmol/l közötti tartományban található (a nyulaknál 5,3mmol/l) (BONATH et al., 1982).
Ennek a normál értéknek a kialakításában és fenntartásában a pancreas, az inzulin/glukagon hatás révén meghatározó szerepet játszik. Egyes betegségek következtében pl. diabetes mellitus, a szervezet szénhidrát szabályozási rendszerének mechanizmusa zavart szenved.

A hipoglikémiás kóma elkerüléséhez humán vizsgálatok szerint a szervezet vércukorszintjének 2,6 mmol/l felett kell, maradni (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 1998 a). A tartósan magas vércukorszint azonban káros, mivel a hiperglikémia egyes fehérjék nem enzimatikus glikálódását idézi elő, mely irreverzibilis folyamat és a fehérjék megváltozott működését idézi elő.

1.3. A diabetes mellitus

Diabetes kialakulhat az inzulintermelés hiánya (abszolút inzulinhiány), illetve az inzulindependens szövetek gátolt működése (relatív inzulinhiány) következtében.
A szénhidrátfelvétel zavara miatt a sejtek nem képesek a glükózt felvenni, így megnövekszik a vércukorszint, mely számos káros következményt von maga után.

A diabetes mellitus több típusa ismert. A primer diabetes-nek két formáját különböztetjük meg, az I. típusút, mely inzulindependens (IDDM), illetve a II. típusút, mely nem inzulin dependens (NIDDM) (FEKETE és mtsai., 1992, AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 1998 a).
A szekunder diabetes egyik formájánál a pancreas elhalása miatt, vagy sebészeti eltávolítás miatt gátolt az inzulin szekréció. Másik formája nem pancreas eredetű, hanem az inzulinantagonista hormonok túlsúlya (STH-túltengés, Cushing-kór) okozza a betegséget.

1.3.1. A késői szövődmények

A késői szövődmények kialakulásának oka a tartósan magas vérglükózszint, mely szöveteket, szerveket károsít. A magas vérglükózszint a fehérjék nagyfokú glikálódását idézi elő, melynek következtében megváltoznak a fehérjék fizikokémiai és morfológiai tulajdonságai.
A szövődmények súlyossága függ a magas vércukorszint mértékétől, attól, hogy mennyi ideje áll fenn, és függ attól is, hogy a szervezet ezt hogyan tudja tolerálni.
A késői szövődmények közt mikroangiopátiás és komplex szövődményeket különböztetünk meg.

1.3.2. Az árpa antidiabetogén hatása

Az inzulinterápia kiegészítésére diétás étrend adása javallott. Ismeretes, hogy a cukorbetegség diétás kezelésének alapja a magas rosttartalmú és alacsony energiatartalmú táplálék. E diéta a vércukorszint ingadozásának csökkentését segíti elő. Az árpa rosttartalma igen magas (30-80g/kg sza.), viszont energiatartalma a többi gabonához képest relatíve kicsi (bruttó E=15,10MJ/kg sza.) (ANDERSSON, 1998). Az árpának magas a β glükán tartalma (26-59g/kg sza.), ami szintén előnyös a diabetes diétás kezelésénél (TOR-AGBIDYE, 1992, WURSH and PI-SUNYER, 1997).

2. CÉLKITŰZÉSEK

- A vér eltarthatóságának, tárolásának tisztázása a házinyúl glikált fehérje meghatározása során

- A glikált paraméterek közül a szérum fruktózamin mérésére alkalmas egyszerűsített, költséghatékony vizsgálati módszer kidolgozása

- A felnőttkori és a magzati hemoglobin elkülönítése, arányának meghatározása házinyúlban

- A nyúlfaj glikált paraméterei fiziológiás alapadatainak felvétele (életkor, ivari állapot), valamint a vérglükóz és a glikált fehérjék (szérum fruktózamin, glikált hemoglobin) közti összefüggések megállapítása

- A glikálódás hatásának vizsgálata házinyúlban, valamint a takarmány energiaösszetételének hatása a vérplazma vérglükóz illetve fehérje tartalmára, így a glikált paraméterekre is

- A nyúlfajban mesterségesen (alloxánnal) kiváltott diabetes hatásának vizsgálata a vérplazma glikált és egyéb paramétereire a kórszövettani elváltozások tükrében

- Az árpa antidiabetogén hatásának vizsgálata

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Elővizsgálatok

3.1.1. A vér eltarthatóságának vizsgálata. A tárolási módok és időtartamok hatása a glikált paraméterekre vonatkozóan

Az első vizsgálatunkba vont 15 anyanyúl vérmintáit az aznapi laboratóriumi analízisek után ismételten vizsgáltuk (SeFa, GHb mérés).
Az utolsó feldolgozott vérminta eredményeinek megállapítása után összehasonlítottuk a különböző tárolási módok (+4ºC 1 nap, -20ºC 1, 3, 7 nap) és időtartamok után kapott glikált fehérje értékeket a vérvétel napján friss vérből történt analízisek eredményeivel.

3.1.2. Plazma fruktózamin mérés automatizált mikromódszerrel

Célunk volt egy új, költséghatékony, SeFa mérési rendszer kidolgozása.
A reagenseket illetően JOHNSON és munkatársai (1982) eredeti módszerét alkalmaztuk. 96 szögletes lyukú ELISA lemez vályulataiba 20-20 µl plazmát pipettáztunk 3 paralellben, hagyományos Finn-pipettával, a négy sarki lyukat üresen hagyva. Ez lemezenként 28 minta SeFa koncentrációjának meghatározását tette lehetővé.
Majd 8 csatornás pipettával minden mérőhelyre felvittünk 200-200 µl reagens oldatot. 5 percig kevertük és inkubáltuk a mintákat 38 ºC-on, a kezdeti abszorbanciát (A1) 550 nm-en határoztuk meg. Újabb 5 perc hasonló inkubálás után ugyanígy megmértük az A2 értékeket is és az A2-A1 értéket hasonlítottuk össze a standard értékeivel. Az új módszer makro változata (200 µl plazma) is jól alkalmazható.

3.2.1. A házinyúl szimpatoadrenális izgalmának vizsgálata

Célkitűzés: Az ismételt vérmintavételek hatására kialakuló „stressz” hatásának vizsgálata a vércukorszintre illetve a glikált fehérjékre

Kísérleti elrendezés: 5 felnőtt (4-5 kg-os) nőivarú új-zélandi fehér nyulat vizsgáltunk a KÁTKI (Gödöllő) nyúltelepén.

A vérvétel menete: A nyulaktól egymás után ötször vettünk vért (0., 30., 60., 120., és 240. perc).

Meghatározott vérparaméterek: vérglükóz (G), szérumfruktózamin (SeFa) és glikált hemoglobin (GHb) valamint hematokrit (Ht), hemoglobin (Hb), albumin (Alb), összfehérje (TP)

3.2.2. A házinyúl életkor szerinti vizsgálata, különböző beltartalmi értékű tápok etetésekor

Célkitűzés:

- A különböző beltartalmi értékű tápok hatásának vizsgálata a vér glikált és egyéb paramétereire felnőtt és újszülött állatokban
- A plazma szérum fruktózamin és a vérplazma glükóz szintek alakulásának és korrelációjának vizsgálata az ellés/születés körüli időszakban

Kísérleti elrendezés:
Vizsgálatainkat a KÁTKI nyúltelepén végeztük. A nyulak valamennyien vemhesítve voltak. A fialások után a szopósokat automatikusan az anyák szerinti csoportosításban vizsgáltuk tovább.
Kísérletünkben három kísérleti csoportot (n=5-5-5 egyed) alakítottunk ki, az állatok takarmányai szerint, melyet ad libitum fogyasztottak.
I. csoport: 16% nyersfehérje, 9,5 MJ/kg DE, 14,00% nyersrost (normál hízótáp)
II. csoport: 18% nyersfehérje, 10,5 MJ/kg DE, 13,50% nyersrost (anyanyúltáp)
III. csoport: 18% nyersfehérje, 12 MJ/kg DE, 12,10% nyersrost (emelt energia szintű táp)

Vérvételek gyakorisága, módja: A kísérlet az ellés előtt 4 héttel kezdődött, amelyben a hetedik hétig hetenkénti vérvételek történtek, így elléskor is, és az ellés utáni hetedik hétig tartott. A kísérlet hetedik hetétől kéthetente vettünk vért az állatokból. Vérvételenként mindegyik anyából (n=15), később csoportonként 3 szopósból is vettünk vért.
A vérvételek minden alkalommal reggel 8 és 10 óra között történtek. Minden vérvételkor testsúlyt és takarmányfogyasztást is mértünk.

Vizsgált vérparaméterek: vérglükóz (G), plazma fruktózamin (SeFa), glikált hemoglobin (GHb), valamint hematokrit (Ht), hemoglobin (Hb), albumin (Alb), összfehérje (TP)

3.2.3. A fetális és az adult hemoglobin aránya és a glikált paraméterek meghatározása, újszülött és fiatal nyulakban

Célkitűzés: A nyulak magzati (fetális) és a felnőttkori (adult) hemoglobin mennyiségének és arányának meghatározása, és ennek segítségével annak megállapítása, hogy az állat hány napos korában váltja fel a magzati hemoglobint a felnőttkori hemoglobin.

Kísérleti elrendezés: A vizsgálatot szintén a KÁTKI nyúltelepén végeztük, normál tartási és takarmányozási körülmények között tartott új-zélandi fehér nyulakon (n=33). Minden korosztály (összesen 11 korcsoport) 3 egyedéből vért vettünk. A kísérletbe vont egyedek 0, 1, 2, 7, 14, 28, 31, 35, 46, 56 illetve 70 naposak voltak.

Vizsgált vérparaméterek: vércukor (G), szérum fruktózamin (SeFa) és glikált hemoglobin (GHb)

Egyéb laboratóriumi munka: A vérmintákból keneteket készítettünk, melyeket megfestettünk és értékeltünk (NIERHAUS, 1967, NIERHAUS és BETKE, 1968). A mikroszkópikus sejtszámlálás után meghatároztuk az egyes korcsoportokban a fetális és az adult hemoglobin arányát.

3.2.4. A glikált hemoglobin és a vérglükóz közti korrelációk megállapítása házinyúlban

Célkitűzés:

- Az e két paraméter közötti korreláció értékének megállapítása, valamint az, hogy ezek milyen időintervallumokban állapíthatóak meg
- Annak vizsgálata, hogy az ellenanyag termelésekor levett kb. 50 ml vér milyen változást okoz a fenti paraméterek metabolizmusában

Kísérleti elrendezés: A kísérletben 7 felnőtt (2-3 kg-os) nőivarú új-zélandi fehér nyulat vizsgáltunk állatházunkban.

Kivitelezés: A nyulak mindegyikétől heparinos csövekbe levettük az alapvért (5-5 ml-t a marginalis fülvénából) (0. érték). Ezt követően tovább folytattuk a vérvételt, így minden állattól összesen 50 ml vér egyszeri lebocsájtására került sor. A továbbiakban a nyulaktól az 1., a 7., a 14., a 21. és a 35. napon 5-5 ml vérmintát vettünk. A minták a vérvételek napján laboratóriumi analízisre kerültek.

Vizsgált vérparaméterek: hematokrit (Ht), hemoglobin (Hb), vérglükóz (G), glikált hemoglobin (GHb)

3.2.5. A diabetes mellitus hatásainak vizsgálata házinyúl modellállatban, árpaetetési kísérletben

Célkitűzések:

- A szénhidrát anyagcsere monitorozása a glikált fehérjék és a vérplazma glükóz szintek nyomonkövetésével
- Az árpa antidiabetogén hatásának vizsgálata
- A diabetes mellitus késői szövődményeinek legkorábbi kialakulásának vizsgálata
-

Kísérleti elrendezés: A kísérletben 21 kifejlett nőivarú új-zélandi fehér nyúlban, alloxánnal kísérletesen kiváltott cukorbetegséget vizsgáltunk.
A kísérlet tanszéki állatházunkban, három csoportra osztva (n=7-7-7) történt.

Az állatok takarmányozása:
Az I. csoport és a kontroll (III). csoport kizárólag normál hízótápot evett.
A II. kísérleti csoport takarmánya fele részben a normál hízótápot, fele részben árpát tartalmazott.

Kivitelezés:
A kontroll csoport egyedeinek 10 ml steril fiziológiás NaCl oldatot injektáltunk intravénásan. a marginális fülvénába.
A kísérleti csoportok állatainak alloxánt adtunk szintén intravénásan. a marginális fülvénába (560 µmol/ttkg alloxan = 0,089 g/ttkg feloldva fiziológiás NaCl oldatban, 0,36 g alloxán/10 ml NaCl) (BÖLCSHÁZY, 1994).

A vizsgált vérparaméterek: hematokrit (Ht), hemoglobin (Hb), glükóz (G), összfehérje (TP), albumin (Alb), plazma fruktózamin (SeFa) glikált hemoglobin (GHb)
A naponkénti vérmintavételekkor csak vérglükóz értékeket mértük automata vércukormérővel. A vércukorszintet inzulinnal csökkentettük, hipoglikémia esetén glükózt adtunk szájon át, a mért vérglükóz szinteknek megfelelően.
A kórszövettani metszeteket fénymikroszkópos és elektronmikroszkópos vizsgálatoknak vetettük alá.

3.3. Laboratóriumi vizsgálatok

3.3.1. Hematokrit meghatározás: mikrohematokrit-kapillárissal.

3.3.2. Hemoglobin meghatározás: Drabkin oldattal (SÓS, 1974).

3.3.3. Glikohemoglobin meghatározás: REANAL teszttel, melyet BÁRDOS és munkatársai (1990) adaptáltak háziállatokra FLÜCKIGER és WINTERHALTER 1976) humán módszeréből.

3.3.4. Fruktózamin meghatározás: új makro módszerünkel. (OPPEL és mtsai., (2000b,c).

3.3.5. Vérglükóz meghatározás: GOD/POD reagenssel (REANAL).

3.3.6. Plazma albumin meghatározás: BCG módszerrel (BÁRDOS és OPPEL, 1986).

3.3.7. Összfehérje meghatározás: Biuret módszerrel (SÓS, 1974).

3.3.8. Vérkenetfestés: NIERHAUS (1967) és NIERHAUS és BETKE (1968) humán metodikájának nyomán.

4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A házinyúl irodalomból hiányzó fiziológiás glikált alapparamétereinek meghatározása, különböző életkorokban és ivari állapotokban, normál, ill. különböző beltartalmi értékű tápok etetésekor.

2. Újszülött és fiatal házinyulakban a felnőtt és a fetális hemoglobin (HbA és HbF) arányának alakulása során a 2-7. életnap körül a HbF-et 50 %-ban felváltja a HbA, majd előbbi a 31. nap tájékán szinte teljesen eltűnik a nyulak véréből.

3. Házinyulakban a glikált vérparaméterek közül a GHb a 2 héttel korábbi vérplazma glükózzal erős, szinifikáns retrospektív korrelációban van ($r=0,85$; $p<0,05$). A SeFa az 1 héttel korábbi vérplazma glükózzal mutatja ugyanezt a korrelációt ($r=0,91$; $p<0,05$).

4. A kísérletesen (alloxánnal) házinyulakban kiváltott diabetes mellitus tüneteinek kialakulása, ill. szénhidrátparamétereinek (vérglükóz, SeFa, GHb) növekedése a takamányba kevert árpával késleltethető, ill. mérsékelhető.

5. A monogasztrikus háziállatok közül tanulmányozott házinyúl (új-zélandi fehér nyulak) szénhidrát metabolizmusának vizsgálatáról összegzésként megállapítható, hogy a glikált fehérjék e fajokban is jó markernek bizonyultak a vérglükóz koncentrációk hosszabb távú, biztosabb meghatározására. Ezért a három paraméter (vérplazma glükóz, SeFa és GHb) együttes meghatározása a szénhidrát-anyagcsere elemzését e fajokban is hitelesebbé teszi.

6. Egy modern, a monogasztrikus háziállatok, ezen belül különösen a házinyúl takarmányozásának hatását mutató, a szénhidrát- és fehérjeanyagcseréjét jellemző, ún. metabolikus profilteszt vizsgálatában a „hagyományos” vérparaméterek (pl. az általunk is vizsgált hematokrit, hemoglobin, összefehérje, albumin és vérglükóz) mellé fontos lenne a glikált paraméterek (glikált hemoglobin és/vagy szérum fruktózamin) felvétele is.

5. A KÍSÉRLETEK EREDMÉNYEIBŐL LEVONHATÓ KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A nyúlfajban folytatott kísérleti eredményeink szerint az állatok laboratóriumi vizsgálata, ezen belül is a vér anyagcsere-paramétereinek meghatározása, segíti az optimális fejlődés, tartás, takarmányozás és az egészségi állapot ellenőrzését.

Vizsgálataink alapján a humán gyakorlathoz hasonlóan a nyúl modellállatban végzett kísérleteink szerint a gazdasági haszonállatok laboratóriumi vérvizsgálatait javasoljuk a glikált paraméterek (szérum fruktózamin és a glikált fehérje) mérésével kiegészíteni, hogy az egyed szénhidrátmetabolizmásáról hiteles képet kaphassunk.

A vér eltarthatóságának vizsgálata, elsősorban a tárolási módok és időtartamok hatása a glikált paraméterekre vonatkozóan

A SeFa értékek tekintetében nem találtunk szignifikáns eltérést a friss vérből történt mérés és az egy hétig –20 °C-on hűtött vérmintából mért értékek között, így mérése friss vérből és tároltból egyaránt hitelesen elvégezhető.

A glikált hemoglobin esetében a friss vérből történt mérés eredményeképpen szignifikánsan ($p<0,001$) magasabb a vérvételt követő első napi (+4 °C) mérési eredménye. A –20 °C-on történt vizsgálatok eredményei is a friss vérminták vizsgálati eredményeihez képest még jelentős a különbséget ($p<0,05$) mutattak.
Így a GHb esetében mindenképpen a friss vérből történt analízis javasolható.

Plazma fruktózamin egy új mérési metodikájának beállítása

A humán plazma minta szérum fruktózamin koncentrációiban a LaRoche kit módszerrel és ELISA lemezen végzett új mikromódszerünkkel két paralellben történő mintafelvitellel mutatott igen szoros korrelációt ($r=0,942$) ($p<0,001$), valamint a regressziós egyeneshez való jó illeszkedett. Három párhuzamos mérés esetén még szorosabb: 0,972 volt a korreláció.
A módszer kivitelezhetőségét emlősállatokon is teszteltük. Az először vizsgált humán minták szoros korrelációja jól egyezett a hasonlóan vizsgált állati (szarvasmarha, kutya, nyúl és ló) két módszer közötti $r=0.93$-0.97 értékeivel. Ezek alapján a SeFa mérését az egyszerűsített makro módszerünkkel minimális anyagi ráfordítással lehet meghatározni a kevésbé műszerezett laboratóriumokban is.

A házinyúl szimpatoadrenális izgalmának vizsgálata

A glikált paraméterek meghatározása azért is fontos, mert a vérglükóz mért értéke nem minden esetben tekinthető mértékadónak a szénhidrát metabolizmus vizsgálatában, hiszen néhány változás, pl. a szimpatoadrenális rendszer

aktivitásának növekedése megváltoztathatja annak aktuális értékét. Míg ezalatt a glikált paraméterek értéke stabil, megbízható, nem változik. Az ismételt vérvételek szénhidrát anyagcserére gyakorolt hatásának a házinyúlban a glikált fehérjék és a vérglükózszintek meghatározásával történő vizsgálata is erre hívta fel a figyelmet.

A házinyúl életkor szerinti vizsgálata, különböző beltartalmi értékű tápok etetésekor, egyidejűleg a szérum fruktózamin és a vérglükóz köztikorrelációk megállapítása

A házinyulak ellés körüli időszakában vizsgált, takarmányozásban kissé eltérő három csoportjában a fontosabb tendenciák a következők. Az összfehérje magasabb értékei a magasabb fehérjetartalmú takarmányt fogyasztó II. és III. csoport közül főleg a II. csoporban jelentkeztek. A mért összfehérje szintet azonban nem a fogyasztott magasabb fehérjetartalmú nyúltakarmány indokolja, hiszen az albumin értékek közel azonos szintűek a három vizsgált csoportban. A globulin frakció növekedésének tudható be tehát a különbség, melynek hátterében valószínűsíthetően egészségügyi probléma állt.
A szénhidrátanyagcsere paramétereiben (vérglükóz, SeFa) tapasztalt csökkenés az emelt energiaszintű nyúltápot fogyasztott anyákban meglepőnek tűnhet, és arra utal, hogy a takarmány értékesülésében nem csupán a szénhidrátkomponens mennyiségét, hanem a fehérjekomponenshez viszonyított arányát is tükrözi e jelenség.
Ugyanis a kontrollhoz, azaz a normál hízótáphoz képest, amelyet az I. csoport fogyasztott a kísérlet egész tartama alatt, a III. csoport anyái nem csupán emelt szintű energia, hanem nagyobb mértékű fehérjeellátásban is részesültek egyidejűleg. Így ezek aránya csupán a II. csoportban tért el a fehérje javára.
Az általunk értékelt termelési eredmények (élve maradt szopósok %-os mennyisége, átlagos alomszám) a magasabb szénhidrát és fehérjetartalmú tápot fogyasztó anyákban voltak a legkedvezőbbek. Az anyák napi testtömeg változásai is e csoportban voltak a legkiegyenlítettebbek, így megállapítható, hogy a kísérletileg összeállított takarmány a magasabb beltartalmi értékek miatt némileg drágább ugyan, de a tenyésztési paraméterek pozítív alakulása ezt a többletráfordítást mégis gazdaságossá teszi.
Megállapítható, hogy az etetett takarmány fehérje és szénhidrát beltartalmi értékeit a legstabilabban a glikált fehérjék, leginkább a GHb mutatta. Ennek mérése azért is jelentős, mert a hagyományosan meghatározott összfehérje értéke a fentieknek megfelelően nem csak a takarmány beltartalmán alapul, hanem egyéb tényezők, pl. gyulladás, immunológiai állapot (immunglobulinok) is befolyásolhatják. A szimpatoadrenális helyzet aktuális változásai pedig a vérglükóz szinteket módosítják.
A takarmányozás laboratóriumi paraméterekre kifejtett hatásának értékelésekor szükséges volt a különböző időpontokban mérhető, az irodalomban nem szereplő fiziológiás értékek meghatározása, hiszen ezekhez tudjuk a változásokat hasonlítani.

Mindhárom csoport szopós nyulainak paraméterei jól tükrözték az anyai értékeket az élet első időszakában, majd folyamatosan a saját vérképzési funkciók tökéletesedésével kialakultak az adott kornak megfelelő fiziológiás értékek az általunk vizsgált paraméterekben is.

Vizsgálataink során bizonyítást nyert, hogy a szénhidrát metabolizmust jelző paramétereket (G, SeFa, GHb) nem csak önmagukban, hanem együttesen érdemes értékelni. Megállapítottuk, hogy nyúlfajban a glükóz az 1 héttel későbbi szérum fruktózaminnal (r=0,91) mutat szoros korrelációt.

A fetális és az adult hemoglobin aránya és a glikált paraméterek meghatározása, újszülött és fiatal nyulakban

Születéskor kizárólag HbF tartalmúak a vörösvérsejtek (100 %), majd a 2-7. életnap között válik 50-50 % arányúvá a HbF és HbA. Utóbbinak jelenléte ezután a kisnyúl vörösvérsejtjeiben folyamatosan nő, így 28 napos korban 95,60 %, 31 naposan 98,04 %, és végül a 70. napra teljesen HbA tölti ki a vörösvérsejteket, és HbF tartalmú vörösvérsejtek a vérkeringésben ezen túl már nem találhatók meg.
A glikált hemoglobin születéstől 10 hetes korig való növekedése ($p<0,001$) nyúlban is a HbF és HbA különböző szerkezetében keresendő. HbF-ban a két alfa lánc melletti két gamma lánc található, mely nagyobb oxigén iránti affinitást kölcsönöz a Hb molekulának (ANDRESEN, 1977), de glikálódási képességet nem mutat (ABRAHAM et. al, 1983).

A glikált hemoglobin és a vérglükóz közti korrelációk megállapítása házinyúlban

Vizsgálatunkban megállapítottuk, hogy nyúlfajban a vérglükóz a 2 héttel későbbi glikált hemoglobinnal (r=0,85) mutat szoros korrelációt. A nyúlban számított két hetes korreláció értéke azonban jól értelmezhető a vörösvérsejtek élettartamának ismeretében.

A diabetes mellitus hatásainak vizsgálata házinyúl modellállatban

A házinyúlban alloxánnal kísérletesen kiváltott diabetes mellitus hatásainak vizsgálati eredményei kiegészítő információul szolgálhatnak a természetes úton létrejövő (pl. társállatoknál) cukorbetegség gyógyításában. Ebben a kísérletben igazoltuk a már mások által is felvetett árpa antidiabetogén hatását (MAHDI, et al., 1994, WURSCH és PI-SUNYER, 1997). Ezen következtetésünket arra alapozzuk, hogy az árpát is fogyasztó kísérleti csoportban volt a legkedvezőbb valamennyi paraméter alakulása, ill. az árpával is etetett csoportban lassabban alakultak ki a diabetes tünetei. Eszerint az árpa relatíve alacsony energiatartalma és magas rosttartalma révén alkalmas a cukorbetegség diétás kezelésére.

Kísérletünkben az árpa etetését sikerült pontosan kontrollálni (egyedi ketrecekben tartott állatoknál az el nem fogyasztott táp pontos visszamérésével), azonban a jövőben hasonló elven összeállított kísérleteknél érdemesebb lenne a kísérleti tápot granulátumként előállítani. Ez egyszerűbbé tenné a technikai kivitelezést.
Nagyobb egyedszám is indokolt lehet, hiszen a gondos inzulinkezelés ellenére is –ilyen súlyos elváltozások kialakulásánál– elkerülhetetlen egyes kísérleti állatok elhullása. A kórszövettani eredmények alapján megállapítható, hogy a diabetes késői szövődményeinek kialakulásához nem elegendő a vizsgált kilenc hetes időszak, ezért ennek vizsgálatához a kísérlet időtartamát növelni szükséges.

Az, hogy bizonyítást nyert a glikált fehérjék vizsgálatának jelentősége, egyben azt is jelenti, hogy e lehetőség révén egyidejűleg három időpont szénhidrátállapotáról szerezhetünk információt egyetlen vérvétel eredményeiből. Ez lehetővé teszi számunkra, hogy szakmailag igényesebb eredményekhez jussunk, és ezzel egyidejűleg az állatvédelem szempontjait is jobban érvényre tudjuk juttatni.

6. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

OPPEL K., **TEMESVÁRY K.,** VIRÁG GY., LAKNER H., PALLÓS L.: A vérmintavételek hatása a nyulak szénhidrát metabolizmusára. Állattenyésztés és Takarmányozás. 1999. *48*. 872-873.

OPPEL K., BÁRDOS L., LAKNER H., **TEMESVÁRY K**., BÖLCSHÁZY G., KULCSÁR M., FERENCZ A., SIMON J.: A glikált (glucosilált) fehérjék, és vizsgálatuk jelentősége háziállatainkban. (Irodalmi áttekintés). Magy. Áo. Lapja, 2000.a *122*. 106-111.

OPPEL, K., KULCSÁR, M., BÁRDOS, L., FERENCZ, A., LAKNER, H., SIMON, J., **TEMESVÁRY, K**., KARCHESZ, K.: A new, modern, cost-saving micro/macro method for the determination of serum fructosamine. Acta Vet. Hung, 2000.b *48*. 285-291.

OPPEL, K., KULCSÁR, M., FERENCZ, A., SIMON, J., LAKNER, H., BÁRDOS, L., BÖLCSHÁZY, G., **TEMESVÁRY, K**., MÉSZÁROS, GY.: Plazma fruktózamin mérés automatizált mikromódszerrel. Klin. Kísérl. Lab. Med., 2000.c *27*. 24-27.

OPPEL K. PALLÓS L., **TEMESVÁRY K**., LAKNER H.: Az ismételt vérvételek szénhidrát anyagcserére gyakorolt hatásának vizsgálata a glikált fehérjék és a vérglükózszintek meghatározásával házinyúlban. Magy. Áo. Lapja, 2000.d *122*. 486-492.

OPPEL K., **TEMESVÁRY K**.: A glikált fehérjék metabolizmusa házinyúlban. 1. A glikált hemoglobin és a vérplazma glükóz szintek többhetes alakulása egyszeri vérbocsájtás hatására. Magy. Áo. Lapja, 2001. *123*. 233-237.

TEMESVÁRY K., OPPEL K.: A glikált fehérjék metabolizmusa házinyúlban. 2. A szérum/plazma fruktózamin és a vérplazma glükóz szintek alakulása az ellés körüli időszakban. Magy. Áo. Lapja, 2001. *123*. 297-301.

TEMESVÁRY K., OPPEL K., HIDAS A.: A glikált fehérjék metabolizmusa házinyúlban. 3. A glikált hemoglobin szintek és a fetális hemoglobin alakulása a születés utáni időszakban. Magy. Áo. Lapja, 2001. *123*. 302-306.(in Hungarian with English abstract)

TEMESVÁRY, K., OPPEL, K.: The relation of fetal/adult hemoglobin (HbF and HbA) and the glycated hemoglobin (HbA_{1c}) levels in newborn and young rabbits. Hung. Agricult. Res., 2001. *10*. 8-10.

Konferenciák

OPPEL, K., BÁRDOS, L., LAKNER, H., **TEMESVÁRY, K.**: The fetal hemoglobin (HbF) and the glycated proteins of cattle, The Romanian-Hungarian Physiology Joint-meeting: Szeged, Hungary, 3-4 July, 1996 FC20, in Fiziologia/physiology (Official Journal of the Romanian Society of Physiological Sciences) p.57, vol. 6, Nr. 2 (10) 1996.

OPPEL, K., BÁRDOS, L., LAKNER, H., **TEMESVÁRY, K.**: Determination of postnatal levels of glycated hemoglobin and fetal hemoglobin in calves. Az MLDT 46. Nagygyűlése, 1996. szeptember 5-7. poster No 25, Miskolc, in Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina 1996. *23*. 114.

OPPEL K., PALLÓS L., **TEMESVÁRY K.,** LAKNER H.: A vérplazma albumin alakulása környezeti tényezők hatására kutyákban Az MTA. NÉM/FM Állatorvos-tudományi Szakbizottság Akadémiai Beszámolói. 1997. *24*. 19.

OPPEL K., **TEMESVÁRY K.,** VIRÁG GY., LAKNER H., PALLÓS L.: A vérmintavételek hatása a nyulak szénhidrát metabolizmusára- Kitörési pontok a Magyar Állattenyésztésben, Tudományos Konferencia, MTA Budapest, 1999.nov. 24.

TEMESVÁRY K., OPPEL K., PALLÓS L., LAKNER H.: A környezeti tényezők hatása a vérplazma fehérje összetevőiben kutya modellben. A Magyar Élettani Társaság LXIV. Vádorgyűlése, Budapest, 1999 július 5-8. Az előadások és poszterbemutatók összefoglalásai p. 140. 1999.

VIRÁG GY., ERDÉLYI M., MÉZES M., OPPEL K., **TEMESVÁRY K.**: Alloxán kezelés hatása a glutation-peroxidáz aktivitásra nyúlban. 2001. 13. Nyúltenyésztési Tudományos Nap, Kaposvári Egyetem, 101-106.

VIRÁG, GY., ERDÉLYI, M., MÉZES, M., OPPEL, K., **TEMESVÁRY, K**.: Alloxán kezelés hatása a glutation-peroxidáz aktivitásra nyúlban. 2001. MTA Állatorv. Tud. Bizottsága Besz. Ülése, Budapest. *27*. 3-16.