



SZENT ISTVÁN EGYETEM

**A TERMÉSZETES EREDETŰ KAROTINOIDOK FELSZÍVÓDÁSA
ÉS SZÖVETI MEGOSZLÁSA HÁZITYÚKBAN**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Gregosits Balázs

Gödöllő

2011

A doktori iskola

megnevezése: **ÁLLATTENYÉSZTÉS-TUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA**

tudományága: **MEZŐGAZDASÁGTUDOMÁNY**

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**

egyetemi tanár, az állatorvos-tudomány kandidátusa

Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar

Állattudományi Alapok Intézet

Állatélettani és Állat-egészségtani Tanszék

.....
A témavezető jóváhagyása

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

A MUNKA ELŐZMÉNYEI, KITŰZÖTT CÉLOK

Az elmúlt évtizedekben egyre távolabb kerültünk a természetes állattartási szokásoktól, eleget téve az iparszerű állattartás technológiai előírásainak. Napjainkban azonban a természetes tartási módok ismét létjogosultságot kapnak. Ezek főleg szaporodó kis állatlétszámú gazdaságokban terjednek, de hatásuk egyre inkább érezhető az iparszerű állattartás területén is. A szinte már feledésbe merült gazdasági állatok (pl.: mangalica, őshonos tyúkfajták) újra tenyésztésbe vonásával, valamint az e fajokból származó termékek élelmiszer-alapanyagként történő felhasználásában kedvező lehetőségek rejlenek. A természetes tartás és a genetikai háttér miatt is ezek testösszetétele több vonatkozásban kedvezőbb, mint az intenzív fajták esetében (KISS és mtsai., 2003).

A takarmányban alkalmazott természetes adalékanyagok eredete, fajtája nem lehet közömbös a természetes tartási mód megvalósításában, főleg a természetes anyagok antioxidáns tulajdonságainak ismeretében. Prognosztizálható a mesterséges takarmányadalékok, így a színezékek alkalmazásának korlátozása. Ugyanakkor még az emberi táplálékban is alkalmazhatóak maradnak a természetes közegből származó színyanyagok (CFR 2002). Emiatt várható olyan karotinoid tartalmú melléktermékek takarmányozási célra való felhasználása, amelyek a paradicsom, paprika, sütőtök konzervipari feldolgozása során keletkeznek (STRAND és mtsai., 1998, MLODKOWSKI és KUČHTA 1998, LAI és mtsai., 1996, HEIDLAS és mtsai., 1996).

A karotinoidok kutatása napjainkra mindinkább a figyelem központjába került, egyre jobban kurrens területté nőtte ki magát. Ennek létjogosultsága szoros összefüggésben áll az általuk kiváltott számos–mind humán élelmezési, mind takarmányozás-élettani szempontból–jótékony hatással: antioxidáns és citoprotektív hatás, LDL oxidáció csökkentése, ateroszklerózis kockázatának csökkentése, prosztatata-, mell- és tüdőrák kialakulásának csökkent esélye, javuló immunválasz, sejt-sejt közötti kommunikáció stb. Az állati termékek előállítás és fogyasztása során érdemes ezekért a hatásokért felelős vegyületeket alaposabban megvizsgálni.

A kutatómunka során a természetes eredetű karotinoidok felszívódása és szöveti megoszlása került vizsgálatra a házityúk különböző korcsoportjaira.

Az Európai Unióhoz történő csatlakozásunkat követően hangsúlyossá vált az állati termék előállítása során az állatok magas szintű védelme, így az okszerű takarmányozás mellett elsődleges az állatok alacsonyabb megterheléssel járó takarmányozása, tehát a minimális antibiotikum használat, és a természetes eredetű alapanyagok előtérbe helyezése a szintetikus takarmánykiegészítő anyagokkal szemben.

A karotin felvétel és egyes betegségek rizikója közötti összefüggés számos kérdést vet fel. Tisztázandó, hogy a karotinoidok önmagukban is védő faktorok, vagy csak más tényezőkkel kölcsönhatásban hatékonyak, illetve a táplálékban és/vagy a szövetekben kimutatható szintjük csak

jelzője-e bizonyos folyamatoknak. A felszívódás és szöveti eloszlás kérdése különösen fontos, hiszen a karotinoidok többségének van saját aktivitása, és csak kevesebb fejt ki provitamin hatást. A karotinoid metabolizmus akár egyénenként is változó tényezője közül az egyes karotinoidoknak a táplálékban való fiziko-kémiai sajátosságai, a részben ebből fakadó felszívódásbeli eltérések és a bélhámsejtből történő esetleges átalakulás és/vagy a transzport-molekulakomplexbe csomagolás az, ami aztán a szöveti felvételt is meghatározza.

A vizsgálatok célkitűzései a házi tyúk zsírsanyagcserével kapcsolatos speciális területén, a karotinoid metabolizmussal összefüggésben a következők voltak:

- A likopinkiegészítés hatásának megismerése a tojó tyúkok karotinoid- és lipidanyagcseréjére és a tojásba történő beépülésére.
- A naposcsibében történő likopin, lutein és β -kriptoxantin kiegészítést követő felszívódás tanulmányozása a kelést követő 72 órában.
- Tojó tyúkok likopin, β -karotin és lutein felszívódásának megítélése.
- A természetes karotinoidok raktározódásának és szöveti megoszlásának kutatása.

1. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. A likopin, lutein, β -kriptoxantin felszívódásának vizsgálata naposcsibében, a kelést követő 72 órában (I. kísérlet)

A kísérletet 63 db naposcsibével végeztük a kelést követő 72 órában. A karotinoid felszívódás tanulmányozására *per os* adagoltuk a kísérleti állatoknak a természetes eredetű karotinoidokat.

A kezelt állatok (63 db - csoportonként 7 állat) a következő kiegészítésben részesültek: 5 ppm lutein [0,152 g Capsantal EBS 40 NT: nagyvirágú bársonyvirág (*Tagetes erecta*) kivonata, melynek hatóanyagtartalma: 40 g/kg sárga xantofill: 0,8% β -karotin (BC), 1,5% kriptoxantin (BCX), 82,0% transz-lutein (LU), 4,0% transz-zeaxantin (ZX), 11,7% egyéb karotinoidok], és 5 ppm likopin (0,012 g sűrített paradicsom). Minden esetben 125 μ l napraforgóolajjal elegyítettük a hatóanyagot, majd 500 μ l-re vízzel egészítettük ki. Az így készült emulziót a csibéknek csőrükön keresztül pipettával adagoltuk. Az ivóvízzel történő ellátás folyamatos volt, ugyanakkor a kiegészítésen kívül az állatok nem juthattak egyéb tápanyagokhoz.

A kezelést követően az állatokat a 0., 2., 4., 6., 8., 24., 36., 48., illetve 72. órában *lege artis* elvéreztettük (minden jelzett órában 7 állatot), a felfogott vér alvadását követően centrifugálással szérumot nyertünk, a szikzacskót és a májat kipreparáltuk. A mintákból HPLC technikával direkt extrakciót követően Rocket Platinum-CN oszlopon (Alltech Inc.) normál fázison izokratikus elúcióval meghatároztuk a karotinoid profilt.

A továbbiakban az előző kísérlet kiegészítéseként újabb 42 naposcsibének 3,846 mg mennyiségű RedivivoTM Lycopene 5,2% TG/P (DSM Nutritional Products) likopint 0,5 ml vízzel keverve készítettünk elő, majd fecskendővel közvetlenül a szikzacskóba juttattunk.

Az ily módon kezelt állatokat ismételten elvéreztettük a 0., 24., 48. és 72. órában (a jelzett órákban átlagban 10 állat), majd a vér, szik és máj mintákat gyűjtöttük és a mintákból HPLC technikával, direkt extrakciót követően normál fázison izokratikus elúcióval meghatároztuk a karotinoid profilt.

2.2. A likopin, β -karotin és a lutein felszívódása felnőtt tyúkokban (II. kísérlet)

Tojótyúkokkal (közel egyéves, már termelő *bovans nera* tojóhibridek; 8 állat/kezelés) végzett kísérleteinkben egyszeri, 20ppm karotinoid *per os* adagolását követően a vérplazma HPLC analízisével vizsgáltuk az onnan kimutatható karotinoidok kinetikáját (0-48 óra).

A kiegészítést a tyúkok által átlagosan ismert napi takarmányfogyasztás és irodalmi adatok alapján számítottuk: 20 ppm karotinoid/állat (357 mg lutein CWS/S-TG 5,6%; 192,3 mg β -karotin 10,4%; 384,6 mg Redivivo likopin 5,2%; DSM Nutritional Products). Ennek kétféle kombinációja a

következő volt: a 20 ppm karotinoid/állat karotinoidonként 1/3-ad részről (6,6 ppm lutein + 6,6 ppm β -karotin + 6,6 ppm likopin) tevődik össze, illetve 3 x 20 ppm karotinoid/állat (20 ppm lutein + 20 ppm β -karotin + 20 ppm likopin) volt a dózis.

A kísérlet kezdetekor nátrium EDTA-ra 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 és 48 óra elteltével egyedi vérvételre került sor (kb. 3 ml), a tojásokat folyamatosan gyűjtöttük. A mintákból HPLC technikával karotinoid (lutein+zeaxantin, β -kriptoxantin, likopin, β -karotin) és retinoid (retinol, retinil-palmitát) profil meghatározást végeztünk.

A karotinoidok antioxidáns hatásának jellemzésére a plazmából vasredukciós tesztet (FRAP) végeztünk, ill. meghatároztuk a vörösvérsejt hemolizátum tiobarbitursav-reaktív anyag (TBARS) szintjét.

2.3. A likopinkiegészítés hatása a tojótyúkok karotinoid- és lipidanyagcseréjére és a tojásba történő beépülésére (III. kísérlet)

A kísérletet egy 14 000 férőhelyes, battériákkal berendezett tojóistállóban végeztük. Az istállóban *hy-line brown* árutojást termelő tojóhibridek voltak elhelyezve. Egy rekeszbe 6 db tojótyúk került elhelyezésre. A tyúkok etetése szalagos takarmánytovábbítóval ellátott külső vályúból, az itatás szelepes önitatóból történt. A kísérleti állatok előtti etetőszalagra 4-4 ketrecet ellátó vályú volt helyezve, amibe naponta kétszeri feltöltéssel a kísérleti takarmány adagolása történt, ami így gyakorlatilag *ad libitum* állt a tyúkok rendelkezésére. A külön takarmányozott állatok tojásait egy, a tojásgyűjtő szalagra merőlegesen elhelyezett terelőlap segítségével külön lehetett gyűjteni. A három kezelt csoport kontrolljának az istállóban termelő állományból véletlenszerűen vett minták szolgáltak.

A telepen alkalmazott tojótáp összetételét figyelembe véve készült a kísérleti takarmány, ami sárgító adalékot (kantaxantin tartalmú Carophyll[®] Red – DSM Nutritional Products) nem tartalmazott. Az egyik tojócsoporthoz ezt a takarmányt fogyasztotta (LY₀ csoport). Két másik kísérleti csoport takarmányának alapját ugyanez a kantaxantin mentes keverék képezte, de az LY₅ csoport esetében 5g, az LY₁₀ csoport esetében 10g Redivivo[™] Lycopene 5% TG/P (DSM Nutritional Products) is volt kilogrammonként a takarmányba keverve. Ezáltal 250 mg, ill. 500 mg likopint tartalmaztak a tápok takarmány-kilogrammonként.

A kísérlet kezdetekor két hétig mindhárom csoport (összesen 72 állat) a Carophyll nélküli takarmányt fogyasztotta. Két hét elteltével csoportonként 10-10 tojást gyűjtöttünk, és 10-10 vérmintát (5 ml/állat) vettünk a kezelt és kontroll állatokból is. Ezt követően a csoportok a kísérleti takarmányt fogyasztották (LY₀, LY₅ és LY₁₀). Minden kezelési hét végén 10-10 tojást gyűjtöttünk csoportonként négy héten át. A negyedik hét végén ismét vért vettünk minden csoport 10-10 állatából.

Vizsgáltuk a vér karotinoid és retinol koncentrációját, a tojássárgája színintenzitását, valamint a szérum és a tojássárgája lipid koncentrációit. A karotinoidok antioxidáns hatásának jellemzésére meghatároztuk a tojássárgája tiobarbitursav-reaktív anyag (TBARS) szintjét.

2.4. Keltetési technológia

Az I. kísérletben szereplő naposcsibéket az Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet Gödöllői Kutatótelepétől vásárolt, egy állományból származó tenyésztőtojásokból (szülői háttér: sárga magyar fajta) keltették az Állatélettani és Állategészségtani Tanszék laboratóriumában lévő ME3M (Maino Enrico-Ariano Di Maino Roberto C.S.N.C.) típusú keltetőgépben.

2.5. Biológiai mintavétel

Attól függően, hogy a karotinoid és retinoid analíziseket milyen nagynyomású/érzékenységgű kromatográfiás rendszeren [normál fázisú: a.) NP-HPLC, ill. fordított fázisú: b.) RP-HPLC] végeztük a minta előkészítések eltérőek voltak.

Plazma/szérum előkészítése –karotinoid és retinoid analízishez

A mintákat -20°C -on tároltuk. A lefagyasztott mintákból felolvasztás és örvénykevertetés után $250\ \mu\text{l}$ -t mértünk $4\ \text{ml}$ -es centrifugacsőbe, majd ehhez $250\ \mu\text{l}$ 10%-os aszkorbinsavat és $500\ \mu\text{l}$ etanolt adtunk, 30 másodperces örvénykeverés után $1000\ \mu\text{l}$ hexánt mértünk hozzá, majd ismét 30 másodpercig örvénykevertettük. 10 perces centrifugálást követően a tiszta felülúszóból:

a.) NP-HPLC analízishez közvetlenül felhasználtuk a szeparátumot.

b.) RP-HPLC analízishez $400\ \mu\text{l}$ -t Eppendorf-csőbe pipettáztunk, és N_2 áramoltatással bepároltunk (kb. 4-5 percig). A maradékot közvetlenül a HPLC-oszlopra történő injektálás előtt $100\ \mu\text{l}$ etanol-dioxán 1:1 arányú keverékben felvettük, és rövid ideig tartó örvénykeverés után $150\ \mu\text{l}$ acetonitrilt adtunk hozzá.

Máj előkészítése –karotinoid és retinoid analízishez

Az elvéreztetett csirkék boncolása során kiemeltük a májat, lemértük a tömegét, majd feldolgozásig -20°C -on tároltuk. A lefagyasztott mintákból felolvasztás után $0,3\ \text{g}$ kimértünk, ehhez $1,5\ \text{ml}$ 10%-os aszkorbinsavat adtunk. Örvénykeverés közben üveggottal homogenizáltuk, és $3\ \text{ml}$ extraháló keveréket (10:6:6:7: hexán: acetone: absz. etanol: toluol) adtunk hozzá. 10 perces centrifugálást követően a tiszta felülúszóból:

a.) NP-HPLC analízishez közvetlenül felhasználtuk a szeparátumot.

b.) RP-HPLC analízishez $400\ \mu\text{l}$ -t Eppendorf-csőbe pipettáztunk, és N_2 áramoltatással bepároltunk (kb. 4-5 percig). A maradékot közvetlenül 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.

Szik előkészítése –karotinoid és retinoid analízishez

Az elvértetett csirkék boncolása során kiemeltük a szikzacskót, lemértük a tömegét, majd a feldolgozásig a szikzacskót -20°C -on tároltuk. A lefagyasztott mintákból felolvasztás után 0,3 grammot kimértünk, ehhez 1,5 ml 10%-os aszkorbinsavat adtunk. Örvénykeverés közben üvegbottal homogenizáltuk, és 3 ml extraháló keveréket (10:6:6:7: hexán: acetone: absz. etanol: toluol) adtunk hozzá. 10 perces centrifugálást követően a tiszta felülúszóból:

a.) NP-HPLC analízishez közvetlenül felhasználtuk a szeparátumot.

b.) RP-HPLC analízishez 400 μl -t Eppendorf-csőbe pipettáztunk, és N_2 áramoltatással bepároltunk (kb. 4-5 percig). A maradékot közvetlenül 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.

2.6. Analitikai módszerek

2.6.1. Nagynyomású kromatográfia HPLC

2.6.1.1. Izokratikus normál fázisú nagynyomású kromatográfia (NP-HPLC)

A tojássárgája, szik, máj és a szérum minták karotinoid és retinoid összetételét az I. kísérletben normál fázisú izokratikus HPLC módszerrel mértük (BIESALSKI és mtsai., 1986; BÁRDOS, 1988; MATUS és mtsai., 1994), meghatározva a jellemző karotinoid profilokat.

A HPLC készülék a következő egységekből állt:

- nagynyomású pumpa (Jasco PU-980 Intelligent HPLC Pump, Japan)
- átfolyós küvetával ellátott UV-Vis fotométer (ISCO V4 - Akron, USA)
- előtétoszloppal szerelt Rocket Platinum-CN analitikai oszlop (100A 3 μ 53 mm x 7 mm) (Alltech, USA)
- Barspec Data Software Package System Version No. 1.26 (Barspec Systems, Inc. Izrael)

A szeparációs paraméterek a következők voltak:

- az iniciált minta mennyisége 20 ml,
- az elútló folyadék: n-hexán/metanol (98:2). Mindkét oldószer HPLC minőségű (Reanal, Budapest)
- az elútlós áramlási sebesség és nyomás 1,51 ml/min, 50 bar,
- detektálási hullámhossz retinoidok esetében 325, karotinoidok esetében 450 nm, likopin esetében 505 nm volt.

2.6.1.2. Izokratikus fordított fázisú nagynyomású kromatográfia (RP-HPLC)

A tojássárgája, szik, máj és a szérum minták karotinoid és retinoid összetételét a II. és III. kísérletben fordított fázisú izokratikus HPLC módszerrel mértük (KERTI ÉS BÁRDOS, 2006).

A minta előkészítés részben leírt preparáció végén nyert tiszta kivonatot (20 µl) C18 Rocket Platinum oszlopra injektáltuk (100A 3µ 53 mm x 7 mm) (Alltech, USA), amely a HPLC rendszerhez kapcsolva PU-980-as pumpát és UV-2077 4λ-ás 4 csatornás detektort (Jasco, Japan) tartalmazott. A mozgó fázis acetonitril:tetrahidrofurán:metanol:ammónium-acetát 1%-os (684:220:68:28) keverékével lett előkészítve. Az áramlás mértéke 1 ml/perc volt, valamint a kromatogramok tokoferolra 290 nm-en, retinoidra 325 nm-en, karotinoidokra 450 nm-en és likopinra 505 nm-en lettek azonosítva. Az analízisek azonosítása a standardok és a koncentrációk alapján a Chrompass programmal történt.

2.6.2. Triglicerid meghatározás

A szérum triglicerid tartalmát szintén enzimatikus (GPO-POD) kolorimetriás módszerrel mértük (Reanal, Budapest). A trigliceridet a lipoprotein-lipáz (LPL) hidrolizálja. A keletkező glicerint a glicerokináz (GK), ATP jelenlétében, glicerín-3-foszfáttá alakítja. A glicerín-3-foszfát oxigén és glicerín-3-foszfát-oxidáz (GPO) közötti reakcióban hidrogén-peroxid képződik, amely peroxidáz enzim (POD) és színeképző jelenlétében színes oxidációs terméket képez, melynek mennyisége a minta triglicerid tartalmával arányos és fotometriásan mérhető.

2.6.3. Koleszterin/HDL koleszterin meghatározás

Meghatároztuk a tojássárgája és szérum minták egyes lipoidjait is, így enzimatikus (CHOD-POD) kolorimetriás teszttel (Reanal, Budapest) a koleszterin (CH) koncentrációt, és a könnyű lipoproteid frakciók kicsapását követően a HDL koleszterin frakció értékét is.

A koleszterin zsírsavakkal történő észterezését követően a hasítás koleszterin-észterázzal történt. A koleszterin-oxidázon (CHOD) keresztül katalitikus reakció során hidrogén-peroxid jött létre. Ez a hidrogén-peroxid a peroxidáz enzim (POD), valamint színeképző segítségével színes oxidációs terméket képezett, ami már fotométerrel meghatározható volt, mivel annak összkoleszterin tartalmával arányos.

A VLDL, LDL, kilomikron (portomikron) frakciókat a plazmából foszforvolfrámsav-magnézium-reagenssel kicsaptuk. A HDL-frakciót a felülúszó tartalmazta. Ennek a koleszterin koncentrációját határoztuk meg Reanal koleszterin (CHOD-POD) diagnosztikai reagens készlettel.

2.6.4. Vasredukációs képesség (FRAP) mérése

Alacsony pH értéken a ferri-tripiridil-triazin (Fe^{III} TPTZ) komplex a közegben jelenlévő oxidáns anyagok mennyiségének mértékében ferro (Fe^{II} TPTZ) formájúvá redukálódik. Az utóbbi 593 nm-en mérhető intenzív kék elszíneződést ad (BENZIE és STRAIN, 1996).

Törzsoldatok

A: 300 mmol/l acetát puffer (3,1 g Na-acetát $\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ +16 ml ecetsav ad 1l)

B: 10 mmol/l TPTZ (2,4,6-tripiridyl-s-triazin) 40 mmol/l HCl-ben oldva

C: 20 mmol/l ferri-klorid ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

D: 1000 $\mu\text{mol/l}$ ferro-szulfát ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

Reagens oldat

A+B+C (10:1:1) naponta frissen készítve a mintaszám függvényében

Standard oldat

A D-törzsoldat hígításából készül

Koncentráció ($\mu\text{mol/l}$)	D-törzsoldat hígítás
1000	eredeti D-törzsoldat
750	1,5 ml ad 2,0 ml
500	1,0 ml ad 2,0 ml
250	0,5 ml ad 2,0 ml
100	0,2 ml ad 2,0 ml

Kivitelezés

20 μl minta (EDTA plazma) + 600 μl reagens ▲ $\text{OD}_{593\text{nm}}$ 20 sec.

2.6.5. TBARS mérés

A tojássárgája oxidatív stabilitását jellemző TBARS értékek (kifejezve nmol MDA/g tojássárgája) meghatározását DORMAN és munkatársai (1995) által ismertett módszer alapján végeztük. A tojássárgája mintából 0,1 g-ot 0,9 ml 1,15%-os KCl oldatban homogenizáltunk. A homogenizátum 0,5 milliliteréhez 1,5 ml 20%-os ecetsavat (pH 3,5), 1,5 ml 0,8%-os tiobarbitursav oldatot (1,1% Na-dodecyl-szulfátban oldva) és 0,5 ml desztillált vizet adtunk. Homogenizálás után 100 °C-os vízfürdőben 30 percig inkubáltuk. Az elegyhez lehűtés után mintánként 5ml n-butanolt adtunk, majd újbóli homogenizálás után 1500 fordulat/perc fordulatszámom 10 percig centrifugáltuk. A butanolos fázist butanol vak oldattal szemben 532 nm-en fotometráltuk. A mért értékek MDA (malondialdehid) koncentrációban történő kifejezése érdekében tetraetoxipropán (malonaldehid-bis-dimetil-acetát) etanolos oldatából előállított standard sor mérési eredményeit használtuk fel.

2.6.6. A tojássárgája színének mérése

2.6.6.1 Objektív színmérés

A felületi színek objektív mérésének elve az, hogy a fehér fényel történő pillanatszerű megvilágítást követően az érzékelőbe visszajutó jeleket a felület fényességét (L^*) vörös-zöld (a^*) és sárga-kék (b^*) színátmeneti értékét kifejező koordináta rendszer a CIELab pontjaihoz viszonyítja (Special Chem). Az általunk használt kézi mérőműszer (Micromatch™; Sheen Ltd) is ezzel a CIELab spektrummal veti össze a vizsgált felület színét. A készüléket az iparban a felületek, de élelmiszer alapanyagok színének azonosítására és bemérésére is használják. A műszerrel történő mérés gyors és objektív. Az adatok tárolhatók és számítógépre is átvihetők. A műszer mérőablakának a feltört tojás sárgájához illesztését egy megfelelő, a tojássárgáját befogadó edényzet (pl.: portölcser) használatával végeztük el. A mérőablak enyhe nyomással teljes felületével a sárgája felszínére illett, a hibafaktorokat (sárgája felrepedés, oldalfény bejutás a mérőablakba) sikerült kiküszöbölni és a mérés objektív színminősítést tett lehetővé (SZABÓ és mtsai., 2007a).

A tojássárgája színét kolorimetriás módszerrel a CIELab skálához viszonyító kézi reflexiós célfotométerrel határoztuk meg (Micromatch™; Sheen Ltd.) a kutatóhelyen adaptált módszer segítségével (SZABÓ és mtsai., 2007a).

2.6.6.2. YCF

A Yolk Colour Fan színskálához történő viszonyítás szemikvantitativ módszer. A színskála 15 – az emberi szem által könnyen megkülönböztethető – árnyalatot foglal magába, halvány sárgától a narancsvörösig. Használata a tojássárgájához történő közvetlen viszonyításon alapul, az értékelés pedig a színskála leginkább hasonlatos számának jelölésével történik.

2.7. Statisztikai értékelés

Az egyes kísérletek eredményeit ANOVA teszttel (Tukey) Prism 5 for Windows programmal $p < 0,05$ szinten minősítettük (GRAPHPAD SOFTWARE). A vizsgálatok értékelésekor továbbá az átlagszámítást (\bar{x}), a szórábecslést ($\pm s$) és a szignifikancia szint számítását alkalmaztuk. Utóbbi az ún. Student-féle kétmintás t -próbával. Az grafikonok *Microsoft Excel 6.0* programmal készültek.

3. EREDMÉNYEK

3.1. A likopin, lutein, β -kriptoxantin felszívódásának vizsgálata naposcsibében, a kelést követő 72 órában (I. kísérlet)

A likopin nem jelent meg sem a szérumban, sem a máj karotinoidjai között. A szikben a 24. órára már csökkenő, a májban és a szérumban még emelkedő lutein értékeket regisztráltunk. A kontroll állatokban a kezelt állatokhoz hasonló jellegű volt a karotinoid profil alakulása. A kelést követő 24 órában a karotinoid felszívódásban aktív szerepet játszó bélszakasz az intenzív transzport eredményeképpen mintegy tamponálódott a karotinoidokban bővelkedő saját szikanyaggal, ami így nem tette lehetővé a *per os* adagolt karotinoidok hatékony felszívódását.

A szikbe injektált likopin esetében ott tendenciaszerű emelkedés tapasztalható, míg a vérben és májban jelentős emelkedés nem történt.

3.2. A likopin, β -karotin és a lutein felszívódása felnőtt tyúkokban (II. kísérlet)

Mindhárom általunk vizsgált karotinoid (lutein, β -karotin, likopin) esetében, mind a kétféle adagolást követően az adott karotinoid koncentrációjának szignifikáns mértékű megemelkedését tapasztaltuk a kezdeti időponthoz viszonyítva. A mintavételi időpontokból következően vizsgálatainkban minden tanulmányozott karotinoid plazmában történő megjelenése egyfázisú volt. Az adagolt karotinoid koncentráció vérbeli csúcspontja a kiegészítést követő 6. (β -karotin és likopin), illetve a 12. (lutein) órában jelentkezett, majd maximális értéket elérve karotinoid adagolás hiányában fokozatosan visszatért az alapértékre.

Az egyedi karotinoid kiegészítések közül a β -karotin és a likopin esetében tapasztalható szignifikáns ($p < 0,05$) eltérés a többi kombinált alkalmazáshoz képest. Továbbá a karotinoidokat együttesen adagolva, a kisebb kombinált dózis (Σ 20 ppm: 6,6 ppm egyedileg) mindhárom karotinoid esetében nagyobb koncentráció emelkedést eredményezett. A nagyobb kombinált adagolás (Σ 60 ppm: 20 ppm egyedileg) esetében interakciót tapasztaltunk a plazma karotinoid koncentrációkban.

Megállapítást nyert, hogy az apoláros karotinoid (likopin) jelenléte rontotta az oxikarotinoidok (lutein és zeaxantin) hasznosulását, továbbá annak antioxidáns hatása vasredukációs képesség mérésével nem, TBARS módszerrel viszont igazolható volt, tehát a vörösvérsejt hemolizátum TBARS szintjei mindhárom karotinoid esetében csökkentek.

3.3. A likopin kiegészítés hatása a tojóttyúkrok karotinoid- és lipidanyagcseréjére és a tojásba történő beépülésére (III. kísérlet)

A két hétig tartó előtetetés alatt a vér összkarotinoid tartalma szignifikáns mértékben lecsökkent. Ebben a kiürülési szakaszban a tojássárgája CIELab a* átlagértékei a negyedére (19,59→4,82) estek ($p < 0,01$). A kísérlet további egy hónapja alatt kisebb ingadozás mellett, gyakorlatilag ezt az értéket lehetett mérni az LY₀ csoportban. Mind a két likopinos takarmányt fogyasztó tojóttyúk csoportban (LY₅ és LY₁₀) a kiürülési szakaszt követő hétre (3. hét) a kiindulási szintig közeledett a színintenzitás értéke. A kiindulási értéket az LY₁₀ csoport már a negyedik, az LY₅ csoport a 6. hétre érte el.

A tojóttyúkrok vérében csak a Redivivo™ tartalmú takarmányt fogyasztó csoportokban volt mérhető a likopin. De a két csoport vérmintáinak likopin koncentrációja nem tükrözte a két dózis közötti kétszeres különbséget. A vérplazma retinol koncentrációi gyakorlatilag azonos szinten voltak a kísérlet alatt.

A 3-6. hét közötti időszakban a likopin mentes tápot fogyasztó LY₀ és a két likopinnal kiegészített csoport (LY₅ és LY₁₀) értékei között egyaránt szignifikáns volt a különbség az objektív színérés (CIELab) és kémiai analízis összkarotinoid értékei esetében.

A kísérlet zárásakor a szérum összkoleszterin koncentrációi az árutó állomány értékeihez viszonyítva az LY₁₀ csoport esetében szignifikánsan ($p < 0,05$) kisebbek voltak. A tojássárgájából mért összkoleszterin, valamint a szérumból meghatározott HDL-koleszterin és triglicerid koncentrációk kezelésekként nem különböztek egymástól.

A tojássárgájának antioxidáns szintje fordítottan arányos a TBRAS szinttel, ezzel szoros összefüggésben áll, hogy a lipidperoxidációs folyamatok jelenléte a karotinoidok hiányában emelkedő tendenciát mutatnak.

4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A korai posztembrionális korban (napos korban, a kikeléstől számított megközelítőleg 3 napig, illetve 72 óráig) a karotinoid felszívódás szinte kizárólag a szikzacskóból történik, amit az bizonyít, hogy a szik karotinoidjai közül értelemszerűen hiányzó likopin *per os* adása esetén sem jelent meg a vér karotinoid frakciójában.
2. Tojótyúkrok esetében három vizsgált karotinoid (likopin, β -karotin, lutein) esetében, mind az egyedi, mind a keverékként történő adagolásukat követően az adott karotinoid szignifikáns mértékű megemelkedése jelezte a felszívódás tényét, de az azonos adagok (koncentrációk) ellenére tapasztalható eltérő vérszintek a karotinoidok közötti kölcsönhatásra utalnak.
3. Az adott karotinoid koncentráció vérben történő emelkedésének mértéke valószínűsíthetően összefüggésben van a molekula szerkezetével (polaritás, azaz oldékonyság), a bélbeni történéseivel, majd portomikronba történő beépülés arányával.
4. Tojótyúkrokban a felszívódást követően a *per os* adott két apoláros karotinoid (likopin, β -karotin) a 6. órában, míg az oxikarotinoid (lutein) a 12. órában érte el a legnagyobb vérszintet. Kismértékű, de elnyújtottabb emelkedés ellenére a likopin rontja az oxikarotinoidok hasznosulást.
5. A likopin tojást színező hatása mind objektív színméréssel, mind analitikai eljárással (HPLC) igazolható volt. Az antioxidáns hatás a TBARS módszerrel kimutatható volt.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.

5.1. A likopin, lutein, β -kriptoxantin felszívódásának vizsgálata naposcsibében, a kelést követő 72 órában (I. kísérlet)

Az általunk alkalmazott karotinoid dózis a már kifejezett színező hatást eredményező mennyiség (LEESON és CASTON, 2004) alapján került kiszámításra úgy, hogy az egy napi adagnak megfelelő legyen. A standard karotinoidokat vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a likopin 80, a β -karotin 90, a β -kriptoxantin 102-108 és a lutein+zeaxantin 180 sec. retenciós idővel volt regisztrálható a kromatogramokon. Az általunk adagolt karotinoidok közül a likopin rendszeren nem található a szikben. Eredményeink szerint a likopin napos csibében nem jelent meg a szérumban és a máj karotinoidjai között sem. Sőt véleményünk szerint a napos csibékben a *p. os* adagolt, egyébként az élettani körülmények között jellemzőnek tekinthető fő oxikarotinoidok (lutein és zeaxantin) mennyisége sem emelkedett meg a szérumban és májban a dózishoz megfelelő mértékben.

Napos korban a jelenség a szikzacskó tartalmának felszívódásával is bonyolódik. Az általunk tapasztalt jelenséget az magyarázhatja, hogy a kikelést követően a szikzacskóból az anyagok felszívódásának két útja lehetséges. Egyrészt a szikzacskóból a sziktömlő nyélen keresztül történik a tartalom kiürítése a bélcsatornába. Ez kb. 72 óráig tart, ezt követően a felgyülemelő limfatikus sejtek részben elzárják a passzázs lehetőségét. Koplaltatott naposcsibe sziktömlőjébe iniciált vitális festék két órán belül a béltartalmat a zúzógyomortól a kloákáig megfestette. Azaz a sziktömlő nyélen keresztül a szik bejutott a középbélbe ahonnan antiperisztaltika orális, a perisztaltika pedig aboralis irányba továbbította a festett tartalmat (FEHÉR és GYÜRÜ, 1971). Baromfiban (nem csirke) a szikből a vérbe történő transzportot a kelést megelőzően és az azt követő első 72 órában figyelték meg. A szikzacskóból a sziktömlőnyélen keresztül a bélcsatornába irányuló szállítást a kikelést követő 120 órában (csirkékben csak 72 óráig) tapasztalták. A szekréciónál elsősorban az ileum proximális szakaszában történt, ahol reflux jelentkezett, ami által a tartalom a vékonybél kezdeti szakaszáig, valamint a zúzógyomorig eljutott. Kikelést követően az antiperisztaltikus mozgás fokozódott, és a szekréciónál megfigyelt időpontnál tovább tartott. A disztális vékonybél szakaszban a szik kelés környékén nem hasznosult (NOY és SKLAN, 1998).

Esetünkben az első 24 órában tehát az intenzív szik→jejunum→duodenum→gyomor irányú transzport eredményeképpen a napos csibék azon bélszakasza, ami épp a karotinoid felszívódásban aktív szerepet játszik mintegy tamponálódott a karotinoidokban bővelkedő saját szikanyaggal. Ez nem tette lehetővé a *p. os* adagolt karotinoidok hatékony felszívódását.

A napos állat szikzacskójába közvetlenül injektált likopin kinetikája igazolja, hogy az rendszerint nincs a takarmányban, viszont abban az esetben, amikor direkt módon a szikzacskóba juttatjuk, megjelenik, míg *per os* történő kiegészítéskor nem. Következésképpen a likopin egyfajta indikátor, akár karotinoid felszívódás modell lehet, amit a napos csibénél vizsgálataink során ki is tudtunk mutatni: szikbe injektálva. Tehát a tojón keresztül átkerül a tojásba és ilyen módon biológiai aktivitása van, azaz potenciálisan dúsított élelmiszer. Mivel a likopin ezek szerint hasznosul, deponálódik a tojásban, így jelentősége megsokszorozódik a különböző takarmánykiegészítők, melléktermékek (paradicsomtörköly, paradicsomzúzalék) tekintetében, ezért humán fogyasztásra beviteli lehetősége lenne a tojással, a korábban említett számos jótékony hatása miatt.

5.2. A likopin, β -karotin és a lutein felszívódása felnőtt tyúkokban (II. kísérlet)

Mindhárom általunk vizsgált karotinoid (lutein, β -karotin, likopin) esetében, mind a kétféle adagolást követően a vérben az adott karotinoid koncentrációjának szignifikáns mértékű megemelkedését tapasztaltuk a kezdeti időponthoz viszonyítva.

A mintavételi időpontokból következően vizsgálatainkban minden tanulmányozott karotinoid plazmában történő megjelenése egyfázisú volt. Az adagolt karotinoid koncentráció vérbeli csúcspontja a kiegészítést követő 6. (β -karotin és likopin), illetve a 12. (lutein) órában jelentkezett, majd maximális értéket elérve karotinoid adagolás hiányában fokozatosan visszatért az alapértékre. A karotinoidok akkumulálódásában és tárolásában tapasztalt különbségek a különböző karotinoidok esetében a polaritás függő szelektív felszívódási és szállítási folyamatok meglétét támasztják alá.

Nem mindegyik általunk vizsgált karotinoidnak van provitamin aktivitása. Amit az eredményeink is igazoltak, csak a β -karotin kiegészítést követte a szignifikáns mértékű retinoid koncentráció növekedése a vérben. A plazma retinil-palmitát koncentrációk mind β -karotin, mind kombinált adagolás esetében változtak. A metabolikus felhasználás és depozíció hatására a vizsgált időintervallumot követően a szintek visszaálltak a kiinduláskori értékre.

A karotinoidokat együttesen adagolva, a kisebb kombinált dózis (Σ 20 ppm: 6,6 ppm egyedileg) mindhárom karotinoid esetében nagyobb koncentráció-emelkedést eredményezett. A nagyobb kombinált adagolás (Σ 60 ppm: 20 ppm egyedileg) esetében interakciót tapasztaltunk a plazma karotinoid koncentrációkban. A karotinoidok között kialakuló kompetíció következtében feltehetően a kötőhelyek és/vagy a szállító lipoprotein komplexek pillanatnyi telítődése következhetett be, és az apoláros karotinoid (likopin) jelenléte rontotta az oxikarotinoidok (lutein és zeaxantin) hasznosulását.

A vizsgálatot annak érdekében terveztük, hogy részletes információt nyerjünk 48 órás mintavételi időtartamot és eltérő nagyságú adagokat alkalmazva különböző karotinoidok egyszeri dózisait követően tojótújúkban.

Feltehető, hogy az egyes karotinoidok között a felszívódás során, pl. a micellákba történő bekerülés érdekében zajló versengésben, a kötőhelyekért folytatott versenyben, a felszívódást követő lipoproteinek közötti karotinoid kicserélődésben, valamint a provitamin karotinoidok hasadásának gátlásában változatos kölcsönhatások alakulhatnak ki.

5.3. A likopinkiegészítés hatása a tojótújúk karotinoid- és lipidanyagcseréjére és a tojásba történő beépülésére (III. kísérlet)

Vizsgálatunkban 5% likopintartalmú mikrokapszulázott gyári készítményt használtunk (Redivivo™ Lycopene 5% TG/P, DSM Nutritional Products). Ugyanezt a készítményt alkalmazva tojótújúkban arról számoltak be, hogy csak előzetesen 60°C-on történő vizes hidrolízist követő takarmányba keverés után volt hatékony a felszívódás (OLSON és mtsai., 2008). Esetünkben ilyen előkezelés nélkül is hatékonyan minősíthetjük a felszívódási folyamatot, amit a kezelt csoportok vérében és tojássárgájában mért likopin koncentrációk és a tojássárgája intenzív sárga színe egyaránt bizonyít.

A tojássárgáját vizsgálva megfigyelhető, hogy a takarmányban alkalmazott koncentráció esetén a sárgája lipidjeibe oldódva nem vörös, hanem intenzív sárga színt eredményezett annak ellenére, hogy a likopin abszorpciós spektruma a vörös színtartományban van.

A CIELab szabvány alapján történő fotometriás színmérés a^* értékei a korábbi vizsgálataink szerint igen szoros és szignifikáns korrelációban vannak mind a zsírolószeres extrakciót követő fotometriás, mind az elterjedt, de a vizsgáló szubjektivitásától nagyban függő színskála (Yolk Colour Fan, DSM Nutritional Products) segítségével mért értékekkel (SZABÓ és mtsai., 2007). A tojássárgája színintenzitási, és likopin koncentráció értékei csak kissé, de nem szignifikáns mértékben tükrözték a takarmánykiegészítő sokkal jelentősebb mértékű (LY₅ 250 ill. LY₁₀ 500 mg/tak.kg) különbségeit. Ez tojótújúkban végzett karotinoid abszorpciós és raktározási vizsgálatokban már korábban leírtakkal összeegyeztethető eredmény, azaz minél kisebb a kiegészítésként adagolt karotinoid koncentráció, annál nagyobb a felszívódás, majd az értékesülés (takarmány → vér, vér → bőr) határfoka (NA és mtsai., 2004). Az LY₅ kezelés $4,35 \pm 0,91$, az LY₁₀ kezelés $5,57 \pm 1,38$ µg/g tojás likopin koncentrációkat eredményezett. Ez egy 17-19 g súlyú sárgája esetében ~80-100 µg mennyiségnek felel meg. Ezek ugyan elmaradnak a paradicsom, ill. paradicsom készítmények értékeitől (LUGASI és mtsai., 2004), de nem kizárt, hogy hatékonyabb

biológiai értékesülést eredményez a tojássárgája biológiai közegében eloszló likopin, mint a növényi eredetű.

Ezt a likopintartalmú táplálékkínálatot lehetne bővíteni likopinnal dúsított tojások előállításával. A tojótápra kevert likopin a takarmány saját karotinoidjai mellett már kétheti etetés során a piaci kívánalmaknak megfelelő színintenzitást eredményez, de az előzőekben leírtak szerint ez a takarmánykiegészítés nemcsak szubjektív fogyasztó igényt elégít ki, hanem funkcionális hatást is eredményez. A fogyasztók elvárásai eltérőek a tojás színével kapcsolatban. A tojáshéj színe fajta/hibrid függő, és nem mutat összefüggést a tojás egyéb beltartalmi értékeivel, így a sárgája színével sem. Napjainkban az a legkedveltebb, ha a tojássárgája színe a nemzetközileg elfogadott és széles körben használt színskálán (Yolk Colour Fan) 11-12-es értékű. Ez a színhatás 250 mg likopin/tak.kg koncentrációval már elérhető, így a likopint nagyobb koncentrációban adagolni nem érdemes.

A SZERZŐNEK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEI

Tudományos közlemények folyóiratban

- **GREGOSITS, B., KERTI A., SZABÓ, CS., LAKNER, H., JUNG, I. ÉS BÁRDOS, L. (2009):** A likopinkiegészítés hatása a tojótyúkok karotinoid- és lipidanyagcseréjére és a tojásba történő beépülésre. Magyar Állatorvosok Lapja 131. 594-600. (IF:0,2)
- **GREGOSITS, B., KERTI, A., BÁRDOS, L. (2007):** A karotinoid kutatás nem szokványos kísérleti állatai. Irodalmi áttekintés. Animal Welfare, Ethology and Housing Systems Vol. 3(1): 2-15.
- **KERTI, A., SZABÓ, CS., GREGOSITS, B., JUNG, I., BÁRDOS, L. (2008):** A tojásminőség fontos festékanyagai. Animal Welfare, Ethology and Housing Systems (AWTH), 4. 773-779. p.

Konferencia kiadványban teljes terjedelemben megjelent közlemények

- **KISS, ZS., GREGOSITS, B., BÁRDOS, L. (2003):** A likopin a táplálékláncban-EU Konform Mezőgazdaság és Élelmiszerbiztonság Gödöllő-Debrecen. (p.20-25). Gödöllő
- **BÁRDOS, L., KISS, Zs., GREGOSITS, B., RÉTHY, K., KERTI, A., SZABÓ, Cs. (2005):** Studies on the effects of lycopene in poultry (*hen and quail*). 12th International Congress ISAH, Warsaw, Poland. Proceedings Vol. 2. p. 65-68.
- **GREGOSITS, B., KERTI, A., SZABÓ, CS., BÁRDOS, L. (2007):** Carotenoid absorption in laying hens. 7th Slovak Conference of Animal Physiology. Nyitra 2007. május 23-24. p. 68-72.

Konferencia előadások

- BÁRDOS, L., RÉTHY, K., **GREGOSITS, B.**, KISS, ZS., OPPEL, K. (2004): Are there beneficial effects of lycopene supplementation on flows? (Pilot study on Japanese quail) - Risk Factors of Food Chain IV., Slovak Agr. Univ. in Nitra, 2004. Oct. 7.
- RÉTHY, K., BÁRDOS, L., KISS, ZS., **GREGOSITS, B.**, LAKATOS, R. (2004): Modellkísérlet a likopin mint természetes takarmány-kiegészítő élettani hatásának vizsgálatára. Innováció, a tudomány és a gyakorlat egysége az ezredforduló agráriumban, Debrecen
- **GREGOSITS, B.**, KERTI, A., BÁRDOS, L. (2005): Likopin, lutein és β -kriptoxantin felszívódásának vizsgálata naposcsibében, a kelést követő 72 órában. MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága, Akadémiai beszámoló. Takarmányozástan, állathigiénia, p. 17.
- **GREGOSITS, B.**, KERTI, A., BÁRDOS, L. (2005): Karotinoidok (likopin, lutein, zeaxantin) felszívódásának vizsgálata naposcsibében – XI. ITF, 2005. március 24. Keszthely
- **GREGOSITS, B.**, KERTI, A., BÁRDOS, L. (2005): Karotinoidok (likopin, lutein, zeaxantin) felszívódásának vizsgálata naposcsibében. (Absz.) XI. Ifjúsági Tudományos Fórum. Keszthely
- **GREGOSITS, B.**, KERTI, A., BÁRDOS, L. (2006): Absorption of carotenoids (lycopene, lutein, β -cryptoxanthin) in newly-hatched chick. World's Poultry Science Journal 62. (SUPPL.) 464.
- **GREGOSITS, B.**, KERTI, A., BÁRDOS, L. (2006): Absorption of carotenoids (lycopene, lutein, β -cryptoxanthin) in newly-hatched chick. WPSA 12th European Poultry Conference: Verona, 2006. szeptember 10-14. poster No 32.
- **GREGOSITS, B.**, KERTI, A., BÁRDOS, L. (2006): Absorption of carotenoids (lycopene, lutein, β -cryptoxanthin) in newly-hatched chick. World's Poultry Science Journal Book of Abstracts p. 464.
- KERTI, A., SZABÓ, CS., **GREGOSITS, B.**, JUNG, I., BÁRDOS, L. (2008): A tojásminőség fontos festékanyagai. I. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok. 2008. április 11-12. Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Gödöllő.

- BÁRDOS, L., KERTI, A., SZABÓ, CS., LAKNER, H., JUNG, I., **GREGOSITS, B.** (2009): A likopin karotinoid és lipid metabolikus hatásai tojtyúkban. II. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok, 2009. október 16-17. Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Gödöllő.
- KERTI, A., **GREGOSITS, B.**, SZABÓ, CS., BÁRDOS, L. (2009): Felszívódás során tapasztalható karotinoid kölcsönhatások tojtyúkban. II. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok, 2009. október 16-17. Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Gödöllő.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ NEM KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

- KISS, ZS., SZABÓ, CS., LAKNER, H., **GREGOSITS, B.**, BÁRDOS, L. (2007): Effect of apple cider vinegar on immune status of chicken. Risk Factors of Food Chain VII. 2007. október 11. Nitra p. 105-109.
- SZABÓ CS., **GREGOSITS B.**, KISS ZS., SZABÓ ZS., BÁRDOS L. (2008): Almaecetes itatóvíz hatása a pecsenyecsirkék baromfipestis elleni immunválaszkészségére. Magyar Állatorvosok Lapja 130. (12) 727-732. pp.
- SZABÓ CS, **GREGOSITS B**, KISS ZS, SZABÓ ZS, BÁRDOS L. (2009): Almaecetes itatóvíz hatása az ellenállóképességre. II. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok, 2009. október 16-17. Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Gödöllő.