



SZENT ISTVÁN EGYETEM

**A LIKOPIN FELSZÍVÓDÁSA, HASZNOSULÁSA ÉS GYAKORLATI
SZEREPE TOJÓMADARAK TAKARMÁNYOZÁSÁBAN
(JAPÁN FÜRJÖN VÉGZETT MODELLKÍSÉRLETEK)**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Papócsi-Réthy Katalin

GÖDÖLLŐ
2012

A doktori iskola

megnevezése: ÁLLATTENYÉSZTÉS-TUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

tudományága: ÁLLATTENYÉSZTÉS-TUDOMÁNY

vezetője: Dr. Mézes Miklós egyetemi tanár,
MTA levelező tagja
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Állattudományi Alapok Intézet, Takarmányozástani Tanszék

Témavezető: Dr.Kiss Zsuzsanna egyetemi docens és
Dr. Bárdos László egyetemi tanár, az állatorvos-tudomány kandidátusai
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Állattudományi Alapok Intézet
Állatélettani és Állat-egészségtani Tanszék



.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezetők jóváhagyása

A MUNKA ELŐZMÉNYEI, KITŰZÖTT CÉLOK

A világ karotinoid piaca 2010-ben 1,07 milliárd USA dollár volt, 2015-re pedig elérheti a 1,2 milliárd dollárt (Cosgrove, 2010). Ennek mintegy 60%-a takarmányokhoz adagolt karotinoid. Takarmány adalékanyagként legnagyobb mennyiségben eladott karotinoid a β -karotin, az asztaxantin és a kantaxantin. Míg az első provitamin aktivitású takarmány-adalékanyag, addig az utóbbi kettő, elsősorban színező funkciót tölt be az aquakultúrában és baromfitakarmányozásban, bár egyéb, például antioxidáns hatásaikat is figyelembe veszik alkalmazásuk során. A baromfi termékeknek, mint pl. a bőrnek és a tojássárgájának tetszetősebbé tétele színezéssel a fogyasztói igények miatt általánosan alkalmazott. A tojássárgája színezésére csupán igen kis hányadban alkalmaznak természetes eredetű növényi festékanyagokat, mint például a bársonyvirág kivonatát vagy a piros paprikaport, mert ezek kombinált használata gazdasági szempontból nem versenyképes a piacvezető, szintetikus asztaxantin, kantaxantin vagy apokarotin-észter színezékekkel szemben.

A „bio” élelmiszerek iránt egyre nő a kereslet világszerte, főképp a fejlett országokban. Az ökológiai gazdaságok termékei iránti igény és hozamuk növekszik, több országban a támogatásuk is jelentős mértékű. Az élelmiszerekben egyre nagyobb szerepet kapnak a természetes adalékanyagok. A tudatos fogyasztó olyan állati eredetű termékeket keres, melynek megtermelése során lehetőség szerint természetes takarmány-adalékanyagokat alkalmaztak. Ennek a következménye a növényi eredetű színezőanyagok térnyerése is.

A karotinoidok természetes, kis molekulájú vegyületek, amelyek közül egyesek pro-retinoid hatásúak és nemcsak színeznek, de egyúttal hatékony antioxidánsok is. Ezek védik a szervezetet a fiziológiás és toxikus eredetű oxidációs folyamatok következtében keletkezett oxigén szabad gyökök, vagy egyéb oxidáló anyagok káros hatásaival szemben. A karotinoidok közé sorolt vegyületek közül a likopin – amit a paradicsom (*Solanum lycopersicum*) különösen nagy mennyiségben tartalmaz – az egyik leghatékonyabb természetes antioxidáns, emellett citoprotektív tulajdonságú (Leal *et al.*, 1999). A likopinnak nincs provitamin hatása, azaz a szervezetben nem alakul át az anyagcsere során A-vitaminná. Antioxidáns kapacitása mellett, a sejtek közötti anyag- és információáramlásban (*cell-to-cell communication*) is részt vesz (Bertram és Vine, 2004), valamint az előzőekkel is összefüggő immunmodulációs hatása is kiemelendő (Rao és Agarwal, 1999).

A dolgozatomban bemutatott kísérleteim során japánfürjek takarmányát három, különböző likopin forrással (sűrített paradicsom, szintetikus likopinkészítmény és paradicsomtörköly) egészítettük ki, a vegyület egyes élettani hatásainak a tanulmányozása céljából. A japánfürj gyors fejlődési eréje, szaporasága, kis mennyiségű takarmány-igénye miatt kitűnő modellállat és az eredmények a gyakorlati szempontból lényeges tyúkfélékre is adaptálhatók (Klasing, 1998; Gregosits *et al.*, 2007).

A paradicsom a kedvező éghajlati viszonyok miatt Magyarország egyik vezető zöldségnövénye. Statisztikai adatok szerint hazánkban 2009-ben 120.000 tonna került feldolgozásra (Monsanto, 2009; FAO, 2012). A paradicsom és annak melléktermékei alkalmasak lehetnek a baromfitakarmányozásban történő alkalmazásra is, különös tekintettel a tojássárgája színezésére. Egyéb kedvező hatásai miatt, pedig akár alkalmas lehet funkcionális élelmiszerek előállítására is (Bárdos *et al.*, 2006; Sahin *et al.*, 2008).

A lehetőség feltérképezésére kutatásaim során a következőket tűztem ki célul:

- előállítani egy olyan kísérleti takarmányt, ami csökkentett karotinoid tartalmú és ezzel alkalmassá válik a likopin baromfi szervezetben belüli nyomon követésére illetve hatásainak kimutatására;
- meghatározni a karotinoidok kiürülési (deplecio) idejét, majd a kiürülést követően dózisfüggő hatásvizsgálatokat végezni likopinnal;
- meghatározni a likopin-molekula felszívódási helyét a fürjek vékonybelében;
- vizsgálatokat végezni a likopin élettani hatásainak tanulmányozására, pl: test-, és májtömeg, tojástermelési paraméterek (tojástömeg, darabszám, tojássárgája szín), lipid-anyagcsere, a vér néhány biokémiai paramétere, retinoid-anyagcsere és antioxidáns kapacitás;
- megvizsgálni a paradicsomtörköly, mint természetes likopin forrás, hasznosulását tojómadarakban.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Kísérleti helyszín és tartástechnológia

A kísérleteket japán fürjekkel (*Coturnix coturnix japonica*) végeztük, amely takarmányozási vizsgálatokban a házityúk modellállatának tekinthető (Klasing, 1998; Gregosits *et al.*, 2007). A kísérleti helyszín a SZIE-MKK, Állatélettani és Állat-egészségtani Tanszék (ÁÉET) kísérleti állatháza volt, ahol természetes megvilágítás mellett (minimum 14 óra) az állatokat külső etetővel és önitatókkal felszerelt battériákban ill. faforgácsal almózott műanyag állattartó dobozokban tartottuk ad libitum takarmány és ivóvíz ellátással.

Új, csökkentett karotinoid tartalmú takarmány előállítás

A természetes eredetű karotinoidok metabolizmusának tanulmányozása céljából olyan kísérleti takarmányt állítottunk össze, amely csak minimális mértékben tartalmazott karotinoidokat. Ennek a speciális takarmánynak az összeállításánál – a tojómadarak táplálóanyag szükségleteinek figyelembevételével – a hántolt rizs bizonyult a legalkalmasabb takarmány-alapanyagoknak, mivel a rizsnek a legkisebb a karotinoid-tartalma. A többi takarmány alapanyagot is úgy választottuk ki, hogy azok csak minimális mennyiségben, tartalmazzanak karotinoidokat. A kísérleti tojótakarmány táplálóanyag tartalma a hagyományos, kukorica alapú tojótáppal megegyező energia, nyersfehérje, nyerszsír és nyersrost tartalmú volt. A csökkentett karotinoid tartalmú, kísérleti illetve a vizsgálatban kontrollként szolgáló kukorica alapú tojótakarmány karotinoid spektrumát spektrofotometriásan határoztuk meg, míg azok karotinoid-tartalmát HPLC módszerrel mértük. (Kerti és Bárdos, 2006).

A vizsgálatokhoz felhasznált likopinforrások likopin tartalmának meghatározása és a kísérleti dózisok kiszámítása

A sűrített paradicsom likopin-tartalmát a karotinoid spektrum felvételét követően a likopin moláris abszorpciós koefficiense alapján számítottuk. A paradicsomtörköly likopin-tartalmát pedig HPLC módszerrel mértük (Kerti és Bárdos, 2006).

A kísérleti dózisokat úgy állítottuk be, hogy a kereskedelmi tojótakarmányban mért A-vitamin tartalommal (8333,6 NE/kg) sztöchiometriailag megegyező retinol-ekvivalens β - karotint és ezzel egyező mennyiségű likopint vettük alapdózisnak (L1).

Ezek alapján a kísérleti likopin koncentrációk a következők voltak: L1=4,7 mg/kg takarmány, L2=9,4 mg/kg takarmány, L3=14,1 mg/kg takarmány.

1. kísérlet A karotinoidok kiürülési (depléciós) fázisának meghatározása és dózisfüggő hatás-vizsgálatok likoppinnal

A kísérlet célja az volt, hogy meghatározzuk a karotinoidok szervezetből való kiürülési idejét és annak hatását a szervezet retinoid szintjére, lipidanyagcseréjére, antioxidáns státuszára és a tojástermelés egyes paramétereire. Célunk volt továbbá, hogy a kiürülést követően vizsgáljuk, a kétféle dózisú likopin bevitel hogyan befolyásolja a fent említett élettani paraméterek értékeit.

A kísérletben 40, nyolc hetes aktívan tojó japán fürjet vizsgáltunk. A madarakkal a korábban leírt csökkentett karotinoid tartalmú, rizs alapú takarmányt etettük a kísérlet ideje alatt, amely nem tartalmazott hozzáadott A-vitamint. Hat hetes depléciós fázist követően, a 7-9. héten sűrített paradicsomot kevertünk az állatok takarmányába L2 és L3 dózisban.

Csoportonként naponta 5 tojást véletlenszerűen kiválasztottunk, tömegüket lemértük és elvégeztük a tojások sárgájának színbírálatát a Yolk Color Fan (YCF) színskálával. A tojássárgájából kromatogramot vettünk fel, a likopin dózisfüggő beépülésének igazolására. A

lipidperoxidációs folyamatok intenzitását jelző tiobarbitursav reaktív anyagok mérésére a tojássárgájából malondialdehid (MDA) mennyiségi méréseket is végeztünk. A tárolt A-vitamin tartalmat jellemző retinil-palmitát (RP) és az A-vitamin tranzit állapotát mutató retinol (ROL) mennyiségét a kísérlet kezdetekor (**D0**), a kiürülési (depléciós) fázis vizsgálatának lezárásakor, a 6. héten (**D6**), továbbá a három hetes likopin kiegészítést (**L2** ill. **L3**) követően a 9. héten mértük, csoportonként 10-10 állat májából. A vérszérumból hetente, FRAP módszerrel meghatároztuk a vér antioxidáns kapacitását, továbbá három időpontban mértük a triglicerid és az összkoleszterin koncentrációkat is.

2. kísérlet A likopin és a β -karotin élettani hatásainak összehasonlítása

A vizsgálat célja az volt, hogy felmérjük és összehasonlítsuk a likopint, a β -karotint illetve a kereskedelmi tojótakarmányt fogyasztó tojómadarak egyes élettani és tojástermelési paramétereit.

A kísérletbe összesen 30, nyolc hetes, aktív tojó japán fürjet vontunk be, amelyeket véletlenszerűen három kísérleti csoportba osztottunk (n=10/ csoport). A kísérlet időtartama 8 hét volt, ami a két karotinoid kiegészítésű csoport esetében 2 hét depléciós fázisból (-2-0.hét) és 6 hét (0-6 hét) kísérleti szakaszból állt. A kontroll csoport a kísérlet teljes időtartama alatt kukorica alapú tojótápot fogyasztott. A Likopin (**L1**) csoport 4,7 mg/tak. kg likopin kiegészítést kapott sűrített paradicsom formájában. A másik csoport (**BC**) esetében a kísérleti takarmányt β -karotinnal (4,7 mg/kg) egészítettük ki Lucarotin 10% (BASF) formájában.

A kísérlet során a tojástermeléssel összefüggő napi méréseket végeztünk, ezek a következők voltak: csoportonkénti napi termelt tojásmennyiség, tojástömeg és tojássárgája színbíráló (5 tojás/csoport). A 0. és 6. héten vett tojás és vérmintákból meghatároztuk a lipidanyagcsere változásait (triglicerid és összekoleszterin tartalom), valamint mértük a vér összfehérje és hemoglobin koncentrációit és a hematokrit érték alakulását. A kísérlet zárásakor a három csoport összehasonlítása céljából mértük a máj és vér retinoid-tartalmát. Meghatároztuk továbbá a vér karotinoid profilját az egyes kísérleti csoportokban.

3. kísérlet A likopinkiegészítés egyes élettani hatásai és összefüggése az A-vitamin ellátottsággal

Ebben a kísérletben célunk volt megvizsgálni, hogy miképp reagál az állatok szervezete a csökkentett karotinoid tartalmú kísérleti takarmányra, illetve annak esetleges negatív hatásait hogyan befolyásolja a likopin és A-vitamin kiegészítés, valamint mindez hogyan hat az állatok egyes élettani paramétereire.

A kísérletben 60 darab, 10 hetes aktív tojó fürjből véletlenszerűen három kísérleti csoportot alakítottunk ki (n=20/csoport). A vizsgálat három hétig tartott, amelynek során mindhárom csoport a csökkentett karotinoid tartalmú kísérleti takarmányt kapta. A likopin kiegészítésű csoport takarmányát sűrített paradicsommal, 14,1 mg/kg (**L3**) likopinnal egészítettük ki, a likopin és A-vitamin együttes kiegészítésben részesült csoport pedig az L3 likopin dózissal és 8300 NE A-vitaminnal kiegészített takarmányt fogyasztott (**L3+Av**). A kontroll csoporttal, kiegészítés nélkül a kísérleti takarmányt etettük.

Csoportonként hetente öt állatot véletlenszerűen kiválasztottunk és mértük a test-, a máj-, és a tojástömegét, valamint elvégeztük a tojássárgája színbírálóvizsgálatát. Vérvizsgálatot végeztünk, melynek során mértük a vér összfehérje és hemoglobin tartalmát valamint a hematokrit értékét, a glükóz és fruktóz-amin koncentrációját, továbbá a lipidanyagcsere egyes mutatóit, így a triglicerid és összkoleszterin koncentrációkat. A vérszérum és a máj antioxidáns kapacitását FRAP módszerrel mértük.

4. kísérlet A likopin felszívódási helyének meghatározása és hasznosulása paradicsomtörköly valamint szintetikus likopin készítmény etetését követően

A vizsgálat célja annak meghatározása volt, hogy nagy dózisban (500 mg/kg takarmány) adagolt szintetikus likopinforrás felhasználásával meghatározzuk a likopin molekula felszívódásának a helyét az emésztőcsatornában, továbbá az egyes szervekben való raktározásának mértékét. További célunk volt megvizsgálni a paradicsomtörköly, mint természetes likopinforrás hasznosulását a baromfifajok modellállataként szolgáló japán fürjben.

A kísérletben 40, tíz hetes életkorú, aktív tojó japán fürjet vizsgáltunk. A kísérleti időszakot három szakaszra osztottuk. A -2-0. hét a kiürülési (depléciós) fázis volt, amelynek során mindhárom kísérleti csoport a csökkentett karotinoid tartalmú alaptakarmányt fogyasztotta. Ezt 5 hetes kísérleti szakasz követte, amikor a kontroll csoport továbbra is csak az alaptakarmányt, míg a két kísérleti csoport likopinnal kiegészített takarmányt fogyasztott. Az egyik csoport takarmányába szintetikus likopin tartalmú adalékanyagot (RedivivoTM Lycopene 5% TG/P (DSM)) kevertünk, amely 500 mg/kg takarmány likopin kiegészítést jelentett. A másik csoport takarmányába pedig paradicsomtörköly formájában 25 mg/kg likopint kevertünk. A harmadik szakaszban, a 6-7. héten mindhárom csoport kukorica alapú tojótakarmányt fogyasztott.

A két, likopinnal kiegészített takarmányt fogyasztó csoport 6-6 egyedének vérszérumából és tojásainak sárgájából mértük a likopin-tartalmat a karotinoid kiegészítés kezdetén és végén (0. és 5. hét), valamint a kísérlet zárásakor. Mértük továbbá az 5. héten a szintetikus likopint fogyasztó csoport duodenum- és a jejunum-homogenátum mintáinak likopin-tartalmát valamint mindkét likopin kiegészítést kapott csoport májmintáinak likopin tartalmát. A kontroll csoportban mértük a duodenum- és a jejunum szárazanyag-tartalmát a kísérlet zárásakor. A vérszérum és a tojássárgája összkoleszterin tartalmát a 0. és 5. héten határoztuk meg csoportonként 6-6, valamint a kísérlet zárásakor csoportonként 4-4 állatból. A kísérlet teljes ideje alatt csoportonként, hetente 5 tojás sárgájából színbírálatot is végeztünk.

Mintavétel és minták előkészítése

Vérminták

A vérvizsgálatokhoz a mintákat a madarak szárnyvénájából vettük. Heparinra történő vérvételkor a kinyert plazmát, alvadásban nem gátolt vér esetében a szérumot használtuk fel.

Májminták

A májmintákból 1:9 (máj:0.65 % NaCl oldat) térfogat arányban készítettük a homogenátumot, amelyet centrifugáltunk (10 000 rpm, 4°C, 10 min) és a felülúszóból végeztük el a kémiai analíziseket.

A májhomogenizátumok karotinoid és retinoid analíziséhez azokat 1,5 ml 10 %-os aszkorbinsav kiegészítéssel homogenizáltuk, majd 3 ml extraháló keverékkel (10:6:6:7: hexán: aceton: absz. etanol: toluol) extraháltuk és az extraktumot centrifugáltuk majd a tiszta felülúszóból végeztük a méréseket:

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

b.) RP-HPLC analízishez az extraktumot nitrogén áramban bepároltuk, a maradékot 100 µl etanol-dioxán 1:1 arányú keverékben felvettük, majd 150 µl acetonitrilt adtunk hozzá és azt HPLC oszlopra injektáltuk.

Bélszövet minták

A hasüregből az elvéreztetést követően a vékonybelet kiemeltük és a vizsgálandó bélszakaszokat (duodenum és jejunum) elkülönítettük. Ezt követően a bélszakaszokat hideg (4 °C) 0,75%-os NaCl (v/w) oldattal átmostuk, majd kifordítottuk és újabb fiziológiás oldattal történő öblítés után csiszolt tárgylemez élével a bélnyálkahártyát (*tunica mucosa*) lekapartuk a simaizom rétegről (*tunica muscularis*). A nyálkahártya kaparéék tömegét lemértük és 4°C-os élettani sóoldattal homogenizáltuk (Ganguly *et al.*, 1959).

A szárazanyag vizsgálathoz az adott bélszakaszokat az előbb leírtaknak megfelelően kipreparáltuk és súlyállandóságig szárítottuk.

Tojás minták

Tojássárgájából pipettával 1 ml mintát vettünk, ezt használtuk fel a vizsgálatokhoz. A koleszterin és triglicerid koncentrációk meghatározásához (mivel e módszerek eredendően szérummintákra lettek kifejlesztve) a tojásokat úgy készítettük elő, hogy azokat megfőztük, majd 0,1 g tojássárgáját 0,8 ml vízzel homogenizáltunk, ezt követően vattán, centrifugálással leszűrtük (Ágota, 2000). A kapott oldatból végeztük el a méréseket.

Mérési módszerek

A test-, máj-, és tojások tömegét analitikai mérlegen mértük. A tojássárgája színét a nemzetközi standardnak tekinthető színskálával -Yolk Color Fan (DSM) - összehasonlítva pontértékben fejeztük ki. A tojássárgájából az MDA tartalmat Dorman *et al.* (1995) módszerével mértünk. A vér és máj retinil-palmitát és retinol koncentrációját, valamint a tojássárgája és a vér karotinoid-profilját Biesalsky *et al.* (1986), Kerti és Bárdos (1999) által módosított HPLC módszerével határoztuk meg. A paradicsomtörköly, a takarmányok valamint a szérum, a máj, a tojássárgája és a vékonybélszakaszok likopin tartalmát továbbá a takarmány alapanyagok lutein és zeaxantin koncentrációját fordított fázisú, izokratikus HPLC módszerrel mértük Kerti és Bárdos (2006) metodikája szerint.

A vérplazma és a tojássárgája antioxidáns kapacitásának mérésére Benzie és Strain módszerével (1996) a vasredukciós tesztet (FRAP) alkalmaztuk. A szérum és tojássárgája összkoleszterin és triglicerid koncentrációit enzimatikus, kolorimetriás módszerrel mértük (Koleszterin CHOD-PAP, illetve Triglicerid-GPO-POD-liqS: tesztkészlet, Reanal, Budapest). Szintén enzimatikus, kolorimetriás módszerrel mértük a glükóz (Glükóz GOD-PAP liquid, Reanal,

Budapest) koncentrációt, míg a szérumból fruktóz-amin mérését Opiel *et al.* (2000) módszerével végeztük. A heparinra levett vérből meghatároztunk a hematokrit és hemoglobinszint értékeit (Gaál, 1999). A vérplazmából az összfehérje koncentrációt Biuret-reakcióval mértük.

Statisztikai értékelés

Az egyedi mérési adatokból átlag és szórás ($\bar{x} \pm s$) számítást végeztünk. Azokban az esetekben ahol több csoportátlag értékeit elemeztük varianciaanalízis alkalmazva (ANOVA) post hoc Tukey tesztet (*GraphPad Prism ver. 5.0 for Windows*) végeztünk. A csoportok közötti heti változásokat kétmintás Student *t*-próbával (MS Office 2003 Excel) $p > 0,001$ szinten hasonlítottuk össze. A glükóz és fruktóz-amin szintek alakulásának összehasonlítására korrelációanalízist végeztünk.

EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

Új, csökkentett karotinoid tartalmú takarmány előállítás

Karotinoid „mentes” alapanyagként a hántolt rizst (*Oryza sativa*) választottuk, amely alkalmasnak bizonyult a kísérleti tojótakarmányba való bekeverésre és 40 %-os arány mellett sem eredményezett takarmány-visszautasítást vagy termelés-csökkenést madarainkban. A HPLC-vel végzett karotinoid-spektrum méréseink igazolták, hogy a rizs gyakorlatilag nem, a búza, napraforgódara és extrahált szójadara pedig igen kis mértékben (≤ 1 mg/kg) tartalmaz luteint és zeaxantint, amely karotinoidok a tojássárgája legfontosabb színezőanyagai.

A vizsgálatokhoz szükséges likopinforrások likopin tartalmának meghatározása

A sűrített paradicsomból vett minta látható tartományban felvett abszorbancia spektruma jól mutatta, hogy a likopinnek is – a karotinoidokra általában jellemző – három abszorpciós maximuma van. Ezek közül a moláris extinkciós/abszorpciós koefficiens alapján végzett koncentráció kiszámításánál az 505 nm-es, a legtöbb karotinoidra jellemző, 450-470 nm-es sávól távol eső maximummal (OD-értékkel) számoltunk.

Likopin tartalomra vonatkozó mérési eredményeink összhangban állnak más kutatócsoportok által mért eredményekkel. Az eredmények összehasonlításánál azonban figyelembe kell venni azt a tényt, hogy a paradicsom likopintartalma, fajta, éghajlat és termőterület függvényében jelentős eltérést mutat illetve, hogy a mérések csak teljesen azonos minta előkészítési és módszer-beli azonosság esetén vehetők össze.

1.kísérlet A karotinoidok kiürülési (depléciós) fázisának meghatározása és dózisfüggő hatás-vizsgálatok likopinnal

Japán fürjekben a karotinoidok tojásból való kiürüléséhez 3 hétre volt szükség, de a tojássárgája színének szignifikáns csökkenése a 11. naptól jelentkezett. A kísérlet második szakaszában a tojások sárgájának színe a likopin etetés hatására dózisfüggő mértékben sötétedett. A likopin kiegészítés japán fürjben a házityúkhhoz hasonlóan eredményesen alkalmazható, mivel az a tojásba beépül és deponálódik.

A máj retinil-palmitát tartalma 6 hét alatt jelentősen ($p < 0,05$) csökkent. Mivel a retinil-palmitát az A-vitamin legfőbb tárolási formája, a drasztikusan csökkent mennyiség az jelenti, hogy a szervezet az A-vitamin igényét a májban képzett tartalékból mobilizációval pótolta. Tehát az alkalmazott takarmány valóban retinoidmentes volt és minimális mennyiségű karotinoidot tartalmazott. Ezt igazolja a 2. kísérletben szérumból felvett karotinoid profil is amelyben a kiegészítésként adagolt karotinoidokon (β -karotin és likopin) kívül a kísérleti állatok vérében más karotinoid nem volt kimutatható.

A vérplazma FRAP értéke a depléciós fázisban ingadozott, majd a likopin kiegészítés hatására a magasabb dózisú csoportban (L3:14,1 mg/kg) csoportban tendenciózusan emelkedni kezdett, viszont az kisebb dózisú L2 csoportnál (9,4 mg/kg) nem változott. Ez a likopin antioxidáns jellegére utal, ami dózisfüggőnek mutatkozott, bár a változás nem volt szignifikáns. A tartósan karotinoid hiányos diéta esetleg negatívan befolyásolhatta, a szervezet antioxidáns státuszát.

Tojásból, három időpontban mért MDA értékek enyhe csökkenést mutattak a kísérlet során, ám statisztikai különbséget az értékek között nem mértünk. Korábbi vizsgálatunk alkalmával nagyobb likopin koncentráció (57 mg/tak. kg) azonban szignifikáns csökkenést okozott a tojásból mért MDA értékekben. Ebből arra következtetünk, hogy az antioxidáns hatás dózisfüggő mértékben jelentkezik. Tehát, ha japán fürj tojóknak kifejezettebb antioxidáns hatást kívánunk elérni, akkor nagyobb likopin dózis javasolható.

A szérumból mért összkoleszterin koncentráció már a kísérleti takarmány kizárólagos etetésének hatására is csökkenni kezdett, a likopin hozzáadást követően mindkét alkalmazott dózis esetén szignifikáns eredményt mutatott.

2. kísérlet A likopin és a β -karotin élettani hatásainak összehasonlítása

A két, kísérleti takarmányt fogyasztó csoportnál a két hetes depléciós fázis végére csökkenést tapasztaltunk a tojások tömegében ($p < 0,05$), majd a karotinoid kiegészítések hatására nőtt a tojások tömege. Mind a heti tojás össztömegben (átlagos heti tojástömeg \times termelt tojások száma), mind pedig a halmozott tojás össztömegben (a teljes időszakban termelt tojások átlagtömege \times az összes termelt tojás számával) a karotinoid kiegészítésű csoportok eredményei meghaladták a kontroll csoportét. Figyelemre méltó ez az eredmény, mert kísérleti takarmány etetése mellett kis dózisú karotinoid bevitellel jobb termelési eredményt tudtunk elérni mint a kukoricára alapozott tojótakarmánnyal.

A tojássárgája színbírálat alapján a kontroll csoport tojássárgájának színe az irodalmi adatokkal összehangban áll, 30-40% kukorica bekeverési aránya esetén. A karotinoid kiegészítésű csoportokban a tojássárgája két hét alatt érte el végleges színárnyalatát. A karotinoidok közül a β -karotin nem, illetve csak nagyon szerény mértékben rendelkezik színező hatással. A likopin a tojássárgáját 4,7 mg/tak. kg dózisban eredményesen megszínezte.

A vér összkoleszterin szintjét mind a β -karotin mind pedig a likopin kiegészítésű csoport csökkenteni tudta, a likopin esetében $p < 0,001$ szignifikancia szinten. Nem zárható ki az a feltételezés, hogy a likopin esetleg fokozza a tojáson illetve a bélsáron át történő koleszterin kiválasztást és ilyen módon járul hozzá a vér koleszterinszintjének csökkenéséhez. A tojás relatív állandó koleszterin szintje azt is bizonyítja, hogy ez a létfontosságú biomolekula szükséges a potenciálisan a tojásban fejlődő új élet számára.

A kísérlet zárásakor vett vérmintákból vizsgáltuk az egyes csoportok karotinoid profiljait. A kontroll csoport szérum mintáinak extraktumában több csúcs volt kimutatható (β -karotin, β -kriptoxantin, kriptoxantin és lutein/zeaxantin) a kukoricaalapú takarmánynak köszönhetően, míg a kísérleti csoportok csak a kiegészítésként kapott β -karotin, illetve likopin csúcsot mutatták, ezzel igazolandó, hogy kísérleti takarmányunk nem tartalmazott más karotinoidot.

A vérből mért retinol tartalom a 4,7 mg/kg β -karotin kiegészítésben részesült csoportban mérsékelt emelkedést mutatott, ami a β -karotin \rightarrow retinoid átalakulást jelzi. A likopin esetében erőteljes csökkenés volt mérhető ($p < 0,01$), hiszen az aciklusos (jonon gyűrűt nem tartalmazó) likopin nem provitamin, vagyis a karotinoid-retinoid átalakulás nem megy végbe. A májmintákból mért RP és ROL koncentrációk azt mutatták, hogy a likopin kiegészítésben részesült madarak esetében szignifikáns módon lecsökkent a szervezet retinoid szintje.

A vér összfehérje szintjét a likopin adagolás megemelte ($p < 0,01$), hemoglobin szintre és hematokrit értékre azonban nem volt hatással. Baromfiban ez ideig ilyen irányú vizsgálatot még nem végeztek.

3. kísérlet A likopinkiegészítés élettani hatásai és összefüggése az A-vitamin ellátottsággal

A tojássárgája színbírálatokor már egy hét elteltével szignifikáns ($p < 0,05$) különbség mutatkozott a két likopin kiegészítésű, illetve az kontroll csoport között. A likopint valamint a likopint+A-vitamint fogyasztó állatok esetében a tojássárgája azonos szintet mutatott és azonos görbét írt le a vizsgálati időtartam alatt. Ez annak tudható be, hogy az adagolt likopin mennyisége azonos volt, az A-vitamin nem befolyásolja a tojássárgája színének alakulását. Kontroll csoport tojássárgája az első hét végére YCF=1-re halványodott és ezt a szintet a kísérlet végéig tartotta.

Az összfehérje koncentrációt a likopin kiegészítés, főként az első hét végére növelte a kontrollhoz képest ($p < 0,001$), míg a hematokrit értékre és hemoglobin koncentrációra nem volt hatással a likopin-kiegészítés. A likopinbevitel a vér glükóz és fruktóz-amin szintjét növelte. A

korrelációs együttható értéke mindhárom csoportnál nagyobb volt mint 0,95, tehát a vér glükóz és fruktóz-amin szintje közötti szoros összefüggés japán fürjekben is igazolódott. A vér és máj antioxidáns kapacitására, a likopinkiegészítésnek, FRAP módszerrel mérve nem volt hatása. A likopin kiegészítés ugyanakkor a vér összkoleszterin szintjét a kísérlet végére szignifikánsan csökkentette.

A csökkentett karotinoid tartalmú kísérleti takarmányt fogyasztó madarak átmeneti visszaesés volt tapasztalható a testtömegben az első hét végére, a 2. hét végére viszont a teljes állomány testsúlya kiegyenlítődt, ez a kísérleti takarmányunk beltartalmi helyességét igazolta. Feltételezhető, hogy az első héten adaptációs időről lehetett szó, amíg a madarak az új takarmányhoz hozzászoktak. A likopin (és A-vitamin) kiegészítéssel az állatok, ezt az adaptációs időt kompenzálni tudták, amely egyenletes testtömeget eredményezett a kísérlet során.

4. kísérlet A likopin felszívódási helyének meghatározása és hasznosulása paradicsomtörköly valamint szintetikus likopin-készítmény etetését követően

A rendkívül nagy (500 mg/kg) likopin bevitel alkalmasnak bizonyult a likopin molekula felszívódási helyének meghatározására. Az általunk alkalmazott kísérleti elrendezés alapján megállapíthattuk, hogy japán fürjben a proximális vékonybélszakaszok nyálkahártyája eltérő mennyiségben tartalmazott likopint. A bélnyálkahártya homogenizátumból elvégzett mérés eredményei azt mutatták, hogy a jejunum nyálkahártyája átlagosan háromszor több likopint tartalmaz, mint a duodenum. Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy a likopin felszívódása főként a jejunum nyálkahártyáján át történik japán fürjben. A házityúk és a japán fürj már említett, és számos kísérletben bizonyított, élettani hasonlósága miatt ez a megállapítás a házityúkra is érvényes lehet.

A paradicsomtörköly fogyasztás során antinutritív hatást nem tapasztaltunk. A likopin mindkét kísérleti adalékanyagunkból eredményesen felszívódott és hasznosult. Ezt az általunk vizsgált vér-, máj-, és tojásminták likopin tartalma igazolta. Ha a takarmányba kevert és a tojásból visszamért likopin mennyiségét összevetjük a két csoportban, akkor ez a paradicsomtörköly esetében 5,84%-os, míg a szintetikus likopin kiegészítésű csoport esetében 4,7%-os tojásba épülést jelent. Esetünkben a paradicsomtörköly szintetikus likopin-készítménnyel szembeni jobb hasznosulása annak tudható be, hogy a feldolgozás során a nyers paradicsomban lévő tipikusan transz izomerek cisszé alakulhattak, ami javítja a biológiai hasznosulást. A szintetikus likopin készítményben viszont főként (>70%) transz izomerek találhatók.

Mind 25 mg/tak. kg mind pedig 500 mg/tak. kg dózisú likopin kiegészítés szignifikáns mértékben csökkentette a vér összkoleszterin szintjét, míg a tojássárgája koleszterin szintjére nem volt hatással a likopin. Mind a négy kísérletünk mérési eredményei alapján, összegzésként elmondható, hogy a likopin vér-összkoleszterin csökkentő hatása japán fürjek esetében igazolást nyert.

A tojássárgája színét vizsgálva, kiemelendő, hogy az extrém magas (500 mg/kg) likopin bevitel sem eredményezett YCF >13 értéket, ami azt jelenti, hogy a tojás „telítődik” vagyis egy adott dózis felett már nem képes további likopin raktározására. A paradicsomtörkölyt, 25 mg/tak. kg likopin mennyiségben fogyasztó állatok tojás sárgáinak színe két hét alatt állt be YCF 5,7±0,35 átlagos értékre, amelyet a csoport a kezelési szakasz végéig meg tartott. Megállapítottuk, hogy a szárított paradicsomtörköly homogéne bekeverhető és a tojássárgáját egyenletesen színezi meg, tehát alkalmasnak bizonyult tojótakarmányba való bekeverésre.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A rizs, a búza, a napraforgódara és az extrahált szójadara ≤ 1 mg/kg koncentrációban tartalmaz luteint és zeaxantint, ezzel alkalmassá válnak karotinoid-kutatások kísérleti takarmányának összeállítására. A rizs, mint takarmány alapanyag akár 40 %-os koncentrációban is alkalmazható lehet tojómadarak számára összeállított karotinoidokban szegény kísérleti takarmányok előállítására során.
2. A karotinoidok kiürülése japán fürj tojókban már 10 nap elteltével mérhető, azonban a teljes kiürüléshez 2-3 hétre van szükség. A likopin tojásban való beépüléséhez legalább 2 hét szükséges, de ezen időtartam extrém nagy dózis esetén (500mg/tak. kg) 1 hétre csökkenthető.
3. Csökkentett karotinoid tartalmú takarmány etetése esetén, a likopin már 4,6 mg/kg dózisban megszínezi a tojást (YCF=3,75 \pm 0,72), de még 500 mg/kg dózisban sem érhető el YCF>13 érték. Ez az eredmény arra utal, hogy a tojásban karotinoid szaturáció feltételezhető.
4. A likopin a vér összkoleszterin szintjét már 4,7 mg/kg koncentrációban csökkenti japán fürjben, amely hatás azonban a tojássárgájában nem volt kimutatható.
5. A likopin hatással van a vér egyes biokémiai paramétereire japán fürjben, az összfehérje, a glükóz és fruktóz-amin szinteket különösen a kiegészítés kezdeti szakaszában növeli. A hematokrit értékre és hemoglobin koncentrációra a likopinnek japán fürjben nincs hatása.
6. A likopin felszívódási helye japán fürjben a vékonybél duodenum (25,4 %) és jejunum (74,6 %) szakasza, amelyek közül a jejunum tekinthető dominánsnak.
7. A paradicsomtörkölyből, mint természetes likopinforrásból származó likopin a szintetikus likoppinnal azonos hatásfokkal szívódik fel és épül be a tojásba.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

Tudományos közlemények referált folyóiratban

Réthy K., Papócsi P., Bárdos L., Kiss Zs. 2005. Karotinoidmentes takarmány alkalmazása a tyúkfélék karotinoid-anyagcseréjének vizsgálatához. *Állattenyésztés és Takarmányozás*. 54. 379-386.

Papócsi-Réthy K., Kerti A., Kiss Zs., Bárdos L. 2011. A likopin felszívódási helye és tojásba épülésének jellege japán fürjben (modell kísérlet). *Magyar Állatorvosok Lapja*. 2011. 133. 526-532.

Papócsi-Réthy K., Kiss Zs., Kerti A., Bárdos L. 2011. A paradicsom, mint likopinforrás alkalmazása japán fürjben. *Állattenyésztés és Takarmányozás*. 60. 4. 429-436.

Teljes terjedelemben megjelent konferencia közlemények

Bárdos, L., **Réthy, K.**, Gregosits, B., Kiss, Zs., Opper, K. 2004. Are there beneficial effects of lycopene supplementation on flows? (Pilot study on Japanese quail). *Proc. Conf. Risk Factors of food chain IV, Proceeding book: 22-25, Slovak Agricultural University in Nitra, Nitra, October 7.*

Bárdos L., Kiss Zs., Gregosits B., **Réthy K.**, Kerti A., Szabó Cs. 2005. Studies on the effects of lycopene in poultry (Hen and quail) – *Proc. ISAH Conference, Warsaw, Poland Vol. 2. pp. 65-68*

Papócsi-Réthy K., Kerti A., Kiss Zs., Bárdos L. 2011. Modellkísérlet a likopin felszívódás vizsgálatára japánfürjben. *Animal Welfare, Etológia és Tartástechnológia*, 7. 4. 389-396. p.

Konferencia absztraktok

Bárdos L., **Réthy K.**, Kiss Zs., Szabó Cs. 2004. Effects of dietary lycopene on lipid parameters and yolk coloration in Japanese quail – *Acta Angiologica, Vol.10. Suppl., Abstracts, Carotinoids and dietary lipids in health and disease, International Conference, Krakow, December 9-12.*

Réthy K., Bárdos L., Kiss Zs., Lakatos R., Gregosits B. 2004. Modellkísérlet a likopin, mint természetes takarmány-kiegészítő élettani hatásának vizsgálatára. *Innováció, a tudomány és a gyakorlat egysége az ezredforduló agráriumban, DE AMTC, Debrecen, április 16.*

Bárdos L. **Réthy K.** Kiss Zs. 2006. Likopintartalom kialakítása a tojássárgájában. *Magyar Táplálkozástudományi Társaság XXXI. Vándorgyűlése, okt. 5-7. Metabolizmus 4. 308.*

Réthy K., Kiss Zs., Kerti A., Bárdos L. 2006. Likopin kiegészítés hatása a tojássárgája színére és koleszterin tartalmára. MTA Állatorvostudományi Bizottsága, Akadémiai beszámolók, 33.1.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ NEM KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

Kiss Zs., **Réthy K.** 2002. Tisztább víz - egészségesebb szervezet, Kistermelők Lapja. 12. pp. 21.

Réthy K., Bárdos L. 2004. A házityúk vízháztartása 1. rész, Baromifágazat. 4: (4) 56-60.

Réthy K., Bárdos L. 2005. A házityúk vízháztartása 2. rész, Baromfiágazat. 5: (1) 56-62.

Gerritsen, R., van Dijk, A.J., **Rethy, K.**, Bikker, P. 2009. The effect of blends of organic acids on apparent faecal digestibility in weaned piglets. International Symposium on digestive physiology of pigs. Poster section, XI, 20–22 May, Costa Daurada, Spain