



**Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem,
Élettani és Takarmányozástani Intézet**

**Glükóioxidáció változása növekedéskor indukált
stressz modellben**
Stress-Induced Modifications in Glucose Oxidation in Growing Pigs

TDK dolgozat

Készítette: Fábíán Márió
X9DWK1
Mezőgazdasági Mérnök alapképzés
nappali tagozat
Kaposvári Campus

Témavezetők: Csötönyi Orsolya,
Egyetemi tanársegéd
Élettani és Takarmányozástani Intézet,
Gazdasági Állatok Takarmányozása Tanszék

Prof. Dr. Halas Veronika,
Tanszékvezető egyetemi tanár
Élettani és Takarmányozástani Intézet,
Gazdasági Állatok Takarmányozása Tanszék

**Kaposvár
2024**

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés és célkitűzések	2
2.	Szakirodalmi áttekintés	3
2.1.	Állatkísérletek etikai megfontolásai (3R szabály)	3
2.2.	Állatkísérletek szabályozása Magyarországon.....	3
2.3.	Stressz jelentősége az állatkísérletek során.....	4
2.3.1.	Mi a stressz?	4
2.3.2.	A stressz csoportosítása.....	6
2.3.3.	Stressz energia forgalomra gyakorolt hatása	8
2.4.	Energia és szénhidrát forgalom mérése	10
2.5.	Irodalomból levonható következtetések.....	12
3.	Alkalmazott módszerek (anyag és módszer)	13
3.1.	Állatok és elhelyezésük	13
3.2.	Az állatok felkészítése	14
3.3.	Állatkísérleti módszerek.....	14
3.3.1.	A kísérlet beállítása	14
3.3.2.	Mintakezelés, - előkészítés.....	17
3.3.3.	A minták feldolgozása.....	17
3.3.4.	Számolások.....	20
3.4.	Statisztikai elemzés	21
4.	Eredmények	22
4.1.	Vérszérum teljes kortizolszintje.....	22
4.2.	Plazma minták $^{13}\text{C}_6$ glükóz tartalma.....	23
4.3.	Vörösvértestek $^{13}\text{CO}_2$ tartalma	24
4.4.	Levegő minták $^{13}\text{CO}_2$ tartalma	25
5.	Diszkusszió	27
6.	Következtetés és javaslatok.....	30
7.	Összefoglalás	31
8.	Köszönetnyilvánítás.....	32
9.	Irodalomjegyzék	33
10.	Ábrajegyzék.....	38

1. Bevezetés és célkitűzések

Napjainkban az állatkísérletekkel szemben egyre nagyobb a társadalom előítélete annak ellenére, hogy az állatkísérletek során nagy figyelmet fordítanak az állatjóléti szempontokra. Az aktivisták szeretnék elérni, hogy csökkentsék vagy tiltsák be az állatok használatát a különböző kutatásokban. Nem szabad azonban elfelejteni, hogy a tudományos kísérletek nem önös, hanem komoly társadalmi célt szolgálnak. Az orvostudományhoz köthető kísérletekben a cél, hogy a különböző betegségekre, sokszor élethosszig tartó egészségügyi problémákra találjanak orvosságot. Az érvek között sokszor előkerül, hogy az állatokon kipróbált hatóanyagok és gyógymódok nagy százalékban nem feltétlenül lesznek sikeresek humán tesztelésben, de a kis sikerességi arány is képes hosszútávú és életmentő előnyöket teremteni a humán betegek számára (Jones, 2023). Az állatkísérletek nem csak az orvostudományt, hanem az élelmiszertermelést is előreviszik, ezek nélkül jóval kevesebben tudnánk arról, hogy hogyan javítható a gazdasági állatok termelése és a takarmányozás hatékonysága, és biztosan rosszabb lenne az élelmiszerbiztonság is.

Mindazok a kutatások, amik a stressz élettani hatásait vizsgálják, hozzájárulnak ahhoz, hogy megismerjük és megértsük azokat a folyamatokat, amik kísérleti körülmények között, illetve a gyakorlatban is befolyásolják az állatok anyagcserefolyamatait, teljesítményét. A dolgozatban bemutatott vizsgálatunkban arra kerestük a választ, hogy egy rövid ideig tartó stressz miképpen befolyásolja az energiaforgalom egyik alapvető folyamatát. Célunk annak értékelése volt, hogy egységes stressz indukció esetén milyen mértékben változik a felvett szénhidrátok oxidációja és a stressz hatással van-e a szénhidrát lebontásának dinamikájára. Azt is monitorozni kívántuk, hogy a nem invazív, vagy csak kismértékű kényelmetlenséget okozó mintavételek kiválthatják-e az invazív mintavételt a sertésekkel végzett szénhidrát-oxidációs vizsgálatokban.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1. Állatkísérletek etikai megfontolásai (3R szabály)

Az Európai Unióban az állatkísérletek állatjóléti, etikai okokból adódóan csak kontrollált körülmények között valósulhatnak meg. Az egyik alapvető elvárás, hogy az állatkísérleteket mindig az úgynevezett 3R szabállyal összhangban kell megtervezni. A 3R elvét (reduction, refinement, replacement) Bill Russel és Rex Burch dolgozta ki 1959-ben (Principles of Humane Experimental Technique, 1959), melyet a magyar szakirodalomban 3Cs elvként fordítanak: csillapít, csökkent, cserél. A 3R elv célja az állatok védelme és az állatkísérletek etikus lefolytatása. A „reduction” (csökkentés) a kísérlet során felhasznált állatok létszámának a csökkentését jelenti, hogy csak annyi állatot használjunk amennyi a megbízható statisztikai értékeléshez szükséges. A minimális létszám meghatározására több matematikai-statisztikai módszer is rendelkezésre áll, az állattudományban a „Power Analysis” módszert használjuk, mely megadja, hogy a megbízható statisztikai elemzéshez hány ismételtes, azaz hány egyed vagy minta szükséges (Palarea-Albaladejo és McKendrick, 2020). A képlet szerint a szükséges ismételteszám attól függ, hogy milyen a csoportokon belül várható szórás és milyen mértékű különbséget tartunk szakmailag elfogadhatónak. A „refinement” (csillapítás) az állat tartási körülményeinek és a kísérlet során alkalmazott módszereknek a megválasztását jelenti, melyek a legkevésbé okoznak fájdalmat vagy stresszt. A „replacement” (csere) olyan, élőállat használatát nem igénylő kísérleti folyamatok alkalmazását jelenti, melyek tudományosan elfogadottak, például in vitro módszerek, mechanisztikus modellek (Csákó, 2017; Sneddon és mtsai., 2017).

2.2. Állatkísérletek szabályozása Magyarországon

A kísérleti állatok használatát egy egységes irányelvben határozza meg az Európai Unió (86/609/EGK), azonban az állatkísérletek szabályozása tagállamonként eltérő lehet. Hazai vonatkozásban az állatvédelmi szabályozást 1998. évi XXVIII. törvény és ennek 2017-ben megjelent módosítása tartalmazza. E törvény szerint állatkísérletnek minősül minden olyan folyamat, amiben az állatnak egy tűszúrásnál nagyobb fájdalommal egyenértékű károsodást, szenvedést okoznak, még akkor is, ha valamilyen érzéstelenítést használnak az állaton. A hazai állatvédelmi törvény szerint állatkísérlet elvégzéséhez először egy szigorú engedélyezési folyamaton kell átesni. A kérvénynek tartalmaznia kell minden a kísérlettel kapcsolatos információt, mint például az egyedek létszámát, a tartás módját, a kísérlet részletes leírását, az állatok fájdalmának csökkentésére használt módszereket, valamint azt is, hogy a 3R elvet a

kísérlet milyen formában és mértékben teljesíti. Ezt a kérelmet az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács (ÁTET) bírálja el, majd az Állatvédelmi Hatóság, a NÉBIH illetékes főosztálya adja ki az engedélyt az kísérlet elvégzésre. Ezen szabályozási módnak és engedélyezési folyamatnak köszönhetően csökkent az elmúlt években az állatkísérletek száma (Csákó, 2017).

2.3. Stressz jelentősége az állatkísérletek során

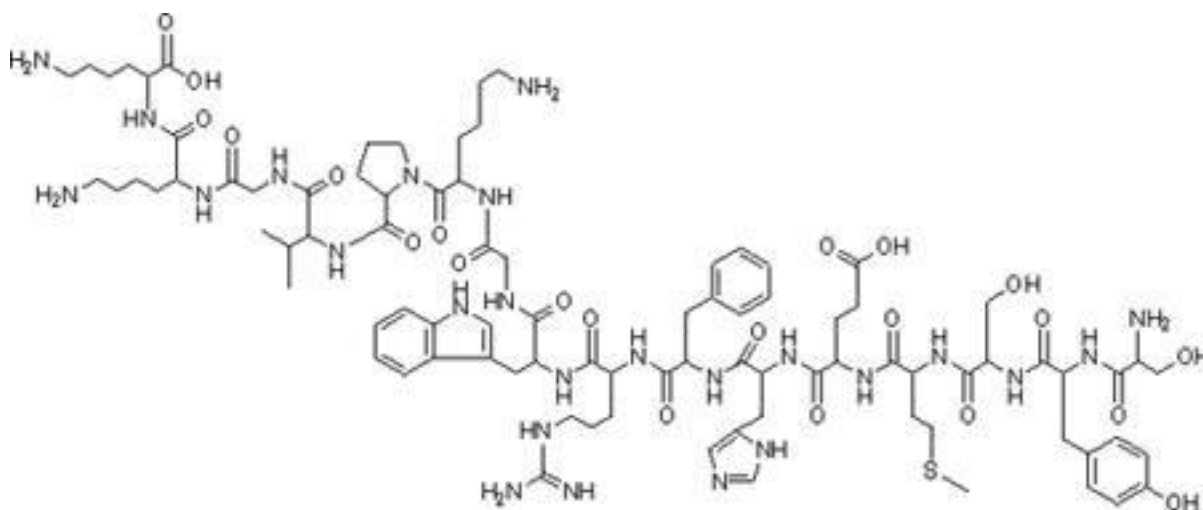
2.3.1. Mi a stressz?

A stressz leggyakoribb definíciója, az az állapot, amikor az állat képtelen megbirkózni az őt ért belső vagy külső hatásokkal. A stressz tulajdonképpen egy biológiai reflex reakciónak tekinthető. Ennek során megváltozik az állat viselkedése, gyakran külső megjelenése is, kedvezőtlen folyamatok indulnak el az anyagcserében, ami a belső, szabályozó rendszerek egyensúlyának változását, megbomlását mutatja. A stressz a szervezetet ért külső hatások, azaz a stresszor(ok) következménye. A szervezetet ért káros ingerekre - azok hosszától és nagyságától függően - a szervezet kétféle módon reagál. A Cannon-féle vészreakcióval vagy a Selye János (1965) által meghatározott általános adaptációs szindrómával. Mindkettőnek az adrenalin termelésének a növekedése adja a kulcsszerepet, aminek további hatásai vannak, nevezetesen felkészül a szervezet a gyors reagálásra, a menekülésre. Emellett megemelkedik a vérnyomás, megnövekszik a légzésszám és a vér glükóz tartalma (Ábrahám és mtsai., 2003). A hosszabb ideig fennmaradó, vagy sokszor ismétlődő stresszhatásra a szervezet az általános adaptációs szindrómával reagál. Ennek oka, hogy ha sokáig maradna fent az adrenalin által fokozott állapot, nagyon hamar kimerülne az állat. Ez utóbbi folyamatnak három szakasza van. Az alarm-reakció szakasz, melyre a folyamatosan emelkedő adrenokortikotrop hormon (ACTH) szint és a glükokortikoidok szintjének az emelkedése a jellemző. A második az ellenállás szakasza, ahol a kortizol és az ACTH szintje tartósan magas, azonban, ha van lehetőség alkalmazkodásra akkor kialakulhat a megfelelő ellenállás, ilyenkor a normális szint fölé emelkedik az ellenállóképesség és az alarm reakció tünetei látszólag eltűnnek. A harmadik a kimerülési szakasz. Ebben a szakaszban, ha a szervezet túl sokáig áll ugyanazon stresszor hatása alatt, amihez már alkalmazkodott, akkor kimerülhet az energia szintje és újra, ezúttal tartósan megjelennek az alarm reakció jelei, aminek elhullás lehet a következménye.

Az adrenokortikotrop hormon (későbbiekben ACTH) egy 39 aminosavból álló hormon (1. ábra) melynek elsődleges funkciója a glükokortikoidok (például: kortizol) termelésének serkentése.

Az ACTH hormon kiválasztása, termelése az agyalapi mirigy elülső lebenyében történik stresszhatására. A hormon szekréciója a mellékvesékben beindítja a kortizol kiválasztódását, adrenalint, noradrenalint és egyéb androgének termelését, felszabadítását. Ezek szintje ugyancsak visszahat az ACTH termelődésére, a magas kortizol csökkenti az ACTH további felszabadulását. A szabályozásban részt vesznek a hipotalamusz, az agyalapi mirigy és a mellékvese is, így ezt hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengelynek (HPA) hívják. A visszacsatolási rendszer több lépésből áll. Először az alacsony kortizol szint miatt a hipotalamusz kortikotropin-felszabadító (későbbiekben: CRH) hormonokat szabadít fel, melyek serkentik az agyalapi mirigy ACTH kiválasztódását. A megjelent ACTH hormonok stimulálják a mellékveséket, hogy kortizolt és androgéneket szabadítsanak fel. A kortizolszint emelkedés jelez a hipotalamusznak, hogy csökkenjen a CRH termelés, és ezzel bezárul a visszacsatolási folyamat. A HPA tengely résztvevőit ért bármely probléma hatással lehet a hormon egyensúlyra, köztük az ACTH-ra is.

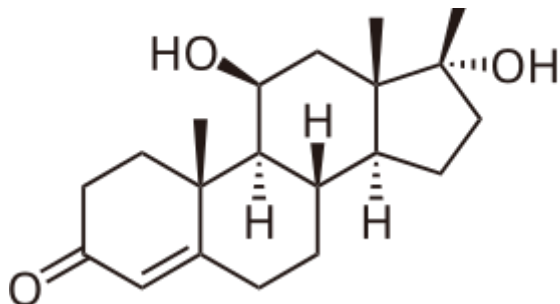
1. ábra: Az adrenokortikotrop hormon szerkezete
(Forrás: Wikipédia)



A kortizol (2. ábra) a szervezet egy szteroid hormonja, mely koleszterinből szintetizálódik. A köztudatban stresszhormonként ismert, de számos más hatása is van. A mellékvesekéregből szabadul fel, termelését, szekrécióját a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely szabályozza. Ha nem megfelelő a szabályozása, a túlzott kortizol szint következtében olyan betegségek alakulhatnak ki, mint például Cushing-szindróma, ami az állatoknál elsősorban a lovakban és a kutyákban gyakori, vagy úgynevezett agykérgi elégtelenség (Addison-kór) jelenthet meg. Hosszantartó magas kortizol szint az immunrendszer

gyengüléséhez, alvászavarokhoz, mentális problémákhoz vezethet. A kortizol funkciója elsősorban a stresszválasz, megnöveli az energia szintet, segít az alkalmazkodásban és a túlélés érdekében a nem létfontosságú folyamatokat elnyomja, emellett a glükoneogenezis serkentésével megnöveli a vércukorszintet.

2. ábra: A kortizol szerkezete
(Forrás: Wikipédia)



2.3.2. A stressz csoportosítása

A stresszhatásokat sokféle képpen csoportosíthatjuk, lehet az időtartama alapján (akut vagy krónikus), illetve lehet a kiváltó okai alapján (például: immunológiai, környezeti, szociális, szállítási stressz; Martínez- Miró és mtsai., 2016).

Immunológiai stressz keletkezése az állatokban valamilyen fertőzésnek (bakteriális, vírusos, endokrin) köszönhető, mely a betegség alatt vagy a betegség, vakcinázás után jelenik meg. Ezek mellett minden olyan stresszhatás, amely az immunrendszert befolyásolja (például hőstressz) ide sorolható. Immunológiai stressz során megnövekszik a vér leukocita száma és aránya, melyet lehet egy első védvonalnak is tekinteni a kiváltó fertőzés vagy sérülés ellen. Változást lehet érzékelni az állat viselkedésében és anyagcseréjében, aktív immunrendszer esetén étvágytalanság, letargia lesz megfigyelhető, valamint metabolikus változások is megjelennek (Song és mtsai., 2014). Abban az esetben, ha a stressz időtartama hosszabb, az állat teljesítménye csökken, mivel a védekező mechanizmusok előnyt élveznek a szervezetben és ezek nagyobb táplálóanyag igénye és a gyakran csökkent étvágy mellett a felépítő folyamatokra sokkal kevesebb táplálóanyag jut. Stresszhatás alatt csökkenni fog a növekedési hormon szintje is, azaz nem csak a táplálóanyag ellátás, de az endokrin rendszer is korlátozza a genetikai teljesítő képességet. A metabolikus stressz leggyakrabban takarmány és/vagy víz korlátozásából, megvonásából, helytelen takarmányozásból ered (Toscano és mtsai., 2007). Az elégtelen takarmányfelvétel negatív hatásai nagy mértékben függenek az éhezési időszak hosszától. Éhezéskor a vér glükóz szintje csökken, ilyenkor a szervezet úgynevezett alternatív

energiahordozókat, mint pl. a ketonanyagokat vagy a fehérjéket használ fel az ATP szintéziséhez.

A zárt körülmények között tartott sertések esetében érdemes figyelmet fordítani a környezeti stresszre és az abból adódó problémákra (Pearce és mtsai., 2013). A hőmérséklet, a páratartalom, a por-, fény- és gázkoncentráció, a levegő ammónia szintje és a környezet hangintenzitása a leggyakoribb kiváltó okok, melyekhez az állat alkalmazkodni tud megadott idő után. A terem hőmérsékletének a sertés korának megfelelő tartományban kell lennie, azonban ez olyan helyeken, ahol hosszabb extrém meleg időszakok vannak, nehezebb biztosítani. Az állatok környezetében megtalálható gépek, ajtócsapódás, ventillátorok zajából fakadó erős hangintenzitás (mechanikai zaj) stressz okozhat az állatoknak, ami pulzusszám növekedéshez vezethet (Žitňák és mtsai., 2011; Mihina és mtsai., 2012). Hosszantartó vagy intenzív zaj esetén megemelkedik a kortizol és az ACTH koncentrációja, közben aktívabbá, idegesebbé is válhatnak az állatok (Brouček, 2014). A levegő magas ammónia szintje is stresszorként jelentkezik (Banhazi és mtsai., 2008), de hosszú távon légzőszervi irritáció is kialakulhat, ami káros hatással van az állat termelési paramétereire (Kim és mtsai., 2008). Az optimális fényintenzitásról sertés esetében kevés információ áll rendelkezésünkre. Az embereknel az alacsony fényerő szintnek negatív hatása van, emiatt feltételezhető, hogy sertésekben is valószínűleg érdemes lenne a megfelelő fényintenzitást meghatározni (O'Connor és mtsai., 2010).

Szociális stressz a sertés tartásban jellemzően olyankor fordul elő, mikor az állatok a termelési ciklusuk különböző fázisaiban (például: választáskor, vemhesítés előtt) új csoportokba kerülnek (Pitts és mtsai., 2000; Coutellier és mtsai., 2007). Ilyenkor elindul egy dominancia harc, aminek célja a hierarchia kialakítása, mely stressz forrásként hat. A megjelenő stressz, ha csak az átcsoportosítás pillanatában hat, akkor akut (rövid ideig tart), ha a dominancia kialakítási folyamat után az állat elszigetelt, alárendelt, vagy többszöri átcsoportosításra kerül sor, akkor lehet krónikus stresszhelyzet is (Coutellier és mtsai., 2007). A stressz mértékére hatással van az új csoport mérete és helye. Nagyobb csoportokban alacsonyabb a stressz mértéke a kisebb létszámú csoportokhoz képest (Nielsen és mtsai., 1995, Turner és mtsai., 2001). Emellett az állatok korától, ivarától, genotípusától is nagy mértékben függ az állatok stressztűrő képessége. Az egy egyedre jutó terület csökkenése a mozgástér csökkenéséhez, esetleges étvágytalansághoz vezethet, ami idővel viszont az alultápláltság és éhség miatt agresszív viselkedést válthat ki (Weng és mtsai., 1998). Ennek az agresszív viselkedésnek a mértéke a hímeknél gyakoribb és egyedenként változó mértékű lehet. A

szociális stressz hatással lehet az állatok egészségére is, csökkenti a szervezet ellenálló képességét. Malacok újracsoportosítása során Bacou és mtsai. (2017) vizsgálatában csökkent egyes interleukonok (IL-8 és TNF α) szekréciója és a mononukleáris sejt fagocitózis kapacitása is.

2.3.3. Stressz energia forgalomra gyakorolt hatása

Az állatok életfolyamatainak működéséhez energia szükséges, amit az elfogyasztott táplálékból vesz fel. Az energia elsődleges forrásai a szénhidrátok, a zsírok és a fehérjék. A szénhidrátok, mint a keményítő és a cukrok, jól emészthetők, összes felvett energia legnagyobb részét ezek biztosítják. A zsírok nagy energiasűrűséggel rendelkeznek, de takarmány zsírtartalma növedék és hizósértések esetében általában nem különösebben magas (2-5%). A fehérjéket megfelelő táplálóanyag és energiaellátás esetén a fehérjeszintézisben használja a szervezet, bár energiává is alakíthatóak, de ez sem biológiailag, sem ökonómiai szempontból nem hatékony. Az állatok energiaszükséglete függ a koruktól. Növedéksértések energia igényét a létfenntartás, a fehérje- és zsírbeépülés energiafelhasználása határozza meg. A szervezet számára hasznosítható energia az állatok által felvett takarmány szerves vegyületeiből felszívódott glükózból, zsírsavakból, aminosavakból és illózsírsavakból származik. Ezekből a táplálóanyagokból felszabadult energiát ATP formájában hasznosítja a szervezetben. A szervezet táplálóanyag és energiaforgalma kétirányú, de ezek egymással összehangoltan működnek. A katabolizmus a szervezet anyagcseréjének a lebontó folyamatait foglalja magába, aminek során a nagy, komplex molekulákból kisebb, egyszerűbb molekulákat készít (Kil és mtsai., 2013). Ez a folyamat nagy energiát szabadít fel, ami az életfunkciók működtetésénél használandó fel. A katabolikus folyamatok lényege az energia nyerés és hasznosítás. Ilyen folyamat lehet a takarmányokban lévő szénhidrátok vagy a májban tárolt glikogén glükózzá történő bontása, majd a glükóz energiává (ATP) alakítása; a zsírok lebontása zsírsavakra, glicerinre, amiket a sejtek energiává alakítanak; a fehérjék lebontása aminosavakra, melyek energiaforrásként is hasznosulhatnak vagy más folyamatok alapanyagként szolgálhatnak. A felszabadult vagy raktározott energia felhasználásra kerülhet a mozgás, hőtermelés, sejtosztódás során. A szervezet lebontó folyamataival szemben a felépítő, azaz az anabolikus folyamatok során a kisebb, egyszerűbb molekulákból keletkeznek nagyobb, komplexebb molekulák. Anabolikus folyamat a fehérjék szintézise, amikor aminosavakból fehérjék képződnek, amik az izomnövekedésben, illetve más szervek felépítésében vesznek részt; a zsírsavak szintézise, mikor lipidek keletkeznek zsírsavak és glicerin összekapcsolódásával,

energia hasznosítás vagy raktározás céljából; a szénhidrát szintézis, mely során a glükóz molekulákból glikogén formájában raktározott energia képződik. A katabolikus és anabolikus folyamatok együttesen alkotják a metabolikus egyensúlyt, melyben a lebontás során energia szabadul fel, építés során energia használandó fel (Kil és mtsai., 2013).

Az állat stresszmentes környezetben tud a legjobban, leghatékonyabban működni, ekkor a táplálóanyagok a szervezetben létfenntartásra és termelésre fordítódnak, miközben a létfenntartás szükséglete a lehető legkisebb. Mikor az állatot valamilyen stresszhatás éri, „fight or flight” üzemmódba kapcsol, ami magával vonzza az energia és a táplálóanyagok megoszlásának a változását is. Ennek hatására a perifériás területek (például: végtagok) vérellátása megnövekszik, szaporább lesz a szívverés és a nagyobb oxigén szükséglet miatt nő levegővételek száma (Ábrahám és mtsai., 2003). Ezen változások következtében a létfenntartás szükséglete is megnő, ami csökkenteni fogja a növekedésre fordítható táplálóanyag és energia mennyiséget. Ehhez csatlakozik még, hogy a takarmányfelvétel is kisebb lesz stresszhelyzetben, ami a magas létfenntartó energia szükséglet mellett, még kevesebb energia mennyiséget enged a termelés számára. A stresszt kiváltó tényezők általában hasonló válaszokat váltanak ki a különböző állatokban, azonban ugyanez az inger elindíthat más folyamatokat is (pl. pupillák kitágulása, erek összehúzódása), attól függően, hogy az állatnak milyen a környezete, kora, és genotípusa.

Az irodalom tanulmányozása során nem találtam kvantitatív vizsgálatokat sertésekkel a szénhidrát oxidáció mérésére stressz során. Charoensap és mtsai. (2023) atlétákkal végzett felmérése során a nagy intenzitású mozgás során felhasznált szénhidrát mennyiségét 18°C és 33°C, 60% relatív páratartalom mellett mérték és arra a következtetésre jutottak, hogy a magasabb hőmérsékleten, amit a szerzők mérsékelt hőstresszként jellemeztek, a szervezet energiafelhasználása korlátozottabb volt, a szénhidrát oxidáció mintegy 19%-kal visszaesett. Egy másik humán sportolókkal végzett vizsgálatban a hőstressz tendenciózusan növelte az izmok glikogén felhasználását, de csökkentette a felvett szénhidrát oxidációját ($P < 0,10$; Jentjens és mtsai., 2002). Hőstressz esetén azonban a szervezet hőháztartásának biztosítása érdekében elképzelhető, hogy más metabolikus útvonalak segítik a szervezet adaptációját, mint egyéb stresszor esetén.

2.4. Energia és szénhidrát forgalom mérése

A szervezet energia forgalmának a mérésére invazív és nem invazív módszereket is kidolgoztak. Az úgynevezett vágópróbával meghatározható az adott takarmányon, adott időszakban beépített energia mennyisége. Ehhez az állatok egy csoportját a vizsgálat elején, míg a maradék állatokat a vizsgálat végén levágják és teljestest analízissel meghatározzák a testek fehérje és zsírtartalmát. Ez alapján meghatározható az adott időszakban beépült energia mennyisége, de a módszer nem alkalmas a létfenntartás energiaszükségletének meghatározására. A takarmánnyal felvett energia értékesülésének nyomonkövetése kalorimetriás vizsgálatokkal lehetséges. Ezzel nem csak a szervezetből bélsárra, vizelettel és bélgázokkal távozó energia, de a hővel elvesző energia is mérhető. A szervezet hőtermelése a biokémiai folyamatok végterméke, melyet direkt és indirekt kalorimetriával is értékelhetünk. Mindkét technika alkalmas a szervezet energiaforgalmának mérésére, de a szénhidrátok oxidációját az indirekt kalorimetriás vizsgálatokkal lehet pontosan meghatározni. A direkt kalorimetria során a szervezet hőtermelését közvetlenül határozzák meg, míg az indirekt kalorimetria esetében respirációs berendezésben mérik az oxigénfogyasztást és a szén-dioxid termelést. A szén- és nitrogénforgalmi vizsgálatok eredményeinek felhasználásával kiszámítható a különböző táplálóanyagok, így a szénhidrátok oxidációjából felszabadult energia mértéke (Schoffelen és mtsai., 2018).

A humán vizsgálatokban használatban van továbbá egy módszer, mely a nehézvíz (D_2O^{18}) stabil izotópjainak felhasználásával méri a szervezet energiaforgalmát (Schutz, 2018). A D_2O^{18} módszert a 20. században alkotta meg Lifson az ökológiai rendszerek karbonlábnymának becslésére. A módszer lényegében két izotópos molekulajelölést alkalmaz, a D_2 és az ^{18}O segítségével határozza meg a szervezet CO_2 termelését (Schutz, 2018). A módszer mérési pontossága azonban nem megbízható, ezért jelenleg a respirációs berendezések számítanak referencia módszernek az oxidációs folyamatok monitorozására.

Amennyiben csak a szénhidrát, pontosabban a glükóz oxidációjának meghatározása a cél, úgy nem szükséges a respirációs berendezés használata. A szénhidrát forgalom mérése lehetséges stabil izotóppal jelölt szénhidrátok alkalmazásával, például ^{13}C izotóppal. Amennyiben a glükóz molekula mind a 6 szénatomját ^{13}C izotóppal állítjuk elő, úgy a jelölt C, mint marker használható a szénhidrát szervezetben való átalakulásának követésére. Mivel a szervezet nem tesz különbséget a jelölt és jelöletlen szénhidrátok között, ezek bekerülnek az anyagforgalomba, és pl. a vérben mérhetővé válnak. Jelölésüknek köszönhetően az energiatermelő folyamatok végtermékeként a kilélegzett levegővel távoznak a szervezetből. A

^{13}C izotóp mérésével, a $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ arány figyelembevételével az egyes mintákban meghatározható a szénhidrát oxidáció mértéke. A jelölésnek köszönhetően a jelölt molekulák teljes útját le lehet követni a szervezetben.

A szénhidrát metabolizmus kvantitatív felmérésére döntően patkánnyal végzett vizsgálatokat találtam, amik vagy a cukorbetegség, vagy az infarktus utáni felépülés körüli változásokat, esetleg a szénhidrát oxidáció biokémiai hátterét kutatták (Randle és mtsai., 1994; Wang és mtsai., 2005; Olefsky, 1976). A stabil izotópos jelölést humán vizsgálatokban is használták (Metges és Günther, 1991), a módszer tapasztalatait Kim és mtsai. (2016) adták közre. A közlemény kiemeli, hogy a technika alkalmazása kockázatmentes és megbízható, így az egyik legjobb módszer humán alanyokon végzett klinikai vizsgálatokhoz. A stabil izotóp jelzőanyagként való használata sikeresen alkalmazható a molekuláris és sejtbiológiai eszközökkel együtt, így biztosítva az anyagcsere-folyamatokban bekövetkező változások feltárását és dinamikus értékelését, valamint a megfigyelt kinetikai válaszok molekuláris alapjainak egyidejű vizsgálatát (Kim és mtsai., 2016). Mivel az energiaforgalom optimalizálása különösen fontos az élsportolók körében, ezért a humán vizsgálatokba nem csak betegeket, de sportolókat is gyakran bevonnak, mint például a Ijaz és mtsai. (2024). A szerzők a magasabb és nagyobb súlyú, illetve az alacsonyabb és kisebb testtömegű atléták szénhidrát oxidációját vizsgálták intenzív edzés során. Ehhez a résztvevők különböző időpontokban kaptak glükózoldatot, illetve adott mennyiségű ^{13}C izotóppal jelölt glükózt, majd a vérből és a kilélegzett levegőből meghatározták a jelzett glükóz koncentrációját. A kapott adatok alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a kisebb súlyú atléták esetében kisebb mértékű volt a szénhidrát oxidáció (Ijaz és mtsai., 2024). A kapott eredmények alapján azt a következtetést vonták le, hogy az élsportolók esetében szénhidrátok pótlásának optimalizálásakor a testsúlyt és a magasságot is érdemes figyelembe venni.

Gazdasági haszonállatokkal csak kevés számú kutatást végeztek, elsősorban tejelő szarvasmarha és kisebb számban sertéssel végzett vizsgálatokról számol be a szakirodalom (Metges és mtsai., 1990; Derno és mtsai., 2013; Kuhla és mtsai., 2016; Krueger és mtsai., 2014). Ezek elsősorban az anyagcsereutak feltárását szolgálták, sertésnél kifejezetten a vemhesség alatti gyenge embriófejlődés következményeit vizsgálták (Metges és mtsai., 2014; Krueger és mtsai., 2014).

Stresszel összefüggő, a szénhidrát forgalmat értékelő kvantitatív vizsgálatot nem találtam az irodalomban. Pedig az állati szervezetben számos folyamatnak, szövetnek van szüksége glükózra a tökéletes működéshez, ilyen például az agy, a vázizom, a máj, a vesék,

egyes immunsejtek és a vörösvértestek. A glükóz elsődlegesen a takarmányból származik, a szervezet glükózt csak nagyon korlátozott mértékben tud visszatartani. A testben glikogén formájában tárolt glükózt a máj glikogenolízis segítségével használja fel. Ez a folyamat csak az éhezési szakasz elején (első óráiban), vagy rövid távon, harc vagy menekülés során lesz hozzáférhető, mert ezek a glikogén raktárak idővel kifogynak. Abban az esetben, ha hosszabb ideig tart az éhezés időszaka, akkor a vércukorszint fenntartásához egy másik folyamat is hozzájárul, a glükoneogenezis. Ilyenkor ezen két folyamatnak az egyensúlya, együttes működése biztosítja az állandó vércukorszintet (Chourpiliadis és mtsai., 2019). Glükoneogenezis során glükóz és glicerín termelődik aminosavakból (például: alaninból), tejsavból. Hosszantartó fizikai aktivitás esetén kimerülnek a glikogénraktárak, az izmokban keletkező tejsav eljut a májba a véráram segítségével, ahol újra glükózzá alakul. Mindkét glükóz termelő folyamatnak vannak szabályozó hormonjai, melyek befolyásolják működésüket. Az adrenalin és a glükagon serkenti a glükóz termelést, az inzulin viszont gátolja azt. Stressz hatására ezek a szabályozó mechanizmusok is módosulhatnak, azonban nagyon kevés ismeretünk van arról, hogy adott típusú stressz milyen mértékben befolyásolja a szervezet energiatermelő folyamatait.

2.5. Irodalomból levonható következtetések

A stressz szervezetre gyakorolt élettani hatása régóta kutatott, hiszen már több mint 50 éve ismerjük a Selye által leírt adaptációs szindrómát és a Cannon-féle vészreakciót, azonban a folyamat komplexitása miatt még mindig vannak válaszra váró kérdések. A stressz negatív hatásának kivédésére csak akkor lehet megfelelő stratégiát kidolgozni, ha pontosan ismerjük a stresszor által kiváltott hatást. Ahhoz, hogy kvantifikálni lehessen a stressznek a szervezet energiaforgalmára gyakorolt hatását, érdemes glükózoxidáció változását egy adott mértékű stressz során vizsgálni. A stresszvizsgálatok esetében az is kiemelten fontos, hogy olyan módszert alkalmazzunk, ami az állatoknak nem okoz kellemetlenséget, hiszen ezzel a kontroll körülmények között mért „referencia értékeket” torzítanánk.

3. Alkalmazott módszerek (anyag és módszer)

3.1. Állatok és elhelyezésük

A Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Kaposvári Campusának Gazdasági Állatok Takarmányozása Tanszékén, a Sertés Kutató Laboratóriumában zajlott a vizsgálat. A kísérletben 10 keresztezett (Duroc x Topigs) növendék sertést használtunk. A vizsgálatban csak ártányokat használtunk. Az állatkísérlet engedélyszáma: SO/31/00881-2/2023 (KA-3926)

Érkezéskor az állatok átlagos élősúlya 15 kg volt, a kísérlet kezdetén pedig 23 kg átlagsúlyúak voltak. A sertések egyedi kutricákban voltak elhelyezve, ezek alapterülete 1 m x 1,55 m, magasságuk 1 m volt. Az elhelyezésük során alomanyagot nem használtunk.

A terem hőmérsékletét és páratartalmát a növendék sertések részére megfogalmazott ajánlásnak megfelelően állítottuk be (Tucker és mtsai., 2020). A kutricák etetővel és önitatóval voltak ellátva. Az állatok a takarmányukat naponta két alkalommal (8.00 és 15.00h-kor) kapták, a takarmányadag megfelelt a létfenntartó energiaszükséglet 2,8-szorosának (ME_{em} = 450 kJ/kg^{0,75}/nap). Ivóvízfogyasztásukat nem korlátoztuk.

Az etetett takarmány táplálóanyag tartalmát az NRC (2012) ajánlásai szerint állítottuk össze. Az etetett alaptakarmány összetételét és táplálóanyag tartalmát a 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat: Az alaptakarmány összetétele és számított táplálóanyag tartalma

Összetevők	g/kg	Táplálóanyag-tartalom	
Kukorica	466,0	Szárazanyag	890,64
Búza	180,0	ME*(MJ/kg)	13,23
Ext. szójadara	218,5	Nyersfehérje	183,83
Növényi olaj	25,0	Nyerszsír	47,82
MCP	3,1	Nyersrost	41,63
Takarmánymész	13,5	Nyershamu	28,4
Premix**	5,0	Nmka	614,8
NaCl	4,1	Lizin	13,88
Lizin-HCl	8,1	M+C	8,04
DL-metionin	3,7	Kalcium	6,32
L-treonin	1,9	Emészthető foszfor	1,61
Napraforgó dara	60,0		
Cellulóz	10,0		
Összesen:	1000,0		

* számított érték

** 1 kg premix: Vit. A: 2400000 IU, Vit. D3: 348000 IU, Vit. E: 6000 mg, Vit. K3: 198 mg, Vit. B1: 402 mg, Vit. B2: 1002 mg, Vit. B3: 10020 mg, Vit. B5: 4980 mg, Vit. B6: 402 mg, Vit. B12: 7,8 mg, Biotin: 19,8 mg, Folsav: 102 mg, Kolin: 62792 mg, Fe: 45855 mg, Zn: 33600 mg, Mn: 26880 mg, Cu: 330000 mg, Co: 134 mg, I: 488 mg, Se: 67 mg.

3.2. Az állatok felkészítése

Az állatokat a kísérleti időszak előtt 3-4 hétig szoktattuk az emberi jelenlétéhez és az alkalmazni kívánt módszerekhez, ezzel is elkerülve az eredmények torzítottságát. Fontos volt, hogy a sertéseknek természetes legyen az emberrel való napi kontaktus, illetve nem zavarja őket a levegő, a nyál és a vérvétel. A malacokat a szoktatási időszakban naponta legalább 30 perc időtartamban meglátogattuk, jutalomfalattal kínáltuk, simogattuk őket, játszottunk velük. A levegőminta vételéhez egy speciális maszkot használtunk, a maszk felhelyezése után a malacok ismét jutalomfalatot kaptak. A nyálmintavételhez az állatoknak rágszálni kellett a számukra felkínált mintavevő tampont. A vérvételekhez való hozzászoktatás a nyaki rész simogatásával és a pólya rendszeres felhelyezésével történt. A tartós vénakanül beültetését a felelős állatorvos rövid sebészeti beavatkozással végezte el a vizsgálatok megkezdése előtt 3-4 nappal. Az állatokat im. adott Zoletil 50 (4 mg/kg) bódította, majd Mapleson D elrendezésben (nem-visszalégző légzőkör használatával), 5tf% isofluran és O₂ (300 ml/kg/min) keverékével altatta. Az állatorvos a bőrön egy pár mm-es bemetszést ejtetett és a tartós vénakanült a v. jugularisba vezette, ezután a kanült 2 öltéssel a bőrhöz rögzítette. A vénakanüloket naponta ellenőriztük és annak érdekében, hogy az erek gyulladását vagy a vérrögképződést, illetve a vénakanülökben a vér alvadását meggátoljuk, napi mosás volt szükséges. Ezt heparinizált sóoldattal (90 NE/kg heparin) végeztük.

3.3. Állatkísérleti módszerek

3.3.1. A kísérlet beállítása

A kísérlet önkontrollos vizsgálat volt, minden állat önmaga kontrolljaként szolgált. A sertések alapértékeit az első nap mintáiból kaptuk meg. A kísérlet egy úgynevezett kontroll napból és egy stressz-indukciós napból állt, ezek során az állatokból több alkalommal vettünk vér, nyál és levegő mintát. A mintavételi napok az alábbi ütemezésben zajlottak: az állatokat a 0. percben 700 mg/testtömegkilogramm D-glükóz és 10 mg/testtömegkilogramm ¹³C₆ glükóz (D-Glucose U-¹³C₆, 99%, Cambridge Isotope Laboratories Inc., Andover, MA 01810 USA) vízben feloldott elegyével itattuk 20 ml-es fecskendőkből. A stressz-indukciós napon az előző nappal megegyező időpontban újra 700 mg/testtömegkilogramm D-glükóz és 10 mg/testtömegkilogramm ¹³C₆ glükóz (D-Glucose U-¹³C₆, 99%, Cambridge Isotope Laboratories Inc., Andover, MA 01810 USA) vízben oldott elegyét itattuk az állatokkal 20 ml-es fecskendőkből a 0. percben, valamint ezzel egyidőben a tartós vénakanülon át 10 µg/testsúlykilogramm Synacthen 0,25 mg/1 ml ACTH injekciót adtunk be. A kontroll és

stresszindukciós nap mintavételi időpontjai azonosak voltak (3. ábra). A vérmintákat a tartós vénakanülökön keresztül fecskendővel vettük napi 16 alkalommal (-15 perc, 0 perc, 15 perc, 30 perc, 45 perc, 60 perc, 75 perc, 90 perc, 105 perc, 120 perc, 150 perc, 180 perc, 210 perc, 240 perc, 360 perc, 480 perc). A kilélegzett levegőmintákat 13 alkalommal vettük (1-2. kép) (-15 perc, 0 perc, 15 perc, 30 perc, 45 perc, 60 perc, 75 perc, 90 perc, 120 perc, 150 perc, 180 perc, 210 perc, 240 perc) az aznapi második etetési időpontig (15h).

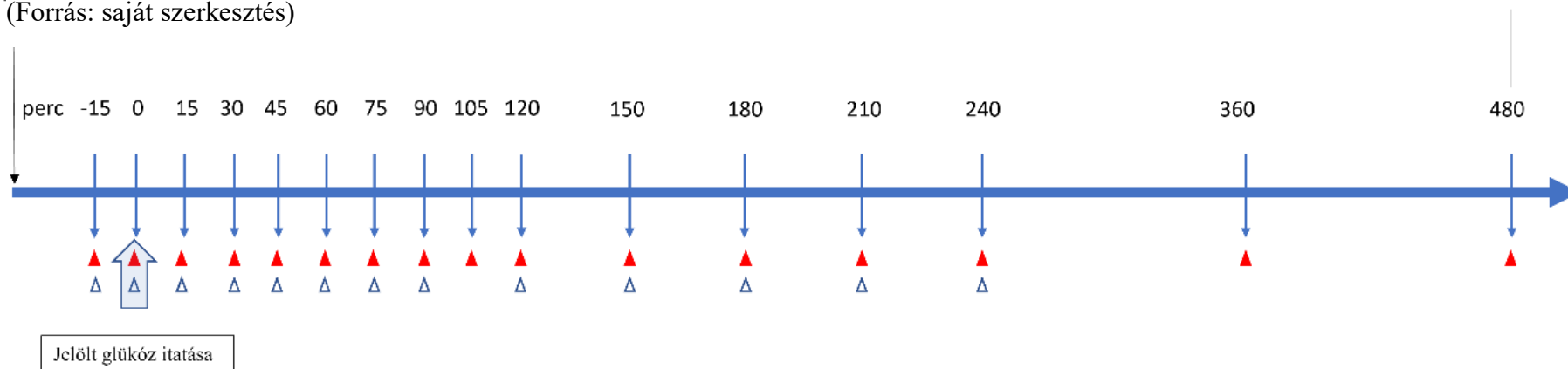
1. kép: Maszk használatban 1
(Forrás: saját készítés)



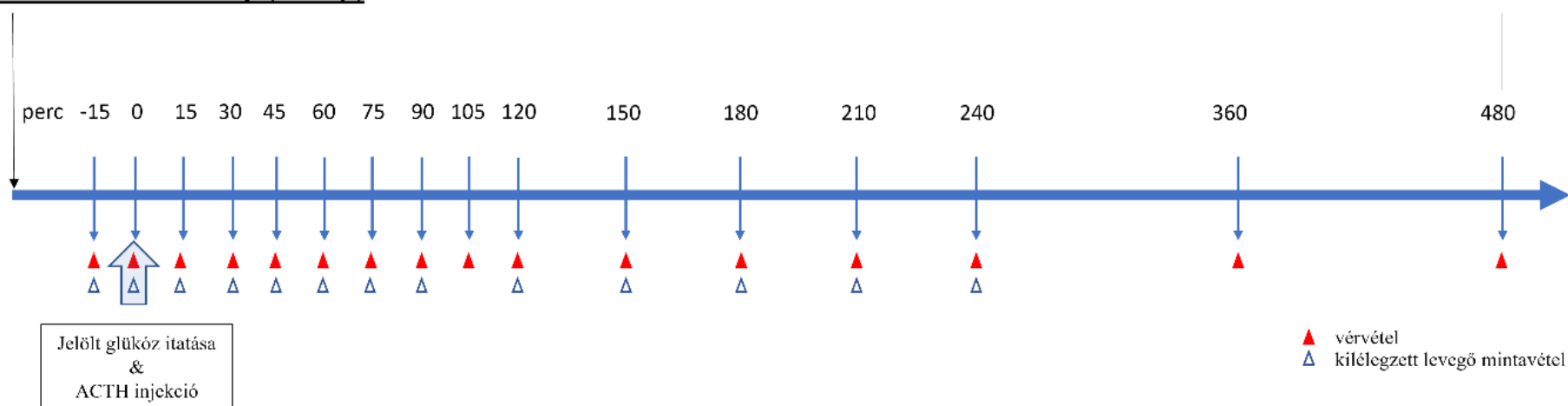
2. kép: Maszk használatban 2
(Forrás: saját készítés)



3. ábra: Mintavételezések időpontjai
(Forrás: saját szerkesztés)



Stresszindukciós nap (2. nap)



▲ vérvétel
△ kilégzett levegő mintavétel

3.3.2. Mintakezelés, - előkészítés

Minden feltüntetett vérmintavételi időpontban tartós vénakanülökön keresztül fecskendővel 4 ml vért vettünk EDTA-s véralvadásgátlós csövekbe, és 4 ml vért szérumsövekbe. A vérmintákat 15 percig 2500 g fordulaton, 4 °C-on centrifugáltuk. Ezután a vérplazmát, a szérumot és a vörösvértesteket 2 ml-es Eppendorf csövekbe pipettáztuk, majd 20 °C-on tároltuk az elemzésig.

3.3.3. A minták feldolgozása

Szérum kortizol meghatározás

A vérszérumminták teljes kortizol szintjének elemzése a MATE Gödöllő, Genetika és Biotechnológiai Intézetében történt. A szérum kortizol mennyiségi meghatározásához a DNOV001 katalógusszámú (Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH, Németország) ELISA készletek lettek felhasználva. Az immunpróbát a gyártó utasításainak megfelelően végezték, és a szérummintákat három párhuzamos mérésben elemezték. A mérések Thermo Multiskan™ FC (Waltham, MA, USA) mikrolemezes olvasóval történtek, SkanIt RE szoftverrel (6.1.1.7 verzió). Az abszorbanciát 450 nm-nél mérték, 630 nm-es referencia hullámhosszal.

Vérplazma glükóz szintjének meghatározása

A vérplazma minták elemzését Németországban (Dummerstorf-Forschungsinstitut für Nutztierbiologie) végeztük, a kísérlet kivitelezésében részt vevő partner kutatócsoportnál. A plazma $^{13}\text{C}_6$ glükózsintjének meghatározásának első előkészítő lépése a derivatizációs folyamat elvégzése volt aldonitril-pentaacetát származék képzésével. A fagyasztott mintákat jégen felolvasztottuk. A felolvasztás után egy Eppendorf csőben 50 µl plazmához 250 µl acetonitrilt (ACN) adtunk, majd vortexeltük a keveréket. Ezt követően a mintát 13 000 rpm-en centrifugáltuk 20 percen keresztül, 4 °C-on. A centrifugálás után a felülúszót üvegcsövekbe pipettáztuk, majd nitrogén (N_2) alatt 60 °C-on szárítottuk. A derivatizáláshoz aldonitril-pentaacetátot készítettünk. A nitrogén alatt kiszárított mintához hozzáadtunk 50 µl 20 mg 1 ml piridinben feloldott hidroxilammonium-kloridot, majd vortexeltük a keveréket. A mintát 90 °C-on 60 percig inkubáltuk. Ezután 50 µl piridint és 100 µl ecetsavanhidridet adtunk hozzá, majd újra 60 percig inkubáltuk 90 °C-on. A folyamat végén a mintát nitrogén alatt 60 °C-on szárítottuk. A kiszárított mintához 100 µl etil-acetátot adtunk, melyben feloldottuk, ezt

követően 1 percig vortexeltük. A kész oldatot üveg tartókba pipettáztuk, a GC/MS analízis elvégzéséig (3. kép) -20 °C-on tároltuk. Ezután az előkészített minták gáz kromatográfiás-tömegspektrometriás mérései Junghans és mtsai (2007) módszere alapján kerültek elvégzésre.

3. kép: GC/MS készülék mérés közben



Vörösvértestek széndioxid tartalmának meghatározása

A vörösvérsejtek elemzését Németországban (Dummerstorf-Forschungsinstitut für Nutztierbiologie) végeztük, a kísérlet kivitelezésében részt vevő partner kutatócsoportnál. A vérben található CO_2 ^{13}C izotóparányának meghatározása érdekében 100 μl vörösvértestmintához egy üvegcsőben 200 μl 10%-os tejsavat adtunk, majd légmentesen lezártuk gumitömítéssel ellátott csavaros kupakkal. 2 óra elteltével szobahőmérsékleten (4. kép) a vérből felszabadult CO_2 -t a fejgáz-térben gáz izotóparány-tömegspektrometriával (IRMS) Gas Bench II-vel összekapcsolva mértük a $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ arány meghatározása érdekében.

4. kép: Vörösvértestminták inkubáció közben



Kilélegzett levegő széndioxid tartalmának mérése

A kilélegzett levegőmintákat speciális maszkokkal (5. kép) gyűjtöttük, amelyeket egy kétirányú, vissza nem engedő szelepen keresztül csatlakoztattunk egy gázzáró zsákhoz (Linde AG, München, FRG). Az elemzésig a kilélegzett levegőmintákat a gyűjtőzsákokból üveg tárolókba vezettük át és az elemzésig szobahőmérsékleten, gumitömítéssel ellátott csavaros kupakkal lezárt üveg tartókban tároltuk. A mintavételezések előtt az üvegampullákat és a gyűjtőzsákokat argonnal öblítettük ki, hogy kiszorítsa a bennük lévő környezeti levegő szén- dioxid tartalmát.

5. kép: Kilélegzett levegő mintavevő maszk
(Forrás: saját készítés)



Az elemzést Németországban (Dummerstorf-Forschungsinstitut für Nutztierbiologie) végeztük el. A minták mérése izotóparány-tömegspektrometriával (IRMS) Gas Bench II-vel összekapcsolva történt a $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ arány meghatározása érdekében.

3.3.4. Számolások

Számítások vörösvértest és kilélegzett levegőminták esetében

A minta $\delta^{13}\text{C}$ - értéke (‰) a $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ arány eltérése a nemzetközi Pee Dee Belemnite

karbonát standard (PDB) $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ arányától. A PDB alapján a szénizotóp arány ($^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$) értéke: 0,0112372. A minta $\delta^{13}\text{C}$ értéke az alábbiak szerint kerül kiszámolásra:

$$\delta (\text{‰}) = \frac{\text{mintaarány} - \text{referenciaarány}}{\text{referenciaarány}} * 1000$$

Ahol az arány $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$

A minta CO_2 tartalmát a PDB-hez kalibrált laboratóriumi CO_2 standard (kontroll) gázhoz viszonyítva mérjük.

$$\Delta\delta\text{C} (\text{‰}) = \delta_{\text{minta}} (\text{‰}) - \delta_{\text{háttér}} (\text{‰})$$

*a háttér a minta természetes ^{13}C tartalma a jelölt glükóz beadása előtt (ez a 15. perc értéke)

Atomszázalék többlet: (a jelölt glükóz nehezebb atomszázalékkal rendelkezik, mint a nem jelzett)

$$\text{APE} = \frac{\text{mintaarány} - \text{referenciaarány}}{(\text{mintaarány} - \text{referenciaarány}) + 1} * 100 \%$$

δ konvertálása a többleté

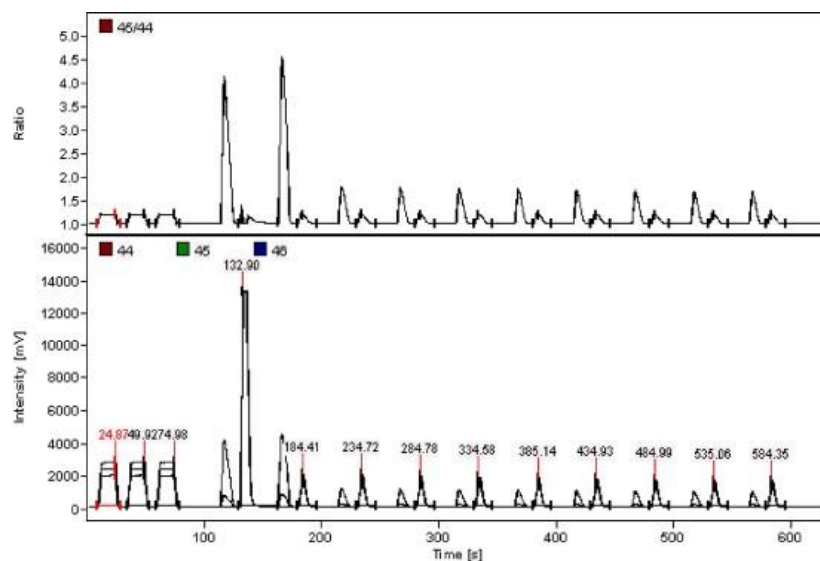
$$\text{APE} = \frac{\delta * \text{referenciaarány}}{(\delta * \text{referenciaarány}) + 1000} * 100 \%$$

Jelzett glükóz aránya (R):

$$R = (\text{arány}_{\text{minta}} - \text{arány}_{\text{referencia}}) - (\text{arány}_{\text{háttér}} - \text{arány}_{\text{referencia}})$$

$$R = \text{arány}_{\text{minta}} - \text{arány}_{\text{háttér}}$$

4. ábra: $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ arány mérése
(Forrás: saját szerkesztés)



3.4. Statisztikai elemzés

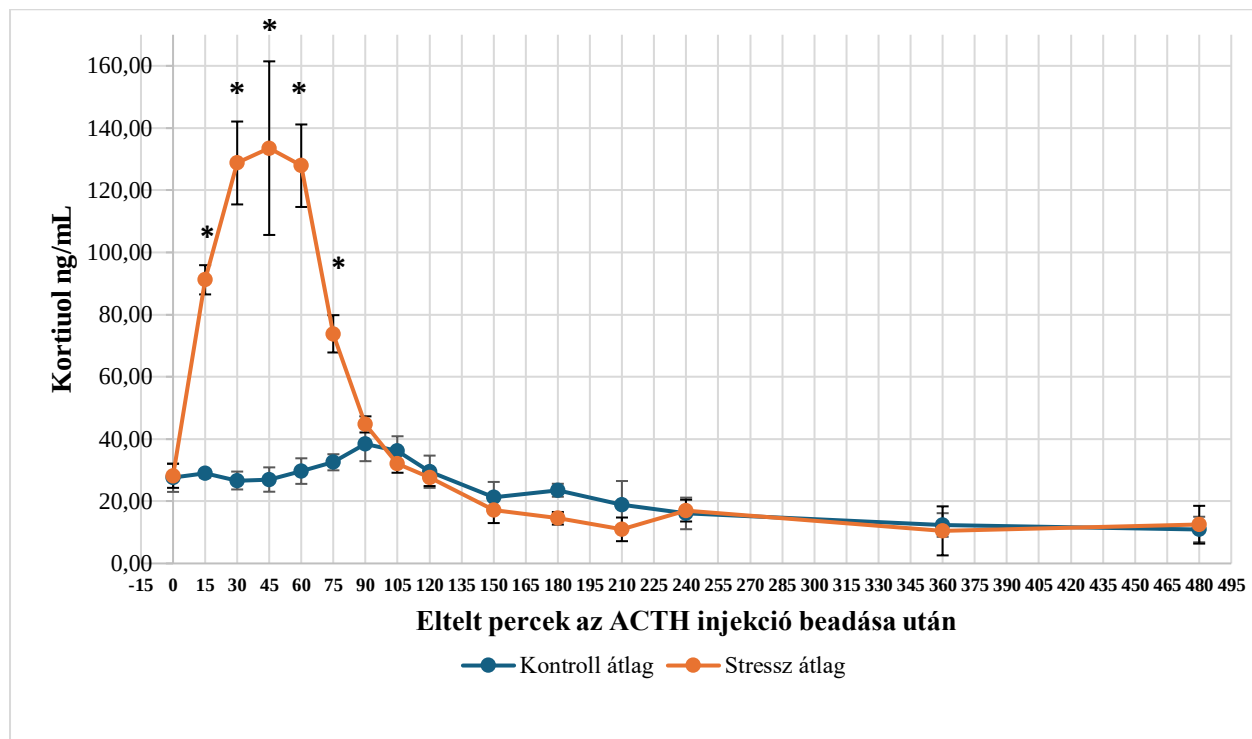
A kontroll és stresszindukciós nap azonos időpontokban vett minták eredményeinek átlagértékeit páros T-próbával hasonlítottuk össze. A szignifikanciaszintet $P < 0,05$ -nél határoztuk meg. Korreláció analízissel hasonlítottuk össze a kontroll és a stressz napon azonos időben a levegőben és a vörösvértestekben mérhető jelzett széndioxid koncentrációk közötti lineáris összefüggés erősségét.

4. Eredmények

4.1. Vércsérum teljes kortizolszintje

A kísérlet során, a vérmintákban mért kortizolszintet 5 egyed értékének az átlagával határoztuk meg, a kontroll napon és a stressz napon is. Ezen eredmények alapján (5. ábra) elmondhatjuk, hogy a kontroll napon mért értékek a normális tartományba tehetők (Parrot és mtsai., 1989), vagyis nem volt az állatok számára különösebb stresszor. A 90. perc környékén az értékek egy picit magasabbak a kezdeti szinthez képest, azonban még mindig 40ng/mL alatt voltak, ami a nyugalmi értéknek felel meg. A stressz napon mért értékek ezzel ellentétben az mutatják, hogy az ACTH injekció beadását követően rövid időn belül hirtelen emelkedést mutatott a kortizol szintje. Ez arra utal, hogy a vérben megjelenő nagyobb koncentrációjú hormon következtében a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely (HPA) megkezdte működését és elkezdte a kortizol kiválasztását. A kortizol az ACTH beadást követően gyors ütemben nőtt és a 45. perc környékén elérte a maximumát, majd a csúcsot követően hirtelen, ugyanolyan ütemben lecsökkent. Az ACTH beadást követő 90. perctől a kontroll napon mért értékektől már statisztikailag nem különbözött. A stresszmentes időszakban és a stressz- indukciót követően a 15. perctől a 75. percig mért adatoknál szignifikáns különbséget találtunk a vér kortizol szintjében. Az adott időpontokban mért értékek a kontroll napon kis szórást mutattak, míg a stressznapon a 30., a 45. és a 60. percben, az egyébként magas kortizol értékek nagy szórással rendelkeztek, ami arra utal, hogy az állatok különbözően reagáltak az ACTH injekcióra.

5. ábra: A szérumban kortizol szintje a kontroll és a stressznapon
(Forrás: saját szerkesztés)

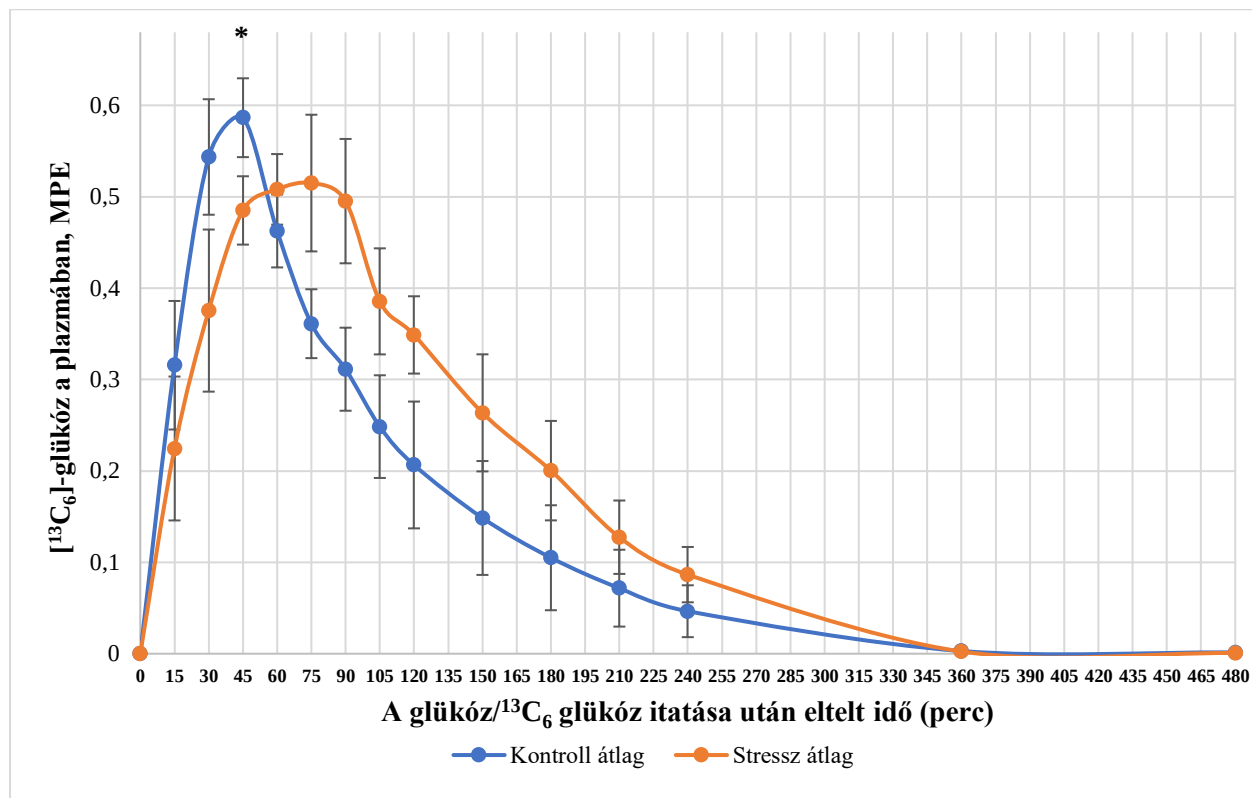


* : az adott időpontban mért különbség statisztikailag igazolható, $P < 0,05$

4.2. Plazma minták $^{13}\text{C}_6$ glükóz tartalma

Vérplazmában a szénhidrát oxidáció a mértékét a nem sugárzó izotóppal megjelölt $^{13}\text{C}_6$ glükóz segítségével határoztuk meg (6. ábra). A kontroll napon a glükóz itatása után rövid idő alatt magasra emelkedett a plazmában mérhető jelölt glükóz tartalom, és a 45. percben érte el a maximum értéket, majd ugyanolyan intenzív csökkenéssel 360. perctől már közel 0 értéket mutatott. A stressznapon a jelzett glükóz szintje a felvételt követően hasonlóan magas szintig emelkedett, azonban ezen a napon a 75. percben volt mérhető a maximum érték. A maximum értéket lassabb ütemben és valamivel kisebb csúccsal érték el, mint a kontroll napon, de a 360. perctől a kontrollnaphoz hasonlóan a jelzett szénhidrát felhasználásra került és a vérben már nem volt kimutatható. A stressznapon mért átlag értékek a szénhidrát beadását követő 30. és 45. percben mintegy 20-25%-kal voltak alacsonyabbak, mint a kontroll napon ($P < 0,05$), majd mivel ezek szintje lassabban csökkent, ezért a 75. és a 150. perc között a stressz-indukált állatok vérében 20-25%-kal magasabb értékeket mértünk. A mért értékek minden időpontban relatív nagy szórási tartományban helyezkedtek el, azonban az idő múlásával és a kiürülés mértékével a szórás is csökkent.

6. ábra: A plazmában mért jelzett glükóz a kontroll és a stressz napon
(Forrás: saját szerkesztés)

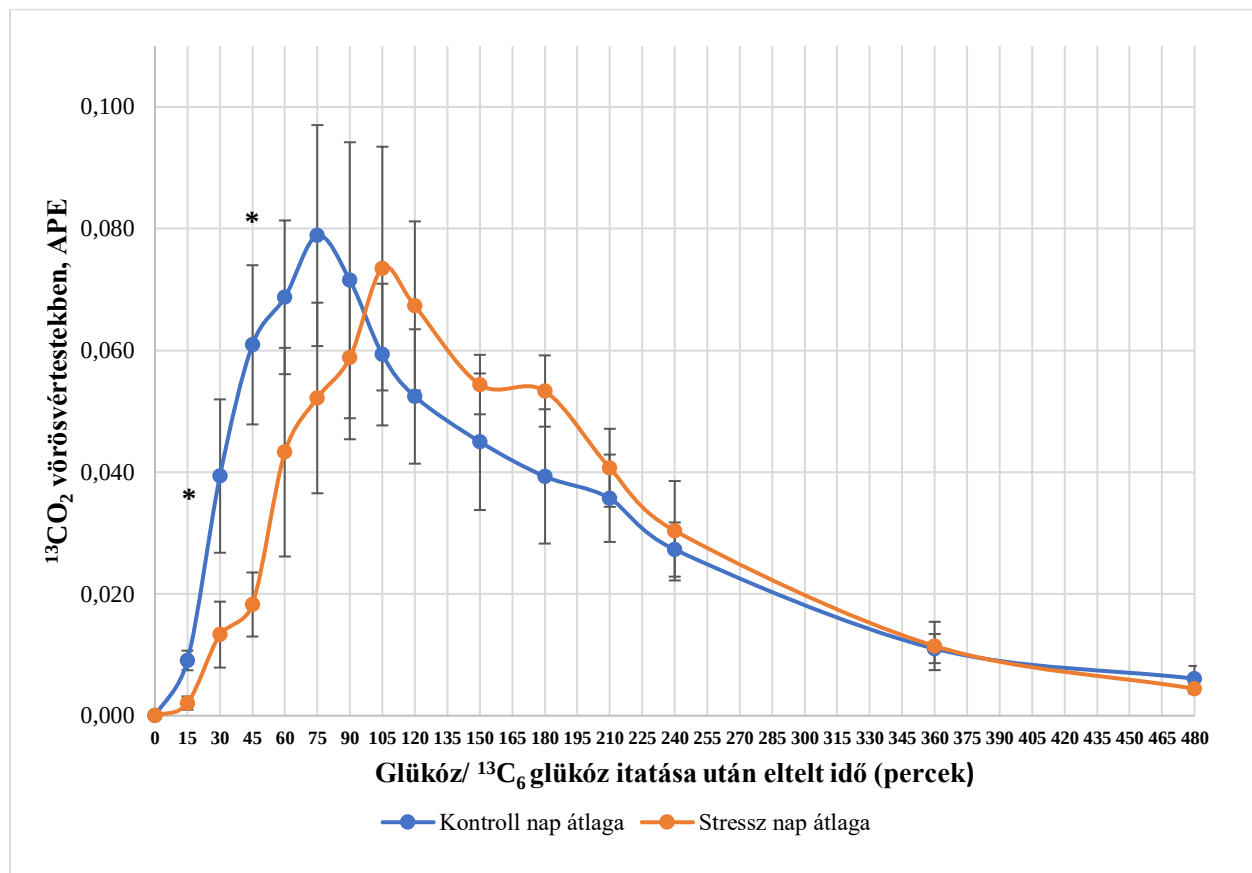


* : az adott időpontban mért különbség statisztikailag igazolható, $P < 0,05$

4.3. Vörösvértestek ¹³CO₂ tartalma

Az itatott, ¹³C₆-glükóz a felszívódást követően belép a Szentgyörgyi-Krebs ciklusba, aminek végén a jelzett C atom ¹³CO₂ formájában mérhetővé válik. A jelzett C molekula követésével az oxidáció mértéke jól követhető. A ¹³CO₂-ot a vörösvértestekben is mértük, a koncentráció lefutása a vérben mérhető jelzett glükózhoz hasonlóan egy csúcsos görbével írható le (7. ábra). A kontroll és a stressznapon mért értékek maximum értékében nincs jelentős különbség, azonban, csak úgy, mint a vérben mért glükóz esetében, a csúcs helyében igen. Míg a kontroll napon a csúcst a 75. percben érte el a vörösvértestek ¹³CO₂ tartalma, addig a stressznapon a csúcs mintegy 30 perccel később volt mérhető. A csúcs után mindkét napon az értékek egy fokozatosan csökkenő tendenciát mutatnak, és az utolsó mérési időpontban (480. perc) már nem lehet kimutatni a jelzett CO₂-ot. A két nap adatainak összehasonlítása alapján csupán a 15. percben és a 45. percben volt statisztikailag igazolható különbség ($P < 0,05$) a mért értékekben. Az egyedi variancia minden időpontban nagy volt a vörösvértestek CO₂ tartalma tekintetében.

7. ábra: Vörösvértestek jelzett CO₂ koncentrációja a kontroll és a stressz napon
(Forrás: saját szerkesztés)

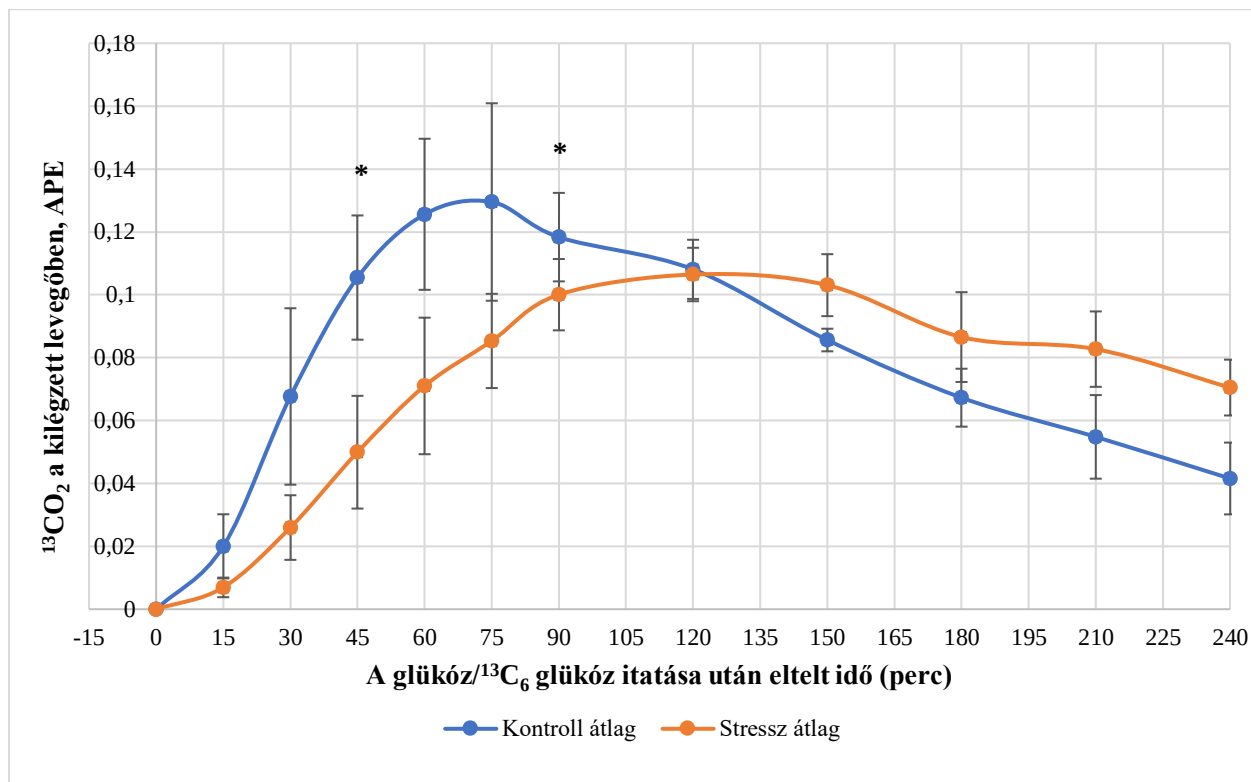


* : az adott időpontban mért különbség statisztikailag igazolható, P < 0,05

4.4. Levegő minták ¹³CO₂ tartalma

A 8. ábra a jelölt glükóz itatása után, a kilélegzett levegőben mért ¹³CO₂ koncentrációját mutatja. A kontroll napon a kilélegzett levegőben mért ¹³CO₂ koncentráció meredekebb emelkedést mutatott az első 75 percben, mint a stressz-indukciót követően, majd a maximumot elérve 0,13 APE értéknél tetőzött. Ezt követően egy lassú, fokozatos csökkenés során a 240. percre 0,04-re csökkent. A stressznapon mért értékek ezzel szemben egy lassabb, fokozatosabb emelkedést követően, a 120. perc környékén érték el maximumot. A mért CO₂ tartalom esetében két időpontban volt szignifikáns (P<0,05) különbség a stresszmodellben, a 45. és a 90. percben. Az adatok alapján elmondható, hogy a kontroll napon valamivel gyorsabban került felhasználásra a jelzett glükóz, mint a stressznapon.

8. ábra: A kilélegzett levegő minták jelzett CO₂ koncentrációja a kontroll és a stressz napon
(Forrás: saját szerkesztés)



* : az adott időpontban mért különbség statisztikailag igazolható, $P < 0,05$

Az azonos időpontban vett levegőminták és a vörösvértestek által kötött jelzett CO₂ koncentrációk között szoros pozitív kapcsolatot találtunk, $r=0,711$ értékkel. Érdekesség, hogy amennyiben a kontroll és a stressznapon mért mintapárokat elemeztük, akkor a kontrollnapon a korreláció valamivel alacsonyabb, $r=0,622$ volt, míg a stressznapon igen szoros, $r=0,805$ értékkel volt jellemezhető.

5. Diszkusszió

A stressz számos folyamat révén befolyásolja a szervezet normál működését, és negatívan hat a növekedési teljesítményre. Vizsgálatunkban a stressznek a felvett szénhidrát anyagcserében való hasznosulását értékeltük, amihez szükséges volt a kontroll napon stresszmentes környezetet biztosítása az állatok számára. Eredményeink azt mutatták, hogy a kontroll napon mért kortizol szintek megfelelnek az irodalom által közölt nyugalmi kortizol szintekkel. A kortizol vérben mérhető koncentrációjának napi ingadozásáról több szerző is beszámol, így a reggeli órákban tapasztalt enyhén magasabb érték valószínűleg nem a kísérleti körülmények következtében kialakult stressznek, hanem a természetes cirkadián ritmusnak volt köszönhető (De Jong és mtsai., 2000).

A kísérletben az ACTH injekcióval indukált stresszhatás enyhe mértékű volt, az állatokon a kellemetlen közérzetnek külső, szemmel látható jeleit nem tapasztaltuk. A kapott eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a jelölt glükóz hasznosulása a stresszindukciós napon később kezdődött el a szervezetben, mintegy 30 perc eltolódást mértünk az ACTH injekciót követően a glükóz vérben mérhető maximális értékében, ami a szénhidrát oxidáció vörösvértestek által kötött és a kilélegzett levegőben mért széndioxid esetében is tapasztalható volt. Ezzel igazoltuk, hogy egyszeri, kismértékű stressz esetén is számítani kell a szénhidrát forgalom dinamikájában bekövetkező változásra. Fontos megjegyezni, hogy ez az eltolódás esetleg a fehérjeforgalom működésére is kihat. Sertésekkel végzett vizsgálatban van den Borne és mtsai. (2007) megerősítették, hogy az aminosavak és a glükóz felszívódás szinkronizálása pozitív hatású az állatok N-retenciójára. Azt is érdemes kiemelni, hogy a szénhidrát oxidációs tesztek eredményeit a humán vizsgálatokban gyakran a tápcsatorna egészségi állapotával hozzák összefüggésbe (Keller és mtsai., 2021). Keller és mtsai. (2021) szerint a jelzett szénhidrát vérben való megjelenésének késleltetése a tápcsatorna felszívó felületének vagy a felszívódási mechanizmus hatékonyságának a csökkenéséből is adódhat. Az alkalmazott kis mértékű stresszhatás esetén azonban a mi kísérletünkből ilyen irányú következtetést nem szabad levonni.

Az általunk használt ^{13}C izotóp, mint jelölő anyag és az ehhez kapcsolódó kilélegzett levegő mintavétele még ritkán alkalmazott módszer az állattenyésztési kutatásokban. A vonatkozó irodalmi adatok főleg humán betegeken végzett felmérésekről, esetleg humán modellként használt patkány vagy egérkísérletek eredményeiről számolnak be (Sciascia és Metges, 2023). Csupán néhány vizsgálati eredmény áll rendelkezésre gazdasági haszonállatról. Az alkalmazott módszer egy olyan nem-invazív technikát jelent, mellyel nem csak a glükóz

oxidációjának a mértékét és dinamikáját tudjuk mérni, de azt is, hogy milyen hamar jut el a takarmány a vékonybélbe. Jørgensen és mtsai. (2010) valamint Martens és mtsai. (2020) ^{13}C izotóppal jelölt zsírsavakat használtak a gyomorürülés mérésére. A jelzett zsírsavak szénatomja a duodenumban felszívódva, majd $^{13}\text{CO}_2$ -dá alakulva a kilélegzett levegőben mérhető volt. Korábban ezeket az oxidációs tesztek hidrogén kilégzési méréssel tesztelték, azonban ilyen módszerről sertések esetében nem sok ismeretünk van (Berthold és mtsai., 2009). A sertések esetében továbbra is nehézkes ezen kísérletek összehasonlítása, mivel nem csak a mintavétel módjától függ az eredmény, hanem a fogyasztott takarmány összetételétől, vagy a sertések korától is (Sciascia és Metges, 2023). Összeségében azonban elmondhatjuk, hogy az invazív kísérleti módszerek alkalmazásának szabályozásával az olyan nem-invazív technikák, mint például a ^{13}C stabil izotóppal jelölt, majd a kilélegzett levegőben mért $^{13}\text{CO}_2$ szintje megoldást adhat hasonló vizsgálatok elvégzéséhez.

Vizsgálataink során azt is értékeltük, hogy glükóz oxidációs vizsgálatok során gyűjtött minták közül mennyire informatív a nem-invazív mintavétel eredménye. A mintavételek közül a vérvétel invazív beavatkozás, míg a levegővétel nem szokványos a sertések számára. Mivel a mintavételi napokon negyedóránként volt vérvétel, ezért az állatokat tartós vénakanüllel láttuk el a kísérlet megkezdése előtt. A mintavételek nem jelentettek stresszt az állatok számára, a tartós vénakanül nyitása, a vér kiszívása és a kanül visszazárása rövid ideig tartott és az emberek jelenléte nem zavarta az állatokat. Bár a kísérletet megelőzően a sertéseket a nyak környékén való „matatáshoz” is hozzászoktattuk, valószínűleg alapvetően az ember iránti bizalom volt a kulcs a stresszmentes vérvételhez. Véleményem szerint a kísérlet legkritikusabb eleme a malacok kilélegzett levegőminta gyűjtő maszk viseléséhez való szoktatása volt, ami a kortizol eredmények alapján sikeresnek tekinthető. A glükózoxidációs teszt stabil izotóppal való alkalmazása során a levegő jelzett CO_2 tartalma alapján értékelik az eredményeket. Az állatok felkészítésének hiányában vagy elégtelen felkészítés esetén a levegőminta vétele mindenképpen stresszt jelent az állatoknak. Ebben az esetben javasolható a vörösvértesek jelzett CO_2 tartalmának mérése, mivel ennek lefutása hasonló a levegőben lévő jelzett CO_2 -hoz és a vérvétel a vér glükózkoncentrációjának ellenőrzése miatt ugyancsak a teszt része. Szoros kapcsolatot találtunk a két mintatípusban mért jelölt CO_2 koncentráció között ($r > 0,7$), vagyis a koncentrációváltozás iránya és mértéke jól követi egymást. A vérben megjelenő CO_2 csúcshoz képest a maximális koncentrációt a kontroll napon a levegőben mintegy 15 perccel, a stressznapon 30 perccel később mértük.

A stresszmentes mintavételi eljárások alkalmazását az állatkísérletek során egyre gyakrabban és egyre többen szorgalmazzák. Ennek fontosságát az etikai szempontok mellett az általunk végzett vizsgálat is megerősíti. Igazoltuk, hogy a stressz megváltoztatja a glükóz felszívódásának és anyagcserében való értékesülésének a dinamikáját, ami a takarmányozási kísérletek esetében torzíthatja az eredményeket.

6. Következtetés és javaslatok

Vizsgálataink alapján elmondható, hogy sikeresen el tudtuk végezni a glükóz oxidációs tesztet 23 kg átlagos élősúlyú sertéseken éber állapotban úgy, hogy az nem jelentett az állatok számára stresszt. Ehhez nagyban hozzájárult az állatokkal való előzetes foglalkozás, amelyek során a malacokat felkészítettük a kísérlet későbbi szakaszaiban alkalmazott mintavételekre.

A vizsgálatok során mért adatokból megállapítható, hogy a sertések egyszeri ACTH-val való kezelése módosította a szénhidrát felszívódásának dinamikáját, de a jelzett glükóz felvétele után 6 órával, már nem volt mérhető az izotóp a vérben.

Az állatok felkészítésének hiányában vagy elégtelen felkészítés esetén számítani kell arra, hogy a glükózcsúcs késleltetve jelenik meg a vérben, és ennek következtében az oxidációs folyamatok időben eltolódnak.

A vörösvértestek és a levegőben mért jelzett CO₂ tartalom kis időbeni eltéréssel, de nagyon hasonló lefutású. Amennyiben a glükóz anyagcsere vizsgálatok előkészítése során az állatok felkészítése nem elégséges, úgy meggondolandó a levegővétel elhagyása és a tartós vénakanülön keresztül nyert vérből a vörösvértestek jelzett CO₂ tartalmának mérése.

7. Összefoglalás

Az állatkísérletek módszertanának fejlesztése az egyik legfontosabb feladat a kutatásban, mert a társadalmi elvárás és a jogi szabályozás egyre komolyabban korlátozza az invazív módszerek alkalmazását. Mindazok a kutatások, amik a stressz élettani hatásait vizsgálják, hozzájárulnak ahhoz, hogy megismerjük és megértsük azokat a folyamatokat, amik kísérleti körülmények között, illetve a gyakorlatban is befolyásolják az állatok anyagcserefolyamatait, teljesítményét. A dolgozatban bemutatott vizsgálatunk célja annak értékelése, hogy egységes stressz indukció esetén milyen mértékben változik a felvett szénhidrátok oxidációja és a stressz hatással van-e a szénhidrát lebontásának dinamikájára.

A kísérletben 5 keresztezett (Duroc x Topigs) növendék ártányt használtunk, melyek kezdeti átlagos élősúlya 15 kg volt, a mintavételek idején pedig 23 kg. Annak érdekében, hogy az állatoknak természetes legyen a kísérleti rutin (levegő, nyál és vérvétel), ezért a kísérleti időszak előtt 3-4 hétig szoktattuk őket az emberi jelenlétnek és az alkalmazni kívánt módszerekhez. A kísérlet során minden állat önmaga kontrolljaként szolgált. A kontroll és stresszindukciós nap mintavételi időpontjai azonosak voltak, az alapértékeket az első nap mintáiból kapott értéknek tekintettük. A vérmintákban a teljes kortizol szintet, a vérplazmában a $^{13}\text{C}_6$ glükóz szintjét, a vörösvértestekben pedig $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ izotóparányát mértük. A kilélegzett levegő mintákat speciális maszkokkal gyűjtöttük ugyancsak a $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ arány meghatározása érdekében. A kontroll és stresszindukciós nap azonos időpontjaiban vett minták eredményeinek átlagértékeit páros T-próbával hasonlítottuk össze.

A sertések kortizolszintje a kontroll napon a normális tartományban volt, míg a stressznapon egy gyors kortizolszint emelkedés történt az ACTH hormonnak köszönhetően. Vizsgálatai eredményeink alapján elmondható, hogy sikeresen el tudtuk végezni a glükóz oxidációs tesztet 23 kg élősúlyú sertéseken éber állapotban úgy, hogy az nem jelentett az állatok számára stresszt. Ehhez nagyban hozzájárult az állatokkal való előzetes foglalkozás, amelyek során a malacokat felkészítettük a kísérlet későbbi szakaszaiban alkalmazott mintavételekre. A vizsgálatok során mért adatokból megállapítható, hogy a sertések egyszeri ACTH-val való kezelése módosította a szénhidrát felszívódásának dinamikáját, de a jelzett glükóz felvétele után 6 órával, már nem volt mérhető az izotóp a vérben. Az állatok felkészítésének hiányában vagy elégtelen felkészítés esetén számítani kell arra, hogy a glükózcsúcs késleltetve jelenik meg a vérben, és ennek következtében az oxidációs folyamatok eltolódására kell számítani.

8. Köszönetnyilvánítás

A kutatás a PIGWEB (101004770) program keretében valósult meg, mely az Európai Unió Horizont 2020 kutatási és innovációs programjából nyert támogatást. A munkát a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Flagship Research Groups Programja is támogatta.

9. Irodalomjegyzék

- Ábrahám** Csaba, Seenger Julianna, Szűcs Endre (2003): A stresszállapot és annak mérhetősége. Állattenyésztés és takarmányozás 2003. 52.6. 527-537
- Bacou**, E., Haugroge, K., Mignot, G., Allard, M., De Beaurepaire, L., Marchand, J., Terenina E., Billon Y., Jacques B., Bach J-M., Mormède P., Gervé J., Lieubeau, B. (2017). Acute social stress-induced immunomodulation in pigs high and low responders to ACTH. *Physiology & behavior*, 169, 1-8.
- Banhazi**, T. M., Seedorf, J., Rutley, D. L., & Pitchford, W. S. (2008). Identification of risk factors for sub-optimal housing conditions in Australian piggeries: Part 1. Study justification and design. *Journal of Agricultural Safety and Health*, 14(1), 5-20.
- Berthold**, H. K., Schober, P., Scheurlen, C., Marklein, G., Horre, R., Gouni-Berthold, I., & Sauerbruch, T. (2009). Use of the lactose-[13 C] ureide breath test for diagnosis of small bowel bacterial overgrowth: comparison to the glucose hydrogen breath test. *Journal of gastroenterology*, 44, 944-951.
- Brouček**, Jan. (2014). EFFECT OF NOISE ON PERFORMANCE, STRESS, AND BEHAVIOUR OF ANIMALS INTRODUCTION. 47. 111-123.
- Charoensap**, T., Kilding, A. E., & Maunder, E. (2023). Carbohydrate, but not fat, oxidation is reduced during moderate-intensity exercise performed in 33 vs. 18° C at matched heart rates. *European Journal of Applied Physiology*, 123(9), 2073-2085.
- Chourpiliadis**, C., & Mohiuddin, S. S. (2019). Biochemistry, gluconeogenesis.
- Coutellier**, L., Arnould, C., Boissy, A., Orgeur, P., Prunier, A., Veissier, I., & Meunier-Salaün, M. C. (2007). Pig's responses to repeated social regrouping and relocation during the growing-finishing period. *Applied animal behaviour science*, 105(1-3), 102-114.
- De Jong**, I. C., Prelle, I. T., van de Burgwal, J. A., Lambooij, E., Korte, S. M., Blokhuis, H. J., & Koolhaas, J. M. (2000). Effects of environmental enrichment on behavioral responses to novelty, learning, and memory, and the circadian rhythm in cortisol in growing pigs. *Physiology & behavior*, 68(4), 571–578.
- Derno**, M., Nürnberg, G., Schön, P., Schwarm, A., Röntgen, M., Hammon, H. M., Metges, C. C., Bruckmaier, R. M., & Kuhla, B. (2013). Short-term feed intake is regulated by macronutrient oxidation in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 96(2), 971-980.
- Ijaz**, A., Collins, A. J., Moreno-Cabañas, A., Bradshaw, L., Hutchins, K., Betts, J. A., Podlogar,

T., Wallis, G. A., & Gonzalez, J. T. (2024). Exogenous Glucose Oxidation During Exercise Is Positively Related to Body Size. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*, 1–12. Advance online publication.

Jentjens, R. L., Wagenmakers, A. J., & Jeukendrup, A. E. (2002). Heat stress increases muscle glycogen use but reduces the oxidation of ingested carbohydrates during exercise. *Journal of applied physiology*, 92(4), 1562-1572.

Jørgensen, H., Strathe, A., Theil, P. K., & Knudsen, K. E. B. (2010). Evaluation of a simple non-invasive ¹³C breath test to evaluate diet effects on gastric emptying in pigs. *Livestock Science*, 133(1-3), 64-66.

Junghans, P., Görs, S., Lang, I. S., Steinhoff, J., Hammon, H. M., & Metges, C. C. (2010). A simplified mass isotopomer approach to estimate gluconeogenesis rate in vivo using deuterium oxide. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, 24(9), 1287–1295.

Keller, J., Hammer, H. F., Afolabi, P. R., Benninga, M., Borrelli, O., Dominguez-Munoz, E., Dumitrascu D., Goetze O., Haas S. L., Hauser B., Pohl D., Salvatore S., Sonyi M., Thapar N., Verbeke K., Fox M. R., & European ¹³C-breath test group. (2021). European guideline on indications, performance and clinical impact of ¹³C-breath tests in adult and pediatric patients: an EAGEN, ESNM, and ESPGHAN consensus, supported by EPC. *UEG Journal*, 9(5), 598-625.

Kim, K. Y., Ko, H. J., Kim, H. T., Kim, C. N., & Byeon, S. H. (2008). Association between pig activity and environmental factors in pig confinement buildings. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48(5), 680-686.

Kim, I. Y., Suh, S. H., Lee, I. K., & Wolfe, R. R. (2016). Applications of stable, nonradioactive isotope tracers in in vivo human metabolic research. *Experimental & molecular medicine*, 48(1), e203-e203.

Kil, D. Y., Kim, B. G., & Stein, H. H. (2013). Feed energy evaluation for growing pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 26(9), 1205.

Krueger, R., Derno, M., Goers, S., Metzler-Zebeli, B. U., Nuernberg, G., Martens, K., Pfuhl, R., Nebendahl, C. Zeyner, A., Hammon, H. M., & Metges, C. C. (2014). Higher body fatness in intrauterine growth retarded juvenile pigs is associated with lower fat and higher carbohydrate oxidation during ad libitum and restricted feeding. *European journal of nutrition*, 53, 583-597.

Kuhla, B., Metges, C. C., & Hammon, H. M. (2016). Endogenous and dietary lipids influencing feed intake and energy metabolism of periparturient dairy cows. *Domestic animal endocrinology*, 56 Suppl, S2–S10.

Martens, B. M. J., Schols, H. A., Bruininx, E. M. A. M., & Gerrits, W. J. J. (2020). The effects of physical feed properties on gastric emptying in pigs measured with the ¹³C breath test. *animal*, 14(9), 1892-1898.

Martínez-Miró, S., Tecles, F., Ramón, M. et al. (2016) Causes, consequences and biomarkers of stress in swine: an update. *BMC Vet Res* 12, 171.

Metges, C. C., & Wolfram, G. (1991). Medium and long chain triglycerides labeled with ¹³C: a comparison of oxidation after oral or parenteral administration in humans. *The Journal of nutrition*, 121(1), 31-36.

Metges, C., Kempe, K., & Schmidt, H. L. (1990). Dependence of the carbon-isotope contents of breath carbon dioxide, milk, serum and rumen fermentation products on the $\delta^{13}\text{C}$ value of food in dairy cows. *British Journal of Nutrition*, 63(2), 187-196.

Mihina, S. – Kazimirova, V. – Copland, T. A. (2012). Technology for farm animal husbandry. 1st Issue. Nitra. Slovak Agricultural University. 2012. 99 p. ISBN 978-80-552-0934-0.
Nielsen, B. L., Lawrence, A. B., & Whittemore, C. T. (1995). Effect of group size on feeding behaviour, social behaviour, and performance of growing pigs using single-space feeders. *Livestock Production Science*, 44(1), 73-85.

O’connor, E. A., Parker, M. O., McLeman, M. A., Demmers, T. G., Lowe, J. C., Cui, L., Davey E. L., Owen R. C., Wathes C. M., & Abeyesinghe, S. M. (2010). The impact of chronic environmental stressors on growing pigs, *Sus scrofa* (Part 1): stress physiology, production and play behaviour. *Animal*, 4(11), 1899- 1909.

Olefsky, J. M. (1976). The effects of spontaneous obesity on insulin binding, glucose transport, and glucose oxidation of isolated rat adipocytes. *The Journal of clinical investigation*, 57(4), 842-851.

Palarea-Albaladejo, J., & McKendrick, I. (2020). Best practice for the design and statistical analysis of animal studies. *The Veterinary record*, 186(2), 59–64.

Parrott, R. F., Misson, B. H., & Baldwin, B. A. (1989). Salivary cortisol in pigs following adrenocorticotrophic hormone stimulation: comparison with plasma levels. *British veterinary journal*, 145(4), 362-366.

- Pearce**, S. C., Gabler, N. K., Ross, J. W., Escobar, J., Patience, J. F., Rhoads, R. P., & Baumgard, L. H. (2013). The effects of heat stress and plane of nutrition on metabolism in growing pigs. *Journal of animal science*, 91(5), 2108-2118.
- Pitts**, A. D., Weary, D. M., Pajor, E. A., & Fraser, D. (2000). Mixing at young ages reduces fighting in unacquainted domestic pigs. *Applied Animal Behaviour Science*, 68(3), 191-197.
- Randle**, P. J., Priestman, D. A., Mistry, S., & Halsall, A. (1994). Mechanisms modifying glucose oxidation in diabetes mellitus. *Diabetologia*, 37, S155-S161.
- Russell**, W. M. S., Burch, R. L., & Hume, C. W. (1959). *The principles of humane experimental technique* (Vol. 238). London: Methuen.
- Schoffelen**, P.F.M., Plasqui, G. (2018) Classical experiments in whole-body metabolism: open-circuit respirometry—diluted flow chamber, hood, or facemask systems. *Eur J Appl Physiol* 118, 33– 49 .
- Schutz**, Y. (2018). Respiration chamber calorimetry and doubly labeled water: two complementary aspects of energy expenditure?. *European journal of clinical nutrition*, 72(9), 1310-1313.
- Sciascia**, Q. L.; Metges, C. C. (2023): Review: Methods and biomarkers to investigate intestinal function and health in pigs. *Animal* 17 (Suppl. 3): 100860, 1-11
- Selye**, J. (1965). *Életünk és a stress*. Akadémiai Kiadó.
- Sneddon**, L. U., Halsey, L. G., & Bury, N. R. (2017). Considering aspects of the 3Rs principles within experimental animal biology. *Journal of Experimental Biology*, 220(17), 3007-3016.
- Song**, C., Jiang, J., Han, X. et al. (2014) Effect of immunological stress to neuroendocrine and gene expression in different swine breeds. *Mol Biol Rep* 41, 3569–3576.
- Toscano**, M. J., Lay Jr, D. C., Craig, B. A., & Pajor, E. A. (2007). Assessing the adaptation of swine to fifty-seven hours of feed deprivation in terms of behavioral and physiological responses. *Journal of animal science*, 85(2), 441-451.
- Tucker**, C.B., MacNeil, M.D., Webster, A.B. (2020) *Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching*.
- Turner**, S. P., Horgan, G. W., & Edwards, S. A. (2001). Effect of social group size on aggressive behaviour between unacquainted domestic pigs. *Applied Animal Behaviour Science*, 74(3), 203-215.

Van den Borne, J. J. G. C., Schrama, J. W., Heetkamp, M. J. W., Verstegen, M. W. A., & Gerrits, W. J. J. (2007). Synchronising the availability of amino acids and glucose increases protein retention in pigs. *Animal*, 1(5), 666-674.

Wang, P., Lloyd, S. G., & Chatham, J. C. (2005). Impact of high glucose/high insulin and dichloroacetate treatment on carbohydrate oxidation and functional recovery after low-flow ischemia and reperfusion in the isolated perfused rat heart. *Circulation*, 111(16), 2066-2072.

Weng, R. C., Edwards, S. A., & English, P. R. (1998). Behaviour, social interactions and lesion scores of group-housed sows in relation to floor space allowance. *Applied Animal Behaviour Science*, 59(4), 307-316.

Žitňák, M. – Lendelová, J. – Bureš, Ľ. (2011). Working environment of dairymen in summer time. Rural buildings in European regions, Architectural – constructions – technology – safety. *Slovak J. Anim. Sci.*, 47, 2014 (2): 111-123.

Internetes források

Csákó Beáta, (2017), ÁLLATKÍSÉRLETEK

https://www.parlament.hu/documents/10181/1202209/Infojegyzet_2017_39_allatkiserletek.pdf

Jones, B, (2023) Feature: Animal research saves lives. So why do opponents say it is ineffective?

<https://www.eara.eu/post/feature-animal-research-saves-lives-so-why-do-opponents-say-it-is-ineffective>

10. Ábrajegyzék

1. ábra: Az adrenokortikotrop hormon szerkezete (Forrás: Wikipédia)	5
2. ábra: A kortizol szerkezete (Forrás: Wikipédia).....	6
3. ábra: Mintavételezések időpontjai (Forrás: saját szerkesztés)	16
4. ábra: $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ arány mérése (Forrás: saját szerkesztés)	21
5. ábra: A szérumban kortizol szintje a kontroll és a stressznapon (Forrás: saját szerkesztés)	23
6. ábra: A plazmában mért jelzett glükóz a kontroll és a stressz napon (Forrás: saját szerkesztés)	24
7. ábra: Vörösvértestek jelzett CO_2 koncentrációja a kontroll és a stressz napon (Forrás: saját szerkesztés)	25
8. ábra: A kilélegzett levegő minták jelzett CO_2 koncentrációja a kontroll és a stressz napon (Forrás: saját szerkesztés)	26

1. kép: Maszk használatban 1 (Forrás: saját készítés).....	15
2. kép: Maszk használatban 2 (Forrás: saját készítés).....	15
3. kép: GC/MS készülék mérés közben	18
4. kép: Vörösvértestminták inkubáció közben	19
5. kép: Kilélegzett levegő mintavevő maszk (Forrás: saját készítés)	19

1. táblázat: Az alaptakarmány összetétele és számított táplálóanyag tartalma	13
---	----